

Bisphenol A, Nonylphenol, Pentachlorophenol MCF-7 및 PC-3 세포 증식에 미치는 영향

이수민 · 최형기 · 유경희*
산업자원부 기술표준원 생물환경과
(접수 : 2003. 8. 13. 게재승인 : 2003. 10. 25.)

Effect of Bisphenol A, Nonylphenol, Pentachlorophenol on the Proliferation of MCF-7 and PC-3 Cells

Su-Min Lee, Hyeong-Ki Choi, and Gyung-Hee Yu†
Biotechnology & Environmental Technology Division, Agency for Technology & Standards, Ministry of Commerce,
Industry & Energy, Jooang-dong, Kwacheon-shi, Kyonggi-do 427-716, Korea
(Received : 2003. 8. 13. Accepted : 2003. 10. 25.)

In the present study, we have analyzed effects of the endocrine disruptors, such as bisphenol A, nonylphenol and pentachlorophenol, on cell proliferation in the human breast cancer cell line, MCF-7, and the human prostate cancer cell line, PC-3, with MTT method. A dose dependent analysis of the cell proliferation of MCF-7 cells after administration of bisphenol A, nonylphenol and pentachlorophenol revealed a significant induction of cell proliferation. Maximum induction of cell proliferation was observed at concentrations between 10^{-7} and 10^{-6} M. Whereas, these chemicals had little effect on proliferation of PC-3 cells. These results demonstrated that bisphenol A, nonylphenol and pentachlorophenol do not induce proliferation of PC-3 cells but exhibit a significant induction of MCF-7 cell proliferation, suggesting all these chemicals are a estrogen mimic.

Key Words : Endocrine disruptors, bisphenol A, nonylphenol, pentachlorophenol, cell proliferation

서 론

내분비계 장애물질은 생체 내의 항상성 유지와 발생과정을 조절하는 호르몬의 생산, 분비, 이동, 대사, 결합작용 및 배설을 간섭하는 외인성 물질로 정의되고 있으며, 일반적으로 생체호르몬과는 달리 쉽게 분해되지 않고, 환경 및 생체 내에 잔류하며, 인체 등 생물체의 지방 및 조직에 농축되는 성질을 지니고 있다(1-2). 미국, 일본 등은 자국의 실정에 맞추어 내분비계 장애물질 목록을 작성하여 관리하고 있으며, 이러한 내분비계 장애물질의 목록에는 플라스틱 합성물질, 제초제, 염색약, 소독약 등 많은 화학물질이 포함된다(3-4).

Bisphenol A는 일회용 식품용기, 일회용 음료 캔 및 식품 캔, 치과 재료에 사용되는 폴리카보네이트 수지의 구성물

로써, 폴리카보네이트 수지로 이루어진 플라스틱을 고온·고압 열간을 수행할 때 bisphenol A가 용출되어 효모의 증식을 유도하는 것이 보고되었다(5). 또한 알킬페놀류 화학물질 중에 계면활성제로 많이 사용되고 있는 nonylphenol이 유방암 세포를 증식시킨다는 보고가 있으며(6), nonylphenol과 유사한 알킬페놀류인 octylphenol의 경우도 강한 세포증식성이 있음이 이미 알려져 있다(7). 한편 유기염소계 살충제로써 세계적으로 가장 널리 사용되어 온 polychlorinated biphenyl (PCB)의 경우 수컷의 암컷화와 수컷성기의 왜소화를 초래한다는 것이 알려져 있다(8).

이러한 내분비계 장애물질이 지니고 있는 내재적 위험성은 순간적으로 인체가 고농도의 환경에 노출되는 경우 뿐만 아니라, 적은 양의 물질이 지속적으로 체내에 축적되어 아직 검증되지 않은 영향을 받을 수 있는데 기인한다. 따라서, 저농도의 내분비계 장애물질 노출에 관한 연구와 더불어 내분비 교란작용을 갖는 저농도의 독성물질을 찾아내는 세포수준에서의 분석방법의 확립이 시급히 요구되고 있다.

본 연구에서는 여성호르몬 유사물질로 알려진 bisphenol A 및 nonylphenol과 PCB와 비슷한 유기염소계 물질로써 섬유 및 신발류, 가구, 벽지, 매트리스등 염색제품에 많이 사용되

† Corresponding Author : Biotechnology & Environmental Technology Division, Agency for Technology & Standards, Ministry of Commerce, Industry & Energy, #2 Jooang-dong, Kwacheon-shi, Kyonggi-do 427-716, Korea

Tel : +82-2-509-7257, Fax : +82-2-507-1922

E-mail : ghyu@ats.go.kr

는 pentachlorophenol의 자성 및 음성 생식세포에 대한 증식 효과를 조사하여 세포수준에서 이들 내분비계 장애물질을 스크리닝 할 수 있는 시험방법을 수립하고자 하였다. 이를 위하여 여성호르몬에 증식반응을 보이는 여성 유방암 세포 유래의 MCF-7 세포주와 남성 전립선 암세포 유래의 PC-3 세포주를 대상으로 bisphenol A, nonylphenol, pentachlorophenol 이 세포 증식에 미치는 효과를 생존 세포수 확인 실험을 통해 조사하였다.

재료 및 방법

시약

Nonylphenol은 GmbH (Seoul, Korea)로부터 구입하였으며, bisphenol A (4,4'-isopropylidenediphinol), pentachlorophenol, dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 Sigma-Aldrich (Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 기타 세포 배양 및 보관에 관련된 시약은 Gibco. BRL (Grandisland, USA)에서 구입하였다.

세포배양 및 보관

한국세포주은행으로부터 여성호르몬 양성 반응의 여성 유방암 세포유래 세포주인 MCF-7 (KCLB 30022; passage no. 163)과 남성의 전립선 암세포 유래 세포주인 PC-3 (KCLB 21435; passage no. 52)인 세포를 분양 받아 실험을 수행하였으며, 분양 받은 세포는 3.7 g/L sodium bicarbonate를 포함한 Dublecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지에 0.1% penicillin과 streptomycin을 투여한 후, 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다. 열처리 불활성화 시킨 Fetal Bovine Serum (FBS)은 배지 내에 10% 농도로 유지하였다. 처음 세포 분주 후에 다음날 배지를 교환하였으며, 이 후 매 3일 간격으로 배지를 교환하였고, 플라스크에 세포가 충분히 자라면, 세포 분주를 실시하였다. 세포의 보관을 위해 7.5%의 DMSO와 55%의 FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 액체질소를 사용하여 동결 보관하였다.

혈청 전처리

FBS에 내재되어 있는 호르몬성 물질들을 제거하기 위해 Soto 등(9)이 사용하였던 방법을 수정하여 사용하였다. 먼저, 활성탄에 dextran을 코팅하기 위해, 증류수에 5% (w/v) 활성탄과 0.5% (w/v) dextran을 현탁시키고, 121°C에서 15분간 멸균한 후, 1000 × g에서 10분간 원심 분리를 하여 상층의 증류수를 조심스럽게 제거하였다. 남아 있는 dextran 코팅 활성탄 침전물에 위에서 제시된 증류수와 동일한 부피의 FBS를 넣어 현탁하였다. 혼합기를 이용하여, 10회진/분의 속도를 유지하면서, 상온에서 60분간 반응시켜 FBS에 포함되어 있는 호르몬성 물질을 dextran 코팅 활성탄에 흡착시켜 제거하였다. 반응 완료 후 50,000 × g에서 20분간 원심분리를 실시하여, FBS에 내재되어 있는 호르몬성 물질을 흡착한 dextran 코팅 활성탄을 침전시켰으며, 이와 같이 처리된 FBS는 0.2 μm membrane filter를 이용하여 멸균 후 사용하였다.

생존 세포수 측정

Mosmann(10)이 사용하였던 방법을 수정하여 사용하였다.

T-25 플라스크에서 충분히 자란 세포를 0.05% trypsin을 포함한 0.53mM EDTA 용액 1 mL로 현탁 후 수확한 다음, haematocytometer (Sigma)를 이용하여, 96 well plate에 세포 수가 3×10^3 에서 6×10^3 개 정도가 유지되도록 분주하였다. 세포 배양 조건과 같은 조건에서 배양하였으며, 다음날 배지를 교환하였고, 현미경 확인 후 표면의 세포가 50% 정도에 이르면, 배지를 제거하고, 세포에 잔존하고 있는 호르몬성 물질들을 제거하기 위해 KCl 0.2 g/L, KH₂PO₄ 0.2 g/L, NaCl 8 g/L, Na₂HPO₄ 2.2 g/L를 포함하고 pH 7.3 인 Posphate Buffered Saline (PBS)을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후, phenol red가 세포 성장에 미치는 영향을 제거하기 위해 phenol red가 첨가되지 않은 DMEM 배지에 110 mg/L sodium pyruvate와 0.1% penicillin과 streptomycin을 첨가하였다. 세포 성장 시에 FBS 내부에 존재하는 호르몬성 물질들에 의한 세포 증식 유도효과를 배제하기 위하여 앞에서의 방법과 같이 dextran을 입힌 활성탄으로 처리한 FBS를 5% (v/v)가 되도록 첨가하였다. 이 후에 위에서 설명한 세포 배양 조건과 동일한 조건에서 3일간 배양하였으며, 3일 후 배지 교환과 동시에 bisphenol A, nonylphenol, pentachlorophenol을 DMSO에 녹인 후 10^{-3} M에서 10^{-9} M의 농도로 투여하였다. DMSO 농도는 세포배양액의 0.1% (v/v)를 유지하였다. 투여 후에 24, 48, 72, 96시간 동안 인큐베이터 내에서 5% CO₂, 37°C 조건으로 배양하였다. 지정된 배양시간 후, 각 well에 methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide (MTT) 최종 농도가 0.5 mg/mL가 되도록 용액을 처리한 다음 인큐베이터에서 다시 4시간 배양하였다. 각각의 시료가 처리된 96 well plate를 450 × g에서 5분간 원심분리한 후 마이크로피펫을 이용하여 조심스럽게 배지를 제거하였다. 생존 세포로부터 생성된 MTT formazan을 용해시키기 위해 각 well에 200 μL의 DMSO를 분주하였다. 3분간 교반을 실시하여, 생성된 MTT formazan을 완전히 용해시킨 후, ELISA reader (Spectra Fluor, TECAN)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Bisphenol A의 영향

내분비계 장애물질로 알려진 bisphenol A, nonylphenol, pentachlorophenol은 DMSO에 녹인 후 세포에 처리하였기 때문에 처리구와 대조구에 있어서 DMSO 최종 농도는 배양액의 0.1%를 유지하도록 하여 DMSO에 의한 간섭효과를 배제하였다. Fig. 1은 bisphenol A의 농도를 변화시켜 PC-3세포와 MCF-7의 배양시간에 따른 세포증식의 변화를 알아보았다. PC-3 세포에서 96시간까지 매 24시간마다 세포증식률을 조사한 결과 bisphenol A를 고농도인 10^{-4} M 농도로 처리하였을 경우에는 여성 유방암 세포 유래의 MCF-7 세포주와 남성 전립선 암세포 유래의 PC-3 세포주 모두에서 세포증식률이 약 40%에서 60% 정도 감소하였다. 그러나 10^{-5} M과 10^{-6} M에서는 대조구와 비슷한 수준에서 세포증식을 유지하였으며, 특히 bisphenol A의 경우에도 세포증식효과는 관찰할 수 없었다. Bisphenol A는 여성호르몬 수용체 결합능력, BPA 처리 시에 pS2 유전자의 mRNA 발현 정도, 실험쥐의 자궁무게 증가 현상 등을 실험을 통해 확인한 결과 약한 여성호르몬성을

지니는 화학물질로 알려져 있으나(11-12), 본 연구에서는 MCF-7 세포의 증식효과를 크게 확인할 수 없었다. 특히, 10^5 M, 10^4 M 등의 고농도의 처리에서는 오히려 세포 증식을 억제하였다.

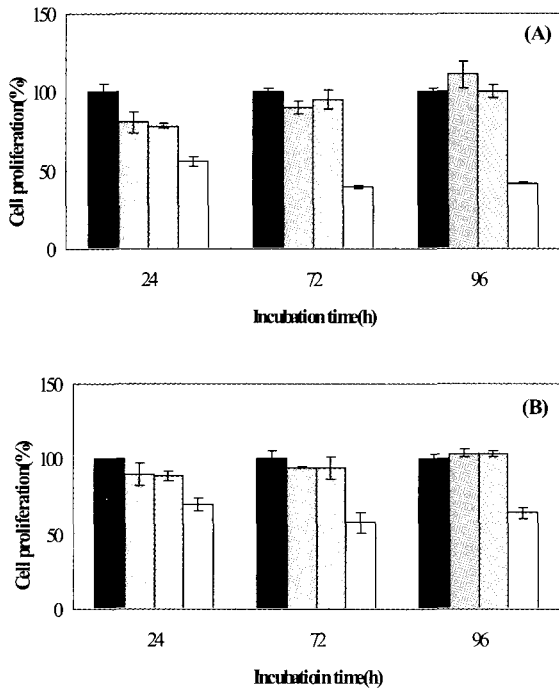


Figure 1. Effect of bisphenol A on proliferation of MCF-7(A) and PC-3(B) cells at various incubation times (■ : untreated, ▨ : 6×10^6 M, □ : 10^5 M, ▩ : 10^4 M bisphenol A). Each data point represents the mean of three separate experiments \pm SD.

Fig. 1의 실험결과는 bisphenol A 농도범위가 10^6 M에서 10^4 M로 Bergeron 등(13)은 MCF-7의 세포 증식을 증가시키는 bisphenol A의 농도가 10^7 M에서 10^8 M임을 보고하였으며, 이를 고려할 때, 보다 낮은 농도에서 이들 내분비계 장애 물질의 효과를 조사할 필요가 있었다. 따라서 10^9 M에서 10^4 M 농도로 bisphenol A를 MCF-7 세포에 처리한 후 24시간 후에 세포 생존율을 조사하였다(Fig. 2). Bisphenol A 농도가 10^9 M에서 10^7 M까지는 처리 농도에 비례하여 생존 세포의 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 10^6 M 농도부터는 생존 세포수가 오히려 감소하였으며, 가장 높은 세포 성장률을 보이는 농도는 10^7 M 농도임을 알 수 있었다. 이러한 결과에서 bisphenol A는 10^7 M 수준에서 여성호르몬인 에스트로젠과 마찬가지로 MCF-7 세포주의 증식을 유도함을 알 수 있었으며 이전의 논문(14)에서 보고와 일치하는 결과를 얻을 수 있었다.

Nonylphenol 농도변화에 따른 영향

Nonylphenol은 알킬페놀류 화학물질로 계면활성제로 많이 사용되고 있는 내분비계장애물질로 여성의 유방암세포를 증식시킨다는 보고가 있다(15). 따라서 여성호르몬 에스트로젠에 증식반응을 보인다고 알려지고, 여성호르몬 유사물질이라

고 보고된 bisphenol A에도 증식반응을 보인 MCF-7 세포의 nonylphenol 영향을 조사하였다(Fig. 3). Nonylphenol은 10^9 M에서 10^6 M의 농도에서 세포 증식효과를 관찰할 수 있었으나, 10^5 M 이상의 농도에서는 생존 세포수가 급격하게 감소함을 볼 수 있었다. 10^5 M 이상 농도에서의 급격한 생존률의 감소는 고농도에 의한 독성효과라고 추정된다. 한편, PC-3세포는 남성 전립선 암세포 유래 세포주로 여성호르몬계통의 물질에는 증식반응을 보이지 않는 것으로 보고되었다(16). PC-3 세포에 10^7 M에서 10^5 M 농도 범위의 nonylphenol을 처리하였을 때 10^7 M의 농도에서도 PC-3의 세포 증식효과는 관찰되지 않았으며 10^5 M 농도에서는 고농도 독성효과에 의하여 PC-3 세포의 생존률이 50% 정도 감소하였다.

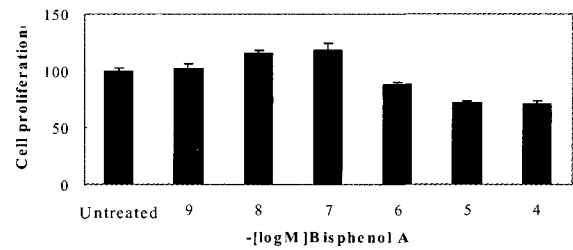


Figure 2. Proliferation of MCF-7 cells administrated with various concentrations of bisphenol A for 24 h. Each data point represents the mean of three separate experiments \pm SD.

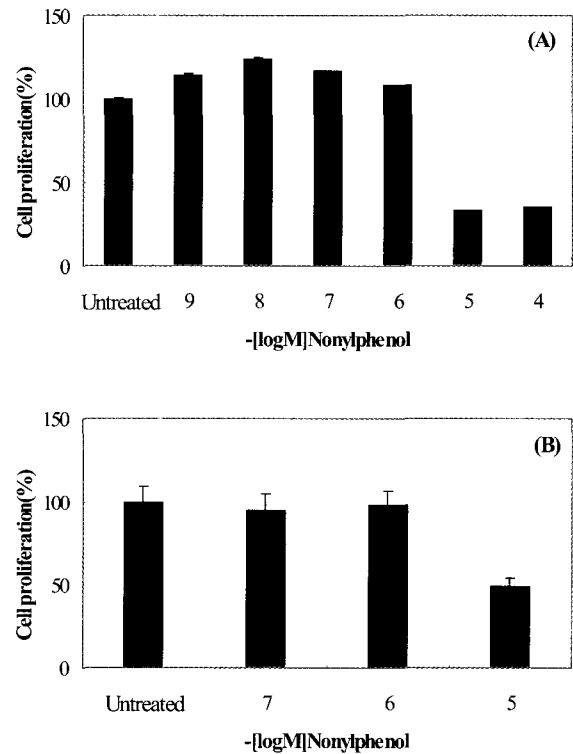


Figure 3. Proliferation of MCF-7(A) and PC-3(B) cells administrated with various concentrations of nonylphenol for 24h. Each data point represents the mean of three separate experiments \pm SD.

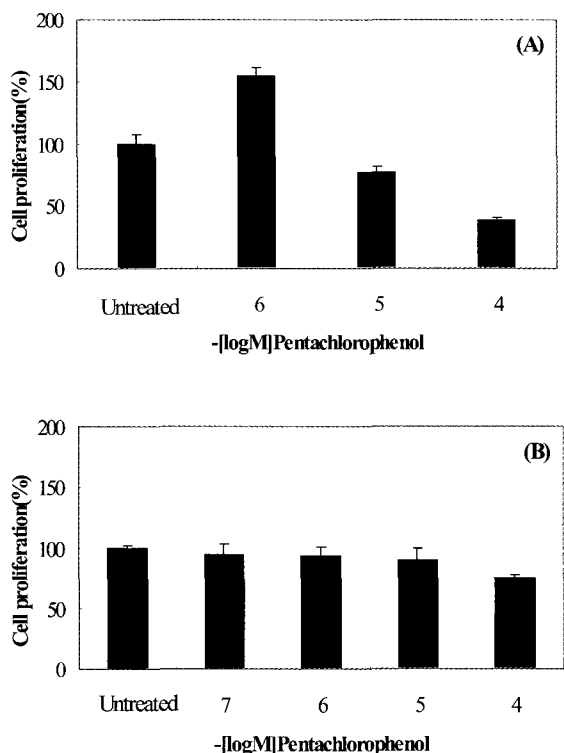


Figure 4. Proliferation of MCF-7(A) and PC-3(B) cells administrated with various concentrations of pentachlorophenol for 24h. Each data point represents the mean of three separate experiments ± SD.

Pentachlorophenol의 영향

한편 유기염소계 살충제로써 세계적으로 가장 널리 사용되어 온 PCB의 경우 수컷의 암컷화와 수컷성기의 왜소화를 초래한다는 것이 알려져 있다. Pentachlorophenol 또한 PCB와 유사물질로써 내분비계 장애 물질로 분류되어 있지만(3), 세포수준에서의 반응을 자세하게 조사한 결과는 보고 되지 않았다. 본 연구에서 pentachlorophenol의 농도 변화에 따른 MCF-7 및 PC-3 세포의 생존을 변화를 조사한 결과(Fig. 4), 10⁶ M 농도에서 급격한 MCF-7 세포 증식효과를 유도하였다. 대조군 대비 약 60%의 세포 증식효과를 확인할 수 있었으며, 10⁵ M 농도 이상에서는 고농도 독성효과에 의하여 세포증식이 감소하는 것을 알 수 있었다. 그러나 PC-3에서는 10⁶ M에서 10⁴ M 농도사이에서 세포 증식 효과는 관찰되지 않았으며, 고농도로 처리할수록 생존 세포수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 내분비계 장애물질인 bisphenol A, nonylphenol, pentachlorophenol의 여성호르몬에 증식반응을 보이는 MCF-7 세포증식 유도효과를 보여주고 있다. Pentachlorophenol이 가장 높은 세포 증식 유도 효과를 보여주고 있으며, nonylphenol, bisphenol A 순으로 MCF-7 세포의 증식효과를 보여주었다. 그러나 남성전립선 암 유래세포로 여성호르몬에 증식반응을 보이지 않는다고 알려진 PC-3 세포주에서는 이들 3종류의 화학물질에 대해서 어떠한 증식 반응도 관찰되지 않았으며 고농도에서의 일반적인 독성효과만을 볼 수 있었다.

내분비계장애물질이 지니고 있는 내재적 위험성은 적은 양의 물질이 지속적으로 체내에 축적되어 아직 검증되지 않은 영향을 받을 수 있는데 기인한다. 따라서, 내분비 교란 작용을 갖는 저농도의 독성물질을 찾아내기 위한 분석방법의 수립이 시급히 요청되고 있는바, 본 연구에서 수행한 실험 방법 및 결과는 세포수준에서 내분비계 장애물질 또는 의심물질을 스크리닝 할 수 있는 유용한 방법을 제공할 수 있다고 사료된다.

요 약

내분비계장애물질인 bisphenol A, nonylphenol, pentachlorophenol을 대상으로 여성 유방암세포 유래 MCF-7 세포주와 남성 전립선암세포 유래 PC-3 세포주에서 세포 증식효과를 MTT 방법으로 조사하였다. MCF-7 세포주에 이들 세 종류의 내분비계장애물질을 농도별로 처리하여 세포증식에 미치는 영향을 조사한 결과 모두 세포증식을 촉진하는 결과를 보였다. 10⁷ M에서 10⁶ M 농도 범위에서 MCF-7 세포의 최대 증식효과를 유도하였다. 그러나 PC-3 세포주의 경우에는 세포증식에 bisphenol A, nonylphenol, pentachlorophenol 모두 영향을 미치지 못하였다. 이러한 결과는 이들 세 종류의 내분비계 장애물질이 남성 전립선세포 유래인 PC-3 세포주의 증식에는 관여하지 않고 여성 유방암 세포에서 유래하고 에스트로젠 반응성인 MCF-7 세포주에만 증식효과를 갖는 사실을 보여주고 있으며 이는 bisphenol A, nonylphenol, pentachlorophenol이 여성호르몬인 에스트로젠과 유사한 역할을 한다는 사실을 보여주는 것이라 할 수 있다.

REFERENCES

- Colborn, T., F. S. vom Saal, and A. M. Soto (1993), Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect* **101**, 378-384.
- Sumpter, J. P. (1998), Xenoendocrine disrupters-environmental impacts, *Toxicol. Lett.* **102-103**, 337-342.
- US EPA. (1997), Special report on environmental endocrine disruption : An effect assessment and analysis, EPA. 630/R-96/12. Washington DC.
- Kavlock, R. J. (1999), Overview of endocrine disruptor research activity in the United States, *Chemosphere* **39**, 1227-1236.
- Krishnan, A., P. Stathis, S. Permuth, L. Tokes, and D. Feldman (1993), Bisphenol A: and estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving, *Endocrinology* **132**, 2279-2286.
- National Research Council (1999), Hormonally active agents in the environment, In *Hormonally active agents in the environment*, pp 27-53. National Academy Press, Washington DC.
- White R., S. Jobling, S. A. Hoarse, J. P. Sumpter, and M. G. Parker (1994), Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic, *Endocrinology* **135**(1), 175-182.
- Krinsky, S. (2000), *Hormonal chaos*, The Johns Hopkins Press, Baltimore.
- Soto, A. M., C. Sonnenschein, K. L. Chung, M. F. Fernandex, N. Olea, and F. Olea-Serrano (1995), The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants, *Environ. Health Perspect* **103**, 113-122.
- Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and

- survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
11. Takahashi S., X. J. Chi, Y. Yahmahuchi, H. Suzuki, S. Sugaya, K. Kazuko, K. Hiroshima, H. Yamamori, M. Ichinose, and N. Suzuki (2001), Mutagenicity of bisphenol A and its suppression by interferon- α in human RSs cells, *Mutat. Res.* **490**, 199-207.
 12. Gould J. C., L. S. Leonard, S. C. Maness, B. L. Wagner, K. Conner, T. Zacharewski, S. Safe, D. P. McDonnell, and K. W. Gaido (1998), Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol, *Mol. Cell. Endocrinol.* **142**, 203-214.
 13. Bergeron R. M., T. B. Thompson, L. S. Leonard, L. Pluta, and K. W. Gaido (1999), Estrogenicity of bisphenol A in a human endometrial carcinoma cell line, *Mol. Cell. Endocrinol.* **150**, 179-187.
 14. Diel P., S. Olf, S. Schmidt, and H. Michna (2002), Effects of the environmental estrogens bisphenol A, o,p'-DDT, p-tert-octylphenol and coumestrol on apoptosis induction, cell proliferation and the expression of estrogen sensitive molecular parameters in the human breast cancer cell line MCF-7, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **80**, 61-70.
 15. Sato A., H. Justica, J. W. Wray, and C. Sonnenschein (1991), p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene, *Environ. Health Perspect* **92**, 167-173.
 16. vom Saal, F. S., B. G. Timms, M. M. Montano, P. Palanza, K. A. Thayer, S. Nagel, M. D. Dahr, V. K. Ganjam, S. Parmigianim, and W. V. Welschons (1997), Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects of at high doses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2056-2061.