J. Fd Hyg. Safety
Vol. 22, No. 3, pp. 218~222 (2007)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

효모재조합 검색시험법을 이용한 DEHP, DBP의 에스트로젠 효과

정지윤*
공주대학교 특수동물학과

The Estrogenic Effects of Phthalates(DEHP, DBP) in Yeast Recombinant Assay

Ji-Youn Jung*
Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan, Korea
(Received August 3, 2007/Accepted September 10, 2007)

ABSTRACT – Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) were screened for estrogenic activity using a recombinant yeast screening system consisted with estrogen receptors and β-galactosidase as reporter gene. The chemicals showed estrogenic activity in ranges of 1×10^{-10} to 1×10^{-7}M (DEHP) and of 1×10^{-9} M to 1×10^{-6} M (DBP) respectively. 17β-estradiol, as a positive control, showed maximal activity at 1×10^{-9} M. The concentration of half-maximal estrogenic activity was 1×10^{-9} M for both chemicals. However, the concentration of maximal estrogenic activity was 1×10^{-7} M for DEHP and 1×10^{-8} M for DBP. These results suggested that DBP was higher in relative potencies and more sensitive than DEHP. In conclusion, DEHP and DBP were both estrogenic, even though DBP was more reactive to estrogen receptor.

Key words: DEHP, DBP, yeast recombinant assay, 17ß-estradiol

서 론

최근까지 내분비 교란물질이라고 불리우는 인공 estrogen 모방 화학물질에 대하여 인간의 내분비호르몬에 대하여 영향을 줄 수 있는 물질에 대한 노출의 증가가 정자의 양 또는 질이 저하되는 현상과 관련한다는 보고가 있어왔다.[1-3]

살충제, 계면활성제 그리고 플라스틱과 같은 주요 화학물질들은 다양한 용도로 사용된다. DDT라는 살충제는 초기 환경호르몬 중의 하나로 어류에서 내분비 교란에 대하여 연구 되었다.[4-5] 일부 다른 인공화학물질은 발정을 촉진하는 것으로도 알려져 왔다. 예를 들어 비이온 계면활성제의 산물인 4-nonylphenol, Nonylphenol Polyethoxylate에 노출되어 지는 것은 *in vivo*와 *in vitro*에서 둘 다 발정을 촉진하는 효과를 유발하는 것으로 알려졌다.[6-7] 그러나, 자연적으로 생성하는 xenoestrogen (coumestrol과 genistein과 같은 phytoestrogen을 포함하여, zearalenone과 같은 mycoestogen들) 또한 존재하는데 이것들은 인간이 항상 노출되어왔던 식물 음식 성분에서 보이기도 한다.

*Correspondence to: Ji-Youn Jung, Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University
Tel: 82-41-330-1526 Fax: 82-41-330-1529
E-mail: wangza@kongju.ac.kr

이러한 많은 환경호르몬 물질 중에서 phthalate는 발정을 촉진하는데 영향을 주는 많은 화학물질 중에 하나로서 생식계통에 이상을 주는 것으로 실험 결과 밝혀지고 있다.[8-10] *in vivo* 실험에서 다세대에 걸친 연구결과 Sprague-Dawley(SD) rat에서의 DBP의 생식독성이 최근 보고되었다. DBP에 노출된 rat는 대부분 생식능력이 없는 동물이 F1 수컷에서 첫 번째 세대보다 두 번째 세대가 훨씬 많은 것으로 나타났다. 이러한 결과들로부터 phthalate가 생체 내에서 발정을 촉진하고 정상적인 수컷 성장의 발달을 저해한다는 가능성이 꾸준히 보고되고 있다.

phthalate는 본래 polyvinyl chloride(PVC) 같은 중합체 물질에서 유연성을 얻기 위해서 그리고 플라스틱에 있어서 가소제로 사용되고 있다. phthalate는 세계적으로 많은 양이 생산되고 있고 대부분이 자연환경에서 노출된 상태로 확인되고 있다.[11-15] 예를 들어 phthalate는 멕시코만의 물, 침전물, 공기, 생물상에서 그리고 영국의 그레이터맨체스터 지역의 강물과 오물방수로에서 뽑은 샘플에서도 검출되었다. 또한 phthalate에 오염된 음식 샘플도 보고되었다. 이러한 phthalate류의 화학물질은 지방에 잘 녹는 성질을 가지고 있어서 지방성 음식들(크림, 치즈, 버터 등)에 있어서 함유될 가능성이 높다. Sharman *et al.*에 의하면 치즈에서 총 phthalate가 114 mg/kg 이상 발견되었다.[12]

그러나 다수의 샘플에서는 DEHP가 0.6-3.0 mg/kg이고 총 phthalate는 4-20 mg/kg이 함유되어 있었다. Sharman *et al.*은 이러한 높은 수치의 phthalate가 검출되는 것이 원료 또는 오염균의 존재가 희석되는 결과가 아닌 환경적인 원인(예를 들어 치즈를 싸고 있는 포장지로부터)으로부터 발생한다고 언급했다.

광범위하게 사용되는 phthalate 같은 화학물질은 사람이나 야생에서 번식체계에 해로운 영향을 끼칠 수 있는 가능성이 있다. 그러나 phthalate가 연구되면서 phthalate들이 모두 비슷한 특성을 가졌다는 가정으로(예를 들어 에스트로겐의 활동) 하나의 그룹으로 해석되기도 한다.[13-15] 이번 연구에서 이러한 phthalate계통의 화학물질 중에서 효모재조합검색법을 이용하여 에스트로젠의 반응을 나타내는 것으로 의심되는 DEHP와 DBP에 대하여 연구를 수행하여 실제로 이러한 특성을 어떻게 나타내는지에 대하여 조사하고자 하였다.

Di-phthalate 또는 bis-phthalate, DEHP로도 불리고 있는 물질은 플라스틱에서 유연제로 쓰이는 액상의 물질이다. 플라스틱의 용도(우의, 신발, 바닥재료, 식탁보, 장난감 등)에 따라서 1-40%의 DEHP를 함유할 수 있으며, 혈액 튜브 등의 의학용 도구에도 사용되고 있다. 이러한 DEHP는 일단 플라스틱 제품에 사용되어진 후에 시간이 경과하면서 서서히 용출 되며, 따라서 공기, 흙, 물 등에 광범위하게 분포할 수 있다. 또한, 음식물에 있어서도 포장재, 제조과정, 수송 중에 DEHP가 잠재적으로 들어갈 수 있으며, 육류에서도 발견되고 있고, 또한 오일이나 지방성 음식에 더 잘 녹는 성질을 가지고 있어서 우유나 치즈에서 최고 농도로 검출되었다는 보고도 있다.[16-18]

DBP는 무색, 무미, 무취의 오일성상의 액체이며, 플라스틱을 유연하게 만드는 성질을 가지고 있어서 카펫트, 페인트, 접착제, 헤어스프레이, 로케트 연료 등에 다양하게 사용되고 있다. 현대 사회에서 DBP의 사용은 매우 다양하고, 그 양 또한 우리나라에서만 매년 약 4천 톤으로서 환경 중에 널리 분포하고 있음을 짐작할 수 있으며, 대부분의 사람들은 공기, 물, 음식을 통하여 낮은 농도이기는 하지만 계속 노출될 수 있다.[19] 그 중에서도 음식을 통한 노출이 DBP의 주요 오염경로로서, 음식물을 통해 일일 약 50-500 ppb가 섭취될 수 있다고 한다. 이러한 공기, 물, 음식을 통한 섭취가 사람에게 해로울 정도로 높은 양은 아니지만, 몇몇 경우에는 예상보다 훨씬 많은 양에 노출되기도 한다.[20-21]

이상에서의 연구 보고서에서 보듯이 DEHP와 DBP는 모두 환경에서 인체에 영향을 줄 수 있는 물질로서 그 동안은 안전한 물질로 판단되어 왔으나, 최근의 동물 실험 및 인간에게서 일어나는 환경에 의한 생식기 계통의 이상, 정자수의 감소 즉 내분비교란성 물질이라는 의심을 받고 있는 물질들이다.[22] 본 논문에서 수행하는 효모재조합시험법은 사람의 estrogen receptor(ER)을 도입한 yeast 세포에서 VIT promoter와 reporter (luc or CAT)를 재조합하여 시험하는 특징이 있다. 이 시험법은 독성물질의 유해성을 평가하기 위해 많이 사용되어 왔고, 염소화 살충제에 매우 둔감하기도 하지만 alkylphenol류의 시험에서는 가장 민감하게 반응하기도 한다. 리포터 유전자의 재조합능력에 따라 다르기도 하지만 다른 ER 결합 시험법보다 사용이 용이하다. 따라서, phthalate계통의 화학물질 중 DEHP와 DBP를 이 시험법에 적용하여 에스트로젠 활성도 유무 및 환경호르몬으로서의 가능성에 대하여 연구하고자 한다.

재료 및 방법

Saccharomyces cerevisiae ER+ LYS 8127(YER)를 성장배지에 넣은 후, shaking incubator (300rpm)에서 증식시킨다. 이 효모는 각각 CUP1 metallothionine promoter와 hER 유전자를 포함하는 vector와 리포터시스템으로 estrogen response element, β-gal 유전자를 안정적으로 발현한다. S. cerevisiae ER+ LYS 8217은 3.35 g/ml yeast nitrogen base, 2% dextrose, 30 μg/ml L-lysine-HCl, 35 μg/ml L-histidine-HCl를 포함하는 성장배지에서 유지하고, 성장배지에 20% glycerol를 첨가하여 -80°C 이하에서 보존한다.

효모가 증식하면 신선한 배지로 적정 희석한 후 500 uM $CuSo_4$를 첨가한 다음, 50 ml 튜브에 적정량을 분주한다. 각각의 물질을 처치하여 shaking incubator에서 18시간 배양한 후, 신선한 배양액을 동일한 농도로 희석한 후 96-well plate에 100 ul씩 분주한다. 각 well에 Z buffer를 100 ul씩 분주하고 20분 후 발색정도를 microplate ELISA reader를 이용하여 420nm와 590nm를 이용하여 측정한다. 모든 자료의 통계는 SAS를 이용하여 ANOVA 분석 후, Dunnett't test를 유의수준 5%에서 분석한다.

결과 및 고찰

사람의 ER을 도입한 yeast 세포에서 VIT promoter와 reporter (luc or CAT)를 재조합하여 파라벤이 에스트로젠 수용체에 결합하는 정도를 시험하여 내분비계 장애작용을 검색하였다.

17β-Estradiol의 효모재조합시험에서의 에스트로젠 활성도

효모재조합시험이 잘 이루어지고 있는지의 여부를 평가하는 것과 아울러 17β-Estradiol의 농도별 에스트로젠 활성도를 측정하기 위하여 17β-Estradiol에 대한 효모재조합시험을 선행하여 실시하였다. 그 결과 에스트로젠 최대 활성치 대비 50% 이상의 활성을 보이기 시작한 농도는 10^{-11} M에서 나타났으며, 에스트로젠 최대활성농도는 10^{-9} M에서 관찰 되었다(Fig. 1).

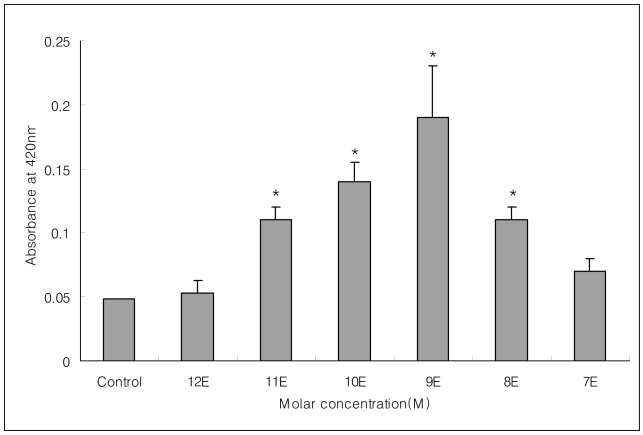

Fig. 1. Estrogenic effect of E2 in Yeast recombinant assay. *P<0.05; Each point is mean of three determinations and significant differences as compared with control.

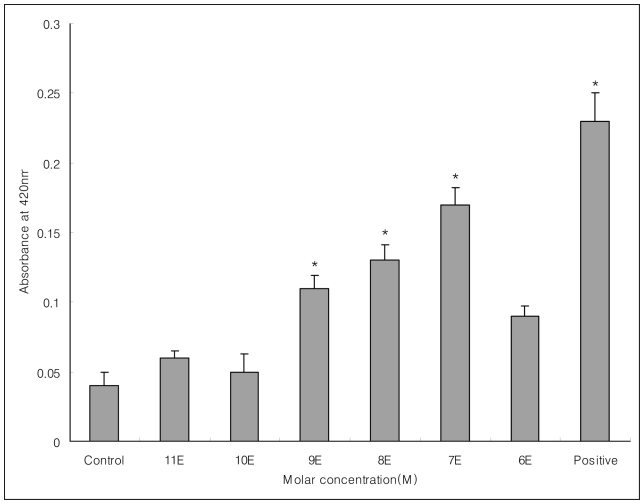

Fig 2. Estrogenic effect of DEHP in Yeast recombinant assay. *P<0.05; Each point is mean of three determinations and significant differences as compared with control.

DEHP의 효모재조합시험에서의 에스트로젠 활성도

시험물질인 DEHP 처치시의 효모재조합시험에서의 결과는 10^{-9} M에서 10^{-7} M까지 시험하였을 때 농도의존적으로 에스트로젠 활성이 증가하였으며, 10^{-7} M 농도에서 가장 강력한 에스트로젠 활성을 나타내었다(Fig. 2).

DBP의 효모재조합시험에서의 에스트로젠 활성도

DBP의 경우 에스트로젠 최대 활성치 대비 50% 이상 활성화가 되어진 구간은 10^{-9} M에서부터 10^{-6} M까지 였으며 에스트로젠이 최대활성화가 나타난 농도는 10^{-8} M이었다(Fig. 3).

에스트로젠 수용체와 리포터 유전자인 β-galactosidase가 도입된 효모재조합검색시험법을 이용하여 DEHP와 DBP의 내분비계 장애작용을 검색하였다. 양성대조 시험물질로 17β-estradiol을 설정하여 DEHP와 DBP의 에스트로젠

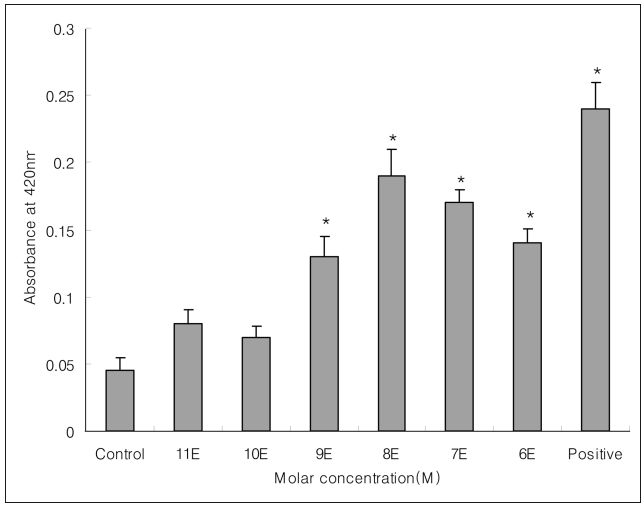

Fig 3. Estrogenic effect of DBP in Yeast recombinant assay. *P<0.05; Each point is mean of three determinations and significant differences as compared with control.

활성을 비교분석 하였을 때, 17β-estradiol의 경우 10^{-9} M에서 가장 활성이 높게 관찰되었다. DEHP의 경우 10^{-10} M에서 10^{-7} M까지 시험하였을 때 농도의존적으로 에스트로젠 활성이 증가하였으며, 10^{-7} M의 경우 가장 강력한 에스트로젠 활성을 보였다. DBP의 경우 10^{-9} M에서 10^{-6} M까지 에스트로젠 활성이 관찰되었다. Yeast two-hybrid assay는 포유류의 ER를 도입시킨 형질변환효모를 이용하는 방법이다. 이 효모는 세포핵내에 에스트로겐 수용체를 가지고 있어서 여기에 에스트로겐 물질이 결합해 활성화하게 되면, DNA상의 에스트로겐 응답성 엘리먼트에 결합해서 β-galactosidase를 분비시켜 reporter 유전자의 Lac가 전사를 개시하고, 이 β-galactosidase를 ONPG용액으로 정색시켜 흡광도를 측정하는 것으로 에스트로겐 활성을 조사하게 된다. 이러한 원리를 이용하여 본 시험을 실시하게 되었으며 EC_{50}을 기준으로 각각의 시험물질을 비교해보면 DEHP와 DBP의 경우 최대활성화 대비 50% 이상의 활성도를 보이기 시작하는 농도가 10^{-9} M로 나타나서 비슷한 농도에서 에스트로젠 활성화가 이루어지는 것으로 추측할 수 있었다. 그러나, 에스트로젠 최대활성화 시의 농도를

Table 1. Estrogenic activity of DEHP and DBP in Yeast recombinant assay

Compound	EC_{50}	C_{max}
17β-Estradiol	1×10^{-11} M	1×10^{-9} M
DEHP	1×10^{-9} M	1×10^{-7} M
DBP	1×10^{-9} M	1×10^{-8} M

EC50 is the concentration of the test compound giving half-maximal estrogenic activity.
Cmax is the concentration of the test compound giving maxmal estrogenic activity.

비교해 보면 DBP가 DEHP보다 10배 낮은 농도에서 최대 활성치가 관찰되었기 때문에 DBP가 DEHP보다 에스트로젠 작용에 더 민감하게 반응하는 것으로 판단할 수 있었다(Table 1).

그러나, 이러한 *in vitro* 상에서의 반응은 생체에서 실제 일어날 수 있는 여러 반응 중 극히 일부분만으로 실험되어지기 때문에 *in vivo*에서의 결과를 얻지 않은 상태에서 단정적으로 결론을 내기는 어렵다. 결과적으로 본 실험에 사용되어진 시험물질인 DEHP와 DBP는 효모재조합시험법에 있어서 에스트로젠 활성을 유도하는 것으로 판단되어지며 감수성에 있어서는 DBP가 DEHP보다 높은 것으로 여겨진다.

요 약

에스트로젠 수용체와 리포터 유전자인 β-galactosidase가 도입된 효모재조합검색시험법을 이용하여 DEHP와 DBP의 내분비계 장애작용을 검색하였다. 양성대조 시험물질로 17β-estradiol을 설정하여 DEHP와 DBP의 에스트로젠 활성을 비교분석 하였을 때, 17β-estradiol의 경우 10^{-9} M에서 가장 활성이 높게 관찰되었다. DEHP의 경우 10^{-10} M에서 10^{-7} M까지 시험하였을 때 농도의존적으로 에스트로젠활성이 증가하였으며, 10^{-7} M의 경우 가장 강력한 에스트로젠활성을 보였다. DBP의 경우 10^{-9} M에서 10^{-6} M까지 에스트로젠활성이 관찰되었다.

DEHP와 DBP의 경우 최대활성화 대비 50% 이상의 활성도를 보이기 시작하는 농도가 10^{-9} M로 나타나서 비슷한 농도에서 에스트로젠 활성화가 이루어지는 것으로 추측할 수 있었다. 그러나, 에스트로젠 최대활성화 시의 농도를 비교해 보면 DBP가 DEHP보다 10배 낮은 농도에서 최대활성치가 관찰되었기 때문에 DBP가 DEHP보다 에스트로젠 작용에 더 민감하게 반응하는 것으로 판단할 수 있었다. 결과적으로 본 실험에 사용되어진 시험물질인 DEHP와 DBP는 효모재조합시험법에 있어서 에스트로젠 활성을 유도하는 것으로 판단되어지며 감수성에 있어서는 DBP가 DEHP보다 높은 것으로 여겨진다.

참고문헌

1. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., and Skakkebaek, N.E.: Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* **305**, 609-613 (1992).
2. Sharpe, R.M. and Skakkebaek, N.E.: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet.* **341**, 1392-1395 (1993).
3. Soto, A.M., Justicia, H., and Wray, J.W., and Sonnenschein C.: p-Nonyl-phenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect.* **92**, 167-173 (1991).
4. White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., and Parker, M.G.: Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology.* **135**, 175-182 (1994).
5. Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G., and Sumpter, J.P.: A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect.* **103**, 582-587 (1995).
6. Sonnenschein, C., Soto, A.M., Fernandez, M.F., Olea, N., Olea-Serrano, M.F., and Ruiz-Lopez, M.D.: Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin Chem.* **41**, 1888–1895 (1995).
7. Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., and Serrano, F.O.: The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect.* **103**, 113-122 (1995).
8. Sharpe, R.M., Fisher, J.S., Millar, M.M., Jobling, S., and Sumpter, J.P.: Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Perspect.* **103**, 1136-1143 (1995).
9. Wine, R.N., Li, L.H., Barnes, L.H., Gulati, D.K., and Chapin, R.E.: Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspect.* **105**, 102-107 (1997).
10. Jaeger, R.J. and Rubin, R.J.: Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. *N Engl J Med.* **287**, 1114-1118 (1972).
11. Giam, C.S., Chan, H.S., Neff, G.S., and Atlas, E.L.: Phthalate ester plasticizers: a new class of marine pollutant. *Science.* **199**, 419-421 (1978).
12. 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).
13. Shibko, S.I. and Blumenthal, H.: Toxicology of phthalic acid esters used in food-packaging material. *Environ Health Perspect.* **3**, 131-137 (1973).
14. Dirven, H.A., van den Broek, P.H., Arends, A.M., Nordkamp, H.H., de Lepper, A.J., Henderson, P.T., and Jongeneelen, F.J.: Metabolites of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate in urine samples of workers in polyvinylchloride processing industries. *Int Arch Occup Environ Health.* **64**, 549-554 (1993).
15. Ahel, M., McEvoy, J., and Giger, W.: Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ Pollut.* **79**, 243-248 (1993).
16. Albro, P.W. and Lavenhar, S.R.: Metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Drug Metab Rev.* **21**, 13-34 (1989).
17. Gray, T.J. and Gangolli, S.D.: Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environ Health Perspect.* **65**, 229-235 (1986).
18. Siddiqui, A and Srivastava, S.P.: Effect of di(2-ethyl-

hexyl)phthalate administration on rat sperm count and on sperm metabolic enzymes. *Bull Environ Contam Toxicol*. **48**, 115-119 (1992).
19. 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).
20. Gangolli, S.D.: Testicular effects of phthalate esters. *Environ Health Perspect*. **45**, 77-84 (1982).
21. Ousterhout, J., Struck, R.F., and Nelson, J.A.: Estrogenic activities on methoxychlor metabolites. *Biochem Pharmacol*. **30**, 2869-2871 (1981).
22. Ashby, J., Lefevre, P.A., Odum, J., Harris, C.A., Routledge, E.J., and Sumpter, J.P.: Synergy between synthetic oestrogens? *Nature*. **385**, 494-494 (1997).