

Di-(2-ethylhexyl)phthalate에 의한 흰쥐 간세포 미세구조와 metallothionein 발현에 미치는 영향

김다함 · 문승훈 · 이미영¹ · 이종화² · 박영현³ · 신길상 · 김완중*

순천향대학교 생명과학과, ¹의료생명공학과, ²환경보건학과, ³식품영양학과

Ultrastructure and Metallothionein Expression in Rat Liver Treated with Di-(2-ethylhexyl)phthalate

Da Ham Kim, Seung Hoon Moon, Mi Young Lee¹, Jong Hwa Lee²,
Young Hyun Park³, Kil Sang Shin and Wan Jong Kim*

Department of Biology, ¹Department of Medical Biotechnology,

²Department of Environmental Health Science,

³Department of Food Science and Nutrition, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

Abstract – Di-(ethylhexyl) phthalate (DEHP), commonly used as a plasticizer for manufacturing flexible vinyl products, has been the topic of extensive research, especially concerning endocrine disrupting properties. Metallothionein (MT) is a low molecular weight (6,000 ~ 7,000 Da), cysteine-rich (22 ~ 23%), metal-binding protein and is known to be induced by extrinsic factors such as chemical agents and stresses. Some of the known function of MT include detoxification of heavy metals and alkylating agents and neutralization of free radicals. Nonetheless, the definitive physiological function of MT are still unknown. This study was carried out to investigate the effects of DEHP on the ultrastructural changes and the expression of MT of the rat liver. The rats were orally intubated with either corn oil (experimental control) or 0.5 mg, 1.5 mg and 4.5 mg DEHP kg⁻¹ day⁻¹ in 0.5 mL of corn oil for 15 days before sacrificing and sampling. DEHP induced mild ultrastructural changes of some cell organelles such as rough endoplasmic reticulum, mitochondria, lysosomes and peroxisomes in the rat liver treated with DEHP. In the respect of immunogold labelling and Western blotting, MT expression of the liver tissue was up-regulated by DEHP. In conclusion, DEHP has effects on the ultrastructures and hepatic function for MT expression in rat.

Key words : Di-(ethylhexyl)phthalate (DEHP), liver, metallothionein

서 론

내분비 교란물질 (endocrine disruptor)이란 동물이나

사람의 체내로 유입되어 내분비계의 정상적인 기능을 방해하거나 혼란시키는 화학물질로 통상 ‘환경호르몬 (environmental hormone)’으로 일컬어지고 있다. 내분비 교란물질은 미국 환경보호국 (Environmental Protection Agency, EPA)에서는 ‘생체 항상성 (homeostasis)의 유지와 발달과정을 조절하는 체내 정상 호르몬의 생산, 방출,

*Corresponding author: Wan Jong Kim, Tel. 041-530-1251, E-mail. wjkim56@sch.ac.kr

이동, 대사, 결합, 작용 혹은 배설을 간섭하는 체외물질'로, 우리나라 식품의약품안전청에서는 '내분비 기능에 변화를 일으켜 생체 또는 그 자손의 건강에 위대한 영향을 나타내는 외인성 물질'로 규정하고 있다. 내분비 교란물질은 극미량으로 생식기능장애를 유발하고, 강한 지용성으로 생물체의 지방조직에 농축되어 자연의 먹이사슬을 통해 동물이나 사람의 체내에 축적되며, 생체호르몬과는 달리 쉽게 분해되지 않고 안정하다는 특징을 가지고 있다. 내분비 교란물질로 널리 알려진 di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)는 플라스틱 제품들에 가소성을 제공하는 화합물로 1930년대부터 사용되어져 왔으며 인형, 장난감, 포장필름, 혈액보관백, 수술장갑 등에 사용되는 PVC 가소제 광범위하게 사용되고 있는 물질이다. 또한, 지용성으로 유제품 및 축산물의 지방질에 농축되어 있을 가능성이 크며, 주방기구의 코팅제나 도료 등에도 포함되어 있으므로 인체에 노출될 위험성이 매우 높은 화합물로 알려져 있다 (DeAngelo *et al.* 1986).

DEHP는 시험관 내 (*in vitro*)에서 지방분해 효소인 리파아제 (lipase)에 의해 monoethylhexylphthalate (MEHP)로 쉽게 가수분해되며 실험동물에 투여하면 매우 느리게 MEHP로 전환되지만 종에 따라 DEHP의 대사차이가 큰 것으로 알려져 있다. 방사능으로 표지된 DEHP를 투여하고 혈중 농도를 측정된 실험에서 DEHP를 정맥투여하면 혈액으로부터 간, 폐, 비장으로 신속히 분포되며 경구투여 시 DEHP는 MEHP의 형태로 작용하는 것으로 알려졌다. 또한 흰쥐나 다른 종의 동물에 유효 DEHP를 정맥투여할 때 폐 손상이 보고되었으며, 투여 2시간 후에 폐에 13~48.6%, 간에 26.3~38.2% 분포되는 것이 밝혀졌다. 한편, 신생아에서 DEHP 혈중농도는 수혈에 의해 약 10 mg L⁻¹까지 올라갈 수 있으며 이는 혈소판을 수혈 받은 백혈병 환자의 혈중 농도 2배, 혈액투석 환자의 5배가 되는 농도이다. 2시간 내에 3 mg L⁻¹로 급속히 혈중 농도가 감소한 후에는 10~12시간 정도의 반감기로 좀 더 감소하게 된다는 보고도 있다.

DEHP의 체내 대사와 영향은 동물 종이나 계통에 따라서 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 흰쥐의 경우, 소변에 대사되지 않은 DEHP는 없었으나 마우스와 녹색원숭이에서는 소량 검출되었고 기니피그, 원숭이, 사람에서 MEHP는 대부분이 소변으로 소실되는 것으로 알려졌다 (Schulz and Rubin 1973). 장기간 DEHP를 복용하면 주 배설경로가 바뀌는데, 흰쥐에서 전투여가 없을 때 대변으로 주로 배설되었지만, 7일간 투여한 후에는 소변으로의 배설이 주가 되는 것으로 밝혀졌다 (Daniel and Bratt 1974). 흰쥐에 7주간 DEHP를 경구투여 했을 때, 간에서의 소실속도는 느린 편으로 반감기가 3~5일이

며, 7일간 1 g kg⁻¹, 2.8 g kg⁻¹, 5 g kg⁻¹ 용량으로 매일 투여했을 때 DEHP와 MEHP가 체내에 축적되지는 않는 것으로 보고되었다 (Albro *et al.* 1982). Rat에 복강으로 500 mg kg⁻¹ 투여했을 때 자발적 운동능력이 감소하고 행동상의 변화도 보고되었고 50 mg kg⁻¹을 정맥 투여했을 때 부종, 출혈, 다핵성 백혈구의 침투 같은 폐 손상이 나타났으며, 이는 폐포의 대식세포 (macrophage)의 리소좀 효소들의 방출에 의한 것으로 보인다 (Bally *et al.* 1980).

DEHP는 흰쥐와 마우스에서 간 퍼옥시좀의 증식을 촉진시키고, 미토콘드리아 내 효소활성을 감소시키며, 간세포 내 글리코겐 대사과정에 변화를 유발한다는 보고도 있다 (Srivastava *et al.* 1978; Mushtaq *et al.* 1980). DEHP는 특히 포유동물의 응성 생식기관에 강한 독성 작용을 나타내는 것으로 알려져 있는데 4주령 흰쥐에 2,800 mg kg⁻¹을 구강삼관법으로 10일간 투여했을 때, 세정관의 위축으로 인해 정자세포와 정모세포의 소실이 일어나는 것이 관찰되었으나, 10주령 흰쥐에 비슷한 실험을 했을 때는 50%만이 영향을 받았고 15주령이 되었을 때에는 고환 손상이 전혀 없었다. 4주령 흰쥐에 20 g kg⁻¹의 DEHP를 먹이에 포함하여 먹었을 때 실제 용량은 약 1,200 mg kg⁻¹ day⁻¹로, 정소 병변은 성적 성장이 다 끝나기 전이나 후에 투여를 멈추면 원래대로 회복되는 가역적인 것이었다 (Bhattacharya *et al.* 2005; Grande *et al.* 2006).

Metallothionein (MT)은 분자량 6,000~7,000 D 정도의 단백질로 주로 간, 장 또는 신장에 분포하며, 세포질 내 아연, 구리 등의 중금속 이온과 황화결합을 형성하고 있다. 전체 아미노산의 약 30%는 시스테인 (cysteine)들로 이루어져 있으며, 방향족 아미노산 (aromatic amino acid)과 히스티딘 (histidine)이 거의 존재하지 않는 것으로 밝혀져 있다. MT의 iso-form으로서 모든 기관에 분포하는 MT-1, MT-2가 있고, 뇌에서 주로 발현되는 MT-3와 중추평상피에서 주로 분포하는 MT-4 등이 있다 (Banerjee *et al.* 1982; Clough *et al.* 1986). MT는 필수 금속이온의 항상성 유지와 금속독성, 자유기 (free radical), 방사선과 DNA 손상에 대한 방어작용을 하는 것으로 보고되어 왔으며 (Ebadi *et al.* 1987), 세포간기의 G1 및 S기에 구리나 아연 이온 등을 세포질에서 핵 내로 수송함으로써 DNA 합성 및 세포분열에도 관여하는 것으로 알려졌다.

현재까지 MT에 대한 연구는 암조직과 세포분열 유도, 발생, 중금속에 의한 조직손상 등에서 활발히 진행되어, MT가 정상조직에서는 세포질에서만 분포하나 암 조직에서는 핵과 세포질에 공통적으로 분포하며, MT의 발현양도 높아지는 것으로 보고되었다. 최근의 연구에서는 간의 MT합성이 세포의 재생과 조직의 회복을 위해 요

구되는 여러 금속함유효소와 전사인자를 활성화할 수 있다는 것을 보고하고 있으며 (Han *et al.* 1998) 이는 MT가 손상된 세포의 재생기동안 필수 성장 인자의 역할을 한다는 것을 의미한다 (Ghoshal and Jacob 2000). 현재까지 중금속에 노출된 조직이나 다양한 종류의 암 조직에서의 MT에 대한 연구는 많이 이루어져 왔으나 내분비계 장애물질에 노출된 세포에서의 MT 발현이나 분포에 관한 연구는 잘 확립되어 있지 않은 실정이다 (Lee *et al.* 2005).

본 연구에서는 상기의 보고들을 토대로 하여 내분비계 장애물질로 잘 알려져 있는 DEHP에 의한 간세포의 미세구조 변화를 관찰하고, 간세포에서의 MT 발현 양상을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 처리

본 실험에서는 3주령, 50 g 내외의 Sprague-Dawley 계통의 웅성 흰쥐 (Rat)를 사용하였으며, 일정하게 조정된 실내 환경에서 5일간의 적응기간 후 여러 그룹으로 나누어 물과 고형사료를 정상적으로 공급하며 실험에 임하였다. 실험군은 3 그룹으로 나누어 di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP, 분자량: 390.6, LD50: 30 g kg⁻¹, Sigma사)를 corn oil에 0.5 g kg⁻¹, 1.5 g kg⁻¹, 4.5 g kg⁻¹의 농도로 용해시켜 15일간 ball-tipped needle (직경 1 mm, 길이 70 mm)을 이용하여 0.5 mL씩 삼관 투여하였고, 대조군은 어떠한 처리도 하지 않은 정상 대조군과 실험군과 동량의 corn oil만을 삼관 투여하는 실험 대조군으로 설정하여 각각 실험군과 비교하였다. 실험군과 대조군은 최종 투여 후 7일 후에 희생시켜 즉시 간을 적출하여 실험재료로 사용하였다.

2. 전자현미경 표본제작

DEHP에 노출된 흰쥐 간의 미세구조적 변화를 관찰하기 위하여 전자현미경 표본을 제작하였다. 각 실험군과 대조군에서 적출한 간조직을 0.1 M 인산완충용액(phosphate buffer, pH 7.2)으로 조정된 4% glutaraldehyde용액으로 약 12시간 동안 전고정한 후 동일한 완충용액을 사용하여 20분씩 3회 수세하고, 1% osmium tetroxide (OsO₄)로 60분 동안 후고정한 후, 동일한 완충용액을 사용하여 20분씩 3회 수세하였다. 이후 60%~100% 농도 상승 ethanol 수용액에 각 20분씩 조직을 침수시켜 탈수 과정을 진행하고 propylene oxide로 10분씩 2회 치환하

였으며, propylene oxide와 epon 1 : 1 혼합액에서 24시간 침투시켰다. 침투가 끝난 조직은 poly/Bed 812 resin과 경화제인 nadic methyl anhydride (NMA), dodecenylsuccinic anhydride (DDSA), 가속제인 2, 4, 6-tri(dimethyl amino-methyl)phenol (DMP-30)으로 조성된 epon 혼합액으로 포매한 후 60°C에서 72시간 동안 중합하였다. 이렇게 만들어진 epon 블록은 초박절편기 (Reichert Supernova Ultramicrotome, Leica사)를 이용하여 60~70 nm 두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경 (JEM1010, JEOL사)으로 80 kV하에서 관찰하고 사진촬영하였다.

3. Western Blot

DEHP에 노출된 흰쥐 간 조직내 MT 함량을 비교하기 위하여 western Blot를 시행하였다. 적출한 간 조직을 단백질 추출 시약인 PRP-PREP (iNtRON사)과 함께 균질 분쇄하고 -20°C에서 30분간 처리한 후, 13,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 변성시킨 후 12% acrylamide gel을 이용하여 100 V에서 2시간동안 전기영동한 후 같은 조건으로 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 이동시켰다. Membrane은 비특이적 반응을 억제하기 위하여 blocking 용액 [5% skim milk in Tris-buffered saline with 0.05% tween 20 (TBST)]에서 3시간 동안 처리하고 TBST로 15분씩 4회 세척한 후, 5,000배 희석시킨 1차 항체 (monoclonal mouse anti-MT, DAKO사)를 3시간 동안 처리하였다. 그 후 TBST로 15분씩 4회 세척하고 5,000배 희석시킨 2차 항체 [ZyMax Goat Anti-Mouse IgG (H+L) HRP Conjugate, ZYMED사]를 1시간동안 처리하고 동일한 방식으로 세척하였다. Signal 검출은 peroxidase의 기질인 luminol이 peroxidase에 의해 산화되면서 빛을 내는 것을 X-ray 필름상에 감광시키는 enhanced chemiluminescence (ECL)법을 이용하였으며 검출시약은 WEST-ZOL (plus) western Blot Detection System(iNtRON사)을 사용하였다. 감광된 X-ray 필름은 image master VDS software (ver. 2.0, Pharmacia biotech사)를 이용하여 정량하였다.

4. 면역세포화학적 표본제작

DEHP에 노출된 흰쥐 간 세포에서 MT의 분포를 전자현미경으로 관찰하기 위하여 면역세포화학적 표본을 제작하였다. 각 실험군과 대조군에서 적출한 간 조직을 0.1 M 인산완충용액 (phosphate buffer, pH 7.2)으로 조정된 2% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde 용액을 사용하여 3시간 동안 고정된 후, 동일 완충용액으로 20분

씩 3회 수세하고 이후 60%~100% 농도 상승순으로 ethanol 용액으로 탈수하였다. 탈수된 조직은 propylene oxide로 10분씩 2회 치환한 후, propylene oxide와 araldite 1:1 혼합액에서 24시간 침투시켰고, 이후 동일한 resin으로 포매하여 60°C에서 72시간 동안 중합시켰다. 제작된 블록은 초박절편기를 사용하여 90~100 nm두께로 초박절편을 만든 후 니켈(nikel)그리드에 부착시켜 3% hydrogen peroxide, 10% gelatin, 0.01 M glycine 용액에 10분씩 처리하고, 각 단계 후 3차 증류수로 수세하였다. 그 후 1% BSA 용액에서 1시간 동안 처리하여 1차 항체의 비특이적 반응을 제거하고 PBS로 100배 희석시킨 monoclonal mouse anti-MT 항체를 실온에서 12시간 처리하여 결합시키고 PBS로 수세하였다. 1차 항체는 10 nm 금(gold) 입자가 부착되어있는 2차 항체 [anti-mouse IgG (whole molecule) gold conjugate, 10 nm, Sigma사]를 6시간 동안 처리하여 표지하고 PBS로 3회 수세하였다. 1% glutaraldehyde와 1% OsO₄에서 1분씩 처리하여 고정시키고, 3차 증류수로 수세하였다. 면역반응이 끝난 초박절편은 투과전자현미경으로 80 kV 하에서 관찰하고 사진촬영을 실시하였다.

결과 및 고찰

동물의 정상적인 내분비 기능에 손상을 일으키는 것으로 널리 알려진 내분비 교란물질(환경호르몬)에 관한 이슈는 오존층 파괴 및 지구온난화 문제와 더불어 세계 3대 환경문제로 대두될 만큼 관심을 끌고 있다. 내분비 교란물질은 극미량으로도 생식기능을 비롯한 대사과정에 큰 영향을 미칠 수 있고, 주로 체내 지방조직에 축적되면 생체의 대부분 호르몬들과는 달리 쉽게 생분해(bio-degradation)되지 않고 안정하여 오랜 기간 동안 효과가 지속된다는 점에서 더욱 큰 경각심을 불러 일으키고 있다. 또한 내분비 교란물질들은 수질이나 토양 등에 흡착되어 식물이나 어패류 및 이를 원료로 하는 식품 등을 통해 인체에 노출되며 생체 호르몬과는 달리 쉽게 분해되지 않고 인체의 지방 및 조직에 농축되는 성질을 가지고 있다. 또한 화학적인 구조가 생명체의 호르몬과 유사하여 갑상선의 기능이상, 면역기능의 저하, 생식기의 기형, 생식기능의 저하 및 암 등을 유발시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.

플라스틱 제품에 가소성을 제공하기 위해 첨가되는 화합물인 di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)는 무색무취의 액체로서 인화성을 가지고 있는 화학물질로 1920년대 이후 플라스틱의 가소제로서 세계적으로 널리 이용

되고 있으며, 플라스틱 생활용품의 증가에 따라 제품의 생산과정에서 많이 사용되고 있다.

현재까지 DEHP의 대사과정이나 혈중 농도 혹은 생체 내 축적 등에 관하여 많은 연구들이 수행되어져 왔다. 또한 여러 동물들과 다양한 기관들에 미치는 DEHP의 영향 등에 관한 보고도 많이 있으나, 대부분 육안적 변화를 관찰하거나 생식소의 발달 혹은 효소작용에 관한 측면에서 제한적으로 이루어져 있는 상태이다(Kim *et al.* 1999). 한편, metallothionein (MT)은 50여 년 전부터 중금속에 의한 독성작용을 완화시키는 단백질로 알려지면서 연구되어져 왔으나, 최근에는 이 단백질이 여러 화합물질 혹은 스트레스 자극과 같은 외부 요인으로 생성이 자극되는 것으로 보고되어져 있고, 조직 재생 및 세포분열 혹은 발암과정과 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Duna *et al.* 1987). 이 단백질의 발현 양상이나 분포를 알아내기 위하여 다양한 조직들에서 면역화학적 방법을 사용하거나, 블로팅법을 적용하여 많은 연구들이 수행되어지고 있다.

정상대조군과 실험대조군 흰쥐 간세포(liver cell, hepatocyte)의 미세구조는 간 소엽내 부위에 따라 다양한 특징을 지니고 있다. 일반적으로 간세포는 주변 세포 혹은 혈관 내피세포들과의 연접에 의하여 다면체를 보이고, 핵은 구형 혹은 난형이지만 크기는 다양하고, 세포질내에서 조면소포체와 활면소포체가 연속되어 있는 것으로 보이며, 골지복합체도 핵 주변부와 담세관(bile canaliculus) 인접부에서 관찰되었다. 또한 리소솜들이나 퍼옥시솜들이 구형의 막구조로서 관찰되고, 크리스테가 발달한 미토콘드리아도 다수 관찰할 수 있었으며, 글리코겐 과립들이 분산되거나 집적되어 있었고, 전자밀도가 낮은 지방적들도 나타나는 특징들은 사람을 비롯한 포유동물 간세포의 전형적인 특징을 나타냈다. 실험군에서 DEHP에 의한 간세포의 미세구조 변화는 부분적으로 일부의 막구조와 소기관에서 관찰할 수 있었다. 아무런 처리도 하지 않은 정상대조군과 corn oil만을 처리한 대조군에 비해, 저농도(0.5 g kg⁻¹)의 DEHP를 처리한 군의 간세포에서 조면소포체가 발달하고, 미토콘드리아의 수가 다소 증가된 세포들을 종종 관찰할 수 있었으나, 미토콘드리아 내 크리스테의 구조에는 별다른 변화가 관찰되지 않았다. 또한 핵내의 이질 염색질의 분포나 인의 발달 정도, 세포질내 다른 소기관들의 변화도 뚜렷하지 않았다. 한편 처리 농도가 높은 군의 경우, 흰쥐 간세포의 세포질내에서 미토콘드리아의 수가 증가하는 특징 외에도 핵내 이질염색질이 덩어리를 형성하거나 세포질내에 리소솜 혹은 퍼옥시솜들이 증가한 모습도 종종 관찰되었는데 (Fig. 1), 이것은 DEHP가 세포내 에너지 대사 및 가

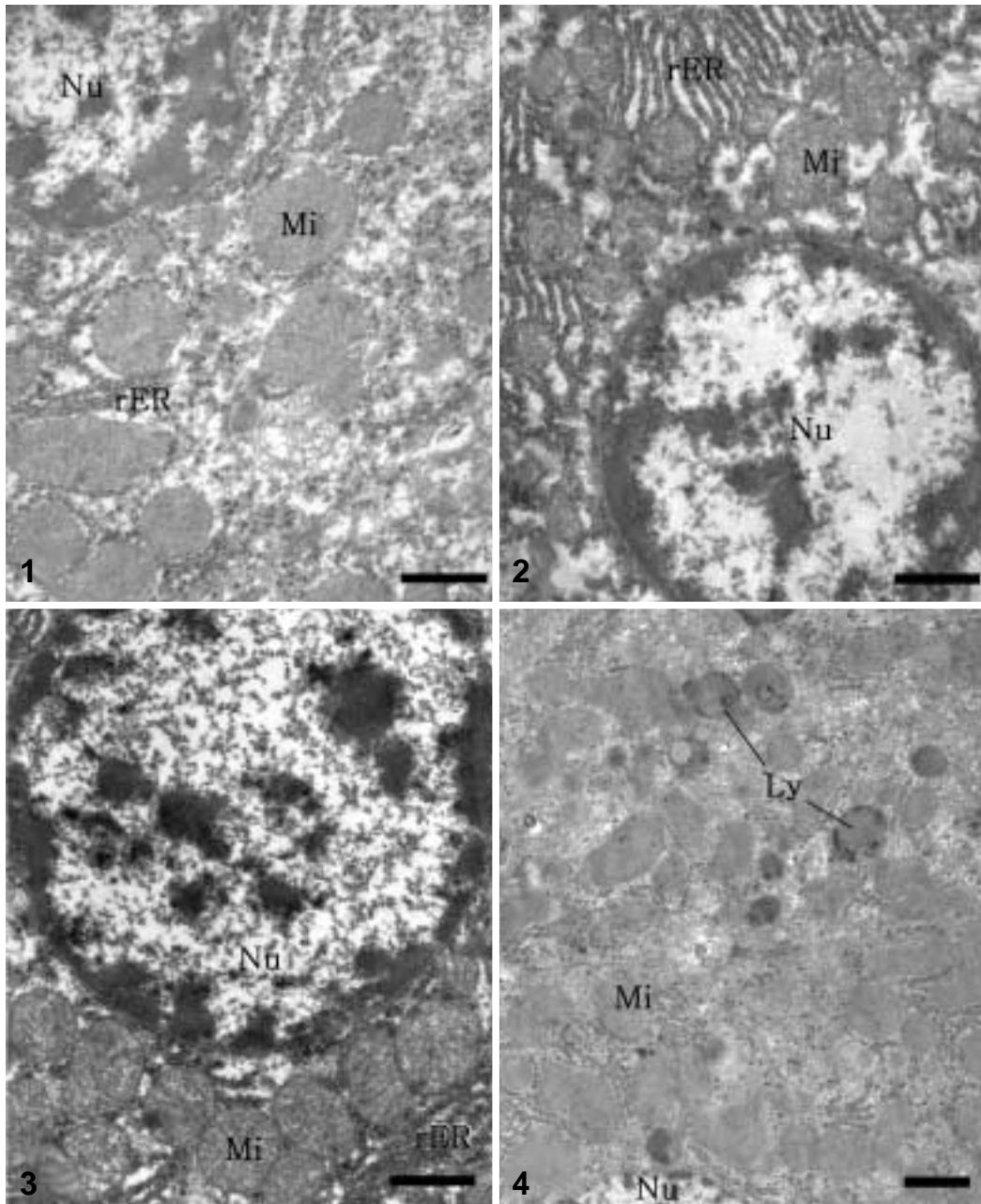


Fig. 1. Electron micrographs of liver cells of rat ① control ② 0.5 g DEHP kg⁻¹ day⁻¹ ③ 1.5 g DEHP kg⁻¹ day⁻¹ ④ 4.5 g DEHP kg⁻¹ day⁻¹. Ly: lysosome, Mi: mitochondrion, Nu: nucleus, rER: rough endoplasmic reticulum (Scale bar: 1 μm).

수분해 효소 등의 합성에 관여하는 효소들의 작용을 저해하기 때문으로 판단되며, DEHP 처리 후 발생중인 흰쥐 태아 간 조직의 생화학적 변화를 조사한 연구들과 비교되는 결과이다 (Srivastava *et al.* 1989).

DEHP에 의해 metallothionein (MT) 유전자의 발현이 영향을 받는지 알아보기 위하여 MT 단백질을 전기영동한 후 western Blot하고, 항체를 이용하여 특수 염색한 후 나타난 이미지를 densitometer로 조사하였다. 대조군

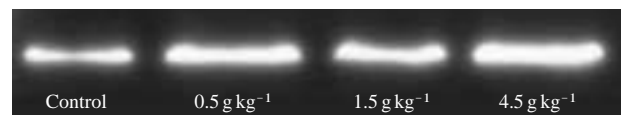


Fig. 2. Western blot analysis of MT protein expressed in rat liver.

과 각 실험군에서 MT 단백질이 발현되는 상대적 양을 비교해본 결과 대조군에 비해 저농도 투여군에서는 약

1.5배, 고농도 (4.5g kg⁻¹) 투여군에서는 2배 정도의 MT 발현이 증가하는 것으로 조사되었다(Fig. 2, Table 1). 한편, DEHP에 의한 MT 단백질의 분포(localization)와 상

대적 함량을 전자현미경으로 관찰하기 위하여 아탈다이 트 블록을 초박절편하여 MT 단백질에 직경 10nm의 금 입자(primary antibody conjugated)를 면역반응시켜 조사하였다. MT 존재 부위에 항원-항체 반응의 산물인 금 입자가 관찰되는데, 대조군의 경우 핵과 세포질에서 모두 면역반응이 양성으로 일어났으나, 대체로 간세포 1개 당 70개 내외의 금 입자가 확인될 정도로, 양성 반응의 강도는 높지 않은 편이었다. DEHP를 처리한 실험군에서는 처리 농도에 대한 차이가 뚜렷하지 않은 것으로

Table 1. The relative concentrations MT protein

Group	Relative concentration (%)
Control	100
0.5 g kg ⁻¹ DEHP	154.54
1.5 g kg ⁻¹ DEHP	142.24
4.5 g kg ⁻¹ DEHP	187.08

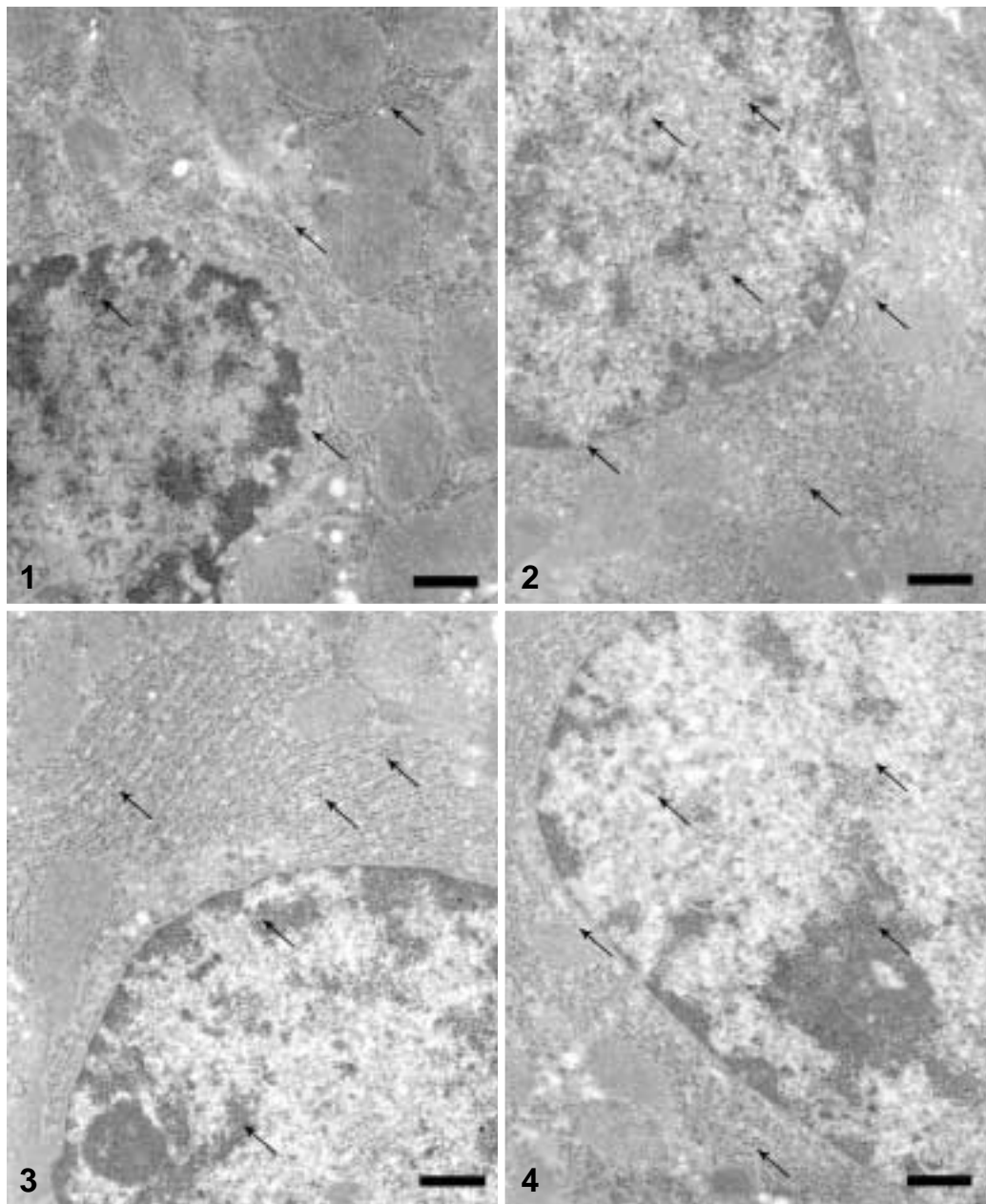


Fig. 3. Immunocytochemical electron micrographs of metallothionein in rat liver. ① control ②~④ 4.5 g DEHP kg⁻¹ day⁻¹. Arrows indicate gold particles showing the positive reaction for MT (Scale bar: 1 μm).

관찰되었으며, 양성 반응의 산물인 금 입자들의 상대적 인 분포가 대조군에 비해서 증가한 것으로 관찰되었다. 또한 핵과 세포질에서의 금 입자 분포의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 금 입자들은 세포질내에 유리되어 있거나, 조면소포체 및 골지복합체와 같은 세포내 막 구조들 혹은 핵내 인 연관 이질염색질 (nucleolus associated heterochromatin) 부위에 주로 분포하는 것으로 나타났다. 그러나 미토콘드리아 내에서는 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 이러한 실험결과들로서 흰쥐의 경우 DEHP 투여에 의해 간세포에서의 MT 발현이 증가하는 것으로 조사되었는데, 이는 DEHP에 의해 대사 저해가 야기되고, 유전자 발현의 변화가 뒤따른 것으로 판단된다.

DEHP에 의한 간세포에서의 미세구조 변화를 조사하였던 바, 실험군 간세포의 미토콘드리아 수가 증가하였으나, 내막의 확장으로 형성된 크리스테의 구조는 오히려 불완전한 것으로 보아 에너지 대사에 영향을 주는 것으로 판단되며, 고농도 군에서는 지방적이 증가하거나 퍼옥시좀 분포가 증가하여 있었고, 간세포간 연결 복합체에서도 미세한 변화가 관찰되기도 하였다. 그 외에 다른 연구자들의 보고와는 달리 큰 미세구조상의 변화를 관찰할 수 없었는데, 이러한 결과들은 본 실험에서는 DEHP를 처리한 7일 후, 흰쥐를 희생시켜 표본을 제작하여 관찰하였으므로 간세포에서의 미세구조 변화가 어느 정도 회복되었기 때문으로 생각된다. 이에 대해서는 약물 처리 후 영향이 최대에 이르는 12시간이 경과한 군을 설정하여 보다 자세한 관찰을 할 필요가 있는 것으로 판단된다. 실험군에서 MT 발현이 증가되는 현상은 다른 연구자들의 결과와 유사한 것으로 판단된다(Vasak and Hasler 2000). 한편, 본 연구자들은 DEHP에 의한 흰쥐 간 세포내의 MT 유전자의 발현정도를 알아보기 위하여 DNA microarray를 실시하여 확인한 결과 대조군에 비하여 4.5 g kg⁻¹ day⁻¹ DEHP 처리군에서 MT 유전자의 발현이 MT1a가 6.7배, MT2가 8.1배, MT3가 3.7배 증가한 것이 확인되었다(미발표).

DEHP가 동물체내에서 어떤 특정한 세포에 한정되어 작용하여 상기와 같은 결과들이 초래되는지, 아니면 여러 종류의 세포에 작용하여 억제 효과를 유발하는지에 대해서는 논의의 여지가 있다.

이상과 같이 DEHP는 고농도 처리군에서는 간의 미세구조와 기능에도 영향을 미치는 것으로 판단되며 MT 발현을 증가시키는 것으로 추측된다. 이 화합물의 혈액 내 혹은 세포내 대사과정, 주요 표적세포 및 세포내 작용 부위 및 경로 등과 같은 보다 정확한 기작에 관해서는 더욱 깊이 있는 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 내분비계 장애물질으로 알려져 있고, 플라스틱 제품의 가소제로 사용되고 있는 di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)가 흰쥐의 간세포 미세구조와 간 조직내 metallothionein (MT)의 발현 양상에 미치는 영향을 조사하였다.

DEHP는 흰쥐 간세포의 미세구조와 MT 발현에 영향을 주었다. 실험군의 경우 조면소포체가 발달하고, 미토콘드리아가 증가하며 리소솜 혹은 퍼옥시좀들이 증가하는 경향을 나타냈다. 한편, MT 발현의 변화를 면역세포화학적 방법과 western Blot을 수행한 결과 저농도 투여군에서는 약 1.5배, 고농도 투여군에서는 약 2배 가량 증가하는 결과를 나타냈다.

결론적으로 DEHP는 흰쥐 간세포의 구조와 기능에 영향을 주는 것으로 판단되며, 이러한 세포내 스트레스가 MT 발현 증가 현상과 연관이 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 2005년도 순천향대학교 연구비 지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

- Albro PW, JT Corbett, JL Schroeder, S Jordan and HB Matthews. 1982. Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ. Health Perspect.* 45:19-25.
- Bally MB, DJ Dpheim and HG Shertzer. 1980. Di-(2-ethylhexyl)phthalate enhances the release of lysosomal enzymes from alveolar macrophages during phagocytosis. *Toxicology* 18:49-60.
- Banerjee D, S Onosaka and MG Cherian. 1982. Immuno histochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of rat liver and kidney. *Toxicology* 24: 95-105.
- Bhattacharya N, JM Dufour, MN Vo, J Okita and R Okita. 2005. Differential effects of phthalates on the testis and the liver. *Biol. Reprod.* 72:745-754.
- Clough SR, RS Mitra and AP Kulkarni. 1986. Qualitative and quantitative aspects of human fetal liver metallothioneins. *Biol. Neonate* 49:241-254.
- Daniel JW and H Bratt. 1974. The absorption, metabolism and

- tissue distribution of di-(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicology* 2:51-65.
- DeAngelo AB, CT Garrett, LA Manolukas and T Yario. 1986. Di-n-octyl phthalate (DOP), a relatively ineffective peroxisome inducing straight chain isomer of the environmental contaminant di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), enhances the development of putative preneoplastic lesions in rat liver. *Toxicology* 41:279-288.
- Duna MA, TL Blalock and RJ Cousins. 1987. Metallothionein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 185:107-119.
- Ebadi M, H Brown-Borg, H Refraey, BB Singh, S Garrett, S Shavali and SK Sharma. 2005. Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 134:67-75.
- Ghoshal K and ST Jacob. 2000. Regulation of metallothionein gene expression. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 66: 357-384.
- Grande SW, AJ Andrade, CE Talsness, K Grote and I Chahoud. 2006. 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.
- Han SC, YC Kil and WJ Kim. 1998. Cytochemistry on Regeneration of Rat Liver. *Soonchunhyang J. Nat. Sci.* 4(2): 285-291.
- Kim WJ, YC Kil, JH Lee and KS Shin. 1999. Effect of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on spermatogenesis in rat testis. *Kor. J. Environ. Biol.* 17:285-292.
- Lee J, J Park, B Jang and TB Knudsen. 2005. Altered expression of genes related to zinc homeostasis in early mouse embryos exposed to di-2-ethylhexyl phthalate. *Toxicol. Lett.* 152:1-10.
- Mushtaq M, SP Srivastava and PK Seth. 1980. Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on glycogen metabolism in rat liver. *Toxicology* 16:153-161.
- Schulz CO and RJ Rubin. 1973. Distribution, metabolism, and excretion of di-2-ethylhexyl phthalate in the rat. *Environ. Health Perspect.* 3:123-129.
- Srivastava SP, DK Agarwal, M Mushtaq and PK Seth. 1978. Effect of Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on chemical constituents and enzymatic activity of rat liver. *Toxicology* 11:271-275.
- Srivastava SP, VK Awasthi, SP Srivastava and PK Seth. 1989. Biochemical alterations in rat fetal liver following in utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Indian J. Exp. Biol.* 27:885-888.
- Vasak M and DW Hasler. 2000. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 177-183.

Manuscript Received: April 3, 2007
Revision Accepted: October 16, 2007
Responsible Editor: Seung Bum Kim