

내분비장애물질로서 Metribuzin의 랫드와 HeLaTRE Cell 중 갑상선 호르몬활성 영향

유아선* · 정미혜 · 이제봉 · 박연기 · 신진섭 · 박경훈¹

국립농업과학원 농산물안전성부 농약평가과, ¹국립식량과학원 벼맥류부 간척지농업과

(2008년 12월 3일 접수, 2008년 12월 13일 수리)

Thyroid Hormone-like Activity of Metribuzin as a Endocrine Disruptor in Rats and HeLaTRE Cell Culture

Are-Sun You*, Mihye Jeong, Je Bong Lee, Yoen-Ki Park, Jin Sup Shin and Kyung-Hun Park¹

Division of Pesticide Safety Evaluation, Department of Crop Life Safety, National Academy of Agricultural Sciences, ¹Division of Reclaimed land agriculture Research, Department of Rice and Winter, National Institute of Crop Science

Abstract

This study was carried out to investigate the suitability of the pubertal assay and the enhanced TG 407 as methods for detection of endocrine-mediated effects. Thyroid function was also considered. Male and female Sprague-Dawley rats were gavaged daily with 0, 25, 50, 100 mg/kg metribuzin in corn oil during 30 days. The effects of metribuzin on thyroid gland, the genital organs and thyroid hormone were measured in male and female rats. Dose of metribuzin 50 mg/kg/day increased relative weight of testis, prostate, and seminal vesicle in male rats but relative weight of thyroid gland was not significantly different from control group. Dose of metribuzin 25 mg/kg/day decreased relative weight of thyroid gland in female rats. Another purpose of this study was to investigate the effects of endocrine-disruptors as like thyroid hormone *in vitro*. Luciferase activity was measured to detect reaction of test chemicals and thyroid hormone response elements in HeLaTRE cell. Dose of metribuzin from 1 to 1,000 nM increased to 106-122% of luciferase activity.

Key words metribuzin, thyroid hormone, endocrine disruptor

서 론

Metribuzin은 triazine계 선택성 제초제로서 침투 이행 특 성으로 인해 식물의 뿌리나 경엽에서 흡수되어 잡초의 광합 성을 저해하여 서서히 고사시킨다(정, 2004). 미국 EPA의 metribuzin에 대한 reregistration eligibility decision(RED) 에서는 metribuzin이 갑상선의 상대적 장기중량을 증가시킨

다고 보고한 바 있으며(US/EPA, 1998) 세계야생보호기금 (WWF)에서는 metribuzin을 내분비계 장애물질로 분류하고 있다(WWF Canada, 1996). 내분비계 장애물질에 대하여 OECD에서는 ‘내분비 기능에 변화를 일으켜 생체 또는 그 자손의 건강에 유해한 영향을 나타내는 외인성 물질’이라고 정의하였으며, US/EPA에서는 ‘체내의 항상성 유지와 발달 과정을 조절하는 생체내 호르몬의 생산, 분비, 이동, 대사, 결합작용 및 배설을 간섭하는 외인성 물질’(Stoker 등, 2000; Naciff와 Daston, 2004)이라고 정의하고 있다.

내분비계 장애 추정 물질 중에는 metribuzin과 같이 갑상

* 2005 유럽독성학회(EUROTOX) 포스터발표

*연락처 : Tel. +82-31-290-0595, Fax. +82-31-290-0508
E-mail: aresun@rda.go.kr

선 호르몬성 영향을 나타내거나 갑상선 기능에 영향을 주는 물질들이 있는데 이러한 외인성 화학물질은 6개 부분에서 직접적으로 갑상선 시스템에 영향을 줄 수 있다(DeVito 등, 1999): (1) 활성 iodine uptake, thyroglobulin의 요오드화, thyroglobulin내에서 iodothyrosine을 갑상선 호르몬 형태에 연결, thyroglobulin으로부터 갑상선 호르몬의 효소적 분해와 혈액으로 갑상선 호르몬 분비하는 갑상선(Hadley, 1996); (2) 혈액과 CSF(cerebrospinal fluid)에서 유리(free) 갑상선호르몬의 농도를 일정하게 유지시키는 세포의 갑상선호르몬결합 혈장단백질(THBPs)(Robbins, 1996); (3) 표적세포로 갑상선 호르몬의 흡수(Hennemann 등, 2001); (4) nuclear-receptor-mediated transcription의 중재 역할을 한다고 생각되는 세포내 세포질성 THBPs(Ashizawa와 Cheng, 1992; Mori 등, 2002); (5) 갑상선 호르몬을 활성화 또는 비활성화시키는 대사효소(St. Germain, 1994); (6) 갑상선호르몬 반응 요소를 통해 gene 발현을 직접적으로 조절하는 thyroid receptor와 부속 단백질(McKenna 등, 1999).

갑상선 호르몬은 조직의 성장과 성숙, 세포호흡과 전체 에너지 소비에 관여하고, 많은 종류의 효소를 생성하여 단백질이나 탄수화물의 산화대사를 촉진, 미토콘드리아의 수효와 크기를 증가시켜 대사를 활발하게 진행하게 하므로 에너지 생성이 증가되어 체온조절에 영향을 미친다. 또한 골격성장 작용과 단백질 합성 촉진작용을 증가시키는 협력작용을 하여 성장기 아이의 성장에 영향을 미치고 신경시냅스의 발달과 미엘린 수초의 형성에 영향을 주어 뇌와 중추신경계의 발달에 중요한 역할을 담당한다. 아울러 조직에서 생성된 대사산물로 인해서 조직혈관이 확장되며 조직으로 산소공급을 증가시키기 위해서 심혈관계 작용을 조절하는 등 중요한 기능을 한다(홍사석, 1993; 서울대학교 의과대학 생리학교실, 1996; 해리슨내과학, 1997; 전국의과대학교수 번역, 1999).

갑상선 호르몬(T3와 T4)은 시상하부의 thyrotrope 기능을 조절하고 갑상선자극호르몬(TSH)의 생성을 억제하며(Shupnik 등, 1994) nuclear thyroid receptor와의 결합에 의해 조정된다(Lazar, 1993). 사람에게 있어 갑상선암은 가장 일반적인 내분비계 종양이며 발병이 증가하고 있는데(Kim 등, 2007) 90% 이상이 여포상피세포에서 유래된 유두상 갑상선암이거나 여포암으로서 분화 갑상선암이고 예후는 병기와 조직학적 아형에 영향을 받으나 다른 장기의 악성종양에 비하여 대체로 매우 양호한 편이다(Hong, 2000; Sheman, 2002).

이러한 갑상선 호르몬성 영향 및 갑상선 기능에 영향을 주는 물질을 구분하기 위한 여러 가지 시험이 수행되고 있는데 본 연구는 Enhanced OECD Test Guideline 407과 EDSTAC

(Endocrine disruptors screening and Testing Advisory Committee)에서 권고하는 'Pubertal Development and Thyroid Function in Immature Male Rats'(Yamasaki 등, 2002)에 기초하여 시험을 수행하고 metribuzin의 갑상선 호르몬성 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

시험물질 및 시약

내분비계 장애 추정물질로 알려진(Kashian 등, 2002) metribuzine 93.7%(경농으로부터 분양)을 사용하여 시험하였다. 멸균 사료와 깔짚은 (주)한림실험동물에서, T4 및 T3, FT4, FT3, estradiol, testosterone FIA kit는 PerkinElmer에서 구입하였다. FBS와 L-glutamine 첨가 DMEM은 GibcoBRL에서, DMSO는 Sigma, cell lysis buffer와 luciferin은 Promega에서 구입하였다.

시험동물 및 사육환경

시험에 사용한 21-23일령 Sprague Dawley rat는 농업과학기술원 유해물질과 실험동물실에서 사육한 동물로 일반증상과 체중증가가 정상적인 건강한 동물만을 골라 사용하였다. 각 시험군당 개체수는 암수 10마리였으며 동물 사육실 환경은 온도 23±2℃, 상대습도 55±5%, 병암교대 12시간 및 조도 200-300 Lux에서 폴리카보네이트 랫드용 사육상자(명진기계상사, 한국)에 넣어 사육하였다. 시험기간동안 사용한 사료(삼양사, 한국) 및 깔짚(한림실험동물, 한국)은 방사선으로 멸균된 것을 구입하였으며 음용수는 멸균수를 자유로이 공급하였다.

시험물질 투여

Metribuzin의 만성독성 NAOEL을 기준으로 NAOEL보다 높은 약량을 저약량으로 설정하기 위하여 LD₅₀의 1/20, 1/40, 1/80을 고, 중, 저약량으로 설정하였으며, 약량은 0, 25, 50, 100 mg/kg/day으로 투여하였다. 각 약량을 corn oil에 녹여 5 mL/kg body weight로 매일 체중을 측정 후 존대를 사용하여 30일간 경구 투여하였다.

시험동물 부검

부검 전 16-18시간동안 절식시킨 후 CO₂ 가스로 안락사시켜 부검을 실시하였다. 복강을 열어 복대동맥에서 주사기로 채혈하고 40분간 빙상에 정치시킨 후 4℃ 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하였고 간, 신장, 뇌, 갑상

선과 주요 생식기 등의 장기중량을 측정하였다.

호르몬 측정

DELFLIA kit(PerkinElmer)를 이용하여 ELISA방법으로 시험하였으며 TRF(Time resolved Fluorescence meter)장비로 Victor²D(PerkinElmer)로 측정하였다. T4(M.S. 등, 2002), T3, free T4, free T3, estradiol, testosteron는 각각의 kit를 이용하여 제공된 매뉴얼에 따라 시험을 실시하였는데 형광물질로는 Europium(Eu)를 사용하였다. Eu tracer stock에는 BSA와 dextran T10을 첨가한 Tris-HCl buffer(pH 7.8)를, antibody stock solution은 BSA와 0.1% 미만의 sodium azide를 첨가한 Tris-HCl buffer(pH 7.8)를 사용하였으며 Tween 20을 첨가한 Tris-HCl(pH 7.8)을 washing solution으로 사용하였다.

갑상선 호르몬 특이반응 세포 시험

갑상선 호르몬 특이반응 세포는 국립수의과학검역원에서

제조한 HeLaTRE 세포주를 분양 받았다. 이 세포주는 강력한 viral promoter인 SV40과 리포터 유전자로서 luciferase 발현유전자를 함유하는 plasmid에 TREs의 core유전자를 증폭하여 삽입한 후 다시 유전자도입 plasmid(Fig. 1)를 증폭·정제하여 인체자궁암세포주(HeLa cell)에 도입하여 제조하였다.

이 세포주를 이용하여 갑상선 호르몬성 영향 시험을 하였다. 1% FBS와 2 mM L-glutamine을 첨가한 DMEM(GibcoBRL) 배지를 사용하여 24 well plate에 1×10⁵ cells/well을 분주하고 18시간 배양한 후 시험물질을 0.1% DMSO 농도 수준으로 24시간 처리하였다. Cell lysis buffer(Promega)로 lysis시킨 후 1분간 원심분리하여 luminometer(MicroLumatPlus, Berthold)를 이용하여 luciferase assay를 실시하였다. Luciferin(Promega) 50 μl와 lysis된 샘플 10 μl를 반응시켜 5초간 luminometer로 측정하였다.

결과 및 고찰

Metribuzin 투여 rat의 체중 증체율의 변화

Fig. 2에서는 metribuzin 투여 rat의 체중변화를 나타내었는데 30일간 매일 측정된 결과 수컷에서는 약제 투여군이 대조군에 비하여 체중 증체율이 감소하는 경향이 나타났으나 유의하지 않았고 약제투여군 사이에서는 약량별 차이가 없었다. 암컷에서는 대조군과 약제투여군의 체중 증체율에 차이가 없었으며 약량별 차이도 나타나지 않았다. 갑상선 호르몬은 교감신경계와 여러 단계의 상호작용을 통하여 에너지대사를 조절하는 것으로 알려져 있으며(Siva, 1995) 따라서 갑상선기능 이상이 발생하면 에너지 대사율이 변하고 체중을 일정하게 유지하기 위한 보상기전으로 식욕의 변화가 흔히 뒤 따른다고 알려져 있다(Cugini, 1999). 즉 갑상선기능항진증

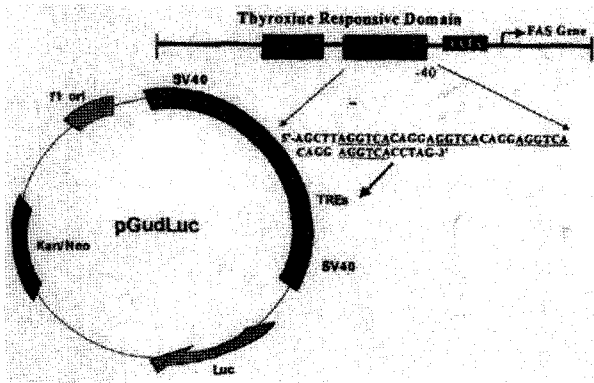


Fig. 1. Structure of the expression vector pGL1.1. The vector contains malic enzyme gene (ME)-thyroid hormone responsive elements (TREs) (정 등, 2003).

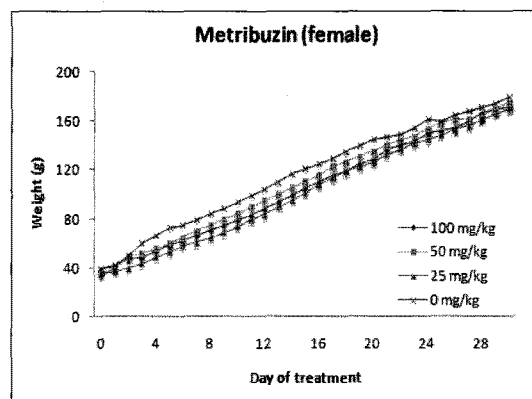
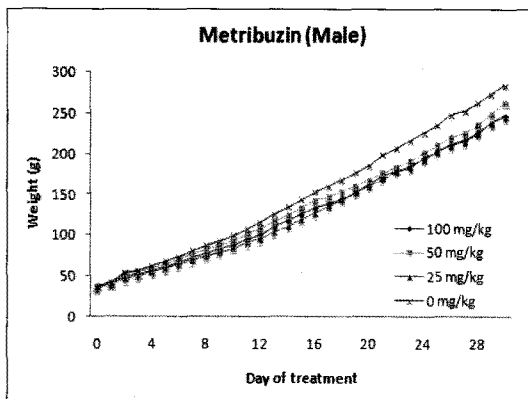


Fig. 2. Change of daily body weight gain of control and the treated groups during 30-day of treatment of metribuzin.

환자에서는 식욕이 증가하고, 반대로 갑상선기능저하증 환자에서는 식욕의 저하가 관찰된다(Kim 등, 2002). 갑상선 자체에 염증이냐 종양 같은 병변이 나타나 기능이 저하될 때 이를 원발성 갑상선 기능저하증이라 하며(두, 1993), 갑상선 호르몬이 적게 나올 경우에는 대사 과정이 지나치게 느려져 변비, 무기력증, 얼굴과 손발에 부종이 있으며, 추위에 약하고 땀이 잘 나지 않는다. 또한 피로, 기억력 감퇴, 월경과다, 근육통 등이 나타나며, 식욕은 감퇴되었는데도 체중이 증가하는 증상을 보인다(Kim과 Kim, 2001). Fig. 2와 같이 본 시험에서는 갑상선기능항진증 시 체중 감소나 저하증 시 체중 증가의 변화는 나타나지 않았다. 따라서 metribuzin 투여시 체중 증체에 영향을 주지 않았다고 사료되었다.

Metribuzin 투여 rat의 상대적 장기중량

Table 1에서는 metribuzin 투여 수컷 rat의 상대적 장기중량을 나타내었는데 뇌중량은 100 mg/kg/day 수준에서 유의적인 증가를 보였으며, 50, 100 mg/kg/day 수준에서는 소뇌 중량의 유의적인 증가가 나타났다. 부신에서는 50, 100 mg/kg/day 수

준에서 중량이 증가하였으나 간에서는 100 mg/kg/day 수준에서 중량이 감소하였다. 부고환, 전립선, 정낭의 중량이 50 mg/kg/day 수준에서 중량증가를 보였다. 갑상선에서는 유의한 중량 변화를 보여주지 않았으므로 갑상선에 대한 영향이 나타나지 않았다. Table 2에서는 Metribuzin 투여 암컷 rat의 상대적 장기중량을 나타내었는데 100 mg/kg/day 수준에서 간, 신장의 중량이 증가하였다. 갑상선의 중량이 25 mg/kg/day 수준에서 유의적으로 감소하였으나 용량의존적 반응은 나타나지 않았다. 난소와 자궁, 질의 생식장기의 중량은 유의적인 변화를 보이지 않았다. 따라서 metribuzin 투여 암컷에서는 생식장기에 영향이 나타나지 않았으며 갑상선에 대한 영향이 있다고 보기 어렵다. 미국 EPA에 의하면 beagle dog에서 2년간 사료섭취를 통한 metribuzin 노출시험에서 암컷과 수컷의 갑상선 상대중량이 증가하였고 수컷에서는 간, 비장 및 신장의 상대중량이 증가한 것으로 보고하였다(US/EPA, 1998). 랫드에 대한 본 시험에서는 수컷에서 metribuzin 투여군에서 간 중량이 감소하였고 암컷에서 간, 신장의 중량이 증가하여 metribuzin이 수컷과 암컷에 동일한 영향을 나타내지는 않았

Table 1. Relative organ weights of male rats exposed to metribuzin

(unit : %)

Organ	Dose (mg/kg/day)				
	0	25	50	100	
Terminal body weight	247.99±27.58	246.60±16.60	250.00±12.31	248.03±10.82	
Brain	Whole	0.64±0.078	0.69±0.052	0.69±0.081	0.70±0.047*
	Cerebellum	0.11±0.026	0.14±0.036	0.16±0.0225*	0.15±0.040*
Pituitary gland	0.0033±0.00037	0.0027±0.00078*	0.0028±0.00065	0.0028±0.00056	
Adrenal gland	Left	0.0073±0.0018	0.00829±0.00203	0.0091±0.00095*	0.0088±0.0011
	Right	0.0077±0.00082	0.0088±0.0015	0.093±0.0013*	0.0090±0.0010*
Liver	4.73±0.52	4.65±0.31	4.44±0.42	4.29±0.20*	
Spleen	0.23±0.020	0.26±0.026*	0.20±0.070	0.26±0.064	
Kidney	Left	0.50±0.052	0.538±0.037	0.492±0.028	0.50±0.027
	Right	0.51±0.041	0.521±0.041	0.492±0.032	0.50±0.023
Testis	Left	0.47±0.071	0.493±0.046	0.510±0.041	0.530±0.054
	Right	0.47±0.044	0.485±0.037	0.504±0.035	0.521±0.057
Epididymis	Left	0.063±0.00910	0.067±0.0061	0.073±0.013	0.066±0.0090
	Right	0.061±0.01003	0.067±0.0097	0.080±0.017*	0.074±0.018
Prostate	0.083±0.019	0.093±0.016	0.10±0.019*	0.087±0.012	
Seminal vesicle	0.13±0.022	0.15±0.031	0.17±0.029*	0.156±0.023	
Thyroid gland	Left	0.0026±0.00051	0.0033±0.00069	0.0030±0.00065	0.0026±0.00095
	Right	0.0029±0.00051	0.0033±0.000443	0.0030±0.00073	0.0026±0.00074
Anogenital distance	10.19±1.15	10.41±0.65	10.810±1.25	11.19±1.12**	
Stature	21.52±0.77	20.80±0.65	20.69±0.43	20.64±0.23	

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

다. 암컷에서는 개에서와 같이 간과 신장에 노출영향을 나타내는 것으로 사료되었다.

Metribuzine 투여 rat의 갑상선 호르몬 및 성호르몬 변화

Table 3에서는 metribuzin 투여 rat의 갑상선 호르몬 및

성호르몬 변화를 나타내었는데 수컷에서는 FT4가 50, 100 mg/kg/day 수준에서 유의하게 증가한 반면 T3와 testosterone은 100 mg/kg/day 수준에서 유의하게 감소하였다. 암컷의 경우 T3가 50, 100 mg/kg/day 수준에서 유의하게 증가하였고 FT3는 25 mg/kg/day 수준에서 유의하게 감소하였다. 분화 갑상선암 환자중 조사대상 환자 모두가 갑상선기능

Table 2. Relative organ weights of female rats exposed to metribuzin

(unit : %)

Organ	Dose (mg/kg/day)				
	0	25	50	100	
Terminal body weight	164.80±15.64	170.77±9.29	171.58±21.01	156.95±12.29	
Brain	Whole	0.92±0.11	0.95±0.058	0.91±0.12	1.00±0.14
	Cerebellum	0.17±0.063	0.20±0.190	0.18±0.034	0.18±0.037
Pituitary gland	0.0044±0.0011	0.0048±0.0006	0.0049±0.0009	0.0040±0.0017	
Adrenal gland	Left	0.015±0.0038	0.016±0.0031	0.014±0.0040	0.017±0.0031
	Right	0.015±0.0028	0.014±0.0056	0.014±0.0043	0.017±0.0024
Liver	4.165±0.547	4.61±0.33	4.48±0.44	5.07±0.60*	
Spleen	0.24±0.031	0.24±0.038	0.21±0.038	0.244±0.042	
Kidney	Left	0.49±0.043	0.53±0.049	0.51±0.080	0.54±0.061*
	Right	0.50±0.045	0.56±0.057	0.51±0.079	0.56±0.063*
Ovary	Left	0.027±0.0081	0.032±0.0049	0.072±0.122	0.031±0.0074
	Right	0.027±0.0093	0.031±0.0058	0.069±0.118	0.032±0.0051
Uterus	0.26±0.099	0.31±0.130	0.25±0.085	0.24±0.069	
Vagina	0.075±0.0116	0.088±0.0223	0.093±0.0151	0.088±0.028	
Thyroid gland	Left	0.0043±0.0007	0.0027±0.0008*	0.0045±0.00039	0.0045±0.0010
	Right	0.0048±0.0008	0.0029±0.0007*	0.0039±0.0014	0.0046±0.0008
Anogenital distance	5.56±0.704	7.08±1.18	6.18±1.32	6.17±0.87	
Stature	18.84±0.82	19.52±0.36	19.73±0.99	19.18±0.68	

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Table 3. Activity of thyroid hormone and sex hormone in plasma of rats exposed to metribuzin

Sex	Hormone	Dose (mg/kg/day)			
		0	25	50	100
Male	T4 (nmol/L)	745.11±130.52	667.33±200.944	728±213.64	616±185.71
	FT4 (pmol/L)	16.29±6.28	41.8±19.64	47.83±29.48**	49.12±24.27*
	T3 (nmol/L)	25.66±1.19	22.894±7.31	22.66±7.18	20.55±6.98*
	FT3 (pmol/L)	6.015±1.94	5.674±1.66	6±2.18	5.64±2.012
	Estradiol (nmol/L)	26.43±12.46	22.14±15.38	30.99±14.38	13.20±13.78
	Testosterone (nmol/L)	98.51±56.12	71.34±54.93	114.39±74.14	44.48±48.26**
female	T4 (nmol/L)	624±159.37	635.38±296.25	719.45±164.26	688.5±246.62
	FT4 (pmol/L)	10.716±1.30	11.167±1.038	10.74±0.34	13.36±1.58
	T3 (nmol/L)	20.14±0.26	20.969±8.36	23.81±1.709*	25.02±2.37**
	FT3 (pmol/L)	7.078±2.24	4.496±1.15*	5.26±2.24	4.67±2.19
	Estradiol (nmol/L)	32.045±7.14	25.68±17.07	26.94±17.2	27.82±17.19
	Testosterone (nmol/L)	65.198±68.38	79.14±55.66	94.73±74.01	97.14±61.89

T4 : Thyroxine, FT4 : Free Thyroxine, T3 : Triiodothronine, FT3 : Free Triiodothronine

저하증 상태라고 보고한 결과가 있다(Lee 등, 2003). 일차성 갑상선기능저하증에서 혈중 T3, T4의 농도는 낮은 반면 혈중 TSH의 농도는 증가한다. 이차성 또는 삼차성 갑상선기능저하증의 경우 혈중 T3, T4의 농도는 낮고 혈중 TSH 농도는 정상이거나 낮다(Yu, 1986; Chung, 2006). 갑상선기능항진증은 갑상선 호르몬이 혈중으로 과분비되어 발생하며 신경계, 위장관계, 근골격계 및 심혈관계 등에 연관된 증상과 징후가 나타나는 질환으로(Larsen 등, 2003) 성조숙증 다음으로 가장 많이 나타나는 내분비 이상 양상이다(Feuillan 등, 1999; Mastorakos 등, 2000). 단기간의 갑상선기능조작에 따른 혈중 TSH와 FT3의 농도를 측정하였을 때 갑상선기능항진유발 시 혈중 TSH 농도는 낮았고 FT3 농도는 높았다는 연구결과가 있는데(Kim 등, 2002), 이러한 호르몬들의 내분비장애물질에 의한 영향을 관찰하기 위하여 혈중 호르몬 수치를 측정한 결과 metribuzin 투여시 수컷에서 testosterone이 감소하는 영향을 나타내어 성호르몬에도 영향을 주는 것으로 나타난 반면 주요 호르몬인 T4에는 영향을 나타내지 않았으나 THBPs와 결합하지 않은 활성화상태의 FT4가 증가하였고 암컷에서는 활성화상태인 FT3가 증가하여 갑상선기능항진증과 유사한 양상을 나타내었다. 따라서 metribuzin 투여시 갑상선 호르몬성 영향이 나타나는 것으로 사료되었다.

갑상선 호르몬 특이반응 시험세포를 이용한 metribuzin의 농도별 영향

Fig. 3에서는 갑상선 호르몬 영향을 나타내었는데 Thyroxin

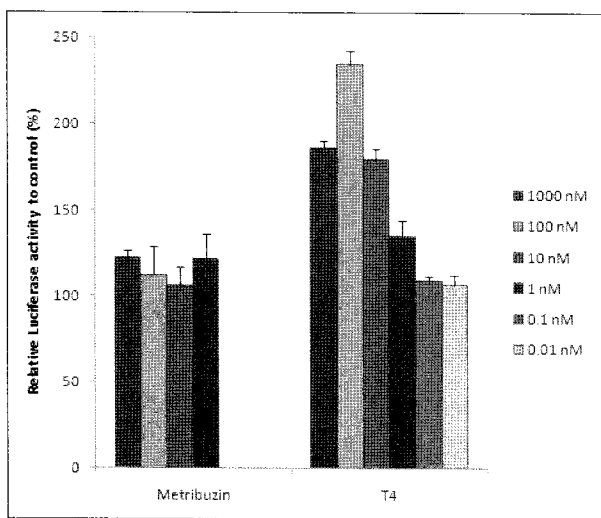


Fig. 3. Relative inction of luciferase by the cotreatment of T4 and metribuzin 100 nM in HeLaTRE cells for investigation of thyroid hormone effect. %=luciferase activity of sample/luciferase activity of control.

(T4)을 양성 대조군으로 갑상선 호르몬성 영향을 비교하였다. T4에서는 100 nM에서 가장 높은 영향을 보였으며 1000 nM에서는 수치가 낮은 경향을 보였다. 0.1 nM-100 nM까지는 농도에 따라 반응을 나타내었으며 0.01 nM에서는 0.1 nM과 비교하여 갑상선 영향에 차이가 크게 나타나지 않았다. Metribuzin을 처리하였을 때 최대농도인 1000 nM에서 상대적 luciferase 활성은 122%의 영향을 보였으며 10 nM에서는 106%의 영향을 보여 농도 증가시 영향이 증가하는 경향을 보였으나, 1 nM에서 121%로 영향이 다시 증가하였다.

갑상선 호르몬은 hydrophobic compounds로서 세포내에서 표적 유전자의 발현을 조절하는 specific nuclear receptor들에 의해 활성이 조정된다(Yen과 Chin, 1994). 혈장 내에서 갑상선 호르몬은 특이 단백질과 결합하여 혈관시스템을 통해 표적세포로 분포하게 된다(Robbins, 1996). 갑상선 호르몬과 혈장 단백질의 결합 평형정도가 유리된 갑상선 호르몬의 농도를 결정하는데 이 유리 갑상선 호르몬이 세포로 들어가 반응을 나타낼 수 있다(Ekins 등, 1982; Mendel, 1989). 내분비장애물질 중에는 hydrophobic compound들이 있는데 이중에는 내분비 호르몬을 운반하는 혈장 단백질과 반응함으로써 호르몬 수송체계를 방해하기도 한다(Brucker-Davis, 1998). Nagel 등(1997, 1998)에 의하면 어떤 특이 외인성 물질은 혈장단백질과 강하게 상호작용하는데 호르몬 결합 혈장단백질과 상호작용한 외인성 물질이 chemical과 호르몬 두가지 모두의 세포내 출입을 조정한다고 보고하였다. 이러한 내분비장애물질은 호르몬과 같이 nuclear receptor와 결합할 수 있기 때문에 갑상선 호르몬 receptor(TRE)가 삽입된 HeLa 세포주를 이용하여 metribuzin의 갑상선 호르몬성 영향을 검색한 결과 용량의존적으로 반응을 나타내지는 않았으나 receptor와의 반응이 증가한 것으로 보아 갑상선 호르몬과 유사한 활성을 가질 수 있는 것으로 사료되었다.

갑상선 호르몬 특이반응 시험세포를 이용한 항갑상선 호르몬성 영향

Fig. 4에서는 항갑상선 호르몬성 영향을 나타내었는데 24 well plate에 well당 metribuzin 100 nM을 처리한 후 T4 0.1 nM부터 100 nM 까지 처리하였다. 대조군에는 metribuzin 대신 용매인 DMSO만을 처리하였다. Metribuzin 처리군에서는 대조군과 비교하여 T4 100 nM에서 유의하게 감소하였고 10 nM과 1 nM에서는 감소하였으나, 유의한 차이는 없었다. 내분비계장애물질은 사람과 동물에서 estrogen이나 androgen, thyroid hormone의 고유한 기능을 방해할 수 있으며(Naciff와 Daston, 2004, Stoker 등, 2000). 일부 내분비장애물질은

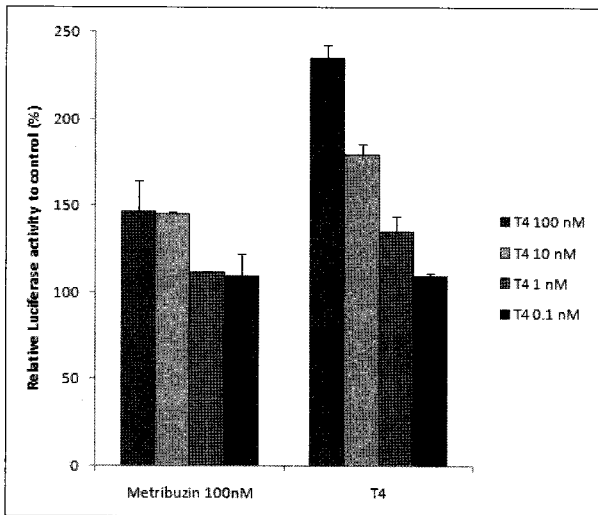


Fig. 4. Relative induction of luciferase by the cotreatment of T4 and metribuzin 100 nM in HeLaTRE cells for investigation of antithyroid hormone effect. %=luciferase activity of sample/luciferase activity of control.

그 자체가 세포내 반응없이 receptor와 결합하는 호르몬을 교란시켜 자연생성 호르몬의 기능을 변화시키는 것으로 알려져 있다(Funabashi 등, 2003, Iwamuro 등, 2006). TCDD나 aroclor 1254, bisphenol은 그 구조가 갑상선 호르몬과 유사하지만 갑상선 호르몬과 관련된 생물학적 반응에 대한 영향은 현재까지도 조사되고 있으며 지금까지 연구된 바에 의하면 이들은 강력한 갑상선 호르몬 receptor 길항제로 보고하고 있다(Miyazaki 등, 2004). 이와 같이 항갑상선 호르몬성 영향을 나타내는 물질들에 대한 사례가 있어서 본 시험에서 metribuzin의 갑상선 호르몬 receptor 길항작용을 조사한 결과 T4와 receptor와의 반응이 억제되는 것으로 나타나 항갑상선 호르몬성 영향을 나타낼 가능성이 있다고 사료되었다.

갑상선에 영향이 있는 것으로 알려진 metribuzin에 대하여 내분비 장애의심물질의 갑상선 호르몬성 영향 시험으로서 pubertal assay와 갑상선 호르몬성 시험세포를 이용한 시험을 실시한 결과 *in vivo* 및 *in vitro* 시험에서 갑상선과 갑상선 호르몬에 영향이 있었으며, 또한 본 연구에 사용된 시험법도 앞으로 내분비계 장애추정물질 screening에 활용 가능할 것으로 사료되었다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Ashizawa, K. and S. Y. Cheng (1992) Regulation of thyroid hormone receptor-mediated transcription by a cytosol protein,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9277~9281.

Brucker-Davis, F. (1998) Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function, *Thyroid* 8:827~856.

Kim, C. S., F. Furuya, H. Ying, Y. Kato, J. A. Hanover, and S. Y. Cheung (2007) Gelsolin: A Novel thyroid hormone receptor- β interacting protein that modulates tumor progression in a mouse model of follicular thyroid Cancer, *Endocrinology* 148(3):1306~1312.

Chung, J. H. (2006) From A to Z of Thyroid disease with which the psychiatrist should be familiar, *Korean J Psychosomatic Medicine*, 14(2):73~80.

Cugini, P., Paggi, A., Cristina, G., Ceccotti, P., Pellegrino, AM, Fontana, S., Di Marzo A., Vacca, K., Di Siena G (1999) Hunger sensation in Graves' disease before and after pharmacological therapy. *Clin Ter* 150:115~119.

DeVito, M., Biegel, L., Brouwer, A., Brown, S., Brucker-Davis, F., Cheek, A.O., Christensen, R., Colborn, T., Cooke, P., Crissman, J., Crofton, K., Doerge, D., Gray, E., Hauser, P., Hurley, P., Kohn, M., Lazar, J., McMaster, S., McClain, M., McConnell, E., Meier, C., Miller, R., Tietge, J., Tyl, R. (1999) Screening methods for thyroid hormone disruptors, *Environ. Health Perspect.* 107:407~415.

Ekins, R., Edwards, P., Newman, B. (1982) The role of binding proteins in hormone delivery. In: Albertini, A., Ekins, R.P. (Eds.), *Free Feuille PP, Shawker T, Rose SR, Jones J, Jeevanram RK, and Nisula BC (1990) Thyroid abnormalities in the McCune-Albright Syndrome: Ultrasonography and Hormonal studies. J Clin Endocrinol Metab* 71:1596~1601.

Hadley, M.E. (1996) *Endocrinology*, 4th ed. Prentice Hall, New Jersey; pp. 290~313.

Hennemann, G., Docter, R., Friesema, E.C., de Jong, M., Krenning, E.P., Visser, T.J. (2001) Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability, *Endocr. Rev.* 22, 451~476.

Hong, S. W. (2000) Radioiodine therapy for differentiated thyroid cancer, *Korean J Nucl Med*, 34:265~275.

Kashian, D. R., Dodson S. I. (2002) Effects of common-use pesticides on developmental and reproductive processes in *Daphnia*, *Toxicol Ind Health.* 18(5):225~35.

Kim, M. S., M.D., Yoon, C. Y., Cho, Y. M., Jung, H. S., Shin, C. S., Park, K. S., Kim, S. Y., Cho, B. Y., Lee, H. K., and Bloom, S. R. (2002) Changes in Plasma Leptin Levels Relating to Short-Term Thyroid Manipulation in Rats, *Korea J of Endocrinol* 17(2):197~205.

Kim, Y. S., Kim, K. S. (2001) Clinical study of 1 case of patient with Hypothyroidism, *Korean J oriental medical prescription* 9(1):397~403.

Larsen, PR, Kronenberg, HM, Melmed, S, Polonsky, KS (2003) *Williams textbook of endocrinology*. 10th ed. p. 374, Philadelphia, W.B. Saunders.

Lazar, M.A. (1993) Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities, *Endocr. Rev.* 14:184~193.

Lee, J. R., Ahn, B. C., Jeong, S. Y., Lee, Jaetae, Lee, K. B.

- (2003) Detection for Residual Thyroid Tissue and Metastatic Lesion after Total Thyroidectomy in Patients with Differentiated Thyroid Cancer: Comparison between Tc-00m Pertechnetate Scan and High Dose I-131 Therapy Scan, *Korean J Nucl Med* 37(2):120~127.
- Marty, M. S., Crissman, J. W., and Carney, E. W. (2002) Evaluation of the Male Pubertal Assay's Ability to Detect Thyroid Inhibitor and Dopaminergic Agents, *Toxicological sciences* 60:63~76.
- Mastorakos, G, Mitsiades, NS, Doufas, AG, Koutras, DA (1997) Hyperthyroidism in MacCune-Albright syndrome with a Review of Thyroid Abnormalities sixty years after the first report, *Thyroid* 7:433~439.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., O'Malley, B.W. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology, *Endocr. Rev.* 20:331~344.
- Mendel, C. M. (1989) The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model, *Endocr. Rev.* 10:232~274.
- Miyazaki, K., Iwasaki, T., Takeshita, A., Kuroda, Y., and Koibuchi, N. (2004) Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone receptor-mediated transcription through a novel mechanism, *J Biol Chem*, 279:18195~18202.
- Mori, J., Suzuki, S., Kobayashi, M., Inagaki, T., Komatsu, A., Takeda, T., Miyamoto, T., Ichikawa, K., Hashizume, K. (2002) Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent cytosolic T3 binding protein as a regulator for T3-mediated transactivation, *Endocrinology* 143:1538~1544.
- Naciff, J. M., and Daston, G. P. (2004) Toxicogenomic approach to endocrine disruptors: identification of a transcript profile characteristic of chemicals with estrogenic activity, *Toxicol Pathol*, 32 Supple 2:59~70.
- Nagel, S. C., vom Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., Boechler, M., Welshons, W.V. (1997), Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ. Health Perspect.* 105:70~76.
- Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Welshons, W.V. (1998); The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217:300~309.
- Robbins, J. (1996) Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. In: Braverman, L.E., Utiger, R.D. (Eds.), *Weiner and Ingbar's The Thyroid*, 7th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp. 96~110.
- Silva JE: (1995) Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 5:481~492
- Sheman S.I. (2002) Management of differentiated thyroid carcinoma, *Korean J Endocrinol* 17(Supp-2):31~51.
- Shupnik, M. A., Rdgway, E. C., Chin, W. W. (1994), *Throtropin Mol. Biol.: Update Endo. Rev (Monograph)* 3:18~22.
- St. Germain, D.L. (1994), Iodothyronine deiodinases. *Trends Endocrinol. Metab.* 5:36~42.
- Stoker, T. E., Parks, L. G., Gray, L. E., and Cooper, R. L., (2000) Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations, *Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Commottee, Crit Rev Toxicol* 30:197~252.
- US/EPA (1998), Registration Eligibility decision Metribuzin, EPA 738-R-97-006, 10.
- World Wildlife Fund Canada (1996) <http://www.wwfcanada.org>
- Yamasaki, K., Tago, Y., Nagai, K., Sawaki, M., Noda, S., Takatsuki M. (2002) Comparison of toxicity studies based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline no. 407' and the research protocol of 'Pubertal Development and Thyroid Function in Immature Male Rats' with 6-n-propyl-2-thiouracil, *Arch Toxicol* 76:495~501.
- Yen, P.M., Chin, W.W. (1994) New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action, *Trends Endocrinol. Metab.* 5:65~72.
- Yu, C. J., Ahn, W. J., Lee, H. Y., Ro, H. K. (1986) The clinical study on 39 cases of subclinical hypothyroidism, *Korean J Nucl Med*, 20(1):67~73.
- 두호경 (1993) *동의현계학*, 서울, 동양의학연구소, pp. 1059-1065.
- 서울대학교 의과대학 생리학교실 (1996), *생리학*, 서울, 의학문화사, p. 373.
- 전국외과대학교수 번역 (1999), *오늘의 진단과 치료*, 서울, 한우리, pp. 1187~1188.
- 정상희, 김병용, 구현옥, 박종명, 정갑수, 조준형 (2002) 화학물질의 갑상선호르몬계 교란유발성 고감도 간이 검색기법 개발, *국립수의과학연구보고서*, pp. 79~87.
- 정영호 (2004) *최신 농약학*, 시그마프레스, p. 246.
- 해리슨 내과학 (1997) 서울, 정담출판사, p. 2089.
- 홍사석 (1993), *이우주의 약리학강의*, 서울, 의학문화사, pp. 503~504.

내분비장애물질로서 Metribuzin의 랫드와 HeLaTRE Cell 중 갑상선 호르몬활성 영향

유아선* · 정미혜 · 이제봉 · 박연기 · 신진섭 · 박경훈¹

국립농업과학원 농산물안전성부 농약평가과, ¹국립식량과학원 벼맥류부 간척자농업과

요 약 최근 내분비장애 추정물질의 분류를 위해 많은 시험법이 연구되고 있으며 미국 EPA와 OECD에서는 시험법을 설정하려고 노력하고 있다. 추후 기등록농약에 대한 자료요구 또는 신규 등록농약 적용 등록기준의 추가 등을 고려하여 내분비 계장애 추정물질 관련 OECD와 EPA에서 권장하는 시험법을 확립하고자 본 연구를 수행하였다. 시험약제를 30일간 경구 투여 하여 조사한 결과, metribuzin 투여 수컷에서 부고환, 전립선, 정낭의 중량이 증가하였고 갑상선에서는 유의한 중량변화가 나타나지 않았다. 암컷에서는 갑상선의 중량 감소가 나타난 반면에 생식장기 중량에는 유의적인 변화가 없었다. Metribuzin 투여 수컷에서 testosterone이 100 mg/kg/day 처리수준에서 감소하였고 FT4가 50, 100 mg/kg 수준에서 증가하였다. 암컷에서는 T3가 50, 100 mg/kg/day 수준에서 증가하여 갑상선 호르몬에 영향이 나타나는 것을 볼 수 있었다. 시험세포를 이용한 시험 결과, 시험약제를 1 nM에서 1,000 nM까지 처리하였을 때 음성대조군과 비교할 때 metribuzin은 106-122%의 영향을 나타내어 세포이용시험에서는 metribuzin이 갑상선 호르몬성 영향을 보인 것으로 나타났다. 항갑상선 호르몬성 영향 시험에서는 시험약제 100 nM과 T4의 혼합 처리시 metribuzin은 양성 대조군과 비교하여 감소하여 항갑상선 호르몬성 영향을 나타내었다. 본 시험을 통하여 OECD TG 407과 EDSTAC에서 권고하는 pubertal assay와 수의과학 검역원에서 제조한 HeLaTRE cell을 이용한 *in vitro* 시험이 갑상선 호르몬성 영향 검색 시험으로 활용될 가능성이 있는 것으로 사료되었다.

색인어 metribuzin, 갑상선호르몬, 내분비장애 추정물질