

## Spermatogenesis stage 분류와 Sertoli cell indices를 이용한 2-bromopropane의 생식독성평가

정용현\* · 한정희 · 유일재

한국산업안전공단 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터

### Reproductive Toxicity Assessment on 2-Bromopropane using Spermatogenesis Stage Classification and Sertoli Cell Indices

Yong Hyun Chung\*, Jeong Hee Han and Il Je Yu

Center for Occupational Toxicology, Occupational Safety & Health Research Institute,  
Korea Occupational Safety & Health Agency, 104-8, Munji-dong,  
Yuseong-gu, Daejeon, 305-380, Korea

(Received April 10, 2001)

(Accepted October 18, 2001)

**ABSTRACT** : This study was carried out to assess the reproductive toxicity of 2-bromopropane (2-BP) using spermatogenesis stage classification and Sertoli cell indices (SCI). Vehicle control olive oil and 2-BP doses of 125, 250 and 500 mg/kg of body weight were injected in the interaperitoneum of 12 weeks male Sprague-Dawley rats for 28 days respectively. Stage specificity of 2-BP at low dose (125 mg/kg) on the spermatogenesis showed significant decreases of SCI on germ cells including the spermatogonia of stages II-III, VI, X, XI, XIII, and spermatocytes of stages VIII (preleptotene), X (leptotene), XII (zygotene), V and VI (pachytene), and the round spermatids of stage VI. Considering the process of maturation depletion in spermatogenesis, spermatogonia may be the primary target cells of 2-BP toxicity.

**Key Words** : 2-Bromopropane, Reproductive toxicity, Testis, Spermatogenesis, Stage, Sertoli cell indices, S.D. rats

#### I. 서 론

최근 사회적으로 내분비장애물질에 대한 관심이 고조됨에 따라 우리나라에서도 자궁비대반응시험, 수컷성선비대 반응시험 등 내분비장애물질 평가시험법이 추진되고 있으나, OECD의 test guideline 407(OECD, 1997)에서 추천하는 내분비장애물질평가를 위한 병리조직학적인 평가 방법인 고환의 정자발생과정(spermatogenesis) 평가기법을 이용한 고환독성평가는 아직 부족한 실정이다. 고환독성을 평가하기 위한 병리조직학적 평가방법은 고환조직에 대한 변성정도를 주관적으로 판단하는 방법, 고환조직의 변성정도를 등급을 정하여 평가하는 방법, Sertoli cell index(SCI)를 이용하는 방법 등이 있고(Jones 등, 1987), 정자발생과정을 이용한 고환독성 평가방법 중에는 Ettlín 등(1984)이 제시한 고환독성해석법이 있으나, 이 방법은 단

회투여 시에만 고환내의 표적세포를 찾을 수 있는 제한점이 있고, 고환내의 각 정세관의 단면적을 표준화하지 않은 시험법이다. 정세관 단면적의 표준화는 고환내의 정세관에서 이루어지는 정자형성과정상의 각 생식세포의 생존 숫자를 파악하여 평가하는 고환독성시험법으로서 중요한 요소 중의 하나이다.

이러한 단점을 보완하기 위하여 본 연구에서는 Kumi-Diaka와 Dennis(1978)가 제시한 Sertoli cell index(SCI)를 이용하여 정세관의 단면적을 표준화시킨 후 정자발생과정상의 변화를 평가하고자 하였다. SCI에 이용되는 Sertoli cell은 세포분열을 하지 않으며, 고환내에서 가장 강한 세포로, Sertoli cell 당 생식세포의 비율을 이용한 평가법(SCI)은 고환내 정세관의 단위면적을 표준화하여 고환내 정세관내의 생식세포의 변성을 평가할 수 있는 좋은 지표가 될 수 있다. 본 연구에서는 고환에 영향을 주는 물질로 알려진 2-Bromopropane(Kim 등, 1996; Yu 등, 1997; Ichihara 등, 1997)을 랫드에 복강으로 투여한 후 각 투여

\*To whom correspondence should be addressed

농도별로 고환내 정세관의 각 스테이지별로 생식세포 및 Sertoli cell을 계수하여 SCI를 구하여 고환내의 정세관의 변성정도를 평가하고, 변성된 생식세포의 탈락을 고려한 생식세포의 시간적 변화상을 정자형성과정에서 유추함으로써 2-BP의 고환내 표적세포를 파악하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질

2-Bromopropane(2-BP,  $\text{CH}_3\text{CHBrCH}_3$ , CAS No. 75-26-3)은 Tokyo Chemical Industry 제품(Lot. FGA01, Tokyo, Japan)을 구입하여 GC-mass(Shimadzu, model GCMS-QP5000)를 이용하여 순도(99%)를 확인한 후, 올리브 기름(Lot. 25613, Yakuri Pure Chemical Co., LTD, Osaka, Japan)에 섞어 체중 kg 당 1 ml 수준으로 복강으로 1일 1회, 1주일에 6회, 4주 동안 투여하였다.

### 2. 실험동물

특정병원균(specific pathogen free)이 없는 환경에서 사육된 10주령의 Sprague-Dawley 수컷 랫트를 대한실험동물센터(충북 음성)에서 구입하였다. 실험동물은 시험물질을 투여하기 전에 2주간 순화시켜 사육환경에 적응하도록 하였다. 실험동물 사육실의 온도는 20~26°C였고, 상대습도는 40~60%였다. 실험동물에게는 설치류 사료(퓨리나 코리아, 한국)를 구입하여 정제수와 같이 부족함이 없이 공급하였다. 실험동물은 폴리카보네이트로 만들어진 케이지 당 3~4마리씩 분리하여 사육하였다. 시험개시 1주일 전에 체중을 측정하여 대조군 10마리, 저농도군(125 mg/kg/day) 10마리, 중농도군(250 mg/kg/day) 10마리, 고농도군(500 mg/kg/day) 10마리 등으로 나누었다.

### 3. 관찰 및 검사항목

#### 1) 부검 및 병리조직표본제작

실험동물의 복대동맥을 통하여 혈액을 채취한 후, 고환

를 채취하여 장기무게를 측정하고, 10% 중성 포르마린용액에 고정한 후, 파라핀으로 포매하고 파스-헤마톡시린(PAS-hematoxyline) 염색을 하였다.

#### 2) 생식세포 SCI 백분율(%)

고환의 변성정도를 관찰하기 위하여 대조군, 125 mg/kg 투여군, 250 mg/kg 투여군, 500 mg/kg 투여군 등 투여농도별로 각각 6마리를 임의로 선정하였다. 각 군별로 선정된 6마리의 왼쪽 고환 24개를 파스-헤마톡시린으로 염색하여 정자세포내의 골지체로부터 만들어지는 acrosome이 정자형성과정별로 핵을 싸고 있는 각도가 다르게 나타나는 방법을 이용하여(Takahashi, 1994) 400 배율의 광학현미경으로 312개의 각 정세관의 스테이지(stage)를 14종류로 구분하였으며, 각 스테이지별로 세르토리 세포(Sertoli cell)와 각 단계별 생식세포의 종류별로 숫자를 분석한 후 세르토리 세포에 대한 생식세포의 비율(SCI)을 구하고, 각 스테이지의 생식세포별로 대조군의 SCI에 대한 투여군의 SCI 백분율(%)을 계산하였다.

### 4. 통계

시험자료는 평균±표준편차로 표시하였으며, One-way ANOVA를 사용하여  $p < 0.01$  혹은  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검정하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 체중 및 장기무게

Table 1에서 보는 바와 같이 시험물질의 투여농도에 비례하여 250 mg/kg 투여군과 500 mg/kg 투여군에서 통계적으로 유의한 체중감소를 볼 수 있었으며, 체중 100 g에 대한 고환의 상대무게도 시험물질의 투여농도에 비례하여 250 mg/kg 투여군과 500 mg/kg 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다. 125 mg/kg 투여군에서는 통계적으로 유의하지는 않았지만 체중과 고환의 무게가 감소하는 경향을 보였다. 각 시험군에 대한 광학현미경관찰에서도

Table 1. Body weight (g) and relative testes weight (mg) of male rats treated with 2-bromopropane for 28 days

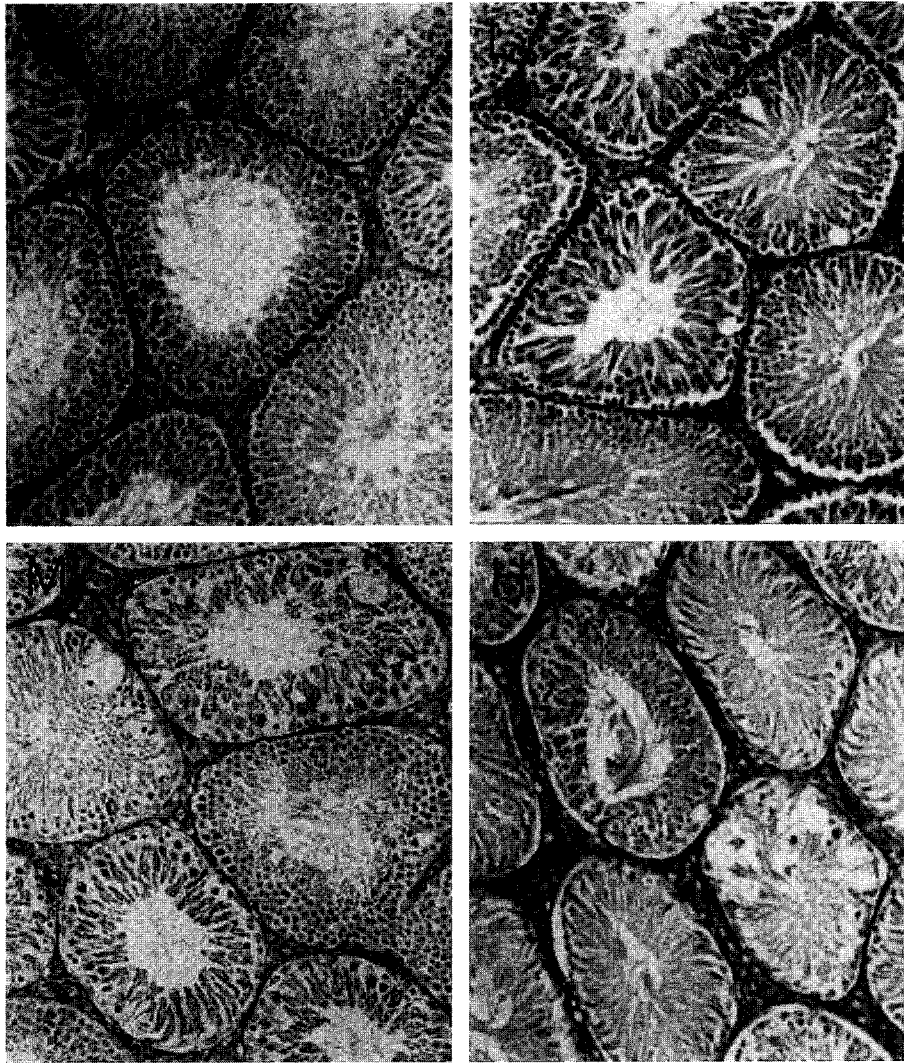
	Control	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg
Initial body weight	300.5±14.3	300.7±12.7	300.3±12.7	301.4±13.2
Terminal body weight	356.7±16.1	352.5±11.8	330.4±10.7*	289.8±16.0*
Testes (L)	475.5±30.7	467.9±36.7	402.9±49.3*	329.8±88.8*

Values are means±S.D.

Significantly different from control group at \*  $p < 0.05$  or \*\*  $p < 0.01$ .

Relative testes weight = (testes weight/terminal body weight)×100 g.

L : Left.



**Fig. 1.** Histopathology of testes treated with 2-bromopropane for 28 days. C; control, L; 125 mg/kg, M; 250 mg/kg, H; 500 mg/kg. Note a significant decrease of seminiferous tubules size depending on concentration of 2-bromopropane.  $\times 40$ . PAS & Hematoxylin.

고환의 정세관이 시험농도에 비례하여 위축된 것을 볼 수 있었다(Fig. 1). 고환을 제외한 다른 장기는 유의한 무게변화를 찾을 수 없었으며, 육안검사와 병리조직검사에서도 시험물질에 의한 특이한 변화는 찾을 수 없었다.

## 2. SCI

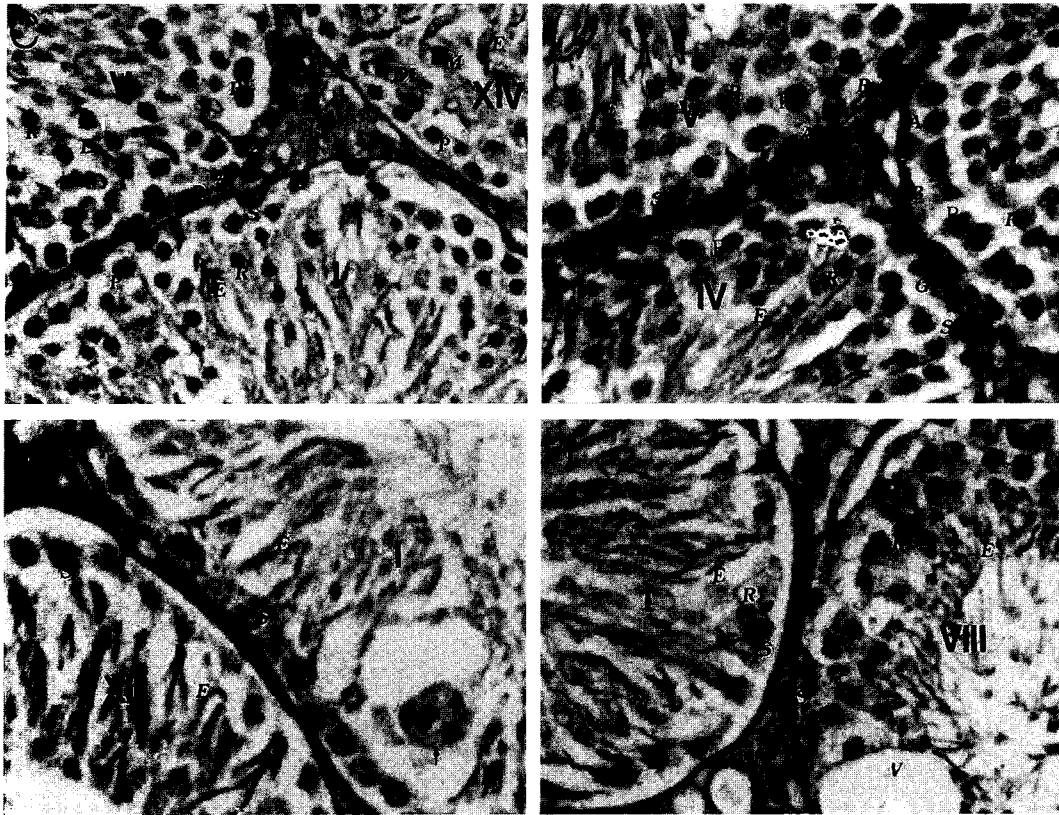
세르토리세포는 정세관내 생식세포에 영양을 공급하고 지지기능과 탐식작용을 하는 세포이다. 이 세포는 랫드의 경우 생후 18일~21일령 이후에는 세포분열을 하지 않는 세포이다(Wanda *et al.*, 1991). 시험물질이 세르토리세포에 미치는 영향을 보기 위하여 세르토리세포의 수를 분석한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 250 mg/kg 투여군에서 세르토리세포수의 유의한 감소를 보였으나, 시험군 전

체적으로 농도의존적으로 감소하지는 않았으며, 세르토리세포의 기능이상시 볼 수 있는 정세관 stage VIII 이후의 stage에서 step 19 spermatid 저류 현상은 볼 수 없는 것으로 미루어 시험물질이 세르토리세포에 직접 작용을 하지는 않는 것으로 판단되었다. 시험물질이 고환의 생식세포

**Table 2.** Numbers of Sertoli cells and Sertoli cells indices (SCI) of rats treated with 2-bromopropane for 28 days

	Control	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg
No. of Sertoli cells	17.7 $\pm$ 2.2	16.8 $\pm$ 1.2	13.6 $\pm$ 1.0*	16.1 $\pm$ 1.8
SCI	30.2 $\pm$ 2.8	26.9 $\pm$ 4.7	21.0 $\pm$ 3.0**	11.8 $\pm$ 1.4**

Values are means $\pm$ S.D. Significantly different from control group at \*  $p < 0.05$  or \*\*  $p < 0.01$ . SCI = Total number of germ cells/total number of Sertoli cells. Total numbers of testes in each group = 6. Number of tubules in each testis = 13.



**Fig. 2.** Cellular associations of seminiferous epithelium at each stage of testes treated with 2-bromopropane for 28 days. (C) stage I, V, XIV of control testes. (L) stage IV, V, VI of testes treated with 125 mg/kg. (M) stage I, XIII of testes treated with 250 mg/kg. All most spermatogonia and spermatocyte germ cells were digested by the surrounding Sertoli cells. Multinucleated giant cells appeared (↑). (H) stage I, VIII of testes treated with 500 mg/kg. All most spermatogonia and spermatocyte germ cells were disappeared. Vacuolization is present (V). G; spermatogonia, A; spermatogonia A type, B; spermatogonia B type, S; sertoli cell, P; pachytene spermatocyte, R; round spermatid, E; elongate spermatid, ×400, PAS & Hematoxylin.

에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 세르토리세포수에 대한 생식세포수의 비율인 SCI를 구한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 250 mg/kg, 500 mg/kg 투여군에서 SCI는 유의성 있게 감소하였으며, 125 mg/kg 투여군에서도 통계적으로 유의하지는 않지만 SCI가 감소하였다. 이러한 시험 결과로 정세관내에서 2-BP의 표적세포는 생식세포로 판단되었다.

시험물질이 생식세포 중 어느 생식세포에 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 각 시험군 별로 정세관을 관찰하여 스테이지를 구분하고(Fig. 2), 생식세포 종류별 SCI를 구하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 500 mg/kg 투여군에서는 spermatogonia, spermatocyte, round spermatid 등의 SCI가 대조군에 비하여 뚜렷한 감소를 보였으며 elongate spermatid의 SCI도 대조군에 비하여 다소 감소하였다.

250 mg/kg 투여군에서도 spermatogonia, spermatocyte 등의 SCI가 대조군에 비하여 뚜렷한 감소를 보였으며 round spermatid의 SCI도 대조군에 비하여 다소 감소하였

으나 elongate spermatid는 변화가 없었다. 500 mg/kg 투여군과 250 mg/kg 투여군은 대부분의 생식세포가 시험물질에 영향을 받았으므로 시험물질에 의한 구체적인 표적세포를 찾기가 어려웠다. 125 mg/kg 투여군에서는 spermatogonia, preleptotene spermatocyte, pachytene spermatocyte, round spermatid의 SCI가 유의한 감소를 보였다. 시험물질에 의한 구체적인 초기 표적세포를 찾기 위하여 125 mg/kg 투여군을 선정하여 대조군에 대한 각 생식세포의 SCI 비율(%)을 스테이지별로 구하여(Table 4) 정자발생과정에서의 표적세포를 추적하여 보았다.

### 3. 표적세포

일반적으로 화학물질마다 고환내의 표적세포가 특정적으로 나타나지만, 투여기간이나 투여농도에 따라 표적세포는 달라질 수 있다(Creasy, 1997). 생식세포의 경우에는 세르토리세포에 의하여 24시간 내에 시험물질에 영향을 받은 세포들이 탐식되어 보이지 않고, 성숙한 정자세포는 정

**Table 3.** Sertoli cells indices (SCI) of each spermatogenic cell of rats treated with 2-bromopropane for 28 days

	Control	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg
SCI				
Spermatogonia	1.2±0.1	1.0±0.1*	0.4±0.2**	0.3±0.1**
Spermatocyte				
preleptotene	3.6±0.6	2.6±0.5**	1.0±0.2**	0.0±0.0**
leptotene	4.1±0.7	3.2±0.5	1.6±0.2**	0.2±0.1**
zygotene	4.6±0.7	3.9±0.6	1.5±0.6**	0.0±0.0**
pachytene	4.7±0.6	3.8±0.3**	2.0±0.9**	0.0±0.0**
diplotene	5.9±1.1	5.9±1.2	2.5±2.1*	0.0±0.0**
Spermatid				
round	15.1±1.4	12.7±0.7*	9.8±2.2**	1.8±0.6**
elongate	12.1±1.1	11.0±1.0	12.1±0.9	10.4±1.4*

Values are means±S.D.

Significantly different from control group at \* p < 0.05 or \*\* p < 0.01.

SCI = each number of germ cells/total number of Sertoli cells.

Total numbers of testes in each group = 6.

Number of tubules in each testis = 13.

세관 내강(lumen)으로 계속 빠져나가므로 표적세포를 찾아내는데 혼란스러울 수 있다(Creasy, 1997). 고환독성을 평가하기 위해서는 동일한 스테이지의 각 생식세포의 종류별로 수를 비교하여 통계적 유의성을 찾는 방법을 통하여 표적세포를 찾아 볼 수 있다(Creasy, 1997). 2-BP의 표적장기로 판단된 고환내의 표적세포를 찾기 위하여 125 mg/kg 투여군의 정세관의 스테이지별로 각 생식세포의 SCI를 구하여 대조군에 대한 각 생식세포의 스테이지별 SCI 비율(%)을 구한 결과, Table 4에서 보는 바와 같이 spermatogonia는 II-III, VI, X, XI, XIII 스테이지에서 유의한 감소를 보였으며, spermatocyte는 preleptotene의

VIII 스테이지, leptotene의 X 스테이지, zygotene의 XII 스테이지, pachytene의 V, VI 스테이지에서 유의한 감소를 보였다. Round spermatid는 VI 스테이지에서 유의한 감소를 보였으나, elongate spermatid는 전 스테이지에서 유의한 변화를 보이지 않았다. 랫드의 경우 정자발생(spermatogenesis)은 정소내에서 48일~53일 동안 약 4 cycle로 이루어지고, 1 cycle은 14 스테이지로 구성되는데, 1 cycle에 소요되는 시간은 12일~13.3일 정도이다(Haschek and Rousseaux, 1991). 스테이지 별로 소요되는 시간은 각 스테이지마다 다르며 고환에서 출현하는 정세관 스테이지 빈도수와 비례하게 된다(Haschek and Rousseaux, 1991). 본 시험에서는 Table 4에서 보는 바와 같이 spermatogonia, spermatocytes 그리고 초기 spermatids에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 생식세포의 감소를 볼 수 있었다. 즉, 시험물질이 spermatogonia에 영향을 미쳐 시험기간인 4주 후에 spermatogonia, spermatocytes, 그리고 초기 spermatids의 손실로 나타난 것이다. 만일 spermatocytes에 시험물질이 영향을 미쳤다면, spermatocytes와 후기 spermatids의 감소가 나타났을 것이고, spermatogonia의 수는 변화가 없었을 것이다. 결론적으로 정자발생과정과 세르토리세포의 탐식작용을 고려할 때, 본 시험물질의 표적세포는 spermatogonia로 판단되었다.

## 참고문헌

Creasy, D.M. (1997): Evaluation of testicular in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging, *Toxicologic Pathology*, **25**,

**Table 4.** At indicated stage, Sertoli cell indices (SCI) % of each germ cell of rats treated with 2-Bromopropane 125 mg/kg for 28 days

stage	spermatogonia		spermatocytes			spermatids	
	preleptotene	leptotene	zygotene	pachytene	diplotene	round	elongate
I	100±25				79±20	87±34	94±43
II-III	54±11**				92±44	94±44	100±37
IV	108±31				99±26	99±23	102±17
V	83±40				78±16*	84±28	90±30
VI	78±9**				85±11*	89±10*	94±25
VII	104±53	68±28			83±44	72±25	56±22
VIII	90±30	56±35*			75±29	77±29	82±33
IX	70±45		89±28		88±36		104±41
X	50±18**		73±27*		80±27		98±13
XI	66±27*		86±18		101±30		89±27
XII	112±37			82±14*	92±21		95±22
XIII	66±19*			87±28		102±30	104±20
XIV	95±59				83±35	103±38	98±29

Values are means±S.D.

Significantly different from control group at \* p < 0.05 or \*\* p < 0.01.

SCI = The number of the each germinal cells/total number of Sertoli cells.

Date are expressed as % of control value.

Total numbers of testes = 6.

Number of tubules in each testis = 13.

- 119-131.
- Ettlin, R.A., Bechter, R., Lee, I.P. and Hodel, C. (1984): Aspects of testicular toxicity induced by anticancer drugs, *Arch. Toxicol. Suppl.*, **7**, 151-154.
- Haschek, W.M. and Rousseaux, C.G. (Eds.) (1991): Handbook of toxicologic pathology, academic press, 829-889.
- Ichihara, G., Asaeda, N., Kumazawa, T., Tagawa, Y., Kamijima, M., Yu, X., Kondo, H., Nakajima, T., Kitoh, J., Yu, I., Moon, Y., Hisanaga, N. and Takeuchi, Y. (1997): Testicular and hematopoietic toxicity of 2-bromopropane, a substitute for ozone layer-depleting chlorofluorocarbons, *J. Occup. Health*, **39**, 57-63.
- Jones, T.C., Mohr, U. and Hunt, R.D. (Eds.) (1987): Genital system, Springer-Verlag, 212-218.
- Kim, Y., Jung, K., Hwang, T., Jung, G., Kim, H., Park, J., Kim, J. Park. J., Park. D., Park. S., Choi, K. and Moon, Y. (1996): Hematopoietic and reproductive hazards of Korean electronic works exposed to solvents containing 2-bromopropane, *Scand. J. Work Environ. Health*, **22**, 387-391.
- Kumi-Diaka, J. and Dennis, S.M. (1978): The Sertoli cell index as a measure of testicular degeneration in the bull, *Vet. Rec.*, **103**, 112-114.
- OECD (1997): Draft detailed review paper : appraisal of test methods for sex-hormone disrupting chemicals.
- Takahashi, M (1994): Atlas of testicular seminiferous tubules, soft science publications, 1-36.
- Yu, I.J., Chung, Y.H., Lim, C.H., Maeng, S.H., Lee, J.Y., Kim, H.Y., Lee, S.J., Kim, C.H., Kim, T.G., Lim, C.H. Park, J.S. and Moon, Y.H. (1997): Reproductive toxicity of 2-bromopropane in Sprague Dawley rats, *Scand. J. Work Environ. Health*, **23**, 281-288.