

니켈 및 코발트의 세포독성 기전에서 Nitric Oxide의 역할

전북대학교 의과대학 예방의학교실 및 의과학 연구소

염정호 · 오경재 · 유영천

— Abstract —

Role of Nitric Oxide in the Nickel and Cobalt Induced Cytotoxicity in RAW 264.7 cell

Jung-Ho Youm, Gyung-Jae Oh, Young-Cheun Yoo

*Department of Preventive Medicine and Public Health,
School of Medicine and Institute for Medical Science, Chonbuk National University*

Objectives : The nickel and cobalt present in many industrial working environments and consumer products. They are two of the leading causes of allergic contact dermatitis, which is a typical delayed(type IV) hypersensitivity reaction. However, the mechanism by which nickel and cobalt causes this pathology is not well known. The nickel and cobalt induced contact dermatitis is mediated primarily through macrophages. This mechanism is similar to the autotoxicity procedure for NO. Therefore, this study was designed to examine whether the metals could modulate NO production and how the metals may affect ATP production and cell viability. In summary, the purpose of this study was to elucidate the role of NO in the nickel and cobalt induced cytotoxicity.

Methods : This study is based on observations of cultures of RAW 264.7 cells which are originated from a tumor of Balb/c mouse that was induced by Abelson murine leukemia virus. RAW 264.7 cells were treated with either Ni, Co, Ni plus Co, or N-monomethyl-L- arginine(NMLA) for 24-72 h. The cytotoxicity of the nickel and cobalt was measured by cell viability and NO₂⁻, and mitochondrial function was evaluated by adenosine triphosphate(ATP) production in RAW 264.7 cells. In addition, the morphology of cells was observed using an inverted microscope.

Results : The NO₂⁻ synthesis of RAW 264.7 cells increased with increasing concentrations of Ni and Co up to 50 μM after 24 and 48 h of exposure to Ni and Co but then decreased if the concentration was greater than 50 μM and the time period was greater than 48 h. However, the viability of cells was decreased by Ni and Co exposure in a dose and time dependent manner. Therefore, 50 μM Ni or Co and 48 h of treatment were used in this study. A complete inhibition of NO₂⁻ synthesis by Ni or/and Co occurred when iNOS inhibitor, NMLA, were pretreated prior to addition of Ni or/and Co, whereas Ni or/and Co induced decrease of synthesis of ATP and viability completely recovered when NMLA were pretreated prior to addition of Ni or/and Co. Ni or/and Co(50 μM) induced the characteristic morphological features of cytotoxicity which is characterized by a shrinkage of cytoplasm and irregular shape of the cells, but the pretreatment of NMLA resulted in a recovered morphological change of the cells to their normal appearance.

Conclusions : These results suggest that NO plays an important role in the pathogenesis of the cytotoxicity of nickel and cobalt, and nickel and cobalt may exert their toxicities by means of modulation of NO production. The results from this study may facilitate further understanding the role of NO on nickel and cobalt induced immune and inflammatory processes.

Key Words : Ni, Co, NO, NMLA, ATP, RAW 264.7 cell

〈접수일 : 2001년 6월 27일, 채택일 : 2001년 7월 16일〉

교신저자 : 염 정 호 (Tel : 063-270-3094) E-mail : yjho@moak.chonbuk.ac.kr

서 론

니켈 및 코발트는 인체에 필요한 필수미량원소이면서 과량이 흡수되거나 노출되면 지연성 과민반응(type IV hypersensitivity)의 일종인 접촉성 피부염 및 자극증상을 일으키는 대표적인 중금속으로, 최근 의료 및 산업분야에서의 사용증가로 인한 인체폭로가 증가하고 있고 합금생성에 함께 이용되는 경우가 많아 폭로 또한 대부분 다중폭로의 형태로 이루어지고 있다(Lacy 등, 1996; Ermoli 등, 2001). 이에 따라 이들 금속에 대한 독성연구가 활발히 진행되고 있으나 두 금속에 의한 염증반응 유발과정의 기전이나 관련 매개물질에 대해서는 정확히 밝혀진 바가 없다.

생체의 면역체계에 영향을 미치는 중금속은 최근 면역반응의 지표로 알려진 nitric oxide(NO)와 밀접한 관련성이 존재한다고 보고되고 있어(Evans, 1993; 염정호, 1997) 일종의 면역반응인 지연성 과민반응(type IV hypersensitivity)을 나타내는 것으로 알려진 니켈과 코발트(Lacy 등, 1996) 또한 NO와 밀접한 관련성이 있을 개연성이 있다. NO에 의해 성장이 억제된다고 알려진 감염성 질환들(Cryptococcus neoformans, Toxoplasma gondii, Leishmania major, Tropanosoma cruzi, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae 등)에서는 병원체의 침입시 T-세포에서 분비되는 IL-1, TNF 등과 같은 cytokine들의 자극으로 대식세포의 inducible nitric oxide synthase(iNOS)가 활성화되어 NO가 대량 생성되는 과정을 통해서 면역조절이 이루어지는 데(Snyder와 Bredt, 1992) 이러한 과정은 니켈 및 코발트 등의 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.

따라서, 불안정하고 반감기가 극히 짧은 NO 대신 그 대사물질인 nitrite(NO₂⁻)의 측정을 통해 NO의 생성을 간접적으로 유추하거나(Hibbs 등, 1988), 세포대사에 필요한 ATP 생성과 관련된 효소를 NO가 억제하는 특징을(Kolb와 Kolb-Bachofen, 1992; Snyder와 Bredt, 1992) 이용하여 NO에 의한 ATP 생성능의 변조 유·무와 이와 관련된 생존율을

관찰한다면 세포수준에서의 니켈 및 코발트의 독성효과와 그 기전을 파악하는 데 중요한 정보를 얻을 수 있을 것이다.

이에 본 연구에서는 RAW 264.7 cell의 배양조건에 니켈, 코발트 또는 iNOS의 competitive inhibitor인 N^G-monomethyl-L-arginine(NMLA)(Hibbs 등, 1987; Moncada 등, 1991; Green과 Nacy, 1993)를 여러 조건으로 처리하여 NO 생성의 변조유무 및 이와 관련된 ATP 생성과 세포생존율의 변조양상을 관찰함으로써 니켈 및 코발트가 염증반응을 일으키는 세포독성 과정에서의 NO 역할에 관한 자료를 얻고자 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 대사물질인 NO₂⁻를 측정하므로써 정량적으로 유추하였다.

2. 실험방법

1) RAW 264.7 세포의 준비

동결보관중인 RAW 세포를 37~38 °C의 수조에 서 가온하여 빙결상태가 풀린 세포부유액을 20 ml DMEM에 옮겨 원심 후 세척하는 과정을 2회 반복하고, 10 % FCS-DMEM을 첨가한 배양병에서 1 × 10⁵/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-1 α (rMu IL-1 α , 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(NiCl₂, Sigma Chemical Co.) 또는 코발트(CoCl₂, Sigma Chemical Co.)를 여러 농도(0, 25, 50, 100, 150 μ M)로 첨가하여 12, 24, 48, 72 시간을 배양하였다.

니켈(50 μ M) 또는 코발트(50 μ M)를 각각 첨가하거나 동시에 첨가하여 48시간을 배양하였고, iNOS inhibitor인 N^ω-monomethyl-L-arginine(NMLA, Sigma Chemical Co.)를 6시간 동안 전처리한 후 니켈(50 μ M) 또는 코발트(50 μ M)를 각각 첨가하거나 동시에 첨가하여 48시간을 배양하였다.

3) 세포생존률 검사

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

4) 배양액내 NO₂⁻의 정량

Hibbs 등(1987)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 배양액 50 μ l씩을 취해 microtiter plate에 옮기고 100 μ l의 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 μ M의 sodium nitrate(NaNO₂)를 반응시킨 흡광도에 의한 표준곡선으로부터 NO₂⁻ 농도를 구하였다.

5) ATP 정량

배양이 끝난 세포를 원심하여 PBS(pH 7.4)로 세척한 후, 여기에 6 %의 trichloroacetic acid(TCA) 200 μ l를 첨가하여 초음파분쇄기(ultrasonicator)를 이용하여 세포를 파괴시켰다. 이를 4 $^{\circ}$ C, 1,200 rpm의 조건으로 10분간 원심하여 얻은 상층액 20 μ l에 100 mM glycine 80 μ l를 첨가한 다음, HEPES buffer 2 ml에 녹인 luciferase 5 mg을 혼합하여

luciferase와 ATP의 반응에 따른 발광정도를 luminometer로 측정하였다.

6) 세포의 형태학적 관찰

각 실험조건에서의 세포의 형태학적 변화는 inverted microscope(\times 400)를 이용하여 관찰하였다.

3. 통계처리

측정자료들의 각군간의 차이는 Student's t-test를 이용하여 비교하였다.

결 과

1. 배양시간별 RAW 264.7 세포의 NO₂⁻ 생성능과 세포생존율

RAW 264.7 세포의 기본배양조건에 cytokines을 첨가한 후 배양했을 때, NO₂⁻ 생성능은 배양 후 48시간까지는 시간경과에 따라 직선적으로 증가하고 있으며, 배양 12시간 후의 측정치에 비해 48시간째의 측정치는 2배 수준으로 현저하게 증가하였으며, 48시간 이후에는 그 생성량이 감소하여 12시간의 값과 차이가 없었다(Fig. 1). 동일 배양조건에서 세포생존율은 48시간까지는 평균 95% 이상을 유지하였으나, 48시간 이상의 배양결과에서는 그 생존율이 현저히 감소하였다(Fig. 2).

2. 니켈 및 코발트 첨가에 의한 시간 경과별

RAW 264.7 세포의 NO₂⁻ 생성능과 세포생존율

본 연구에서 이용된 농도의 니켈 또는 코발트는 cytokines이 첨가하지 않은 배양 조건에서는 두 금속 모두 세포의 생존율 및 NO₂⁻ 생성에 영향을 주지 않았다(data not shown). 한편, cytokines이 첨가된 배양조건에 여러 농도(0~150 μ M)의 니켈(NiCl₂)을 첨가했을 때의 세포의 NO₂⁻ 생성능은 배양 후 48시간까지는 50 μ M 농도 이하에서 니켈농도의 증가에 따라 용량의존적으로 증가하다가 그 이상의 농도에서는 현저히 감소하였고 48시간 이후에는 전반적으로 농도증가에 따라 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 동일 조건에서 세포생존율은 첨가한 니켈농도의 증가에 따라 용량의존적으로 감소하고 있으며 시간 경과에 따라서도 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 또한, 기본 배양조건에 여러 농도

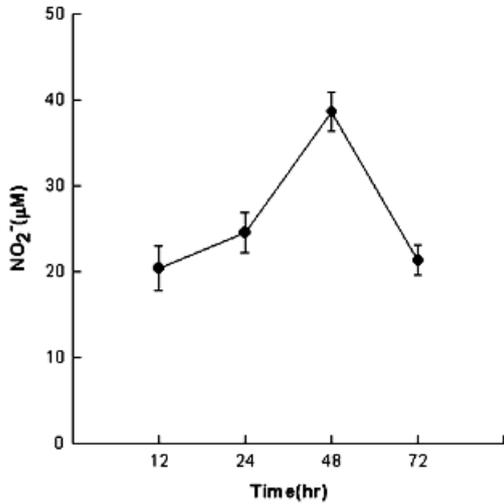


Fig. 1. The synthesis of NO₂⁻ from RAW 264.7 cells in DMEM containing 10 % FCS and cytokines(IL-1 α 40 U/ml and IFN- γ 20 U/ml). NO₂⁻ were continuously measured at 12, 24, 48, and 72 hours after incubation. Values are expressed as mean \pm S.D. of three experiments.

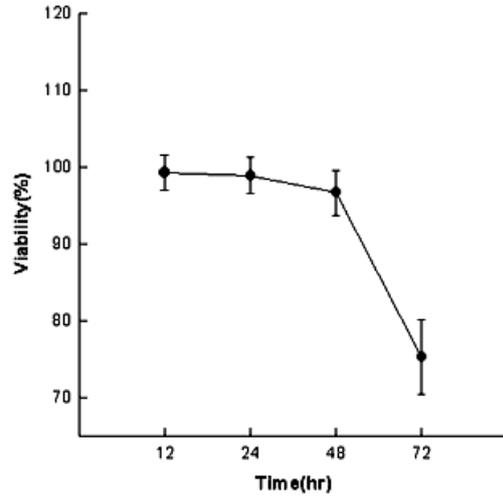


Fig. 2. The viability of RAW 264.7 cells in DMEM containing 10 % FCS and cytokines(IL-1 α 40 U/ml and IFN- γ 20 U/ml). Viability were continuously measured at 12, 24, 48, and 72 hours after incubation. Values are expressed as mean \pm S.D. of three experiments.

(0~150 μ M)의 코발트(CoCl₂)을 첨가하여 관찰한 세포의 NO₂⁻ 생성능 및 세포생존율은 니켈을 첨가했을 때와 유사한 경향을 보였다(Fig. 5, 6).

따라서, 두 금속의 독성발현기전에서 NO의 역할을 알아보기 위한 다음의 연구결과는 두 금속 모두 세포생존율 및 NO₂⁻ 생성율이 높게 유지되는 50 μ M, 48시간 배양 조건에서 이루어졌다.

3. NMLA 전처리에 의한 NO₂⁻ 생성의 변화

RAW 264.7 세포의 기본배양조건에 cytokines(IL-1과 IFN- γ), 50 μ M의 니켈, 코발트를 각각 또는 동시에 첨가하여 48시간 후에 측정된 배양액내의 NO₂⁻ 생성량은, 전반적으로 NO의 생성유도에 필수적으로 필요한 cytokines의 첨가로 NO₂⁻ 생성이 현저하게 증가하였으며(p<0.05) cytokines의 첨가로 NO 생성이 유도된 상태에서의 니켈 및 코발트 첨가는 두 금속 모두에서 cytokines만의 첨가시보다 NO₂⁻ 생성이 더욱 증가시켰다(p<0.05). 특히 두 금속을 동시에 첨가한 실험에서는 NO₂⁻ 생성량이 상가(additive)적으로 증가하였다(Fig. 7). 또한 이들 배양조건에 100 μ M NMLA의 전처리는 모든 실험 조

건에서 NO₂⁻ 생성을 NO생성이 유도되지 않은 대조군 수준으로 회복시켰다(Fig. 7).

4. NMLA 전처리에 의한 ATP 생성의 변화

니켈 및 코발트의 독성정도를 알아보기 위해 측정된 세포의 ATP 생성정도는 NO₂⁻ 생성의 변화와는 다르게 각각의 금속첨가로 대조군 및 cytokines 첨가군보다 현저하게 감소하였으며, 두 금속의 동시첨가시에는 대조군의 47 %, cytokines 첨가군의 55 %로 현저하게 감소를 하였다(p<0.05, Fig. 8). 또한 이들 배양조건에 100 μ M NMLA의 전처리는 모든 실험 조건에서 ATP 생성을 대조군 수준으로 회복시켰다(Fig. 8).

5. NMLA 전처리에 의한 세포생존율의 변화

세포의 생존율은 NO₂⁻ 생성과는 반대로 니켈 및 코발트 모두 대조군보다 현저히 감소하였으며(p<0.05) 또한 cytokines만의 첨가시보다도 현저한 감소(p<0.05)를 나타내었다. 또한, 두 금속의 동시첨가는 생존율이 상가(additive)적으로 감소하였으며, 이들 금속에 NMLA를 동시첨가한 경우는 모두 대조군 수준으로 회복되어 97 % 이상의 생존율을 나타내었다(Fig. 9).

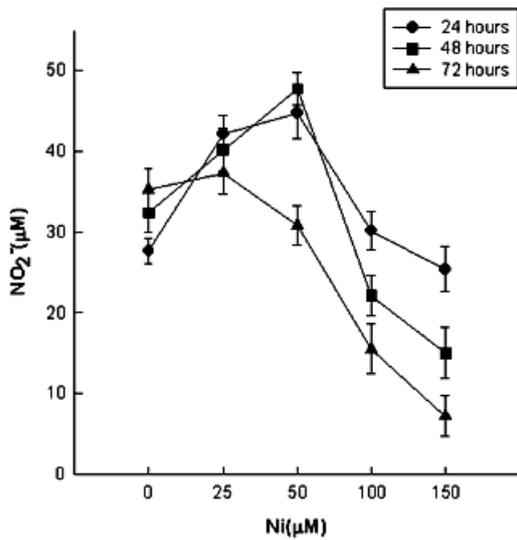


Fig. 3. The effect of NiCl₂ on synthesis of NO₂⁻ from RAW 264.7 cells which were cultured in DMEM containing 10 % FCS, cytokines(IL-1 α 40 U/ml and IFN- γ 20 U/ml), and NiCl₂. Synthesis of NO₂⁻ were continuously measured at 24, 48, and 72 hours after incubation. Values are expressed as mean \pm S.D. of three experiments.

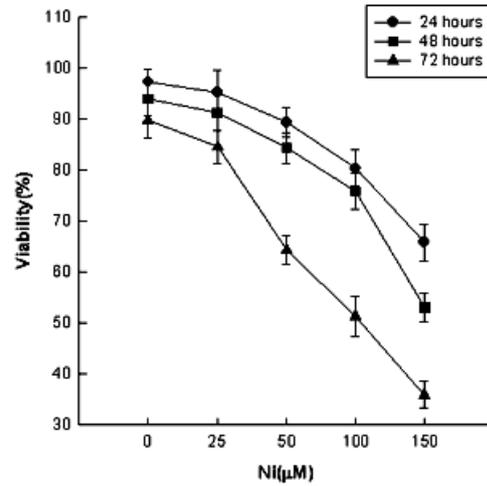


Fig. 4. The effect of NiCl₂ on viability of RAW 264.7 cells in DMEM containing 10 % FCS, cytokines(IL-1 α 40 U/ml and IFN- γ 20 U/ml), and NiCl₂. Viability were continuously measured at 24, 48, and 72 hours after incubation. Values are expressed as mean \pm S.D. of three experiments.

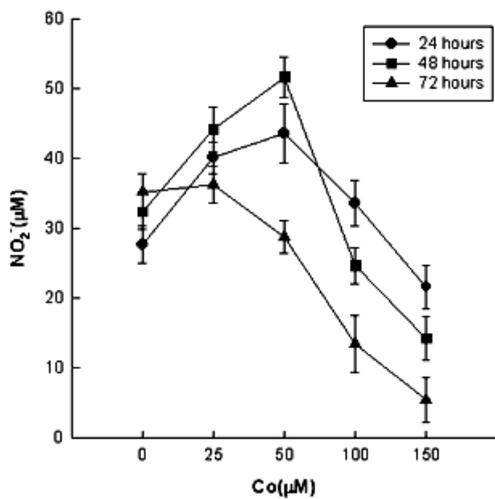


Fig. 5. The effect of CoCl₂ on synthesis of NO₂⁻ from RAW 264.7 cells which were cultured in DMEM containing 10 % FCS, cytokines(IL-1 α 40 U/ml and IFN- γ 20 U/ml), and NiCl₂. Synthesis of NO₂⁻ were continuously measured at 24, 48, and 72 hours after incubation. Values are expressed as mean \pm S.D. of three experiments.

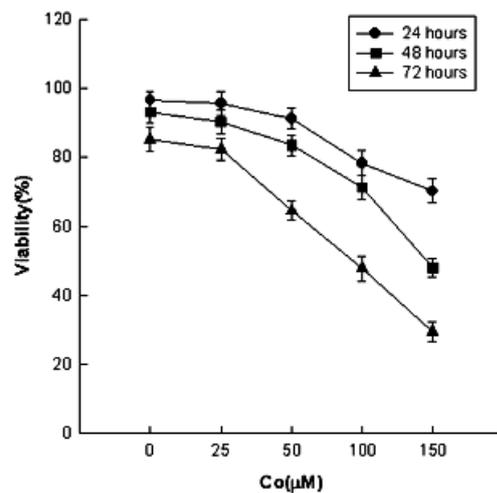


Fig. 6. The effect of CoCl₂ on viability of RAW 264.7 cells in DMEM containing 10 % FCS, cytokines(IL-1 α 40 U/ml and IFN- γ 20 U/ml), and CoCl₂. Synthesis of NO₂⁻ were continuously measured at 24, 48, and 72 hours after incubation. Values are expressed as mean \pm S.D. of three experiments.

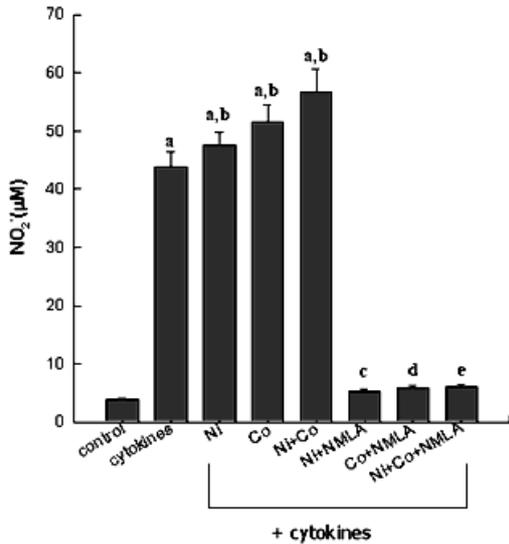


Fig. 7. The effect of metals(NiCl₂ and CoCl₂) or NMLA(N^G-monomethyl-L-arginine) on synthesis of NO₂⁻ from RAW 264.7 cells. Cells were incubated with DMEM containing 10 % FCS(control) and cytokines(IL-1 α 40 U/ml and IFN- γ 20 U/ml) or NMLA(100 μ M) for 6 hours and then treated to NiCl₂(50 μ M), CoCl₂(50 μ M), or their mixture for another 48 hours. Values are expressed as mean \pm S.D. of three experiments. Significant differences(p<0.05) in NO₂⁻ levels between the groups were determined using a Student's t-test. ^aSignificantly different from the control. ^bSignificantly different from group given: cytokines. ^cSignificantly different from group given: Ni. ^dSignificantly different from group given: Co. ^eSignificantly different from group given: Ni+Co.

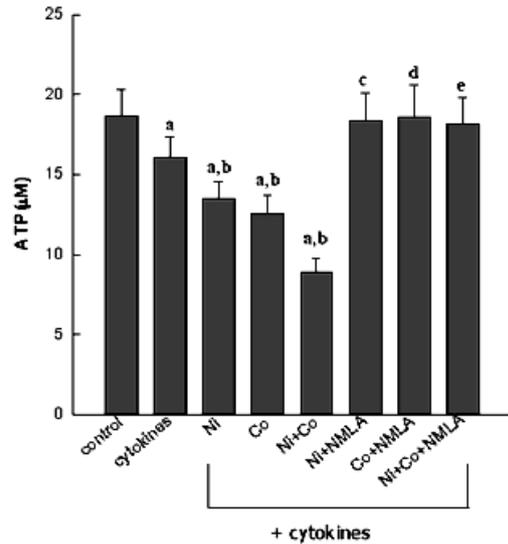


Fig. 8. The effect of metals(NiCl₂ and CoCl₂) or NMLA(NG-monomethyl-L- arginine) on synthesis of ATP from RAW 264.7 cells. Cells were incubated with DMEM containing 10% FCS(control) and cytokines(IL-1 α 40 U/ml and IFN- γ 20 U/ml) or NMLA(100 μ M) for 6 hours and then treated to NiCl₂(50 μ M), CoCl₂(50 μ M), or their mixture for another 48 hours. Values are expressed as mean \pm S.D. of three experiments. Significant differences(p<0.05) in ATP levels between the groups were determined using a Student's t-test. ^aSignificantly different from the control. ^bSignificantly different from group given: cytokines. ^cSignificantly different from group given: Ni. ^dSignificantly different from group given: Co. ^eSignificantly different from group given: Ni+Co.

6. 니켈 및 코발트 첨가시 RAW 264.7 세포의 형태학적 관찰

니켈 및 코발트를 단독 또는 동시에 첨가하여 48시간 배양한 후 RAW 264.7 세포상태를 역상현미경(inverted microscope)으로 관찰한 결과 cytokines만을 첨가한 경우는 양호한 세포상태를 반영하는 특유의 형태인 방추형 또는 엽상으로 배양용기의 바닥에 균일한 세포단일층을 형성하고 있으며 세포괴사는 소량(少量) 나타났었다. 그러나 니켈 또는 코발트를 첨가하여 배양한 경우는 전반적으로 세포층의 형성이 균일하지 못

하고 위축되어 불규칙한 외형을 하고 있거나 작은 원형의 모양을 보이는 세포들이 다량(多量) 나타나고 있으며 배양액의 중층에는 세포들이 괴사하여 응집된 세포괴들이 부유하고 있었다. 이러한 세포괴들은 두 금속을 동시에첨가한 경우 더욱 확연히 증가하였다(Fig. 10).

7. NMLA 전처리시 RAW 264.7 세포의 형태학적 관찰

니켈 또는 코발트를 첨가하기 전 RAW 264.7 세포를 NMLA로 전처리하면 니켈 또는 코발트의 단독 또는 동시에 첨가시 나타났던 세포괴사 덩어리들은

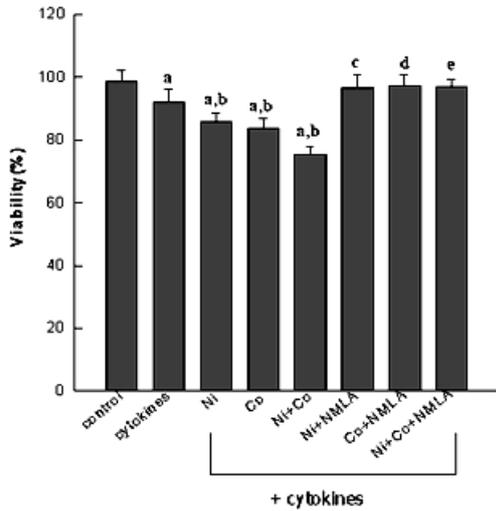


Fig. 9. The effect of metals(NiCl₂ and CoCl₂) or NMLA(NG-monomethyl-L-arginine) on viability of from RAW 264.7 cells. Cells were incubated with DMEM containing 10 % FCS(control) and cytokines(IL-1 α 40 U/ml and IFN- γ 20 U/ml) or NMLA(100 μ M) for 6 hours and then treated to NiCl₂(50 μ M), CoCl₂(50 μ M), or their mixture for another 48 hours. Values are expressed as mean \pm S.D. of three experiments. Significant differences(p<0.05) in viability between the groups were determined using a Student's t-test. ^aSignificantly different from the control. ^bSignificantly different from group given: cytokines. ^cSignificantly different from group given: Ni. ^dSignificantly different from group given: Co. ^eSignificantly different from group given: Ni+Co.

존재하지 않고 기본 배양조건의 세포상태와 마찬가지로 배양용기의 바닥에 방추형 또는 엽상으로 균일한 세포단일층을 형성하고 있었다(Fig. 11).

고 찰

환경 내에 존재하는 많은 화학물질은 지연성 과민반응(type IV delayed hypersensitivity)의 일종인 접촉성 피부염을 일으키는 것으로 알려져 있으며(Kanerva 등, 2000) 니켈 및 코발트는 접촉성 피부염을 일으키는 대표적인 금속으로 인구의 15 %가 이들 금속에 대해 과민반응을 나타내는 것으로 알려

져 있다(Lacy 등, 1996). 니켈 및 코발트는 최근 의료 및 산업분야에서의 사용증가로 인체폭로 또한 증가하고 있는 추세에 있는 데(Klassen 등, 1989; Acevedo 등, 2001) 폭로양상은 의료분야의 경우 이식(implant)분야에서 인체에 삽입되는 각종 보조물의 주요성분으로 조직 내에 직접 노출되거나, 시멘트 및 광산산업장과 용접작업 등을 통해서 이들 중금속을 함유하고 있는 분진에 의한 피부폭로로 나타나고 있다(Klassen 등, 1989). 그러나 이러한 폭로 증가에도 불구하고 니켈과 코발트에 의한 지연성 과민반응은 항원으로 감작된 T 세포에서 분비된 림포카인이 대식세포를 활성화시켜 염증반응을 유도하여 발생한다는 사실(Stohs와 Bagchi, 1995; Veronesi 등, 1998) 외에는 그 정확한 기전이나 관련물질에 대해서는 아직 밝혀지지 않고 있다.

한편, 피부에 대해서 세포매개형 지연성 과민반응을 일으키는 니켈 및 코발트의 병리기전(Veronesi 등, 1998)은 최근 세포성 면역의 분자생물학적 지표로 인정되고 있는(Nathan 등, 1991; Evans 등, 1993) NO에 의해 성장이 억제되는 병원체들의 인체감염시 나타나는 cytokines에 의한 대식세포 활성화라는 일련의 염증반응 과정과(Moncada 등, 1991) 유사하다.

NO는 자동차의 배기가스 등에 포함된 화석연료의 산화물들이 소위 광화학반응(photochemical reaction)을 거치면서 생성되는 대기오염물질의 하나로 서만 인식되어 오던(Koshland, 1992) 물질로 반감기가 매우 짧은 특징이 있다. 최근 NO는 생체내에서 혈관이완 및 자궁이완, 신경계에서의 신호전달기능, 유전자 발현조절, 세포내 병원성 미생물에 대한 방어기능과 일부 종양세포들에 대한 세포독성을 나타내는 등 매우 다양한 생리학적, 병리학적 기능을 발휘하는 중요한 분자임이 밝혀졌다(Amber 등, 1988; Snyder와 Bredt, 1992; Kolb와 Kolb-Bachofen, 1992; Knowles와 Moncada, 1994).

염증반응과 관련된 세포 및 기타 면역세포들로부터 생성되는 NO는 TNF- α , IL-2, IFN- γ 등의 여러 cytokine의 자극을 받은 iNOS의 효소작용에 의해 생성된 것으로써 외부에서 침입한 세포내 병원체(intracellular organism) 등에 대항하여 성장을 억제하거나 세포독성을 나타내어 방어작용을 나타낸다(Snyder와 Bredt, 1992). 그러나 이 경우 NO

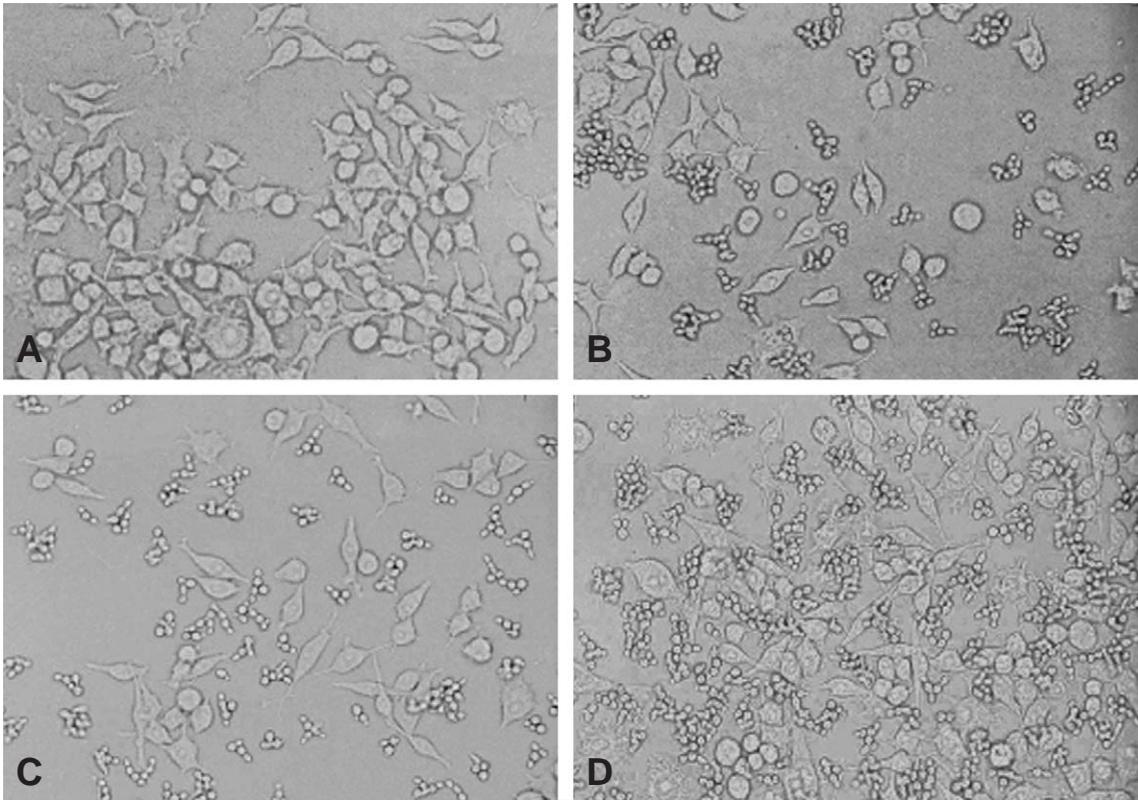


Fig. 10. Inverted microphotographs of RAW 264.7 cells. Cells were cultured in medium(DMEM and 10 % FCS), cytokines(IL-1 α 40 U/ml and IFN- γ 20 U/ml), and absence or presence of metals(NiCl₂ and CoCl₂). **A.** Cytokines supplemented group without metals. **B.** Cytokines and NiCl₂(50 μ M) supplemented group. **C.** Cytokines and CoCl₂(50 μ M) supplemented group. **D.** Cytokines, NiCl₂(50 μ M), and CoCl₂(50 μ M) supplemented group. Magnification \times 400.

는 고농도로 분비되어 외부에서 침입한 미생물에 대해 방어작용을 나타낼 뿐만 아니라 정상적인 주위세포에도 자가독성(autotoxicity)을 나타내거나 과민반응(hypersensitivity)을 초래한다(Kolb와 Kolb-Bachofen, 1992 ; Snyder와 Brecht, 1992). 이러한 세포독성은 NO가 ironsulfur(Fe-S)집합체를 갖는 효소 등의 분자구조에 반응하여 iron-sulfur-nitrosyl 복합체를 형성하므로써 효소의 기능을 억제하여 이루어진다(Kolb와 Kolb-Bachofen, 1992; Snyder와 Brecht, 1992). 이렇게 억제되는 효소들은 대부분 citric acid cycle, electron transport chain, glycolytic pathway와 관련된 것들이어서 NO의 세포독성 효과는 이러한 효소들의 작용을 억제한 결과로 ATP 생성 억제와 생존율의 감소로 나타난다(Kolb와 Kolb-Bachofen, 1992;

Snyder와 Brecht, 1992).

따라서 니켈 및 코발트의 지연성 과민반응을 나타내는 염증반응은 면역체계에 있어서 NO와 밀접한 관련성이 존재하리라 여겨지며 니켈 및 코발트에 의한 NO 생성의 변조유무 및 ATP 생성 또는 세포 생존율의 변화를 관찰한다면 두 금속이 염증반응을 일으키는 기전을 파악하는데 중요한 정보를 얻을 수 있을 것이다.

본 연구의 결과에서, 150 μ M 이하 농도의 니켈 및 코발트는 cytokines이 첨가하지 않은 배양 조건에서 두 금속 모두 세포의 생존율 및 NO₂⁻ 생성에 영향을 주지 않았으나 배양조건에 cytokines의 첨가로 RAW 264.7 세포를 활성화시키면 NO 생성량은 시간경과에 따라 배양 48시간까지 생성량이 현저히 증가하였으며 이러한 양상은 니켈 및 코발트를 단독

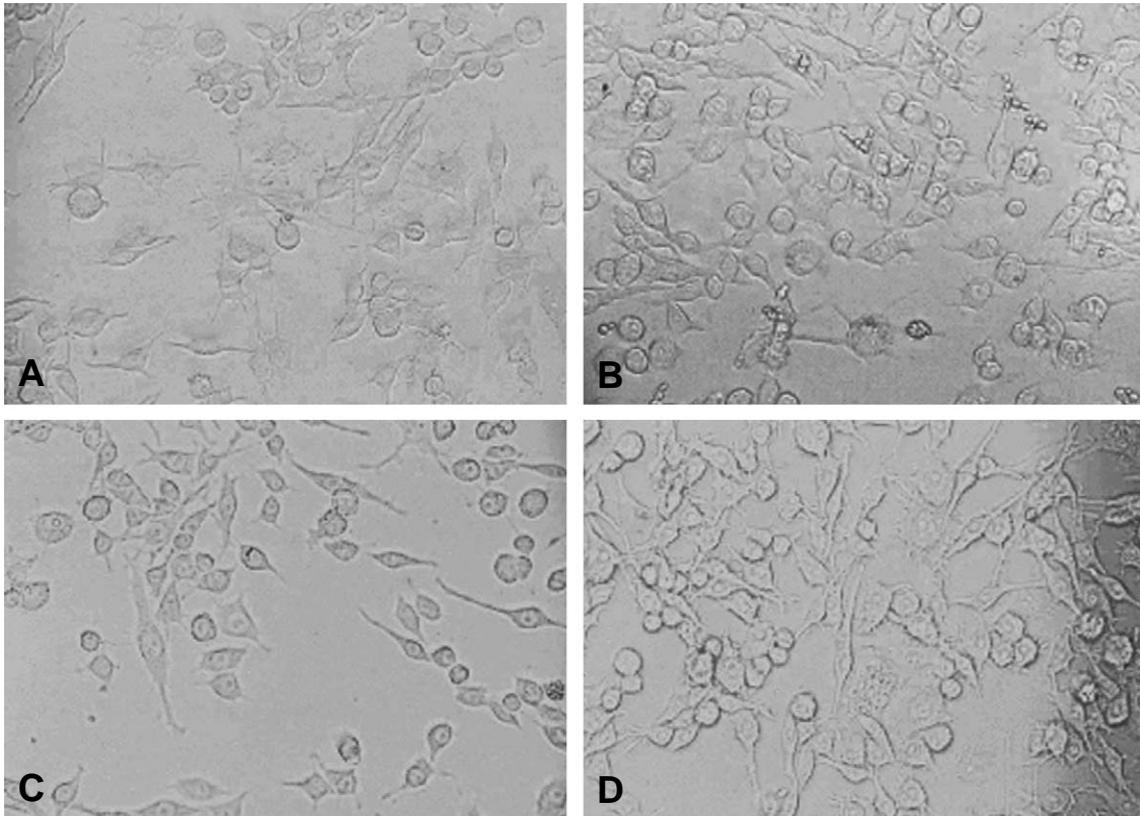


Fig. 11. Inverted microphotographs of RAW 264.7 cells. Cells were incubated with DMEM containing 10 % FCS and cytokines(IL-1 α 40 U/ml and IFN- γ 20 U/ml) or NMLA(NG-monomethyl-L-arginine, 100 μ M) for 6 hours and then treated to NiCl₂(50 μ M), CoCl₂(50 μ M), or their mixture for another 48 hours. **A.** No treatment with chemicals. **B.** Pretreatment of NMLA prior to the addition of NiCl₂. **C.** Pretreatment of NMLA prior to the addition of CoCl₂. **D.** Pretreatment of NMLA prior to the addition of NiCl₂ and CoCl₂. Magnification \times 400.

또는 동시 첨가한 경우에 더욱 확연하게 나타나고 있다. 따라서 두 금속은 대식세포의 NO 생성을 증가시킴을 알 수 있으며 두 금속의 NO 생성에는 cytokines이 유도되는 특정한 조건이 필요함을 확인할 수 있었다. 한편, 배양 48시간 까지 생성량이 현저히 증가했던 NO는 이후 72시간 까지 현저히 감소하고 있는 데 이것은 생존율의 급격한 감소와 시간적으로 일치하고 있어 배양 상층액 내의 NO 축적량과 세포생존율의 감소 사이에는 서로 상관성이 존재하는 것으로 보인다. 즉, 이 결과는 대식세포에서 고농도로 분비되는 경우 NO는 주위세포에 자가독성을 나타내는 특성(Green과 Nacy, 1993)을 고려할 때, 다량 생성된 NO는 세포들의 생존율을 낮추었을

것이고 이후 생존율의 급격한 감소에 따라 생존세포에 의한 NO 생성량 또한 감소한 결과로 여겨진다.

이 연구에서 배양과정에 전처리된 NMLA(N^G-monomethyl-L-arginine)은 NO 생성에 필요한 substrate인 L-arginine의 동류물질(analogues)로서 iNOS의 competitive inhibitor로 작용하므로 *in vitro*, *in vivo*에서 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). 본 연구에서 NMLA는 주어진 농도에서 그 자체로서는 RAW 264.7 세포의 생존율, NO₂⁻ 및 ATP 생성에

영향을 주지 않았으며(data not shown) 니켈 또는 코발트에 의해 증가된 NO 생성을 대조군의 수준으로 회복시키고 있어 Moncada 등(1991) 및 Green과 Nancy 등(1993)이 보고한 NMLA의 NO 억제 기능이 니켈 또는 코발트에 의한 NO 생성 증가에서도 그대로 나타나고 있음을 확인할 수 있었다.

NO의 독성 발현이 대부분 ATP 생성과 관련된 효소를 억제한다는 연구결과에(Kolb와 Kolb-Bachofen, 1992) 따라 각각의 실험 조건에서 ATP를 측정된 결과, 각각의 니켈 및 코발트의 첨가시 ATP 생성은 현저하게 감소하였으며 이러한 감소경향은 세포생존율의 감소양상과 비슷하였다. 한편, 두 금속의 독성발현에 NO의 관련여부를 확인하기 위해 iNOS의 competitive inhibitor인 NMLA를 전처리한 경우, NO 생성은 억제되고 두 금속에 의해 감소했던 ATP 및 세포 생존율은 대조군과 거의 같은 수준으로 회복되었다. 이렇듯, 니켈 및 코발트에 의해 감소하였던 ATP 및 세포 생존율이 NMLA의 전처리로 완전히 회복되는 결과는 니켈 및 코발트의 대부분의 독성효과는 NO에 의해 유발되었음을 간접적으로 보여주고 있다.

또한, inverted microscope로 관찰한 세포들의 형태 관찰 결과에서도 두 금속의 첨가로 나타났던 불균일한 세포층 및 세포의 위축으로 인한 불규칙한 외형들은 NMLA의 전처리로 기본 배양조건의 세포와 같은 상태로 회복되어 상기한 여러 실험조건에서 나타났던 결과들과 일치하고 있었다.

이상의 결과로부터 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 고농도로 분비된 NO는 자가독성을 나타내며 니켈 및 코발트는 대식세포의 NO 생성을 증가시키고 독성효과에 있어서는 서로 상가(additive)작용을 나타냄을 알 수 있었다. 한편, 이들 금속의 독성 양상은 ATP 생성 억제와 이에 따른 생존율의 감소로 나타나고 있어 NO의 독성 발현은 대부분 ATP 생성과 관련된 효소의 억제를 통해 발현된다(Kolb와 Kolb-Bachofen, 1992; Snyder와 Bredt, 1992)는 그 간의 연구결과와 일치하고 있다. 또한, 이러한 독성효과들은 NMLA의 전처리로 완전하게 회복되고 있어 니켈 및 코발트의 독성효과들은 대부분 NO에 의해 매개됨을 알 수 있었다.

따라서, NO에 의해 성장이 억제된다고 알려진 병원체의 감염에 의해 나타나는 질환들은 인간에서 지

연성 과민반응을 나타내는 대표적인 감염성 질환들로서 발현 과정이 전형적인 대식세포 매개형 지연성 과민반응의 과정과 유사함을 감안할 때, 피부에 대해서 지연성 과민반응을 일으키는 니켈 및 코발트의 염증 유발 과정도 NO에 의해 매개될 것으로 사료된다.

요 약

목적 : 이 연구는 RAW 264.7 cell의 배양조건에 니켈, 코발트 또는 iNOS의 competitive inhibitor인 NMLA를 여러 조건으로 처리하여 NO 생성의 변조유무 및 이와 관련된 ATP 생성과 세포생존율의 변조양상을 관찰하므로써 니켈 및 코발트가 염증반응을 일으키는 세포독성 과정에서의 NO 역할에 대해 알아보고자 실시하였다.

방법 : Balb/c 마우스의 복강내에 Abelson leukemia virus(A-MuLV)를 주입하여 발생시킨 대식세포주 RAW 264.7 세포의 배양조건에 니켈, 코발트 또는 iNOS의 특이억제제인 NMLA를 여러 조건으로 처리하여 NO 생성의 변조유무 및 이와 관련된 ATP 생성과 세포생존율의 변조양상을 관찰하였다. 세포생존율은 trypan-blue dye exclusion 방법을 이용하였으며 NO는 Hibbs 등(1987)의 방법에 따라 그 대사물질인 nitrite(NO₂⁻)의 측정을 통해 간접 측정하였다. 또한, ATP는 세포막을 파괴한 후 luciferase와 ATP의 반응에 따른 발광정도를 luminometer로 측정하였다. 한편, 각 실험조건에서의 세포의 형태학적 변화는 inverted microscope(×400)를 이용하여 관찰하였다.

결과 : 기본배양조건에 cytokines과 여러 농도의 니켈 또는 코발트의 단독 및 동시첨가의 경우 두 금속 모두 50 μM, 48시간을 기점으로 NO 생성량은 첨가농도의 증가에 따라 용량의존적으로 증가하다가 그 이상의 농도 및 시간에서는 현저히 감소하였으며, 동일 조건에서의 세포생존율은 저농도에서는 대조군과 차이가 없었으나 전반적으로 첨가한 금속의 농도증가에 따라 용량 및 시간 경과에 따라서 감소하는 경향을 보였다.

두 금속 모두 세포생존율 및 NO의 생성율이 높게 유지되는 50 μM, 48시간 배양 조건에서의 결과 또한, 니켈 및 코발트 첨가는 두 금속 모두 cytokines만의 첨가시보다 NO 생성을 더욱 증가시켰으며

ATP 생성정도는 NO 생성 양상과는 반대로 니켈 및 코발트 모두 대조군보다 현저히 감소하였다. 한편 동일 조건에서의 세포생존율은 ATP 감소양상과 비슷하였으며, 이러한 결과들은 두 금속의 동시첨가 시 상가(additive)작용으로 나타났다.

한편, 니켈 및 코발트를 단독 또는 동시 첨가한 경우 모두에서 나타났던 NO의 증가와 ATP 감소 및 세포생존율의 감소는 iNOS 억제제인 NMLA를 전처리로 NO 생성은 감소하고 ATP 및 세포생존율은 증가하여 모든 경우에서 대조군 수준으로 완전히 회복되었다.

또한, 이러한 경향은 RAW 264.7 세포를 여러 실험 조건으로 배양한 후 세포상태를 inverted microscope로 관찰한 결과에서도 동일한 결과를 나타내어 니켈 또는 코발트의 첨가로 나타났던 전반적인 세포의 위축과 불규칙한 외형들은 NMLA의 전처리에서는 나타나지 않았다.

결론 : 이상의 결과에서, 니켈 및 코발트는 대식세포의 NO 생성을 증가시키며 이들 금속에 의한 ATP 생성 억제는 그 간 알려졌던 NO의 궁극적인 독성양상인 ATP 생성억제와 동일한 결과로서, 니켈 및 코발트는 대식세포를 활성화시켜 NO 생성을 증가시키고 NO는 ATP 생성을 억제하여 생존율을 감소시키는 것으로 사료된다. 한편, 니켈 및 코발트의 독성효과들은 NMLA를 전처리로 완전하게 억제되고 있어 니켈 및 코발트의 독성은 대부분 NO에 의해 매개됨을 알 수 있었다. 따라서 NO는 니켈 및 코발트의 염증유발 과정에서 중요한 매개역할을 수행하리라 사료된다.

참고문헌

엄정호. 수은화합물에 의한 EMT-6 세포의 nitric oxide 생성과 관련된 요인에 관한 연구. *대한산업의학회지* 1997;9(1):122-130.

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

Amber I.J., Hibbs J.B., Parker C.J., Johnson B.B., Taintor R.R., Vavrin Z. Activated macrophage conditioned medium: Identification of the soluble factors inducing cytotoxicity and the L-arginine

dependent effector mechanism. *J Leukoc Biol* 1991;49:610-620.

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 T.G., Thai L, Granger D.L., Hibbs J.B. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine Leishmaniasis. *J Immunol* 1993;151:907-915.

Green S.J., Nacy C.A. Antimicrobial and Immunopathologic effects of cytokine-induced nitric oxide synthesis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 1993;6:384-396.

Hibbs J.B., Vavrin Z, Taintor R.R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 1987;138:550-565.

Hibbs J.B., Vavrin Z, Taintor R.R., Rachlin E.M. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:87-94.

Hon W.M., Chhatwal V.J.S., Khoo H. E., Mochhala S.M. Histochemical method for detecting nitric oxide synthase activity in cell cultures. *Biotechnic & Histochemistry* 1997;72(1):29-32

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):155-160.

Klassen, C.D., Amdur, M.O., Doull J. *Casarett and Doull's Toxicology*. Macmillan Publishing Company, New York. 1998

Knowles R.G., Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J* 1994;298:249-258.

Kolb H, Kolb-Bachofen V : Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol Today* 1992;13:157-160.

Koshland Jr, D.E. The molecule of the year. *SCIENCE* 1992;258(18):1861-1865.

Lacy S.A., Merritt K, Brown S.A., 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.

Lewis R.S., Tamir S, Tannebaum S.R., Deen W. M. Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages in vitro. *J Biol*

- Chem 1995;270(49):29350-29355.
- Liew F. Y., Millott S, Parkinson C, Palmer R. M. J., Moncada S. Macrophage killing of leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 1990;44:4794-4797.
- Moncada S, Palmer R. M. J., Higgs, E. A. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews* 1991;43(2):109-142.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. Gower Medical Publishing, London. 1989
- Snyder S.H., Bredt D.S. Biological roles of nitric oxide. *Scientific Am* May1992:28-35.
- Stohs S.J and Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 1995;18(2):321-336.
- Veronesi B., Williams W.C., Smialowicz R.J., Sailstad D.M., Doerfler D., Selgrade M.J.K. Neuropeptide denervation alters both the elicitation and induction phases of contact hypersensitivity in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1998;153(2):243-249.
- Wang W.W., Jenkinson C.P., Griscavage J.M., Kern R.M., Arabolos N.S., Byrins R.E., Cederbaum S.D., Ignarro L.J. Co-induced of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;210:1009-1016.