

비스페놀 A 및 Diethylstilbestrol의 유전독성 평가를 위한 염색체이상, 자매염색분체교환, 소핵형성, 단일세포 겔 전기영동법의 활용

김병모 · 정해원 *
서울대학교 보건대학원

Analysis of chromosome aberration, sister chromatid exchange, micronuclei and single cell gel electrophoresis in human lymphocytes exposed *in vitro* to Bisphenol A and Diethylstilbestrol

Byeong Mo Kim and Hai Won Chung*

School of Public Health, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea
(Received September 25, 2001 / Accepted November 3, 2001)

ABSTRACT : Endocrine disruptors have been implicated in carcinogenesis in animal studies, but carcinogenetic effects on human remain controversial. In order to examine the genotoxicity of two common endocrine disruptors, Bisphenol A and Diethylstilbestrol, cytogenetic endpoints including chromosome aberration (CA), sister chromatid exchange (SCE), micronuclei (MN) analyses and DNA damage by single cell gel electrophoresis (SCGE) were assessed. The effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on the frequencies of CA and MN were increased in a dose-dependent manner and that of Bisphenol A was more significant by Kendall's τ test. Bisphenol A and Diethylstilbestrol also increased the frequency of SCE. Bisphenol A and Diethylstilbestrol induced DNA damage in a dose-dependent manner and the DNA damage induced by Diethylstilbestrol in human blood lymphocytes was more significant.

Keywords : Bisphenol A, Diethylstilbestrol, Chromosome aberration, Micronuclei, Sister Chromatid Exchange (SCE), Single Cell Gel Electrophoresis

서 론

생체내 스테로이드계 성호르몬은 핵에 존재하는 수용체 단백질과 결합하여 성기능과 관련된 단백질뿐만 아니라 성장인자 및 면역과 관련된 사이토카인등의 발현에 관여하는 생체내 조절기구조 알려져 있다(Verthelyi & Klinman, 2000). 내분비계 장애물질은 마치 정상 호르몬인 것처럼 호르몬 수용체와 결합하여 세포반응을 일으키거나 호르몬 수용체 결합부위를 봉쇄함으로써 정상호르몬이 수용체에 접근하는 것을 막아 내분비계가 기능을 발휘하지 못하게 하거나 수용체와 반응함으로써 정상적인 호르몬 작용에서는 일어나지 않는 세포분열이나 생체내에서 물질의 대사과 합성 등을 유발한다. 또한 수용체와 결합하지 않고 간접적으로 호르몬의 합성, 저장, 배설, 분비, 이동 등에 작용하여 정상적인 내분비 기능을 방

해하기도 한다.

내분비계 장애물질은 쉽게 분해되지 않고 안정하여 환경 혹은 생체내에서 지속적으로 존재한다. 그러나 이들이 인체의 호르몬 기능에 미치는 기전에 대해서는 확실히 알려진 바 없다.

내분비계 장애물질에 대한 연구는 마우스를 비롯한 실험동물들을 대상으로 주로 이루어졌으며 사람을 대상으로 한 연구는 별로 이루어지지 않고 있다. 특히 이들 물질이 염색체나 DNA에 미치는 세포유전학적인 효과에 대한 연구도 상대적으로 많이 수행되지 않았다.

본 연구에서는 최근 주변 생활환경에서 사용되어 주목을 받고 있는 비스페놀 A와 DES를 대상으로 이들의 세포유전학적 독성효과를 구명하고자 한다.

비스페놀 A는 에스트로젠과 비슷한 효과가 있는 것으로 알려져 있는데 이는 젓병이나 플라스틱 식기 등을 만드는데 사용되는 폴리카보네이트수지나 캔제품 내면의 부식을 방지

*To whom correspondence should be addressed

하기 위해 사용되는 에폭시수지의 원료 화학물질로 널리 사용되고 있으며 치과에서 치료에 사용하는 몇몇 중합체에도 포함되어 있는 것으로 보고되고 있다. 비스페놀 A는 동물 뇌신경 세포와 생식기 질병 및 불임을 유발시키는 것으로 알려져 있다. Hamster ovary나 embryo에서 염색체 이상을 유발하지 않는다는 보고가 있으나(Ivett *et al.*, 1989; Tsutsui *et al.*, 1998) 염색체 이상을 유발한다는 상반된 보고(Hilliard *et al.*, 1998)도 있으며 잠재적으로 염색체 수적이상을 유발한다는 연구가 보고되고 있다(Pfeiffer *et al.*, 1997). 또한 고농도의 비스페놀 A에 노출될 때 세포주기가 교란되고 telomere의 길이가 짧아지며 DNA adducts을 형성한다는 연구가 보고되고 있다(Roy *et al.*, 1997).

DES는 에스트로젠과 같은 호르몬의 작용을 가진 인공적으로 합성된 약물로 1960년대 중반 미국에서 유산을 방지할 목적으로 이용된 바 있다. DES를 복용한 임신부로부터 태어난 자녀들에게는 생식기 및 유방, 질에서의 압과 정자수의 감소, 질의 저하 등이 발생된다고 보고되었다. DES는 림프구의 증식을 억제하며(Hill & Wolff, 1983), 염색체의 수적이상과 소핵을 유발하고(Schnitzler *et al.*, 1994; Fauth *et al.*, 2000), 사람과 마우스에서 DNA fragmentation을 유발하는 것으로 알려져 있지만(Banduhn & Obe, 1985; Anderson *et al.*, 1997), 자매염색분체교환의 경우는 서로 상반된 연구결과가 보고되고 있다(Lundgren *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1987).

본 연구는 비스페놀 A 및 DES의 유전독성 기전을 확인하기 위해 염색체이상, 자매염색분체교환, 소핵형성 및 단일세포 겔 전기영동을 통한 DNA 손상을 분석하고자 한다.

연구 목적

본 연구의 목적은 최근 그 위해성이 부각되고 있는 내분비장애물질 중 비스페놀 A와 DES(diethylstilbestrol)의 유전독성을 평가하기 위해 사람 림프구를 대상으로 염색체이상 분석, 자매염색분체교환 분석, 소핵 분석 및 단일세포겔전기영동 분석을 시행하고 유전독성물질 노출의 생물학적 지표로서의 활용 가능성을 구명하고자 한다.

연구 방법

세포배양 및 비스페놀 A 및 diethylstilbestrol 처리

사람의 말초혈액에 비스페놀 A(SIGMA) 또는 diethylstilbestrol(SIGMA) 각각을 0, 10, 20, 50, 100, 300 μ M 농도로 처리하고 3시간 후 인산완충용액으로 2번 세척하였다. 10% 우태아 혈청(GIBCO)이 포함된 RPMI 1640 배지

(GIBCO)에 penicilin, streptomycin, PHA(phytohemagglutinin, SIGMA)를 첨가한 다음 5% CO₂가 공급되는 항온기에서 염색체이상, 자매염색분체교환 및 소핵분석 방법에 따라 각기 시간을 달리하여 배양하였다. 비스페놀 A와 DES(diethylstilbestrol)는 DMSO(dimethylsulfonate)에 용해한 후 적정농도로 희석하여 사용하였다.

염색체이상 분석

염색체이상 분석을 위해서 사람 말초혈액에 비스페놀 A 또는 DES 각각을 농도별로 처리하고 3시간 후에 인산완충용액으로 2번 세척하고 10% 우태아 혈청과 PHA가 포함된 RPMI 1640에 48시간 추가 배양하였다. 염색체 표본작성 3시간 전에 세포 배양액에 Colcemid(2×10^{-7} M)를 첨가한 후 3시간 후에 저장액(0.075M KCL)을 거쳐 Canoy 고정액(metanol:acetic acid=3:1)을 2회 처리하는 일반적인 방법에 의해 염색체 표본을 작성하였다.

자매염색분체교환 분석

Perry(1984)의 방법에 준해 사람 말초혈액에 비스페놀 A 또는 DES 각각을 농도별로 처리하고 3시간 후에 인산완충용액으로 2번 세척하고 10% 우태아 혈청과 PHA가 들어있는 RPMI 1640에 10 μ M의 5-Bromo-2-deoxyuridine을 추가로 첨가하여 72시간 배양한 후 염색체 표본을 작성하였다. 염색체표본을 암실에서 건조시킨 후 Fluorescent plus Giemsa 방법에 의해 5 μ g/ml의 Hoechst 33258(SIGMA)로 13분간 염색하고, black light로 10분간 조사한 다음 5% Gurr's Giemsa 용액으로 염색하였다. 자매염색분체교환은 각 농도별로 60개의 세포를 무작위로 관찰하여 하나의 세포 당 평균 염색분체 교환빈도로 분석하였다.

소핵 분석

Fenech(1993)의 방법에 준해 수행하였다.

세포배양 44시간 후에 Cytochalasin B(3 μ g/ml)를 처리하고 다시 28시간 배양한 다음 염색체 슬라이드를 작성하였다. Giemsa 염색후 핵이 두 개인 경우만 분석하였고 소핵은 본 핵의 1/3 이하의 크기인 경우에만 인정하였으며 각 농도당 2000개의 세포를 관찰함을 원칙으로 하였다.

세포생존률

건강한 사람 말초혈액으로부터 Ficoll을 이용 림프구를 분리하여 배지에 넣고 비스페놀 A 또는 DES 각각을 0, 10, 20, 50, 100, 300 μ M로 처리한 후 CO₂가 공급되는 37°C 항온기에서 3시간 동안 배양하였다. 이를 인산완충용액으로 세척하고, PHA가 포함된 새로운 배지에 넣고 48시간 추가

배양한 후 Tryphan blue exclusion 방법에 의해 혈구계수기를 이용하여 생존한 세포수를 측정하였다. 세포생존률은 대조군에서의 생존 세포수에 대한 처리군에서의 생존 세포수의 비로 나타내었다.

단세포전기영동법

Singh 등(1988)의 방법에 준해 수행하였다.

말초혈액과 배지를 섞은 후 비스페놀 A 또는 DES 각각을 농도별로 처리하고 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온기에서 3시간 동안 배양한 후 인산완충용액으로 2회 세척하고 Ficoll을 이용하여 림프구를 분리하였다. Fully frosted slide glass에 0.6% normal melting agarose gel을 130 µl 도말하여 24×50 mm coverslip으로 덮어준 후 4°C에서 10분간 굳힌 다음 coverslip을 제거하였다. 그 위에 림프구와 0.5% low melting agarose gel의 혼합물 75 µl를 도말하여 coverslip으로 덮어준 후, 다시 4°C에서 10분간 굳히고 coverslip을 제거한 후 0.5% low melting agarose gel 110 µl를 도말하여 세포가 agarose 층에 묻히도록 하였다. 이층이 굳으면 coverslip을 제거하고 슬라이드를 차가운 lysis solution(2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris base, 1% N-Lauryl sarcosinate, 1% Triton X-100, pH 10)에 담가 4°C에서 1시간 세포용해 시켰다. 3차 증류수로 슬라이드에 남아 있는 염을 제거한 후 슬라이드를 electrophoretic buffer(300 mM NaOH, 0.1% 8-hydroxyquinoline, 2% DMSO, 10 mM Na₄EDTA, pH>12.3)에 장치하였다. DNA 양가닥을 풀리게 하기 위해 약 20분간 방치한 후 buffer를 계속 순환시키면서 22 V, 330 mA로 전기영동을 걸어 주었는데 이러한 과정은 추가적인 DNA 손상을 막기 위하여 암실에서 진행되었다. 전기영동이 끝난 후 슬라이드를 중화시키기 위해 0.4 M Tris로 5분간 3회 중화시켰으며, DNA가 슬라이드에 침착되도록 적어도 1시간 동안 100% 에탄올에 담가 두었다. 관찰은 슬라이드를 건조시킨 후

Ethidium bromide(20 µg/ml) 60 µl로 형광염색하고, G2A filter(515-560 nm의 excitation, 590 nm의 barrier filter)를 이용하여 400배율로 관찰하였다. 한 농도에서 60개의 세포를 무작위로 선택하여 이미지 분석 프로그램(Image-Pro Plus 4.0)을 통해 DNA의 손상정도를 head 중심에서 tail로의 DNA 단편의 이동거리로 분석하였다.

통계분석

- 1) 비스페놀 A와 DES의 염색체이상 및 소핵형성 관계를 보기 위해 Kendall's τ rank test를 시행하였다.
- 2) 비스페놀 A와 DES의 자매염색분체 교환빈도 간의 양-반응 관계는 Chi-Square를 이용한 Trend test와 paired t-test를 병행하여 시행하였다.
- 3) 비스페놀 A, DES의 농도에 따른 DNA 손상을 보기 위하여 Mann-Whitney test를 시행하였다.

연구 결과

세포생존률

비스페놀 A, DES를 3시간 처리한 후 세척하고, 48시간 동안 추가 배양한 다음 세포수를 측정한 결과 10, 20, 50, 100, 300 µM에서 상대생존률이 비스페놀 A의 경우 86.0%, 97.7%, 82.2%, 62.6% 및 49.4%로 나타났으며 DES의 경우에는 83.7%, 99.4%, 72.2%, 68.3%, 31.7%로 나타났다 (Fig. 1).

염색체이상빈도 분석

사람 림프구에서 세포독성을 유발하는 것으로 나타났던 농도를 기준으로 비스페놀 A와 DES를 10, 20, 50, 100, 300 µM의 농도로 각각 처리하였다. 비스페놀 A의 경우에는 100 µM까지는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으나 100~300 µM의 농도에서 뚜렷한 증가양상을 보였으며 염색

Table 1. The frequency of chromosome aberration in human lymphocytes induced by Bisphenol A

Treatment	No. of cells counted	Aberrant cells / 200 cells	Structural Aberration / 200 cells					
			Chromatid type			Chromosome type		
			exchange	deletion	total	exchange	deletion	total
c	200	2	0	2	2	0	0	0
10	200	3	0	3	3	0	0	0
20	200	5	0	5	5	0	0	0
50	200	4	0	4	4	0	0	0
100	200	4	0	4	4	0	0	0
300	200	10	0	10	10	0	0	0
Kendall's τ^*		0.060		0.060	0.060			
p		0.027		0.027	0.027			

*Kendall's τ was calculated on cell bases.

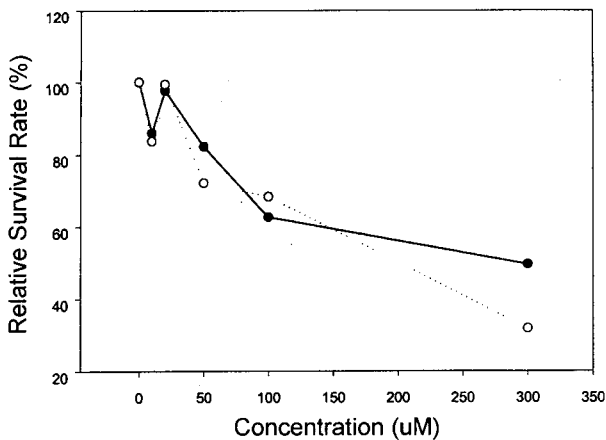


Fig. 1. The Cell survival rate in human lymphocytes after treatment with Bisphenol A and DES for 3 hours (-●-, Bisphenol A; -○-, Diethylstilbestrol).

분체형 이상만을 관찰할 수 있었다(Table 1). DES역시 100 µM의 농도까지는 이상빈도의 뚜렷한 증가를 볼 수 없었으나 50 µM 이상에서는 이동원염색체와 같은 염색체형 이상을 볼 수 있었다(Table 2).

자매염색분체 교환빈도 분석

Table 3, 4에서 보는 바와 같이 비스페놀 A의 경우 모든 농도에서 대조군의 세포당 자매염색분체교환 빈도수 2.55에 비해 각각 2.70, 2.88, 2.85, 3.35, 3.81로 100, 300 µM에서 자매염색분체교환 빈도가 통계적으로 유의하게 증가하였으며(p<0.05), DES의 경우에도 100, 300 µM에서 통계적으로 유의한 증가를 보였다(p<0.05). 또한 χ^2 를 이용한 trend test에서도 유의한 증가를 보였다.

소핵분석

대조군과 비스페놀 A 10, 20, 50, 100, 300 µM의 농도

Table 3. The frequency of Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by Bisphenol A

Dose	No. of cells scored	SCE / cell (mean±S.E.)	Range
control	60	2.55±0.20	0-8
10 µM	60	2.70±0.20	0-8
20 µM	60	2.88±0.22	0-8
50 µM	60	2.85±0.20	0-8
100 µM	60	3.35±0.24*	1-8
300 µM	60	3.81±0.25**	1-11

χ^2 test (20.013), p=0.000

*Observed value is significantly higher than control value. (p<0.05).

**Observed value is significantly higher than control value. (p=0.000).

Table 4. The frequency of Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by Diethylstilbestrol

Dose	No. of cells scored	SCE / cell (mean±S.E.)	Range
Control	60	2.55±0.20	0-8
10 µM	60	2.92±0.22	0-8
20 µM	60	2.95±0.22	0-8
50 µM	60	3.00±0.21	0-8
100 µM	60	3.20±0.25*	0-7
300 µM	60	4.13±0.24**	1-11

χ^2 test (25.791), p=0.000

*Observed value is significantly higher than control value. (p<0.05).

**Observed value is significantly higher than control value. (p=0.000).

에서 2000개의 binucleated cell당 소핵발생은 각각 5, 12, 12, 14, 32, 31이었고, DES의 경우에는 같은 농도에서 2000개의 BN에서 각각 5, 3, 6, 6, 13, 21이었다(Table 5, Table 6). 또한 비스페놀 A와 DES에 의한 소핵발생은 통계적으로 유의한 양-반응관계를 보였다.

DNA 손상 분석

비스페놀 A와 DES를 농도를 달리하여 3시간 처리 하였

Table 2. The frequency of chromosome aberration in human lymphocytes induced by Diethylstilbestrol

Treatment	No. of cells counted	Aberrant cells / 200 cells	Structural Aberration / 200 cells					
			Chromatid type			Chromosome type		
			exchange	deletion	total	exchange	deletion	total
c	200	2	0	2	2	0	0	0
10	200	4	0	4	4	0	0	0
20	200	4	0	4	4	0	0	0
50	200	4	0	3	3	1	0	1
100	200	4	0	3	3	1	0	1
300	200	6	0	5	5	1	0	1
Kendall's τ^*		0.031		0.018	0.018	0.039		0.039
p		0.227		0.478	0.478	0.127		0.127

*Kendall's τ was calculated on cell bases.

Table 5. The frequency of Micronucleus in human lymphocytes induced by Bisphenol A

Dose	No. of binucleated cells	No. of binucleated cell with MN					Total No. of MN
		No. of MNCB	MN=1	MN=2	MN=3	MN=4	
0	2,000	4	3	1	0	0	5
10 μ M	2,000	11	10	1	0	0	12
20 μ M	2,000	11	10	1	0	0	12
50 μ M	2,000	12	10	2	0	0	14
100 μ M	2,000	23	17	4	1	1	32
300 μ M	2,000	23	18	3	1	1	31
Kendall's τ^*		0.034					0.044
p		0.000					0.000

*Kendall's τ was calculated on cell bases.

Table 6. The frequency of Micronucleus in human lymphocytes induced by Diethylstilbestrol

Dose	No. of binucleated cells	No. of binucleated cell with MN					Total No. of MN
		No. of MNCB	MN=1	MN=2	MN=3	MN=4	
0	2,000	4	3	1	0	0	5
10 μ M	2,000	3	3	0	0	0	3
20 μ M	2,000	6	6	0	0	0	6
50 μ M	2,000	6	6	0	0	0	6
100 μ M	2,000	14	14	0	0	0	14
300 μ M	2,000	14	10	2	1	1	21
Kendall's τ^*		0.029					0.036
p		0.001					0.000

*Kendall's τ was calculated on cell bases.

Table 7. Induction of DNA damage in human lymphocytes by Bisphenol A

Dose	No. of cell	Tail length (μ m)	
		Mean \pm S.E.	Median
0	60	16.45 \pm 1.41	10.92
10 μ M	60	18.62 \pm 1.91	12.22
20 μ M	60	18.97 \pm 1.59	14.23
50 μ M	60	20.85 \pm 1.93	13.51
100 μ M	60	20.75 \pm 1.74	14.77
300 μ M	60	29.73 \pm 3.11*	18.62

*Significant at p=0.000 (Mann-Whitney).

Table 8. Induction of DNA damage in human lymphocytes by DES

Dose	No. of cell	Tail length (μ m)	
		Mean \pm S.E.	Median
0	60	16.45 \pm 1.41	10.92
10 μ M	60	19.73 \pm 2.20	11.28
20 μ M	60	21.85 \pm 1.59**	17.01
50 μ M	60	23.70 \pm 1.89**	17.54
100 μ M	60	23.28 \pm 2.26*	15.21
300 μ M	60	31.08 \pm 2.15**	26.89

*Significant at p=0.01 (Mann-Whitney).

**Significant at p=0.000 (Mann-Whitney).

을 때 Table 7, 8에서 보는 바와 같이 300 μ M에서만 비스페놀 A에 의한 DNA 손상이 유의하게 높았으며 DES의 경우에는 10 μ M을 제외하고는 모든 농도에서 유의하게 DNA 손상을 증가시켰다. 전체적으로는 비스페놀 A 보다 DES가 DNA 손상을 더 많이 일으키는 것으로 나타났다.

토 의

내분비장애물질(Endocrine disruptors)이란 생체내 항상성 유지와 성장발육을 조절하는 호르몬의 생산, 분비, 운반, 대사, 반응체와의 결합, 작용기작 등을 교란시키는 유해화학물질을 일컫는데(Bigsby *et al.*, 1999) 이들이 생체내로 유입되면 마치 호르몬과 같이 작용한다 하여 환경호르몬으로 불리고 있다. 여러 가지 야생생물에서 갑상선의 기능이상, 임신능력의 저하, 생식행동이상, 생식기의 기형, 탈 수컷 및 암컷 화 및 면역기능의 저하 등이 보고되어 있지만 사람에게서도 이러한 영향이 나타날 것인지는 불분명하다.

비스페놀 A는 에폭시, 폴리카보네이트와 여러 수지의 주요 구성분으로 사용되고 있다. 이는 100 μ M이상에서 세포의 성장을 감소시키는 것으로 알려져 있으며 또한 200 μ M까지는 배양된 syrian hamster embryo cells에서 colony

형성 효율에 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다 (Tsutsui *et al.*, 1998). 또한 비스페놀 A는 체내에 들어오게 되면 비스페놀-*o*-퀴논으로 산화한 뒤 DNA나 dGMP에 결합하여 adducts를 형성하는데 이러한 결합은 cytochrome P450에 의해 억제될 수 있다(Atkinson & Roy, 1995a, 1995b). Pfeiffer E(1997) 등에 의하면 비스페놀 A는 잠재적으로 이수성을 유발하는 물질로 분류되고 있다. 본 연구에서 비스페놀 A는 소핵의 빈도를 증가시키는 것으로 확인되었으며 염색체의 구조적 이상도 유발하는 것으로 나타났다. 즉 소핵은 염색체의 수적 이상 뿐만 아니라 구조적 이상도 반영해 줄 수 있기 때문에 비스페놀 A는 aneuploidogen 및 clastogen으로도 작용하는 것을 알 수 있다(Hilliard *et al.*, 1998, Tsutsui *et al.*, 1998). 또한 비스페놀 A는 자매 염색분체교환을 유발하였으며 DNA 단일가닥 절단을 유발하는 등 DNA에 직접적으로 손상을 미친다는 것을 알 수 있었지만 다른 연구결과가 없기 때문에 비교 할 수는 없다.

DES는 강력한 합성 여성호르몬으로 각종 역학조사에서 이미 그 발암성이 밝혀진 바가 있다(Cranmer *et al.*, 1977, Imaida & Shirai, 2000, Vessey *et al.*, 1989). DES는 소핵 및 염색체의 수적 이상을 유발하며 염색체의 구조적 이상도 유발하나 그 정도가 훨씬 덜하다고 알려져 있으며 (Stoppelaar *et al.*, 2000), 비스페놀 A와 같이 유사분열 동안 spindle에 손상을 끼치는 것으로 알려져 있다(Ochi *et al.*, 1999). Wheeler 등(1987)도 DES를 잠재적인 유사분열 저해제로 지적하면서, 유사분열동안 spindle assembly를 억제하며 cytoplasmic microtubule complex를 분리시킴을 밝힌 바 있다. DES에 의해 유발된 소핵은 대부분이 centromere를 포함하는 것으로 보아 이수성을 유발하는 aneuploidogen으로 보고되고 있는데(Migliore *et al.*, 1996), Eastmond & Tucker(1989)도 DES의 aneuploidogen으로의 특성을 강조한 바 있다. 마우스의 경우 감수분열시 DES에 폭로되면 세포 분열이 저해되고(Can & Semiz, 2000), 비스페놀 A와 마찬가지로 대사활성화에 의해 DNA adducts를 유발하는 것으로 알려져 있다(Hayashi *et al.*, 1996). 본 연구에서는 DES에 의해 염색체의 구조적 이상이 약하게 유발되는 것을 관찰하였으며 특히 50 μ M 이상에서는 교환형 염색체이상인 이동원염색체도 관찰되었으나 Banerjee 등(1994)은 염색체 수준에서의 교환이 증가되지 않는다고 보고하여 본 연구와 상이한 결과를 보여주고 있다. DES가 사람 림프구에서 자매염색분체교환을 일으킨다는 보고가 있지만(Lungren *et al.*, 1988), 태아세포에서만 유발한다는 보고도 있고(Sharma *et al.*, 1985) 또한 산모와 신생아에서 모두 자매염색분체교환에 영향을 주지 않는다는 보고(Chen *et al.*, 1987)도 있어 일관성 있는 연구결과가 보고되지 않고 있다. 본 연구에서는

DES의 농도에 따라 자매염색분체 교환빈도가 증가되는 양상을 보였으며 특히 100 μ M 이상에서는 통계적으로 유의한 결과를 보여주었다. 또한 본 연구결과 DES는 낮은 농도에서도 DNA 단일가닥 절단을 유발하였으며 Anderson 등(1997)도 같은 결과를 보고한 바 있다. Comet head의 core에서 tail까지의 거리인 tail length를 측정된 본 연구에서 대조군에서의 16.45 μ m는 McNamee 등(2000)에 의한 결과와 비슷하였으며 본 연구실에서 이전에 수행된 연구결과와는 약간의 차이를 보이고 있으나 이는 실험조건이나 기증자에 따라 달라질 수 있다. 본 연구에서 사용된 두 물질의 농도는 독성물질에 의한 DNA의 손상정도를 측정하는 일반적인 실험에 사용된 농도에 비해 높았기 때문에 비스페놀 A와 DES가 일반독성물질 만큼 DNA 손상을 입힌다고는 볼 수 없다.

또한 본 연구에서 소핵에서는 비스페놀 A가 DES보다 높은 수치를 보였으며 자매염색분체교환과 DNA손상에서는 반대양상을 보였다. 소핵은 염색체 이상이 있었음을 의미하기도 하지만 그보다는 방추체의 손상으로 인해 형성되는 경우가 많기 때문에 DES가 DNA 자체 또는 염색체상의 손상을 더 일으키는 것에 반해 비스페놀 A는 DES 보다 방추체의 손상을 더 유발하는 것으로 보인다.

참고문헌

- Anderson, D., Dobrzynska, M.M. and Basaran, N. (1997): Effect of various genotoxins and reproductive toxins in human lymphocytes and sperm in the Comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen* 17(1), 29-43.
- Atkinson, A. and Roy, D. (1995a): *In vitro* conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite(s). *Biochem Biophys Res Commun* 210(2), 424-433.
- Atkinson, A. and Roy, D. (1995b): *In vivo* DNA adduct formation by bisphenol A. *Env and Mol Mutagenesis* 26(1), 60-66.
- Banduhn, N. and Obe, G. (1985): Mutagenicity of methyl 2-benzimidazolecarbamate, diethylstilbestrol and estradiol: structural chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, C-mitoses, polyploidies and micronuclei. *Mutat Res* 156(3), 199-218.
- Banerjee, S.K., Banerjee, S., LI, S.A. and LI, J.J. (1994): Induction of chromosome aberrations in Syrian hamster renal cortical cells by various estrogens. *Mutat Res* 311(2), 191-197.
- Bigby, R., Chapin, R.E., Daston, G.P., Davis, B.J., Gorski, J., Gray, L.E., Howdeshell, K.L., Zoeller, R.T. and vom Saal, F.S. (1999) : Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 4, 613-618.
- Can, A. and Semiz, O. (2000): Diethylstilbestrol (DES)-induced cell cycle delay and meiotic spindle disruption in mouse oocytes during *in-vitro* maturation. *Mol Hum Reprod* 6(2),

- 154-162.
- Chen, X., Schmidt, B. and Dunkelberg, H. (1987): The induction of sister chromatid exchange by diethylstilbestrol and mitomycin C in lymphocytes of mothers and their newborn infants. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* **184**(1), 78-86.
- Cranmer, M.F. (1977): Estimation of risks due to environmental carcinogenesis. *Med Pediatr Oncol* **3**(2), 169-198.
- Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989): Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen* **13**(1), 34-43.
- Fauth, E., Scherthan, H. and Zankl, H. (2000): Chromosome painting reveals specific patterns of chromosome occurrence in mitomycin C- and diethylstilbestrol-induced micronuclei. *Mutagenesis* **15**(6), 459-467.
- Fenech, M. (1993): The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population. *Mutat Res* **285**, 35-44.
- Hayashi, N., Hasegawa, K., Komine, A., Tanaka, Y., McLachian, J.A., Barrett, J.C. and Tsutsui, T. (1996): Estrogen-induced cell transformation and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells. *Mol Carcinog* **16**(3), 149-156.
- Hill, A. and Wolff, S. (1983): Sister chromatid exchanges and cell division delays induced by diethylstilbestrol, estradiol and estriol in human lymphocytes. *Cancer Res* **43**(9), 4114-4118.
- Hilliard, C.A., Armstrong, M.J., Bradt, C.I., Hill, R.B., Greenwood, S.K. and Galloway, S.M. (1998): Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons. *Environ Mol Mutagen* **31**(4), 316-326.
- Imaida, K. and Shirai, T. (2000): Endocrine disrupting chemicals and carcinogenesis - breast, testis and prostate cancer. *Nippon Rinsho* **58**(12), 2527-2532.
- Ivett, J.L., Brown, B.M., Rodgers, C., Anderson, B.E., Resnick, M.A. and Zeiger, E. (1989): Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro*. IV. Results with 15 chemicals. *Environ Mol Mutagen* **14**(3), 165-187.
- Lundgren, K., Randerath, K. and Everson, R.B. (1988): Role of metabolism and DNA adduct formation in the induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes by diethylstilbestrol. *Cancer Res* **48**(2), 335-338.
- McNamee, J.P., McLean, J.R., Ferrarotto, C.L. and Bellier, P.V. (2000): Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutat Res* **466**(1), 63-69.
- Migliore, L., Cocchi, L. and Scarpato, R. (1996): Detection of the centromere in micronuclei by fluorescence in situ hybridization: its application to the human lymphocyte micronucleus assay after treatment with four suspected aneugens. *Mutagenesis* **11**(3), 285-290.
- Ochi, T. (1999): Induction of multiple microtubule-organizing centers, multipolar spindles and multipolar division in cultured V79 cells exposed to diethylstilbestrol, estradiol-17beta and bisphenol A. *Mutat Res* **431**(1), 105-121.
- Perry, P.E. (1984): The Methodology of Sister Chromatid Exchange. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd edn., Elsevier Scientific, Amsterdam* 495-530.
- Pfeiffer, E., Rosenberg, B., Deuschel, S. and Metzler, M. (1997): Interference with microtubules and induction of micronuclei *in vitro* by various bisphenols. *Mutat Res* **390**(1-2), 21-31.
- 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), 1-29.
- Schnitzler, R., Foth, J., Degen, G.H. and Metzler, M. (1994): Induction of micronuclei by stilbene-type and steroidal estrogens in Syrian hamster embryo and ovine seminal vesicle cells *in vitro*. *Mutat Res* **311**(1), 84-93.
- Sharma, R.K., Jacobson-Kram, D., Lemmon, M., Bakke, J., Galperin, I. and Blazak, W.F. (1985): Sister-chromatid exchange and cell replication kinetics in fetal and maternal cells after treatment with chemical teratogens. *Mutat Res* **158**(3), 217-231.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**, 184-191.
- Stoppelaar, J.M., Faessen, P., Zwart, E., Hozeman, L., Hode-maekers, H., Mohn, G.R. and Hoebee, B. (2000): Isolation of DNA probes specific for rat chromosomal regions 19p, 19q and 4q and their application for the analysis of diethylstilbestrol-induced aneuploidy in binucleated rat fibroblasts. *Mutagenesis* **15**(2), 165-175.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E., Hasegawa, K., Takahashi, M., Maizumi, N., Yamaguchi, F. and Barrett, J.C. (1998): Bisphenol A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured syrian hamster embryo cells. *Int. J. Cancer* **75**, 290-294.
- Verthelyi, D. and Klinman, D.M. (2000): Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells *in vivo*. *Immunology* **100**(3), 384-390.
- Vessey, M.P. (1989): Epidemiological studies of the effects of diethylstilboestrol. *IARC Sci Publ* **96**, 335-348.
- Wheeler, W.J., Hsu, T.C., Tousson, A. and Brinkley, B.R. (1987): Mitotic inhibition and chromosome displacement induced by estradiol in Chinese hamster cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **7**(3), 235-247.