

유기수은의 세포독성에 대한 셀레늄의 방어효과에 관한 연구

전북대학교 의과대학 예방의학교실 및 의과학 연구소

고대하 · 염정호 · 고영상 · 조선환 · 오탁순

— Abstract —

A Study of Protective Effect of Selenium Against Cytotoxicity of Methylmercury Chloride

Dai Ha Koh, Jung Ho Youm, Young Sang Koh,
Sun Hwan Joh, Tak Soon Oh

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

The purpose of the present study was to elucidate the cytotoxic influence of mercurial compounds and the protective effect of selenium against mercurial compounds.

The effects of mercury compounds and selenium on the syntheses of nitrite(NO_2^-) and ATP were observed in the cell cultures of EMT-6 cells and peritoneal macrophages from Balb/c mouse.

The viabilities of EMT-6 cells and peritoneal macrophages at the end of culture were significantly decreased in dose-dependent manner by methylmercury chloride(CH_3HgCl) added into the media.

NO_2^- and ATP syntheses of the cells were dose-dependently inhibited by CH_3HgCl .

Simultaneous addition of the equimolar dose of selenium completely prevented mercury-induced inhibitions of NO_2^- and ATP syntheses, which were observed in both of EMT-6 cells and peritoneal macrophages. But these effects of selenium were not appeared in the new medium containing mercurials only which were removed the selenium after the pre-treatment of selenium for 6 hours.

These results suggest that protective effect of selenium against mercurial compounds was archived by the formation of a complex consisting of Se-Hg or Se-Hg-protein. Though its mechanism was not clear, the protective role of selenium against the mercury toxicity would be exhibited in the immunological system.

Key Words : CH_3HgCl , Selenium, Nitrite, Nitric oxide, ATP, EMT-6 cell

서 론

인체에 대한 수은의 유해성은 주로 산업장의 작업 환경 내에서의 지속적인 폭로 및 환경오염에 기인하는 생물학적 먹이연쇄를 통한 수은화합물의 체내유입으로 이루어지며(Goyer, 1991), 최근의 경향은 산업장에서의 지속적인 폭로는 점차 감소하는 추세를 보이고 있으나 치과영역에서 사용되는 아말감(amalgam), 기타 토양 및 해양으로부터 얻어지는 식품 등을 통한 지속적인 인체내 유입은 여전히 문제가 되고 있다(Nielson, 1992).

생체내에서 수은의 독작용에 대해서는 많은 논란이 있으나 대부분의 연구들은 수은이 세포막을 구성하는 단백질 중 특히 수은과 친화력이 있는 sulfhydryl(SH)기에 결합하여 세포막의 손상을 유도하거나(Stacey와 Klaassen, 1980), 지질과산화(lipid peroxidation) 반응의 촉진에 의한 과산화 연쇄반응(peroxidative chain reaction)의 활성화에 의해 수은의 세포독성이 발휘되는 것으로 보고하고 있다(Stacey와 Kappus, 1982; Fukuno 등, 1984; Halliwell과 Gutteridge, 1985).

수은을 포함한 일부 중금속들이 실험동물의 면역능에 변화를 초래할 수 있다는 것이 알려진 이후(Polak 등, 1968), 수은이 생체의 면역기능에 미치는 영향을 관찰한 연구로는 대식세포나 임파구의 증식억제 및 탐식능의 변화(Charpentier 등, 1981; Nakatsuru 등, 1985; Ilback, 1991), 항체생성능의 변화(Lawrence 등, 1987), 표적기관인 신장 병변의 특징이 자가면역질환에서와 같이 anti-nucleus antibody의 증가와 동반된다는 관찰결과(Aten 등, 1988; Hultman과 Johansson, 1991) 등이 있다.

셀레늄은 수은을 비롯한 카드뮴의 독성억제와 항암효과가 있는 비금속으로 인체에 꼭 필요한 필수미량원소이다(Shamberger, 1970). 셀레늄의 중금속 독성억제와 항암작용에 대해서는 glutathione peroxidase의 활성화에 의한 항산화작용(antioxidant activity)을 통하여 이루어지거나(Rotruck 등, 1973) 셀레늄이 중금속과 직접 결합하거나 이들 금속에 친화력이 있는 단백질을 매개로 결합하여 독성이 적은 화합물을 형성하므로써 이루어진다는 주장

이 있다(Morimoto 등, 1982).

한편, 세포독성을 나타내는 지표로 이용되는 nitric oxide(NO)는 마우스의 대식세포가 암세포의 증식을 억제하기 위해 필수적으로 이용하는 L-arginine이 세포내에서 대사될 때 guanidino nitrogen의 산화에 의하여 L-citrulline과 동량으로 생성되는 물질로(Hibbs 등, 1987a, 1987b), 주로 cytokines의 자극을 받은 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 효소작용에 의해 생성된다(Kolb와 Bachofen, 1992; Moncada 등, 1992). 또한, 최근의 연구결과들은 NO를 세포성 면역의 분자생물학적 지표로 인정하여 반감기가 극히 짧은 NO 대신 그 대사물인 nitrite(NO₂⁻) 및 nitrate(NO₃⁻)를 측정하므로써 NO의 생성을 간접적으로 유추하고 있다(Hibbs 등, 1988; Green과 Nacy, 1993; Evans 등, 1993).

따라서, 세포배양의 기본조건에 수은 및 셀레늄을 단독 또는 동시첨가하여 배양할 때 두 중금속이 L-arginine-NO pathway에 미치는 영향을 살펴보면 세포에 대한 수은의 독성 및 수은에 대한 셀레늄의 방어효과를 파악하는데 중요한 정보를 얻을 수 있을 것이며 아울러 그 기전 또한 명확히 할 수 있을 것이다.

이 연구에서는 세포성 면역반응(cell-mediated immune response)을 알아보는 데 많이 이용되는 마우스의 복강대식세포와(Hibbs 등, 1987a; Green 등, 1990), Balb/C 마우스의 유선암에서 자연발생적으로 기원하면서 IL-1 또는 IFN- γ 등의 자극에 의해 면역반응이 쉽게 활성화되어 다량의 NO를 생성하는 특성이 있는(Amber 등, 1988) EMT-6 세포를 실험에 이용하여 각 실험조건에서의 세포반응을 관찰하였다. 또한, EMT-6 세포의 기본 배양조건에 수은(CH₃HgCl)과 셀레늄을 단독 또는 병행 첨가한 배양조건과 수은을 배양액에 첨가하기 전에 셀레늄을 전처리한 조건에서 세포생존율과 NO 생성능 및 ATP(adenosine triphosphate) 생성의 변화양상을 비교, 관찰하여 수은에 대한 셀레늄의 방어기전을 명확히 하고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. EMT-6 세포의 준비

동결배양액 [10.5 ml of 5% fetal bovine serum

(FBS, Gibco)-Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Sigma Chemical Co.)+1.2 ml of dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co.)+3.25 ml of FBS) 내에 2×10^6 세포수/ml인 상태로 동결보관중인 EMT-6 세포를 37-38 °C의 수조에서 가온했다. 발생한 세포부유액을 20 ml DMEM에 옮겨 2회 원심분리하여 세척한 다음 2-3회 계대배양한 후 1×10^5 세포수/ml/well의 밀도로 24 well plate에 배양하여 관찰하였다.

실험에서의 기본 배양액은 10% FBS를 포함한 DMEM이었으며, 40 U/ml의 interleukin(rMu IL-1, Sigma Chemical Co.)와 20 U/ml농도의 interferon(rMu IFN- γ , Sigma Chemical Co.)을 첨가하였다.

2. 마우스 복강대식세포의 획득

면역학적으로 활성화된 복강대식세포를 획득하기 위해서 1% thioglycolate($C_2H_4O_2S$, Sigma Chemical Co.) 1 ml을 복강내에 투여하여 10-14일이 경과한 후 치사시키고, 배양액을 복강에 주사한 다음 이를 exudate pipet으로 수거하여 복강세포를 얻었다. 수거액을 원심하여 상청액을 버리고 PBS (pH 7.2)로 3회 세척하여 배양액에 부유시킨 2.4×10^7 개의 세포를 24 well의 culture plate상에 분주하고, 이를 CO_2 부란기에 2시간 동안 정치하여 바닥에 부착된 세포군을 제외한 상청액을 제거. 배양액을 교환해주므로써 복강대식세포의 단일층을 얻었다.

3. 실험조건

대조군은 배양조건에 상기의 cytokine들 즉, IL-1과 IFN- γ 의에는 첨가물이 없는 실험조건이며, 여기에 수은과 셀레늄을 단독 또는 조합하여 병행첨가하였다. 이때, 셀레늄은 수은과 동시첨가한 경우(이하 수은-셀레늄 동시첨가군) 및 셀레늄을 6시간 전 첨가한 후 수은만이 함유된 배양액으로 교환하여 배양한 경우(이하 셀레늄 전처리군)로 구분하였다.

수은(methylmercury chloride, CH_3HgCl , Sigma Chemical Co.)은 대조군($0 \mu M$)외의 5개 실험군에 각각 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, $0.8 \mu M$ 의 농도로 첨가하여 36 시간을 배양하였으며, 셀레늄(sodium selenite, Na_2SeO_3 , Fluka AG,

Swiss)은 수은화합물과 동일농도(equimolar dose)로 첨가하였다.

수은의 농도와 첨가물질에 따라 구분되는 각각의 실험군과 대조군의 실험관찰수는 24회(6 plate \times 4 well/group)였다.

4. 세포생존율 검사

배양이 끝난 후 EMT-6세포의 생존율은 trypan-blue dye exclusion 방법(Phillips, 1973)에 의해 관찰하였다.

5. 배양액내 NO_2^- 의 정량

Hibbs 등(1987)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 배양액 50 μ 씩을 취해 microtiter plate에 옮기고 100 μ 의 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 540 nm에서 흡광도를 읽었으며, 0-100 μM 의 sodium nitrate($NaNO_2$)에 의한 표준곡선으로부터 NO_2^- 농도를 구하였다.

6. ATP 정량

배양이 끝난 세포를 채취하여 2회 원심세척한 후, 6% trichloroacetic acid(TCA) 200 μ 를 첨가하여 초음파분쇄기(ultrasonicator)를 이용하여 세포막을 파괴시켰다. 이를 4 °C, 5,000 g의 조건으로 10분간 원심한 후 얻은 상층액 20 μ 에 100 mM glycine 80 μ 를 혼합한 다음 luciferase luciferin 5 mg을 HEPES buffer 2 ml에 녹인 후 luciferase와 ATP의 반응에 따른 발광정도를 luminometer로 측정하였다.

7. 세포의 현미경적 관찰

EMT-6 세포에 유기수은 $0.8 \mu M$ 단독 및 동일농도의 셀레늄을 동시첨가 또는 셀레늄을 6시간전에 첨가하여 수은만이 함유된 배양액으로 교환하여 배양한 후 inverted microscope로 세포상태를 관찰하였다.

8. 통계처리

측정자료들의 각 군간의 차이는 t-test 및 ANOVA

Table 1. The viability and concentration of NO₂⁻ in EMT-6 Cells and peritoneal macrophages cultured with cytokines and CH₃HgCl for 36 Hours

Dose of CH ₃ HgCl(μM)	Viability(%)		NO ₂ ⁻	
	EMT-6 cell	Mφ	EMT-6 cell	Mφ
0.00*	94.30±2.83	94.79±3.53	78.62±3.16	28.86±1.20
0.05	95.31±2.11	91.20±2.32*	75.34±2.39*	25.14±1.57*
0.10	92.80±3.13	85.63±2.45*	75.68±2.54*	23.43±2.33*
0.20	93.46±3.07	84.12±2.97*	73.27±2.47*	21.54±1.97*
0.40	92.62±3.53	80.13±3.31*	69.11±3.07*	20.38±2.04*
0.80	92.19±2.74	75.58±2.39*	67.96±2.63*	17.25±1.69*

Values represents Mean±S.D.

a : control.

b : The Mφ reopresents to peritoneal macrophage.

* Significantly different from control. p<0.05, Scheffe' s test.

를 이용하였으며, ANOVA 결과에 따라 각 군간에 대한 post-hoc test는 Scheffe' s test를 사용했다.

연구결과

1. EMT-6 세포에 대한 관찰

1) 수은에 의한 세포생존율과 NO₂⁻ 생성능

기본 배양조건에 수은을 첨가하여 36시간을 배양했을 때의 EMT-6 세포의 생존율은 전 실험군(0.05-0.8 μM)에서 90% 이상을 나타냈으며(Table 1), NO₂⁻ 생성량은 평균 68-78 μM의 범위로서 대조군에 비해 현저히 저하되는 것으로 나타났다(p<0.05, Table 1).

2) 수은과 셀레늄의 동시첨가 및 셀레늄 전처리에 의한 NO₂⁻ 및 ATP 생성능

셀레늄의 단독첨가는 세포생존율과 NO₂⁻ 및 ATP 생성량에 영향을 미치지 않았고 대조군과 차이가 없었다.

배양액에 수은과 동일농도의 셀레늄을 첨가한 경우, NO₂⁻ 생성량은 수은-셀레늄군에서 77 - 78 μM의 범위로, 대조군과 차이가 없었다(Fig. 1). 그러나 셀레늄이 포함된 배양액에서 6시간 동안 전처리 한 후 수은만을 포함하는 새로운 배양액으로 교환하여 36 시간을 배양하였을 때의 NO₂⁻ 평균생성량은 71-78 μM의 범위로 용량의존적인 감소경향을 나타냈으며(p<0.05, Fig. 1), 수은을 단독으로 처리했던 조건과 차이가 없었다.

한편, 수은만을 첨가하여 배양한 조건에서 각 군별 ATP의 생성은 평균 13-21 μM의 범위로 대조군에 비해 현저히 저하되어 있었다(p<0.05, Fig. 2). 배양액에 수은과 동일농도의 셀레늄을 동시첨가한 경우와 셀레늄을 전처리하여 6시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 수은이 포함된 새로운 배양액을 첨가하여 배양하였을 때의 평균 ATP 생성량은 전자에서는 20-21 μM의 범위로 전 실험군에서 대조군의 수준을 나타냈고, 후자에서는 14-21 μM의 범위로 대조군에 비해 모든 실험군에서 현저하게 저하된 생성량을 보였다(p<0.05, Fig. 2).

3) 형태적 관찰

EMT-6 세포를 36시간 배양한 후 세포상태를 inverted microscope으로 관찰한 결과, 수은과 셀레늄을 첨가하지 않은 대조군은 양호한 배양상태를 반영하는 높은 세포생존율로써 특유의 세포형태인 방추형 또는 염상으로 배양용기의 바닥에 균일한 세포단일층을 형성하고 있다(Fig. 3-A). 그러나 기본 배양액에 0.8 μM 수은만을 첨가하여 배양한 경우는 전반적으로 세포층의 형성이 균일하지 못하고 세포들은 위축되어 있거나 불규칙한 모양을 보이고 있으며 배양액의 중층에는 방추형의 세포는 보이지 않고 괴사한 것으로 보이는 세포괴들이 응집하여 부유하고 있다(Fig. 3-B).

수은과 동일농도의 셀레늄을 동시첨가한 경우, 세포들은 방추형의 세포가 바닥에 균일한 단일층을 형성하고 양호한 배양상태를 보이고 있다(Fig. 3-C).

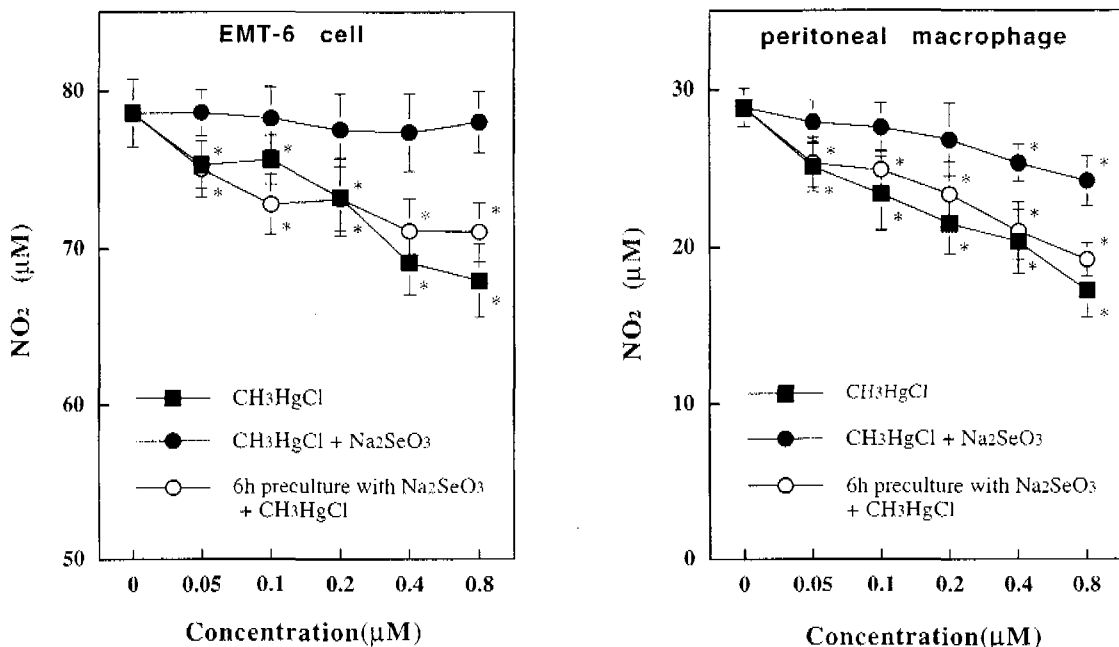


Fig. 1. The syntheses of NO₂ from EMT 6 cells and peritoneal macrophages which were cultured for 36 hours in DMEM containing IU, 1 40 U/ml and 20 U/ml in the various concentrations of CH₃HgCl and Na₂SeO₃. ●: Simultaneous addition of the equimolar dose of CH₃HgCl and Na₂SeO₃. ○: Na₂SeO₃ containing medium was replaced after 6 hours with new medium that containing CH₃HgCl. ■: CH₃HgCl were added only to medium. * Significantly different from the corresponding value of the control at p<0.05.

그러나 6시간동안의 셀레늄 전처리는 세포의 배양상태를 개선시키지 못하고 수은 단독첨가에서와 비슷한 배양상태를 보였다(Fig. 3-D).

2. 복강대식세포에 대한 관찰

1) 수은에 의한 세포생존율과 NO₂ 생성능

수은만을 첨가한 후 36시간을 배양하였을 경우 생존율은 수은의 첨가농도(0.05-0.8 µM)에 따라 75%까지 EMT-6 세포의 경우보다 더 급격한 감소양상을 보였다(Table 1). 한편, 평균 NO₂⁻ 생성량은 17 - 28 µM의 범위로서 각 실험군에서 대조군에 비해 현저한 감소를 보였다(p<0.05, Table 1).

2) 수은과 셀레늄의 동시첨가 및 셀레늄 전처리에 의한 NO₂⁻ 및 ATP 생성능

셀레늄의 단독첨가는 EMT-6 세포에서와 마찬가지로 세포생존율과 NO₂⁻ 및 ATP 생성량에 영향을 미치지 않았고 대조군과 차이가 없었다.

복강대식세포를 기본 배양액에 수은과 동일농도의

셀레늄을 동시에 첨가하여 36시간 배양한 후 측정된 세포의 평균 NO₂ 생성량은 24-28 µM의 범위로서 저농도(0.2 µM)에서는 대조군과의 차이가 없었지만 고농도(0.4-0.8 µM)에서는 대조군보다 현저히 낮았다(Fig. 1). 한편, 셀레늄을 포함하는 배양액에서 6시간 동안 전처리한 후 수은만을 포함하는 새로운 배양액에서 36시간을 배양하였을 때의 NO₂⁻ 생성량은 19-28 µM의 범위로 나타나 전처리 없이 유기수은을 단독처리했을 경우와 마찬가지로 용량의존적으로 감소하였으며(p<0.05) 전 실험군에서 대조군보다 현저하게 저하되었다(p<0.05, Fig. 1).

한편, 수은만을 첨가하여 배양한 조건에서 각 개별 ATP의 생성은 평균 5-10 µM의 범위로서 대조군에 비해 현저히 저하되어 있었으며(p<0.05, Fig. 2). 수은과 동일농도의 셀레늄을 첨가한 경우와 셀레늄을 전처리하였을 때의 평균 ATP 생성량은 전자에서는 8-10 µM의 범위로서 저농도(0.2 µM)에서는 대조군과의 차이가 없었지만 고농도(0.4-0.8 µM)에서는 대조군보다 현저히 낮았고, 후자에서는 6-10 µ

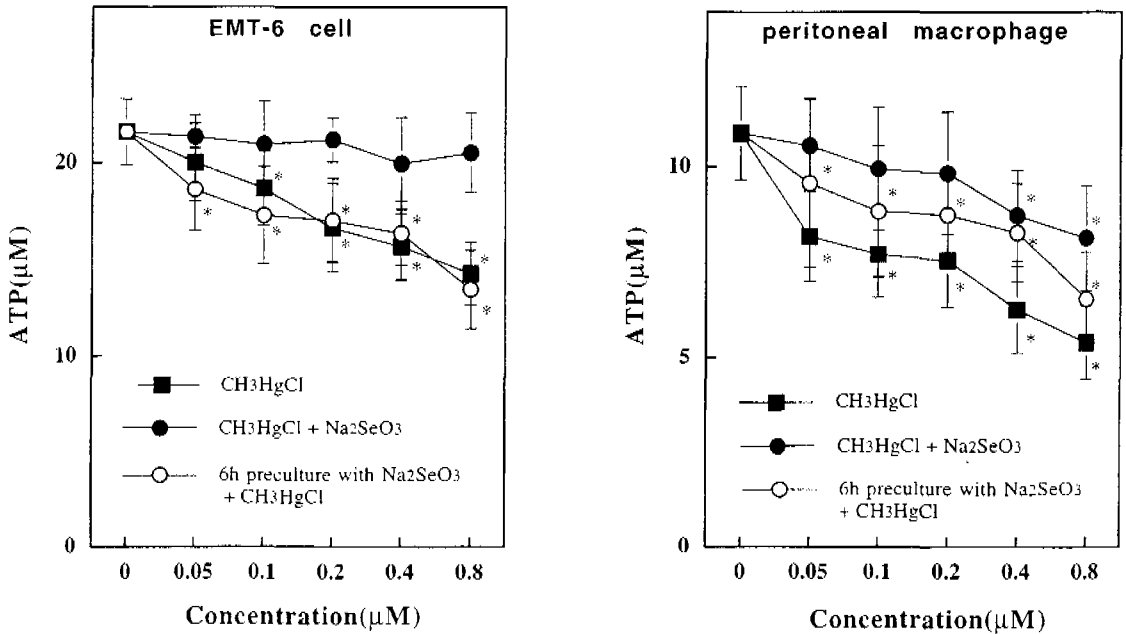


Fig. 2. The syntheses of ATP from EMT-6 cells and peritoneal macrophages which were cultured for 36 hours in DMEM containing IL-1 40 U/ml and 20 U/ml in the various concentrations of CH₃HgCl and Na₂SeO₃. ●: Simultaneous addition of the equimolar dose of CH₃HgCl and Na₂SeO₃. ○: Na₂SeO₃ containing medium was replaced after 6 hours with new medium that containing CH₃HgCl. ■: CH₃HgCl were added only to medium. * Significantly different from the corresponding value of the control at p<0.05.

M의 범위로 대조군에 비해 모든 실험군에서 현저하게 저하된 생성량을 보였다(p<0.05, Fig. 2).

고 찰

그동안 수은의 세포독성기전에 대해서는 수은이 체내대사에 관여하는 효소들의 활성을 억제(Goyer, 1991)하거나 세포막 구성 단백질 중 sulfhydryl (SH)기를 함유하는 단백질의 비활성화(Stacey와 Klaassen, 1980) 또는 미토콘드리아의 손상(Nath 등, 1996) 등을 유발하므로써 세포독성을 일으킨다는 보고들이 있다. 또한, 수은이 생체의 면역반응에 이상을 초래할 수 있다는 것이 여러 연구자들에 의해 밝혀진(Koller, 1980; Luster와 Blank, 1987) 이후, 수은에 노출된 개체에서 신장조직내에 면역복합체(circulating immune complex, CIC)가 침착되거나(Hultman과 Enestrom, 1988), 신장조직의 전자현미경적 소견에서 면역복합체의 침착과 관련된 사구체신염(glomerulonephritis)의 소견(Oliveira

등, 1987)과 같은 자가면역질환의 특성이 관찰되는 (Aten 등, 1988; Hultman과 Enestrom, 1992) 등의 최근 연구보고들은 생체에 대한 수은의 독작용을 이해하기 위해서는 면역학적 접근이 필요함을 시사하고 있다. 일반적으로 수은 투여에 의해 면역기능이 변조된 개체는 세포성 면역의 저하가 특징적이며(Dieter 등 1983). 이는 특정 병원체의 감염에 대한 감수성 또는 치사율이 증가되는 것으로써 확인되고 있다(Koller, 1973; Gainer, 1977).

셀레늄은 인체에 필요한 필수 미량금속으로서 부족시 근육의 퇴행성 변화, 간 괴사, 생식능 변화 등을 유발하며, 음식을 통한 셀레늄의 다량 섭취는 탈모, 손·발톱의 이상, 소화기계의 이상, 관절 이상, 피부나 치아의 변색, 생식능 소실, 선천성 기형 유발 등의 중독증상을 나타낸다(Schroeder 등, 1970). 또한 셀레늄 자체는 다른 금속들에 비해 독성이 미약하지만 DNA 손상 및 자매염색분체(sister-chromated exchange, SCE)의 발생빈도를 높여 발암성(carcinogenesis), 변이원성(mutage-

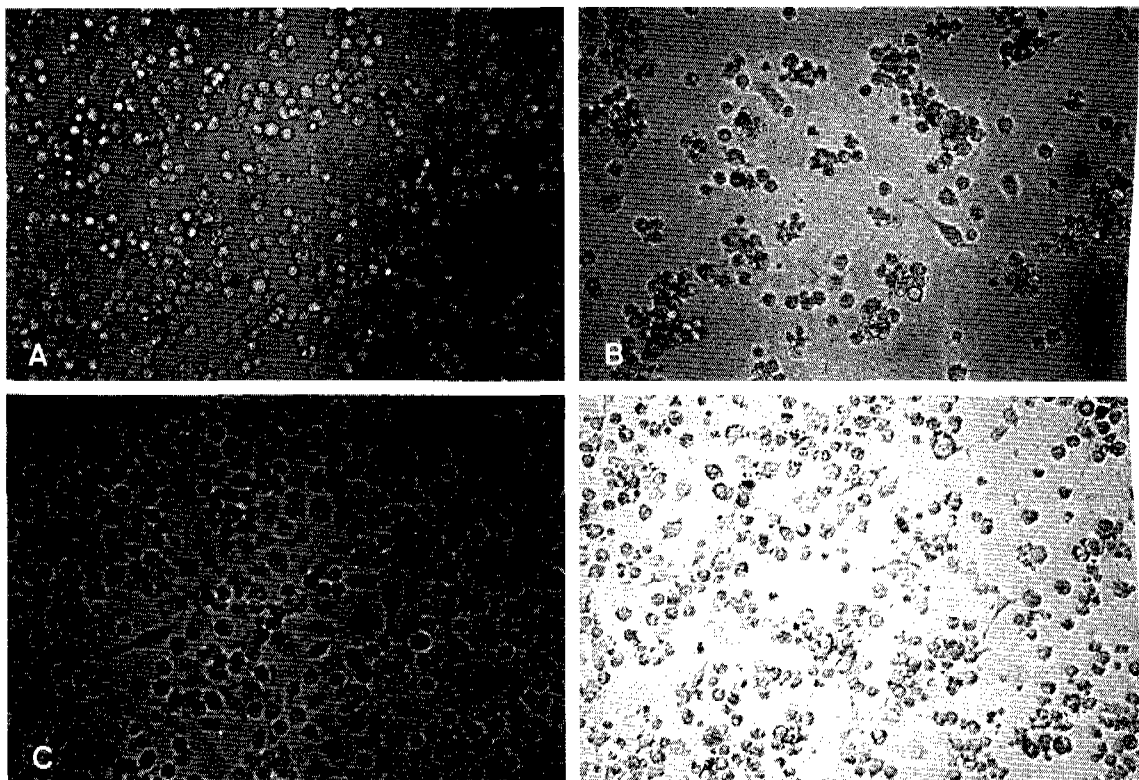


Fig. 3. Inverted microphotographs of EMT-6 cells which were cultured for 36 h. EMT-6 cells were cultured in medium containing IL-1 40 U/ml and INF- γ 20 U/ml a without methylmercury chloride (CH_3HgCl) and sodium selenite(Na_2SeO_3). b with 0.8 μM CH_3HgCl , c with 0.8 μM CH_3HgCl and Na_2SeO_3 , d 0.8 μM Na_2SeO_3 for 6 h and thereafter exchanged to with new medium that containing 0.8 μM CH_3HgCl . Magnification $\times 400$.

ncsis)을 나타내기도 한다(Ray와 Alltenberg, 1980; Whiting 등, 1980). 그러나, 셀레늄이 수은과 생체 내에서 공존하는 상태에서 셀레늄은 수은의 세포독성에 대해 방어효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다(Sumino 등, 1977; Morimoto 등, 1982). 이러한 방어효과는 셀레늄 의존성 glutathione peroxidase의 활성에 의한 항산화작용(Shamberger, 1970; Nath 등, 1996)과 셀레늄과 수은이 직접 결합하거나 두 금속에 친화성이 높은 특이단백질에 셀레늄과 수은이 결합하여 저(低)독성 화합물의 형성(Sumino 등, 1977; Morimoto 등, 1982; Yoneda와 Suzuki, 1997)을 통해 이루어지는 것으로 보고되고 있다. 그러나 이러한 여러 연구결과들에도 불구하고 수은의 세포독성에 대한 셀레늄의 방어기전은 명확히 밝혀지지 않고 있다.

본 연구의 결과에서 EMT-6 세포의 NO생성을

반영하는 NO_2^- 농도는 수은을 첨가한 경우 EMT-6 세포를 이용하여 수은 독성을 확인한 연정호 등(1997)의 연구에서와 마찬가지로 대조군에 비해 현저히 저하되는 현상을 보였다. Hibbs 등(1987b)에 의하면 L-arginine으로부터 NO의 생성과정은 ATP를 요구하므로 수은화합물의 첨가로 EMT-6 세포의 ATP 및 NO 생성능이 저하되는 것은 Goyer(1991) 등이 보고한 바와 같이 수은이 에너지 대사에 관여하는 특정 효소의 활성을 억제하므로써 나타나는 결과로 보인다. 따라서 수은에 의한 세포성 면역의 장애는 수은에 의해 세포내 대사과정이 손상을 받아 세포분열 또는 NO의 생성에 필요한 에너지의 공급이 억제되어, 그 결과 대식세포의 탐식능의 감소(Castranova 등, 1980; Nakatsuru 등, 1985; Ilback, 1991; 김공호 등, 1996)로써 나타난 것으로 사료된다.

결론

한편, 마우스의 체내에서 정상적인 생리기능을 수행하는 복강대식세포에서도 저농도의 수은-셀레늄 동시첨가시 셀레늄의 방어효과가 나타나는 것은 본 실험의 결과가 생체모델에서도 적용될 수 있다는 개연성을 갖는다. 그러나 수은화합물을 첨가한 실험조건에서 복강대식세포는 EMT-6 세포와 비교할 때 현저히 낮은 세포생존율로 수은독성에 매우 취약한 세포인 것으로 것으로 확인되었다. 세포생존율이 현저히 저하된다면 당연히 NO와 ATP 생성량도 비례해서 감소될 것이기 때문에, 이같은 낮은 세포생존율 때문에 수은독성의 지표가 될 수 있는 세포의 일부 고유기능이 이미 저하 되어 있는 상태이므로 마우스 복강대식세포를 이용하여 NO 및 ATP 생성을 정량적으로 관찰하거나, 특정 자극인자에 대한 인과관계로 파악하는 세포독성연구에는 어려움이 있다고 사료된다.

셀레늄은 수은의 세포독성에 대해 방어효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다(Morimoto 등, 1982; Christensen 등, 1989). 이 연구에서도 배양과정에 첨가된 셀레늄은 EMT-6 세포 또는 복강대식세포에 어떠한 영향도 주지 않았다. 그러나 EMT-6 세포를 이용한 실험에서 셀레늄을 수은과 동시에 첨가한 경우, 수은에 의해 억제된 NO_2^- 및 ATP 생성을 대조군의 수준으로 회복시키므로써 Nielsen 등(1992)과 Yoneda와 Suzuki(1997)가 보고한 바와 같은 1:1(셀레늄:수은) 농도비에서 수은 독성이 완화되었다. 그러나 충분한 농도의 셀레늄이 함유되어 있는 조건에서 세포를 6시간 동안 전처리한 경우라도, 셀레늄을 제거한 후 수은과 접촉하면 셀레늄의 방어효과가 전혀 관찰되지 않는 것으로 보아 셀레늄의 방어효과를 ATP 생성과는 관련이 없는 glutathione peroxidase의 활성화에 의한 항산화작용으로 보기는 어렵다. 오히려 이전의 염정호 등(1997)이 제시한 바와 같이 세포내에 유입된 셀레늄이 수은과 반응하여 Hg-Se complex를 형성하거나 Morimoto 등(1982)과 Yoneda와 Suzuki(1997)가 보고한 바와 같이 이들 물질에 친화력이 있는 단백질에 결합하여, 비활성·저독성의 화합물을 형성하므로써 에너지대사와는 관련이 없는 lysosomes과 같은 세포소기관에 수은을 재분배한다는 설명이 보다 타당하다.

배양중인 EMT-6 세포 및 Balb/c 마우스의 복강대식세포에 수은 및 셀레늄을 단독 또는 병행첨가하거나 셀레늄을 전처리하여 세포생존율과 NO_2^- 및 ATP 생성의 변화를 관찰한 결과는 다음과 같다.

수은을 첨가한 배양조건에서 EMT-6 세포의 생존율은 90% 이상으로 유지되었으며, 그 이상의 농도에서는 생존율의 현저한 감소가 관찰되었다. 복강대식세포의 경우 같은 농도조건에서 EMT-6 세포에 비해 더욱 낮은 생존율을 나타냈다. 이때 EMT-6 세포와 복강대식세포의 NO_2^- 및 ATP 생성능은 수은의 농도증가에 따라 용량의존적으로 저하되었다.

셀레늄의 단독 첨가는 EMT-6 세포 및 복강대식세포의 생존율과 NO_2^- 및 ATP 생성에 영향을 주지 않지만, 수은에 의해 저하된 NO_2^- 및 ATP 생성능은 동량(mol)의 셀레늄을 첨가해주므로써 대조군의 수준으로 회복되었다. 그러나 셀레늄으로 6시간 동안 전처리한 후 셀레늄을 제거한 상태로 수은화합물을 첨가한 경우는 셀레늄의 수은에 대한 방어효과가 없었다.

이상의 결과는 수은에 의한 세포독성은 세포내 ATP 생성과 관련한 대사과정의 억제를 통해 NO 생성을 저해하는 것으로 보이며, 셀레늄은 수은과 반응하여 Hg-Se complex를 형성하거나 이들 물질이 친화력이 있는 단백질에 결합하여 수은의 세포내 유입과 막단백질과의 결합을 방해하므로써 수은의 세포독성에 대해 방어효과를 나타내는 것으로 사료된다. 또한 수은의 세포독성에 대한 셀레늄의 방어효과는 생체의 면역계에서도 유사한 기전으로 나타날 것으로 예상된다.

인용문헌

- 김공호, 소병율, 고대하. RAW264.7 세포를 이용한 수은의 세포독성 기전에 대한 연구. 산업의학회지 1996; 8(3):560-569.
- 염정호, 고대하, 소병율. 수은화합물 및 셀레늄이 EMT-6 세포에 미치는 면역독성학적 영향. 산업의학회지 1997; 9(3):466-477.
- Amber IJ, Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z. Cytokine induce an L-arginine-dependent effec-

- tor system in nonmacrophage cells. *J Leuko Biol* 1988;44:58-65.
- Aten J, Bosman CB, Rozing J, Stijnen T, Hoedemaeker PJ, Weening J. Mercuric chloride-induced autoimmunity in the Brown Norway rat. *Am J Pathol* 1988;133:127-138.
- Castranova V, Bowman L, Miles PR, Reasor MJ. Toxicity of metal ions to alveolar macrophages. *Am J Indust Med* 1980;1:349-357.
- Charpentier B, Moullot P, Faux N, Manigand G, Fries D. Fonctions lymphocytaires T au cours d'une glomerulonephrite extramembraneuse induite par une intoxication chronique au mercure. *Nephrologie* 1981;2:153-157.
- Christensen M, Rungby J, Mogensen SC. Effects of selenium on toxicity and ultrastructural localization of mercury in cultured murine macrophages. *Toxicol Letters* 1989;47:259-270.
- Dieter MP, Luster MI, Boorman GA, Jameson CT, Dean JH, Cox JW. Immunological and biochemical response in mice treated with mercury chloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983;68:218-228.
- Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB Jr. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine Leishmaniasis. *J Immunol* 1993;151:907-915.
- Fukuno H, Hirai M, Hsueh YM, Yamane Y. Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;73:395-401.
- Gainer JH. Effects of heavy metals and of deficiency of zinc on mortality rates in mice infected with encephalomyocarditis virus. *Am J Vet Res* 1977;38:869-872.
- Goyer RA. Toxic effects of metals. In Amdur MO, Doull J, Klaassen CD(Eds.), Casarett and Doull's Toxicology. 4th Ed., Pergamon Press Inc., New York. 1991, pp. 646-651.
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 1990;144:278-283.
- Green SJ, Nacy CA. Antimicrobial and immunopathologic effects of cytokine-induced nitric oxide synthesis. *Curr Opin Infect Dis* 1993;(6):384-396.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Mol Aspects Med* 1985;8:89-193.
- Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 1987a;138:550-565.
- Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR. Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987b;235:473-476.
- Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR, Rachlin EM. Nitric oxide: Acytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:87-94.
- Hultman P, Eneström S. Mercury induced anti-nuclear antibodies in mice: Characterization and correlation with renal immune complex deposits. *Clin Exp Immunol* 1988;71:269.
- Hultman P, Johansson U. Strain differences in the effect of mercury on murine cell-mediated immune reactions. *Food Chem Toxicol* 1991;29(9):633-638.
- Hultman P, Eneström S. Dose-dependent studies in murine mercury-induced autoimmunity and immune-complex disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;113:199-208.
- Iiback NG. Effects of methyl mercury exposure on spleen and blood natural killer(NK) cell activity in the mouse. *Toxicology* 1991;67:117-124.
- Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol Today* 1992;13:157-160.
- Koller LD. Immunosuppression produced by lead, cadmium and mercury. *Am J Vet Res* 1973;34:1457-1458.
- Lawrence DA, Mudzinski S, Rudofsky U, Warner R. Mechanisms of metal-induced autoimmunity. In Berlin A, Dean J, Draper EH, Smith EMB, Spreafico F(Eds.), *Immunotoxicology*. Martinus Nijhoff, Dordrecht 1987:293-307.
- Luster MI, Blank JA. Molecular and cellular basis of chemically induced immunotoxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1987;27:23-49.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1992;43(2):109-142.
- Morimoto K, Sumino, I, Koizumi A. Selenite prevents the induction of sister-chromatid exchanges

- by methyl mercury and mercuric chloride in human whole-blood culture. *Mutation Res* 1982;102:183-192.
- Nakatsuru S, Oohashi J, Nozaki H, Nakada S, Imura N. Effect of mercurials on lymphocyte function in vitro. *Toxicology* 1985;36:297-305.
- Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int* 1996;50(3):1032-1043.
- Nielson JB. Toxicokinetics of mercuric chloride and methylmercuric chloride in mice. *J Toxicol Environ Health* 1992;37:85-122.
- Oliveira DBG, Foster G, Savill J, Syme PD, Taylor A. Membranous nephropathy caused by mercury-containing skin-lightening cream. *Postgrad Med J* 1987;63:303-304.
- Pelletier L, Pasquier R, Hirsch F, Sapin C, Druet P. Autoreactive T cells in mercury induce autoimmune disease. In vitro demonstration. *J Immunol* 1986;137:2548-2554.
- Phillips HJ. Dye exclusion tests for cell viability. In Kruse PR, Patterson MK (Eds.), *Tissue Culture Method and Application*. Academic Press, New York. 1973, pp.406-408
- Polak L, Barnes JM, Turk JL. The genetic control of contact sensitization to inorganic metal compound in guinea-pig. *Immunology* 1968;14:707-711.
- Ray JH, Altenberg LC. Dependence of inorganic selenium compounds on the valence state of selenium. *Mutation Res* 1980;76:261-266.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973;179:588-560.
- Schroeder HA, Frost DA, Balassa JJ. Essential trace metals in man: selenium. *J Chron Dis* 1970;23:227-243.
- Shamberger RJ. Relationship of selenium to cancer: inhibitory effect of selenium on carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1970;44:931-936.
- Stacey NH, Klaassen CD. Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *J Toxicol Environ Health* 1980;7:139-147.
- Stacey NH, Kappus H. Cellular toxicity and lipid peroxidation in response to mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982;63:29-35.
- Sumino K, Yamamoto R, Kitamura S. A role of selenium against methylmercury toxicity. *Nature* 1977;268:73-74
- Whiting RF, Wei L, Stich HF. Unscheduled DNA synthesis and chromosome aberrations induced by inorganic and organic selenium compounds in the presence of glutathione. *Mutation Res* 1980;78:159-169.
- Yoneda S, Suzuki KT. Detoxification of mercury by selenium by binding of equimolar Hg-Se complex to a specific plasma protein. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;143(2):274-280.