

Bis(tributyltin) oxide 가 랫드의 면역 및 성호르몬 활성에 미치는 영향

최한영 · 나규환
연세대학교 환경과학과

Studies on Immunity and Sex Hormone Activity of Bis(tributyltin) oxide

Han Young Choi and Kyu Hwan Ra

Department of Environmental Science, Yonsei University

ABSTRACT

The purpose of this study finds out the effect of red ginseng extract(1.0 g/kg) on bis(tributyltin)oxide(TBTO) (10, 20 and 40 mg/kg) which poisons against some organs like thyroid gland, liver, kidney, testis, ovary. Serum immunity and sex hormone activity of rats are examined by gastric tubing for 3 weeks. The weights of each organ in treated group were increased, especially liver in females and those of testis in males were significantly increased at 10, 20 and 40 mg/kg ($P<0.05$, $P<0.01$). In group treated with TBTO(10, 20 and 40 mg/kg) for females, the serum IgG level was significantly reduced in comparison with control group($P<0.05$). The group of females which were poisoned by TBTO and rGe was significantly recovered in TBTO 10 mg/kg + rGe 1.0 g/kg and TBTO 20 mg/kg + rGe 1.0 g/kg. In case of sex hormone activity of each sex, the estradiol activity of females and testosterone activity of males were significantly decreased rather than the control group. And control group by bis(tributyltin)oxide and red ginseng extract is just increased estradiol activity.

· Key word : Bis (tributyltin) oxide, Immunity, Testosterone, Estradiol

I. 서 론

환경호르몬이란 환경에 노출된 화학물질이 생체내로 유입되어 마치 호르몬처럼 작용한다는 의미에서 만들어졌으며 학술적으로 널리 사용되는 용어는 내분비교란물질이다. 세계자연보호기금(WWF)에서는 자연계에 노출된 환경호르몬의 종류를 67종으로 선정하고 있다.

이중 합성화학물질류에 속하는 유해화학물질 중 최근 dioxin, PCB, DDT, bisphenol A 및 선저도료나 어망, 어구등에 사용되는 TBT화합물이 문제시 되고 있다.

내분비교란물질로 알려진 tributyltin(TBT)화합물의 생태계 교란 현상은 '80년대초 영국과 프랑스에서 참굴(*Crassostrea gigas*)의 패각기형과 개체군의 감소를 통해 처음 보고¹⁾ 되었고, 연이어 독성시험을 통하여 TBT 화합물이 굴의 성장억제와 패각기형을 일으키고 치패의 성장에 영향을 미치며, 홍합의 성장 속도를 감소시키고, 홍합유생의 높은 사망률을 유도한다는 것이 밝혀졌다.^{3,5)} 또한 복조류에 imposex를 일으키는 것이 밝혀지면서 이를 TBT화합물의 유용한 생물지표로서 활용되고 있다. 이같은 합성화학물질의 환경호르몬 물질은 비

단 생식기능에 제한되는 것이 아니며, 캐나다 퀘벡주 북부의 이누이트족의 어린이들처럼 면역력이 떨어져 호흡계 질환과 중이염에 시달리고 있고, 타지역에 비해 모유의 PCB농도가 7~10배 높다는 점이 밝혀졌다. imposex를 일으키는 기전에 대해서는 정확히 밝혀지지 않았으며, 단지 환경호르몬물질이 천연호르몬 같이 행동한다는 모방설, 봉쇄설 등 몇몇 가설에 기인하는 것으로 알려져^{6,7)} 있을 뿐 충분히 검증되지 않은 상황이다.

따라서 본 연구는 TBT화합물중에서도 독성이 강하다고 알려진 bis(tributyltin) oxide(TBTO)를 랫드에 투여하여 면역 및 성호르몬물질의 활성을 분석하고, 또한 홍삼엑기스(rGe)를 투여하여 TBTO 중독에 미치는 해독작용을 조사 연구한 결과 유의있는 지견을 얻었기에 보고한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 사양

대한실험동물센터에서 공급받은 Sprague-Dawley계 랫드를 암·수 각각 42마리 (체중 수컷 : 130~170 g, 암

컷 : 120~160 g)씩을 실험실 환경에서 적응시킨후 체중에 따라 난괴법으로 1군당 6마리씩 총 7군으로 나누어 3주간 실험에 사용하였다. 실험기간중 물과 사료는 제한없이 공급하며 사육실의 온도는 20±2°C로 유지하고 자연채광하에서 랫드용 케이지에 넣어 사육하였다. 시약중 TBTO(sp 는 1.17)는 스위스 Fluka 화학사, 홍삼엑기스는 한국담배인삼공사제품을 사용하였다. IgM kit 및 IgG kit는 독일 Behring사, testosterone kit coat-A count 및 estradiol kit coat-A-count는 미국 Diagnostic제조회사 제품을 각각 사용하였다.

2. 실험방법

1) 약물투여

(1) 대조군 : olive oil을 5.0 mg/kg씩 주입관을 통해 경구투여하였다.

(2) TBTO 투여군 : TBTO를 각각 10 mg/kg, 20 mg/kg 및 40 mg/kg이 되도록 TBTO를 olive oil에 녹여 대조군과 같은 방법으로 투여하였다.

(3) TBTO와 rGe 병용투여군 : (2)의 투여군에 각각 rGe를 1.0 g/kg씩을 동시 투여하였다.

2) LD₅₀치 측정

체중 150~200 g의 건강한 수컷 Sprague-Dawley계 랫드에 TBTO를 경구투여한 다음 24시간 이후의 치사유무를 관찰하여 Litchfield-Wilcoxon⁸⁾ 법에 따라 LD₅₀치를 구하였다.

3) 체중 및 각 조직기관 중량 측정

최종약물투여 24시간 후의 체중을 측정하고 랫드를 ether로 마취시키고 신속히 복부 정중선을 절개하여 복부 대동맥에서 채혈하였다. 채혈후 갑상선, 간장, 신장, 정소 및 난소의 원형을 유지하면서 생리식염수용액으로 깨끗이 씻어 여지로 수분을 제거한 다음 즉시 각 조직기관의 중량을 측정하였다.

4) IgM 및 IgG 분석

혈청학적 처리한 혈청을 각 IgM 및 IgG kit에 의해 정량분석하였다.

5) Testosterone 및 estradiol 분석

혈청을 각 testosterone kit coat-A-count 및 estradiol kit coat-A-count에 의한 γ -counter에서 활성을 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. LD₅₀치

TBTO를 일정량씩 랫드에 경구투여하고 24시간후의 치사유무를 관찰하여 Litchfield-Wilcoxon법에 의하여 구한 LD₅₀치는 189 mg/kg이었다. 이는 Yoshizuka⁹⁾등의 Wistar계 수컷에 대한 근육주사 투여한 LD₅₀치 1920 mg/kg보다는 10배정도 낮은 수치였다. 그러나 Funahashi¹⁰⁾등의 Sprague-Dawley 랫드에 대한 경구투여한 LD₅₀치 197 mg/kg와는 유사하였다.

이는 투여방법과 동물종류의 차이에 따라 LD₅₀치가 다르게 나타난 것으로 사료된다.

Table 1. Effects of TBTO on each organ weight in rats for for 3 weeks

		Control (5.0 ml/kg)	TBTO oral does(mg/kg) ^a					
			10	20	40	10 + rGe ^b	20 + rGe	40 + rGe
Males								
Body weight	initial	155.6 ± 3.1	155.6 ± 5.0	159.0 ± 6.5	153.6 ± 3.5	153.6 ± 3.5	166.6 ± 1.5	165.3 ± 3.5
	final	209.0 ± 6.7	186.5 ± 5.0	179.6 ± 6.0	130.3 ± 9.1	191.6 ± 6.5	198.0 ± 3.6	191.6 ± 5.7
Thyroid gl.		0.049	0.069*	0.067*	0.082*	0.067	0.072	0.084
Liver		3.349	4.276*	3.529*	4.222	4.109	4.175	4.786
Kidney		0.440	0.418	0.358**	0.469	0.509*	0.458*	0.543
Testes		0.707	0.771*	0.761*	0.930*	0.753	0.649	0.869
Females								
Body weight	initial	140.3 ± 1.5	147.0 ± 1.2	134.3 ± 2.5	135.3 ± 1.5	133.0 ± 3.6	131.0 ± 6.0	135.6 ± 2.1
	final	181.3 ± 2.3	187.3 ± 5.8	164.0 ± 7.5	124.9 ± 1.8	170.3 ± 6.8	157.0 ± 5.6	129.1 ± 1.0
Thyroid		0.067	0.064	0.069	0.093*	0.073	0.102**	0.108
Liver		3.546	4.161**	4.398**	5.133**	3.937	4.577	4.678
Kidney		0.396	0.414	0.384	0.448**	0.404	0.419	0.426
Ovary		0.038	0.043	0.026*	0.035	0.035	0.036*	0.023

Each value represents the mean ± SD of data from 6 rats/group a : TBTO, b : red ginseng extract (1.0 g/kg) Significant difference between control and treated group, TBTO treated and rGe group (*P<0.05, **P<0.01).

2. 체중 및 각 조직기관 중량변화

Table 1에서 보는 바와 같이 3주후 체중증가율은 암·수 다같이 대조군에 비하여 TBTO투여군에서 감소하는 경향을 나타내었으며 특히 수컷에서는 대조군의 34.3% 증가에 비하여 TBTO를 10 mg/kg, 20 mg/kg 및 40 mg/kg 투여군에서 각각 19.9%, 12.97 및 7.5%로 증가하여 유의성 있는 감소를 나타내어 TBTO의 독성에 기인한 것으로 사료된다(P<0.01).

한편 rGe를 병용투여한 군에서는 다소 체중증가율을 보였으며 특히 수컷의 경우 TBTO 20 mg/kg + rGe 1.0 g/kg 투여군에서 유의한 증가율을 나타내어 rGe에 의한 TBTO의 해독작용이라 사료된다.

각 조직기관의 중량변화는 TBTO의 투여량 증가에 따라 대조군에 비해 암·수 모두 증가되었다. 특히 수컷에서는 신장을 제외한 조직기관에서 유의성이 인정되었으며(P<0.05), 암컷에서도 유의성 있게 증가되었다(P<0.01). 또한 TBTO투여량 변화에 따른 rGe일정량 병용 투여군에서는 갑상선을 제외한 암·수 모두 중량이 원상태로 감소하는 경향을 나타냈는데 이는 rGe가 각조직의 활성변화에 영향을 준 결과라고 사료되거나 유의성은 없었다. Wester¹¹⁾ 등은 TBTO의 2년간 만성독성실험에서 갑상선, 간장, 신장 및 난소등의 중량은 증가하였고 고환은 감소하였다고 보고하였다. 또한 Krajnc¹²⁾ 등은 4주간 TBTO를 고농도로 정규적 투여군에서 간장, 신장이 유의하게 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서도 대조군에 비하여 각 TBTO 암·수 모든 투여군에서 Wester¹¹⁾ 및 Krajnc¹²⁾ 등의 결과와 유사하였다.

3. 면역활성에 미치는 영향

Table 2에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여 TBTO의 10 mg/kg 및 20 mg/kg 투여군에서 IgM는 암수 모두 대조군의 27.3 mg/dl 와 유사하였으나 40 mg/kg 투

여군에서는 약간 증가하는 경향은 있었으며 유의성은 없었다. 한편 rGe 병용투여군에서는 TBTO 40 mg/kg + rGe 1.0 g/kg 병용투여군에서 암수 모두 유의성 있는 감소를 나타내었다(P<0.05).

IgG에 있어서는 암컷의 경우 각 TBTO 투여군에서 대조군 36.7 mg/dl에 비해 유의성 있는 감소를 보였으며 (P<0.01, P<0.05), rGe 병용투여군에서는 유의성있게 회복되었음을 알 수 있다. Fiske¹³⁾ 등과 Hokin¹⁴⁾ 등에 의해 제시된 면역계는 현재 흉선 및 점막상 등가성 유해임과구(T 및 B세포)로 구성되어 있으며 IgM의 생물학적 기능은 면역반응이 초기에 나타나며 동종 응집소가 생기기 감염증가와 B세포 억제감소가 일어나는 것으로 알려져 있다. 한편 IgG의 생물학적 기능이상은 2차 면역반응도중 1차적으로 합성, 혈관의 조직으로 쉽게 확산되고 간장질환, 만성간염의 증가등 B세포 억제감소가 생기는 것으로 알려져 있다. Krajnc¹²⁾ 등은 암수 Wistar계 랫드에 TBTO를 4주간 사료로 고농도 투여한 결과에서 IgG는 감소하였고 IgM은 증가한다고 보고하였다. 또한 Wester¹¹⁾ 등은 TBTO (0.5 mg/kg, 5 mg/kg 및 50 mg/kg)을 106주간 실험에서 고농도군의 IgM이 대조군에 비해 현저하게 증가하였다고 보고하였다. 그러나 암컷의 고농도 처리군에서는 IgG 기능이 저하된다고 보고하였다. 또한 Vos¹⁵⁾ 등은 TBTO를 *in vitro* 실험결과 IgM 및 IgG가 감소하였으나 유의하지는 않다고 보고하였다. 본 연구에서도 Krajnc 등과 Vos 등의 결과와 유사하였으며 특히 암컷에서의 IgG 감소는 같은 경향을 나타내었다.

TBTO와 rGe를 병용투여한 군에서는 암컷의 경우 IgG를 제외하고는 거의 활성의 변화가 나타나지 않는 것으로 보아 면역반응초기에 활성이 없는 것으로 사료된다.

4. 성 hormone 물질 활성

Table 3에서 보는 바와 같이 TBTO를 10 mg/kg,

Table 2. Effect of TBTO on serum immunity in rats for 3 weeks

	Control (5.0 ml/kg)	TBTO oral does(mg/kg) ^a					
		10	20	40	10 + rGe ^b	20 + rGe	40 + rGe
Males							
IgM(mg/dl)	27.3±0.26	27.3±0.12	27.3±0.15	30.6±0.53	27.3±0.12	27.3±0.15	27.6±0.32*
IgG(mg/dl)	28.4±0.7	26.0±1.36	26.7±2.01	28.8±0.55	31.7±1.38	26.2±1.79	28.8±0.93
Females							
IgM(mg/dl)	27.3±0.16	27.4±0.30	27.4±0.2	28.8±0.55	27.3±0.15	27.3±0.2	27.3±0.26*
IgG(mg/dl)	36.7±1.5	30.6±1.62**	25.3±3.68**	23.2±3.55*	33.8±1.16**	27.2±4.32*	30.3±2.05

Each value represents the mean ± SD of data from 6 rats/group a : TBTO, b : red ginseng extract (1.0 g/kg) Significant difference between control and treated group, TBTO treated and rGe group (*P<0.05, **P<0.01).

Table 3. Effect of TBTO on serum hormone in rats for 3 weeks

	Control (5.0ml/kg)	TBTO oral does(mg/kg) ^a					
		10	20	40	10 + rGe ^b	20 + rGe	40 + rGe
Males							
Testosterone (ng/ml)	0.16 ± 0.03	0.12 ± 0.03**	0.08 ± 0.04	0.02 ± 0.005**	0.15 ± 0.05**	0.12 ± 0.03	0.03 ± 0.01*
Estradiol(pg/ml)	21.56 ± 1.43	20.60 ± 5.50	26.23 ± 5.60	30.26 ± 9.80	17.56 ± 6.87	23.36 ± 2.95	27.03 ± 4.30
Females							
Testosterone (ng/ml)	0.013 ± 0.005	0.013 ± 0.005**	0.01 ± 0.00**	0.013 ± 0.005**	0.013 ± 0.005**	0.06 ± 0.02**	0.043 ± 0.005*
Estradiol(pg/ml)	27.63 ± 0.66	25.36 ± 5.05*	23.23 ± 3.85**	20.6 ± 2.68**	31.33 ± 3.90	25.53 ± 5.10*	21.26 ± 4.00**

Each value represents the mean ± SD of data from 6 rats/group a : TBTO, b : red ginseng extract (1.0 g/kg) Significant difference between control and treated group, TBTO treated and rGe group (*P<0.05, **P<0.01).

20 mg/kg 및 40 mg/kg씩 투여량을 증가한 결과 수컷의 혈청중 testosterone은 대조군의 0.16 ng/ml에 비해 각각 0.12 ng/ml, 0.08 ng/ml 및 0.02 ng/ml로 유의성 있는 감소현상을 나타내었다. 또한 암컷의 estradiol도 대조군의 27.63 pg/ml에 비해 각각 25.36 pg/ml, 23.23 pg/ml 및 20.60 pg/ml로 역시 유의성 있는 감소를 나타내었다. 한편 수컷의 estradiol 성분은 TBTO의 투여량 증가에 따라 증가하는 경향을 나타내어 testosterone과는 반대 현상을 보이고 있으며 암컷의 testosterone은 거의 변화가 없었다. 한편 rGe 병용투여군에서는 수컷의 testosterone함량과 암컷의 testosterone 및 estradiol 분비량은 유의성있게 회복되었음을 알 수 있다.

IV. 결 론

TBTO 독성물질을 rat에 3주간 투여하고, 해독 효과를 보기 위하여 홍삼엑기스를 첨가하여 각 조직 무게 변화, 면역 및 생식 호르몬 물질 활성변화를 관찰한 결과 다음과 같았다.

1. 체중은 대조군에 비하여 암·수 모두 TBTO 투여군에서 유의성있는 감소율을 나타내었다(P<0.01). 또한 각 기관 중량은 암·수 모두 TBTO처리군에서 갑상선을 제외한 나머지 조직기관에서 증가하였다.

2. 면역활성도에 있어서는 IgM은 암, 수 모두 TBTO 처리군이 대조군에 비해 큰 활성의 변화는 없었다. 그러나 IgG는 수컷보다 암컷에서 TBTO처리군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(P<0.05, P<0.01). rGe 병용투여에 있어서는 암컷의 IgG가 TBTO 10 mg/kg + rGe 1.0 g/kg 및 TBTO 20 mg/kg+rGe 1.0g/kg군에서 유의성 있는 증가로 회복되었다.

3. 성호르몬 물질은 TBTO투여에 따라 수컷의 testosterone과 암컷의 estradiol의 함량이 대조군에 비하

여 유의성있는 감소를 나타내었다. TBTO와 rGe 병용 투여군에서는 수컷 testosterone, 암컷의 testosterone 및 estradiol 함량이 유의성있게 증가되었다.

참고문헌

- Stephenson, M. D. A field bioassay approach to determining tributyltin toxicity to oysters in California. *Mar. Environ. Res.* **32**, 51-59, 1991.
- Lawler, I. A. and Aldrech, J. C. Sub-lethal effects of bis(tri-n-butyltin) oxide on *Crassostrea gigas* spat. *Mar. Poll. Bull.*, **18**(6), 274-278, 1987.
- Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummer stone, L. G. and Burt, G. R. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around South-West England : evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **66**, 611-640, 1986.
- Horiguchi, T., Shiraiishi, H., Shmizu, M., Yamazaki, S. and Morita, M. Imposax and organotin compounds in this clavigera and *T. bronni* in japan, *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **74**, 651-669, 1994.
- Ten Hallers-Tjabbes, C., Kemp, J. P. and Boon, J. P. Imposax in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North sea : Relation to shipping traffic intensities. *Mar. Poll. Bull.*, **28**(5), 311-313, 1994.
- Kavlock, R. J., et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors, A report of the U.S EPA-Sponsored workshop, *Environ. Health Persp.* 104 suppl., **4**, 714-740, 1996.
- Toppari, J., et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens, *Environ. Health Persp.* 104 suppl., **4**, 714-803, 1996.
- Litchfield, J. J. and Wilcoxon, F. A Simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **96**, 99-113, 1949.
- Mitsuaki Yoshizuka et al. Studies on the hepatotoxicity induced by bis(tributyl tin)oxide, *Arch. Toxicol.*, **66**, 182-187, 1992.

10. Norio Funahashi, Isao Iwasaki and Genshiro IDE. Effect of Bis(tri-n-butyl tin)oxide of Endocrine and cynphaid organs of male rats. *Acta. pathologica.*, **30**(6), 955-966, 1980.
11. Wester, P. W., Krajnc, E. I., Van Leeuwen, F. X. R., Loeber, J. G., Van Der Heijden, C. A., Vaessen, H. A. M. G., and Hellenam, P. W. chronic toxicity and carcinogenicity of bis(tri-n-butyltin) oxide (TBTO) in the rat. *Food Chem, Toxicol*, **28**, 179-106, 1990.
12. Krajnc, E. I., P.W. Wester, J. G. Loeber, F. X. R. Van Leeuwen, J. G. Vos, H. A. M. G. Vaessen, and C. A. Van der Heijden. Toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO)in the rat. I. Short-term effects on general parameters and on the endocrine and lymphoid systems. *Tox. Appl. pharm*, **75**, 363-386, 1984.
13. Fiske, C. H., and subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. chem.*, **66**, 375-400, 1925.
14. Hokin, L. E., Dahl, J. L., Deupree, J. D., Dixon. J. F., Hackney. J. F., and Perdue, J. F. Studies on the characteization of the sodium-potassium transport of adenosine triphosphatase X, Purification of the enzyme from the rectal gland of squalas acanthias, *J. Biol. Chem.*, **248**, 2593-2605, 1973.
15. Vos, J. G., Deklerk, A., Krajnc, E. I., Van Loveren. H., and Roxing, J. Immunotoxicity of bis(tri-n-butyltin) oxide in the rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **105**, 144-155, 1990.
16. Ross *et al*, *Recent progr. Horm, Res*, 1970. **26**, 1-62, 1990.
17. RX : RIA for physicians, Vol 2 : 10 Scientific New sletters, Inc Anaheim, California. 1977.
18. Kolp LA *et al*, Forkolin-associated luteinizing hormone release by rat anterior pituitary glands : *Effect of castration and estiradiol replacement. Neuroendocrinology*, **54**, 399-404, 1991.
19. Davis, A., R. Barale, G. Brun *et. al*. Evaluation of the genetic and embryotoxic effects of bis(tri-n-butyltin) oxide(TBTO), a broad-spectrum pesticide in multiple in vivo and in vitro short-term tests, *Mutation Res.*, **188**, 65-95, 1987.