

## Bisphenol A에 의한 신경계 세포의 칼슘 항상성 교란 및 세포독성에 미치는 영향

이웃모<sup>1</sup> · 이상민<sup>1</sup> · 손동주<sup>1</sup> · 이선영<sup>1</sup> · 박혜지<sup>1</sup> · 남상윤<sup>2</sup> · 김대중<sup>2</sup> · 윤영원<sup>2</sup>  
유환수<sup>1</sup> · 오기완<sup>1</sup> · 김태성<sup>3</sup> · 한순영<sup>3</sup> · 홍진태<sup>1</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 약학대학, <sup>2</sup>수의과대학, <sup>3</sup>식품의약품안전청

## Bisphenol A Disturbs Intracellular Calcium Homeostasis and its Relationship with Cytotoxicity

Yoot Mo Lee<sup>1</sup>, Sang Min Lee<sup>1</sup>, Dong Ju Son<sup>1</sup>, Sun Young Lee<sup>1</sup>, Hye Ji Park<sup>1</sup>,  
Sang Yun Nam<sup>2</sup>, Dae Joong Kim<sup>2</sup>, Young Won Yun<sup>2</sup>, Hwan Soo Yoo<sup>1</sup>, Ki Wan Oh<sup>1</sup>,  
Tae Seong Kim<sup>3</sup>, Soon Young Han<sup>3</sup> and Jin Tae Hong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy and <sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763

<sup>3</sup>National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

Received June 28, 2004; Accepted August 31, 2004

**ABSTRACT.** We previously found that bisphenol A (BPA) caused neurotoxic behavioral alteration. Since disturbance of calcium homeostasis is an implicated contributor in the neurotoxic mechanism of environmental toxicants, we investigated whether BPA alters calcium homeostasis. Unlike other neurotoxic agents which cause increase of intracellular calcium level, BPA decreased  $[Ca^{2+}]_i$  dose-dependently in PC12 cells and cortical neuronal cells regardless of the calcium existence in buffer. BPA at greater concentrations than 100  $\mu$ M reduced cell viability significantly in both types of cells. BPA also suppressed L-glutamate (L-type channel activator, 30 mM) and trifluoperazine (calmodulin antagonist, 30  $\mu$ M)-induced increase of  $[Ca^{2+}]_i$ . BPA further lowered caffeine (RyR activator, 100  $\mu$ M)-decreased  $[Ca^{2+}]_i$ , but did not alter dantrolene (RyR inhibitor, 100  $\mu$ M), heparin (IP<sub>3</sub> inhibitor, 200 units/ml) and xestospongic C (IP<sub>3</sub> inhibitor, 5  $\mu$ M)-decreased  $[Ca^{2+}]_i$ . Cell viability was not directly related to intracellular calcium change by bisphenol A that alternation of intracellular calcium may not be a direct causal factor of BPA-induced neuronal cell death.

**Keywords:** Bisphenol A, Calcium homeostasis, Neurotoxic mechanism.

### 서 론

에스트로겐 유사 환경호르몬은 인체에 잠재적인 위험요소로 인식되어져 왔으며(Roy *et al.*, 1997), bisphenol A 및 alkyl phenols, phthalates, polychlorinated biphenyls 등의 산업화학물질과 DDT 및 methoxychlor, dieldrin, toxaphene, endosulfan 등의 농약성분을 예로서 들 수 있다(Soto *et al.*, 1995; Olea *et al.*, 1998). 이러한 에

스트로겐 유사화학물질은 환경에 널리 존재하며 생태계의 먹이사슬에 유입되고 있어 그 잠재위험이 더욱 심각하다고 할 수 있을 것이다(Guillette *et al.*, 1995). 에스트로겐 유사 활성 환경호르몬으로 알려져 있는 bisphenol A (Paris *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2000)는 polycarbonate, phenoxy, polysulfone, polyester 수지 제조 중간물질 및 식기와 음료수 캔 제조에 사용되는 화학물질이며(Krishnan *et al.*, 1993; Brotons *et al.*, 1995), 치아 충전제, 특히, 어린이 치아 코팅제인 polycarbonate 플라스틱으로 이용되고 있다(Olea *et al.*, 1996). 이러한 bisphenol A는 최근의 연구결과에서 다양한 독성효과가 보고되어지고 있음에도 불구하고 신경계에 미치는 영향은

Correspondence to: Jin Tae Hong, College of Pharmacy, Chungbuk National University, 48, Gaesin-dong, Heungduk-gu, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea  
E-mail: jinthong@chungbuk.ac.kr

그 중요성에 비해 선행연구가 매우 미비한 실정이다. 또한, bisphenol A가 유도하는 배아 및 태아 독성(Kim *et al.*, 2001; Takai *et al.*, 2000)을 고려한다면 신체 여러 기관을 포함하여 신경계 발달에도 독성현상을 나타낼 것으로 판단되어져 이에 대한 연구가 필요하다 할 수 있을 것이다. 이러한 필요에 따라 본 연구자들은 *in vivo* 및 *in vitro*에서 bisphenol A의 신경계에 미치는 영향에 대하여 연구조사 하였다. 연구 결과, *in vivo* 실험에서 생후 3주된 마우스에 bisphenol A의 투여 시 비정상적 행동변화(locomotor 활성 감소와 rearing, jumping forepaw tremor 증상 유도 등)가 관찰되었다. 또한, *in vitro* 연구에서 널리 사용되고 있는 신경세포 암 종인 PC12 세포와 배아 및 태아 상태에 근접한 신경세포로서 생후 1일된 랫트의 뇌에서 분리한 대뇌피질 신경세포(cortical neuronal cell)를 이용하여 bisphenol A로 유도한 PC12 세포 및 대뇌피질 신경세포의 생존 감소에 대해 에스트로겐 억제제는 보호작용을 보이지 못한 반면에 MEK-1 억제제인 PD98059에 의한 효과적인 보호작용이 관찰되었다(데이터 미발표). 따라서, 본 연구보고에서는 신경계에서 bisphenol A가 일으키는 이러한 영향이 세포 내 칼슘 항상성의 변화와도 관계가 있을 수 있다는 판단에 따라 bisphenol A와 여러 칼슘 관련 조절 인자들과의 관계에 대하여 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

Xestospongine C, dantrolene, thapsigargin, tamoxifen (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), ICI 182, 780 (Tocris, Ellisville, MO, USA)과 비스페놀 A(Sigma-Aldrich)는 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 용해하여 사용하였다. Heparin(American biologics, Philadelphia, Pa, USA)은 주사액제로 만들어진 것을 이용하였고 Caffeine과 trifluoperazine(Sigma-Aldrich)은 증류수로 녹여 사용하였다. L-glutamate(Sigma-Aldrich)은 Tris와 함께 증류수에 녹여 사용하였다. Fura-2 AM은 TEFLABS 제품을 사용하였다. KRH buffer에는 NaCl(121 mM) 및 KCl(4.7 mM),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (1.2 mM),  $\text{MgSO}_4$ (1.2 mM),  $\text{CaCl}_2$ (2.0 mM),  $\text{NaHCO}_3$ (5.0 mM), Glucose(10 mM), BSA(0.2%)를 포함한다. Calcium free buffer는 KRH buffer에서  $\text{CaCl}_2$ 만 제외하고 제조하였다.

### 세포배양

PC12 세포는 10% heat-inactivated horse serum 및 5% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 100

units/ml streptomycin이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)과 Ham's F-12 nutrient media(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 배양하였다. 대뇌피질 신경세포는 생후 1일된 Sprague-Dawley 랫트의 뇌 피질에서 분리하여 poly-L-lisine이 처리된 배양디쉬에서 B27 serum(Invitrogen)이 들어있는 Neurobasal media로 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 배양하였다.

### 세포 내 칼슘 측정

세포 내 칼슘 측정은 fura-2 AM을 형광염료로 이용하여 측정하였다. Fura-2 AM을 세포가 들어있는 KRH buffer에 최종농도가 5  $\mu\text{M}$ 이 되도록 첨가하여 37°C에서 30분간 암반응시켰다. 그 후 원심분리하여 KRH buffer로 세정하였다. 이 실험에는 Delta Scan System(Photon Technology International, Princeton, NJ, USA)을 사용하였으며 이 기기로 세포가 부유되어 있는 KRH buffer를 340 nm와 380 nm에서 측정하여 최소 2회 이상의 실험을 통해 재현성을 확인한 이 두 값의 비율, 즉 Ratio = F340/F380로 실험결과를 나타내었다. 이 때, 340 nm는 fura-2 AM과 calcium의 binding된 것의 수치이며 380 nm는 fura-2 AM만의 수치를 나타낸 것이다.

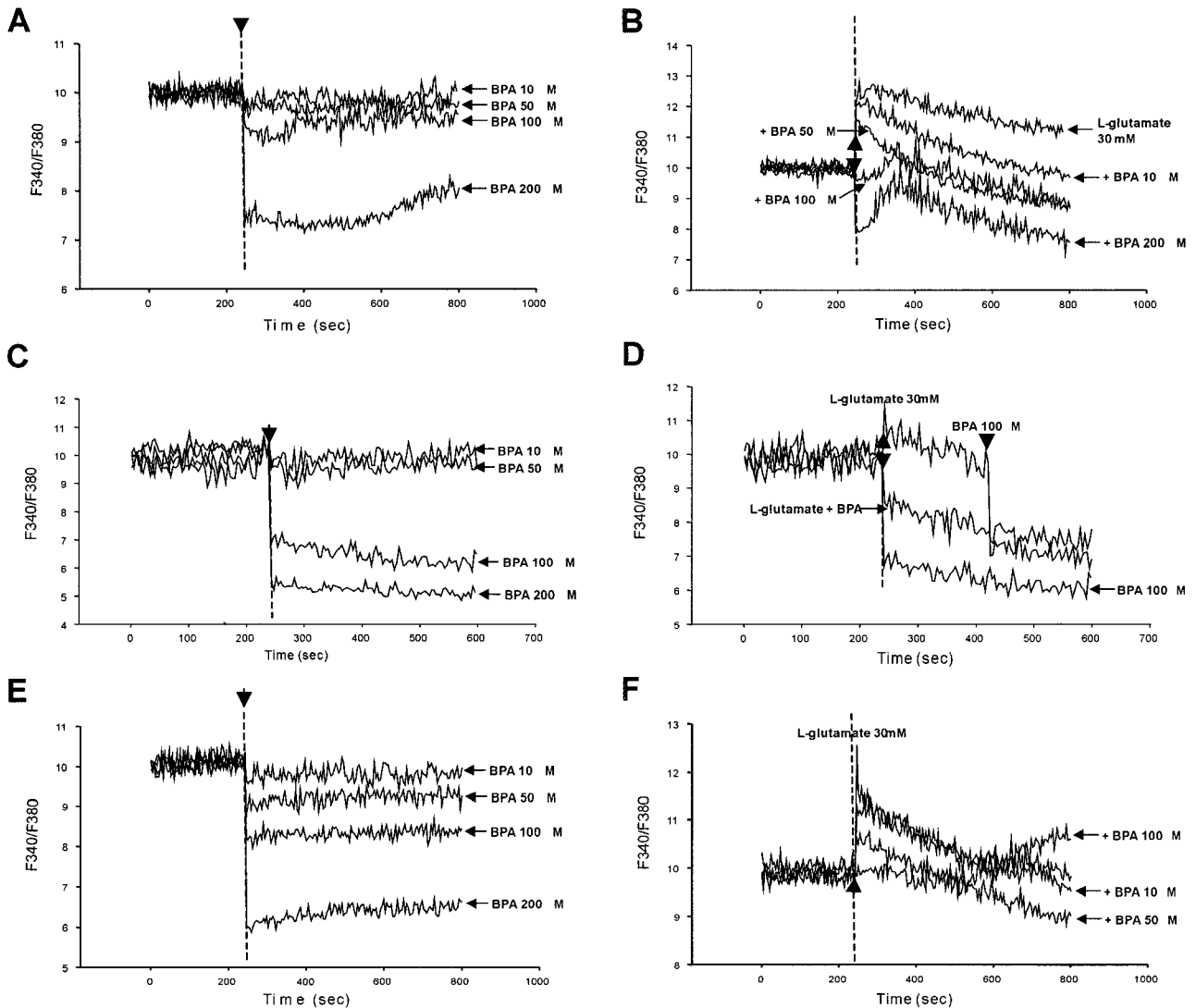
### WST-1 측정

배양된 세포의 배지를 제거한 후 90 ml PBS와 10 ml WST-1 시약(Roche, Penzberg, Germany)을 각각 처리한 후, PC12 세포와 대뇌피질 신경세포를 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 대조군이 열린 노란색으로 변할 때까지 반응(PC12 세포: 3시간, 대뇌피질 신경세포: 5시간)시켜 micro plate reader(software Magellan, TECAN, Grodig/Salzburg, Austria)를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존력은 대조군(비처리군) 흡광도/시험군(처리군) 흡광도의 %로 표현하였다.

## 결 과

### 세포 내 칼슘 농도에 미치는 bisphenol A 및 칼슘 조절 인자의 영향

Bisphenol A가 신경계 세포 내 칼슘의 항상성에 영향을 주는지를 조사하였다. Bisphenol A는 PC12 세포의 내부 칼슘 농도를 buffer내 칼슘이 존재하거나(Fig. 1A) 존재치 않거나(Fig. 1C) 농도 의존적으로(10~200  $\mu\text{M}$ ) 억제하였다. 또한 Bisphenol A는 칼슘이 포함된 buffer 내에서 대뇌피질 신경세포의 세포 내 칼슘 농도를 PC12세포에서 보다 더욱 강하게 억제하였다(Fig. 1E). 게다가

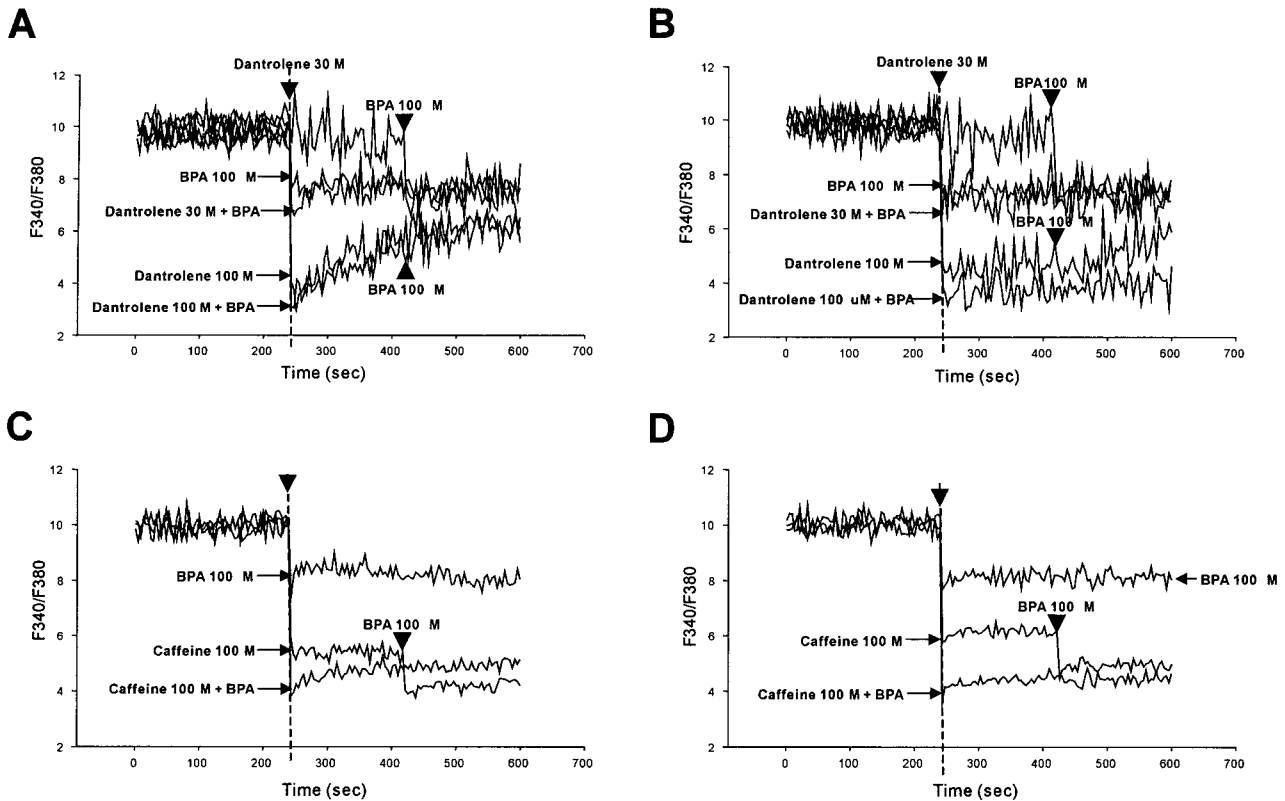


**Fig. 1.** Effect of BPA alone or combination with L-glutamate on  $[Ca^{2+}]_i$ . Calcium image is represented as the F340/F380 ratio. **A**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of PC12 cells to BPA in calcium containing buffer. **B**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of PC12 cells to L-glutamate and BPA which were treated simultaneously in calcium containing buffer. **C**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of PC12 cells to BPA in calcium free buffer. **D**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of PC12 cells to L-glutamate and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (L-glutamate: at 240 sec, BPA: at 420 sec) in calcium free buffer. **E**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of cortical neurons to BPA in calcium free buffer. **F**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of cortical neurons to L-glutamate and BPA which were treated simultaneously in calcium containing buffer.

bisphenol A와 L-glutamate를 동시에 처리하였을 경우 칼슘이 포함된 buffer 내의 PC12 세포(Fig. 1B)와 대뇌피질 신경세포(Fig. 1F)에서 L-glutamate(L-type channel activator, 30 mM)가 유도하는 세포 내 칼슘의 일시적인 상승을 농도 의존적으로(10~100 또는 200  $\mu$ M) 억제하였을 뿐만 아니라 칼슘이 포함되지 않은 buffer 내의 PC12 세포(Fig. 1D)에서도 bisphenol A 100  $\mu$ M의 L-glutamate과 동시 혹은 3분 간격의 후 처리는 L-glutamate가 유도하는 칼슘의 일시적인 상승을 억제하였다. L-glutamate 단독으로는 칼슘이 포함된 buffer에서 세포 내 칼슘 농도

를 크게 증가시킨 반면에 칼슘이 미포함된 buffer에서는 그 정도가 약하게 나타났다.

신경계 세포에서의 칼슘 조절은 endoplasmic reticulum (ER)의 칼슘 조절 수용체에 의하여 크게 좌우되는데 그 중요한 수용체가 RYR(ryanodine receptor)과 IP3R(inositol triphosphate receptor)이다. RYR 억제제인 dantrolene은 저농도(30  $\mu$ M)에서 buffer 내 칼슘이 존재하거나(Fig. 2B) 존재치 않거나(Fig. 2A) PC12 세포의 내부 칼슘 변화에 유의성 있는 영향을 주지 못하였다. 반면에, 고농도(100  $\mu$ M)의 dantrolene은 buffer 내 칼슘이 존재하거나



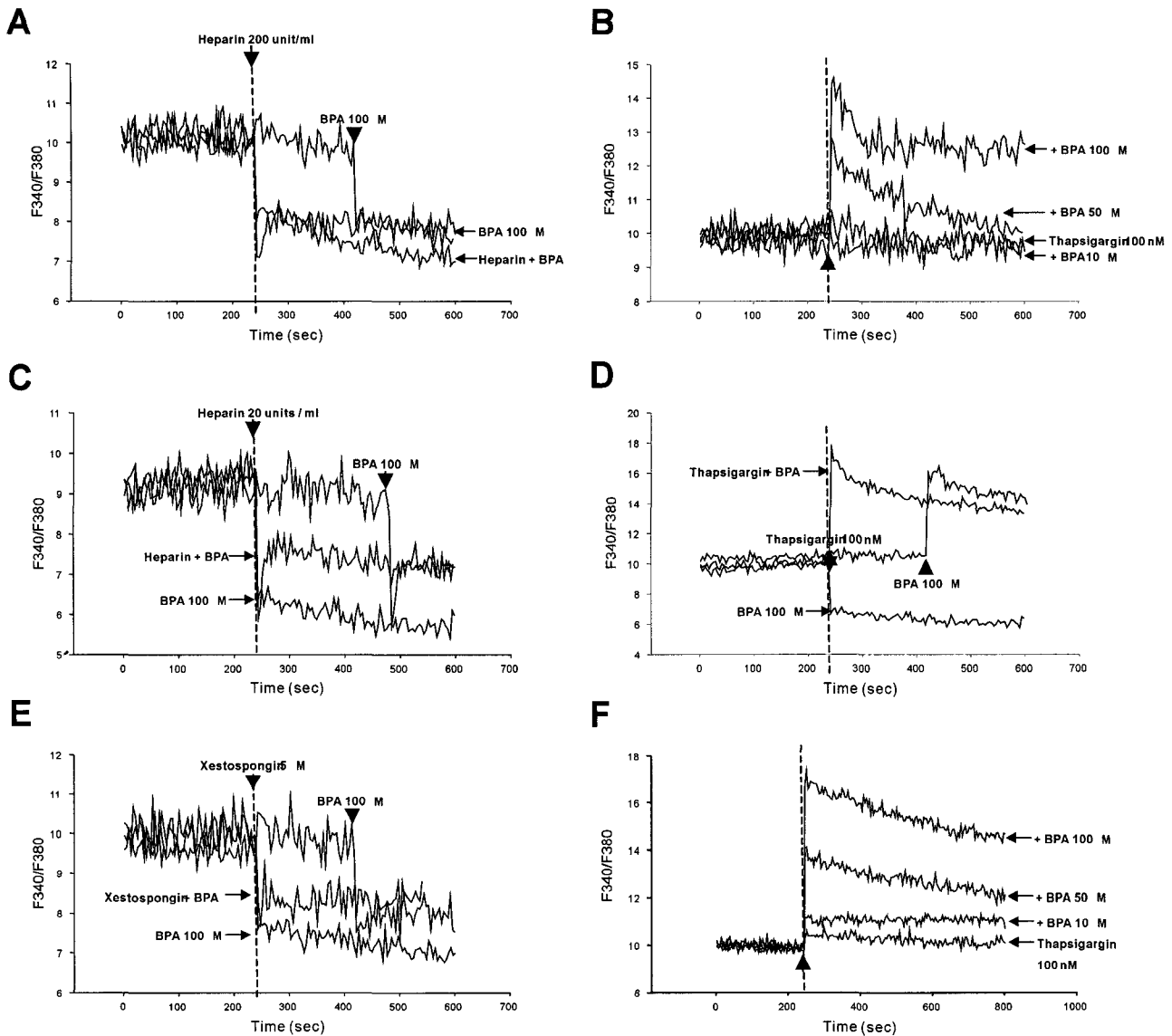
**Fig. 2.** Effect of RYR modulators in combination with BPA on  $[Ca^{2+}]_i$ . Calcium image is represented as the F340/F380 ratio. **A**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of PC12 cells to dantrolene and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (dantrolene: at 240 sec, BPA: at 420 sec) in calcium free buffer. **B**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of PC12 cells to dantrolene and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (dantrolene: at 240 sec, BPA: at 420 sec) in calcium containing buffer. **C**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of PC12 cells to caffeine and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (caffeine: at 240 sec, BPA: at 420 sec) in calcium free buffer. **D**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of PC12 cells to caffeine and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (caffeine: at 240 sec, BPA: at 420 sec) in calcium containing buffer.

(Fig. 2B) 존재치 않거나(Fig. 2A) PC12 세포의 내부 칼슘 농도를 큰 폭으로 감소시켰으며, bisphenol A 100  $\mu$ M은 그 감소에 별다른 영향을 끼치지 못했다. 한편 bisphenol A 100  $\mu$ M의 처리는 buffer내 칼슘이 존재하거나(Fig. 2D) 존재치 않거나(Fig. 2C) PC12 세포에서 caffeine (RYR activator, 100  $\mu$ M)이 유도하는 내부 칼슘 농도의 감소를 조금 더 증폭시켰다. IP<sub>3</sub> 억제제인 Heparin 200 unit/ml(Fig. 3A: 칼슘이 포함되지 않은 buffer, Fig. 3C: 칼슘이 포함된 buffer)과 xestospongin C 5  $\mu$ M(Fig. 3E: 칼슘이 포함되지 않은 buffer)은 PC12 세포의 내부 칼슘 변화에 유의적인 영향을 주지 못했다.

Bisphenol A는 calcium-ATPase 억제제인 thapsigargin 100 nM이 유도하는 PC12 세포(Fig. 3B: 칼슘이 포함되지 않은 buffer) 및 대뇌피질 신경세포(Fig. 3F: 칼슘이 포함된 buffer)의 내부 칼슘 증가를 농도의존적(10~100  $\mu$ M)으로 더욱 증가시켰다. 뿐만 아니라, 칼슘이 포함된 buffer 내의 PC12 세포에서도 bisphenol A 100  $\mu$ M의

thapsigargin과 동시 혹은 3분 간격의 후 처리는 thapsigargin 100 nM이 유도하는 내부 칼슘 농도의 증가를 더욱 증폭시켰다(Fig. 3D).

또 다른 칼슘인자의 영향을 보고자 bisphenol A 100  $\mu$ M의 trifluoperazine(calmodulin antagonist)과 동시 혹은 3분 간격의 후 처리는 buffer 내 칼슘이 존재하거나(Fig. 4B) 존재치 않거나(Fig. 4A) trifluoperazine 30  $\mu$ M이 유도하는 내부 칼슘의 약한 증가를 억제하였으며, 전반적으로 세포 내부 칼슘 농도를 bisphenol A 100  $\mu$ M만 처리한 만큼 억제하였다. 그리고 buffer 내 칼슘의 존재 하에서 estrogen 억제제(ICI 182,780, tamoxifen 30~300 nM)와 bisphenol A 100  $\mu$ M 동시 처리는 bisphenol A가 유도하는 PC12 세포(Fig. 4C) 및 대뇌피질 신경세포(Fig. 4D)의 내부 칼슘 농도 감소를 약하게 억제하였다. 두 가지 세포 종류(PC12 세포, 대뇌피질 신경세포)에 쓰인 칼슘 조절 인자들과 bisphenol A간의 세포 내부 칼슘 농도의 변화양상은 두 세포에서 유사하였다.

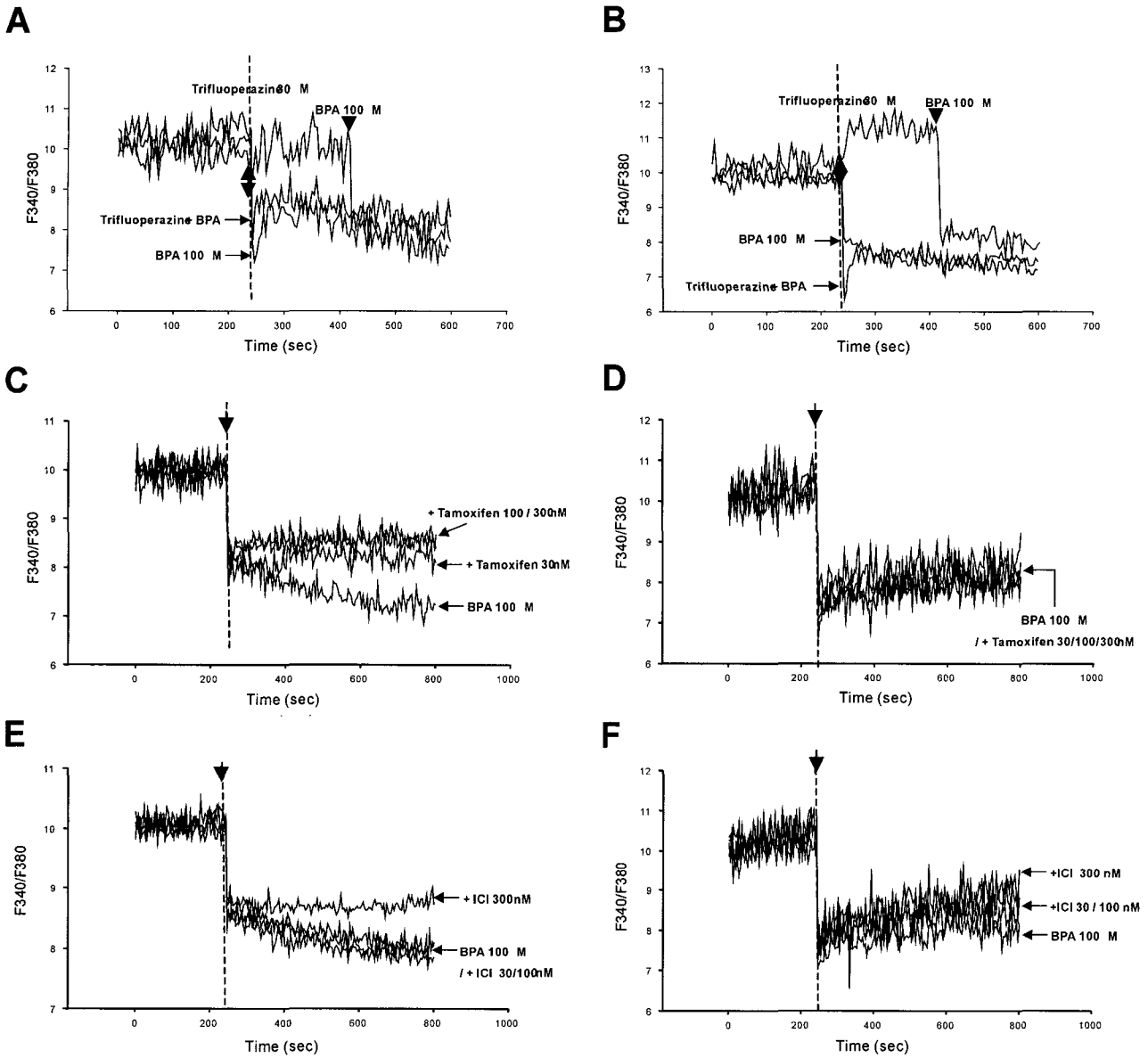


**Fig. 3.** Effect of IP<sub>3</sub> modulators or Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor in combination with BPA on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Calcium image is represented as the F340/F380 ratio. **A**, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> response of PC12 cells to heparin and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (heparin: at 240 sec, BPA: at 420 sec) in calcium free buffer. **B**, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> response of PC12 cells to thapsigargin and BPA which were treated simultaneously in calcium free buffer. **C**, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> response of PC12 cells to heparin and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (heparin: at 240 and 360 sec, BPA: at 480 sec) in calcium containing buffer. **D**, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> response of PC12 cells to thapsigargin and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (thapsigargin: at 240 sec, BPA: at 420 sec) in calcium containing buffer. **E**, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> response of PC12 cells to xestospongin (C) and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (xestospongin (C): at 240 sec, BPA: at 420 sec) in calcium free buffer. **F**, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> response of cortical neurons to thapsigargin and BPA which were treated simultaneously in calcium containing buffer.

### 세포 생존율에 대한 bisphenol A 및 칼슘 조절 인자의 영향

Bisphenol A 100 μM과 다양한 칼슘 조절 인자들을 PC12 세포와 대뇌피질 신경세포에 동시 처리하여 72시간 배양 후 세포독성을 WST-1 방법으로 측정하였다(Fig. 5). Bisphenol A 100 μM은 L-glutamate 30 mM 및

caffeine 100 μM, trifluoperazine 30 μM에 의한 세포 생존율감소에 있어서는 특이적 영향을 나타내지 않았으나 heparin 200 units/ml로 유도한 세포사멸을 두 세포 모두에서 감소시켰다. 반면에, bisphenol A 100 μM은 thapsigargin 100 nM로 유도한 독성을 두 세포에서 증가시켰다. 한편, dantrolene 30 μM은 대뇌피질 신경세포



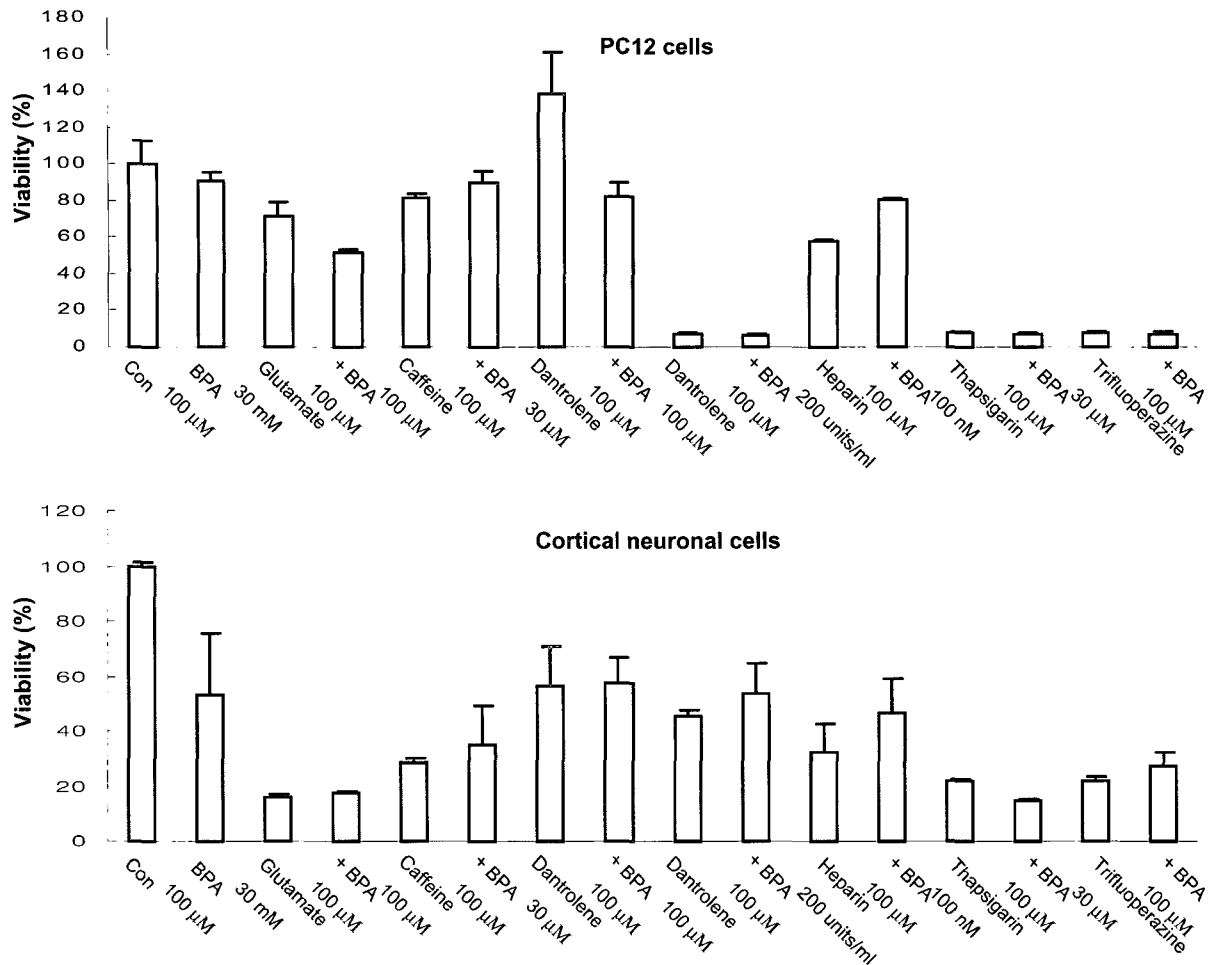
**Fig. 4.** Effect of calmodulin antagonist or estrogen- $\beta$  antagonist in combination with BPA on  $[Ca^{2+}]_i$ . Calcium image is represented as the F340/F380 ratio. **A**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of PC12 cells to trifluoperazine and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (trifluoperazine: at 240 sec, BPA: at 420 sec) in calcium free buffer. **B**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of PC12 cells to trifluoperazine and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (trifluoperazine: at 240 sec, BPA: at 420 sec) in calcium containing buffer. **C**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of PC12 cells to the estrogen inhibitor (tamoxifen or ICI 182,780) and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (tamoxifen or ICI 182,780: at 240 sec, BPA: at 420 sec) in calcium containing buffer. **D**,  $[Ca^{2+}]_i$  response of cortical neurons to the estrogen inhibitor (tamoxifen or ICI 182,780) and BPA which were treated simultaneously (at 240 sec) or separately (tamoxifen or ICI 182,780: at 240 sec, BPA: at 420 sec) in calcium containing buffer.

에서 독성을 나타낸 반면에 PC12 세포에서는 비처리군 세포보다 더 높은 생존율을 나타내었다. Dantrolene 30  $\mu$ M과 bisphenol A 100  $\mu$ M을 동시 처리한 두 세포의 생존율은 bisphenol A 100  $\mu$ M 단독 처리한 세포의 생존율과 유사하였다. Dantrolene 100  $\mu$ M은 두 세포에서 매우 큰 폭의 생존율 감소를 야기하였으며 bisphenol A

100  $\mu$ M은 이러한 감소에 대하여 특이적 영향을 나타내지 않았다.

### 고찰

위 실험결과에서, bisphenol A가 신경계 세포사를 100



**Fig. 5.** Effect of calcium modulators on cell viability in the combination with BPA. Neuronal cells or PC12 cells cultivated in 96 wells for 1 day were treated on the conditions (compounds and concentrations in total volume) mentioned in the text. After 72 hr, cell viability was measured by WST-1 method. Living cells were represented as a percentage of the total population of living and dead cells. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E. from three experiments with triplicates.

$\mu$ M 이상에서 농도 의존적으로 유발시킨다는 선행 연구결과(데이터 없음)와 두 신경계 세포의 내부 칼슘 농도 저하가 100  $\mu$ M 이상에서 보다 확연히 일어났다는 사실로 미루어 볼 때 bisphenol A에 의한 신경계 세포사가 세포 내 칼슘의 고갈과 관련이 있다고 추측되어진다. 하지만 단순히 세포 내 칼슘 농도를 증가시키는 세포독성 유발물질(L-glutamate, trifluoperazine, thapsigargin)과 bisphenol A가 동시에 존재 시 신경계 세포독성이 조절되지 않았으며 오히려 thapsigargin은 bisphenol A과 함께 존재 시 내부 칼슘 농도와 세포독성을 증가시킨 반면에 선행연구(데이터 없음)에서 PD 98059가 bisphenol A의 신경계 세포사를 감소시킨 사실은 단순한 내부 칼슘 농도 저하만으로 설명할 수 없는, 즉 세포 내 칼슘 농도변화를 일으키는 세포 내 특정 칼슘 관련 인자들, 예를 들어 MAP kinase family에 영향을 주는 작용기작(Arai *et al.*,

2004; Egea *et al.*, 1999)이 bisphenol A의 신경계 세포 독성과의 관련성이 보다 높은 것으로 추측되어진다.

선행 연구 결과에서 저농도(50  $\mu$ M 이하)의 bisphenol A가 신경계 세포의 뉴라이트를 발달시키면서 세포 생존율을 비처리군보다 다소 증가시켰으나 고농도(100  $\mu$ M 이상)에서는 농도 의존적으로 생존율을 감소시킨다는 사실을 발견하였다(미발표 자료). 그와 더불어 세포 내 칼슘 농도를 상승시키는 다른 신경독성물질과는 다르게 bisphenol A가 PC12 세포와 대뇌피질 신경세포에서 칼슘농도를 농도 의존적으로 감소시킨다는 사실을 발견하였다. 세포 내부 칼슘 농도의 감소는 지각 및 통각 능력을 감소시키는 등의 신경계 이상 증상을 야기할 수 있다고 보고된 바 있어(Chaban *et al.*, 2003; Ramoska *et al.*, 1990; Todorovic *et al.*, 2004), 결국 bisphenol A의 세포 내 칼슘 농도 저하 작용과 신경 독성작용에 주목할만한 관련

성이 있을 것으로 추정되어졌다. 따라서, 본 연구에서는 bisphenol A의 세포 내 칼슘 저하 작용을 더욱 구체적으로 조사하여 이것이 세포독성과 어떠한 연관성이 있는지에 대하여 연구조사 하였다.

고농도의 glutamate는 신경계에  $Ca^{2+}$ 의 유입과 세포사를 동반한다고 알려졌는데(Choi, 1987; Finkbeiner *et al.*, 1988), 본 연구에서는 bisphenol A가 L-glutamate(L-type channel activator, 30 mM)가 유도하는 일시적인  $[Ca^{2+}]_i$  증가를 PC12 세포와 대뇌피질 신경세포에서 농도 의존적으로 억제하였다. 그런데 bisphenol A가 PC12 세포의 내부 칼슘 농도를 칼슘 비함유buffer에서도 농도 의존적으로 감소시킨 사실은 세포 외부에서 내부로의 칼슘 유입을 담당하는 L-type channel의 차단에 의한 것이 bisphenol A가 유도하는 세포 내부 칼슘 고갈의 주된 작용기작과는 관련성이 희박하다는 것을 반영한다. PC12 세포와 대뇌피질 신경세포에 30 mM L-glutamate을 100  $\mu$ M bisphenol A와 동시 처리하여 72시간 후 세포 생존율을 측정된 결과, 내부 칼슘 농도 상승의 억제가 L-glutamate이 유도하는 신경독성을 막아주지는 못하였다. 결과적으로 L-glutamate이 유도하는  $[Ca^{2+}]_i$  상승과 세포사는 직접적인 연관성이 적은 것으로 판단되어졌다.

다음으로 신경세포에서 칼슘조절의 중요 역할을 담당하는 세포 내 ER의 칼슘 조절 수용체 변화에 의한 세포 내 칼슘 농도 변화 여부와 세포독성을 알아보았다. Caffeine은 일시적으로  $[Ca^{2+}]_i$ 을 상승시킨 후 투여 전의 수준 이하로 떨어뜨리며, 이는 caffeine에 의해 ER로부터 칼슘 유리가 억제되거나 세포 밖으로 방출되는 수송로가 활성화되기 때문일 것으로 보고되었다(Krizaj *et al.*, 1999). 본 연구에서 caffeine에 의한 세포 내부 칼슘 농도의 상승이 측정하기에는 매우 순간적이든 아니든 간에, 100  $\mu$ M bisphenol A는 caffeine(RYR activator, 100  $\mu$ M)으로 유도된 내부 칼슘 농도의 감소 폭을 조금 증가시켰다. 반면에 100  $\mu$ M bisphenol A는 caffeine에 의한 신경 세포사에 유의한 영향을 나타내지 못하였다. Dantrolene은 여러 가지 세포종류와 환경에서 다양한 세포 보호 효과(glutamate에 의한 독성, 운동으로 인한 근육손상, 뇌조직의 허혈성 손상, carbon tetrachloride에 의한 간독성 등으로부터 보호)를 지니고 있다고 보고되어져 있다(Frandesen *et al.*, 1991, 1993; Amelink *et al.*, 1990; Katchman *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Yamagishi *et al.*, 1993). 본 연구에서 dantrolene(RYR inhibitor, 30  $\mu$ M)이 대뇌피질 신경세포에서 독성을 나타낸 반면에, PC12 세포에서는 비처리군보다 세포 생존율을 다소 증가시켰고 100  $\mu$ M bisphenol A의 존재와 무관하게 그 자체적으로는  $[Ca^{2+}]_i$ 에 영향을 주지 않았다. Dantrolene

30  $\mu$ M과 bisphenol A 100  $\mu$ M을 동시 처리한 두 세포의 생존율은 bisphenol A 100  $\mu$ M만 처리한 세포의 생존율과 유사하였다. Dantrolene(RYR inhibitor, 100  $\mu$ M)은 대뇌피질 신경세포의 내부 칼슘 농도와 세포 생존율을 상당히 감소시켰으며, bisphenol A는 그러한 감소를 변화시키지 못하였다. 이는 bisphenol A가 RYR에 유의성 있는 영향을 주지 않기 때문이라고 판단된다. Heparin은 세포에 apoptotic 및 anti-proliferative 효과를 지니고 있다고 보고되어져 있다(Li *et al.*, 2001; Kati *et al.*, 2003). 또한 heparin과 xestospongine C는  $Ca^{2+}$  transients를 억제한다고 밝혀져 있다(White *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Gafni *et al.*, 1997). 본 연구에서 heparin(200 unit/ml)과 xestospongine C(5  $\mu$ M)는 PC12 세포에서 100  $\mu$ M bisphenol A의 존재와 무관하게 그 자체적으로는  $[Ca^{2+}]_i$ 에 영향을 주지 못하였으며, 100  $\mu$ M bisphenol A는 heparin 200 units/ml로 유도된 PC12 세포 및 대뇌피질 신경세포의 생존율 감소에 미미한 저해효과를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때, bisphenol A에 의한 신경독성 및 세포 내 칼슘 고갈의 작용기작이 ER의 칼슘 조절 수용체를 통한 칼슘 조절 기작과 큰 관련이 없는 것으로 추측되어 졌다.

본 연구에서 주목할 만한 결과로서 bisphenol A는 thapsigargin(calcium-ATPase inhibitor, 100 nM)에 노출된 PC12 세포와 대뇌피질 신경세포의  $[Ca^{2+}]_i$  상승과 독성을 더욱 증가시켰다. 이러한 결과는 bisphenol A가 thapsigargin의 calcium-ATPase를 통한  $Ca^{2+}$  uptake 억제 효과 혹은 ER에서의  $Ca^{2+}$  유리효과를 강화시켜 주었기 때문이라고 추정되며 이것은 thapsigargin에 의한 neuroblastoma 세포의 ER 스트레스가 독성을 일으키는 ERK를 활성화시킨다는 보고(Arai *et al.*, 2004)와 일치하였다. 아울러 이러한 결과는 bisphenol A 단독으로도 calcium-ATPase 및  $Ca^{2+}$  유리와 관련한 homeostasis의 방해를 통한 ER스트레스의 유발 가능성을 시사한다. 또한 이 결과는 bisphenol A가 야기하는 신경계 세포의  $[Ca^{2+}]_i$  고갈이 bisphenol A와 fura-2간의 반응에 의한 것이 아님을 간접 증명해 준다.

한편, 100  $\mu$ M bisphenol A는 PC12 세포에서 trifluoperazine(calmoduline antagonist, 30  $\mu$ M)이 유도하는  $[Ca^{2+}]_i$ 의 약한 증가를 떨어뜨렸고, 이는 bisphenol A가 calmoduline antagonist에 길항하여 calmodulin/ $Ca^{2+}$  결합을 증가시킬 것으로 추정된다. 그런데 trifluoperazine이 약한 세포 내부 칼슘 증가를 나타내었음에도 불구하고 그에 의한 PC12 세포 및 대뇌피질 신경세포의 세포사율은 상당히 높았으나 bisphenol A는 그 독성에 특이적인 영향을 끼치지 못했다. 이는 camodulin 저해제에 의한



mitochondrial F1 ATPase의 oligomycin-sensitive sub-unit 억제효과 및 trifluoperazine의 세포막과 지질에 대한 직접적인 용해 및 박리 작용과 같은 calmodulin과 칼슘의 상호작용이 아닌 기타의 효과들(Geary *et al.*, 1986; Ruben and Rasmussen, 1981; Malheiros *et al.*, 2000a, b)과 관련이 있기 때문인 것으로 사료되어진다. Bisphenol A의 에스트로겐 유사성과 신경계 세포의 내부 칼슘 농도와의 상관성 조사 연구에서 에스트로겐 억제제 (ICI 182,780, tamoxifen 30~300 nM)는 100  $\mu$ M bisphenol A로 야기된 세포 내 칼슘 농도의 감소를 미약하게 억제하였고, 이는 bisphenol A에 의한 ER $\beta$  활성화와 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>이 부분적 혹은 약한 관련성을 갖고 있는 것으로 추정되어진다. 아울러 bisphenol A가 유도하는 PC12 세포 및 대뇌피질 신경세포의 생존율 감소에 대해 에스트로겐 억제제는 유의적 억제효과를 보이지 못한 반면에 PD 98059는 효과적인 보호작용을 나타내었다(data not shown). 따라서, ERK의 활성이 calmodulin/calcium 의존적이라는 보고(Egea *et al.*, 1999; Murasawa *et al.*, 1998)는 bisphenol A가 유발시키는 신경독성에 ERK signal을 통과하는 calmodulin/calcium 변화와 관련성이 높을 것으로 판단되어진다.

### 감사의 말씀

이 연구는 식품의약품안전청 내분비장애물질 관리 사업 연구비(2002 및 2003) 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

### 참고문헌

- Amelink, G.J., Van der Kallen, C.J., Wokke, J.H. and Bar, P.R. (1990): Dantrolene sodium diminishes exercise-induced muscle damage in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **179**, 187-192.
- Arai, K., Lee, S.R., van Leyen, K., Kurose, H. and Lo, E. H. (2004): Involvement of ERK MAP kinase in endoplasmic reticulum stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.*, **89**, 232-239.
- Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Villalobos, M., Pedraza, V. and Olea, N. (1995): Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 608-612.
- Chaban, V.V., Mayer, E.A., Ennes, H.S. and Micevych, P.E. (2003): Estradiol inhibits atp-induced intracellular calcium concentration increase in dorsal root ganglia neurons. *Neuroscience*, **118**, 941-8.
- Choi, D.W. (1987): Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.*, **7**, 369-379.
- Egea, J., Espinet, C. and Comella, J.X. (1999): Calcium influx activates extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway through a calmodulin-sensitive mechanism in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 75-85.
- Frandsen, A. and Schousboe, A. (1991): Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.*, **56**, 1077-1078.
- Frandsen, A. and Schousboe, A. (1993): Excitatory amino acid-mediated cytotoxicity and calcium homeostasis in cultured neurons. *J. Neurochem.*, **60**, 1202-1211.
- Finkbeiner, S. and Stevens, C.F. (1988): Applications of quantitative measurements for assessing glutamate neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4071-4074.
- Gafni, J., Munsch, J.A., Lam, T.H., Catlin, M.C., Costa, L.G., Molinski, T.F. and Pessah, I.N. (1997): Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron*, **19**, 723-733.
- Geary, T.G., Divo, A.A. and Jensen, J.B. (1986): Effect of calmodulin inhibitors on viability and mitochondrial potential of *Plasmodium falciparum* in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **30**, 785-788.
- Guillette, L.J. Jr., Gross, T.S., Gross, D.A., Rooney, A.A. and Percival, H. F. (1995): Gonadal steroidogenesis *in vitro* from juvenile alligators obtained from contaminated or control lakes. *Environ Health Perspect.*, **103**, 31-36.
- Hashimoto, Y. and Nakamura, M. (2000): Estrogenic activity of dental materials and bisphenol-A related chemicals *in vitro*. *Dent. Mater. J.*, **19**, 245-262.
- Katchman, A.N. and Hershkowitz, N. (1993): Early anoxia-induced vesicular glutamate release results from mobilization of calcium from intracellular stores. *J. Neurophysiol.*, **70**, 1-7.
- Karti, S.S., Ovali, E., Ozgur, O., Yilmaz, M., Sonmez, M., Ratip, S. and Ozdemir, F. (2003): Induction of apoptosis and inhibition of growth of human hepatoma HepG2 cells by heparin. *Hepatogastroenterology*, **50**, 1864-1866.
- Katchman, A.N. and Hershkowitz, N. (1993): Early anoxia-induced vesicular glutamate release results from mobilization of calcium from intracellular stores. *J. Neurophysiol.*, **70**, 1-7.
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.P., Tokes, L. and Feldman, D. (1993): Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, **132**, 2279-2286.
- Krizaj, D., Bao, J.X., Schmitz, Y., Witkovsky, P. and Copenhagen, D.R. (1999): Caffeine-sensitive calcium stores regulate synaptic transmission from retinal rod photoreceptors. *J. Neurosci.*, **19**, 7249-7261.
- Lee, K.W., Webb, S.E. and Miller, A.L. (2003): Ca<sup>2+</sup> released via IP3 receptors is required for furrow deepening during cytokinesis in zebrafish embryos. *Int. J. Dev. Biol.*, **47**, 411-421.
- Li, H.L., Ye, K.H., Zhang, H.W., Luo, Y.R., Ren, X.D., Xiong, A.H. and Situ, R. (2001): Effect of heparin on apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells. *Cell Res.*, **11**, 311-315.
- Malheiros, S.V., Brito, M.A., Brites, D. and Meirelles, N.C. (2000a): Membrane effects of trifluoperazine, dibucaine and praziquantel on human erythrocytes. *Chem. Biol.*

- Interact.*, **126**, 79-95.
- Malheiros, S.V., Meirelles, N.C. and de Paula, E. (2000b): Pathways involved in trifluoperazine-, dibucaine- and praziquantel-induced hemolysis. *Biophys. Chem.*, **17**, 89-100.
- Murasawa, S., Mori, Y., Nozawa, Y., Masaki, H., Maruyama, K., Tsutsumi, Y., Moriguchi, Y., Shibasaki, Y., Tanaka, Y., Iwasaka, T., Inada, M. and Matsubara, H. (1998): Role of calcium-sensitive tyrosine kinase Pyk2/CAKbeta/RAFTK in angiotensin II induced Ras/ERK signaling. *Hypertension*, **32**, 668-675.
- Olea, N., Pazos, P. and Exposito, J. (1998): Inadvertent exposure to xenoestrogens. *Eur. J. Cancer Prev.*, **7** Suppl 1, S17-23.
- Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pendraza, V., Soto, A.M. and Sonnenschein, C. (1996): Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect*, **104**, 298-305.
- Paris, F., Balaguer, P., Terouanne, B., Servant, N., Lacoste, C., Cravedi, J.P., Nicolas, J.C. and Sultan, C. (2002): Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol. Cell Endocrinol.*, **193**, 43-49.
- Ramoska, E.A., Spiller, H.A. and Myers, A. (1990): Calcium channel blocker toxicity. *Ann. Emerg. Med.*, **19**, 649-653.
- Roy, D., Palangat, M., Chen, C.W., Thomas, R.D., Colerangle, J., Atkinson, A. and Yan, Z.J. (1997): Biochemical and molecular changes at the cellular level in response to exposure to environmental estrogen-like chemicals. *J. Toxicol. Environ Health*, **50**, 1-29.
- Ruben, L. and Rasmussen, H. (1981): Phenothiazines and related compounds disrupt mitochondrial energy production by a calmodulin-independent reaction. *Biochim. Biophys. Acta.*, **637**, 415-422.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandes, M.F., Olea, N. and Serrano, F.O. (1995): The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect*, **103**, 113-122.
- White, C. and McGeown, J.G. (2003): Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors modulate Ca<sup>2+</sup> sparks and Ca<sup>2+</sup> store content in vas deferens myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **285**, C195-204.
- Yamagishi, F., Komoda, T., Ohnishi, K. and Itoh, S. (1993): Protective effect of dantrolene sodium on carbon tetrachloride induced liver injury in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **82**, 237-240.
- Zhang, L., Andou, Y., Masuda, S., Mitani, A. and Kataoka, K. (1993): Dantrolene protects against ischemic, delayed neuronal death in gerbil brain. *Neurosci. Lett.*, **158**, 105-108.