J. ENVIRON. TOXICOL.
Vol. 19, No. 2, 177~182 (2004)

수종의 유기용제가 사람 정자의 점액 침투능, 운동성과 생존율에 미치는 영향

유 동 철, 최 달 웅※

고려대학교 병설 보건대학 환경보건과

Effects of Organic Solvents on Mucus Penetration Distance, Motility and Survival Rate of Human Sperm *in vitro*

Dong-Chul Yoo and Dal-Woong Choi※

Department of Environmental Health, College of Health Sciences, Korea University, Seoul 136-703, Korea

ABSTRACT

Alcohol consumption and exposure to endocrine disruptors and industrial solvents have been implicated in impaired spermatogenesis, increase in the incidence of malformed sperm and decrease in the percentage of moving sperm. The aim of this study was to determine and compare the direct effects of some organic solvents (bisphenol A; BPA, dibutyl phthalate; DBP, formaldehyde; HCHO, dimethylsulphoxide; DMSO, ethanol) on mucus penetration distance, motility and survival rate of human sperm *in vitro*. Semen samples from 3 health subjects were prepared using swim-up method and 0.0005~0.5% organic solvents were added to the test medium. BPA, DBP, HCHO and DMSO produced significant decreases in the motility and survival rate with a different potency. The most potent inhibition of mucus penetration distance, motility and survival rate was observed after exposure to HCHO. A concentration of 0.0005% HCHO significantly inhibited sperm motility. When ethanol is added directly to sperm, at concentrations equivalent to that in serum after heavy drinking, these damaging effects were lowest compared with other solvents. Present study shows that each compound has different toxic potency to human sperm and we need special caution for the use of HCHO.

Key words : human sperm, motility, survival rate, formaldehyde, organic solvent

서 론

산업현장에서 많이 사용되는 formaldehyde (HCHO)는 하드보드와 합판 등 나무로 만든 제품에 많이 사용되고 있다. 일반인들이 쉽게 노출되는 장소는 집안의 벽, 가구, 마루바닥이며 HCHO는 사용된 가구나 합성물질에서 가스로 방출되어 호흡을 통해 체내로 유입된다. 다른 여러 가지 용매 중에서도 특히 dimethylsulphoxide (DMSO)는 탁월한 용매 효과에 의해 널리 이용되고 있는 universal solvent 이다. 이 DMSO는 동물 실험 및 약물의 vehicle 용도 이외에도 세포의 냉보호제로도 사용되며 산업용매로써 수지, 살균제, 염료의 용매로 이용되고 있

※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-940-2861, E-mail: dalwoong@empal.com

다. 내분비계 장애물질인 dibutyl phthalate (DBP)는 프탈레이트류의 주요 물질 중 하나이며, 라텍스 접착제, 플라스틱, 염료, 살충제, 인쇄잉크 등의 성분이며 화장품에서 윤활제로도 사용되고 있다. 또한 식품 캔의 내부코팅제와 각종 식품용기 및 포장재의 소재로 사용되는 bisphenol A (BPA)는 통조림용기로부터 음식물로 이행되며, 폴리카보네이트 병에서도 유출될 수 있다. 인간은 이렇게 생활 환경 그리고 산업 현장에서 자기 자신도 모르게 산업 용매와 내분비계 장애물질에 노출되어 있다. 이러한 물질들은 인류의 보다 나은 생활을 위해 사용되었지만, 지금은 생명을 위협하기까지 하는 무서운 존재가 되었다. BPA 또는 DBP와 같은 물질은 세포를 사용한 실험에서 에스트로겐 수용체에 결합하는 것이 확인되면서 내분비계 장애물질로 추정되어 많은 관심이 집중되어 왔다(Colborn *et al.*, 1993; Jobling *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1997). 임신기간 또는 수유기간 동안 실험 동물이 낮은 수치의 BPA 또는 DBP에 노출되었을 때 그 태자에서, 또는 직접 실험동물이 이러한 내분비계 장애물질에 노출되었을 때 그 실험동물에서 고환의 크기 감소, 정자의 생성 감소, 정자 운동성 감소 등의 생식독성이 보고되었다(Gray *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 2000; Takahashi and Oishi, 2003; Wang *et al.*, 2004). 또한 과량의 알코올 섭취는 사람 정자 운동성 감소와 정자의 형태 변화와 같은 생식기능 이상을 유발함이 알려져 있다(Gomathi *et al.*, 1993; Pajarinen *et al.*, 1996).

그러나, 이러한 내분비계 장애물질과 용매가 정자에 미치는 효과가 직접적으로 작용하는지 또는 체내 대사체에 의해 간접적으로 작용하는 지와 그 상대적인 작용의 세기는 명확히 알려져 있지 않다. 또한 인체에 미치는 효과는 상대적으로 덜 알려져 있지 않다. 인체에 미치는 작용을 정확히 이해하는데 있어 이러한 유기용제류가 인간 정자에 미치는 직접적인 영향에 대한 정보가 있다면 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 최근 남성 정자의 질 감소가 여러 가지 환경적인 요소에 의해 유발될 수 있다는 경계가 확산되어가고 있다. 따라서 본 실험에서는 우리가 환경 중에서 쉽게 노출될 수 있는 유기용제류인 HCHO, DMSO, BPA, DBP, ethanol을 선정하여 이러한 유기용제가 인간 정자의 점액 침투능, 운동성과 생존율에 미치는 직접적인 영향을 *in vitro*에서 관찰하고 그 작용의 상대적인 세기를 비교하였다. 기존의 시험에서는 주로 실험동물을 사용하였으나 본 실험에서는 실제 사람의 정자를 사용하였고 서로 다른 3가지 검사 방법을 사용하여 사람 정자에 미치는 영향을 다양하게 관찰하였다. 실험물질의 농도는 만취상태의 혈중 에탄올 농도인 0.5%를 주 기준으로 하여 정하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시료 채취

20대 초반의 건강한 남성들로부터 3일간 금욕 후 수음에 의해 정액을 채취하고 기본적 정액검사를 실시하여 WHO (1992)의 지침에 의하여 80×10^6 sperm/mL 이상, 30분간 50% 이상의 전진운동성, 50% 이상의 정상형태 (heads, mid pieces, tails)를 가지는 3 명의 검체를 본 실험에 이용하였다.

2) 배양액 제조

배양액으로는 Ham's F10 (Gibco, USA)에 Penicillin G 100 mg/L, Streptomycin 200 mg/L, Fructose 7 m Mol/L, 그리고 1% bovine serum albumin (Gibco, USA)을 첨가한 배양액을 사용하였다(한형장 등, 1987; 김혜영 등, 1990).

3) 시험 물질

내분비계 장애물질로는 BPA (Sigma, USA)와 DBP (Sigma, USA)를, 용매로는 HCHO (Aldrich, USA), DMSO (Sigma, USA)과 ethanol (Aldrich, USA)을 시험 물질로 정하고 이들 물질을 총칭하여 유기용제라고 표기하였다.

2. 실험방법

실험에 사용될 정자는 swim up 방법으로 분리하였다(김혜영 등, 1990). 채취된 정액을 20분간 액화시킨 후 원심분리 tube에 넣고 Ham's F10 배양액을 2배 첨가한 후, 300 g으로 10분간 원심분리를 시켜 상층액을 제거하여 정자 원침(pellet)을 만들었다. 이 정자 원침에 다시 배양액을 넣어 원심분리를 위와 같이 시행하여 정자 원침을 만든 후에, 상층액을 제거하고 배양액을 첨가하여 1.4 mL가 되게 한

후 이를 두 개의 바닥이 둥근 시험관에 동량으로 나눈 후 120 g으로 5분간 원심분리한 후 37°C, 5% CO_2 인큐베이터 내에서 45도로 기울인 후 40분간 swim up을 시행하였다. Swim up 시킨 상층액을 Markler Counting Chamber (Sefi Medical Instruments, Kentucky, USA)로 정자의 숫자, 형태, 운동성을 확인한 후 미리 준비된 배양액에 첨가하여 각각의 실험 조건에 맞게 37°C, 5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다

1) 정자의 점액 침투능에 미치는 영향

정자의 점액 침투능 검사(Alexander, 1981; 김진홍 등, 1996)는 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 인간의 배란기 경관점액과 생화학적, 유동학적으로 비슷한 발정기 소의 경관점액 대용으로 이미 실험에서 밝혀진 계란 휜자를 이용하였다. 알코올로 겉을 깨끗이 닦은 계란을 깨뜨려 소독된 비이커 속에 넣은 후 납작한 모세관(4.5×0.1×100 mm, Vitro Dynamics, USA) 속으로 계란 휜자 중 안쪽의 점착성의 부분을 흡입하여 한쪽 끝을 배양액으로 알맞게 희석된 정액 표본 0.2 mL이 담긴 falcon 2508 시험관 속에 담갔다. Falcon 2508 시험관은 CO_2 인큐베이터에서 수직으로 90분간 배양한 후 위상차 현미경 하에서 가장 멀리 이동된 선두 정자의 이동거리를 기록하였다. 처리군에서는 BPA, DBP, HCHO, DMSO 또는 ethanol을 각각 0.0005~0.5% 포함하는 계란 휜자를 사용하였다.

2) 정자의 운동성에 미치는 영향

정자의 운동성 검사는 정자를 배지에 희석해서 2시간 동안 CO_2 인큐베이터에서 각각의 시험 물질 0.0005~0.5% 존재하에 배양한 후 컴퓨터가 연결된 위상차 현미경으로 전체 정자 모두를 동시에 관찰하여 움직이고 있는 정자의 수를 세어 백분율로 나타내었다(김혜영 등, 1990; 김용준 등, 2002). 각 시간에 정자 운동성을 관찰하여, 배양 0시간의 정자 운동성에 대한 2시간 배양 후 정자 운동성을 백분율로 나타내어 운동성이라 하였다.

3) 정자의 생존율에 미치는 영향

정자의 생존율은 CO_2 인큐베이터에 12시간 동안 각 시험 물질 0.5%와 함께 배양한 후 트리판 블루 용액(Sigma, Germany)을 사용하는 초생체 염색법(supravital stain) (Jager *et al.*, 1984; Viganpo *et al.*, 1990)으로 염색한 후 400배 현미경하에서 200개의 정자 중 염색이 안된 정자를 백분율로 표시하였다. Fig. 1은 둥근 형태 또는 뾰족한 형태의 머리 부위가 트리판 블루에 진하게 염색된 사람 정자를 보여주고 있다.

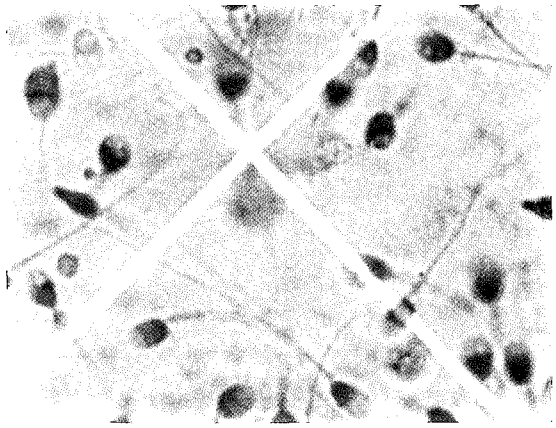

Fig. 1. Human sperm stained by trypan blue solution.

3. 통계처리

여러 처치군 간의 유의성을 one-way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman-keuls multiple range test로 검정하였다.

결 과

1. 정자의 점액 침투능에 미치는 영향

각각의 시험 물질을 첨가하여 인큐베이터에 90분 방치 후 정자의 이동거리를 측정한 결과 대조군은 35 mm까지 움직인 것이 확인되었다(Fig. 2A). BPA 0.5% 처리군에서의 정자 침투능은 15 mm로 매우 큰 감소를 나타내었으나, DBP 0.5% 처리군에서는 29 mm로 대조군과 유의성 있는 차이는 없었다. HCHO 0.5%를 첨가한 처리군에서의 침투능은 14 mm로 대조군과 비교하여 강력한 침투능 감소를 보였고, DMSO 0.5%에서도 20 mm로 유의성 있는 침투능 억제를 나타내었다. 에탄올 0.5% 처리는 31 mm의 침투능으로 대조군과 유사한 정도의 침투능을 나타내었다. Fig. 2A에서 나타난 바와 같이

BPA, HCHO와 DMSO 처리군은 통계처리 결과 유의성 있는 감소를 나타내었지만 이들 처리군간에는 유의성 있는 차이가 나타나지 않아 작용 세기를 비교할 수 없었다. 따라서 더 낮은 용량으로 추가 실험을 수행하였다. 0.05% BPA와 DMSO는 유의성 있는 침투능 억제를 나타내지 못 하였다(Fig. 2B). 반면 HCHO의 경우는 0.005% 농도까지 강력한 억제를 나타내었고 0.0005%에서도 유의성 있는 억제를 나타내어 HCHO가 가장 강력하게 정자의 점액 침투능을 억제시킴을 알 수 있었다(HCHO > BPA≒DMSO > DBP≒ethanol).

2. 정자의 운동성에 미치는 영향

배지에 시험 물질을 각각 첨가하여 인큐베이터에 2시간 방치 후 운동성을 비교하였다. 그 결과 아무 처리를 하지 않은 대조군에서의 정자 운동성은 88% 였다(Fig. 3A). 0.5% BPA 처리군에서는 정자 운동성이 강력하게 억제되었으며 0.5% DBP 처리군에서도 대조군과 통계적으로 유의성 있는 감소를 나타내었다. 한편 0.5% HCHO를 처리한 배지에서 정자는 HCHO의 강한 영향을 받아 현미경 관찰 시 운동성이 전혀 관찰되지 않았다. 0.5% DMSO 처리군에서도 유의성 있는 운동성 억제를 나타내었으며 에탄올을 0.5% 넣어준 배지에서는 81%의 운동성을 보여 감소하는 경향을 나타내었지만 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이지는 않았다. 0.5% BPA와 HCHO가 정자 운동성을 완전히 억제하여 그 세기를 비교할 수가 없었으므로 저농도 용량을 추가하여 실험을 계속 수행하였다. 0.05% BPA 처리군은 43%의 운동성을 나타낸 반면 0.05% DMSO는 유의성 있는 억제를 나타내지 못 하였다(Fig. 3B). HCHO의 경우에는 0.005% 농도까지 정자의 운동성을 완전히 억제하였으며 0.0005%에 이르러서야 35%의 운동성을 나타내어 HCHO에 의한 운동성 억제가 가장 강력함을 알 수 있었다(HCHO > BPA > DMSO > DBP > ethanol).

3. 정자의 생존율에 미치는 영향

유기용제를 12시간 동안 정자에 직접 노출시킨 후 사람 정자의 생존율에 미치는 영향을 Fig. 4에 나타내었다. 본 실험에서 대조군의 생존율은 66%를 나타내었다. 0.5% BPA 처리군에서는 생존율을

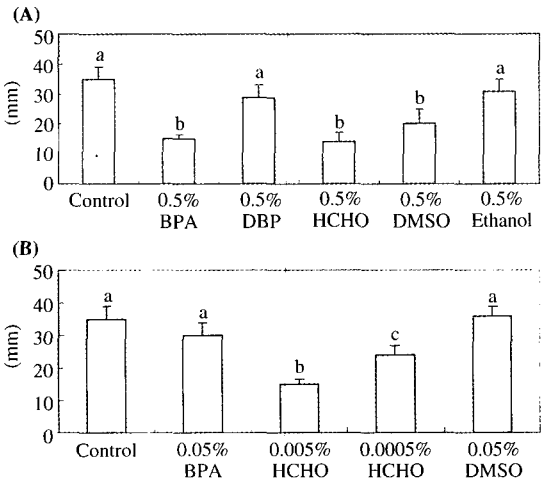

Fig. 2. Mean values of sperm penetration distance after organic solvents treatments. Experiments were performed with sperms of 3 persons. Values are the mean±S.D. of three individual determinations. Values with different letters differ from each other significantly (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p<0.05$).

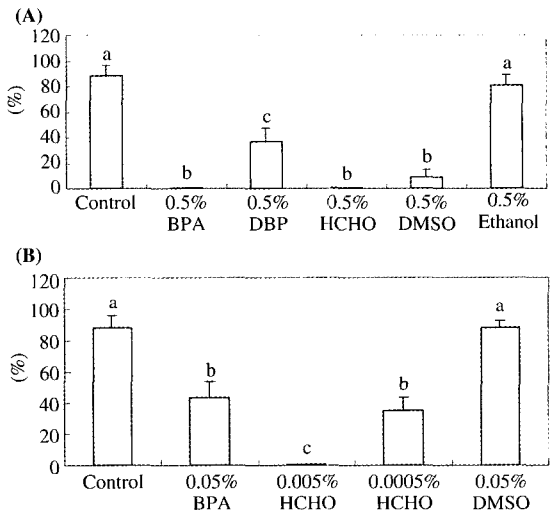

Fig. 3. Effects of BPA, DBP, HCHO, DMSO or ethanol on human sperm motility. Experiments were performed with sperms of 3 persons. Values are the mean± S.D. of three individual determinations. Values with different letters differ from each other significantly. (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p<0.05$).

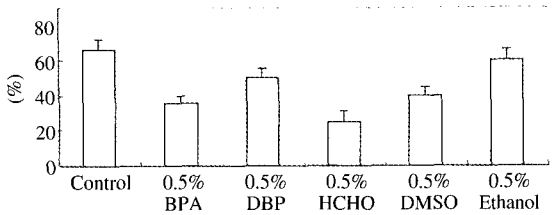

Fig. 4. Effects of BPA, DBP, HCHO, DMSO or ethanol on human sperm survival rate. Experiments were performed with sperms of 3 persons. Values are the mean±S.D. of three individual determinations. Values with different letters differ from each other significantly (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p<0.05$).

약 절반으로 감소하였고 0.5% DBP 처리군에서는 미약하지만 유의성 있는 감소를 나타내었다. 운동성 실험에서 강한 독성을 보였던 0.5% HCHO는 약 25 %의 생존율을 보여 유기용제 처리군 중에서 통계적으로 가장 큰 감소를 나타내었다(HCHO > BPA≒DMSO > DB > ethanol). 0.5% DMSO 처리군의 생존율은 약 40%로 DMSO가 정자 생존을 억제시킴을 알 수 있었다. 0.5% 에탄올을 첨가한 배지에서는 60%의 생존율을 나타내어 감소하는 경향을 나타내었지만 대조군과 유의성 있는 차이가 없음을 알 수 있었다.

고 찰

체외에서의 정자의 점액 침투능 검사(sperm mucus penetration assay)는 특별히, 정자의 가임 능력과 관련이 있다고 믿어지는 정자의 전방운동성(forward moving)을 평가하는데 빠르고 쉽게 사용할 수 있다(김진홍 등. 1996). 이 검사의 수치는 정자의 운동성과 의미 있는 상관관계가 있으므로 침투능 검사를 인간 정자의 운동성과 이에 따른 수정능력을 평가하는데 사용할 수 있다. 본 실험에서도 유기용제가 정자의 점액 침투능과 운동성에 미치는 효과가 유사한 경향을 나타내었으며 다만 운동성에 미치는 효과가 더욱 강하게 나타났다. 이러한 결과가 나타난 이유로는 첫 번째 실험인 점액 침투능의 경우, 단위 시간당 움직인 거리를 나타내므로 순발력과 속도에 미치는 요소가 포함되며 두 번째 실험인 운동성의 경우, 운동 지구력에 미치는 요소가 포함되기 때문이라고 사료된다.

이번 시험 물질들 중에 정자에 가장 큰 독성 작용을 나타낸 물질은 HCHO로 정자의 점액 침투능, 운동성과 생존율을 강력하게 억제하였다. 특히 운동성을 강력하게 억제하였는데 0.005% HCHO 존재하에서 정자는 2시간 만에 운동성을 100% 상실하였다. 내분비계 장애물질인 BPA도 운동성을 강력하게 억제하였지만 그 효과가 HCHO보다 미약하였다. DBP도 정자의 운동성과 생존율을 억제하였지만 다른 유기용제류인 HCHO, DMSO와 BPA의 효과와 비교하였을 때 그 효과는 미약하였다. 5 %의 혈중 에탄올 농도는 술을 고농도로 섭취하였을 때 나타날 수 있는 농도로 본 실험에서 사용된 농도에서 ethanol은 정자에 미치는 효과가 다른 시험물질들에 비해 가장 미약하였다. 그러나 이 역시 운동성과 생존율을 낮추는 경향을 나타내었기 때문에 단기간은 아니더라도 만성적인 노출시 문제가 될 것으로 예상된다. 많은 시험물질을 대상으로 하지는 못하였지만 본 실험은 일부 내분비계 장애물질과 용매류가 고농도에서 사람 정자에 직접적으로 독성 작용을 나타낼 수 있다는 것과 그 작용의 강도가 다양하게 나타남을 보여주었다. 특히 HCHO는 그 직접적인 효과가 다른 시험 물질들에 비해 강하였으므로 HCHO가 함유된 용기에 정자 보관 등 사용에 특별한 주의가 필요하며 인체가 환경중의 HCHO에 노출되지 않도록 각별히 노력하여야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 환경부의 차세대핵심환경기술개발사업 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

김용준, 한종현, 유일정, 지동범. Equex-STM paste 첨가 희석액이 개 정액의 동결 융해 후 정자활력 및 생존율에 미치는 영향, J. Vet. Clin. 2002; 19: 80-85.

김진홍, 김은중, 손우석, 권동진, 임용택, 이진우, 김창이, 김수평. 정자의 수정능력평가에 있어 일반 정액매개변수, 정자운동성 지수, 정자 침투거리측정법의 비교, 대한산

부인과학회지 1996; 39: 1300-1309.

김혜영, 한혁동, 권장연, 차동수, 김대현. Ham's F10 배양액 내 제대혈청, 모체혈청, BSA가 정자 생존력에 미치는 영향, 대한산부인과학회지 1990; 33: 1142-1148.

한형장, 박기현, 박병하, 박경득, 박찬규. 정자배양시 모체혈청이 정자 운동성에 미치는 영향, 대한산부인과학회지 1987; 30: 988-994.

Alexander NJ. Evaluation of male infertility with in vitro cervical mucus penetration test, Fertil. Steril. 1981; 33: 201-205.

Colborn T, vom Saal FS and Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, Environ. Health Perspect. 1993; 101: 378-384.

Foster PM, Cattley RC and Mylchreest E. Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: implications for human risk assessment, Food Chem. Toxicol. 2000; 38 (1 Suppl): S97-S99.

Gomathi C, Balasubramanian K, Bhanu NV, Srikanth V and Govindarajulu P. Effect of chronic alcoholism on semen -studies on lipid profiles, Int. J. Androl. 1993; 16: 175-181.

Gray LE Jr, Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL and Ostby J. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p, p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl-and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat, Toxicol. Ind. Health 1999: 15: 94-118.

Harris CA, Henttu P, Parker M and Sumpter JP. The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*, Environ. Health Perspect. 1997; 105: 802-811.

Jager S, Kuiken J and Kremer J. Triple staining of human sperm: technical aspects, Arch. Androl. 1984; 12(Suppl): 53-58.

Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG and Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic, Environ. Health Perspect. 1995; 103: 582-587.

Pajarinen J, Karhunen PJ, Savolainen V, Lalu K, Penttila A and Laippala P. Moderate alcohol consumption and disorders of human spermatogenesis, Alcohol Clin. Exp. Res. 1996; 20: 332-337.

Takahashi O and Oishi S. Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mic, Food Chem. Toxicol. 2003; 41: 1035-1044.

Vigano P, Brignate C, Gonfiantini C, Doldi N and Busacca M. Which is the best test to evaluate the integrity of sperm plasma membrane? Acta. Eur. Fertil. 1990; 21: 231-234.

Wang Y, Song L, Chen J, He J, Liu R, Zhu Z and Wang X. Effects of di-butyl phthalate on sperm motility and oxidative stress in rats, Zhonghua Nan Ke Xue. 2004; 10: 253-256.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 1992; 3rd edn., Cambridge University Press, Cambridge.