

2001년도 직업병예방을 위한 연구용역보고서

내분비계 교란물질에 의한 생식기계 독성
기전에 대한 연구 :
Cadmium과 Di-(2-ethylhexyl) Phthalate

2002. 7.

한국산업안전공단
산업안전보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 산업안전보건연구원 원장 귀하

본 연구 용역 보고서를 2001년도 산업안전보건연구원의 직업병예방을 위한 연구용역사업으로 수행된 “내분비계 교란물질에 의한 생식기계 독성 기전에 대한 연구 : Cadmium과 Di-(2-ethylhexyl) Phthalate”에 대한 최종 결과보고서를 제출합니다.

2002년 7월 15일

연구책임자: 박 정 덕

목 차

1. 연구배경	-----	1
2. 연구목적	-----	4
3. 연구방법	-----	5
4. 연구결과	-----	11
4-1. DEHP 독성실험	-----	11
4-2. Cadmium 독성실험	-----	24
5. 토 의	-----	37
6. 맺 음 말	-----	40
7. 참고문헌	-----	41

내분비계 교란물질에 의한 생식기계 독성 기전에 대한 연구 : Cadmium과 Di-(2-ethylhexyl) Phthalate

1. 연구배경

카드뮴(cadmium, Cd)과 di-(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP)는 내분비계 교란물질(endocrine disruptor)로서 생식기계 장애를 일으킬 수 있는 대표적인 환경호르몬 물질로 분류된다. Cd은 부식성에 대한 내성이 강하고 용점이 낮은 금속이온으로서 합금 등 여러 분야에 널리 이용되어 왔으며, DEHP는 안정성이 강하여 polyvinyl chloride(PVC)와 같은 플라스틱 제재 등 여러 분야에 이용되고 있다. DEHP의 연간 유통량은 약 21만톤(환경부, 2000)으로서 우리나라에서의 내분비계 장애물질 규제대상 67종의 총 유통량 약 35만톤의 약 2/3에 해당된다. Cd의 경우 아직까지 우리나라에서 관리대상 환경호르몬물질로서는 분류되어 있지 않으나 각종 오염원별 주요 유해물질의 상위 그룹에 위치하고 있으며 일본, 미국 등 선진국에서는 주요 내분비계 장애물질로서 매우 관심이 높은 물질이다. 특히 산업이 발달함에 따라 Cd과 DEHP는 다양하고 폭 넓게 이용됨으로서 주요한 환경오염물질로 부각되고 있는 실정이다. Cd과 DEHP에 의한 건강장애의 가능성이 오염된 환경으로부터 폭로되는 일반 주민들에서 문제가 제기되고 있다. 그러나 Cd과 DEHP가 광범위하게 이용되는 산업장에서 이들을 취급하는 작업공정에 장기간 종사하고 있는 근로자들에 대한 건강 관리면에서 건강장애의 가능성을 배제할 수는 없다. Cd과 DEHP는 실험동물에서 고환 독성물질로서 오래 전부터 비교적 잘 알려져 왔다. 즉, 실험동물에서 Cd의 표적 장기로 알려진 간장과 신장에는 손상을 입히지 않을 정도의 저농도의 Cd에 의해서 고환조직은 치명적인 손상을 미친다는 보고(Parizeck and Zahor, 1956)와 실험동물에서 DEHP에 의해 초래된 광범위한 고환손상이 보고(Shaffer 등, 1945)된 이래 Cd

과 DEHP에 의한 고환독성은 매우 폭 넓은 연구가 진행되어 온 편이다. 그러나 아직까지 Cd과 DEHP에 의한 고환독성의 기전에 대해서는 많이 알려져 있지 않은 편이다. 실험동물에서 Cd과 DEHP에 의해 초래되는 고환독성을 비교해 보면 testosterone의 변화, 고환 조직내 여러 효소활성도의 변화, 정세포의 파괴 및 고환의 피사와 위축 등 매우 유사한 소견을 나타내고 있음을 알 수 있다. 이와 같이 Cd과 DEHP에 의한 고환 독성을 비교해 볼 때 Cd과 DEHP의 고환 독성기전에 대한 비교·연구의 필요성이 요구되나 아직까지 Cd과 DEHP의 고환 독성기전에 대한 비교·연구는 거의 찾아 볼 수 없다.

아연(Zinc, Zn)은 생체에서 필수적이며 정상적인 고환성숙에도 반드시 요구되는 금속이온으로서 실험동물에서 체내 아연이 부족한 경우 Cd과 DEHP에 의한 고환손상에 더욱 민감하게 반응하는 것으로 보고된 바 있다(Agarwal 등, 1986; Oteiza 등, 1999). 또한 DEHP에 의한 고환 손상시 고환 조직내 아연농도가 감소되며 Cd에 의한 고환손상에서도 고환 조직내 아연농도의 변화가 초래된다고 보고된 바 있다(Chellman 등, 1985; Maitani and Suzuki, 1986; Oishi, 1986; Parmar 등, 1995). 이러한 자료는 고환에서의 아연농도가 Cd과 DEHP에 의한 고환손상을 설명할 수 있는 중요한 자료가 될 수 있음을 시사한다. 이러한 자료를 근거로 볼 때 Cd과 DEHP에 의한 고환손상의 기전에 아연이 중요하게 작용할 것으로 추정할 수 있다. Cd과 DEHP와 같은 고환 독성물질에 의한 고환 조직내 아연의 변동 여부가 최근 아연이동과 관련이 있는 것으로 알려진 아연 이동 단백질(zinc transporter)의 발현과 관련성이 있는지를 밝힐 필요가 있다고 생각한다.

고환에 흡수된 고환독성 물질에 의한 고환 조직손상 기전의 하나로서 Cd의 경우 oxidative stress에 의한 손상기전이 제기되고 있다(Oteiza 등, 1999; El-Missiry and Shalaby, 2000). DEHP의 oxidative stress에 의한 간장 손상에 대해서는 최근 비교적 많이 연구되고 있으며 이는 간장 손상의 한 기전으로 작용할 것으로 이해되고 있다(Takagi 등, 1992; Goll 등, 1999) 그러나, DEHP에 의한 고환손상에 있어서도 oxidative stress가 손상기전으로 작용하는지는 아직 잘 알려져 있지 않다. 산업

장에서 폭로될 수 있는 유해물질의 독성기전에 대한 연구는 산업장 근로자의 건강 관리에 있어서 조기 진단을 위해 필수적인 민감하고 특이적인 biomarker(폭로 및 손상에 대한)의 개발을 위해서도 기본적으로 요구되는 연구이다. 또한, DEHP와 Cd은 PVC 제조생산 등 일부 작업공정에서 복합적으로 폭로될 가능성이 있다. 즉, 서로 다른 유해 물질에 의한 독성효과의 종말점이 동일한 표적장기에서 비슷한 양상을 초래하는 경우 동일한 기전이나 또는 다른 기전에 의한 손상인지를 밝히는 것은 작업환경의 특성상 복합 폭로에 의한 상승 혹은 상가효과에 대한 관리를 위해서도 필요한 접근방법으로 생각된다.

2. 연구목적

본 연구과제에서는 서로 다른 내분비 교란물질인 Cd과 DEHP에 의한 고환독성의 양상과 Cd과 DEHP에 의해 초래되는 고환독성과 관련된 요인 등을 비교·분석함으로써 Cd과 DEHP에 의한 고환 독성기전을 규명하는데 보탬이 되고자 한다. 연구목적을 달성하기 위하여 Cd과 DEHP에 의한 고환독성과 Cd과 DEHP의 고환 조직내 분포양상을 관찰하고, Cd과 DEHP에 의한 고환독성에 있어서 아연의 변동여부를 관찰하여 아연의 역할과 zinc transporter의 발현 여부를 관찰하여 고환조직내 아연농도의 변화와 관련이 있는지를 관찰하고, 여러 종류의 산소 반응성 지표를 분석하여 고환손상과의 관련성을 조사하고자 한다.

3. 연구방법

(1) 실험동물

실험동물은 3주령과 8주령의 수컷 APF(animal pathogen free) Sprague-Dawley rat를 Samtaco사로부터 구입하여 이용하였다. 구입한 실험동물은 온도 약 22°C, 습도 55%의 동물사육실에서 5일동안 실험실 환경에 적응시켰다.

(2) 실험모델 및 시료채취

가. DEHP 독성실험

예비실험에서 DEHP에 의한 고환독성은 실험동물의 연령에 따라 차이가 있었다. 즉, 실험동물의 연령이 낮을수록 DEHP의 고환독성에 민감하여 본 실험은 3주령의 실험동물을 대상으로 수행하였다.

실험동물을 DEHP 처치군과 대조군으로 구분하였다. DEHP 처치군은 실험동물 체중 kg당 2 g의 DEHP를 5 ml 용량으로 corn-oil에 녹여 1일 1회 2주까지 경구투여 하였다. 대조군은 corn-oil을 실험군과 동일한 방법으로 경구투여 하였다. 실험기간동안 실험동물의 체중을 매일 측정하여 실험동물의 체중변화를 관찰하였다. 실험군은 DEHP를 투여후 6시간과 12시간에서 각각 6마리의 실험동물을 희생시켰고 이후 1일, 2일, 7일 및 14일째에서 각각 12마리의 실험동물을 희생시켰다. 대조군에서는 corn-oil 투여후 1, 2, 7 및 14일째에서 각각 12마리의 실험동물을 희생시켰다. 이때 경추탈골방법으로 실험동물을 희생시켰다. 실험동물을 희생시킨 후 고환을 적출하여 즉시 액체질소에 넣은 다음 추 후 분석 때까지 -80°C에서 냉동보관하였다. 각 시간별로 희생한 12마리씩의 DEHP 처치군과 대조군으로부터 각각 6마리는 고

환조직내 zinc transporter, DEHP와 MEHP 농도 및 조직병리학적 소견관찰에 이용하였고 나머지 6마리씩은 고환조직내 아연농도와 산소반응성 손상 관찰을 위한 시료로 이용하였다. Zinc transporter는 DEHP를 투여후 6, 12시간, 1, 2, 7 및 14일에서, 그리고 고환의 조직병리소견, 산소반응성 손상 및 아연농도는 DEHP 투여후 1, 2, 7 및 14일에서 관찰하였다.

나. Cadmium 독성실험

예비실험에서 Cd에 고환독성에 대한 감수성은 실험동물의 연령에 따라 차이가 있는 것으로 관찰되었다. 그러나, 실험동물에서의 Cd에 의한 고환독성은 DEHP에서와는 달리 실험동물의 연령이 많을수록 Cd의 고환독성에 민감하여 본 실험은 8주령의 실험동물을 대상으로 수행하였다.

실험동물을 Cd 처치군과 대조군으로 구분하였다. Cd 처치군은 실험동물 체중 kg당 2 mg의 CdCl₂를 4 ml 용량으로 생리적 식염수에 녹여 1일 1회 2주까지 피하 주사 하였다. 대조군은 생리적 식염수를 실험군과 동일한 방법으로 피하주사 하였다. 실험기간동안 실험동물의 체중을 매일 측정하여 실험동물의 체중변화를 관찰하였으며, 분석항목에 따른 실험군과 대조군의 구분 등은 전술한 DEHP 독성실험과 동일한 방법으로 수행하였다. Cd 독성실험에서는 고환조직내 DEHP나 MEHP 대신 Cd농도를 분석하였다.

(3) 조직병리학적 소견 관찰

DEHP처치군과 대조군으로부터 1, 2, 7 및 14일에서 각 군당 6마리로부터 얻은 우측 고환을 10% 포르말린용액에서 48시간 동안 침적 고정하였다. 이 후 통상적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 4μm 절편으로 만들어 hematoxylin-eosin

염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(4) Lipid peroxidation 측정

고환조직내 lipid peroxidation은 Ohkawa 등(1979)의 방법을 이용하여 TBARS assay를 통하여 측정하였다. 즉, 고환조직에 10배 용량의 1.15% KCl 용액을 첨가하여 Potter-Elvehjem 조직분쇄기로 2회 균질화한 후 4°C, x1000g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 시료로 사용하였다. 시료 0.1 ml를 8.1% SDS 0.1ml, 20% acetic acid 0.75ml, 0.8% thiobarbituric acid 0.75ml의 혼합액에 첨가하여 95°C oil bath에서 30분간 가열시킨 후 즉시 얼음물로 냉각하여 반응을 정지시켰다. 이 반응액에 0.5ml 증류수와 n-butanol과 pyridine 혼합액(15:1, v/v) 2.5ml를 첨가하여 혼합한 후 x1000g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액의 흡광도를 형광광도계(SFM 25, ontron Inst)를 이용하여 excitation 515 nm, emission 535 nm에서 측정하여 생성된 MDA의 양을 nmol/g wet weight로 나타내었다.

(5) GSH 측정

고환조직내 GSH는 van Klaveren 등(1997)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 고환조직에 10배 용량의 5% 5-sulfosalicylic acid 용액을 첨가하여 Potter-Elvehjem 조직분쇄기로 2회 균질화한 후 4°C, x1000g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 시료로 사용하였다. 원심분리하여 얻은 상층액 20 μ l를 daily buffer (0.248mg/ml NADPH in 143mM sodium phosphat, 6.3mM Na₄-EDTA at pH 7.5) 700 μ l, 6mM DTNB 100 μ l 및 증류수 180 μ l와 혼합한 후 35°C에서 15분간 반응시켰다. 반응액에 GSSG reductase (5u/ml) 10 μ l를 첨가하여 35°C에서 20분간

반응시킨 후 분광광도계(UVIKON, Kontron Inc.)를 이용하여 412nm에서 흡광도를 측정하였다. 고환조직내 GSH의 양은 $\mu\text{mol/g wet weight}$ 로 나타내었다.

(6) 8-OH-dG 분석

고환조직내 8-OH-dG 농도는 고환조직으로부터 DNA를 추출하여 JAICA로부터 구입한 8-OH-dG ELISA kit를 이용하여 sandwich ELISA 방법으로 분석하였다. DNA는 Invitrogen 社의 Easy-DNATM kit를 이용하여 약 50-100mg의 고환조직으로부터 추출하였다. 추출된 DNA는 분광광도계를 이용하여 정량한 후 8-OH-dG의 분석에 사용하였다.

고환조직으로부터 추출된 각각의 DNA($20\mu\text{g}/50\mu\text{l}$)에 primary antibody $50\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 37°C 에서 1시간 반응시킨 다음 제작사로부터 제공된 washing 용액으로 세척(3회)한 후 secondary antibody $100\mu\text{l}$ 를 첨가하여 37°C 에서 1시간 반응시킨다. 반응 종료후 다시 세척한 다음 chromatic solution $100\mu\text{l}$ 를 첨가하여 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 반응정지액을 첨가하여 반응을 중단시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 고환조직의 8-OH-dG의 농도는 $\text{nmol}/\mu\text{g DNA}$ 로 환산하여 나타내었다.

(7) Zn 분석

고환조직내 아연량을 정량하기 위하여 적출된 고환을 습식회화하여 원자흡광분광광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer, Perkin-Elmer 5100 PC를 이용하여 flame 방법으로 분석하였다. 고환조직내 아연농도는 $\mu\text{g/g wet weight}$ 로 환산하여 나타내었다.

(10) ZnT1 mRNA 분석

고환조직내 ZnT1 mRNA의 발현정도는 RT-PCR방법을 이용하여 분석하였다. 즉, 고환조직으로부터 Tri Reagent[®] (Molecular Research Center, Inc.)를 이용하여 총 RNA를 분리하였으며, 분리된 각각의 RNA는 분광광도계를 이용하여 260nm에서 정량하고 formaldehyde agarose gel 전기영동방법으로 확인하였다. 고환조직으로부터 얻은 RNA로부터 first strand cDNA를 Roche社로부터 구입한 1st strand cDNA synthesis kit를 이용하여 제작하였다. 즉, RNA를 65°C에서 15분간 보온한 후 얼음에서 식힌 다음 미리 준비된 RT mixture(10x Reaction buffer, 25mM MgCl₂, Deoxynucleotide mix, random primer, RNase inhibitor, AMV reverse transcriptase 등)에 2 μ g의 RNA를 첨가하여 42°C 1시간, 94°C 10분, 4°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 얻었다. 제작한 cDNA로부터 PCR 방법을 이용하여 ZnT1만을 특이적으로 증폭시켰다. 즉, cDNA를 미리 준비된 PCR mixture(10x Tag buffer, 25mM MgCl₂, Taq DNA, dNTP, up and down primer 등)에 2 μ l 첨가한 후 30cycle의 PCR 반응(94°C 5분, 94°C 60초, 48°C 60초, 72°C 60초)을 시행하였다. 이때 특이적으로 ZnT1을 증폭하기 위하여 Gene Bank로부터 얻은 rat의 ZnT1 complete coding sequence(Accession No. U17133, Palmiter and Findley, 1995)를 이용하여 미리 주문 제작한 특이적인 probe(5' primer, GTGTGAACCCGTGTTTTCCT; 3' primer, GCGTGAATTCCATGATTGTG)를 이용하였다. PCR 결과 얻은 증폭된 DNA는 2% Agarose gel을 이용하여 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 확인하였다.

4. 연구결과

4-1. DEHP 독성실험

(1) 체중변화

실험동물의 체중은 DEHP 처치군과 대조군 모두에서 관찰기간동안 지속적으로 증가되었으나 DEHP를 투여한 군이 corn-oil을 투여한 대조군에 비해 체중증가가 다소 적은 것으로 나타났다(그림 1).

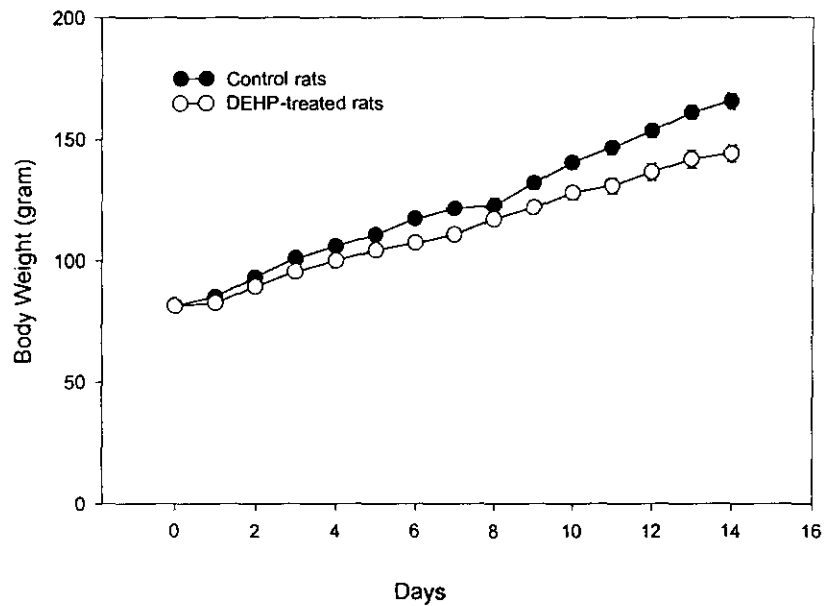


그림 1. DEHP (2g/5ml corn-oil/kg body weight) 투여군과 대조군(5ml corn-oil/kg body weight)에서의 체중변화

(2) 고환무게 변화

대조군에서는 고환 무게가 관찰기간동안 지속적으로 증가되어 실험 14일에서 고환의 평균무게는 1.45g로서 실험 1일째의 0.60g에 비해 약 2.4배이었다. DEHP 처치군에서의 평균 고환무게는 실험 1일째 0.53g, 14일째 0.54g로서 대조군과는 달리 고환무게가 증가되는 양상이 관찰되지 않았다 (그림 2, upper panel). 고환의 무게를 체중으로 보정한 상대 고환무게는 관찰기간동안 대조군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았으나 DEHP 처치군에서는 감소되는 경향을 나타내었다(그림 2, lower panel).

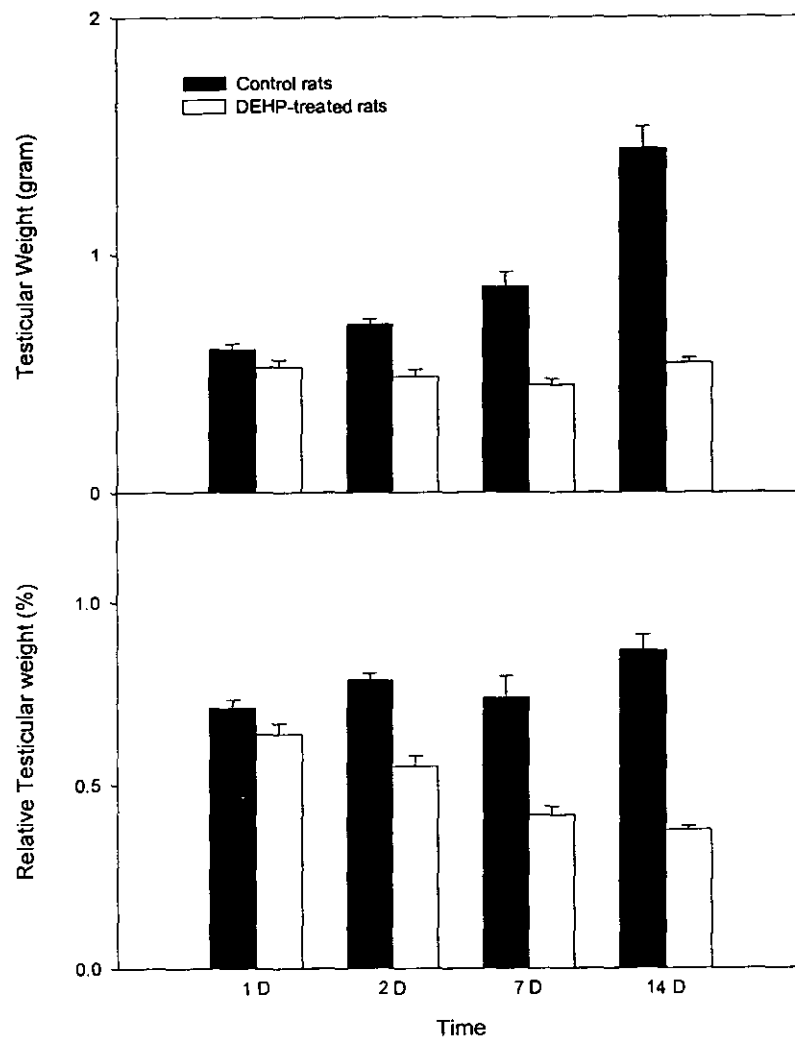


그림 2. DEHP (2g/5ml corn-oil/kg body weight) 투여군과 대조군(5ml corn-oil/kg body weight)에서의 고환무게 변화 (upper panel : absolute testicular weight, lower panel : relative testicular weight)

(3) 고환의 조직병리학적 소견

대조군에서는 정상적인 정자생성과정의 관찰되었다(그림 3-A : 실험후 2일째, 3-B : 실험후 14일째). 즉, 실험후 1일째에는 1차 정세포가 관찰되었으나 시간이 지남에 따라 고환의 성숙과정이 진행되어 실험 14일째에는 정자세포도 관찰되었다. DEHP 처치군에서는 DEHP투여후 1일과 2일째부터 정세포의 파괴가 관찰되었으며 시간이 지남에 따라 정세포의 손상은 더욱 심해져 광범위한 정세포의 괴사와 함께 정자생성과정이 거의 관찰되지 않았다(그림 3-C : 실험후 2일째, 그림 3-D : 실험주 14일째).

(4) 8주령에서의 체중과 고환무게의 변화 및 조직병리학적 소견

8주령 Sprague-Dawley rats에 실험동물 체중 kg당 2 g의 DEHP를 7일 동안 반복 투여하였을 때 DEHP 투여군과 대조군에서의 체중변화, 고환무게의 변화 및 조직병리학적 소견은 그림 4, 5 및 6과 같다. 즉, DEHP 처치군과 대조군에서 관찰기간동안 체중이 서서히 증가하였으나 두 군간에 체중증가의 차이는 나타나지 않았다. DEHP를 7일간 투여하였을 때 고환의 무게와 상대 고환무게는 대조군과 비슷하여 DEHP 투여에 따른 고환 무게의 변화는 관찰되지 않았다. 또한 DEHP 처치군과 대조군 고환의 조직병리학적 소견에서도 성숙된 정상적인 정자형성과정이 관찰되었다.

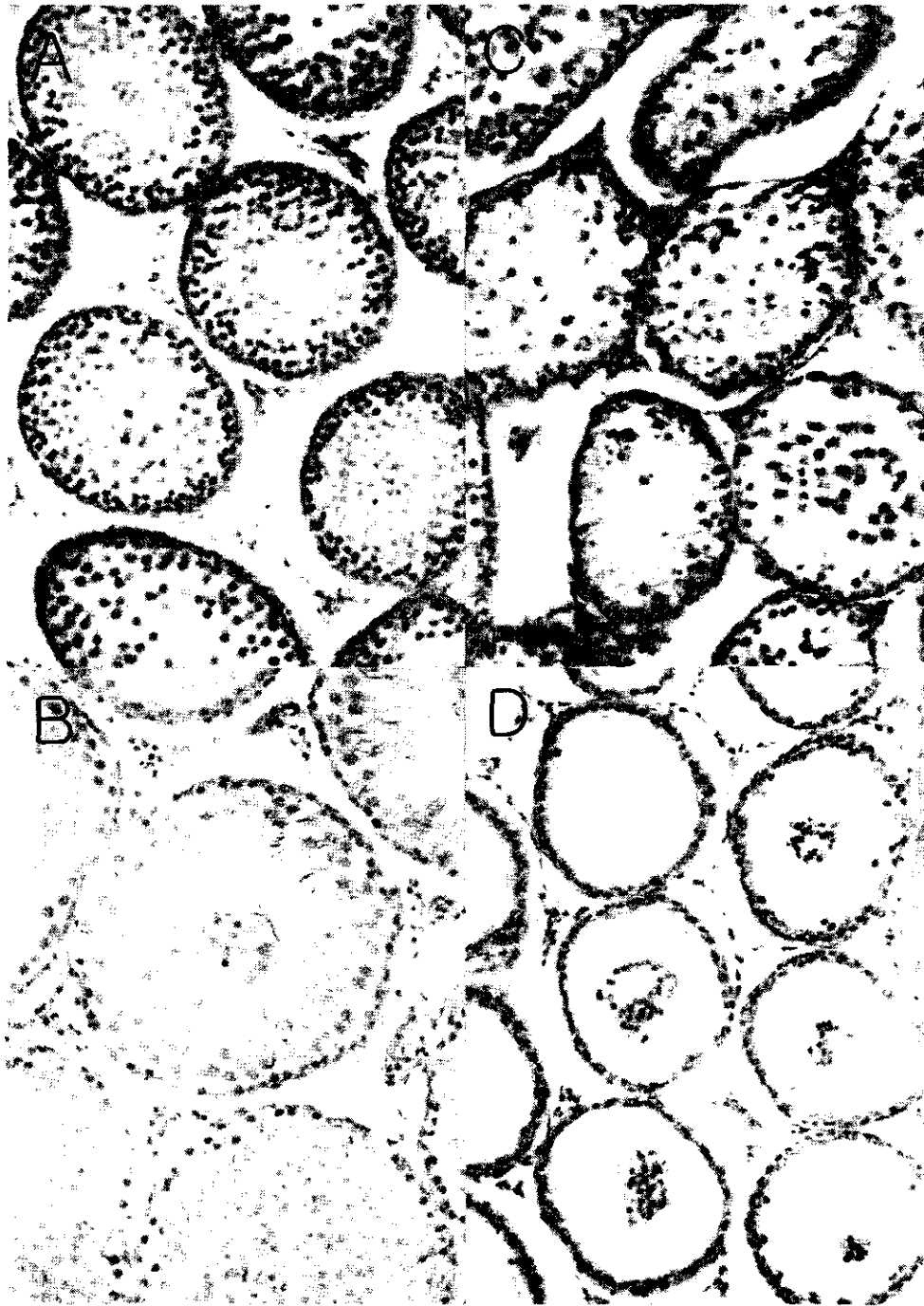


그림 3. DEHP (2g/5ml corn-oil/kg body weight) 투여군과 대조군(5ml corn-oil/kg body weight)에서 고환의 조직병리학적 소견 (A : control rat at day 2, B : control rat at day 14, C : DEHP-treated rat at day 2, D : DEHP-treated rat at day 14)

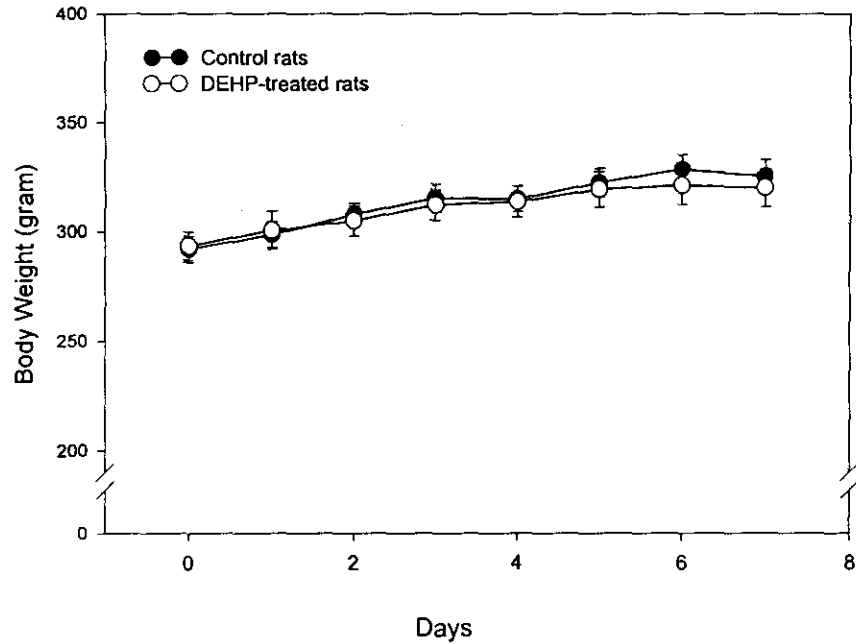


그림 4. DEHP (2g/5ml corn-oil/kg body weight) 투여군과 대조군(5ml corn-oil/kg body weight)에서의 체중변화 (8 주령)

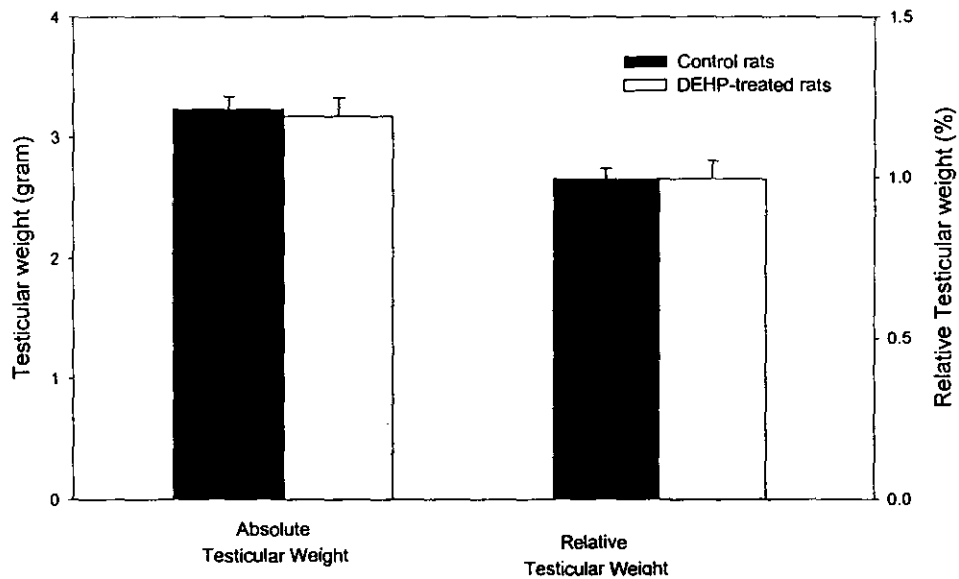


그림 5. DEHP (2g/5ml corn-oil/kg body weight) 투여군과 대조군(5ml corn-oil/kg body weight)에서의 고환무게 변화 (8 주령, left panel : absolute testicular weight, right panel : relative testicular weight)

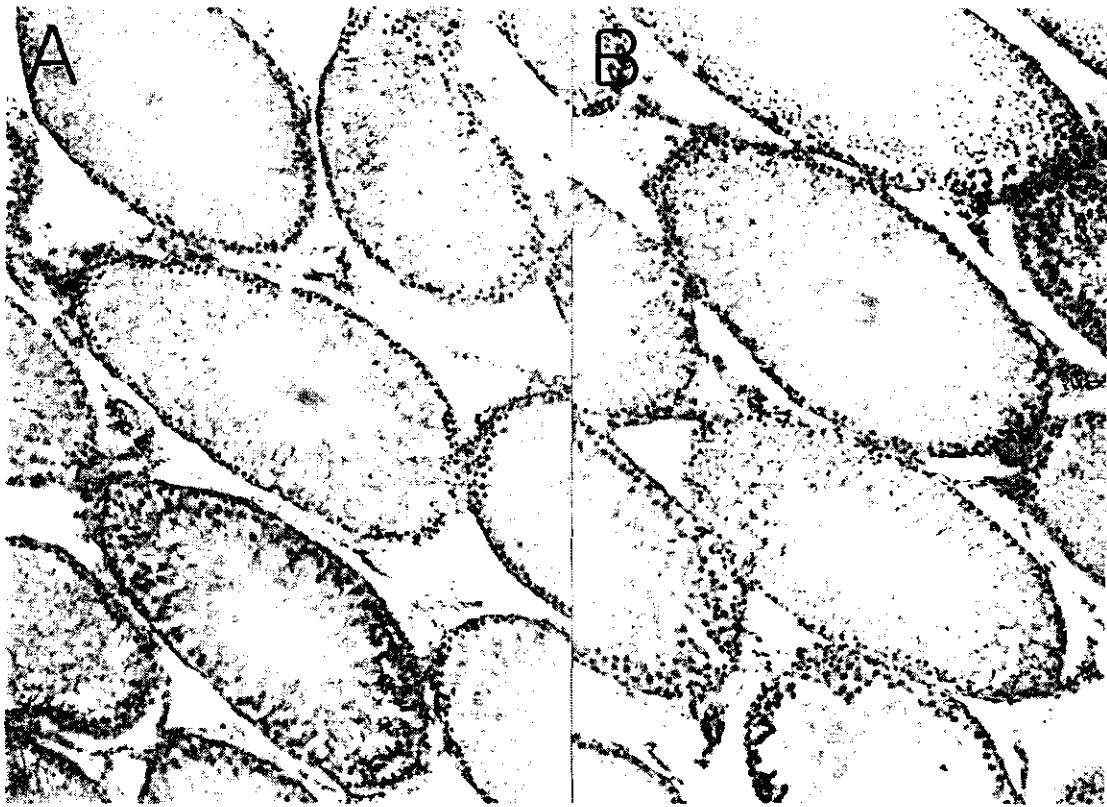


그림 6. DEHP (2g/5ml corn-oil/kg body weight) 투여군과 대조군(5ml corn-oil/kg body weight)에서 고환의 조직병리학적 소견 (8 주령, A : control rat at day 7, B : DEHP-treated rat at day 7)

(5) 고환 조직내 lipid peroxidation

대조군 실험동물에서는 관찰기간동안 고환조직내 lipid peroxidation 생성에 있어서 뚜렷한 변화를 관찰할 수 없었다. DEHP 처치군에서는 DEHP 투여후 1일째 대조군에 비해 고환 조직내 lipid peroxidation 생성이 다소 증가되었으나 2일에는 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다. 그러나 DEHP투여후 7일과 14일에서는 대조군에 비해 고환 조직내 lipid peroxidation의 생성이 감소되는 것으로 관찰되었다(그림 7).

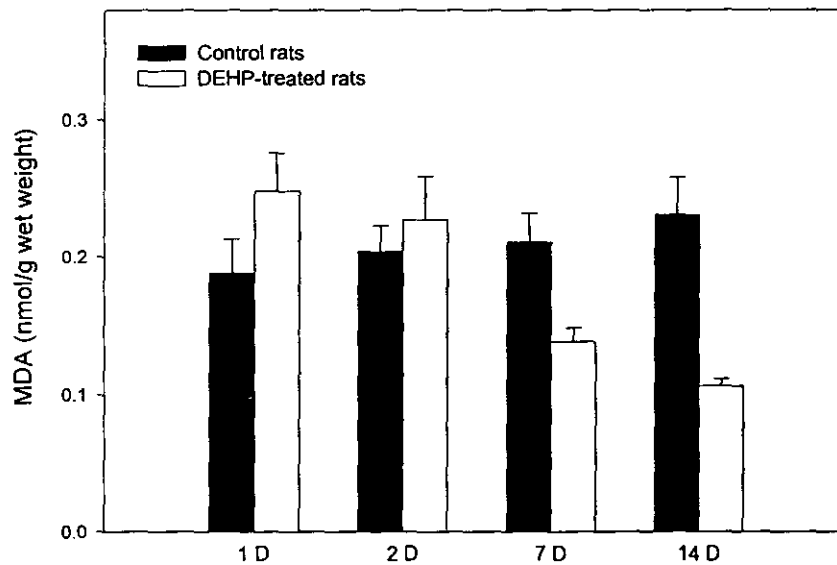


그림 7. DEHP (2g/5ml corn-oil/kg body weight) 투여군과 대조군(5ml corn-oil/kg body weight)에서의 고환 조직내 lipid peroxidation

(6) 고환 조직내 GSH

대조군에서 고환 조직내 GSH 수준은 관찰기간동안 유의한 변화가 나타나지 않았다. DEHP처리군에서는 DEHP 투여후 1일과 2일에서는 대조군과 비슷한 수준이었으나 7일과 14일에서는 대조군에 비해 고환 조직내 GSH 수준이 감소되었다(그림 8).

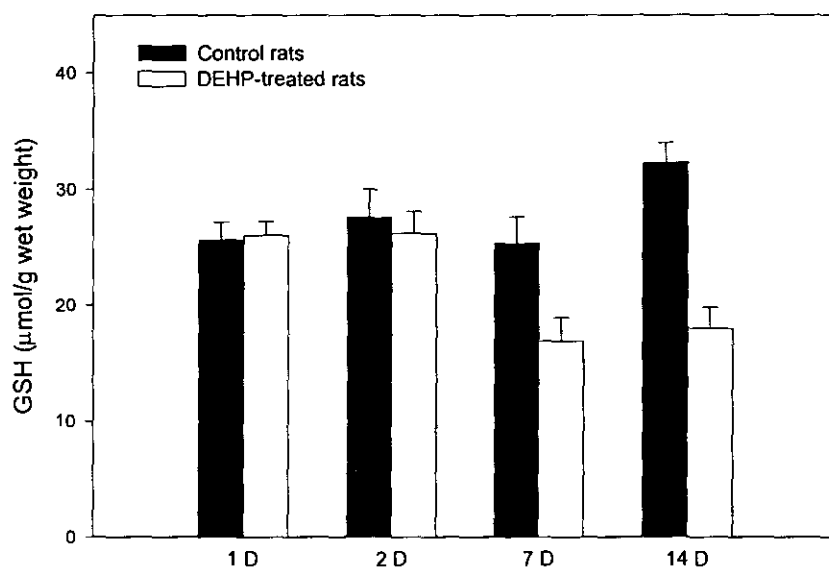


그림 8. DEHP (2g/5ml corn-oil/kg body weight) 투여군과 대조군(5ml corn-oil/kg body weight)에서의 고환 조직내 GSH

(7) 고환조직내 8-OH-dG 농도

고환 조직내 8-OH-dG의 농도는 DEHP 투여후 1일에서는 대조군과 차이가 없었으나 DEHP 투여후 2일부터 증가되기 시작하여 DEHP 투여후 14일에서는 대조군

에 비해 유의하게 높은 것으로 관찰되었다(그림 9).

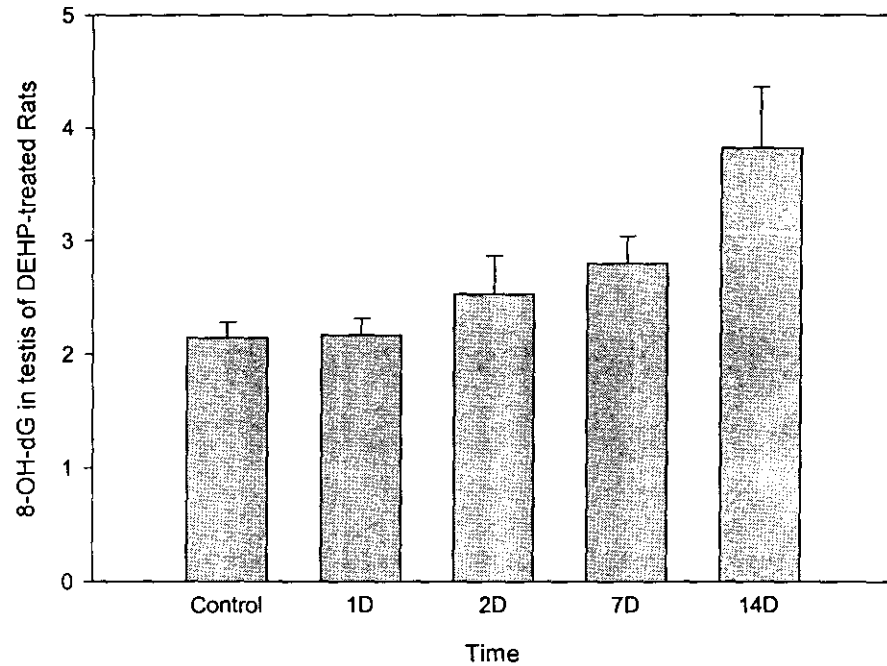


그림 9. DEHP (2g/5ml corn-oil/kg body weight) 투여군과 대조군(5ml corn-oil/kg body weight)에서의 고환 조직내 8-OH-dG

(8) 고환조직내 Zn 농도

대조군의 고환 조직내 아연농도는 약 17 $\mu\text{g/g}$ wet weight로서 관찰기간동안 유의한 변화가 관찰되지 않았다. DEHP 처치군에서의 고환 조직내 평균 아연농도는 DEHP 투여후 1일째 16.9 $\mu\text{g/g}$ wet weigh로서 대조군과 차이가 없었으나 시간이 지남에 따라 점차적으로 감소되는 경향을 나타내어 DEHP 투여후 7일과 14일에서는 대조군에 비해 약 30-35% 감소되었다(그림 10).

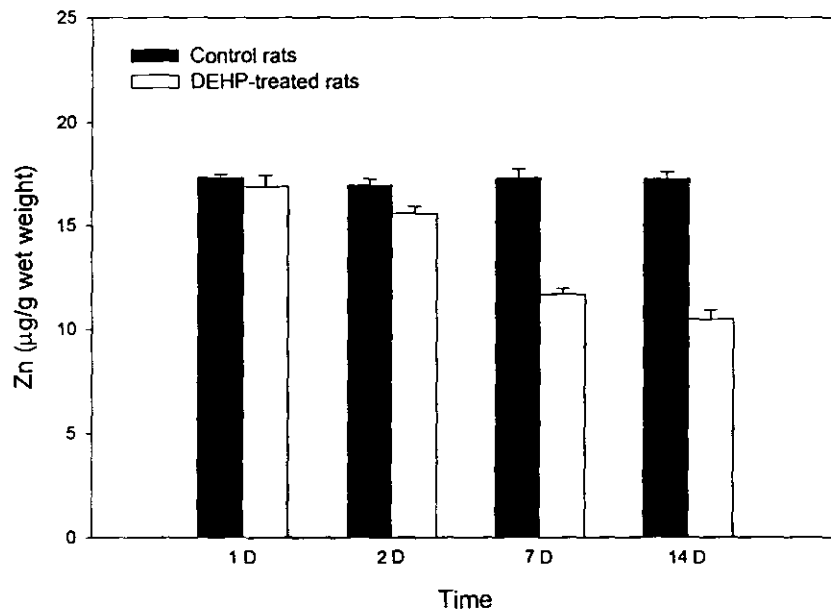


그림 10. DEHP (2g/5ml corn-oil/kg body weight) 투여군과 대조군(5ml corn-oil/kg body weight)에서의 고환 조직내 zinc 농도

(9) 고환조직내 DEHP와 MEHP의 농도

대조군에서의 고환 조직내 DEHP와 MEHP의 농도는 매우 낮은 수준이었다(<0.1 µg/g wet weight). DEHP를 투여하였을 때 고환 조직내 DEHP 또는 그 대사 산물인 MEHP 농도의 분포는 DEHP에 비해 MEHP가 매우 높은 것으로 관찰되었다. DEHP를 투여후 6시간부터 2주까지 관찰하였을 때 고환 조직내 DEHP농도는 시간에 따른 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다. 고환 조직내 MEHP는 DEHP 투여후 첫 6시간에서 급격히 증가하였다. 그러나 1일 1회 반복 투여하였을 때 7일과 14일에서의 고환 조직내 MEHP 농도가 첫 1일에서의 고환 조직내 MEHP의 농도에 비해 낮은 것으로 관찰되었다(그림 11).

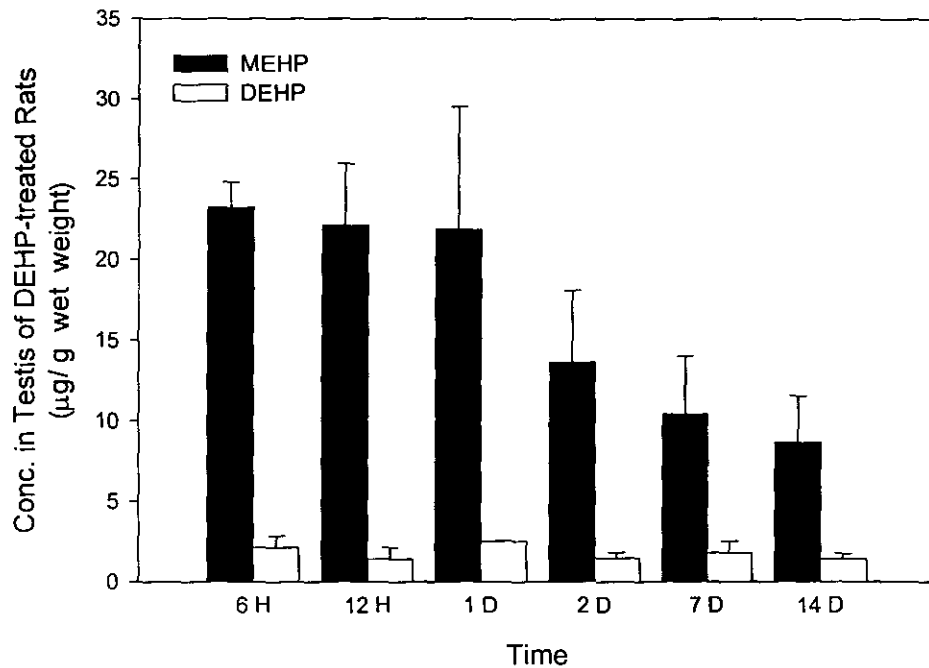


그림 11. DEHP (2g/5ml corn-oil/kg body weight) 투여군과 대조군(5ml corn-oil/kg body weight)에서의 고환 조직내 DEHP와 MEHP 농도

(10) 고환조직내 ZnT1 mRNA 발현

대조군과 DEHP 처치군에서의 고환조직에서 분리한 RNA로부터 제작한 cDNA를 이용하여 얻은 PCR 생산물에 대한 전기영동 결과 그림 12와 같다. 즉, DEHP 처치군에서 DEHP 투여후 6시간, 12시간, 1일, 2일, 7일 및 14일에서의 고환 조직내 ZnT1의 발현정도는 대조군 고환조직에서의 ZnT1 발현정도와 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다.

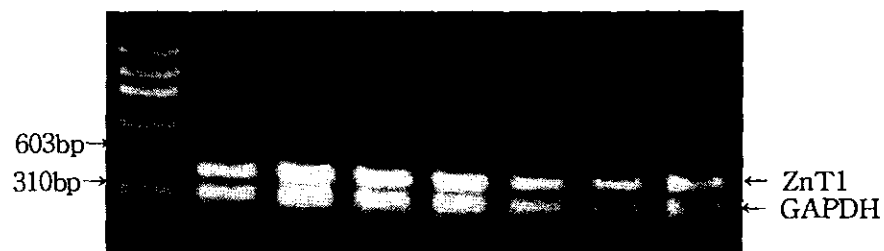


그림 12. DEHP (2g/5ml corn-oil/kg body weight) 투여군과 대조군(5ml corn-oil/kg body weight)에서의 고환 조직내 ZnT1 발현

4-2. Cadmium 독성실험

(1) 체중변화

실험동물의 체중증가는 생리적 식염수를 투여한 대조군에서는 관찰기간동안 지속적으로 증가되었으나 Cd를 투여한 군에서는 관찰기간동안 체중증가가 거의 관찰되지 않아 Cd에 의해 체중증가가 억제되는 것으로 관찰되었다(그림 13).

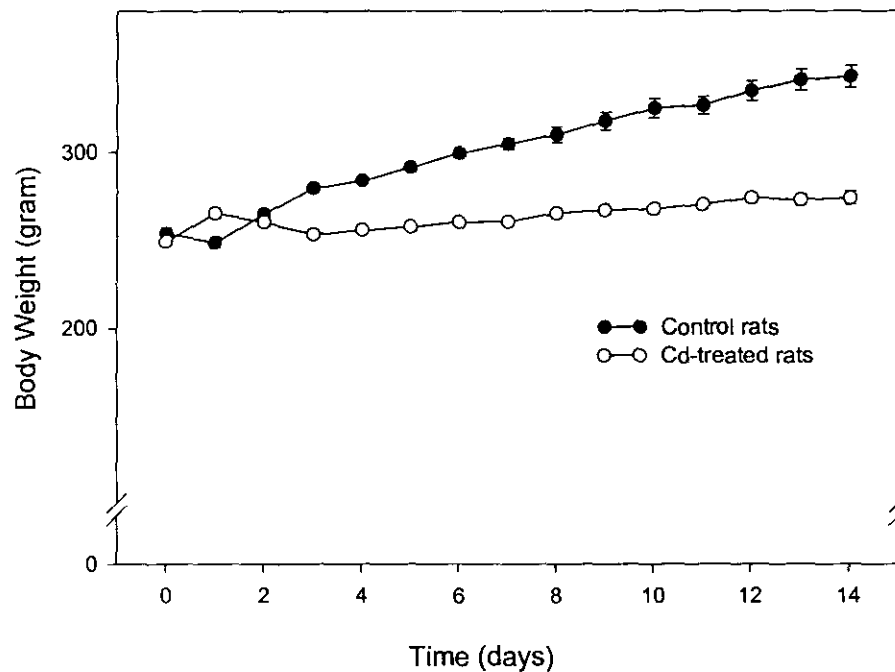


그림 13. Cd (2mg/4ml normal saline/kg body weight) 투여군과 대조군(4ml normal saline/kg body weight)에서의 체중변화

(2) 고환무게 변화

대조군에서는 고환 무게가 관찰기간동안 완만하게 증가되어 실험 1일째 고환의 평균 무게 2.81g에서 실험 14일에서 평균 3.31g로 다소 증가되었다. Cd 처치군에서의 평균 고환무게는 실험 1일 째 평균 3.12g 이었으나 실험 7일과 14일에서는 각각 1.798g, 1.719g으로서 약 40-45%의 고환무게가 감소되는 것으로 관찰되었다(그림 14, upper panel). 고환의 무게를 체중으로 보정한 상대 고환무게는 관찰기간동안 대조군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았으나 Cd 처치군에서는 Cd 투여후 7일과 14일에서는 현저하게 감소되는 것으로 관찰되었다(그림 14, lower panel).

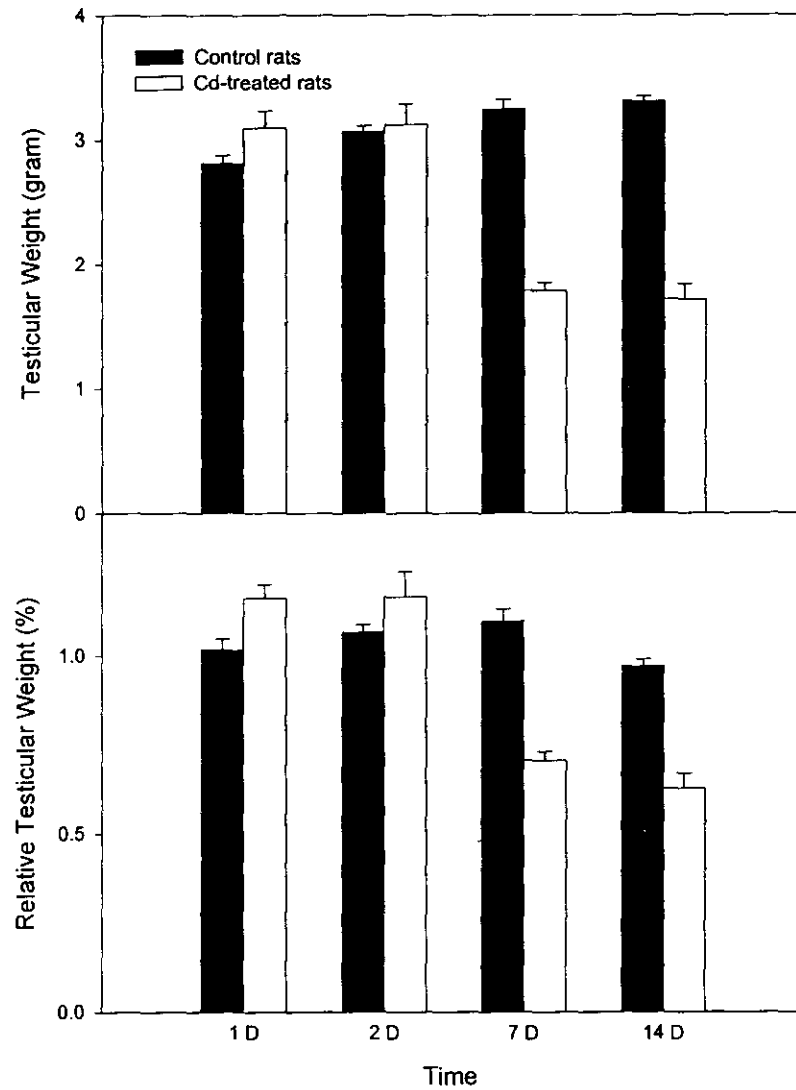


그림 14. Cd (2mg/4ml normal saline/kg body weight) 투여군과 대조군(4ml normal saline/kg body weight)에서의 고환무게 변화 (upper panel : absolute testicular weight, lower panel : relative testicular weight)

(3) 고환의 조직병리학적 소견

대조군에서는 정상적인 정자생성과정이 관찰되었다(그림 15-A : 실험후 7일째). Cd 처치군에서는 Cd 투여후 1일째부터 정세포의 파괴가 관찰되었으며 시간이 지남에 따라 정세포의 손상은 더욱 심하며 간질내 출혈현상이 관찰되었고, Cd 투여후 14일째에서는 광범위한 정세포의 괴사, 석회화 및 간질조직의 섬유화와 고환의 위축이 관찰되었으며 정자생성과정은 관찰되지 않았다(그림 15-B : 실험후 1일째, 그림 15-C : 실험후 2일째, 그림 15-D : 실험후 14일째).

(4) 3주령에서의 체중과 고환무게의 변화 및 조직병리학적 소견

3주령 Sprague-Dawley rats에 실험동물 체중 kg당 2 mg의 $CdCl_2$ 를 7일 동안 반복 투여하였을 때 Cd 투여군과 대조군에서의 체중변화, 고환무게의 변화 및 조직병리학적 소견은 그림 16, 17 및 18과 같다. 즉, Cd 처치군과 대조군에서 관찰기간동안 체중이 지속적으로 증가되었으며 두 군간에 체중증가의 차이는 나타나지 않았다. Cd를 7일간 투여하였을 때 고환의 무게와 상대 고환무게도 대조군과 비슷하여 Cd 투여에 따른 고환 무게의 변화는 관찰되지 않았다. 또한 Cd 처치군과 대조군 고환의 조직병리학적 소견에서도 형태학적으로 특별한 이상소견이 관찰되지 않았다.



그림 15. Cd (2mg/4ml normal saline/kg body weight) 투여군과 대조군(4ml normal saline/kg body weight)에서 고환의 조직병리학적 소견 (A : control rat at day 7, B : Cd-treated rat at day 1, C : Cd-treated rat at day 2, D : Cd-treated rat at day 14)

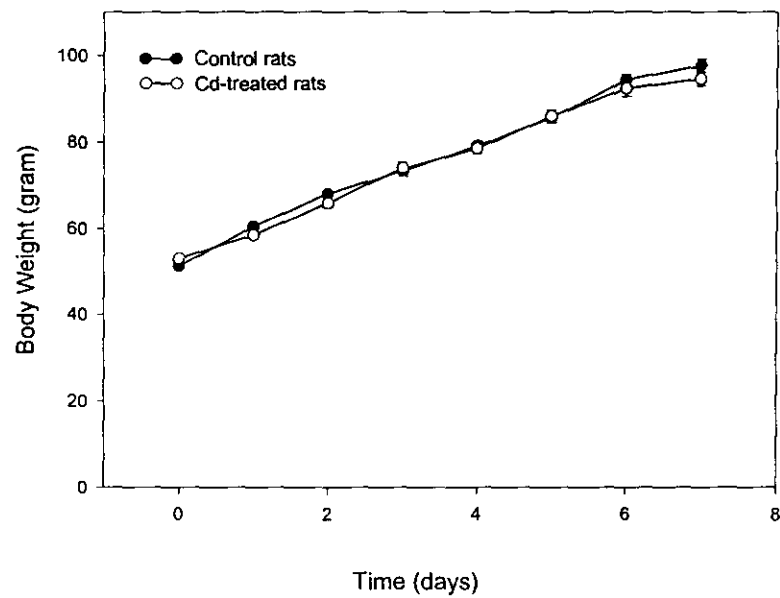


그림 16. Cd (2mg/4ml normal saline/kg body weight) 투여군과 대조군(4ml normal saline/kg body weight)에서의 체중변화 (3 주령)

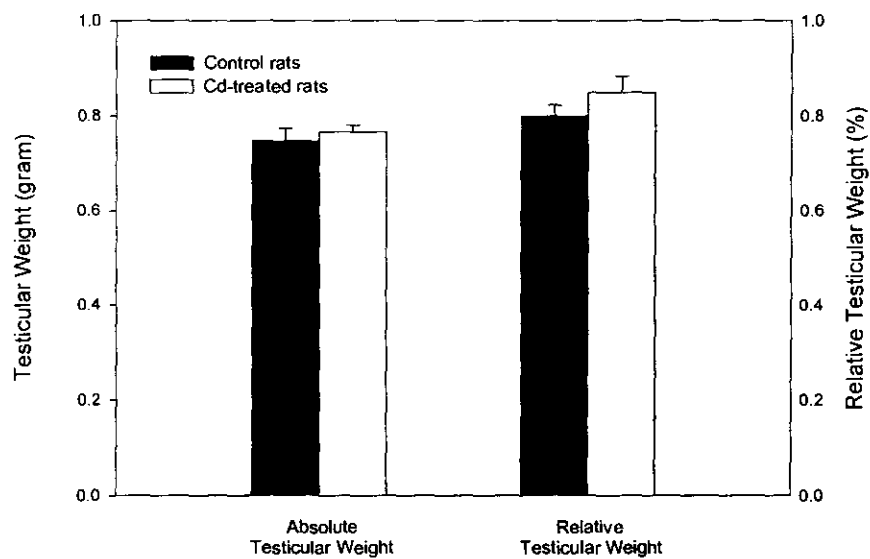


그림 17. Cd (2mg/4ml normal saline/kg body weight) 투여군과 대조군(4ml normal saline/kg body weight)에서의 고환무게 변화 (3 주령, left panel : absolute testicular weight, right panel : relative testicular weight)

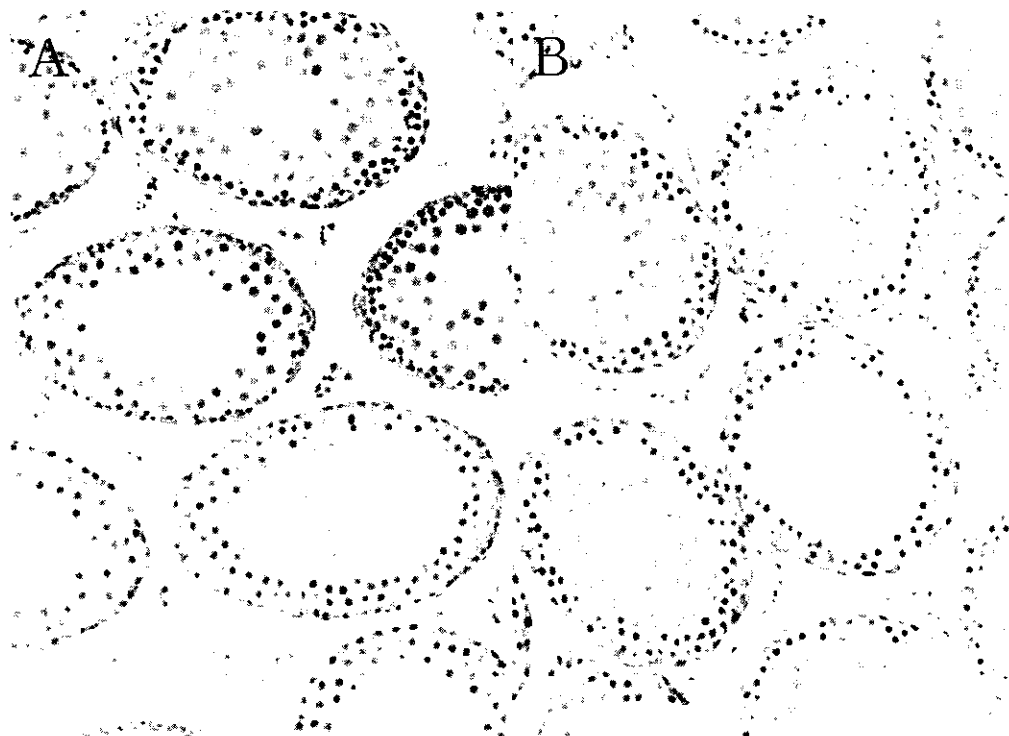


그림 18. Cd (2mg/4ml normal saline/kg body weight) 투여군과 대조군(4ml normal saline/kg body weight)에서 고환의 조직병리학적 소견 (3 주령, A : control rat at day 7, B : Cd-treated rat at day 7)

(5) 고환 조직내 lipid peroxidation

대조군 실험동물에서는 관찰기간동안 고환조직내 lipid peroxidation 생성에 있어서 뚜렷한 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나, Cd 처치군에서는 고환조직내 lipid peroxidation 생성이 Cd 투여후 1일째에서는 대조군과 뚜렷한 차이가 나타나지 않았으나 Cd 투여후 2일에서는 유의하게 증가되었고 Cd 투여후 7일과 14일에서는 대

조군에 비해 고환 조직내 lipid peroxidation의 생성이 약 12-15배 증가되는 것으로 관찰되었다(그림 19).

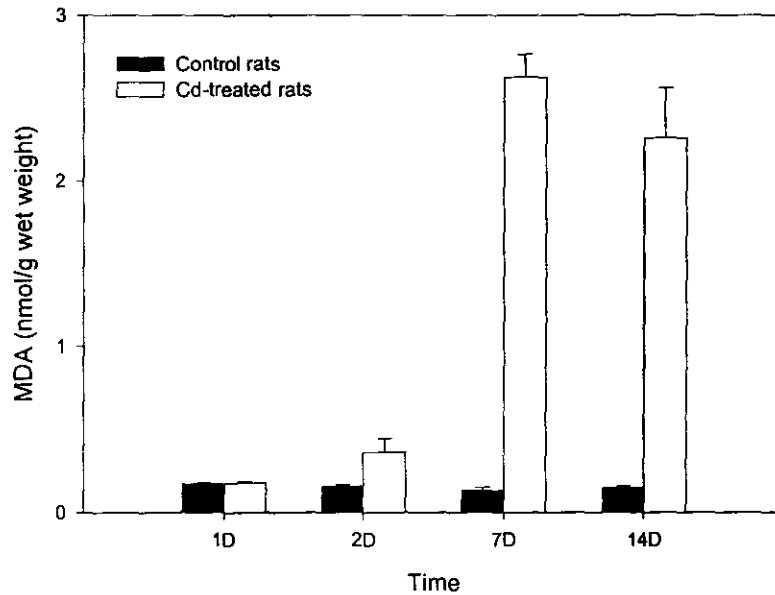


그림 19. Cd (2mg/4ml normal saline/kg body weight) 투여군과 대조군(4ml normal saline/kg body weight)에서의 고환 조직내 lipid peroxidation

(6) 고환 조직내 GSH

대조군에서의 고환 조직내 GSH 수준은 관찰기간동안 뚜렷한 변화가 나타나지 않았다. Cd 처치군에서는 고환 조직내 GSH 수준이 Cd 투여후 1일과 2일에서는 대조군에 비해 약 18-20% 낮았으며 Cd 투여후 7일과 14일에서는 대조군에 비해 약 35-40% 낮은 수준으로서 관찰기간동안 Cd 처치군에서의 고환 조직내 GSH 수준은 대조군에 비해 감소되는 것으로 관찰되었다(그림 20).

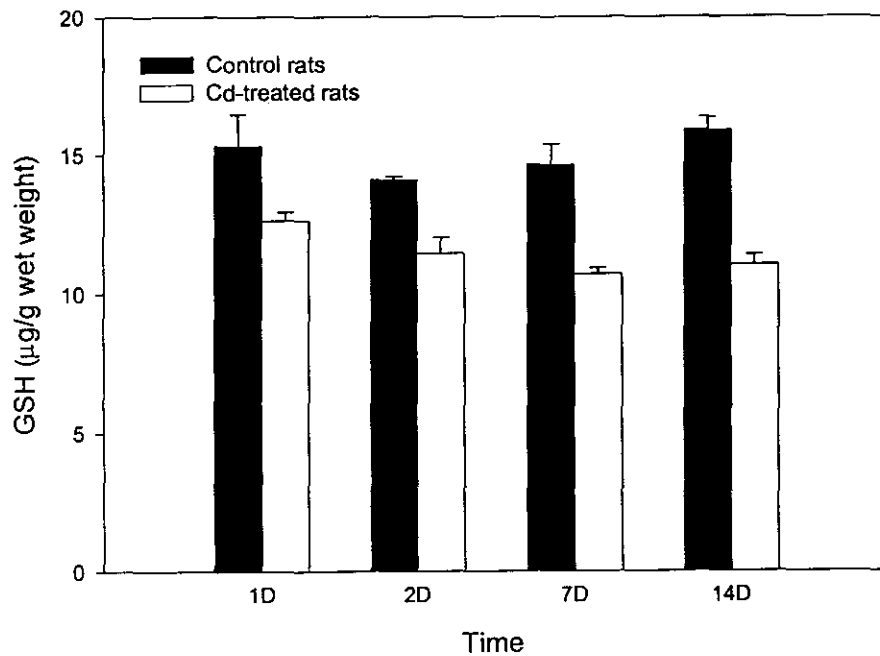


그림 20. Cd (2mg/4ml normal saline/kg body weight) 투여군과 대조군(4ml normal saline/kg body weight)에서의 고환 조직내 GSH

(7) 고환조직내 8-OH-dG 농도

Cd처리군에서의 고환 조직내 8-OH-dG 농도는 카드뮴 투여후 1일째부터 대조군에 비해 높았으며 관찰기간동안 대조군에 비해 약 40-70% 높게 관찰되었다(그림 21).

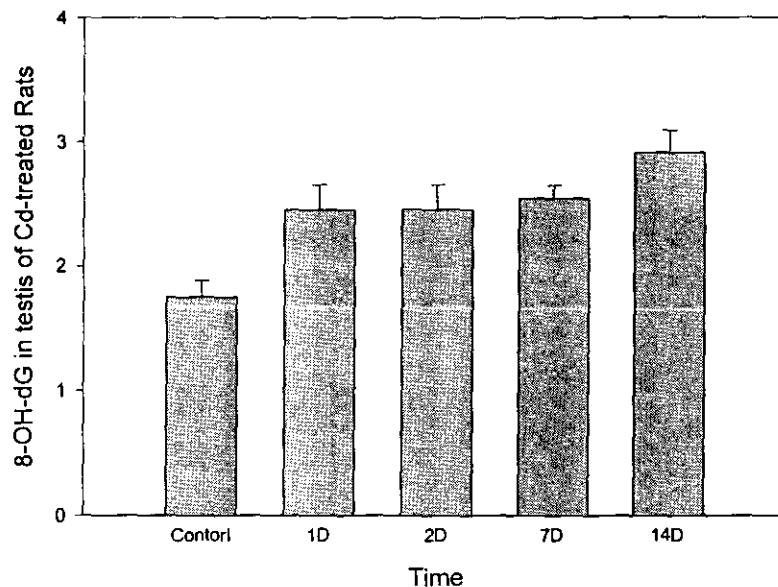


그림 21. Cd (2mg/4ml normal saline/kg body weight) 투여군과 대조군(4ml normal saline/kg body weight)에서의 고환 조직내 8-OH-dG

(8) 고환조직내 Zn 농도

대조군의 고환 조직내 아연농도는 약 20 $\mu\text{g/g}$ wet weight로서 관찰기간동안 유의한 변화가 관찰되지 않았다. Cd 처치군에서의 고환 조직내 평균 아연농도는 Cd 투여후 1일과 2일에서는 각각 18.8 $\mu\text{g/g}$ wet weight, 17.0 $\mu\text{g/g}$ wet weight로서 대조군에 비해 다소 낮게 관찰되었으나 Cd 투여후 7일과 14일에서는 23.8 $\mu\text{g/g}$ wet weight와 24.3 $\mu\text{g/g}$ wet weight로서 대조군에 비해 다소 높은 것으로 관찰되었다 (그림 22).

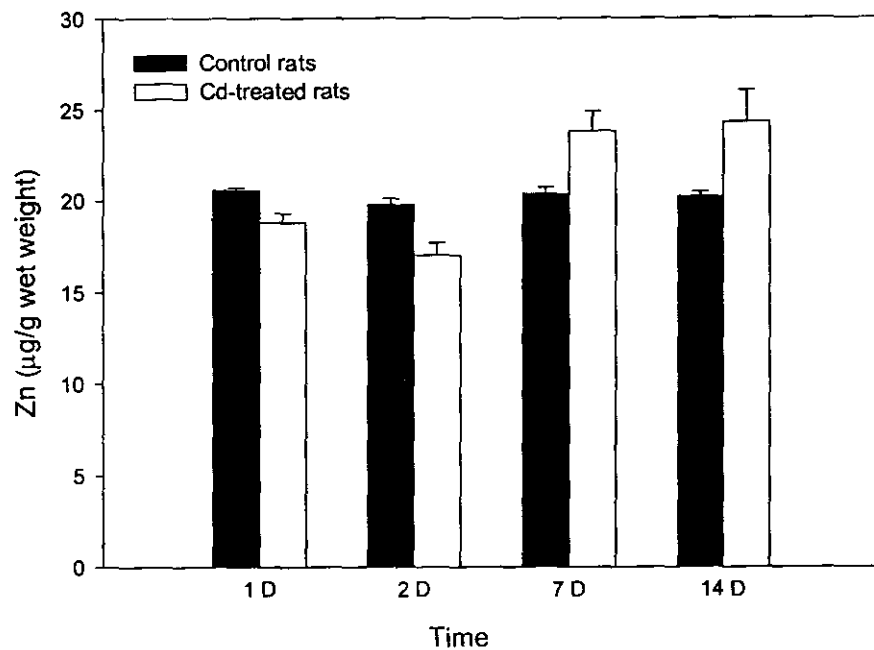


그림 22. Cd (2mg/4ml normal saline/kg body weight) 투여군과 대조군(4ml normal saline/kg body weight)에서의 고환 조직내 Zn 농도

(9) 고환조직내 Cd 농도

대조군의 고환 조직내 Cd 농도는 매우 낮은 수준($<0.015 \mu\text{g/g}$ wet weight) 이었다. Cd 처치군에서 고환 조직내 Cd 농도는 Cd 투여후 첫 6시간에서 급격히 증가하여 12시간에서 정점을 이룬 후 24시간에서 다소 감소되는 경향을 나타내었다. 1일 1회 Cd를 반복 투여하였을 때 고환 조직내 카드뮴 농도는 시간이 지남에 따라 증가되는 것으로 관찰되었다(그림 23).

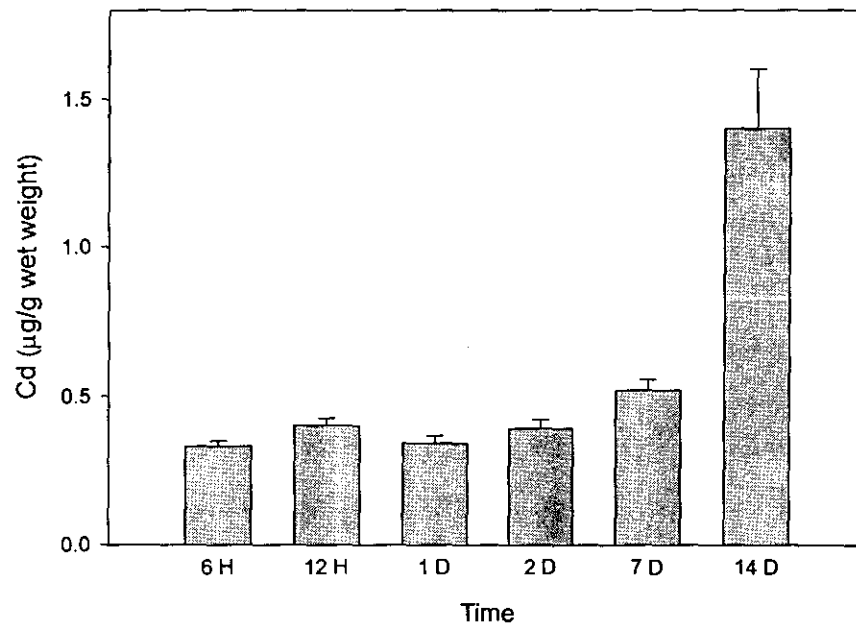


그림 23. Cd (2mg/4ml normal saline/kg body weight) 투여군과 대조군(4ml normal saline/kg body weight)에서의 고환 조직내 Cd 농도

(10) 고환조직내 ZnT1 mRNA 발현

대조군과 Cd 처치군에서의 고환조직에서 분리한 RNA로부터 제작한 cDNA를 이용하여 얻은 PCR 생산물에 대한 전기영동 결과 그림 24과 같다. 즉, Cd 처치군에서 Cd 투여후 6시간, 12시간, 1일, 2일, 7일 및 14일에서의 고환 조직내 ZnT1의 발현정도는 대조군 고환조직에서의 ZnT1 발현정도와 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다.



그림 24. Cd (2mg/4ml normal saline/kg body weight) 투여군과 대조군(4ml normal saline/kg body weight)에서의 고환 조직내 ZnT1 발현

5. 토의

이번 연구과제에서 3 주령의 Sprague-Dawley male rat의 체중 kg당 2g의 DEHP를 1일 1회 2주 동안 반복 투여하였을 때 실험동물의 체중증가 감소, 고환의 절대 무게(absolute testicular weight)와 체중으로 보정한 상대 무게(relative testicular weight)의 감소, 고환 조직 정세포의 파괴와 광범위한 피사를 동반한 고환위축 등을 초래하였다. 8 주령의 Sprague-Dawley male rat에 체중 kg당 2mg의 $CdCl_2$ 를 1일 1회 2주 동안 반복 투여하였을 때 실험동물의 현저한 체중증가의 감소, 고환의 절대 무게와 상대 무게의 감소, 정세포의 파괴, 간질내 출혈현상, 광범위한 정세포의 피사와 석회화를 동반하였으며 마침내 고환의 위축을 초래하였다. 즉, 내분비계 교란물질로 알려져 있는 DEHP와 Cd의 반복 투여에 의한 고환의 독성은 유사한 소견을 나타내었으며, 고환독성으로 인해 궁극적으로 고환의 정자 생성과정이 완전히 파괴되고 고환 위축이라는 비슷한 양상이 초래되었다. 이번 연구에서 Cd과 DEHP에 의해 관찰된 고환 독성은 Cd과 DEHP 각각의 물질에 의한 고환독성에 대한 이전 연구결과들과 일치하는 결과이다. 이번 연구에서 실험동물에 투여한 체중 kg당 2g의 DEHP 또는 2mg의 $CdCl_2$ 는 동일한 방법에 의한 각각의 LD_{50} 의 약 1/5-1/6의 용량에 해당된다. 이는 투여용량을 결정하기 위한 예비실험에서 외형적으로 전형적인 고환의 손상이 관찰되는 용량으로서 DEHP 또는 Cd에 의한 고환독성의 기전을 관찰하기 위해서는 적절한 용량으로 판단되었다. 이전 연구에서 실험동물에서 DEHP와 Cd에 의한 독성효과에 있어서 간장이나 신장에 비해 고환이 민감한 것으로 관찰되었으며, 특히 Cd에 의한 간장 독성은 비교적 초기에 관찰되었으나 신장 독성은 상대적으로 시간이 지난 후에 관찰되는 것으로 알려져 있다. 그러나, 이번 연구에서는 간장과 신장 및 기타 장기의 Cd 또는 DEHP에 의한 손상여부를 고환독성과 비교·관찰하지는 않았다.

서로 다른 물질인 Cd과 DEHP에 의한 고환 독성에 대한 각 물질의 위해성에 대해서는 각 유해물질의 특성상 직접적인 용량을 비교하기에는 어려운 점이 있다. 그

러나, 이번 연구에서 DEHP의 경우 3 주령의 실험동물에서 고환독성을 초래한 용량을 8 주령의 실험동물에 1 주 동안 반복 투여하였을 때 DEHP에 대한 고환의 감수성은 관찰되지 않았다. 또한 Cd의 경우 8 주령의 실험동물에서 고환독성을 초래한 용량을 3 주령의 실험동물에 1 주일 동안 반복 투여하였을 때 Cd에 의한 고환독성이 초래되지 않았다. 즉, DEHP와 Cd의 고환 독성에 대한 감수성은 실험동물의 연령에 따라 매우 큰 차이가 있는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 Cd과 DEHP는 비슷한 손상 양상을 초래하는 고환 독성물질이지만 독성물질의 유해성은 유해물질 그 자체뿐만 아니라 여러 가지 다른 숙주 요인에 따라서도 크게 좌우되며, 이는 유해물질의 위해성 평가 및 관리에 있어서도 반드시 고려되어야 할 것으로 사료된다.

DEHP를 투여한 실험동물의 고환 조직내 아연농도는 DEHP 투여후 1일에는 대조군과 차이가 없었으나 2일에 다소 감소하였으며 7일과 14일에는 대조군에 비해 약 30-35% 감소하였다. Cd를 투여한 실험동물에서의 고환 조직내 아연농도는 Cd 투여후 1일과 2일에서는 대조군에 비해 감소되었으나 7일과 10일에서는 오히려 대조군에 비해 높게 나타나 DEHP에 의한 고환 조직내 아연농도의 변화양상과는 다르게 관찰되었다. 그러나, DEHP 또는 Cd를 처리한 군에서의 고환 조직내 아연이동에 관련한다고 알려져 있는 단백질 즉, zinc transporter 1(ZnT1)의 발현정도는 DEHP 또는 Cd를 투여후 24시간 이내의 급성 시기나 24시간 이후 1일 1회, 2주까지 반복 투여한 군에서도 대조군과 비슷한 수준으로 발현되었다. 이러한 결과를 볼 때는 DEHP와 Cd에 의한 고환 조직내 아연농도의 변화는 ZnT1과는 관련이 적은 것으로 사료된다.

전술한 바와 같이 이번 연구결과에서 DEHP와 Cd에 의한 고환 조직내 아연 이동양상은 양자간에 차이가 있는 것으로 관찰되었다. DEHP에 의한 고환 조직에서의 아연농도의 감소에 대해서는 아연의 감소가 DEHP에 의한 고환 독성의 원인적인 요인으로 추정된 바 있으나, 이번 연구에서 DEHP 투여후 고환조직내 아연의 감소는 DEHP 투여후 2일 이후부터 관찰되었으나 고환 조직의 손상은 1일째부터 관찰

되었다. 이러한 결과는 DEHP 투여에 따른 아연의 소실이 고환 독성의 1차적인 원인으로 작용하기보다는 고환독성에 따라 수반되는 2차적인 현상임을 시사한다. Cd 투여후 1일과 2일에서의 아연 농도의 감소와 7일과 14일에서의 고환 조직내 아연농도의 증가는 Cd의 고환독성으로 인해 고환조직으로부터의 아연의 소실 또는 흡수의 증가 등으로 해석되기보다는 Cd의 독성에 의해 초기에 고환의 염증성 비대와 시간이 지남에 따른 고환의 위축현상 등이 고환 조직의 단위 무게당 아연의 농도에 영향을 주는 한 요인으로 작용할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나, Cd에 의한 고환 조직내 아연의 이동양상과 그 기전에 대해서는 추후 연구되어야 할 과제로 생각한다.

실험동물에 Cd를 투여한 후 고환 조직에서 산소반응성 손상을 반영할 수 있는 지표 즉, lipid peroxidation, GSH 및 8-OH-dG 등을 분석한 결과 Cd 투여에 따라 lipid peroxidation의 증가, GSH 수준의 감소 및 8-OH-dH 농도의 증가 등의 소견이 관찰되어 산소반응성 손상때 나타나는 현상들과 잘 일치하는 결과였다. 이는 Cd에 의한 고환손상에 있어서 산소반응성 손상이 고환 손상기전의 하나로서 역할하는 것을 시사하는 결과이다. DEHP의 경우 실험동물에서 GSH의 감소와 8-OH-dG의 증가를 보여 Cd에 의한 고환 독성과 비슷한 양상으로 DEHP에 의한 고환 손상에서도 산소반응성 손상이 기전의 일부로서 관여할 것으로 사료되나 DEHP 투여후 7일과 14일에서 lipid peroxidation의 생성이 대조군에 비해 현저히 저하되어 해석에 다소 어려움이 있다. 그러나, DEHP에 의한 간독성의 한 기전으로 산소반응성 손상이 유력하게 이해되고 있으며 이번 연구에서도 고환조직에서 산소반응성 손상에 대한 방어기전으로 작용하는 GSH의 감소 등은 DEHP에 의한 고환 독성에 있어서 산소반응성 손상이 일부 관여할 것이라는 것을 시사한다.

Cd과 DEHP를 반복 투여후 고환조직내 Cd과 DEHP 또는 DEHP의 대사산물인 MEHP의 시간에 따른 분포양상이 유해물질간에 크게 차이가 있어 고환 독성물질의 체내 대사도 유해물질의 단독 폭로 또는 복합폭로 등에 따른 독성 기전을 연구하는데 있어서 반드시 고려되어야 할 분야로 사료된다.

6. 맺음말

DEHP와 Cd은 일명 ‘내분비계 교란물질’로 알려져 있으나 널리 사용되고 있으며 비교적 잘 알려진 고환 독성물질이다. Sprague-Dawley male rat에 DEHP와 Cd을 반복 투여하였을 때 체중증가의 감소, 고환무게의 감소, 정세포의 파괴와 광범위한 괴사 및 고환의 위축 등 유사한 양상의 고환 독성이 초래되었다. 그러나, DEHP와 Cd에 의한 고환독성은 실험동물의 연령에 따라 차이가 있어, DEHP는 어릴수록 Cd은 상대적으로 연령이 많을수록 고환 독성에 민감하였다. DEHP와 Cd을 반복 투여하였을 때 고환 조직내 Cd과 DEHP 또는 DEHP의 대사산물인 MEHP는 시간에 따른 분포양상이 크게 차이가 있었다. DEHP와 Cd에 의한 실험동물의 고환 조직내 아연농도의 변화양상은 두 물질간에 차이가 있었으며, 아연 이동 단백질인 ZnT1의 발현과는 관련이 없는 것으로 관찰되었다. Cd에 의한 고환조직에서의 lipid peroxidation 생성의 증가, GSH 수준의 감소, 8-OH-dG 농도의 증가 소견과 DEHP에 의한 고환 조직내 GSH 수준의 감소와 8-OH-dG 농도의 증가 소견 등이 관찰되어 Cd과 DEHP에 의한 고환 손상에 있어서 산소반응성 손상이 독성 기전의 일부로서 역할하는 것을 시사하였다.

이상의 결과를 요약하면 Cd과 DEHP에 의한 고환의 손상은 실험동물의 연령 등 숙주요인에 따른 고환 독성에 대한 감수성과 유해물질의 체내에서의 대사 양상에 따라서도 차이가 있는 것으로 관찰되었으며 산소반응성 손상은 두 물질의 고환 손상기전에 공통적으로 최소한의 역할을 하는 것으로 관찰되었다. 따라서 향후 고환 독성물질인 Cd과 DEHP에 복합적으로 폭로되었을 때 고환 독성에 미치는 영향과 숙주요인 및 기타 요인에 따른 고환 독성의 감수성에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

7. 참고문헌

환경부 (2000). 내분비계 장애물질 규제 및 사용현황.
URL:[http://www.me.go.kr:9999/ DEPTDATA/200006/27194141/사용현황.doc](http://www.me.go.kr:9999/DEPTDATA/200006/27194141/사용현황.doc).

Agarwal DK, Eustis S, Lamb JC, et al. (1986). Influence of dietary zinc on di(2-ethylhexyl) phthalate-induced testicular atrophy and zinc depletion in adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 84, 12-24.

Chellman GJ, Shaikh ZA, Baggs RB, et al. (1985). Resistance to cadmium-induced necrosis in testes of inbred mice: Possible role of a metallothionein-like cadmium-binding protein. *Toxicol Appl Pharmacol* 79, 511-523.

El-Missiry MA, Shalaby F. (2000). Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *J Biochem Mol Toxicol* 14, 238-243.

Goll V, Alexandere E, Viollon-Abadie C, et al. (1999). Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis, and apoptosis in rat and human hepatocyte culture. *Toxicol Appl Pharmacol* 160, 21-32.

Maitani T, Suzuki KT. (1986). Effect of cadmium on essential metal concentrations in testis, liver and kidney of five inbred strains of mice. *Toxicology* 42, 121-130.

Oishi S. (1986). Testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl)phthalate: Changes in histology, cell specific enzyme activities and zinc concentrations in rat testis. *Arch Toxicol* 59, 290-295.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351-358.

Oteiza PI, Adonaylo VN, Keen CL. (1999). Cadmium-induced testes oxidative damage in rats can be influenced by dietary zinc intake. *Toxicology* 137, 13-22.

Palmiter RD, Findley SD. (1995). Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J* 14, 639-649.

Parizek J, Zahor Z (1956). Effect of cadmium salts on testicular tissue. *Nature* 177, 1036.

Parmar D, Srivastava SP, Singh GB, et al. (1995). Testicular toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate in developing rats. *Vet Hum Toxicol* 37, 310-313.

Shaffer CB, Carpenter CP, Smyth Jr. HF (1945). Acute and subacute toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate with note upon its metabolism. *J Ind Hyg Toxicol* 27, 130-135.

Suna S, Jitsunari F, Asakawa F, Kitamado T, Ohnishi S, Hirao T, Fukunaga I (2001). Simplified determination of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) in blood and organs of the rat administered DEHP. *Sangyo Eiseigaku Zasshi* 43, 73-75.

Takagi A, Sai K, Umemura T, et al. (1992). Hepatomegaly is an early biomarker for hepatocarcinogenesis induced by peroxisome proliferators. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 11, 145-149.

van Klaveren RJ, Hoet PH, Pype JL, Demedts M, Nemery B. (1997). Increase in

gamma-glutamyltransferase by glutathione depletion in rat type II pneumocytes.
Free Radic Biol Med 22, 525-534.