

체외배양 생쥐정소세포에서 합성에스트로젠이 P450 동위효소의 발현에 미치는 영향

울지외과대학교 생리학교실¹, 의과학연구소², 서울보건대학교 임상병리과³, Bio-Genomics 연구소⁴

이호준¹ · 김묘경² · 고덕성² · 김길수⁴ · 강희규³ · 김동훈²

Effects of Xenoestrogens on Gene Expression of Cytochrome P450 Genes in *in vitro* Cultured Mice Spermatogenic Cells

Ho-Joon Lee¹, Myo-Kyung Kim², Duck-Sung Ko², Kil-Soo Kim⁴, Hee-Kyoo Kang³, Dong-Hoon Kim²

Department of Physiology¹, Eulji University School of Medicine, Medical Science Institute²,
Eulji General Hospital, Seoul, 139-711, Korea, Department of Clinical Pathology³,
Seoul Health College, Sungnam-Si, Kyunggi-Do, Bio-Genomics Institute⁴

Objective: To know the effects of xenoestrogen on spermatogenesis, we investigated the expression of cytochrome P450s enzymes (CYP_{scc}, CYP_{17 α} , CYP19) and 3 β -HSD genes involved in steroidogenesis.

Methods: Mouse testicular cells were prepared from 15-day-old ICR mice which had only pre-meiotic germ cells by enzyme digestion using collagenase and trypsin. Testicular cells were cultured in DMEM supplemented with FSH (0.1 IU/ml) and 10% FBS or medium with estrogen (E₂), bisphenol-A (BPA), octylphenol (OP; 10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M, respectively) and aroclor 1254 (A1254) known as PCBs for 48 hours. The gene expression of cytochrome P450 enzymes were examined by semi-quantitative RT-PCR. The production of estrogen and testosterone was examined by RIA.

Results: As results, expression of CYP_{scc} mRNA was not significantly decreased, but 3 β -HSD and CYP_{17 α} mRNA were significantly dose-dependent decreased. And production of testosterone and estrogen were not different except BPA and OP group (10⁻⁵ M).

Conclusion: BPA, OP and A1254 might inhibit steroidogenesis by decreasing CYP_{scc}, 3 β -HSD and CYP_{17 α} mRNA expression in the mouse testis. These results suggest that BPA, OP and PCBs like as an endocrine disruptors inhibit the productions of steroidogenic enzymes and decrease the production of T and E by negative feedback mechanism. Therefore, these might disrupt steroidogenesis in Leydig cells of testis and would disturb testicular function and subsequently impair spermatogenesis.

Key Words: Mouse, Bisphenol-A, Octylphenol, PCB (Aroclor 1254), Cytochrome P450

인간을 포함한 포유동물의 생식계통은 시상하부-뇌하수체 전엽-생식소로 이어지는 기관에서 분비되는 호르몬들에 의하여 조절되고 있으며, 특히 생식소 호르몬인 estrogen과 androgen은 난자형성과정,

여포형성과정과 정자형성과정을 조절할 뿐만 아니라 생식과 관련된 여러가지 내분비 기능을 지니고 있다. 최근 급격한 산업화와 공업화에 따른 환경 변화는 여러가지 합성호르몬 (xenoestrogen)들을 창출하여

교신저자: 이호준, 서울시 노원구 하계동 280-1, 을지병원 의과학연구소, 을지외과대학교 생리학교실
Tel: (02) 970-8710, Fax: (02) 970-8002, e-mail: lchj@emc.eulji.ac.kr

*본 연구는 2000년 식약청 내분비계 장애물질 용역사업 (ED 2000-40) 지원으로 수행되었음.

식물 뿐 아니라 인간을 비롯한 포유동물에 내분비 장애와 성분화억제 등 심각한 현상을 나타내고 있다.³ 대부분 알려진 내분비계 장애물질들은 여성호르몬 또는 반여성호르몬적 작용능력을 가지고 있어 생식 호르몬의 표적기관이나 표적세포에 작용하여 단계별로 발현되는 특정유전자들의 발현에 영향을 미치며, 소량으로도 생체 내 생식기관의 기능을 교란시키는 것으로 보고되고 있다.^{20,24} 또한 생체 내에서 쉽게 분해되지 않고 축적되는 특징이 있어 다음 세대까지 생식기관을 비롯한 신경계 및 면역계에 영향을 미치므로 그 심각성이 더욱 문제시되고 있다. 그 예로 1950년도에서 1970년 사이에 여성호르몬인 에스트로겐 기능을 가진 유산방지제 diethylstilbestrol (DES)를 복용한 여성에 있어 자녀들의 생식기관에서 이상율의 증가가 보고 되었으며,^{14,15} 성인 남성들에 있어서도 요도하열, 잠복정소, 정소의소증, 정자의 기형 증가 및 수 감소 등의 보고가 있었다.^{8,21} 내분비계 장애물질로 잘 알려진 bisphenol-A (BPA)와 octylphenol (OP)은 에스트로겐적인 활성을 가진 화학물질들로 체내, 외에서 prolactin의 분비를 증가시키고,¹ 뇌하수체에서 LH와 FSH의 분비를 억제시키는 것으로 알려져 있다.¹⁷ 또한, 웅성 성체 환경에 투여하였을 때, 혈청 내 testosterone 양이 줄어드는 것을 확인하였으며,⁴⁵ 임신한 환경에 OP를 투여하게 되면 cytochrome P450_{17 α} -hydroxylase/C17-20 lyase와 steroidogenic factor-1 (SF-1)의 mRNA와 단백질 발현이 새끼 환경의 정소에서 줄어드는 것을 확인하였다.¹⁴ 이와 같이 내분비계 장애물질의 접촉에 따른 생체 내 또는 체외에서 특히 생식기관에서 일어나는 변화에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 그 작용기전을 밝히기 위한 많은 연구가 진행중이다. 따라서 본 연구는 정자형성과정에 미치는 합성에스트로젠의 기작과 유해 효과를 확인하기 위해서 생쥐정자세포의 체외배양법을 이용하여 패놀계 내분비계 장애물질로 알려진 bisphenol-A (BPA), octylphenol (OP)와 polychlorinated biphenyl (PCBs)의 일종인 aroclor 1254 (A1254)를 체외배양된 생쥐정자세포에 처리하여, 스테로이드 호르몬의 변화양상을 조사하고, 체내에 작용하는 정상적인 호르몬 기작에 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위해 steroidogenesis를 조절하는 효소인 P450 동위효소군의 유전자 발현양상을 조사함으

로써 내분비계 장애물질이 정자형성과정에 작용하는 기작을 규명하고자 실행하였다.

재료 및 방법

1. 미분화 정자세포 (감수분열 이전의 정자세포)의 회수와 체외배양

1) 미분화 정자세포의 분리

본 연구에 사용된 실험동물은 ICR계 (Charles's Rivers Korea Co.)의 생쥐를 사용하였다. 미분화 정자세포의 분리는 Tres 등²³ (1983)이 사용한 방법을 응용하여, 생후 14~15일령의 ICR 웅성생쥐로부터 정소를 회수하여 정소막을 제거한 후 erythrocyte-lysing buffer (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 2 mM, pH 7.2)를 처리하여 적혈구를 제거하였다. 이들 정소 조직을 PBS (Phosphate buffer saline) 용액에서 곡세 정관을 아주 작게 세절한 다음, 피펫으로 부드럽게 pipetting 하여 세정관을 흐트러 주었다. 다시 세정관을 0.1% collagenase와 20 μ g/ml DNase가 함유된 PBS 용액과 0.25% trypsin과 20 μ g/ml DNase가 함유된 PBS 용액에 각각 30분, 15분 동안 37°C에서 배양하여 세포부유액을 만들어 70 μ m nylon mesh를 사용하여 여과한 후 1,200 rpm에서 5분간 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후, 상층액은 제거하고 재조된 배양액 (DMEM + 10% FBS)으로 2회 원심분리하여 정자세포 부유액을 준비하였다.

2) 공배양을 위한 생쥐 정소 내 체세포 준비

생후 15일령된 ICR 웅성생쥐로부터 위의 정자생식세포 분리와 같은 방법으로 정자세포부유액을 얻는다. 세포부유액 속의 Sertoli 세포는 32°C 배양기에 이틀간 배양시켜 배양접시 바닥에 부착할 수 있도록 유도한 후, 20 mM Tris (pH 7.3)를 약 1분간 처리하여 부유하고 있는 생식세포를 제거한 다음,¹³ 새 배양액으로 교체하여 위에 준비한 정자세포와 공배양을 실시하였다.

3) 배양조건

기본배양액으로는 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium)에 10% FBS, 1% nonessential amino acid, 0.5% essential amino acid와 10 μ g/ml gentamycin이 첨가된 배양액을 사용하였다. 첨가물질로 human FSH 0.1 IU/ml (Metrodin, Serono)을 기본배양액에 첨

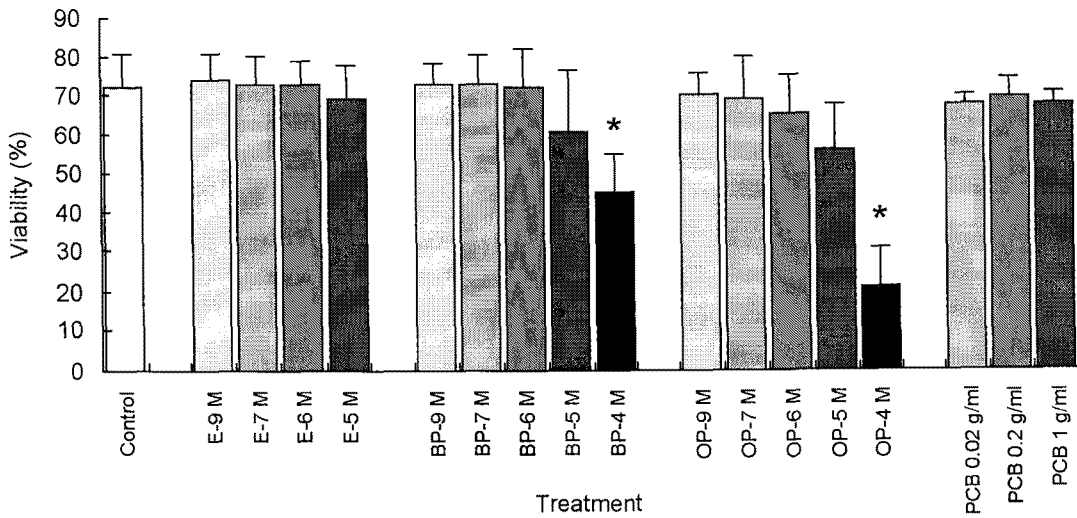


Figure 1. The viability of mouse testicular cells treated E₂, BPA, OP and A1254 (10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M) and A1254 (0.02, 0.2, 1 µg/ml) for 48 hr. (*p<0.05).

Table 1. Primers used for RT-PCR

Primer	Sequence	Size (bp)
5' β-actin	5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3'	
3' β-actin	5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3'	540
5' CYP _{scc}	5'-AGTGGCAGTCGTGGGGACAGT-3'	
3' CYP _{scc}	5'-TAATACTGGTGATAGGCCACC-3'	411
5' CYP _{17α}	5'-CCCATCTATTCTCTTCGCCTGGGTA-3'	
3' CYP _{17α}	5'-GCCCCAAAGATGTCTCCACCGTG-3'	743
5' CYP ₁₉	5'-ATAATGTCACCATCATGGTCCCGG-3'	
3' CYP ₁₉	5'-GCATGATGTGTCTCATGAGGGTCA-3'	579
5' 3β-HSD	5'-TGGTGACAGGAGCAGGA-3'	
3' 3β-HSD	5'-AGGAAGCTCACAGTTTCCA-3'	890

가하였다. 배양조건은 35 mm dish에 세포농도는 5 × 10⁵/cm²로 조정하여 32°C 배양기에서 6일 동안 배양하였다. 배양 전후, 정자세포의 생존율은 0.4% trypan blue로 염색하여 hemocytometer를 이용하여 판정하였다.

2. 체외배양된 웅성생식세포에 합성에스트로젠(xenoestrogens)의 처리

1) 내분비계 장애물질의 처리

앞서 언급한 공배양을 통하여 정자세포를 체외배

양하는 동안 합성에스트로젠인 bisphenol-A (BPA) (4, 4-isopropyl-idenediphenol; I-0635, Sigma), octylphenol (OP) (4-tert-octylphenol; Fluka), aroclor 1254와 생체 내 호르몬인 estrogen (E₂)을 각 군별로 농도별 (10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M)로 처리하여 이를 동안 배양하였다. 배양 후 얻은 정소 내 세포들의 생존율과 전체 세포 수를 확인하였다.

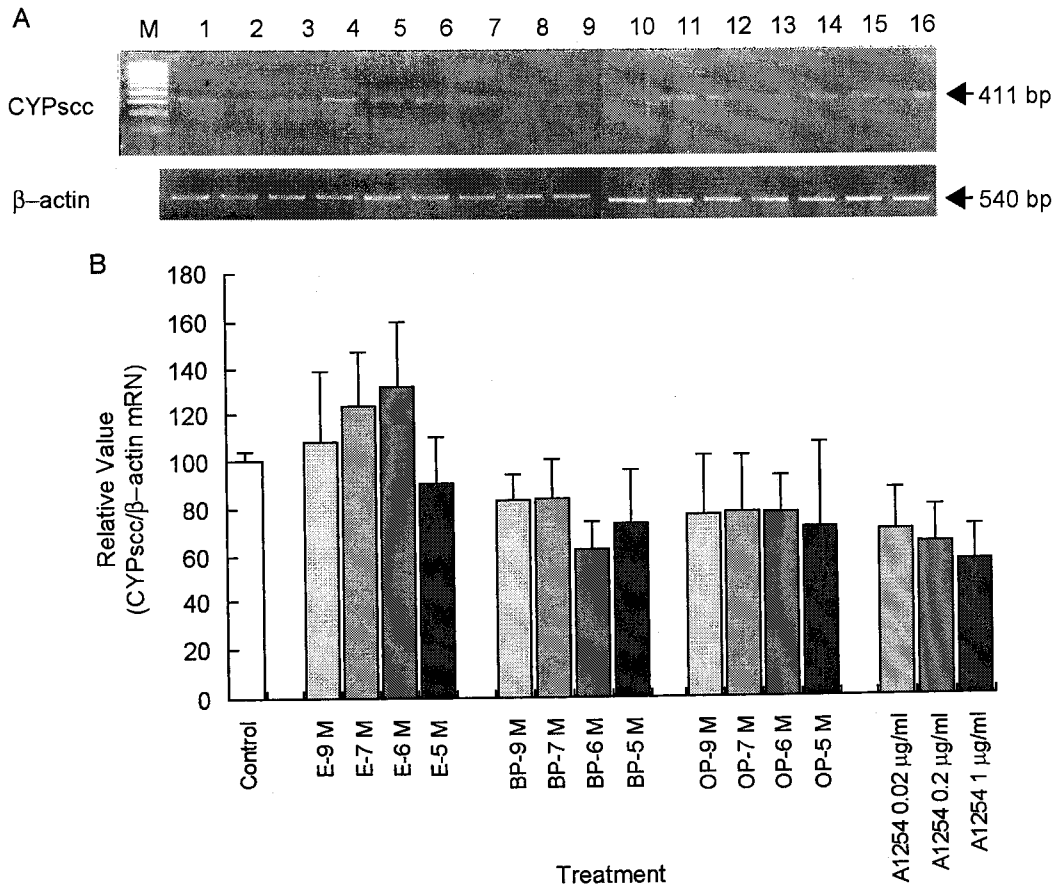


Figure 2. The relative mRNA levels of CYPsc in E₂, BPA, OP and A1254 treated pre-pubertal mouse testicular cells for 48 hr. **A.** RT-PCR amplification of CYPsc and β-actin mRNA. M: 100 bp ladder, lane 1: control, 2~5: E₂, 6~9: BPA, 10~13: OP (10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M, respectively) and 14~16: A1254 (0.02, 0.2, 1 µg/ml). **B.** Relative changes in the amount of CYPsc mRNA (relevant to β-actin).

3. Cytochrome P450 동위효소와 3β-HSD 유전자의 발현

1) 정자세포로부터 RNA 분리

체의배양된 미성숙 정자세포의 전체 RNA는 acid guanidinium phenol chloroform 방법을⁶ 응용하여 다음과 같이 분리하였다. Homogenizer를 이용하여 채취한 정소를 간 다음, TRIZOL (Gibco BRL, USA)를 첨가하여 조직을 녹인 후, chloroform을 첨가하여 phenol층과 분리한 다음 원심분리하였다. 상층액만을 분리하여 isopropyl alcohol을 동량 첨가하여 다시 원심분리하여 pellet으로 형성된 RNA를 얻었다.

2) 역전사중합효소 연쇄반응 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

cDNA 합성을 위한 역전사 반응은 500 ng의 RNA에 10 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP mix, 2.5 µM Random primer p(dN)₆, 2.5 U RNase inhibitor, 1 U 중합효소 연쇄반응 AMV reverse transcriptase (Boehringer Mannheim, Germany)를 혼합한 다음 42°C에서 1시간 동안 수행하였다. 각 실험군들은 역전사에 의해 만들어진 cDNA를 이용하여 cytochrome P450 (cholesterol side-chain cleavage enzyme: CYPsc, 17α-hydroxylase/C17-20 lyase: CYP_{17α}, aromatase: CYP19) 동위효소와 3β-hydroxysteroid dehydrogenase/Δ⁵, Δ⁴ isomerase: 3β-HSD 유전자의 발현 양상을 조사하였는데, PCR에 사용된 primer들은 한

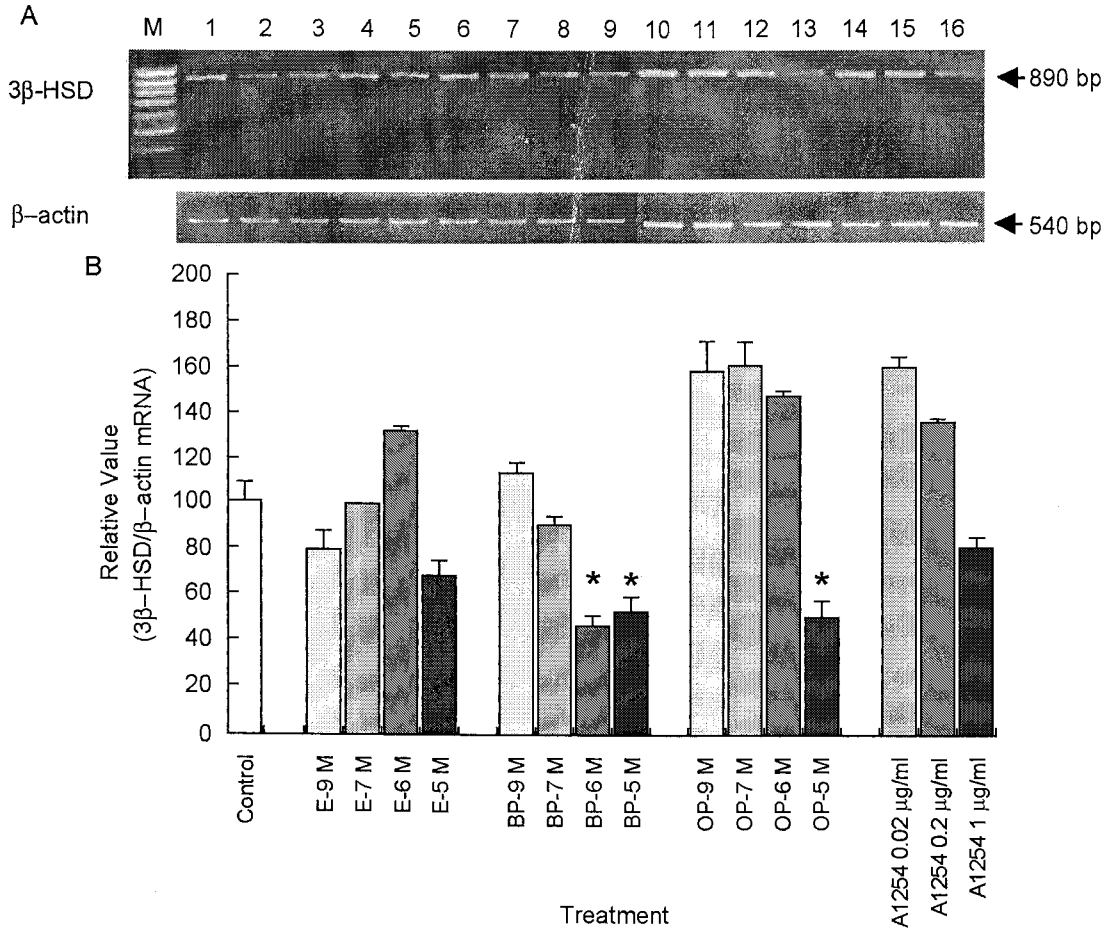


Figure 3. The relative mRNA levels of 3β-HSD in E₂, BPA, OP and A1254 treated pre-pubertal mouse testicular cells for 48 hr. (*p<0.05). **A.** RT-PCR amplification of 3β-HSD and β-actin mRNA. M: 100 bp ladder, lane 1: control, 2~5: E₂, 6~9: BPA, 10~13: OP (10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M, respectively) and 14~16: A1254 (0.02, 0.2, 1 μg/ml). **B.** Relative changes in the amount of 3β-HSD mRNA (relevant to β-actin).

국 Bioneer에서 제조하여 사용하였다 (Table 1).²⁵ 각 반응은 최종 반응 부피 20 μl에 10 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 20 pmol primer쌍, 0.5 unit의 Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim, Germany)을 혼합하여 DNA thermal cycler에서 94°C에서 45초; 54°C에서 45초; 72°C에서 1분 30초의 cycle을 40회 수행하였다. 반응이 끝난 증폭 산물은 2% agarose gel 전기영동법으로 분석하였다.

4. estrogen과 testosterone의 양 분석

체외배양 동안 정소세포로부터 분리된 스테로이드 호르몬의 분석을 위해서 배양된 배양액으로부터 es-

trogen과 testosterone 양을 RIA 방법으로 조사하였다.

5. 통계

각 군간의 유의성은 χ²-test로 검정하였으며, p값이 0.05 이하일 경우에 통계적으로 유의하다고 보았다.

결 과

1. 음성생식세포에 합성에스트로젠의 처리

실험군으로 합성에스트로젠 중 phenol계인 bisphenol-A (BPA), octylphenol (OP)를 10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M 농도별로 aroclor 1254 (A1254)를 0.02, 0.2, 1 μg/ml로 처리한 후 2일간 정자세포를 배양한 후 세

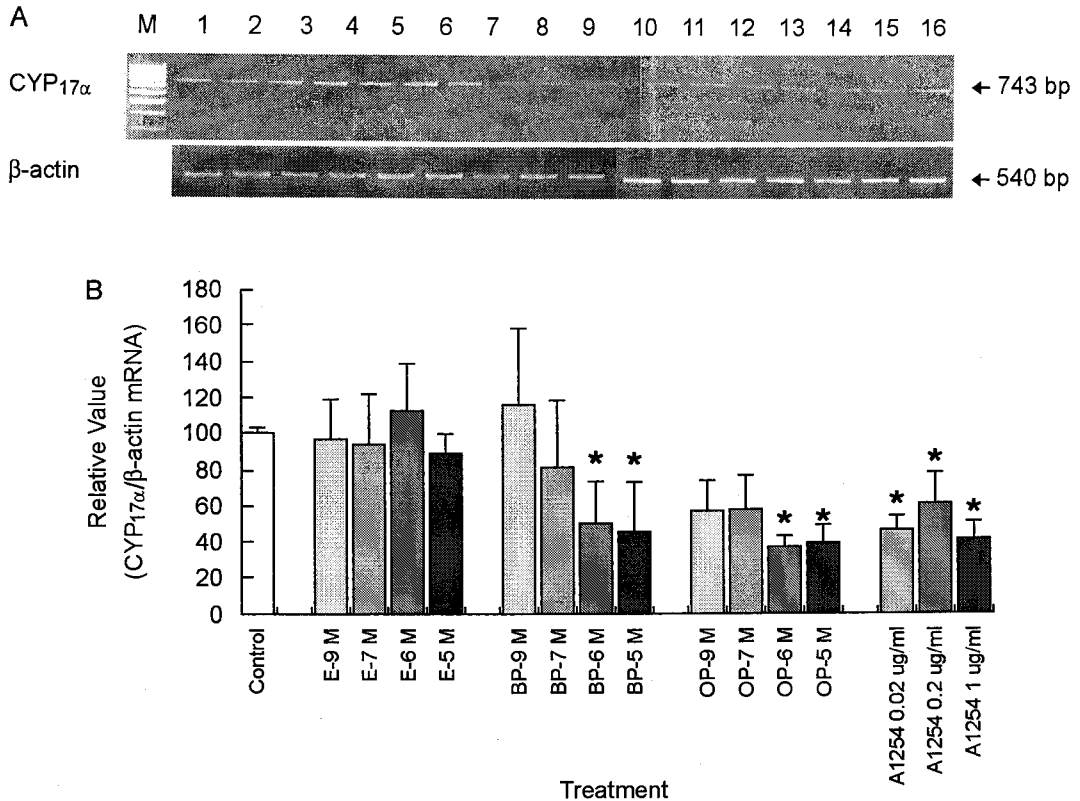


Figure 4. The relative mRNA levels of CYP_{17α} in E₂, BPA, OP and A1254 treated pre-pubertal mouse testicular cells for 48 hr. (*p<0.05). **A.** RT-PCR amplification of CYP_{17α} and β-actin mRNA. M: 100 bp ladder, lane 1: control, 2~5: E₂, 6~9: BPA, 10~13: OP (10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M, respectively) and 14~16: A1254 (0.02, 0.2, 1 μg/ml). **B.** Relative changes in the amount of CYP_{17α} mRNA (relevant to β-actin).

포를 회수하여 trypan blue (0.4%)로 생존율을 확인하였다. BPA와 OP를 1 mM 첨가하였을 때는 첨가시 바로 모든 세포가 죽는 것을 관찰하였으며, 10⁻⁴ M 처리하였을 때 대조군이나 다른 군에 비해 유의하게 세포의 생존율이 감소하였다 (Figure 1).

2. Xenoestrogens 처리를 통한 유전자 발현

1) Cytochrome P450 동위효소 (CYP_{scc}, 3β-HSD, CYP_{17α}, CYP₁₉)의 유전자 발현

BPA, OP (10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M)와 PCB (0.02, 0.2, 1 μg/ml)를 처리한 세포군에서 2일간 배양 후 각 군의 모든 세포를 회수하여 RNA를 분리하여 RT-PCR 방법으로 Leydig 세포에서 조절되는 호르몬의 작용을 확인하기 위해서 cholesterol에서 androgen 그리고 estrogen을 형성하기 위해 작용하는 전이효소인 P450 동위효소군의 작용을 조사하기 위해 이들 효소

의 유전자 발현변위를 semi-quantitative PCR 방법으로 조사하였다. 합성에스트로젠이 첨가된 군에서 CYP_{scc}의 유전자 발현이 대조군에 비해 낮은 경향을 나타내었고 (Figure 2), 3β-HSD의 유전자 발현은 BPA 처리군에서는 농도 의존적으로 그 발현량이 감소하였으며 (Figure 3), OP와 PCB 처리군에서는 저농도에서는 대조군보다 다소 높은 발현을 보였지만 10⁻⁵ M의 처리군에서는 대조군에 비해 낮은 발현양상을 보였다. 그러나, CYP_{17α}의 유전자 발현은 모든 합성 에스트로젠 처리군에서 농도가 증가할수록 낮게 나타났다 (Figure 4). 특히 OP와 PCB의 모든 처리군에서 유의하게 낮은 발현율을 나타내었다. CYP₁₉ 유전자의 발현은 발현량이 적어서 인지 관찰되지 않았다.

3. estrogen과 testosterone 양 분석

체외에서 2일간 배양된 정자세포로부터 분비된 호

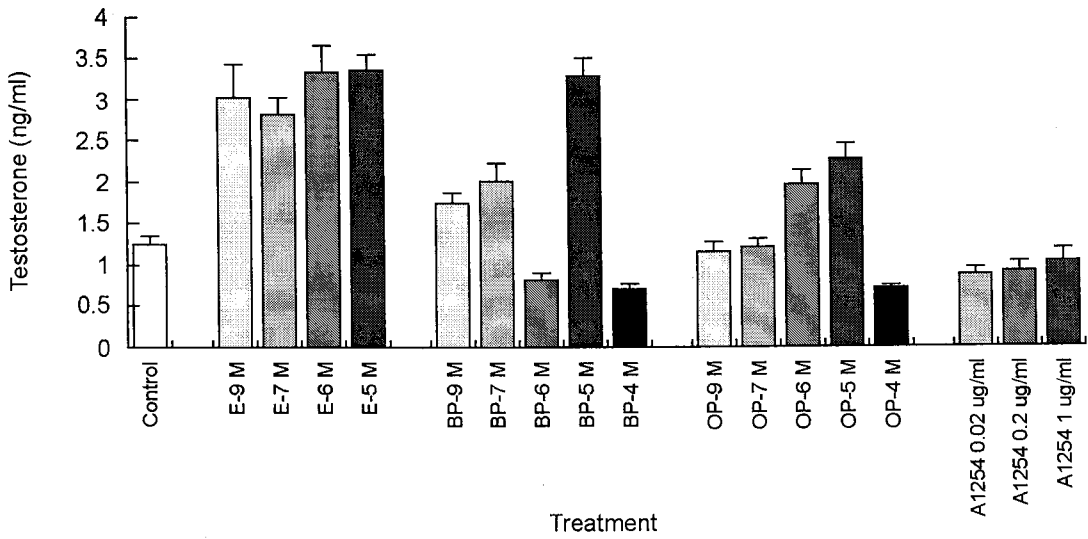


Figure 5. The effects of E₂, BPA, OP and A1254 on testosterone production of *in vitro* cultured pre-pubertal mouse testicular cells.

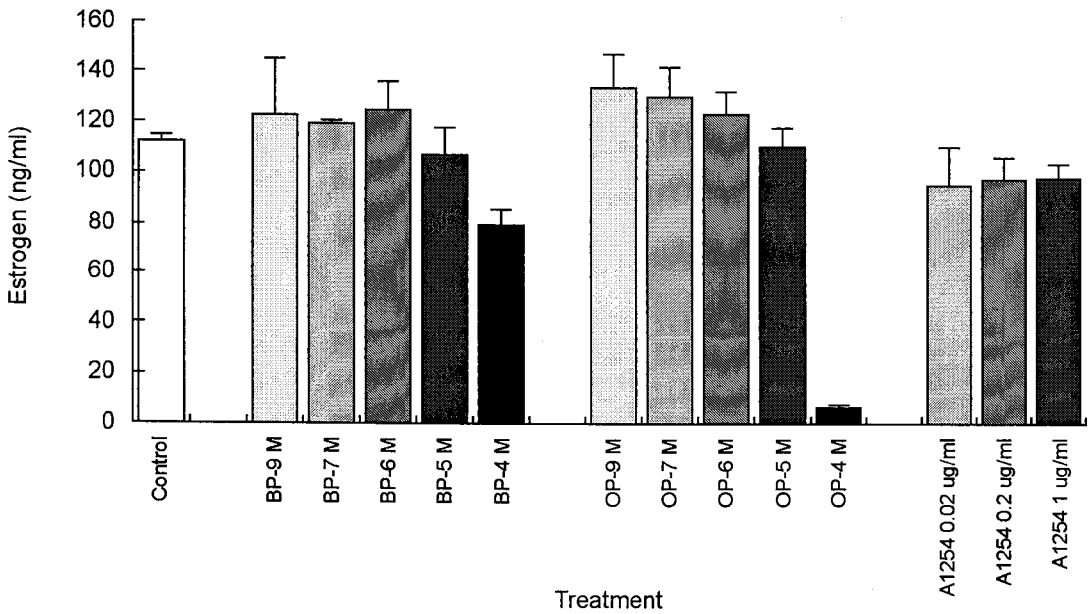


Figure 6. The effects of BPA, OP and A1254 on estrogen production of *in vitro* cultured pre-pubertal mouse testicular cells.

르몬의 분석을 위해서 배양된 배양액으로부터 estrogen (E)과 testosterone (T)을 검사하였다. 배양액 내 E와 T의 양은 대조군과 비교하여 처리군에서 유의한 차이가 없었으나, 고농도인 BPA와 OP (10⁴ M) 처리군에서 대조군보다 낮은 수치가 측정되었다 (Figure 5, 6).

고 찰

환경호르몬으로 알려진 내분비계 장애물질들은 흔히 일상생활에서 사용하는 캔, 플라스틱이나 일회용품, 살충제, 농약류 등에서 검출될 뿐만 아니라, 공

기중이나 물과 토양에 오염되어 동·식물은 물론 먹이사슬을 통해 축적된 형태로 인간에게 돌아오게 된다.⁷ 최근 들어 내분비계 장애물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 그 대부분이 스테로이드계 호르몬과 유사작용이나, 방해, 억제작용을 통해 여러 가지 생식기 발달 이상, 신경계 및 면역계에 영향을 일으키는 것으로 알려지고 있다.^{12,22}

웅성생식기인 정소에서 이루어지는 주요 기능 중의 하나는 Leydig 세포에서 남성호르몬인 testosterone (T)을 만드는 것으로, 정자세포의 분화와 정자형성 과정을 유지하고 남성적 성장을 나타내는 중요한 기능을 하고 있다.^{9,16} 이 호르몬의 합성은 cholesterol 이 4가지 효소, cholesterol side-chain cleavage enzyme (CYP_{17α}), 3β-hydroxysteroid dehydrogenase/Δ⁵, Δ⁴ isomerase (3βHSD), 17α-hydroxylase/C17-20 lyase (CYP_{17α}) 그리고, 17-ketosteroid reductase의 작용을 받아 합성된다.¹⁸ 또한 이렇게 만들어진 T는 CYP19에 의해 정소 내 E₂를 형성하게 된다. 정소 내 E₂의 기능은 아직 완전히 알려져 있지 않은데 주로 웅성 생식관의 유류, 제흡수, 정자의 성숙 및 뇌하수체호르몬의 조절에도 관여하는 것으로 알려지고 있다.¹⁰ 따라서 내분비계 장애물질이 이러한 일련의 과정을 방해한다면, 정상적인 steroidogenesis가 이루어지지 않아, 정자형성이나 정소의 다른 세포의 기능에도 영향을 미칠 것으로 보여진다. Johnson 등¹¹은 Dioxin (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)을 성체 흰쥐에 처리하였을 때는 농도 의존적으로 Leydig 세포의 부피와 기능이 저하되었다고 보고하고 있으며, Akinbemi 등²은 HPTE를 Leydig 세포에 처리하였을 때, 스테로이드 합성의 주원료인 콜레스테롤을 pregnenolone으로 전환시키는 효소인 CYP_{17α}의 유전자 발현이 감소되고, 특히 Leydig 세포에 대한 민감성이 출생 직후에서부터 미성숙 그리고 성체순으로 나타난다고 보고하고 있다. Andric 등³도 polychlorinated biphenyls (PCBs)의 일종인 aroclor 1248을 흰쥐에 투여하였을 때, 투여 농도에 따른 반응은 조금 차이가 있었으나 3β-HSD, 17α-hydroxylase/lyase와 17β-hydroxysteroid dehydrogenase의 활성이 저하되어 정소 내 androgenesis가 방해를 받는다고 확인하였다.

본 연구에서는 정소 내 정자세포들의 분화가 완전히 일어나기 전인 생후 15일령의 생쥐정자세포를 이

용하여 에스트로젠 성격을 가지고 있는 것으로 알려진 BPA, OP와 A1254가 정자형성과정에 미치는 영향을 알아보기 위해 체외배양법을 이용하여 스테로이드 호르몬 합성에 관여하는 효소들의 발현과 호르몬의 생성량을 확인하였다. 또한 내분비계 장애물질들이 에스트로젠과 같은 결과를 정소세포에서 유발시키는가를 확인하기 위해 E₂도 농도별로 처리하였다. 본 실험 결과에서는 합성호르몬인 BPA, OP와 A1254가 10⁻⁵ M 이하의 농도에서는 세포의 생존에는 크게 영향을 미치지 않아 Raychoudhury 등¹⁹의 실험 결과와 유사하게 나타났으며, CYP_{17α}, 3β-HSD와 CYP_{17α} 유전자의 발현은 억제되어 생쥐 정소 내 steroidogenesis를 방해하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 E₂는 이들과 같은 농도에서는 이와 같은 억제작용은 일어나지 않는 것으로 보아 이들 내분비계 장애물질이 생체 내 에스트로젠과는 다른 대사를 하는 것으로 여겨진다. 이는 이들 합성에스트로젠들이 생체 내 E₂와 유사하게 작용함으로써 negative feedback 기작에 의해 뇌하수체 분비호르몬의 분비를 억제하고 시상하부-뇌하수체 전엽-생식소 축의 호르몬 균형의 교란을 유발, 뇌하수체 분비호르몬인 FSH나 LH의 분비를 줄임으로써 정상적인 정소의 기능을 방해하여 결과적으로 정소의 분화와 정자형성과정에 이상을 초래할 것으로 사료된다.

이러한 결과는 내분비계 장애물질이 포유동물의 성숙 및 생식세포의 발생을 조절하는 스테로이드 호르몬의 생성 및 발현에 영향을 미치게 된다는 것을 의미하며 따라서, 정자형성과정 뿐만 아니라 정상적인 생식기관의 분화 및 정소의 발생을 저해할 것으로 사료된다. 그리고, steroidogenesis의 억제가 태아기나 사춘기의 성숙 시기에 일어난다면, 성인보다 더욱 치명적인 해를 입게 될 것으로 예측할 수 있으며 내분비계 장애물질의 규정에 대한 screening 방법과 내분비계 장애물질이 미치는 영향에 대하여 체내 및 체외 실험을 통한 정확한 기전에 관한 연구와 대책이 필요할 것이다. 본 연구는 환경오염물질인 합성에스트로젠에 대한 동물실험을 통해 이들 물질이 웅성생식계에 작용하는 영향을 연구함으로써 인간에게도 나타날 여러 가지 현상을 규명하고 그 기작을 밝혀내는 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Abraham EJ, Frawley SL. Octylphenol, an environmental estrogen, stimulates prolactin gene expression. *Life sciences* 1997; 60(17): 1457-65.
2. Akinbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Gunsalus GL, Hardy MP. A metabolite of methoxychlor, 2,2-bis(ρ -hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane, reduces testosterone biosynthesis in rat leydig cells through suppression of steady-state messenger ribonucleic acid levels of the cholesterol side-chain cleavage enzyme. *Biol Reprod* 2000; 62: 571-8.
3. Andric SA, Kostic TS, Stojilkovic SS, Kovacevic RZ. Inhibition of rat testicular androgenesis by a polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1248. *Biol Reprod* 2000; 62: 1882-8.
4. Blake CA, Boockfor FR. Chronic administration of the environmental pollutant 4-tert-octylphenol to adult male rats interferes with the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulation hormone, prolactin and testosterone. *Biol Reprod* 1997; 57: 255-66.
5. Boockfor FR, Blake CA. Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testis and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis and increases the incidence of sperm deformities. *Biol Reprod* 1997; 57: 267-77.
6. Chomzynski P, Sacchi N. Singly-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annual Biochem* 1998; 162: 156-9.
7. Colborn T, Dumanoski D, Myers JP. *Our stolen Future*. Putton, New York, 1996. Colborn T, vom Saal FS and Soto AM: Developmental effects of endocrine-disruption chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993; 101: 378-84.
8. Gill W, Schumacher G, Bibbo M, Straus F, Schoenberg H. Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. *J Urol* 1979; 122: 36-9.
9. George FW, Wilson JD. Sex determination and differentiation. IN: Knobil E, NeillJD (eds). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 1994; 3-28.
10. Hess RA, Bunick D, Lee K, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 1997; 390: 509-12.
11. Johnson L, Dickerson R, Safe SH, Nyberg CL, Lewis RP, Welsh TH Jr. Reduced leydig cell volume and function in adult rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p -dioxin without a significant effect on spermatogenesis. *Toxicology* 1992; 76: 103-18.
12. Kuiper GJM, Lemmen JG, Carlsson B. Interaction of oestrogenic chemicals and phytoestrogens with oestrogen receptor β . *Endocrinology* 1998; 139: 4252-63.
13. Le Magueresse-Battistoni B, Gérard N, Jégou B. Pachytene spermatocytes can achieve meiotic process *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 1115-21.
14. Majdic G, Sharpe RM, O'Shaughnessy PJ, Saunders PTK. Expression of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase in the fetal rat testis is reduced by maternal exposure to xenogenous estrogens. *Endocrinology* 1996; 137: 1063-70.
15. McLachlan J, Newbold R, Bullock B. Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Science* 1975; 190: 991-2.
16. Miller WR. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocri Rev* 1988; 9: 295-318.
17. Nikula H, Talonpoika T, Kaleva M, Toppari J. Inhibition of hCG-stimulated steroidogenesis in cultured mouse leydig tumor cells by bisphenol A and octylphenols. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 157: 166-73.
18. Payne AH, Youngblood GL. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in leydig cells. *Biol Reprod* 1995; 52: 217-25.
19. Raychoudhury SS, Blake CA, Millette CF. Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and sertoli cells, *Toxicol. Appl Pharmacol* 1999;

- 157: 192-202.
20. Reinhart KC, Dubey RK, Keller PJ, Lauper U, Rosselli M. Xeno-oestrogens and phyto-oestrogens induce the synthesis of leukaemia inhibitory factor by human and bovine oviduct cells. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(10): 899-907.
 21. Saunders PTK, Majdic G, Parte P, Millar MR, Fisher JS, Turner KJ, Sharpe RM. Fetal and perinatal influence of xenoestrogens on testis gene expression. *Adv Exp Med Biol* 1997; 424: 99-110.
 22. Spearow JL, Doemeny P, Sera R, Leffler R, Barkley M. Genetic variation in susceptibility to endocrine disruption by estrogen in mice. *Science* 1999; 285: 1259-61.
 23. Tres LL, Kierszenbaum AL. Viability of rat spermatogenic cells *in vitro* is facilitated by their coculture with sertoli cells in serum-free hormone-supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 3377-81.
 24. White R, Jobling S, Hoare Sa, Sumpster JP, Parker MG. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 1994; 135: 175-82.
 25. Wolkowicz MJ, Coonrod SM, Reddi PP, Millan JL, Hofmann MC, Herr JC. Refinement of the differentiated phenotype of the spermatogenic cell line GC-2spd (ts). *Biol Reprod* 1996; 55: 923-32.
-