메틸수은으로 손상된 배양 심근세포에 대한 冬瓜子의 영향

하대호[1*] · 양현웅[1,3] · 이강창[2]

1:원광대학교 의과대학, 2:원광대학교 한의학 전문대학원, 3:원광의과학연구소

Effect of Benincasae Semen on Methylmercury-Induced Myotoxicity in Cultured Myocardial Cells

Dae Ho Ha[1*], Hyun Woong Yang[1,3], Kang Chang Lee[2]

1:School of Medicine, 2:Professional Graduate School of Oriental Medicine, 3:Institute of Wonkwang Medical Science, Wonkwang University

To clerify the toxic effect of methylmercuric chloride(MMC) in cultured mouse myocardial cells, cytotoxic effect was measured by MTT assay after cultured myocardial cells were incubated for 48 hours in the media containing 1~30 uM concentrations of MMC. And also, the protective effect of Benincasae Semen (BS) was assessed in these cultrures. Cell viability was significantly decreased in a dose-dependent manner after cultured myocardial cells were exposed to 30 uM MMC for 48 hours. In the neuroprotective effect of BS on MMC-induced cytotoxicity, BS blocked the MMC-induced myotoxicity in these cultures. From these results, it suggests that MMC is toxic on cultured mouse myocardial cells and BS is effective in blocking the neurotoxicity induced by MMC.

Key words : Cultured myocardial cell, Benincasae Semen, Methylmercuric chloride

서 론

수은을 비롯한 납이나 크롬등은 독성이 강하기 때문에 일단 체내에 축적이 되어지면 배출이 어렵고 체내에 계속 축적됨으로서 각종 부작용이나 후유증을 초래하게 된다[1,2]. 특히, 메틸수은과 같은 유기수은은 무기수은에 비하여 분해가 잘 안될 뿐만 아니라 체외로의 배출이 어렵기 때문에 심각한 후유증을 일으키며 나아가서 생명을 위협하게 된다[1,3]. 따라서 국내외 많은 학자들은 수은을 비롯한 맹독성의 중금속에 대한 세포독성에 대한 기전규명을 위하여 많은 연구를 진행하여 왔다[4,5]. 수은은 은백색을 띠고 있으며 중금속과 달리 상온에서 액체상태로 존재하기 때문에 피부접촉시 침투위험이 따르고 동시에 상온에서 소량이 증발됨으로서 이를 흡입할 경우 호흡기계는 물론 인체내의 여러 장기에 손상을 주어 수은중독을 유발함은 잘 알려진 사실이다[3]. 한편, 수은은 온도계를 제조하는 원료로 사용되어질 뿐만 아니라 건전지 제조나 도금등과 같은 각종 공정과정에 널리 사용되어지고 있다[1,3]. 특히, 이들의 제조과정중 폐수에 섞여 하천에 흘러 유입될 경우 수질오염은 물론 먹이연쇄를 통하여 인체에 유입됨으로서 심각한 중독현상을 초래하기도 한다[1,6]. 실제로 1960년대에 일본의 수후만에 대량의 수은이 유입됨으로서 많은 인구가 수은중독으로 인하여 뇌질환이나 간질환은 물론 다양한 병변에 이완된 경우가 대표적인 예이다[3]. 지금까지 알려진 수은중독에 의한 증상을 보면 근육진전을 비롯하여 정신증상 및 구내염등과 같은 병변의 소견을 나타낼 뿐만 아니라 특히 임신쥐에서 태아의 기형을 비롯하여 신장 및 비뇨기계통이나 신경계통에 다양한 이상을 초래한 다고 보고되고 있다[1,7]. 특히 수은중독은 사람에게 있어 기형유발물질로 되어 있어 임신시 제대를 통하여 배자나 태아에 유입될 경우 안면기형을 비롯한 정신발육부전과 같은 여러 선천성 기형을 유발하기 때문에 이의 취급이나 보관시 각별한 조심을 요하여야 한다[3,8]. 최근 유기수은의 하나인 메틸수은은 이의 붕괴시 산소라디칼을 생성한다는 보고가 되면서 수은중독을 산화적 손상측면에서 규명할려는 연구가 시도되어 왔다[1,,9]. 수은의 붕괴과정중 생성된 산소라디칼은 산화적 손상을 통하여 세포의 DNA 합성을 비롯하여 지질과산화반응, 세포내 이차전달자 및 사이토카인 (cytokine)의 분비에 영향을 미침으로서 그 결과 세포의 퇴화나 사멸을 유발시킨 다고 알려져 있다[4,10]. 특히

* 교신저자 : 하대호, 경기도 군포시 산본동 1126-1 원광대학교 부속 한방병원
· E-mail : hdh@wonkwang.ac.kr · Tel : 031-390-2555
· 접수 : 2003/07/10 · 수정 : 2003/08/18 · 채택 : 2003/09/30

산소라디칼은 protein kinase C(PKC)와 같은 신호전달체계에 영향을 줄뿐만 아니라[5,8], 항산화계에도 손상을 주어 세포의 고사나 이에 따른 병변의 촉진을 가속화시킨다고 한다[11,12]. 최근에는 산소라칼은 흥분성아미노산의 분비를 유도한다는 연구보고가 이루어지면서 활성산소의 산화적 손상이 수은의 중독과도 밀접한 관련이 있음이 밝혀지고 있다[1,13]. 최근에 한약추출물들의 성분중 항산화효과를 비롯하여 노인성치매나 파킨슨씨병과 같은 난치성 질환에 효과적인 약리활성을 나타낸다는 보고들이 되고 있다[14]. 한약추출물중 동과자 (Benincasae Semen, BS)는 백과식물에 속하는 일년생 덩굴성식물로서 맛은 달고 성은 양 (凉)하다. 이수의 효능이 있고 폐농양이나 충수염의 치료에 널리 사용되고 있으며[14] 그 밖에도 거담작용이 있으나 항산화작용에 대해서는 잘 알려져 있지 않다[15]. 근래에 세포배양기술의 보급으로 인하여 심근세포를 비롯한 각종 세포의 배양이 가능하게 되었다[11,16]. 특히, 심근세포는 다른 세포들과는 달리 박동을 할 수 있기 때문에 각종 화학약제나 활성물질의 효능을 검정하는데 적합한 재료로 선택되고 있다[13]. 더욱이 심근세포는 심혈관계와 연관이 되어 있어 혈압을 비롯한 죽상경화증이나 심근경색 과 같은 심질환과 직접적인 관련이 있다[11,13]. 그러나 아직까지 심근세포와 심질환간에 대한 발병기전이나 효과적인 치료적 방법에 대한 개발이 미흡한 상태에 있다[13,17]. 본 연구는 MMC의 심근독성에 대한 기전을 규명하기 위하여 생쥐의 심근세포를 배양한 후 MMC의 세포독성을 분석하였으며 또한 MMC에 의하여 유발되는 심근독성에 대한 BS의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용한 동물은 원광대학교 의과대학 동물사육실에서 순수분리 사육중인 건강 상태가 양호한 생후 3 일된 ICR 계통의 생쥐를 사용하였다.

2) 약제 제조

본 실험에 사용한 methylmercuric chloride(MMC, Sigma)는 각각 1M, 100mM, 10mM, 1mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

생쥐의 심장조직으로 부터 심근세포의 분리는 Park 등[11]의 방법에 따라 효소해리술에 의하여 시행하였다. 분리된 심근세포는 혈구계산기를 이용하여 배양액에 1 x 10^5cells/well의 밀도로 96-multiwell에 넣어 분주하였다. 분주가 완료된 세포는 CO_2 정온기에서 3 일 동안 배양한 후 실험에 사용하였으며, MMC가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로하여 실험군과 비교 조사하였다.

2) MMC 처리

MMC가 배양 심근세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1 uM에서 50 uM 까지의 농도로 MMC가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 48 시간 동안 배양한 후 이의 독성효과를 조사하였다.

3) 한약추출물의 처리

일정시간 배양한 심근세포에 30 uM MMC를 처리하기 2 시간 전에 각각 40~160 μg/ml 농도의 Benincasae Semen(BS)가 포함된 배양액에서 배양한 다음 이들이 MMC의 독성에 미치는 영향을 조사하였다.

4) 세포생존율 조사

배양 심근세포에 여러 농도의 MMC나 BS를 처리한 후 MMC가 심근세포에 미치는 독성효과와 또한 MMC의 독성에 대한 BS의 영향을 MTT분석법에 의하여 조사하였다.

5) 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다. 통계적 유의수준은 p값이 0.05미만인 경우로 하였다.

실험성적

1. MMC의 세포독성

1) 농도에 따른 영향

생쥐의 배양 심근세포에 MMC가 1~50 uM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 48 시간 동안 배양한 후 MMC의 독성효과를 MTT 분석법에 의하여 조사한 결과 1 uM MMC의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 83%로 나타났으며 10 uM의 처리에서는 71%로 나타났다. 또한 30 uM과 50 uM MMC의 처리에서는 세포의 생존율이 각각 49%($p<0.05$)와 21%($p<0.01$)로 나타났으며 30 uM에서 MTT50 값을 나타냈다(Fig. 1).

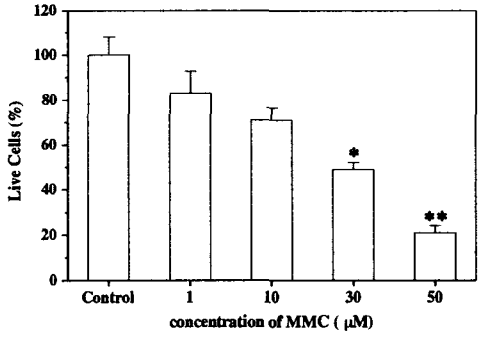

Fig. 1. A dose-dependency of methylmercuric chloride(MMC). MMC-induced cardiotoxicity was measured by MTT assay in mouse myocardiual cell cultures. Cultured cells were exposed to 1, 10, 30 and 50 uM MMC for 48 hours, respectively. The results indicate the mean±SD(n=6). *p(0.05;**p(0.01

2) 시간에 따른 영향

생쥐의 배양 심근세포에 MMC가 30 uM의 농도로 포함된 배양액에서 12~60 시간 동안 배양한 후 MMC의 독성효과를 MTT 분석법에 의하여 조사한 결과 12 시간 MMC의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 79%로 나타났으며 24 시간의 처리에서는 67%로 나타났다. 또한 48 시간과 60 시간의 MMC

처리에서는 세포의 생존율이 각각 50%($p<0.05$)와 43%($p<0.01$)로 나타났다(Fig. 2).

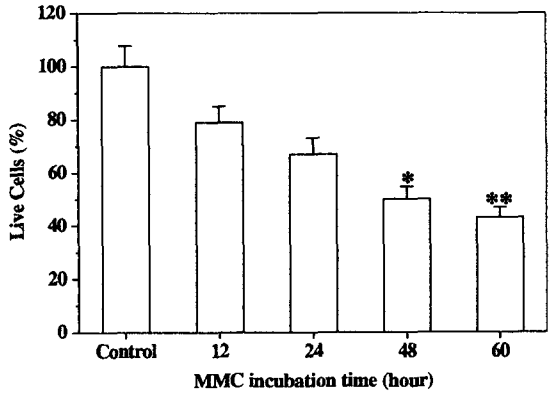

Fig. 2. A time-dependency of methylmercuric chloride(MMC). MMC-induced cardiotoxicity was measured by MTT assay in mouse myocardiual cell cultures. Cultured cells were exposed to 30 uM MMC for 12, 24, 48 and 60 uM MMC for 48 hours, respectively. The results indicate the mean±SD(n=6). *p<0.05;**p<0.01

2. 동과자(BS)의 영향

1) 세포생존율에 대한 영향

MMC의 독성에 대한 BS의 영향을 세포생존율의 측면에서 조사하기 위하여 30 uM MMC가 포함된 배양액에서 심근세포를 48 시간 동안 배양하기 2 시간 전에 40~160 ug/ml BS가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 배양한 후 세포생존율을 조사한 결과 40 ug/ml BS 배양에서는 대조군에 비하여 52%로 나타났다. 또한 80 ug/ml를 처리한 경우 67%로 나타났으며 160 ug/ml의 처리에서는 73%로 나타났다. 특히, 160 ug/ml BS를 처리한 경우는 세포생존율이 20 uM MMC만의 처리인 37%에 비하여 유의하게 증가한 것으로 나타났다($p<0.05$)(Fig. 3).

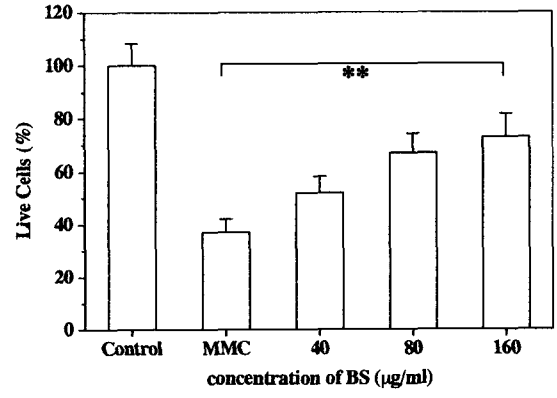

Fig. 3. Dose-response relationship of Benincasae Semen (BS) for its protective effect on methylmercuric chloride(MMC)-induced neurotoxicity by MTT assay. Cultured cells were preincubated with BS for 2 hours before exposure to 30 uM MMC for 48 hours. The results indicate the mean± SD(n=6). Asterisk indicate the significants difference(*p<0.05) between groups. *p<0.05

고 찰

수은은 카드뮴이나 납과 같이 맹독성의 중금속류로서 특히, 카드뮴의 중독을 Itai-Itai desease라고 불려진 것에 비하여[4,5], 수은의 중독은 Minamata disease라고 알려져 있다[1,3]. 특히, 메틸수은(MMC)과 같은 유기수은은 무기수은에 비하여 독성이 더욱 강하고 이의 붕괴속도가 매우 느리기 때문에 인체내 축적시 쉽게 배출되지 않아서 각종 부작용과 심각한 후유증을 낳고 있다[1]. 따라서 MMC의 독성효과에 대한 연구가 활발히 시도되어 왔다[3]. 최근 MMC가 붕괴될 때 산소라디칼을 생성한다는 연구 보고가 되면서 수은의 독성을 산소라디칼에 의한 산화적 손상 측면에서 밝히려는 연구가 시도되고 있다[1,8]. 따라서 본 연구에서는 MMC의 심근독성을 조사하기 위하여 생쥐로부터 순수분리 배양한 심근세포에 1~50 uM MMC를 48 시간동안 처리한 결과 MMC는 심근세포에 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 감소시켰으며 특히 30 uM MMC에서 MTT50값이 나타났다. Borenfreund 등[17]은 독성판정기준에서 MTT50 값이 100 uM 이하이면 고독성인 것으로 판정하였으며 100 uM 이상이면 중독성으로, 1,000 uM 이상이면 무독성으로 판정하였다. 따라서 본 실험의 결과에서는 MMC의 MTT50 값이 30 uM로 나타남으로서 MMC는 배양 심근세포에 고독성인 것으로 나타났다. 이는 MMC가 배양 심근세포에 세포독성효과를 가지고 있는 것으로서 본 실험의 이러한 MMC의 독성효과는 아마도 MMC가 세포내 단백질합성이나 DNA합성에 영향을 주었거나 또는 붕괴시 형성되는 산소라디칼에 의하여 세포내 항산화효소의 활성저해로 인한 산화적 손상에 의하여 세포생존율이 저하하였을 것으로 생각한다[1,3]. 이러한 이유의 하나로 본 실험에서 행한 MTT assay에서 세포생존율의 감소를 보인 것은 세포내의 사립체의 효소활성이 저하된 결과의 측면에서 볼 때 MMC가 세포내 소기관내에 위치하고 있는 효소활성에 손상을 줌으로서 나타난 현상임을 배제할 수는 없다[16]. 따라서, 본 실험의 이같은 결과는 Park 등[11]이 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 MMC를 처리한 결과 세포생존율이 유의하게 감소되었다는 연구결과와 일치하였다. 한편, MMC의 독성에 대한 동과자 (BS)의 영향을 세포생존율의 측면에서 조사하기 위하여 BS가 40~160 ug/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 30 uM MMC에 처리하기 2 시간 전에 배양한 결과 MMC만을 처리하였을 때 세포생존율인 37%에 비하여 50~70%이상으로 증가하였으며 특히 160 ug/ml BS의 처리에서는 73%로서 이는 MMC만의 처리인 37%에 비하여 거의 2 배 정도로 유의한 증가를 보인 것으로 나타났다($p<0.05$). 본 실험결과는 BS가 MMC의 독성방어에 효과가 있었다는 것을 증명하고 있으며 이는 아마도 BS에 포함되어 있는 saponin이나 citrulline등의 성분이 단독으로 또는 상호 복합적으로 작용하여 MMC에 의하여 손상되는 단백질합성에 관련되는 효소의 활성이나 항산화효소의 활성손상을 방어하였을 가능성이 클 것으로 생각된다[12,15]. 그러나 MMC와 같은 중금속의 독성기전의 규명이나 이의 독성에 대한 동과자와 같은 한약추출물들의 방어효과에 대한 기전을 자세히 밝히기 위하여서는 중금속의 독성과 산화적 손상간의 상호작용현상에 대한 현상을 분자유전적인 측면에서 조사함과 동시에 또한 한약추출물의 각 분획에 대한 약리활성을 생리나 약리를 비롯하여 생화학이나 분자유전과 같은 다양한 측면에서 복합적인 연구가 수행되어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

메틸수은(MMC)의 세포독성효과를 조사하기 위하여 MMC가 여러 농도로 포함된 배양액에 생쥐로부터 유래된 심근세포를 일정 시간 동안 배양한 후 여러 농도의 MMC를 처리하여 MMC의 독성효과를 조사하였으며, 또한 MMC의 세포독성에 대한 한약추출물인 동과자 (Sophorae Radix, SR)의 방어효과를 세포생존율의 측면에서 조사하였다. 그 결과 생쥐의 심근세포를 1~50 uM MMC가 포함된 배양액에서 48 시간 동안 배양한 결과 MMC는 심근세포에 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰다. 또한 MMC의 심근독성에 대하여 한약추출물인 BS의 영향을 조사한 결과 BS는 MMC에 의해 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시켰다. 이상의 결과로 부터 MMC는 생쥐의 배양 심근세포에 세포독성을 나타냈으며 BS와 같은 한약추출물이 MMC의 심근독성을 방어하는데 효과적인 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

참고문헌

1. Ganther HE: Interactions of vitamin E and selenium with mercury and silver. Ann NY Acad Sci 355:212-225, 1980.
2. Park OK, Oh JM, Choi MK, Park ST, Chung YT : Effect of Antioxidants on FeSO4 Toxicity in Cultured Myocardial Cells. Korean J Physical Anthropolo 10:161-168, 1997.
3. Greener, Y. and Kochen J.A. : Methylmercury toxicity in the chick embryo. Teratology 28:23-28, 1983.
4. Coogan TP, Bare RM, waalkes MP : Cadmium -induced DNA strand damage in cultured liver cells : reduction in *cadmium genotoxicity following zinc pretreatment*. Toxicol Appl Pharmacol 113:227-233, 1992.
5. Koizumi T, Waalkes MP : Effects of zinc on the binding cadmium to DNA : assessment with testicular interstitial cell and calf thymus DNA. Toxicol In Vitro 4:51-55, 1990.
6. Friberg L, Kjellstrom, T : Cadmium : Bronner F, Coburun JW(eds) In "Disorders of Mineral Metabolism". Academic Press Inc New York pp. 318-334, 1981.
7. Hatcher EL. Chen Y. Kang YJ. Cadmium resistance in A 549 cells correlates with elevated gluthathione content but not antioxidant enzymatic activities. Free Radic Biol Med 19:805-812, 1995.
8. Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J : NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. Nature(London)336:68-70, 1988.
9. Inatani R, Nakatani N, Fuwa H : Antioxidative effect of consttuents of rosemary(Rosemarinus of ficinalis L.) and their derivatives. Agric Biol Chem 47:521-528, 1983.
10. Saunders RD, Dugan LL, Demediuk P, Means ED, Harrocks LA, Anderson DK : Effects of methyl prednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. J Neurochem 49:24-31, 1987.
11. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU : *Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists*. Neurotoxicol 17:37-46, 1996.
12. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Morroni F : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. J Neurosci 10:1035-1041, 1990.
13. Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ, Poberts R : Enhancenent of recovery of myocardial function by oxygen free radical scavengers after reversible regional ischemia. Circulation 72:915-921, 1985.
14. 김현수, 신재욱 : 한국산 도꼬마리 추출물의 항균효과 및 분리 정제. Kor J Appl Microbiol Biotechnol 25(2):183-188, 1997.
15. 정옥삼, 김명동, 유도곤, 이호섭 : 축수탕 전탕액이 백서 신장기능에 미치는 영향. 동의생리학회지. 8(1):79-97, 1993.
16. Mosmann, T : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, 65, 55-63, 1983.
17. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alcuacil N : Coparisons of two in vitro cytotoxzicity assays-The neutral red(NR) asnd tetrazolium MTT test. Toxic In Vitro 2:1-6, 1988.