

## 흰쥐 수유기에 경구투여된 Bisphenol A의 영향

김 판 기\* · 유 재 홍<sup>1</sup>

용인대학교 환경생명학부, <sup>1</sup>용인대학교 자연과학연구소

### Effects of Bisphenol A on Dams during Lactation Period in Rats

Pan Gyi Kim\* and Jae-Hong Leu<sup>1</sup>

*Division of Environmental and Biological Sciences, Yongin University, Yongin 449-714, Korea*

<sup>1</sup>*Institute of Natural Science, Yongin University, Yongin 449-714, Korea*

**Abstract** - Bisphenol A (4, 4'-isopropylidenediphenol, C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>) is the monomer used in the manufacture of polycarbonate. Polycarbonate, in turn, is used in a wide array of plastic products, with new applications continuously being developed. Also it has been used to produce epoxy resins and polycarbonate plastics for food container. This study was carried out to investigate the effects of bisphenol A on lactation period to dams and F1. Sprague-Dawley females were mated with on 2:1 ratio basis. Various doses of bisphenol A (0, 2, 20, 200, and 2,000 µg kg<sup>-1</sup>) were daily administered to females for 21 days after parturition. Dams and offsprings were sacrificed at the time of weaning. The results were as follows, 2000 µg kg<sup>-1</sup> of bisphenol A decreased the dams' body weight at post-partum 18 days and also 200 and 2,000 µg kg<sup>-1</sup> of bisphenol A decreased the body weight of neonates at the days of post-partum 21 days. Bisphenol A increased the relative weights of liver and spleen in male offsprings, depending on the doses. But female offsprings showed high relative organ weights of ovaries, and low relative organ weights of uterine in a some dose-response manners. High dose of bisphenol A induced low viability of neonates exposed during lactation period. The dams treated with bisphenol A showed prematured estrous stage. Bisphenol A was recovered about 21.2% average in serum of dams, and also in offsprings'. The results indicate that the bisphenol A induces estrous cycle during lactation period in dams, also reaches to the offspring through breast milk. Thus bisphenol A exposed to dams and neonates via lactation induces some estrogenic and toxic effects.

**Key words** : bisphenol A, lactation, food container, endocrine disruptor

## 서 론

산업화의 진행과 함께 환경오염이 가속화되며, 이에

대한 대중의 인식도 높아지고 있다. 청정환경을 확보하고자 하는 인류의 욕구는 경제가치의 전도를 초래하여 청정생산기술, 저에너지 고효율기술, 청정에너지 기술개발 촉진으로 인한 맑은 물과 공기 확보에 주력하게 되었고, 안전하고 청정한 식품의 수요를 창출하고 있다. 최근, Our Stolen Future 발간과 함께 대중에 인식된 내분

\* Corresponding author: Pan Gyi Kim, Tel. 031-330-2752, E-mail. pgkim@yongin.ac.kr

비계 장애물질은(김 1998, 2000), 산업화의 진행과 관련된 환경오염 부작용의 하나로 인식되고 있으며, 환경생태계는 물론, 인간의 건강증진에 악영향 요인으로 인식되고 있어, 이 문제의 해결을 위한 환경기술개발 필요성이 요구된다. 식품 캔의 내부코팅제와 각종 식품용기 및 포장재의 소재로 사용되는 bisphenol A는 estrogenic 특성으로 인하여 내분비계 장애물질 여부에 관한 논란이 되고 있으며(Borton *et al.* 1995), 안전성과 전전성에 대한 다양한 평가의 대상이 되고 있다. Bisphenol A는 에폭시, 폴리카보네이트, 수지(resin)의 제조에 사용되는데, 58%가 폴리카보네이트의 제조에 사용되고, 33%가 에폭시 레진에 사용되며, 2%가 tetrabromobisphenol A의 제조에, 7%는 그 밖의 용도로 사용되고 있다. 이 플라스틱 제품들은 다양한 식품과 음료수의 포장소재로 사용되고 resin은 일반적으로 통조림이나 병마개, 송수관과 같은 금속물질의 표면을 처리하는데 사용되어 왔으며, 치과에서 sealant로 사용되기도 한다(Staples *et al.* 1998).

Bisphenol A는 1993년 MCF-7 세포에서 에스트로겐성 효과를 나타내었다. 또한, bisphenol A는 통조림용기로부터 음식물로 이행되며, 폴리카보네이트 병으로부터 나올 수 있으며, 치아 충전물에 의해서 섭취될 수 있다. 채소 통조림으로부터 나온 bisphenol A가 함유된 표면처리제가 사람의 유방암세포에 에스트로겐성을 갖는 것으로 보고되었으며, 임신한 랫드에 낮은 수치의 bisphenol A를 투여했을 때 태자 고환의 크기 및 정자수가 감소되는 것이 보고되었다. Bisphenol A를 치과환자에게 sealant로 처리한 후 1시간 동안 타액에서 90~931 µg이 검출되었다고 보고되었다(Krishnan *et al.* 1993; Borton *et al.* 1995). Bisphenol A는 여성호르몬을 모방, 차단, 촉진할 수 있으며, 통조림이나 폴리카보네이트 병으로부터 음식물에 유입되어 생체에 흡수되며, 현재 인간에 대한 흡수 정도는 마우스의 생식기계에 영향을 주는 용량과 비슷한 것으로 알려지고 있다. Bisphenol A는 우리나라에서 미규제물질로서 아직은 많은 연구가 필요한 상태이다. 본 실험에서는 bisphenol A를 수유기간 동안 모체에 투여하였을 때 모유를 통해서 차세대에게 흡수되는 bisphenol A의 양을 측정하고, 이때 차산자에서의 영향을 평가하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

Bisphenol A(순도 99.7%, Aldrich Chemical Co.)를 상업적으로 구입하였고, 실험동물은 Sprague-Dawley계

10주령 랫드를 삼육실험동물센터(주)로부터 구입하였다. 실험동물은 구입 후 일주일간 순화시켰고, 온도와 상대습도는 각각  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 와  $55 \pm 7\%$ , 낮/밤 주기는 12시간으로 조절되는 환경에서 실험을 수행하였다. 설치류용 사료와 음료가 자유로이 공급되었다. 현재 인간에 대한 bisphenol A의 흡수 수치는 마우스의 생식계에 영향을 주는 수치와 비슷한 것으로 알려져 있는데, Jobling (1995) 등, vom Saal (1998) 등, Atkinson (1995) 등, Tsutsui (1998) 등, Krishnan (1993) 등의 실험에서 사용한 용량을 참고하여 설정하였다. 본 실험에서는 대조군을 포함해서 2, 20, 200, 2000 µg kg<sup>-1</sup> 5 ml<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>로 총 5개의 군으로 용량을 설정하였다. 용매는 corn oil을 사용하여 분만 직후부터 이유시기까지(분만 21일) 매일 경구 투여하였다. 수컷과 암컷 흰쥐를 합방시켜 질도말 표본에서 정자가 관찰되었거나 질전(vaginal plug)이 확인된 것을 임신 0일로 하였고, 오전 9시까지 분만이 완료된 모체를 분만 0일로 하였다.

부검 하루 전 절식시킨 후 모체와 태자의 체중을 측정하였고, 경추탈구하여 안락사시켰다. 안락사 후 혈액을 채취하였고, 간장, 신장, 비장과 주요 생식기관인 고환, 부고환, 정낭, 전립선, 자궁, 난소 등의 중량을 측정하였다. 장기중량으로 상대장기중량(장기중량/체중×1000)을 계산하였다. 신생자의 체중은 태어난 날을 기준으로 암, 수 각각 1, 4, 7, 14, 21일, 부검일 총 6회 측정하였다. 부검시 각 성별에 따라 생식기관을 포함한 간장, 비장, 신장 등의 각 주요 장기의 중량을 측정하였다. 생후 4일 생존율과 이유시의 생존율을 다음과 같이 계산하였다.

○ 생후 4일 생존율(%) = (생후 4일의 생존자수/생존출산자수) × 100

○ 이유시 생존율(%) = (생후 22일의 생존자수/생후 4일의 생존자수) × 100

생존율을 측정하기 위하여 출산 직후의 생존자수를 확인하였고, 생후 4일의 생존자를 확인한 후 모체당 암수 각각 4마리 총 8마리를 기준으로 실험에 사용하였다.

투여물질에 의한 모체의 조기발정 유무를 확인하기 위하여 회생 전 5일간 발정주기 검사를 모체의 질구 상피세포를 현미경으로 관찰하여 실시하였다.

High performance liquid chromatography (HPLC, Young-lin Instrument Co., LTD)를 사용하여 bisphenol A의 혈청내 함량을 확인하였다. 모체와 신생자로부터 채취한 혈청에서 200 µl를 취해 ethanol (HPLC grade) 200 µl를 가한 후 methylene chloride (HPLC grade) 8 ml을 혼합하였다. 실온에서 하루밤 방치 후, 하층의 유기용매층을 취해 회전식 진공 농축기로 농축하였다. Aceto-

nitrile (HPLC grade) 4 ml을 첨가해 희석하여, 분석시 40  $\mu$ l을 HPLC에 주입하였다. HPLC 분석시의 유속은 1 ml  $\text{min}^{-1}$ , 파장은 233 nm, 이동상의 비율은 40 : 60 (water : acetonitrile)으로 하였다 (OSHA의 bisphenol A 분석조건). Column은  $C_{18}$  9.4  $\times$  250 mm (Waters)를 사용하였으며, 검출기는 UV detector ( $\lambda = 133$  nm)를 사용하였다. 표준곡선은 bisphenol A를 0.05, 0.5, 5, 50, 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (acetonitrile)의 농도로 제조한 standard solution을 분석하여 작성하였으며, 전처리한 표준곡선과 전처리를 하지 않은 표준곡선을 작성하여 회수율을 구하였다. 통계 처리는 ANOVA를 이용하였으며, 0.05% 유의수준에서 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 모체 및 신생자의 체중 변화

투여기간 동안 모체의 체중은 크게 변동하지 않으면서 체중을 유지하였으며, 수유 15일이후부터는 체중증가가 억제되는 경향을 보였다. 최고용량군인 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군의 18, 21일의 체중이 대조군과 유의한 ( $p < 0.05$ ) 차이를 나타냈다.

부검일에 전체 실험군에서 전반적으로 체중의 급격한 감소를 나타냈는데, 이는 부검 전날 실시한 절식에 기인하는 것으로 사료된다. 박(2001) 등의 연구에서 수유기 투여에 의한 체중변화는 약간의 증가 혹은 현상유지였

다. 수유에 의해 급격한 체중 증가가 보이지 않았으며, 이는 본 실험의 결과와 일치하였다. Bisphenol 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여에 의하여 수유 18일부터 체중감소를 보였으며, 이는 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단된다. 흰쥐의 비유량은 임신 16~18일에 최대를 보이고 이후 감소하며, 차산자의 사료섭취량이 점차 늘어나지만, 차산자의 성장으로 인한 포유총량이 최대가 되는 시기(이 1991)이기도하다. 따라서, 모체의 사료섭취량이 증가할지라도 체중의 급격한 증가가 나타나지 않게 되거나, 약간 감소할 수 있다.

암컷 신생자의 체중은 수유하는 동안 체중 증가가 지속되었으며, 대조군의 경우 생후(6.3 g) 1주(13.9 g), 2주(25.5 g)의 체중이 전주대비 거의 2배의 체중 증가를 보였다. 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군은 대조군과 유사한 체중 증가를 보였으나, 20, 200, 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군은 체중 증가가 약간 감소하여 수유 21일에 200, 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군의 체중이 대조군에 비하여 유의하게 낮은 ( $p < 0.05$ ) 결과를 보였다 (Table 2).

대조군의 수컷 신생자 체중은 수유기간에 따라서 점차 증가하였으며, 암컷과 같이 출생일의 체중(6.4 g)이 1주(13.8 g), 2주(26.8 g)으로 거의 2배로 증가함을 나타내었다. 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군은 대조군과 유사한 체중증가를 보였으나, 20, 200, 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군에서는 수유 21일에 대조군에 비하여 유의하게 낮은 ( $p < 0.05$ ) 체중을 보였다 (Table 3). Nagel (1997) 등의 실험에서 저농도(100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) 폭로시에 수컷의 체중 감소를 보고하였으며, 본

**Table 1.** Body weight change of dams during the bisphenol A treatment

[mean (g)  $\pm$  SD]

Group ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	day							
	0	3	6	9	12	15	18	21
Control	303 $\pm$ 16.8	303 $\pm$ 16.2	307 $\pm$ 18.0	305 $\pm$ 13.7	306 $\pm$ 11.1	302 $\pm$ 19.3	301 $\pm$ 8.9	261 $\pm$ 13.0
2	302 $\pm$ 35.5	299 $\pm$ 31.2	296 $\pm$ 28.1	300 $\pm$ 27.6	303 $\pm$ 41.7	297 $\pm$ 21.7	300 $\pm$ 26.4	259 $\pm$ 22.1
20	303 $\pm$ 15.5	304 $\pm$ 20.8	306 $\pm$ 21.7	308 $\pm$ 20.3	310 $\pm$ 17.5	308 $\pm$ 12.1	303 $\pm$ 17.3	262 $\pm$ 15.4
200	302 $\pm$ 28.8	305 $\pm$ 19.6	309 $\pm$ 15.2	310 $\pm$ 11.3	311 $\pm$ 15.8	306 $\pm$ 14.2	303 $\pm$ 20.4	266 $\pm$ 17.1
2000	304 $\pm$ 28.3	301 $\pm$ 20.7	301 $\pm$ 19.0	308 $\pm$ 16.7	303 $\pm$ 8.6	299 $\pm$ 23.7	292 $\pm$ 10.7*	248 $\pm$ 11.8*

\* : statistically different from control group ( $p < 0.05$ )

**Table 2.** Body weight change of F1 female rats in lactation period during bisphenol A treatment

[mean (g)  $\pm$  SD]

Group ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	day						at Sacrifice (22)
	1	4	7	14	21		
Control	6.3 $\pm$ 0.55	8.8 $\pm$ 0.90	13.9 $\pm$ 1.72	25.5 $\pm$ 3.45	37.8 $\pm$ 3.51	36.6 $\pm$ 3.82	
2	6.2 $\pm$ 0.30	8.6 $\pm$ 0.79	12.7 $\pm$ 0.74	24.4 $\pm$ 1.89	35.4 $\pm$ 3.30	34.0 $\pm$ 2.87	
20	6.2 $\pm$ 0.72	9.5 $\pm$ 1.74	13.5 $\pm$ 2.31	23.1 $\pm$ 4.64	34.8 $\pm$ 4.23	33.1 $\pm$ 4.75	
200	6.5 $\pm$ 0.76	9.3 $\pm$ 1.35	13.3 $\pm$ 2.57	22.5 $\pm$ 4.28	32.7 $\pm$ 4.20*	31.9 $\pm$ 3.92*	
2000	6.2 $\pm$ 0.28	8.5 $\pm$ 1.66	12.1 $\pm$ 3.17	23.1 $\pm$ 3.26	31.4 $\pm$ 3.41*	30.7 $\pm$ 3.44*	

\* : statistically different from control group ( $p < 0.05$ )

**Table 3.** Body weight change of F1 male rats in lactation period during bisphenol A treatment [mean (g)±SD]

Group ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	day					
	1	4	7	14	21	at sacrifice (22)
Control	6.4±0.80	9.3±0.74	13.8±1.83	26.8±4.10	40.1±4.72	39.8±4.61
2	6.5±0.30	9.8±1.36	13.1±1.34	24.3±2.50	37.2±2.97	36.2±3.78
20	6.4±0.53	9.1±1.57	13.0±3.01	24.1±3.80	35.2±3.48*	33.8±4.35
200	6.4±0.65	8.8±1.33	12.2±2.34	24.5±3.69	33.8±3.77*	31.0±3.23*
2000	6.3±0.45	8.7±1.21	12.4±2.48	24.6±4.91	32.7±4.31*	31.0±4.31*

\* : statistically different from control group ( $p < 0.05$ )**Table 4.** Reproductive performance of dams and viability of neonates administered orally with bisphenol A during lactational period [mean (number)±SD]

Group ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Control	2	20	200	2000
No. of implantation	12.4±3.80	13.2±3.74	13.8±4.83	12.8±4.10	14.1±4.71
No. of live fetus	11.5±4.30	12.1±4.36	13.1±5.34	12.1±4.50	13.3±4.97
Pregnancy rate (%)	(92.7)	(91.7)	(94.9)	(94.5)	(93.6)
M/F ratio	0.94	0.89	0.93	0.98	0.94
4 days viability (%)	90/92 (98)	106/109 (97)	89/92 (97)	93/97 (96)	101/106 (95)
21 days viability (%)	63/64 (98)	70/72 (97)	54/56 (96)	61/64 (95)	61/64 (95)

\* : statistically different from control group ( $p < 0.05$ )

실험에서의 결과와 일치하였다. Bisphenol A는 저용량에서 체중에 영향이 없거나 약간의 증가를, 고용량에서 체중감소 영향을 나타내는 것으로 판단된다.

수유기 투여에 의한 모체 및 차산자의 생식특성을 확인하기 위하여 착상율과 성비 및 4일과 21일 생존율을 Table 4에 나타내었다. 임신율은 대조군이 92.7%를 보였으며, 각 실험군에서 91.7~94.9%의 착상율을 보였다. 이러한 결과는 Sprague-Dawley 흰쥐의 생식특성인 8.9~14.9마리의 착상과 90% 이상의 착상율(Baker *et al.* 1984)과 일치하는 것이며, 박(2001) 등이 보고한 Wistar의 생존자 수 10.3~11.7와 임신율 91.9~99.1%와 유사한 결과를 보였다. 성비는 대조군 0.94였으며, 실험군 0.89~0.98으로서 정상범위였다(Baker *et al.* 1984). 4일 생존율은 대조군의 98%에 비하여 최고용량군인 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 가 95%로 낮은 값이었고, 21일 생존율도 200, 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군의 생존율이 감소하는 결과를 보였다. 이는 Jobling(1995) 등이 보고한 저농도 bisphenol A (2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )의 차산자 사망이 없는 결과와 유사하며, 수유기 모체 폭로에 의한 유즙이행 가능성을 확인하는 결과로 해석된다.

## 2. 장기증량의 변화

모체체중에 대한 각 장기의 상대증량은 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군의 자궁이 유의하게 낮은( $p < 0.05$ ) 결과를 보였다

(Table 5). 간장 상대증량은 시험군에서 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았으나 용량증가에 따라 증가하는 경향을 보였다. 비장 상대증량 역시 용량증가에 따라 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다. 좌우측 신장의 상대증량은 대조군과 차이가 나타나지 않았다. 좌우측 난소 상대증량은 군간의 유의한 차이는 나타나지 않았으나 고용량군에서 감소하는 경향을 보였다.

암컷 차산자의 상대 장기증량은 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군의 자궁, 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군의 우측 난소와 자궁, 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군의 우측 신장, 우측 난소, 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군의 좌측 신장, 좌우측 난소와 자궁에서 대조군과 유의한 차이( $p < 0.05$ )를 나타냈다(Table 6). 간장의 상대증량은 모체에서와 동일하게 용량증가에 따라 상대증량이 증가하는 경향을 보였으나, 통계학적 유의성은 인정되지 않았다. 비장 상대증량도 모체에서처럼 용량증가에 따라 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 신장 상대증량은 용량증가에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 200, 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군에서 각각 우측과 좌측 상대증량이 유의하게 낮은( $p < 0.05$ ) 결과를 보였다. 자궁 상대증량은 모든 투여군에서 낮은 결과를 보였으며, 2, 20, 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군에서 유의한 결과( $p < 0.05$ )를 나타내었다.

수컷 신생아의 장기 상대증량은 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 의 좌측 신장, 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 의 비장, 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 의 간장, 비장, 좌측 신장과 정낭이 대조군에 비하여 유의한 차이( $p < 0.05$ )

**Table 5.** Relative organ weight of dams administered bisphenol A during lactation period [mean (%)±SD]

Group ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Liver	Spleen	Kidney (L)	Kidney (R)	Ovary (L)	Ovary (R)	Uterine
Control	36.3±4.11	1.9±0.40	4.0±0.31	4.0±0.25	0.12±0.031	0.13±0.040	1.00±0.095
2	36.9±3.98	2.2±0.41	4.0±0.28	3.9±0.25	0.11±0.014	0.11±0.031	1.04±0.073
20	35.3±4.92	2.0±0.39	3.9±0.39	4.00±0.45	0.13±0.033	0.13±0.032	0.98±0.0617
200	38.3±4.90	2.1±0.33	3.8±0.37	3.9±0.47	0.11±0.041	0.11±0.035	0.93±0.081
2000	38.8±4.65	2.4±0.40	3.9±0.37	3.9±0.27	0.09±0.048	0.11±0.028	0.86±0.094*

\* : statistically different from control group ( $p < 0.05$ )**Table 6.** Relative organ weight of F1 females exposed to bisphenol A during lactation period [mean (%)±SD]

Group ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Liver	Spleen	Kidney (L)	Kidney (R)	Ovary (L)	Ovary (R)	Uterine
Control	32.7±1.74	4.1±0.81	6.4±0.45	6.5±0.21	0.15±0.043	0.15±0.040	0.80±0.054
2	33.5±1.62	4.2±1.81	6.0±0.21	6.1±0.35	0.14±0.034	0.15±0.044	0.67±0.068*
20	34.2±1.91	4.3±0.95	6.3±0.33	6.2±0.37	0.18±0.051	0.19±0.037*	0.71±0.067*
200	34.3±3.57	4.4±0.83	6.1±0.54	6.0±0.28*	0.19±0.040	0.18±0.024*	0.77±0.123
2000	35.2±3.11	4.5±0.46	5.8±0.57*	6.1±0.58	0.20±0.049*	0.21±0.047*	0.66±0.091*

\* : statistically different from control group ( $p < 0.05$ )**Table 7.** Relative organs weight of F1 males exposed to bisphenol A during lactation period [mean (%)±SD]

Group ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Liver	Spleen	Kidney (L)	Testis (L)	Epididymis (L)	Seminal vesicle (L)	Prostate
Control	31.9±2.25	4.2±0.51	6.3±0.43	2.7±0.23	0.45±0.097	0.12±0.037	0.52±0.084
2	34.7±3.00	4.2±0.45	5.9±0.42	2.6±0.29	0.43±0.090	0.11±0.034	0.51±0.084
20	33.5±2.24	4.4±0.49	5.7±0.41*	2.9±0.33	0.43±0.0090	0.11±0.029	0.50±0.120
200	33.3±2.87	4.8±0.43*	5.9±0.60	2.8±0.26	0.45±0.067	0.13±0.036	0.52±0.130
2000	35.6±2.46*	5.1±0.37*	5.6±0.36*	3.0±0.34	0.43±0.082	0.18±0.041*	0.50±0.099

\* : statistically different from control group ( $p < 0.05$ )

를 나타냈다 (Table 7).

간장 상대중량은 용량증가에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군에서 유의하게 높은 ( $p < 0.05$ ) 상대중량을 보였다. 비장 상대중량은 용량의존적으로 증가하는 결과를 보였으며, 200, 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군에서 통계학적인 유의성 ( $p < 0.05$ )을 보였다. 좌측신장 상대중량은 용량증가에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군에서 유의하게 낮은 ( $p < 0.05$ ) 중량을 나타냈다. 좌측 고환 상대중량은 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군에서 약간 높은 결과를 보였으나 유의성은 인정되지 않았고, 다른 투여군에서도 대조군수준의 상대중량을 보였다. 좌측 부고환 상대중량은 대조군과 차이가 없었으며, 정낭은 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군에서만 유의하게 높은 결과 ( $p < 0.05$ )를 보였다. 전립선 상대중량은 대조군과 차이를 발견하지 못하였다.

전체적으로 bisphenol A 폭로에 의하여 모체와 차산자의 간장, 비장의 상대중량은 증가하였으며, 신장과 자궁의 상대중량은 감소하였다. 그러나, 모체의 경우 난소의 중량이 약간 감소하였으나, 차산자는 난소 상대중량이

증가하는 결과를 보이고 있다.

Jobling (1995) 등은 성인 (75 kg)의 150  $\mu\text{g}$ , 어린이 (25 kg)의 50  $\mu\text{g}$ 에 상응하는 일일 용량인 bisphenol A와 octylphenol을 각각 2, 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  body weight의 농도로 임신된 마우스에 투여했을 때 신생아의 전립선 중량이 증가하였다고 보고했는데 이것은 본 실험의 결과와 다른 것이다. 또한 vom Saal (1998) 등은 임신기간 동안 bisphenol A와 octylphenol이 처리된 마우스의 수컷 태아의 일일 정자 생산과 생식기관에 대한 실험에서 2 ppb의 bisphenol A가 지속적으로 포피선의 크기를 증가시키는 것으로 나타났으며, 부고환의 크기가 감소하였다고 보고하였으며, 본 실험에서 부고환의 상대중량은 투여군에 따라 약간 감소하는 경향을 나타냈다. Atkinson와 Roy (1995)는 CD 1 수컷 흰쥐에 200  $\text{mg kg}^{-1}$ 의 bisphenol A 투여가 DNA adduct를 발생시킨다고 보고하였으며, Tsutsui 등(1998)은 bisphenol A가 50  $\mu\text{mol}$  이상 농도에서 햄스터 배아세포의 DNA adduct 형성과 세포 변성을 보고하였으며, Niwa 등(2000)은 bisphenol A에 의한 간의 대사효소 억제효과를 보고하여 간독성 가능

**Table 8.** Estrous cycle of dams before autopsy

Group ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Proestrus	Estrus	Diestrus	Total
Control	—	—	8	8
2	—	—	9	9
20	—	—	7	7
200	1	2	5	8
2000	—	2	6	8

성을 보고하였다.

### 3. 모체의 발정주기

대조군과 2, 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군에서 부검전 모체의 질 상피세포 발정주기 검사에서 모두 휴지기를 나타냈다. 200, 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 에서는 각각 3, 2마리가 발정전기와 발정기의 상피세포를 나타내어 조기 발정을 나타냈다. 이것은 bisphenol A가 모체의 발정주기에 영향을 미친 것으로 판단된다 (Table 8).

흰쥐의 발정주기는 발정전기 (proestrus), 발정기 (estrus), 발정후기 (metestrus), 발정휴지기 (diestrus)로 구분한다. 발정전기는 흰쥐에서 약 12시간 지속되며, 질에 유핵상피세포가 다수 출현하며 이 시기 마지막 부분에서 발정징후가 나타난다. 발정기에는 외음부 종창, 발적이 나타나며, 질 상피세포는 유핵상피가 사라지면서 각화상피가 대부분을 차지한다. 발정기는 12시간 가량 지속되며 발정기가 거의 끝날 무렵에 배란이 이루어진다. 발정후기는 각화상피가 소실되며 유핵상피와 백혈구가 혼재되어 관찰되며, 시간적으로 가장 긴 휴지기에는 백혈구와 무정형 점액만이 관찰된다. 임신이 성립되면 발정휴

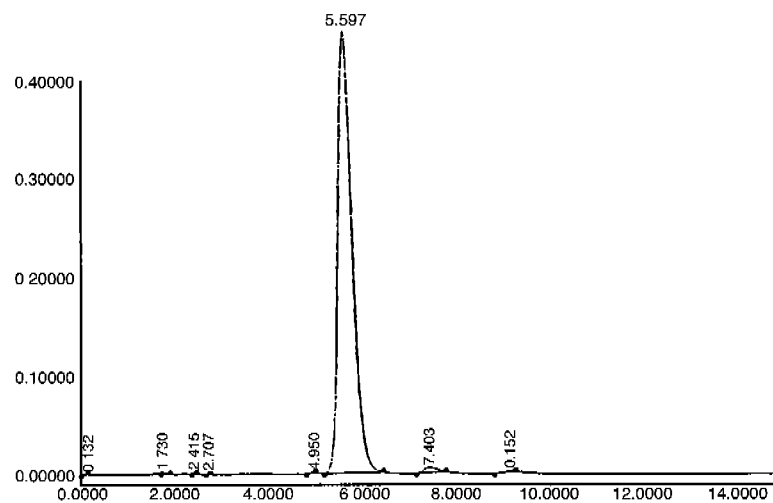
지기 상태를 지속하게 된다.

흰쥐는 후분만발정을 제외하고 비유중에는 발정이 억제되며 질구는 발정휴지기상을 나타내는 수유기발정휴지 (lactational diestrus)가 된다. 발정휴지기간의 길이는 어미의 일령, 산차수, 영양상태, 포유자수, 사육관리 등에 따라 다르지만 일반적으로는 수유를 중단했을 경우, 또는 이유 후 3~5일에 발정이 돌아와서 배란이 일어난다 (이 1991). 따라서, 분만 후 발정이 흰쥐에서 분만 직후에 발견된다고 할지라도, 본 실험에서는 발정주기 검사가 분만후 15일부터 5일간 이루어진 결과임을 감안하면, bisphenol A에 폭로된 모체가 수유로 인하여 발정휴지기를 지속하여야 하는 기간에 발정주기의 비정상상태가 발현된 것으로 판단된다.

### 4. 혈청내 bisphenol A의 함량 분석

OSHA의 bisphenol A 분석조건에 따라 혈액 내의 bisphenol A 양을 정량하기 위하여 표준곡선을 작성하였다. 평균 회수율은 97%였다. 군별로 혈액 샘플을 각각 2개씩 취하여 최소 3~5회 반복적으로 분석한 결과, bisphenol A의 retention time은 5.6분이었으며, 표준 곡선을 포함한 모든 샘플의 분석에서도 5.6분대에서 검출되었다 (Fig. 1).

모체의 혈청 분석에서 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군의 검출값이 다른 고용량투여군보다 상대적으로 많은 양이 검출되었다. 모체에서 검출된 값에 비하여 수유를 통하여 폭로된 차산자의 혈액중 bisphenol A의 검출값은 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  투여군을 제외하고 모든 투여군에서 거의 모체 수준과 맞먹는 결과를 보였다. 전반적으로 수컷에서보다 암컷에서의 농



**Fig. 1.** A representative profile of bisphenol A measured by HPLC, 40  $\mu\text{l}$  of bisphenol A (20  $\text{mg ml}^{-1}$ ) dissolved in ethanol was injected.

**Table 9.** Concentration of bisphenol A in serum of dams and neonates

Group ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Control	2	20	200	2000
Neonates ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Male	-	$0.88 \pm 0.017$	$1.86 \pm 0.013$	$2.14 \pm 0.013$	$2.22 \pm 0.013$
	Female	-	$0.93 \pm 0.021$	$1.94 \pm 0.013$	$2.29 \pm 0.013$	$3.50 \pm 0.013$
Dams ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )			$1.71 \pm 0.013$	$1.99 \pm 0.108$	$2.88 \pm 0.244$	$3.59 \pm 2.705$

- : Not detected

도가 높게 나타났다(Table 9).

혈액 분석을 통해서, 투여되는 양의 평균 21.2%가 모체의 혈류로 흡수됨을 알 수 있었으며, 이로 인해 bisphenol A가 경구폭로로 인하여 혈액에 잔류됨을 확인하였다. 또한, bisphenol A를 모체에 폭로하였을 때 수유기 동안 모체의 유즙을 통해 차산자에게 간접 흡수됨을 확인하였다. Hooper (1998) 등은 polychlorinated biphenyls 과 PCDDs, PCDFs를 1994년 남 카자흐스탄 지역에서 채취한 모유에서 측정된 결과, PCDD/PCDFs와 비슷한 독성을 갖고 있는 높은 수치 ( $10 \sim 120 \text{ pg g}^{-1} \text{ fat}$ )의 TCDD (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)가 검출되었다고 보고하였다. DDT나 PCBs와 같이 bisphenol A도 모유를 통하여 차산자에게 전이됨을 확인하였다. 향후 bisphenol A에 임신기간이나 수유기에 폭로된 차산자의 수태능력 시험이나 생식과 관련된 실험이 계속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

각종 수지로서 식품 포장재 및 용품으로 사용되어 내분비계 장애물질(환경호르몬)로 알려지고 있는 bisphenol A를 신생 랫드의 수유기 동안 모체에 폭로시켰을 때 모체와 차산자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행하였으며, 실험결과는 다음과 같다. Bisphenol A  $2,000 \mu\text{g kg}^{-1}$  투여군에서 모체의 분만 21일 체중을 저하시켰으며, 20, 200,  $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$  투여군 차산자의 21일령 체중저하를 나타내었다. 차산자 4일, 21일 생존율이 bisphenol A에 의하여 약간 감소하였으나, 유의성은 없었다. Bisphenol A 투여에 의하여 모체의 자궁 상대중량이 감소하였으며, 암컷 차산자의 자궁 상대중량 역시 용량의존으로 감소하였다. 암컷 차산자의 간장, 비장, 난소의 상대중량은 증가했으며, 난소에서는 용량 의존적 경향을 보였다. 수컷 차산자의 간장, 비장 상대중량이 증가하였으며, 신장 중량은 감소하였다. 그 외의 생식기관의 상대중량 변화는 관찰되지 않았다. Bisphenol A 200,  $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ 에서 각각 3, 2마리의 모체가 수유중에

발정주기 개시를 나타내었다. 혈액 분석결과 모체의 혈액에서는 투여량의 평균 21.2%에 해당하는 bisphenol A가 검출되었다. Bisphenol A는 수유기의 모체투여에 의해 모체에 estrogenicity를 나타내며, 수유를 통하여 차산자의 난소, 자궁의 상대 중량변화를 가져왔고, 모체의 혈액으로부터 이동한 bisphenol A는 유즙을 통해 차산자에게 전이됨을 확인하였다.

## 사 사

본 연구는 SKCR-5319 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- 김판기. 2000. 내분비계 교란물질과 환경보건. 용인대학교 학생생활연구소 논문집. 8:129-136.
- 김판기. 1998. 환경호르몬(내분비계장애물질)과 식품안전. 용인대학교 자연과학연구소 논문지. 4:45-52.
- 김판기, 이나래, 유재홍, 양윤희. 1998. Bisphenol A가 임신랫드에 미치는 영향. 보건복지학회지. 1:193-209.
- 박귀례, 한순영, 김판기, 신재호, 장성재. 2001. 방사선 조사 인삼이 랫드의 태자와 신생아의 발달 및 모체기능에 미치는 영향에 관한 연구. J. Toxicol. Pub. Health 17:17-25.
- 이영순. 1991. 실험동물의학. pp. 118-146. 서울대학교 출판부, 서울.
- 최돈찬. 1999. HPLC를 이용한 내분비 장애물질 측정. 용인대학교 논문집. 17:403-414.
- Atkinson A and D Roy. 1995. In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. Environ. Mol. Mutag. 26:60-66.
- Andersen ME, HJ Clewell III, J Gearhart, BC Allen and HA Barton. 1997. Pharmacodynamic model of the rat estrus cycle in relation to endocrine disruptor. Toxicol. Environ. Health 52:189-203.
- Baker HJ, JR Lindsey and SH Weisbroth. 1984. The laboratory rat. pp 88-93. Academic Press, New York.
- Bortons JA, MF Lea-Serrano, M Villalobos, V Pedraz and N Olea. 1995. Xenoestrogens released from lacquer

- coating in food cans. *Environ. Health Perspect.* 103:608-612.
- Colerangle JB and D Roy. 1997. Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of Noble rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 60:153-160.
- Hooper K, MX Petreas, T Chuvakova, G Kazbekova, N Druz, SD Hayward, J Ianwen, J Grassman and RD Setpens. 1998. Analysis of breast milk to assess exposure to chlorinated contaminants in Kazakstan ; high level of Southern Kazakstan. *Environ. Health Perspect.* 106:797-806.
- Jan C, S Paige, E Tolbert, HR Carol, LJ Guillette Jr and RJ Jackson. 1997. Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida. *Environ. Health Perspect.* 105:1030-1032.
- Jobling S, T Reynolds, R White, MG Parker and JP Sumpster. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. 103:582-587.
- Krishnan AV, P Starhis, SF Permuth, L Tokes and D Feldman. 1993. Bisphenol A, an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286.
- Longnecker MP, WJ Rogan and G Lucier. 1997. The human health effects of DDT and PCBs and an overview of organochlorines in public health. *Annu. Rev. Public Health* 18:211-244.
- Nagel SC, S Fredrick, FS vom Saal, KA Thyer, MG Dhar, M Boechler and WV Welshons. 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.
- Niwa T, M Tsutsui, K Kishimoto, Y Yabusaki, F Inhibashi and M Katagiri. 2000. Inhibition of drug-metabolizing enzyme activity in human hepatic cytochrome P450 by bisphenol A. *Biol. Pharm. Bull* 23:498-501.
- Kim PG, EN Kwon and SH Hwang. 2000. Bisphenol A and nonylphenol concentrations in Kyonahn Cheon. *Korean J. Environmental Health* 26:107-113.
- Santti R, M Akelas, L Struss, J Korkman and ML Kostian. 1998. Phytoestrogens : potential endocrine disruptors in males. *Toxicol. Ind. Health* 14:223-237.
- Shane R, D Solla, CA Bishop, GVD Krak and RJ Brooks. 1998. Impact of organochlorine contamination on levels of sex hormones and external morphology of common snapping turtles (*Chelydra serpentina*) in Ontario. *Environ. Health Perspect.* 106:253-260.
- Staples CA, PB Dorn, GM Klecka, ST O'Block and LR Harris. 1998. A review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36:2149-2173.
- Tsutsui T, Y Tamaura, E Tagi, K Hasegawa, M Takahashi, N Maizumi, F Yamaguchi and JC Barrett. 1998. Bisphenol A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cutural Syrian hamster embryo cells. *Int. J. Cancer* 75:290-294.
- vom Saal FS, PS Cooke, DL Buchanan, P Palanza, KA Thayer, SC Nagel, S Parmigiani and WV Welshons. 1998. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals in the size of reproductive organs, daily sperm production and behavior. *Toxicol. Ind. Health* 14:239-260.

Manuscript Received: March 25, 2003

Revision Accepted: April 15, 2003

Responsible Editorial Member: Don Chan Choi

(Yong-In Univ.)