



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

인간 림프아세포에서
Di-(2-ethylhexyl) phthalate
(DEHP), Dibutyl phthalate (DBP)의
돌연변이성 및 세포사멸 기전 연구

제주대학교 대학원

바이오소재공학과

박 은 미

2020년 01월

인간 림프아세포에서
Di-(2-ethylhexyl) phthalate
(DEHP), Dibutyl phthalate (DBP)의
돌연변이성 및 세포사멸 기전 연구

지도교수 김 민 영

박 은 미

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2020년 01월

박은미의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 김 정 현

위 원 김 민 영

위 원 문 서 현

제주대학교 대학원

2020년 01월

Molecular Mechanisms of Mutagenesis and Apoptosis
induced by Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and
Dibutyl phthalate (DBP) in Human Lymphoblastoid
Cells.

Eun Mi Park

(Supervised by professor Min Young Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Master
of Biomaterials science and technology

2020. 01.

This thesis has been examined and approved.

.....
.....
.....

.....
2020. 01.

Department of Biomaterials Science and Technology

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

Contents

Contents i

List of Tables iv

List of Figures v

Abstract vi

I. 서 론 1

II. 재료 및 방법

1. 세포배양 10

2. 실험재료 10

3. 시험물질 처리 조건 11

4. Ttypan blue exclusion에 의한 세포 생존율 측정 11

5. 돌연변이 빈도 측정 12

| | |
|--|----|
| 6. Griess assay에 의한 산화질소 (NO [•]) 생성량 측정 | 12 |
| 7. 세포내 reactive oxygen species (ROS) 측정 | 13 |
| 8. Apoptosis 분석 | 13 |
| 9. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA 발현 분석 | 14 |
| 10. 통계분석 | 14 |

Ⅲ. 결 과

| | |
|--|----|
| 1. PART1. Phthalate를 TK6 세포에 처리하였을 때 나타나는 돌연변이성 및 독성 기전 분석 | 15 |
| 1) DEHP, DBP와 대사물질 처리가 세포 생존율에 미치는 영향 | 15 |
| 2) <i>HPRT</i> 와 <i>TK1</i> 유전자 돌연변이 빈도 분석 | 17 |
| 3) DEHP, DBP와 대사물질에 의한 NO [•] 생성량 측정 | 19 |
| 4) DEHP, DBP와 대사물질에 의한 ROS의 생성량 측정 | 21 |
| 2. PART2. MEHP에 노출된 TK6 세포에서 일어나는 세포사멸 기전 분석 | 23 |
| 1) MEHP 노출이 세포 생존율에 미치는 영향 | 23 |
| 2) MEHP에 의한 NO [•] 생성량 측정 | 25 |
| 3) MEHP를 처리한 TK6 세포에서의 NOS mRNA 발현 | 27 |
| 4) MEHP를 처리한 TK6 세포 내에서의 ROS의 생성량 측정 | 29 |
| 5) Annexin V-FITC와 PI 염색에 의한 TK6 세포에서의 apoptosis 분석 | 31 |
| 6) MEHP가 IAP family 발현에 미치는 영향 | 33 |

| | |
|--------------|----|
| Ⅳ. 고 찰 | 35 |
|--------------|----|

| | |
|------------------|----|
| V. 참 고 문 헌 | 42 |
| VI. 요 약 | 52 |
| 감 사 의 글 | 53 |

List of Tables

Table 1. Mutation fraction in the *HPRT* and *TK1* genes of TK6 cells exposed to phthalate. 18

Table 2. Production of nitric oxide by TK6 cells treated with phthalate. 20

List of Figures

| | |
|---|----|
| Fig. 1. Structure of phthalate. | 3 |
| Fig. 2. Metabolic pathways of phthalate esters in humans. | 4 |
| Fig. 3. Metabolic pathways of DEHP. | 5 |
| Fig. 4. Metabolic pathways of DBP. | 6 |
| Fig. 5. Effect of phthalate exposure on TK6 cell proliferation and viability. · | 16 |
| Fig. 6. Effect of phthalate on ROS levels in TK6 cells. | 22 |
| Fig. 7. Effect of MEHP exposure on TK6 cell, as determined by trypan blue exclusion. | 24 |
| Fig. 8. Effects of MEHP on cellular NO level in TK6 cells. | 26 |
| Fig 9. Effects of MEHP on NOS mRNA expression in TK6 cells. | 28 |
| Fig. 10. Effects of MEHP exposure on TK6 cells ROS production. | 30 |
| Fig. 11. Apoptosis of MEHP determined by flow cytometry assays. | 32 |
| Fig. 12. Effect of MEHP on IAPs family expression. | 34 |

Abstract

This present study was undertaken to examine the molecular mechanisms of mutagenesis and apoptosis of Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), dibutyl phthalate (DBP) and its metabolites mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), 2-ethylhexanoic acid (2-EHA) and monobutyl phthalate (MBP) in human lymphoblastoid TK6 cells. TK6 cells were exposed to either rat S9 activated DEHP, DBP for 6 h or MEHP, 2-EHA and MBP for 1 h in serum-free medium. Cell survival determined by trypan blue exclusion, and 6-thioguanine and trifluorothymidine-resistant mutants at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) and thymidine kinase (*TK1*) genes were assessed with doses of which relative survival is 30 % or more. DEHP, DBP and its metabolites tested showed dose-dependent increases in cell killing and mutant fraction with increasing nitric oxide (NO[•]) production but exhibited considerable variation in potency. MEHP, 2-EHA and MBP were considerably more cytotoxic and mutagenic than the corresponding parent compound DEHP and DBP. These findings indicate the mutagenicity of DEHP, DBP and its metabolite at the *HPRT* and *TK1* loci and contribute to the elucidation of mechanisms through which DEHP, DBP and its metabolite may exert its effects in vivo.

MEHP, one of the metabolites of DEHP. However, the detailed mechanisms of toxicity remain unclear. The present study investigated the role of NO[•] and reactive oxygen species (ROS), and inhibitors of apoptosis (IAPs) during apoptosis induced by MEHP in TK6 cells. Here we show MEHP induced strong apoptotic response in TK6 cells. MEHP up-regulated the expression of nitric oxide synthase (NOS), elevated NO[•] and ROS production and weakening the anti-apoptotic signals IAPs thus facilitating the process of

apoptosis. Collectively, our results indicate that MEHP-induced apoptosis was related with modulation of endogenous NO[•] and ROS, and IAP family gene expression.

I. 서 론

내분비계 교란물질 (Endocrine disruptors)은 환경호르몬이라고도 하며, 환경에 배출된 합성 화학물질들이 생물체 내에 들어가 호르몬과 유사한 작용을 하여 정상적인 내분비계 기능을 방해하는 물질을 뜻한다[1]. 내분비계 교란물질은 대부분 생물에 의해 잘 분해되지 않기 때문에 장기간에 걸쳐 환경 속에 잔류하고 있으며, 체내에 축적됨으로써 호르몬 분비와 활동에 이상을 일으켜 비정상적인 대사기능을 일으키고 생식기능을 파괴하는 등의 심각한 증상을 야기할 수 있다. 내분비계 장애를 유발 할 수 있는 물질 가운데 현재까지 집중적으로 연구되고 있는 물질들은 음료수 코팅물질 등에 사용되는 bisphenol A, 가정용세제 성분의 분해물인 alkylphenol류, 소각장의 dioxin류, 농약이나 변압기절연유로 사용되었으나 사용이 금지된 DDTs와 PCBs 그리고 플라스틱 가소제인 phthalate류 등을 들 수 있다[2]. 내분비계 교란물질에 대한 독성 연구는 주로 생리 및 형태적인 변화에 대한 것이 대부분이었으나, 근래에는 세포 손상의 기전에 대한 연구가 점점 증가하고 있다. 세포 증식의 변화 및 세포사멸 (apoptosis) 유발은 세포 손상과 관련된 중요한 변화로 보고되며, 최근에는 세포의 apoptosis에 관련된 다양한 분자들의 변화가 내분비계 교란물질에 의한 손상 시에도 관련될 것으로 보고되고 있다[3].

내분비계 교란물질 중 한 종류인 프탈레이트 (phthalate)는 플라스틱을 부드럽게 만드는 가소제역할을 하며, 점성 조절제, 안정제, 윤활제 등의 물성을 가지고 있어 전자제품, 페인트안료, 식품용기, 어린이용 완구용품, 화장품 및 의약품 등 일상생활에 필수적으로 쓰이고 있다[4]. 많은 phthalate 종류 중에서 대표적으로 Diethyl phthalate (DEP), Di-(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP), Di-propyl phthalate (DprP), Di-n-butyl phthalate (DBP), Di-n-pentyl phthalate (DPP), Di-n-hexyl phthalate (DHP), Di-cyclohexyl phthalate (DCHP), Butyl benzyl phthalate (BBP)와 Di-2-ethylhexyl adipate phthalate (adipate) 8종이 가장 일반적으로 사용되고 있으며, 환경에서 잔류하는 독성이 매우 높은 내분비계 교란물

질 및 생식독성의 일종으로 분류되어 진다[5, 6]. 여러 종류의 phthalate는 성호르몬, 갑상선호르몬의 작용의 교란을 일으켜 생식능력 저하, 태아사망, 기형, 고환과 간 상해 및 유방암, 간암 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한, 내분비 교란물질로서 체내에 흡수되어 내분비계 교란을 통한 직접적, 간접적으로 여러 조직과 세포에 영향을 주게 되고, 영향을 받은 세포 손상은 apoptosis 유발에 관련하여 중요한 변화로 보고된다[3, 7, 8]. 현재 국내외적으로 사용이 규제되어온 유해물질로 DEHP, DBP 등의 phthalate는 고위험성 물질에서 15종 물질에 포함되며, 일부는 monoesters 형태의 대사산물이 되어 생식독성과 발달독성을 야기할 수 있는 것으로 알려져 있다. DEHP는 체내에 들어가면 빠르게 분해되는 특징이 있으며, 대부분 mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP)와 2-ethylhexanoic acid (2-EHA)로 빠르게 가수 분해된다. DBP는 매우 다양하게 사용되어 공기, 물, 음식을 통해 계속해서 노출되어 체내로 흡수되면 mono-n-butyl phthalate (MnBP)로 분해되고, 그 후 glucuronide가 결합된 형태로 배설되고, 일부는 unconjugated monobenzyl phthalate (MBzP)와 free phthalic acid 형태로 뇨를 통해 배출된다 [9, 10, 11, 12, 13].

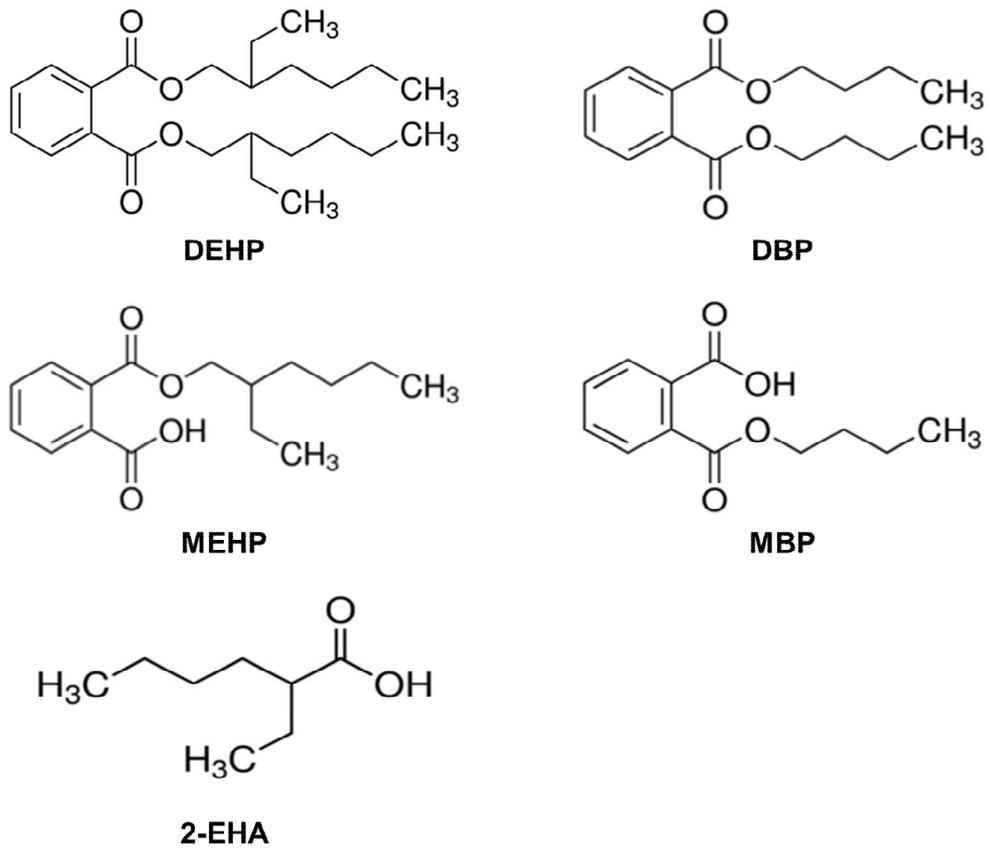


Fig 1. Structure of phthalate.

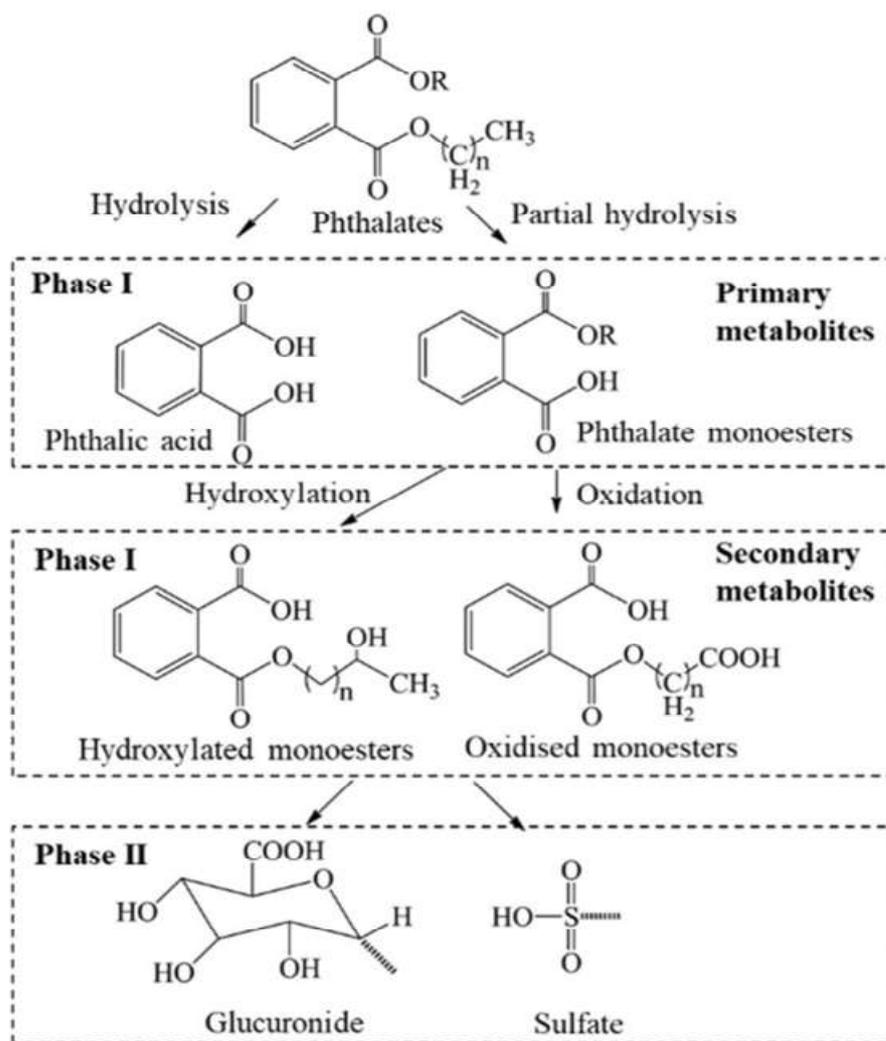


Fig 2. Metabolic pathways of phthalate esters in humans [14]

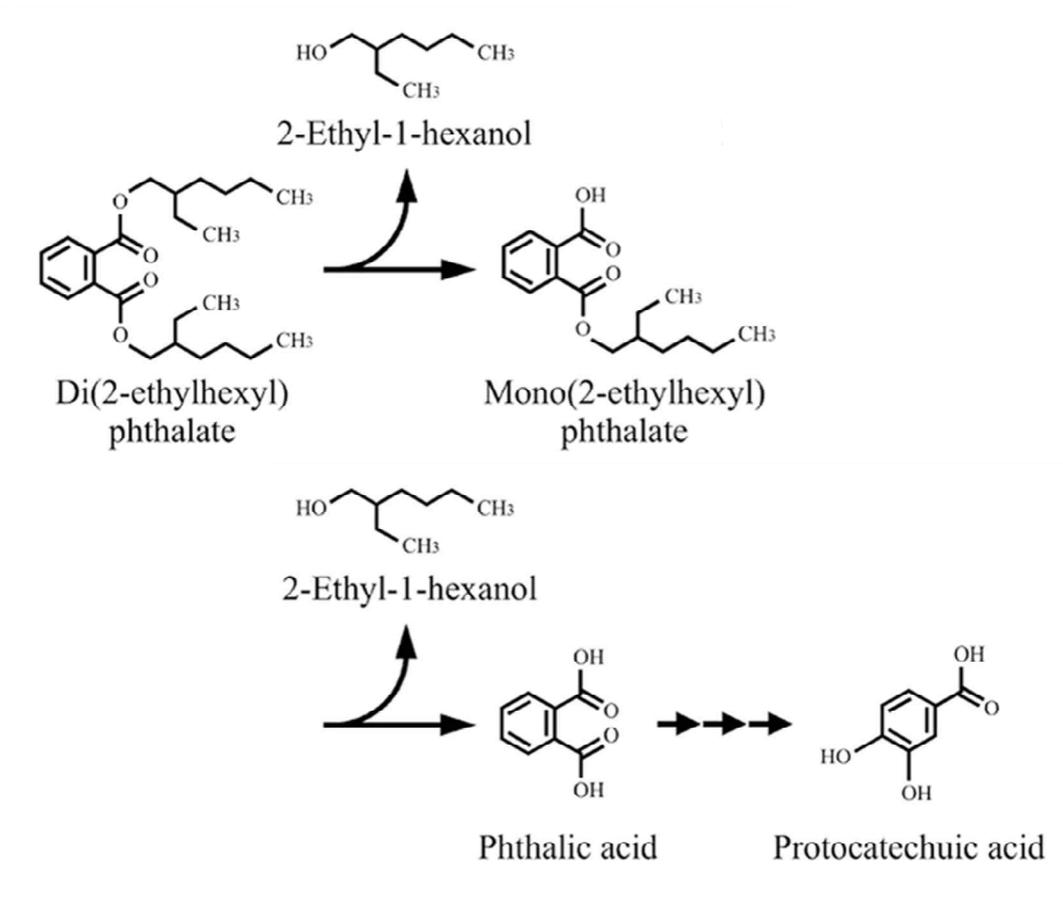


Fig 3. Metabolic pathways of DEHP [15]

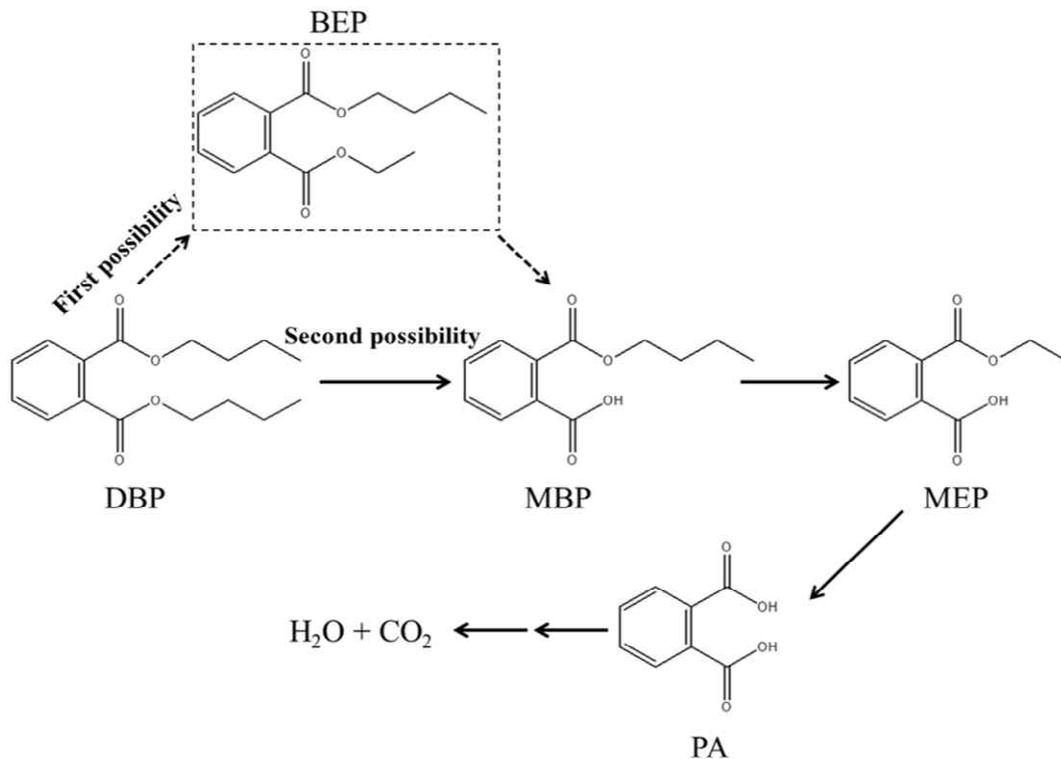


Fig 4. Metabolic pathways of DBP [16]

생물체는 유전정보를 세포 내 유전자에 보관하고 이러한 정보는 복제되어 다음 세대로 전달되어지며, 정확한 유전자 복제와 염색체 분열을 통해 진행된다. 생물체는 분열과 복제를 진행하면서 발생하는 돌연변이를 막으려고 하지만 생물체 유전자 복구 시스템의 한계를 넘으면 돌연변이로 이어지게 된다. 이러한 유전자 돌연변이는 여러 질환을 발생시키는데 특히 암 유발 및 노화 촉진 등을 일으킨다. Hypoxanthin-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*)는 퓨린의 대사과정 중 salvage pathway에 관여하는 효소로 hypoxanthin과 guanin을 각각 inosine과 guanine monophosphate로 전환시켜 과다한 요산생성을 방지하는 역할을 한다. *HPRT*는 정상적인 기질 외에도 6-thioguanine과 같은 정상 세포에 독성이 있는 purine 유도체를 기질로 이용함으로써 purine 유도체가 포함된 배지를 사용하여 *HPRT* 결핍 세포를 선택적으로 배양할 수 있다[17, 18, 19]. L5178Y/*TK*^{+/-} 세포의 thymidine kinase 결핍 (*TK*^{-/-}) 돌연변이체는 pyrimidine

의 유사체인 trifluorothymidine으로 선택된다. X-연결된 기능성 반접합성 *HPRT* 유전자와 달리, *TK* 유전자 자리는 마우스 염색체 11상에 위치하고 2개의 카피로 존재하며, 그 중 하나는 이중 접합체에서 기능적이다. 상염색체 위치로 인해, *TK* 유전자는 *HPRT* 유전자에서 검출되지 않은 유형의 돌연변이를 회수 할 수 있다. 즉, *TK*⁺ 대립 유전자는 유사 분열 재조합으로 인해 상실 될 수 있거나, *HPRT* 유전자에서 발생할 수 없는 돌연변이 세포는 *HPRT* 돌연변이에 치명적인 큰 DNA 결손에서도 생존 할 수 있다. *TK* 유전자 돌연변이 검정은 유전자 돌연변이, 대규모 염색체 변화, 재조합 및 이수성을 포함하여 광범위한 유전적 손상을 검출 할 수 있다. 대부분의 변화는 인간의 종양에서 발생하며 발암과 관련이 있는 것으로 보인다[20, 21].

산화질소 (nitric oxide, NO[•])는 혈관의 이완, 신경 전달, 혈액 응고, 염증 반응 및 면역계의 방어기능 등의 생리적 기능을 나타내며, 과량의 NO[•]가 발생하게 되면 apoptosis, 패혈성 쇼크, 당뇨병과 같은 여러 질환의 원인이 된다[22]. 산화질소는 L-arginine을 원료물질로 하여 산화질소합성효소 (nitric oxide synthase, NOS)에 의해 합성되며, iNOS (inducible NOS), eNOS (endothelial NOS) 및 nNOS (neuronal NOS) 세 가지가 존재한다. 유도성의 iNOS는 지질다당체로 자극한 각종 세포에서 발현되고, 침습성 세균에 감염된 상피세포 또는 IL-1과 같은 cytokine의 자극에 의해서도 발현이 증가한다. 또한 고농도의 NO[•]를 생산하여 nitrosation, nitration 및 oxidation 반응을 일으켜 선천적 면역에 깊게 관여하고 있다. 신경의 eNOS와 내피세포의 nNOS는 일반 세포에서 구상적으로 발현되고 짧은 시간동안 저농도의 NO[•]를 생산하여 세포 내 신호전달이나 단백질의 활성화 또는 억제에 관여한다[23, 24]. NO[•]의 과발현으로 발생하는 문제는 핵 속에서 유전자 변이를 일으키고, DNA 재생효소를 억제하고, DNA strand break를 매개한다. 또한 NO[•]는 단백질과 핵산 반응을 포함한 몇 가지 세포독성을 가지며, DNA 손상을 유도하고 p53 유도와 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 활성화를 통하여 세포사멸을 유발한다[23, 25].

활성산소 (reactive oxygen species, ROS)는 정상적인 세포 내 활성작용 과정에서 생산되며 세포분화, 유전자 발현, cytokine에 대한 반응 등의 생물학적 과정에 연관되어 있다. 그러므로 세포의 성장과 생존에는 ROS의 항상성을 유지하는

것이 중요하다. ROS에는 superoxide, hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical이 있으며, 넓게는 지질과산화물이나 할로젠화산소, 내피유래 이완인자로서 동정된 NO^{*}도 포함된다[26, 27, 28]. ROS는 단백질, DNA, 지질 등을 산화시켜 cell necrosis를 일으키는 역할을 하는 물질이며, 세포 내의 필수적인 second messenger로서 특정 cytokine이나 성장 인자의 신호 전달에 중요한 역할을 한다. 이는 ROS가 세포사멸에 중간 신호를 전달하는 매개체 역할 하여 apoptosis 유발의 원인을 제공하는 것을 알 수 있다. 이는 ROS는 TNF- α 의 자극으로 인해 생성되어 다양한 신호 단백질을 산화시킴으로써 caspase를 통한 apoptosis 신호 경로와 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activator B cells (NF- κ B)를 통해 생존경로가 조절되는 것으로 보고된다[26].

세포의 죽음은 세포의 형태적 및 생화학적 특성에 의하여 necrosis와 apoptosis로 구분된다. Necrosis는 생리화학적인 외상에 의해 일어나는 세포의 죽음이고, apoptosis는 여러 가지 외부 스트레스나 신호전달에 의해 세포 자신이 더 이상 손상을 치유하거나 세포증식이 불가능하다고 판단되면 일련의 신호들을 단계적으로 활성화시켜 유도한 죽음이다. Necrosis와 구별되는 점은 개체의 발생 단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체 방어 기전이라는 점이다. Apoptosis에는 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등이 수반되는데 이러한 현상은 세포 내부의 정교한 신호전달에 의해 조절된다. 또한 apoptosis는 개체 보존 수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈이나 특정 세포주기 조절인자 활성의 변화가 apoptosis의 주원인이 될 수 있다[26, 29].

Inhibitor of apoptosis proteins (IAP)는 apoptosis 억제기능을 가지고 있는 단백질이며, 인간에게서 보고된 IAP의 종류에는 cIAP-1, cIAP-2, XIAP, survivin이 있다. Apoptosis는 활성화된 caspase-9에 의해 caspase-3과 다른 caspase를 활성화시킴으로써 신호를 단계적으로 증폭시켜 세포사멸을 일으킨다. 그러나 chrocaspase-3와 chrocaspase-9의 활성화는 XIAP를 포함한 IAP family에 의해 억제될 수 있다. Caspase에 결합한 IAP는 ubiquitin ligase로 작용하여 caspase를 분해시키고, IAP가 caspase와 세포사멸을 조절하는 것 이외에도 염증 신호와 면역, 성장, 세포 전이도 조절할 수 있다고 한다[30, 31, 32]. 이러한 사실을 통해

apoptosis에 기인하는 IAP family에 관한 연구를 진행하여 프탈레이트에 의한 apoptosis 유발이 TK6 세포에 어떠한 영향을 미치는지 알 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 human lymphoblastoid 세포주인 TK6 세포에서 DEHP, DBP와 이에 대한 대사산물인 MEHP, 2-EHA 그리고 MBP에 의한 작용기전을 분석하여 독성 수준을 평가하고, 위 물질에 대한 기초자료를 제공하고자 실험을 진행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

Human lymphoblastoid 세포주인 TK6 세포는 Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, MA, USA)로부터 분양 받았으며, 10 % Horse serum (Gibco)과 1 % Peniciline-Streptomycine (100 units/ml, Gibco), 1 % L-glutamin (200 mM, 100X, Gibco)이 포함된 RPMI 1640 (welgene, Gyeongsangbuk-do, korea) 배지를 사용하여 37 °C, 5 % CO₂ 조건하에서 배양하였다. 세포가 배양접시의 80 % 정도가 자라면 계대 배양하여 세포수를 일정하게 유지하였다.

2. 실험재료

본 실험에서의 사용된 DEHP, DBP (Daejung, Gyeonggi-do, korea)는 멸균된 dimethyl sulfoxide (DMSO, bio basic, NY, USA)를 이용하여 25, 50, 100 mM stock으로 만들어 4 °C에 보관하여 사용하였다. MEHP (Sigma aldrich, St. Louis, USA), 2-EHA (Daejung, Gyeonggi-do, korea) 및 MBP (Wako, Osaka, Japan)는 멸균된 DMSO를 사용하여 100, 200, 400, 800 mM stock을 만들어 4 °C에 보관하여 사용하였다.

S9 mix는 Lyophilized SD rat liver S9. Aroclor 1254 (Moltox, Boon, NC), 180 mg/mL glucose-6-phosphate (Sigma aldrich, St. Louis, USA), 25 mg/mL β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Tokyo Chemical Industry, Chuo-ku, Tokyo), 150 mM Potassium chloride (Junsei Chemical, Chuo-ku,

Tokyo)을 각 2:1:1:1 비율로 섞어 제조하였으며, 시험물질을 배양하는 horse serum을 첨가하지 않은 배지 양의 2 %를 첨가하여 실험을 진행하였다.

3. 시험물질 처리 조건

DEHP와 DBP는 S9을 처리하지 않은 직접법과 S9을 처리한 대사활성법 두 가지 방법으로 실험을 진행하였으며, 직접법은 horse serum을 첨가한 배지를 사용하였고 대사활성법은 horse serum을 제외한 배지에 S9 mix를 첨가하여 사용하였다. 농도는 0, 25, 50, 100 μM 로 측정하였으며, 6시간 동안 처리하여 실험을 진행하였다. MEHP, 2-EHA와 MBP는 horse serum을 첨가하지 않은 배지를 사용하였고, 0, 100, 200, 400 μM 의 농도를 1시간 동안 처리하고 측정하여 실험을 진행하였다.

또한 MEHP 시험물질의 시간의 흐름에 따른 영향을 살펴보기 위해 horse serum 첨가 배지를 사용하여 24, 48, 72시간 동안 처리 하고 새로운 배지로 교체한 뒤 overnight하여 안정화시킨 다음 측정하였다. 여러 농도를 24시간 처리하였을 때 세포 생존율이 30 %가 되는 농도를 정하여 실험을 진행하였다.

4. Trypan blue exclusion에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율은 Kim 등[33]의 방법을 변형하여 측정하였다. TK6 세포를 6 well plate에 1×10^6 cells/well이 되도록 분주하고, DEHP, DBP, MEHP, 2-EHA 그리고 MBP를 농도별로 처리하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 조건 하에서 배양하였다. 처리시간이 지난 후 세포를 모아 부유시킨 후 세포 배양액과 trypan blue 용액을 1:1로 섞어 hemacytometer에 고정하여 광학현미경으로 관찰하여 살아있는 세포를 계수하였다.

특정 물질의 시간 변화에 따른 생존율 측정은 TK6 세포를 6 well plate에 1×10^6 cells/well이 되도록 분주하고 처리시간에 따라 위와 같은 조건으로 배양 한다. 그 후 세포를 모아 배지를 제거하고 Dulbecco's Phosphate buffered saline (D-PBS, welgene, Gyeongsangbuk-do, korea)를 이용하여 세포를 세척하고 새로운 배지를 첨가하여 6 well plate에 재부유시켜 overnight 한 후 같은 방법으로 세포를 계수하였다.

5. 돌연변이 빈도 측정

돌연변이 빈도는 Li 등[34]의 방법을 변형하여 측정하였다. TK6 세포를 1×10^6 cells/well의 비율로 분주하여 시험물질을 처리하고, 처리시간이 지난 세포를 D-PBS로 두 번 세척하여 100 mm culture plate에 배양하였으며, 계대배양하며 7-10일 동안 성장 시켰다. 각각의 처리그룹으로부터 well 당 40,000 cells/ 100 μ L 세포의 밀도로 총 12개의 96 well plate로 분주하여 *HPRT* 돌연변이체 발현에는 6-thioguanin (Alfa aesar, Massachusetts, USA)을 첨가하였고 *TK1* 돌연변이체 발현은 trifluorothymidine (Tokyo Chemical Industry, Chuo-ku, Tokyo)을 첨가하였다. 평판배양효율은 well 당 1 cell/ 100 μ L의 세포 밀도로 6개의 96 well plate에 분주하였으며, 약 2주 동안 배양한 뒤 콜로니를 세어 돌연변이 빈도를 계산하였다.

6. Griess assay에 의한 산화질소(NO^\bullet) 생성량 측정

NO^\bullet 측정은 Byun 등[35]의 방법을 변형하여 실험을 진행하였다. 시험물질을 적정농도로 처리하고 처리시간이 지난 후 배지를 모아 원심분리 하여 상층액을 걸어낸 뒤 96 well plate에 100 μ l씩 넣고 griess reagent A 와 griess reagent B

를 1:1로 섞어서 제조한 혼합물을 100 μ l씩 처리하여 실온에서 차광하여 10분간 반응시켰다. 10분 후 Spectra MR DYNEC technologies (Dynerx Technologies Inc., Chantilly, VA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrite (Sigma aldrich, St. Louis, USA) 표준곡선을 그려 계산하였다.

7. 세포내 reactive oxygen species (ROS) 측정

시험물질에 대한 ROS 생성은 6 well plate에 TK6 세포를 처리시간 만큼 배양 후 10 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA, Sigma aldrich, St. Louis, USA) stock을 37 °C에서 30분 동안 처리하였다. 처리한 세포를 모아 원심 분리하여 상층액을 제거하고 D-PBS를 사용하여 세포를 2번 세척하였다. 형광정도를 측정하기 위해서 D-PBS를 500 μ L를 넣어 재부유 한 뒤 차광하여 보호하고 flow cytometry (BD Accuri C6 Plus, BD Biosciences)를 이용하여 측정하고 CellQuest program으로 분석 하였다.

8. Apoptosis 분석

TK6 세포에 시험물질을 처리하고 처리시간 동안 배양한 후, D-PBS로 2번 세척하였다. 얼음 안에서 1X Annexin V Binding buffer을 200 μ L 넣고 섞은 다음 propidium iodide (PI)와 Annexin을 각 5 μ L씩 넣어준 뒤 15분 동안 실온에서 차광하여 반응시킨다. 반응 시간 후 1X Annexin V Binding buffer을 290 μ L 넣고 잘 섞어준 뒤 세포를 flow cytometry (BD Accuri C6 Plus, BD Biosciences)로 측정하였다. 측정 후 CellQuest program을 사용하여 본 결과를 분석하였다.

9. Reverse transcription-polymerase chain (RT-PCR)에 의한 mRNA 발현 분석

RT-PCR은 Im 등[36]의 방법을 참고하여 측정하였다. 처리시간 동안 배양한 세포를 2번 세척하여 TRI reagent (Sigma aldrich, St. Louis, USA)를 첨가하여 잘 섞어주고, 12,000 xg로 4 °C에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 새로운 tube에 모아 실온에서 5분간 반응시킨다. 세포를 분리하기 위해서 chloroform 200 μ L를 넣고 10분 동안 실온에서 반응시키고 12,000 xg로 4 °C에서 15분간 원심 분리하여 나타난 상층액을 새로운 microtube로 옮겼다. Isopropanol 500 μ L를 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 뒤, 12,000 xg로 4 °C에서 10분간 원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 원심분리 후, RNA pellet을 75 % ethanol로 세척하고 12,000 xg로 4 °C에서 5분간 원심분리 하였다. 75% ethanol이 날아가도록 말린 후, 추출한 RNA를 멸균된 DEPC-water에 녹인 후 RNA를 정량하였다. 정제한 RNA 1 μ g을 주형으로 계산하여 각각의 primer와 DEPC-water 그리고 TOP script™ one-step RT-PCR kit (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 넣고 gene pro yhermal cyclor TC-E (Bioer technology, Hangzhou, China)를 이용하여 증폭시킨 후, PCR 산물을 ethidium bromide (EtBr)가 포함된 1.5 % agarose gel에서 15분간 100 V에서 전기영동 하여 chemidoc universal hood II (Bio-rad, Hercules, CA, USA)으로 발현을 확인하였다. 대조군으로 β -actin을 사용하였다.

10. 통계분석

본 실험의 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타냈으며, 모든 실험 결과는 PASW statistics 19 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS) 통계 프로그램을 이용하여 Student *t*-test에 의해 통계적 유의성을 나타내었다.

III. 결 과

1. PART1. Phthalate를 TK6 세포에 처리하였을 때 나타나는 돌연변이성 및 독성 기전 분석

내분비계 교란물질인 DEHP, DBP와 이에 대한 대사산물인 MEHP, 2-EHA 그리고 MBP를 TK6 세포에 처리하였을 때 나타나는 세포 생존율, 돌연변이 빈도 측정, NO[•] 및 ROS 생성량의 변화 측정 등의 다양한 방법을 사용하여 평가하고자 하였다.

1) DEHP, DBP와 대사물질 처리가 세포 생존율에 미치는 영향

인간 림프아성 TK6 세포에 parents compound인 DEHP와 DBP, 이에 대한 대사물질인 MEHP, 2-EHA 및 MBP를 처리한 후 세포생존율의 변화를 알아보기 위해 trypan blue exclusion을 시행하였다. DEHP와 DBP는 S9를 처리하지 않고 시험물질만 처리한 직접법과 S9를 처리한 대사활성법으로 실험을 진행하였고, 이때 S9를 처리한 경우는 horse serum을 첨가하지 않은 배지를 사용하였다. 농도는 0, 25, 50, 100 μM 로 6시간 동안 처리하였으며, 농도 의존적으로 감소함을 보였으나 최소 80 % 이상의 세포생존율로 큰 변화를 나타내지 않았다. 그러나 S9를 처리한 경우 최대 50 %의 세포 사멸률을 나타내며 직접법으로 처리했을 경우에 비해 크게 감소했음을 알 수 있었다. DEHP의 대사산물인 MEHP, 2-EHA 그리고 DBP의 대사산물인 MBP는 horse serum이 없는 배지를 사용하였으며, 0, 100, 200, 400 μM 농도로 1시간 동안 처리하여 배양하였다. MEHP, 2-EHA 및 MBP는 농도 의존적으로 유의하게 생존율의 감소를 나타내었고 최고농도인 400 μM 에서 70-80 %의 세포 사멸률을 나타내었으며, 이는 대사산물이 parents compounds 보다 강한 세포독성을 가졌다는 것을 알 수 있었다.

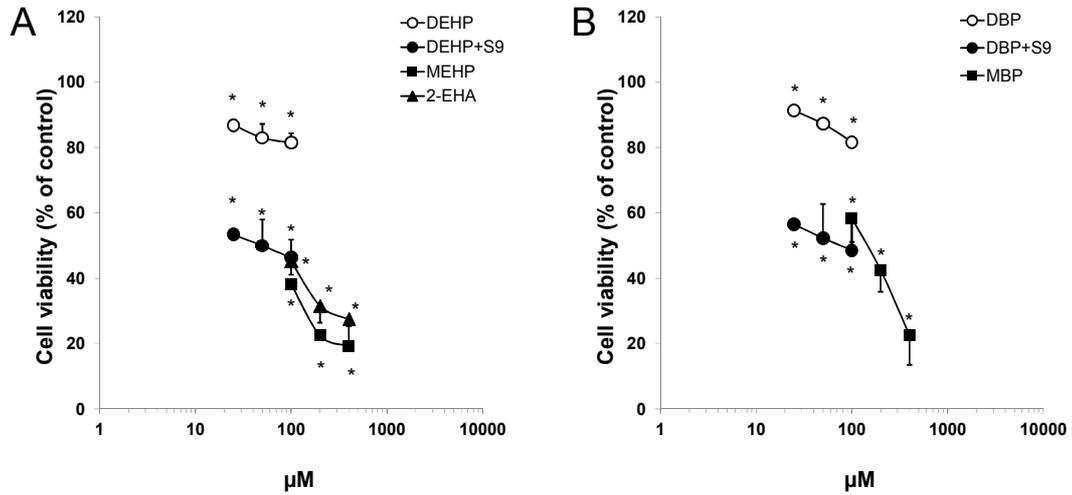


Fig. 5. Effect of phthalate exposure on TK6 cell proliferation and viability.

Survival of TK6 cells after (A) DEHP (-/+S9), MEHP, 2-EHA, (B) DBP (-/+S9) and MBP treatment, as determined by trypan blue exclusion. Cells treated with DMSO acted as controls. Results are presented as a percentage of control cells. The data are expressed as the mean \pm SD of three experiments. * $p < 0.05$ compared to the control by Student's *t*-test.

2) *HPRT*와 *TK1* 유전자의 돌연변이 빈도 분석

화학물질의 유전자 변이원성 평가를 위해 *HPRT*, *TK1* 유전자를 이용하여 TK6 세포에 유전자 변이시험을 수행하였다. 본 실험에 사용된 시험물질의 농도는 대사산물에서의 세포 생존율에서 30 %의 생존율을 나타내는 농도를 기준으로 대조군, 30 % 이상의 생존율을 나타내는 농도를 한 개 이상 선택하여 분석하였다. DEHP (-/+S9)와 DBP (-/+S9)는 0, 200, 400, 800 μM 의 농도로 처리하였고, MEHP, 2-EHA와 MBP는 0, 200, 400 μM 의 농도로 처리하였다. Table 1.에 나타난 결과를 보면 전체적으로 농도 의존적으로 증가함을 보였다. DEHP와 DBP에서 400 μM 을 기준으로 S9를 첨가하지 않았을 때와 첨가 하였을 때를 비교하였을 경우 각 11.2, 15.6 (*HPRT*), 7.3, 8.7 (*TK1*)배가량 높게 나타났고, 유의성을 살펴보면 DEHP+S9, MEHP와 2-EHA는 DEHP와 통계적으로 비교하였고 DBP+S9과 MBP는 DBP를 기준으로 하여 통계를 나타내었으며, 그 결과 2-EHA의 무처리군을 제외한 모든 결과에서 DEHP와 DBP를 기준으로 통계적으로 유의함을 나타내었다.

Table 1. Mutation fraction in the *HPRT* and *TK1* genes of TK6 cells exposed to phthalate.

| | $\times 10^{-5}$ | 0 | 200 | 400 | 800 |
|--------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>HPRT</i> | DEHP | 0.18 ± 0.018 | 0.43 ± 0.024 | 0.47 ± 0.039 | 0.6 ± 0.04 |
| | DEHP+S9 | 4.43 ± 0.437* | 4.42 ± 0.448* | 5.26 ± 0.343* | 6.27 ± 0.501* |
| | MEHP | 0.35 ± 0.051* | 0.89 ± 0.0* | 10.47 ± 0.053* | - |
| | 2-EHA | 0.19 ± 0.0 | 5.73 ± 0.282* | 6.05 ± 0.345* | - |
| | DBP | 0.63 ± 0.06 | 0.8 ± 0.06 | 1.08 ± 0.108 | 1.14 ± 0.036 |
| | DBP+S9 | 4.43 ± 0.437* | 7.55 ± 0.667* | 7.86 ± 0.213* | 7.95 ± 0.39* |
| | MBP | 0.35 ± 0.051* | 8.61 ± 0.291* | 14.27 ± 0.402* | - |
| <i>TK1</i> | DEHP | 0.95 ± 0.04 | 0.84 ± 0.034 | 0.69 ± 0.046 | 1.19 ± 0.014 |
| | DEHP+S9 | 4.01 ± 0.044 [#] | 10.55 ± 1.0 [#] | 10.79 ± 0.63 [#] | 11.55 ± 0.349 [#] |
| | MEHP | 1.7 ± 0.031 [#] | 9.59 ± 0.439 [#] | 10.71 ± 0.097 [#] | - |
| | 2-EHA | 1.7 ± 0.031 [#] | 9.45 ± 0.436 [#] | 9.96 ± 0.318 [#] | - |
| | DBP | 0.95 ± 0.04 | 1.06 ± 0.127 | 1.21 ± 0.326 | 1.52 ± 0.223 |
| | DBP+S9 | 4.01 ± 0.044 [#] | 8.1 ± 0.386 [#] | 10.58 ± 0.696 [#] | 11.57 ± 0.421 [#] |
| | MBP | 1.7 ± 0.031 [#] | 8.89 ± 0.081 [#] | 9.20 ± 0.055 [#] | - |

The data are expressed as the mean ± SD of three experiments. * $p < 0.05$ compared to DEHP and [#] $p < 0.05$ compared to DBP by Student's t-test.

3) DEHP, DBP와 대사물질에 의한 NO[•] 생성량 측정

DEHP, DBP 및 대사물질 처리에 의한 TK6 세포에서의 NO[•]의 생성을 확인하기 위해 griess reation assay를 통해 실험을 진행하였다. Griess reation assay는 질소환원효소를 이용하여 NO₃⁻를 NO₂⁻로 환원시키고 griess 시약을 이용하여 발색반응을 일으켜 NO₂⁻의 농도를 측정한다[37]. Table 2.에서 보는바와 같이 모든 시험물질에서 농도 의존적으로 산화질소 생성량이 증가하는 것을 알 수 있었다. DEHP와 DBP는 1.17-6.88 μmols/10⁹, S9을 넣었을 때는 19.16 - 142.9 μmols/10⁹으로 보다 높은 수치를 나타냈으며, 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다. 대사물질 중에서는 2-EHA와 MBP는 2.5-31.8 μmols/10⁹ 사이에 유사한 값을 나타냈으며, MEHP는 400 μM 농도에서 528.7 μmols/10⁹의 가장 높은 생성량을 나타내었다.

Table 2. Production of nitric oxide by TK6 cells treated with phthalate.

| NO [•] ($\mu\text{mols}/10^9$) | 0 | 200 | 400 | 800 |
|--|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| DEHP | 1.2 \pm 1.27 | 3.4 \pm 1.38 | 3.4 \pm 0.61 | 3.5 \pm 1.28 |
| DEHP+S9 | 19.2 \pm 1.86 [*] | 66.7 \pm 9.91 [*] | 108.3 \pm 12.81 [*] | 132.7 \pm 27.18 [*] |
| MEHP | 3.9 \pm 1.6 | 92.3 \pm 37.86 | 528.7 \pm 99.65 [*] | - |
| 2-EHA | 4.2 \pm 4.58 | 17.0 \pm 4.6 [*] | 31.8 \pm 0.0 [*] | - |
| DBP | 2.2 \pm 1.11 | 3.5 \pm 1.2 | 4.5 \pm 0.47 | 6.9 \pm 3.98 |
| DBP+S9 | 21.5 \pm 2.62 [#] | 65.9 \pm 24.0 [#] | 86.1 \pm 23.47 [#] | 142.9 \pm 5.35 [#] |
| MBP | 2.5 \pm 0.8 | 11.5 \pm 7.29 | 30.4 \pm 8.26 [#] | - |

The data are expressed as the mean \pm SD of three experiments. ^{*} $p < 0.05$ compared to DEHP and [#] $p < 0.05$ compared to DBP by Student's t-test.

4) DEHP, DBP와 대사물질에 의한 ROS의 생성량 측정

세포 내 ROS 생성량을 측정하기 위해서 세포 내 ROS의 양을 측정할 수 있는 지표로 사용되는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate라는 형광물질을 사용하였다. H₂DCFDA는 ROS에 의해 산화되어 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 변환되어 형광을 나타내게 된다[38]. 이에 본 실험에서는 H₂DCFDA 시약을 사용하여 ROS의 생성량을 측정하였다. DEHP와 DBP는 0, 400, 800 μ M의 농도로 ROS 생성량을 측정하였으며, S9를 처리하지 않았을 때 control에 비교한 값은 최대 8-13 %, S9를 처리하였을 때는 최대 31-34 %로 4배가량 높은 ROS 생성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한 S9를 첨가하여 처리하였을 때 통계적으로 유의하게 증가함을 알 수 있었다. 대사물질인 MEHP, 2-EHA와 MBP에서의 ROS 생성량을 살펴보면 각 control에 비교하여 통계적으로 유의하게 농도 의존적으로 증가하였으나 control에 비교한 값이 50 %가 넘는 MEHP와 MBP에 비해 2-EHA는 40 %로 보다 적은 ROS 생성량을 나타내었다.

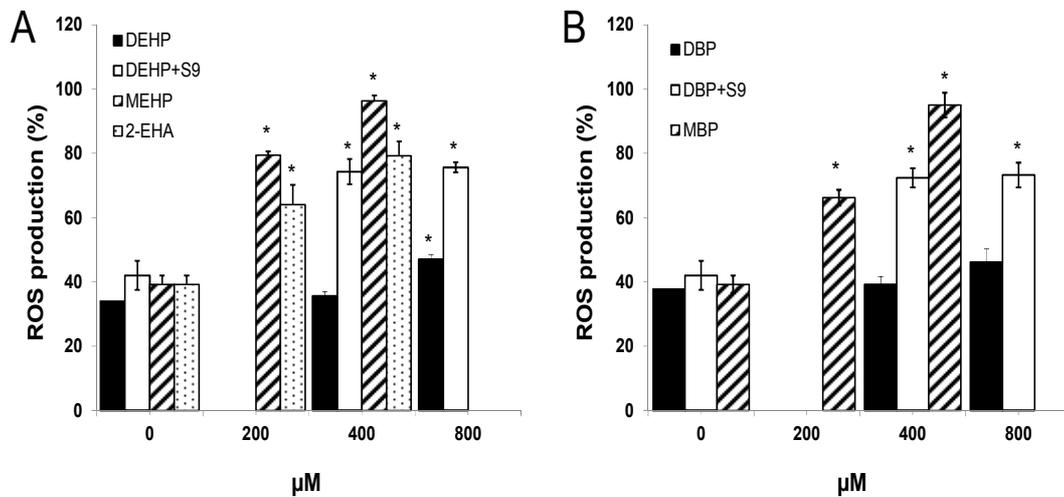


Fig. 6. Effect of phthalate on ROS levels in TK6 cells.

TK6 cells were exposed to DMSO or phthalate *in vitro* and subjected to *in vitro* ROS assays to measure ROS levels. After being treated for 6 or 1h, TK6 cells were collected for H₂DCFDA staining. (A) shows DEHP (-/+S9), MEHP, 2-EHA. (B) shows DBP (-/+S9) and MBP. The data are expressed as the mean \pm SD of three experiments. * $p < 0.05$ compared to untreated group by Student's t-test.

2. PART2. MEHP에 노출된 TK6 세포에서 일어나는 세포사멸 기전 분석

PART1.에서는 DEHP, DBP와 이에 대한 대사산물인 MEHP, 2-EHA 및 MBP의 독성유발 기전에 대해서 살펴보았다. 그 결과 DEHP, DBP보다 MEHP, 2-EHA 및 MBP에서 TK6 세포에서 유전독성을 유발하는데 높게 관여하는 것을 알 수 있었다. 대사산물인 MEHP, 2-EHA 및 MBP를 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정할 예비실험을 통해 세포독성을 확인한 결과 MEHP에서 세포 사멸률이 가장 높게 나타났고, 2-EHA와 MBP에서는 MEHP보다 현저하게 낮은 세포 사멸률을 나타내었다. 그러므로 대사산물 중에서 MEHP를 처리하였을 때 TK6 세포에서 발생하는 apoptosis 기전을 분석하였다.

1) MEHP 노출이 세포 생존율에 미치는 영향

DEHP의 1차 대사산물인 MEHP를 노출되는 시간에 따라 세포에 미치는 영향을 조사하기 위해서 24시간 동안 여러 농도를 노출시켜 30-35 %의 세포 생존율을 나타내는 농도를 설정하였다. 선택된 농도를 노출시간의 증가에 따른 세포 생존율을 측정하였다. 세포를 1×10^6 cells/well 의 밀도로 horse serum이 첨가된 배지를 사용하여 6 well plate에 배양하였고 MEHP를 세포에 직접 처리하였다. 처리시간 후 새로운 배지로 교체하고 하루 동안 안정화 시킨 후 trypan blue exclusion 방법을 사용하여 생존율을 계산하였다. 그 결과로 세포 생존율이 농도의존적으로 유의하게 증가함을 알 수 있었고, 400 μ M의 농도에서 35 %의 세포 생존율을 나타내었다. 이 후 400 μ M의 MEHP를 24, 48, 72시간 동안 처리한 결과 시간이 증가함에 따라 세포 사망률이 통계적으로 유의하게 증가하였다.

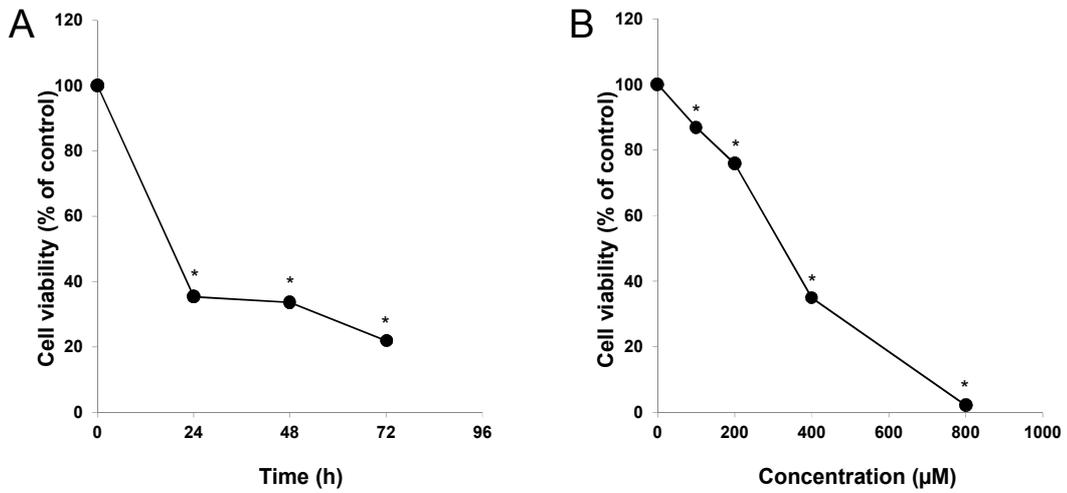


Fig. 7. Effect of MEHP exposure on TK6 cell, as determined by trypan blue exclusion.

(A) Survival of TK6 cells after treatment with MEHP for 24, 48 and 72h in TK6 cells. (B) Cell viability in TK6 cells exposed to MEHP for 24h. Results are presented as a percentage of control cells. The data are expressed as the mean \pm SD of three experiments. * $p < 0.05$ compared to the control by Student's t-test.

2) MEHP에 의한 NO• 생성량 측정

TK6 세포에서 MEHP를 시간별로 처리하였을 때 발생하는 NO• 생성량을 측정하였다. MEHP를 24, 48, 72시간 처리하였을 때 15.2, 27.7, 97.8 $\mu\text{mols}/10^8$ 으로 24, 48시간은 비슷한 수치를 나타내었으며, 72시간을 처리하였을 때 24, 48시간보다 3.5-6.4 배가량 높은 수치가 나타났다. 또한, 통계적으로 유의성을 검증한 결과 시간 의존적으로 유의하게 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig 8).

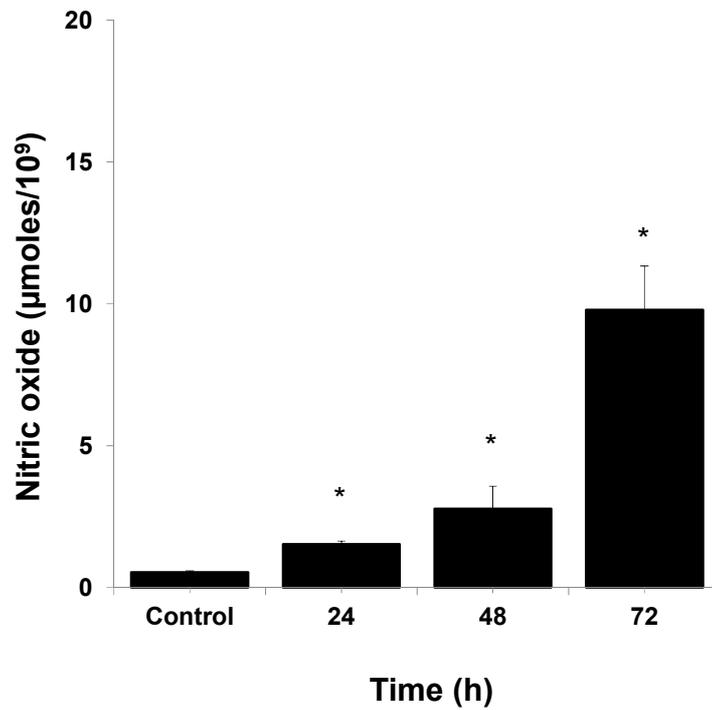


Fig. 8. Effects of MEHP on cellular NO[•] level in TK6 cells.

Cells were treated with 24, 48, 72h of MEHP at 400 µM. Detection of NO[•] using griess reagents. The significant increased in NO[•] production was detected in treated cells compared to control untreated cells. The data are expressed as the mean ± SD of three experiments. **p* < 0.05 compared to the control by Student's t-test.

3) MEHP를 처리한 TK6 세포에서의 NOS mRNA 발현

RT-PCR을 사용하여 MEHP를 처리한 TK6 세포의 nNOS, iNOS 및 eNOS의 발현을 조사하였다. 그 결과 iNOS와 eNOS에서 시간 의존적으로 확실히 발현의 증가를 보였지만, nNOS는 시간변화에 큰 차이를 나타내지 않고 거의 일정한 발현 상태를 나타내었다(Fig 9). NOS 발현은 앞서 살펴보았던 NO[•]의 측정결과와 일치하게 시간 의존적인 증가를 나타내는데 이는 NO[•] 생성량의 변화가 산화질소 합성효소인 NOS의 발현량과 관계가 있다는 것으로 판단된다.

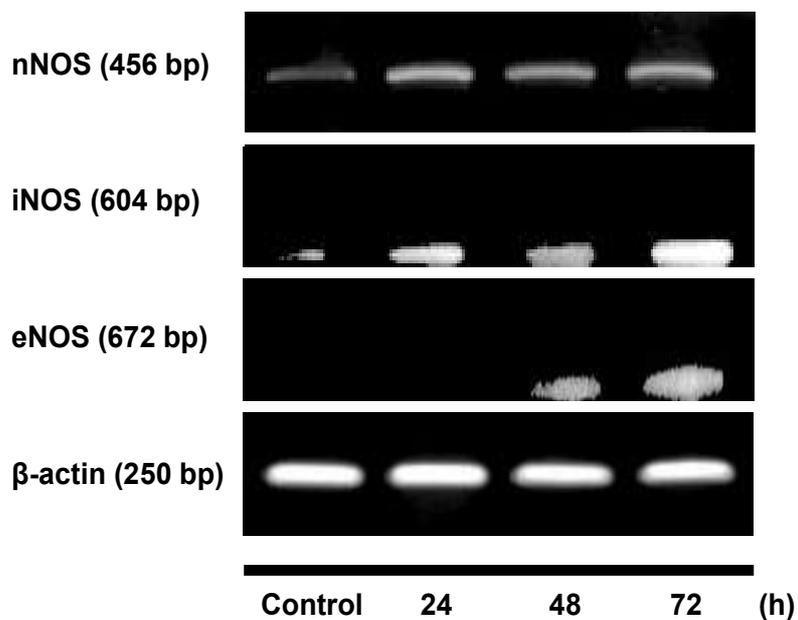


Fig 9. Effects of MEHP on NOS mRNA expression in TK6 cells.

Expression of NOS mRNA in TK6 cells were detected by RT-PCR. Representative RT-PCR products for nNOS, iNOS, eNOS and β -actin are shown. RT-PCR products were separated on 1.5 % agarose gel and stained with EtBr.

4) MEHP를 처리한 TK6 세포 내에서의 ROS의 생성량 측정

MEHP가 시간별로 TK6 세포에 미치는 ROS 양을 측정하였다. Fig 10.에서 볼 수 있듯이 MEHP 400 μ M을 24, 48, 72시간으로 처리하여 ROS 생성량을 측정하였고, 각 72.7 %, 81.7 %, 91.2 %의 수치로 통계적으로 유의하게 증가하였다. 세포 내, 외부로 자극하는 데미지로 인해 발생하는 ROS로 인해 DNA 및 미토콘드리아의 손상을 야기하여 apoptosis 유발에 관여하므로[39] 이러한 결과는 TK6 세포의 apoptosis 유발에 관여함을 알 수 있다.

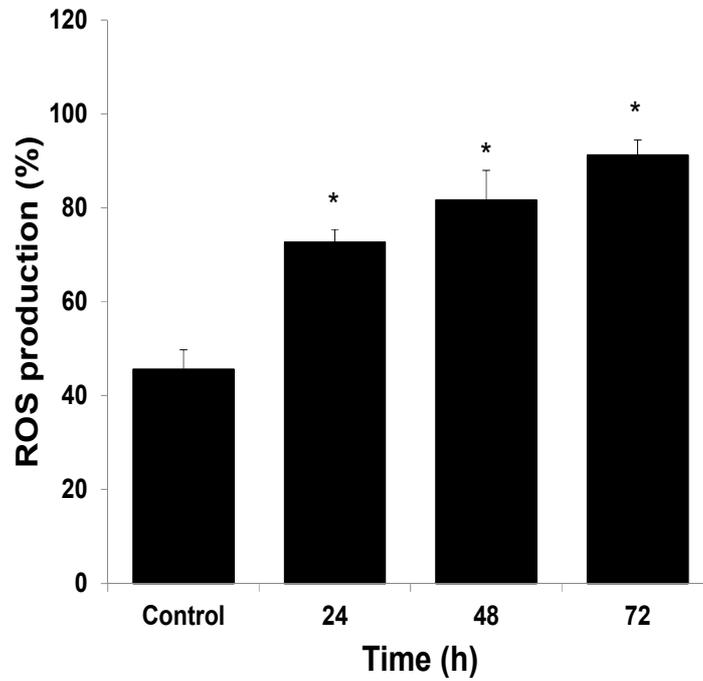


Fig. 10. Effects of MEHP exposure on TK6 cells ROS production.

Induction of ROS production after 24, 48 and 72h of exposure to MEHP in TK6 cells. Detection of ROS using H₂DCFDA dye. The data are expressed as the mean ± SD of three experiments. **p* < 0.05 compared to untreated group by Student's t-test.

5) Annexin V-FITC와 PI 염색에 의한 TK6 세포에서의 apoptosis 분석

Annexin V-FITC와 PI로 이중 형광 염색하여 apoptosis 유발 정도를 측정하였다. Apoptosis가 발생하게 되면 세포질 쪽에 위치하고 있던 phosphatidyl serine (PS)이 세포막 바깥쪽으로 노출되게 되는데, 이 때 annexin V는 PS에 선택적으로 결합하여 형광을 나타내게 된다. 또한, propidium iodide (PI)는 세포 안의 핵과 결합하여 형광을 나타내므로 PI 형광의 증가량을 통해 세포의 손상을 알 수 있다[28]. 이러한 원리를 토대로 TK6 세포에 노출된 MEHP에 의해 발생하는 apoptosis의 양을 측정하였다. TK6 세포에서 MEHP를 400 μ M 농도로 24, 48, 72시간 동안 처리한 후에 새로운 배지로 교체하고 overnight 하여 안정화를 시킨 후 Annexin V-PI staining을 통해 분석하였으며, MEHP에 의해 나타난 세포사멸이 시간에 따라 증가하는 경향을 나타내는 것을 확인하였다. Fig 11.에서 확인할 수 있듯이 MEHP를 24, 48, 72시간 동안 처리했을 때 세포가 오른쪽에서 증가하고, 수치화 하여 나타내었을 때 apoptosis는 36.0 %, 57.8 %, 71.9 %로 시간 의존적으로 증가하였고 통계적으로 유의함을 알 수 있었다.

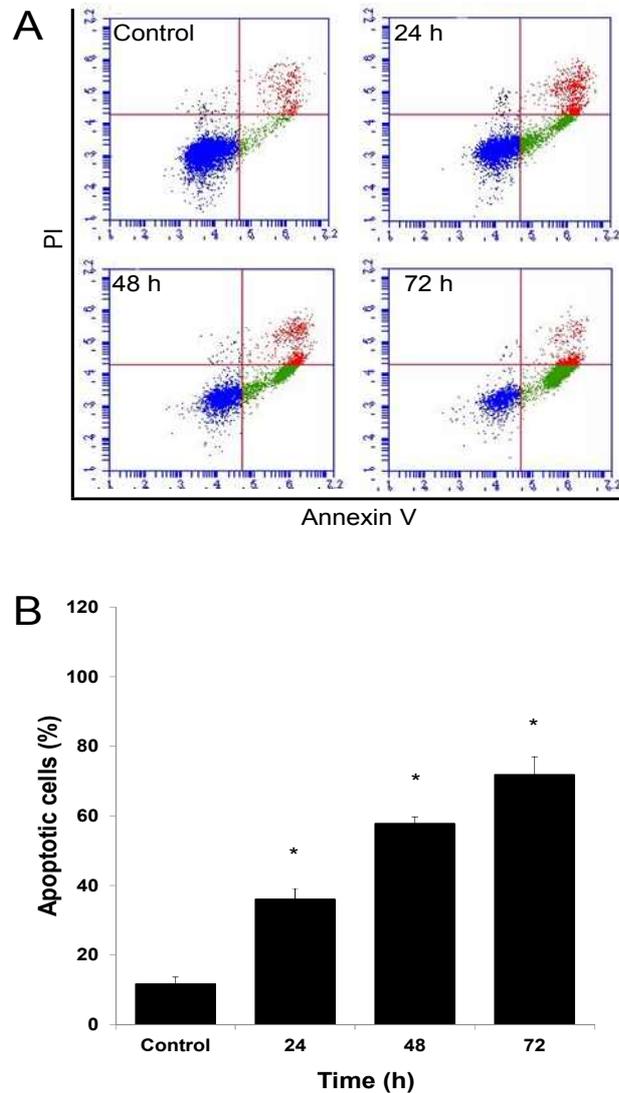


Fig. 11. Apoptosis of MEHP determined by flow cytometry assays.

Annexin V flow cytometry assay was performed to visualize the extent of programmed cell death in the control group and groups treated with MEHP. After being treated for 24, 48, 72h, TK6 cells were collected for Annexin V-FITC and PI staining followed by flow cytometry analysis. (A) shows flow cytometric plots. (B) shows flow cytometric analysis result. Each values is the mean \pm SD of three experiments. * $p < 0.05$ compared to control by Student's t-test.

6) MEHP가 IAP family 발현에 미치는 영향

Apoptosis 조절인자 중에서 IAP family에 속하는 인자들이 caspase와 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptosis 활성을 억제 할 수 있는 것으로 밝혀져 있다 [40]. 따라서 MEHP에 의해 유도된 apoptosis 기전을 분석하기 위하여 IAP family인 survivin, XIAP, cIAP-1 그리고 cIAP-2의 발현 양상을 mRNA 수준에서 탐색하였다. 그 결과 Fig 12.에서 나타난 바와 같이 cIAP-1을 제외한 survivin, XIAP 그리고 cIAP-2의 발현량이 저해된 것을 볼 수 있었다. 시간에 따라 나타나는 발현 양상을 비교하였을 때 MEHP를 24, 48시간 처리를 했을 경우는 control에 비해 차이가 없는 것을 확인하였고, 72시간을 처리했을 때 눈에 띄게 감소하는 경향을 보였다.

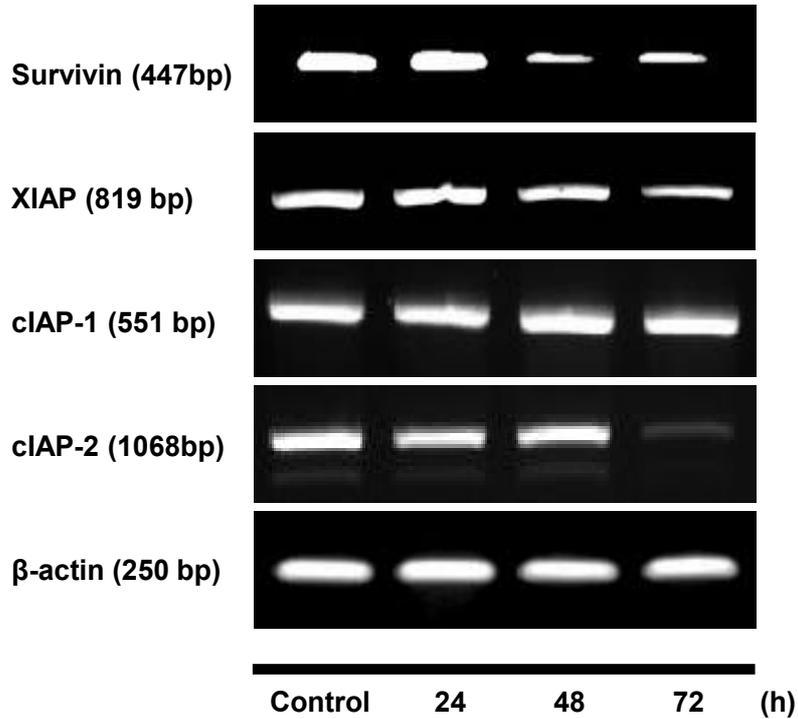


Fig. 12. Effect of MEHP on IAPs family expression.

Cells were treated with 24, 48, 72h of MEHP at 400 μ M and thereafter the expression of survivin, XIAP cIAP-1 and cIAP-2 mRNA was analyzed by semiquantitative RT-PCR. As internal controls, β -actin used. The resulting cDNAs were subjected to PCR with the indicated primers, and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1.5 % agarose gel and visualized by EtBr staining.

IV. 고 찰

환경호르몬이라 불리는 내분비 교란물질에 의해 유발되는 생식기능 저하, 기형, 성장장애, 면역기능 저하, 암 등 생물체에 미치는 영향들에 대하여 논란이 되고 있다. 동물실험을 통해서 표적 기관인 생식계에 미치는 영향에 대한 연구는 이루어졌으나 사람의 생체 내에서도 나타나는 가능성에 관해서는 명확하게 밝혀진 바가 없다. 또한, 현재까지 연구된 내분비교란 작용을 나타낸 물질들은 작용 범위 및 손상 정도가 일정하지 않았기에 다양한 내분비계 교란물질이 인체 내에서 일어나는 손상과 작용 범위를 확실하게 이해할 수 있는 자료를 위한 연구가 이루어져야 할 필요가 있다[11, 41].

내분비 교란물질 중에서 문제가 되고 있는 phthalate류의 DEHP와 DBP에 대한 연구를 진행하게 되었으며, 이러한 물질들은 플라스틱 가소제로서 일상생활에서 많이 쓰여 쉽게 노출될 수 있다. 또한, 동물실험을 통해 암 유발과 간 손상 및 남성 생식기관에 영향을 미치는 것을 확인하였으며, DBP는 일종의 가스로 공기 중에서 포함되어 계속적으로 노출 될 수 있다[10, 42, 43]. DEHP와 DBP는 생체 내로 유입되면 다양한 물질로 대사되는데 DEHP는 주로 MEHP로 전환되고 일부 2-EHA로 전환되며, DBP는 MBP로 대사된다[44]. 본 화합물뿐만 아니라 생체 내로 유입되었을 때 변환되는 대사산물을 통해 발생하는 문제점에 대한 연구를 진행할 생각이다. 현재 인간 체내에서 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구 진행은 미흡한 실정이다. 그래서 본 실험에서는 phthalate가 인간 림프아성 TK6 세포에 노출되었을 때 미치는 영향을 돌연변이성 및 세포사멸 기전을 통해 살펴 보았다.

Phthalate를 TK6 세포에 농도별로 처리하여 세포 생존율을 측정한 결과 DEHP와 DBP는 S9를 함께 처리한 경우 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이에 대한 대사산물인 MEHP, 2-EHA와 MBP를 농도별로 처리하였을 때 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 특히, MEHP에서 가장 높은 사멸률을 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 유해물질인 phthalate의

노출로 인해 발생하는 문제는 생식계를 비롯한 신경계 및 발암유발 등 건강에 심각한 문제를 끼친다. 이에 대한 문제발생 중에서 DEHP의 노출이 암을 유발하는데 관여함을 알 수 있는데 이는 간세포, 고환세포, 백혈구 세포, 유방암 세포 및 여러 세포 신호 경로를 포함하여 다양한 세포 유형에서 DEHP가 의존적으로 독성을 유발하는데 기여하기 때문이다. 또한 자궁내막암 세포인 Ishikawa 세포주의 생존율을 증가시켜 자궁내막증을 유발할 수 있다고 확인하였다[45, 46 47]. 최근에 역학 연구에서 환경 내에서 내분비 장애의 증가와 고환암으로 인한 남성의 불임 발생률 증가, 정액의 질 저하, 고환 및 고지혈증과의 상관관계를 확립하였다. Onorato 등[48]의 연구에서는 GC-2 세포(정자형성 세포)에서 MEHP를 처리하였을 때 농도의존적인 감소를 보였으며, phthalate는 이들 연구에 의해 지적되는 화학물질 중 하나로 phthalate 에스테르에 노출로 인한 설치류의 정자 수 감소가 검증되었다[49]. 결과적으로 phthalate와 phthalate 에스테르의 노출은 많은 연구 결과를 통해 암 세포의 성장을 야기하는 것을 알 수 있었고 본 실험을 통해 인간 림프아성 TK6 세포의 성장 또한 저해함을 확인할 수 있었다.

Phthalate에 노출된 TK6 세포의 생존율의 감소의 원인을 파악하기 위해서 *HPRT* 및 *TK1* 유전자에서 돌연변이 유발성을 조사 하였다. *HPRT*와 *TK1* 유전자에서의 돌연변이 빈도는 농도 의존적인 증가를 보였으며, 이러한 결과는 세포 생존율과 상이한 결과를 나타내었다. 또한, DEHP와 DBP 보다 S9를 첨가한 경우와 대사물질에 노출되었을 때 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었다. 발암물질 중 하나인 1,2,3,4-diepoxybutane (DEB)를 인간 림프아성 TK6 세포에 처리하였을 때 *HPRT* 유전자에서 DEB에 대한 돌연변이 발생률을 검사 하였다. 24시간 동안 농도별로 DEB를 처리한 결과 4 μ M에서 약 10 %의 상대 생존율을 나타내었고, *HPRT* 유전자의 돌연변이 빈도는 DMSO를 처리한 결과보다 5배가량 높게 나타났다[50]. 이에 나타난 세포 생존율의 감소와 돌연변이 유발의 증가는 TK6 세포에 phthalate를 처리한 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내므로 두 실험결과의 상관관계가 있는 것으로 사료되며, phthalate가 돌연변이에 의해 유전 독성을 유도 할 수 있는 돌연변이 유발 발암물질로 판단된다. *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU)은 다양한 돌연변이 시험 시스템에서 가장 강력한 돌연변이 중 하나로, 유전 독성 연구를 위한 양성 제어 물질 및 다양한 유기체에

서 새로운 돌연변이를 유발하는 수단으로 사용되어왔다. 이는 마우스 림프종 세포에서 많은 돌연변이를 유도하는 것으로 나타났으며, *TK* 돌연변이 유도는 용량에 따라 돌연변이 빈도의 증가가 관찰되었다. 또한 ENU를 마우스 림프종 세포에 처리하였을 때 *HPRT* 유전자보다 *TK* 유전자에서 2배가량 더 높은 돌연변이를 초래한다는 것을 발견 하였다[20]. TK6 세포에 NO^\bullet 노출로 인한 *HPRT*와 *TK1* 유전자 돌연변이의 발생률에서도 대조군에 비해 *HPRT*와 *TK1*의 유전자 돌연변이 발생이 높게 나타났고, 서로 비교하였을 때 *TK1* 유전자에서 돌연변이 발생률이 *HPRT* 보다 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다[51]. 이는 반접합성의 *HPRT* 유전자와 달리, 이형접합성의 기능을 가진 *TK* 유전자의 특징 때문으로 보인다. TK^+ 대립 유전자는 유사 분열 재조합으로 인해 소실되거나 돌연변이체 세포가 *HPRT* 돌연변이에 치명적인 큰 DNA 결실에도 생존 할 수 있는 특징을 가지고 있다[20, 52]. 본 실험결과에서는 *HPRT* 유전자에서 보다 *TK1* 유전자에서 돌연변이 발생이 400 μM 에서 MBP를 제외한 모든 시험물질에서 1.0 - 1.5 배가량 높은 것을 확인할 수 있었는데, 이는 설명된 유전자의 기능의 차이 때문으로 판단된다.

산화 스트레스는 ROS와 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)의 발생과 항산화 방어계간에 심각한 불균형이 발생하는 경우를 말한다. ROS는 산소기 (oxygen radical) 뿐만 아니라 산소의 비자유기 유도체 (non-radical derivatives of O_2)를 총칭하고 superoxide, hydrogen peroxide 및 lipid peroxyl radical 등을 포함하며 염증반응, 고혈압 및 고지혈증에서 세포 신호전달 과정을 매개하고 직접적으로 조직 손상을 유발하며 혈관 기능을 저하시킨다. NO^\bullet 는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 산소와의 자동산화 반응을 통해 N_2O_3 를 생성하여 RNS를 유도하며[23], 과량의 NO^\bullet 가 발생할시 세포사멸, 패혈성 쇼크, 당뇨병 등의 여러 질환을 야기한다. 또한, NO^\bullet 는 ROS에 포함된 superoxide와의 반응으로 강력한 산화물질인 peroxynitrite (ONOO^-)를 형성하여 산화 염증 손상에 기여한다. 이렇듯 NO^\bullet 와 ROS의 생화학적 작용은 조직 병리와 연관이 있다[53].

본 실험결과 시험물질들의 NO^\bullet 와 ROS의 생성량을 살펴보면 세포 사멸률의 증가에 비례하여 농도 의존적으로 증가하였다. NO^\bullet 의 생성량은 400 μM 에서 각 parents compound와 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였고, ROS 생성은 각

control과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였다. ROS의 생성량을 살펴보면 NO[•]의 생성과 유사한 경향으로 MEHP에서 가장 높게 나타났다. 이는 ROS가 지질과산화물, 할로겐화산소, 내피유래 이완자로서 넓게 NO[•]를 포함하므로 시험 물질의 NO[•]와 ROS 생성량이 관련이 있는 것으로 보인다[22].

NO와 ROS의 생성량을 동물과 세포를 통한 실험 결과를 통해 살펴보면 DEHP에 노출된 수컷 마우스에서의 고환조직에 대한 NO[•] 생성량을 검사하였을 때 control에 비해 약 2배가량 증가한 것을 알 수 있었다[54]. DEHP와 DBP로 처리된 잉어 식세포의 NO[•] 생성량은 각각 1, 10 nM 농도, 100, 1000 nM 농도에서 NO[•] 생성량이 유의하게 증가하는 것을 나타내었으며[55], mouse-derived pluripotent neural progenitor cells (NPCs)에 DBP를 처리하였을 때 농도 의존적으로 증가하였다. 또한, NPC 세포에 DBP 노출로 인해 ROS 생산 및 미토콘드리아 기능 장애를 유도함을 시사하였다[56]. 또한, 대식세포주 RAW264.7 세포에서 MEHP를 처리결과 농도 의존적인 증가를 보였다[57]. 다양한 동물과 세포에서 phthalate의 노출에 의해서 상당히 많은 NO[•]와 ROS의 생성을 야기하고, 이로 인해 면역 장애를 일으켜 다양한 염증성 질환이 유발된다. 본 실험에서 또한 낮은 수치의 NO[•]와 ROS 생성량을 보이므로 이러한 문제점이 발생할 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구는 phthalate의 노출이 TK6 세포에서 세포 독성 및 변이 원성을 유도하고 NO[•]와 ROS의 생성량을 증가시켜 염색체 손상 및 DNA에 손상을 유발하는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 phthalate의 노출에 의해서 생체 내에서 어떠한 영향을 미치는지 동물과 세포 실험의 자료를 통해 예측 가능하지만 직접적으로 일어나는 반응에 대한 변수가 있어 자료에서와 같은 문제의 발생이 나타나는지 불확실하므로 유전 독성과의 잠재적 관련성을 밝히기 위해 본 실험을 통한 기초자료를 토대로 심화적인 추가연구가 필요하다고 사료된다.

MEHP는 DEHP가 체내로 들어가서 효소에 의해 활성 대사산물로 가수분해된 것이며, DEHP와 마찬가지로 여러 체외 연구에서 생식 조직의 구조와 기능에 악영향을 미치는 것으로 밝혀졌다[58]. 본 연구에서는 두 가지 phthalate와 그에 대한 대사산물에 관한 연구결과를 통해 나타난 가장 높은 독성효과를 나타낸 물질인 MEHP를 선택해서 시간에 따른 독성효과를 살펴보기 위해 실험을 진행

하였다. MEHP의 농도는 24시간 동안 농도를 다르게 처리하여 안정화 시킨 후 세포 생존율을 측정된 결과에서 35 %의 세포 생존율을 나타낸 농도를 지정하였다. TK6 세포에 지정된 농도를 24, 48, 72시간 동안 직접적으로 처리하고 overnight 하여 안정화시킨 뒤 세포 생존율, NO[•]와 ROS 생성을 측정, apoptosis 분석, RT-PCR 분석 실험을 통해 세포 독성의 기전을 분석하였다.

MEHP가 35 %의 생존율을 나타내는 농도는 400 μ M로 24, 48, 72시간 동안 처리하였을 때 24, 48시간의 생존율은 유사하였고 72시간을 처리하였을 때 현저하게 줄어드는 것을 확인하였다. 산화질소는 L-arginine이 L-citrulline로 변환되는 과정에서 NOS에 의해 생성되는데, 이 과정을 매개하는 합성효소는 eNOS, nNOS, iNOS이며, 발생량에 따라 apoptosis를 증진 또는 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[23, 24, 33]. 이에 griess reaction으로 NO[•] 생성량을 측정하고 RT-PCR 방법을 통해 eNOS, nNOS, iNOS의 발현양을 확인한 결과 TK6 세포에서 NO[•] 생성량은 세포 생존율과 유사한 경향으로 24, 48시간의 NO[•] 생성량은 비슷하였고 72 시간을 처리한 결과는 control에 비해 약 4-5배 정도 높게 나타났다. RT-PCR로 측정된 NOS의 발현량을 나타낸 결과에서 iNOS, eNOS는 NO[•]의 생성량과 유사하게 72시간에서 상당한 증가를 보였다. 또한, MEHP 노출에 대한 ROS 측정량 또한 NO[•]의 증가와 같이 시간 의존적으로 생성량이 증가하였다. MEHP는 다른 세포에서도 ROS 생성량의 증가를 나타내었는데 CD-1 mice의 난소에서 분리한 antral follicles에서 MEHP를 96시간 동안 노출시켰을 때 ROS 생성량이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다[58]. Zhang 등[59]의 논문에서는 랫트를 공여자로 사춘기 전의 sertoli 세포를 수득하여 MEHP 노출에 의해 미치는 영향을 확인한 결과 sertoli 세포에서 MEHP를 여러 농도로 24, 48시간 동안 노출시켰을 때 세포 증식 억제 비율이 증가할 뿐만 아니라 48시간 동안 처리한 농도별 ROS 생성량 또한 증가시켰다. 즉, 높은 노출량의 MEHP는 세포 내 ROS 수준을 증가시켜 sertoli 세포 증식을 방해함을 알 수 있었다. 또한, ROS의 생성량 수준은 생물학적 시스템에서 산화 스트레스의 직접적인 지표로, ROS의 증가는 산화적 스트레스를 초래하여 DNA 및 미토콘드리아의 손상을 일으켜 apoptosis를 유발할 뿐만 아니라 암, 동맥경화, 고혈압, 당뇨병, 노화, 치매 등의 질병을 야기하는 것으로 보고된다[7, 39, 27]. 이렇듯 MEHP는 농도,

시간 의존적으로 인간 세포 및 동물 세포에 영향을 미치며 ROS의 발생으로 인해 세포가 영향을 받아 사멸률이 증가하는 것으로 판단된다.

Annexin V 염색은 세포사멸사의 초기에 세포막 내에 위치하였다가 세포막 바깥표면으로 전위되는 phosphatidylserine에 높은 친화력을 가지고 결합하는 annexin V-Fluorescein의 성질을 이용한 apoptosis 판정 방법이다. 초기 단계의 apoptosis가 진행 중인 세포는 annexin V-Fluorescein에만 염색되고 PI로는 염색되지 않는 반면, 후기단계의 apoptosis가 진행 중인 세포 또는 necrosis가 진행 중인 세포들은 annexin V-Fluorescein과 PI로 동시에 염색되며, 살아 있는 세포는 어느 것에도 염색되지 않는 양상을 나타낸다[60, 61]. 설명된 Annexin V-PI staining을 이용하여 유세포 분석기를 통해 MEHP 처리에 의한 TK6 세포의 apoptosis를 측정 한 결과는 late apoptosis와 early apoptosis를 더해서 나타내었으며, 시간이 지날 수록 통계적으로 유의하게 증가하여 보다 높은 수치를 나타내었다.

Lin 등[62]의 논문에서 MEHP에 의해 노출된 고환 세포의 생존율은 감소하였고, annexin V 염색 및 caspase-3 분석에 의해 apoptosis의 수치가 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 MEHP 노출에 의해 세포 증식률의 억제와 ROS 생성률의 증가를 나타낸 sertoli 세포에서 apoptosis를 증가시키는 경향을 나타내었으며, 이는 MEHP가 sertoli 세포의 세포 골격 및 단단한 접합을 방해하고 세포 기능 손상을 야기하는 것으로 확인되어 생식 세포로부터의 분리와 apoptosis의 증가를 나타낸 것으로 보인다[59]. 그러므로 TK6 세포에서 결과 MEHP는 세포 사이를 방해하여 골격을 무너뜨리고 기능의 손상을 야기하여 apoptosis를 발생시키는 하나의 원인으로 작용한다고 생각된다.

Apoptosis 조절에 관여하는 여러 인자들 중 IAP family는 생체 내에서 매우 중요한 anti-apoptotic 활성을 보이는 단백질이다. 세포의 사멸을 조절하는 역할 이외에 nuclear factor-kappaB (NF- κ B)활성화 신호경로, 세포주기조절 등 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 IAP는 caspase와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있을 것으로 밝혀져 IAP family들의 잠재적인 역할에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서 MEHP 처리에 의한 TK6 세포의 apoptosis 유발에 XIAP, cIAP-1, cIAP-2 그리고 survivin이 관여하는지의 여부를 조사하였다[30, 31, 40]. TK6 세포에서 MEHP 처리에 의한 apoptosis 유발

에 IAP family와 연관이 있는지 발현양상을 살펴본 결과 survivin, XIAP, cIAP-2의 발현량이 시간이 지남에 따라 현저히 감소하였다. Li 등[63]의 논문을 살펴보면 TK6 세포에서 NO•를 처리한 경우 IAP family 단백질 XIAP, cIAP-1 및 survivin이 TK6세포의 기능적 p53에 의해 발현의 하향 조절되는 것을 확인하여 TK6 세포에서 p53 의존성 apoptosis 반응에서 중요한 중개자임을 설명하였다 [63, 64]. 이는 MEHP 처리에 의한 apoptosis 유발에서 TK6 세포에서 p53에 의해 IAP family의 부분적 발현저하가 나타나고, caspase의 결합조절을 통하여 apoptosis의 활성을 조절하는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해서 보면 TK6 세포를 대상으로 MEHP의 독성작용을 살펴본 결과, MEHP 처리 시간에 따라 TK6 세포의 사멸률이 증가하였고, 이는 apoptosis 유발과 관련이 있었다. NO•의 생성량 측정과 유세포 분석기를 통한 ROS의 발생량 및 apoptosis 발생의 증가, NOS의 증가와 IAP family 단백질의 분석을 통하여 확인하였다. 이러한 결과들은 일상생활에서 흔히 노출되는 phthalate의 위험성을 부각하고 phthalate가 인체에 미치는 영향에 관한 연구의 기초 자료가 될 수 있을 것이다.

V. 참고 문헌

1. Park, C. J., Kim, W. and Gye, M. C. 2015. Safty of Alternatives for Endocrine Disrupting Substances. *Korean J. Environ. Biol* 33(4), 361-374.
2. Lee, C. W., Choi, K. H., Jeong, S. W., Kim, H. L. and Seo, Y. R. 2009. An Overview and Future Perspective on Endocrine Disruptors. *Endocrinology and Metabolism* 24(1), 7-14.
3. Wang, E. H., Lee, K. H., Yang, K. H., Lee, J. S., Jung, E. S., Kang, C. S. and Choi, Y. J. 2004. The Apoptotic Molecular Changes of Cellular Injury in Mouse Testis Induced by Endocrine Disrupting Chemicals. *The Korean Journal of Pathology* 38, 228-237.
4. Kim, W. and Gye, M. C. 2017. Maleficent Effects of Phthalates and Current States of Their Alternatives: A Review. *J. Environ. Biol* 35(1), 21-36.
5. Shin, H. S., Shin, J. H. and Ahn, Y. G. 2012. Distribution Levels of Phthalates and Di-2-ethylhexyladipate in Domestic Environment. *Korean J Community Living Sci* 23(4), 411-418.
6. Yang, J. Y., Shin, D. C., Lee, S. E., Lee, G. W., Kim, J. H., Lee, Y. J. and Lim, Y. W. 2018. Study on the Indoor Exposure Factors of Phthalates using Bio-monitoring data. *J. Odor Indoor Environ* 17, 315-321.
7. Eom, J. H., Chung, S. T., Lee, J. K., Park, J. H., Kwon, T. W., Kim, J. Y., Oh, H. Y. and Kim, H. S. 2002. Developmental Immunotoxicity in SD Rat Pups Exposed by Di (n-butyl) Phthalate through Pre and Postnatal. *J.*

Toxicol. Pub. Health 18, 401-409.

8. Kho, Y. L., Jeong, J. Y., Choi, K. H. and Kim, P. G. 2008. Determination of Phthalate Metabolites in Korean Children's Urine by High Performance Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *J. Env. Hlth. Sci* 34, 271-278.

9. Hong, S. K., Nam, H. S., Jung, K. K., Kang, I. H., Kim, T. S., Cho, S. E., Jung, S. H., Lee, J. W., Kim, J. C., Kho, Y. L. and Kang, T. S. 2010. Development and Validation of On-line Column Switching HPLC-MS/MS Method for 10 Phthalate Metabolites in Human Urine. *J. Env. Hlth. Sci* 36, 510-517.

10. Lee, S. Y., Kim, S. J., Lee, S. H., Park, Y. S., Park, B. K., Kim, B. S., Kim, S. K., Choi, C. S., Yoon, S. I., Kim, J. S., Jung, J. W. and Jung, J. Y. 2007. The Estrogenic Effects of Phthalates (DEHP, DBP) in MCF-7 Cell. *Journal of Food Hygiene and Safety* 22(3), 209-212.

11. Song, J. Y., Cho, Y. H., Kim, Y. J. and Chung, H. W. 2005. Genotoxicity of Di-2-Ethylhexyl phthalate, 2-EthylHexanoic Acid and Di-2-Ethyl Phthalate in Human Lymphocytes in vitro. *Environmental Mutagens & Carcinogens* 25(3), 110-117.

12. Song, M. H., Cho, Y. D., Choe, E. K. and Myoung, Y. C. 2012. Study on Verification of Various National Standards Regarding Phthalate Testing in Industrial Products. *Analytical science & technology* 25(3), 178-189.

13. Xu, Y., Cook, T. J. and Knipp, G. T. 2005. Effects of Di-(2-Ethylhexyl)-Phthalate (DEHP) and Its Metabolites on Fatty Acid

Homeostasis Regulating Proteins in Rat Placental HRP-1 Trophoblast Cells. *Toxicological sciences* 84, 287-300.

14. Wang, Y., Zhu, H. and Kannan, K. 2019. A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. *Toxics* 7(2), 21.

15. Benjamin, S., Kamimura, N., Takahashi, K. and Masai, E. 2016. *Achromobacter denitrificans* SP1 Efficiently utilizes 16 phthalate diesters and Their Downstream Products through Protocatechuate 3,4-cleavage Pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 134, 172-178.

16. Wang, Y., Li, F., Ruan, X., Song, J., Lv, L., Chai, L., Yang, Z. and Luo, L. 2017. Biodegradation of Di-*n*-butyl phthalate by Bacterial Consortium LV-1 Enriched from River Sludge. *PLoS ONE* 12(5), e0178213.

17. Kim, Y. M. 1993. Murine 세포주에서 사람 *HPRT* 유전자의 발현. 충남대학교 대학원(생물학과 생물학전공) 석사논문.

18. Yang, J. H., Park, M. H., Kim, D. S., Shim, J. W., Shim, J. Y., Jung, H. L., Yoo, H. W. and Park, M. S. 2003. Partial *HPRT* Deficiency Due to a Missense Mutation in the *HPRT* Gene. *Journal of the Korean Society of Pediatric Nephrology* 7(1), 86-90.

19. You, H. J. and Woo, E. R. 2004. The Suppressive Effect of Medicinal Herbs on the H₂O₂-Induced Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase (*HPRT*) Mutation. *Kor. J. Pharmacogn* 35(1), 28-34.

20. Chen, T., Brock, K. H. and Moore, M. M. 2002. Mutant Frequencies and loss of Heterozygosity induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea in the Thymidine

Kinase Gene of L5178Y/*TK*^{+/-}-3.7.2C mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis* 17, 105-109.

21. Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D. S., Zhang, L. S., Suzuki, T., Hayashi, M. and Honma, M. 2004. Genotoxicity of Microcystin-LR in Human Lymphoblastoid TK6 Cells. *Mutation Research* 557, 1-6.

22. Jeong, J. C., Bae, S. M. and Shin, H. C. 2005. Scavenging Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by *Jungans sinensis*. *Korean J. Oriental Physiology and Pathology* 19(6), 1615-1621.

23. Choi, E. Y., Noh, J. K., Hasan, N. and Yoo, J. W. 2014. Antimicrobial Mechanisms of Nitric Oxide and Strategies for Developing Nitric Oxide-based Antimicrobial Agents. *J. Microbiology* 50(2), 87-94.

24. Kim, J. M., Kim, J. S., Jung, H. C., Song, I. S. and Kim, C. Y. 2002. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Production in Human Gastric Epithelial Cells Infected with *Helicobacter pylori*. *The Korean Journal of Gastroenterology* 39(5), 324-334.

25. Kim, H. K. and Lee, I. K. 2006. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Vascular Complication. *J Korean Diabetes* 30, 145-150.

26. Kang, S. W. 2013. Role of Reactive Oxygen Species in Cell Death Pathways. *Hanyang Med Rev* 33, 77-82.

27. Lee, J. Y., Soung, D. Y., No, J. K., Kim, Y. J., Je, J. H., Kim, M. S., Choi, J. S., Chung, H. Y. and Lee, K. H. 2003. Peroxynitrite (ONOO⁻) Scavenging Activity of Caffeic Acid. *Journal of Korean Association of Cancer Prevention*

8(3), 173-180.

28. Lee, Y. S., Park, H. G., Kim, S. W., Cha, J. H. and Yoo, Y. J. 2009. Induction of IL-8 and Reactive Oxygen Species in Periodontal Ligament Cells by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Korean Acad Periodontol* 39, 331-337.

29. Kim, K. Y., Hahn, B. S. and Choe, W. C. 2012. H₂O₂ Induced Two Type of Cell Death in Human Hepatoma Cell, Huh7. *Cancer Prevention Research* 17(1), 15-18.

30. Lee, E. L. Distinct Roles of cIAP1 and cIAP2 in Induction of Cellular Premature Senescence. 연세대학교 대학원(시스템 생물학과) 석사논문.

31. Lee, S. H., Lee, J. Y., Jung, C. L., Bae, I. H., Suh, K. H., Ahn, Y. G., Jin, D. H., Kim, T. W., Suh, Y. A. and Jang, S. J. 2014. A Novel Antagonist to the Inhibitors of Apoptosis (IAPs) Potentiates Cell Death in EGFR-overexpressing nonsmall-cell Lung Cancer Cells. *Cell Death and Disease* 5(10), e1477.

32. Sung, J. H., Jeong, M. Y., Lee, E. R., Jeong, H. S. and Cho, S. G. 2006. Mitochondrial Proteins in Apoptosis and Neuronal Degeneration. *Cancer Prev Res* 11, 256-263.

33. Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2014. Immature Citrus Fruit Extracts Enhance the Apoptosis Inducing Potential of Cisplatin in Human Malignant Melanoma A375 Cells via Regulation of Nitric Oxide and Inhibitor of Apoptosis Family (IAP). *Journal of Life Science* 24(4), 454-460.

34. Li, C. Q., Trudel, L. J. and Wogan, G. N. 2002. Nitric Oxide-Induced Genotoxicity, Mitochondrial damage, and Apoptosis in Human lymphoblastoid cells Expressing wild-type and mutant p53. *PNAS* 99(16), 10364-10369.
35. Byun, J. H. and Kim, Y. K. 2014. Apoptotic Effect of *Sasa quepaertensis* Nakai in Human Colon Cancer HT-29 Cells. *Journal of Life Science* 24(9), 1012-1018.
36. Im, S. J., Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2014. Endogenous Nitric Oxide Strengthens Doxorubicin-induced Apoptosis in Human Colorectal Cell Lines. *Journal of Life Science* 24, 1137-1143.
37. National Institute of Environmental Research. 2015. 독성평가를 위한 생체지표 연구 NIER-GP2015-157.
38. Kang, J. W., Quan, Z. j., Jang, J. H. and Kang, H. C. 2015. Valproic Acid Reduces Reactive Oxygen Species in Fibroblast of X-linked Adrenoleukodystrophy. *J Korean Child Neurol Soc* 23(2), 45-50.
39. Hong, S. H., Park, C., Kim, K. M. and Choi, Y. H. 2015. Induction of Apoptosis by Hwangheuk-san in AGS Human Gastric Carcinoma Cells through the Generation of Reactive Oxygen Species and Activation of Caspases. *Journal of Life Science* 25(11), 1235-1243.
40. Kim, J. H., Kang, D. H., Choi, Y. H. and Hwang, W. D. 2009. Effects of Deep-sea Water on Apoptosis by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in Human Lung Cancer Cells. *Cancer Prev Res* 14, 60-69.
41. Kim, W. J., Kil, Y. C. and Shin, K. S. 1999. Effects of Di-(2-ethylhexyl)

phthalate (DEHP) on Ultrastructure of Rat Testis. *Korean J. Electron Microscopy* 29(3), 353-362.

42. Hu, Y., Li, D., Lu, Y. and Han, X. 2013. Monobutyl phthalate Induces the Expression Change of G-Protein-Coupled Receptor 30 in rat Testicular Sertoli Cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 51(1), 18 - 24.

43. Jung, J. Y. 2007. The Estrogenic Effects of Phthalates (DEHP, DBP) in Yeast Recombinant Assay. *J. Food Hyg. Saf* 22(3), 218-222.

44. Alejandra, M. I., Luis, D. M. R., Edgar, R. V. M., Nayeli, M. C., Rogelio, F. R., Elizabeth, G. G., Marisol, L. L., Carlos, O. G., Ignacio, C. A. and Marco, C. 2019. Unhealthy Levels of Phthalates and Bisphenol A in Mexican Pregnant Women with Gestational Diabetes and Its Association to Altered Expression of miRNAs Involved with Metabolic Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 20(13), 3343.

45. Chen, X., Qin, Q., Zhang, W., Zhang, Y., Zheng, H., Liu, C., Yang, Y., Xiong, W. and Yuan, J. 2013. Activation of the PI3K-AKT-mTOR Signaling Pathway Promotes DEHP-induced Hep3B Cell Proliferation. *Food and Chemical Toxicology* 59, 325-333.

46. Cho, H. H. 2012. Epigenetic control of Endocrine Disrupting Chemicals on Gynecological Disease: Focused on Phthalates. *Korean J Obstet Gynecol* 55(9), 619-628.

47. Choi, J. S. 2019. Analysis of Toxicity in Endometrial Cells Exposed Phthalate. *Korean J Clin Lab Sci* 51(1), 86-92.

48. Onorato, T. M., Brown, P. W. and Morris, P. L. 2008. Mono-(2-ethylhexyl) Phthalate Increases Spermatocyte Mitochondrial Peroxiredoxin 3 and Cyclooxygenase 2. *Journal of Andrology* 29(3).
49. Lucas, B., Fields, C., Joshi, N. and Hofmann, M. C. 2012. Mono-(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) Affects ERK-dependent GDNF Signalling in Mouse stem-progenitor Spermatogonia. *Toxicology* 299, 10-19.
50. Steen, A. M., Meyer, K. G. and Recio, L. 1997. Analysis of *HPRT* Mutations Occurring in Human TK6 Lymphoblastoid Cells following exposure to 1, 2, 3, 4-diepoxybutane. *Mutagenesis* 12(2), 61-67.
51. Kim, M. Y. 2017. Intracellular and Extracellular Factors Influencing the Genotoxicity of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. *Oncology Letters* 13, 1417-1424.
52. Wiese, C., Gauny, S. S., Liu, W. C., Cherbonnel-Lasserre, C. L. and Kronenberg, A. 2001. Different Mechanisms of Radiation-induced Loss of Heterozygosity in Two Human Lymphoid Cell Lines from a Single Donor. *Cancer Research* 61, 1129 - 1137.
53. Lim, D. G. 2004. Oxidative Stress: Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide. *Korean Journal of Critical Care Medicine* 19(2), 81-85.
54. Nosrat, B., Mehdi, G., Azam, H., Susan, S., Russel J, R. and Saeed, M. 2018. Evaluating the Protective effects of Melatonin on Di(2-ethylhexyl) phthalate-induced Testicular Injury in Adult Mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 108, 515 - 523.

55. Watanuki, H., Gushiken, Y. and Sakai, M. 2003. In vitro Modulation of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Phagocytic Cells by Di-*n*-butyl phthalate and Di-2-ethylhexyl phthalate. *Aquatic Toxicology* 63, 119-126.
56. Lee, W. J. 2019. Dibutyl phthalate impairs the Proliferation of Neural Progenitor Cells and Hippocampal Neurogenesis. 부산대학교 대학원(약학과) 석사논문.
57. Anette, K. B., Johan, O., Jan, T. S., Jorn A, H., Kirsten E, R., Gro H, M., Ragnhild E, P., Monica, S. K. and Rune, B. 2012. Mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP) induces TNF- α release and Macrophage Differentiation through Different Signalling Pathways in RAW264.7 Cells. *Toxicology Letters* 209, 43-50.
58. Wang, W., Craig, Z. R., Basavarajappa, M. S., Hafner, K. S. and Flaws, J. A. 2012. Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate Induces Oxidative Stress and Inhibits Growth of Mouse Ovarian Antral Follicles. *Biology of Reproduction* 87(6), 1-10.
59. Zhang, L., Gao, M., Zhang, T., Chong, T., Wang, Z., Zhai, X., Wu, Z. and Li, H. 2017. Protective Effects of Genistein against Mono-(2-ethylhexyl) Phthalate-Induced Oxidative Damage in Prepubertal Sertoli Cells. *BioMed Research International* 2017(4), 1-12.
60. Hur, S. Y. and Lee, J. M. 2008. Induction of Apoptosis by the Kinase Inhibitor Flavopiridol in Human Ovarian Cancer Cell Lines. *Korean Journal of Gynecologic Oncology* 19(1).
61. Kim, E. Y. and Kim, A. K. 2011. Enhancement of TRAIL-Induced

Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cells by Apigenin. *Yakhak Hoeji* 55(1), 49-55.

62. Lin, Y. C., Kuo, K. K., Wuputra, K., Lin, S. H., Ku, C. C., Yang, Y. H., Wang, S. W., Wang, S. W., Wu, D. C., Wu, C. C., Chai, C. Y., Lin, C. L., Lin, C. S., Kajitani, M., Miyoshi, H., Nakamura, Y., Hashimoto, S., Matsushima, K., Jin, C., Huang, S. K., Saito, S. and Yokoyama, K. K. 2014. Bovine Induced Pluripotent Stem Cells are More Resistant to Apoptosis than Testicular Cells in Response to Mono-(2-ethylhexyl) Phthalate *Int. J. Mol. Sci* 15, 5011-5031.

63. Li, C. Q., Robles, A. I., Hanigan, C. L., Hofseth, L. J., Trudel, L. J., Harris, C. C. and Wogan, G. N. 2004. Apoptotic Signaling Pathways Induced by Nitric Oxide in Human Lymphoblastoid Cells Expressing Wild-Type or Mutant p53. *Cancer Research* 64, 3022 - 3029.

64. Shin, D. Y., Kim, S. G. and Choi, T. H. 2007. Apoptotic Cell Death by Water Extract of Pine Needles (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) through the Induction of Bax and Activation of Caspases in U937 Human Leukemia Cells. *Cancer Prevention Research* 12(1).

VI. 요약

본 연구는 인간 림프아성 TK6 세포에서 DEHP, DBP 및 이에 대한 대사산물 MEHP, 2-EHA 그리고 DBP의 돌연변이성 및 세포사멸 기전을 조사하기 위해 수행되었다. TK6 세포에 DEHP, DBP는 집접법과 rat S9을 첨가한 대사활성법으로 노출하여 측정하였으며, 대사활성법은 hoese serum을 제외한 배지를 사용하여 6시간 동안 노출시켰고, MEHP, 2-EHA 및 MBP 또한 hoese serum을 제외한 배지에서 1시간 동안 노출시켰다. 세포 생존율이 30 % 이상인 농도로 *HPRT*와 *TK1* 유전자에서 6-thioguanine와 trifluorothymidine 내성 돌연변이체를 평가하였다. DEHP, DBP 및 이에 대한 대사산물은 세포 사망률, 돌연변이 빈도 그리고 NO^{\bullet} 생성량이 농도 의존적인 증가를 나타내었으나, 상당한 효능의 변화를 나타내었다. MEHP, 2-EHA 및 MBP의 세포 독성 및 돌연변이 빈도는 parents compound인 DEHP와 DBP 보다 높게 나타났다. 이는 *HPRT* 및 *TK1* 유전자에서 DEHP, DBP 및 이에 대한 대사산물의 변이원성을 나타내고, 생체 내에서 영향을 끼치는 메카니즘 설명에 기여할 수 있다.

MEHP는 DEHP의 대사물질로 독성에 대한 메카니즘이 불분명하다. 본 연구는 TK6 세포에서 MEHP에 의해 apoptosis가 유도되는 동안에 NO^{\bullet} , ROS 및 IAP family의 역할을 조사하였다. 이에 대한 결과로 MEHP에 노출된 TK6 세포에서 강한 apoptosis가 유도되었다. MEHP는 NOS의 발현을 상향 조절하고, NO^{\bullet} 및 ROS 생성을 증가시키고, apoptosis 억제 신호 IAP를 약화시켜 apoptosis 과정을 촉진시킨다. 전체적으로, 이에 대한 결과는 MEHP에 의해 유도된 apoptosis가 내인성 NO^{\bullet} , ROS의 조절 및 IAP family 유전자 발현과 관련이 있음을 나타낸다.

감 사 의 글

길게도 느껴지고 짧게도 느껴졌던 석사과정을 마치면서 드디어 학위 논문을 마무리 짓게 되었습니다. 지나면 추억이라고 말로만 그러는 줄 알았는데 실험실 생활을 하면서 즐거웠던 일도, 힘들었던 일도 지금은 정말 다 추억이 되었습니다. 학위 논문을 마치면서 추억이 될 수 있게 도움을 주신 분들께 감사의 말씀을 전합니다.

미흡하지만 학위 논문을 끝까지 마칠 수 있도록 이끌어 주신 김민영 교수님께 감사드리고 옆에서 힘들 때 다독여주시고 많은 조언을 해주신 김지혜 언니에게 감사하고, 항상 친절하게 잘 챙겨주셨던 강다희 언니에게 고맙다고 전하고 싶습니다. 그리고 힘들 때 힐링이 되어주었던 오랜 친구들한테도 고맙다고 전하고 싶습니다.

언제나 제 편으로 지원을 아끼지 않으신 엄마 이동열, 아빠 박근태, 정신적으로 버팀목이 되어준 박보미 언니, 한결같은 동생들 박강타, 박환희, 그리고 사랑스러운 나니, 아리 모두에게 정말 감사하고 사랑하는 마음을 전합니다.