韓國受精卵移植學會誌(2004) 第 19 卷 第2 號
Korean J. Emb. Trans. (2004) Vol. 19, No. 2, pp. 75~80

Nicotine이 생쥐 고환에 미치는 세포독성효과

김충희 · 고필옥[1] · 원청길[1] · 김종수[1] · 강정부[1] · 강명곤[2] · 김태숙 · 갈경영 · 정장용 · 박희성†
진주산업대학교 동물생명과학과 · 동물생명산업지역협력연구센터

A Mophological Study on the Cytotoxic Effect of Nicotine in Mice Testis

C. H. Kim, P. O. Koh[1], C. K. Won[1], J. S. Kim[1], C. B. Kang[1], M. G. Kang[2], T. S. Kim, G. Y. Gal, J. Y. Chung and H. S. Park†
Dept. of Animal Science & Biotechnology & RAIRC, Jinju National University, Jinju 150

SUMMARY

This study was performed to examine the cytotoxic effects of nicotine on the seminiferous tubules and Leydig cells in mice testis. A different amount of nicotine (2~15 mg/kg, for two weeks, one dose of 100 mg/kg) were administered to four-month male mice, and then the optical microscopic findings of its effect on testis of the mice are as follows:

1. The group that 2 mg/kg of nicotine was administered showed normal findings that nucleus and cytoplasm of Leydig cells are distinct, while the other group that 5 mg/kg of nicotine was given to showed nucleus and cytoplasm are swollen and thickened a little, and slightly dyed.
2. The group that 10 mg/kg of nicotine was given had irregular arrangement of spermatogenesis inside seminiferous tubules so it was impossible to distinguish phages of seminiferous tubules. It was also impossible to observe cells due to fusion of their nucleuses, and distinct cytoplasm.
3. The group that 15 mg/kg of nicotine was administered showed destruction of nucleuses and cytoplasm of spermatocytes and sperms and a fill of fibered connective tissues so that it is impossible to observe rumens of seminiferous tubules.

(Key word : Leydig cells, testis, spermatocytes, nicotine, seminiferous tubule, mice)

서 론

Nicotine은 강한 독성으로 인하여 체내 축적이 되면 자율신경계와 중추신경계를 비롯한 뇌, 폐, 심장, 간 등 여러 장기에 부작용을 초래한다(Riesenfeld, 1985; Cohen, 1963). 특히 nicotine은 adrenalin의 분비를 촉진시켜 혈관을 수축시킴으로 혈압을 상승시키며, 항 이뇨호르몬의 분비를 촉진하

*본 연구는 한국과학재단 지정 진주산업대학교 동물생명산업지역협력연구센터(과제번호: R12-2002-01004-0)의 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

[1]경상대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)
[2]건국대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Konkuk University)
† Correspondence : E-mail : hspark@jinju.ac.kr

여 고혈압을 악화시키는 원인이 되기도 한다(Doll 등, 1966). Nicotine에 대한 최근의 연구발표에 의하면, 체내의 monoamine oxidase B (MAO B)의 작용을 억제하여 dopamine이 파괴되지 않고 지속적으로 작용하도록 도움으로 정신적 쾌감을 연장하여 중독증세를 일으키지만, 이러한 약리적 작용으로 파킨스병이나 알츠하이머 질환의 예방약으로 사용될 수 있다고 발표되기도 하는 등 긍정적인 부분도 소개되었다(Badanich 등, 2004; Brody 등, 2004). 그러나 nicotine의 독성에 관한 연구는 오랫동안 생화학, 생리학, 약리학 그리고 분자생물학적 측면에서 많이 이루어져 왔다. 이러한 연구에 의하면 nicotine은 음부로 가는 혈류를 감소시켜 발기의 기능장애와 더불어 정자수의 감소를 초래한다는 보고가 있어 담배를 피우는 사람들에게 정력감소 및 불임의 원인이 될 수 있다는 가능성을 제시하고 있다(Brinster, 1972). 그렇지만 지금까지 nicotine의 독성효과로 발표된 보고는 폐암과 관련된 부분과 정자수의 감소에 대하여 많은 연구가 수행되었으나 고환에 미치는 조직학적 소견에 대해서는 연구가 전혀 없는 실정이다.

지금까지의 보고에 따르면 nicotine은 정자의 운동성 감소, 사멸 및 기형의 원인이 되고, 이러한 결과는 고환의 생리적 또는 기능적 변화가 선행되는 것으로 생각된다(Aydos 등, 2001; Yasuhisa 등, 1998). 고환에서 정세관 상피는 정조세포, 정모세포, 정자세포로 구성되어 있으며 이들이 변화과정을 거쳐 정조세포로부터 정자를 형성한다. 생쥐의 이와 같은 정자형성단계는 정세관을 종축으로 잘랐을 때 정세관을 구성하는 정세포의 종류에 따라 16단계로 구분하며 이를 Ⅰ ~ ⅩⅥ까지 표기한다(Rodman, 1979). 따라서 이들의 상태를 조사함으로 고환에 미치는 독성효과를 평가할 뿐만 아니라 정세관 주위에 존재하는 Leydig 세포를 관찰함으로 생쥐의 고환에 미치는 영향을 평가할 수 있다. 그리하여 nicotine이 고환에 미치는 조직학적 소견을 관찰하고 정자의 형성단계에 미치는 독성평가를 정확히 이해하고자 생쥐에 급성, 아급성 또는 만성 수준의 nicotine을 투여하여 고환에 미치는 세포독성효과에 대하여 조직학적 수준에서 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

생후 4개월 된 ICR 계통의 수컷 생쥐(40 g)를 효창사이언스로부터 공급받아 사용하였으며, 실험동물의 사육 온도는 23±1℃, 상대습도는 60±10%, 조도는 150~300 Lux에서 12시간 조명하는 조건에서 각 군당 3두가 되게 하였다. 사료는 고형사료(제일사료주식회사)를 이용하였으며, 음수는 수돗물을 100℃로 가열멸균 후 상온으로 식힌 다음 자유섭취토록 하였다.

2. 실험방법

담배 한 개피의 nicotine 함량은 6~8 mg이며, 이 가운데 약 90%가 폐를 통하여 체내에 흡수되므로 성인이 하루 20개피(한갑) 정도를 피운다고 가정하면, 1.5~2 mg/kg/day의 nicotine 용량이 체내에 투여되는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 nicotine (St. Louis, MO, USA)의 만성 또는 아급성독성 투여용량 실험을 위하여 2, 5, 10, 15 mg의 5군으로 나누어 1일 1회 2주간 피하주사하였으며, 급성독성농도 투여군으로 100 mg을 1회 피하주사하였다. 각 군의 투여 용량은 0.1ml/10 g되게 하였으며, 대조군은 동량의 식염수를 투여하였다. 각 군은 nicotine 마지막 처치 후, 24시간 뒤 경추탈구법으로 치사시킨 다음 광학현미경상의 소견 관찰을 위하여 즉시 고환을 채취하여 10% formalin 용액에 고정한 후, 통상적인 조직표본 제작과정에 따라 Hematoxylin and Eosin 염색을 하였다.

결 과

고환의 육안적 소견은 nicotine 2 mg/kg 투여군과 5 mg/kg 투여군에서는 고환의 피막이 대조군과 비슷한 탄력성을 유지하고 있었으나, 10 mg/kg 투여군과 15 mg/kg 투여군에서는 고환 피막의 탄력성이 현저하게 감소되어 있었다. 특히 100 mg/kg 투여군에서는 단 1회의 투여에도 불구하고 탄력성이 매우 소실되어 쉽게 함몰되었으며 고환의 색상도 대조군보다 다소 어둡게 나타났다.

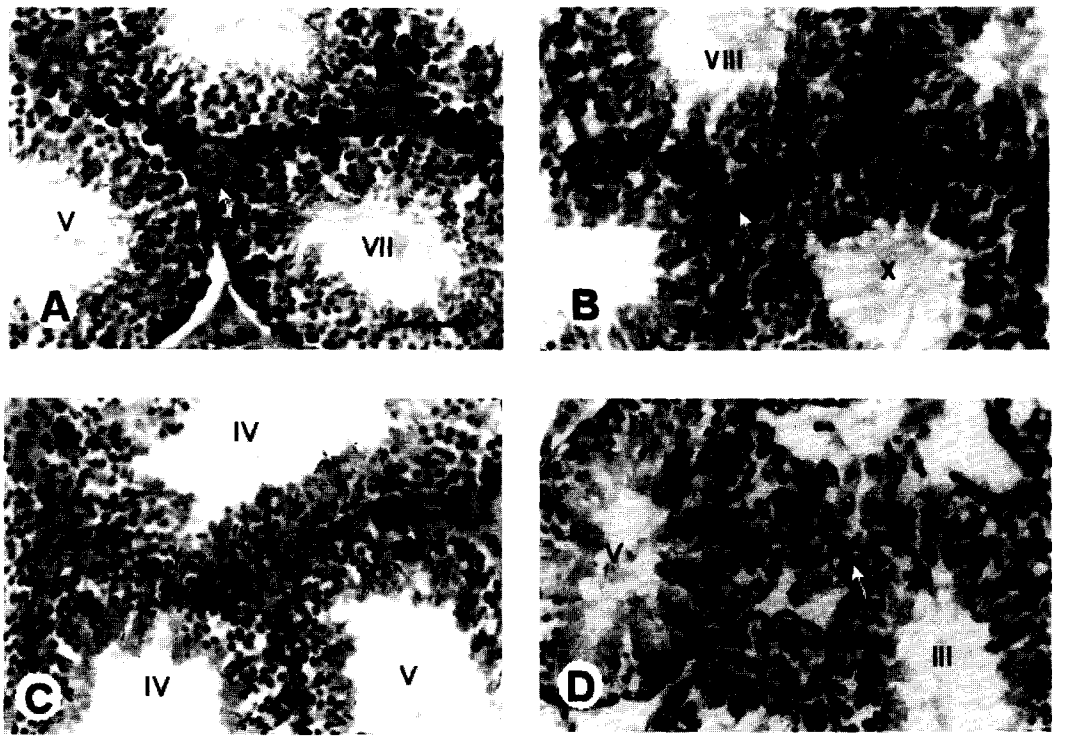

Fig. 1. Photomicrograph showing testis of mice in untreated (A and B), 2 mg/kg nicotine treated (C), and 5 mg/kg nicotine treated (D) group. All figures were stained hematoxylin and eosin. Numbers indicated the stage of seminiferous tubules and arrows indicated Leydig's cells. The bar = 20 ㎛.

Hematoxylin과 Eosin 염색을 통한 현미경적 세포의 관찰 소견은 대조군에서는 정상적인 고환조직의 소견으로 Ⅰ~ⅩⅥ단계의 다양한 단계의 정세관의 구조를 모두 관찰할 수 있었고 정세관내의 일차 정모세포, 이차 정모세포, 정자세포들의 세포질과 핵이 명확하게 염색되어 각각의 세포들을 구분할 수 있었으며, 정자의 형성과 성숙과정을 확인할 수 있었다(Fig. 1A and 1B). 또한, 정세관 주위의 Leydig 세포 역시 핵과 세포질의 경계가 명확하게 관찰되었다(Fig. 1A and 1B). Nicotine 2 mg/kg 투여군에서는 대조군과 비슷한 정상적인 고환의 정세관 세포의 모습과 정자의 형성과정이 관찰되었고, 정세관 주위의 Leydig 세포도 핵과 세포질이 뚜렷한 정상적인 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 1C, arrow marker). 그러나, 5 mg/kg 투여군에서는 다양한 단계의 정세관이 관찰되며, 정세관내의 모습이 다소 정상적인 소견으로 관찰되나, 대조군에 비해 단계의 구분이 명확하지 않은 정세관이 관찰되기 시작하였으며, 두드러진 변화는 정세관 주위의 Leydig 세포가 대조군의 Leydig 세포들보다 핵과 세포질이 훨씬 비후되어 있고, 핵의 염색성도 다소 약해져 있으며, Leydig 세포들이 정세관으로부터 떨어진 상태로 관찰되었다(Fig. 1D, arrow marker). 특히, nicotine 10 mg/kg 투여군에서 몇몇 정세관에서는 정세관 발달단계의 구분이 가능하나, 대부분의 정세관에서는 정세관내의 정자 발생 세포인 1차 정모세포와 2차 정모세포, 정자세포의 배열이 규칙적으로 배열되지 않고, 혼합하여 존재하는 모습으로 나타나 정세관의 단계를 구분할 수 없었다(Fig. 2A). 또한, 정세관 주위의 조직인 Leydig 세포와 다른 여러 결합조직 세포들의 핵들이 거의 융해되어 관찰되지 않고, 세포질만 존재하

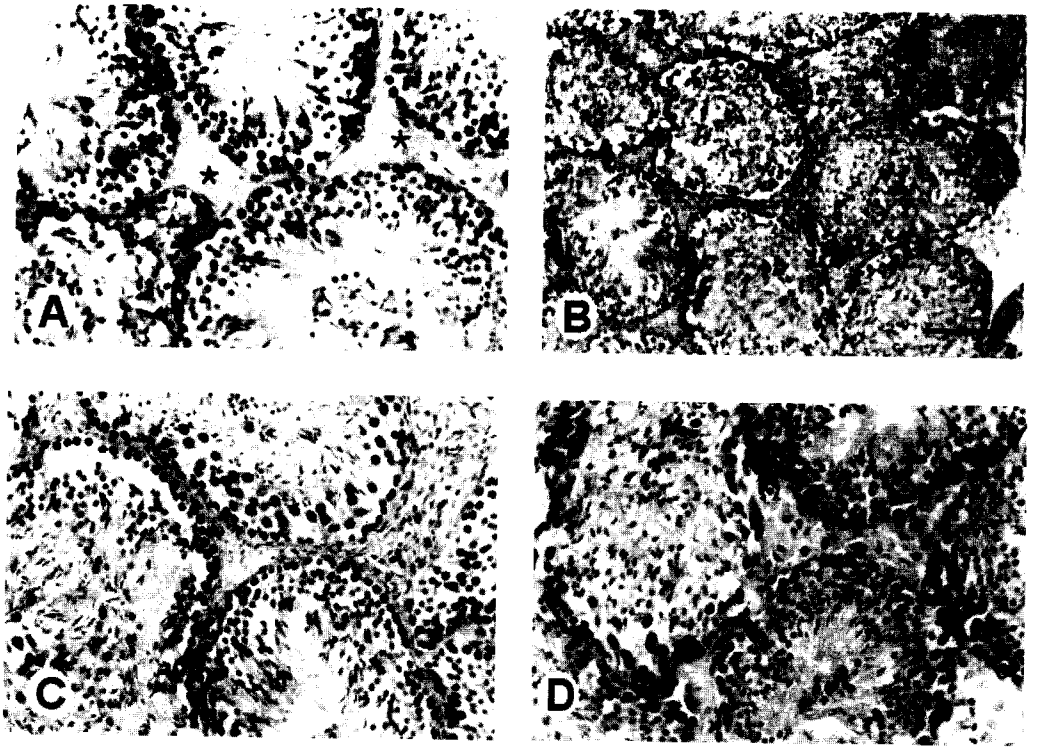

Fig. 2. Photomicrograph of mice testis in 10 mg/kg nicotine treated (A) and 15 mg/kg nicotine treated (B, C, and D) group. All figures were stained hematoxylin and eosin. Asterisk indicated interstitial cell region. Scale bar = 20 ㎛ (A), 50 ㎛ (B).

는 상태이며, 세포질 역시 명확하지 않아 구분을 할 수 없었다(Fig. 2A, asterisk). Nicotine 15 mg/kg을 투여한 실험군의 고환에서는 각 정세관의 발달 단계를 구분할 수 없을 정도로, 정세관내의 정모세포와 정자세포의 핵과 세포질이 파괴되어 있었고, 정세관의 내강이 관찰되지 않을 정도로 섬유화된 결합조직이 채워져 있었다(Fig. 2B). 또한, 정세관 주위의 조직들도 정상적인 Leydig 세포의 형태를 갖추지 못하고, 섬유화된 결합조직으로 이루어져 있었다(Fig. 2C, 2D). 급성독성 투여용량인 100 mg/kg 투여군에서는 대부분의 정세관이 파괴되어 정상적인 정세관의 배열을 관찰할 수 없었고, 이들 세포의 구조, 역시 관찰하기 어려웠다.

고 찰

Nicotine은 담배를 피울 때 폐를 통하여 몸에 축적되는 담황색의 물질로 독성이 강하여 폐암을 유발하며(Dietrich 등, 1997), 중추 및 자율신경계의 nicotine 수용체를 자극하여 acetylcholine이 비정상적으로 신경조직에 축적됨으로써 구토나 경련, 호흡정지 등의 증후를 유발하고(Armitage 등, 1975) 태아의 성장을 억제함으로 미숙아, 저 체중아 그리고 정신발육 지연과 같은 장애를 일으키기도 한다. 포유류의 초기배아에 대한 nicotine의 독성효과는 쥐에서 세포분열 억제와 투명대 소실 지연 및 착상 지연과 같은 저해효과를 초래하기도 한다(Saha 등, 2000). 또한 nicotine 0.4 mg/100 g을 15일간 투여하였을 때 정자수의 감소와 운동성의 저하를 나타내었고(Reddy 등, 1998), 30일간 투여하였을 때 고환의 위축과 정자수의 감소 그리고 번식률의 저하를 나타내었다고 한다 (Ramesh 등, 1998). 본 연구에서는 만성상태를 유발하는 nicotine 2 mg/kg 투여군에서는 대조군과 차이를 나타내지 않았으나

5 mg/kg 투여군에서는 Leydig 세포의 핵과 세포질이 다소 비후되었으며 염색 정도가 약하게 나타났다. 이 결과는 Kamaldeep 등 (2002)이 쥐에 nicotine 2 mg/kg을 30일간 투여하여 나타난 고환위축과 정자수의 감소와 비교하여 볼 때 2주간의 짧은 투여기간으로 인해 대조군과 큰 차이를 나타내지 않은 것으로 생각된다. 그러나 농도를 증가시킨 10 mg/kg 투여군에서는 육안적으로 고환피막의 탄력성저하 및 색상의 변화를 관찰할 수 있었고, 광학현미경적 소견으로는 정세포의 배열이 불규칙할 뿐만 아니라 정세관의 각 단계별 발달정도를 구분할 수 없었으며, Leydig 세포도 핵이 융해되어 관찰되지 않았고 세포질 역시 불명확한 소견을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 정세포에서 정상적인 정자의 형성이 이루어지지 않을 것으로 보이며, 만일 이미 형성된 정자에도 수의 감소 및 운동성 감소 등이 초래될 것으로 생각된다. Saha 등 (2000)은 쥐에 nicotine 6 mg/kg을 2주간 투여하였을 때 고환의 위축, 정자수의 감소, 정자의 운동성의 감소를 나타내었다고 한다. 이것은 본 실험의 조직학적 소견에서 예상할 수 있는 정자의 상태와 거의 일치한다. 또한 본 실험에서 15 mg/kg 투여군에서는 정자세포의 파괴를 나타내었는데, 이는 결과를 나타내지 않았지만 급성중독 및 치사를 나타낼 수 있는 농도인 nicotine 100 mg/kg을 1회 투여한 군과 거의 같은 결과를 나타내었다. 이러한 상태의 정세관은 정상적인 기능이 완전 소멸되어 정자형성을 할 수 없으며, 형성된 정자라 할지라도 번식능력은 상실될 것으로 생각된다.

수컷생쥐 Leydig 세포의 변성은 Carr(1962)에 의해 처음 보고되었으며 이는 정세관 주변의 세포들이 변성에 의한 공포화 현상을 나타내는 것이라고 하였다. 이러한 현상은 본 실험의 결과와 일치함을 알 수 있다. 화학물질의 독성은 특정 정세포뿐만 아니라 정자세포발생에 기초한 각 단계에 따라 다르게 나타난다. Son 등(1997)은 고용량의 2-bromopropane은 Ⅸ ~ ⅩⅣ 단계의 정세관에서 정세포의 광범위한 변성을 유발한다고 하였으며, Hew 등(1993)은 카드뮴이 Ⅶ 단계의 정세관에 작용하여 독성을 일으킨다고 하였다. 따라서 각 단계에 따른 정세관의 형태학적 변화를 관찰하는 것은 독성을 평가하는 데 매우 중요하다. 본 연구에서는 15 mg/kg 투여군의 모든 정세관에서 핵과 세포질이 파괴되고 섬유화된 결합조직이 채워짐으로 단계별 발달과정을 구분할 수 없었다. 이러한 결과는 nicotine은 다른 독성물질과는 달리 모든 단계의 정세관에 나쁜 영향을 미치는 것으로 생각된다.

이상에서와 같이 포유류의 정세포가 nicotine과 같은 고농도의 독성물질에 노출될 때 생리적 및 기능적으로 악영향을 받아 기질적 변화가 초래되어 독성작용에 의해 정세관의 발달과정에 나쁜 영향을 미치어 Leydig 세포의 변성을 초래하며, 결국 정자의 형성 저해, 번식력의 저하, 고환의 위축을 초래하는 것으로 나타났다.

적 요

Nicotine(2 ~ 15 mg/kg 2주간, 100 mg/kg 1회 투여)을 생후 4개월령 수컷 생쥐에 투여한 후, 고환에 미치는 광학현미경적 소견은 다음과 같다.

1. Nicotine 2 mg/kg 투여군에서는 정세관과 정세관 주위의 Leydig 세포도 핵과 세포질이 뚜렷한 정상적인 소견을 나타내었으나, 5 mg/kg 투여군에서는 Leydig 세포의 핵과 세포질이 다소 비후되었으며 염색정도가 약하였다.
2. 10 mg/kg 투여군은 대부분 정세관내의 정자발생의 배열이 불규칙적으로 존재하여, 정세관의 단계를 구분할 수 없었고, Leydig 세포도 핵이 융해되어 관찰되지 않았고, 세포질 역시 불명확하게 나타났다.
3. 15 mg/kg 투여군에서는 정모세포 및 정자세포의 핵과 세포질이 파괴되었으며, 정세관의 내강이 관찰되지 않을 정도로 섬유화된 결합조직이 채워져 있었다.

참고문헌

Armitage AK, Dollery CT, George CF, Houseman TN, Lewis PJ and Turner DM. 1975. Absorption and metabolism of nicotine from cigarettes. J. British Med., 4:313.

Aydos K, Guven MC, Can B and Ergun A. 2001. Nicotine toxicity to the ultrastructure of the testis in rats. B.J.U. Int., 88:622-626.

Badanich KA and Kirsteina CL. 2004. Nicotine administration significantly alters accur dopamine in the adult not in the adolescent rat. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1021:410-417.

Brinster R. 1972. Reproductie Biology. Excerpta Medica, Amsterdam. 748.

Brody AL, Olmstead RE, London ED, Farahi J and Meyer J. 2004. Smoking-induced ventral striatum dopamine release.

Carr I and Carr J. 1962. Membranous whorls in the testicular interstitial cell. Anat. Res., 144:143-147.

Cohen JA. 1963. The active site of acetylcholinesterase and related esterase and its reactivity towards substrates and inhibitors. Springer-Verlag, Berlin, 5:146.

Dietrich H, Mirjana VD and Ilse H. 1997. The changing cigarette. Preventive medicine, 26: 427-434.

Doll R and Hill AB. 1966. In epidemiological study cancer and other chronic disease, national cancer institute monograph. Bethesda Maryland NIH., 19:205.

Hew KW and Ericson WA. 1993. A single low cadmium dose causes failure of spermiation in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol., 121:15-21.

Kamaldeep D and Anupam S. 2002. Prevention of chronic alcohol and nicotine-induced azospermia, sterility and decreased libido, by a novel tri-substituted benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linneaus in healthy male rats. Life Sciences, 71:3059-3069.

Ramesh LL, Srinvasreddy P, Somanathreddy P and Saraswati BP. 1998. Nicotine induced inhibition of the activities of accessory reproductive ducts in male rats. J. Ethnopharmacology, 60:215-221.

Reddy S, Londonkar R, Ravindra RS and Patil SB. 1998. Testicular changes due to graded doses of nicotine in all mice. Indian. J. Physiol. Pharmacol., 42:276-280.

Riesenfeld A. 1985. Growth depressing effects of alcohol and nicotine in two strains of rats. Acta. Anat., 122:18.

Rodman TC, Lidtwin SD, Romani M and Vidali G. 1979. Life history of mouse sperm protein. Intratesticular stages. J. Cell Biol., 80:605-620.

Saha L, Bhargava VK, Garg SK and Majumdar S. 2000. Effect of nimodipine on male reproductive functions in rats. Indian J. Physiol. Pharmacol., 44:449-455.

Son HY and Cho SW. 1997. Testicular lesion in the Sprague-Dawley rats treated with high dose of 2-bromopropane. Kor. J. Vet. Pathol., 1:97-105.

Yasuhisa Y, Eiko I, Nikolaos S and Ikuo M. 1998. Effects of smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. Urol. Res., 26: 45-48.

(접수일: 2004. 3. 2/ 채택일: 2004. 6. 4)