

BPA와 DEHP가 돼지 정액 성상에 미치는 독성 영향

박동헌¹ · 장현용¹ · 정희태² · 김종택² · 박춘근¹ · 김정익¹ · 양부근^{1,*}¹강원대학교 동물생명과학대학, ²수의학부대학

Toxicologic Effects of BPA and DEHP on Semen Characteristics in Pig

Dong-Heon Park¹, Hyun-Yong Jang¹, Hee-Tae Cheong², Jong-Taek Kim², Choon-Keun Park¹,
Choung-Ik Kim¹ and Boo-Keun Yang^{1,*}¹College of Animal Life Science and ²School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the toxic effects of Bisphenol A(BPA) and di-2 ethylhexyl phthalate (DEHP) as endocrine disrupters on sperm motility, viability, membrane integrity and abnormality during *in vitro* incubation of boar semen. Semen were randomly divide into 24 groups and treated with different concentrations of BPA and DEHP (1~100 μ M) for 3, 6 and 9 hrs, respectively. The percentages of sperm motility and viability decreased by treatment time with both BPA and DEHP, and obviously differ from the controls. The percentages of sperm motility and viability significantly decreased by incubation with both 100 μ M of BPA and DEHP compared to control and other treatment groups ($p < 0.05$). Sperm membrane integrity was significantly reduced by incubation with 10 and 100 μ M of BPA and DEHP, respectively ($p < 0.05$), but sperm abnormality were not significantly affect both BPA and DEHP. These results indicate that high concentration of BPA and DEHP (>10 μ M) can affect noxiously the sperm characteristics.

(Key words : BPA, DEHP, Semen characteristics, Endocrine disrupter, Pig)

요 약

본 연구는 내분비계 장애물질인 BPA와 DEHP가 돼지 정액 성상(운동성, 생존율, 원형질막의 정상성, 기형율)에 유해한 영향을 미치는지를 검토하였다. 일정 농도로 희석한 돼지 정액에 BPA와 DEHP를 각각 0, 1, 10, 100 μ M의 농도로 처리하여 3, 6, 9시간 동안 체외배양을 실시하였다. BPA 처리에 따른 운동성과 생존율은 체외배양 시간과 첨가농도에 따라 감소하였으며, 체외배양시간이 경과함에 따라 대조구와 명백한 차이를 나타냈다. 100 μ M의 농도로 처리한 경우의 운동성과 생존율은 체외배양시간에 관계없이 처리군이 대조구에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). DEHP 처리에 따른 정자의 운동성과 생존율도 체외배양시간과 첨가농도에 따라 감소하여 BPA의 성적과 유사한 경향을 나타냈다. 정자 원형질막의 기능성은 배양시간에 따라 감소하였으며 BPA 및 DEHP 첨가농도 간에 차이가 인정되었으며, 특히 100 μ M 처리구에서 급격히 감소하는 성적을 나타냈다. 정자의 기형율은 BPA 및 DEHP 처리시간 및 농도에 크게 영향을 받지 않았다. 본 연구의 결과로 볼 때, 고농도의 BPA와 DEHP(>10 μ M)에 정자의 장시간 노출은 유해한 영향을 줄 것으로 사료된다.

서 론

내분비계 장애물질이란 환경에 노출된 화학 물질이나 환경 내에 존재하는 물질이 체내에 유입되어 내분비계의 정상적인 기능을 방해하는 물질로서, 천연호르몬과는 달리 쉽게 분해되지 않고 인체의 지방 및 조직에 농축되는 성질을 가지고 있다.

외인성 estrogen 물질인 Bisphenol A(BPA)는 polycar-

bonate plastics와 epoxy 수지의 단량체로서, polycarbonate plastics와 epoxy 수지의 제조시 기본 원료로 사용되고 있다. BPA는 Dodds와 Lawson 등(1936)에 의해서 처음으로 estrogen 활성이 증명되었으며, 생물체 내에 유입되면 estrogen 수용체와 결합하여 estrogen과 같은 유사작용을 한다고 보고되고 있다(Lazear, 1995; Staples 등, 1998; Cagen 등, 1999). BPA의 수용체 결합능력과 활성능력은 17 β -estradiol보다 1,000~15,000배 정도 낮은 활성이 있다고 보고되고 있다(Gaido 등, 1997; Takai 등, 2000).

* Corresponding author : Phone: +82-33-250-8623, E-mail: bkyang@kangwon.ac.kr

BPA의 생물체 내에 유입은 정상적인 호르몬의 기능을 혼란시켜 웅성의 경우는 생식기의 무게 감소, 정액 생산의 감소 및 기형율 증가 등이 보고되고 있으며(Sharpe 등, 1996; vom Saal 등, 1998; Stoker 등, 1999), 자성의 경우는 자궁 무게의 증가, 질각화의 유도 및 prolactin의 방출을 조절하는 뇌하수체 세포의 분비를 증가시켜 유방압과 불임에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Steinmetz 등, 1998; Buchanan 등, 1999; Hunter 등, 1999;).

플라스틱의 제조시 가소제로 폭넓게 사용되고 있는 di-2-ethylhexyl phthalate(DEHP)는 장난감, 비닐바닥재, 의료 장비 및 식품포장지 등의 기본 원료로 사용되고 있다(Key 등, 1999). DEHP는 호흡, 식수, 음식을 통해서 사람에게 흡수되며 또한 식품의 포장지와 의학용품에 의해서도 사람에게 흡수된다. DEHP의 생물체 내에 유입은 간에서는 간의 무게를 증가시키고 peroxisome을 증식시켜 간암을 유발하는 것으로 보고되고 있으며(Woodward, 1990), 호르몬 분비의 감소(Oishi와 Hiraga, 1980), 번식기능의 감소(Agarwal 등, 1986) 및 태아 독성(Shiota와 Mima, 1985) 등을 일으킨다고 보고되고 있지만 이와 상이한 결과도 보고되고 있다. 그러나 BPA나 DEHP와 같은 내분비계 장애물질이 직접 정액에 노출되었을 때 정자의 일반적인 성상에 미치는 영향에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 일정농도의 BPA 및 DEHP의 첨가가 돼지정액의 체외 보존시 일반성상에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

정액 채취

강원도 원주시 영서 A-I center의 종돈에서 수암법으로 정액을 채취하였으며, 채취한 정액은 일정농도가 되도록 희석액(Modena)으로 조정후 17°C의 돼지정액 보관고에 옮겨 2시간 이내에 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다.

정액 성상 검사

육안에 의한 운동성 검사

37°C의 slide 가운편에서 가운시킨 slide glass에 액상 정액을 떨어뜨린 후, 위상차 현미경(400×) 하에서 생존율을 검사하였다.

정자의 생존율 검사

Makler Counting Chamber(Sefi-Medical Instruments, Israel)를 이용하여 사멸정자, 전자운동정자, 회전운동정자 등을 조사하고 -20°C에서 20분간 동결시킨 후 융해하여 총 정자수를 계산하여 전진운동 정자 비율을 계산하였다.

Hypoosmotic Swelling Test (HOST)

정자 원형질막의 기능성 검사는 Na-citrate·2H₂O와 Fructose가 혼합된 150 mOsm의 저장액을 만든 후 37°C의 저

장액 내에서 30분간 배양시킨 후 정자 미부의 굴곡 여부를 검사하였다. 정자의 원형질막 기능성 검사의 기준은 미부가 감겨있거나, 나선형으로 감겨있는 정자는 정자 원형질막의 기능이 손상되지 않은 것으로 판단하였다.

기형정자 검사

Rose-Bengal 염색방법을 이용하여 정자의 기형율을 조사하였다. Slide glass위에 정자 부유액을 옮겨 도말하고, 실온에서 건조시킨 후 Rose-Bengal 염색액을 떨어 뜨려 염색한 후 위상차 현미경(400×) 하에서 기형정자를 검사하였다.

정자의 체외배양

돼지 정자의 일반 성상 검사를 위해 희석액에 BPA (Sigma)와 DEHP(Sigma)를 각각 0, 1, 10, 100 μM을 첨가하여 3, 6 및 9시간 동안 체외배양하면서 정자의 일반 성상을 검사하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS package를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 최소 유의차 검정(Least Significant Difference test ; LSD test)을 실시하여 통계처리를 실시하였다. 돼지 정액의 체외배양시 내분비계 교란물질인 BPA와 DEHP의 첨가 효과와 체외배양 시간의 효과를 검증하기 위하여 아래 모형에 의하여 분석을 실시하였다.

$$y_{ijk} = \mu + E_i + I_j + (EI)_{ij} + e_{ij}$$

y_{ijk} : kth observation of jth time intervals of incubation
 μ : overall mean

E_i : the effect of ith BPA and DEHP

I_j : the effect of jth interval of incubation

$(EI)_{ij}$: the effect of (ij)th BPA and DEHP -time interval of incubation interaction

e_{ij} : Random error associated with (ij)th observation

결 과

돼지 정액에 일정량의 BPA 및 DEHP를 첨가한 후 체외배양 시간(3, 6 및 9시간)에 따른 정자의 일반성상(운동성, 생존율, 정자 원형질막의 기능성 검사 및 기형율)에 미치는 효과를 Fig. 1 및 2에 요약하였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 정자의 운동성은 BPA의 처리 시간에 따라 점진적으로 감소하였으며, 체외배양시간이 연장됨에 따라 대조구와 처리구간에는 커다란 차이가 인정되었다. BPA 처리 농도에 따라서는 점진적으로 감소하는 경향을 보이다가(0 μM, 84.6%; 1 μM, 80.7%; 10 μM, 76.2%) 100 μM 농도로 처리시에는 유의적으로 감소하였다 (15.0%, $p < 0.05$). 돼지 정자의 생존성도 운동성과 비슷한 경향을 보여 BPA의 처리 시간에 따라 감소하였다. 정자의 생존율은 BPA 처리농도에 따라 점진적으로 감소하는 경향을 보이다가(0 μM, 72.2%; 1 μM, 70.7%; 10 μM, 62.4%) 100 μM 농도로 처리시에는 유의적으로 감소하는 결과를 나타냈다(11.7%, $p < 0.05$). 정자원형질막의 기

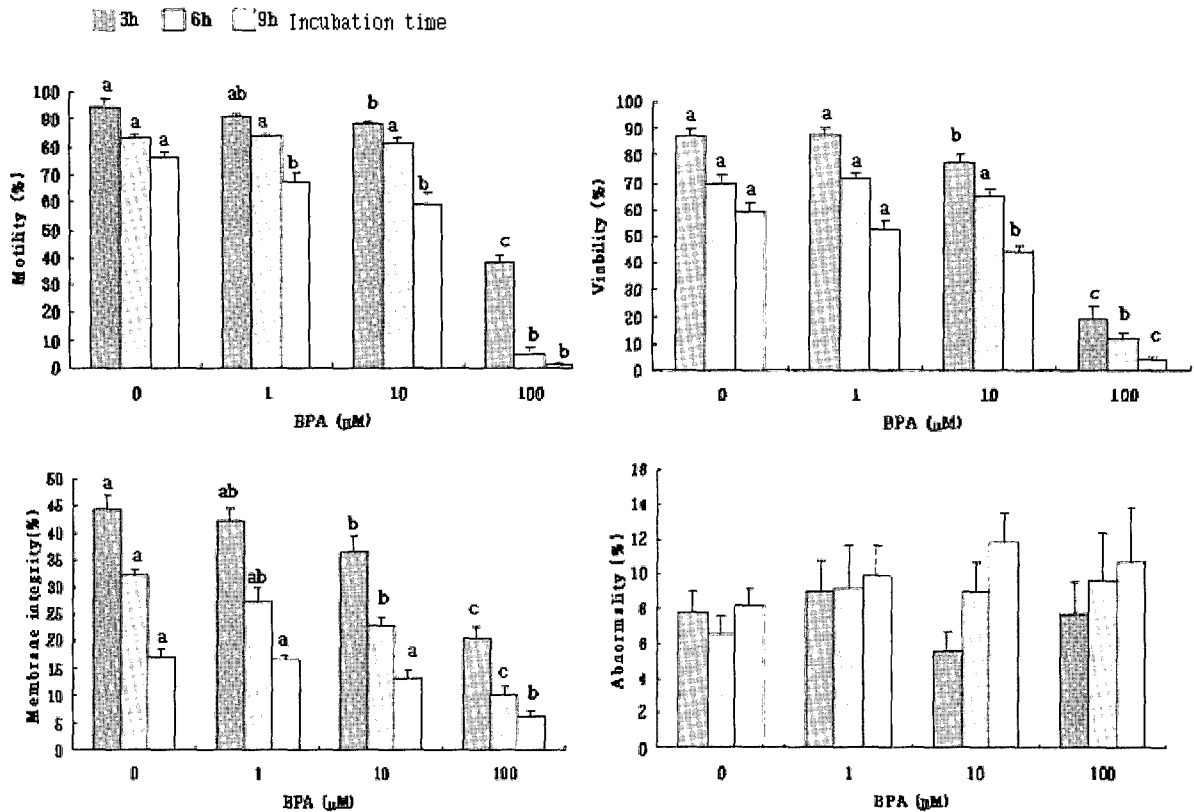


Fig. 1. Effects of BPA on sperm characteristics in pig. ^{a-c} Values with different superscripts in the same incubation time are significantly different ($p < 0.05$).

능성에 대한 결과에서는 배양시간에 따라 감소하는 경향을 보였고, BPA 10 μM 및 100 μM 첨가구에서 각각 24.2% 및 12.3%로서 대조구(31.2%) 및 BPA 1 μM 첨가구(28.6%)에 비하여 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 그러나 정자의 기형율은 처리 시간 및 농도에 크게 영향을 받지 않았다.

한편, DEHP의 영향도 Fig. 2에 나타난 바와 같이 DEHP의 처리 시간에 따른 운동성과 생존율은 BPA 처리구와 비슷한 양상을 나타내었다. 정자의 운동성은 DEHP 처리 농도에 따라 점진적으로 감소하는 경향을 보이다가 10 μM 및 100 μM 농도로 처리시에는 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$), 고농도 100 μM에서 9시간 배양한 경우 1%의 정자 운동성을 유지하였다. 정자의 생존성도 운동성과 비슷한 경향을 보여 DEHP 처리 농도에 따라 점진적으로 감소하는 경향을 보이다가(0 μM, 71.6%; 1 μM, 65.2%; 10 μM, 50.2%) 100 μM 농도로 처리시에는 유의적으로 감소하였다(7.5%, $p < 0.05$). 정자 원형질막의 기능성은 6시간 및 9시간에서 DEHP 처리구에서 무첨가구(6시간, 32.3%; 9시간, 16.8%)에 비해 통계적으로 유의하게 감소하는 경향을 나타냈다(6시간: 1 μM, 28.0%; 10 μM, 22.7%; 100 μM, 5.3%; 9시간: 1 μM, 12.2%; 10 μM, 8.2%; 100 μM, 1.7%). 정자의 기형율은 BPA의 결과와 유사한 경향을 나타내 처리시간 및 농도(7.5-10.7%)에 크게 영향을 받지 않았다.

Modena 회석액에 BPA와 DEHP의 첨가 및 배양 시간

에 따라 돼지 정액의 일반적 특성에 미치는 영향에 대한 분산분석을 실시한 결과를 Table 1 및 2에 요약하였다.

BPA와 DEHP 첨가 용량에 따른 운동성과 생존율은 두 그룹 간에 유의적인 차이가 인정되었으며($p < 0.01$), 원형질막의 기능성에서도 유의적인 차이가 인정되었다($p < 0.01$). 그러나 정자의 기형율에는 커다란 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. Table 2에서 나타난 바와 같이 체외배양 시간에 따른 정자의 일반적 특성에서는 운동성($p < 0.01$), 생존율($p < 0.01$), 원형질막의 기능성($p < 0.01$) 및 기형율($p < 0.05$)에는 유의적인 차이가 인정되었다.

고찰

내분비계 장애물질은 대부분 호르몬 제제 의약품인 약물성 물질과 자연계에 존재하는 식품 유래의 물질로서 phytoestrogen이라고 하는 자연성 물질 및 합성화학 물질이면서 환경을 오염시키는 환경성 내분비계 장애물질로 분류되고 있다.

내분비계 장애물질 외에 사용과 수입을 규제하고 있지만 현재 많은 양이 사용되고 있는 penta-nonyl phenols, BPA, DEHP 및 DBP 등 4종은 내분비계 장애 관찰물질로 규정되고 있어 이들 물질이 인간의 건강과 생식능력에 미치는 영향에 대하여 많은 관심이 집중되고 있다.

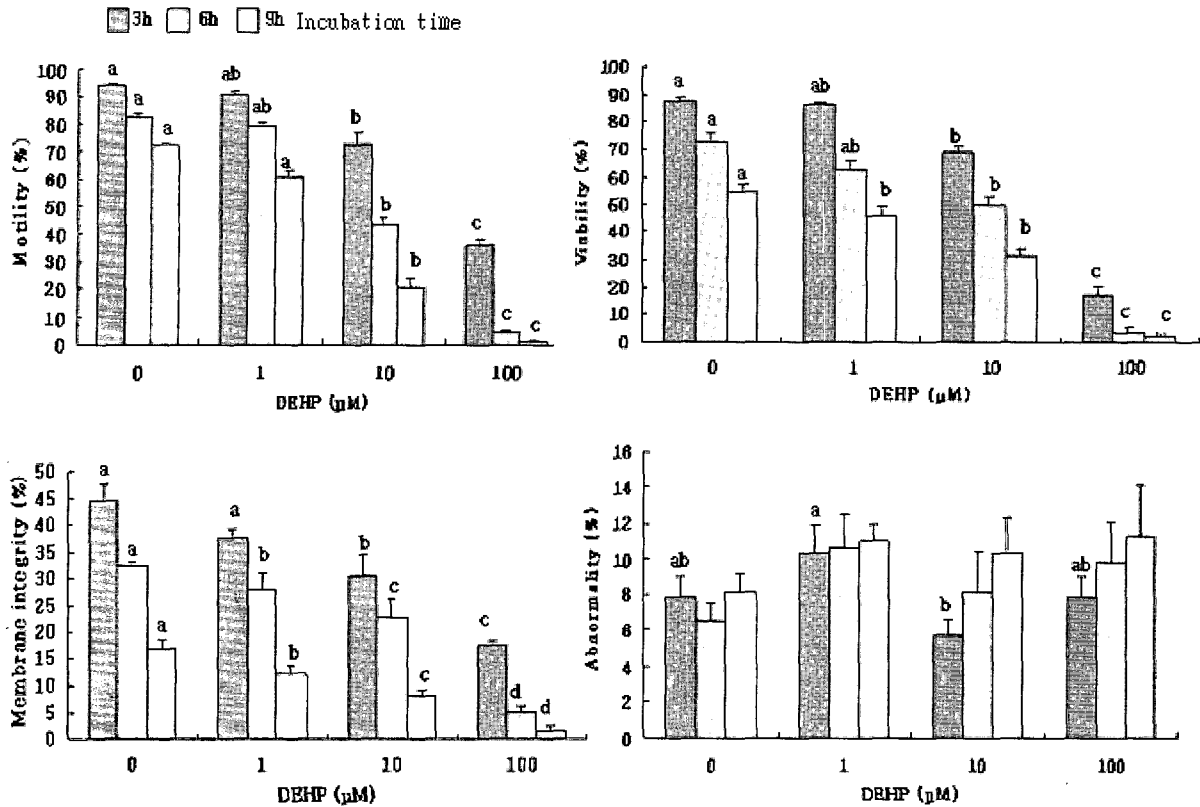


Fig. 2. Effects of DEHP on sperm characteristics in pig. ^{a-d} Values with different superscripts in the same incubation time are significantly different ($p < 0.05$).

Table 1. Least squares analysis of variance of boar sperm characteristics on the endocrine disrupter and dose level in Modena extender

Source of variation	df	Motility	Viability	Membrane integrity	Abnormality
		M.S.	M.S.	M.S.	M.S.
Endocrine disrupter	1	3126.7**	1139.1*	242.8	1.8
Dose level	3	35990.8**	29520.6**	2995.7**	45.5
Endocrine disrupter-dose interaction	3	1798.5**	211.2	32.6	6.5
Error	136	222.9	209.7	120.4	19.1
Total	143				

Significant level; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

df: degree of freedom.

M.S: Mean square.

특히 BPA와 DEHP는 내분비계 관찰물질 중 인간에게 쉽게 노출될 수 있고 체내에 유입되면 정상적인 호르몬의 대사작용에 영향을 미쳐 생식기관과 번식 기능에 유해한 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Colborn 등, 1993; Sumpster, 1998).

Cagen 등(1999)은 쥐에 BPA를 경구로 투여한 결과 웅성자손의 번식형질에 있어 정자농도 및 정자의 생산량에

는 통계적 유의차는 없었지만, 고농도의 BPA 투여구에서는 정액 성상이 통계적으로 유의하게 낮은 성적을 나타내 BPA가 정액 성상에 유해한 영향을 미친다고 보고하였으며, Ashby 등(1999)와 Sharpe 등(1996)의 연구자들도 쥐에 고농도의 BPA를 투여하였을 때 정자의 생산량이 유의하게 낮음을 보고하였다. 본 실험의 경우, BPA를 10 μM 농도 이상을 처리하였을 때 돼지 정자의 운동성, 생

Table 2. Least squares analysis of variance of boar sperm characteristics on the endocrine disrupters and incubation times in Modena extender

Source of variation	df	Motility	Viability	Membrane integrity	Abnormality
		M.S.	M.S.	M.S.	M.S.
Endocrine disrupter	1	3126.7**	1139.1*	242.8	1.8
Incubation times	2	11471.0**	10664.0**	6257.5**	73.4*
Endocrine disrupter-time interaction	2	199.2	62.3	22.0	0.4
Error	138	872.0	697.6	93.5	18.9
Total	143				

Significant level; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

df: degree of freedom.

M.S: Mean square.

존성 및 정자의 원형질막의 정상성에서 낮은 결과를 나타내 위의 연구자들의 결과와 일치하는 경향을 보였다.

DEHP가 포유동물에 미치는 보고에 의하면, 간에서는 간의 무게를 증가시키고 peroxisome을 증식시키며 간암을 유발하는 것으로 보고되고 있으며, 미국에서는 암을 유발시킬 수 있는 물질로 분리하고 있다(Busser와 Lutz 등 1987; Woodward, 1990). 또한 정자의 기형율의 증가, 정소의 무게 감소, 세정관의 위축, Sertoli 세포의 공포화, 갑상선세포의 축소, 태아의 외부 기형 증가 및 염색체 이상의 증가 등이 보고되고 있지만(Grays 등, 1977; Agarwal 등, 1986; Tsutsui 등, 1993), 같은 투여경로, 투여량 및 투여 기간에서도 상이한 결과도 보고되고 있다. Parmar 등(1987)은 쥐에 체중 kg 당 2,000 mg의 DEHP를 처리하였을 때 정자의 두부 기형 및 정자수의 감소의 결과를 나타내었다. 본 실험에서는 고농도의 DEHP 처리구(10 ~ 100 μ M)에서 정자의 운동성, 정자의 생존율 및 정자 원형질막의 기능성 검사에서 무첨가구보다 낮은 결과를 나타내어 DEHP의 노출은 정자의 체외보존에 유해한 영향을 미치는 것으로 나타났다.

본 실험의 결과, 저농도(1 μ M)의 BPA 및 DEHP는 정액성상에 크게 유해한 영향을 미치지 않는 반면, 고농도(>10 μ M)의 BPA와 DEHP 첨가는 체외배양 시간에 관계 없이 돼지의 정액성상에 유해한 영향을 미치는 것으로 나타났다.

인용문헌

1. Agarwal DK, Eustis S, Lamb JC, Real JR, Kluwe WM (1986): Effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on the gonadal pathophysiology, sperm morphology and reproductive performance of male rats. *Environ Health Perspect* 65:343-350.
2. Ashby B, Tinwell H, Haseman J (1999): Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol in the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. *Regula Toxicol Pharma* 30:156-166.
3. Buchanan DL, Setiawan T, Lubahn DB, Taylor JA, Kurita T, Cunha GR, Cooke PS (1999): Tissue compartment-specific estrogen receptor- α participation in the mouse uterine epithelial secretory response. *Endocrinol* 140:484-491.
4. Busser MT, Lutz WK (1987): Stimulation of DNA synthesis in rat and mouse liver by various tumor promoters. *Carcinogen* 8:1433-1437.
5. Cagen SZ, Waechoter JM, Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, Shiotsuka RL, Veenstra GE, Harris, LR (1999): Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxico Sci* 50:36-44.
6. Colborn T, vom Seal FS, Soto AM (1993): Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and human. *Environ Health Perspect* 101: 378-384.
7. Dodds EC, Lawson W (1936): Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137:996.
8. Gaido KW, Leonard LS, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP (1997): Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 143:205-212.
9. Grays TJB, Butter Worth KR, Gaunt IF, Grasso P, Gangolli SD (1977): Short-term toxicity study of di-(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Food Cosmet Toxicol* 15:389-399.
10. Hunter DS, Hodges LC, Vonier PM, Fuchs-Young R, Gottardis MM, Walker CL (1999): Estrogen receptor activation via activation function 2 predicts agonism of xenoestrogen in normal and neoplastic cells of the uterine myometrium. *Cancer Res* 59: 3090-3099.
11. Keys DA, DG Wallace, TB Kepler, RB Conolly (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.
12. Lazer NR (1995): Polycarbonate : high-performance resin. *Adv Material Processes* 147:43-45.
 13. Oishi S, Hiraga K (1980): Testicular atrophy induced by phthalic acid esters : Effect on testosterone and zinc concentrations. *Toxicol Appl Pharmacol* 53: 35-41.
 14. Parmar D, Srivastava SP, Singh GB, Seth PK (1987): Effect of testosterone on the testicular atrophy caused by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicol Lett* 36:297-308.
 15. Sharpe RM, Majdic G, Fisher J, Parte P, Miller MR, Saunders PTK (1996): Effects on testicular development and function. *Int Cong Endocrinol* pp:23-24.
 16. 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.
 17. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR (1998): A review of the environmental fate : effects and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36:2149-2173.
 18. Steinmetz R, Mitchner NA, Grant A, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N (1998): The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation and c-fos gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinol* 139:2741-2747.
 19. Stoker TE, Robinette CL, Brit BH, Law SC, Cooper RL (1999): Prepubertal exposure to compounds that increase prolactin secretion in the male rat : effect on the adult prostate. *Biol Reprod* 61:1636-1643.
 20. Sumpter JP (1998): Xenoendocrine disrupters-environmental impacts. *Toxicol Lett* 102-103:337-342.
 21. Takai Y, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Hiroi H, Osuga Y, Momoeda M, Yano T, Taketani Y (2000): Estrogen receptor-mediated effects of a xenoestrogen, bisphenol A, on preimplantation mouse embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 270:918-921.
 22. 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. *Carcinogen* 14:611-618.
 23. Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan D, Palanza P, Thayer UA, Nagal SC, Parmigiani S, Welshons W (1998): A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production and behavior. *Toxicol Ind Health* 14: 239-260.
 24. Woodward KN (1990): Phthalate esters, cystic kidney disease in animals and possible effects on human health : a review. *Hum Exp Toxicol* 9:397-401.

(접수일자: 2006. 8. 13 / 채택일자: 2006. 9. 13)