

Glutathione이 유기수은에 의해 유도된 Apoptosis에 미치는 영향

전북대학교 의과대학 예방의학교실

염정호 · 고대하 · 권근상 · 이미애

— Abstract —

Effect of Glutathione on Apoptosis Induced by Methyl Mercury Chloride

Jung Ho Youm, Dai Ha Koh, Keun Sang Kwon, Me Yae Lee

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

Objectives: This study was performed to evaluate the critical role of glutathione(GSH) in methyl mercury chloride(MeHgCl) induced cell apoptosis.

Methods: The effect of GSH in 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, which is an assay dependent partially on the mitochondrial function. Moreover, in the presence of NAC, a GSH precursor, the MeHgCl induced cytotoxicity was significantly decreased whereas BSO, a specific GSH synthesis inhibitor, increased the MeHgCl induced cytotoxicity. The MeHgCl induced DNA fragmentation and chromatin condensation was consistent with the morphological alterations.

The MeHgCl treated cells exhibited increasing annexin V-FITC binding to the phosphatidylserine(PS) translocated from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane and those cells with NAC pretreatment significantly exhibited decreasing annexin V-FITC binding compared to the cells treated with MeHgCl only. However BSO pretreatment markedly exhibited the increasing annexin V-FITC binding.

The MeHgCl treated cells generated ROS, which was evidenced by the oxidation of dihydroethidine and the generation of the fluorescent product, ethidium. In addition, BSO pretreatment further enhanced the extent of ROS generation caused by MeHgCl whereas NAC pretreatment decreased the amount of ROS generation.

MeHgCl led to a dose dependent decrease in the GSH content. Although MeHgCl exposure significantly reduced the GSH level, those cells that had a NAC pretreatment contained a higher level of GSH compared to the cells treated with MeHgCl only. In contrast, BSO pretreatment further enhanced the extent of GSH depletion caused by MeHgCl.

Conclusions: These results indicate that MeHgCl reduced the GSH content and impaired the defense against oxidative damage caused by ROS formation in RAW 264.7 cells. It is possible that these factors leads to the activation of the apoptosis signaling pathway. Ultimately these results suggest that GSH plays a crucial role in protecting the activity against MeHgCl induced apoptosis.

Key Words: Apoptosis, Methyl mercury chloride, Antioxidants, Glutathione

〈접수일: 2002년 9월 10일, 채택일: 2002년 10월 5일〉

교신저자: 염 정 호 (Tel: 063-270-3131) E-mail: yjho@moak.chonbuk.ac.kr

* 이 논문은 2001년도 전북대학교 연구기반 조성 연구비에 의해 연구됨.

서 론

수은을 포함한 중금속에 대한 만성적인 폭로는 인체 면역 체계의 기능 장애를 유도한다고 알려져 있다. 각종 해산물, 곡류 등에 의한 수은 오염은 높은 대중적 경각심을 일으키고 있으며, 최근 치과용 아말감에 의한 인체 내 수은 축적(Guo 등, 1998; Shenker 등, 2000)이 보고되어 수은 독성, 특히 수은의 면역 독성에 대한 관심이 증가되고 있다.

수은 화합물의 면역체계 활성화 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 활성화와 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, 형태학적 특징을 동반한다(Chio 등, 1996; Oyama 등, 2000; Gasso 등, 2001)는 사실이 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).

Glutathione(L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-

glycine, GSH)은 glutamic acid, cystein, glycine으로 구성된 tripeptide로 생체에서 가장 풍부한 sulfhydryl group의 공급원으로서 동식물과 미생물의 모든 세포 내에 존재하여 세포의 많은 신진대사와 물질이동의 조효소로 작용하고, 활성산소기(reactive oxygen radical)에 의한 세포 손상이나 외부로부터 유입된 유해 중금속 등의 독성에 대하여 방어 작용을 하는 세포 내 방어물질의 하나로 알려져 있다(Chio 등, 1996). GSH는 세포막을 통과하지 못하므로 GSH 전구체(precursor)로부터 세포 내에서 합성되어 세포 밖으로 배출된 후 분해되고 다시 세포 내로 유입되어 합성되는 고유의 순환적 대사경로, 즉 γ -glutamyl cycle을 경유하여 물질 수송에 관여하는데, cystein의 sulfhydryl group에 여러 화합물이 결합한 후 이 대사경로를 통해서 물질 수송이 일어나게 된다. 또한 GSH는 Ca^{2+} 과 thiol의 균형 유지에 중요한 역할을 하기 때문에 GSH의 산화 또는 환원형이 세포 손상과 죽음에 중요하게 작용한다(Close 등, 1999). 최근의 연구에 의하면 GSH는 아세트아미노펜(acetaminophen)이나 수은과 같은 중금속에 대한 세포 독성에 대해 효과적으로 방어하는 것으로 보고되고 있으나 그 기능에 대해서는 아직 논란의 여지가 남아 있다(Chio 등, 1996; Ning 등, 2000).

본 연구는 수은의 세포 독성에 대하여 방어효과를 나타낸다고 알려진 GSH와 세포내 GSH 고갈 물질인 buthionine sulfoximine(BSO)을 처리하여 이들이 수은에 의해서 유도되어지는 apoptosis에 미치는 영향을 알아보고, 수은에 의한 미토콘드리아의 기능 장애의 증거로서 활성산소 발생정도를 측정하고 세포 내 GSH 농도 변화가 활성산소 형성에 미치는 영향을 조사함으로써 수은에 의해 유도되어지는 apoptosis에 대한 GSH의 방어 기전과 역할을 규명하고자 하였다.

재료 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 2-3

일 주기로 37℃, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 각각의 실험에 사용된 시약들은 methyl mercury chloride (MeHgCl, Kanto Chemical Co., Japan), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma Chemical Co., USA), N-acetyl-L-cystein(NAC, Sigma Chemical Co., USA), L-buthionine sulfoximine(L-BSO, Sigma Chemical Co., USA), glutathione(GSH, Sigma Chemical Co., USA), dihydroethidium(HE, Fluka, Switzerland), propidium iodide(PI, Sigma Chemical Co., USA), dimethylsulfonic acid(DMSO, Sigma Chemical Co., USA), Hoechst 33258(Sigma Chemical Co., USA), annexin V-FITC Kit(Pharmingen, San Diego, USA), glutathione assay Kit(Calbiochem, San Diego, USA) 등이다.

2. 수은의 세포독성 검사

수은이 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(1×10^4 /well)를 96 well plate에 seeding 한 후 세포가 잘 부착될 수 있도록 37℃에서 12시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 그런 다음 유기수은(0-5 μ M)을 처리하여 6시간과 24시간 동안 배양한 다음 MTT(5 mg/ml)를 전 well에 25 μ 씩 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 μ 씩 첨가한 후 균일하게 흔들어 주었다. 빛이 차단된 실온에서 5-15분 동안 보관한 후 ELISA reader(SpectraCount)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 내 GSH 농도변화가 수은의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포(1×10^4 /well)를 96 well plate에 seeding 한 후 BSO(50 μ M), GSH(250 μ M), NAC(100 μ M) 등

을 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 범위의 농도로 처리하여 37℃에서 12시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 그런 다음 well에 있는 media를 제거하고 유기수은을 처리하여 24시간 동안 배양한 다음 MTT(5 mg/ml)를 전 well에 25 μ 씩 첨가한 후 위에서 설명한 바와 같이 측정하였다.

3. 세포 내 GSH 농도 측정

RAW 264.7 세포(1×10^6)를 100 mm dish에 seeding하여 12시간 동안 배양한 다음, 다양한 농도의 유기수은(0.5-4 μ M)을 처리하여 37℃에서 48시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 각각의 dish에 있는 세포들을 500 \times g, 4℃에서 원심분리하여 수거한 후 여기에 5% metaphosphoric acid(MPA)를 처리하고 초음파분쇄기를 이용하여 세포를 파괴시킨 다음 3000 \times g, 4℃에서 10분간 원심분리하였다. 이렇게 해서 얻어진 상층액은 GSH assay kit를 이용하여 분광광도계(spectrophotometer)로 흡광도(OD, 400 nm)를 측정함으로써 GSH를 정량하였다(Stokes 등, 2000). 또한 유기수은에 의한 세포 내 GSH 변화에 대한 NAC과 BSO의 영향에 대해서 알아보기 위해 RAW 세포에 NAC(100 μ M)과 BSO(50 μ M)를 12시간 동안 전 처리한 후 유기수은(3 μ M)을 처리하여 48시간 동안 37℃, CO₂ incubator에서 배양한 다음 GSH를 정량하였다.

4. DNA 분절 분석

RAW 264.7 세포(2×10^6)를 60 mm tissue culture dish에 seeding하여 37℃에서 12시간 CO₂ incubator에서 배양하였다. 그런 다음 다양한 농도의 유기수은(0.5-4 μ M)을 처리하여 12시간 후에 DNA laddering 정도를 분석하였다(Jung 등, 2001; Munder 등, 1998). 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 μ g/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 관찰하였다.

5. 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(4×10^5) 6 well plate 내부에 놓인 11 mm glass coverslip 위에 seeding 한 후, 37°C에서 12시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 다음 유기수은(3 μM)을 처리하여 24시간 더 배양한 후 ice-cold 상태의 PBS를 이용하여 coverslip 위에서 자란 세포들이 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

coveslip에 mounting 용액(glycerol, 1 : PBS, 1 v/v)을 떨어뜨려 형광 현미경(Olympus BH2 compound microscope; Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 또한 유기수은 존재 하에서 세포 내 GSH 변화에 따른 핵 형태를 관찰하기 위해 NAC(10 μM), GSH(250 μM) 및 BSO(50 μM)를 12시간 전 처리한 후 유기수은 존재 하에서 24시간 동안 37°C, CO₂ incubator에서 배양한 다음 형광 현미경으로 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 NAC(250 μM), GSH(250 μM) 그리고 BSO(50 μM)를 처리하고 60 mm dish에서 37°C에서 12시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 다음, 유기수은(3 μM)을 처리하여 24시간 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,

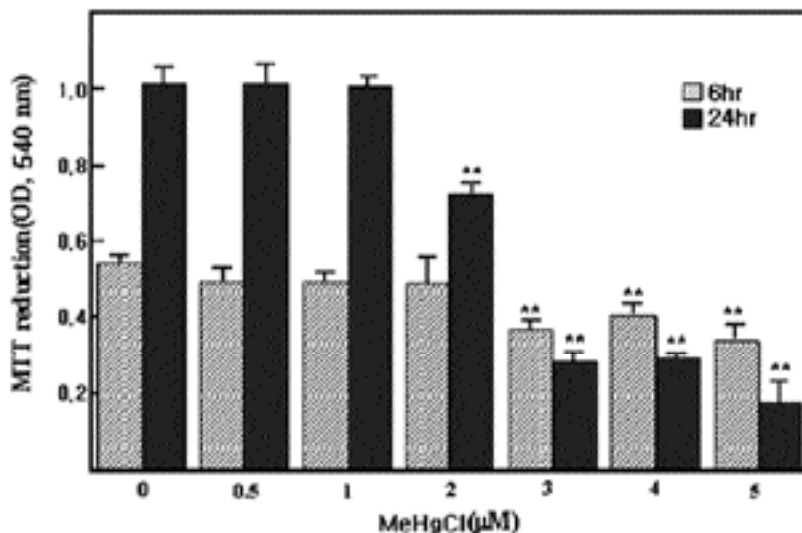


Fig. 1. Effects of methyl mercury chloride(MeHgCl) expressed as MTT reduction(OD, 540 nm) in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^4 /well) were incubated at 37°C in a CO₂ incubator with varying concentration of MeHgCl for 6 hr and 24 hr. The differences between the control group and the MeHgCl treated groups were tested by unpaired t-test. : ** p<0.01

140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂)에 세포를 부유시켰다. 이러한 세포 부유액 중 100 μl (1x10⁵ 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. 활성산소기 생성 분석

세포 내 O₂⁻(superoxide) 특이적 형광 염색물질인 dihydroethidium(HE)을 이용하여 flow cytometer를 통해 측정하였다(Dinara 등, 2001; InSug 등, 1997; Ye 등, 1999). RAW 264.7 세포(4×10⁵)를 60 mm dish에서 12시간 동안 배양

한 다음 유기수은을 처리하고 37℃에서 48시간 동안 CO2 incubator에서 배양하였다. 배양 종료 1시간 전에 HE(2 μM/DMSO)을 처리하는데 이 때 세포에 첨가된 DMSO의 최종 농도는 0.1%이며, 배양 종료 후 ice cold 상태의 PBS로 2-3회 세척한 다음 FACScan flow cytometer를 이용하여 분석하였다. HE는 488 nm에서 excitation되고 575 nm에서 emission되어 bandpass filter를 통하여 측정되었다.

8. 자료처리 및 분석방법

자료처리는 SPSS 10.0을 이용하였다. 대조군과 실험군간의 MTT assay 결과 및 GSH 농도 차이의 유의성을 unpaired t-test로 비교하였다.

결 과

1. 유기수은에 의한 세포독성

유기수은처리 6시간의 경우는 대조군과 비교하여 3 μM부터 흡광도가 현저히 감소되고, 유기수은처리 24시간의 경우는 대조군과 비교하여 유기수은 2 μM

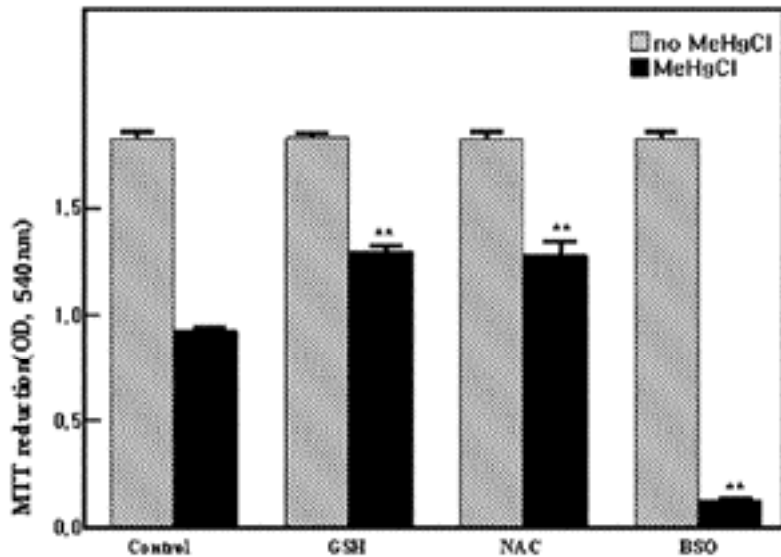


Fig. 2. Effects of GSH, NAC or BSO on MeHgCl-induced cytotoxicity expressed as MTT reduction(OD, 540 nm) in RAW 264.7 cells. The cells were pretreated with NAC (250 μM), GSH(250 μM) and BSO(50 μM) for 12 hr, followed by treatment with or without MeHgCl(3 μM) for 24 hr without a medium change. The differences between the control group and the treated groups(GSH, NAC, BSO) were tested by unpaired t-test. : ** p<0.01

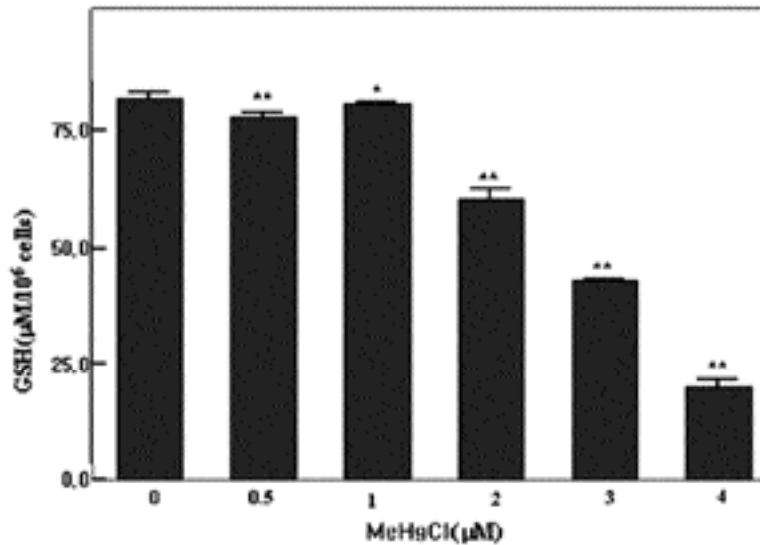


Fig. 3. Concentration of intracellular GSH produced by RAW 264.7 cells which were cultured in DMEM and 0-4 µM MeHgCl. GSH were measured at 48 hr after incubation. The differences between the control group and the MeHgCl treated groups were tested by unpaired t-test. : * p<0.05, ** p<0.01

부터 흡광도가 현저히 감소되어 세포독성효과가 나타남을 알 수 있었다(p<0.01, Fig. 1).

2. GSH, NAC, BSO가 유기수은에 의한 세포독성에 미치는 영향

GSH, NAC 또는 BSO만을 처리하고 유기수은을 처리하지 않은 군은 대조군과 차이가 없었으나, GSH 또는 NAC을 전 처리한 후 유기수은을 처리한 군은 유기수은만을 처리한 대조군에 비해 흡광도가 현저하게 증가하였고, 이와 반대로 BSO를 전 처리한 후 유기수은을 처리한 군은 유기수은만을 처리한 대조군에 비해 흡광도가 현저하게 감소하였다(p<0.01, Fig. 2).

3. 유기수은과 NAC 및 BSO가 세포 내 GSH 농도에 미치는 영향

유기수은은 용량 의존적으로 RAW 264.7 세포의 GSH 농도를 감소시켰다(p<0.05, p<0.01, Fig. 3).

또한 대조군에 비해 NAC만을 전 처리한 군은 세포의 GSH 농도가 현저히 증가하였고(p<0.01), BSO만을 전 처리한 경우는 현저하게 세포내 GSH

농도가 감소되었다(p<0.01). 한편 유기수은만을 처리한 군은 대조군과 비교할 때 세포 내 GSH 농도가 현저하게 감소되었고(p<0.01), NAC을 전 처리한 후 유기수은을 처리한 군이 유기수은만을 처리한 군보다 세포 내 GSH 농도가 현저하게 증가하였으며(p<0.01), 이와 반대로 BSO를 전 처리한 후 유기수은을 처리한 군은 유기수은만을 처리한 군에 비해 세포 내 GSH 농도가 현저하게 감소되었다(p<0.01, Fig. 4).

4. 유기수은에 의해 유도된 DNA 분절

유기수은 3 µM을 처리한 군에서 뚜렷한 DNA 분절과 laddering이 관찰되었으며, 유기수은 4 µM을 처리한 군은 약간의 DNA 분절과 함께 necrosis의 형태학적 특징 중에 하나인 DNA degradation이 관찰되었다(Fig. 5).

5. 세포 내 GSH 변화가 유기수은에 의해 유도된 핵 형태에 미치는 영향

대조군 (Fig. 6A)과 NAC(Fig. 6C) 및 BSO(Fig. 6E)만을 처리한 군은 Hoechst-33258 염색에 의해 pale green 염색을 띠는 반면 유기수

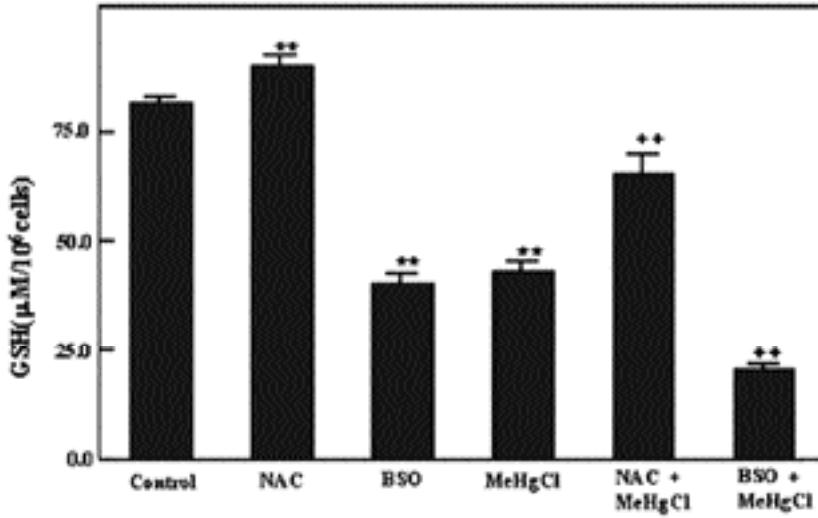


Fig. 4. Concentration of intracellular GSH produced by RAW 264.7 cells which were pretreated with NAC(250 μM) or BSO(50 μM) for 12 hr and then treated with MeHgCl(3 μM). GSH were measured at 48 hr after incubation. The differences between the control group and the treated groups(NAC, BSO, MeHgCl) were tested by unpaired t-test. : ** p<0.01 The differences between the MeHgCl treated group and the NAC + MeHgCl(BSO+MeHgCl) treated groups were tested by unpaired t-test. : ++ p<0.01

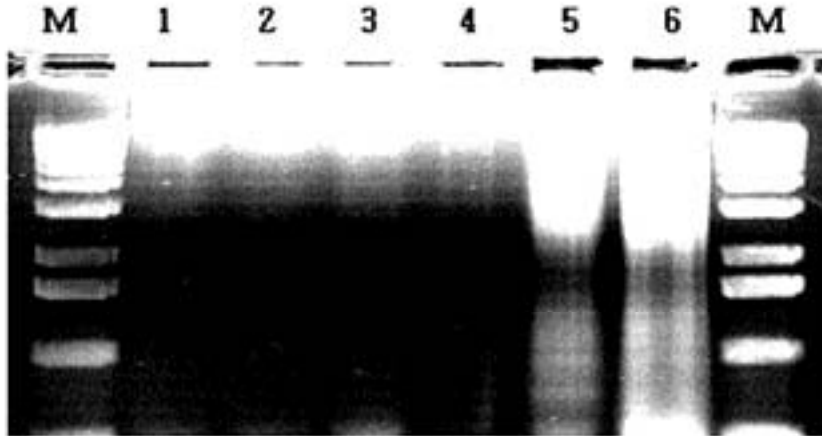


Fig. 5. Evidence for MeHgCl-induced apoptosis. RAW 264.7 cells were treated with various concentration of MeHgCl (0-4 μM) for a period of 12 hr and the cells were then analyzed for the occurrence of apoptosis by DNA fragmentation assay, gel electrophoresis. Analysis of the DNA by 2% agarose gel electrophoresis indicated the occurrence of apoptosis. M : 1kb DNA ladder, Lane 1 : medium alone, Lane 2 : 0.5 μM of MeHgCl, Lane 3 : 1 μM of MeHgCl, Lane 4 : 2 μM of MeHgCl, Lane 5 : 3 μM of MeHgCl, Lane 6 : 4 μM of MeHgCl.

은을 첨가한 군(Fig. 6B)에서는 핵 응축현상으로 인한 bright green 염색의 밀도가 현저하게 증가하였고 세포막 손상으로 인한 PI 염색도 관찰되었다.

이와 대조적으로 NAC을 전 처리한 후 유기수은을 첨가한 군(Fig. 6D)은 유기수은만 첨가한 군에 비해서 apoptosis 세포에서 보여지는 bright green

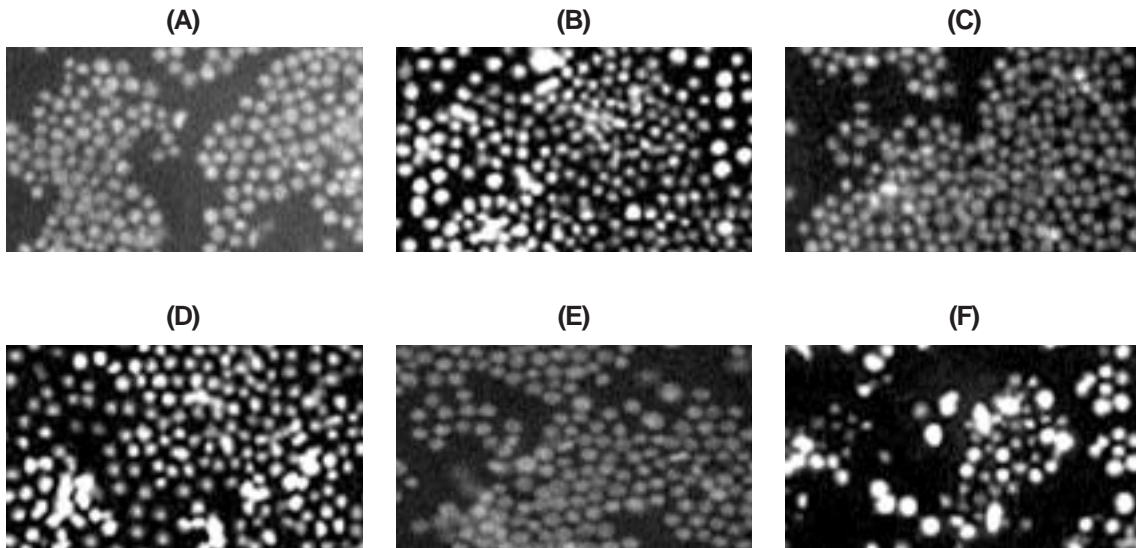


Fig. 6. Cell staining for apoptotic nuclear morphology as evidence for MeHgCl-induced apoptosis. Cells were incubated for 24 hr in medium(A), NAC(C), BSO(E) alone or in the presence of 3 μ M MeHgCl(B). Some cells were pretreated with 250 μ M NAC(D), 50 μ M BSO(F) for 12 hr, followed by treatment with 3 μ M MeHgCl for 24 hr. Cells were stained with Hoechst 33342 dye and Propidium iodide(PI) and examined in a fluorescent microscope. Calibration bar is 10 μ m for fluorescence microscope.

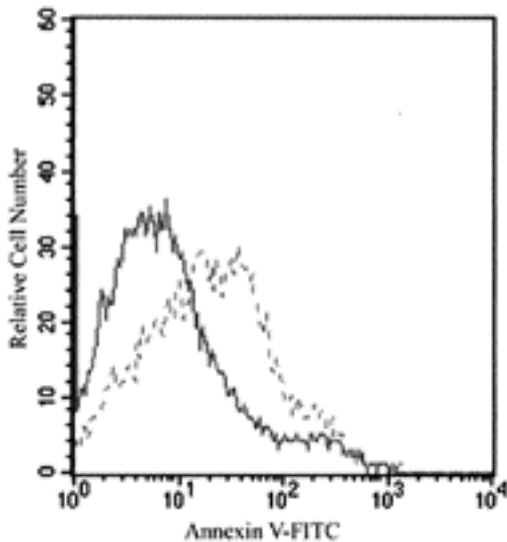


Fig. 7. Effects of MeHgCl on plasma membrane lipid organization as evidence for apoptosis. The effects of MeHgCl on plasma membrane lipid organization was evaluated by the binding of annexin V-FITC to phosphatidylserine(PS). Cells were incubated with in the absence(solid line) or presence (dotted line) of 3 μ M MeHgCl for 24 hr and then stained with annexin V-FITC and analyzed by flow cytometry. Fluorescence was determined by log amplification. At least 10,000 cells were analyzed.

염색의 밀도가 현저하게 줄어들고 정상세포에서 관찰되는 pale green 염색 밀도가 상대적으로 증가하였다. 한편 BSO를 전 처리 한 후 유기수은을 첨가한 군은(Fig. 6F) 유기수은만 첨가한 군에 비해 핵 응축현상과 함께 극심한 세포막 손상으로 인한 apoptosis 후기 세포로 예상되는 bright orange

염색 밀도가 거의 대부분을 차지하고 있었다.

6. 세포 내 GSH 변화가 유기수은에 의해 유도된 세포막의 지질구성 변화에 미치는 영향

유기수은이 처리된 세포에 annexin V-FITC를 이용하여 PS가 세포막 바깥으로 이동하는지를 조사

한 결과 유기수은을 처리한 군은 대조군에 비해 annexin V-FITC에 강하게 결합함을 알 수 있었다 (Fig. 7).

Fluorescence

RAW 264.7 세포에 NAC(250 μ M), GSH(250 μ M)와 BSO(50 μ M)를 전 처리한 후 유기수은을 처리한 군들에 annexin V-FITC 와 PI 염색을 한 다음 apoptosis를 측정 한 결과 대조군은 전체 세포의 1.1%(LR)만 annexin V-FITC에 결합했으며(Fig. 8A), 유기수은을 첨가한 군은 전체 세포의

58.0%(LR)가 annexin V-FITC에 결합하였다 (Fig. 8B). 한편 NAC과 GSH를 전 처리한 후 유기수은을 첨가한 군은 각각 전체 세포의 18.7%(LR)와 16.2%(LR)만이 annexin V-FITC에 결합함으로써 유기수은에 의해서 유도되는 apoptosis를 현저하게 감소시켰다(Fig. 8C, D). 이와 대조적으로 BSO를 전 처리한 후 유기수은을 처리한 군은 전체 세포의 75.9%(LR)가 annexin V-FITC에 결합함으로써 유기수은에 의해 유도되는 apoptosis를 급격하게 증가시켰을 뿐만 아니라 전체 세포수에 4.3%(UR)가 annexin V-FITC와 PI에 동시에 결합함으로써 유기수은만을 처리한 군(1.1%)에 비

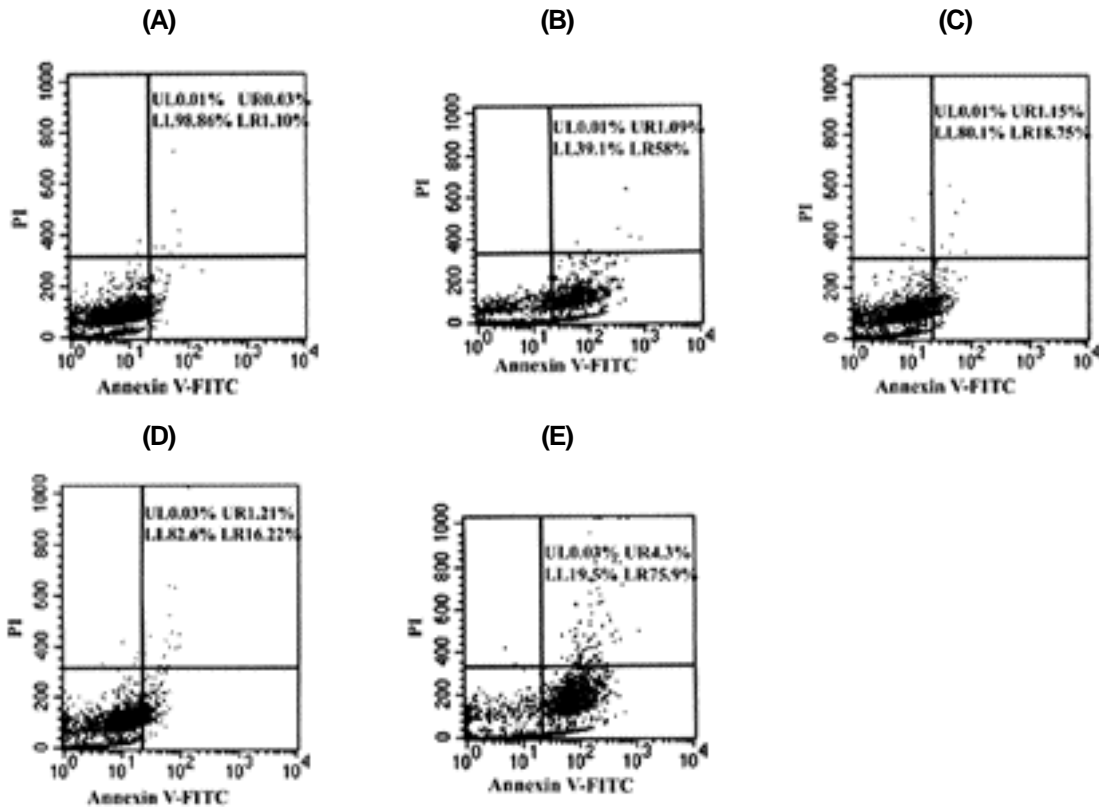


Fig. 8. Effects of intracellular GSH changes to MeHgCl-induced apoptosis in RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hr in medium alone(A) or in the presence of 3 μ M MeHgCl (B). Some cells were pretreated with NAC(C), GSH(D) or BSO(E) for 12 hr, followed by treatment with 3 μ M MeHgCl for 24 hr. Cells were then stained with annexin V-FITC and PI. Viable cells(lower left quadrant: LL) are characteristic as cells exhibiting negative for both annexin V-FITC and PI; apoptotic cells(lower right quadrant: LR) exhibit positive for annexin V-FITC and negative for PI; cells in late stage apoptosis with secondary necrosis(upper right quart: UR) exhibit positive for both annexin V-FITC and PI.

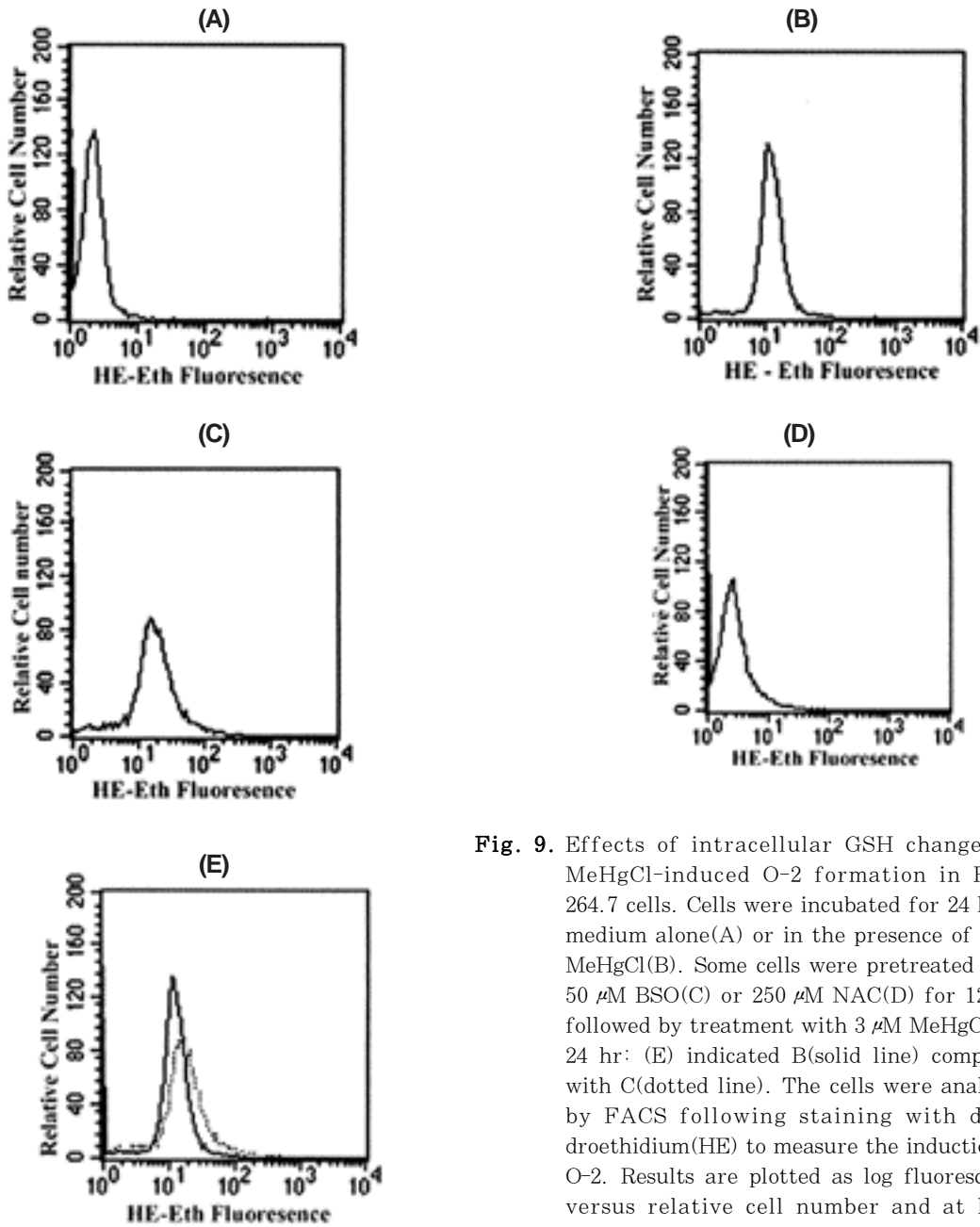


Fig. 9. Effects of intracellular GSH changes on MeHgCl-induced O-2 formation in RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hr in medium alone(A) or in the presence of 3 μM MeHgCl(B). Some cells were pretreated with 50 μM BSO(C) or 250 μM NAC(D) for 12 hr, followed by treatment with 3 μM MeHgCl for 24 hr: (E) indicated B(solid line) compared with C(dotted line). The cells were analyzed by FACS following staining with dihydroethidium(HE) to measure the induction of O-2. Results are plotted as log fluorescence versus relative cell number and at least 10,000 cells were analyzed.

해 apoptosis 후기 또는 2차 necrosis를 겪는 세포 수도 현저하게 증가하였다(Fig. 8E).

7. 세포 내 GSH 변화가 유기수은에 의한 활성산 소기 생성에 미치는 영향

유기수은을 처리한 군은(Fig. 9B) 대조군(Fig.

9A)에 비해 O₂⁻ 의존적 HE의 산화적 형광부산물인 ethidium 생성 증가 양상인 fluorescence(오른쪽으로 이동)를 보였고, NAC(Fig. 9D)을 전 처리한 군은 대조군과 비슷한 양상을 보였다. 그러나 이와 대조적으로 세포 내 GSH 합성 저해물질인 BSO(Fig. 9C)를 전 처리 한 군은 유기수은(Fig.

9B)만을 처리한 군 보다 이러한 ethidium 생성 양상이 증가됨을 보여주고 있다(Fig. 9E).

고 찰

수은 화합물은 세포막을 구성하는 여러 단백질의 sulfhydryl group과 결합하여 세포막 구조를 손상시키거나 기능을 약화시키고, 미토콘드리아의 내부로 유입된 수은 화합물은 기질에 있는 효소들과 결합하여 효소의 활성을 저해할 뿐만 아니라 내막의 전자전달계에 관련된 여러 단백질들과 결합하여 에너지 형성을 억제하는 것으로 알려져 있으며(Wild 등, 1997), 이러한 과정에서 생성된 활성산소기에 대한 항산화능(antioxidative defence)을 감소시키고, 기타 여러 효소들의 활성을 저해시켜 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있다(InSug 등, 1997; Shenker 등, 1999 & 2000). 이와 같이 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). 본 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(Fig. 1). 미토콘드리아의 기능 감소는 apoptosis가 나타나는 세포에서 일어나는 극심한 기능적 변화들 중의 하나라는 연구보고(Madesh 등, 1999; Nakatani 등, 2000; Shenker 등, 1998)와 일치하였다.

GSH는 생물체내에 존재하는 가장 중요한 항산화제로서 세포 독성과 손상에 대해 생체 내 방어작용을 한다. GSH와 GSH 전구체인 NAC 그리고 GSH 생합성에 관여하는 γ -glutamylcystein synthetase를 저해하는 BSO 등을 처리하여 MTT assay를 통한 미토콘드리아 기능장애를 측정하여 세포독성을 알아본 결과 BSO를 전 처리한 후 수은을 처리한 경우는 오히려 수은에 의한 세포독성을 현저하게 증가시켰으며 이와 대조적으로 GSH 또는 NAC을 전 처리한 후 수은을 처리한 경우는 세포독성을 현저하게 감소시켰기에 따라 GSH는 수은의 세포독성에 방어 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 이것은 GSH가 세포 외부에서 수은과 결합하여 수은의 세포독성으로부터 세포를 보호한다는 Atkins 등(2000)과 Chio 등(1996)의 연구 결과와 일치하였다.

수은화합물은 마우스 대식세포나 임파구의 미토콘드리아에 구조적 변형을 초래하고 apoptosis와 관련된 기능들의 변화를 유도한다고 보고되어 있으며, 세포 내 GSH 농도의 감소와 활성산소기 생성에 의한 oxidative stress를 유도하여 미토콘드리아 투과성의 변이를 가져와 궁극적으로 세포사를 유도하는 apoptotic cascade를 자극한다고 한다(Abedi-Balugerdi 등, 1999; Romamoorthy 등, 1998; Shenker 등, 2000). 본 연구에서도 유기수은이 농도 의존적으로 세포 내 GSH 농도를 감소시켰으며(Fig. 4), NAC을 전 처리한 후 유기수은을 처리한 군의 GSH 농도는 현저하게 증가되고, 반대로 BSO를 전 처리한 후 유기수은을 처리한 군의 GSH 농도는 현저하게 감소되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 Abedi-Balugerdi 등(1999)과 Atkins 등(2000) 그리고 InSug 등(1998)의 보고와 마찬가지로 유기수은에 의한 GSH 감소와 apoptosis와의 연관성을 제시해주고 있으며, 이러한 GSH 감소는 아마도 유기수은이 free GSH와 결합하거나 또는 GSH S-transferase와 같은 GSH 합성에 관여하는 효소들과 결합하여 활성을 저해함으로써 일어나는 것으로 사료된다.

Apoptotic process는 많은 서로 다른 level에서 조절되어진다고 알려져 있으며 apoptotic process 초기 단계는 미토콘드리아의 기능적 변화에 의해 조절되어진다고 한다. 알려진 미토콘드리아 막 투과성

의 변이의 특징은 첫째, 미토콘드리아 막 전위 상실 (loss of mitochondria transmembrane potential ($\Delta\psi_m$)), 둘째, 활성산소기 생성, 셋째, 미토콘드리아 외막의 일시적 파열과 팽창의 결과로 인한 세포질 내로 cytochrome c의 방출들이며 이러한 변화는 apoptosis를 유발시키는 중요한 신호전달기전 중 하나인 caspases를 활성화시켜 apoptosis와 관련 있는 다양한 형태학적 변화와 세포질 파괴를 일으키고 궁극적으로 세포 소멸을 가져온다(Close 등, 1999). 계획된 세포사로 일컬어지는 apoptosis는 첫째, 세포질 수축(cellular shrinkage)과 크로마틴 응축(chromatin condensation), 둘째, 세포막의 수포화 현상(cytoplasmic blebbing), 셋째, 180-200 bp DNA로 이루어진 여러 개의 DNA 분절(DNA fragmentation) 형성 등 necrosis와는 다른 형태학적, 생화학적 특징을 동반한다. 본 연구에서는 유기수은에 의한 DNA 유전적 분석을 통해 관찰된 DNA laddering 형성(Fig. 3)과 flow cytometry를 이용한 핵 형태 분석에서 관찰된 핵 응축 현상과 세포분절을 유도하는 apoptotic body 형성(Fig. 6), 그리고 PI와 FITC-conjugated annexin V를 이용한 세포막 지질 구성변화를 통해(Fig. 7) 유기수은이 RAW 264.7 세포에서 apoptosis를 유도한다는 사실을 알 수 있었다. 또한 핵 형태 변화와 세포막지질 구조 변화를 통해 유기수은에 의해서 유도되어지는 apoptosis와 세포 내 GSH 변화의 연관성을 알아본 결과, NAC은 수은에 의한 apoptosis를 급격하게 감소시켰으며, 이와 대조적으로 BSO는 apoptosis를 오히려 현저하게 증가시켰음을 알 수 있었다. 이러한 결과들(Fig. 3, 4, 5, 7)을 통해 세포 내 GSH 농도는 수은에 의해 유도되는 apoptosis를 결정하는 중요한 인자임을 확인할 수 있었다.

수은에 노출된 세포는 미토콘드리아의 기능장애를 가져오고 결과적으로 활성산소 생성과 세포 내 thiol group의 고갈을 가져온다(InSug 등, 1997; Hart 등, 1999; Oyama 등, 2000; Laynes 등, 2001). O_2^- , H_2O_2 , OH $^-$ 등과 같은 활성산소기는 염증 반응, 미토콘드리아 기능장애, 저 항산화 방어체계(low antioxidant defense)를 가지는 세포의 산화적 대사로부터 기원된다. 활성산소기의 가장 극심한 손상효과는 활성산소기가 세포막 지질을 산화시킬

때 일어나는 지질과산화 반응을 통해 지질 과산화소(lipid hydroperoxide), 알데하이드, 알코올과 같은 독성 부산물이 만들어지고, 이러한 것들에 의해 칼슘 균형의 장애와 DNA와 RNA 합성이 저해되고 미토콘드리아 호흡저해 등 apoptosis와 관련된 신호전달기전을 개시하여 결국 세포사에 이르게 한다. GSH는 세포 내 free radical, 특히 활성산소 생성에 중요한 방어 역할을 하는 물질이며, 이들 활성산소 중간물의 대량 생성은 결과적으로 세포 내 GSH 고갈을 가져오며, 많은 세포 내 시스템에서 이러한 GSH 고갈은 세포의 apoptosis 시작과 관련이 있다. 즉 정상세포의 경우 미토콘드리아 내의 GSH는 활성산소와 직접적으로 결합하여 세포 밖으로 배출함으로써 이들 활성산소를 제거하는데, 이러한 과정에 미토콘드리아의 내막에 있는 GSH peroxidase(GPx)와 세포질에 존재하는 catalase가 관여하게 된다. Gasso 등(2000)의 보고에 의하면 세포 내의 활성산소기 생성과 세포 내 GSH 감소와 같은 항산화 체계(antioxidant system)의 저하는 세포의 산화 환원 상태의 변형에 의해 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유도하여 apoptosis를 일으킨다고 한다. 본 연구에서는 유기수은에 의해 유도되는 미토콘드리아의 활성산소기 생성을 측정할 결과 유기수은에 의한 세포 내에서 활성산소기 생성을 확인하였다. 이러한 사실은 수은이 미토콘드리아의 기능저하를 가져온다는 연구보고(Rao 등, 2000; Ye 등, 1999)와 일치함을 알 수 있었다. 또한 GSH 전구체로서 항산화제로 알려져 있는 NAC은 유기수은에 의한 활성산소기 생성을 감소시켰으며, 반면 BSO에 의한 GSH 농도 감소는 이러한 활성산소기 생성을 증가시켰는데 이러한 결과는 유기수은에 의한 활성산소 생성이 세포 내 thiol 상태의 변화에 의해 영향을 받는다는 것을 말해주고 있다. 즉 세포 내 GSH는 활성산소기 제거자로서 수은에 의한 활성산소기 생성으로 야기되는 세포 손상과 apoptosis 유도에 대한 방어 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해보면 유기수은은 RAW 264.7 세포에서 apoptosis를 유도하는 두 가지 중요한 변형을 일으킨다. 유기수은은 첫째, 세포 내 free GSH에 결합하거나 GSH 합성에 관여하는 효소를 저해함으로써 일차적으로 세포 내 GSH를 감소시킨다. 둘째, 미토콘드리아 기능장애를 가져오는

활성산소기를 생성하여 산화적 스트레스를 유도한다. 세포 내 GSH는 세포 내재적 방어물질의 하나로 정상세포에서 발생하는 활성산소기와 결합하여 고유의 순환 대사경로를 통해 활성산소기를 세포밖으로 배출함으로써 세포독성에 대한 방어 역할을 한다. 이러한 과정에 있어서 미토콘드리아로 유입된 유기수은은 미토콘드리아 내막에 존재하는 활성산소기해독에 관여하는 효소와 결합하여 활성을 저해함으로써 활성산소기 생성을 유발시킨다. 또한 미토콘드리아에 존재하는 GSH는 세포질 GSH로부터 유입되므로 유기수은에 의한 일차적 세포 내 GSH 감소는 미토콘드리아 GSH의 감소를 가져오고 이러한 요인 역시 활성산소기 생성을 증가시키며 이러한 활성산소기가 지질과산화연쇄 반응을 일으켜 미토콘드리아 막 변이와 함께 DNA 손상 등 산화적 스트레스를 유발하고 apoptosis를 일으키는 signal pathway가 활성화된다. 궁극적으로 이러한 결과를 통해 세포 내 GSH는 유기수은에 의해 유도되는 apoptosis를 결정하는 중요한 인자라고 사료된다.

결 론

본 연구는 수은의 세포 독성에 대하여 방어효과를 나타낸다고 알려진 GSH와 세포내 GSH 고갈 물질인 BSO를 처리하여 이들이 수은에 의해서 유도되어지는 apoptosis에 미치는 영향을 알아보고, 수은에 의한 미토콘드리아의 기능 장애의 증거로써 활성산소 발생정도를 측정하고 세포 내 GSH 농도 변화가 활성산소 형성에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 유기수은은 농도 의존적으로 세포독성 효과를 나타냈으며, GSH와 NAC은 유기수은에 의한 세포독성을 감소시키고 BSO는 세포독성을 현저하게 증가 시켰다.
2. 유기수은은 농도 의존적으로 세포 내 GSH 농도를 감소시켰으며, NAC을 처리한 경우 세포 내 GSH가 증가되었으며, BSO를 처리한 경우는 현저하게 세포 내 GSH가 감소되었다.
3. DNA 유전분석과 Hochest 33258 및 PI 염색을 이용한 핵 형태 분석을 통해 DNA laddering과 핵 응축 그리고 apoptotic body를 확인하여 유기수은에 의해서 apoptosis가 유도된다

는 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.

4. 유기수은에 의해 유도되는 apoptosis와 세포내 GSH 변화와의 관계를 조사한 결과, NAC은 핵 형태 변화와 세포막 지질구조에 있어서 대조군과 같은 양상을 보인 반면 BSO는 수은에 의한 apoptosis를 현저하게 증가시켰다.
5. 유기수은은 대조군에 비해 유의하게 O_2^- 생성을 증가시키고, NAC을 처리한 군은 유기수은에 의한 O_2^- 생성을 감소시켰으며, BSO는 이러한 생성을 오히려 증가 시켰다.

이상의 연구결과는 세포에 흡수된 유기수은이 GSH 농도를 저하시켜 미토콘드리아의 기능적 저하를 가져오고 활성산소기를 생성함으로써 apoptosis를 유도하는 signal pathway를 활성화시켜 결국 세포사를 가져오게 된다. 즉, 세포 내 GSH는 유기수은에 의해 유도되는 apoptosis를 결정하는 중요한 인자라고 사료된다.

참고문헌

Abedi-Baluggerdi 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):605-615.

Atkins KB, Lodhi IJ, Hurley LL and Hinshaw DB. N-Acetylcysteine and endothelial cell injury by sulfur mustard. *J Appl Toxicol* 2000;20:S125-S128.

Brune B, Gotz C, Meßmer UK, Sandau K, Hirvonen MR and Lapetina EG. Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272(11):7253-7258.

Chio BH, Yee S and Robles M. The effects of glutathione glycoside in methyl mercury poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;141:357-364.

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;77:1433-1443.
- Close AH, Guo TL and Shenker BJ. Activated human T lymphocytes exhibit reduced 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 H₂O₂ provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2001;30(12):1347-1356.
- Dinara S, Sengoku K, Tamate K, Horikawa M, Ishikawa M. Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes. *Hum Reprod* 2001; 16(9):1976-1981.
- Gasso S, Cristofol RM, Selema G, Fosa R, Rodriguez-Farre E and Sanfeliu C. Antioxidant compounds and Ca²⁺ pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chloride neurotoxicity. *J Neurosci Res* 2001;66:135-145.
- 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):250-257.
- 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 participation of oxidant stress. *Toxicology* 1999;133:43-58.
- 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;13:2311-2317.
- 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;124:211-224.
- Jiang Y and Moller G. In vitro effects of HgCl₂ on murine lymphocytes. II. Selective activation of T cells expressing certain V beta TCR. *Int Immunol* 1996;8:1729-1736.
- Jung U, Zheng X, Yoon SO and Chung AS. S-Methylselenocysteine induces apoptosis mediated by reactive oxygen species in HL-60 cells. *Free Radic Bio Med* 2001;31:479-489.
- Laynes RL, Brune B and Townsend AJ. Apoptosis in RAW 264.7 Cells Exposed to 4-Hydroxy-2-Nonenal: Dependence on Cytochrome c Release but not P53 Accumulation. *Free Radic Biol Med* 2001;30(8):884-89.
- 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):240-248.
- Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 1998;160(11):5347-5354.
- 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;125:151-163.
- Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW and Varden D. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int* 1996;50:1032-1043.
- Ning J and Grant MH. The role of reduced glutathione and glutathione reductase in the cytotoxicity of chromium(IV) in osteoblasts. *Toxicol Vitro* 2000;14(4):329-335.
- 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.
- Rao RK, Li L, Baker RD and Gupta A. Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. *Am J Physiol* 2000;279:G332-G340.
- 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;53:415-421.
- 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;77:149-159.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ye J, Wang S, Leonard SS, Sun Y, Butterworth L, Antonini J, Ding M, Rojanasakul Y, vallyathan V, Castranova V and Shi X. Role of Reactive Oxygen Species and p53 in Chromium(VI)-induced Apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274(49):34974-34980.