

실험동물에서의 환경호르몬 물질의 생체내 영향 및 검색법 정립에 대한 연구

정지윤 · 이영순*

서울대학교 수의과대학
(계재승인: 2005년 11월 28일)

Estrogenic Effects of endocrine disruptors and establishment of screening methods in mice

Ji-Youn Jung, Yong-Soon Lee*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742 Korea
(Accepted: November 28, 2005)

Abstract : The major protocol features of the rodent uterotrophic assay have been evaluated using a range of reference chemicals. The protocol variables considered include the selection of the test species and route of chemical administration, the age of the test animals, the maintenance diet used, and the specificity of the assay for estrogens. The rodents were ovariectomized under general anesthesia via bilateral flank incisions and randomly assigned to groups of 5 animals. Chemicals were DEHP, DBP, BPA and NP, were injected sc once daily with combinations of chemicals treatments for 3 days. In the results, the reported estrogenic chemicals DEHP and DBP were both negative in the single dose treatments. But, in the combinations of chemicals treatments, DEHP and DBP increased in bud number of mammary gland. Treatment of ovariectomized mice with combinations of other chemicals resulted in uterine and vaginal hyperplasia. The additive estrogenic effects were seen with the combinations of 17 β -estradiol and DBP treatment. the competitive estrogenic effects were seen with the combinations of 17 β -estradiol and nonylphenol, 17 β -estradiol and bisphenol-A treatments. These results offers a systematic and mechanistically informative approach to assessing estrogenicity. it provides a useful profile of activity using a reasonable amount of resources and is compatible with the study of individual chemicals as well as the investigation of interactions among combinations of chemicals. The results described illustrate the intrinsic complexity of evaluating chemicals for estrogenic activities and conform the need for rigorous attention to experimental design and criteria for assessing estrogenic activity.

Key words : di-ethylhexyl phthalate, di-n-butyl phthalate, endocrine disruptors, estrogenic effects

서 론

Endocrine disruptors(EDs)란 “무처리 생물의 내분비계에 대하여 그 개체 혹은 그 자손의 세대 어떤 단계에서 든 건강 장해성의 변화를 일으키는 외래성 물질” 또는 “생체의 항상성, 생식, 발생, 혹은 행동에 관여하는 각종

생체 호르몬 등의 합성, 분비, 생체내 수송, 수용체와의 결합, 그리고 그 호르몬작용 및 그 배제 등의 제 과정을 방해하는 성질을 가진 외래성 물질”을 일컫는 말이다. 이러한 내분비 교란성 물질 중에서 플라스틱에 유연재로 사용되고 있는 di-ethylhexyl phthalate(DEHP)와 di-n-butyl phthalate(DBP)가 최근에 문제 시 되고 있다.

*Corresponding author: Yong-Soon Lee
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[Tel: +82-2-880-1298, Fax: +82-2-876-7610, E-mail: leeys@snu.ac.kr]

Di-phthalate 또는 bis-phthalate, DEHP로도 불리고 있는 이 물질은 플라스틱에서 유연제로 쓰이는 액상의 물질이다. DEHP는 우리나라에서만 매년 약 9만 톤이 상업적 혹은 의학적 목적으로 사용되고 있는데, 플라스틱의 용도(우의, 신발, 바닥재료, 식탁보, 장난감 등)에 따라서 140%의 DEHP를 함유할 수 있으며, 혈액 튜브 등의 의학용 도구에도 사용되고 있다. 이러한 DEHP는 일단 플라스틱 제품에 사용되어진 후에 시간이 경과하면서 서서히 용출되며, 따라서 공기, 흙, 물 등에 광범위하게 분포할 수 있다. 또한, 음식물에 있어서도 포장재, 제조과정, 수송 중에 DEHP가 잠재적으로 들어갈 수 있으며, 육류에서도 발견되고 있으며, 또한 오일이나 지방성 음식에 더 잘 녹는 성질을 가지고 있어서 우유나 치즈에서 최고 농도로 검출되었다는 보고도 있다 [7, 10].

DBP는 무색, 무미, 무취의 오일성상의 액체이며, 플라스틱을 유연하게 만드는 성질을 가지고 있어서 카펫, 페인트, 접착제, 헤어스프레이, 로켓 연료 등에 다양하게 사용되고 있다. DBP는 쉽게 기화하지는 않지만, 일종의 가스로서 공기 중에 상당히 많은 양이 함유될 수 있어서 공기 중의 먼지와 결합할 수도 있으며, 일반적으로 공기 중에서 수일 내에 분해된다. DBP는 물에 잘 녹지 않으나 더러운 먼지입자가 물과 접촉 시에는 물에서 검출되기도 한다. 이러한 DBP의 자연계에서의 분해는 박테리아가 관련하는데 박테리아의 종류 및 온도에 따라 수 일 내지는 수개월 걸려서 분해 되기도 한다 [1].

이상에서의 연구 보고서에서 보듯이 DEHP와 DBP는 모두 환경에서 인체에 영향을 줄 수 있는 물질로서 그동안은 안전한 물질로 판단되어 왔으나, 최근의 동물 실험 및 인간에게서 일어나는 환경에 의한 생식기 계통의 이상, 정자수의 감소 즉 내분비교란성 물질이라는 의심을 받고 있는 물질들이다. 이러한 물질들은 그들 하나하나의 독성을 나타내기에는 미약할지라도 이러한 여러 물질에 생체가 노출되었을 때 그들 물질간의 상승작용에 의한 인체에의 영향 그리고 체내에 만성으로 축적시의 영향을 생각할 때 이러한 내분비 교란성 물질에 대한 연구가 활발히 이루어져야 할 것이다. 또한, 오늘날 우리가 일상생활에서 섭취하는 환경 호르몬 물질들은 그 하나하나 마다의 EDs 작용은 미약할 수 있으나, 그러한 작용이 서로 상가 작용을 일으킬 때의 위험요소는 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다. 이러한 DEHP, DBP가 생체 내 만성 독성뿐만 아니라 내분비계의 장애 물질로서 최근에 대두되고 있는 바 본 실험에서는 이 물질을 이용한 생체내에서의 내분비계 장애 및 이를 토대로 내분비계 교란 물질 검색법의 정립을 위해서 연구를 실행하였다.

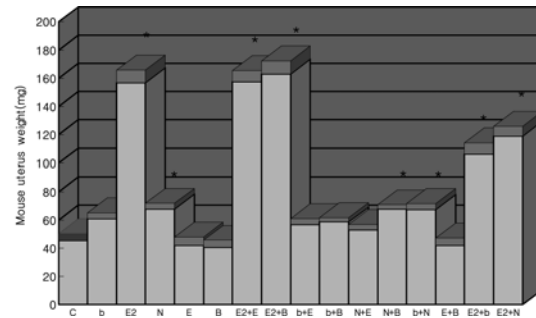


Fig 1. Change of uterus weight of mice exposed to chemical mixture Each value represents mean±SD (n = 5) C, corn oil 5 ml/kg; E2, 17 β -estradiol 5 μ g/kg; B, DBP 1,500 mg/kg; E, DEHP 1,500 mg/kg; b, bisphenol-A 100 mg/kg; N, nonylphenol 100 mg/kg *, significantly different from control group ($p < 0.05$).

재료 및 방법

실험동물

대한 실험 동물센터에서 암컷 9주령 마우스(ICR) 80 마리를 구입하여 실험실 환경에 1주일간 순화기간을 두고 건강한 개체만을 선별하여 사용하였다. 지금까지의 보고서에 의하면 랫드와 마우스의 내분비 교란 물질에 대한 감수성이 실험 물질마다 다르게 나타났으나 [2,12], 이전 실험 결과를 기준으로 볼 때 랫드와 마우스에 DEHP, DBP 단독 투여시의 estrogenic effect에 대한 감수성은 유의적인 차이가 없게 나타난 바, 마우스를 실험 동물 종으로 선택하였다. 순화기간이 지난 마우스에 난소 적출술을 실시한 후 2주간 기간을 두어 난소 적출이 완벽하게 된 마우스를 실험에 사용하였다. 예비사육 및 실험 전 기간 동안 사육환경은 온도 23 \pm 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 60 \pm 10%를 유지하였고, 마우스를 자연 채광 하에서 케이지(polycarbonate, 26 \times 42 \times 18 cm, 명진, 한국)에 각각 5 마리씩 넣어 사육하였으며, 실험동물용 사료 (삼양사료, 한국)와 식수를 자유로이 공급하였다.

시험물질

시험 물질인 DEHP, DBP, nonylphenol, bisphenol-A, 그리고 17 β -estradiol (E2)을 Sigma (USA)사에서 구입하였으며, 실온·차광 하에 보관하며 실험에 사용하였다.

투여 방법 및 투여 군의 구성

일반적으로 내분비 교란 물질에 대한 검색 방법에 있어서의 투여경로는 피하주입과 복강주입이 있으나, 실험하는 물질의 혼합투여시 피하주입에 대한 보고가 없으므로 피하주입으로 투여하였으며, 내분비 교란 물질의 *in*

vivo 검색법 중 하나인 설치류 3일 자궁 증식 에세이 방법에 따라서 투여횟수 및 투여기간은 1일 1회, 3일간 투여를 원칙으로 실험을 실시하였다. 투여 군은 총 16개 군으로 각 군당 5마리의 마우스를 두어 실험에 사용하였다.

시험군의 구성, 투여농도 및 용량

1) 시험군의 구성

Group	Dose
corn oil	5 m/kg
bisphenol-A	100 mg/kg
17β-estradiol	5 μg/kg
nonylphenol	100 mg/kg
DEHP	1,500 mg/kg
DBP	1,500 mg/kg
E2+DEHP	E2 5 μg/kg + DEHP 1,500 mg/kg
E2+DBP	E2 5 μg/kg + DBP 1,500 mg/kg
BPA+DEHP	BPA 100 mg/kg + DEHP 1,500 mg/kg
BPA+DBP	BPA 100 mg/kg + DBP 1,500 mg/kg
NP+DEHP	NP 100 mg/kg + DEHP 1,500 mg/kg
NP+DBP	NP 100 mg/kg + DBP 1,500 mg/kg
BPA+NP	BPA 100 mg/kg + NP 100 mg/kg
DEHP+DBP	DEHP 1,500 mg/kg + DBP 1,500 mg/kg
E2+BPA	E2 5 μg/kg + BPA 100 mg/kg
E2+NP	E2 5 μg/kg + NP 100 mg/kg

E2, 17β-estradiol; BPA, bisphenol-A; NP, nonylphenol

2) 용량 설정 : DEHP, DBP, Bisphenol-A, estradiol, nonylphenol 은 기존의 보고서에 근거하여 estrogenic effect를 주는 최소용량을 투여 용량으로 설정하였다[5, 6, 9].

3) 투여 방법 : Bisphenol-A는 먼저 100% ethanol에 녹인 후 corn oil에 ethanol의 용량이 10%가 되도록 희석하여 투여하고, estradiol, nonylphenol, DEHP 그리고 DBP 는 corn oil에 각 군에 맞는 용량을 희석하여 마리 당 volume이 5 m/kg 이 되도록 견갑부 피하에 투여하였다.

실험 항목

1) 시험 방법

난소 적출된 랫드 및 마우스를 투여 직전 군 분리한 다음 시험 물질을 3일간 매일 1회 투여하였다. 임상 관찰 및 체중변화는 매일 관찰 기록하였으며, 마지막 투여 후 24시간 경과 시에 부검을 실시하였다.

2) 난소 적출술

Ketamin과 Rumpun을 9 : 1의 비율(v/v)로 혼합하여 랫드, 마우스 각각 2 m/kg이 되도록 복강에 주입하여 마취시킨 후, 요추 1-3번째에 해당하는 부위를 1.5 cm 정도 절개하여 피부 및 근육을 분리한 후 난소를 제거한 다음 봉합하였다. 난소 적출의 완벽하게 되었는지의 여부를 확인하기 위해서 수술 후 시험물질 투여 전 2 주 동안 질 도말을 통하여 질 상피 세포의 각화 유무를 판독하였다.

3) 조직학적인 검사

10% 중성포르말린에 고정된 질, 자궁, 간장 그리고 신장을 탈수, 파라핀침투 및 포매한 후 조직 절편을 제작하여 H&E 염색을 하여 광학 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 한편, 광학 현미경으로의 관찰시 질 점막 상피세포의 각화 및 높이, 자궁체에서 난관으로 1되는 부위를 일정하게 채취하여 자궁 점막 상피세포의 상태 및 높이, 그리고 난관의 직경을 측정하였다.

4) 유선 조직의 관찰

부검 시 채취한 유선을 슬라이드 글라스에 잘 펴서 도말 한 다음, glacial acetic acid와 100% ethanol을 1 : 3으로 섞은 용액에 60분간 고정시킨 다음 70% ethanol과 증류수로 각각 15분씩 조직을 씻어낸 후 24시간동안 alum carmine에 침적하여 염색을 실시하는 whole mount assay법을 이용하였다. 염색액인 alum carmine은 1g의 carmine과 2.5 g의 alum potassium을 500 ml의 증류수에 넣어 섞은 후 20분간 끓여서 다시 500 ml이 되도록 증류수를 부은 후 필터에 여과하고 thymol 100 mg을 첨가하여 만들었다. 24시간 alum carmine 염색을 실시한 조직슬라이드를 탈수한 후 toluene에 담귀서 지방조직을 분해하였고, 1주일이 지난 후 permount로 slide glass 상에 mounting을 실시하여, 실체현미경(Olympus, Japan)으로 terminal end buds와 terminal end ducts의 수를 유선 림프절을 중심으로 한 일정한 배율(×20)상에서 관찰하였다.

5) 각종 조직의 apoptosis 관찰

파라핀 포매한 질, 자궁, 간장 그리고 신장조직에서의 apoptosis를 관찰하기 위하여 ApopTag kit(Oncor, USA)를 이용하여 TUNEL assay를 실시하였다. 조직을 탈파라핀 과정을 거친 후 흡수하여 proteinase K에 15분간 적용시킨 후, 2% 과산화수소에 5분간 담귀서 내인성 peroxidase를 차단시켰다. Digoxigenin-dUTP end labeled DNA를 anti-digoxigenin-peroxidase antibody로 검출하고, 이를 0.05% DAB를 이용하여 발색시킨 후, methylgreen

으로 5분간 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

자료의 통계처리

부검 시 측정된 모든 장기 및 각 조직에서 산출된 모든 수치들은 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 유의성은 공히 95%($p < 0.05$) 및 99%($p < 0.01$)의 수준에서 검정하였다.

결 과

투여 기간 중의 체중 변화

투여 전 기간을 통하여 투여 물질에 의하여 체중이 변했다고 여겨지는 변화를 관찰할 수 없었으며, 통계학적으로도 유의적인 차이를 나타내는 군은 없었다.

Uterus weight 및 fluid의 존재 유무

전체 음성대조군인 corn oil군을 제외한 15개군 중에서 통계학적으로 자궁무게의 유의적인 증가를 보인 군은 8개군이었으며, 이 군들의 각각의 자궁 무게는 다음과 같이 4개 그룹으로 나눌 수 있었다. 즉, 150 mg 이상인 그룹, 100-150 mg인 그룹, 60-100 mg인 그룹, 그리고 60 mg 이하인 그룹으로 나누어 보았다.

150 mg 이상인 그룹에는 17 β -estradiol(156.94), 17 β -estradiol + DEHP(157.52 mg), 17 β -estradiol + DBP(169.12 mg)으로 3개군이었으며, 자궁 무게가 100-150 mg인 군으로는 17 β -estradiol + bisphenol-A(106.24 mg), 17 β -estradiol + nonylphenol(118.96 mg) 군으로 2개군이였다. 60-100 mg의 자궁 무게를 보인 군은 nonylphenol(67.84 mg), nonylphenol + DBP(67.8 mg), nonylphenol + bisphenol-A(67.64 mg), bisphenol-A(61.04 mg)군으로 4개군이었고, 60 mg 이하를 보인 군은 DEHP(42.02 mg), DBP(40.72 mg), bisphenol-A + DEHP(56.88 mg), bisphenol-A + DBP(58.78 mg), nonylphenol + DEHP(52.96 mg), DEHP + DBP(42.24 mg), 그리고 음성대조군인 corn oil(45.48 mg)군으로 7개군이였다(Fig 1).

한편, 자궁 내 fluid의 존재는 자궁 무게가 100 mg 이상인 군에서의 모든 개체에서 발견되었으며, 그 이하 무게에서의 군에서는 발견되지 않았다.

유선조직의 변화

이번 실험에서의 환경호르몬 물질 또는 환경호르몬 물질로 의심되는 물질들을 혼합 투여시에 유선 조직의 변화를 관찰해 본 결과는 다음과 같다(Table 1).

① 17 β -estradiol을 단독 또는 다른 물질과 혼합투여시의 모든 군에서 유선조직에서의 bud의 숫자가 음성대조군에 비하여 증가한 것을 관찰할 수 있었다.

Table 1. Change of terminal ductal structures in mammary glands of female mice exposed to chemical mixture. C, corn oil 5 m//kg; E2, 17 β -estradiol 5 μ g/kg

Group	No. of Structure	
	Terminal end buds	Terminal ducts
Corn oil	85 \pm 9**	56 \pm 6**
E2 + DBP	112 \pm 14*	52 \pm 8
E2	162 \pm 23*	82 \pm 7*
E2 + DEHP	138 \pm 17*	71 \pm 5*
E2 + bisphenol-A	119 \pm 9*	64 \pm 7
E2 + nonylphenol	107 \pm 8*	62 \pm 6
nonylphenol	117 \pm 10*	67 \pm 4
nonylphenol + DBP	104 \pm 9	68 \pm 7
bisphenol-A + nonylphenol	108 \pm 7	66 \pm 6
bisphenol-A	133 \pm 11*	77 \pm 8*
bisphenol-A + DEHP	129 \pm 12*	75 \pm 3*
bisphenol-A + DBP	137 \pm 15*	71 \pm 8
nonylphenol + DEHP	108 \pm 9	68 \pm 6
DEHP	78 \pm 7	57 \pm 5
DBP	83 \pm 9	60 \pm 6
DEHP + DBP	123 \pm 12*	72 \pm 5*

*; significantly different from control group ($p < 0.05$).

**; Each value represents mean \pm SD (n = 5).

② 자궁 무게에 있어서 통계학적으로 유의적인 무게 증가를 나타낸 모든 군(17 β -estradiol을 처치한 모든 군, nonylphenol, nonylphenol + DBP, nonylphenol + bisphenol-A)에서 유선의 bud 숫자가 증가한 것을 관찰할 수 있었다.

③ 자궁 무게에 있어서 유의적인 증가를 보이지 않은 투여군 중에서 bisphenol-A 단독 투여군, bisphenol-A 와의 혼합투여군, DEHP + DBP 혼합 투여군에서의 유선에서 bud 숫자가 증가한 것을 관찰할 수 있었다.

④ corn oil군을 제외한 총 15개군 중 terminal end buds 와 terminal ducts에서 대조군에 비해서 유의적인 차이를 보인 군은 5개군이였으며, 그중 자궁 무게에 있어서 유의적인 차이를 보이지 않은 DEHP + DBP군이 있었다.

자궁 및 질 상피세포의 관찰

ICR mouse에 17 β -estradiol, DEHP, DBP, nonylphenol, bisphenol-A를 혼합투여한 후, 각 군에서의 자궁 및 질 내막 상피 세포를 관찰한 결과는 다음과 같다.

질 내막 상피세포층의 높이를 측정한 결과, 음성대조군(13.3 μm)에 비하여 유의적인 증가를 보인 군은 전체 음성대조군을 제외한 15개 군중에서 12개군으로 나타났는데, 17β-estradiol, nonylphenol, bisphenol-A 단독 또는 혼합 투여한 모든 군이 유의적인 증가를 나타내었으며, 질 내막 상피세포층의 높이에 따라서 크게 네 부분으로 나눌 수 있었다. 즉, 질 내막 상피세포층의 높이를 100 μm 이상인 군, 50-100 μm인 군, 30-50 μm인 군, 그리고 30 μm 이하인 군으로 나누어 보았다.

질 내막 상피세포층이 100 μm 이상인 군은 17β-estradiol (155 μm), 17β-estradiol + DBP(172.5 μm), 17β-estradiol + bisphenol-A(148.75 μm), 17β-estradiol + nonylphenol (121.25 μm), nonylphenol(106.25 μm), nonylphenol + DBP(113.75 μm), bisphenol-A + nonylphenol(120 μm)이었다. 질 내막 상피세포층의 높이가 50-100 μm인 군은 17β-estradiol + DEHP(91.25 μm), bisphenol-A + DBP(66.25 μm)이었으며, 30-50 μm 이하인 군은 bisphenol-A(45 μm), bisphenol-A + DEHP(41.25 μm), nonylphenol + DEHP(34.16 μm)이었으며, 30 μm 이하인 군은 DEHP(15 μm), DBP(12.5 μm), DEHP + DBP(17.5 μm), 그리고 음성 대조군인 corn oil (13.3 μm)이었다(Fig 2).

자궁 내막 상피세포층의 높이를 측정한 결과, 음성대조군(13.75 μm)에 비하여 유의적인 증가를 보인 군은 전체 15개군 중에서 10개군에서 유의적인 증가를 나타냈다. 자궁 내막 상피세포층의 높이를 크게 3부분으로 나누어 보면, 상피세포층 높이가 30-50 μm인 군, 20-30 μm인 군, 그리고 20 μm 이하인 군으로 나누어 보았다. 자궁 내막 상피세포층의 높이가 30-50 μm인 군은 17β-estradiol + DBP(48.75 μm), 17β-estradiol(50 μm), 17β-estradiol + DEHP(48.75 μm), 17β-estradiol + nonylphenol(45 μm), 17β-estradiol + bisphenol-A(40 μm), nonylphenol + DBP(46.25 μm)로서 6개군이었으며, 20-30 μm인 군은 nonylphenol (26.25 μm), bisphenol-A(25 μm), bisphenol-A + DEHP(22.5 μm), nonylphenol + DEHP(20 μm)로서 4개군이었다. 20 μm 이하인 군은 bisphenol-A + nonylphenol(16.25 μm), bisphenol-A + DBP(17.5 μm), DEHP(11.25 μm), DBP(13.75 μm), DEHP + DBP(11.25 μm), 그리고 음성대조군인 corn oil(13.75 μm)로서 6개군이었다(Fig 3).

자궁 난관의 직경 측정

자궁 난관의 직경을 측정한 결과 음성 대조군인 corn oil(1,100 μm)에서의 직경에 비하여 유의적인 증가를 보인 군은 15개군 중 10개군이었다.

자궁 난관의 직경은 그 크기에 따라서 크게 세 부분으로 나누어 보았다. 2,000 μm 이상인 그룹과 1,500-2,000 μm인 그룹, 그리고 1,000-1,500 μm인 그룹으로 나눌 수

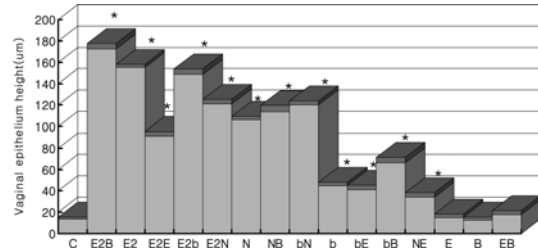


Fig 2. Change of vaginal epithelium height of mice exposed to chemical mixture. Each value represents mean±SD (n=5) C, corn oil 5 ml/kg; E2,17β-estradiol 5 μg/kg; B, DBP 1,500 mg/kg; E, DEHP 1,500 mg/kg; b, bisphenol-A 100 mg/kg; N, nonylphenol 100 mg/kg *; significantly different from control group (p<0.05).

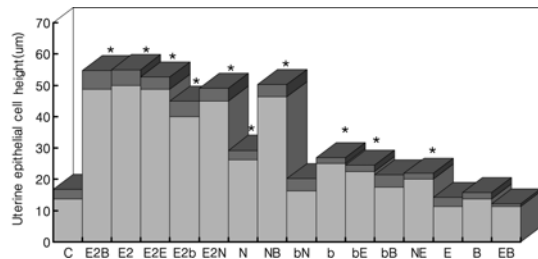


Fig 3. Change of uterine epithelial cell height of mice exposed to chemical mixture. Each value represents mean±SD (n=5). C, corn oil 5 ml/kg; E2,17β-estradiol 5 μg/kg; B, DBP 1,500 mg/kg; E, DEHP 1,500 mg/kg; b, bisphenol-A 100 mg/kg; N, nonylphenol 100 mg/kg *; significantly different from control group (p<0.05).

있었다. 2,000 μm 이상인 그룹은 17β-estradiol + DBP (2,912.5 μm), 17β-estradiol(2,062.5 μm), 17β-estradiol + nonylphenol(2,350 μm)으로서 3개군에서 관찰되었고, 직경의 크기가 1,500-2,000 μm인 군은 17β-estradiol + DEHP(1,850 μm), 17β-estradiol + bisphenol-A(1,937.5 μm), nonylphenol (1,500 μm), nonylphenol + DBP(1,537.5 μm), bisphenol-A + nonylphenol(1,562.5 μm), bisphenol-A + DBP(1,600 μm), nonylphenol + DEHP(1,537.5 μm)로서 7개군이었으며, 1,500 μm 이하인 군은 bisphenol-A(1,162.5 μm), bisphenol-A + DEHP(1,375 μm), DEHP(1,212.5 μm), DBP(1,275 μm), DEHP + DBP(1,312.5 μm), 그리고 음성대조군인 corn oil (1,100 μm)으로서 6개군에서 관찰되었다(Fig 4).

표적장기의 증량변화

시험 물질인 DEHP의 표적 독성 장기인 간장에서의 무게를 측정한 결과, DEHP를 단독 또는 혼합 투여한 군에서 전반적으로 음성대조군인 corn oil(1.88 g)에 비

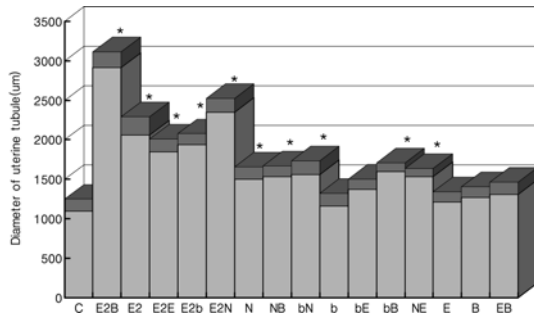


Fig 4. Change of diameter in uterine tubule (\pm SD) at mice exposed to chemical mixture. Each value represents mean \pm SD (n = 5). C, corn oil 5 ml/kg; E2, 17 β -estradiol 5 μ g/kg; B, DBP 1,500 mg/kg; E, DEHP 1,500 mg/kg; b, bisphenol-A 100 mg/kg; N, nonylphenol 100 mg/kg; *, significantly different from control group ($p < 0.05$).

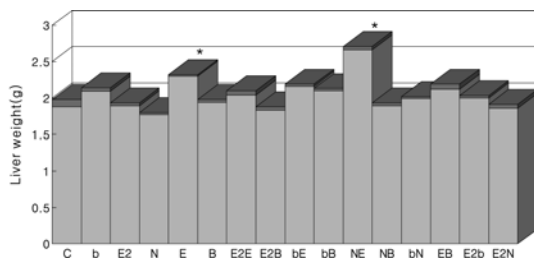


Fig 5. Change of liver weight of mice exposed to chemical mixture. Each value represents mean \pm SD (n = 5). C, corn oil 5 ml/kg; E2, 17 β -estradiol 5 μ g/kg; B, DBP 1,500 mg/kg; E, DEHP 1,500 mg/kg; b, bisphenol-A 100 mg/kg; N, nonylphenol 100 mg/kg; *, significantly different from control group ($p < 0.05$).

하여 무게의 증가를 관찰할 수 있었으며 특히 통계학적으로 유의성을 보인 그룹은 DEHP 단독 투여군(2.3 g)과 DEHP와 nonylphenol을 혼합투여(2.66 g)한 2개군이었다 (Fig 5).

시험물질인 DBP의 표적 독성 장기인 신장의 무게를 측정된 결과, 모든군에서 음성대조군과 비교하여 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(Fig 6).

Apoptosis 발생빈도

본 실험에서 구성된 16개군에서의 간, 신장, 그리고 자궁과 질에서 apoptosis의 발생빈도를 측정하였다. 실험 결과 모든 군에서의 apoptosis는 대조군에 비하여 그 빈도에 차이가 나타나지 않았으며, 단지 DBP 1,500 mg/kg 단독 투여군 중 1마리에서의 자궁조직에 apoptosis의 발현이 현저히 증가한 것을 관찰할 수 있었다.

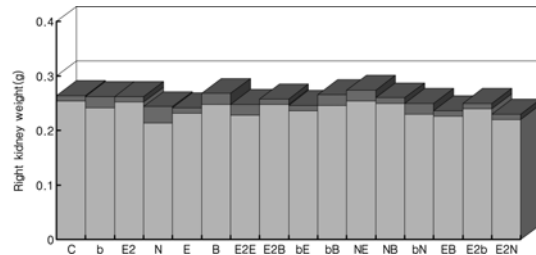


Fig 6. Change of right kidney weight of mice exposed to chemical mixture. Each value represents mean \pm SD (n = 5). C, corn oil 5 ml/kg; E2, 17 β -estradiol 5 μ g/kg; B, DBP 1,500 mg/kg; E, DEHP 1,500 mg/kg; b, bisphenol-A 100 mg/kg; N, nonylphenol 100 mg/kg; *, significantly different from control group ($p < 0.05$).

고 찰

DEHP, DBP는 생체 내 만성 독성뿐만 아니라 내분비계의 장애 물질로서 최근에 대두되고 있는 물질로서, 환경호르몬 물질로 알려진 bisphenol-A, nonylphenol과 혼합 투여시 *in vivo*에서의 estrogenic effect 작용여부에 대하여 알아보았다. 본 논문에서는 *in vivo* 실험 방법 중 Rodent 3-day uterotrophic assay와 Modified rodent 3-day uterotrophic assay를 취합하여 실험에 적용하였다. 또한, 기존에 실험 항목으로 언급되어 있지 않는 whole mount assay와 TUNEL assay를 아울러 실험에 적용하였다. 검사 항목으로는 자궁 및 질의 무게, 유선 조직에서의 bud의 숫자 양상, 자궁 조직에서 자궁 내막 상피세포층의 높이, 질 내막 상피세포층의 높이, 자궁 난관의 직경을 측정하는 방법을 사용하였다. 유선 조직에서의 DEHP + DBP군에서 bud의 숫자는 조직에서의 유의적인 변화가 없는 것과는 달리 유선에서의 bud의 숫자가 음성대조군에 비하여 증가한 양상을 보였기 때문에 whole mount assay도 검색법에 있어서 중요한 지표로 여겨진다. 결론적으로, 환경 호르몬 검색 항목에 있어서 지금까지 일반적으로 사용된 자궁의 무게보다는 자궁과 질에서의 내막 상피세포층의 조직학적인 검사와 whole mount assay도 유용한 검색 방법일 것으로 판단되어진다.

간 과 신장의 무게를 측정된 결과 DEHP를 투여한 군과 DEHP와 nonylphenol을 혼합 투여한 군에서의 간 조직의 비대를 관찰할 수 있었는데, 이러한 결과가 nonylphenol이 DEHP의 peroxisomal proliferation 작용에 대하여 promoter로 작용하는 것으로 여겨진다. 앞으로 좀더 연구되어야할 것은 DEHP와 같은 성질 즉, hypolipidemic non-genotoxic carcinogenic 한 다른 독성 물질과 함께 병용 실험하여 결과를 비교해 보는 연구와 female rat에서의 장기간 투여 시 내분비계 장애에 대한 연구가 또한

필요하겠다.

간, 신장, 자궁 그리고 질 조직에서의 apoptosis를 관찰한 결과 대조군에 비하여 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. 기존의 논문에 의하면 MEHP(DEHP의 생체 내 대사산물) 처치 후 3시간 경과 시 germ cell의 apoptosis가 감소하는 결과를 보였는데 이것은 MEHP가 정상적인 apoptosis를 방해하는 것을 나타내는 것으로 여겨지며, Sertoli cell의 vimentin filament 역시 MEHP처치후 3시간 경과시 붕괴되는 모습을 보였는데 이러한 결과는 apoptosis의 진행과 vimentin filament의 붕괴 사이에 MEHP에 의해 영향받는 생화학적 성분 및 기전을 공유하고 있음을 시사한다 [8]. 결국, vimentin이 apoptotic cellular signal transduction pathway에 관련하고 있다고 생각할 수 있었고, 적어도 MEHP가 apoptotic cellular signal transduction pathway의 구성 성분에 직접적으로 상호 작용함을 알 수 있다.

Phthalates 물질에 대한 estrogenic effect는 BBP, DBP, DIBP, DEP, DINP는 *in vitro*에서 weak estrogen인 것으로 나타났으며, 그러한 감수성은 17 β -estradiol에 비하여 백만배 이상 낮은 반응을 가진 것으로 나타났다 [3]. 또한, 실험에 사용한 물질의 혼합 투여시에 그 반응은 상승효과가 아닌 상가작용을 나타내는 것으로 나타났다. 그러나, 이러한 *in vitro* 상에서의 반응은 생체 반응 중 한정된 부분만 국한되어 실험되어 지기 때문에 그 점에 유의하여야 하며, *in vivo* 실험 시 투여경로와 사용동물의 종을 선택하는데 있어서 신중을 기하여야 한다. 난소 적출 후 실시한 피하주입에 의한 결과에서 환경호르몬 물질과 DEHP, DBP를 혼합 투여했을 때 estrogenic effect에 대하여 상가 작용을 일으키는 것으로 나타났으며, 결국 DEHP와 DBP 두 물질은 단독 투여 시 estrogenic effect가 없었으나, estrogenic effect가 있는 물질과의 혼합 투여 시는 weak estrogenic effect를 나타내는 것으로 여겨진다. 더불어, E₂와 nonylphenol 그리고 E₂와 bisphenol-A를 혼합 투여시에는 estrogenic effect가 각각의 물질을 단독 투여했을 때 보다 감소한 것을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과는 자궁 및 질 조직에서의 estrogen receptor에 대해서 서로 경쟁적으로 결합하기 때문인 것으로 여겨진다 [4, 11]. 현재, phthalate는 *in vivo* 실험에 있어서 경구 투여에 의한 데이터는 많이 있으나, 복강 및 피하, 흡입 투여에 관한 자료는 전무한 실정이다. 따라서, 이러한 경로에 의한 독성 평가도 필요하다고 사료된다.

결 론

본 연구에서는 내분비계 호르몬 교란 물질에 대한 검

색 방법 및 환경호르몬 물질 간의 상가작용을 알아보기 위하여 실험을 실시하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 전체적인 투여 물질별 압컷 생식장기에서의 조직학적인 변화 및 유선 조직의 estrogenic effect를 살펴보면, 17 β -estradiol >> nonylphenol > bisphenol-A >>> DBP > DEHP의 순서였다.

2. DEHP와 DBP의 경우 이 물질들이 단독으로 투여되었을 때는 estrogenic effect를 관찰할 수 없었으나, 다른 물질과 혼합투여 시에는 estrogenic effect를 나타낸다고 볼 수 있을 정도의 미약한 효과를 나타내었으며, 특히 이 두 물질을 혼합투여 시에는 자궁 및 질 조직에서는 변화가 관찰되지 않았으나, 유선 조직에서 estrogenic effect를 관찰할 수 있었다.

3. DEHP와 DBP의 독성표적장기인 간과 신장의 무게를 측정된 결과, DEHP의 경우 기존에 만성으로 장기간 투여 시 나타난다는 간장의 hyperplasia를 유도하였으며, nonylphenol과 혼합투여 시에 그 무게의 증가 정도가 DEHP 또는 nonylphenol 단독 투여시보다 훨씬 큰 상승 작용을 나타내는 것으로 보아 nonylphenol이 DEHP의 peroxisomal proliferation에 있어서 promotor작용을 일으키는 것으로 여겨진다.

4. TUNEL assay를 실시한 결과 apoptosis를 일으키는 세포와 본 실험에서의 내분비계 장애 물질에 의한 조직에서 영향을 받는 세포와는 상관성이 없는 것으로 여겨진다.

5. 환경호르몬 물질 검색에 있어서의 환경호르몬 물질에 민감하게 측정된 항목은 질 내막 상피세포층의 높이, 자궁 내막 상피세포층의 높이, 자궁 난관의 직경, 자궁의 무게 순으로 통계학적인 유의수준을 나타내었다. 한편, 유선 조직에서의 bud의 숫자는 DEHP+DBP군에서 조직에서의 유의적인 변화가 없는 반면, 유선에서의 bud의 숫자가 음성대조군에 비하여 증가한 양상을 보였기 때문에 이 항목도 검색법에 있어서 중요한 지표로 여겨진다. 결론적으로, 환경 호르몬 검색 항목에 있어서 지금까지 일반적으로 사용된 자궁의 무게보다는 자궁과 질에서의 내막 상피세포층의 조직학적인 검사가 더 유용할 것으로 판단되어진다.

감사의글

본 연구는 2005년도 한국학술진흥재단으로부터 연구비를 지원 받았습니다(KRF-005-E00076).

참고문헌

1. Albro PW, Jordan ST, Schroeder JL, Corbett JT.

- Chromatographic separation and quantitative determination of the metabolites of di-(2-ethylhexyl) phthalate from urine of laboratory animals. *J Chromatogr* 1982, **244**, 65-79.
2. **Bulger WH, Nuccitelli RM, Kupfer D.** Studies on the *in vivo* and *in vitro* estrogenic activities of methoxychlor and its metabolites role of hepatic mono-oxygenase in methoxychlor activation. *Biochem Pharmacol* 1978, **27**, 2417-2423.
 3. **Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP.** The Estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ Health Perspect* 1997, **105**, 802-811.
 4. **Lech JJ, Lewis SK, Ren L.** *In vivo* estrogenic activity of nonylphenol in rainbow trout. *Fundam Appl Toxicol* 1996, **30**, 229-232.
 5. **Mukku VR, Kirkland JH, Hardy M, Stancel GM.** Hormonal control of uterine growth: temporal relationships between estrogen administration and deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 1982, **111**, 480-487.
 6. **Odum J, Lefevre PA, Tittensor S, Harris CA, Beresford NA, Sumpter JP, Ashby J.** The rodent uterotrophic assay : critical protocol features, studies with nonylphenols and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997, **25**, 176-188.
 7. **Page BD, Lacroix GM.** The occurrence of phthalate ester and di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian packaging and food sampled in 1985-1989: a survey. *Food Addit Contam* 1995, **12**, 129-151.
 8. **Richburg JH, Boekelheide K.** Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995, **137**, 42-50.
 9. **Robison AK, Schmidt WA, Stancel GM.** Estrogenic activity of DDT: estrogen-receptor profiles and the responses of individual uterine cell types following *o,p'*-DDT administration. *J Toxicol Environ Health* 1985, **16**, 493-508.
 10. **Sharman M, Read WA, Castle L, Gilbert J.** Levels of di-(2-ethylhexyl) phthalate and total phthalate esters in milk, cream, butter and cheese. *Food Addit Contam* 1994, **11**, 375-385.
 11. **Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C.** p-nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environ Health Perspect* 1991, **92**, 167-173.
 12. **Steinmetz R, Mitchner NA, Grant A, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N.** The xenoestrogen bisphenol-A induces growth, differentiation, and *c-fos* gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinology* 1998, **139**: 2741-2747.