

昇汞의 長期投與가 白鼠肝臟中の Na, K 및 Cholesterol 含量에 미치는 影響

金 明 姬

機器分析科

Effect of Long Term Exposure to Mercuric Chloride on Na, K and Cholesterol Contents of Liver Tissue in Rats

Myung Hee Kim

Instrumental Analysis Division

= Abstract =

Mercury compounds interact with -SH and -S-S- groups of Proteins in a multitude of systems, and the biochemical basis of toxicological effect of mercury are generally sought through mercury-sulfur interactions.

This study was performed to investigate the relationship between liver tissue level of Na, K, cholesterol and several enzymes activity due to mercury intoxication.

Sixty male rats weighing 70 to 80 gm. were randomly divided into control and experimental groups. Control groups were given free access to tap water and experimental groups to mercuric chloride solution (100 ppm) ad. libitum.

After 8 and 16 weeks, the rats were sacrificed by decapitation and livers were removed, rinsed in ice cold water, and then stored at -70°C for chemical analysis.

Mercury, Na and K contents of the liver tissue were determined by atomic absorption spectrophotometry, cholesterol by gaschromatography.

The results were as follows:

1. Control values of mercury concentrations in the liver tissue were $0.37 \mu\text{g/g}$ and $0.43 \mu\text{g/g}$ at 8th and 16th week, respectively, while the mercury concentrations of experimental animals were $1.99 \mu\text{g/g}$ at 8th week and $4.31 \mu\text{g/g}$ at 16th week.
2. Sodium contents of liver tissue in all experimental groups were significantly decreased about 11% compared to the control ones.
3. Potassium contents of liver tissue in experimental groups were higher than control ones at 8th and 16th week by 16% and 28%, respectively. Especially K/Na ratio of experimental animal tissues were increased significantly.
4. In liver cholesterol contents of experimental groups were decreased about 20% significantly than control ones.

緒 論

生體에 對한 重金屬의 必要性和 아울러 毒性에 關하

여는 수세기 동안 生物學을 비롯한 여러 分野에서 研究되어 왔으나 그들의 生化學的 역할이 系統的으로 밝혀지기 시작한 것은 지난 4半世紀에 불과하다. 이런 重金屬類中에서도 유일한 液體金屬인 水銀은 그의 有

機化合物이나 無機化合物들이 下劑를 비롯하여 梅毒治療劑나 消毒劑 및 利尿劑 등으로 有用하게 使用되어 왔으나 점차 그 毒性이 밝혀지면서 이 製劑들의 使用은 줄어들고 있다.¹⁾ 그러나 發達하는 現代文明과 産業의 發展에 따라 環境은 점차 汚染되고 工場廢水나 農藥의 多量使用 등으로 水銀이 food chain을 거쳐 生體에 가지 影響을 미쳐 심각한 問題로 대두되고 있는데 이는 日本 熊本縣에서 發生한 Minamata病이 좋은 例이다.^{2,3)}

最近 이러한 水銀의 毒性에 관하여는 電磁顯微鏡 혹은 光學顯微鏡의 發達로 各種臟器에 대한 組織-病理學的인 면으로는 많은 研究가 이루어지고 있으나⁴⁻⁸⁾ 生化學的인 變化에 대하여는 알려진 바가 극히 적다. 이에 著者는 水銀劑에 의한 各臟器의 組織呼吸의 變化와 腦의 機能 및 몇가지 腦組織內 生化學的 物質들의 變化에 대해 이미 보고한 바 있다.^{9,10)}

한편 水銀劑는 生體에 들어가 Hg²⁺로 酸化되며 이들은 -S H(sulfhydryl group) 및 -S-S-(disulfide group)을 갖고있는 蛋白質과 結合하여 그 機能을 抑制하며 세포막의 phosphoryl group과도 反應한다고 한다.^{11,12)} 이와같이 水銀劑가 -S H 기와 관련이 있다는 事實은 Na-K ATPase와의 연관성이 있음을 알려주고 있으나 in vivo로 ATPase의 抑制作用을 觀察하기가 매우 어렵으므로 Na, K 含量을 測定하여 間接的으로 이를 確認하고자 하는 意圖에서 本實驗을 試圖하였고 또한 이 水銀劑가 HMG-CoA reductase 에도 影響을 미치는지 여부를 알아보고자 cholesterol含量을 測定하여 몇가지 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

實驗材料

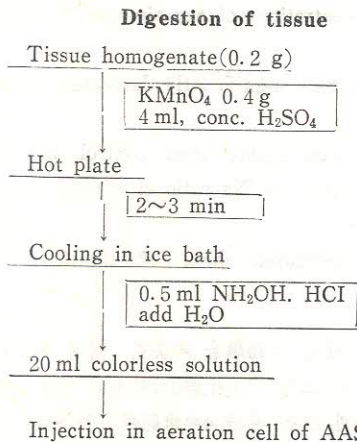


Fig. 1. Determination method of mercury in tissues.

實驗動物은 體重 70 g 程度의 어린 雄性 흰쥐 60마리를 同數의 實驗群과 對照群으로 나누고 實驗群에는 100 ppm의 昇汞水를, 對照群에는 常水를 8주 및 16주간 ad. libitum으로 攝取케 하면서 一定한 條件下에서 飼育하였다. 水分攝取量을 每日 記錄하고 일주일마다 體重을 計測하였다.

分析에 使用된 試藥은 水銀分析에는 atomic absorption spectrophotometer(AAS)用 特殊試藥으로, Perkin-Elmer Co製 mercury free reagent를, gaschromatography에는 Wako Co製 特殊試藥을, 그리고 標準物質로 使用한 cholesterol 등은 Merck Co製이며 기타 試藥들은 特級을 使用하였다.

實驗方法

實驗動物을 4°C 冷室에서 斷頭로 犧牲시키면서 採血하고 腦와 肝, 心臟, 腎臟等을 摘出한 다음 차거운 정제수로 3회 洗滌하고 dry ice 위에서 冷凍시켜 秤量한後 즉시 -70°C로 保管하였다가 實驗하였다.

1) 水銀含量 測定

血液 및 肝組織中の 水銀含量은 Velghe 등의 方法¹³⁾에 따라 分解한 다음(圖 1) atomic absorption spectrophotometry (cold method)로 測定하였으며 이때의 條件은 圖 1의 右側과 같다.

2) Na, K 含量 測定

肝組織中の Na, K 含量은 組織 500mg을 取하여 正確하게 秤量한 다음 이를 豫備炭化시키고 다시 600°C로 灰化시켜 少量의 HCl에 溶解시킨다. 여기에 증류수를 加하여 一定量으로 한 후 atomic absorption spectrophotometer(Perkin-Elmer 306)에 依하여 flame emission으로 測定하였고 이때의 實驗條件은 表 1과 같다.

3) Cholesterol 測定

摘出한 肝을 1.0 g 정도 取하여 homogenate한 다음

The condition of AAS (cold method)

Model: Perkin Elmer 306
 W.L.: 255 nm (UV)
 Lamp source: 6 mV
 Function: ABS
 Slit: 4 (0.7)
 Phase: Normal
 Range: 5 mV
 Signal: TC₁
 Chart speed: 5 mm/min.

Table 1. Atomic absorption spectrophotometric condition for sodium and potassium

	Wave length (nm)	Method	Fuel (l/min)	Standard Concentration	Slit
Na	vis-295	Flame Emission	Air/Acetylen(14/4)	1~20ppm	4
K	vis-383	Flame Emission	Air/Acetylen(14/4)	1~30ppm	4

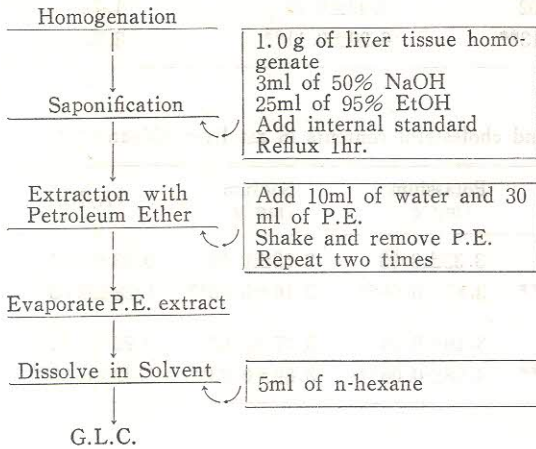


Fig. 2. Flow sheet for determination of cholesterol in liver tissue.

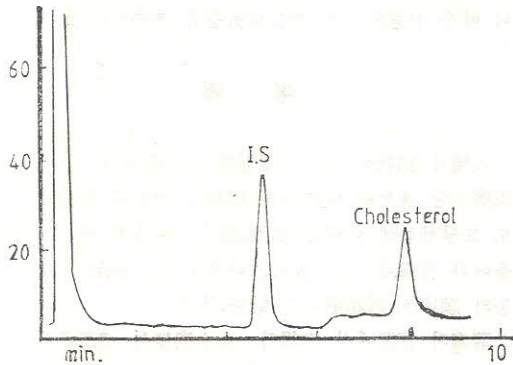


Fig. 3. Chromatogram of cholesterol on 3%-SE 30.

圖 2와 같은 방법으로 抽出하여 gaschromatography를 行하였으며(圖 3) 이때의 實驗條件은 表 2와 같다.

4) 統計檢定

모든 測定值의 平均은 對照群과 實驗群 사이에서 Student's t-test를 行하여 그 有意性을 檢定하였고 基準은 5%에 두었다.

結 果

1. 體重變化

16週間 觀察한 體重의 變動은 圖 4에 提示된 바와 같다. 對照群에 比하여 100 ppm의 昇汞을 投與한 實驗

Table 2. Gaschromatographic condition for cholesterol determination

Model	Perkin-Elmer 900
Detector	Flame ionization detector
Column	3%-SE 30 (69~80 mesh) on Chromosorb AW. φ 3mm×2m stainless steel.
Col. temp.	245°C
Det. temp.	280°C
Inj. temp.	260°C
Carrer gas	N ₂ , 40ml/min
Chart speed	5mm/min
Sample size	5μl

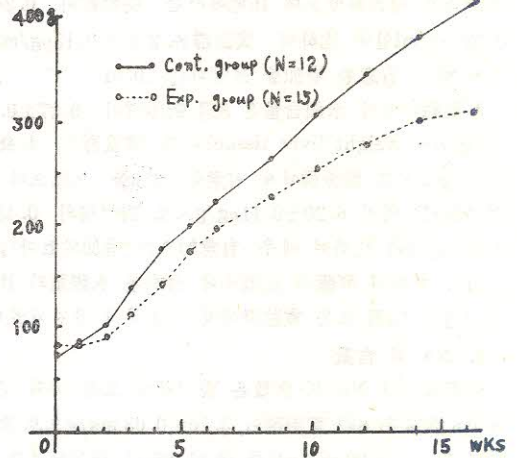


Fig. 4. Changes of body weight in the period of 16 weeks.

群에서 顯著하게 體重의 增加가 지연되었으며 이런 現象은 期間이 經過함에 따라 더욱 顯著하여져 對照群과 의 體重差가 더 커지나 16週동안 體重이 減少되는 경우는 없었다. 一日 水分攝取量을 전체 期間을 通하여 平均하였더니 對照群이 17.8ml이고 實驗群은 18.2ml로 有意한 差는 없었다.

2. 水銀含量

血液 및 肝組織中の 水銀含量은 表 3에 提示되었다. 血液의 水銀含量은 8週 對照群이 0.24±0.02 μg/ml

Table 3. Concentrations of mercury in the blood and liver tissues of rats (Mean±S.E.)

	Group	No. of Case	Blood (μg/ml)	Liver (μg/g)	Liver
					Blood
8 weeks	Control	7	0.24±0.02	0.37±0.03	1.54
	Experimental	10	1.63±0.09**	4.48±0.07**	2.75
16 weeks	Control	8	0.24±0.02	0.43±0.02	1.79
	Experimental	14	2.24±0.13**	6.20±0.11**	2.77

** p<0.01

Table 5. Effect of mercuric chloride intake on Na, K and cholesterol contents in rat liver (Mean±S.E.)

	Group	No. of Case	Cholesterol (μg/g)	Potassium (mg/g)	Sodium (mg/g)	K/Na
8 weeks	Control	7	2534.7±107.4	3.33±0.03	3.58±0.09	0.93±0.01
	Experimental	10	2099.4±36.1**	3.87±0.08**	3.16±0.03**	1.28±0.03**
16 weeks	Control	8	2442.6±73.1	3.19±0.04	3.47±0.05	0.92±0.01
	Experimental	14	1935.7±57.8**	4.08±0.08**	3.09±0.03**	1.32±0.03**

** p<0.01

(whole blood)이고 實驗群은 1.63±0.09 μg/ml로 매우 有意하게 增加되었으며 16週에서는 對照群이 0.24±0.02 μg/ml인데 比하여 實驗群은 2.24±0.13μg/ml로 역시 매우 有意한 增加를 보였다(p<0.01).

肝組織에서의 水銀含量은 8週 對照群이 0.37±0.03 μg/g(wet weight liver tissue)이고 實驗群은 4.48±0.07μg/g으로 實驗群에서 有意한 增加를 보였으며 16週 實驗群 역시 6.20±0.11μg/g으로 對照群의 0.43±0.02 μg/g에 比하여 매우 有意적으로 增加되었다(p<0.01). 그러나 肝臟과 血液中에 含有된 水銀量의 比率은 8週나 16週 모든 實驗群에서 一定하게 유지되었다.

3. Na, K 含量

肝組織中の Na, K 含量은 表 4에서 보는 바와 같으며 Na 含量은 8週 實驗群이 3.16±0.03 mg/g으로 對照群의 3.58±0.09 mg/g보다 약 11.8%나 減少되었고 16週에서도 역시 實驗群이 對照群에 比하여 약 11.2%정도 有意적으로 減少되었다. 그러나 K 含量은 Na 과는 反對로 對照群에 比하여 實驗群이 8週에 16% 程度, 16週에는 28% 程度 增加되었으며 이차 역시 매우 有意의 이었다(p<0.01). 한편 K/Na 비 역시 對照群은 8週나 16週 모두에서 0.93±0.01, 0.92±0.01로 거의 一定한 반면 實驗群은 8週에 1.28±0.03, 16週에 1.32±0.03으로 크게 增加되었다.

4. Cholesterol 含量

肝組織中の cholesterol 含量 역시 表 4에 提示된 바와 같다. 즉 8週 實驗群은 2099.4±36.1 μg/g으로 對照

群의 2534.7±107.4 μg/g에 比하여 약 17%程度 減少되었고 16週에서도 對照群에 比하여 實驗群이 21%程度나 매우 有意적으로 減少되었음을 볼수있다(p<0.01).

考 察

人體나 動物에서는 水銀製劑가 呼吸器나 消化器 및 皮膚 등을 通하여 吸收되며 胎盤을 通하여 胎兒에 까지 도달하는데 이들은 血漿蛋白과 結合한 後 各組織에 들어가 腎臟에 가장 많이, 다음이 肝, 脾臟, 血液, 腦 등의 順序로 蓄積된다고 한다.^{14,15)}

著者の 實驗에서 水銀의 血中濃度는 8週에서 보나 16週 實驗群에서 약 37%程度 增加되었고 肝組織中の 水銀含量 역시 이와 매우 類似하게 增加되었음을 볼수 있었다. 이는 Friberg 등¹⁶⁾이 昇汞을 投與한 後 各臟器 別로 水銀含量을 報告한 값들과도 거의 일치하며, 몇몇 學者들의 주장에^{17,18)}의하면 血中水銀濃度는 中毒進行에 따라 增加되나 그 값이 약 2 μg/ml에 이르던 거의 增加되지 않는다고 하는데 이들의 주장에 따르면 著者の 實驗成績중 16週 實驗群의 血中水銀濃度가 2.24 μg/ml임은 이러한 狀態에 도달하였음을 意味하는것 같다. 또한 腦組織에서는 투여한 期間에 거의 비례하여 水銀含量이 增加되었으나 肝組織은 그와 달리 水銀濃度가 크게 增加하지 않았는데 이는 肝臟이 解毒作用을 主재하는 器管이므로 어떤 有毒物質이 들어갔을 경우 이를 解毒시켜 排泄하기 때문인것으로 思慮된다.

體重의變化는實驗群이對照群에比하여發育이顯著히 지연되었는데 이는水銀中毒의一般症狀인食欲減退와消化器障礙등에기인되는것으로生覺되나中樞神經系障礙도이에관련되는지의與否는알수없다. Verity등¹⁷⁾에의하면methyl mercury投與後神經中毒이發生하는時期에顯著的體重의減少가있다고하였으나本實驗結果에依하면實驗群이對照群에比하여體重의增加率만低下되었을뿐絶對的인減少를볼수는없었다. 이는投與한水銀劑의種類와投與量이서로다르기때문인것같다.

1940年 Fildes는¹⁹⁾昇汞의殺菌作用이glutathion에의해방해를받으며이런방해作用은glutathion의分子內-SH기에의한다고報告한바있다. 그후Salle와Ginoza를비롯한여러學者들의報告역시水銀劑가電解質再吸收에관여하는酵素를抑制함을강력히時事하고있다.²⁰⁾ 따라서이런-SH기를갖고있는succinic dehydrogenase와같은여러酵素들이水銀劑에依해그活性이低下됨이알려졌고이에한걸음더 나아가Na-K ATPase에對한影響도점차밝혀지고있다.²¹⁾ Taylor²²⁾와Rendi²³⁾는in vitro에서腎臟의ATPase가水銀劑에依해抑制되는것을報告하였을뿐in vivo에서는ATPase의抑制作用을觀察할수없었다고한다.

한편動物細胞는 대체로細胞內에는 K^+ 이, 그리고細胞外에는 Na^+ 이 많고 이들은 다른 여러 음이온들과均衡을 이루며細胞內外로移動되는데 이에 따라細胞의機能이나活性이影響을 받는다. 또 이러한 Na^+ , K^+ 의 이동은 주로 active transport에 의하므로 energy가 필요하며 이에 Na-K ATPase가 관여하고 있음은 잘 알려진事實이다. 그러나 이런 Na-K ATPase가水銀劑에影響을 받아 그活性이變化한다면 그에 따라細胞內외의Na와K含量역시變하리라生覺된다. 따라서著者の實驗에서肝組織中のNa, K含量이매우有意하게變化하고 특히K/Na ratio에 큰變動이있음을볼때이酵素가水銀劑에依하여크게影響을 받는것 같으나 후細胞膜의permeability에異狀을 갖어와電解質의移動이變할要因도 있으므로本實驗만으로단정을 내리기는 어려울것 같다.

또한 cholesterol은體內肝이나腸에서 acetyl Co-A로부터生合成되며 rate limiting enzyme인 HMG-Co-A reductase(3-hydroxy 3-methyl glutaryl Co-A reductase)에依하여調節된다.²⁴⁾ 이 cholesterol은 free form과 ester form으로體內에存在하는데 bile acid나 steroid hormone의前驅物質로서血清內의含量은動脈硬化症, 高血壓等 心脈管系疾患과密接한關係가

있으며生合成은外部로부터의 cholesterol 投與나 bile acid, ACTH, Iron, Copper 및 Zinc 등에 의해影響을 받는다고 하였다.²⁵⁻²⁹⁾ 이에著者はHg²⁺에 의해 HMG-Co-A reductase가影響을 받는다면肝組織中の cholesterol 含量에變化가 있으리라生覺되어 이를測定하였던바實驗群에서 cholesterol含量이顯著히低下됨을보았다. 이로 미루어 짐작하건대 Hg²⁺이 HMG-Co-A reductase를 억제하는것으로 추측할수는 있으나肝組織內 cholesterol 含量이低下되었다고 하여 반드시合成過程이抑制되었다고는볼수없으므로 이는 앞으로 좀더研究하여야 한課題인 것이다.

結 論

以上の實驗成績과考察을通하여 다음과 같은結論을 얻었다.

1. 肝組織中の水銀含量은 8週 對照群이 0.37 $\mu\text{g/g}$, 16週 對照群이 0.43 $\mu\text{g/g}$ 인데 비하여實驗群은 8週에서 4.48 $\mu\text{g/g}$, 16週에서 6.20 $\mu\text{g/g}$ 이었고投與期間이 연장됨에 따라 有意하게 增加되었다.
 2. Na含量은 對照群에 比하여實驗群이 8週에 약 11.7%, 16週에는 약 11%程度 有意하게 減少되었다.
 3. K含量은 對照群에 比하여實驗群이 8週에 약 16%, 16週에는 28%增加하였고 이에 따라 K/Na 比率이 顯著히 增加되었다.
 4. 肝組織中の cholesterol含量은 對照群에 比하여實驗群에서 매우 有意하게 減少되었다.
- 따라서水銀中毒時肝組織中のNa, K含量이變하고 cholesterol含量이低下되며 이는 Na-K ATPase와 HMG-Co-A reductase의活性에 관련이 있을것으로 추측되나今後 解明하여야 할 課題라 思慮된다.

參 考 文 獻

1. Vallee, B.L. & Ulmer, D.D.: Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Ann. Rev. Biochem. 41:91, (1972).
2. 孫東憲: 韓國土壤中の總水銀含量에 관한 研究. 藥學會誌 23:95, (1979).
3. Friberg, L. & Vostal, J.: Mercury in the Environment. CRS press (Cleveland). 1st, p. 17, (1972).
4. Morikawa, N.: Pathological studies on organic mercury poisoning in cats and its relation to the causative agent of Minamata disease. Kumamoto

- Med. J. 14:71, (1961).
5. Takeuchi, T., Morikawa, N., Matsumoto, H. & Shioaishi, Y.: A pathological study of Minamata disease in Japan. *Acta Neuropathol.* 2:40, (1962).
 6. Miyakawa, T. & Deshimaru, M.: Electron microscopical study of experimental induced poisoning due to organic mercury compound. *Acta Neuropathol.* 14:126, (1969).
 7. Cavanagh, J.B. & Cohen, F.C.K.: Amino acid incorporation in protein during the "silent phase" before organo-mercury and p-bromophenyl-acetylurea neuropathy in the rats. *Acta Neuropathol.* 19:216, (1971).
 8. Chang, L.W. & Hartmann, H.A.: Ultrastructural studies of the nervous system after mercury intoxication. *Acta Neuropathol.* 20:316, (1972).
 9. 김명희 : 급속수은 및 승홍이 흰쥐장기의 산소소비량에 미치는 영향. 가톨릭大學 醫學部 論文集 30:17, (1977).
 10. 김명희 : 승홍의 장기간 투여가 흰쥐의 행동, 기억력 및 뇌내 핵산량과 Catecholamine 함량에 미치는 영향. 가톨릭大學 醫學部 論文集 33:279, (1980).
 11. 조규철 : 수은이노제. 가톨릭大學 醫學部 論文集 30:1, (1977).
 12. Bahn, R.C. & Longley, J.B.: Quantitative effects of mercurial diuretic on the distribution of renal succinic dehydrogenase in the rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 118:365, (1956).
 13. Velghe, N., Campe, A. & Claeys, A.: Semi-automated determination of mercury in fish. *Atomic absorp. newlett.* 17:37, (1978).
 14. Berlin, L. & Ullberg, S.: Accumulation and retention of mercury in the mouse. *Arch. Environ. Health.* 6:589, (1963).
 15. Suzuki, T., Miyama, T. & Katsunuma, H.: Affinity of mercury of the thyroid. *Industr. Health* 4:69, (1966).
 16. Friberg, L., Odeblad, E. & Forssman, S.: Distribution of two mercury compounds in rabbits after a single subcutaneous injection. *Arch. Industr. Health* 16:163, (1957).
 17. Verity, M.A., Brown, W.J. & Cheung, M.: Organic mercurial encephalopathy: In vivo and in vitro effects of methyl mercury on synaptosomal respiration. *J. Neurochem.* 25:759, (1975).
 18. Klein, R., Herman, S.P., Brubaker, P.E., Lucier, G.W. & Krigman, M.R.: A model of acute methylmercury intoxication in rats. *Arch. Pathol.* 93:409, (1972).
 19. Fildes, P.: Mechanism of anti-bacterial action of mercury. *Brit. J. Exp. Pathol.* 21:67, (1940).
 20. Salle, A.J. & Ginoza, Y.W.: Effect of certain organic compounds on germicidal efficiency of mercuric chloride. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 54:85, (1943).
 21. Bickers, J.N., Bresler, E.H. & Weiberger, R.: The acute effect of an organic mercurial on the rats kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 128:283, (1960).
 22. Taylor, C.B.: The effect of mercurial diuretics on adenosine triphosphate of rabbit kidney in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 12:539, (1963).
 23. Rendi, R.: Sodium, potassium-requiring adenosine triphosphatase activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 99:564, (1965).
 24. Stryer, L.: *Biochemistry*, Toppan company (Tokyo.). 1st p. 489 (1975).
 25. Quintao, E., Grundy, S.M., & Ahrens, E.H.: Effects of dietary cholesterol on the regulation of total body cholesterol in men. *J. Lip. Res.* 12:233, (1971).
 26. Sharma, R.K., & Sawhney, R.S.: Metabolic regulation of steroidogenesis in isolated adrenal cell. *J. Bechem.* 17:316, (1978).
 27. Sherman, A.R., Helen, A.G., & Zulak, I.M.: Iron deficiency hyperlipidemia in 18-day-old rat pups. *J. Nutr.* 108:152, (1978).
 28. Shefer, S.: Regulatory effects of dietary cholesterol and bile acids on rats intestinal HMG Co-A reductase. *J. Lip. Res.* 14:400, (1973).
 29. Helwig, L.R.: Effects of varied zinc/copper ratios on egg and plasma cholesterol level in white Leghorn hens. *J. Food Sci.* 43:636, (1978).