

# 메틸수은으로 손상된 골모세포에 대한 NMDA 수용체길항제의 영향

하대호<sup>1</sup> · 양현웅<sup>1</sup> · 이증화<sup>1</sup> · 이강창<sup>\*</sup>

원광대학교 한의학 전문대학원, 1: 원광대학교 의과대학

## Effect of NMDA receptor antagonist on Osteoblasts Damaged by Methylmercuric Chloride

Dae Ho Ha<sup>1</sup>, Hyun Woong Yang<sup>1</sup>, Joung Hwa Lee<sup>1</sup>, Kang Chag Lee<sup>\*</sup>

Department of Graduate School of Oriental Medicine, 1: School of Medicine, Wonkang University, Iksan

In order to elucidate the mechanism between cytotoxicity of methylmercuric chloride(MMC) and oxygen radicals in cultured osteoblasts of neonatal mouse, cell viability was measured by MTT assay in osteoblasts treated with 1~50 μM MMC for 30 hours. And also, the protective effect of N-methyl D-aspartate(NMDA) receptor antagonist, D-2-amino-5-phosphoaleric acid(APV) was examined by cell viability in these cultures. Cell viability was significantly decreased in dose dependently after exposure of 30 μM MMC to cultured osteoblasts for 30 hours. Protective effect of APV against MMC-mediated toxicity was very effective in these cultures. From above the results, it suggests that MMC is toxic in cultured mouse osteoblasts and NMDA receptor antagonist such as APV is effective in blocking the osteotoxicity induced by MMC.

Key words : MMC, APV, Osteoblast, N-methyl D-aspartate(NMDA)

### 서 론

수은을 비롯한 납이나 카드뮴과 같은 중금속류들은 의약품이나 공업용품의 재료로 광범위하게 사용되고 있어 해마다 이들의 소비량이 증가추세에 있다<sup>1,2,14</sup>. 그러나 이들이 각종 공장의 폐수에 섞여 인접된 하천에 유입됨으로서 수질을 오염시킬 뿐만 아니라 먹이사슬을 통하여 인체에 노출될 경우 대부분은 독성이 강하기 때문에 수은중독은 물론 각종 질환을 야기함은 이미 잘 알려진 사실이다<sup>3,4,15</sup>. 특히 메틸수은과 같은 유기수은은 분해가 느릴 뿐만 아니라 체외로의 이의 배출이 잘 안되기 때문에 소량이 축적되어도 심각한 부작용을 유발할 수 있어 이들의 취급에 있어서 매우 신중을 가해야 한다<sup>1,5</sup>. 특히, 수은에 중독 될 경우 중추나 말초신경계통의 손상은 물론 간이나 신장과 같은 인체의 여러 기관에 손상을 초래함으로써 각종 부작용을 유발하고 나아가서 생명을 위협하게 된다<sup>3,6</sup>. 따라서 국내외의 많은 학자들은 수은의 독성기전을 밝히기 위하여 동물을 대상으로 연구를 진행하여 왔다<sup>1,5,6</sup>. 그러나 아직까지 이에 대한 자세한 기전이 밝혀져 있지 않다

<sup>5</sup>. 최근에 유기수은의 하나인 메틸수은이 붕괴되면서 메틸라디칼을 발생한다는 것이 제시되면서 메틸수은의 독성을 산소자유기의 산화적 손상측면에서 규명하려는 연구가 이루어지고 있다<sup>1,5,16</sup>. 산소자유기는 치매를 비롯하여 뇌졸중이나 고혈압과 같은 난치성질환의 병인으로 밝혀지고 있으며 그 밖에도 뇌허혈 및 세포고사사와도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려지고 있다<sup>7,8</sup>. 최근 산소자유기는 흥분성아미노산의 분비촉진을 유도함으로써 세포내 칼슘의 유입을 유도하여 세포의 퇴화나 세포사멸을 야기한다는 것이 밝혀졌다<sup>9</sup>. 특히, 산소라디칼은 질소라디칼과 반응하여 peroxynitrate라는 독성이 강한 물질을 생성함으로써 세포손상에 막대한 영향을 미치게 된다<sup>9</sup>. 더욱이 산소자유기는 phospholipase A2를 활성화시킴으로써 새로운 산소자유기를 생성케하며 생성된 산소자유기는 칼슘의 세포내 증가와, Ca<sup>2+</sup>-dependent PKC의 통로를 통하여 protein kinase C의 발현을 촉진시킴으로써 세포의 성장이나 분화에 영향을 미침으로써 결국 세포의 사멸을 초래하게 된다<sup>8,9</sup>. 근래에 세포배양기술이 발달되면서 여러 종류의 배양세포를 이용한 병변모델을 만들어 병변의 병리적 현상 및 치료적 접근을 위한 연구에 널리 적용되어 지고 있다<sup>10</sup>. 배양세포는 생체내의 세포와 동일한 형태 및 화학적 특징이 동일한 것은 물론 생체에서 보다 세포의 분열주기가 빨라 짧은 시간내에 동일한 종류

\* 교신저자 : 이강창, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대학교 군포한방병원  
· E-mail : kcl207@wonkwang.ac.kr Tel : 031-390-2367  
· 접수 : 2003/01/31 · 수정 : 2003/03/07 · 채택 : 2003/03/29

의 세포를 다량 얻을 수 있어 같은 실험을 수회 반복함으로써 재현성이 뛰어나다는 잇점을 가지고 있다<sup>11,12</sup>. 특히, 배양세포를 이용한 독성효과나 약제의 효능은 분석 단계에 따라 정량적으로 조사할 수 있어 시험관내 가장 적합한 분석도구로 자리잡고 있다<sup>10,13</sup>. 따라서 본 연구는 생쥐의 골조직으로 순수 분리 배양한 골모세포를 대상으로 골세포의 손상을 유도하는 중금속의 일종인 메틸수은을 세포에 여러 농도로 처리하여 골모세포의 대한 메틸수은의 독성효과를 조사하였으며 또한 MMC의 독성을 산소자유기의 산화적 손상측면에서 조사하기 위하여 메틸수은의 독성에 대한 glutamate receptor 길항제의 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

본 실험에 사용한 동물은 건강 상태가 양호한 생후 3일된 ICR 계통의 생쥐를 사용하였다.

#### 2) 약제 제조

본 실험에 사용한 methylmercuric chloride(MMC, Sigma)는 각각 1M, 100mM, 10mM, 및 1mM의 저장액을 만들어 냉암소에 저장한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 세포배양

Michikawa 등<sup>9</sup>의 방법에 따라 골모세포를 trypsin에 의한 효소해리분리법에 의하여 골조직으로부터 순수분리하였다. 분리된 골모세포는 혈청이 포함된 배양액에  $2 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 산정하여 96-multiwell에 넣어 분주하였다. 분주된 세포는 CO<sub>2</sub> 정온기에서 5일 동안 배양하였으며 배양이 완료된 세포는 약제를 처리한 배양액에서 배양한 다음 약제가 포함되어 있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다.

#### 2) MMC 처리

MMC가 배양 골모세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1 μM에서 50 μM까지의 MMC가 함유된 배양액에서 골모세포를 30시간 동안 배양한 후 이의 독성효과를 분석하였다.

#### 3) NMDA 수용체 길항제의 처리

일정시간 배양한 골모세포에 30 μM MMC를 처리하기 전에 20~80 APV가 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 처리한 후 APV가 MMC에 미치는 영향을 조사하였다.

#### 4) 세포생존율 조사

여러 농도의 MMC를 배양 골모세포에 처리한 후 MMC가 골모세포에 미치는 독성효과와 이에 대한 APV의 효과를 Borenfreund 등<sup>12</sup>의 MTT분석법에 의하여 조사하였다.

#### 5) 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다. 통계적 유의수준은 p값이 0.05미만인 경우로 하였다.

## 결 과

### 1. MMC의 독성효과

#### 1) 농도에 따른 영향

MMC가 1~50 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 생쥐의 배양 골모세포를 30시간 동안 배양한 후 MMC의 독성효과를 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 1 μM MMC의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 79%로 나타났으며 10 μM MMC의 처리에서는 64%로 나타났다. 또한 30 μM과 50 μM MMC의 처리에서는 각각 세포의 생존율이 56%(p<0.05)와 38%(p<0.01)로 각각 나타났으며 30 μM에서 MTT50 값을 나타냈다(Fig. 1).

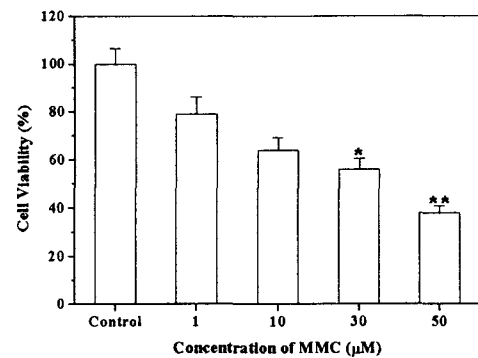


Fig. 1. A dose-dependency of methylmercuric chloride(MMC). MMC-induced cytotoxicity was measured by MTT assay in cultured osteoblasts. Cultured cells were exposed to 1, 10, 30 and 50 μM MMC for 30 hours, respectively. The results indicate the mean±SE(n=6). \*p<0.05,\*\*p<0.01

#### 2) 처리시간에 따른 영향

MMC의 처리시간에 의한 세포생존율의 변화를 조사하기 위하여 30 μM MMC가 포함된 배양액에서 골모세포를 6~42시간 동안 배양후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 6시간 배양에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 83%로 나타났으며 18시간 배양에서는 72%로 나타났다. 또한 30시간과 42시간 배양에서는 각각 세포생존율이 51%(p<0.05)와 26%(p<0.01)로 나타났다(Fig. 2).

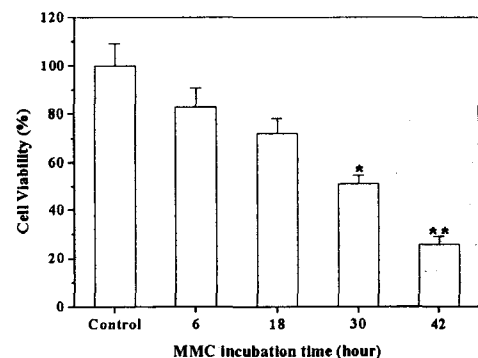


Fig. 2. A time-dependency of MMC. MMC-induced cytotoxicity was measured by MTT assay in cultured osteoblasts. Cultured cells were exposed to 30 μM MMC for 6, 18, 30 and 42 hours, respectively. The results indicate the mean±SE(n=6). \*p<0.05,\*\*p<0.01

2. APV의 효과

APV가 MMC의 독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30  $\mu$ M MMC가 포함된 배양액에서 APV가 20~80  $\mu$ M의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양한 다음 APV가 MMC에 미치는 영향을 MTT assay법에 의하여 조사하였다. 그 결과 30  $\mu$ M MMC만의 처리에 있어서는 세포생존율은 대조군에 비하여 42%로 나타났는데 비하여 20  $\mu$ M APV의 처리에서는 57%로 나타났으며, 또한 40  $\mu$ M 처리에서는 68%로 나타났으며, 특히 80  $\mu$ M APV 처리에서는 86%( $p < 0.01$ )로 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

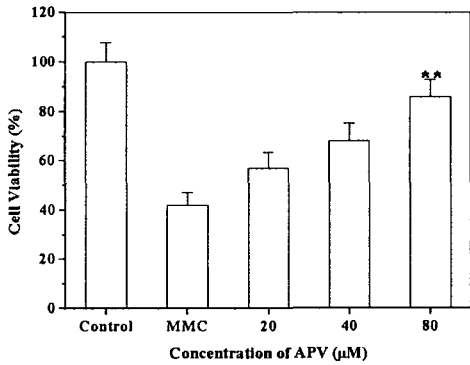


Fig. 3. Dose-response relationship of (APV) for its protective effect on MMC-induced cytotoxicity by MTT assay. Cultured cells were preincubated APV for 2 hours before exposure of 30  $\mu$ M MMC for 30 hours. The results indicate the mean  $\pm$  SE (n=6). \*\* $p < 0.01$

고 찰

수은은 카드뮴이나 납과 같이 독성이 강하기 때문에 일당 체내에 축적이 되면 배설이 잘 안되기 때문에 이들에 의한 중독은 매우 심각한 후유증을 유발하게 된다<sup>1,13,15</sup>. 특히, 수은의 중독은 일본의 미나마타 연안에서 발생함으로써 이를 minamata disease라고 부르기도 한다<sup>4</sup>. 수은중 메틸수은(MMC)과 같은 유기수은은 무기수은에 비하여 분해가 느리고 독성이 더욱 강하기 때문에 이의 취급시 매우 주의가 필요하다<sup>4,6</sup>. 수은은 골조직 뿐만 아니라 심폐기관이나 신장등 여러 장기에 영향을 주어 결국 세포나 조직의 사멸을 초래하게 된다. 이중 골조직은 골다공증이나 관절염, 골절등과 밀접히 연관되어 있어 이를 구성하고 있는 골세포의 손상은 매우 중요한 병변을 야기하게 된다<sup>1,5</sup>. 이중 골다공증은 해마다 증가하여 세계적인 관심의 대상이 되었다. 그러나 이에 대한 자세한 기전규명은 되어 있지 않으나 이의 병인으로 중금속을 비롯하여 알콜, 화학약제, 생활습관등이 알려져 있으나 이들에 의한 작용현상에 대해서는 많은 연구가 되어 있지 않다<sup>3</sup>. 본 실험에서 중금속의 일종인 MMC가 1~50  $\mu$ M의 농도로 각각 포함된 배양액에서 골모세포를 30시간 동안 배양한 결과 세포에 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰다. 이는 MMC가 배양 골모세포에 세포독성이 있음을 증명하고 있음을 알 수 있다. Park 등<sup>9</sup>은 생쥐의 배양 심근세포에 MMC를 처리한 결과 세포생존율을 유의하게 저하시킴으로서 세포독성을 나타냈다고 보고하였는데 이는 MMC

가 세포독성을 가지고 있음을 말해주며 본 실험의 결과와도 일치하였다. 최근에 MMC의 붕괴시 산소라디칼이 생성된다는 것이 제시되면서 MMC의 독성이 산화적 손상과 밀접한 관련이 있다고 주장되었다<sup>5</sup>. 따라서 본 연구결과에서 나타난 MMC의 독성도 산화적 손상과 밀접한 연관이 있을 가능성이 클 것으로 생각된다<sup>6</sup>. 한편, 최근의 연구에서 산소라디칼은 흥분성아미노산의 생성을 유도함으로써 세포내 칼슘증가를 일으키고 그 결과 세포를 사멸케 한다는 것이 밝혀졌으며<sup>8</sup> 또한 흥분성아미노산에 의한 칼슘의 증가는 NMDA 수용체와 연관되어 있어 활성산소와 흥분성아미노산, 칼슘증가는 상호 보완적인 위치에 있다고 한다<sup>6,8</sup>. 따라서 본 연구에서는 MMC의 독성을 흥분성아미노산의 측면에서 조사하기 위하여 NMDA 수용체 길항제인 APV를 MMC를 처리하기 2시간 전에 20~80  $\mu$ M의 농도로 APV가 각각 포함된 배양액에서 골모세포를 처리한 후 이의 영향을 세포생존율 측면에서 조사하였다. 그 결과 30  $\mu$ M MMC만을 처리한 경우 세포의 생존율은 대조군에 비하여 42%로 나타났는데 비하여 20  $\mu$ M APV의 처리에서는 57%, 40  $\mu$ M 농도에서는 68%로 나타났으며 특히, 80  $\mu$ M APV 처리에서는 86%( $p < 0.01$ )로 매우 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 APV가 MMC의 세포독성을 방어함으로써 세포생존율을 증가시킨 것으로 생각된다<sup>8</sup>.

본 실험의 이같은 결과는 MMC의 독성이 활성산소와 관련이 있음을 제시하고 있으며<sup>1,6</sup> 동시에 MMC의 독성이 흥분성아미노산과도 연관이 있다는 것을 증명하고 있다<sup>8</sup>. 이에 대한 더욱 자세한 작용기전의 규명을 위해서는 칼슘채널과 신호전달체와 같은 측면에서 종합적인 분석에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

배양 골모세포에 MMC가 미치는 독성효과와 이에 대한 NMDA 수용체 길항제의 영향을 조사하기 위하여 여러 농도의 MMC가 각각 포함된 배양액에 골모세포를 30시간 동안 처리한 후 MMC의 세포독성을 조사하였으며, 또한 MMC에 의하여 유발된 독성효과에 대한 NMDA 수용체 길항제의 방어효과를 MTT assay법에 의하여 분석하였다. 생쥐로부터 순수분리 배양한 골모세포를 1~50  $\mu$ M MMC가 포함된 배양액에서 30시간 동안 배양한 결과 MMC의 농도에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰다. 또한 MMC에 의한 세포독성에 대하여 APV는 세포생존율을 유의하게 증가시킴으로서 MMC의 독성으로부터 세포생존율의 감소를 유의하게 방어하였다.

이상의 결과로부터 중금속인 MMC는 생쥐의 배양 골모세포에 독성효과를 나타냈으며 APV가 MMC의 독성을 방어하는데 효과적인 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 두뇌한국21사업과 원광대학교 교비의 일부지원에 의해서 연구됨

## 참고문헌

1. Greener, Y., Kochen J.A. : Methylmercury toxicity in the chick embryo. *Teratology*, 28:23-28, 1983.
2. 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.
3. Friberg L, Kjellstrom, T : Cadmium : Bronner F, Coburn JW(eds) In "Disorders of Mineral Metabolism". Academic Press Inc New York pp. 318-334, 1981.
4. Tsubaki T, Takahashi H: Recent advances in Minamata disease studies. Kodansha, Tokyo, 1986.
5. Ganther HE: Interactions of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Ann NY Acad Sci* 355: 212-225, 1980.
6. 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.
7. Hayase F., Hirashima S., Okamoto G., Kato H. : Scavenger of active oxygens by melanoidin. *Agric Biol Chem* 53:3383-3389, 1989.
8. 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.
9. Michikawa M., Lim K.T., McLarnon J.G., and Kim S.U. : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37:62-70, 1994
10. Park OK, Oh JM, Choi MK, Park ST, Chung YT : Effect of Antioxidants on FeSO<sub>4</sub> Toxicity in Cultured Myocardial Cells. *Korean J Physical Anthropol* 10:161-168, 1997.
11. Mosmann T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63, 1983.
12. Borenfreund E. and Puerner J. A. : A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/ NR-90). *J Tiss Cult Meth* 9:7-9, 1984.
13. Chung YT, Park ST, Choi MK, Kim JJ, Mun YJ, Woo WH, Han DS, Choi BK, So JT : A study on the cytotoxicity of cadmium in vitro. *Korean J Toxicol* 9:45-60, 1993.
14. Coogan TP, Bare RM, Waalkes MP : Cadmium -induced DNA strand damage in cultured liver cells : reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 113: 227-233, 1992.
15. Audesirk T., Audesirk G., Ferguson C., and Shugarts D. : Effects of inorganic lead on the differentiation and growth of cultured hippocampal and neuroblastoma cells. *Neurotoxicol* 12:529-638, 1991
16. Kasuya M : The effect of vitamin E on the toxicity of alkyl mercurials on nervous tissue in culture. *Toxicol Appl Pharmacol* 32:374-354, 1975