J. Fd Hyg. Safety 21(4), 258–262 (2006)

마우스에서의 환경호르몬물질의 상가작용에 대한 조직학적인 변화

정지윤†

공주대학교 산업과학대학 특수동물학과

Histopathologic Changes to Additive Effect of Endocrine Disruptors in Mice

Ji-Youn Jung†

Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Chung-nam, Korea

(Received November 24, 2006/ Accepted December 18, 2006)

ABSTRACT – To investigate additive effects of endocrine disruptors, we have histopathologically studied the exchanges of the reproductive organ to ovariectomized ICR mice. Female ICR mice were ovariectomized and then treated with endocrine disruptors after two weeks. Macroscopic exchanges, which were body weight, feed and water intake, of all groups were not seen during experiment period. Histopathological changes of uterine epithelial cells, vaginal epithelial cells, mammary glands and the diameter in uterine tubles were observed. In the results, the histopathological sensitivity to endocrine disruptors effect was more seen to the vaginal epithelial cell height than others. The additive estrogenic effects of endocrine disruptors, which were combinations of DEHP, DBP and BPA, were seen with E2 and BPA treatments. These results offers a sysmatic and mechanistically informative approach to assessing estrogenicity. It provides a useful profile of activity using a reasonable amount of resources and is compatible with the study of individual chemicals as well as the investigation of interactions among combinations of chemicals.

Key words: Endocrine disruptors, DEHP, DBP, BPA, Histopathology

환경호르몬물질이란 "생명체의 정상적인 호르몬 기능에 영향을 주는 합성 혹은 자연상태의 화학물질" 또는 "생명체의 항상성(homeostasis)의 유지와 발달과정을 담당하는 체내의 자연호르몬의 생산, 방출, 이동, 대사, 결합, 작용 혹은 배설을 간섭하는 체외물질"(USA EPA)을 뜻한다. 최근에 수많은 화학물질들이 새롭게 만들어지면서 인간에게 유용한 제품으로 사용되고 있는 오늘날에 있어서, 인간의 편리함만을 추구하여 만들어진 이러한 물질들이 인체에서 어떠한 유해한 작용을 하는지에 대해서 간과한 결과, 생체시스템에서 가장 민감하게 반응할 수 있는 호르몬에 대하여 간섭을 일으키는 물질들이 있음이 알려지게 되었으며 이러한 물질들을 환경호르몬물질이라 정의하게 되었다.

국내에서는 1990년대 후반에 컵라면용기에서 유출될 가능성이 있는 프탈레이트계물질의 유해성에 관한 매스컴에서의 조명을 시작으로 하여 환경호르몬물질에 대한 관심이 고조되었으며, 그 후 오늘날에 이르기까지 플라스틱류, 포장재, 유아용품, 농약제등 많은 분야에 걸쳐서 다양한 물질이 환경호르몬으로서 검출되고 있는 실정이다.

Di-ethylhexyl phthalate(DEHP)는 플라스틱에서 유연제로 쓰이는 물질로서 음식물에 있어서도 포장재, 제조과정, 수송중에 DEHP가 잠재적으로 들어갈 수 있으며, 육류에서도 발견되고 있으며, 또한 오일이나 지방성 음식에 더 잘 녹는 성질을 가지고 있어서 우유나 치즈에서 최고 농도로 검출되었다는 보고도 있다.[1,2]

DEHP의 인체 내 축적경로는 그 농도가 매우 낮게 측정되어 인간에게 있어서 DEHP의 축적정도를 산출하기란 거의 불가능하며, 인간에게 있어서의 DEHP의 건강에 미치는 영향에 대한 직접적인 보고는 아직까지는 없다. 그러나, 미국에서는 암을 유발시킬 수 있는 물질로서 DEHP를 규정하고 있으며, 랫드와 마우스에서 암을 유발하는 것으로 보고되어 있다.[3,4] 또한, DEHP가 간 손상 및 남성 생식기관에 영향을 주는 것으로 동물을 이용한 연구에서 밝혀졌다.[5,6]

Di-*n*-butyl phthalate(DBP)는 무색, 무미, 무취의 오일성상

†Author to whom correspondence should be addressed.
Ji-Youn Jung, Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan, Chung-nam 340-702, Korea. Tel: 82-41-330-1526, E-mail: wangza@kongju.ac.kr

의 액체이며, 플라스틱을 유연하게 만드는 성질을 가지고 있어서 카펫트, 페인트, 접착제, 헤어스프레이, 로케트 연료 등에 다양하게 사용되고 있다. 현대 사회에서 DBP의 사용은 매우 다양하고, 환경 중에 널리 분포하고 있어서, 많은 사람들은 공기, 물, 음식을 통하여 계속 노출될 수 있다.[7] DBP는 또한 호흡에 의해서 노출될 수도 있는데 일반적으로 도시에서 그리고 특히 가정에서도 매니큐어 사용 등으로 노출될 수 있다.[8] 이러한 공기, 물, 음식을 통한 섭취가 사람에게 해로울 정도로 높은 양은 아니지만, 몇몇 경우에는 예상보다 훨씬 많은 양에 노출되기도 한다.

Bisphenol-A(BPA)는 에스트로겐 작용을 나타내는 화학물질로서 polycarbonate 플라스틱을 만드는데 사용되며 청량음료 캔이나 치아봉합제, 많은 플라스틱 등의 구성물로 존재하고 있다.[9] bisphenol A는 polycarbonate, phenoxy, polysulfone, polyester수지 제조의 중간물질로 사용된다. bisphenol A는 고압증기 멸균기(autoclave)에서 polymer가 파괴되거나 불완전하게 중합되기 때문에 플라스틱에서 용출된다. bisphenol A는 또한 플라스틱 치아 충진제 특히, 어린이 치아 코팅제인 polycarbonate plastic으로 사용한다. bisphenol A에 노출된 즉시 또는 짧은 시일 내에 피부와 눈에 염증이나 발열이 생기지만 노출 몇 시간 이후에 생길 수 있는 만성적 영향력은 몇 개월이나 몇 년 동안 지속적일 수 있다.[10-12] 즉, 암을 유발하거나 태아 발육 이상과 수정률 감소와 피부 알러지를 유발시키며 이 알러지가 발전하면 매우 낮은 장래 노출에도 가려움과 피부 발진을 유발할 수 있다.[13,14]

본 논문에서는 이러한 수많은 환경호르몬 물질들 중 DEHP, DBP, BPA가 그동안 단일물질로서 그 유해성을 평가하고 일일허용섭취량을 측정하였으나, 환경호르몬물질 상호간에 복합적으로 작용할 경우에 있어서의 상가 내지는 상승작용에 대한 실험이 전무하다는 점에 착안하여 환경호르몬 물질로 규정된 물질 및 의심되는 물질들을 두 가지씩 함께 섭취하였을 경우 생체에서의 반응에 대하여 실험동물에서 조직학적인 해석을 통한 규명을 하고자 실시하였다.

재료 및 방법

시험물질

시험물질은 DEHP, DBP, BPA 그리고 17β-estradiol(E2)을 Sigma(USA)사에서 구입하였으며, 실온·차광 하에 보관하며 실험에 사용하였다.

시험동물

시험에 사용한 동물은 암컷 7주령 마우스(ICR) 60마리를 (주) 샘타코코리아에서 구입하여 실험실 환경에 1주일간 순화기간을 두고 건강한 개체만을 선별하여 사용하였다. 지금까지의 보고서에 의하면 마우스의 내분비 교란 물질에 대한 감수성이 실험물질마다 다르게 나타났으나(Steinmetz 등, 1997; Bulger 등, 1978), ICR 마우스는 각종 독성평가시험에 가장 널리 사용되고 있으며, 비교할 생리, 해부 및 독성학적인 기초자료가 많이 축적되어 있어서 실험에 선택하였다.

순화기간이 지난 마우스에 난소 적출술을 실시한 후 2주간 기간을 두어 난소 적출이 완벽하게 된 마우스를 실험에 사용하였다. 예비사육 및 실험 전기간 동안 사육환경은 온도 23±2°C, 상대습도 60±10%를 유지하였고, 마우스를 자연채광 하에서 케이지(polycarbonate, 26×42×18 cm, 명진)에 각각 5마리씩 넣어 사육하였으며, 실험동물용 사료(삼양사료)와 식수를 자유로이 공급하였다.

시험군의구성, 투여농도 및 용량

시험군의 구성은 총 11개 군으로 대조군, 양성대조군, DEHP, DBP, BPA 단독 투여 군을 두었고, 실험물질인 DEHP, DBP, BPA 및 양성대조군을 두개씩 혼합하여 투여한 6개 군을 두어 각 군당 5마리씩 배정하였다. 이전 실험의 결과를 바탕으로 하여 양성대조군인 estradiol은 5 ug/kg으로 용량을 설정하였으며, DEHP, DBP는 2000 mg/kg을 투여하였고, BPA는 200 mg/kg을 투여용량으로 설정하였다.

실험하는 물질의 혼합투여시의 *s.c.*에 대한 보고가 없으므로 *s.c.* 경로로 투여하였으며, 내분비 교란 물질의 *in vivo* 검색법중의 하나인 설치류 3일 자궁 증식 에세이 방법에 따라서 투여횟수 및 투여기간은 1일 1회, 3일간 투여를 원칙으로 실험을 실시하였다.

관찰 및 검사항목

1) 일반증상

투여기간동안 1일 1회 모든 시험동물에 대하여 실시하였으며, 일반상태의 변화, 운동성, 외관, 자율신경등의 일반증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

2) 체중측정 - 투여기간 및 부검당일에 측정하였다.

3) 자궁의 관찰 및 무게 측정

본 실험에서 주요 타겟장기로 생각되어지는 암컷생식장기 중 자궁에 대하여 부검 시 육안적 소견과 무게를 측정하여 그 유의성을 관찰하였다.

4) 조직병리학적인 검사

10% 중성포르말린에 고정한 질, 자궁, 간장 그리고 신장을 탈수, 파라핀침투 및 포매한 후 조직 절편을 제작하여

H&E 염색을 하여 광학 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 한편, 광학 현미경으로의 관찰 시 질 점막 상피세포의 각화 및 높이, 자궁체에서 난관으로 1 cm되는 부위를 일정하게 채취하여 자궁 점막 상피세포의 상태 및 높이를 측정하였다.

5) 유선 조직의 관찰을 위한 whole mount assay.

부검시 채취한 유선을 슬라이드 글라스에 잘 펴서 도말한 다음, glacial acetic acid와 100% ethanol을 1:3으로 섞은 용액에 60분간 고정시켰다. 70% ethanol과 증류수로 각각 15분씩 조직을 씻어낸 후 24시간동안 alum carmine에 침적하여 염색을 실시하였다. Alum carmine은 1 g의 carmine과 2.5 g의 alum potassium을 500 ml의 증류수에 넣어 섞은 후 20분간 끓여서 다시 500 ml이 되도록 증류수를 부은 후 필터에 여과하고 thymol 100 mg을 첨가하여 만들었다. 24시간 Alum carmine 염색을 실시한 조직슬라이드를 탈수한 후 toluene에 담궈서 지방조직을 분해하였고, 일주일이 지난 후 permount로 slide glass 상에 mounting을 실시하여, 실체현미경(Olympus, Japan)으로 terminal end buds와 terminal end ducts의 수를 유선 림프절을 중심으로 한 일정한 배율(×20)상에서 관찰하였다.

자료의 통계처리

부검시 측정한 모든 장기 및 각 조직에서 산출된 모든 수치들은 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 유의성은 공히 95%($p<0.05$) 및 99%($p<0.01$)의 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

일반증상 및 사망률

관찰기간동안 모든 시험군에서 특이한 일반증상은 관찰되지 않았으며, 사망례도 발생하지 않았고, 체중 및 사료와 음수 섭취량에 대하여 대조군 및 시험물질투여군간의 차이는 관찰되지 않았다(data not shown).

자궁의 관찰

DEHP, DBP, BPA 용량별 단독 투여 시 모든 그룹에서 자궁 무게가 음성 대조군과 비교 시 유의적인 증가가 관찰되지 않았으나, 자궁 내 fluid 존재는 E2 단독 투여 군과 E2와 함께 투여한 모든 그룹(E2+DEHP, E2+DBP, E2+BPA)에서 관찰되었다. 양성대조군과 시험물질을 혼합투여한 군 중 에서는 E2+DBP, E2+BPA군에서 자궁의 무게가 양성대조군(17β-estradiol) 단독투여군과 비교 시 증가한 것이 관찰 되었다(Fig. 1).

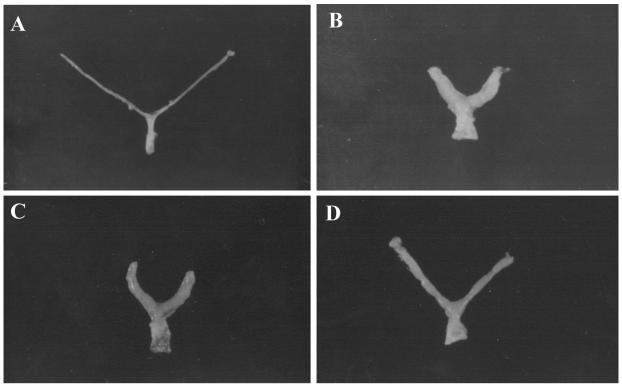

Fig. 1. Uterus in ovariectomized mice treated with corn oil (A), E2 (B), combination E2 + DBP (C) and E2 + BPA (D) at the subcutaneous for 3 days.

자궁상피세포의 조직병리학적 검사

H&E 염색을 통한 시험군에서의 자궁 내막 상피세포의 증식 정도를 관찰한 결과, 시험물질 단독투여군에서는 자궁 내막상피세포의 활성화를 관찰할 수 없었으나, E2와 함께 투여한 군중에서는 DBP, BPA 투여 군에서 E2 단독투여군보다 유의적인 자궁내막 상피세포의 활성화를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 음성대조군과 비교시 유의적인 자궁내막상피세포의 증가를 보인 그룹은 E2혼합투여군, BPA 단독투여군 그리고 BPA+DEHP투여군 이었다.

질 상피세포의 조직병리학적 검사

질 상피세포의 증식정도에 대하여 측정한 결과, 음성대조군과 비교하여 유의적인 증식을 관찰할 수 있었던 그룹은 E2, BPA 단독투여그룹, E2와 시험물질 혼합처치군 및 BPA

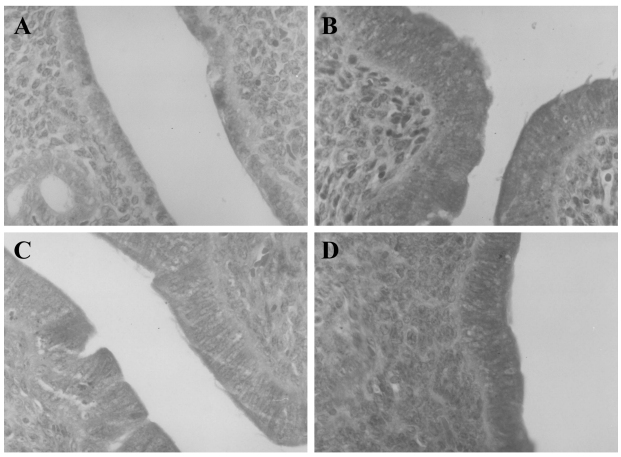

Fig. 2. Uterine histology in ovariectomized mice treated with corn oil (A), E2 (B), combination E2 + DBP (C) and E2 + BPA (D) at the subcutaneous for 3 days.

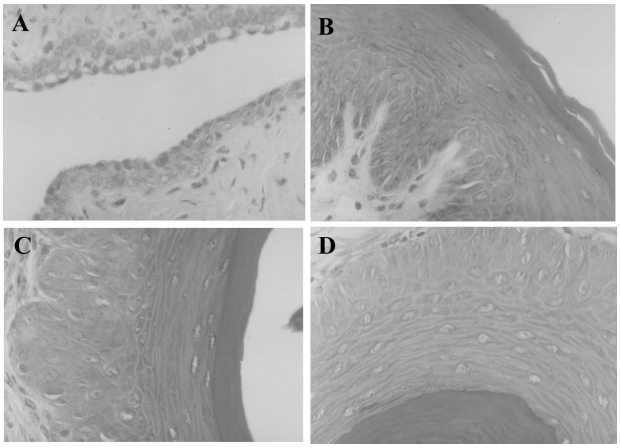

Fig. 3. Vaginal histology in ovariectomized mice treated with corn oil (A), E2 (B), combination E2 + DBP (C) and E2 + BPA (D) at the subcutaneous for 3 days.

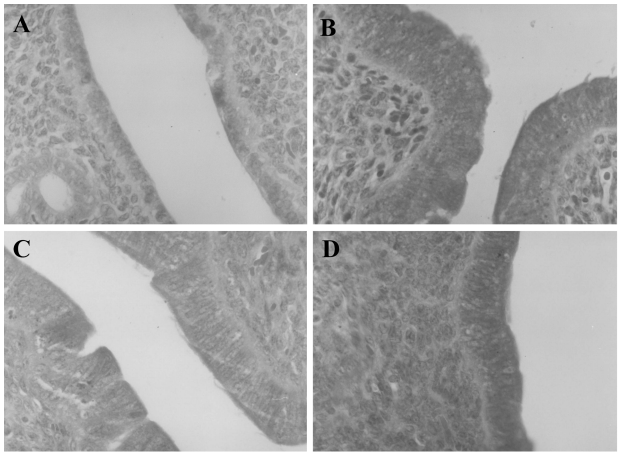

Fig. 4. Uterine histology in ovariectomized mice treated with corn oil (A), E2 (B), combination E2 + DBP (C) and E2 + BPA (D) at the subcutaneous for 3 days.

와 시험물질 혼합 처치군 이었다. 한편, 양성대조군인 E2 단독 투여군과 비교 시 질 상피 세포의 증식이 유의적으로 증가한 그룹은 E2+BPA 처치 군에서 관찰되었다(Fig. 3).

난관의 조직 병리학적 검사

난관의 조직학적인 단면을 현미경하에서 관찰한 결과, 음성대조군에서의 난관의 직경과 비교시 유의적인 증가를 보인 그룹은 E2와 시험물질 혼합처치군 전체와 BPA+DBP 군이었다(Fig. 4).

유선의 조직 병리학적 검사

E2를 단독 또는 다른 물질과 혼합투여시의 모든 군에서 유선조직에서의 bud의 숫자가 음성대조군에 비하여 증가한 것을 관찰할 수 있었으며, BPA 단독 투여군, BPA와의 혼합 투여군, DEHP+DBP 혼합 투여군에서의 유선에서 bud 숫자가 증가한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

이상에서의 결과를 보면 본 실험에서 사용된 DEHP, DBP, BPA 물질에 있어서의 유의적인 상가 내지는 상승작용은 관찰되지 않았으나, E2와의 혼합처치시에 E2단독처치군과 비교 시 생체내에서의 에스트로젠 활성화에 도움을 주는 것으로 판단할만한 혼합처치군이 일부 관찰되었다. 시험물질 중에서 이러한 상가작용을 하는 것으로 의심되는 물질은 BPA 였으며, 조직학적인 관찰항목 중 가장 민감하게 조직의 활성화를 나타낸 조직은 질상피세포였다. 결론적으로 환경호르몬물질간의 생체내에서 상가 혹은 상승작용에 대한 명확한 실험결과는 도출할 수 없었으나, 환경호르몬물질이 생체내 작용하는 데에 있어서 서로간에 상승작용을 할 수 있다는 가능성은 충분한 것으로 판단되어진다.

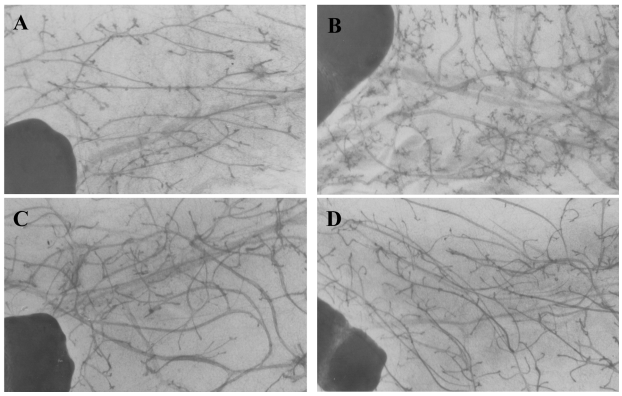

Fig. 5. Mammary gland histology in ovariectomized mice treated with corn oil (A), E2 (B), combination E2 + DBP (C) and DEHP + DBP (D) at the subcutaneous for 3 days.

국문요약

환경호르몬 물질의 생체내에서의 상호작용에 의한 상가 또는 상승 작용을 알아보기 위하여 환경호르몬 물질들을 조합하여 마우스에 처치한 후 생체내에서 생식기의 변화 정도를 조직병리학적으로 관찰하였다. 암컷 ICR 마우스에 난소적출술을 실시하고 2주 후에 DEHP, DBP, BPA 의 환경호르몬 물질을 단독 또는 두개씩 조합하여 마우스에 피하로 주입하였다. 육안적인 변화에서는 모든 군에서 이상이 관찰 되지 않았으며, 부검 후 자궁의 무게를 측정한 결과에 있어서도 유의적인 변화를 관찰할 수 없었으나, 자궁 내 fluid 존재에 있어서는 E2 단독 투여 군과 E2와 함께 투여한 모든 그룹(E2+DEHP, E2+DBP, E2+BPA)에서 관찰되었다. 조직병리학적인 관찰에 있어서는 자궁상피세포, 질 상피세포, 유선의 변화 그리고 난관 직경의 변화를 관찰하였다. 그 결과 민감도에 있어서 가장 유의적인 변화를 보인 항목은 질 상피세포의 변화였으며, 환경호르몬 물질을 두개씩 혼합하여 처치한 그룹에 있어 단독으로 처치한 그룹과 비교 시 변화의 정도가 심한 것이 일부 관찰 되었으나 통계학적으로 유의성을 가지고 있다고 결론을 내리기는 힘들었다. 결론적으로 환경호르몬물질간의 생체내에서 상가 혹은 상승작용에 대한 명확한 결과는 도출할 수 없었으나, 환경호르몬물질이 생체내 작용하는 데에 있어서 서로 간에 상승작용을 할 수 있다는 가능성은 충분한 것으로 판단되어진다.

참고문헌

1. Page, B. D., and Lacroix, G. M.: The occurrence of phthalate ester and di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian packaging and food sampled in 1985-1989: a survey. *Food Addit Contam* **12**, 129-151 (1995).
2. Sharman, M., Read, W.A., Castle, L. and Gilbert, J.: Levels of di-2-ethylhexyl phthalate and total phthalate esters in milk, cream, butter and cheese. *Food Addit Contam* **11,** 375-385 (1994).
3. Siddiqui, A. and Srivastava, S.P.: Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate administration on rat sperm count and on sperm metabolic enzymes. *Bull Environ Contam Toxicol* **48,** 115-119 (1992).
4. Davis, B.J., Maronpot, R.R. and Heindel, J.J.: Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **128,** 216-223 (1994).
5. Gangolli, S.D.: Testicular effects of phthalate ester. *Environ Health Perspect* **45,** 77-84 (1982).
6. Gray, T.J.B. and Gangolli S.D.: Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environ Health Perspect* **65,** 229-235 (1986).
7. Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food (MAFF).: Plasticizer : continuing surveillance. Food surveillance paper no. 30. London: Her Majestry's Stationery Office (1990).
8. Gray, T.J.B., and Beamand J.A.: Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells. *Food Chem. Toxicol.* **22**, 123-131 (1984).
9. Kang, J.H. and Kondo, F.: Distribution and biodegradation of bisphenol A in water hyacinth. *Bull Environ Contam Toxicol.* 77, 500-507 (2006).
10. Kamrin, M.A.: Bisphenol A: a scientific evaluation. *MedGenMed.* **6**, 7(2004).
11. Gatidou, G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S. and Lekkas, T.D.: Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* **27** (2006).
12. Hong, E.J., Park, S.H., Choi, K.C., Leung, P.C. and Jeung, E.B.: Identification of estrogen-regulated genes by microarray analysis of the uterus of immature rats exposed to endocrine disrupting chemicals. *Reprod Biol Endocrinol.* **29**, 49 (2006).
13. Wolff, M.S.: Endocrine disruptors: challenges for environmental research in the 21st century. *Ann N Y Acad Sci.* **1076**, 228-238 (2006).
14. Tsai, W.T.: Human health risk on environmental exposure to Bisphenol-A: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* **24**, 225-255 (2006).