

몇가지 중금속(Cr, Hg 및 Cd)이 배양 섬유모세포에 미치는 세포독성에 관한 연구*

정연태 · 박승택 · 최민규 · 김정중 · 김재민^a · 최봉규^b · 한두석^c
우원홍^d · 위인선^e

원광대학교 의과대학 해부학·^b약리학교실 · 치과대학, ^d한의학대학
^a동신실업전문대학 안경광학과, ^e전남대학교 생물학과

A STUDY ON THE CYTOTOXICITY OF SEVERAL HEAVY METALS(Cr, Hg AND Cd) ON CULTURED FIBROBLASTS IN VITRO

Yeun Tai Chung, Seung Taeck Park, Min Kyu Choi, Jeong Joong Kim, Jae Min Kim^a,
Bong Kyu Choi^b, Du Seok Han^c, Won Hong Wood and In Sun Wui^e

Department of Anatomy and Department of Pharmacology^b, School of Medicine,
School of Oriental Medicine^d and, Dental School^c, Wonkwang University,
Department of Ocular Optics, Dongshin Junior College^a and
Department of Biology, Chonnam National University^e.

(Received June 25, 1992)

(Accepted July 1, 1992)

ABSTRACT: Present study was carried out to investigate the cytotoxicity of cadmium, chromium and mercury on cultured rat fibroblasts. The colorimetric assays of neutral red (NR) and tetrazolium MTT, the measurement of total content of protein and electron microscopic studies were performed on the fibroblasts cultured in the media containing various concentrations of cadmium, chromium and mercury.

The results are as follows;

1. In cadmium-treated group, the NR and MTT values were dose-dependent increase. The NR₉₀, NR₅₀, MTT₉₀ and MTT₅₀ values of cadmium were 0.2 μ M, 19.5 μ M, 1.0 μ M and 60.0 μ M, respectively. The total contents of protein at concentrations of cadmium, 0.2 μ M, 24.5 μ M were 90% and 50% of the control, respectively. Electron microscopy showed dilation of cisternae of granular endoplasmic reticulum in cultured fibroblasts treated with cadmium.

*이논문은 1990년도 문교부 지원 학술진흥재단의 자유공모과제 학술 연구조성비에 의하여 연구되었음.

2. In chromium-treated group, NR uptake was decreased dose-dependently and NR_{90} and NR_{50} values were $0.2 \mu M$ and $1.7 \mu M$ respectively. Chromium induced the dose-dependent decrease of the mitochondrial succinic dehydrogenase activity. The MTT_{90} and MTT_{50} values were $0.5 \mu M$ and $5.5 \mu M$ respectively. Protein content was decreased dose-dependently in fibroblasts treated with chromium. Electron microscopy of cultured fibroblasts treated with chromium showed cisternal dilatation of rough endoplasmic reticulum, decrease of polyribosome and increase of lysosome in number.
3. In mercury-treated group, NR uptake showed dose-dependent decrease. The NR_{90} and NR_{50} values were 7.0 and $21.5 \mu M$ respectively. Mercury induced the dose-dependent decrease of mitochondrial succinic dehydrogenase activity and MTT_{90} and MTT_{50} values were $5.0 \mu M$ and $22.0 \mu M$ respectively. Protein content decreased dose-dependently. Electron microscopy showed degenerative changes of granular endoplasmic reticulum, and few lipid droplets in cultured fibroblasts treated with mercury.

The results described indicate that cadmium, chromium and mercury give destructive damage to cell organelles, especially to those involving the protein synthesis, it suggests that heavy metals disturb cell metabolism and results in eventually cell death.

Key words: Cadmium, Chromium, Mercury, Colorimetric assay, Protein content, Electron microscopy

서 론

모든 생물체는 직·간접으로 각종 환경오염물질에 노출되고 있다. 이들 오염물질중 중금속은 생물체에 축적되어 여러가지 형태적, 생리적 부작용을 초래한다. 카드뮴은 일본에서 Itai-Itai병의 원인물질로 밝혀진 이래(Hagino and Yoshioka, 1961), 이의 독성에 관한 연구가 계속되어 왔으며 발암물질로 밝혀졌다(Nomiyama, 1986). 실제로 카드뮴에 노출된 동물이나 카드뮴을 취급하는 공장의 근로자는 빈혈발생률이 높으며(Friberg *et al.*, 1974; Samarawikrama, 1979), 호흡기계통의 질환으로 급성폐렴이나 호흡기 부종(Nordberg, 1972), 심장 혈관계, 골격계 및 신장질환을 유발한다(Nomiyama, 1980; Friberg and Kjellstrom, 1981). 발생계에는 golden hamster의 안면부와 상악의 기형(Ferm and Carpenter, 1967)이나 생쥐의 사지 및 안면부의 기형을 유발시킨다(Layton and Layton, 1979). 지표면에 풍부한 크롬은 다양한 형태의 화합물로 존재하며 그 중 3가와 6가 크롬의 독성이 심하다. 6가 크롬은 높은 용해도와 침투력 때문에 3가 크롬보다 더 심한 세포독성(Nakamura *et al.*, 1987)을 가지며 특히 신장, 간장 그리고 폐등에서 뚜렷한 생화학적, 병리형태학적 변화를 일으키고(Kumar *et al.*, 1985), 생쥐의 초기배아 발생에도 기형을 유발한다(Iijima *et al.*, 1983; Park *et al.*, 1987). 수은은 농업 및 산업분야에서 널리 이용되어 왔으며 인체에 대한 독성으로 Minamata병의 발생이후(Tokuomi *et al.*, 1961) 이들에 대한 관심이 높아졌다. 수은은 포유동물의 발생초기에서 기형과 치사작용을 일으키고(Weis and Weis, 1977; Fuyuta *et al.*, 1978; Greener and Kochen, 1983), 생물체의 생리적 변화를 주며(Olson and Massaro, 1977; Chen *et al.*, 1979), 특히 임신한

취의 경우, 모체보다 태아에 더 심각한 영향을 미친다(Matsumoto *et al.*, 1967).

근래에 들어 세포배양기술이 발달함에 따라 많은 종류의 세포배양계에 특정 독성물질을 투여하여 이들의 독성작용을 세포수준에서 규명하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(Iijima *et al.*, 1983; Russo and Pacchierotti, 1988; Chung *et al.*, 1988; Moon *et al.*, 1991). 특히 이들의 독성작용을 효과적으로 분석하려는 방법들이 최근 많이 개발되고 있다. Neutral red(NR)과 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-1-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] 분석법은 각각 세포소기관중 용해소체와 사립체에 대한 영향을 분석할 수 있는 방법으로 세포의 생존력 검정의 결과와 거의 일치하며, 기존의 trypan blue exclusion test보다 훨씬 간편하고 정확하므로 독성물질이 배양세포의 생존력에 미치는 영향을 분석하는데 최근 효과적으로 사용되고 있다(Chung *et al.*, 1988; Moon *et al.*, 1991).

본 연구는 카드뮴, 크롬 및 수은이 백서의 배양 섬유모세포에 미치는 영향을 검정하기 위하여 NR과 MTT분석, 총단백질양의 측정 그리고 전자현미경적인 관찰등이 시도되었다.

재료 및 방법

세포배양

생후 2-3일 된 백서의 미부에서 분리한 섬유모세포를 배양용기(24 well plate, Nunc)에서 3-4회 계대 배양하여 사용하였다. 세포배양액은 Eagle's minimum essential medium(MEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 Penicillin G(25 unit/ml), Streptomycin(25 μ g/ml) 및 Fungizone(0.25 μ g/ml)을 혼합하여 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂로 조정된 항온기내에서 배양하였으며, 배양액은 3일마다 교환하였다. 세포수의 산정은 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 부유시킨 후 0.2% trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 계산하였다.

중금속 처리

본 실험에 사용한 중금속, 카드뮴(cadmium chloride, Sigma), 크롬(chromium chloride, Sigma)과 수은(mercuric chloride, Mallinckradt)은 증류수에 녹여 MEM으로 희석한 후 10 mM의 저장액으로 만들어 냉암소에 보관하고 사용당일 필요한 농도로 사용하였다.

세포소기관 독성검정

NR(Neutral Red)정량

Borenfreund와 Puerner(1984)방법에 의하여 세포를 배양용기당 10⁴ cells/ml이 되도록 24 well plate에 분주하여 24시간 배양 후, 여러 종류의 중금속이 포함된 배양액으로 교환하고 다시 24시간 동안 배양하여 NR(Sigma) 50 μ g/ml가 포함된 배양액을 37°C 암소에서 overnight시킨 후, well당 1 ml씩 넣어 3시간동안 배양하였다. 배양완료 후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline(PBS)으로 2-3회 세척하여 1% formaldehyde- 1% CaCl₂를 well당 0.5 ml씩 넣어 세포를 고정하였으며, 1% glacial acetic acid-50% ethanol을 well당 2 ml씩 넣어 15분간 실온에 방치하여 3시간 동안 용해소체내에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR의 흡광도를 분광광도계(540 nm)로 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

MTT정량

Mosmann(1983)의 방법에 의하여, 세포를 중금속이 첨가된 배양액에서 24시간 배양한 후, 분석당일 조제한 MTT(Sigma) 50 μ g/ml가 포함된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고 Dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온방치하여 MTT formazan을 용해한 후, 분광광도계(550 nm)로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교조사하였다(Carmichael *et al.*, 1987; Borenfreund *et al.*, 1988).

세포의 전자현미경적 관찰

배양세포의 미세구조관찰을 위한 전자현미경시료의 제작은 Moeses와 Claycomb의 방법(1982)을 약간 변형하여 사용하였다. 직경 60 mm petri-dish에 세포를 분주하여 24시간 배양하였으며 중금속이 NR₉₀과

NR₅₀의 농도로 포함된 배양액에 24시간 노출시킨 후, PBS로 3회 세척하여 1% glutaraldehyde(0.1 M phosphate 완충액, pH 7.2)로 전고정하고 1% OsO₄(0.1 M phosphate 완충액, H 7.2)로 후고정하였다. 고정된 시료는 ethanol(50-100%)로 탈수시켰다. 100% ethanol에 의한 최종탈수는 2회 반복하였으며, 100% ethanol과 epon 수지(Epon 812, Polysciences)혼합액을 1:1로 섞은 혼합액으로 실온에서 1시간동안 침투시켰다. 그 후 순수한 epoxy혼합액만으로 교환하고 35°C, 45°C, 60°C 오븐내에서 각각 24시간씩 유지시켜 중합을 완료하였다. 수지중합 후 액체 질소(-196°C)에 5분간 보존시킨 다음 꺼내어 세포배양용기와 세포가 매몰되어 있는 epoxy블럭을 분리시켰다. Ultramicrotome을 이용하여 80 nm두께로 초박질편을 만들고, uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하였다. 세포의 미세구조는 Hitachi H-600 전자현미경을 이용하여 75 KV 가속전압하에서 관찰하였다.

통계처리

실험결과와 통계처리는 Student's paired t-test에 준하였고, P-value가 0.05이하일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

세포소기관 독성검정

여러 농도의 카드뮴으로 처리하여 NR의 흡광도를 측정하였다. 대조군의 흡광도를 100%로 하여 농도에 따른 흡광도를 비례적으로 산출한 결과, 흡광도는 농도에 비례하여 감소하였으며, 세포가 영향을 받기 시작하는 농도인 NR₉₀(Initial point cytotoxicity value;ICV)과 50%의 영향을 받는 농도인 NR₅₀(Midpoint cytotoxicity value:MCV)은 각각 0.2 μM과 19.5 μM이었다. 여러 농도의 크롬으로 처리하여 NR의 흡광도를 조사하였다. 흡광도는 농도에 비례하여 감소하였으며, NR₉₀과 NR₅₀은 각각 0.2 μM과 19.5 μM이었다. 여러 농도의 수은으로 처리하여 NR의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 농도에 비례하여 감소하였으며, NR₉₀과 NR₅₀은 각각 7.0 μM과 21.5 μM이었다(Fig.1).

카드뮴이 여러농도로 포함된 배양액에서 백서의 섬유모세포를 24시간 배양하여 MTT의 흡광도를 측정하였다. 대조군의 흡광도를 100%로 하여 농도에 따른 흡광도를 비례적으로 산출하였다. 흡광도는 카드뮴의 농도 증가에 따라 감소하였으며, MTT₉₀과 MTT₅₀의 농도는 각각 1.0 μM과 60.0 μM이었다. 여러 농도의 크롬을 처리하여 MTT의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 농도에 비례하여 감소하였으며, MTT₉₀과

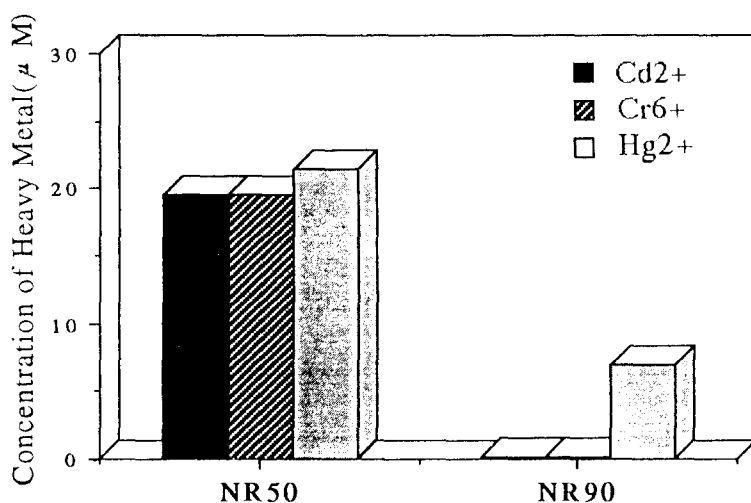


Figure 1. The effect of Cd²⁺, Cr⁶⁺ and Hg²⁺ in rat fibroblasts on the ability of neutral red uptake. Each point represents the mean from at least three different experiments.

MTT₅₀의 농도는 각각 0.5 μ M과 5.5 μ M이었다. 여러 농도의 수은을 처리하여 MTT의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 농도에 비례하여 감소하였으며, MTT₉₀과 MTT₅₀의 농도는 각각 5.0 μ M과 22.0 μ M이었다 (Fig. 2).

대조군의 총단백질량을 100%로 하여 농도에 비례적으로 산출하여 각 농도에 따른 총단백질량을 백분율로 나타내었다. 카드뮴의 NR₉₀농도에서 총단백질량은 89%, NR₅₀에서는 55%로 나타났으며, 총단백질량이 대조군의 90%와 50%로 감소를 보인 농도는 각각 0.1 μ M, 25 μ M로 나타났다. 총단백질량의 감소 양상은 NR의 농도에 따른 감소 양상과 일치하였다.

크롬의 NR₉₀의 농도에서 총단백질량은 대조군의 94%, NR₅₀에서는 62%로 나타났으며, 총단백질량이

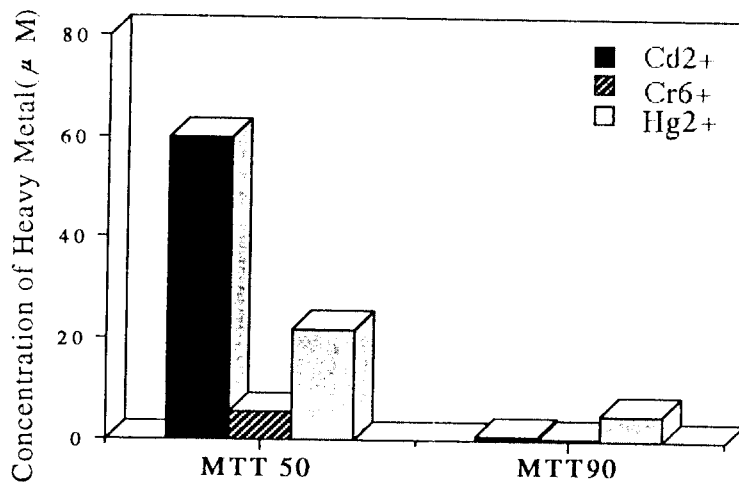


Figure 2. The effect of Cd²⁺, Cr⁶⁺ and Hg²⁺ on the production of MTT formazan in rat fibroblasts.

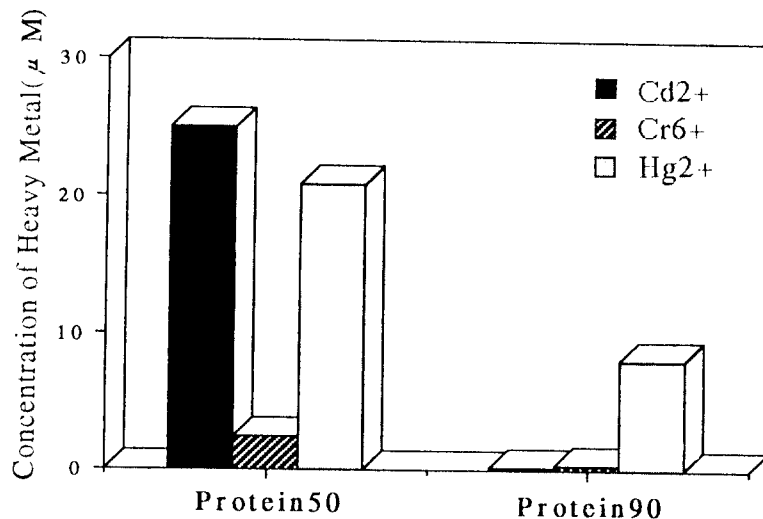


Figure 3. Protein contents of rat fibroblasts by NR uptake in each heavy metal treated group.

대조군의 90%와 50%로 감소를 보인 농도는 각각 $0.4 \mu\text{M}$ 과 $2.4 \mu\text{M}$ 로 나타났다. 총단백질량은 NR의 농도에 따라 감소하였다.

수은의 NR_{90} 의 농도에서 총단백질량은 대조군의 92%, NR_{50} 에서는 51%로 나타났으며, 총단백질량이 대조군의 90%와 50%로 감소를 보인 농도는 각각 $8.0 \mu\text{M}$ 과 $21.0 \mu\text{M}$ 로 나타났다. 총단백질량의 감소 양상은 NR의 농도에 따른 감소 양상과 일치하였다(Fig. 3).

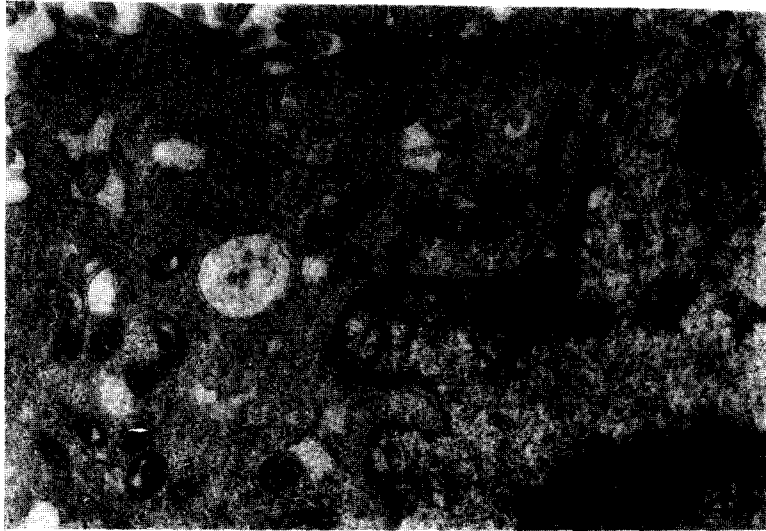


Figure 4. An electron micrograph of a rat fibroblast cultured in the control medium for 24 h. Nucleus (N), mitochondria(M) and rough endoplasmic reticulum(RER) are shown. $\times 25,000$.

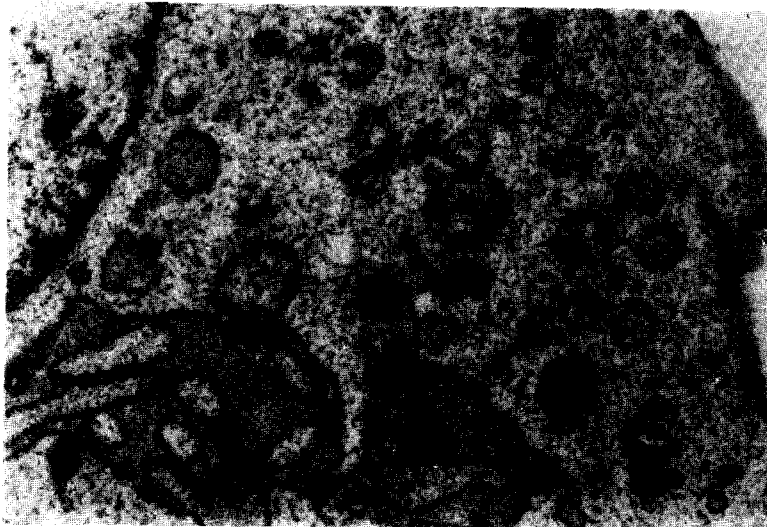


Figure 5. An electron Micrograph of cultured rat fibroblasts in the medium containing cadmium chloride at the concentration of NR_{50} for 24 h. It shows swollen mitochondria(M) and dilated endoplasmic reticulum(arrow). $\times 20,000$.

배양세포의 전자현미경적 관찰

전자현미경적 관찰 결과 대조군의 섬유모세포는 대체로 방추형이었고, 핵은 중앙부에 위치하였으며, 이염색질이 핵막주위에 풍부하게 분포되어 있었다. 세포질내에는 타원형이거나 간상형의 사립체가 관찰되었고, 약간의 조면내형질망과 상당량의 유리리보솜등이 관찰되었다(Fig. 4).

카드뮴을 NR_{90} 농도로 처리한 세포에서는 사립체, 용해소체, 유리리보솜등은 특징적인 형태적 변화를 보이지 않았으며, 그들의 숫자도 대조군과 비슷하게 관찰되었으나, 조면내형질망의 조가 약간 확장되었고,

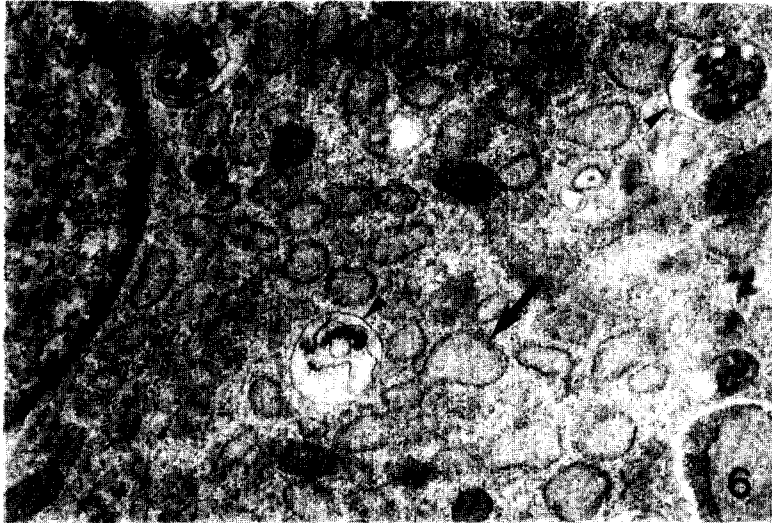


Figure 6. An electron micrograph of a rat fibroblast cultured grown in medium containing 1.7μ of chromic chloride for 24 h. Dilated cisternae and amorphous contents of granular endoplasmic reticulum(arrow) and lysosomes(arrow head) with some internal structures are shown. $\times 20,000$.

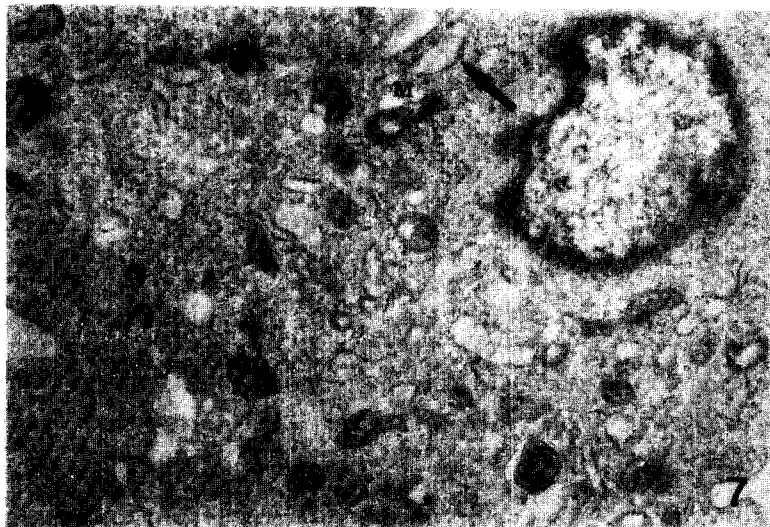


Figure 7. An electron micrograph of cultured rat fibroblasts in the medium containing mercuric chloride at the concentration of NR_{50} for 24 h. It shows destructive mitochondria(M) and dilated endoplasmic reticulum(arrow). $\times 20,000$.

간혹 농소체가 주위에 전자밀도가 높은 과립에 둘러싸여 관찰되었다. NR₆₀농도로 처리한 세포에서는 조면내형질망의 조가 더욱 확장되고, 세포질의 전자밀도가 현저하게 감소하는 양상을 보였으며, 사립체의 팽창과 파괴도 관찰되었다(Fig. 5).

크롬 첨가군의 경우 NR₅₀농도에서는 조면내형질망의 조가 약간 확장 된 것 외에는 대조군과 비슷한 형태를 보였다. NR₅₀농도에서 배양세포는 대조군에 비하여 미세구조에 상당한 변화, 즉 핵에서 이염색질은 핵막을 따라서 얽은 층상으로 나타나고 핵질은 전반적으로 더 짙고 이염색질과 진염색질의 구별이 뚜렷하지 않았으며, 조면내형질망의 조는 심하게 확장되고 균일한 농도를 갖는 내용물로 채워져 있었으며, 유리 리보솜의 증가가 관찰 되었다. 용해소체의 수는 증가하여 불규칙한 내용물을 함유하고 있었고 간혹 지방소적이 관찰되기도하였다. 그러나 사립체는 비교적 정상적인 구조를 보였다(Fig. 6).

수은 첨가군에서도 NR₉₀의 농도에서는 대조군과 비슷한 형태로 관찰되는데 비하여 NR₅₀농도에서는 조면내형질망에서 리보솜이 탈락되고 유리리보솜이 증가하는 경향을 보였으며 조면내형질망의 조가 확장되고, 부분적으로 사립체능이 파괴되었으며 소수의 지방소적이 관찰되었다. 그리고 세포소기관들의 파괴로 인한 공포가 출현하기도 하였으며 소수의 용해소체도 관찰되었다(Fig. 7).

고 찰

본 연구는 몇가지 중금속(Cr⁶⁺, Hg 및 Cd)이 세포소기관에 미치는 독성을 조사하기 위하여 세포독성 검정법으로 널리 사용되고 있는 용해소체의 NR 흡수능과 MTT분석법에 의하여 사립체의 succinic dehydrogenase활성도를 측정하였다. colorimetric assay인 NR, MTT 분석법은 각종 화학물질의 세포독성을 일차적으로 검정하는데 이용되는 방법으로 형태적인 변화를 위상차 현미경으로 관찰할 수 있고, 분광광도계를 이용하여 정량적으로 세포독성을 비교할 수 있는 편리한 방법이며, 최근 미국 국립암연구소(National Cancer Institute)에서도 항암제등 독성물질의 검정을 위한 좋은 방법으로 제안한 바 있다(Carmichael *et al.*, 1987). Borenfreund등(1988)은 NR과 MTT의 흡광도를 대조군과 비교하여 ICV(세포가 정미하게 영향을 받기 시작하는 농도; NR₉₀, MTT₉₀)와 MCV(심한독성을 받는 농도; NR₅₀, MTT₅₀)를 결정한 후 NR₅₀, MTT₅₀ 농도로, 고독성(NR₅₀, MTT₅₀ < 100 μ M), 중간독성(100 μ M NR₅₀, MTT₅₀, < 1000 μ M) 저독성(1000 μ M > NR₅₀, MTT₅₀, 2000 μ M), 무독성(NR₅₀, MTT₅₀ > 2500 μ M)등의 독성판정기준을 제시하였다.

본 실험에서 크롬의 NR₉₀과 MTT₉₀의 농도는 각각 0.2 μ M과 0.5 μ M로, NR₅₀과 MTT₅₀의 농도는 각각 1.7 μ M과 5.5 μ M로 나타났으며, 수은에서 NR₉₀과 MTT₉₀의 농도는 각각 7.0 μ M과 5.0 μ M로, NR₅₀과 MTT₅₀의 농도는 각각 21.5 μ M과 22.0 μ M로 나타났는데, 특히 NR₅₀농도 범위는 Borenfreund와 Babichi(1987)가 BALB/c 3T3 cell에서 제시한 NR₅₀의 농도와 일치하였다. 카드뮴의 경우 NR₅₀과 MTT₅₀의 농도는 각각 19.5 μ M과 60.0 μ M로 나타났으며, 특히 NR₅₀의 농도 범위는 최와 김(1990)이 생쥐의 섬유모세포 상대증식도 50%의 수준과 Borenfreund와 Babichi(1987)가 BALB/c 3T3 cell에서 제시한 NR₅₀의 농도와 일치하였다. 그러나, 수은과 카드뮴에서 NR₅₀ 및 MTT₅₀의 값이 Borenfreund와 Babichi(1987)가 BALB/c 3T3 cell에서 제시한 NR₅₀의 농도와 일치하는 양상을 보인 반면, BF-2 cell과는 상당한 농도의 차이를 보이고 있는데, 이것은 몇가지 알코올이 mouse, hamster, human cell line에 미치는 영향에 관한 연구에서 HTD(Highest tolerated dose)는 cell line에 따라 현저한 차이를 보인다는 Borenfreund와 Babichi(1987)의 보고 및 실험실내에서 배양조건에 적응이 된 cell line과 primary culture한 세포들은 외적환경 변화에 대한 반응이나 세포간 상호작용에 많은 차이가 있을 수 있다는 Taub(1990)의 보고와 일치하고 있다. 이와 같은 결과는 카드뮴, 수은과 같은 중금속은 세포내에 역시 이상의 농도가 축적되었을 때 그 효과가 나타나는 등 중금속의 특성때문으로 사료된다. 한편 카드뮴, 크롬과 수은의 NR₅₀과 MTT₅₀의 농도는 모두 100 μ M이하로 나타났는데, 이러한 농도 수준은 Borenfreund와 Babichi(1987)의 독성판정기준에 의하면 매우 고독성인 것으로 나타났다. 또한 이들 중금속간의 세포독성의 정도는 크롬 > 수은 > 카드뮴의 순이었다. 각각의 중금속 농도에 따른 총단백질량의 변화는 NR₉₀, NR₅₀의 농도에서 크롬은 94%, 62%, 수은은 92%, 51%, 카드뮴은 89%, 55%로 세포소기관에 미치는 약제의 NR농도와 일치하여 감소하였으며, 이는 Takahashi등(1987)과 김등(1990)이 심근세포와 섬유모세포에서 항암제를 처리한 결과와 일치하였다. 전

자현미경적 관찰 결과, 카드뮴 첨가군에 있어서 NR₉₀ 농도에서 조면내형질망의 조가 확장되기 시작하여 NR₅₀농도에서는 더욱 확장되고 사립체의 팽창, 농소체의 출현, 세포질의 전자밀도의 현저한 감소등 심한 변화양상을 보인 반면, 리보솜, 유리리보솜등 다른 세포소기관들에서는 NR₉₀농도와 NR₅₀농도에서 모두 특징적인 변화가 관찰되지 않았는데, 이것은 카드뮴이 조면내형질망의 형태적인 변화를 초래하여 기능적인 변화가 오고, 이로 인하여 단백질 합성계가 영향을 받음으로서 그 결과 세포가 사멸되는 것으로 사료된다.

크롬 첨가군의 경우에는 핵내 염색질의 미세구조 변화와, 심하게 확장되고 짙은 내용물을 갖는 조면내형질망의 조의 출현 및 유리리보솜의 심한 감소와 같은 소견은 단백질 합성계의 심한 장애와 세포의 대사기능 저하를 나타내는 소견으로 이는 크롬의 독성과 관련지어 생각할 수 있고, 크롬이 배양중인 BHK 섬유모세포에 있어서 단백질의 합성을 저해한다는 연구결과(Levis *et al.*, 1978)와 일치하는 소견이라 사료된다. 또한 용해소체와 지방소체의 증가도 크롬에 의한 세포의 심한 대사장애를 시사하는 것으로 간주된다. 세포소기관의 변성에 따른 용해소체의 증가를 관찰할 수 있었으나 크롬이 세포소기관에 영향을 미치는 자세한 기전에 대하여서는 추후 연구를 계속해야 할 것으로 생각된다.

수은 첨가군에서도 조면내형질망의 변화가 가장 현저하였으며 사립체의 부분적인 파괴와 소수의 지방소체가 출현하는 등의 변화를 보여서 단백질 합성계에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 세포소기관의 변성으로 인하여 지방적이 출현하는 것으로 생각된다.

본 연구는 카드뮴, 크롬 그리고 수은이 인체에 축적시 인체의 정상세포에 미칠 수 있는 영향을 배양세포를 이용한 *in vitro* 실험으로 간접적으로 알아 보았는데 이들 중금속들의 보다 정확한 작용기전을 알기 위해서는 생화학적인 연구와 더불어 *in vivo* 실험도 계속 시행되어야 하리라 사료된다.

참 고 문 헌

- Borenfreund, E. and Puerner, J.A.(1984) : A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Culture Meth.*, **9**, 7-9.
- Borenfreund, E. and Babichi, H.(1987): *In vitro* cytotoxicity of heavy metals, acrylamide and organotin salts to neural cells and fibroblasts. *Cell Biol. Toxicol.* **3**, 63-73.
- Borenfreund, E., Babichi, H. and Martin-Alcuacil, N.(1988) : Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays-The neutral red(NR) and Tetrazolium MTT tests. *Toxic. In Vitro* **2**, 1-6.
- Carmicheal, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Michell, J.B.(1987) : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, **47**, 936-942.
- Chen, W.J., Body, R.L. and Motilet, N.K.(1979) : Some effects of continuous low-dose congenital exposure to methylmercury on organ in the rat fetus. *Teratology* **20**, 31-36.
- Chung, Y.T., Choi, M.K., Kim, J.J., Kim, J.M. and Park, S.T.(1988) : A study on the cytotoxicity of adriamycin on cultured rat myocardial and endothelial cells. *J. Chonnam Med. Sci.*, **1**, 221-229.
- Ferm, V.H. and Carpenter, S.(1967) : Teratogenic effect of cadmium and its inhibition by zinc. *Nature*, **1116**, 11-23.
- Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G.F. and Kjellstrom, T.(1974) : Cadmium in the Environment(2nd ed). CAC Press Cleveland OH.
- Friberg, L. and Kjellstrm, T.(1981) : Cdmium : Bronner F, Coburun JW(eds) In "Disorders of Mineral Metabolism". Academic Press Inc. New York. pp. 318-334.

- Fuyuta, M., Fujimoto, T. and Hirata, S.(1978) : Embryotoxic effects of methylmercuric chloride administered to mice and rats during organogenesis. *Teratology*, **18**, 353-366.
- Greener, Y. and Kochen, J.A.(1983) : Methylmercury toxicity in the chick embryo. *Teratology*, **28**, 23-28.
- Hagino, N. and Yoshika, K.(1961) : A study on the ethiology of so-called "Itai-Itai" disease. *J. Japan Orthop. Assoc.* **20**, 812-814.
- Lijima, S., Spindle, A. and Pederson, R.A.(1983) : Developmental and cytogenetic effects of potassium dichromate mouse embryos *in vitro*. *Teratology*, **27**, 109-115.
- Kumar, A., Rana, S.V.S. and Prakash, R.(1985) : Dysenzymia induced by hexavalent chromium in rat liver. *Int. J. Tiss. React.*, **7**, 333-338.
- Layton, W.M.Jr and Layton, M.W.(1979) : Cadmium induced limb defects in mice: Strain associated difference in sensitivity. *Teratology*, **19**, 229-236.
- Levis, A.G., Buttignol, M., Bianchi, V. and Sponza, G.(1978) : Effects of potassium dichromate on nucleic acid and protein synthesis and on precursor uptake in BHK fibroblasts. *Cancer Res.*, **38**, 110-116.
- Matsumoto, T., Suzuki, A. and Morita, C.(1967) : Preventive effect of penicillamine of the brain defect of fetal rat poisoned transplacentally with methylmercury. *Life Sci.*, **6**, 2321-2326.
- Moon, C.S., Park, H.S., Kim, J.J. and Chung, Y.T.(1991) : A study on the cytotoxicity effects of mitomycin C and 5-Fluorouracil in cultured rat fibroblasts. *Kor. J. Toxicol.*, **7**, 13-20.
- Moses, R.L. and Claycomb, W.C.(1982) : Ultrastructure of terminally differentiated adult rat cardiac muscle cells in culture. *Am. J. Anat.*, **164**, 113-131.
- Mosmann, T.(1983) : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, **65**, 55-63.
- Nakamura, K., Yoshikawa, K., Sayato, Y. and Kurata, H.(1987) : Comparative studies of chromosomal aberration and mutagenicity of trivalent and hexavalent chromium. *Mut. Res.*, **58**, 175-181.
- Nomiyama, K.(1980) : Recent progress and perspectives in cadmium health effects studies. *Sci. Total Environ.*, **14**, 199-232.
- Nordberg, G.F.(1972) : Cadmium metabolism and toxicity. *Environ. Physiol. Biochem.*, **2**, 121-130.
- Olson, F.C. and Massaro, E.J.(1977) : Effects of metlymercury on murine fetal amino acid uptake, protein synthesis and palate closure. *Teratology*, **16**, 187-194.
- Park, S.T., Kim, J.O., Woo, W.H., Choi, M.K. and Chung, Y.T.(1987) : A morphological study on the effect of hexavalent chromium on the early developmental stages of mouse embryos *in vitro*. *J. Wonkwang Med. Sci.*, **3**, 1251-134.
- Russo, A. and Pacchierotti, F.(1988) : Meiotic arrest and aneuploidy induced by vinblastine in mouse oocytes. *Mut. Res.*, **202**, 215-221.
- Samrowickrama, G.P.(1979) : Biological effects of cadmium in mammals. In the Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium(Webb M. Ed.) pp. 341-

421.

- Takahashi, K., Fujita, Y., Mayumi, T., Hama, T. and Kishi, T.(1987) : Effect of adriamycin cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Phar. Bull.*, **35**, 3261-334.
- Taub, M.(1990) : The use of defined media in cell and tissue culture. *Toxic. in vitro*, **3**, 213-225.
- Tokuomi, H., Okajima, T., Kanao, J., Tsunoda, M., Ichiyasu, Y., Misumi, H., Shimomura, K. and Takaba, M.(1961) : Minamata disease. *World Neurology* **2**, 5361-545.
- Weis, P. and Weis, J.S.(1977) : Methylmercury teratogenesis in the killifish fundulus heteroclitus. *Teratology*, **16**, 317-326.
- 김재민, 김기원, 정연태(1990) : Cytosin Arabinoside와 Vinblastin이 백서의 배양 섬유모세 포에 미치는 세포독성에 관한 연구. *한국독성학회지* **6**, 29-40.
- 최민규, 김정중(1990) : 카드미움, 구리, 수은 및 크롬이 생쥐 섬유모세포에 미치는 세포독성에 관한 연구. *원광의과학* **3**, 77-91.