

Tributyltin에 의한 흰쥐 흉선 내 상피세포의 지방세포 유도과 세포자연사 증가

이효진 · 이아라 · 안보람 · 전은제 · 정예지 · 양현원[†]

서울여자대학교 자연과학대학 생명환경공학과

Tributyltin Induces Adipogenesis and Apoptosis of Rat Thymic Epithelial Cells

Hyojin Lee, Ara Lee, Boram Ahn, Eunje Jeon, Yeji Jeong and Hyunwon Yang[†]

*Dept. of Bioenvironmental Technology, College of Natural Sciences,
Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea*

ABSTRACT : Tributyltin (TBT) is one of endocrine disrupters which are known as having similar function to sex steroid hormone inducing apoptosis in various tissues of rodents. Recently, it has been reported that TBT induces apoptosis in thymus causing the decreased thymic function, but little is known about the mechanism. To elucidate the mechanism, three-week-old SD female rats were orally administrated with TBT 1, 10, and 25 mg per body weight (kg) and sesame oil as a control for 7 days. On day 8, the thymi were obtained and weighed, and then the number of thymocytes was counted. We also performed H&E staining, TUNEL assay, and Annexin V flow cytometric analysis to examine the apoptosis rates and the structure in the thymus. Next, we investigated the adipogenesis and apoptosis-related mRNA expression levels in the thymi by real-time PCR. The thymic weight and the number of thymocytes were decreased by TBT in a dose-dependent manner. As a result of the H&E staining, the boundary between cortical and medullary area was blurred in the thymi of TBT treated rats compared to those of controls. In the results of TUNEL assay and Annexin V flow cytometric analysis, apoptosis rates in the thymus were increased after TBT treatment. The expression levels of thymic epithelial cell marker genes such as EVA, KGF, AIRE, and IL-7 were significantly decreased in the thymi of TBT treated rats, but PPAR γ , aP2, PEPCK, and CD36 were significantly increased. The expression of TNF α and TNFR1 as apoptosis-related genes also was significantly increased after TBT treatment. The present study demonstrates that TBT can increase the expression of adipogenesis and apoptosis-related genes leading to apoptosis in the thymus. These results suggest that the increased adipogenesis of thymus by TBT exposure might induce apoptosis in the thymus resulting in a loss in thymic immune function.

Key words : Adipogenesis, Apoptosis, Immunity, Thymic epithelial cell, Tributyltin

요 약 : 성 호르몬과 유사한 기능을 하는 것으로 알려진 내분비교란물질은 흰쥐 흉선세포에 세포자연사를 일으켜 흉선의 기능을 감소시키는 것으로 보고되고 있으나, 그 작용 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 내분비교란물질 중 하나인 Tributyltin(TBT)를 흰쥐에 투여한 후 흉선의 상피세포가 지방세포로 분화되는지를 조사하고, 이로 인한 T 세포의 세포자연사와 연관성을 조사함으로써 TBT가 흉선기능에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 3주령 된 암컷 흰쥐에 각각 TBT 1, 10, 25 mg/kg/day를 1주일 동안 경구 투여한 후, 흉선을 획득하여 무게와 세포 수를 측정하였고, 파라핀 절편으로 H&E 염색, TUNEL 분석을 수행하였다. 또한 real-time PCR 방법으로 상피세포 표지 유전자들, 지방세포 유도 유전자들과 세포자연사 관련 유전자들을 비교 분석하였으며, 유세포 분석기를 통해 세포자연사 정도를 조사하였다. 흉선의 무게와 세포 수는 대조군과 비교하여 TBT의 농도가 높을수록 유의하게 감소하였다. H&E 염색 결과, TBT의 농도가 증가할수록 흉선의 크기가 감소하고 피질과 수질의 경계가 흐려짐을 관찰하였다. TUNEL 염색 결과에서는 대조군에

비해 TBT를 투여한 군에서 세포자연사가 증가하였으며, 유세포 분석결과에서도 TBT 농도 의존적으로 세포자연사가 증가하였다. Real-time PCR 결과, 상피세포 표지 유전자인 EVA, IL-7, AIRE, KGF는 TBT의 농도가 증가

[†] 교신저자: 양현원, 서울시 노원구 공릉2동 126번지 서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과. (우) 139-774, (전) 02-970-5662, (팩) 02-970-5974, E-mail: hwyang@swu.ac.kr

할수록 발현양이 유의하게 감소한 반면, 지방세포 유도과 관련된 유전자인 PPAR γ , aP2, PEPCK, CD36은 TBT의 농도가 증가할수록 발현양이 유의하게 증가하였다. 세포자연사와 관련된 유전자인 TNF α , TNFR1도 TBT의 농도가 증가할수록 발현양이 유의하게 증가하였다. 위의 결과를 종합하여 볼 때, 내분비교란물질인 TBT는 흉선 상피세포에 직접적으로 작용하여 지방세포로 분화 유도시킴으로써 흉선의 기능을 상실케 만들면서 T 세포의 발달에 영향을 미치는 것으로 보인다. 이러한 결과는 지속적으로 노출되는 TBT가 흉선의 기능을 떨어뜨림으로써 면역력 저하를 유발시킬 수 있음을 제시하고 있다.

서론

유기주석화합물인 Tributyltin(TBT)는 성 호르몬과 유사한 기능을 하는 것으로 알려진 내분비장애물질로 각종 플라스틱 첨가제, 산업용 촉매, 살충제, 살균제 등에 함유되어 실생활에서 널리 사용되고 있다(Shawky & Emons, 1998). 그러나 TBT 화합물에 의한 생태계 교란 현상이 1980년대 초 처음 보고된 이래로 TBT로 인한 임포섹스 현상이 보고되었고, 또한 TBT가 포유류에 노출될 경우 어패류와 마찬가지로 생식 기능에 문제가 야기될 수 있는 것으로 알려져 있다(Blaber, 1970). 최근 연구에서 생쥐가 TBT에 노출될 경우 정자 형성 과정에 이상이 생기면서 정자 수가 감소하는 것으로 보고하고 있으며(Chen et al., 2008), 또한 Leydig 세포 내 스테로이드 합성 효소의 발현을 억제시키고 세포자연사 유도 단백질의 발현을 촉진시키는 것으로 보고하고 있다(Kim et al., 2008). 본 연구실에서도 TBT가 흰쥐 정소 내 간질세포의 지방세포 유도과 세포자연사를 증가시킴으로써 생식 기능이 저하되는 것으로 보고하였다(Song et al., 2010).

이러한 TBT의 위험성은 생식 기능뿐만 아니라 면역 기능에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Smialowicz et al., 1989). 흰쥐를 이용한 연구에서 면역기관에 대한 TBT의 독성은 흉선세포의 세포자연사를 통해 유도되는 것이 밝혀졌다(Zucker et al., 1994). 즉, 투여된 TBT는 흉선세포의 세포자연사를 증가시키고, 이로 인하여 흉선 내 T 세포의 발달과 성장을 억제시킴으로써 흉선의 기능이 저하되는 것으로 보고하고 있다(Grundler et al., 2001; Raffray & Cohen, 1993; Snoeij et al., 1988).

흉선은 T 세포의 발달과 성장이 일어나는 기관으로, 골수로부터 들어온 조혈모 줄기세포가 흉선 내 상피세포의 도움으로 분화가 일어나는 곳이다. 흉선 내 상피세포는 흉선 바깥쪽을 구성하는 피질 상피세포와 안쪽을 구성하는 수질 상피세포로 구분할 수 있으며, 이 두 상피세포에서 분비되는

다양한 성장인자와 사이토카인에 의해 T 세포가 분화하고 성장한다(Linton & Dorshkind, 2004). 이러한 흉선 내 상피세포는 사춘기에 접어들면서 지방세포로의 전환이 시작되고, 중년기 이후에는 대부분 상피세포가 지방세포로 전환되면서 면역력은 급속히 저하된다(Taub & Longo, 2005). 이러한 흉선 퇴화 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않고 있으나, 최근 연구에 따르면 노화에 따른 흉선 퇴화 과정에서 흉선 상피세포 내 PPAR γ 유전자가 증가하는 것으로 보고하고 있다(Yang et al., 2009). 또한 PPAR γ 리간드 유사체인 rosiglitazone을 투여할 경우 흉선이 급속히 지방조직으로 전환되면서 흉선 기능이 상실되고, 이로 인하여 면역력이 저하되는 것으로 보고하고 있다(Youm et al., 2010).

PPAR γ 는 핵 수용체 단백질인 retinoid X receptor(RXR)와 복합체를 형성하면서 DNA상의 특정 부위에 결합하여 표적 유전자를 전사시키는 조절자로서, 특히 지방세포 분화 유전자의 전사에 관여하는 것으로 알려져 있다(Berger & Moller, 2002; Michalik et al., 2006). 흥미롭게도 TBT가 이러한 PPAR γ 단백질의 활성화를 유도하면서 지방세포로의 분화를 촉진시키고, 아울러 세포 내 지질의 축적을 유도하는 것으로 보고하고 있다(Kirchner et al., 2010; Le Maire et al., 2009). 지방세포 세포주를 이용한 실험에서도 TBT는 PPAR γ 의 활성화를 통해 직접적으로 지방세포 분화를 촉진시켰고(Kanayama et al., 2005; Li et al., 2011), 흰쥐에 TBT를 투여한 실험에서도 간과 정소 주위에 지방 축적을 보고하였다(Grün et al., 2006).

이상의 보고된 결과들을 종합해 볼 때, TBT에 의한 면역 기능의 저하 원인을 TBT가 흉선 상피세포에 작용하여 지방세포로의 전환을 유도하고, 이로 인하여 흉선기능이 떨어지기 때문에 일어나는 것으로 가정하였다. 이를 증명하기 위하여 본 연구에서는 흰쥐에 TBT를 투여한 후 흉선의 구조를 조사하고, 아울러 흉선에서 지방세포 유도 관련 유전자와 세포자연사 관련 유전자의 발현을 조사함으로써 TBT 노출에

따른 흉선의 기능 저하 기전을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물과 TBT 투여

샘타코 바이오코리아에서 공급받은 3주령 된 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 서울여자대학교 동물 사육실에서 적응시킨 후 그룹 당 6마리씩 총 4개의 실험군으로 나누어 실험을 진행하였다. TBT(Tributyltin acetate; Sigma, USA)를 sesame oil(Sigma, USA)에 녹여 사용하였으며, 투여된 양은 1 mg(1 mg/kg), 10 mg(10 mg/kg), 25 mg(25 mg/kg) 농도로 7일간 경구 투여하였다. 대조군으로는 sesame oil만을 7일간 투여하였다. TBT 투여 후 8일째에 체중을 측정한다. 흰쥐를 희생시켜 흉선을 얻어 무게를 측정하고 T 세포수를 계수하였다. 생식선지수(gonad somatic index)는 흉선 무게를 체중으로 나눈 값에 100을 곱하여 산출하였다. 실험동물 사용은 서울여자대학교 동물실험 윤리위원회의 심의를 거쳐 허락을 받아 사용하였으며, 모든 실험과정은 동물실험 사용과 관리를 위한 규정에 따라 수행하였다.

2. Hematoxylin-Eosin 염색

획득된 흉선을 4% paraformaldehyde solution에서 15분 동안 고정시켰다. 흉선의 탈수를 위해 70%, 80%, 90%, 100% ethanol 용액에 순서대로 30분간 처리한 후 xylene에서 45분 동안 넣어 투명화 과정을 거치고, paraffin과 xylene을 1:1로 섞은 용액에 2시간 동안 처리하였다. 이후 100% paraffin 용액에서 2시간 동안 포매한 후 파라핀 블록을 만들었다. 흉선 파라핀 블록은 박편절단기(RM2235, Leica, Germany)를 이용하여 두께 8 μ m의 연속된 절편으로 만들었다.

흉선 내 구조를 조사하기 위하여 흉선 절편을 hematoxylin-eosin으로 염색하였다. 먼저 흉선 절편을 xylene에 3분간 넣어두었다가 100%, 95%, 80% ethanol에 순서대로 3분씩 처리하였다. 증류수로 5분간 세척한 다음 hematoxylin에 1분 30초간 담가 염색하였다. 흐르는 물로 5분간 세척한 다음 eosin으로 30초간 염색하였다. 염색된 조직은 95%과 100% ethanol에 5분간 처리한 후 xylene에 10분간 넣어두었다. 봉입제로 염색된 절편을 봉입한 후 광학현미경 하에서 관찰하였다.

3. Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 분석

획득한 흉선에 Tri regent(RNA isoplus, TaKaRa, Japan) 300 μ l를 첨가하고 조직분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 조직은 상온에서 5분간 방치하고 원심분리한 후(14,000 rpm, 4°C, 20분) 상등액을 새 시험관에 옮겼다. Chloroform(Sigma, USA) 60 μ l를 첨가하여 15초간 섞은 다음 상온에서 10분간 방치한 후 원심분리하였다(14,000 rpm, 4°C, 15분). 상등액을 새 시험관에 옮긴 후 isopropanol(Sigma, USA) 150 μ l를 첨가한 다음 원심분리하였다(14,000 rpm, 4°C, 10분). 상등액을 제거하고 75% ethanol(Sigma, USA) 1 ml를 첨가한 후 원심분리하였다(14,000 rpm, 4°C, 5분). 시험관에 남아있는 75% ethanol을 제거하고 DEPC(TaKaRa, Japan) 용액 20 μ l를 넣어준 상태로 약 1분간 섞은 후 냉동 보관하였다. 추출한 total RNA의 양은 Nano-drop(Thermo Fisher Scientific Inc., USA)을 이용하여 측정하였다. 각 조직으로부터 준비된 RNA를 이용하여 reverse transcription PCR 방법으로 cDNA를 합성한 다음, 합성된 cDNA를 template DNA로 하여 각 특정 primer와 SYBR Green I (Roche, Switzerland)을 넣고 Light Cyclor 480(Roche, Switzerland)으로 특정 유전자의 발현량을 분석하였다. 대조유전자로는 18s 유전자를 사용하였고, 18s를 기준으로 다른 유전자의 상대적인 발현량을 계산하였다. 유전자 특이적 primer 서열은 다음과 같다.

18s Forward(F) 5'-GTCTSTGATGCCCTTAGATG-3'; Reverse(R) 5'-AGCTTATGACCCGCACTTAC;

EVA F 5'-GGCTGGCTTTCCTGATGTAT-3'; R 5'-TTAACCGAACATCTGTCCCGT-3';

AIRE F 5'-GGTTCTGTTGGACTCTGCCCTG-3'; R 5'-TGTGCCACGACGGAGGTGAG-3';

IL-7 F 5'-GGGAGTGATTATGGGTGGTGAG-3'; R 5'-TGCGGGAGGTGGGTGTAG-3';

KGF F 5'-TTGACAAACGAGGCAAAGTG-3'; R 5'-CCCTTTGATTGCCACAATTC-3';

PPAR γ F 5'-ACAAGACTACCCTTTACTGAAATTA
CCAT-3'; R 5'-TGCGAGTGGTCTTCCATCAC-3';

aP2 F 5'-GCGTGGAATTCGATGAAATCA-3'; R 5'-CCC GCCATCTAGGGTTATGA-3';

CD36 F 5'-CCTGCAAATGTCAGAGGAAA-3'; R 5'-GCGACATGATTAATGGCACA-3';

PEPCK F 5'-AACTGTTGGCTGGCTCTC-3'; R 5'-GA

ACCTGGCGTTGAATGC-3';

TNF α F 5'-AGGGTCTGGCCATAGAACT-3'; R 5'-CC
ACCACGCTCTTCTGTCTAC-3';

TNFR1 F 5'-ATGGATGTATCCCCATCAGC-3'; R 5'-A
ATGGGGGAGTGAGAGGC-3';

4. TUNEL 염색

TBT 투여 후 흉선 내 세포자연사를 확인하기 위하여 terminaldeoxynucleotidyl-transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigeninnick end-labeling(TUNEL) 방법을 사용하였다. 흉선 절편은 xylene과 ethanol을 사용하여 파라핀을 제거한 후 PBS로 세척하였다. 흉선 절편 위에 TUNEL reaction mixture(*In Situ* Cell Death Detection Kit, Roche, Switzerland)를 30 μ l 떨어뜨리고 37°C에서 1시간 반응시켰다. DAPI로 2차 염색을 시행하였고 증류수로 2번 세척한 후 봉입제로 봉입한 후 형광현미경(Axioskop2+, Carl Zeiss, Germany) 하에서 세포자연사가 일어난 세포를 확인하였다.

5. 유세포 분석

먼저 흉선 내 T 세포는 흉선 조직을 yellow mesh 위에서 갈아서 획득하였다. 획득한 T 세포는 RPMI+5% FBS 용액으로 세척한 후 trypan blue(Sigma, USA)로 염색하였고, 혈구계를 사용하여 T 세포의 생존율과 세포 수를 계수하였다. T 세포 수가 1×10^6 개가 되도록 취하여 1X binding buffer 500 μ l에 Annexin V(Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Sigma, USA) 5 μ l와 Propidium Iodide(PI) 10 μ l를 넣은 다음, 10분 동안 상온에서 배양한 후 유세포 분석기

(CYTOMICS FC500, Beckman Coulter, USA)를 이용하여 분석하였다.

6. 통계학적 분석

각 실험군 당 6마리의 흰쥐를 사용하였으며, 무게와 모든 유전자의 발현 정도는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. 통계학적 유의성 검정은 student *t*-test와 one-way ANOVA, Tukey test 방법을 사용하였으며, 대조군과 실험군을 비교하여 *p*값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. TBT 투여 후 흉선 무게 및 T 세포 수의 감소

TBT 투여에 따른 체중의 변화를 알아보기 위해 7일간 체중을 측정한 결과, TBT 25 mg/kg을 투여한 실험군에서 체중이 감소하는 경향을 보였으나, sesame oil만을 투여한 대조군과 비교해서 유의한 차이는 보이지 않았다(Fig. 1A). 또한 TBT 투여가 흉선 무게에 어떤 영향을 미쳤는지 알아보기 위해 TBT 투여 후 8일째에 흉선 무게를 측정된 결과, 흉선 무게는 높은 농도의 TBT를 투여할수록 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었고(Fig. 1B), 체중에 따른 흉선의 무게를 나타내는 somatic index 또한 고농도의 TBT를 투여할수록 유의하게 감소하였다(Fig. 1C). 흉선에서 획득한 T 세포 수 또한 대조군에 비해 TBT를 투여한 군에서 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 1D).

2. TBT 투여 후 흉선의 구조 변화

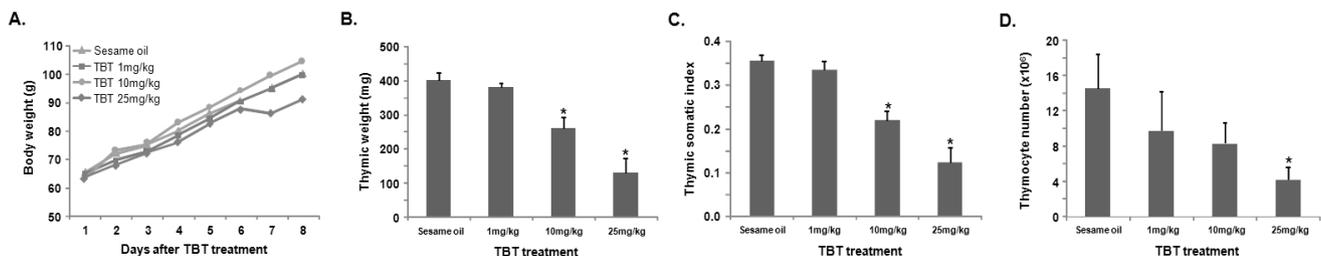


Fig. 1. The body and thymic weights and the number of thymocytes after TBT treatment. Three week-old female rats were orally administrated with TBT 1, 10, and 25 mg/kg or sesame oil for 7 days daily. (A) The body weight was decreased in 25 mg/kg TBT treated rats, but showing no significant difference compared to sesame oil treated controls. (B) The thymic weights were significantly decreased in 10 and 25 mg/kg TBT treated rats compared to control rats. (C) The thymic somatic index were also significantly decreased in 10 and 25 mg/kg TBT treated rats. (D) The number of thymocytes was significantly decreased in 25 mg/kg TBT treated rats. Data are represented as mean \pm SEM. * *p*<0.05 compared to sesame oil as a control.

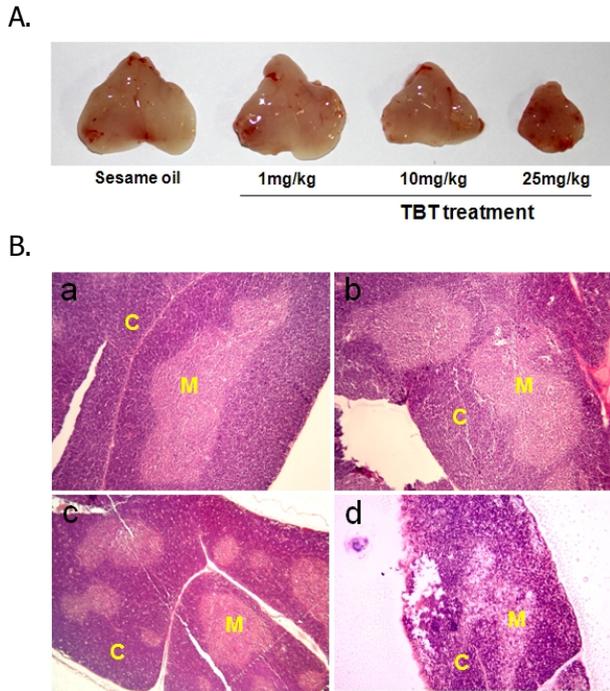


Fig. 2. The thymic gross morphology and the structure of inner thymus after TBT treatment. Three week-old female rats were orally administrated with TBT 1, 10, and 25 mg/kg or sesame oil for 7 days daily. (A) The size of thymus was decreased in TBT treated rats in a dose-dependant manner. (B) The thymic sections were stained with hematoxylin and eosin. The thymus of sesame oil treated rat showed clear boundary between medulla and cortex area, but the thymus of 25 mg/kg TBT treated rat showed most vague boundary between medulla and cortex area. (a) Sesame oil, (b) TBT 1 mg/kg, (c) TBT 10 mg/kg (d) TBT 25 mg/kg. Original magnification, $\times 100$.

흰쥐 흉선의 크기는 TBT 투여 후 현저히 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). 이러한 흉선 크기의 변화가 흉선 내 구조에는 어떤 변화를 유발시켰는지를 확인하기 위하여 흉선 내부를 관찰하였다. 흉선 내 구조 변화를 알아보기 위하여 H&E 염색한 결과, 대조군에 비해 TBT를 투여한 군에서 흉선 수질과 피질의 경계가 뚜렷하지 않게 흐트러져 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 특히, TBT 25 mg/kg을 투여한 흉선 내 피질 부위는 상피세포들 사이에 많은 공간이 보이면서 T 세포 수가 감소해 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B,d).

3. TBT 투여 후 흉선 내 세포자연사 세포 증가

TBT 투여 후 흉선 내에서 세포자연사가 일어난 세포를

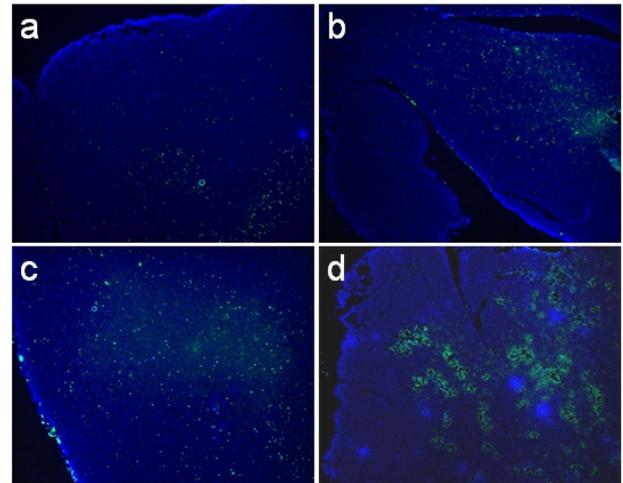


Fig. 3. The apoptosis detection in thymus after TBT administration. Three week-old female rats were orally administrated with TBT 1, 10, and 25 mg/kg or sesame oil for 7 days daily. Apoptotic cells were detected by TUNEL assay kit using the paraffin sections of the TBT treated thymi. The number of apoptotic cells was dramatically increased in the thymus treated with 25 mg/kg of TBT. (a) Sesame oil, (b) TBT 1 mg/kg, (c) TBT 10 mg/kg (d) TBT 25 mg/kg. Original magnification, $\times 100$.

확인하기 위하여 TUNEL 방법으로 염색한 후 확인한 결과, 대조군에서는 세포자연사가 일어난 세포들(녹색으로 염색됨)을 거의 찾아볼 수 없었으나(Fig. 3a), TBT를 투여한 실험군에서는 투여된 TBT 농도 의존적으로 세포자연사가 일어난 세포 수가 증가하였고(Fig. 3b,c), 특히 TBT 25 mg/kg을 투여한 실험군의 흉선에서 다량의 세포자연사가 일어난고 있음을 확인하였다(Fig. 3d).

흉선에서 분리한 T 세포를 Annexin-V와 PI로 표지하여 유세포 분석기를 이용하여 분석한 결과, TBT 25 mg/kg을 투여한 실험군에서 Annexin-V로 염색된, 즉 세포자연사가 일어난 세포 수는 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

4. TBT 투여 후 흉선 내 유전자 발현

흉선 상피세포 표지 유전자 발현을 real-time RCR 방법으로 확인한 결과, TBT 투여군에서 상피세포 표지 유전자인 EVA, KGF, AIRE, IL-7의 mRNA 발현이 TBT 농도에 의존적으로 감소하였다(Fig. 5). 지방세포 유도 관련 유전자 발현을 real-time PCR 방법으로 확인해 본 결과, TBT 투여군에서 지방세포 분화 관련 유전자인 PPAR γ , CD36, PEPCK,

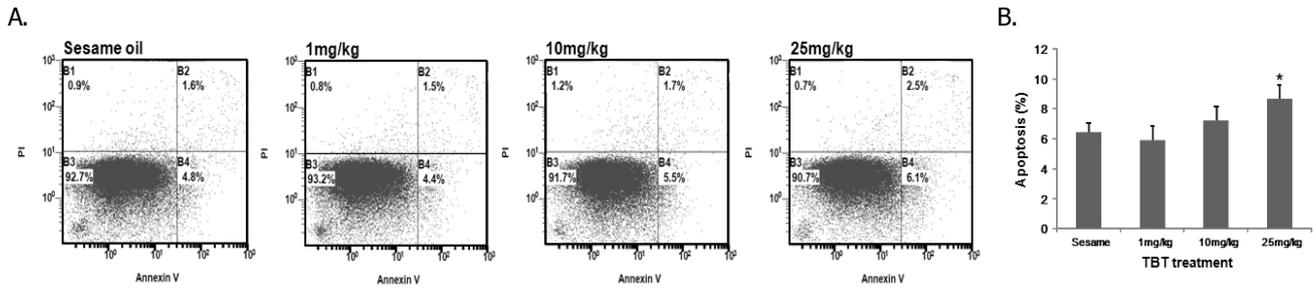


Fig. 4. Flow cytometric analysis of apoptotic cells in rat thymus after TBT treatment. Three week-old female rats were orally administrated with TBT 1, 10, and 25 mg/kg or sesame oil for 7 days daily. Total thymocytes were prepared from thymus. (A) Apoptotic cells were stained using Annexin V labeling kit followed by analyzed by flow cytometry. (B) The percentage of apoptotic cells was significantly increased in the thymus treated with 25 mg/kg of TBT. Data are represented as mean±SEM. * $p < 0.05$ compared to sesame oil as a control.

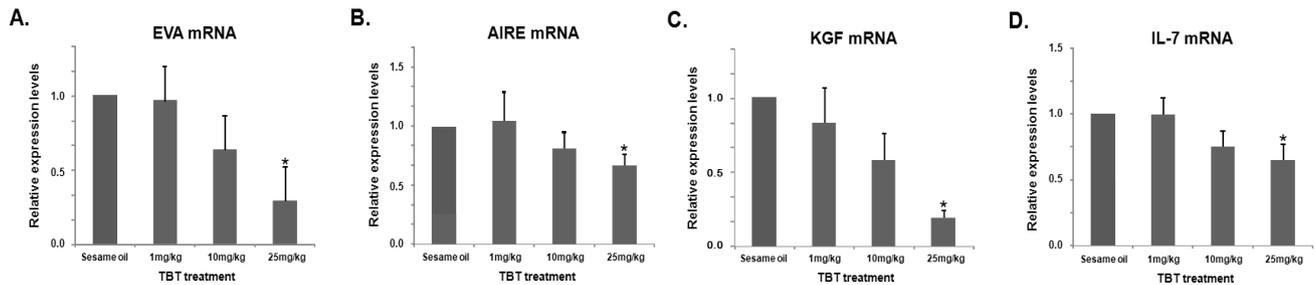


Fig. 5. The expression levels of epithelial cell marker genes in the rat thymus after TBT treatment. Three week-old female rats were orally administrated with TBT 1, 10, and 25 mg/kg or sesame oil for 7 days daily. Total RNAs were prepared from thymi after TBT treatment and mRNA expression levels were analyzed by real-time PCR. The expression levels were normalized to 18s mRNA. Data are represented as mean±SEM. * $p < 0.05$ compared to sesame oil as a control.

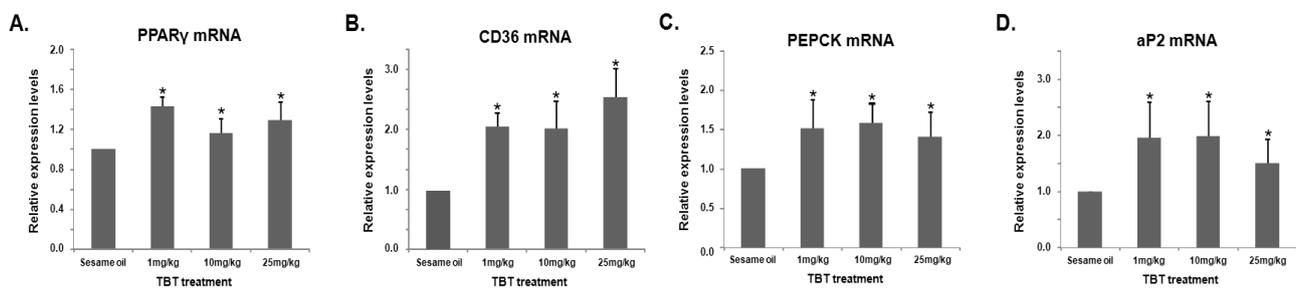


Fig. 6. The expression levels of adipogenesis-related genes in the rat thymus after TBT exposure. Three week-old female rats were orally administrated with TBT 1, 10, and 25 mg/kg or sesame oil for 7 days daily. Total RNAs were prepared from thymi after TBT treatment and mRNA expression levels were analyzed by real-time PCR. The expression levels were normalized to 18s mRNA. Data are represented as mean±SEM. * $p < 0.05$ compared to sesame oil as a control.

aP2의 mRNA 발현이 TBT 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 6). TBT 투여와 흉선 내 세포자연사와의 연관성을 알아보기 위해 세포자연사 관련 유전자 발현을 real-time

PCR 방법으로 확인한 결과, 세포자연사 관련 유전자인 TNF α 와 TNFR1의 mRNA 발현이 TBT를 투여한 군에서 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

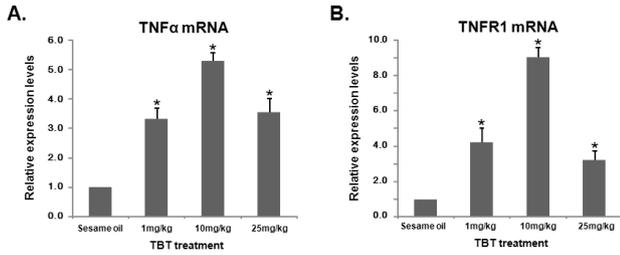


Fig. 7. The expression levels of apoptosis-related genes in the rat thymus after TBT exposure. Three week-old female rats were orally administrated with TBT 1, 10, and 25 mg/kg or sesame oil for 7 days daily. Total RNAs were prepared from thymi after TBT treatment and mRNA expression levels were analyzed by real-time PCR. The expression levels were normalized to 18s mRNA. Data are represented as mean±SEM. * $p < 0.05$ compared to sesame oil as a control.

논 의

대표적인 환경성 내분비교란물질인 TBT는 흉선 기능을 억제시키면서 면역력을 저하시키는 것으로 보고하고 있으나, 어떠한 기전으로 TBT가 흉선 기능에 영향을 미치는지는 잘 알려져 있지 않다. 그러나 이미 발표된 여러 연구결과에 따르면, TBT는 생식기관을 포함한 다양한 기관에서 PPAR γ 의 리간드로 작용하면서 지방세포 분화를 유도하고, 이로 인하여 각 기관의 기능이 감소하는 것으로 보고하고 있다 (Kirchner et al., 2010). 이에 본 연구에서도 기존에 밝혀진 연구결과와 같이 TBT가 흉선에서도 지방세포 분화를 유도하면서 흉선 기능을 억제할 것이라고 가정하고, 흰쥐 흉선을 대상으로 TBT 투여 후 흉선 내에서 지방세포 분화가 일어나는지, 이에 따른 흉선의 기능이 감소하는지를 조사하였다.

먼저 TBT 투여에 따른 섭식과 체중의 변화를 평가하기 위하여 TBT 투여 후 매일 체중을 측정하였다. 흰쥐의 체중은 TBT 투여와 상관없이 정상적인 증가 양상을 보였다. 25 mg/kg TBT를 투여한 실험군에서 체중 증가 폭이 다른 군에 비하여 낮았으나, sesame oil만 투여한 대조군과 비교해서 유의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 흉선의 무게는 TBT 투여 후 유의하게 감소하였으며, 체중에 따른 흉선의 무게 (somatic index) 또한 투여된 TBT 농도가 높을수록 감소하는 결과를 보였다. 아울러 흉선 내 T 세포의 숫자도 TBT 투여 후 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 TBT가 흉선 세

포의 세포자연사를 유도함으로써 흉선의 무게와 T 세포 수를 감소시킨다는 기존의 보고와 일치하고 있다(Raffray & Cohen, 1993; Ueno et al., 2009). 이러한 흉선 무게와 T 세포 수의 감소가 흉선 내부 구조 변화와 어떤 연관성이 있는지를 확인하기 위하여 흉선 절편을 가지고 H&E 염색을 수행한 결과, TBT를 25 mg/kg으로 고농도로 투여한 실험군에서 흉선 내 피질과 수질 사이의 경계가 불분명해짐을 확인할 수 있었다. 흉선은 피질과 수질 부위로 나눌 수 있으며, 피질과 수질 경계 부위에 존재하는 혈관을 통해 골수로부터 조혈모 줄기세포가 유입된다. 이러한 조혈모 줄기세포는 피질 부위로 이동하면서 피질 상피세포의 도움으로 분화하기 시작하고, 최종적으로 분화된 CD4+ 또는 CD8+ T 세포는 수질 부위로 이동하여 수질 상피세포의 도움으로 음성 선택과정을 거쳐 혈관으로 방출된다(Love & Bhandoola, 2011). 이러한 흉선은 태아시기에 가장 발달되어 있으면서 흉선의 크기도 크고 피질과 수질부위의 경계도 명확하게 구분되어 있다. 그러나 점점 노화가 진행이 되면서 흉선의 크기는 작아지고 흉선 내 상피세포들은 지방세포로 변하면서 피질과 수질부위의 경계부위도 불분명해진다(Lynch et al., 2009). 이러한 과정을 흉선 퇴화 과정이라고 하며, 흉선 퇴화는 사춘기에 시작하여 중년기 이후에는 대부분의 흉선 조직이 지방조직으로 변하면서 그 기능이 상실된다(Lynch et al., 2009). 본 실험결과에서 TBT 투여 후 흉선 내 피질과 수질부위의 경계가 불분명해진다는 것은 TBT에 의해 흉선의 퇴화가 유발될 수 있음을 제시하는 것이라 할 수 있다.

한편, TBT가 생식기관을 포함한 다양한 조직에서 세포자연사를 유발시킨다는 것은 잘 알려진 사실이다(Fawthrop et al., 1991). 이에 본 연구에서도 투여된 TBT에 의해 흉선 내 세포자연사가 증가하는지를 확인하였다. 흉선 절편을 이용하여 TUNEL 분석을 수행한 결과, 투여된 TBT 농도가 높을수록 흉선 내 세포자연사가 증가하는 것을 확인할 수 있었고, Annexin V 염색 후 유세포 분석기로 분석한 결과에서도 TBT 농도 의존적으로 세포자연사가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 TBT가 직접적으로 T 세포의 세포자연사를 유발시켜 흉선 기능을 감소시킨다는 기존의 보고와 일치하고 있다(Ken et al., 2004; Tomiyama et al., 2009).

이상의 본 실험결과와 기존에 발표된 연구결과들을 종합하여 볼 때, TBT는 흉선의 크기와 구조를 변화시키고, 아울러 흉선 내 세포자연사를 일으키면서 흉선의 기능을 억제시

키는 것으로 판단할 수 있다. 이러한 TBT 투여에 따른 흉선 내 구조의 변화와 세포자연사의 증가가 어떤 기전으로 유발되는지를 알아보고자 T 세포 분화와 발달에 중요한 역할을 하는 흉선 내 상피세포의 기능을 조사하였다. 먼저, 기존에 알려진 바와 같이 TBT가 흉선 조직 내에서도 지방세포 분화를 유도하는지를 확인하기 위하여 지방세포 유도 관련 유전자와 흉선 상피세포 표지 유전자의 발현을 조사하였다. 본 연구결과에서 지방세포 유도 관련 유전자로 알려진 PPAR γ , aP2, CD36, PEPCK 모두 TBT 투여 후 유의하게 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. TBT가 PPAR γ 의 발현을 촉진시키고, 또한 RXR과 상호작용하여 지방세포로의 분화를 촉진시킨다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다(Nakanishi, 2008). 또한 aP2(adipocyte fatty acid binding protein)는 지방대사와 지방산 세포 내 수송에 관여하는 단백질로 지방세포화 과정에서 다량 발현하는 것으로 알려져 있으며(Mandrup & Lane, 1997; Gregoire et al., 1998), 배양된 지방세포주에 TBT를 처리할 경우 aP2 발현이 급속히 증가한다는 것이 보고되었다(Carfi et al., 2008; Shao & Lazar, 1997). CD36은 지방세포에서 발현되는 scavenger receptor로 산화된 LDL을 제거하고 (Febbraio et al., 2001), 지방산을 지방세포 안으로 수송하는 기능이 있는 것으로 보고하고 있다 (Ibrahimi et al., 1996). CD36 발현은 지방세포로의 분화과정 중에 aP2와 마찬가지로 PPAR γ 에 의해 조절 받는 것으로 알려져 있다(Feng et al., 2000). 이러한 연구결과들을 고려해 볼 때, TBT가 흉선 조직 내 PPAR γ 유전자의 발현을 촉진시키고, 이로 인하여 지방세포 분화 관련 유전자인 aP2, CD36, PEPCK 유전자 발현이 증가한다는 것은 TBT가 다른 기관에서와 마찬가지로 흉선에서도 지방세포화를 촉진시킬 수 있다는 것을 보여주고 있다.

한편, TBT 투여에 따른 흉선 내 지방세포화 촉진이 흉선 상피세포의 기능을 감소시킬 수 있을 것으로 판단하고, 흉선 상피세포 표지 유전자인 EVA, KGF, AIRE, IL-7의 발현을 분석하였다. EVA(Epithelial V-like antigen)는 흉선 상피세포에서 발현되는 단백질로 흉선 내 T 세포의 발달 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Maria et al., 1998). KGF(Keratinocyte growth factor)는 흉선을 포함한 다양한 조직의 상피세포에서 발현되는 fibroblast growth factor 중의 하나로(Danilenko, 1999), FGF receptor 2와 결합하여 흉선 상피세포의 발달에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다

(Erickson et al., 2002). 흉선 수질 상피세포에서 발현되는 AIRE(Autoimmune regulator)는 면역 관용을 조절하면서 T 세포 발달 과정 중 음성 선택 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다(Liston et al., 2003). IL-7은 흉선 세포의 생존, 증식, 분화를 증진시키는 사이토카인 중 하나로 T 세포 발달 과정 양성 선택 과정에서 음성 선택 과정으로의 전환과 성숙한 T 세포의 증식을 촉진시킨다(Maraskovsky et al., 1997; Trigueros et al., 2003; Hare et al., 2000). 본 연구결과에서 이러한 흉선 상피세포 표지 유전자인 EVA, KGF, AIRE, IL-7의 발현량은 TBT 투여 후 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 최근 생쥐를 이용한 연구결과에 따르면, 노화에 따른 흉선 퇴화 과정에서 흉선 상피세포 표지 유전자의 발현량이 감소하고, 이로 인하여 흉선의 기능이 떨어지면서 면역력이 감소하는 것으로 보고하고 있다(Youm et al., 2010). 이러한 상피세포 표지 유전자 발현의 감소는 흉선 퇴화가 진행되는 과정에서 PPAR γ 와 같은 지방세포 유도 유전자 발현의 증가 때문인 것으로 밝혀졌다(Yang et al., 2009). 이러한 결과들을 고려해 볼 때, TBT는 흉선 내 상피세포의 지방세포화를 유도하고, 이로 인하여 상피세포의 기능이 상실되면서 흉선의 기능이 억제되는 것으로 사료된다.

다음으로 본 연구에서는 투여된 TBT가 흉선 내 세포자연사를 증가시키는 원인을 알아보고자 세포자연사 관련 유전자의 발현량을 조사하였다. TNF α 와 TNFR1의 발현이 TBT 투여 후 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. TNF α 는 대표적인 염증성 사이토카인으로 염증반응 시 호중구 세포의 생성을 유발하지만, 일반적으로 다양한 세포에서 세포자연사를 유발하는 것으로 알려져 있다(Murray et al., 1997). TNF α 에 의해 유도되는 세포자연사는 세포 표면에 발현하는 TNF Receptor 1(TNFR1)과 연관이 있으며, 이 수용체에 TNF α 가 결합할 경우 세포자연사가 유발되는 것으로 보고하고 있다(Micheau & Tschoep, 2003; Gaur & Aggarwal, 2003). 또한 흉선을 채외에서 배양하면서 TNF α 를 처리하면 흉선 내 T 세포의 발달이 억제되는 것으로 밝혀졌고(Middlebrook et al., 2007), 최근 연구에서는 TNF α 가 IFN γ 와 함께 골수 줄기세포로부터 분화되는 T 세포의 세포자연사를 유발시키는 것이 밝혀졌다(Liu et al., 2011). 이러한 결과들은 TBT에 의해 증가된 TNF α 가 TNFR1를 발현하고 있는 흉선 내 세포들에 작용하여 세포자연사를 유발시킬 수 있다는 것을 뒷받침하는 증거라고 사료된다.

본 연구 결과들을 종합해 볼 때, TBT는 흉선 내 지방세포 유도 관련 유전자인 PPAR γ , aP2, PEPCK 및 CD36의 발현을 증가시키면서 지방세포화를 촉진하고, 흉선 상피세포의 표지 유전자인 EVA, KGF, AIRE, IL-7의 발현을 감소시킴으로써 T 세포의 분화와 발달을 저해하는 것으로 사료된다. 아울러 TBT는 세포자연사 유도 유전자인 TNF α 와 TNFR1의 발현을 증가시켜 흉선 내 T 세포의 세포자연사를 유발시키는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 일상생활 속에서 지속적으로 노출되고 있는 TBT가 흉선의 기능을 떨어뜨림으로써 면역력 저하를 유발시킬 수 있음을 제시하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2011학년도 서울여자대학교 교내학술연구비지원금을 받아 작성되었습니다.

인용문헌

- Berger J, Moller DE (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53:409-435.
- Blaber SJM (1970) The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus*. *J Mollus Stud* 39:231-233.
- Carfi M, Croera C, Ferrario D, Campi V, Bowe G, Pieters R, Gribaldo L (2008) TBTC induces adipocyte differentiation in human bone marrow long term culture. *Toxicology* 249:11-18.
- Chen Y, Zuo Z, Chen S, Yan F, Chen Y, Yang Z, Wang C (2008) Reduction of spermatogenesis in mice after tributyltin administration. *Toxicology* 251:21-27.
- Danilenko DM (1999) Preclinical and early clinical development of keratinocyte growth factor, an epithelial-specific tissue growth factor. *Toxicol Pathol* 27:64-71.
- Erickson M, Morkowski S, Lehar S, Gillard G, Beers C, Dooley J, Rubin JS, Rudensky A, Farr AG (2002) Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor. *Blood* 100:3269-3278.
- Fawthrop DJ, Boobis AR, Davies DS (1991) Mechanisms of cell death. *Arch Toxicol* 65:437-444.
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108:785-791.
- Feng J, Han JH, Pearce SF, Silverstein R, Gotto AM, Hajjar DP, Nicholson AC (2000) Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J Lipid Res* 41:688-696.
- Gaur U, Aggarwal BB (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 66:1403-1408.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809.
- Grün F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Cubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B (2006) Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol* 20:2141-2155.
- Grundler W, Dirscherl P, Beisker W, Marx K, Stampfl A, Maier K, Zimmermann I, Nusse M (2001) Early functional apoptotic responses of thymocytes induced by tri-n-butyltin. *Cytometry* 44:45-56.
- Hare KJ, Jenkinson EJ, Anderson G (2000) An essential role for the IL-7 receptor during intrathymic expansion of the positively selected neonatal T cell repertoire. *J Immunol* 165:2410-2414.
- Ibrahimi A, Sfeir Z, Magharaie H, Amri E, Grimaldi P, Abumrad NA (1996) Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2646-2651.
- Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, Nishikawa J (2005) Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol Pharmacol* 67:766-774.
- Ken Nakano, Masashi Tsunoda, Nobuhiro Konno (2004) Tributyltin (TBT) increases TNF α mRNA expression and induces apoptosis in the murine macrophage cell

- line *in vitro*. Environ Health Prev Med 9:266-271.
- Kim SK, Kim JH, Han JH, Yoon YD (2008) Inhibitory effect of tributyltin on expression of steroidogenic enzymes in mouse testis. Int J Toxicol 27:175-182.
- Kirchner S, Kieu T, Chow C, Casey S, Blumberg B (2010) Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. Mol Endocrinol 24:526-539.
- Le Maire A, Grimaldi M, Roecklin D, Dagnino S, Vivat-Hannah V, Balaguer P, Bourguet W (2009) Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors. EMBO Rep 10:367-373.
- Li X, Ycaza J, Blumberg B (2011) The environmental obesogen tributyltin chloride acts via peroxisome proliferator activated receptor gamma to induce adipogenesis in murine 3T3-L1 preadipocytes. J Steroid Biochem Mol Biol 127:9-15.
- Linton PJ, Dorshkind K (2004) Age-related changes in lymphocyte development and function. Nat Immunol 5:133-139.
- Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC (2003) Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. Nat Immunol 4:350-354.
- Liu Y, Wang L, Kikuri T, Akiyama K, Chen C, Xu X, Yang R, Chen W, Wang S, Shi S (2011) Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α . Nat Med 17:1594-1601.
- Love PE, Bhandoola A (2011) Signal integration and cross-talk during thymocyte migration and emigration. Nat Rev Immunol 11:469-477.
- Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R, Sempowski GD (2009) Thymic involution and immune reconstitution. Trends Immunol 30:366-373.
- Mandrup S, Lane MD (1997) Regulating adipogenesis. J Biol Chem 272:5367-5370.
- Maraskovsky E, O'Reilly LA, Teepe M, Corcoran LM, Peschon JJ, Strasser A (1997) Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1^{-/-} mice. Cell 89:1101-1109.
- Maria G, Francesca S, Maddalena P, Simona P, Barbara M, Margherita M, Tabet T, Giacomo CG, Fabio G (1998) Epithelial V-like antigen (EVA), a novel member of the immunoglobulin superfamily, expressed in embryonic epithelia with a potential role as homotypic adhesion molecule in thymus histogenesis. J Cell Biol 141:1061-1071.
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. Pharmacol Rev 58:726-741.
- Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell 114:181-190.
- Middlebrook AJ, Lebsack T, DeLuca D (2007) TNF-alpha mediated modulation of T cell development and exacerbation of *in vitro* T1DM in fetal thymus organ culture. J Autoimmun 29:134-145.
- Murray J, Barbara JA, Dunkley SA, Lopez AF, Van Ostade X, Condliffe AM, Dransfield I, Haslett C, Chilvers ER (1997) Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis *in vitro*. Blood 90:2772-2783.
- Nakanishi T (2008) Endocrine disruption induced by organotin compounds; organotins function as a powerful agonist for nuclear receptors rather than an aromatase inhibitor. J Toxicol Sci 33:269-276.
- Raffray M, Cohen GM (1993) Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin-induced thymic atrophy *in vivo*. Arch Toxicol 67:231-236.
- Shao D, Lazar MA (1997) Peroxisome proliferator activated receptor γ , CCAAT/ enhancer-binding protein α , and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte

- differentiation. *J Biol Chem* 272:21473-21478.
- Shawky S, Emons H (1998) Distribution pattern of organotin compounds at different trophic levels of aquatic ecosystems. *Chemosphere* 36:523-535.
- Smialowicz RJ, Riddle MM, Rogers RR, Luebke RW, Copeland CB (1989) Immunotoxicity of tributyltin oxide in rats exposed as adults or pre-weanlings. *Toxicology* 57:97-111.
- Snoeij NJ, Penninks AH, Seinen W (1988) Dibutyltin and tributyltin compounds induce thymus atrophy in rats due to a selective action on thymic lymphoblasts. *Int J Immunopharmacol* 10:891-899.
- Song YH, Joung JE, Lee HA, Hong JH, Yang H (2010) Tributyltin increase adipogenesis and apoptosis of rat testicular interstitial cells. *Dev Reprod* 4:297-306.
- Taub DD, Longo DL (2005) Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol Rev* 205:72-93.
- Tomiyama K, Yamaguchi A, Kuriyama T, Arakawa Y (2009) Analysis of mechanisms of cell death of T-lymphocytes induced by organotin agents. *J Immunotoxicol* 6:184-193.
- Trigueros C, Hozumi K, Silva-Santos B, Bruno L, Hayday AC, Owen MJ, Pennington DJ (2003) Pre-TCR signaling regulates IL-7 receptor alpha expression promoting thymocyte survival at the transition from the double-negative to double-positive stage. *Eur J Immunol* 33:1968-1977.
- Ueno S, Kashimoto T, Susa N, Asai T, Kawaguchi S, Takeda-Homma S, Terada Y, Sugiyama M (2009) Reduction in peripheral lymphocytes and thymus atrophy induced by organotin compounds *in vivo*. *J Vet Med Sci* 71:1041-1048.
- Yang H, Youm YH, Vishwa DD (2009) Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution. *J Immunol* 183:3040-3052.
- Youm YH, Yang H, Amin R, Smith SR, Leff T, Dixit VD (2010) Thiazolidinedione treatment and constitutive-PPARgamma activation induces ectopic adipogenesis and promotes age-related thymic involution. *Aging Cell* 9:478-489.
- Zucker RM, Elstein KH, Thomas DJ, Rogers JM (1994) Tributyltin and dexamethasone induce apoptosis in rat thymocytes by mutually antagonistic mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 127:163-170.
-
- (Received 1 December 2011, Received in revised form 16 December 2011, Accepted 18 December 2011)