



## 미성숙 마우스에 Bisphenol A 노출시 신경내분비계에서 에스트로젠 수용체 발현 및 신경행동 변화

성민제<sup>1</sup> · 신임철<sup>1</sup> · 이윤모<sup>1</sup> · 손동주<sup>1</sup> · 송연숙<sup>1</sup> · 전계현<sup>1</sup> · 김윤배<sup>2</sup> · 이범준<sup>2</sup> · 김대중<sup>2</sup>  
윤영원<sup>2</sup> · 김태성<sup>3</sup> · 한순영<sup>3</sup> · 송석길<sup>1</sup> · 오기완<sup>1</sup> · 홍진태<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>충북대학교 약학대학, <sup>2</sup>충북대학교 수의과 대학, <sup>3</sup>식품의약품안전청

## Behavior Alterations and Expression of Estrogen Receptors in Mice Exposed to Bisphenol A

Min Jae Seung<sup>1</sup>, Im Cheol Shin<sup>1</sup>, Yoot Mo Lee<sup>1</sup>, Dong Ju Son<sup>1</sup>, Youn Sook Song<sup>1</sup>, Kei Hyun Jeon<sup>1</sup>,  
Yun Bae Kim<sup>2</sup>, Beum Jun Lee<sup>2</sup>, Dae Joong Kim<sup>2</sup>, Young Won Yun<sup>2</sup>, Tae Seong Kim<sup>3</sup>,  
Soon Young Han<sup>3</sup>, Suk Gil Song<sup>1</sup>, Ki Wan Oh<sup>1</sup> and Jin Tae Hong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy and <sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763  
<sup>3</sup>National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

Received June 23, 2004; Accepted August 31, 2004

**ABSTRACT.** A large number of chemical pollutants including phthalates, alkylphenolic compounds and organochlorine pesticides have the ability to disrupt endocrine function in animals, and alter cognitive function. Because hormone mediated events play an important role in central nervous system development and function, the changes in cognitive function seem to be mediated by the endocrine-like action of these chemicals. The present study therefore was designed to investigate effect of bisphenol A (BPA), an endocrine disrupting chemical on neuro-behavioral patterns, and expression of estrogen receptors and tyrosine hydroxylase, a limiting enzyme of dopamine synthesis pathway. BPA was treated orally for 3 weeks into 3 week old mice, and then the neuro-behavioral patterns (stereotypic behaviors such as jumping rearing and forepaw tremor, climbing behavior, tail flick, rotarod and locomotor activity), and the expression of estrogen receptors and tyrosine hydroxylase were determined every 3 week for 9 weeks. During the treatment of BPA, the food uptake and body weight increase were not significantly changed. BPA resulted in the increased stereotypic behaviors (jumping, rearing and forepaw tremor) 6 or 9 weeks after treatment. The time response to tail flick and locomotor activity were decreased by the treatment of BPA, whereas the time for rotarod was increased by the treatment of BPA. The expression of estrogen receptor alpha and beta was increased in the brain and pituitary gland. Maximum expression was found in the brain after 9 week of 100 mg/kg BPA treatment and in the pituitary gland after 6 week of 100 mg/kg BPA treatment. Tyrosine hydroxylase was increased in dose and time dependent manners in the brain but no change was found in the pituitary gland. The present data show that exposure of BPA in the young mice could alter expression of estrogen receptors and dopamine synthesis pathway, thereby modulate neuro-behavioral patterns (increase of stereotypic behaviors but decrease locomotor activity).

**Keywords:** Bisphenol A, Behavior alterations, Estrogen receptors, Tyrosine hydroxylase.

## 서 론

내분비계 장애물질(endocrine disruption chemicals, EDC)이란 생체내의 항상성유지와 성장 발달 과정을 조절하는 체내 자연호르몬의 합성, 분비, 운반, 대사, 수용체와의 결합 및 결합 후 작용 기전을 방해하는 외부 환경 물질을 말하는데, 일반적으로 체내에서 각종 호르몬 수용체와의 결합 과정을 차단하여 정상적인 호르몬 역할을 방해한다. 따라서 호르몬의 상호작용을 저해하고 유사 호르몬으로 작용함으로써 정상 호르몬의 기능을 변화시키거나 그 결과로 인간을 포함한 생명체의 생식기능저해, 기형출산, 성장장애 및 암을 유발시킨다. 지금까지 내분비계 장애물질이 생체에 미치는 연구의 초점은 주로 생식기능의 저해, 성전환 유발여부 등의 연구와 이런 과정에서의 에스트로젠/ 항에스트로젠 및 안드로젠/항안드로젠 활성 여부와 성 성숙도와의 상관관계 규명이 주요연구 분야였으며, EDSTAC(endocrine disruptor screening and testing advisory committee)이 제안한 이와 같은 연구분야의 시험 범위 및 표준화 등이 주 연구초점이 되어왔다.

뇌는 발생기 동물의 활발한 생명현상의 중심에 있는 기관으로 외부 환경에 대응하는 과정에서 그만큼 예민하게 반응하는 기관이다. 더구나 뇌는 다른 조직보다 지방산 조성이 높은 기관이기 때문에 많은 EDC 화합물이 lipophilic 함으로써 쉽게 노출될 가능성이 있다. 더구나 뇌는 시상하부(hypothalamus)-뇌하수체(pituitary)-호르몬 분비 장기로 이어지는(neuroendocrine loop) 호르몬 생성 및 억제기전의 중심에서 호르몬 생성에 깊숙이 관여하고 있다. 뇌의 신경전달물질과 호르몬의 관계에 대한 연구가 많이 이루어지고 있는데 신경계 전달물질인 dopamine은 hypothalamus-pituitary factors로 유선발달과 관련이 있는 prolactin의 분비 억제에 관여하고 있으며(Arbogast *et al.*, 1990), estrogen은 중추신경계에 작용하여, 인식능, 신경세포 분화, 시냅스생성 및 성분화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Toran-Allerand *et al.*, 1999; Agrati *et al.*, 1997; Ferretti *et al.*, 1992; Pasqualini *et al.*, 1995; Kompoliti, 1999). Estrogen은 또한 dopamine 신경세포에서 세포 내 저장고로부터 칼슘유리를 촉진 시킨다고 보고되었다(Beyer and Raab, 1998). 이와 같은 신경계와 호르몬과의 상호 작용 때문에 호르몬의 생성 및 활성에 영향을 주는 내분비계장애 물질이 신경계에 미치는 영향이 클 것으로 판단되고 있으나 생식기 장애 및 암 유발에 대한 내분비계 장애물질의 영향에 비하여 상대적으로 연구가 덜 이루어지고 있다.

그 동안의 연구결과를 살펴보면, polychlorinated biphenyl(PCB)에 오염된 농작물을 섭취한 태국 여성들이 낳

은 아이들은 낮은 IQ와 행동학적 문제들을 보였으며(Schantz, 1996), PCB에 의하여 도파민 신경계 세포인 PC12 cells에서 도파민 분비를 감소시킨다고 보고되었고(Angus and Contreras, 1996), 실험동물에 PCB 노출시 행동장애가 있어남이 발견되었다(Holene *et al.*, 1998). Estrogen 활성이 높은 bisphenol A(BPA)가 prolactin의 유리를 촉진시킴이 실험동물 및 *in vitro* cell line에서 보고되었으며(Steimetz *et al.*, 1997), 최근, octylphenol이 snapping turtle에서 신경세포분화 및 알츠하이머 질병과 관련이 있는 amyloid precursor protein(APP)의 hypothalamus에서의 발현을 증가시켰다고 보고되었고(Trudeau *et al.*, 2002) 같은 물질이 UV와 함께 처리된 개구리 hypothalamus에서 신경전달물질( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 합성에 관련되는 유전자 발현(glutamate decarboxylase)과 발달(larval development)을 변화시켰다고 보고되고 있다(Crump *et al.*, 2002). 그러나 내분비 장애물질에 의한 호르몬의 변화와 신경계 장애 및 이들의 상호관련성에 대한 직접적인 연구가 이루어지고 있지 않고 있다.

에폭시 수지와 폴리카보네이트 플라스틱제조에 사용되는 BPA는 산화방지 및 염화 비닐의 안정제로 열과 충격에 대한 내구성이 뛰어나 캔 내부의 코팅제 식품 등의 포장재로 쓰이고 있으며 특히 학교 급식의 용기 유아용 젓병이나 통조림 등에서 용출 되는 것으로 알려지고 있어(Brotons *et al.*, 1995) 이 물질에 의한 성장기 인체 위해성에 대한 많은 연구가 요구되고 있다. 더구나 최근의 연구에 의하면 BPA는 유방암 세포에서 estrogen 활성을 가지는 것으로 밝혀졌고(Villalobos *et al.*, 1995) 미성숙 랫드에서 생식기관(자궁 및 질)의 비대와 estrogen활성이 증가됨이 보고되었다(Kim *et al.*, 2001). 그러나 이 물질은 강한 estrogen 활성이 있음이 밝혀졌지만 이 물질에 의한 신경계에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 미미하다. 따라서 본 연구에서는 내분비계 장애물질 중 강한 estrogen 활성이 있는 BPA에 의한 신경계 장애 여부를 연구하고자 미성숙(3주령 마우스) 동물에 생식기 비대를 초래한 농도의 BPA를 노출시켜 1) 뇌 및 뇌하수체에서 estrogen receptor( $\alpha$  and  $\beta$ ) 발현과 2) 행동약리변화를 연구하여 BPA가 호르몬 수용체에 미치는 영향과 신경계 행동양상에 미치는 영향 그리고 이들의 상호관련성을 밝혀 내분비 장애물질에 의한 신경계에 미치는 독성현상을 밝히고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험동물에 내분비계 장애물질인 bisphenol A의 투여 및 일반행동 변화 관찰

실험물질은 경구로 50, 100, 및 200 mg/kg이 되도록

bisphenol A를 corn oil에 녹여 매일 3주간 각 군당 20수 동물에 경구투여 하고 투여가 끝난 익일(0 week) 및 3주, 6주 및 9주 후에 각 군당 3수를 도살하여 estrogen 및 tyrosine hydroxylase의 발현을 보았다. 나머지 동물(각 군당 0주: 20수, 3주: 17수, 6주: 14수, 9주: 11수의 동물, 단 투여과정에서 투여 실수에 의하여 죽은 대조군 2, 낮은 농도군 1, 및 고 농도군 2 마리는 제외됨)을 가지고 신경행동학적 실험을 실시하였고 각 군당 8 마리에 대하여는 stereotype behaviors(jumping, rearing, forepaw tremor 등)를 관찰하였다.

#### Effects on the Muscle Coordination(회전봉법근이완 작용시험)

하룻밤 절식시킨 실험동물(군 당 20~30 g 수컷 마우스 10마리)에 피검약물을 투여한 후, 1분에 5 회전하는 직경 3 cm의 rotarod 회전봉 위에 실험동물을 회전하는 반대 방향으로 머리가 오도록 올려 놓았다. 대조 군은 피검약물을 녹인 용매만 투여하여 실험하였다. 쥐가 2분 이내에 떨어지는 경우는 근이완 작용에 의한 운동장애가 발생한 것으로 판단하였다. 측정에 앞서 회전봉 위에서 3분 이상 떨어지지 않는 동물을 선택하여 사용하였다. 결과분석은 2분 이내에 떨어지는 개체 수와 2분 이상 떨어지지 않는 개체 수를 대조 군과 비교 측정하여 Chi-square 값을 구하여 통계 처리하였다.

#### 자발운동 측정법

하룻밤 절식시킨 마우스(군 당 20~30 g 수컷 마우스 10마리)를 피검약물 투여 전에 운동량 측정용 cage (AMB-10, Ohara & Co.Ltd.) 에 넣어 5분간 적응시킨 후 10여분 동안의 자발운동량을 측정하였다. 또한 피검약물을 투여가 끝난 시점으로부터 시간 별로 마우스를 운동량 측정용 cage에 넣어 앞에서와 같은 방법으로 5분 적응 후 10분간의 자발운동량을 측정하였다. 위와 같은 방법으로 피검약물 대신 피검약물을 녹인 용매를 투여하여 대조 군으로 하였다.

결과분석은 약물투여 전에 측정한 자발운동량을 100%로 하여 피검약물을 투여가 끝난 시점으로부터 각 시간 별로 측정한 자발운동량의 %를 구하여 대조 군과 비교하였다. 유의성 검정은 t-test로 통계처리 하였다.

#### Climbing Behavior(기어오르기)

Apomorphine을 실험 동물(군 당 20~30 g 수컷 마우스 10마리)에 투여한 후, 철망으로 된 원통에 넣고 5분 후부터 10, 20, 30분대에 1분간 관찰하였다. Apomorphine에 의한 중추흥분작용으로 mouse가 철망을 기어오르는 행동을 일으키는데 앞, 뒷다리 모두 기어오르는 경우 2점,

뒷다리는 바닥에 있고 앞다리만 걸쳐있는 경우 1점을 주었다. 결과분석은 각 시간대 별로 Climbing score를 측정하여 점수를 합산한 후 대조 군과 비교하였고 유의성 검정은 Mann-Whitney U test로 통계처리 하였다.

#### Tail flick(꼬리 열 자극)

마우스(군 당 20~30 g 수컷 마우스 10마리)의 꼬리에 열 자극을 주어 꼬리를 들어올리기까지의 시간을 측정하였다. 결과분석은 대조 군과 비교하여 t-test로 통계처리 하였다.

#### Western blotting

투여한 동물을 마취하여 뇌하수체 및 뇌를 꺼내 PBS에 적당량을 넣고 분쇄하였다. 분쇄한 조직을 1000 rpm에서 원심분리 하여 상층 액을 버린 뒤 2 ml의 cold PBS로 두 번 세척하였다. 여기에 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% Sodium Azide, 0.2% SDS, PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) 100 µg/ml, Aprotinin 50 µg/ml, Igapal 630(또는 NP-40) 1%, NaF 100 mM, Sodium Deoxychoate 0.5%, EDTA(Ethylendiaminetetraacetic acid-Sigma E-4884) 0.5 mM, EGTA(Ethylene glycol-bis(β-aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid-sigma E-4378) 0.1 mM로 조성된 Lysis Buffer를 50~100 µl를 가해 잘 vortex하면서 4°C에서 lysis시킨 후, 1.5 ml tube에 담아 원심분리 하였다. 원심분리 하여 상층 액만 취하고 최종추출물의 단백질 양은 Bio-rad protein assay kit를 사용하여 측정하였다. 즉 단백질 standard 용액과 준비한 시료를 각각 Bio-rad protein dye reagent로 혼합하여 5분 동안 반응시킨 후, ELISA plate reader에서 595 nm로 흡광도(OD)를 구하여 시료의 OD를 standard 용액의 정량그래프(X축: 농도, y축: OD)에 대입하여 시료의 단백질 정량 값을 산출하였다. 정량이 된 단백질에 Lysis Buffer와 60 mM Tris pH 6.8, 25% Glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue로 조성된 5X sample buffer를 섞어 protein 양을 같게 한 후, 100°C에서 5분 동안 boiling하였다. 전기영동을 하기 위해 4 ml의 polyacrylamide : bis(30% : 0.8% w/v)와 6.9 ml의 증류수 그리고 3.8 ml의 1.5 M Tris, pH 8.8과 10% SDS 150 µl을 혼합한 용액에 시험당일 제조된 10%(w/v) ammonium persulfate 150 µl와 TEMED 10 µl를 부가 혼합하여 만든 다음, 깨끗이 세척하여 조립된 전기영동 유리판에 용액을 부어 Separating gel(12%)을 형성시켰다. Stacking gel(5%)은 670 µl의 polyacrylamide : bis(30% : 0.8% w/v)와 2.2 ml의 증류수 그리고 1 ml의 1.5 M Tris, pH 6.8과

10% SDS 40  $\mu$ l을 혼합한 용액에 실험당일 제조된 10% (w/v) ammonium persulfate 65  $\mu$ l와 TEMED 6.5  $\mu$ l를 부가 혼합한 것으로서 separating gel 위에 부어져 완전한 gel을 형성하였다. 전기영동 Running buffer는 Tris base 30.3 g, Glycine 144 g, SDS 10 g을 증류수 1 l에 녹여 사용 농도의 10배인 stock을 만들었다. 정량한 단백질을 buffer에 담긴 gel의 홈에 20  $\mu$ l씩 loading하고 50~80 volt로 약 20분간 running하고 stacking gel의 전계가 끝나면 100~120 volt로 separating gel을 약 2시간 정도 전개시킨 후, transfer하였다. Transfer buffer는 Tris base 3.03 g, Glycine 14.63 g, Methanol 200 ml에 증류수를 채워 1 l가 되게 한 것이다. Protein을 buffer 내에서 80 volt로 1시간 30분간 Gel에서 nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell, 0.45  $\mu$ m)으로 transfer 시킨 다음에 그 membrane을 0.05% Tween-20, 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0으로 조성된 TBS-T 용액으로 washing한 후, 약간 물기를 제거하고 TBS-T 용액으로 희석한 약 5% skim milk로 약 2시간 정도 blocking한 후 TBS-T 용액으로 여러 번 세척하였다. TBS-T 용액으로 희석한 3% skim milk에 1차(estrogen receptor  $\alpha$  및  $\beta$ , tyrosine hydroxylase) 항체를 권장농도로 약 200~1000배 희석하여 만든 용액에 blocking한 membrane을 담가 실온에서 3시간 정도 반응시킨 후, TBS-T 용액으로 10분마다 새로운 TBS-T 용액으로 갈아주면서 1시간 동안 세척하였다. Peroxydase가 부착되어 있으며 1차 항체와 반응하기에 적합한 2차 항체를 권장농도로 약 1000~2000배 희석하여 1차 항체와 결합한 membrane을 반응시킨 후 실온에서 1시간 정도 반응시키고 TBS-T 용액으로 10분간 3~5번 세척하였다. 그 membrane을 cassette의 wrap 안쪽으로 옮긴 후, ECL 용액 1(black), 2(White)를 1 : 1로 잘 섞어 membrane 위에 뿌려서 골고루 묻히고 1분 정도 반응시킨 후 wrap을 씌웠다. Membrane을 씌운 wrap 위에 film을 올려놓고 cassette를 닫고 일정 시간 형광반응을 시킨 다음 그 film을 developer에 담근 후 그것에 어느 정도 band가 나타나면 fixer로 옮겨 골고루 고정이 잘 되도록 흔들어주었다. 고정이 끝나면 흐르는 물로 깨끗이 씻어 건조시켜 관찰하였고 밴드의 발현 강도를 정량하였다.

**결 과**

**Bisphenol A에 의한 체중변화**

BPA 투여 군들이 대조 군보다 시간이 흐를수록 체중이 조금 더 나가는 경향을 보였으나 농도 경향 내지 군간 큰 차이점은 없었다(Fig. 1).

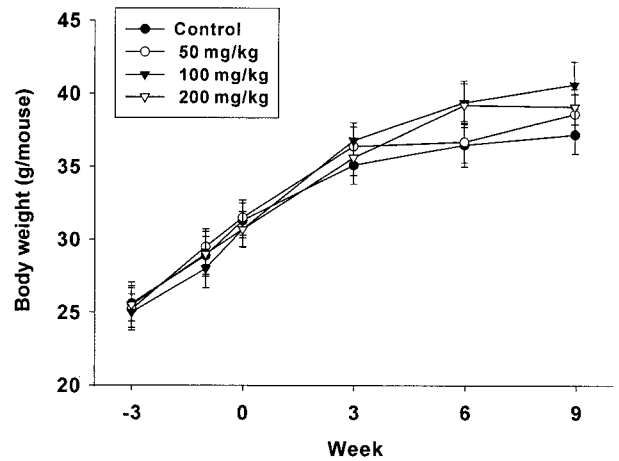


Fig. 1. Change of body weight during or after treatment of bisphenol A in the mice.

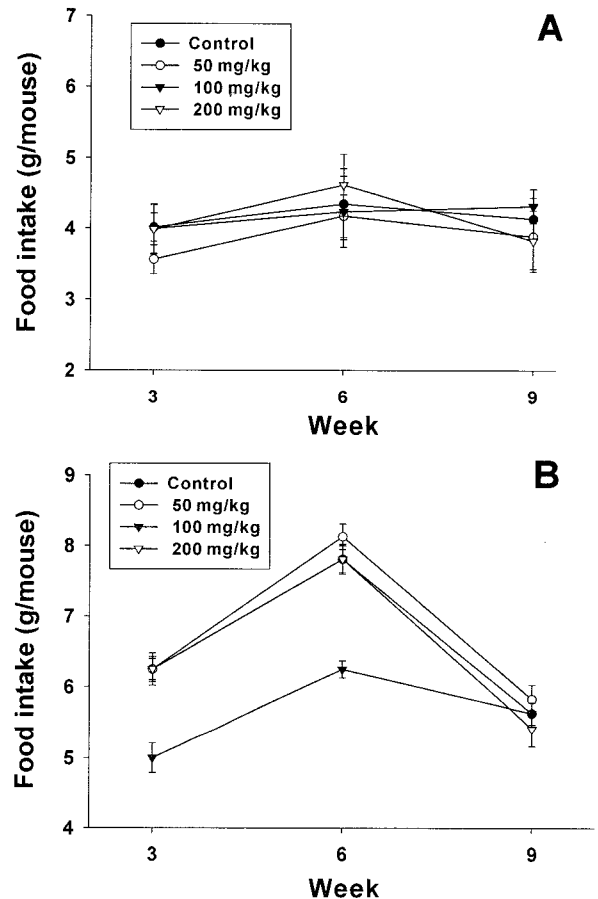


Fig. 2. Food (A) and water (B) intake after treatment of bisphenol A in the mice.

**사료 및 물 섭취량변화**

BPA의 투여가 끝난 후 3, 6, 9주에 사료 및 물의 섭취량을 조사하였다. BPA의 투여에 의하여 사료 및 물 섭취

**Table 1.** Strepotype behavior 3 weeks after treatments of bisphenol A in the mice (n=8)

| Behavior pattern | Days after treatment doses | 0   | 3   | 6   | 9   | 12  | 15  | 18  | 21  |
|------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Rearing*         | Control                    | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 |
|                  | 50 mg/kg                   | 3/8 | 8/8 | 7/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 |
|                  | 100 mg/kg                  | 3/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 |
|                  | 200 mg/kg                  | 3/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 | 8/8 |
| Jumping**        | Control                    | 0/8 | 8/8 | 0/8 | 0/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 |
|                  | 50 mg/kg                   | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 1/8 | 2/8 | 2/8 | 2/8 |
|                  | 100 mg/kg                  | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 2/8 | 3/8 | 4/8 |
|                  | 200 mg/kg                  | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 1/8 | 3/8 | 3/8 | 4/8 |
| Forepaw tremor   | Control                    | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 2/8 | 3/8 | 3/8 | 4/8 | 3/8 |
|                  | 50 mg/kg                   | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 3/8 | 6/8 | 5/8 | 6/8 | 5/8 |
|                  | 100 mg/kg                  | 0/8 | 0/8 | 1/8 | 4/8 | 2/8 | 5/8 | 5/8 | 6/8 |
|                  | 200 mg/kg                  | 0/8 | 0/8 | 3/8 | 2/8 | 2/8 | 5/8 | 8/8 | 7/8 |

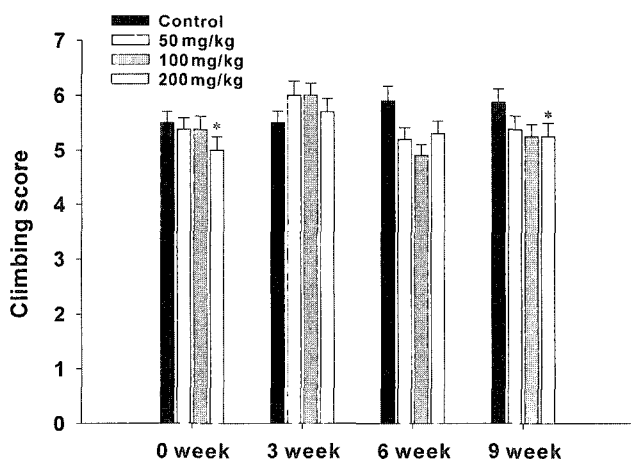
\*Rearing: repeatedly standing on his hind paws rearing or scratching of the cages.

\*\*Jumping: repeatedly jumping and circling of the cage.

량의 변화가 유의성이 있게 일어나지 않았다(Fig. 2). 다만 100 mg/kg 투여 군에서 나머지 군보다 적은 물 섭취량이 BPA의 투여가 끝난 후 3 주 및 6주에서 관찰되었으나 9 주째에서는 큰 변화를 보이지 않았다. 3주 및 6주에서 적은 물 섭취량의 원인이 무엇인지 확인 할 수 없으나 생리학적으로 큰 의미가 없는 것으로 사료되는데 그 이유는 이 기간 동안 사료 섭취 및 체중변화에 유의성이 있는 차이가 나타나지 않았기 때문으로 실험 중 오차일 것으로 판단된다.

**Bisphenol A에 의한 일반행동변화**

BPA에 의한 일반적인 행동양상은 관찰되지 않았다. 그러나 투여가 끝난 6주 후부터 용량의존적으로 rearing, jumping 및 forepaw tremor 증상을 보이는 동물 수가 증가하였다(Table 1).



**Fig. 3.** Climbing behavior scored for 9 weeks in the mice after treatment of bisphenol A for 21 days.

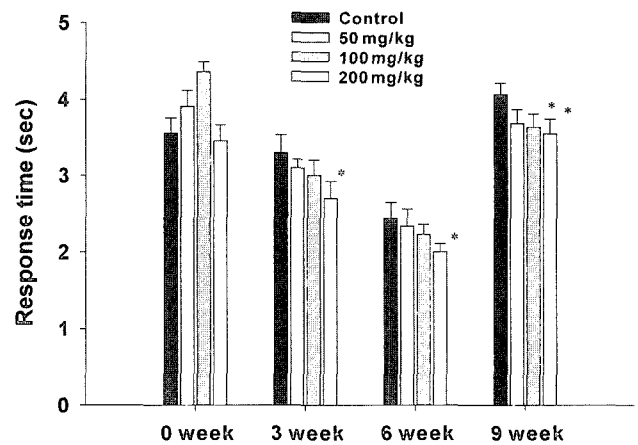
**Bisphenol A에 의한 약리학적 행동변화**

BPA에 의한 호르몬 변화 및 이에 의한 행동양상의 변화를 보기 위하여 tail flick, rota-rod, climbing behavior 및 locomotor activity를 측정하였는데 climbing behavior(Fig. 3) 및 tail flick치의 변화는 크지 않았으나 tail flick 결과치는 전체적으로 BPA 투여에 의하여 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4).

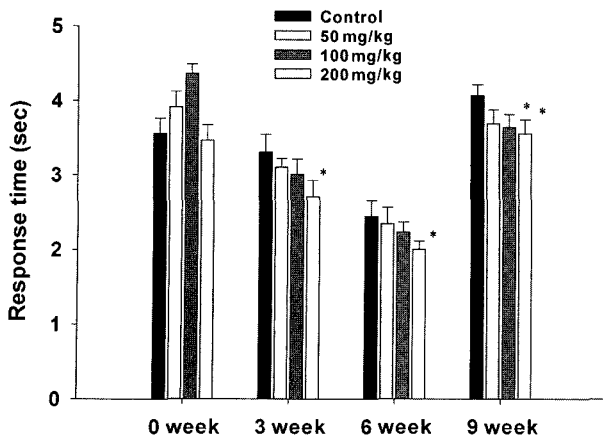
Rotarod 시험에서는 회전 붐에 머무는 시간이 관찰 기간 및 투여 양에 비례하여 점점 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 5). 그러나 locomotor activity의 양상은 BPA 투여 군이 정상 군과 비교하여 locomotor activity가 떨어지는 것으로 관찰되었으며 고 용량 투여 군은 전 측정 기간에서 대조 군의 50% 수준으로 떨어졌다(Fig. 6).

**뇌 및 뇌하수체에서의 estrogen receptors 발현 변화**

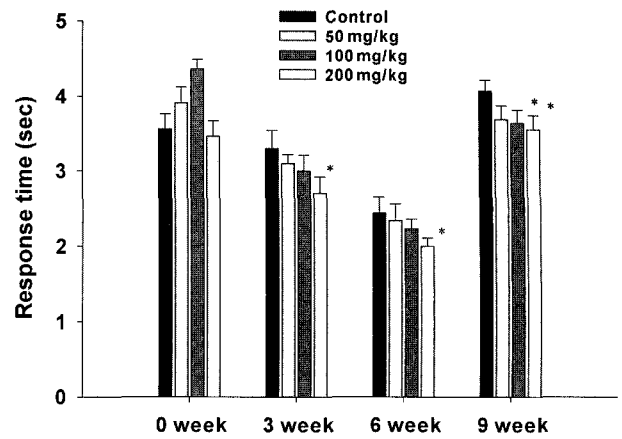
BPA를 corn oil에 녹여 매일 3주간 mice에 투여 하고



**Fig. 4.** Tail flick response to heat shock in the mice after treatment of bisphenol A for 21 days.



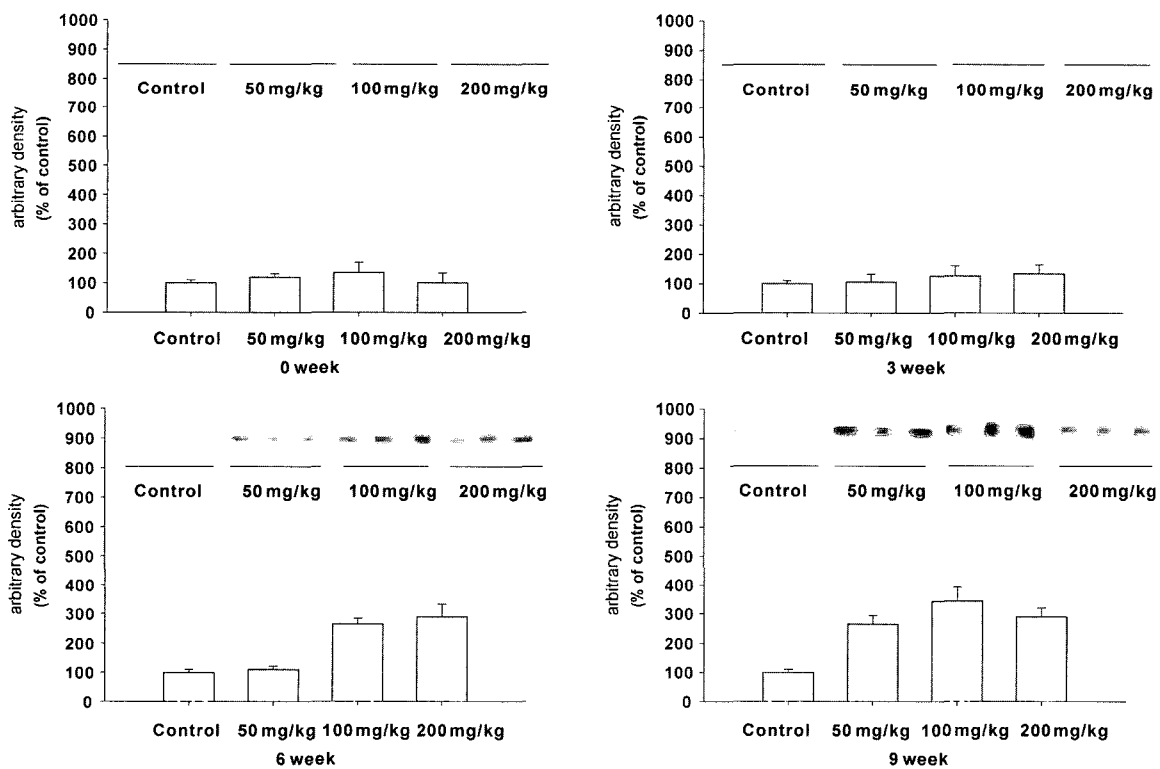
**Fig. 5.** Duration time that mice stays on the rotarod. Mice were treated with bisphenol A for 21 days, and the rotarod test was performed for 9 weeks every 3 week.



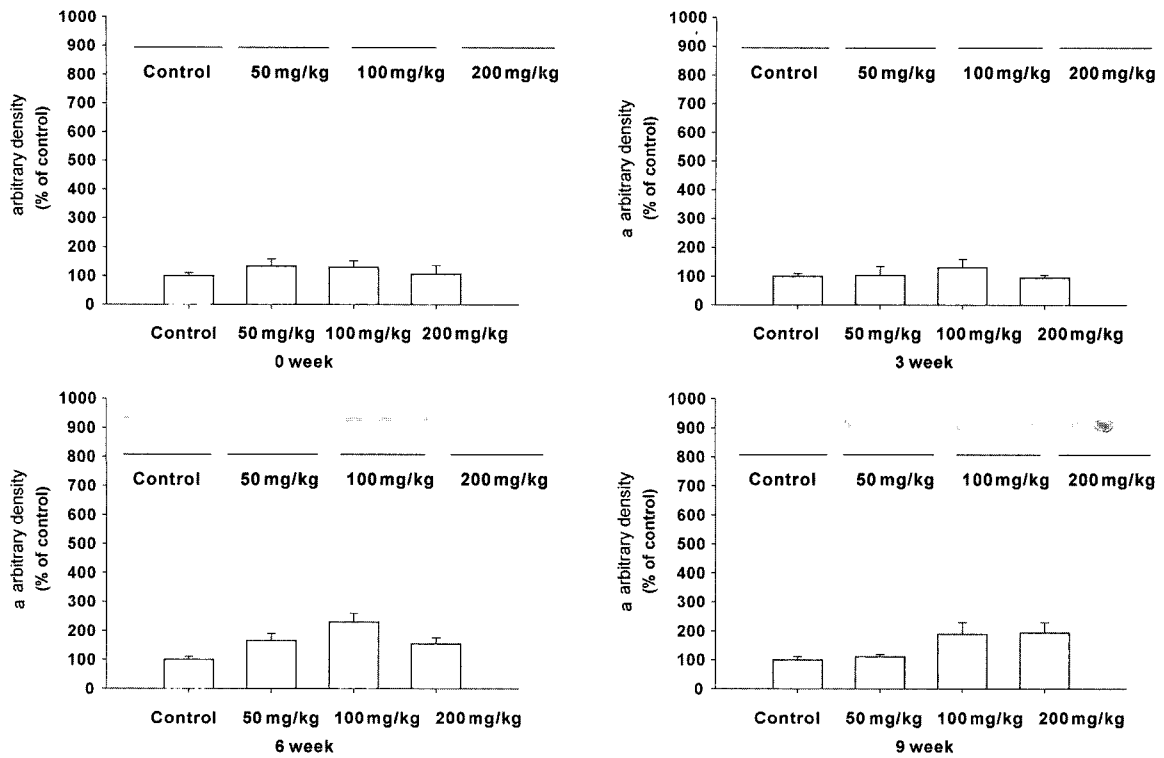
**Fig. 6.** Locomotor activity. Mice were treated with bisphenol A for 21 days, and the activity was measured for 9 weeks every 3 week.

투여가 끝난 익일(0 week) 및 3주, 6 주 및 9주 후에 각 군당 3수를 도살하여 estrogen receptors 발현을 보았다. BPA 투여가 끝난 후 estrogen receptor  $\alpha$ 는 6 주 및 9 주에서 용량의존적으로 발현이 증가하였는데, 6주째 100 및 200 mg/kg 투여 군에서 3배 증가하였고, 9주째 100 mg/kg 투여 군에서는 4배까지 증가하였다(Fig. 7). 뇌하수체에서도 estrogen receptor  $\alpha$ 의 발현은 같은 양상으

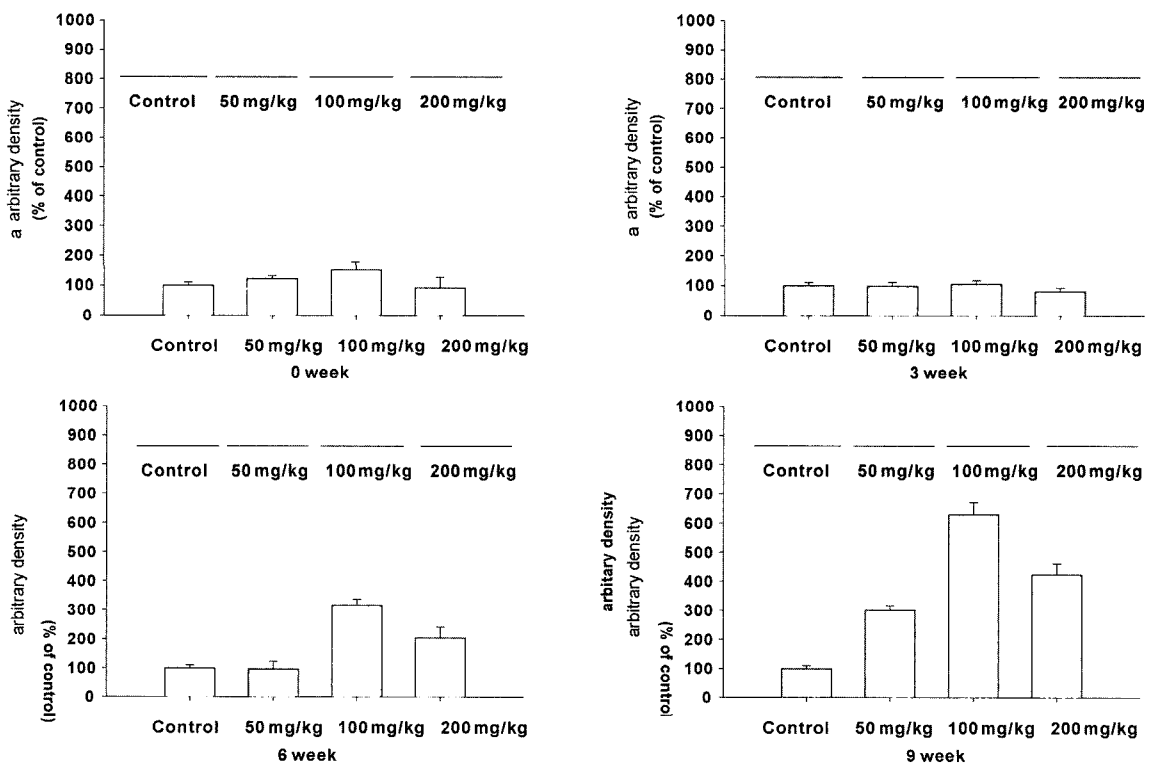
로 증가하였으나 뇌에서보다는 그 정도가 약했으며 BPA 투여가 끝난 9주 후에 100 mg/kg 및 200 mg/kg 투여 군에서 2배 정도가 증가 하였다(Fig. 8). estrogen receptor  $\beta$ 는 BPA 투여가 끝난 후 3주째에서 발현이 크게 증가하기 시작하여 6주째의 100 mg/kg 투여 군에서 최대 발현양상을 보였으며 9주째의 100 mg/kg 및 200 mg/kg 투여 군에서 발현 강도가(상대발현밴드의 강도가) 2~



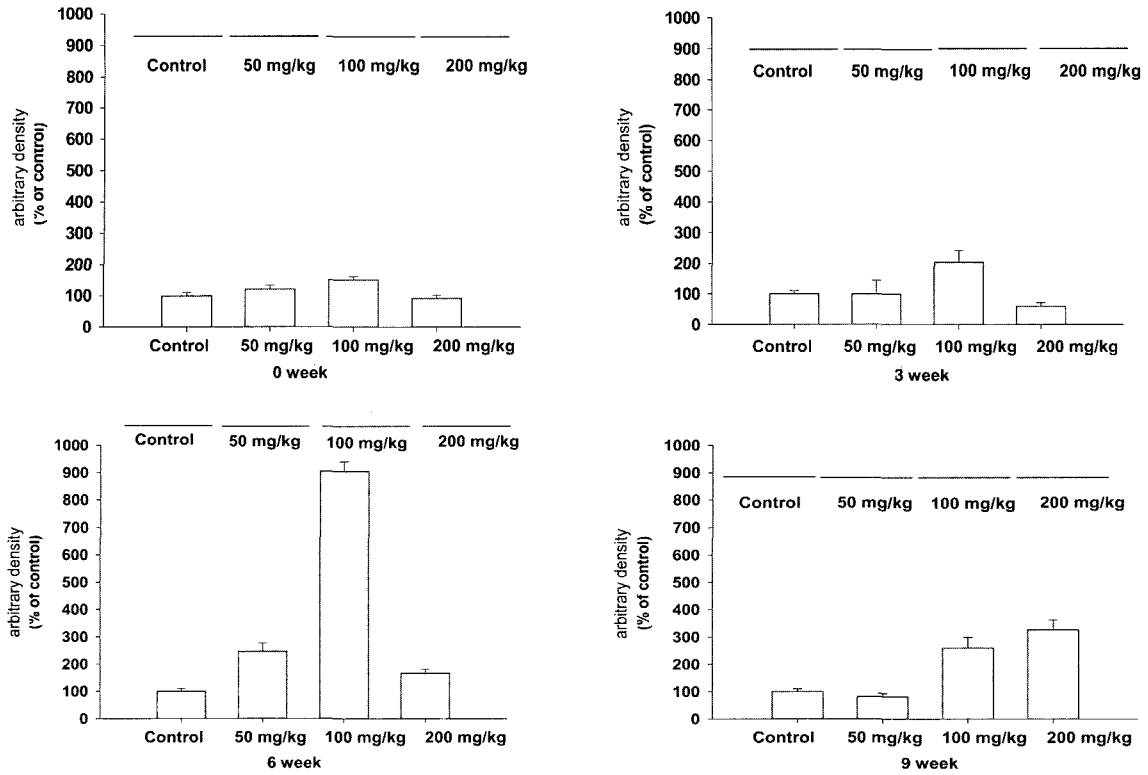
**Fig. 7.** Expression of estrogen receptor- $\alpha$  in the brain of mice. The expression was measured in the brain of mice soon after the final treatment or 3, 6 and 9 week after treatment for 21 days.



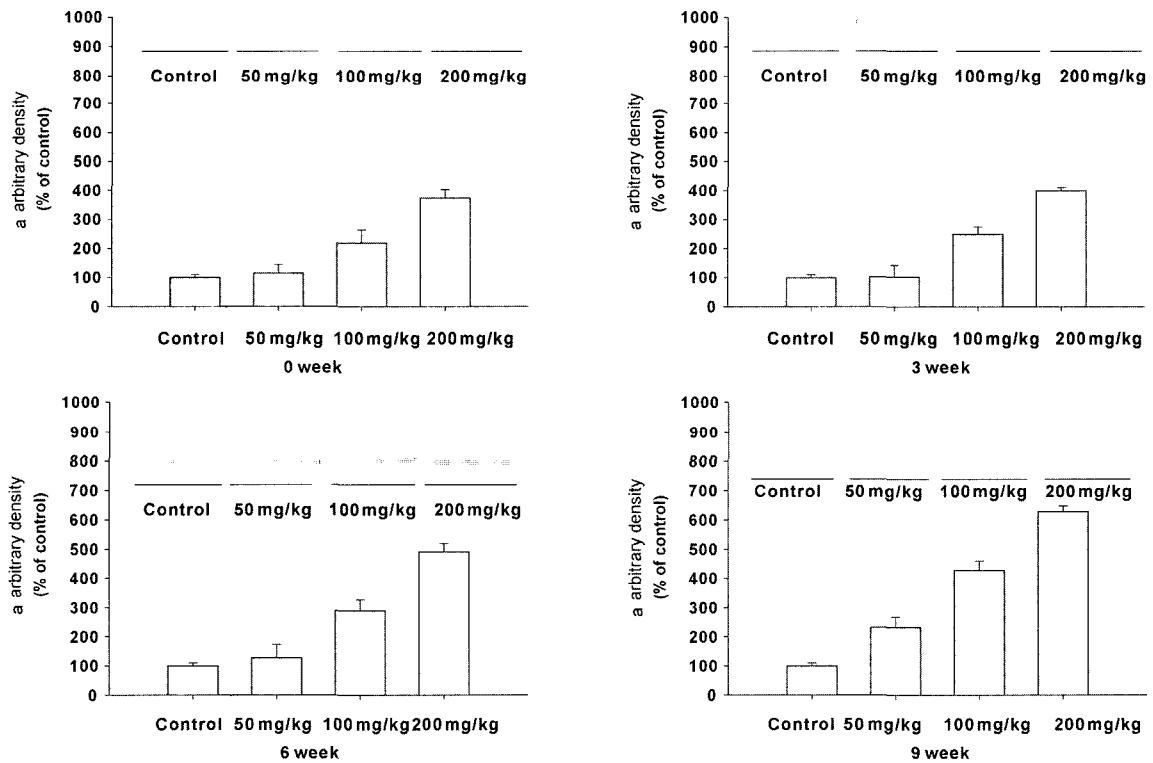
**Fig. 8.** Expression of estrogen receptor-alpha in the pituitary gland of mice. The expression was measured in the brain of mice soon after the final treatment or 3, 6 and 9 week after treatment for 21 days.



**Fig. 9.** Expression of estrogen receptor-beta in the brain of mice. The expression was measured in the brain of mice soon after the final treatment or 3, 6 and 9 week after treatment for 21 days.

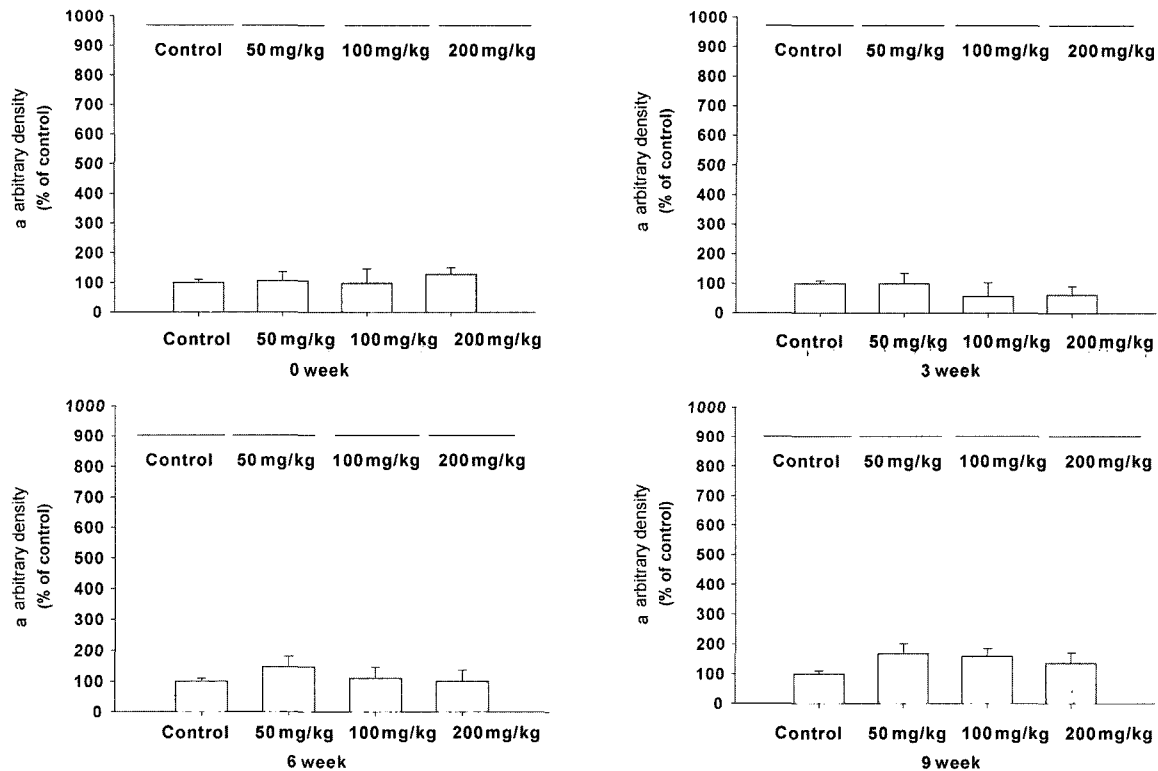


**Fig. 10.** Expression of estrogen receptor-beta in the pituitary gland of mice. The expression was measured in the brain of mice soon after the final treatment or 3, 6 and 9 week after treatment for 21 days.



**Fig. 11.** Expression of tyrosine hydroxylase in the brain of mice. The expression was measured in the brain of mice soon after the final treatment or 3, 6 and 9 week after treatment for 21 days.





**Fig. 12.** Expression of tyrosine hydroxylase in the pituitary gland of mice. The expression was measured in the brain of mice soon after the final treatment or 3, 6 and 9 week after treatment for 21 days.

3배 증가하였다(Fig. 9). 뇌하수체에서의 estrogen receptor  $\beta$  발현양상도 뇌에서와 같았는데 투여가 끝난 6주 후에 100 mg/kg 투여 군에서는 3배, 200 mg/kg 군에서는 2배가, 9주 후에 100 mg/kg 투여 군에서는 6배, 200 mg/kg 군에서는 4배정도가 증가하였다(Fig. 10).

#### 뇌 및 뇌하수체에서의 tyrosine hydroxylase의 발현 변화

BPA를 corn oil에 녹여 매일 3주간 mice에 투여 하고 투여가 끝난 익일(0 week) 및 3주, 6 주 및 9주 후에 각 군당 3수를 도살하여 tyrosine hydroxylase의 발현을 보았다. BPA를 투여한 동물의 뇌에서의 도파민 합성효소인 tyrosine hydroxylase의 발현 양상은 BPA 연속 3주 투여 후 발현이 크게 증가하기 시작하여 투여가 끝난 9주 후에 최고용량 투여군인 200 mg/kg 투여 군에서 최대 발현양상을 보였다. 투여가 끝난 1일 후에 100 mg/kg 및 200 mg/kg 투여 군에서 각각 2 배, 4배 정도의 tyrosine hydroxylase의 발현이 증가하였고(상대발현밴드의 강도가), 3주 후에는 각각 2.5배 및 4배가, 6주 후에는 3배 및 5배가, 9주 후, 50 mg/kg, 100 mg/kg 그리고 200 mg/kg 투여 군에서는 각각 2 배, 4.5배 그리고 6배 정도가 증가하였다(Fig. 11). 그러나 뇌하수체에서 tyrosine hydroxyl-

ase의 발현증가는 관찰되지 않았다(Fig. 12).

## 고 찰

BPA에 의한 쥐의 체중증가가 미약했지만 유의성이 없었던 점과 BPA가 사료 섭취량에 별 영향을 주지 않은 결과들은 BPA가 기본적인 대사기능이나 식욕중추신경에 큰 영향을 주지 않는 것을 보이며, 이는 임신 중에 BPA의 경구 투여에 의하여 어미 및 출생자의 체중변화에는 별 영향을 주지 않는다는 다른 연구결과(Cagen *et al.*, 1999)와 일치한다. 하지만 수정란을 1 nM BPA에 노출시킨 후, 암컷 mouse의 자궁에 착상시켜 태어난 쥐들이 생후 21 일째 측정에서 non-treated 쥐들보다 유의성이 있게 체중이 더 나갔다는 보고(Takai *et al.*, 2001)도 있기 때문에 수정란 상태에서 BPA의 직접적인 노출은 그 배아 및 태아의 체중에 민감하게 영향을 줄 수 있을 지도 모른다.

Tail flick은 외부의 열 자극에 의한 통증이 중추신경계에 작용하여 일어나는 반응을 말하는데 이 반응시간이 BPA 투여에 의하여 떨어지는 것(반응이 쉽게 나타남)은 통증에 대한 역치를 떨어뜨린 결과일 가능성이 크다. BPA가 유도하는 rearing, jumping 및 forepaw tremor

증상은 BPA에 의한 stereotypical behavior의 변화가 초래됨을 나타내며 이는 주변환경에 의해 spontaneous stereotype(jumping 및 patterned running)의 행동 변화가 일어난다는 보고(Powell et al., 1999)와 direct acting dopamine agonist이며 dopamine system에 neurotoxic한 6-OHDA의 처리가 보다 강하게 stereotype 행동변화를 초래한다는 보고와 관련이 있는 것으로 보인다(Ugerstedt et al., 1971). 이는 또한 dopamine synthesis pathway의 limiting enzyme인 tyrosine hydroxylase의 발현이 용량의존적으로 brain에서 증가한 것과 관련이 있는 것으로서 bisphenol A에 의한 dopamine synthesis의 변화가 일어나고 그 결과 spontaneous stereotype(jumping 및 rearing)의 행동이 일어날 수 있음을 시사한다. 다만 특별한 행동변화와 dopamine의 양 및 dopamine 합성과정 효소 또는 receptor 발현에는 brain의 regional specificity가 있는 만큼 보다 구체적인 연구가 필요하다. 한편 BPA를 투여한 실험 군에서 locomotor가 떨어졌는데 이 결과는 ovariectomized 된 rat에서 estradiol benzoate 결정의 이식에 의하여 locomotor activity가 줄어 들었다는 보고(Febo et al., 2002)와 유사한 결과로 estrogen성 내분비계 물질인 BPA가 estrogen과 유사한 작용을 통하여 locomotor activity를 떨어뜨린 것으로 판단된다. 또한 cocaine에 의한 stereotype의 행동 및 locomotor activity 유도가 자궁 제거 후에 estradiol benzoate 결정을 이식한 쥐에 naloxone을 투여함으로써 유의성이 있게 증가하였지만 자궁만 제거한 쥐에 naloxone을 투여한 경우에는 그렇지 못하였고 하면서 estrogen과 opioids가 상호 작용을 통하여 locomotor activity를 조절할 수 있다는 보고(Febo et al., 2002)가 있기에 BPA 투여로 estrogen성 작용이 증가하고 이것이 locomotor activity를 억제하는 동시에 opioids에도 약하게 영향을 끼쳐서 stereotype의 행동 증가를 유도할 수도 있는 것으로 판단된다. 이와 더불어서 climbing behavior의 변화가 관찰되지 않았는데 이는 뇌에서의 dopamine 합성에 관여하는 tyrosine hydroxylase의 발현 증가와는 불일치 하는 것으로 비록 tyrosine hydroxylase의 발현이 증가하였으나 dopamine의 실질적인 증가가 이루어지지 않았거나 다음 단계에 관여하는 효소의 활성이 억제되어 dopamine의 생성이 이루어지지 않은 것으로 판단된다. 더구나 estrogen은 locomotor activity와 직접적인 관련성이 있는 dopaminergic function을 dopamine receptors의 친화도 감소와 dopamine의 재 수 증가에 의해 감소시킬지도 모른다(Gordon and Perry, 1983; Morissette et al., 1990; Morissette and Di Paolo, 1993)고 알려지고 있어 BPA에 의한 tyrosine

hydroxylase의 발현 증가와 dopamine성 행동약리(locomotor activity, climbing behavior)와의 관련성은 여러 요인들(dopamine의 생성 및 receptor 친화도, 그리고 재흡수와 opioid receptor 자극 및 brain의 regional specificity)이 관여하고 있을지도 모른다. 또한 BPA가 체내에서 estrogen성 작용을 증가시키는 결과를 Western blotting로 확인하였다. 이것은 estrogen receptors의 신경행동 약리변화와의 관련성 및 내분비계 장애물의 노출에 의한 행동 발달 장애 및 변화에서의 역할에 대한 연구의 중요성을 시사하는 것으로 보인다.

이번 연구가 BPA의 생체 내에서 일으키는 생리적 변화 및 행동변화 양상을 파악하고 이해하는 데 도움을 줄 것으로 기대되며 BPA를 포함한 환경호르몬의 신경독성학적 mechanism이 구체적으로 규명되기를 바란다.

### 감사의 말씀

이 연구는 식품의약품안전청 내분비장애물질 관리 사업 연구비(2002)의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Agrati, P., Ma, Z.Q., Patrone, Bondiolli, G., Bottone, M.G. and Maggi, A. (1997): Dopaminergic phenotype induced by estrogen in a human neuroblastoma cell line. *Eur. J. Neurosci.*, **9**, 1008-1016.
- Angus, W.G. and Contreras, M.L. (1996) Effects of polychlorinated biphenyls on dopamine release from PC12 cells. *Toxicol. Lett.*, **31**, 191-199.
- Arbogast, L.A. and Ben-Jonathan, N. (1999): The preovulatory prolactin surge is prolonged by progesterone-dependent dopaminergic mechanism. *Endocrinology*, **126**, 246-252.
- Beyer, C. and Raab, H. (1998): Nongenomic effects of oestrogen: embryonic mouse midbrain neurones respond with a rapid release of calcium from intracellular stores. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 255-262.
- Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Villalobos, M., Pedraza, V. and Olea, N. (1995): Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 608-612.
- Cagen, S.Z., Waechter, J.M. Jr., Dimond, S.S., Breslin, W.J., Butala, J.H., Jekat, F.W., Joiner R.L., Shiotsuka, R.N., Veenstra, G.E. and Harris, L.R. (1999): Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol. Sci.*, **50**, 36-44.
- Crump, D., Lean, D. and Trudeau, V.L. (2002): Octylphenol and UV-B radiation alter larval development and hypothalamic gene expression in the leopard frog (*Rana pipiens*). *Environ. Health Perspect.*, **110**, 277-284.
- Febo, M. and Jimenez-Rivera, C.A. (2002) Segarra AC. Estro-

- gen and opioids interact to modulate the locomotor response to cocaine in the female rat. *Brain Res.*, **943**, 151-161.
- Ferretti, C., Blengio, M., Vigna, I., Ghi, P. and Genazzani, E. (1992): Effects of estradiol on the ontogenesis of striatal dopamine D1 and D2 receptor sites in male and female rats. *Brain Res.*, **57**, 212-217.
- Morissette, M., Biron, D. and Di Paolo, T. (1990): Effect of estradiol and progesterone on rat striatal dopamine uptake sites. *Brain Res. Bull.*, **25**, 419-422.
- Morissette, M. and Di Paolo, T. (1993): Effect of chronic estradiol and progesterone treatments of ovariectomized rats on brain dopamine uptake sites. *J. Neurochem.*, **60**, 1876-1883.
- Gordon, J.H. and Perry, K.O. (1983): pre- and postsynaptic neurochemical alterations following estrogen-induced striatal dopamine hypo- and hypersensitivity. *Brain Res. Bull.*, **10**, 425-428.
- Holene, E., Nafstad, T., Skaare, J.U. and Sagvolden, T. (1998): Behavioral hyperactivity in rats following postnatal exposure to sub-toxic doses of polychlorinated biphenol congener 153&126. *Behav. Brain Res.*, **94**, 213-224.
- Kompolti, K. (1999): Estrogen and movement disorders. *Clin. Neuropharmacol.*, **22**, 184-188.
- Morissette, M., Biron, D. and Di Paolo, T. (1990): Effect of estradiol and progesterone on rat striatal dopamine uptake sites. *Brain Res. Bull.*, **25**, 419-422.
- Pasqualini, C., Olivier, V., Guibert, B., Frain, O. and Leviel, V. (1995): Acute simulatory effect of estradiol on striatal dopamine synthesis. *J. Neurochem.*, **65**, 1651-1657.
- Powell, S.B., Newman, H.A., Pendergast, J.F. and Lewis, M.H. (1999): A rodent model of spontaneous stereotypy: initial characterization of developmental, environmental, and neurobiological factors. *Physiol. Behav.*, **66**, 355-363.
- Schantz, S.L. (1996): Developmental neurotoxicity of PCBs in humans: what do we know and where do we go from here? *Neurotoxicol. Teratol.*, **18**, 217-227.
- Steinmetz, R., Brown, N.G., Allen, D.L., Bigsby, R.M. and Ben-Jonathan, N. (1997): The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release *in vitro* & *in vivo*. *Endocrinology*, **138**, 1780-1786
- Takai, Y., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., Kamei, Y., Osuga, Y., Yano, T. and Taketan, Y. (2001): Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development. *Reprod. Toxicol.*, **15**, 71-74.
- Toran-Allerand, C.D., Singh, M. and Setalo, G. (1999): Novel mechanisms of estrogen action in the brain: New player in an old story. *Front Neuroendocrinol.*, **20**, 97-121.
- Trudeau, V.L., Chiu, S., Kennedy, S.W. and Brooks, R.J. (2002): Octylphenol (OP) alters the expression of members of the amyloid protein family in the hypothalamus of the snapping turtle, *Chelydra serpentina serpentina*. *Environ. Health Perspect.*, **110**, 269-275.
- Ungerstedt, U. (1971): Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degradation of the nigro-striatal dopamine system. *Acta. Physiol. Scand.*, **371**, 1-48.
- Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Ruiz de Almodovar, J.M. and Pedraza, V. (1995): The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 844-850.