

쥐에서 Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate로 유발된 정자 형성 장애에 대한 Vitamin E와 Catechin의 예방 효과

이지우 · 이경갑 · 정종태 · 윤영민 · 이주명 · 박현정 · 우호춘 · 유재규¹ · 손우진¹ · 강민수² · 강태영[†]
제주대학교 수의학과

Preventive Effects of Vitamin E and Catechin on Spermatogenic Disturbance Induced by Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate in Rat

J. W. Lee, K. K. Lee, J. T. Cheong, Y. M. Yun, J. M. Lee, H. J. Park, H. C. Woo,
J. G. Yoo¹, W. J. Son¹, M. S. Kang² and T. Y. Kang[†]

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University

SUMMARY

The purpose of the present study was to determine the preventive effects of the two antioxidant vitamin E and catechin on DEHP-induced disturbance of spermatogenesis in male rats. Rats at 4 weeks of age were randomly allocated into five groups with 20 animals per group. The first group was not any administrated as control. The second group was administrated DEHP (2 g/kg) daily for 14 days. The third group was administrated vitamin E (500 IU/kg) following DEHP treatment by the same method (daily for 14 days). The fourth group was administrated catechin (200 mg/kg) following DEHP treatment by the same method. The fifth group was co-administrated vitamin E (500 IU/kg) and catechin (200 mg/kg) following DEHP treatment by the same method. In order to determine the preventive effects, we examined pathological changes of testis with apoptotic index, and characteristics of sperm with computer assisted sperm analysis (CASA). Vitamin E and catechin supplementation were significantly prevented the testicular atrophy, apoptosis of germ cells in the seminiferous tubules and abnormal rate of sperm. Moreover, sperm concentration, viability and motility was significantly recovered in groups of alone and along with vitamin E and catechin. The results suggest that preventive effects of alone and along administration of vitamin E and catechin on DEHP-induced testicular atrophy damages have been demonstrated.

(Key words : DEHP, catechin, vitamin E, spermatogenic disturbance, rat)

서 론

사람에게 악성 종양, 생식 기능 장애 등을 초래하는 것으로 알려져 있는 di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)는 유기 염소계와 더불어 환경 호르몬(내분비계 장애 물질)으로 분류되어 있으며, 정자 형성 장애를 일으키는 것에 대한 관심이 모아지고 있다. 이 물질은 플라스틱 제품의 가소제로 널리 사용되어 왔으며, 최근 카테터나 수혈 bag 같은 의료 기구에도 사용되고 있으며, 용도에 따라 음식물, 공기, 물, 흙 등을 통해 유출된다 (Albro, 1987; Thomas 등, 1978). DEHP를 투여한 쥐에서 생식기 및 부생식기관의 구조의 변형과 기능을 저해하고 임신된 쥐에서는 태아의 성장을 지연시키고 기형을 유발하거나 간의 종대를 동반한 간암이 발병되었다는 보고가 있다(Oishi,

1989; Srivastava 등, 1989; Tomita 등, 1982).

DEHP에 의한 독성 유발 기전은 불분명하지만, DEHP에 노출된 쥐에서 정자 형성의 필수 요소인 vitamin A, vitamin B₁₂, vitamin C를 투여하여 정자 무형성증을 효과적으로 예방하였다(Ishihara 등, 2000; Oishi, 1994). 특히, 항산화제로 잘 알려진 vitamin E를 투여하였을 때 DEHP에 의하여 유발된 정소위축의 방지 효과가 있어 그 예방 효과의 가능성을 제시하였다(Niki, 1987; Summerfield와 Tappel, 1984). 또한, 녹차의 주요한 성분인 catechin을 매일 섭취함으로써 전신적인 항산화 기능을 유지할 수 있어서 만성 중금속 중독, 항생제에 의해 유발된 신부전, 심부전 등에 전신적인 항산화 예방 효과가 있음이 보고되었다(Sato 등, 2002). 그리고 catechin이 DEHP와 유사한 구조의 bisphenol A에 대해서 억제 효과를 볼 수 있었기

¹ 경상대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

² 제주대학교 생명자원과학대학 생물산업학부(Major of Animal Science and Biotechnology, Cheju National University)

[†] Correspondence : E-mail : tykang87@cheju.ac.kr

때문에 DEHP에 대한 예방 효과가 기대가 된다. Vitamin E와 catechin을 함께 투여해서 세포 수준에서 유의성 있는 항산화 효과도 보고되었다(Sato 등, 1998). 그러므로 DEHP가 유발하는 정소 손상에 대해 vitamin E와 catechin의 투여는 항산화 상승 작용을 나타낼 것으로 예측된다.

Apoptosis는 세포사를 조절하여 정상적 발달 과정과 항상성, 그리고 인간의 질병에 큰 역할을 한다고 알려져 있다(Amiya 등, 1999). Germ cell death의 조절을 연구하기 위한 모델로 spermatogenesis를 이용한 최근 연구에서는 성숙 쥐에서 호르몬 공급을 제거한 후의 germ cell death가 거의 apoptosis를 통해서만 발생한다는 보고가 있다(Kasahara 등, 2002).

본 연구에서는 정자 형성 장애를 일으킨다고 알려진 DEHP를 웅성 랫드에 투여하고, vitamin E와 catechin을 단독 또는 병용 투여로 정소 조직의 apoptosis와 CASA를 이용하여 정자의 운동성 변화 등을 조사하여 그 예방 효과를 알아보고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

4주령의 Sprague-Dawley(SD) 랫드 수컷을 100마리를 구입하여 5개의 군으로 20마리씩 나누어 배치하였다. 명암주기는 12시간 간격으로 하였으며, 사료와 물은 자유 급식하였다.

2. 약물 투여

랫드를 실험에 사용하기 전 새로운 환경에 적응시키기 위하여 1주일간 계류시키고, 각 군별로 다음과 같이 2주 동안 매일 경구 투여하였다. I군은 무처리군으로 DEHP, vitamin E, catechin을 투여하지 않았다. II군은 DEHP를 2 g/kg으로 투여하였다. III군은 DEHP를 2 g/kg으로 투여하고 vitamin E 500 IU/kg을 함께 투여하였다. IV군은 DEHP를 2 g/kg로 투여하고 catechin을 200 mg/kg을 함께 투여하였다. V군은 DEHP를 2 g/kg으로 투여하고 vitamin E 500 IU/kg과 catechin을 200 mg/kg을 함께 투여하였다. 실험에 사용되는 DEHP와 vitamin E는 혼합하지 않고 각각 투여하였으며 catechin은 증류수와 혼합하여 투여하였다.

3. 정소의 조직 검사 및 Apoptosis Index(AI)의 측정

2주간 실험을 마친 다음 랫드를 diethyl ether로 심마취하여 안락사를 유도한 후 정소와 부고환을 적출하였다. 분리한 정소는 Bouin's solution에 고정된 후 일반 조직 병리학적 방법으로 아래와 같이 실시하였다. 파라핀에 포매된 조직을 절단하여 슬라이드 위에 부착시킨 후 탈파라핀과 합수 처리를 하였다. Proteinase K를 20분간 처리하여 단백질을 분해시키고 3% 과산화수소 용액에 5분간 처리하여 PBS로 세척하였다. 그 후

TdT를 점적한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. Stop buffer로 10분간 반응을 종료시킨 후 PBS로 수세하였다. Anti Dioxigenin Peroxidase와 실온에서 30분간 반응시킨 후 발색제인 DAB를 점적하여 발색이 되면 봉합하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 횡단면된 정소 조직의 정세관 100개에서 갈색으로 염색된 세포수를 세어 평균과 표준 편차로 나타내었다.

4. 정자 농도와 기형을, 생존을 측정

부고환은 10 ml의 TCM 199 media에 잘게 잘라 넣고 정자가 흘러나올 수 있도록 10분간 항온 수조에 incubation시켰다. 정자 농도 측정을 위해 10 ml media에 희석된 정액 50 μ l와 증류수 445 μ l를 혼합한 뒤 eosin-nigrosin 용액을 5 μ l 첨가시켰다. 그리고 Makler chamber에 희석액을 떨어뜨린 후 관찰하였다. 기형을 측정은 10 ml media에 희석된 정액을 슬라이드에 떨어뜨린 후 eosin-nigrosin 용액으로 염색하여 압착 도말한 뒤 1,000배 시야에서 검경하였다. 기형의 형태는 정자 100마리를 관찰하면서 두부, 중간부, 미부로 구분하여 정상과 기형으로 구분하였다. 정자의 생존을 측정은 압착 도말한 슬라이드에서 100마리의 정자를 관찰하여 생사를 감별하였다. 정자의 두부가 염색된 것은 죽은 정자, 염색이 되지 않은 것은 살아있는 정자로 구분하였다.

5. CASA를 이용한 정자 분석

희석되어 있는 정자를 37°C로 가열한 Makler chamber에 떨어뜨린 후 image analysis software인 VideoTesT-Sperm 2.1 CASA (VideoTesT Co., Russia)을 이용하여 CASA 분석을 하였다. CASA의 분석 설정값은 Table 1과 같이 설정하여 측정하였다. 정자 운동성 척도는 평균 거리 속력(VAP), 곧은 직선 속력(VSL), 곡선 속력(VCL), 정자 머리측면 전위(ALH), 진동 정도(BCF), 정자 트랙 곧은 정도(STR), 직선도(LIN)를 포함하였다. VAP, VSL, STR, LIN은 정자 진행을 나타내고, 반면 VCL, ALH와 BCF는 정자 활성을 나타낸다.

Table 1. Parameters settings used with computer assisted sperm analysis system

| System parameter | Value |
|------------------------------------|----------|
| Image sampling frequency (frame/s) | 25 |
| Duration of image capture (s) | 1 |
| Minimum motile speed (μ m/s) | VSL* 10 |
| Maximum motile speed (μ m/s) | VSL* 250 |
| Maximum countable number (sperm) | 400 |
| Maximum countable frame | 10 |

* VSL: Straight-line velocity.

6. 통계 방법

통계 처리가 가능한 항목과 그 결과에 대해서는 ANOVA를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 정소 조직의 검사

정상 정소 조직(I군)과 DEHP와 vitamin E, catechin을 투여한 정소 조직(II군, III군, IV군, V군)에서 apoptotic body가 갈색의 소체로 염색되었고, 그 중 II군에서는 apoptosis가 현저하게 많이 나타난 것을 볼 수 있으며, 조직학적 변화로 정세관이 위축되고 정모 세포와 sertoli 세포가 현저하게 적은 것을 알 수 있었다. III군, IV군, V군에서는 DEHP를 투여한 II군에 비해 apoptotic body가 적었으며 완전하지는 않지만 부분적인 정자 형성이 이루어지며 정세관의 위축도 II군에 비해서 적게 나타났다(Fig. 1).

2. Apoptosis Index의 측정

DEHP와 vitamin E, catechin의 투여가 apoptosis에 미치는 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. II군의 apoptotic index는 101.8±6.5로 I군의 apoptotic index 47.2±11.4에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 값을 나타내었다($p<0.05$), III군, IV군, V

군의 apoptotic index는 각각 56.8±7.8, 77.2±17.6, 64.8±22.8로 I군과 비슷한 수준으로 나타났다.

3. 정자의 농도 및 생존율

DEHP와 vitamin E, catechin의 투여가 정자의 농도 및 생존율에 미치는 결과는 Table 3에 보는 바와 같다. II군의 정자농도는 67.8±31.5×10⁶/μl로 I군의 정자 농도에 비하여 통계적

Table 2. Assessment of apoptotic germ cells in groups

| Type | Apoptotic index (mean±SD) |
|-----------|---------------------------|
| Group I | 47.2±11.4 ^a |
| Group II | 101.8± 6.5 ^b |
| Group III | 56.8± 7.8 ^a |
| Group IV | 77.2±17.6 ^a |
| Group V | 64.8±22.8 ^a |

^{a,b} $p<0.05$ significantly different from the group I.

Group I; no administration.

Group II; administration of DEHP 2 g/kg.

Group III; administration of DEHP 2 g/kg and vitamin E 500 IU/kg.

Group IV; administration of DEHP 2 g/kg and catechin 200 mg/kg.

Group V; administration of DEHP 2 g/kg, vitamin E 500 IU/kg and catechin 200 mg/kg.

Table 3. Changes of sperm concentration and viability in groups

| Treatment | Sperm conc. (×10 ⁶ /μl) | Viability (%) |
|-----------|------------------------------------|------------------------|
| Group I | 209.4±77.0 ^a | 95.7±12.3 |
| Group II | 67.8±31.5 ^b | 72.6± 9.1 [*] |
| Group III | 179.0±75.6 ^{ac} | 84.9± 8.7 |
| Group IV | 132.4±26.5 ^{ac} | 94.2± 9.2 |
| Group V | 140.6±38.5 ^{ac} | 90.9± 9.2 |

^{a,b,c} $p<0.05$ significantly different from the group I.

^{*} $p<0.001$ significantly different from the group I.

Group I; no administration.

Group II; administration of DEHP 2 g/kg.

Group III; administration of DEHP 2 g/kg and vitamin E 500 IU/kg.

Group IV; administration of DEHP 2 g/kg and catechin 200 mg/kg.

Group V; administration of DEHP 2 g/kg, vitamin E 500 IU/kg and catechin 200 mg/kg.

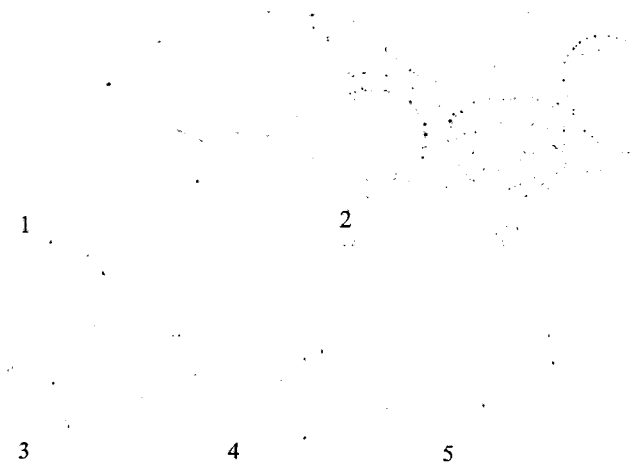


Fig. 1. Histological changes of seminiferous tubules stained with TUNEL (×400).

1: Group I; no administration.

2: Group II; administration of DEHP 2 g/kg.

3: Group III; administration of DEHP 2 g/kg and vitamin E 500 IU/kg.

4: Group IV; administration of DEHP 2 g/kg and catechin 200 mg/kg.

5: Group V; administration of DEHP 2 g/kg, vitamin E 500 IU/kg and catechin 200 mg/kg.

으로 유의하게 낮은 값을 나타내었다($p<0.05$), III군, IV군과 V군의 정자 농도는 각각 $179.0\pm 75.6\times 10^6/\mu\text{l}$, $132.4\pm 26.5\times 10^6/\mu\text{l}$, $140.6\pm 38.5\times 10^6/\mu\text{l}$ 로 대조군과 비슷한 수준으로 나타나 점차 정상에 가깝게 회복되는 경향을 보였다. 그러나 약물 투여군 간의 차이는 나타나지 않았다.

II군의 정자 생존율은 $72.6\pm 9.1\%$ 로 I군의 정자 생존율($95.7\pm 12.3\%$)에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 값을 나타내었다($p<0.001$). 정자 생존율 역시 약물 투여군 간의 유의성 있는 차이는 없었으나 I군에 비해서는 낮은 수준이었으나 vitamin E와 catechin 투여로 생존율이 회복되는 경향을 보였다.

4. 정자의 기형율

DEHP와 vitamin E, catechin의 투여가 정자의 기형율에 미치는 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. II군의 정상 정자율은 $67.5\pm 11.2\%$ 로 I군($75.8\pm 10.4\%$)에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 값을 나타내었다($p<0.05$). 약물 처리군 간의 정상 정자율은 I군과 비슷한 수준으로 나타났다.

정자의 각 부분별 기형율을 살펴보면, 두부의 기형율은 II군과 V군에서 I군, III군과 IV군에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 값을 나타내었다($p<0.05$). 중간 부위의 기형율에서는 I군이 다른 군에 비하여 낮은 기형율을 보였으며, 처리군 중 III군이 DEHP에만 노출시킨 II군보다 높은 기형율을 보였다. 미부에서의 기형율은 I군과 약물 처리군인 IV군과 V군에서 II군과 III군보다 높은 기형율을 보였다.

5. 정자의 운동성

약물 투여에 대한 정자 운동성의 변화는 CASA를 이용하여 분석하였으며 결과는 Table 5와 같았다. 정자 운동성은 II군에서 가장 낮게 나타나 다른 군들과 통계적 유의성이 나타났다($p<0.05$). CASA 지표에서는 각 군 간의 통계학적 유의성은 없었고, ALH에서만 II군에서 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$).

Table 4. Changes of sperm morphology in groups

| Treatment | Normal (%) | Head (%) | Midpiece (%) | Tail (%) |
|-----------|------------------|--------------------|------------------|------------------|
| Group I | 75.8 ± 10.4^a | 8.7 ± 3.3^a | 14.4 ± 1.3^a | 76.9 ± 15.6^a |
| Group II | 67.5 ± 11.2^b | 13.8 ± 4.1^b | 37.1 ± 6.4^b | 49.1 ± 6.5^b |
| Group III | 73.1 ± 4.5^a | 8.4 ± 2.6^a | 42.5 ± 10.8^c | 49.1 ± 11.7^b |
| Group IV | 72.9 ± 7.9^a | 9.4 ± 4.7^a | 23.4 ± 2.4^d | 67.3 ± 16.5^a |
| Group V | 72.0 ± 7.0^a | 12.1 ± 1.2^{ab} | 21.3 ± 2.7^d | 66.6 ± 12.7^a |

Values with different superscripts are significantly differ from the column, $p<0.05$.

Group I; no administration.

Group II; administration of DEHP 2 g/kg.

Group III; administration of DEHP 2 g/kg and vitamin E 500 IU/kg.

Group IV; administration of DEHP 2 g/kg and catechin 200 mg/kg.

Group V; administration of DEHP 2 g/kg, vitamin E 500 IU/kg and catechin 200 mg/kg.

Table 5. Comparison of the sperm motility and kinematic characteristics

| Treatment | Motility (%) | VAP ($\mu\text{m/s}$) | VSL ($\mu\text{m/s}$) | VCL ($\mu\text{m/s}$) | ALH (μm) | BCH (Hz) | STR (%) | LIN (%) |
|-----------|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------|----------------|----------------|
| Group I | 69.5 ± 6.2^a | 44.0 ± 22.5 | 40.3 ± 25.3 | 131.6 ± 69 | 2.8 ± 1.0 | 7.6 ± 1.0 | 90.2 ± 14.1 | 49.1 ± 33.2 |
| Group II | 47.7 ± 7.9^b | 25.9 ± 8.9 | 22.0 ± 9.9 | 91.9 ± 60 | $1.9\pm 0.7^*$ | 6.7 ± 2.2 | 74.7 ± 19.4 | 36.8 ± 23.5 |
| Group III | 60.0 ± 4.1^c | 34.7 ± 7.6 | 31.1 ± 20.1 | 106.7 ± 63.8 | 2.3 ± 0.9 | 7.4 ± 1.0 | 88.7 ± 15.4 | 46.1 ± 31.4 |
| Group IV | 62.6 ± 3.3^c | 39.7 ± 15 | 33.4 ± 15.5 | 116.0 ± 71 | 3.0 ± 0.6 | 7.3 ± 0.8 | 88.3 ± 16.8 | 48.2 ± 32.3 |
| Group V | 59.1 ± 7.0^c | 36.7 ± 16.4 | 32.5 ± 19.4 | 106.0 ± 46.9 | 2.4 ± 0.6 | 7.5 ± 1.0 | 89.4 ± 13.6 | 47.7 ± 32.9 |

Data are expressed as means \pm SD.

^{a,b,c} values with different superscripts are significantly differ($p<0.01$).

* values with different superscripts are significantly differ($p<0.05$).

Group I; no administration.

Group II; administration of DEHP 2 g/kg.

Group III; administration of DEHP 2 g/kg and vitamin E 500 IU/kg.

Group IV; administration of DEHP 2 g/kg and catechin 200 mg/kg.

Group V; administration of DEHP 2 g/kg, vitamin E 500 IU/kg and catechin 200 mg/kg.

VAP, average path velocity; VSL, straight line velocity; VCL, curvilinear velocity; ALH, amplitude of lateral head displacement; BCH, beat cross frequency; STR, straightness; LIN, linearity.

고찰

DEHP는 현재 내분비계 장애 물질로 분류되고 있다. 그러나 직접적으로 에스트로겐 유사 작용을 한다는 증거는 아직 없다 (Nakai 등, 1999). DEHP의 정자 형성 장애의 대사가전이 모호하기는 하지만 정소의 장애를 줄이려는 연구가 시도되고 있다. Oishi(1984)는 DEHP를 투여한 쥐에서 정소와 혈청 내 테스토스테론이 감소한다고 보고했다. 그러나 테스토스테론이나 생식선 자극 호르몬의 투여에 의해서도 정소의 위축은 예방되지 않았다. 또한 DEHP 투여시 쥐에서 선택적으로 아연의 결핍이 나타났으나 아연의 투여에 의해서도 정소의 위축은 예방되지 않았다고 보고하였다(Oishi와 Hiraga, 1983).

DEHP에 의해 유발된 정자 형성 장애는 처음으로 vitamin B₁₂의 투여에 의해 예방되었다고 보고하였다(Oishi, 1994). 따라서 이 현상은 DEHP에 의한 vitamin 결핍 가능성을 제시하였다. Vitamin A 및 B₁₂와 같이 vitamin E 결핍 역시 정자 형성 장애시 나타나므로 정상적인 정자 형성에 필수적 요소이다(Bensoussan 등, 1998). 또한, catechin은 녹차의 주요 성분으로 항산화 효과가 탁월하여 유리 산소기 제거에 효과적이며, 특히 정소 독성에서 항산화제로 효과가 있다고 보고된 바 있다(Orozco 등, 2003; Wong과 McLean, 1999). 수용성인 catechin은 세포질에만 있는 반면 지용성인 vitamin E는 대부분의 세포막에 존재한다(Giasuddin과 Diplock, 1981; Tappel, 1962). 전자선 수용성일 때 산소기를 제거하고, 후자는 세포막 지질의 안전성을 높여 세포 손상을 방어한다. 이 두 물질의 특성을 이용하여 병합 투여할 경우보다 예방 효과가 상승하리라 생각되어 본 연구에 사용하게 되었다.

정세관내 정조 세포와 정모 세포의 apoptosis는 DEHP의 자극을 받은 II군에서 다른 대조군과 처리군에 비해 현저하게 많았다. 이는 apoptosis가 세포내의 신호들과 방사선에 노출되거나, 화학 요법 또는 호르몬과 같은 세포 외로부터 받은 자극을 포함한 여러 가지 인자들에 의하여 유발된다는 보고와 일치하였다(Kasahara 등, 2002; Amiya 등, 1999). 그리고 대조군의 정상 정소 조직에서도 apoptotic body가 관찰되었는데, 이는 정자 형성 과정 중 유사 분열과 관련하여 항상성을 유지하려는 것으로 Choi 등(2003)의 결과와 일치하였다. 이는 vitamin E와 catechin이 정세관내 Sertoli cell과 정자 세포들의 apoptosis를 감소시키거나 지연시키는 것으로 생각된다.

DEHP의 투여군은 대조군에 비하여 정자의 농도가 유의성 있게 감소되는 것으로 나타났으며, vitamin E와 catechin 투여군에서는 대조군과 비슷한 수준으로 나타난 것으로 보아, DEHP가 정자의 농도를 감소시키며 이러한 현상은 vitamin E와 catechin의 투여에 의해 예방되는 것으로 생각되며 catechin 단독 투여 및 vitamin E와 catechin의 병용 투여보다도 vitamin E 단독 투여가 더 효과가 있는 것으로 보여진다. 정자 생존율 및 기형율에서 DEHP 투여가 정자의 생존율은 감소시키며 기형

율은 증가됨을 알 수 있었고, 이러한 현상은 vitamin E와 catechin의 투여에 의해 차츰 정상으로 회복되고 있는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서는 vitamin E와 catechin을 병용 투여할 경우 상승 효과를 기대하였으나, 결과에서 보듯 vitamin E나 catechin 단독 투여보다 통계학적으로 유의적인 결과를 얻지 못하였다. Lotito와 Fraga(2000)는 사람의 혈장내에서 플라보노이드의 종류에 따라 α -tocopherol의 지방 산화의 지연 효과를 알아 본 결과 (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epicatechin, (+)-catechin, (-)-epigallocatechin 순으로 나타났으며, Frank 등(2006)은 흰쥐에서 catechin이 용량 의존적으로 α -tocopherol의 농도를 감소시키고 지방 산화를 지연시킨다고 보고했다. 따라서 본 연구에서 (+)-catechin을 vitamin E와 병용 투여하였기 때문에 지방 산화 지연과 지질성 항산화제인 α -tocopherol의 충분한 상승 효과를 얻지 못한 것으로 사료된다.

정자 분석에 사용되는 컴퓨터 보조 정액 분석기(Computer Assisted Sperm Analysis, CASA)는 정자의 운동성을 객관적으로 분류하는 장비이다(Boyers 등, 1989). CASA는 랫드 부고환의 정자 운동성 특징을 측정하며, CASA의 여러 가지 측정치는 부고환과 정소 독성의 지표로서 활용된다(Perreault, 1998; Slott 등, 1995). 본 연구에서 CASA를 이용하여 정자 분석을 한 결과 정자 운동성은 대조군이 가장 높은 운동성을 보였으며, CASA 지표에서 따른 VAP, VSL, BCF, STR, LIN에서는 각 처리군 간의 통계적 유의성이 나타나지 않았다. 실험 동물에서 epichlorohydrin에 4시간 동안 노출시켜 정자 운동성을 CASA로 측정 한 결과, 운동성의 유의적 차이는 없었으며(Slott 등, 1997; Toth 등, 1989), 랩스터에 α -chlorohydrin을 4일간 용량을 달리 하여 투여한 결과 VCL, VAP와 VSL의 저하가 나타났으나, 정자 운동성의 변화를 없었다. Alpha-chlorohydrin 노출은 체의 수정 능력에 영향을 주는 비직선 운동 손상과 관련이 있다고 보고하였다(Slott 등, 1995). CASA 지표가 생식 독성에 나타나는 변화를 민감하게 나타내고 부고환과 정소 독성의 척도로 해석하는데 이용이 가능하였다(Perreault와 Cancel, 2001; Perreault, 1998; Toth 등, 1989). 비록 CASA 지표가 민감한 바이오 마커지만 각자 다른 CASA 장치와 설정 기준을 사용하기 때문에 본 연구에서 그 지표를 다른 연구자와 직접 비교하기는 어려웠다. 그러므로 장치와 설정의 표준화와 규격화가 요구되는 실정이다(Davis 등, 1992).

본 실험으로 쥐에서 DEHP 투여에 의해 일어난 정자 형성 장애로 정자 농도 저하, 정자 생존율 저하, 정자 기형율 상승, 정자 운동성 변화 등을 나타내었다. 반면 vitamin E와 catechin 단독 및 병용 투여에 의해 정상에 가깝게 회복되어 정소 독성의 예방 효과가 있는 것으로 판단되었다.

적요

본 연구에서는 수컷 랫드에 DEHP를 투여하여 실험적으로

생식 독성을 유발하고, vitamin E와 catechin을 단독 및 병용 투여하여 수컷 랫드에서 정소의 조직학적 변화, 정액 특성의 변화 및 정자의 운동성 변화 등을 조사하여 그 예방 효과를 알아보려고 하였다. DEHP를 투여한 군은 대조군에 비해 정자농도, 정자 생존율, 정상 정자율이 감소하였다. DEHP에 의한 생식 독성을 예방하기 위해 vitamin E와 catechin을 단독 또는 병행 투여한 결과, DEHP를 투여한 군에 비하여 정자 농도, 정자 생존율, 정상 정자율이 증가하였다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, catechin과 vitamin E의 투여는 DEHP에 의한 생식 독성을 예방하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Albro PW. 1987. The biochemical toxicology of di(2-ethylhexyl) phthalate: Testicular atrophy and hepatocarcinogenesis. *Review of Biochemistry and Toxicology*, 8:73-119.
- Amiya P, Hikim S and Swerdloff RS. 1999. Hormonal and genetic control germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of Reproduction*, 4:38-47.
- Bensoussan K, Morales CR and Hermo AL. 1998. Vitamin E deficiency causes incomplete spermatogenesis and affects the structural differentiation of epithelial cells of the epididymis in the rats. *J. Androl.*, 19:266-288.
- Boyers SP, Davis RO and Katz DF. 1989. Automated semen analysis. *Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fertil.*, 12:173-199.
- Choi JY, Cho SW, Ryu SY, Jee YH, Lee GJ and Son HY. 2003. Apoptosis of germ cell after vasectomy in rats. *Korean J. Vet. Res.*, 43:485-492.
- Davis RO, Rothman SA and Overstreet JW. 1992. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertil. Steril.*, 57:648-653.
- Frank J, Budek A, Lundh T, Parker RS, Swanson JE, Lourenco CF, Gago B, Laranjinha J, Vessby B and Kamal-Eldin A. 2006. Dietary flavonoids with a catechol structure increase alpha-tocopherol in rats and protect the vitamin from oxidation *in vitro*. *J. Lipid Res.*, 47:2718-2725.
- Giasuddin ASM and Diplock AT. 1981. The influence of vitamin E on membrane lipids of mouse fibroblasts in culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 210:348-362.
- Ishihara M, Itoh M, Miyamoto K, Suna S, Takeuchi Y, Takenak I and Jitsunari F. 2000. Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. *Int. J. Androl.*, 23:85-94.
- Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M, Konaka R, Hiramoto K, Sasaki J, Tokuda M, Nakano Y and Inoue M. 2002. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Biochem. J.*, 365:849-856.
- Lotito SB and Fraga CG. 2000. Catechins delay lipid oxidation and alpha-tocopherol and beta-carotene depletion following ascorbate depletion in human plasma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 225:32-38.
- Nakai M, Tabira Y, Asai D, Yakabe Y, Shimoyozu T, Noguchi M, Takatsuki M and Shimohigashi Y. 1999. Binding characteristics of dialkyl phthalates for the estrogen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254:311-314.
- Niki F. 1987. Interaction of ascorbate and a tocopherol. *Annals of the New York Academy of Science*, 498:186-198.
- Oishi S and Hiraga K. 1983. Testicular atrophy induced by di-2-ethylhexyl phthalate : Effects of vitamin A and zinc concentrations in the testis, liver and serum. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 70:43-48.
- Oishi S. 1984. Testicular atrophy of rats induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate: Effect of vitamin E and zinc concentrations in the testis, liver and serum. *Toxicology Letters*, 20:75-78.
- Oishi S. 1989. Enhancing effects of luteinizing hormone releasing hormone on testicular damage induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicology Letters*, 47:271-277.
- Oishi S. 1994. Prevention of di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced testicular atrophy in rats by co-administration of the vitamin B₁₂ derivative adenosylcobalamin. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26:497-503.
- Orozco TJ, Wang JF and Keen CL. 2003. Chronic consumption of a flavanol- and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat testes. *J. Nutr. Biochem.*, 14:104-110.
- Perreault SD and Cancel AM. 2001. Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies. *Reproduction*, 121:207-216.
- Perreault SD. 1998. The impact of new technologies. *Reproductive and Developmental Toxicology*, 3:99-109.
- Sato K, Kanazawa A, Ota N, Nakamura T and Fujimoto K. 1998. Dietary supplementation of catechins and alpha-tocopherol accelerates the healing of trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 44:769-778.
- Sato K, Sakamoto Y, Ogata A, Nagai F, Mikuriya H, Numazawa M, Yamada K and Aoki N. 2002. Inhibition of aromatase activity by green tea extract catechins and their en-

- doctrinological effects of oral administration in rats. Food and Chemical Toxicology, 40:925-933.
- Slott VL, Jeffay SC, Dyer CJ, Barbee RR and Perreault DS. 1997. Sperm motion predicts fertility in male hamsters treated with α -chlorohydrin. J. Androl., 18:708-716.
- Slott VL, Jeffay SC, Suarez JD, Barbee RR and Perreault SD. 1995. Synchronous assessment of sperm motility and fertilizing ability in the hamster following treatment with α -chlorohydrin. J. Androl., 16:523-535.
- Srivastava S, Awasthi VK, Srivastava SP and Seth PK. 1989. Biochemical alterations in rat fetal liver following in utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). Indian J. Exp. Biol., 27:885-888.
- Summerfield FW and Tappel AL. 1984. Effects of dietary polyunsaturated fats and vitamin E on aging and peroxidative damage to DNA. Archives of Biochemistry and Biophysics, 233:408-416.
- Tappel AL. 1962. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. Vitamins and Hormones, 20:493-510.
- Thomas JA, Darby TD, Wallin RF, Garvin PJ and Martis L. 1978. A review of the biological effects of di(2-ethylhexyl) phthalate. Toxicology and Applied Pharmacology, 45:1-27.
- Tomita I, Nakamura TR, Yagi Y and Tutikawa K. 1982. Teratogenicity/fetotoxicity of DEHP in mice. Environ. Health. Perspect., 45:71-75.
- Toth, GP, Stober JA and Read EJ. 1989. The automated analysis of rat sperm motility following subchronic epichlorohydrin administration; methodologic and statistical considerations. J. Androl., 10:401-415.
- Wong WS and McLean AE. 1999. Effects of phenolic antioxidants and flavonoids on DNA synthesis in rat liver, spleen, and testis *in vitro*. Toxicology, 139:243-253.

(접수일: 2007. 5. 30 / 채택일: 2007. 6. 16)