대한산업의학회지 제 15 권 제 1 호 (2003년 3월)
Korean J Occup Environ Med, 2003;15(1):61-71

NO 및 H_2O_2가 니켈의 세포독성에 미치는 영향

원광대학교 의과대학 예방의학교실, 전북대학교 의과대학 예방의학교실[1)]

오경재, 권근상[1)]

— **Abstract** —

Effect of Nitric Oxide (NO) or Hydrogen Peroxide (H_2O_2) in the Nickel Induced cytotoxicity in RAW 264.7 Cell

Gyung-Jae Oh, Keun-Sang Kwon[1)]

Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine Wonkwang University, Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine Chonbuk National University[1)]

Objectives: Nickel (Ni) is present in many industrial working environments and consumer products, and is one of the leading cause of allergic contact dermatitis, which is a typical delayed (type IV) hypersensitivity reaction. However, the mechanism by which nickel causes this pathology is not well known. The contact dermatitis induced by nickel is mediated, primarily, through macrophages. This property was similar to autotoxicity related nitric oxide (NO) production. NO mediated cytotoxicity was dependent on both H_2O_2 and peroxynitrite ($OONO^-$). The purpose of this study was to elucidate the role of NO/H_2O_2 in the cytotoxicity induced by nickel. Therefore, this study was designed to examine whether nickel could modulate NO/H_2O_2 production and how the Ni may affect ATP production, intracellular GSH level, and cell viability.

Methods: This study was based on the observations of cultures of RAW 264.7 cells, which originated from a tumor in a Balb/c mouse that had been induced by the Abelson murine leukemia virus. RAW 264.7 cells were treated with either Ni, N-monomethyl-L- arginine (NMLA), catalase, and DTT for 24-72 h. The cytotoxicity of the nickel was measured via the cell viability and NO_2^-, H_2O_2, GSH, and the mitochondrial function was evaluated by the adenosine triphosphate (ATP) production in the RAW 264.7 cells.

Results: The NO_2^- synthesis of RAW 264.7 cells increased with the increase in concentrations of Ni up to 50- μM, after 24 and 48 h of exposure, but then decreased at concentrations greater than 50- μM, and with time periods exceeding 48 h. In contrast, viability of cells and intracellular GSH level decreased in the presence of Ni in a dose and time dependent manner. However, the H_2O_2 synthesis of RAW 264.7 cells was not changed in the all experimental conditions.

The NO_2- synthesis of the cells was higher than control, whereas ATP, GSH and viability were lower than control in addition of Ni and the pretreatment of catalase or DTT prior to addition of Ni.

Conclusions: These results suggest that NO plays an important role in the cytotoxicity of Ni. Cytotoxicity of Ni may exert through modulation of NO production and associate with a decrease in intracellular GSH levels.

Key Words: Ni, NO, H_2O_2, NMLA, GSH, ATP, RAW 264.7 cell

<접수일: 2003년 1월 7일, 채택일: 2003년 2월 19일>
교신저자: 오 경 재 (Tel: 063-850-6781) E-mail: pmokj@wonkwang.ac.kr
* 이 연구는 2002년도 원광대학교의 교비지원을 받아 수행하였음.

서 론

니켈은 인체에 필요한 필수미량원소이면서 과량이 흡수되거나 노출되면 지연성 과민반응(type IV hypersensitivity)의 일종인 접촉성 피부염 및 자극 증상을 일으키는 대표적인 금속으로서, 최근 인체내에 삽입되는 의료용 합금의 생산 및 산업분야에서의 사용증가로 인체폭로 또한 증가하고 있다(Lacy 등, 1996; Ermoli 등, 2001). 이에 따라 니켈에 대한 독성연구가 활발히 진행되고 있다.

생체의 면역체계에 영향을 미치는 금속은 최근 면역반응의 지표로 알려진 nitric oxide(NO)와 밀접한 관련성이 존재한다고 보고되고 있다(Evans, 1993; Tian과 Lawrence, 1996). 또한 병원체의 침입에 의한 염증반응에서, T-세포에서 분비되는 IL-1, TNF 등과 같은 cytokines의 분비에 의해 대식세포의 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 활성화되어 대량 생성된 NO가 세포독성을 일으키므로써 면역기능을 수행한다(Snyder와 Bredt, 1992). 이러한 과정은 니켈이라는 항원에의 노출로 자극된 T-세포가 분비하는 IL-1, TNF 등과 같은 cytokine이 대식세포를 활성화시켜 염증반응이 나타나는 전형적인 대식세포 매개형 지연성 과민반응의 과정(Roitt 등, 1989; Veronesi, 1998)과 흡사하다. 또한 일부 연구보고에서는 니켈이 대식세포의 NO 생성을 증가시키는 것으로 보고하고 있어 (Tian과 Lawrence, 1996), 일종의 면역반응인 지연성 과민반응(type IV hypersensitivity)을 나타내는 것으로 알려진 니켈(Lacy 등, 1996)의 세포독성 또한 NO와 밀접한 관련성이 있을 개연성이 있을 것으로 사료된다. 그러나 이러한 연구들은 니켈에 의한 세포독성에 있어서 염증반응 유발과정이나 관련 매개물질에 대해서는 정확히 제시하지 못하고 있다.

한편, NO의 세포독성에 대한 그간의 연구들은, 활성화된 대식세포(activated macrophage)가 동시에 생성하는 NO와 superoxide(O_2^-)가 결합하여 형성된 peroxinitrite(^-OONO)에 의해 매개되는 것으로 보고하고 있다(Ischiropoulus 등, 1992; Huie와 Padmaja, 1993). 이렇게 형성된 ^-OONO는 일종의 자유기(free radical)로서 세포막의 지질 과산화(lipid peroxidation)의 촉진(Radi 등, 1991a) 및 ironsulfur(Fe-S)결합체를 갖는 효소 등의 분자구조에 반응하여 iron-sulfur-nitrosyl 복합체를 형성하므로써 효소의 기능을 억제(Radi 등, 1991b; Kolb와 Kolb-Bachofen, 1992; Snyder와 Bredt, 1992)하여 세포막이나 세포소기관막에 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 보고와는 다르게 일부 대식세포를 대상으로 연구한 보고들에서는, NO의 세포독성은 ^-OONO보다는 superoxide dismutase(SOD)에 의해 O_2^-로부터 전환되는 hydrogen peroxide(H_2O_2)와의 상호작용에 의해 유발된다(Stamler 등, 1992)거나, 대식세포에 의한 NO 생성시 전구물질인 L-arginine이 부족한 경우에는 iNOS가 H_2O_2의 생산을 증가시킨다 (Pou 등, 1992)고 보고되고 있어 NO의 세포독성에는 직·간접적으로 H_2O_2가 관련되어 있음을 제시하고 있다.

이에 본 연구에서는 RAW 264.7 cell의 배양조건에 니켈, iNOS의 competitive inhibitor인 N^G-monomethyl-L-arginine(NMLA)(Hibbs 등, 1987; Moncada 등, 1991; Green과 Nacy, 1993), antioxdant인 catalase, 그리고 GSH 보호물질인 DTT를 여러 조건으로 처리하여 NO 및 H_2O_2 생성의 변조유무 및 이와 관련된 ATP 생성, 세포 내 GSH 및 세포생존율의 변조양상을 관찰하므로써 니켈의 세포독성을 매개하는 물질을 파악하고 그 기전을 제시하고자 한다.

대상 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서는 NO의 생성정도를 보고자 RAW 264.7 세포를 이용하였다.

이 연구에서 이용하고 있는 RAW 264.7 cell은 Balb/c 마우스의 복강내에 Abelson leukemia virus(A-MuLV)를 주입하여 발생시킨 대식세포주로서 IL-1 또는 INF-γ 등과 같은 cytokine의 자극만으로도 스스로 NO를 생성하는 특성을 가지고 있어 일반적으로 세포독성을 갖는 물질들의 독성검정을 위해 유용하게 사용되고 있다(Lewis 등, 1995; Wang 등, 1995; Hon 등, 1997).

세포독성의 정도는 세포생존율 및 NO와 ATP 생성의 변화를 관찰하여 알아보았으며 NO의 측정은 반감기가 매우 짧은 특성 때문에 안정한 대사물인 NO_2^-를 측정하므로써 정량적으로 유추하였다.

2. 실험방법

1) RAW 264.7 세포의 준비

동결보관중인 RAW 세포를 37~38℃의 수조에서 가온하여 빙결상태가 풀린 세포부유액을 20 ml DMEM에 옮겨 원심 후 세척하는 과정을 2회 반복하고, 10% FCS-DMEM을 첨가한 배양병에서 1×10^5/ml의 밀도로 2~3회 정도 계대한 후 실험에 사용하였다.

실험에서의 기본 배양조건은 10% FCS를 포함한 DMEM이었으며, 세포에서 다량의 NO 생성을 유도하기 위해서 기본배양조건에 40 U/ml의 interleukin-1α(rMu IL-1α, Sigma Chemical Co.)와 20 U/ml 농도의 interferon-γ(rMu IFN γ, Sigma Chemical Co.)을 첨가하였다.

2) 배양조건

대조군은 RAW 264.7 세포의 기본배양조건이며, 여기에 상기 농도의 cytokines(IL-1과 IFN-γ) 및 니켈($NiCl_2$, Sigma Chemical Co.)을 여러 농도(0, 25, 50, 100, 150 μM)로 첨가하여 12, 24, 48, 72 시간을 배양하였다.

iNOS inhibitor인 N^G-monomethyl-L-arginine(NMLA, 100 μM, Sigma Chemical Co.) 및 antioxidants인 catalase(400 U/ml, Sigma Chemical Co.), GSH protector인 DTT를 6 시간동안 전처치한 후 니켈(50 μM)을 첨가하여 48시간을 배양하였다.

3) 세포생존율 검사

배양이 끝난 후 RAW 264.7 세포의 생존율은 trypan-blue dye exclusion 방법(Phillips, 1973)에 의해 관찰하였다.

4) NO_2^-의 정량

Hibbs 등(1987)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 배양액 50 μl씩을 취해 microtiter plate에 옮기고 100 μl의 Griess reagents(1:1 mixture of 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in 60% acetic acid, and 1% sulfonilamide in 30% acetic acid)를 혼합하여 실온에서 교반한 후, 분홍의 발색을 확인하고 543 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 0~100 μM의 sodium nitrate($NaNO_2$)를 반응시킨 흡광도에 의한 표준곡선으로부터 NO_2^- 농도를 구하였다.

5) H_2O_2의 정량

H_2O_2는 Heinzel 등(1992)이 기술한 방법을 이용하여 측정하였다. 상층액에 HCL을 넣고 교반 후 10 mM ferrous ammonium sulphate 20 μl와 2.5 M potassium thiocyanate 30 μl를 첨가하고 10분 간 반응시킨 후 495 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) GSH 정량

세포내 GSH농도 측정은 GSH assay kit(Calbiochem, USA; cat. #354102)을 이용하여 분광광도계에서 흡광도를 측정하였다. 배양된 세포를 수거하여 500×g, 4℃에서 5분간 원심분리한 후 초음파분쇄기를 이용하여 세포를 파괴시킨 다음 10,000×g, 4℃에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 상층액과 동량의 10% metaphosphoric acid(MPA)를 혼합하여 다시 10,000×g, 4℃에서 8분간 원심분리한 다음 상층액에서 GSH assay kit를 이용하여 GSH을 측정하였다.

7) ATP 정량

배양이 끝난 세포를 원심하여 PBS(pH 7.4)로 세척한 후, 여기에 6%의 trichloroacetic acid(TCA) 200 μl를 첨가하여 초음파분쇄기(ultrasonicator)를 이용하여 세포를 파괴시켰다. 이를 4℃, 1,200 rpm의 조건으로 10분간 원심하여 얻은 상층액 20 μl에 100 mM glycine 80 μl를 첨가한 다음, HEPES buffer 2 ml에 녹인 luciferase 5 mg을 혼합하여 luciferase와 ATP의 반응에 따른 발광정도를 luminometer로 측정하였다.

3. 통계처리

측정자료들의 대조군과의 차이는 SPSS(ver.

10.0)을 이용하여 t-test를 실시하여 비교하였다.

결 과

1. 배양시간별 RAW 264.7 세포의 NO_2^- 및 H_2O_2 생성능과 세포생존율

RAW 264.7 세포의 기본배양조건에 cytokines을 첨가한 후 배양했을 때, NO_2^- 생성능은 배양 후 48시간까지는 시간경과에 따라 직선적으로 증가하고 있으며, 배양 12시간 후의 측정치에 비해 48시간 째의 측정치는 2배 수준으로 현저하게 증가하였으며, 48시간 이후에는 그 생성량이 감소하여 초기 12시간의 값과 차이가 없었다(Fig. 1). 그러나 H_2O_2 생성량은 시간 경과와 무관하게 모든 시간대에서 차이가 없었다. 한편 동일 배양조건에서 세포생존율은 48시간까지는 평균 90% 이상을 유지하였으나, 48시간 이상의 배양결과에서는 그 생존율이 현저히 감소하였다(Fig. 2).

2. 니켈 첨가에 의한 RAW 264.7 세포의 NO_2^- 및 H_2O_2 생성능, 세포생존율과 세포내 GSH 농도의 변화

본 연구에서 이용된 농도의 니켈은 cytokines을 첨가하지 않은 배양 조건에서는 두 금속 모두 세포의 생존율 및 NO_2^- 생성에 영향을 주지 않았다 (data not shown).

한편 cytokines이 첨가된 배양조건에 여러 농도 (0~150 μM)의 니켈($NiCl_2$)을 첨가했을 때의 세포의 NO_2^- 생성능은 50 μM 농도 이하에서 니켈농도의 증가에 따라 용량의존적으로 증가하다가 100 μM 이상의 농도에서는 현저히 감소하는 경향을 보였다. 그러나 세포의 H_2O_2의 생성량은 니켈의 첨가와는 무관하여 니켈을 첨가한 모든 군에서 대조군과 차이가 없었다(Fig. 3). 동일 조건에서 세포생존율은 50 μM에서 80% 이상을 나타내고 있으나 , 100 μM 이상의 농도에서는 70% 이하의 생존율을 나타내었다 (Fig.4). 한편 동일 조건에서의 세포내 GSH 농도는 50 μM 이상의 니켈 첨가군에서 니켈을 첨가하지

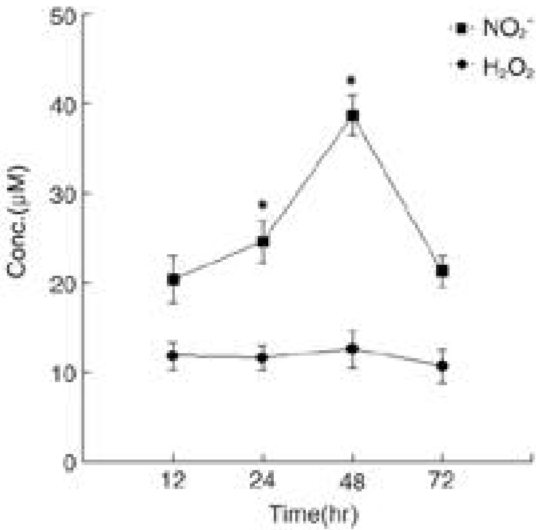

Fig. 1. The synthesis of NO_2^- and H_2O_2 from RAW 264.7 cells in DMEM containing 10% FCS and cytokines (IL-1 α40 U/ml and IFN- γ20 U/ml). NO_2^- were continuously measured at 12, 24, 48, and 72 hours after incubation. Values are expressed as mean±S.D. of three experiments. *Significantly different from the corresponding values for 12 hr at $p<0.05$ by t-test.

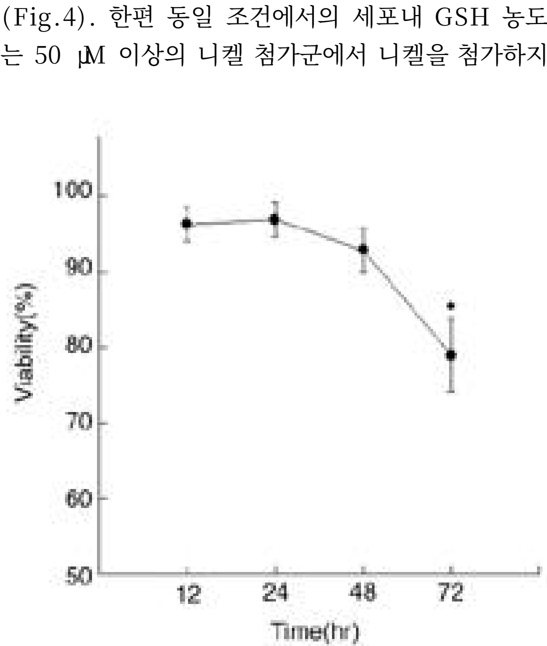

Fig. 2. The viability of RAW 264.7 cells in DMEM containing 10% FCS and cytokines (IL-1 α40 U/ml and IFN- γ20 U/ml). Viability were continuously measured at 12, 24, 48, and 72 hours after incubation. Values are expressed as mean±S.D. of three experiments. *Significantly different from the value for 12 hr at $p<0.05$ by t-test.

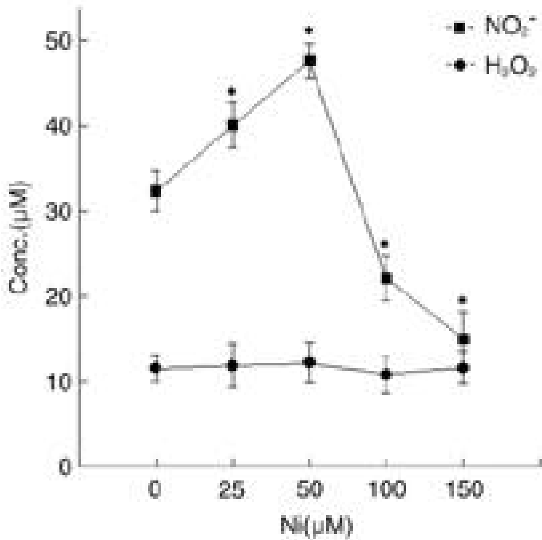

Fig. 3. The effect of $NiCl_2$ on synthesis of NO_2^- and H_2O_2 from RAW 264.7 cells which were cultured in DMEM containing 10% FCS, cytokines (IL-1 α40 U/ml and IFN- γ20 U/ml), and $NiCl_2$. Synthesis of NO_2^- and H_2O_2 were measured at 48 hours after incubation. Values are expressed as mean±S.D. of three experiments. *Significantly different from the corresponding values for 12 hr at $p<0.05$ by t-test.

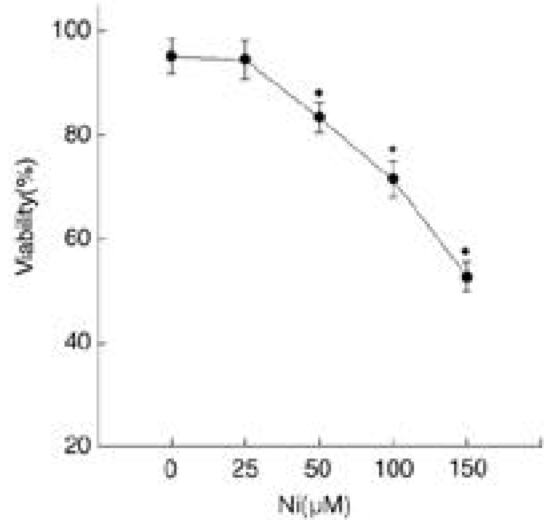

Fig. 4. The effect of $NiCl_2$ on viability of RAW 264.7 cells in DMEM containing 10% FCS, cytokines (IL-1 α40 U/ml and IFN- γ20 U/ml), and NiCl2. Viability were measured at 48 hours after incubation. Values are expressed as mean±S.D. of three experiments. *Significantly different from the control value at $p<0.05$ by t-test.

않은 대조군보다 현저히 낮게 나타났다(Fig. 5).

이상의 결과로부터, 니켈에 의한 세포독성 발현기전에서의 NO 및 H_2O_2의 역할을 알아보기 위한 다음의 연구결과는 NO_2^- 생성율이 높게 유지되며 세포생존율 또한 높게 유지되는 50 μM 니켈, 48시간 배양 조건에서 실시하였으며, 이후의 독성평가는 니켈의 독성발현에 NO 및 H_2O_2의 기여여부를 확인하기 위해서 NOS의 competitive inhibitor인 NMLA(N^G-monomethyl-L-arginine)와 H_2O_2를 H_2O 및 O_2로의 전환을 촉매하는 catalase를 전처리하였으며, lipid peroxidation에 의한 세포독성의 효과를 확인하기 위해서는 이에 대해 방어작용을 하는 glutathione(GSH)의 보호물질인 dithiotreitol(DTT)를 전처리하였다.

또한, NO의 독성 발현이 궁극적으로 ATP 생성억제와 관련이 있으므로 직접 ATP를 측정하여 세포독성 여부를 알아보았다.

3. NMLA, catalase 및 DTT 전처리에 의한 NO_2^- 생성의 변화

RAW 264.7 세포의 기본배양조건에 cytokines (IL-1과 IFN-γ), NMLA(100 μM), catalase(400 U/ml), DTT(30 μM)을 전처리한 후 니켈(50 μM)을 첨가했을 때의 NO 생성량의 변화는 전반적으로 NO의 생성유도에 필수적으로 필요한 cytokines의 첨가로 NO생성을 현저하게 증가하였으며 cytokines의 첨가로 NO생성이 유도된 상태에서 니켈은 NO 생성을 더욱 증가시켰다. NMLA 전처리는 NO 생성을 NO 생성이 유도되지 않는 대조군 수준으로 감소시켰으며, catalase 전처리는 cytokines에 의해 대식세포가 활성화된 조건 및 이에 니켈을 첨가한 배양조건에서와 동일한 결과를 나타내었다. 한편 DTT의 전처리에서는 NO 생성량이 대조군보다는 현저히 증가하였지만 cytokine 첨가 및 니켈이 첨가된 조건보다는 감소하였다(Fig.6).

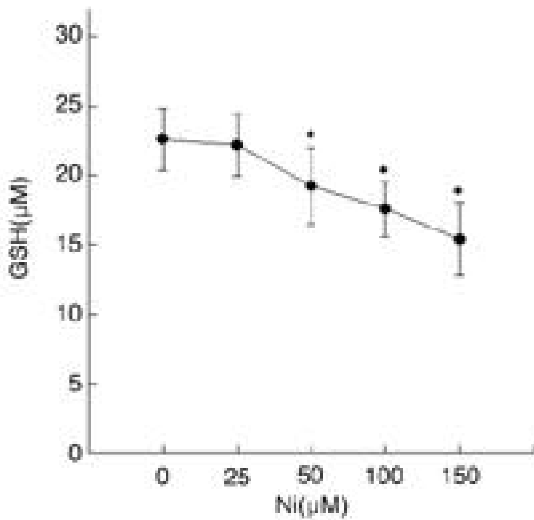

Fig. 5. The effect of $NiCl_2$ on the production of GSH from RAW 264.7 cells in DMEM containing 10% FCS, cytokines (IL-1 α40 U/ml and IFN- γ 20 U/ml), and NiCl2. The production of GSH were measured at 48 hours after incubation. Values are expressed as mean±S.D. of three experiments. *Significantly different from the control value at $p<0.05$ by t-test.

4. NMLA, catalase 및 DTT 전처리에 의한 H_2O_2 생성의 변화

H_2O_2 생성량은 모든 실험조건에서 큰 변화가 없었으며 대조군과 현저한 차이는 없었다(Fig. 7)

5. NMLA, catalase 및 DTT 전처리에 의한 세포내 GSH 농도의 변화

세포내 GSH 농도는 NO 생성이 억제된 NMLA 전처리나 GSH 보호물질인 DTT를 전처리한 조건에서 대조군과 같은 수준을 나타내고 있으나, NO가 고농도로 분비되는 조건, 즉, cytokine을 첨가한 실험조건이나 이 조건하에서 니켈 및 catalase를 첨가한 조건에서는 대조군보다 현저히 감소하였다(Fig. 8).

6. NMLA, catalase 및 DTT 전처리에 의한 세포내 ATP 농도의 변화

세포내 ATP 생성정도는 cytokines의 첨가 및 동

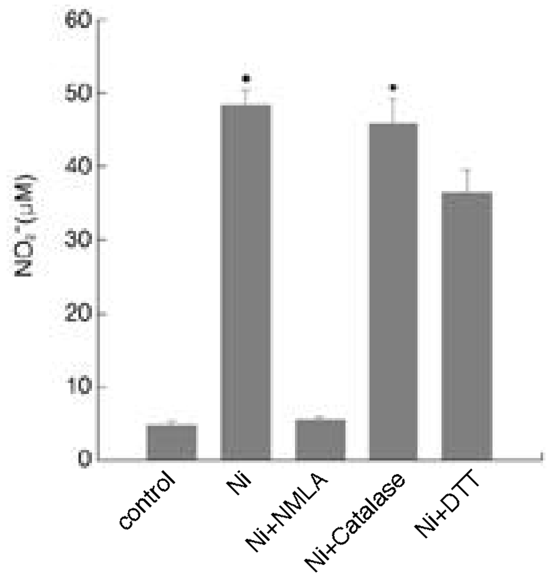

Fig. 6. The effect of $NiCl_2$, NMLA (N^G-monomethyl-L-arginine), catalase, and DTT (dithiotreitol) on synthesis of NO_2^- from RAW 264.7 cells. Cells were incubated with DMEM containing 10% FCS (control) and cytokines (IL-1 α40 U/ml and IFN- γ20 U/ml), NMLA (100 μM), catalase (400 U/ml), or DTT (30 μM) for 6 hours and then treated to $NiCl_2$ (50 μM) for another 48 hours. Values are expressed as mean±S.D. of three experiments. *Significantly different from the control value at $p<0.05$ by t-test.

일조건에 니켈 및 catalase를 첨가한 NO가 고농도로 분비되는 조건에서 대조군보다 감소하였으며, 특히, 니켈첨가 또는 catalase를 전처리한 경우 cytokine만을 첨가한 조건보다 ATP 생성을 더 감소시켰다. 한편, NMLA나 DTT의 전처리는 ATP 생성을 대조군 수준으로 회복시켰다(Fig. 9).

7. NMLA, catalase 및 DTT 전처리에 의한 세포생존율의 변화

세포생존율은 NO 생성(Fig. 6)과는 반대로 cytokine의 첨가 및 여기에 니켈 및 catalase를 첨가한 조건에서 대조군보다 현저히 감소하고 있으며, 니켈의 첨가로 cytokine만의 첨가시보다도 더 감소하였다. 한편, NMLA 또는 DTT를 전처리한 경우

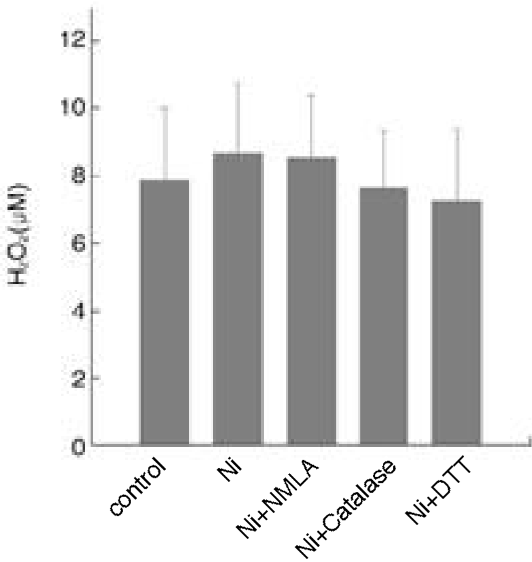

Fig. 7. The effect of $NiCl_2$, NMLA (N^G-monomethyl-L-arginine), catalase, and DTT (dithiotreitol) on synthesis of H_2O_2 from RAW 264.7 cells. Cells were incubated with DMEM containing 10% FCS (control) and cytokines (IL-1 α40 U/ml and IFN- γ20 U/ml), NMLA (100 μM), catalase (400 U/ml), DTT (30 μM) for 6 hours and then treated to NiCl2 (50 μM) for another 48 hours. Values are expressed as mean±S.D. of three experiments.

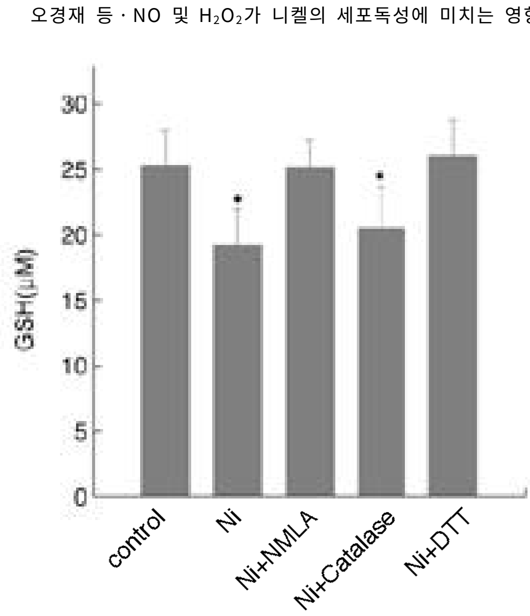

Fig. 8. The effect of $NiCl_2$, NMLA (N^G-monomethyl-L-arginine), catalase, and DTT (dithiotreitol) on the production of GSH (glutathion) from RAW 264.7 cells. Cells were incubated with DMEM containing 10% FCS (control) and cytokines (IL-1 α40 U/ml and IFN- γ20 U/ml), NMLA (100 μM), catalase (400 U/ml), DTT (30 μM) for 6 hours and then treated to $NiCl_2$ (50 μM) for another 48 hours. Values are expressed as mean ±S.D. of three experiments. *Significantly different from the control value at $p<0.05$ by t-test.

에서 대조군 수준으로 회복되어 90% 이상의 생존율을 나타내었다(Fig. 10).

고 찰

니켈은 의료분야나 시멘트 및 광산산업장과 용접작업 등을 통해서 인체폭로가 증가되고 있지만 니켈에 의한 염증반응은 항원으로 감작된 T 세포에서 분비된 림포카인이 대식세포를 활성화시켜 발생된다는 사실(Stohs와 Bagchi, 1995; Veronesi 등, 1998) 외에는 그 정확한 기전이나 관련물질에 대해서는 아직 밝혀지지 않고 있다. 그러나 최근의 연구에서 니켈이 염증반응에서 중요한 역할을 수행하는 대식세포의 NO 생성을 촉진한다(Tian과 Lawrence, 1996)거나 대식세포에 의한 NO 생성시 전구물질인 L-arginine이 부족한 경우에는 iNOS가 H_2O_2의 생산을 증가시킨다(Pou 등, 1992)고 보고되고 있어 니켈에 의한 세포독성에는 NO 및 H_2O_2와 같은 자유기가 직 · 간접적으로 관련되어 있을 개연성을 보여주고 있다. 따라서 니켈에 의한 NO 및 H_2O_2 생성의 변조유무, 이들 물질의 독성효과로 알려진 ATP 생성, 세포 내 GSH 또는 세포 생존율의 변화를 관찰한다면 니켈이 염증반응을 일으키는 기전 및 매개물질을 파악하는데 중요한 정보를 얻을 수 있을 것이다.

이 연구의 결과에서, 150 μM 이하 농도의 니켈은 cytokine을 첨가하지 않은 배양 조건, 즉 대식세포가 활성화되지 않은 조건에서는 세포의 생존율 및 NO 및 H_2O_2 생성에 영향을 주지 않았으나, 배양조건에 cytokine의 첨가로 RAW 264.7 세포를 활성화시킨 상태에서 니켈을 첨가시키면 NO 생성량은 시간경과에 따라 배양 48 시간까지 생성량이 현저히

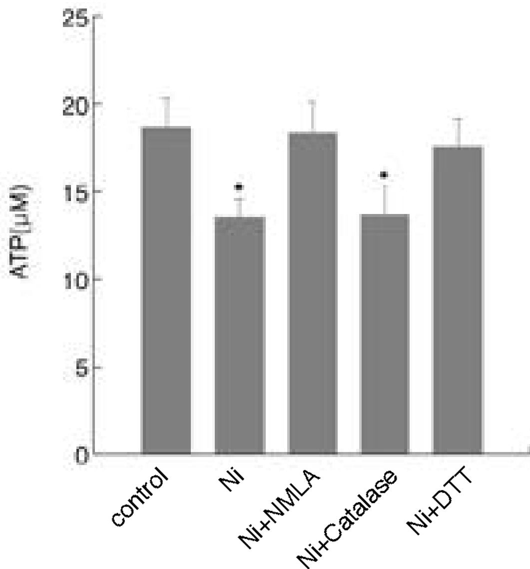

Fig. 9. The effect of $NiCl_2$, NMLA (NG-monomethyl-L-arginine), catalase, and DTT (dithiotreitol) on synthesis of ATP from RAW 264.7 cells. Cells were incubated with DMEM containing 10% FCS (control) and cytokines (IL-1 α40 U/ml and IFN- γ20 U/ml), NMLA (100 μM), catalase (400 U/ml), DTT (30 μM) for 6 hours and then treated to $NiCl_2$ (50 μM) for another 48 hours. Values are expressed as mean±S.D. of three experiments. *Significantly different from the control value at $p<0.05$ by t-test.

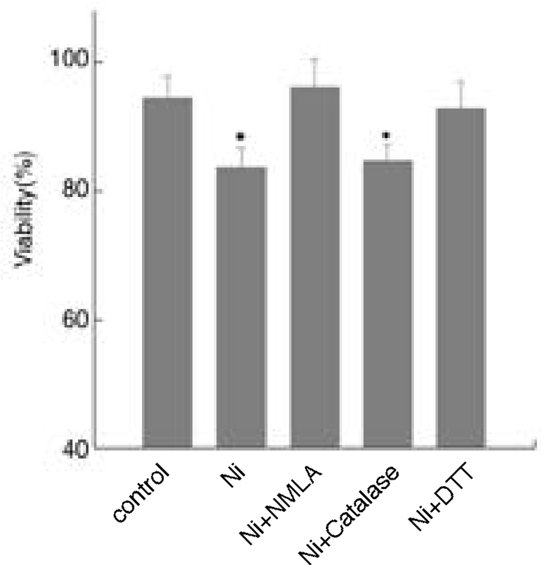

Fig. 10. The effect of $NiCl_2$, NMLA (NG-monomethyl-L- arginine), catalase, and DTT (dithiotreitol) on viability of RAW 264.7 cells. Cells were incubated with DMEM containing 10% FCS (control) and cytokines (IL-1 α40 U/ml and IFN- γ20 U/ml), NMLA (100 μM), catalase (400 U/㎖), DTT (30 μM) for 6 hours and then treated to $NiCl_2$ (50 μM) for another 48 hours. Values are expressed as mean±S.D. of three experiments. *Significantly different from the control value at $p<0.05$ by t-test.

증가하였다. 그러나 H_2O_2 생성량은 모든 실험조건에서 대조군의 수준과 차이를 나타내지 않았다. 따라서 니켈은 대식세포의 NO 생성을 증가시키지만 H_2O_2 생성에는 영향을 미치지 않으며, 니켈에 의한 NO 생성에는 cytokine의 유도되는 특정한 조건이 필요함을 확인할 수 있었다. 한편, 동일조건에서 배양 48 시간까지 생성량이 현저히 증가했던 NO는 이후 72 시간까지 현저히 감소하고 있는 데 이것은 생존율의 급격한 감소와 시간적으로 일치하고 있어 배양 상층액 내의 NO 축적량과 세포생존율의 감소사이에는 서로 상관성이 존재하는 것으로 보인다. 따라서 이 결과는 대식세포에서 고농도로 분비되는 경우 NO는 주위세포에 세포독성을 나타내는 특성(Green과 Nacy, 1993)때문에, 다량 생성된 NO는 세포들의 생존율을 낮추었을 것이고 이후 생존율의 급격한 감소에 따라 생존세포에 의한 NO 생성량 또한 감소한 결과로 여겨진다.

또한 각각의 실험 조건에서 ATP를 측정한 결과, NO가 고농도로 분비되는 조건, 즉, cytokine을 첨가한 실험조건이나 이 조건하에서 니켈 및 catalase를 첨가한 조건에서 대조군보다 현저히 감소하고 있어, NO의 독성 발현이 대부분 ATP 생성과 관련된 효소를 억제하므로써 나타난다(Kolb와 Kolb-Bachofen, 1992; Castro등, 1994)는 그 간의 연구결과들과 동일한 결과를 나타내었다.

한편, 니켈의 독성기전에서의 NO 및 H_2O_2의 역할을 알아보기 위한 실험에서, 니켈의 독성발현에 NO의 관련여부 및 H_2O_2만의 독성효과를 확인하기 위해서 iNOS의 competitive inhibitor인 NMLA를 전처리한 경우, 니켈의 첨가로 현저히 증가하였

던 NO 생성량은 대조군 수준으로 감소하였으며, H_2O_2 생성은 니켈 및 NMLA의 첨가와는 무관하게 대조군 수준을 유지하였다. 또한 니켈에 의해 감소했던 ATP 및 세포생존율은 대조군과 거의 같은 수준으로 회복되어 독성효과는 나타나지 않았다. 이 연구에서 배양과정에 전처리된 NMLA(NG-monomethyl-L-arginine)은 NO 생성에 필요한 subsrate인 L-arginine의 동류물질(analogues)로서 iNOS의 competitive inhibitor로 작용하므로 in vitro, in vivo에서 NO 생성을 억제하여 NO의 기능을 파악하고자 하는 경우 흔히 사용되며, cytokines에 의해 활성화된 대식세포에서 유발되는 iNOS의 가장 강력한 억제물질로 알려져 있다(Moncada 등, 1991; Green과 Nacy, 1993). 한편, H_2O_2를 H_2O 및 O_2로의 전환을 촉매하는 catalase를 전처리하여 세포에 대한 H_2O_2의 영향을 배제한 상태에서의 실험 결과는, NO 생성은 현저히 증가하였고 세포생존율 및 ATP 생성은 현저히 감소하는 등의 세포독성을 나타내고 있어 cytokines에 의해 대식세포가 활성화된 조건에 니켈을 첨가한 조건, 즉 NO 및 H_2O_2의 영향을 모두 나타내는 배양조건에서와 동일한 결과를 나타내고 있다.

따라서 H_2O_2는 Ni의 세포독성에 거의 영향을 미치지 않으며, 일부 연구보고(Stamler 등, 1992)와는 다르게 NO의 세포독성은 H_2O_2에 대한 의존성이나 상호작용은 존재하지 않는 것으로 사료된다. 또한 니켈에 의해 감소하였던 ATP 및 세포 생존율이 NMLA의 전처리로 완전히 회복되는 결과는 니켈의 대부분의 독성효과는 NO에 의해 유발되었음을 나타내 주고 있다.

금속의 세포독성에 대한 여러 가지 기전 중에서 가장 많이 연구된 부분은 과산화연쇄반응(peroxidative chain reaction)의 자극에 의한(Halliwell과 Gutteridge, 1985) 지질과산화(lipid peroxidation) 촉진과정으로서(Maracine 과 Segner, 1998). 이러한 세포독성 과정은 금속에 의해 생성된 자유기(free radical)와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 금속의 생체내 유입시 자유기(free radical)의 생성에 의한 세포독성에 대해 방어작용을 하는 대표적인 물질로는 glutathione(GSH)이 있는 데(Meister, 1983, Singhal 등, 1987) GSH는 glutamic acid, cysteine, glycine으로 구성된 tripeptide이며 생체에서 가장 풍부한 sulfhydryl compounds의 공급원이다(Meister, 1983, Singhal 등, 1987). 한편, 세포내 GSH의 영향을 알아보기 위해서는 세포막 투과성이 작은 GSH보다는 세포막 투과가 용이하고 -SH기를 풍부하게 함유하고 있어 -SH기와 친화성이 있는 독성물질이 세포내로 유입되면 독성물질에 우선적으로 결합하여 세포 내 GSH를 보호하는 특성을 지닌 dithiotreitol(DTT)을 전처리하여 GSH의 영향을 간접적으로 유추하고 있다.

이 연구에서 대식세포의 활성화로 NO 생성이 증가되는 여건, 즉 cytokines 및 니켈의 단독 또는 동시첨가, 그리고 catalase 전처리 조건에서 세포내 GSH는 감소하고 있어, NO에 의한 GSH 감소효과를 보고한 연구결과들(Kronke 등, 1994; Misra 등, 1996; Wakulich와 Tepperman, 1997)과 동일한 결과를 나타내었으며, 동일 실험조건들에서 궁극적으로는 세포생존율과 ATP 생성이 감소하였다. 그러나 DTT의 전처리로 세포 내 GSH는 증가하고 NO 생성은 감소하고 있으며, 그 결과로 세포생존율 및 ATP 생성은 회복되어 세포독성은 나타나지 않았다. 이러한 결과들은 NMLA 전처리로 NO 생성이 억제된 경우에도 동일한 경향을 나타나고 있어내고 있어, 니켈에 의한 세포독성은 NO에 의한 세포내 GSH 감소와 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.

이상의 결과로부터 니켈에 의한 세포독성은 고농도로 분비되는 NO에 기인하는 것으로 여겨지며, ATP 생성 억제 및 생존율의 감소로 나타나는 연구결과는 NO의 궁극적인 독성물질인 $^{-}OONO$의 효과에 대한 그 간에 보고된 연구결과들(Ischiropoulus 등, 1992; Huie와 Padmaja, 1993)과 일치하고 있어 니켈에 의한 세포독성은 활성화된 대식세포(activated macrophage)가 동시에 생성하는 NO와 superoxide(O_2^-)가 결합하여 형성된 $^{-}OONO$에 의해 매개되는 것으로 사료되며, NO의 세포독성효과에서 H_2O_2의 상호작용을 제시한 일부 연구(Stamler 등, 1992)와는 다르게 H_2O_2는 니켈의 세포독성에는 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다. 또한, 니켈에 의한 세포독성은 NO 생성증가에 의한 세포내 GSH 감소와 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다.

요 약

목적: 이 연구는 니켈에 의한 NO 및 H_2O_2 생성의 변조유무, 이들 물질의 독성효과로 알려진 ATP 생성, 세포 내 GSH 또는 세포 생존율의 변화를 관찰하여 니켈이 염증반응을 일으키는 기전 및 매개물질을 파악하고자 실시하였다.

방법: RAW 264.7 세포의 배양조건에 니켈, NMLA, catalase, 그리고 DTT를 여러 조건으로 처리하여 NO 및 H_2O_2 생성의 변조유무 및 이와 관련된 ATP 생성, 세포 내 GSH 및 세포생존율의 변조양상을 관찰하였다. 세포생존율은 trypan-blue dye exclusion 방법을 이용하였으며 NO는 Hibbs 등(1987)의 방법에 따라 그 대사물질인 nitrite(NO_2)의 측정을 통해 간접 측정하였다. 또한, ATP는 세포막을 파괴한 후 luciferase와 ATP의 반응에 따른 발광정도를 luminometer로 측정하였다, H_2O_2는 상층액에 HCL을 넣고 교반 후 10 mM ferrous ammonium sulphate 20 ㎕와 2.5 M potassium thiocyanate 30 ㎕를 첨가하고 10분 간 반응시킨 후 495 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포내 GSH농도 측정은 GSH assay kit을 이용하여 분광광도계에서 흡광도를 측정하였다.

결과: 기본배양조건에 여러 농도의 니켈을 첨가한 경우, 50 μM, 48시간을 기점으로 NO 생성량은 첨가농도의 증가에 따라 용량의존적으로 증가하다가 그 이상의 농도 및 시간에서는 현저히 감소하였으며, 동일 조건에서의 세포 생존율 및 세포내 GSH 농도는 전반적으로 첨가한 니켈의 용량 증가에 따라서 감소하는 경향을 보였다. 그러나 H_2O_2 생성량은 첨가한 니켈농도와는 무관하게 대조군과 차이가 없었다.

기본 배양조건에, NMLA, catalase, DTT을 전처리한 후 니켈(50 μM)을 첨가했을 때의 연구결과, 니켈 단독첨가 및 catalase 전처리 조건에서 NO 생성량은 대조군에 비해서 현저히 증가하였으나 세포내 GSH 농도, ATP 생성량 및 세포생존율은 대조군보다 현저히 감소하였다. 그러나 동일 실험조건에서 NMLA 전처리는 NO 및 ATP 생성량, 세포내 GSH 농도 및 세포생존율을 대조군 수준으로 회복시켰다.

한편, DTT의 전처리는 세포내 NO 농도를 대조군 수준으로 감소시키지는 않았지만, 세포내 GSH 농도, ATP 생성량 및 세포생존율은 대조군 수준으로 회복시켰다.

그러나 H_2O_2 생성량은 모든 실험조건에서 큰 변화가 없었으며 대조군과 차이를 보이지 않았다.

결론: 이상의 결과에서 니켈에 의한 세포독성은 NO에 의해 기인하며, 이것은 니켈에 의해 활성화된 대식세포가 동시에 생성하는 NO와 superoxide (O_2^-)가 결합된 OONO에 의해 매개되는 것으로 사료된다. 또한 니켈에 의한 세포독성은 NO 생성증가에 의한 세포내 GSH 감소와 밀접한 관련이 있는 것으로 여겨진다. 그러나 H_2O_2는 니켈의 세포독성에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

김영곤, 김영균. 프리라디칼. 여문각, 서울 1997.

Acevedo F, Serra MA, Ermolli M, Clerici L, Vesterberg O. Nickel-induced proteins in human HaCaT keratinocytes: annexin II and phosphoglycerate kinase. Toxicology 2001;159:33-41.

Castro L, Rodriguez M, Radi R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. J. Biol. Chem. 1994;269:29409-15.

Ermolli M, Menne C, Pozzi G, Serra MA, Clerici LA. Nickel, cobalt and chromium-induced cytotoxicity and intracellular accumulation in human hacat keratinocytes. Toxicology 2001;159:23-31.

Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine Leishmaniasis. J Immunol 1993;151:907-915.

Green SJ, Nacy CA. Antimicrobial and Immunopathologic effects of cytokine-induced nitric oxide synthesis. Current Opinion in Infectious Diseases 1993;6:384-96.

Halliwell B, Gutteridge JMC. The importance of free radicals and catalystic metal ions in human disease. Molec Aspects Med 1985;8:89-193.

Hibbs JB, Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. J mmunol 1987;138:550-65.

Huie RE, Padmaja. The reaction of no with

superoxide. Free Rad. Res. Commun. 1993;18: 195-9.

Ischiropoulus H, Zhu L, Beckman JSS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. Arch. Biochem. Biophys. 1992;298:446-51.

Kanerva L, Jolanki R, Estlander T, Alanko K, Salvela A. Incidence rates of occupational allergic contact dermatitis caused by metals. Am J Contact Dermat 2000;11(3):155-60.

Klassen CD, Amdur MO, Doull J. Casarett and Doull 's Toxicology. Macmillan Publishing Company, New York. 1998.

Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. Immunol Today 1992;13:157-60.

Kroncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, Bettermann H, Breunig KD, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of zinc finger-type transcription activator LAC9. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000;200:1105-10.

Lacy SA, Merritt K, Brown SA, Puryear A. Distribution of nickel and cobalt following dermal and systemic administration with in vitro and in vivo studies. J Biomed Mater Res 1996; 32(2):279-83.

Maracine M, Segner H. Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology 1998;120(1):83-8.

Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. Science 1983;220:472-7.

Misra RR, Hochadal JF, Smith GT, Cook JC, Waalkes MP, Wink DA. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. Chem. Res. Toxicol. 1996;9:326-32.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. Pharmacological Reviews 1991; 43(2):109-42.

Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitic oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Current Opinion Immunol 1991;3:65-70.

Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. J. Biochem. Chem. 1992; 267:24173-6.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Arch. Biochem. Biophys. 1991a;288:481-7.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Arch. Biochem. Biophys. 1991b;266:4244-50.

Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. Gower Medical Publishing, London. 1989

Singhal RH, Anderson ME, Meister A. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. FASEB J 1987;1:220-3.

Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. Scientific Am May1992;28-35.

Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science 1992;258:1898-902.

Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radical Biology and Medicine 1995;18(2):321-36.

Tian L, Lawrence DA. Metal-Induced Modulation of Nitric Oxide Production in Vitro by Murine Macrophages: Lead, Nickel, and Cobalt Utilize Different Mechanisms. Toxicology and Applied Pharmacology 1996;141(2):540-7.

Veronesi B, Williams WC, Smialowicz RJ, Sailstad DM, Doerfler D, Selgrade MJK. Neuropeptide denervation alters both the elicitation and induction phases of contact hypersensitivity in mice. Toxicology and Applied Pharmacology 1998;153(2):243-9.

Wakulich CA, Tepperman BL. Role of glutathione in nitric oxide-mediated injury to rat gastric mucosal cells. Eur J Pharmacol. 1997;319(2-3): 333-41.