

임신중인 생쥐에 DEHP 투여가 번식현상에 미치는 영향 I. 임신중인 생쥐에 DEHP 투여가 분만 후 번식특성과 혈액성분에 미치는 영향

박동현 · 장현용 · 박춘근 · 정희태 · 김정익 · 양부근[†]
강원대학교 동물자원과학대학 동물자원학부

Effect of DEHP Administration on Reproduction in Pregnant Mice I. Effect of DEHP Administration on Reproductive Characteristic and Blood Hematological Values in Pregnant Mice

Dong-Heon Park, Hyun-Yong Jang, Choon-Keun Park, Hee-Tae Cheong,
Choung-Ik Kim and Boo-Keun Yang[†]

Division of Animal Resource Science, College of Animal Resource Science,
Kangwon National University, Chuncheon-si 200-701, Korea

ABSTRACT : This study is illustrated that 1) the effects of DEHP administration on body weight, sex ratio and litter size on 19 days in the prenatal period 2) the effects of reproductive organ weight and blood hematological values on 25 days postpartum in pregnant mice. DEHP was administrated to pregnant mice by intraperitoneal injection at 0, 0.5, 1.0 and 10.0mg/kg B.W from day 1 to day 16 in the gestation period with 5 times at 3 days interval. There were no significantly differences in the maternal body weight, litter size and sex ratio on 19 days in the prenatal period. The body weight of the fatal male mice was slightly lower in 1.0 and 10.0mg DEHP groups than in any other groups. The reproductive organ weight and hematological values in dam mice on 25 days postpartum were not affected by DEHP administration.

The histological evaluation of ovary in dam mice on 25 days after delivery was not different in all experimental groups, but the endometriosis and edema of uterus in dam mice were significantly decreased in 0.5mg DEHP group than that of control group. These results indicate that the administration of low concentration of DEHP was not affected on reproductive characteristic and blood hematological values in pregnant mice.

Key words : DEHP, Reproductive organ weight, Blood hematological and chemical values, Pregnant mice.

요 약 : 본 연구는 임신한 생쥐에 DEHP의 투여가 분만 후 생쥐의 번식기능과 태아의 성비에 미치는 영향을 검토하였다. 임신한 자성 생쥐에 DEHP를 투여한 후 임신 19일째에 임신한 자성의 체중, 태아의 체중, 태아수 및 태아성비를 조사한 결과, 실험개시시와 실험종료시 임신한 자성의 체중은 각 투여구간에 차이가 없었으며, 자·웅성태아의 체중, 평균 태아수 및 태아의 자·웅성 성비는 투여구간에 커다란 차이가 없었다. 임신기에 DEHP의 투여가 분만한 후 어미의 번식기관 무게와 혈구화학치에 미치는 영향을 조사한 결과, 실험개시시 체중, 실험종료시 체중, 자궁 및 난소의 무게는 투여구간에 차이가 없었다. 혈구화학치에 미치는 효과를 검사한 결과, 각 투여구간에 커다란 차이는 없었다. 임신기에 DEHP의 투여가 분만한 후 난소와 자궁의 조직에 미치는 영향을 조사한 결과, 난소에서는 모든 투여구간에 커다란 차이가 없었으나, 자궁에서는 0.5mg 투여구가 대조구에 비해 자궁내막층과 부종이 감소했으며, 1.0mg 투여구와 10.0mg 투여구는 일부에서 자궁내막층이 감소했지만 0.5mg 투여구에서의 감소보다는 적었다. 임신중인 생쥐에 저농도의 DEHP의 투여는 임신중인 모체와 태어난 자손의 번식 특성과 혈구화학치에 영향을 미치지 않았다.

서 론

1920년대 이후 플라스틱의 가소제로 이용되고 있는 phthalate

[†] 교신저자: 강원도 춘천시 호자2동 192-1, 강원대학교 동물자원과학대학 동물자원학부. (우) 200-701, (전) 033-250-8623, (팩) 033-244-2532, E-mail: bkyang@kangwon.ac.kr

esters는 장난감, 비닐바닥재, 의료장비 및 식품포장지등에 원료로서 사용되어왔다(Keys *et al.*, 1999). 한국에서는 매년 약 9만톤이 상업적 또는 의학적 목적으로 사용되고 있으며, 사용되고 있는 전체 가소제의 1/4 정도가 di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)이다. DEHP는 미국 등 대부분의 국가에서 내분비계 장애물질 중 의심되는 물질로 분류하고 있으며, 한국에서는 관찰물질로 지정하여 사용과 수입을 규제하기 시작했지만

현재까지도 많은 양이 사용되고 있다.

환경에서 DEHP의 인체내 축적경로는 매우 다양하면서도 그 농도가 매우 낮게 측정되며 개개인의 노출되는 경로에 따라 영향을 받는 정도가 다르므로 정확히 인간에게 있어서 DEHP의 축적 정도를 산출하기란 거의 불가능한 것으로 보고되었다(정, 1998).

DEHP의 생물체내에 유입은 간에서는 세포의 DNA 합성과 유사분열을 증가시켜 종양을 유발하며, peroxisome의 숫자와 크기를 증가시키는 것으로 보고되고 있으며(Shneider *et al.*, 1989; Huber *et al.*, 1996), 웅성에서는 정액생산의 감소(Siddiqui & Srivastava, 1992), 세정관의 위축(Oishi *et al.*, 1993), 정소 등 번식기관의 무게 감소(Oishi & Hiraga, 1979) 및 testosterone의 감소(Oishi & Hiraga, 1980) 등이 보고되고 있지만, 연구자들마다 상이한 결과를 보고하고 있다. 또한, 자성에서는 번식주기의 연장(Davis *et al.*, 1994), granulosa 세포의 크기 감소(Treinen *et al.*, 1990) 및 호르몬 분비의 변화(Laskey & Berman, 1993) 등이 보고되고 있다.

본 연구는 임신기의 자성 생쥐에 저 농도의 DEHP의 투여가 분만 후 번식기관과 혈액성분에 미치는 영향을 검토하고, 태아의 체중, 태아수 및 성비에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물, 혈액 채취, 번식기관 무게 측정, 혈구 분석 및 조직검사

생쥐의 혈액 채취, 번식기관 무게 측정, 혈구 분석 및 조직검사는 "DEHP의 투여가 생쥐의 번식특성과 혈액 성분 변화에 미치는 영향"의 방법에 준하여 실시하였다.

2. DEHP의 제조 및 투여방법

DEHP(Aldrich)의 제조는 corn oil(Sigma)에 희석하여 제조하였다.

DEHP의 투여는 자성 생쥐에 체중 kg당 corn oil(control),

0.5, 1.0 및 10.0mg DEHP의 용량으로 1회 투여하고 투여 당일 웅성 생쥐와 교배시켰으며 교배 후 다음날 질전이 확인된 개체를 임신한 것으로 판정하여, 3일 간격으로 5회 복강주사하였다. Corn oil의 투여는 체중 kg당 3ml을 복강주사하였다. 공시동물은 임신19일째 태아실험을 위한 부검군은 각 처리구당 10마리씩 총 40마리, 출산 후 23일째 부검군은 각 처리구당 12마리씩 총 48마리를 완전임의배치법에 의해 배치하였다.

3. 태아 성비 검사

웅성 ICR 생쥐와 교배시킨 날을 임신 1일로 하며, 분만 1일전인 임신 19일에 태아의 숫자, 체중 및 성비를 검사하였다. 임신 19일에 자성 생쥐를 경추탈골시킨 다음, 안과가위로 가슴부위를 절개하고 자궁을 적출한 후 filter paper에서 태아를 꺼내어 양수를 제거하고 태아의 숫자와 성비를 판단하였다.

4. 분만한 어미의 검사

분만한 어미는 분만일을 비유 1일로 하며 비유 23일에 새끼를 이주시켰으며, 이유 2일 후에 체중 및 번식기관 무게를 검사하였다.

5. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS Package를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 최소 유의차검정(Least Significant Difference test ; LSD test)을 실시하여 통계처리를 실시하였다.

결 과

임신한 자성 생쥐에 DEHP의 투여가 임신한 자성의 체중, 태아의 체중, 태아수 및 태아의 성비에 미치는 결과를 Table 1에 요약하였다.

임신한 자성에 DEHP를 체중 kg당 0, 0.5, 1.0 및 10.0mg DEHP를 투여한 구에서 실험개시시의 체중과 임신 19일째인

Table 1. Body weight, litter size and sex ratio of pups born after DEHP administration in pregnant mice

DEHP (mg/kg B.W)	Maternal body weight (g)		Fetal body weight (g)		Litter size (n)	Fetal sex ratio (%)	
	Initial	Final	Male	Female		Male	Female
0	29.14±2.57	57.12±3.04	1.31±0.14	1.26±0.10	12.4±1.9	50.5±8.7	49.5±8.7
0.5	29.16±4.38	58.56±5.80	1.30±0.11	1.27±0.10	13.0±2.3	57.4±8.2	42.6±8.2
1.0	31.36±4.76	58.32±7.28	1.24±0.14	1.23±0.10	14.0±2.7	56.4±8.3	43.6±8.3
10.0	31.32±0.98	58.70±4.11	1.25±0.10	1.27±0.08	13.0±2.2	54.3±5.1	45.7±5.1

실험종료시의 체중은 투여구간에 커다란 차이는 없었다.

임신 19일째 태아체중을 조사한 결과, 음성태아의 평균체중은 1.0mg 투여구와 10.0mg 투여구가 각각 1.24 및 1.25g으로 여타구(대조구, 1.31 및 0.5mg 투여구, 1.30g)보다 다소 낮은 체중을 나타냈지만 통계적 유의차는 인정되지 않았으며, 자성태아의 평균체중은 각각 1.26, 1.27, 1.23 및 1.27g으로 투여구간에 커다란 차이가 없었다($P>0.05$). 또한 자·음성 태아의 평균 태아수와 태아의 성비는 투여구간에 차이가 없었다($P>0.05$).

임신기에 DEHP의 투여가 분만한 후 어미의 번식기관 무게와 자궁과 난소의 조직에 미치는 결과를 Table 2와 Fig. 1 및 Fig. 2에 나타내었다.

Table 2에 나타난 바와 같이 실험개시 체중과 실험종료시의 체중은 투여구간에 차이가 없었으며($P>0.05$), 자궁과 좌·우측 난소의 무게도 투여구간에 커다란 차이는 없었다($P>0.05$).

Fig. 1과 2는 임신중에 DEHP의 투여가 분만한 후 어미의 난소와 자궁의 조직에 미치는 영향을 조사한 결과로서, 난소

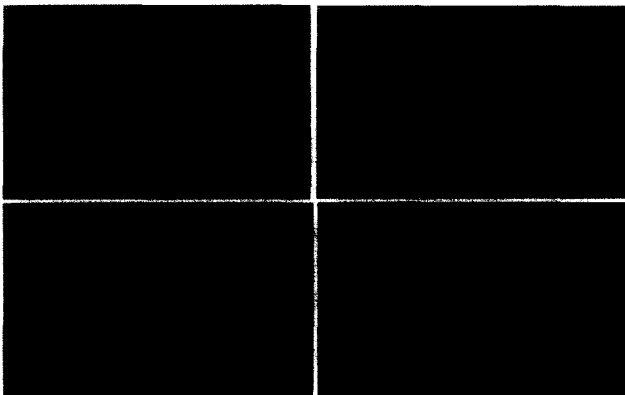


Fig. 1. Light micrograph of ovary according to the DEHP administration for 2 weeks in pregnant mouse. H&E stain($\times 100$).
1-1. Control as corn oil administration, 1-2. 0.5mg/kg B.W DEHP administration, 1-3. 1.0mg/kg B.W DEHP administration, 1-4. 10.0mg/kg B.W DEHP administration.

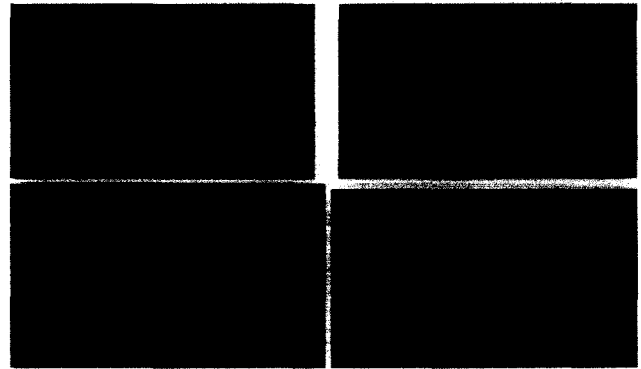


Fig. 2. Light micrograph of uterus according to the DEHP administration for 2 weeks in pregnant mouse. H&E stain($\times 100$).
2-1. Control as corn oil administration, 2-2. 0.5mg/kg B.W DEHP administration, 2-3. 1.0mg/kg B.W DEHP administration, 2-4. 10.0mg/kg B.W DEHP administration.

에서 과립막과 난포외막 등의 난포 발육상태와 황체 등을 조사한 결과, 투여구간에 커다란 차이는 없었다.

자궁은 자궁내막의 변화, 자궁근층의 두께와 세포크기 및 염증상태 등을 조사한 결과(Fig. 2), 0.5mg 투여구는 대조구에 비해 자궁내막층과 부종이 감소했으며, 1.0mg 투여구와 10.0mg 투여구는 일부에서 자궁내막층이 감소했지만 0.5mg 투여구에서의 감소보다는 적었다.

임신중에 DEHP 투여가 분만한 후 어미의 혈구화학치에 미치는 결과를 Table 3에 요약하였다.

DEHP의 투여가 혈구화학치에 미치는 효과를 검사한 결과에서도 각 투여구간에 혈구화학치는 커다란 차이는 인정되지 않았다($P>0.05$).

고 찰

본 연구는 임신중인 자성 생쥐에 저 농도의 DEHP 투여가 분만 후 번식기관과 혈액성분에 미치는 영향을 검토하고, 태아의 체중, 태아수 및 성비에 미치는 영향을 검토하였다.

실험동물에서 DEHP의 독성은 간종, hypolipidemia, 성선

Table 2. Effects of DEHP administration on body weight and reproductive organ weight at 25 days postpartum in female mice

DEHP (mg/kg B.W)	Body weight(g)		Uterus (g)	Ovary(g)	
	Initial	Final		Right	Left
0	30.72 \pm 2.59	37.57 \pm 2.12	0.204 \pm 0.027	0.0088 \pm 0.0012	0.0077 \pm 0.0010
0.5	31.58 \pm 2.52	37.33 \pm 3.07	0.214 \pm 0.075	0.0090 \pm 0.0016	0.0072 \pm 0.0016
1.0	31.72 \pm 1.85	37.85 \pm 2.15	0.191 \pm 0.062	0.0087 \pm 0.0011	0.0076 \pm 0.0012
10.0	31.78 \pm 2.95	37.50 \pm 5.27	0.224 \pm 0.074	0.0086 \pm 0.0021	0.0071 \pm 0.0016

Table 3. Blood hematological values on the DEHP administration at 25 days postpartum in female mice

Parameter	DEHP (mg/kg B.W)			
	0	0.5	1.0	10.0
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	10.38± 1.67	8.90± 1.23	9.01± 1.16	9.46± 1.63
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	11.08± 1.61	10.66± 1.13	11.14± 0.92	11.42± 0.76
HB (g/dl)	17.74± 2.34	17.80± 1.52	18.05± 1.46	18.91± 1.29
HT (%)	49.07± 6.72	47.65± 4.64	49.96± 4.36	50.28± 7.13
MCV (μm^3)	44.32± 3.22	44.76± 1.29	44.75± 0.78	43.83± 2.13
MCH (pg)	16.10± 1.24	16.70± 0.93	16.17± 0.72	15.85± 0.95
MCHC (g/dl)	36.35± 0.89	37.37± 1.75	36.30± 1.32	36.37± 1.23
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	900.9 ±63.8	897.4 ±67.3	953.4 ±134.5	958.5 ±108.7

WBC : White blood cell, RBC : Red blood cell, HB : Hemoglobin, HT : Hematocrit, MCV : Mean corpuscular volume, MCH : Mean corpuscular hemoglobin, MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration, PLT : Platelets.

독성, 기형 발생, 돌연변이 유발 및 암 발생 등이 보고되고 있지만(Agarwal *et al.*, 1986; Tsutsui *et al.*, 1993), 동물사육실의 조건, 급여된 사료의 성분, 실험동물의 사육조건, 교배방법, 투여경로 및 종간의 차이점 때문에 보고자들마다 상반된 결과를 보고하고 있다.

생쥐에 체중 kg당 100mg DEHP 이상의 농도를 사료에 혼합해서 공급하면 자·웅성 모두에게 수정시 손상을 입힌다고 보고되었으며, 설치류에서는 수정란과 태아에 독성이 있는 것으로 보고되었다(Lamb *et al.*, 1987; Agarwal *et al.*, 1989). 임신한 설치류에 대한 보고에서는 태아체중의 감소, 유산의 증가 및 태아의 골격과 신경관 기형의 증가 등 태아에 유해한 영향을 미친다고 보고되었다(Yagi *et al.*, 1980; Tomita *et al.*, 1982).

본 실험에서는 임신한 자성 생쥐에 DEHP를 투여한 후 임신 19일째에 임신한 자성의 체중, 태아의 체중, 태아수 및 태아성비를 조사한 결과, 임신한 어미와 자성태아의 체중은 투여구간에 차이가 없었으며, 웅성태아의 체중은 1.0mg 투여구와 10.0mg 투여구가 대조구와 0.5mg 투여구보다 다소 낮은 체중을 나타냈지만 커다란 차이는 없었다. 또한 자성에서의 평균 태아수와 태아의 자·웅성 성비는 투여구간에 커다란 차이가 없었다.

Shiota와 Mima(1985)는 임신한 ICR 생쥐에 임신기간 7~9일 동안 DEHP 및 MEHP를 복강주사와 경구로 투여시, 체중 kg당 1,000mg DEHP의 경구투여구에서 태아의 기형이 증가하고 몸무게가 감소했지만, 다른 투여구에서는 효과가 없었기 때문에 생쥐에서 수정란 독성과 기형 발생은 복강주사가

아닌 경구투여시 일어나며, 이것은 투여경로에 의한 대사 및 분비에 차이점이 있기 때문에 발생할 수 있다고 보고하였으며, Lamb 등(1987)은 CD-1 생쥐에 0.01~0.3% DEHP를 사료에 혼합해서 급여시, 0.1% 급여구 이상에서 태아의 생존율과 태아숫자가 통계적으로 유의하게 감소하였다고 보고하였다.

또한, Tyl 등(1988)은 CD-1 생쥐에 0.025~0.15% DEHP를 사료에 혼합해서 임신기 17일 동안 급여시, 임신한 어미에서는 음식 소비, 간의 무게 및 황체의 숫자는 투여구간에 차이가 없었으나 어미의 체중과 태아가 들어있는 자궁의 무게는 0.10% 급여구 이상에서 감소하였으며, 태아에서는 태아의 성비는 투여구간에 차이가 없었지만, 태아의 생존율과 자·웅성 태아의 체중은 0.10% 급여구 이상에서 감소하였다고 보고하였는데, 이들의 결과와 본 실험의 결과가 일치하지 않는 것은 본 실험에서는 DEHP의 투여농도가 낮고 투여방법의 차이에 기인된다고 생각된다.

본 실험에서 임신기에 DEHP의 투여가 분만한 후 어미의 번식기관 무게, 혈구 화학치 및 조직에 미치는 영향을 조사한 결과, 자궁과 난소의 무게는 투여구간에 차이가 없었으며, 혈구 화학치와 난소의 조직은 투여구간에 커다란 차이가 없었지만, 자궁의 조직에서는 0.5mg 투여구가 대조구에 비해 자궁내막층과 부종이 감소했으며, 1.0mg 투여구와 10.0mg 투여구는 일부에서 자궁내막층이 감소했지만 0.5mg 투여구에서의 감소보다는 적게 나타났다.

본 실험의 결과, 임신기에 저 농도의 DEHP 투여는 분만 후 번식기관과 혈액성분에 영향을 미치지 않으며 태아의 생존율과 태아 성비에도 영향이 없는 것으로 나타났다.

인용문헌

- Agarwal DK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J (1989) Effects of parenteral di(2-ethylhexyl)phthalate on gonadal biochemistry, pathology and reproductive performance of mice. *J Toxicol Environ Health* 26:39-59.
- Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ (1994) Di(2-ethylhexyl)phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 128:216-223.
- Huber WW, Grasi-Kraupp B, Schulte-Hermann R (1996) Hepato- carcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implication on human risk. *Crit Rev Toxicol* 26:365-481.
- Keys DA, Wallace DG, Kepler TB, Conolly RB (1999) Quantitative evaluation of alternative mechanism of blood and testes disposition of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)-phthalate in rats. *Toxicol Sci* 49:172-185.
- Lamb JC, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR (1987) Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 88:255-269.
- Laskey JW, Berman E (1993) Steroidgenic assessment using ovary culture in cycling rats : effect of di(2-ethylhexyl)-phthalate on ovarian steroid production. *Reprod Toxicol* 7: 25- 33.
- Oishi S (1993) Strain differences in susceptibility to di(2-ethylhexyl) phthalate-induced testicular atrophy in mice. *Toxicol Lett* 66:47-52.
- Oishi S, Hiraga K (1979) Effect of phthalic acid esters on gonadal function in male rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 21:65-67.
- Oishi S, Hiraga K (1980) Testicular atrophy induced by phthalic acid esters : effect on testosterone and zinc concentrations. *Toxicol Appl Pharmacol* 53:35-41.
- Shiota K, Mima S (1985) Assessment of the teratogenicity of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in mice. *Arch Toxicol* 56:263-266.
- Shneider B, Schena J, Truog R, Jacobson M, Kevy S (1989) Exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate in infants receiving extra-corporal membrane oxygenation. *N Engl J Med* 320:1563.
- Siddiqui A, Srivastava SP (1992) Effect of di(2-ethylhexyl)-phthalate on rat sperm count and on sperm metabolic enzymes. *Bull Environ Contam Toxicol* 48:115-119.
- Tomita I, Nakamura Y, Yagi Y, Tutikawa K (1982) Teratogenicity/fetotoxicity of DEHP in mice. *Environ Health Perspect* 45:71-75.
- Treinen KA, Dodson WC, Heindel JJ (1990) Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation and progesterone production by mono(2-ethylhexyl)phthalate in rat granulosa cell cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 106:334-340.
- Tsutsui T, Watanabe E, Barrett JC (1993) Ability of peroxisome proliferators to induce cell transformation, chromosome aberrations and peroxisome proliferation in watured syrian hamsters embryo cell. *Carcinogenesis* 14:611-618.
- Tyl RW, Price CJ, Marr MC, Kimmel CA (1988) Developmental toxicity evaluation of dietary di(2-ethylhexyl) phthalate in Fisher 344 rats and CD-1 mice. *Fund Appl Toxicol* 10:395-412.
- Yagi Y, Nakamura Y, Tomita I, Tsuchikawa K, Shimoi N. (1980) Teratogenic potential of di-and mono-2-ethylhexyl-phthalate in mice. *J Environ Pathol Toxicol* 4:533-544.
- 정지영 (1998) 내분비교란물질인 DEHP, DBP의 생체내 영향과 내분비계 교란물질 검색법 정립에 대한 연구. 서울대학교 수의과대학원 석사논문집.