

흰쥐 정자형성과정에 미치는 Di-(2-ethylhexyl)phthalate의 영향

김완중 · 길영천 · 이종화¹ · 신길상

(순천향대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹환경보건학과)

적 요 - 플라스틱 제품의 가소제로 널리 사용되며, 최근 내분비 교란물질로 알려져 있는 di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)를 흰쥐에 15일 동안 구강 투여(1 g/kg/day, 2 g/kg/day, 3 g/kg/day)한 후, 정자형성과정에 연관된 정소의 기능과 구조에 미치는 영향을 조사하였다. DEHP 처리군에서는 대조군에 비하여 체중 증가율이 감소하였을 뿐만 아니라 정소의 무게도 감소하였다. 또한 세정관의 직경이 고농도군으로 갈수록 작아지는 경향을 보였으며 세정관내의 세포층이 감소하는 현상이 나타났다. 미세구조의 변화를 관찰한 결과, 실험군은 세정관내 세포사이 공간이 증가하였으며 정원세포와 정모세포의 수가 감소하였고, 세포질내 공포가 증가하는 것이 관찰되었다. 또한 세정관내 Sertoli 세포의 전체 세포질 양이 감소하는 경향을 보였고, 정원세포의 경우 핵막 이중층이 분리되는 현상을 보였다. 특히 고농도군의 세정관내에서는 Sertoli 세포 이외의 세포는 거의 관찰되지 않았으며, 세포사이 공간과 공포들이 상당히 증가하였다. Sertoli 세포의 핵막은 심하게 함입된 형태를 나타냈으며 이질염색질이 증가하여 염색질의 덩어리를 이루고 있었고, Sertoli 세포들을 지지하는 기저판은 심하게 굴곡된 형태를 보였다. Leydig 세포의 미세구조에 있어서도 실험군은 대조군과 비교하여 현저한 차이를 보였다. 세포질내의 활면소포체와 핵막 이중층이 심하게 팽대되는 경향을 보였으며 핵내에 이질염색질이 상당히 증가하고 세포질내 리소솜이 증가하는 특징을 보였다. 또한 혈청내 테스토스테론 함량에 있어서도 실험군은 현저히 낮은 수치를 나타냈다. 결론적으로, DEHP는 정소의 발달을 농도의존적으로 저해하고, Leydig 세포의 테스토스테론 합성기능을 저해하며, 이어서 세정관내부의 Sertoli 세포의 구조와 기능을 손상시켜 생식세포들의 피사를 유도하는 과정을 통해 일련의 정자형성과정을 억제하는 것으로 사료된다.

서 론

환경호르몬 또는 내분비 교란물질(endocrine disruptor)은 생체의 항상성, 생식 및 발육을 조절하는 호르몬의 합성, 분비, 수송, 수용체와의 결합과 작용, 또는 분해 과정을 방해하는 물질을 일컫는다. 1996년 이후 전 세계적으로 내분비 교란물질에 대한 관심이 고조되기 시작하였으며, 지금까지 유기염소계물질을 비롯하여 프탈레이트, 농약, 스티렌 다이머 및 트리머, 다이옥신, 중금속 등 수십 종의 내분비교란물질들이 알려져 있다. 이러한 물질들은 생체내에서 내분비계에 영향을 주기 때문에 극미량도 이상을 유발할 수 있고, 다음 세대에서도 영향을 미치는 특징을 지니고 있다. 특히, 내분비 교란물질들은 대부분 잔류성이 높아 생태계의 먹이사슬을 통해 동물이나 사람의 체내에 축적되어 생식기능의 저하와 기형 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 최근에 내분비 교란물질 중의 하나로 인정된 di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)는 플라스틱 제품들에 유연성을 제공해 주기 위한 가소제로서 1930년대부터 사용되어져 왔으며, 전체 가소제의 1/4을 차지할 정도로 광범위하게 사용되고 있고 유제품이나 주방기구 또는 도료 등에도 포함되어 있으므로 인체에 노출될 가능성이 매우 높은 화합물이다(Karle *et al.* 1997).

DEHP는 척추동물들에서 생식소 및 부속선의 구조와 기능에 영향을 주며, 임신된 흰쥐에서 태아의 성장을 지연시키고, 기형을 유발하거나 간 무게를 비정상적으로 증가시키는 결과를 초래하는 것으로 알려져 있다(Tomita *et al.* 1982; Goldman *et al.* 1990). 또한 DEHP는 일부 설치류의 간세포내에서 피옥시좀의 증식을 일으키고, 미토콘드리아내 효소들의 활성을 감소시키며, 심한 경우 간암의 발병률을 증가시킨다는 보고도 있다(Srivastava *et al.* 1978, 1989; Richmond *et al.* 1996; James *et al.* 1998). 이 외에도 흰쥐에 DEHP를 투여한 결과, 간에서 glucose-6-phosphate dehydrogenase, phosphorylase, 그리고 glucose-6-phosphatase의 활성을 감소시켰으므로 간세포

포내에서의 글리코젠 대사과정에 변화를 일으키는 것으로 밝혀졌다(Mushtaq *et al.* 1980; Muhlenkamp & Gill, 1998). DEHP는 특히 포유동물들의 웅성 생식기관에 강한 독성작용을 나타내는 것으로 알려져 있는데, 흰쥐를 이 화합물에 노출시킨 경우, 부고환내 정자의 수가 감소하였고, gamma-glutamyl transpeptidase와 lactate dehydrogenase, 그리고 beta-glucuronidase의 활성이 증가하였으나, acid phosphatase의 활성은 감소하는 등, 효소활성을 크게 변화시켰다(Mattison *et al.* 1990). 또한 DEHP는 정소내 아연(zinc)의 결핍을 야기하는 것으로도 알려져 있는데, 이러한 결과로 미루어 볼 때 정소내 몇몇 효소들의 활성도 변화는 체내 필수 금속원소인 아연의 결핍에 의해 초래되는 것으로 생각되며, 정상적인 정자형성과정의 억제도 수반되는 것으로 알려져 있다(Thomas *et al.* 1982). 또한 DEHP는 효소의 활성도 뿐만 아니라 정소의 퇴축(atrophy)을 유발하며, 이러한 현상은 테스토스테론을 인위적으로 투여함으로써 막을 수 있다는 주장이 있다. 이러한 결과는 이 화합물이 정소내 테스토스테론의 합성을 억제함으로써 앞에서 언급된 일련의 변화가 초래됨을 암시한다(Parmar *et al.* 1987). 이상과 같이 DEHP의 독성에 관한 연구는 수종 효소의 에너지 대사에 관련된 내용에 관하여 주로 연구되어져 왔고, 일부 정자의 생성에 미치는 영향이 부분적으로 조사되었으나, 현재까지 성숙중인 흰쥐를 대상으로 DEHP를 반복 투여하여 정소의 구조와 내분비기능 또는 정자형성과정과 관련된 여러 세포들의 미세구조에 미치는 영향을 조사한 바는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 내분비 교란물질인 DEHP가 정자형성과정에 미치는 형태 및 기능적인 영향을 확인하기 위해서, DEHP를 흰쥐의 구강에 반복투여한 후, DEHP에 의한 정소의 변화양상은 물론 혈액내 테스토스테론의 함량과 정소내 Sertoli 세포, Leydig 세포 및 분화중인 생식세포들의 미세구조적 변화를 관찰함으로써, 성숙한 정소의 기능적·형태적 변화를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 약물처리

본 실험에 사용된 실험동물은 Sprague-Dawley 계통의 웅성 흰쥐(생후 30일 전후, 체중 95g 내외)로서, 동물실험실내에서 물과 사료를 정상적으로 공급하면서 투약하였다. 투약은 다양한 농도의 di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP, Sigma, LD₅₀: 30 g/kg)를 corn oil에 용해하여 구강으로 삼관투여하였다. 대조군은 처리하지 않은 정상대조군과 동량의 corn oil만을 투여한 실험대조군을

설정하여 비교하였으며, 실험군들은 DEHP를 1 g/kg, 2 g/kg 그리고 3 g/kg을 각각 corn oil 0.5 ml에 용해하여 매일 1회씩 15일 동안 구강으로 투여하였고, 최종 투여일 24시간 후에, 체중을 측정하고, 희생시켜 정소를 적출하고 무게를 측정하였다.

2. 광학 및 전자현미경 표본제작

적출된 정소는 인산완충액(0.1 M, pH 7.2)으로 조정된 4% glutaraldehyde 용액으로 전고정하였다. 광학현미경 표본은 탈수와 파라핀 포매과정을 거쳐 절편을 제작한 후 hematoxylin과 eosin으로 이중염색하여 광학현미경 하에서 세정관의 직경을 측정하고, 조직학적 변화를 관찰하였다. DEHP에 의한 정소의 미세구조 변화를 관찰하기 위해, 4% glutaraldehyde 용액으로 고정된 시료를 1% OsO₄ 용액으로 후고정하여 알코올 농도 상승순으로 탈수하고, epon 혼합액에 포매하였다. Epon 블록을 70-90 nm의 두께로 초박절편한 후, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(JEM-1010)으로 80 kV하에서 검경하였다.

3. Testosterone 함량 측정

대조군 및 실험군 흰쥐를 마취시킨 후 배대정맥으로부터 채혈하였으며, 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액의 혈청을 시료로 사용하였다. Anti-testosterone coated tube와 ¹²⁵I total testosterone을 포함하는 kit (Diagnostic Products 사)를 이용한 RIA (radioimmunoassay)법을 적용하여 γ -계수기로 측정하였다.

결과 및 고찰

DEHP 투여 이전과 15일간 투여한 후의 흰쥐 체중을 측정한 결과, 정상 및 실험대조군의 경우 투여 전에 비하여 80g 내외의 체중이 증가되어 정상적으로 성장한 것을 알 수 있었다. 실험군의 체중 증가가 대조군과 비교하여 상당히 낮게 나타났으며, DEHP 투여농도가 높아질수록 체중의 증가가 둔화되었고, 3g/kg을 투여한 경우, 오히려 체중이 감소하는 현상을 보였다. 이러한 체중 감소의 요인은 지속적인 구강투여로 인한 스트레스나 용매인 corn oil의 영향이 아니라, DEHP의 대사장애 효과 때문인 것으로 보여진다(Table 1).

대조군과 실험군의 정소무게를 측정한 결과, DEHP를 고농도로 투여할수록 정소의 크기가 대조군에 비해 상대적으로 작아지는 것을 육안으로도 확인할 수 있었으며, 정소의 무게 또는 체중에 대한 정소무게의 비율도 대조군에 비해 훨씬 낮게 나타나는 경향을 보였다

Table 1. Changes in body weights of rats treated with DEHP

Group	Body weight (g)		
	Initial	Final	15 day's weight increase
Control	91.00±4.00a	170.65±7.85	79.65±11.85
1g/kg DEHP	98.00±3.39	154.63±16.35	56.63±13.20
2g/kg DEHP	92.00±5.00	116.2±14.60	24.2±9.60
3g/kg DEHP	97.67±1.25	88.30±12.67	-9.37±11.44

a Mean±S.D.

Table 2. Changes in testis weights of rats treated with DEHP

Group	Testis weight	
	g	% of body weight
Control	1.08±0.01a	0.63±0.03
1g/kg DEHP	0.45±0.14	0.28±0.07
2g/kg DEHP	0.19±0.05	0.21±0.01
3g/kg DEHP	0.24±0.04	0.30±0.04

a Mean±S.D.

(Table 2). 또한, 고농도 투여군에서는 정소 크기가 감소할 뿐만 아니라 부고환과의 인접부위에 울혈 (congestion)이 나타나는 특징을 보였는데, 이러한 현상은 DEHP가 정맥혈관의 협착이나 폐쇄를 일으켜 나타난 순환장애의 결과로 생각된다 (Parmar *et al.* 1987).

DEHP에 의한 정소의 조직학적 변화를 관찰한 결과, 실험군에서는 세정관 단면의 직경이 대조군에 비해 매우 작아지는 경향을 나타냈다 (Table 3). 또한 세정관내의 세포층수에 있어서도 대조군의 경우 Sertoli 세포와 생식세포들이 4~8개의 층으로 분포하고 있으나, 실험군에서는 세정관내의 세포층수가 현저히 감소하였으며 고농도 처리군에서는 2~3개의 세포층만으로 형성되어 있었다. 이러한 결과는 세정관 직경의 변화와 비교되는 결과이며, DEHP가 세정관이 발달하는 시기에 테스토스테론의 합성을 억제하고, 이로 인해 Sertoli 세포의 증식과 분화를 억제하였기 때문인 것으로 판단된다 (Thomas *et al.* 1982).

대조군에서는 Sertoli 세포와 생식세포사이에 세포간 공간이 거의 없이 치밀하게 분포하고 있었으나, 실험군에서는 세포간 공간이 확장되고 비교적 커다란 공포 (vacuole)들이 형성되어 있는 것이 관찰되었다. 이러한 공포들은 Sertoli 세포들의 분화가 저해됨으로써 생식세포의 발달을 촉진하지 못하여 나타나는 결과로 생각된다. 한편, DEHP 1g을 투여한 실험군의 정소 단면을 관찰한 결과, 세정관의 발달정도나 크기 및 세정관내 세포

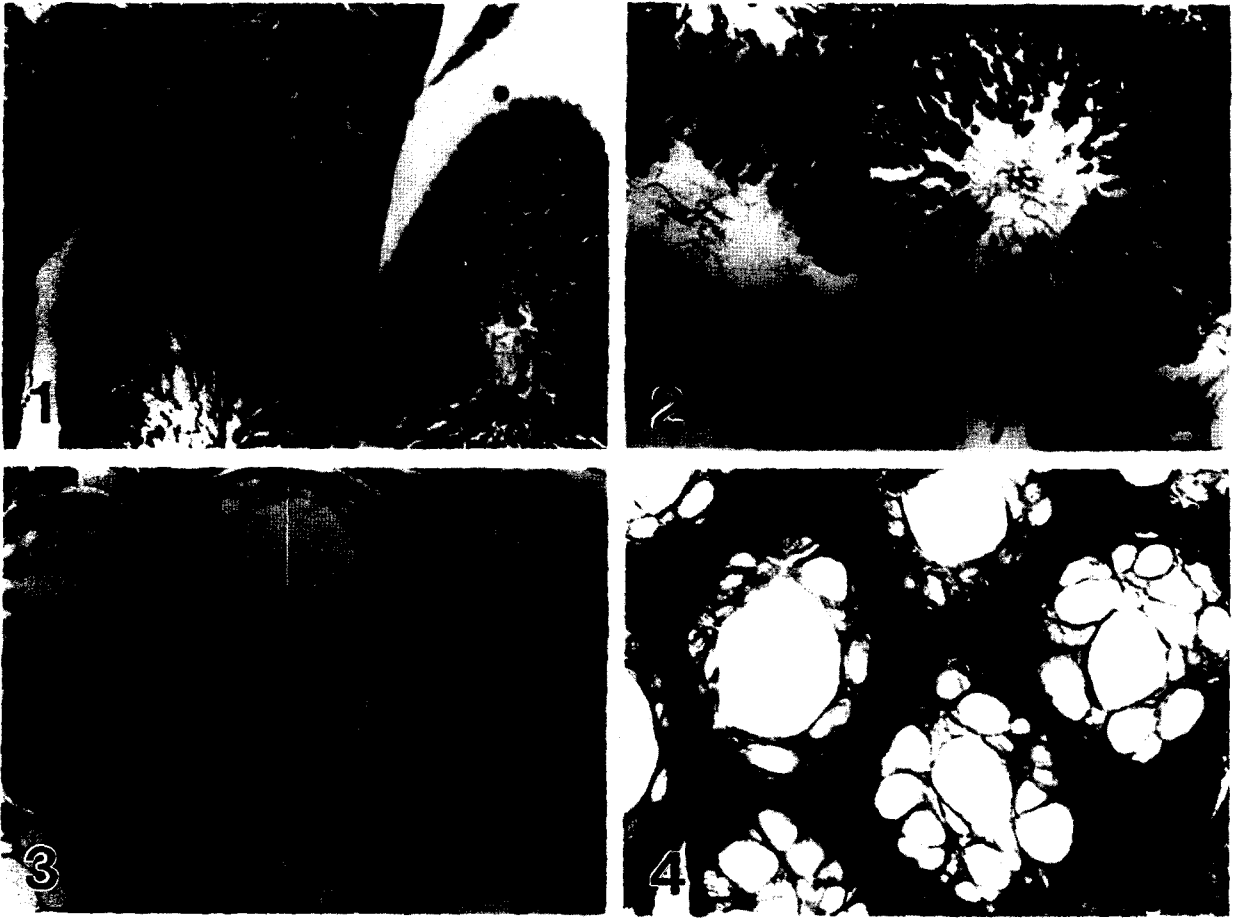
Table 3. Diameters of seminiferous tubule of rats treated with DEHP

Group	Diameter (μm)	Relative Length (%)
Control	180.5±5.19a	100.0
1g/kg DEHP	151.8±8.71	84.1
2g/kg DEHP	129.7±10.10	71.9
3g/kg DEHP	118.3±12.83	65.5

a Mean±S.D.

들의 분포양상은 부위에 따라 상당한 차이를 보였다. 세정관 직경이 비교적 크고 발달한 부분들에서는 내부에 생식세포와 Sertoli 세포들이 다수 분포하고 있었으나, 그 이외의 부분들에서는 세정관 내부에 생식세포들이 거의 존재하지 않았으며, 고농도 실험군에서 관찰되었던 커다란 공포들이 상당수 존재하고 있는 모습도 종종 관찰할 수 있었다. 또한, 고농도 실험군으로 갈수록 세포들의 손상과 괴사현상이 더욱 심하게 나타나는 것으로 보아, 투여된 DEHP의 농도에 따라 변화가 더욱 뚜렷하게 나타나는 것을 알 수 있었다 (Figs. 1, 2, 3, 4).

DEHP는 간이나 정소와 같은 일부 기관들에 독성작용을 나타내는 물질로 알려져 있으나, 아직까지 성숙중인 흰쥐 정소에서 DEHP에 의한 변화를 정소의 기능과 관련된 세포들 및 세포소기관들을 중심으로 하여 미세구조적 측면에서 연구된 바는 거의 없는 실정이다. 따라서, 본 실험에서는 성숙중인 흰쥐 정소의 기능에 중요한 역할을 하는 체세포들과 생식세포들의 미세구조 및 기능에 미치는 DEHP의 영향을 알아보고자 하였다. 대조군의 경우, 테스토스테론 합성세포인 Leydig 세포가 세정관 사이의 모세혈관과 인접하여 분포하는 경향을 보였으며 짧은 미세융모들을 세포유리면에 갖고 있었다. 또한 이들 세포는 진염색질과 이질염색질이 고르게 분포하고 있는 구형의 핵을 포함하고 있었고, 세포질내에서는 관상의 크리스테를 갖는 구형 혹은 난형의 미토콘드리아와 지방적들이 다수 분포하고 있었다. 특히, 활면소포체가 조밀하게 발달하고 있는 것이 관찰되었으며 이러한 미세구조적 특징은 이들 세포가 테스토스테론을 효율적으로 합성하기 위해 분화된 구조들로 생각된다 (Cross & Mercer, 1993). 한편, 세정관내에서 정자형성과정을 조절하는 체세포인 Sertoli 세포의 기저부는 세정관벽에 부착하고 정단부는 세정관의 강소쪽으로 길게 분포하고 있었으며, 정단부와 기저부 사이의 세포질은 생식세포들을 완전히 둘러싼 형태를 취하고 있었다. 또한 세포의 핵은 난형이었고, 진염색질이 핵질의 대부분을 차지하며, 인 (nucleolus)도 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. 세포질에서는 관상의 크리스테를 갖는 미토콘드리아

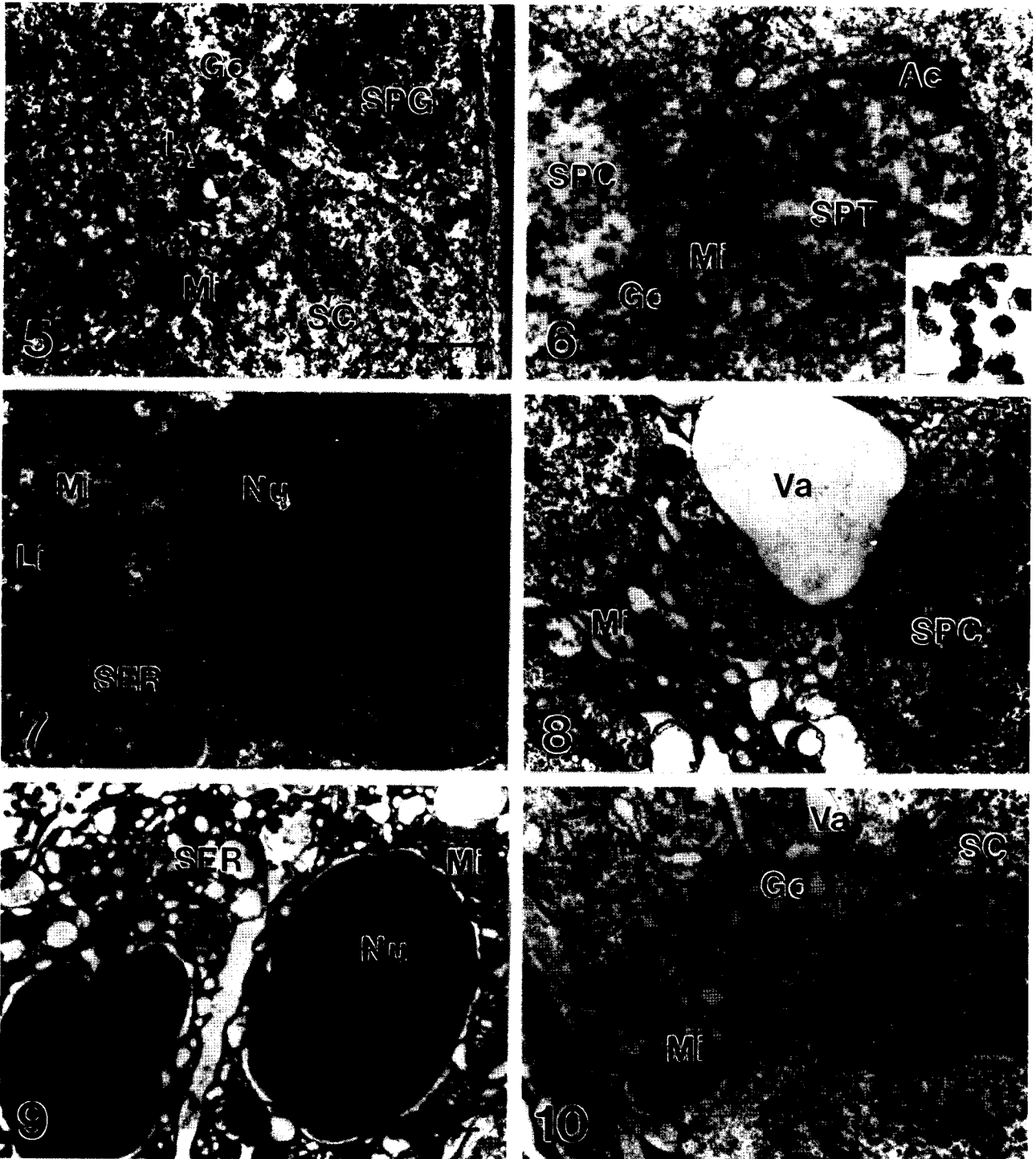


Figs. 1-4. Light micrographs of rat testes. H-E stain. $\times 200$.

Cross sectioned seminiferous tubules of control (1), and experimental groups treated with 1.0 g/kg (2), 2.0 g/kg (3), and 3.0 g/kg (4), respectively. Note the decrease of diameters and the vacuolized appearances in the tubules of experimental groups.

를 다수 볼 수 있었으며 조면소포체, 골지체 그리고 리소솜이 발달되어 있었다. Sertoli 세포는 다른 세포들과의 연결장치가 잘 발달하고 있었으며, 이는 혈관에서 생식세포로의 직접적인 물질이동을 차단하고 생식세포의 분화가 완전히 이루어 질 때까지 지지력을 제공해 주기 위한 구조로 생각된다. 전체적인 세정관내 세포의 분포를 보면 정원세포와 Sertoli 세포들이 세정관 벽을 따라 기저부에 분포하고 있었으며 세정관의 내강쪽을 향해 1차 및 2차 정모세포, 정세포 혹은 정자들이 순차적으로 분포하는 양상을 나타냈다. 분화 초기에 있는 정세포들은 골지체가 핵에 인접하여 발달하고 핵막의 외측에는 골지체로부터 만들어진 침체과립들이 모여 침체를 형성하기 시작하고 있었다. 또한 미세소관으로 구성된 9+2 구조의 편모가 서서히 형성되기 시작하고 미토콘드리아는 세포막 주변과 형성중인 정자꼬리의 주변에 많이 분포하는 양상을 보였다. 성숙한 정자는 고도로 응축된 핵

과 그 앞부분에 완전한 형태의 침체를 가지는 머리부분, 편모를 중심으로 그 주위에 미토콘드리아들이 둘러싸고 있는 정자꼬리 중편, 그리고 편모로만 구성된 단편으로 이루어져 있었으며 Sertoli 세포의 세포질로 둘러싸여 존재하고 있었다. 이 밖에도 세정관 내강쪽에는 정자들이 빠져나간 후 남은 세포질 부위가 Sertoli 세포에 의해 분해되고 있는 잔사체가 관찰되었다(Figs. 5, 6). 한편, DEHP를 투여한 실험군의 정소에서 각 세포들의 미세구조는 대조군에서 나타나는 특징들과 뚜렷한 차이를 나타냈다. 1g을 투여한 실험군의 경우 광학현미경상에서 관찰되어진 비교적 잘 발달되고 손상의 정도가 약한 부위를 관찰해 본 결과, 세정관 내의 세포들의 종류 및 그 분포에 있어서 대조군과 비교할 때 아주 커다란 차이는 볼 수 없었으나, 대조군에서는 세정관 벽을 따라 존재하던 정원세포와 정모세포의 수가 점차 감소하는 경향을 보였으며, Sertoli 세포와 생식세포사이의 세포간



Figs. 5-10. Electron micrographs of rat testes. Scale bar on each figure represents 2 μm . (5) Sertoli cell (SC) and spermatogonium (SPG) of control group. (6) Spermatid (SPT) and cross sectioned sperm tails (in inlet) of control group. (7) Leydig cell of 1g/kg treated group. (8) Spermatocyte (SPC) of 1g/kg treated group. (9) Leydig cell of 2 g/kg treated group. (10) Sertoli cell (SC) of 2 g/kg treated group. Note the swellings of smooth endoplasmic reticulum (SER) and perinuclear space, and the irregular outlines of basal lamina (arrowheads) and nuclear envelope in most experimental groups. Ac: acrosome, Go: Golgi complex, Li: lipid droplet, Ly: lysosome, Mi: mitochondrion, Nu: nucleus, Va: vacuole, arrow: clumped chromatin

Table 4. Concentrations of testosterone in rat serum treated with DEHP

Group	Testosterone (ng/ml)	Relative Conc. (%)
Control	1.60	100
1 g/kg DEHP	0.56	35
2 g/kg DEHP	0.13	8
3 g/kg DEHP	0.03	2

공간이 크게 증가하고 세포질 내부에 공포들이 다수 존재하는 것이 관찰되었다. 이는 정상대조군의 Sertoli 세포와 생식세포들이 연결 장치들에 의해 서로 치밀하게 부착되어 있는 것과는 상반된 결과이다. 이 밖에도 Sertoli 세포내에 지방적들이 대조군에 비해 증가하였으며, Sertoli 세포의 세포질의 양이 감소하고, 정원세포의 핵막 2중층이 분리되는 현상을 보였다. 한편, 고농도 투여군의 경우는 미세구조적 변화가 크게 나타났다. 즉, 세정관 내부에서 Sertoli 세포 이외의 세포는 거의 관찰되지 않았으며, 세포와 세포사이의 공간은 커다란 공포들이 존재하고 있었다. 또한 Sertoli 세포의 핵은 핵막이 심하게 함입되어 있었으며 이질염색질이 상당량 증가하여 염색질의 덩어리(clump)를 이루고 있었고, Sertoli 세포들을 지지하는 기저판(basal lamina)은 심하게 굴곡된 형태를 나타냈다. 고농도 투여군으로 갈수록 세포들의 미세구조적 변화 및 세포의 손상 또는 괴사의 정도가 뚜렷해지는 것으로 보아, 이러한 일련의 미세구조적 변화들도 DEHP의 투여 농도에 의존적인 것으로 생각된다. 세정관 내부의 세포 미세구조적 형태 뿐만 아니라 간질조직에 있는 Leydig 세포들의 미세구조 또한 DEHP를 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 상당한 차이를 보였다. 대조군에서 모세혈관을 중심으로 분포하고 있던 이 세포들은 실험군에서는 간질조직 대부분을 차지할 정도로 상당수가 증식하여 있었고 그 미세구조에 있어서도 핵막 2중층이 분리되고 핵내 이질염색질의 양이 대조군에 비해 증가하였으며 세포질내 활면소포체의 내강이 크게 팽대되는 현상을 보였다(Figs. 7, 8, 9, 10). 이러한 Leydig 세포의 미세구조적 형태 변화는 정소내 정자형성과정에 커다란 영향을 미치는 테스토스테론의 합성 및 분비 기능과도 연관이 있을 것으로 판단되어, 혈청내 테스토스테론의 농도를 측정된 결과 DEHP를 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 혈청내 테스토스테론의 함량이 크게 감소한 것으로 나타났다(Table 4).

이러한 결과는 DEHP의 투여가 Leydig 세포의 미세구조들을 변화시키고 손상시키기 때문에 이 세포들의

기능부전을 초래하였으며 결과적으로 테스토스테론의 합성, 분비 기능을 억제하여 혈청내 테스토스테론의 함량을 감소시켰음을 암시한다. 또한 간질조직내 Leydig 세포의 수가 고농도 실험군으로 갈수록 증가하는 경향을 보이는 것은 혈청내 테스토스테론의 함량 감소로 인한 반응으로서 Leydig 세포의 증식이 유도된 것으로 생각된다. 앞에서 언급된 세정관내 Sertoli 세포의 형태학적 변화 또한 테스토스테론의 함량저하에 의해 기인된 것으로 생각되며, 이러한 Sertoli 세포의 형태적 변화는 이들 세포에 의해 외부환경으로부터 보호받는 생식세포의 괴사 및 미세구조적 변화를 유발함으로써 정자형성과정을 억제하는 것으로 생각된다(Li *et al.* 1989; Gray *et al.* 1995; Murakami *et al.* 1995; Guillette *et al.* 1996; Jobling *et al.* 1996). 이러한 결론은 DEHP에 의한 정소의 퇴축현상을 테스토스테론을 동시에 투여함으로써 완화시킬 수 있다는 보고(Parmar *et al.* 1987)와, DEHP가 에스트로겐 수용체에 결합하여, 에스트로겐의 효과를 과잉으로 나타내도록 한다는 보고들(Zacharewski *et al.* 1998; Makoto *et al.* 1999)로써 뒷받침될 수 있다. 한편, Sertoli 세포에 독성효과를 보이는 물질이 생식세포들의 사멸(apoptosis)을 유도하고, 이 화합물이 배양중인 Sertoli 세포와 생식세포간의 물리적인 접촉을 방해함으로써 정자형성과정을 억제한다는 보고들(Richburg & Boekelheide, 1996; Lee *et al.* 1997)과도 비교되는 결과이다.

DEHP가 동물체내의 어떤 특정한 세포에만 작용하여 효과가 나타나는 것인지, 아니면 대부분의 세포에 독성효과를 나타내는 것인지에 대해서는 아직 논의의 여지가 있다. 또한 이 화합물은 지질 용해성을 지니고 있어 체지방에 쉽게 축적되고, 난분해성 특징으로 체내에 장기간 축적될 수 있으므로 체내에 소량으로 존재할 경우에는 심각한 문제가 되지 않으나 먹이사슬을 통해 체내에 농축되는 경우에는 이상이 발생할 수 있으며, 다음 세대에도 악영향이 나타날 수 있다는 점에 심각성이 있다. 이상의 결과들로 정자형성과정이 방해받는 기전은 DEHP에 의해 Leydig 세포가 손상되고, 기능 부전이 나타나 테스토스테론의 분비가 감소하고, 이어서 Sertoli 세포가 손상되고 생식세포의 분화가 저해되는 것으로 생각된다. 이상과 같이 DEHP는 정소의 발육과정에서 미세구조적인 변화를 일으키고, 정소의 내분비 기능과 정자형성과정을 억제하는 것으로 판단되며, 이 화합물의 표적세포 또는 작용기전 등에 관해서는 더욱 깊이 있게 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 1999년도 순천향대학교 연구비 지원으로 이루어졌음.

참 고 문 헌

- Cross PC & KL Mercer (1993) Cell and Tissue Ultrastructure. pp. 336-350. Freeman, New York.
- Goldman JM, RL Cooper, SC Laws, GL Rehnberg, TL Edwards, WK McElroy & JF Hein (1990) Chlordimeform-induced alterations in endocrine regulation within the male rat reproductive system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **104** : 25-35.
- Gray LE, WR Kelce, E monosson, JS Ostby & LS Birnbaum (1995) Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male long evans rat and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weight in offspring with normal androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **131** : 108-118.
- Guillette LJ, DB Pickford, DA Crain, AA Rooney & HF Percival (1996) Reduction in penis size and plasma testosterone concentration in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen. Comp. Endocrinol.* **101**(1): 32-42.
- James NH, AR Soames & RA Roberts (1998) Suppression of hepatocyte apoptosis and induction of DNA synthesis by the rat and mouse hepatocarcinogen diethylhexylphthalate (DEHP) and the mouse hepatocarcinogen 1,4-dichlorobenzene. *Arch. Toxicol.* **72**(12) : 784-790.
- Jobling S, D Sheahan, JA Osborne, P Matthiessen & JP Sumpter (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**(2) : 194-202.
- Karle VA, BL Short, GR Martin, DI Bulas, PR Getson, NLC Luban, AM O'Brien & RJ Rubin (1997) Extracorporeal membrane oxygenation exposes infants to the plasticizer, di (2-ethylhexyl)phthalate. *Crit. Care. Med.* **25**(4) : 696-703.
- Lee JW, JH Richburg, SC Younkin & K Boekelheide (1997) The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* **138**(5) : 2081-2088.
- Li LH, WF Jester & JM Orth (1998) Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **153**(2) : 258-265.
- Makoto N, T Yukiko, A Daisuke, Y Yoshikuni, S Teruo, N Masato, T Mineo & S Yasuyuki (1999) Binding characteristics of dialkyl phthalates for the estrogen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**(2) : 311-314.
- Mattison DR, DR Plowchalk, MJ Meadows, AZ Al-Juburi, J Gandy & A Malek (1990) Reproductive toxicity: Male and female reproductive systems as targets for chemical injury. *Med. Clin. Nor. Am.* **74**(2) : 391-411.
- Muhlenkamp CR & SS Gill (1998) A glucose-regulated protein, GRP58, is down-regulated in C57B6 mouse liver after diethylhexyl phthalate exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **148**(1) : 101-108.
- Murakami M, S Hosokawa, T Yamada, M Harakawa, M Ito, Y Koyama, J Kimura, A Yoshitake & H Yamada (1995) Species-specific mechanism in rat Leydig cell tumorigenesis by procymidone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **131** : 244-252.
- Mushtaq M, SP Srivastava & PK Seth (1980) Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on glycogen metabolism in rat liver. *Toxicology* **16**(2) : 153-161.
- Parmar D, SP Srivastava, GB Singh & PK Seth (1987) Effect of testosterone on the testicular atrophy caused by di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Toxicol. Lett.* **36**(3) : 297-308.
- Richburg JH & K Boekelheide (1996) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **137** : 42-50.
- Richmond RE, JH Carter, HW Carter, FB Daniel & AB Deangelo (1996) Hepatocyte expression of tumor associated aldehyde dehydrogenase (ALDH-3) and p21 Ras following diethylnitrosamine (DEN) initiation and chronic exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Carcinogenesis* **17**(8) : 1647-1655.
- Srivastava S, VK Awasthi, SP Srivastava & PK Seth (1989) Biochemical alterations in rat fetal liver following in utero exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Indian. J. Exp. Biol.* **27**(10) : 885-888.
- Srivastava SP, DK Agarwal, M Mushtaq & PK Seth (1978) Effect of Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on chemical constituents and enzymatic activity of rat liver. *Toxicology* **11**(3) : 271-275.
- Thomas JA, KA Curto & MJ Thomas (1982) MEHP/DEHP: Gonadal toxicity and effects on rodent accessory sex organs. *Environ. Health. Perspect.* **45** : 85-88.
- Tomita I, Y Nakamura, Y Yagi & K Tutikawa (1982) Teratogenicity/fetotoxicity of DEHP in mice. *Environ. Health. Perspect.* **45** : 71-75.
- Zacharewski TR, MD Meek, JH Clemons, ZF Wu, MR Fielden & JB Matthews (1998) Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.* **46**(2) : 282-293.

Effect of Di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP) on Spermatogenesis in Rat Testes

Wan Jong Kim, Young Chun Kil, Jong Hwa Lee¹ and Kil Sang Shin

(Department of Life Science, ¹Department of Environmental Health Science, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Choongnam, 336-745, Korea)

Abstract - Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is a plasticizer known as one of endocrine disruptors. The present study was carried out to investigate the alterations of function and ultrastructure in rat testes after oral intubation of DEHP in dosages of 1 g/kg/day, 2 g/kg/day or 3 g/kg/day in 0.5 ml of corn oil for 15 days. DEHP reduced the growth of body and testes, inhibited spermatogenesis and induced structural changes on various cell types of the rat testis. Leydig cells, Sertoli cells and the developing germ cells seemed to be impaired their differentiations in terms of the structural changes of cell organelles. The increase of heterochromatin in amount were common features in all 3 cell types. In addition, the Leydig cells were characterized by the swelling of smooth endoplasmic reticulum and perinuclear space, the increases in number and size of lysosomes. The Sertoli cells became irregular in nuclear envelope and the number of lysosomes and vacuoles seemed to be increased. There were some indications of necrosis of the germ cells, such as vacuolized nucleus and segregated nucleolus. And also, DEHP lowered the level of testosterone in experimental rat serum. DEHP suppressed spermatogenesis decreasing developing germ cells and these effects of DEHP on the rat testis were dose dependent. The detrimental effect of DEHP on spermatogenesis and ultrastructure of rat testes seems to be derived from the decreased level of testosterone by Leydig cells, followed by the abnormalities of Sertoli cells and the germ cells. [DEHP, testis, ultrastructure, spermatogenesis].