J. Fd Hyg. Safety
Vol. 22, No. 3, pp. 209~212 (2007)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

유방암세포인 MCF-7세포를 이용한 DEHP, DBP의 에스트로젠 효과

이수연 · 김소정 · 이성호 · 박영석 · 박병권 · 김병수 · 김상기 · 최창순[1] · 윤성일[2] · 김종석[3] · 정지원[4] · 정지윤*

공주대학교 특수동물학과, [1]중앙대학교 식품영양학과, [2]한양대학교 생명과학과,
[3]전북대학교 의과대학 생화학교실, [4]서울대학교 수의학과

The Estrogenic Effects of Phthalates (DEHP, DBP) in MCF-7 Cell

Su-Youn Lee, So-Jung Kim, Seung-Ho Lee, Young-Seok Park, Byung-Kwon Park, Byeong-Soo Kim, Sang-Ki Kim, Changsun Choi[1], Seong-Il Yoon[2], Jong-Suk Kim[3], Ji-Won Jung[4], and Ji-Youn Jung*

Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan, Korea
[1]Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Chung-Ang University, Ansung, Korea
[2]Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul, Korea
[3]Department of Biochemistry, Institute of Medical Science, Chunbuk National University Medical School, Jeonju, Korea
[4]Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received August 16, 2007/Accepted September 14, 2007)

ABSTRACT – To evaluate the estrogenic activities of di-ethyl hexyl phthalate (DEHP) and di-butyl phthalate (DBP), two phthalates known as endocrine disrupters, we used MCF-7 human breast cancer cell line. As results, DBP and DEHP had estrogenic effects. In brief, the concentration of maximal MCF-7 cell proliferation was 10^{-7}M and 10^{-8}M for DEHP and DBP, respectively. The ratio of maximal cell yield of the test compounds to that of 17β-estradiol was 87.5% for DEHP and 73.4% for DBP. In summary, both DEHP and DBP had cell proliferation potencies in the MCF-7 cell. Potencies ranged from approximately 10 to 100 times less than 17beta-estradiol. DBP was stronger than DEHP in the concentration of maximal efficacy. However, DEHP was stronger than DBP in the MCF-7 cell proliferation. Results from this study suggested that DEHP and DBP may play an important role in the estrogenic activity. Therefore, it is suggested that DEHP and DBP are estrogenic.

Key Words: DEHP, DBP, phthalate, MCF-7 cell

환경호르몬 물질이란 무처치 생물의 내분비계에 대하여 그 개체 혹은 그 자손의 세대 어떤 단계에서든 건강 장해성의 변화를 일으키는 외래성 물질 또는 생체의 항상성, 생식, 발생, 혹은 행동에 관여하는 각종 생체 호르몬 등의 합성, 분비, 생체내 수송, 수용체와의 결합, 그리고 그 호르몬작용 및 그 배제 등의 재과정을 방해하는 성질을 가진 외래성 물질로 정의된다[1]. 이러한 환경호르몬 물질은 크게 의약품류 (diethylstilbestrol, ecdysteroids, progesterons, androgens), 유기염소계의 살충제 (DDT, heptachlor, aldrin), polychlorinated biphenyls (PCBs), dioxins, alkylphenols, 그리고 phytoestrogens로 나눌 수 있다[2]. 내분비교란 물질 중에서 최근에 문제가 되고 있는 물질이 프탈레이트 계통 물질로서 플라스틱의 가소제로 사용하고 있는 DEHP 와 DBP 가 있다. DEHP는 Di-phthalate 또는 bis-phthalate로 불리기도 하는데 플라스틱에서 유연제로 쓰이는 액상의 물질로서, 매년 약 9만 톤이 상업적 혹은 의학적 목적으로 사용되고 있으며, 플라스틱의 용도에 따라서 1-40%의 DEHP를 함유하고 혈액 튜브 등의 의학용 도구에도 사용되고 있다[3-4]. 이러한 DEHP는 공기, 흙, 물 등에 광범위하게 분포할 수 있으며, 음식물에 있어서도 포장재, 제조과정, 수송 중에 들어갈 수 있고, 오일이나 지방성 음식에 더 잘 녹는 성질을 가지고 있어서 우유나 치즈에서 최고 농도로 검출되었다는 보고도 있다[5-6].

현재 미국에서는 암을 유발시킬 수 있는 물질로서 DEHP를 규정하고 있으며, 랫드와 마우스에서 암을 유발하는 것으로 보고되어 있고, 간 손상 및 남성 생식기관에 영향을 주는 것으로 동물을 이용한 연구에서 밝혀졌다[7-10].

DBP 또한 플라스틱을 유연하게 만드는 성질을 가지고

*Correspondence to: Ji-Youn Jung, Department of Companion and Laboratory Animal Science Kongju National University
Tel: 82-41-330-1526 FAX: 82-41-330-1529
E-mail: wangza@kongju.ac.kr

있어서 카펫트, 페인트, 접착제, 헤어스프레이, 로케트 연료 등에 다양하게 사용되고 있다. DBP는 쉽게 기화하지는 않지만, 일종의 가스로서 공기 중에 상당히 많은 양이 함유될 수 있어서 공기중의 먼지와 결합할 수도 있으며, 일반적으로 공기 중에서 수일 내에 분해된다. DBP는 물에 잘 녹지 않으나 더러운 먼지입자가 물과 접촉 시에는 물에서 검출되기도 한다. 이러한 DBP의 자연계에서의 분해는 박테리아가 관련하는데 박테리아의 종류 및 온도에 따라 수 일 내지는 수개월 걸려서 분해되기도 한다[11]. 현대 사회에서 DBP의 사용은 매우 다양하여 대부분의 사람들은 공기, 물, 음식을 통하여 낮은 농도이기는 하지만 계속 노출될 수 있다[12]. 그 중에서도 음식을 통한 노출이 DBP의 주요 오염경로로서, 음식물을 통해 일일 약 50-500ppb가 섭취될 수 있다고 한다[13]. 체내로 들어온 DBP는 다른 물질로 대사되며, 이 중 대부분은 오줌을 통하여 배출되고, 나머지는 대변을 통하여 배출되며, 배출에 걸리는 시간은 최소 24시간에서 최대 48시간 정도 걸린다[14]. 아직까지 인체에 대한 독성 등 제반 영향은 보고되어 있지 않는 반면, 동물에 있어서 DBP를 대량으로 투여 시 생식능력에 문제를 주는 것으로 밝혀졌다[15,17-18].

이러한 DEHP, DBP가 생체 내 만성 독성뿐만 아니라 내분비계의 장애 물질로서 최근에 관심의 대상으로 떠오르고 있어서 본 실험에서는 에스트로젠 의존성을 가진 MCF-7 세포에 DEHP, DBP를 적용하여 에스트로젠 의존성 호르몬 작용을 하는지의 여부를 관찰하고자 하는 데에 목적이 있다.

재료 및 방법

시약 및 재료

실험물질로 DEHP와 DBP (Sigma-aldrich)가 사용되었고 양성대조군으로 [2,3,6,7-H3]estradiol (Sigma-aldrich)(이하 E2) 이 사용되었다.

실험방법

MCF-7세포를 이용한 Estradiol의 최대 증식 농도 측정 시험 – 강력한 에스트로젠 작용 물질인 estradiol의 MCF-7 세포 증식에 있어서의 estradiol 농도별 증식 정도를 측정하여 시험물질인 DEHP와 DBP와 증식정도를 비교하기 위해서 우선적으로 실험을 실시하였다.

5% Fetal Bovine Serum (FBS)(Gibco)과 1%의 PSN antibiotic mixture (Gibco)가 첨가된 Phenol red-free D-media를 공급하여 유방암세포인 MCF-7세포를 5% CO_2, 37°C 인큐베이터(Sanyo)에서 배양하였다. 시험에 사용되는 MCF-7 세포는 6-well culture plate (Nunc)에서 배양하고, 물질처치 전 5% dextran coated charcoal-stripped FBS (Hyclone)와 0.3% PSN antibiotic mixture가 포함된 D-media로 호르몬적 영향을 배제하였고 물질처치 시, 5% dextran coated charcoal-stripped FBS (Hyclone)와 1% PSN antibiotic mixture에 물질을 원하는 농도로 희석하여 3일간 배양하였다. 그 기간 동안 시험물질이 포함된 배지를 한번 교체해주고, 처치 3일째, 0.1N의 NaOH (Sigma)를 처치하여 DNA content를 spectrophotometer (Beckman)를 이용하여 OD 260nm 값을 측정하였다[16].

MCF-7세포를 이용한 DEHP와 DBP의 최대 증식 농도 측정 시험 – 5% Fetal Bovine Serum (FBS)(Gibco)과 1%의 PSN antibiotic mixture (Gibco)가 첨가된 Phenol red-free D-media를 공급하여 유방암세포인 MCF-7세포를 5% CO_2, 37°C 인큐베이터(Sanyo)에서 배양하였다. 시험에 사용되는 MCF-7 세포는 6-well culture plate (Nunc)에서 배양하고, 물질처치 전 5% dextran coated charcoal-stripped FBS (Hyclone)와 0.3% PSN antibiotic mixture가 포함된 D-media로 호르몬적 영향을 배제하였고 물질처치 시, 5% dextran coated charcoal-stripped FBS (Hyclone)와 1% PSN antibiotic mixture에 물질을 원하는 농도로 희석하여 3일간 배양하였다. 그 기간 동안 시험물질이 포함된 배지를 한번 교체해주고, 처치 3일째, 0.1N의 NaOH (Sigma)를 처치하여 DNA content를 spectrophotometer (Beckman)를 이용하여 OD 260 nm 값을 측정하였다.

결과 및 고찰

MCF-7세포를 이용한 Estradiol의 최대 증식 농도 측정 시험

양성대조군으로 설정한 17β-estradiol의 MCF-7 세포에 있어서의 세포증식 정도를 측정하기 위하여 실험을 실시하였다(Fig. 1).

17β-estradiol은 10^{-13} M에서 대조군과 비교하여 약 1.43배의 증식을 보였으며, 10^{-12}M에서는 약 1.5배, 10^{-11}M에서는 약 1.61배, 10^{-10}M에서는 약 1.8배, 10^{-9}M에서는 약 2.35

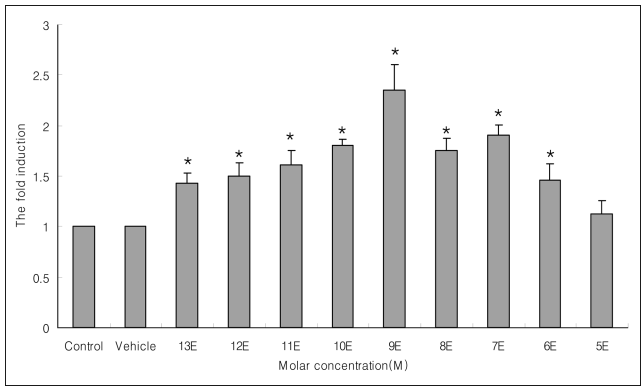

Fig. 1. MCF-7 cell proliferation treated with E2. *P<0.05; Each point is mean of three determinations and significant differences as compared with control.

배, 10^{-8}M에서 약 1.75배, 10^{-7}M에서 약 1.91배, 10^{-6}M에서 약 1.46배 그리고 10^{-5}M에서 약 1.12배의 세포증식이 관찰되었다.(Fig. 1) MCF-7 세포의 증식을 최대로 하는 농도는 10^{-9}M로 나타났으며 이 농도를 다음 단계인 시험물질 처치 시의 양성대조군 농도로 정하여 실험에 사용하였다.

MCF-7세포를 이용한 DEHP의 최대 증식 농도 측정 시험

DEHP를 이용한 MCF-7세포에서의 농도별 세포증식을 측정한 결과 대조군의 증식정도와 비교 시 10^{-10}M에서는 약 1.27배, 10^{-9}M에서는 약 1.33배, 10^{-8}M에서 약 1.56배, 10^{-7}M에서 약 1.82배, 그리고 10^{-6}M에서 약 1.12배의 증식 증가 양상을 나타내었다(Fig. 2). 세포의 증식을 최대로 하는 농도는 10^{-7}M로 나타났으며 양성대조군 대비 약 87.5%의 증식, 음성대조군 대비 약 182%의 증식을 나타내는 것으로 관찰되었다.

MCF-7세포를 이용한 DBP의 최대 증식 농도 측정 시험

시험물질인 DBP를 처치한 MCF-7세포에서의 농도별 세포증식을 측정한 결과 대조군의 증식 정도와 비교 시 10^{-10}M에서는 약 1.23배, 10^{-9}M에서는 약 1.38배, 10^{-8}M에서 약 1.58배, 10^{-7}M에서 약 1.45배, 그리고 10^{-6}M에서 약 1.16배의 증식 증가 양상을 나타내었다(Fig. 3). MCF-7세포 증식을 최대로 하는 DBP의 농도는 10^{-8}M이었으며, 양성대조군인 17β-Estradiol과 비교 시 73.4%, 음성대조군과 비교 시에는 158%의 세포 증식율을 보였다.

이상의 결과를 종합하여 17β-Estradiol과 비교시의 시험물질인 DEHP와 DBP의 MCF-7 세포의 최대 증식시의 농도를 조사해본 결과, 17β-Estradiol에 비하여 DEHP는 100배 정도 높은 농도에서 최대 증식능력을 보였고, DBP는 10배 정도 높은 농도에서 최대 증식능력을 보였다(Table 1). 최대 증식 능력을 보일 때의 양성대조물질인 17β-Estradiol의 증식 정도 차이를 비교하였을 때에는 DEHP는 양성대조군 대비 87.5%의 증식정도를 나타내었고, DBP는 73.4%의 증식정도를 나타내었다. 결론적으로 DEHP와 DBP 두 물질 모두 MCF-7 세포의 증식에 영향을 주는 것으로 판단되었으며, 최대 작용농도에 있어서는 DBP>DEHP, 세포증식정도에 있어서는 DEHP>DBP 인 것으로 판단되어진다.

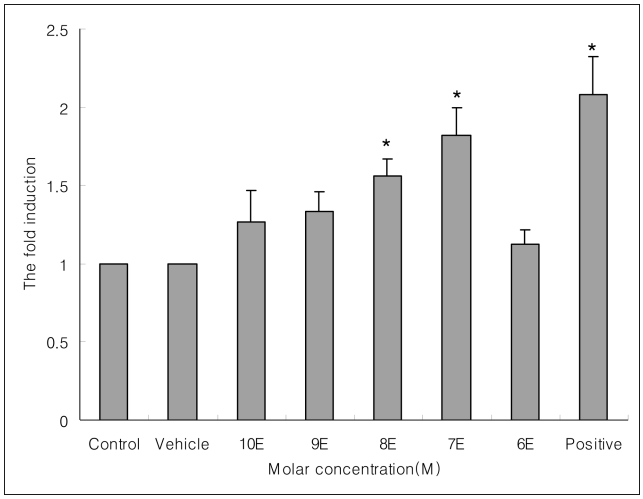

Fig. 2. MCF-7 cell proliferation treated with DEHP. *P<0.05; Each point is mean of three determinations and significant differences as compared with control.

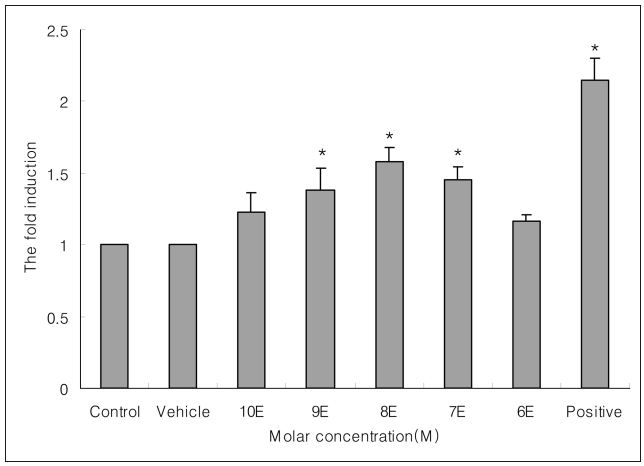

Fig. 3. MCF-7 cell proliferation treated with DBP. *P<0.05; Each point is mean of three determinations and significant differences as compared with control.

Table 1. Proliferation effect of DEHP and DBP

Compound	C_{max}[a]	RPP[b]	RPE[c]
17-Estradiol	1×10^{-9}M	1	100%
DEHP	1×10^{-7}M	1×10^{-2}	87.5%
DBP	1×10^{-8}M	1×10^{-1}	73.4%

[a] is the concentration of the test compound giving maximal proliferation.
[b] is the ratio of the Cmax of the test compound to that of 17β-Estradiol.
[c] is the ratio of maximal cell yield of the test compound to that of 17β-Estradiol, expressed as a percentage.

요 약

내분비 교란 물질 중에서 최근에 문제가 되고 있는 물질이 프탈레이트계통 물질로서 플라스틱의 가소제로 사용하고 있는 DEHP 와 DBP에 대하여 사람유방암세포 이면서 에스트로젠 의존성을 가지고 있는 MCF-7 세포에서의 세포 증식 정도를 농도 별로 측정하여 두 물질의 에스트로젠 작용가능성에 대하여 조사하였다. 시험물질인 DEHP와 DBP의 MCF-7 세포의 최대 증식 시의 농도를 조사해본 결과, DEHP는 17β-Estradiol에 비하여 100배 정도 높은 농도인 10^{-7}M 에서 최대 증식능력을 보였고, DBP는

10배 정도 높은 10^{-8}M 에서 최대 증식능력을 보였다. 최대 증식 능력을 보일 때의 양성대조물질인 17β-Estradiol와 증식 정도 차이를 비교하였을 때에는 DEHP는 양성대조군 대비 87.5%의 증식 정도를 나타내었고, DBP는 73.4%의 증식 정도를 나타내었다. 결론적으로 DEHP와 DBP 두 물질 모두 MCF-7 세포의 증식에 영향을 주는 것으로 판단되었으며, 최대 작용농도에 있어서는 DBP>DEHP, 세포 증식 정도에 있어서는 DEHP>DBP 인 것으로 판단 되어진다.

참고문헌

1. Pan G, Hanaoka T, Yoshimura M, Zhang S, Wang P, Tsukino H, Inoue K, Nakazawa H, Tsugane S, Takahashi K.: Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): a cross-sectional study in China. *Environ Health Perspect*. **114**, 1643-1648 (2006).
2. Weuve J, Sanchez BN, Calafat AM, Schettler T, Green RA, Hu H, Hauser R.: Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: urinary concentrations of monoesters and oxidative metabolites. *Environ Health Perspect.* **114**, 1424-1431 (2006).
3. Marsee K, Woodruff TJ, Axelrad DA, Calafat AM, Swan SH.: Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance. *Environ Health Perspect.* **114**, 805-809 (2006).
4. Hong EJ, Ji YK, Choi KC, Manabe N, Jeung EB.: Conflict of estrogenic activity by various phthalates between in vitro and in vivo models related to the expression of Calbindin-D9k. *J Reprod Dev.* **51**, 253-263 (2005).
5. Liu K, Lehmann KP, Sar M, Young SS, Gaido KW.: Gene expression profiling following in utero exposure to phthalate esters reveals new gene targets in the etiology of testicular dysgenesis. *Biol Reprod*. **73**, 180-92 (2005).
6. Adibi JJ, Perera FP, Jedrychowski W, Camann DE, Barr D, Jacek R, Whyatt RM.: Prenatal exposures to phthalates among women in New York City and Krakow, Poland. *Environ Health Perspect.* **111**, 1719-1722 (2003).
7. O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS.: Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. *Toxicol Sci*. **69**, 92-108 (2002).
8. Mihovec-Grdic M, Smit Z, Puntaric D, Bosnir J.: Phthalates in underground waters of the Zagreb area. *Croat Med J*. **43**, 493-497 (2002).
9. Fukuwatari T, Suzuki Y, Sugimoto E, Shibata K.: Elucidation of the toxic mechanism of the plasticizers, phthalic acid esters, putative endocrine disrupters: effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate on the metabolism of tryptophan to niacin in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* **66**, 705-710 (2002).
10. Hashizume K, Nanya J, Toda C, Yasui T, Nagano H, Kojima N.: Phthalate esters detected in various water samples and biodegradation of the phthalates by microbes isolated from river water. *Biol Pharm Bull*. **25**, 209-214 (2002).
11. Foster PM, Mylchreest E, Gaido KW, Sar M.: Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Hum Reprod* **7**, 231-235 (2001).
12. Gray LE Jr, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DN, Parks L.: Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci*. **58**, 350-365 (2000).
13. Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, Gray LE Jr.: The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci.* **58**, 339-349 (2000).
14. Keys DA, Wallace DG, Kepler TB, Conolly RB.: Quantitative evaluation of alternative mechanisms of blood disposition of di(n-butyl) phthalate and mono(n-butyl) phthalate in rats. *Toxicol Sci*. **53**, 173-184 (2000)
15. Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP.: The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect.* **105**, 802-811 (1997)
16. Tani A, Kiyota M, Aiga I.: Trace gases generated in closed plant cultivation systems and their effects on plant growth. *Biol Sci Space*. **9**, 314-326 (1995).
17. Scott RC, Dugard PH, Ramsey JD, Rhodes C.: In vitro absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin. *Environ Health Perspect.* **74**, 223-227 (1987).
18. Shiota K, Nishimura H.: Teratogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in mice. *Environ Health Perspect.* **45**, 65-70 (1982).