

임신중인 생쥐에 Bisphenol A 투여가 모체의 생식독성과 태아의 성비에 미치는 영향

박동현 · 장현용 · 김정익 · 정희태 · 박춘근 · 양부근
강원대학교 동물자원과학대학

Effect of Bisphenol A Administration on Reproductive Toxicant of Dam and Sex Ratio of Pups in Pregnant Mice

Dong-Heon Park, Hyun-Yong Jang, Choung-Ik Kim, Hee-Tae Cheong,
Choon-Keun Park and Boo-Keun Yang

College of Animal Resource Science, Kangwon National University

Received December 20, 2004; Accepted May 27, 2005

ABSTRACT. Bisphenol A (BPA), an environmental endocrine disruptor, is considered to bind to estrogen receptors and to regulate the expressions of estrogen responsive genes. This study was to evaluate the effect of BPA administration on body weight, sex ratio and litter size on 18 days in prenatal periods, the effect of reproductive organ weight and blood hematological values on 24 days postpartum in pregnant mice. The female mice were administered to low doses of BPA (0, 0.05, 0.5 and 5.0 mg/kg B.W.) by intraperitoneal injection in gestation days 0~15 with 5 times at 3 days interval. The maternal body weight, litter size and sex ratios were similar to in all experimental groups, but body weights of male and female offspring were significantly lower in 5.0 mg BPA group when compared to any other groups ($P < 0.05$). No treatment-related effects on body weight, ovary weight and blood hematological values were observed in dams on 24 days after delivery. The uterine weight in 5.0 mg BPA group was slightly higher than those of any other groups, but not significantly difference. The histological evaluation of ovary in dam mice on 24 days after delivery was not difference in all experimental groups, but the endometriosis of uterus in dam mice were significantly increased in 0.5 mg BPA group when compared to control group. These results indicate that low concentration of BPA should not be considered as a selective reproductive toxicant.

Keywords: BPA, Reproductive organ weight, Pregnant mice, Sex ratio, Blood hematological value.

서 론

내분비계 장애물질이란 환경에 노출된 화학물질이나 환경 내에 존재하는 물질이 체내에 유입되어 내분비계의 정상적인 기능을 방해하는 물질로서, 한국에서는 세계야생보호기금에서 선정한 67종을 내분비계 장애물질로 지정하고 penta-nonylphenols, bisphenol A(BPA), di(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP) 및 dibutylphthalate(DBP)

등 4종은 관찰물질로 지정하여 사용과 수입을 규제하기 시작했지만 현재도 많은 양이 사용되고 있다.

석유를 기본으로 하는 화학물질인 1분자의 acetone과 2분자의 phenol을 혼합해서 만든 BPA는 polycarbonate plastics의 합성시 단량체로서 이용되며, epoxy 수지의 기본원료로 사용되는 화학물질로서 생물체내에 유입되면 estrogen 수용체와 결합하여 estrogen과 같은 유사작용을 한다고 보고되고 있다(Cagen *et al.*, 1999; Lazear, 1995; Staples *et al.*, 1998).

BPA의 생물체내에 유입은 정상적인 호르몬의 기능을 방해하여 여성의 경우는 생식기의 무게감소, 정액생산의 감소 및 기형울증가 등이 보고되고 있으며(Sharpe *et al.*,

Correspondence to: Boo-Keun Yang, College of Animal Resource Science, Kangwon National University, Korea
E-mail: bkyang@kangwon.ac.kr

1996; Stoker *et al.*, 1999; vom Saal *et al.*, 1998), 자성의 경우는 자궁무게의 증가, 질각화의 유도 및 prolactin의 방출을 조절하는 뇌하수체 세포의 분비를 증가시켜 유방암과 불임에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있지만 (Buchanan *et al.*, 1999; Hunter *et al.*, 1999; Steinmetz *et al.*, 1998), 보고자들마다 상이한 결과를 보고하고 있으며, 이들 대부분의 보고들은 인간이 실생활에서 노출될 수 있는 BPA의 노출범위보다 매우 높은 농도에서 수행된 연구들이다. 따라서 각국마다 BPA의 안전노출 한계치를 규정하고 있는데 미국 환경청의 경우 1일 섭취 허용량을 체중 kg당 0.05 mg BPA로 규정하고 있으며, 수질계로의 방출농도를 0.1 ppm 이하로 제한하고 있다(Dorn *et al.*, 1987). 유럽공동체의 경우는 식품이나 식품생산물 중의 BPA의 농도를 3 mg/kg으로 제한하고 있으며, 한국과 일본의 경우도 식품용기에서 BPA의 용출기준을 2.5 ppm으로 제한하고 있다(Gandara *et al.*, 1992).

본 연구는 임신중인 자성 생쥐에 저 농도의 BPA의 투여가 분만 후 번식기관과 혈액성분에 미치는 영향을 검토하고, 태아의 체중, 태아수 및 성비에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 11~12주령된 ICR 생쥐를 이용하였으며, 사육조건은 온도 20~25°C, 습도 60~70% 및 12시간의 명암주기로 사육하였고 사료는 마우스용 배합사료를 식수와 함께 자유급식 시켰다.

BPA의 제조 및 투여방법

BPA(Aldrich)의 제조는 100%의 ethanol에 녹인 다음 corn oil(Sigma)을 첨가하여 각각 1:9의 비율로 희석하여 제조하였다. BPA의 투여는 자성 생쥐에 체중 kg당 0, 0.05, 0.5 및 5.0 mg BPA의 용량으로 1회 투여하고 투여 당일 날 웅성 생쥐와 교배시켰으며 교배 후 다음날 질전이 확인된 개체를 임신한 것으로 판정하고 2일후부터 3일 간격으로 5회 복강주사하였다. 공시동물은 임신18일째 태아실험을 위한 부검군은 각 처리구당 10마리씩 총 40마리, 출산 후 22일째 부검군은 각 처리구당 12마리씩 총 48마리를 완전임의배치법에 의해 배치하였다.

태아성비검사

웅성 ICR 생쥐와 교미시킨 다음날 질전이 확인된 개체를 임신 0일로 하며 임신 18일에 자성 생쥐를 경추탈골시킨 다음, 복부부위를 절개하고 자궁을 적출한 후 filter

paper에서 태아를 꺼내어 양수를 제거하고 태아의 숫자, 체중 및 성비를 검사하였다.

분만한 어미의 검사

분만한 어미는 분만일을 출산 0일로 하며 출산 22일에 새끼를 이유시켰으며, 이유 2일 후에 체중, 번식기관무게, 혈액채취 및 조직검사를 실시하였다. 자성 생쥐의 번식기관무게 측정은 생쥐를 경추탈골 시킨 다음, 자궁 및 난소를 적출하여 filter paper에서 지방조직을 제거하고 무게를 측정하였다.

번식기관의 조직검사

임신중인 생쥐에 BPA를 투여한 후 분만 후 어미의 자궁과 난소의 조직검사는 Hematoxylin-Eosin 염색방법으로 실시하였다. 적출한 좌,우측 자궁과 난소를 Bouin 용액(Sigma)에 24시간 동안 고정시킨 후 automatic tissue processor(Hypercenter, Shandon)를 이용하여 탈수, 투명, paraffin 침투과정을 거친 다음, 포매, 삭정, 박절, 염색 및 봉입하였다. 염색과정은 탈 paraffin과 함수과정을 거친 조직을 세척하고 3분간 hematoxylin 염색액으로 염색한 후 과 염색된 부분은 흐르는 수돗물로 세척하고 3분간 eosin으로 염색을 실시한 후 탈수와 투명과정을 거쳐 slide 표본을 준비하였다.

혈구분석

혈액의 채취는 안와정맥총으로부터 microcapillary tube (Chase)를 이용하여 채혈한 후 혈구측정에 이용하였다. 혈구성분분석은 혈구자동분석기(Cobas Minos, Roch, France)를 이용하여 혈구화학치를 측정하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS Package를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 최소 유의차검정(Least Significant Difference test; LSD test)을 실시하여 통계처리를 실시하였다.

결 과

임신한 어미의 체중, 태아의 체중, 태아수 및 성비에 미치는 영향

임신한 자성 생쥐에 BPA를 체중 kg당 0, 0.05, 0.5 및 5.0 mg BPA를 투여한 구에서 실험개시 체중과 임신 18일째인 실험종료시의 체중은 투여구간에 커다란 차이가 없었다(Table 1).

임신 18일째 태아체중을 조사한 결과, 웅성태아의 체중

Table 1. Maternal and fetal body weight, litter size and sex ratio of pups on day 18 after bisphenol A administration in pregnant mice

BPA (mg/kg B.W)	Maternal body weight (g)		Fetal body weight (g)		Litter size (n)	Fetal sex ratio (%)	
	Initial	Final	Male	Female		Male	Female
0	28.12 ± 3.33	50.20 ± 6.71	1.39 ^a ± 0.11	1.32 ^a ± 0.12	9.4 ± 1.8	55.9	44.1
0.05	28.10 ± 3.48	52.22 ± 6.51	1.41 ^a ± 0.12	1.35 ^a ± 0.11	10.2 ± 3.3	59.9	40.1
0.5	28.52 ± 3.51	53.40 ± 7.88	1.39 ^a ± 0.10	1.35 ^a ± 0.09	12.4 ± 2.7	55.8	44.2
5.0	28.48 ± 1.16	53.94 ± 2.75	1.19 ^b ± 0.20	1.16 ^b ± 0.20	11.6 ± 2.4	60.4	39.6

^{a,b}Values with different superscripts within same rows are significantly differ, P<0.05.

Table 2. Effects of bisphenol A administration on the body weight and reproductive organ weight on day 24 postpartum in dam mice

Bisphenol A (mg/kg B.W)	Body weight (g)		Uterus (g)	Ovary (g)	
	Initial	Final		Right	Left
0	29.59 ± 3.83	34.17 ± 4.79	0.185 ± 0.024	0.0085 ± 0.0024	0.0068 ± 0.0031
0.05	30.39 ± 3.39	34.35 ± 2.76	0.156 ± 0.029	0.0074 ± 0.0009	0.0065 ± 0.0010
0.5	30.73 ± 3.12	36.79 ± 4.56	0.194 ± 0.062	0.0084 ± 0.0034	0.0066 ± 0.0026
5.0	29.52 ± 1.71	34.82 ± 3.74	0.208 ± 0.045	0.0078 ± 0.0021	0.0070 ± 0.0022

은 5.0 mg 투여구가 1.19 g으로 여태구(대조구, 1.39; 0.05 mg 투여구, 1.41 및 0.5 mg 투여구, 1.39 g)보다 통계적으로 유의하게 낮은 체중을 나타냈으며, 자성태아의 체중은 각각 1.32, 1.35, 1.35 및 1.16 g으로 5.0 mg 투여구가 여태구보다 통계적으로 유의하게 낮은 체중을 나타냈다(Table 1).

한 마리의 어미에서 태어난 평균 태아수는 각각 9.4, 10.2, 12.4 및 11.6마리로서 BPA 투여구가 대조구보다 다소 많은 태아수를 나타냈지만 통계적 유의성은 인정되지 않았다. 태아의 성비는 웅성이 각각 55.9%, 59.9%, 55.8% 및 60.4% 였으며, 자성의 성비는 각각 44.1%, 40.1%, 44.2% 및 39.6%로서 5.0 mg 투여구가 다소 높은 웅성비율을 나타냈지만 통계적 유의성은 인정되지 않았다(Table 1).

분만한 어미의 번식기관무게와 자궁과 난소 조직에 미치는 영향

실험개시 체중과 실험종료시의 체중은 투여구간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 자궁의 무게는 5.0 mg 투여구가 0.208 g으로서 여태구(대조구, 0.185; 0.05 mg 투여구, 0.156 및 0.5 mg 투여구, 0.194 g)보다 다소 높은 무게를 나타냈지만 통계적 유의성은 인정되지 않았으며, 좌·우측 난소의 무게도 투여구간에 커다란 차이는 없었다(Table 2).

Fig. 1와 2는 임신중에 BPA의 투여가 분만한 후 어미의 난소와 자궁의 조직에 미치는 영향을 조사한 결과로서, 난소에서 과립막과 난포외막층의 난포발육상태와 황체등을 조사한 결과, 투여구간에 커다란 차이는 없었다(Fig. 1).

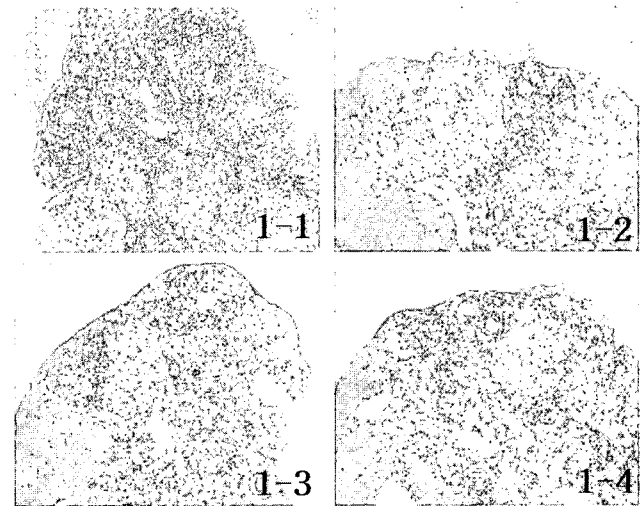


Fig. 1. Light micrograph of ovary according to the BPA administration in pregnant mice. H&E stain (×100). 1-1. Control as corn oil administration. 1-2. 0.05 mg/kg B.W BPA administration. 1-3. 0.5 mg/kg B.W BPA administration. 1-4. 5.0 mg/kg B.W BPA administration.

자궁은 자궁내막의 변화, 자궁근층의 두께와 세포크기 및 염증상태등을 조사한 결과, 0.05 mg 투여구는 대조구에 비해 자궁내막층이 다소 증식된 반면, 0.5 mg 투여구는 자궁내막층을 가장 많이 증식시켰으며, 5.0 mg 투여구에서는 자궁근층의 결손이 나타났다(Fig. 2).

분만한 어미의 혈구화학치에 미치는 영향

BPA의 투여가 혈구화학치에 미치는 효과를 검사한 결과, WBC는 각각 9.40, 8.39, 8.78 및 7.71 × 10³/mm³로

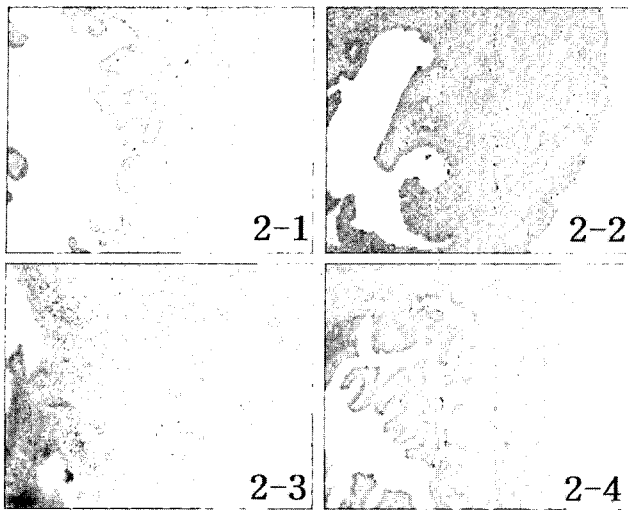


Fig. 2. Light micrograph of uterus according to the BPA administration in pregnant mice. H&E stain ($\times 100$). 2-1. Control as corn oil administration. 2-2. 0.05 mg/kg B.W BPA administration. 2-3. 0.5 mg/kg B.W BPA administration. 2-4. 5.0 mg/kg B.W BPA administration.

서 5.0 mg 투여구가 대조구보다 다소 낮은 수치를 나타냈지만 커다란 차이는 없었으며, PLT는 0.5 mg 투여구와 5.0 mg 투여구가 각각 921.7 및 $891.8 \times 10^3/\text{mm}^3$ 로서 여타구(대조구, 860.6 및 0.05 mg 투여구, $874.4 \times 10^3/\text{mm}^3$)보다 높은 수치를 나타냈지만 통계적 유의차는 인정되지 않았다. RBC, HB, HT, MCV, MCH, MCHC는 투여구간에 커다란 차이가 없었다(Table 3).

고찰 및 결론

본 실험에서는 임신한 자성 생쥐에 BPA를 투여한 후 임신 18일째에 임신한 어미의 체중, 태아의 체중, 태아수 및 태아성비를 조사한 결과, 실험개시시와 실험종료시 임신한 어미의 체중은 투여구간에 차이가 없었지만 웅성과

자성 태아의 체중은 5.0 mg 투여구가 여타구에 비해 통계적으로 유의하게 낮은 체중을 나타냈다($P < 0.05$).

한 자성에서 태어난 평균 태아수와 태아의 자·웅성 성비는 투여구간에 커다란 차이가 없었다. 또한, 임신기에 BPA의 투여가 분만한 후 어미의 번식기관무게에 미치는 영향을 조사한 결과, 실험개시시 체중, 실험종료시 체중 및 난소의 무게는 투여구간에 차이가 없었으며, 자궁의 무게는 5.0 mg 투여구가 여타구에 비해 다소 높게 나타났지만 통계적 유의성은 없었다. 이러한 결과는 임신한 CF1 생쥐에 임신 11~17일까지 체중 kg당 2 ug 및 20 ug BPA를 경구 투여한 결과, 분만한 태아의 숫자 및 태아 성비에는 차이가 없었으며, 분만한 후 25일 후에 어미의 체중도 투여구간에 차이가 없었다고 보고한 Ashby *et al.* (1999)과 임신한 CF1 생쥐에 임신 11~17일간 체중 kg당 0.2~200 ug BPA를 경구 투여한 결과, 분만한 태아수, 태아의 성비 및 새끼의 생존율에는 차이가 없었으며, 분만한 후 어미의 체중, 사료소비 및 식수소비도 차이가 없었다고 보고한 Cagen *et al.*(1999)의 결과와 일치하는 경향을 보였다.

반면, Hardin *et al.*(1981)은 임신한 자성 rats에 체중 kg당 80 및 125 mg BPA를 임신기 1~15일 동안 복강주사로 투여시 태아사망의 수가 증가하였고 태아체중이 감소하였으며 125 mg BPA 투여군에서는 항문폐쇄 태아와 골화 지연도 증가하였다고 보고한 결과와는 상반된 결과를 보였는데 이는 본 실험의 경우 저농도의 BPA를 투여한 결과와 동물종간의 차이에 기인된 것으로 생각된다.

본 실험에서 임신기에 BPA의 투여가 분만한 후 어미의 혈구화학치에 미치는 영향을 조사한 결과, 혈구성분은 각 투여구간에 커다란 차이가 없었다. 한편 난소와 자궁의 조직에 미치는 영향을 조사한 결과에서 난소는 각 투여구간에 커다란 차이가 없었지만, 자궁에서는 대조구에 비해 0.05 mg 투여구는 자궁내막층을 다소 증식된 반면, 0.5 mg 투여구는 자궁내막층이 가장 많이 증식되었으며, 5.0

Table 3. Effects of bisphenol A administration on the blood hematological values on day 24 postpartum in dam mice

Parameter	BPA (mg/kg B.W)			
	0	0.05	0.5	5.0
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	9.40 ± 1.10	8.39 ± 1.63	8.78 ± 2.21	7.71 ± 1.69
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	10.05 ± 1.11	9.97 ± 0.98	10.51 ± 1.15	10.05 ± 0.91
HB (g/dl)	16.42 ± 1.41	16.64 ± 1.56	16.87 ± 1.39	16.68 ± 1.15
HT (%)	45.31 ± 2.65	46.80 ± 2.80	46.01 ± 1.84	46.33 ± 2.88
MCV (μm^3)	45.71 ± 2.81	47.69 ± 1.99	45.77 ± 3.12	47.16 ± 1.63
MCH (pg)	16.33 ± 1.25	16.70 ± 1.42	16.34 ± 1.71	16.62 ± 0.94
MCHC (g/dl)	35.87 ± 1.26	35.78 ± 2.02	35.79 ± 1.56	35.29 ± 1.87
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	860.6 ± 80.28	74.4 ± 109.9	921.7 ± 114.5	891.8 ± 154.6

WBC : White blood cell, RBC : Red blood cell, HB : Hemoglobin, HT : Hematocrit, MCV : Mean corpuscular volume, MCH : Mean corpuscular hemoglobin, MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration, PLT : Platelets.

mg 투여구에서는 자궁근층의 결손현상이 나타났다.

본 실험의 결과를 보면 태아의 체중에는 다소 영향을 미쳤으나 어미의 체중과 난소 및 자궁 조직에는 커다란 영향을 미치지 않았다. 또한 어미의 혈구성분에서도 커다란 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 요약해보면 임신기에 저 농도의 BPA 투여는 생쥐의 번식기능과 혈액성분에 유해한 영향을 미치는 독성물질로서 작용하지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ashby, B., Tinwell, H. and Haseman, J. (1999): Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. *Regula. Toxicol. Pharma.*, **30**, 156-166.
- Buchanan, D.L., Setiawan, T., Lubahn, D.B., Taylor, J.A., Kurita, T., Cunha, G.R. and Cooke, P.S. (1999): Tissue compartment-specific estrogen receptor- α participation in the mouse uterine epithelial secretory response. *Endocrinology*, **140**, 484-491.
- Cagen, S.Z., Waechoter, J.M., Dimond, S.S., Breslin, W.J., Butala, J.H., Jekat, F.W., Joiner, R.L., Shiotsuka, R.N., Veenstra, G.E. and Harris, L.R. (1999): Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Regula. Toxicol. Pharmacol.*, **30**, 130-139.
- Dorn, P.B., Chou, C.S. and Gentempo, J.J. (1987): Degradation of bisphenol A in the natural waters. *Chemosphere*, **16**, 1501-1507.
- Gandara, J.S., Losada, P.P. Mahia, P.L. Lozano, J.S. and Abuin, S.P. (1992): RP-HPLC-TSP-MS of epoxy resins bisphenol A diglycidylether type. *J. Chromatograp. Sci.*, **30**, 11-16.
- Hardin, B.D., Bond, G.P. Sikov, M.R. Andrew, F.D. Beliles, R.P. and Niemeier, R. (1981): Testiny of selected workplace chemicals for teratogenic potential. *Scand. J. Work. Environ. Health*, **7**, 66-75.
- Hunter, D.S., Hodges, L.C. Vonier, P.M. Fuchs-Young, R., Gottardis, M.M. and Walker, C.L. (1999): Estrogen receptor activation via activation function 2 predicts agonism of xenoestrogen in normal and neoplastic cells of the uterine myometrium. *Cancer Res.*, **59**, 3090-3099.
- Lazear, N.R. (1995): Polycarbonate : high-performance resin. *Advmaterial and Processes*. **147**, 43-45.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafson, J.A. (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, **138**, 863-870.
- Muldoon, T.G. (1981): Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature and functionality in normal mouse mammary tissue. *Endocrinology*, **109**, 1339-1346.
- Routledge, E.J., White, R., Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (2000): Differential effects of xenoestrogen on coactivator recruitment by ER α and ER. *J. Biol. Chem.*, **29**.
- Sharpe, R.M., Majdic, G., Fisher, J., Parte, P., Millar, M.R. and Saunders, P.T.K. (1996): Effects on testicular development and function. *Int. Con. Endocrinol.*, pp. 23-24.
- Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T. and Harris, L.R. (1998): A review of the environmental fate : effects and exposures of biapnenol A. *Chemosphere*, **36**, 2149-2173.
- Steinmetz, R., Mitchner, N.A. Grant, A., Allen, D.L., Bigsby, R.M. and Ben-Jonathan, N. (1998): The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation and c-fos gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinology*, **139**, 2741-2747.
- Stoker, T.E., Robinette, C.L., Britt, B.H., Law, S.C. and Cooper, R.L. (1999): Prepubertal exposure to compounds that increase prolactin secretion in the male rat : effect on the adult prostate. *Biol. Reprod.*, **61**, 1636-1643.
- vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, Palanza, D.P., Thayer, U.A., Nagal, S.C., Parmigiani, S. and Welshons, W. (1998): A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production and behavior. *Toxicol. Ind. Health*, **14**, 239-260.