

# 내분비계장애물질 평가방법의 최적화 및 Apoptosis에 관한 연구

안 광 현, 이 경 아, 김 봉 희\*

충남대학교 약학대학

## Optimization of the Assesment and Apoptosis of Endocrine-Bisphenol A Disruptors

Kwang-Hyun Ahn, Kyung-A Lee and Bong-Hee Kim\*

Department of Pharmacy, Chungnam National university, Daejeon, Korea

### ABSTRACT

Xenoestrogens are chemicals with diverse structure that mimic estrogen. Bisphenol A, a monomer of polycarbonate and epoxy resins, has been detected in canned food and human saliva. Bisphenol A stimulate cell proliferation and induce expression of estrogen-response genes in vitro.

The purpose of the this study was to evaluate cell proliferation of bisphenol A in the presence of a rat liver S9 mix containing cytochrome P450 enzymes and Cu(II). The fragmentation of intact DNA, a parameter of apoptotic cell death, was evaluated quantitatively by diphenylamine reaction method. Bisphenol A induced apoptotic cell death in a dose-dependent manner. The effect of radical scavenger on the apoptotic cell death induced by bisphenol A was investigated. The DNA fragmentation induced by bisphenol A was significantly inhibited by addition of radical scavenger to the culture medium. This indicated that elevated oxidative stress caused by imbalance between the production and removal of free radicals occurred in cells. Taken together, these results suggest that free radical reacts with Cu(II) leading to oxidative stress.

**Key words :** Bisphenol A, Cell proliferation, DNA fragmentation

### 서 론

최근들어 bisphenol A 등 생활용품 물질들이 내분비계 장애물질로 분류되고 있는데 그 이유는 여성호르몬인 에스트로젠과 같은 효과가 있다고 보고되고 있기 때문이며 이중 특히 bisphenol A가 주목을 받고 있는 이유는 bisphenol A가 현재 에폭시 레진과 폴리카보네이트 플라스틱의 원료로 사용되

고 있기 때문이다. 이들 플라스틱류들은 음식용기와 음료포장재로 널리 전세계적으로 사용되어지고 있으며 또한 레진은 식품용 캔이나 물병마개 그리고 물 공급용 파이프 등에 금속을 코팅하는 물질로 널리 이용되고 있는 물질이다. 또한 bisphenol A는 치과 치료제에도 포함되어 있는 것으로 보고되고 있다(Brotons JA *et al.*, 1995). 많은 연구결과에 의하면 bisphenol A가 미약한 여성호르몬성이 있다는 것을 부인하는 사람은 없다. 단지 현재 bisphenol A가 용기로부터 식품속으로 전이되는 매우 작은양(ppb, part per billion)이 실제 생체에 위

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-42-821-5935, E-mail: bukimnh@cnu.ac.kr

해한가에 대하여 논쟁중이다(Colerangle JB *et al.*, 1997). 설치류를 이용한 실험에서 임신한 암컷의 쥐에 bisphenol A를 실제 사람들에게 노출될 수 있는 낮은 용량을 투여한 후 그 태어난 새끼들의 수컷의 전립선과 정자생성 능력을 조사했더니 생식과 관련한 이상이 관찰되었다고 보고되었다(Colborn T *et al.*, 1995). 이러한 생식기관과 관련한 내분비계 장애뿐만 아니라 in vitro에서 세포증식을 자극하고 에스트로겐에 반응하는 유전자의 발현을 유도하며 in vivo에서는 prolactin의 분비를 증가시키고 자궁, 질, 유방의 성장과 분화를 자극한다고 알려져 있으며, 세포주기 속도를 변화시키고, DNA 손상을 유도하며, telomeric association과 염색체 변이를 일으키며, 에스트로겐 수용체에서 mRNA stabilizing factor의 발현에 대한 에스트로겐 자극을 억제하는 작용을 하는 antiestrogen 기전을 통해 내분비계 장애물질임이 알려져 있다(Atkinson A *et al.*, 1995; DJ reed *et al.*, 1995). 본 실험에서는 bisphenol A의 대사적 활성화를 위해 rat의 간에서 유래한 S9 mixture를 사용하였으며 대사적 활성화에 따른 bisphenol A의 에스트로젠성을 알아보기 위해 E-Screen assay를 통해 알아보았으며 bisphenol A에 의해 생성된 free radical과 그에 따른 산화적 스트레스가 apoptosis를 유발하는지를 알아보기 위해 DNA fragmentation을 측정하였다. Apoptosis는 세포가 죽을 때 이미 준비된 상황에서 사망 프로그램을 가동시켜 능동적으로 죽음을 맞이한다는 개념이며 세포가 죽을 때 한 세포 내에서 여러 입자들이 나누어지고 이 나누어진 입자들이 막(membrane)에 의해 둘러 싸여지며 결국 이웃하는 세포들의 식작용(phagocytosis)에 의해 사라지게 되는 과정을 나타낸다(CB Thompson *et al.*, 1995). 세포 내의 적은 양의 free radical도 apoptotic signal trasduction을 조절하고 apoptotic death pathway를 활성화한다고 알려져 있으며(H. Sies *et al.*, 1986) antioxidant, N-acetylcysteine과 같은 thiol reductants, MnSOD의 overexpression이 apoptosis를 억제한다고 알려져 있다. 또한 endogenous protein인 bcl-2는 항산화 기전을 통해 apoptosis를 통한 세포죽음을 방어한다고 알려져 있다(YJ Suzuki *et al.*, 1997). 따라서 free radical의 발생과 그에 따른 세포 내 산화-환원대사의 변화가 apoptosis에 중요한 역할을 하므로 bisphenol A의 metabolic redox-

cycling에 의해 생성된 free radical이 세포내에서 apoptosis를 유발하는지를 DNA fragmentation을 통해 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. 3~4일 마다 계대배양 하였으며 자연발생적인 돌연변이의 생성을 최소화하고자 10번 미만으로 계대배양한 세포만을 실험에 사용하였다. 포화습도 하에서 5% CO<sub>2</sub>를 공급하는 37°C Dual CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 1. E-screen assay (에스트로젠 고유활성 검색)

#### 1) CD-FBS 제조 (FBS내의 steroid hormones 제거)

Serum의 에스트로젠 활성을 최소화하기 위해 FBS를 다음과 같이 처리하였다. 0.5% charcoal과 0.05% dextran을 FBS와 동일부피의 3차 증류수 100 ml에 녹여 만들고 이를 2,500 rpm에서 10분 정도 원심분리하여 세척 후 상등액은 버려 pellet을 얻었다. 여기에 미리 녹여둔 FBS 100 ml을 첨가하여 실온에서 60분간 10 cycles/min로 교반한 후 2,500 rpm에서 15분 정도 원심분리하여 얻은 상등액을 0.2 micro filter (0.2 μm, Nalgene)에서 여과하여 CD-FBS를 얻었다. 여기서 얻은 CD-FBS는 -20°C에 저장하였다.

#### 2) MCF-7 cells 배양

MCF-7 cells을 일정시간 배양한 후 well culture plate에 세포를 분주하기 하루 전 flask내의 배지를 교환한 후 실험 당일에 배지를 제거하여 PBS buffer로 1회 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA를 가하여 세포를 분리하였다. 그 후 세포 배양액을 15 ml conical tube에 포집하여 4°C에서 원심분리(1,500

rpm, 5 min)한 후 상등액을 aspirator로 제거하였다. 일정량의 배지를 conical tube에 가하여 세포를 단일화한 후 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하고 DMEM배지를 가하여 일정량의 세포수( $5 \times 10^6$  cells/ml)로 조정하였다. 그 후 24-well culture plate에 각 well당 10,000개의 세포액을 가하였으며 96-well의 경우 well당 2,000개의 세포액을 가하였다. 5% CO<sub>2</sub>가 일정하게 유지되는 37°C 배양기에서 24시간동안 배양한 후 각각의 well에 들어있는 배지를 제거하였다. 혈청에 함유된 세포 증식인자를 제거한 Charcoal-dextran처리 FBS (CD-FBS)를 5% 함유한 DMEM배지를 90 µl씩 각 well에 가하고 bisphenol A를 각 농도별로 10 µl씩 well에 첨가하였다. 이 때 음성대조 물질로는 ethanol만을 첨가한 배지를 사용하였으며 각 well당 ethanol의 최종 농도가 0.5%를 넘지 않도록 하였다. 그 후 bisphenol A가 첨가된 well plate를 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 6일간(144시간) 배양하였다.

### 3) 세포생존을 측정

#### (1) SRB assay

MCF-7 cells의 증식도를 측정하기 위하여 세포단백질의 음이온과 SRB의 양이온이 결합하여 발색하는 원리를 이용한 SRB assay를 사용하였다. SRB (sulforhodamine B)용액은 1% acetic acid에 0.4% (w/v)의 농도로 준비하였다. 배양액을 제거한 후 plate의 각 well을 ice-cold PBS 500 µl (96-well plates: 150 µl)로 두번 세척하였다. Cold-10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 200 µl (96-well plates: 100 µl)을 각 well에 넣어 4°C에서 30분간 세포를 고정시켰다. TCA를 버린 후에 세포를 멸균증류수를 사용하여 5번 세척한 후 35~40°C에서 완전히 말린 다음 각 well의 고정된 세포에 SRB용액 250 µl (96-well plates: 50 µl)를 넣어주었다. 10분 후에 상등액을 버린 다음 1% acetic acid로 washing solution의 색깔이 없어질 때까지 5번 정도 세척하여 결합되지 않은 SRB를 제거하였다. Plate를 실온에서 완전히 건조시킨 후에 각 well에 cold-10 mM Tris buffer (pH 10.5) 500 µl (96-well plates: 100 µl)를 넣어 20분간 흔들어 주어 세포와 결합된 SRB를 녹였다. 상등액 50 µl를 96-well plates에 옮겨 microplate reader를 사용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였고 96-well plates에서 실험한

경우 직접 흡광도를 측정하였다.

#### (2) MTT assay

Mitochondrial dehydrogenase activity의 index를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 시험물질에 대한 세포생존율을 측정하였다. 배양액을 제거한 후 500 µl (96-well plates: 100 µl)의 신선한 배지를 넣고 각 well에 phenol red-free medium에 2 mg/ml의 농도로 제조된 MTT medium 250 µl (96-well plates: 50 µl)을 넣어 37°C에서 3시간 배양한 다음 각 well로부터 조심스럽게 배지를 제거한 후 dimethylsulfoxide 500 µl (96-well plates: 100 µl)을 넣었다. Formazan 결정체가 용해될 때까지 plate를 약 10분간 진동시킨 다음 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (3) NRU assay

NR용액은 0.4% aqueous stock solution으로 준비하여 DMEM으로 1 : 80의 비율로 희석한 후 상온에서 24시간 동안 침전시켰다. 1,500 g에서 10분간 원심분리한 다음 상층액을 시험에 사용하였다. 배양액을 제거한 후 NR이 포함되어 있는 200 µl의 DMEM을 넣은 다음 vital dye가 viable uninjured cell의 lysosome으로 들어가도록 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 3시간동안 배양하였다. 시험세포에 흡수되지 않은 NR용액을 plate에서 제거한 후 각 well을 100 µl (96-well plates: 20 µl) formal-calcium 용액(1% formaldehyde와 1% CaCl<sub>2</sub>)으로 세척한 후 200 µl (96-well plates: 40 µl) extraction solution (1% glacial acetic acid-50% ethanol solution)을 각 well에 넣어 시험세포에 흡수된 NR dye를 추출하였다. 5~10분간 plate를 흔들어 준 다음 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) Tamoxifen의 세포독성을 이용한 E-screen assay

E-screen assay에 사용할 tamoxifen의 농도를 결정하기 위하여 MTT assay를 사용하여 MCF-7 cells에 대한 tamoxifen의 세포독성을 측정하였다. 96-well에 well당 10,000 개의 MCF-7 cells을 배양하고 24시간이 지난 후 10% FBS를 포함하는 DMEM 세포배양액에 5, 10, 25, 50 µM의 tamoxifen을 각 well에 처리하고 배양하였다. 배양 66시간이 지난 후 MTT 용액을 well당 50 µl씩 넣었다. 시험

세포를 37°C에서 4시간 동안 배양한 다음 각 well로부터 media를 조심스럽게 제거한 후 DMSO 100  $\mu$ l를 각 well에 넣었다. Formazan 결정체가 용해될 때까지 plate를 10분 동안 잘 흔들어준 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 O.D 값을 측정하였다. E-screen assay를 사용하여 세포증식률을 측정하기 위해 17 $\beta$ -estradiol과 bisphenol A가 농도별로 처리된 well에 tamoxifen이 50  $\mu$ M이 되게 처리한 후 well plate를 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 6일간 배양한 다음 SRB assay법으로 세포생존률을 측정하여 대조군에 대한 MCF-7 cells의 증식률을 구하였다.

#### 5) 대사 활성계에서의 에스트로겐성

E-screen assay를 사용하여 대사 활성에 따른 세포증식률을 측정하기 위해 S (10%) mix에 녹인 bisphenol A가 농도별로 (0.05~5  $\mu$ M) 처리한 후 well plate를 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 6일간 배양한 다음 SRB assay법으로 세포생존률을 측정하여 대조군에 대한 MCF-7 cells의 증식률을 구하였다.

## 2. DNA fragmentation

4  $\times$  10<sup>6</sup>개의 세포에 bisphenol A를 농도별 (30, 60, 120, 250, 500, 1000  $\mu$ M)로 처리하여 12시간 배양 후 PBS로 세척한 다음 Trypsin-EDTA 처리하여 세포를 회수한 후 원심분리하여 cell pellet을 얻었다. Cell pellet에 lysing buffer (0.2% Triton X-100, 10 mM Tris, and 1 mM EDTA, pH 8.0) 400  $\mu$ l를 넣어 lysis 시킨 후 13,000  $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 intact DNA를 포함하는 pellet으로부터 DNA fragment를 포함하는 상등액을 분리하였다. Intact DNA를 포함하는 pellet에 lysing buffer 200  $\mu$ l를 넣은 다음 pellet suspension과 상등액 200  $\mu$ l에 최종 농도 0.5 N의 perchloric acid를 넣은 후에 95°C에서 15분간 반응시켰다. 상등액과 pellet의 DNA를 diphenylamine reaction으로 정량하였다. 2배 부피의 DPA reagent (0.088 M DPA, 98% v/v glacial acetic acid, 1.5% v/v sulfuric acid, and 0.5% v/v of 1.6% acetaldehyde solution)를 각각에 넣어준 다음 실온에서 12시간 배양 후에 200  $\mu$ l를 취해 96-well polystyrene microtiter plates로 옮긴 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 OD값을 측정하였다. DNA fragmentation의 양은 다음의 식으로 계산하

였다.

$$\text{DNA fragmentation (\%)} = \frac{2 \times (\text{상등액의 OD})}{\text{pellet의 OD} + 2(\text{상등액의 OD})} \times 100$$

## 결 과

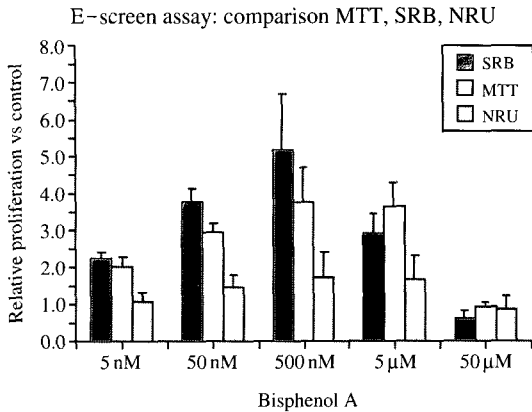
### 1. E-screen assay

#### 1) SRB, MTT, NRU assays 비교

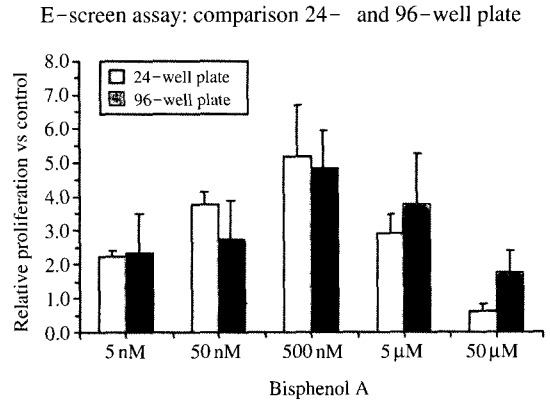
Proliferation assay에 있어서 다양하고 수많은 물질을 평가하기 위해서는 측정방법의 기준화와 단순화가 요구되며 이러한 변화에는 측정방법의 sensitivity가 유지되는 것이 필요하다. 직접 세포수를 세는 것 보다 간단한 colorimetric assays를 사용하는 것이 쉽고 정확하므로 대표적인 세포 생존률 측정방법인 SRB, MTT, NRU assays를 이용하였으며, 24-well plates에 세포개수는 예비실험 결과 10,000개를 사용하였다. 단일 물질 혹은 환경물질의 시료의 에스트로겐성을 측정하는데 있어 E-screen assay의 한계농도는 hormone-free negative control에 대해 세포성장을 일으키는 농도로 표현된다. Bisphenol A의 경우 한계농도는 NRU assay를 제외하고는 SRB, MTT assay에서 5 nM로 나타났으며 최대 세포증식 농도는 세가지 방법 모두 500 nM이었다 (Fig. 1). 최대성장 농도인 500 nM에서 PE (proliferation effect)값은 SRB assay가 4.473  $\pm$  1.9, MTT assay는 3.774  $\pm$  0.92, NRU assay는 1.719  $\pm$  0.66로 나타나 SRB assay가 가장 민감한 것으로 나타났으며 그 이하의 농도에서도 다른 측정방법에 비해 PE값이 높게 나타나 bisphenol A의 에스트로겐성을 파악하는데 높은 sensitivity를 보여주었다. 500 nM에서 최대 증식률을 나타낸 후 그 이상의 농도에서는 PE값이 점점 감소하여 50  $\mu$ M에서는 세가지 측정방법 모두 1 이하로 나타났다. 이것은 bisphenol A에 의한 세포독성에 기인한 결과로 사료된다.

#### 2) E-screen assay의 소형화

최근에는 Estrogen receptor (ER)-positive human MCF-7 breast cancer cells (E-screen assay)을 이용한 세포증식 실험을 변형한 다양한 방법들이 제시되고 있다. 여기에서는 E-screen assay의 소형화를

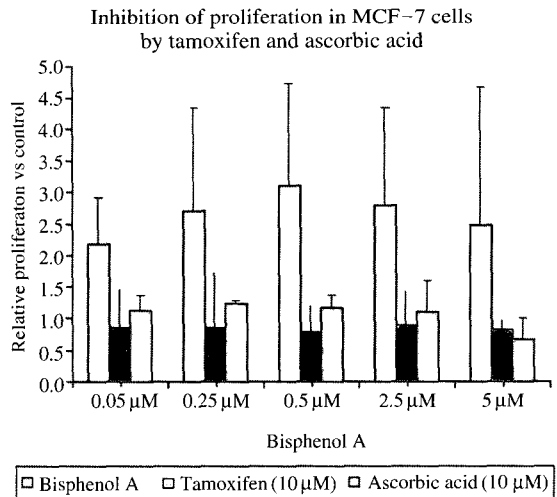


**Fig. 1.** Concentration-response curves of the E-screen assay for bisphenol A using MTT, SRB and NRU assays. Proliferation experiments conducted in quadruplicate wells at least three times. Data represent the normalized absorbances were measured by Microplate reader.



**Fig. 2.** Concentration-response curves of the E-screen assay for bisphenol A performed in parallel in 24-well and 96-well plates. Proliferation experiments conducted in quadruplicate wells at least three times. Data represent the normalized absorbances were measured by Microplate reader.

위해 24-well 대신 96-well plate를 사용한 실험을 수행하였다. 96-well과 24-well plate에서 여러 농도의 bisphenol A를 SRB assays를 이용하여 세포증식 효과를 실험한 결과 sensitivity를 유지하면서 유사한 결과가 얻어졌다. 그러나 최대증식농도인 500 nM에서 PE값은 24-well이  $5.181 \pm 1.5$ , 96-well이  $4.836 \pm 1.2$ 로 나타나 24-well과 96-well이 거의 유사한 sensitivity를 나타냈다.  $17\beta$ -estradiol을 가지고 96-well plate에 2,000개의 세포에 농도별 (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 nM)로 처리한 후 SRB assay를 이용하여 세포증식률을 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다.

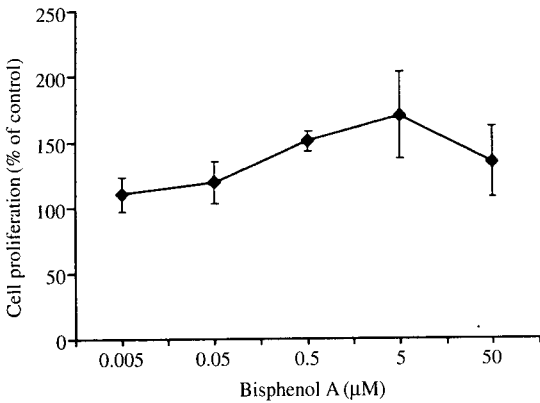


**Fig. 3.** Inhibition of the proliferative effect of bisphenol A in ER-positive MCF-7 cells by cotreatment with 10 μmol/L of the estrogen receptor antagonist Tamoxifen and 10 μmol/L of the antioxidant Ascorbic acid.

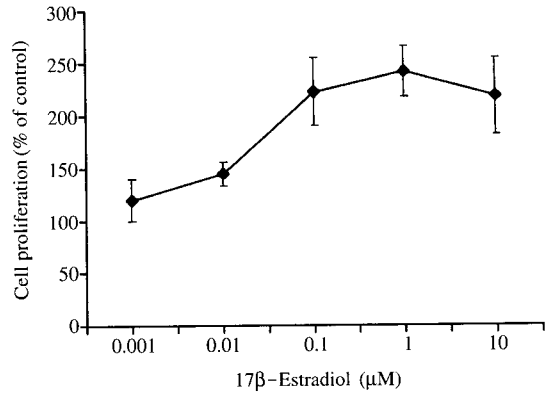
3) Tamoxifen의 세포독성을 이용한 E-screen assay

Bisphenol A와 같은 생체의 이물질의 에스트로겐 성을 측정하기 위하여 에스트로겐 수용체에 작용하여 세포독성을 나타내는 tamoxifen과의 에스트로겐 수용체에서의 경쟁을 통한 MCF-7 cells의 세포성장을 측정하였다. Tamoxifen을 전처리 한 후 bisphenol A를 처리한 결과 bisphenol A에 의한 MCF-7 cell의 세포 증식률이 상당히 낮아짐을 확인할 수 있었다(Fig. 4). Tamoxifen의 농도설정을 위하여 미토콘드리아 활성을 측정하는 MTT assay

를 사용하였다. Tamoxifen을 처리한 후 세포 생존률을 측정 한 결과 농도가 증가함에 따라 mitochondrial dehydrogenase activity가 점점 감소하여 50 μM에서는 세포생존률이 10% 정도로 감소하였으며 이것은 세포내의 에스트로겐 수용체와 관련이



**Fig. 4.** Proliferative effect of MCF-7 cells grown in 96-well plates after 6 days incubation with tamoxifen (pretreated 50 μM) and bisphenol A in culture medium with 10% charcoal dextran fetal bovine serum. Proliferation experiments conducted in quadruplicate wells at least three times. Data represent the normalized absorbances were measured by Microplate reader.



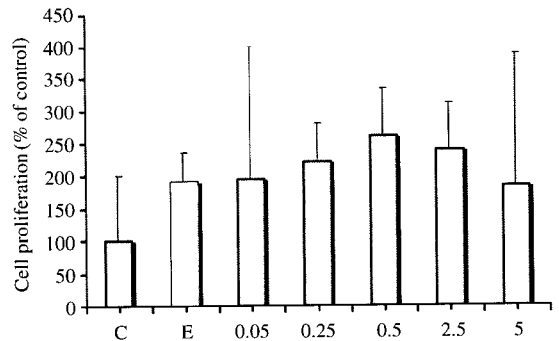
**Fig. 5.** Proliferative effect of MCF-7 cells grown in 96-well plates after 6 days incubation with tamoxifen (pretreated 50 μM) and 17β-estradiol in culture medium with 10% charcoal dextran fetal bovine serum. Proliferation experiments conducted in quadruplicate wells at least three times. Data represent the normalized absorbances were measured by Microplate reader.

있음을 알 수 있다.

Bisphenol A와 tamoxifen의 에스트로겐 수용체 경쟁을 통한 세포증식률을 biological estrogen인 17β-estradiol과 비교하여 보았다. MCF-7 cells의 생존률이 10% 이하로 감소된 50 μM tamoxifen을 bisphenol A와 17β-estradiol을 각 농도별로 처리한 well에 넣어준 후 세포증식률은 Fig. 3에서 보듯이 50 μM tamoxifen을 처리한 세포 생존률을 100으로 보았을 때 농도가 증가할수록 MCF-7 cells의 생존률이 증가하였다. 또한 17β-estradiol 역시 MCF-7 cells의 생존률을 크게 증가시켰다(Fig. 5). Bisphenol A와 17β-estradiol을 비교시 bisphenol A는 5 μM에서 170.88 ± 43.52%의 최대 증식효과가 나타났으며 17β-estradiol은 1 nM에서 241.59 ± 24.65%로 최대 증식효과가 나타났다. 특히 17β-estradiol은 앞선 실험에서 나타난 17β-estradiol 자체의 MCF-7 cells의 성장을 자극하는 최대농도인 1 nM과 일치하였다. E-screen assay의 결과는 hormone을 첨가하지 않은 대조군에 대한 세포수로 나타낸다.

4) 대사 활성계에서의 에스트로겐성

대사활성에 따른 bisphenol A의 에스트로겐성을 확인하기 위하여 0.05 μM에서 5 μM의 bisphenol A을 S9 mix와 함께 배양 한 후 MCF-cell의 세포

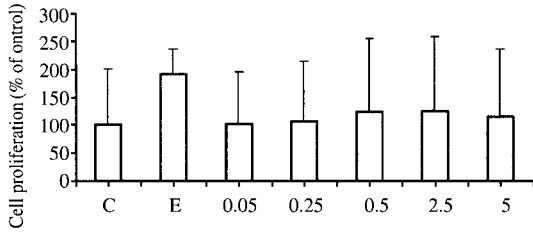


**Fig. 6.** Effects of bisphenol A on the growth of MCF-7 cells. The compounds were tested at concentrations ranging from 0.05 μM to 5 μM for 6 days. Results are expressed as the mean ± S.E. of four determinations. C, E indicate untreated control and 17β-estradiol (1pM)-treated cells, respectively.

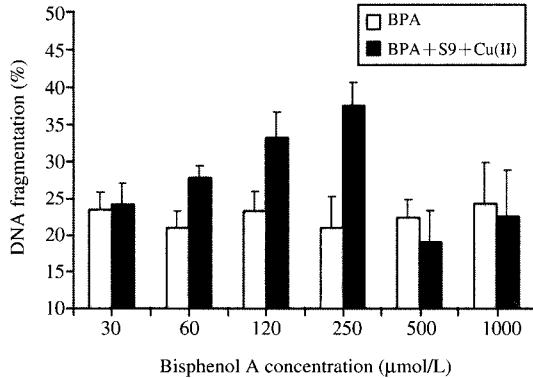
증식률을 비교한 결과 bisphenol A만을 배양한 결과 (Fig. 6)에 비해 S9 mix와 함께 배양시 세포증식률이 감소함을 확인하였다(Fig. 7).

2. DNA fragmentation

Apoptosis는 endonuclease의 활성화에 의해 nuc-

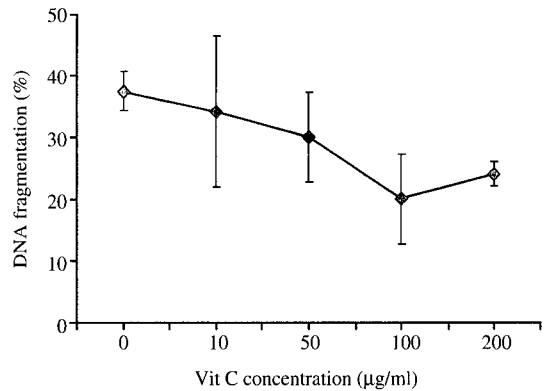


**Fig. 7.** Effects of bisphenol A and S9 mix on the growth of MCF-7 cells. The compounds were tested at concentrations ranging from 0.05  $\mu$ M to 5  $\mu$ M for 6 days. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of four determinations. C, E indicate untreated control and 17 $\beta$ -estradiol (1pM)-treated cells, respectively.



**Fig. 8.** Effect of BPA treatment on the DNA fragmentation of HaCaT cells. HaCaT cells were incubated in serum-free medium with various concentrations of BPA for 48h. After incubation, HaCaT cells were harvested, and the amount of DNA fragmentation was determined by diphenylamine reaction as described in Methods

lear DNA를 nucleosome 크기의 절편으로 절단하는 DNA fragmentation으로 특징지어진다. Bisphenol A에 의해 MCF-7 cells에서 특징적인 apoptotic internucleosomal DNA cleavage를 측정하기 위해 Bisphenol A만을 처리한 대조군과 대사활성화 시킨 bisphenol A와 Cu(II)를 함께 처리한 실험군으로부터 DNA sample을 얻어 diphenylamine method를 통해 DNA fragmentation을 측정하였다. MCF-7 cells은 serum이 없는 배지에서 배양하였으며 12시간동안 여러 농도의 bisphenol A와 함께 배양하였다. Fig. 8에서 보듯이 12시간 배양동안 bisphenol A



**Fig. 9.** Effect of Vit C concentrations on the DNA fragmentation by Bisphenol A treatment. After incubation of HaCaT cells in serum free medium containing 6 $\mu$ M BPA for 48h, HaCaT cells harvested. DNA fragmentation was determined by diphenylamine reaction.

만을 배양시킨 실험군에서는 농도에 관계없이 DNA fragmentation이 일어나지 않았음을 알 수 있다. 이와는 대조적으로 S9 mix와 Cu(II)를 함께 배양시 MCF-7 cells의 DNA fragmentation에 대한 영향이 250  $\mu$ M에까지 용량 의존적으로 증가하였다. 250  $\mu$ M의 bisphenol A를 처리한 세포에서 DNA fragmentation이 최대로 일어났으나 250  $\mu$ M 이상의 bisphenol A를 처리시 DNA fragmentation이 대조군과 유사한 수준으로 일어났다. 이것은 bisphenol A의 처리에 따른 cell death가 apoptosis가 아닌 necrosis에 기인한 것으로 여겨진다. 이러한 결과가 free radical에 기인함을 알아보기위해 항산화제인 Vit C의 영향을 diphenhydramine method를 통하여 알아본 결과 250  $\mu$ M의 bisphenol A를 포함하는 배지속의 Vit C의 농도가 증가할수록 DNA fragmentation이 감소하였다(Fig. 9).

### 고찰

내분비계 장애물질 검색 및 시험법에 대한 표준화 및 validation을 위한 연구가 전 세계적으로 공동 수행되고 있으며 그 결과들이 점차 구체화되고 있다. 그러나 아직까지 이들 시험법에 대한 감도 및 정확성에 대해서는 각 연구마다 다소 차이를 나타내고 있다. 본 연구에서는 내분비계 장애물질

의 에스트로겐 활성화에 대한 시험법 확립의 목적으로 대표적인 *in vitro* 시험법인 E-screen assay를 실시하였다. E-screen assay는 Soto(1995)의 방법에 따라 실시하여 17 $\beta$ -estradiol과 bisphenol A가 MCF-7 cells의 증식에 미치는 영향을 검토한 결과 용량-의존적으로 세포 생존율을 증가시켰다 (Villaobos M *et al.*, 1995). 일반적으로 Soto 등이 확립한 MCF-7 cells은 배양조건, 계대배양 횟수 및 보관조건 등에 따라 세포증식율 및 생존율에 차이를 나타낸다고 보고된 바 있다 (Gaido KW *et al.*, 1997). 그러나 본 연구 결과는 Soto(1995) 및 Korner 등(1999)의 결과와 유사하였다. 본 실험에서 사용한 세포생존율 검정방법은 독성기준 설정을 위해 미국 암협회(National Cancer Institute)에서 이용하고 있는 방법 중 MTT, SRB, NR 분석법을 사용하였다. Tetrazolium MTT(MTT) 분석법과 Sulforhodamine B protein(SRB) 분석법은 세포반응에 의한 효소작용을 측정하는 방법이고 Neutral red(NR) 분석법은 세포질 반응 중 용해소체의 변화를 측정하는 방법이다. 세포수를 측정하는 방법으로서 SRB, MTT, NRU assays를 사용한 결과 NRU assay를 제외하고 시험물질의 에스트로겐성을 측정하는데 적합하였다. 특히 SRB assay의 경우 세포의 개수를 측정하는데 있어 한계농도와 최대증식농도 사이에서 높은 감도를 나타내 내분비계 장애물질을 검색하는데 적합한 방법으로 판단되었다. MTT assay의 경우 생성되는 formazan에 의한 발색정도가 시간에 따라 변하는 단점이 있으나 SRB assay는 단층 및 다층의 세포를 검색하는데 정확하다고 알려져 있으므로 오랜시간의 배양에 따른 세포의 개수를 측정하는데 적합하다고 여겨지며 세포내 단백질의 음이온과 SRB의 양이온이 결합하여 발색하는 원리를 이용하므로 안정적인 데이터를 얻을 수 있었다. MTT assay는 SRB assay보다 시간과 경비가 적게 소요되었으며 다른 측정방법에 비해 쉽고 빠른 장점이 있었으나 발암물질인 MTT와 DMSO를 사용한다는 단점이 있었다. 또한 E-screen assay를 수행하는 기구로 24-well plates 대신에 96-well plates를 사용하였으며 실험에 사용된 세포개수는 24-well plate의 경우 보편적으로 사용하는 10,000개를 사용하였다. 96-well plate의 경우 예비실험결과 2,000개 이하, 2,000개 이상에서는 낮은 PE값이 나타났다. 이러한 결과는 2,000

개 이하일 경우 세포수가 적어 감도가 낮았으며, 2,000개 이상일 경우는 6일간 배양에 따른 세포의 과증식에 의한 오차로 여겨지며 특히 17 $\beta$ -estradiol과 같이 높은 세포증식률을 나타내는 시료의 경우 오차가 크게 나타났다. 이러한 E-screen assay는 여러 장점에도 불구하고 시험물질이 에스트로겐 수용체에 직접 작용하는 지에 대한 정보를 알 수 없다는 단점이 있다. 따라서 이들 결과를 보충할 수 있는 시험법으로 수용체에 대한 상경적 결합반응시험이 필요하다. Bisphenol A와 같은 내분비계 장애물질은 에스트로겐 수용체를 경유하여 세포증식을 일으키므로 MCF-7 cells의 수용체에 작용하여 세포독성을 나타내는 tamoxifen을 이용하여 내분비계 장애물질과 tamoxifen의 MCF-7 cells의 수용체에서의 경쟁을 통한 PE값을 측정하였다. Tamoxifen을 사용하여 감소된 세포생존율이 17 $\beta$ -estradiol과 bisphenol A에 의해 증가하였으며 17 $\beta$ -estradiol과 bisphenol A를 단독으로 배양한 결과와 비교시 감도를 잃어버리지 않으면서 에스트로겐성을 측정할 수 있었다. 이러한 에스트로겐 수용체에 대한 상경적 결합반응 시험만으로는 환경 중에 유래하는 에스트로겐 화학물질이 estrogen agonist 또는 antagonist로 작용하는지에 대해서는 정확하게 판정하기 어려우나 세포내 에스트로겐 수용체에 대한 결합반응 정도를 평가하는데 매우 용이한 방법중 하나라고 생각된다.

또한 본 연구에서는 bisphenol A에 의한 산화적 스트레스가 apoptosis를 유발하는지를 확인하기 위하여 S9 mix와 Cu(II) 존재하에서 bisphenol A에 의한 DNA fragmentation을 측정해 본 결과 어느정도 DNA fragmentation이 일어났으며 DNA fragmentation이 항산화제 의해 억제됨을 확인하였다. 따라서 bisphenol A는 세포내에서 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의한 apoptosis가 일어났으며 항산화제에 의해 apoptosis가 억제됨을 확인하였다. 그러나 세포의 apoptosis에는 수많은 유전자들이 관여하며 bisphenol A에 의한 apoptosis는 p 53, Bcl-2, caspase, Fas와 같은 유전자들에 대한 연구를 통해 증명이 되어야겠다.

## 감사의 글

이 논문은 2003년도 충남대학교 자체연구비의



지원에 의하여 연구되었습니다.

### 참 고 문 헌

- Atkinson A and Roy D. In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ Mol Mutagen*, 1995b; 26: 60-66.
- Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V and Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ health Perspect*, 103: 608-612
- C.B. Thompson. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* 1995; 267 1456-1462.
- Colborn T. environmental estrogens: health implications for humans and wildlife. *Environ Health Perspect*, 1995; 103: 135-136
- Colerangle JB and Roy D. Profound effects of the weak environmental estrogens-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of Noble rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1997; 60: 153-160
- D.J. reed, Toxicity of oxygen, in: F. De Matteis, L.L Smith (Eds.), *Molecular and Cellular Mechanisms of Toxicity*, CRC Press, New York, 1995; pp.35-68.
- Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould J, Babai D, Portier CJ and McDonnell DP. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in an yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay, *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1997; 143: 205-212
- H Sies, *Biochemistry of oxidant stress*, Agrew. Chem. Int. Ed. 1986; 25: 1058-1071.
- Villaobos M, Olea N, brotons JA, Olea-Serrano MF, Ruiz de Almodovar JM and Pedraza V. The E-screen assay: a comparison fo different MCF-7 cell stocks. *Environ. Health Perspect*. 1995; 103: 844-850.