

수은이 마우스의 체액성 및 세포성 면역반응에 미치는 영향

염정호

전북대학교 의과대학 예방의학교실

-Abstract-

Effect of Mercury Chloride on Humoral and Cell-mediated Immune Responses in Mice

Jung-Ho Youm

Department of Preventive Medicine and Public Health
Chonbuk National University Medical School

The in vivo and in vitro humoral and cell-mediated immune responses of lymphocytes of BALB/c mouse exposed to mercury chloride(HgCl_2) were investigated.

In vitro exposure of the splenocytes to mercury chloride produced overt cytotoxicity in 3 hours period. The IC_{50} (the concentration required to inhibit a splenocyte viability by 50%) for mercury chloride was $>0.1\text{mM}$ for cytotoxicity.

In vivo mercury chloride exposed mice were significantly depressed delayed type hypersensitivity(DTH) response to sheep red blood cells(SRBC) in a dose-dependent manner compared with control group.

Mercury chloride inhibited the proliferative responses of splenocytes to lipopolysaccharide,

pokeweed mitogen, concanavalin A and phytohemagglutinin in a dose-dependent manner.

Hemagglutinin response to SRBC in mercury chloride exposed mice was significantly depressed in a dose-dependent manner compared with control group.

After 7 weeks of mercury chloride exposure in vivo, mercury chloride induced an increase of nonspecific serum IgG₁ and IgE levels in BALB/c mice.

Key Words: mercury chloride, immune response

서 론

수은(Mercury chloride)은 산업 및 의학적 분야에서 널리 이용될 뿐 아니라, 오늘날 심각하게 다루되고 있는 근로자들의 직업성 중독(Clarkson, 1972; Goyer, 1991; Mailman, 1988)과 무기 및 유기수은을 함유한 산업폐수의 환경으로부터 간접적인 중독증을 유발시키는 중금속 중의 하나이다(Mclaughlin 등, 1980; Snodgrass 등, 1981; Wide, 1986).

수은 중독에 관한 연구는 주로 임상적인 면에서 기질적, 기능적 장애와 더불어 생체조직 내 수은 축적 농도와 독성발현과의 관련성 규명 및 환경 오염 평가에 관한 연구가 대부분이었다(Donaldson과 Gulber, 1978; Roels 등, 1985; Rustam 등, 1975; Wojtalik, 1971).

근래에는 생체 및 시험관 내에서 수은을 포함한 여러 가지 환경 오염물질이 면역반응에 미치는 영향에 관한 여러 연구들이 진행되고 있으며(Druet 등, 1987; Weening 등, 1981), 이들 환경 오염물질들이 면역계에 독성을 나타내거나, 병원체에 대한 숙주의 저항성을 감소시킬 수 있다고 보고하고 있다(Blakley 등, 1980; Blakley와 Archer, 1981; Faith와 Moore, 1977; Hemphill 등, 1971; Koller와 Kovach, 1974; Koller 등, 1976; Luster 등, 1978).

또한 수은은 인간을 포함한 모든 포유류에서 면역

병리학적 효과(immunopathological effect)를 일으키며(Druet 등, 1987), 수은에 감수성이 높은 동물에 수은을 장기간 노출시켰을 경우, 자가면역질환의 발생을 관찰할 수 있다(Aten 등, 1988; Bellon 등, 1982; Chalopin과 Lockwood, 1984; Hirsch 등, 1982; Pelletier 등, 1988, 1991; Rossert 등, 1991; Sapin 등, 1982).

현재까지 중금속의 면역독성 작용(immunotoxic effect)을 평가하는 지표로는 다음과 같은 것들이 있다. 체액성 면역반응(humoral immunity)의 평가를 위해서는 혈구응집소반응(hemagglutination)과 같은 항체축적이 일반적으로 사용되며, 마이토젠(mitogen)을 이용한 림프구 증식반응(lymphocyte blastogenesis), 지연성 과민반응(DTH, delayed type hypersensitivity) 및 바이러스나 세균에 대한 감수성 검사 등과 같은 세포성 면역반응(cell-mediated immunity)을 나타내는 지표들이 이용된다.

이상에 열거한 실험적 지표들은 관찰 농도나 실험 동물 및 표적세포들의 종류에 따라서 서로 상이한, 또는 부분적인 결과만을 기술하고 있다. 따라서 저자는 단일 실험동물로서 BALB/c 마우스를 택하여 수은 투여의 방법과 각 면역지표의 측정에 동원된 생체 및 시험관 내 실험방법을 통일, 일관성을 유지하여 얻은 결과를 분석하는 것이 바람직하다는 판단 하에, 향후 수은중독에서 출현할 수 있는 면역반응에 대해 일반적인 지표를 얻는데 일조하고자 한다.

이를 위해 수은을 투여받은 마우스의 생존율, 시험관 내에 첨가된 여러 농도의 수은이 BALB/c마우스 비장세포의 생존 및 증식능에 미치는 영향, 면양적혈구(SRBC)에 대한 DTH반응과 혈구응집소반응, 그리고 여러 농도의 수은을 마우스에 투여하여 경시적으로 혈청면역글로불린 농도를 측정하여 대조군의 것과 비교, 분석한 결과를 기술하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물

생후 5~6주된 BALB/c 마우스를 한국화학연구소로부터 구입하였으며 실험군 및 대조군은 동성(sex-matched)의 동물을 사용하였다. 이들 동물은 수도물과 펠렛사료(제일사료 주식회사, 대전)를 공급하면서 가능한 한 안정된 환경에서 사육하였다.

2. 배지

우태아 혈청(FCS, GIBCO Lab., Grand Island)이 10% 함유된 RPMI 1640(GIBCO La., Grand Island, NY)을 사용하였다.

3. 항원

흉선의존성 항원(thymus-dependant antigen)으로는 면양적혈구(SRBC)를 사용하였다. SRBC는 알시버씨액(Alsever's solution pH 6.1)을 가하여 4~6°C에 보관하여 4주 이내에 사용하였다. 보관 중인 SRBC를 사용할 때는 사용 직전에 멸균된 생리식염수로 3회 원심세척하여 필요한 농도로 멸균 생리식염수에 부유하여 사용하였다.

4. 약제

T 및 B림프구 증식반응검사에 사용한 mitogen은 phytohemagglutinin(PHA-P, Sigma), lipopolysaccharide(LPS, sigma), 및 pokeweed mitogen(PWM, sigma) 등을 사용하였다.

5. 수은 투여

생후 6주된 암컷 마우스에 subtoxic농도의 수은(HgCl_2 , sigma) 0.01mg, 0.05mg, 0.1mg 및 0.3mg (per 100g body weight)을 생리적 식염수에 희석하여 6주 내지 7주 동안 1주일에 3번 피하 주사하였고, 대조군 마우스에는 생리적 식염수를 주사하였다.

6. 세포부유액의 준비

생후 6~8주된 암컷 마우스를 경추 탈골로 희생시키고 무균적으로 비장을 적출하여 한냉 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS, GIBCO Lab., Grand Island, NY)에서 teasing한 다음 2~3분간 정치시켜 침전된 세포괴를 제거하고 HBSS로 3회 원심세척하여 10% FCS가 들어 있는 RPMI 1640배지에 2×10^6 cell/ml 되게 부유시켜 즉시 실험에 사용하였다. 이때 trypan blue dye exclusion에 의해서 측정된 세포의 생존율은 90% 이상이었다.

7. 세포독성 검사

수은의 세포독성 검사(cytotoxicity test)는 trypan blue dye exclusion 방법으로 실시하였다. 즉 flat bottomed 96 well microculture plate(Dinatech, Alexandria, VA)의 각 well에 2×10^6 세포 0.025ml, RPMI 1640으로 희석한 여러 농도의 수은(10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} or 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} ,

1mM/ml), 그리고 대조군은 RPMI 1640 0.025ml 을 넣고 plate를 밀폐하여 37°C CO₂부란기에 3시간 or 24시간 배양하였다. 그후 0.2% trypan blue 용액을 사용직전 4.25%식염수로 4:1로 희석한 후 이 용액 0.05ml을 각 well에 가하여 잘 혼합하고 혈구계산판 상에서 사멸 및 생존 세포 수를 검경하였다. 이때 100개의 세포이상을 검경하였으며 세포 독성지수는 다음 공식에 따라 계산하였다.

$$\text{Cytotoxic index} = \frac{A-B}{100-B} \times 100$$

A: % died with HgCl₂

B: % died without HgCl₂

8. SRBC 면역조치와 SRBC에 대한 Arthus 및 DTH 반응검사

Arthus 및 지연성 과민반응은 SRBC에 대한 즉척종창반응(footpad swelling reaction)으로 측정하였는데, 수은 투여 6주 후 대조군과 실험군 마우스에 1×10⁷세포가 포함된 SRBC부유액을 복강내 주사하여 면역하고, 면역 후 4일에 20% SRBC 부유액 0.03ml을 마우스의 후족척피하에 야기조치(challenge)한 다음 calliper-type engineer's micrometer를 사용하여 야기조치 직전(T₀), 야기조치 4시간(T₄), 24시간(T₂₄) 및 48시간(T₄₈) 후에 즉척종창 정도를 측정하였으며, 그 종창증가의 정도는 다음 공식에 따라 %증가율로 표시하였다.

$$\% \text{ Increase} = [(T_3, T_{24} \text{ or } T_{48} - T_0) / T_0] \times 100$$

9. SRBC에 대한 적혈구 응집소

수은 투여 6주 후 1×10⁷ SRBC를 복강 주사하여 면역한 후 7일에 안와 후 정맥동으로부터 파스퇴르

피펫을 이용하여 채혈하고 혈청을 분리한 후 56°C 항온수조에서 30분간 보체를 비동화시켰다. 총항체가를 측정하기 위해서 microtitration tray (chemical Co., Inc., New Haven, CT)의 각혈에 혈청과 동량의 0.5% SRBC 부유액을 혼합하여 37°C에서 1시간 방치 후 응집을 일으킨 혈청의 최고 희석도를 항체가로 판독하였다. 또한 2-mercaptoethanol에 대한 감별 감수성을 이용하여 19S 및 7S 항체가를 측정하였다(Eidinger와 pross 등, 1967).

10. In vitro에서 mitogen으로 유도한 림프구의 증식반응검사

위에서 준비한 마우스 비장세포를 2mM의 glutamine과 80µg/ml의 gentamicin이 들어 있는 10% FCS-RPMI 1640배지에 2×10⁶/ml이 되게 부유하고 미리 측정하여 알아본 지적 농도, 즉, LPS (4µg/ml), PHA-P(2µg/ml) 및 PWM(5µg/ml)으로 자극하여 flat bottomed 96 well microculture plate의 각 well에 분주한 다음 다양한 농도의 수은을 처리하여 37°C 5% CO₂ 부란기에서 54시간 배양하였다. 배양세포에의 ³H-thymidine(³H-TdR, specific activity 20 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston) 0.5µCi를 각 well에 배양종료 18시간 전에 첨가하였으며, ³H-TdR의 incorporation 측정은 multiple cell harvester로 세포를 수확한 후 성광계수기(scintillation counter, Packard international, Model Tricarb 300C, Switzerland)를 이용하였다(Gaworski와 Sharma, 1978).

비장세포의 증식반응 정도는 실험에 따른 변동을 최소화 하기 위해 다음 공식에 따라 % control로 표시하였다.

% control =

$$\frac{\text{cpm of HgCl}_2\text{-exposed, mitogen-stimulated cultures}}{\text{cpm of nonexposed, mitogen-stimulated cultures}} \times 100$$

11. 혈청 면역글로불린 측정

수은 투여 7주 후 대조군 및 실험군 마우스의 혈청 면역글로불린 농도를 ELISA 방법으로 측정하였다(O'Gorman 과 Oger, 1989). ELISA는 sandwich 방법을 이용하였다. 이때 사용한 제1차 항체는 rabbit anti-mouse IgG₁, sheep anti-mouse IgE이고 제2차 항체는 sheep anti-mouse IgG₁-peroxidase, rat anti-mouse IgE-peroxidase로서 490nm 파장에서 microplate reader(Dynatech. MR 5000)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(Kemeny 등 1985).

간기하면, plate의 각 well을 제1차 항체로 coating-세척하고 blocking시킨 다음 여기에 4배 계열희석한 각 시료를 넣어 2시간 작용-세척시켰다. 이어 peroxidase가 conjugation된 제2차 항체를 넣어 2시간 작용-세척한 다음 phosphate citrate buffer로 용해한 orthophenylene diamine (OPD)을 가하여 10분간 발색을 유도한 후 490nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 수은투여에 의한 혈청 면역글로불린 농도의 변화는 다음 공식에 따라 표시하였다.

% control =

$$\frac{\text{Serum Ig level of experimental mice}}{\text{Serum Ig level of control mice}} \times 100$$

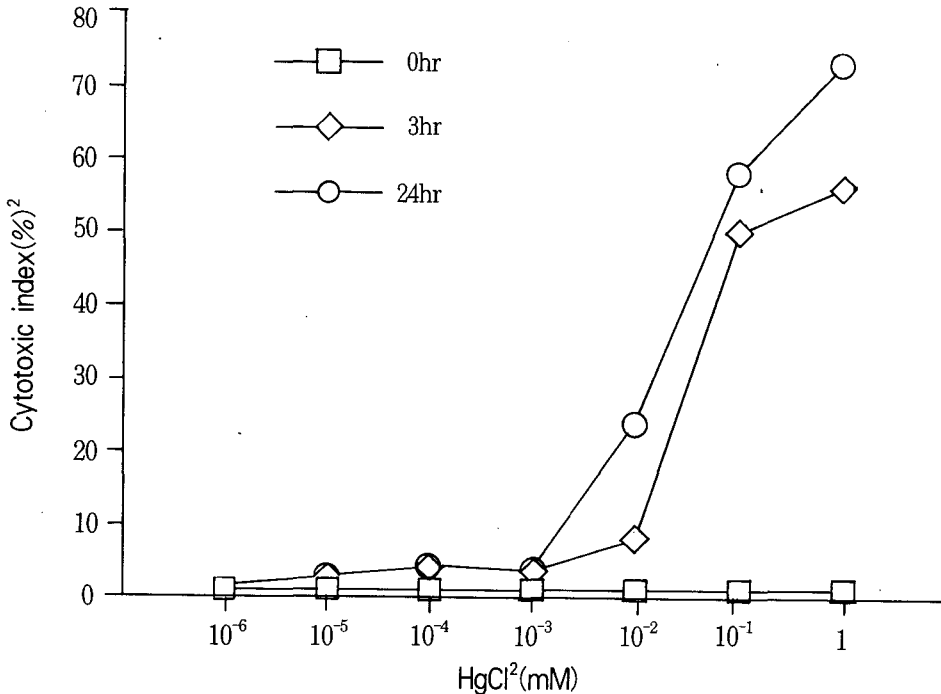


Figure 1. Overt toxicity of HgCl₂ on mouse splenocytes. Cells(2×10⁶/ml) were incubated with various concentrations of HgCl₂ for the indicated time intervals. The cell toxicity was measured by trypan blue dye exclusion test. For each sample, at least 100 cells were counted.

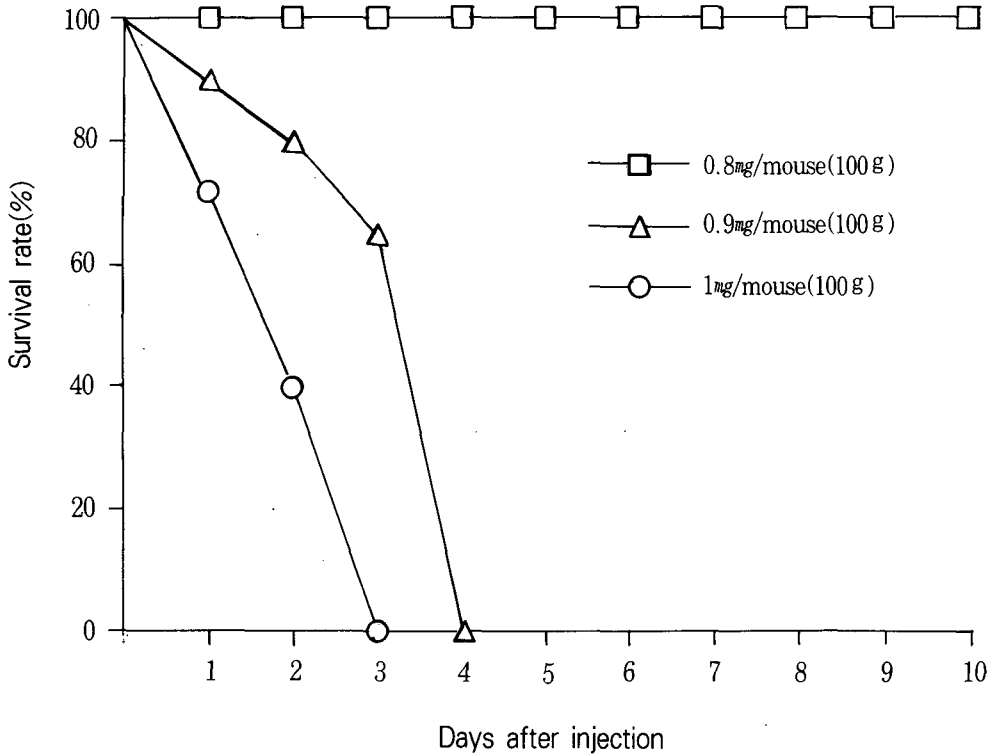


Figure 2. Effect of various concentrations of HgCl₂ on the survival of mice. Mice were given a single subcutaneous injection of 1mg, 0.9mg or 0.8mg HgCl₂(per 100 g body weight). Mice were observed until 10 days after injection of HgCl₂(n=6 for each group)

12. 통계처리

대조군과 실험군의 차이를 검정하기 위해 통계기법은 t-test를 사용하였다.

실험성적

1. 수은이 in vitro에서 마우스 비장세포의 생존에 미치는 영향.

수은이 시험관 내에서 마우스의 비장세포의 생존에 미치는 직접적 영향을 보기위하여 세포독성검사(cytotoxicity test)를 실시하였다. 그림 1에서 보는 바와 같이 각 마우스의 비장세포를 여러 농도의 수은 존재하에 노출시킨 후 3시간 및 24시간의 세포

독성 지수(cytotoxic Index)를 조사하였는데, 비장세포를 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 및 10⁻³, 10⁻²mM의 수은에 노출시킨 후 3시간에 세포독성 지수를 보면 약 2~8%로서 비장세포의 생존에 커다란 영향을 미치지 못했으나 10⁻¹ 및 1mM 수은은 마우스 비장세포에 약 50~60% 정도의 세포독성 지수를 나타냈다. 비장세포를 10⁻¹mM수은에 노출시킨 후 24시간에서는 약 60% 이상의 세포독성 지수를 나타냄으로서 명백한 세포독성 작용을 보여주고 있다.

2. 수은이 in vivo에서 마우스의 생존에 미치는 영향.

여러 농도의 수은을 마우스에 단 1회 피하주사하고 10일 동안 관찰하여 마우스의 생존율을 조사하였

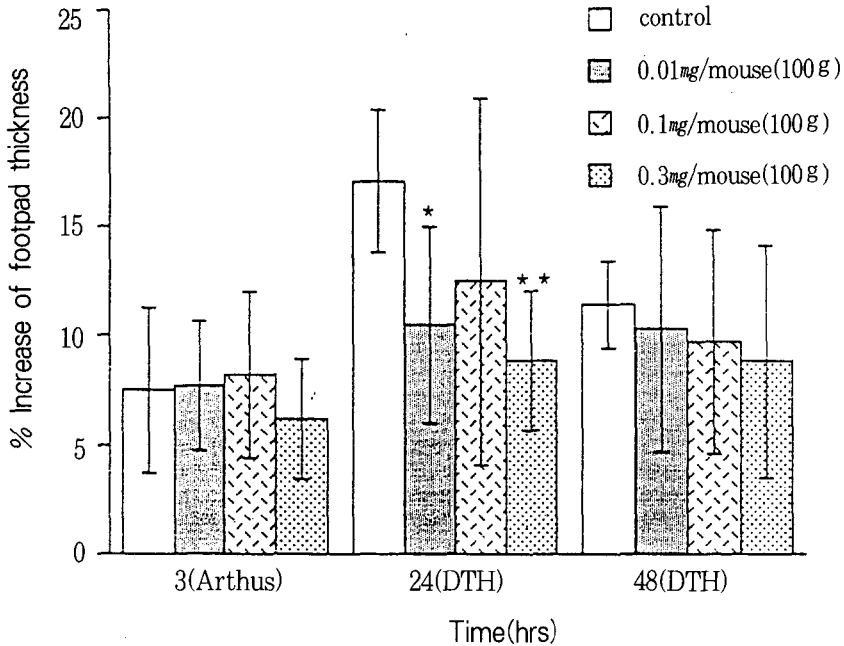


Figure 3. Arthus & delayed-type hypersensitivity to SRBC in mice 6 weeks exposure to various concentrations of $HgCl_2$ given subcutaneously. All groups of mice were immunized intraperitoneal with $0.5ml$ of 0.2% SRBC suspension on 6 weeks and were challenged with $0.03ml$ of 20% SRBC suspension 4 days after immunization. The results calculated by the formula, i.e.,
 $\% \text{ increase} = \frac{(T_3, T_{24} \text{ or } T_{48} - T_0)}{T_0} \times 100$
 Each column and bar represents the mean \pm SD from 5 mice, respectively
 * $p < 0.05$ as compared with control
 ** $p < 0.01$ as compared with control

던 바 그림 2에서 보는 바와 같이 $1mg$ (per 100 g body weight) 수은을 주사한 지 2일째 40%의 생존율, 그리고 3일 이내에 0% 생존율을 나타냈다. $0.9mg$ 수은을 주사했을 때는 2일째 80%, 4일째 60%, 그리고 5일 이내에 0% 생존율을 보였으며, $0.8mg$ 의 수은을 주사했을 경우에는 10일 동안 모든 마우스가 생존하여 100%의 생존율을 보였다.

3. 수은이 면양적혈구에 대한 Arthus 및 DTH반응에 미치는 영향.

수은 투여 6주 후에 마우스를 SRBC로 면역한 다음, 4일 후 모든 마우스를 야기 주사하고 SRBC에 대한 Arthus 및 DTH반응을 측정하였다. 그 결과 그림 3에서 보는 바와 같이 여러 농도의 수은을 투

여한 군과 대조군간에 Arthus(T_3)반응에 있어서는 유의한 차이점을 보이지 않았으나 DTH(T_{24} , T_{48}) 반응에 있어서는 대조군에 비해 수은 투여군이 DTH반응이 억제되었으며, 특히 T_{24} 시간에서 $0.01mg$ (per 100g body weight), $0.3mg$ 의 수은을 투여한 군은 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 반응이 억제됨을 알 수 있었다.

4. 수은이 면양적혈구에 대한 항체반응에 미치는 영향.

수은 투여 6주 후 대조군 및 실험군 마우스를 면양적혈구로 면역하고 면역 7일 후에 감작항원에 대한 항체반응을 혈구응집반응으로 측정하였다. 실험군 마우스의 면양적혈구에 대한 총응집소가 및 2-

Table 1. Effect of administration of HgCl₂ on hemagglutinin titers.

1) HgCl ₂ (mg/body weight 100g)	Antibody	2) Titer(Log ₂ . mean±SD : n=5)
	THA	MER-HA
Control	9	3.2 ± 0.83
0.01	8.7 ± 0.95	3.7 ± 0.95
0.05	8.4 ± 0.89	1.8 ± 2.06
0.1	6.5** ± 1.29	1.7 ± 2.06
0.3	6* ± 2.3	0.6* ± 1.5

1) Mice were injected s.c. with varying concentrations of HgCl₂ for 6 weeks.

2) Mice were immunized i.p with 0.5ml of 0.2% SRBC suspension on the last day of HgCl₂ injection and bled 7 days thereafter.

* p<0.05 as compared with control

** p<0.01 as compared with control

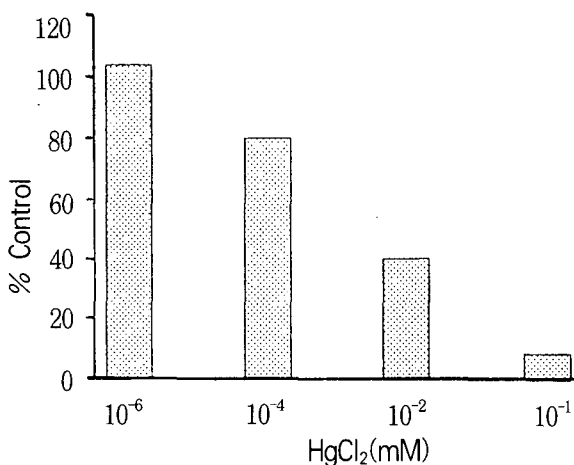


Figure 4. Effect of in vitro exposure to various concentrations of HgCl₂ on phytohemagglutinin(PHA)-induced proliferation of splenocytes. Splenocytes(2×10⁶/ml) were cultured with an optimal concentration of PHA(2μg/ml) for 3 days. Cultures were pulsed with 0.5μCi/well of [³H] TdR for the last 18 hr of culture. Values are expressed as percentage of the control response induced by mitogen in the absence of mercury.

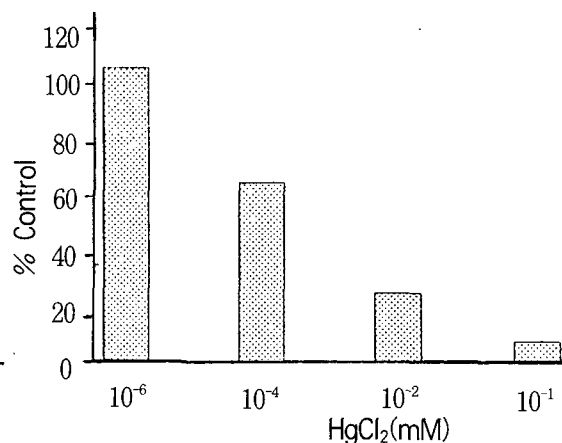


Figure 5. Effect of in vitro exposure to various concentrations of HgCl₂ on pokeweed mitogen(PWM)-induced proliferation of splenocytes. Splenocytes(2×10⁶/ml) were cultured with an optimal concentration of PWM(5μg/ml) for 3 days. Cultures were pulsed with 0.5μCi/well of [³H] TdR for the last 18 hr of culture. Values are expressed as percentage of the control response induced by mitogen in the absence of mercury.

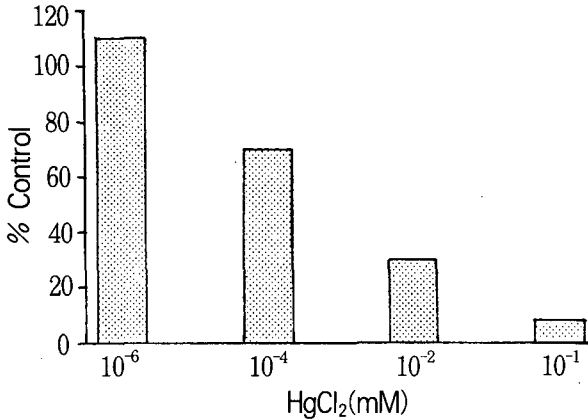


Figure 6. Effect of in vitro exposure to various concentrations of HgCl₂ on lipopolysaccharide(LPS)-induced proliferation of splenocytes. Splenocytes(2×10⁶/ml) were cultured with an optimal concentration of LPS(4μg/ml) for 3 days. Culture were pulsed with 0.5μCi/well of (³H) TdR for the last 18 hr of culture. Values are expressed as percentage of the control response induced by mitogen in the absence of mercury.

mercaptoethanol내성 혈구응집소가(7S항체)는 수은 투여 농도에 의존적으로 억제되었으며, 특히 수은 농도 0.1mg(per 100g body weight), 0.3mg에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 억제되었다(표 1).

5. 수은이 마우스 비장세포의 증식반응에 미치는 영향.

여러 농도의 수은이 마우스 비장세포의 PHA, PWM 또는 LPS에 대한 증식반응에 미치는 영향을 검사하였다. 그 결과 그림 4, 5 및 6에서 보는 바와 같이 마이토젠의 종류에 관계없이 비장세포의 증식능은 수은 농도에 의존적으로 억제되었다.

10⁻⁶mM수은은 비장세포의 증식능에 영향을 미치

Table 2. Effect of administration of HgCl₂ on in vivo nonspecific IgG₁ and IgE responses.

1) Immunoglobulin	HgCl ₂ (mg/100g body weight)			
	0.01	0.05	0.1	0.3
IgG ₁	101	105	111	125
IgE	175	182	203	207

All values refer to pooled sera from 3 mice.

Each number represent the percentage of immunoglobulin level of control sera.

1) Mice were injected s.c. with varying concentrations of HgCl₂ for 7 weeks, and were bled the last day of HgCl₂ injection.

지 못했으나 10⁻²mM 과 10⁻¹mM 수은은 마이토젠의 종류에 관계없이 비장세포의 증식반응을 현저하게 억제하였다(표 2).

6. 수은 투여가 마우스 혈청 면역글로불린 생산에 미치는 영향

Subtoxic농도의 수은을 마우스의 피하에 7주 동안 주사한 후 혈청 면역글로불린 중 수은에 감수성이 있는 IgG₁과 IgE 농도를 측정하였다.

본 실험결과는 0.01mg 및 0.05mg 수은을 투여한 군의 IgG₁ 항체 생산은 대조군과 별 차이가 없었으며 0.3mg 수은은 대조군의 그것에 비해 약 25% 정도 증가하였다.

IgE 항체 생산은 0.01mg 및 0.05mg 수은을 투여한 군의 경우 대조군의 그것보다 80% 정도 증가하였으며 0.1mg 및 0.3mg 수은을 투여한 군은 대조군의 IgE 항체 생산보다 2배 정도 증가하였다.

고 찰

최근에 심각하게 대두되고 있는 환경 오염과 이에 따른 여러 가지 직업성 중독증을 일으키고 있는 많

은 중금속들에 인간은 치명적으로 노출되고 있다. 이러한 현상이 급증됨에 따라 의학 및 산업보건 분야에서는 중금속의 독성발현 규명과 환경 오염 평가 뿐만 아니라 면역계에 이러한 중금속이 미치는 영향에 대해 꾸준히 연구되고 있다. 따라서 본 실험은 여러 가지 중금속 중 수은이 체액성 및 세포성 면역반응에 미치는 영향을 밝히고자 시행되었다.

먼저, 수은의 세포독성 작용을 조사하였는데 실험결과 수은은 (10^{-1} mM) 시험관 내에서 마우스 비장세포에 명백한 독성작용을 나타냄을 알 수 있었다(그림 1). 본 실험결과에서 수은이 세포 생존을 50% 정도 저해하는 농도(IC₅₀: Inhibition concentration)는 10^{-1} mM이며 이러한 사실은 이 농도의 수은에 노출된 지 3시간 안에 명백한 세포독성 효과를 나타낸다는 보고와도 일치하였다(Darzynkiewicz, 1980, 1990; John 등, 1971).

수은의 세포독성 효과는 in vivo에서도 관찰되었는데 수은 1mg, 0.9mg(per 100g body weight)을 주사하였을 때는 2~5일 이내에 100% 치사율을 나타내었다.

수은의 SRBC에 대한 DTH반응을 측정된 결과 특히 T₂₄시간에서 0.3mg(per 100g body weight)의 수은을 투여한 군은 대조군에 비하여 유의하게 (P<0.01) DTH반응이 억제되었다. 이러한 사실은 subtoxic 농도의 중금속에 만성적(10주 이상)으로 노출된 마우스는 세포성 면역반응이 저하된다는 보고(Diamantstein 등, 1976; Muller 등, 1977, 1979; Shenker 등, 1977), 수은에 노출된 흰쥐에서 CD8⁺ 억제 T세포에 의하여 면역반응이 억제된다는 보고(Cohen 등, 1989; Koller 등, 1973; pelletier 등, 1988, 1990; Rossert 등 1988, 1991), 및 수은에 의해 유도된 자가면역질환에 있어서 T세포의 조절역할에 관하여 수은은 DTH에 관여하는 T_{H1}세포를 감소시켜 조직손상을 증가시키고 이식대숙주반응을(Graft-vs-host-like reaction) 유도한다는 보고(Mcknight 등, 1991; Papp 등,

1992; pelletier, 등, 1986; Peter 등, 1993; spickett 등, 1983) 등을 참작할 때 본 실험의 결과는 이러한 연구결과와 일치한다는 것을 알 수 있다.

또한 수은이 흉선 의존성 항원인 면양적혈구에 대한 항체생산에 미치는 영향을 혈구응집반응을 통하여 조사하였던 바 앞의 Arthus 및 DTH반응에서와 마찬가지로 수은 투여 농도에 의존적으로 억제되었다. 이러한 사실은 수은은 흉선 의존성 항원에 대한 면역반응을 감소시킨다는 보고(Pelletier 등 1988, 1991; Rossert 등 1991; Stow 등, 1972), 여러 종류의 실험동물에서 흉선 의존성 항체반응을 약 25~60% 정도 감소시킨다는 연구 보고(Dieter 등 1983; Thaxton 과 Parkhurst, 1973)와 일치하여 수은의 명백한 독성 작용(immunotoxic effect)은 체액성 면역반응(humoral immune response)을 감소시킨다는 사실을 뒷받침해 주는 증거로 생각되었다.

마이토젠에 대한 림프구 증식반응은 비특이적이지만 항원 자극시 생체 내에서 일어나는 면역세포의 증식반응과 비슷하여 생체 내 림프구의 활성을 알아 보기 위하여 이용되고 있다(Catalona 등, 1975). 본 실험에서는 시험관 내에서 마이토젠에 대한 비장세포의 증식반응을 조사하였는데 그 반응의 정도는 마이토젠의 종류에 관계없이 유의하게 수은 농도에 의존적으로 억제되었다(그림 4.5.).

이러한 결과는 5×10^{-3} mM 및 2×10^{-2} mM 수은 이 PHA 및 PWM에 대한 비장세포의 증식반응을 약 50% 정도 억제시켰다는 보고(Gaworski와 Sharma, 1978; Hultman과 Johansson, 1991)와는 상당히 일치하는 결과라고 볼 수 있다. 또한 LPS에 대한 본 실험결과는 LPS에 대한 비장세포의 증식반응이 수은 농도에 의존적으로 억제된다는 보고(Daum 등 1993)와도 서로 상응되는 결과라고 볼 수 있으나, 반응의 정도를 억제시키는 농도에 있어서 본 실험에서는 약 10^{-2} mM 수은이 LPS에 대한 비장세포의 증식반응을 70% 정도 억제시킨 반면

(그림 6.). Daum 등의(1993) 보고에서는 10^{-4} mM 농도에서 그 증식반응의 정도를 70% 억제시켰다는 점에서 다소 차이가 있었다.

중금속에 대해서 T세포가 B세포보다 약간 더 감수성이 크다는 보고(Koller 등 1975)를 참작할 때 세포배양시 T세포 또는 B세포를 각각 순수 분리하여 수은의 비장세포 증식반응에 대한 독작용을 조사해 볼 필요가 있다고 생각된다.

수은에 감수성이 있는 마우스에 수은을 subtoxic농도로 반복주사하면 특히 IgG₁ 및 IgE 농도가 크게 증가된다고 한다(Hultman과 Enestron, 1987, 1988; Martina 등, 1991; Mirtcheva 등, 1989; Pietsch 등, 1989). 본 실험에서는 0.3mg 수은을 투여한 군의 IgE 항체 생산이 대조군에 비해 2배 정도 높았고, 그 이하의 농도에서는 대조군의 그것에 비해 약 80%정도 높았으며 위의 보고 등을 참작할 때 비슷한 실험결과를 얻었으나 그 증가 정도는 상대적으로 낮았다(표 2). 그리고 IgG₁의 경우는 수은 농도에 의존적으로 약간 증가함을 보였으나 그 증가정도가 낮았다. 이러한 결과는 특정 항원인 SRBC에 대한 항체반응은 감소하더라도 수은에 의한 생체 내 면역글로불린 농도는 증가한다는 것을 의미한다. Pelletier 등(1988)은 수은 투여 마우스와 랫트의 혈청 IgG, A, E 농도 모두가 증가한다고 보고하고 있으며, 특히 IgE 농도의 증가에는 수은이 B세포의 polyclonal activation을 유발하기 때문이며 여기에 T_H세포로부터 분비되는 IL-4가 관여한다고 보고하였다(Andress 등, 1984; Hultman과 Enestron, 1988; Paul 과 ohara, 1987; Prouvost 등, 1981; Pusey 등, 1983). Ochel 등(1991)은 IL-4에 대한 항체를 수은 투여 마우스에 주사하면 혈청 IgE 농도는 완전히, 그리고 혈청 IgG₁ 농도는 부분적으로 증가가 억제된다고 보고하고 있다.

수은에 만성적으로 노출된 랫트의 자가면역질환에 있어서도 IL-4가 중요한 역할을 하며, 생체 내에

서 수은은 IL-2생산, IFN-r, DTH에 관여하는 T_{H1}-CD4⁺ T cell을 억제시켜 조직손상을 증가시키고, IL-4 및 IL-5생산에 관여하는 T_{H2}-CD4⁺ T cell을 활성화하여 polyclonal B cell activation을 유발하고 혈청 내에 IgE 농도를 증가시킨다고 한다(Mathieson 등, 1992, 1993; Mcknight 등 1991; Papp 등 1992, Thomas:1989). 수은 투여에 따른 IgG₁ 및 IgE 농도 증가에 관한 본 실험결과는 앞에서 이미 언급하였던 이전의 보고를 참작할 때, 증가 경향은 일치하나 그 정도가 상대적으로 낮았다. 이는 실험에 사용한 실험동물, 수은 투여량 및 투여 경로 등에 따라 차이가 있기 때문으로 생각된다. 수은에 대한 반응을 결정하는 유전적 요소(Genetic factor)는 MHC(major histocompatibility complex)와 background gene인데 마우스에 있어서는 MHC genotype에 따라 HgCl₂에 의해서 T_{H1}-CD4⁺ T cell이 활성화 되는지 아니면 T_{H2}-CD4⁺ T cell이 활성화 되는지가 결정된다. 즉 MHC class II molecule의 genotype 이 H-2^b 혹은 H-2^s인가에 따라 그 반응의 정도가 달라지는 것으로 알려졌다(Mathieson 등 1993; Powrie와 Mason, 1990; Spickett 등 1983). 따라서 수은이 면역계에 미치는 영향에 관한 연구에 있어서, 결과에 영향을 미치는 여러 가지 요인 중 실험동물의 선택이 중요하며 앞으로 서로 다른 종의 마우스를 비교하여 연구하는 것도 흥미로운 과제 중의 하나일 것이다.

요 약

수은이 마우스의 세포성 및 체액성 면역반응에 미치는 영향을 밝히고자 실험을 통해 얻은 결과를 다음과 같이 요약하는 바이다.

10^{-2} mM 이상의 농도에서 수은은 시험관 내의 마우스 비장세포에 대한 명백한 독성 작용(toxic

effect)을 나타냈다.

수은에 의한 마우스 생존율(survival rate)은 0.8mg(per 100g body weight) 이하의 농도에서는 100% 생존율을 나타냈으며, 0.9mg 이상의 농도에서는 5일 이내에 100% 치사율을 나타냈다.

Subtoxic 농도의 수은 투여에 따른 Arthus 및 DTH반응의 결과는 Arthus(T_3)반응에 있어서 수은 투여군과 대조군 사이에 유의한 차이가 나타나지 않았던 반면, T_{24} , T_{48} 의 DTH반응은 수은 투여군이 대조군에 비하여 억제되었다.

수은 투여 마우스의 면양적혈구(SRBC)에 대한 항체반응을 측정된 결과 면양적혈구에 대한 총응집 소가는 수은 투여 농도에 의존적으로 대조군의 값에 비해 억제되었다.

시험관 내에서 마이토젠에 대한 비장세포의 증식 반응은 수은 농도에 의존적으로 억제되었다.

수은 투여군의 IgE 생산은 농도 증가에 따라 1.7~2.0배의 수준으로 증가하였으며, IgG₁의 경우도 증가의 경향을 보였으나 대조군에 비해 큰 차는 아니었다.

이상의 결과를 살펴볼 때 수은 중독시 출현할 수 있는 면역반응의 변화로서, 초기에는 세포성 면역반응의 감소가 현저할 것으로 사료되나 중독이 진행됨에 따라 Ig농도의 상승을 제외한 체액성 면역반응의 전반적인 감소가 수반될 것으로 예측된다.

참고문헌

- Andres P. IgA IgG disease in the intestine of Brown-Norway rats ingesting mercuric chloride. *Clin Immunol Immunopathol* 1984;30: 488
- 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
- Bellon B, Capron M, Cruet E, Verroust P, Vial M-C, Sapin C, Girard JF, Foidart JM, Mahieu P, Druet P. Mercuric chloride induced autoimmune disease in Brown-Norway rat: sequential search for anti-basement membrane antibodies and circulating immune complexes. *Eur J Clin Invest* 1982;12:127-133
- Blakley BR, Archer DL. The effect of lead acetate on the immune response in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981;61:18
- Blakley BR, Sisodia CS, Mukkur TK. The effect of methylmercury, tetraethyl lead, and sodium arsenite on the humoral immune response in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981;52:245
- Catalona WJ, Tarpley JL, Potvin C, Chretien PB. Correlations among cutaneous reactivity to DNCB, PHA-induced lymphocyte blastogenesis and peripheral blood E rosettes. *Clin Exp Immunol* 1975;19:327
- Chalopin JM, Lockwood CM. Autoregulation of autoantibody synthesis in mercuric chloride nephritis in the Brown Norway rat II. Presence of antigen-augmentable plague-forming cells in the spleen is associated with humoral factors behaving as auto-anti-idiotypic antibodies. *Eur J Immunol* 1984;14:470
- Clarkson TW. The pharmacology of mercury compounds. *Ann Rev Pharmacol* 1972;12:375
- Cohen IR, Atlan HJ. *Autoimmun* 1989;2:613
- Darzynkiewicz Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. *Methods in Cell Biology. Flow Cytometry* 1990;285-298
- Darzynkiewicz. Z, Sharpless T, Staiano-Colco L, Melumel MR. Subcompartments of the G₁ phase of cell cycle detected by flow

- cytometry. *Proc Nat'l Acad Sci. USA.* 1980;77: 6696–6699
- Daum JR, Shepherd DM. *Immunotoxicology of Cadmium and Mercury on B-lymphocytes J. Immunopharmacology* 1993;15:383–394
- Diamantstein D, Keppler W, Blitstein-Willinger E, Ben-Efraim S. *Immunology* 1976;30:401
- Dieter M, Luster ML, Boorman GA. *Immunological and biochemical response in mice treated with HgCl. Toxicol Appl Pharmacol* 1983; 68:218–226
- Donaldson ML, Gubler CJ. *Biochemical effects of mercury poisoning in rat. Am J Clin Nutri* 1978;31:859
- Druet P, Hirsch F, Pelletier L, Baran K, Sapin L. *Mechanism of chemical-induced glomerulonephritis. In Mechanism of Cell Injury : Implications for Human-Health(ed. Fowler, B.A). John Wiley, New York 1987;153–173*
- Eidinger D, Pross HF. *The immune response to sheep erythrocytes in the mouse. I, A study of the immunological events utilizing the plague technique. Exp. Med* 1967;126: 15
- Faith RE, Moore J.Aa. *Impairment of thymus-dependent immune functions by exposure of the developing immune system to 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD). J. Toxicol. Environ. Health* 1977;3, 451
- Gaworski CL, Sharma RP. *The effects of heavy metals on [3H] thymidine uptake in lymphocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol* 1978;46:305
- 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 1992;646*
- Hemphill FE, Kaerberle MI, Buck WB. *Lead suppression of mouse resistance to Salmonella typhimurium. Science* 1971;172:1031
- Hirsch F, Couderc J, Sapin C, Fournie G, Cruet P. *Polyclonal effect of HgCl in the rat, its possible role in an experimental autoimmune disease. Eur J Immunol* 1982;12:620
- Hultman P, Enestrom S. *Mercury induced antinuclear antibodies in mice: characterization and correlation with renal immune complex deposits. Clin Exp Immunol* 1988;71:269
- Hultmans P, Johansson U. *Strain differences in the effect of mercury on murine cell-mediated immunereactions. Food Chem Toxicol* 1991;29: 633–638
- Jones RH, Williams RL, Jones AM. *Effect of Heavy Metal in the Immune Response and Preliminary Findings for Cadmium in Rats. Proc Soc Exp Biol & Med* 1971;137:1231–1236
- Kemeny R, Urbanek D, Samuel E, Richards D. *Increased Sensitivity and Specificity of a Sandwich ELISA for Measurement of IgE Antibodies. J Immunol Methods* 1985;78:217–226
- Koller LD, Exon JH, Roan JG. *Antibody suppression by cadmium. Arch Environ Health* 1975;30:598
- Koller LD, Exon JH, Roan JG. *Humoral antibody response in mice after single dose exposure to lead or cadmium. Proc Soc Exp Biol & Med* 1976;151:339
- Koller LD, Kovach S. *Decreased antibody formation in mice exposed to lead. Nature* 1974; 250:148
- Loren D, Koller LD. *Immunosuppression Produced by Lead, Cadmium, and Mercury. Am*

- J Vet Res* 1973;34:11
- Luster ML, Faith RE, Moore JA. *Effects of polybrominated biphenyls(PBB) on the immune response in rodents. Environ Health Perspect* 1978;23:227
- Mailman RB. *Heavy metal. In Guthrie FE, Perry JJ(eds.), Introduction to environmental toxicology. Elsevier North.Holland. Inc., New York* 1980,pp 34-43
- Martina O, Hans-Werner V, Christiane P, Ernst G. *IL-4 is Required for IgE and IgG increase and IgG autoantibody formation in mice treated with mercuric chloride. J.Immunol* 1991; 146:3006-3011
- Mathieson PW, Thiru S, Oliveira DBG. *Mercuric chloride-treated Brown Norway rats develop widespread tissue injury including necrotizing vasculitis. Lab Invest* 1992;67:121
- McLaughlin JF, Teizrow RW, Scott CM. *Neonatal mercury vapor exposure in an infant incubator. Pediatrics* 1980;66:988
- McKnight AJ, Barclay AN, Mason DW. *Molecular cloning of rat interleukin 4 cDNA and analysis of the cytokine repertoire of subsets of CD4 T cells. Eur J Immunol* 1991;21:1187
- Mirtcheva J, Pfeiffer C, Bruijn JA, Jacquesmart F, Gleichmann E. *Immunological alterations inducible by mercuric compounds. H-2A acts as an immune response and H-2E as an immune "suppression" locus for HgCl induced antinucleolar autoantibodies. Eur J Immunol* 1989;19:2257
- Muller S, Gillert KE, Krause CH, Gross U, I'Age-Stehr J, Kiamantstein T. *Effect of cadmium on the immune system of mice. Experientia.* 1977;33:667
- Ochel M, Vohr HW, Pfeiffer C, Gleichmann E. *IL-4 is required for the IgE & IgG increase and IgG autoantibody formation in mice treated with mercuric chloride. J Immunol* 1991;146:3006
- O'Gorman MRG, Oger JJF. *Regulation of in vitro. PWM-induced IgG secretion in Humans. Cell Immunol* 1989;118:435
- Papp I, Wieder KJ, Sablinski T, O'Connell PJ, Milford EL, Strom B, Kupiec-Weglinski JW. *Evidence for functional heterogeneity of rat CD4⁺ T cells in vivo. J Immunol* 1992;148:1308
- Paul WE, Ohara J. *B-cell stimulatory factor-1/interleukin. Ann Rev Immunol* 1987;5:429
- Pelletier L, Pasquier R, Guettier C, Vial MC, Mandet C, Nochy D, Bazin H, Druet P. *HgCl₂-induced T and B cells to proliferate and differentiate BN rats. Clin Exp Immunol* 1988a; 71:336-342
- Pelletier L, Rossert J, Pasquier R, Vial MC, Druet P. *HgCl₂-induced perturbation of the T cell network in experimental Allergic encephalomyelitis. Scan J Immunol* 1991;31:65
- Pelletier L, Pasquier R, Hirsch F, Sapin C, Druet P. *Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmune disease; in vitro demonstration. J Immunol* 1986;137:2548
- Pelletier L, Pasquie R, Rossert J, Vial MC, Mandet C, Druet P. *Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmunity: ability to induce the autoimmune disease. J Immunol* 1988b;140: 750
- Peter WM, Sathia T, David BGO. *Regulatory Role of OX22high T Cells in Mercury induced Autoimmunity in the Brown Norway Rat. J Exp Med* 1993;177:1309-1319

- Pietsch P, Vohr HW, Degitz K, Gleichmann E. *Immunological alterations inducible by mercuric compounds. II. HgCl₂ and gold sodium thiomalate enhance serum IgE and IgG concentrations in susceptible mouse strains. Int Arch Allergy Appl Immunol 1989;90:47*
- Powrie F, Mason D. *OX-22 high CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology; prevention by the OX-22 low subset. J Exp Med 1990;172:1701*
- Prouvost-Danon A, Abadie A, Sapin C, Bazin H, Druet P. *Induction of IgE synthesis and Potentiation of anti-ovalbumin IgE antibody response by HgCl₂ in the rat. J. Immunol 1981; 126:699*
- Pusey CD, Bowman C. *Effects of cyclophosphamide on autoantibody synthesis in the BN rat. Clin Exp Immunol 1983;54:697*
- Stiller-Winkler R, Radaszkiewicz T, Gleichmann E. *Immunopathological signs in mice treated with mercury compounds-I. identification by the popliteal lymph node assay of responder and non-responder strains. Int J Immunopharmacol 1988;10:475-484*
- Roels HA, Gennart JP, Lauwerys R, Buchet JP, Malchaire J, Bernard A. *Surveillance of workers exposed to mercury vapor; validation of previously proposed biological threshold limit value for mercury concentration in urine. Am J Indust Med 1985;7:45*
- Rossert J, Pelletier L, Pasquier R, Druet P. *Autoreactive T cell in memory-induced autoimmunity. Demonstration by limiting dilution analysis. Eur J Immunol 1988;18:1761*
- Rossert LP, Pasquier R, Villarroya H, Oriol R, Druet P. *HgCl₂-induced perturbation of the T cell network in experimental allergic encephalomyelitis. Cellular Immunology 1991; 137:367-378*
- Rustam H, Burg RV, Hassani SE. *Evidence for a neuromuscular disorder in methylmercury poisoning. Arch Environ Health 1975;30:190*
- Sapin C, Mandet C, Druet E, Gunther E, Druet P. *Immune complex type disease induced by HgCl₂ in Brown-Norway rats: genetic control of susceptibility. Clin Exp Immunol 1982;48:700*
- Shenker BJ, Matarazzo WJ, Hirach RL, Gray L. *Trace metal modification of immunocompetence. 1. Effect of trace metals in the culture on in vitro transformation of B lymphocytes. Cell Immunol 1977;34:19-24*
- Snodgrass W, Sullivan JB Jr, Rumack BH, Hashimoto C. *Mercury poisoning from home gold processing. JAMA 1992; 246*
- Spickett GP, Brandon MR, Mason DW, Williams AF, Woolett GR. *MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte common antigen. J Exp Med 1983;158: 795*
- Stiller-Winkler R, Radaszkiewicz T, Gleichmann E. *Immunopathological signs in mice treated with mercury compounds-I. identification by the popliteal lymph node assay of responder and nonresponder strains. Int J Immunopharmac 1988;10:475*
- Stowe HD, Wilson M, Gouer RA. *Clinical and Morphologic Effects of Oral Cadmium Toxicity in Rabbits. Arch Pathol 1972;94:389-405*
- Thaxton P, Parkhurst CR. *Toxicity of mercury to young chickens. Poultry Sci 1973;52:761-778*
- Thomas ML. *The leukocyte common antigen family.*

Ann Rev Immunol 1989;7:339

Weening JJ, Hoedemaeker PJ, Bakker WW.
*Immunoregulation and anti-nuclear antibodies in
mercury-induced glomerulopathy in the rat. Clin
Exp Immunol* 1981;45:64-71

Wide C. *Mercury hazards arising from the repair
sphygmomanometers. Br Med J* 1986;293:1409

Wojtalik TA. *Accumulation of mercury and its
compounds. J WPCF* 1971;1290:43