

내분비계 장애물질의 에스트로겐 활성에 대한 *In vitro* 및 *In vivo* 검색시험법

김형식* · 한순영 · 한상국 · 신재호 · 문현주 · 김소희 · 박기숙 · 김규봉 · 이이다 · 장성재 · 박귀례
국립독성연구소 독성부

Evaluation of *In vitro* and *In vivo* Screening Methods for Estrogenic Activity of Endocrine Disruptors

Hyung Sik Kim*, Soon-Young Han, Sang Kuk Han, Jae Hoo Shin, Hyun Ju Moon, So Hee Kim, Ki Sook Park, Kyu Bong Kim, Rhee Da Lee, Seung Jae Jang and Kui Lea Park

Reproductive & Developmental Toxicology Division, National Institute of Toxicological Research, Korea Food & Drug Administration 5, Eunpyung-gu, Nokbun-dong, Seoul

(Received March 8, 2000)

(Accepted May 4, 2000)

ABSTRACT : The purposes of our study were to optimize the conditions of the screening and testing methods for endocrine disruptors, to characterize these assays using several compounds with well-defined endocrine activity, and to compare the sensitivity between these assays currently undergoing validation. Two *in vitro* test systems, MCF-7 cells proliferation (E-screen assay) and competitive binding to estrogen receptors (ER) were selected to evaluate the estrogenic effects. 17 β -Estradiol (E2) and diethylstilbestrol (DES) were used as a positive control *in vitro* test. Also, E2 and ethinyl estradiol (EE) were used as a positive control *in vivo* uterotrophic assay. In *in vitro* test, E2 and DES showed a strong estrogenic response at concentration of 1.0 nM. In uterotrophic assay, E2 (0.3 μ g/kg) and EE (0.3 μ g/kg) produced a significant increase in uterus and vagina weight in both immature and ovariectomized rats. Although we did not compare the specificity between *in vivo* and *in vitro* assays, these assay systems may serve as a good tool for endocrine disruptors screening methods. Our data indicate that these assay systems exhibit some difference in their sensitivity to the same estrogenic compounds. Therefore, as a first rapid screening assay for estrogenic activity of unknown chemicals, at least two assay systems should probably be carried out with a view of high sensitivity and standardization conditions. Also, a careful validation tests are necessary to obtain a reasonable degree of reproducibility.

Key Words : Endocrine disruptors, MCF-7 cells, E-screen assay, Competitive binding, Uterotrophic assay

I. 서 론

최근 야생생물 뿐만 아니라 인간을 포함한 포유동물의 생식기능에도 이상을 일으키는 각종 내분비계 장애물질에 대한 위협이 심각한 상태에까지 이르렀다고 주장하는 보고들이 있다(Safe, 1995; Colborn *et al.*, 1996; Kavlock and Ankley, 1996). 오존층 파괴, 지구온난화문제와 함께 21세기 지구를 위협하는 환경문제로 등장한 내분비계 장애물질의 영향은 지난 70년대 초에 유엔에서 처음으로 보고된 후 지금까지 미국 오대호 지역과 플로리다에서 야생

생물의 생식기능이상, 암·수 동체 잉어 발견 등 야생 생물에서 다양한 피해사례가 발견되고 있다(Colborn *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1993; Dhar *et al.*, 1998). 또한 그 피해는 사람에서도 최근 50년동안 남성의 정자수 및 정액량 변화와 유방암, 자궁암, 전립선암 등의 생식기관에 관련된 암 발생이 과거에 비해 현저하게 증가된 것과도 관련이 있는 것으로 추정되고 있다(Sharpe and Skakkebaek, 1993; Brinbaum, 1994). 그러나 대부분의 경우 내분비계 장애물질로 추정되는 물질들이 직접적으로 야생생물 뿐만 아니라 사람의 내분비계에 위대한 영향을 유발시키는지에 대한 관련성은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았다. 따라서 이에 대한 각국의 연구가 현재 활발하게 진행되고 있으며,

*To whom correspondence should be addressed

그 중에서도 내분비계 장애물질 검색 및 시험법 확립에 관한 연구는 전 세계적으로 매우 시급한 과제로 인식되고 있다.

일반적으로 내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemicals, EDCs)이란 생체내 항상성 유지와 성장, 발육, 생식 기관 발달 등을 조절하는 호르몬의 생성, 분비, 이동, 대사 및 수용체와의 결합 등을 교란시키는 유해화학물질을 일컫는 용어이다. 특히 이들 화학물질이 체내에 유입되면 마치 호르몬과 같이 작용한다고 하여 일명 "환경호르몬"이라고도 불리고 있다. 현재 미국 및 일본을 비롯한 선진국에서는 내분비계 장애물질의 모니터링 뿐만 아니라 독성기전연구 및 인체 위해영향에 관한 다양한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 지금까지 다수의 화학물질들이 내분비계 장애작용을 나타낼 가능성이 있다고 보고한 바 있다(Klotz *et al.*, 1996). 이와 같은 취지에 부합하여 미국 EPA(환경보호국)에서는 내분비계 장애물질 검색 및 시험법 확립을 위한 프로토콜 개발에 많은 인력과 예산을 설정하여 추진하고 있다. 그 결과 내분비계 장애물질 연구를 위한 자문기구로 EDSTAC(내분비계장애물질 검색 및 시험 자문위원회)를 구성하였다(Gray *et al.*, 1998). 또한 내분비계 장애물질 시험지침과 규제를 위한 OECD의 관련위원회에서도 사람 및 야생생물에서 뿐만 아니라 어류 및 무척추동물까지 그 규제범위를 넓히고 있다(Holmes *et al.*, 1998). 그 뿐만 아니라, 이들 물질들에 대한 검색 시험법을 확립하기 위해 다국적인 공동연구방향으로 각 참여연구기관을 선정하여 시험법에 대한 prevalidation을 실시하는 중에 있다. 일본에서도 국립환경연구소를 중심으로 본격적인 연구에 착수하였으며, 우리나라에서도 이에 관한 연구의 필요성을 인식하여 각 정부기관 및 학계를 중심으로 중·장기 연구계획을 수립하였으며 본격적인 연구를 실시하고 있다.

따라서 본 연구에서는 미국 EPA의 EDSTAC과 OECD에서 제시한 내분비계 장애물질 검색 및 시험법중 에스트로겐 및 항에스트로겐 활성 평가에 관한 *in vitro* 및 *in vivo* 시험법을 확립하고 동일한 시험물질에 대하여 각 시험법의 장·단점과 감도를 비교하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

17 β -Estradiol(E2), diethylstilbestrol(DES), tamoxifen, HEPES, ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), dithiothreitol, 99% ethanol, corn oil, dimethylsulfoxide(DMSO), sulforhodamine-B(SRB), trizma base 및 일반적으로 실험에 쓰여진 화학물질들은 Sigma Chemical(St. Louis, MO)사에서 구입하였다. Hydroxyapatite(HAP)는 Bio-Rad(Her-

cules, CA)사에서 구입하였으며, Dulbecco's modification of Eagle's medium(DMEM), phenol red free DMEM, phosphate buffered saline(PBS), trypsin 및 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco BRL(Gaithersburg, MD)사에서 구입하였으며, 상업적으로 판매하는 charcoal-dextrane activated FBS(CDA-FBS)는 Hyclone(Logan, UT)사에서 구입하였다. 방사선 동위원소인 [³H]Estradiol ([³H]E2)은 Amersham(Arlington Height, IL)사에서 구입하였다.

2. 시험동물 및 사육환경

시험동물은 특정 병원체 부재 Sprague-Dawley 암컷 랫드를 식품의약품안전청 실험동물자원실(Seoul, Korea)로부터 분양 받아 일정시간 동안 순화 사육한 후 시험에 사용하였다. 사육조건은 온도 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도 55 \pm 10%, 명암은 12시간마다 자동조절되는 환경에서 사육하였다. 사료와 물은 자유공급하였다.

3. 세포주 및 배양조건

사람 유방암세포주인 MCF-7 세포는 Soto(Tufts University, MA)로부터 분양받았다. MCF-7 세포는 5% FBS, 1 mM sodium pyruvate 및 7.5% NaHCO₃가 첨가된 DMEM 배지를 가하여 5% CO₂와 37 $^{\circ}$ C로 유지되는 배양기에서 순차적으로 계대배양하였다.

4. E-Screen assay

E-screen assay는 Soto 등(1995)의 방법에 따라 실시하였다. MCF-7 세포를 일정시간 배양한 후 96-well culture plate(Falcon #353072, Non-pyrogenic)에 세포를 분주하기 하루 전 flask내의 배지를 교환한 후 실험 당일에 배지를 제거하여 PBS buffer로 1회 세척한 후, 0.25% trypsin을 가하여 세포를 분리하였다. 그 후 세포배양액을 15 ml conical tube에 포집하여 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리(1,000 rpm, 5 min)한 후 상등액을 aspirator로 제거하였다. 일정량의 배지를 conical tube에 가하여 세포를 단일화한 후 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하고 DMEM 배지를 가하여 일정량의 세포수(5 \times 10⁶ cells/ml)로 조정하였다. 그 후 96-well culture plate에 각 well당 일정량(100 μ l)의 세포액을 가하여 5% CO₂가 일정하게 유지되는 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 각각의 well에 들어 있는 배지를 제거하였다. 시험용 배지인 5% CDA-FBS를 포함하는 DMEM 90 μ l씩 각 well에 가하고 시험물질을 각 농도별로 10 μ l씩 well에 첨가하였다. 이때 음성대조물질로는 DMSO만을 첨가한 배지를 사용하였으며 각 well당

DMSO의 최종농도가 0.5%를 넘지 않도록 하였다. 그 후 시험물질이 첨가된 96 well plate를 5% CO₂, 배양기에서 6일간 배양하고 SRB assay법에 의해 MCF-7세포의 증식을 구하였다(Soto *et al.*, 1995).

5. 에스트로겐 수용체와의 상경적 결합시험

성숙한(7주령) 비임신 Sprague-Dawley계 암컷 랫드를 이용하여 난소를 제거하고 10일후에 자궁을 적출하였다. 자궁의 지방조직을 제거하고 무게를 측정후 cold TEDG buffer(10 mM Trizma base, 1.5 mM EDTA, 10 mM dithiothreitol, 10% glycerol, pH 7.4)를 1 g/10 ml씩 가하여 polytron homogenizer(Cole-Parmer Instrument, IL)를 이용하여 4°C에서 균질화하였다. 그 후 ultracentrifuge(105,000 ×g, 4°C)로 60 min간 원심분리하였다. 상등액(estrogen receptor를 함유)을 15 ml의 conical tube에 취하여 단백질 농도를 측정후 2 mg/ml로 조정하여 실험에 이용될 때까지 -70°C에서 보관하였다(Shelby *et al.*, 1996). 먼저 test tube에 일정량의 [³H]E2 (10 μl, 1×10⁻⁹ M 최종농도)를 넣고 cytosol 농도(0, 25 μg, 50 μg, 100 μg, 200 μg, 300 μg)를 가한 후 최종 volume이 500 μl가 되도록 50 mM Tris buffer(pH 7.4)를 가하였다. 그 후 test tube를 roller drum을 이용하여 4°C에서 20시간 동안 반응시킨 후 [³H]E2과 에스트로겐 수용체와의 결합반응정도를 측정하였다.

상경적 결합반응 시험은 [³H]E2 (10 μl, 최종농도 1×10⁻⁹ M)과 10 μl의 radioinert competitors(E2, DES, EE) 및 100 μl의 cytosol를 가하여 최종 volume이 300 μl가 되도록 50 mM Tris buffer를 가하여 조정후 vortex하여 4°C의 roller drum에서 20시간 동안 반응시켰다. 그 후 free ligand로부터 에스트로겐 수용체와 결합한 ligand를 분리하기 위해 동량의 60% HAP slurry(시험 전에 50 mM Tris buffer로 미리 활성화)를 가하였다. 시험관을 ice-cold water bath에서 20분간 방치하면서 5분 간격으로 vortex한 후 600×g로 4°C에서 원심분리하였다. 상등액은 버리고 2.0 ml의 50 mM Tris buffer를 가하여 3회 washing하였다. 최종 washing한 후 2.0 ml의 ethanol(99.9%)를 가하여 HAP와 결합한 receptor-ligand complex를 추출하였다. 그 후 일정량의 ethanol 상등액을 취하여 10 ml의 scintillation cocktail이 든 vial에 가하여 radioactivity를 측정후 에스트로겐 수용체에 대한 상경적 결합반응을 구하였다.

6. 미성숙 동물을 이용한 자궁비대반응 시험

생후 18일(출산일을 0일로 산정하였음)의 미성숙 Sprague-Dawley계 암컷 랫드(체중 20~30 g)를 분양받아 2일간 실험실 환경에 적응시킨 후 시험군을 각 군당 6마리씩 용

매대조건, E2 및 EE 투여군으로 분리하였다. 생후 20일에 시험물질인 E2 및 EE를 각각 95% ethanol에 용해한 후 corn oil에 현탁(95% 에탄올의 최종농도가 5% 이내) 하여 3일간(20~22일간) 피하투여 하였다. 투여량은 모두 0.3 μg/kg으로 동일하게 하였으며 투여액량은 4 ml/kg으로 매일 체중을 측정하여 체중에 따라 산출하였다. 시험물질 투여는 매일 동일한 시간에 실시하였다. 시험물질을 마지막 투여 후 24시간에 모든 동물을 투약 순서로 사멸하여 자궁, 질 및 난소를 적출하고 지방을 제거하여 각각의 중량을 측정하였다. 또한 자궁은 wet 무게를 측정후 자궁을 4등분하여 Whatman paper위에 올려놓고 내용액을 제거한 무게를 측정하였다.

7. 난소절제동물을 이용한 자궁비대반응 시험

건강한 Sprague-Dawley계 암컷 랫드(약 5주령, 체중 130±10 g)를 1차 선별하여 1주간 실험실 환경에서 순화시킨 후 난소를 제거하였다. 난소절제동물은 매일 임상증상 및 염증여부를 1주간 관찰한 후 체중범위가 180~190 g인 건강한 동물만을 선별하였다. 난소절제 1주 후 시험물질인 E2 및 EE를 동일한 용량 및 동일한 방법으로 3일간 연속하여 피하 투여하였다(OECD, 1999). 마지막 투여 후 24시간에 모든 동물을 투약 순서대로 사멸하여 자궁 및 질을 적출하고 지방을 제거하여 중량을 측정하였다. 또한 자궁은 wet무게를 측정후 Whatman paper에 올려놓고 내용액을 제거한 무게를 측정하였다.

III. 결 과

1. E-Screen assay

본 연구에서는 Soto 등(1995)의 방법과 같이 에스트로겐 작용물질로서 알려져 있는 E2 및 EE를 양성대조물질로서 사용하여 사람 유방암세포인 MCF-7세포의 증식에 미치는 영향을 시험하였다. 먼저 세포배양에 미치는 혈청의 영향을 검토하기 위해 동일한 조건에서 상업용으로 판매되고 있는 FBS 및 CDA-FBS(Hyclone)과 본 연구에서 제조한 활성탄처리 혈청(KFDA-FBS)을 첨가하여 세포증식에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과, Hyclone사의 활성탄처리 혈청보다 본 연구실에서 조제한 혈청(KFDA-FBS)이 MCF-7 cells의 세포증식에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 또한 본 연구에서는 일반적으로 세포배양에 이용되는 혈청에 5 nM E2를 첨가하여 MCF-7 세포의 증식에 미치는 영향을 비교하였다. 배양 6일까지 5% FBS를 첨가한 배지에서는 배양 시간에 따라 MCF-7 세포의 증식을 촉진시키는 경향을 나타내었다(Fig.

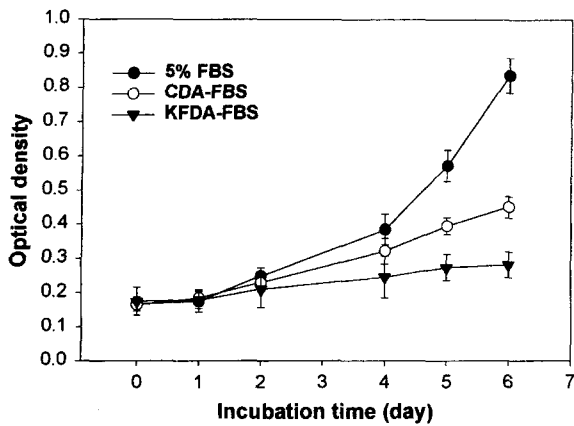


Fig. 1. Effect of sera on MCF-7 cell proliferation in culture. Proliferation experiments conducted in quadruplicate wells at least three times. Data represent the normalized absorbances were measured by Microplate reader.

2. 이것은 5 nM의 E2를 가한 5% CDA-FBS 배지에서 배양한 경우와 동일한 효과였다(Fig. 2). 반면에 본 연구에서 조제한 혈청(KFDA-FBS)를 첨가한 배지에서 MCF-7 세포를 6일까지 배양할 때는 세포의 증식에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2). 시험물질로 DES와 E2를 각각 5×10^{-14} M부터 5×10^{-8} M까지 배양액에 처리하여 E-screen assay를 실시한 결과 용량 증가에 따라 MCF-7 세포의 증식을 촉진시키는 경향을 나타내었다(Fig. 3). 그러나 5×10^{-9} M 이상의 농도에서는 오히려 세포독성을 유발하는 경향을 보였다(Fig. 3).

2. 상경적 결합반응시험

자궁 cytosol에 있는 에스트로겐 수용체를 이용하였다. 먼

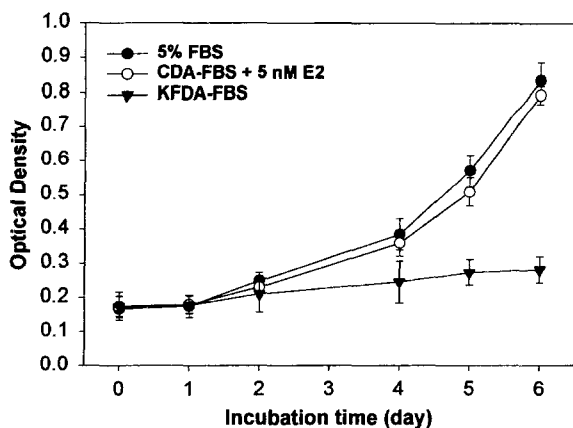


Fig. 2. Typical patterns of MCF-7 cell proliferation by 17β-estradiol. Proliferation experiments conducted in quadruplicate wells at least three times. Data represent the normalized absorbances were measured by Microplate reader.

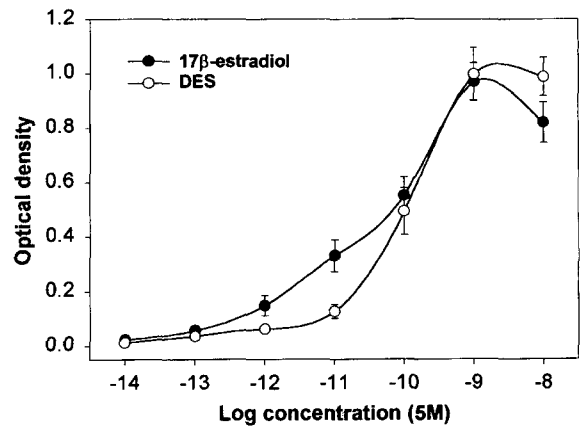


Fig. 3. Dose-response curves of 17β-estradiol (E2) and diethylstilbestrol (DES) on MCF-7 cells in culture. Proliferation experiments conducted in quadruplicate wells at least three times. Data represent the normalized optical density values were measured by Microplate reader.

저 자궁 cytosol 내에 함유된 에스트로겐 수용체와 [³H]-E2와의 결합정도를 측정하기 위해 일정한 농도의 [³H]E2 (10 μl, 1×10^{-9} M)과 자궁 cytosol 농도를 다르게 하여 측정하였다. 그 결과 에스트로겐 수용체와 결합하는 [³H]E2의 양은 cytosol 농도에 비례하여 ($r^2=0.955$) 점차 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 4). 이들 결과에 기초하여 cytosol 200 μg이 본 시험을 수행하는데 가장 적절한 용량으로 사용되었다. 따라서 자궁 cytosol내의 에스트로겐 수용체 함량은 일정량의 cytosol(200 μg)과 [³H]E2 (0.05~1.6 nM)를 가하여 결합반응 정도를 측정하였다. 그 결과 [³H]E2 농도에 따라 에스트로겐 수용체와의 결합이 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 5). 자궁 cytosol 에스트로겐 수용체에 대한 [³H]E2 결합의 K_d 와 B_{max} 를 Scatchard analysis를 실시

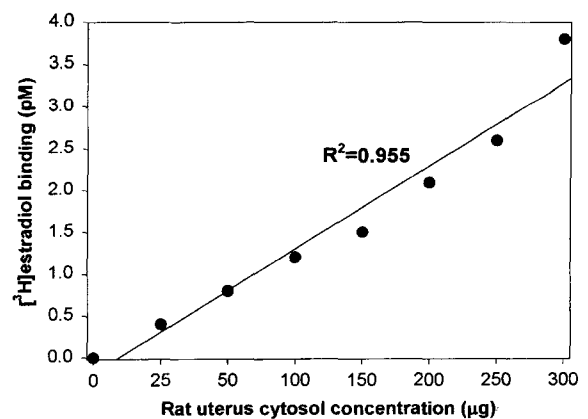


Fig. 4. Binding of the estrogen receptor by [³H]17β-estradiol at different concentrations of Sprague-Dawley rat uterus cytosol. Cytosol were incubated with [³H]17β-estradiol as described in Materials and Methods. Data are representative of at least two other experiments.

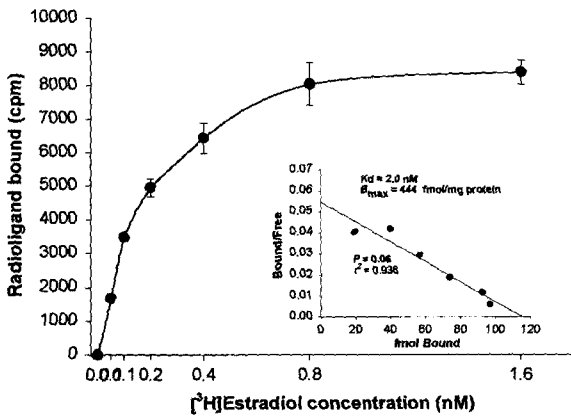


Fig. 5. Dose-response effects of ER binding affinity with different concentrations of [³H]17 β -estradiol. Cytosol (200 μ g) was incubated with various concentrations of [³H]17 β -estradiol as described in Materials and Methods. Data are representative of at least two other experiments.

하여 구하였다. 그 결과, K_d 값은 2.0 nM, B_{max} 는 444 fmol/mg protein으로 산출되었다(Fig 5). 상기의 결과에 따라 수용체에 대한 상경적 결합반응시험에서는 cytosol 200 μ g에 결합할 수 있는 [³H]E2의 농도를 약 1.0 nM로 정하였다. 따라서 상경적결합 반응시험은 cytosol 200 μ g과 [³H]E2 (1 nM) 및 radioinert competitors(E2, EE 및 DES)를 각각 $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-5}$ M 가하여 에스트로겐 수용체에 대한 상경적 결합반응정도를 비교하였다. 그 결과 시험물질 모두 에스트로겐 수용체에 대한 결합반응을 용량 증가에 따라 억제하는 경향을 나타내었다. 또한 DES, E2 및 EE의 IC50치는 각각 0.55 nM, 1.0 nM 및 10.5 nM 이었다. 따라서 랫드 자궁내 에스트로겐 수용체에 대한 결합율에서 EE는 DES 및 E2에 비하여 약 10~20배 정도 약한 것으로 나타났

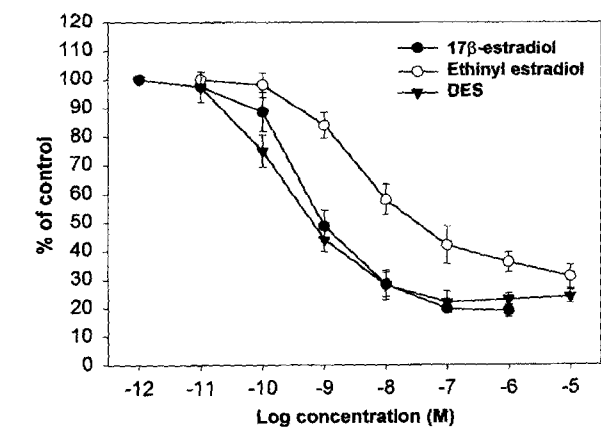


Fig. 6. Competitive binding assay of 17 β -estradiol, ethinyl estradiol, diethylstilbestrol on estrogen receptor isolated from the uterus of Sprague-Dawley rats. Cytosol were incubated with [³H]17 β -estradiol (1×10^{-9} M) and competitors for 20 h at 4 $^{\circ}$ C as described in Materials and Methods. Data are representative of at least two other experiments.

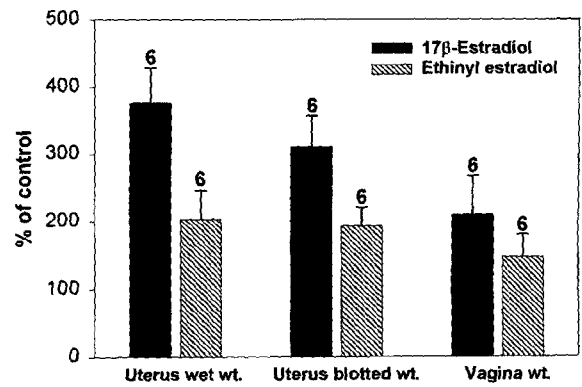


Fig. 7. Effect of 17 β -estradiol (0.3 μ g/kg) and ethinyl estradiol (0.3 μ g/kg) on uterus (wet and blotted) and vagina weight in immature rats. Control received corn oil only. Data represent group (mean \pm SD). The number above the bar represents the animal sizes.

3. Uterotrophic assay

자궁비대반응시험은 시험동물에 따라 시험물질의 감도를 측정하기 위하여 실시하였다. 미성숙 랫드와 난소적출 랫드에 각각 에스트로겐 양성대조물질인 E2와 EE를 용량 및 투여경로를 동일하게 하여 비교 실시하였다. 미성숙 랫드에 E2 0.3 μ g/kg을 3일간 피하로 투여한 후 자궁과 질 무게를 측정된 결과 자궁의 wet 및 blotted 무게는 대조군에 비해 각각 약 3.7 및 3.0배 이상 증가를 나타내었으며, 질 무게는 약 2.1배의 증가를 보였다. 그러나 0.3 μ g/kg의 EE를 미성숙 랫드에 피하 투여시 자궁무게는 약 2배의 증가를 나타내었으며 질 무게는 1.5배의 증가를 나타내었다(Fig. 7). 반면에 난소적출 랫드에 E2 0.3 μ g/kg을 3일간 피하로 투여한 후 자궁과 질 무게를 측정된 결과 자궁의 wet 및 blotted 무게는 대조군에 비해 각각 약 3.6 및 3.3 배 이상의 증가를 나타내었으며 질 무게는 약 2배의 증가를 보였다. 반면에 0.3 μ g/kg의 EE를 난소적출 랫드에 피

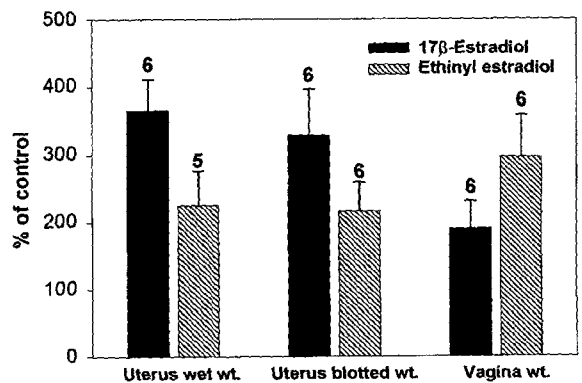


Fig. 8. Effects of 17 β -estradiol (0.3 μ g/kg) and ethinyl estradiol (0.3 μ g/kg) on uterus (wet and blotted) and vagina weight in ovariectomized rats. Control received corn oil only. Data represent group (mean \pm SD). The number above the bar represents the animal sizes.

하 투여시 자궁무게는 약 2.1배 이상의 증가를 나타내었으며 질 무게는 2.9배의 증가를 나타내었다(Fig. 8).

IV. 고 찰

내분비계 장애물질 검색 및 시험법에 대한 표준화 및 validation을 위한 연구가 전 세계적으로 공동 수행되고 있으며 그 결과들이 점차 구체화되고 있다. 그러나 아직까지 이들 시험법에 대한 감도 및 정확성에 대해서는 각 연구소마다 다소 차이를 나타내고 있으며 특히, *in vivo* 시험의 경우는 투여시기 및 농도에 따라서 상당한 차이를 나타낸다고 해도 과언은 아니다.

본 연구에서는 내분비계 장애물질의 에스트로겐 활성에 대한 시험법 확립의 목적으로 *in vitro* 시험(E-screen assay, ER binding assay) 및 *in vivo* 시험(uterotrophic assay)을 실시하여 에스트로겐성 물질들에 대한 상호 비교 및 시험법간의 상관성을 비교하고자 하였다. E-screen assay는 Soto 등(1995)의 방법에 따라 실시하여 MCF-7세포의 증식에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 본 연구에서 E2 및 DES는 MCF-7 세포의 증식을 용량 의존적으로 증가시키는 경향을 나타내었다. 또한 E2 및 DES의 에스트로겐 활성 차이는 거의 없었다. 일반적으로 Soto 등이 확립한 MCF-7 세포주는 배양조건, 계대배양 횟수 및 보관조건 등에 따라 세포증식율 및 생존율에 차이를 나타낸다고 보고한 바 있다(Villalobos *et al.*, 1995). 그러나 본 연구 결과는 Soto 등(1995) 및 Korner 등(1999)의 결과와 유사하였다. 또한 세포증식에 미치는 FBS의 영향을 비교한 결과, Hyclone사의 CDA-FBS보다 KFDA-FBS가 MCF-7세포의 증식에 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과는 활성탄 처리방법에 따라 혈청중에 함유된 세포증식인자 제거에 영향을 미치기 때문으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 Soto 등(1995)이 제안한 E-screen assay 시험법을 확립하였으며 본 시험법은 미지물질의 에스트로겐 활성 검색에 이용될 수 있는 시험법으로 제시할 수 있었다. 그러나 E-screen assay는 시험물질이 에스트로겐 수용체에 직접 작용하는 지에 대한 정보를 알 수 없다는 단점이 있다. 따라서 이들 결과를 보충할 수 있는 시험법으로 수용체에 대한 상경적 결합반응시험이 요구된다.

에스트로겐 수용체에 대한 상경적 결합반응 시험만으로는 환경 중에 유래하는 에스트로겐 화학물질이 estrogen agonist 또는 antagonist로 작용하는지에 대해서는 정확하게 판정하기 어려우나 세포내 또는 조직에서 에스트로겐 수용체에 대한 결합반응 정도를 평가하는데 매우 용이한 방법중 하나라고 제시된 바 있다(Bolger *et al.*, 1998). 최근 *in vitro* 내분비계 장애물질 검색 시험법으로 사람 및 설치

류의 에스트로겐 수용체에 대한 상경적 결합반응을 이용한 내분비계 장애물질 검색법으로 시도되고 있다(Tong *et al.*, 1997). 또한 White 등(1994)은 rainbow trout로 부터 에스트로겐 수용체에 대한 E2와의 상경적 결합반응을 측정한 결과 이들 화학물질은 E2 보다 약 $10^3 \sim 10^4$ 배의 높은 농도에서 에스트로겐 활성을 나타내었다고 보고하였다. 또한 시험물질에 따라서도 에스트로겐 강도에 서로 상이한 차이를 나타내는 것은 세포내에서 이들 물질의 대사체계에 차이점이 있는 것으로 평가하였다. 더욱이 이들 물질의 에스트로겐 활성은 세포내 에스트로겐 수용체를 경유하여 나타나는 것이라고 보고하였다. 본 연구에서도 에스트로겐 수용체에 대한 상경적 결합시험결과 DES가 EE보다 100배의 높은 용량에서 동일한 에스트로겐 활성을 나타내는 것으로 평가되었다.

자궁의 증식에 대한 반응은 에스트로겐 활성과 직접적인 관련이 있으므로 에스트로겐 유사물질들에 대한 검색법으로 이용된다(Reel *et al.*, 1996; Odum *et al.*, 1997). 가장 일반적으로 이용되는 자궁비대반응시험의 지표로 자궁 무게 변화이나 자궁내 세포의 생화학적 변화들도 대체 지표로 이용될 수 있다(Clark and Peck, 1979). Odum 등(1997)은 생후 22~25일령의 미성숙 랫드에 17β -estradiol benzoate(E2B) $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 을 피하로 3일간 투여한 후 자궁 무게 증가를 관찰한 결과 대조군에 비해 3배 정도의 증가율을 나타내었으나 26~27일령에서는 자궁무게 증가 효과는 나타나지 않았다고 보고한 바 있다. 따라서 미성숙 랫드를 이용한 시험에서는 성숙숙 기간의 선택이 매우 중요하며 에스트로겐 주기에 의한 내인성 에스트로겐의 영향에 따라 소량의 에스트로겐성 물질의 검색에 어려움이 있다. 이들은 또한 자궁의 절대무게가 상대무게보다 더 좋은 지표로 이용될 수 있다고 하였다. 반면에 Ashby 등(1997a)은 체중에 대한 자궁의 상대무게는 체중의 변화에 영향을 미치는 화학물질에 적용된다고 제시하였다. 일반적으로 고용량의 E2를 실험동물에 투여시 현저한 체중감소를 유발하므로 자궁의 상대무게가 증가된다고 한다. 또한 투여경로에 따른 비교에서 E2 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 을 투여시 피하가 경구보다 저용량에서 민감하게 반응하는 경향을 나타내었으나 자궁 무게증가를 유발하는 최대 효과(대조군에 비해 2.5~3.0배)는 투여경로에 관계없이 유사하였다고 보고한 바 있다(Barton *et al.*, 1998). EE를 피하투여 할때 강한 에스트로겐 효과를 나타내었으며 trophic activity는 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 에서 나타났다. 반면에 자궁비대반응시험에서 에스트로겐성 물질에 의한 자궁무게 증가와 질개구 정도와는 항상 일치하는 결과를 나타내지 않았다. 따라서 질개구 관찰은 에스트로겐성 물질의 검색방법으로서 좋은 지표는 아니라고 제시한 바 있다(Ashby *et al.*, 1997b).

본 연구에서는 미성숙 랫드와 난소적출 랫드를 이용하

여 각각 에스트로겐 양성대조물질인 E2와 EE를 용량 및 투여경로를 동일하게 하여 비교 실시하였다. 동일한 용량의 E2 및 EE를 난소적출 랫드와 미성숙 랫드에 투여시 대조군에 대한 자궁무게 증가는 큰 차이를 나타내지 않았으나 질 무게는 EE 투여군에서 난소적출 랫드가 미성숙 랫드에서 보다 높은 증가율을 나타내었다. 이 결과는 에스트로겐성 물질에 의한 자궁 및 질에 대한 반응은 시험물질에 따라 다소 차이를 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

Anderson 등(1973, 1975)은 자궁 무게 변화는 최종물질 투여후 부검시간에 따라 영향을 받는다고 보고하였다. 즉, 자궁 내용액은 6시간에, 세포의 증식은 24시간에 각각 최대를 나타내었다. 비록 자궁 무게 측정이 기술적으로 간편하지만 모든 화학물질에 대하여 자궁내에서 동일한 시간대에서 동일한 반응을 나타내는지에 대해서는 의심이 된다. 즉, 자궁 내용액은 6시간에, 세포의 증식은 24시간에 측정되는 것이 고려되지만 이것은 E2 투여에 의한 것이며, 다른 화학물질들을 투여시에는 서로 상이한 결과를 나타낼 수 있다고 한다(Reel *et al.*, 1996). 일반적으로 *in vitro* assay는 *in vivo* assay에서 양성을 나타낼 가능성이 있는 물질에 대한 1차 검색 방법으로 이용된다. 특히, 시험물질이 서로 구조적인 유사성이 있을 때 검색방법으로 매우 중요한 가치를 준다. 그러나 *in vitro*와 *in vivo*에서의 결과가 항상 일치하지 않을 경우도 있다. 그러므로 내분비계 장애 물질의 검색법에 있어서 가장 중요한 것은 물질의 특성에 따라 *in vitro* 및 *in vivo* 시험법을 조합한 적절한 시험계를 사용하여야 한다는 것이다. 앞으로 이들 시험법을 표준화하기 위해서는 더 광범위하고 포괄적인 연구들이 선행되어야 할 것으로 본다.

참고문헌

- Anderson, J.N., Peck, E.J. Jr. and Clark J.H. (1973): Nuclear receptor-estrogen complex: relationship between concentration and early uterotrophic responses. *Endocrinology*, **92**, 1488-1495.
- Anderson, J.N., Peck, E.J. Jr. and Clark J.H. (1975): Estrogen-induced uterine responses and growth: relationship to receptor estrogen binding by uterine nuclei. *Endocrinology*, **96**, 160-167.
- Ashby, J., Odum, J. and Foster, J.R. (1997a): Activity of raloxifene in immature and ovariectomized rat uterotrophic assays. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **25**, 226-231.
- Ashby, J. and Lefevre, P.A. (1997b): The weanling male rat as an assay for endocrine disruption: Preliminary observations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **26**, 330-337.
- Barton, H.A., Anderson, M.E. and Allen, B.C. (1998): Dose-response characteristics of uterine responses in rats exposed to estrogen agonists. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **28**, 133-149.
- Birnbaum, L.S. (1994): Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins, and other xenobiotics: implications for policy and future research. *Environ. Health. Perspect.*, **102**, 676-679.
- Bolger, R., Wiese, T.E., Ervin, K., Nestich, S. and Checovich, W. (1998): Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ. Health Perspect.*, **106**, 551-557.
- Clark, J.H. and Peck, E.J. Jr. (1979): *Female Sex Steroids*. Springer-Verlag, New York.
- Colborn, T., Dumanoski, D. and Myers, J.P. (1996): *In Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival? A Scientific Detective Story*. Dutton Books, New York.
- Colborn, T., vom Saal, F.S. and Soto, A.M. (1993): Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and human. *Environ. Health Perspect.*, **101**, 378-384.
- Davis, D.L., Bredlow, H.L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D.G. and Anton-Culver, H. (1993): Medical hypothesis: Xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ. Health Perspect.*, **101**, 372-377.
- Dhar, J.D., Mishra, R. and Setty, B.S. (1998): Estrogen, androgen and antiestrogen responses in the accessory organs of male rats during different phases of life. *Endocr. Res.*, **24**, 159-169.
- Gray, L.E. Jr. (1998): Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. *Toxicol. Lett.*, **28**, 102-103.
- Holmes, P., Humfrey, C. and Scullion, M. (1998): *In Appraisal of Test Methods for Sex-Hormone Disrupting Chemicals*. OECD Environment Directorate, Environmental Health and Safety Division, Paris.
- Kavlock, R.J. and Ankley, G.T. (1996): A perspective on the risk assessment process for endocrine-disruptive effects on wildlife and human health. *Risk Anal.*, **16**, 731-739.
- Klotz, D.M., Beckman, B.S., Hill, S.M., McLachlan, J.A., Walters, M.R. and Arnold, S.F. (1996): Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of *in vitro* assays. *Environ. Health Perspect.*, **104**, 1084-1089.
- Korner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempter, C., Metzger, J. and Hagenmaier, H. (1999): Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci. Total. Environ.*, **225**, 33-48.
- Odum, J., Lefevre, P.A., Tittensor, S., Paton, D., Routledge, E.J., Beresford, N.A., Sumpter, J.P. and Ashby, J.

- (1997): The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **25**, 176-188.
- OECD. (1999): Validation Management Committee: Endocrine Disruptors Screening and Testing, Agenda Item 5, Validation Protocol for the Uterotrophic Assay.
- Reel, J.R., Lamb, I.V.Jc. and Neal, B.H. (1996): Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **34**, 288-305.
- Safe, S.H. (1995): Environmental and dietary estrogens and human health: Is there a problem? *Environ. Health Perspect.*, **103**, 346-351.
- Sharpe, R.M. and Skakkebaek, N.E. (1993): Are oestrogens involved in failing sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, **341**, 1392-1395.
- Shelby, M.D., Newbold, R.R., Tully, D.B., Chae, K., Davis, V.L., Shelby, M.D., Newbold, R.R., Tully, D.B., Chae, K. and Davis, V.L. (1996): Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays. *Environ. Health Perspect.*, **104**, 1296-1300.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L, Fernandez, M.F, Olea, N. and Serrano, F.O. (1995): The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 113-122.
- Tong, W., Perkins, R., Strelitz, R., Collantes, E.R., Keenan, S., Welsh, W.J., Branham, W.S. and Sheehan, D.M. (1997): Quantitative structure-activity relationships (QSARs) for estrogen binding to the estrogen receptor: predictions across species. *Environ. Health Perspect.*, **105**, 1116-1124.
- Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F, Ruiz de Almodovar, J.M. and Pedraza, V. (1995): The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 844-850.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P. and Parker, M.G. (1994): Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, **135**, 175-182.