

마우스에서 Bisphenol A의 아급성노출이 IgM-PFC형성능과 비장세포 증식능에 미치는 영향

변 정 아, 표 명 윤*

숙명여자대학교 약학대학

Effects of Subacute Oral Administration of Bisphenol A on the IgM-PFC and Proliferation of Splenocytes in Mice

Jung A Byun and Myoung Yun Pyo*

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University

ABSTRACT

To determine whether or not bisphenol A affects the immune system, female ICR mice were treated bisphenol A (BPA) orally at the doses of 100, 500 and 1,000 mg/kg for 30 consecutive days. Four days before enumerating plaque-forming cells (PFCs) mice were immunized intraperitoneally with sheep red blood cells (SRBCs). The spleen cellularity and PFC/spleen were significantly reduced by 30-day exposure to BPA (1,000 mg/kg/day), but the PFC/10⁶ spleen cells was slightly decreased. When splenocytes isolated from the mice exposed to BPA for 30 days were cultured in the presence of LPS, Con A or PHA with IL-2, the lymphocyte proliferation *ex vivo* was not significantly suppressed by BPA. Our present results indicated that 30-day exposure of mice to BPA might have mild immunotoxic potential.

Key words : Bisphenol A, IgM-PFC, splenic proliferation

서 론

Bisphenol A (BPA : 4, 4'-isopropylidenediphenol)은 치과용 수지와 식품포장재, 캔, 병마개 등에 이용되는 epoxy resin과 polycarbonate제조에 사용되는 monomer로 내분비계 장애물질로 분류되는 xenobiotics이다.

근래에 BPA가 polycarbonate flask (Krishnan *et al.*, 1993), 멸균한 polycarbonate 재질의 우유병

(Mountfort *et al.*, 1997), 시판되는 통조림식품 (Goodson *et al.*, 2002), 심폐기 (Sakurai *et al.*, 2002)나 치과용 수지 (Olea *et al.*, 1996) 등에서 유출되는 것으로 보고되었으며, BPA가 태반을 통과하여 모체 뿐 아니라 태아, 태반에서도 검출된 것으로 보고되어 (Kang and Kondo, 2002) 인체에 미치는 영향에 대한 관심이 높아지고 있다.

BPA의 estrogenic activity (Chen *et al.*, 2002; Papaconstantinou *et al.*, 2000), 유전독성 (Hiliard *et al.*, 1998), 생식독성 (Morrissey *et al.*, 1987)은 이미 잘 알려져 있고, 그 외에도 BPA가 human plasma sex hormone binding protein (hSHBG)과 결합하여

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-710-9573, E-mail: mypyo@sdic.sookmyung.ac.kr

체내에서 작용함으로써 체내에 hSHBG와 결합하지 않은 estrogen과 testosterone의 양을 증가시켜 체내의 호르몬균형을 잃게 하거나 (Déchaud *et al.*, 1999) 뇌에도 영향을 미칠 수 있다고 보고되어 있다 (Farabollini *et al.* 2002).

이처럼 BPA의 유전독성, 발암성, 생식독성 등에 대한 연구가 많이 보고된 것에 비해 면역계에 미치는 영향에 대한 연구는 많이 보고되지 않았다. 본 연구실에서는 이미 BPA를 마우스에 급성노출시킨 후 면역병리학적변화, 혈중 IgM 항체생성능, 임파구 증식능 등에 미치는 영향을 보고 (표명윤과 변정아, 2001)하였다. 본 연구에서는 일반적으로 환경오염물질이 반복적으로 노출된다는 점을 고려하여 BPA를 30일간 경구투여하여 아급성노출시킨 후 체중에 대한 비장의 중량비와 비장 세포수, splenic IgM-PFC 생성능과 임파구 증식능 등에 미치는 영향을 실험하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

3~4주령인 ICR계 암컷 마우스를 유한양행중앙연구소로부터 분양받아 삼양사에서 구입한 고품사료와 물을 자유롭게 공급하면서 실험동물실에서 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.

2. 실험물질 조제 및 투여

실험물질 bisphenol A (BPA, 순도 99%)는 Aldrich 사 제품 (USA)을 구입하여 마우스 체중 10g 당 0.1 ml 투여할 수 있는 농도로 올리브 기름에 현탁하여 사용하였다. BPA의 투여 용량을 결정하기 위하여 ICR 암컷 마우스에 용량별 BPA를 1회 경구투여한 후 Litchfield & Wilcoxon법 (Tallarida and Murray, 1981)을 이용하여 얻은 LD₅₀ (4.61 g/kg)값과 EPA의 면역독성시험 지침서 (EPA, 1996)를 참고하였다. BPA를 100, 500, 1,000 mg/kg/day 용량으로 마우스에 주 5회 30일간 경구투여한 후 32일째에 모든 실험을 하였다. 모든 실험의 대조군에는 동량의 olive oil을 같은 방법으로 투여하였다.

3. 비장세포중의 IgM-plaque forming cell수 측정

비장세포중의 IgM항체 생성세포수 (plaque forming cell : PFC)를 측정하기 위한 항원으로 한국배지 (주)에서 구입한 면양적혈구 (sheep red blood cell : SRBC)를 4°C에 보관하면서 2주 이내에 사용하였다. 사용직전 PBS 용액으로 3회 원심세척 (2,500 rpm, 5 min, 4°C)한 후, SRBC 농도가 2×10^9 cells/ml가 되도록 PBS 용액으로 조정하여 0.2 ml (4×10^8 cells)/mice를 BPA 투여 28일째에 모든 실험동물의 복강내에 투여하여 면역하였다. 면역일로부터 4일 후에 모든 실험동물군의 비장을 적출하여 빙냉의 HBSS에 넣고 frosted slide glass를 이용하여 비장세포액을 만들어 원심분리 (1,000 rpm, 10 min, 4°C)한 후 세포 침전물에 RBC lysis buffer를 가하였다. 적혈구를 용혈시킨 후 원심분리 (1,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 상등액을 제거하고 침전된 비장세포를 HBSS로 2회 원심세척 (1,000 rpm, 10 min, 4°C)한 후 일정량의 HBSS 용액을 가하여 viable cell수를 trypan blue exclusion method (Dolye *et al.*, 1993)로 측정하여 2×10^6 cells/ml의 비장세포 현탁액을 만들었다.

IgM-PFC수를 측정하기 위해 Cunningham의 방법 (Cunningham and Szenberg, 1968)을 약간 변형시킨 방법 (Deyo and Kerkvliet, 1990)을 사용하였다. 즉, SRBC부유액 (5×10^9 cells/ml) 0.5 ml, guinea pig complement 0.3 ml, 10% FBS-HBSS 용액 2.0 ml를 혼합한 액 50 μ l와 비장세포 현탁액 (2×10^6 cells/ml) 50 μ l를 혼합하여 microchamber에 35 μ l씩 주입하고, vaseline과 paraffin을 동량으로 혼합한 액으로 밀봉하여 37°C에서 1시간 방치한 후 형성되는 PFC수를 현미경하에서 측정하여 비장세포 10^6 개 중의 항체생성 세포수와 spleen당 항체생성 세포수로 계산하여 나타내었다.

4. Mitogen에 의한 임파구 증식능 측정

실험물질인 BPA를 100, 500, 1,000 mg/kg/day 용량으로 30일간 투여한 후 2일째에 적출한 마우스 비장의 중량을 측정한 후, 빙냉의 RPMI배지에 넣고 frosted microscope slides를 이용하여 각각의 비장세포액을 만들어 원심분리 (1,000 rpm, 10 min, 4°C)한 후 세포침전물에 RBC lysis buffer를 가했다.

적혈구를 용혈시킨 후 원심분리 (1,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 상등액을 제거하고 PBS로 2회 원심세척한 후 비장세포수를 측정하고 10% FBS-RPMI배지로 4×10^6 cells/ml이 되도록 비장세포액을 만들었다. 96 well flat bottomed microplate (Greiner)의 각 well에 비장세포액 100 μ l (2×10^6 cells/ml)을 가하고 30분간 안정화시킨 후 Con A (2 μ g/ml), PHA (5 μ g/ml)와 IL-2 (0.1 μ g/ml), LPS (50 μ g/ml)를 각각 가하고 10% FBS-RPMI배지로 200 μ l이 되도록 조정된 후 배양 (37°C, 5% CO₂)하였고 72시간 후에 MTT (3 mg/ml) 용액 50 μ l/well을 가하고 4시간동안 배양한 후 생성된 formazan을 DMSO에 용해하여 microplate reader (ELx 800, BIO-TEK instruments, INC.)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 임파구 증식능을 측정하였다.

5. 통계학적 처리

본 실험에서 얻은 측정치를 각 실험군의 평균과 표준편차로 나타내었고, 대조군과의 차이에 대한 유의성은 Student's t-test를 이용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 비장중량비 및 비장세포수 변화

BPA를 30일간 경구투여한 후 마우스에서 적출한 비장의 중량비와 비장세포수 변화를 Table 1에 나타내었다. 마우스 비장을 체중에 대한 중량비로 나타낸 결과 대조군에 비해 차이를 보이지 않았으나 비장세포수는 고용량인 1,000 mg/kg/day군에서 대조군에 비해 30.8% 감소하고 유의성있는 차이를 보여 고용량의 BPA가 마우스에 반복적으로 노출되는 경우 비장세포수에 영향을 주는 것으로 보인다. BPA를 급성노출 (500, 1,000, 2,000 mg/kg)시킨 후 2일째에 비장의 중량변화는 없었으나 비장세포수는 대조군에 비해 모든 용량에서 유의성있게 감소됨을 보고한 바 있다(표명윤과 변정아, 2001).

2. 비장세포종 IgM 용혈반 생성 세포수에 미치는 영향

BPA투여일 28일째에 SRBC 항원을 복강주사하

Table 1. Changes in spleen weight and splenic cellularity in the mice orally exposed to various concentrations of BPA for 30 days

Bisphenol A (mg/kg/day)	Spleen (%)	Cellularity ($\times 10^6$ cells/spleen)
Control	0.48 \pm 0.12	94.33 \pm 19.00
100	0.46 \pm 0.09	95.80 \pm 21.09
500	0.48 \pm 0.11	90.45 \pm 28.75
1,000	0.49 \pm 0.08	65.30 \pm 20.97**

Bisphenol A (BPA) was orally administered to ICR mice (100, 500, and 1,000 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. Changes of spleen weight (%) = (spleen weight/body weight) \times 100. The results are expressed as the means \pm S.D. of 7 separate experiments (5 mice/group/experiment). Significant difference from control group (** p < 0.01).

Table 2. Modulation of IgM-antibody forming response to SRBC in the mice subacutely exposed to BPA.

Bisphenol A (mg/kg/day)	PFC/ 10 ⁶ spleen cells	PFC ($\times 10^3$)/ spleen
Control	3056 \pm 1512	628 \pm 402
100	2961 \pm 1662	659 \pm 522
500	2750 \pm 1584	428 \pm 285
1,000	2733 \pm 1489	430 \pm 199*

BPA was orally administered to ICR mice (100, 500, and 1,000 mg/kg/day) for 30 days. Mice were i.p. immunized with SRBC-antigen on day 28. The results are expressed as the means \pm S.D. of 6 separate experiments (3 mice/group/experiment). Significant difference from control group (* p < 0.05).

여 면역시킨 후 4일째에 비장을 적출하여 IgM PFC수를 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다.

SRBC-항원이 *in vitro*보다는 *ex vivo*로 작용했을 때 PFC생성에 더 예민한 결과를 나타내며 항원주사 후 4일째에 PFC가 가장 많이 생성되므로 (Mishell and Dutton, 1966), 본 실험에서 SRBC를 마우스에 복강주사하여 면역시킨 후 4일째에 PFC를 *ex vivo* 실험으로 측정하였다. BPA를 항원주사 2일 후에 급성노출시킨 경우, 500, 1,000, 2,000 mg/kg/day 투여군에서 PFC수가 대조군에 비해 각각 29.4%, 46.9%, 80.0% 용량 의존적으로 유의성있게 (p < 0.01) 감소되어 BPA에 급성노출되었을 때 체액성 면역반응이 억제되는 것으로 보고되었다(표명윤과 변정아, 2001). 본 실험에서는 BPA를 아급성 노출시킨 경우 500, 1,000 mg/kg/day 용량군에서 PFC/10⁶ spleen cells가 대조군에 비해 각각 10.0%, 10.6

% 감소하는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었고, PFC/spleen은 대조군에 비해 각각 31.9%, 31.6% 감소하였고 특히 1,000 mg/kg/day 용량에서는 유의성있게 ($p < 0.05$) 감소하였다. 이와같이 BPA를 아급성으로 노출시킨 경우에는 급성노출에서 보여준 PFC/ 10^6 spleen cells의 유의성있는 감소가 나타나지 않았는데 이는 BPA에 반복적으로 노출되면서 감수성이 높은 세포는 apoptosis되고 상대적으로 BPA에 감수성이 적어 살아남는 세포가 보상기전에 의해 증식되면서 BPA에 내성을 가지게 된 것으로 생각되며 PFC/spleen은 고용량에서 유의성있는 감소를 나타낸 것은 고용량에서의 spleen cellularity가 감소한 결과와 관련이 있는 것으로 보인다.

3. 임파구 증식능에 미치는 영향

마우스에 BPA를 100, 500, 1,000 mg/kg/day 용량으로 주5회 경구투여하여 30일간 반복적으로 노출시킨 후 2일째에 비장세포액을 제조한 후 마우스 비장세포에 Con A, LPS, 또는 PHA와 IL-2를 가하여 3일간 배양한 후 MTT assay를 이용하여 임파

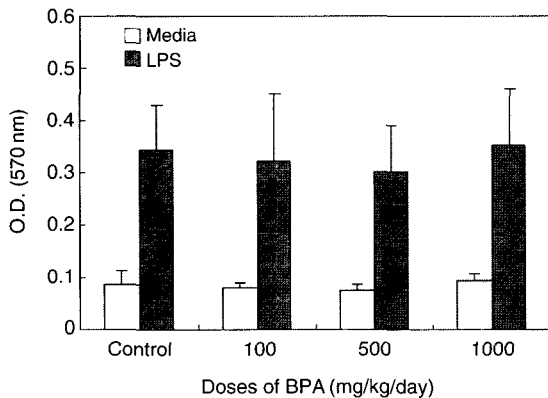


Fig. 1. Alteration in LPS-induced proliferation of splenocytes from the mice orally exposed to various concentrations of BPA for 30 days. BPA was orally administered to ICR mice (100, 500, and 1,000 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. Splenocytes were cultured with LPS (50 μ g/ml) for 3 days. Splenocytes proliferation was assessed by MTT assay. The results are expressed as the means \pm S.E. of 4 separate experiments for 3 mice per treatment.

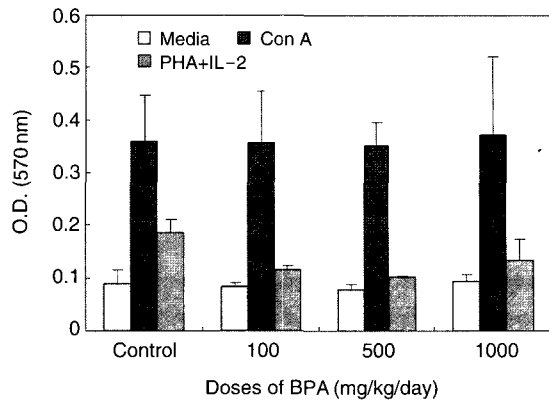


Fig. 2. Alteration in Con A or PHA with IL-2-induced proliferation of splenocytes from the mice orally exposed to various concentrations of BPA for 30 days.

Splenocytes were cultured with Con A (2 μ g/ml), or PHA (5 ng/ml) with IL-2 (0.1 μ g/ml) for 3 days. Other legends and methods are the same as those described in Fig. 1.

구 증식능을 평가하였다 (Figs. 1, 2).

비장세포 증식능을 측정하기 위한 예비실험으로 비장세포 2×10^6 cells/ml에서 마우스의 비장세포 증식능이 가장 높게 나타나는 Con A와 LPS의 농도를 각각 2 μ g/ml와 50 μ g/ml로 정하여 실험하였다. BPA에 500, 1,000, 2,000 mg/kg 용량으로 급성노출된 경우에 Con A와 LPS에 의한 비장세포 증식능이 대조군에 비해 500 mg/kg에서 각각 9.3%, 5.3%, 1,000 mg/kg에서 각각 19.3%, 24.4%, 2,000 mg/kg에서 각각 10.0%, 21.3% 감소하여 유의성있는 감소를 보인다고 보고되었다 (표명윤과 변정아, 2001). 그러나 본 실험에서 100, 500, 1,000 mg/kg 용량으로 아급성 노출시킨 경우에는 Con A에 대한 T 세포 증식능이나 LPS에 대한 B 세포 증식능에서 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 또한 T cell growth factor인 IL-2와 PHA를 동시에 처리하였을 때에는 대조군에 비해 다소 감소되는 경향을 보였으나 유의성이 없어 BPA의 아급성 노출이 임파구 증식능에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 이와같이 비장세포 증식능이 아급성노출의 경우 급성노출보다 그 영향이 뚜렷하지 않은 것은 위의 PFC 결과에서 언급한 이유로 설명할 수 있으나 좀 더 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

Bisphenol A (BPA)를 100, 500, 1,000 mg/kg/day 용량으로 ICR 마우스에 주 5회 30일간 경구 투여하여 아급성노출시킨 후 비장의 중량비, 비장세포수, IgM PFC 수 및 비장세포 증식능을 측정한 결과, 비장의 중량비는 대조군에 비해 차이를 보이지 않았으나 비장세포수는 고용량(1,000 mg/kg/day)에서 유의성있게 감소하였다. SRBC 항원을 BPA 최종 투여 2일 전에 복강주사하였을 때, 고용량에서 비장세포(10^6 cells) 중의 IgM PFC수가 다소 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었고, 비장의 IgM PFC는 고용량(1,000 mg/kg/day)에서 유의성있게 감소하였고, BPA에 30일간 노출된 마우스의 비장세포에 LPS 또는 Con A를 처리하거나 PHA와 IL-2를 함께 가한 결과 비장세포 증식능에 유의성있는 차이를 보이지는 않았다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R04-2000-00057) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 표명윤, 변정아. Bisphenol A의 급성노출이 마우스의 면역 기능에 미치는 영향. 약학회지 2001; 45(1): 55-63.
- Chen MY, Ike M and Fujita M. Acute toxicity, Mutagenicity, and Estrogenicity of Bisphenol-A and other bisphenols. Environ. Toxicol, 2002; 17: 80-86.
- Cunningham A and Szenberg A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. 1968; Immunol., 14: 599-600.
- Déchaud H, Ravard C, Claustrat F, Aude Brac de la perrière and Pugeat M. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). Steroids, 1999; 64: 328-334.
- Deyo JA and Kerkvliet NI. Immunotoxicity of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline following subchronic administration to C57B1/6 mice. Fundam. Appl. Toxicol., 1990; 14: 842-849.
- Dolye A, Griffiths JB and Newell DG. Cell & Tissue Culture; Laboratory procedures, 1993; John Wiley & Sons Ltd., U.K.
- EPA-Health Effects Test Guidelines-Immunotoxicity (1996).
- Farabollini F, Porrini S, Seta DD, Bianchi F and Dessi-Fulgheri F. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. Environmental Health Perspectives, 2002; 110(suppl 3): 409-414.
- Goodson A, Summerfield W and Cooper I. Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. Food Addit Contam, 2002; 19(8): 796-802.
- Hiliard CA, Armstrong MJ, Bradt CI, Hill RB, Greenwood SK and Galloway SM. Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals (nd metabolic poisons. Environmental and molecular mutagenesis, 1998; 31: 316-326.
- Kang J and Kondo F. Determination of bisphenol A in canned pet foods. Res Vet Sci, 2002; 73(2): 177-183.
- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L and Feldman D. Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endo. 1993; 132: 2279-2286.
- Mishell RI and Dutton RW. Immunization of normal mouse spleen cell suspensions *in vitro*. Science., 1966; 153: 1004-1005.
- Morrissey RE, George JD, Price CJ, TYL RW, Marr MC and Kimmel CA. The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. Fundam. Appl. Toxicol., 1987; 8: 571-582.
- Mountfort KA, Kelly J, Jickells SM and Castle L. Investigations into the potential degradation of polycarbonate baby bottles during sterilization with consequent release of bisphenol A. Food Addit Contam, 1997; 14(6-7): 737-740.
- Olea N, Pulgar R, Pérez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedreaza V, Soto AM and Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. Environmental Health perspectives, 1996; 104(3): 298-305.
- Papaconstantinou AD, Umbreit TH, Fisher BR, Goering PL, Lappas NT and Brown KM. Bisphenol A-induced increase in uterine weight and alteration in uterine morphology in ovariectomized B6C3F1 mice: role of the estrogen receptor. Toxicol Sci., 2000; 56: 332-339.
- Sakurai H, Maeda M, Miyahara K, Nakayama M, Murayama H, Hasegawa H, Hayakawa M, Sugiura T and Kamikura K. Extraction of bisphenol-A from a cardiopulmonary bypass circuit. Kyobu Geka, 2002; 55(9): 770-772.
- Tallarida RJ and Murray RB. Manual of Pharmacologic calculations with computer programs, 1981; Springer-Verlag.