

## 형질전환효모를 이용한 내분비계장애물질검색과 Nonylphenol의 Estrogen 유사작용에 대한 DEHP의 상협작용

박미선 · 정해관 · 박현신 · 한의식 · 김종원 · 엄미옥 · 정상희<sup>1</sup> · 오혜영\*

식품의약품안전청, 국립독성연구소 독성부  
<sup>1</sup>국립수의과학연구소

### Modification of Estrogenic Effect of Nonylphenol Combined with DEHP in Yeast-based Bioassay

Mi Sun Park, Hai Kwan Jung, Hyun Shin Park, Eui Sik Han, Jong Won Kim,  
Mi Ok Eom, Sang Hee Jung<sup>1</sup> and Hye Young Oh\*

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research,  
Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul 122-704, Korea

<sup>1</sup>National Veterinary Research and Quarantine Service 480 Anyang 6dong,  
Manan-gu, Anyang Kyonggido, 430-016, Korea

(Received March 30, 2001)

(Accepted April 12, 2001)

**ABSTRACT** : The key targets of endocrine disruptors are nuclear hormone receptors, which bind to steroid hormones and regulate their gene transcription. A yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay was previously developed for the evaluation of chemicals with endocrine modulating activity. The yeast transformants used in this assay contain the human estrogen receptor along with the appropriate steroid response elements upstream of the  $\beta$ -galactosidase reporter gene. We tried to evaluate several natural and synthetic steroids of their potential to interact directly with the steroid receptor. Some putative endocrine disruptors, including nonylphenol, are weakly estrogenic. But the combined treatment of these chemicals with di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) significantly increased the  $\beta$ -galactosidase activity in the yeast transformant. These results suggest that we also have to consider the synergistic effects of endocrine disruptors. In this study, we showed that yeast-based bioassay is a valuable tool for screening potential endocrine disruptors and quantitative determination of estrogenicity. And the possibility that the estrogen receptor binds multiple environmental chemicals adds another level of complexity to the interaction between the endocrine disruptors and the human hormone system.

**Key Words** : Human estrogen receptor, DEHP, Nonylphenol, Synergistic effects, Yeast bioassay

### I. 서 론

환경 및 일상생활에서 접하게 되는 천연 또는 합성 화학 물질 중에는 스테로이드 호르몬 유사작용을 나타내면서 생체 내에서 합성되는 호르몬과 비교하여 쉽게 분해되지 않고 안정하여, 체내에 축적됨으로써 내분비계장애를 일으키는 것들이 있다. 이러한 내분비계장애물질은 체내에 유입되어 마치 호르몬처럼 작용함으로써, 생체의 항상성 유지, 생식·발생 혹은 행동에 관여하는 각종 생체 호르몬의

작용과정을 방해하여 생식기능과 면역기능의 저하, 기형, 성장장애, 암 등을 유발한다고 보고되고 있다(Arnold 등, 1996d; Bruder 등, 1997; Gaido 등, 1996; Kelce 등, 1995; Klotz 등, 1997; Maness 등, 1998; Zacharewski 등, 1998). 현재 내분비계장애를 일으킬 수 있다고 추정되는 물질로는 각종 산업용 화학물질(원료물질), 살충제 및 제초제 등의 농약류, 유기중금속류, 소각장의 다이옥신류 외에도 식물에 존재하는 estrogen류(phytoestrogen), 합성estrogen인 diethylstilbestrol(DES) 등이 있다(Arnold 등, 1996b; Gaido 등, 1997; Collins 등, 1997; Breithofer 등, 1998).

우리나라에서는 내분비계장애물질과 관련하여 1998년

\*To whom correspondence should be addressed

dibutylbezy l phthalate(BBP), di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), penta-nonyl phenol류와 bisphenol A등 4종의 물질을 '관찰물질'로 지정하고 이에 대해 본격적인 규제조치를 취하기로 했다.

1992년 WHO 보고에 의하면, phthalate류의 세계 생산량은 연간 2~8백만톤에 이르며 이중 약 50%가 DEHP이다. DEHP는 플라스틱의 가소제로 쓰이는 액상의 물질로 우리나라에서만도 매년 약 9만 톤이 상업적 혹은 의학적 목적으로 사용되고 있는데, 플라스틱 제품이나 합판, 식품포장지에 사용되는 잉크의 재료나 첨가제로도 사용되고, 혈액 튜브 등의 의료용구에도 사용되고 있다(Blom 등, 1998; Zacharewski 등, 1998). 또한 DEHP는 포장재, 제조과정, 수송 중에 잠재적으로 음식물에 들어갈 수 있으며, 육류에서도 발견되고 있고 또한 오일이나 지방성 음식에 더 잘 녹는 성질을 가지고 있어서 우유나 치즈에서 최고 농도로 검출되었다는 보고도 있다(Petersen 등, 2000; Li 등, 2000). DEHP는 환경 속에서 인체내 축적경로가 매우 다양하면서도 그 농도가 매우 낮게 측정되어 그 동안 안전한 물질로 판단되어 왔다. 그러나, 최근 DEHP에 대한 동물 실험 및 사람에게서 나타나는 환경유래 생식기 계통의 이상, 정자수의 감소 등이 보고되고 있어 내분비계장애물질이라는 의심을 받고 있으며, DEHP가 건강에 미치는 영향에 대한 직접적인 보고는 아직까지 없지만 암을 유발시킬 수 있는 물질로서 추정하고 있다(Harris 등, 1997; Zacharewski 등, 1998; Li 등, 2000).

Nonylphenol은 합성세제의 주성분인 계면활성제나 농약, 유용성 폐놀수지 등의 원료이며 플라스틱의 성형에 산화방지제로서 사용되고 있으며, 가정내 세척제의 분해물, 살충제 또는 플라스틱 제조시 이용되며 estrogen 유사작용을 나타낸다고 보고되고 있다(Blom 등, 1998).

또한 1996년 미국에서 발표된 연구보고에 의하면 살충제로 사용되는 몇 가지 화학물질이 개개의 물질로는 인체에 미치는 나쁜 영향은 없었으나 혼합되어 사용될 때 단일화학물질의 160~1,600배의 호르몬 교란효과를 보였으며, 오늘날 우리가 일상 생활에서 접하게 되는 내분비계장애물질들의 경우 서로 혼재 가능성 있으나 이러한 물질들이 서로 혼재되어 나타낼 수 있는 위험요소는 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않아 이에 대한 보다 많은 연구가 요구되어진다. 즉 내분비계장애물질들은 그 하나로 독성을 나타내기에는 미약할 지라도 환경 속에서 다른 물질들과 함께 생체에 노출되었을 때 인체에 미치는 영향, 그리고 체내에 만성으로 축적시의 영향을 고려하여 내분비계장애물질을 평가해야 할 것이다.

지금까지 내분비계장애물질을 검색하기 위해 *in vivo* uterine bioassay, estrogen 수용체에 대한 직접결합법, 유방암세포인 MCF-7 세포증식 시험(E-SCREEN)법, MCF-7 세포에서의 일과성 레포터 유전자 발현법, estrogen 반응성 레포터 유전자법, 무지개 송어에서의 vitellogenin 생성

법 등 많은 시험법들이 소개되고 있지만(Chen 등, 1997; Petit 등, 1997; Balmelli-Gallacchi 등, 1999), 이들 시험결과에는 서로 상이한 점도 나타나고 있어 보다 정확하고 재현성 있는 검색이 요구되고 있다(Andersen 등, 1999). 스테로이드 수용체에 직접적으로 작용하는 화학물질은 극히 낮은 농도에서도 각종 독성작용을 나타낼 우려가 있어, 화학물질의 내분비계장애작용을 평가함에 있어서 그 작용이 수용체와의 직접작용에 기인하는 것인지 그 밖의 경로에 의한 것인지를 결정하는 것이 무엇보다 중요하다. 스테로이드 호르몬 수용체 유전자 전사 시험법은 이러한 의미에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다(Gaido 등, 1997).

따라서 본 연구에서는 사람의 estrogen 수용체를 발현하는 유전자를 가진 플라스미드와 reporter gene으로  $\beta$ -galactosidase를 발현하는 플라스미드를 아미노산 요구성 yeast strain에 도입시켜 얻은 형질전환효모를 사용하여 내분비계장애물질로 추정되는 물질들이 estrogen 수용체에 직접 관여하는지 밝히고자 한다. 또한 DEHP와 nonylphenol을 동시에 처리하여 본 검색법에 적용시킴으로써 그 자체로서는 내분비계교란작용이 미약할지 모르나 환경 내에 다른 여러 물질들과 함께 노출되었을 때 일어날 수 있는 내분비계장애물질의 상협작용 가능성에 대하여 연구하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 형질전환 효모균주 및 배양

*Saccharomyces cerevisiae* strain YPH500(MAT $\alpha$ , ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1- $\Delta$ 63, his3- $\Delta$ 200, leu2- $\Delta$ 1)에 사람의 estrogen 수용체 발현 유전자를 가진 플라스미드와 리간드-수용체 결합체에 의해 발현이 조절되는 리포터 유전자(*lacZ*)를 가진 플라스미드를 *E. coli*에서 증폭하여 순수 정제한 후 Ito 등(1983)의 방법을 변형한 lithium acetate-polyethylene glycol법으로 복합 도입하여 스테로이드 호르몬 수용체 유전자 전환효모를 얻었다. 본 형질전환 효모균주는 *lacZ* 유전자의 부위에 리간드-수용체가 결합할 수 있는 호르몬 반응인자(HRE : hormone response element)가 있어 *lacZ* 유전자 전사를 조절하도록 설계되어 있다. Estrogen 수용체 발현균주는 YEpH E2(human estrogen receptor cDNA)와 YRp E2(structural gene for  $\beta$ -gal) 2개의 플라스미드를 도입하였다. 실험에 사용한 플라스미드와 host yeast strain은 미국 Duke 대학의 McDonnell 박사로부터 분양 받았다(Gaido 등, 1997). 본 실험에 사용한 형질전환효모는 YNB 최소배지(bacto yeast nitrogen base w/o amino acids, Difco, USA)에 adenine(20 mg/l), tryptophane(20 mg/l), uracil(20 mg/l), lysine(30 mg/l)과 40% glucose를 가한 선택배지에서 30°C, 270 rpm shaking

incubator에서 대수증식기(OD<sub>600</sub> ≃ 0.7)까지 배양하였다.

2. 시험물질

Nonylphenol, *p,p'*-DDT(1,1-bis(4-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane)와 이들 유사체들은 Aldrich사(Milwaukee, WI)에서 구입하였으며, oxalyticase는 Enzogenetics (Corvallis, OR)에서 구입하였다. 표준물질로 사용한 17β-estradiol, androstan-17β-01-3-one, progesterone, 그리고 DES(diethylstilbesterol), biochanin A(5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone), genistein(4',5,7-trihydroxy-isoflavone), DEHP(di(2-ethylhexyl)phthalate), ONPG(*o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside), 2-mercaptoethanol, methoxychlor 등 그 밖의 다른 화합물들은 Sigma사(St Louis, MO)에서 구입하였다. 음성 대조물질은 0.1% methanol을 사용하였다.

3. 반응액

형질전환 효모균주 실험에 사용한 반응액(assay buffer)의 조성은 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mM, ONPG 2 mg/ml, 0.1% SDS, 50 mM β-mercaptoethanol, 100 U/ml oxalyticase, antifoam A이다.

4. 실험방법

배양한 효모균을 OD<sub>600</sub>=0.25가 되도록 선택배지로 희석한 다음 96 well microtiter plate에 100 μl씩 분주하고 반응액을 100 μl씩 가해준 다음 30°C에서 30분간 110 rpm으로 진탕하면서 반응을 시킨 후 stop buffer(2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 50 μl를 넣어 반응을 정지 시켰다. 이때 효모균주가 발현시킨 β-galactosidase에 의해 기질로 사용한 ONPG의 분해산물인 orthonitrophenol의 정색반응을 microtiter plate reader로 OD<sub>420</sub>에서 측정하였다. β-galactosidase 활성은 Miller unit(1972)로 나타내었다.

$$\beta\text{-galactosidase activity} = \frac{1000 \times [OD_{420} - (1.75 \times OD_{550})]}{t \times v \times OD_{600}}$$

t = time (min)  
v = volume of culture (ml)

III. 결 과

1. 형질전환 효모균주의 벡터 발현 확인

본 실험에 사용한 형질전환 estrogen 수용체 발현효모균

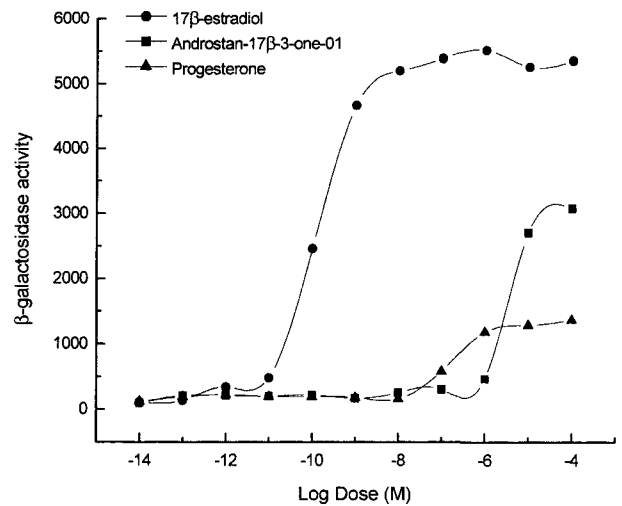


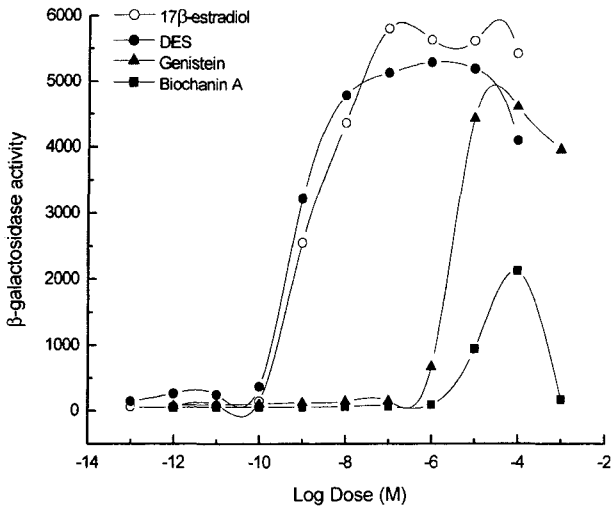
Fig. 1. The selectivity of yeast assay. Steroid hormones were added in yeast cultures in doses ranging from 10<sup>-14</sup>~10<sup>-4</sup> M. Following overnight incubation the cultures were then assayed for β-galactosidase activity at OD<sub>420</sub>.

주에 대하여 아미노산 영양요구성을 지표로 하여 수용체 발현 벡터의 유지를 확인하였다. 이 효모균주에 대하여 17β-estradiol, androstan-17β-01-3-one, progesterone을 표준물질로 하여 각 스테로이드 수용체 감수성과 상호 교차 반응을 측정 한 결과, 17β-estradiol은 estrogen 수용체 발현 균주의 스테로이드 호르몬 수용체에 대하여 높은 검출 특이성을 나타내었다(EC<sub>50</sub> = 1.14×10<sup>-9</sup> M). 이 시스템에 있어서 스테로이드 수용체 작용 발현의 정도는 β-galactosidase의 발현량으로 표현하였다(Fig. 1).

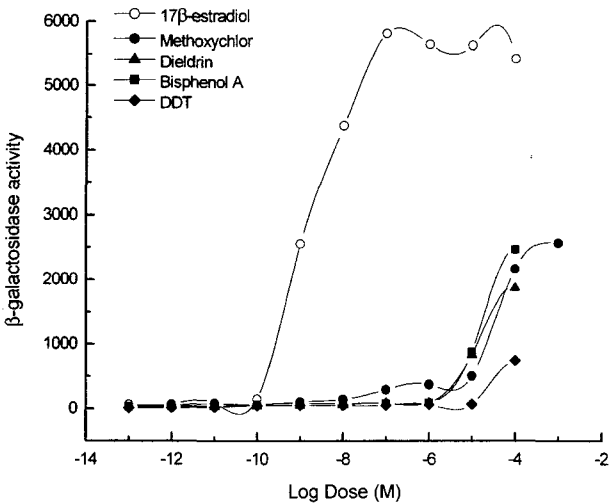
2. 내분비계장애물질의 estrogen 유사활성의 검색

17β-estradiol을 양성대조물질로 하여 이미 알려져 있거나 내분비계장애물질로 추정되는 여러 화학물질들을 형질전환 효모균주를 사용하여 검색하였다. 합성estrogen인 DES는 estrogen 수용체 발현균주에 대하여 선택적으로 17β-estradiol과 비슷한 정도의 높은 감수성을 나타내었으며 (EC<sub>50</sub> = 7.2×10<sup>-10</sup> M), 식물성 estrogen인 genistein과 biochanin A는 17β-estradiol이 나타낸 최대활성의 81.4%, 25.9%를 각각 나타내었다(Fig. 2).

또한 가소제인 bisphenol A와 살충제인 methoxychlor, *o,p'*-DDT, dieldrin 등도 10<sup>-4</sup> M에서 최대활성을 나타내었으며(Fig. 3), 유기염소 살충제인 *o,p'*-DDD, *o,p'*-DDE들은 단독으로 처리시 estrogen 수용체 발현균주에 대하여 반응성을 나타내지 않았다(data not shown). 각 스테로이드 유사 작용물질에 대한 estrogen 수용체 발현균주의 감수성은 17β-estradiol을 양성대조물질로 하여 EC<sub>50</sub> 값으로 비교하였다(Table 1).



**Fig. 2.** Yeast-based estrogen receptor assay for chemicals. 17β-Estradiol (positive control), DES (diethylstilbesterol) and phytoestrogens (genistein, biochanin A) were added in yeast cultures in doses ranging from  $10^{13}$ ~ $10^{-3}$  M. Following overnight incubation the cultures were then assayed for β-galactosidase activity at OD<sub>420</sub>.

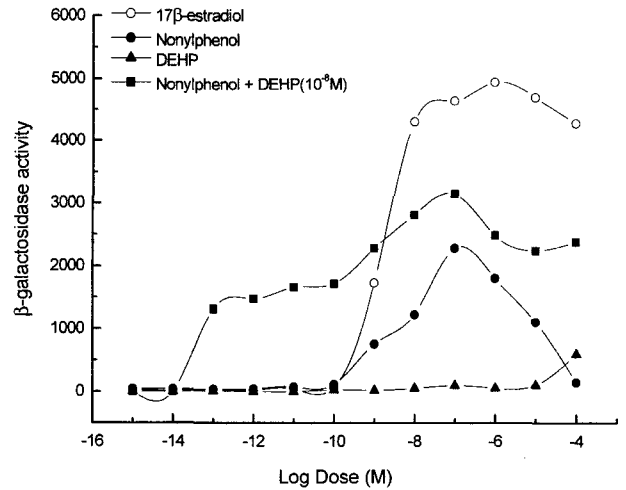


**Fig. 3.** Yeast-based estrogen receptor assay for chemicals. 17β-Estradiol (positive control), xenoestrogens (dieldrin, methoxychlor, bisphenol A) and pesticide (DDT) were added in yeast cultures in doses ranging from  $10^{13}$ ~ $10^{-4}$  M. Following overnight incubation the cultures were then assayed for β-galactosidase activity at OD<sub>420</sub>.

**Table 1.** Relative potency for yeast-based estrogen receptor assay

Chemicals	EC <sub>50</sub>	Relative potency
17-β-estradiol	$1.83 \times 10^{-9}$ M	1
Diethylstilbesterol (DES)	$1.1 \times 10^{-9}$ M	1.7
Genistein	$5.92 \times 10^{-6}$ M	$3.1 \times 10^{-4}$
Biochanin A	$1.0 \times 10^{-5}$ M	$1.8 \times 10^{-4}$
Bisphenol-A	$1.6 \times 10^{-4}$ M	$1.1 \times 10^{-5}$
<i>o,p'</i> -DDT	$1.9 \times 10^{-4}$ M	$9.6 \times 10^{-6}$
Dieldrin	$3.84 \times 10^{-4}$ M	$4.7 \times 10^{-6}$
Methoxychlor	$1.38 \times 10^{-3}$ M	$1.3 \times 10^{-6}$

The relative potency is defined as the EC<sub>50</sub> value of 17β-estradiol over that of the test chemical.



**Fig. 4.** Synergistic effect of nonylphenol and DEHP in yeast-based estrogen receptor assay. 17β-estradiol is positive control. Nonylphenol was added in yeast cultures in doses ranging from  $10^{15}$ ~ $10^{-4}$  M in the presence of DEHP ( $10^{-8}$  M). Following overnight incubation the cultures were then assayed for β-galactosidase activity at OD<sub>420</sub>.

### 3. 스테로이드 유사 작용물질의 상협작용

Nonylphenol이 나타내는 estrogen 유사작용에 대하여 DEHP 병용처리시 나타나는 영향을 살펴보기 위해, estrogen 수용체 발현균주에 대하여  $10^{-8}$  M의 DEHP 존재하에 nonylphenol의 농도를 증가시켜 처리하였다. 이때 양성대조 물질로는 17β-estradiol, 음성대조물질로는 0.1% methanol을 사용하였다.

DEHP를 농도별( $10^{-14}$ ~ $10^{-4}$  M)로 단독 처리하였을 때는 β-galactosidase 활성이 거의 나타나지 않았으며, nonylphenol을 단독 처리하였을 때는  $10^{-7}$  M에서 최고 활성을 나타내어( $EC_{50} = 10^{-8}$  M) 그 작용이 약하였으나, DEHP  $10^{-8}$  M 존재하에서 nonylphenol을 농도별( $10^{-13}$ ~ $10^{-4}$  M)로 처리한 결과 β-galactosidase 활성이 현저하게 증가하였다( $EC_{50} = 10^{-10}$  M)(Fig. 4).

## IV. 고 찰

최근 내분비계장애물질이 인체에 미치는 영향에 대한 많은 우려와 보고가 증가하고 있으며, 이들 물질의 검색과 작용기전을 밝히는데 있어서 스테로이드 호르몬 수용체 경우 여부가 중요하게 대두되고 있다. 본 연구에서는 사람의 스테로이드 호르몬 수용체를 발현시키는 형질전환 효모를 사용하여 핵내 호르몬수용체의 전사활성에 대한 적용을 지표로 내분비계장애물질로 알려져 있거나 가능성이 있는 물질들이 estrogen 수용체에 작용하여 호르몬유사작용을 나타내는지를 검색하였다. 또한 생체내 만성 독성뿐만 아니라 국내에서도 최근 ‘관찰물질’로 지정하여 본격적

인 규제조치를 취하고 있는 DEHP와 penta~nonyl phenol 류인 nonylphenol, bisphenol A 등이 캔이나 식품포장 등에서 혼재가능성이 있음에 착안하여, 이들 각 시험물질을 농도별로 단독 처리하였을 때와 병용 처리하였을 때 estrogen수용체에 대한 작용을 스테로이드 수용체 발현 효모균주를 이용하여 확인하였다.

본 실험에 사용한 형질전환 효모균주의 유효성을 확인하기 위해 인체 및 동물내에 존재하는 대표적인 estrogen인 17 $\beta$ -estradiol을 표준물질로 하여 스테로이드 수용체 감수성을 측정하였다. 그 결과 estrogen 수용체 발현균주는 스테로이드 호르몬 수용체에 대하여 검출 특이성을 나타내었으며, progesterone 고농도( $10^{-4}$  M) 처리시 교차반응을 나타내었다. Estrogen수용체 발현균주(*S. cerevisiae* strain YPH500)에 대한 17 $\beta$ -estradiol의 감수성은 Gaido 등(1997)이 *S. cerevisiae* strain BJ3505에 estrogen수용체를 발현시킨 형질전환효모균주에서 얻은 결과( $EC_{50} = 2.25 \times 10^{-10}$  M)와 유사하였고, Arnold 등(1997a)이 *S. cerevisiae* strain YPH499에 estrogen수용체를 발현시킨 형질전환효모균주에서 17 $\beta$ -estradiol이 10 nM에서 최대활성을 나타낸 결과와도 유사하였다.

Arnold 등(1996d)에 의하면 17 $\beta$ -estradiol은 nM의 농도에서도 높은 estrogen수용체 결합력을 가지며 대부분의 스테로이드 유사작용물질로 알려진 화학물질들은 estrogen수용체에 대해 17 $\beta$ -estradiol의 1/1000배의 결합력을 가진다고 한다. 합성estrogen인 DES는 양성대조물질인 17 $\beta$ -estradiol과 유사한 정도의 높은 감수성을 나타내었고 이는 Arnold 등(1996d)의 결과와 일치한다. 또한 식물성 estrogen인 genistein, biochanin A도 17 $\beta$ -estradiol의 최대활성에 81.4%, 25.9%를 각각 나타냄으로서 estrogen수용체를 경유함을 알 수 있었다(Fig. 2). 플라스틱 가소제로 사용되는 bisphenol A, nonylphenol, 그리고 농약류인 *p,p'*-DDT, dieldrin, methoxychlor등을 실험한 결과 고농도( $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$  M)에서  $\beta$ -galactosidase 발현 최대활성을 나타내었으며, 이는 이들 물질들이 estrogen수용체를 매개로 하여 작용을 나타냄을 알 수 있었다.

최근 환경 유래 스테로이드호르몬 유사작용물질들은 단독 처리시 낮은 potency를 나타내나 두 가지 이상의 물질 즉 dieldrin, endosulfan, 혹은 toxaphene을 병용처리 하였을 때 단독 처리시 보다 사람의 estrogen수용체를 매개로 하는 transactivation에 있어서 1,000배나 높은 potency를 나타낸다는 보고가 있으며(Arnold 등, 1996c), Wade 등(1997)도 dieldrin과 endosulfan을 동시에 처리하였을 때 단독 투여시보다  $EC_{50}$  값을 비교해 볼 때 100배 더 효력이 크게 나타났다고 보고했다. 또한 chlordane, dieldrin, toxaphene 등을 함께 처리하였을 때, [ $^3$ H]17 $\beta$ -estradiol의 결합이 20~30% 억제됨을 관찰하고 이러한 상협작용이

estrogen수용체의 multiple ligand binding site에 기인할 수 있다는 것을 시사한 바 있다(Simons 등, 1996; Arnold 등, 1997b). 또한 효모와 포유동물세포(turtle eggs)에서 여러 화학물질이 동시에 결합되어 작용을 나타내기도 하며, 전사를 활성화시키고 성전환 현상 등을 나타낸다는 보고는 호르몬 수용체의 multiple binding site 가능성을 배제할 수 없음을 말해준다(Arnold 등, 1997a).

본 연구에서는 현재 플라스틱 가소제로 사용되고 있는 nonylphenol과 함께 섭취되어 생체에 영향을 미칠 가능성이 있는 DEHP를 병용처리하여 나타나는 스테로이드 유사작용을 형질전환효모균주를 이용한  $\beta$ -galactosidase 활성을 통해 검색하였다. 사람의 유방암세포주인 MCF-7세포를 이용한 E-Screen assay에서 DEHP는 10  $\mu$ M에서, nonylphenol은 1  $\mu$ M에서 MCF-7 세포증식효과가 보고되고 있으나(Blom 등, 1998; Perez 등, 1998), 본 형질전환 효모균주를 이용한 bioassay에서는 DEHP를 농도별로 단독처리 하였을 때  $\beta$ -galactosidase 활성을 나타내지 않았으며 이러한 결과는 Harris 등(1997)의 결과와도 일치한다. 따라서 DEHP의 estrogen유사작용은 estrogen수용체에 대한 직접적인 작용에 기인하는 것은 아니라고 사료된다. 그러나 DEHP  $10^{-8}$  M 존재하에서 nonylphenol을 농도별( $10^{-13}$ ~ $10^{-4}$  M)로 처리한 결과 형질전환효모균주의  $\beta$ -galactosidase 활성이 현저하게 증가하였으며(Fig. 4), 이는 내분비계장애물질로 추정되는 어떤 물질이 그 자체로는 현저한 내분비계장애작용을 나타내지 않지만 내분비계장애작용이 낮은 또 다른 물질과의 협동작용에 의하여 내분비계에 크게 영향을 미칠 가능성이 있음을 시사한다. 그러나 Ramamoorthy 등(1997)은 형질전환효모와 MCF-7 세포에서 dieldrin과 toxaphene을 병용처리시 상승작용을 관찰할 수 없었으며, Graumann 등(1999)도 형질전환 효모에 endosulfan, dieldrin과 atrazine을 병용처리 하였을 때 상승작용을 나타내지 않았다고 보고하였다. 이러한 상이한 결과는 각 연구실에서의 시험조건의 차이와 실험재료들, 특히 실험에 사용한 효모균주 등이 상이하여 나타날 수 있으며, 내분비계장애물질이 여러 생체활성 과정에서 스테로이드 생합성 과정을 저해하거나 대사변화를 유도해 다양한 분자생물학적 작용을 나타내어 서로 영향을 미친 결과 나타날 수 있다고 사료된다(Graumann 등, 1999).

DEHP는 독성 표적장기인 간에서 hyperplasia를 유도하고 아울러 hepatocellular carcinoma를 일으키며, estrogen 관련 대사변이와 peroxisomal proliferation을 일으킨다고 알려져 있으나 그 정확한 기전들은 아직 밝혀져 있지 않다(Eagon 등, 1994). 본 연구에 나타난 DEHP에 의한 nonylphenol의 estrogen수용체에 대한 상승작용이 DEHP에 의한 다른 작용기전에 의한 영향인지, estrogen수용체의 multiple binding site에 기인한 것인지 아니면 또 다른

생체 대사체의 영향에 의한 것인지에 관해서는 향후 계속 연구하고자 하며, 본 실험에 사용한 프탈레이트 물질인 DEHP 뿐만 아니라 다른 프탈레이트 물질 등도 내분비계 장애를 일으키는지 또는 약한 estrogen 활성을 가진 내분비계장애물질과의 병용처리시 상승작용이 나타나는지 여부도 연구되어야 할 것으로 사료된다.

한편, Crain 등(1998)에 의하면 사람의 estrogen 수용체를 가지는 형질전환 효모균주에 사람의 serum 존재하에서 17 $\beta$ -estradiol과 estrogen 유사작용화학물질들(DES, *o,p'*-DDT)을 처리하였을 때, 17 $\beta$ -estradiol의  $\beta$ -galactosidase activity가 serum 농도의존적으로 감소함을 보였다. 이는 serum이 estrogen 수용체에 대한 17 $\beta$ -estradiol의 binding affinity에 영향을 준 것으로 보이며, estrogen 유사작용화학물질에 비해 binding affinity가 1000배 이상 높은 17 $\beta$ -estradiol이 선택적으로 더 큰 영향을 받았음을 나타낸다.

따라서 환경오염으로 인한 내분비계장애물질이 인체에 미치는 영향을 평가함에 있어서는 생체내에서 serum과 세포내 binding factor들과의 affinity를 고려해야하며, 내분비계장애물질로 추정되는 여러 화학물질들의 서로 혼재 가능성을 고려하여 그들 상호간의 영향을 고려한 실험이 병행되어야 한다고 사료된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청 내분비계장애물질평가사업(1999년도) 연구비로 수행된 과제로 지원에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Andersen, H.R., Andersson, A.M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E.B., Korsgaard, B.A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkeboek, N.E., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Sumpter, J.P., Thorpe, S.M. and Grandjean, P. (1999): Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals, *Environ. Health. Perspect.*, **107(Supp 1)**, 89-108.
- Arnold, S.F. and McLachlan, J.A. (1996a): Synergistic signals in the environment, *Environ. Health. Perspect.*, **101**, 1020-1023.
- Arnold, S.F., Collins, B.M., Robinson, M.K., Guillette, L.J. Jr. and McLachlan, J.A. (1996b): Differential interaction of natural and synthetic estrogens with extracellular binding proteins in a yeast estrogen screen, *Steroids*, **61(11)**, 642-646.
- Arnold, S.F., Klotz, D.M., Vonier, P.M., Klotz, D.M. and McLachlan, J.A. (1996c): Synergism in estrogen-regulated gene expression, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **123**, 119-122.
- Arnold, S.F., Robinson, M.K., Notides, A.C., Guillette, L.J. Jr. and McLachlan, J.A. (1996d): A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens, *Environ. Health. Perspect.*, **104(5)**, 544-548.
- Arnold, S.F., Bergeron, J.M., Tran, D.Q., Collins, B.M., Vonier, P.M., Crews, D., Toscano, W.A. Jr. and McLachlan, J.A. (1997a): Synergistic responses of steroidal estrogens *in vitro* (yeast) and *in vivo* (turtles), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 336-342.
- Arnold, S.F., Vonier, P.M., Collins, B.M., Klotz, D.M., Guillette Louis, J. Jr. and McLachlan, J.A. (1997b): *In vitro* Synergistic interaction of alligator and human estrogen receptors with combinations of environmental chemicals, *Environ. Health. Perspect.*, **105(Supp 3)**, 615-618.
- Balmelli-Gallacchi, P., Schoumacher, F., Liu, J.W., Eppenberger, U., Mueller, H. and Picard, D. (1999): A yeast-based bioassay for the determination of functional and non-functional estrogen receptors, *Nucl. Acids. Res.*, **27(8)**, 1875-1881.
- Blom, A., Ekman, E., Johannisson, A., Norrgren, L. and Pesonen, M. (1998): Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**, 306-310.
- Breithofer, A., Graumann, K., Scicchitano, M.S., Karathanasis, S.K., Butt, T.R. and Jungbauer, A. (1998): Regulation of human estrogen receptor by phytoestrogens in yeast and human cells, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **67**, 421-429.
- Bruder, J.M., Sobek, L. and Oettel, M. (1997): Dehydroepiandrosterone stimulates the estrogen response element, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **62**, 461-466.
- Chen, C.W., Hurd, C., Vorojeikina, D.P., Arnold, S.F. and Notides, A.C. (1997): Transcriptional activation of the human estrogen receptor by DDT isomers and metabolites in yeast and MCF-7 cells, *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 1161-1172.
- Collins, B.M., McLachlan, J. and Arnold, S.F. (1997): The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast, *Steroids*, **62**, 365-372.
- Crain D.A., Noriega N., Vonier P.M., Arnold S.F., McLachlan J.A. and Guillette L.J. Jr. (1998): Cellular bioavailability of natural hormones and environmental contaminants as a function of serum and cytosolic binding factors, *Toxicol Ind Health.*, **14**, 261-273.
- Eagon, P.K., Chandar, N., Epley, M.J., Elm, M.S., Brady, E.P. and Rao, K.N. (1994): Di(2-ethylhexyl)phthalate-induced changes in liver estrogen metabolism and

- hyperplasia, *Int J. Cancer*, **58(5)**, 736-743.
- Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J., Babai, D., Portier, C.J. and McDonnell, D.P. (1997): Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 205-212.
- Graumann, K., Breithofer, A. and Jungbauer, A. (1999): Monitoring of estrogen mimics by a recombinant yeast assay: synergy between natural and synthetic compounds? *Sci. Total. Environ.*, **225**, 69-79.
- Harris, C.A., Henttu, P., Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (1997): The estrogenic activity of phthalate ester *in vitro*, *Environ. Health. Perspect.*, **105**, 802-811.
- Ito, H., Fukada, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983): Transformation of intact yeast cells with alkali cations, *J. Bacteriol.*, **153**, 163-186.
- Kelce, W.R., Stone, C.R., Laws, S.C., Gray, L.E., Kemppainen, J.A. and Wilson, E.M. (1995): Persistent DDT metabolite *p,p'* DDE is a potent androgen receptor antagonist, *Nature*, **375**, 581-585.
- Klotz, D.M., Ladlie, B.L., Vonier, P.M., McLachlan, J.A. and Arnold, S.F. (1997): *o,p'*-DDT and its metabolite inhibit progesterone-dependent response in yeast and human cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **129**, 163-171.
- Li, Ling-Hong, Jester, Jr. W.F., Laslett, A.L. and Orth, J.M. (2000): A single dose of di-(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal rats alters gonocytes, reduces sertoli cell proliferation, and decreases cyclin D2 expression, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **166**, 222-229.
- Maness, S.C., McDonnell, D.P. and Gaido, K.W. (1998): Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **151(1)**, 135-142.
- Miller, J.H. (1972): Experiments in genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Perez, P., Pulgar, R., Olea-Serrano, F., Villalobos, M., Rivas, A., Metzler, M., Pedraza, V. and Olea, N. (1998): The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups, *Environ. Health. Perspect.*, **106**, 167-174.
- Petersen, J.H. and Breindahl, T. (2000) : Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae, *Food Add. Contamin.*, **17(2)**, 133-141.
- Petit, F., Le Goff, P., Cravedi J.-P., Valotaire, Y. and Pakdel, F. (1997): Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures, *J. Mol. Endocrinol.*, **19**, 321-335.
- Ramamoorthy, K., Wang, F., Chen, I.C., McDonnell, D.P., Leonard, L.S., Gaido, K.W., Bocchinfuso, W.P., Korach, K.S. and Safe, S. (1997): Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphene mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based estrogen receptor assays : no apparent synergism, *Endocrinology*, **138(4)**, 1520-1527.
- Simons, S.S. (1996): Environmental estrogen : can two 'alrights' make a wrong? *Science*, **272**, 1451.
- Wade, M.G., Desaulniers, D., Leingartner, K. and Foster, W.G. (1997): Interactions between endosulfan and dieldrin on estrogen-mediated processes *in vitro* and *in vivo*, *Reprod. Toxicol.*, **11(6)**, 791-798.
- Zacharewski, T.R., Meek, M.D., Clemons, J.H., Wu, Z.F., Fielden, M.R. and Matthews, J.B. (1998): Examination of *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate ester, *Toxicol. Sci.*, **46**, 282-293.