

## Bisphenol A와 butyl benzyl phthalate 동시투여가 임신랫드와 차산자에 미치는 영향

최경호\* · 황성희\*,\*\*\* · 권은아\*\* · 김판기\*\*\*†

\*서울대학교 보건대학원, \*\*서울대학교병원 임상약학연구소, \*\*\*용인대학교 환경보건학과

## The Reproductive Toxicity by Combined Treatment of Bisphenol A and Butyl Benzyl Phthalate During Gestation, Lactation Period in Rats

Kyungho Choi\* · Seong Hee Hwang\*,\*\*\* · Ena Kwon\*\* · Pan Gyi Kim\*\*\*†

\*Department of Environmental Health, School of Public Health, Seoul National University, Seoul 110-744

\*\*Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital 110-744

\*\*\*Department of Environmental Health, Yongin University, Yongin 449-714

(Received April 20, 2004; Accepted June 23, 2004)

### ABSTRACTS

This study was performed to evaluate developmental and estrogenic activity of bisphenol A (BPA) and butyl benzyl phthalate (BBP) to the second generation of Sprague-Dawley rats ingested during gestational or lactational periods. Rats were given BPA 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BBP 100  $\text{mg}/\text{kg}$  of pregnancy or lactation periods. Maternal body weight and neonatal body weight were recorded. The rats were sacrificed on day 21 after birth. Reproductive organs of dam and neonate were utilized for receptor binding assay. The plasma concentrations of BPA and MBP, one of the major metabolites of BBP were analyzed with HPLC. The co-administration of BPA and BBP induced slow weight gain compared with single administration in dams. Also, such mixture induced low neonatal body weights in next generation. The dams treated with BPA and BBP during lactational periods showed significant organ weight changes in liver and spleen. The dams exposed during lactational periods showed significant organ weight changes not only in liver and spleen but also in kidney, uterus and ovary. The F1 female rats exposed during lactation periods showed significant organ weight changes in liver, spleen, ovary. The F1 male rats showed significant organ weight changes in liver, kidney, epididymis, vesicular glands, prostate. However, no clear synergistic effects of BPA and BBP were noted. There was no significantly different ER $\alpha$  expression pattern between control and treated groups. However, ER $\alpha$  expression were increased in F1 male testis and female uterus. F1 male showed distinct ER $\alpha$  expression, especially in the group of lactational combined exposure. Synergistic ER $\alpha$  expression was found by combined treatment of BPA and BBP. We could not find any evidences of synergistic effects on BPA and/or BBP combined administration on dams and their fetuses, except in ER $\alpha$  expression of F1 male.

**Keywords:** Bisphenol A, Benzyl butyl phthalate, co-administration, lactation exposure, second generation, ER $\alpha$

### I. 서 론

Bisphenol A[4,4-(1-Methylethylidene)bisphenol A, CAS RN 80-05-7, MW 228.29, 이하 BPA]는 epoxy,

polycarbonate, 수지(resin)의 제조에 사용되는 첨가물로서, 총 생산량의 약 58%가 polycarbonate의 제조에 사용되고, 33%가 epoxy resin에 사용되며, 2%가 tetrabromobisphenol A의 제조에, 7%는 그 밖의 용도로 사용된다. 이 합성수지 제품들은 다양한 식품과 음료수 포장에 사용되고, 통조림이나 병마개, 송수관과 같은 금속물질의 표면처리에 사용되기도 하며, 치과에서 치아복합제로 사용되기도 한다. 치과사용의 경우 처리

†Corresponding author : Department of Environmental Health, Yongin University  
Tel: 82-31-330-2752, Fax: 82-31-330-2886  
E-mail : pgkim@yongin.ac.kr

후 1시간 동안 수집된 타액에서 90-931  $\mu\text{g}$ 이 검출되었다.<sup>1)</sup> BPA는 MCF-7 세포에서 estrogenicity를 나타냄이 보고되었고,<sup>2)</sup> 임신기간 동안 BPA로 처리한 마우스 수컷 태자는 2 ppb 용량에서 표피선(prepuital glands) 크기 증가와 부고환 크기 감소를 유발하였고, 20 ng/g에서는 대조군에 비해 정자생성이 20% 감소됨이 보고된 바 있다.<sup>3)</sup> 또한 BPA는 통조림 음식으로 흡수가 되고,<sup>4,5)</sup> 폴리카보네이트병에서 유출 가능하다고 보고되었다.<sup>6)</sup>

Butyl benzyl phthalate(1,2-Benzenedicarboxylic acid butyl phenylmethyl ester, CAS RN 85-68-7, MW 312.36, 이하 BBP)는 마루타일, 접착제, 합성피혁과 헤어스프레이, PVC 가소제로 사용되고, 식품용기 및 포장재의 가소제로도 광범위하게 사용되며 "SanticizerR 160"이라는 상품명으로 알려져 있다. 캐나다에서 버터와 마아가린 중 47.8 mg/kg의 BBP가 검출된 바 있다.<sup>7)</sup>

모체 랫드에 8-9주 동안 1000  $\mu\text{g}/\text{l}$ 의 농도로 octylphenol, octylphenol polyethoxylate, BBP를 노출시켰을 때, 상대고환중량이 유의하게 감소함으로써, 정자생성의 10~21%( $p < 0.05$ ) 감소를 유발함을 알 수 있었다.<sup>8)</sup> BBP는 Ames test에서 돌연변이원성을 나타내지 않았으나,<sup>9)</sup> Jobling 등은 BBP가 estrogenic 효과가 있다고 보고하였고, 유방암 세포주를 이용한 *in vitro* 실험에서는 세포증식과 에스트로젠 수용체의 상호활성화에 관한 영향을 평가하였다.<sup>10)</sup> BBP나 dibutyl phthalate 투여 후 랫드에서 mono butyl phthalate(MBuP)로 대사되며, 특히 BBP는 경구 혹은 정맥내 투여 후 랫드에서 급속하게 흡수되어 MBuP나 monobenzyl phthalate(MBeP)로 대사된다.<sup>11)</sup>

Arnold 등<sup>12)</sup>은 estrogenicity를 갖는 농약과 같은 환경오염물질들이 둘 이상 함께 작용했을 때 상승적으로 estrogenicity를 나타냈다고 하였다. BPA와 BBP는 두가지 모두 환경 및 식품과 접촉이 가능한 물질들에 널리 사용되고 있고, 환경 및 식품으로의 이행이 확인되고 있어, 동시 노출의 가능성이 아주 높다고 할 수 있다. 물질의 특성상 BPA와 BBP는 음용수를 포함하는 식품의 형태로 노출되거나 산업장에서 노출될 수 있으므로 태내 혹은 수유기간에 노출된 모체를 통해 제2세대에 미치는 영향에 관한 연구자료가 필요하다. BPA와 BBP가 estrogen과 유사한 역할을 하는 물질임을 감안할 때 저농도 장기노출 조건에서 차세대에 미치는 영향, 특히 모체의 노출에 의한 차세대 영향에 관한 연구가 필요한 실정이다.

따라서 본 실험은 랫드를 대상으로 BPA와 BBP 두

가지 물질을 혼합하여 임신기 및 수유기에 투여하여 모체 및 F1 암·수컷에 미치는 생식독성과 estrogenicity를 측정, 장기무게, 조기발정, 혈액 중 투여물질의 농도, 골격기형, estrogen receptor assay를 통해 살펴보고 두가지 물질의 혼합투여가 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 투여물질 및 실험동물

BPA(Aldrich Chemical Co., Inc. 99.7%), BBP(Sigma Co., 98%)를 사용하였고, 용매로 옥수수유를 사용하였다. 실험동물은 Sprague-Dawley계 10주령의 랫드를 삼육실험동물센터(주)로부터 분양받아 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 실험동물과 군설정

실험실에서 1주일간 순화시킨 후 건강한 동물만을 선발하여 실험에 사용하였다. 사육조건은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  상대습도  $55 \pm 7\%$  이내, 명암교대 12시간으로 하였다. 1주일간 실험실에서 순화하였으며, 무작위 추출하여 각군의 평균체중의 군간 차이를 ANOVA 검정하여 확인하였다. 예비실험을 통하여 BPA는 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을, BBP는 100  $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 로 용량을 설정하였다. 투여물질은 옥수수유 5ml에 용해하여 경구투여하였고 대조군은 옥수수유만을 투여하였다.

#### 2) 실험동물의 임신확인, 투여, 관찰사항

교배는 암수 2:1로 하여 교배시킨 후 질내 정자가 관찰되거나, 질전(vaginal plug)이 확인된 동물을 임신동물로 하였으며 이날을 임신 0일로 하였다. 임신기 투여군은 임신이 확인된 날부터 분만시까지 매일 일회 경구투여하였고, 수유기 투여군은 분만이 완료된 모체에 이유까지 매일 일회 경구투여하였다. 국립독성연구원의 생식독성시험방법에 따라, 모체와 태자의 각종 장기무게를 측정하였으며, 안락사전 5일 동안 모체의 발정주기를 검사하였다.

#### 3) Estrogen receptor assay

부검할 때 채취한 생식관련 조직에서 cytosol 분획을 채취하여 극저온 냉동보관( $-72^\circ\text{C}$ )하였다가 분석시 해동하여 사용하였으며, Bradford 분석법<sup>13)</sup>으로 측정하여 동량의 단백질이 사용되도록 하였다. 단백질을 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis)하였고, 니트로셀룰로오즈막에 전이하여 이 막을 estrogen receptor 항체( $\alpha\text{ER anti mouse}$ , Santa Cruz, CA, USA)와 반응시키고, 2차 항체(alkaline phosphatase labelled anti-

mouse, Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 형광발광체 (ECL+ reagent, Amersham Bioscience, INC., Piscataway, NJ, USA)를 붙여 발색시킨 다음 X-선 필름(Hyperfilm, Amersham Bioscience, INC., Piscataway, NJ, USA)에 감광시켜 estrogen receptor의 발현정도를 분석하였다.

4) 혈액중 시험물질 함량 분석

임신 모체 및 태자에서 채취한 전혈에서 혈청을 취해 ethanol(HPLC grade)을 가한 후 methylene chloride (HPLC grade)를 혼합하고 유기용매층을 취하여 회전압축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하였다. Acetonitrile을 가하여 여과하였다. HPLC(Younglin Co. SDV 30 Plus Solvent Degassor & Value Module, M930 Solvent Delivery Pump, M720 Absorbance UV Detector)를 사용하여 두가지 투여물질을 분석하였다. Chromatography 조건은 NIOSH의 방법<sup>14)</sup>을 참조하였다. Younglin HPLC와 Waters Co. C<sub>18</sub> 9.4×250 mm와 μBondapak C<sub>18</sub> 3.9×300 mm의 column을 사용하였으며, UV detector(λ=233 nm, λ=254.2 nm)에서 Acetonitrile/Water/Acetic Acid (40:60)(35:65, v/v), 1.0 ml/min로 분석하였다. BBP는 HPLC에서 MBP(Mono Benzyl Phthalate)를 분석하였다.

5) 태자의 기형검사

임신 20일째의 모체 자궁에서 생존태자를 대상으로 골격을 관찰하였다. 골격염색은 Stapler 방법을 변형한 alcian blue와 alizarin red-S로 이중염색을 하였다.<sup>15)</sup>

3. 통계처리방법

본 실험결과와 통계처리는 대조군과 각 투여군 간의 차이를 분산분석(ANOVA)으로 비교하였으며 유의수준은 α=0.01과 α=0.05로 검정하였다.

III. 결 과

1. 실험동물의 체중변화

1) 모체의 체중변화

임신기간과 수유기간 동안 BPA 20 μg과 BBP 100 mg을 동시에 투여한 군의 체중변화는 Fig. 1과 같다. 혼합투여군의 9일 이후 체중이 무처치군이나 BPA 20 μg 투여군에 비해 유의하게 낮았다. BBP 100 mg 투여군과 혼합투여군에서 무처치군보다 체중의 증가가 감소하였다.

혼합투여군의 체중은 출산 후 수유 첫째날부터 무처치군이나 BPA 20 μg 투여군, BBP 100 mg 투여군의 체중과 유의한 차이를 보였다(p<0.05). 이러한 차이는 전 투여기간동안 계속되었고 출산 후 12일까지 유의성

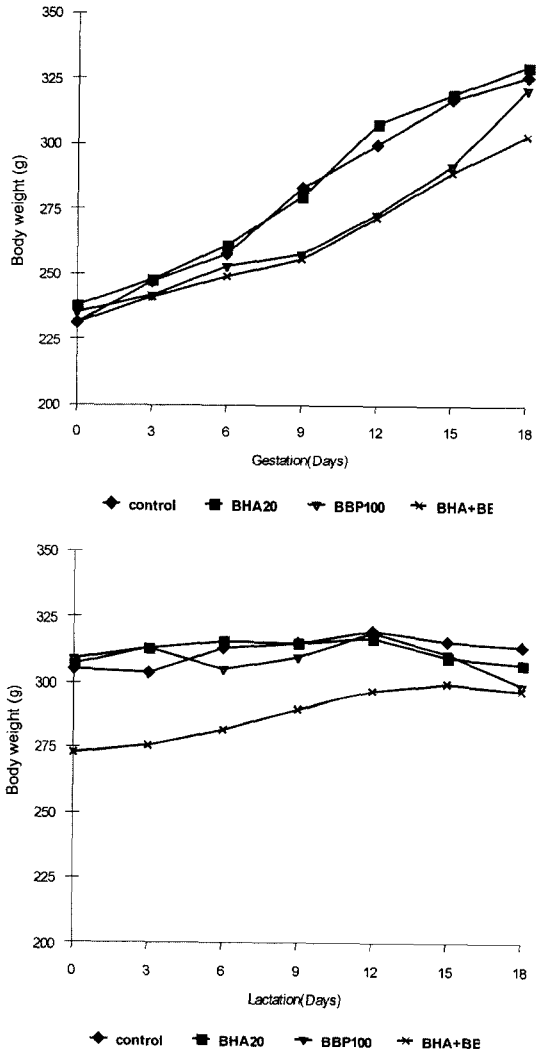


Fig. 1. Body weight changes in dams treated with BPA+BBP during gestation and lactation period.

이 인정되었다(p<0.05).

2) F1의 체중 변화

임신기간 동안 BPA 20 μg과 BBP 100 mg을 동시에 투여한 모체의 F1 암컷의 체중변화는 Fig. 2와 같다. 암컷의 경우 BBP 100 mg투여군의 체중은 출생시부터 혼합투여군보다 다소 높았으며 생후 7일까지는 유의한 수준으로 차이를 보였으나(p<0.05) 점차로 증가율이 감소하여 생후 21일의 체중은 혼합투여군보다 다소 낮게 나타났다.

F1 수컷의 경우 혼합투여군의 체중은 무처치군이나 BPA 20 μg 투여군과 유의한 차이가 없이 증가하는 것

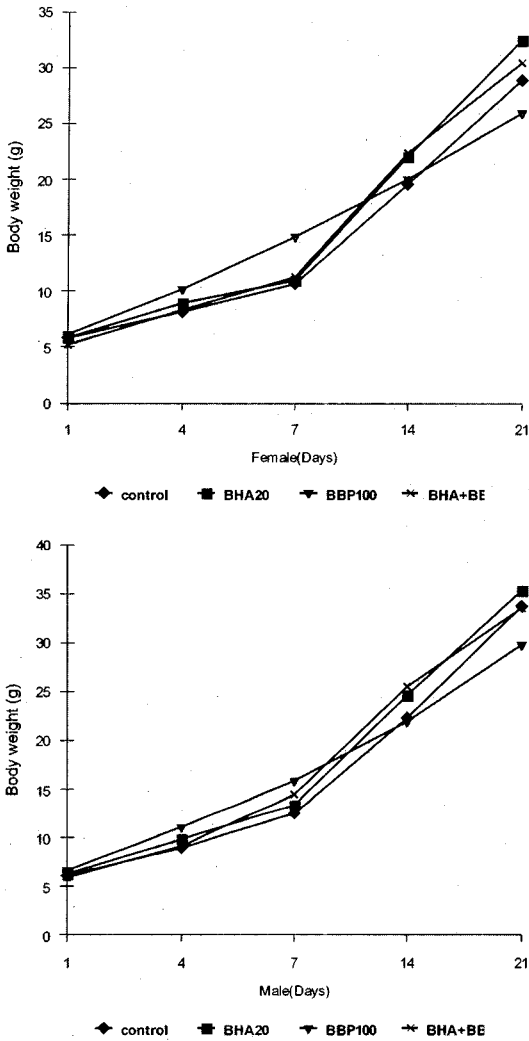


Fig. 2. Body weight changes in F1 female and male rats treated with BPA+BBP during gestation period.

으로 나타났다. BBP 100 mg 투여군의 체중은 생후 7일까지 유의한 수준으로 차이를 보였으나( $p < 0.05$ ) 이후 생후 21일의 체중은 혼합투여군보다 다소 낮았다.

수유기간 동안 BPA 20  $\mu$ g과 BBP 100 mg을 동시에 투여한 모체의 F1 암컷과 수컷의 체중변화는 Fig. 3과 같다. 혼합투여군의 체중은 출생시 다소 낮았으며, BBP 100 mg 투여군의 체중은 출생시부터 무처치군보다 다소 높았으나 점차로 증가율이 감소하여 혼합투여군과 비슷하게 증가하였다.

F1 수컷의 경우, 혼합투여군은 7일 이후 무처치군보다 체중이 유의하게 높았으며( $p < 0.05$ ), BBP 100 mg 투여군의 체중은 출생시부터 혼합투여군보다 다소 높

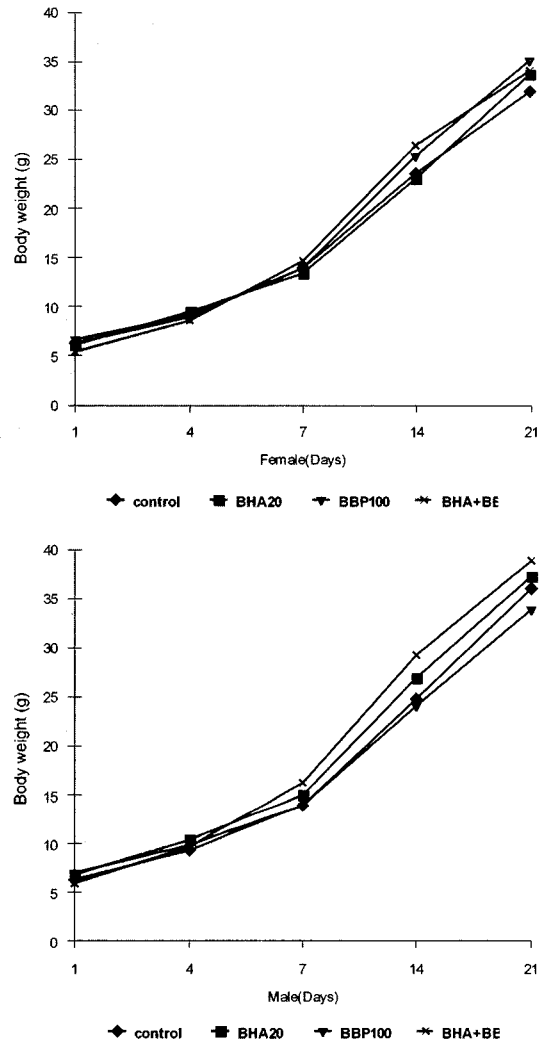


Fig. 3. Body weight changes in F1 female and male rats treated with BPA+BBP during lactation period.

았으나 점차로 증가율이 감소하여 생후 7일의 체중은 혼합투여군보다 유의하게 낮았다( $p < 0.05$ ).

2) 각 장기의 무게

(1) 모체의 장기무게

임신기간 동안 혼합투여한 군의 장기무게를, BPA 20  $\mu$ g 투여군, BBP 100 mg 투여군의 장기 무게와 비교해보면 간장과 비장의 무게는 무처치군과 비교하여 유의하게 높았으며( $p < 0.05$ ), BPA 20  $\mu$ g, BBP 100 mg 단독투여군보다도 절대무게가 증가하였다.

수유기간 동안 혼합투여한 군의 장기무게를, BPA 20  $\mu$ g 투여군, BBP 100 mg 투여군의 장기무게와 비교해보면 간장과 비장의 무게는 무처치군보다 유의하게

높았으며( $p<0.05$ ), BBP 100  $\mu\text{g}$  단독투여군보다도 절대 무게가 높았다.

(2) F1의 장기무게

임신기에 BPA와 BBP를 혼합 투여한 F1 암컷의 신장 상대무게는 무처치군과 BBP 100 mg 단독투여군 ( $p<0.05$ )에 비해서 유의하게 높았으며, 난소는 좌우 모두 무처치군 및 BPA 20  $\mu\text{g}$  단독투여군과는 비슷하였지만 BBP 100 mg 단독투여군보다는 유의하게 낮은 무게를 보였다( $p<0.01$ ). 자궁도 무처치군 및 BPA 20  $\mu\text{g}$  단독투여군보다 유의하게 낮은 상대무게를 나타냈다 ( $p<0.05$ ).

임신기에 노출된 차세대 수컷의 간장상대무게는 무처치군보다 혼합투여군이 유의하게 높게 나타났으나 ( $p<0.01$ ) 각각의 물질을 단독 투여한 경우보다 유의하게 높지는 않았다. 신장상대무게는 무처치군 및 BBP 100 mg 단독투여군보다 유의하게 높았고( $p<0.01$ ) 고환은 무처치군과 비슷하거나 다소 감소하는 경향을 보였다. 정낭선, 전립선의 무게에서는 무처치군보다 유의한 증가현상을 보이기도 했다( $p<0.05$ ).

수유기동안 모체를 통해 노출된 F1 암컷 좌우 난소의 경우는 혼합투여군이 무처치군( $p<0.01$ )이나 BBP 100 mg 단독투여군( $p<0.01$ )보다 모두 높게 나타났다. 자궁상대무게에서 혼합투여군이 무처치군보다 다소 낮은 무게를 보이고 있었다.

수유기동안 모체를 통해 노출된 차세대 수컷의 고환, 부고환의 경우도 혼합투여군이 무처치군보다 다소 높게 나타나기는 했으나 BPA 20  $\mu\text{g}$  투여군( $p<0.01$ ) 및 BBP 100 mg 투여군보다는 낮게 나타나는 경우가 많았다. 정낭선, 전립선의 무게에서 혼합투여군은 무처치군보다 유의하게 높았다( $p<0.01$ ).

3) 모체의 발정유무

분만 후 21일째 임신기 투여군 모체의 estrus cycle를 관찰한 결과 BPA 20  $\mu\text{g}$  투여군에서는 발정전기와

**Table 1.** Estrus cycle of dams treated with BPA and BBP during gestation period

Group	Proestrus	Estrus	Diestrus	Total
Control	-	-	9	9
BPA 20	-	-	9	9
BBP 100	2*	0	6	8
BPA 20+BBP 100	1	1	6	8

BPA 20=group treated with 20  $\mu\text{g}$  BPA.

BBP 100=group treated with 100  $\mu\text{g}$  BBP.

BPA20+BBP100=group treated with both 20  $\mu\text{g}$  BPA and 100  $\mu\text{g}$  BBP.

\*No. of rats.

**Table 2.** Estrus cycle of dams treated with BPA and BBP during lactation period

Group	Proestrus	Estrus	Diestrus	Total
Control	-	-	9	9
BPA 20	-	-	8	8
BBP 100	3*	-	6	9
BPA 20+BBP 100	1	-	7	8

BPA 20=group treated with 20  $\mu\text{g}$  BPA.

BBP 100=group treated with 100 mg BBP.

BPA 20+BBP 100=group treated with both 20  $\mu\text{g}$  BPA and 100 mg BBP.

\*No. of rats.

**Table 3.** Concentration of BPA, MBeP in dams & F1 serum sample treated with BPA and BBP during gestation period (unit :  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

	Control	BPA 20	BBP 100	BPA+BBP	
				BPA	MBeP
Dam	ND	ND	3.290	ND	0.625
Female (F1)	ND	ND	1.076	ND	0.357
Male (F1)	ND	ND	0.507	ND	0.332

BPA 20=group treated with 20  $\mu\text{g}$  BPA.

BBP 100=group treated with 100 mg BBP.

BPA 20+BBP 100=group treated with both 20  $\mu\text{g}$  BPA and 100 mg BBP.

ND=Not Detected.

후기인 모체가 발견되지 않았고 BBP 100 mg 투여군에서는 발정전기 2마리가 관찰되었다. 혼합투여군에서는 발정전기 1, 발정기 1마리가 관찰되었다.

수유기 투여군 모체 발정주기를 관찰한 결과, BPA 20  $\mu\text{g}$  투여군에서는 조기발정된 모체가 관찰되지 않았고 BBP 100 mg 투여군에서는 발정전기인 모체가 3마리 발견되었다. 혼합투여군에서는 발정전기 1마리가 관찰되었다.

4) 혈액 분석 결과

임신기 동안 BPA와 BBP를 동시에 투여한 모체와 F1의 혈액내 투여물질의 함량은 Table 3과 같다. 무처치군과 BPA 20  $\mu\text{g}$  투여군에서는 투여물질이 검출되지 않았고 BBP 100 mg 투여군에서는 모체에서 3.290  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , F1 암컷에서는 1.076  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , F1 수컷에서 0.507  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MBeP잔류가 발견되었다. 혼합투여군의 혈액에서는 BPA가 검출되지 않았고 MBeP는 모체에서 0.625  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , F1 암컷에서는 0.357  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , F1 수컷에서 0.332  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MBeP잔류가 발견되었다. BBP만을 단독으로 투여했을 경우보다 동시에 투여했을 때 오히려 잔류되는 양이 적게 나타났다.

**Table 4.** Concentration of BPA, MBeP in dams and F1 serum sample treated with BPA and BBP during lactation period (unit :  $\mu\text{g/ml}$ )

	Control	BPA 20	BBP 100	BPA+BBP	
				BPA	MBeP
Dam	ND	3.740	ND	3.252	3.310
Female (F1)	ND	1.846	ND	1.853	0.954
Male (F1)	ND	1.953	1.347	1.694	0.668

BPA 20=group treated with 20  $\mu\text{g}$  BPA.

BBP 100=group treated with 100 mg BBP.

BPA 20+BBP 100=group treated with both 20  $\mu\text{g}$  BPA and 100 mg BBP.

ND=Not Detected.

수유기 동안 BPA와 BBP를 동시에 투여한 모체와 F1의 혈액내 투여물질의 함량은 Table 4와 같다. 무치치군에서는 투여물질이 검출되지 않았고 BPA 20  $\mu\text{g}$  투여군에서는 모체에서 3.740  $\mu\text{g/ml}$ , F1 암컷에서 1.846  $\mu\text{g/ml}$ , F1 수컷에서 1.953  $\mu\text{g/ml}$ 의 BPA가 발견되었고 BBP 100 mg 투여군에서는 차산자 수컷에서만 1.347  $\mu\text{g/ml}$ 의 MBeP잔류가 발견되었다. 혼합투여군의 혈액에서는 BPA가 모체에서 3.252  $\mu\text{g/ml}$ , F1 암컷에서 1.853  $\mu\text{g/ml}$ , F1 수컷에서 1.694  $\mu\text{g/ml}$ 의 BPA가 발견되었고 MBeP는 모체에서 3.310  $\mu\text{g/ml}$ , F1 암컷에서는 0.954  $\mu\text{g/ml}$ , F1 수컷에서 0.668  $\mu\text{g/ml}$ 의 MBeP 잔류가 검출되었다. BBP가 체내로 투여되면 투여 3시간 후에 16%는 MBeP(Mono Benzyl Phthalate)로, 44%는 MBuP(Mono Butyl Phthalate)로 완전히 대사<sup>1)</sup>되는 점을 고려하였기 때문이다.

##### 5) 태자의 기형검사

혼합투여군의 태자에 대해 기형검사를 실시한 결과는 Table 5와 같다.

외형상 나타나는 기형은 추가로 실시한 BPA 200  $\mu\text{g}$  +BBP 1000 mg 투여군에서 aneurysm, fused rib, short hind limb이 각각 3수, 2수, 2수가 발견되어 기형을 유발하는 용량을 초과한 것으로 보여지며 흉골융합, 늑골융합과 같은 골격의 변이도 다수 관찰되었다. 흉추에서 dumb-bell 형은 BPA 20  $\mu\text{g}$ +BBP 100 mg 투여군에서 83.7%, BPA 200  $\mu\text{g}$ +BBP 1000 mg 투여군에서는 100%가 기형을 보이고 butterfly 형은 각각 95.3%와 100%로 나타났고 bipartite형은 각각 81.4%와 100%로 골격기형이 고농도로 갈수록 증가하는 것으로 나타났다.

##### 6) 수유기 투여군 차산자의 estrogen receptor assay

수유기에 투여한 차산자 암컷의 자궁에서 ER $\alpha$  발현 정도를 검사한 결과는 Fig. 4와 같다. 대조군에 비하여

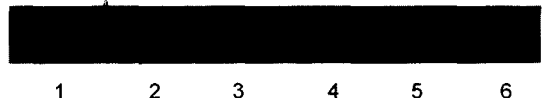
**Table 5.** Frequencies of F1 fetuses with axial skeleton variation/ abnormality, after treated with BPA and BBP during their gestation periods

	Control	BPA 20+ BBP 100	BPA200+ BBP 1000
No. of dams examined	6	7	7
No. of fetus examined	42	43	6
No. of fetus malformed	0	0	3(50.0)
aneurysm	0	0	3(50.0)
fused rib	0	0	2(33.3)
short hind limb	0	0	2(33.3)
Thoracic vertebra centrum			
dumb-bell	58(83.3)	53(83.7)	12(100)
butterfly	65(83.3)	65(95.3)	14(100)
bipartite	11(26.2)	43(81.4)	8(100)
Lumbar vertebra centrum			
dumb-bell	3(7.1)	14(30.2)	11(100)
butterfly	0(0.0)	21(41.9)	10(100)
Sternebrae			
bipartite	3(7.1)	25(55.8)	9(100)
dumb-bell	2(4.8)	16(34.9)	7(83.3)
asymmetry	4(7.1)	18(37.2)	8(100)
No. of ossification retardation	7(16.7)	32(48.8)	12(100)
perfect retardation	5(11.9)	17(39.5)	7(100)
butterfly	3(7.1)	16(34.9)	6(100)

BPA 20+BBP 100=group treated with both 20  $\mu\text{g}$  BPA and 100 mg BBP.

BPA 200+BBP 1000=group treated with both 200  $\mu\text{g}$  BPA and 1000 mg BBP.

Numbers in parentheses are % of fetus examined.

**Fig. 4.** Representative immunoblots analysis of ER $\alpha$  induction in second generation's uterus treated with BPA and BBP to the dams on gestation. Lane 1=Control; 2=BPA 20 mg; 3=BPA 200 mg; 4=BBP 100 mg; 5=BBP 1000 mg; 6=BPA 20 mg+BBP 100 mg.

BPA 20  $\mu\text{g}$  투여군과 200  $\mu\text{g}$  투여군은 ER $\alpha$ 의 발현이 증가했고, BBP 100 mg 투여군에서도 증가함을 볼 수 있었다. BPA 20  $\mu\text{g}$ 과 BBP 100 mg 병용투여군(BPA 20+BBP 100)은 단독투여시와 유사한 ER $\alpha$  발현을 보인 반면 BPA 200  $\mu\text{g}$ 과 BBP 1000 mg 병용투여군(BPA 200+BBP 1000)에서는 ER $\alpha$  발현이 매우 높



**Fig. 5.** Representative immunoblots analysis of ER $\alpha$  induction in second generation's uterus treated with BPA and BBP to the dams on post-parturition. Lane 1=Control; 2=BPA 20  $\mu$ g; 3=BPA 200  $\mu$ g; 4=BBP 100 mg; 5=BBP 1000 mg; 6=BPA 20  $\mu$ g +BBP 100 mg; 7=BPA 200  $\mu$ g + BBP 1000 mg.

게 나타나 발현증가를 보였다.

수유기 투여에 의한 차산자 수컷의 고환에서의 ER $\alpha$  발현정도를 검사한 결과는 Fig. 5와 같다. BPA 20  $\mu$ g 투여군의 ER $\alpha$  발현은 대조군 수준이었으나 BPA 200  $\mu$ g, BBP 100 mg 및 BBP 1000  $\mu$ g 투여군에서 발현이 증가하였다. 병용투여군에서는 상승효과가 보일 정도로 발현이 증가하였는데 BPA 20+BBP 100과 BPA 200+BBP 1000에서는 ER $\alpha$ 의 발현이 증가하여 유즙을 통한 F1의 영향이 암컷보다는 수컷에서 크게 나타남을 알 수 있었다.

#### IV. 토 의

F1 암컷의 경우 임신기보다는 수유기에 노출된 경우 장기무게에 미치는 영향이 큰 것으로 보여진다. 차세대 수컷의 경우는 임신기 노출에 의한 영향이 수유기보다 커서 간장, 신장, 부고환, 정낭선, 전립선에서 무처리군과 유의한 차이를 보였다. 혼합투여로 인한 가중효과가 나타나리라 기대되었던 장기무게에서 특정기관의 무게의 증가나 감소로 판단할 때, 혼합투여로 인한 효과는 대부분의 경우 각각의 투여로 인한 효과보다 배가되지 않는 것으로 나타났다. Gould 등<sup>16)</sup>이 estradiol과 BPA를 동시에 투여했을 때 estradiol이 증가시킨 peroxidase activity를 BPA 100~150 mg이 최소 43% 억제시키며 prolactin level도 최대 55% 억제시킨다고 보고한 것과 본 연구의 결과와 일치하는 것으로 보이며 2가지 이상의 oestrogen을 투여했을 경우 상승효과가 일어날 가능성이 있는 것으로 보인다.

혼합투여군의 조기발정은 임신기투여군의 경우 BBP 단독투여군과 유사한 수준이었고 수유기투여군은 이보다 더 적게 검출되어 혼합투여효과를 볼 수 없었다. 투여물질의 혈액분석결과는 BPA나 BBP를 단독투여했을 경우보다 혼합투여시 잔류되는 양이 오히려 적게 나타나, 혼합투여로 인한 혈액내 투여물질의 잔류정도는 오히려 감소되는 것으로 보여진다.

BPA 200  $\mu$ g+BBP 1000 mg 투여군에서는, 단독 투

여시 나타나지 않았던 aneurysm(무미증), fused rib(갈비뼈융합), short hind limb(단족)이 발견되었고 흉골융합, 늑골융합과 같은 골격의 변이도 다수 관찰되었다.

Butyl benzyl phthalate에 대한 유럽연합(EU)의 Tolerable Daily Intake(TDI)는 0.1 mg/kgbw<sup>17)</sup>이며 미국의 National Toxicology Program(NTP)에 따르면 식이섭취량의 최대무작용량(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)은 0.5%이었고 최저작용량(Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL)은 1.25%이었다.<sup>18)</sup>

Estrogen receptor(ER)는 체내 estrogen이나 외부의 estrogen 유사물질이 세포질내로 유입되었을 때 이와 결합하여 호르몬의 역할이 나타나게 하는 단백질로서, ER $\alpha$ 는 인간의 유방암세포의 변형인 MCF-7 세포에서 많이 발견된다.<sup>16)</sup> 최근 발견된 ER $\beta$ 는 ER $\alpha$ 의 isoform으로 신경계, 심혈관계, 면역계, 소화계, 신장과 허파 등 여러 조직에 골고루 분포하는 반면 자궁에는 ER $\alpha$ 가 ER $\beta$ 보다 훨씬 많이 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>19)</sup> Gould 등<sup>20)</sup>의 연구에 따르면 BPA도 ER $\alpha$ 에 의해 estrogenicity를 나타내는데 *in vivo*에서 estradiol이 ER $\alpha$ 를 발현시키는 능력이 BPA에 비해 26배나 높지만, estradiol의 estrogen activity를 저하시키는 것으로 보아 약한 에스트로젠 물질로만 알려졌던 BPA가 생체내에서는 달리 작용할 가능성이 있음을 보여주었다.

본 연구에서는 직접 노출된 모체에서는 ER $\alpha$ 의 발현이 대조군에 비해 크게 증가하지 않았는데 이는 생체내 생성된 자연 estrogen의 영향으로 투여효과가 상대적으로 줄어들었기 때문으로 보인다. 반면 차세대에서는 저용량 노출군인 BPA 20  $\mu$ g, BBP 100 mg에서도 ER $\alpha$ 의 발현이 크게 증가하고 있어 실험물질에 직접 노출되지 않은 F1이 모체의 노출로 인해 받은 영향이 대조군과 비교해볼 때 많이 나타나고 있음을 알 수 있었다. 모체에서는 혼합투여군의 자궁에서 오히려 ER $\alpha$ 의 발현이 임신기, 수유기 모두 다소 적게 나타나는 현상을 보이기도 했는데 이는 앞에서 언급한 바와 같이 2가지의 estrogen을 투여시 그 효과가 상쇄되는 경우가 발생할 수도 있는 것으로 보여 추가 연구의 필요성이 느껴졌다. 임신기투여군 암컷에서도 이러한 현상이 보였는데 수컷에서는 관찰되지 않았다. 오히려 임신기 투여군과 수유기 투여군 수컷의 경우는 혼합투여군에서 ER $\alpha$  발현이 크게 증가해 혼합투여로 인한 상승작용의 가능성을 보여주었다. 수유기 투여군 암컷에서도 혼합투여에 의한 ER $\alpha$  발현의 증가가 관찰되었으나 수유기 투여군 수컷처럼 큰 차이는 아니었다. 따라서 BPA와 BBP의 투여로 인한 ER $\alpha$  발현의 정도는 모체와 F1이

서로 차이가 있었으며, 노출된 시기가 임신기 혹은 수유기인지에 따라 달리 나타나고 특히 암·수에 따라 영향이 달리 나타나는 등 여러 가지 요인에 따라 ER $\alpha$  발현에 차이가 나타남을 관찰할 수 있었다.

### 참고문헌

- Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Oler-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A. M. and C. : Sonnenschein. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.*, **104**, 298-305, 1996.
- Krishnan, A. V., Starhis, P., Permuth, S. F., Tokes, L. and Feldman, D. : Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, **132**, 2279-2286, 1993.
- Nagel, S. C., Vom Saal, F. S., Thayer, K. A., Dhar, M. G., Boechler, M. and Welshons, W. V. : 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**(1), 70-76, 1997.
- Brotons, J. A., Olea, S. M. F., Villalobos, M., Pedraza, V. and Olea, N. : Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ. Health Perspect.*, **103**(6), 608-12, 1995.
- Biedermann, M., Grob, K., Bronz, M., Curcio, R., Huber, M. and Lopez, F. F. : Bisphenol-A-diglycidyl ether (BADGE) in edible-oil-containing canned foods. Determination by LC-LC-fluorescence detection. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, **87**(5), 547-558, 1996.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L. and Feldman, D. : Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, **132**(6), 2279-2286, 1993.
- Page, B. D. and Lacroix, G. M. : Studies into the transfer and migration of phthalate esters from aluminium foil-paper laminates to butter and margarine. *Food. Addit. Contam.*, **9**, 197-212, 1992.
- Sharpe, R. M. and Fisher, J. S. : Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 1136-1143, 1995.
- Kozumbo, W. J., Kroff, R. and Rubin, R. J. : Assessment of the mutagenicity of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.*, **45**, 103, 1982.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G. and Sumpter, J. P. : A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 582-7, 1995.
- Eigenberg, D. A., Haig, P. B., Dean, E. C. and Glenn, S. : Distribution, excretion and metabolism of butyl benzyl phthalate in rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **17**: 445-456, 1986.
- Ema, M., Harazono, A., Miyawaki, E. and Ogawa, Y. : Embryo lethality following maternal exposure to dibutyl phthalate during early pregnancy in rats. *B. Environ. Contam. Tox.*, **58**, 636-643, 1997.
- Harris, E. L. V. and Angel, S. : Protein purification methods; a practical approach. IRL Press, 16-17, 1989.
- NIOSH. NIOSH manual of analytical methods, 3rd ed. U.S. Department of Health and Human Service, 1984.
- Hayes, W. : Principles and methods of toxicology. 3rd ed. 989-1037, Raven Press, New York, 1994.
- Muramatsu, M. : Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context and estrogen receptor subtype-functional difference between estrogen receptors alpha and beta. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **236**(1), 140-145, 1997.
- EU Document No.7, 1994.
- Mumtaz, M. M., Knauf, L. A., Reisman, D. J., Peirano, W. B., DeRosa, C. T., Gombar, V. K., Enslein, K., Carter, J. R. and Blake, B. W. : Assessment of effect levels of chemicals from quantitative structure-activity relationship (QSAR) models. I. Chronic lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL). *Toxicol. Lett.*, **79**(1-3), 131-43, 1995.
- Gustaffsson, J. A. : Estrogen receptor  $\beta$ - a new dimension in estrogen mechanism of action. *J. Endocrinology*, **163**, 379-383, 1999.
- Gould, J. C., Leonard, L. S., Maness, S. C., Wagner, B. L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D. P. and Gaido, K. W. : Bisphenol A interacts with the estrogen receptor  $\alpha$  in a distinct manner from estradiol. *Mol. Cell. Endocrinology*, **142**, 203-214, 1998.