

## ACTION MECHANISM OF SELENIUM AND ITS ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION ON ORGANIC MERCURY DERIVED BRAIN DAMAGE

Wang-Kee Jhoo\*, Hyoung-Chun Kim\* and Ke-Yong Song\*\*

\*Department of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmacy, Kangweon  
National University, Chun Cheon, 200-701 and

\*\*Department of Pathology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, 151-756, Korea

(Received April 28, 1991)

(Accepted May 15, 1991)

### 유기수은 유발 뇌손상에 미치는 셀레늄의 작용기전 및 전자현미경적 관찰

주왕기\* · 김형춘\* · 송계용\*\*

\*강원대학교 약학대학 약리독성학교실

\*\*중앙대학교 의과대학 병리학교실

**ABSTRACT:** The present study was performed to explore the antioxidant effect of selenium on damaged brain induced by organic mercury. Male ICR mice were given consecutively 7 injections for 7 days of: (1) sodium selenite 1 mg/kg s.c. alone, (2) methylmercuric chloride 10 mg/kg s.c. alone, (3) methylmercuric chloride simultaneously in combination with sodium selenite, and (4) saline alone as control, respectively. Based on the above protocol, we monitored various oxyradical scavenging system as well as the finding of electron microscopy.

The results from brain tissues were as follows;

1. Selenium inhibited the rate of generation of superoxide radical.
2. Selenium induced cytoplasmic SOD, but not mitochondrial SOD.
3. Selenium induced catalase and selenium dependent GSH px, while inhibited peroxidase in the presence of methyl mercury.
4. Selenium promoted the synthesis of SH group.
5. In electron microscope, selenium tended to ameliorate the damaged brain manifested by marked hydropic degeneration of granular cell in the presence of organic mercury. Thus, our findings showed good correlation between bio-

*chemical and morphological changes in brain tissue. Conclusively, our results indicate that the normalization of antioxidant system in the presence of selenium play an important role in protecting effect against organic mercury-induced brain toxicity.*

**Key words:** Antioxidant effect, Selenium, Oxyradical scavenging system, Organic mercury-induced brain toxicity, Hypodropic degeneration of granular cell.

## 서 론

생체내에는 여러 미량금속 성분이 존재하여 체내 항상성 유지에 필수적인 역할을 한다 (Naganuma, A. 1983). 그러나, 그 항상성의 평형이 파괴되면 치명적인 결과를 초래할 수 있다. 우리나라의 경우 급속한 산업화 과정에서 부수되는 수 많은 환경오염 문제들이 크게 대두되고 있는데 그 중에서도 실질적으로 가장 심각한 문제가 바로 중금속오염인 것은 재론의 여지가 없으며, 그로 인한 심각한 중독현상이 선진국에서도 계속되고 있는 실태이다 (Clark, J.A. 등 1982). 중금속 중에서 가장 흔히 노출되는 대상중의 하나로, 또한, 가장 축적성이 강하여 비가역적인 변화를 초래시킬 수 있는 것이 수은으로서, 1860년에 처음으로 그 독성이 보고된 이래 (Taylor, A.S. 등 1860), 1953년 일본의 미나마타병, 1971년에 이라크의 집단 중독 사건등 크고 작은 일련의 중독사건들이 줄을 잇고 있다 (Eddie, W. 등 1971, Bakir, F. 등 1973, Clark, J.A. 등. 1982).

오래전 부터 수은은 농약, 의약품, 의약부외품보조제, 도료 및 수은전지 등의 제조에 불가피하게 이용되어왔으며, 특히 우리나라에서도 심각한 작업환경 오염과 더불어 중금속 폐수가 상당량 하천으로 방류되어 그 오염도가 선진국 수준을 크게 상회하는 등 환경오염에 대한 심각성이 배가 되는 시점에 있다. 1988년 춘천시의 어느 온도계 제조공장에서 발생한 집단 수은 중독 사건이 알려지면서 전국적으로도 수은취급 근로자의 약 20%가 수은 중독인 것으로 나타나, 우리의 작업 환경 개선은 물론 중금속 중독을 최소화 시키는 대책이나 약물개발이 시급히 요청되고 있는 것이다. 본 연구에서는 최근에 이르러 수은독성 발현에 산소 유리기와와의 관련성이 부각됨 (Kim, H. C. 등 1988, Suda, I. 등 1991, Paller, M.S. 1985)에 따라 독성 경감의 대상 약물로 셀레늄을 선정하여 그 가능성을 타진하여 얻은 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 실험동물

Methylmercuric chloride, sodium selenite, cytochrome C, xanthine, xanthine oxidase, bovine serum albumin, potassium cyanide, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, O-dianisidine, glutathione, cumen hydroperoxide, sodium azide 및 glutathione reductase는 Sigma사 제품을 사용하였으며 그 밖의 시약들은 시중의 일급 및 특급을 사용하였다. 실험동물로는 약 2주간 동일조건에서 사육한 ICR계의 수컷 마우스를 사용하였으며, 실험군은 Table 1과 같이 처리하였다. 또한, 좌심실에서부터 생리식염수를 관류하여 혈액이 제거된 뇌조직을 이용하여 생화학적 검정과 전자현미경 검사를 실시하였다.

### 생화학적인 검정

Superoxide 유리기 ( $\dot{O}_2^-$ )의 생성율은 McCord 및 Fridovich 방법 (1969)에 따라 superoxide dismutase (SOD)를 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원 속도를 측정 하였으며, 세포질 및 사립체의 SOD는 Weisiger 및 Fridovich의 방법 (1973)에 따라 추출하여 xanthine과 xanthine oxidase의 존재하에서 생성되는  $\dot{O}_2^-$ 에 의하여 ferricytochrome C의 환원을 억제시키는 원리에 따라 측정하였다. Catalase는 240 nm에서 분해되는  $H_2O_2$  양을 Aebi (1974)의 방법에 따라, peroxidase는 1 mole의  $H_2O_2$ 가 guaiacol을 산화시키는 원리에 따라 Pütter의 방법(1974)에 따라, 그리고 glutathione peroxidase는 Lawrence 등의

**Table 1.** Experimental protocol

Group	Number of animal	Treatment
Control	10	saline alone
Se	10	sodium selenite 1 mg/kg injected by s.c. once a day for 7 days
Hg	10	methylmercuric chloride 10 mg/kg administrated by p.o. once a day for 7 days
Hg+Se	10	this combination group is dosed simultaneously for 7 days

\*Each mouse killed at 24 hr after last administration.

방법 (1974)에 따라 cumen hydroperoxide를 기질로 하여 340 nm에서 변화되는 O.D.를 측정하였다. 또한 뇌조직내의 sulfhydryl은 Ellman 방법 (1959)에 따라 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid가 단백질의 SH와 반응하여 생긴 thionitrobenzoate가 412 nm에서 최대 흡광을 나타내는 것을 측정하였으며, 단백질량은 Lowry 법(1951)에 의하였다.

#### 전자현미경 검색

혈액을 제거시킨 뇌조직을 부위별로 소절편화하여 2.5% glutaraldehyde 용액에 전고정하고, 1% osmic acid 용액에 후고정한 후 초박질편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 중박염색 후 JEOL 200 CX 투과형 전자현미경으로 관찰하였다.

#### 통계분석

Student's t-test를 이용하여 실험결과를 대조치와 비교분석하였다. 유의차 5% ( $p < 0.05$ ) 이하의 수준에서 검정하였다.

## 결 과

#### 메틸수는 중독뇌에서의 superoxide 유리기 ( $\dot{O}_2^-$ )의 생성율에 미치는 셀레늄의 영향

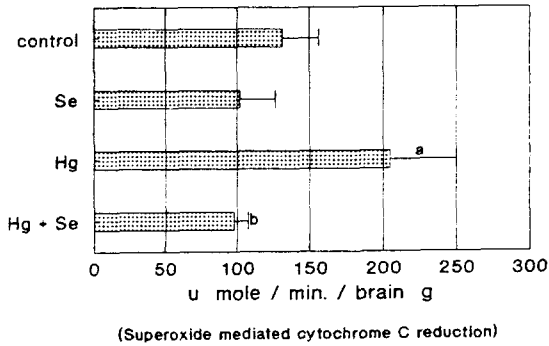
수는 중독뇌에서는 정상대조치에서보다 현저히  $\dot{O}_2^-$  생성율이 증가하였으며 ( $p < 0.05$ ), 셀레늄이 병용될 때에는 현저히  $\dot{O}_2^-$  생성율이 억제되어 ( $p < 0.01$ ), 셀레늄만을 투여한 경우와 동일한 수준으로 되었다 (Fig. 1).

#### 메틸수는 중독뇌에서의 superoxide dismutase (SOD)의 활성유도에 미치는 셀레늄의 영향

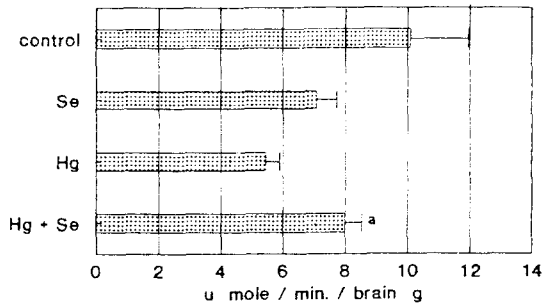
수는 및 셀레늄 병용처리시에는 사립체 SOD의 감소 경향이 나타났으나, 유의한 변화는 나타나지 않았다. 세포질 SOD에 있어서는 대조치와 셀레늄만을 처리시와 각각 비교했을때 경미한 활성감소 경향을 나타내었던 수는 처리군에 셀레늄을 병용투여하면 현저히 그 활성이 유도 ( $p < 0.01$ ) 되었다 (Fig. 2).

#### 메틸수는 중독뇌에서의 catalase 활성유도에 미치는 셀레늄의 영향

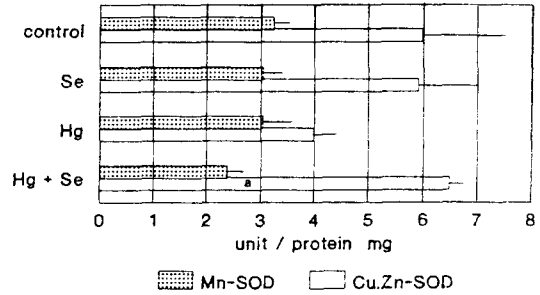
수를 처리한 경우 대조치나 셀레늄만을 처리할 경우와 비교하여 활성 억제 경향을 보였으나, 셀레늄을 병용시킬 때는 활성이 현저히 유도 ( $p < 0.02$ )되어, 정상수준으로 되었다 (Fig. 3).



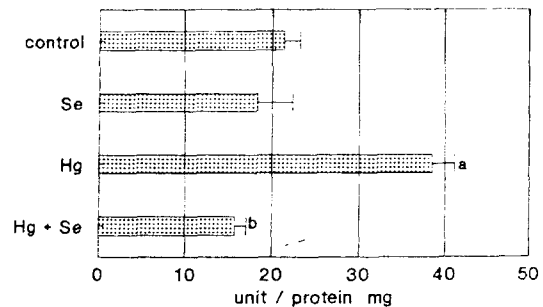
**Fig. 1.** Effect of selenium on the forming rate of superoxide in brain intoxicated by methylmercury. Each value shows mean  $\pm$  S.E. of 10 animals. a:  $p < 0.05$ , vs. control b:  $p < 0.01$ , vs. Hg.



**Fig. 3.** Effect of selenium on the activity of catalase in brain intoxicated by methylmercury. Each value shows mean  $\pm$  S.E. of 10 animals. a:  $p < 0.02$ , vs. Hg.



**Fig. 2.** Effect of selenium on the activity of superoxide dismutase (SOD) in brain intoxicated by methylmercury. A unit was defined as the quantity of SOD required to produce 50% inhibition of the rate of reduction of cytochrome C under the specified conditions. Each value shows mean  $\pm$  S.E. of 10 animals. a:  $p < 0.01$ , vs. Hg.



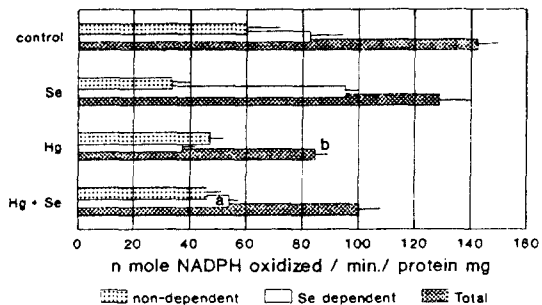
**Fig. 4.** Effect of selenium on the activity of peroxidase in brain intoxicated by methylmercury. A unit was defined as the oxidation of 1 n mole O-dianisidine under the specified condition. Each value shows mean  $\pm$  S.E. of 10 animals. a:  $p < 0.001$ , vs. control b:  $p < 0.001$ , vs. Hg.

### 메틸수은 중독뇌에서의 peroxidase 활성유도에 미치는 셀레늄의 영향

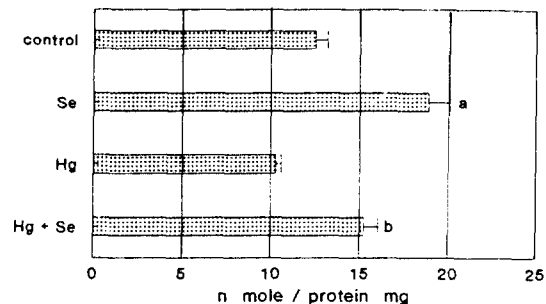
대조치와 셀레늄 처리시에는 동일수준의 활성이 유도 되었으며 수은 처리시에는 대조치 보다 현저하게 활성이 유도 ( $p < 0.001$ ) 되었으나, 셀레늄이 병용되므로서 현저히 억제 ( $p < 0.001$ ) 되어 셀레늄만을 처리한 경우와 동일수준으로 되었다 (Fig. 4).

### 메틸수은 중독뇌에서의 glutathione peroxidase (GSHpx) 활성유도에 미치는 셀레늄의 영향

총 GSHpx의 활성의 경우, 대조치가 가장 높았으며 수은 처리시에는 그 보다 현저히 활성이 억제 ( $p < 0.001$ ) 되었고, 셀레늄이 병용투여되면 활성유도 경향은 나타냈으나, 유의한 변화는 나타내지 못하였다. 셀레늄의존성 GSHpx의 경우는 셀레늄 처리시에 가장 높게 그 활성이 유도되었고, 수은중독시에는 그 활성이 현저히 억제 ( $p < 0.05$ ) 되었다. 또한 셀레늄비의존성 GSHpx의 경우는 대조치에서 가장 높은 활성을, 셀레늄처리시에서 가장 낮은 활성을 나타내었으며, 대조치에 비하여 활성감소 경향을 보인 수은처리군에 셀레늄이 병용되어도 그 활성의 변화는 나타나지 않았다 (Fig. 5).



**Fig. 5.** Effect of selenium on the activity of glutathione peroxidase (GSHpx) in brain intoxicated by methylmercury. Each value shows mean  $\pm$  S.E. of 10 animals. a:  $p < 0.05$ , vs. Hg b:  $p < 0.001$ , vs. control.



**Fig. 6.** Effect of selenium on the content of sulfhydryl in brain intoxicated by methylmercury. Each value shows mean  $\pm$  S.E. of 10 animals. a:  $p < 0.01$ , vs. control b:  $p < 0.001$ , vs. Hg.

#### 메틸수은 중독뇌에서의 SH (sulfhydryl)의 함량에 미치는 셀레늄의 영향

셀레늄 처리시 대조군 보다 그 생성이 현저히 증가 ( $p < 0.01$ )되었으나, 수은을 처리하여도 대조군에 비하여 유의한 변화가 나타나지 않았으나, 셀레늄을 병용처리시에는 그 생성이 현저히 증가 ( $p < 0.001$ )되었다. (Fig. 6).

#### 메틸수은 중독으로 인한 뇌의 미세조직 손상 (전자현미경적 소견)에 미치는 셀레늄의 영향

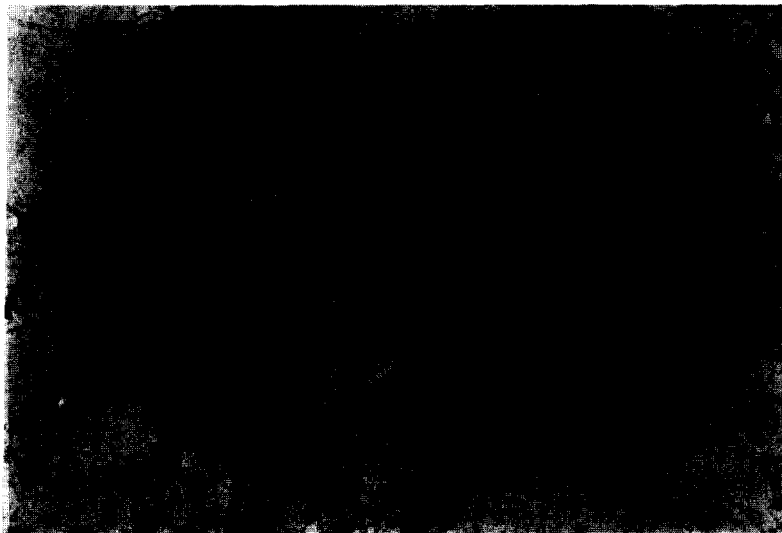
셀레늄을 처리시에는 정상적인 소견이었고, 수은 중독시에는 purkinje 세포는 비교적 정상소견이나, 과립세포에 현저한 수종변성 (hydropic degeneration)을 초래하였다. 수은 및 셀레늄 병용처리시에도 purkinje 세포의 미세구조가 잘 유지되었으나, 과립세포에 경미한 수종변성이 관찰되었다 (Fig. 7-10).



**Fig. 7.** Well preserved brain architectures in selenium group (Lead-citrate-uranyl acetate  $\times 8200$ ).



**Fig. 8.** The purkinje cells showed well preserved architectures, while surrounded granular cells noted by marked hydropic degeneration in methylmercury group (Lead-citrate-uranly acetate  $\times 8200$ ).



**Fig. 9.** Relatively well preserved purkinje cell in methylmercury plus selenium group (Lead-citrate-uranly acetate  $\times 20000$ ).



**Fig. 10.** Mild hydropic degeneration in granular cell was evidenced by marginal clearing cytoplasm in methylmercury plus selenium group (Lead-citrate-uranyl acetate  $\times 20000$ ).

## 고 찰

셀레늄의 항산화작용, 지질과산화의 억제작용 및 수은, 카드뮴, 납을 비롯한 약 15종의 중금속에 대한 길항작용등이 보고 되고 있으나, 그 작용기전은 완전히 밝혀지지 않고 있다 (Naganuma, A. 1983). 한편으로는 셀레늄 자체의 독성이 기형유발 요인이 될수도 있다고 한다 (Robertson, D.S.F. 1970).

인체의 경우 수은중독의 척도는 모발에 축적된 농도를 기준으로 하는데, 미나마타병 발생 당시 일본 참치 어선원의 모발에 차사량의 2배에 달하는 수은이 검출되었는데도 수은 중독 예가 나타나지 않은 사실을 연구자들은 참치내 수은과 더불어 함유된 셀레늄의 작용으로 평가하고 있다 (Ganther, M. E. 등 1972).

본 연구에서는 셀레늄이 glutathione peroxidase의 구성성분임을 인지하여 (Rotruck, J. T. 등 1973) 관련된 전반적인 항산화적인 작용을 규명한 바, 셀레늄은 사립체 (mitochondria) 보다는 세포질의 SOD를 현저히 유도하여 superoxide의 생성을 억제하였는데, 이는 무기수은 유발 실험에서 셀레늄이 사립체의 SOD를 유도하여 superoxide 생성을 억제한 결과와 비교 및 고려해야 할 연구대상이다 (Kim, H. C. 등 1988). 또한, 악성 종양에서 조직의 사립체 SOD가 현저히 억제되는 점을 고려해 볼때 (Fisher, S.M. 등 1988), 유기수은으로 인한 뇌 조직의 사립체 SOD의 억제화도 비가역적인 변화와 연관되는 것으로 보인다.

셀레늄이 수은독성을 경감시킨다 하더라도 병용 투여시에 유의할 사항은 특히 신장과 뇌에서 수은만을 투여할 경우 보다도 투여 초기에는 현저하게 조직내의 수은 농도가 증가되는 점이다 (Naganuma, A. 1983, Jhoo, W.K. 등 1985, Sohn, D.H. 등 1985).

물론, 시간의 경과와 더불어 수은 축적율은 현저히 저하되는데, 이때 metallothioneine 양의 복합체인 Bis(methylmercuric) selenide가 생성되어 독성 경감에 기여한다는 주장도 있다 (Naganuma, A. 1983).

본 연구에서 셀레늄의 투여를 막론하고 투여군 전체에서 사립체 SOD의 유도에 변화가 없는 것은 주목할 사항이다. 그러나, 셀레늄 투여로 현저히 SH 함량이 증가되었을 뿐 아니라, 유기수은으로 저하된 SH 함량을 현저히 증가시켜 지질과산화 억제 및 항산화 작용을 정상화 시킬 수 있음을 시사하고 있다.

Fenton-Harber Weiss 반응에서  $H_2O_2$ 는 superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) 및 미량 철이 금속에 의해 유도된다. 따라서  $H_2O_2$ 를 차단함으로써 초반응성의 Hydroxyl기의 억제에 기여할 수 있다 (Halliwell, B. 1978, Halliwell, B. 등 1984).

Peroxide를 중화 (제거) 하는데는 특이적인 catalase, GSHpx 및 비특이적인 peroxidase의 항상성이 절대적으로 요구된다 (Halliwell, B. 등 1984). 본 연구에서 셀레늄 병용투여로 유기수은 노출시 저하되었던 catalase 및 셀레늄 의존성 GSHpx의 활성은 현저히 유도되고, peroxidase 활성은 거의 정상화되었는데, 주목할 점은 수은만을 처리할 때 보여지는 뇌 peroxidase의 보상성 유도 (compensatory induction)이며, 이때 수은중독 뇌의 기질화 (organization)가 일어날 가능성이 시사된다. 한편, 본 실험조건하에서 조직 학적으로는 개체간의 차이가 인정되었으나, 반복적인 유기수은 노출에도 불구하고 purkinje 세포에는 현저하게 독성이 발현되지 않았으며, 이때 SH 함량도 대조치에 비하여 현저히 저하되지 않았으며, 또한 사립체의 SOD 및 셀레늄 비의존성 GSHpx는 거의 대조치와 유사하였다. 그러나, 과립세포에는 현저한 수종변성 (hydropic degeneration)이 초래되었으며, 이러한 결과는 셀레늄이 병용됨으로서 억제 경향을 나타내었는데, 이러한 현상은 세포질의 SOD, catalase 및 셀레늄 의존성 GSHpx와 같은 항산화 효소가 유도 되는 점과 관련지을 수 있을 것으로 보며 또한, 본 연구자들이 면역조직화학적 검색을 행한 결과, 셀레늄의 항산화작용중의 하나에는 purkinje 세포에서 유도되는 세포질의 SOD가 관여될 가능성을 시사할 수 있었다 (미발표). 그러므로, 본 실험 결과 극미량의 셀레늄은 수은으로 저하된 항산화 체계를 유도하여 수은 독성을 최소화 하는 것으로 사료되며, 만약 극미량 (0.1 ppm 내외)의 셀레늄 화합물을 용해도, 휘발성 유무를 감안하여 음료수에 포함시킨다면, 특히 수은 노출 작업 환경 근로자들의 수은 중독이 격감될 수 있다는 가능성을 제시하고자 한다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1988년도 문교부 학술연구조성지원비로 이루어 졌으며 이에 감사를 드립니다.

### 참고문헌

- Aebi, H. (1974): Calorimetric assay, catalase in *Enzymatic Analysis* (2nd) (Bergmeyer, (Eds), (Academic Press) p. 673-674.
- Baker, F., Kamulji, S. F. and Doherty, R. A. (1973): Methylmercury poisoning in Iraq, *Science*, **81**, 230-241.
- Clark, J.A., Kasselberg, A.G., Glick, A.D., and Oneil, J. A. (1982): Mercury poisoning from mebromin therapy of omphalocele, *Clin. Ped.*, **21**, 445-447.
- Eddie, W., An Robert, C.S. (1971): The fatal dose of methylmercury in man, *J. A. M.*, **216**, 1347.
- Ellman, G.L. (1959): Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
- Fisher, S.M., Floyd, R.A. and Copeland, E.S. (1988): Workshop reprot from the division of research grants, NIH, oxyradical in carcinogenesis, *Cancer Res.*, **48**, 3882-3898.
- Ganther, M.E., Sunde, M.L., and Hoekstra, G. (1972): Selenium related to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna, *Science*, **175**, 1122-1124.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radical, transition metals and disease, *Biochem. J.*, **219**, 1-14.
- Halliwell, B. (1978): Superoxide-dependent formation of OH in the presence of iron chelates, *FEBS Lett.*, **92**, 321-326.



- Jhoo, W.K., Kim, H.C., Huh, I.H., and Sohn, D.H. (1985): The influence of selenium on relation between locomotor activity and brain mercury content in rats. *Res. Bull. Kang Weon, Nat. Univ.*, **21**, 151-156.
- Kim, H.C., Jhoo, W.K., and Huh, I.H. (1988): Influence of sodium selenite on oxygen free radical in mercuric chloride induced renal failure, *J. Pharm. Soc. Kor.*, **32**, 287-293.
- Lawrence, R.A., Sunde, R.A., Schwartz, G.L., and Hoekstra, W.G. (1974): GSHpx activity in rat lense and other tissues in relation to dietary selenium intake, *Exp. Eye. Res.*, **18**, 563-569.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969): SOD enzymatic function for erythrocyte, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.
- Naganuma, A. (1983): Interaction of selenium with mercury in animals, *EISEI KAGAKU*, **29**, 173-187.
- Paller, M.S. (1985): Free radical scavengers in mercuric chloride-induced acute renal failure in the rat, *J. Lab. Clin. Med.*, **105**, 459-464.
- Pütter, J. (1974): Peroxidase, in methods of enzymatic analysis 2nd Bergmeyer, Academic Press, p. 685-687.
- Robertson, D.S.F. (1970): Selenium-a possible teratogen? *The Lancet* **1**, 518-519.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., and Hoekstra, W.G. (1973): Selenium, biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science*, **197**, 588-590.
- Sohn, D.H., Kim, H.C., Heo, M.Y., Jhoo, W.K., and Huh, I.H. (1985): Effects of sodium selenite on merthiolate-induced mercury distribution in rat, *J. Pharm. Soc. Kor.*, **29**, 223-226.
- Suda, I., Totoki, S., and Takahashi, H. (1991): Degradation of methyl and ethylmercury into inorganic mercury by oxygen free radical producing systems-Involvement of hydroxyl. *Arch. Toxicol.*, **56**(2), 129-134.
- Taylor, A.S. and Pavy, F.W. (1860): On poisoning by white precipitate with the physiological effects of this substance on animals, *Guy. Hosp. Rep.*, **6**, 505-510.
- Weisiger, R.A. and Fridovich, I. (1973): SOD, organelle specificity, *J. Biol. Chem.*, **248**, 3582-3592.