

Localization and Accumulated Concentration Changes of Mercury Compound in Reproductive Organs of Female Mice with Time

Young Eun Kim, Yu Seon Kim and Hyun Wook Cho*

Department of Biology, College of Life Science and Natural Resources, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 57922, Korea

Received March 8, 2018 / Revised May 23, 2018 / Accepted June 4, 2018

This study was performed to investigate the localization and concentration changes of mercury compound in female reproductive organs with time. Methylmercuric chloride was subcutaneously injected weekly into pubescent female mice for 3 weeks. For the concentration changes of mercury with time, the mice were sacrificed at 10, 150, and 300 days post treatment (DPT). Body and organ weights were not significantly different between the control and mercury-treated groups, except for 10 DPT in body weight. Localization of accumulated mercury was identified by the autometallography method. Localization of mercury compounds in the uterus, ovary, and ovum was analyzed with a light microscope. In the uterus, mercury was densely located in the stroma cells and surface epithelium of the perimetrium at 10 DPT. Mercury concentration was decreased at 150 DPT and did not appear at 300 DPT. In the ovary, mercury particles were distributed in the stroma cells of the cortex region, cells of the theca around the follicle, and the corpus luteum at 10 DPT. Mercury was concentrated in the medulla region at 150 DPT and was not distributed at 300 DPT. In the ovum, mercury particles were mainly located in the marginal region at 10 and 150 DPT. Mercury concentration was decreased and evenly distributed at 300 DPT. These results suggest that hormone synthesis, implantation, and developing embryos will be affected by mercury compound in the female mouse.

Key words : Autometallography, mercury, ovum, ovary, uterus

서 론

산업이 발달함에 따라 배출되는 산업 폐기물, 또는 중금속이 함유된 농약제의 사용 등, 최근에는 이런 중금속 오염에 대한 다양한 정보를 쉽게 접할 수 있게 되었다. 수은이 미치는 영향에 대한 다양한 기작 중에서, 동물체 내에서 내분비 호르몬 작용을 흥내 내거나, 또는 방해하는 장애 물질에 수은과 같은 중금속을 포함하여 설명을 하기도 한다[31]. 여러 가지 중금속 중, 수은화합물은 공기, 토양, 담수와 해수에서 확인되고 있으며[31], 흔히 주위에서는 담배, 알코올 음료, 다이어트 보조약품, 오염된 공기와 물과 같은 다양한 경로를 통해 중금속 속에 노출된다고 알려져 있다[25]. 아울러서 수은에 노출되는 또 다른 경로는 피부에 바르는 크림[1, 29], 치과에서 사용하는 아말감 충전제[3, 24], 어류와 같은 음식물[19, 28] 등 다양하다. 사람의 경우, 가장 일반적인 수은 노출 경로는 오염된 어류의 섭취를 통해서이다[16]. 대표적으로 1950년대 일본의 구마모

토현 미나마타시에서 메틸수은이 함유된 폐수가 바다로 흘러 갔고, 이 수은이 어류와 패류에 생물 농축되었으며, 이들 어패류를 먹은 주민에서 사지 보행 장애, 떨림, 발음 장애, 근육의 불수의적 운동과 같은 신경계 관련 증상이 발생하면서 알려진 것이 미나마타병이다. 이처럼 수은화합물에 노출될 경우, 특히 신경계의 퇴행성 변화를 유발하는 것으로 알려져 있으며[18], 신장에 가장 많이 축적되는 것으로 알려져 있다[26].

신경계에 미치는 영향 외에도 체내에 수은이 축적될 경우, 생식기관에 미치는 영향에 대한 연구도 많이 보고되어 있다. 수은에 의해 흰쥐 정자의 운동성이 감소되고, 비정상적인 정자 두부의 수가 증가되며, 혈액의 테스토스테론 농도가 감소된다고 하였다[17]. 수은은 혈액 장벽(blood-brain barrier)과 태반 장벽(placental barrier)을 비교적 쉽게 통과할 수 있어서 뇌와 태아의 장기에 축적될 수 있다고 하였다[37]. 따라서 마우스 암컷과 수컷을 모두 수은에 노출시킨 다음, 합사시켜서 생식에 미치는 영향을 조사한 바에 의하면 수은 투여군에서 배아 수, 출산하는 새끼 수, 생존한 새끼 수 모두 감소되었다고 하였다[21].

또한 수컷을 대상으로 한 실험에서, 수은에 노출된 수컷 흰쥐를 암컷과 교미시켜 생식력 테스트를 한 결과 수은투여 농도가 높아질수록 생존 배아 수 또는 새끼 수가 감소되어 생식력이 감소된다고 하였다[4]. 사람의 경우, chlor-alkali 공장에서 수은화합물에 노출된 남성의 경우, 상대 여성의 자연유산이 증가되었다는 보고[11]도 있다.

*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3614, Fax : +82-61-750-3208

E-mail : hwcho@sunchon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이처럼 수은이 암컷과 수컷 생식계에 미치는 다양한 영향에 대하여는 많은 보고가 되어 있으나, 축적된 수은이 자궁이나 난소의 어느 위치에 분포하는지는 보고가 많지 않다. 체내에 축적된 수은의 위치를 현미경으로 확인할 수 있는 방법이 오토메탈로그라피(autometallography)이다[8, 12, 13]. 본 실험에서는 사춘기에 해당하는 암컷 마우스에 수은을 투여하고 일정기간이 지난 다음 희생하였을 때, 생식기관에 축적된 수은의 위치를 파악하고, 아울러서 시간이 지남에 따라 수은 농도가 자연스럽게 감소가 되는지 여부를 확인하기 위해서 오토메탈로그라피 방법으로 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 투여 및 관류

사춘기에 해당하는 ICR (다물 사이언스)계통의 6주령 암컷 마우스 36마리를 구입하여 사용하였다. Emanuele 등[15]이 보고한 기준에 따라 마우스의 사춘기 구별을 정하였다. 마우스의 평균 체중은 24 g이었다. 실험기간 동안 고품사료와 증류수는 무제한으로 공급하였으며, 사육실의 환경은 온도 22±2°C, 상대습도 50±5%, 조명의 주기 12L:12D로 유지하였다. 또한 순천대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 SCNU IACUC- 2014-05)을 받아 실험을 수행하였다.

수은 투여군의 경우, 생리식염수 0.1 ml에 수은 methylmercuric chloride (CH₃HgCl, Juncei Chemical Co, Ltd) 0.01 mg 농도로 용해하여 일주일에 한 번씩 총 3주간 등 쪽 목덜미에 한 마리당 0.1 ml씩 피하 주사하였다. 대조군의 경우 생리식염수 0.1 ml를 수은 투여군과 동일한 방법으로 피하 주사하였다.

대조군과 수은 투여군의 마우스는 3주간 총 3회의 투여 종료 후, 무작위로 세 개의 그룹으로 분류하여 10일, 150일, 300일째에 관류하여 희생하였다. 투여 종료 후 10일에 희생한 그룹의 경우, 대조군과 수은투여군 각각 6마리씩 총 12마리를 배정하였다. 투여 종료 후 150일과 300일에 희생한 경우도 마찬가지로 대조군과 수은 투여군에 각각 6마리씩 배정하였다. 관류희생 전 마우스 한 마리당 100 unit의 heparin (Sigma-Aldrich)을 복강 투여하고, 이후 diethyl ether (Juncei Chemical Co, Ltd)로 흡입 마취하였다. 마취시킨 마우스의 체중을 측정된 뒤 peristaltic pump (Spectra/Chrom MP-1 pump)를 이용하여 관류 실험을 진행하였다. 즉, 좌심실에 관류용 바늘을 찔러 넣어 2분간 ringer's solution (pH 7.4)을 이용해 관류시킨 다음, 이후 4% glutaraldehyde (pH 7.4) 용액으로 치환하여 20분간 관류시켰다.

조직처리 및 염색

관류시킨 마우스에서 난소, 자궁을 적출하였다. 이후 난소를 여과지에 올려 물기를 제거하고 무게를 측정된 뒤, 표본으로 제작하기 전까지 동일한 관류용액인 4% glutaraldehyde

(pH 7.4)에 넣어 4°C에서 보관하였다. 자궁도 마찬가지로 관류 용액에 보관하였다. 이들 기관의 조직을 절편으로 만들기 위해 알맞은 크기로 다듬은 다음 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 수세하고, vacuum (Ted Pella, Inc, Model DOA-P704-AA)을 이용하여 진공상태로 70%(2회), 80%(1회), 95%(2회), 100%(3회) ethanol에서 한 시간 간격으로 탈수시킨 후 infiltration solution 처리를 하였다. 이어서 JB-4 embedding solution (Polysciences, Inc)으로 포매 하였다.

포매 과정을 마친 조직은 microtome (RMC Rotary Microtome, MT 990)을 이용하여 2.5 μm 두께의 절편으로 만들어 슬라이드글라스 위에 올린 뒤, 오토메탈로그라피 방법[7, 8, 12]으로 염색하였다. 먼저 증류수에 10분 처리한 다음 26°C의 developer에서 2시간 동안 발색시켰다. 이 후 흐르는 증류수에 55분, 실온에서 5% sodium thiosulfate에 12분, 증류수에 10분 수세 뒤, 0.5% toluidine blue (Sigma-Aldrich)에 5초간 염색하였다. 이후 증류수로 10분간 수세하고 35°C slide warmer에서 약 1시간 건조 한 뒤, permount (Fisher Chemical)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

사진촬영 및 통계처리

난소, 난자, 자궁 등에 축적된 수은의 위치와 시간에 따른 수은 농도 변화를 확인하기 위해 광학 현미경(Olympus BX50)에 부착된 SPOT camera (Model No. 11.2 Color Mosaic)를 이용하여 촬영하고 분석하였다. 축적된 수은의 농도 비율을 측정하기 위해서 Adobe photoshop CS5프로그램의 색상범위 지정을 사용해 수은이 축적된 부위가 잘 보이도록 색을 조정 한 뒤, 수은이 축적된 부위의 픽셀 값을 구하였다. 비율을 구할 때는 픽셀 값을 사진의 전체 픽셀 값으로 나눈 뒤, 100을 곱하여 조직에 축적된 수은 농도 비율을 구하였다.

체중과 각 기관의 무게에 대한 대조군과 수은 투여군의 통계학적 분석은 ANOVA Test를 이용하였으며, *p* value 0.05 미만을 의미 있는 것으로 판별하였다.

결 과

수은 투여 후 외형적 변화

1회 투여 후 수은 투여군의 주사 부위인 마우스의 등 쪽에 피부괴사가 관찰되기 시작하였고 2회, 3회 투여가 진행될수록 피부괴사가 점점 더 심하게 진행되는 것을 관찰할 수 있었다. 심한 경우 일부 개체에서는 출혈도 관찰되었고, 피부 괴사는 개체마다 차이를 보여 괴사가 진행되지 않거나 심하게 진행되기도 하였다. 3회 투여 후 10일 뒤에는 수은 투여군 모두에서 괴사가 멈추고 상처가 아물기 시작하였다.

체중 및 난소 무게

대조군과 수은 투여군 모두에서 실험 기간 동안 마우스 평

Table 1. Body and ovary weights from control and mercury compound treated groups at each day post treatment

Weight	Group	Day post treatment		
		10	150	300
Body (g)	Control	26.55±1.05	33.79±3.68	36.60±9.74
	Mercury	28.73±1.59*	35.31±5.66	37.80±3.59
Ovary (mg)	Control	10.53±3.06	12.70±1.99	11.98±2.13
	Mercury	10.10±1.68	11.00±1.42	11.78±2.22

Values represent means ± SD.

**p*<0.05 compared with control group of the same day post treatment.

균 체중이 꾸준히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Table 1). 수은 투여 종료 후 10일에 희생한 경우, 대조군에 비해 수은 투여군의 평균 체중이 유의하게 증가하였다. 수은 투여 종료 후 150일과 300일에 희생시킨 경우에도 유의한 차이는 없었지만 대조군에 비해 수은 투여군의 체중이 증가하는 경향을 나타내었다.

실험기간 중 수은 투여 종료 후 150일에 희생시킨 대조군의 난소 1개의 평균 무게가 최대값을 보였으며 300일에는 약간 감소되었다. 그러나 수은 투여군의 난소 무게는 실험기간 내내 증가하는 경향을 보였다(Table 1). 각 희생시킨 날짜별로 대조군과 수은 투여군의 난소 무게를 비교해 보면 대조군에 비해 수은 투여군의 난소 무게가 감소되는 경향을 보였지만 유의한 차이는 나타나지 않았다.

생식기관에 축적된 수은의 분포위치 및 농도변화

자궁의 경우(Fig. 1A), 수은 투여 종료 후 10일에는 자궁 내막 주위의 지질세포에 다량의 수은이 묻혀진 형태로 분포(Fig. 1B)하다가 150일에는 수은의 분포 면적이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1C). 수은 투여 종료 후 300일에는 수은

이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 1D). 자궁바깥막(perimetrium)을 구성하는 중피의 상피(surface epithelium) (Fig. 2A)에 수은 투여 종료 후 10일에는 비교적 넓은 범위에 분포되어 있다가(Fig. 2B), 150일 경우에는 수은의 농도와 범위가 다 같이 감소되었고(Fig. 2C), 300일 경우에는 잘 관찰되지 않았다(Fig. 2D). 자궁에 축적된 수은의 농도 비율은 투여 종료 후 10일, 150일, 300일에 각각 0.72, 0.21, 0.06으로 시간이 지남에 따라 감소하였다(Table 2).

자궁에 비해 난소에 수은이 더 많이 축적되어 있었다. 난소의 경우(Fig. 3A) 수은 투여 종료 후 10일에 희생시켰을 때, 난소 바깥 부분에 해당하는 피질부의 난소의 바탕을 이루는

Table 2. Mercury concentration rates (%) in mercury compound treated group at each day post treatment

Organ	Day post treatment		
	10	150	300
Uterus	0.72	0.21	0.06
Ovary	1.69	0.84	0.07
Ovum	0.35	0.25	0.07

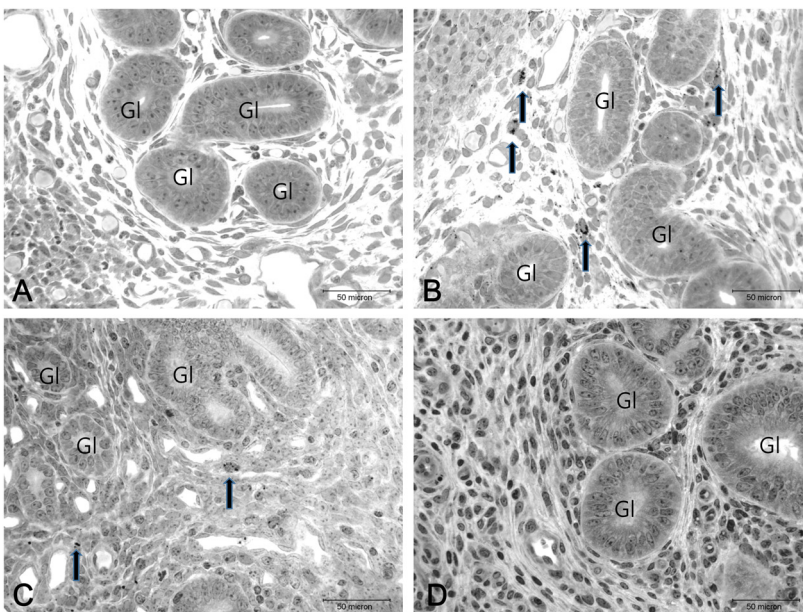


Fig. 1. Micrographs of uterus from control (A) and mercury (B) compound treated groups of 10 days post treatment. Mercury grains (arrows) were distributed in the stroma cells around uterine glands on 10 days of post treatment. However, mercury concentration was decreased on 150 (C) days and not appeared on 300 (D) days post treatment. Bars size = 50 μm. Gl; gland.

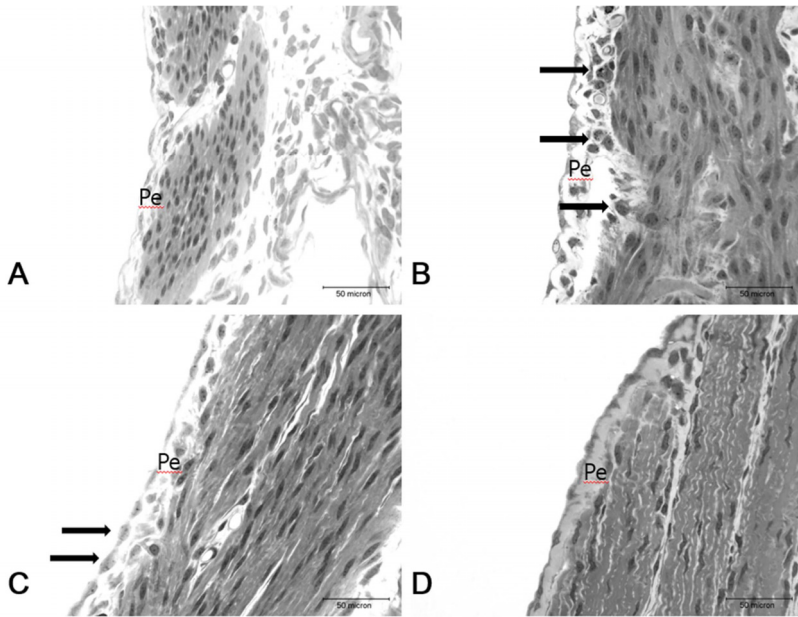


Fig. 2. Micrographs of out serosa layer (perimetrium) of the uterus from control (A) and mercury (B) compound treated groups of 10 days post treatment. Mercury was distributed as dark particles form (arrows) in surface epithelium on 10 and 150 (C) days post treatment. However, mercury was not located in the surface epithelium on 300 (D) days post treatment. Bars size = 50 μ m. Pe; perimetrium.

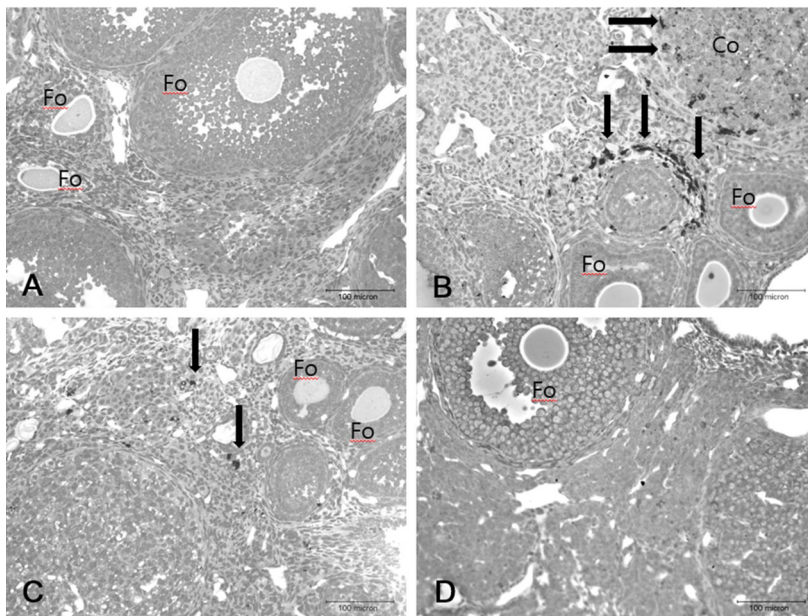


Fig. 3. Micrographs of follicles and stroma cells in the ovary from control (A) and mercury (B) compound treated groups of 10 days post treatment. Mercury (arrows) was distributed as dark particles in the cells of theca around follicle, stroma cells, and corpus luteum on 10 and 150 (C) days post treatment. However, mercury was not located in the granular cells of follicle 10, 150 and 300 (D) days post treatment. Bars size = 50 μ m. Fo; follicle, Co; corpus luteum.

지질세포(stroma cell) 및 황체에 다량의 수은이 묻혀진 형태로 축적되어 나타났다(Fig. 3B). 수은 투여 종료 후 150일 경우에는 수은이 수질부로 이동하였으며, 10일에 비해 수은의 양이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3C). 수은 투여 종료 후 300일 후에는 수은이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 3D). 수은 투여 종료 후 10일에 희생시켰을 때, 난포의 난포막(theca)을 이루는 세포에 수은이 다량으로 축적되어 있었지만, 난포 내 난자 주위의 과립세포에는 수은이 축적되지 않았다. 수은 투여 종료 후 150일에 희생시킨 경우에는 지질세포에 축적된 수은의 농도가 감소되었으며, 300일에는 수은이 약하게 관찰되거나 또는 나타나지 않는 경우도 있었다. 난소에 축적된 수

은의 농도 비율은 투여 종료 후 10일, 150일, 300일에 각각 1.69, 0.84, 0.07로 시간이 지남에 따라 감소하였다(Table 2).

난포 내에 있는 난자의 경우(Fig. 4A), 수은 투여 종료 후 10일에 희생시켰을 때, 난자 전체에 고르게 수은이 분포하는 경우도 있었지만 난자의 바깥쪽에 굵은 알갱이 형태로 줄지어 분포해 있기도 하였다(Fig. 4B). 수은 투여 종료 후 150일의 경우, 바깥쪽과 난자 내부에 수은이 분포하였고 그 농도는 약간 감소하였다(Fig. 4C). 수은 투여 종료 후 300일에는 보다 작은 알갱이 형태로 난자 전체에 고르게 분포되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4D). 난자의 경우에도 축적된 수은 농도 비율은 자궁과 난소처럼 시간이 지남에 따라 역시 감소되었다

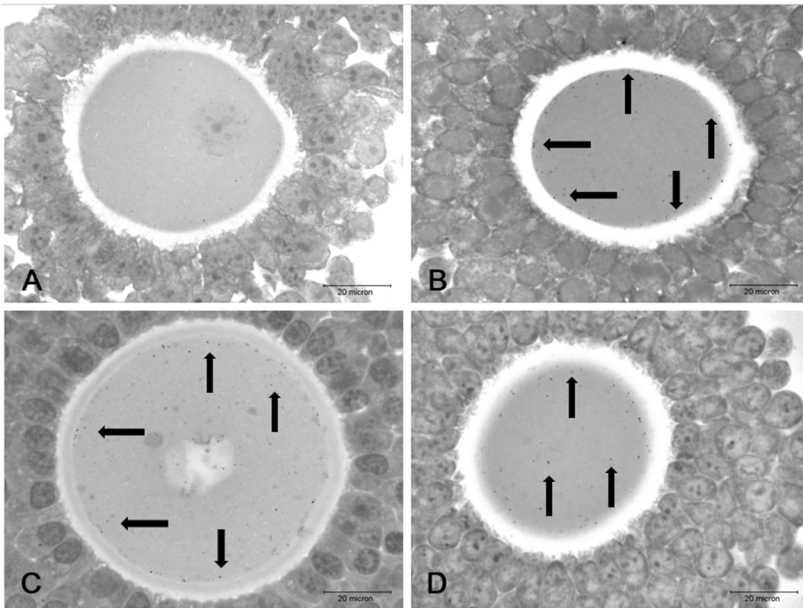


Fig. 4. High magnification micrographs of ovum from control (A) and mercury (B) compound treated groups of 10 days post treatment. Mercury particles (arrows) were mainly located in the marginal region of ovum on 10 and 150 (C) days post treatment. Mercury concentration was decreased and evenly distributed on 300 (D) days post treatment. Bars size = 20 μm.

(Table 2).

고 찰

본 연구에서는 수은이 미치는 영향에 대한 다양한 기초 자료를 확보하기 위해서, 사춘기에 해당하는 생후 6주령 암컷 마우스에 수은화합물을 투여하고, 수은 투여 종료 후 10일, 150일, 300일에 희생시켜 생식기관 조직 내 축적된 수은의 분포 위치와, 아울러서 시간에 따른 축적된 수은의 농도변화를 확인하고자 하였다.

본 실험에서 수은 투여가 끝난 후, 시간이 지남에 따라 축적된 수은의 농도가 감소하였다. 이런 결과는 기존의 보고에 의해서도 확인되고 있다. 즉, 암컷 마우스에 methyl mercury를 30일 동안 매일 경구 투여한 다음, 그 이후에는 수은을 투여하지 않고 2, 4, 6, 8주가 지난 후에 희생시켜 수은의 농도 변화를 관찰하였는데, 신장과 림프절에 축적되어 있던 수은이 투여 종료 2주후부터 실험기간 마지막인 8주까지 꾸준히 감소되었다고 하였다[20]. 이처럼 시간이 지남에 따라 자연스럽게 수은의 농도가 줄어들지만, 배출을 조절하는 경로에 대해서는 아직 완전하게 밝혀져 있지 않다[6, 38]. 거의 모든 세포에 들어 있는 glutathione (GSH) 단백질은 수은과 결합해서 GSH-Hg 복합체를 형성하는데[32, 38], 이것이 세포 밖으로 수은이 수송되는 첫 번째 형태이다[9]. GSH-Hg 복합체는 유기 음이온 수송체(organic anion transporter)를 거쳐 근위세뇨관 세포(proximal tubular cell)로 수송되는데, 결과적으로 multidrug resistance - tolerated proteins (MRPs)에 의해 소변으로 운반되어 배출된다[5]. 수은 독성을 해독하는 GSH는 MT에 의해서 유도되는데, MT는 cysteine 이 풍부한 단백질로서 다양한 동물 조직에 존재하며, 또한 중금속을 제거하는 기능을 갖고 있

다[36].

수은이 동물 체내에 흡수되는 기작에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않은데, 보고에 의하면 methyl mercury에 구강 노출이 될 경우, 혈액의 적혈구 세포를 통해 95%가 흡수되어서 세포나 조직에 분포하게 된다[20]. 수은을 경구 투여한 후 간 조직을 관찰해보면 간소엽의 가장자리에 있는 간문맥에서 간소엽의 한 가운데에 있는 중심정맥으로 혈액이 흐르는데 간문맥 주위의 간세포에 수은이 집중적으로 축적된다고 하였다[7]. 이를 통해서도 혈액을 통해 수은이 수송되는 것을 알 수 있으며, 따라서 그 기관으로 들어가는 정맥 주위 세포에 주로 수은이 분포하게 된다.

본 실험의 마우스 체중에서는 수은 투여 종료 후 희생시킨 모든 시점에서 대조군에 비해 수은 투여군의 마우스 평균 체중이 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 수은이 체중에 미치는 영향에 대해서는 상반되고 다양한 결과가 보고되어 있는데, 마우스에 비해 무게가 10배 정도 더 나가는 암컷과 수컷 흰쥐 실험에서, mercuric chloride 투여에 의해 체중이 유의하게 감소하였다고 하였다[2]. 수컷 흰쥐를 이용한 또 다른 실험에서 매일 수은화합물을 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 3.0 mg/kg 농도로 14일간 경구 투여했을 때, 대조군 체중 408 g에 비해 수은 0.5 mg/kg 농도군에서는 수은 투여군의 체중이 406 g으로 감소했으며, 수은 1.0 mg/kg 농도군에서는 435 g으로 증가했고, 가장 농도가 높은 3.0 mg/kg 농도군에서는 382 g으로 감소했다고 하였다[17]. 즉, 수은의 농도에 따라서 체중의 변화가 있었다고 하였다. 또 성체 수컷 마우스에 수은을 80일간 경구 투여한 경우, 대조군에 비해 수은투여군의 평균 체중이 감소하는 경향을 보였으며[7], 일주일에 한번씩 20일간 수은을 성체 수컷 마우스에 피하 투여한 경우에도 체중이 감소하는 경향을 나타내었다고 보고하였다[8]. 수은을 동일한 농도로 투

여한 경우에도 성별에 따라서 체중 외에 독성에 차이가 있다는 사실이 보고된 바 있는데, 암컷의 신장에 MT (metallothionein)의 농도가 더 높아서[27], 수컷에 비해 암컷 마우스의 신장에 수은이 통계적으로 유의하게 더 많이 축적된다는 결과가 알려져 있다[21]. 높은 수은농도가 칼로리를 제한하기 때문에 체중이 감소한다는 보고[22]와 다양한 수은 농도를 피하 주입한 수은 투여군과 대조군의 체중 사이에는 유의한 차이가 없다는 보고[14] 등 여러 가지 논문이 발표되고 있다. 본 실험에서는 수컷 대신에 사춘기 암컷 마우스를 사용하였는데 체중이 증가하는 결과가 확인되었다. 기존의 보고에서 체중에 미치는 수은의 영향처럼, 암컷과 수컷의 성별, 수은의 농도, 생후 주령, 등 다양한 요인에 의해서 체중이 증가한 것으로 사료된다.

본 실험에서, 체중과는 다르게 난소의 평균 무게는 전 실험 기간에 걸쳐 대조군에 비해 수은 투여군에서 감소하는 경향을 보였다. 본 실험결과와 일치하는 보고로는 수은(mercuric chloride)을 투여한 암컷 마우스에서 대조군에 비해 난소의 무게가 감소되었다는 보고가 있다[21]. 그러나 흰쥐에서는 mercuric chloride 투여에 의해서 난소의 무게가 대조군과 수은 투여군 모두에서 유의한 차이가 없었다는 결과도 있다[2]. 암컷 외에 수컷의 생식기관 무게에 미치는 수은의 영향도 보고되어 있는데 수은을 14일 동안 매일 세 종류 농도(0.5, 1.0, 3.0 mg/kg)로 투여한 수컷 흰쥐 실험에서 정소의 무게가 대조군 1.63 g에 비해 세 종류 수은 투여군에서 각각 1.53 g, 1.71 g, 1.61 g으로 나타나 어떤 일관성을 찾기가 어렵다고도 하였다[17]. 또 수은을 90일 동안 매일 경구 투여한 흰쥐에서 3일, 15일, 30일에 각각 측정된 체중에서는 대조군에 비해 정소의 무게가 감소하였으나 7일, 60일, 90일에 측정된 체중에서는 오히려 대조군의 무게가 유의하게 증가하였다는 보고[4]도 있다. 또 일주일에 한 번씩 20일 동안 수은을 피하 투여한 경우에, 수컷 마우스 정소의 무게가 감소하는 경향을 보인다고 하였다[8]. 수컷 마우스에서 정낭의 무게 감소를 수은에 의한 단백질 합성 저해와 안드로겐 호르몬의 불균형 때문에 유발되는 것으로 설명하기도 하였다[30]. 수은화합물이 에스트로겐 수용체 알파의 호르몬-결합 도메인에 결합할 수 있어서 그 도메인에 결합하는 에스트로겐 결합을 억제한다고 하였다[23]. 따라서 수은화합물이 에스트로겐의 기능을 저해 한다고 할 수 있다. 본 실험에서도 수은에 의해 난소에서 합성되는 단백질 저해, 분비되는 호르몬 불균형 등 다양한 요인에 의해서 난소의 무게가 감소한 것으로 보인다.

다양한 경로로 수은에 노출될 수 있는데, 사람이 바르는 피부크림(수은이 함유된)을 이용한 실험에서, 크림을 바른 마우스는 대조군에 비해 난소에 수은이 축적될 수 있어서 교미행동의 변화, 불임이나 난소 기능 부진으로 연결될 수 있다고 하였다[1]. 또한 수은에 노출되는 여성 치과 의사와 치과 보조원들은 불규칙한 생리 주기, 자연 유산, 사산, 기형아 출산 등이 증가되었다고 하였다[33]. 따라서 수은을 다루는 치과 의료

종사자들의 생식력이 감소된다고 보고되었다[10]. 수은으로 인해 직접적인 영향이 각 기관에 나타날 수 있지만 생식기관의 경우에는 생식력 자체에도 영향을 미치는 것을 알려져 있다. 암컷 마우스에 mercuric chloride 2 mg/kg 농도로 피하 주사 하면 배아의 착상 수와 생존 배아 수가 유의하게 감소된다고 하였다[35]. 본 실험에서도 자궁의 중피와 자궁조직을 구성하는 지질 세포에 수은이 분포하였는데, 이로 인해 배아의 착상, 그리고 착상이 되더라도 발생 중인 배아에 수은이 영향을 미칠 것으로 사료된다.

본 실험에서 수은 투여 종료 10일, 150일에도 난소 내 난포를 구성하는 난포막 세포에 수은이 분포되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 난포막 주위에 있는 난소의 바탕을 이루는 지질 세포에도 수은이 축적되어 있는 것을 볼 수 있었다. 이런 지질 세포에 의해서도 수은의 영향이 나타날 것으로 추정할 수 있지만 에스트로겐 생성과 관련 있는 난포막 세포에 수은이 분포하고 있어서 호르몬 분비에도 영향이 있을 것으로 보인다. 이와 유사한 실험으로, 수컷 흰쥐를 이용한 실험에서 수은화합물이 테스토스테론을 생산하는 정소의 Leydig 세포의 기능을 변형시켜서 호르몬 생산을 억제한다고 하였다[4]. 결과적으로 보면 본 연구에서도 이처럼 에스트로겐 생성을 담당하는 난포의 난포막 세포에 수은이 축적되어 있는 것이 확인되었는데, 이로 인해 에스트로겐 생성에 저해가 있을 것으로 사료된다. 기존 결과들을 종합해 보면 수은과 같은 중금속 속 여성이 노출될 경우, 난소 내 난포의 건강 상태가 빈약하게 되어서 생식력 감소와 해로운 임신 결과로 이어질 수 있다고 하였다[31]. 본 연구에서도 이처럼 암컷 난포에 축적된 수은으로 인하여 단백질 합성 저해와 호르몬 불균형이 유발되고, 결과적으로 생식력에도 문제가 있을 것으로 사료된다.

난자와 정자 같은 생식세포 자체에도 수은이 영향을 미쳐서 다음 세대까지도 수은의 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 즉, 수은을 투여한 첫 번째 세대끼리 교미시켜 태어난 두 번째 세대의 흰쥐 난소의 무게가 유의하게 감소되었다고 하였다[2]. 또한 임신한 마우스에 수은화합물을 피하 주사하여 수은에 노출시킨 다음, 낳은 새끼를 성체가 될 때까지(생후 60일) 사육하고, 조사한 결과에 의하면 성별에 따라 차이가 있지만 암컷에서는 흉선 세포, 림프절 세포, 비장 세포의 사이토카인 생산이 억제되었다고 하였다[34]. 이처럼 임신 중에 수은에 노출되고, 낳은 경우에도 대를 이어 수은화합물이 후손의 면역 기능에 지속적인 영향을 미친다고 하였다. 수컷 흰쥐에서도 수은화합물에 의해 정자 운동성 장애가 유발되고, 또 비정상적인 두부를 가진 정자의 수가 증가되어 생식력이 감소되는 것으로 보고되었다[17]. 본 실험에서도 수은 투여 종료 150일, 300일이 지난 후에도 난포 내 난자에 축적된 수은의 분포 양상에 변화는 있었지만 여전히 위치하고 있어서, 이런 난자들이 수정되고 배 발생되어 새끼로 출산된다면, 그 새끼도 당연히 수은의 다양한 영향을 받을 것으로 추정된다. 따라서 난자에 수은이

한 번 축적되면 오랜 기간이 지난 후에도 여전히 남아 있어서, 다음 세대에도 영향을 받을 수 있다는 결과를 확인할 수 있었다. 이 결과는 기존 보고에서 수은 화합물을 투여 받은 암컷이 낳은 새끼에서도 영향이 나타났다는 사실에 대하여, 본 실험에서 관찰된 오랜 기간 동안 난자에 남아 있는 수은의 존재를 통해서 설명할 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2017년 순천대학교 학술연구비 공모과제로 연구되었음.

References

- Al-Saleh, I., Shinwari, N. and Al-Amodi, M. 2009. Accumulation of mercury in ovaries of mice after the application of skin-lightening creams. *Biol. Trace Element Res.* **131**, 43-54.
- Atkinson, A., Thompson, S. J., Khan, A. T., Graham, T. C., Ali, S., Shannon, C., Clarke, O. and Upchurch, L. 2001. Assessment of a two-generation reproductive and fertility study of mercuric chloride in rats. *Food Chem. Toxicol.* **39**, 73-84.
- Bates, M. N. 2006. Mercury amalgam dental fillings: an epidemiologic assessment. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **209**, 309-316.
- Boujbiha, M. A., Hamden, K., Guerhazi, F., Bouslama, A., Omezzine, A., Kammoun, A. and El Feki, A. 2009. Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod. Toxicol.* **28**, 81-89.
- Bridges, C. C., Joshee, L. and Zalups, R. K. 2011. MRP2 and the handling of mercuric ions in rats exposed acutely to inorganic and organic species of mercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **251**, 50-58.
- Bridges, C. C., Joshee, L. and Zalups, R. K. 2014. Aging and the disposition and toxicity of mercury in rats. *Exp. Gerontol.* **53**, 31-39.
- Cho, H. W., Kim, M. H., Hwang, K. Y., Min, B. W., Park, J. C. and Kim, J. H. 1999. Effects of *Oenanthe javanica* extracts on mercury accumulation in organs of the mouse. *J. Toxicol. Pub. Health* **15**, 1-8.
- Choe, E. S., Kim, K. R., Yee, S. T., Kim, M. H., Min, B. W. and Cho, H. W. 2003. Localization of methyl mercuric chloride in the reproductive tract of male mice. *J. Toxicol. Pub. Health* **19**, 153-159.
- Clarkson, T. W., Vyas, J. B. and Ballatori, N. 2007. Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am. J. Ind. Med.* **50**, 757-764.
- Colquitt, P. J. 1995. The effect of occupational exposure to mercury vapour on the fertility of female dental assistants. *Occup. Environ. Med.* **52**, 214.
- Cordier, S., Deplan, F., Mandereau, L. and Hemon, D. 1991. Paternal exposure to mercury and spontaneous abortions. *Br. J. Ind. Med.* **48**, 375-381.
- Danscher, G. and Montagnese, C. 1994. Autometallographic localization of synaptic vesicular zinc and lysosomal gold, silver, and mercury. *J. Histochem. J.* **17**, 15-22.
- Danscher, G., Stoltenberg, M. and Juhl, S. 1994. How to detect gold, silver and mercury in human brain and other tissues by autometallographic silver amplification. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **20**, 454-467.
- Dufresne, J. and Cyr, D. G. 1999. Effects of short-term methylmercury exposure on metallothionein mRNA levels in the testis and epididymis of the rat. *J. Androl.* **20**, 769-778.
- Emanuele, M. A., LaPaglia, N., Steiner, J., Jabamoni, K., Hansen, M., Kirsteins, L. and Emanuele, N. V. 1998. Reversal of ethanol-induced testosterone suppression in peripubertal male by opiate blockade. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **22**, 1199-1204.
- Ferguson, K. K., O'Neill, M. S. and Meeker, J. D. 2013. Environmental contaminant exposures and preterm birth: a comprehensive review. *J. Toxicol. Environ. Health Part B Crit. Rev.* **16**, 69-113.
- Fossato da Silva, D. A., Teixeira, C. T., Scarano, W. R., Favareto, A. P., Fernandez, C. D., Grotto, D., Barbosa, F. Jr. and Kempinas Wde, G. 2011. Effects of methylmercury on male reproductive functions in Wistar rats. *Reprod. Toxicol.* **31**, 431-439.
- Garman, R. H., Weiss, B. and Evans, H. L. 1975. Alkylmercurial encephalopathy in the monkey (*Saimiri sciureus* and *Macaca arctoides*): a histopathologic and autoradiographic study. *Acta Neuropathol.* **32**, 61-74.
- Grandjean, P., Budtz-Jørgensen, E., Steuerwald, U., Heinzow, B., Needham, L. L., Jørgensen, P. J. and Weihe, P. 2003. Attenuated growth of breast-fed children exposed to increased concentrations of methylmercury and polychlorinated biphenyls. *FASEB J.* **17**, 699-701.
- Havarinasab, S., Björn, E., Nielsen, J. B. and Hultman, P. 2007. Mercury species in lymphoid and non-lymphoid tissues after exposure to methyl mercury: correlation with autoimmune parameters during and after treatment in susceptible mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **221**, 21-28.
- Khan, A. T., Atkinson, A., Graham, T. C., Thompson, S. J., Ali, S. and Shireen, K. F. 2004. Effects of inorganic mercury on reproductive performance of mice. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 571-577.
- Klein, R., Herman, S. P., Brubaker, P. E., Lucier, G. W. and Krigman, M. R. 1972. A model of acute methyl mercury intoxication in rats. *Arch. Pathol.* **93**, 408-418.
- Martin, M. B., Reiter, R., Pham, T., Avellanet, Y. R., Camara, J., Lahm, M., Pentecost, E., Pratap, K., Gilmore, B. A., Divekar, S., Dagata, R. S., Bull, J. L. and Stoica, A. 2003. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* **144**, 2425-2436.
- Martin, M. D. and Woods, J. S. 2006. The safety of dental amalgam in children. *Expert Opin. Drug Saf.* **5**, 773-781.
- Mathur, P. P. and D'Cruz, S. C. 2011. The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian J. Androl.* **13**, 585-591.
- Morcillo, M. A. and Santamaria, J. 1996. Mercury dis-

- tribution and renal metallothionein induction after sub-chronic oral exposure in rats. *Biometals* **9**, 213-220.
27. Nishiyama, S., Taguchi, T. and Onosaka, S. 1987. Induction of zinc-thionein by estradiol and protective effects on inorganic mercury-induced renal toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 3387-3391.
 28. Passos, C. J., Mergler, D., Lemire, M., Fillion, M. and Guimarães, J. R. 2007. Fish consumption and bioindicators of inorganic mercury exposure. *Sci. Total Environ.* **373**, 68-76.
 29. Pollard, K. M. and Hultman, P. 2007. Skin-lightening creams are a possible exposure risk for systemic lupus erythematosus: comment on the article by Finckh et al. *Arthritis Rheum.* **56**, 1721.
 30. Rao, M. V. 1989. Histophysiological changes of sex organs in methylmercury intoxicated mice. *Endocrinol. Exp.* **23**, 55-62.
 31. Rattan, S., Zhou, C., Chiang, C., Mahalingam, S., Brehm, E. and Flaws, J. A. 2017. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *J. Endocrinol.* **233**, R109-R129.
 32. Schläwicke Engström, K., Strömberg, U., Lundh, T., Johansson, I., Vessby, B., Hallmans, G., Skerfving, S. and Broberg, K. 2008. Genetic variation in glutathione-related genes and body burden of methylmercury. *Environ. Health Perspect* **116**, 734-739
 33. Sikorski, R., Juskiewicz, T., Paszkowski, T. and Szprengier-Juskiewicz, T. 1987. Women in dental surgeries: reproductive hazards in occupational exposure to metallic mercury. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **59**, 551-557.
 34. Silva, I. A., El Nabawi, M., Hoover, D. and Silbergeld, E. K. 2005. Prenatal HgCl₂ exposure in BALB/c mice: gender-specific effects on the ontogeny of the immune system. *Dev. Comp. Immunol.* **29**, 171-183.
 35. Suter, K. E. 1975. Studies on the dominant-lethal and fertility effects of the heavy metal compounds methylmercuric hydroxide, mercuric chloride, and cadmium chloride in male and female mice. *Mutat. Res.* **30**, 365-374.
 36. Yasutake, A. and Nakamura, M. 2011. Induction by mercury compounds of metallothioneins in mouse tissues: inorganic mercury accumulation is not a dominant factor for metallothionein induction in the liver. *J. Toxicol. Sci.* **36**, 365-372.
 37. Yoshida, M., Honda, A., Watanabe, C., Satoh, M. and Yasutake, A. 2014. Neurobehavioral changes in response to alterations in gene expression profiles in the brains of mice exposed to low and high levels of mercury vapor during postnatal development. *J. Toxicol. Sci.* **39**, 561-570.
 38. Zalups, R. K. 2000. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev.* **52**, 113-143.

초록 : 암컷 마우스 생식기관 내 수은 화합물의 위치와 시간에 따른 축적된 수은 농도 변화

김영은 · 김유선 · 조현옥*

(순천대학교 생명산업과학대학 생물학과)

본 연구에서는 암컷 생식기관 내 축적된 수은 화합물의 위치와 시간에 따른 수은의 농도 변화를 확인하기 위하여 수행하였다. Methylmercuric chloride를 일주일에 한 번씩 총 3주간 사춘기 암컷 마우스에 피하 주사하였다. 시간에 따른 수은의 농도 변화를 확인하기 위해 투여 종료 후 10일, 150일, 300일째에 희생하였다. 투여 종료 후 10일에 희생한 경우 체중에 유의한 차이가 있었지만, 그 외 경우에는 체중과 난소의 무게에 있어서 대조군과 수은 투여군 사이에 유의한 차이가 없었다. 축적된 수은의 위치를 오토메탈로그라피 방법으로 확인하였고, 자궁, 난소, 난자에 축적된 수은 화합물의 위치를 광학현미경으로 분석하였다. 자궁의 경우, 투여 종료 후 10일째에 수은이 지질 세포와 자궁바깥막의 중피에 위치하였다. 150일째에는 수은 농도가 감소하였으며 300일째에는 나타나지 않았다. 투여 종료 후 10일째 난소의 경우, 수은이 피질 부위의 지질 세포와, 난포를 둘러싸는 난포막 세포, 황체에 분포하였다. 150일째에는 수은이 난소의 수질 부위에 축적되었으며, 300일째에는 분포하지 않았다. 투여 종료 후 10과 150일째 난자의 경우, 수은이 난자의 주변부에 주로 분포하였으며, 300일째에는 수은 농도가 감소되고 난자 전체에 고르게 분포하였다. 이런 결과는 암컷 마우스에서 수은에 의해 호르몬 생성, 착상, 그리고 발생 중인 배아가 영향을 받을 수 있다는 사실을 제시해 준다.