

## Bisphenol A에 의한 Sertoli 세포주 내 세포자연사 검정

김지향 · 김진규 · 도병록<sup>1</sup> · 이창주<sup>1</sup> · 윤용달<sup>1\*</sup>  
한국원자력연구소 방사선연구원, <sup>1</sup>한양대학교 생명과학과

### Evaluation of Bisphenol a Induced Apoptosis in Sertoli Cell-lines

Ji-Hyang Kim, Jin-Kyu Kim, Byoung-Rok Do<sup>1</sup>, Chang-Joo Lee<sup>1</sup> and Yong-Dal Yoon<sup>1\*</sup>

Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

<sup>1</sup>Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

**ABSTRACT** : The present report aimed at evaluating the effect of bisphenol A(BPA) and diethylstilbestrol(DES) on Leydig or Sertoli cell-lines. To identify the differences in the susceptibility to BPA upon different cell-types, assay of the cell viability was done on TM3(Leydig cells) and TM4(Sertoli cells) cell-lines. The result indicates that Sertoli cells are more sensitive to low dose of BPA than Leydig cells. Also, the BPA- or DES-treated Sertoli cells showed a reduction of phospholipase D(PLD) activity identically. According to the confirmation of the mRNA expression of fas receptor and fas ligand in the BPA-treated cells, fas/fasL system activated by BPA will deliver the apoptosis signal onto Sertoli TM4 cells. However, Fas/FasL system was not activated in the DES-treated cells unlike the BPA-treated cells.

**Key words** : Bisphenol A, Pholipase D, Fas signaling, Apoptosis, Sertoli cells.

**요 약** : 본 연구는 Leydig 세포주와 Sertoli 세포주상에 bisphenol A(BPA)와 diethylstilbestrol(DES)의 영향을 알아보려고 수행하였다. 세포 종류에 따른 BPA의 영향을 알아보기 위해, BPA의 농도별로 두 세포주에 처리하여 세포생존율을 비교하였다. Sertoli 세포주가 Leydig 세포주에 비해서 저농도의 BPA에서 생존율이 유의하게 감소되는 것을 확인할 수 있어, Sertoli 세포가 Leydig 세포주에 비해 BPA에 더욱 민감한 것을 알 수 있었다. 또한 BPA나 DES를 처리했을 때 세포 내 분화 및 사멸 신호 전달에 관여하는 phospholipase D(PLD)의 활성이 현저하게 저하되는 것을 확인하였다. 역전사효소 연쇄 반응을 이용하여 세포막상의 세포자연사 신호전달자인 fas와 fas ligand의 mRNA 발현을 확인해 본 결과, BPA의 처리에 의해 fas ligand의 발현이 다른 실험군에 비해 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과들을 정리해 볼 때, 내분비계 교란물질인 BPA는 Sertoli 세포 내 fas/fasL 신호전달계를 자극하여 PLD 활성을 저하시킴으로써, Sertoli 세포 내 세포자연사를 유발시키는 것으로 사료된다.

## 서 론

산업의 발달로 인해 불가피하게 발생하는 농약, 계면활성제, 합성수지 원료 등의 산업 화학물질이 환경으로 유입되면서 인간 및 야생동물에 생태적 위협을 주고 있다(Colborn *et al.*, 1993). 이러한 화학물질들은 인간을 포함한 동물에서 정상적인 내분비 기능을 방해하고 생식 기관의 비정상적인 발달을 유도, 출생을 감소나 불임을 일으키며, 생식, 행동, 신경, 면역체계의 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다(Guillette *et al.*, 1995; Degen *et al.*, 2000). Environmental Pro-

tection Agency(EPA, US)의 규정에 따르면 내분비계 교란 물질(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs)은 생태계에 존재하는 화학물질로서 체내 호르몬의 생산, 분비, 이동, 대사, 결합작용 및 배설을 간섭하는 외인성 물질을 의미한다(Yoon, 1998). 현재 생태계에 존재하는 많은 인공적인 화학 물질 중 명확하게 내분비계 교란물질로 밝혀진 것은 극소수이며, 대부분의 화학물질들이 현재까지는 잠재적 위험성을 가진 것으로 추측되고 있다(Colborn *et al.*, 1993). 현재 내분비계 교란물질로서 잠재적 위험성을 가지고 있을 것으로 추정되는 물질들에는 가소제(diethylphthalate 등 9종), 플라스틱에 존재하는 물질(styrene 등 17종), 산업장 및 환경 오염 물질(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin 등 21종), 농약류(dichloro-, diphenyl-, trichloroethane 등 74종), 증금속(카드뮴, 납, 수은), 합성 에스트로겐(diethylstilbestrol 등 8종), 식품 및 식품첨가물(BHA 등 3종), 그리고 식물에 존재하는 호

본 논문은 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2003-0005-C0051, ABRL)을 받아 수행되었음.

\* 교신저자: 서울특별시 성동구 행당동 17번지, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과. (우) 133-791, (전) 02-2220-0955, (팩) 02-2294-0955, E-mail: ydyoon@hanyang.ac.kr

르몬 유사물질(genistein 등 6종) 등으로 실생활에 매우 손쉽게 이용되는 여러 가지 물질들이 여기에 속한다.

Bisphenol A(4,4'-isopropylidene diphenol, BPA)는 아세톨과 2분자의 페놀 축합에 의해 합성되며 에폭시 수지의 기본 원료로 사용되거나(Fig. 1), 폴리카보네이트(PC) 플라스틱의 합성시 사용되는 일종의 단량체이다(Benjonathan & Steinmetz, 1998). 또한 폴리알릴레이트 등의 원료로서, 산화방지제, 염화비닐 안정제로서 사용된다. 특히, 식품 용기중 BPA는 음료수 캔의 내부 코팅제(에폭시 수지), 플라스틱제 유아용 젓병 및 생수통 등의 소재(PC 수지)로 사용된다. BPA의 축합으로 생성되는 PC 수지 용기는 투명하면서도, 100°C 이상의 열에 견디며, 방탄유리로 사용될 정도의 견고성 때문에 용도가 다양하고 사용량이 매우 많다. BPA는 국내에서 1997년의 경우에 61,287톤이 사용되었다(Yoon, 1998). BPA는 용기 중에 있는 코팅 잔유물 또는 고온이나 가공시에 생성될 수 있는 분해물질에서 용출되어 생태계로 유입될 수 있어 문제가 되고 있다.

난소 적출 흰쥐를 이용한 실험에서 BPA가 에스트로젠(estrogen) 활성을 가진다고 보고(Dodds & Lawson, 1936)된 이래, 유방암 세포인 MCF-7의 생체 밖 분열 증식 유도가 관찰되었다(Nagel *et al.*, 1997). 또한 뇌하수체 세포의 체외 배양 시에 프로락틴(prolactin) 유전자의 발현을 증가시킨다는 보고(Steinmetz *et al.*, 1997)와 흰쥐 자궁 노출 시에 자궁 근층 증식에 관여하는 *c-fos* 등의 유전자 발현을 자극시켜 세포 증식을 유도하는 것(Steinmetz *et al.*, 1998)이 증명되면서 에스트로젠성(estrogenicity) 교란물질임이 증명되었다. BPA의 에스트로젠성은 에스트로젠에 비해 상대적으로 2천 배 정도 낮은 활성을 갖고 있으나, 10억 분의 1 정도의 매우 낮은 존재에서도 활성을 갖는 것이 알려져 있다. 시험관상에서 BPA와 에스트라디올(estradiol) 수용체간의 결합력은 에스트라디올에 비해 1,000~5,000배 정도 낮은 것으로 보고되어 있다(Dodge *et al.*, 1996).

생체 내 BPA의 평균 대사율(metabolic clearance rate)은 흰쥐에서 25.1~33.9mL/min으로 알려져 있다(Kim *et al.*,

2001). 중간대사 산물로는 5-hydroxybisphenol A, 4,5-bisphenol-O-quinone이 있으며, 그 대사과정은 17 $\beta$ -estradiol과 유사한 경로를 거친다(Nira & Rosemary, 1998; Fig. 1). 즉 에스트라디올의 경우는 C-2와 C-4 위치에서 산화과정을 통해 2-3과 3-4 catechols을 형성하고 그 결과 에스트라디올의 에스트로겐 활성이 감소하게 된다. 이 과정에는 cytochrome P450(CYP) monooxygenases인 CYP1 family가 관여하며, 이 유전자는 주로 간과 자궁 및 유선조직에서 발현하는 것으로 알려져 있다(Hakkola *et al.*, 1997). 따라서 BPA 및 과생 대사산물이 생체 내에서 내인성 에스트로겐의 역할을 교란시키는 것은 CYP1 효소 활성, 에스트로겐 합성 억제, 에스트로겐 수용체의 점유 등 다각도적인 영향이 있을 것으로 보이나, 기전과 관련한 명확한 연구는 아직 미비한 실정이다.

DES의 경우에는 처방을 위해서 고안해 낸 합성 에스트로젠으로 BPA와는 다르게 인간에서 문제가 먼저 발견된 경우이다. 1940년대부터 임산부의 원활한 태반 스테로이드 합성 촉진 및 습관적 유산 및 조산 방지제로서 처방되어 왔다(Marselos & Tomatis, 1992). 1971년까지 DES는 계속 처방되어 왔으나, 독립된 두 연구 그룹의 결과에 의해서 태아 시기에 DES에 노출되었던 젊은 여성들(DES daughters)에게서 흔하지 않은 종양의 형태인 투명세포선암(clear cell adenocarcinoma)이 질과 자궁경부에서 발병됨이 증명되었다(Greenwald *et al.*, 1971; Herbst *et al.*, 1971). 또한 태아 시기에 DES 노출된 남성(DES Sons)의 경우에는 비종양적 부정소 내 낭종이 증가하는 것을 보였다(Herbst, 1981). 현재는 태아 시기의 노출된 다음 세대에 대한 영향 추적을 하고 있으며, 이 DES 3세대 중, 한 DES 딸에서 태어난 아이의 경우 뇌성 소아마비 등의 신경학적 손상을 보였다(Blatt *et al.*, 2003).

BPA와 DES는 대표적인 내분비계 교란물질로 많은 연구를 통해 인간 및 야생동물에서의 내인성 에스트로겐 호르몬의 역할을 방해하여, 여러 가지 발생학적 이상 및 생식 기능의 손상 등을 유발시키는 것으로 알려져 있다(Yoon, 1998). 그러나 두 화합물의 생체 내 기전에 대해서는 정확하게 알려져 있지 않기 때문에 명확한 영향을 논하기는 어렵다. 따라서 본 연구에서는 정소 내 대표적인 체세포인 Sertoli 세포의 세포주를 이용하여, BPA에 대한 영향을 확인해 보고, DES와의 결과 비교를 통해 Sertoli 세포 내에서 유발되는 변화를 확인해 보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포주의 준비 및 배양

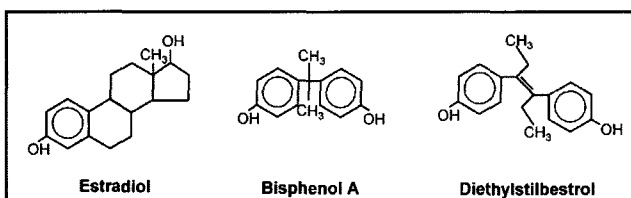


Fig. 1. Chemical structures of estradiol, bisphenol A, and diethylstilbestrol.

미성숙 생쥐의 정소 내 세포인 Leydig TM3(KCLB No. 21714) 세포와 Sertoli TM4(KCLB No. 21715) 세포를 한국 세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분주 받아 사용하였다. 실험에 사용한 기본 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 Dulbecco's modified Eagles medium (D-MEM)으로, 100U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 또한 37°C에서 95% 공기과 5% CO<sub>2</sub>가 공급되고 충분한 습도가 유지되는 배양기 내에서 배양하였다.

## 2. 내분비계 교란물질의 처리

TM3와 TM4 세포는 6-well plates(Iwaki)에  $1 \times 10^5$  cells/mL 이 되도록 접종하여 2mL의 D-MEM으로 배양하였다. 배양 24시간 후에 처리군 별로 처리하였다. 처리액은 기본 D-MEM 배양액에 활성탄(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 처리를 통해 serum-, phenol red-free의 상태로 제조하여 사용하였다(Chun & Gorski, 2000). BPA(Sigma)와 DES(Sigma)는 에탄올에 녹여서 배양액 부피의 1/1,000이 되도록 하였고, 대조군에는 동일한 양의 에탄올을 처리하였다.

## 3. 세포 생존율 분석

세포의 생존율은 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma) reduction method (Mossman, 1983)를 변용하여 측정하였다. 이 방법은 세포 내 미토콘드리아의 호흡 기능을 측정하는 방법으로 trypan blue dye-exclusion 방법보다 정확히 세포의 생존율을 측정할 수 있다고 알려져 있다. 25, 50, 100, 200, 400 µM의 BPA를 처리한 후, 배양액을 제거하고 MTT 용액(0.05% in charcoal-processed medium)을 0.5mL 첨가하여, 배양기 내에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 MTT 용액을 제거한 뒤 배양접시 바닥에 형성된 formazan crystals을 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma) 200 µL에 녹인 후 96-well plate에 분주하였다. ELISA reader(Bio-Tek, SL-340)를 사용하여 570nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 측정하였다.

## 4. 박층 크로마토그래피에 의한 TM3 및 TM4 세포 내 PLD 활성 측정

각 실험군은 6-well plates의 각 well당  $1 \times 10^5$  cells/mL의 세포 밀도로 접종 후 배양하여, 24시간 동안 <sup>3</sup>H-Palmitic acid 1 µCi/mL의 농도로 <sup>3</sup>H을 표지하였다(Kim *et al.*, 1999). 배양액을 제거하고 PBS로 세척 후 다시 serum-free media

를 1mL씩 넣어 37°C에서 50분간 배양했다. HEE buffer를 100 µL를 첨가하고, 10분 후 PBS로 2회 세척하였고, serum-free media에서 BPA(1 µM/mL), DES(1nM/mL)을 각각 30분간 처리하였다. BPA 처리 30분 후 배양액을 버리고 PBS로 3회 세척하였고, methanol 1mL씩을 넣고 4°C에서 세포들을 회수하였다. 회수된 세포들은 glass tube로 옮기고, 남은 잔여물은 0.2N HCl로 옮겼다. 미리 준비한 glass tubes에 ddH<sub>2</sub>O 500 µL와 chloroform을 1mL씩 넣었다(Bligh & Dyer, 1959). 교반기로 잘 섞은 후 200×g, 10분간 원심분리를 하여 하층부의 유기 용매층을 수확하였다. 이 유기 용매층을 centrifugal vaporizer(CVE 100D, EYELA)로 15분간 진공상태에서 건조한 다음, methanol/chloroform (1:1, v/v) 20 µL에 추출된 지질을 녹여 박층 크로마토그래피(thin-layer chromatography, TLC)를 시행할 때까지 -20 °C에서 보관하였다. TLC판(LK6D Silica GL 60 Å, Whatman)을 100°C에서 1시간 동안 활성화 시킨 후, 하단으로부터 2.5cm 위에 각 실험군으로부터 추출된 지질과 함께 표준 지질인 phosphatidyl butanol(Sigma)을 7 µL를 넣어 점적하였다. TLC 전개용매로는 ethylacetate : iso-octane : acetic acid (35:25:10; water saturated, v/v/v)를 사용하였다. 또한 TLC를 시행하기 2시간 전에 TLC chamber(CAMAG, Switzerland)에 넣어 chamber 내부가 전개용매로 완전히 포화되게 하였다. 시료가 점적된 TLC 판을 chamber에 넣어 전개용매의 선단이 판의 상단에서 1cm까지 전개되면 TLC를 중지하고, 판을 꺼내어 30분간 건조시켰다. 건조된 TLC 판을 primulin(0.01% in 80% acetone)으로 염색 후, UV transilluminator(Foto/Prep-I, Fotodyne)상에서 전개된 위치를 확인하였다. 표준지질과 동일한 거리로 전개된 silica gel을 긁어내어 scintillation counting vials에 넣은 뒤 TLC extraction solution(ethanol : acetic acid = 99 : 1, v/v)을 500 µL씩 넣어 혼합하였다. LSC-cocktail(Aquasol-2, Packard)을 5 mL씩 넣어 진탕한 후, liquid scintillation counter(LS 6500S, Beckman)로 방사능을 측정하였다.

## 5. 세포자연사 중재 분자의 역전사중합효소 연쇄 반응

세포자연사에 관여하는 여러 분자들 중에서 미토콘드리아에 관련한 fas와 fas ligand mRNA 발현 변화를 알아보기 위해 역전사 중합효소 연쇄 반응(reverse transcription - polymerase chain reaction, RT-PCR)을 수행하였다. 상보적인 DNA library를 만들기 위해서 각각의 RNA 1 µg을 10 pM oligodT 15 primer(Promega, USA), RNase inhibitor (40U/µL, Promega), 2.5mM dNTP(Takara, Japan), AMV RT

reaction buffer(5×, Promega), AMV reverse-transcriptase (10U/μL, Promega)를 포함하는 반응액 속에서 70분 동안 42°C에서 반응시켰다(Thermal cycler 480, Takara). 제조가 끝난 cDNA는 다음 PCR을 수행할 때까지 -20°C에 보관하였다.

RNA 추출 및 역전사가 제대로 수행되었는지를 확인하기 위해서 house keeping gene으로 알려진 β-actin를 먼저 PCR로 증폭하였다. β-actin의 forward primer sequence는 5'-CACTGCCGCATCCTCTTCT-3', reverse primer sequence는 5'-AGCCACCAATCCACACAFAG-3'을 제조하여 사용하였고, PCR 산물의 크기는 347 bp이다(Colle *et al.*, 1997). Thin wall tube에 동일 양의 cDNA, MgCl<sub>2</sub>, 10X PCR buffer, dNTPs, 그리고 각각의 fas와 fas ligand에 대한 제조된 primer(Kim *et al.*, 2001)를 Taq DNA polymerase (QIAGEN, Germany)과 중합반응시켰다. PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation시킨 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 각 primer에 따라 58~62°C의 온도에서 30초~1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 총 28~35회 실시하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 postelongation시켜 충분히 PCR 산물을 얻어내어 전기영동을 실시하기 전까지 4°C에서 보관하였다. 전기영동은 6X loading dye를 7 μL의 PCR 산물과 혼합 후 2% agarose gel에 loading 하여 100V로 30분간 전기영동하였다. Ethidium bromide(EtBr)로 10분간 염색한 후 Image analyzer(VILER LOURMAT)하에서 관찰하고 촬영하였다. β-actin의 발현량에 비례하여 각 유전자의 발현 양의 변화를 비교하였다. 각 반응은 3회 이상 수행하여 통계 처리하였다.

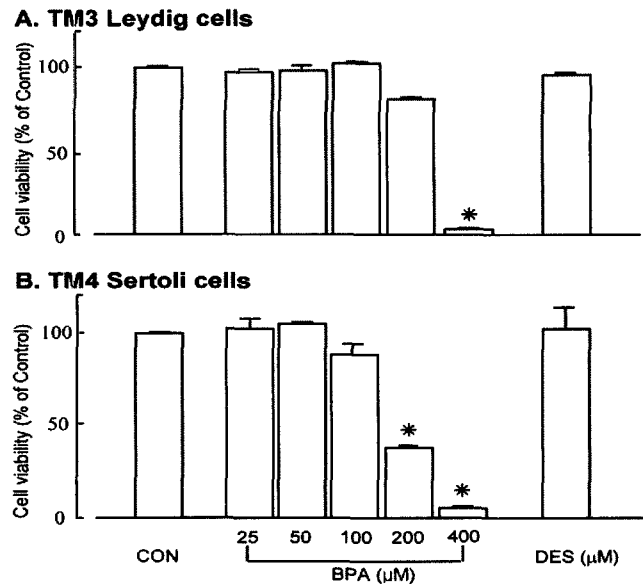
## 6. 통계학적 분석

각 실험군간의 결과에 대한 유의성 검정은 ANOVA 분석 및 Student's *t* test를 사용하였고, *P* 값이 0.05보다 작은 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. BPA 농도에 따른 세포 생존율

Leydig TM3 세포주와 Sertoli TM4 세포주의 생존율에 미치는 BPA의 영향을 알아보았다. BPA는 25, 50, 100, 200, 400 μM의 농도로 에탄올에 녹여 처리하고, DES를 20 μM 24시간 처리하여 결과를 비교해 보았다(Fig. 2). Fig. 2에 보이는 바와 같이 Sertoli 세포주에서 BPA에 대한 농도 의존적으로 생존율이 감소하였다. 100 μM에서 감소되기 시



**Fig. 2.** Dose-dependent cytotoxic effects of BPA on TM3 Leydig cells(A) and TM4 Sertoli cells(B). Cells grown on 6-well plate were serum starved for 4 hr, then were switched to fresh phenol red- and steroid-free medium with 3% BSA in the absence(vehicle) or in the presence of increasing BPA concentration(25, 50, 100, 200, and 400 μM) for 24hr. Asterisks indicate *P*<0.05.

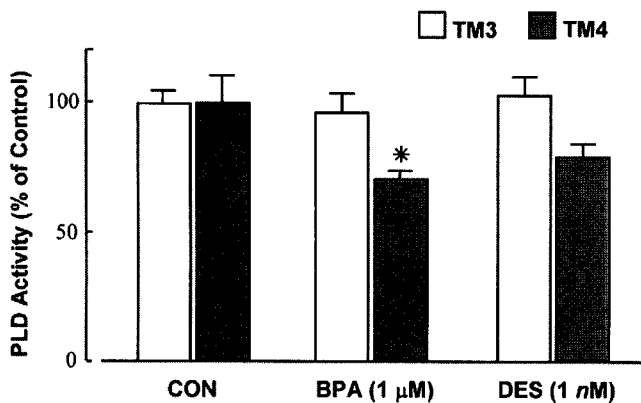
작한 생존율은 200과 400 μM에서는 유의하게 감소하였다 (*P*<0.05). Leydig TM3 세포주에서는 200 μM에서 낮아져 400 μM에서 유의한 생존율을 보였다.

### 2. BPA 처리 세포주 내 PLD 활성화

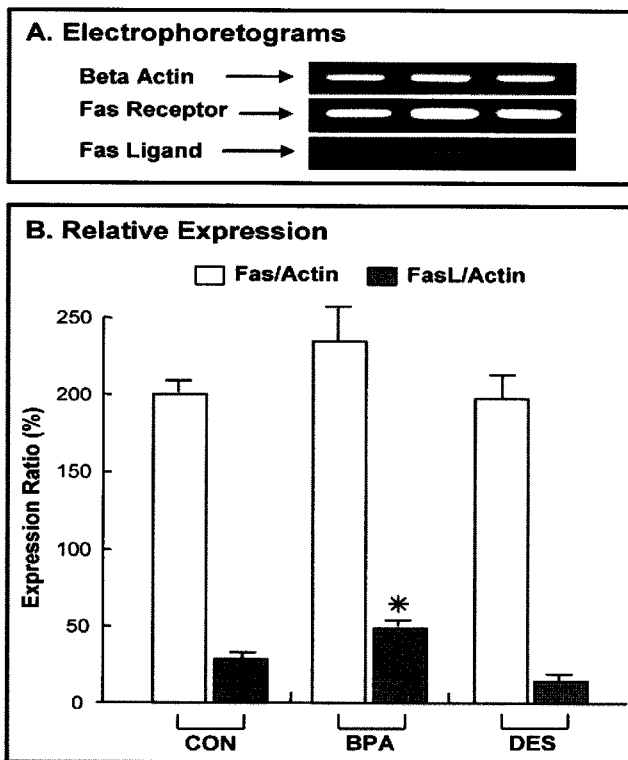
TM3와 TM4 세포주에 BPA와 DES를 처리한 후 각 세포 내 PLD 활성화의 변화를 transphosphatidylatation 반응을 통해서 확인하였다(Fig. 3). 30분간 1 μM BPA와 1nM DES를 처리한 후 지질을 추출하여 박층 크로마토그래피로 분리하여 측정하였다. TM3 Leydig 세포주에서는 BPA와 DES의 처리로 인한 PLD 활성화의 변화가 관찰되지 않았으나, TM4 Sertoli 세포주에서는 BPA와 DES 처리로 인해 PLD 활성이 감소되었다. 특히 BPA(1 μM)를 처리한 경우의 PLD 활성이 DES(1nM)을 처리한 경우보다 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다 (*P*<0.05).

### 3. BPA에 의한 TM4 세포주 내 fas/fas Ligand의 mRNA 발현 변화

세포막 내 세포자연사의 신호를 전달하는 fas receptor와 fas ligands의 mRNA 발현 변화를 BPA와 DES를 처리한 후 비교하였다(Fig. 4). 세포 내 발현에 대한 내부 지표로서 β-actin의 실험군별 발현량에 대한 상대적인 fas receptor와 fas



**Fig. 3.** Changed activities of the PLD activity on the BPA-treated TM4 Sertoli cells. The PLD activity was measured using the transphosphatidyl reaction as described in Materials and Methods. After treatment, lipids were extracted and separated by TLC. PLD activity was determined by liquid scintillation counting. Asterisk indicates  $P < 0.05$ .



**Fig. 4.** Semiquantitative RT-PCR analysis of beta-actin, fas, and fas ligand expressions on the BPA or DES treated TM4 Sertoli cells. The product of PCR was loaded on 2% agarose gels and band intensity normalized for beta-actin(internal control) was calculated.

ligands의 mRNA 발현량을 산출하여 비교하였다. Fas receptor의 발현은 BPA와 DES를 처리함으로써 증가하는 경향을 보였으며, fas ligand의 경우에는 BPA에서 유의하게

증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). DES의 경우에는 대조군에 비해 fas ligand의 발현이 낮아지는 경향을 보였다.

## 고 찰

인류의 산업 활동에 의해 파생되어 생태계로 유입된 여러 화학물질에 의해 야생동물과 인간의 삶이 위협을 받고 있다. 내분비계 교란물질은 체내 대사뿐 아니라 동물의 발생 및 생식에 영향을 주기 때문에 자연계의 종(species)의 존속까지 영향을 준다 할 수 있겠다. 이 논문에서는 합성 에스트로겐인 DES와 함께 대표적 내분비 교란물질인 BPA를 정소 내 대표적인 체세포인 Sertoli(TM4)와 Leydig(TM3) 세포에 처리하여 영향을 비교·확인하였다. 두 세포주에 BPA를 농도별로 처리한 결과 TM4 세포주의 경우에 TM3 세포주에 비해서 저농도 BPA에 훨씬 민감하게 생존율이 저하되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 즉 Leydig 세포보다는 Sertoli 세포의 생존율에 BPA가 더 큰 영향을 주는 것으로 사료되며, 20 μM의 DES를 처리한 경우에는 에스트로겐성에 비해 대조군과 유의한 차이를 확인할 수 없었다.

세포막 수용체를 매개로 이루어지는 신호 전달 체계는 많은 효소와 물질들의 상호 관계에 의해 이루어진다. 신경 전달물질, 호르몬, 성장인자 같은 세포 밖의 신호가 그들의 특이적인 수용체에 결합하면, 세포막 인지질의 분해가 일어난다. 인지질의 분해 산물은 이차전달 물질로써 세포 밖으로부터 전달된 신호를 증폭하고 하부의 신호 전달 분자에게 그 신호를 전달한다. 이러한 신호 전달의 결과로써, 세포의 성장, 분화, 사멸과 같은 세포의 생리적 현상들이 조절된다. PLD는 phosphatidylcholine(PC)을 가수분해하여 phosphatidic acid (PA)와 choline을 만들어 내며 PA는 phosphatidic acid phosphohydrolase(PAP)에 의해서 DAG로 변환될 수 있다. DAG는 PKC의 활성물질이며, PA는 protein kinase, GTPase activating protein(GAP), PI kinases, adenylate cyclase 등 다양한 신호 전달 분자의 조절에 관여한다고 알려져 있다. PLD의 활성은 조절자와의 단백질-단백질 결합 혹은 PKC 등에 의한 인산화 과정을 통해 조절되는 것으로 알려져 있다 (Sylvia *et al.*, 2000).

따라서 PLD 활성의 변화는 세포 내 세포자연사의 신호 전달과 관계있고(Kim *et al.*, 1999), 이것은 fas-fas ligand의 mRNA 발현과 연결된다(Fig. 4). TM4 세포주의 경우에 BPA를 처리한 실험군이 1000분의 1 수준의 DES를 처리한 것보다 낮은 활성을 보여 대조군에 비해 유의하게 저하된 활성을 보였다(Fig. 3). Sertoli 세포주에서의 이러한 PLD 활성

저하는 역전사효소 연쇄반응을 통한 fas와 fas ligand의 mRNA 발현 증가와 함께 세포자연사에 대한 증거로 볼 수 있다. 물론 fas와 fas ligand의 mRNA 발현 증가가 세포자연사를 절대적으로 유발시킨다고 볼 수는 없으나, PLD의 활성화와 함께 Fig. 2에서 보이는 바와 같은 세포 생존율의 저하는 BPA에 의한 Sertoli 세포주 내의 세포자연사 유발을 증명하는 것이라 사료된다(Kim *et al.*, 2001). 이러한 가설의 정확한 검증을 위해서는 세포 내의 세포자연사를 결정짓는 몇몇 다른 분자의 발현 및 활성화에 대한 조사가 추가적으로 이루어져야 할 것이다. 또한 시험관(*in vitro*) 상의 결과를 바탕으로 생체 내 영향에 대한 검증뿐 아니라, Sertoli 세포에 대한 간접적인 영향과 BPA 등의 내분비계 교란물질이 생식 세포에 직접적인 영향을 주는 경우에 대한 분석적인 영향 파악이 필요할 것으로 사료된다.

따라서 본 실험의 결과들을 정리해 볼 때, BPA와 DES에 의한 Sertoli 세포와 Leydig 세포에 대한 영향에 대해 다음과 같은 결론을 맺을 수 있었다. BPA의 농도에 따른 세포 생존율을 확인해 본 결과 Sertoli 세포주가 낮은 농도에서도 민감하게 생존을 저하를 보였으며, 이는 Sertoli 세포주 내 fas와 fas ligand의 발현 증가 및 PLD 활성화의 저하로 연결되었다. 따라서 BPA에 의해 Sertoli 세포 내 세포자연사 유발로 정소 내 분비 이상 및 세정관 내 생식 세포에 대한 구조적 기반 약화 등이 일어날 수 있으며, 이것은 생식 이상 및 불임 등과 연결되어 생태계에 위협을 줄 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Benjonathan N, Steinmetz R (1998) Xenoestrogens: The emerging story of bisphenol A. *Trends Endocrinol Metab* 9:124-128.
- Blatt J, Van Le L, Weiner T, Sailer S (2003) Ovarian carcinoma in an adolescent with transgenerational exposure to diethylstilbestrol. *J Pediatr Hematol oncol* 25: 635-636.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-915.
- Chun TY, Gorski J (2000) High concentrations of bisphenol A induce cell growth and prolactin secretion in an estrogen-responsive pituitary tumor cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 162:161-165.
- Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM (1993) Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101:378-384.
- Colle JH, Falanga PB, Singer M, Hevin B, Milon G (1997) Quantitation of messenger RNA by competitive RT-PCR: a simplified read out assay. *J Immunol Methods* 210:175-184.
- Degen GH, Bolt HM (2000) Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *Int Arch Occup Environ Health* 73: 433-441.
- Dodd EC, Lawson W (1936) Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137:996.
- Dodge JA, Glasebrook AI, Magee DE (1996) Environmental estrogens: Effects on cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59:155-161.
- Greenwald P, Barlow JJ, Nasca PC, Burnett WS (1971) Vaginal cancer after maternal treatment with synthetic estrogens. *N Engl J Med* 285:390-392.
- Guillette LJ, Crain DA, Rooney AA, Pickford DB (1995) Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ Health Perspect* 103 (Suppl 7):157-164.
- Hakkola J, Pasanen M, Pelkonen O (1997) Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis* 18:391-397.
- Herbst AL (1981) The current status of the DES-exposed population. *Obstet Gynecol Annu* 10:267-278.
- Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC (1971) Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med* 284:878-881.
- Kim JH, Lee CJ, Yoon YD (2001) Effect of bisphenol A on testicular cells in prepubertal mice. In: Proc. the 34th Annual Meeting of the Society of the Study of Reproduction, Ottawa, Canada, July 28~August 1, 2001, pp 343.
- Kim JH, Yoon YD, Shin I, Han JS (1999) Effects of ceramide, the Fas signal intermediate, on apoptosis and phospholipase D activity in mouse ovarian granulosa

- cells *in vitro*. IUBMB Life 48:445-452.
- Marselos M, Tomatis L (1992) Diethylstilbestrol: I, pharmacology, toxicology and carcinogenicity in humans. Eur J Cancer 28A:1182-1189.
- Mossman T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Method 65:55-63.
- Nagel SC, Vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. (1997) Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative *in vivo* bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. Environ Health Perspect 105: 70-76.
- Nira BJ, Rosemary S (1998) Xenoestrogens: The emerging story of bisphenol A. Trends Endocrinol Metab 9:124-128.
- Sylvia VL, Boyan BD, Dean DD, Schwartz Z (2000) The membrane effects of 17beta-estradiol on chondrocyte phenotypic expression are mediated by activation of protein kinase C through phospholipase C and G-proteins. J Steroid Biochem Mol Biol 73:211-224.
- Yoon YD (1998) The effects of endocrine disruptors on reproduction and development of wild animals. Dev Reprod 2:115-133.