J. Fd Hyg. Safety 21(4), 197–203 (2006)

파라벤류가 수컷 성 성숙에 미치는 시험연구

김선중[1] · 황재웅[1] · 박정란[1] · 이성훈[1] · 이영건[1] · 정지혜[1] · 정윤혁[1] · 이수진[1] · 정지원[1,3] · 정지윤[2] · 이영순[1,3] · 강경선[1†]

[1]서울대학교 수의과 대학 공중보건학 교실, [2]공주 대학교 산업과학대학 특수동물학과, [3]학술 진흥 재단 지정 인수공통질병 중점 연구소

Assessment of Pubertal Development to Parabens-induced Estrogenic Effect in Male Mice

Sun-Jung Kim[1], Jae-Woong Hwang[1], Jung-Ran Park[1], Yeong-Geon Lee[1], Ji-Hye Chung[1], Yun-Hyeok Jeong[1], Soo-Jin Lee[1], Ji-Won Jung[1,3], Ji-Youn Jung[2], Yong-Soon Lee[1,3], and Kyung-Sun Kang[1†]

[1]*Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea*

[2]*Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, ChungNam, Korea*

[3]*KRF priority Research Institute for Zoonotic Disease*

(Received November 27, 2006/ Accepted December 18, 2006)

ABSTRACT – Parabens are most wildly used in food, cosmetics and pharmaceutic products as preservatives caused of safety and cheap. we had examined that paraben had estrogenic activity through the in *vivo* and *in vitro* experiments in last year. We demonstrated that most of parabens(ethyl, butyl, propyl, isobutyl, isopropyl) increased significantly uterus weight as well as induced proliferation of MCF-7 cell and binding of estrogen receptor as endocrine disrupter compounds. In this study, we evaluated that whether parabens have effect on male reproductive system or not. the male rats were administrated parabens by oral injection then examined separation of preputial day for PND23~PND52. As the results, most parabens delayed pubertal development compare to control group. The separation of preputial day of Butyl and Propyl parabens at high concentration were PND 44 days and PND 45days compared to control group as PND 40 days. Even though, parabens as endocrine disrupter wildly spread in food, cosmetics and pharmaceutic products, we didn't have the safe guideline. In abroad, they are re-evaluating safety assessment for parabens. In conclusion, parabens delayed pubertal development in juvenile. parabens are consider as endocrine disrupter chemicals.

Key words: parabens, estrogenic activity, endocrine disrupter, preputial day

서 론

환경 호르몬 혹은 내분비계 교란 물질이라고 하며, 환경에 노출된 화학물질들이 생체내에 유입되고 축척되어, 호르몬처럼 작용하는 물질을 말한다. 내분비계 장애 물질의 종류는 다양하며, 현재 까지 선정된 물질류는 약 70여종으로 크게 농약류와 합성 화합물들이 그 주류를 이르고 있다. 1990년대 들어서 처음 내분비계 교란 물질의 유해성에 대한 보고가 이루어지기 시작하였으며, 자연적인 호르몬의 작용을 방해하거나 교란시켜 암이나 수컷의 여성화등과 같은 불균형한 호르몬 분비로 인한 유해성이 보고되었다.

내분비계 장애 물질로 추정되는 물질 중 파라벤류는 그동안 안전하면서도 가격이 싸며, 그동안 알려진 독성은 알러지 반응정도에 불과 하였으며, 보존제로서 화장품, 의약품, 식품 등에 널리 사용되어 왔다. 그 종류로는 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸등이 있다. 파라벤류는 여성 호르몬과 유사한 에스트로겐성을 가지고 있어, 에스트로겐과 유사한 작용이 생체내에서 수행됨이 검증되었다. Dabre *et al.*[1,2]은 유방암 환자의 조직에서 파라벤류의 농도가 현저히 증가되어 있었음을 보고 한바 있으며, 임신한 랫드에 파라벤류를 투여 하였을시 F1 male의 정자수 감소도 보고되었다.[3] 본 연구팀에서는 파라벤류가 암컷 랫드에서 자궁의 증식을 유도하였을 뿐 아니라[4] *in vitro* 시험법에서도 유방암 세포주

†Author to whom correspondence should be addressed.

인 MCF-7 세포를 유의적으로 증가 시키고, 에스트로겐 수용체와의 결합함을 보고 하였다[5]. 현행 연구에서 여성뿐 아니라 남성의 성성숙에 어떠한 영향을 미치는지 조사 하기 위하여, 미성숙한 랫드에 파라벤류(에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸) 을 SD 수컷 랫드를 이용, PND 23 일째부터 파라벤류를 예비 실험에서 나온 결과를 토대로 농도별로 PND 52일째까지 투여하며, 투여기간 동안 ,포피선 분리 개시일을 기록하고, 투여종료 후 부검하여 부고환, 정낭선, 전립선등의 남성 생식기 무게 변화와 호르몬 측정 등으로 내분비 장애 작용을 검증하였다.

재료 및 방법

시험물질

시험물질로는 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 이소프로필 파라벤, 부틸 파라벤, 이소부틸 파라벤이 사용되며 대조군으로 옥수수유(Corn Oil), 양성대조군으로 플루타마이드(Flutamide)[1] 를 사용하였다.

시험동물, 동물 수, 동물선별, 군 구성

시험동물로는 Sprague Dawley((주) 오린엔트 코리아 : 경기도 성남시 중원구 상대원 1동 143-1번지))를 사용하였으며 암컷과 수컷 Sprague Dawley rat를 각각 20마리씩 입수, 교배를 실시하여 분만 후 양호하게 발육한 생후 18일령 수컷신생자의 체중을 측정한 후 평균 체중 ± 5%범위 내에 해당하는 동물을 선별하고 2일 후(생후 20일령) 체중을 다시 측정하여 ±5%범위 내의 동물을 선별하여 대조군 (용매 투여군),양성 대조군(Flutamide) 에틸파라벤 투여군, 프로필파라벤 투여군, 이소프로필파라벤 투여군, 부틸파라벤 투여군, 이소부틸 파라벤 투여군 각각 10두씩 시험에 사용한다.

투여

투여경로는 경구 투여로 액체상태의 시험물질을 4ml/kg의 용량으로 생후 23일령 (PND 23)부터 52 (PND 52)일령까지 1일 1회 30일간 투여한다.

일반증상 관찰, 사망률, 체중 측정, 사료 및 음수 섭취량 측정

투여기간동안 1일 1회 일반상태의 변화, 운동성, 자율 신경 이상 등의 일반증상을 관찰한다. 모든 동물에 대해 1일 1회 죽은 동물이나 빈사상태를 살피고, 빈사상태에 있는 동물은 자가분해(autolysis)를 막기 위해 ether로 마취시켜 부검을 수행한다. 시험 중 폐사동물은 발견 시마다 부검하는 것을 원칙으로 하고, 즉시 부검이 불가능할 경우는 냉장보관 후 24시간 내에 부검한다.

체중은 투여시작 2일전(생후 21일령), 투여시작일 (생후23일령), 투여기간 중에는 매일 측정한다. 사료 및 음수 섭취량은 투여기간 중 매일 측정한다.

포피선 분리 측정

성성숙의 지표가 되는 포피선 분리개시일 측정을 위해, 모든 동물에 대해 PND 23일째부터 투여 종료 시까지 매일 관찰하며, 포피선 분리 개시일시[2-4]를 측정 기록한다.

호르몬(TSH. T4,T3, 및 Testosterone) 측정

모든 동물에 대해 투여종료 후 배대 동맥(abdominal aorta)으로부터 채혈한 혈액으로부터 TSH, T4, T3 및 Testosterone을 측정한다.

부검, 장기중량측정

투여종료 후 생존동물은 ether로 마취시켜 외관검사를 실시한 후, 배대동맥으로부터 방혈 및 치사시켜 체내 장기조직에 대해 육안 검사를 실시한 후 고환(Testes), 부고환(Epidiymides), 전립선(Prostate), 정낭(Seminal vesicle with coagulating gland), LABC(Levator ani plus bulbcavernosus muscle complex), 갑상선(Thyroid), 뇌하수체(Pituitary gland), 간(Liver), 신장(Paired Kidney)을 적출하여 절대 장기 중량을 측정하고 체중에 대한 상대 장기 중량을 산출한다.

조직병리학적 검사

모든 시험개체별로 정소(Testes), 부고환(Epidiymides), 전립선(Prostate), 정낭(Seminal vesicle with coagulating gland), LABC(Levator ani plus bulbcavernosus muscle complex), 갑상선(Thyroid), 뇌하수체(Pituitary gland), 간(Liver), 신장(Paired Kidney)을 적출하여 10 % 중성포르말린용액 (10% buffered neutral formalin)에 고정하고 일정한 두께 (3 mm)로 삭정한 다음, 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하여 4 μm의 조직절편을 제작한다. 이후 일반적인 염색방법인 Hematoxylin & Eosin 염색 (H&E stain)을 하여 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical Co., Japan)으로 관찰하여 조직병리학적 검사를 진행한다.

자료의 통계처리

시험 중 측정된 시험동물의 체중 등에 관한 자료의 통계학적 분석을 위하여 one-way ANOVA를 실시하여 $p=0.05$ 수준에서 군간 유의성을 검정하고 유의성이 인정되면, Dunnett's t-test를 실행하여 대조군과 시험군 간의 통계학적 유의성을 검정한다($p<0.05$).

결 과

일반증상, 사망률, 체중 측정, 사료 및 음수 섭취량 측정

관찰 기간 동안 모든 시험군, 대조군, 양성 대조군(플루타마이드)에서 특이한 일반 증상이 관찰되지 않았다. 또한 투여기간 동안 대조군을 비롯한 시험처치군에서 사망한 동물은 없었다. 한편 체중측정 결과 대조군에 비해 양성 대조군인 플루타마이드를 비롯한 파라벤류 처치군에서 체중이 감소함을 보였다(Fig. 1). 사료 및 음수 섭취량은 양성 대조군이 전반적으로 낮은 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다(결과는 보이지 않음).

포피선 분리 측정

파라벤류가 수컷 성 성숙에 미치는 영향을 시험한 결과, 대조군의 포피선 분리 개시일은 40±1.83일이었으며, 각 물질별로 포피선 분리 개시일을 살펴보면 가장 유의적인 그룹은 프로필 파라벤군이였으며, 고농도(2000 mg/kg/day) 에서 44±1.94일 이였다. 부틸 파라벤의 경우도 가장 고농도인 2000 mg/kg/day에서 포피선분리 개시일이 44±2.73일로 유의적으로 분리개시일이 늦어짐이 관찰되었다. 또한 이소부틸

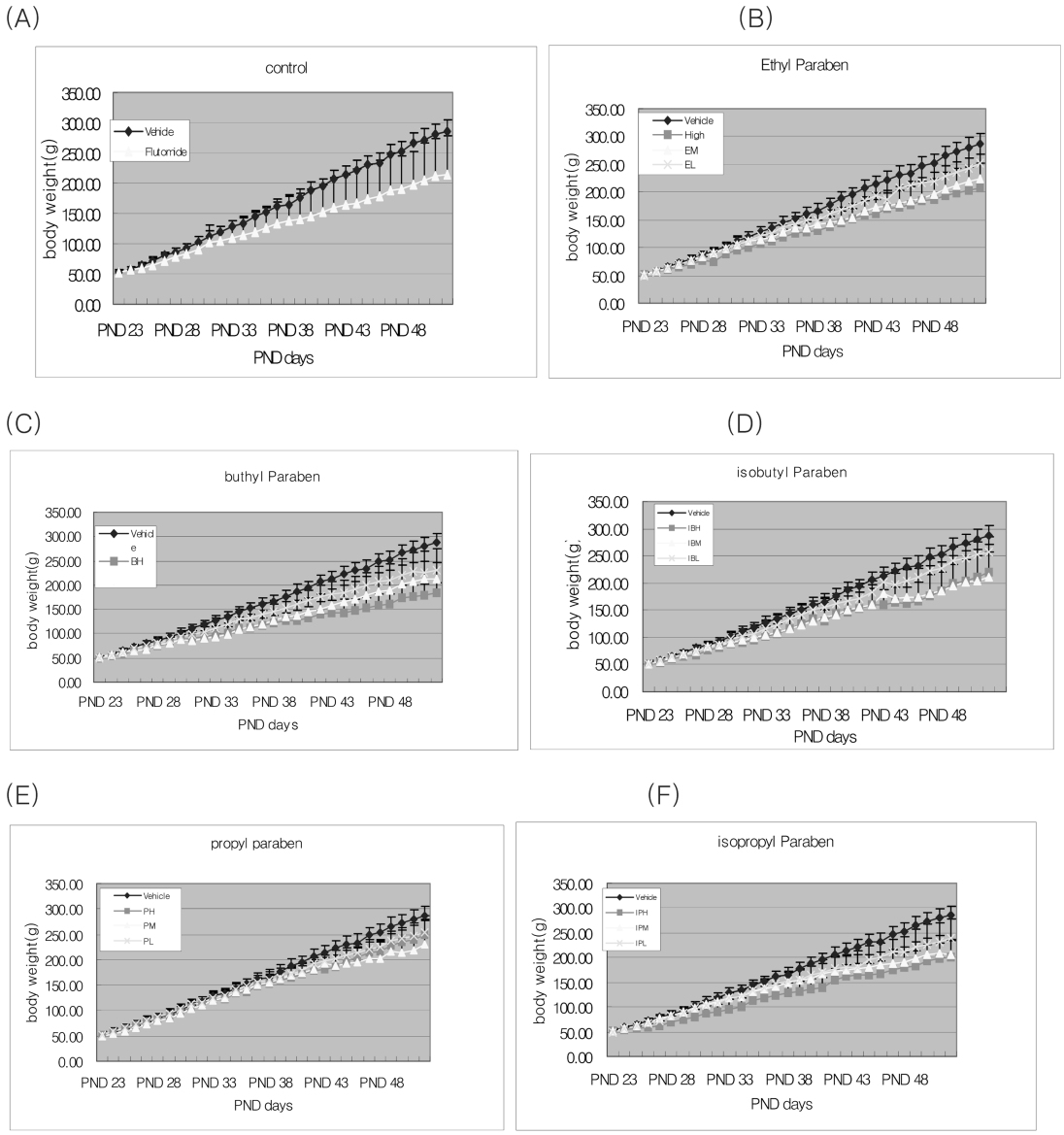

Fig 1. Body weight Changes (A) Control, (B) Ethyl Paraben, (C) Butyl Paraben, (D) Isobutyl Paraben, (E) Propyl Paraben, (F) Isopropyl Paraben.

파라벤(2000 mg/kg) 농도군에서 43±1.25일로 유의적으로 포피선 분리 개시일이 지연되었다. 양성 대조군인 플루타마이드(100 mg/kg/day) 군에서는 부검 당일 날(PND 53)에도 포피선 분리는 되지 않았으며, 문헌 조사 결과 플루타마이드의 포피선 분리 개시일은 53-56일로 조사되었다.

호르몬(TSH. T4,T3, Testosterone)측정

T3(ng/dL)의 경우 대조군(66±4.73 ng/dL)에 비해 양성 대조군인 플루타마이드(50±6.75 ng/dL)군에서 유의적인 감소를 보였으며, 전반적으로 모든 파라벤류에서 감소하는 경향을 나타내었다. 가장 유의적인 그룹은 프로필 파라벤 2000 mg/kg/day 농도군에서 (53.4±8.69 ng/dL)와 이소프로필 파라벤 2000 mg/kg/day 농도군에서 (48.5±8.02 ng/dL)유의적인 감소를 나타내었다. T4(ug/dL)는 대조군(3.9±0.61 ug/dL)에 비해 플루타마이드를 포함한 파라벤류에서 전반적으로 감소하는 경향을 보였으며, 처치 파라벤류의 농도가 높을수록 감소 하는경향을 보였다. 특히 부틸파라벤 고 농도군에서 2.7±0.77 ug/dL으로 유의적인 감소를 보였다. 또한 프로필 파라벤 고농도군(2000 mg/kg.day) 처치군에서도 2.42±0.59 ug/dL로 유의적으로 T4 호르몬 수치가 낮아졌으며, 큭히 이소프로필 고농도군에서 1.87±0.70 ug/dL 가장 유의적인 감소를 보였다. TSH(ul/dL) 호르몬은 이소프로필 파라벤군을 제외하고 양성 대조군인 플루타마이드를 포함한 모든 파라벤류에서 어떠한 통계학적 유의성을 찾을 수 없었다. Testosterone 경우, 양성대조군인 플루타마이드를 비롯한 파라벤류 전 농도군에서 대조군에 비해 낮아지는 경향을 보였으나, 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 2).

부검소견 및 장기중량 측정

부검 소견으로는 양성 대조군에서 뚜렷하게 고환 및 부고

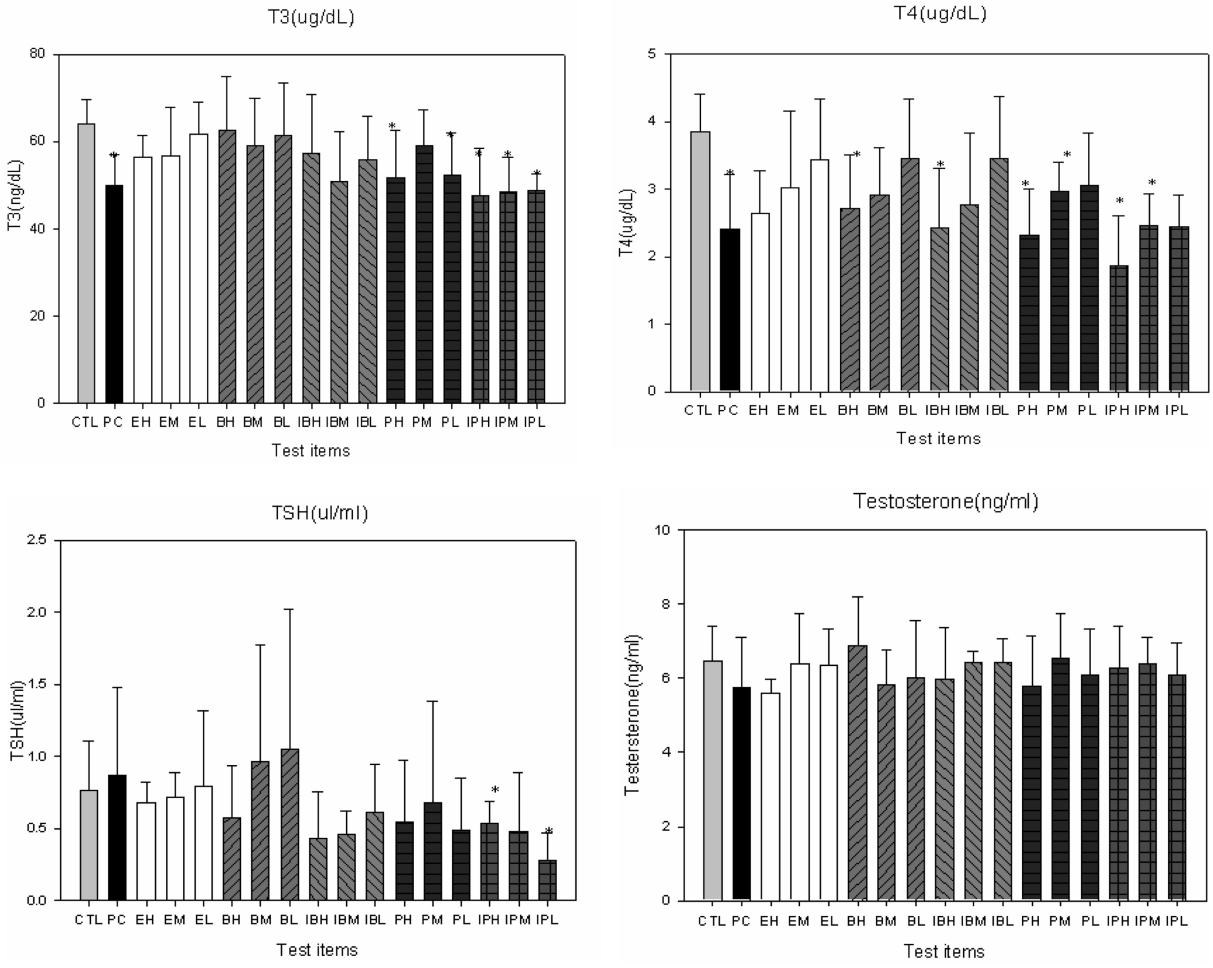

Fig 2. Hormone Level (A) T3 (ng/dL) Hormones (*P<0.05), (B) T4 (ug/dL) Hormones(*P<0.05), (C) TSH (ul/ml) Hormones (*P<0.05), (D) Testosterone Hormones (ng/ml) (*P<0.05).

환, 전립선 정낭 등에서 위축이 보였으며, 파라벤류처치군 에서도 고농도 군에서 고환 및 부고환, 전립선 정낭 등에서 위축을 보였다. 부검 후 장기 무게 결과, 양성 대조군인 플루타마이드군에서 고환, 부고환 전립선, LABC, 정낭 무게가 유의적으로 감소했으며, 전반적으로 모든 파라벤류에서 정소, 부고환, 전립선, 정낭, LABC, 뇌하수체, 간 등의 절대 장기 중량이 유의적으로 감소하였다. 체중 대비 장기 중량을 보면 양성대조군인 플루타마이드 처치군 에서 정낭의 상대 장기 중량이 유의적으로 감소하였으며, 파라벤류 처치군 에서는 부틸(2000 mg/kg/day)와 에틸(1000 mg/kg/day)에서 전립선의 상대 장기중양이 유의적으로 감소하였다. 다른 파라벤류 처치군 에서는 그 유의성을 찾을 수 없었다.

조직 병리학적 소견

조직 병리학적 결과, 대조군에 비해 양성 대조군(Fig. 3(B), Fig. 4(B))은 고환과 부고환에서 유의적인 위축을 보였으며, 부고환 내강에 정자가 결여 된 것도 확인되었다. 대부분 파라벤류에서는 상대 장기 중량에 대한 통계학적 유의성은 없었으나, 조직 병리학적으로 고환과 부고환의 위축이 관찰되었다. 특히 부틸파라벤(Fig. 3(C), Fig. 4(C))과 프로필 파라벤(Fig. 3(D), Fig. 4(D)) 고농도군(2000 mg/kg/day)에서 고환과 부고환의 위축이 관찰되었으며, 프로필 파라벤의 경우 강 내 정자가 결어된 것도 관찰되었다. 모든 파라벤류가 농도 의존적으로 고환과 부고환의 위축됨이 관찰되었으나 고환보다는 부고환이 더 유의적으로 위축됨이 관찰되었다. 또한 전립선의 경우 대조군(Fig. 5(A))에 비해 부틸 파라벤과(Fig. 5(C)) 프로필 파라벤(Fig. 5(D)) (2000 mg/kg/day) 농도 군에서 Hyperplasia가 관찰 되었다. 또한 상대 장기에서 전립선이 유의적으로 감소하였던 에틸 파라벤(Fig.

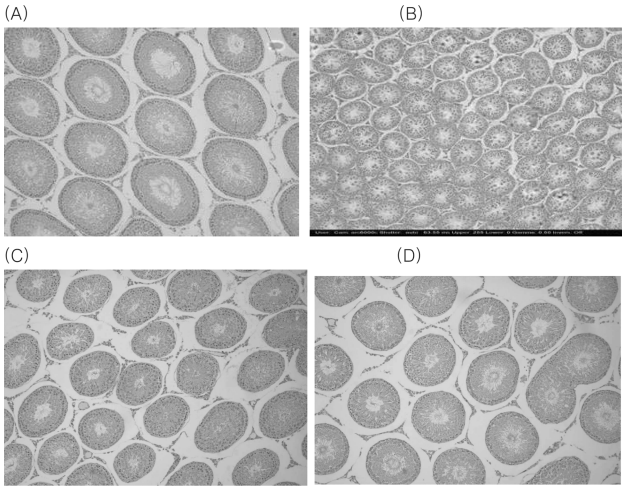

Fig 3. Testes (A) Control, (B) Positive Control (100 mg/kg/day), (C) Butyl Paraben (2000 mg/kg/day), (D) Propyl Paraben (2000 mg/kg/day).

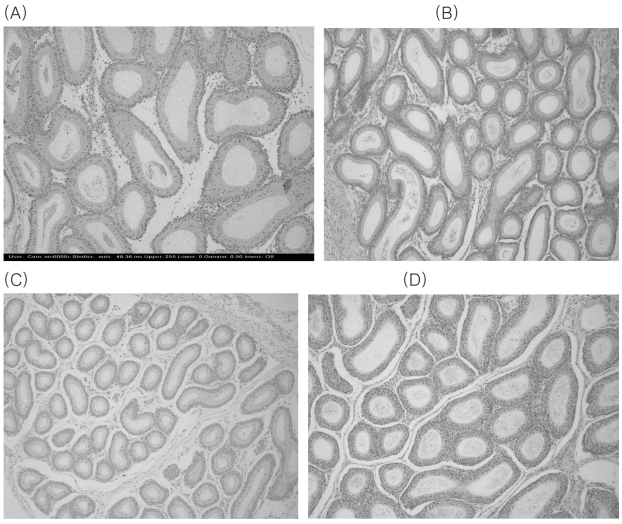

Fig 4. Epididymides (A) Control, (B) Positive Control (100 mg/kg/day), (C) Butyl Paraben (2000 mg/kg/day), (D) Propyl Paraben (2000 mg/kg/day).

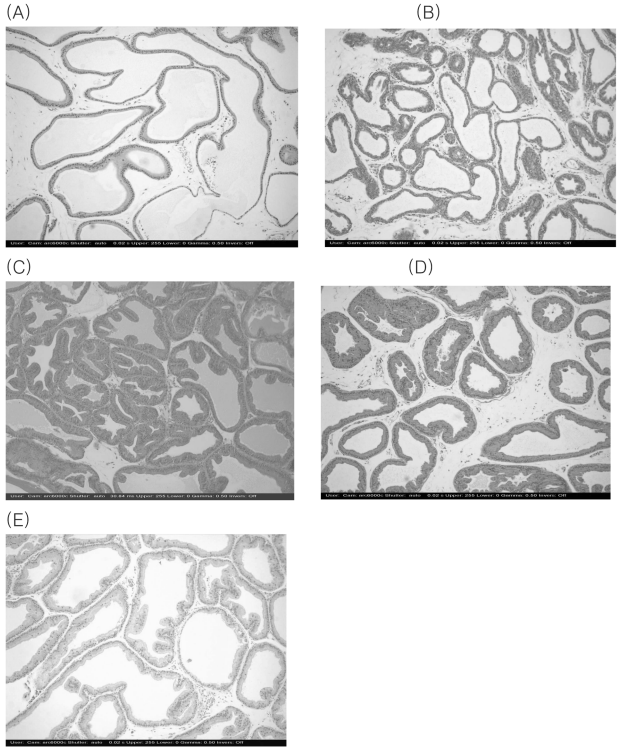

Fig 5. Prostate (A) Control, (B) Positive Control (100 mg/kg/day), (C) Butyl Paraben (2000 mg/kg/day), (D) Propyl Paraben (2000mg/kg/day), (E) Etyl Paraben (1000 mg/kg/day).

5(E)) 1000mg/kg/day농도군에서도 부틸과 프로필 파라벤 만큼 유의적이진 않았다지만 Hyperplasia가 상당히 진행되었음이 관찰되었다.

결론적으로 본 연구는 파라벤류가 성성숙에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 수행하였으며, 그 결과, 모든 파라벤류는 미성숙 랫드의 포피선 분리 개시일을 늦추어 성성숙의 지연을 가져왔으며, 특히 프로필 파라벤과 부틸 파라벤이 크게 유의적으로 성 성숙을 지연시켰다. 또한 고환 및 부고환의 심한 위축을 형성하였으며, 전립선의 hyperplasia를 가져와 생식기에 유해함을 확인하였다.

결론 및 고찰

본 연구에서는 파라벤류가 수컷 랫드의 성성숙을 지연시킴을 검증하였다. 특히 프로필 파라벤과 부틸파라벤의 경우 고농도(2000 mg/kg/day)에서 대조군보다 약 4일정도 포피선 분리 개시일을 지연시켰다. (평균 44일) 또한 호르몬 수치 결과 T4 호르몬의 경우 부틸 파라벤 고동도 군에서 유의적인 감소를 보였으며, T3는 프로필 파라벤 고농도 군에서 유의적으로 호르몬 수치가 대조군에 비해 낮아짐을 보였다. 그러나 Testosterone, TSH는 대체적으로 파라벤류의 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 찾을 수 없었다. 파라벤류 처치군 고농도 군에서 고환 및 부고환, 전립선 정낭등의 위축이 발견되었으며, 채중대비 장기 중량을 고찰한 결과 부틸 파라벤 고농도 군과 에틸파라벤 고동도 군에서 전립선의 상대적 중량이 현저히 감소하였으며, 다른 파라벤류에서는 그 유의성을 찾기 힘들었으나 전반적으로 위축됨이 관찰되었다. 조직병리학적 판독 결과 부틸파라벤(그림 1-3, 그림 1-7)과 프로필 파라벤(그림 1-4, 그림 1-8) 고농도군(2000 mg/kg/day)에서 고환과 부고환의 위축이 관찰되었으며, 프로필 파라벤의 경우 강내 정자가 결어된 것도 관찰되었다. 모든 파라벤류가 농도 의존적으로 고환의 부고환의 위축을 가져왔으며, 부고환의 위축이 더 유의적으로 관찰되었다. 또한 프로필 파라벤 고농도군에서 전립선의 Hyperplasia가 관찰되었고, 또한 상대 장기에서 전립선이 유의적으로 감소하였던 에틸 파라벤(그림 1-13) 1000 mg/kg/day 농도군에서도 부틸과 프로필 파라벤 만큼 유의적이진 않았다지만 Hyperplasia가 상당히 진행되었음이 관찰되었다.

최근 남성들의 화장품류의 사용이 급격히 증가 되었을 뿐만 아니라 파라벤류가 식품에 보존제로 다량 함유되어 있는 것을 생각할 때 파라벤류가 생체내 축척되어 남성호르몬의 감소와 고환과 부고환의 위축 등으로 생식기능이 저하될 수 있다. 이미서구에서는 화장품 및 식품 등의 다양의 파라벤류가 함유 되어있음이 조사되었고, 그에 맞는 가이드라인을 설정하기 위해 노력 중이다.[6,7] 일본의 Oishi *et al.*은 에틸과 메틸 파라벤에서는 정자수 감소등의 영향이 거의 없었다[8] 였으나 부틸과 프로필 파라벤은 수컷 랫드에서 남성호르몬인 테스토스테론의 저하및 생식장기의 중량감소등으로 생식능력의 저하를 가져옴을 발표하였다.[9,10] 또한 최근 파라벤류에 노출된 송어에서도 에스트로겐성을 확인하여 인간뿐 아니라 생태계 전체에 많은 위협을 가하고 있다.[11] 먹이사슬에 있어 사람은 최상위 계급이며, 파라벤류가 생체 밖으로 빠져나가지 못하고 체내에 축적됨을 상기할 때 본 연구를 통해 파라벤류가 여성 생식뿐만 아니라 남성생식에도 유해함을 밝혀내었고, 이에 따라서, 본 연구는 파라벤류가 내분비계 장애 물질로 확립되어 인체에 무해한 안전한 농도를 설정하는 기초 데이타를 제시한데 의의가 있다.

감사의 글

이 연구는 국립 독성 연구원/식품의약품 안전청 2005년 내분비계 장애 물질 평가사업 연구비에 의해 수행되었습니다. 아울러 2006년 학술 진흥 재단 지원에 대한 결과이며 이에 감사드립니다(KFR-005-E00076).

참고문헌

1. Darbre, P.D., Aljarrah, A., Miller, W.R., Coldham, N.G., Sauer, M.J. and Pope, G.S.: Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol*. **24**, 5-13 (2004).
2. Darbre, P.D.: Underarm cosmetics and breast cancer. *Eur J Cancer*. **13**, 153 (2004).
3. Kang, K.S., Che, J.H., Ryu, D.Y., Kim, T.W., Li, G.X., and Lee, Y/S.: Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben).*J Vet Med Sci*. **64**, 227-235 (2002).
4. Jo, E.H., Jung, J.Y., Park, C.B., Park, S.H., Lee, Y.S., and Kang, K.S.: Estrogenic activity of parabens in yterotrophic assay. *J of food hygiene and safety*. **21**, 118-128 (2006).
5. Lee, S.H., Kim, S.J., Park, J.R., Lee, Y.S., and Kang, K.S.: Estrogenic activity of parabens *in vitro* Estrogen Assay. *J of food hygiene and safety*. **21**, 100-106 (2006).
6. Soni, M.G., Carabin, I.G. and Burdock, G.A.: Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol*., **43**, 985-1015 (2005).
7. Gomez, E., Pillon, A., Fenet, H., Rosain, D., Duchesne, M.J., Nicolas, J.C., Balaguer, P., and Casellas, C.: Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks.
8. Oishi, S., Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food Chem Toxicol*.

42, 1845-1849 (2004).
9. Oishi, S., Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol.* **40**, 1807-1813 (2002).
10. Oishi, S., Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. *Arch Toxicol.* **76**, 423-429 (2002).
11. Bjerregaard, P., Andersen, D.N., Pedersen, K.L., Pedersen, S.N., and Korsgaard, B.: Estrogenic effect of propylparaben (propylhydroxybenzoate) in rainbow trout Oncorhynchus mykiss after exposure via food and water. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **136**, 309-317 (2003).