대한산업의학회지 제 15 권 제 3 호 (2003년 9월)
Korean J Occup Environ Med, 2003;15(3):237-251

# RAW 264.7 세포에서 셀레늄이 유기수은에 의해 유도된 apoptosis에 미치는 영향

전북대학교 의과대학 예방의학교실

**권근상 · 고대하 · 염정호 · 윤욱희**

— **Abstract** —

## Effects of Selenium on Apoptosis Induced by Methyl Mercury Chloride in RAW 264.7 Cells

Keun Sang Kwon, Dai Ha Koh, Jung Ho Youm, Wook Hee Yoon

*Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine*
*Chonbuk National University*

**Objective**: This study was performed to evaluate the protective effects of selenium against the methyl mercury chloride (MeHgCl) induced cell apoptosis.

**Methods**: The effect of selenium on the MeHgCl induced cell apoptosis was observed in mouse macrophage-derived RAW 264.7 cells, in vitro. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM).

**Results**: MeHgCl exerted a dose dependent cytotoxicity, as demonstrated by the MTT assay, an assay dependent, in part, on mitochondrial function. Concurrent exposure to selenium provided complete protective effects against the cytotoxicity induced by MeHgCl. Pretreatment with selenium increased the protective effects of subsquent administrations of selenium in conjunction with MeHgCl, but pretreatment of selenium alone did not provide protection against MeHgCl when given alone. Selenium administered after exposure to MeHgCl did not repair the existing MeHgCl induced cytotoxicity.

Furthermore, the apoptosis induced by MeHgCl was revealed by the DNA fragmentation, using the terminal deoxynucleotidyl transferase Biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL) assay, alterations to the nuclear morphology, by nuclei staining, and the plasma membrane lipid organization, as shown by cell flow cytometry. The apoptosis induced by MeHgCl was prevented by the concurrent exposure to selenium, or pretreatment with selenium, prior to the administration of selenium in conjunction with MeHgCl. However, no inhibittion of the MeHgCl induced apoptosis was observed with selenium pretreatment prior to exposure to MeHgCl alone, or with the administration of selenium after exposure to MeHgCl.

**Conclusions**: These results suggest that the coexistence of selenium and MeHgCl are essential for the protective effects of selenium against the MeHgCl-induced apoptosis, and the cytotoxicity, in RAW 264.7 cells, and may involve selenium-MeHgCl binding.

**Key Words**: Selenium, MeHgCl, Apoptosis, RAW 264.7 Cells

<접수일: 2003년 4월 28일, 채택일: 2003년 5월 30일>

교신저자: 권 근 상 (Tel: 063-270-3094) E-mail: dr-keunsang@hanmail.net

## 서 론

각종 해산물, 곡류 등에 의한 수은 오염은 높은 대중적 경각심을 일으키고 있으며, 최근 치과용 아말감에 의한 인체 내 수은 축적이 보고(Guo 등, 1998; Shenker 등, 2000)되어 수은 독성에 대한 관심이 증가되고 있다.

수은 및 기타 중금속에 의한 노출은 인체 면역기능의 장애를 유도하고 있으나, 면역체계 활성 기전들은 아직 잘 밝혀지지 않고 있다. 수은의 폭로는 면역활성에 의한 알러지(allergy)나 자가면역 질환(autoimmune disease)을 일으키기도 하지만, 임파구의 면역 결핍을 유도하여 만성적 또는 재발성 감염을 일으키기도 하는(Jiang 등, 1996; Wild 등, 1997) 등 면역체계 활성과 임상적 후유증은 서로 모순되어 나타나기도 한다. 이러한 결과들은 수은의 독성 효과가 수은 화합물의 화학적 종류, 용량, 섭취 경로와 폭로 세포의 종류 등 조직 특이적 반응의 형성으로 설명할 수 있다. 수은은 사람과 동물의 대식세포(macrophage)나 임파구의 증식능 억제, 사이토카인(cytokine) 생산 저하 및 세포의 DNA 합성을 저해하지만 이러한 저해 작용의 기전들은 서로 다르다고 한다.

최근 중금속의 세포에 대한 독성기전에 apoptosis가 관여한다는 연구 결과들이 제시되면서 중금속이 apoptosis에 미치는 영향과 유도기전 연구에 많은 관심이 집중되고 있다. 카드뮴이나 수은과 같은 중금속에 노출된 임파구나 대식세포들이 apoptosis와 관련된 세포사(cell death)의 전형적인 기능적, 형태적 특징을 동반한다는 사실(Chio 등, 1996; Gasso 등, 2001; Oyama 등, 2000)이 보고되었으며, 수은에 노출된 임파구들이 세포사 이전에 adenine nucleotide energy charge ratio가 급격히 감소하고 지질과산화반응과 $Ca^{2+}$ level의 변화 및 계획된 세포사(programmed cell death)로 특징 지워지는 세포막과 핵의 변화가 관찰됨으로써 수은은 임파구와 대식세포의 apoptosis를 유도한다고 하였다(Abedi-Balugerdi 등, 1999; Oyama 등, 2000; Shenker, 등 1999).

셀레늄은 인간 뿐 만 아니라 다른 모든 생명체에 필수적인 미량원소로서 gluthathione peroxidase(GPx)의 효소학적 활성 부위를 구성하는데 필수적인 성분으로 hydrogen peroxide의 해독에 관여하는 것으로 알려져 있다(Michelle 등, 2002; Weixiong 등, 2001). 최근에 셀레늄은 apoptosis나 세포 성장을 조절하는데 관여하는 thioredoxin reductase(Trx Rs)의 필수 요소임이 밝혀졌으며(Huawei 등, 2002), 동물 모델에서 종양 증식을 저해하는 항암효과가 관찰되었다(Weixiong 등, 2001). 또한 셀레늄은 apoptosis 유도를 통해서 암세포의 성장을 저해한다고 알려져 있다. 이와 같이 셀레늄의 화학적 저해 또는 화학적 치료 기작은 아직까지 명백하게 밝혀져 있지 않으나 산화적 손상에 대한 방어나 발암물질의 대사조절에 관여하거나 또는 세포 합성주기(cell cycle) 조절, thioredoxin 산화 환원 시스템의 조절 그리고 활성산소기 생성으로 인한 2차적인 apoptosis 유도 등을 통해서 이루어진다고 예상하고 있다(Ganther 등, 1999; Jiang 등, 1999). 한편 셀레늄은 GPx 같은 selenoenzyme의 발현을 증가시킴으로써 항산화 작용을 상승하여 수은이나 카드뮴을 비롯한 다양한 중금속의 독성을 억제하거나 수은과 셀레늄 사이의 결합부위 경쟁을 통하여 중금속의 독성을 억제하는 것으로 보고되어 있다(Palmisano 등, 1995; Shanker 등, 1996).

이 연구는 수은의 세포독성 및 apoptosis를 관찰하고, 수은과 셀레늄을 동시에 처리, 셀레늄을 전 처리한 후에 수은 또는 수은과 셀레늄을 동시에 처리하거나 수은을 전처리한 후에 셀레늄을 처리하여 셀레늄이 수은에 의해서 유도되어지는 apoptosis에 미치는 영향을 MTT를 이용한 세포 독성정도를 관찰하고 핵 염색을 통한 핵 형태 변화와 DNA 분절 분석 그리고 세포막 지질 구성 변화를 관찰함으로써 수은에 의해 유도된 apoptosis에 대한 셀레늄의 방어기전을 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포 배양과 시약

마우스 대식세포에서 기원한 RAW 264.7 세포를 10% FBS DMEM (Gibco; Grand Island, NY,

USA) 배지에 0.25% trypsin (Gibco; Grand Island, NY, USA) EDTA 용액을 이용하여 2 - 3일 주기로 37 ℃, 5% $CO_2$ incubator에서 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 각각의 실험에 사용된 시약들은 methyl mercury chloride (MeHgCl, Kanto Chemical Co., Japan), 3-(4,5-dimethylthiozol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma Chemical Co., USA), sodium selenite ($Na_2SeO_3$, Sigma Chemical Co., USA), terminal deoxynucleotidyl transferase Biotin-dUTP nick end labelling (TUNEL, Sigma Chemical Co., USA), propidium iodide (PI, Sigma Chemical Co., USA), Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co., USA), annexin V-FITC Kit (Pharmingen, San Diego, USA) 등이다.

## 2. 수은의 세포독성 검사

수은의 세포독성(cytotoxicity)에 미치는 영향을 알아보는 방법으로 MTT를 이용하여 살아 있는 세포의 미토콘드리아 내에 존재하는 dehydrogenase의 활성을 측정하였다(Hart 등 1999; Madesh 등, 1999; Nath 등, 1996).

RAW 264.7 세포($1\times10^4$/well)를 96 well plate에 seeding 한 후 세포가 잘 부착될 수 있도록 37 ℃에서 4시간 동안 $CO_2$ incubator에서 배양하였다. 그런 다음 유기수은(0 ~ 4 μM)을 처리하여 24, 48과 72시간 동안 배양한 다음 MTT(5 mg/ml)를 전 well에 25 μℓ씩 첨가한 후 발색을 위해 37 ℃에서 4시간 동안 보관하였다. 그 다음 전 well을 세척하고 발색 반응물(formazan; dark blue crystal)을 용출키 위해 ethanol을 전 well에 100 μℓ씩 첨가한 후 균일하게 흔들어 주었다. 빛이 차단된 실온에서 5 ~ 15분 동안 보관한 후 ELISA reader(SpectraCount)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 내 셀레늄의 처치가 수은의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포($1\times10^4$/well)를 96 well plate에 seeding 한 후 유기수은과 셀레늄을 동시처리, 셀레늄 전처리 후 유기수은 처리와 유기수은과 셀레늄의 동시처리, 유기수은 전처리 후 셀레늄 처리하여 MTT(5 mg/ml)를 전 well에 25 μℓ씩 첨가한 후 위에서 설명한 바와 같이 측정하였다.

## 3. DNA 분절 분석

RAW 264.7 세포($2\times10^6$)를 60 mm tissue culture dish에 seeding하여 37 ℃에서 4시간 $CO_2$ incubator에서 배양하였다. 그런 다음 유기수은(2 μM)과 셀레늄(8 μM)을 동시처리, 셀레늄 전처리 후 유기수은 처리와 유기수은과 셀레늄의 동시처리, 유기수은 전처리 후 셀레늄을 처리하여 12시간 후에 DNA laddering 정도를 분석하였다(Jung 등, 2001; Munder 등, 1998). $2\times10^6$ 세포를 trypsin으로 처리하여 수거한 다음 4 ℃에서 3000 rpm으로 원심분리하여 모아진 세포에 50 mM Tris-buffer(pH 8.0)를 첨가 한 후 37 ℃에서 1시간 정도 놓아두었다. 그런 다음 Proteinase K(250 μg/ml)를 처리하여 50 ℃에서 3 ~ 4시간 정도 보관한 후 이 용액과 동량의 phenol/chloroform을 첨가하여 3000 rpm에서 15분간 3회 원심분리해서 마지막으로 얻어진 용액에 10 M ammonium acetate와 2배 에탄올을 처리하여 3000 rpm에서 15분간 원심시켜 용액내의 DNA를 침전시킨 다음 70% 에탄올을 처리하여 2회 세척한 후 실온에서 말려 TE buffer(pH 8.0)에 녹였다. 이렇게 해서 얻어진 genomic DNA 는 2% agarose gel 상에서 전기영동을 하여 분석하였다.

## 4. 핵 형태 변화를 위한 세포 염색

Apoptosis와 necrosis로 인한 세포 죽음의 핵 형태와 크로마틴 구조의 차이점을 Hoechst-33258과 PI를 이용한 핵 염색을 통해서 관찰하였다(Romamoorthy 등, 1998). 세포염색 방법은 먼저 RAW 264.7 세포를($4\times10^5$) 6 well plate 내부에 놓인 11 mm glass coverslip 위에 seeding 한 후, 37 ℃에서 4시간 동안 $CO_2$ incubator에서 배양한 다음 유기수은(2 μM)과 셀레늄(8 μM)을 동시처리, 셀레늄 전처리 후 유기수은 처리와 유기수은과 셀레늄의 동시처리 하여 48시간 더 배양한 후 ice-cold 상태의 PBS을 이용하여 coverslip 위에서 자란 세

포들이 떨어지지 않도록 주의하면서 coverslip을 2~3회 세척하였다. 이러한 coverslip을 Hoechst 33258(8 μg/ml) 용액에 담가 빛을 차단시킨 상태에서 15분 동안 실온에 보관하였다. 그 이후 ice-cold 상태의 PBS로 세척하고 PI(5 μg/ml) 용액에 위와 같은 방법으로 보관한 다음 다시 ice-cold 상태의 PBS로 세척한 후, 슬라이드 글라스 위에서 coverslip에 mounting 용액(glycerol, 1: PBS, 1 v/v)을 떨어뜨려 UV excitation filter (×100)를 사용한 형광 현미경(Olympus BH2 compound microscope; Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

### 5. TUNEL 방법을 이용한 apoptosis 분석

TdT를 이용한 dUTP-FITC nick-end labeling(TUNEL)방법을 통하여 apoptosis 초기단계에서 일어나는 DNA 분절현상을 관찰하였다(Shen 등, 2002; Tai 등, 1998). RAW 264.7 세포를 60 mm dish에 seeding한 후, 37 ℃에서 4시간 동안 CO2 incubator에서 배양한 다음 유기수은(2 μM)과 셀레늄(8 μM)을 동시처리, 셀레늄 전처리 후 유기수은 처리와 유기수은과 셀레늄의 동시처리, 유기수은 전처리 후 셀레늄을 처리하여 48시간 동안 더 배양한 후 ice cold 상태의 PBS를 이용하여 2회 세척하고 500×g에서 5분간 원심분리한 다음 4% paraformaldehyde로 고정시켰다. 여기에 TdT와 Biotin-dUTP를 처리한 다음 실온에서 1시간 방치한 후 PBS로 세척하고, avidin-FITC를 처리한 후 PBS로 다시 세척하여 형광현미경(Olympus BH2 compound microscope; Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

### 6. Flow cytometry를 이용한 apoptosis 분석: 세포막 지질 구성의 변화 분석

Flow cytometry를 이용한 Annexin V-FITC 염색을 통해 apoptosis가 활발하게 진행되고 있는 세포를 측정하였다(Brune 등,1997; Ciriolo 등, 2001; Hortelano 등, 1999). 먼저 RAW 264.7 세포에 유기수은(2 μM)과 셀레늄(8 μM)을 동시처리, 셀레늄 전처리 후 유기수은 처리와 유기수은과 셀레늄의 동시처리, 유기수은 전처리 후 셀레늄을 처리하여 48시간 동안 더 배양하였다. 그런 다음 ice cold 상태의 PBS를 가지고 2회 세척하고 500×g에서 5분간 원심분리한 다음 1×binding buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$)에 세포를 부유시켰다. 이러한 세포 부유액 중 100 μℓ($1\times10^5$ 세포)를 취하고 여기에 Annexin V-FITC와 PI(50 ug/ml) 5 μℓ를 첨가하여 빛을 차단시킨 상태의 실온에서 15분 동안 방치시켰다. 그런 다음 FACScan flow cytometer(Becton Dickinson, San Jose, CA)를 이용하여 apoptosis 정도를 분석하였다. Forward light scatter와 side light scatter (575~590 nm)는 linear mode로 측정되어지고, phosphatidylethanolamine과 FITC(515~545 nm)는 logarimetric mode로 측정하였다. 결과 분석은 CellQuest software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA)를 사용하였다.

### 7. 자료처리 및 분석방법

자료처리는 SPSS 10.0을 이용하였다. 대조군과 실험군간의 MTT reduction 차이의 유의성을 unpaired t-test로 비교하였다.

## 결 과

### 1. 유기수은에 의한 세포독성

유기수은처리 24시간의 경우는 대조군과 비교하여 세포내 미토콘드리아에 존재하는 dehydrogenase 활성의 감소가 없었으나, 48시간의 경우는 2 μM부터, 72시간의 경우는 1 μM부터 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 dehydrogenase의 활성이 현저히 감소되어 세포독성 효과가 나타남을 알 수 있었다 ($p<0.01$, Fig. 1).

### 2. 셀레늄이 유기수은에 의한 세포독성에 미치는 영향

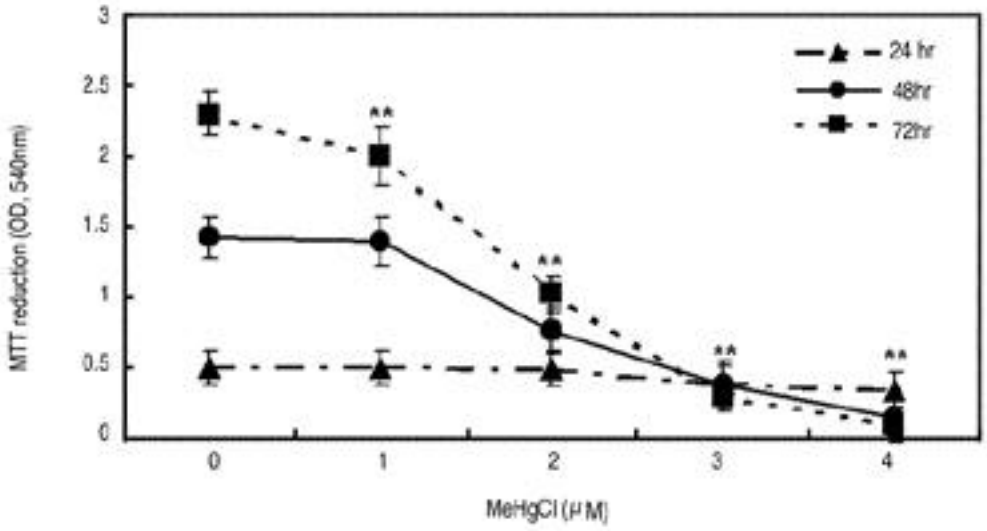


**Fig. 1.** Effects of methyl mercury chloride (MeHgCl) expressed as MTT reduction (OD, 540 nm) in RAW 264.7 cells. Cell were incubated at 37 ℃ in a $CO_2$ incubator with various concentration of MeHgCl for 24 hr, 48 hr and 72 hr. The differences between the control and the MeHgCl treated groups were tested by unpaired t-test. : ** $p<0.01$

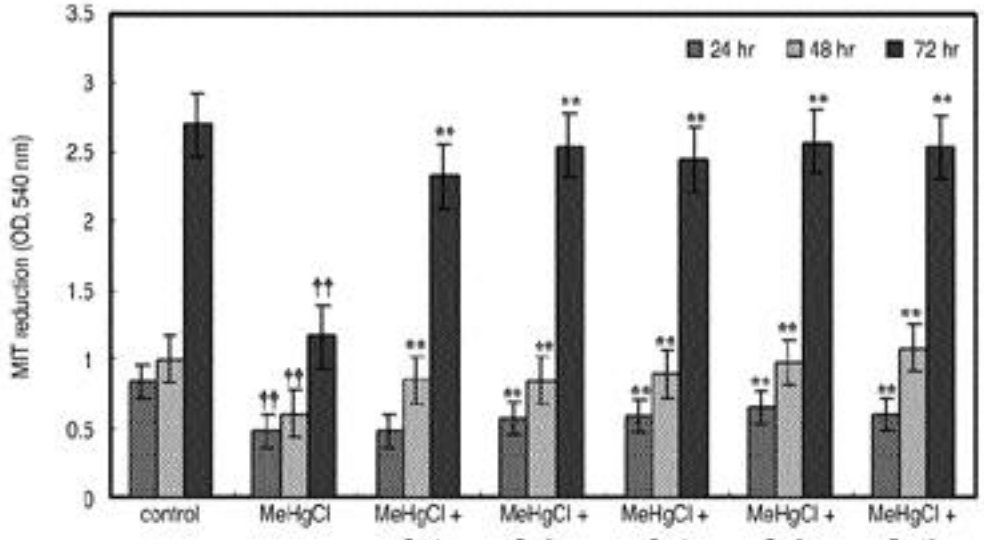


**Fig. 2.** Effects of concurrent exposure to MeHgCl and selenium ($Na_2SeO_3$) expressed as MTT reduction in RAW 264.7 cells. Cells were concurrently exposed to MeHgCl and various concentration of selenium for 24 hr, 48 hr and 72 hr.: control; medium only: MeHgCl only; MeHgCl (2 μM): MeHgCl + Se; MeHgCl (2 μM) plus selenium (1 - 10 μM). The differences between the control and the MeHgCl treated group were tested by unpaired t-test. : ++ $p<0.01$ The differences between the MeHgCl treated group and the MeHgCl + Se treated groups were tested by unpaired t-test. : ** $p<0.01$

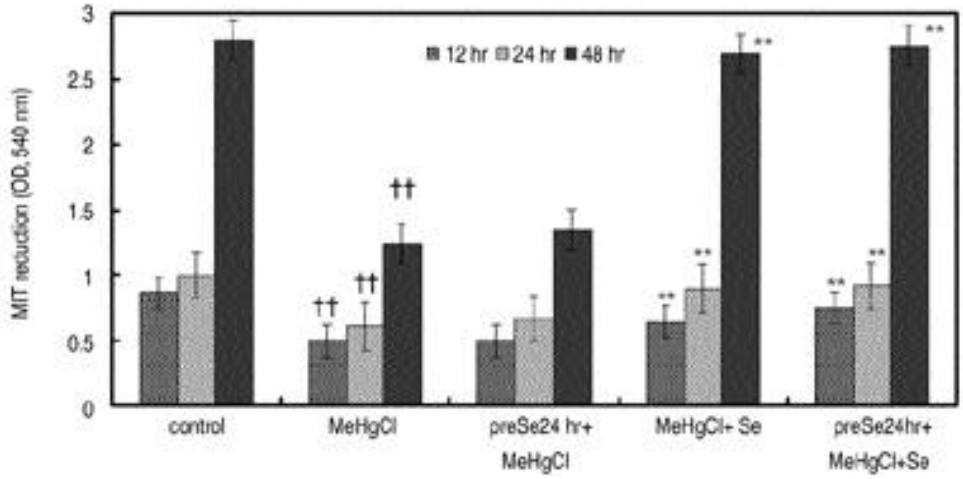


**Fig. 3.** Effects of pretreatment with selenium expressed as MTT reduction in RAW 264.7 cells.: control; medium only: MeHgCl; MeHgCl (2 μM) only: pre Se-MeHgCl; pretreated with selenium (8 μM) for 24 hr prior to MeHgCl (2 μM): MeHgCl + Se; concurrently exposed to MeHgCl (2 μM) plus selenium (8 μM): pre Se-MeHgCl + Se; pretreated with selenium (8 μM) for 24 hr prior to MeHgCl (2 μM) plus selenium (8 μM). Cytotoxicity was expressed as MTT reduction following incubation for 12 hr, 24 hr and 48 hr after pretreatment or no pretreatment. The differences between the control and the MeHgCl treated group were tested by unpaired t-test.: ++ $p<0.01$ The differences between the MeHgCl treated group and the MeHgCl + Se treated groups were tested by unpaired t-test.: ** $p<0.01$

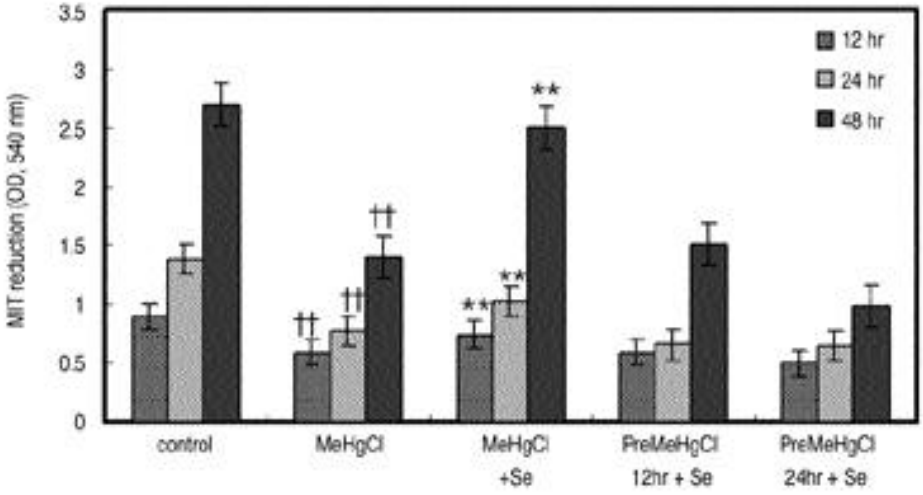


**Fig. 4.** Effects of selenium on reperation of existing damage caused by MeHgCl expressed as MTT reduction in RAW 264.7 cells. Cells were treated with selenium following exposure to MeHgCl.: control; medium only: MeHgCl; MeHgCl (2 μM): MeHgCl + Se; concurrently exposed to MeHgCl (2 μM) plus selenium (8 μM): pre MeHgCl 12 hr + Se; pretreated with MeHgCl (2 μM) for 12 hr prior to selenium (8 μM): pre MeHgCl 24 hr + Se; pretreated with MeHgCl (2 μM) for 24 hr prior to selenium (8 μM). Cytotoxicity was expressed as MTT reduction following incubation for 12 hr, 24 hr and 48 hr after pretreatment or no pretreatment. The differences between the control and the MeHgCl treated group were tested by unpaired t-test.: ++ $p<0.01$ The differences between the MeHgCl treated group and the MeHgCl + Se treated groups were tested by unpaired t-test.: ** $p<0.01$

유기수은만 처리한 군은 대조군에 비해 dehydrogenase의 활성이 현저하게 감소되었고($p<0.01$), 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리 한 군은 유기수은만을 처리한 군과 비교할 때 셀레늄의 농도 의존적으로 dehydrogenase의 활성이 현저히 증가하여 유기수은에 의한 세포독성을 감소시켰다($p<0.01$, Fig. 2). 셀레늄을 전 처리한 후 유기수은을 처리한 군은 단독으로 유기수은을 처리한 군과 dehydrogenase 활성의 차이가 없어 유기수은에 의한 세포독성을 감소시키지 못했으나, 셀레늄 전 처리 후 수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군과 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군은 단독으로 유기수은을 처리한 군에 비해 dehydrogenase의 활성이 현저히 증가하여 유기수은에 의한 세포독성을 감소시켰다($p<0.01$, Fig. 3). 유기수은을 전 처리한 후 셀레늄을 처리한 군은 단독으로 유기수은만을 처리한 군과 dehydrogenase 활성의 차이가 없고, 유기수은 전 처리 시간이 증가할수록 dehydrogenase의 활성이 감소하여 유기수은에 의한 세포독성을 감소시키지 못했다. 반면 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군은 단독으로 유기수은만을 처리한 군보다 dehydrogenase의 활성이 현저히 증가하여 유기수은에 의한 세포독성을 감소시켰다($p<0.01$, Fig. 4).

### 3. 셀레늄이 유기수은에 의해 유도된 핵 형태에 미치는 영향

대조군(Figure 5A)은 Hoechst-33258 염색에 의해 정상적인 핵 형태를 나타내는 pale blue 염색을 띄는 반면 단독으로 유기수은만을 첨가한 군(Fig. 5B)에서는 apoptosis 특징으로 설명되는 핵 응축현상으로 인한 bright blue 염색의 밀도가 현저하게 증가하였고 apoptosis 가 일어난 세포의 세포막 손상과 관련된 PI 염색(bright pink)도 관찰되었다.

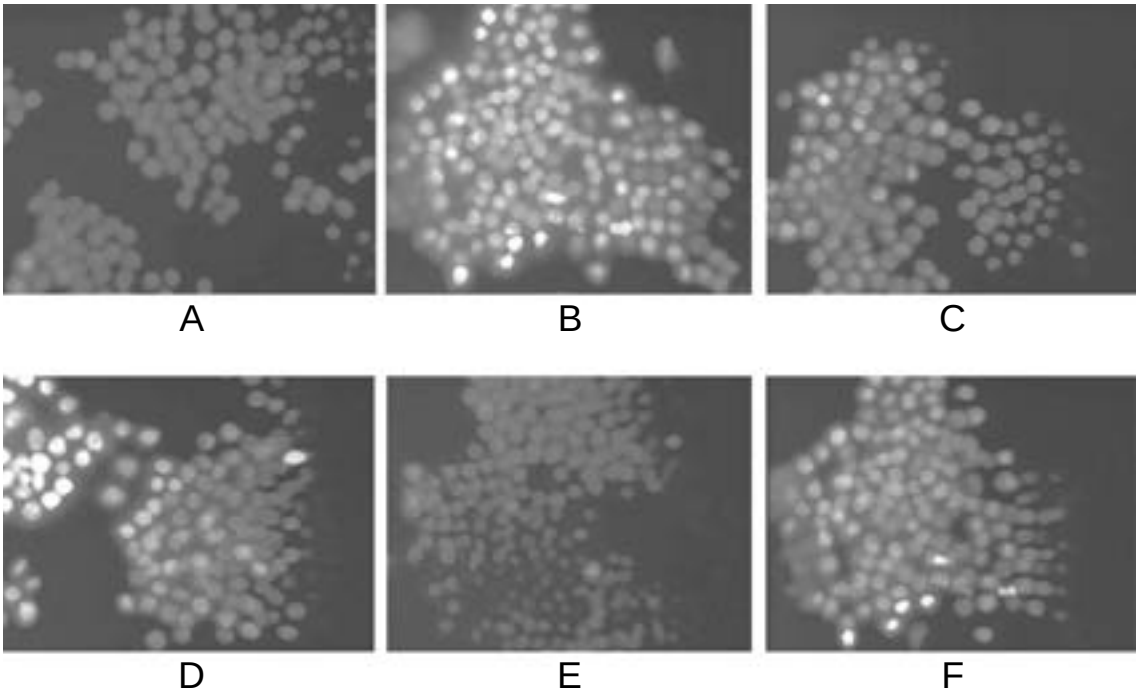


**Fig. 5.** Effects of selenium on apoptotic nuclear morphology as the evidence for MeHgCl-induced apoptosis. Cells were incubated with various experimental conditions for 48 hr and then stained with Hoechst 33258 dye and propidium iodide (PI): (**A**); control (medium only): (**B**); MeHgCl (2 μM) only: (**C**); concurrently exposed to MeHgCl (2 μM) plus selenium (8 μM): (**D**); pretreated with selenium (8 μM) for 24 hr prior to MeHgCl (2 μM): (**E**); pretreated with selenium (8 μM) for 24 hr prior to MeHgCl (2 μM) plus selenium (8 μM): (**F**); pretreated with MeHgCl (2 μM) for 24 hr prior to selenium (8 μM).

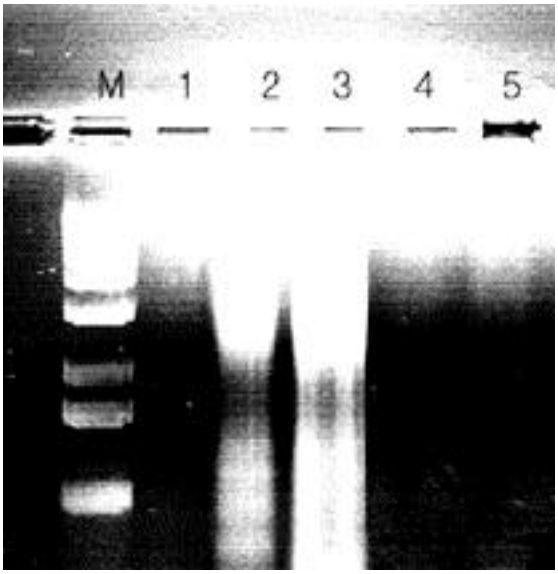


**Fig. 6.** Effects of selenium treatment on MeHgCl-induced apoptosis. Apoptosis were analysed by DNA fragmentation and analysis of DNA by 2% agarose gel electrophoresis indicated the occurrence of apoptosis.: M; 1kb DNA ladder: lane 1; control (medium only): lane 2; MeHgCl (2 μM): lane 3; pretreated with selenium (8 μM) for 24 hr prior to MeHgCl (2 μM): lane 4; concurrently exposed to MeHgCl (2 μM) plus selenium (8 μM): lane 5; pretreated with selenium (8 μM) for 24 hr prior to MeHgCl (2 μM) plus selenium (8 μM).

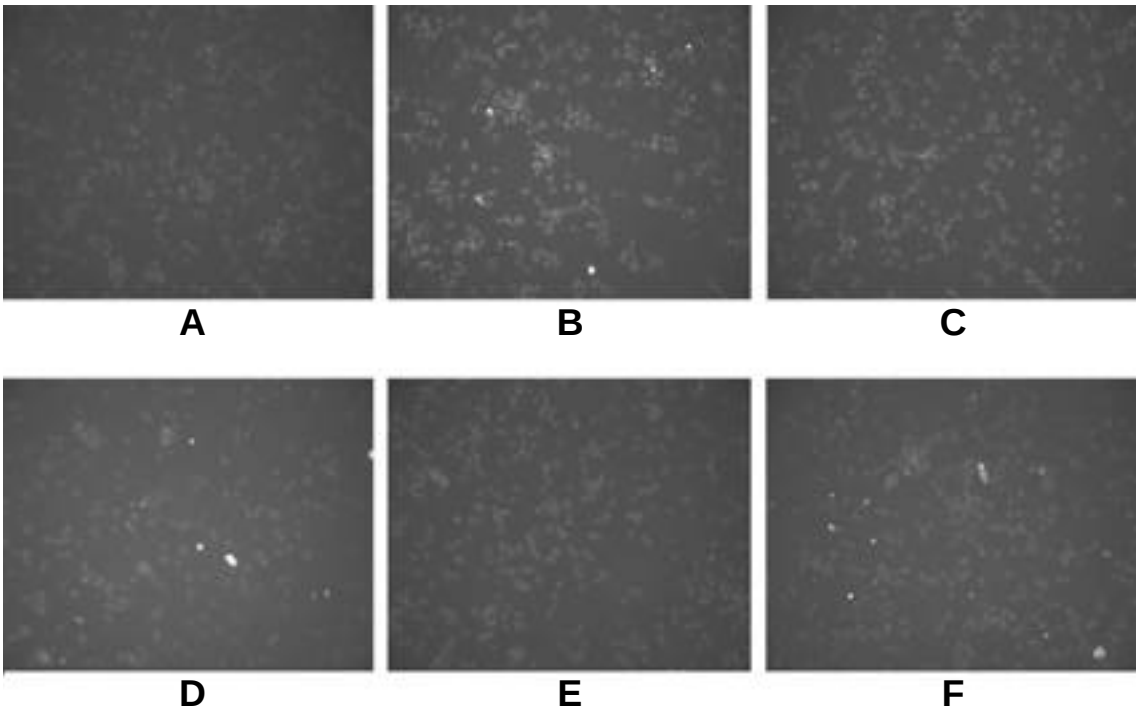


**Fig. 7.** Effects of selenium on MeHgCl-induced apoptosis measured by Terminal deoxynucleotidyl transferase Biotin-dUTP Nick End Labelling (TUNEL) assay.: (**A**); control (**B**); MeHgCl (2 μM) only (**C**); concurrently exposed to MeHgCl (2 μM) plus selenium (8 μM) (**D**); pretreated with selenium (8 μM) for 24 hr prior to MeHgCl (2 μM) (**E**); pretreated with selenium (8 μM) for 24 hr prior to MeHgCl (2 μM) plus selenium (8 μM) (**F**); pretreated with MeHgCl (2 μM) for 24 hr prior to selenium (8 μM).

이와 대조적으로 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군(Fig. 5C)과 셀레늄을 전처리하고 24시간 후에 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군(Fig. 5E)은 유기수은만 첨가한 군에 비해서 apoptosis 세포에서 보여지는 bright blue 염색의 밀도가 현저하게 줄어들고 정상세포에서 관찰되는 pale blue 염색 밀도가 상대적으로 증가하였다. 반면 셀레늄 전처리하고 24시간 후에 단독으로 유기수은만을 처리한 군(Fig. 5D)과 유기수은을 전처리하고 24시간 후에 셀레늄을 처리한 군(Fig. 5F)은 단독으로 유기수은만 첨가한 군과 같이 핵 응축현상으로 인한 bright blue 염색의 밀도가 현저하게 증가하였고

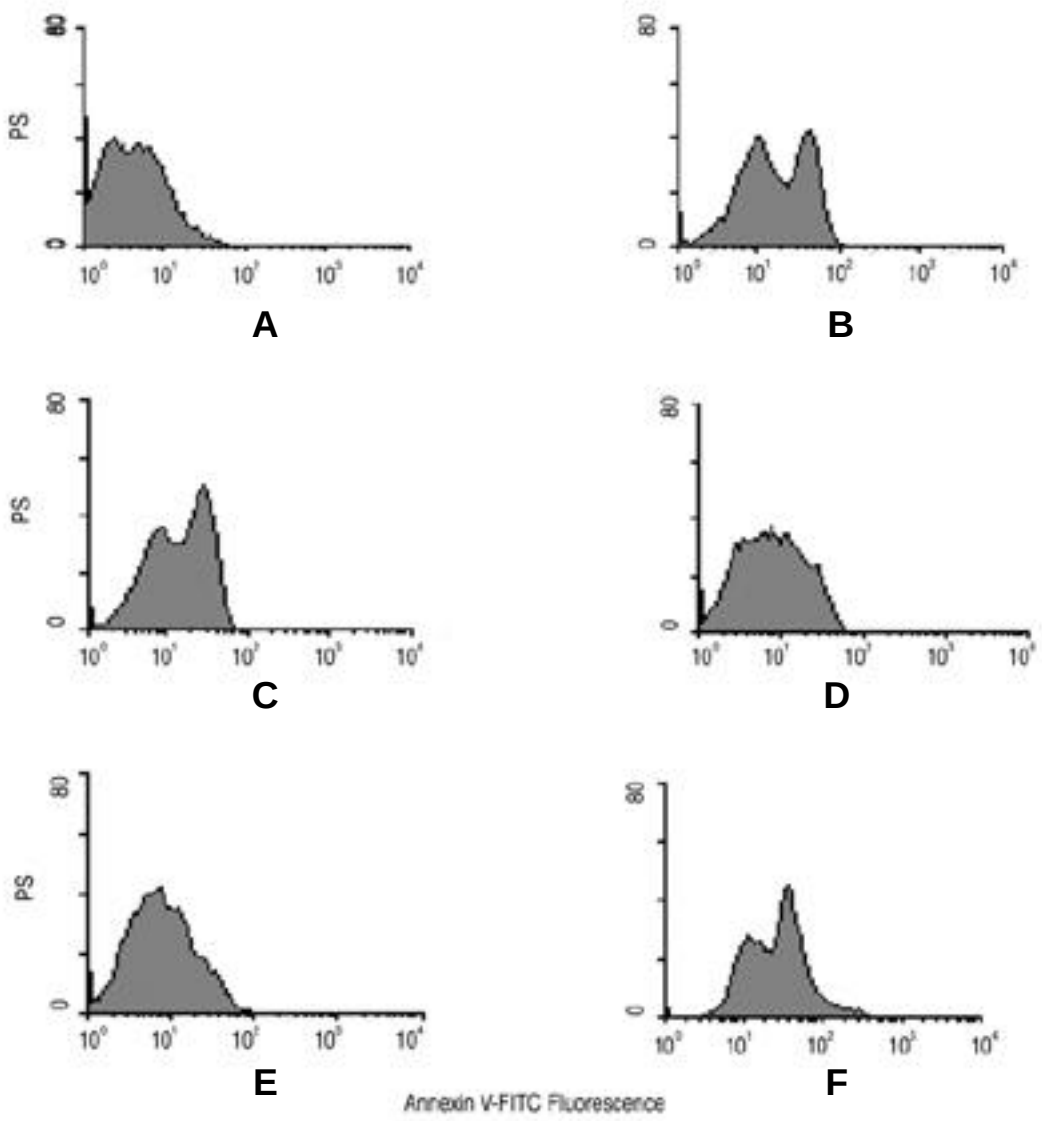


**Fig. 8.** Effects of selenium on plasma membrane lipid organization measured by annexin V-FITC binding to phosphatidylserine (PS) as evidence for MeHgCl-induced apoptosis. Cell were analyzed by FACS and the data are plotted as log FITC fluorescence versus relative cell number. (A); control: (B); MeHgCl (2 μM) only: (C); concurrently exposed to MeHgCl (2 μM) plus selenium (8 μM): (D); pretreated with selenium (2 μM) for 24 hr prior to MeHgCl (2 μM): (E); pretreated with selenium (8 μM) for 24 hr prior to MeHgCl (2 μM) plus selenium: (F); pretreated with MeHgCl (2 μM) for 24 hr prior to selenium (2 μM).

apoptosis 가 일어난 세포의 세포막 손상과 관련된 PI 염색(bright pink)도 관찰되었다.

### 4. 셀레늄이 유기수은에 의해 유도된 DNA 분절에 미치는 영향

단독으로 유기수은만 처리한 군과 셀레늄을 전처리하고 24시간 후에 유기수은을 처리한 군은 뚜렷한 DNA분절과 laddering이 관찰되었으나, 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군과 셀레늄을 전처리하고 24시간 후에 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군은 대조군과 같이 DNA분절과 laddering이 관찰되지 않았다(Fig. 6).

대조군(Fig. 7A)은 pale green 염색을 띄는 반면 단독으로 유기수은만을 첨가한 군(Fig. 7B)에서는 DNA의 분절로 인한 bright green 염색의 밀도가 현저하게 증가하였다. 이와 대조적으로 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군(Fig. 7C)과 셀레늄을 전처리하고 24시간 후에 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군(Fig. 7E)은 유기수은만 첨가한 군에 비해서 DNA가 분절된 apoptosis 세포에서 보여지는 bright green 염색의 밀도가 현저하게 줄어들고 정상세포에서 관찰되는 pale green 염색 밀도가 상대적으로 증가하였다. 반면 셀레늄 전처리하고 24시간 후에 단독으로 유기수은만을 처리한 군(Fig. 7D)과 유기수은을 전처리하고 24시간 후에 셀레늄을 처리한 군(Fig. 7F)은 단독으로 유기수은만 첨가한 군과 같이 DNA의 분절로 인한 bright green 염색의 밀도가 현저하게 증가하였다.

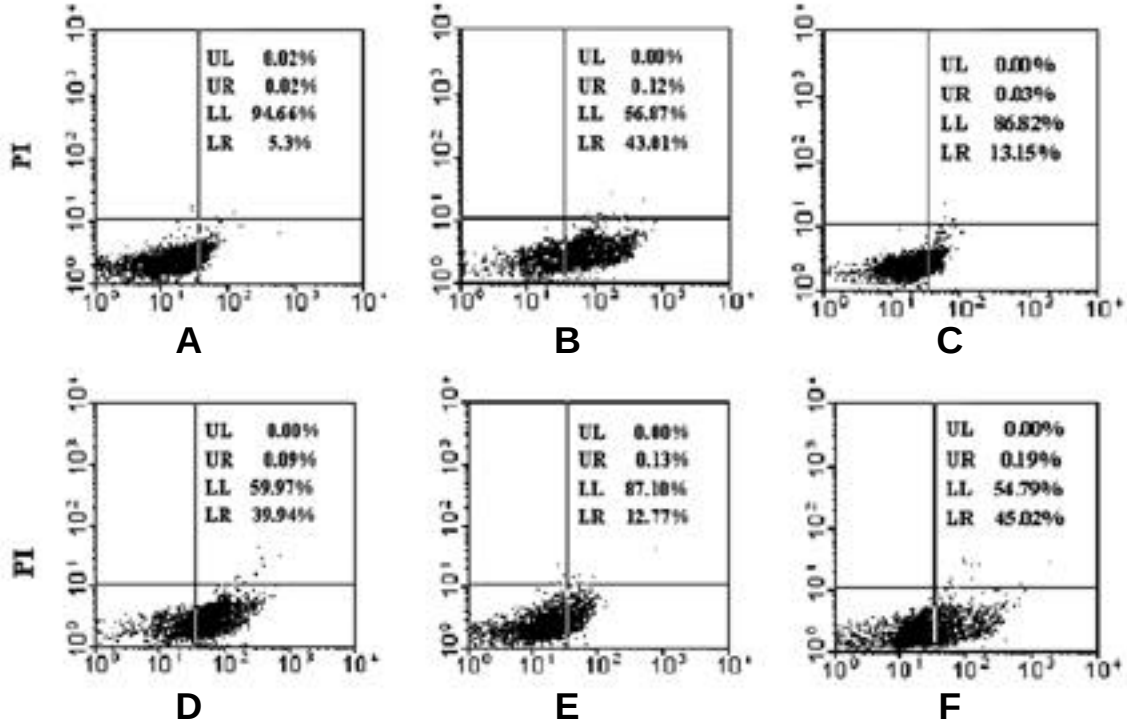


**Fig. 9.** Effects of selenium on plasma membrane lipid organization measured by annexin V-FITC and PI as evidence for MeHgCl-induced apoptosis. The apoptotic cells (lower right quadrant; LR) exhibit positive for annexin V-FITC and negative for PI. The cells in late stage apoptosis with secondary necrosis (upper right quadrant; UR) exhibit positive for both annexin V-FITC & PI. (**A**); control: (**B**); MeHgCl (2 μM) only: (**C**); concurrently exposed to MeHgCl (2 μM) plus selenium (8 μM): (**D**); pretreated with selenium (2 μM) for 24 hr prior to MeHgCl (2 μM): (**E**); pretreated with selenium (8 μM) for 24 hr prior to MeHgCl (2 μM) plus selenium: (**F**); pretreated with MeHgCl (2 μM) for 24 hr prior to selenium (2 μM).

### 5. 셀레늄이 유기수은에 의해 유도된 세포막의 지질구성 변화에 미치는 영향

Annexin V-FITC를 이용하여 PS가 세포막 바깥으로 이동하는지를 조사한 결과 단독으로 유기수은만을 첨가한 군(Fig. 8B), 셀레늄 전처리하고 24시간 후에 단독으로 유기수은만을 처리한 군(Fig. 8D)과 유기수은을 전처리하고 24시간 후에 셀레늄을 처리한 군(Fig. 8F)은 대조군(Fig. 8A)에 비해 annexin V-FITC에 강하게 결합함을 알 수 있었다. 반면 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군(Fig. 8C)과 셀레늄을 전처리하고 24시간 후에 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군(Fig. 8E)은 대조군과 비슷하게 annexin V-FITC에 결합함을 알 수 있었다.

세포에 annexin V-FITC 와 PI 염색을 한 다음 apoptosis를 측정한 결과 대조군은 전체 세포의 5.3%(LR)만 annexin V-FITC에 결합했으며(Fig. 9A), 단독으로 유기수은만을 첨가한 군은 전체 세포의 43.01%(LR)가 annexin V-FITC에 결합함으로써 apoptosis를 급격하게 증가시켰다(Fig. 9B). 한편 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군과 셀레늄을 전처리하고 24시간 후에 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군은 각각 전체 세포의 13.15%(LR)와 12.77%(LR)만이 annexin V-FITC에 결합함으로써 유기수은에 의해서 유도되는 apoptosis를 현저하게 감소시켰다(Fig. 9C, E). 이와 대조적으로 셀레늄 전처리하고 24시간 후에 단독으로 유기수은만을 처리한 군과 유기수은을 전처리하고 24시간 후에 셀레늄을 처리한 군은 각각 전체 세포의 39.94%(LR)와 45.02%(LR)가 annexin V-FITC에 결합함으로써 유기수은에 의해 유도되는 apoptosis를 감소시키지 못하였다(Fig. 9D, F).

## 고 찰

수은을 비롯한 중금속의 세포독성 효과에 대해서는 상당히 많은 연구들이 보고되어 있는 반면 계획되어진 세포사, 즉 apoptosis의 유도자로서 세포 손상과 죽음에 대한 수은의 역할과 기전에 대한 연구는 미비한 실정이다. 최근에서야 카드뮴이나 수은과 같은 중금속에 노출된 임파구나 대식세포들이 apoptosis와 관련된 세포사의 전형적인 기능적, 형태학적 특징을 동반한다는 연구 결과들이 제시되면서 중금속이 apoptosis에 미치는 영향과 유도 기전에 대한 연구에 많은 관심이 집중되고 있다(Close 등, 1999; Gasso 등, 2001; Oyama 등, 2000).

수은의 세포독성 표적기관은 미토콘드리아라고 보고되어 있으며 apoptosis 유도기전에 있어서도 미토콘드리아가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Chio 등 1996; Dare 등, 2001; Insug 등, 1997; Shenker 등, 1999). 이 연구에서도 유기수은의 세포독성작용의 한 부분인 미토콘드리아 손상이 일어나는지를 MTT assay를 통해 조사한 결과 유기수은은 농도 의존적으로 미토콘드리아의 기능 장애를 가져옴으로써 세포독성 효과를 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 미토콘드리아의 기능 감소는 apoptosis가 나타나는 세포에서 일어나는 극심한 기능적 변화들 중의 하나라는 연구보고(Madesh 등, 1999; Nakatani 등, 2000; Shenker 등, 1998)와 일치하였다.

인체 내에서 셀레늄은 필수 미량금속으로서 결핍시 근육의 퇴행성 변화를 유발하고 간 괴사와 생식능 저하 등을 일으키며 이와 반대로 과다 섭취는 탈모, 소화기계의 이상, 관절 이상, 피부나 치아의 변색, 선천성 기형유발 등의 중독증상을 나타내는 것으로 알려져 있다(Shanker 등 1996; Shuhei 등, 2000; Tsutomu 등, 1997). 셀레늄 자체는 다른 중금속들과 비교하여 세포독성이 약하지만 중독시 DNA 손상과 자매 염색분체(sister-chromatid exchange, SCE)의 발생빈도를 높여 발암(carcinogenesis)과 변이원성(mutagenesis)을 나타내기도 한다(Shen 등, 2001; Tsutomu 등, 1997). 셀레늄은 중금속과 같이 생체내에서 미량으로 존재하여 수은을 비롯한 중금속의 세포독성에 대해 방어효과를 나타내는 것으로 알려져 있는데 이러한 방어효과에 대한 기전으로는 여러 가지가 제안되고 있다. 첫째, 현재 selenoprotein으로 알려져 있는 GPx와 Trx같은 셀레늄 의존성 효소의 활성을 증가시킴으로써 항산화 작용을 상승시켜 세포 독성을 저해한다고 보고하고 있다(Lianfgwei 등, 2000; Madiha 등, 2000; Shuhei 등, 2000). 둘째, 수은과 셀레늄의 복합체(Hg-Se complex)형성 즉,

glutathionine에 의해서 selenite($SeO_3^{2-}$)로부터 환원된 selenide($Se^{2-}$)가 수은과 셀레늄의 복합체를 형성하기 위해 수은에 결합함으로써 수은에 의한 세포막 손상 저해와 물질대사에 관여하는 효소들의 활성을 저해한다고 알려져 있다(Shanker 등, 1996; Wang 등, 2001; Yoneda 등, 1997). 셋째, 셀레늄과 셀레늄 합성물은 단백질의 중요한 sulfhydryl group과 반응함으로써 세포 신호 전달 단백질(cell signaling protein), 전사요소(transcription factor) 또는 세포 주기 조절 단백질(cell cycle regulatory protein)의 기능을 조절한다고 알려져 있는데 수은이 결합하여 세포 독성을 유발한다고 알려져 있는 결합부위(binding sites)에 셀레늄이 경쟁적으로 결합함으로써 수은에 의한 세포 독성을 억제한다고 한다(Yoneda 등, 1997; Park 등, 2000; Wang 등, 2001). 본 연구의 결과 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군은 유기수은에 의한 세포독성을 셀레늄의 농도 의존적으로 감소시켰으나 셀레늄을 전 처리 한 후에 단독으로 유기수은만을 처리한 군과 유기수은을 전처리 한 후에 셀레늄을 처리한 군은 유기수은에 의한 세포독성을 감소시키지 못했다. 또한 셀레늄이 유기수은에 의해 유도되는 apoptosis에 미치는 영향을 조사한 결과, 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군은 핵 형태 변화, DNA 분절과 세포막 지질구조에 있어서 대조군과 같은 양상을 보인 반면 셀레늄을 전 처리 한 후에 단독으로 유기수은만을 처리한 군과 유기수은을 전처리 한 후 셀레늄을 처리한 군은 수은에 의한 apoptosis를 감소시키지 못했다. 이러한 결과는 고래세포(cetacean cell)에서 수은과 셀레늄의 동시 처리가 apoptosis와 세포 증식과 관련된 수은의 독성을 감소시켰다는 보고(Imura 등, 1983; Morimoto 등, 1982; Yoneda 등, 1997)와 일치하는 결과라고 할 수 있다. 더 나아가 셀레늄을 전 처리 한 후에 단독으로 유기수은만을 처리한 군과 유기수은을 전처리 한 후 셀레늄을 처리한 군에서와 같이 셀레늄 전 처리로는 세포 손상과 apoptosis에 대한 방어 역할을 할 수 없으며, 이미 유기수은에 의해 내재된 세포 손상 및 apoptosis를 전혀 복구하지 못했다. 이러한 사실은 셀레늄의 방어효과가 GPx의 활성에 의한 항산화작용이나 결합부위 경쟁에 의한 방어기전 보다는 셀레늄이 유기수은과 반응하여 복합체를 형성함으로써 수은에 의한 세포막 단백질 sulfhydryl group의 결합에 의한 세포막 손상 및 미토콘드리아 내막에 존재하는 세포 내 활성산소 해독에 관여하는 여러 효소와의 결합으로 인한 산화적 스트레스 유발을 차단함으로써 결과적으로 수은에 의해 유도되는 apoptosis에 방어 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

## 요 약

**목적**: 이 연구는 수은의 세포 독성에 대하여 방어 효과를 나타낸다고 알려진 셀레늄이 수은에 의해서 유도되어지는 apoptosis에 미치는 영향을 파악하고자 실시하였다.

**방법**: 수은의 세포독성을 알아보기 위하여 MTT를 이용, 미토콘드리아 내의dehydrogenase 활성을 측정하였다. 또한 Hoechst-33258과 PI를 이용한 핵 염색, TdT를 이용한 dUTP-FITC nick-end labeling(TUNEL) 방법 및 Flow cytometry를 이용하여 apoptosis를 관찰하였다.

**결과**: 유기수은은 농도 의존적으로 세포독성 효과를 나타냈으며, 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군은 유기수은에 의한 세포독성을 셀레늄의 농도 의존적으로 감소시켰으나 셀레늄을 전 처리 한 후에 단독으로 유기수은만을 처리한 군과 유기수은을 전처리 한 후 셀레늄을 처리한 군은 유기수은에 의한 세포독성을 감소시키지 못했다.

DNA 유전분석과 Hochest 33258 및 PI 염색을 이용한 핵 형태 분석을 통해 DNA laddering과 핵 응축 그리고 apoptotic body를 확인하여 유기수은에 의해서 apoptosis가 유도된다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 annexin V-FITC를 이용한 세포막 지질 구조 변화에서도 유기수은을 처리한 군에서 PS에 대한 annexin V의 강한 결합에 따라 유기수은에 의해 유도되는 apoptosis를 확인할 수 있었다.

셀레늄이 유기수은에 의해 유도되는 apoptosis에 미치는 영향을 조사한 결과, 유기수은과 셀레늄을 동시에 처리한 군은 핵 형태 변화, DNA 분절과 세포막 지질구조에 있어서 대조군과 같은 양상을 보인 반면 셀레늄을 전 처리 한 후에 단독으로 유기수은만을 처리한 군과 유기수은을 전처리 한 후 셀레늄을 처리한 군은 수은에 의한 apoptosis를 감소시키

지 못했다.

**결론**: 이상의 결과는 셀레늄이 유기수은과 반응하여 복합체를 형성함으로써 수은에 의한 세포막 단백질 sulfhydryl group의 결합에 의한 세포막 손상 및 미토콘드리아 내막에 존재하는 세포 내 활성산소 해독에 관여하는 여러 효소와의 결합 등으로 인한 산화적 스트레스 유발을 차단함으로써 유기수은에 의해 유도되는 세포독성 및 apoptosis에 방어 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

## 참고문헌


Abedi-Balugerdi M, Hu H and Moller G. Mercury-induced antinucleolar autoantibodies can transgress the membrane of living cells in vivo and in vitro. Int Immunol 1999;11(4):605-15.

Brune B, Gotz C, Meβmer UK, Sandau K, Hirvonen MR and Lapetina EG. Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. J Biol Chem 1997; 272(11):7253-8.

Chio BH, Yee S and Robles M. The effects of glutathione glycoside in methyl mercury poisoning. Toxcol Appl Pharmacol 1996;141:357-64.

Chwan-Li Shen, Woosun Song, Pence BC. Interactions of Selenium Compounds with Other Antioxidants in DNA Damage and Apotosis in Human Normal Keratinocytes. Cancer Epidemiology, Biomakers & Prevention. 2001;10:385-90.

Ciriolo MR, Aquilano K, Martino AD, Carri MT and Rotilio G. Differential role of superoxide and glutathione in S-nitrosoglutathione-mediated apoptosis: a rationale for mild forms of familial amyotrophic lateral sclerosis associated with less active Cu, Zn superoxide dismutase mutants. J Neurochem 2001;77:1433-43.

Close AH, Guo TL and Shenker BJ. Activated human T lymphocytes exhibit reduecd susceptibility to methylmercury chloride-induced apoptosis. Toxicol Sci 1999;49:68-77.

Dare E, Li W, Zhivotovsky B, Yuan X and Ceccatelli S. Methylmercury and $H_2O_2$ provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis. Free Radic Biol Med 2001;30(12):1347-56.

Gasso S, Cristofol RM, Selema G, Fosa R, Rodriguez-Farre E and Sanfeliu C. Antioxidant compounds and $Ca^{2+}$ pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chloride neurotoxicity. J Neurosci Res 2001;66:135-45.

Guo TL, Miller MA, Datar S, Shapiro IM, and Shenker BJ. Inhibition of Poly(ADP-ribose) Polymerase Rescues Human T Lymphocytes from Methylmercury-Induced Apoptosis. Toxicol Appl Pharmacol 1998;152:397-405.

Guo TL, Miller MA, Shapiro IM, Shenker BJ. Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: evidence of mitochondrial dysfunction. Toxicol Appl Pharmacol 1998;153(2):250-7.

Hart BA, Lee CH, Shukla GS, Shukla A, Osier M, Eneman JD and Chiu JF. Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the paricipation of oxidant stress. Toxicology 1999;133:43-58.

Helmy MH, Ismail SS, Fayed H, El-bassiouni EA. Effect of selenium supplementation on the activities of glutathione metabolizing enzymes in human hepatoma Hep G2 cell line. Toxicology 2000;144:57-61.

Hortelano S, Alvarez AM and Bosca L. Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. FASEB J 1999;13:2311-7.

InSug O, Katar S, Koch CJ, Shapiro IM and Shenker BJ. Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. Toxicol 1997;124:211-24.

Jiang Y and Moller G. In vitro effects of $HgCl_2$ on murine lymphocytes. II. Selective activation of T cells expressing certain V beta TCR. Int Immunol 1996;8:1729-36.

Jung U, Zheng X, Yoon SO and Chung AS. Se-Methylselenocysteine induces apoptosis mediated by reactive oxygen species in HL-60 cells. Free Radic Bio Med 2001;31:479-89.

Lewin MH, Arthur JR, Riemersma RA, Nicol F, Walker SW, Millar EM, Howie QF and Beckett GJ. Selenium supplementation acting through the induction of thioredoxin reductase and glu-

tathione peroxidase protects the human endothelial cell line EZhy926 from damage by lipid hydroperoxides. Biochimica et Biophysica Acta 2002;1593:85-92.

Madesh M, Remachandran A and Balasubramanian KA. Nitric oxide prevents anoxia-induced apoptosis in colonic HT29 cells. Arch of Bioch and Biophys 1999;366(2):240-8.

Morimoto K, Iijima S and Koiqumi A. Selenite prevents the induction of sister-chromatid exchanges by methly mercury and mercuric chloride in human whole-blood cultures. Mutat Res 1982;102:183-92.

Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by $CD^{4+}$ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. J Immunol 1998;160(11):5347-54.

Nakatani T, Tawaramoto M, Kennedy DO, Kojima A and Matsui Yuasa I. Apoptosis induced by chelation of intracellular zinc is associated with depletion of cellular reduced glutathione level in rat hepatocytes. Chem-Biol Interactions 2000;125:151-63.

Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW and Varden D. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. Kidney Int 1996; 50:1032-43.

Oyama Y, Yamazaki Y, Okada Y, Takahama K, Satoh M and Hayashi H. Toxicity of methylmercury conjugated with L-cysteine on rat thymocytes and human leukemia K562 cells in comparison with that of methylmercury chloride. Environ Toxicol Pharmacol 2000;9:49-55.

Park HS, Park E, Kim MS, Ahn K, Kim IY, Choi EJ. Selenite Inhibits the C-Jun N-terminal Kinase/Stress-activated Protein Kinase (JNK/SAPK) through a Thiol Redox Mechanism. The Journal of Biological Chemistry. 2000; 275(4);2527-31.

Romamoorthy L and Tizard IR. Induction of Apoptosis in a Macrophage Cell Line RAW264.7 By Acemannan, a β(1,4)-Acetylated Mannan. Mol Pharmacol 1998;53:415-21.

Shanker K, Mishra S, Srivastava S, Srivastava R, Dass S, Prakash S, Srivastava MM. Study of Mercury-Selenium(Hg-Se) Interactions and their Impact on Hg Uptake by the Radish (Raphanus sativus) Plant. Food and Chem. Toxicol. 1996;34:883-6.

Shen HM, Ding WX, and Ong CN. Intracellular Glutathione is a Cofactor in Methylseleninic Acid-Induced Apoptotic Cell Death of Human Hepatoma HEPG2 Cells. Free Radical Biology & Medicine 2002;33(4):552-61.

Shenker BJ, Guo TL, and Shapiro IM. Low-Level Methylmercury Exposure Causes Human T-Cells to Undergo Apoptosis: Evidence of Mitochondrial Dysfunction. Environ Res Section A 1998;77: 149-59.

Shenker BJ, Guo TL, Insug O and Shapiro IM. Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: Temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. Toxicol Appl Pharmacol 1999;157:23-35.

Shenker BJ, Guo TL and Shapiro IM. Mercury-Induced Apoptosis in Human Lymphoid Cells: Evidence That the Apoptotic Pathway Is Mercurial Species Dependent. Environ Res Section 2000;84:89-99.

Sakaguchi S, Iizuka Y, Frrusawa S, Tanaka Y, Takayanagi M, Takayangagi Y. Foles of selenium in endotoxin-induced lipid peroxidation in the rats liver and in nitric oxide production in J774A.1 cells. Toxicology Letters. 2000;118:69-77.

Stokes AH, Lewis DY, Lash LH, Jerome WG 3rd, Grant KW, Aschner M, Vrana KE. Dopamine toxicity in neuroblastoma cells: role of glutathione depletion by L-BSO and apoptosis. Brain Res 2000;858(1):1-8.

Urano T, Imura N, and Naganuma A. Inhibitory Effect of Selenium on Biliary Secretion of Methyl Mercury in Rats. Biochemical and Biophysical Research Communications 1997;239: 862-7.

Wang A, Barber D, Pfeiffer CJ. Protective Effects of Selenium Against Mercury Toxicity in Cultured Atlantic Spotted Dolphin(Stenella plagiodon) Renal Cells. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2001;41:403-9.

Wild LG, Ortega HG, Lopez M and Salvaggio JE. Immune System Alteration in the Rat after Indirect Exposure to Methyl Mercury Chloride or Methyl Mercury Sulfide. Environ Res 1997;74: 34-42.

Yoneda S, Susuki KT. Detoxification of mercury

by selenium by binding of equimolar Hg-Se complex to a specific plasma protein. Toxicol Appl Phamacol 1997;143:274-80.

Zeng H. Selenite and Selenomethionine Promote HL-60 Cell Cycle Progression. The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr. 2002; 132:674-9.

Zhong L and Holmgren A. Essential Role of Selenium in the Catalytic Activities of Mammalian Thioredoxin Reductase Revealed by Characterization of Recombinant Enzymes with Selenocysteine Mutations. The journal of Biological chemistry 2000;275(24):18121-8.

Zhong W and Oberley TD. Redox-mediated Effects of Selenium on Apoptosis and Cell Cycle in the LNCaP Human Prostate Cancer Cell Line. Cancer research 2001;61:7071-8.