

수은 및 카드뮴의 세포독성에 대한 Glutathione의 역할에 관한 연구

정재호, 김준연, 고대하

전북대학교 의과대학 예방의학교실 및 의과학 연구소

A Study on the Protective Effects of Glutathione on Cytotoxicity of Mercury and Cadmium

Jae-Ho Jeong, Jun-Youn Kim, Dai-Ha Koh

Department of Preventive Medicine and Public Health,
Chunbuk National University Medical School and Institute for Medical Sciences

Objectives: To evaluate the protective effects of glutathione (GSH) on the cytotoxicity of mercurial compounds(CH_3HgCl , HgCl_2) or cadmium chloride(CdCl_2) in EMT-6 cells.

Methods: The compounds investigated were CH_3HgCl , HgCl_2 , CdCl_2 , GSH, buthionine sulfoximine(BSO), L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid(OTC). Cytotoxicity analysis consist of nitric oxide(NO) production, ATP production and cell viability.

Results: Mercurial compounds and cadmium chloride significantly decreased cell viability and the synthesis of NO and cellular ATP in EMT-6 cells. GSH was not toxic at concentrations of 0 - 1.6 mM. In the presence of GSH, mercurial compounds and cadmium did not decrease the production of ATP and nitrite in EMT-6 cells. The protective effects of GSH against the cytotoxicity of mercurial compounds and cadmium depended on the concentration of added GSH to the culture medium for EMT-6 cells. We evaluated the effects of intracellular GSH level on

mercury- or cadmium-induced cytotoxicity by the pretreatment experiments. Pretreatment of GSH was not changed NO_2^- and ATP production, and pretreatment of BSO was decreased in dose- and time-dependent manner. Pretreatment of OTC was increased NO_2^- and ATP production in dose- and time-dependent manner. Because intracellular GSH level was increased by OTC pretreatment, the protective effect on mercury- and cadmium-induced cytotoxicity was increased.

Conclusions: These results indicated that sulfhydryl compounds had the protective effects against mercury-induced cytotoxicity by the intracellular GSH levels.

Korean J Prev Med 1999;32(2):170-176

Key Words: Glutathione, Mercury, Cadmium, EMT-6, Nitric Oxide

서 론

수은과 카드뮴은 인체에 대해 독성을 나타내는 대표적인 중금속으로 산업장에서 광범위한 이용으로 인하여 인체에 폭로되고 식품을 통한 생체내로의 유입은 여전히 문제로 남아있어 중금속에 대한 독성학 연구의 주요 대상이 되고 있다(Nielsen, 1992).

수은을 비롯한 중금속들은 생체내 유입시 세포막을 구성하는 단백질이나 효소의 sulfhydryl group과 결합하여 세포막의 손상을 유도하거나 그 기능을 저해

시키고(Stacey 등, 1980), 과산화연쇄반응(peroxidative chain reaction)의 강력한 자극제로서 지질과산화(lipid peroxidation)를 촉진시켜 세포독성을 유발하는 것으로 보고되고 있다(Fukuno 등, 1984; Halliwell 등, 1985). 세포내 표적기관인 미토콘드리아 내부로 유입된 수은은 기질에 있는 효소들과 결합하여 활성을 저해하고, 내막의 전자전달계의 전자전달을 방해하여 에너지 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Bracken 등, 1984). 또한 세포내 glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase의 활성을 저해시

켜 free oxygen radical에 대한 항산화능(antioxidative defence)을 감소시키거나(Hirota, 1986), 기타 효소의 활성을 변조시켜 세포독성을 나타내 것으로 알려져 있다(Dieter 등, 1983; Goyer, 1991).

Glutathione(L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH)은 glutamic acid, cysteine, glycine으로 구성된 tripeptide로 동식물 뿐만 아니라 미생물의 모든 세포내에 존재하며 생체에서 가장 풍부한 sulfhydryl group의 공급원으로서, 세포의 많은 신진대사와 물질이동의 조효소로 작용하고 반응산소기(reactive oxygen species)나 외부로부터 유입된 유해 중금속 등의 독성에 대하여 방어작용을 하는 것으로 알려져 있다(Meister, 1983; Singhal 등,

접수 : 1999년 1월 16일, 채택 : 1999년 4월 1일.

*이 논문은 1997년도 전북대학교부속 생체안정성연구소 학술 연구비의 지원으로 이루어졌음(CNU-BSRI, No.97-10).

교신저자 : 고대하 전북대학교 의과대학 예방의학교실 (전화 : 0652-270-3094)

1987). GSH는 세포내에서 합성되어 세포 밖으로 배출된 후 분해되고 다시 세포내로 유입되어 합성되는 고유의 순환적인 대사경로 (γ -glutamyl cycle)를 이용하여 세포의 물질수송에 관여하는데, cysteine(Cys)의 sulfhydryl group에 여러 화합물이 결합한 후 이 대사경로를 통해서 물질수송이 일어나게 된다. 특히 이 대사경로는 세포가 생성한 반응산소기 및 여러 free radical 등의 독성물질을 세포밖으로 배출 또는 제거함으로써 이들의 세포독성으로부터 방어효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다(Meister, 1983, Guillermina 등, 1989, Naganuma 등, 1990; Tanaka 등, 1990). 수은은 표적기관인 신장의 피질에 축적되어 형태 및 근위세뇨관의 기능에 영향을 미치는데, 이때 GSH가 수은과 복합체를 이루며 신장세포내로의 수은축적을 조절하는 역할을 하고(Tanaka 등, 1990; Shimada 등, 1993), GSH가 세포내 수은 축적 억제 및 수은의 세포독성으로부터 방어하는 작용을 하고 있다(Naganuma 등, 1990; Kim 등, 1995). 체내의 수은유입은 GSH 생성을 유도하는 것으로 알려져 있는데, 최근의 연구결과에 의하면 수은 독성의 표적기관인 신장과 뇌 조직에서 수은의 체내 유입으로 인한 GSH의 농도증가와 방어작용을 확인하였다(Li 등, 1996a; 1996b).

Hibbs 등(1987a, 1987b)은 마우스의 대식세포가 암세포의 증식을 억제하기 위해서는 L-arginine이 필수적으로 요구되고, L-arginine의 분자내의 guanidino nitrogen이 산화하여 L-citrulline과 동량의 nitric oxide(NO)가 생성함을 보고하였다. 이는 염증반응에 동원되는 세포 및 기타 면역세포들로부터 생성되는 NO가 여러 cytokine의 자극을 받은 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 효소작용에 의해 생성된 것으로서(Snyder 등, 1992), Nathan 등(1991), Evans 등(1993) 및 Green 등(1990)은 이를 세포성 면역의 분자생물학적 지표로 인정하고 있다. 또한 반감기가 극히 짧은 NO 대신 그 대사물인 nitrite 및 nitrate를 측정하여 NO의 생성을 정량적으로 유추할 수 있는 것

으로 보고되어 있다(Bartholomew, 1984; Hibbs 등, 1988). 따라서 실험조건에 수은을 투여하여 L-arginine-NO pathway의 변조유무를 관찰하는 것은 세포성 면역에 영향을 미치는 중금속의 독성을 파악하는 실험모델로 이용할 수 있다(오경재 등, 1996; 염정호 1997).

본 연구에서는 마우스의 유선암에서 기원한 EMT-6 cell line을 이용하여 유기수은, 무기수은과 카드뮴을 첨가한 배양조건에서 세포 생존율과 세포내 에너지 대사의 지표인 adenosine triphosphate(ATP)의 생성량 및 EMT-6 세포의 고유기능인 NO의 생성능이 변화하는 것을 관찰하고, GSH를 수은 및 카드뮴과 동시에 첨가하였을 때의 NO와 ATP의 생성능을 관찰하여 중금속의 세포독성에 대한 GSH의 방어효과를 알아보고자 한다. 또한 GSH와 세포내 GSH농도를 높여주는 L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid(OTC), 세포내 GSH 합성을 억제하는 buthionine sulfoximine (BSO)를 전처리하여 세포내로 유입시킨 후 세포내부에서 수은과 카드뮴의 세포독성에 대한 GSH의 역할에 대해 알아보고자 한다.

실험재료 및 방법

1. EMT-6 세포의 처리

10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)을 보충한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma Chemical Co.) 10.5 ml에 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co.) 1.2 ml 및 FBS 3.25 ml를 혼합한 동결배양액내에 세포수가 3×10^6 인 상태로 동결보관중인 EMT-6 세포를 37 °C의 수조에서 가온하였다. 빙결상태가 풀린 세포부유액을 20 ml DMEM으로 2회 원심세척하고, 10% FBS를 보충한 DMEM (10% FBS-DMEM)이 들어 있는 배양병에서 2-3회 계대배양한 다음 24 well plate에 1×10^6 cell/well의 밀도로 배양하였다.

2. 배양조건

본 실험에 있어서 EMT-6세포의 기본

배양조건은 10% FBS-DMEM에 IL-1(Sigma Chemical Co.), IFN- γ (Sigma Chemical Co.)을 각각 40 U/ml, 20 U/ml로 첨가하여 배양하였다.

무기수은(mercury chloride, HgCl₂, Sigma Chemical Co.)과 유기수은(methyl mercury chloride, CH₃HgCl, Sigma Chemical Co.)은 1, 2, 4, 8, 16 μ M의 농도로 첨가하였고, 카드뮴(cadmium chloride, CdCl₂, Sigma Chemical Co.)은 10, 20, 40, 80, 160 μ M의 농도로 첨가하였으며, GSH(Sigma Chemical Co.)은 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mM의 농도로 첨가하여 48시간 배양하고 기본배양조건에서 동일시간 배양한 대조군과 비교하였다.

GSH, OTC, BSO 전처리는 기본 배양조건에 세포생존율에 영향을 미치지 않는 농도인 50, 100 μ M로 각각을 첨가하여 12, 24시간을 배양한 후 배양액을 제거한 후 2 μ M 농도의 유기수은과 20 μ M 농도의 카드뮴이 첨가된 새로운 배양액으로 교환하여 다시 36시간을 배양하였다. 대조군은 기본 배양조건으로 12, 24시간을 배양한 후 배양액을 제거한 후 2 μ M 농도의 수은과 20 μ M 농도의 카드뮴이 첨가된 새로운 배양액으로 교환하여 다시 36시간 배양하여 실험군과 비교하였다.

세포의 생존율이 수은 및 카드뮴 첨가로 90%이하로 저하된다면 당연히 NO의 생성이 감소될 것이고 이에 따라 NO와 ATP 생성량도 비례해서 감소될 것이기 때문에 가능한 한 세포생존율을 일정하게 최대한 유지시켜야 하는 전제사항을 만족시키기 위해서 유기수은은 2 μ M, 카드뮴은 20 μ M의 농도로 첨가하였다. 또한 GSH, OTC, BSO 등도 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 50 μ M 및 100 μ M을 이용하였다.

수은의 농도와 첨가물질에 따라 구분되는 각각의 실험군과 대조군의 실험관찰수는 16회(16 plate \times 4 well/group)였다.

3. 세포생존율 검사

배양이 끝난 후에 EMT-6 세포의 생존율은 trypan-blue exclusion 방법(Phillips, 1973)에 의해 관찰하였다.

4. 배양액내 nitrite의 정량

Hibbs 등(1987)의 방법을 참조하여 다음과 같이 측정하였다. 배양액 50 μ l을 취해 microtiter plate에 옮기고 100 μ l의 Griess reagents(1:1 mixture of 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in 60% acetic acid, and 1% sulfonilamide in 30% acetic acid)를 혼합하여 실온에서 교반한 후, 분홍의 발색을 확인하고 543 nm에서 흡광도를 읽었으며, 0 - 100 μ M의 sodium nitrate(NaNO_2)에 의한 표준곡선으로부터 농도를 구하였다.

5. ATP 정량

배양한 세포를 채취하여 원심 및 세척을 2회 반복한 후, 6% trichloroacetic acid(TCA) 200 μ l를 첨가하여 초음파분쇄기(ultrasonicator)를 이용하여 세포막을 파괴시켰다. 이를 4 $^{\circ}$ C 1,200 rpm의 조건으로 10분간 원심한 후 얻은 상층액 20 μ l에 100 mM glycine 80 μ l을 혼합한 다음 luciferase luciferin 5 mg을 HEPES buffer 2 ml에 녹인 후 luciferase와 ATP의 반응에 따른 발광정도를 luminometer로 측정하였다.

6. 통계처리

측정자료들의 각 군간의 차이를 비교하기 위하여 일원배치 분산분석을 하였으며, 그 결과에 따라 post-hoc test로 Scheffe's test를 실시하였다.

결 과

1. 수은화합물 및 카드뮴의 첨가시 세포생존율, NO_2^- 및 ATP 생성량

수은화합물을 첨가한 배양조건에서 EMT-6 세포의 세포생존율은 각각의 농도에 따라 무기수은은 50 - 97%, 유기수은은 43 - 97%, 카드뮴은 50 - 97%의 범위였으며, NO_2^- 의 생성량은 무기수은에서 45 - 61 μ M, 유기수은에서 30 - 60 μ M, 카드뮴에서 37 - 62 μ M의 범위로 관찰되었다. ATP 생성량은 무기수은에서 9 - 19 μ M, 유기수은에서는 7 - 19 μ M, 카드뮴에

서는 7 - 19 μ M 범위였다(Table 1).

세포생존율, NO_2^- 및 ATP 생성량은 무기수은과 유기수은은 4 μ M, 카드뮴은 40 μ M 이상의 농도에서 각각의 대조군에 비해 현저히 저하되었고($p < 0.05$), 첨가한 중금속 화합물의 농도 증가에 따라 용량의존적으로 감소하는 경향을 나타냈다(Table 1).

2. GSH, OTC, BSO 첨가시 세포생존율, NO_2^- 및 ATP 생성량

GSH, OTC, BSO를 단독 첨가한 실험 조건에서의 세포생존율, NO_2^- 및 ATP의 생성량은 첨가농도와 무관하게 대조군과 같은 수준으로 나타났다(Table 2).

3. 수은화합물 및 카드뮴과 GSH 동시 첨가시 세포생존율, NO_2^- 및 ATP 생성량

각각의 여러 농도로 첨가한 수은화합물에 대해 100배 농도의 GSH를 첨가한 경우, 세포생존율은 90% 이상으로 대조군과 비슷한 수준으로 유지되었으며, NO_2^- 및 ATP의 생성량은 역시 GSH의 동시 첨가에 의해 대조군의 수준으로 관

찰되었다(Table 3). 카드뮴과 10배의 GSH를 동시에 첨가한 군에서 역시 세포생존율은 90% 이상으로 유지되었고, NO_2^- 및 ATP의 생성량은 대조군과 유사한 수준으로 관찰되었다(Table 3).

16 μ M의 무기 및 유기수은과 160 μ M의 카드뮴을 첨가한 실험조건에 GSH를 0.1 - 1.6 mM의 조건으로 동시 첨가했을 경우, EMT-6 세포의 세포생존율, NO_2^- 및 ATP 생성량은 GSH의 농도에 따라 용량의존적으로 증가하였다(Fig. 1).

4. GSH, OTC, BSO 전처리에 의한 NO_2^- 와 ATP 생성능의 변화

EMT-6세포에 GSH, OTC, BSO를 각각 50 μ M과 100 μ M농도로 24시간 전처리한 후 2 μ M 농도의 유기수은과 20 μ M 농도의 카드뮴이 포함된 새로운 배양액으로 교환하여 다시 36시간을 배양했을 때의 NO_2^- 및 ATP 생성량은 GSH 전처리는 첨가한 농도에 관계없이 대조군과 같은 양상을 보였다(Figure 2, 3). OTC의 전처리는 대조군과 비교하여 용량의존적으로 NO_2^- 및 ATP 생성량이 증가하였으나($p < 0.05$, Fig. 2, 3), BSO의 전처리는

Table 1. The viability, NO_2^- , and ATP syntheses of EMT-6 cell cultured with HgCl_2 , CH_3HgCl , and CdCl_2 for 48 hours

| | Dose (μ M) | Viability(%) | NO_2^- (μ M) | ATP(μ M) |
|--------------------------|-----------------|-------------------|----------------------------|-------------------|
| HgCl_2 | 0 | 96.16 \pm 1.41 | 61.43 \pm 1.88 | 19.10 \pm 0.24 |
| | 1 | 96.35 \pm 2.45 | 58.64 \pm 1.18 | 19.21 \pm 1.21 |
| | 2 | 95.17 \pm 1.73 | 56.56 \pm 1.25 | 17.53 \pm 1.04 |
| | 4 | 85.31 \pm 2.35* | 52.08 \pm 1.79* | 13.93 \pm 1.71* |
| | 8 | 71.79 \pm 2.38* | 48.13 \pm 2.17* | 10.17 \pm 0.58* |
| | 16 | 50.13 \pm 1.94* | 45.70 \pm 2.03* | 9.71 \pm 1.51* |
| CH_3HgCl | 0 | 96.38 \pm 1.81 | 60.59 \pm 1.73 | 19.38 \pm 1.31 |
| | 1 | 96.27 \pm 3.45 | 58.87 \pm 1.44 | 18.52 \pm 2.64 |
| | 2 | 94.68 \pm 1.72 | 53.15 \pm 1.03* | 14.63 \pm 1.21* |
| | 4 | 87.26 \pm 1.79* | 46.87 \pm 2.18* | 12.01 \pm 1.41* |
| | 8 | 58.35 \pm 2.21* | 33.42 \pm 1.15* | 9.17 \pm 0.50* |
| | 16 | 43.46 \pm 1.79* | 30.13 \pm 2.47* | 7.98 \pm 1.27* |
| CdCl_2 | 0 | 97.38 \pm 1.81 | 62.01 \pm 1.33 | 19.27 \pm 1.71 |
| | 10 | 94.76 \pm 2.45 | 60.38 \pm 1.74 | 19.02 \pm 1.57 |
| | 20 | 92.08 \pm 1.72 | 55.88 \pm 1.03* | 16.06 \pm 1.61* |
| | 40 | 80.28 \pm 1.79* | 50.46 \pm 2.18* | 13.12 \pm 1.68* |
| | 80 | 68.31 \pm 2.21* | 45.14 \pm 1.15* | 9.66 \pm 1.81* |
| | 160 | 50.26 \pm 1.79* | 37.13 \pm 2.47* | 7.86 \pm 1.92* |

Each value represents mean \pm S.D.

Dose : Concentrations of HgCl_2 , CH_3HgCl , and CdCl_2 added in culture.

* Significantly different from the corresponding control(0 μ M group) value at $p < 0.05$ by Scheffe's test.

Table 2. The viability, NO₂⁻, and ATP syntheses of EMT-6 cell cultured with GSH, OTC, and BSO for 48 hours

| | Dose | Viability(%) | NO ₂ ⁻ (μ M) | ATP(μ M) |
|-----|-------------|------------------|---|------------------|
| GSH | 0 mM | 98.71 \pm 0.51 | 60.07 \pm 0.57 | 19.80 \pm 1.13 |
| | 0.1 mM | 97.31 \pm 1.54 | 60.64 \pm 0.26 | 19.23 \pm 1.02 |
| | 0.2 mM | 97.86 \pm 2.70 | 60.46 \pm 1.53 | 19.77 \pm 1.41 |
| | 0.4 mM | 96.58 \pm 1.97 | 62.21 \pm 1.79 | 18.96 \pm 1.29 |
| | 0.8 mM | 97.45 \pm 1.55 | 60.64 \pm 2.16 | 19.72 \pm 0.95 |
| | 1.6 mM | 98.27 \pm 1.94 | 61.08 \pm 2.67 | 19.25 \pm 1.33 |
| OTC | 0 μ M | 96.71 \pm 2.15 | 59.87 \pm 1.16 | 19.23 \pm 2.31 |
| | 10 μ M | 97.31 \pm 0.68 | 59.69 \pm 1.51 | 18.97 \pm 2.61 |
| | 20 μ M | 96.86 \pm 1.89 | 57.29 \pm 2.03 | 18.56 \pm 1.22 |
| | 40 μ M | 96.58 \pm 2.34 | 59.26 \pm 2.19 | 18.06 \pm 1.69 |
| | 80 μ M | 96.45 \pm 0.36 | 58.42 \pm 1.39 | 18.52 \pm 2.06 |
| | 160 μ M | 95.27 \pm 1.30 | 58.49 \pm 2.94 | 18.34 \pm 0.59 |
| BSO | 0 μ M | 97.62 \pm 1.25 | 58.67 \pm 2.45 | 19.56 \pm 1.59 |
| | 10 μ M | 98.26 \pm 2.46 | 58.76 \pm 1.62 | 19.11 \pm 0.59 |
| | 20 μ M | 98.02 \pm 1.84 | 57.84 \pm 1.32 | 18.94 \pm 2.31 |
| | 40 μ M | 97.69 \pm 1.62 | 56.23 \pm 2.00 | 17.56 \pm 2.92 |
| | 80 μ M | 96.95 \pm 2.56 | 56.31 \pm 1.83 | 18.64 \pm 1.84 |
| | 160 μ M | 96.37 \pm 0.96 | 57.42 \pm 1.94 | 18.45 \pm 2.36 |

Each value represents mean \pm S.D.
Dose : Concentrations of GSH, OTC, and BSO added in culture.

Table 3. The viability, NO₂⁻, and ATP syntheses of EMT-6 cell cultured with various concentrations of mercurials, cadmium and GSH

| Experiment | Viability(%) | NO ₂ ⁻ (μ M) | ATP (μ M) |
|---|------------------|---|------------------|
| No additives ^a | 97.81 \pm 2.71 | 60.33 \pm 1.44 | 19.05 \pm 1.08 |
| HgCl ₂ (1 μ M) + GSH(0.1mM) | 97.69 \pm 1.03 | 60.02 \pm 1.93 | 18.56 \pm 1.43 |
| HgCl ₂ (2 μ M) + GSH(0.2mM) | 96.89 \pm 3.50 | 59.73 \pm 3.05 | 17.99 \pm 0.43 |
| HgCl ₂ (4 μ M) + GSH(0.4mM) | 96.17 \pm 2.91 | 60.02 \pm 3.11 | 18.16 \pm 0.37 |
| HgCl ₂ (8 μ M) + GSH(0.8mM) | 95.98 \pm 1.41 | 59.69 \pm 2.46 | 18.52 \pm 1.18 |
| HgCl ₂ (16 μ M) + GSH(1.6mM) | 94.68 \pm 3.17 | 59.58 \pm 2.47 | 17.84 \pm 0.23 |
| CH ₃ HgCl(1 μ M) + GSH(0.1mM) | 97.02 \pm 3.45 | 60.08 \pm 2.06 | 19.16 \pm 0.96 |
| CH ₃ HgCl(2 μ M) + GSH(0.2mM) | 96.31 \pm 1.72 | 60.19 \pm 3.71 | 18.96 \pm 0.57 |
| CH ₃ HgCl(4 μ M) + GSH(0.4mM) | 96.26 \pm 1.79 | 59.06 \pm 1.85 | 18.56 \pm 1.47 |
| CH ₃ HgCl(8 μ M) + GSH(0.8mM) | 93.30 \pm 2.21 | 57.96 \pm 1.03 | 17.68 \pm 1.25 |
| CH ₃ HgCl(16 μ M) + GSH(1.6mM) | 92.81 \pm 1.79 | 56.82 \pm 3.12 | 17.15 \pm 1.19 |
| CdCl ₂ (10 μ M) + GSH(0.1 mM) | 95.14 \pm 2.72 | 59.34 \pm 2.16 | 18.93 \pm 1.17 |
| CdCl ₂ (20 μ M) + GSH(0.2 mM) | 95.70 \pm 2.34 | 59.15 \pm 2.74 | 18.86 \pm 1.56 |
| CdCl ₂ (30 μ M) + GSH(0.4 mM) | 94.19 \pm 2.68 | 57.37 \pm 2.16 | 18.11 \pm 1.66 |
| CdCl ₂ (40 μ M) + GSH(0.8 mM) | 93.18 \pm 3.27 | 57.16 \pm 2.31 | 17.76 \pm 1.35 |
| CdCl ₂ (50 μ M) + GSH(1.6 mM) | 91.34 \pm 2.74 | 56.31 \pm 2.15 | 17.19 \pm 1.45 |

Each value represents mean \pm S.D.
A : 'No additives' means that neither mercurials nor GSH was added.

NO₂⁻ 및 ATP 생성량이 용량의존적으로 감소하였다(p<0.05, Fig. 2, 3).

고 찰

수은의 독성기전에 대해서는 많은 논란이 제기되고 있지만, 세포화학적 측면에서 다음과 같이 두 가지 관점으로 요약

될 수 있다(Goyer 등, 1991). 첫번째는 세포막에서 나타나는 수은의 세포독성으로 세포막을 구성하는 단백질 중 수은과 친화력이 높은 sulfhydryl(-SH)기를 포함하고 있는 단백질과 결합하므로써 독성을 나타낸다는 것인데, 막단백질의 -SH기는 세포막투과성 및 물질수송에 필수적이기 때문에 이와 관련된 세포독성을 일으킨

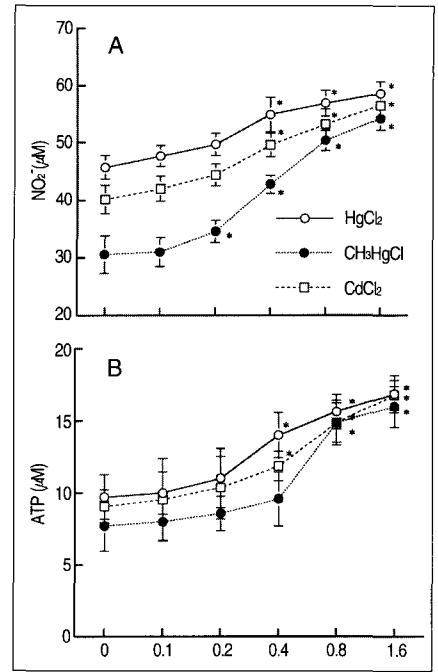


Fig. 1. Effects of HgCl₂(16 μ M), CH₃HgCl(16 μ M), CdCl₂(160 μ M) and GSH on the production of NO₂⁻ (A) and ATP(B) in EMT-6 cells which were cultured for 48 hours. Values are expressed as mean \pm S.D. *Significantly different from the corresponding control value at p<0.05 by Scheffe's test.

다는 것이고(Stacey 등, 1980), 두번째는 세포안에서 나타나는 세포독성으로 수은이 세포내로 유입된 후에 세포내 대사과정에 참여하는 여러 효소들의 활성을 억제하므로써 독성을 일으킨다는 것이다(Dieter 등, 1983; Goyer 등, 1991). 이러한 수은의 세포독성에 대한 세포 보호작용과 세포내 축적은 생체내에서 합성되는 thiol인 GSH와 metallothionein(MT)에 의해 조절되고(Tanaka 등, 1990; Shimada 등, 1993; Kim 등, 1995), 간, 신장 및 뇌와 같은 표적기관으로 유입된 수은은 조직내에서 GSH, MT의 합성을 유도하여 수은의 독성으로부터 표적기관을 보호하는 것으로 알려져 있다(Li 등, 1996a; 1996b). 수은의 세포내 유입기전은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않고 있지만, γ -glutamyl transpeptidase(GGT)에 관련된 기전(Zalups 등, 1994; Zalups, 1995)과 organic anion transport system의 기전에 의해 일어난다고 보고되고 있다(Wu, 1995a; 1995b). GGT는 GSH를

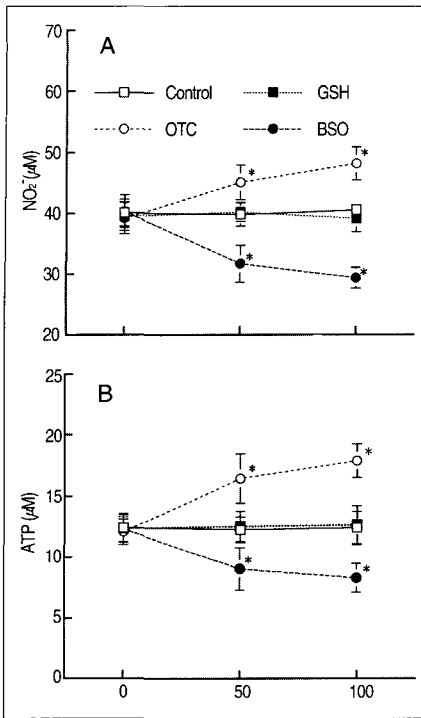


Fig. 2. Productions of NO₂⁻(A) and ATP(B) in EMT-6 cells cultured with 2μM CH₃HgCl after 24 hour-pretreatment of GSH, BSO, or OTC. Values are expressed mean ± S.D. *Significantly different from the corresponding value of the control at p<0.05 by Scheffe's test.

가수분해하는 효소로 세포막에 위치하여 GSH를 분해하고 분해된 아미노산을 세포안으로 이동시켜주는 역할을 하는데, 분해된 cystein을 세포안으로 이동시킬 때 결합된 수은을 세포안으로 유입시키는 것으로 알려져 있다(Meister 등, 1983; Zalups 등, 1994). 실제적으로 GGT의 활성을 인위적으로 저해하게 되면 조직의 세포내 수은축적이 감소하는 것으로 보고되어 있다(Shimada 등, 1993; Kim 등, 1995).

그간의 연구에서 생체내의 수은독성에 대한 GSH의 방어기능은 많은 연구자의 관심을 끌어 왔다. GSH 합성에 관련된 효소들의 저해제나 GSH의 농도를 감소시키는 diethylmaleate(DEM) 등을 처리하여 실험동물의 조직내 GSH 농도를 인위적으로 저하시켜 수은의 독성에 대한 GSH의 방어효과를 보고하였으며(Naganuma 등, 1990; Gregus 등, 1985; Guillermina 등, 1989; Kim 등, 1995), 배

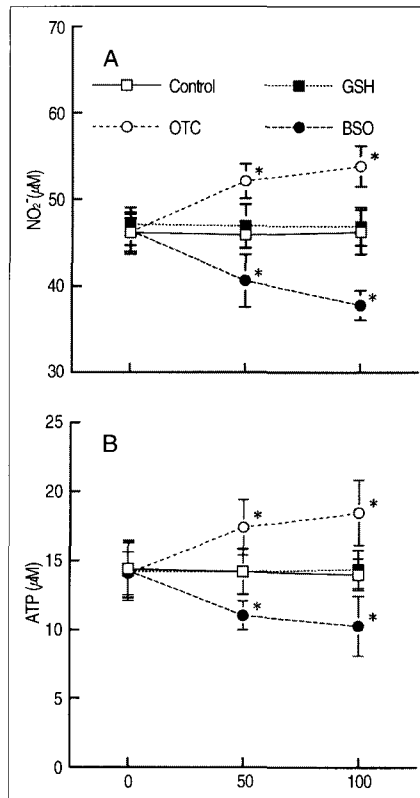


Fig. 3. Productions of NO₂⁻(A) and ATP(B) in EMT-6 cells cultured with 20μM CdCl₂ after 24 hour-pretreatment of GSH, BSO, or OTC. Values are expressed mean ± S.D. *Significantly different from the corresponding value of the control at p<0.05 by Scheffe's test.

양세포를 이용하여 GSH가 세포내 수은의 유입 및 축적을 감소시키는 것으로 확인하였다(Albrecht 등, 1993; Aschner 등, 1994; Mullaney 등, 1994; Endo 등, 1995). 또한 면역세포의 1차 세포배양을 통하여 GSH가 수은에 의해 유발하는 자가면역질환과 면역세포의 비정상적인 증식을 억제, 면역세포에서 수은의 세포독성에 대한 방어효과를 가지고 있음을 보고하고 있다(Hu 등, 1997). 그러나 실험동물을 이용한 지금까지의 연구들은 수은의 세포독성에 대한 생체내에서의 다른 방어인자들에 의한 영향을 배제하지 못하고 있으며, 배양세포를 이용한 연구들은 수은의 세포내 유입과 축적에 관한 연구로 한정되어 있어 세포내에서 독성 기전과 관련된 GSH의 방어작용을 설명하기에는 미비하다. 따라서 수은독성에 대한 GSH의 정확한 방어기전을 설명하

기 위해서는 여러 인자들의 영향을 통제 한 상태의 실험이 요구된다.

본 연구에서 수은화합물과 카드뮴의 단독첨가로 NO₂⁻, ATP 생성능이 용량의 존적으로 급격히 저하되는 것은 L-arginine으로부터 NO가 생성되는 과정, 즉 L-arginine-NO pathway가 반응에너지로서 ATP를 필히 요구하므로(Hibbs 등, 1987b), Stace 등 (1980) 및 Goyer (1991) 등이 지적한 바와 같이 수은이 에너지 대사에 관여하는 특정 효소의 활성을 억제하므로써 나타나는 현상으로 사료된다. 따라서 수은에 의한 세포성 면역의 장애는 일차적으로 세포내 대사과정의 이상이 초래되어 세포분열 또는 NO의 생성에 필요한 에너지의 공급이 억제되고(오경재 등, 1996; 김공호 등, 1996; 염정호, 1997) 그 결과가 탐식능의 감소(Castranova 등, 1980; Nakatsuru 등, 1985; Ilback, 1991)로써 나타난 것으로 보인다.

수은과 카드뮴에 의해 감소했던 EMT-6 세포의 생존율과 NO₂⁻, ATP 생성능이 GSH를 동시 첨가하므로써 모두 대조군과 같은 수준으로 일정하게 유지되는 것으로 보아, GSH가 수은화합물과 카드뮴의 면역독성에 대해 역시 방어작용을 발휘할 것으로 사료된다. 이는 GSH가 중금속의 독성에 대한 방어효과를 보고한 Meister(1983), Guillermina 등(1989) 및 Naganuma 등(1990)의 연구와 유사한 결과이다. 16 μM의 무기수은 또는 유기수은과 여러 농도의 GSH를 동시에 첨가한 경우, 세포생존율, NO₂⁻ 및 ATP 생성량은 첨가된 GSH 농도에 따라 현저히 증가하였다. 이 결과는 Bandyopadhyay 등 (1997)의 연구에서 중금속에 의한 일부 효소기능의 저하가 첨가한 GSH의 농도와 비례하여 회복되는 결과와 일치하며, 수은독성에 대한 GSH의 방어능력은 용량존적임을 보여주고 있다.

GSH의 전처리하는 이들이 세포막을 통과하지 못하기 때문에 대조군과 비슷한 양상으로 나타난 반면에 BSO를 전처리한 군에서는 세포내 GSH 농도의 감소로 인하여 수은의 세포독성이 증가하고, 대

조균에 비하여 NO_2^- 와 ATP 생성량이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 수은의 세포독성이 세포내 GSH와 밀접한 관련이 있음을 보고한 Naganuma 등(1990)의 연구결과와 일치하며, 수은의 세포독성에 대한 GSH의 방어기능은 세포외부 뿐 아니라 세포내부에서도 나타나고, 세포내로 유입된 수은에 대한 방어기전에 세포내 GSH 농도가 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 세포내 GSH의 농도를 증가시키는 OTC를 전처리한 결과 수은의 독성에 대한 방어효과가 시간 및 용량의존적으로 현저하게 증가하였다. 이러한 실험결과는 수은의 세포독성에 대한 GSH의 방어효과가 GSH 세포내 농도와 밀접한 관련이 있음을 간접적으로 보여주고 있다.

이상에서 수은과 카드뮴에 대한 GSH의 방어기능은 생체내에서와 마찬가지로 배양세포인 EMT-6 세포에서도 동일하게 적용된다는 것을 알 수 있으며, 방어기전 또한 그간의 여러 연구에서 제시하였던 생체내로 유입된 중금속과 GSH의 결합(Tanaka, 1990; Bandyopadhyay, 1997)을 통해 방어기전이 이루어질 수 있다는 개연성을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구는 EMT-6 세포를 이용하여 무기수은, 유기수은 및 카드뮴의 세포독성에 대한 glutathione(GSH)의 방어효과를 알아보려고 하였다. 무기수은, 유기수은 및 카드뮴을 첨가한 배양조건에서 EMT-6 세포의 세포생존율, NO_2^- 및 ATP 생성량은 첨가한 중금속의 농도가 증가할수록 용량의존적으로 감소하였다. GSH, OTC 및 BSO를 단독 첨가한 배양조건은 세포의 세포생존율과 NO_2^- 및 ATP 생성량에 영향을 주지 않았다. 수은화합물 및 카드뮴과 GSH를 동시 첨가한 배양조건에서는 세포생존율이 90% 이상 유지되었고, NO_2^- 및 ATP 생성량은 기본배양조건과 비슷한 수준으로 나타났다. 16 μM 의 무기 및 유기수은과 160 μM 의 카드뮴을 첨가한 실험조건에 GSH를 동시 첨가

했을 경우 방어효과는 GSH의 농도에 따라 용량의존적으로 증가하였다. 세포내에서 수은 및 카드뮴의 세포독성에 대한 GSH역할을 알아보려고 GSH, OTC, BSO 전처리 실험을 한 결과, GSH의 전처리는 이들이 세포막을 통과하지 못하기 때문에 대조군과 비슷한 양상으로 나타난 반면에 BSO를 전처리한 군에서는 세포내 GSH 농도의 감소로 수은의 세포독성이 증가하여 대조군에 비하여 NO_2^- 와 ATP 생성량이 현저히 감소하였다. 또한 세포내 GSH의 농도를 증가시키는 OTC를 전처리한 결과 수은의 독성에 대한 방어효과가 시간 및 용량의존적으로 현저하게 증가하였다. 이러한 실험결과는 수은의 세포독성에 대한 GSH의 방어효과가 GSH 세포내 농도와 밀접한 관련이 있음을 간접적으로 보여주고 있다. 본 연구의 결과는 수은 및 카드뮴의 독성에 대한 GSH의 방어작용이 단순히 -SH기와 중금속의 결합에 의한 결과가 아니라 세포내에서 GSH 분자가 갖는 고유의 기능으로 판단되며, 특히 중금속에 의한 에너지대사의 장애를 GSH가 회복시킬 수 있음을 보여준다.

참고문헌

김공호, 소병을, 고대하. RAW264.7 세포주를 이용한 수은화합물의 세포독성기전에 관한 고찰. 대한산업의학회지 1996;8(3):560-569.
 염정호. 수은화합물에 의한 EMT-6 세포의 nitric oxide 생성과 관련된 요인에 관한 연구. 대한산업의학회지 1997;9(1):122-130.
 오정재, 고대하, 염정호. 수은에 의한 EMT-6 세포의 NO_2^- 및 ATP 생성. 예방의학회지 1996;29(3):495-505.
 Albrecht J, Talbot M, Kimelberg HK, Aschner M The role of sulfhydryl groups and calcium in the mercuric chloride-induced inhibition of glutamate uptake in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res* 1993;607:249-254.
 Aschner M, Mullaney KJ, Wagoner D, Lash LH, Kimelberg HK Intracellular glutathione(GSH) levels modulate mercuric chloride(MC)- and methylmercuric chloride(MeHgCl)-induced amino acid release from neonatal rat primary astrocytes cultures. *Brain Res* 1994;664: 133-140.
 Bartholomew B. A rapid method for the

assay of nitrate in urine using the nitrate reductase enzyme of Escherichia coli. *Food Chem Toxicol* 1984;22:541-549.
 Bandyopadhyay D, Chatterjee AK, Datta AG. Effect of cadmium, mercury and copper on partially purified hepatic flavokinase of rat. *Molec Cell Biochem* 1997; 167:73-80.
 Castranova V, Bowman L, Miles PR, Reasor MJ. Toxicity of metal ions to alveolar macrophages. *Am J Indust Med* 1980;1: 349-357.
 Dieter MP, Luster MI, Boorman GA, Jameson CT, Dean JH, Cox JW. Immunological and biochemical response in mice treated with mercury chloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983;68:218-228.
 Endo T, Sakata M. Effects of sulfhydryl compounds on the accumulation, removal and cytotoxicity of inorganic mercury by primary cultures of rat renal cortical epithelial cells. *Pharmacol Toxicol* 1995; 76:190-195.
 Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB Jr. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine Leishmaniasis. *J Immunol* 1993;151:907-915.
 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 1991;646-651.
 Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-arginine- dependent killing mechanism. *J Immunol* 1990;144:278-283.
 Gregus Z, Varga F. Role of glutathione and hepatic glutathione S-transferase in the biliary excretion of methyl mercury, cadmium and zinc: A study with enzyme Inducers and glutathione depletors. *Acta pharmacol et toxicol* 1985;56:398-403.
 Guillermina G, Adriana TM, Monica EM. The implication of renal glutathione levels mercury chloride nephrotoxicity. *Toxicology* 1989;58:187-195.
 Halliwell B, Gutteridge JMC. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Molec Aspects Med* 1985;8:89-193.
 Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 1987a; 138:550-565.
 Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR.

- Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987b;235:473-476.
- Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR, Rachlin EM. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:87-94.
- Hu H, Moller G, Abedi-Valugerdi M. Thiol compounds inhibit mercury-induced immunological and immunopathological alteration in susceptible mice. 1997;107:68-75.
- Ilback NG. Effects of methyl mercury exposure on spleen and blood natural killer(NK) cell activity in the mouse. *Toxicol* 1991;67:117-124.
- Kim CY, Watanabe C, Kasanuma Y, Satoh H. Inhibition of γ -glutamyl transpeptidase decreases renal deposition of mercury after mercury vapor exposure. *Arch Toxicol* 1995;69:722-724.
- Li S, Thompson SA, Kavanagh TJ, Woods JS. Localization of gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA expression in mouse brain following methylmercury treatment using reverse transcription in situ PCR amplification. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996a;140:180-187.
- Li S, Thompson SA, Kavanagh TJ, Woods JS. Localization by in situ hybridization of gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA expression in rat kidney following acute methylmercury treatment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996b;141(1): 59-67.
- Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 1983; 220: 472-477.
- Mullaney KJ, Fehm MN, Vitarella D, Wagoner DE, Aschner M. The role of -SH groups in methylmercuric chloride-induced D-aspartate and rubidium release from rat primary astrocyte cultures. *Brain Res* 1994;641:1-9.
- Naganuma A, Anderson ME, Meister A. Cellular glutathione as a determinant of sensitivity to mercury chloride toxicity. *Biochem Pharmacol* 40:693-697.
- Nakatsuru S, Oohashi J, Nozaki H, Nakada S, Imura N. Effect of mercurials on lymphocyte function in vitro. *Toxicol* 1985; 36:297-305.
- Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion Immunol* 1991; 3:65-70.
- Phillips HJ. Dye exclusion tests for cell viability. In Kruse PR, Patterson MK (Eds.), *Tissue Culture Method and Application*. Academic Press, New York. 1973, pp.406-408
- Shimada H, Fukudome S, Kiyuzumi M, Funakoshi T, Adachi T, Yasudake A, Kojima S. Further study of effects of chelating agents on excretion of inorganic mercury in rats. *Toxicol* 1993;77:157-169.
- Singhal RH, Anderson ME, Meister A. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J* 1987;1:220-223.
- Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Scientific Am* 1992;May:68-77.
- Stacey NH, Klaassen CD. Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *J Toxicol Environ Health* 1980; 7:139-147.
- Tanaka T, Naganuma A, Imura N. Role of gamma-glutamyl-transpeptidase in renal uptake and toxicity in inorganic mercury in mice. *Toxicology* 1990;60:187-198.
- Wu G. Discrimination of transport systems for methylmercury uptake in rat erythrocytes using methylmercury-mercaptalbumin by inhibitors and other factors. *Pharmacol Res* 1995a;32(4):223-2.
- Wu G. Screening of potential transport systems for methyl mercury uptake in rat erythrocytes at 5° by use of inhibitors and substrate. *Pharmacol Toxicol* 1995b;77: 169-176.
- Zalups RK, Lash LH. Advances on understanding the renal transport and toxicity. *J Toxicol Environ Health* 1994;42:1-44.
- Zalups RK. Organic anion transport and action of γ -glutamyl trans-peptidase in kidney linked mechanistically to renal tubular uptake of inorganic mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 132:289-298.