

Tributyltin에 의한 흰쥐 정소 내 간질세포의 지방세포 유도과 세포자연사 증가

송연화 · 정지은 · 이현아 · 홍지희 · 양현원[†]

서울여자대학교 자연과학대학 생명환경공학과

Tributyltin Increases Adipogenesis and Apoptosis of Rat Testicular Interstitial Cells

Yeonhwa Song, Jieun Jung, Hyun A Lee, Jihee Hong and Hyunwon Yang[†]

Dept. of Bioenvironmental Technology, College of Natural Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

ABSTRACT : Tributyltin (TBT), an endocrine disrupting chemical, has been reported to decrease testicular function by causing apoptosis in the testis, but this mechanism is not fully understood. Thus, in this study we examined whether TBT induces adipogenesis of the Leydig cells to find out the correlation between adipogenesis and apoptosis in the testis. Three week old SD male rats were orally administrated with sesame oil, 1 mg/kg of TBT, or 10 mg/kg of TBT daily for 1 week and weighed after administration. The testes obtained on day 8 were weighed and stained with BODIPY and TUNEL kit. Using total RNA extracted from the isolated Leydig cells, adipogenesis and apoptosis-related genes were analyzed by real-time PCR. The testicular weights of the rats treated with 10 mg/kg TBT were significantly decreased compared to those in the control rats treated with sesame oil. As a result of BODIPY staining, the number of Leydig cells stained with BODIPY was increased in the rats treated with 10 mg/kg TBT compared with the control rats. Similar to BODIPY staining results, the TUNEL assay showed that the apoptosis of Leydig cells was increased in TBT treated rats. The results of the gene expression analysis in the Leydig cells showed that the expression of adipogenesis-related genes (PPAR γ , aP2, Perilipin, CD36) and apoptosis-related genes (TNFRSF1A, TNFSF10) was increased after TBT administration. The present study demonstrates that TBT induces the expression of adipogenesis-related and apoptosis-related genes in the Leydig cells leading to adipogenesis and apoptosis in the testes. These results suggest that the dysfunction of Leydig cells by TBT exposure may cause a loss in testicular function.

Key words : Adipogenesis, Apoptosis, Leydig cell, Testis, Tributyltin.

요약 : 내분비교란물질로 알려진 Tributyltin(TBT)는 흰쥐 정소 내 생식세포와 간질세포의 세포자연사를 일으켜 정소의 기능을 감소시키는 것으로 보고되고 있으나, 그 기전은 명확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 정소 내 간질세포를 표적으로 TBT에 의해 지방세포로 분화가 유도되는지를 확인하고, 이로 인한 정소 내 세포자연사와의 연관성을 알아보고자 하였다. 3주령 된 수컷 흰쥐에 각각 TBT 1 mg과 10 mg/kg/day을 1주일 동안 경구 투여한 후 정소를 분리하여 무게를 측정하였다. 획득된 정소의 일부는 냉동 절편을 만들어 BODIPY로 지방세포를 염색하였고, 일부는 파라핀 절편을 만들어 TUNEL 염색을 수행하였다. 나머지 정소는 정소 백색막을 제거한 후 세정관 사이에 존재하는 간질세포를 분리하였다. 분리된 간질세포에서 total RNA를 추출한 다음 real-time PCR 방법으로 지방세포 유도 유전자들과 세포자연사 관련 유전자들을 분석하였다. 정소의 무게는 대조군에 비교해 TBT 10 mg을 투여한 군에서 유의하게 감소하였다. BODIPY 염색 결과, TBT 10 mg을 투여한 군의 간질세포에서 염색된 세포의 수가 증가하였고, TUNEL 염색 결과에서도 대조군과 비교해 TBT 투여한 군에서 간질세포 내 세포자연사가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Real-time PCR을 이용해 간질세포 내 유전자 발현을 분석한 결과, 투여된 TBT의 농도가 증가할수록 PPAR γ , aP2, PLIN, PGAR 등 지방세포 유도 유전자들의 발현이 증가하였고, 이와 함께 TNFRSF1A, TNFSF10과 같은 세포자연사 관련 유전자의 발현도 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과에서 환경성 내분비 교란물질로 알려진 TBT에 노출될 경우 정소 내 간질세포의 지방세포로의 분화가 유발되면서 세포자연사가 증가하고, 이에 따른 정소 기능의 저하를 야기시킬 수 있는 것으로 사료된다.

[†] 교신저자: 서울시 노원구 공릉2동 126번지, 서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과. (우) 139-774, (전) 02-970-5662, (팩) 02-970-5974, E-mail: hwyang@swu.ac.kr

서 론

내분비 교란물질이란 체내 항상성 유지를 담당하는 호르몬의 생산 혹은 작용을 교란하는 체외 물질로 대부분의 환경 오염 물질들이 여기에 포함된다. 현재까지 알려진 환경성 내분비교란물질만도 100종이 넘고 있으며, 대표적으로 Dioxin, Polychlorinated biphenyl(PCB), bisphenol A, Dichlorodiphenyltrichloroethane(DDT) 및 Tributyltin(TBT) 화합물 등이 알려져 있다. 그 중 유기주석 화합물의 일종인 TBT는 PVC 안정제, 각종 플라스틱 첨가제, 산업용 촉매, 살충제, 살균제, 목재 보존제 등에 널리 사용되고 있으며, 특히 선박에 생물이 달라붙지 못하도록 하는 부착 방지제로 선박용 페인트에 첨가하여 사용하고 있다(Appel, 2004; Golub & Doherty, 2004).

유기주석 화합물은 주석(Sn) 유기물에 3개의 뷰틸기($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)가 붙은 화합물로서, 그 독성은 유기그룹의 개수 및 성질과 연관이 있다. 유기그룹이 하나 혹은 둘일 때보다 세 개일 때 독성이 크며, 그 중에서도 TBT가 가장 독성이 강한 것으로 알려져 있다(Craig, 1986). 이러한 TBT 화합물은 해양 오염의 주범으로 복족류, 연체동물, 어류 등 수중 생물의 생식기관 발달에 이상을 초래하면서 수중 생태계에 심각한 문제를 일으키는 것으로 보고하고 있다(Blaber, 1970; Gibbs & Bryan, 1986). 또한 TBT가 포유류에 노출될 경우 어패류에서와 마찬가지로 생식기능에 문제를 야기시킬 수 있으며, 더욱이 간, 신경 및 면역 기관 등에 심한 독성을 나타내는 것으로 보고하고 있다(Ogata et al., 2001; Boyer, 1989). 현재까지 TBT의 독성 효과 기전은 잘 밝혀져 있지 않지만, aromatase와 같은 스테로이드 호르몬 조절 효소의 불활성화, 미토콘드리아 기능 이상 및 세포 내 스트레스 반응을 유발시켜 일어나는 것으로 알려져 있다(Heidrich et al., 2001; Powers & Beavis, 1991; Philbert et al., 2000).

최근에 사람 난소의 과립세포 내 aromatase 효소의 불활성화가 TBT뿐만 아니라 핵 내 호르몬 수용체인 retinoid X receptor(RXR) 또는 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)의 리간드에 의해서도 유발될 수 있다는 결과가 발표되면서(Mu et al., 2001; Saitoh et al., 2001), TBT와 PPAR γ 와의 상호작용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. PPAR γ 는 핵 내 수용체 단백질로 RXR과 복합체를 형성하여 DNA상의 특정 부위에 결합하여 표적 유전자를 전사시키는 조절자로서, 특히 지방세포 분화 유전자의 전사에 관

여하는 것으로 알려져 있다(Berger & Moller et al., 2002; Michalik et al., 2006). 즉, RXR과 PPAR γ 의 활성화는 체내 지방세포의 분화를 촉진시키면서 비만을 유도할 수 있으며, TBT가 이러한 RXR-PPAR γ 복합체의 활성을 자극하는 것으로 알려져 있다(le Maire et al., 2009). 또한 태아 또는 신생아시기 때 TBT에 노출되면 세포 내 PPAR γ 가 활성화되면서 지방세포로의 분화가 촉진되고, 아울러 세포 내 지질이 축적되면서 비만이 유도되는 것으로 보고하고 있다(Kirchner et al., 2010). 지방세포 세포주를 이용한 *in vitro* 실험에서도 TBT는 PPAR γ 의 활성화를 통해 직접적으로 지방세포 분화를 촉진시켰고(Kanayama et al., 2005), *in vivo* 실험에서는 간과 정소 주위에 지방 축적을 증가시켰다(Grün et al., 2006).

한편, 생쥐가 TBT에 노출될 경우 정자 형성 과정에 이상이 초래되면서 정자 수가 감소하는 것으로 보고하고 있으며(Chen et al., 2008), 또한 Leydig 세포 내 스테로이드 합성효소의 발현을 억제시키고 세포자연사 유도 단백질의 발현을 촉진시키는 것으로 보고하고 있다(Kim et al., 2008). 특히 TBT는 Leydig 세포 내 3 β -HSD와 17 β -HSD 효소의 활성을 억제시키고 testosterone 생성이 감소되면서 정소 기능이 저하되는 것으로 보고하고 있다(McVey & Cooke, 2003; Ohno et al., 2005).

이러한 TBT 노출에 따른 정소의 기능 저하가 단순히 Leydig 세포 내 스테로이드 합성효소의 활성 억제로 인한 것인지 아니면 다른 기전에 의한 것인지 명확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 Leydig 세포 또한 TBT에 의해 지방세포로의 분화가 유도될 것이며, 이에 따른 세포자연사가 진행될 것이라고 가정하고, 이를 증명하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 흰쥐에 TBT를 투여한 후 정소 내 세포자연사를 확인하고 분리된 간질세포에서 지방세포 유도 유전자와 세포자연사 관련 유전자의 발현을 조사함으로써 TBT 노출에 따른 정소 내 간질세포의 지방세포 분화 유도와 세포자연사에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물과 TBT 투여

샘타코 바이오코리아에서 공급받은 3주령 된 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 서울여자대학교 동물 사육실에서 적응시킨 후 그룹 당 5마리씩 총 세 개의 실험군으로 나누어 실험을

진행하였다. TBT(Tributyltin acetate; Aldrich Chemical company, Inc, USA)를 sesame oil에 녹여 사용하였으며, 투여된 양은 체중당 1 mg(1 mg/kg)과 10 mg(10 mg/kg) 농도로 7일간 매일 경구 투여하였다. 대조군으로 sesame oil(Sigma, USA) 만을 7일간 투여하였다.

2. 체중 및 정소 무게 측정

TBT 투여 후 8일째에 체중을 측정한다. 흰쥐를 희생시켜 정소와 정소 주변의 지방세포를 얻어 각각의 무게를 측정하였다. 생식선지수(gonad somatic index)는 정소 무게를 체중으로 나눈 값에 100을 곱하여 산출하였다.

3. 정소 내 간질세포 분리

정소의 백색막과 혈관을 제거한 후 15 ml tube에 DMEM 배양액 10 ml와 함께 넣어 2시간 동안 교반기 위에 올려놓고 흔들어서 주었다. 정소의 큰 덩어리를 제외하고 분리된 세포들이 포함된 배양액을 새로운 tube에 옮긴 후 원심분리하였다(1,450 rpm, 4°C, 10분). 원심분리가 끝나면 상등액은 버리고 배양액 1 ml를 넣고 세포를 다시 풀어준 후, 같은 조건으로 원심분리하였다. 상등액은 버리고 1 ml 배양액에 세포를 풀어 1.5 ml tube에 옮겨 같은 조건으로 원심분리하였다. 상등액은 버리고 아래 가라앉은 세포만 획득하여 실험에 사용하였다.

4. Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 분석

획득한 간질세포에 Tri reagent(RNA isoplus, TaKaRa, Japan) 300 μ l를 첨가하여 조직분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 조직은 상온에서 5분간 방치하고 원심분리(14,000 rpm, 4°C, 20분)한 다음, 상등액을 새 시험관에 옮겼다. 여기에 chloroform(Sigma, USA) 60 μ l를 첨가하여 15초간 섞은 후 상온에서 10분간 방치한 다음, 원심분리하였다(14,000 rpm, 4°C, 15분). 상등액을 따서 새 시험관에 옮긴 후 isopropanol(Sigma, USA) 150 μ l를 첨가하였고 위 아래로 조심스럽게 혼합한 다음, 상온에서 10분간 방치한 후 원심분리하였다(14,000 rpm, 4°C, 10분). 상등액을 제거하고, 75% ethanol(Sigma, USA) 1 ml를 첨가하여 섞은 후 원심분리하였다(14,000 rpm, 4°C, 5분). Tube에 남아 있는 75% ethanol을 제거하고 DEPC(TaKaRa, Japan) 물을 넣어준 상태로 약 1분간 섞은 후 냉동 보관하였다. 추출한 total RNA의 양은 Nano-drop(Thermo Fisher Scientific Inc., USA)을 이용하여 측정

하였다. Total RNA 3 μ g을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 즉, Total RNA 3 μ g과 Oligo dT 2.5 μ l를 넣고 DEPC 물로 총 부피를 10 μ l 맞춰준 다음, 70°C에서 5분간 반응시켰다. 반응시킨 시료에 10X RT buffer 7 μ l, dNTP 2 μ l, mixture 1 μ l와 DEPC 물 10 μ l 넣은 다음, 37°C에서 1시간 반응 후 72°C에서 15분 반응시켰다. 합성된 cDNA를 template DNA로 하여 각 특정 primer와 SYBR Green I (Roche, Switzerland)을 넣고 Light Cycler 480(Roche, Switzerland)으로 특정 유전자의 발현량을 분석하였다. 대조유전자로는 18s 유전자를 사용하였고, 18s를 기준으로 다른 유전자의 상대적인 발현량을 계산하였다. 유전자 특이적 primer 서열은 다음과 같다. 18s Forward(F) 5'-GTCTSTGATGCCCTTA GATG-3'; Reverse(R) 5'-AGCTTATGACCCGCACTTAC; PPAR γ F 5'-ACAAGACTACCCTTTACTGAAATTACC AT-3'; R 5'-TGCGAGTGGTCTTCCATCAC-3'; aP2 F 5'-GCGTGG AATTCGATGAAATCA-3'; R 5'-CCCGCCATCTAGGGTT ATGA-3'; Perilipin F 5'-GACACCACCTGCA TGGCT-3'; R 5'-TGAAGCAGGGCCACTCT C-3'; CD36 F 5'-CCTGC AAATGTCAGAGGAAA-3'; R 5'-GCGACATGATTAAT GGCACA-3'; TNFRSF1A F 5'-ATGGATGTA TCCCAT CAGC-3'; R 5'-ATTGGGGGAGTGAGAGGC-3'; TNFSF10 F 5'-TGGAGTCCCAGAAATCCTCA-3'; R 5'-T CACCAA CGAGATGAAGCAG-3'.

5. BODIPY 염색

TBT에 의한 간질세포의 지방세포로의 분화를 확인하기 위해 BODIPY(Invitrogen, USA) 염색을 수행하였다. 정소의 냉동 절편을 4% paraformaldehyde(Sigma, USA)로 5분간 고정시키고, PBS로 세척 후 5분간 방치하였다. PBS로 희석한 BODIPY(1:5000) 용액에 15분간 반응시켰다. PBS로 3번 세척한 후 DAPI(Invitrogen, USA)로 5분간 염색시켰다. 증류수로 세척 후 형광 mounting 용액(fluorescent mounting media, Dako, Denmark)으로 봉입한 후 형광 현미경(Axioskop2+, Carl Zeiss, USA) 하에서 지방세포를 확인하였다.

6. TUNEL 염색

TBT 투여 후 정소 내 세포자멸사를 확인하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling(TUNEL) 방법을 사용하였다.

정소의 파라핀 절편을 xylene에 3분간 넣어 두었다가 100% 알코올 용액에 3분간 넣어 둔 다음 95% 알코올, 80% 알코올에 각각 3분씩 차례로 반응시키고 PBS로 2번 세척해 주었다. 정소 절편 위에 TUNEL reaction mixture(*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*, Roche, Switzerland)를 30 μ l 떨어 뜨리고 Parafilm으로 덮은 다음 37°C에서 1시간 반응시켰다. PBS로 2번 세척한 후 DAPI로 2차 염색을 시행하였다. PBS로 2번 세척한 후 형광 mounting 용액으로 봉입한 후 형광 현미경하에서 세포자연사가 일어난 세포를 조사하였다.

7. 통계학적 분석

각 실험군 당 다섯 마리의 흰쥐를 사용하였으며, 무게와 모든 유전자의 발현 정도는 Mean \pm SEM로 표시하였다. 통계학적 유의성 검정은 student *t*-test와 one-way ANOVA, Tukey test 방법을 사용하였으며, 대조군과 실험군을 비교하여 *p* 값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. TBT 투여 후 체중 및 정소의 무게 변화

TBT 투여에 따른 체중의 변화를 알아보기 TBT를 투여하기 전에 체중을 측정하였고, 이후 7일간 매일 측정한 결과, TBT를 투여한 실험군에서 약간의 체중에 증가를 보였으나,

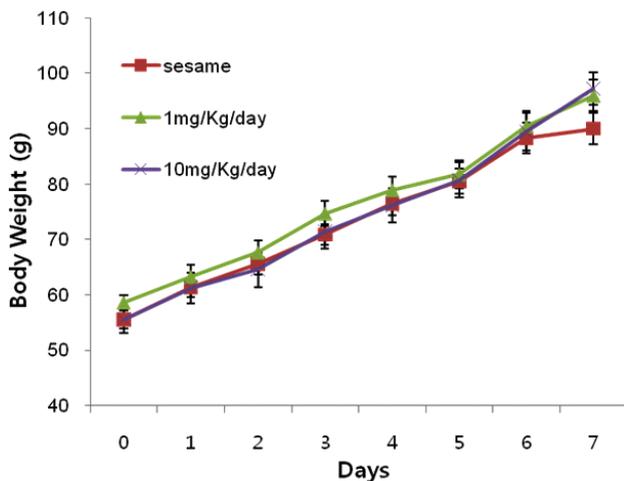


Fig. 1. The body weights of rats after TBT exposure. 3 week-old male rats were orally administrated with sesame oil, 1 mg/kg of TBT, and 10 mg/kg of TBT for 7 days daily. Data are represented as Mean \pm SEM.

sesame oil만 투여한 대조군과 비교해서 유의한 차이는 보이지 않았다(Fig. 1). 또한 TBT가 부정소 지방의 무게에 어떤 영향을 미쳤는지 알아보기 위하여 투여 후 8일째에 흰쥐를 희생시켜 정소와 부정소 지방을 얻어 무게를 측정하였다. 부정소 지방의 무게는 대조군과 비교해서 TBT를 투여한 군에서 투여된 TBT 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 2A). 반면, 정소의 무게는 대조군에 비해 TBT 투여한 군에서 농도 의존적으로 감소하고 있는 것을 확인할 수 있었고, 체중에 따른

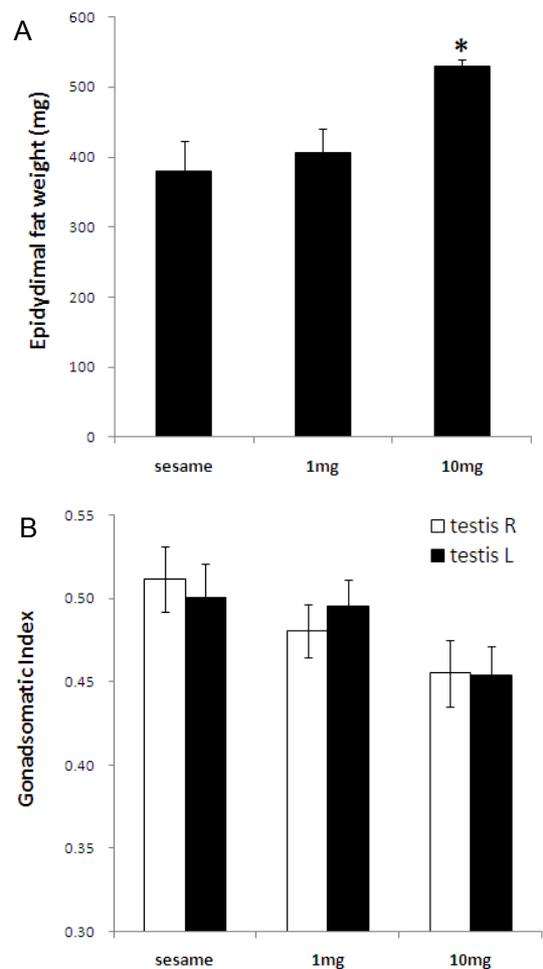


Fig. 2. The weights of rat testes and epididymal fat after TBT exposure. (A) The epididymal fat weights were significantly increased in 10 mg/kg TBT treated rats compared to sesame oil treated rats. (B) The gonadosomatic index (GSI) of the rats treated with 10 mg/kg TBT was significantly decreased compared to the weights of testes in the control rats treated with sesame oil. Data are represented as Mean \pm SEM. *, *P*<0.05 versus control (sesame oil).

상대적인 생식소의 무게를 나타내는 생식선지수(GSI) 또한 대조군에 비해 TBT 처리군에서 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 2B).

2. 간질세포 내 지방세포 분화 유전자 발현 증가

정소에서 분리된 간질세포에서 지방세포 분화 유전자 발현을 real-time PCR 방법으로 확인해 본 결과, TBT 투여군에서 지방세포 분화 관련 단백질인 PPAR γ , aP2, Perilipin, CD36의 mRNA 발현이 TBT 농도 의존적으로 유의한 증가를 보였다(Fig. 3).

3. TBT 투여 후 정소 내 지방세포 확인

TBT 투여 후 정소에서 지방세포 분화가 일어났는지를 확인하기 위하여 BODIPY로 정소 절편을 염색하였다. BODIPY에 의해 염색된 세포 내 지방은 형광 현미경하에서 빨간색 형광을 나타낸다(Fig. 4). BODIPY 염색 결과, sesame oil만을 투여한 대조군에서는 BODIPY에 의해 염색된 세포들을 관찰할 수 없었으나(Fig. 4a, 4c), TBT 10 mg을 투여한 군에

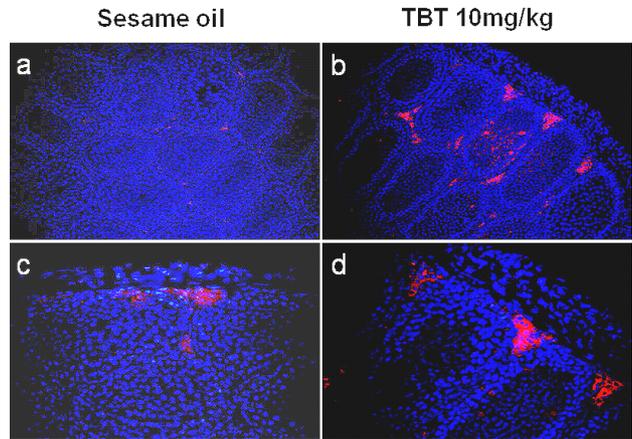


Fig. 4. Adipocyte increase in the rat testes after TBT exposure. Paraffin sections of 3-week-old rat testes were stained with BODIPY (red) and counterstained with DAPI (blue) after TBT exposure for 7 days. Original magnification, a, b; 200 \times ., c, d; 400 \times .

서는 세정관 사이사이 간질세포들에서 빨간색 형광으로 염색된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4b, 4d).

4. TBT 투여 후 정소 내 세포자연사 확인

TBT 투여 후 정소에서 세포자연사가 일어난 세포들을 확인하기 위하여 TUNEL 방법으로 정소 절편을 염색한 후 형광 현미경으로 관찰하였다. TUNEL 염색 결과, sesame oil만 투여한 대조군에서는 염색된 세포들을 찾아볼 수 없었으나 (Fig. 5a), TBT을 투여한 실험군에서는 간질세포들에서 염색된 것을 확인할 수 있었다. 아울러 염색된 세포의 수는 투여된 TBT 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5b).

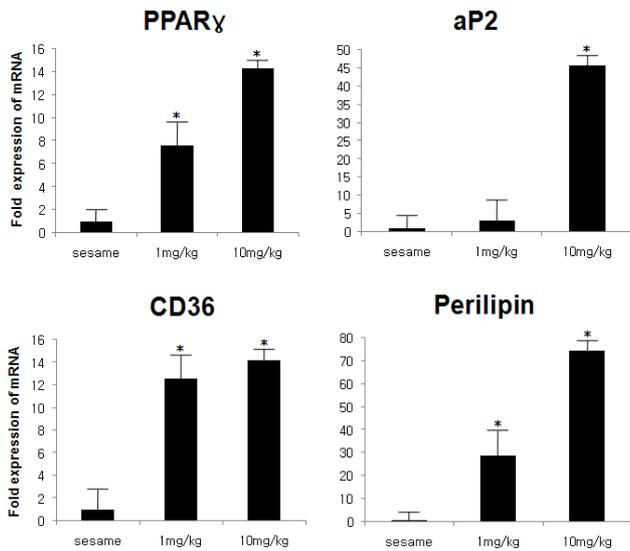


Fig. 3. The expression levels of adipogenesis-related genes in the Leydig cells of rat testes after TBT exposure. The male rats (five animals per treatment) were dosed with TBT 1 mg/kg, 10 mg/kg or vehicle (sesame oil alone) daily for 7 days by oral administration. cDNA was prepared from testis for real-time PCR analysis. Expression levels were normalized to 18s. Data are represented as Mean \pm SEM. *, $P < 0.05$ versus control (sesame oil).

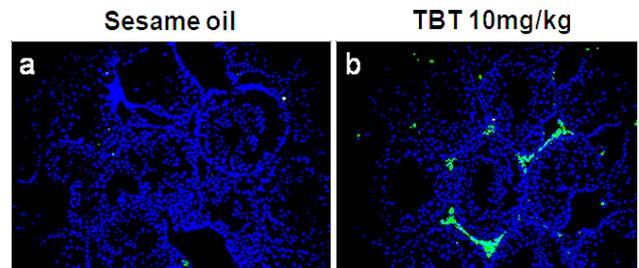


Fig. 5. Detection of the apoptotic cells in the testes after TBT exposure. Paraffin sections of rat testes were stained by using TUNEL assay kit and counterstained with DAPI after TBT exposure for 7 days. Apoptotic cells stained by TUNEL show as green. Original magnification, 200 \times .

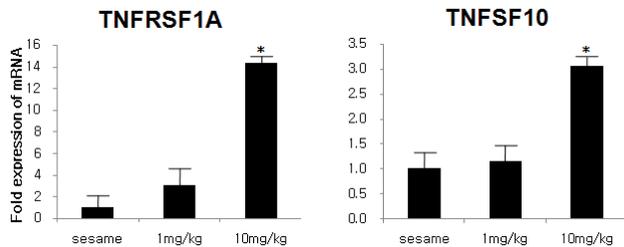


Fig. 6. The expression levels of apoptosis-related genes in the Leydig cells of rat testes after TBT exposure. The male rats (five animals per treatment) were dosed with TBT 1 mg/kg, 10 mg/kg or vehicle (sesame oil alone) daily for 7 days by oral administration. cDNA was prepared from testis for real-time PCR analysis. Expression levels were normalized to 18s. Data are represented as Mean±SEM. *, $P < 0.05$ versus control (sesame oil).

5. 간질세포 내 세포자연사 관련 유전자 발현 증가

TBT가 정소 내 간질세포의 세포자연사와 연관이 있나 알아보기 위해 분리된 간질세포에서 세포자연사 관련 유전자 발현을 real-time PCR 방법으로 확인하였다. TNFRSF1A와 TNFSF10 유전자의 발현이 대조군에 비해 TBT 투여군에서 농도 의존적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

논 의

대표적인 환경성 내분비 교란물질인 TBT는 생쥐 정소 내 스테로이드 호르몬 합성을 억제시키고 세포자연사를 유발시킴으로써 정소의 기능을 저하시키는 것으로 잘 알려져 있다(Ohno et al., 2005). 또한 TBT는 PPAR γ 의 리간드로 지방세포 분화를 유도하여 세포나 조직 기능에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고하고 있다(Kirchner et al., 2010). 그러나 이러한 TBT가 체내 다른 세포에서와 마찬가지로 정소 내 간질세포도 지방세포로 분화 유도시킬 수 있는지, 또한 이러한 지방세포로의 분화가 간질세포의 세포자연사와 연관이 있는지 그 기전에 대해 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 생쥐 정소 내 간질세포를 대상으로 TBT에 의한 지방세포 분화가 일어나는지, 아울러 TBT가 간질세포의 세포자연사에는 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다.

먼저 TBT에 대한 전반적인 독성을 평가하기 위하여 TBT 투여에 따른 체중 변화를 조사하였다. TBT 투여 후 7일간 체중의 변화를 조사한 결과, TBT를 투여한 실험군에서 약간의

체중에 증가를 보였으나, sesame oil만 투여한 대조군과 비교해서 유의한 차이는 보이지 않았다. 반면, 부정소 주위에 붙어 있는 지방의 무게는 10 mg TBT를 투여한 군에서 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 TBT에 의한 지방 전구세포 내 PPAR γ 단백질의 활성화와 연관이 있을 것으로 사료된다. 현재까지 보고된 연구 결과에 따르면, 배양된 지방 전구세포에 TBT를 처리할 경우 PPAR γ 와 RXR 유전자 발현이 증가하면서 지방세포로의 분화가 촉진되는 것으로 보고하고 있으며(Kanayama et al., 2005), 또한 지방유래 줄기세포를 이용한 실험에서도 마찬가지로 지방세포로의 분화가 촉진되고, 세포 내 지질이 축적되는 것을 보고하였다(Grün et al., 2006). 이러한 결과들은 TBT에 노출될 경우 체내 지방이 축적되면서 비만으로 이어질 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

한편, TBT 투여 후 정소의 무게는 감소하는 경향을 보였으며, 생식선지수(GSI)를 계산해 본 결과에서도 대조군에 비해 TBT 처리군에서 생식선지수가 유의하게 감소하는 것을 알 수 있었다. 이러한 정소 무게의 감소는 TBT 투여에 따른 정자 수의 감소가 주원인으로 생각되며, 기존에 발표된 논문에서 생쥐를 TBT에 노출시킬 경우 정자 형성 이상과 함께 정자 수가 감소하는 것으로 보고된 바 있다(Chen et al., 2008). 또한 솜뱅이(*Sebastiscus marmoratus*)를 이용한 실험에서 TBT에 노출시킬 경우 Sertoli 세포 내 γ -glutamyl transpeptidase 활성이 감소하면서 정자 형성이 억제되며, 또 다른 기전으로는 Sertoli 세포 내 RXR와 PPAR γ 발현이 증가하면서 지질 소적(lipid droplet)이 증가하는 것으로 보고하고 있다(Zhang et al., 2009). 이러한 Sertoli 세포 내 지질 소적의 증가는 세포의 기능을 상실시키면서 정자 형성에 이상을 초래하게 된다.

TBT가 위에서 언급한 Sertoli 세포를 포함해 체내 여러 세포를 지방세포로 분화시킬 수 있다는 것은 잘 알려진 사실이다. 이를 근거로 TBT 투여 후 정소 내 간질세포에서 지방세포 분화 유전자 발현을 real-time PCR 방법으로 분석한 결과, PPAR γ 뿐 아니라 aP2, Perilipin, CD36 등 지방세포 분화 관련 유전자들의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. TBT가 PPAR γ 의 발현을 촉진시키고, 또한 RXR과 상호작용하여 지방세포로의 분화를 촉진시킨다는 것은 이미 보고된 바 있다(Nakanishi, 2008). aP2(adipocyte fatty acid binding protein)는 지방 대사와 지방산 세포 내 수송에 관여하는 단백질로 지방세포 분화 과정에서 다량 발현하는 것으로 알려져 있다(Mandrup & Lane, 1997; Gregoire et al., 1998). 또한 배양된 지방세포주

에 TBT를 처리할 경우 aP2 발현이 급속히 증가한다는 것이 보고되었고, 이러한 aP2의 발현은 PPAR γ 에 의해 조절되는 것으로 밝혀졌다(Carfi et al., 2008; Shao & Lazar, 1997). Perilipin은 지방세포와 스테로이드 합성 세포에서 특이적으로 발현되는 인산화 단백질로 중성지방 소적으로 둘러싸여 있으며(Londos et al., 1995), 호르몬 의존성 lipase와 함께 상호 작용하면서 지방분해 신호를 조절하는 것으로 알려져 있다(Egan et al., 1992). 또한 Perilipin은 triglyceride의 저장과 지방대사에 필수적인 요소임이 밝혀지고 있다(Mottagui-Tabar et al., 2003; Tansey et al., 2003). CD36은 지방세포에서 발현되는 scavenger receptor로 산화된 LDL을 제거하고(Febraio et al., 2001), 또한 지방산을 지방세포 안으로 수송하는 기능이 있는 것으로 보고하고 있다(Ibrahimi et al., 1996). CD36 발현은 지방세포로의 분화과정 중에 aP2와 마찬가지로 PPAR γ 에 의해 조절 받는 것으로 알려져 있다(Feng et al., 2000). 이상의 연구 결과들을 종합해 볼 때, 투여된 TBT가 정소 내 간질세포에 작용하여 PPAR γ 의 발현을 촉진시키고, 이로 인하여 지방세포 분화 관련 단백질인 aP2, Perilipin 및 CD36 mRNA 발현이 증가한 것으로 사료된다.

TBT 투여 후 간질세포 내 지방세포 분화 관련 유전자 발현의 증가로 인하여 간질세포가 지방세포로 분화하였는지를 확인하기 위하여 중성지방을 염색하는 BODIPY로 정소 절편을 염색하고 관찰하였다. BODIPY 염색 결과, sesame oil만을 투여한 대조군에서는 BODIPY에 의해 염색된 세포들을 관찰할 수 없었으나, TBT를 투여한 군에서는 세정관 사이에 존재하는 간질세포들이 염색된 것을 확인할 수 있었다. 최근에 흰쥐와 쏘방이를 대상으로 TBT를 노출시킨 후 정소 내 Sertoli 세포를 관찰한 결과, 지질 소적이 증가하였다는 보고가 있었다(Kishita et al., 2007; Zhang et al., 2009). 이러한 결과는 TBT가 Sertoli 세포에서 지방세포 분화를 유도하는 것처럼 간질세포에서도 지방세포 분화를 유도할 수 있을 것으로 사료된다. 즉, 본 실험에서 흰쥐에 투여된 TBT가 정소 내 간질세포에 작용하여 지방세포 분화 관련 단백질의 발현을 촉진시키고, 이로 인하여 간질세포 내 지질 생성이 증가한 것으로 보인다. 더욱이 TBT에 의해 정소 내 세포들이 지방세포로 분화하는 것은 간질세포의 섬유화(fibrosis)와 연관이 있는 것으로 보이며(Zhang et al., 2009), 이로 인하여 정소 기능이 저하될 수 있는 것으로 사료된다.

TBT에 의해 정소에서 세포자연사가 증가한다는 것은 이

미 잘 알려진 사실이나, 본 실험에서도 정소 내 세포자연사가 간질세포에서 일어나는지를 확인하기 위해 TUNEL 방법으로 정소 절편을 염색하였다. TUNEL 염색 결과, 세정관 사이에 존재하는 간질세포에서 염색되는 것을 관찰할 수 있었고, 염색된 세포의 수는 투여된 TBT 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 최근 생쥐를 대상으로 한 실험에서 TBT를 노출시킬 경우 정소 내 생식세포와 Leydig 세포의 세포자연사가 증가하는 것으로 보고하고 있다(Kim et al., 2008). TBT에 의해 유도되는 Leydig 세포의 세포자연사는 testosterone 생성 감소와 연관이 있으며, 이는 TBT에 의한 스테로이드 합성 효소의 활성 억제와 함께 간질세포의 세포자연사가 정소 기능 저하의 주원인으로 사료된다. 그러나 아직 TBT에 의한 정소 내 세포자연사가 어떤 기전으로 유도되는지 명확히 밝혀져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 TBT 투여 후 정소로부터 분리된 간질세포에서 세포자연사 관련 유전자 발현을 조사하였다. TNFRSF1A는 TNF α 수용체(TNFR1) 유전자로 항세포자연사 단백질인 BCL2-associated athanogene 4(BAG4/SODD)와 전환 단백질인 TRADD 및 TRAF2와 상호작용하면서 세포자연사를 조절하는 것으로 알려져 있다(Hsu et al., 1996). 최근 mono-(2-ethylhexyl)phthalate(MEHP)에 의해 유도된 생식세포의 세포자연사가 Sertoli 세포에서 TNF α 와 TNFR1 상호작용에 의해 유도되는 것으로 밝혀졌다. 즉, MEHP 자극으로 생식세포에서 만들어지는 TNF α 가 Sertoli 세포막에 존재하는 TNFR1에 결합하여 NF- κ B를 활성화시키고, 이로 인하여 Sertoli 세포에서 FasL가 발현되면서 생식세포가 세포자연사로 죽어가는 것을 보고하였다(Yao et al., 2007). 이러한 결과는 간질세포에서 발현되는 TNFRSF1A 또한 같은 기전으로 세포자연사를 유발시킬 수 있다는 것을 제시하고 있다. 한편, TNFSF10는 TNF-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)의 유전자로 세포자연사를 유발시키는 리간드로 알려져 있다(Wiley et al., 1995). 즉, TRAIL은 사멸 수용체인 DR4(TRAIL-R1)와 DR5(TRAIL-R2)와 결합하면서 caspase-8를 활성화시키고, procaspase-3, -6, -7으로 이어지는 신호전달 과정을 통해 세포자연사를 유도한다. 본 연구 결과, TNFRSF1A와 TNFSF10 유전자 모두 TBT 투여에 의해 증가한다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 투여된 TBT가 간질세포에서 TNF 수용체와 TRAIL을 증가시킴으로써 세포자연사를 유도할 수 있음을 의미한다.

본 연구 결과들을 종합해 볼 때, 수컷 흰쥐에 투여된 TBT는

정소의 간질세포 내 지방세포 분화 유도 유전자, PPAR γ , aP2, Perilipin 및 CD36 mRNA의 발현을 증가시키면서 간질세포의 지방세포로의 분화를 촉진시켰고, 아울러 세포자연사 유도 유전자인 TNF 수용체와 TRAIL의 발현을 증가시키면서 세포자연사를 유발시키는 것으로 나타났다. 이러한 TBT 노출에 따른 정소 내 간질세포의 지방세포로의 분화와 세포자연사의 증가는 결과적으로 정소의 기능을 저하시키면서 임상적으로는 남성 불임의 원인이 될 수 있음을 제시한다.

감사의 글

본 논문은 2010학년도 서울여자대학교 교내학술특별연구비 지원을 받아 작성되었습니다.

인용문헌

- Appel KE (2004) Organotin compounds: Toxicokinetic aspects. *Drug Metab Rev* 36:763-786.
- Berger J, Moller DE (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53:409-435.
- Blaber SJM (1970) The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus*. *Proc Malacolog Soc London* 39:231-233.
- Boyer IJ (1989) Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology* 55:253-298.
- Carfi M, Croera C, Ferrario D, Campi V, Bowe G, Pieters R, Gribaldo L (2008) TBTC induces adipocyte differentiation in human bone marrow long term culture. *Toxicology* 249(1):11-18.
- Chen Y, Zuo Z, Chen S, Yan F, Chen Y, Yang Z, Wang C (2008) Reduction of spermatogenesis in mice after tributyltin administration. *Toxicology* 251:21-27.
- Craig PJ (1986) *Organometallic Compounds in the Environment*, Longman Group, Ltd., Chichester, United Kingdom.
- Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos MC Jr, Londos C (1992) Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: Translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8537-8541.
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL (2010) CD36: A class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108:785-791.
- Feng J, Han J, Pearce S, Silverstein S, Gotto A, Hajjar D, Nicholson A (2000) Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR- γ . *J Lipid Res* 41:688-696.
- Gibbs P, Bryan G (1986) Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *J Mar Biol Assoc UK* 66:767-777.
- Golub M, Doherty J (2004) Triphenyltin as a potential human endocrine disruptor. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 7:281-295.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809.
- Grün F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Cubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B (2006) Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol* 20:2141-2155.
- Heidrich DD, Steckelbroeck S, Klingmuller D (2001) Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. *Steroids* 66:763-769.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84:299-308.
- Ibrahimi A, Sfeir Z, Magharaie H, Amri E, Grimaldi P, Abumrad NA (1996) Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2646-2651.
- Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, Nishikawa J (2005) Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome pro-

- liferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol Pharmacol* 67:766-774.
- Kim SK, Kim JH, Han JH, Yoon YD (2008) Inhibitory effect of tributyltin on expression of steroidogenic enzymes in mouse testis. *Int J Toxicol* 27:175-182.
- Kirchner S, Kieu T, Chow C, Casey S, Blumberg B (2010) Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Mol Endocrinol* 24:526-539.
- Kishta O, Adeeko A, Li D, Luu T, Brawer JR, Morales C, Herno L, Robaire B, Hales BF, Barthelemy J, Cyr DG, Trasler JM (2007) In utero exposure to tributyltin chloride differentially alters male and female fetal gonad morphology and gene expression profiles in the Sprague-Dawley rat. *Reprod Toxicol* 23:1-11.
- Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Servetnick DA, Schultz CJ, Levin DM, Kimmel AR (1995) Perilipin: Unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Trans* 23:611-615.
- le Maire A, Grimaldi M, Roecklin D, Dagnino S, Vivat-Hannah V, Balaguer P, Bourguet W (2009) Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors. *EMBO Rep* 10:367-373.
- Mandrup S, Lane MD (1997) Regulating adipogenesis. *J Biol Chem* 272:5367-5370.
- McVey MJ, Cooke GM (2003) Inhibition of rat testis microsomal 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity by tributyltin. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:99-105.
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 58:726-741.
- Mottagui-Tabar S, Ryden M, Lofgren P, Faulds G, Hoffstedt J, Brookes AJ, Andersson I, Arner P (2003) Evidence for an important role of perilipin in the regulation of human adipocyte lipolysis. *Diabetologia* 46:789-797.
- Mu YM, Yanase T, Nishi Y, Takayanagi R, Goto K, Nawata H (2001) Combined treatment with specific ligands for PPAR:RXR nuclear receptor system markedly inhibits the expression of cytochrome P450arom in human granulosa cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 181:239-248.
- Nakanishi T (2008) Endocrine disruption induced by organotin compounds; organotins function as a powerful agonist for nuclear receptors rather than an aromatase inhibitor. *J Toxicol Sci* 33:269-276.
- Ogata R, Omura M, Shimasaki Y, Kubo K, Oshima Y, Aou S, Inoue N (2001) Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. *J Toxicol Environ Health A* 63:127-144.
- Ohno S, Nakajima Y, Nakajin S (2005) Triphenyltin and tributyltin inhibit pig testicular 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and suppress testicular testosterone biosynthesis. *Steroids* 70:645-651.
- Philbert MA, Billingsley ML, Reuhl KR (2000) Mechanisms of injury in the central nervous system. *Toxicol Pathol* 28:43-53.
- Powers MF, Beavis AD (1991) Triorganotins inhibit the mitochondrial inner membrane anion channel. *J Biol Chem* 266:17250-17256.
- Saitoh M, Yanase T, Morinaga H, Tanabe M, Mu YM, Nishi Y, Nomura M, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Nawata H (2001) Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN. *Biochem Biophys Res Commun* 289:198-204.
- Shao D, Lazar MA (1997) Peroxisome proliferator activated receptor γ , CCAAT/ enhancer-binding protein α , and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 272:21473-21478.
- Tansey JT, Huml AM, Vogt R, Davis KE, Jones JM, Fraser KA, Brasaemle DL, Kimmel AR, Londos C (2003) Functional studies on native and mutated forms of perilipins: a role in protein kinase A-mediated lipolysis

of triacylglycerols. J Biol Chem 278:8401-8406.

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity 3:673-682.

Yao PL, Lin YC, Sawhney P, Richburg JH (2007) Transcriptional regulation of FasL expression and participation of sTNF-alpha in response to sertoli cell injury.

J Biol Chem 282:5420-5431.

Zhang J, Zuo Z, He C, Cai J, Wang Y, Chen Y, Wang C (2009) Effect of tributyltin on testicular development in *Sebastiscus marmoratus* and the mechanism involved. Environ Toxicol Chem 28:1528-1535.

(received 5 December 2010, received in revised form 19 December 2010, accepted 20 December 2010)