

내분비계 장애물질인 Bisphenol A의 free radical 생성을 통한 독성발현

안 광 현, 김 봉 희*

충남대학교 약학대학

Cytotoxicity of Environmental Estrogenic Compound, Bisphenol A, via Generation of Free Radicals

Kwang-hyun Ahn and Bong Hee Kim*

Department of Pharmacy, Chungnam National University Daejeon, Korea

ABSTRACT

Bisphenol A shares similarities in structure, metabolism and action with DES, a known human teratogen and carcinogen. Bisphenol A, a monomer of polycarbonate and epoxy resins, has been detected in canned food and human saliva. The purpose of the this study was to evaluate the cytotoxicity, cell proliferation of bisphenol A in the presence of a rat liver S9 mix, containing cytochrome P450 enzymes, and Cu (II). In the present study, Bisphenol A in combination with Cu (II) exhibited an enhancement in cytotoxicity which were inhibited by free radical scavengers. The content of malondialdehyde, an end product of lipid peroxidation, was also found to increase with concentration of bisphenol A. Also, we examined the change of CuZn-SOD, Mn-SOD, catalase and GPx activities in the MCF-7 cells exposed to bisphenol A. The activities of CuZn-SOD, GPx, catalase were found to decrease with bisphenol A concentration. Meanwhile, the activity of Mn-SOD was unchanged. This indicated that elevated oxidative stress caused by imbalance between the production and removal of free radicals occurred in cells.

Key words : bisphenol A, cytotoxicity, cell proliferation, free radical scavengers

서 론

야생생물 뿐만 아니라 인간을 포함한 포유동물의 생식기능에도 이상을 일으키는 각종 내분비계 장애물질에 대한 위협이 심각한 상태에 이르렀다 (Safe *et al.*, 1995; Kavlock *et al.*, 1996). 내분비계 장애물질의 영향은 지난 70년대 초에 유엔에서 처음

으로 보고된 후 야생생물의 생식기능이상, 암·수 동체 잉어 발견 등 야생생물에서 다양한 피해사례가 발견되고 있다 (Colborn *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1993; Dhar *et al.*, 1998) 또한 그 피해는 사람에서도 최근 50년 동안 남성의 정자수 및 정액량 변화와 유방암, 자궁암, 전립선암 등의 생식기관에 관련된 암 발생이 과거에 비해 현저하게 증가된 것 과도 관련이 있는 것으로 추정되고 있으며 오존층 파괴, 지구온난화 문제와 함께 새로운 환경문제로 대두되고 있다 (Sharpe *et al.*, 1993; Birnbaum *et al.*,

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-42-821-5935, E-mail: bhkimnh@cnu.ac.kr

1994). 이 중 음료수 캔의 코팅 물질등에 사용되는 Bisphenol A가 내분비계 장애물질로 분류되고 있는데 (Brotons *et al.*, 1995) 그 이유는 여성호르몬인 에스트로젠과 같은 효과가 있다고 보고되고 있기 때문이며 (Bruder *et al.*, 1997; Arnold *et al.*, 1996) 이 중 특히 bisphenol A가 주목을 받고 있는 이유는 bisphenol A가 현재 에폭시 레진과 폴리카보네이트 플라스틱의 원료로 사용되고 있기 때문이다. 현재 미국, 일본을 비롯한 선진국에서 내분비계 장애물질의 모니터링 뿐만 아니라 독성기전연구 및 인체에 미치는 영향에 관한 다양한 연구가 활발히 진행되고 있는데 최근 내분비계 장애물질의 free radical 생성에 따른 독성현상에 관심이 집중되고 있다. 미국 CDC (Center for disease control and prevention)에서 분류한 48종의 내분비계 장애물질에 대하여 조사한 결과 50% 화학물질이 free radical을 형성하고 생식독성, 발암성, 변이원성, 면역독성 및 신경독성을 나타내는 화학물질은 각각 81%, 79%, 73%, 52% 및 51%임을 확인하였다. 따라서 내분비계 장애물질의 독성현상은 free radical 발생과 밀접한 관련이 있으며 최근 연구결과에 따르면 합성수지 제품에 함유된 내분비계 장애물질이 매우 낮은 농도에서도 인간의 면역기능을 교란시킬 뿐만 아니라 과량이되면 암이나 노화의 원인인 활성산소를 증가시킬 가능성이 있다고 보고하였다 (Dizdaraglu, 1991; Stadtman, 1998). 따라서 본 연구에서는 내분비계 장애물질의 free radical 생성을 통한 독성기전을 알아보고자 DES와 구조적 유사성을 가지며 간 대사시 catechol 모핵을 가지는 대사체를 형성하는 bisphenol A의 대사과정 중 free radical 생성여부와 그에 따른 독성현상을 알아보고자 하였다. 우선 bisphenol A의 대사적 활성화를 위해 rat의 간에서 유래한 S9 mixture를 사용하였으며 대사적 활성화에 따른 세포독성과 세포증식률의 변화를 알아보고 Cu (II)와 같은 미량의 금속원소는 catechol의 redox-cycling을 자극한다고 알려져 있으므로 (A.M. seacat *et al.*, 1997) Cu (II)가 bisphenol A의 대사체의 redox cycling에 미치는 영향을 알아보고자 사람유래 세포주에서 지질과산화 정도, free radical 발생에 따른 SOD, Catalase, GPx의 활성도 변화를 알아보았다.

재료 및 방법

사람 유래 세포로서 breast carcinoma, estrogen receptor positive MCF-7 cells, hepatoblastoma HepG2, epidermal cells인 HaCaT cells을 생명공학 연구소로부터 분양받았다. MCF-7 cells, HepG2 cells and HaCaT cells의 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand island, N.Y., USA) 과 1%의 penicillin-streptomycin을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하였다. 3~4일마다 계대배양 하였으며 자연발생적인 돌연변이의 생성을 최소화하고자 10번 미만으로 계대배양한 세포만을 실험에 사용하였다. 포화습도 하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C Dual CO₂ incubator에서 배양하였다.

Bisphenol A, 17β-estradiol, Tamoxifen, Thiobarbituric acid, 1, 1', 3, 3'-tetraethoxypropane, Proteinase K, Agarose, Ascorbic acid 등의 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS) 등은 GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 기타 시약 및 용매는 특급 또는 1급을 사용하였다.

1. Bisphenol A의 세포독성 측정

96-well에 well당 10,000개의 세포를 배양하였다. 24, 48, 72시간 배양 후 S9 (10%) mix를 넣어 주었다. 각 well에 6가지의 농도의 bisphenol A와 200 μM Cu (II)를 넣어 72시간 배양하였다. 또한 bisphenol A에 의한 비가역적 손상을 알아보기 위해 두 개의 plate를 사용하여 다른 하나의 경우 72시간 후에 bisphenol A가 존재하지 않는 배지로 교환한 후 72시간 더 배양하였다. 세포 생존률은 MTT assay (김 등, 2002)를 사용하여 측정하였다.

2. Bisphenol A의 세포증식률 측정

대사활성계에서 bisphenol A의 증식률을 측정하기 위하여 S9 mix를 사용하여 E-screen assay를 수행하였다. 시험 하루 전 시험에 사용될 세포의 배지를 교환하고, 시험 당일 배지가 들어있는 T25 cm² 플라스크의 배지를 흡인 제거한 다음, phos-

phate buffered saline (PBS) 완충액으로 1회 세정하였다. 0.25% 트립신 용액을 플라스크당 500 μ l 첨가하여 MCF-7 cells이 플라스크 바닥에서 분리되면 (1~2분 정도) 배지 5 ml를 넣어서 피펫팅하였다. 배지를 15 ml 원심분리관으로 옮겨 원심분리시켜 (295 \times g, 5분) 상정액을 흡인제거한 다음, 세포가 남아있는 원심분리관에 배지를 넣고 피펫팅하여 세포를 단일화시켜 세포수를 측정하였다. 2×10^3 cells/well로 96 well 배양판에 분주한 후 (well당 배지량 100 μ l) 배양판을 천천히 흔들어 세포가 균일하게 분산되도록 하고 5% CO₂, 37°C로 조절된 배양기에서 24시간 배양시킨 후, well에 들어있는 배지를 흡인·제거하였다. 혈청에 함유된 세포증식인자를 제거한 Charcoal-dextran 처리 FBS (CD-FBS)를 5% 함유한 DMEM 배지 90 μ l를 well에 넣고 시험물질의 농도를 0.05 μ M부터 최고 5 μ M까지 조절하여 각 농도별로 10 μ l씩 well에 가하였다. 이때, 용매로 사용한 ethanol의 최종농도는 0.5%가 되도록 조절하였다. 시료가 첨가된 96-well plate를 5% CO₂, 37°C로 조절된 배양기에서 6일간 배양한 후, SRB assay로 세포 수를 측정하였다. 6일간 배양 후 96-well 배양판의 배지를 흡인·제거하고 4°C에 보관된 10% Trichloroacetic acid (TCA)를 well당 100 μ l씩 첨가하고 4°C에서 1시간동안 정치하여 세포를 고정하였다. 고정액을 제거하고 수세한 후 종이 타월로 물기를 완전히 흡수시켜 상온에서 건조시켰다. 건조된 배양판에 0.4% SRB (1% acetic acid에 용해)를 well당 50 μ l씩 가하여 상온에서 30분정도 염색한 후, 100 μ l의 1% acetic acid로 4회 세척하고 상온에서 건조시켜 10 mM Tris-buffer (pH 10.5)를 well당 100 μ l씩 분주한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포수를 측정하였다.

3. Bisphenol A의 Lipid peroxidation 측정

3.5×10^5 개의 세포를 T75 cm²플라스크에 배양하였다. 3일 후 S9 (10%) mix, 200 μ M Cu (II)와 serum-free medium에 녹인 bisphenol A를 농도별로 72시간 배양하였다. 대조군으로는 serum-free medium 또는 200 μ M Cu (II)만을 배양하였다. 항산화제와 라디칼 소거제의 지질과산화 억제정도를 알아보기 위하여 SOD (incubation level: 100 units), catalase (incubation level: 100 units), Vit C (incuba-

tion level: 50 μ M)을 bisphenol A를 넣어주기 4시간 전에 세포와 반응시킨 후 72시간 배양하였다. 배양 종료 후 각각의 세포를 모두 eppendorf tube에 회수하여 3% SDS 1 ml을 넣어 세포를 lysis 시켰다. 이것을 test tube에 옮긴 후 cell lysate 1 ml에 멸균 증류수 0.1 ml, 40 mM EDTA 0.1 ml, 2% BHT (in ethanol) 0.1 ml을 첨가하였다. 대조군은 cell lysate 대신에 3% SDS 1 ml을 사용하였다. TBA reagent (1 g trichloroacetic acid, 27 mg thiobarbituric acid in 10 ml) 1 ml을 각 tube에 넣은 후 vortex 하였다. Reaction mixture를 90°C에서 20분간 반응시킨 후 실온에서 식힌 다음 n-butanol 1.5 ml을 넣어주었다. 4000 rpm에서 5분동안 원심분리하여 층을 분리시킨 후 추출된 TBARS가 포함된 상등액을 취해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1, 1, 3, 3-tetraethoxy-propane (TEP)의 산가수분해로 얻어진 Malondialdehyde (MDA)를 TBARS 정량을 위한 standard로 사용하였으며 1~10 μ M MDA 0.1 ml를 SDS solution에 첨가하여 calibration하였다.

4. Free radical scavenging enzyme activities 측정

세포내의 Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, catalase and GPx의 활성도를 측정하기 위하여 1×10^6 개의 세포를 S9 (10%) mix, 200 μ M Cu (II), bisphenol A 250 μ M와 T75 cm² flask에서 3일간 배양한 후 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 monolayer cells을 3번 세척해준 다음 Trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 회수한 후 원심분리하여 cell pellets을 얻었다. 여기서 얻어진 cell pellet을 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 100 mM phosphate buffer (pH 7.5), 0.25% sodium cholate and protease inhibitors로 이루어진 NEP buffer에 suspension 시켰다. Cell lysate를 800 g에서 5분간 원심분리하여 가라앉힌 후 free radical scavenging enzymes의 활성을 측정하기 위하여 상등액을 얻었다. Catalase activity는 240 nm에서 흡광도의 감소로 나타나는 H₂O₂의 분해되는 양으로 측정하였다. 10 mM H₂O₂을 포함하는 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 1 ml에 20 μ l의 cell lysate을 넣어 반응시켜 240 nm에서 흡광도를 측정하였다. Enzyme activity는 240 nm에서 H₂O₂의 extinction coefficient 43.6 M⁻¹cm⁻¹임을 이용하여

계산하였다. GPx activity는 enzyme activity가 NADPH의 산화되는 양에 비례함을 이용하여 측정하였다. 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 0.23 mM NADPH, 2 mM glutathione, 1 U/ml glutathione reductase, 0.33 mM t-butyl-hydroperoxide를 포함하는 1 ml의 reaction mixture에 20 μ l의 cell lysate을 넣어 반응시켜 340 nm에서 NADPH의 흡광도의 감소를 측정하였다. GPx의 activity는 bovine erythrocyte GPx (Sigma)의 standard curve를 사용하여 계산하였다. SOD activity는 pyrogallol의 자동산화물을 억제하는 enzyme activity를 측정하였다. 1 mM EDTA를 포함하는 50 mM Tris-cacodylate buffer (pH 8.2) 200 μ l와 0.7 ml H₂O, 100 μ l 2 mM pyrogallol을 포함하는 reaction mixture에 cell lysate 20 μ l를 첨가하여 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자동산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 흡광도 증가로 나타난다. Mn-SOD의 activity는 cell lysate에 5 mM의 NaCN을 4°C에서 1시간 반응시켜 CuZn SOD를 불활성시킨 다음 reaction mixture에 cell lysate 20 μ l를 첨가하여 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 세포주에 대한 bisphenol A의 세포독성

각 세포주의 50% 증식억제 농도 (IC₅₀)는 MCF-7 cells은 89.46 μ M, HepG2 cells은 271.62 μ M, HaCaT cells은 164.63 μ M이었다. MCF-7 cells의 경우 가장 낮은 IC₅₀값을 가져 다른 세포주에 비해 bisphenol A에 가장 민감하게 반응하였으며 HepG2 cells은 가장 높은 IC₅₀값을 나타냈다(Fig. 1).

2. S9 mix 존재하에서 bisphenol A의 세포독성

각 세포주의 50% 증식억제 농도 (IC₅₀)는 대사활성화 존재시 HaCaT cells와 HepG2 cells의 경우 1000 μ M 이하에서는 IC₅₀을 구할 수 없었으며 MCF-7 cells의 경우 702.5 μ M으로 나타나 대사활성화 존재시 각 세포에 대한 세포독성이 대사활성화 부재하에서 보다 크게 감소한 것으로 나타났다(Fig. 2).

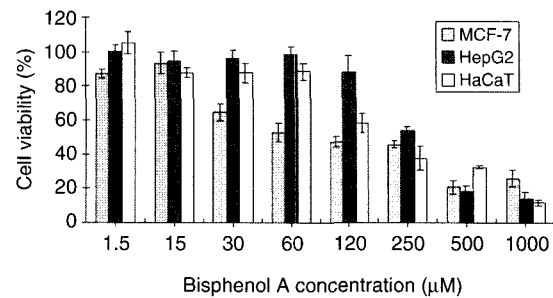


Fig. 1. *In vitro* cytotoxicity of bisphenol A in MCF-7, HepG2, HaCaT cells. Each cells were cultured with indicated concentrations of bisphenol A for 72 h. MTT assay was performed as described in Methods. Data represent O.D average \pm SD from four separate experiments.

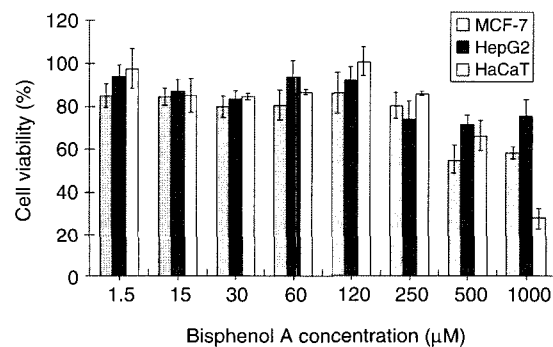


Fig. 2. *In vitro* cytotoxicity of bisphenol A in MCF-7, HepG2, HaCaT cells. Each cells were cultured with indicated concentrations of bisphenol A and S9 mix for 72 h. MTT assay was performed as described in Methods. Data represent O.D average \pm SD from four separate experiments.

3. S9 mix와 Cu (II) 존재하에서 bisphenol A의 세포독성

대사활성화 존재하에서 증가했던 생존률이 Cu (II)를 첨가한 결과 생존률이 크게 감소하는 결과가 나타났다. 세포 각각의 IC₅₀은 MCF-7 cells은 94.05 μ M, HepG2 cells은 233.36 μ M, HaCaT cells은 126.15 μ M으로 나타나 bisphenol A만 세포와 배양했을 경우와 비교해보면 MCF-7 cells의 경우만 약간 높아졌을 뿐 HepG2 cells과 HaCaT cells은 오히려 낮아졌다(Fig. 3).

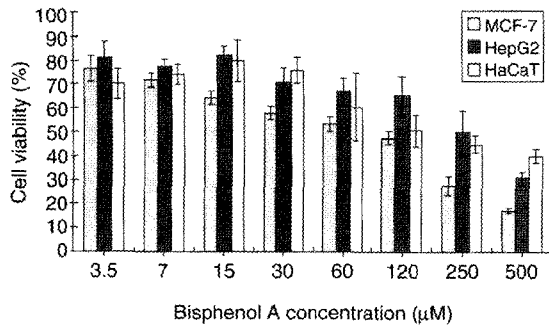


Fig. 3. *In vitro* cytotoxicity of bisphenol A in MCF-7, HepG2, HaCaT cells. Each cells were cultured with indicated concentration of bisphenol A, S9 mix and CuCl₂ for 72 h. MTT assay was performed as described in Methods. Data represent O.D average \pm SD from four separate experiments.

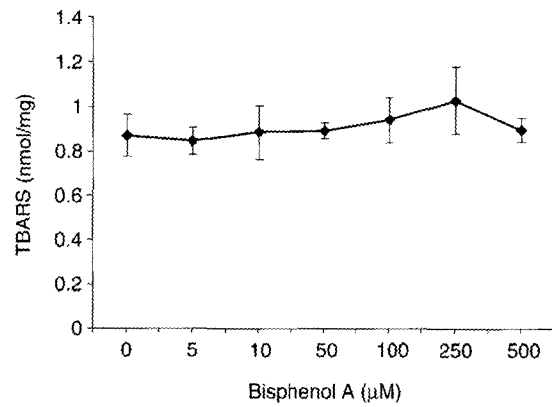


Fig. 5. Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in HepG2 cells. Results are expressed as the mean \pm S.D. of four determinations.

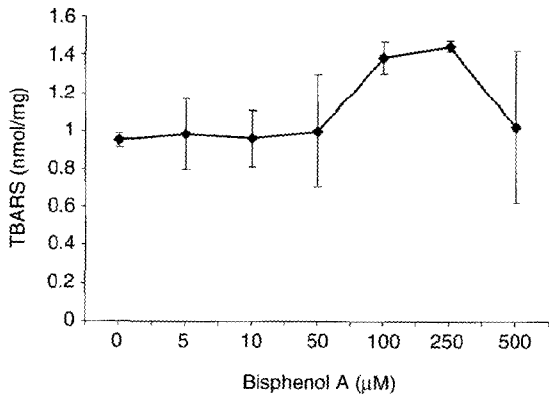


Fig. 4. Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in HaCaT cells. Results are expressed as the mean \pm S.D. of four determinations.

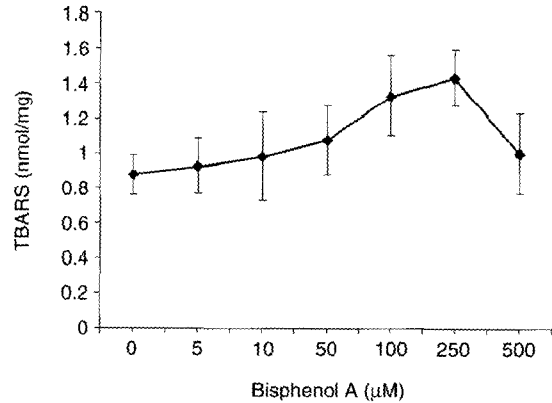


Fig. 6. Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in MCF-7 cells. Results are expressed as the mean \pm S.D. of four determinations.

4. 각 세포주에서의 지질과산화 측정

HaCaT cells에서는 50 µM까지는 대조군과 비교하여 지질과산화를 일으키지 않았으나 100 µM에서부터 유의성 있게 지질과산화가 증가하기 시작하여 250 µM에서는 TBARS값이 1.452 nmol/mg으로 최대로 나타나 대조군에 비해 지질과산화가 52.57% 증가하였다(Fig. 4). HepG2 cells에서는 100 µM까지는 TBARS값에 있어 유의성 있는 변화가 없었으나 250 µM에서 TBARS값이 1.027 nmol/mg으로 최대로 나타나 대조군에 비해 18.45% 증가하였다(Fig. 5). MCF-7 cells에서는 100 µM 이상에서

유의성 있게 지질과산화가 증가하여 250 µM에서 TBARS값이 1.432 nmol/mg으로 최대로 나타나 대조군에 비해 63.53% 지질과산화 증가가 나타났다(Fig. 6, Table 1).

5. 항산화제가 지질과산화에 미치는 영향

MCF-7 cells에서 catalase, SOD, Vit C는 지질과산화를 각각 88.74 \pm 1.34%, 95.98 \pm 3.15%, 91.42 \pm 6.45% 억제하였고 HepG2 cells에서 catalase, SOD, Vit C는 각각 74.65 \pm 4.15%, 78.01 \pm 4.6%, 78.53 \pm 4.7% 억제하였으며 HaCaT cells의 경우 catalase,

Table 1. Comparison of cytotoxicity between MCF-7 cells, HaCaT cells and HepG2 cells

Chemicals	IC ₅₀ , μM		
	MCF-7	HaCaT	HepG2
Bisphenol A	89.46	164.63	271.62
Bisphenol A + S9 mix	702.5	>1,000	>1,000
Bisphenol A + S9 mix + Cu (II)	94.05	126.15	233.36

* Cells were incubated for 72 h. The cells were harvested with trypsin-EDTA.

* IC₅₀ values are the concentration producing 50% inhibition of cell growth compared the control (n=6).

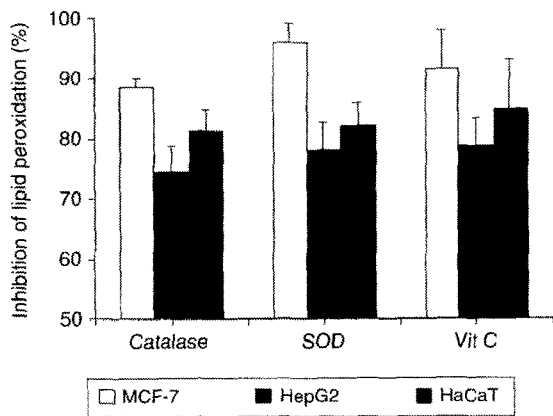


Fig. 7. Inhibitory Effects of Preincubation of Human-derived cells for 4 h with ROS Scavengers on Lipid Peroxidation Levels in the cells incubation for 72 hr with 5 μM (HaCaT), 500 μM (HepG2), 100 μM (MCF-7) of Bisphenol A.

SOD, Vit C는 각각 81.33±3.46%, 82.1±3.82%, 84.76±8.26% 억제하였다. MCF-7 cells에서는 SOD가 HepG2 cells과 HaCaT cells에서는 Vit C가 억제효과가 가장 크게 나타났다(Fig. 7).

6. 항산화효소의 활성도

MCF-7 cells을 250 μM의 bisphenol A와 72시간 반응시킨 결과 SOD activity가 대조군에 비해 약 30% 감소하였으며 CuZnSOD를 억제하는 cyanide를 사용하여 MnSOD의 activity를 측정한 결과 대조군과 비교하여 차이를 보이지 않았다(Fig. 8). GPx는 MCF-7 cells에서 bisphenol A의 농도가 증가함에 따라 activity가 감소(Fig. 9)하였으며 cata-

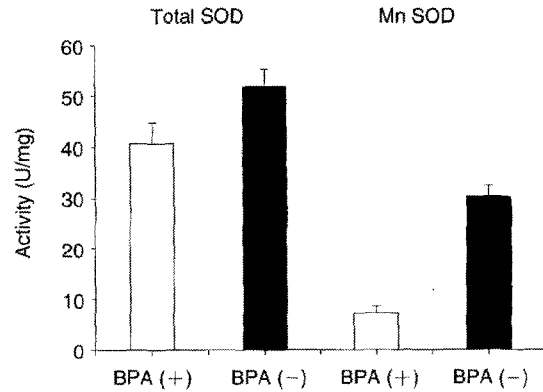


Fig. 8. SOD activity in BPA-treated MCF-7 cells. Lysates prepared from cells grown in the absence or presence of 250 μM BPA for 2 days were tested for total SOD activity, based on the inhibition of oxidation of NADH by superoxide anion. The assays were then repeated with sodium cyanide in the reaction mixture to inhibit CuZn SOD.

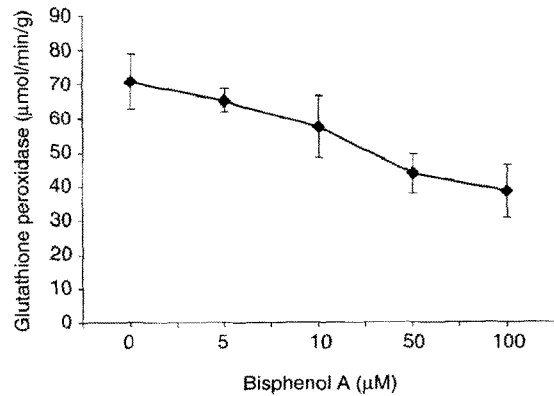


Fig. 9. GPx activity change in BPA-treated MCF-7 cells. Cell lysates prepared from cells grown in the absence or presence of the indicated dose of BPA for 2 days.

Table 2. Catalase activity in control and BPA-treated MCF-7 cells

BPA (μM)	Catalase specific activity (μmol/mg/m)
0	11.48
5	10.92
10	9.58
50	8.87
100	7.51

* Cells were incubated with the indicated dose of BPA for

lase activity 역시 Bisphenol A 농도가 증감함에 따라 대조군에 비해 약간 감소하는 경향을 보였다 (Table 2).

고 찰

대사활성화에서 bisphenol A의 세포독성변화를 알아본 결과 bisphenol A의 세포에 대한 독성이 크게 감소하였다. 따라서 bisphenol A는 간 대사에 의해 세포독성이 낮은 물질로 대사되며 생체에 유입 시 간 대사를 받는 만큼 생체독성이 감소할 것임을 예상할 수 있다. 이러한 연구결과를 바탕으로 bisphenol A와 bisphenol A metabolites으로의 전환 과정에서 redox cycling을 통한 free radical의 생성 여부를 알아보기 위하여 Cu (II)를 사용하였다. Cu (II)를 배지에 첨가한 결과 S9 mix에 의해 감소되었던 세포독성이 S9 mix를 첨가하지 않았을 때만큼 증가하였다. 따라서 DNA strand scission 과정 중 Cu (II)와 free radical이 관여함을 알 수 있었다. 따라서 Cu (II)를 넣어준 배지에서 bisphenol A는 S9 mix존재시 redox cycling을 거쳐 semiquinone과 quinone을 형성하며 이 과정에서 free radical을 형성한다고 여겨진다. 에스트로겐의 대사에 관한 연구에서 Cytochrome P450 oxidase/NADPH-dependent cytochrome P450 reductase system에 의한 catechol estrogen의 redox cycling이 free radical생성을 일으키기 발견되었으며 (Cavaliere *et al.*, 1997) Peroxidase 역시 catechol과 catecholamine을 quinone 형태로 활성화시킴이 보고되었다 (Bolt, 1979). 따라서 이러한 결과들을 종합해볼 때 cytochrome P450-class mixed function oxidase 혹은 peroxidase 같은 효소들은 bisphenol A의 산화를 촉진시켜 bisphenol A의 대사체로 catechol 구조를 갖는 5-hydroxybisphenol A를 형성하며 이러한 redox cycling 과정이 Cu (II)에 의해 촉진되어 free radical을 형성한다고 추측된다. 그러나 생체내에서 copper와 같은 미량금속은 Fenton reaction에 의한 free radical 생성을 자극하나 catechol compound의 산화에 기인하는 다른 여러 pathway가 존재하므로 bisphenol A의 redox cycling을 통한 free radical 생성은 더 많은 연구를 통해 확인되어야 할 것이다. 염색체내에서의 bisphenol A와 copper의 상호작용은 Cu (II)/Cu

(I)의 redox cycling을 자극하여 free radical을 생성하며 DNA에 인접한 곳에서 염색체내의 copper와의 상호작용에 의한 free radical의 발생은 산화적 DNA 손상 (oxidative DNA damage)을 일으킬 수 있다 (Roy *et al.*, 1999). 결국 bisphenol A는 간에서 대사를 받아 catechol 모핵구조를 가진 5-hydroxybisphenol A로 일부 대사되며 이것은 redox cycling을 거쳐 free radical, 특히 DNA damage와 cytotoxicity를 일으키는 hydroxyl radical을 생성한다고 여겨진다. 이러한 과정 중 Cu는 초기의 5-hydroxybisphenol A의 semiquinone intermediate로의 산화를 촉진시키며 quinone form으로 산화되면서 superoxide anion을 형성하게 된다. 세포내의 SOD는 superoxide anion을 hydrogen peroxide로 전환시키며 결국에는 Cu (I)와 같은 미량의 금속이온의 존재하에 반응성이 매우 높은 hydroxyl radical을 형성하게 될 것이다. 이러한 free radical의 형성을 확인하기 위해 세포에서의 지질과산화와 항산화효소의 활성도 변화를 측정된 결과 지질과산화수치가 약간 증가하는 결과가 나타났으며 앞서 수행한 세포독성 실험결과에서 최대 독성을 나타내는 농도와 최대 지질과산화유발 농도가 유사하였다. 따라서 이들 결과를 종합해 보면 bisphenol A에 의한 세포독성은 bisphenol A를 처리한 세포에 있어서 지질과산화 정도와 관련이 있으며 항산화 효소들의 활성이 감소한 것으로 보아 세포내의 항산화 효소들이 cytotoxic lipid peroxidation product로부터 세포를 보호하지 못하였음을 알 수 있다.

참 고 문 헌

- 김현진, 김봉희. *In vitro* 실험법에 의한 천연물 중의 UVA 광독성 억제제 검색, 한국환경독성학회지 2002; 17(3): 253-259.
- Arnold SF and McLachlan JA. Synergistic signals in the environment, *Environ. Health. Perspect.* 1996; 101: 1020-1023.
- Birnbaum LS. Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins, and other xenobiotics: implications for policy and future research. *Environ. Health. Perspect.*, 1994; 102: 676-679.
- Bolt HM. Metabolism of estrogens-natural and synthetic, *Pharm. Ther.* 1979; 4: 155-181.
- Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V

- and Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ health Perspect.* 1995; 103: 608-612.
- Bruder JM, Sobek L and Oettel M. Dehydroepiandroestrone stimulates the estrogen response element, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1997; 62: 461-466.
- Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S, Johansson SL, Patil KD, Gross ML, Gooden JK, Ramanathan R, Cerny RL and Rogan EG. Molecular origin of cancer: catechol estrogen 3,4-quinones as endogenous tumors initiators, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1997; 10937-10942.
- Colborn T, Dumanoski D and Myers JP. *In our stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival? A Scientific Detective Story.* Dutton Books, New York. 1996.
- Davis DL, Bredlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, and Anton-Culver H. Medical hypothesis: Xenoestrogens as preventable causes of breast cancer, *Environ. Health Perspect.* 1993; 101: 372-377.
- Dhar JD, Mishra R and Setty BS. Estrogen, androgen and antiestrogen responses in the accessory organs of male rats during different phases of life, *Endocr. Res.* 1998; 24: 159-169.
- Kavlock RJ and Ankley GT. A perspective on the risk assessment process for endocrine = disruptive effects of wildlife and human health, *Risk Anal.* 1996; 16: 731-739.
- Roy D and Liehr JG. Estrogen, DNA damage and mutations, *Mutat. Res.* 1999; 424: 107-115.
- Safe SH. Environmental and dietary estrogens and human health: Is there a problem? *Environ. Health Perspect.*, 1995; 103: 346-351.
- Seacat AM, Kuppusamy P, Zweier JL and Yager JD. ESR identification of free radicals formed from the oxidation of catechol estrogens by Cu^{2+} , *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; 347: 45-52.
- Sharpe RM and Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in failing sperm counts and disorders of the male reproductive tract?, *Lancet* 1993; 341: 1392-1395.