

연령에 따른 di(2-ethylhexyl) phthalate의 대사 및 고환독성의 변화

중앙대학교 의과대학 예방의학교실

박영주 · 최병선 · 박정덕 · 홍연표

— Abstract —

Age-dependent Effect of Metabolism and Testicular Toxicity to di(2-ethylhexyl) Phthalate

Yeong-Ju Park, Byung-Sun Choi, Jung-Duck Park, Yeon-Pyo Hong

*Department of Preventive Medicine and Community Health,
College of Medicine, Chung-Ang University*

Objectives: The purpose of this study was to evaluate the age-dependent response of testicular toxicity and the mechanism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) induced testicular toxicity.

Methods: DEHP was administered orally in doses of 0, 1.0 and 2.0 g/kg/day, for 7 days, to 3, 6 and 9 week-old Sprague-Dawley rats. Testicular weight and sperm head counts, plasma level of DEHP, mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) and testicular lipid peroxidation were measured. Histopathological changes in the testis were observed.

Results: Reductions in weight gains, and relative testis weights, were observed in the 3 week-old rats in a dose-dependent manner, but not in the 6 and 9 week-old rats, compared to those of the control rats. Sperm head counts were decreased in the 6 week-old rats exposed to 2.0 g/kg/day, but not in the 9 week-old rats. Testicular atrophy and significant size reduction of the seminiferous tubule were observed in a dose-dependent manner in the 3 week-old rats. The plasma concentrations of MEHP were higher than those of DEHP, with these levels being most elevated in the younger rats. Lipid peroxidation, following exposed to DEHP, was increased in a dose-dependent manner in the 3 week-old, but with no changes in the 6 and 9 week-old rats.

Conclusions: Our results suggest the age related difference observed in the testicular response to the oral administration of DEHP may be due to the metabolism, and that oxidative stress may be related to the mechanism of DEHP induced testicular toxicity.

Key Words: Di(2-ethylhexyl) phthalate, Age-dependent, Testicular toxicity, Mono(2-ethylhexyl) phthalate, Metabolism, Oxidative stress

〈접수일: 2002년 7월 25일, 채택일: 2002년 8월 14일〉

교신저자: 최 병 선 (Tel: 02-820-5692) E-mail: bschoi@cau.ac.kr

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 이루어진 것임.

서 론

프탈레이트 에스터(phthalate ester)는 polyvinyl chloride(PVC) 플라스틱 제품의 유연성을 증가시키기 위한 가소제(plasticizer)로 20여 종이 있으며, 1930년 이후 광범위하게 많이 사용되고 있다. 프탈레이트 에스터의 하나인 di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)는 모든 사용량의 절반 이상을 차지하여, 연간 생산량이 약 2백만톤에 이른다(Thomas and Thomas, 1984; NTP, 2000). DEHP는 무색, 무취의 기름 같은 액체로서 최종 플라스틱 제품 무게의 40~50 %에 달하며(Latini, 2000), 칫솔, 고무 젓꼭지, 어린 아이들의 장난감 등에 사용하는 것은 금지되고 있으나, 건축자재(마루, 바닥타일, 지붕도장, 벽지, 전선절연체, 튜브 또는 용기 등), 자동차생산물(좌석, 외장, 바닥 코팅, 비닐 장식), 의류(신발, 우비), 음식물 포장재, 장난감 제품과 의료 용품(혈액 보관용기와 정맥주사 튜브 등) 제작에 사용되고 있어(NTP, 2000), 하루 평균 4~30 µg/kg 정도 폭로되는 것으로 알려져 있다(Moore et al., 2001). 더욱이 DEHP가 함유된 의료 용품을 사용하는 사람들의 경우에는 그 노출량이 훨씬 더 커서, 장기간 혈액 투석을 하는 환자는 일년에 평균 12 g 정도의 DEHP에 노출되고 있다(Faouzi et al., 1999).

우리나라에서도 1998년 한해 동안 유통된 DEHP가 210,940톤으로 전체 내분비계 장애물질 유통량인 349,165톤의 약 60.4 %에 달하고 있으며(환경부, 2000), 최근 시판하고 있는 생수에서도 소량의 DEHP가 검출되어 사회적으로 문제가 되고 있다.

DEHP와 같은 프탈레이트는 최근 수행된 역학조사에서 사춘기 이전의 여성에 대해 영향이 있을 가능성이 제시되었으나(Colon et al., 2000), 사람에 대한 독성은 아직 확인되지 않았다. 하지만 Fisher 344 랫트나 B6C3F 마우스에서 간암을 일으키는 것으로 알려져 있으며(Kluwe et al., 1982), 설치류에서 간세포내 피육시종의 증식을 유도하고(David et al., 1999), 간세포의 증식 및 비대를 일으켜 간의 무게를 증가시킨다고 보고하였다(Rao et al., 1990; Tamura et al., 1990). 고환은 DEHP에 가장 민감한 조직의 하나로, 100 mg/kg/day 용량의

DEHP를 설치류에 폭로시킬 경우, 고환의 무게가 감소하고, 고환 위축이 일어난다고 하였다(Shaffer et al., 1945; Gray and Butterworth, 1980; Sjoberg et al., 1986b; Lamb et al., 1987; Dostal et al., 1988; Oishi, 1989a; Oishi, 1989b). DEHP는 정낭, 부고환 및 전립선의 무게에도 영향을 미치며(Gray and Butterworth, 1980; Lamb et al., 1987), 정자 생성 과정에 영향을 미쳐 남성 생식 능력을 떨어뜨린다고 보고하였다(Lamb et al., 1987). 또한 고환 내 효소에도 영향을 미쳐, γ -glutamyl transpeptidase(GGT), lactic dehydrogenase(LDH)와 β -glucuronidase의 활성도를 증가시키며, sorbitol dehydrogenase와 acid phosphatase를 감소시키는 것으로 알려져 있다(Parmar et al., 1987; Parmar et al., 1995). DEHP의 독성 기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않으나, DEHP 자체 보다는 그 대사산물인 mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP)가 더 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Lake et al., 1975; Gray et al., 1982; Sjoberg et al., 1986a; Thysen et al., 1990; Dalgaard et al., 2001).

한편 DEHP에 의한 고환 독성은 연령 및 종에 따라 현저한 차이를 보여, 랫트나 guinea pig에서는 독성이 현저하나 마우스나 marmoset에서는 잘 나타나지 않으며(Curto and Thomas, 1982; Gray et al., 1982; Oishi, 1993), 연령이 어릴수록 DEHP에 민감하여 독성이 크게 나타난다고 하였다(Gray and Butterworth, 1980; Sjoberg et al., 1985; Sjoberg et al., 1986b; Arcadi et al., 1998). 이러한 고환 독성의 차이는 고환세포의 MEHP에 대한 민감성이 연령에 따라 다르기 때문이라는 주장(Gray and Beamand, 1984)과 DEHP의 흡수 및 대사가 연령에 따라 다르기 때문이라는 주장(Sjoberg et al., 1985)이 제기되고 있으나 아직 정확한 기전은 알려져 있지 않다.

이에 본 연구에서는 DEHP의 연령에 따른 고환 독성 차이와 그 기전을 밝히기 위해 DEHP 투여 후 연령에 따른 고환의 조직학적 소견, 정자 수의 변화, 혈액 내 DEHP 및 그 대사산물인 MEHP의 농도 측정과 고환 독성의 한가지 원인으로 생각되는 산화 스트레스 정도를 관찰하였다. 이러한 연구는 인간에 있어서도 DEHP의 폭로 시기에 따라 독성이 달라질

수 있다는 근거를 제기하며, DEHP의 독성 기전을 이해하는데도 도움이 될 것이다.

대상 및 방법

1. 시약

Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), phosphoric acid, trizma base, sucrose 및 bovine serum albumin은 Sigma Chemical Co. (U.S.A.) 제품을, mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), di-n-octyl phthalate는 Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd. (Japan) 제품을, acetonitrile은 HPLC grade 시약을 사용하였고, 그 외의 시약은 1급 시약을 사용하였다.

2. 실험동물 및 처치

본 연구에 사용된 실험동물은 APF(animal pathogen free) Sprague-Dawley계 수컷 랫트로, (주)샘타코로부터 분양 받아 1주일 전부터 온도 23 ± 2 °C, 습도 50 ± 5 %, 채광 12시간인 사육장에서 사육하여 특별한 이상이 없음을 확인한 다음 실험에 사용하였다. 실험동물은 3, 6, 9 주령으로 구분한 후, 각 주령마다 1개의 대조군과 2개의 투여군으로 나누었다. 실험동물 수는 각 군마다 6마리로 하여 총 54마리가 사용되었다.

DEHP 투여군은 1.0, 2.0 g/kg body weight의 용량을 corn oil에 용해시켜 1 주일간 경구 투여하였고, 대조군은 동일한 양의 corn oil을 투여하였다. 모든 실험동물은 마지막 DEHP을 투여하고 12시간이 경과한 후에 경부탈골에 의하여 희생시키고, 즉시 회복하여 혈액 및 고환을 채취하여 시료로 사용하였다. 이때, 조직표본을 만들기 위하여 좌측 고환은 부왕 용액(Bouin solution)에 고정하였고, 다른 고환은 정자 머리수 측정 및 고환 내 생화학적 검사를 위하여 액체질소로 급냉동 후 -80 °C에 냉동 보관하였다.

3. 연구방법

(1) 몸무게와 고환무게 측정

몸무게는 처치기간동안 매일 측정하였고, 고환의 무게는 마지막 처치 후 희생시켜 측정하였다.

(2) 고환의 정자 머리수 측정

정자 머리수는 Blazak 등(1985)의 방법을 다소 수정하여 측정하였다. 먼저 tunica albuginea를 제거하고 무게를 측정 한 후 50배 부피의 saline-merthiolate-triton(SMT) 용액을 첨가하여, Potter-Elvehjem 조직분쇄기로 2회 균질화하였다. 균질화된 고환은 2분간 초음파처리 하여 서로 엉기지 않도록 한 후 hemocytometer에 놓은 후 1분간 방치하여 현미경을 이용하여 계수하였다. 일일 정자 생성 능력(daily sperm head production)은 이 결과를 랫트의 spermatogenesis 기간인 6.1일 (Robb et al., 1978)로 나누어 계산하였다.

(3) 고환의 조직 소견 관찰

고환의 좌측 반쪽을 부왕 용액에 24시간 동안 침적 고정 한 다음, 통상적인 조직처리 과정을 거쳐 paraffin 포매하였다. 이것을 4 μm 두께로 절편을 만들어 hematoxylin-eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 이때 고환의 정세관의 위축 정도를 정량화하기 위하여 각각의 조직에서 정단면으로 잘린 정세관 20개씩을 Pro plus software를 이용하여 단면적을 측정하였다.

(4) 혈액 내 DEHP와 MEHP의 농도 측정

혈장 내 DEHP와 MEHP의 농도는 Suna 등의 방법(2001)으로 HPLC(Waters 501, USA)를 이용하여 분석하였다. 혈액 내 DEHP와 MEHP를 추출하기 위하여 혈장 100 μl에 1M NaOH 용액 400 μl과 아세트니트릴 1.7 ml를 첨가하여 20 분간 초음파 처리 후, 인산 20 μl를 넣어 중화하였다. 이 용액을 1000×g에서 15분간 원심분리하여, 상층액을 새 용기에 옮기고 질소가스로 아세트니트릴을 증발시킨 후, 100 μl의 아세트니트릴을 넣어 다시 용해시켜 시료로 사용하였다. 이 때 internal standard로 di-n-octyl phthalate를 사용하였으며, 시료 주입

량은 30 µl로 하였다. 분석할 때 이동상은 13분 동안은 아세토니트릴과 1 % 인산 용액을 60:40(v:v)으로, 그 후에는 85:15(v:v)의 조성으로 하여 사용하였으며, 유속은 0.8 µl/min으로 하였다. Column은 XTerra RP18 5 µm(3.9 mm×150 mm, Waters, U.S.A.)을 사용하였으며, UV 검출기(Waters 484, USA)로 230 nm에서 검출하였다.

(5) 고환 내 지질 과산화 측정

고환 내 지질 과산화는 Ohkawa 등(1979)의 방법을 이용하여 TBARS assay를 통하여 측정하였다. 이때 시료는 고환 조직에 10배 부피의 1.15 % KCl 용액을 첨가하여 Potter-Elvehjem 조직분쇄기로 2회 균질화하여 사용하였으며, 8.1 % SDS 0.1 ml, 20 % acetic acid 0.75 ml와 0.8 % thiobarbituric acid 0.75 ml를 시료 0.1 ml에 첨가하여 95 °C oil bath에서 30분간 가열시킨 후 즉시 얼음물로 냉각시켜 반응을 정지시켰다. 이 용액에 0.5 ml의 증류수와 2.5 ml의 n-butanol과 pyridine 혼합액(15:1, v/v)을 넣어 30초간 잘 혼합한 후, 1000×g에서 15분간 원심분리하여, 상층액을 형광 분광광도계(excitation: 515 nm; emission: 553 nm, SFM 25, Kontron Inst., Switzerland)로 측정하였다.

(6) 통계 분석

모든 자료는 SAS package(version 8.01)를 이용하여 분석하였다. DEHP 투여에 따른 몸무게의 변화는 반복측정 분산분석을 이용하였고, DEHP 투여에 따른 고환의 무게, 고환 내 정자 생성, 정세관 단면적의 차이와 DEHP 및 MEHP의 농도차이는 Student's t-test를 시행하여 분석하였다. 연령에

따른 DEHP와 MEHP의 농도의 차이는 분산분석을 시행하여 분석하였고, 분산분석에서 차이가 있는 변수는 Tukey법으로 다중비교를 수행하였다.

결 과

1. 체중과 고환무게의 변화

3 주령에서는 DEHP 투여량의 증가에 따라 체중 증가가 감소되었으나(p<0.001), 6 주령 및 9 주령에서는 이러한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 1).

고환의 무게도 3 주령에서는 DEHP 투여량의 증가에 따라 뚜렷하게 감소하였고(p<0.001), 6 주령과 9 주령에서는 DEHP 투여량에 따른 차이가 관찰되지 않았다(Table 1).

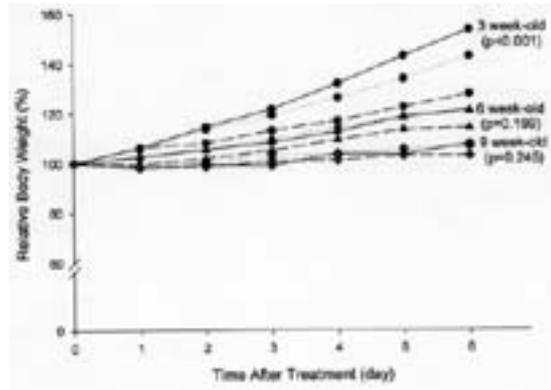


Fig. 1. Daily changes of body weights in controls and DEHP-treated rats. Solid lines indicate control rats, dotted lines indicate 1.0 g/kg DEHP-treated rats, and dash lines indicate 2.0 g/kg DEHP-treated rats (●: 3-week-old, ▲: 6-week-old, ◆: 9-week-old).

Table 1. The effects of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the weight of testes

	Absolute testicular weight (gram)			Relative testicular weight (testes weight/body weight, %)		
	3 week-old	6 week-old	9 week-old	3 week-old	6 week-old	9 week-old
Control	0.72±0.06	2.05±0.04	3.23±0.12	0.84±0.06	1.01±0.03	1.09±0.04
1.0 g/kg DEHP	0.36±0.04**	2.20±0.08	3.13±0.08	0.45±0.05**	1.09±0.04	1.06±0.03
2.0 g/kg DEHP	0.28±0.03**	1.88±0.11	3.02±0.07	0.38±0.04**	0.98±0.05	1.07±0.02

Each value represents the mean±SE

** Significantly different from respective controls, p<0.01

2. 고환 내 일일 정자 생성의 변화

3 주령에서는 모두 정자가 나타나지 않았고, 6 주령에서는 대조군은 고환 1 g당 정자가 $1.47 \pm 0.11 \times 10^7$ 였고, 1.0 g/kg DEHP 투여군에서는 $1.37 \pm 0.08 \times 10^7$ 으로 대조군과 차이가 없었으나, 2.0 g/kg DEHP 투여군에서는 $0.77 \pm 0.15 \times 10^7$ 로 감소하였다($p=0.003$). 9 주령에서 대조군, 1.0 g/kg 과 2.0 g/kg DEHP 투여군에서 각각 $1.66 \pm 0.11 \times 10^7$, $1.66 \pm 0.07 \times 10^7$ 과 $1.71 \pm 0.11 \times 10^7$ 로 DEHP 투여에 따른 차이가 없었다(Table 2).

3. 조직병리학적 소견

3 주령의 투여군은 고환 조직 적출시 육안으로도 크기가 대조군에 비해 매우 왜소하였다. 조직학적 소견에서 정세관의 위축이 1.0 g/kg 투여군에서 나타나기 시작하여 2.0 g/kg 투여군에서는 더욱 심하게 나타났다(Fig. 2). 정세관 단면적은 대조군의 경우 $0.025 \pm 0.002 \text{ mm}^2$ 이었으나, DEHP를 1.0과 2.0 g/kg을 투여한 군에서는 각각 0.015 ± 0.003 과 $0.012 \pm 0.002 \text{ mm}^2$ 로 DEHP 투여량이 증가할수록 감소하였다($p<0.001$, Table 3). 또한 정세관내 생식세포들의 층수도 대조군의 경우 5~7층이었으나, DEHP 투여군에서는 세포층의 수가 점차 감소하는 경향을 보였고, 정세관내 공포성 변성도 나타났다. 그러나 6 주령 랫트에서는 대조군과 1.0 g/kg를 투여한 군간에는 차이가 없었으며 2.0 g/kg 투여군에서 정세관의 위축이 국소적으로 나타났다. 정세관 단면의 면적도 대조군이 $0.045 \pm 0.004 \text{ mm}^2$ 이었고 1.0과 2.0 g/kg 투여군에 각각 0.043 ± 0.002 와

$0.040 \pm 0.005 \text{ mm}^2$ 로 투여량이 증가함에 따라 다소 작아지는 경향이 있었으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. 9 주령에서는 조직병리학적 소견상 대조군과 투여군 간에 차이를 관찰할 수 없었으며, 정세관의 단면적도 대조군, 1.0과 2.0 g/kg 투여군이 각각 0.060 ± 0.009 , 0.061 ± 0.008 과 $0.058 \pm 0.003 \text{ mm}^2$ 으로 차이가 없었다.

4. DEHP와 MEHP의 농도

혈중 DEHP는 같은 연령에서는 투여량에 따라 차이가 나타나지 않았으나, 연령에 따라 1.0 g/kg 투여군에서 각각 5.94, 3.46과 2.92 $\mu\text{g/ml}$ 로서 3 주령에서 가장 높았으며($p=0.032$), 2.0 g/kg 투여군에서는 6.63, 6.75과 1.73 $\mu\text{g/ml}$ 으로 연령에 따라 차이가 있었다($p=0.001$, Fig. 3). 혈중 MEHP는 DEHP에 비하여 그 농도가 매우 높았으며, 투여량이 증가함에 따라 3 주령에서는 MEHP의 농도가 증가하였으나($p=0.006$), 6 주령과 9 주령에서는 차이가 없었다. 혈중 MEHP의 농도는 1.0 g/kg 투여군에서 연령에 따라 각각 11.96, 7.87과 5.41 $\mu\text{g/ml}$ 로 연령이 어릴수록 높은 경향이 있었으나 통계적으로 유의하지는 않았으며, 2.0 g/kg 투여군에서는 각각 99.52, 16.83과 12.98 $\mu\text{g/ml}$ 로 연령이 어릴수록 MEHP의 농도가 높았다($p=0.001$).

5. 고환 내 지질 과산화

3 주령에서 대조군은 0.134 ± 0.017 , 1.0 g/kg 투여군은 0.217 ± 0.070 그리고 2.0 g/kg 투여군은 $0.371 \pm 0.142 \mu\text{mol MDA/g wet weight}$ 로 투여량이 증가함에 따라 고환 조직내 지질 과산화가 증

Table 2. Daily sperm production in controls and DEHP-treated rats

	Daily sperm production ($10^7/\text{g testis}$)		Daily sperm production ($10^7/\text{rat}$)	
	6 week-old	9 week-old	6 week-old	9 week-old
Control	1.47 ± 0.11	1.66 ± 0.11	3.02 ± 0.23	5.40 ± 0.50
1.0 g/kg DEHP	1.37 ± 0.08	1.66 ± 0.07	3.01 ± 0.20	5.18 ± 0.51
2.0 g/kg DEHP	$0.77 \pm 0.15^{**}$	1.71 ± 0.11	$1.50 \pm 0.33^{**}$	5.14 ± 0.30

Each value represents the mean \pm SE

** Significantly different from respective controls, $p<0.01$

가하였다(p=0.017, p=0.002, Table 4). 그러나 6 주령 및 9 주령에서는 대조군과 DEHP 투여군 간에 차이가 없었다.

고 찰

DEHP는 고환, 부고환, 정낭 및 전립선의 무게와 정자 생산능력을 감소시키며(Gray et al, 1977; Oishi and Hiraga, 1980; Oishi, 1985; Oishi, 1986; Parmar et al, 1986; Siddiqui and Srivastava, 1992), 고환에 다양한 병리학적 이상 소견을 일으키는데 이는 항안드로젠 효과로 여겨진다(Mylchreest et al., 1998). 본 연구에서도 3 주령의 랫트는 1.0 g/kg DEHP 노출 후 대조군과 비교하여 체중 증가의 감소가 관찰되었고, 고환의 무게도 현저하게 감소하였다. 하지만 6 주령과 9 주령에서는 체중 증가의 변화 및 고환무게가 대조군과 차이가 없었다. 정세관의 위축과 단면적 감소도 3 주령에서는 DEHP 투여 용량이 증가함에 따라 비례하는 양상을 보였으나 6 주령에서는 이러한 조직학적 변화가 2.0 g/kg 투여군에서 국소적으로 나타났

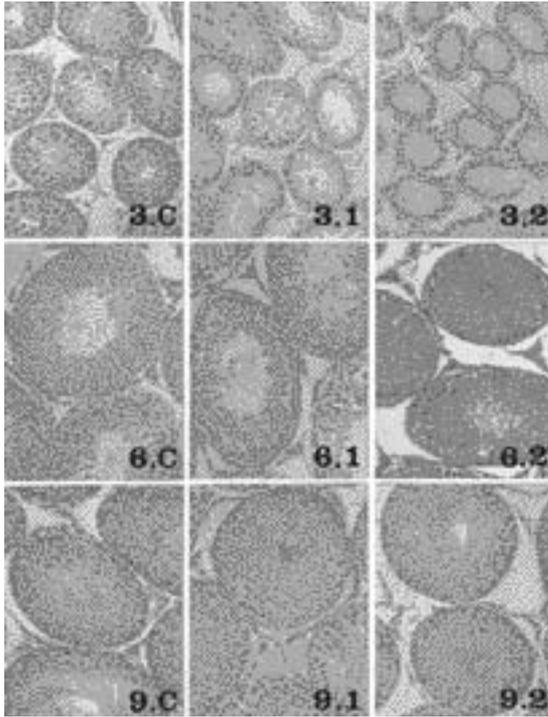


Fig. 2. Series of light micrographs from the study where DEHP was given in oral route (Hematoxylin-eosin stain, ×100). Age at start of dosing and doses are indicated. C=control. Note the severe damage in 3 week-old rats (2.0 g/kg/day). There are no change in 9 week-old animals.

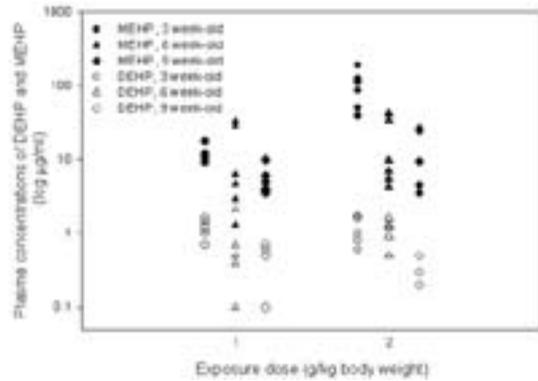


Fig. 3. Plasma concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP).

Table 3. Seminiferous tubular luminal size in controls and DEHP-treated rats

	Seminiferous tubular luminal size (mm ²)		
	3 week-old	6 week-old	9 week-old
Control	0.025±0.002	0.045±0.004	0.060±0.009
1.0 g/kg DEHP	0.015±0.003**	0.043±0.002	0.061±0.008
2.0 g/kg DEHP	0.012±0.002**	0.040±0.005	0.058±0.003

Each value represents the mean±SE

** Significantly different from respective controls, p<0.01

Table 4. The effects of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on testicular thiobarbituric acid reactive substances

	Thiobarbituric acid reactive substances ($\mu\text{mol MDA/g wet weight}$)		
	3 week-old	6 week-old	9 week-old
Contro	10.134 \pm 0.017	0.209 \pm 0.030	0.184 \pm 0.024
1.0 g/kg DEHP	0.217 \pm 0.070*	0.196 \pm 0.075	0.171 \pm 0.010
2.0 g/kg DEHP	0.371 \pm 0.142**	0.225 \pm 0.037	0.172 \pm 0.021

Each value represents the mean \pm SE

* Significantly different from respective controls, $p < 0.05$

** Significantly different from respective controls, $p < 0.01$

고, 9 주령에서는 변화를 보이지 않았다. 그리고 DEHP 투여 후 정자생성 능력은 정자형성이 되지 않은 3 주령에서는 관찰할 수 없었고, 6 주령의 2.0 g/kg/day 투여군에서 유의한 감소를 나타냈으나 9 주령에서는 차이가 없었다. 이상의 결과를 통하여 DEHP에 의한 고환 독성은 연령이 어릴수록 더 민감한 것으로 나타났다. Gray와 Butterworth (1980)는 4, 10, 15 주령의 Wistar rat를 이용한 실험에서 2.8 g/kg/day 용량의 DEHP를 10일간 투여하였을 때, 4, 10 주령의 랫트에서는 고환독성이 나타났으나 15 주령의 랫트에서는 나타나지 않았다고 하였고, Sjoberg 등(1986b)은 25, 40, 60일 된 Sprague-Dawley 랫트에 1.0과 1.7 g/kg 용량의 DEHP를 2주간 투여하였을 때, 25일과 40일 된 랫트에서 1.7 g/kg DEHP를 투여시 고환의 무게 감소가 현저하였고, 25일 된 랫트의 고환에서 정세관의 위축 등 고환 조직 손상이 현저하고, 40일 된 랫트에서는 1.7 g/kg 투여군에서 국소적인 위축을 볼 수 있고, 60일 된 랫트에서는 별다른 이상 소견을 볼 수 없다고 하여 본 연구 결과와 유사하였다.

혈중 MEHP 농도는 DEHP 농도보다 높게 나타났는데, 이는 2.8 g/kg DEHP를 단일 폭로시킨 Teirlynck와 Belpaire(1985)의 연구 결과와 일치하였다. 경구투여 된 DEHP는 비특이적인 지방분해효소들에 의해 장에서 가수분해되어 MEHP와 2-ethylhexanol로 흡수되며(Albro and Thomas, 1973; Daniel and Bratt, 1974; Lake et al., 1977; Rowland et al., 1977), 이는 다시 여러 종류의 산화 효소에 의해서 산화되어 배설되거나, 산화 후

glucuronide와 결합하여 배설된다(Albro et al, 1983). White 등(1980)은 everted gut sac을 이용한 in vitro 실험에서 DEHP는 대사되지 않은 상태로 소장 벽을 통과할 수 없다고 하였고, Albro 등(1982)은 DEHP의 흡수 역치(absorption threshold)인 0.5 g/kg 이하에서는 간에서 DEHP가 검출되지 않았으나, 투여 농도가 증가함에 따라 간에 가수분해되지 않은 DEHP가 검출됨을 보고하였는데, 본 연구에서 사용한 1.0과 2.0 g/kg의 농도는 이러한 흡수 역치를 초과하는 농도이므로, 장에서 DEHP가 MEHP로 되는 가수분해 과정이 포화되어 일부 DEHP가 가수분해되지 않은 채로 흡수되어 혈중에 DEHP가 검출된 것으로 생각된다.

Gray와 Beamand(1984)는 고환 세포를 이용한 in vitro 실험에서 MEHP를 투여하였을 때, germ cell detachment 속도가 농도에 비례하여 증가하였으나, DEHP를 투여하였을 때는 이러한 영향을 볼 수 없다고 하였고, Moss 등(1988)은 MEHP를 투여한 Sertoli cell에서는 lactate의 생산이 증가하여 lactate/pyruvate의 비가 증가하였으나, DEHP와 2-ethylhexanol 투여시에는 이러한 효과를 볼 수 없다고 하여 DEHP 투여에 의한 독성이 DEHP 자체에 의한 것이라기보다는 대사물인 MEHP 때문이라고 하였다. 혈중 MEHP의 농도는 연령에 의한 차이를 나타내, 고환독성이 현저히 나타난 3 주령에서 가장 높게 나타났으며(Fig. 2), 연령에 따른 고환 독성의 차이가 DEHP의 흡수 및 대사의 차이에 기인한다고 생각한다. 하지만 이번 연구에서는 연령에 따른 농도 차이가 DEHP 및 MEHP의 흡수 차이에

의한 것인지, 대사 및 배설에 의한 것인지는 알 수 없어 추후 이에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

DEHP는 간에서 지질 과산화를 유발하며(Jayar-aman et al, 1988; Tomaszewski et al, 1990; Santhosh et al, 1998), 혈중 및 고환 내 vitamin E를 떨어뜨리며, 항산화 비타민을 동시에 투여할 경우, 고환 독성이 현저히 감소하는 것으로 알려져(Oishi, 1994; Ishihara et al, 2000) 고환독성의 기전에 산화스트레스가 관여할 것으로 생각된다. 이번 연구결과에서도 고환독성이 현저히 나타난 3주령의 랫트에서는 DEHP 투여량 증가에 따라 지질 과산화가 증가함을 보여 산화스트레스가 DEHP에 의한 고환 독성 기전의 하나로서 작용할 수 있을 것으로 생각된다. DEHP의 고환 독성에 지질과산화와 관여함은 DEHP의 발암성 연구와 향후 MEHP의 유전독성 연구에 중요한 단서를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 연구결과를 통하여 DEHP는 폭로 시기에 따라 고환 독성이 달라질 수 있다는 근거를 제시하며, 위해도 평가 및 적절한 보호 대책 수립에 있어 폭로 연령에 따른 차이를 고려할 필요가 있으리라 생각된다.

요 약

목적 : 본 연구에서는 연령에 따른 DEHP의 고환 독성의 차이와 DEHP 투여로 인한 고환독성의 기전을 규명하고자 하였다.

방법 : 3, 6, 9 주령의 Sprague-Dawley계 수컷 랫트에 0, 1.0, 2.0 g/kg body weight의 DEHP를 7일간 경구투여하였다. 고환의 무게와 정자 머리수, 혈장 내 DEHP와 MEHP의 농도, 고환의 지질과산화를 측정하였고, 고환의 조직병리학적 소견을 관찰하였다.

결과 : 3 주령의 랫트에서는 DEHP 투여군에서 체중 증가의 감소와 고환 무게의 감소가 나타났으나, 6 주령 및 9 주령에서는 이러한 변화를 관찰할 수 없었다. DEHP 투여에 따른 정자 형성의 억제는 6 주령에서는 2.0 g/kg 투여군에서 나타났으나, 9 주령에서는 차이가 없었다. 조직병리학적 소견에서도 3 주령에서는 1.0 g/kg 투여군에서부터 정세관의 위축이 현저하였으나, 6 주령에서는 국소적인 위축이

2.0 g/kg 투여군에서부터 관찰되었고, 9 주령에서는 이러한 변화가 나타나지 않아 연령이 어릴수록 고환 독성이 심함을 확인하였다. MEHP의 혈중 농도가 DEHP 농도보다 높았고, MEHP와 DEHP의 혈중 농도는 연령이 어릴수록 높게 나타났다. DEHP에 의한 고환의 지질 과산화는 3 주령에서는 투여량이 증가함에 따라 증가하였으나, 6 주령과 9 주령에서는 지질 과산화의 차이를 관찰할 수 없었다.

결론 : 이상의 결과에서 연령에 따른 DEHP 고환 독성의 차이는 DEHP의 대사가 연령에 따라 다르기 때문이라 생각되며, 산화 스트레스가 DEHP로 인한 고환독성의 기전과 연관되는 것으로 추정된다.

참고문헌

환경부. 내분비계 장애물질 규제 및 사용현황. URL: <http://www.me.go.kr:9999/DEPTDATA/200006/27194141/사용현황.doc>. 2000.

Albro PW, Hass JR, Peck CC, Jordan ST, Corbett JT, et al. Applications of isotope differentiation for metabolic studies with di-(2-ethylhexyl) phthalate. *J Environ Sci Health B* 1982;17(6):701-714.

Albro PW, Thomas RO. Enzymatic hydrolysis of di-(2-ethylhexyl) phthalate by lipases. *Biochim Biophys Acta* 1973;306(3):380-390.

Albro PW, Tondeur I, Marbury D, Jordan S, Schroeder J, et al. Polar metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1983;760(2):283-292.

Arcadi FA, Costa C, Imperatore C, Marchese A, Rapisarda A, et al. Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the Long-Evans rat. *Food Chem Toxicol* 1998;36(11):963-970.

Blazak WF, Ernst TL, Stewart BE. Potential indicators of reproductive toxicity: Testicular sperm production and epididymal sperm number, transit time, and motility in Fischer 344 rats. *Fundam Appl Toxicol* 1985;5(6 pt 1):1097-1102.

Colon I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect* 2000;108(9):895-900.

Curto KA, Thomas JA. Comparative effects of diethylhexyl phthalate or monoethylhexyl phtha-

- late on male mouse and rat reproductive organs. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982;62(1) :121-125.
- Dalgaard M, Nellemann C, Lam HR, Sorensen IK, Ladefoged O. The acute effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes of prep-ubertal Wistar rats. *Toxicol Lett* 2001;122(1) :69-79.
- Daniel JW, Bratt H. The absorption, metabolism and tissue distribution of di(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicology* 1974;2(1) :51-65.
- David RM, Moore MR, Cifone MA, Finney DC, Guest D. Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di(2-ethylhexyl)phthalate and the effects of recovery. *Toxicol Sci* 1999;50(2) :195-205.
- Dostal LA, Chapin RE, Stefanski SA, Harris MW, Schwetz BA. Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl)phthalate and the recovery of fertility as adults. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988;95(1) :104-121.
- Faouzi MA, Khalfi F, Dine T, Luyckx M, Brunet C, et al. Stability, compatibility and plasticizer extraction of quinine injection added to infusion solutions and stored in polyvinyl chloride (PVC) containers. *J Pharm Biomed Anal* 1999;21(5) :923-930.
- Gray TJ, Beamand JA. Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells. *Food Chem Toxicol* 1984;22(2) :123-131.
- Gray TJ, Beamand JA, Lake BG, Foster JR, Gangolli SD. Peroxisome proliferation in cultured rat hepatocytes produced by clofibrate and phthalate ester metabolites. *Toxicol Lett* 1982;10(2-3) :273-279.
- Gray TJ, Butterworth KR. Testicular atrophy produced by phthalate esters. *Arch Toxicol Suppl* 1980;4:452-455.
- Gray TJ, Butterworth KR, Gaunt IF, Grasso GP, Gangolli SD. Short-term toxicity study of di(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Food Cosmet Toxicol* 1977;15(5) :389-399.
- Ishihara M, Itoh M, Miyamoto K, Suna S, Takeuchi Y, et al. Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. *Int J Androl* 2000;23(2) :85-94.
- Jayaraman S, Kumar KR, Rao MV. Di-2-ethylhexylphthalate induced peroxidative stress in rat liver. *Bull Environ Contam Toxicol* 1988;41(3) :360-364.
- Kluwe WM, Haseman JK, Douglas JF, Huff JE. The carcinogenicity of dietary di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *J Toxicol Environ Health* 1982;10(4-5) :757-815.
- Lake BG, Brantom PG, Gangolli SD, Butterworth KR, Grasso P, et al. The hepatic effects of orally administered di-(2-ethylhexyl) phthalate in the ferret. *Biochem Soc Trans* 1977;5(1) :310-311.
- Lake BG, Gangolli SD, Grasso P, Lloyd AG. Studies on the hepatic effects of orally administered di-(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975;32(2) :355-367.
- Lamb JC, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR. Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;88(2) :255-269.
- Latini G. Potential hazards of exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate in babies. *Biol Neonate* 2000;78(4) :269-276.
- Moore RW, Rudy TA, Lin TM, Ko K, Peterson RE. Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect* 2001;109(3) :229-237.
- Moss EJ, Cook MW, Thomas LV, Gray TJ. The effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate and other phthalate esters on lactate production by Sertoli cells in vitro. *Toxicol Lett* 1988;40(1) :77-84.
- Mylchreest E, Cattley RC, Foster PM. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl) phthalate: An antiandrogenic mechanism? *Toxicol Sci* 1998;43(1) :47-60.
- National Toxicology Program. Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. CERHR Evaluation of Di(2-ethylhexyl) Phthalate, Intermediate Draft, June 15, 2000. Available: http://cerhr.niehs.nih.gov/news/Draft_Dehp_6_16.pdf.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric

- acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95(2):351-358.
- Oishi S. Reversibility of testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Environ Res* 1985;36(1) :160-169.
- Oishi S. Testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl)phthalate: changes in histology, cell specific enzyme activities and zinc concentrations in rat testis. *Arch Toxicol* 1986;59(4) :290-295.
- Oishi S. Enhancing effects of luteinizing hormone-releasing hormone on testicular damage induced by di-(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicol Lett* 1989a;47(3) :271-277.
- Oishi S. Effects of co-administration of di(2-ethylhexyl)phthalate and testosterone on several parameters in the testis and pharmacokinetics of its mono-de-esterified metabolite. *Arch Toxicol* 1989b;63(4) :289-295.
- Oishi S. Strain differences in susceptibility to di-2-ethylhexyl phthalate-induced testicular atrophy in mice. *Toxicol Lett* 1993;66(1) :47-52.
- Oishi S. Prevention of di(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy in rats by co-administration of the vitamin B12 derivative adenosylcobalamin. *Arch Environ Contam Toxicol* 1994;26(4) :497-503.
- Oishi S, Hiraga K. Effects of phthalic acid monoesters on mouse testes. *Toxicol Lett* 1980;6(4-5) :239-242.
- Parmar D, Srivastava SP, Seth PK. Effect of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on spermatogenesis in adult rats. *Toxicology* 1986;42(1) :47-55.
- Parmar D, Srivastava SP, Singh GB, Seth PK. Effect of testosterone on the testicular atrophy caused by di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Toxicol Lett* 1987;36(3) :297-308.
- Parmar D, Srivastava SP, Singh GB, Seth PK. Testicular toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in developing rats. *Vet Hum Toxicol* 1995;37(4) :310-313.
- Rao MS, Yeldandi AV, Subbarao V. Quantitative analysis of hepatocellular lesions induced by di(2-ethylhexyl)phthalate in F-344 rats. *J Toxicol Environ Health* 1990;30(2) :85-89.
- Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 1978;54(1) :103-107.
- Rowland IR, Cottrell RC, Phillips JC. Hydrolysis of phthalate esters by the gastro-intestinal contents of the rat. *Food Cosmet Toxicol* 1977;15(1) :17-21.
- Santhosh A, Nair KG, Arun P, Deepadevi KV, Manojkumar V, et al. Effect of DEHP [di-(2-ethylhexyl) phthalate] on lipid peroxidation in liver in rats and in primary cultures of rat hepatocytes. *Indian J Med Res* 1998;108:17-23.
- Shaffer CB, Carpenter CP, Smyth Jr HF. Acute and subacute toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate with note upon its metabolism. *J Ind Hyg Toxicol* 1945;27:130-135.
- Siddiqui A, Srivastava SP. Effect of di(2-ethylhexyl)phthalate administration on rat sperm count and on sperm metabolic enzymes. *Bull Environ Contam Toxicol* 1992;48(1) :115-119.
- Sjoberg P, Bondesson U, Gray TJ, Ploen L. Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate and five of its metabolites on rat testis in vivo and in vitro. *Acta Pharmacol Toxicol* 1986a;58(3) :225-233.
- Sjoberg P, Bondesson U, Kjellen L, Linqvist NG, Montin G, et al. Kinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and effect on testis. *Acta Pharmacol Toxicol* 1985;56(1) :30-37.
- Sjoberg P, Lindquist NG, Ploen L. Age-dependent response of the rat testes to di (2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect* 1986b;65:237-242.
- Suna S, Jitsunari F, Asakawa F, Kitamado T, Ohnishi S, et al. Simplified determination of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) in blood and organs of the rat administered DEHP. *Sangyo Eiseigaku Zasshi*. 2001;43(4) :73-75.
- Tamura H, Iida T, Watanabe T, Suga T. Long-term effects of hypolipidemic peroxisome proliferator administration on hepatic hydrogen peroxide metabolism in rats. *Carcinogenesis* 1990;11(3) :445-450.
- Teirlynck OA, Belpaire F. Disposition of orally administered di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Arch Toxicol* 1985;57(4) :226-230.
- Thomas JA, Thomas MJ. Biological effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and other phthalic acid esters. *Crit Rev Toxicol* 1984;13(4) :283-317.
- Thyssen B, Morris PL, Gatz M, Bloch E. The effect of mono(2-ethylhexyl) phthalate on Sertoli cell transferrin secretion in vitro. *Toxicol*

- Appl Pharmacol 1990;106(1) :154-157.
- Tomaszewski KE, Heindel SW, Jenkins WL, Melnick RL. Induction of peroxisomal acyl CoA oxidase activity and lipid peroxidation in primary rat hepatocyte cultures. Toxicology 1990;65(1-2) :49-60.
- White RD, Carter DE, Earnest D, Mueller J. Absorption and metabolism of three phthalate diesters by the rat small intestine. Food Cosmet Toxicol 1980;18(4) :383-386.