J. Toxicol. Pub. Health
Vol. 21, No. 1, pp. 31-37 (2005)

Official Journal of Korean Society of Toxicology
Available online at http://www.toxmut.or.kr

사람의 유방암 세포주와 미성숙 랫드에서 정향피의 비스페놀 A 독성방어 효과

조은혜 · 양세란 · 조성대 · 정지원 · 박준석 · 황재웅 · 이성훈 · 박정란 · 이영순 · 강경선
서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

Protective Effect of the Stem Bark of *Syringa velutina* on Bisphenol-A in the Human Breast Cancer Cell Line and Immature Rat

Eun-Hye Jo, Se-Ran Yang, Sung-Dae Cho, Ji-Won Jung, Joon-Suk Park, Jae-Woong Hwang, Seong-Hun Lee, Jung-Ran Park, Yong-Soon Lee and Kyung-Sun Kang
Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Received December 17, 2004; Accepted March 10, 2005

ABSTRACT. The inhibitory activity against bisphenol-A (BPA), one of well-known endocrine disrupters was examined with the water extracts prepared from the Stem Bark of *Syringa velutina* (SBS). In this study, we have investigated the effect of SBS on the toxicity caused by BPA in human breast cancer cell line, MCF-7 cells and immature *Sprague-Dawley* rats. In the estrogen receptor-mediated proliferation assay using MCF-7 cells, BPA (16 ng/ml) induced the cell proliferation, but the water extract of SBS inhibited BPA-induced cell proliferation in a dose-dependent manner. These results are associated with PARP degradation and specific cleavage of anti-apoptotic protein Bcl-2 of apoptotic regulatory factors. Additionally, the BPA (400 mg/100 g) significantly induced the increase of the uterine and virginal weights, while SBS (50 mg/100 g) showed the inhibitory action against BPA, i.e. caused the increase of estrogen-related organ weights in immature rat uterotrophic assay. Taken together, the present data suggest that SBS may have anti-toxicity activities against BPA *in vitro* and *in vivo* systems. SBS may be capable of inhibiting adverse effects of BPA such as reproductive disorder.

Keywords: Bisphenol-A, MCF-7 cells, *Syringa velutina*, Uterotrophic assay, PARP, Bcl-2.

서 론

내분비계 장애물질이란 생명체의 내부에 들어가 내분비계의 정상적인 기능을 방해하거나 혼란시키는 화학물질로, 내분비계 교란물질(Endocrine Disruptors)의 통칭이다. 또한 내분비계 장애물질은 화학물질이 인체의 내분비계에 작용하여 호르몬 분비를 차단, 과잉, 과소 분비토록 하여 불임, 성기능장애, 정자수 감소 등 생식기능이상을 초래할 가능성이 있는 물질로서 환경호르몬이라고도 한다. 환경호르몬은 생체 호르몬과는 달리 쉽게 분해되지 않고 환경 및 체내에 수년간 잔류하며, 인체 등 생물체의 지방 및 조직에 농축되는 성질이 있다고 보고되고 있다(Golden *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 1991).

그 중 Bisphenol-A(BPA)는 외인성 estrogen으로 estrogen 수용체에 결합하여 유사작용을 일으킨다.

체외실험에서 BPA의 estrogen 수용체와의 결합과 활성 능력은 17β-estradiol보다 15,000배 더 낮았다는 등의 BPA의 외인성 estrogen으로서의 능력은 매우 낮다는 보고가 많다(Gaido *et al.*, 1997). 그러나 다른 연구결과에서는 BPA를 난소적제술을 실시한 생쥐에 피하주사로 투여시 estradiol의 10,000배 낮은 능력을 보였다고 보고된 적이 있으며, 체외실험결과 BPA는 estrogen 수용체의 antagonist 또는 agonist로 작용하며, 체내실험에서 BPA는 약한 estrogen 효과를 나타내지만, 체외 또는 출생 후 조기에 노출되었을 경우에는 차산자 수컷의 전립선 무게를 증가시키는 것으로 알려져있다(Millgan *et al.*, 1998).

Correspondence to: Kyung-Sun Kang, Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Shilim-9dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
E-mail: kangpub@snu.ac.kr

이와 같이, 환경호르몬에 대한 생체독성시험은 많이 이루어져 왔다. 생체독성시험 결과의 많은 보고에도 불구하고 BPA의 경우 실질적으로 치과와 공업에서 음식포장재로 감열기, 감압지등의 특수용기의 현색제로 폭 넓게 사용되고 있다.

따라서 BPA 등의 환경 호르몬에 대한 독성방어 물질의 개발이 시급한 실정이다. 우리나라의 경우 고려홍삼이 BPA에 의하여 야기되는 발생독성을 방어할 수 있는 활성물질을 가지고 있고 정자의 질을 개선하는 작용이 있다고 보고된 바가 있다(Kim *et al.*, 2001). 그러나 이러한 홍삼의 방어 작용 이외에 환경호르몬의 독성방어물질의 연구는 전세계적으로 미약하다. 이러한 경향에 비춰, 본 연구진은 이전연구에서 한약을 바탕으로 한 작물 추출물 가운데 MCF-7 세포의 증식과 내분비계 장애물질인 BPA의 활성을 억제하는 유효물질을 검색한 적이 있다(Yang *et al.*, in process). 이 유효물질 가운데 50% 이내로 BPA의 활성을 억제하는 정향나무(*Syringa velutina*)의 껍질를 선별하여 독성억제 기전과 *in vitro*에서의 효과를 살펴보고자 하였다.

정향나무는 도금양목 도금양과의 상록 소교목으로 16세기 포르투갈인에 의해 처음 발견되어 식품, 약품, 방부제 등에 쓰이거나 발작증을 비롯하여 치과에서 진통제 등으로 쓰이고 있지만 정향나무의 줄기 껍질인 정향피에 관한 연구는 미비한 실정이다(Park *et al.*, 1999).

그러므로 본 연구에서는 내분비계 장애물질에 대한 독성 방어물질 개발의 일환으로 정향피의 물 추출물이 BPA에 의한 사람의 유방암세포와 미성숙랫드에서의 독성을 방어 또는 억제하는지 알아보기 위하여 식품의약품안전청의 의약품 등의 독성시험기준(KGLP, 1999)과 비임상시험관리기준(KGLP, 2000)에 준하여 시험을 실시하였다.

재료 및 방법

시험 물질

본 실험에 사용된 Bisphenol-A(BPA)는 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였고, MCF-7 cell assay에서는 100% EtOH 그리고 immature uterotrophic assay에서는 corn oil(Sigma, USA)에 용해하여 사용하였다. 정향피의 물 추출물은 한국식품개발연구원(경기도 성남시)에서 Table 1에서 기재된 방법으로 조제된 동결건조 분말을 입수하여 100% EtOH에 용해하여 Stock(16 μg/ml)을 만들어 사용하였다.

시험동물 및 사육환경

실험동물은 *Sprague-Dawley* female rat 17일령을 한림실험동물(주)에서 구입하여 1일 동안 순화시킨 후 시험에 사용하였다. 시험기간 동안 온도 22±3°C, 상대습도 55±5%, 환기횟수 10~12회/hr, 명암주기 12시간, 조도 150~200 lux로 유지하였으며 호르몬의 영향이 배제된 AIN-76A Diet를 섭취 시켰으며, 음수는 상수도를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

Table 1. Water extraction of SBS

SBS 100 g+D.W. 2000 ml
↓ Extraction at 80°C for 3 hr
Filtration on filter paper (Whatman No 2)
↓
Filtrate (1st)+Residue
| ↓ Addtion of D.W. 500 ml and Extraction at 80°C for 3 hr
| Filtration on filter paper (Whatman No 2)
| ↓
| Filtrate (2nd) + Residue
——→ ↓
Concentration of 1st and 2nd filtrate
↓
Dissolving of concentrate with D.W.

MCF-7 cell assay

MCF-7 세포주 배양 및 proliferation assay. 5% fatal bovine serum(FBS)와 3 ml/l의 PSN antibiotic mixture가 첨가된 phenol red-free D-media를 공급한 MCF-7 세포를 5% CO_2, 95% air, 100% humidity, 37°C가 유지되는 incubator에서 배양하였다.

시험에 사용되는 세포(5×10^4 cells/ml)는 6-well culture plate에서 incubation 시키고 24시간 동안 attach시킨 후 phenol red-free D-media 배지에서 24시간 incubation 하였다. 24시간 후 medium을 제거하고 모든 compounds는 5% dextran-coated charcoal-stripped FBS(DCC_FBS; Hyclone, USA)와 3 ml PSN antibiotic mixture(test media)/L Medium에 희석하여 공급한 배지에서 37°C, 3일 동안 incubation하였다. 그 기간동안 test medium은 한번 교체해주고 수거한 cell은 spectrophotometer OD 260 nm에서 DNA content를 측정하였다.

Hoechst를 이용한 핵 염색. 1×10^5 cells/ml의 MCF-7 세포를 35 mm dish에 파종한 후 세포가 80~90%의 confluency에 도달하면 유효 농도의 물질을 dish에 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 끝나면 PBS로 3회 washing하고 4% paraformaldehyde solution으로 30~60분 고정한 후 1 μg/ml의 Hoechst 33258 solution을 첨가하여 30~60분 염색하였다. 염색이 끝나면 PBS로 3회 washing 한 후 fluorescence microscope에 UV filter를 적용하여 관찰하였다.

Western blot assay. Proliferation assay와 같은 방법으로 세포를 배양한 후 lysis buffer(20% SDS, 1 mM

phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 10 mM iodoacetoamide, 1 mM leupeptin, 1 mM antipain, 0.1 mM sodium orthovanadate, 5 mM sodium fluoride)를 첨가하여 세포를 lysis 하였다. Cell lysate를 probe sonicator로 sonication 한 후 DC protein assay kit(Bio-Rad, USA)로 정량한 후 12.5% polyacrylamide gel로 영동하여 nitrocellulose membrane에 transfer시킨 후 PARP, Bcl family 등 apoptosis와 관련된 protein에 대한 항체, 혹은 cyclins, cdks, p21 등 cell cycle progression에 관련된 protein에 대한 항체를 반응시키고, 그에 해당하는 2차 항체를 반응시킨 후 chemiluminescent detection reagent를 이용하여 X-ray film에 노출시켜 현상하였다.

Immature uterotrophic assay

시험군의 구성. Sprague-Dawley female rat 17일령을 I군(용매대조군, 시험물질과 동량의 corn oil), II군(정향피의 물추출물 50 mg/day/100 g-body weight), III군(정향피의 물추출물 10 mg/day/100 g-body weight), IV군(정향피의 물추출물 50 mg/day/100 g-body weight+BPA 400 mg/day/100 g-body weight), V군(정향피의 물추출물 10 mg/day/100 g-body weight+BPA 400 mg/day/100 g-body weight), VI군(BPA 400 mg/day/100 g-body weight)으로 구성된 6개 군에 군당 3마리씩 체중범위에 따라 무작위로 배정하였다.

시험방법. 이전 연구의 시험방법(Kang *et al.*, 2000)에 따라, 실험동물로는 수유기를 고려하여 생후 17일령을 구입하고 1일간 순화시킨 후 생후 18일의 미성숙 랫드을 사용하였다. 실험동물이 준비되면 3일 동안 BPA와 정향피 용액을 피하경로로 동시 처치한 후, 마지막 투여일로부터 24시간 후에 체중을 측정한 후에 경추탈구하였다. 부검 시, 자궁에 있는 액체나, 지방을 깨끗이 분리한 다음, 무게를 측정하고, 10% 포르말린에 고정한 다음 통상적인 방법을 거쳐 조직표본을 작성하고 병리조직학적 검사를 실시하였다.

통계학적 방법. 시험 중 측정된 시험동물의 체중 등에 관한 자료의 통계학적 분석을 위하여 one-way ANOVA를 실시하여 P=0.05 수준에서 군간 유의성을 검정하였고 유의성이 인정되면, Dunnett's t-test를 실행하여 대조군과 시험군간의 통계학적 유의성을 검정하였다(P<0.05).

결 과

MCF-7 cell assay

정향피 물 추출물에 의한 MCF-7 세포에서 BPA의 독성방어 및 핵의 분절 현상. BPA와 정향피가 세포의 성장율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 BPA를 16 ng/ml에서 단독으로 노출시키고 동시에 정향피 물 추출물과 BPA를 72시간 동안 처치 한 후 세포 변화를 살펴보았다. Fig. 1에서 볼 수 있는 것처럼, 16 ng/ml BPA를 처치하였을 때 MCF-7세포의 성장을 1.47배 증가시키지만, 정향피의 물 추출물 100 μg/ml과 BPA를 동시에 처치하였을 때 세포의 성장은 현저하게 감소하여 BPA에 의한 유방암세포에서 증식을 저하시켰다. 또한 정향피의 물 추출물을 사람의 유방암 세포에 단독으로 처치하였을 때, 100 μg/ml의 정향피가 무처치군과 비교하여 유방암 세포의 성장을 76%까지 감소하는 것으로 관찰되었다.

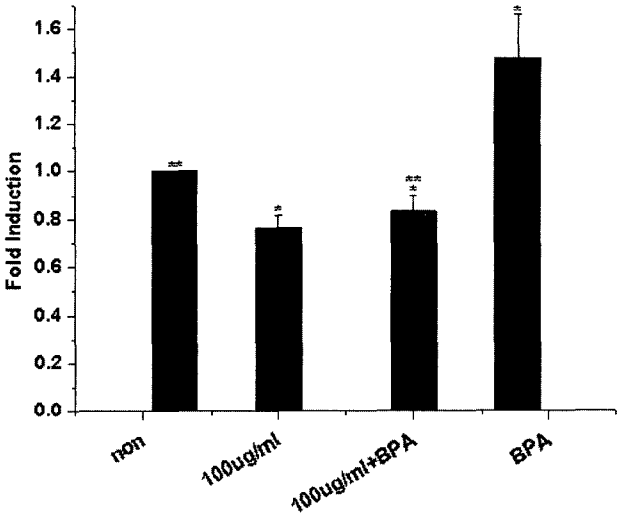

Fig. 1. Effects of SBS on cell proliferation in MCF-7 cells. The cells were treated for 72 hr, lysed with 1 ml of 0.1 N NaOH and then the lysates was determined by a spectrophotometer. * Significant difference at P<0.05 level compared with the negative control group. ** Significant difference at P<0.05 level compared with the positive control (BPA 16 ng/ml) group.

정향피의 물 추출물이 BPA에 의해 증식된 유방암 세포에서 어떠한 기전으로 성장을 억제하고 세포의 proliferation이 감소하였는지를 알아보기 위하여 세포의 사멸의 특징인 핵의 손상을 관찰하기 위하여 같은 농도에서 48시간 정향피를 BPA와 처치한 후 Hoechst 33258 staining을 실시하였다. 염색 후, 정향피의 물 추출물은 100 μg/ml의 농도에서 단독으로 처치하였을 때 (B)와 16 ng/ml의 BPA와 동시에 노출시켰을 때 (C), 모두 육안적으로 유방암세포의 proliferation이 줄어듬과 동시에 세포사멸이 일어나면서 핵의 분절이 관찰되었다(Fig. 2). 이상의 결과에서 사람의 유방암 세포에서의 유도된 BPA에 의한 세포증식을 정향피가 세포사멸을 통해 억제하는 것으로 확인 할 수 있었다.

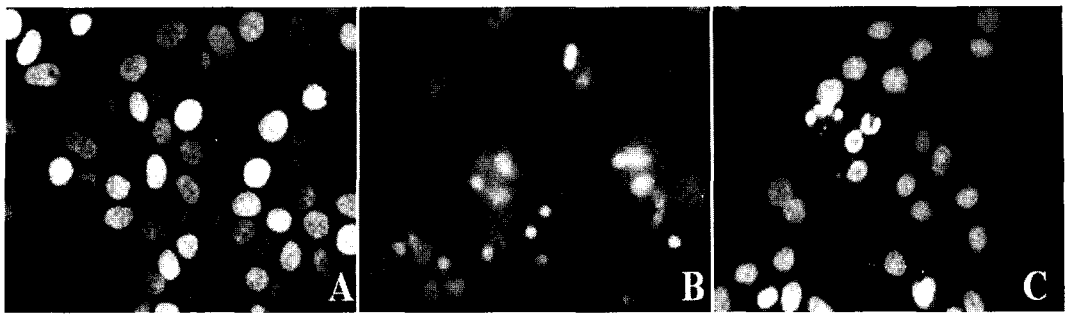

Fig. 2. SBS induced the death of MCF-7 cells and nuclear fragment. The cells were treated with 100 ug/ml SBS and 16 ng/ml BPA for 48 hr, stained with Hoechst 33258, and observed under florescence microscope. (A), untreated cells. (B), SBS-treated cells. (C), SBS and BPA-treated cells.

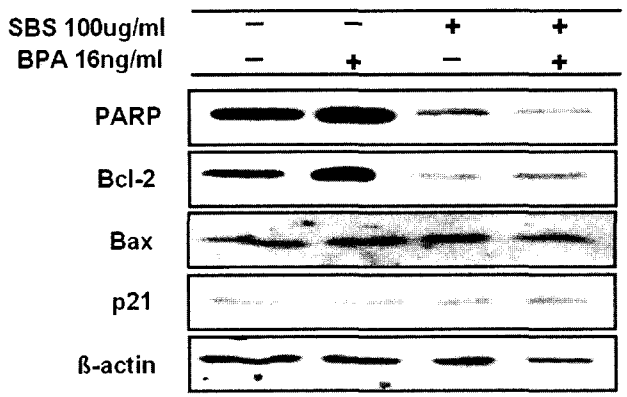

Fig. 3. Effect of SBS on protein expression of PARP, Bcl-2 family and p21. Cells were treated with 100 ug/ml water extracts of SBS and BPA for 72 hr. Total cellular proteins were prepared and western blot were performed with an antibody specific for corresponding proteins.

정향피 물 추출물에 의한 MCF-7 세포에서 BPA의 독성방어 작용기전. 정향피의 물 추출물에 의하여 BPA에 노출된 유방암세포에서 유도된 세포사멸 현상의 과정에서 세포사멸 신호전달계의 중요 신호전달 분자인 p21 단백질과 세포내 항산화 단백질인 Bcl-2 등의 변화를 Western blotting을 통하여 관찰하였다. 100 μg/ml 농도의 정향피 물 추출물을 72시간 동안 BPA와 동시에 MCF-7 세포에 처치한 후 여러 단백질의 발현 변화를 조사하였다. Fig. 3을 보면 정향피의 물 추출물은 단독으로 처치했을 때와 BPA를 동시에 처치했을 때 모두 PARP 기질을 85 kD에서 분해시켜 세포사멸로 이끌어 가는 것이 관찰되었다. 또한, 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 발현을 감소시켜 BPA에 의한 MCF-7 세포의 증식억제와 세포사멸을 유도하는 것으로 판단되었다. 그러나 성장조절 인자인 p21과 세포사멸을 유도하는 Bax의 발현에는 변화가 없었다.

Immature uterotrophic assay

일반증상. 용매처치군과 BPA 단독 처치군 등 모든 개체에서 시험물질을 처치하는 3일 동안 이상증상이나 행동을 보이지 않았다.

체중. 체중변화에 있어 각 투여군과 용매대조군간의 유의성이 관찰되지 않았다(Table 2).

자궁과 질의 중량. BPA 400 mg/100 g을 3일 동안 투여한 군은 질과 자궁 모두 용매대조군에 비해 유의적인 증가가 관찰되었다. 질의 습중량의 경우 용매대조군(31.97±12.36 g)에 비하여 BPA를 처치하였을 때(53.36±4.31 g) 약 22 g의 증가를 보였으며 자궁의 습중량의 경우 용매대조군(43.20±2.85 g)에 비하여 BPA 투여군(74.35±5.30 g)은 약 30 g의 변화가 관찰되었다. 질습중량/체중 비율에서도 용매대조군(6.79±2.4)에 비해 7 정도의 증가가, 자궁습중량/체중 비율에서도 약 7의 비율 증가가 관찰되었다 . 그러나 BPA와 정향피 물 추출물 병행 투

Table 2. Effect of water extract of SBS on body weight of immature rat

Dose (mg/day/100 g-body weight)	Start weight (g)	Weight after 1 day (g)	Weight after 2 days (g)	Final weight (g)
Vehicle control	38.7 ± 2.0[a)]	42.6 ± 2.8	46.6 ± 2.4	52.1 ± 2.6
BPA 400	43.7 ± 1.9	47.3 ± 2.2	50.0 ± 2.1	53.5 ± 2.5
SBS50	43.3 ± 1.8	44.8 ± 1.6	48.4 ± 1.5	51.3 ± 1.5
SBS10	40.6 ± 1.5	40.6 ± 1.3	43.3 ± 1.8	46.5 ± 2.3
SBS50+BPA400	43.3 ± 1.8	44.8 ± 1.6	48.4 ± 1.5	51.3 ± 1.5
SBS10+BPA400	40.6 ± 1.5	40.6 ± 1.3	43.3 ± 1.8	46.5 ± 2.3

[a)]Values shown are mean ± SD.

Table 3. Effect of water extract of SBS on reproductive tracts of immature rat

Dose (mg/day/100 g-body weight)	Vagina (mg)	Uterus (mg)	Vagina weight/Body weight	Uterus weight/Body weight
Vehicle control	31.97 ± 12.36**[a)]	43.20 ± 2.85**	6.79 ± 2.4(× 10^{-4})**	9.25 ± 0.55(× 10^{-4})**
BPA 400	53.36 ± 4.31*	74.35 ± 5.30*	13.50 ± 2.81(× 10^{-4})*	16.70 ± 1.09(× 10^{-4})*
SBS50	28.83 ± 9.90**	34.50 ± 16.04**	6.12 ± 1.73(× 10^{-4})**	7.30 ± 2.98(× 10^{-4})**
SBS10	24.07 ± 2.15**	34.40 ± 0.46**	4.91 ± 0.86(× 10^{-4})**	7.03 ± 1.16(× 10^{-4})**
SBS50+BPA400	46.37 ± 3.18**	70.23 ± 23.79*	11.90 ± 1.59(× 10^{-4})*	18.10 ± 6.41(× 10^{-4})*
SBS10+BPA400	40.87 ± 5.07**	70.40 ± 10.22*	8.85 ± 0.32(× 10^{-4})**	15.20 ± 0.61(× 10^{-4})*

[a)], Values shown are mean ± SD.
*, Significantly different from vehicle control at $P<0.05$.
**, Significantly different from positive control (BPA 400mg/100g) at $P<0.05$.

여군에 있어서는 고농도 투여군(50 mg/100 g)과 저농도(10 mg/100 g) 투여군 모두 BPA 단독 투여군(53.36± 4.31 g)에 비해 질의 습중량이 유의적인 감소되는 것이 관찰되었다. 또한 질습중량/체중 비율에서 저농도(10 mg/100 g)의 정향피 추출물을 BPA와 병행 투여하였을 때 BPA 투여군에 비해 유의적인 감소를 보였다. 정향피 물 추출물을 단독으로 처치한 군에서는 질과 자궁의 습중량이 용매대조군에 비해 감소가 관찰되었으나 유의적이지 않고 정향피 투여용량과도 무관하므로 개체차에 의한 것이라 사료된다.

고찰 및 결론

사람의 유방암 세포인 MCF-7 세포는 핵막에 에스트로젠 수용체가 존재하며, 이 수용체는 에스트로젠과 결합하여 DNA에 달라붙어 progesterone 수용체, growth factors 등 여러 가지 유전자의 발현에 관여하여 세포의 성장이나 분화에 관여한다고 알려져 있다(Fioravanti *et al.*, 1998). 본 연구에서는 식품용기 포장재로 널리 사용되고 있는 외인성 환경호르몬인 BPA를 이 유방암 세포에 투여하여 에스트로젠 수용체와 결합한 후 얼마정도의 세포증식 효과가 있는지 살펴보았다. 또한 정향피의 물 추출물이 BPA의 유방암 증식효과를 얼마나 감소시킬 수 있는지 측정함으로서 내분비계 장애물질의 방어효과를 관찰하였다. Schafer *et al.*에 의해 10^{-6} M의 BPA는 MCF-7 세포에서 무처치 군에 비해 약 3배의 증식효과를 보였으며(Schafer *et al.*, 1999), 본 시험에서도 16 ng/ml을 처치하였을 때 72시간 후 1.5배 이상의 유방암 세포성장이 관찰되었다. 그러나 이러한 내분비계 장애물질의 방어에 대한 연구는 아직 미비한 실정이며, 정향피에 관련된 연구 또한 그러하다. 1999년에 발표된 연구논문에 정향피가 coniferyl-aldehyde 4-O-glucoside, syringin, ligstroside, (+)-syringaresinol 4-O-glucoside, (+)-medioresinol 4''-O-glucoside, (-)-olivil 4''-O-glucoside 등의 6가지 물질로 정제되어 다양한 종양(P-388, L-1210, SNU-5 and HL-60)세포에서 세포 독성효과가 있다고 소개된 것이 처음이었다(Park *et al.*, 1999).

본 연구는 우선 BPA의 실제 사람에서의 노출농도에서의 에스트로젠 호르몬 효과를 살펴보기 위해 BPA를 16 ng/ml에서 단독으로 노출시키고 동시에 정향피 물 추출물과 노출시켜 BPA에 의한 세포의 변화를 어떻게 방어하는지를 살펴보았다.

BPA를 16 ng/ml의 농도에서 72시간 동안 처치하였을 때 MCF-7 세포의 성장을 1.5배 촉진시키는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 정향피의 물 추출물 100 μg/ml과 동시에 처치하였을 때 BPA에 의한 세포의 성장은 오히려 무처치군의 83%에 이르는 등 BPA의 사람 유방암세포에서 증식을 방어하는 효과를 보였다. 게다가 정향피의 물 추출물을 72시간 동안 단독으로 처치하였을 때 100 μg/ml에서 무처치군과 비교하면 세포의 성장이 76%까지 감소하여 유방암의 억제 능력 또한 가지고 있다고 사료되었다. 이러한 결과는 BPA가 에스트로젠과 유사한 작용을 하여 사람의 유방암 세포 증식을 유발하지만 정향피의 물 추출물은 이러한 독성기작을 저해하며 동시에 유방암 세포에 특이적으로 증식을 억제할 수 있는 활성성분을 가지고 있어 암세포의 사멸 또한 유도하는 것으로 생각되어졌다.

이것을 증명하기 위해서 정향피의 물 추출물이 BPA에 의해 증식된 유방암 세포에서 어떠한 기전으로 성장을 억제하고 세포의 proliferation이 감소하였는지를 알아보기 위하여 세포의 사멸 형태 중 가장 빈번히 발생하는 핵의 손상과 사멸을 알아보기 위한 방법으로서 대표적인 Hoechst 33258 staining을 실시하여 세포사멸을 관찰하였다. 스크리닝을 거쳐 탐색된 유방암세포의 성장을 억제하는 정향피 물 추출물과 BPA를 48시간 처치 후 Hoechst 33258으로 염색하였더니 대조군과 유의적인 차를 보였다. 정향피의 물 추출물은 100 μg/ml의 농도에서 단독으로 처치하였을 때, 16 ng/ml의 BPA와 동시에 노출시켰을 때, 모두 육안적으로 유방암세포의 proliferation이 줄어듬과 동시에 세포사멸이 일어나면서 핵의 분절이 관찰되었다. 따라서 정향피의 물 추출물은 사람의 유방암 세포의 사멸

(apoptosis)을 유도하여 BPA에 의한 유방암에서의 생리활성을 저해 하는 것으로 판단되어졌다.

정향피의 물 추출물에 의한 BPA의 유방암세포에서의 증식 억제의 특징적인 현상인 핵산 분절을 유도하였기 때문에 그 작용기전을 확인하기 위하여 세포의 성장조절 인자인 p21 단백질과 세포내 항산화 단백질인 Bcl-2 등의 변화를 Western blotting을 통하여 관찰하였다. 최근에 세포사멸기작에서 caspase로 이름 붙여진 interleukin-1-b-converting enzyme(ICE) family cystein protease가 사멸 과정의 중심 역할을 하고 이 효소가 poly(ADP-ribose)polymerase(PARP) 같은 기질을 분해하는 것으로 알려져 있어(Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1999) PARP의 발현정도 또한 관찰하였다. 그 결과 정향피의 물 추출물은 PARP 기질을 85 kD에서 분해시켜 세포사멸로 이끌어 가는 것이 관찰되었다. 그리고 세포 사멸을 조절하는 세포 안 밖의 여러 가지 인자들이 밝혀져 있는 데, 그 중에서 Bcl-2 family 단백질들은 세포 사멸 촉진하거나(Bad, Bax) 억제하는 것(Bcl-2, Bcl-XL)으로 알려져 있으며, 이 단백질들이 서로 어떻게 결합하는가에 따라 세포 사멸 억제 또는 촉진한다고 밝혀졌다(Burlacu, 2003). 정향피의 물 추출물은 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 발현을 감소시켜 BPA에 의한 MCF-7 세포의 증식억제와 세포사멸을 유도하는 것으로 판단되었다. 그러나 성장조절 인자인 p21과 세포사멸을 유도하는 Bax의 발현에는 변화가 없어 정향피 물 추출물의 작용기전에는 관계가 없는 것으로 사료된다.

위의 결과를 바탕으로 유방암 세포에서 뿐만 아니라 BPA와 정향피의 물 추출물을 미성숙 랫드에 3일 동안 반복투여하여 BPA가 미치는 독성을 평가하고, 이에 대한 정향피의 방어 또는 억제효과를 규명해 보고자 하였다. 시험기간 동안 정향피 처치군과 BPA 단독 처치군 등 모든 개체에서 이상증상이나 행동을 보이지 않았고 체중변화에 있어서도 각 투여군과 용매대조군간의 유의성이 관찰되지 않았다. 그러나, 질의 습중량, 자궁의 습중량, 질습중량/체중 비율, 자궁습중량/체중 비율은 BPA 400 mg/100 g을 3일 동안 투여한 군은 용매대조군에 비해 통계학적 유의한 증가를 나타냈다. 이 결과는 Yamasaki *et al.*의 시험에서 미성숙 랫드에 본 실험에서 사용한 농도보다 낮은 BPA 8, 40, and 160 mg/kg/day을 3일 동안 피하투여하였을 때, 자궁의 습중량과 자궁습중량/체중비율이 증가하였다는 결과와 동일하다(Yamasaki *et al.*, 2000). BPA와 정향피 물 추출물 병행 투여군에 있어서는 고농도 투여군과 저농도 투여군 모두 BPA 단독 투여군에 비해 질의 습중량이 유의적인 감소되는 것이 관찰되었다. 또한 질습중량/체중 비율에서 저농도의 정향피 추출물을 BPA와 병행 투여하였을 때 BPA 투여군에 비해 유의적인 감소를 보였다.

결론적으로 사람의 유방암 세포에서 BPA 16 ng/ml은 약 1.5배의 세포증식을 유발하며, 정향피 물 추출물 100 μg/ml을 병행하여 처치하면 72시간 후 정상세포와 동일한 수치로 세포증식을 억제시키는 것으로 확인되었다. 이것은 pro-apoptotic 단백질인 Bcl-2와 그 이 외의 알려지지 않은 여러 요인에 의한 세포사멸에 의한 것으로 사료된다. 그리고 미성숙 랫드에 내분비계 장애물질인 BPA를 400 mg/100 g을 3일 동안 투여하면 체중의 변화는 없지만 질과 자궁의 유의적인 증가가 관찰되고, 정향피의 물 추출물 10 mg/100 g을 BPA 400 mg/100 g과 병행하여 투여하면 유의적으로 BPA의 독성을 억제 또는 방어해주는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 산하 농림기술개발센타 지원 '농산물 및 가공식품으로부터 내분비계 장애물질에 대한 억제물질의 탐색 및 이를 이용한 기능성 식품개발'과 '유방암 억제능이 있는 Phytoestrogen 소재 및 갱년기 대응 식품 개발' 사업(200001-03-3-CG000, 203004-03-HD110)의 지원을 받아 수행하였다. 그리고 본 연구는 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었다(KRF-2004-005-E00076).

참고문헌

Burlacu, A. (2003): Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J. Cell Mol. Med.*, **7**, 249-257.

Fioravanti, L., Miodini, P., Cappelletti, V. and DiFronzo, G. (1998): Synthetic analogs of vitamin D3 have inhibitory effects on breast cancer cell lines. *Anticancer Res.*, **18**, 1703-1708.

Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babai, D., Protier, C.J. and McDonnell, D.P. (1997): Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 205-212.

Golden, R.J., Noller, K.L., Titus-Ernstroff, L., Koufman, R.H., Mitterndof, R., Stillman, R. and Reese, E.A. (1998): Environmental endocrine modulators and human health: An assessment of the biological evidence. *Crit. Rev. Toxicol.*, **28**, 109-227.

Kang, K.S., Kim, H.S., Ryu, D.Y., Che, J.H. and Lee, Y.S. (2000): Immature uterotrophic assay is more sensitive than ovariectomized uterotrophic assay for the detection of estrogenicity of p-nonylphenol in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Lett.*, **118**, 109-115.

Kim, J.C., Lim, K.H., Suh, J.E., Wee, J.J., Nam, K.Y. and Chung, M.K. (2001): Effect of korean red ginseng water

extract on bisphenol A-induced developmental toxicity in rats. *J. Toxicol. Pub. Health*, **17**, 225-234.

Milligan, S.R., Khan, O. and Nash, M. (1998): Competitive binding of xenobiotic oestrogen to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *Gen. Com. Endocrinol.*, **112**, 89-95.

Park, H.J,, Lee, M.S., Lee, K.T., Sohn, I.C., Han, Y.N. and Miyamoto, K. (1999): Studies on constituents with cytotoxic activity from the stem bark of Syringa velutina. *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1029-1031.

Schafer, T.E., Lapp, C.A., Hanes, C.M., Lewis, J.B., Wataha, J.C. and Schuster, G.S. (1999): Estrogenicity of bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 192-197.

Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Iyer, S., Boulares, H. and Smulson, M.E. (1999): Involvement of PARP and poly(ADP-ribosyl)ation in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Mol. Cell Biochem.*, **193**, 137-148.

Soto, A.M., Justica, H., Wray, J.W. and Sonnenschein, C. (1991): p-Nonylphenol: An estrogenic xenobiotic released from 'modified' polystyrene. *Environ. Health Perspect*, **92**, 167-173.

Yamasaki, K., Sawaki, M. and Takatsuki, M. (2000): Immature rat uterotrophic assay of bisphenol A. *Environ. Health Perspect.*, **108**, 1147-1150.

Yang, S.R., Hong, H.D., Ahn, N.S., Jung, J.W., Park, J.S., Jo, E.H., Lee, Y.S. and Kang, K.S. (in process): Assessment of hormonal activities using recombinant yeast assay system containing estrogen receptor or androgen receptor and inhibition of MCF-7 cells from plants, foods and herbs. *J. Microbio. Biotech.*

식품의약품안전청 (1999): 의약품 등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호.

식품의약품안전청 (2000): 비임상시험기준, 식품의약품안정청 고시 제 2000-63호.