

내분비계 화학물질이 등줄쥐의 번식에 미친 영향에 대한 연구

김지혜, 윤명희*, 민병윤¹

경성대학교 생물학과, ¹경남대학교 환경공학부

서 론

본 연구자들은 부산시 가덕도 대항동, 남해군 삼동면 및 산청군 중산리 지리산에서 포획된 등줄쥐의 14-42%가 매우 왜축된 정소 및 부정소를 가지며, 포획된 대부분의 등줄쥐에 phenol 화합물과 유기주석화합물이 높은 농도로 축적되어 있음을 밝힌 바 있다(윤, 2003). 본 연구에서는 위의 등줄쥐에서 번식이상 상태를 정확히 알기 위하여 등줄쥐 생식기에 대하여 광학 및 전자 현미경을 이용한 조직학적 관찰을 수행하였고, 또한 번식이상을 발생시킨 화합물의 종류를 규명하고자, 등줄쥐의 번식이상이 발견되지 않은 경기도 이천시 설성면 및 경남 양산시 상북면에서 포획한 등줄쥐에 TBTCI, bisphenol A, 4t-octylphenol 및 nonylphenol을 투여하여 각 화합물이 등줄쥐의 번식에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

투여실험을 위한 예비조사로서, 번식이상이 발생하지 않은 등줄쥐를 포획하기 위한 장소를 선정하기 위하여, 경기도 이천시 설성면 지역(농경지 부근)에서 등줄쥐 수컷 약 40개체, 경남 양산시 상북면 지역(산저지대 초원지역)에서 등줄쥐 수컷 약 40개체를 포획하여 이들의 생식소의 크기를 관찰한 결과 왜축된 정소를 가진 개체는 발견되지 않았다. 따라서 위 장소에서 등줄쥐를 포획하여 투여실험에 이용하였다.

2. 등줄쥐의 연령 구분 및 생식소비 산출

치아의 마모도(Lin and Shiraishi, 1992; Koh, 1983), 두개골의 크기 및 체중(Yoon et al., 1997)을 이용하여 6단계로 연령을 구분하여 성체만을 실험에 사용하였다. 또한 수컷 등줄쥐로부터 오른쪽 정소와 부정소를 적출하여 무게를 측정 후, 체중에 대한 정소 및 부정소의 무게 비(생식소비)를 계산하였다.

3 조직학적 연구 방

실험에 사용한 모든 수컷 등줄쥐로부터 적출한 오른쪽 정소를 1mm³의 크기로 세절하여 2% paraform aldehyde와 2.5% glutaraldehyde의 혼합고정액(pH 7.4)에서 24시간 전고정한 후, OsO₄로 1시간 30분 동안 후고정하였다. 이후 알콜 탈수와 아세톤 치환과정을 거쳐 epon 812혼합액으로 포매 중합하였다. Ultramicrotome(LKB2088)으로 15 μ m 정도의 두께로 자른 후 0.5% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였고, 60-90nm의 두께로 잘라 uranyl acetate와 lead nitrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(JEOL100s)으로 관찰하였다.

4. 투여 실험

경기도 이천 지역에서 포획한 등줄쥐 중, 20g 이상의 성체 등줄쥐를 선별하여, 암수 5쌍에게 TBTCI 300, 600 및 3,000 μ g/kg/day를, 또 다른 4쌍에게 bisphenol A(BPA) 250, 500 및 5,000 μ g/kg/day을 7일간 매일 대퇴부에 근육 주사했으며 4개월 후 등줄쥐(P 세대)의 생식소비와 정소 및 부정소의 LM 및 TEM 상, 각 화합물의 잔류농도, 이들로부터 태어난 새끼(F1세대)들의 수, 수컷 새끼들이 성체에 이르렀을 때의 생식소비 및 F1세대 정소 및 부정소 조직의 LM 및 TEM 상을 조사하였다. 또한 경남 양산시 상북면 지역에서 포획한 등줄쥐 중 성체만을 선별하여, 암수 각각 5쌍씩에게 4t-octylphenol 800 μ g/kg/day, nonylphenol 900 μ g/kg/day, 또는 4t-octylphenol 800 μ g/kg/day 과 nonylphenol 900 μ g/kg/day을 동시에, 주 2회씩 2개월간 근육 주사했으며, 실험 직후 각 화합물의 잔류농도 측정을 제외하고는 TBTCI과 BPA 투여 실험의 경우와 같은 실험을 실시하였다. 각 실험군에 대한 각각의 대조군 4쌍 및 5쌍에게는 투여기간 동안 corn oil만을 각각 10 μ l/g/day씩 7일 동안, 2 μ l/g/day씩 주 2회 2개월 동안 투여하였다.

결과 및 고찰

가덕도 대항, 남해군 삼동면 및 산청군 지리산에서 포획된 등줄쥐 중, 왜축된 생식소(정소 및 부정소) 전체에서 정자형성 중의 생식세포 및 성숙한 정자가 관찰되지 않았다. 또한 phenol 화합물(bisphenol A, 4t-octylphenol, nonylphenol)이 높게 검출된 등줄쥐의 수컷 생식소에서 많은 상해가 관찰된 점으로부터 등줄쥐의 번식이상을 유도한 화합물은 phenol 화합물일 가능성이 제시되었다. 한편 투여실험 후 각 처리군에서 검출된 TBTCI과 BPA 두 화합물의 잔류농도는 대조군에서 검출된 농도와 유의적인 차이를 보이지 않아, 투여 후 4개월이 경과되면 이들 화합물이 체내에 거의 잔류하지 않음을 알 수 있었다. 이는 가덕도 등 세장소의 등줄쥐로부터 높은 농도의 화합물들이 검출된 것은 이들 화합물들이 장

기간에 걸쳐 축적되었는지, 또는 고농도의 화합물에 노출된 지 얼마 경과되지 않아 포획되었을 가능성을 시사하고 있다. 또한 TBTCI과 BPA의 모든 투여군에서 성체 수컷의 생식소비(RMR=2.59~4.05)는 대조군(RMR=2.46~3.95)과 비교해서 차이를 보이지 않았으며, 성체의 정소의 생식세포 및 지지세포, 부정소관의 발달 정도, 부정소관 내 정자의 형태 등에서 대조군과 별다른 차이점이 관찰되지 않았고, F1세대에서도 정소 및 부정소가 정상적으로 발달하였다(Table 1). 따라서 TBTCI과 BPA을 단기 투여할 경우 수컷의 생식소에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각되었다. Nagao 등(1999)에 의해서도 암컷과 수컷 흰쥐에게 BPA 300 $\mu\text{g}/\text{g}$ 을 생후 1-5일간 단기 투여했을 경우 생식소에 미치는 영향이 없음이 보고된 바 있다. 한편 성체 수컷 흰쥐에 45일간 0.2, 2 and 20 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ 의 BPA를 경구 투여했을 때에는 생식소의 무게, 정자의 활동성, 정자의 수에 영향을 미치고(Chitra et al., 2003), 생후 23-53일 동안 100 $\text{mg}/\text{kg bw}/\text{day}$ 의 BPA를 투여했을 때에는 성 성숙이 늦어지고 정소조직의 이상이 발생하고 정자형성에 이상이 관찰된 바 있어(Tan et al., 2003), BPA를 30일 이상 장기 투여했을 때 생식소 조직에 이상이 발생했음을 알 수 있다. TBT에 의한 포유류의 변식이상에 관한 연구는 그 수가 많지 않은데, TBT 10 또는 20 mg/kg 을 수컷 rat에게 35일 동안 경구투여 했을 때 저정낭의 무게가 감소하고 부정소관 내에서의 세포 파편과 괴사된 세포가 증가함이 알려져 있다(Yu et al., 2003). 즉 TBT와 BPA를 흰쥐 성체에 단기 투여할 경우에는 생식소 조직에 영향을 미치지 않지만, 장기 투여할 경우 생식소 조직에 이상을 발생시키는 점으로부터, 등줄쥐 성체에서도 이들 화합물을 장기 투여할 경우 생식소 조직에 이상을 발생시킬 가능성이 시사된다. 한편 TBTCI 과 BPA 실험군에서 태어난 새끼 수를 비교하면, 모든 실험군에서 출산이 되지 않거나 또는 태어난 새끼를 잡아먹는 경우가 발생한 점으로부터 이들 화합물이 태아의 발생에 영향을 미치는 것으로 생각되었다(Table 1). 수태시 이들 화합물의 단기투여에 의한 태아의 사망률의 증가는 흰쥐와 생쥐에서도 알려져 있다(Butala et al., 2001; Noda et al., 1991; Tyl et al., 2001).

4t-octylphenol 또는 nonylphenol 투여군의 경우, nonylphenol을 투여한 1개체를 제외하고(RMR=0.84) 모든 개체에서 생식소가 정상적으로 발달했다(RMR=1.78~4.08). 그러나 대부분의 개체의 정세관에서 apoptosis가 관찰되고 부정소관이 좁아져 있었으며 부정소 내의 정자 수가 감소하였다. 따라서 4t-octylphenol 과 nonylphenol을 2개월 이상 장기 투여하면 수컷의 번식에 영향을 미치는 것으로 생각되었으며, 실험용 흰쥐에서도 이와 유사한 연구가 보고된 바 있다. 즉 Boockfor and Blake(1997)에 의하면 4t-octylphenol 80 mg/rat 을

Table 1. Counts of pregnant females, birth, offspring and RMR in the striped field mice exposed to TBTCI, BPA, 4t-octylphenol and nonylphenol.

Compounds	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	N. females	N. pregnant females	Individual N. of pregnant females	Counts of birth	Offspring		
						N.(male/female)	Death	RMR(%)**
TBTCI	300	5	2	T300-2	2	4(2/2)	0	3.46, 3.34
						3(2/1)	0	3.65, 3.52
				T300-4	2	3(3/0)	1*	3.93 ~ 4.29
						3(2/1)	0	3.84, 4.44
	600	5	0	-	-	-	-	
	3000	5	1	T300-2	2	5(3/2)	1*	3.72 ~ 4.35,
2(1/1)						1*	3.61	
BPA	250	4	0	-	-	-	-	
	500	4	1	B300-4	-	[14] [†]	0	-
	5000	4	1	B300-3	1	4(1/3)	2*	4.38
[4] [†]						0	-	
Control I		4	1	CON-2	1	6(2/4)	0*	3.16, 2.93
4t-octylphenol	800	4	0	-	-	-	-	-
Nonylphenol	900	5	0	-	-	-	-	-
4t-octylphenol + Nonylphenol	800 + 900	5	0	-	-	-	-	-
Control II		5	0	-	-	-	-	-

*, killed and eaten by parents immediately after birth

**, ratio of the male reproductive organ weight to the body weight

† , counts of embryos in the uteri

성체 수컷 흰쥐에게 두 달간 투여했을 때 정자 수가 매우 감소되고, 수컷 생식소와 accessory reproductive organs의 크기와 기능에 영향을 미친다고 보고되어 있으며, nonylphenol 의 경우, 생후 25-53일에 100 mg/kg bw/day을 경구 투여했을 때, 성 성숙의 지연, 정소조직의 상해와 정자발생 이상 등이 관찰되었으며 (Tan et al., 2003), 250 mg/kg bw/day을 50 일간 경구 투여했을 때에도 부정소 무개가 감소하고 정소조직에 상해가 관찰되었음이 알려져 있다(Han et al., 2004). 한편, 수컷 흰쥐에게 20mg/kg의 octylphenol을 5일 동안 단기 투여했을 경우에도 정세관의 직경과 testosterone의 양의 감소가 알려져 있으며(Kim et al.,

2004), 임신 11일-18일 사이의 흰쥐에게 nonylphenol 75 와 15 mg/kg bw/day를 경구 투여했을 때 태어난 새끼의 부정소 무게가 감소되어(Han et al., 2004; Hossaini et al., 2001), 이들 화합물의 단기간의 노출에 의해서도 수컷의 생식소의 발달에 영향이 미침이 알려져 있다.

한편, 4t-octylphenol 및 nonylphenol 실험에서 임신·출산한 개체가 전혀 없지만, 대조군의 경우도 출산한 개체가 없었으므로 이들 화합물의 투여가 태아의 발생에 영향을 미쳤는지의 여부를 알기 어렵다. 그러나 Gotz 등(2001)에 의하면 octylphenol이 사람 및 여러 야생동물의 임신에 영향을 준다고 보고하고 있으며, Nagao 등(2001)은 50 mg/kg의 nonylphenol을 임신 시작부터 분만 후 21일까지 흰쥐에게 경구 투여했을 때 새끼들의 사망율을 높인다고 보고하고 있어, 이들 화합물이 등줄쥐의 태아의 발생에 영향을 미쳤을 가능성을 배제할 수 없다.

이상으로부터, 가덕도 등 세 장소에서 포획된 등줄쥐 중 phenol 화합물이 고농도로 검출된 등줄쥐에서 많은 조직 상해가 관찰된 점, TBTCI과 BPA를 등줄쥐 성체에 단기 투여할 경우 4개월 후 체내에 거의 잔류하지 않으며 수컷 생식소의 발달에 영향을 미치지 않지만, BPA의 장기투여에 의한 수컷의 번식저하 가능성을 배제할 수 없는 점, 그리고 4t-octylphenol 또는 nonylphenol을 2개월 이상 장기적으로 투여할 경우 수컷 생식소의 조직 상해가 관찰된 점으로부터, 윤(2003)에 의하여 관찰된 등줄쥐 수컷의 번식이상 현상이 등줄쥐 체내에 고농도로 축적되어 있던 phenol 화합물들에 의하여 발생했음이 시사된다. 또한 위의 네 가지 화합물이 모두 암컷의 출산율도 현저히 저하시키며, TBTCI과 BPA의 장기투여, 또는 4t-octylphenol과 nonylphenol의 단기 투여에 의한 번식 저하의 가능성도 배제할 수 없는 점으로부터, 가덕도 등 세 장소에서 발생한 등줄쥐 수컷의 번식이상은 이들 모든 화합물에 의한 장·단기적 노출에 의하여 초래된 것이라고 생각할 수 있으며, 야생 등줄쥐들이 이들 화합물에 지속적으로 노출될 경우 등줄쥐 집단의 개체 수가 대폭적으로 감소할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Boockfor, F.R., Blake, C.A., 1997. Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis, and increases the incidence of sperm deformities. *Biol. Reprod.* 57, 267-277.
- Butala, J.H., Cagen, S.Z., Waechter, J.M., Dimond, S.S., Breslin, W.J., Jekat, F.W., Joiner, R.L., Shiotsuka, R.N., Veenstra, G.E., Harris, L.R., 2001. Bisphenol A: Low Dose Effects-High Dose Effects - Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol

- A and in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Reproductive Toxicology* 15, 587-599.
- Chitra, K.C., Latchoumycandane, C., Mathur, P.P., 2003. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 185, 119-127.
- Gotz, F., Thieme, S., Doner, G., 2001. Female infertility-effects of perinatal xenoestrogen exposure on reproductive functions in animals and humans. *Folia. Histochem. Cytobiol.* 39, 40-43.
- Han, X.D., Tu, Z.G., Gong, Y., Shen, S.N., Wang, X.Y., Kang, L.N., Hou, Y.Y., Chen, J.X., 2004. The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reprod. Toxicol.* 19, 215-221.
- Hossaini, A., Dalgaard, M., Vinggaard, A.M., Frandsen, H., Larsen, J., 2001. In utero reproductive study in rats exposed to nonylphenol. *Reprod. Toxicol.* 15, 537-543.
- Kim, S.K., Lee, H.J., An, S.Y., Lee, C.J., Yoon, Y.D., 2004. Effects of postnatal exposure to octylphenol on the Transcriptions of Steroidogenic enzyme in mouse testis. *Korean J. Environ. Biol.* 22, 550-558.
- Koh, H.S., 1983. A study on age variation and secondary sexual dimorphism in morphometric characters of Korean rodents: I. An analysis on striped field mice, *Apodemus agrarius coreae* Thomas, from Cheongju. *Korean J. Zool.* 26, 125-134.
- Lin, L.K., Shiraiishi, S., 1992. Skull growth and variation in the formosan wood mouse, *Apodemus semotus*. *J. Fac. Agr. Kyushu University* 37, 51-69.
- Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K., Kuwagata, M., Imai, K., 1999. Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate. *Reprod. Toxicol.* 13, 303-311.
- Nagao, T., Kazuyoshi, W., Hideki, M., Shinsuke, Y., Hiroshi, O., 2001. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration; a two-generation study. *Reproductive Toxicology* 15, 293-315.
- Noda, T., Morita, S., Yamano, T., Shimizu, M., Nakamura, T., Saitoh, M., Yamada, A., 1991. Teratogenicity study of tri-n-butyltin acetate in rats by oral administration. *Toxicol. Lett.* 55, 109-115.
- Tan, B.L.L., Kassim, N.M., Mohd, M.A., 2003. Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenol A

- and nonylphenol. *Toxicol. Lett.* 143, 261-270.
- Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Chang, T.Y., Seely, J.C., Brine, D.R., Veselica, M.M., Fail, P.A., Joiner, R.L., Butala, J.H., Dimond, S.S., Shotsuka, R.N., Stropp, G., Veenstra, G.E., Waechter, J.M., Harris, L.R., 2001. Bisphenol A: Low Dose Effects-High Dose Effects - Three-generation reproductive toxicity study of bisphenol A (BPA) administered in the diet to CD (sprague-dawley) rats. *Reproductive Toxicology* 15, 587-599.
- Yoon, M.H., Jung, S.J., Oh, H.S., 1997. Population structure and reproductive pattern of the Korean striped field mouse, *Apodemus agrarius*. *Korean J. Biol. Sci.* 1, 53-61.
- Yu, W.J., Nam, S.Y., Kim, Y.C., Lee, B.J., Yun, Y.w., 2003. Effects of tributyltin chloride on the reproductive system in pubertal male rats. *J. Vet. Sci.* 4, 29-34.
- 윤명희, 2003. 2003년 한국환경생물학회 추계 학술발표대회 논문집, pp. 38-47.