

생쥐 정소 실질내 Gossypol 투여가 조정기능에 미치는 영향

황권식 · 장규태 · 오석두* · 성환후** · 정진관** · 이병오 · 윤창현

경상대학교 농과대학

Effects of Gossypol Injection into the Stroma of Testes on Spermatogenesis in Mouse

Hwang, K.S., K.T. Chang, S.D. Oh*, H.H. Seong**, J.K. Jung**, B.O. Lee and C.H. Yun

College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

This experiment was conducted to determine the effects of gossypol injection on spermatogenesis of mice. Gossypol was injected into the stroma of testes(TS) and the doses of gossypol injected were 5, 10 and 15mg per kg of body weights, respectively.

The number of sperm and the weight of testes were gradually reduced($P < 0.01$) from 2 to 4 weeks after gossypol treatment in all groups of mice treated with gossypol, compared with the control group.

The rates of malformation(loss of proacrosome, damage of midpiece and breaking of tail) of sperm were significantly($P < 0.01$) increased at 2 and 3 weeks after the injection of 10 or 15mg of gossypol. However, the weight of testes and the number of normal sperm were gradually increased and the malformation rate of sperm was decreased between 4 and 6 weeks after injection of 5mg of gossypol.

The results of this experiment indicated that probably ireversible suppression of spermatogenesis could be brought about easily and immediately by the single injection of gossypol into TS.

(Key words; gossypol, sperm, testes, malformation, ICR male mouse)

I. 서 론

Gossypol은 목화종자로부터 정제하여 얻을 수 있는 유독성 phenol 복합물질(2,2'-bis[8-formyl-1, 6, 7-tri-hydroxy-5-isopropyl-3-methyl-naphthyl])로서 생체내에서 유독성이 있다고 Abou-Donia(1976)가 처음으로 보고한 이래, 사람을 비롯하여 포유동물의 수컷에 장기간 경구투여하게 되면 생식기의 발육 저하를 일으켜 불임이 유발된다고 알려져 있다(Chinese

team, 1978; Ridley와 Blasco, 1981; Perreault 등, 1982; Cameron 등, 1982; Kennedy 등, 1983).

Gossypol에 대한 연구는 특히 중국에서 많은 연구가 보고되었다. Chinese team(1978)은 건강한 성인남자에게 gossypol을 1년 이상 경구투여한 결과 기형정자 발생율이 98.8%였다고 보고하였고, rat에 있어서도 사료속에 일정량의 gossypol을 장기간 경구투여 하였을때 Sertoli세포의 위축현상으로 기형정자의 출현율이 매우 높거나, 정자의 형성이 불가능하였다고 하였다(Oko와 Hrudka, 1982; Nadakavukaren 등,

* 진주산업대학교(Jin Ju National University)

** 축산시험장(Livestock Experiment Station)

1979; Shepu 등, 1980; Hadley 등, 1981; Burgos 등, 1980; Shi와 Friend, 1983; Hoffer, 1983). 또한, Coutinho 등(1984)도 브라질의 성인에게 2일에 20mg씩 주당 60mg을 1년간 경구투여한 결과 4개월째부터 무정자증과 정자수의 감소 및 기형정자가 대부분이었고 testosterone 및 gonadotropin의 혈중 농도가 유의적으로 낮았다고 보고하여 정소의 내분비적 기능을 강력하게 억제하는 것으로 판단된다고 보고하였다(Chang 등, 1980; Hoffer, 1980).

이러한 보고들은 gossypol의 장기간 경구투여로 인하여 불임유기에 효과가 있으나 투여방법이 번거롭고 정소외의 생체조직에 미치는 부작용이 많을 것으로 사료된다. 이러한 점을 보완하여 gossypol을 이용하여 보다 효과적인 거세효과를 얻기 위해 정소조직내에 gossypol의 국소 투여로 인한 정소의 기능 및 정소상체미부에서 회수한 정자의 성상을 검토하여 거세 유기효과를 검토하고 정소외의 다른 조직에 미치는 영향에 대하여 검토해 볼 가치가 있는 것으로 사료된다.

이에 본 연구는 ICR계 생쥐에게 gossypol을 체중 kg당 5, 10 및 15mg을 정소실질내에 각각 투여한 후 시간경과에 따라 정액의 이화학적 성상과 정자의 미세구조 및 정소의 조직화학적 변화를 비교 검토하여 일시적 혹은 영구적 거세 유기효과의 가능성을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

10~12주령(체중 30~35g)의 ICR계 수컷 생쥐를 공시하였으며 사육관리는 관행법(사료 및 급수: 자유공급, 온도: 21~24℃, 점등: 14시간, 소등: 10시간)에 따랐다.

2. Gossypol의 투여

완전임의배치된 80마리의 생쥐에게 체중 kg당 5, 10 및 15mg의 gossypol(Sigma Co., NO. G-8761, USA)을 polyethylene glycol에 용해하여, 투여량을 50μl로 조절하여 좌우 정소실질내에 투여하고 대조구는 polyethylene glycol만 좌우측 정소실질내에 50μl씩 동량을 투여하였다.

3. 정소무게 측정 및 정자수의 계산

Gossypol투여 후 2, 3, 4 및 6주째 투여용량별로 각 각 도살하여 좌우측 정소를 분리하여 analytical balance(Oertling, R51, 영국)로 0.1mg 수준까지 측정하였고, 정자의 채취는 정소상체 미부를 외과적인 방법으로 채취하여 생리식염수를 30 gauge syringe에 주입하여 정관으로 연결된 부위쪽에서 정소상체 미부 쪽으로 정자괴가 밀려 나오게 하는 방법으로 0.2ml씩 3회 압력을 가하여 회수하였고, 회수한 정자는 100배 희석한 다음 hematocytometer를 이용하여 100~400×로 검정하여 정자수 및 기형정자를 조사하였다.

4. 정소의 및 정자의 조직화학적 관찰

정소의 조직화학적인 변화를 관찰하기 위하여 10% formalin이 함유된 PBS용액에 48시간 이상 침적하여 동결절편봉입제(compound, USA)에 포말하여 -70℃에서 동결시켰다. 동결된 정소조직을 냉동조직절편기(Microtome Damon/IEC Co., USA)를 이용하여 10μm로 조직을 절편하여 1:1 비율의 난황과 glycerol용액으로 도말한 slide glass에 부착시켜 냉 acetone에 고정하여 2~3시간 풍건을 실시하여 eosin 용액에 15초간 염색후 광학현미경으로 관찰하였다.

정자의 세포학적 변화를 검토하기 위하여 정자의 전자현미경 관찰을 실시하였다. 정소상체 미부에서 회수된 정자를 1,000rpm에서 5분간 원심분리를 실시하여 상층액을 제거한 후 침전된 정자를 2.5% glutaraldehyde가 함유한 0.1M의 PBS용액(pH 7.4)에 12시간 고정한 후 PBS에서 30분간 3회 세척하고 1% phosphate osmium tetroxide 용액에서 1시간 고정을 실시하였다. 이후 60%, 80%, 90% 그리고 99.5% 에틸알코올에서 각각 10분씩 탈수를 한 다음 acetone으로 10분간 3회 세척하여 완전히 탈수를 실시하여 SEM방법(Scanning electron microscopy)으로 관찰하였다(Akashi, Model DS 130C, Japan).

6. 통계학적 분석

통계처리는 SPSS통계 package program에 의하여 각 반복간의 평균과 표준오차를 산출하였고, 각 반복간의 차이는 F검정에 의하여 유의성(P<0.01)을 검토하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 정소실질내 gossypol투여가 정소 중량 및 정자수에 미치는 영향

정소실질내 gossypol을 투여한 후 시간경과에 따라 정소무게 및 정소조직에 미치는 영향은 Fig. 1과 같다. 즉, 투여용량에 따른 정소중량은 2주째부터 4주째까지 대조구(309.6 ± 2.5 mg)에 비하여 전처리구에서 유의적($P < 0.01$)으로 감소되었으나, 5 mg의 투여구에 있어서는 4주 이후부터 서서히 회복되기 시작하여 6주째의 정소중량은 211.25 ± 4.25 mg으로 정상적으로 급속하게 회복되는 경향을 보였다.

Hoffer(1980)와 Soufier 등(1989)의 보고에 의하면 rat에게 체중 kg당 일일 20~30mg의 gossypol을 3개월간 이상 장기투여했을 때 정소내의 Leydig 및 Sertoli 세포의 정상적인 기능이 유지하지 못하여 정소무게가 감소되고 정소상체의 협착현상이 일어나 결국 불임유기효과가 있다고 보고하였다(Ridley와 Blasco, 1981). 이것은 gossypol이 함유하고 있는 유독성 phenol이 장기간 경구투여로 인해 정소세포내의 단백질 물질을 응고시킴으로써 정소조직을 괴사시켜 거세효과를 유지시키는 것으로 사료되나, 장기간 경구투여로 인해 정소외의 생체 주요조직, 특히 심장의 박동을 저해하는 부작용이 있으므로 gossypol의 경구투여가 정소를 거세시키기에는 문제점이 있는 것으로 사

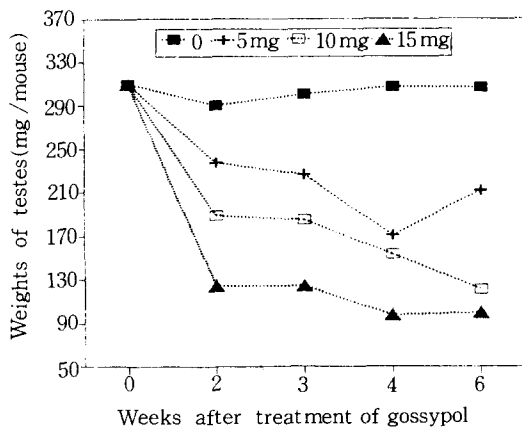


Fig. 1. Changes in the weight of testes ICR mice given bilateral intratesticular injections of gossypol.

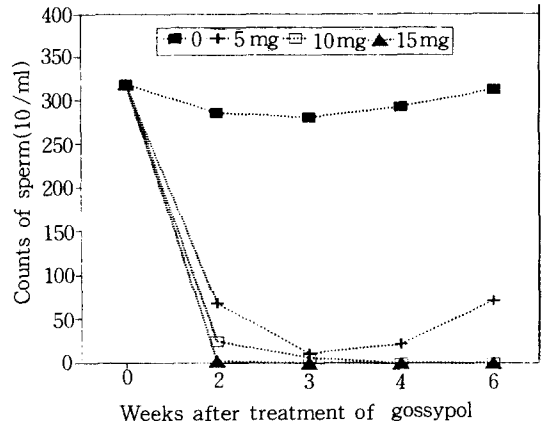


Fig. 2. Changes in the number of sperm of ICR mice given bilateral intratesticular injections of gossypol.

료된다.

정소실질내에 gossypol의 투여용량별, 투여후 시간경과에 따른 정자수는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 5, 10 및 15mg으로 구분하여 투여하였을 때, 정자수의 변화는 대조구의 318.8 ± 21.6 개(10^7 /ml)에 비하여 전처리구에서 투여후 2주째부터 유의적($P < 0.01$)으로 감소현상을 가져 왔으며, 회수된 정자의 대부분이 사멸정자였다. Shandilya 등(1982)은 Cynomolgus monkeys에게 체중 kg당 gossypol 5mg을 6개월간 매일 경구투여하였을 때 정자수의 감소 및 사출된 정자의 대부분이 사멸되었고, 10mg 투여구에서는 정자수의 감소는 물론 정자의 미부가 절단된 기형 정자의 유발이 급격히 증가하였다고 보고하였고, Coutinho 등(1984)도 사람에게 장기간 경구투여한 결과 무정자증이 유발되었다고 하였다. 이러한 보고들은 gossypol은 장기간 경구투여로 인한 불임유기효과는 있으나 정소조직외에 심장박동 등 생체 중요 장기에 유해한 작용으로 인해 체중 감소현상과 과량 투여시는 폐사 등의 부작용이 있다고 하였다.

본 시험 결과는 gossypol의 정소실질내 미량(5 mg) 투여시는 부생식선(전립선, 정낭선 및 요도구선)이 수축되어 성욕이 감소되는 현상외에 생체내의 다른 조직에 영향을 거의 미치지 않고 정소의 Sertoli 세포 및 Leydig 세포의 일시적 기능 저하로 정상적인 정자형성에 장애가 일어나서 일시적 거세 유기현상이 일어나는 것으로 사료되며 10 및 15mg의 투여시는 다른

생체기관에 아무런 장애를 주지 않는다면 정소조직의 완전괴사로 인하여 완벽한 거세 유효효과가 있는 것으로

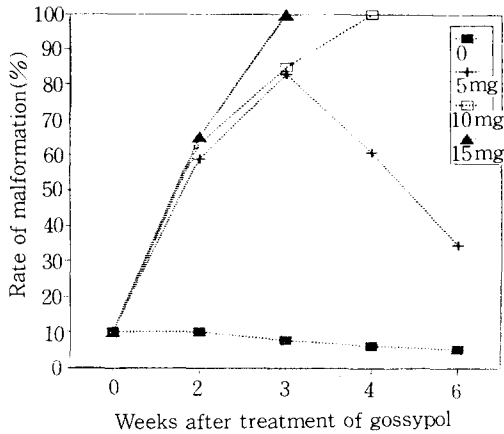


Fig. 3. Changes in the rate of malformation of ICR mice given bilateral intratesticular injections of gossypol.

로 생각된다. 이러한 거세효과는 생체의 다른 조직이나 장기에 영향을 미치는지를 검토하기 위해서 gossypol 투여후 혈액의 성분을 검토할 필요성이 있는 것으로 사료된다.

2. 정소실질내 gossypol 투여가 정소 및 정자의 형태에 미치는 영향

Fig. 4는 정소실질내 gossypol 5mg을 투여한 후 2주일째의 정소세포 및 정자의 전자현미경적 사진을 나타내었다. 10 및 15mg 투여구에 있어서는 정소조직이 응고되기 시작하여 3주째부터는 거의 대부분이 괴사되어 Sertoli세포 및 정소세포의 흔적은 거의 없었다. 흥미있는 현상은, 대조구에서는 정상적으로 침모가 형성된 정자가 검출되었으나(Fig. 4A), 5mg 투여구에서는 정자의 침모가 소실되는 현상 등의 기형현상이 검출 되었으며(Fig. 4B), 정소조직에서 정자세포의 형성을 확인할 수 없었다(Fig. 4D). 투여후 4주부

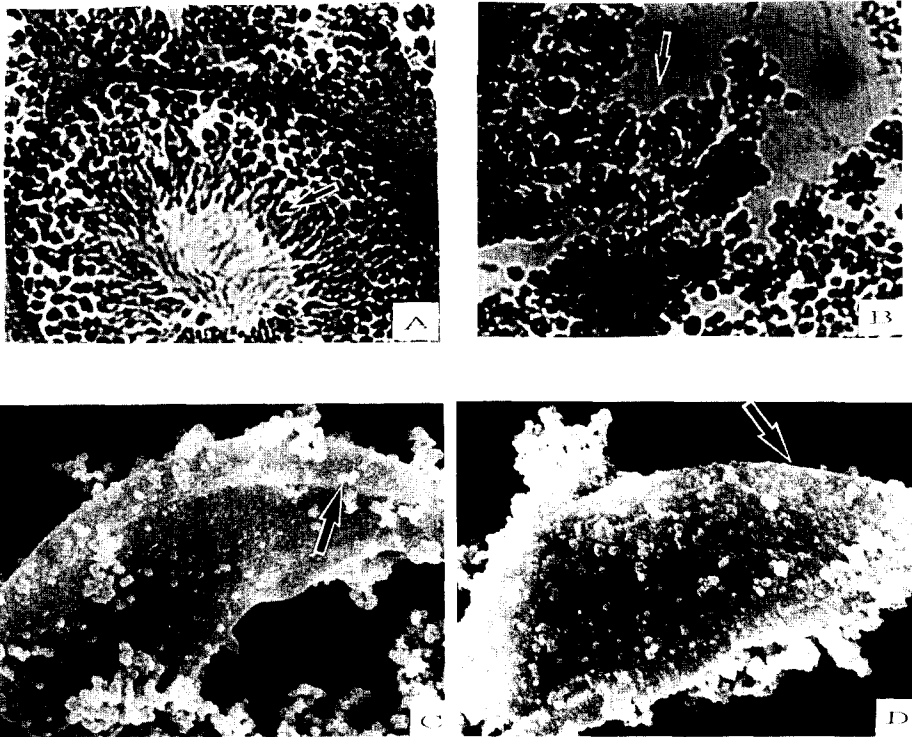


Fig. 4. Testicular cross sections and sperm from ICR mice untreated(A, C) or 2 weeks after treated 5mg of gossypol(B, D).

Testicular sections of 10 μ m in thickness were stained with eosin.

Each photographs were taken at $\times 210$ (A, B) and $\times 5,600$ (C, D)

터 6주째에는 정상적인 정자수가 증가하였으며 기형정자는 대조구와 비슷한 경향으로 나타났다. 한편, 10 또는 20mg투여구는 각각 4주 및 3주째부터 전혀 정자형성이 이루어지지 않고 완전히 조직의 괴사현상이 나타났다. 이와 유사한 결과로, Oko와 Hrudka(1982)는 rat에게 체중 kg당 일일 20mg의 gossypol을 30일간 경구투여 하였더니 정자 두부의 침모 소실과 정자 체부의 외피 손상으로 운동성은 거의 없는 기형정자가 대부분이었다고 보고하였다.

또한, Hoffer(1983)도 rat에 있어서 gossypol의 장기간 투여후 정자수 감소, 기형 정자 발생 및 사멸정자 출현 등의 원인은 Sertoli 세포의 파괴, cytoplasmic복합체의 저해, Golgi체의 손상 등으로 인한 testosterone 및 LH의 수준 변화에 기인되는 현상이라 하였다(Shandilya et al., 1982; Chang et al., 1980).

최근, Nishimura등(1992)에 의하면 성숙 rat에게 0.15ml의 lactic acid [total lactic acid, CH₃CH(OH)COOH]를 주사했을 때 정소 및 부생식선의 급격한 위축현상과 혈중 testosterone 농도가 24시간 이내에 거의 분비되지 않았으며, 개에게 1.0ml를 주사했을때도 비슷한 결과를 얻었다고 보고하였다.

본 시험에서는 gossypol의 장기간 경구투여로 인한 문제점을 극복하고 보다 실용적인 거세 유기효과를 얻기 위해 gossypol을 적당한 용량으로 조절하여 단1회의 정소실질내 투여로 인해 일시적으로 정소의 기능을 정지시킬 수도 있으며, 또한 영구적으로 완전한 거세를 효과적으로 유기시킬 수 있을 것으로 생각된다.

IV. 요약

ICR계 수컷 생쥐에게 gossypol을 체중 kg당 5, 10 및 15mg을 정소실질내에 각각 국소 투여하여 시간의 경과에 따라 조정기능에 미치는 영향에 대해 검토하였다. 본 실험의 결과 gossypol 5, 10 및 15mg투여구에서 공히 2주째부터 4주째까지 정자수 및 정소 무게가 유의적(P<0.01)인 감소현상이 나타났다. 형성된 정자는 대부분이 기형정자로서 정자의 침모 소실, 정자 체부의 손실이 나타났으며 특히, 10 및 15mg투여구에서 2 및 3주째부터 정상적인 정자는 거의 형성되지 않았다. 반면, 5mg 투여구에서는 4주째부터 6주째에서 정자수 및 정소무게가 감소하다가 대조구의 정상치

로 회복하기 시작하였으며 정자의 기형율도 대조구와 비슷하게 점차 감소되기 시작하였다.

이상의 결과로서, 생쥐 정소실질내 gossypol의 단독처리는 일시적으로 정자형성을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

V. 인용문헌

1. Abou-Donia, M.B. 1976. Physiological effects and metabolism of gossypol. *Residue Rev.*, 61:125-160.
2. Burgos, M.H., C.Y. Chang, L. Nelson and S. J. Segal. 1980. Gossypol inhibits motility of abracia sperm. *Biol. Bull.*, 159:467.
3. Cameron, S.M., D.P. Waller and L.J.D. Zaneveld. 1982. Vaginal spermicidal activity of gossypol in the macaca arctoides. *Fertil. Steril.*, 37(2):273-275.
4. Chang, M.C., G. Zhiping and S.K. Saksena. 1980. Effects of gossypol on the fertility of male rats, hamster and rabbits. *Contraception*, 21:4612-469.
5. Chinese team(anonymous). 1987. Gossypol - a new antifertility agent for male. *J. Chin. Med.*, 54:417-428.
6. Coutinho, E.M., J.F. Melo, I. Barbosa and S.J. Segal. 1984. Antispermogenic action of gossypol in men. *Fertil. Steril.*, 42(3):424-430.
7. Hadley, M.A., Y.C. Lin and M. Dym. 1981. Effects of gossypol on the reproductive system of male rats. *J. Androl.*, 2:190-199.
8. Hoffer, A.P. 1980. Light and electron microscopic studies on the effects of gossypol in the male rat. *Res. Fertil. Regulation*, 1(4):1-15.
9. Hoffer, A.P. 1983. Effects of gossypol on the seminiferous epithelium in the rat: a light and electron microscope study. *Biol. Reprod.*, 28:1007-1020.
10. Kennedy, W.P., H.H. Vanderven, J.W. Straus, A.K. Bhattacharya, D.P. Waller, L.

- J.D. Zaneveld and K.L. Polakoski. 1983. Gossypol inhibition of acrosin and proacrosin, and oocyte penetration by human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 29:999-1009.
11. Nadakavukaren, M.J., R.H. Sorensen and J. N. Tone. 1979. Effect of gossypol on the ultrastructure of rat spermatozoa. *Cell Tissue Res.*, 204:293-296.
 12. Nishimura, N., N. Kawate, T. Sawada and J. Mori. 1992. Chemical castration by a single intratesticular injection of lactic acid in rats and dogs. *J. Reprod. Dev.* 38:263-266.
 13. Oko, R. and F. Hrudka. 1982. Segmental aplasia of the mitochondrial sheath and sequelae induced by gossypol in rat spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 26:183-195.
 14. Perreault, S.D., B.R. Zinkin and B.J. Rogers. 1982. Effect of trypsin inhibitors on acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 26:343-351.
 15. Ridley, A.J. and L. Blasco. 1981. Testosterone and gossypol effect on human sperm motility. *Fertil. Steril.*, 36(5):638-642.
 16. Shandilya, L., T.B. Clarkson, M.R. Adams and J.C. Lewis. 1982. Effects of gossypol on reproductive and endocrine function of male cynomolgus monkeys. *Biol. Reprod.*, 27: 241-251.
 17. Shepu, X., Z. Shundong, S. Shuyun, W. Yanwan, L.Y.Z. Zenghua and M. Xixin. 1980. Antispermatic effect of gossypol on the germinal epithelium of the rat testis - a cytological, autoradiographical and ultrastructural observation. *Singapore Sci.*, 23: 642-652.
 18. Shi, Q.X. and D.S. Friend. 1983. Gossypol-induced inhibition of guinea pig sperm capacitation *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 29: 1027-1032.
 19. Soufrier, J.C., C. Radigue, M.C. Dantec, D. Garnier and B. Jegou. 1989. Gossypol-induced modification in the microenvironment of rat epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 86:427-434.