

Bisphenol과 Octylphenol이 TM3 세포에 미치는 영향: Cytochrome P450scc와 Estrogen Receptor α 유전자의 발현

이호준^{1,2} · 김묘경^{1†} · 강희규¹ · 김동훈¹ · 한성원¹ · 고덕성¹

¹을지병원 의과학연구소, ²을지의과대학교 생리학교실

Effects of Bisphenol and Octylphenol on TM3 Cell : Expression of Cytochrome P450scc and Estrogen Receptor α mRNA

Ho-Joon Lee^{1,2}, Myo Kyung Kim^{1†}, Hee Gyoo Kang¹, Dong Hoon Kim¹,
Sungwon Han¹ and Duck Sung Ko¹

¹Eulji Medical Science Institute, Eulji Medical Center,

²Department of Physiology, Eulji University School of Medicine

요약 : 대부분의 내분비교란물질들은 에스트로젠이나 항에스트로젠적인 활성을 가지고 있어 사람이나 생태계에 있어서 생식기능 발달을 저해하는 것으로 보고되고 있다. 본 연구는 estrogen (E_2)과 bisphenol (BP) 그리고 octylphenol (OP)이 생쥐 Leydig cell line인 TM3 세포에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. TM3 세포는 11~13일령의 BALB/c nu/+ 생쥐로부터 유래한 정소내 세포인 Leydig cell로 DMEM에 FBS (10%)가 첨가된 배양액에 E_2 , BP와 OP를 농도별 (1 pM, 1 nM, 1 μ M, 1 mM)로 처리하고 48시간동안 체외에서 배양하였다. 배양 후, 전체 세포수와 생존율을 혈구세포판과 trypan blue 염색방법으로 조사하였고, 스테로이드호르몬 합성에 관여하는 cytochrome P450scc (CYPscc)와 estrogen receptor α (ER α) 유전자의 발현은 역전사 중합효소 연쇄반응으로 관찰하였다. 결과를 살펴보면 TM3 세포의 생존율에 있어서는 1 μ M 이하에서는 차이가 없었으며 1 mM 첨가군에서는 유의하게 감소함을 보였다. 세포수에 있어서는 OP 처리군에서만 유의하게 적게 나타났다. CYPscc 유전자의 발현은 E_2 군을 제외하고 BP (1 nM, 1 μ M) 첨가군에서 약간 감소가, OP (1 nM, 1 μ M) 첨가군에서는 유의한 감소가 나타났다. 그러나 ER α 유전자의 발현은 처리군 모두에서 대조군보다 높은 발현율을 나타내었다. 결론적으로 고농도의 BP와 OP는 CYPscc 유전자의 발현을 감소시킴으로써 스테로이드합성 과정을 억제시켜 정소기능에 장애를 일으키며, 정자형성 과정에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

Key words : TM3, Bisphenol, Octylphenol, Cytochrome P450scc 유전자, Estrogen receptor α 유전자

ABSTRACT : Most of endocrine disrupters (EDs) have been reported to exhibit estrogenic or anti-androgenic activity and thereby may disrupt reproductive development in human or wildlife. This study was performed to investigate the effects of estrogen (E_2), bisphenol (BP) and octylphenol (OP) on the mouse Leydig cell line (TM3). TM3 originated from testis of 11~13-day-old BALB/c nu/+ mice was cultured in DMEM supplemented with 10% FBS alone or medium with estrogen (E_2), bisphenol (BP) and octylphenol (OP; 1 pM, 1 nM, 1 μ M, 1 mM, respectively) for 48 hours. After culture, total cell number and viability were assessed by hemacytometer and trypan blue stain. Expression of cytochrome P450scc (CYPscc) mRNA whose product is involved in steroid hormone biosynthesis and estrogen receptor α (ER α) mRNA were detected by RT-PCR. As a result, treatment of TM3 with E_2 , BP and OP (1 mM, respectively) significantly decreased the viability but not all of groups as high as 1 μ M. Exposure of TM3 to OP significantly reduced the total cell number but not E_2 or BP. The expression of CYPscc mRNA was slightly reduced in BP (1 nM, 1 μ M) and significantly decreased in OP (1 nM, 1 μ M) treated TM3, except E_2 group. But the expression of ER α mRNA was slightly increased in all treated groups. In conclusion, BP and OP (high concentration) might inhibit steroidogenesis by decreasing the CYPscc mRNA expression in the mouse testis. These results suggest that BP and OP might impair spermatogenesis and subsequently disturb testicular function.

Key words : TM3, Bisphenol, Octylphenol, Cytochrome P450scc mRNA, Estrogen receptor α mRNA

[†]교신저자: 서울시 노원구 하계 1동 280-1, 을지병원 의과학연구소
(우)139-711 (전) 02-970-8711 (팩) 02-970-8002 e-mail: kmkemsi@eulji.or.kr

서 론

포유동물의 음성생식기관의 발달과 정자형성과정은 남성 호르몬을 비롯한 여러 가지 호르몬들과 성장인자 및 cytokines 등 다양한 물질들에 의해 이루어지는 복잡한 대사과정이다. 그러나 최근 들어 환경오염이 가속화되면서 환경으로부터 합성된 화학물질들이 생체내 호르몬의 기능을 방해 또는 변형시켜 생식기관의 발달과 성숙을 방해한다고 알려지고 있다. 이들 대부분의 내분비장애물질들은 여성호르몬 또는 항여성호르몬적 작용능력을 가지고 있어, 소량으로도 생체내 생식기능을 교란시키는 것으로 보고되고 있다 (Abraham과 Stephen Frawley, 1997).

일상생활에서 널리 사용되는 생활용품이나 플라스틱 용기 등에서 추출되는 Bisphenol-A (bp)와 octylphenol (OP)은 이미 잘 알려진 내분비장애물질로 Kuiper 등 (1998)은 생체 내 에스트로겐과 유사하게 에스트로겐 수용체에 결합이 가능하고, 에스트로겐의 작용에 의한 대사를 변형시켜 정상적인 E₂ 대사를 방해한다고 보고하고 있다. 음성 생식기에 있어서 에스트로겐의 기능은 아직 완전히 밝혀지지는 않지만, LH 분비의 조절과 에스트로겐 수용체를 통해 남성 생식기관내 용액 흡수와 Leydig cell에서의 스테로이드 형성을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Hess 등, 1997; Akinbemi 등, 2000). 그러나 성분화가 완전히 일어나지 않은 시기에 과량의 에스트로겐에 노출되면 ER 유전자 발현이 증가되어 정상적인 성분화가 일어나지 못하게 되고 또한 정소암과 같은 장애를 유발시킬 수 있다 (Tena-Sempere 등, 2000). bp와 OP는 에스트로겐보다 1,000~2,000 배 정도 낮은 활성을 가지고 있기는 하지만, 생체내·외에서 에스트로겐과 유사하게 prolactin의 분비를 촉진시키고 (White 등, 1994), 뇌하수체에서 LH와 FSH의 분비를 감소시킨다고 보고되고 있다 (Blake와 Boockfor, 1997). 또한, 음성 성체 흰쥐에 투여하였을 때, 혈청내 testosterone량이 줄어드는 것을 확인하였으며 (Boockfor와 Blake, 1997), 임신한 흰쥐에 OP를 투여하게 되면 cytochrome P450 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase와 steroidogenic factor-1의 발현이 새끼 흰쥐의 정소에서 줄어드는 것을 확인하였다 (Majdic 등, 1996).

그러나 최근 이들 알려진 내분비 장애물질들이 에스트로겐과 다른 대사를 통해 세포에 손상을 시킨다는 연구가 보고되고 있다. Nikula 등 (1999)은 체외 실험을 통해 bp와 OP에 의해 Leydig cell내 cAMP의 생성이 급격히 줄어들었으나, E₂ 첨가시는 cAMP생성이나 세포내 progesterone의 합성에는 저

해를 받지 않았다고 보고하고 있다. 따라서 본 연구에서는 생체내 호르몬인 에스트로겐과 내분비장애물질인 bp, OP를 각각 같은 농도로 생쥐 Leydig cell line인 TM3 세포에 처리하였을 때 TM3 세포의 생존율과 남성 호르몬인 testosterone 합성에 관여하는 cytochrome P450 side chain cleavage enzyme (CYPsc)과 estrogen receptor α (ER α) 유전자의 발현 변화를 비교하고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. TM3 세포의 배양

실험에 사용한 TM3 (ATCC Co., USA) 세포는 11~13일령 된 BALB/c nu/+생쥐의 정소로부터 얻어진 Leydig 세포주를 사용하였다. TM3 세포는 DMEM (+10% FBS) 과 3 ng/ml LH (luteinizing hormone)가 함유된 배양액에 1×10^5 세포농도로 6-well culture flask에 배양하였다.

2. E₂, BP 그리고 OP 처리

TM3 세포가 배양 접시내 sub-confluent 하게 자란 것을 확인하고, 배양액 단독 또는 estrogen (E₂; β -estradiol; E-8875, Sigma), bisphenol (bp; 4,4'-isopropyl-idenediphenol; I-0635, Sigma)과 octylphenol (OP; 4-tert-octylphenol; Fluka)를 1 M 농도로 에탄올에 녹인 후 각각 1 pM, 1 nM, 1 μ M, 1 mM 농도로 희석하여 첨가하였다. 배양 이틀 후 TM3 세포의 생존율은 0.4% trypan blue 염색법을 이용하였으며, 배양된 세포의 전체 수는 hemacytometer로 측정하였다.

3. TM3 세포의 전체 RNA 분리

이들동안 배양된 TM3 세포의 전체 RNA는 acid guanidinium phenol chloroform 방법 (Chomzynski와 Sacchi, 1987)을 응용하여 다음과 같이 분리하였다. 배양용기에 부착된 TM3 세포에 trypsin (0.05%)을 처리하여 세포들을 획득하고 원심관에 넣은 후 PBS로 2회 원심분리하여 배양액을 제거시켰다. 획득된 pellet을 TRIZOL (Gibco BRL, USA)에 녹인 다음, chloroform을 첨가하여 phenol층과 분리하여 원심분리 (14,000 rpm, 15 min)하였다. 원심분리 후, 상층액만을 회수하여 isopropyl alcohol을 동량 첨가, 다시 원심분리하여 (14,000 rpm, 15 min) 최종적으로 pellet으로 형성된 RNA를 얻었다.

4. 역전사중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

전체 RNA로부터 cDNA 합성을 위한 역전사 반응은 1st strand cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여

Table 1. Primers used for RT-PCR

Gene	5'-Primers (5' → 3')	3'- Primers (5' → 3')	Size (bp)
β -actin	GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA	CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC	540
CYPsc	AGT GGC AGT CGT GGG GAC AGT	TAA TAC TGG TGA TAG GCC ACC	411
ER α	TGG CGC TCC ATG GAA CAC	CAT CTC CAG GAG CAG GTC'	453

다음과 같이 실시하였다. 약 1 μ g의 RNA에 10 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP mix, 2.5 μ M oligo-p(dT)15 primer, 50 U RNase inhibitor, 20 U AMV reverse transcriptase (Boehringer Mannheim)를 혼합한 다음 25°C에서 10분, 42°C에서 1 시간 동안 배양하였고, 마지막으로 99°C에서 5분간 reverse transcriptase를 inactivation하였다. β -actin, CYPsc와 ER α 유전자의 primer는 한국 bioneer로부터 제작하였다 (O'shaughnessy 와 Mannan, 1994) (Table 1). β -actin의 PCR 조건은 94°C에서 45초, 54°C에서 45초, 72°C에서 1분 30초의 cycle을 20회 실시하고, CYPsc는 95°C에서 5분간 denaturation을 1회, 94°C에서 1분, 68°C에서 1분 30초의 cycle을 35회 실시하였고 72°C에서 7분간 extension시켰다. ER α 는 95°C에서 5분간 denaturation을 1회, 95°C에서 30초, 68°C에서 45초간의 cycle을 32회 실시하였다. 반응이 끝난 증폭 산물은 2%

agarose gel에서 확인하였다. 각 CYPsc과 ER α 유전자의 β -actin 유전자에 대한 상대적인 양의 변화를 image analysing software (BIO-PROFIL Bio-1D)을 이용하여 측정하였다.

5. 통 계

모든 실험의 결과는 3번 이상 반복하여 얻었으며, 각 군간의 유의성은 χ^2 -test로 검정하였고, p값이 p<0.05인 경우를 통계적으로 유의하다고 보았다.

결 과

1. TM3 세포의 생존율과 세포수

TM3 세포에 E₂, BP와 OP를 각각 1 pM, 1 nM, 1 μ M, 1 mM 첨가한 후, 2일간 배양하여 생존율을 trypan blue 염색법으로 조사한 결과 1 pM, 1 nM, 1 μ M에서는 생존율이 95%이상으로 유의차가 없었으며, E₂를 1 mM 넣었을 때는 43.5%로 반이상의 세포가 죽은 것을 확인하였다 (Table 1). 그리고 BP와 OP를 1 mM 넣었을 때는 세포들이 모두 죽어서 바닥에 부착하지 못하였다. 이틀간 배양하여 얻은 TM3의 전체 세포수는 E₂와 BP가 첨가된 군에서는 차이가 없었으며, OP첨가군에서는 다른 군에 비해 세포수가 유의하게 적게 나타났다 (Table 1).

2. Cytochrome P450sc (CYPsc) 유전자의 발현

TM3 세포에서 CYPsc 유전자의 발현량을 LH의 첨가 유무에 따라 비교하였을 때, Fig. 1에서 보는 바와 같이 LH 자극에 의해 CYPsc 유전자의 발현이 증진되는 것을 확인하였으며, 이후 실험에서는 모두 LH (3 ng/ml)을 첨가하여 실시하였다. E₂, BP와 OP가 1 mM 첨가된 군에서는 세포의 생존에 치명적인 영향을 끼쳐 다음 실험에서 제외시켰다. CYPsc 유전자의 발현량을 각 군의 β -actin 유전자 발현에 대한 상대값으로 계산하여 비교하였다. Fig. 2의 결과와 같이, E₂ 첨가군에서는 대조군에 비해 발현량의 차이를 볼 수 없었으며, BP 첨가군에서도 첨가 농도가 증가함에 따라 발현량이 다소 감소하는 것을 확인할 수 있었으나 통계적인 유의차는 보이지 않았다. 그러나 OP 첨가군에 있어서는 1 nM 이상의 OP가 첨가됨에 따라 대조군에 비해 유의하게 CYPsc 유전자의 발현이

Table 2. The viability and cell number of TM3 treated with E₂, BP and OP

Treatment	Viability (%)	Cell count (X 10 ⁴)
Control	97.00 ± 3.12	244.0 ± 20.0
E ₂ 1 pM	96.97 ± 1.91	229.9 ± 12.1
E ₂ 1 nM	97.10 ± 1.84	218.9 ± 38.6
E ₂ 1 uM	97.10 ± 2.03	298.9 ± 19.9
E ₂ 1 mM	43.50 ± 3.40*	90.0 ± 20.0**
BP 1 pM	97.74 ± 1.77	229.9 ± 42.8
BP 1 nM	98.06 ± 2.19	295.0 ± 50.8
BP 1 uM	96.28 ± 1.32	211.7 ± 24.2
BP 1 mM	0**	-
OP 1 pM	95.20 ± 1.71	175.5 ± 17.2*
OP 1 nM	96.71 ± 1.58	178.8 ± 20.6*
OP 1 uM	96.93 ± 1.86	158.8 ± 4.6*
OP 1 mM	0**	-

Note. Data represent the results of three studies. Cell viability/count was determined after 48 hr of treatment. Data are expressed as means ± SE.

The symbols * and ** indicates *P < 0.05, **P < 0.01.

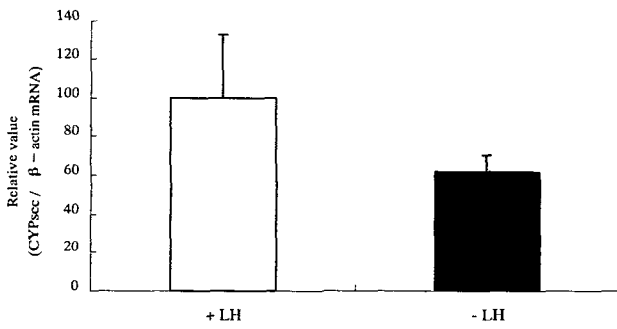


Fig. 1. Effects of the LH on the CYP17c mRNA expression of cultured TM3. LH (3 ng/ml) were added at culture medium. Note. Data represent the results of three studies.

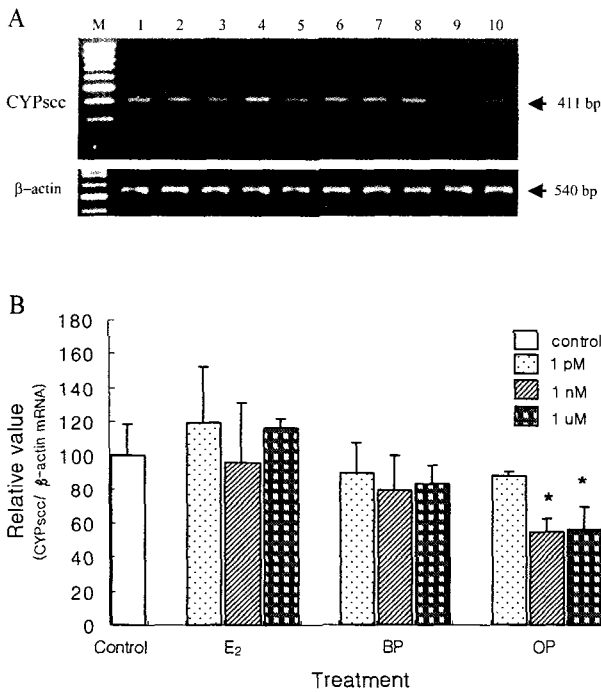


Fig. 2. Relative mRNA levels of CYP17c in E₂, BP and OP treated TM3 for 48 hr. A. RT-PCR amplification of CYP17c/β-actin mRNA expression. M : 100 bp ladder, lane 1: control, lane 2~4 : E₂, lane 5~7 : BP, lane 8~10 : OP (1 pM, 1 nM, 1 uM, respectively). B. Relative changes in the amount of CYP17c mRNA (relevant to β-actin) of cultured TM3 with E₂, BP and OP (1 pM, 1 nM, 1 uM, respectively)(* P<0.05). Note. Data represent the results of four studies.

감소하는 것을 확인할 수 있었다 (P<0.05).

3. Estrogen receptor α (ERα) 유전자의 발현

E₂, BP와 OP를 첨가한 각 군에서의 ERα 유전자 발현양상과 변화를 살펴보면 모든 첨가군에서 ERα 유전자가 발현되었으며 양적인 측면에서도 대조군에 비해 모든 군에서 높은

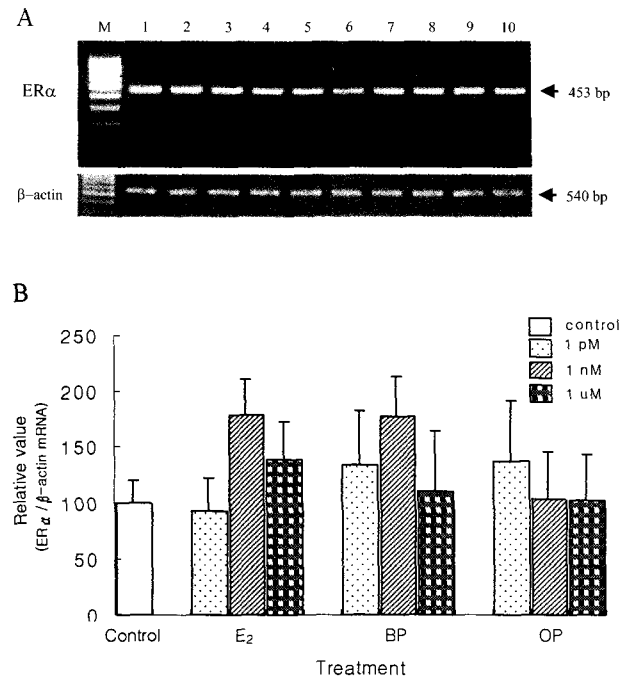


Fig. 3. Relative mRNA levels of estrogen receptor α in E₂, BP and OP treated TM3 for 48 hr. A. RT-PCR amplification of ERα/β-actin mRNA expression. M :100 bp ladder, lane 1: control, lane 2~4 : E₂, lane 5~7 : BP, lane 8~10 : OP (1pM, 1nM, 1uM, respectively). B. Relative changes in the amount of ERα mRNA (relevant to β-actin) of cultured TM3 with E₂, BP and OP (1 pM, 1 nM, 1 uM, respectively). Note. Data represent the results of four studies.

발현량을 보였다 (Fig. 3).

고찰

내분비 장애물질은 기능적으로 호르몬과 같은 작용을 하여 태아기에는 발생 및 분화에 장애를 일으켜 성의 정상적인 발달 장애를 유발하고, 성체에서는 생식기관에 작용하여 정자와 난자의 성숙 및 생성에 이상을 초래하게 된다. 환경 에스트로겐에는 천연 식물성 에스트로겐과 합성 화학물질들이 있는데 살충제, 제초제, PCB류, 가소제 및 계면활성제의 분해산물들이 에스트로겐의 작용을 한다. 이와 같이 에스트로겐 성격을 가지고 있는 것으로 알려진 BP, OP와 E₂가 음성의 생식기관에 미치는 영향을 알아보기 위해 생쥐의 정소내 체세포인 Leydig cell의 세포주인 TM3 세포를 이용하여 농도에 따른 BP, OP와 E₂의 영향을 관찰한 결과, 1 μM 이하 농도의 E₂나 BP와 OP를 처리하였을 때 세포의 생존율에는 영향을 미치지 않았다. 이는 Blake 등 (1995)이 OP 1 μM 이하의 저농도에서는 Leydig cell의 생존율에 감소가 없었다고 보고한

것과 같은 결과이다. 본 실험에서는 100 μ M의 OP 첨가군에서는 0%의, E₂와 BP 첨가군에서는 80% 이상의 생존율을 보였으나 (data not shown), 1 mM의 고농도에서는 BP와 OP 첨가군에는 TM3 세포가 모두 사멸되었고, E₂ 처리군에서만 50% 이하의 생존율을 보여 고농도에서는 세포의 생존율과 밀접한 관련이 있다는 것을 알 수 있었다. Raychoudhury 등 (1999)은 생쥐 정자세포와 Sertoli cell에 OP (10⁻⁸ M, 10⁻¹² M)를 처리했을 때, E₂ (10⁻⁶ M) 나 diethylstilbestrol (10⁻⁶ M) 처리 때와 달리 세포 생존율의 감소와, 세포자연사 (apoptosis)가 증가한 것을 확인하였다. 또한 생후 3주된 흰쥐로부터 회수한 Sertoli cell이 성체로부터 얻은 Sertoli cell보다 저농도의 OP 처리시에도 생존율에 더 치명적인 영향을 받았다고 보고하고 있다. 이러한 결과는 내분비 장애물질의 종류에 따라 그리고 같은 내분비 장애물질이라도 그 독성의 정도가 세포의 종류와 성숙도에 따라서도 달라질 수 있다는 것을 의미한다. E₂, BP 그리고 OP 처리하여 이를 배양 후 얻어진 전체 세포수는 OP가 첨가된 군이 다른 군에 비해 적게 나타난 것으로 보아 OP가 TM3의 증식에도 영향을 미쳤다고 사료되어진다.

Leydig cell의 주요 기능은 testosterone을 합성하는 것이며, dioxin (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- ρ -dioxin), HPTE [2,2-bis(ρ -hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane], PCBs (polychlorinated biphenyls) 등 여러 가지 내분비 장애물질들에 의해 스테로이드 합성과정에 장애를 받아 정상적인 호르몬합성이 이루어지지 않는다고 보고되고 있다 (Majdic 등 1996). Akinbemi 등 (2000)은 HPTE를 Leydig cell에 처리하였을 때, 스테로이드 합성의 주원료인 콜레스테롤을 pregnenolone으로 전환시키는 효소인 CYP₁₇의 유전자 발현이 감소되고, 특히 Leydig cell에 대한 민감성이 출생 직후, 미성숙, 성체순으로 나타난다고 보고하고 있다. Andric 등 (2000)도 흰쥐에 aroclor 1248를 투여하였더니 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5, Δ^4 isomerase (3 β HSD), 17 α -hydroxylase/C17~20 lyase (CYP_{17 α}) 그리고, 17-ketosteroid reductase의 작용이 억제되어 정소내 남성호르몬합성이 저하되었다고 보고하였다. 본 실험의 결과에서도 E₂ 첨가시에는 CYP₁₇ 유전자의 발현에 영향이 없었으나 BP와 OP 첨가군에서는 농도가 증가함에 따라 CYP₁₇ 유전자의 발현이 감소하는 결과를 얻어, BP와 OP가 E₂와는 다른 경로로 스테로이드 합성에 작용하여 Leydig cell에 영향을 미치는 것이라고 사료된다. 한편, ER α 유전자의 발현에 있어서는 처리군 모두 대조군보다 높은 발현율을 보여 BP와 OP가 E₂와 같이 ER α 의 발현을 촉진시킨다는 결과를 얻을 수 있었는데, Barthold (1999) 등도 내분비 장애물질인 dioxin을 어린 돼지

에 투여하였더니 ER 단백질의 발현이 정소내에서 증가함을 확인하였다. 이 결과는 내분비 장애물질이 에스트로겐의 효과를 활성화시킴으로써 정소에 영향을 주게 되고 정상적인 생리적 기작을 방해하여 FSH나 남성호르몬의 생성을 억제하게 되어 정자형성과정에 영향을 줄 것으로 사료된다.

결론적으로 BP와 OP를 Leydig 세포주인 TM3 세포에 고농도로 처리하였을 때 CYP₁₇ 유전자의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. 그러나 같은 농도의 E₂를 처리하였을 때는 이와 같은 억제작용은 일어나지 않았다. 물론 BP와 OP처리시에도 E₂와 유사하게 ER α 유전자의 발현을 증진시키기는 하였지만, 본 실험의 결과만으로는 BP와 OP가 반드시 에스트로겐적인 활성을 가졌다거나 에스트로겐적인 활성에 의해 스테로이드합성과정에 영향을 미친다고 결론 내는 것은 아직 미흡함이 있을 것으로 여겨진다. 또한 성숙숙이 완전히 일어나지 않은 새끼시기에 ER 유전자의 과다한 발현은 음성 뿐만 아니라 자성에 있어서도 생식기관의 장애를 가져와 성분화에 나쁜 영향으로 작용할 것으로 사료된다. 따라서, 내분비 장애물질들에 대한 정확한 반응기전을 밝히기 위해서는 임신기, 태아기, 성체기에 따라 각각 다양한 내분비 장애물질의 처리에 의해 형태학적인 조사와 더불어 조절인자들을 확인하는 연구들이 이루어져야 할 것이다.

인용문헌

- Abraham EJ, Stephen Frawley L (1997) Octylphenol, an environmental estrogen, stimulates prolactin gene expression. *Life Sci* 60(17): 1457-1465.
- Akinbemi BT, Ge R-S, Klinefelter GR, Gunsalus GL, Hardy MP (2000) 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* 62: 571-578.
- Andric SA, Kostic TS, Stojilkovic SS, Kovacevic RZ (2000) Inhibition of rat testicular androgenesis by a polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1248. *Biol Reprod* 62: 1882-1888.
- Barthold JS, Kryger JV, Derusha AM, Duel BP, Jednak R, Skafar DF (1999) Effects of an environmental endocrine disruptor on fetal development, estrogen receptor(alpha) and epidermal growth factor receptor expression in the procine male genital tract. *J Urol* 162: 864-871.
- Blake CA, Nair-Menon JU, Raychoudhury SS, Millette CF, Bo-

- govich K, Woller MJ, Lin T, Wang D, Boockfor FR, Campbell GT (1995) Octylphenol causes death of cultured rat thymocytes, splenocytes and cells for reproductive organs. *Mol Biol Cell* 6(Suppl.), 356a.
- Blake CA, Boockfor FR (1997) 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* 57: 255-266.
- Boockfor FR, Blake CA (1997) 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* 57: 267-277.
- Chomzynski P, Sacchi N (1987) Singly-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annual Biochem* 162: 156-159.
- Hess RA, Bunick D, Lee K-H, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB (1997) A role for estrogens in men and women. *Nature* 390: 509-512.
- Kuiper GJM, Lemmen JG, Carlsson B (1998) Interaction of oestrogenic chemicals and phytoestrogens with oestrogen receptor β . *Endocrinology* 139: 4252-4263.
- Majdic G, Sharpe RM, O'shaughnessy PJ, Saunders PTK (1996) Expression of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/C17~20 lyase in the fatal rat testis is reduced by maternal exposure to xenogenous estrogens. *Endocrinology* 137: 1063-1070.
- Nikula H, Talonpoika T, Kaleva M, Toppari J (1999) Inhibition of hCG-stimulated steroidogenesis in cultured mouse leydig tumor cells by bisphenol A and octylphenols. *Toxicol Appl Pharmacol* 139: 437-444.
- O'shaughnessy PJ, Mannan MA. (1994) Development of cytochrome P-450 side chain cleavage mRNA levels in neonatal ovaries of normal and hypogonadal (hpg) mice. *Mol Cell Endocri* 104: 133-138.
- Raychoudhury SS, Blake CA, Millette CF (1999) Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and sertoli cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 157: 192-202.
- Tena-Sempere M, Navarro J, Pinilla L, Gonzalez LC, Huhtaniemi I, Aguilar E (2000) Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor alpha and beta mRNA expression in rat testis during postnatal development. *J Endocrinol* 165(2): 345-357.
- White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135: 175-182.