

사춘기 전 수컷 흰쥐의 저정낭과 전립선의 성숙에 미치는 Di(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP)의 영향

허현진 · 이원용 · 윤용달¹ · 최돈찬² · 이성호[†]

상명대학교 생명과학전공, ¹한양대학교 생명과학과, ²용인대학교 생명과학과

Effect of Prepubertal Exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate on the Maturation of Rat Seminal Vesicles and Prostate Glands

Hyun-Jin Heo, Won-Yong Lee, Yong-Dal Yoon¹, Donchan Choi² and Sung-Ho Lee[†]

Dept. of Life Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

¹*Dept. of Life Science, College of Natural Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea*

²*Dept. of Biological Science, College of Natural Science, Yong-In University, Yongin 449-714, Korea*

ABSTRACT : The plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP) is one of the most well known endocrine disrupting chemicals (EDCs) because of its strong anti-androgenic effects on the reproductive and developmental process in male rodents and human. The present study was performed to examine whether prepubertal exposure to DEHP can make any alteration during the maturation of accessory sex organs in male rats. As a result, there was no significant change in body weights, serum T levels and tissue weights except of seminal vesicle and ventral prostate in DEHP-treated animals compared to vehicle-treated ones. The seminal vesicle weights in high-dose group (200 mg/kg) were significantly lower than those from the control group ($p<0.05$), and ventral prostate weights were significantly lower than those from the control group ($p<0.05$) in both low-dose (20 mg/kg) and high-dose group. Histological studies revealed that the seminal vesicles from DEHP-treated groups showed reduced areas of mucosal folds. Pseudostratified columnar epithelia were observed in the ventral prostates of DEHP-treated samples while cuboidal epithelia were found in the control group. The transcriptional activities of ER- α in seminal vesicle from high-dose group ($p<0.05$) were significantly higher than those from the control group, and ER- β expression was significantly decreased in low-dose group ($p<0.05$) compared to the control. In ventral prostate, ER- β mRNA levels from low-dose group ($p<0.05$) were significantly lower than those from the control group, and significantly increased in high-dose group ($p<0.01$). AR expressions, however, were not significantly different in all experimental groups of both seminal vesicle and ventral prostate. In conclusion, the present study demonstrated that (i) adverse effect (s) of DEHP on sexual maturation during prepubertal period could be limited, (ii) seminal vesicle and prostate gland were sensitive targets to DEHP in prepubertal rats and (iii) the deleterious effects of DEHP might be mediated through ER-associated mechanism.

Key words : Prepubertal, DEHP, Seminal vesicle, Prostate gland, Estrogen receptor.

요 약 : 플라스틱 가소제인 di(2-ethylhexyl)phthalate

(DEHP)는 매우 잘 알려진 내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemicals; EDCs) 중 하나로, 수컷 설치류와 인간의 생식과 발생 과정에 있어 강력한 항안드로젠성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 사춘기 이전에 수컷 흰쥐를 DEHP에 노출시킴으로써 부속 성기관의 성숙 과정 동안 나타나는 변화를 조사한 것이다.

* Heo, HJ and Lee, WY contributed equally to this work.

[†] 교신저자: 서울특별시 종로구 홍지동 7, 상명대학교 생명과학전공, (우) 110-743, (전) +82-2287-5139, (팩) +82-2-2287-0070, E-mail: shlee@smu.ac.kr

결과로, DEHP 투여에 의한 체중, 혈중 T 수준, 저정낭과 전립선을 제외한 조직의 무게는 대조군과 비교하여 유의적인 변화가 없었다. 저정낭의 경우, 고농도(200 mg/kg)의 DEHP를 처리한 투여군의 무게가 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며($p < 0.05$), 전립선의 경우, 저농도(20 mg/kg)와 고농도의 DEHP를 처리한 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의한 무게의 감소를 나타내었다($p < 0.05$). 조직학적 연구 결과, DEHP 투여군의 저정낭은 대조군에 비해 점막층의 면적이 감소하였다. 또한, 전립선의 경우 대조군에서는 분비상피세포들이 입방형인데 비해 DEHP 투여군에서는 위중층상피세포 형태가 관찰되었다. 정량적 RT-PCR 연구에서, 저정낭에서의 ER- α 발현은 고농도 DEHP 투여에 의해 유의한 발현 증가가 나타났으며($p < 0.05$), ER- β 의 경우 저농도 DEHP 투여에 의해 유의한 발현 감소가 나타났으며($p < 0.05$). 전립선에서의 ER- β 수준은 저농도 DEHP 투여에 의해 유의하게 감소하나($p < 0.05$), 고농도 DEHP 투여에 의해서는 유의한 발현 증가가 나타났으며($p < 0.01$). 그러나 AR 발현의 경우, 저정낭과 전립선 모두에서 DEHP에 의해 유의한 차이가 나타나지 않았다. 결론적으로, 본 연구는 (i) DEHP의 유해한 작용이 사춘기 이전 시기의 성적인 성숙을 교란할 수 있으며, (ii) 저정낭과 전립선이 사춘기 이전 시기 DEHP 노출에 대한 민감한 표적이 될 수 있고, (iii) DEHP의 유해한 작용이 ER과 연관된 기작을 통해 매개될 수 있음을 시사한다.

서론

지난 20세기말부터 인간과 야생동물들에서 급증한 생식계의 발생 이상 현상들은 내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemical, EDC)의 유해성에 대해 전세계적으로 과학자들은 물론 정부와 민간인들의 경각심을 불러 일으키게 되었다(Hoyer, 2001; Schoeters et al., 2008; Hotchkiss et al., 2008). EDC 가운데 플라스틱류 합성 가소제로 사용되는 프탈레이트(phthalate)류 물질들은 유아용 젖병, 장난감, 건축 자재, 식품 포장재, 의료용품 등에 포함되어 있으므로 일상적으로 인체에 노출될 가능성이 매우 높은 화합물이다(Latini, 2005). 프탈레이트류 물질 중 가장 많이 사용되어온 di(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP)의 경우 그 활성대사물인 monoethylhexylphthalate(MEHP), 유사체인 di-n-butyl phthalate(DBP) 등과 함께 인간과 실험동물의 생식내분비계에 매우 유해하다는 증거들이 급속히 축적되고 있다(Foster et al., 2001; Latini et al., 2006).

DEHP의 생식독성은 임신기에서 수유기까지 혹은 출생 전후 일정 기간 동안 DEHP에 노출된 수컷 흰쥐들의 정소와 부정소, 전립선 그리고 저정낭과 같은 생식도관이 비정상적으로 발생하고 정자생산 저하와 부정소의 정자 수 감소 및 성행동 이상 등 생식능력의 감소가 초래됨을 보고한 여러 연구로부터 확인되었다(Gangolli, 1982; Agarwal et al., 1986; Gray et al., 2000; Moore et al., 2001; Jarfelt et al., 2005; Dalsenter et al., 2006). 또한, 고농도의 DEHP에 노출시킨 수컷 흰쥐들의 사춘기 개시가 지연되었다(Dalsenter et al., 2006).

이러한 연구들에 사용된 흰쥐의 나이에 상응하는 연령의 인간의 경우, 선진화된 사회의 어린이가 어른에 비해 훨씬 다량의 DEHP에 노출됨이 보고되었는데, 이는 일일 허용기준(Tolerable Daily Intake, TDI: 20~48 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)을 상회하는 수준이었고, 심한 경우는 기준치의 20배를 넘는 경우들이 있었으며, 더욱이 중환자실에 입원한 신생아들의 경우는 최대 1,780 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 의 농도로 TDI의 100배까지 노출됨이 보고되었다(Koch et al., 2006). 그런데 실험동물에서 얻은 결과들은 DEHP 노출에 의한 폐해가 성인보다도 어린이나 신생아에서 더 크게 나타날 것을 시사하는데, DEHP 노출에 있어서 현실적이고 다양한 농도, 노출 시기, 표적 장기별 선별적인 병리 효과와 작용기작 등에 대한 보다 상세한 조사가 필요한 상황이다.

대부분의 EDC들은 임신 중 생식기관의 발생과 분화에 영향을 미침과 동시에 사춘기 개시 조절에도 영향을 미치는데, 이는 EDC 추정물질을 조사하는데 매우 유용할 수 있다(Teilmann et al., 2002). 본 연구는 수컷 흰쥐를 사용하면서, 과거에 많이 적용된 임신기에서 수유기까지 동안 DEHP에 노출시키는 모델이 아닌, 인간의 아동기에 해당하는 생후 4주부터 3주간, 즉 사춘기 이전 시기에 DEHP에 노출시키는 모델을 채택하였으며, 기존의 DEHP 노출 효과에 대한 연구들에서 다루지 않은 정소 이외 표적 장기의 병리조직학적인 조사와 DEHP 표적 유전자로 예상되는 에스트로겐 수용체들(estrogen receptors, ER- α & ER- β)과 안드로겐 수용체(androgen receptor, AR)의 발현 양상을 조사하여 DEHP가 부속 생기관에 미치는 영향을 규명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

상명대학교 실험동물 사육장에서 일정한 온도와 광주기 (18~22°C; 12시간 조명, 12시간 소등) 하에서 먹이와 물 섭취가 자유로운 상태(*ad libitum*)로 사육한 Sprague-Dawley (SD) strain 흰쥐를 사용하였다. 생후 28일(60~70 g B.W.) 된 미성숙 수컷 흰쥐에 DEHP(20 and 200 mg/kg/day, respectively, Sigma, USA)를 21일 동안 매일 경구 투여하였고, 대조군으로는 Sesame oil(0.2 ml/animal; Sigma, USA)를 경구 투여하였다. 실험동물들은 DEHP를 21일 동안 매일 경구 투여한 후, 다음날 오후 6시에 일괄적으로 희생시켰다.

2. 조직학적 관찰

대조군과 실험군에서 얻은 저정낭, 전립선의 농도별 변화양상을 조사하기 위하여 paraformaldehyde(4%)에 고정된 조직을 ethanol로 탈수한 다음 파라핀으로 포매한 후 5~7 μ m 두께로 연속 절편을 얻었다. 조직 절편들은 hematoxylin-eosin으로 대조 염색하여 광학현미경(Olympus, Japan) 하에서 관찰하였다.

3. RNA 추출과 Semi-Quantitative RT-PCR

조직의 total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 방법(Chomzynski & Sacchi, 1987)에 따라 추출하였다. 1 μ g의 total RNA를 주형으로 0.5 μ g의

dT₂₀ primer와 AccuPower™ RT Premix(Bioneer)를 사용하여 최종 반응 volume 20 μ l로 역전사하였다. PCR 반응은 1 μ l의 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 염색 후 ImagerIII-1D main software(Bioneer)로 정량하였다. 정량을 위한 internal control PCR에서는 GAPDH primer를 사용하였다.

4. 방사면역측정법을 통한 혈중 Testosterone(T) 측정
혈중 테스토스테론 수준은 방사면역측정법을 사용하여 측정하였다(Kim et al., 2007). 항원으로 사용한 4-androsten-17 β -ol-3-one 3-carboxymethyloxim:bovine serum albumin (Testosterone 3-CMO:BSA, Steraloids, USA)을 이용하여 생산한 항혈청을 사용하였다. 혈청 내 스테로이드 호르몬은 diethyl ether(Merck, Germany)를 사용하여 추출하여 gelatin phosphate-buffered saline에 용해시켰다. 항체의 교차 반응율은 5 α -dihydrotestosterone과 41%, 5 β -dihydrotestosterone과 27.48%, androsterone과 0.14%, 프로게스테론과 0.054%이었으며, 에스트라디올 및 콜티솔과는 0.001% 이하였다. T의 interassay variation의 변이계수(coefficient of variation, CV)는 42.4 \pm 3.7 pmol/l 감도에서 8.78%이고, 10.3 \pm 0.8 pmol/l 에서 7.8%이었으며, interassay variation 변이계수는 45.6 \pm 2.8 pmol/l 감도에서 4.1%이고, 9.8 \pm 0.05 pmol/l 에서 4.4%이었다.

Table 1. Primer sequences for semi-quantitative RT-PCR analyses

| Gene | Accession number | Primer sequence | Product size(bp) | AT(°C) |
|--------------|------------------|----------------------------|------------------|--------|
| GAPDH | NM_017008 | F 5'- CCATCACCATCTTCCAGGAG | 576 | 50 |
| | | R 5'- CCTGCTTACCACCTTCTTG | | |
| ER- α | NM_012689 | F 5'- GTCGATTCCGCATGATGAAC | 435 | 63 |
| | | R 5'- AATGTGCTGAAGTGGAGCTG | | |
| ER- β | NM_012754 | F 5'- ACCACCGAATGCCAAGTTCT | 414 | 63 |
| | | R 5'- GCAGGCTCTAAGGATGTAAC | | |
| AR | NM_012502 | F 5'- GCACTGCTACTCTTCAGCAT | 286 | 60 |
| | | R 5'- GATCATCTCTGTGCAAGTGC | | |

F: forward, R: reverse, AT: annealing temperature.

5. 통계 처리

실험 결과의 통계적 처리는 one-way ANOVA에 의해 p 값이 0.05보다 작은 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

수컷 흰쥐에 DEHP를 20 mg 또는 200 mg/kg B.W.로 생후 28일부터 3주간 경구 투여한 결과, 실험동물의 체중과 각종 조직의 무게 변화를 측정된 결과, 실험개시 체중과 실험 종료 시의 체중은 대조군과 DEHP 투여군들 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다(Table 2). 또한, 저정낭과 전립선을 제외한 모든 조직의 무게 역시 대조군과 비교하여 DEHP 투여군들 간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 저정낭의 무게는 20 mg 투여군이 0.208 ± 0.029 g으로 대조군(0.292 ± 0.036 g)에 비해 28% 가량 감소를 보였으나 통계적인 유의성은 없었으며, 200 mg 투여군의 경우 0.188 ± 0.018 g으로 대조군에 비해 약 35% 가량 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 전립선의 경우, 20 mg을 처리한 투여군의 무게는 0.108 ± 0.017 g으로써, 이는 대조군의 무게 0.171 ± 0.019 g에 비해 37% 가량 유의하게 감소한 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 200 mg을 처리한 투여군의 무게는 0.120 ± 0.009 g으로써, 이는 대조군에 비해 약

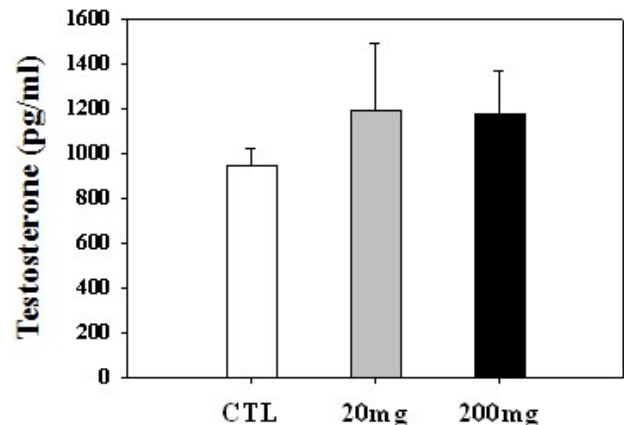


Fig. 1. Effect of DEHP administration on changes in serum T level. Specific T RIAs were performed as described in 'Materials and Methods'. Values are expressed as mean ± S.E. (n=5).

30% 가량 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$, Table 2). 한편, 혈중 T 수준을 측정된 결과 20 mg을 처리한 투여군의 1187.04 ± 299.16 pg/ml와 200 mg을 처리한 투여군의 1171.11 ± 194.23 pg/ml 모두 대조군의 946.23 ± 72.90 pg/ml에 비해 높은 경향을 나타냈지만 통계적 유의성은 없었다(Fig. 1).

조직병리학적인 조사에서, 대조군 저정낭에서는 분비상피 세포들로 구성된 점막층이 넓은 면적을 차지하며 발달하고

Table 2. Effects of prepubertal exposure to DEHP on changes in body and tissue weights in male rats

| Parameter (g) | Control | DEHP (mg/kg B.W.) | |
|------------------|---------------|-------------------|----------------|
| | | 20 | 200 |
| Body weight | 195.92 ± 5.85 | 195.00 ± 7.17 | 184.50 ± 8.47 |
| Testis | 2.115 ± 0.060 | 2.139 ± 0.041 | 2.077 ± 0.029 |
| Epididymis | 0.290 ± 0.010 | 0.305 ± 0.015 | 0.305 ± 0.026 |
| Seminal vesicle | 0.292 ± 0.036 | 0.208 ± 0.029 | 0.188 ± 0.018* |
| Ventral prostate | 0.171 ± 0.019 | 0.108 ± 0.017* | 0.120 ± 0.009* |
| Vas deference | 0.105 ± 0.006 | 0.100 ± 0.005 | 0.110 ± 0.003 |
| Adrenal gland | 0.034 ± 0.002 | 0.030 ± 0.003 | 0.030 ± 0.002 |
| Kidney | 1.772 ± 0.057 | 1.739 ± 0.071 | 1.737 ± 0.090 |
| Spleen | 0.723 ± 0.032 | 0.698 ± 0.108 | 0.668 ± 0.071 |
| Liver | 8.761 ± 0.276 | 9.077 ± 0.443 | 9.509 ± 0.457 |
| Thymus | 0.545 ± 0.025 | 0.604 ± 0.032 | 0.551 ± 0.032 |

Data are presented as the mean ± S.E. and six replications were done.

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

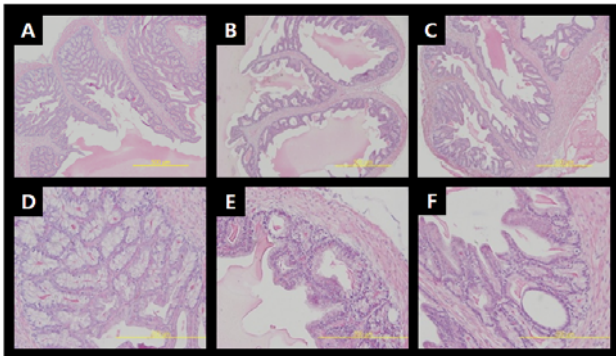


Fig. 2. Microphotographs of seminal vesicle from control and DEHP-treated rats. Animals were fed by gavage tubing with 0.2 ml sesame oil alone (CTL) or containing DEHP (20 or 200 mg/kg/day) for 3 weeks from postnatal day 28. A & D, control group. Mucosal folds of control rat were fully developed and pseudostratified columnar epithelium cells are thickened. B & E, DEHP (20 mg/kg/day)-treated group; C & F DEHP (200 mg/kg/day)-treated group. Mucosal folds were thinner than those of control rats. Hematoxylin and eosin staining, Magnification, $\times 100$ (A, B and C), $\times 400$ (D, E and F).

있는 것이 관찰되었으나, DEHP 투여군들의 저정낭에서는 점막층의 면적이 대조군에 비해 감소하였고, 이를 구성하는 상피세포의 발달 정도도 대조군에 비해 미약하여 점막층의 두께가 감소한 것이 관찰되었다(Fig. 2). 전립선에서는 대조군의 분비상피세포들은 입방형 세포형태를 띄고 있는 반면 DEHP 투여군의 세포는 위중층상피세포의 형태를 보이고 있었으며, 이로 인하여 상피세포의 두께가 대조군에 비해 증가한 것이 관찰되었다(Fig. 3).

정량적 RT-PCR에서, 저정낭에서의 ER- α mRNA 수준을 조사한 결과, 20 mg 투여군(대조군:20 mg 투여군=1:1.09 \pm 0.20 AU, Fig. 4A)에서는 대조군과 차이가 없었지만 200 mg 투여군(대조군:200 mg 투여군=1:1.61 \pm 0.21 AU, $p < 0.05$, Fig. 4A)에서는 유의하게 높았다. 반면, 전립선에서의 ER- α mRNA의 발현은 검출되지 않았다. 저정낭과 전립선에서의 ER- β mRNA 수준을 조사한 결과, 20 mg 투여군에서는 저정낭(대조군:20 mg군=1:0.69 \pm 0.15 AU, $p < 0.05$, Fig. 4B)과 전립선(대조군:20 mg 투여군=1:0.88 \pm 0.05 AU, $p < 0.05$, Fig. 5A)에서 모두 유의하게 낮았고, 200 mg 투여군에서는 저정낭(대조군:200 mg 투여군=1:1.03 \pm 0.08 AU, Fig. 4B)이 대조군과의 차이가 없었으나, 전립선(대조군: 200 mg 투여군=1:1.23 \pm

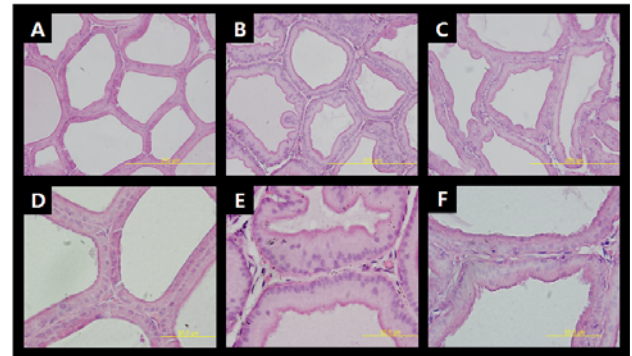


Fig. 3. Microphotographs of prostate gland from control and DEHP-treated rats. A & D, control group. Cuboidal epithelia were observed in control rats. B & E, DEHP (20 mg/kg/day)-treated group; C & F DEHP (200 mg/kg/day)-treated group. Pseudostratified columnar epithelia were observed in DEHP-treated rats. Hematoxylin and eosin staining, Magnification, $\times 100$ (A, B and C), $\times 400$ (D, E and F).

0.03 AU, $p < 0.01$, Fig. 5A)에서는 유의하게 높았다. 한편, 저정낭과 전립선에서의 AR mRNA 수준을 조사한 결과, 20 mg 투여군의 저정낭(대조군:20 mg 투여군=1:0.78 \pm 0.17 AU, Fig. 4C)이 낮은 경향만을 보였으나 유의성은 없었으며, 20 mg군의 전립선(대조군:20 mg 투여군=1:1.00 \pm 0.11 AU, Fig. 5B)과 200 mg 투여군의 저정낭(대조군:200 mg 투여군=1:0.93 \pm 0.15 AU, Fig. 4C), 그리고 전립선(대조군:200 mg 투여군=1:1.08 \pm 0.20 AU, Fig. 5B)에서는 모두 대조군과의 차이를 보이지 않았다.

고찰

1930년대 개발된 이래 플라스틱 제품들은 이제 우리 실생활에 있어서 필수불가결한 위치를 차지하고 있으며, 따라서 플라스틱 가소제인 프탈레이트류 물질은 내분비계 장애물질 가운데에서도 전세계적으로 가장 광범위하고 다량 노출되는 물질로 손꼽힌다. 대다수의 프탈레이트류 물질은 실험동물에서 간 손상과 간암 유발과 같은 일반 독성은 물론 태아 사망, 기형 발생과 같은 발생 독성, 정소 손상과 수컷 생식도관의 기형적 발생 유도, 항안드로겐 활성에 따른 불임 유발 등 생식독성을 갖고 있음이 잘 알려져 왔다(Latini et al., 2006). 사춘기 개시 무렵에 대한 상세한 연구에서, 임신기에서 수유

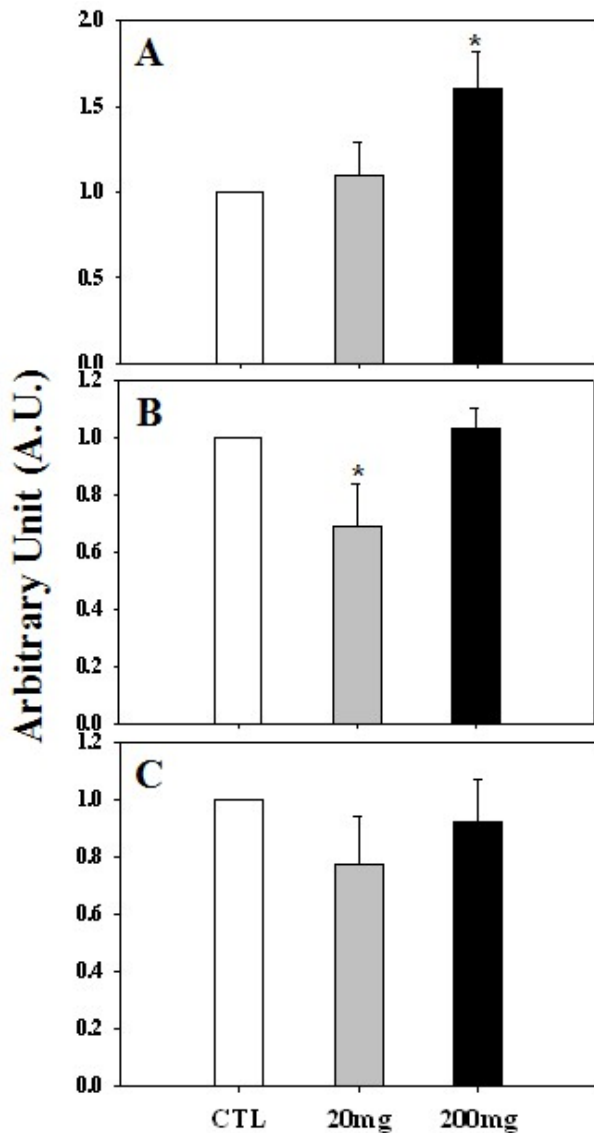


Fig. 4. Semi-quantitative RT-PCR analysis of ER- α (A), ER- β (B) and AR (C) expressions in the seminal vesicles from the rats. Semi-quantitative RT-PCRs were carried out as described in 'Materials and Methods'. Values are expressed as mean \pm S.E. (n=5). *Significantly different from control group, $p<0.05$.

기에 걸쳐 어미를 통해 비교적 고농도의 DEHP(0, 375, 750 또는 1,500 mg/kg/day)에 노출된 수컷 흰쥐를 생후 21일, 63일 그리고 105~112일에 조사한 결과, 농도의존적으로 잠복정소, 영구적인 귀두포피선 분리(Preputial separation, PPS) 실패, 정소는 물론 부정소를 포함한 부속생식기관들의 유의

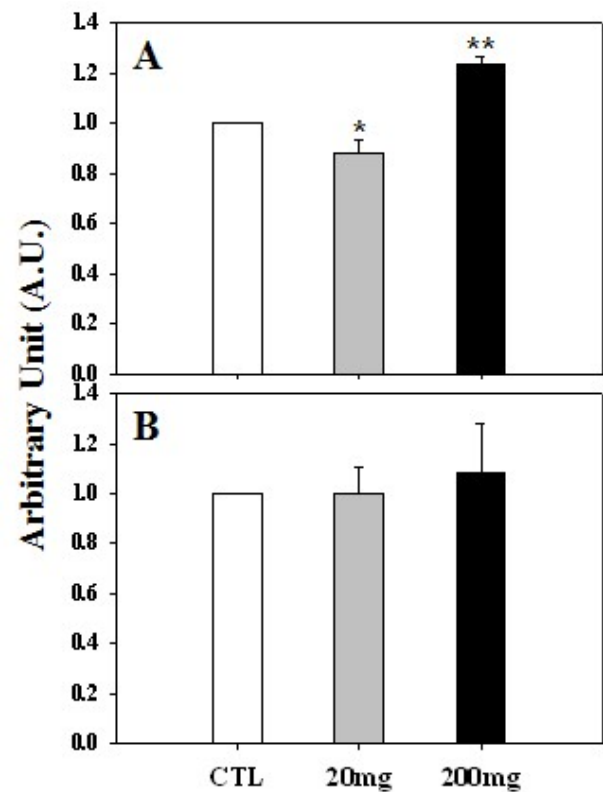


Fig. 5. Semi-quantitative RT-PCR analysis of ER- β (A) and AR (B) expressions in the ventral prostates from the rats. Semi-quantitative RT-PCRs were carried out as described in 'Materials and Methods'. Values are expressed as mean \pm S.E. (n=5). *Significantly different from control group, $p<0.05$, **Significantly different from control group, $p<0.01$.

한 무게 감소가 관찰되었으며, 특히 저정낭과 전립선의 완전 혹은 부분적인 발육부전(agenesis)이 나타났다(Moore et al., 2001). 이러한 DEHP의 부속생식기관 성숙 저해 효과는 다른 연구들에서도 확인되었는데(Gray et al., 2000; Jarfelt et al., 2005; Dalsenter et al., 2006), 이들 연구의 공통점은 모두 고농도의 DEHP 노출모델이었고, 임신기에서 수유기까지 혹은 출생 전후에 노출시킨 것이었다. 부속생식기관의 발생에 있어서 안드로겐이 작용할 수 있는 'window'가 설정된 '결정적인 기간(critical period)'이 존재하고, 임신기의 DEHP 노출에 의해 수컷 태아의 안드로겐 생산이 저하되면, 기관 형성의 결정적인 기간에 정상적인 분화가 일어나지 못해 기형적인 발생이 일어나는 것으로 추정된다(Foster et al., 2001).

그런데, 사춘기 이전 시기에 DEHP에 노출시킨 본 연구에서는 정소무게나 조직학적 이상 그리고 혈중 T 수준의 극적인 차이는 관찰되지 않았고, 부속생식기관인 저정낭과 전립선의 성숙에서 유의한 차이가 나타났다. 아마도 결정적인 기간에 일어나는 '기관형성' 또는 '분화'와는 달리 사춘기 이전에 일어나는 '성숙' 또는 정상적인 성장은 안드로겐에 절대적으로 의존하지는 않는 대신 미묘한 차이들에도 쉽게 영향을 받는 것으로 추정된다.

한편, 최근에 다양한 농도의 DEHP 노출시 농도의존적 효과보다는 이중양상(biphasic) 효과가 나타난다는 보고들이 있다. 임신 6일부터 수유기까지 DEHP를 다양한 농도(0.015 ~ 405 mg/kg/day)로 투여한 결과, 과거에 비해 극히 낮은 농도(0.045와 0.405 mg/kg/day)에서는 혈중 T 수준이 유의하게 증가하고 이후 농도가 증가해도 변화가 없다가 최고농도(405 mg/kg/day)에서 다시 유의하게 증가함이 관찰되었다(Andrade et al., 2006). 최근 이유 후 매일 경구 투여를 통해 DEHP에 노출된 수컷 흰쥐의 성적 성숙의 지표인 귀두표피선 분리가 저농도(10 mg/kg/day)에서 오히려 앞당겨졌으며, 고농도(500과 750 mg/kg/day)에서는 유의하게 지연되었으며, 혈중 T 농도 역시 저농도에서는 대조군에 비해 유의하게 높았지만 최고농도에서는 감소하였다(Ge et al., 2007). 이와 유사하게 DEHP의 노출경로와 관련해서도, 단기간 소량(4주 또는 8주간, 5 또는 25 mg/m³의 용량으로 매일 6시간씩)을 흡입한 미성숙한 수컷 흰쥐의 경우 8주 노출 시 체중, 정소와 부정소의 무게 그리고 안드로겐 합성효소들의 발현의 차이가 없었으며, 혈중 LH와 FSH 수준도 변화가 없었으나, 저정낭의 크기는 대조군에 비해 유의하게 증가하였고, 혈중 T 수준도 증가하였다(Kurahashi et al., 2005). 이러한 DEHP의 항안드로겐 효과가 아닌 안드로겐 혹은 에스트로겐 유사 효과는 흡입과 섭취 시 DEHP의 대사 경로가 달라 다른 대사물들이 생성되어 작용하기 때문으로 판단된다. 이러한 양상은 암컷에서도 나타나는데, 미성숙한 암컷 흰쥐에 경구 투여한 경우 사춘기 개시가 유의하게 지연되는데 비해(Lee & Lee, 2006a&b), 흡입으로 노출시킨 경우는 오히려 촉진됨이 보고된 바 있다(Ma et al., 2006). 따라서 향후 연구에 있어서는 보다 다양한 노출 경로, 세분화된 노출 농도군 설정, 상세한 노출 시기 및 기간에 대한 고려가 반드시 필요할 것이다.

임신기에 노출된 DEHP는 태아 정소 내 Leydig 세포의 T 생산을 저해하고(Akingbemi et al., 2001, 2004), 세포내 perox-

isome proliferators-activated receptor-gamma(PPAR- γ)와 ERK1/2 인산화 경로를 통해 procaspase-3를 유도하여 세포자멸사를 유발함이 보고되었다(Ryu et al., 2007). 그런데 태아기 부속생식기관의 발생에 있어서 안드로겐의 역할이 지대한 것은 주지의 사실이다. 불피안관(Wolffian duct)에서 분화되는 저정낭의 경우, 태아 정소로부터의 T에 의해, 그리고 비노생식동(urogenital sinus)으로부터 분화되는 전립선은 5 α -reductase에 의해 T로부터 전환된 dihydroxytestosterone(DHT)에 의해 분화되는데, 이때 프탈레이트류에 노출되면 일차적으로 T 생산 저하가 야기되어 부속생식기관의 비정상적인 발생이 일어나게 되는 것으로 추정된다(Foster et al., 2001). 그러나, DEHP가 직접 부속생식기관에 작용할 가능성을 배제할 수 없는데, 앞서 언급한 PPAR- γ 경로의 세포자멸사 유도 외에도 표적기관에서의 유전자 발현을 조절할 가능성이 있다. 본 연구에서는 저정낭에서의 ER- α 와 ER- β 발현이 각각 고농도와 저농도 DEHP 노출에 의해 유의하게 증가하거나 감소하고, 전립선에서는 ER- β 발현이 저농도 노출시 감소하고 고농도 노출시에는 유의하게 증가함이 나타났다. 이때 두 조직 공히 AR의 발현은 변화가 없었으며, 혈중 T 수준도 변화가 없었다. 이는 사춘기 이전의 DEHP 노출에 의한 저정낭과 전립선의 성숙 이상이 AR이 아닌 ER을 매개로 일어날 가능성을 시사하는 것이다. 한편, 본 연구에서는 전립선에서 ER- α 발현이 검출되지 않았는데, 이는 본 연구에는 복측(ventral)만을 사용하였기 때문으로 생각된다. 이를 지지하는 연구로, 수컷 흰쥐의 비노생식계에서 ER- β 가 더 우세하게 발현되고, 전립선의 경우도 ER- α mRNA가 요도 전립선부(prostatic urethra)에서만 검출된 보고가 있으며(Mäkälä et al., 2000), 시간적으로도 적절한 유도가 있기 전까지 사춘기 전후에는 발현되지 않거나 미약할 가능성이 있다.

결론적으로, 본 연구는 (i) DEHP 노출에 의한 유해한 영향이 비록 제한적이지만 사춘기 이전 시기의 성적인 성숙을 교란할 수 있으며, (ii) 저정낭과 전립선이 사춘기 이전 시기 DEHP 노출에 대한 민감한 표적이 될 수 있고, (iii) DEHP 노출의 유해성이 AR 보다는 ER과 연관된 기작을 통해 매개될 수 있음을 시사한다. 인간에 대한 DEHP 노출 연구로, 소변으로 배출되는 프탈레이트류 대사물들의 수준을 통해 노출량을 환산한 결과, 독일의 경우 성인보다도 어린이들이 일 반적인 예상보다 훨씬 높게 일상적으로 DEHP에 노출되고 있음이 보고되었는데, 이는 산업화가 많이 진행되어 플라스-

틱류 생산량이 많고 1회용 플라스틱 물품 사용빈도가 높으며, 수혈이나 수액 공급 등 현대적 의료 행위의 적용이 높고, 새로 건축된 아파트, 학교, 보육시설 등에서 머무르는 시간이 길수록 직접 섭취나 흡입으로 DEHP에 노출이 많이 일어나기 때문에 추정된다(Koch et al., 2003, 2006; Wittassek et al., 2007). 따라서 DEHP 노출의 경로, 시기, 농도, 표적장기와 기작 및 신체에 미치는 영향 조사는 매우 시급하면서도 철저하게 수행될 필요가 있다고 사료된다.

인용문헌

- Agarwal DK, Eustis S, Lamb JC 4th, Reel 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.
- 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.
- 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.
- Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Gericke C, Grote K, Golombiewski A, Sterner-Kock A, Chahoud I (2006) A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology* 228: 85-97.
- Chomzynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by RNA guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Dalsenter PR, Santana GM, Grande SW, Andrade AJ, Araújo SL (2006) Phthalate affect the reproductive function and sexual behavior of male Wistar rats. *Hum Exp Toxicol* 25:297-303.
- Foster PM, Mylchreest E, Gaido KW, Sar M (2001) Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Hum Reprod Update* 7:231-235.
- Gangolli SD (1982) Testicular effects of phthalate esters. *Environ Health Perspect* 45:77-84.
- Ge RS, Chen GR, Dong Q, Akingbemi B, Sottas CM, Santos M, Sealfon SC, Bernard DJ, Hardy MP (2007) Biphasic effects of postnatal exposure to diethylhexylphthalate on the timing of puberty in male rats. *J Androl* 28:513-520.
- Gray LE Jr, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DN, Parks L (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci* 58:350-365.
- Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR, Wilson VS, Hartig PC, Ankley GT, Foster PM, Gray CL, Gray LE (2008) Fifteen years after "Wingspread"- environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol Sci* 105:235-259.
- Hoyer PB (2001) Reproductive toxicology: current and future directions. *Biochem Pharmacol* 62:1557-1564.
- Jarfelt K, Dalgaard M, Hass U, Borch J, Jacobsen H, Ladefoged O (2005) Antiandrogenic effects in male rats perinatally exposed to a mixture of di(2-ethylhexyl)phthalate and di(2-ethylhexyl) adipate. *Reprod Toxicol* 19: 505-515.
- Kim SK, Kim JH, Lee HJ, Yoon YD (2007) Octylphenol reduces the expressions of steroidogenic enzymes and testosterone production in mouse testis. *Environ Toxicol* 22:449-458.
- Koch HM, Drexler H, Angerer J (2003) An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int J Hyg Environ Health* 206:77-83.
- Koch HM, Preuss R, Angerer J (2006) Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure- an update and latest results. *Int J Androl* 29: 155-165.
- Kurahashi N, Kondo T, Omura M, Umemura T, Ma M,

- Kishi R (2005) The effects of subacute inhalation of di (2-ethylhexyl)phthalate(DEHP) on the testes of prepubertal Wistar rats. *J Occup Health* 47:437-444.
- Latini G (2005) Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin Chim Acta* 361:20-29.
- Latini G, Del Vecchio A, Massaro M, Verrotti A, De Felice C (2006) Phthalate exposure and male infertility. *Toxicology* 226:90-98.
- Lee KY, Lee SH (2006a) Effect of di(2-ethyl hexyl) phthalate(DEHP) on the onset of puberty in female rat. *Dev Reprod* 10:147-154.
- Lee KY, Lee SH (2006b) Effect of endocrine disruptors on the expression of estrogen receptors in ovary and uterus from immature rats. *Dev Reprod* 10:255-261.
- 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.
- Mäkelä S, Strauss L, Kuiper G, Valve E, Salmi S, Santti R, Gustafsson JA (2000) Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. *Mol Cell Endocrinol* 170:219-229.
- Moore RW, Rudy TA, Lin TM, Ko K, Peterson RE (2001) Abnormalities 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.
- Ryu JY, Whang J, Park H, Im JY, Kim J, Ahn MY, Lee J, Kim HS, Lee BM, Yoo SD, Kwack SJ, Oh JH, Park KL, Han SY, Kim SH (2007) Di(2-ethylhexyl)phthalate induces apoptosis through peroxisome proliferators-activated receptor-gamma and ERK 1/2 activation in testis of Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A* 70:1296-1303.
- Schoeters G, Den Hond E, Dhooze W, van Larebeke N, Leijts M (2008) Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:168-175.
- Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J (2002) Putative effects of endocrine disrupters on pubertal development in the human. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16:105-121.
- Wittassek M, Heger W, Koch HM, Becker K, Angerer J, Kolossa-Gehring M (2007) Daily intake of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by German children - A comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels. *Int J Hyg Environ Health* 210:35-42.

(received 17 October 2008, received in revised form 16 November 2008; accepted 17 November 2008)