

Trad-MCN 분석법을 이용한 비스페놀 에이 및 방사선의 위해성 비교

**Comparison of Risks due to Bisphenol A and Radiation
with Trad-MCN Assay**

신해식, 이진홍

충남대학교

대전시 유성구 궁동 220

김진규, 천기정, 이병헌

한국원자력연구소

대전시 유성구 덕진동 150

요 약

다양한 용도로 이용되고 있는 합성화학물질 중의 일부는 생물체의 내분비계를 교란시키는 환경호르몬이다. 이러한 환경호르몬의 생물학적 위해를 정량적으로 평가할 수 있는 실험기법이 확립되어 있지 않은 실정이다. 감수분열중인 자주달개비 화분모세포는 외부의 유해자극에 매우 민감하기 때문에 이를 생물말단점으로 이용한 평가방법 수립이 가능하다. 감마선 50 cGy 이하의 저선량 영역에서 미세핵의 생성률은 뚜렷한 선량-반응 관계를 나타내었으며 또한 4 μ M/ml까지의 비스페놀 에이에 대해서도 뚜렷한 농도-반응 관계를 나타내었다. 이와 같은 반응 관계로부터 동일한 미세핵 생성률을 유발하는 방사선 등가선량 또는 비스페놀 에이 등가농도를 산정하는 것이 가능하다. 실험결과 1 μ M/ml의 비스페놀 에이는 방사선 1.8 cGy에 상응하는 생물학적 영향을 유발하는 것으로 나타났다. 본 연구결과를 통해 볼 때 Trad-MCN 분석법을 응용하여 미량으로 존재하는 환경유해물질이나 합성화학물질의 생물학적 위해를 정량적으로 평가하는 것이 가능하다.

Abstract

Many kinds of synthetic chemicals have been being used for various purposes. Some of them are called 'environmental hormones' because they can disturb the endocrine system of organisms. Presently no technique is established for the quantitative assessment of biological risk of the environmental hormones.

The pollen mother cells (PMC) of *Tradescantia* are very sensitive to chemical toxicants or ionizing radiation, and thus can be used as a biological end-point assessing their effect. Micronucleus frequencies in PMC showed a good dose- and concentration-response relationship for radiation and bisphenol A. From the dose-response relationship, it is possible to estimate the equivalent bisphenol A concentration, or *vice versa*. One $\mu\text{M}/\text{ml}$ of bisphenol A is equivalent to 1.8 cGy of radiation in the induction of micronuclei. It is known from the result that Trad-MCN assay can be an excellent tool for detection of biological risk due to environmental toxicants or synthetic chemicals.

서 론

일상생활에서 합성화학물질의 사용은 점차 증가되고 있는 실정이며 이들 중 일부가 내분비계 장애물질로 작용할 수 있다는 연구결과가 보고되기 시작하였다. 대부분의 합성화학물질이 일으키는 생태학적 영향은 지금까지 명확하게 규명되지 않았다. 여러 가지 합성화학물질 중에서도 현재 생태계에 중요한 영향을 미칠 것으로 의심이 되는 다이옥신, DDT, PCBs 및 Bisphenol A 등의 물질은 선진국에서는 내분비계 장애물질로 분류하여 관리하고 있다. 내분비계 장애물질은 내분비계의 정상적인 기능을 방해하는 화학물질로서 환경 중 배출된 화학물질이 체내에 유입되어 마치 호르몬처럼 작용함으로써 생물개체 그리고 나아가 생태계를 교란하고 있다. 이러한 합성화학물질에 노출로 인한 영향은 정자수의 감소, 암 촉진, 암수의 변화, 기형유발을 일으키는 것으로 추정되고 있다 [1]. 합성화학물질은 앞으로도 우리 생활에서의 비중이 커짐에 따라 이들 물질들에 대한 정확한 검색 및 시험법을 확립하고 그 생물학적 위해성에 대한 평가가 보다 상세하게 이루어져야 한다.

생물체의 생식기관은 매우 민감한 세포들로 구성되어 있기 때문에 이온화방사선과 환경독성물질에 의한 손상이 쉽게 나타난다. 자주달개비의 화분모세포 (PMC; pollen mother cell)는 감수분열을 통하여 4개의 꽃가루를 형성하는 양성 생식세포로서 방사선 또는 돌연변이원에 매우 민감하다. 특히 감수분열중인 화분모세포의 염색체는 동일개체의 분열중인 체세포 염색체보다도 훨씬 방사선에 민감하다는 사실이 잘 알려져 있다 [2]. 그러나 화분모세포의 감수분열 중기 I에는 염색체가 매우 엉성하여 검경시 모양을 뚜렷이 관찰하기 힘들다는 단점을 지니고 있기 때문에 염색체이상 분석에 잘 이용되지 못했었다. 방사선 생물학적 연구와 관련하여 이 같은 단점을 극복하기 위해서는 방사선 처리를 감수분열 전기 I 초기에 맞추어 시행하고 난 후 분열중인 염색체에 대한 적당한 회복시간을 부여하여야 한다. 무동원체 염색체 조각이나 점착성 염색체 복합부위가 감수분열의 4분자 염색체 (tetrad) 시기에

미세핵으로 남게 된다. 이것을 이용한 분석과정을 일명 Trad-MCN assay라하여 돌연변이 유발물질이나 방사선에 의한 염색체 손상 연구에 이용되기 시작하였다. 1950년대 초반에 일부 연구자들에 의해 식물체가 영양부족 등의 화학적 결손에 의하여 PMC에서 미세핵이 생성됨을 밝혔다. 1970년대 초부터 포유동물 감수분열 세포에서도 미세핵의 생성은 염색체 손상을 의미하는 유용한 지표로서 이용되기 시작하면서부터 동물세포는 물론 식물세포에 있어서도 미세핵은 염색체 손상을 나타내는 명백한 지표로서 인식되기에 이르렀다 [3]. 최근에는 자주달개비 미세핵 분석법을 이용하여 대기오염에 대한 발암성 평가 [4], 오염 토양 및 수자원의 유전독성 평가 [5], 액체상 또는 기체상의 살충제의 유전독성 평가 [6] 등 자주달개비 미세핵 분석법의 응용분야가 급속도로 다양화되고 있다.

본 연구는 Muller and Streffer (1991) [7]에 의하여 제시된 방사선에 대한 생물지표로서의 조건들을 상당 부분 충족시키며, 환경독성물질 및 저선량 방사선에 민감하게 반응하는 것으로 밝혀진 자주달개비를 대상생물로 이용하여 환경독성물질 중 내분비계 장애물질로 추정되는 비스페놀 에이 (bisphenol A)에 의한 화분모세포 미세핵 생성율의 농도 또는 선량-반응 관계의 정립을 통하여 비스페놀 에이 및 감마선에 의해 유발되는 각각의 생물학적 위해도를 비교하였다.

재료 및 방법

공시재료 : 실험용 식물체는 방사선에 민감하게 반응하면서도 자발돌연변이율이 비교적 낮은 *Tradescantia* 4430 클론을 사용하였다. 온실에서 건전하게 생육된 화서를 절취하여 실험군별로 20개 이상 (>200화기)을 성장상 (growth chamber)에서 24시간 순치시킨 다음 실험에 사용하였다.

Bisphenol A : 비스페놀 에이 (4,4'-Isopropylidenediphenol, $C_{15}H_{16}O_2$, FW:228.3, Sigma Co.)는 수용액에서는 불용성이기 때문에 에탄올에 용해시킨 다음 1%의 처리액으로 희석하여 1, 2 그리고 4 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 의 농도로 희석하여 사용하였다. 순치되어 있던 절취화서를 각각의 농도별로 비스페놀 에이의 처리액에 침지한 다음 폭기 (aeration)를 실시하면서 6시간 동안 처리하였다.

방사선 조사 : 방사선원은 ^{60}Co (선원강도 약 150 TBq, Panoramic Irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd.)을 이용하였고, 절취화서 (cuttings)가 시드는 것을 방지하기 위해 줄기가 양액에 침지된 상태로 공기중에서 0~50 cGy를 조사하였다.

방사선 조사가 끝난 화서는 새로운 Hougland's solution No.2 6배 희석액에 침지하여 생육상내에서 두고 폭기를 실시하였다.

미세핵 분석 : 화분모세포에 생성된 미세핵을 분석하기 위해서는 화서의 고정, 저장 및 염색과정을 거쳐야 한다. 일련의 처리과정은 기 보고된 절차를 따랐다 [11]. 전처리가 끝난 후 실험군별로 10여개의 슬라이드 프레파라트를 제작하고, 광학현미경 하에서 미세핵을 계수하였다. 통상 하나의 프레파라트에서 약 300개 이상의 4분자 염색체를 검경하여 100 사분자당 미세핵 숫자로서 각 실험조건별 미세핵 생성률을 산정하였다.

결과 및 고찰

방사선 및 유전독성 물질에 의한 생물학적 효과 중 돌연변이에 관해서 획득된 데이터의 양이 풍부할 경우 Chadwick과 Leenhouts (1980)의 방사선 작용에 관한 분자이론 [8]에 따른 정교한 수식으로 선량-반응 관계를 표현할 수 있다. 분자이론에 따른 선량-반응식을 보면 일정한 선량범위까지는 돌연변이 발생률이 상승하여 정점에 이르게 되지만 선량이나 농도가 더욱 증가하게 되면 세포가 사망에 이르게 되기 때문에 돌연변이가 감소한 것으로 나타나는데 이때의 돌연변이는 의미를 상실한 것이다. 저선량이나 저농도에 있어서의 반응양상을 보면 방사선량이나 독성물질의 농도의 증가에 따른 생물학적 효과가 선형적으로 증가하여 일차함수 같은 양상으로 나타난다.

일반적으로 방사선 및 독성물질에 의한 돌연변이, 염색체 이상 또는 종양유발 등의 생물학적 효과를 간단한 선형적-이차함수적 선량반응관계로 표현하기도 한다. 이와 같은 linear-quadratic dose-response의 경우도 선량포화가 나타나지 않는 저선량 영역에서는 선량의 제공이 곱해지는 이차함수항이 생물학적 효과에 미치는 기여분은 무시될 수 있는 수준이기 때문에 저선량 영역에 있어서의 반응관계는 단순한 일차함수로 표현할 수 있다. 이와 같이 일차함수로 선량-반응관계를 나타내는 것이 타당함은 이미 여러 연구보고를 통해 잘 입증된 사실이다 [9,10].

자주달개비 화서 내에는 다양한 발육상태의 화아들이 공존하고 있으며, 특히 이들 중 일부 화아 내에는 감수분열중인 화분모세포가 포함되어 있다. 감수분열중인 화분모세포는 방사선에 매우 민감하기 때문에 방사선을 받게 되면 염색체의 일부가 절단되어 미세핵을 형성하게 된다. 미세핵의 생성률은 방사선량의 증가에 따라 점차 증가하는 양상을 나타냈으나, 50 cGy 이상의 다소 높은 선량영역에서는 MCN

생성물의 변이가 매우 크게 나타나서 선량-반응 관계를 규정짓기는 곤란한 것으로 밝혀졌다. 그러나 0~50 cGy 선량범위에서 평균값보다는 최대 MCN 생성물이 갖는 선량-반응 관계가 뚜렷하다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1). 최대 미세핵 생성물이 갖는 감마선량 반응식은 다음의 (1)식과 같다.

$$F_{MCN} = 1.97D + 4.05, \quad (r^2 = 0.95) \quad \text{-----} \quad (1)$$

여기서,

F_{MCN} = 최대 미세핵생성률 (MCN/100 tetrads)

D = 감마선량 (cGy).

이 관계식의 회기계수 $r^2=0.95$ 로 0~50 cGy 선량범위에 있어서의 선량-반응 관계를 일차함수로 표현하는 것에 무리가 없음을 알 수 있었다. 관계식의 정의에 따르면 미세핵의 자연생성률은 최대 4 MCN/100 tetrads인데 이 값은 실제로 분석된 화분모세포 미세핵 자연생성률의 범위와 일치하는 것으로 나타났다 [11].

비스페놀 에이에 대한 자주달개비 미세핵분석을 통하여 얻은 실험 결과, 농도별로 1%의 에탄올에 포함되어 있는 1, 2 그리고 4 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 의 비스페놀 에이가 자주달개비 화분모세포에 미치는 영향을 나타내었다 (Fig. 2). 비스페놀 에이가 전혀 포함되지 않은 1% 에탄올 처리군은 2.33 ± 0.62 이었다. 반면 1 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 을 처리하였을 때 미세핵의 생성률은 8.06 ± 0.70 ($p < 0.01$), 2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 을 처리하였을 때는 12.76 ± 1.06 ($p < 0.01$), 그리고 4 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 을 처리한 자주달개비의 화분모세포 중 4분자 염색체에 나타난 미세핵은 19.67 ± 1.52 ($p < 0.001$)이었다. 즉 처리한 비스페놀 에이의 농도가 높을수록 자주달개비의 화분모세포에 나타나는 염색체손상이 따라서 증가함으로써 자주달개비의 염색체변이는 비스페놀 에이에 대하여 뚜렷한 농도-반응관계를 나타내었다. 최대 미세핵 생성물이 갖는 비스페놀 에이의 반응식은 (2)식과 같다. 비교적 낮은 농도에서 비스페놀 에이가 식물체에 미치는 영향을 확인할 수 있었다.

$$F_{MCN} = 4.26D + 3.24, \quad (r^2 = 0.98) \quad \text{-----} \quad (2)$$

여기서,

F_{MCN} = 최대 미세핵생성률 (MCN/100 tetrads)

D = 비스페놀 에이 농도 ($\mu\text{M}/\text{ml}$).

이 관계식의 회기계수 $r^2=0.98$ 로 0~4 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 의 농도범위에 있어서의 용량-반응 관계를 일차함수로 표현하는 것에 무리가 없음을 알 수 있었다. 관계식의 정의에 따르면 미세핵의 자연생성률은 최대 3.2 MCN/100 tetrads인데 이 값은 실제로 분

석된 화분모세포 미세핵 자연생성물의 범위와 일치하는 것으로 나타났다 [11].

실험결과로부터 수립된 반응-관계식을 이용하여 동일한 수준의 미세핵을 생성하는 방사선량 또는 비스페놀 에이 농도를 산정하는 것이 가능하다. 자주달개비 미세핵 분석법은 방사선 처리시기를 감수분열 전기 I에 맞추어 분석할 경우 5 cGy까지 감지해 낼 수 있으며, 이와 같은 장점을 이용하여 합성화학물질인 비스페놀 에이에 대한 미세핵생성물을 실험한 결과 1 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 의 비스페놀 에이는 1.8 cGy에 상응하는 방사선에 의한 미세핵생성물과 동일한 것으로 나타났다. 인체의 여러 세포군에 손상을 유발하여 임상적 증상을 초래할 수 있는 감마선량은 25 cGy인데, 이에 상응하는 비스페놀 에이의 등가 농도는 그 이하에 머물고 있음을 확인할 수 있다 (Table. 1). 인간에게 영향을 줄 수 있는 비스페놀 에이의 농도는 2~5 ppb라는 보고된 자료와 Trad-MCN에 의하여 나타난 결과와 비교하면 다른 생물학적 분석법보다 탁월한 민감성을 확인할 수 있다 [12]. 합성화학물질의 농도가 매우 미량인 농도에서 염색체의 손상으로 인하여 미세핵을 유발하는데 상당히 민감한 반응을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

결 론

사용량이 점차 증가하고 있는 합성화학물질은 생태계에 변화를 유발할 수 있으며 이들 중 몇몇은 생물체의 내분비계에 장애를 유발하는 환경호르몬이라는 사실이 밝혀졌다. 현재까지는 이러한 내분비계 장애물질에 대한 위해도 평가방법이 마련되어 있지 않다. 일부 동물실험을 통하여 평가실험을 수행하고 있으나 그 인과관계가 명확하게 나타나고 있지 않다. 이러한 관점에서 환경독성물질에 대한 검색기법의 확립은 중요한 의미를 지닌다고 할 수 있다. 최근 방사선 및 돌연변이원에 민감한 자주달개비의 화분모세포를 생물말단점으로 이용하여 각종 환경유해물질의 생물학적 위해도를 평가하고 생물학적 정보를 획득하기 위한 기법개발이 본격화되고 있다는 사실에 주목할 필요가 있다. 본 연구에서는 방사선과 비스페놀 에이가 자주달개비 화분모세포에 유발하는 미세핵 빈도의 선량·농도-반응 관계를 정립하고 각각의 요인에 의한 생물학적 영향을 비교·평가하였다. 그 결과를 통하여 불 때 Trad-MCN 분석법은 환경호르몬 등 다양한 환경유해물질의 생물학적 영향을 검색하는데 유용한 도구로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

Table. 1. Bisphenol A concentration and equivalent radiation dose for inducing the same micronucleus frequency in *Tradescantia* pollen mother cells

Bisphenol A (μ M/ml)	Equivalent radiation dose (cGy)	Micronucleus frequency (MCN/100 tetrads)	Remarks
0.5	0.68	5.4	
1	1.8	7.5	
2	3.9	11.8	
4	8.2	20.3	
8	16.9	37.3	

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부에서 시행하는 특정연구사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 신동천. "내분비계 장애물질이란?," 식품과학과 산업, Vol. 33, No. 2, pp. 2-18 (1999).
2. Ma T. H., G. J. Kentos, Jr. and V. A. Anderson, "Stage sensitivity and dose response of meiotic chromosomes of pollen mother cells of *Tradescantia* to X-rays," Environ. Exp. Bot., Vol. 20, pp. 169-174 (1980).
3. Savage J. R. K and D. G. Papworth, "An investigation of LET 'finger-prints' in *Tradescantia*." Mut. Res., Vol. 422, pp. 313-322 (1998).
4. Sadowska A, E. Pluygers, M. Narkiewicz, A. Pawelczak and B. Lata, "Environmental genotoxicity and cancer risk in humans: a combined evaluation correlating the results of the *Tradescantia* micronucleus assay in the field and human biomarker assessments in serum I. The TRAD-MCN

- assay." Eur. J. Cancer Prev. Jar., Vol. 3, No. 1, pp. 69-78 (1994).
5. Kong M. S. and T. H. Ma, "Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassay." Mut. Res., Vol. 426, pp. 221-228 (1999).
 6. Ma T. H. and K. B. Mohammed, "*Tradescantia*-micronucleus and -stamen hair mutation assays on genotoxicity of gaseous and liquid forms of pesticides," Mut. Res., Vol. 426, pp. 193-199 (1999).
 7. Muller W. U. and C. Streffer, "Biological indicators for radiation damage." Int. J. Radiat. Biol., Vol. 59, pp. 863-873 (1991).
 8. Chadwick K. H. and H. P. Leenhouts. "The Molecular Theory of Radiation Action". Springer-Verlag. Heidelberg, pp. 92-117 (1980).
 9. 김진규, 김원록, 김채성, 신해식, 이정주. "기온일교차와 감마선의 영향에 의한 자주달개비 수술털의 체세포돌연변이 빈도." 환경생물학회지, vol. 16, 253-262 (1998).
 10. Cebulska-Wasilewska A., K. Rekas and J. K. Kim. "Application of TSH bioindicator for studying the biological efficiency of radiation." Nukleonika, vol. 44, pp. 15-30 (1999).
 11. Kim J. K. "Biological Monitoring of Radiation using Indicator Plants," KAERI/RR-1583/95, Korea Atomic Energy Research Institute (1995).
 12. Krishnan A. V., P. Starhis, S. F. Permuth, L. Tokes and D. Feldma, "Bisphenol A; an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving." Endocrine, Vol.132, pp.2279-2286 (1993)

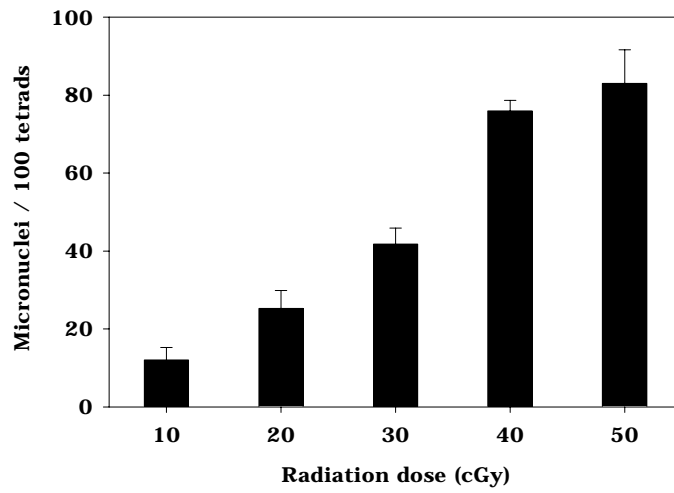


Figure 1. Micronucleus frequencies induced by radiation in pollen mother cells of T-4430.

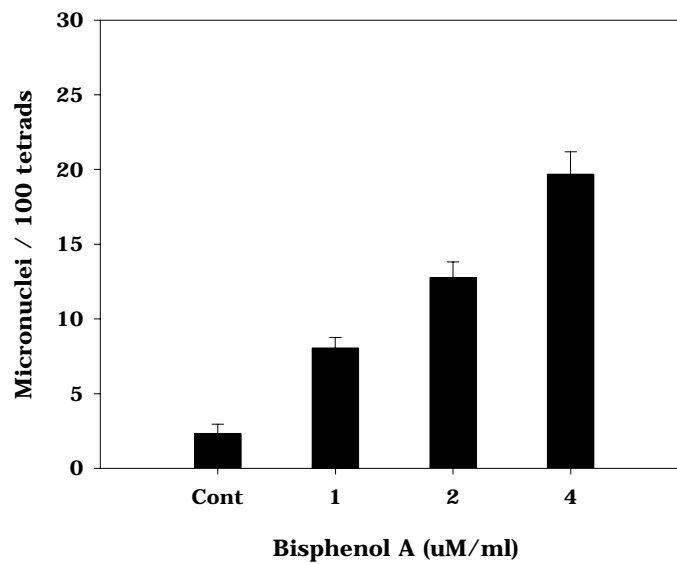


Figure 2. Micronucleus frequencies induced by bisphenol A in pollen mother cells of T-4430.