

Detailed Analysis on the Toxic Effect of Bisphenol A to the Liver and Testis in the Rat

Ju-Yun Choi and Min Yoo[†]

Department of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

Environmental endocrine disruptors are very toxic to the animals including humans. They are hormone-like acting chemicals which can be found in our normal daily life. We have examined the toxic effect of bisphenol A and if lactic acid bacteria could suppress this toxic effect. Thirty rats were divided into three groups (control, bisphenol A treated, bisphenol A and lactic acid bacteria treated). Treatments were carried out at an interval of 12 hours for each group. Control group showed normal and clear morphology of tissues. Cells were fine in their shape and color, and density was high enough for the normal function. However, bisphenol A treated group was abnormally destructed in cell morphology. In the testis, sperms were totally destructed. When treated with lactic acid bacteria together, the toxic effect of bisphenol A was clearly decreased. This study indicated that bisphenol A was toxic in any concentration especially for the liver and testis, however, lactic acid bacteria could suppress the toxic effects of bisphenol A.

Key Words: Bisphenol A, Endocrine disruptor, Lactic acid bacteria, Liver, Testis

서 론

환경호르몬이라 불리는 내분비계장애물질 (endocrine disruptors)에 관한 관심이 사회적으로 고조되고 있다. 이러한 장애물질들은 내분비계의 정상적인 기능을 방해하는 화학물질로서 주로 일상생활에서 배출된 화학물질들이다. 이들은 체내에 유입되면 마치 천연호르몬처럼 작용하기 때문에 환경호르몬이라 불리기도 한다.

내분비계장애물질은 대부분 산업용 화학물질이며, 크기는 동물성 에스트로젠 기능약물과 식물성 에스트로젠으로 나뉜다. 그러나 그 기원과는 상관없이 이들 내분비계장애물질은 인간의 생식기능 저하, 성장장애, 암을 유발하는 물질로 추정되고 있어 전 세계적으로 생물 중에 위협이 될 수 있다는 경각심을 일으키고 있다 (Henderson et al., 1993; Gray et al., 1998). 더욱이 이들은 오존층 파괴와 지구 온난화 문제에도 영향을 미치기 때문에 세계 3대 환경문제 요인으로 등장하고 있다 (Carlsen et al., 1992).

수많은 화학물질 중 아직까지 명확하게 내분비계장애물질로 밝혀진 것은 극히 일부분이며, 대부분의 물질이 잠재적

위험성이 있는 것으로만 알려져 있다. 생체 내에서 합성되는 천연호르몬과 비교하여 내분비계장애물질의 특성은 쉽게 분해되지 않고 화학적으로 안정하며, 환경 및 생체 내에 잔존하여 심지어 수년간 그 영향이 지속되기도 하면서 지방조직에 농축되는 성질이 있다고 알려져 있다. 특히 사람을 포함한 동물 생태계에 대해 나타날 수 있는 내분비계장애물질의 대표적인 영향으로 호르몬 분비의 불균형, 생식능 저하 및 생식기관 기형, 성장저해, 암 유발, 면역기능 저해 등이 보고되어 있다 (Holzhausen et al., 1984; Ryu, 1999). 덴마크에서는 환경호르몬으로 인하여 과거 50년 동안 남자들의 정자 수가 반감되었다는 보고가 있었으며, 일본에서는 20대 남성 34명의 정액을 조사한 결과 정자의 농도와 운동성에서 WHO의 기준을 충족시킨 사람은 1명에 불과했다는 사실이 보고된 바 있다. 게다가 정자 수의 급격한 감소 (Irvine et al., 1996; Swan et al., 1997), 정소종양 (고환암)이나 요도열과 같은 기형의 증가를 유발시키며 (Czeizel, 1985), 여성의 유방암의 증가를 환경호르몬과 관련된 현상으로 보는 보고도 있다 (Wolff et al., 1993).

이밖에도 여성의 경우 유방 및 생식기관의 암, 자궁내막증 (endometritis), 유방의 섬유세포 질환, 골반염증성 질환 (pelvic inflammatory disease) 등이 환경호르몬의 영향이라고 보고되어 있고, 남성의 경우 정자 수 감소, 정액 감소, 정자운동성 감소, 기형정자 발생 증가, 생식기 기형, 정소 암, 전립선 질환, 기타 생식에 관련된 조직의 이상 등이 역시 보고되어 있다 (Veer et al., 1989; Vom et al., 1998).

*논문 접수: 2005년 9월 2일

수정재접수: 2005년 9월 12일

[†]교신저자: 유민, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000번지, 계명대학교 생물학과

Tel: 053-580-5537, Fax: 053-580-5537

e-mail: ymin@kmu.ac.kr

이와 같은 질병을 유발시키는 내분기계장애물질 중 비스페놀 A (bisphenol A)는 전 세계적으로 이용되고 있는 식품 용기소재로서, epoxy resin과 polycarbonate 플라스틱의 원료로 주로 사용되고 있다 (Benjonathan and Steinmetz, 1998). 이들 플라스틱류들은 음식용기와 음료포장재로 널리 사용되어지고 있는 물질이다. 또한 비스페놀 A는 치과치료제에도 포함되어 있는 것으로 보고되어 있다 (Brotons et al., 1995). 비스페놀 A는 영남지역의 낙동강 오염 주범으로도 인식되어 있는 물질이다. 그럼에도 불구하고 비스페놀 A는 아주 미세한 양으로 자연계에 존재하기 때문에 그 영향성을 아직 잘 모르고 있다.

본 연구는 내분비계장애물질 중 특히 비스페놀 A가 생물체에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위한 직접적 실험이다. 특히 흰쥐의 정소 및 간에 비스페놀 A가 어떠한 독소적 영향을 미치는지를 알아보기 위해 실시된 것이다. 물론 유사한 실험들이 과거에 있었지만 특정 조직에 대한 연구는 거의 이루어진 적이 없는 현실이기 때문이다 (Jun, 2001).

본 실험은 흰쥐에 대한 비스페놀 A의 독소적 영향 연구를 통해 사람이 환경호르몬에 노출됨으로써 예상되는 장기들의 이상에 대해 확인하고 예방하기 위한 기준과 방안을 마련하는데 기여할 것이다.

재료 및 방법

실험동물은 외견상 건강한 Sprague-Dawley계의 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 구입 후 1개월간 각종 시료를 투여하며 적정온도와 습도가 유지된 사육실에서 유지되었다. 대조군으로는 표준식이균 (일반사료투여군)을 사용하였고, 실험군은 비스페놀 A 투여군 및 비스페놀 A와 유산균을 동시에 투여한 그룹이었다. 유산균을 함께 투여한 이유는 유산균의 환경호르몬 저해능을 동시에 관찰하기 위함이었다. 실험용 유산균은 *Lactobacillus casei* YA-70으로 (주)비락의 시제품에서 채취하였다. 환경호르몬 비스페놀 A는 Sigma Co. (USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 비스페놀 A의 용해 특성상 ethyl alcohol에 녹여서 실험군 별로 다양한 농도로 투여하여 실험하였다. 일반미생물학적 실험은 표준 처리 방법을 따랐으며 기타 시약들은 시중에서 구입 가능한 최상의 품질을 사용하였다. 초자기구는 121°C에서 30분간 고압 증기 멸균하여 사용하였다.

비스페놀 A는 0.4 mg/ml의 농도로 녹인 후, 1일 2회, 12시간 간격으로 주사기를 이용하여 투여하였다. 유산균주는 음료로 만들어 매일 사료와 함께 먹도록 하였다. 비스페놀 A와는 달리 유산균 음료는 자유급식 방법을 사용하였다.

실험군 별로 몸무게와 크기 등 신체적 변화를 일차적으로 살펴보았다. 몸무게는 육안으로 관찰한 후 저울로 무게를 측

정하고, 크기는 육안 관찰 후 길이를 측정하였다. 눈동자의 색, 윤기 등은 전체적인 형태 변화를 관찰하였고, 행동학적 변화도 병행 관찰하였다. 이후 실험동물을 마취한 후 실험군 별로 나누어 해부하였다. 해부 후 각 장기의 색, 크기, 위치, 형태를 각각 육안으로 비교 관찰하였고, 사진촬영하여 보관하였다. 각 조직은 얇은 절편으로 박리한 뒤 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 세포의 상태를 현미경 관찰하였다.

결과 및 고찰

내분비계장애물질의 영향은 그 세대에서 다음 세대에 이르기까지 다양한 시기에 걸쳐 나타나기 때문에 단적으로 평가하기 어렵다는 것이 일반적 논리이다. 그럼에도 불구하고 우리는 실험에서 일상 환경에서 접촉할 수 있는 농도의 최소 5배에서 10배에 이르는 농도를 투여함으로써 그 결과를 빠른 시일 내에 관찰하고자 하였다. 흰쥐의 경우 사람과 유사한 물질대사 체계를 가지고 있기 때문에 성호르몬 (sex hormone) 교란으로 인한 내분비 계통 교란의 결과를 유추할 수 있다는 가정하에 실험을 실시하였다.

내분비계장애물질은 생체 내로 유입되면 마치 호르몬과 같이 작용한다 하여 환경호르몬으로도 불리고 있다. 여러 가지 야생생물에서 갑상선의 기능 이상, 임신능력의 저하, 생식행동 이상, 생식기의 기형, 탈 수컷 및 자웅동체화, 면역기능의 저하 등이 보고되어 있지만 아직까지 사람에서도 이러한 영향이 나타날 것인지는 불분명한 상태이다.

암을 일으키는 경우, 대표적인 경우가 여성 생식기에서의 선암종 (adenocarcinoma)이고, 유방암과 고환암 역시 의심되고 있다. 아직 환경호르몬의 대사과정은 명확하지 않지만 aromatase 같은 스테로이드 cytochrome P450 효소를 억제하여 성호르몬의 균형을 깨뜨린다는 보고가 한때 있었다.

한편으로 유산균의 항암 효능이 여러 방면에서 확인되고 있다. 유산균이 함유된 발효유를 많이 섭취할 때 유방암 발생이 억제되었고, 유제품, 섬유질을 많이 섭취하는 핀란드 사람에게서는 대장암 발생이 적은 것으로 보고되었다 (Veer et al., 1989).

우리는 실험용 흰쥐를 대상으로 비스페놀 A에 대한 유산균 억제 효과 시험을 함께 병행하였다. 비스페놀 A만 투여한 군에서는 몸무게가 현저하게 줄어들었으며, 외관상에서도 표준식이균과 구별될 만큼 털의 윤기도 없었고 또한 왜소하였다. 이러한 결과는 비스페놀 A의 농도에 상관없이 항상 동일한 결과로 나타났다. 마취한 뒤 해부를 하여 정소와 간의 조직을 관찰해 본 결과 표준식이균에서는 세포조직이 조밀한 반면 (Fig. 1A) 비스페놀 A를 처리한 간에서는 세포간 밀도가 매우 엉성한 모습을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1B). 특히 색깔에서 검은 색을 띄었으며 (Fig. 1C), 이는 간세포의 기능

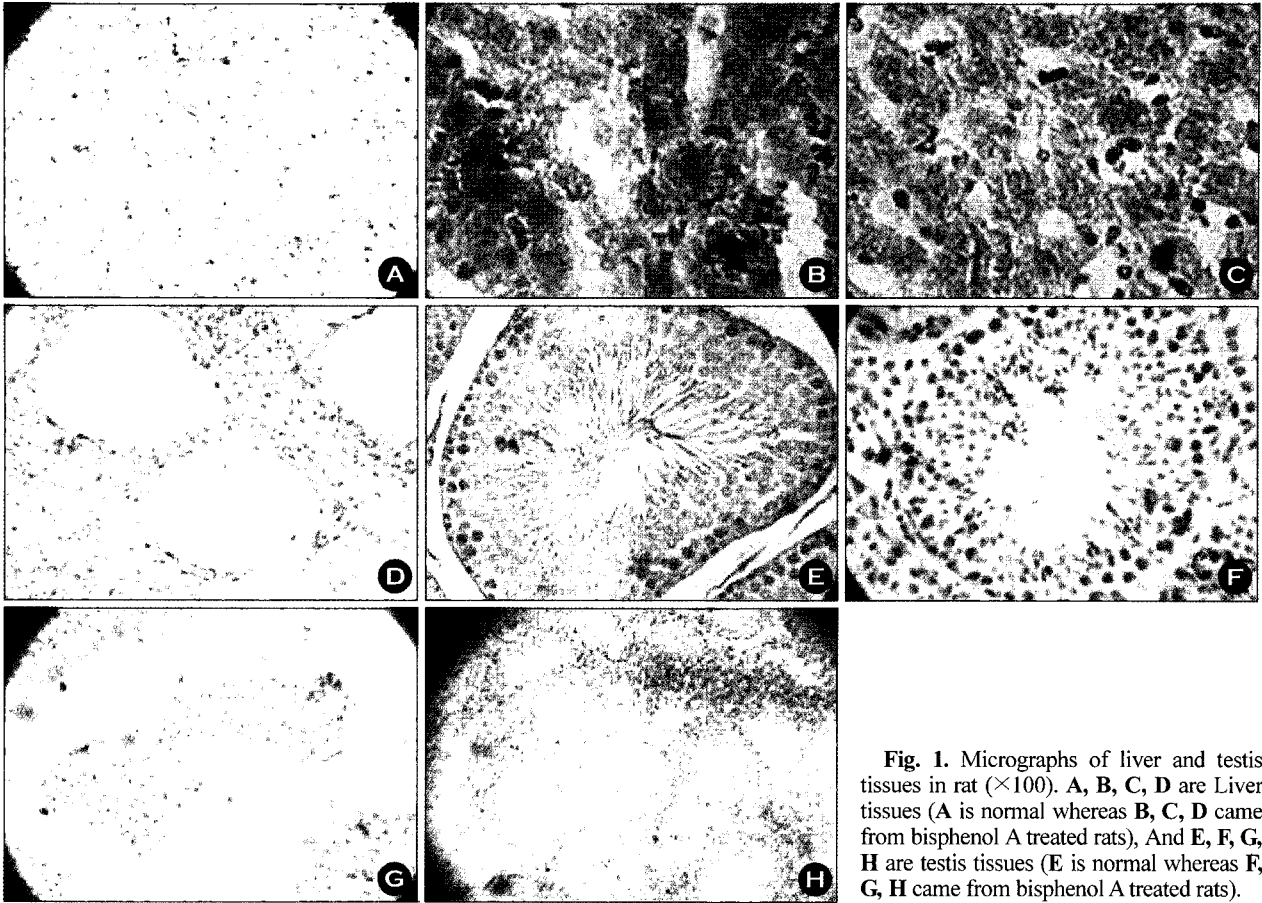


Fig. 1. Micrographs of liver and testis tissues in rat ($\times 100$). A, B, C, D are Liver tissues (A is normal whereas B, C, D came from bisphenol A treated rats), And E, F, G, H are testis tissues (E is normal whereas F, G, H came from bisphenol A treated rats).

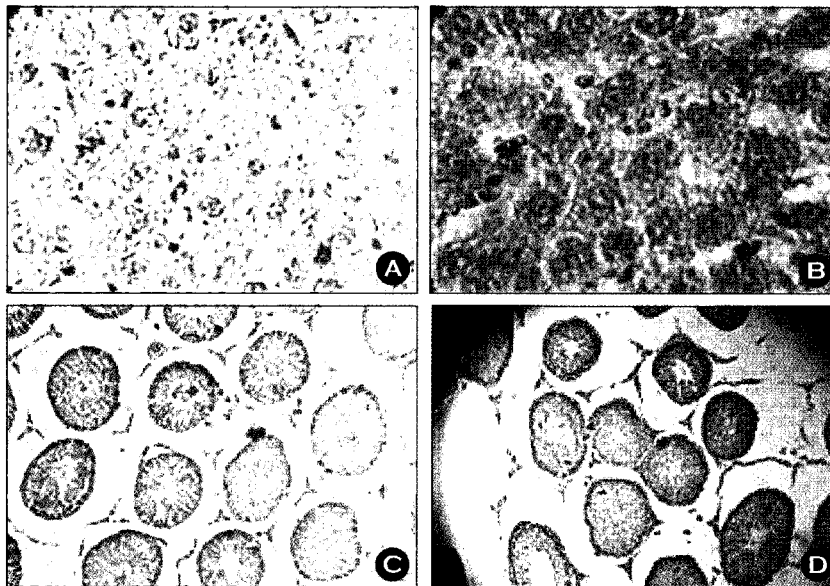


Fig. 2. A, B are liver tissues and C, D are testis tissues that came from bisphenol A plus *Lactobacillus casei* YA-70 treated rats.

이 현저하게 떨어졌음을 나타내는 지표로 사료되었다. 혈관의 분포 역시 상당히 위축되어 있어 혈액 공급에 문제가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1D). 농도에 상관없이 이러한 결과로 인해 흰쥐는 실험도중 상당수가 사망하였다. 사멸 직전 호흡곤란과 식용부진 증세가 나타났다. 3주 이상 살아남은 개체들의 증상도 비슷하였다. 따라서 사육을 계속할 지라도 이들의 생존시간 역시 길지는 않을 것으로 예측되었다.

정소 역시 비슷한 결과를 나타내었다. 정상군 (Fig. 1E)과 비교해 대부분의 경우 생성된 정자의 양이 엄청나게 줄어들어 있었으며 (Fig. 1F), 곡정세관이 파괴되어 실질적으로 정소로서의 기능을 잃어버린 것으로 파악되었다 (Fig. 1G). 곡정세관들이 상당히 위축되어 있었으며, 내부적으로 정자의 생성능력 역시 형태학적 관찰만을 통해서도 상당히 저해되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1H).

Lactobacillus casei YA-70를 병행 투여한 실험군에서는 생존률이 약간 상회하는 것으로 확인되었다. 또한 유산균을 동시 투여했을 경우에는 전체적인 장기 훼손의 정도를 볼 때 비교적 대조군처럼 세포 분포가 조밀하여 양호한 것으로 관찰되었다. 이러한 효과는 정소와 간 모두에서 동일하게 관찰되었다 (Fig. 2).

일반적으로 비스페놀 A의 농도가 높을수록 내부 장기들의 영향에 더욱 심각한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 실제로는 일상 환경에서 접할 수 없는 농도이기에 예측만이 가능했을 뿐 실질적 관찰이 어려웠던 결과이다. 분명한 것은 비스페놀 A가 특히 간과 같은 물질대사의 핵심인 장기에 영향을 심각하게 미친다는 점, 그리고 생식계에 영향을 미친다는 것이다. 한편 이러한 독성 효과는 유산균 음료를 많이 섭취할수록 손상이 줄어드는 것으로 확인되었다. 하지만 유산균 음료가 비스페놀 A를 억제하는 효능이 어느 정도까지인지는 확인되지 않았다. 난소와 난자에 미치는 비스페놀 A의 영향도 계속적으로 실험되어야 할 부분이다.

본 실험은 환경호르몬에 노출되어 있는 사람들 특히, 불임으로 걱정하는 젊은 성인들에게 적절한 지식을 심어 주고 환경호르몬을 억제할 수 있는 기능성 발효유의 개발과 제품의 음용을 통해 건강 증진에 기여할 것으로 기대가 된다.

감사의 글

본 연구는 계명대학교의 비사업연구비 지원으로 수행되었으며, 산업자원부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 일부 지원에 의해 이루어졌기에 감사드립니다.

REFERENCES

Benjonathan N, Steinmetz R. Xenoestrogens, The emerging story

of bisphenol A. Trends Endocrinol Metab. 1998. 9: 124-128.

Ryu BH. Effect of Endocrine Disruptors on Endocrine Function and Reproductive Function in Wildlife and Humans. 1999. 28: 1180-1186.

Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coating in foodcans. Environ Health Perspect. 1995. 103: 608-612.

Carlsen E, Giwercman A, Kseding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Br Med J. 1992. 3: 609-613.

Czeizel. Increasing trends in congenital malformations of male external genitalia. Lancet 1985. 1: 462-463.

Gray LE, Ostby J, Wolf C, Lambright C, Kelce W. The value of mechanistic studies in laboratory animals for the prediction of reproductive effects in wildlife: endocrine effects of mammalian sexual differentiation. Environ Toxicol Chem. 1998. 17: 109-118.

Henderson BE, Ross RK, Pike MC. Hormonal chemoprevention of cancer in women. Science 1993. 259: 633-638.

Holzhausen C, Murphy S, Birke L. Neonatal exposure to a progestin via milk alters subsequent LH cyclicality in the female rat. J Endocrinol. 1984. 100: 149.

Irvine S, Cawood E, Richardson D, McDonald E, Aitken J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. Int J Gynecol Obstet. 1996. 54: 315.

Jun JW. Effect of Bisphenol A, Endocrine Disrupting Chemical on the Developing System in Mouse. 2001. 2: 1-3.

Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have a Sperm Densities Declined? A Reanalysis of Global Trend Data. Environ Health Perspect. 1997. 105: 1228-1232.

Veer PV, Dekker JM, Lamers JW, Kok FJ, Schouten EG, Brants HA, Sturmans F, Hermus RJ. Consumption of fermented milk products and breast cancer. A case control study in Netherlands. Cancer Res. 1989. 9: 4020-4023.

Vom FS, Cooks PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV. 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. 1998. 14: 239-260.

Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M, Dubin N. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. J Natl Cancer Inst. 1993. 21: 648-652.