

랫드와 HeLaTRE Cell에서의 Alachlor에 의한 갑상선 호르몬성 영향 연구

유아선* · 정미혜 · 박경훈 · 김병석 · 김진배 · 권오경

농업과학기술원 농산물안전성부 유해물질과

(2008년 8월 23일 접수, 2008년 9월 2일 수리)

Thyroid Hormone-like Activity of Alachlor as a Endocrine Disruptor in Rats and HeLaTRE Cell Culture

Are-Sun You*, Mihye Jeong, Kyung-Hun Park, Byung-Seok Kim, Jin-Bae Kim and Oh-Kyung Kwon

Division of Hazardous Substances, Department of Crop Life Safety, National Institute of Agricultural Science & Technology

Abstract

This study was designed to investigate the suitability of the pubertal assay and the enhanced TG 407 as methods for detection of endocrine-mediated effects, especially thyroid function. Male and female Sprague-Dawley rats were gavaged daily with 0, 12.5, 25, 50 mg/kg alachlor in corn oil during 30 days. The effects of alachlor on thyroid gland, the genital organs and thyroid hormone were measured in male and female rats. Dose of alachlor 25, 50 mg/kg/day increased relative weight of testis and thyroid gland in exposed male rats and decreased relative weight of vagina in exposed female rats. Relative weight of thyroid gland was decreased in alachlor 25 mg/kg/day exposed female rats. Dose of alachlor 25, 50 mg/kg/day decreased plasma T4 and testosterone in female rats. Another purpose of this study was to investigate the effects of endocrine disruptors as like thyroid hormone in vitro. Luciferase activity was measured to detect reaction of test chemicals and thyroid hormone response elements in HeLaTRE cell. Dose of alachlor 1 nM-1000 nM increased 100-134% luciferase activity compared with control.

Key words Alachlor, Thyroid hormone, Endocrine disruptor

서론

chloroacetanilide계 제초제인 alachlor는 가장 많이 사용되고 있는 농약 중의 하나로서(Tessier and Clark, 1998) 벼와 잡초의 어린 눈에 흡수되어 선택적 기능을 나타낸다(Galassie 등, 1996). alachlor는 일부 시험동물에서 간독성, 안구의 포도막 퇴화, 종양 등을 유발시킨다는 보고가 있으며(Scottie 등, 1999, Osano 등, 2002) 미국환경보호청(US/EPA)에서는 alachlor가 사람에게 발암가능 물질로 분류되어 있는데 이는 랫드를 이용한 만성노출시험에서 nasal tumor가 발생한다는

보고에 따른 것이다(US/EPA, 1985). 또한 Dearfield 등(1999)은 마우스의 폐와 랫드의 위장과 갑상선에서 종양이 나타나는 것이 alachlor에 노출되는 것과 관련이 있다고 보고하였다. 세계야생보호기금(WWF)에서는 alachlor를 내분비계 장애물질로 보고한 바 있다(WWF Canada, 1996). 내분비계 장애물질에 대하여 OECD에서는 '내분비 기능에 변화를 일으켜 생체 또는 그 자손의 건강에 유해한 영향을 나타내는 외인성 물질'이라고 정의하였으며 US/EPA에서는 '체내의 항상성 유지와 발달과정을 조절하는 생체내 호르몬의 생산, 분비, 이동, 대사, 결합작용 및 배설을 간섭하는 외인성 물질'(Naciff와 Daston, 2004, Stoker 등, 2000)이라고 정의하고 있다. 내분비계 장애 추정 물질 중에는 alachlor와 같이 갑상선 호르몬성 영

*연락처 : Tel. +82-31-290-0539, Fax. +82-31-290-0506
E-mail: aresun@rda.go.kr

향을 나타내거나 갑상선 기능에 영향을 주는 물질들이 있는데 이러한 외인성 화학물질은 6개 부분에서 직접적으로 갑상선 시스템에 영향을 줄 수 있다(DeVito 등, 1999): (1) 활성 iodine uptake, thyroglobulin의 요오드화, thyroglobulin내에서 iodothyrosine을 갑상선 호르몬 형태에 연결, thyroglobulin으로부터 갑상선 호르몬의 효소적 분해와 혈액으로 갑상선 호르몬 분비하는 갑상선(Hadley, 1996); (2) 혈액과 CSF에서 유리 갑상선호르몬의 농도를 일정하게 유지시키는 세포외 갑상선 호르몬결합 혈장단백질(THBPs)(Robbins, 1996); (3) 표적세포로 갑상선 호르몬의 흡수(Hennemann 등, 2001); (4) nuclear-receptor-mediated transcription의 중재 역할을 한다고 생각되는 세포내 세포질성 THBPs(Ashizawa와 Cheng, 1992; Mori 등, 2002); (5) 갑상선 호르몬을 활성화 또는 비활성화시키는 대사효소(St. Germain, 1994); (6) 갑상선호르몬 반응 요소를 통해 gene 발현을 직접적으로 조절하는 thyroid receptor와 부속 단백질(McKenna 등, 1999). 갑상선 호르몬은 조직의 성장과 성숙, 세포호흡과 전체 에너지 소비에 관여하고, 많은 종류의 효소를 생성하여 단백질이나 탄수화물의 산화대사를 촉진, 미토콘드리아의 수효와 크기를 증가시켜 대사를 활발하게 진행하게 하여 에너지 생성을 증가시킴으로써 체온조절에 영향을 미친다. 또한 골격성장작용과 단백질 합성 촉진작용을 증가시키는 협력작용을 하여 성장기 아이의 성장에 영향을 미치고 신경시냅스의 발달과 미엘린 수초의 형성에 영향을 주어 뇌와 중추신경계의 발달에 중요한 역할을 담당하며 조직에서 생성된 대사산물로 인해서 조직혈관이 확장되며 조직으로 산소 공급을 증가시키기 위해서 심혈관계 작용을 조절하는 등 중요한 기능을 한다(해리슨내과학, 1997, 전국의과대학교수 번역, 1999, 서울대학교 의과대학 생리학교실, 1996, 홍사석, 1993). 이러한 갑상선 호르몬성 영향 및 갑상선 기능에 영향을 주는 물질을 구분하기 위한 여러 가지 시험이 수행되고 있는데 본 연구는 Enhanced OECD Test Guideline 407과 EDSTAC(Endocrine disrupters screening and Testing Advisory Committee)에서 권고하는 'Pubertal Development and Thyroid Function in Immature Male Rats' (Yamasaki 등, 2002)에 기초하여 시험을 수행하고 alachlor의 갑상선 호르몬성 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

시험물질

내분비계 장애 추정물질로 알려진(Kashian 등, 2002) alachlor 93%((주)경농에서 공급)를 사용하여 시험하였다.

시험동물 및 사육환경

시험에 사용한 21-23일령 Sprague Dawly rat는 농업과학기술원 유해물질과 실험동물실에서 사육한 동물로 일반증상과 체중증가가 정상적인 건강한 동물만을 골라 사용하였다. 각 시험군당 암수 10마리를 사용하였다. 동물 사육실 환경은 온도 23°C±2, 상대습도 55±5%, 명암교대 12시간 및 조도 200-300 Lux에서 폴리카보네이트 랫드용 사육상자(명진기계상사, 한국)에 넣어 사육하였으며 시험기간동안 사용한 사료(삼양사, 한국) 및 깔짚(한림실험동물, 한국)은 방사선으로 멸균된 것을 구입하여 사용하였다. 음용수는 멸균수를 자유로이 공급하였다.

시험물질 투여

Alachlor의 만성독성 NAOEL을 기준으로 NAOEL보다 높은 약량을 저약량으로 설정하기 위하여 LD₅₀의 1/20, 1/40, 1/80을 고, 중, 저약량으로 설정하였으며, 약량은 0, 12.5, 25, 50 mg/kg/day으로 투여하였다. 각 약량을 corn oil에 녹여 5 mL/kg body weight로 30일간 매일 경구 투여하였다. 준대를 사용하여 투여하였으며 매일 체중을 측정하였다.

시험동물 부검

부검 전 16-18시간동안 절식시킨 후 CO₂ 가스로 안락사시켜 부검을 실시하였다. 복강을 열어 복대동맥에서 주사기로 채혈한 후 40분간 빙상에 정치시킨 후 4°C 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 간, 신장, 뇌, 갑상선과 주요 생식기 등의 장기중량을 측정하였다.

호르몬 측정

DELFLIA kit(PerkinElmer)를 이용하여 ELISA방법으로 시험하였으며 TRF(Time resolved Fluorescence meter)장비로 Victor²D(PerkinElmer)를 사용하여 측정하였다. T4(Marty 등, 2002), T3, free T4, free T3, estradiol, testosterone은 각각의 kit를 이용하여 제공된 매뉴얼에 따라 시험을 실시하였는데 형광물질로는 Europium(Eu)를 사용하였다. Eu tracer stock에는 BSA와 dextran T10을 첨가한 Tris-HCl buffer(pH 7.8)사용하였고 Antibody stock solution은 BSA와 0.1%미만의 sodium azide를 첨가한 Tris-HCl buffer(pH 7.8)를 사용하였으며 washing solution으로 Tween 20을 첨가한 Tris-HCl(pH 7.8)을 사용하였다.

갑상선 호르몬 특이반응 세포 시험

갑상선 호르몬 특이반응 세포는 국립수의과학검역원에서

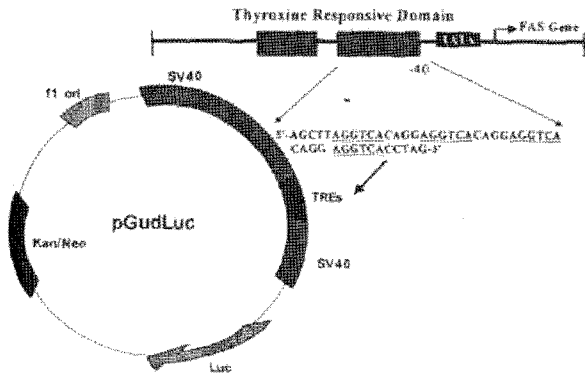


Fig. 1. Structure of the expression vector pGL1.1. The vector contains malic enzyme gene (ME)-thyroid hormone responsive elements (TREs) (정 등, 2003).

제조한 HeLaTRE 세포주를 분양 받았다. 이 세포주는 강력한 viral promoter인 SV40과 리포터 유전자로서 luciferase 발현유전자를 함유하는 plasmid에 TREs의 core유전자를 증폭하여 삽입한 후 다시 유전자도입 plasmid(Fig. 1)를 증폭·정제하여 인체자궁암세포주(HeLa cell)에 도입하여 제조되었다.

이 세포주를 이용하여 갑상선 호르몬성 영향 시험을 하였다. 1% FBS와 2 mM L-glutamine을 첨가한 DMEM(GibcoBRL) 배지를 사용하여 24 well plate에 1×10^5 cells/well을 분주하고 18시간 배양한 후 시험물질을 0.1% DMSO 농도 수준으로 24시간 처리하였다. cell lysis buffer(Promega)를 이용하여 lysis 시킨 후 1분간 원심분리하여 Luminometer(MicroLumatPlus, Berthold)를 이용하여 Luciferase assay를 실시하였다. Luciferin (Promega) 50 ul와 lysis된 샘플 10 ul을 반응시켜 5초간 Luminometer로 측정하였다.

결과 및 고찰

Alachlor 투여 rat의 체중변화

Fig. 2에서는 alachlor 투여시 rat의 체중변화를 나타내었는데 30일간 매일 체중을 측정할 결과 수컷에서는 약제 투여군이 대조군에 비하여 증체율이 낮은 것으로 나타났으나 유의하지 않았고 약제투여군 사이에서는 약량별 차이가 없었다. 암컷에서는 대조군과 약제투여군 간의 증체율 변화가 없었으며 약량별 차이도 나타나지 않았다. 갑상선 자체에 염증이나 종양 같은 원발성 병변이 나타나 기능이 저하될 때 이를 원발성 갑상선 기능저하증이라 하며(杜, 1993), 갑상선 호르몬이 적게 나오는 경우에는 대사 과정이 지나치게 느려져 변비가 생기거나 몸이 늘어져 아무 것도 하기 힘든 상태가 되기도 하고, 얼굴과 손발, 눈 주위가 부어오르는 부종이 있으며, 추위를 잘 견디지 못하고, 땀이 잘 나지 않으며, 피로, 기억력 감퇴, 월경과다, 근육통 등이 나타나고, 식욕은 감퇴되었는데도 체중이 증가하는 증상을 보인다(Kim 등, 2001). Fig. 2와 같이 본 시험에서는 갑상선기능저하증 증상의 하나인 체중증가의 변화는 나타나지 않았다. 따라서 alachlor 투여시 증체율에 영향을 주지 않았다고 사료되었다.

Alachlor 투여 수컷 rat의 상대적 장기중량

Table 1에서는 체중에 대한 절대장기중량의 비율(%)인 상대적 장기중량을 이용하여 alachlor 투여 수컷 rat의 상대적 장기중량 변화를 관찰하였다. 뇌와 뇌하수체에서는 12.5 mg/kg/day에서 유의적으로 감소하였으나 용량의존적인 반응을 보이지 않았다. 부신에서는 25, 50 mg/kg/day에서 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 간에서는 12.5 mg/kg/day에서 유의적인 증가를 보였다. 비장에서는 세 약량 모두 유의적으로 증가

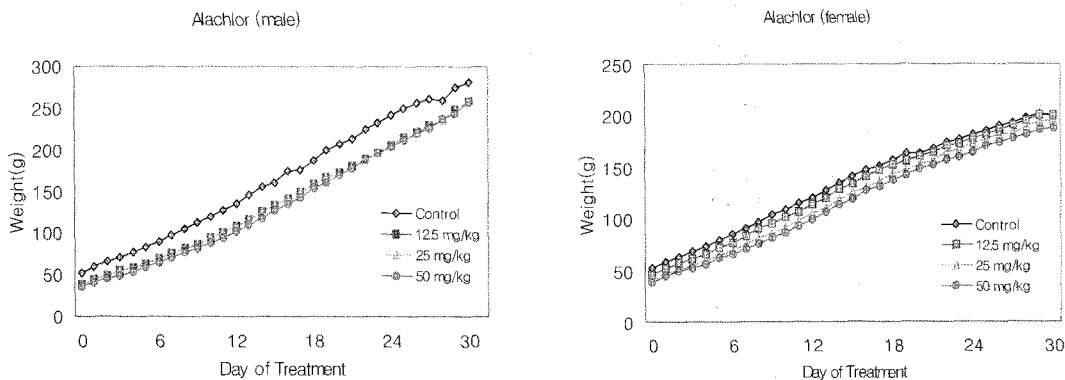


Fig. 2. Daily body weight gain of control group and treated groups during 30-day of treatment.

Table 1. Relative organ weights of male rats exposed to alachlor

(unit : %)

| Organ | Dose (mg/kg/day) | | | | |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| | 0 | 12.5 | 25 | 50 | |
| Terminal body weight | 268.07±18.41 | 239.77±23.68 | 230.29±21.4 | 226.77±20.86 | |
| Brain | Whole | 0.682±0.051 | 0.593±0.045** | 0.733±0.081 | 0.738±0.05 |
| | Cerebellum | 0.109±0.037 | 0.113±0.032 | 0.101±0.022 | 0.136±0.032 |
| Pituitary gland | 0.00321±0.01 | 0.00267±0.0004* | 0.00311±0.0003 | 0.00275±0.001 | |
| Adrenal gland | Left | 0.00631±0.01 | 0.00710±0.001 | 0.00999±0.002*** | 0.01037±0.002*** |
| | Right | 0.00673±0.001 | 0.00723±0.001 | 0.0993±0.003** | 0.00962±0.002** |
| Liver | 4.248±0.452 | 4.914±0.326** | 4.569±0.403 | 4.522±0.377 | |
| Spleen | 0.224±0.021 | 0.272±0.022*** | 0.264±0.031* | 0.273±0.037*** | |
| Kidney | Left | 0.478±0.019 | 0.493±0.045 | 0.517±0.06 | 0.532±0.039** |
| | Right | 0.478±0.03 | 0.507±0.045 | 0.523±0.057 | 0.540±0.04** |
| Testis | Left | 0.482±0.047 | 0.43±0.034* | 0.552±0.053** | 0.547±0.05* |
| | Right | 0.508±0.032 | 0.428±0.038** | 0.564±0.057* | 0.548±0.05 |
| Epididymis | Left | 0.074±0.01 | 0.063±0.007 | 0.078±0.01 | 0.123±0.143 |
| | Right | 0.08±0.01 | 0.063±0.008 | 0.074±0.009 | 0.121±0.148 |
| Prostate | 0.108±0.025 | 0.096±0.027 | 0.123±0.03 | 0.114±0.02 | |
| Seminal vesicle | 0.218±0.045 | 0.18±0.045 | 0.184±0.03 | 0.192±0.057 | |
| Thyroid gland | Left | 0.00244±0.001 | 0.00208±0.001 | 0.0031±0.000657** | 0.00294±0.000458** |
| | Right | 0.00266±0.000728 | 0.00223±0.000514 | 0.00323±0.000701* | 0.00383±0.000805** |
| Anogenital distance | 11.63±1.269 | 10.56±1.329 | 12.011±0.709 | 11.107±1.166 | |
| Stature | 21.67±0.703 | 22.211±0.549 | 21.378±0.46 | 21.18±0.573 | |

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

하였다. 신장은 50 mg/kg/day에서 유의적인 증가를 나타냈다. 고환에서는 12.5 mg/kg/day에서는 감소하고 나머지 두 약량에서는 증가하는 경향을 보였으나 용량의존적 반응을 나타내지 않았다. 갑상선에서는 25, 50 mg/kg/day에서 유의적인 증가를 보였다. 오른쪽 갑상선의 경우 용량에 따라 증가가 더욱 유의적으로 나타났다. 따라서 갑상선과 고환에 영향이 나타난 것으로 보인다.

Alachlor 투여 암컷 rat의 상대적 장기중량

Table 2에서는 alachlor 투여 암컷 rat의 상대적 장기중량을 나타내었는데 뇌의 전체 중량은 50 mg/kg/day 투여군에서 유의한 증가를 나타내었다. 간의 중량이 12.5 mg/kg/day에서 유의한 증가를 보였으나 용량의존적 반응은 보이지 않았다.

신장의 중량이 50 mg/kg/day에서 유의한 증가가 나타났다. 생식장기인 난소와 자궁에서는 유의한 변화가 없었으나 질의 중량이 25, 50 mg/kg/day에서 유의하게 감소하였다. 갑상선의 중량은 25 mg/kg/day에서 유의한 감소를 나타내었다. 따라서 alachlor 투여 암컷 rat에서는 질 중량에 변화가

나타나고 갑상선에서는 변화는 있으나 용량의존적 반응이 나타나지 않음을 보였다.

Alachlor 투여 rat의 갑상선 호르몬 및 성호르몬 변화

Table 3에서는 alachlor 투여 rat의 갑상선 및 성호르몬 변화를 나타내었는데 수컷에서는 12.5 mg/kg/day 투여군에서 FT3가 유의하게 증가하였고 testosterone은 유의하게 감소하였다. T4가 암컷 25, 50 mg/kg/day에서 유의하게 감소하였고 T3가 50 mg/kg/day에서 유의한 감소를 보였다. FT3는 12.5 mg/kg/day에서 유의하게 감소하였으며 testosterone은 25, 50 mg/kg/day에서 유의하게 감소하였다.

갑상선 호르몬(T3와 T4)은 시상하부의 thyrotrope 기능을 조절하고 갑상선자극호르몬(TSH)의 생성을 억제하며(Shupnik 등, 1994) nuclear thyroid receptor와의 결합에 의해 조절된다(Lazar, 1993). 사람에게 있어 갑상선암은 가장 일반적인 내분비계 종양이며 발병이 증가하고 있는데(Caroline 등, 2007) 90%이상이 여포상피세포에서 유래된 유두상 갑상선암이거나 여포암으로서 분화 갑상선암이고 예후는 병기와 조직학적 아형에 영향을 받으나 다른 장기의 악성종양에 비하여 대체

Table 2. Relative organ weights of female rats exposed to alachlor

(unit : %)

| Organ | Dose (mg/kg/day) | | | | |
|----------------------|------------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
| | 0 | 12.5 | 25 | 50 | |
| Terminal body weight | 164.81±15.65 | 170.77±9.3 | 171±20.79 | 156.95±12.29 | |
| Brain | Whole | 0.924±0.111 | 0.955±0.086 | 0.93±0.104 | 1.033±0.073* |
| | Cerebellum | 0.169±0.063 | 0.166±0.048 | 0.131±0.021 | 0.183±0.047 |
| Pituitary gland | 0.0044±0.001 | 0.0054±0.002 | 0.0048±0.001 | 0.0051±0.001 | |
| Adrenal gland | Left | 0.0154±0.004 | 0.0157±0.004 | 0.0141±0.005 | 0.0166±0.004 |
| | Right | 0.0147±0.003 | 0.0157±0.005 | 0.0293±0.038 | 0.017±0.003 |
| Liver | 4.165±0.547 | 4.681±0.319* | 4.056±0.4 | 4.258±0.312 | |
| Spleen | 0.242±0.032 | 0.256±0.032 | 0.258±0.021 | 0.3±0.123 | |
| Kidney | Left | 0.489±0.044 | 0.497±0.043 | 0.493±0.061 | 0.524±0.029* |
| | Right | 0.498±0.046 | 0.478±0.137 | 0.506±0.055 | 0.526±0.031 |
| Ovary | Left | 0.027±0.008 | 0.031±0.007 | 0.024±0.004 | 0.033±0.007 |
| | Right | 0.028±0.009 | 0.03±0.006 | 0.026±0.005 | 0.031±0.007 |
| Uterus | 0.262±0.099 | 0.202±0.127 | 0.201±0.114 | 0.235±0.135 | |
| Vagina | 0.075±0.012 | 0.073±0.019 | 0.057±0.014** | 0.06±0.014* | |
| Thyroid gland | Left | 0.0043±0.001 | 0.004±0.001 | 0.0041±0.001 | 0.004±0.001 |
| | Right | 0.0048±0.001 | 0.0045±0.001 | 0.0036±0.001* | 0.0043±0.001 |
| Anogenital distance | 5.566±0.704 | 5.591±0.624 | 5.231±0.279 | 5.227±0.38 | |
| Stature | 18.84±0.824 | 19.52±0.358 | 19.533±0.971 | 19.18±0.676 | |

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Table 3. Activity of Thyroid hormone and Sex hormone in plasma of rats exposed to alachlor

| Sex | Item | Dose (mg/kg) | | | |
|--------|-----------------------|----------------|-----------------|----------------|------------------|
| | | 0 | 12.5 | 25 | 50 |
| Male | T4 (nmol/L) | 622.44±487.564 | 541.933±392.827 | 628.63±505.865 | 531.8±490.677 |
| | FT4 (pmol/L) | 4.659±1.026 | 6.39±1.263 | 4.054±0.733 | 5.836±2.276 |
| | T3 (nmol/L) | 13.37±8.494 | 13.11±7.824 | 12.408±8.227 | 15.095±7.075 |
| | FT3 (pmol/L) | 4.659±1.026 | 6.39±1.263* | 4.054±0.733 | 5.836±2.276 |
| | Estradiol (nmol/L) | 8.362±5.247 | 3.829±6.017 | 14.539±15.776 | 10.776±15.711 |
| | Testosterone (nmol/L) | 101.45±51.038 | 26.913±28.704** | 66.459±74.099 | 59.639±71.381 |
| Female | T4 (nmol/L) | 1203.5±108.321 | 1091.8±300.944 | 855.4±472.346* | 580.11±494.573** |
| | FT4 (pmol/L) | 10.716±1.297 | 11.71±1.977 | 10.527±0.704 | 14.44±3.739 |
| | T3 (nmol/L) | 20.41±0.264 | 20.15±0.889 | 17.159±5.628 | 13.474±7.928* |
| | FT3 (pmol/L) | 7.078±2.223 | 5.081±1.549* | 6.443±2.031 | 6.112±1.432 |
| | Estradiol (nmol/L) | 32.045±7.140 | 28.174±11.955 | 17.475±16.051 | 16.046±16.447 |
| | Testosterone (nmol/L) | 155.42±65.657 | 119.22±65.657 | 65.198±68.373* | 85.232±65.484* |

T4 : Thyroxine, FT4 : Free Thyroxine, T3 : Triiodothronine, FT3 : Free Triiodothronine

로 매우 양호한 편이다(Sheman, 2002, Hong, 2000). Lee 등(2003)에 의하면 분화 갑상선암 환자중 조사대상 환자 모두가 갑상선 기능저하증 상태라고 보고하였다. 일차성 갑상선기능저하증에서 혈중 T3, T4의 농도는 낮은 반면 혈중 TSH의 농도는 증가한다. 이차성 또는 삼차성 갑상선 기능저하증의 경우 혈중 T3, T4의 농도는 낮고 혈중 TSH 농도는

정상이거나 낮다(Chung, 2006, Yu, 1986). 이러한 호르몬들의 내분비장애물질에 의한 영향을 관찰하기 위하여 혈중 호르몬 수치를 측정하였는데 alachlor 투여시 주요 호르몬인 T4의 감소가 나타나 갑상선 기능저하증과 같은 양상으로 판단되었다.

갑상선 호르몬 특이반응 시험세포를 이용한 alachlor의 농도별 영향

Fig. 3에서는 갑상선 호르몬 영향을 나타내었는데 Thyroxin (T4)을 양성 대조군으로 갑상선 호르몬성 영향을 비교하였다. Luciferase activity는 처치군의 RLU(relative light unit)를 음성대조군의 RLU 수치로 나누어 %로 표시하였다. T4에서는 100 nM에서 가장 높은 영향을 보였으며 1000 nM에서는 수치가 낮은 경향을 보였다. 0.1 nM-100 nM까지는 농도에 따라 반응을 나타내었으며 0.01 nM에서는 0.1 nM과 비교하여 갑상선 영향에 차이가 크게 나타나지 않았다. Alachlor를 처리하였을 때 최대농도인 1000 nM에서 음성대조군에 비하여 134%의 영향을 보였으며 최저농도인 1 nM에서는 음성대조군과 차이가 없었다. 용량의존적인 반응으로 농도에 따라 영향이 증가함을 나타내었다. 갑상선 호르몬은 hydrophobic compounds로서 세포내에서 표적 gene의 발현을 조절하는 specific nuclear receptor들에 의해 활성이 조정된다(Yen과 Chin, 1994). 혈장내에서 갑상선 호르몬은 특이 단백질과 결합하여 혈관시스템을 통해 표적세포로 이동하게 된다(Robbins, 1996). 갑상선 호르몬과 혈장 단백질의 결합 평형정도가 유리된 갑상선 호르몬의 농도를 결정하는데 이 유리 갑상선 호르몬이 세포로 들어가 반응을 나타낼 수 있다(Ekins 등, 1982, Mendel, 1989). 내분비장애물질 중에는 hydrophobic compound들이 있는데 이 중에는 내분비 호르몬을 운반하는 혈장 단백질과 반응함으로써 호르몬 수송체계를 방해하기도 한다(Bruker-Davis, 1998). Nagel 등(1997, 1998)에 의하면 어떤 특이 외인성 물질은 혈장단백질과 강하게 상호작용하는데 호르몬 결합 혈장단백질과 상호작용한 외인성 물질이 chemical과 호르몬 두가지 모두의 세포내 출입을 조정한다고 보고하였다. 이러한 내분비장애물질은 호르몬과 같이 nuclear

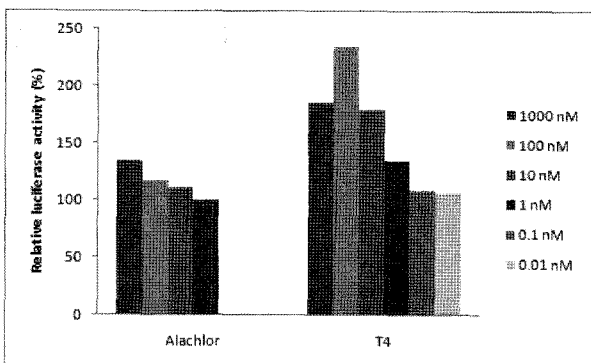


Fig. 3. Relative inductions of luciferase by alachlor in HeLaTRE cells or investigation of thyroid hormone effect. (Relative luciferase activity (%) = RLU of sample \times 100/RLU of control)

receptor와 결합할 수 있기 때문에 갑상선 호르몬 receptor (TRE)가 삽입된 HeLa 세포주를 이용하여 alachlor의 갑상선 호르몬성 영향을 검색한 결과 용량의존적으로 반응을 나타내어 갑상선 호르몬과 유사한 활성을 가질 수 있는 것으로 사료되었다.

갑상선 호르몬 특이반응 시험세포를 이용한 항갑상선 호르몬성 영향

Fig. 4에서는 항갑상선 호르몬성 영향을 나타내었는데 24well plate에 well당 시험물질 100 nM을 처리한 후 T4 0.1 nM부터 100 nM 까지 처리하였다. Luciferase activity는 처치군의 RLU(relative light unit)를 음성대조군의 RLU 수치로 나누어 %로 표시하였다. Alachlor 100 nM 처리군에서는 대조군과 비교하여 T4 100 nM에서 감소하는 경향이 있으나 유의하지 않았고, T4 1 nM과 0.1 nM에서는 증가하였으며, 0.1 nM에서 유의한 차이를 나타냈다. 따라서 alachlor에 의한 항갑상선 호르몬성 영향은 나타나지 않았으며, T4 0.1 nM에서는 상승작용을 나타내었다. 내분비장애물질은 사람과 동물에서 estrogen이나 androgen, thyroid hormone의 고유한 기능을 방해할 수 있다(Naciff와 Daston, 2004, Stoker 등, 2000). 어떤 내분비장애물질은 그 자체가 세포내 반응없이 receptor와 결합하는 호르몬을 교란시켜 자연생성 호르몬의 기능을 변화시키기도 한다(Funabashi 등, 2003, Iwamuro 등, 2006). TCDD나 aroclor 1254, bisphenol은 그 구조가 갑상선 호르몬과 유사하지만 갑상선 호르몬과 관련된 생물학적 반응에 대한 영향은 현재까지도 조사되고 있으며 지금까지 연구된 바에 의하면 이들은 강력한 갑상선 호르몬 receptor 길항제로 보고하고 있다(Miyazaki 등, 2004). 이와 같이 항갑

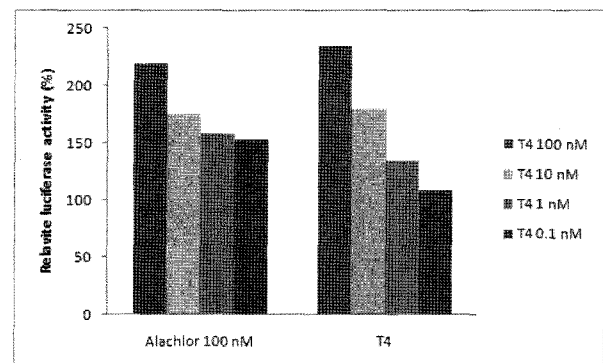


Fig. 4. Relative Induction of luciferase by the cotreatment of T4 and alachlor 100 nM in HeLaTRE cells for investigation of antithyroid hormone effect. (% = luciferase activity of sample /luciferase activity of control)

상선 호르몬성 영향을 나타내는 물질들이 있어 본 시험에서 alachlor의 갑상선 호르몬 receptor 길항작용을 조사하였으나 항갑상선 호르몬성 영향이 나타나지 않은 것으로 사료되었다.

갑상선 종양을 유발하는 것으로 알려진 alachlor에 대하여 내분비장애의심물질의 갑상선호르몬성 영향 시험으로서 pubertal assay와 갑상선호르몬성 시험세포를 이용한 시험을 실시한 결과 *in vivo* 및 *in vitro* 시험에서 갑상선과 갑상선호르몬에 영향이 있었으며, 또한 본 연구에 사용된 시험법도 앞으로 내분비계 장애추정물질 screening에 활용 가능할 것으로 사료되었다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Ashizawa, K. and S. Y. Cheng (1992) Regulation of thyroid hormone receptor-mediated transcription by a cytosol protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9277/9281.

Brucker-Davis, F. (1998) Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function, Thyroid 8, 827/856.

Caroline, S. Kim, Fumihiko, Furuya, Hao, Ying, Yasuhito, Kato, John, A. Hanover and Sheue-yann Cheung (2007) Gelsolin: A Novel Thyroid hormone Receptor- β Interacting Protein that Modulates Tumor Progression in a Mouse Model of Follicular Thyroid Cancer, Endocrinology 148(3):1306~1312.

Chung, J. H. (2006) From A to Z of Thyroid Disease with Which the Psychiatrist should be Familiar, Korean J Psychosomatic Medicine, 14(2):73~80.

Dearfield, K. L., N. E. McCarroll, A. Protzel, H. F. Stack, M. A. Jackson and M. D. Waters (1999) A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals II. Mutagenicity and carcinogenicity of selected chloracetanilides and related compounds. Mutat Res, 443, 183~221.

DeVito, M., L. Biegel, A. Brouwer, S. Brown, F. Brucker-Davis, A. O. Check, R. Christensen, T. Colborn, P. Cooke, J. Crissman, K. Crofton, D. Doerge, E. Gray, P. Hauser, P. Hurley, M. Kohn, J. Lazar, S. McMaster, M. McClain, E. McConnell, C. Meier, R. Miller, J. Tietge and R. Tyl (1999) Screening methods for thyroid hormone disruptors, Environ. Health Perspect. 107, 407/415.

Ekins, R., P. Edwards and B. Newman (1982) The role of binding proteins in hormone delivery. In: Albertini, A., Ekins, R. P. (Eds.), Free Hormones in Blood. Elsevier, New York, pp. 3/44.

Galassie, S., A. Provini, S. Mangiapan and E. Benfenati (1996) Alachlor and its metabolites in surface water, Chemosphere, 32(2):229~237.

Hadley, M. E. (1996) Endocrinology, 4th ed. Prentice Hall, New Jersey, pp. 290/313.

Hennemann, G., R. Docter, E. C. Friesema, M. de Jong, E. P. Krenning and T. J. Visser (2001) Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability, Endocr. Rev. 22, 451/476.

Hong, S. W. (2000) Radioiodine therapy for differentiated thyroid cancer, Korean J Nucl Med, 34, 265~275.

Kashian, D. R. and S. I. Dodson (2002) Effects of common-use pesticides on developmental and reproductive processes in Daphnia, Toxicol Ind Health. 18(5):225~35.

Kim, Y. S. and K. S. Kim (2001) Clinical study of 1 case of patient with Hypothyroidism, Korean J oriental medical prescription Vol. 9(1), 397~403

Lazar, M. A. (1993) Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities, Endocr. Rev. 14, 184~193.

Lee, J. R., B. C. Ahn, S. Y. Jeong, Jaetae Lee, K. B. Lee (2003) Detection for Residual Thyroid Tissue and Metastatic Lesion after Total Thyroidectomy in Patients with Differentiated Thyroid Cancer: Comparison between Tc-00m Pertechnetate Scan and High Dose I-131 Therapy Scan, Korean J Nucl Med : Vol. 37(2), 120~127.

Marty, M. S., J. W. Crissman and E. W. Carney (2002) Evaluation of the Male Pubertal Assay's Ability to Detect Thyroid Inhibitor and Dopaminergic Agents, Toxicological sciences 60, 63~76.

McKenna, N. J., R. B. Lanz and B. W. O'Malley (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology, Endocr. Rev. 20, 331/344.

Mendel, C. M. (1989) The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model, Endocr. Rev. 10, 232/274.

Miyazaki, K., T. Iwasaki, A. Takeshita, Y. Kuroda and N. Koibuchi (2004) Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone receptor-mediated transcription through a novel mechanism, J Biol Chem, 279, 18195~18202.

Mori, J., S. Suzuki, M. Kobayashi, T. Inagaki, A. Komatsu, T. Takeda, T. Miyamoto, K. Ichikawa and K. Hashizume (2002), Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent cytosolic T3 binding protein as a regulator for T3-mediated transactivation, Endocrinology 143, 1538/1544.

Naciff, J. M. and G. P. Daston (2004) Toxicogenomic approach to endocrine disruptors: identification of a transcript profile characteristic of chemicals with estrogenic activity, Toxicol Pathol, 32 Supple 2, 59~70.

Nagel, S. C., F. S. vom Saal, K. A. Thayer, M. G. Dhar, M. Boechler and W. V. Welshons (1997) Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative *in vivo* bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. Environ, Health Perspect. 105, 70/76.

Nagel, S. C., F. S. vom Saal and W. V. Welshons (1998) The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in

- human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 217, 300/309.
- Osano, O., W. Admiral, H. J. Klamer, D. Pastor and E. A. Bleeker (2002) Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidonones and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*, Environmental Pollution, 119, 195~202.
- Robbins, J. (1996) Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. In: Braverman, L.E., Utiger, R.D. (Eds.), Weiner and Ingbar's The Thyroid, 7th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp. 96/110.
- Scotte, C. L. Siming, L. Russell, H. Ernest and L. Randy (1999) *In vitro* metabolism of alachlor by human liver microsomes and human cytochrome P450 isoforms, Chemico-Biological Interactions, 122(1), 27~39.
- Sheman, S. I. (2002) Management of differentiated thyroid carcinoma, Korean J Endocrinol 17(Supp-2):31~51.
- Shupnik, M. A., E. C. Rdgway, W. W. Chin (1994) Throtropin Mol. Biol.: Update Endo. Rev (Monograph) 3, 18~22.
- St. Germain, D. L. (1994) Iodothyronine deiodinases. Trends Endocrinol. Metab. 5, 36/42.
- Stoker, T. E., L. G. Parks, L. E. Gray and R. L. Cooper (2000) Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations, Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Commottee, Crit Rev Toxicol, 30, 197~252.
- Tessier, D. M. and J. M. Clark (1998), An enzyme immunoassay for mutagenic metabolites of the herbicide alachlor, Analytica Chimica Acta 376, 103~112.
- United States Environmental Prtectoipm Agency Office of Pesticides Programs (1985) Special review of certain pesticide products. Alachlor: Position document 1. PB85-175503.
- World Wildlife Fund Canada (1996) <http://www.wwfcanada.org>
- Yamasaki, K., Y. Tago, K. Nagai, M. Sawaki, S. Noda and M. Takatsuki (2002) Comparison of toxicity studies based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline no. 407' and the research protocol of 'Pubertal Development and Thyroid Function in Immature Male Rats' with 6-n-propyl-2-thiouracil, Arch Toxicol 76:495~501.
- Yen, P. M. and W. W. Chin (1994) New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action, Trends Endocrinol. Metab. 5, 65/72.
- Yu, C. J., W. J. Ahn, H. Y. Lee and H. K. Ro (1986) The clinical Study on 39 Cases of Subclinical Hypothyroidism, Korean J Nucl Med, 20(1), 67~73.
- 料鎬京 (1993) 동의현계학, 서울, 동양의학연구소 1059~1065.
- 서울대학교 의과대학 생리학교실 (1996), 생리학, 서울, 의학문화사, 373.
- 전국외과대학교수 번역 (1999) 오늘의 진단과 치료, 서울, 한우리 1187~1188.
- 정상희, 김병용, 구현옥, 박종명, 정갑수, 조준형 (2002) 화학물질의 갑상선호르몬계 교란유발성 고감도 간이 검색기법 개발, 국립수의과학연구보고서 79~87.
- 해리슨 내과학 (1997) 서울, 정담출판사 2089.
- 홍사석 (1993) 이우주의 약리학강의, 서울, 의학문화사 503~504.

랫드와 HeLaTRE Cell에서의 Alachlor에 의한 갑상선 호르몬성 영향 연구

유아선* · 정미혜 · 박경훈 · 김병석 · 김진배 · 권오경

농업과학기술원 농산물안전성부 유해물질과

요 약 내분비장애 추정물질의 분류를 위해 많은 시험법이 연구되고 있는데 추후 내분비장애 추정물질로 분류된 기등록농약에 대한 자료요구 또는 신규 등록농약에 대한 등록기준의 추가 등을 고려하여 OECD와 EPA에서 권장하는 시험법을 확립하고자 본 연구를 수행하였다. 시험약제를 30일간 경구 투여하여 조사한 결과, alachlor 투여 수컷에서 25 mg/kg/day, 50 mg/kg/day에서 고환과 갑상선의 중량이 증가하였다. Alachlor 투여 암컷에서는 질의 중량이 25, 50 mg/kg/day에서 감소하였고 25 mg/kg/day에서 갑상선의 중량이 감소하였다. Alachlor 투여 암컷 25, 50 mg/kg/day에서 주요 갑상선 호르몬인 T4와 성호르몬 testosterone이 감소하였다. 따라서 pubertal assay 결과 alachlor는 갑상선 호르몬성 영향이 의심되었다. 시험세포를 이용한 시험 결과, 시험약제를 1 nM에서 1000 nM까지 처리하였을 때 음성대조군과 비교하여 alachlor는 100-134%의 갑상선 호르몬성 영향을 나타내었다. 따라서 세포를 이용한 시험에서는 alachlor에 의한 갑상선 호르몬성 영향이 나타나는 것으로 판단되었다. 항갑상선 호르몬성 영향 시험에서는 시험약제 100 nM과 T4의 혼합 처리시 alachlor는 항갑상선 호르몬성 영향은 나타나지 않았다.

색인어 alachlor, 갑상선호르몬, 내분비장애물질