

Phosphamidon을 투여한 닭 및 랫트 고환의 Apoptosis에 대한 연구

이차수¹, 정재용¹, 박상준¹, 정규식²

¹경북대학교 수의과대학, ²미국 국립보건원

Phosphamidon-induced apoptosis in the testis of chickens and rats

Cha-Soo Lee¹, Jae-Yong Chung¹, Sang-Joon Park¹, Kyu-Shik Jeong²

¹ College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

² National Institutes of Health, Maryland, U.S.A

Abstract. Phosphamidon(PMD) is organophosphate insecticide broadly using in agriculture. In order to study PMD toxicity in the testis, histopathological change and apoptosis were assessed following acute and chronic oral administration in rats and chickens. In acute studies, histopathological changes included necrosis and desquamation of spermatogenic cells, multinucleated giant cells in the lumen of seminiferous tubules, and necrotic cells and the giant cells in the epididymal lumen. Atrophy of seminiferous tubule was seen in the chronic exposure with low doses. The toxic effects of PMD in chronic exposure including clinical signs and histopathological changes were more pronounced in chickens than rats. Apoptosis assessment was performed by TUNEL method and Hoechst staining. TUNEL-positive apoptotic cells were found in spermatocytes of seminiferous tubules, testicular apoptosis was more prominent following acute exposure than control and chronic exposure. Above mentioned result noticed that PMD causes apoptotic death and effects directly the spermatocytogenesis.

Key words: phosphamidon, insecticide, apoptosis, TUNEL, spermatogenesis

서 론

농약으로 이용되는 살충제는 여러 해충 및 곤충의 박멸과 농작물을 보호하기 위해 광범위하게 사용되기 때문에 환경오염이 날로 심화되고 있다¹ 국내에서도 식량증산을 위해 농약사용량이 64년을 기준으로 1,115톤이었던 것이 74년에는 5.2배인 5,844톤으로, 84년에는 15배인 16,688톤으로 크게 증가되었다². 살충제로 사용되는 대부분의 농약은 인간을 비롯한 모든 동물에 독성을 가지

고 있고, 그중 유기인살충제는 다른 살충제에 비해 강한 독성을 가지며, 돌연변이를 유발하는 인자로 알려져 있다³.

유기인살충제인 Phosphamidon(PMD)은 화학명이 2-chloro-2-diethyl carbamoyl-methyl vinyl dimethyl phosphate로 농작물의 진딧물 및 솔잎혹파리의 방제에 주로 사용되고 있다⁴. 그리고 본 PMD가 동물에 계속 투여되면 cholinesterase를 차단하여 신경말단부에 acetylcholine이 축적됨으로써 신경조직과 그 소속 장기에 비가역적 변화를 일으킨다⁵. 임상소견으로는 오심, 구토, 설사, 발한, 배변, 배뇨, 축동, 호흡곤란 및 유연 등의

무스카린양 소견과 근섬유수축, 호흡마비 등의 니코틴양 증상, 그리고 두통, 언어장애, 착란, 혼수, 체온상승 등의 중추신경계 증상이 나타난다⁶.

Apoptosis는 계획된 세포사로 생존가능한 조직 중에서 더 이상 필요치 않은 세포만을 선택적으로 제거하는 과정이며⁷, 배자의 발육, 형태변화 및 정상조직에서의 세포수를 조절하는 중요한 작용의 하나라고 한다⁸. Apoptosis가 일어난 세포는 염색질의 분할로 핵막주변으로 이 파편이 응집하여 핵막주변성 염색질로 나타나며 세포질과 핵이 농축된 후 분절되어 apoptotic body를 형성하는 특징을 갖는다⁹. Apoptosis가 일어난 세포는 초기에 핵 변화가 뚜렷하며 이후에 세포질의 변화가 시작된다¹⁰.

Apoptosis는 장점막과 망막의 발육 등 정상발육시 또는 장음와상피나 고환의 정세포 등과 같이 정상성숙조직중에서 일어나는 세포사멸에서 볼 수 있다. 그리고 거세후 전립선의 위축, glucocorticoid투여에 의한 ACTH의 억제로 인한 부신피질의 위축과 췌관의 폐쇄에 따른 췌장의 위축 등과 같이 위축에 따른 세포사멸, 또한 방사선, 화학적 발암물질, 암치료용 화학물질 투여에 의한 세포사에서도 관찰이 된다. 한편 고열에 의한 세포손상, 독소 및 국소빈혈 등에 의한 세포손상시 나타나는 세포사멸과 악성종양에서의 자가세포사멸에서도 apoptosis가 관찰된다. 그 외에 calcium ionophore, topoisomerase inhibitor, alkylating agent, antimetabolite, 세포분열억제제 및 호르몬 길항제 등이 apoptosis 유발물질로 알려져 있다.¹¹⁻¹⁶

본 연구에서는 농약으로 사용되고 있고 강한 독성물질로 알려진 유기인제 농약인 PMD에 대한 생식기에 미치는 독성을 알아보기 위하여 phosphamidon을 투여한 랫트와 닭의 고환에 대해 병리조직학적으로 관찰하고 동시에 TdT-mediated dUTP-X nick end labelling(TUNEL)법¹⁷ 및 Hoechst 염색¹⁸을 이용한 apoptosis의 출현 정도를 관찰한 바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 모두 웅성으로 13주령 백색 육계

(Arbor Acres) 50수, 200g 내외의 Sprague-Dawley 랫트 50마리를 사용하였다. 실험닭은 경북 모양계장에서 건강한 육계를 구입하여 단독 양계용 케이지에 분리사육하였으며, 사료(대구축협, 육계용)와 음수를 자유섭식케하였다. 랫트는 생명공학연구소에서 사육번식중인 것을 분양받았으며 각 군을 polycarbonate cage에 분리사육하였고 랫트 전용고형사료(삼양사)와 음수를 자유섭식시켰다.

실험방법

급성중독군 : 랫트 및 육계를 각각 10마리씩 공시하였으며 그중 각각의 3마리에 대해서는 대조군으로 사용하였다. 나머지 랫트 7마리에 대해서는 5~25mg/kg, 닭 7수에 대해서는 6~12mg/kg의 Phosphamidon(PMD, 다이메크론, 경농)을 1마리에 대해서 각각 1회내지 12회까지 경구투여한 후 임상증상을 관찰하면서 공시하였고 폐사된 예는 즉시 부검하였다.

장기투여군 : 랫트와 육계 각 40마리를 실험군과 대조군으로 나누었으며 1군은 50ppm, 2군은 100ppm의 농도로 PMD를 자유섭식시켰고 대조군 10마리에 대해서는 일반음수를 급여하였다. PMD 급여후 지속적으로 임상증상과 이상유무를 관찰하였고 2, 4, 6, 8 및 12주에 각 군당 3마리씩을 부검하였다.

병리조직학적 관찰

PMD를 투여한 각군의 공시동물을 부검하여 육안적 관찰을 행한 후, 각종 장기를 10% 중성 formalin과 Bouin액에 각각 고정하였다. 고정한 조직은 통상방법에 따라 파라핀 포매과정을 거쳐 조직절편을 만들어 H-E염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

TUNEL법에 의한 apoptosis 검색¹⁷

3~4 μ m두께의 파라핀절편을 poly-L-lysine (Sigma)을 처리한 슬라이드글라스에 부착시킨 다음 ApopTag in situ apoptosis detection kit(Oncor, USA)를 사용하여 검색하였다. 탈파라핀한 후 조직을 0.05M PBS(pH 7.4)로 세척하여 proteinase K(20 μ g/ml, Sigma)로 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 처리한 후 증류수로 세척하였다. 검색 kit내에

포함된 equilibration buffer로 5~10분간 처리하고 이어서 TdT enzyme과 reaction buffer혼합액으로 37°C에서 1시간 처리하였다. 그리고 kit내에 함유된 working strength stop/wash buffer로 실온에서 10분간 처리하여 PBS로 3회 세척하였다. 그후 anti-digoxigenin peroxidase를 실온에서 30분간 반응시켜 PBS(pH 7.4)로 3회 세척하여 0.05% DAB와 0.033% H₂O₂혼합액(0.01M TB, pH 7.6)으로 발색시킨 후 methyl green으로 대비염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.'

Hoechst 염색에 의한 apoptosis 검색¹⁸

3~4 μ m두께의 파라핀절편을 poly-L-lysine (Sigma)을 처리한 슬라이드글라스에 부착시킨 다음 PBS로 희석시킨 0.1 μ g/ml bisbenzimidazole H33342(Hoechst, Calbiochem)로 실온에서 1시간 동안 염색한 후, 형광현미경(Epi-fl Optiphot-2, Nikon)으로 세포핵의 형태를 관찰하여 apoptosis를 검색하였다.

결 과

임상소견

급성중독군 : 랫트에서는 PMD를 25mg/kg의 용량으로 1회 투여한 4마리에서 심한 경련, 호흡곤란, 유연, 설사 및 운동실조 등의 증상을 나타내면서 5~35분만에 폐사하였고, 5~10mg/kg을 매일 1~2회 투여한 랫트 3마리에서는 경미한 증상을 나타내면서 25시간~12일만에 폐사하였다. 닭에서는 PMD를 12mg/kg으로 1회 혹은 6mg/kg을 매일 2~3회 투여한 닭 7수에서는 심한 경련, 호흡곤란, 유연, 설사, 운동실조 및 침울 등의 증상을 보이며 40분~3일만에 폐사하였으며, 특히 폐사직전에는 경련과 호흡곤란이 상당히 심하게 나타났었다.

장기투여군 : PMD를 50ppm 또는 100ppm의 농도로 투여한 랫트군에서는 대조군에 비해 큰 임상적 변화를 보이지는 않았으나, 음수섭취량이 감소하는 경향이였다. PMD를 50ppm 또는 100ppm의 농도로 투여한 닭에서는 다소의 침울 및 운동실조를 나타냈으며, 100ppm투여군에서는 50ppm투여군에 비해 임상증상이 더 심하고 사료 및 음수섭취량이 감소하는 경향이였다.

육안적 및 병리조직학적 소견

급성중독군 : 각 실험군에 대한 육안적 소견으로는 정도의 차이는 있었으나, 전반적으로 고환에서는 큰 병적 변화가 인정되지 않았다. 병리조직학적 소견에 있어서는 랫트에서 정세관의 정세포의 괴사와 탈락, 정세관의 위축, 다핵형거대세포의 출현과 부고환관강내에서의 괴사 및 탈락된 정세포와 다핵형거대세포가 관찰되었다(Fig 1, 2). 닭에서는 고환 정세포의 괴사가 다양하게 관찰되었다.

장기투여군 : PMD 50ppm과 100ppm을 각각 장기간 투여한 랫트실험군에서의 고환의 육안적 병변은 거의 관찰되지 않았으며, 병리조직학적 소견으로는 정세관내 다핵형거대세포의 출현과 괴사 및 변성된 정세포가 관찰되었다. 이들의 변화는 시간경과에 따라 다소 심하게 나타나는 경향이였다. 닭에서는 정세관 세포의 변성과 괴사가 현저하였으며 시간경과에 따라 고환의 위축이 심하게 나타났었다(Fig 3).

Apoptosis 소견

PMD를 투여한 랫트의 급성중독군과 장기투여군 그리고 닭의 급성중독군, 장기투여군에 대해 TUNEL법 및 Hoechst 염색으로 염색을 실시하여 표 1에 표시하였다. 모든 실험군의 고환조직에서 apoptotic cell이 관찰되었으며 주로 정모세포에서 출현하였다. 급성군에서는 대조군 및 장기투여군에 비하여 TUNEL 양성세포가 다수 관찰되었으며, 장기투여군에서는 대조군에 비하여 양성세포가 다소 많이 출현하는 경향이였으나 현저한 차이는 인정되지 않았다. 특히 랫트에서 PMD를 kg당10mg으로 2회투여한 후 25시간만에 폐사한 급성중독군에서 apoptotic cell이 다수 관찰되었고(Fig. 4), 닭 급성중독군에서는 랫트 급성군에 비하여 정세관 당 apoptotic cell이 더 많이 관찰되었다(Fig. 5). 그리고 Hoechst 염색에서 파편화 및 농축되어 있는 apoptotic body를 쉽게 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

고 찰

본 실험에 사용된 PMD는 실험동물에서 반수

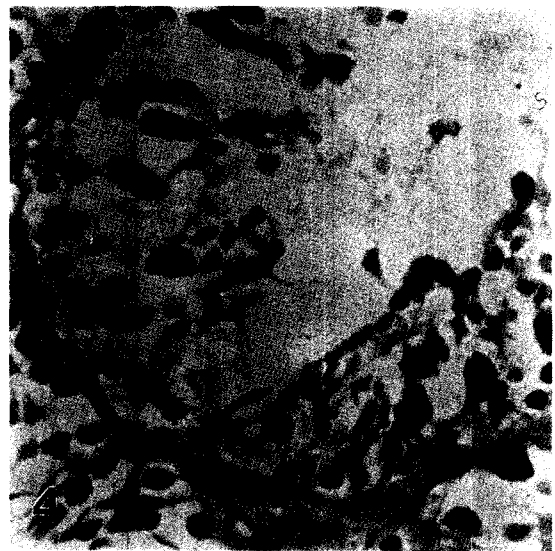
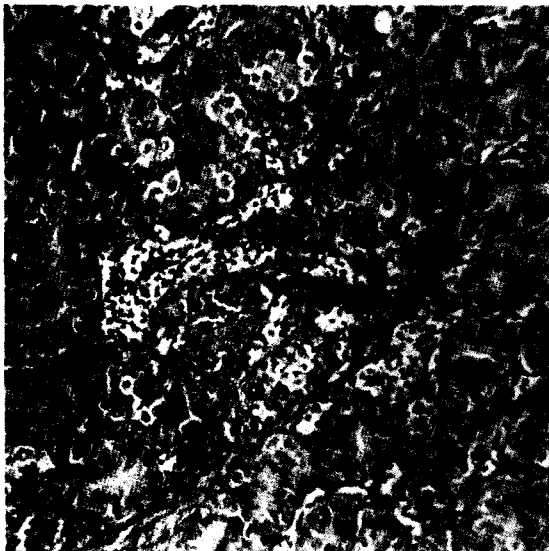
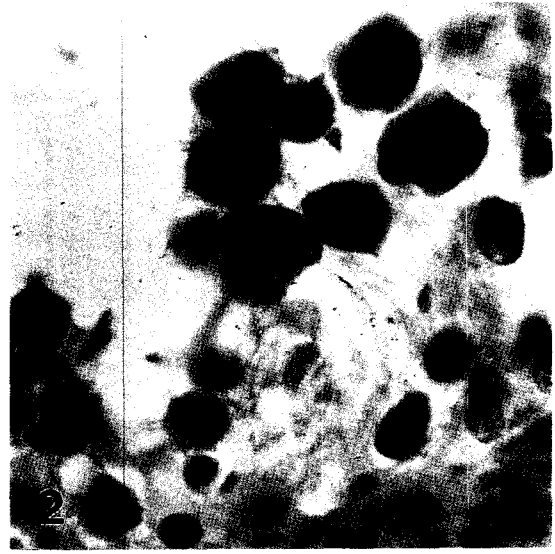
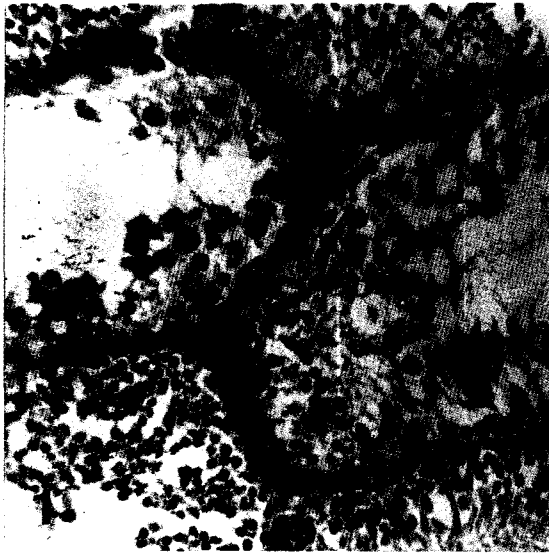


Table 1. Appearances of apoptotic cells by TUNEL method in the testis of rats and chickens following PMD administration

Group	Administration doses	Degree of appearance	Remarks
Rat	25mg/kg	+	Died (5mins)
	"	++	" (17-35mins)
	10mg/kg/12hrs	+++	" (25hrs)
	5mg/kg/day	++	" (4-12days)
chronic	100ppm	+	Killed (2-12wks)
	50ppm	+	" (2-12wks)
Chicken	12mg/kg	++	Died (40mins)
	6mg/kg/3~4hrs	++	" (26-30hrs)
	100ppm	+	Killed (2-12wks)
	50ppm	+	" (2-12wks)

+ ; a few, ++ ; moderate, +++ ; numerous

치사량이 22mg/kg이고⁴, 이것을 기준으로 랫트에서는 5~25mg/kg, 닭에서는 6~12mg/kg으로 1회 혹은 수회 경구투여한 결과, 랫트에서는 고환 정세포의 탈락과 괴사 및 다핵형거대세포가 관찰되었고, 닭에서는 고환 정세포의 괴사가 관찰되었다. 장기투여군에서는 랫트에서 정세관내 다핵형거대세포의 출현, 정세포의 괴사 및 변성이 관찰되었고, 닭에서는 고환 정세포의 변성과 괴사 및 정세관의 위축과 섬유화가 현저하였다.

유기인제 중독의 독성병리학적 관찰에 대해 Datta와 Dikshith¹⁹는 유기인제 중 ethyl parathion 단독 또는 methyl parathion과 DDT를 혼합한 제제를 랫트 복강내 계속 투여한 바, 고환에서의 정세포의 변성, 다핵형거대세포의 출현 및 간질의 증식 등을 관찰하였다. 그리고 다량의 1회 노출시보다 소량으로 반복노출시 더 심한 병리조직학적 병변을 유발한다고 하였다. Saxena와 Sarin²⁰은 유기인제인 Thimat를 0.6mg/kg의 용량

- Fig.1.** Acute case. Multinucleated giant cells and necrotic cells are observed in the seminiferous tubules of rat administered with 25mg/kg of PMD. H-E. $\times 67$.
- Fig.2.** High magnification of Fig. 1. It shows multinucleated giant cells within seminiferous tubule. H-E. $\times 268$.
- Fig.3.** Chronic case. Atrophy of seminiferous tubules and fibrosis are observed in the testis of chicken administered with 50ppm of PMD for 4 weeks. H-E. $\times 67$.
- Fig.4.** Acute case. Testis of rat administered with 10mg/kg/12hrs, two times of PMD. Apoptotic cells in seminiferous tubule are stained with dark-brown. TUNEL method, Methyl green counterstain, $\times 100$.
- Fig.5.** Acute case. Testis of chicken administered with 12mg/kg of PMD. Brownish cells are showing apoptotic cells. TUNEL method, Methyl green counterstain, $\times 50$.
- Fig.6.** Acute case. Testis of rat administered with 25mg/kg of PMD. Hoechst staining of nuclei(arrows) shows fragmentation and compaction of chromatin which are consistent with apoptosis. Hoechst staining, $\times 200$.

으로 마우스에 복강주사한 결과 고환에서의 간질의 증가, 정세포의 핵 농축, 정세관 상피층의 감소 및 Leydig cell의 위축이 관찰되었다고 보고하였다. 이들의 성적과 비교해 볼 때 대체적으로 유사한 조직학적 변화를 나타내었으며, 장기투여군의 랫트와 닭의 경우에는 닭이 랫트보다 더 심한 임상증상과 조직학적 변화를 나타내었고 따라서 닭이 PMD에 더 민감한 것으로 사료되었다.

Boehme과 Lenardo²¹는 유기인제제 등의 독성 물질 중독시 정자형성세포에서 DNA합성기인 S-phase에 영향을 미쳐 염색질의 농축과 Ca의존성 endonuclease 활성에 의해서 염색질의 분절을 일으킴으로써 apoptosis를 유발한다고 보고하였다. 한편 화학물질에 의한 정소독성의 발현은 1) cyclophosphamide²²나 nitrobenzene²³과 같이 정세관상피를 직접 장애하는 것, 2) ethane dimethanesulfonate²⁴나 estrogen과 같은 호르몬을 통해 간접적으로 정자형성을 장애하는 것, 3) α -chlorohydrin²⁵과 같은 정자형성이 완료된 후 정자를 장애하는 것, 4) cadmium²⁶과 같은 순환 장애를 통해서 실질세포를 장애하는 것 등으로 분류하고 있다. 본 실험에서는 대조군에 비해 급성중독군에서 더 많은 TUNEL 양성세포가 정모세포에서 주로 관찰되었으며 장기투여군에서는 TUNEL 양성세포가 대조군과 크게 차이가 없었다. 이러한 소견은 직접적인 작용으로 정모세포의 S-phase에 손상을 주어 apoptosis를 유도하고 한편 이 약물에 의한 직접적인 장애로 괴사를 일으켜 고환의 위축을 초래하는 것으로 사료되었다.

이상의 PMD투여에 의한 고환의 병리조직학적 변화 및 apoptosis의 소견은 PMD 환경오염에 의한 생식세포에 미치는 영향에 관한 기초자료로 중요한 의의를 가질 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 경북대학교 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Matsumura MM, Margulius SP, et al. Environmental Toxicology of Pesticides, p.30. Academic Press, New York, 1972.
2. 정후섭. 식량증산에 있어서 병충해방제의 중요성. 농약과 식물보호. 1:86-93, 1986.
3. Murphy SD. Pesticides. In: Toxicology, ed. Doull J, Klasien CD, et al., pp.357-408. Macmillan, New York, 1980.
4. 농약공업협회. 농약사용지침서. p.439, 1996.
5. Johnson MK. The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters. : Biochemical studies and toxicological application. In: Reviews in biochemical toxicology, vol. 4, ed. Hodgson E, Bend JR, et al., pp.141-212. New York, 1982.
6. Gage JC. The significance of blood cholinesterase activity measurements. Residue Rev 18:159-173, 1967.
7. Pesce M, Farrace MG, et al. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). Development 11:1089-1094, 1993.
8. Arends MJA and Wyllie AH. Apoptosis: mechanism and role in pathology. Int Rev Exp Path 32:223-254, 1991.
9. Wyllie AH, Morris RG, et al. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin and dependence on macromolecular synthesis. J Pathol 142:67-77, 1984.
10. Wyllie AH, Kerr JFR, et al. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 68:251-306, 1980.
11. Barry MA, Behneke CA, et al. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. Biochem Pharmacol 40:2353-2362, 1990.
12. Singh S. Apoptotic cell death and cancer therapy. Drugs News Views 2:55-59, 1994.
13. Singh S and Anand S. Cell death by apoptosis. Indian J Exp Biol 32:843-847, 1994.
14. Stanley A, Averal HI, et al. Vincristine can cause apoptotic death of male germinal

- cells. *Biomedical Letters* 51:161-168, 1995.
15. Averal HI, Stanley A, et al. Apoptotic death of male germinal line cells of rat caused by vincristine: light and electron microscopic study. *Biomedical letters* 52:171-180, 1996.
 16. Chateau MT, Ginestier C, et al. Dimethyl sulfoxide-induced apoptosis in the human leukemic U937 cells. *Ann Cell Pathol* 10:75-84, 1996.
 17. Wijsman JH, Jonker RR, et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections in situ end labelling of fragment DNA. *J Histochem Cytochem* 41:7-12, 1993.
 18. Dubray B, Breton C, et al. In vitro radiation-induced apoptosis and early response to low-dose radiotherapy in non-Hodgkin's lymphomas. *Radiother Oncol* 46(2):185-191, 1998.
 19. Datta KK and Dikshith TSS. Histopathologic changes in the testes and liver of rats repeatedly exposed to pesticides. *Exp Pathol* 8:363-370, 1973.
 20. Saxena AK and Sarin K. Histopathological and biochemical changes in the liver and testes of Desert Gerbil, after repeated exposures of thimet (phorate). *Toxicology* 18:133-144, 1980.
 21. Boehme SA and Lenardo MJ. Propriocidal apoptosis of mature T-lymphocytes occurs at S-phase of the cell. *Eur J Immunol* 23:1552-1560, 1993.
 22. Matsui H, Mitsumori K, et al. Morphological evaluation of testicular toxicity in rats induced by cyclophosphamide using quantitative morphometry of spermatogenic cycle stages. *J Toxicol Sci* 20:407-414, 1995.
 23. Mitsumori K, Kurokawa Y, et al. Confirmation study, using nitrobenzene, of the combined repeat dose reproductive/developmental toxicity test protocol proposed by the OECD. *J Toxicol Sci* 19:141-149, 1994.
 24. Yamada T, Inoue T, et al. Effects of short-term administration of α -chlorohydrin on reproductive toxicity parameters in male Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Sci* 20:195-205, 1995.
 25. Takahashi M and Matsui H. Mechanisms of testicular toxicity. *J toxicol Pathol* 6:161-174, 1993.