

마우스에서 bisphenol A 노출로 인한 면역병리학적 연구

변정아 · 표명윤
숙명여자대학교 약학대학

Immunopathological studies in mice exposed to bisphenol A

Jung A Byun, Myoung Yun Pyo
College of Pharmacy, Sookmyung Women's University

(Received December 16, 2002 / Accepted December 31, 2002)

ABSTRACT : Bisphenol A (BPA) is a monomer widely used in the manufacturing polycarbonate plastics or epoxy resin, and xenobiotics recently known as endocrine disrupting chemical. In this paper, to assess the effects of bisphenol A on immunopathological parameters (body weight, organ weight, hematological parameters, cellularity and surface marker) in mice, ICR female mice were orally exposed to BPA dissolved in olive oil as concentrations of 100, 500, 1000 mg/kg/day b.w. 5 days a week for 30 days (subacute exposure). Liver - and kidney - weight was significantly increased as dose-dependent manner, but body- , spleen- and thymus- weight didn't changed. In hematological parameters, WBC and MCHC were lowered but HCT and MCV were significantly enhanced. There was no significant differences in peritoneal macrophages number of the mice exposed to BPA. However, number of splenocytes of spleen, CD3⁺ and CD4⁺ cell in splenocytes, CD4⁺ and CD8⁺ cell in thymocytes were decreased at the mice subacutely exposed to BPA. In addition, BPA decreased expression of B7-1 and B7-2 on macrophages. Therefore, these results showed BPA may affect hematological parameters, cellularity and surface marker of immunocytes.

Keywords : Bisphenol A, organ weight, hematological parameters, cellularity, surface marker

서 론

Bisphenol A(BPA: 4,4'-isopropylidenediphenol)는 치과용 수지, 식품포장재, 캔, 병마개 등에 이용되는 epoxy resin이나 polycarbonate제조에 사용되는 monomer로서 국내에서는 연간 약 3만 5천톤이 생산되고 점차 생산량이 증가되는 추세이다. BPA는 주로 제조과정이나 사용 중에 지표수로 유입되어 환경에 노출되며 물에 가장 많이 분포되어 있고 다음으로 토양, 침전물 순서로 분포되어 있는 것으로 보고되었다(Staples 등, 1998).

BPA는 *in vitro* 실험에서 estrogen 작용(Chen 등, 2002)이 많이 보고되어 있을 뿐 아니라 BPA투여에 의해 uterotrophic activity(Papaconstantinou 등, 2000)를 나타내거나 estrogenic effect에 특이적 biomarker인 혈청 중의 alpha2u-globulin이 감소(Yamasaki 등, 2002)되고, 폐경기 이후의 암컷 마우스에서 골 손실(bone loss)을 감소시키는(Toda 등, 2002) 등 동물실험에서도 estrogen 효과가 확인

된 내분비계 장애물질이다. BPA는 estrogen과 같이 estrogen receptor(ER)(Sakazaki 등, 2002)와 low-affinity estrogen binding site(Washington 등, 2001)에 결합하며, ER α 에는 agonist와 antagonist로 작용하고 ER β 에는 agonist로만 작용(Hiroi 등 1999)하는 등 estrogen의 작용보다 더 복잡한 양상을 가지고 있다. 지금까지 보고된 바에 의하면 BPA는 estrogen 작용외에도 unscheduled DNA(Takahashi 등, 2001)나 chromosome aberration(Hiliard 등, 1998)을 유발하거나 CD1 수컷 마우스(Atkinson 등, 1995)에서 DNA adduct 형성을 유발하는 등의 유전독성을 나타낸다. 또한, 송사리의 산란량과 부화율을 저하시키고(김 등, 2000) 실험 동물에서 수컷의 생식능(Moon 등, 2001)이나 정자수(AI-Hiyasat 등, 2002)를 감소시키며 자손의 수와 생존율을 저하(Tyl 등, 2002)시키는 등의 생식독성을 유발하는 것으로 보고되어 있다.

또한, 내분비계 장애물질이 야생동물이나 인류의 생식, 정신기능의 장애와 교란을 유발할 뿐 아니라 면역기능장애도 일으킬 수 있으며, 그 예로 methoxychlor, kepone, DDT, diethylstilbestrol 등이 estrogenic activity를 나타내고 체액

*To whom correspondence should be addressed

성 면역과 세포성 면역계를 억제하거나 암이나 감염에 대한 저항성을 감소시킨다고 보고 (Dayan 등, 1990)되었으며, 최근에는 TCDD(Kerkvlet, 2002)나 PCB(Daniel 등, 2001)등도 면역계에 영향을 나타낸다고 보고되고 있다. 그러나, bisphenol A의 발암성이나 유전독성 및 생식독성 등에 대한 연구에 비해 생체내의 면역독성에 대한 연구는 거의 보고되지 않고 있다. 그러므로 bisphenol A가 생체내의 면역계에 미치는 영향을 체계적으로 연구하고자, 본 연구에서는 bisphenol A를 실험동물인 마우스에 아급성 노출시킨 후 일차적으로 면역병리학적인 parameter를 측정하였다.

재료 및 방법

실험동물

3-4주령인 ICR계 암컷 마우스를 유한양행중앙연구소로부터 분양받아 삼양사에서 구입한 고품사료와 물을 자유롭게 공급하면서 실험 동물실에서 2-3주간 적응시킨 후, 건강상태가 양호한 5-7주령(25±2 g)의 마우스를 실험에 사용하였다. 실험동물실의 온도는 21-24°C, 습도는 40-60%로 유지하였고 조명은 12시간 간격으로 조정하였다.

실험물질 조제 및 투여

실험물질 bisphenol A(BPA, 순도 99%)는 Aldrich 제품(USA)을 구입하여 마우스 체중 10 g당 0.1 ml 투여할 수 있는 농도로 올리브 기름에 용해 조제하여 사용하였다. BPA의 투여 용량을 결정하기 위하여 ICR 암컷 마우스에 용량별로 BPA를 1회 경구투여한 후 Litchfield & Wilcoxon법 (Tallarida 등, 1981)을 이용하여 LD₅₀을 산출한 결과, LD₅₀은 4.61 g/kg(신뢰한계 4466~5434 mg/kg, P=0.05)이었다.

이와같이 산출된 BPA의 LD₅₀와 EPA의 면역독성시험 지침서(EPA, 1996)를 기준으로 정한 100, 500, 1000 mg/kg/day 용량을 마우스에 주 5회 30일간 경구투여한 후 32일째에 모든 실험을 하였다. 모든 실험의 대조군에는 동량의 올리브기름을 같은 방법으로 투여하였다.

체중 및 장기무게 변화 측정

실험시작하기 전 약 16시간동안 절식하여 체중을 측정하였으며, 체중변화는 BPA 투여일의 체중을 기준으로 하여 실험일의 증가된 체중으로 나타내었다. 또한, 각 장기무게 변화는 실험일에 실험동물의 비장, 흉선, 간장, 신장을 적출하여 각각의 무게를 실험일의 체중에 대한 백분율 (%)로 나타내었다.

혈액학적 parameter 측정

마우스의 안정맥총에서 heparinized capillary(Chase instruments

Co.)로 채혈하여 EDTA(K3)가 들어있는 시험관(Sherwood medical)에 취하고 roll mixer로 혼화한 후 WBC(white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin), HCT(hematocrit), MCV(mean corpuscular volume), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration), PLT(platelet)를 Coulter counter(T-890, Coulter)로 측정하였다. Coulter counter는 사용 전에 4C plus(Ⓢ) 액으로 WBC, RBC, HGB, HCT, PLT값을 표준용액에 맞게 보정한 후 혈액을 분석하였다.

비장세포수 및 복강 대식세포수 측정

실험동물의 비장을 적출하여 병냉의 HBSS에 넣고 frosted microscope slides(Fisher Scientific)를 이용하여 만든 세포액을 원심분리(1000 rpm, 10 min, 4°C)하고 비장세포침전물에 RBC lysis buffer를 가하여 적혈구를 용혈시킨 후 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 침전된 비장세포에 일정량의 HBSS용액을 가한 후 Turk's 용액(Mishell 등, 1980)으로 비장세포수를 측정하였다. 또한, 실험동물의 복강내에 병냉의 DMEM 배지 8 ml를 주입하여 마사지 한 다음 복강내의 세포액을 취하여 원심분리(2000 rpm, 5 min., 4°C)한 후 침전물에 0.2%의 NaCl을 가하여 적혈구를 용혈시키고 PBS로 2회 세척하였으며 Turk's 용액을 이용하여 복강 대식세포수를 측정하였다.

비장세포 및 흉선세포의 표면항원 분석

BPA로 아급성 노출된 마우스의 비장 또는 흉선을 적출하여 각각의 세포액을 조제하여 trypan blue exclusive method (Dolye 등, 1993)를 이용하여 1×10⁷ cells/ml로 조정하였다. Staining buffer(0.1% NaN₃, 5% FBS가 함유된 PBS) 2 ml가 있는 flow tube에 세포액 100 μl를 가한 후 원심분리(1500 rpm, 10 min, 4°C)하였다. 상등액을 제거한 다음 purified anti mouse CD16/CD32(FcγIII/IIreceptor) 100 μl를 가한 후 혼화하여 30분간 4°C에서 방치하였다. FITC anti-mouse CD3e(CDεchain, 145-2c11)와 PE anti-mouse CD19(1D3) 용액을 각각 100 μl(1 μg/10⁶cells)를 가하거나 FITC anti-mouse CD3e(CDεchain, 145-2c11), PE anti-mouse CD4(L3T4, RM4-5), Cy-chromeTM anti-mouse CD8a(Ly-2)를 각각 100 μl(1 μg/10⁶cells) 가하여 혼화한 후 차광상태로 하여 30분간 4°C에서 방치하였다. Staining buffer 2 ml를 가하여 원심분리하고 상등액을 제거하는 조작을 3회 반복한 후 1% paraformaldehyde 300 μl를 가하여 염색된 세포를 고정 한 다음 차광상태로 4°C에 보관하여 FACScan(Coulter Electronics)을 이용하여 비장세포종의 CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺, CD19⁺ 세포 및 흉선세포종의 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ 세

포비율을 분석하였다.

복강 대식세포의 B7분자 발현 분석

BPA로 아급성 노출된 마우스의 복강 대식세포를 얻어 trypan blue exclusive method를 이용하여 1×10^7 cells/ml로 조정된 후 staining buffer(0.1% NaN_3 , 5% FBS 가 함유된 PBS) 2 ml가 있는 flow tube에 세포액 100 μl 를 가하여 원심분리(1500 rpm, 10 min, 4°C)하였다. 상등액을 제거한 후 purified anti mouse CD16/CD32(Fc γ RII/IIIreceptor) 100 μl 를 가한 후 혼화하여 30분간 4°C에서 방치하였다. FITC anti-mouse F4/80 antigen와 PE anti-mouse CD80(B7-1) 또는 PE anti-mouse CD86(B7-2)을 각각 100 μl (1 $\mu\text{g}/10^6$ cells)를 가하고 혼화한 후 차광상태로 하여 30분간 4°C에서 방치하였다. Staining buffer 2 ml를 가하고 원심분리하여 상등액을 제거하는 조작을 3회하여 반복하여 세척하고 1% paraformaldehyde 300 μl 를 가하여 염색된 세포를 고정한 다음 차광상태로 4°C에 보관하였으며, FACScan을 이용하여 B7-1과 B7-2 molecule의 발현정도를 분석하였다.

통계처리

각 실험군의 측정값의 평균과 표준편차를 구하고, 대조군과의 차이를 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

체중과 장기무게에 미치는 영향

BPA를 100, 500, 1000 mg/kg/day 용량으로 주 5회 경구투여하여 30일간 아급성 노출시킨 후 32일째에 체중과 체중에 대한 장기중량비의 결과는 Table 1과 같다.

BPA에 노출된 실험동물의 체중증가는 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었으나 유의성있는 차이는 보이지 않았고, 30일간 섭취한 사료량 및 흉선과 비장의 중량비는 대조군과 유사하였다.

간장과 신장의 중량비는 BPA의 농도에 의존적으로 유의성있게 증가하였고, 간장이나 신장의 무게도 대조군에 비하

여 증가하여 간장과 신장 중량비의 증가가 체중감소 때문이 아님을 알 수 있었다. 보고 된 바에 의하면, Cagen 등(1999)은 암컷 CF-1 마우스에 BPA를 경구투여 한 결과 사료섭취량이나 체중, 장기무게에 영향을 나타내지 않았다고 보고하였으나, B6C3F1 마우스에 BPA를 13주간 투여한 연구에서는 체중증가율과 사료섭취량이 감소하였다(Furukawa 등, 1994). 이와 같이 BPA가 아급성으로 노출로 인하여 체중, 사료섭취량 및 장기무게 등에 대한 영향이 다르게 나타나는 것은 사용된 실험동물, 투여량 및 투여기간이 각각 다르기 때문으로 보이며 일정 용량이상으로 BPA에 노출되면 체중과 간장의 중량비에 영향을 줄 것으로 생각된다. Yamasaki 등(2002)은 SD랫드에 BPA를 600 mg/kg/day으로 28일간 투여한 결과, 혈액 중의 glutamic-pyruvic transaminase (GPT), total cholesterol, alkaline phosphatase, γ -glutamyl transferase(γ -GTP), chloride가 유의성있게 감소된다고 보고하였고, 간의 대사효소에도 영향을 준다고 보고(Yokota 등, 1999) 되었으며, 본 연구에서는 간의 무게가 증가되는 것이 관찰되어 BPA의 간독성의 기전에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

혈액학적 parameter에 미치는 영향

BPA를 100, 500, 1000 mg/kg/day 용량으로 주 5회 경구투여하여 30일간 아급성 노출시킨 후 32일째에 안정맥총에서 채혈하여 순환말초혈관내의 혈액학적 parameters를 분석한 결과는 Table 2와 같다. 500, 1000 mg/kg/day 용량의 경우 백혈구 수가 각각 $8.8 \times 10^3/\text{mm}^3$, $8.6 \times 10^3/\text{mm}^3$ 으로 대조군($9.2 \times 10^3/\text{mm}^3$)에 비해 약간 감소하였으나 유의성은 보이지 않았다. 적혈구 용적을 의미하는 HCT는 500, 1000 mg/kg/day 용량에서 대조군에 비해 각각 18.3%, 23.2% 농도의존적으로 증가하여 유의성있는 ($p < 0.01$) 차이를 보였으며 적혈구의 평균용적을 나타내는 MCV도 1000 mg/kg/day 용량에서 대조군에 비해 13.2%가 증가하여 유의성있는 ($p < 0.05$) 차이를 나타내었다. 적혈구의 혈색소 평균농도인 MCHC는 고용량에서 감소되는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 적혈구(RBC)수, hemoglobin(HGB), 적혈구

Table 1. Body - and organ - weight in mice subacutely exposed to BPA.

Exp. Groups (mg/kg/day)	B.W. gain (g)	Food (g)	Spleen (%)	Thymus (%)	Liver (%)	Kidney (%)
Control	4.15±0.40	396±50	0.48±0.12	0.14±0.03	4.78±0.57	1.33±0.09
100	4.13±0.45	416±38	0.46±0.09	0.15±0.03	4.90±0.52	1.34±0.09
500	3.86±0.43	401±52	0.48±0.11	0.14±0.02	5.49±0.49*	1.41±0.08
1000	3.79±0.42	399±27	0.49±0.08	0.14±0.03	5.90±0.59**	1.49±0.07**

BPA was orally administered to ICR mice (100, 500, 1000 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. B.W gain=final weight-initial weight. Changes of organ weight=(organ weight/body weight)×100. Results are the means±S.E. of 7 separate experiments (5 mice/group/experiment). Significant difference from control group(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Table 2. Hematological parameters in mice subacutely exxposed to BPA

Parameters	Hematological Doses of BPA (mg/kg/day)			
	Control	100	500	1000
WBC ($10^3/mm^3$)	9.2±1.4	9.3±1.4	8.8±1.0	8.6±1.9
RBC ($10^3/mm^3$)	7.3±0.6	7.6±0.6*	7.2±0.3	7.3±0.3
HG3 (g/dl)	12.6±1.4	12.7±1.4	11.9±1.0**	12.2±1.2
HCT (%)	42.7±7.5	46.5±11.6	50.5±14.7**	52.6±14.3**
MCV (μm^3)	64.5±20.6	66.2±21.6	71.0±22.5	73.0±23.2*
MCH (pg)	16.8±1.2	16.8±1.1	16.7±1.0	16.7±1.2
MCHC (g/dl)	28.7±8.3	28.0±8.6	25.7±9.1	25.7±9.0
PLI ($10^3/mm^3$)	1006±197	942±114*	1055±117	1035±208

BPA was orally administered to ICR mice (100, 500, 1000 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. Results are the means±S.E. of 2 separate experiments (3 mice/group/experiment). Significant difference from control group (*p<0.05, **p<0.01).

평균 혈색소(MCH), 혈소판(PLT)은 큰 변화가 없었다. 그러나, BPA에 의한 용혈작용이 보고(Larson 등, 1977)된 바 있어 BPA가 혈액성분에 영향을 미치는 것을 시사해 주고 있다.

비장세포수 및 복강 대식세포수에 미치는 영향

BPA를 100, 500, 1000 mg/kg/day 용량으로 30일간 경구적으로 아급성 노출시킨 후 32일째에 비장세포수 및 복강 대식세포수를 측정된 결과는 Fig. 1과 Fig. 2에 나타난 바와 같다. Fig. 1에서 보는 바와같이 100, 500 mg/kg/day 용량으로 투여한 경우에는 비장세포수가 대조군과 거의 유사하였으나 고용량인 1000 mg/kg/day 투여군에서 대조군에 비해 30.8% 유의성있는 (p<0.01) 감소를 나타내었다. 그러나, 복강 대식세포수는 모든 용량에서 대조군과 거의 차이가 없는 결과를 보였다(Fig. 2).

비장세포 표면항원 분석

마우스에 BPA를 100, 500, 1000 mg/kg을 30일간 경구 투여한 후 32일째에 비장세포액을 조제하여 비장세포에 발현된 CD3⁺, CD19⁺, CD4⁺, CD8⁺ 비율을 분석하여 Table 3과 Fig. 3에 나타내었다. BPA 100, 500, 1000 mg/kg/day 투여군에서 CD3⁺ 비율은 대조군(44.3%)에 비해 각각 43.5%, 42.4%, 37.0%로 감소하였으나 CD19⁺ 비율은 BPA의 모든 용량에서 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 그러므로, BPA의 아급성노출에 의해 비장세포종의 T 세포수가 감소하고 B 세포 수는 다소 증가하는 것으로 보인다. 또한, CD4⁺CD8⁺ 비율은 변화를 보이지 않으나 CD4⁺CD8⁻ T cell의 비율은 고농도에서 감소하는 경향을 나타내어 BPA가 cytotoxic T cell보다 helper T cell에 영향을 나타내는 것으로 보인다. 그러므로 BPA의 아급성노출에 의해 마우스 비장의 T cell과 B cell의 비율 뿐 아니라 T cell의 분화에

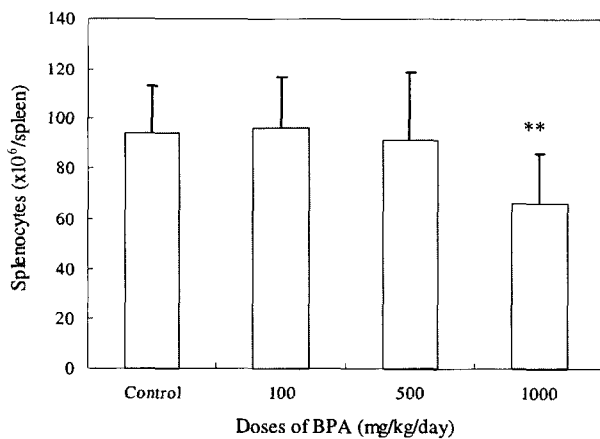


Fig. 1. Spleen cellularity in mice subacutely exposed to BPA. BPA was orally administered to ICR mice (100, 500, 1000 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. Results are means±S.D. of 9 separate experiments (3 mice/group/experiment). Significant difference from control group (** p<0.01).

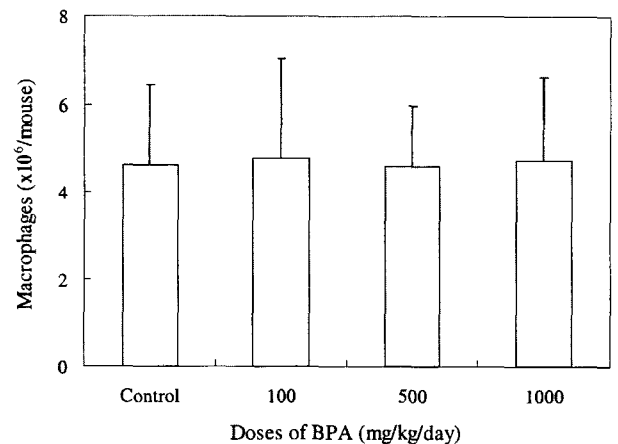


Fig. 2. Peritoneal macrophages number in mice subacutely exposed to BPA. BPA was orally administered to ICR mice (100, 500, 1000 mg/kg/day) for 30 days. Peritoneal macrophages were collected on day 32. Results are the means ±S.E. of 7 separate experiments (3 mice/group/ experiment).

Table 3. Percentages of T cell and B cell population of spleen obtained from mice subcutely exposed to BPA

Cell marker	Doses of BPA (mg/kg/day)			
	Control	100	500	1000
CD3 ⁺	44.3±4.6	43.5±5.4	42.4±6.2	37.0±6.0
CD19 ⁺	46.4±5.1	47.3±5.8	47.2±5.8	49.6±7.8
CD4 ⁺ CD8 ⁻	29.3±2.7	29.3±4.2	26.9±5.4	26.5±7.5
CD4 ⁻ CD8 ⁺	7.7±2.0	8.2±1.4	7.7±2.0	8.4±3.1

BPA was orally administered to ICR mice (100, 500, 1000 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. Percentages of the different lymphocytes subsets in splenocytes were analyzed by FACScan. Results are the means±S.E. of 5 separate experiments (5 mice/group/experiment).

영향을 주어 subpopulation이 변화하였고, BPA에 의하여 helper T cell의 비율이 감소되어 helper T cell의 작용이 감소될 뿐 아니라 helper T cell의 작용을 받는 B cell, macrophages 등 다른 면역세포에도 간접적인 영향을 미칠 것으로 생각된다.

흉선세포 표면항원분석

마우스에 BPA를 100, 500, 1000 mg/kg을 주 5회 30일간 경구투여한 후 32일째에 흉선세포액을 조제하여 흉선세포에 발현된 CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ 비율을 분석하여 Table 4에 나타내었다. Table 4에서 보는 바와 같이 CD4⁺CD8⁻ cell의 비율은 저용량에서는 대조군과 거의 같으나 500 및 1000 mg/kg 용량에서 각각 15.7%, 12.1%로 나타나 대조군 (17.8%)에 비해 각각 감소되었고, CD4⁻CD8⁺ 세포의 비율은 투여용량에 관계없이 대조군에 비해 감소되었다. 그러나, CD4⁺CD8⁺ T cell의 비율은 500 mg/kg투여군에서만 대조군에 비해 유의성있게 (p<0.05) 감소되

Table 4. Percentages of CD4 and CD8 population of thymus obtained from mice subcutely exposed to BPA.

Cell marker	Doses of BPA (mg/kg/day)			
	Control	100	500	1000
CD4 ⁺ CD8 ⁺	62.8±4.7	63.6±3.2	55.7±5.3	*61.6±5.3
CD4 ⁺ CD8 ⁻	17.8±4.7	18.0±4.7	15.7±5.8	12.1±2.5
CD4 ⁻ CD8 ⁺	4.2±1.1	3.4±0.7	3.3±0.3	3.5±1.8

BPA was orally administered to ICR mice (100, 500, 1000 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. Percentages of the T lymphocytes subsets in thymocytes were analyzed by FACScan. Results are the means±S.E. of 3 separate experiments (5 mice/group/experiment). Significant difference from control group (*p<0.05).

었고 그 외의 용량에서는 큰 변화를 보이지 않았다. 이러한 결과로 BPA에 의해 흉선에서 진행되는 helper T 세포와 cytotoxic T 세포의 발달이 저해되는 것으로 보이며 double positive T세포의 비율에는 변화를 주지 않는 것으로 보인다. 내분비계 장애물질로 잘 알려진 TCDD에 노출된 경우에도 흉선세포종의 CD4⁺CD8⁺의 감소와 CD4⁻CD8⁻의 증가가 유발된다고 보고 (Vorderstrasse 등, 2001)되고 있어 내분비계 장애작용이 있는 환경물질이 흉선에서의 T 세포분화에 영향을 주는 지에 대한 연구가 진행될 필요가 있다고 생각 된다.

복강 대식세포 표면항원분석

BPA를 100, 500, 1000 mg/kg/day 용량으로 30일간 경구투여하여 아급성 노출시키고 32일째에 복강 대식세포를 얻어 세포의 B7-1과 B7-2 molecule의 발현정도를 FACScan으로 분석한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

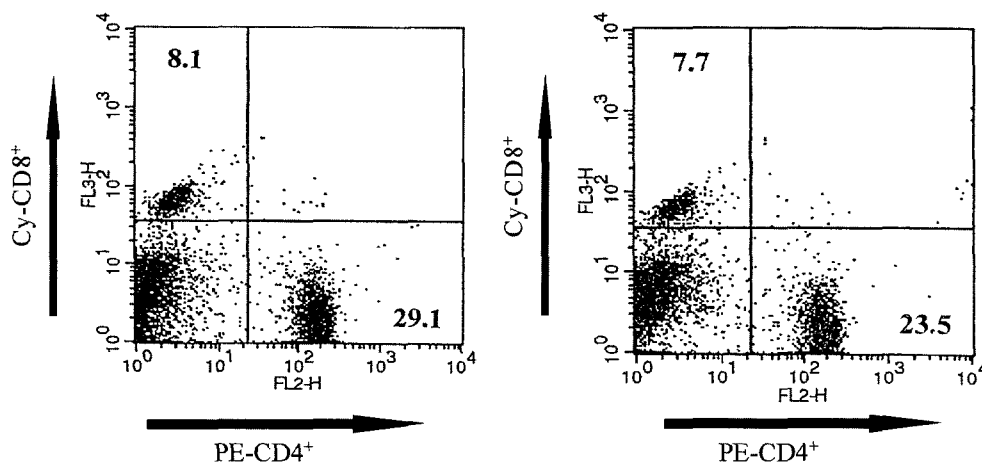


Fig. 3. T cell subpopulation of spleen in mice subcutely exposed to BPA. BPA was orally administered to ICR mice (A: 100 mg/kg/day, B: 500 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. Percentages of the T lymphocytes subsets of spleen were analyzed by FACScan.

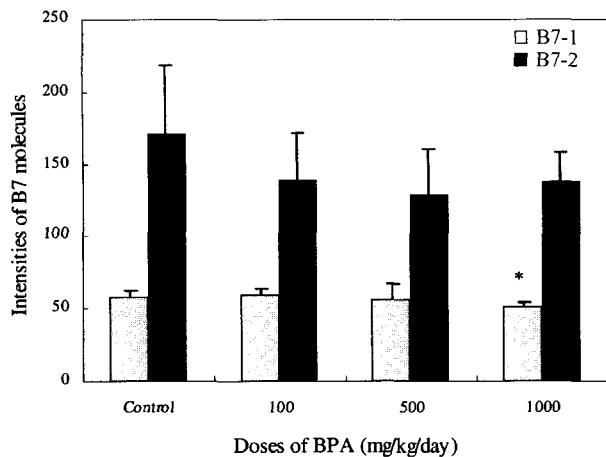


Fig. 4. Intensities of B7-1 and B7-2 on peritoneal macrophages in mice subacutely administered BPA. BPA was orally administered to ICR mice (100, 500, 1000 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. Intensities of B7 molecules on macrophages were analyzed by FACScan. Results are the means \pm S.E. of 4 separate experiments (3 mice/group/experiment). Significant difference from control group (* $p < 0.05$).

Fig. 4에서 보는 바와 같이 BPA를 500, 1000 mg/kg/day 투여군에서는 B7-1의 발현이 대조군에 비해 각각 4.7%, 13.8% 감소하였으며 1000 mg/kg 용량에서는 유의성($p < 0.05$)있는 차이를 보였다. B7-2의 발현은 투여용량에 관계없이 대조군에 비해 19~25% 감소하여 B7-1과 B7-2 molecule 모두 이급성 노출에 의해 영향을 받았다. B7-1과 B7-2는 주로 macrophage, dendritic cell, B cell 등 professional APC에 존재하는 accessory molecule로서 resting cell에는 거의 발현되지 않고 endotoxin이나 cytokine에 의해 자극을 받거나, T cell의 CD40L과 작용하면 발현이 증가되어 costimulatory signal로서의 기능을 한다. 그리고 T cell의 CD28 또는 CTLA-4와 작용하여 T cell proliferation, differentiation, effector function, CD4⁺ cell과 CD8⁺ cell의 항상성(Yu 등, 2000)에 관여한다. 또한, B7-1은 IL-4, IL-10, IFN- γ 에 의해 up-regulation되고 B7-2는 IL-4, IL-10, TNF- α 에 의해서 down-regulation되지만 IFN- γ 에 의해서는 up-regulation되며(Creery 등, 1996) 반대로 B7-1, B7-2가 CD28과 CTLA-4와 작용하여 Th1 또는 Th2 세포에 영향을 주기도 한다(Kuchroo 등, 1995). 그러므로 BPA에 의해 B7 molecule의 발현이 억제됨으로서 T cell에 secondary signal이 감소하여 T 세포활성이 저하될 수 있는 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서는 BPA가 생체내 면역계에 미치는 영향을 체

계적으로 평가하기 위해 BPA를 ICR마우스에 100, 500, 1000 mg/kg/day 용량으로 주 5회 30일간 경구적으로 이급성 노출시킨 후 체중, 장기무게, 혈액학적 parameters, 비장세포수 및 복강 대식세포수, 비장세포와 흉선세포의 표면항원 분석 및 B7 molecule 발현 정도를 측정하고, 체중, 비장 및 흉선 중량비에는 변화가 없었으나 간장과 신장의 중량비는 대조군에 비해 증가하였고 혈액학적 parameters 중 백혈구 수는 약간 감소하는 경향을 나타냈으며 HCT와 MCV가 증가하였다. 그리고, BPA에 의하여 비장세포수, 비장세포중의 CD3⁺ cell과 CD4⁺CD8⁺ cell이 감소하였고, 흉선세포에서는 CD4⁺CD8⁻ cell과 CD4⁺CD8⁺ cell이 감소하였으며, 복강 대식세포의 B7 molecules 발현도 저하되어 BPA의 반복적인 노출이 T 세포의 분화 및 복강 대식세포의 활성에 영향을 주는 것으로 보인다.

이상의 연구결과, BPA로 이급성 노출되면 면역병리학적 parameters가 영향을 받게 되어 생체 면역기능 저하가 유발될 것으로 사료되어 BPA의 면역독성에 대한 연구를 계속 진행하고 한다.

감사의 글

본 연구의 일부는 숙명여자대학교 2001년도 교비 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Al-Hiyasat, A.S., Darmani, H. and Elbetieha, A.M. (2002): Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *Euro-pean Journal of Oral Science*. **110**, 163-167.

Atkinson, A. and Roy, D. (1995): In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ. Mol. mutagen.* **26**(1) 60-66.

Chen, M., Ike, M., Fujita, M. (2002): Acute toxicity, Mutagenicity, and Estrogenicity of Bisphenol-A and other bisphenols. *Environ. Toxicol.* **17**, 80-86.

Creery, W.D., Diaz-Mitoma, F., Filion, L. and Kumar A. (1996): Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1273-1277.

Dayan, A.D., Hertel, R.F., Heseltine, E., Kazantzis, G., Smith, E.M., Van der Venne M.T. (1990): Immunotoxicity of metals and immunotoxicology Plenum Publishing Corporation.

Dolye, A., Griffiths, J.B. and Newell, D.G. (1993): Cell & Tissue Culture; Laboratory procedures, John Wiley & Sons Ltd., U.K. 4B: 1.1.

Daniel, V., Huber, W., Bauer, K., Suesal, C., Conradt, C. and Opelz, G. (2001): Associations of blood levels of PCB, HCHS, and HCB with numbers of lymphocytes subpopulations, *in vitro* lymphocyte response, plasma cytokine levels,

- and immunoglobulin autoantibodies. *Environ. Health. Perspect* **109**(2), 173-178.
- EPA (1996): Health Effects Test Guidelines - Immunotoxicity
- Erlandsson, M.C., Ohlsson, C., Gustafsson, J.A. and Carlsten, H. (2001): Role of oestrogen receptors α and β in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus. *Immunology*. **103**, 17-25.
- Furukawa, F., Nishikawa, A., Mitsui, M., Sato, M., Suzuki, J., Imazawa, T. and Takahashi, M. (1994): A 13-week subchronic toxicity study of bisphenol A in B6C3F1 mice. *Eisei Shikenjo Hokoku*. **112**, 89-96.
- Hiliard, 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. *Environmental and molecular mutagenesis*. **31**, 316-326.
- Kerkvliet, N.I. (2002): Recently advances in understanding the mechanism of TCDD immunotoxicity. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 277-291.
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N. and Glimcher, L.H. (1995): B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathway: Application to autoimmune disease therapy. *Cell*. **80**, 707-718.
- Kurosawa, T., Hiroi, H., Tsutsumi, O., Ishikawa, T., Osuga, Y., Fujiwara, T., Inoue, S., Muramatsu, M., Momoeda, M. and Taketani, Y. (2002): The activity of bisphenol A depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. *Endocr J.* **49**(4), 465-471.
- Larson, D.F., Mayall, B. and Anderson, R.M. (1977): Hemolysis due to chemical contamination of clinical perfusion apparatus. *Ann. Thorac. Surg.* **23**(4), 374-375.
- Mishell, B.B. and Shiigi, S.M. (1980): Selected methods in cellular immunology. W.H. Freeman and Company pp 15.
- Moon, D.G., Sung, D.J., Kim, Y.S., Cheon, J. and Kim J.J. (2001): Bisphenol A inhibits penile erection via alteration of histology in the rabbit. *Int. J. Impot. Res.* **13**(5), 309-316.
- Papaconstantinou, A.D., Umbreit, T.H., Fisher, B.R., Goering, P.L., Lappas, N.T. and Brown, K.M. (2000): Bisphenol A-induced increase in uterine weight and alteration in uterine morphology in ovariectomized B6C3F1 mice: role of the estrogen receptor. *Toxicol. Sci.* **56**, 332-339.
- Sakazaki, H., Ueno, H. and Nakamuro, K. (2002): Estrogen receptor a in mouse splenic lymphocytes: possible involvement in immunity. *Toxicology letters*. **133**, 221-229.
- Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., Sondra, T.O, Block, S.T. and Harris, L.R. (1998): A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*. **36**(10), 2149-2173.
- Takahashi, S., Chi, X.J., Yamaguchi, Y., Suzuki, H., Sugaya, S., Kita, K., Hiroshima, K., Yamamori, H., Ichinose, M. and Suzuki, N. (2001): Mutagenicity of bisphenol A and its suppression by interferon-alpha in human R5a cells. *Mutat Res.* **490**(2), 199-207.
- Tallarida, R.J. and Murray, R.B., (1981): Manual of Pharmacologic calculations with computer programs, Springer-Verlag. Procedure. 9.
- Toda, K., Miyaura, C., Okada, T. and Shizuta, Y. (2002): Dietary bisphenol A prevents ovarian degeneration and bone loss in female mice lacking the aromatase gene (Cyp19). *Eur. J. Biochem.* **269**, 2214-2222.
- 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.
- Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Thomas, B.F., Keimowitz, A.R., Brinw, D.R., Veselica, M.M., Fail, P.A., Chang, T.Y., Seely, J.C., Joiner, R.L., Butala, J.H., Diamond, S.S., Cagen, S.Z., Shiotsuka, R.N., Stropp, G.D. and Waechter, J.M. (2002): Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicology Science.* **68**(1), 121-146.
- Vorderstrasse, B.A., Steppan, L.B., Silverstone, A.E. and Kerkvliet, N.I. (2001): Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice generate normal immune responses to model antigens and are resistant to TCDD-induced immune suppression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **171**, 157-164.
- Washington, W., Hubert, L., Jones, D. and Gray, W.G. (2001): Bisphenol A binds to the low-affinity estrogen binding site. *In Vitro Mol Toxicol.* **14**, 43-51.
- Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Noda, S. and Takatsuki, M. (2002): Changes of serum alpha2u-globulin in the subacute oral toxicity study of ethynyl estradiol and bisphenol A based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline No. 407'. *Toxicology.* **176**, 101-112.
- Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S. and Yuasa, A. (1999): Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem. J.* **340**, 405-409.
- Yu, X., Fournier, S., Allison, J.P., Sharpe, A.H. and Hodes, R.J. (2000): The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis. *J. Immunol.* **164**, 3543-3553.
- 김형배, 백혜자, 이영돈, 나오수, 오성립(2000): Effects of Bisphenol A on the hatching of fertilized eggs and spawning of adult fish in songsari, *Oryzias latipes*. *한국수산학회지.* **33**(5), 378-382.