

## 망간이 백서 두개관세포에 미치는 영향

김지은 · 김영준 · 정현주 · 김옥수

전남대학교 치과대학 치주과학교실

### I. 서론

망간은 회백색의 금속으로서 인체에 필요한 미량의 원소 (tracing element) 이며 망간이 생체내에서 담당하고 있는 역할에 대한 연구는 상당히 많이 진행되어 왔다. 망간은 연골에 있어서 chondroitin sulfate의 합성에 관여하며, 생식기능, 당대사, 지질대사에 관여하고 있다고 알려져 있다<sup>1)</sup>. 또한 망간은 여러 가지 효소의 활성을 높이는데, 망간이 활성화시키는 효소로는 succinic dehydrogenase, glutamine synthetase, mitochondrial superoxide dismutase 등이다<sup>2, 3)</sup>.

그러나 망간의 결핍은 근 골격계에 영향을 미쳐서 성장장애를 유발시키며 기타 배란 및 당대사(glucose metabolism)장애를 유발시킨다. 또한 망간의 과부하는 독성을 야기하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 태아에 대한 망간 독성에 관한 연구로는 Sanchez 등<sup>4)</sup>이 임신한 쥐에 임신 6일째부터 15일째까지 과량의 망간을 투여한 결과 새끼 쥐의 체중감소, 형태학적 기형이 나타났다고 보고하였고 Torrente 등<sup>5)</sup>도 임신한 쥐에 과량의 망간 투여는 새끼 쥐에서 골의 석회화가 늦어진다고 하였다.

과량의 망간이 체내로 흡수되었을 때 주된 대상기관은 뇌, 간, 폐, 생식기관 및 면역계이다. 망간은 cal-

cium channel을 통하여 세포내로 유입되며 세포내로 들어온 망간은 조면세포질 내망 (rough endoplasmic reticulum) 등 소기관에 저장된 calcium의 세포질내 분비를 유도한다<sup>6, 7)</sup>. 특히 다양한 경로를 통해 세포내로 들어간 망간은 세포내 여러 소기관에 존재하는 calcium의 세포질내 유리를 촉진시키며<sup>8)</sup> 세포내에서 oxygen free radical에 의하여 3가 이온 ( $Mn^{3+}$ )으로 산화되어 세포독성에 관여한다<sup>9, 10)</sup>.

한편 좋지 않은 작업환경 하에서 망간의 지속적인 노출에 의한 망간 중독은 인체에 여러 가지 심각한 장애를 가져오며 이는 망간증이라고 알려져 있다. 만성적인 망간 노출은 파킨슨 질환 (Parkinson's disease)과 유사한 extrapyramidal dysfunction이 나타난다<sup>11, 12)</sup>. 특히 만성적인 간 질환을 갖는 사람에서 망간 중독의 위험성이 증가하는데 이는 금속이온의 혈중 및 뇌에서 그 level 이 증가되고 이에 따라서 행동학적 결함 및 퇴행성 신경장애가 나타난다<sup>13)</sup>.

망간이 세포에 미치는 영향은 주로 신경세포에 집중되어 왔다. 저농도의 망간은 PC12 세포의 분화를 유도하며 이는 nerve growth factor와 유사한 비슷한 신호 전달 경로를 따른다고 하였다<sup>14)</sup>. 그러나 고농도의 망간은 PC12 세포의 세포사를 야기하며 이것은 시간과 농도의존성이며 여기에는 여러 가지 효소와

단백질이 관여한다고 하였다<sup>15)</sup>. 망간에 의한 신경세포의 손상 및 세포사는 아직도 논란이 많지만 세포사의 주된 원인은 과사에 의한 것이 아니라 oxidative stress, calcium toxicity, 생존인자의 결핍 등에 의한 자멸사(apoptosis)로 생각되고 있다<sup>16)</sup>.

한편, 조골세포에 대한 망간의 영향을 관찰한 연구는 드문 편이다. Lampugnani 등<sup>17)</sup>은 MG63 osteosarcoma 세포에 0.1-300  $\mu$ M의 망간을 투여시 고농도에서는 세포부착이 감소되었지만 낮은 농도에서 세포부착이 증진되었다고 하였다. 이는 저농도의 망간 자극에 의해 MG63 세포가 fibrinogen과 von Willebrand factor에 대한 부착능력이 증진시켰기 때문이라고 하였다.

지금까지의 연구결과<sup>14-17)</sup>로 볼 때 저농도의 망간은 세포의 부착과 활성을 증진시키나 고농도의 망간은 세포의 활성을 억제시켜 세포의 사멸을 유도하는 것으로 생각된다. 망간은 담즙내에서 대사되어 없어지지만 정상적인 간 기능을 방해하는 경우에는 망간이 인체내 장기에 과 축적이 야기될 수 있다. 따라서 간 경화를 포함하여 만성 간 질환이 있는 사람에서는 osteopenia의 위험성이 높으며 이는 망간의 과부하와 관련이 있을 수 있다. 즉 만성적인 간 질환에 의한 망간 대사 장애가 있는 환자나 골다공증 등 골 대사 관련 질환자들, 그리고 망간이 과량 축적될 수 있는 환경에 노출되어 있는 작업자들에게는 고농도의 망간이 골 대사에 문제를 야기할 수 있다. 그러나 대부분의 망간 연구들이 뇌와 관련된 세포들에서의 것으로 망간의 골 세포들에 대한 효과를 연구는 거의 없다.

이에 본 연구에서는 골대사에 있어서 망간의 역할을 규명하는 첫 단계로써 여러 농도의 망간이 백서 두개관세포의 증식 및 활성에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 백서 두개관세포의 분리 및 배양

백서 두개관세포는 McCarthy 등<sup>18)</sup>의 방법을 변형한 순차소화효소기법을 이용하여 분리 배양하였다.

태령 20-21일째의 백서 태자를 모체로부터 무균적으로 적출하고 태자의 두부로부터 두개관을 절제하여 골막과 연조직을 제거하였다. 절제한 두개관은 수술용 가위로 세절한 후 0.2% collagenase (GibcoBRL, U.S.A.)를 함유한 bone cell buffer(1 M NaCl, 0.3 M HEPES, 0.125 M  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 M Mannitol, 0.1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7.4) 1.5 ml과 함께 교반하면서 37 $^\circ\text{C}$ , 15 분간 소화시켰다. 3번의 소화과정중에 얻어진 세포현탁액은 버리고 4번째와 5번째의 세포현탁액을 모아 1000 xg에서 10분간 원심분리한 후 Bone cell buffer로 세척하고 다시 원심분리하여 분리된 세포를 수집하여 배양하였다. 수집된 세포들은 75 ml flask에 10% fetal bovine serum (FBS; GibcoBRL, U.S.A.) 및 1% antibiotic-antimycotic solution (GibcoBRL, U.S.A.)이 첨가된 BGJb media (GibcoBRL, U.S.A.)에 배양하였다. 배양액은 3일 간격으로 교환하였으며 배양시 습도는 100%, 온도는 37 $^\circ\text{C}$ , 95%의 공기와 5%의  $\text{CO}_2$ 를 계속 공급하였다. 실험에는 계대배양 1번째와 2번째 것을 이용하였다.

### 2. 배양접시내 $\text{MnCl}_2$ 의 적용

$\text{MnCl}_2$  (Sigma, U.S.A) 는 3차 증류수에 녹여서 사용하였다. 사용된  $\text{MnCl}_2$ 의 농도는 여러 문헌을 참고하였으며 배지내 최종농도가 0, 10, 30, 60, 100, 300  $\mu$ M이 되도록 stock solution으로 준비하여 실험에 사용하였다. 대조군은  $\text{MnCl}_2$ 를 적용하지 않은 군을, 실험군은 해당 농도의  $\text{MnCl}_2$ 를 적용한 군으로 하였다.

### 3. 세포활성도 평가

#### 1) Two-color fluorescence assay

계대배양 1세대와 2세대의 백서 두개관세포를 0.25% trypsin-EDTA (GibcoBRL, NY, U.S.A.) 용액으로 처리하여 분리한 후 well당 1 X 10<sup>5</sup>개의 세포수가 되게 하여 12 well plate (Nunc, U.S.A.)에 접종한 후 배양하였다. 세포가 약 70%정도의 밀생에 도달되었을 때 2% fetal bovine serum 포함된 BGJb 배양액으로 교환하고 해당농도의  $\text{MnCl}_2$ 를 첨가하였다.

배양 1일 후와 3일 후에 세포의 활성도를 two-color fluorescence assay를 통하여 알아보았다. 이 활성도 검사는 살아있는 세포와 죽어있는 세포에 대한 형광색소 투과도의 차이를 이용한 것이다. 즉, 살아있는 세포는 녹색 형광을, 죽어있는 세포는 적색 형광을 나타낸다. 배양 1일 후와 3일 후에 각 well에서 배양액을 제거하고 생리식염수로 2회 세척 후 LIVE/DEAD kit (Molecular Probe, U.S.A)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 세포 활성도를 형광현미경으로 관찰하였다.

## 2) MTT assay

계대배양 1세대와 2세대의 백서 두개관세포를 0.25% trypsin-EDTA (GibcoBRL, U.S.A.) 용액으로

처리하여 분리한 후 well당  $1 \times 10^4$ 개의 세포수가 되게 하여 96 well plate (Nunc, U.S.A.)에 접종한 후 배양하였다. 세포가 약 70%정도의 밀생에 도달되었을 때 2%와 0% fetal bovine serum 포함된 BGJb 배양액으로 교환하고 해당농도의  $MnCl_2$  을 첨가하였다. 배양 1일 후와 3일 후에 MTT assay를 시행하였다. 각 well에서 배양액을 제거하고 생리식염수로 2회 세척 후 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega, WI, U.S.A.)를 이용하여 제조사의 지시대로 3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 용액 50  $\mu$ l를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 반응을 정지시키기 위하여 여기에 20  $\mu$ l의 10% SDS를 첨가한 후 ELISA plate reader (Microplate manager<sup>®</sup> BioRad, U.S.A)로 파장

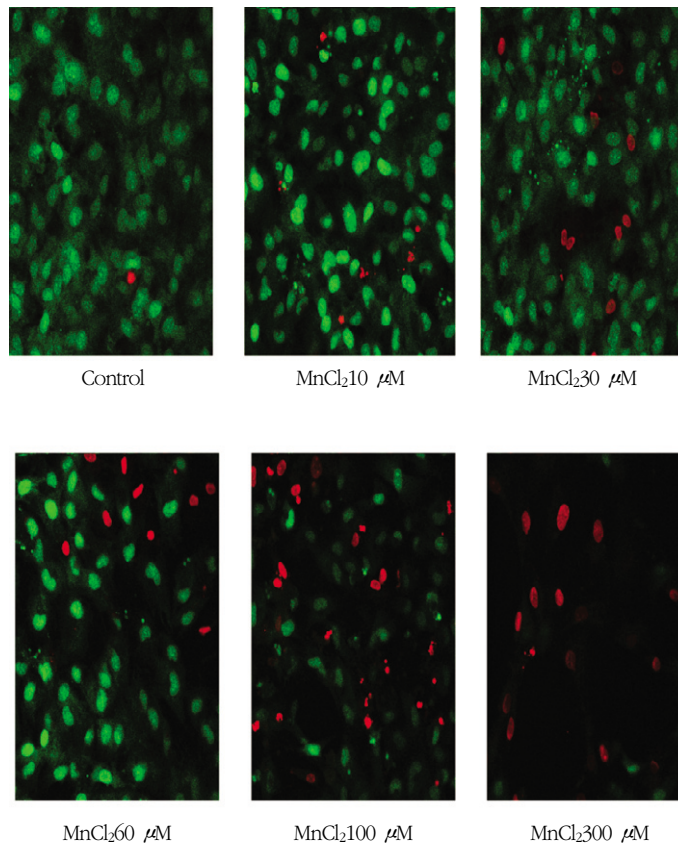


Figure 1. Fluorescent photomicrographs of primary rat calvarial cells labeled with Live-Dead Assay at day 1(original magnification x100)

490nm에서의 흡광도를 측정하였다. 해당농도의 키토산에 대한 세포활성도 평가는 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

#### 4. 단백질 함량 측정

백서 두개관세포를 6 well dish에  $5 \times 10^5$  cell을 분주하였다. 배양 3일째와 7일째에 배양액을 제거하고 인산완충생리식염수로 2회 세척하였다. 각 well에 200  $\mu$ l의 1x cell lysis solution (Cell signaling, U.S.A)를 넣고 5분간 배양한 후 cell scaper (Corning, U.S.A)를 이용하여 내용물을 얻은 다음 10  $\mu$ l를 취하여 단백질양을 Bradford법에 의하여 측정하였다. Protein assay kit 시약 (BioRad U.S.A.)을 이용하여

UV spectrophotometer (SmartSpec, BioRad, U.S.A.) 595nm에서 흡광도를 측정하고 세포내의 단백질 함량을 산정하였다.

#### 5. 통계학적 분석

실험에서 얻어진 수치는 one-way ANOVA와 사후검정에 Duncan 법을 시행하였다.

### III. 결 과

#### 1. 세포 활성도 검사

##### 1) 형광현미경적 소견

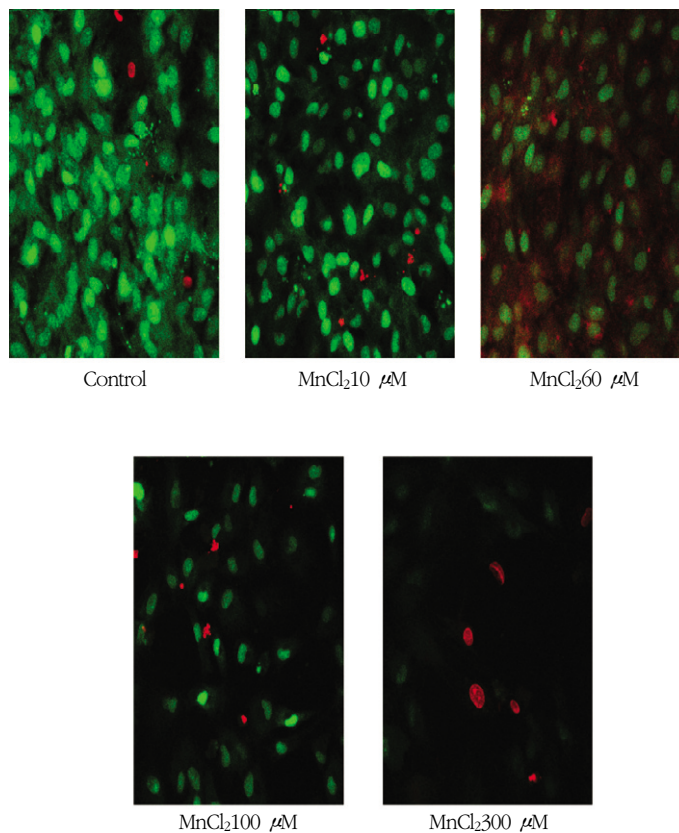


Figure 2. Fluorescent photomicrographs of primary rat calvarial cells labeled with Live-Dead Assay at day 3 (original magnification x100).

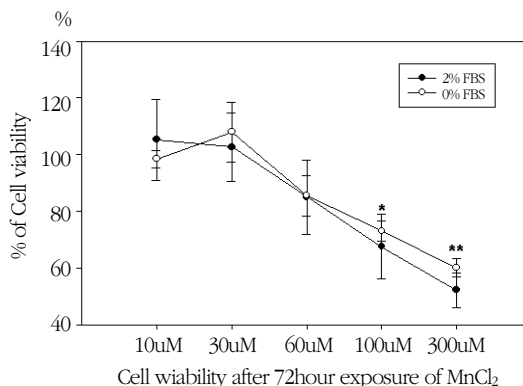
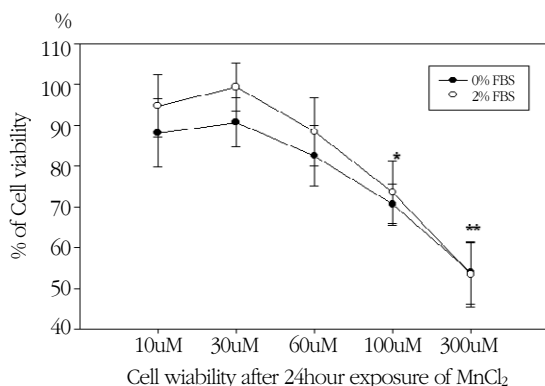


Figure 3. MTT assay for primary rat calvarial cell viability with MnCl<sub>2</sub>

\*: indicates significantly difference with control group ( $p < 0.05$ ).

세포활성도 검사를 형광현미경으로 관찰한 결과 1일에 망간 농도 10, 30, 60  $\mu\text{M}$ 에서는 살아있는 초록색의 세포들이 대조군과 비슷한 정도로 관찰되었지만, 100  $\mu\text{M}$ 과 300  $\mu\text{M}$ 에서는 총 세포수가 감소되었고 죽어있는 적색의 세포들이 많이 관찰되었다. 3일 후의 관찰에서도 24시간째에서와 유사하였으며 100  $\mu\text{M}$ 에서도 총 세포수는 감소되었지만 살아있는 세포가 많이 관찰되었다. 그러나 300  $\mu\text{M}$ 에서는 살아있는 세포가 거의 관찰되지 않아 계속적으로 세포의 사멸이 진행되고 있음을 알 수 있었다.

## 2) MTT Assay 결과

MTT assay 결과, 1일에 세포 활성도는 MnCl<sub>2</sub>에 농도 100  $\mu\text{M}$ 이상에서는 대조군에 비해 유의한 감소를 보였으며 3일에도 MnCl<sub>2</sub> 농도 100  $\mu\text{M}$ 이상에서 세포활성도가 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ).

Fetal bovine serum 첨가 유무에 따른 세포 활성도 변화는 1일, 3일 후 모두에서 관찰되지 않았다 (Figure 3).

## 3. 총 단백질 양

세포의 단백질 함량측정에서도 MnCl<sub>2</sub> 10, 30, 60  $\mu\text{M}$ 에서는 총 단백질 양이 3일째에 0.99 - 1.12  $\mu\text{g/ml}$ 으로 대조군과 유의한 차이가 없었지만 100  $\mu\text{M}$ 에서는 0.71  $\mu\text{g/ml}$ 으로 대조군에 비하여 유의하게 적었다 ( $p < 0.01$ ). 7일째에서도 총 단백질량은 대조군이 1.34  $\mu\text{g/ml}$ , MnCl<sub>2</sub> 10, 30, 60  $\mu\text{M}$ 에서는 1.11-1.42  $\mu\text{g/ml}$ 로 3일째에 비하여 증가하였으며 대조군과 유의한 차이가 없었으나 MnCl<sub>2</sub> 100  $\mu\text{M}$ 에서는 0.82  $\mu\text{g/ml}$ 로 대조군에 비해 유의하게 적었다 ( $p < 0.01$ ).

Table 1. Protein determination of rat calvarial cells treated with MnCl<sub>2</sub>

Conc. ( $\mu\text{M}$ )	total protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	3 day	7 day
control	1.17 $\pm$ 0.21	1.34 $\pm$ 0.25
10	1.12 $\pm$ 0.09	1.42 $\pm$ 0.16
30	1.11 $\pm$ 0.09	1.34 $\pm$ 0.24
60	0.99 $\pm$ 0.17	1.11 $\pm$ 0.21
100	0.71 $\pm$ 0.14*	0.82 $\pm$ 0.09*

\*: indicates significant difference compared to the control ( $p < 0.01$ ).

#### IV. 고찰

망간은 사람에게 있어서 필수 미량원소이며 망간이 생체 내에서 담당하고 있는 역할에 대한 연구는 상당히 많이 진행되어 왔다. 이러한 망간의 최저 한계량은 Sandstead<sup>19)</sup>의 연구에 의하면 정상인의 일상 음식물 중 음식물을 통한 망간의 섭취는 2.0~8.8 mg/day라고 하였다.

경구 섭취된 망간은 장관 내에서 흡수되며 음식물 내의 칼슘이나 인의 증가는 망간의 흡수율을 저하시킨다<sup>20)</sup>. 현재 세포내로의 망간 흡수는 철분(iron)이 이동되는 것과 유사하다고 알려져 있다. 즉 철분의 이동은 transferrin (Tf) cycle을 거치게 되며  $Fe^{3+}$ 로 산화된다. 이 3가 양이온은 효소에 의하여 환원되고 transport protein인 divalent metal transporter 1 (DMT1)에 의하여 세포내로 이동된다<sup>21)</sup>. 철분의 세포내로의 이동은 Tf-의존성에 의하지만 또한 DMT1을 거쳐서 Tf-비의존성으로도 이동된다. 이 DMT 1 단백질은 여러 2가 양이온들 즉,  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  등의 이동에도 관계한다<sup>22)</sup>.

체내 망간의 95-98%는 위장관으로 배설되는데 그 대부분은 담즙과 함께 십이지장으로 배설된다. 이 배설경로가 차단되면 췌장의 망간 농도가 높아지고 췌액을 통하여 배설되게 된다. 과잉 망간 부하의 경우에는 이같은 담관외의 경로에 의한 배설을 증가시켜 체내 망간의 항상성을 유지시키게 된다<sup>23)</sup>. 이와 같이 과량의 망간 흡수나 섭취는 체액 및 장기 내 망간 농도를 증가시키지만 배설이 빠르기 때문에 망간의 부하가 없어지면 일부 장기를 제외하고는 빠르게 감소한다. 曾我部<sup>24)</sup>는 백서에  $MnO_2$  1.7 g/kg를 매일 사료와 함께 90일간 투여한 결과 검사한 모든 장기에서 망간의 함량이 정상치보다 높았으나, 투여 중지 3일 후에는 대부분의 장기내 망간 함량은 정상으로 되돌아 왔다고 하였다. 그러나 경골과 치아는 계속 높은 수치를 유지하고 있어 망간이 경조직에 오래 잔류됨을 시사하였다. 따라서 장기간 망간에 노출된 근로자나 간 경화를 포함하여 만성 간 질환으로 망간의 배설 장애가 있는 사람에서는 망간에 의한 신경세포의 손상뿐만 아니라 골 세포들도 영향을 받을

것으로 생각된다.

망간에 의한 세포 손상 기전은 주로 신경세포에 대한 것이 알려져 있으며 여러 인자들이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 지금까지 알려진 손상의 기전은  $Mn^{2+}$ 이 calcium channel을 통해 세포내로 들어가 세포내 세포질내망 등 소기관에 저장된  $Ca^{2+}$ 의 분비를 유도하고<sup>6, 9)</sup>, 세포내 사립체에 우선적으로  $Ca^{2+}$ 의 유입을 증가시켜<sup>8, 25)</sup> 세포의 손상에 관여한다고 알려져 있다. 그의 기전으로는 도파민의 auto-oxidation,  $Mn^{2+}$ 이 활성 산소종(reactive oxygen species)의 생성을 자극하여 이들 활성 산소종이 도파민 수용체나 도파민에 직접 작용<sup>26)</sup>하여 손상을 초래한다고 알려져 있다. 또한 망간은 PC12 세포에서 세포자살과 관련된 단백질인 p38과 caspase-3의 활성을 자극하지만, caspase 활성화와 무관하게 PC12 세포의 세포사가 일어날 수 있다고 하는 등<sup>15)</sup> 아직까지 망간에 의한 세포 손상기전은 확실하게 규명되지 못하고 있다.

지금까지 대부분의 망간에 의한 독성 혹은 세포사는 주로 신경세포쪽에 집중되어 있었다. 그러나 망간의 과부하는 체내에서 골에도 많은 영향을 줄 것으로 생각된다. 따라서 만성적인 간 질환에 의한 망간 배설 장애, 그리고 골다공증 등 골 대사 관련 질환이 있는 환자에서는 망간이 골세포에 영향을 미칠 것으로 생각되나 이에 대한 연구는 적다. 이에 본 연구는 백서 두개관세포를 이용하여 여러 농도의 망간을 적용하고 이들 세포의 활성을 MIT assay와 단백질 합성을 통해 망간이 백서 두개관세포에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

망간이 세포의 활성을 억제시키고 세포사를 유발하는 농도는 저자들마다 차이가 있지만<sup>14, 15, 27)</sup>, 여러 문헌을 참고해 보면 신경세포의 경우에는 100-1000  $\mu M$ 이다. MG63 osteosarcoma cells의 경우는 0.1-100  $\mu M$ 의  $MnCl_2$ 을 투여시 낮은 농도에서 세포 부착이 증진되었으며, 이것은 RGD 의존성 형태를 보였다고 하였다. 이에 본 연구에서는 망간 농도를 10-1000  $\mu M$ 의 넓은 범위로 하여 예비실험을 시행하였으며, 그 결과 500  $\mu M$  이상의  $MnCl_2$ 은 24시간 이내에 백서 두개관세포의 사멸을 가져와서 본 실험에서

는 300  $\mu\text{M}$ 이하의 농도를 사용하였다. 세포활성도 검사를 형광현미경으로 관찰한 결과 24시간째에 망간 농도 10, 30, 60  $\mu\text{M}$ 에서는 살아있는 초록색의 세포들이 대조군과 비슷한 정도로 관찰되었지만, 100  $\mu\text{M}$ 과 300  $\mu\text{M}$ 에서는 죽어 있는 적색의 세포들이 많이 관찰되었다. 72시간째 관찰에서도 24시간째에서와 유사하였으며 100  $\mu\text{M}$ 에서도 세포수는 적지만 살아 있는 세포가 많이 관찰되었다. 그러나 300  $\mu\text{M}$ 에서는 살아있는 세포가 거의 관찰되지 않아 망간 농도 300  $\mu\text{M}$ 에서는 계속적으로 세포의 사멸이 진행되고 있음을 알 수 있었다. MTT assay 결과에서는 24시간째에 세포 활성도는  $\text{MnCl}_2$  농도 100  $\mu\text{M}$ 이상에서도 대조군에 비해 유의한 감소를 보였으며 72시간째에도  $\text{MnCl}_2$  농도 100  $\mu\text{M}$ 이상에서 세포활성도가 유의하게 감소하였다.

망간에 의한 세포소실은 자멸사의 형태로 이루어진다고 알려져 있는데, Hirata 등<sup>27)</sup>은 PC12 세포에 100-1000  $\mu\text{M}$ 의 망간을 첨가하였을 때 자멸사가 유발된다고 하였다. 본 실험에서는 망간 농도 100  $\mu\text{M}$  이상에서는 24시간째부터 세포 활성도가 감소하여 Hirata 등의 결과로 유추해 볼때, 백서 두개관세포의 세포 소실도 자멸사의 형태로 이루어질 것으로 추정되나 이런 자멸사를 유도하는 기전에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

세포의 단백질 함량 측정에서  $\text{MnCl}_2$  10, 30, 60  $\mu\text{M}$ 에서는 총 단백질 양이 3일째에 0.99 - 1.12  $\mu\text{g/ml}$ 로 대조군과 유의한 차이가 없었지만 100  $\mu\text{M}$ 에서는 0.71  $\mu\text{g/ml}$ 로 대조군에 비하여 유의하게 적었다. 7일째에서도 총 단백질량은 대조군이 1.34  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\text{MnCl}_2$  10, 30, 60  $\mu\text{M}$ 에서는 1.11-1.42  $\mu\text{g/ml}$ 로 3일째에 비하여 증가하였으며 대조군과 유의한 차이가 없었으나  $\text{MnCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ 에서는 0.82  $\mu\text{g/ml}$ 로 대조군에 비해 유의하게 적었다. 이는 백서 두개관세포에서 망간 농도 100  $\mu\text{M}$ 이상에서는 세포의 성장이 억제되며 독성을 나타냄을 의미한다.

본 연구 결과 백서 두개관세포에  $\text{MnCl}_2$ 를 적용하면 100  $\mu\text{M}$  이상의 농도에서는 세포의 활성이 감소되었다. 그러나 본 실험은 골 대사에 있어서 망간의 역할을 규명하는 첫 단계로 향후 백서 두개관세포의

활성 억제나 세포 사멸의 기전을 밝히는 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## V. 결론

망간은 인체에 필요한 필수 영양소이지만, 고농도의 망간에 지속적으로 노출되면 신경계의 손상을 가져와 망간중독증을 일으킨다고 알려져 있으며 망간에 의한 신경세포 손상과 관련된 많은 연구들이 있었다. 만성적인 간 질환이나 골다공증 등 골 대사 관련 질환자들, 그리고 망간이 과량 축적될 수 있는 환경에 노출되어 있는 작업자들에게는 고농도의 망간이 골 대사에 문제를 야기할 수 있다. 이에 본 연구에서는 골대사에 있어서 망간의 역할을 규명하는 첫 단계로써 여러 농도의 망간이 백서 두개관세포의 증식 및 활성에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

망간의 농도는 0, 10, 30, 60, 100, 300  $\mu\text{M}$ 로 하였으며 백서 두개관세포는 계대배양 1-2세대의 것을 이용하였다. 해당농도의 망간을 백서 두개관세포에 적용하고 1일과 3일 후에 세포 활성을 LIVE/DEAD kit 및 MTT assay를 통해 관찰하였으며 3일과 7일 후에 단백질 합성능을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 형광현미경으로 관찰한 결과 24시간째에 망간 농도 10, 30, 60  $\mu\text{M}$ 에서는 살아있는 초록색의 세포들이 대조군과 비슷한 정도로 관찰되었지만, 100  $\mu\text{M}$ 과 300  $\mu\text{M}$ 에서는 죽어 있는 적색의 세포들이 많이 관찰되었다. 72시간째 관찰에서도 24시간째에서와 유사하였으며 100  $\mu\text{M}$ 에서도 세포수는 적지만 살아있는 세포가 많이 관찰되었다. 그러나 300  $\mu\text{M}$ 에서는 살아있는 세포가 거의 관찰되지 않았다.
2. MTT assay 결과, 24시간째에 세포활성도는  $\text{MnCl}_2$ 에 농도 100  $\mu\text{M}$ 이상에서는 대조군에 비해 유의한 감소를 보였으며 72시간째에도  $\text{MnCl}_2$  농도 100  $\mu\text{M}$ 이상에서 세포활성도가 유의하게 감소하였다.

3. 세포의 단백질 함량 측정에서도  $\text{MnCl}_2$  10, 30, 60  $\mu\text{M}$ 에서는 총 단백질 양이 3일째에 0.99~1.12  $\mu\text{g/ml}$ 으로 대조군과 유의한 차이가 없었지만 100  $\mu\text{M}$ 에서는 0.71  $\mu\text{g/ml}$ 으로 대조군에 비하여 유의하게 적었다 ( $p < 0.01$ ). 7일째에서도 총 단백질량은 대조군이 1.34  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\text{MnCl}_2$  10, 30, 60  $\mu\text{M}$ 에서는 1.11~1.42  $\mu\text{g/ml}$ 로 3일째에 비하여 증가하였으며 대조군과 유의한 차이가 없었으나  $\text{MnCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ 에서는 0.82  $\mu\text{g/ml}$ 로 대조군에 비해 유의하게 적었다 ( $p < 0.01$ ).

이상의 결과 망간 농도 100  $\mu\text{M}$ 에서는 골세포의 활성화 기능을 억제시키는 것으로 나타나 만성 간질환자, 골대사 관련 질환자 및 망간 작업자에서는 고농도의 망간이 백서 두개관세포의 활성을 억제시킬 것으로 추정된다.

## VI. 참고 문헌

1. Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG: Harrison's principles of internal medicine. McGraw Hill, New York, 443-445, 1991.
2. NAS : Manganese. National Academy of science, III, 1973.
3. Wedler FC, Denman RB: Glutamine synthetase: The major Mn(II) enzyme in mammalian brain, *curr Top Cell Regul* 24: 153-69, 1984.
4. Sanchez PD, Domingo JL, Ilober JM, Keen CL: Maternal and developmental toxicity of manganese in the mouse, *Toxicology Letters* 69:45-52, 1993.
5. Torrente M, Albina ML, Colomina MT, Corbella J, Domingo JL: Interactions in developmental toxicology: effects of combined administration of manganese and hydrocortisone. *Trace elements and Electrolytes* 17:173-179, 2000.
6. Anderson M: Mn ions pass through calcium channels; A possible explanation, *J Gen Physiol*

- 81:805-827, 1983.
7. Narita K, Kawasaki F, Kita H: Mn and Mg influxes through calcium channels of motor nerve terminals are prevented by verapamil in frogs, *Brain Res* 510:289-295, 1990.
8. Gavin CE, Gunter KK, Gunter TE: Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria, *Biochem J* 266:329-334, 1990.
9. Aschner M and Aschner JL: Manganese neurotoxicity: Cellular effects and blood-brain barrier transport, *Neurosci Biobehav Rev* 15:333-340, 1991.
10. Verity MA: Manganese neurotoxicity; A mechanism hypothesis, *Neurotoxicol* 20:489-497, 1999.
11. Cotzias GC: Manganese, melanins and extrapyramidal system, *J Neurosurg* 34(suppl):170-180, 1966.
12. Donaldson J: The physiopathologic significance of manganese in brain; its relation to schizophrenia and neurodegenerative disorders, *Neurotoxicol* 8:451-462, 1987.
13. Burkhard PR, Delavelle J, Du pasquier R, Spahr L: Chronic parkinsonism associated with cirrhosis: a distinct subset of acquired hepatocerebral degeneration, *Arch Neurol* 60:521-528, 2003.
14. Roth JA, Horbinski C, Higgins D, Lein P, Garrick MD: Mechanism of manganese-induced rat pheochromocytoma (PC12) cell death and cell differentiation, *Neurotoxicol* 23:147-157, 2002
15. Roth JA, Feng L, Walowitz J, Browne RW: Manganese-induced rat pheochromocytoma (PC12) cell death is independent of caspase activation, *J Neurosci Res* 61:162-171, 2000.
16. Choi DW: Excitotoxic cell death, *J Neurobiol* 23:1261-1276, 1992.
17. Lampugnani MG, Bernasconi S, Neri P, Lozzi L, Gavazzi I, Marchisio PC, Dejana E: Role of manganese in MG-63 osteosarcoma cell attachment to fibrinogen and von willebrand factor, *Lab*



- Invest 65:96-103, 1991.
18. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E: Further biochemical and molecular characterization of primary rat parietal bone cell culture. *J Bone Min Res*, 3: 401-408, 1988.
  19. Sandstead HH: Some trace elements which are essential for human nutrition. *Progress in Food and Nutrition Science*, I, 371-391, 1975.
  20. Underwood EJ: Trace element in human and animal Nutrition(3rd). New York, Academic Press, 1971.
  21. Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC: Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat; evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1148-1153, 1998.
  22. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA: Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388:482-488, 1997.
  23. Thomson ABR, Olatunbosun D, Valberg LS: Interrelation of intestinal transport system for manganese and iron. *J Lab Clin Med* 78:642-655, 1971.
  24. 曾我部恵美子: 家?にあける経口投與マンカンの排泄 及び体内分布に関する研究 四國醫誌 29:348-358, 1973.
  25. Konji V, Montag A, Sandri G, Nordenbrand K, Ernster L: Transport of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  by mitochondria from rat liver, brain. *Biochimie* 67:1241-1250, 1985.
  26. Grahm DG: Catecholamine toxicity: A proposal for molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicol* 5:83-96, 1984.
  27. Hirata Y, Adachi K, Kiuchi K: Activation of JNK pathway and induction of apoptosis by manganese in PC12 cells. *J Neurochem* 71:1607-1615, 1998.
  28. Martin SJ and Green DR: Apoptosis and cancer; the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol* 18:137-153, 1995.

## Effect of Manganese on primary rat calvarial cell

Ji-Eun Kim, Young-Joon Kim, Hyun-Ju Chung, Ok-Su Kim

Dept. of Periodontology, College of Dentistry and Dental Science Research Institute,  
Chonnam National University

Chronic exposure to high levels of manganese leads a pronounce and debilitating disorder known as man-ganism. Research on the toxic manifestation of manganese have focused primarily on its neurological effects because exposure to high levels of the metal produces a distinct and irreversible extrapyramidal dysfunction resembling the dystonic movements associated with Parkinson's physiological and biochemical systems in the body.

The purpose of this study was to evaluate the effect of manganeses on primary rat calvarial cell growth and toxicity. The experimental groups were in concentration of 0, 10, 30, 60, 100, 300  $\mu$ M. Cell activity was assessed at day 1 and day 3 using a fluorescent molecular probe. Cell proliferation was evaluated at day 1 and day 3 by MTT assay. The amount of total protein synthesis was measured at day 3 and day 7.

The results were as follows:

The proliferation of primary rat calvarial cells were inhibited by  $\text{MnCl}_2$  in the concentration exceeding 100  $\mu$ M. The primary rat calvarial cells treated with  $\text{MnCl}_2$  showed similar protein synthesis to the control group except in 100  $\mu$ M.

These result suggest that manganese suppress the viability and protein synthesis of primary rat calvarial cells in concentration exceeding 100  $\mu$ M.