

Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)가 흰쥐 저정낭의 미세구조에 미치는 영향

길 영 천, 김 완 중*, 신 길 상
순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

Effects of Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on Ultrastructure of Rat Seminal Vesicle

Young-Chun Kil, Wan-Jong Kim* and Kil-Sang Shin
Department of Life Science, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University,
Asan, Choongnam, 336-745, Korea
(Received January 14, 2000)

ABSTRACT

Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) has been known as one of endocrine disruptors. The present study was carried out to investigate the alterations of fine structure in rat seminal vesicle after oral intubation of DEHP in dosages of 1 g/kg/day, 2 g/kg/day or 3 g/kg/day respectively in 0.5 ml of corn oil for 15 days.

In rats treated with DEHP for 15 days, seminal vesicle exhibited extensive histological alterations compared to those observed in control groups. The size of the seminal vesicle and the mucosal folds decreased, but the lamina propria was considerably thickened. The ultrastructural changes of epithelial cells in seminal vesicle of rat treated with DEHP were characterized by the high nuclear/cytoplasmic ratio and the increased heterochromatin within irregular nuclear envelope. And also, the rough endoplasmic reticulum, Golgi complex and secretory vesicles were poorly developed. In conclusion, DEHP caused the ultrastructural and functional alterations of seminal vesicle in rats dose-dependently. It is suggested that these detrimental effects of DEHP on seminal vesicle are derived from the decrease level of testosterone.

Key words : Di-(2-ethylhexyl)phthalate, Seminal vesicle, Ultrastructural changes

서 론

최근에 내분비 교란물질 중의 하나로 인정된 di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)는 플라스틱 제품들에

가소성을 제공하는 화합물로서 1930년대부터 사용되어 왔으며, 전체 가소제의 3/4을 차지할 정도로 광범위하게 사용되고 있다. 이 화합물은 지용성으로 유제품이나 축산물의 지방질에 농축되어 있을 가능성이 크며 주방기구 또는 도료 등에도 포함되어 있으므로

*Correspondence should be addressed to Dr. Wan-Jong Kim, Department of Life Science, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Choongnam, 336-745, Korea. Ph: (0418) 530-1251, FAX: (0418) 530-1256, E-mail: wjkim56@asan.sch.ac.kr
Copyright © 1999 Korean Society of Electron Microscopy

인체에 노출될 위험이 매우 높은 화합물로 알려져 있다(Karle et al., 1997).

DEHP는 척추동물의 생식소 및 부속생식선의 구조와 기능에 영향을 주며, 임신한 흰쥐의 경우 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 퍼옥시좀의 증식을 일으키고, 미토콘드리아내 효소들의 활성을 감소시키며, 심한 경우 간암의 발병률을 증가시킨다는 보고도 있다(Srivastava et al., 1978; Srivastava et al., 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 감소시켜 간세포내에서의 글리코겐 대사과정에 변화를 일으키는 것으로 밝혀졌다(Mushtaq et al., 1980; Muhlenkamp & Gill, 1998).

DEHP는 특히 포유동물들의 응성 생식기관에 강한 독성작용을 나타내는 것으로 알려져 있는데, 흰쥐들이 화합물에 노출시킨 경우, 부고환내 정자의 수가 감소하였고, gamma-glutamyl transpeptidase와 lactate dehydrogenase, 그리고 beta-glucuronidase의 활성은 증가시키고, acid phosphatase의 활성은 감소시키는 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)도 유발하는데, 테스토스테론을 인위적으로 투여하면 이러한 현상을 막을 수 있다는 주장이 있다(Parmar et al., 1987).

최근에 연구된 바에 의하면 사춘기 이전 흰쥐에 DEHP를 반복투여 할 경우 세정관의 직경이 감소되며 정자형성과 관련된 세포들인 Leydig 세포와 Sertoli 세포의 미세구조적 형태변화를 유발하여 생식세포들의 정상적인 분화 및 증식을 억제할 뿐만 아니

라 혈액 내 테스토스테론의 농도, 감소를 유발하는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 1999).

본 연구에서는 상기의 보고들을 토대로 하여, 사춘기 직전의 흰쥐를 대상으로, 내분비 교란물질들 중의 하나로 알려진 DEHP를 구강으로 반복 투여한 후, 이 화합물이 부속생식선인 저정낭의 미세구조적 형태변화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 실험동물은 Sprague-Dawley 계통의 응성 흰쥐(생후 30일, 체중 100 g 내외)로서, 동물실험실내에서 물과 사료를 정상적으로 공급하면서 투약하였다. 투약은 다양한 농도의 di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP, Sigma 사)를 corn oil에 용해하여 구강으로 삼관투여(intubation) 하였다. 대조군으로서는 intact한 상태의 정상 대조군과 동량의 corn oil만을 투여한 실험 대조군을 설정하여 비교하였으며, 실험 군들로서는 DEHP를 체중 kg당 1 g/0.5 ml, 2 g/0.5 ml 혹은 3 g/0.5 ml씩 매일 1회 15일 동안 투여하고, 마지막 투여 다음날 희생시켜 체중을 측정하고 저정낭을 적출하여 그 무게를 측정하였다.

적출된 저정낭은 인산완충액(0.1 M, pH 7.2)으로 고정된 4% glutaraldehyde 용액으로 전고정하였다. 광학현미경 표본은 탈수와 파라핀 포매과정을 거쳐 절편을 제작한 후 hematoxylin과 eosin으로 이중염색하여 광학현미경하에서 조직학적 변화를 관찰하였다.

DEHP에 의한 저정낭의 미세구조 변화를 관찰하기 위해 4% glutaraldehyde 용액으로 고정된 시료를 1% OsO₄ 용액으로 후고정하여 알코올 농도상승순으로 탈수하고, epon 혼합액에 포매하였다. Epon 블록을 70~90 nm의 두께로 초박절편한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 투과전자현미경(JEM-1010)으로 80 kV 하에서 검경하였다.

결과 및 고찰

플라스틱 제품의 가소제로 널리 사용되며, 최근에 내분비 교란물질중의 하나로 인정된 di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)는 1930년대 이후 지속적으로

사용되고 있으며 전체 가소제의 3/4을 차지할 정도로 광범위하게 사용되고 있다. 이 화합물은 지용성으로 유제품이나 축산물의 지방질에 농축되어 있을 가능성이 크며 주방기구 또는 도료 등에도 포함되어 있으므로 인체에 노출될 위험이 매우 높은 화합물이다 (Karle et al., 1997).

보고된 바에 따르면 DEHP를 사춘기 이전의 흰쥐에 투여할 경우, 성장률이 감소하며 정소의 위축현상이 나타나는 것으로 알려져 있고, 테스토스테론을 합성하는 세포인 Leydig 세포의 형태적 변화를 유도하여 혈 중 테스토스테론의 함량을 감소시키며, Sertoli 세포와 생식세포들의 정상적인 분화과정을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Kim et al., 1999).

이러한 사실로 볼 때 DEHP가 정소 뿐만 아니라 부속생식선인 저정낭에도 형태적 또는 기능적 변화를 초래할 것으로 생각되어 DEHP를 흰쥐에 15일 동안 구강 투여하고, 최종 투여 24시간 후, 희생시켜 저정낭을 적출하고 그 무게를 측정하였으며 광학 및 전자현미경 표본을 제작하여 형태학적으로 관찰하였다. 관찰 결과 corn oil만을 투여한 실험 대조군의 경우 저정낭 무게와 광학 또는 전자현미경적 소견상 정상 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았으나 DEHP를 투여한 실험군에서는 뚜렷한 차이를 나타냈다. 이러한 사실로 보아 15일간의 DEHP 투여후 나타나는 일련의 변화들은 용매로 사용된 corn oil의 영향이 아니라 DEHP에 의해 나타나는 현상으로 판단된다. 저정낭 무게를 측정한 결과, 대조군의 경우 저정낭의 무게가 66.7 ± 15.3 mg이었으나, 체중 kg당 1g, 2g 혹은 3g을 투여한 실험군에서는 각각 50.0 ± 10.0 mg, 25.0 ± 10 mg, 20.0 ± 10.0 mg으로 DEHP의 투여량이 증가할수록 저정낭의 발육이 미흡한 것으로 나타났다. 저정낭은 무게 뿐만 아니라 체중에 대한 비율도 3g 투여군으로 갈수록 감소하는 경향을 보였는데 이러한 사실로 미루어 보아 저정낭 무게의 감소는 성장물의 감소로 인한 체중의 차이 때문에 나타나는 결과가 아니라 성적으로 성숙되는 시기에 있는 흰쥐에 장기적으로 DEHP를 투여함으로써 나타난 결과로 생각된다.

DEHP가 저정낭의 조직학적 형태에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군 저정낭에서는 분비상피세포들로

구성된 점막층이 상당히 넓은 면적을 차지하며 발달하고 있는 관상의 구조들이 다수 관찰되었으나, 실험군 저정낭의 경우에는 점막층의 표면적이 대조군에 비해 상당히 감소하고, 점막층을 구성하고 있는 상피세포들의 발달정도도 미약하여 점막층의 두께가 감소하고 관상구조의 주변에 결합조직들이 증가하는 경향을 나타냈다 (Figs. 1, 2). 이러한 결과는 DEHP의 투여가 혈액내 테스토스테론의 함량을 크게 저하시켜 이 호르몬의 영향을 받는 저정낭의 정상적인 분화를 억제하여 나타나는 결과로 판단된다 (Kim et al., 1999a).

DEHP가 저정낭의 미세구조에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군의 저정낭 분비상피의 경우 원주형의 세포형태를 취하며 타원형의 핵이 세포 기저부에 존재하고 있는 것이 관찰되었다. 기저부의 핵 주위에는 조면소포체가 밀집하여 발달하고 있었으며, 세포의 자유표면 쪽에는 골지체와 분비소포가 상당수 분포하고 다수의 미세용모가 발달하고 있는 것이 관찰되었다. 분비소포내에는 전자밀도가 높은 과립들이 한 쪽으로 치우쳐 분포하고 있었으며, 상피세포간 인접부위에는 연결장치들이 잘 발달되어 있는 것이 관찰되었다 (Figs. 3, 4). 이는 이들 세포에서 물질합성이 정상적으로 이루어지며 활발한 분비작용이 일어나고 있음을 반영하는 결과이다 (Cross & Mercer, 1993).

이에 반해 실험군의 상피세포는 그 미세구조적 특징에 있어서 상당히 변화된 형태를 나타냈다. 1g을 투여한 실험군의 경우에는 미세용모와 분비과립의 분포가 다소 감소한 것 이외에는 별다른 변화양상을 보이지 않았으나, 2g 혹은 3g을 투여한 실험군의 경우에는 상피세포의 핵대 세포질 비가 증가하면서 세포의 형태가 원주형에서 입방형으로 변화하는 특징을 보였으며, 핵막이 불규칙한 형태를 취하고 핵내 이질염색질이 증가하는 경향을 보였다. 세포질 내에서는 조면소포체의 발달이 매우 미약하고 분비소포의 수가 감소하는 특징을 보였을 뿐만 아니라, 소포내 농축된 과립이 거의 관찰되지 않았다. 상피세포의 기저부 외측에서 관찰되는 기저판의 경우, 대조군에 비해 심하게 굴곡되어 있는 형태를 보였으며 기저판과 외측의 섬유아세포 사이에는 교원섬유가 상당히 증가되어 있는 것이 관찰되었다 (Figs. 5, 6, 7, 8).

이러한 결과는 DEHP가 저정낭 상피세포의 활성을 억제하여 나타나는 결과로 보이며, 이와 유사한 억제 작용은 발달중인 정도에도 나타나는 것으로(Kim et al., 1999b) 보고되었으며, 그 원인은 테스토스테론의 혈액내 함량 감소 때문인 것으로 판단된다. 이러한 일련의 변화들은 DEHP의 투여농도가 증가할수록 심화되는 경향을 보였는데, 이미 보고된 결과와 같이 테스토스테론의 혈액내 함량이 DEHP의 투여 농도에 의존적으로 감소하는 것과 일치하는 결과이다(Kim et al., 1999a). 분비상피의 기저판이 고농도 투여군으로 갈수록 심하게 굴곡되는 현상을 보이는 것은 저정낭내 관상분비선의 분화와 발달이 억제되어 나타나는 결과이거나 약물에 대한 대사의 변화로서 물질 흡수의 면적을 증가시키기 위한 반응으로 알려져 있다(Lee et al., 1997).

결론적으로 DEHP를 사춘기이전의 흰쥐에 투여할 경우 저정낭의 발육 억제 및 조직학적 또는 미세구조적 형태변화를 유발함으로써 정상적인 분비기능을 억제하는 것으로 나타났다. 이와 같은 일련의 변화들은 이미 알려진 바와 같이 DEHP가 정소내 테스토스테론 합성세포인 Leydig 세포의 형태적, 기능적 변화를 유도함으로써 결과적으로 혈액내 테스토스테론의 함량을 감소시키고 이에 따라 혈중 테스토스테론의 함량에 크게 영향을 받는 저정낭이 형태 및 기능적 변화를 초래한 것으로 판단된다. 물론 정자형성과 성숙 및 활성화의 과정은 테스토스테론 하나의 작용만으로 조절되는 것이 아니라 시상하부, 뇌하수체, 정소의 조절축에서 여포자극호르몬과 황체호르몬 그리고 테스토스테론 및 억제인자 등의 복합적인 조절작용에 의해서 이루어진다고 알려져 있다(Browder et al., 1991). 따라서 DEHP가 남성생식계의 구조와 기능을 억제하는 기작을 명확하게 규명하기 위해서는 보다 폭넓고 구체적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 즉, 테스토스테론 이외의 여러 호르몬에 대한 함량측정과 호르몬의 합성과 분비와 작용에 관련돼 여러 효소들의 활성 비교 및 호르몬 수용체들에 대한 세포화학적 또는 생화학적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Browder LW, Erickson CA, Jeffery WR: Spermatogenesis. Developmental Biology. Saunders college publishing, pp. 27-53, 1991.
- Cross PC, Mercer KL: Cell and Tissue Ultrastructure. Freeman, New York, pp. 336-350, 1993.
- Goldman JM, Cooper RL, Laws SC, Rehnberg GL, Edwards TL, McElroy WK, Hein JF: Chlordimeform-induced alterations in endocrine regulation within the male rat reproductive system. Toxicol Appl Pharmacol 104 : 25-35, 1990.
- James NH, Soames AR, Roberts RA: 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, 1998.
- Karle, VA, Short, BL, Martin, GR, Bulas, DI, Getson, PR, Luban, NLC, O'Brien, AM, Rubin, RJ: Extracorporeal membrane oxygenation exposes infants to the plasticizer, di(2-ethylhexyl)phthalate. Crit Care Med 25(4): 696-703, 1997.
- Kim WJ, Kil YC, Lee JH, Shin KS: Effect of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on spermatogenesis in rat testes. Korean J Environ Biol 17(3): 285-292, 1999a. (Korean)
- Kim WJ, Kil YC, Shin KS: Effect of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on ultrastructure of rat testes. Korean J Electron Microscopy 29(3): 353-362, 1999b. (Korean)
- Lee JW, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K: The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. Endocrinology 138(5): 2081-2088, 1997.
- Mattison DR, Plowchalk DR, Meadows MJ, Al-Juburi AZ, Gandy J, Malek A: Reproductive toxicity: Male and female reproductive systems as targets for chemical injury. Med Clin Nor Am 74(2): 391-411, 1990.
- Muhlenkamp CR, Gill SS: A glucose-regulated protein, GRP58, is down-regulated in C57B6 mouse liver after diethylhexyl phthalate exposure. Toxicol Appl Pharmacol 148(1): 101-108, 1998.
- Mushtaq M, Srivastava SP, Seth PK: Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on glycogen metabolism in rat liver. Toxicology 16(2): 153-161, 1980.

- Parmar D, Srivastava SP, Singh GB, Seth PK: Effect of testosterone on the testicular atrophy caused by di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Toxicol Lett* 36(3) : 297-308, 1987.
- Richmond RE, Carter JH, Carter HW, Daniel FB, Deangelo AB: 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, 1996.
- Srivastava S, Awasthi VK, Srivastava SP, Seth PK: Biochemical alterations in rat fetal liver following in utero exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Indian J Exp Biol* 27(10) : 885-888, 1989.
- Srivastava SP, Agarwal DK, Mushtaq M, Seth PK: Effect of Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on chemical constituents and enzymatic activity of rat liver. *Toxicology* 11(3) : 271-275, 1978.
- Thomas JA, Curto KA, Thomas MJ: MEHP/DEHP: Gonadal toxicity and effects on rodent accessory sex organs. *Environ Health Perspect* 45 : 85-88, 1982.
- Tomita I, Nakamura Y, Yagi Y, Tutikawa K: Teratogenicity/fetotoxicity of DEHP in mice. *Environ Health Perspect* 45 : 71-75, 1982.

< 국문초록 >

플라스틱 제품의 가소제 성분으로 쓰여지며, 내분비

교란물질로 알려져 있는 di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)가 흰쥐 부속생식선의 발달에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 미성숙한 상태의 웅성 흰쥐에 DEHP (1 g/kg/day, 2 g/kg/day, 3 g/kg/day)를 15일간 구강으로 삼관 투여한 후, 저정낭 상피세포들을 중심으로 광학 및 전자 현미경적 관찰을 실시하였다.

DEHP 투여에 의한 광학현미경적 변화로서는 분비선의 크기와 상피층의 두께가 감소하고, 강소 주변부위에서 교원섬유를 비롯한 결합조직 성분들이 증가하는 경향을 나타냈다.

저정낭 분비세포들의 미세구조를 보면, 원주형의 대조군 세포들내 전자밀도가 높은 분비관립들은 세포내 가장자리에 치우쳐 있었고, 세포질내에서 조면소포체와 골지복합체가 잘 발달하였으며, 다수의 미세용모들이 존재하고 있었다. DEHP 1g을 처리한 실험군에서 분비세포들의 미세구조상의 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았으나, 미세용모와 분비소포의 분포가 다소 감소한 것으로 나타났다. 2g을 처리한 실험군에서는 분비세포의 세포질이 감소하여 세포의 형태가 원주형에서 입방형으로 변화되었으며, 핵막이 불규칙한 모습을 보였고, 조면소포체의 발달이 미흡하였으며, 분비소포의 수도 크게 감소하였다. 3g을 처리한 실험군에서는 세포소기관들의 미세구조가 뚜렷한 변화를 나타냈다. 핵내 이질염색질이 크게 증가하였고, 세포질내에서 분비소포를 거의 관찰할 수 없었으며, 2차 리소솜이나 공포들도 관찰할 수 있었다.

이상과 같이, DEHP는 저정낭내 분비세포들의 분화 및 기능을 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 이러한 저해작용은 DEHP에 의한 테스토스테론의 농도 감소와 연관이 있는 것으로 판단된다.

FIGURE LEGENDS

Each scale bar on electron micrograph represents 2 μm .

- Fig. 1.** Light micrograph of cross sectioned diverticulum of control rat seminal vesicle. Mucosal folds are fully developed. $\times 200$
- Fig. 2.** Cross sectioned seminal vesicle of rat treated with 3.0 g/kg DEHP. Mucosal folds surrounding the luminal area are thinner and shorter than those of control rat, but the lamina propria was considerably thickened. $\times 200$
- Fig. 3.** Electron micrograph of epithelial cells of control rat seminal vesicle. The conspicuous rough endoplasmic reticulum (RER) and secretory vesicles (SV) are observed. Go; Golgi complex, Mi; mitochondrion, Nu; nucleus
- Fig. 4.** Apical cytoplasm of epithelial cells and lumen (Lu) of control rat seminal vesicle. A number of microvilli (MV) and secretory vesicles (SV) are observed. square inset; junctional complex, Go; Golgi complex, RER; rough endoplasmic reticulum
- Fig. 5.** Epithelial cells of seminal vesicle of rat treated with 2.0 g/kg DEHP. Secretory vesicles (SV) decreased in number and rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex are poorly developed. MV; microvilli, Nu; nucleus
- Fig. 6.** Fibroblast and epithelial cells of seminal vesicle of rat treated with 2.0 g/kg DEHP. The heterochromatin (Hc) and cytoplasmic vacuoles (Va) are obvious. arrowhead; invaginated nuclear envelope, empty arrowhead; basal lamina, RER; rough endoplasmic reticulum, Nu; nucleus, SV; secretory vesicle
- Fig. 7.** Epithelial cells of seminal vesicle of rat treated with 3.0 g/kg DEHP. The basal lamina (empty arrowhead) and nuclear envelope (arrowhead) show irregular shapes. CF; collagen fiber, Va; vacuole, Hc; heterochromatin
- Fig. 8.** Apical cytoplasm of epithelial cells and lumen of seminal vesicle of rat treated with 3.0 g/kg DEHP. It shows the decreased activity of the cell. MV; microvilli; SV; secretory vesicle, Hc; heterochromatin



