

미성숙 랫드에 있어서 경구 및 피하투여에 의한 Ethinyl estradiol의 자궁증식효과

정문구* · 임광현 · 김종춘 · 김영희 · 서정은 · 하창수

한국화학연구소 안전성연구센터 생식독성실

Uterotrophic Activity of Ethinyl Estradiol by Gavage and Subcutaneous Administration in Immature Female Rats

Moon-Koo Chung*, Kwang-Hyeon Lim, Jong-Choon Kim, Young-Hee Kim,
Jeong-Eun Suh and Chang-Soo Ha

Reproductive Toxicology Division, Toxicology Research Center, Korea Research Institute of
Chemical Technology, Yousung, Daejeon 305-600, Korea

(Received August 11, 2000)

(Accepted September 6, 2000)

ABSTRACT : In association with the international validation program to establish a rodent uterotrophic assay, we conducted preliminary uterotrophic assay proposed by OECD using immature female rats. In the present study, oral and subcutaneous routes were chosen to compare the effects of estrogenic compounds in the two dosing regimens. The reference compound ethinyl estradiol (EE) and the antagonist ZM189154(ZM) were administered by gavage or subcutaneously (s.c.) to immature female SD rats from 20 to 22 days of age. For each study, sixty-six female rats were randomly assigned to eleven groups: Untreated control, EE 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 and 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, EE 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (gavage)/0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (s.c.) & ZM 0.1 mg/kg, and EE 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (gavage)/0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (s.c.) & ZM 1.0 mg/kg. There were no treatment-related changes in clinical signs, body weights, food consumption, and necropsy findings in any groups of two studies. The wet and blotted uterus weights increased dose-dependently. Histopathological examination revealed that diameter of uterine duct, height of uterine luminal epithelium, and height of vaginal epithelium increased dose-dependently. The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunoreactive cells were increased in number dose-dependently. The estrogenic effects observed in the present studies occurred at $\geq 0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ of oral dose and $\geq 0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ of s.c. dose. An antagonistic effect of ZM against EE was found in both uterus weight and histopathological parameters. From the results obtained, it can be concluded that dose-dependence of the uterotrophic assay using EE and ZM was well demonstrated by gavage and subcutaneous administration and that the estrogenic effects of EE by s.c. dose were higher than those by gavage administration. In addition, blotted uterus weight was more sensitive than wet uterus weight and vaginal epithelial height was found to be the most sensitive parameter among the parameters examined.

Key Words : Endocrine disrupting chemicals, In vivo screening assay, Ethinyl estradiol, Estrogen, Uterus weight, Immature female rat

I. 서 론

1996년 '도둑맞은 미래'(Colborn 등, 1996)라는 책이 출간되어 내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemicals)의 위해성이 세인에게 알려지고, 일본과 국내에서 컵라면

과 젓병에서의 내분비계 장애물질 검출이 보고되면서 내분비계 장애물질 문제는 지구온난화 및 오존층파괴와 더불어 인류가 해결해야할 가장 큰 과제로 부각하고 있다. 특히 환경화학물질에 대한 노출이 내분비계 장애를 유발 시킴으로서 인간의 번식과 발달에 중대한 위협을 야기시킬 수 있다는 우려가 크게 증대되고 있다(Colborn 등, 1993; Sharpe와 Skakkeback, 1993; Toppari 등, 1996). 논란의 대상이 되고 있는 내분비계 장애물질은 생체내 항상성(homeostasis) 유지와 성장, 발육 및 생식기관의 발달 등

*To whom correspondence should be addressed

List of abbreviations : EDCs, endocrine disrupting chemicals; EDTA, Endocrine Disruptor Testing and Assessment; EDSTAC, Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee; EE, ethinyl estradiol; ZM, ZM189154; PCNA, proliferating cell nuclear antigen.

을 조절하는 천연호르몬의 생성, 분비, 이동, 대사, 결합, 작용 또는 배설을 간섭하는 외인성물질로서(Kavlock 등, 1996), 생체내로 유입되면 마치 호르몬과 같이 작용한다고 하여 일명 환경호르몬이라 불리고 있다. 조직의 분화를 조절하는데 있어서 호르몬의 역할은 매우 중대하기 때문에 발달중의 개체는 호르몬 또는 항호르몬 작용을 지닌 화학물질의 노출의 시점 및 강도에 특히 영향을 받기가 쉽다. 내분비계 장애물질은 자연상태에서 잘 분해되지 않고 저농도로 장기간에 걸쳐서 생체에 노출됨으로서 내분비계를 교란시킨다고 한다. 이러한 물질들은 사람이나 야생동물에 있어서 요도하열(hypospadias), 잠복정소(cryptorchidism), 가성반음양(pseudohermaphroditism) 등의 생식기 발육이상과 정자수 감소 및 정자활력 저하 등의 생식기능 이상, 그리고 차세대의 발육이상 등의 생식독성학적 부작용을 초래하고, 정소, 전립선 및 유방의 암발생을 증가시키는 중요한 원인중의 하나로 의심되고 있다(Carlson 등, 1992; Ahlberg 등, 1995; Sharpe 등, 1995; Colborn 등, 1996). 이에 따라 세계 각국의 정부는 그 대책수립에 나서 정부 연구기관, 산업계, 학계, 소비자단체 및 환경보호단체들과 공동으로 해결책 마련에 부심하고 있다. 미국 환경청(US EPA)에서는 1996년 5월 환경호르몬 검색 및 시험자문위원회(Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, EDSTAC)를 설치하였고 내분비계 장애물질로 의심되는 화학물질에 대한 검색 및 시험법을 발표할 예정이다. 일본에서는 1996년 7월부터 후생성과 환경청을 중심으로 내분비계 장애물질에 대한 연구를 추진하고 있으며, 우리 나라에서도 1998년 5월부터 환경부와 식품의약품안전청을 중심으로 대책 및 연구협의회를 구성하여 이 문제를 다루기 시작하였다.

국제기구인 OECD는 1998년 3월 환경호르몬 시험 및 평가 실무작업반(Endocrine Disruptor Testing and Assessment, EDTA)을 구성하여 독성기전연구, 실험동물모델개발, 생체내에서 호르몬 생합성과 대사를 예견할 수 있는 *in vitro* 시험법 개발을 수행해 오고 있다. 특히 내분비계 장애물질 검색법의 확립에 주력하고 있는데, 최근에는 단기 검색법의 일종인 자궁증식법에 대한 검증작업(validation work)을 수행하고 있고, 미국과 일본, 독일, 영국, 한국 등의 19개 독성시험기관에서 이러한 검증시험사업에 참여하고 있다. OECD에서는 자궁증식시험법의 검증작업을 위해 ethinyl estradiol(EE)을 시험물질(reference compound)로 그리고 ZM189154(ZM)를 에스트로젠 길항물질(estrogen antagonist)로 선정하였다. EE는 합성 에스트로젠으로서 경구 피임약으로 널리 사용되고 있고, 임상용량은 5 mg/day, 즉 약 80 µg/kg이다. 그리고 EE는 돌연변이 억제작용을 지니고 있으며 2주간의 반복투여시에는 혈압상승을 유발한다고 한다(Bhatt와 Gulati, 1986; Wilpart 등,

1986; Sumpter, 1998).

본 연구는 OECD에서 제안하는 설치류 자궁증식시험법을 확립하기 위한 국제공동연구의 일환으로 수행하였다. 자궁증식시험에서는 호르몬 영향을 배제하기 위하여 난소를 적출한 랫드를 이용하거나 난소를 적출하지 않은 미성숙 랫드를 이용하는데, 본 시험에서는 난소를 적출하지 않은 미성숙 암컷 랫드를 이용하여 모델물질인 EE의 경구 및 피하투여 자궁증식시험을 수행하였다. 또한 본 시험조건에 의한 용량상관성과 투여경로에 따른 독성효과의 차이 및 ZM의 길항작용을 조사하여 본 시험법이 내분비계 장애물질의 검색에 적합한지를 평가해 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

본 시험에는 Schering Co.(Berlin, Germany)에서 입수한 ethinyl estradiol(EE)과 Zeneca Co.(London, UK)에서 입수한 ZM189154(ZM)를 최소한의 95% ethanol(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 녹인 후 corn oil(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 희석하여 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

한국화학연구소 안전성연구센터 실험동물육종실(대전광역시 유성구 장동 100)에서 구입한 17일령의 암컷 Sprague-Dawley 랫드를 3일간 검역 및 순화를 실시하여 외견상 건강하며 각군당 평균±5 g에 속하는 암컷 132마리를 선별해 경구투여 및 피하투여시험에 사용하였다. 본 시험은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 환기횟수 10~20회/hr., 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 조도 150~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시하였다. 시험기간 중 방사선 조사(25 kGy)로 멸균한 실험동물용 고형사료[제일사료(주), 대전광역시 대덕구 대화동]와 자외선 유수살균기로 소독한 상수도를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

3. 시험군의 구성과 투여량의 설정

시험군의 구성과 용량설정은 Table 1에서 보는 바와 같이 OECD에서 제공한 validation protocol에 준하여 실시하였다(OECD, 1999).

4. 투여방법 및 투여기간

생후 20일령의 암컷동물에게 시험물질 EE와 ZM을 경

Table 1. Experimental design for uterotrophic assay of ethinyl estradiol in rats

군	성별	동물수	동물번호	투여량		투여액량 (ml/kg/day)
				EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ZM (mg/kg)	
Untreated control	Female	6 ^a /6 ^b	1-12	0	0	-
Vehicle control	Female	6/6	13-24	0	0	5
T1	Female	6/6	25-36	0.01	0	5
T2	Female	6/6	37-48	0.03	0	5
T3	Female	6/6	49-60	0.10	0	5
T4	Female	6/6	61-72	0.30	0	5
T5	Female	6/6	73-84	1.00	0	5
T6	Female	6/6	85-96	3.00	0	5
T7	Female	6/6	97-108	10.00	0	5
T8	Female	6/6	109-120	3.0 ^a /0.3 ^b	0.1	5/5
T9	Female	6/6	121-132	3.0 ^a /0.3 ^b	1.0	5/5

a, 경구투여; b, 피하투여.

구투여용 존네가 장착된 주사기를 이용하여 위내로 직접 주입하거나(경구투여시험), 경배부에 피하로(피하투여시험) 1일 1회씩 3일간 반복하여 투여하였다. 단, ZM 투여군은 ZM을 먼저 투여하고 15분 이내에 EE를 투여하였다. 투여액량은 투여개시일에 측정된 체중을 기준으로 하여 kg당 5 ml로 산출하였다.

5. 관찰 및 검사항목

1) 일반증상관찰

투여 전기간에 걸쳐 1일 2회씩 일반증상을 관찰하였다.

2) 체중측정

투여개시전일과 투여기간동안 매일 체중을 측정하였다.

3) 사료섭취량측정

체중측정일에 사료를 급여하고 익일 잔량을 측정하여 익일 섭취량을 계산하였다.

4) 부검 및 자궁중량측정

3일간 반복투여가 끝난 대조군 및 투여군의 동물들을 투여종료후 24시간 이내에 CO₂로 마취시킨 후 부검하였다. 부검시 자궁의 습중량(wet weight)과 자궁 내용물을 제거한 실중량(blotted weight)을 측정하였고, 대조군 및 투여군의 모든 동물에 대해서 질, 자궁 및 난소를 10% 중성 포르말린액에 고정하였다.

5) 병리조직학적 검사

고정된 장기를 이용하여 파라핀 포매, 박절하여 hematoxylin-eosin(H&E) 염색표본을 만든 다음 광학현미경에서 병리조직학적 이상유무를 관찰하였다. 특히 자궁에서는 자궁관의 직경(diameter of uterine duct)과 자궁내막상피세

포의 높이(height of uterine luminal epithelium) 및 자궁선의 수(No. of uterine glands)를 측정하였고, 질에서는 질내막상피세포의 높이(height of vaginal epithelium)를 관찰하였다. 자궁은 추가로 면역조직화학염색법을 이용하여 조직표본을 제작한 후 세포중식 여부를 관찰하였는데, 면역조직화학적 관찰을 위해 항체는 proliferating cell nuclear antigen(PCNA, BioGenex, San Ramon, CA, USA)에 대한 단클론 항체를 이용하였으며, avidin-biotin system(ABC Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)을 이용하여 염색한 후 DAB kit(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)로 발색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

6. 통계학적 분석

얻어진 모든 시험자료는 평균±표준편차로 표기하였고, 통계분석은 SAS 프로그램(1990)을 이용하였다. 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)에서 유의성이 인정된 자료는 Duncan 다중비교법을 이용하여 5% 수준에서 유의차검정을 하였다.

III. 결 과

1. 경구투여 시험성적

1) 일반증상

무처치대조군을 제외한 모든 시험군에서 허약 또는 하복부의 오염이 각 군당 6마리 중 1~2례씩 관찰되었다.

2) 체중

체중변화에 있어서 각 투여군과 무처치대조군간의 유의성은 인정되지 않았다(Table 2).

Table 2. Body weights of females

I. Gavage dose study											
Dose	EE (µg/kg)									ZM (mg/kg)/EE 3.0 (µg/kg)	
Period	UC	VC	0.01	0.03	0.1	0.3	1.0	3.0	10.0	0.1	1.0
Day 0	33.9±3.55	34.9±5.81	33.1±4.53	34.4±4.21	36.2±2.95	31.3±5.37	32.2±4.31	36.2±2.66	33.5±4.13	34.6±4.76	34.4±4.49
Day 1	39.2±3.47	39.4±5.87	39.1±4.24	39.2±4.23	40.7±2.72	37.4±3.98	37.9±3.41	40.3±3.06	37.6±4.39	38.9±4.70	38.2±5.16
Day 2	43.7±3.65	44.2±6.43	43.4±4.85	44.1±4.05	45.3±3.36	41.6±5.23	42.2±4.28	46.1±3.00	42.2±3.60	43.8±5.22	42.7±5.83
Day 3	48.9±3.69	49.4±6.82	47.7±5.25	49.1±4.62	50.4±3.12	46.9±5.12	47.6±4.02	51.7±3.06	47.5±3.66	48.3±5.87	48.2±6.28

II. s.c. dose study											
Dose	EE (µg/kg)									ZM (mg/kg)/EE 0.3 (µg/kg)	
Period	UC	VC	0.01	0.03	0.1	0.3	1.0	3.0	10.0	0.1	1.0
Day 0	33.2±3.14	33.2±1.76	32.5±3.58	33.2±3.84	34.3±4.08	33.4±4.92	32.8±3.66	33.6±3.80	33.4±4.59	34.5±4.83	31.0±5.53
Day 1	38.2±3.13	38.6±2.54	36.3±4.10	37.4±4.02	38.6±4.62	35.4±4.97	36.5±3.84	36.8±4.36	36.3±5.29	38.0±5.61	35.3±5.14
Day 2	42.6±3.36	42.9±2.73	41.2±4.34	42.6±4.42	43.1±5.01	41.1±6.41	42.2±4.22	42.1±4.60	40.8±5.44	43.1±5.73	39.6±5.36
Day 3	47.5±3.70	48.0±2.95	45.7±4.43	48.0±4.35	47.3±5.30	46.1±6.87	46.9±4.03	46.6±4.31	45.5±5.84	48.3±5.25	45.2±5.63

Values are means±S.D., EE, ethinyl estradiol; ZM, ZM189154; UC, untreated control; VC, vehicle control.

Table 3. Food consumption of females

I. Gavage dose study											
Dose	EE (µg/kg)									ZM (mg/kg)/EE 3.0 (µg/kg)	
Period	UC	VC	0.01	0.03	0.1	0.3	1.0	3.0	10.0	0.1	1.0
Day 1	7.1±1.04	6.9±0.06	12.5±1.12	10.2±5.41	7.9±1.36	8.6±1.72	8.7±3.46	18.8±7.85**	7.2±1.59	12.8±2.59	7.6±3.02
Day 2	7.5±1.40	10.0±1.16	9.1±2.35	10.0±3.26	9.3±2.22	8.4±2.97	10.0±2.95	16.3±5.40	10.4±2.84	12.6±3.01	9.5±3.48
Day 3	23.5±12.96	11.3±0.90	15.2±1.17	11.9±3.14	13.8±5.99	14.0±3.55	14.0±3.33	18.3±3.63	11.3±2.18	14.7±4.11	9.5±1.79

II. s.c. dose study											
Dose	EE (µg/kg)									ZM (mg/kg)/EE 0.3 (µg/kg)	
Period	UC	VC	0.01	0.03	0.1	0.3	1.0	3.0	10.0	0.1	1.0
Day 1	6.8±0.98	7.1±0.26	6.6±0.78	7.2±1.18	7.1±1.25	6.1±0.45	6.7±0.15	6.3±1.01	6.2±3.12	6.9±1.08	5.9±1.61
Day 2	8.3±0.82	8.3±0.36	7.9±0.42	8.9±0.78	8.4±1.15	8.7±1.42	8.2±0.67	8.3±0.74	8.2±0.68	8.3±1.11	7.6±1.33
Day 3	9.8±0.89	9.5±0.17	8.8±0.74	9.2±0.40	9.1±0.85	9.1±1.22	8.7±0.36	8.8±0.76	9.1±0.93	9.1±0.21	8.8±1.33

Values are means±S.D.

** indicates significant difference from UC at p<0.01 level. EE, ethinyl estradiol; ZM, ZM189154; UC, untreated control; VC, vehicle control.

3) 사료섭취량

사료섭취량은 EE 3 µg/kg 투여군에서 무처리 대조군에 비해 통계학적으로 유의성있는 증가를 나타냈을 뿐 그 밖의 시험군에서는 정상적인 사료섭취가 관찰되었다(Table 3).

4) 부검조건

대조군을 포함한 모든 투여군에서 특이 부검조건은 발견되지 않았다.

5) 자궁의 중량

자궁의 습중량은 EE 3 및 10 µg/kg 투여군에서 무처리 대조군에 비해 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 나타냈고, EE + ZM 병행투여군에 있어서는 EE 3 µg/kg + ZM 1 mg/kg 투여군에서 EE 3 µg/kg 투여군에 비해 통계학적 유의성있는 감소가 관찰되었다 (Fig. 1). 자궁의 실중

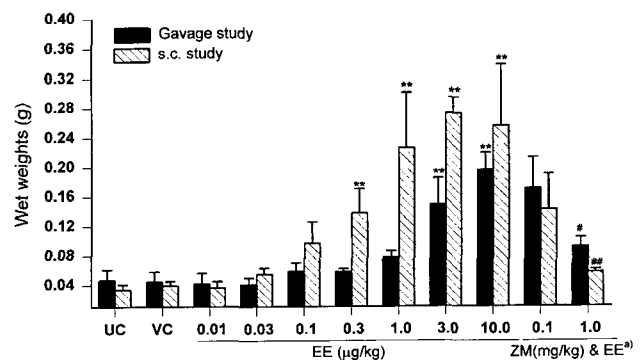


Fig. 1. Uterus-wet weight. ^{a)}EE = 3 µg/kg (gavage study), 0.3 µg/kg (s.c. study), **; p<0.01 from UC, #; p<0.05 or ##; p<0.01 from EE.

량은 EE 1, 3 및 10 µg/kg 투여군에서 무처리대조군에 비해 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 보였고,

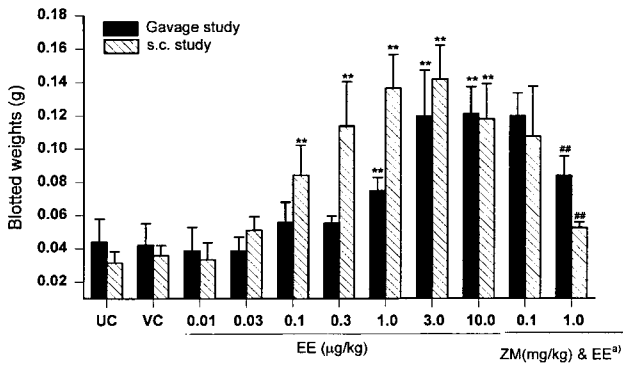


Fig. 2. Uterus-blotted weight. ^{a)}EE = 3 μg/kg (gavage study), 0.3 μg/kg (s.c. study), **, p<0.01 from UC, ##, p<0.01 from EE.

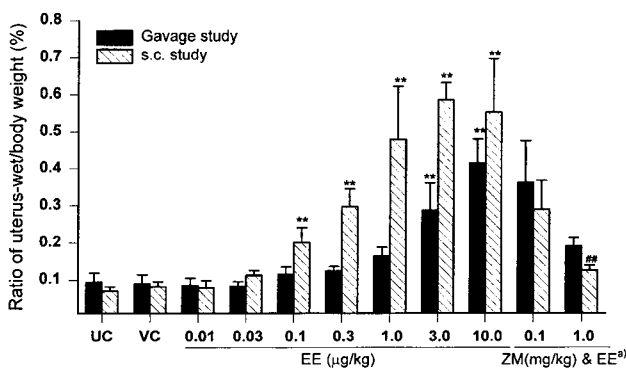


Fig. 3. Uterus-wet/body weight ratio. ^{a)}EE = 3 μg/kg (gavage study), 0.3 μg/kg (s.c. study), **, p<0.01 from UC, ##, p<0.01 from EE.

EE + ZM 병행투여군에 있어서는 EE 3 μg/kg + ZM 1 mg/kg 투여군에서 EE 3 μg/kg 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 감소가 발견되었다(Fig. 2). 자궁습중량/체중 비율은 자궁의 습중량과 같이 EE 3 및 10 μg/kg 투여군에서 무처치대조군에 비해 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 나타냈고, EE+ZM 병행투여군에서는 EE 3 μg/kg 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 3). 자궁실중량/체중 비율은 자궁의 실중량과 같이 EE 1, 3 및 10 μg/kg 투여군에서 무처치대조군에 비해 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 보였고, EE + ZM 병행투여군에서는 EE 3 μg/kg 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 4).

6) 병리조직학적 소견

H&E 염색법에 의해 제작된 조직표본을 검경한 결과, 자궁관의 직경은 EE 1, 3 및 10 μg/kg 투여군에서 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 나타냈고, EE+ZM 병행투여군에 있어서는 EE 3 μg/kg + ZM 1 mg/kg 투여군에서 EE 3 μg/kg 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 감소가 관찰되었다(Fig. 5). 자궁내막상피세포의 높이는 EE 3

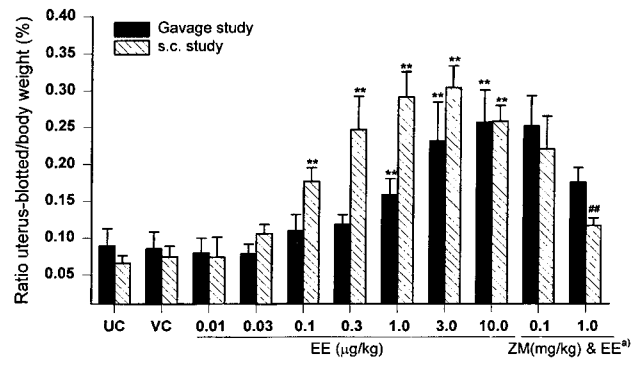


Fig. 4. Uterus-blotted/body weight ratio. ^{a)}EE = 3 μg/kg (gavage study), 0.3 μg/kg (s.c. study), **, p<0.01 from UC, ##, p<0.01 from EE.

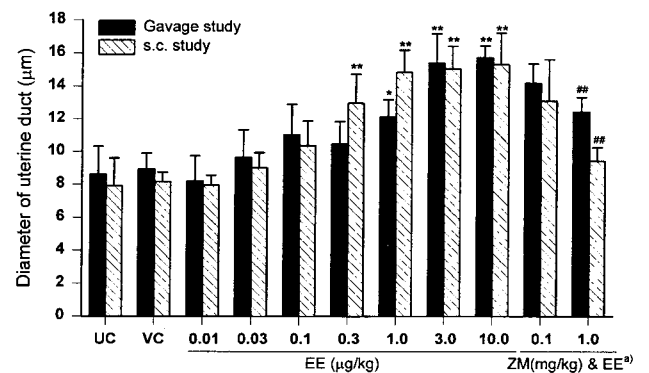


Fig. 5. Diameter of uterine duct. ^{a)}EE = 3 μg/kg (gavage study), 0.3 μg/kg (s.c. study), *, p<0.05 or **, p<0.01 from UC, ##, p<0.01 from EE.

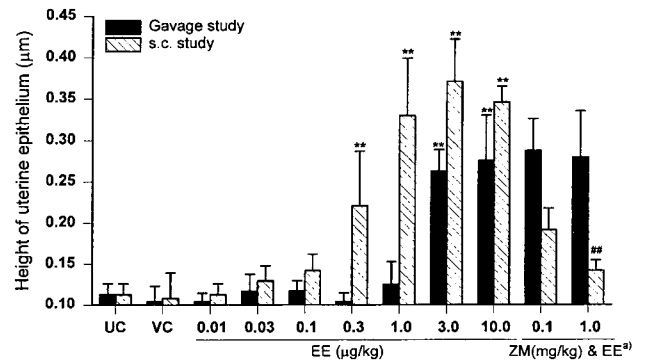


Fig. 6. Height of uterine luminal epithelium. ^{a)}EE = 3 μg/kg (gavage study), 0.3 μg/kg (s.c. study), **, p<0.01 from UC, ##, p<0.01 from EE.

및 10 μg/kg 투여군에서 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 보였고, EE + ZM 병행투여군에서는 EE 3 μg/kg 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 6). 질내막상피세포의 높이는 EE 0.3, 1 및 3 μg/kg 투여군에서 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 나타냈고, 10 μg/kg 투여군에서는 3 μg/kg 투여군에 비

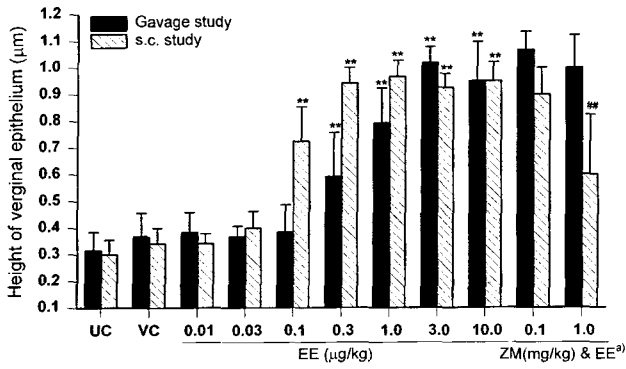


Fig. 7. Height of vaginal epithelium. ^{a)}EE = 3 µg/kg (gavage study), 0.3 µg/kg (s.c. study), **: p<0.01 from UC, ###: p<0.01 from EE.

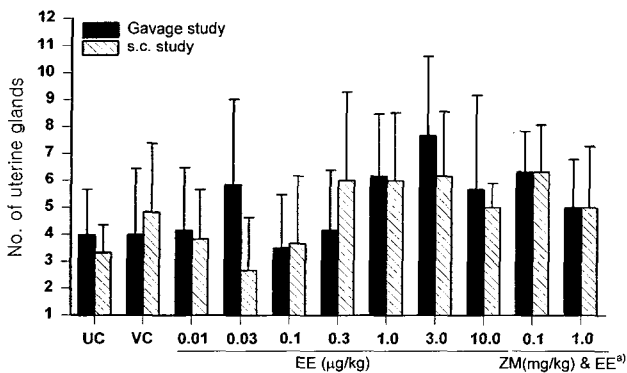


Fig. 8. No. of uterine glands. ^{a)}EE = 3 µg/kg (gavage study), 0.3 µg/kg (s.c. study).

해 감소하는 경향을 나타냈으며, EE + ZM 병행투여군에서는 EE 3 µg/kg 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 7). 자궁선의 수에 있어서 각 투여군과 무처치대조군간의 유의차는 인정되지 않았다(Fig. 8). 난소의 경우 모든 투여군에서 특이소견이 발견되지 않았다. PCNA 염색법에 의해 제작된 자궁 조직표본의 검경시 PCNA 양성율을 조사한 결과, 매체대조군과 EE 0.01 µg/kg 투여군을 제외한 모든 투여군에서 무처치대조군에 비해 PCNA 발현율의 증가가 확인되었다(Fig. 9). 한편 EE + ZM 병행투여군에 있어서는 EE 3 µg/kg + ZM 1 mg/kg 투여군에서의 PCNA 양성율이 EE 3 µg/kg 투여군에 비해 현저하게 감소한 것으로 나타났다.

2. 피하투여 시험성적

1) 일반증상

무처치대조군과 매체대조군, EE 3 µg/kg 투여군 및 EE 0.1 µg + ZM 0.1 mg/kg 투여군을 제외한 모든 시험군에서 허약 또는 하복부의 오염이 각 군당 1~2례씩 관찰되었다.

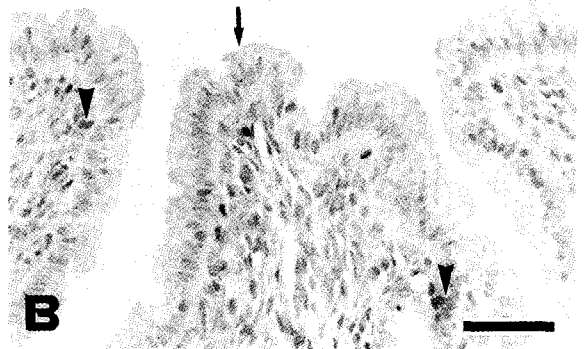
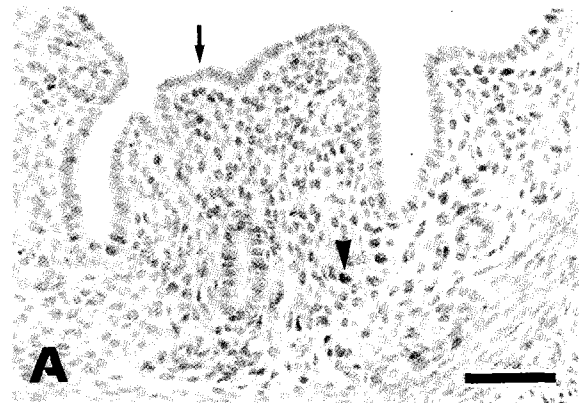


Fig. 9. The effects of oral administration of ethinyl estradiol (10 µg/kg) on uterine histopathology in immature rats (PCNA stain). (A) a control rat, showing normal appearance. (B) a ethinyl estradiol-treated rat, showing the dramatic increases in luminal epithelium (arrow) and PCNA positive cells (arrowhead). Scale bar is 50 µm.

2) 체중

체중변화에 있어서 각 투여군과 무처치대조군간의 유의성은 인정되지 않았다(Table 2).

3) 사료섭취량

사료섭취량은 모든 시험군에서 정상적인 사료섭취가 관찰되었다(Table 3).

4) 부검소견

대조군을 포함한 모든 시험군에서 특이 부검소견은 발견되지 않았다.

5) 자궁의 중량

자궁의 습중량은 EE 0.3, 1 및 3 µg/kg 투여군에서 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 나타냈고 10 µg/kg 투여군에서는 3 µg/kg 투여군에 비해 감소하는 경향을 나타냈으며, EE + ZM 병행투여군에 있어서는 EE 0.3 µg/kg + ZM 1 mg/kg 투여군에서 EE 0.3 µg/kg 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 감소가 관찰되었다(Fig. 1).

자궁의 실중량은 EE 0.1, 0.3, 1 및 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 보였고 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서는 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에 비해 감소하는 경향을 나타냈으며, EE + ZM 병행투여군에 있어서는 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + ZM 1 mg/kg 투여군에서 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 감소가 관찰되었다(Fig. 2). 자궁습중량/체중 비율은 EE 0.1, 0.3, 1 및 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 나타냈고 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서는 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에 비해 감소하는 경향을 나타냈으며, EE + ZM 병행투여군에 있어서는 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + ZM 1 mg/kg 투여군에서 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 감소가 관찰되었다(Fig. 3). 자궁실중량/체중 비율은 EE 0.1, 0.3, 1 및 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 나타냈고 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서는 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에 비해 감소하는 경향을 나타냈으며, EE+ZM 병행투여군에 있어서는 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + ZM 1 mg/kg 투여군에서 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 감소가 관찰되었다(Fig. 4).

6) 병리조직학적 소견

H&E 염색법에 의해 제작된 조직표본을 검정한 결과, 자궁관의 직경은 EE 0.3, 1, 3 및 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 나타냈고, EE + ZM 병행투여군에 있어서는 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + ZM 1 mg/kg 투여군에서 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 감소가 관찰되었다(Fig. 5). 자궁내막상피세포의 높이는 EE 0.3, 1 및 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 보였고 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서는 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에 비해 감소하는 경향을 나타냈으며, EE + ZM 병행투여군에 있어서는 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + ZM 1 mg/kg 투여군에서 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 감소가 관찰되었다(Fig. 6). 질내막상피세포의 높이는 EE 0.1, 0.3 및 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서 용량상관성있게 통계학적 유의한 증가를 나타냈고 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서는 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에 비해 감소하는 경향을 보였으며 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서는 다시 상승하는 경향을 나타냈다. 그리고 EE+ZM 병행투여군에 있어서는 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + ZM 1 mg/kg 투여군에서 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에 비해 통계학적으로 유의성있는 감소가 관찰되었다(Fig. 7). 자궁선의 수에 있어서 각 투여군과 무처치대조군간의 유의차는 인정되지 않았다(Fig. 8). 난소의 경우 모든 투여군에서 특이소견이 발견되지 않았다. PCNA 염색법에 의해 제작된 자궁 조직표본의 검정시 PCNA 양성율을 조사한 결과, 매체대조군과 EE 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군을 제외한 모든 투여군에서 무처치 대조군에 비해 PCNA 발현율의 증가가 확인되었

다(Fig. 9). 그러나 EE + ZM 병행투여군에 있어서는 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + ZM 1 mg/kg 투여군에서의 PCNA 양성율이 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에 비해 현저하게 감소한 것으로 나타났다.

IV. 고 찰

내분비계 장애물질은 생체내 항상성(homeostasis) 유지와 성장, 발육 및 생식기관의 발달 등을 조절하는 천연호르몬의 생성, 분비, 이동, 대사, 결합, 작용 또는 배설을 간섭하는 외인성물질로서, 생체내로 유입되면 호르몬과 같이 작용한다고 한다. 특히 에스트로젠성을 지닌 화학물질들이 문제시되고 있는데, 이러한 화학물질들이 자궁내막의 증식을 유발한다는 사실은 이미 오래전부터 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있다(Astwood, 1938; Kaye 등, 1972; Clark와 Markaverich, 1983; Clark와 Mani, 1994). 현재 내분비계 장애물질 연구에 있어서 자궁내막의 증식, 즉 자궁중량의 증가를 유발하는 물질들은 내분비계 장애물질로서 평가되고 있다(Ashby와 Tinwell, 1998; Baker 등, 1999).

자궁증식시험은 내분비계 장애물질, 특히 에스트로젠성 물질의 검색을 위한 단기검색법중의 하나로서 최근 OECD에서 검중작업을 수행하고 있다. 현재 미성숙 랫드를 이용한 시험법과 난소절제동물을 이용한 방법이 논의되고 있는데, 본 연구에서는 난소를 절제하지 않은 미성숙 랫드를 이용하여 EE에 대한 경구 및 피하투여시험을 수행하여 용량상관성과 투여경로에 따른 독성효과의 차이를 조사하였고 아울러 ZM의 길항작용을 검색하였다.

본 시험에서 일반증상 관찰시 경구투여시에는 무처치대조군을 제외한 모든 투여군에서 그리고 피하투여시에는 무처치대조군, 매체대조군, EE 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군 및 EE + ZM 0.1 mg/kg 투여군을 제외한 모든 투여군에서 각각 1~2레씩 발견된 허약과 하복부의 오염은 투여스트레스도 다소 작용했을지 모르나 동물들이 너무 어려서 물과 사료를 정상적으로 섭취하지 못했고 그로 인하여 상기의 증상들이 나타난 것으로 사료된다. 투여경로에 관계없이 체중과 사료섭취량에 있어서 시험물질의 투여에 기인한 소견은 관찰되지 않았다. 그런데 EE와 유사한 작용을 나타내는 17 β -estradiol(E_2)과 diethylstilbestrol(DES)의 90일 랫드 사료혼합투여시험 결과, E_2 는 0.12 및 0.24 ppm 용량군에서 본 시험의 경우와 마찬가지로 체중과 사료섭취량에 영향을 주지 않았으나, DES는 0.12 ppm 용량군에서 체중과 사료섭취량의 감소를 유발시켰다고 한다(Ferrando와 Valette, 1975).

자궁중량의 증가는 단순한 반응이 아니라, 혈관투과성, 수분장류 및 자궁증식의 변화 등을 포함한 다양한 반응으로 나타난다고 한다(Clark와 Peck, 1979; Reel 등, 1996).

자궁중량의 측정 결과, 경구투여의 경우 습중량은 EE 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서부터 그리고 실중량은 EE 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서부터 용량상관성있는 증가를 보였고, 피하투여의 경우 습중량은 EE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서부터 그리고 실중량은 EE 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서부터 용량상관성있는 증가를 보여서, 피하투여는 경구투여보다 그리고 실중량은 습중량보다 더 민감한 검사항목임을 알 수 있었다. 그런데 피하투여의 경우 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군의 실중량과 습중량은 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군보다 다소 낮게 나타나 자궁 중량에 대한 EE의 에스트로젠성 반응은 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서부터 평형(plateau)을 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 그리고 EE + ZM 병행투여군에 있어서는 경구투여의 경우 자궁의 습중량 및 실중량이 그리고 피하투여의 경우 자궁의 습중량, 실중량, 자궁습중량/체중 비율 및 자궁실중량/체중 비율이 EE 단독투여군보다 낮게 나타나 ZM의 길항작용을 확인할 수 있었다.

병리조직 검사 결과, 경구투여의 경우 EE 투여군에서는 질내막상피세포의 높이, 자궁관의 직경 및 자궁내막상피세포의 높이의 순으로 민감하게 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군으로부터 용량상관성있는 증가를 나타냈고 피하투여의 경우에는 질내막상피세포의 높이, 자궁관의 직경 또는 자궁내막상피세포의 높이의 순으로 민감하게 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군으로부터 용량상관성있는 증가를 나타냈으며, 피하투여가 경구투여보다 더 민감한 것으로 관찰되었다. 자궁내막상피세포의 높이의 경우 경구투여시에는 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 용량에서 최고치를 나타내었고, 피하투여시에는 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 용량에서 평형상태를 나타내었다. 질내막상피세포의 높이의 경우 경구투여시에는 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서 그리고 피하투여시에는 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서 평형상태를 관찰할 수 있었다. EE + ZM 병행투여군에 있어서는 경구투여의 경우 자궁관의 직경이 그리고 피하투여의 경우 자궁관의 직경, 자궁내막상피세포의 높이 및 질내막상피세포의 높이가 EE 단독투여군보다 낮게 나타나 ZM의 길항작용을 확인할 수 있었다. 한편 자궁선의 수에 있어서는 투여경로에 관계없이 시험물질의 영향이 인정되지 않았다.

자궁조직의 면역조직화학염색표본에서 경구 및 피하 투여시험의 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이상 투여군에서 관찰된 PCNA 양성율의 증가는 자궁조직이 매우 활발하게 증식하고 있다는 증거이며, 이는 자궁중량의 증가와도 잘 일치하는 소견이었다. 한편 경구투여 및 피하투여시험에서 에스트로젠 길항제 ZM을 1 mg/kg으로 EE와 병행투여한 시험군에서는 EE 단독투여군에 비해 PCNA 양성율이 각각 감소한 것으로 나타났는데, 이는 ZM이 EE의 자궁증식효과에 대해서 길항작용을 나타낸다는 것을 암시해 준다.

Odum 등(1997)은 E2, estradiol benzoate(EB) 및 EE의 자궁증식시험에서 E2가 세물질들 중에서 가장 높은 자궁

증식활성효과를 나타내며 피하투여시 경구투여시보다 더 높은 반응성을 나타낸다는 사실을 발견하였다. 상기한 투여경로에 따른 독성반응의 차이는 본 연구의 결과와 일치하는데, 이러한 결과는 투여경로의 차이에 따른 약동학적(pharmacodynamic) 차이에 기인한 것으로 사료된다. 최근에는 DES에 관한 자궁증식활성의 결과가 보고된 바 있다(Christian, 1998; Odum 등, 1999).

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 EE 및 ZM의 자궁증식시험에서 자궁중량 및 병리조직학적 검사항목의 경우 용량상관성을 확인할 수 있었고, 피하투여는 경구투여보다 그리고 자궁의 실중량은 습중량보다 더 민감하며 자궁중량의 변이가 매우 큰 것을 고려할 때, 질내막 상피세포의 높이가 검사항목들 중에서 가장 민감한 검사항목으로 판단되었다. 결론적으로 본 시험조건에 의한 자궁증식법은 내분비계 장애물질의 검색을 위한 유용한 시험법으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 과기부에서 주관하는 기술개발과제의 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ahlborg, U.G., Lipworth, L., Titus-Ernstoff, L., Hsieh, C.C., Hanberg, A., Baron, J., Tricopoulos, D. and Adami, O. (1995): Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometritis; an assessment of the biological and epidemiological evidence, *Crit. Rev. Toxicol.*, **25**, 463-531.
- Ashby, J. and Tinwell, H. (1998): Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat, *Environ. Health Perspect.*, **106**, 719-720.
- Astwood, E.B. (1938): A six-hour assay for the quantitative determination of estrogen, *Endocrinology*, **23**, 25-31.
- Baker, V.A., Hepburn, P.A., Kennedy, S.J., Jones, P.A., Lea, L.J., Sumpter, J.P. and Ashby, J. (1999): Safety evaluation of phytoestrogen esters. Part 1. Assessment of estrogenicity using a combination of *in vivo* and *in vitro* assays, *Fd. Chem. Toxicol.*, **37**, 13-22.
- Bhatt, J.D. and Gulati, O.D. (1986): The role of sympathetic nerve system in oestrogen-induced hypertension in rats, *Br. J. Pharmacol.*, **89**, 685-691.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *Br. Med. J.*, **305**, 609-613.
- Christian, M.S., Hobermann, A.M., Bachmann, S. and Hellwig, J. (1998): Variability in the uterotrophic re-

- sponse assay (an *in vivo* estrogenic response assay) in untreated control and positive control (DES-DP, 2.5 microG/kg, bid) Wistar and Sprague-Dawley rats, *Drug Chem. Toxicol.*, **21**(Suppl. 1), 51-100.
- Clark, J.H. and Mani, S.K. (1994): Actions of ovarian steroid hormones in *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E. and Neill, J.D. eds.), Vol I, Raven press, New York, pp. 1011-1059.
- Clark, J.H. and Markaverich, B.M. (1983): The agonistic and antagonistic effects of short acting estrogens: A review, *Pharmacol. Ther.*, **21**, 429-453.
- Clark, J.H. and Peck, E.J. (1979): *Female Sex Steroids*, Springer-Verlag, New York.
- Colborn, T., vom Saal, F.S. and Soto, A.M. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.*, **101**, 378-384.
- Colborn, T., Dumaoski, D. and Myers, J.P. (1996): Our Stohlen Future. Are we threatening our fertility, intelligence and survival?, A Scientific Detective Story, Dutton.
- Ferrando, R. and Valette, J.P. (1975): Direct effects of diethylstilbestrol (DES) and oestradiol given at low doses in the ration: Practical consequences, *Folia Vet. Lat.*, **5**, 27-44.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, D., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G. and Luster, M. (1996): Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop, *Environ. Health Perspect.*, **104**[Suppl 4], 715-740.
- Kaye, A.M., Sheratzky, D. and Lindner, H.R. (1972): Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: age dependence and estradiol stimulation, *Biochem. Biophys. Acta*, **261**, 475-486.
- Odum, J., Lefevre, P.A., Tittensor, S., Paton, D., Routledge, E.J., Beresford, N.A., Sumpter, J.P. and Ashby, J. (1997): The rodent uterotrophic assay: Critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **25**, 176-188.
- Odum, J., Pyrah, I.T., Foster, J.R., Van Miller, J.P., Joiner, R.L. and Ashby, J. (1999): Comparative activities of p-nonylphenol and diethylstilbestrol in noble rat mammary gland and uterotrophic assays, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **29**, 184-195.
- OECD. (1999): Validation protocol for the uterotrophic assay. Task force on endocrine disruptor testing and assessment, Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Reel, J.R., Lamb, J.C. and Neal, B.H. (1996): Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **34**, 288-305.
- SAS Institute Inc. (1990): *SAS/STAT User's Guide*, Version 6, Fourth Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sharpe, R.M. and Skakkebaek, N.E. (1993): Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?, *Lancet*, **341**, 1392-1395.
- Sharpe, R.M., Fisher, J.S., Millar, M.M., Jobling, S. and Sumpter, J.P. (1995): Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production, *Environ. Health Perspect.*, **103**, 1136-1143.
- Sumpter, J.P. (1998): Xenoendocrine disruptors: environmental impacts, *Toxicol. Lett.*, **102**, 337-342.
- Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J., Jegou, B. and Jensen, T.K. (1996): Male reproductive health and environmental xenoestrogens, *Environ. Health Perspect.*, **104**[Suppl 4], 741-776.
- Wilpart, M., Speder, A., Ninane, P. and Roberfroid, M. (1986): Antimutagenic effects of natural and synthetic hormonal steroids, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **6**, 265-273.