

Bisphenol A가 미성숙 생쥐 정소 생식세포에 미치는 영향

김지향, 이창주, 정진용, 윤용달  
 한양대학교 자연과학대학 생명과학과

서론

내분비계 장애물질은 생태계에 존재하는 화학물질로서 인간을 포함한 동물에서 정상적인 내분비 기능을 방해하고 생식 기관의 비정상적인 발달을 유도, 출생률 감소나 불임을 일으키며, 생식, 행동, 신경, 면역체계의 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다 (Yoon, 1998). Bisphenol A (BPA)는 에폭시 수지 및 폴리카보네이트 플라스틱의 합성시 이용되는 단량체로서, 산화방지제와 염화비닐 안정제로 사용된다 (Toshihiro *et al.*, 1999). 특히, 식품 용기중 BPA는 음료수 캔의 내부 코팅제, 플라스틱제 유아용 젖병 및 생수통 등의 소재로 이용되며, 여러 경로로 노출시 BPA는 에스트로젠 유사 작용을 통해 내분비계를 교란시키는 것으로 보고되었다 (Atanassova *et al.*, 2000; Benjonathan and Steinmetz, 1998).

따라서 본 실험에서는 생체 및 체외 실험을 통해 BPA의 처리에 따른 직·간접적인 영향을 살펴보고, 신호전달 과정에 관여하는 효소들의 발현을 비교함으로써 BPA의 교란 기전을 알아보려 하였다.

재료 및 방법

본 연구에서는 4주령의 생쥐에 BPA를 2.4 mg/kg (LD<sub>50</sub>/1000)의 농도로 일회 구강투여하고, 처리 1, 2, 3일 후에 몸무게 및 정소 무게와 부피의 변화를 측정하였다. 혈청을 수집하여 방사면역측정법으로 테스토스테론의 농도를 정량 하였고, 적출된 정소 중 일부는 Toluidine blue o 염색을 통한 조직학적 분석과 신호전달에 관여하는 PLC, PKC isozymes의 발현을 알아보기 위해 Western blot analysis를 수행하였다. 생체내 실험과 함께 TM3, TM4 세포주에 대한 처리를 통해 BPA가 정소내 세포에 대한 직접적인 영향을 알아보기 위해 BPA의 농도별 생존율을 MTT

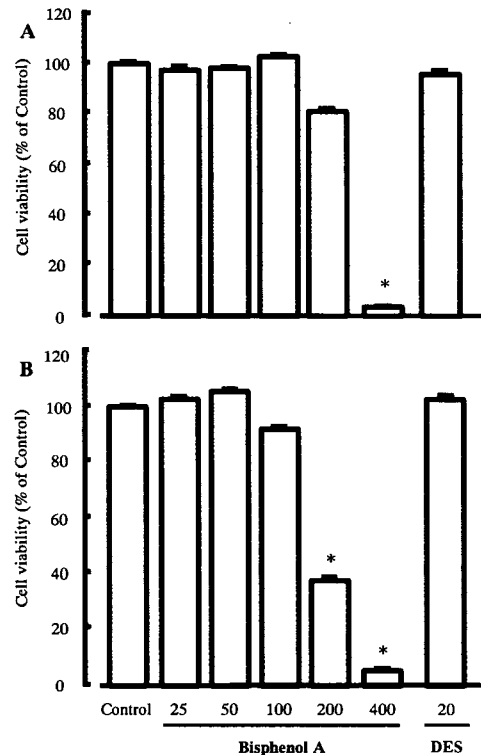


Figure 1. Cytotoxic effect of BPA (25 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM, 400 μM) on the TM3 (A) and TM4 (B) cells cultured for 24 hours *in vitro* \*, P<0.05 versus control.

viability assay를 통해 구하였고, TM3 배양액내 테스토스테론의 농도를 정량하여 합성능을 비교하였다. 또한 두 세포주에서 신호전달 매개자인 PLD 활성을 비교하였다.

Table 1. Changes of gonad index after *po* administration of bisphenol A

Day	Experimental group					
	CON	BPA	DES	FSH	BPA+FSH	DES+FSH
1	18.68±2.14	24.71±1.40*	24.25±0.36*	-	-	-
2	21.82±2.04	21.09±1.06	24.03±2.23	20.86±1.77	28.01±0.83**	27.97±0.92
3	20.09±1.89	26.73±1.82*	24.21±1.1	25.07±1.23	22.26±1.33	29.29±1.54**

Each value represents the mean ± SEM of data from 5 mice/group.

\* and \*\*, p<0.05 significantly different from control and FSH control, respectively.

Table 2. Changes of serum testosterone concentration in the male mice after *po* administration of bisphenol A

Day	Experimental group					
	CON	BPA	DES	FSH	BPA+FSH	DES+FSH
1	3.44±0.45	1.92±0.18*	0.56±0.06*	-	-	-
2	4.03±0.62	3.15±0.17	5.55±0.09	2.39±0.33	2.20±0.15	6.69±1.27**
3	3.56±0.15	1.49±0.06*	5.49±0.24	3.40±0.12	5.46±0.96	5.61±0.95

Each value represents the mean ± SEM of data (ng/ml) from 5 mice/group. \* and \*\*, p<0.05 significantly different from control and FSH control, respectively.

**결 과**

저농도의 BPA를 미성숙 생쥐에 구강투여 한 결과, 1, 2, 3 일의 몸무게 및 정소 무게는 변하지 않았으나 혈청내 테스토스테론의 농도는 감소하였다. 정소의 조직학적 관찰 결과 정소내 세정관의 배열과 구조등에는 차이가 없었으나, multinucleated cell 등과 같은 조직병리학적 세포들이 나타나고, BPA 처리군에서는 elongated spermatids가 관찰되지 않은 세정관이 관찰되었다. PLC, PKC isozymes에 대한 정소내 발현은 큰 차이가 없었으나, PKC delta의 경우에는 대조군에 비해 낮은 발현양상을 보였다. TM3, TM4 세포는 BPA 농도에 따른 생존율의 감소를 보였으며, 특히 TM4 Sertoli

세포의 경우에는 현저히 감소하였다. TM3 배양액내 테스토스테론의 농도는 변화를 보이지 않았고, PLD 활성은 TM4 세포에서 확연히 감소하였다.

**논 의**

이상의 결과를 통해 BPA는 직접적으로 Leydig 세포에 영향을 가하여 테스토스테론의 농도를 변화 시

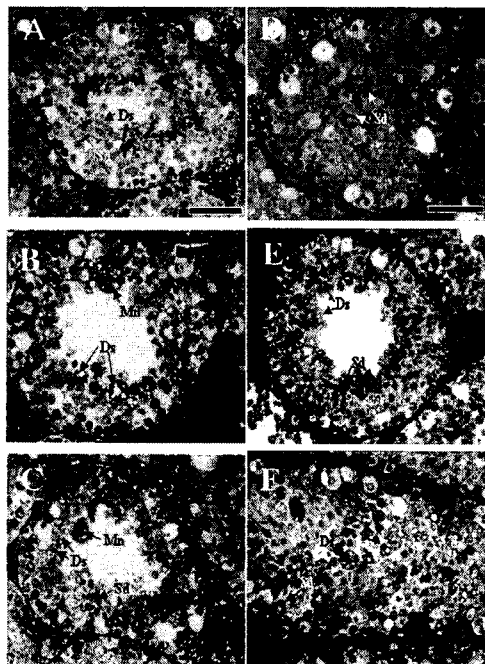


Figure 2. Microphotographs of the characteristic seminiferous tubule in the prepubertal mice testis. A, oil control; B, bisphenol A; C, diethylstilbestrol; D, FSH control; E, BPA+FSH; and F, DES+FSH. Sd, spermatids; Ds, degenerating spermatocytes; and Mn, multinucleated cells. Scale bar = 50 μm.

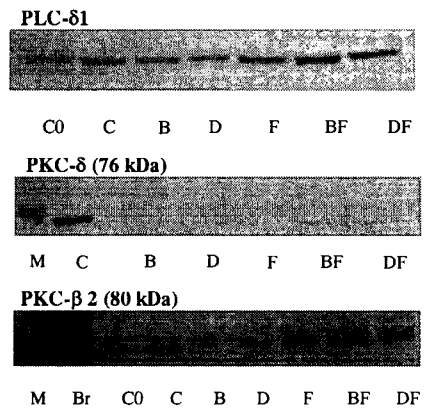


Figure 3. Immunoelectrophoretograms of PLC and PKC isozymes extracted from mouse testis.

키는 것이 아니라, Sertoli 세포등에 영향을 통해 간접적으로 체내 테스토스테론의 농도를 변화시키는 것으로 보이며, 결과적으로 성성숙의 지연 및 정소내 정자형성과정의 손상을 야기 시킬 것으로 사료된다. 또한 BPA의 교란 기전을 알아보기 위한 실험결과, PKC delta의 발현을 영향을 주는 것이 관찰되어, PKC delta의 하위경로인 PLD2의 발현을 비교해 본 결과, 특히 Sertoli 세포의 PLD의 활성이 떨어지는 것으로 나타났다. 이는 BPA가 생쥐 정소내 Sertoli cells에서 PLC-PKC δ-PLD2의 경로를 통해 작용하고, 그로 인해 정소내 생식세포 및 Leydig 세포에 영향을 주어 결국 정자수 감소, 부속기관의 이

상, 불임 등의 결과를 일으키는 것으로 사료된다.

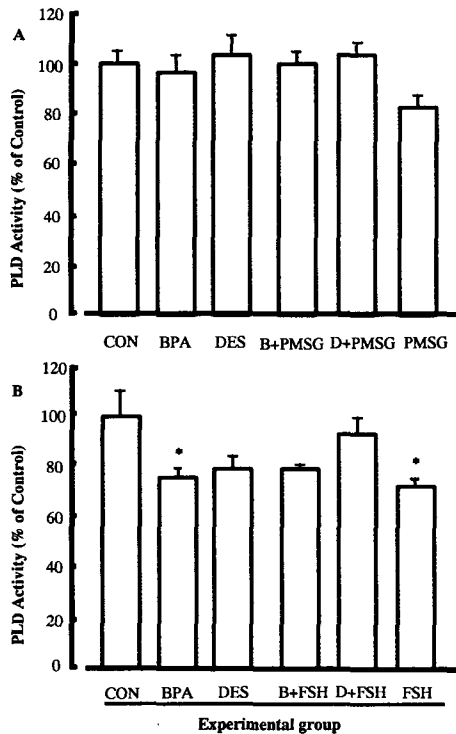


Figure 4. Effects of BPA on PLD activities on TM3 (A) and TM4 (B) cells cultured for 3 hours *in vitro* \*,  $p < 0.05$  versus control.

### 참고문헌

- Atanassova N, McKinnell C, Turner KJ, Walker M, Fisher JS, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe RM. (2000) Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* **141** : 3898-3907.
- Atkinson A, and Roy D. (1995) In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ Mol Mutagen* **26** : 60-66.
- Benjonathan N. and Steinmetz R. (1998) Xenoestrogens: The emerging story of bisphenol A. *Trends Endocrinol Metab* **9** : 124-128.
- Krishnan AV., Stathis P., Permuth SF., Tokes L., Feldman D. (1993) Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving.

- Endocrinology* **132** : 2279-2286.
- Morrissey RE., Geroge JD., Price Cj., Tyl RW., Marr MC., and Kimmel CA. (1989) The developmental toxicology of bisphenol A in rats and mice. *Fund Appl Toxicol* **13** : Nakhla AM, Mather JP, Janne OA, Bardin CW (1984) Estrogen and androgen receptors in Sertoli, Leydig, myroid and epithelial cells; effects of time in culture and cell density. *Endocrinology* **115** : 121-128.
- Nira BJ and Rosemary S. (1998) Xenoestrogens: The emerging story of bisphenol A. *Trends Endocrinol Metab* **9** : 124-128.
- Toshihiro T, Wakako N, Isao N, Koichi A, Kenji K, Kozo H. (1999) Exposure with the environmental estrogen bisphenol A disrupts the male reproductive tract in young mice. *Life Sciences* **65** : 2251-2357.
- Yoon YD (1998) The effects of endocrine disruptors on reproduction and development of wild animals. *Dev. Reprod* **2** : 115-133.