

계배 대뇌의 신경세포 분화에 미치는 수은의 영향 (II)

김 생 곤 · 정 해 만 · 조 광 필*
조선대학교 치과대학 인체생물학교실, *목포전문대학 물리치료과

Effects of Mercuric Chloride on the Differentiation Cerebral Neuron of Chick Embryo (II)

Kim, Saeng Gon, Jeong, Hae Man and Kwang Phil Cho*
Dept. of Human biology, College of Dentistry, Chosun University
*Dept. of Physical Therapy, Mokpo Junior College
(Received May 22, 1996)

ABSTRACT

To investigate the effects of mercuric chloride (HgCl_2) on the differentiation of the cerebral neuron of chick embryo 9 days, the ultrastructural changes in nerve cells injected with a various doses of mercuric chloride were observed with transmission electron microscope. The enzyme activity of the some dehydrogenases, cerebral proteins and adenosine triphosphate (ATP) were also analyzed.

The results obtained are as follows:

The ultrastructural changes in 0.5 and 1.0mg-injected groups were undetectable, but in 2.0 mg-injected group, the nuclear envelopes were very irregular and mitochondria were swelled and destroyed partly.

The number of polypeptide bands separated by SDS-PAGE in the normal group were 37 bands. According to the increased dose of mercuric chloride, contents of the bands were increased in 7 bands. The activities of dehydrogenases were declined by increasing the dose of mercuric chloride. Lactate dehydrogenase (LDH) activity falled to 78% in 1.0 mg-injected group and greatly to 68% in 2.0 mg-injected group.

Malate dehydrogenase (MDH) activity falled to 81% in 2.0 mg-injected group. On the other hand, succinate dehydrogenase (SDH) activity decreased to 80% in 1.0 mg-injected group and greatly to 63% in 2.0 mg-injected group. ATP content in 1.0 mg-injected group was increased slightly and in 2.0 mg-injected group was increased greatly.

Key words : HgCl_2 , Chick embryo, Dehydrogenases, ATP Ultrastructures.

* 이 논문은 조선대학교 교내 연구비의 지원에 의하여 이루어졌음.

서 론

자연계에 존재하는 수은은 지질과 광물에 섞여 있는 것이 비나 흐르는 물에 의해서 서서히 확산되고, 이것은 식물이나 동물에 의해 흡수, 섭취되었다가 이들의 분비 작용에 의하여 다시 지층으로 옮겨져서 일정한 상태를 유지하게 된다 (Lee, 1988). 그러나 수은에 의한 환경오염 문제가 발생하게 된 원인은 이러한 자연계의 현상으로 인한 것이 아니고 산업의 발달로 인한 수은의 사용량이 증가되면서 배출량이 많아질 뿐만 아니라 석유의 연소산물로서, 산업폐기물로서, 또한 가연 휘발유의 사용으로 많은 수은이 생활주변에 배출되어 환경을 오염시키기 때문이다 (Wood *et al.*, 1978; Frank and Jerome, 1980).

수은은 옛부터 농업분야 뿐 아니라 공업분야에서도 광범위하게 이용되어왔다. 그러나 1953년에서 1960년에 걸쳐 일본 미나마타시에서 사지의 마비증, 난청, 언어장애 등을 호소하는 환자가 발생하였는데 그 오염경로를 역학적으로 조사한 결과 아세틸렌에서 아세트알데하이드를 합성하는 화학공장에서 촉매제로 사용되는 무기수은으로부터 상당량의 methyl수은이 생성되어 공장에서 내보내는 폐수와 함께 유출된 것이 이들 질환유발의 원인으로 밝혀졌다 (Murakami, 1972; Richardson and Murphy, 1974; Moller and Danscher, 1986). 그리고 농업분야에서는 1972년 이라크에서 곡류의 종자 소독제로 사용된 methyl수은이 많은 사망자를 발생시켰다 (Murakami, 1972; Amin-Zaki *et al.*, 1974; Koos and Longo, 1976; Choi *et al.*, 1978; Reuhl and Chang, 1979; Schardein, 1985). 우리나라의 경우 농업분야에서 1950년대와 1960년대에 수 천톤의 유기수은 살균제가 생산되었으나 일본의 미나마타 사건 이후 그 사용량이 감소하기 시작하였으며 1978년에는 제조 및 사용이 금지되었다 (Park and Cha, 1984; Rhee *et al.*, 1985; Hwang *et al.*, 1986). 그러나 아직도 공업분야에서는 제련수은기, 전진지, 수은등, 스위치 제조, 화학합성공업 촉매제, 치과재료, 의약품 등에 널리 이용되고 있으며 연간 10,000톤 이상의 수은이 환경으로 배출되고 그 대부분이 폐수로 유출되고 있다. 또한 원유, 석유 등에 함유되어 있는 수은이 연소에 의해서 매년 수 천톤 이

상이 대기중에 배출되어 환경오염원이 되고 있다 (Joensuu, 1971; Park and Cha, 1984; Rhee *et al.*, 1985).

무기수은은 다른 수은 화합물과는 달리 소독제, 이노제, 살균제 등의 의약품으로 널리 이용되고 있는데, 이들은 동물의 장기 내에서 혹은 하상지질토에서 methanobacteria 등에 의해 쉽게 methyl화를 일으킴으로써 결과적으로 무기수은의 methyl화는 생태계에서 필연적으로 발생하는 생물학적 과정으로 되어있다 (Rozynekowa and Raczkiwicz, 1977; Park and Cha, 1984).

뇌에서 무기수은의 축적과 분포에 대한 연구는 여러 연구자에 의해서 수행되어왔다 (Clarkson, 1972; Chang, 1977; Moller-Madsen and Danscher, 1986). 무기수은은 쥐의 성상세포 내에서 이온화되어 Na^+ , K^+ -ATPase 활성 및 hexokinase 활성에 영향을 줌으로써 선택적으로 glutamate의 수송을 억제하고 (Clarkson, 1986; Brookes, 1988a; Brookes and Kristt, 1989), 중추신경계의 기능장애와 신경변성을 일으킨다 (Olney, 1979; Schwarcz and Meldrum, 1985).

최근에는 수은의 투여량과 방법에 따른 중추신경에 축적되는 수은의 분포 (Moller-Madsen, 1990; Moller-Madsen and Danscher, 1991), 수은의 독성작용으로 인한 뇌의 발생에서 신경성장 요인의 변화 (Larkfors *et al.*, 1991), amino acid 운반자에 의하여 blood-brain barrier를 통하여 수송되는 수은의 수송기작 (Kerper *et al.*, 1992) 발생중인 대뇌피질에서 synaptosome의 ATP diphosphohydrazase에 대한 수은의 영향 (Oliveira *et al.*, 1994), 수은투여 후 쥐의 대뇌피질에서 alkaline phosphatase 활성의 변화 (Albrecht *et al.*, 1994), 달걀껍질의 형성과 점액선의 생화학적인 변화에 대한 수은의 영향 (Lundholm, 1995), 섬유아세포에서 신경반응과 신경성장인자에 대한 수은의 영향 (Soderstrom and Ebendal, 1995) 등에 대한 연구보고도 있으나 수은의 의한 배자의 대뇌신경세포를 대상으로 한 연구 보고는 미미한 상태다.

따라서 본 연구는 수은의 축적 농도가 계배의 발생에 따른 대뇌의 신경세포에 미치는 영향을 밝히기 위하여 대뇌의 조직 및 세포의 분화과정을 전자현미경으로 관찰하고 SDS-PAGE를 이용하여 단백질의 변화양상을 비교 분석하는 한편 LDH, MDH 및 SDH의 효소활성도와

ATP함량 변화를 측정, 비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

정상 사료로 사육한 Abor acres계 (전남 나주군 노안면 지산 부화장에서 분양)의 수정란 (60±5 g)을 부란기 내에서 최적 조건 (온도 38±0.5°C, 상대 습도 60%)으로 부란하였다. 투여약품은 mercuric chloride (HgCl₂, 藥理化學, Co., 日本)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) Mercuric chloride의 투여

실험군은 수정란을 24시간 동안 발생시킨 후 체중 kg 당 0.1 mg, 0.5 mg, 1.0 mg, 2.0 mg의 HgCl₂를 0.9% 생리식염수 0.05 ml에 희석하여 각각 난각을 통하여 배반 부위에 1회 투여하였고 대조군으로서는 정상군과 0.9% 생리식염수 0.05 ml을 동일한 방법으로 투여한 개체들을 사용하였다. 난각에 생긴 구멍은 paraffin으로 봉한 후 부란 9일 (stage 35)째 까지 부란시켜 계배를 적출하고 대뇌를 분리하였다.

2) 전자현미경 관찰

계배를 적출하여 대뇌를 분리하고 1 mm³으로 세절한 후 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)로 조정된 2.5% glutaraldehyde에서 5시간 전고정하고, 동일한 완충액으로 15분씩 3회 세척한 다음, 동일한 완충액 내의 1% osmium tetroxide (OsO₄) 용액으로 2시간동안 후고정 하였다. 고정된 조직을 동일한 완충액으로 15분씩 3회 세척한 다음 alcohol 상승 농도 순으로 탈수하여 propylene oxide로 치환한 후, Epon 포매제로 포매하고, 초박편기 (ultramicrotome LKB-V형)를 사용하여 1 μm 두께로 절편제작한 다음 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰 대상부위를 확인하였다. 확인한 부위를 60 nm의 초박절편으로 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM 100CX-II 투과형 전자현미경 (80 KV)으로 관찰하였다.

3) SDS-PAGE에 의한 단백질 분석

계배대뇌를 적출하여 ultrasonic dismembrator (AR-TEK-300, U.S.A.)로 ice bath 상에서 마쇄시킨 후

원심 분리기 (Beckman J2-21)로 0°C에서 10,000 G로 10분간 원심분리하여 상층액을 액체 질소 (liquid nitrogen)통에 보존하면서 단백질 분석 시료로 사용하였다.

전기영동시에 각 well에 동일한 양의 단백질을 가해주기 위해서 다음과 같이 시료의 단백질 함량을 정량하였다. Sample buffer (0.1 g glycerol, 62.5 μl upper tris buffer, 0.02 g SDS, 50 μl β-mercaptoethanol, 15 g brom thymol blue/ml)에 용해된 total protein의 함량을 측정하기 위하여 brom thymol blue를 넣지 않은 sample buffer와 sample을 1:1 비율로 혼합하였다. 그 후 2분간 끓는 물에서 중탕한 다음, microcentrifuge를 사용하여 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하고, 이 상층액을 Bradford (1976)방법에 따라 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 단백질 정량을 하였다. 단백질이 정량된 시료를 Coomassie brilliant blue G-250으로 염색하여 spectrophotometer (Pye Unicam Co., U.K.)로 595 nm에서 optical density를 측정하고 표준물질로 표준곡선을 작성하여 단백질 함량을 환산하였다.

Lamlli (1970) 및 Annapur 등 (1986)의 방법에 따라 vertical slab gel kit (Hoefler, SE 600)를 이용하여 전기영동 (SDS-PAGE)하였다. 먼저 glass plate (16×17 cm)에 1.5 mm spacer를 고정하여 10% acrylamide gel (*)을 만들고, 단백질 함량이 측정된 시료를 조단백질 (crude protein)함량으로 환산하여 0.8 g protein/μl가 되도록 희석하여 조정된 후, 이 액 30 μl와 sample buffer (0.1 g glycerol, 62.5 μl upper tris buffer, 0.02 g SDS, 50 μl β-mercaptoethanol, 15 g brom thymol blue/ml) 30 μl를 혼합하여 끓는 물에서 2분간 중탕한 다음 냉각하였다. 냉각된 시료는 microcentrifuge로 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액 40 μl를 well에 loading하여 각 well 당 16 g의 가용성 단백질을 전기영동 하였는데 4°C 하에서 running buffer (3g tris, 14.4g glycerol, 1g SDS/μl)를 이용하여 전류 20 mA에서 15시간동안 전개하였다. 전개된 gel은 Coomassie brilliant blue (2.5% Coomassie brilliant blue R, 40% methanol, 7% acetic acid)로 3시간 염색한 후 acetic acid buffer (5% methanol, 7.5% acetic acid)로 탈색하여 각 시료의 영동상을 분석하였고 표준 단백질은 aldolase (158 KD),

bovine serum albumin (66 KD), egg albumin (45 KD), glyceraldehyde-3-phosphatate dehydrogenase (36 KD), carbonic anhydrase (29 KD), trypsinogen bovine pancrease (24 KD), trypsin inhibitor soybean (20 KD) 그리고 α -lactalbumin (14 KD) 을 사용하였다.

탈색된 gel은 gel dryer (Hoefler, SE 1160)에서 완전히 건조시킨 후에 densitometer (Shimadzu C-9000)로 570nm에서 protein band의 밀도를 측정하여 상호 비교하였다.

4) 효소활성도 측정

(가) Lactate dehydrogenase (LDH)의 활성도 측정

LDH의 활성은 Holbrook 등 (1975)의 방법을 이용하여 반응액에 효소원을 가한 후 1분동안 감소되는 NADH의 양을 340 nm에서의 흡광도를 측정하여 감소되는 NADH의 양으로부터 환산하여 측정하였다. 반응액 (3 ml)의 조성은 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.6 mM sodium pyruvate, 21.3 mM nicotinamide, 0.18 mM NADH로 하고 효소원으로는 추출된 조효소액 0.1 ml을 혼합하여 효소활성도를 측정하였다.

(나) Malate dehydrogenase (MDH)의 활성도 측정

MDH의 활성은 Joo와 Han (1976)의 방법을 이용하여 반응액에 효소원을 가하고 상온에서 1분동안에 감소되는 2, 6-dichlorophenol indophenol (DICPIP)의 양을 spectrophotometer (Shimadzu-1201)를 이용하여 600 nm에서 측정하여 환산하였다. 반응액의 조성은 14 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.43 mM NAD⁺, 30 mM nicotinamide, 0.86 mM KCN, 0.034 mM DICPIP, 7.1 mM sodium malate로 하고, 여기에 추출된 조효소액 0.1 ml을 혼합하여 사용하였다.

(다) Succinate dehydrogenase (SDH)의 활성도 측정

SDH의 활성은 Joo와 Han (1976)의 방법을 이용하여 반응액에 효소원을 가하고 상온에서 1분동안 환원되는 DICPIP의 양을 spectrophotometer (Shimadzu-1201)를 이용하여 600 nm에서의 흡광도 변화로써 활성을 측정하였다. 반응액의 조성은 50 mM phosphate buffer (pH 7.6), 1 mM KCN, 0.04 mM DICPIP, 20 mM sodium succinate로 하고, 추출된 조효소액 0.1 ml을

혼합하여 사용하였다.

5) Adenosine triphosphate (ATP)함량 측정

계배대뇌에서 추출된 시료액 200 μ l와 HEPES 완충용액 (50 mmol Tris acetate buffer, pH 7.75, 1.5 mmol EDTA, 0.075% bovine serum albumin, 10 mmol Magnesium acetate) 200 μ l를 혼합하고 (Wulff, 1983) 여기에 HEPES 완충용액으로 용해시킨 D-luciferin-luciferase (from Firefly; Calbiochem Co.)용액 100 μ l를 혼합한 10초 후에 발광된 광도를 luminometer (Berthold, LB9501)를 이용하여 측정하였다 (Bowie, 1978). 표준곡선은 1.97×10^{-5} mol ATP 용액을 HEPES 완충용액으로 희석하여 시료액과 동일하게 측정하였다.

결 과

1. 전자현미경적 소견

정상군 염색질은 핵질 안에서 비교적 고르게 분포해 있었으며 핵막은 2중으로 아주 선명하게 구별되어 있음을 관찰할 수 있었다. 특히 조면소포체와 Golgi복합체가 잘 발달되어 있었으며, 또한 polysome이 관찰되었고 synaptic 소포들이 신경세포들 사이에 분포해 있었다. 세포질 전체에 걸쳐서 ribosome이 산재되어 있었다 (Fig. 3). 0.1 mg 투여군은 핵질 내에 2개의 인이 분포해 있었으며 염색질은 망상으로 핵질 내에 고르게 분포해 있고 비교적 양호한 조면소포체와 mitochondria를 관찰할 수 있었으나 그 형태는 다양하였다. Golgi복합체도 비교적 발달이 좋았으며 소수의 lysosome을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 0.5 mg 투여군은 핵막이 약간 불규칙하였고 세포막에서는 음세포 활동에 의해 흡수되는 소수의 음세포들이 관찰되었다 (Fig. 5). 1.0 mg 투여군의 염색질은 핵질 내에서 인을 중심으로 그 중심부에 밀집되어 있었고 핵막은 구별되나 불규칙 하였다. 세포질은 비교적 발달이 좋았고 Golgi복합체가 잘 발달되어 있었다 (Fig. 6). 한편 신경세포체와 수상돌기 사이에서 synapsis가 형성되어 있었다 (Fig. 6-1). 2.0 mg 투여군의 핵은 핵막이 매우 불규칙 할 뿐만 아니라 이질 염색질이 핵막 주변부에 밀집해 있으며 핵막의 일부는 파괴되어 나타났다. 세포질 내에는 전자 밀도가 높은 물질이 나타났으며 유리

ribosome이 세포질 전체에서 고르게 관찰되었다. Mitochondria는 팽윤되었고 막 일부가 파괴되어 관찰되었다 (Fig. 7)

2. 단백질 조성 및 함량

단백질 band는 총 37개가 분리되었다. 분자량 330 KD의 단백질 band의 농도는 투여량에 따라 다소 증가하다가 2.0 mg 투여군 (정상군의 186%)에서는 크게 증가되었다. 320 KD의 단백질 band는 0.5 mg 투여군 이하에서 감소하였으나 1.0 mg 투여군 (161%)과 2.0 mg 투여군 (182%)에서는 증가하는 것으로 나타났다. 250 KD, 230 KD 및 24 KD의 단백질 band는 0.1 mg 투여군에서 감소되었고 0.5 mg 투여군에서는 대조군과 비슷하였으나 1.0 mg 투여군과 2.0 mg 투여군에서는 크게 증가하는 것으로 나타났다. 45 KD의 단백질 band는 0.5 mg 투여군 이하에서는 감소되었으나 1.0 mg 투여군 (155%)과 2.0 mg 투여군 (595%)이 증가되었다. 15 KD의 단백질 band는 모든 실험군에서 투여량에 따라 증가

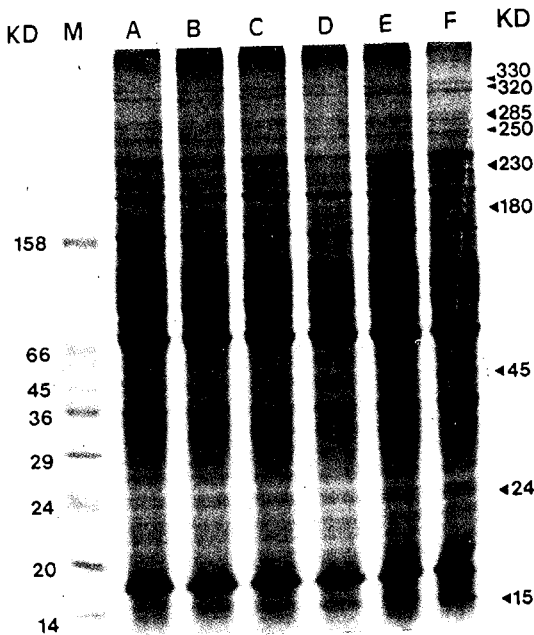


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cerebrum fluid proteins in chick embryo : (M) marker protein, (A) control group, (B) saline, (C) 0.1 mg/kg, (D) 0.5 mg/kg, (E) 1.0 mg/kg, (F) 2.0 mg/kg.

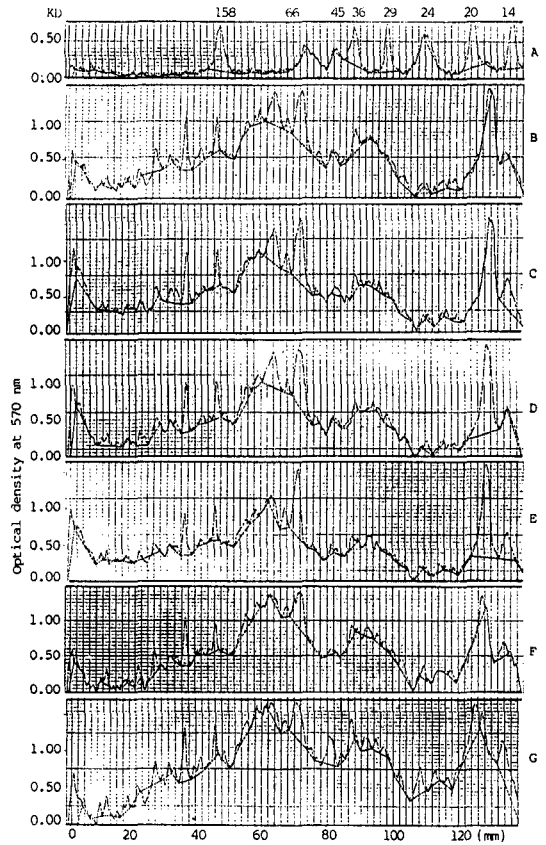


Fig. 2. Densitometric curves of the cerebrum fluid protein fractions through SDS-PAGE : (A) maker protein, (B) control group, (C) saline, (D) 0.1 mg/kg, (E) 0.5 mg/kg, (F) 1.0 mg/kg, (G) 2.0 mg/kg.

현상을 보였다 (Figs. 1, 2).

3. 효소활성도의 변화

1) Lactate dehydrogenase (LDH)의 활성도

LDH 활성은 정상군과 비교하였을 때 saline 투여군, 0.1 mg 투여군, 0.5 mg 투여군 및 1.0 mg 투여군이 각각 91%, 84%, 82%, 78%로 활성의 감소를 가져왔으며, 2.0 mg 투여군에서는 61%로 활성이 크게 감소되었다 (Table 1).

2) Malate dehydrogenase (MDH)의 활성도

MDH 활성을 비교해보면 정상군에 비해 saline 투여군, 0.1 mg 투여군, 0.5 mg 투여군 및 1.0 mg 투여군

이 각각 97%, 97%, 96%, 95%로 나타났고 2.0 mg 투여군에서는 81%로 활성이 감소되었다. 10일군의 MDH 활성은 saline 투여군, 0.1 mg 투여군, 0.5 mg 투여군, 1.0 mg 투여군이 정상군에 비해 96%, 94%, 93%, 90%로 다소 감소를 가져왔으나, 2.0 mg 투여군에서 76%로 MDH 활성이 크게 감소되었다 (Table 2).

3) Succinate dehydrogenase (SDH)의 활성도

정상군에 비해 saline 투여군, 0.1 mg 투여군, 0.5 mg 투여군이 각각 98%, 97%, 95%였으나 1.0 mg 투여군에서는 80%로 SDH 활성이 크게 감소되었고, 2.0 mg 투여군에서는 63%로 활성이 감소되어 나타났다. 10일군에서는 정상군과 비교하여 saline 투여군에서 98%로 나타났고, 0.1 mg 투여군, 0.5 mg 투여군에서는 각각

Table 1. Effects of HgCl₂ on lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cerebrum in chick embryo.

Incubation days	Groups	Enzyme activity ⁺ (unit/cerebrum)	Relative activity ⁺⁺ (%)
9	control	11.07	100
	saline	10.02	91
	0.1 mg/kg	9.30	84
	0.5 mg/kg	9.07	82
	1.0 mg/kg	8.69	78
	2.0 mg/kg	6.75	61

One unit of enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition described in the text.

Relative activities were expressed as percent of control.

Table 2. Effects of HgCl₂ on malate dehydrogenase (MDH) activity of the cerebrum in chick embryo.

Incubation days	Groups	Enzyme activity ⁺ (unit/cerebrum)	Relative activity ⁺⁺ (%)
9	control	11.89	100
	saline	11.50	97
	0.1 mg/kg	11.47	97
	0.5 mg/kg	11.46	96
	1.0 mg/kg	11.28	95
	2.0 mg/kg	9.63	81

* One unit of enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition described in the text.

** Relative activities were expressed as percent of control.

96%, 89%의 감소를 보였으며 1.0 mg 투여군에서는 79%, 2.0 mg 투여군에서는 62%의 활성을 보여 크게 감소되었다 (Table 3).

4) Adenosine triphosphate (ATP)의 변화

ATP양은 정상군이 2.50×10^{-6} mol/ml이었으며, saline 투여군, 0.1 mg 투여군, 0.5 mg 투여군에서는 각각 2.20×10^{-6} mol/ml, 2.50×10^{-6} mol/ml, 2.65×10^{-6} mol/ml로 나타나 정상군과 거의 같았고, 1.0 mg 투여군은 9.10×10^{-6} mol/ml로 ATP양이 다소 증가하였으며 2.0 mg 투여군에서는 5.40×10^{-5} mol/ml로 크게 증가하였다 (Table 4).

Table 3. Effect of HgCl₂ on succinate dehydrogenase (SDH) activity of the cerebrum in chick embryo.

Incubation days	Groups	Enzyme activity ⁺ (unit/cerebrum)	Relative activity ⁺⁺ (%)
9	control	8.45	100
	saline	8.30	98
	0.1 mg/kg	8.16	97
	0.5 mg/kg	8.02	95
	1.0 mg/kg	6.75	80
	2.0 mg/kg	5.30	63

One unit of enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition described in the text.

** Relative activities were expressed as percent of control.

Table 4. Effects of HgCl₂ on adenosine triphosphate (ATP) contents of the cerebrum in chick embryo.

Incubation days	Groups	ATP mol/ml
9	control	2.50×10^{-6}
	saline	2.20×10^{-6}
	0.1 mg/kg	2.50×10^{-6}
	0.5 mg/kg	2.65×10^{-6}
	1.0 mg/kg	9.10×10^{-6}
	2.0 mg/kg	5.40×10^{-5}

고 찰

계배 중추신경계의 발생은 부란 24시간 후 체절이 형성됨과 동시에 외배엽으로부터 신경관이 형성되고 이어서

신경관이 발달한다. 신경관 내 배상피층에서 미분화세포들이 분열하여 기저막 쪽으로 이동하면서 기질세포로 변형된 후에 점차 신경아세포와 해면아세포로 발달한다. 신경세포는 신경아세포로부터 분화되는데 이 과정에서 조면소포체를 비롯한 세포소기관들이 발달하고 세포질과 돌기들이 확장되어 세포간 공간이 점차 줄어들는다(Berry and Rogers, 1965; Altman, 1966; Caley and Maxwell, 1966; Karfunkel, 1974; Kim *et al.*, 1988). 또한 신경세포는 출생 전과 출생 직후에 대부분이 형성되어져서 일생 동안 거의 분열하지 않고 그 성분이 일정하게 지속되며(Clarke and Cowan, 1975), 신경계의 발생과정중에 나타나는 중요한 특징으로서 신경세포의 빠른 증식과 함께 집단적인 퇴화현상이 일어남이 보고 되었으며(McMillian and Simpson, 1978), 이러한 두 가지의 상반적인 현상을 거쳐 신경계가 완성되는 것으로 알려져 있다(Pasko, 1972). 이러한 현상은 척추동물의 배 발생시 조직의 분화, 기관발생 및 형태형성의 진행시에도 나타나는 일반적인 현상으로 간주된다(Saunders, 1966; Decker, 1974; Hamburger, 1975; Chu-Wang and Oppenheim, 1978a, b; Koh *et al.*, 1988).

Brookes와 Kristt (1989)에 의하면 쥐 대뇌의 성상세포내에서 1 μ m HgCl₂ 투여시 미세구조의 변화는 heterochronatin의 분리, lysosome의 증가와 세포표면의 불규칙성의 증가를 가져왔고, 5 μ m을 투여 했을때에는 많은 세포들이 확장되었고 단백질 합성과 수송에 관여하는 소기관들의 파괴가 수반되었으며 신경세포의 세포질에서 lysosome들이 특징적으로 나타났다고 보고 하였다. 또한, Kim 등 (1994a, 1994b) 계배 대뇌 신경세포 분화과정에서 HgCl₂ 투여시 미세구조적 변화는 핵막의 격리와 2중막의 분리, mitochondria의 cristae 파괴현상이 뚜렷하였고 조면소포체와 Golgi 복합체의 발달이 미약하였다고 보고하였다. 본 연구에서의 미세구조적 변화는 1.0 mg 투여군에서 핵막이 약간 불규칙했으나 큰 변화는 관찰되지 않았고 2.0 mg 투여군에서는 핵막이 매우 불규칙할 뿐만 아니라 일부는 파괴되어 나타났으며, 세포질에서는 mitochondria가 팽윤되었고 막 일부가 파괴되어 관찰되었다. 이러한 세포내의 미세구조의 변화는 수은 독성이 대뇌세포의 분화와 형태형성에 많은 영향을 미치기 때문인 것으로 생각된다.

Bamburg 등 (1973)은 계배 발생중 대뇌의 neurotubule 단백질은 발생 5일과 발생 11일 사이에서 유의성있게 증가하여 발생 11~17일 사이에는 거의 1/4 정도가 neurotubule 단백질로서 이 기간 동안 그 농도가 일정하게 유지되다가 성체가 되면 감소하였으며, 소뇌에서는 일부 단백질이 발생 8일째에 크게 증가되었다가 발생 16~20일까지는 점차적으로 감소한다고 하였다.

Hah 등 (1987)은 계배의 중추신경조직으로부터 단백질의 주요 band 범위는 90 KD에서 16 KD까지 나타나며, 부란 4일 후 약 24~28개의 band가 densitometry에 의해 관찰된다고 보고하였다. 본 연구에서는 계배에서 37개의 단백질 band가 분리되었는데 320 KD의 3조의 단백질은 소량투여군에서 감소하다가 투여량의 증가에 따라 그 농도가 증가하는 현상을 보였다. 이는 수은의 독성효과로 인한 현상으로 생각된다.

Asztalos와 Nemcsok (1985)는 몇 가지 중금속과 살충제에 의한 조직손상의 정도는 LDH활성의 증가와 비례하며 따라서 대뇌조직 및 혈액 내에서 LDH 활성이 증가되었는데 이는 약물의 독성작용에 대한 방어기전의 하나로 나타나는 현상이라고 하였다. 반면 Choe 등 (1985)은 phenylalanine, tryptophan, tyrosine과 같은 방향족 아미노산을 투여하고 15일간 부란한 계배의 경우 LDH, MDH 그리고 SDH와 같은 기초대사에 중요한 효소들의 활성도가 크게 감소된다고 보고하였고, Choe 등 (1986)은 부란 10일 후 계배 두부의 LDH, MDH, SDH 등의 기초 대사 관련 효소들의 활성도를 측정하였던 바 LDH 활성도는 tryptophan 투여군의 경우 정상군에 비해 80%로 크게 감소되었고, MDH 활성의 경우에는 79%로 활성이 감소되었으며 SDH의 경우도 56%로 감소가 일어남을 보고하였다. 한편, 본 연구에서도 LDH, MDH 및 SDH 활성도는 수은의 투여량이 증가할수록 감소현상을 보였는데 이것은 수은의 축적이 대뇌 세포에 손상이 일어나 탄수화물, 지질, 아미노산 등의 최종 생물학적 산화회로인 TCA 회로의 효소활성이 저해되기 때문인것으로 생각된다.

수은은 쥐 뇌의 microsomal Na-K-ATPase의 활성을 저해하고 ATP를 비경쟁적으로 억제하며(Magour *et al.*, 1987) 세포 내의 세포질면에 존재하는 Na-K-ATPase도 저해하는 것으로 알려졌다(Anner and Moosmayer, 1992). 또한 쥐 성상세포 내에서는 수은 이온

의 결합으로 인해 Na-K-ATPase 활성이 영향을 받음도 보고되었다(Brookes, 1988b). Hechtenberg and Beyersmann(1991)은 중금속이 토끼 근세포체의 Ca^{++} -ATPase의 활성을 저해함으로써 ATP의 가수분해를 억제하는데 카드뮴과 납 보다는 수은이 ATP 분해 효소의 활성을 보다 심하게 억제하며 또한 Ca^{++} -pump의 강한 억제자로서 낮은 농도에서도 세포 내 Ca^{++} 의 활동과 항상성을 저해한다고 보고하였다. 본 연구에서는 ATP 함량이 1.0 mg 이상 투여군에서 투여량이 증가에 비례하여 증가하는 것으로 나타났는데 이는 mitochondria 내의 탈수소효소에 비해 ATP 가수분해효소가 수은 독성에 보다 큰 영향을 받기 때문인 것으로 생각된다.

결 론

HgCl₂의 투여량에 따른 제배의 대뇌 발생에 미치는 영향을 규명하기 위하여 신경세포의 형태학적 변화를 전자현미경을 이용하여 관찰하였으며, 또한 대뇌 단백질, 탈수소효소의 활성도 및 ATP의 변화상을 분석한 결과는 다음과 같다.

대뇌세포 미세구조의 변화는 0.5 mg과 1.0 mg 투여군에서는 핵막이 약간 불규칙하게 관찰되었지만 세포질은 비교적 발달이 좋았다. 2.0 mg 투여군에서는 핵막이 매우 불규칙할 뿐만 아니라 세포질내의 mitochondria가 팽윤되었고 막 일부가 파괴되었다.

정상군 제배 대뇌 단백질의 SDS-PAGE를 통하여 37개의 polypeptide band들이 분리되었으며 수은 투여량의 증가에 따라 7개의 band들은 그 함량이 증가하였다.

탈수소효소의 활성도는 수은 투여량이 증가할수록 감소하는 현상을 보였는데 LDH의 활성도는 1.0 mg 투여군에서 78%로 감소하였고 2.0 mg 투여군에서는 61%로 크게 감소하였다. MDH 활성도는 2.0 mg 투여군에서 81%로 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 한편, SDH 활성도는 1.0 mg 투여군에서는 80%, 2.0 mg 투여군에서는 63%로 활성이 크게 감소하였다.

ATP의 변화는 1.0 mg 투여군에서 다소 증가하였으나 2.0 mg 투여군에서는 크게 증가하는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

Albrecht J, Szumanska G, Gadamski R, Gajko-

wska B, 1994. Changes of activity and ultrastructural localization of alkaline phosphatase in cerebral cortical microvessels of rat after single intraperitoneal administration of mercuric chloride. *Neurotoxicology* 15(4), 897-902

Altman J, 1966. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 128, 431-474

Amin-Zaki L, Elhassani S, Majeed MA, Clarkson TW, Doherty RA and Greenwood M, 1974. Intrauterine methylmercury poisoning in Iraq. *Pediatrics* 54, 587-595

Annapur GS, Gundling GJ, Benson TA, Spear BB, 1986. Vegetative expression of the δ -endotoxin genes of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* in *B. subtilis*. *J. bacteriol.* 166, 194-204

Anner BM, Moosmayer M, 1992. Mercury inhibits Na-K-ATPase primarily at the cytoplasmic side. *Am. J. Physiol.* 262(5), 843-848

Asztalos B, Nemcsok J, 1985. Effect of pesticides on the LDH activity and isoenzyme pattern of carp (*Cyprinus carpio* L.) sera. *Comp. Biochem. Physiol.* 82, 217-219

Bamburg JR, Shooter EM, Wilson L, 1973. Developmental changes in microtubule protein of chick brain. *Biochem.* 12(8), 1476-1482

Berry M, Rogers AW, 1965. The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J. Anat.* 99, 691-709

Bowie LJ, 1978. In *methods in enzymology*, Academic press. NY. 57, 26

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254

Brookes N, 1988a. Specificity and reversibility of the inhibition by HgCl₂ of glutamate transport in astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 50, 1117-1122

Brookes N, 1988b. The relative sensitivity of amino acid transport systems in astrocytes to inhibition by HgCl₂. *J. Faseb.* 2, 1820

Brookes N, Kristt DA, 1989. Inhibition of amino acid transport and protein synthesis by HgCl₂

- and methylmercury in astrocytes: selectivity and reversibility. *J. Neurochem.* 53(4), 1228-1237
- Caley DW, Maxwell DS, 1966. An electron microscopic study of the neuroglia during postnatal development of the rat cerebrum. *J. Comp. Neurol.* 133, 45-70
- Chang LW, 1977. Neurotoxic effects of mercury—a review. *Environ. Res.* 14, 329-373
- Choe RS, Joo CN, Choi CK, Kim JW, 1985. Cell biological studies of the effect of aromatic amino acid on early development of chick embryo. *Korean J. Zool.* 28(4), 257-273
- Choe RS, Joo CN, Choi CK, Kim JW, Joo SO, 1986. Cell biological studies on brain formation at the early stage of chick embryogenesis. *Korean J. Zool.* 29(3), 215-233
- Choi BH, Lapham LW, Amin-Zaki L, Saleem T, 1978. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 37, 719-733
- Chu-Wang IW, Oppenheim RW, 1978a. Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. I. A light and electron microscopic study of naturally occurring and induced cell loss during development. *J. Comp. Neurol.* 177, 33-58
- Chu-Wang IW, Oppenheim RW. 1978b. Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. II. A quantitative and qualitative analysis of degeneration in the ventral root, including evidence for axon outgrowth and limb innervation prior to cell death. *J. Comp. Neurol.* 177, 59-86
- Clarke PGH, Cowan WH, 1975. Ectopic neurons and aberrant connections during neural development. *P.N.A.S. USA.* 72, 4455-4458
- Clarkson TW, 1972. The pharmacology of mercury compounds. *Annu. Rev. Pharmacol.* 12, 375-406
- Clarkson TW, 1986. Effects-general principles underlying the toxic action of metals, in *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, Amsterdam. 2nd ed.(Friberg L, Nordberg G.F, and Vouk. V., eds), pp.128-148
- Decker RS, 1974. Lysosomal packaging in differentiating and degenerating anuran lateral motor column neurons. *J. Cell Biol.* 61, 599-612
- Frank E, Guthrie, Jerome J, 1980. Introduction to environmental toxicology: Perry, NY Elsevier North Holland 68, 105
- Geelen JAG, Dormans JAMA, Verhoef A, .1990. The early effects of methylmercury on the developing rat brain. *Acta Neuropathol.* 80, 432-438
- Hah JC, Han CB, Kim DS, 1987. Studies on the distribution of soluble proteins within the central nervous system during embryogenesis of the chick embryo. *Korean Journal of Zoology* 30(3), 261-271
- Hamburger V, 1975. Cell death in the development of lateral motor column of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 160, 535-546
- Hechtenberg S, Beyersmann D, 1991. Inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase activity by cadmium, lead and mercury. *Enzyme.* 45(3), 109-115
- Holbrook JJ, Liljas A, Steindel SJ, Rossmann MG, 1975. Lactate dehydrogenase. In "The Enzyme (Vol. XI), (Boyer, P.D. ed)". Academic Press Inc., Publishers, NY. pp.191-292
- Hwang JI, Bae ES, Cha CW, 1986. A study on the protective effect of the Korean garlic on the albino rat chronically exposed to methyl mercury. *J. Korea Medical College* 23(1), 121-128
- Joensuu OL, 1971. Fossil fuels as source of mercury pollution. *Science* 172, 1028
- Joo CN, Han JH, 1976. The effect of ginseng saponins on chicken's hepatic mitochondrial succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase. *Korean Biochem. J.* 9, 43-51
- Karfunkel P, 1974. The mechanism of neural tube formation. *Int. Rev. Cytol.* 38, 245-270
- Kerper LE, Ballatori N, Clarkson TW, 1992.

- Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *Am. J. Physiol.* 262(5), 761-765
- Kim SG, Cho KP, Kim JS, 1994a. Effect of mercuric chloride on the differentiation cerebral neuron of chick embryo(1). *Kor. Soc. Elec. Micro.* 24(2), 26-36
- Kim SG, Cho KP, Kim JS, 1994b. Effects of mercuric chloride on the differentiation of cerebrum of chick embryo. *Korean J. Zool.* 37(3), 428-438
- Kim WJ, Deung YK, Choe RS, 1988. Effects of malathion on the development of the chick embryo cerebrum. *Korean J. Zool.* 31(3), 191-206
- Koh KS, Shin CO, Yoo CK, Choe RS, 1988. A cytochemical study on the acid phosphatase of neurons of developing chick embryo brain. *Korean J. Electron Microscopy.* 18(2), 119-131
- Koos BJ, Longo LD, 1976. Mercury toxicity in the pregnant woman, fetus, and newborn infant. A review. *Am. J. Obstet Gynecol.* 126, 390-409
- Lammi UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *T. Nature* 227, 680-685
- Larkfors L, Oskarsson A, Sundberg J, Ebendal T, 1991. Methylmercury induced alterations in the nerve growth factor level in the developing brain. *Brain-Res-Dev-brain-Res.* 62(2), 287-291
- Lee KM, 1988. Heavy metals in environment. *J. Catholic Medical College* 41(2), 475-478
- Lundholm CE, 1995. Effects of methyl mercury at different dose regimens on eggshell formation and some biochemical characteristics of the eggshell gland mucosa of the domestic fowl. *Comp. Biochem. Physiol Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 110(1), 23-8
- Magour S, Maser H, Greim H, 1987. The effect of mercury chloride and methyl mercury on brain microsomal Na⁺-K⁺-ATPase after partial delipidation with Lubrol. *Pharmacol. Toxicol.* 60(3), 184-186
- McMillian V, Simpson SB, 1978. Proliferative and degenerative events in the early development of chick dorsal root ganglia. I. Normal development. *J. Comp. Neurol.* 182, 727-740
- Moller-Madsen B, 1990. Localization of mercury in CNS of the rat. II. Intraperitoneal injection of methylmercuric chloride and mercuric chloride. *Toxicology & applied Pharmacology* 103, 303-323
- Moller-Madsen B, Danscher G, 1986. Localization of mercury in CNS of the rat. 1. Mercuric chloride (HgCl₂) per os. *Environmental Research* 41, 29-43
- Moller-Madsen B, Danscher G, 1991. Localization of mercury in CNS of the rat. *Toxicology & applied Pharmacology* 108, 457-473
- Oliveira EM, Rocha JB, Sarkis JJ, 1994. In vitro and in vivo effects of HgCl₂ on synaptosomal ATP diphosphohydrolase from cerebral cortex of developing rats. *Arch. Int. Physiol. Biochem. Biophys.* 102(5), 251-4
- Olney JW, 1979. Excitotoxic amino acids and Huntington's disease, in *Advances in Neurology* (Chase T.N, Wexler N.S, and Barbeau A., eds), Raven Press, N.Y. 23, 609-624
- Park JS, Cha CW, 1984. A study on the effect of garlic on the toxicity of phenyl mercuric acetate in rats. *J. Korea Medical College* 21(3), 49-55
- Pasko R, 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145, 61-84
- Reuhl KR, Chang LW, 1979. Effects of methylmercury on the development of the nervous system: a review. *Neurotoxicology* 1, 21-55
- Rhee MG, Cha CW, Bae ES, 1985. A study on the chronological changes of rat tissues and the effect of garlic in acute methyl mercury poisoning. *J. Catholic Medical College* 22(1), 153-159
- Richardson RJ, Murphy SD, 1974. Neurotoxicity produced by intracranial administration of methyl mercury in rat. *Toxicol. Appl. Pharma.* 29, 289
- Rozynekowa D, Raczkiwicz B, 1977. Destructive effect of methyl mercury chloride on human mitosis in living cells in vitro. *Mutation Rese-*

- arch 56, 185
- Saunders JW, 1966. Death in embryonic systems. *Science* 154, 604-612
- Schardein JL, 1985. Chemically induced birth defects. Marcel Dekker, N.Y. pp.618-644
- Schwarcz R, Meldrum B, 1985. Excitatory amino acid antagonists provide a therapeutic approach to neurological disorders. *Lancet* 2, 140-143
- Soderstrom S, Ebendal T, 1995. In vitro toxicity of methyl mercury : effect on nave growth factor (NGF)-trrsponsive neuronsand on NGF synthesis in fibroblasts. *Toxicol. Lett.* 75(1-3), 133-144
- Wood JM, Cheh A, Dizikes LJ, 1978. Mechanisms for the biomethylation of metals and metalloids. *Fed. Proc.* pp.16-21.
- Wulff K, 1983. In *methods of enzymatic analysis*, 3rd ed. Verlag Chemi C, Weinheim 1, 351-355

FIGURE LEGENDS

- Figs. 3-7.** Electronmicrographs of neurons in cerebral cortex of 0.1 mg/kg embryo incubated for 9 days.
- Fig. 3.** Electron microhraph of neurons in the cerebral cortex of normal chick embryo. A number of ribosomes and well developed Golgi complex (G)/vesicles (GV) are observed. N, nucleus; RER, rough endoplasmic reticulum; D, dendrite.
- Fig. 4.** Electron micrograph of neurons in the cerebral cortex of 0.1mg/kg of mercuric chloride-injected chick embryo incubated for 9 days. Golgi complex (G)/a number of Golgi vesicles, and rough endoplsmic reticulum (RER) are found. Primary lysosomes (Ly) are observed sparsely. N, nucleus.
- Fig. 5.** Electron micrograph of neurons in the cerebral cortex of 0.5 mg/kg of mercuric chloride-injected chick embryo incubated for 9 days. Neuron contains a nucleus (N) with three prominent nucleoli (No). Pinocytotic vesicles (PV) are observed in the peripheral cytoplam.
- Fig. 6.** Electron micrograph of neurons in the cerebral cortex of 1.0mg/kg of meucric chloride-injected chick embryo incubated for 9 days. The outer membrane of nuclear envelope is disrupted partially. The well developed Golgi complex (G) and synapsis are observed. D, dendrite; N, nucleus; No, nucleolus.
- Fig. 6-1.** The magnification of Fig. 32. G, Golgi complex; M, mitochondria.
- Fig. 7.** Electron micrograph of neurons in the cerebral cortex of 2.0 mg/kg of mercuric chloried-injected chick embryo incubated for 9 days. The outer membrane of nuclear envelope and cytoplasm are disrupted partially. A large mitochondrion (M) with sparse cristae is observed. DB, dense body: V. vesicles; M. mitochondria; N. nucleus.

