

메틸수은으로 손상된 골모세포에 대한 홍화의 효과에 관한 연구

민부기 · 홍기연 · 오연균 · 신용일 · 한선희¹ · 이상복¹ · 신민교² · 전병훈² · 송호준² · 류도곤² · 박승택*

원광대학교 의과대학 해부학교실, 1:원광보건대학, 2:한의과대학

Study on the Effect of Flos Carthami on Cultured Osteoblasts Damaged by Methylmercuric Chloride

Bu Ki Min, Gi Youn Hong, Yeon Kyun Oh, Yong Il Shin, Sun Hee Han¹, Sang Bork Lee¹, Min Kyo Shin², Byung Hoon Jeon², Ho Jun Song², Do Gon Ryu², Seung Taeck Park*

School of Medicine, 1:Wonkwang health Science College, 2:College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan

To evaluate the osteotoxic effect of methylmercuric chloride(MMC) on cultured mouse osteoblasts, cytotoxic effect was measured by MTT assay after cultured mouse osteoblasts were incubated with various concentrations of MMC for 20 hours. The protective effect of Flos Carthami(FC) against MMC-induced osteotoxicity was also examined in these cultures. MMC decreased cell viability of cultured mouse osteoblasts remarkably in a dose- and time-dependent manners. In protective effect of FC was remarkably effective in blocking the osteotoxicity induced by MMC. From above the results, it is suggested that MMC induce osteotoxicity, and the selective herba extract such as FC is very effective in blocking MMC-mediated neurotoxicity on cultured mouse osteoblasts.

Key words : Methylmercuric chloride, Cultured osteoblast, Flos carthami

서 론

수은은 온도계 제조를 비롯하여 의약품이나 도금등의 산업부문에 널리 사용되고 있다⁵. 수은은 실온에서 액체를 나타냄으로서 피부의 접촉이나 기체상태의 흡입에 의한 중독현상이 빈번히 발생함으로서 수은중독은 직업병의 하나로서 사회적 문제로 대두되게 되었다^{6,11}. 특히 임산부의 경우 인체내 수은 노출시 다양한 기형을 유발함으로서 이의 독성은 매우 중요한 관심사가 되었다^{7,13}. 유기수은은 무기수은에 비하여 독성이 매우 강하며 또한 인체내에 축적시 체외로의 배출이 느리기 때문에 이에 의한 중독은 치명적인 병변을 초래하게 된다^{8,13}. 수은은 카드뮴과 같은 환경오염원으로서 다른 중금속류들 처럼 공장의 폐수에 함유되어 환경을 오염시키는 물론 이들이 먹이연쇄를 통해 인체에 노출 되면 인체의 여러 장기에 손상을 주어 각종 부작용을 초래하게 된다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다^{11,14}. 유기수은은 소량으로도 동물에서 기형을 유발할 뿐만 아니라^{1,15}, 중추신경이나 말초신경에 신경독성을 나타낸다고 한다^{3,16}. 근래에 수은독성에

대한 소수의 연구에서 유기수은이나 산화구리와 같은 몇몇 중금속들은 분해시 산소라디칼을 발생한다고 제시된 바 있다^{2,8,11}. 이 같이 붕괴시 생성된 산소라디칼들은 신경세포의 항산화효소의 활성을 저해할 뿐만아니라 또한 세포막의 지질과산화반응을 유발하며^{5,6}, 결국 세포의 사멸을 초래하게 된다^{3,16}. 따라서 많은 학자들은 산화적 손상 측면에서 수은의 독성을 규명하기 위하여 동물을 대상으로 꾸준히 연구를 진행하여 왔다⁷⁻¹⁰. 최근에 활성산소의 산화적 손상에 대한 연구에서 활성산소는 흥분성아미노산(excitotoxic amino acid, EAA)을 분비케 함으로써 세포손상을 더욱 촉진시킨다고 한다⁹. 분비된 흥분성 아미노산은 glutamate 수용체의 하나인 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 과활성화 시킴으로서 세포내 Ca²⁺의 유입을 증가시킴은 물론 DAG-PKC pathway를 통해 세포를 손상내지는 사멸시킨다고 알려져 있다^{9,10,12}. 더욱이 활성산소는 phospholipase A2를 과활성화 시켜 새로운 산소라디칼의 생성과 이차적으로 이는 질소라디칼과 반응함으로서 peroxynitrite라는 독성물질을 형성하여 결국 세포의 손상을 초래하게 된다^{3,7,12}. 한편, 한약추출물이나 동식물들로 부터 유래된 천연물들이 활성산소에 대한 항산화활성을 가지고 있다는 것이 보고되어 지고 있다^{11,16}. 즉, 인삼의 saponin 성분은 환경호르몬의 독성을 완화시키는 약리적 활성물질을 가지

* 교신저자 : 박승택, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 의과대학

E-mail : stpark@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6759

· 접수: 2002/06/08 · 수정: 2001/07/22 · 채택 : 2002/08/05

고 있다고 보고된 바 있다⁹⁾. 근래에 면역세포화학색법의 개발과 *in vitro* 분석법이 개발됨에 따라 배양세포를 적용하여 독성 물질의 기전규명을 비롯하여 신약제나 한약추출물질의 효능을 정량적으로나 정성적으로 분석할 수 있게 되었다^{4,12)}. 따라서 본 연구는 메틸수은의 신경독성에 대한 기전을 산화적 손상 측면에서 규명하기 위하여 생쥐의 척수 운동신경세포를 배양하여 메틸수은을 처리한 다음 이의 독성효과를 분석하였으며, 또한 수은의 독성에 대한 한약추출물인 의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

생쥐의 골모세포의 분리는 Michikawa 등¹⁰⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 골편으로 부터 분리된 골모세포는 phosphate buffered saline(PBS)로 3회 세척한 후 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)에 10%의 fetal bovine serum(FBS, Gibco)이 포함된 배양액에 부유시킨 다음 미리 poly-L-lysine(Sigma)으로 전 처리한 96-multiwell plate에 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하였다. 분주된 세포는 10일동안 배양한 후 실험에 사용하였으며, 분주후 3일째에 새로운 배양액으로 교환하여 주었다.

2. 한약재추출

본 실험에 사용한 한약재의 추출은 한약재와 증류수를 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 분말 시료를 얻었다.

3. 시약제조

본 실험에 사용된 methylmercuric chloride(MMC, Sigma) 1mM, 10mM, 100mM, 1M 등의 저장액을 각각 만들어 냉암소에 보관후 실험당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 직접 필요한 양을 배양액에 첨가하여 사용하였다.

4. Methylmercuric Chloride(MMC)처리

배양중인 골모세포를 여러농도의 MMC가 포함된 배양액내에서 24시간 배양한 후 MMC의 독성효과를 약제가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교분석하였다.

5. 한약추출물 처리

일정시간 배양한 골모세포에 MTT50값의 MMC를 처리하기 2시간 전에 여러 농도의 FC가 포함된 배양액에서 배양한 후 FC가 MMC의 독성효과에 미치는 영향을 조사하였다.

6. 세포독성 조사

배양 골모세포에 여러 농도의 MMC를 처리한 후 MMC가 골모세포에 미치는 독성효과와 또한 FC를 전처리한 배양 신경세포에 대한 방어효과를 Mosmann⁴⁾에 의한 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-

2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma)분석법에 의하여 분석하였다. spectrophotometer로 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 통계처리

실험 결과에 대한 유의성 검정은 ANOVA후 Student's t-test에 의하였으며 p값이 0.05이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. Methylmercuric Chloride(MMC)의 독성효과

MMC가 5~60 μ M의 농도로 각각 포함된 배양액에서 생쥐의 배양 골모세포를 20시간 동안 배양한 후 MMC의 독성효과를 MTT분석법에 의하여 조사한 결과 5 μ M MMC처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 87.6%로 나타났으며 15과 30 μ M MMC처리에서는 각각 81.2%와 53.7%($p < 0.05$)로 나타났다. 또한 60 μ M MMC처리에서는 41.7%($p < 0.01$)로 나타났다(Fig. 1).

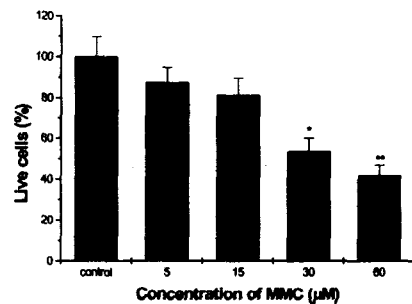


Fig. 1. A dose-dependency of methylmercuric chloride(MMC). MMC-induced osteotoxicity was measured by MTT assay in mouse osteoblasts. Cultured cells were exposed to 5, 15, 30 and 60 μ M MMC for 20 hours, respectively. The results indicate the mean \pm SE(n=6). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

시간의 변화에 따른 MMC의 독성효과를 조사하기 위하여 30 μ M MMC가 포함된 배양액에서 골모세포를 8~26시간 배양후 세포의 생존율을 MTT분석법에 의하여 조사한 결과, 8시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 76.7%로 나타났으며 14시간 배양에서는 65.4%로 나타났다. 또한 20시간과 26시간 배양에서는 세포의 생존율이 각각 49.3%($p < 0.05$)와 30.6%($p < 0.01$)로 나타났다(Fig. 2).

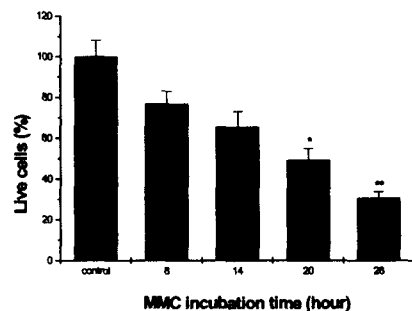


Fig. 2. A time-dependency of methylmercuric chloride(MMC). MMC-induced osteotoxicity was measured by MTT assay in mouse osteoblasts. Cultured cells were exposed to 30 μ M MMC for 8, 14, 20 and 26 hours, respectively. The results indicate the mean \pm SE(n=6). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

2. 한약추출물의 효과

한약추출물인 FC가 MMC의 독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30 μ M MMC에 배양 골모세포를 노출시키기 2시간 전에 FC가 30~120 μ M의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양한 다음 FC가 MMC의 독성에 미치는 영향을 MTT분석법에 의하여 조사하였다. 30 μ M MMC만을 처리한 경우 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 47.6%로 나타난 데 비하여, 30 μ g/ml의 처리에서는 62.7%로 나타났다. 또한 60 μ g/ml의 처리에서는 81.4%($p < 0.05$)로 비교적 높은 생존율을 나타냈다. 특히, 120 μ g/ml FC를 처리한 경우 세포의 생존율은 MMC만을 처리한 경우의 생존율(47.6%)에 비하여 88.4%($p < 0.01$)로 매우 높게 나타났다(Fig. 3).

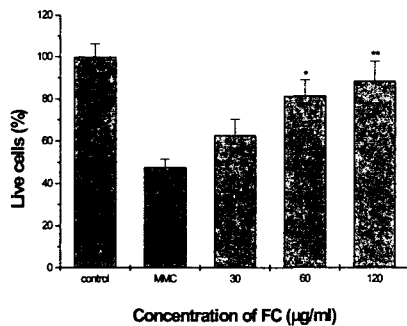


Fig. 3. Dose-response relationship of Flos Carthami(FC) for its protective effect on MMC-induced neurotoxicity by MTT assay. Cultured cells were preincubated with FC for 2 hours before exposure to 30 μ M MMC for 20 hours. The results indicate the mean \pm SE(n=6). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

고찰

수은은 독성이 강한 중금속으로 인체에 폭로시 심한 후유증과 부작용을 초래하게 된다^{3,7}. 특히 유기수은은 공장의 폐수에 함유되어 하천에 배출되는데 이는 환경을 오염시키는 물론 동식물에 영향을 주고 이차적으로 체내에 유입축적됨으로서 각종 질환을 초래하게 된다^{2,13,16}. 메틸수은은 기형유발물질로서 많은 동물실험에서 태아의 발생저해와 구개열(cleft palate)과 같은 기형을 초래함이 보고된 바 있다^{7,11}. 더욱이 메틸수은과 같은 유기수은은 무기수은에 비하여 매우 강한 독성효과를 나타낸다고 한다^{2,16}. 본 실험에서 메틸수은이 골모세포에 미치는 독성효과를 조사하기 위하여 생쥐의 배양 골모세포에 5~60 μ M의 농도로 methylmercuric chloride(MMC)가 각각 포함된 배양액에서 처리한 결과 MMC는 처리한 농도와 시간에 비례하여 골모세포의 생존율을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다. 이같은 본 실험의 결과는 Kasuya²가 생쥐의 배양 생쥐의 소뇌신경세포에 알킬수은을 처리한 결과 농도의존적으로 알킬수은이 세포생존율을 현저하게 감소시켰다는 보고나, Park 등³이 생쥐의 배양 대뇌신경에 MMC를 처리한 결과 농도에 따른 유의한 세포생존율의 감소와 신경세포의 수적인 감소를 보고한 결과와 일치하였다. 위와 같은 연구 결과들은 MMC가 신경세포에 독성효과를 가지고 있음을 말해주고 있다. 이러한 현상은 MMC가 골모세포의 DNA

합성이나 단백질합성을 방해한 결과라는 가능성을 배제할 수는 없겠지만⁸, 그 보다는 아마도 MMC의 분해시 생성된 활성산소의 산화적 스트레스에 의해 세포가 손상을 받았을 가능성이 클 것으로 생각된다^{5,16}. 이러한 이유의 하나는 메틸수은이 붕괴될 때 산소라디칼을 생성한다는 보고가 이를 증명하고 있으며 실제로 항산화제를 처리한 경우 메틸수은에 의한 세포의 손상이 현저히 감소되었다는 실험결과가 보고되어 있다^{5,8}. 한편, 한약추출물중에는 활성산소의 산화적 손상을 방어하는 항산화 활성을 나타내는 활성물질이 있어 임상적으로 유효한 치료효과를 나타냈다는 보고가 되어지고 있다¹⁰. 따라서 본 연구에서는 메틸수은의 독성으로 손상된 골모세포에 한약추출물의 일종인 FC가 미치는 영향을 조사하기 위하여 FC를 배양 골모세포에 처리하여 MMC 독성에 대한 FC의 효과를 조사한 결과 30~120 μ g/ml FC를 처리한 경우 MMC만을 처리한 실험군의 생존율(47.6%)에 비하여 88.4%($p < 0.01$)로 거의 2배 이상의 높은 생존율을 보였다.

이러한 현상은 FC의 성분중 항산화 활성을 가지고 있는 물질이 함유되어 있음을 시사하고 있으며 이를 위해 약재성분의 분획추출물을 대상으로 항산화물질의 약리적 활성을 정확히 정성과 정량분석을 통한 연구를 수행할 필요성이 있다고 생각한다.

결론

메틸수은이 골모세포에 미치는 세포독성을 조사하기 위하여 생쥐의 배양 골모세포에 여러 농도의 메틸수은을 20시간 동안 배양한 후 MTT 분석법으로 세포독성을 분석하였으며, 또한 메틸수은의 세포독성에 대한 한약추출물인 홍화(FC)의 방어효과를 조사하였다. 메틸수은은 배양 골모세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포의 생존율을 현저히 감소시켰으며 한약추출물인 FC가 메틸수은에 의해서 유도된 세포독성을 방어하였다. 위의 결과로 부터 메틸수은은 생쥐의 배양 골모세포에 세포독성을 나타냈으며 FC와 같은 선택적인 한약추출물이 메틸수은의 독성을 효과적으로 방어하였다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 원광보건대학 교비와 두뇌한국 21 및 원광대학교 교비의 일부지원에 의해서 연구됨

참고문헌

- Greener Y, Kochen J. A : Methylmercury toxicity in the chick embryo. *Teratology* 28:23-28, 1983.
- Kasuya M : The effect of vitamin E on the toxicity of alkylmercurials on nervous tissue in culture. *Toxicol Appl Pharmacol* 32:374-354, 1975.
- Matsumoto T, Suzuki A, Morita C : Preventive effect of penicillamine of the brain defect of fetal rat poisoned transplacentally with methylmercury. *Life Sci* 6:2321-2326, 1967.

4. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63, 1983.
5. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU : Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol* 17:37-46, 1996.
6. Tsubaki T, Takahashi H: Recent advances in Minamata disease studies. Kodansha, Tokyo, 1986.
7. Watanabe T, Shimada J, Endo A. Effects of mercury compounds on ovulation and meiotic and mitotic chromosomes in female golden hamsters. *Teratol* 25: 381-384, 1982.
8. Ganther HE: Interactions of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Ann NY Acad Sci* 355: 212-225, 1980.
9. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F: Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage, *J Neurosci* 10: 1035-1041, 1990.
10. Cheng B, Mattson MP: IGF-I and IGF-II protect cultured hippocampal and septal neurons against calcium-mediated hypoglycemic damage. *J Neurosci* 12: 1558-1566, 1992.
11. Michikawa M, Lim KT, Mclarnon JG, Kim SU: Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37: 62-70, 1994.
12. Borenfreund E, Babichi H, Martin-Alcuacil N : Comparisons of two in vitro cytotoxicity assay-The neutral red(NR) and tetrazolium MTT assay test. *Toxic In Vitro* 2: 1-6, 1988.
13. Mattson MP, Zhang Y, Bose S: Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons. *Exp Neurol* 121:1-13, 1993.
14. Audesirk T, Audesirk G, Ferguson C, Shugarts D : Effects of inorganic lead on the differentiation and growth of cultured hippocampal and neuroblastoma cells. *Neurotoxicol* 12:529-638, 1991.
15. Bellinger D, Leviton A, Waternaux C, Needleman H, Rabinowitz M : Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N Engl J Med* 316:1037-1043, 1987.
16. Louis-Ferdinand R. T., Brown D. R., Fiddler S. F. : Morphometric and enzymatic effects of neonatal lead exposure in the rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 43:351-360, 1978.