

4. 유기주석화합물 (Tributyltin)이 미성숙 생쥐의 음성 생식기관들에 미치는 영향에 대한 연구

이 경 진*, 이 중 빈
전남대학교 생명과학부 비교해부학실

Abstract

The present was performed to identify the effects of tributyltin (TBT) in the immature mice testes. 3-week-old male ICR mice were orally administrated on one time basis of TBT dose of 0 (Vehicle control, VC), 25 (TBT 25 mg/kg, T₂₅), 50 (TBT 50 mg/kg, T₅₀), 100 (TBT 100 mg/kg, T₁₀₀) mg/kg per each one. After 3 days the time treated of TBT, mice were sacrificed and weighed body, testis, epididymis, seminal vesicle, vas deferens, and prostate. As the result of weighing, weights of each organ and gonad index were tendency decreased in comparing groups of TBT treated with that (C) of untreated ($p < 0.05$). As the result of examination of Steroid hormones in the immature male mice, The concentrations of serum and intratesticular testosterone were significantly increased rather than the control group. But concentrations of estradiol were decreased objectly. A group of the highest change of concentrations of steroid hormones is T₂₅. The high dose group, T₁₀₀, was decreased all of concentrations of steroid hormones rather than those of T₂₅. The result of observation with histological changes in testis showed a tendency for innercellular wall to increase damage and extinction in seminiferous tubes. As the result of investigation apoptotic cell numbers in the testis using terminal deoxy-nucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxygenin nick end-labeling immunohistochemical strain, The ratio of Apoptotic cells significantly was increased in depending on treatment of TBT does. In conclusion, these results shows that TBT triggers apoptosis on reproductive cell in testis and changes level of concentrations of steroid hormones in the immature male mice, as endocrine disruptors (EDs).

I. 서 론

세계야생생물보호기금 (World Wildlife Fund; WWF)에서는 자연계에 노출된 환경 호르몬의 종류를 67종으로 선정하고 있다. 이중 합성 화합물류에 속하는 유해 화학

물질 중 최근 Dioxin, Polychlorinated biphenyl (PCB), Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), Bisphenol A 및 TBT 화합물이 문제시되고 있다. 그 중 TBT 화합물들은 PVC 안정제, 각종 플라스틱 첨가제, 산업용 촉매, 살충제, 살균제, 목재 보존제 등으로 널리 사용되고 있다. 특히 선박용 페인트 속에는 부착생물 (fouling organism)이 달라붙지 못하도록 부착 방지제 (antifoulant)를 첨가하고 있으며 이 페인트를 방오페인트 (antifouling paint)라고 한다. 이러한 TBT 화합물의 생태계 교란 현상을 '80년대 초 영국과 프랑스에서 참굴 (*Crassostrea gigas*)의 패각 기형과 개체군의 감소를 통해 처음 보고되었고, 연이은 독성 실험을 통해 패각 기형을 일으키고 (Stephenson *et al.*, 1986), 치폐의 성장에 영향을 미치며 (Lawler & Aldrich, 1987), 홍합의 성장속도를 감소시키고 (Stephenson *et al.*, 1986), 홍합 유생의 높은 사망률을 유도한다는 것이 밝혀졌다 (Bryan 1986). 또한 TBT 화합물들은 최근 세포자연사를 유발하는 물질로 많은 연구가 되고 있다. 이러한 세포자연사는 지속적으로 성장, 성숙하는 세포에서 자연적으로 발생하는 현상 중 하나이며, 그 대표적인 기관 중 하나가 정소이다. 정상적인 정소 내에서도 생식세포의 소멸이 일어난다는 사실은 1900년에 최초로 발견되었다 (Ragaud, 1900). '90년대에 들어와서, 정소내 생식세포의 소멸과정이 세포자연사 (apoptosis or programmed cell death) 과정 중에 일어나는 형태적인 특징과 일치한다고 알려지고 있다 (Cohen, 1993; Schwartz and Osborne, 1993). 그러나 환경호르몬에 의한 정소내 세포자연사 과정 중 분자생물학적인 조절기작에 대한 연구는 미미한 실정이다. 따라서, 본 실험은 환경호르몬으로 분류된 TBT가 미성숙 웅성 생쥐의 생식기관들 및 생식세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행되었다.

II. 재료 및 방법

실험 동물

대한 실험동물 센터에서 공급받은 ICR계 미성숙 수컷 생쥐 (3주령, 12.5 ± 0.5 g)를 실험기간 중에 물과 사료는 제한 없이 공급하였으며, 사육실의 온도는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였고, 하루 12시간/12시간 (Light/Dark) 조명조건하에서 사육하였다.

TBTA 처리

Corn oil 10ml에 TBT (Aldrich)를 농도별로 녹인 후 24시간 동안 상온에 보관하

였다. 각 군당 5 마리씩 TBT 처리 농도별로 100 μ l 씩 주입관을 통해 경구 투여하였다. 또한 대조군으로는 비투여군 (C)과 corn oil만을 경구 투여한 군 (VC)으로 나누었다.

체중 및 생식기관의 무게 측정

TBT를 처리한 뒤 3일 후에 체중을 측정한 다음 diethyl ether (Merck)로 마취상태하에 cardiac puncture 방법으로 혈액을 얻었다. 그후에 정소 (testis), 부정소 (epididymis), 저정낭 (seminal vesicle), 수정관 (vas deferens), 전립선 (prostate)을 원형을 유지하면서 생리식염수로 3회 세척 후 filter paper (Wattman 10)로 수분을 제거한 다음 무게를 측정했다.

방사면역 측정법에 의한 testosterone과 estradiol의 정량

Testosterone과 estradiol 호르몬의 농도는 binding percent [(Bound-NSB) / (B₀-NSB) × 100]를 Y축으로 하고 표준용액의 log 농도를 X축으로 하는 표준곡선에서 시료내의 스테로이드 호르몬의 농도를 산출하였다. 계산은 RIA Data Reduction Program을 이용하여 IBM PC로 시행하였다.

조직학 및 면역조직화학적 관찰

Hematoxylin에 5분동안 핵을 염색한 후, 1% HCl-alcohol에 탈색시키고, 흐르는 물에 10분동안 방치하였다. 그 후 eosin으로 2분간 세포질을 염색한 후 alcohol 과정을 거쳐 탈수시켰으며, xylene에서 투명시킨 후 Canada Balsam (Wako)으로 봉입하여 영구표본을 제작하였다. 또한 정소 내 세포자연사를 관찰하기 위해 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling (TUNEL) 방법에 의한 검출 키트 (ApopTag; Oncor., Hyosung Trading co., Seoul)를 사용하였다.

통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA with *t*-test 방법을 사용했으며, *p*값이 0.05 보다 작은 경우를 유의하다고 판정했다.

III. 결과 및 고찰

미성숙 수컷 생쥐에 구강으로 투여된 TBT가 생식기관 무게의 변화에 미치는 영향

으로는 먼저 체중이 TBT 처리 농도에 따라 감소되었으며, 각 생식기관들의 무게도 줄어들었다. 이는 Wester (1990) 등이 TBT 화합물에 대한 임상적 독성 실험에서 흰쥐의 간이나 신장 등은 증가하였고, 정소는 감소하였다는 보고와 유사한 결과를 나타내고 있다. 그리고, Table 1에서 보듯이 체중, 정소, 저정낭의 경우는 오차 범위가 작아 그 유의성이 ($p < 0.05$) 인정되나 전립선과 수정관은 무게가 작고, 그 오차 범위가 크게 나타났다.

정상적인 내분비계에 외인성 물질인 TBT 화합물이 체내로 들어오게 되면, 암컷 복조류에서 testosterone의 양은 증가하고, 반면에 estradiol의 양은 감소한다고 보고되었다 (Spooner *et al.*, 1991). 이렇게 TBT 화합물에 의해 증가된 testosterone이 이러한 개체들의 임포섹스 (imposex)를 일으킨다 (Spooner *et al.*, 1991; Stroben *et al.*, 1991). 그러나 고등 동물에서 TBT가 직접적으로 testosterone에서 estradiol로 전환시키는 효소인 aromatase를 억제한다는 구체적인 보고는 없는 실정이다. 본 실험의 결과 (Fig. 1), TBT를 투여한 군들이 대조군에 비해서 testosterone의 양은 증가하였고, estradiol의 양은 감소함을 보였다. 따라서 이러한 결과로 볼 때, 처리한 TBT가 aromatase의 효소활성을 억제한다는 Matthiessen & Gibbs (1998)의 가설과 상호 연관성 있는 결과라 사료된다. 그리고, 조직학 및 조직면역학적 관찰 결과 (Fig. 2)로 TBT 처리 농도에 따라 정소 조직에 손상이 커지는 것을 관찰할 수 있으며 세정관내에 세포 자연사를 유발하는 빈도가 현저히 증가되었다. 결론적으로, 본 실험은 TBT가 정소 내 생식세포의 세포 자연사를 농도 의존적으로 유발하며, 저농도의 TBT 처리시 testosterone의 분비를 증가시키고, estradiol 분비를 억제시킴으로서 내분비 교란물질로서 작용함을 확인하였다. 이는 TBT가 aromatase활성을 억제한다는 것을 의미하며, 본 결과는 TBT 화합물의 작용기전을 연구하는데 중요한 자료로 활용할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- Bryan GW, Gibbs PE, Burt GR (1986) A comparison of the effectiveness of tri-n-butyltin chloride and five other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dog-welk, *Nucella lapillus*. *J Mar Biol Ass UK* 68: 733-744.
- Cohen JJ (1993) Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-130.
- Lawler IA, Aldrech JC (1987) "Sub-lethal effects of bis (tri-n-butyltin) oxide on *Crassostrea gigas spat*". *Mar Poll Bull* 18(6): 274-278.

- Ragaud CP (1900) Degenerescence des cellules seminales chez les mammiferes en l'absence de tout etat pathologique. CR Soc Biol 52: 268-270.
- Schwartz LM and Osborne BA (1993) Programmed cell death, apoptosis and killer genes. Immunol Today 14: 582-590.
- Spooner N, Gibbs PE, Bryan GW, Goad LJ (1991) The effects of tributyltin upon steroid titers in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. Mar Environ Res 32: 37-49.
- Stephenson MD (1991) "A field bioassay approach to determining tributyltin toxicity to oysters in California". Mar Environ Res. 32: 51-59.
- Stroben E, Ohelmann, J Bettin C (1991) TBT-Induced Imposex and the Role of Steroids in Marine Snails. Tenth World Meeting of ORTEP (Organotin Environmental Programme) Association, Vlissingen.
- Wester PW, Krajnc EI, Van Leeuwen FXR, Loeber JG, Van Der Heijden CA, Vaessen HAMG, Hellenam PW (1990) Chronic toxicity and carcinogenicity of bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO) in the rat. Food Chem Toxicol 28: 179-186.