

Bisphenol A가 흰쥐의 태반 기능과 출산에 미치는 영향

이채관, 김석현, 문덕환, 김정호, 손병철, 김대환, 이창희, 김희동, 김정원, 김종은, 이채언

인제대학교 산업의학연구소 및 부산백병원 산업의학과

Effects of Bisphenol A on the Placental Function and Reproduction in Rats

Chae-Kwan Lee, Seog-Hyun Kim, Deog-Hwan Moon, Jeong-Ho Kim, Byung-Chul Son, Dae-Hwan Kim,
Chang-Hee Lee, Hwi-Dong Kim, Jung-Won Kim, Jong-Eun Kim, Chae-Un Lee

Institute of Industrial Medicine & Department of Occupational & Environmental Medicine, Busan Paik Hospital, Inje University

Objectives : The aim of this study was to investigate the effects of bisphenol A (BPA), an estrogen-like environmental endocrine disrupter, on the placental function and reproduction in rats. The mRNA levels of the placental prolactin-growth hormone(PRL-GH) gene family, placental trophoblast cell frequency and reproductive data were analyzed.

Methods : The pregnancies of F344 Fisher rats (160 g \pm 20 g) were detected by the presence of the copulatory plug or sperm in the vaginal smear, which marked Day 0 of pregnancy. Pregnant rats were divided into three groups. The control group was intraperitoneally injected with a sesame oil vehicle. The two remaining groups were injected with 50 or 500 mg/kg B.W./day of BPA, resuspended in sesame oil, on either days 7 to 11 or 16 to 20 of pregnancy, with the rats sacrificed on either day 11 or 20, respectively. The mRNA levels of PRL-GH and Pit-1a and b isotype genes were analyzed by Northern blot hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction. The hormone concentrations were analyzed by radioimmunoassay, and the frequency of the placental trophoblast cells observed by a histochemical study. Reproductive data, such as the placental weight and litter size, were surveyed on day 20. The fetal weight was surveyed for 4 weeks after birth. A statistical analysis was carried out using the SAS

program (version 8.1).

Results : The mRNA levels of the PRL-GH gene family, such as placental lactogen I, Iv and II, prolactin like protein A, C and Cv, and decidual prolactin-related protein were significantly reduced due to BPA exposure. The mRNA levels of the Pit-1a and b isotype genes, which induce the expression of the PRL-GH gene family in the rat placenta, were also reduced due to BPA exposure. The PL-Iv and PL-II concentrations were reduced in the BPA exposed group. During the middle to last stage of pregnancy (Days 11-20), a high dose of BPA exposure reduced the frequency of spongiotrophoblast cells, which are responsible for the secretion of the PRL-GH hormones. Reproductive data, such as the placental and fetal weights and the litter size, were reduced, but that of the pregnancy period was extended in the BPA exposed compared to the control group.

Conclusions : BPA disrupts the placental functions in rats, which leads to reproductive disorders.

J Prev Med Public Health 2005;38(3):330-336

Key words : Bisphenol A, Placenta, PRL-GH family gene, Pit-1 gene, Reproduction.

서론

우리 주위의 도처에 오염되어 있는 인공 화학 물질들은 사람과 동물의 내분비 계통을 교란시킬 수 있는 잠재력을 가진다. 이 인공 화학 물질, 일명 "내분비교란물질" 들은 생체의 호르몬 및 신경 전달 물질들과 이들 수용체간의 인지 능력을 감소시키며, 또한 수용체들과의 활성을 억제하여 생물 생존의 기본 조건, 즉 발생 및 생식 기능을 교란시킨다 [1]. Bisphenol A(이하 BPA)는 음식 포장 산업과 치과에서 아말

감 등으로 사용되는 polycarbonate plastics의 단량체이며 epoxy resin과 polycarbonate로 구성되어 있다 [2]. 이들은 생체에 유입되면 에스트로겐 유사체로 작용하며, fetus의 경우 내분비계의 발생을 교란시켜 생식기 기형, 성행동이상 등을 유발하여 궁극적으로는 생식기능을 저하시킨다 [3,4].

한편 태반은 포유동물의 발생에 특이적인 기관으로서 임신 초기에 형성되어 출산 시까지 존재하며 흰쥐의 경우 크게 두 부위, junctional zone과 labyrinth zone으로 나누어진다. 주요 구성 세포종은 glycogen,

syncytial, spongiotrophoblast, trophoblast giant 세포 등 4종으로 구분된다 [5-8]. 임신 기간 동안 흰쥐 태반의 spongiotrophoblast, trophoblast giant 세포에서는 뇌하수체의 프로락틴, 성장호르몬과 유사한 placental lactogen군(이하 PL)의 PL-I, Iv(I variant), II [5-7]와 prolactin like protein군(이하 PLP)의 PLP-A, B, C, Cr Cv, D등 다양한 단백질성 호르몬들이 분비되며 [8-12], 임신 초기에는 decidual prolactin-related protein(이하 dPRP)이 분비 된다 [13]. 이 태반 호르몬들은 fetus와 태반의 성장과 스테로이드 호르몬 분비 조절을 통한 모체와의 생리적 조절 등에 관여한다 [14]. 이들은 뇌하수체

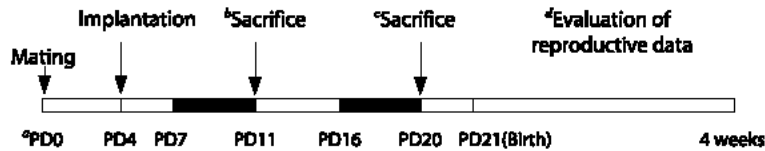


Figure 1. Schematic representation showing the sequence of experiment. White and black bar indicate the period from mating to 4 weeks after birth. *Pregnant day, [†]Northern blot hybridization of PL-I, [‡]Northern blot hybridization, RT-PCR, radioimmunoassay, Histochemical study, measurement of placental weights, [§]Measurement of litter size and fetus body weight. Black areas indicate the period of BPA injection.

의 프로락틴 및 성장 호르몬과 유전자 염기서열, 단백질 구조 및 기능이 매우 유사하다. 이러한 이유로 뇌하수체의 프로락틴 및 성장 호르몬 유전자와 태반의 PL 및 PLP 유전자들은 단일 조상에서 기원한 것으로 알려져 PRL-GH군 유전자로 불린다 [15].

Pit-1 유전자는 뇌하수체에서 처음 발견된 transacting factor로서 [16] Pit-1a, b, T의 3가지 isotype이 존재하며 각각 뇌하수체의 lactotroph 세포의 프로락틴, somatotroph 세포의 성장호르몬, thyrotroph 세포의 갑상선호르몬 자극호르몬(TSH) 등의 유전자 발현을 유도한다 [17-19]. Bamberger와 이 등의 연구에 의하면 Pit-1a, b 유전자는 사람과 흰쥐의 태반에서도 발견되며 [20,21], PRL-GH군 호르몬 유전자들의 발현조절 인자로 작용한다 [22,23].

내분비교란물질에 관한 연구는 이들의 독성이 알려지면서 활발하게 진행되었는데, 특히 발생 및 생식에 미치는 영향에 관한 연구에 많은 관심이 집중되고 있다. 그러나 에스트로겐 유사 내분비교란물질 중 하나인 BPA가 포유동물 발생의 중추인 태반의 대표적 호르몬인 PRL-GH군 호르몬에 관한 보고는 아직 없었다. 따라서 이 연구에서는 BPA가 흰쥐의 태반의 기능과 출산에 미치는 영향을 연구하기 위하여 BPA에 폭로된 흰쥐 태반의 PRL-GH군 유전자 발현 및 호르몬 농도를 분석하고, trophoblast세포의 분화 및 사멸, 그리고 발생학적 자료를 조사하고자 하였다. 본 연구진은 흰쥐를 이용한 발생학적 모니터링방법을 이용하여 내분비계 교란물질인 BPA와 polychlorinated biphenyls(Aroclor 1254), 카드뮴과 6가크롬 등의 중금속, 그리고 톨루

엔과 트리클로로에틸렌 등의 유기용제가 태반의 PRL-GH군 호르몬유전자 발현과 태반세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였으며, 연구수행 과정에서 실험동물을 효율적으로 사용하기 위하여 각 유해인자에 대한 대조 실험군을 공유하여 동시에 실험을 수행하였으며, A1254, 6가크롬, 톨루엔 등에 관한 결과는 이미 보고한 바 있다 [24-26].

연구 재료 및 방법

I. 실험동물 관리 및 BPA 투여

1) 실험동물 관리

실험동물은 15 주령의 F344 Fisher 흰쥐를 사용하였으며, 조절된 온도(24 °C~26 °C)와 광조건(명기 14시간, 암기 10시간)에서 사육하였다. 임신된 흰쥐를 얻기 위하여 암, 수를 교배시켜(1:1) 임신을 유도한 후 copulatory plug 또는 자궁내 점액질(vaginal smear)에 의해 정자가 관찰된 날을 임신 0일로 설정하였다. 실험동물은 인제대학교 동물사육실 운영규칙에 따라 관리하였다.

2) BPA 투여

BPA(Sigma, Missouri, USA)를 sesame oil에 녹인 후 임신이 확인된 흰쥐에 복강 주사하였고 대조군은 0.5 ml의 sesame oil을 주사하였다. BPA 투여량은 BPA가 흰쥐발생에 미치는 영향에 관한 연구 자료를 참고하여 [27,28], 대조군, 50 mg/kg BW 투여군, 500 mg/kg BW 투여군 등 3군으로 나누었다. 임신 11일에 PL-I 유전자 발현 분석을 위하여 각 실험군 당 3 마리씩 도살하였으며(n=3×3=9), 임신 20일에 태반 호르몬 농도 및 유전자 발현 분석, 조직학적 분석을

위한 슬라이드 제작과 litter size 및 태반 무게 측정 등을 위해 각 실험군 당 7 마리씩 도살하였다(n=7×3=21). 그리고 fetus의 무게, 임신 기간 조사를 위해 각 실험군 당 10 마리씩(n=10×3=30)사용하였다 (Figure 1).

2. 연구방법

1) RNA 추출

적출된 시료에 Tri-Reagent(Sigma-Aldrich Co., USA, 0.1 g/ml)를 가한 후 Polytron(Zipperer GmbH, Etzenbach 16, Staufen Germany)을 사용하여 얼음에 시험관을 담긴 상태로 약 30초간 마쇄하였다. 마쇄액이 담긴 시험관에 동량의 chloroform을 넣고 실온에서 15 분간 방치 후, 4 °C, 13,500 rpm에서 15 분간 원심 분리하였다. 상층액을 새 시험관에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 넣고 실온에서 10 분간 방치 후, 다시 4 °C, 13,500 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 상층액을 제거하고 남겨진 침전물을 75% 에탄올로 2회 세척하였다. 이 침전물을 실온에서 10분 동안 건조한 후 적당량의 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 멸균수에 녹였다. 추출된 total RNA는 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였고, 280 nm에 대한 260 nm 흡광도의 비율이 1.6~2.0인 것들을 RT-PCR 및 Northern blot hybridization에 사용하였다.

2) RT-PCR

Pit-1a, b isotype 유전자의 발현을 조사하기 위하여 Pit-1a, b isotype을 동시에 합성할 수 있는 primer: Sense primer 5'-tgtagtggccaaccttcacctcggg-3', antisense primer 5'-ccagcagaggttggtgcagg-3'를 제작하여 사용하였다. 정량을 위하여 total RNA의 양(0.1 µg, 0.5 µg, 1.0 µg)과 합성 반복 회수(15회, 20회, 25회, 30회)에 따라 유효 범위(0.5 µg, 25회 합성)를 확인하였다. 추출된 total RNA 0.15 µg을 200 unit의 Moloney murine leukemia virus(MMLV) reverse transcriptase와 37 °C에서 1시간 동안 반응시켜 complementary DNA(cDNA)를 합성하였다. 합성된 cDNA를 10 units의 Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus)와 합성된 primer 및 dNTP 등과 혼합한 후 30회 반응(95 °C 1분, 55 °C 1분, 72 °C 1분)시켰다. 증폭된 cDNA 절편들은 1%

agarose gel로 전기 영동한 후 추출하여 pGEM-T Easy Vector(Promega)에 클로닝 하였다. 클로닝 된 유전자 절편들은 fmol PCR sequencing system(Promega)을 이용하여 염기 서열을 분석하였다.

3) Northern blot hybridization

Northern blot hybridization은 Chomczynki 등의 방법을 사용하였다 [29]. 반응 온도는 60 °C이었다. 사용된 probe는 RT-PCR로 합성 후 염기서열을 확인한 유전자 절편을 주형으로 Oligolabelling Kit(Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden)를 사용하여 [³²P] dCTP로 표지하였다. 합성된 cDNA probe는 Nick column(Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden)으로 정제하고, SET

buffer (0.1% SDS, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 mM dithiothreitol)로 추출하였다. cDNA probe의 활성은 1×10⁶ cpm/μg 이상으로 하였다. Hybridization 후 X-ray film(XO-Mat, Eastman Kodak USA)으로 14일간 감광시킨 후 X-ray 필름 자동 현상기(RGII, Fuji, Japan)로 현상한 후 Kodak Digital Camera와 ID Image Analysis program(Eastman Kodak USA)을 사용하여 분석하였다.

4) 태반, fetus, 모체 혈액의 PL - Iv, II 농도 분석

태반과 fetus의 혈액(n=30)은 적출 후 유리섬유가 내장된 시험관으로 원심 분리 (1200 rpm, clinical table-top)하여 채취하였다. 호르몬 농도치의 일중 변화를 감안하

여 오후 1시로 시료 채취 시간을 고정하였으며, 채취한 혈액에서 혈장을 분리하여 -70 °C에 보관하였고, PL-Iv와 PL-II의 농도는 방사성 면역측정법(radioimmunoassay)으로 분석하였다.

5) 조직학적 관찰 (Histological study)

임신 20일에 적출된 흰쥐 태반을 15 ml의 perfusion buffer (phosphate-buffered saline, 4% paraformaldehyde)로 4 °C에서 2시간 처리한 후 파라핀 용액으로 고정화하였다. 파라핀 블록을 820 Histocut Rotary Microtome(Bright, England)을 이용하여 6 μm 두께로 절단한 뒤 digital tissue float을 이용하여 주름을 펴고 slide warmer 위에서 유리 슬라이드에 부착시켰다. 탈 파라핀 과정에는 Coplin jar를 이용하였으며 핵은 methylene blue로 염색하였다. 제작된 조직 슬라이드는 광학 현미경으로 관찰 후 사진 촬영하였다.

6) 발생학적 자료 (Reproductive data) 조사

태반은 임신 20일에, fetus는 출산 직후, 출산 1주 후, 출산 4주 후에 각각 무게를 측정하여 대조군과 비교하였다. 임신 기간은 합사 후 자궁 내 점액질(vaginal smear)에서 정자가 관찰된 날과 출산일을 기준으로 하였다.

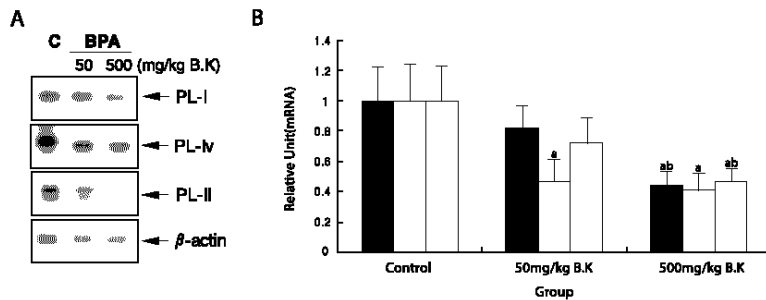


Figure 2. Effects of BPA on expression of PL-I, Iv, II genes in the rat placenta. (A) Northern blot analysis of PL-I, Iv and PL-II genes. Total RNAs (15 μg) were fractionated on an 1% formaldehyde agarose gel, transferred to nylon paper and hybridized with ³²P-labeled PL-I or Iv or II cDNA probe. βactin was hybridized to certified the equal loading of total RNA. Arabic numbers on the lanes indicate the dose of BPA injection. C: control. (B) Northern signals were quantified by ID Image Analysis program. PL-I, Iv, II signals were normalized by βactin and expressed the relative unit of C value as 1.0. Experiments were repeated three times and individual values were expressed mean ± S.D. a and b on the bar indicates the significant difference (p<0.05) compared with control and 50 mg exposed groups, respectively.

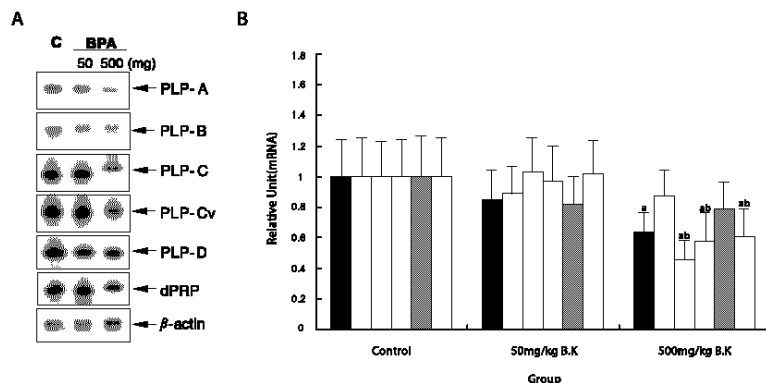


Figure 3. Effects of BPA on expression of PLP-A, B, C, Cv, D and dPRP genes in the rat placenta. (A) Northern blot analysis of PLP-A, B, C, Cv, D and dPRP genes. Total RNAs (15 μg) were fractionated on an 1% formaldehyde agarose gel, transferred to nylon paper and hybridized with ³²P-labeled PLP-A or B or C or Cv or D or dPRP probe. βactin was hybridized to certified the equal loading of total RNA. Arabic numbers on the lanes indicate the dose of BPA injection. C: control. (B) Northern signals were quantified by ID Image Analysis program. PLP-A, B, C, Cv, D, dPRP signals were normalized by βactin signals and expressed the relative unit of C value as 1.0. Experiments were repeated three times and individual values were expressed mean ± S.D. a and b on the bar indicates the significant difference (p<0.05) compared with control and 50 mg exposed groups, respectively.

3. 자료 분석

자료 분석은 SAS 프로그램(version 6.12)을 이용하여 연속자료의 두 군간 비교는 Mann-Whitney (U) test를, 세 군 이상 간 비교는 Kruskal-Wallis test를 시행하였다.

연구 결과

1. PRL-GH군과 Pit-1a,b 유전자 발현 분석

PL-I과 II 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 BPA 투여군에서 투여량에 따라 직선적으로 감소되었으며 500 mg 투여군은 통계적으로 유의하였다 (p<0.05). 그리고 PL-Iv 유전자의 발현도 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소되었다 (p<0.05)(Figure 2). PLP-A 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 BPA 투여군에서 투여량에 따라 직

Table 1. Mean serum PL-Iv and PL-II levels in rat placental, fetal and maternal blood according to the BPA exposure status

Hormone	Organ	Control	Exposed group	
			50 mg/kg BW	500 mg/kg BW
PL-Iv	Placenta ($\mu\text{g/g}$)	1358.8 \pm 369.4	1135.5 \pm 532.8	869.2 \pm 313.1*
	Embryo ($\mu\text{g/g}$)	33.9 \pm 5.4	23.8 \pm 4.9*	18.6 \pm 3.3*
	Maternal blood ($\mu\text{g/ml}$)	1103.6 \pm 280.3	818.2 \pm 180.9*	659.9 \pm 105.8*
PL-II	Placenta ($\mu\text{g/g}$)	318.6 \pm 49.1	245.7 \pm 38.3*	203.9 \pm 22.7*
	Embryo ($\mu\text{g/g}$)	320.5 \pm 38.7	261.3 \pm 39.2*	208.2 \pm 22.3*
	Maternal blood ($\mu\text{g/ml}$)	225.8 \pm 35.2	169.0 \pm 24.2*	125.1 \pm 18.2*

These values originated from 7 pregnant rats, 40 placentas and fetuses in each group.

* and * indicate the significantly difference ($p < 0.05$) compared with control and 50 mg exposed groups, respectively.

p value was calculated by Mann-Whitney(U) test.

Table 2. Mean weight of rat placenta and fetus, and mean pregnancy period and litter size according to the BPA exposure status

Parameter	Control	Exposed group	
		50 mg/kg B.W	500 mg/kg B.W
Placental weight (g)	0.64 \pm 0.07	2.75 \pm 0.41*	0.54 \pm 0.08*
After birth	3.15 \pm 0.34	8.12 \pm 0.74*	2.64 \pm 0.38*
Fetal weight (g)	8.96 \pm 0.43	84.75 \pm 8.98	7.65 \pm 0.86*
1 week after birth	86.31 \pm 9.01	21.38 \pm 0.68	85.41 \pm 8.47
4 weeks after birth	21.05 \pm 0.72	12.21 \pm 3.25	21.89 \pm 0.82
Pregnancy period (day)	13.41 \pm 2.31	0.58 \pm 0.07*	10.07 \pm 2.54*
Litter size			

Placental weight originated from 7 pregnant rats and other values originated from 10 pregnant rats in each group.

* and * indicate the significantly difference ($p < 0.05$) compared with control and 50 mg exposed groups, respectively.

p value was calculated by Mann-Whitney(U) test.

선적으로 감소되었으며 500 mg 투여군은 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$). 그러나 PLP-B 유전자의 발현은 유의한 변화가 없었다. PLP-C와 Cv 유전자의 발현은 두 유전자 모두 500 mg 투여군에서는 변화가 없었으나 500 mg 투여군에서는 통계적으로 유의하게 감소되었다 ($p < 0.05$). PLP-D 유전자 발현도 BPA 투여군에서 감소되는 경향이였으며, dPRP 유전자의 발현은 500 mg 투여군에서는 변화가 없었으나 500 mg 투여군에서는 통계적으로 유의하게 감소되었다 ($p < 0.05$)(Figure 3). PRL-GH군 호르몬 유전자의 발현 유도인자로 알려진 Pit-1 a, b isotype 유전자는 대조군과 비교하여 BPA 투여군에서 투여량에 따라 직선적으로 감소되었으며 500 mg 투여군은 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$)(Figure 4).

2. 태반 fetus. 모체 혈액의 PL-Iv, II 호르몬 농도

BPA 폭로량에 따른 태반의 평균 PL-Iv 호르몬 농도는 대조군 1358.8 $\mu\text{g/g}$, 50 mg 투여군 1135.5 $\mu\text{g/g}$, 500 mg 투여군 869.2 $\mu\text{g/g}$ 으로 조사되어 BPA 투여군에서 감소되었으며, 500 mg 투여군은 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$). Fetus와 모체의 혈액에서도

유사한 결과였다 ($p < 0.05$). 태반의 평균 PL-II 호르몬 농도도 대조군 318.6 $\mu\text{g/g}$, 50 mg 투여군 245.7 $\mu\text{g/g}$, 500 mg 투여군 203.9 $\mu\text{g/g}$ 로 조사되어 BPA 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소되었다 ($p < 0.05$). Fetus와 모체의 혈액에서도 유사한 결과였다 ($p < 0.05$)(Table 1).

3. 태반의 조직학적 관찰

BPA 50 mg 투여군의 흰쥐 태반에서는 특이할 만한 조직학적 변화를 발견할 수 없었으나 500 mg 투여군에서는 태반의 구성 세포종의 빈도에 변화를 보였다. Junctional zone에서 PRL-GH군 호르몬을 분비하는 주요 구성 세포종인 spongiotrophoblast 세포의 관찰빈도가 대조군과 비교하여 뚜렷이 감소되었다. 그러나 Labyrinth zone의 spongiotrophoblast와 trophoblast giant 세포의 관찰빈도는 변화가 없었다 (Figure 5).

4. 발생학적 자료(Reproductive data)

임신 20일에 조사된 BPA 폭로 상태에 따른 태반의 평균 무게는 대조군 0.64 g, 50 mg 투여군 0.58 g, 500 mg 투여군 0.54 g로 조사되어 BPA 폭로군에서 통계적으로 유의하

게 감소하였다 ($p < 0.05$). 출산 직후, 출산 1주 후, 출산 4주 후에 각각 측정된 fetus의 평균 체중은 출산 직후와 출산 1주 후에는 BPA 투여량에 따라 통계적으로 유의하게 감소하는 경향이였다 ($p < 0.05$). 그러나 출산 4주 후에는 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다. BPA 폭로 상태에 따른 평균 임신 기간은 대조군 21.05일에 비하여 50 mg 투여군 21.38일, 500 mg 투여군 21.89일로 조사되어 BPA 폭로량에 따라 직선적으로 증가하였다. Litter size는 대조군 13.41마리, 50 mg 투여군 12.21마리, 500 mg 투여군에서 10.27마리로 조사되어 BPA 폭로량에 따라 직선적으로 감소하였으며 500 mg 투여군에서의 litter size 감소는 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$)(Table 2).

고찰

국내 공공기관의 조사보고에 의하면 우리나라의 초산, 경산 산모의 태반에서 BPA(124.2-138.9 ng/g)가 검출되었다 [30]. 그리고 폴리카보네이트 재질의 유아용 젓병에 끓는 물을 넣었을 때도 BPA가 검출됐으며, 탄산음료 등의 캔 제품에서도 BPA(0.27-12.41 ppb)가 검출되었다. 그 외에도 초유에서 발암물질인 다이옥신이 허용 기준치의 30배 이상 검출된바 있으며, 성인 남녀의 혈액과 소변 등에서도 BPA를 포함한 내분비교란물질이 다수 검출됐다 [30]. 또한 유방암 환자의 혈청 및 유방지방 조직에서 살충제 DDT의 대사산물인 DDE와 변압기 절연류인 화학 물질 PCBs의 농도를 측정할 결과 유방암 환자군에서 검출된 양이 대조군의 1.5배에 달했다고 밝혔다. 이처럼 내분비교란물질의 오염 및 인체에 대한 유해성은 다방면에서 나타나며 그 위험도가 점차적으로 증가되고 있다 [30].

BPA는 fetus의 체중을 감소시키는 것으로 알려져 있으며 [28,31] 이 연구에서도 BPA 투여군에서 태반과 fetus의 체중감소를 확인할 수 있었다. 그리고 이 연구의 결과 BPA는 임신기간을 연장시키고 litter size를 감소시켰다. 그러나 지금까지의 연구에서 이러한 BPA의 발생독성에 관한 분

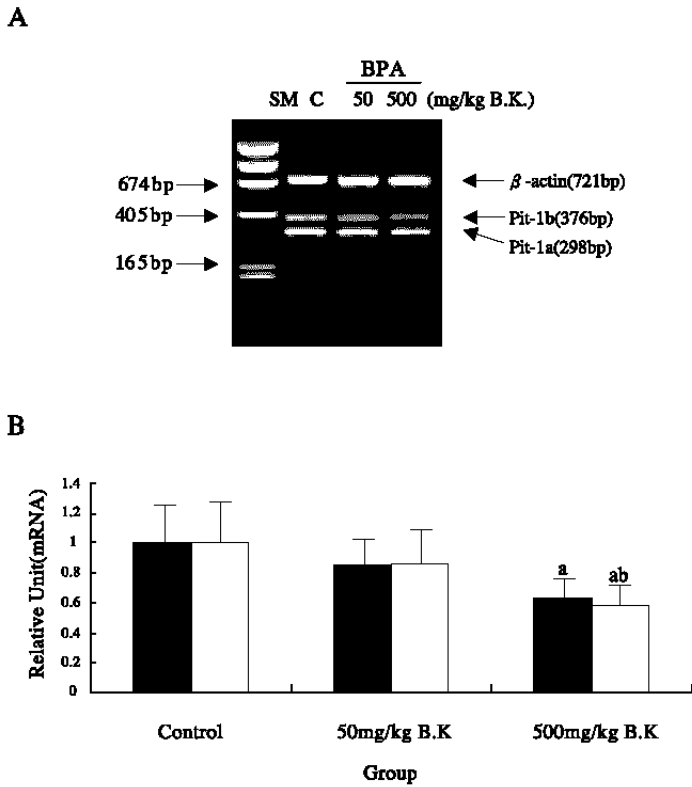


Figure 4. Effects of BPA on expression of Pit-1a and b isotype gene in the rat placenta. (A) Reverse transcribed and amplified cDNAs were fractionated on a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. Arabic numbers on the lanes indicate the dose of BPA injection. C: control. (B) Signals were quantified by ID Image Analysis program. Pit-1a, b signals were normalized by β actin signals and expressed the relative unit of C value as 1.0. Experiments were repeated three times and individual values are expressed mean \pm S.D. a and b on the bar indicates the significantly difference ($p < 0.05$) compared with control and 50 mg exposed groups, respectively.

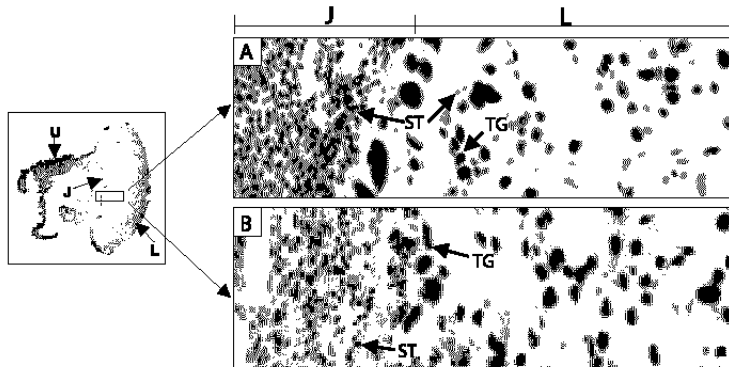


Figure 5. Effect of BPA on the histochemical feature of developing rat placenta. Perfused placental tissues with Bouin's fix solution were embedded in paraffin, sectioned at 6 μ m and counter-stained with methylene blue. (A) Microphotographs (X 400 reproduced at 70%) of control group, (B) BPA 500 mg exposed group. J: junctional zone, L: labyrinth zone, U: uterus, ST: nucleus of methylene blue stained spongiotrophoblast cell, TG: nucleus of methylene blue stained trophoblast giant cell.

자생물학적 기전에 관한 연구는 미비한 실정이었다. 따라서 이 연구에서는 BPA 투여에 의한 태반 기능 및 fetus 발생 장애에 대한 보다 기초적인 원인을 규명하기

위한 일환으로 태반에서 분비되는 PRL-GH군 호르몬 유전자들의 발현에 대한 BPA의 영향을 연구하였다. 연구결과에 의하면 BPA는 PL-I, IV, PL-II, PLP-A, C, Cv,

dPRP 유전자의 발현을 유의한 수준으로 억제하였으며 기타 유전자의 발현도 억제하였다. 그리고 PRL-GH군 호르몬 유전자들의 발현과 함께 fetus와 태반 그리고 모체의 혈액에서 PL-IV, II 호르의 농도도 유전자 분석 결과와 일치하여 BPA 투여군에서 감소되었다. PRL-GH군 호르몬의 기능에 관한 연구들에 의하면 PL-I은 프로게스테론의 분비를 촉진시키고 황체의 기능을 유지시킨다고 알려져 있다 [32,33]. 또한 프로게스테론에 의하여 유전자 발현이 억제되어 임신 기간 동안 PL-I과 프로게스테론은 길항 관계를 나타낸다 [33]. PL-II 또한 프로게스테론 분비를 촉진하며 [32], 에스트로젠 수용체 α 유전자의 발현을 촉진시키는 등 스테로이드 호르몬 대사에 관여한다 [34]. 그리고 모체의 유선 발생을 유도한다 [32]. PL-IV는 Nb2 lymphoma 세포의 분화를 유도하며 tyrosine 인산화를 통해 STATs (signal transducers and activators of transcription)을 활성화시키는 JAK2 (Janus tyrosine kinase 2) 유전자의 발현을 유도한다 [35]. PLP-A는 fetus의 착상 부위에서 natural killer (NK)세포에 반응하여 NK세포의 활성화에 관여한다고 알려져 있다 [36]. PLP-C와 Cv는 임신 후반기에 태반의 성장 및 모체와의 생리 조절에 관여하며 [37], dPRP 유전자는 deciduom세포의 분화를 유도하고 태반 성장에 관여한다 [38]. 이러한 연구 결과들을 토대로 이 연구의 결과를 해석하면 BPA에 의한 원위 태반의 PRL-GH군 유전자의 발현 억제와 이에 따른 호르몬 분비 감소는 태반 세포의 분화, 스테로이드 호르몬 대사, 모체와의 생리적 조절 등의 태반기능에 대한 장애요인으로 작용하여 태반과 fetus의 체중감소 및 임신 기간 증가 및 litter size감소의 주요원인으로 작용하였을 것이다.

BPA에 의한 PRL-GH군 유전자 발현억제 및 호르몬 농도 저하의 원인으로는 첫 번째 BPA에 의한 에스트로젠 활성화억제와 그로 인한 태반세포 분화억제를 들 수 있다. 임신 기간 동안 난소에서는 다량의 에스트로젠과 프로게스테론이 분비되는데 이들은 태반을 구성하는 trophoblast 세포의 분화와 성장 인자로 작용한다 [39]. 따라서

BPA와 같은 에스트로젠 유사 내분비교란 물질은 생체에 유입되면 에스트로겐의 활성을 경쟁적으로 억제함으로써 태반의 trophoblast 세포의 분화에 장애요인으로 작용할 것이다. 두 번째로는 BPA에 의한 Pit-1 유전자의 발현 억제이다. Pit-1 유전자는 사람과 흰쥐의 뇌하수체와 태반에서 PRL-GH군 호르몬 유전자들의 발현 유도 인자로 작용하는데 [21,22], 이 연구에서 BPA가 흰쥐의 태반에서 Pit-1 유전자의 발현을 억제함을 확인하였다. 에스트로젠은 Pit-1 유전자의 발현 유도인자로 알려져 있다 [21]. 따라서 BPA에 의한 에스트로젠 활성 억제는 Pit-1 유전자의 발현을 억제하고 궁극적으로는 PRL-GH군 호르몬 유전자들의 발현을 억제하였을 것이다.

포유동물 고환에서도 PRL-GH군 유전자 발현이 보고되었으며 이들 유전자 발현 경향의 변화와 생식세포 분화 및 고환중양세포 발생과의 관련성을 제시한바 있다 [40]. 이 연구의 결과로 보아 고환에서의 PRL-GH 유전자 발현도 BPA를 포함한 에스트로젠성 내분비교란물질의 영향을 받을 가능성이 높으며, 추후 이들 내분비교란물질과 정소의 PRL-GH군 유전자 발현에 관한 연구는 내분비교란물질이 정자형성(spermatogenesis), 정자완성(spermiogenesis), 정자의 운동성, 첨체(acrosomal body)의 활성화 등 남성의 생식기능에 미치는 영향을 연구하는데 중요한 자료가 되리라 생각되며, 아울러 남성의 정자수 감소의 원인을 규명하는데도 도움이 될 것이다. 이 논문에서 제시된 결과들은 BPA 등의 내분비교란물질에 의해 야기되고 있는 발생 및 생식기능 장애에 관하여 보다 근본적인 자료를 제시하였다는 점에서 의미가 있다고 생각되며, 내분비교란물질 대한 예방대책 마련에 필요한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

이 연구의 제한점으로는 BPA 투여 방법에서 주사에 의한 스트레스와 사용된 참기름이 교란변수로 작용할 가능성이 있다는 점 등이다. 그러나 참기름은 reactive oxygen species (ROS)의 생성을 감소시키는 등 Oxidative stress를 억제 한다고 알려져 있다(41). 따라서 그 효과는 BPA에 의한 PRL-GH군 유전자의 발현 억제 효과와는

상반되어 발생장애를 유발할 가능성은 극히 미약 하다고 판단된다. 그러나 BPA에 의한 발생장애에 대하여 교란변수로는 작용할 가능성이 있다고 생각된다.

결론

BPA가 흰쥐의 태반기능과 출산에 미치는 영향을 연구하기 위하여 BPA를 투여한 흰쥐 태반의 PRL-GH군과 Pit-1 유전자의 발현, 세포분화 그리고 발생학적 자료들을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

BPA는 태반의 PRL-GH군 유전자 발현과 PRL-GH군 유전자의 발현 유도 인자인 Pit-1a, b isotype 유전자의 발현을 억제하였으며, PL-IV와 II 호르몬 농도를 감소시켰다. BPA는 태반의 spongiotrophoblast 세포의 분화를 억제하였으며, 태반과 fetus의 무게, litter size를 감소시켰고, 임신 기간을 연장시켰다. 이러한 결과들로 보아 BPA는 흰쥐 태반의 PRL-GH군 호르몬 분비와 태반 세포의 분화억제 등 태반기능 이상을 초래하며 fetus 발생의 장애요인으로 작용할 수 있다.

참고문헌

1. Sone H. Endocrine disrupter and reproductive disorders in women. *Nippon Rinsho* 2000; 58: 2521-2516
2. Haishima Y, Hayashi Y, Yagami T, Nakamura A. Elution of bisphenol-A from hemodialyzers consisting of polycarbonate and polysulfone resins. *J Biomed Mater Res* 2001; 58: 209-215
3. Hiroi H, Tsutsumi O, Momoeda M. Differential interactions of bisphenol A and 17 beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ER alpha) and ER beta. *Endocr J* 1999; 46: 773-778
4. Funabashi T, Sano A, Mitsushima D, Kimura F. Bisphenol A increases progesterone receptor immunoreactivity in the hypothalamus in a dose-dependent manner and affects sexual behaviour in adult ovariectomized rats. *J Neuroendocrinol* 2003; 15: 134-140
5. Duckworth ML, Kirk KL, Friesen HG. Isolation and identification of a cDNA clone of rat placental lactogen II. *J Biol Chem* 1986; 261: 10871-10878
6. Robertson MC, Cosby H, Fresnoza A, Cattini PA, Shiu RP, Friesen HG. Expression, purification, and characterization of recombinant rat placental lactogen-I: a comparison with the

- native hormone. *Endocrinology* 1994; 134: 393-400
7. Deb S, Faria TN, Roby KF, Larsen D, Kwok SC, Talamantes F, Soares MJ. Identification and characterization of a new member of the prolactin family, placental lactogen-I variant. *J Biol Chem* 1991; 266: 1605-1610
8. Duckworth ML, Peden LM, Friesen HG. Isolation of a novel prolactin-like cDNA clone from developing rat placenta. *J Biol Chem* 1986; 261: 10879-10884
9. Deb S, Roby KF, Faria TN, Szpirer C, Levan G, Kwok SCM, Soares MJ. Molecular cloning and characterization of prolactin-like protein C complementary deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 1991; 266: 23027-23032
10. Croze F, Kennedy TG, Schroedter IC, Friesen HG. Expression of rat prolactin-like protein B in deciduoma of pseudopregnant rat and in decidua during early pregnancy. *Endocrinology* 1990; 127: 2665-2672
11. Dai G, Liu B, Szpirer C, Levan G, Kwok SC, Soares MJ. Prolactin-like protein-C variant: complementary deoxyribonucleic acid, unique six exon gene structure, and trophoblast cell-specific expression. *Endocrinology* 1996; 137: 5009-5019
12. Iwatsuki K, Shinozaki M, Hattori N, Hirasawa K, Itagaki S, Shiota K, Ogawa T. Molecular cloning and characterization of a new member of the rat placental prolactin (PRL) family, PRL-like protein D (PLP-D). *Endocrinology* 1996; 137: 3849-3855
13. Roby KF, Deb S, Gibori G, Szpirer C, Levan G, Kwok SCM, Soares MJ. Decidual prolactin-related protein. *J Biol Chem* 1993; 268: 3316-3322
14. Day IN, Chen XH, Gaunt TR, King TH, Voropanov A, Ye S, Rodriguez S, Syddall HE, Sayer AA, Dermison EM, Tabassum F, Barker DJ, Cooper C, Phillips DI. Late life metabolic syndrome, early growth, and common polymorphism in the growth hormone and placental lactogen gene cluster. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5569-5576
15. Forsyth I. Prolactin, growth hormones, and placental lactogens: an historical perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997; 2: 3-6
16. Ingraham HA, Chen RP, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 1988; 55: 519-529
17. Haugen BR, Wood WM, Gordon DF, Ridgway EC. A thyrotrope-specific variant of Pit-1 transactivates the thyrotropin beta promoter. *J Biol Chem* 1993; 268: 20818-20824

18. Bodner M, Karin M. A pituitary-specific transacting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. *Cell* 1987; 50: 267-275
19. Li S, Crenshaw EB 3rd, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 1990; 347: 528-533
20. Bamberger AM, Bamberger CM, Pu LP, Puy LA, Loh YP, Asa SL. Expression of pit-1 messenger ribonucleic acid and protein in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2021-2026
21. Lee BJ, Jeong JK, Kim JH, Kang SG, Kim MO, Choi WS. Local expression of a POU family transcription factor, Pit-1, in the rat placenta. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 118: 9-14
22. Lee CK, Kang HS, Lee BJ, Kang HM, Choi WS, Kang SG. Effects of dopamine and melatonin on the regulation of the PIT-1 isotype, placental growth hormone and lactogen gene expressions in the rat placenta. *Mol Cells* 1999; 9: 646-651
23. Lee CK, Kang HS, Lee BJ, Kang HM, Choi WS, Kang SG. Effects of dopamine and estrogen on the regulation of Pit-1 alpha, Pit-1 beta, and PL-II gene expression in the rat placenta. *Mol Cells* 1998; 8: 205-211
24. Lee CK, Lee CU, Kim JH, Son BC, Kim DH, Lee CH, Kim HD, Kim JW, Toon YD, Kang SG, Moon DW. Effects of aroclor 1254 on the expression of rat placental PRL-family genes. *Mol Cells* 2003; 15: 114-121
25. Lee H, Chun JH, Moon DH, Lee CU, Kang SG, Son BC, Kim DH, Lee CH, Kim JW, Lee CK. Effects of chromium (VI) exposure on the placental function and reproduction in rat. *Korean J Prev Med* 2004; 37: 99-103 (Korean)
26. Choe BS, Lee CK, Moon DH, Son BC, Kim DH, Lee CH, Kim HD, Kim JW, Kim JE, Lee CU. Effects of toluene on the expression of placental PRL-GH family genes and reproduction in the rat. *Korean J Occup Environ Med* 2004; 16:262-275 (Korean)
27. Kwon S, Stedman DB, Elswick BA, Cattley RC, Welsch F. Pubertal development and reproductive functions of Crl:CD BR sprague-dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development. *Toxicol Sci* 2000; 55: 399-406
28. Tyl RW, Myers CB, Mar MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stropp GD, Waechter JM. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD sprague-dawley rats. *Toxicol Sci* 2002; 68: 121-146
29. Chomczynski P, Sacchi M. Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159
30. 식품의약품안전청. 내분비계 장애물질 평가사업 결과 보고서. 1999; 58-91
31. Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vanderbergh JG, Von Saal FS. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 1999; 401: 763-764
32. Galosy SS, Talamantes F. Luteotropic actions of placental lactogens at midpregnancy in the mouse. *Endocrinology* 1995; 136: 3993-4003
33. Forsyth IA. Comparative aspects of placental lactogens: structure and function. *Exp Clin Endocrinol* 1994; 102: 244-251
34. Telleria CM, Zhong L, Deb S, Srivastava RK, Park KS, Sugino N, Park-Sarge OK, Gibori G. Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens. *Endocrinology* 1998; 139: 2432-2442
35. Cohick CB, Dai G, Xu L, Deb S, Kamei T, Levan G, Szpirer C, Szpirer J, Kwok SC, Soares MJ. Placental lactogen-I variant utilizes the prolactin receptor signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 116: 49-58
36. Muller H, Liu B, Croy BA, Head JR, Hunt JS, Dai G, Soares MJ. Uterine natural killer cells are targets for a trophoblast cell-specific cytokine, prolactin-like protein A. *Endocrinology* 1999; 140: 2711-2720
37. Conliffe PR, Simmen RC, Buih WC, Shiverick KT. Cloning of a novel rat placental prolactin-like protein C-related cDNA. *Mol Reprod Dev* 1995; 41: 167-176
38. Rasmussen CA, Orwig KE, Vellucci S, Soares MJ. Dual expression of prolactin-related protein in decidua and trophoblast tissues during pregnancy in rats. *Biol Reprod* 1997; 56: 647-654
39. Cronier L, Guibourdenche J, Niger C, Malassiné A. Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta* 1999; 20: 669-676
40. Berger P, Untergasser G, Hemann M, Hittmair A, Madersbacher S, Dirnhöfer S. The testis-specific expression pattern of the growth hormone/placental lactogen (GH/PL) gene cluster changes with malignancy. *Hum Pathol* 1999; 30: 1201-1206
41. Prasad K, Muralidhara, Rajini PS. Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 299-306