

암컷 흰쥐의 사춘기 개시에 미치는 di(2-ethyl hexyl)phthalate(DEHP)의 효과

이 경 엽 · 이 성 호[†]

상명대학교 생명과학전공

Effect of Di(2-ethyl hexyl)phthalate(DEHP) on the Onset of Puberty in Female Rat

Kyeung-Yeup Lee and Sung-Ho Lee[†]

Department of Biology, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

ABSTRACT : Phthalates such as di(2-ethyl hexyl)phthalate(DEHP) are industrial chemicals with wide-ranging human exposures because of their use in plastics and other common consumer products. Consequently, their adverse effects as endocrine disruptor in the reproductive physiology of both laboratory rodents and human have been studied extensively. The present study was undertaken to examine whether prepubertal exposure to DEHP affects on the onset of puberty and the associated reproductive parameters such as hormone receptor expressions in female rats. DEHP(100mg/kg/day) was administered daily from postnatal day 25(PND 25) through the day when the first vaginal opening(VO) was observed, and the animals were sacrificed on the next day. Gross anatomy and weight of reproductive tissues were compared to test the DEHP's effects on the cell proliferation. Furthermore, histological studies were performed to assess the structural alterations in the tissues. Specific radioimmunoassay was carried out to measure serum LH levels. To determine the transcriptional changes in progesterone receptor(PR), total RNAs were extracted and applied to the semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). As a result, delayed VO was shown in the DEHP group(PND 37.3±0.7) compared to the control group(PND 35.3±0.7; $p<0.05$). DEHP treatment significantly decreased the wet weight of ovaries and uteri compared to the control group($p<0.05$). Interestingly, elevation of serum LH levels was shown in the DEHP group($p<0.05$). Graafian follicles and corpora lutea were observed only in the ovaries from the control animals. Numerous primary, secondary follicles and small atretic follicles were observed in the ovaries from DEHP-treated animals. Similarly, hypotrophy of luminal and glandular uterine epithelium was found in the DEHP-treated group. These effects were probably due to the inhibitory effects of DEHP on the synthesis and secretion of estrogen from granulosa cells. In the semi-quantitative RT-PCR studies, the transcriptional activities of PR in both ovary($p<0.05$) and uterus($p<0.01$) from DEHP-treated animals were significantly lower than those from the control animals. The present studies demonstrated that the acute exposure to DEHP during the critical period of prepubertal stage could inactivate the reproductive system resulting delayed puberty in female rats.

Key words : Di(2-ethyl hexyl) phthalate(DEHP), Vaginal opening, Anti-estrogenic, Progesterone receptor, Puberty onset.

요 약 : 전세계적으로 매년 대량생산되는 프탈레이트(phthalate)류 물질은 플라스틱처럼 다양한 생활용품의 원료로 사용되기 때문에 인간에 대한 노출 정도가 매우 높은 산업 물질이다. 대표적으로 di(2-ethyl hexyl)phthalate(DEHP)와 그 활성 대사물인 monoethyl hexyl phthalate(MEHP)가 내분비계 장애물질(endocrine disruptor)로 작용하여 인간과 실험 동물의 생식계를 교란한다는 증거들이 급속히 축적되고 있다. 본 연구는 DEHP가 암컷 흰쥐의 사춘기 개시와 이와 관련된 생식 지표들의 변화에 미치는 효과를 조사한 것이다. 생후 25일부터 corn oil 또는 DEHP(100mg/kg/day i.p.)를 사춘기 개시의 지표인 질구 개방(vaginal opening, VO)이 일어나는 날까지 투여하였다. 다음 날 희생시킨 후 난소와 자궁의 외양과 조직 무게를 측정하여 DEHP가 이들 조직에서의 세포증식에 미치는 효과를 조사하였고, 현미경 관찰을 통해 해부학적인 변화 양상을 조사하였다. 또한 혈액내의 LH 수준을 방사면역측정법(RIA)로 측정하였다. 자궁 성숙의 지표인 프로게스테론

수용체(PR) 발현 양상은 정량적인 RT-PCR로 확인하였다. 결과로, DEHP 투여에 의해 질구 개방이 지연됨을 확인하였다(35.3±0.7 day in control group vs 37.3±0.7 day in DEHP group, $p<0.05$). 흥미롭게도, 첫번째 주사 다음 날($p<0.05$)부

[†] 교신저자: 서울시 종로구 홍지동 7 상명대학교 생명과학전공. (우) 110-743, (전) 02-2287-5139, (팩) 02-2287-0070, E-mail: shlee@smu.ac.kr

더 이후 마지막 주사 날($p < 0.01$)까지 DEHP 군의 체중이 대조군에 비해 유의하게 낮음을 관찰하였다. 난소와 자궁의 크기와 무게, 그리고 혈중 LH 수준도 대조군에 비해 DEHP 군에서 유의하게 감소하였다. 질구 개방이 일어난 대조군의 난소에서는 성숙의 지표인 그래프 난포(Graafian follicle)와 황체가 관찰되었으나 DEHP 군의 난소에서는 미성숙한 1차, 2차 난포 그리고 작은 퇴화 난포(atretic follicle)들만이 다수 관찰되었다. 자궁의 경우도 대조군에서는 내막층과 근막층은 물론 상피층까지 잘 발달된 과다 성장 상태와 함께 분비선 수의 증가가 나타났으나 DEHP 군에서는 모든 세포층의 발달이 미약한 상태였다. 이러한 결과는 DEHP가 과립세포에서의 에스트로겐 합성·분비에 억제적 효과를 나타내는 것에 기인하는 것으로 보인다. RT-PCR 결과 난소($p < 0.05$)와 자궁($p < 0.01$)에서의 PR mRNA 수준은 DEHP 투여에 의해 유의한 발현 감소가 나타났다. 결론적으로, 본 연구는 사춘기 전 특정 시기에 단기적인 DEHP 투여에 의해 암컷 흰쥐의 생식계 활성화가 억제되고, 그 결과 사춘기가 지연될 수 있음을 시사한다.

서 론

유아용 젖병, 장난감, 건축 자재, 식품 포장재, 의료용품 등의 플라스틱류 합성 가소제로 사용되는 프탈레이트(phthalate)류 물질들은 일상적으로 인체에 노출될 가능성이 매우 높은 화합물이다(Kamrin & Mayor, 1991; Hoyer, 2001). 프탈레이트류 물질 가운데 가장 많이 사용되어온 di(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)와 그 활성대사물인 monoethyl hexyl phthalate(MEHP)는 대표적인 내분비계 장애물질(endocrine disruptor)로, 인간과 실험 동물의 생식계에 유해하다는 증거들이 급속히 축적되고 있다(Lovekamp-Swan & Davis, 2003; Latini *et al.*, 2006).

대부분의 프탈레이트류 물질은 노출시기와 노출량에 따라서 실험 동물과 사람의 간 손상과 간암 발생, 퍼옥시좀(peroxisome) 증식과 같은 일반 독성(general toxicity) 외에도 태아 사망, 기형 발생(malformation)과 같은 발생 독성(developmental toxicity), 그리고 정소 손상, 수컷 생식 도관의 기형, 항-안드로겐 활성화, 불임 등 생식 독성(reproductive toxicity)을 나타냄이 잘 알려져 왔다(Latini *et al.*, 2006). 생식 독성에 관해 설치류 동물 모델을 사용한 초기 연구에서 DEHP의 *in vivo* 노출시 착상률 저하, 사망한 배아의 채흡수 증가, 태아 체중 감소, 기형 발생 증가가 농도의존적으로 나타났다(Kaul *et al.*, 1982). 설치류 수컷에서 DEHP 투여는 세정관의 위축(atrophy)과 정소 무게 및 정자 수 감소, 정소 내 아연 함량 감소를 야기하여 불임을 초래하였다(Foster *et al.*, 1980; Lamb *et al.*, 1987). 한편 설치류 암컷에서 DEHP *in vivo* 노출은 난소에서의 에스트로겐 합성 저하, 생식주기 연장, 그리고 무배란을 유도하였고, 결과적으로 황체가 결여된 낭포성(cystic) 난소가 출현하였다(Davis *et al.*, 1994).

프탈레이트류 물질이 내분비계 장애물질로 작용함에는 의문의 여지가 없지만 다양한 실험조건에 따라 에스트로겐과 안드로겐 수용체에 길항제 또는 정반대로 억제제로 작용함이 알려졌다(Takeuchi *et al.*, 2005). 이는 다른 내분비계 장애물질들과 마찬가지로 프탈레이트류 물질 역시 투여농도, 투여기간, 투여시기, 표적조직 등 제 변수에 대한 합리적이고 다양한 고려가 필요함을 의미한다. 프탈레이트류 물질의 생식 독성에 관한 연구는 대부분 수컷 또는 남성을 대상으로 한 것들로, 암컷이나 여성에 대한 연구 가운데서도 특히 사춘기 개시에 관한 연구는 극히 취약한 실정이다.

본 연구는 기존의 연구들보다 현실적인 DEHP 노출 상황으로 여겨지는 DEHP 투여 조건하에서 암컷 흰쥐에서의 사춘기 개시에 미치는 효과를 조사한 것이다. 이를 위해, 기존의 연구들에 비해 저용량(100mg/kg/day) DEHP를 비교적 단기간인 사춘기 이전(생후 25일)에서 질구 개방이 일어날 때까지 매일 투여하는 모델을 채택하였다. 실험대상의 체중 변화와 생식기관의 성숙 정도를 관찰하였고, 생식기관의 성숙과 관련된 프로게스테론 수용체(PR)의 발현 양상을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

상명대학교 실험 동물 사육장에서 일정한 온도와 광주기(18~22°C; 12시간 조명, 12시간 소등), 그리고 먹이와 물의 접근을 자유롭게 한 상태(*ad libitum*)에서 사육한 Sprague-Dawley(SD) strain 흰쥐를 사용하였다. 생후 25일(53~58g B.W.)된 미성숙 암컷 흰쥐에 DEHP(100mg/kg/day; Sigma, USA)를 매일 복강 주사하였고, 대조군으로는 com oil(200uL/animal; Sigma, USA)을 주사하였다. 동물들은 매일 오전 10시에 주사 후 체중을 측정하고 질구 개방 여부를 확인하였다. 질구 개방이 일어난 경우, 생리식염수를 사용한 질도말법

(vaginal smear)으로 슬라이드에 도포한 질 상피세포를 현미경하에서 확인하고 다음 날 오후 5시에 희생시켰다. 희생 후 즉시 조직 무게를 측정하고 RNA를 추출하였고, 혈액은 원심분리(4℃, 1500×g, 15분)하여 혈장을 얻은 후 LH 방사면역측정법을 시행하기 전까지 -20℃에 보관하였다.

2. 난소와 자궁의 조직학적 관찰

대조군과 실험군에서 얻은 난소와 자궁의 성적인 성숙 정도를 조사하기 위하여 paraformaldehyde(4%)에 고정된 조직을 ethanol로 탈수한 다음 파라핀 포매 후 5~7μm 두께로 연속 절편을 얻었다. 조직 절편들은 hematoxylin-eosin으로 대조 염색하여 광학현미경(Olympus)으로 관찰하였다.

3. LH 방사면역측정법(RIA)

혈중 LH 수준은 double antibody RIA reagent를 사용하여 측정하였다(Lee *et al.*, 1994). Iodination용 펩타이드인 NIDDK-rLH-I-9과 Na-I125(1μCi, NEN)를 chloramine T 방법으로 표지하였다. 흰쥐 LH에 대한 항혈청은 NIDDK-rLH-S-10, reference 펩타이드는 NIDDK-rLH-RR-2를 사용하였다. RIA variation의 intra-와 inter-assay의 coefficient는 각각 5~7%와 8~10%였다.

4. RNA 추출과 Semi-Quantitative RT-PCR

조직의 total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 방법 (Chomczynski & Sacchi, 1987)에 따라 추출하였다. 1μg의 total RNA를 주형으로 0.5μg의 dT₂₀ primer와 AccuPower™ RT PreMix(Bioneer)를 사용하여 최종 반응 volume 20μL로 역전사하였다. PCR 반응은 1μL의 역전사 산물을 주형으로 하여 각각의 전사물에 해당하는 primer들과 Taq DNA polymerase(Takara)를 사용하였다. Table 1은 본 실험에서 사용된 primer들의 염기서열과 annealing 온도를 표시하였다. PCR 산물은 전기영동으로 분리하였고, ethidium bromide로 염색후 Imager III-1D main software(Bioneer)로 정량하였다. 정량을 위한 internal con-

trol PCR에서는 GAPDH primer를 사용하였다.

5. 통계 처리

실험 결과의 통계적 처리는 Student's *t*-test에 의해 이루어졌으며 *P*-value 0.05 이하를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

생후 25일부터 주사를 시작하여 암컷 흰쥐의 사춘기 개시 지표로 널리 사용되는 질구 개방이 일어난 날을 조사한 결과, 총 주사 일수는 대조군(10.3±0.7회)에 비해 DEHP 군(12.3±0.7회)에서 유의하게 증가하였다(*p*<0.05, Fig. 1). 따라서 질구 개방일은 각각 생후 35.3±0.7일(대조군)과 37.3±0.7일(DEHP)이었다. 체중의 경우, 주사를 시작한 다음날(대조군 60.5±0.8g vs DEHP 군 57.8±0.7g, *p*<0.05)부터 대조군에서 질구 개방이 일어난 생후 35일경(대조군 122.9±5.7g vs DEHP 군 105.3±2.9g, *p*<0.01)까지 DEHP 군의 체중이 대조

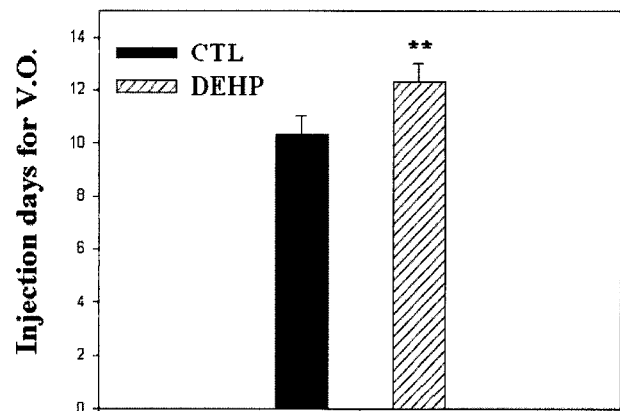


Fig. 1. Delayed vaginal opening(V.O.) in immature female rats treated with DEHP. CTL, control group; DEHP, DEHP-treated group(100mg/kg/day i.p.). Bars are mean±S.E.(n=10 per group). * Significantly different from control group, *p*<0.05, ** Significantly different from control group, *p*<0.01.

Table 1. Primer sets for semi-quantitative RT-PCR analysis

Gene	Nucleic acid sequences	Product size	A.T.(℃)
PR	F 5'-CAGCATGTCGTCTGAGAAAG	472 bp	61
	R 5'-TATAGCATCTGTCCACTGAC		
GAPDH	F 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG	576 bp	50
	R 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG		

PR, progesterone receptor; F, forward; R, reverse; A.T., annealing temperature.

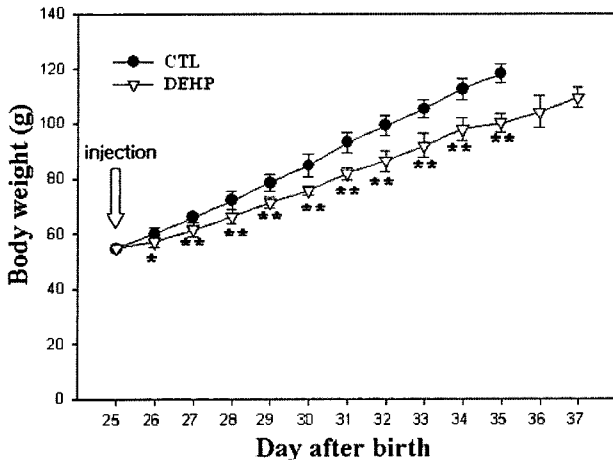


Fig. 2. Changes in body weight during the DEHP administration. Values are expressed as mean±S.E.(n=10 per group), * Significantly different from control group, $p<0.05$, ** Significantly different from control group, $p<0.01$.

군에 비해 유의하게 낮음을 관찰하였다(Fig. 2). DEHP 군에서 질구 개방이 일어난 생후 37일경 혈중 LH 수준은 DEHP 군 ($33.0\pm 12.2\text{pg/mL}$)에서 대조군($12.0\pm 6.1\text{pg/mL}$)에 비해 2.75배 가량 유의하게 증가하였다($p<0.05$, Table 2). 생후 35일 질도 말법으로 질 상피세포를 확인한 결과, 대조군에서는 발정주기에서 estrus 시기임을 나타내는 각질세포들(cornified cells)이 나타났으나(Fig. 3 A&C), 질구 개방이 일어나지 않은 DEHP 군은 상피세포를 채취할 수 없었다(Fig. 3 B&D).

조직 외형 관찰에서, 대조군의 난소는 DEHP 군에 비해 크고 바깥 쪽으로 잘 발달된 난포들이 위치하였고, 자궁 역시 대조군에서 더 발달된 상태를 보였다(Fig. 4 A&B). 난소와 자궁의 무게 역시 예상대로 대조군에 비해 DEHP 군에서 모두 유의하게 감소하였다(Fig. 4 C&D). 조직학적인 연구에서, 대조군의 난소는 성숙의 지표가 되는 그라프 난포와 황체가 다수 관찰되었으나 DEHP 군에서는 작고 미성숙한 1차와 2차 난포들과 퇴화중인 난포(atretic follicle)들이 주로 관찰되

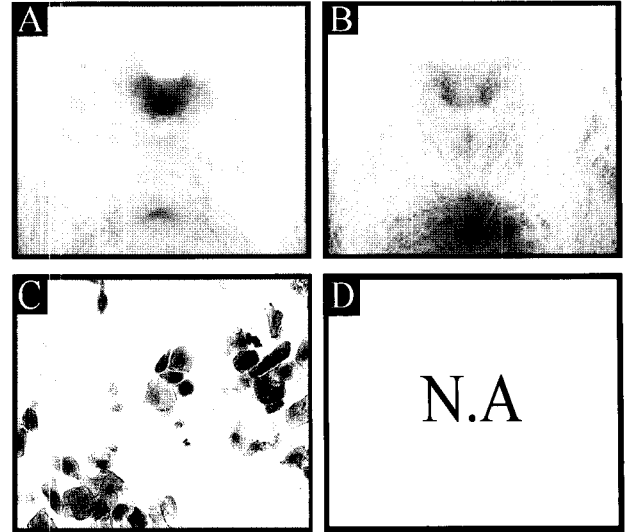


Fig. 3. Comparison of V.O. status and smeared vaginal cells between control and DEHP-treated rats. (A) V.O. is evident in control rats sacrificed on PND 36. (B) V.O. is not occurred in DEHP-treated rats sacrificed on same day. (C) Smeared vaginal epithelial cells from control rats. The cornified feature of cells represents estrus status. (D) Vaginal epithelial cells are not available in DEHP-treated rats.

었다(Fig. 5 A&B). 대조군의 자궁은 내강측 상피(luminal epithelium), 내막층과 근막층은 물론 외측 상피층까지 잘 발달된 상태이면서 동시에 분비선 수의 증가가 나타났으나 DEHP 군의 자궁에서는 모든 세포층과 분비선의 발달이 미약한 상태(hypertrophy)였다(Fig. 5 C&D). 유전자 발현에 있어서 암컷 성성숙 개시의 지표가 되는 프로게스테론 수용체의 mRNA 수준을 조사한 결과 난소와 자궁 모두 DEHP 군이 대조군에 비해 유의하게 낮았다(Fig. 6 A&B).

고 찰

본 연구는 일상생활에서 다량으로 노출되고 있는 DEHP

Table 2. Initial(PND 26) and final (PND 35) body weights and serum LH levels at the day after V.O. in DEHP group(PND 38)

		Control	DEHP
Body weight(g)	PND 26	60.5±0.8	57.8± 0.9*
	PND 35	122.9±5.7	105.3± 2.9**
Serum LH (pg/mL)	PND 37	12.0±6.1	33.0±12.2*

Values are expressed as mean ± S.E.(n=10).

* Significantly different from control group, $p<0.05$.

** Significantly different from control group, $p<0.01$.

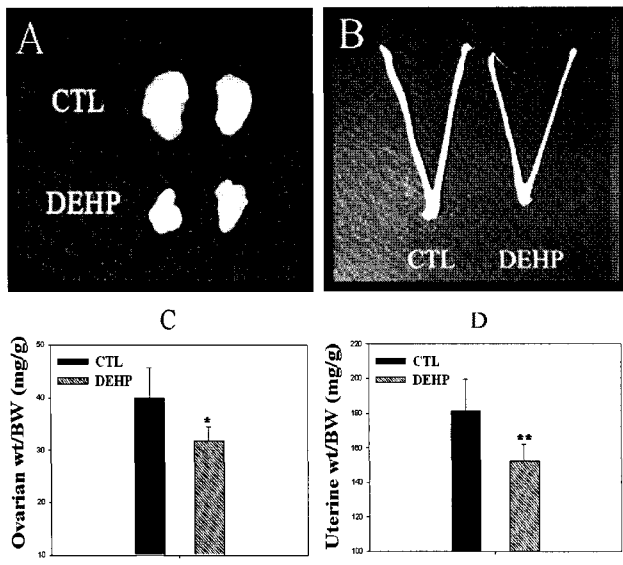


Fig. 4. Comparison of shape and weight of the organs between control and DEHP-treated rats at PND 36. Enlarged ovaries(A) and uteri(B) are shown in control group. (C) The relative ovarian weights per body weights in control(CTL) and DEHP-treated rats(DEHP). (D) The relative uterine weights per body weights in control and DEHP-treated rats. Values are expressed as mean±S.E.(n=10 per group), * Significantly different from control group, $p<0.05$, ** Significantly different from control group, $p<0.01$.

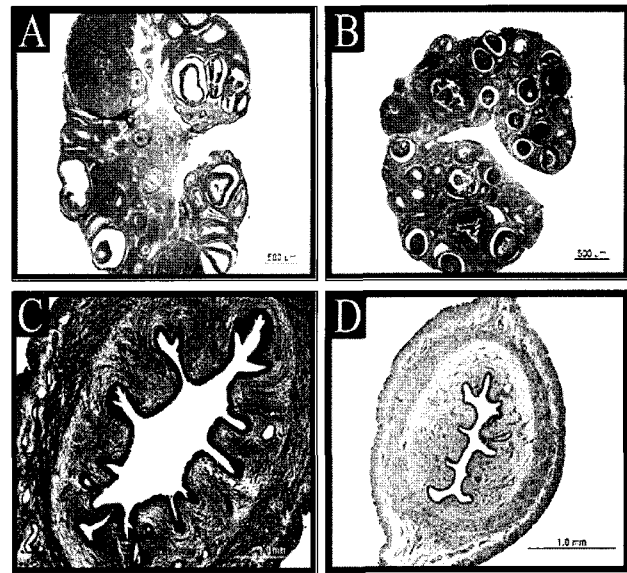


Fig. 5. Microphotographs of ovaries and uteri from control and DEHP-treated rats at PND 36. Note several Graafian follicles and corpora lutea in ovary from control rat. (A) Only a small follicle and some atretic follicles are apparent in the ovary from DEHP-treated rat. (B) Hypertrophy of both luminal and glandular uterine epithelium is evident in the uterus from DEHP-treated rat(D) compared to the control uterus(C). Hematoxylin and eosin staining, $\times 20$.

가 흰쥐 암컷의 사춘기 개시에 미치는 생식 독성을 조사한 것이다. 일반적으로 생식 독성은 간암 발생이나 태아의 기형 발생과 같은 일반 독성이나 발생 독성에 비해 상대적으로 경미하다고 받아들여지고 있으나, 불임율 유발할 가능성이 높다는 점과 diethylstilbestrol(DES) 오용 연구에서 밝혀진 바처럼 그 폐해인 질암이나 경부암이 대를 이어 나타날 수 있다는 점에서 결코 가볍게 여길 사안이 아니다(Laitman, 2002). 이는 흔히 환경호르몬으로 지칭되는 내분비계 장애물질의 노출에 의한 인간과 여러 야생 동물들에서의 생식 독성, 즉 잠복정소(cryptorchidism), 요도하열(hypospadias), 왜소음경(micropenis) 증가는 물론 정자 수 감소, 불임, 부화 또는 임신유지 실패, 비정상적인 번식 패턴이 증가하고 있음에 대해 현재 관련 학계는 물론 정부와 민간 차원에서도 높은 관심을 기울이고 적극적인 대처가 이루어짐에서 잘 반영된다(Hoyer, 2001). 프탈레이트류 물질은 흔히 인지하는 식품 포장재나 플라스틱 식기는 물론 실내 건축자재, 의료용 튜브, 혈액 및 링거액용 백 등 전방위적으로 노출 수준이 높은 대표적인 내분비계 장애물질이며, 따라서 그 생식 독성에 대한

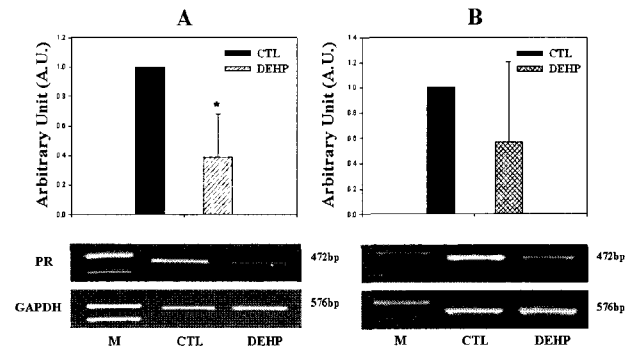


Fig. 6. Effects of prepubertal DEHP administration on the expression of PR in the ovaries(A) and uteri(B) in rats sacrificed on PND 36. Animals were sacrificed on the day after V.O. of control rats. Semi-quantitative RT-PCR was carried out as described in 'Materials and Methods'. Values are expressed as mean±S.E.(n=6 per group), * Significantly different from control group, $p<0.05$.

연구가 활발히 이루어지고 있다(Kaul *et al.*, 1982; Den Hond & Schoeters, 2006). Moore 등(2001)에 따르면 태아기와 수유기에 DEHP에 노출된 수컷 흰쥐의 경우 농도 의존적(375~

1,500mg/kg/day)으로 임신중 사망률 상승과 체중 및 정소, 부정소, 저정낭, 전립선, 음경의 무게 감소가 관찰되었다. 그런데 이 연구에서 암컷의 경우 체중의 유의한 감소가 있었을 뿐이고 기타 생식과 관련된 지표들에는 유의한 영향이 없었다. 이처럼 수컷 흰쥐에서 DEHP는 대부분의 연구들에서 공히 항안드로젠(antiandrogen) 효과 내지 안드로젠 부족 효과를 나타냄이 보고되었다(Foster *et al.*, 1980; Lamb *et al.*, 1987; Akingbemi *et al.*, 2001, 2004; Lovekamp-Swan & Davis, 2003; Salazar *et al.*, 2004). 그런데 암컷 흰쥐를 사용한 본 연구에서는 사춘기전인 생후 25일부터 저용량 DEHP(100 mg/kg/day)를 투여했을 때 Moore 등(2001)의 보고와는 달리 사춘기가 지연되고 체중 감소와 함께 난소와 자궁의 발달이 지체되었다(Fig. 1~6). 이러한 불일치는 암컷 흰쥐에 DEHP를 투여시 연구자에 따라 혈중 에스트로겐 농도의 감소(Davis *et al.*, 1994; Hirosawa *et al.*, 2006), 증가(Ma *et al.*, 2006) 또는 무변화(Moore *et al.*, 2001; Grande *et al.*, 2006b)로 보고함에서도 나타난다. 유사하게, 사춘기 개시에 미치는 DEHP 효과의 경우도 촉진(Ma *et al.*, 2006), 무변화(Moore *et al.*, 2001) 또는 지연(Grande *et al.*, 2006a; Salazar *et al.*, 2006)으로 보고되었다. 이러한 암컷 흰쥐에서의 DEHP 효과 차이는 i) 수정 직후, 태아기, 수유기, 사춘기 전후, 성체기와 같은 등 투여시기의 차이, ii) 경구 투여, 복강 주사, 피하 주사, 호흡, 피부 도포 등과 같은 투여경로의 차이, iii) 투여기간과 투여량 차이 등 다양한 변수들에 기인하는 것으로 추정된다. 따라서 이들 변수를 합리적으로 고려한 보다 정밀한 실험 동물 모델의 수립이 DEHP를 비롯한 내분비계 장애물질의 생식 독성을 연구함에 있어서의 중요한 선결과제라고 사료된다.

인체를 대상으로 하는 DEHP의 생식 독성 연구는 실험 동물을 사용한 연구들에 비해 극히 제한적이다. 최초의 연구로, 고농도의 프탈레이트에 항시 노출되는 여성 노동자들의 임신율이 저하하는 반면 유산율이 상승함이 보고되었다(Aldyrevva *et al.*, 1975). 또한 자궁내막증이 있는 여성의 혈중 DEHP 농도가 정상인에 비해 유의하게 높음이 보고되었다(Cobellis *et al.*, 2005). 프탈레이트에 노출된 남성의 경우 DEHP의 대사물질인 MEHP와 Monoethyl phthalate(MEP)의 소변 중 농도와 정자의 DNA 손상 간에 유의한 상관관계가 있음이 보고되었다(Hauser *et al.*, 2006). 특별한 주의가 필요한 부분으로, 식자재를 통한 경구투여 외에도 가전제품, 벽재와 마루 바닥재 등으로부터 유래되어 실내 공기를 오염시키는 에스터 형태의 프탈레이트류 역시 호흡을 통해 일상적

으로 노출될 수 있다는 점이다(Clausen *et al.*, 2003; Wensing *et al.*, 2005). 실제로 유치원아들이 이들의 부모나 교사보다 소변 중 총 DEHP 대사물질 농도가 유의하게 높다는 보고가 있다(Koch *et al.*, 2004).

상당수의 내분비계 장애물질이 내인성 에스트로겐보다는 훨씬 약하지만 에스트로겐 수용체에 결합할 수 있어서 항 에스트로겐 효과(anti-estrogenic)를 나타내거나 반대로 약한 에스트로겐 효과(estrogenic)를 나타낸다고 알려져 왔다(Fisher, 2004). 그런데 DEHP의 항에스트로겐 효과는 직접 에스트로겐 수용체(ER)를 경유하기보다 세포내 스테로이드 합성 관련 단백질들을 매개로 나타나는 것으로 보인다. 구체적으로, 투여된 DEHP의 활성 대사물질인 MEHP가 성숙한 배란 전 난포(preovulatory follicle) 내 과립세포에서의 aromatase 전사와 단백질 합성, 그리고 효소 활성 모두를 저하시켜 결과적으로 estradiol의 합성·분비가 감소되는 것으로 추정하였다(Davis *et al.*, 1994). 후속 연구들에 따르면, DEHP에 의한 암컷 생식 독성의 분자적인 작용 기작으로 (1) DEHP가 체내에서 MEHP로 대사되어 세포내에 유입되고, (2) MEHP는 FSH에 의해 증가된 세포내 cAMP 농도를 감소시켜 스테로이드 합성의 첫 단계인 콜레스테롤에서 프레그놀론으로의 전환효소인 P450_{sc} 활성을 낮추고, (3) 동시에 MEHP는 peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)인 PPAR α 와 PPAR γ 를 활성화시켜 aromatase 전사와 활성을 낮춤이 제안되었다(Lovekamp-Swan & Davis, 2003). 이 가설은 태아기에 DEHP에 노출되었을 때 성 스테로이드가 결정적으로 작용하는 성분화 과정이 비정상적으로 진행되면서 심각한 기형 발생이 초래될 수 있음을 시사하는데, 이는 DEHP의 생식 독성이 임신기에 노출되었을 때 가장 극적으로 나타남에서 잘 설명된다(Moore *et al.*, 2001; Dalgaard *et al.*, 2003). 아마도 사춘기로부터 성체기에 걸친 시기에 DEHP에 노출되었을 경우에는 항상성을 유지하려는 생리적인 압력 아래에서 시상하부-뇌하수체-생식소 호르몬 축의 활성 변화가 유도되어 태아기 노출보다는 경미한 생식 독성이 나타날 것으로 추정된다. 본 연구는 사춘기 직전 비교적 단기간에 동안 저농도의 DEHP에 노출될 경우 사춘기 개시가 유의하게 지연됨을 보여준 것으로서, 이 결과를 인간의 경우에 적용하면 뚜렷한 유전적, 내분비적 소인이 없는 성적 미숙 현상을 설명하는데 도움이 될 것이다.

인용문헌

Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy

- MP (2004) Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:775-780.
- Akingbemi BT, Youker RT, Sottas CM, Ge R, Katz E, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP (2001) Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Biol Reprod* 65:1252-1259.
- Aldyreva MV, Klimova TS, Iziumova AS, Timofeevskaya LA (1975) The effect of phthalate plasticizers on the generative function. *Gig Tr Prof Zabol* 12:25-29.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Clausen PA, Lindeberg Bille RL, Nilsson T, Hansen V, Svensmark B, Bowadt S (2003) Simultaneous extraction of di(2-ethylhexyl) phthalate and nonionic surfactants from house dust. Concentrations in floor dust from 15 Danish schools. *J Chromatogr A* 986:179-190.
- Cobellis L, Latini G, De Felice C, Razzi S, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P, Petraglia F (2003) High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum Reprod* 18:1512-1515.
- Dalgaard M, Hass U, Vinggaard AM, Jarfelt K, Lam HR, Sorensen IK, Sommer HM, Ladefoged O (2003) Di (2-ethylhexyl) adipate (DEHA) induced developmental toxicity but not antiandrogenic effects in pre- and postnatally exposed Wistar rats. *Reprod Toxicol* 17:163-170.
- Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ (1994) Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 128:216-223.
- Den Hond E, Schoeters G (2006) Endocrine disrupters and human puberty. *Int J Androl* 29:264-271.
- Fisher JS (2004) Are all EDC effects mediated via steroid hormone receptors? *Toxicology* 205:33-41.
- Foster PM, Thomas LV, Cook MW, Gangolli SD (1980) Study of the testicular effects and changes in zinc excretion produced by some n-alkyl phthalates in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 54:392-398.
- Grande SW, Andrade AJ, Talsness CE, Grote K, Chahoud I (2006a) A dose-response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: effects on female rat reproductive development. *Toxicol Sci* 91:247-254.
- Grande SW, Andrade AJ, Talsness CE, Grote K, Golombiewski A, Sterner-Kock A, Chahoud I (2006b) A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Reproductive effects on adult female offspring rats. *Toxicology* in press.
- Hauser R, Meeker JD, Singh NP, Silva MJ, Ryan L, Duty S, Calafat AM (2006) DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum Reprod* in press.
- Hoyer PB (2001) Reproductive toxicology: current and future directions. *Biochem Pharmacol* 62:1557-1564.
- Kamrin MA, Mayor GH (1991) Diethyl phthalate: a perspective. *J Clin Pharmacol* 31:484-489.
- Kaul AF, Souney PF, Osathanondh R (1982) A review of possible toxicity of di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) in plastic intravenous containers: effects on reproduction. *Drug Intell Clin Pharm* 16:689-692.
- Lamb JC 4th, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR (1987) Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. 1: *Toxicol Appl Pharmacol* 88:255-269.
- Laitman CJ (2002) DES exposure and the aging woman: mothers and daughters. *Curr Womens Health Rep* 2: 390-393.
- Latini G, Del Vecchio A, Massaro M, Verrotti A, De Felice C (2006) Phthalate exposure and male infertility. *Toxicology* 226(2-3):90-98.
- Lee SH, Song ES, Yu SK, Kim C, Lee DK, Choi WS, Kim K (1994) Temporal changes in ovarian gonadotropin releasing hormone mRNA levels by gonadotropins in the rat. *Mol Cells* 4:39-44.
- Lovekamp-Swan T, Davis BJ (2003) Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect* 111:139-145.
- Ma M, Kondo T, Ban S, Umemura T, Kurahashi N, Takeda M, Kishi R (2006) Exposure of prepubertal female rats to inhaled di(2-ethylhexyl)phthalate affects the onset of puberty and postpubertal reproductive functions. *Toxicol Sci* 93:164-171.
- Moore RW, Rudy TA, Lin TM, Ko K (2001) Abno-

- malities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect* 109:229-237.
- Salazar V, Castillo C, Ariznavarreta C, Campon R, Tresguerres JA (2004) Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring. *Toxicology* 205:131-137.
- Takeuchi S, Iida M, Kobayashi S, Jin K, Matsuda T, Kojima H (2005) Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors alpha and beta, and androgen receptor. *Toxicology* 210: 223-233.
- Wensing M, Uhde E, Salthammer T (2005) Plastics additives in the indoor environment-flame retardants and plasticizers. *Sci Total Environ* 339:19-40.