

카드뮴이 고환에 미치는 영향에 관한 형태학적 및 생화학적 연구

권경석 · 조근자 · 양은진 · 권오유 · 김원식
충남대학교 의과대학 해부학교실

Morphological and Biochemical Studies on the Effects of Cadmium on the Rat Testis

Kyoung-Seok Kwon, Keun-Ja Cho, Eun-Jin Yang, O-Yu Kwon and Won-Sik Kim

Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Taejon 301-131, Korea

ABSTRACT

To investigate the cadmium (Cd) toxicity on the testis, male rats were treated with 1, 2, 4 and 8 mg/kg of Cd by IP. According to histochemical studies, Cd-treated testis tissue showed death of spermatozoa, death of Sertoli cells, death of all the spermatogenic cells, and finally disappearance of basal lamina of seminiferous tubules with increasing doses, and showed decreased ground substances and Leydig cells, increased inflammatory cells and fibroblasts, and finally disappearance of ground substances and all the cells except fibroblasts within interstitial tissues with increasing doses. According to biochemical studies, two kinds of proteins, 25 and 45 kDa, were dramatically disappeared from the total protein of rat testis treated with Cd comparing to normal testis. The result of electrophoresis of total protein suggests that actin (45 kDa), presumed on its molecular weight and amount, in the testis-cells is the primary target of Cd poisoning. Although its exact mechanism is not clear, the disappearance of two proteins when testis is exposed to Cd should give some clues to understand the mechanism of necrosis of testis tissue crumbling by heavy metal pollutant such as Cd.

Key words: Cadmium, Testis, Spermatozoa, Fibroblast, Leydig cell.

서 론

산업발달의 부산물인 각종 공해물질은 인류 건강에 큰 위협요소가 되고 있으며, 생활수준 향상에 따라 공해로부터의 보호에 대한 관심이 높아져가고 있다. 카드뮴 (cadmium, Cd)은 자연상태에서는 다른 유독성금속과 같은 양상으로 비교적 낮은 농도로 존재하지만 각종 사업장에서 합성수지 안정제, 농약의 원료, 반도체, 형

광등, 유리제조, 전기도금, 착색제, 합금원료 등으로 그 이용량과 범위가, 점차로 증가하는 것과 함께 대기 오염물질로서도 점차로 그 문제가 심각해지고 있는 것이 현실이다 (Amdur & Doull, 1986). 우리 나라에서도 하천 및 대기 중에 상당량의 카드뮴이 검출되고 있다는 보고가 있다 (강 등, 1994).

정상적인 카드뮴의 장흡수율은 mouse와 rat가 2%, 원숭이가 5%, 사람은 1.5~29%로 알려져 있고 일단 흡수된 카드뮴은 간으로 가서 metallothionein 생성을 촉

진하고, 생성된 metallothionein과 결합한 상태로 존재한다. 이 결합물이 신장에 축적되면 세노관에서 재흡수 장애를 일으켜서 단백질, 당뇨, 아미노산뇨 등의 원인이 된다 (일본생화학회, 1990; 김 등, 1991). 또한 카드뮴은 중추신경계장애, 골연화증, 고혈압, 기형, 염색체이상 및 변이 등을 유발하는 것과 함께 체내에 존재하는 각종 금속 의존성 효소 및 산소의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다 (Axeleson *et al.*, 1968; Itokawa, 1973; Faeder, *et al.*, 1977; Dudly *et al.*, 1982; 황·김, 1990; 맹, 1991). 이와 같이 최근에는 카드뮴의 체내대사와 독성실험을 중심으로 한 연구가 수행되고 있고 이와 함께 카드뮴과 체내 금속들간의 상호작용이 많이 연구되고 있다 (Suzuki & Yoshikawa, 1972; Nakamura *et al.*, 1977; 심, 1993).

한편, 카드뮴은 이들 작용 외에도 고환을 포함한 생식 기관에 일차적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있어 이에 대한 연구도 많이 행해지고 있지만, 대부분이 투여량과 노출시간에 따른 조직의 손상정도를 현미경으로 관찰하고 카드뮴의 축적량을 측정하여 비교하는 정도에 그치고 있다 (인삼연구보고서, 1986; 임 등, 1986; 이·김, 1987; 김, 1990; 강, 1995). 따라서 최근 문제시되고 있는 남성불임의 원인중의 하나가 환경오염물질의 증가와 관련이 있고 카드뮴에 기인할 수 있는 가능성이 있음을 고려할 때, 이를 증명하고 그 해결방법을 찾기 위해서는 종래의 연구로는 부족한 점이 있다. 이점에 착안하여 카드뮴이 고환에 미치는 영향을 조직학적 방법과 단백질의 전기영동을 통한 생화학적 방법, 즉 카드뮴이 고환조직에 변화를 일으킬 때 특이적으로 출현하거나 소실되는 단백질을 탐색하여 고환조직의 괴사 기전을 이해하는 방법으로 접근하여 이를 규명할 수 있는 기초자료를 제공하고자 본 연구를 실시하게 되었다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 카드뮴 투여

본 실험에는 생후 6주령의 Sprague Dawley계 수컷

랫드를 실험동물로 사용하였다. 실험기간동안의 사육환경은 실온 24℃, 상대습도 55%의 조건하에서 420 W × 180 D × 175 H mm크기의 polycarbonate 사육상자를 이용하였으며 12 시간의 명암조명을 유지하였다. 기간 중에는 사료 (제일사료, 대전)와 물을 자유로이 섭취할 수 있게 공급하였다. 카드뮴투여군은 체중kg당 0, 1, 2, 4, 8 mg의 카드뮴 (cadmium chloride, Sigma # C-3141)을 0.9% 생리적 식염수 (화인콘정, 대한약품공업주식회사)에 녹여서 최종 부피가 2 ml가 되게 하여 주사기를 사용하여 복강내로 단회 주입하였다. 주사후 1주일이 지난 뒤, 실험동물을 ethyl ether로 마취시킨 다음 2개의 고환조직을 취하여 각각 조직학적, 생화학적인 실험재료로 사용하였다.

2. 조직학적 방법

두 개의 고환중 한 개의 고환은 고정액이 충분히 흡수 되도록 바늘로 여러 곳에 구멍을 내어 10% 완충 중성 포르말린용액 (buffered neutral formalin solution)속에 넣고 실온에서 48 시간 고정하였다. 이후에 흐르는 수돗물로 12 시간 세척하고, 세척된 고환을 농도가 점차 높은 ethanol로 탈수시키고 xylol로 투명화 과정을 거친 다음, paraffin에 포매하였다. 이를 3 μm의 두께로 절단하여 gelatin을 바른 슬라이드 표면에 부착시키고, 통상적인 방법으로 hematoxylin-eosin (H & E)염색을 실시하여 광학현미경 (Nikon)으로 관찰하고 사진 촬영하였다.

3. 전기영동 방법

채취한 고환을 50 ml 튜브 (Greiner사)에 넣고 10 ml의 SDS lysis buffer (0.125 M Tris /6.8, 3% SDS)를 넣고, 최종농도가 20 mM이 되도록 DTT (dithiothreitol)를 분쇄직전에 넣었다. 분쇄는 Tissue Tearor TM (Biospec Products, Inc)를 사용하여 충분히 실시한 후 실온에서 1,200 rpm으로 1차 원심 분리하여 상층액을 회수하고, 이것을 실온에서 12,000 rpm으로 다시 원심 분리하여 얻은 상층액을 5분간 수조

에서 100℃로 가열한 다음 전기영동 할 때까지 1.5 ml의 튜브에 여러 개로 분주하여 -80℃에 보관하였다. 정자의 총단백을 준비하기 위하여, 카드뮴을 처리하지 않은 정상 랫드로부터 신선한 고환을 적출하고 두께가 0.5 mm 정도 되게 절단하여 부고환과 함께 1 × PBS (phosphate buffered saline)에 넣어 4℃에서 30분간 경과토록 하였다. 이어 이때 얻은 탁한 상층액에서 현미경을 사용하여 정자들이 존재하는 것을 확인한 후, 실온에서 500 rpm으로 원심분리하여 정자 이외의 큰 물질을 제거하고 1,500 rpm으로 다시 원심분리하여 정자를 모아 SDS lysis buffer에서 용해하였다. 전기영동의 stacking gel은 3.5%, separating gel은 5, 8, 12%를 각각 사용하였다. 단백질의 염색은 CBB (Coomassie brilliant blue)와 은염색 키트 (silver stain kit, Bio-Rad사)을 사용하였다. 최종적으로 전기영동에 앞서 준비한 시료를 4 × sample buffer (4 ml-100% glycerol, 5 ml~0.5 M Tris, 1 ml-0.1% CBB/10 ml)로 희석하여 다시 한번 100℃로 2분간 가열한 뒤에 사용하였다. 전기영동은 Bio-Rad사의 만능소형전기영동조 (mighty small apparatus)를 이용하여 4℃에서 100 V의 일정 전압 하에서 1.5 시간 수행하였다.

결 과

정상대조군 고환의 정세관내에서는 정세포, 분화중인 정모세포 및 정자의 꼬리 등이 잘 관찰되었고 잘 배열된 지지세포 (Sertoli cells)들을 관찰할 수 있었으며 정세관의 벽에는 하나의 납작한 세포층이 형성하고 있는 기저막이 간질조직과 뚜렷하게 경계를 짓고 있었다. 간질조직에는 정세관 사이사이에서 매우 균일한 간질결합조직속에 핵이 길쭉한 섬유모세포들과 핵이 비교적 둥글고 큰 간질세포 (Leydig cells)들이 산재해 있었으며 정세관 사이에서 혈관들이 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig. 1, 2). 한편, 카드뮴 1 mg/kg 투여군의 정세관내에서는 미세한 간질조직의 양적 감소는 있었으나 세포성분의 변화는 관찰할 수 없었다 (Fig. 3, 4). 그러나

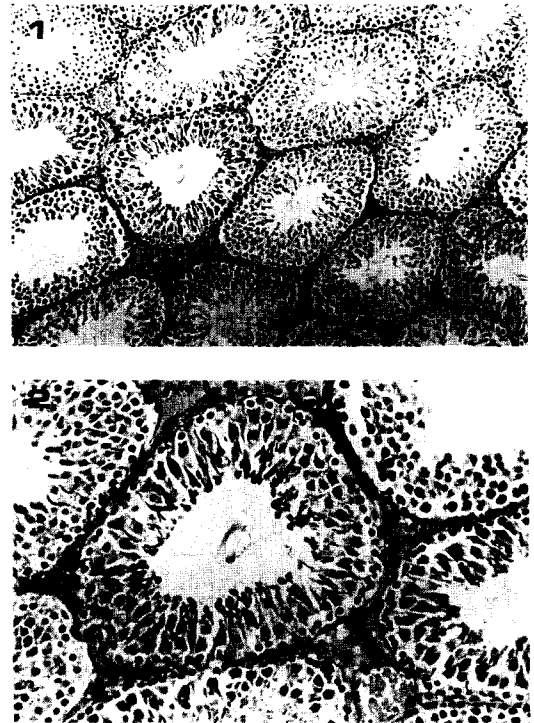


Fig. 1, 2. Normal rat testis tissue stained with H & E, × 100 (upper panel) & × 200 (lower panel).

카드뮴 2 mg/kg 투여군의 정세관내에서는 지지세포의 파괴로 인한 미분화 정자세포들의 증가 등이 관찰되었고 간질조직에서는 간질조직의 양적 감소와 다수의 염증세포들의 출현 등이 관찰되었다 (Fig. 5, 6). 한편, 카드뮴 4 mg/kg 투여군의 정세관내에서는 정세포, 정모세포, 정자세포 및 정자등 모든 정세포들과 모든 지지세포들의 괴사가 관찰되었고, 괴사한 세포들의 세포잔해들이 정세관 내부를 가득 채우고 기저막만이 간질조직과 경계를 이루고 있었다. 간질조직에서는 섬유성분만 일부 남아있을 뿐 세포사이 물질이 거의 사라지고 섬유모세포들과 염증세포들만이 다수 관찰되고 간질세포는 드물게 보였다 (Fig. 7, 8). 그리고 카드뮴 8 mg/kg 투여군의 정세관에서는 모든 정세포, 모든 지지세포들이 없어지고 기저막까지도 파괴되어 버렸다. 즉 정세관 자체도 파괴되어 간질조직과 구별할 수 없었으며, 간

질조직에는 일부 섬유성분들만 남아있을 뿐 세포사이 물질은 없었고, 세포성분도 일부 섬유모세포들을 제외하고는 모두 사라졌다 (Fig. 9, 10).

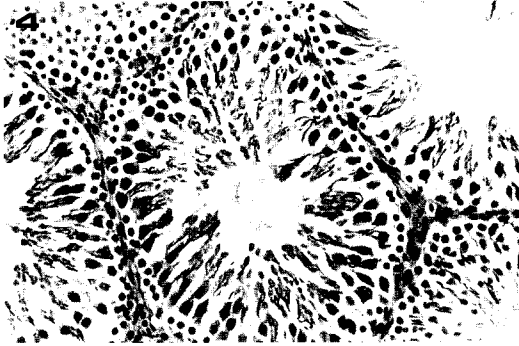
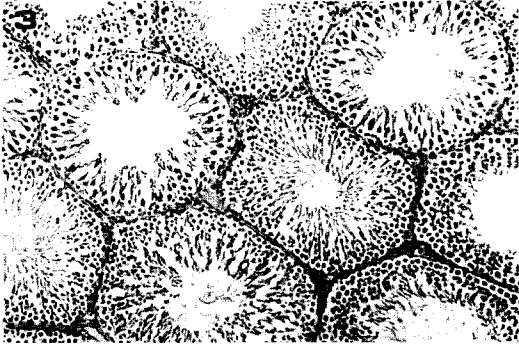


Fig. 3, 4. Rat testis tissue treated with Cd (1 mg/kg) and stained with H & E, $\times 100$ (upper panel) & $\times 200$ (lower panel).

Changes of testis tissue were not remarkable.

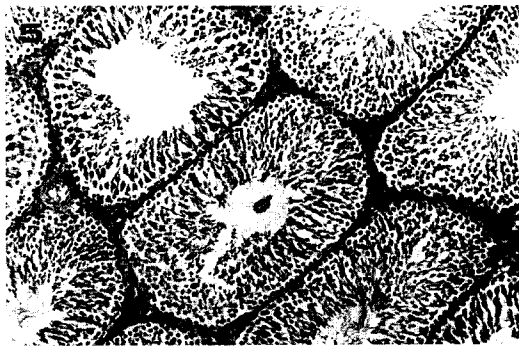


Fig. 5. Rat testis tissue treated with Cd (2mg/kg) and stained with H & E, $\times 100$.

See legend in Fig. 6.

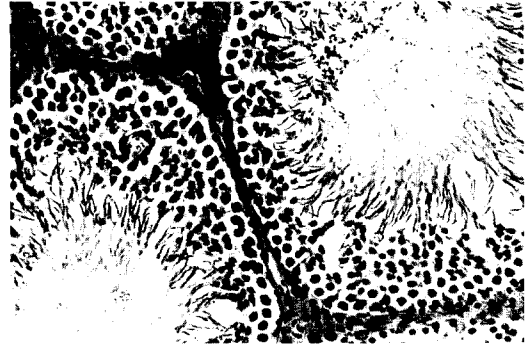


Fig. 6. Rat testis tissue treated with Cd (2 mg/kg) and stained with H & E $\times 200$.

Increased undifferentiated spermatids, Sertoli cell death in seminiferous tubules and decreased ground substances, decreased interstitial cells, increased inflammatory cells in interstitial tissues were found.



Fig. 7, 8. Rat testis tissue treated with Cd (4 mg/kg) and stained with H & E, $\times 100$ (upper panel) & $\times 200$ (lower panel).

All the spermatogenic cells were dead, almost all the ground substances within interstitial tissues disappeared, the number of fibroblasts and inflammatory cells increased, and Leydig cells were not found.



Fig. 9, 10. Rat testis tissue treated with Cd (8 mg/kg) and stained with H & E, × 100 (upper panel) & × 200 (lower panel).

In addition to the 4 mg/kg treated group, disappearance of basal lamina of seminiferous tubules, disappearance of ground substances and cellular components except fibroblasts within interstitial tissues were found.

고환의 총단백질의 전기영동 결과는, 단백질의 가장 일반적인 염색방법인 CBB로 전기영동된 8% 겔을 염색한 결과, 카드뮴을 처리되지 않은 고환의 총단백질에 비하여 1, 4, 8 mg의 카드뮴이 처리된 고환의 총단백질에서 공통적으로 25 kDa의 단백질이 사라졌다 (Fig. 11, 12). 한편 염색능력이 CBB보다가 뛰어난 은염색 키트 (silver stain kit)을 사용하여 동일 겔을 염색한 결과 25 kDa이외에 45 kDa 단백질이 역시 공통적으로 급속히 사라지는 것이 확인되었다 (Fig. 12). 84 kDa이상의 큰 단백질에서의 변화를 더욱 자세히 알기 위하여 5%의 겔을 사용하여 전기 영동한 결과 특이한 변화를

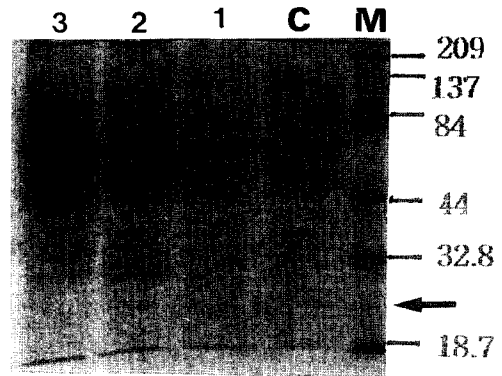


Fig. 11. Electrophoretogram of total proteins of the rat testis treated with different concentration of Cd and run on 8% acrylamide gel followed by CBB staining.

M indicates protein marker. Total protein of the normal testis is represented by C. Line 1 (1 mg), 2 (4 mg), 3 (8 mg) represent the total proteins from Cd treated testis with varying dose, respectively.

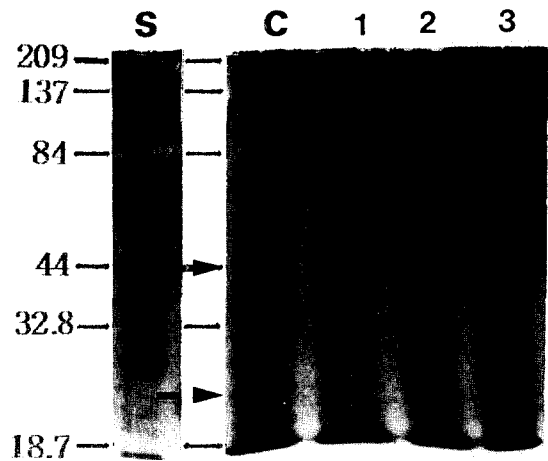


Fig. 12. Electrophoretogram of total proteins of the rat testis treated with different concentration of Cd and run on 8% acrylamide gel followed by silver staining.

S indicates total protein of rat sperm. Total protein of the normal testis is represented by C. Line 1 (1 mg), 2 (4 mg), 3 (8 mg) represent the total proteins from Cd treated testis with varying dose, respectively.

보이는 단백질은 나타나지 않았다 (Fig. 13). 그리고 30

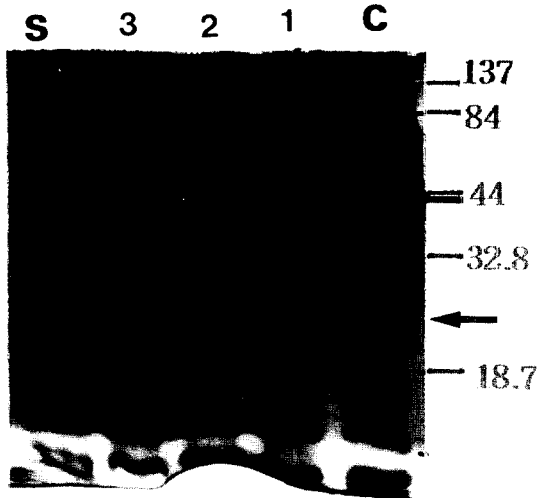


Fig. 13. Electrophoretogram of total proteins of the rat testis treated with different concentration of Cd and run on 12% acrylamide gel followed by silver staining.

S indicates total protein of rat sperm. Total protein of the normal testis is represented by C. Line 1 (1 mg), 2 (4 mg), 3 (8 mg) present the total proteins from Cd treated testis with varying dose, respectively.

kDa이하의 작은 단백질에서의 변화를 관찰하기 위하여 12% 겔을 사용한 결과 25 kDa과 45 kDa 이외의 특이한 변화를 보이는 단백질은 없었다 (Fig. 14). 따라서 카드뮴치리에 의해 고환의 총단백중에서 급격하게 소실되는 대표적인 단백질로는 분자량이 각각 25, 45 kDa인 두 종류의 단백질이 있음을 확인하였다.

고 찰

카드뮴 급성 중독시 정세관에서는 용량이 증가함에 따라 정조세포의 손상, 지지세포의 손상, 모든 정세포들과 지지세포들의 소실, 그리고 기저막의 소실 등의 순으로 손상이 초래되는 것으로 보이며, 이는 특히 사용한 카드뮴의 용량에 민감하여 어느 선을 넘으면 (critical dose, 본 실험에서는 4 mg/kg) 비가역적인 과사를 일으키는 것으로 보인다. 정세관에서 정조세포의 손상이 진행되는 것은 카드뮴의 표적세포가 고환에서는 정조세

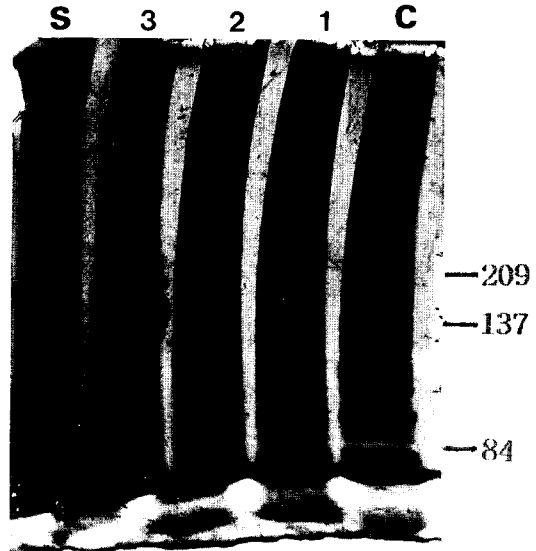


Fig. 14. Electrophoretogram of total proteins of the rat testis treated with different concentration of Cd and run on 5% acrylamide gel followed by silver staining.

S indicates total protein of rat sperm. Total protein of the normal testis is represented by C. Line 1 (1 mg), 2 (4 mg), 3 (8 mg) represent the total proteins from Cd treated testis with varying dose, respectively.

포인 것을 의미하는 것으로 생각되나 (박 등, 1992), 양을 증가시켰을 때에는 지지세포의 손상도 초래되며, 그에 따라 정자형성이 일어나지 못해 정세포들이 소실되는 것으로 생각된다. 간질조직내에서는 카드뮴의 투여로 세포사이 물질의 감소가 선행되는 것으로 보아 소량 투여시에는 간질조직내 세포들의 기능이 억제되다가, 이후 용량이 증가하면서 간질세포의 감소, 염증세포의 출현, 세포사이 물질의 소실, 섬유성분만의 증가 등으로 이어지는 변화가 일어나, 점차 회복될 수 없는 심한 손상을 일으키는 것으로 추정된다. 여기서 특이한 점은, 종래의 보고에서는 카드뮴의 표적세포가 정조세포라고 알려져 있었지만 (박 등, 1992), 간질세포수의 감소가 비교적 소량에서도 인지되었는 바, 카드뮴에 노출되면 남성의 성적특성 (maleness)에도 민감한 영향을 미칠 것으로 생각된다. 간질조직에서의 변화 또한 심한 용량의존성을 보여, 대개의 경우에서와 같이, 만성적인 노

출에 따른 축적효과의 측면에서 카드뮴중독을 고려할 때, 축적량이 일정량을 넘어서면 비가역적 변화가 초래됨을 염두에 두어야 할 것으로 생각된다.

카드뮴의 투여로 인한 고환의 조직학적인 변화는, 카드뮴 1 mg을 투여하였을 때에는 미세한 변화를 보이지만 단백질의 전기영동결과에서는 25, 45 kDa의 단백질들이 현저하게 사라지는 것을 알 수 있었다. 이 결과에 대하여는 몇 가지 가능성으로 설명할 수 있는데 그 첫째는 카드뮴투여로 인하여 고환조직에서 단백질 변성이 시작되었고, 그 중 단백분해효소 (protease)의 공격에 가장 약한 단백질구조를 가지는 것이 분해되어 없어지는 것, 둘째로는 카드뮴과 결합함으로써 인하여 분자량이 커져 겔내의 이동이 늦어지는 것 (gel mobility shift), 셋째로는 카드뮴 투여로 인하여 괴사인자 (necrosis factor)가 활성을 나타내 그것으로 인하여 단백질이 분해되는 것 등이다. 그 결과는 결국 부정자증과 조직의 파괴를 일으키는 것으로 추측할 수 있다.

이러한 추측은 정자의 총단백만을 전기영동한 결과 25, 45 kDa의 단백질은 정소를 형성하는 단백질 유래이지 정자 유래의 단백질이 아님을 보여주는 실험적 결과에 의해 뒷받침되고 있다 (Fig. 12). 그러나 카드뮴의 용량이 높아질수록 겔의 배경 (back ground)이 탁해지는 것으로 보아 두 번째 가능성도 배제할 수는 없다. 두 개의 단백질중 45 kDa은 총단백에서 차지하는 단백질량과 분자량으로 판단하여 actin일 가능성이 높다. 이 단백질이 만약 actin이라면, 카드뮴에 의하여 세포내 골격구조를 형성하는 가장 중요한 단백질중의 하나인 actin이 붕괴됨으로 인해 정세포의 붕괴가 초래될 가능성과 G-actin의 중합반응이 카드뮴에 의하여 저해되어 세포골격을 유지하는 actin세사의 지속적인 공급이 중단되고 이것이 세포붕괴를 초래할 수도 있다. 그렇다면 나머지 25 kDa의 단백질은 actin의 붕괴 후 생기는 이차적인 단백질이거나 actin붕괴와 밀접한 관계가 있는 actin관련 단백질일 가능성이 있다. 위의 가능성을 증명하기 위하여 각 단백질의 N-말단의 단백질염기서열의 결정과 함께 항체를 사용한 western blotting방법이 사

용될 수 있다.

요 약

카드뮴이 고환에 미치는 영향과 고환조직의 괴사기전을 밝히기 위하여 랫드를 실험동물로 사용하여 1, 2, 4, 8 mg/kg의 카드뮴을 단회 복강내 투여하고 1주일 후에 희생시켜서 얻은 고환을 병리조직학적 방법과 단백질의 전기영동을 통한 생화학적인 방법으로 실험을 하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

병리조직학적 변화로는 투여량의 증가와 함께 정세관 내에서는 정조세포의 손상, 지지세포의 손상, 모든 정세포의 소실 및 기저막의 와해 등이 일어났고, 간질조직에서는 세포사이 물질의 감소, 간질세포의 감소, 염증 세포의 증가, 세포사이 물질의 소실, 간질세포와 염증세포의 소실, 섬유조직의 증가와 일부 섬유모세포만의 간류 등의 변화가 용량 의존적으로 일어났다. 고환조직의 단백질변화는 카드뮴 1 mg/kg투여와 동시에 분자량이 각각 25, 45 kDa인 두 개의 단백질이 정상적인 고환 조직과 비교하여 현저하게 사라졌다.

카드뮴이 정소에서 정조세포가 표적세포라는 종래의 보고와 함께 본 연구에서 밝혀진 카드뮴에 의한 간질세포의 소실은 매우 의미 있는 변화이며, 이 결과는 고환조직이 카드뮴중독에 따른 중독 양상과 변화의 기전을 이해하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

인용문헌

- Amdur MO, Doull J (1986): Toxic effects of metals. Casarett & Doull's toxicology. 3rd ed., New York: Macmillan Publishing Co., pp 582.
- Axeleson B, Darhlgren SE, Piscator M (1968): Renal lesions in the rabbit after long-term exposure to Cd. Arch Environ Health 17: 24.
- Dudly RE, Svovoda DJ, Klaassen CD (1982): Acute exposure to Cd causes severe liver in-

- jury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 65: 302.
- Faeder EJ, Chanet SQ, King LC (1977): Biochemical and ultrastructural changes in livers of Cd treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 39: 473.
- Itokawa Y (1973): Bone change in experimental chronic Cd poisoning, radiological and biochemical approaches. *Arch Environ Health* 26: 241.
- Nakamura K, Kajizuka E, Nakano J, Sugiura Y, Takata T (1977): An experimental study on the effects simultaneous administration of Cd and zinc on the accumulation of Cd. *J Toxicol Sci* 2: 373.
- Suzuki Y, Yoshikawa H (1972): Effect of Cd injection in intracellular distribution of essential metals in rat liver. *Ind Health* 10: 93.
- 日本生化学会 (1990): 生化学辞典. 第2版, 東京: 東京化学同人, pp 279.
- 강성규, 홍정표, 김기웅, 장재연, 정호근, 정규철 (1994): 국내카드뮴 취급사업장의 카드뮴폭로 실태평가. *대한산업의학회지* 6: 252.
- 강수철 (1995): 카드뮴투여 경로에 따른 랫드 고환내 카드뮴농도와 병리조직학적 변화. *충남대 보건대학원 석사논문*.
- 김남송, 이재형, 고대하, 기노석 (1991): 카드뮴에 의한 흰쥐의 간장 및 신장의 metallothionein변화와 방어효과. *예방의학회지* 24: 287.
- 김상태 (1990): 흰쥐 정소세포에서의 카드뮴독성작용과 selenium 전처리의 영향. *환경생물학회지* 8: 33.
- 맹승희 (1991): 카드뮴독성을 평가하기 위한 방법으로서의 염색체 이상 및 자매염색체 교환. *한국환경위생학회지* 17: 110.
- 박경아, 이원택, 박미경, 이종은 (1992): 남성생식기. *조직학*. 서울: 고려의학, pp 580.
- 심상일 (1993): 랫드의 생체내 카드뮴 축적에 대한 아연의 영향. *충남대 대학원 석사논문*.
- 이용욱, 김판기 (1987): 백서모체의 카드뮴중독이 태자 및 태반에 미치는 영향. *대한보건협회* 13: 25.
- 인삼연구보고서 (1986): 인삼성분의 중금속에 대한 방어효과. *인삼연초연구소*.
- 임국환, 김영환, 배은상 (1986): 카드뮴투여가 백서의 태반 및 태자에 미치는 영향. *대한보건협회지* 12: 113.
- 황인경, 김 돈균 (1990): CHO-K1 세포의 자매염색분체 교환에 미치는 카드뮴의 영향에 관한 연구. *예방의학회지* 23: 178.