

마우스 말초신경계에 미치는
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
(TCDD)의 영향에 대한
형태학적 분석

연세대학교 대학원
의과학 사업단
양 희 준

마우스 말초신경계에 미치는
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
(TCDD)의 영향에 대한
형태학적 분석

지도교수 이혜연

이 논문을 석사 논문으로 제출함

2001 년 12 월 일

연세대학교 대학원
의과학 사업단
양희준

양희준의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

감사의 글

이 논문이 나오기까지 저를 지도해주신 박경아 교수님과 이혜연 부교수님, 그리고 바쁘신 중에도 논문심사를 위해 오가면서 꼼꼼히 지도해 주신 엄창섭 교수님께 감사드립니다. 연구가 진행되는 동안 음으로 양으로 도와주신 정인혁 교수님을 비롯한 해부학교실의 모든 선생님들과 같이 일하는 동료들에게 감사드립니다. 멀리서도 도와주신 윤호 조교수님과 사진과 그림 작업을 도와주신 윤관현 선생님께 감사드립니다.

전자현미경 결과분석에 도움을 주신 병리학교실의 김태승 교수님과, 다이옥신에 대한 관심을 불러 일으켜 주신 미생물학교실의 이원영 교수님께 감사드립니다.

바쁜 임상 현장에 있으면서도 저의 학업과 발전에 관심을 기울여 준 의학과 졸업동기들에게 감사드리며, 끝으로 기초의학의 길을 가는 것을 묵묵히 지켜봐 주시는 부모님들께 깊은 감사를 드립니다.

저 자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 실험동물	6
2. TCDD 용량 및 투여방법	6
3. 척수,척수신경절,궁둥신경의 조직표본 제작 ..	7
4. 관찰 및 형태분석	8
5. 통계처리	9
III. 결과	10
1. TCDD가 척수앞뿔 신경세포에 미치는 영향	10
2. TCDD가 척수신경절의 신경세포에 미치는 영향	12
3. TCDD가 궁둥신경에 미치는 영향	13
가. 궁둥신경의 형태 변화	13
나. 궁둥신경의 형태계측 및 분석	15

(1) 궁둥신경 단위면적당 수초신경섬유의 수	15
(2) 궁둥신경 축삭의 단면적	15
(3) 궁둥신경 수초의 단면적	16
(4) 궁둥신경 수초의 밀도	17
다. 궁둥신경의 전자현미경 관찰	18
IV. 고 찰	19
V. 결 론	22
참고문헌	23
영문요약	28

그림 차례

그림 1. 척수 앞뿔 신경세포의 형태	11
그림 2. 척수신경절 신경세포의 형태	12
그림 3. 궁둥신경의 변화	14
그림 4. TCDD를 투여한 생쥐의 궁둥신경의 전자현미 경 사진	18

표 차례

표 1. 척수신경절 신경세포 수	13
표 2. 궁둥신경 단위면적당 수초신경섬유의 수	15
표 3. 궁둥신경 축삭의 단면적	16
표 4. 궁둥신경 수초의 단면적	16
표 5. 궁둥신경 수초의 밀도	17

국문요약

마우스 말초신경계에 미치는 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)의 영향에 대한 형태학적 분석

환경호르몬 중의 하나인 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)는 사람과 여러 동물의 많은 장기와 계통에서 다양한 독성효과를 나타내나, 말초신경계통에 미치는 영향에 관한 연구는 미비하다. 본 연구에서는 생쥐를 대상으로 TCDD가 말초신경에 미치는 독성효과를 형태학적으로 분석하였다. 생후 4 주된 C57BL/6J 생쥐의 복강에 TCDD 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 1회 주사하고, 1 주, 4 주, 16 주 후에 척수의 넷째 허리분절, 넷째 허리척수 신경절, 궁둥신경을 떼어 일반조직표본을 만들고, 궁둥신경의 일부는 전자현미경 표본을 만들었다. 척수와 척수신경절의 신경세포체의 형태 및 수, 궁둥신경의 축삭과 수초의 형태, 섬유유 수, 축삭과 수초의 넓이, 수초의 밀도, 궁둥신경 미세구조의 변화 등을 관찰하였다. 척수 앞쪽 신경 세포의 형태와 척수신경절 신경세포의 형태 및 수는 TCDD 투여군과 대조군에서 차이가 없었다. 궁둥신경에서 축삭의 형태, 축삭의 단면적은 양군간에 차이가 없었으나, TCDD 투여군에서는 수초가 두터워진 섬유유가 많이 관찰되었고, 수초의 단면적은 TCDD 투여 후 4 주군과 16 주군에서 대조군보다 넓었다. TCDD 투여군의 수초밀도는 대조군의 것보다 낮았다. 축삭의 미세구조는 TCDD 투여군과 대조군이 서로 차이가 없었으나, TCDD 투여군의 수초 층판은 비정상적으로 벌어져 불규칙하게 배열되어

있었다. 이상의 결과는, TCDD가 말초신경섬유 수초의 흥판 배열만 특이하게 파괴하는 신경독성 효과를 가지고 있음을 의미한다.

핵심되는 말 : TCDD, 신경독성효과, 말초신경병, 수초 변성, 환경호르몬, 형태계측분석

**마우스 말초신경계에 미치는
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)의 영향에 대한
형태학적 분석**

< 지도교수 이혜연 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

양희준

I. 서론

다이옥신은 polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD) 군을 모두 일컫는 말이며, 이들 중 일반적으로 다이옥신이라 부르는 것은 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)이다. TCDD가 환경호르몬 중 에서 특히 주목받는 이유는 이것이 각종 화합물 제조과정이나¹, 폐기물 소각², 자동차와 같은 내연기관 연소³ 또는 흡연⁴ 등과 같은 과정에서 흔히 발생하고, 인체에서의 반감기가 7.6년 정도로⁵ 길기 때문이다. 이것은 월남전에서 사용된 고엽제 제조 과정의 불순물에도 섞여 있었으며, 고엽제 피해보상 문제와 관련되어 지금까지 큰 논쟁거리가 되고 있다⁶.

산업폐기물 처리장과 같은 상업현장에서 TCDD에 노출된 사람들에게서 허파, 간, 위, 직장, 임파선, 혈구세포, 고환 등의 암발생율이 증가하고^{7, 8, 9, 10}, 자궁내막증¹¹, 기형아 출산¹²과 같은 심각한 생식기계통의 장애가 나타날 수 있으며, 면역계통의 변화¹³와 내분비계통의 변화¹⁴도 나타난 것으로 알려졌다. 이 외에도 간기능 이상¹⁵, 피부질환¹⁶, 염색체 이상¹⁷, 정신과적 질환¹⁸ 등도 유발된 것이 보고되었다.

이와 같은 독성 작용은 동물실험을 통하여 몸의 거의 모든 장기에 나타나는 것이 증명되고 있다. 즉 실험적으로 악성종양의 발생¹⁹ 뿐만 아니라, 간비대, 지방간, 간괴사, 간경변, 간기능장애와 기타 소화기관의 비대 등을 유발하는 것이 관찰되었다. 피부에서 염소좌창, 피지샘 파괴나 탈모도 보고되어 있고, 심장기능의 변화가 관찰되었고, 내분비계통에도 영향을 미쳐 성장계를 교란시키며, DNA나 세포막, 뇌조직에 산화성 손상을 일으키며, 태아에서는 흉선 및 비장의 위축, 출혈, 부종을 일으키며, 수신증과 구개열, 치아발생의 이상과 면역계 기능 저하를 유발하는 것이 실험적으로 증명된 바 있다²⁰. TCDD에 노출되었던 사람 중에서 감각이상이나 운동장애와 같은 신경계 증상을 호소하는 사람들은 많으나⁷, TCDD와 말초신경병의 관계를 임상적으로 평가한 연구결과는 보고자에 따라 매우 상이하다^{21, 22, 23, 24}.

동물실험을 통하여 TCDD에 의해 청각장애²⁵, 운동기능과 행동양식 변화²⁶, 중심체온 저하²⁷, 학습장애²⁸, 식욕저하²⁸ 등과 같이 중추신경계의 장애를 일으키는 것은 보고되어 있으나, TCDD에 노출된 환자에서 나타

나는 감각장애나 운동장애가 말초신경계의 장애에 의한 것인지 중추신경계의 이상에 의한 것인지에 대한 분석이 충분치 않다. 전기생리학적 실험에서 TCDD가 운동신경과 감각신경의 전도속도를 떨어뜨린다는 결과²⁹는 TCDD가 말초신경의 축삭이나 수초에 손상을 주고 있음을 나타낸다. 그러나 TCDD가 말초신경에 병변을 일으킨다면 그 병변이 (1) 신경세포체가 파괴되어 이차로 축삭과 수초가 변성을 일으킨 것인지, (2) 결합조직질환에 의해 축삭이 영향을 받은 것인지, (3) 혈관질환이 발생하여 신경이 혈액공급을 받지 못해 발생한 것인지, (4) 자가면역성 염증반응에 의해 손상된 것인지, (5) 독성물질에 의해 슈반 세포나 축삭에 직접 손상이 가해진 것인지를 구별하기 위해서는 그 효과를 형태학적으로 분석할 필요가 있다.

이에 본 연구자는 생쥐의 궁둥신경 및 이와 연관된 척수분절과 척수신경절에서 TCDD의 영향을 형태계측학적으로 분석하여, TCDD가 말초신경계에 미치는 독성효과의 기전을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 TCDD의 median lethal dose(LD₅₀)가 알려져 있는 C57BL/6J 생쥐(연세의료원 동물 실험실)를 실험군과 대조군으로 각각 10 마리씩 사용하였다.

2. TCDD 용량 및 투여 방법

신경계가 성숙한 후 TCDD에 노출되었을 때의 변화를 관찰하기 위하여, 생쥐의 수초화가 완성되는 생후 4주에³⁰ TCDD를 투여하였다. 선택한 실험동물에게 안전한 범위 내에서 최대용량을 투여하기 위하여, 다른 동물 실험에서 TCDD의 LD₅₀의 10 - 40%를 1회 복강주사했던 것²⁹을 고려하여 TCDD의 용량을 결정하였다. C57BL/6J 생쥐의 TCDD의 LD₅₀가 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ³¹이므로 이의 40%인 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 지용성 물질의 용매로 이용되는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 10배로 희석하여 실험군에 1회 복강주사 하였다. 대조군에는 실험군에 주사한 약물과 같은 양의 DMSO를 동일한 방법으로 주사하였다.

3. 척수, 척수신경절, 궁둥신경의 조직표본 제작

실험군은 TCDD를 대조군은 DMSO를 복강주사하고, 1 주, 4 주, 16 주 후에 생쥐를 에테르로 마취한 후 가슴을 열고 원심실에 바늘을 꽂아 생리식염수와 2.5% glutaldehyde · 4% paraformaldehyde 용액을 관류하여 고정하였다. 수술현미경(Zeiss, Germany)으로 관찰하면서 해부하여, 척추뼈를 제거하고, 궁둥신경의 형성과 관계있는 척수분절 중 하나인 넷째 허리분절과 넷째 허리척수신경절을 떼어내고, 살고랑을 기준으로 먼쪽으로 10mm 길이가 되게 궁둥신경을 잘라내었다.

떼어낸 척수와 척수신경절은 4% paraformaldehyde 용액에 담가 다시 고정한 후 통상적인 조직표본 제작방법에 따라 파라핀에 포매하고, 로타리마이크로톰으로 6 μ m 두께로 잘랐다. 척수는 다섯 개마다 하나의 절편을 취하였고, 척수신경절은 연속절단하여 모든 절편을 cresyl violet으로 염색하였다.

궁둥신경은 2.5% glutaldehyde PBS(0.01 M) 용액에 담가 다시 고정한 뒤 종양의 3 mm만 취하여 1% osmium tetroxide로 후고정하여 통상적인 방법에 따라 에폭시 수지에 포매한 후 후박절편과 초박절편을 만들었다. 후박절편은 toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였고, 초박절편은 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 미세구조의 관찰에 사용하였다.

4. 관찰 및 형태분석

척수의 앞끝세포와 척수신경절 세포는 광학현미경으로 관찰하여 신경세포체의 형태가 비정상적으로 둥근 정도와 세포핵의 위치, 세포질의 염색 정도 등에 이상소견이 나타나는지 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 척수신경절에서는 전체 신경세포의 수를 세었는데, 한 세포가 여러 절편에 걸쳐 출현하여 중복계수되지 않도록 세포핵 안에 핵소체가 보이는 것만 세었다.

궁동신경은 toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 축삭과 수초의 형태를 관찰하고, 800배의 사진을 촬영하였다. 촬영된 사진은 image scanner를 이용하여 컴퓨터에 입력하고 영상분석 프로그램인 Optimas[®] (Version 6.1, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, USA)를 이용하여 신경섬유의 수, 수초의 단면적, 축삭의 단면적을 측정하고, 수초가 차지하는 비율로 수초의 밀도를 계산하였다.

궁동신경의 전자현미경 표본에서는 실험군과 대조군에서 축삭과 수초의 전체적인 형태, 축삭 내 세포소기관의 이상형태, 공포형성, 세포포함물의 축적, 축삭형질막의 파괴, 축삭의 소실과 같은 축삭의 퇴행 소견의 존재 여부와 수초 층판 구조의 배열 및 슈반세포의 이상유무를 관찰하였다.

5. 통계처리

본 연구에서 얻어진 자료는 Excel[®] 2002 프로그램 (Version 10.2614.2625, Microsoft Co., Redmond, WA, USA.)을 이용하여 통계분석하였다. 실험군과 대조군의 척수신경절 세포의 수는 Mann-Whitney 분석 방법으로 비교하였고, 궁둥신경의 신경섬유 수, 축삭의 단면적, 수초의 단면적, 수초의 밀도는 1 주, 4 주, 16 주 째의 표본에서 각각 측정하여 실험군과 대조군 사이의 차이를 신뢰구간을 95%로 하여 t-검정을 실시하여 비교하였다.

III. 결 과

1. TCDD가 척수앞물 신경세포에 미치는 영향

Cresyl violet으로 염색한 척수 앞물의 신경세포체의 모양은 다각형으로, 대조군과 모든 실험군에서 차이가 없었다(그림 1). 세포질의 염색 상태도 대조군과 모든 실험군에서 차이가 없었다. 핵은 세포체의 중심에 있었으며, 진정염색질이 풍부하였고, 뚜렷한 점 형태의 핵소체를 가지고 있었다. 신경세포체의 손상이나 퇴행으로 의심되는 소견은 관찰되지 않았다.

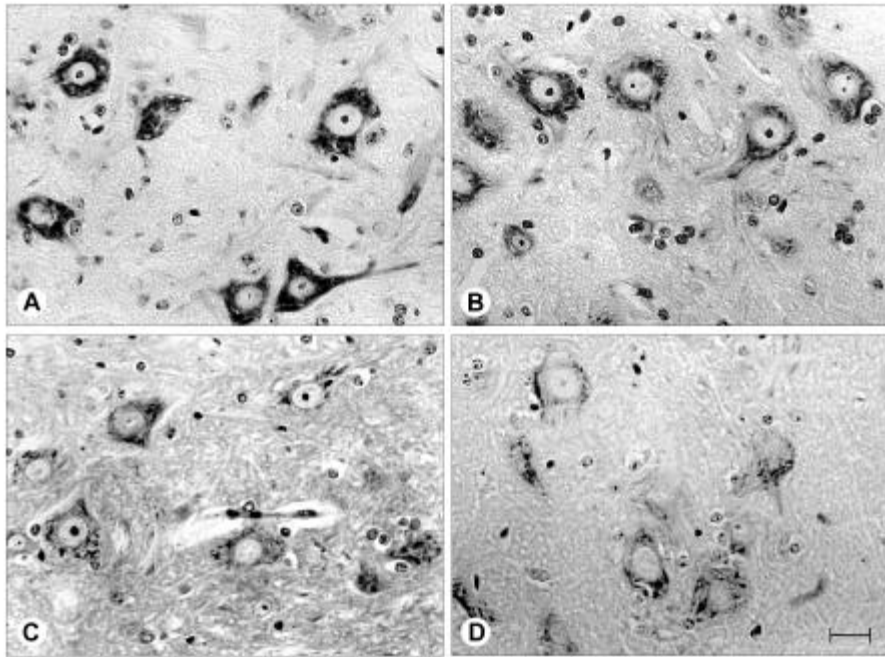


그림 1. 척수앞물 신경세포의 형태. 생쥐에 TCDD를 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 1회 복강으로 투여하고 1 주, 4 주, 16 주 후에 희생하여 격출한 넷째 허리척수분절의 척수 앞물의 일부분이다. 대조군 표본(A)과, TCDD를 주사한 뒤 1 주(B), 4 주(C), 16 주(D)가 지난 표본에서 모두 다각형의 신경세포체를 관찰할 수 있었으며, 세포질이 균일하게 염색되어있고, 염색 상태가 실험군과 대조군에서 큰 차이가 없으며, 핵이 세포의 중앙에 위치하고 핵소체의 형태가 뚜렷하다. 실험군에서 신경세포체 자체의 손상이나 퇴행을 나타내는 형태변화는 나타나지 않았다. Cresyl violet 염색 (Bar = 10 μm).

2. TCDD가 척수신경절의 신경세포에 미치는 영향

척수신경절 신경세포도 모양과 염색성 등에서 대조군과 실험군에서 차이가 없었고, 신경세포내에서 공포도 관찰되지 않았다. 척수신경절 내에서 염증세포도 관찰되지 않았다(그림 2).

척수신경절 신경세포의 수는 표 1과 같았으며, 대조군과 실험군은 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

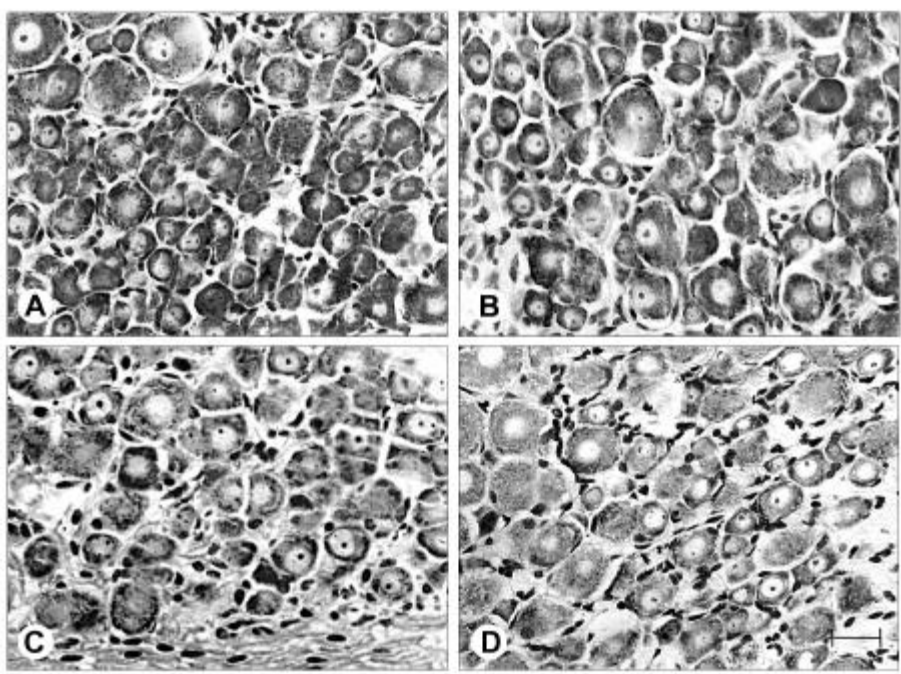


그림 2. 척수신경절 신경세포의 형태. TCDD를 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 를 1회 복강으로 투여하고 1 주, 4 주, 16 주 후에 희생하여 격출한 넷째 허리척수분절 척수신경절 표본의 일부이다. 대조군(A), TCDD를 투여한 뒤 1 주(B), 4 주(C), 16 주(D) 실험군에서 신경세포의 형태는 다각형이며 세포질의 염색 정도는 서로 차이가 없었다. Cresyl violet 염색 (Bar = 10 μm).

표 1. 척수신경절 신경세포 수¹⁾

관찰시기 ²⁾	대조군	TCDD 투여군
1 주	6360.8 ± 838.7	5540.3 ± 325.5
4 주	5538.3 ± 500.8	5738.3 ± 526.7
16 주	6017.0 ± 601.5	5337.7 ± 380.4

¹⁾ 값은 평균 ± 표준오차

²⁾ 관찰시기 : TCDD 투여군은 생후 4주된 생쥐에 TCDD 40 µg/kg를 1회 복강주사하고, 대조군은 용매인 DMSO 동량을 1회 복강주사 후 관찰하기까지 걸린 기간

3. TCDD가 궁둥신경에 미치는 영향

가. 궁둥신경의 형태 변화

전자현미경 관찰을 위하여 제작된 궁둥신경으로부터 얻은 후박절편을 toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과, 대조군에서 수초의 형태는 원형이었으며, 축삭의 형태와 염색성도 정상이었다. TCDD를 투여한 실험군에서는 수초가 매우 두꺼워지거나, 뭉쳐있는 신경 섬유들이 많이 관찰되었다(그림 3).

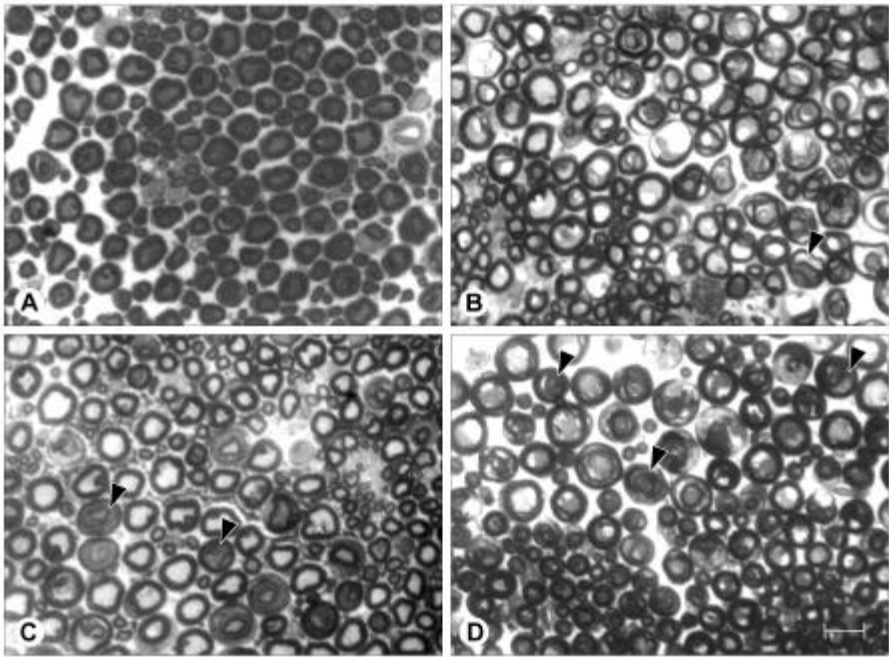


그림 3. 궁둥신경의 변화. TCDD를 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 1회 복강으로 투여하고 1 주, 4 주, 16 주 뒤에 적출한 궁둥신경을 가로절단한 표본이다. 대조군(A)과 달리 TCDD 주사 후 1 주(B), 4 주(C), 16 주(D) 실험군에서는 수초가 매우 두꺼워지거나, 뭉쳐진 신경섬유들(화살표 머리)이 많이 관찰된다. Toluidine blue 염색 (Bar = 10 μm).

나. 궁둥신경의 형태계측 및 분석

(1) 궁둥신경 단위면적당 수초신경섬유의 수

궁둥신경의 일정한 면적(mm^2)에서 계수한 수초신경섬유의 수는 표 2와 같다. 실험군과 대조군에서 수초신경섬유의 수는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(표 2).

표 2. 궁둥신경 단위면적당 수초신경섬유의 수¹⁾

관찰시기 ²⁾	대조군	TCDD 투여군
1 주	6721.5 ± 1119.0	5549.9 ± 658.4
4 주	6894.4 ± 268.7	5622.2 ± 739.1
16 주	4797.2 ± 567.3	4182.1 ± 661.4

¹⁾ 단위는 mm^2 당 수초신경섬유의 수이며 값은 평균 ± 표준오차

²⁾ 관찰시기 : TCDD 투여군은 생후 4주된 생쥐에 TCDD 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 를 1회 복강주사하고, 대조군은 용매인 DMSO 동량을 1회 복강주사 후 관찰하기까지 걸린 기간

(2) 궁둥신경 축삭의 단면적

궁둥신경에서 축삭의 단면적을 측정한 결과, 대조군과 모든 실험군에서 통계적으로 의미있는 차이가 없었다(표 3).

표 3. 궁둥신경 축삭의 단면적¹⁾

관찰시기 ²⁾	대조군	TCDD 투여군
1 주	23.9 ± 4.6	29.7 ± 5.3
4 주	24.4 ± 3.8	28.8 ± 6.1
16 주	23.9 ± 3.6	27.6 ± 6.0

¹⁾ 단위는 μm^2 이며 값은 평균 ± 표준오차

²⁾ 관찰시기 : TCDD 투여군은 생후 4주된 생쥐에 TCDD 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 를 1회 복강 주사하고, 대조군은 용매인 DMSO 동량을 1회 복강주사 후 관찰하기까지 걸린 기간

(3) 궁둥신경 수초의 단면적

궁둥신경에서 수초의 단면적을 측정한 결과는 표 4와 같다. TCDD 투여후 4주 군과 16주 군에서 수초신경섬유의 단면적은 대조군의 것보다 넓었다.

표 4. 궁둥신경 수초의 단면적¹⁾

관찰시기 ²⁾	대조군	TCDD 투여군
1 주	103.7 ± 4.5	96.9 ± 4.4
4 주	80.0 ± 3.2	97.0 ± 4.3*
16 주	121.0 ± 4.9	134.7 ± 5.1*

¹⁾ 단위는 μm^2 이며 값은 평균 ± 표준오차

²⁾ 관찰시기 : TCDD 투여군은 생후 4주된 생쥐에 TCDD 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 를 1회 복강주사하고, 대조군은 용매인 DMSO 동량을 1회 복강주사 후 관찰하기까지 걸린 기간

* t-test에서 $P < 0.05$

(4) 궁둥신경 수초의 밀도

궁둥신경에서 단위면적당 수초가 차지하는 비율을 측정한 결과, TCDD를 투여한 군에서 수초 밀도는 대조군보다 감소하였다(표 5).

표 5. 궁둥신경 수초의 밀도¹⁾

관찰시기 ²⁾	대조군	TCDD 투여군
1 주	47.2 ± 1.2	38.7 ± 1.1*
4 주	42.2 ± 0.6	34.3 ± 1.2*
16 주	47.6 ± 1.7	37.1 ± 2.9*

¹⁾ 단위는 % 이며 값은 평균 ± 표준오차

²⁾ 관찰시기 : TCDD 투여군은 생후 4주된 생쥐에 TCDD 40 µg/kg을 1회 복강주사하고, 대조군은 용매인 DMSO 동량을 1회 복강주사 후 관찰하기까지 걸린 기간

* t-test에서 P<0,05

다. 궁둥신경의 전자현미경 관찰

TCDD를 투여한 실험군 궁둥신경의 toluidine blue 염색 표본에서 수초가 두터워지거나, 뭉쳐 있었던 부분을 전자현미경으로 관찰한 결과, 슈반세포의 형질막들이 서로 떨어져 있어, 수초의 층판 사이가 불규칙하게 벌어져 있는 소견을 보였다(그림 4).

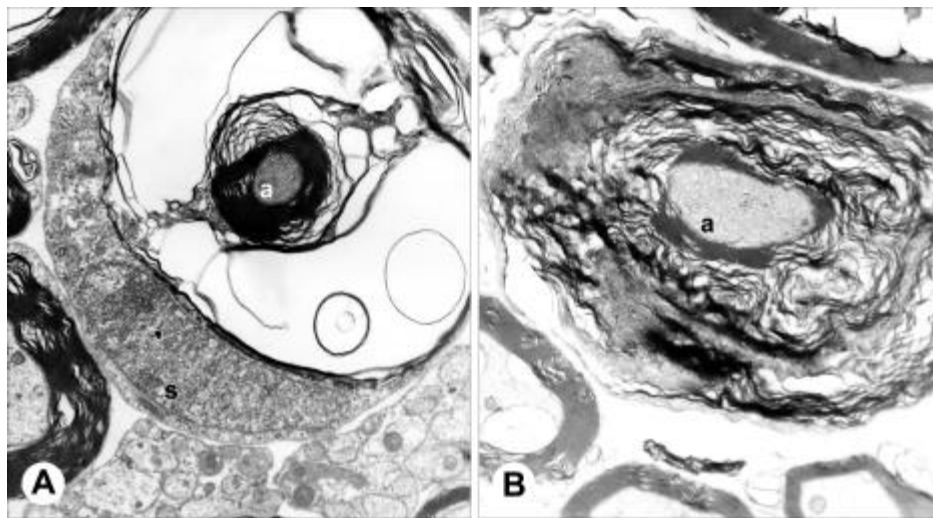


그림 4. TCDD를 투여한 생쥐 궁둥신경의 전자현미경 사진(17,800배). TCDD를 투여한 생쥐의 궁둥신경의 toluidine blue 염색 표본 상에서 광학현미경으로 수초가 매우 두꺼워지거나, 축삭이 안 보일 정도로 수초가 뭉쳐있는 소견을 보이던 신경섬유들을 전자현미경으로 관찰하였다. (A) 수초의 바깥층과 안쪽 층이 심하게 떨어져 있다. 슈반 세포(s)의 세포핵과 핵 주변부는 이상소견이 보이지 않는다. (B) 정상적으로 이러한 증끼리 물어서 촘촘한 층판 형태의 수초를 이루고 있어야 할 슈반세포의 형질막이 서로 분리되어 매우 성긴 배열을 이루고 있다. 축삭(a)의 내부에는 이상소견이 보이지 않는다.

IV. 고 찰

말초신경이 TCDD에 의하여 영향을 받는가에 대해서는 TCDD에 노출된 말초신경계에서 전기생리학적 이상이 나타난다는 임상연구결과^{23, 24}에서부터 TCDD에 노출된 환자에서 말초신경병의 증상이나 발생빈도가 이 화합물과 뚜렷한 인과관계가 없다는 보고^{16, 22}까지 다양하다.

이와 같이 상이한 연구결과들이 보고되는 이유는, TCDD가 발생경로가 다양하고 반감기가 길기 때문에 일상생활에서 쉽게 노출되어 축적할 기회는 많지만, 말초신경병의 발병원인에서 흡연이나 당뇨와 같은 인자들을 배제하고 TCDD만을 그 원인으로 지목하기는 쉽지 않기 때문일 것이다.

TCDD 투여 후 궁동신경에서 운동과 감각신경의 신경전도속도가 모두 감소한다는 실험결과²⁵로 미루어 볼 때, TCDD가 말초신경 또는 중추신경계에 영향을 주는 것은 분명하다고 생각되나 아직까지 그 독성효과를 형태학적으로 분석 보고한 것이 없어 그 병인이 뚜렷하게 밝혀졌다고는 할 수 없다.

이에 본 연구자는 TCDD를 투여하고 말초신경의 일부 및 그 신경과 연관된 척수 앞쪽 및 척수신경절 세포를 형태학적으로 분석하여 신경전도속도를 떨어뜨리는 것과 같이 기존에 보고된 TCDD의 효과가 축삭이나 수초에 대한 직접적인 독성에 의한 것인지, 아니면 운동신경원이나 감각신경원의 신경세포체의 손상에 의한 이차적인 반응인지를 밝히고자 하

었다. 그 결과 본 연구자는 TCDD 투여 후 척수 앞쪽이나 척수신경절 신경세포의 형태와 수는 변화되지 않았으며, 축삭의 단면적과 미세구조도 변화되지 않음을 확인하였다(결과 참조). 따라서, 감각의 이상이나 신경전달속도가 느려지는 것과 같은 변화는 운동신경세포체나 감각신경세포체, 또 축삭에 대한 TCDD의 직접적인 독성에 의해 나타나는 이차적인 효과는 아닌 것으로 판단된다. 이 실험에서 본 연구자가 얻은 중요한 결과는 수초의 단면적은 증가하나, 수초의 밀도는 감소한 것이다. 광학현미경으로 관찰하였을 때, 수초의 두께는 두꺼워져 있었으나 전자현미경으로 관찰한 결과 실제 수초가 증식되어 두터워진 것이 아니고 수초의 규칙적인 층판구조가 변형되어 슈반세포의 형질막 사이가 벌어져서 나타난 현상임을 알 수 있었다. 이러한 관찰결과로 미루어 볼 때 TCDD는 수초가 축삭의 인슐레이터로서의 정상적인 역할 수행에 장애를 초래함으로써 기존에 보고된 바와 같이 신경전도속도를 떨어뜨리는 결과를 초래하는 것으로 추정된다.

이 연구에서 TCDD 투여 후 관찰된 수초의 전자현미경적 소견은, 수초가 과형성되어 수초 층판 구조는 촘촘하게 유지되면서 수초의 가장 안쪽 층부터 가장 바깥 층까지가 한꺼번에 방향을 바뀌가며 축삭을 감아나가는 양상을 띠는 tomaculous neuropathy³²와는 다르고, 축삭 둘레에 비정상적으로 슈반세포 세포질이 증식되어 수초처럼 둘러싸는 onion bulb³³와도 다르며, 수초가 벌어져 있으나 그 간격이 규칙적인 마크로글로블린 혈증 소견³⁴과도 차이가 있다.

본 연구자가 관찰한, 수초층판이 부분부분 벌어지는 소견과 세포막이 뭉쳐지는 소견은, 슈반세포의 표면에 발현되는 단백질로, 축삭 주위에 수초가 형성되는 과정에서 축삭과 슈반세포 사이의 상호작용에 관계함으로써 말초신경 중 수초신경섬유를 유지하는 데에 필수적인 역할을 하는 myelin-associated glycoprotein (MAG)이 발현되지 않았을 때에 나타나는 전자현미경적 소견^{35, 36}과 매우 유사하다. 아울러 말초신경의 수초신경섬유를 유지하는데에 필수적인 단백질인 MAG가 발현되지 않는 경우에는 신경전도속도가 감소된다³⁶고 보고되어 있어 본 연구자는 MAG의 발현과 작용에 직접 또는 간접적으로 영향을 줌으로써 말초신경 수초의 층판 구조를 파괴할 가능성이 있음을 제시한다. 이러한 가능성은 앞으로 계속적인 연구를 통하여 규명되어야 할 것이다.

V. 결 론

TCDD가 말초신경에 미치는 영향을 형태학적으로 분석하기 위하여 C57BL/6J 생쥐에 TCDD를 1회 복강으로 주사한 후 넷째 허리척수분절의 앞뿌세포와 넷째 허리척수신경절의 신경세포 및 궁둥신경을 광학현미경과 전자현미경으로 관찰하고 형태계측을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 척수 앞뿌과 척수신경절의 신경세포의 형태나 수는 TCDD 투여군과 대조군에서 차이가 없었다.
2. 궁둥신경 축삭의 형태와 단면적은 TCDD 투여군과 대조군에서 차이가 없었다.
3. 궁둥신경 수초의 단면적은 TCDD 투여 후 4주군과 16주군에서 대조군보다 컸다.
4. 궁둥신경 수초의 밀도는 TCDD 투여군에서 대조군보다 낮았다.
5. 전자현미경에서 궁둥신경의 수초의 층판 사이가 벌어져 불규칙하게 배열되어 있었다.

이상의 결과는 TCDD가 척수와 척수신경절의 신경세포에는 영향을 주지 않으나, 말초신경섬유에서 특히 수초의 층판 구조 배열을 변성시키는 특이적인 신경 독성을 가지고 있음을 의미한다고 판단된다.

참고 문헌

1. Sandalls J, Berryman B, Bennett L, Newstead S, Fox A. PCDD/PCDF on land around an industrial site and identification of source. *Chemosphere*, 1998 ;37:2225-37.
2. Domingo JL, Schuhmacher M, Muller L, Rivera J, Granero S, Llobet JM. Evaluating the environmental impact of an old municipal waste incinerator: PCDD/F levels in soil and vegetation samples. *J Hazard Mater*, 2000;76:1-12.
3. Miyabara Y, Hashimoto S, Sagai M, Morita M. PCDDs and PCDFs in vehicle exhaust particles in Japan. *Chemosphere*, 1999;39:143-50.
4. Muto H, Takizawa Y. Related Articles. Dioxins in cigarette smoke. *Arch Environ Health*, 1989;44:171-4.
5. Michalek JE, Tripathi RC. Pharmacokinetics of TCDD in veterans of Operation Ranch Hand: 15-year follow-up. *J Toxicol Environ Health*, 1999;57:369-78.
6. Hardell L, Eriksson M, Axelson O. Agent Orange in war medicine: an aftermath myth. *Int J Health Serv*, 1998;28:715-24.
7. Kogevinas M, Becher H, Benn T, Bertazzi PA, Boffetta P, Bueno-de-Mesquita HB, et al. Cancer mortality in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and dioxins. An expanded and updated international cohort study. *Am J Epidemiol*, 1997;145:1061-75.

8. Cordier S, Le TB, Verger P, Bard D, Le CD, Larouze B, Dazza MC, Hoang TQ, Abenhaim L. Viral infections and chemical exposures as risk factors for hepatocellular carcinoma in Vietnam. *Int J Cancer*. 1993;55:196-201.
9. Bertazzi PA, Zocchetti C, Guercilena S, Consonni D, Tironi A, Landi MT, Pesatori AC. Dioxin exposure and cancer risk: a 15-year mortality study after the "Seveso accident". *Epidemiology*. 1997;8:646-52.
10. Bullman TA, Watanabe KK, Kang HK. Risk of testicular cancer associated with surrogate measures of Agent Orange exposure among Vietnam veterans on the Agent Orange Registry. *Ann Epidemiol*. 1994;4:11-6.
11. Osteen KG, Sierra-Rivera E. Does disruption of immune and endocrine systems by environmental toxins contribute to development of endometriosis? *Semin Reprod Endocrinol*. 1997;15:301-8.
12. Birnbaum LS. Developmental effects of dioxins and related endocrine disrupting chemicals. *Toxicol Lett*. 1995;82-83:743-50.
13. Tonn T, Esser C, Schneider EM, Steinmann-Steiner-Haldenstatt W, Gleichmann E. Persistence of decreased T-helper cell function in industrial workers 20 years after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environ Health Perspect*. 1996;104:422-6.
14. Calvert GM, Sweeney MH, Deddens J, Wall DK. Evaluation of diabetes mellitus, serum glucose, and thyroid function among United States workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Occup Environ Med*. 1999;56:270-6.

15. Neuberger M, Rappe C, Bergek S, Cai H, Hansson M, Jager R, et al. Persistent health effects of dioxin contamination in herbicide production. *Environ Res.* 1999;81:206-14.
16. Sweeney MH, Mocarelli P. Human health effects after exposure to 2,3,7,8-TCDD. *Food Addit Contam.* 2000;17:303-16.
17. Kaye CI, Rao S, Simpson SJ, Rosenthal FS, Cohen MM. Evaluation of chromosomal damage in males exposed to agent orange and their families. *J Craniofac Genet Dev Biol Suppl.* 1985;1:259-65.
18. Robinowitz R, Roberts WR, Dolan MP, Patterson ET, Charles HL, Atkins HG, et al. Carcinogenicity and teratogenicity vs. psychogenicity: psychological characteristics associated with self-reported Agent Orange exposure among Vietnam combat veterans who seek treatment for substance abuse. *J Clin Psychol.* 1989;45:718-28.
19. Dragan YP, Schrenk D. Animal studies addressing the carcinogenicity of TCDD (or related compounds) with an emphasis on tumour promotion. *Food Add Cont.* 2000;17:289-302.
20. Birnbaum LS, Tuomisto J. Non-carcinogenic effects of TCDD in animals. *Food Add Cont.* 2000;17:275-288.
21. Sweeney, HS, Flingerhut, MA, Arezzo, JC, Hornung, RW, Connally, LB. Peripheral Neuropathy After Occupational Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD). *Am. J. Ind. Med.* 1993;23:845-858.
22. Goetz CG, Bolla KI, Rogers SM. Neurologic health outcomes and Agent Orange: Institute of Medicine report. *Neurology.* 1994;44:801-9.

23. Barbieri S, Pirovano C, Scarlato G, Tarchini P, Zappa A, Maranzana M. Long-term effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the peripheral nervous system. Clinical and neurophysiological controlled study on subjects with chloracne from the Seveso area. *Neuroepidemiology*. 1988;7:29-37.
24. Klawans HL. Dystonia and tremor following exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mov Disord*. 1987;2:255-61.
25. Goldey ES, Lau C, Kehn LS, Crofton KM. Developmental dioxin exposure: disruption of thyroid hormones and ototoxicity. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1996;30:225.
26. Thiel R, Koch E, Ulrich B, Chahoud I. Peri- and postnatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1991;69:79-86.
27. Cordon CJ, Ying Y, Gray LE. Autonomic and behavioral thermoregulation in golden hamsters exposed perinatally to dioxin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1996;137:120-125.
28. Sirkka U, Pohjanvirta R, Nieminen S, Tuomisto J, Ylitalo P. Acute neurobehavioral effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) in Han/Wistar rats. *Pharmacology and Toxicology*. 1992;71:284-288.
29. Grehl H, Grahmann F, Claus D, Neundoerfer B. Histologic evidence for a toxic polyneuropathy due to exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) in rats. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1993;88:354-357.
30. Orian JM, Slavin A, Ayers MM, Bernard CCA. Delayed and Incomplete Myelination in a Transgenic Mouse Mutant With Abnormal Oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience Research*. 1997;50:809-820.

31. Weber LWD, Lebofsky M, Stahl BU, Smith S, Rozman KK. Correlation between Toxicity and Effects on Intermediary Metabolism in 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Treated Male C57BL/6J and DBA/2J Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1995;131:155-162.
32. Lane JE, Foulkes GD, Hope TD, Mayorov VI, Adkison L. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies mimicking multifocal compression neuropathy. *J Hand Surg [Am]* 2001;26:670-4.
33. Vital A, Ferrer X, Lagueny A, Vandenberghe A, Latour P, Goizet C, et al. Histopathological features of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease in 8 patients from 6 families with different connexin32 mutations. *J Peripher Nerv Syst* 2001;6:79-84.
34. Vital A, Favereaux A, Martin-Dupont P, Taupin JL, Petry K, Lagueny A, et al. Anti-myelin-associated glycoprotein antibodies and endoneurial cryoglobulin deposits responsible for a severe neuropathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001;102:409-12.
35. Owens GC, Bunge RP. Schwann cells infected with a recombinant retrovirus expressing myelin-associated glycoprotein antisense RNA do not form myelin. *Neuron*. 1991;7:565-75.
36. Weiss MD, Luciano CA, Quarles RH. Nerve conduction abnormalities in aging mice deficient for myelin-associated glycoprotein. *Muscle Nerve*. 2001;24:1380-7.

Abstract

Morphological analysis of the effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the peripheral nervous system of mouse

Hee Joon Yang

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Associate Professor Hye-Yeon Lee)

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), an environmental hormone has systemic and multi-organic toxic effects in human and several animals. While many patients exposed to TCDD complain several peripheral neurological symptoms, its effects on the peripheral nerve are not clear. This study was designed to analyze the morphological changes of the peripheral nerves by the toxic effect of TCDD. Fourty $\mu\text{g}/\text{kg}$ of TCDD was single injected intraperitoneally to 4 week-old C57BL/6J mice. At the 1st, 4th and 16th weeks after TCDD injection, 4th lumbar segments of the spinal cord, 4th lumbar spinal ganglia, and the sciatic nerves were dissected and processed for light and electron microscopy. Morphometrical analysis of the nerve fiber was performed with an Optimas[®] 6.1 image analysis program.

The shape of nerve cell body of the anterior horn and the spinal ganglia was not different between TCDD-treated and control groups. The number of the nerve cell of the spinal ganglia in the TCDD-treated group did not differ from that in the control group.

Axonal regression or loss was not found in sciatic nerves of both groups while the thickened myelin was frequently observed in the TCDD-treated group. The cross sectional area of axons did not show the difference between TCDD-treated and control groups while area of myelin in the TCDD-treated group at 4 or 16 weeks was larger than that of the control group. The density of myelin in the TCDD-treated group was lower than that of the control group. Electron microscopy revealed no abnormal axonal changes in both groups. However, the lamellar structure of the TCDD-treated myelin was disrupted. These results suggest that TCDD does not have toxic effects on the nerve cell body of the anterior horn and spinal ganglia but has a specific toxic effect on the myelin sheath of the peripheral nerve.

Key words : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, neurotoxicity, peripheral neuropathy, myelin degeneration, environmental hormone, morphometrical analysis