



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

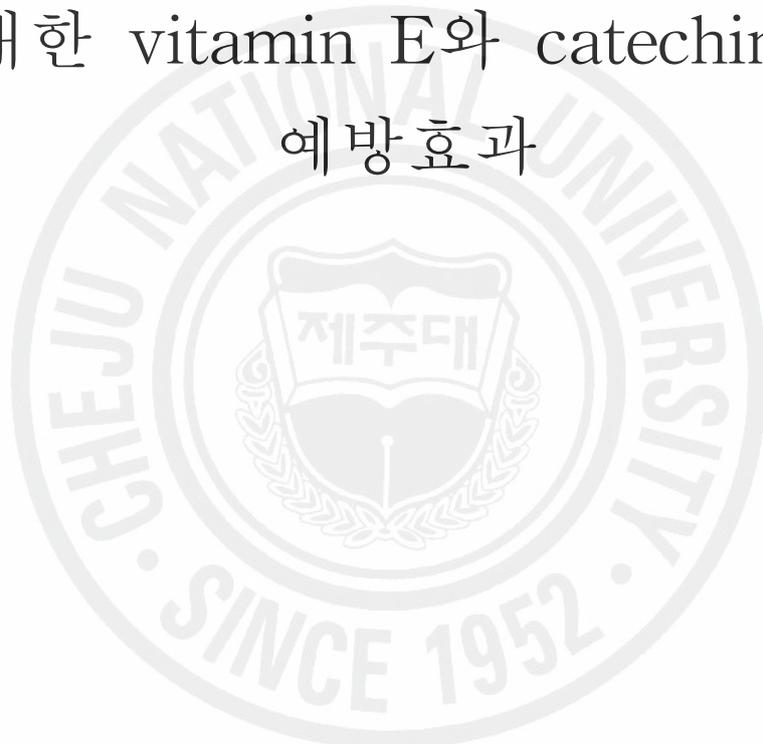
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

쥐에서 di-(2-ethylhexyl)
phthalate로 유발된 정자형성장애에
대한 vitamin E와 catechin의
예방효과



제주대학교 대학원

수의학과

이 지 우

2006 년 12 월

귀에서 di-(2-ethylhexyl)
phthalate로 유발된 정자형성장애에
대한 vitamin E와 catechin의
예방효과

지도교수
강 태 영

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함

2006 년 12 월

이지우의 수의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	_____	인
위 원	_____	인
위 원	_____	인

제주대학교 대학원

2006 년 12 월

Preventive Effects of Vitamin E and Catechin on Spermatogenic
Disturbance Induced by di-(2-ethylhexyl)phthalate in Rat

Ji-Woo Lee

(Supervised by professor Tae Young Kang)

Department of Veterinary Medicine,
Graduate School, Cheju National University,
Jeju, Korea

Abstract

The purpose of the present study was to determine the preventive effects of the two antioxidant vitamin E and catechin on DEHP-induced disturbance of spermatogenesis in male rats. Rats at 4 weeks of age were randomly allocated into five groups with 20 animals per group. The first group was not any administrated as control. The second group was administrated DEHP(2 g/Kg) daily for 14 days. The third group was administrated vitamin E(500 IU/Kg) following DEHP treatment by the same method(daily for 14 days). The fourth group was administrated catechin(200 mg/Kg) following DEHP treatment by the same method. The fifth group was coadministrated vitamin E(500 IU/Kg) and catechin(200 mg/Kg) following DEHP treatment by the same method. In order to determined preventive effects, we examined pathological changes of testis, characteristics of sperm, and concentration of testosterone. Vitamin E and catechin supplementation were significantly prevented the testicular atrophy, apoptosis of germ cells in the seminiferous tubules and

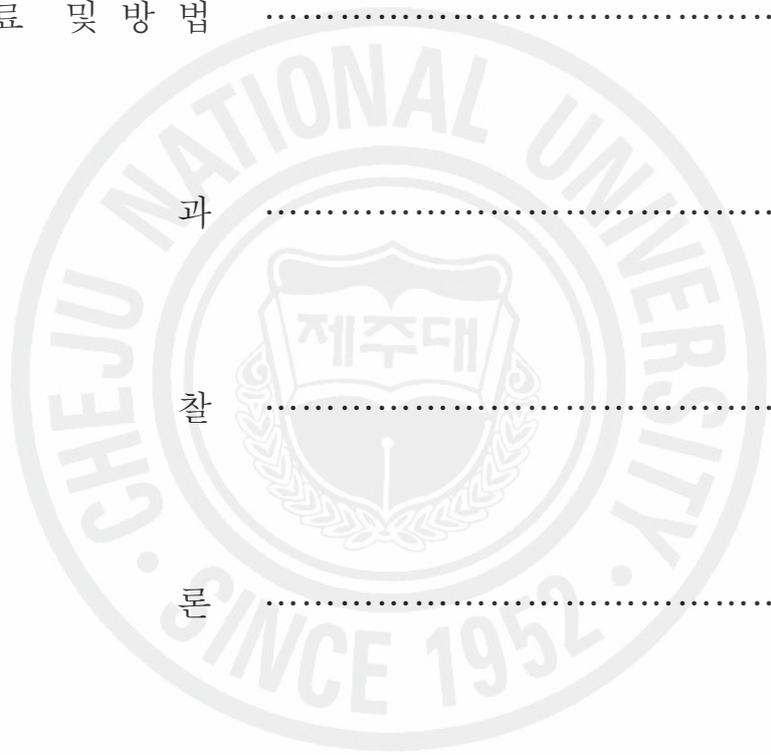
abnormal rate of sperm. Moreover, sperm concentration, viability and motility was significantly recovered in groups of alone and along with vitamin E and catechin. There was no significant difference in the concentration of testosterone between the groups. The results suggest that preventive effects of alone and along administration of vitamin E and catechin on DEHP-induced testicular atrophy damages have been demonstrated.

Key words : DEHP, Catechin, Vitamin E, Spermatogenic disturbance, Rat



목 차

I. 서	론	1
II. 재	료 및 방	법 3
III. 결	과	6
IV. 고	찰	14
V. 결	론	17
VI. 참	고 문	헌 18



서 론

사람에게 악성종양, 생식기능 장애 등을 초래하는 것으로 알려져 있는 di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)는 유기염소계와 더불어 환경호르몬(내분비계 장애물질)으로 분류되어 있으며, 정자형성 장애를 일으키는 것에 대한 관심이 모아지고 있다. 이 물질은 플라스틱 제품의 가소제로 널리 사용되어 왔으며, 최근 카테터나 수혈 bag 같은 의료 기구에도 사용되고 있으며, 용도에 따라 음식물, 공기, 물, 흙 등을 통해 유출된다(3,29). DEHP를 투여한 쥐에서 생식기 및 부생식기관의 구조의 변형과 기능을 저해하고 임신된 쥐에서는 태아의 성장을 지연시키고 기형을 유발하거나 간의 종대를 동반한 간암이 발병되었다는 보고가 있다(14,26,30).

DEHP에 의한 독성 유발 기전은 불분명하지만, DEHP에 노출된 쥐에서 정자형성의 필수 요소인 vitamin A, vitamin B₁₂, vitamin C를 투여하여 정자무형성증을 효과적으로 예방하였다(10,15). 특히, 항산화제로 잘 알려진 vitamin E를 투여하였을 때 DEHP에 의하여 유발된 정소위축의 방지 효과가 있어 그 예방효과의 가능성을 제시하였다(13,27). 또한 녹차의 주요한 성분인 catechin을 매일 섭취함으로써 전신적인 항산화 기능을 유지할 수 있어서 만성 중금속 중독, 항생제에 의해 유발된 신부전, 심부전 등에 전신적인 항산화 예방효과가 있음이 보고되었다(23). 그리고 catechin이 DEHP와 유사한 구조의 bisphenol A에 대해서 억제효과를 볼 수 있었기 때문에 DEHP에 대한 예방효과가 기대가 된다. Vitamin E와 catechin을 함께 투여해서 세포 수준에서 유의성있는 항산화 효과도 보고되었다(22). 그러므로 DEHP가 유발하는 정소 손상에 대해 vitamin E와 catechin의 투여는 항산화 상승 작용을 나타낼 것으로 예측된다.

Apoptosis는 세포사를 조절하여 정상적 발달과정과 항상성, 그리고 인간의 질병에 큰 역할을 한다고 알려져 있다(4). Germ cell death의 조절을 연구하기 위한 모델로 spermatogenesis를 이용한 최근 연구에서는 성숙쥐에서 호르몬 공급을 제거한 후의 germ cell death가 거의 apoptosis를 통해서만 발생한다는 보고가 있다(11).

정자분석에 사용되는 컴퓨터 보조 정액 분석기(Computer Assisted Sperm Analysis, CASA)는 정자의 운동성을 객관적으로 분류하는 장비이다(6). CASA는 랫드 부고환의 정자 운동성 특징을 측정하며, CASA의 여러 가지 측정치는 부고환과 정소 독성의 지표로서 활용된다(20,25).

본 연구에서는 정자형성장애를 일으킨다고 알려진 DEHP를 웅성 랫드에 투여하고, vitamin E와 catechin을 단독 또는 병용투여로 정소의 조직학적 변화, 정액특성의 변화 및 정자의 운동성 변화, 및 호르몬의 변화 등을 조사하여 그 예방효과를 알아보려고 실험을 수행하였다.



재 료 및 방 법

실험동물

4주령의 Sprague-Dawley(SD) 랫드 수컷을 100마리를 구입하여 5개의 군으로 20마리씩 나누어 배치하였다. 명암주기는 12시간 간격으로 하였으며, 사료와 물은 자유 급식하였다.

약물투여

랫드를 실험에 사용하기 전 새로운 환경에 적응시키기 위하여 1주일간 계류시키고, 각 군별로 다음과 같이 2주 동안 매일 경구투여 하였다. I 군은 무처리군으로 DEHP, vitamin E, catechin을 투여하지 않았다. II 군은 DEHP를 2 g/kg로 투여하였다. III 군은 DEHP를 2 g/kg로 투여하고 vitamin E 500 IU/kg를 함께 투여하였다. IV 군은 DEHP를 2 g/kg로 투여하고 catechin을 200 mg/kg를 함께 투여하였다. V 군은 DEHP를 2 g/kg로 투여하고 vitamin E 500 IU/kg와 catechin을 200 mg/kg를 함께 투여하였다. 실험에 사용되는 DEHP와 vitamin E는 혼합하지 않고 각각 투여하였으며 catechin은 증류수와 혼합하여 투여하였다.

체중과 정소무게 측정

2 주간 실험을 마친 다음 랫드를 diethyl ether로 심마취하여 체중을 측정하고 정소를 적출한 후 정소에서 정소상체를 분리하고 지방조직을 제거하고 전자저울을 이용하여 무게를 측정한 후 체중에 대한 정소무게의 백분율로 나타내었다.

정소의 조직검사 및 apoptosis index(AI)의 측정

Bouin's solution에 고정된 정소를 일반 조직병리학적 방법인 hematoxylin eosin염색방법으로 실시하였다. 파라핀에 포매된 조직을 절단하여 슬라이드 위에 부착시킨 후 탈파라핀과 함수처리를 한 후 3 % 과산화수소 용액에 5분간 처리하여 PBS로 세척한 후 TdT를 점적한 후 37 °C에서 1시간 반응시킨 후 stop buffer에 10분간 반응시켰다. PBS로 수세한 후 Anti Dioxigenin Peroxidase와 실온에서 30분간 반응시킨 후 발색제인 DAB를 점적하여 발색이 되면 봉합하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 횡단면된 정소조직의 정세관 100개에서 갈색으로 염색된 세포수를 세어 평균과 표준편차로 나타내었다.

정자 농도와 기형율, 생존율 측정

정자 농도 측정을 위해 10 ml media에 희석된 정액 50 μ l와 증류수 445 μ l를 혼합한 뒤 eosin-nigrosin 용액을 5 μ l첨가시켰다. 그리고 Makler chamber에 희석액을 떨어뜨린 후 관찰하였다. 기형율 측정은 10 ml media에 희석된 정액을 슬라이드에 떨어뜨린 후 eosin-nigrosin용액으로 염색하여 압착 도말한 뒤 1000배 시야에서 검경하였다. 기형의 형태는 정자 100마리를 관찰하면서 두부, 중간부, 미부로 구분하여 정상과 기형으로 구분하였다. 정자의 생존율 측정은 압착 도말한 슬라이드에서 100마리의 정자를 관찰하여 생사를 감별하였다. 정자의 두부가 염색된 것은 죽은 정자, 염색이 되지 않은 것은 살아있는 정자로 구분하였다.

CASA를 이용한 정자 분석

부고환은 10 ml의 TCM 199 media에 잘게 잘라 넣고 정액이 흘러나올 수 있도록 10분간 항온수조에 incubation시켰다. 이 용액을 37 °C로 가열한 Makler chamber에 떨어뜨린 후 image analysis software인 VideoTesT-Sperm 2.1 CASA(VideoTesT Co., Russia)을 이용하여 CASA 분석을 하였다. CASA의 분

석 설정값은 표 1과 같이 설정하여 측정하였다. 정자 운동성 척도는 평균 거리
 속도(VAP), 곧은 직선 속도(VSL), 곡선 속도(VCL), 정자 머리측면 전위(ALH),
 진동정도(BCF), 정자 트랙 곧은 정도(STR), 직선도(LIN)을 포함하였다. VAP,
 VSL, STR, LIN은 정자 진행을 나타내고, 반면 VCL, ALH와 BCF는 정자 활성
 을 나타낸다.

Table 1. Parameters settings used with computer assisted sperm analysis system

System	Parameter	Value
	Image sampling frequency(frame/s)	25
	Duration of image capture(s)	1
	Minimum motile speed($\mu\text{m/s}$)	VSL, 10
	Maximum motile speed($\mu\text{m/s}$)	VSL, 250
	Maximum countable number(sperm)	400
	Maximum countable frame	10

*VSL :Straight-line velocity

Testosterone농도 측정

심장으로부터 혈액을 채취하여 응고된 후 5분간 3000 rpm으로 혈청을 원심분리하였다. 분리된 혈청은 냉동보관 하였다가 testosterone농도를 측정하였다. Testosterone 특이 항체가 부착된 tube에 시료의 항원과 ^{125}I 로 표시된 testosterone을 경쟁반응 시켰다(RIA). 반응 시킨 후 세척을 통해 미결합된 표지자를 버린 후 gamma counter로 측정하였다.

통계방법

통계처리가 가능한 항목과 그 결과에 대해서는 ANOVA를 이용하여 분석하였다.

결 과

랫드의 체중과 정소무게의 변화

DEHP와 vitamin E, catechin의 투여가 랫드의 체중 및 정소무게에 미치는 결과는 다음과 같았다. II 군은 실험 후 체중과 정소의 무게는 각각 399.6 ± 21.4 g, 1.3 ± 0.25 g으로 I 군(438.2 ± 47.7 g, 1.6 ± 0.19 g)에 비하여 다소 낮은 값을 나타내었다. 체중에 대한 정소 무게의 백분율은 II 군에서 0.34%로 I 군(0.36%)에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 값을 나타내었다($p < 0.01$).

Vitamin E와 catechin을 DEHP와 단독 또는 병용투여한 III 군, IV 군과 V 군의 실험 후 체중은 I 군과 거의 비슷한 수준으로 나타났으며, 정소의 무게도 I 군과 비슷한 수준으로 나타났다(Table 2).

Table 2. Changes of body and testicular weight in groups

Treatment	Body weight (g)	Testicular weight(g)	Testis/body weight(%)
Group I	438.2 ± 47.7	1.6 ± 0.19	0.36
Group II	399.6 ± 21.4	1.3 ± 0.25	0.34*
Group III	406.7 ± 24.9	1.5 ± 0.23	0.37
Group IV	420.2 ± 30.0	1.6 ± 0.15	0.38
Group V	425.4 ± 46.3	1.6 ± 0.12	0.37

The Values represent mean \pm S.D.

*: $p < 0.01$ significantly different from the group I

Group I ; no administration,

Group II ; administration of DEHP 2 g/kg,

Group III ; administration of DEHP 2 g/kg and vitamin E 500 IU/kg,

Group IV ; administration of DEHP 2 g/kg and catechin 200 mg/kg,

Group V ; administration of DEHP 2 g/kg, vitamin E 500 IU/kg and catechin 200 mg/kg.

Relative weight of testis ; testis weight/body weight x 100.

정소조직의 검사

정상 정소조직(I 군)과 DEHP와 vitami E, catechin을 투여한 정소조직(II 군, III 군, IV 군, V 군)에서 apoptotic body가 갈색의 소체로 염색되었고 그 중 II 군에서는 apoptosis가 현저하게 많이 나타난 것을 볼 수 있으며 조직학적 변화로 정세관이 위축되고 정모세포와 sertoli세포가 현저하게 적은 것을 알 수 있었다. III 군, IV 군, V 군에서는 DEHP를 투여한 II 군에 비해 apoptotic body가 적었으며 완전하지는 않지만 부분적인 정자형성이 이루어지며 정세관의 위축도 II 군에 비해서 적게 나타났다. (Fig. 1)



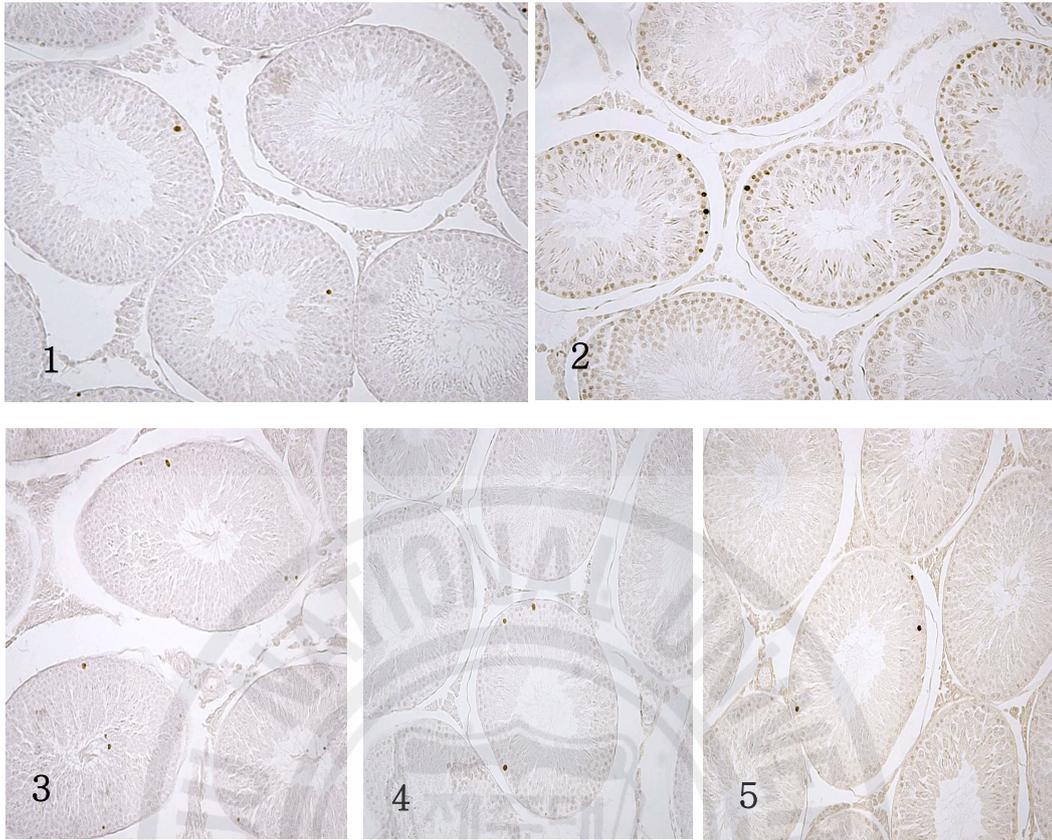


Figure 1. Histological changes of seminiferous tubules stained with TUNEL($\times 400$).

- 1: Group I ; no administration,
- 2: Group II ; administration of DEHP 2 g/kg,
- 3: Group III ; administration of DEHP 2 g/kg and vitamin E 500 IU/kg,
- 4: Group IV ; administration of DEHP 2 g/kg and catechin 200 mg/kg,
- 5: Group V ; administration of DEHP 2 g/kg, vitamin E 500 IU/kg and catechin 200 mg/kg.

Apoptosis index의 측정

DEHP와 vitamin E, catechin의 투여가 apoptosis에 미치는 결과는 표 3에서 보는 바와 같다. II 군의 apoptotic index는 101.8 ± 6.5 로 I 군의 apoptotic index 47.2 ± 11.4 에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 값을 나타내었다 ($p < 0.05$), III 군, IV 군, V 군의 apoptotic index는 각각 56.8 ± 7.8 , 77.2 ± 17.6 , 64.8 ± 22.8 로 I 군과 비슷한 수준으로 나타났다.

Table 3. Assessment of apoptotic germ cells in groups

Type	Apoptotic index (mean \pm SD)
Group I	47.2 ± 11.4^a
Group II	101.8 ± 6.5^b
Group III	56.8 ± 7.8^a
Group IV	77.2 ± 17.6^a
Group V	64.8 ± 22.8^a

ab: $p < 0.05$ significantly different from the group I

Group I ; no administration,

Group II ; administration of DEHP 2 g/kg,

Group III ; administration of DEHP 2 g/kg and vitamin E 500 IU/kg,

Group IV ; administration of DEHP 2 g/kg and catechin 200 mg/kg,

Group V ; administration of DEHP 2 g/kg, vitamin E 500 IU/kg and catechin 200 mg/kg.

정자의 농도 및 생존율

DEHP와 vitamin E, catechin의 투여가 정자의 농도 및 생존율에 미치는 결과는 표 4에 보는 바와 같다. II 군의 정자농도는 $67.8 \pm 31.5 \times 10^6 / \mu\text{l}$ 로 I 군의 정자 농도에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 값을 나타내었다($p < 0.05$), III 군, IV 군과 V 군의 정자농도는 각각 $179.0 \pm 75.6 \times 10^6 / \mu\text{l}$, $132.4 \pm 26.5 \times 10^6 / \mu\text{l}$, $140.6 \pm 38.5 \times 10^6 / \mu\text{l}$ 로 대조군과 비슷한 수준으로 나타나 점차 정상에 가깝게 회복되는 경향을 보였다. 그러나 약물투여군 간의 차이는 나타나지 않았다.

II 군의 정자 생존율은 $72.6 \pm 9.1\%$ 로 I 군의 정자 생존율($95.7 \pm 12.3\%$)에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 값을 나타내었다($p < 0.001$). 정자생존율 역시 약물 투여 군 간의 유의성있는 차이는 없었으나 I 군에 비해서는 낮은 수준이었으나 vitamin E와 catechin 투여로 생존율이 회복되는 경향을 보였다.

Table 4. Changes of sperm concentration and viability in groups

Treatment	Sperm conc. ($\times 10^6 / \mu\text{l}$)	Viability(%)
Group I	209.4 ± 77.0^a	95.7 ± 12.3
Group II	67.8 ± 31.5^b	$72.6 \pm 9.1^*$
Group III	179.0 ± 75.6^{ac}	84.9 ± 8.7
Group IV	132.4 ± 26.5^{ab}	94.2 ± 9.2
Group V	140.6 ± 38.5^{ab}	90.9 ± 9.2

abc: $p < 0.05$ significantly different from the group I

*: $p < 0.001$ significantly different from the group I

Group I ; no administration,

Group II ; administration of DEHP 2 g/kg,

Group III ; administration of DEHP 2 g/kg and vitamin E 500 IU/kg,

Group IV ; administration of DEHP 2 g/kg and catechin 200 mg/kg,

Group V ; administration of DEHP 2 g/kg, vitamin E 500 IU/kg and catechin 200 mg/kg.

정자의 기형율

DEHP와 vitamin E, catechin의 투여가 정자의 기형율에 미치는 결과는 표 5에서 보는 바와 같다. II 군의 정상 정자율은 $67.5 \pm 11.2\%$ 로 I 군($75.8 \pm 10.4\%$)에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 값을 나타내었다($p < 0.05$). 약물처리군 간의 정상 정자율은 I 군과 비슷한 수준으로 나타났다.

정자의 각 부분별 기형율을 살펴보면, 두부의 기형율은 II 군과 V에서 I 군, III 군과 IV 군에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 값을 나타내었다($p < 0.05$). 중간부위의 기형율에서는 I 군이 다른 군에 비하여 낮은 기형율을 보였으며, 처리군 중 III 군이 DEHP에만 노출시킨 II 군보다 높은 기형율을 보였다. 미부에서의 기형율은 I 군과 약물처리군인 IV 군과 V 군에서 II 군과 III 군보다 높은 기형율을 보였다.

Table 5. Changes of sperm morphology in groups

Treatment	Normal(%)	Head(%)	Midpiece(%)	Tail(%)
Group I	75.8 ± 10.4^a	8.7 ± 3.3^a	14.4 ± 1.3^a	76.9 ± 15.6^a
Group II	67.5 ± 11.2^b	13.8 ± 4.1^b	37.1 ± 6.4^b	49.1 ± 6.5^b
Group III	73.1 ± 4.5^a	8.4 ± 2.6^a	42.5 ± 10.8^c	49.1 ± 11.7^b
Group IV	72.9 ± 7.9^a	9.4 ± 4.7^a	23.4 ± 2.4^d	67.3 ± 16.5^a
Group V	72.0 ± 7^a	12.1 ± 1.2^{ab}	21.3 ± 2.7^d	66.6 ± 12.7^a

Values with different superscripts are significantly differ from the column, $P < 0.05$

Group I ; no administration,

Group II ; administration of DEHP 2 g/kg,

Group III ; administration of DEHP 2 g/kg and vitamin E 500 IU/kg,

Group IV ; administration of DEHP 2 g/kg and catechin 200 mg/kg,

Group V ; administration of DEHP 2 g/kg, vitamin E 500 IU/kg and catechin 200 mg/kg.

정자의 운동성

투여약물투여에 대한 정자 운동성의 변화는 CASA를 이용하여 분석하였으며 결과는 다음과 같았다. 정자 운동성은 II 군에서 가장 낮게 나타나 다른 군들과 통계적 유의성이 나타났다($P<0.05$). CASA 지표에서는 각 군 간의 통계학적 유의성은 없었고, ALH에서만 II 군에서 유의적으로 낮게 나타났다($P<0.05$).

Table 6. Comparison of the sperm motility and kinematic characteristics

Treatment	Motility(%)	VAP($\mu\text{m/s}$)	VSL($\mu\text{m/s}$)	VCL($\mu\text{m/s}$)	ALH(μm)	BCH(Hz)	STR(%)	LIN(%)
Group I	69.5±6.2 ^a	44.0±22.5	40.3±25.3	131.6±69	2.8±1.0	7.6±1.0	90.2±14.1	49.1±33.2
Group II	47.7±7.9 ^b	25.9±8.9	22.0±9.9	91.9±60	1.9±0.7*	6.7±2.2	74.7±19.4	36.8±23.5
Group III	60.0±4.1 ^c	34.7±7.6	31.1±20.1	106.7±63.8	2.3±0.9	7.4±1.0	88.7±15.4	46.1±31.4
Group IV	62.6±3.3 ^c	39.7±15	33.4±15.5	116.0±71	3.0±0.6	7.3±0.8	88.3±16.8	48.2±32.3
Group V	59.1±7.0 ^c	36.7±16.4	32.5±19.4	106.0±46.9	2.4±0.6	7.5±1.0	89.4±13.6	47.7±32.9

Data are expressed as means \pm SD

^{abc} values with different superscripts are significantly differ($P<0.01$).

* values with different superscripts are significantly differ($P<0.05$).

Group I ; no administration,

Group II ; administration of DEHP 2 g/kg,

Group III ; administration of DEHP 2 g/kg and vitamin E 500 IU/kg,

Group IV ; administration of DEHP 2 g/kg and catechin 200 mg/kg,

Group V ; administration of DEHP 2 g/kg, vitamin E 500 IU/kg and catechin 200 mg/kg.

VAP, average path velocity; VSL, straight line velocity; VCL, curvilinear velocity; ALH, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; STR, straightness; LIN, linearity

혈중 testosterone의 변화

DEHP와 vitamin E, catechin의 투여가 혈중 testosterone 농도에 미치는 변화는 표 7에 나타내었다. 각 군별 혈중 testosterone의 농도는 각각 2.8 ± 1.45 ng/ml, 2.8 ± 3.30 ng/ml, 2.6 ± 2.48 ng/ml, 1.1 ± 0.72 ng/ml, 2.5 ± 1.78 ng/ml로 모든 투여군에서 대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

Table 7. Comparison of testosterone in groups

Treatment	Testosterone(ng/ml)
Group I	2.8 ± 1.45
Group II	2.8 ± 3.30
Group III	2.6 ± 2.48
Group IV	1.1 ± 0.72
Group V	2.5 ± 1.78

Group I ; no administration,

Group II ; administration of DEHP 2 g/kg,

Group III ; administration of DEHP 2 g/kg and vitamin E 500 IU/kg,

Group IV ; administration of DEHP 2 g/kg and catechin 200 mg/kg,

Group V ; administration of DEHP 2 g/kg, vitamin E 500 IU/kg and catechin 200 mg/kg.

고 찰

DEHP는 현재 내분비계 장애물질로 분류되고 있다. 그러나 직접적으로 에스트로겐 유사작용을 한다는 증거는 아직 없다(12). DEHP의 정자형성 장애의 대사가전이 모호하기는 하지만 정소의 장애를 줄이려는 연구가 시도되고 있다. Oishi(16)는 DEHP를 투여한 쥐에서 정소와 혈청 내 테스토스테론이 감소한다고 보고했다. 그러나 테스토스테론이나 생식선 자극호르몬의 투여에 의해서도 정소의 위축은 예방되지 않았다. 또한 DEHP 투여 시 쥐에서 선택적으로 아연의 결핍이 나타났으나 아연의 투여에 의해서도 정소의 위축은 예방되지 않았다고 보고하였다(17).

DEHP에 의해 유발된 정자형성장애는 처음으로 vitamin B₁₂의 투여에 의해 예방되었다고 보고하였다(15). 따라서 이 현상은 DEHP에 의한 vitamin결핍 가능성을 제시하였다. Vitamin A와 B₁₂와 같이 vitamin E결핍 역시 정자형성 장애 시 나타나므로 정상적인 정자형성에 필수적 요소이다(5). 또한 catechin은 녹차의 주요 성분으로 항산화 효과가 탁월하여 유리 산소기 제거에 효과적이며, 특히 정소 독성에서 항산화제로 효과가 있다고 보고된 바 있다(18,32). 수용성인 catechin은 세포질에만 있는 반면 지용성인 vitamin E는 대부분의 세포막에 존재한다(9,28). 전자는 수용성일 때 산소기를 제거하고, 후자는 세포막 지질의 안정성을 높여 세포손상을 방어한다. 이 두 물질의 특성을 이용하여 병합투여 할 경우 보다 예방효과가 상승하리라 생각되어 본 연구에 사용하게 되었다.

본 실험에서는 DEHP투여군이 대조군에 비하여 체중과 정소의 무게가 다소 낮은 값을 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다. 그러나 체중에 대한 정소무게의 비율은 대조군에 비하여 유의성있게 낮은 값을 나타내었다. Vitamin E 및 catechin투여군에서는 체중 및 정소의 무게 그리고 체중에 대한 정소무게의 비율이 대조군과 비슷한 수준으로 나타난 것으로 보아 vitamin E와 catechin의 투여에 의해 예방되는 것으로 생각된다.

정세관내 정조세포와 정모세포의 apoptosis는 DEHP의 자극을 받은 II 군에서 다른 대조군과 처리군에 비해 현저하게 많았다. 이는 apoptosis가 세포내의

신호들과 방사선에 노출되거나, 화학요법 또는 호르몬과 같은 세포 외로부터 받은 자극을 포함한 여러 가지 인자들에 의하여 유발된다는 보고와 일치하였다(4,11). 그리고 대조군의 정상 정소조직에서도 apoptotic body가 관찰되었는데, 이는 정자형성과정 중 유사분열과 관련하여 항상성을 유지하려는 것으로 최 등(7)의 결과와 일치하였다. 이는 vitamin E와 catechin이 정세관내 Sertoli cell과 정자세포들의 apoptosis를 감소시키거나 지연시키는 것으로 생각된다.

DEHP의 투여군은 대조군에 비하여 정자의 농도가 유의성있게 감소되는 것으로 나타났으며, vitamin E와 catechin 투여군에서는 대조군과 비슷한 수준으로 나타난 것으로 보아, DEHP가 정자의 농도를 감소시키며 이러한 현상은 vitamin E와 catechin의 투여에 의해 예방되는 것으로 생각되며 catechin 단독투여 및 vitamin E와 catechin의 병용투여 보다도 vitamin E 단독 투여가 더 효과가 있는 것으로 보여진다. 정자 생존율 및 기형율에서 DEHP 투여가 정자의 생존율은 감소시키며 기형율은 증가됨을 알 수 있었고, 이러한 현상은 vitamin E와 catechin의 투여에 의해 차츰 정상으로 회복되고 있는 것을 알 수 있었다.

CASA를 이용하여 정자 분석을 한 결과 정자 운동성은 대조군이 가장 높은 운동성을 보였으며, CASA 지표에서 따른 VAP, VSL, BCF, STR, LIN에서는 각 처리군 간의 통계적 유의성이 나타나지 않았다. 실험동물에서 epichlorohydrin에 4시간 동안 노출시켜 정자운동성을 CASA로 측정한 결과, 운동성의 유의적 차이는 없었으며(24), 햄스터에 α -chlorohydrin을 4일간 용량을 달리 하여 투여한 결과 VCL, VAP와 VSL의 저하가 나타났으나, 정자 운동성의 변화를 없었다. Alpha-chlorohydrin 노출은 체외수정능력에 영향을 주는 비직선 운동 손상과 관련이 있다고 보고하였다(25). CASA 지표가 생식독성에 나타나는 변화를 민감하게 나타내고 부고환과 정소독성의 척도로 해석하는데 이용이 가능하였다(20,21,30). 비록 CASA 지표가 민감한 바이오마커지만 각자 다른 CASA 장치와 설정 기준을 사용하기 때문에 본 연구에서 그 지표를 다른 연구자와 직접 비교하기는 어려웠다. 그러므로 장치와 설정의 표준화와 규격화가 요구되는 실정이다(8).

수컷에서 중요한 호르몬인 testosterone은 주로 고환내의 Leydig cells에서 생성된다. 출생 후 21일, 35일, 56일째에 Leydig cells은 progenitor,

immature, adult Leydig cells의 3단계를 거쳐 분화한다.(2) Leydig cells이 발달되면서 testosterone 생성능력도 점차적으로 증가하게 된다. 뇌하수체에서 분비되는 LH는 Leydig cell의 기능을 조절하는 주된 호르몬이다. testosterone의 생성이 억제되면 수컷의 수정능력이 저하된다.

본 실험에서는 DEHP와 vitamin E, catechin의 투여 시 혈중 testosterone의 농도는 대조군과 비교하여 유의성있는 차이가 관찰되지 않았다. Parks 등(19)의 연구결과에 따르면, 태아기 14일부터 출생 후 3일 까지 DEHP 750 mg/kg/day에 노출시킨 수컷 랫드에서 태아기 17일, 18일, 20일 그리고 출생 후 2일째의 testosterone 농도를 측정된 결과, testicular testosterone의 농도는 모든 일령에서 유의하게 감소하는 것으로 나타났고, 특히 태아기 20일경에 가장 현저한 감소를 보였다. 고환을 제외한 나머지 조직의 testosterone의 농도는 태아기 17일과 18일경에 유의한 감소를 나타내었지만, 태아기 20일경에서는 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과로 미루어 보아 DEHP는 Leydig cell을 손상시켜 초기에 testosterone 농도의 감소를 야기하고, 시간이 경과되면 testosterone의 농도가 증가하는 것을 볼 수 있는데, 이러한 현상은 Leydig cell 손상에 의한 보상기전으로 성선의 조직에서의 스테로이드호르몬 생산의 증가에 기인한 것이라고 생각된다(1). 또한 본 실험에서의 DEHP 및 vitamin E 그리고 catechin의 투여기간은 호르몬 농도의 변화상을 관찰하기에는 매우 짧은 기간이었다고 사료되며, 앞으로 장기적인 실험에 의한 호르몬 농도의 변화양상을 연구하는 실험이 필요할 것이다.

본 실험으로 쥐에서 DEHP 투여에 의해 일어난 정자형성장애로 체중저하, 정소무게 저하, 정자 농도 저하, 정자 생존율 저하, 정자 기형을 상승, 정자 운동성 변화 등을 나타내었다. 반면 vitamin E와 Catechin 단독 및 병용투여에 의해 정상에 가깝게 회복되어 정소독성의 예방효과가 있는 것으로 판단되었다.

결 론

본 연구에서는 수컷 랫드에 DEHP를 투여하여 실험적으로 생식독성을 유발하고, vitamin E와 catechin을 단독 및 병용 투여하여 수컷 랫드에서 정소의 조직학적 변화, 정액특성의 변화 및 정자의 운동성 변화, 및 호르몬의 변화 등을 조사하여 그 예방효과를 알아보려고 하였다. DEHP를 투여한 군은 대조군에 비해 정소의 무게, 정자농도, 정자생존율, 정상 정자율이 감소하였다. DEHP에 의한 생식독성을 예방하기 위해 vitamin E와 catechin을 투여한 결과, DEHP를 투여한 군에 비하여 정소의 무게, 정자농도, 정자생존율, 정상 정자율이 증가하였으며, 혈중 testosterone의 농도는 대조군과 각 투여군간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, catechin과 vitamin E의 투여는 DEHP에 의한 생식독성을 예방하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Akingbemi BT, Ge R, Rosenfeld CS, Newton LG, Hardy DO, Catterall JF, Lubahn DB, Korach KS, Hardy MP. Estrogen receptor- α gene deficiency enhances androgen biosynthesis in the mouse Leydig cell. *Endocrinology* 2003; 144(1): 84-93.
2. Akingbemi BT, Youker RT, Sottas CM, Ge R, Katz E, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol Reprod* 2001; 65: 1252-1259.
3. Albro PW. The biochemical toxicology of di(2-ethylhexyl) phthalate: testicular atrophy and hepatocarcinogenesis. *Review of Biochemistry and Toxicology* 1987; 8: 73-119.
4. Amiya P, Hikim S, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of Reproduction* 1999; 4: 38-47.
5. Bensoussan K, Morales CR, Hermo AL. Vitamin E deficiency causes incomplete spermatogenesis and affects the structural differentiation of epithelial cells of the epididymis in the rats. *J Androl* 1998; 19: 266-288.
6. Boyers SP, Davis RO, Katz DF. Automated semen analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil* 1989; 12: 173-199.

7. Choi JY, Cho SW, Ryu SY, Jee YH, Lee GJ and Son HY. Apoptosis of germ cell after vasectomy in rats. *Korean J Vet Res* 2003; 43(3): 485-492.
8. Davis RO, Rothman SA, Overstreet JW. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertil Steril* 1992; 57: 648-653
9. Giasuddin ASM and Diplock AT. The influence of vitamin E on membrane lipids of mouse fibroblasts in culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1981; 210: 348-362.
10. Ishihara M, Itoh M, Miyamoto K, Suna S, Takeuchi Y, Takenak I, Jitsunari F. Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. *International Journal of Andrology* 2000; 23: 85-94.
11. Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M, Konaka R, Hiramoto K, Sasaki J, Tokuda M, Nakano Y, Inoue M. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Biochem J* 2002; 365: 849-856.
12. Nakai M, Tabira Y, Asai D, Yakabe Y, Shimyozu T, Noguchi M, Takatsuki M, Shimohigashi Y. Binding characteristics of dialkyl phthalates for the estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254:311-314.

13. Niki F. Interaction of ascorbate and a tocopherol. *Annals of the New York Academy of Science* 1987; 498: 186-198.
14. Oishi S. Enhancing effects of luteinizing hormone releasing hormone on testicular damage Induced by di-(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicology Letters* 1989; 47: 271-277.
15. Oishi S. Prevention of di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy in rats by co-administration of the vitamin B12 derivative adenosylcobalamin. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 1994; 26: 497-503.
16. Oishi S. Testicular atrophy of rats induced by di-(2-ethylhexyl)phthalate: Effect of vitamin E and zinc concentrations in the testis, liver and serum. *Toxicology Letters* 1984; 20: 75-78.
17. Oishi S, Hiraga K. Testicular atrophy induced by di-2-ethylhexyl phthalate : Effects of vitamin A and zinc concentrations in the testis, liver and serum. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1983; 70: 43-48.
18. Orozco TJ, Wang JF, Keen CL. Chronic consumption of a flavanol- and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat testes. *J Nutr Biochem* 2003; 14(2): 104-110.

19. Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, Gray LE. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicological Sciences* 2000; 58: 339-349.
20. Perreault SD. The impact of new technologies. *Reproductive and Developmental Toxicology* 1998; 3: 99-109.
21. Perreault SD, Cancel AM. Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies. *Reproduction* 2001; 121: 207-216.
22. Sato K, Kanazawa A, Ota N, Nakamura T, Fujimoto K. Dietary supplementation of catechins and alpha-tocopherol accelerates the healing of trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1998; 44: 769-778.
23. Sato K, Sakamoto Y, Ogata A, Nagai F, Mikuriya H, Numazawa M, Yamada K, Aoki N. Inhibition of aromatase activity by green tea extract catechins and their endocrinological effects of oral administration in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2002; 40: 925-933.
24. Slott VL, Jeffay SC, Dyer CJ, Barbee RR, Perreault DS. Sperm motion predicts fertility in male hamsters treated with α -chlorohydrin. *J Androl* 1997; 18: 708-716.

25. Slott VL, Jeffay SC, Suarez JD, Barbee RR, Perreault SD. Synchronous assessment of sperm motility and fertilizing ability in the hamster following treatment with α -chlorohydrin. *J Androl* 1995; 16: 523-535.
26. Srivastava S, Awasthi VK, Srivastava SP, Seth PK. Biochemical alterations in rat fetal liver following in utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP). *Indian J Exp Biol* 1989; 27: 885-888.
27. Summerfield FW, Tappel AL. Effects of dietary polyunsaturated fats and vitamin E on aging and peroxidative damage to DNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1984; 233: 408-416.
28. Tappel AL. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitamins and Hormones* 1962; 20: 493-510.
29. Thomas JA, Darby TD, Wallin RF, Garvin PJ, Martis L. A review of the biological effects of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1978; 45: 1-27.
30. Tomita I, Nakamura TR, Yagi Y, Tutikawa K. Tetragenicity/fetotoxicity of DEHP in mice. *Environ Health Perspect* 1982; 45: 71-75.
31. Toth, GP, Stober JA, Read EJ. The automated analysis of rat sperm motility following subchronic epicholorohydrin administration; methodologic and statistical considerations. *J Androl* 1989; 10:

401-415.

32. Wong WS, McLean AE. Effects of phenolic antioxidants and flavonoids on DNA synthesis in rat liver, spleen, and testis in vitro. *Toxicology* 1999; 139(3): 243-253.

