

내분비계 장애물질 Bisphenol A가 생쥐의 정자형성에 미치는 영향

남현식 · 서동삼 · 고 용[†]

고려대학교 자연자원대학 응용동물학과

Effects of an Endocrine Disruptor (Bisphenol A) on the Mouse Spermatogenesis

Hyun-Sik Nam, Dong-Sam Seo and Yong Ko[†]

Department of Animal Science, College of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701, Korea

요약: 내분비계 장애물질은 생체내에서 호르몬 등의 내분비계에 영향을 주기 때문에 미량으로도 생식기능에 이상을 가져올 수 있고, 급·만성 독성과는 달리 차세대에 그 영향이 발현될 수 있다. 대부분의 내분비계 장애물질은 에스트로젠 유사 물질로 알려져 있으며, 내분비계 장애물질의 하나인 bisphenol A (BPA)도 이러한 성질을 가진 물질이다. 본 연구는 BPA가 생쥐의 정자형성과정에 어떤 영향을 미치는가를 분석하고자, 농도별 (저농도: 20 mg/kg, 고농도: 200 mg/kg) 구강투여를 실시하였다. 정자수와 테스토스테론 농도 및 산자수가 대조군에 비해 처리군에서 점진적으로 감소하는 경향을 보였으며, 산자수에서 유의적인 차이($P < 0.01$)를 나타내었다. 특히 국부적이긴 하지만 세정관 내강에서의 정자세포 소실 양상은 정자수의 감소 원인으로 사료된다. 성성숙 이후 정소에서의 발현이 소실되는 것으로 알려진 TGF- β 계에서는 TGF- β_1 이 고농도의 BPA 투여시 발현되었지만, 그 외의 리간드와 수용체의 발현은 관찰되지 못했다. 결론적으로 고농도의 BPA 노출은 응성생식계에 영향을 미칠 수 있으며, 이는 정자형성에 장애를 일으켜 불임을 유발할 수도 있을 것으로 보여진다.

Key words: 생쥐, 내분비계 장애물질, BPA, 정소, 정자형성과정, TGF- β

ABSTRACT: Endocrine disruptors (EDs) are exogenous chemicals which interfere several aspects of natural hormone properties. EDs with estrogenic activity have been recently reported to cause animal reproductive problems. This study was performed to investigate the effects of bisphenol A (BPA) on the mouse spermatogenesis *in vivo*. Male ICR mice were orally injected on a daily basis with low dose of BPA 20 mg/kg, high dose of BPA 200 mg/kg, or corn oil (vehicle control) for 7 days, and litter size and weights of body, testis, and cauda epididymis were measured. The level of serum testosterone and the expression of TGF- β_1 mRNA were also analyzed using RIA and RT-PCR, respectively. Also, morphological differences of testes after treatments were examined. Sperm concentration and level of serum testosterone showed a decreasing tendency detected as untreated > corn oil > low > high dose BPA treated mice, although there were no significant statistical differences. Interestingly, in mice treated with a high dose of BPA, partial disappearance of spermatozoa in seminiferous tubular lumen and the expression of TGF- β_1 mRNA were observed. Spermatogenesis was disrupted through TGF- β system in the seminiferous tubules, resulting in no development of germ cells. Similarly, the litter size treated with a high dose of BPA was significantly different from that of untreated control group. In conclusion, these results that a high dose of BPA (200 mg/kg) acts as an endocrine disruptor during spermatogenesis in male mice and that there are BPA-specific lesions in the adult male reproductive tract might represent a permanently altered responsiveness to testosterone by BPA in the affected target tissue.

Key words: Mouse, Endocrine disruptor, BPA, Testis, Spermatogenesis, TGF- β .

서론

오늘날 우리가 살아가고 있는 환경 중에는 수많은 화학물질이 존재하고 있다. 산업발달이 급격히 증대되면서 사용된

농약이나 산업화학물질 중 많은 것들이 야생동물이나 인간에 악영향이 미친다고 연구, 발표되면서 세계적으로 관심의 대상이 되었다. 일명 환경호르몬이라고 불리기도 한 내분비계 장애물질 (endocrine disruptor)은 인간 및 동물의 생체내에 작용하여 수컷의 정자수를 감소시키거나 (Pajarinen et al., 1997), 생식기의 기형 (Colborn et al., 1996) 혹은 면역독성 (Bradley & Ralph, 1999) 등을 유발하면서 생명체에 심각한 독성을 미치는 요인으로서 인식되기 시작하였다. 이러한 내

[†]교신저자: Department of Animal Science, College of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701, Korea. (전) 02-3290-3490, (팩) 02-925-1970, e-mail: yongko@korea.ac.kr

분비계 장애물질은 생체내에서 내분비계에 영향을 주기 때문에 미량으로도 생식기능에 이상을 가져올 수 있고 급·만성 독성과는 달리 차세대에 그 영향이 발현될 수 있다. 대부분의 내분비계 장애물질은 에스트로겐 유사물질로 알려져 있으며, 본 연구에서 사용된 bisphenol A는 플라스틱 가소제와 캔 코팅제, 치과용 충전제로 많이 사용되고 있는 에스트로겐 유사작용을 하는 물질로 알려져 있다 (Morrissey et al., 1989; Krishnan et al., 1993; Nicolas et al., 1996). 이러한 에스트로겐 유사작용으로 인한 수컷의 정소에서의 영향은 정상적인 내분비 기전을 교란시킬 수 있을 것이다.

LH의 자극에 의해 Leydig 세포에서 생성되는 테스토스테론 (Eik-Nes, 1975)과 세포의 증식과 분화에 촉진적인 작용을 하는 대부분의 성장인자와는 달리 특정 세포의 증식과 분화에 억제작용을 하는 transforming growth factor- β (TGF- β)는 정자형성과정에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Gautier et al., 1997). TGF- β 는 스테로이드합성에 중요한 Leydig 세포의 성장을 억제하고, 미성숙 돼지와 흰쥐의 Leydig 세포에서 human chorionic gonadotropin (hCG) 수용체의 수를 감소시키고, 테스토스테론 수준을 저하시킨다고 보고되었다 (Avallet et al., 1987; Fauser & Hsueh, 1988). TGF- β 를 첨가하여 정소내 세포들을 체외 배양한 실험에서 테스토스테론이 저하된 보고들은 이들이 스테로이드합성과정 (steroidogenesis)에 영향을 미친다는 증거라 할 수 있다.

성성숙 이후 TGF- β 의 발현은 점진적으로 소실되는 반면 테스토스테론의 생산은 급증하는 것으로 알려져 있다 (Teerds & Dorrington, 1993; Haisenleder et al., 1994; Le Magueresse-Battistoni et al., 1995a, 1995b).

따라서, 본 연구는 외인성 에스트로겐인 BPA를 체내에 노출시켜, 테스토스테론 농도의 변화 양상과 TGF- β 의 발현 양상을 조사하고, 정소의 조직형태학적 분석 및 정자수 측정을 수행함으로써 BPA가 정소에 미치는 영향을 밝히고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

본 실험에 사용된 동물로는 ICR종을 이용하였고, 이들 개체에서 얻어진 F¹을 성별로 분리한 후 5주령된 수컷을 체중별로 분류하여 각 실험구별 8마리씩 사용하였다. 또한 유전적인 배경을 동일하게 하기 위하여 전형매 (full-sib)의 개체를 사용하였다.

사양실 사육환경은 온도 22±2°C, 조명시간 12L:12D로 유

지하였고, 생쥐전용사료 [(주)삼양사]를 물과 함께 자유급식시켰다.

2. BPA 처리 및 시료채취

대조군은 비투여군과 면실유 투여군으로 나누고, 처리군은 저농도(20 mg/kg) 투여군과 고농도(200 mg/kg) 투여군으로 나누었다. 처리군은 체중을 환산하여 식용 면실유에 BPA (Sigma Co., USA)를 분말화시켜 현탁액 상으로 제조한 후 7일간 구강 투여하였다. 투여완료 후 산자수 확인을 위해 암컷 2마리와 교미시킨 다음 정소 및 정소상체미부를 적출하였으며, 혈액으로부터 혈청을 분리하였다.

3. 조직형태분석

적출된 정소의 일부는 Bouin's 용액에서 12시간 동안 고정시켜 세척과정을 거친 후, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% ethanol에서 각 1시간씩 순차적으로 탈수를 실시하였다. Ethanol과 xylene을 3:1, 1:1, 1:3의 비율로 만들어 각각 1시간씩 처리했으며, 이 후 100% xylene을 1시간씩 3회 반복 처리하고, xylene:paraffin wax는 3:1, 1:1, 1:3의 비율에서 포매 전처리하고, 100% paraffin wax로 1시간씩 3회 반복해서 포매시켰다. 성형 후, 미세절단기에서 5 μ m의 크기로 절단하여, hematoxylin-eosin과 PAS 염색 후 현미경상에서 조직형태를 분석하였다.

4. 정자수 측정

정소상체미부를 Hanks' balanced salt solution (HBSS) 1 ml에 절단하여 넣고, 37°C에서 5분간 배양시켰다. 상층액 100 μ l를 400 μ l의 HBSS가 들어있는 새로운 tube에 넣고 충분히 혼합한 다음 hemocytometer를 이용하여 현미경하에서 관찰하였다. 관측된 정자수는 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$SM/TW (g) = [ASH \times SF (5) \times HF (10^4) \times DF (5)] / TW (g)$$

SM, sperm number; TW, tissue weight; ASH, average count of sperm heads from five chambers; SF, square factor; HF, hemocytometer factor; DF, dilution factor

5. RNA 분리

액체질소에 보관중인 정소에서 Chomzynski와 Sacchi (1987)에 의해 보고된 guanidine thiocyanate 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 정소조직 (약 0.1 g)을 4 M guanidine thiocyanate 용액 [25 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5% sarcosyl, 0.1 M β -mercaptoethanol] 1 ml 속에서 균질화시키

고, 60 μ l의 2 M sodium acetate (pH 4.0)와 600 μ l water-saturated phenol, 그리고 120 μ l chloroform과 충분히 혼합하였다. 혼합된 용액은 4°C에서 5분간 정치한 후 17,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후 RNA를 추출하여 동량의 isopropanol과 -20°C에서 20분간 정치시켰다. 원심분리로 침전된 RNA는 75%의 ethanol을 사용하여 세척하였고, DEPC 처리한 물을 사용하여 RNA 침전물을 녹인 후 -70°C에서 보관하였다. RNA의 농도와 순도를 구하기 위해 UV-spectrometer를 사용하여 A_{260} / A_{280} 를 측정하였다.

6. Complementary DNA (cDNA) 합성

cDNA는 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM dNTP, RNasin 10U, RTase 20U가 포함되어 있는 AccuPower™ RT Premix (Bioneer Co., Korea)를 사용하여 합성에 이용하였다. RNA (1 μ g)와 random primer (0.3 μ g)의 반응을 42°C에서 60분간 유도함으로써 합성하였다.

7. PCR 실시

합성된 cDNA에서 TGF- β_1 의 발현을 확인하고자 Choung (1999)이 발표한 primer (sense primer: 5'-CAG CTC CAC AGA GAA GAA CTG C-3'; antisense primer: 5'-CGG GTT GTG TTG GTT TGT AGA GG-3')를 사용하여 증폭시켰다 (1 cycle: 94°C 5분; 35 cycle: 94°C 30초, 65°C 30초, 72°C 1분; final cycle: 72°C 7분). mRNA의 integrity를 알아보기 위하여 internal control gene인 β -actin을 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1U DNA polymerase, 1 mM dNTP가 포함되어 있는 AccuPower™ PCR Premix (Bioneer Co., Korea)에 각각 10 pmole primer (sense primer: 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'; antisense primer: 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3')를 넣은 후 증폭하였다 (1 cycle: 94°C 5분; 35 cycle: 94°C 30초, 63°C 30초, 72°C 1분; final cycle: 72°C 7분).

8. Testosterone 분석

혈청내의 testosterone은 radioimmunoassay (RIA)를 통해 정량분석을 하였으며, RIA kit (Coat-A-Count. Diagnostic Products Corporation, USA)를 사용하여 공급회사에서 제시된 실험방법을 준수하여 측정하였다.

9. 통계처리

통계처리는 Statistical Analysis System (SAS, 1995) 통계 프로그램을 이용하여 대조군과 처리군의 체중변화 및 정자수 그리고 testosterone의 농도를 one-way ANOVA에 의한 Duncan 방법에 의해 처리군별 유의성 검정을 실시하였다.

결 과

1. 체중 및 정소무게

각 실험군에서 체중과 정소 무게의 변화를 조사한 결과는 Table 1에 제시하였다. 면실유 투여 대조군과 BPA 저농도 투여군에서 비처리 대조군보다 무게가 저하된 경향을 보였고, 고농도 투여군에서도 약간의 저하 경향을 보이고 있으나 통계적 유의성은 없었다. 또한 Fig. 1은 체중에 대한 정소의 상대적인 무게를 나타낸 것으로 각 처리군별 통계적인 유의성이 발견되지는 않았다.

2. 정자수와 산자수

측정된 정자수를 조직의 무게로 환산하여 나타낸 것을 보면 정소의 무게 (g)에 대한 비율이나 정소상체의 무게 (mg)에 대한 비율이 거의 유사한 경향을 나타내었다. 고농도 BPA 투여군에서 가장 낮은 경향을 보이나, 통계적인 유의차는 나타나지 않았다 (Table 2). 그러나 산자수를 측정된 결과 비투여 대조군에 비해 고농도 BPA 투여군에서 유의적 ($P < 0.01$)으로 감소하였으며, 면실유 투여 대조군과 저농도 BPA 투여군에서는 대조군과 비슷한 경향을 나타내었다 (Fig. 2).

Table 1. Changes in initial and terminal body weight (BW) and testis weight (TW) between control (none, oil) and BPA (low, high dose)-treated groups.

Items	Treatments			
	None	Oil	Low dose	High dose
Initial BW (g)	26.24 \pm 0.91	26.03 \pm 1.06	26.20 \pm 0.99	26.04 \pm 0.70
Terminal BW (g)	34.38 \pm 3.03	31.63 \pm 2.62	31.13 \pm 2.93	32.79 \pm 2.58
Gain of BW (g)	8.24 \pm 3.14	5.77 \pm 3.21	4.86 \pm 3.40	6.64 \pm 2.82
TW (mg)	108.19 \pm 11.73	100.05 \pm 13.47	98.22 \pm 11.74	105.43 \pm 10.39

Results are shown as mean \pm SD.

Table 2. Sperm concentration (SC) per cauda epididymis weight (CEW) and testis weight (TW) between control (none, oil) and BPA (low, high dose)-treated groups

Items	Treatments	None	Oil	Low dose	High dose
SC/CEW ($\times 10^8$)		4.32 \pm 3.23	3.32 \pm 3.51	3.06 \pm 2.65	1.72 \pm 0.89
SC/TW ($\times 10^7$)		3.14 \pm 2.62	2.82 \pm 2.89	2.57 \pm 2.59	1.39 \pm 0.79

Results are shown as Mean \pm SD.

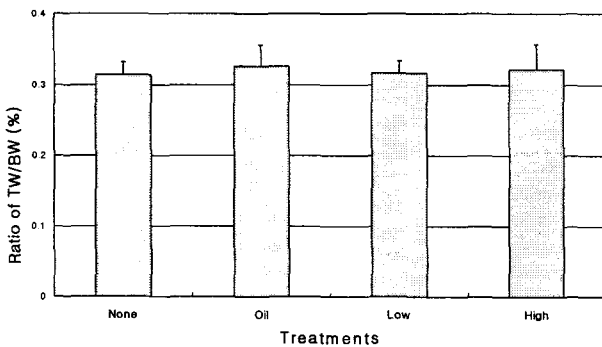


Fig. 1. Gonadal index between control (none, oil) and BPA (low, high dose)-treated groups. Data represent mean \pm SD.

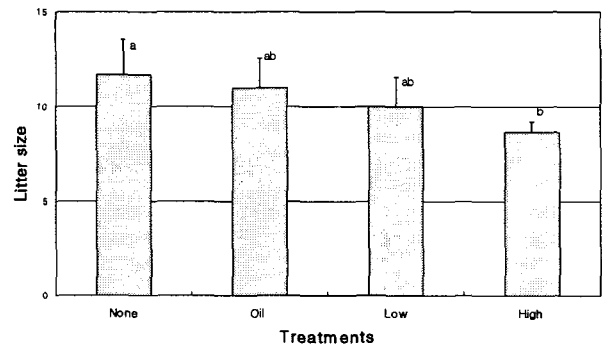


Fig. 2. Comparison of litter sizes. The female was co-housed with the male for 4 days. Means with different letters are significantly different ($P < 0.01$).

3. Serum Testosterone 분석

비투여 대조군에 비해 면실유 투여 대조군과 저농도 BPA 투여군, 고농도 BPA 투여군에서 순차적인 감소를 보였으나 개체변이에 의한 표준편차 (SD)값이 크게 나타남으로써 통계적인 유의성은 없었다 (Table 3). 비투여 대조군과 비교하여 고농도 BPA 투여군에서 테스토스테론이 가장 적게 측정됨이 관찰되었는데, 이것은 정자수에서 나타난 감소경향과 유사한 양상을 나타내고 있다.

4. 정소 조직형태학적 분석

정소조직형태는 비투여 대조군 (Fig. 3A)의 경우 세정관 사이의 Leydig 세포가 고르게 분포하였고, Sertoli 세포나 생식세포의 형태적인 이상은 보여지지 않으며, 세정관내강에서 정자세포가 치밀하게 차여 있는 것이 관찰되었다. 면실유 투여 대조군 (Fig. 3B)과 저농도 BPA 투여군 (Fig. 3C)의 정소

조직에서도 비투여 대조군과 형태적으로 비슷하였다. 그러나, 고농도 BPA 투여군의 경우는 세정관의 일부에서 내강의 정자세포가 사라진 것이 관찰되었는데, 이는 세정관 전체에서 나타나는 것이 아닌 국부적인 양상이었다 (Fig. 3D).

5. RT-PCR

BPA는 internal control gene으로 사용된 β -actin 발현에는 영향을 나타내지 않았다 (Fig. 4A). TGF- β_1 은 고농도 BPA 투여군에서 발현이 되고 있지만, 대조군인 비투여군과 저농도 BPA 투여군에서는 발현이 되지 않았고, 면실유 투여군에서는 아주 미약하게 발현되었다 (Fig. 4B). 그러나, TGF- β 계를 구성하고 있는 TGF- β_2 , β_3 리간드와 수용체인 T β R-I과 T β R-II는 모든 시료에서 발현을 관찰할 수 없었다 (data not shown).

Table 3. Concentration of the serum testosterone between control (none, oil) and BPA (low, high dose)-treated groups

Items	Treatments	None	Oil	Low dose	High dose
Testosterone (ng/dL)		223.15 \pm 294.82	178.55 \pm 241.36	165.43 \pm 258.38	88.36 \pm 91.90

Results are shown as Mean \pm SD.

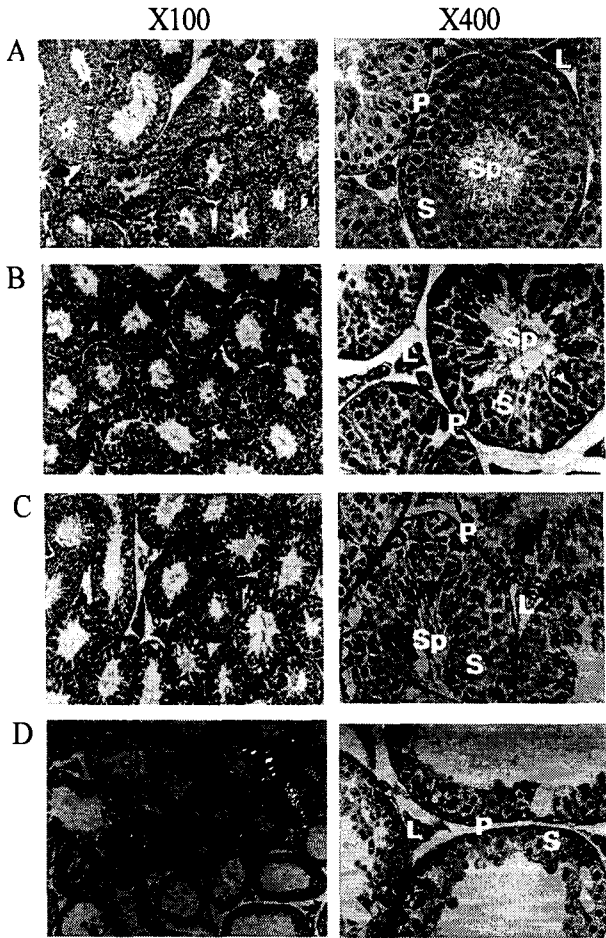


Fig. 3. Histological assay of mouse testis. A: None-treatment, $\times 100$, $\times 400$. B: Corn oil treatment, $\times 100$, $\times 400$. C: Low dose BPA treatment $\times 100$, $\times 400$. D: high dose BPA treatment, $\times 100$, $\times 400$. L, Leydig cell; S, Sertoli cell; P, peritubular myoid cell; Sp, spermatozoa.

고찰

생쥐의 정소에 BPA가 어떻게 영향을 미치는가를 조사한 결과, 정자수와 혈중 테스토스테론 농도가 비투여군과 비교할 때 면실유 투여군과 저농도, 고농도 BPA 투여군의 순서로 점진적인 감소 경향을 나타내었다. BPA는 에스트로겐 유사작용을 하는 물질이지만 (Nicolas et al., 1996; Roy et al., 1997; Ashby et al., 1999), diethylstilbestrol (DES)과 같은 에스트로겐 유사작용 물질과는 달리 비교적 약한 독성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 (Brotons et al., 1995), 상대적으로 저농도 수준에서는 별다른 영향이 없는 것으로 보고되고 있다 (Ashby et al., 1998). 본 실험의 결과에서도 고농도 BPA 투여군에서의 BPA 효과가 저농도 BPA 투여군보다 더 많이 나타나는 경향을 보이고 있어서 Ashby (1998) 등의 보고와 같

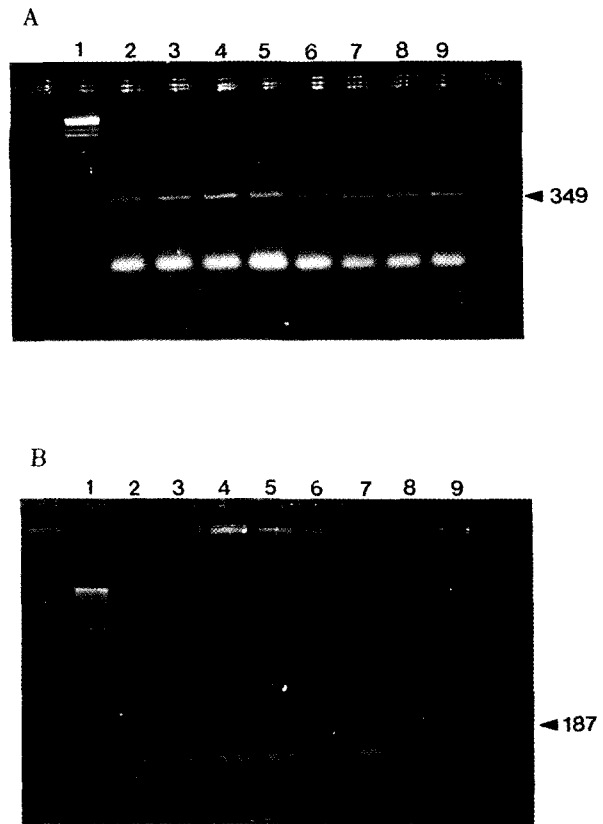


Fig. 4. Messenger RNA expression of β -actin (A) and TGF- β_1 (B) in the mouse testes. Arrows indicate its specific expression, respectively. Lane 1, size marker (1 kb ladder); lanes 2~3, non-treatments; lanes 4~5, corn oil treatments; lanes 6~7, low dose BPA treatment; lanes 8~9, high dose BPA treatment.

이 저농도에서는 정소의 정자형성과정에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

정상적인 수컷의 내분비계에서는 시상하부에서 분비되는 성선호르몬자극호르몬 (GnRH)이 LH와 FSH의 분비를 촉진하고, 이들은 정소의 Leydig 세포와 Sertoli 세포에 영향을 주게 되어 테스토스테론의 생성과 정자형성과정에 관여한다. 이렇게 생성된 테스토스테론 농도가 증가될 경우, aromatase의 작용에 의해서 에스트로겐으로 전환되어 negative feedback으로 시상하부 및 뇌하수체 전엽에 영향을 미치게 된다 (Wilson et al., 1983; Charles et al., 1993; Randall et al., 1997). 이러한 정상적인 내분비계에 외인성 에스트로겐이 체내로 들어와 에스트로겐과 같은 작용을 일으킨다면, 인위적인 negative feedback을 유발시키게 되어 Leydig 세포에서의 테스토스테론 생성이 감소하고, 이 결과는 정자형성에 좋지 않은 영향을 끼치게 될 것이다. 따라서 본 실험 결과에 나타난 테스토스테론의 감소 경향은 BPA의 에스트로겐 유사작용이

원인이라고 사료된다.

테스토스테론과 정자수 사이에는 정의 상관관계가 있는 것으로 Winter 등 (1976)은 보고하였다. 본 연구에서도 테스토스테론과 정자수가 동반적으로 감소하는 경향이 관찰되었는데, 이는 BPA가 테스토스테론과 정자수에 영향을 미치고 있음을 나타내는 결과이다. 또한, Jerry 등 (1997)은 BPA에 노출되었을 경우 산자수가 저하됨을 보고하였는데, 이는 본 연구결과와 고농도 BPA 투여군에서 관찰된 유의적인 산자수 감소가 이러한 정자수 감소에 의한 결과임을 간접적으로 추측할 수 있다. 이것은 본 실험의 조직형태학적인 분석을 통해 부분적이나마 증명되었다. 비투여군의 세정관 내강 (Fig. 3A)은 정자세포들이 치밀하게 차여져 있는 반면에, 고농도 BPA 투여군의 세정관 내강 (Fig. 3D)에서는 정자세포가 국부적으로 관찰되지 않았다. 본 실험결과는 만약 농도가 더 높아지거나 노출되는 기간이 길어진다면, 이러한 국부적인 영향이 증가되어 무정자증이나 저정자증에 의한 불임이 유발될 수 있음을 암시하고 있다.

한편, BPA 투여에 따른 TGF- β 계 발현 실험에서는 TGF- β_1 의 발현이 확인되었으나 (Fig. 4B), β_2 와 β_3 및 T β R-I과 T β R-II는 발현되지 않았다 (data not shown). 성성숙이 지난 후 성체에서의 TGF- β 계 발현은 점차적으로 소실되는 것으로 보고되었는데 (Mullaney & Skinner, 1993; Teerds & Dorrington, 1993), 본 연구결과와 고농도 BPA 투여군에서 TGF- β_1 이 발현된 것은 내분비적인 기전의 결과라 해석할 수 있다. BPA가 전반적인 TGF- β 계의 리간드와 수용체의 발현을 유도하지는 않았으나 TGF- β_1 을 발현시킨 것은 두 가지 방향으로 추측할 수 있다. 첫 번째는 Whitlock (1999)이 dioxin의 기전에서 보고한 것과 같이, BPA가 TGF- β_1 의 유전자 발현을 촉진할 수 있는 전사인자 (transcription factor)로써 작용하여 성성숙 이후 발현이 억제되어 있는 TGF- β_1 유전자 발현을 유도한 것이라 볼 수 있다. 또한, 두 번째의 가설은 태아가나 미성숙시기에 발현이 되는 TGF- β_1 이 성성숙이 되면서 발현이 소실되는데, 이는 FSH 투여시 TGF- β 계의 리간드 발현이 현격히 줄어드는 것으로 알 수 있다 (Mullaney & Skinner, 1993). 이처럼 FSH가 많이 분비되기 시작하는 성성숙 개시 시점부터 상피세포 성장억제인자로서 작용하는 TGF- β 리간드의 발현이 줄어드는 것은 정자형성과정에서 중요한 요인이라 할 수 있겠다. 한편, 성성숙이 지난 후 발현이 억제되어야 함에도 불구하고, BPA가 feedback 기전에 작용하여 FSH의 분비를 교란시키고, 이러한 이유로 TGF- β 의 발현 억제작용이 저하되어 고농도 BPA 투여군에서 TGF- β_1 의 발현이 나타날 수 있을 것으로 사료된다.

TGF- β 는 정소에서 특히 테스토스테론의 생성과 관련성이 많은데, 스테로이드 생산에 중요한 Leydig 세포에 강력한 억제작용이 있다고 보고되고 있다. 미성숙 돼지와 흰쥐의 Leydig 세포에서 TGF- β 는 hCG 수용체의 수를 감소시키고, Leydig 세포 증식과는 무관하게 cAMP와 테스토스테론 수준을 저하시킨다 (Avallet et al., 1987; Fauser & Hsueh, 1988). 태아 흰쥐의 Leydig 세포를 체외배양하는 실험에서 TGF- β 처리시 테스토스테론의 양이 줄어드는 것을 알 수 있었는데, 이는 정소내에서의 스테로이드생산을 저해하는 직접적인 증거라 할 수 있다 (Gautier et al., 1997).

그러나, 본 연구에서는 TGF- β_2 와 β_3 그리고 T β R-I과 II의 발현은 관찰할 수 없었다. 이는 BPA가 이들 유전자의 발현에는 영향을 미치지 못한다고 생각할 수 있다. 따라서 리간드와 세포막 수용체 사이의 결합에 의하여 TGF- β 억제작용이 세포내로 전이되는 것을 감안하면, BPA가 TGF- β system에 미치는 작용기전에 관해서는 더 많은 연구가 필요하며 현재 이에 대한 연구가 진행 중에 있다.

본 연구결과들을 종합하면, BPA는 고농도에서 정소에 비교적 약한 에스트로겐으로 작용하여 테스토스테론 생산량을 감소시키고, 세정관 내강의 정자세포를 소실시키며, 이러한 결과로 정자수를 감소시켜 산자수의 저하를 초래하는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 BPA에 대한 인체 유해성이 중요하게 인식되면서도 현재 국내의적으로 내분비계 작용기전에 관한 연구가 매우 미비한 실정으므로, 생식발생에 대한 독성기전 연구의 기초자료로 활용할 수 있을 것이다.

인용문헌

- Ashby J, Tinwell H. (1998) Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat. *Environ Health Perspect* 106: 719-720.
- Ashby J, Tinwell H, Haseman J. (1999) Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. *Regul Toxicol Pharmacol* 30: 156-166.
- Avallet O, Vigier M, Perrard-Sapori MH, Saez JM. (1987) Transforming growth factor beta inhibits Leydig cell functions. *Biochem Biophys Res Commun* 146: 575-581.
- Bradley C, Ralph JS. (1999) Persistent suppression of delayed-type hypersensitivity in adult F344 rats after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology* 134: 79-88.
- Brotos JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V,

- Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. (1995) Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* 103: 608-612.
- Charles T, Narie-Claire L, Hunter RHF. (1993) *Reproduction in Mammals and Man*. English revised Edition 227-255.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Choung MH. (1999) Expression of transforming growth factor- β s in the pregnant mouse uterus. Thesis for the Degree of Master. Korea University.
- Colborn T, Smolen MJ. (1996) Epidemiological analysis of persistent organochlorine contaminants in Cetaceans. *Rev Environ Contam Toxicol* 146: 91-172.
- Eik-Nes KB. (1975) Biosynthesis, and secretion of testicular steroids, In: Greep RO, Astwood EB, Astwood EB, Halminton DW, Geiger S (eds) *hand book of physiology*. American physiological Society, Washington DC. 5: 95-115.
- Fausser BC, Hsueh AJ. (1988) Effect of transforming growth factor-beta on human chorionic gonadotropin induced testosterone production by cultured rat testicular cells. *Life Sci* 43: 1363-1370.
- Gautier C, Levacher C, Saez JM, Habert R. (1997) Expression and regulation of transforming growth factor β_1 mRNA and protein in rat fetal testis *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 135-139.
- Haisenleder DJ, Dalkin AC & Marshall JC. (1994) Regulation of gonadotropin gene expression. In *The Physiology of Reproduction*. Eds E. Knobil & JD. Raven Press. Neill. New York. pp 1793-1813.
- Jerry R, Julia G, Lawton A, Christina M, James L. (1997) Reproductive toxicology. Bisphenol A. *Environ Health Perspec*. 105 Suppl 1: 273-274.
- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. (1993) Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132: 2279-2286.
- Le Magueresse-Battistoni B, Morera AM, Benahmed M. (1995a) In vitro regulation of rat Sertoli cell inhibin messenger RNA levels by transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor alpha. *J Endocrinol* 146: 501-508.
- Le Magueresse-Battistoni B, Morera AM, Goddard I, Benahmed M. (1995b) Expression of mRNAs for transforming growth factor-beta receptors in the rat testis. *Endocrinology* 136: 2788-2791.
- Morrissey RE, Geroge JD, Price CJ, Tyl RW., Marr MC. and Kimmel CA. (1989) The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fund Appl Toxicol* 13: 747-777.
- Mullaney BP, Skinner MK. (1993) Transforming growth factor-beta (beta 1, beta 2, and beta 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 7: 67-76.
- Nicolas O, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. (1996) Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 104: 298-305.
- Pajarinen J, Laippala P, Penttila A, Karhunen PJ. (1997) Incidence of disorders of spermatogenesis in middle aged Finnish men, 1981-91: two necropsy series. *British Med J* 314: 13-18.
- Randall D, Burggeren W, French K. (1997) *Hormones: Regulation and action*. Animal Physiology mechanisms and adaptations. W.H. Freeman and Company. The fourth edition. 301-349.
- Roy D, Palangat M, Chen CW, Thomas RD, Colerangle J, Atkinson A, Yan ZJ. (1997) Biochemical and molecular changes at the cellular level in response to exposure to environmental estrogen-like chemicals. *J Toxicol Environ Health* 50: 1-29.
- SAS. (1995) *SAS/STAT Guide for personal computers*, Version 6.12. SAS institute Inc., Cary, NC., USA.
- Teerds KJ, Dorrington JH. (1993) Localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 during testicular development in the rat. *Biol Reprod* 48: 40-45.
- Whitlock JP Jr. (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 103-125.
- Wilson JD, Griffin JE, George FW, Leshin M. (1983) The endocrine control of male phenotypic development. *Aust J Biol Sci* 36: 101-128.
- Winter JS, Hughes IA, Reyes FI, Faiman C. (1976) Pituitary-gonadal relations in infancy: 2. Patterns of serum gonadal steroid concentrations in man from birth to two years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 42: 679-686.