

Di-(2-ethylhexyl)phthalate가 흰쥐
Sertoli cell의 구조와 기능에
미치는 영향

연세대학교 대학원

의 과학과

길영천

Di-(2-ethylhexyl)phthalate가 흰쥐
Sertoli cell의 구조와 기능에
미치는 영향

지도교수 이혜연

이 논문을 박사 학위 논문으로 제출함

2006년 12 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

길영천

길영천의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2006 년 12 월 일

감사의 글

여러모로 부족한 제가 소중한 분들의 도움을 바탕으로 작은 결실을 얻었습니다. 오래전 학부시절에 은사님께서 들려주신 말씀이 생각납니다. 학문은 과거부터 현재까지 수많은 학자들이 하나의 작은 모래알을 던져 이룩한 사막과 같은 것이라는 말씀이었습니다. 논문을 마무리하는 시점에서 과연 제 연구결과가 하나의 모래알이라도 될 수 있을지 걱정이 앞서기는 하지만 언제나처럼 새로이 출발선에 선 마음가짐으로 더 많은 모래알을 던질 수 있도록 노력하고자 합니다. 하나의 관문을 넘어 또 다른 출발선에 설 수 있도록 이끌어 주셨고, 스스로를 돌아보고 부족함을 채울 수 있도록 애정 어린 질책과 격려, 믿음을 베풀어 주신 이해연 선생님께 감사드립니다. 아울러 바쁘신 가운데 논문지도를 통해 부족한 부분을 채워주시고 격려해주신 한상원 선생님, 김영태 선생님, 조남훈 선생님, 한순영 선생님께도 진심으로 감사드립니다. 또한 해부학교실에서 생활하는 동안 변함없는 관심과 격려로 이끌어 주시고 지도해 주셨던 정인혁 선생님, 박경아 선생님, 박형우 선생님, 이원택 선생님, 이종은 선생님, 김명희 선생님께도 감사드립니다. 그리고 부족함 많은 제가 학문의 길에 들어설 수 있도록 해주시고, 지치고 어려울 때마다 올바른 선택을 할 수 있도록 이끌어주신 순천향대 김완중 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

감사의 글을 쓰면서 돌이켜보니 정말 많은 분들의 관심과 도움을 받으며 지내왔다는 생각이 듭니다. 실험을 하면서 어려움에 봉착할 때마다 아낌없는 조언과 함께 좋은 결과가 얻어질 수 있도록 도움을 주셨던 신영호 선생님, 유병기 선생님, 고시환 선생님, 정동룡 선생님, 최승룡 선생님, 김대원 선생님, 김준호 선생님께 감사드립니다. 또한 동료로서 때로는 친구로서 기쁨과 어려움을 함께 했던 안근재 박사님과 송정현 박사님께 감사드리고, 양희준 선생님, 장동수 선생님, 정원석 선생님, 원형선 선생님과 교실에서 함께 고생하고 함께 즐거워하던 다른 모든 분들께도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 지금의 제가 있을 수 있도록 변치 않는 믿음과 사랑으로 지켜봐 주시고 기도해 주셨던 어머니와 아버지, 모자란 사위에게 분에 넘치는 사랑과 믿음을 보여주신 장인어른과 장모님께 진심어린 감사와 사랑한다는 말씀 드리고 싶습니다. 그리고 지금껏 힘든 길이지만 사랑과 믿음으로 함께한 인생의 동반자이며 언제나 편안한 안식처가 되어준 나의 사랑하는 아내, 그리고 나의 삶에 활기를 주는 사랑스런 첫째 수정이와, 둘째 수호에게도 언제나 함께 있어주지 못함을 이해해 주길 바라면서 고맙고 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다.

저자 씀

차 례

그림 및 표차례	iii
국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	8
1. 실험동물 및 DEHP 투여	8
2. 체중 측정 및 표본 적출	9
3. 광학현미경 표본 제작	9
4. 전자현미경 표본 제작	10
5. 면역조직화학염색	10
6. 정세관 직경 측정 및 inhibin subunit antibody에 대한 양성반응 정세관 수의 관찰	11
7. 혈청 내 호르몬 농도 측정	12
8. 통계 분석	12
III. 결과	13
1. Corn oil이 실험결과에 미치는 영향	13
2. 체중 및 정소 무게 측정 결과	13
가. DEHP가 체중증가에 미치는 영향	13
나. DEHP가 정소 발육에 미치는 영향	14
3. DEHP가 정소조직의 형태에 미치는 영향	15
4. DEHP가 정세관 직경에 미치는 영향	17
5. DEHP가 정세관 내 생식세포 및 Sertoli cell의 미세구조적 형태에 미치는 영향	18
6. DEHP가 혈청 내 FSH, testosterone, Inhibin B의 농도에 미치는 영향	22
가. FSH	22

나. testosterone	23
다. Inhibin B	24
7. DEHP가 정소 조직 내 inhibin subunit의 발현 및 분포양상에 미치는 영향	25
8. DEHP가 정소 조직 내 inhibin subunit에 양성 반응을 보이는 정세관의 비율에 미치는 영향	28
IV. 고찰	31
V. 결론	37
참고문헌	39
영문요약	49

그림 차례

- 그림 1. DEHP 투여 후 나타나는 정소 조직의 형태학적
특징 변화 16
- 그림 2. DEHP 투여 종료 후 2주간 회복사육 한 수컷
흰쥐의 정소 형태변화 16
- 그림 3. DEHP 투여 후 정세관 내 Sertoli cell과 생식
세포들의 미세구조적 특징 변화 20
- 그림 4. DEHP 투여 종료 후 2주간 회복사육 한 수컷
흰쥐 정소의 미세구조적 특징 변화 21
- 그림 5. DEHP 투여 후 정소 조직 내 inhibin α
subunit의 분포와 발현량의 변화 25
- 그림 6. DEHP 투여 종료 후 2주간 회복사육 한 수컷
흰쥐의 정소 내 inhibin α subunit의 분포 및
발현량의 변화 26
- 그림 7. DEHP 투여 후 정소 조직 내 inhibin β B
subunit의 분포와 발현량의 변화 27

그림 8. DEHP 투여 종료 후 2주간 회복사육 한 수컷
흰쥐의 정소 내 inhibin β B subunit의 분포 및
발현량의 변화 28

표 차례

표 1. DEHP가 흰쥐 체중증가에 미치는 영향	14
표 2. DEHP가 정소 발육에 미치는 영향	15
표 3. DEHP 투여가 정세관 직경에 미치는 영향	17
표 4. DEHP가 혈청 내 FSH 농도에 미치는 영향	22
표 5. DEHP가 혈청 내 testosterone 농도에 미치는 영향	23
표 6. DEHP가 혈청 내 inhibin B 농도에 미치는 영향 ...	24
표 7. DEHP가 정소 조직 내 inhibin α subunit 양성반응 정세관의 비율에 미치는 영향	29
표 8. DEHP가 정소 조직 내 inhibin β B subunit 양성반응 정세관의 비율에 미치는 영향	30

국문 요약

Di-(2-ethylhexyl)phthalate가 흰쥐 Sertoli cell의 구조와 기능에 미치는 영향

내분비 장애물질의 하나인 Di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)는 정소에 특이적 독성작용을 나타내며, 그 효과는 주로 testosterone 합성과 이와 연관된 Leydig 세포에 대한 영향을 위주로 분석되어 왔다. 그러나 정자가 성숙 및 분화되어가는 과정, 즉 정자형성과정에는 testosterone 뿐만 아니라 Sertoli 세포의 물리적 지지와 분화유도 등의 과정이 필요하다. 이에 본 연구자들은 DEHP가 정소에 특이적 독성작용을 나타내는 기전에는 Sertoli 세포의 기능을 저해하는 부분을 고려해야 한다는 관점에서 이 연구를 시행하였다. 본 연구에서는 4주령 쥐에 매일 1g/kg 또는 3g/kg의 DEHP를 2주간 투여한 후, 정소의 무게, 세정관의 형태와 호르몬 분비의 변화를 관찰하고, Sertoli 세포의 미세구조 변화와 Sertoli 세포에서 합성되는 inhibin B의 농도 및 inhibin subunit의 분포변화를 관찰하였다. 또한 DEHP를 2주 동안 투여한 후, 투여를 중지한 시점으로부터 2주 동안 사육한 군에서 동일한 요소들을 분석하여 DEHP의 효과가 지속되는지의 여부를 비교하여 분석하였다.

DEHP 투여 후 체중은 변화하지 않았으나, 정소 발육을 심각하게 저해하였으며, 특히 정세관의 위축과 함께 생식세포의 손상과 간질조직 및 Leydig 세포의 증가를 유발하였으나, 정세관에 있는 Sertoli 세포의 수와 형태는 유지되었다. 생식세포에 미치는 DEHP의 영향은 특히 정세관 기저부에 위치한 정원세포와 정모세포의 미세구조가 손상되는 것으로 나타났다. Sertoli 세포의 경우는 내부의 세포소기관은 감소하였으나 생식세포를 지지하는 구조인 연접복합체에는 크게 영향을 미치지 않았다. DEHP 투여에 의한 이러한 변화 양상들은 DEHP의 투여 종료 후에도 유지되거나 더 진행되는 것으로 나타났다. DEHP를 투여하여도 Testosterone의 농도가 변화하지 않는 결과는 생식세포의 손상이 관찰되는 것과는 상반되는 결과였다. Testosterone은 DEHP 투여를 종료하고 2주간 사육한 그룹에서는 대조군에 비해 낮은 농도를 보였다. Follicle stimulating hormone(FSH)은 DEHP를 투여할 경우 농도의존적으로 증가하였으며, 투여를 중단한 후에는 감소하기는 하나 저농도군에서만 정상 수준으로 회복된 결과를 보였으며, FSH가 정상으로 회복되는

결과와는 달리 생식세포의 손상은 지속적으로 나타났다.

Inhibin B는 DEHP를 투여할 경우 농도 의존적으로 급격히 감소하며 투여를 중단한 후에도 감소하는 양상은 지속되었다. 정상 정세관에서 Inhibin의 α -subunit는 정세관 기저부의 Sertoli 세포와 정원세포, 정모세포에서 강한 양성반응을 보였으며, β B-subunit는 Sertoli 세포에만 특이적으로 양성반응을 보였다. DEHP를 투여할 경우 inhibin α -와 β B-subunit에 양성반응을 보이는 정세관의 수도 감소하였으며, 양성반응을 나타내는 세포의 수도 감소하는 경향을 보였고 DEHP 투여를 중단한 후에도 이 변화는 유지되었다.

이상의 결과로 볼 때, DEHP의 효과는 이미 알려진 바와 같이 Leydig 세포의 비정상적인 증식을 유도하고 testosterone과 FSH의 농도에 영향을 미치는 것만으로는 설명할 수 없었으며, Sertoli 세포가 생식세포를 물리적으로 지지하는 기능에는 영향을 미치지 않으나, Sertoli 세포가 inhibin의 subunit를 합성하는 능력을 저하시킴으로서 inhibin B의 농도가 감소되어 정자형성 과정에 장애를 주는 것이 정소 특이적 독성 작용의 중요한 기전의 하나인 것으로 생각한다.

핵심되는 말 : Di-(2-ethylhexyl)phthalate, 정소, 생식세포, testosterone, FSH, inhibin B, sertoli 세포

Di-(2-ethylhexyl)phthalate가 흰쥐 Sertoli cell의 구조와 기능에 미치는 영향

<지도교수 이 혜 연>

연세대학교 대학원 의과학과

길 영 천

I. 서론

생체호르몬의 합성, 수송, 분비, 작용 등을 방해하는 물질을 내분비 장애물질 또는 환경호르몬이라 한다. 대부분의 내분비 장애물질들은 다이옥신, polychlorinated biphenyl(PCB), 농약과 같은 환경오염 물질들이며 다양한 경로를 통해 인체 내로 유입된다.

내분비 장애물질로 알려진 Di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)는 플라스틱 제품의 가소제, polyvinyl chloride(PVC) 제품의 첨가제 등으로 사용되는 물질이다. DEHP의 국내 유통량은 20만 톤 이상이며 이러한 유통량은 현재 국내에서 사용되고 있는 내분비 장애물질들 중 가장 많은 양이다. 또한 DEHP는 혈액보관용기, 일회용 의료장비, 수술 장갑, 포장지, 포장필름, 인형, 장난감, 비옷, 정원호스, 식탁보, 음식보관용기, 바닥타일 등 일상생활과 밀접한 제품들에 널리 사용되고 있어 인체에 노출될 가능성이 매우 높은 물질이다.

실제로 우유, 유제품 및 유아용 분유에 함유된 DEHP의 양을 조사한 결과 낮게는 약 10~30 μ g/kg, 높게는 약 40~140 μ g/kg의 DEHP가

검출되었다는 보고가 있으며¹, 유아식 포장 용기를 대상으로 DEHP의 함유 여부와 음식물로의 용출 검사를 실시한 결과 대부분의 포장용기에서 DEHP가 검출되었고 0.33~3.5 $\mu\text{g}/\text{sample}$ 의 DEHP가 포장용기에서 음식물로 용출되었다는 보고도 있다². 식품용기의 뚜껑을 대상으로 한 연구에서는 조사대상 중 약 12% 정도의 제품에서 DEHP가 검출되었고 이들 제품의 내용물로 DEHP가 용출되는 것으로 알려졌다^{3,4}. 또한 PET(polyethylene terephthalate)에 9개월 보관한 물을 조사한 결과 DEHP가 검출되었으며⁵, 의료용으로 사용되는 PVC line을 대상으로 조사한 결과 27 $^{\circ}\text{C}$ 에서 422.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 33 $^{\circ}\text{C}$ 에서 540.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 DEHP가 용출되는 것으로 보고되었다^{6,7}.

미국 FDA(Food and Drug Administration)에서는 신생남아에 대한 DEHP의 일일 허용기준치(TDI, Tolerable Daily Intake)를 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 로 규정하고 있으나⁸, DEHP의 함량 및 용출량에 대한 연구결과들과 TDI를 비교해 볼 때 일상생활에서 DEHP에 노출되는 양과 빈도는 상당한 위험 수준임을 알 수 있다.

체내에 유입된 DEHP는 약 50%만 위장관에서 흡수되며⁹, lipase에 의해 가수분해 되어 2-ethylhexanol 또는 mono-(2-ethylhexyl)-phthalate의 형태로 변환되거나 DEHP의 형태로 흡수된다. 흡수된 DEHP는 α 또는 β -산화과정을 거쳐 몇몇 종류의 대사체로 변환되는데, 이 과정에서 형성되는 주요 대사체로는 mono-(2-ethyl-hexyl)-phthalate, 2-ethyl-5-hydroxyhexylphthalate, [2-(carboxymethyl)-hexyl]phthalate, 2-ethyl-5-carboxypentylphthalate, 2-ethyl-5-oxyhexylphthalate를 들 수 있으며, 인체 내에 흡수된 DEHP의 약 67%는 24시간 이내에 주요 대사체의 형태로 변환되어 소변으로 배출된다⁵¹.

생체 내에 유입된 DEHP는 동물과 사람에서 유사한 독성효과를 나타내는 것으로 알려져 있다¹⁰. DEHP에 노출시킨 암컷 송사리(Japanese Medaka)의 경우 난소 내 성숙 난모세포의 수가 감소하였

으며¹¹, 수컷 돼지에 DEHP를 경구 투여할 경우 luteinizing hormone(LH)과 testosterone의 합성이 감소하는 것으로 보고된 바 있다^{12,13}. 또한 DEHP에 노출된 암컷 흰쥐에서는 granulosa cell 내의 peroxisome-proliferator activated receptor를 활성화 시켜 aromatase의 transcription을 감소시키고 이로 인해 estradiol의 합성이 감소되는 현상이 나타나며¹⁴, 임신 중인 흰쥐에 DEHP를 투여할 경우 fetal testis에서 생식세포의 퇴화와 Leydig 세포의 증가현상과 embryonic Zinc homeostasis에 중요한 유전자들인 metallothionein-I, metallothionein-II, zinc transporter-I 등의 발현이 감소하는 것으로 알려져 있다^{15,16,17}. 이밖에도 DEHP는 체중 감소의 원인이 되며¹⁸, 간과 부속생식선의 무게를 증가시키거나 암을 유발하는 등 체내 다양한 장기에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다^{19,20}.

DEHP가 독성작용을 나타내는 장기들 중 가장 심각한 영향을 받는 것으로 알려진 장기는 남성생식기관인 정소이다. 정상남성과 불임남성을 대상으로 한 연구결과에 따르면 정상 남성에 비해 불임 남성의 정액에서 DEHP의 농도가 높게 측정되었으며²¹, DEHP에 노출될 경우 정자의 운동성이 감소하고 정자의 형태이상을 유발하는 것으로 보고된 바 있다²². 뿐만 아니라 DEHP는 정세관의 직경을 감소시키고 정소의 위축을 유발하며²³, 정세관내에 위치한 생식세포들의 사멸을 초래하는 것으로 알려져 있다^{24,25,26,27,28,29}. DEHP가 testosterone 및 LH의 합성을 저해하고^{30,31,32,33,34}, 그 기전으로는 aromatase, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase I, hydroxysteroid dehydrogenase 3b5, hydroxysteroid dehydrogenase 3b4와 같은 효소들의 활성변화로 나타난다는 보고들이 있으며³⁵, 이를 DEHP의 정소 특이적 독성작용의 원인으로 설명하는 연구가 많으나, 일부 연구에서는 DEHP에 노출되면 체내 testosterone 및 LH가 증가한다는 것도 보고되어 있다^{36,37}.

이와 같이 DEHP에 대한 노출량과 노출경로, 영향을 미치는 생체 기관과 독성작용의 결과들에 대해서는 많은 연구들이 있어왔으나 정

자형성과정에 관여하는 많은 요인 중 Leydig 세포의 기능을 교란시킨다는 점이 밝혀진 것 외에는 그 작용기전을 명확히 설명하는 연구결과는 아직 없다. 그러나 실제로 DEHP가 정자형성과정에 미치는 영향을 제대로 이해하기 위해서는 testosterone을 합성하는 Leydig 세포에 대한 작용 외에도 직접 생식세포와 접하고 있으면서 이들을 외부환경으로부터 차단하고 분화 및 성숙에 필요한 물질과 호르몬을 공급하는 역할을 하는 Sertoli 세포에 대한 DEHP의 영향이 간과되어서는 안 될 것이다.

Sertoli 세포는 생식세포에 필요한 lactate, transferrin, androgen binding protein과 더불어 transforming growth factor- α , transforming growth factor- β , insulinlike growth factor-I, epidermal growth factor와 같은 성장조절인자들을 공급하는 역할을 한다. 또한 mullerian-inhibiting substance, inhibin, activin 등의 hormone의 합성을 통해 정소가 정상적으로 발육하고 정소 내에서 원활한 정자형성 과정이 일어나도록 하는 역할을 한다³⁸. Leydig 세포에서 합성 분비되는 testosterone과 함께 Sertoli 세포의 기능을 조절하는 대표적 호르몬인 follicle-stimulating hormone(FSH)는 뇌하수체에서 분비되며 Sertoli 세포에 존재하는 G protein-coupled receptor와 결합하여 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)를 활성화시킨다. FSH에 의해 증가된 cAMP는 하위에 있는 protein kinase A(PKA), mitogen-activated protein(MAP) kinase, calcium channel, phosphoinositol 3 kinase (PI3K), phospholipase A2(PLA2)의 활성을 변화시킴으로써 transcription factor 활성화와 세포 내 칼슘이온 농도를 증가시키며 lactate와 transferrin 및 inhibin의 합성을 증가시키는 역할을 한다³⁹.

Sertoli 세포에서 합성, 분비되는 물질 중 inhibin과 activin은 glycoprotein hormone으로써 뇌하수체에서 FSH의 분비를 조절하며 정자형성과정과도 밀접한 관계를 갖고 있는 것으로 알려져 있다⁴⁰. Inhibin 과 activin은 두 개의 subunit가 disulfide bridge에 의해 결합

하여 형성된다. 이들을 구성하는 세 개의 subunit는 α , βA , βB 이며 그 조합에 따라 명칭과 기능이 달라진다. Inhibin은 한 개의 α subunit와 β subunit가 결합하여 형성되며 inhibin A(α 와 βA)와 inhibin B(α 와 βB)의 두 종류가 있다. 남성에서 Inhibin A는 태아시기에 많이 발현되나 출생 후 급감하여 이후에는 inhibin B가 주로 합성, 분비된다. Inhibin B는 체내에서 FSH에 대한 음성되먹임작용을 통해 FSH의 분비를 조절하는 기능과 함께 생식세포의 분화와 성숙에 중요한 역할을 하는 호르몬으로 알려져 있다⁴¹. 최근 보고된 비정상적 정자형성 및 Sertoli cell Only Syndrom(SOC)을 가진 수컷 흰쥐에서 정상에 비해 체내 inhibin B의 농도가 낮다는 연구결과는 inhibin B가 Sertoli 세포의 기능과 밀접한 관련이 있고 병적인 상태의 정소와 정상 상태의 정소를 구분하는 지표 물질로서 매우 유용하게 쓰일 수 있다는 것을 보여준다⁴². Activin은 두 개의 β subunit가 결합하여 형성되며 activin A(βA 와 βA), activin B(βB 와 βB), activin AB(βA 와 βB)의 세 종류가 있다. 이중에서 체내에서 FSH에 대한 양성되먹임작용을 통해 FSH의 분비를 조절하는 것은 activin A로 알려져 있으며 inhibin B의 합성 및 분비와도 관련이 있는 것으로 알려져 있다³⁸.

이에 본 연구에서는 DEHP가 개체의 성숙과 정소의 발육에 미치는 영향은 물론 이에 관련된 호르몬(FSH, testosterone)의 분비와 정자의 발달과 성숙에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 Sertoli 세포의 형태 및 미세구조에 미치는 영향 및 inhibin B의 합성 및 분비에 미치는 영향을 조사함으로써 DEHP의 정소 특이적 독성작용의 명확한 작용기전을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 DEHP 투여

생후 4주일 된 Sprague-Dawley 계통의 수컷 흰쥐 70마리를 사용하였으며 모두 7개 군으로 무작위 선택한 뒤 군별로 나누어 사육하였다. Di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP, Sigma-aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA; M.W. 390.6, LD50; 30g/kg)는 corn oil(Sigma-aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)에 용해하여 구강으로 삼관투여 하였다. DEHP와 corn oil의 희석비율은 각 군별로 결정된 투여농도에 적합한 비율로 희석하였으며 개체 당 1회 투여량이 0.5ml이 되도록 하였다. 투여농도 및 사육방법에 따른 각 군의 분류는 다음과 같다.

가. DEHP 처리군

(1). 정상대조군-A(N-tr)

아무것도 투여하지 않은 군. 실험시작 2주째에 희생시킴.

(2). 실험대조군(S)

corn oil만을 2주간 투여한 군.

(3). 저농도 투여군(1g-tr)

corn oil에 DEHP를 용해하여 1g/kg/day의 농도로 2주간 투여한 군.

(4). 고농도 투여군(3g-tr)

corn oil에 DEHP를 용해하여 3g/kg/day의 농도로 2주간 투여한 군.

나. DEHP 처리 후 회복군

(1). 정상대조군-B(N-re)

아무것도 투여하지 않은 군. 실험시작 4주째에 희생시킴.

(2). 저농도 투여 후 회복군(1g-re)

corn oil에 DEHP를 용해하여 1g/kg/day의 농도로 2주간 투여한 후, 투여를 중지하고 2주간 정상적으로 사육한 군.

(3). 고농도 투여 후 회복군(3g-re)

corn oil에 DEHP를 용해하여 3g/kg/day의 농도로 2주간 투여한 후, 투여를 중지하고 2주간 정상적으로 사육한 군.

2. 체중 측정 및 표본 적출

각각의 흰쥐는 매일 1회 동일한 시간에 체중을 측정하고 기록하였다. 실험 종료 후 각각의 흰쥐는 ethyl ether로 흡입 마취한 후 오른 심실에 심장천자를 실시하여 혈액을 채취하고 우측 정소의 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 혈청 내 호르몬 농도 분석을 위하여 4℃, 3000rpm에서 원심분리하여 혈청만을 분리한 후 -70℃에 냉동 보관하였다. 적출한 정소는 광학현미경, 전자현미경 표본제작을 위하여 각각 4% paraformaldehyde와 2% paraform-2% glutaraldehyde로 고정하였다.

3. 광학현미경 표본제작

조직학적 형태변화를 관찰하기 위하여 4% paraformaldehyde에 고정시킨 정소 조직을 광학현미경 표본으로 제작하였다. 고정된 조직을 수세하여 조직 내에 남아있는 고정액을 제거하였고 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 알코올과 두 번의 무수 알코올을 거치면서 농도 상승 순으로 탈수하였다. 완전히 탈수된 조직을 benzene을 이용하여 치환한 후 파라핀 침투 및 포매과정을 거쳐 파라핀블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록은 회전형 박질기를 이용하여 5 μ m 두께로 박질하고 hematoxylin과 eosin으로 이중염색한 후 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

4. 전자현미경 표본제작

미세구조의 변화를 관찰하기 위하여 2% paraform-2% glutaraldehyde에 고정시킨 조직을 이용하여 전자현미경 표본을 제작하였다. 전고정이 완료된 조직을 1% osmiumtetroxide(OsO_4) 용액으로 후고정한 후 0.1M phosphate buffer(pH 7.2)로 세척하였다. 이후 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 알코올과 두 번의 무수 알코올을 거치면서 농도 상승 순으로 탈수하였고 완전히 탈수된 조직을 propylene oxide로 치환하였다. NMA(nadic methyl anhydride), DDSA (dodeceny succinic anhydride), poly/bed 812 resin, DMP-30(2, 4, 6-tri(dimethyl aminomethyl))으로 조성된 epon 혼합액을 사용하여 침투 및 포매과정을 수행하였으며 35°C, 45°C, 60°C의 dry oven에서 온도상승 순으로 각각 12시간씩 열중합 시켰다. 제작된 epon 블록은 초박절편기로 60-70nm의 두께로 초박절편하였으며 제작된 절편은 uranyl acetate와 lead citrate 이중 염색하여 JEM1010 투과전자현미경(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)으로 관찰하고 사진촬영 하였다.

5. 면역조직화학염색

정소 조직 내 inhibin α subunit와 inhibin βB subunit의 분포양상과 발현정도를 알아보기 위하여 면역조직화학염색을 하였다. 파라핀 블록을 5 μm 두께로 박절하여 slideglass에 부착하였다. Xylene을 이용하여 탈 파라핀 과정을 거친 후 무수 알코올에서부터 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% 알코올과 0.1M phosphate buffered saline(PBS) pH7.2를 거치면서 흡수 시켰다.

Antigen retrieval을 위하여 citrate buffer(pH6.0)에서 30분간 heat retrieval 하였고 3% hydrogen peroxide로 내인성 peroxidase를 block한 후에 PBS를 이용하여 10분간 2회 세척하였다. 이 후 원활한 antibody penetration을 위하여 1% triton x-100 in PBS에 1시간 처리하였고 non-specific antibody binding을 막기 위하여 10% normal

goat serum(NGS)에 30분간 처리하였다.

1차 항체인 mouse anti-inhibin alpha(Serotec, Oxford, UK)는 1:50 비율로 5% NGS in PBS에 희석하여 4°C에서 18시간 반응시켰으며 anti-inhibin beta B(Serotec, Oxford, UK)는 1:25 비율로 5% NGS in PBS에 희석하여 4°C에서 18시간 반응시켰다. 이후 0.1% triton x-100 in PBS로 10분간 2회, PBS로 10분간 2회 세척하였고 2차 항체인 goat anti-mouse IgG(Dako, Glostrup, Denmark)에 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 1차 항체와 동일한 방법으로 세척하였고 extravidin peroxidase conjugate(Sigma-aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)에 1시간 동안 반응시켰다.

1차 항체와 동일한 방법으로 세척한 후 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)(Sigma-aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)로 발색하였다. 발색 완료 후 증류수로 세척하였고 50% 알코올에서부터 무수알코올까지 농도 상승 순으로 탈수하였다. 이후 xylene을 이용하여 치환한 후 balsam을 이용하여 봉입하였다.

6. 정세관의 직경 측정 및 inhibin subunit antibody에 대한 양성 반응 정세관 수의 관찰

각각의 실험군 개체에서 적출한 정소조직을 통상적 방법에 따라 파라핀 블록을 제작하고 5 μ m 두께로 100장의 연속절편을 제작하였다. 제작된 연속절편에서 다섯 개의 절편 당 한 개의 절편을 취해 일반적인 Hematoxylin-Eosin 염색법에 따라 염색한 후 광학현미경하에서 100배의 배율로 각기 다른 부위를 촬영 하였다. 절편 당 네 개의 부위를 촬영하였고 각각의 촬영된 부위에서 5개의 정세관을 무작위로 선택하여 정세관의 중심부를 지나는 최단거리를 영상분석 프로그램인 Optimas(version 6.1, media cybernetics Inc., silver spring, MD, USA)를 이용하여 측정하였다.

면역조직화학 염색을 위한 절편 또한 동일한 방법으로 제작하고 촬영하였으며, 각 촬영부위에서 양성반응을 보이는 정세관과 음성반응을 보이는 정세관의 수를 세었다.

7. 혈청 내 호르몬 농도 측정

FSH, testosterone, Inhibin B의 혈청 내 농도를 측정하기 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 시행하였다. FSH는 rat FSH ELISA kit (Biocode-Hycel, Liege, Belgium)를 이용하여 측정하였으며 testosterone과 Inhibin B는 각각 active testosterone EIA kit (Diagnostic System laboratories Inc., Webster, TX, USA)와 active Inhibin B ELISA kit(Diagnostic System laboratories Inc., Webster, TX, USA)를 이용하여 측정하였다. 각각의 호르몬을 측정하는 과정은 제조사에서 명시한 방법을 따라 시행하였으며 Thermomax microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하고 standard curve와 sample 에서의 농도를 측정하였다.

8. 통계 분석

모든 계측값 및 측정값을 SPSS 12.0 for windows(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. 체중과 정소의 무게 및 호르몬 농도는 각 개체에서 측정한 값을 통계분석하였으며, 정세관 직경과 inhibin subunit들에 양성반응을 보이는 정세관의 비율은 각 개체에서 측정한 값들의 평균값을 구한 후, 각각의 평균값 사이의 통계적 유의성을 검증하였다. 통계분석은 비모수 검증법인 Kruskal-Wallis 검정을 통해 각 군들의 유의성을 확인하였고 획득한 서열변수를 이용하여 One-way ANOVA 및 Tukey의 다중 t 검정을 실시하여 각 군사이의 유의도를 분석하였다.

III. 결 과

1. Corn oil이 실험결과에 미치는 영향

DEHP 투여 시 vehicle로 사용된 corn oil이 실험결과에 미치는 영향을 검증하기 위하여 corn oil 만을 투여한 실험대조군을 구성하여 아무것도 투여하지 않은 정상대조군의 실험 결과값을 비교한 결과 정상대조군과 실험대조군사이에 모든 측정값에서 통계적으로 유의한 차이점이 나타나지 않았다. 따라서 이후 언급 될 모든 결과에서 실험대조군에서 획득한 결과는 생략하였다.

2. 체중 및 정소 무게 측정결과

가. Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)가 체중증가에 미치는 영향

DEHP 투여 전과 후의 체중을 비교하여 DEHP가 흰쥐의 체중에 미치는 영향을 관찰하였다. 4주령 수컷 흰쥐를 무작위로 선택하여 구분한 각 군의 초기 체중을 측정한 결과 각 군간 체중의 차이는 없었다. 체중에 미치는 DEHP의 영향을 알아보기 위하여 4주령 수컷 흰쥐에 2주간 DEHP를 투여한 결과 저농도 투여군과 고농도 투여군 모두에서 6주령 정상대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으며 2주간의 DEHP 투여를 종료한 후 2주간 정상 사육한 실험군에서도 8주령의 정상대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(표 1).

표 1. Di-(2-ethylhexyl)phthalate가 흰쥐 체중¹증가에 미치는 영향

실험군 ²	실험 초기	2주간 DEHP 투여	DEHP 투여 종료 후 2주간 회복 사육
N-tr	118.4±8.9	240.8±20.3	-
DEHP 처리군			
1g-tr	112.4±7.0	229.5±12.1	-
3g-tr	116.7±10.6	216.0±30.9	-
DEHP 처리 후 회복군			
N-re	117.6±9.1	238.8±14.1	352.1±22.7
1g-re	113.3±9.8	224.3±16.6	332.7±14.8
3g-re	117.8±9.7	221.4±15.7	341.4±19.9

¹ 단위는 gram이고 그 값은 평균±표준편차로 나타냄

² 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 DEHP 처리군과 DEHP 처리 후 회복군으로 구분하였으며 각각의 군은 N-tr: 정상대조군(생후 6주에 희생시킴), 1g-tr: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여군, 3g-tr: DEHP를 2주간 3g/kg 매일 1회 투여군과 N-re : 정상대조군(생후 8주에 희생시킴), 1g-re: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군, 3g-re: DEHP를 3g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군으로 세분하였음. DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate

나. Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)가 정소 발육에 미치는 영향

DEHP가 정소 발육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각각의 실험군에서 오른쪽 정소의 무게를 측정하였다. 체중과 다르게 정소의 무게는 DEHP를 2주간 투여한 실험군 모두에서 6주령의 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며 이러한 정소 무게의 차이는 고농도군으로 갈수록 크게 나타났다. DEHP 투여로 인한 정소무게의 감소는 DEHP의 투여를 종료한 후 2주간의 회복기간을 거친 후에도 정상으로 회복되지 않았다(표 2).

표 2. Di-(2-ethylhexyl)phthalate가 정소 발육에 미치는 영향

DEHP 투여 농도	DEHP 처리군		DEHP 처리 후 회복군	
	실험군 ¹	정소 무게 ²	실험군	정소 무게
none treat	N-tr	1.03±0.06	N-re	1.45±0.10
1g/kg/day treat	1g-tr	0.87±0.18	1g-re	1.06±0.43**
3g/kg/day treat	3g-tr	0.41±0.09*	3g-re	0.49±0.08**

¹ 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 DEHP 처리군과 DEHP 처리 후 회복군으로 구분하였으며 각각의 군은 N-tr: 정상대조군(생후 6주에 희생시킴), 1g-tr: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여군, 3g-tr: DEHP를 2주간 3g/kg 매일 1회 투여군과 N-re : 정상대조군(생후 8주에 희생시킴), 1g-re: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군, 3g-re: DEHP를 3g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군으로 세분하였음.

² 오른쪽 정소의 무게를 측정된 값이며 단위는 gram이다. 측정값은 평균±표준편차로 표시하였다.

* N-tr에 비하여 p<0.01, ** N-re에 비하여 p<0.01

DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate

3. Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)가 정소조직의 형태에 미치는 영향

광학현미경을 이용하여 정소 조직을 관찰한 결과 대조군에서는 정세관들이 매우 조밀하게 분포하고 있었으며 정세관 사이의 간질조직에 Leydig 세포들이 소수 분포하고 있었다. 생식세포 및 Sertoli 세포들은 정세관 내에서 두터운 층을 이루며 분포하고 있었다. 이에 반해 저농도 투여군에서는 정세관 사이의 간질조직이 넓어진 부위가 나타나고 Leydig 세포가 증가하는 경향을 보이며 일부 정세관에서 생식세포들이 소실되는 현상이 나타났다. 이러한 증상은 고농도 투여군에서는 더욱 심각하게 나타났다. 대부분의 정세관에서 생식세포가 괴사하여 Sertoli 세포만 확인되었으며, Leydig 세포가 과도하게 증가하고 덩어리져 분포하는 형태를 보였다(그림 1). DEHP 투여 후 나타나는

정소 조직의 형태변화는 DEHP 투여 종료 후 2주간의 회복기간에도 불구하고 변화가 없었으며 오히려 저농도 투여 후 회복군에서는 손상의 정도가 더 심해지는 경향을 보였다(그림 2).

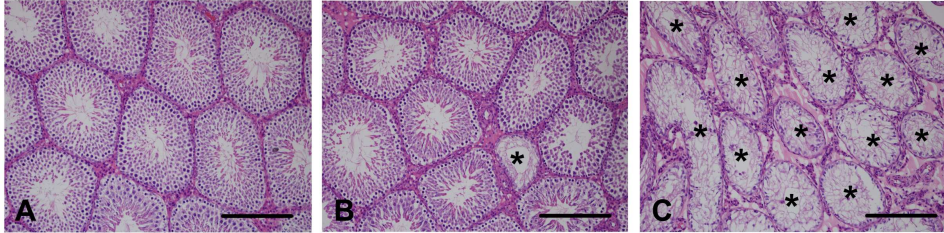


그림 1. Di-(2-ethylhexyl)phthalate 투여 후 나타나는 정소 조직의 형태학적 특징 변화. 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)에 2주간 DEHP를 투여한 후 6주령 대조군과 비교하였음. A: 6주령 정상대조군(N-tr), B: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여군(1g-tr), C: DEHP를 2주간 3g/kg 매일 1회 투여군(3g-tr). 적출한 정소를 두께 5 μ m의 파라핀 절편으로 제작하여 Hematoxylin-Eosin 염색을 실시하였음. 1g/kg 투여군에서 정세관의 위축이 나타나기 시작하며 간질조직의 증가가 나타났다. 3g/kg 투여군에서는 대부분의 정세관이 손상되어 위축된 것을 관찰할 수 있었다.

*: 생식세포의 피사로 인해 위축된 정세관, DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate (scale bar = 100 μ m)

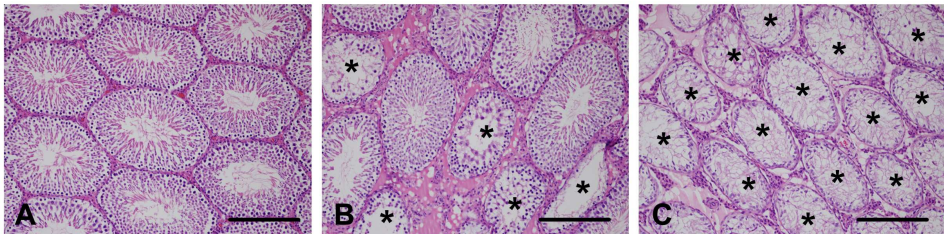


그림 2. Di-(2-ethylhexyl)phthalate 투여 종료 후 2주간 회복사육 한 수컷 흰쥐의 정소 형태변화. 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)에 2주간 DEHP를 투여한 후 2주간 사육한 실험군과 8주령의 대조군을 비교하였음. A: 8주령 정상대조군(N-re), B: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군(1g-re), C: DEHP를 3g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군(3g-re). 적출한 정소를 두께 5 μ m의 파라핀 절편으로 제작하여 Hematoxylin-Eosin 염색을 실시하였음. DEHP의 투여를 종료한 후 2주간 회복사육한 후에도 정소조직의 손상은 변화가 없었으며 오히려 저농도 투여군에서는 정세관의 손상이 증가하는 현상을 보였다.

*: 생식세포의 피사로 인해 위축된 정세관, DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate (scale bar = 100 μ m)

4. Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)가 정세관 직경에 미치는 영향

2주 동안 DEHP를 투여한 후 정세관 직경을 측정된 결과 저농도 투여군에서는 대조군과 비교하여 별다른 차이를 보이지 않았으나 고농도 투여군에서는 정세관의 직경이 유의하게 감소하였다. DEHP 투여 종료 후 2주 동안 정상 사육한 결과 대조군은 직경이 증가한 데 반해 저농도 및 고농도 투여군은 별다른 변화가 없었다(표 3).

표 3. Di-(2-ethylhexyl)phthalate 투여가 정세관 직경에 미치는 영향

DEHP 투여농도	DEHP 처리군		DEHP 처리 후 회복군	
	실험군 ¹	정세관 직경 ²	실험군	정세관 직경
none treat	N-tr	111.3±9.3	N-re	128.6±11.9
1g/kg/day treat	1g-tr	117.2±12.4	1g-re	109.0±16.6**
3g/kg/day treat	3g-tr	73.8±5.8*	3g-re	78.7±5.1**

¹ 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 DEHP 처리군과 DEHP 처리 후 회복군으로 구분하였으며 각각의 군은 N-tr: 6주령 정상대조군, 1g-tr: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여군, 3g-tr: DEHP를 2주간 3g/kg 매일 1회 투여군과 N-re : 8주령 정상대조군, 1g-re: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군, 3g-re: DEHP를 3g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군으로 세분하였음.

² 정세관의 중심을 지나는 최단거리를 측정된 값으로 평균±표준편차로 표시하였으며 단위는 μm 이다.

* N-tr에 비하여 $p < 0.01$, ** N-re에 비하여 $p < 0.01$

DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate

5. Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)가 정세관 내 생식세포 및 Sertoli 세포의 미세구조적 형태에 미치는 영향

4주령 수컷 흰쥐에 2주간 DEHP 투여 후 정세관을 구성하는 세포들의 미세구조 변화를 6주령 정상대조군과 비교 관찰하였다. 6주령 정상대조군에서는 기저부에 Sertoli 세포와 정원세포가 위치하고 정세관의 내강 쪽으로 갈수록 점차 성숙된 정모세포와 정세포 및 정자들이 위치하고 있었다. Sertoli 세포의 핵은 타원의 형태를 가지며 진 염색질이 고르게 분포하고 있었고 구형의 뚜렷한 핵인이 존재하였다. 세포질 내에는 관상의 cristae를 갖는 미토콘드리아가 다수 존재하고 리보솜과 소포체, 인접세포들과의 연결복합체(junctional complex)들이 고르게 발달한 형태를 갖고 있었다.

이에 반해 저농도 투여군에서는 기저부에 위치한 정원세포가 기저막으로부터 분리되는 현상이 나타나고 정모세포의 괴사현상이 나타났다. 그러나 정세포의 경우 정상적인 형태를 유지하고 있으며 sertoli 세포의 핵과 세포질내의 세포소기관 및 연결복합체들도 정상적인 형태를 유지하고 있었다. 고농도 투여군의 경우 생식세포가 대부분 소실된 것을 볼 수 있으며 Sertoli 세포의 경우 핵 내에 이질염색질이 증가하고 세포질 내에 세포소기관들이 감소하는 경향을 보이나 연결복합체들은 여전히 잘 발달되어 있었다(그림 3).

4주령 수컷 흰쥐에 2주간 DEHP를 투여한 후 2주간 정상적 사육한 이후에 8주령 정상대조군의 미세구조적 형태와 비교 관찰하였다. DEHP를 투여하였던 실험군의 경우 2주간의 회복사육기간에도 불구하고 2주간 DEHP를 투여한 후 즉시 희생시킨 실험군에서 나타나는 미세구조적 형태변화 양상이 동일하게 나타났다. 저농도 투여군의 경우 Sertoli 세포의 세포질 내에 지질 방울과 공포(vacuole)가 대조군에 비해 증가하였고, 정원세포는 기저막으로부터 분리되거나, 타원형 또는 불규칙한 형태의 핵을 갖고 있었으며, 염색질이 심하게 응축되어 있는 것이 관찰되었다. 정모세포의 경우, 세포 괴사현상의 특징인, 핵막 및 세포막의 붕괴현상과 세포소기관의 소실이 관찰되었다. 그러나

정세포의 경우, 대조군과 비교하여 주목할 만한 미세구조적 형태변화가 관찰되지 않았으며, Sertoli 세포들 간에 형성된 연접복합체 또한 정상적인 형태를 유지하고 있었다. 고농도 투여군의 정세관을 관찰한 결과, 정세관 내에서 거의 대부분의 생식세포가 소실되어 Sertoli 세포만이 관찰 되었으며, Sertoli 세포는 불규칙한 형태의 핵이 관찰되고, 세포질 내에는 다수의 공포와 지질방울이 관찰 되었다. 연접복합체는 Sertoli 세포 사이에 고르게 발달되어 있었으나, 그 형태는 정상대조군에 비해 불규칙한 형태를 보였다(그림 4).

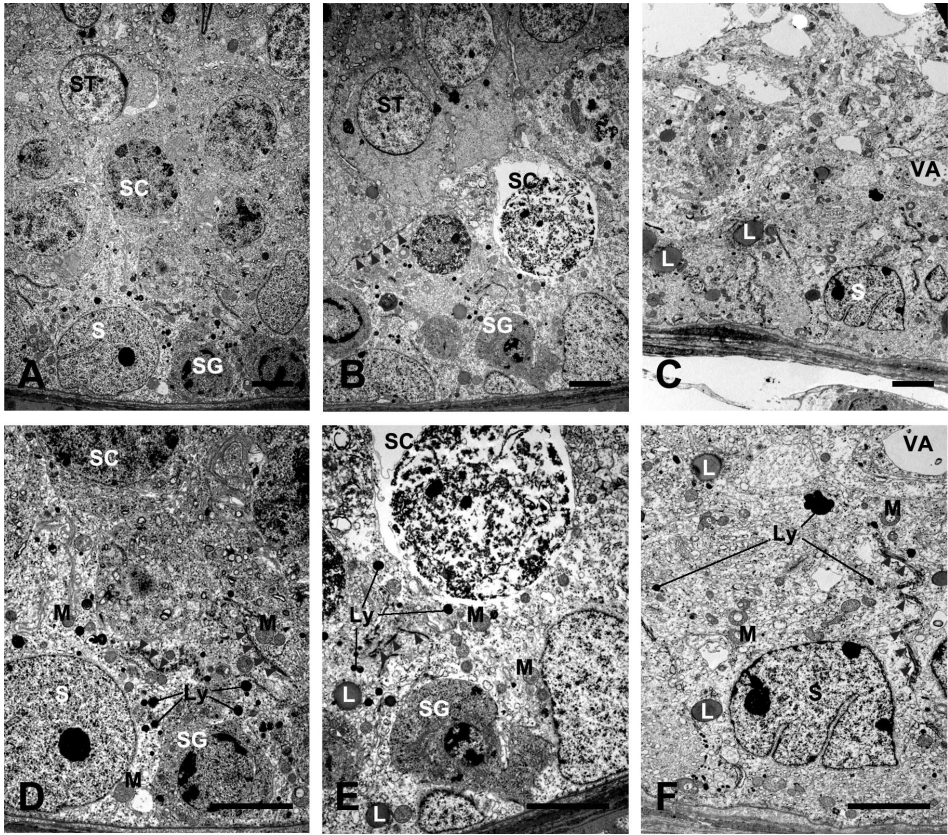


그림 3. Di-(2-ethylhexyl)phthalate 투여 후 정세관 내 Sertoli 세포와 생식세포들의 미세구조적 특징 변화. 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)에 2주간 DEHP를 투여한 후 6주령 대조군과 비교하였음. A, D: 6주령 정상대조군(N-tr), B, E: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여군(1g-tr), C, F: DEHP를 2주간 3g/kg 매일 1회 투여군(3g-tr). 적출한 정소를 두께 60nm의 초박 절편으로 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색을 실시하였음. 각각의 사진에서 아래쪽은 기저막 부위이며 위쪽은 정세관의 내강에 인접한 부위임. 위쪽 세 개의 사진은 저배율 사진이며 아래쪽 세 개의 사진은 동일부위의 고배율 사진임. 1g/kg 투여군에서 정원세포가 기저막으로부터 분리되는 현상과 정모세포 특이적 세포 괴사현상이 나타남. 정세포의 경우 DEHP 투여 후에도 크게 손상받지 않는 것이 관찰됨. 3g/kg 투여군에서는 대부분의 생식세포가 손실되어 정세관 내에 Sertoli 세포만이 존재하는 것을 볼 수 있었음.

S: Sertoli 세포, SG: 정원세포, SC: 정모세포, ST: 정세포, M: 미토콘드리아, VA: 공포(vacuole) Ly: 리소좀(lysosome), L: 지방적(lipid drop), 화살표머리: 연결복합체, DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate

(scale bar = 5,000nm)

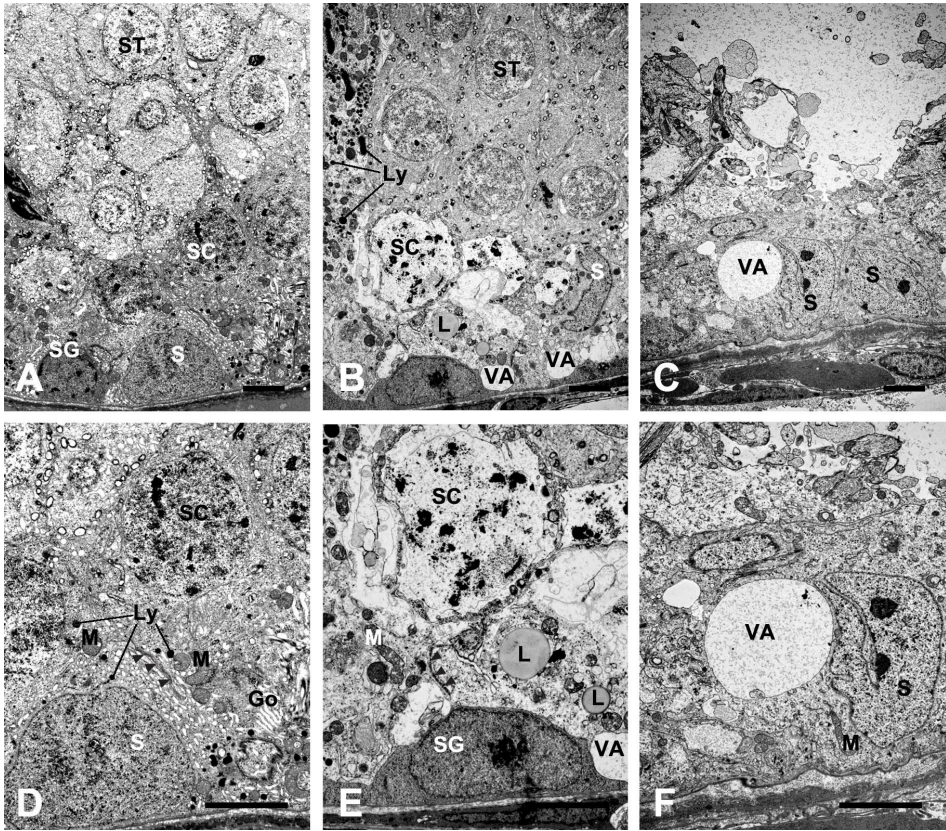


그림 4. Di-(2-ethylhexyl)phthalate 투여 종료 후 2주간 회복사육 한 수컷 흰쥐 정소의 미세구조적 특징 변화. 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)에 2주간 DEHP를 투여한 후 2주간 사육한 실험군과 8주령의 대조군을 비교하였음. A, D: 8주령 정상대조군(N-re), B, E: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군(1g-re), C, F: DEHP를 3g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군(3g-re). 적출한 정소를 두께 60nm의 초박 절편으로 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색을 실시하였음. 각각의 사진에서 아래쪽은 기저막 부위이며 위쪽은 정세관의 내강에 인접한 부위임. 위쪽 세 개의 사진은 저배율 사진이며 아래쪽 세 개의 사진은 동일부위의 고배율 사진임. DEHP를 1g/kg 투여하였던 군에서 2주간의 회복사육에도 불구하고 지속적인 정모세포 특이적 괴사현상이 나타남.

S: Sertoli 세포, SG: 정원세포, SC: 정모세포, ST: 정세포, M: 미토콘드리아, VA: 공포(vacuole) Ly: 리소좀(lysosome), L: 지방적(lipid drop), 화살표머리: 연결복합체, DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate

(scale bar = 5,000nm)

6. Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)가 혈청 내 follicle stimulating hormone (FSH), testosterone, Inhibin B의 농도에 미치는 영향

가. FSH

표 4. Di-(2-ethylhexyl)phthalate가 혈청 내 follicle stimulating hormone 농도에 미치는 영향

DEHP 투여 농도	DEHP 처리군		DEHP 처리 후 회복군	
	실험군 ¹	FSH 농도 ²	실험군	FSH 농도
none treat	N-tr	2.57±0.91	N-re	3.23±2.48
1g/kg/day treat	1g-tr	6.05±2.23*	1g-re	4.03±1.38
3g/kg/day treat	3g-tr	13.72±4.76*	3g-re	6.70±3.66**

¹ 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 DEHP 처리군과 DEHP 처리 후 회복군으로 구분하였으며 각각의 군은 N-tr: 6주령 정상대조군, 1g-tr: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여군, 3g-tr: DEHP를 2주간 3g/kg 매일 1회 투여군과 N-re : 8주령 정상대조군, 1g-re: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군, 3g-re: DEHP를 3g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군으로 세분하였음.

² 단위는 ng/ml이며 평균±표준편차로 표시하였다.

* N-tr에 비하여 p<0.05, ** N-re에 비하여 p<0.05

DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate, FSH: follicle stimulating hormone

DEHP가 혈청 내 FSH의 농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 4주령 수컷 흰쥐에 2주간 DEHP를 투여한 후 6주령 정상대조군과 혈청 내 FSH의 농도를 비교한 결과, 정상대조군은 약 3ng/ml의 농도를 보였으나 저농도 투여군에서는 6.05ng/ml로 두 배 정도 증가하였고 고농도 투여군에서는 13.72ng/ml로 크게 증가하였다. 그러나 DEHP투여 종료 후 2주간 정상사육한 군과 8주령 정상대조군의 혈청 내 FSH의 농도를 비교한 결과 저농도로 DEHP를 투여 하였던 군에서는 8주

령의 정상대조군과 비슷한 수준으로 감소하였으며 고농도로 투여하였던 군에서는 정상대조군에 비해 약 2배정도의 농도로 감소하는 현상을 보였다(표 4).

나. testosterone

혈청 내 testosterone의 농도를 측정한 결과 6주령 정상대조군과 2주 동안 DEHP를 투여한 군 모두에서 약 3.5ng/ml로 동일한 농도를 보였다. 그러나 8주령 정상대조군에서는 14.72ng/ml로 6주령 정상대조군에 비해 testosterone 농도가 크게 증가하는데 반해 2주 동안 DEHP를 투여한 후, 투여 종료 시점으로 부터 2주간 회복사육한 군에서는 testosterone의 농도가 증가하지 못하고 약 5ng/ml 정도의 낮은 농도를 유지하는 것을 확인하였다.(표 6).

표 5. Di-(2-ethylhexyl)phthalate가 혈청 내 testosterone 농도에 미치는 영향

DEHP 투여 농도	DEHP 처리군		DEHP 처리 후 회복군	
	실험군 ¹	testosterone 농도 ²	실험군	testosterone 농도
none treat	N-tr	3.56±1.16	N-re	14.72±3.85 [†]
1g/kg/day treat	1g-tr	3.50±1.15	1g-re	5.07±1.67 [*]
3g/kg/day treat	3g-tr	3.52±2.18	3g-re	4.09±2.13 [*]

¹ 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 DEHP 처리군과 DEHP 처리 후 회복군으로 구분하였으며 각각의 군은 N-tr: 6주령 정상대조군, 1g-tr: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여군, 3g-tr: DEHP를 2주간 3g/kg 매일 1회 투여군과 N-re : 8주령 정상대조군, 1g-re: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군, 3g-re: DEHP를 3g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군으로 세분하였음.

² 단위는 ng/ml이며 평균±표준편차로 표시하였다.

[†] N-tr에 비하여 p<0.05, ^{*} N-re에 비하여 p<0.05

DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate

다. Inhibin B

Inhibin alpha와 beta B subunit의 결합에 의해 형성된 기능적 활성화 형태인 inhibin B의 혈청 내 농도를 측정하였다. 6주령 정상대조군의 경우 80.1pg/ml의 농도로 측정되었으나, 4주령 수컷 흰쥐에 2주간 DEHP를 투여한 결과 저농도 투여군은 52.0pg/ml로 크게 감소하였으며, 고농도 투여군의 경우 측정한계를 벗어나는 낮은 농도를 보였다. DEHP 투여를 종료 한 후 2주간 회복사육 한 군과 8주령 정상대조군의 혈청 내 inhibin B 농도를 비교하여 정상으로 회복되는지 관찰하였으나 역시 대조군에 비해 현저히 낮은 농도를 보였으며 고농도 투여군에서는 측정한계를 벗어난 낮은 농도를 계속 유지하였다(표 6).

표 6. Di-(2-ethylhexyl)phthalate가 혈청 내 inhibin B 농도에 미치는 영향

DEHP 투여농도	DEHP 처리군		DEHP 처리 후 회복군	
	실험군 ¹	Inhibin B 농도 ²	실험군	Inhibin B 농도
none treat	N-tr	80.1±16.9	N-re	26.6±6.70
1g/kg/day treat	1g-tr	52.0±14.6*	1g-re	9.4±6.80**
3g/kg/day treat	3g-tr	0.0±0.00*	3g-re	0.0±0.00**

¹ 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 DEHP 처리군과 DEHP 처리 후 회복군으로 구분하였으며 각각의 군은 N-tr: 6주령 정상대조군, 1g-tr: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여군, 3g-tr: DEHP를 2주간 3g/kg 매일 1회 투여군과 N-re : 8주령 정상대조군, 1g-re: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군, 3g-re: DEHP를 3g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군으로 세분하였음.

² 단위는 pg/ml이며 평균±표준편차로 표시하였다.

* N-tr에 비하여 p<0.05, ** N-re에 비하여 p<0.05

DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate

7. Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)가 정소 조직 내 inhibin subunit의 발현 및 분포 양상에 미치는 영향

DEHP의 투여가 Inhibin α 와 β B subunit의 발현과 분포양상에 미치는 영향을 조사하고자 4주령 수컷 흰쥐에 2주간 DEHP를 투여한 후 실험군과 6주령 정상대조군 정소조직에 inhibin subunit에 대한 면역조직화학염색을 실시하고 그 결과를 비교하였다. Inhibin α subunit는 6주령 정상대조군의 경우 정세관 기저부에 위치한 분화 초기의 생식세포와 Sertoli 세포에서 강한 양성반응을 보였다. DEHP를 투여 할 경우 발현 부위의 변화는 나타나지 않으나 양성반응을 보이는 세포의 수가 감소하는 것을 관찰하였으며 고농도 투여군의 경우 정세관내에 양성반응을 보이는 세포가 매우 적은 것을 관찰할 수 있었다(그림 5).

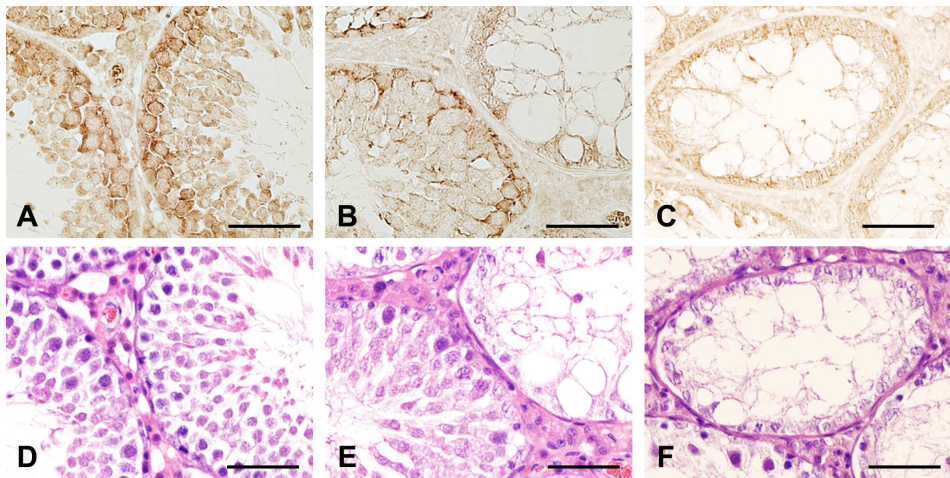


그림 5. Di-(2-ethylhexyl)phthalate 투여 후 정소 조직 내 inhibin α subunit의 분포와 발현량의 변화. 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)에 2주간 DEHP를 투여한 후 6주령 대조군과 비교하였음. A, D: 6주령 정상대조군(N-tr), B, E: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여군(1g-tr), C, F: DEHP를 2주간 3g/kg 매일 1회 투여군(3g-tr). 적출한 정소를 두께 5 μ m의 파라핀 절편으로 제작하여 inhibin α subunit에 대한 면역조직화학 염색을 실시하였음. 위는 inhibin α subunit에 대한 면역염색결과이며 아래는 인접한 절편의 동일부위를 H-E 염색 한 결과임. inhibin α subunit는 정세관 기저부의 Sertoli 세포와 정원세포, 정모세포에서 특이적인 양성반응을 보였다. 2주간 DEHP를 투여한 군에서는 6주령 정상대조군과 비교할 때 발현부위의 변화는 없으나 양성반응을 보이는 세포들의 수가 감소한 것을 볼 수 있었다. (scale bar = 25 μ m)

DEHP 투여 후 나타나는 α subunit 발현양상의 변화는 DEHP 투여 종료 후에도 지속적으로 나타나는지 알아보기 위하여 4주령 수컷 흰쥐에 2주간 DEHP를 투여한 다음 2주간 정상 사육하였고 inhibin α subunit에 대한 면역조직화학염색을 실시하여 8주령 정상대조군과 비교하였다. DEHP 투여로 인한 inhibin α subunit 양성반응 세포의 감소는 2주간의 회복사육 후에도 동일한 양상을 보였다.(그림 6).

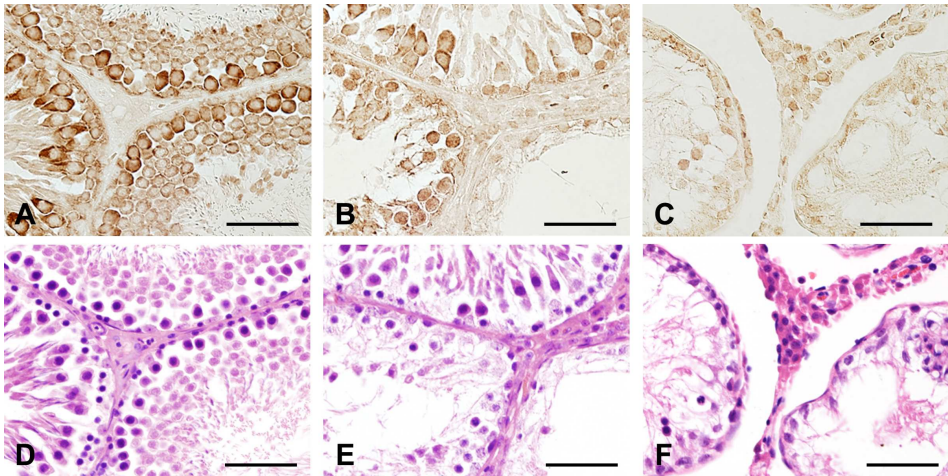


그림 6. Di-(2-ethylhexyl)phthalate 투여 종료 후 2주간 회복사육 한 수컷 흰쥐의 정소 내 inhibin α subunit의 분포 및 발현량의 변화. 4주령 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley)에 2주간 DEHP를 투여한 후 2주간 사육한 실험군과 8주령의 대조군을 비교하였음. A, D: 8주령 정상대조군(N-re), B, E: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군(1g-re), C, F: DEHP를 3g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군(3g-re). 적출한 정소를 두께 5 μ m의 파라핀 절편으로 제작하여 inhibin α subunit에 대한 면역조직화학 염색을 실시하였음. 위는 inhibin α subunit에 대한 면역염색결과이며 아래는 인접한 절편의 동일부위를 H-E 염색 한 결과임. 8주령 정상대조군에 비해 DEHP를 투여하였던 실험군에서 inhibin α subunit 양성반응을 보이는 세포의 수가 감소한 것을 볼 수 있었으며 생식세포가 괴사되어 탈락된 정세관에서는 양성반응을 보이는 세포가 거의 없는 것을 볼 수 있었다.

DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate (scale bar = 25 μ m)

Inhibin β B subunit의 발현 양상을 관찰한 결과 α subunit와 달리 대부분 정세관 기저부에 위치한 Sertoli 세포에서 양성반응을 보이는 것을 알 수 있었다. DEHP를 투여할 경우 이러한 분포 양상은 변하지

않으나 양성반응을 보이는 Sertoli 세포의 수가 감소하는 것을 관찰하였으며(그림 7), DEHP 투여 종료 후 2주간 사육한 그룹에서도 동일한 감소양상을 보이는 것을 관찰하였다(그림 8).

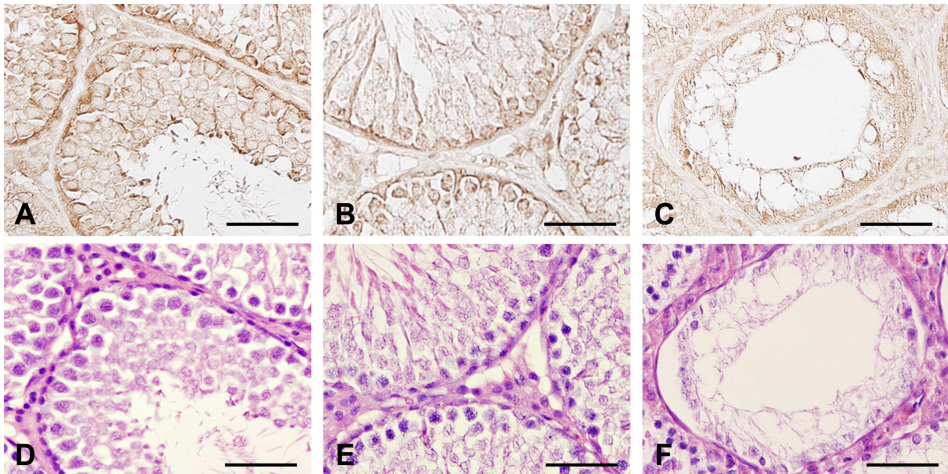


그림 7. Di-(2-ethylhexyl)phthalate 투여 후 정소 조직 내 inhibin β B subunit의 분포와 발현량의 변화. 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)에 2주간 DEHP를 투여한 후 6주령 대조군과 비교하였음. A, D: 6주령 정상대조군(N-tr), B, E: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여군(1g-tr), C, F: DEHP를 2주간 3g/kg 매일 1회 투여군(3g-tr). 적출한 정소를 두께 $5\mu\text{m}$ 의 파라핀 절편으로 제작하여 inhibin β B subunit에 대한 면역조직화학 염색을 실시하였음. 위는 inhibin β B subunit에 대한 면역염색결과이며 아래는 인접한 절편의 동일부위를 H-E 염색 한 결과임. inhibin β B subunit는 정세관 기저부의 Sertoli 세포에서 특이적인 양성반응을 보였다. 2주간 DEHP를 투여한 군에서는 6주령 정상대조군과 비교할 때 발현부위의 변화는 없으나 양성반응을 보이는 세포들의 수가 감소한 것을 볼 수 있었다. DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate (scale bar = $25\mu\text{m}$)

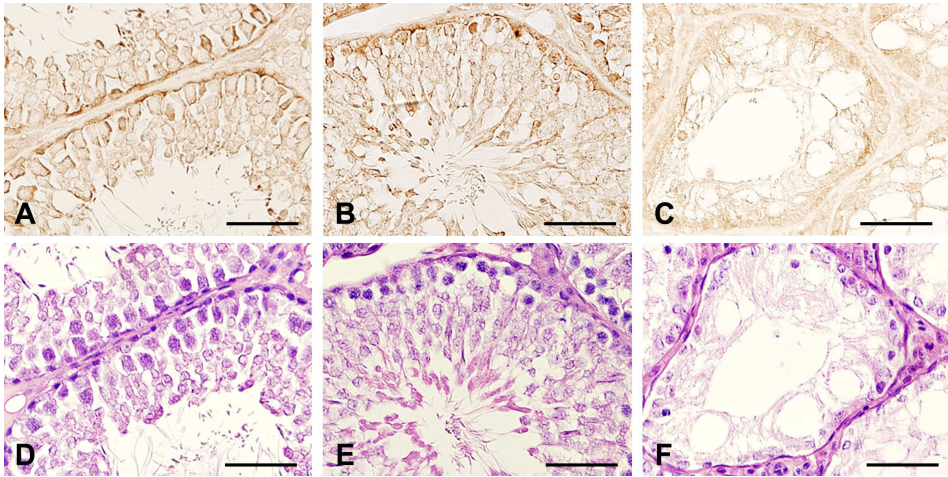


그림 8. Di-(2-ethylhexyl)phthalate 투여 종료 후 2주간 회복사육 한 수컷 흰쥐의 정소 내 inhibin β B subunit의 분포 및 발현량의 변화. 4주령 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley)에 2주간 DEHP를 투여한 후 2주간 사육한 실험군과 8주령의 대조군을 비교하였음. A, D: 8주령 정상대조군(N-re), B, E: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군(1g-re), C, F: DEHP를 3g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군(3g-re). 적출한 정소를 두께 5 μ m의 파라핀 절편으로 제작하여 inhibin β B subunit에 대한 면역조직화학 염색을 실시하였음. 위는 inhibin β B subunit에 대한 면역염색결과이며 아래는 인접한 절편의 동일부위를 H-E 염색 한 결과임. 8주령 정상대조군에 비해 DEHP를 투여하였던 실험군에서 inhibin β B subunit 양성반응을 보이는 세포의 수가 감소한 것을 볼 수 있었으며 생식세포가 괴사되어 탈락된 정세관에서는 양성반응을 보이는 세포가 거의 없는 것을 볼 수 있었다.

DEHP: Di-(2-ethylhexyl) phthalate (scale bar = 25 μ m)

8. Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)가 정소 조직 내 inhibin subunit 양성반응을 보이는 정세관의 비율에 미치는 영향

정소 조직 내에서 inhibin α 및 β B subunit 양성반응을 보이는 정세관과 음성반응을 보이는 정세관의 비율을 조사한 결과 α 및 β B subunit에 양성반응을 보이는 정세관의 비율이 DEHP 투여 후에 감소하는 것을 알 수 있었으며 이러한 현상은 DEHP 투여를 종료 한 후 2주간 회복 사육한 그룹에서도 동일하게 나타나는 것을 관찰하였다 (표 7, 8).

표 7. Di-(2-ethylhexyl)phthalate가 정소 조직 내 inhibin α subunit 양성반응 정세관의 비율에 미치는 영향

DEHP 투여 농도	DEHP 처리군		DEHP 처리 후 회복군	
	실험군 ¹	Inhibin α 양성반응 정세관 ²	실험군	Inhibin α 양성반응 정세관
none treat	N-tr	78.7 \pm 8.5	N-re	73.9 \pm 6.2
1g/kg/day treat	1g-tr	64.1 \pm 10.4*	1g-re	62.7 \pm 22.1**
3g/kg/day treat	3g-tr	15.6 \pm 12.0*	3g-re	15.3 \pm 3.5**

¹ 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 DEHP 처리군과 DEHP 처리 후 회복군으로 구분하였으며 각각의 군은 N-tr: 6주령 정상대조군, 1g-tr: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여군, 3g-tr: DEHP를 2주간 3g/kg 매일 1회 투여군과 N-re : 8주령 정상대조군, 1g-re: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군, 3g-re: DEHP를 3g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군으로 세분하였음.

² 단위는 %(percent)이며 평균 \pm 표준편차로 표시하였다.

* N-tr에 비하여 $p < 0.05$, ** N-re에 비하여 $p < 0.05$

DEHP: Di-(2-ethylhexyl) phthalate

표 8. Di-(2-ethylhexyl)phthalate가 정소 조직 내 inhibin β B subunit 양성반응 정세관의 비율에 미치는 영향

DEHP 투여농도	DEHP 처리군		DEHP 처리 후 회복군	
	실험군 ¹	Inhibin β B 양성반응 정세관 ²	실험군	Inhibin β B 양성반응 정세관
none treat	N-tr	74.7±9.0	N-re	68.0±10.7
1g/kg/day treat	1g-tr	63.4±6.6	1g-re	58.8±15.7
3g/kg/day treat	3g-tr	13.3±17.8*	3g-re	9.8±10.4**

¹ 4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 DEHP 처리군과 DEHP 처리 후 회복군으로 구분하였으며 각각의 군은 N-tr: 6주령 정상대조군, 1g-tr: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여군, 3g-tr: DEHP를 2주간 3g/kg 매일 1회 투여군과 N-re : 8주령 정상대조군, 1g-re: DEHP를 2주간 1g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군, 3g-re: DEHP를 3g/kg 매일 1회 투여한 후 2주간 정상사육한 군으로 세분하였음.

² 단위는 %(percent)이며 평균±표준편차로 표시하였다.

* N-tr에 비하여 $p < 0.05$, ** N-re에 비하여 $p < 0.05$

DEHP: Di-(2-ethylhexyl) phthalate

IV. 고 찰

내분비 장애물질로 알려져 있고 정소 특이적인 독성작용을 보이는 Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)가 전 세계적으로 매우 많은 양이 유통되고 있으며, 일상생활과 밀접한 관계에 있는 다양한 편의 제품들과 의료기기 및 음식물 포장재로부터 용출된 DEHP가 위험한 수준의 농도로 체내에 유입되고 있다는 사실은 이미 많은 연구에서 보고된 바 있다^{1,2,5,6,7}. 또한 DEHP가 체내에 유입됨으로써 나타날 수 있는 독성작용들이 동물실험을 통한 연구들에서 지속적으로 보고되고 있다^{11,19,20}.

DEHP에 의한 정소 특이적 독성작용이 어떠한 원인에 의해 나타나는지를 규명하기 위해서는 두 가지 관점에서 접근할 필요가 있다. 첫째로는 DEHP가 정자형성과 관련된 특정 세포, 즉 Sertoli 세포 또는 생식세포에 직접적인 독성물질로써 작용하여 이들 세포의 물리적 구조들을 손상시킴으로써 생식세포의 소실을 유도할 가능성이 있다. 둘째로는 DEHP가 Sertoli 세포나 생식세포의 물리적 구조를 손상시키지는 않지만 이들 세포의 기능 및 생존에 필요한 물질의 합성을 간접적으로 방해함으로써 결과적으로 생식세포의 괴사를 유도할 가능성이 있다. 정상적이고 원활한 정자형성과정의 진행 및 정자의 성숙을 위해서는 다양한 요소들이 작용하고 있으나, 이러한 두 가지 가능성을 고려할 때 중점적으로 고려할 사항들은 몇 가지 중요 요소들로 압축된다.

정자형성과정은 시상하부-뇌하수체-Leydig 세포를 요소로 하는 한 축과 시상하부-뇌하수체-Sertoli 세포를 요소로 하는 또 하나의 축에 의해 조절된다. 시상하부는 gonadotropin releasing hormone(GnRH)를 분비함으로써 뇌하수체에서 LH 및 FSH의 분비를 유도한다. LH는 Leydig 세포에 작용함으로써 testosterone의 합성 및 분비를 유도하고

정자형성과정을 촉진하게 된다³⁰. Leydig 세포와 달리 Sertoli 세포는 보다 다양한 방법으로 정자형성과정을 유도하며 생식세포들을 보호하는 작용을 한다. 우선 Sertoli 세포는 물리적 장벽으로써 생식세포들을 외부환경으로부터 완벽히 차단하는 역할을 하며 연접복합체들을 통해 생식세포들을 물리적으로 지지하는 역할을 한다. 또한 뇌하수체에서 분비된 FSH가 Sertoli 세포의 G protein-coupled receptor와 결합하면 cAMP를 활성화시키게 되고, FSH에 의해 증가된 cAMP는 하위에 있는 protein kinase A(PKA), mitogen-activated protein(MAP) kinase, calcium channel, phosphoinositol 3 kinase(PI3K), phospholipase A2(PLA2)의 활성을 변화시킴으로써 transcription factor 활성화와 세포내 칼슘이온 농도를 증가시킨다. 뿐만 아니라 생식세포에 필수물질들인 lactate와 transferrin 및 inhibin의 합성을 증가시키는 역할을 한다³⁹. Sertoli 세포에서 분비하는 물질 중 inhibin은 정자형성과정에 매우 중요한 역할을 하며 뇌하수체에 작용하여 FSH의 분비를 조절하는 되먹임 작용을 한다^{39,40,44}. 다양한 종류의 inhibin 중에서 특히 inhibin B는 alpha와 beta B subunit로 이루어져 있으며^{38,45}, 정자형성과정에 있어서 생식세포들의 분화와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다^{41,42,46,47}.

본 연구자는 DEHP가 정소 내에서 일어나는 과정 중에서 정자형성 과정을 어떤 경로를 통하여 교란시키는지, 특히 생식세포와 인접하여 이들 세포를 지지하는 sertoli 세포에 대해 어떠한 작용을 하는지를 중심으로 이 연구를 수행하였다.

4주령 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)에 2주간 DEHP를 투여할 경우, 체중은 정상대조군과 큰 차이를 보이지 않았으며, 2주간 DEHP를 투여하고 투여 종료시점부터 2주간 회복사육을 실시한 경우에도 대조군과 실험군 사이에서 체중 변화량은 차이가 없음을 관찰하였다. 이 결과는 3주간 투여한 Bernal 등의 결과와는 차이가 있으나¹⁸, 투여기간이 서로 다르므로 결과를 직접 비교하는 것은 어렵다고 생각한다.

DEHP 투여 후 체중은 크게 변하지 않았으나 정소의 발육에는 영향을 주었다. 즉 정소의 무게가 감소하고, 정세관의 직경이 크게 감소하였으며, 정세관 내에 존재하는 생식세포의 수가 감소하는 현상 등은 DEHP가 정소의 발육에 장애를 주고 있음을 보여주는 결과이다.

정세관 직경이 감소한 정도와 정세관 내의 생식세포들이 소실된 정도로 미루어 보아 DEHP 투여 후 나타나는 정소발육의 저해는, 정세관 내에 Sertoli 세포가 잘 보존되어 있고, 간질조직에 Leydig 세포가 증가하기는 하였으나, 정세관내의 생식세포의 감소로 인한 정세관의 직경감소가 외형적으로 정소발육의 저해로 나타난 것으로 생각된다. 이러한 연구결과는 DEHP가 정소 특이적 독성작용을 나타내며, 정소 및 정세관의 위축을 유도하고²³, 생식세포의 괴사를 유도한다는 연구결과^{24,25,26,27,28,29} 에서도 보고된 바 있다. 이러한 현상은 DEHP 투여를 중단하고 2주 후에 관찰하여도 크게 개선되지 않았으므로, DEHP의 투여 효과가 상단기간 지속되는 것으로 해석하였다.

DEHP 투여 후 정세관이 위축되고 간질세포가 증가하는 조직학적 변화는 DEHP 투여 중단 후에도 계속 지속되었다. 그러나 이러한 정세관과 생식세포의 변화와는 달리, 정세관의 바닥층에서 이들을 지지하고 혈액정소장벽(blood testis barrier)을 형성하고 있는 Sertoli 세포는 정세관 기저막 부위에서 계속 그 형태를 유지하고 있었으며, 전자현미경으로 관찰한 결과에서 sertoli 세포의 미세구조 또한 비교적 정상형태로 유지되는 것으로 보아 DEHP는 적어도 Sertoli 세포의 숫자를 감소시키거나 세포 구조를 손상시키는 것은 아닌 것으로 해석하였다. 최근의 연구결과들에 따르면 DEHP가 Sertoli 세포 사이의 연접복합체 형성을 방해함으로써 정세관 내에서 생식세포의 탈락을 유도한다고 한다^{48,49}. 그러나 본 연구에서 DEHP 투여 후 정세관의 미세구조적 형태를 관찰한 결과 Sertoli 세포 사이의 연접복합체들이 잘 발달되어있는 것으로 볼 때 생식세포의 탈락이 연접복합체의 손상으로 인한 물리적 요인이 아닌 생리적 요인에 의한 현상인 것으로 생각된다.

본 연구에서 DEHP 투여 후 정세관은 위축되고 간질조직이 증가하였고, testosterone을 합성하는 Leydig 세포의 수가 증가하는 것이 관찰되었으며, 이러한 결과는 다른 연구에서도 보고된 바 있다^{36,37}. Leydig 세포가 증가함에 따라서 testosterone의 합성도 증가한다는 보고도 있으나^{36,37}, 본 연구 결과에 의하면 2주간 DEHP를 투여했을 때에는 testosterone의 농도가 변화하지 않았으며, 이는 조직표본에서 Leydig 세포가 증가하는 것과 반대되는 결과이다. 이는 DEHP로 인해 Leydig 세포의 과잉증식이 유도되었으나 증가된 Leydig 세포가 정상적으로 testosterone을 합성하지 못하고 있음을 나타내는 것으로 분석하였다. 또한 DEHP 투여 후 2주간 투여를 중지하더라도 testosterone 양이 계속 감소하고 조직변화가 계속되는 결과를 얻은 것은 Leydig 세포의 testosterone 합성 능력이 투여를 중지한 상태에서도 계속 장애를 받고 있음을 나타내다.

그러나 DEHP 2주 투여 후 testosterone 혈중농도가 감소하지 않았음에도 생식세포 합성에 손상이 오는 것은 다른 연구자들이 보고한 것과^{30,31,32,33,34} 같이 단순히 간질조직의 Leydig 세포 손상으로 인한 testosterone의 농도 저하만으로는 설명할 수 없는 부분이다.

Sertoli 세포에 직접 작용하여 그 기능을 활성화 시키는 것으로 알려진 FSH는⁵² 2주간 DEHP를 투여하면 증가하였다가, 투여 종료 시점으로부터 2주간 투여를 중지하면 정상수준으로 회복하였으며, 따라서 DEHP 투여 후 나타나는 정모세포의 특이적 손상은 Sertoli 세포를 활성화 시키는 FSH 농도 변화와는 무관한 것으로 생각하였다. 사람에서는 소변에서 DEHP가 검출되는 경우 혈중 FSH의 농도가 감소되어 있는 결과를 근거로 DEHP가 FSH 합성을 감소시킨다는 분석을 한 연구보고는 있다⁵⁵.

Inhibin은 Sertoli 세포에서 분비되는 물질이며 생식세포의 분화과정과 밀접한 연관이 있으므로 Sertoli 세포의 기능을 간접적으로 분석하는 물질로 사용하였다. 또한 inhibin은 Sertoli 세포를 활성화 시키

는 FSH가 뇌하수체에서 분비되는 것을 조절하는 되먹임 작용을 한다
39,40,44

정자형성과정에 있어서 생식세포들의 분화와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있는 inhibin^{41,42,46,47,50,52}의 변화는 세부단위별로 분석하였으며, inhibin B의 혈중 농도는 2주간 DEHP를 투여한 군에서도 투여를 2주간 종료한 군에서도 모두 감소하였다. 이는 DEHP 투여 후 FSH의 농도가 급격히 증가하는 것과 상반되는 것이며, DEHP가 FSH에 의해 유도되는 Sertoli 세포 내의 inhibin B 합성과정을 방해하는 것인지 아니면 DEHP의 투여가 Sertoli 세포의 기능을 억제하여 inhibin 합성을 저해하여 나타나는 되먹임 현상인지에 대한 분석이 더 필요할 것이다.

본 연구에서 또 하나의 중요한 사실은 면역조직화학 염색법을 통해 관찰한 결과 inhibin subunit들에 대한 양성반응이 Sertoli 세포, 정원세포 그리고 정모세포에서만 특이적으로 나타나며, DEHP 투여 후 피사현상을 보이는 세포의 종류 또한 inhibin subunit 양성반응을 보이는 세포에 국한되어 나타난다는 것이다. Inhibin subunit는 Sertoli 세포에서 합성하는 물질이므로 그 양성반응이 이 세포에서 관찰되는 것은 이미 보고되었던 결과이나, 정원세포나 정모세포에서 Inhibin α 양성반응이 나타나는 것은 지금까지 보고된 적이 없는 결과이며, Inhibin이 이들 세포의 분화를 도와주는 역할을 수행하는 것과 밀접한 연관이 되는 결과로 생각한다.

DEHP 투여 후 정세관의 Sertoli 세포는 형태는 유지되나 세포에서 나타나는 α 와 β B subunit에 대한 면역 반응이 감소하는 것으로 볼 때 DEHP가 Sertoli 세포에 미치는 효과는 Sertoli 세포가 형성하는 물리적인 지지구조는 비교적 손상시키지 않음에도 불구하고, Sertoli 세포의 중요한 기능의 하나인 inhibin B 합성 과정을 교란함으로써 생식세포의 분화에 장애를 초래하는 것이 이 물질이 정소에 특이적으로 독성작용을 나타내는 중요한 기전 중 하나인 것으로 생각한다.

이상의 결과들로 볼 때, DEHP에 의한 정소 특이적 독성작용은 지금까지 알려진 Leydig 세포의 기능 억제, 특히 testosterone 합성 장애뿐만 아니라 정세관을 지지하고 정자 분화에 중요한 역할을 하는 Sertoli 세포에 대한 독성작용도 매우 중요하다는 것을 이 연구를 통해 분석하였다.

향후 Sertoli 세포에 대한 DEHP의 독성작용의 기전을 보다 세부적이고 명확한 밝히기 위해서는 Sertoli 세포 내에서 일어나는 신호전달 체계, 특히 inhibin 합성을 조절하는 요인들에 대한 활발한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 아직까지 inhibin subunit의 합성을 조절하는 요인들에 대한 보고가 많지 않으나 일부 연구자들에 의해 inhibin subunit의 합성이 mammalian target of rapamycin(mTOR), p70 S6 kinase, protein kinase c, 또는 세포질 내 칼슘농도에 의해 조절된다는 것이 보고된 바 있다^{53,54}. 따라서 앞으로 지속적인 연구를 통해 DEHP가 이러한 요소들에 미치는 영향을 밝힐 수 있다면, DEHP로 인해 생식세포의 손상이 일어나는 과정을 온전히 이해할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

DEHP가 흰쥐 생식기관에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 생후 4주령의 수컷 흰쥐에 2주간 DEHP를 투여하였으며, 일부 군에서는 투여를 중지한 후 2주 동안 사육하여 효과의 지속여부 및 회복여부를 관찰하였다.

흰쥐에서 DEHP를 투여한 효과와 투여를 중지하고 2주간 회복시킨 결과는 다음과 같다.

1. DEHP의 투여는 수컷 흰쥐의 체중 증가에 큰 영향을 주지 않았다.
2. 정소의 무게는 DEHP 투여 농도에 의존적으로 크게 감소하였고, 2주간의 회복사육 후에도 정상수준으로 회복되지 못하였다.
3. DEHP의 투여는 정세관 직경의 감소, 생식세포의 손상, 간질조직의 증가 및 Leydig 세포의 증가를 초래하였으며 이러한 현상은 DEHP 투여를 종료한 후 2주간 정상사육 하여도 정상수준으로 회복되지 않았다.
4. DEHP 투여 후에도 생식세포를 물리적으로 지지하는 Sertoli 세포 사이의 연접복합체(junctional complex)는 잘 발달되어 있었다.
5. 2주간 DEHP를 투여 한 실험군의 testosterone 농도는 정상대조군과 차이가 없었음에도 불구하고 생식세포의 괴사가 진행되었으며 DEHP 투여를 종료한 후에 2주간 회복사육을 실시하면 FSH의 농도가 정상수준으로 회복됨에도 불구하고 지속적인 생식세포의 괴사현상이 나타났다.

6. DEHP를 2주간 투여한 군과 DEHP 투여 종료 후 2주간 회복사육한 군 모두에서 inhibin B의 농도가 정상대조군에 비해 감소하는 현상이 나타났다.
7. DEHP 투여 후 생식세포의 괴사는 inhibin subunit에 대한 면역염색결과에서 양성반응을 보이는 세포들에 국한되어 나타났다.

이상의 결과를 종합하면 DEHP는 개체의 정상적인 발육보다는 정소 자체의 성장에 크게 영향을 미치고 이러한 효과는 DEHP의 투여를 중단하여도 일정기간 유지됨을 알 수 있다. 또한 DEHP로 인한 생식세포의 손상은 Sertoli 세포의 물리적 보호역할의 장애나 testosterone 및 FSH의 합성저해로 인한 것 보다는 Sertoli 세포에서 inhibin subunit 들의 합성이 저해됨으로 인해 정자형성 및 생식세포 분화에 중요한 역할을 하는 inhibin B의 합성을 감소시킴으로서 나타나는 현상으로 생각된다.

참고문헌

1. Sørensen LK. Determination of phthalates in milk and milk products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry Rapid Commun. Mass Spectrom 2006; 20: 1135-1143.
2. Ozaki A, Yamaguchi Y, Okamoto A, Kawai N. Determination of alkylphenols, bisphenol A, benzophenone and phthalates in containers of baby food, and migration into food simulants. Shoku Eisei Zasshi 2002; 43: 260-266.
3. Tsumura Y, Kaihara A, Ishimitsu S, Yoshii K, Tonogai Y. Contents of plasticizers in cap-sealing for bottled food and their migration into food. Shoku Eisei Zasshi 2002; 43: 377-384.
4. Tsumura Y, Ishimitsu S, Hirayama K, Fujimaki T, Nakazawa H, Tonogai Y. Migration of di(2-ethylhexyl) phthalate from polyvinyl chloride tubes used in preparation of foods. Shoku Eisei Zasshi 2002; 43: 254-259.
5. Biscardi D, Monarca S, De Fusco R, Senatore F, Poli P, Buschini A, et al. Evaluation of the migration of mutagens/carcinogens from PET bottles into mineral water by Tradescantia/micronuclei test, Comet assay on leukocytes and GC/MS. Sci Total Environ 2003; 302: 101-108.
6. Loff S, Kabs F, Subotic U, Schaible T, Reinecke F, Langbein M. Kinetics of diethylhexyl-phthalate extraction From polyvinylchloride-infusion lines. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2002; 26: 305-309.

7. Inoue K, Higuchi T, Okada F, Iguchi H, Yoshimura Y, Sato A, et al. The validation of column-switching LC/MS as a high-throughput approach for direct analysis of di(2-ethylhexyl)phthalate released from PVC medical devices in intravenous solution. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 31: 1145-1152.
8. Jaeger RJ, Weiss AL, Brown K. Infusion of di-2-ethylhexyl phthalate for neonates: a review of potential health risk. *J Infus Nurs* 2005; 28: 54-60.
9. Koch HM, Gonzalez-Reche LM, Angerer J. On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 784: 169 - 182.
10. Gourlay T, Samartzis I, Stefanou D, Taylor K. Inflammatory Response of Rat and Human Neutrophils Exposed to Di-(2-ethyl-hexyl)-phthalate-Plasticized Polyvinyl Chloride. *Artif Organs* 2003; 27: 256-260.
11. Fukuwatari T, Suzuki Y, Sugimoto E, Shibata K. Identification of a Toxic Mechanism of the Plasticizers, Phthalic acid Esters, which are Putative Endocrine Disrupters: Time-dependent Increase in Quinolinic Acid and Its Metabolites in Rats Fed di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 2687-2691.

12. Ljungvall K, Spjuth L, Hulten F, Einarsson S, Rodriguez-Martinez H, Andersson K, et al. Early post-natal exposure to low dose oral di(2ethylhexyl) phthalate affects the peripheral LH-concentration in plasma, but does not affect mating behavior in the post-pubertal boar. *Reprod Toxicol.* 2006; 21: 160-166.
13. Ljungvall K, Karlsson P, Hulten F, Madej A, Norrgren L, Einarsson S, et al. Delayed effects on plasma concentration of testosterone and testicular morphology by intramuscular low-dose di(2-ethylhexyl)phthalate or oestradiol benzoate in the prepubertal boar. *Theriogenology* 2005; 64: 1170-1184.
14. Lovekamp-Swan T, Davis BJ. Mechanisms of Phthalate Ester Toxicity in the Female Reproductive System. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 139-145.
15. Shirota M, Saito Y, Imai K, Horiuchi S, Yoshimura S, Sato M, et al. Influence of di-(2-ethylhexyl)phthalate on fetal testicular development by oral administration to pregnant rats. *J Toxicol Sci* 2005; 30: 175-194.
16. Borch J, Dalgaard M, Ladefoged O. Early testicular effects in rats perinatally exposed to DEHP in combination with DEHA--apoptosis assessment and immunohistochemical studies. *Reprod Toxicol.* 2005; 19: 517-525.
17. Lee J, Park J, Jang B, Knudsen TB. Altered expression of genes related to zinc homeostasis in early mouse embryos exposed to di-2-ethylhexyl phthalate. *Toxicol Lett.* 2004; 152: 1-10.

18. Bernal CA, Martinelli MI, Mocchiutti NO. Effect of the dietary exposure of rat to di(2-ethylhexyl)phthalate on their metabolic efficiency. *Food Addit Contam* 2002; 19: 1091-1096.
19. Voss C, Zerban H, Bannasch P, Berger MR. Lifelong exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces tumors in liver and testes of Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 2005; 206: 359-371.
20. Yamashita U, Sugiura T, Kuroda E. Effect of endocrine disrupters on immune responses in vitro. *J UOEH* 2002; 24: 1-10.
21. Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtaba R. Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil Steril* 2002; 78: 1187-1194.
22. Kang JS, Morimura K, Toda C, Wanibuchi H, Wei M, Kojima N. Testicular toxicity of DEHP, but not DEHA, is elevated under conditions of thioacetamide-induced liver damage. *Reprod Toxicol*. 2006; 21: 253-259.
23. Cammack JN, White RD, Gordon D, Gass J, Hecker L, Conine D, et al. Evaluation of reproductive development following intravenous and oral exposure to DEHP in male neonatal rats. *Int J Toxicol* 2003; 22: 159-174.
24. Giammona CJ, Sawhney P, Chandrasekaran Y, Richburg JH. Death Receptor Response in Rodent Testis after Mono-(2-ethylhexyl)Phthalate Exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 185: 119 - 127.

25. Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M, Konaka R, Hiramoto K, Sasaki J, et al. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem J* 2002; 365: 849-856.
26. Park JD, Habeebu SS, Klaassen CD. Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate in young Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 2002; 171: 105-115.
27. Dalgaard M, Nellemann C, Lam HR, Sorensen IK, Ladefoged O. The acute effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes of prepubertal Wistar rats. *Toxicol Lett* 2001; 122: 69-79.
28. Awal MA, Kurohmaru M, Andriana BB, Kanai Y, Hayashi Y. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) induces testicular alterations in male guinea pigs at prepubertal stage. *Tissue Cell* 2005; 37: 167-175.
29. Andriana BB, Tay TW, Tachiwana T, Sato T, Ishii M, Awal MA, et al. Effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in rats in vitro. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2004; 80: 127-136.
30. Gazouli M, Yao ZX, Boujrad N, Corton JC, Culty M, Papadopoulos V. Effect of peroxisome proliferators on Leydig cell peripheral-type benzodiazepine receptor gene expression, hormone-stimulated cholesterol transport, and steroidogenesis: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *Endocrinology* 2002; 143: 2571-2583.

31. Akingbemi BT, Youker RT, Sottas CM, Ge R, Katz E, Klinefelter GR, et al. Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol Reprod* 2001; 65: 1252-1259.
32. Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 1119-1124.
33. Borch J, Ladefoged O, Hass U, Vinggaard AM. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reprod Toxicol.* 2004; 18: 53-61.
34. Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. *Arch Toxicol* 2003; 77: 446-451.
35. Wong JS, Gill SS. Gene Expression Changes Induced in Mouse Liver by Di(2-ethylhexyl) Phthalate. *Toxicol Appl Pharm* 2002; 185: 180-196.
36. Kurahashi N, Kondo T, Omura M, Umemura T, Ma M, Kishi R. The effects of subacute inhalation of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the testes of prepubertal Wistar rats. *J Occup Health* 2005; 47: 437-444.

37. Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 775-780.
38. Kretser DM, Buzzard JJ, Okuma Y , O'Connor AE, Hayashi T, Lin SY, et al. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 225: 57-64.
39. Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB. Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Endocrinol* 2002; 174: 195-204.
40. Kamischke A, Simoni M, Schrameyer K, Lerchl A, Nieschlag E. Is inhibin B a pharmacodynamic parameter for FSH in normal men? *Eur J Endocrinol* 2001; 144: 629-637.
41. Kumanov P, Nandipati KC, Tomoval A, Robeva R, Agarwal A. Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications. *Reprod BioMed Online* 2005; 10: 786-796.
42. Ren L, Medan MS, Ozu M, LI C, Watanabe G, Taya K. Effects of Experimental Cryptorchidism on Sperm Motility and Testicular Endocrinology in Adult Male rats. *J Reprod* 2006; 52: 219-228.

43. Buzzard JJ, Loveland KL, O'Bryan MK, O'Connor AE, Bakker M, Hayashi T, et al. Changes in Circulating and Testicular Levels of Inhibin A and B and Activin A During Postnatal Development in the Rat. *Endocrinology* 2004; 145: 3532-3541.
44. Devi YS, Sarda K, Stephen B, Nagarajan P, Majumdar SS. Follicle-Stimulating Hormone-Independent Functions of Primate Sertoli Cells: Potential Implications in the Diagnosis and Management of Male Infertility. *J Clin Endocrinol Metabol* 2006; 91: 1062-1068.
45. O'Connor AE, Kretser DM. Inhibins in Normal Male Physiology. *Sem Reprod Med* 2004; 3: 177-185.
46. Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 561-571.
47. Yalti S, Gübü B and LU CF. Serum levels of inhibin B in men and their relationship with gonadal hormones, testicular volume, testicular biopsy results and sperm parameters. *J Obstet Gynaecol* 2002; 22: 649-654.
48. Kang KS, Lee YS, Kim HS, Kim SH. DI-(2-ethylhexyl) phthalate-induced cell proliferation is involved in the inhibition of gap junctional intercellular communication and blockage of apoptosis in mouse Sertoli cells. *J Toxicol Environ Health A* 2002; 65: 447-459.

49. Isenberg JS, Kamendulis LM, Ackley DC, Smith JH, Pugh G Jr, Lington AW, et al. Reversibility and persistence of di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP) and phenobarbital- induced hepatocellular changes in rodents. *Toxicol Sci* 2001; 64: 192-199.
50. Fujisawa M, Yamazaki T, Fujioka H, Takenaka A. Differential regulation of inhibin subunits by germ cells in human testes. *Arch Androl* 2004; 50: 339-345.
51. Koch MH, Preuss R, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP); human metabolism and internal exposure - an update and latest results. *Int J Androl* 2006; 29: 155-165.
52. Okuma Y, Saito K, O'Connor AE, Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP. Reciprocal regulation of activin A and inhibin B by interleukin-1(IL-1) and follicle-stimulating hormone(FSH) in rat Sertoli cells *in vitro*. *J Endocrinol* 2005; 185: 99-110.
53. Klaij IA, Timmerman MA, Blok LJ, Grootegoed JA, de Jong FH. Regulation of inhibin β B-subunit mRNA expression in rat Sertoli cells: consequences for the production of bioactive and immunoreactive inhibin. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 85: 237-246.
54. Alam H, Maizels ET, Park YK, Ghaey S, Feiger ZJ, Chandel NS, et al. Follicle-stimulating Hormone Activation of Hypoxia-inducible Factor-1 by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/Ras Homolog Enriched in Brain (Rheb)/Mammalian Target of Rampamycin(mTOR) Pathway Is Necessary for Induction of Select Protein Marker of Follicular Differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279: 19431-19440.

55. Duty SM, Calafat AM, Silva MJ, Ryan L, Hauser R. Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men. *Hum Reprod* 2005; 20: 604-610.

Abstract

Effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate on the structure and the function of Sertoli cell in rats

Gil, Young-Chun

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Lee, Hye-Yeon)

Di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP), one of the endocrine-disrupting chemicals, is known to present toxic effects specific to testis. Prior studies have revealed that the causes of DEHP's toxicity primarily in terms of testosterone synthesis, thus examining the effects DEHP has on Leydig cells, linked to testosterone synthesis. However, its effects on Sertoli cells, which take part in the protection and maturing process of the sperm, have been overlooked. Our study was conducted by taking the view that DEHP may exert toxic effects specific to testis by obstructing the functions of Sertoli cells. In this study, 4-week old rats were given 1g/kg or 3g/kg of DEHP daily for two weeks. We then observed morphological changes in the testis and changes in hormonal secretion. We also observed morphological changes in Sertoli cells and the level of inhibin B synthesized in Sertoli cells and changes in distribution of inhibin subunits. In addition, we studied the persistent effects of DEHP on testis in rats after two weeks from the point of stage that the administration of DEHP was stopped.

Although DEHP had no effect on the normal increase in body weight, it seriously disrupted the growth of the testis. DEHP also induced atrophy of seminiferous tubules, injury of germ cells and increase in interstitial tissue and Leydig cells. As we observed the change in

appearance on ultrastructural findings, spermatogonia and spermatocytes at the basal area of seminiferous tubules and a decrease in cytoplasmic organelles within Sertoli cells. However, we observed no effect on the junctional complex that gives structural support to germ cells. Also, we observed that such changes caused by the administration of DEHP continued even after stopping its administration. While the administration of DEHP did not change the level of testosterone, the group that was kept for two weeks after the administration was stopped showed a lower level of testosterone than the control group. FSH increased in a dose-dependent manner when DEHP was administered, and it reverted back to the normal level in the low dose group when its administration was stopped.

Inhibin B levels decreased drastically in a dose-dependent manner when DEHP was administered. Even when the administration of DEHP was stopped, inhibin B levels showed a persistent pattern of decrease. When we looked at the patterns and levels of inhibin α and β B subunit expression in the testicular tissue, we observed strong positive reactions for α subunits in Sertoli cells, spermatogonia and spermatocytes located at the basal area of the seminiferous tubules. The β B subunits showed a positive reaction, specifically in Sertoli cells. When DEHP was administered, the number of seminiferous tubules and cells that test positive for inhibin α and β B subunits decreased. Such a pattern of decrease did not change, when the administration of DEHP was stopped.

DEHP induces abnormal proliferation of Leydig cells and affects the levels of testosterone and FSH. However, immediately following two weeks of DEHP administration, germ cells show injury even though testosterone levels remain normal. Furthermore, when rats were kept for two weeks after the stoppage of DEHP administration, injury on germ cells appeared, even though the levels of FSH returned to normal. When we take these two sets of results into consideration, we find it difficult to consider the change in the levels of these hormones as the direct cause for the injury of the germ cells. Moreover, when we consider the fact the junctional complex between Sertoli cells was well-maintained regardless of DEHP administration, we suggest that DEHP does not

particularly affect the physical function of Sertoli cell. Whereas, the levels of inhibin B decreased immediately after two weeks of DEHP administration and after rats were kept for two additional weeks following the initial two week period with DEHP. When we examine the correlation between the degree of inhibin B reduction and injury of germ cells, we can discern that injury of germ cells caused by DEHP are closely related to the decrease in inhibin B. Furthermore, when we examine the fact that injury of germ cells following the administration of DEHP characteristically appear on the germ cells that show a positive reaction for inhibin subunits, we conclude that injury of germ cells caused by DEHP reduce the synthesis of inhibin subunits in Sertoli cells.

Key Words : Di-(2-ethylhexyl)phthalate, testis, germ cell, testosterone, FSH, inhibin B, Sertoli cell