

## LNCaP 세포주를 이용한 내분비계장애물질중 안드로겐성 확인시험을 위한 검색법

김진호\* · 정혜주 · 김영옥 · 정승태 · 박재현 · 조대현 · 김동섭  
식품의약품안전청 국립독성연구소

### Screening Assay for Identification of Endocrine Disruptors with Androgen Activities using LNCaP Cells

Jin Ho Kim\*, Hye Joo Chung, Young Ok Kim, Seung Tae Chung, Jae Hyun Park,  
Dae Hyun Cho and Dong Sub Kim

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and  
Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul 122-704, Korea  
(Received February 6, 2002)  
(Accepted March 14, 2002)

**ABSTRACT** : Substantial evidences have been accumulated about the hormone-like effects of exogenous substances such as pesticides and industrial chemicals during past years. The effects of these substances on the endocrine system are believed to be either enhancing or reducing of various endocrine actions. It is necessary to identify putative causal agents by the battery system and to assess their ability to disrupt the endocrine system. A variety of in vitro and in vivo approaches have been used to determine the androgenic effects of environmental chemicals. To establish the method for assessment of the putative endocrine disruptors with androgenic activity, we carried out the cell proliferation assay by MTS method after treatment with the various concentrations of testosterone in LNCaP cells (human prostatic cancer cell line) and also observed the expression of androgen-related genes by quantitative RT-PCR. In the cell proliferation assay, the results showed that the growth of LNCaP cells increased within level of at least 10 pM testosterone. We measured by quantitative RT-PCR method on the effects of testosterone on mRNA expression of androgen receptor (AR), prostate-specific antigen (PSA), bone morphogenetic protein (BMP) and BMP receptor (BMPR) in LNCaP cells. The results demonstrated that mRNA expression of PSA and BMPR-IB was observed differently within level of at least 0.01 pM testosterone compared with non-treated control. These observations suggest that the detection of PSA and BMPR-IB mRNA by the quantitative RT-PCR in LNCaP cells is very sensitive method to identify the endocrine disruptors to have the androgenic effects.

**Key Words** : Endocrine disruptor, Androgen, LNCaP cells, PSA and BMPR-IB, RT-PCR

#### I. 서 론

산업의 발달과 더불어 파생된 환경오염 물질이 물고기, 야생동물에서 호르몬과 비슷한 작용을 가지며 호르몬의 고유한 기능을 교란시키는 것으로 확인되었다(Sonnenschein과 Soto, 1998). 이러한 내분비계의 이상을 초래하는 물질을 총칭하여 내분비계 장애물질(endocrine disruptors)로

명명하였다. 이들 내분비계 장애물질은 물질의 종류에 따라 표적 호르몬과 표적 장기 등에 따라서 작용기전이 다양하며 에스트로겐(estrogen) 및 안드로겐(androgen) 같은 성 호르몬과 유사한 작용을 하거나 길항하는 작용, 이들 호르몬의 합성과 대사를 변화시키는 작용, 또는 호르몬 수용체의 양을 변화시키는 작용 등을 들 수 있다(Sonnenschein과 Soto, 1998; Zacharewski, 1998; Kelce 등, 1998).

내분비계의 장애를 유발시키는 화학물질에 의한 환경오염은 파충류, 어류, 조류, 포유류 등의 야생동물에서 생식기 발달에 심각한 문제를 야기시키고 있다(Sonnenschein과 Soto, 1998; Zacharewski, 1998; Kelce 등, 1998). 내분비계 장애물질에 노출된 동물들은 암컷에서 수컷의 생식

\*To whom correspondence should be addressed  
Abbreviations : AR, androgen receptor; PSA, prostate-specific antigen; BMP, bone morphogenetic protein; BMPR, bone morphogenetic protein receptor; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; FBS, fetal bovine serum

기가 관찰되고 불임, DDT에 노출된 악어에서는 수컷의 암컷화 및 수컷 성기의 왜소증이 관찰되었으며, 이들 물질에 대한 동물실험에서 정자의 감소와 요도하열, 고환암 등 남성 생식기의 구조 및 기능에 심각한 영향이 나타나고 있다(Chen 등, 1988; Bromwich 등, 1994; Olsen 등, 1995; Kelce 등, 1997; Safe 등, 1997; Kurata 등, 1998; Mylchreest 등, 1998).

많은 화학물질과 환경오염물질에 대하여 생식기 및 성호르몬에 영향을 나타내는 내분비계 장애물질을 검출하기 위한 다수의 *in vitro* 및 *in vivo* 방법이 개발되었다(Ashby와 Lefevre, 1997; Gray, 1998; Ashby와 Lefevre, 2000). 본 연구에서는 남성 생식기의 발달과 기능에 중요한 역할을 담당하는 남성호르몬에 영향을 미치는 내분비계 장애물질의 검색법을 확립하고 발전시키기 위하여 사람의 전립선 암세포에서 유래된 LNCaP 세포에 남성호르몬을 처리한 후 세포의 증식에 미치는 영향을 흡광도 측정법을 이용하여 관찰하였다. 또한 안드로겐의 작용에 따라서 발현이 증가되는 유전자인 prostate-specific antigen(PSA) 및 bone morphogenetic protein receptor(BMP)와 발현이 억제되는 유전자인 androgen receptor(AR) 및 bone morphogenetic protein(BMP)을 quantitative RT-PCR법으로 분석하여 LNCaP 세포주에서 남성호르몬 작용성 내분비계 장애물질을 평가하기 위한 *in vitro* 방법을 개발하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

사람의 전립선암에서 유래한 LNCaP 세포주(ATCC CRL-10995)는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 RPMI 1640 배지(10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1.0 mM sodium pyruvate, 100 units/ml penicillin 및 100 mg/ml streptomycin)에서 유지하였다.

### 2. 세포의 증식반응

LNCaP 세포주를 RPMI 1640 배지로 세포를 3번 세척하여 96-well flat bottom plate에 well당  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ 개씩  $100 \mu\text{l}$ 를 분주하고 각 well에 testosterone을 최종농도가  $10^{-7}$ ~ $10^{-15}$  M이 되도록  $100 \mu\text{l}$ 씩 추가하여 72시간 동안 배양하였다. 이때 FBS는 charcoal과 dextran으로 처리된 FBS(HyClone® Lab. INC.)를 사용하였다. 세포의 증식능 측정은 tetrazolium 화합물(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS, Promega Co.)을 이용한 MTS 세포증식능 측정법으로 평가하였다(Dalkin 등, 1996). 세포증식능

판정은 무처리군과 비교하여 세포 증식능이 10% 이상 증가하였을 때 양성으로 판정하였다. MTS를 각 well에 추가한 후 90분 동안 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 반응시켜 490 nm에서 흡광도를 microplate reader(Molecular Devices Co, USA)로 측정하였다.

증식능은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{증식능(\%)} = \frac{\text{실험군 흡광도} - \text{배지 흡광도}}{\text{대조군 흡광도} - \text{배지 흡광도}} \times 100$$

### 3. RNA 준비 및 quantitative RT-PCR

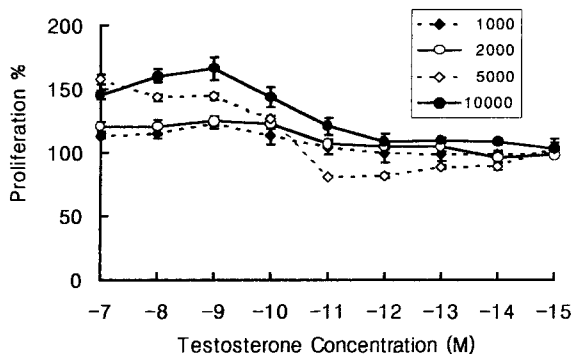
RPMI 1640 배지로 LNCaP 세포를 6-well flat bottom plate에 well당  $1 \times 10^5$ 개씩 접종하여 24시간 배양한 후, 각 well에 testosterone을 최종농도가  $10^{-6}$ ~ $10^{-14}$  M이 되도록 각 well에 분주하여 72시간 동안 배양하였다. 배양한 후 각 well의 세포에서 RNeasy Mini Kit(QIAGEN Ltd, CA, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다.

LNCaP 세포로부터 추출한 각각의 RNA 20 ng에 대하여 Super-Script™ One-Step™ RT-PCR System(Life Technologies, Inc.)을 이용하여 quantitative RT-PCR을 수행하여 testosterone 의존성 mRNA의 발현을 분석하였으며, 내부 대조유전자는  $\beta$ -actin과 비교하였다. RT-PCR에 사용한 각 primer의 sequences와 PCR 산물의 크기는 다음과 같다: AR2.3, 265 bp, 5'-GGAGACTGCCAGGGACCATGT-3'과 5'-TCCCAGAGTCATCCCTGCTTC-3'; AR7.8, 228 bp, 5'-GATGAACTTCGAATGAACTAC-3'과 5'-CACTTGCACAGAGATGATCTC-3';  $\beta$ -actin, 313 bp, 5'-GACTACCTCATGAAGATCCT-3'과 5'-GCGGATGTCCACGTCACACT-3'; BMP-IB, 643 bp, 5'-GCAGCACAGACGGATATTGT-3'과 5'-TTTCATGCCTCATCAACACT-3'; BMP-2, 671 bp, 5'-TCATAAAACCTGCAACAGCCAACTCG-3'과 5'-GCTGTACTAGCGACACCCAC-3'; PSA, 540 bp, 5'-GGTCGGCACAGCCTGTTTCA-3'과 5'-CCACGATGTGTCCTTGATC-3'(Ide 등, 1997; Grant 등, 1996). 이들 primer는 RT-PCR 반응액에 각각 10  $\mu\text{M}$ 씩 추가하였고 PCR은 Perkin-Elmer 2400 DNA thermal cycler에서 수행하였다. AR2.3와 AR7.8의 primer에 대한 RT-PCR의 조건은 RT는 45°C에서 30분 수행한 후 PCR은 denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 55°C에서 1분, extension은 72°C에서 2분으로 35회 수행하였다.  $\beta$ -actin, BMP-IB, BMP 및 PSA는 RT를 45°C에서 30분 수행하였으며 PCR은 denaturation은 95°C에서 45초, annealing은 60°C에서 1분, extension은 72°C에서 1.5분으로 30회 수행하였다. 각 유전자의 PCR의 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 관찰하였다(Ide 등, 1997; Grant 등, 1996).

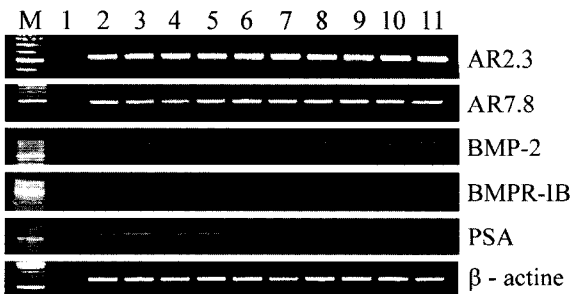
### III. 결 과

#### 1. 세포 증식능

LNCaP 세포주를 이용하여 세포 농도 별로  $10^{-7}$ ~ $10^{-15}$  M의 testosterone 농도에 따른 세포 증식능의 변화를 MTS 세포증식능 분석법으로 측정된 결과 Fig. 1과 같이 관찰되었다. LNCaP 세포주는 well당  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$  개씩 접종한 세포 농도에서는 100 pM의 testosterone 농도에서 각각  $113.0 \pm 7\%$ ,  $122.4 \pm 3.6\%$ ,  $126.3 \pm 2.5\%$  정도로 LNCaP 세포주의 증식이 증가하였다. Well당  $1 \times 10^4$  개씩 접종한 세포는 10 pM의 testosterone 농도까지 양성반응이



**Fig. 1.** Effects of testosterone on the proliferation of LNCaP cells. Cells were seeded at 1000, 2000, 5000 and 10000 per well in 96-well plates and cultured in RPMI-1640 supplemented with dextran treated charcoal-stripped FBS and varying concentrations of testosterone. Each well was subjected to the MTS assay at the third day. In the MTS assay the absorbance at 490 nm is correlated with the number of living cells. M; log10 M.



**Fig. 2.** Expression of AR2.3, AR7.8, BMP-2, BMPR-IB, PSA and  $\beta$ -actin mRNA in LNCaP cells. Cells were seeded at 100,000 per well in 6-well plates and cultured in RPMI-1640 supplemented with dextran treated charcoal-stripped FBS. Twenty nanograms of total RNA isolated from cells cultured under varying concentrations of testosterone were subjected to one step RT-PCR. Products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Lane M, 50-bp ladder DNA; lane 1, distilled water; lane 2,  $10^{-6}$  M testosterone; lane 3,  $10^{-7}$  M testosterone; lane 4,  $10^{-8}$  M testosterone; lane 5,  $10^{-9}$  M testosterone; lane 6,  $10^{-10}$  M testosterone; lane 7,  $10^{-11}$  M testosterone; lane 8,  $10^{-12}$  M testosterone; lane 9,  $10^{-13}$  M testosterone; lane 10,  $10^{-14}$  M testosterone; lane 11, zero testosterone control.

관찰되었으며 이때의 세포 증식능은  $120.7 \pm 6.3\%$  이었다. 또한 세포의 모든 농도에서 1 nM의 testosterone 처리시 세포의 증식능이 가장 높게 관찰되었다.

#### 2. Testosterone 의존성 mRNA 발현에 미치는 영향

LNCaP 세포주를 well당  $1 \times 10^5$  개씩 접종하여 24시간 배양한 후 각 well에 testosterone을 최종농도가  $10^{-6}$ ~ $10^{-14}$  M이 되도록 각 well에 처리하고 72시간 동안 배양한 후 RNA를 추출하여 quantitative RT-PCR 방법으로 testosterone 의존성 mRNA의 발현을 관찰한 결과 Fig. 2와 같이 나타났다. 대조 유전자  $\beta$ -actin를 비롯한 AR2.3, AR7.8, 및 BMP의 유전자는 testosterone의 각 농도에 대하여 발현의 차이가 관찰되지 않았으나 BMPR-IB과 PSA 유전자는 0.01 pM의 testosterone 농도까지 대조군보다 증가하였다.

### IV. 고 찰

남성호르몬인 안드로젠(testosterone)은 고환의 Leydig 세포에서 생산되어 albumin과 globulin 등의 혈청 운반 단백질과 결합하여 AR과 결합할 수 있는 세포로 확산되며 (Hammond 등, 1983; Kelce 등, 1998) 전립선과 부고환 같은 표적조직에서는 testosterone은 더욱 강하게 결합하고 유리가 늦어지는  $5\alpha$ -dihydrotestosterone(DHT)로 환원된다(Zhou 등, 1995). 안드로젠과 결합한 AR은 heat-shock protein의 결손으로 구조적인 변성이 나타나고 두 개로 나누어지는 장소인 핵내로 들어가게되어(Wong 등, 1995) 안드로젠이 intron 지역 혹은 안드로젠 반응성 유전자의 안드로젠 반응 요소의 DNA 조절 염기서열과 결합하게 됨에 따라 전사작용이 나타난다(Tan 등, 1992; Ho 등, 1993). 성분화와 발육기간에 안드로젠 유도성 유전자 산물은 발육되는 조직에서 성 성숙에 중요한 안드로젠 의존성 세포의 기능을 활성화시키는 작용을 한다(Kelce 등, 1998).

환경오염물질과 살충제를 비롯한 농약 등의 물질에 노출된 물고기, 야생동물 및 사람에서 성호르몬의 고유한 기능에 이상이 나타나는 것으로 확인되었다. 특히 이러한 물질은 생체에서 항상성 유지와 성장에 매우 중요한 호르몬의 생산, 분비, 수송, 대사, 결합, 생물학적인 작용 등을 방해하는 것으로 밝혀져 있다. 내분비계 이상을 나타내는 대표적인 물질은 천연물질(phytoestrogen), 의약품(diethylstilbestrol, ethynyl estradiol), 환경오염물질(DDT, polychlorinated biphenyl, dioxin, polyaromatic hydrocarbon)과 산업관련물질(alkylphenol, bisphenol A) 등이 있다(Sonnenschein과 Soto, 1998; Zacharewski, 1998; Kelce 등, 1998; Chen 등, 1988; Bromwich 등, 1994; Olsen 등, 1995; Kelce 등, 1997; Safe 등, 1997; Kurata 등, 1998; Mylchreest 등,

1998).

내분비계 장애물질은 생체내에서 많은 경로에 의해서 장애를 야기시키기 때문에 이들 물질의 검색은 수용체 매개 기전과 수용체 비매개 기전을 상호 보완할 수 있는 *in vivo* 및 *in vitro* 방법으로 평가를 다양하게 수행하여야 한다. 대다수의 *in vitro* 방법은 성호르몬의 작용기전을 바탕으로 발전되었다. 분석방법들은 스테로이드 합성을 포함한 효소의 활성측정(Laskey와 Berman, 1993; Laskey 등, 1994), 호르몬과 결합하는 globulin과 수용체를 이용한 competitive ligand binding assay(Eil과 Nisula, 1990; Hammond와 Lahteenmaki, 1983), 세포 증식능 측정(Soto 등, 1992; Soto 등, 1995) 그리고 세포에서의 유전자의 발현을 분석하는 방법(Balaguer 등, 1996) 등 다양한 방법이 개발되었다.

Androgen proliferation screen assay(A-SCREEN) 중에서 사람의 전립선 암세포에서 유래한 LNCaP 세포주를 이용하는 방법이 있으며 LNCaP 세포는 안드로겐에 대해서 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다(Sonnenschein과 Soto, 1998). Ligand에 의하여 활성화된 androgen receptor (AR)는 제한된 유전자 PSA 및 BMPR-IB의 발현을 지배하는 전사요인으로서 작용한다.

안드로겐 작용성 내분비계 장애물질의 검색방법을 확립하기 위하여 본 논문에서 AR이 존재하는 LNCaP 세포주에서 testosterone을 각 농도별로 처리한 후 LNCaP 세포주의 증식능을 일차적으로 관찰하였으며 안드로겐에 의하여 영향을 받는 PSA 및 BMPR-IB 유전자의 발현을 측정하였다. 또한 안드로겐과 연관성이 있는 유전자는 AR 유전자의 exon 2와 3(AR2.3) 그리고 7과 8(AR7.8)에 위치하는 두 set의 primer는 AR mRNA 검색의 민감성을 증가시키기 위하여 사용하였고 여러 가지 표적세포에서 성장, 분화 및 apoptosis를 조절하는 다양한 기능을 가지고 있는 물질인 transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 계열의 bone morphogenetic protein(BMP) 유전자의 발현을 관찰하였다(Ide 등, 1997; Grant 등, 1996). Testosterone에 대한 LNCaP 세포주의 증식을 측정한 결과(Fig. 1) well 당  $1 \times 10^4$  cells을 접종한 군에서 10 pM testosterone 농도까지 LNCaP 세포가 증식하였으며  $1 \times 10^3$  cells,  $2 \times 10^3$  cells과  $5 \times 10^3$  cells의 처리군에 비하여 더 민감하게 반응하였으며 이는 Kim 등(1996)의 10 pM DHT 농도까지 유의성있게 증가된 보고와 일치하였다.  $1 \times 10^4$  LNCaP cells의 농도에서 세포 증식능을 측정하는 방법으로 내분비계 장애물질중 안드로겐과 유사한 작용을 하는 내분비계 장애물질이 세포의 분열과 성장에 미치는 영향을 확인할 수 있다. 또한 LNCaP 세포주에 10 pM testosterone과 내분비계 장애물질을 동시에 처리할 경우 내분비계 장애물질과 호르몬과의 상승 및 억제 등의 상호작용을 관찰할 수 있을 것으로

생각된다. Testosterone에 대한 LNCaP 세포에서 안드로겐과 관련하여 변화가 예상되는 유전자를 RT-PCR를 실시하여 PCR 산물을 agarose gel에서 확인한 결과 PSA 및 BMPR-IB 유전자의 발현이 0.01 pM( $1 \times 10^{-14}$  M) testosterone의 농도를 처리한 세포에서 무처리군보다 증가됨이 관찰되었고 PSA 유전자는 농도 의존적으로 발현이 증가되었으며 이러한 결과는 Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee(EDSTAC)가 제시한 Tier I *in vitro* 검색법인 *in vitro* yeast transactivation system을 사용하여 확인한 testosterone 농도(최저농도  $1 \times 10^{-9}$  M, EC<sub>50</sub>  $1.2 \times 10^{-8}$  M) 보다 낮은 검출농도였다(O'Connor 등, 2000). AR2.3, AR7.8 및 BMP 유전자는 testosterone의 각 농도에 대하여 발현의 차이가 관찰되지 않았다. AR2.3과 AR7.8 유전자 분석은 AR의 발현에 영향을 미치는 내분비계 장애물질의 검색에 중요하게 활용될 수 있으며 BMP 유전자의 분석은 이들 세포에 대하여 성장, 분화 및 apoptosis 등에 관여하는 내분비계 장애물질의 검색을 위하여 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 androgen receptor와 관련되어 내분비계 장애를 일으키는 물질의 검색을 위한 방법으로 안드로겐과 관련된 유전자, PSA 및 BMPR-IB을 RT-PCR 방법을 사용하여 안드로겐과 유사한 작용을 하는 내분비계 장애물질을 최소 검출한계가 0.01 pM 농도까지 검색할 수 있고 세포 증식을 통한 검색방법 보다도 100배 이상 민감하며, O'Connor 등(2000)이 수행한 EDSTAC의 *in vitro* yeast transactivation system법보다 민감한 방법으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 확립한 LNCaP 세포주 배양방법으로 세포증식능과 androgen과 관련된 유전자인 PSA, BMPR-IB, AR 및 BMP의 발현의 정도를 RT-PCR 방법으로 측정하여 수많은 환경오염물질이 AR과 남성호르몬의 작용에 미치는 영향을 빠르고 정확하게 평가할 수 있으며, 또한 항안드로겐 및 프로게스테론 작용성 물질 등에 대한 폭넓은 연구를 지속적으로 수행함으로써 내분비계 장애물질을 조기에 검색하여 내분비계 장애물질의 인체에 미치는 영향을 감소할 수 있으리라 사료된다.

## 참고문헌

- Ashby, J. and Lefevre, P.A., (2000): The peripubertal male rat assay as an alternative to the Hershberger castrated male rat assay for the detection of anti-androgens, oestrogens and metabolic modulators, *J. Appl. Toxicol.*, **20**, 35-47.
- Ashby, J. and Lefevre, P.A. (1997): The weanling male rat as an assay for endocrine disruption: preliminary observations, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **26**, 330-337.
- Balaguer, P., Joyeux, A., Denison, M., Vincent, R., Gillesby,

- B. and Zacharewski, T. (1996): Assessing the estrogenic and dioxin-like activities of chemicals and complex mixtures using in vitro recombinant receptor/reporter gene assays. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **74**, 216-222.
- Bromwich, P., Cohen, J., Stewart, I. and Walker, A. (1994): Decline in sperm counts: an artefact of changed reference range of "normal"? *B.M.J.*, **309**(6946), 19-22.
- Chen, W., Zhou, X.M., Chen, D.Y. and Kang, J.S. (1988): Effects of Cimetidine, Progesterone, Cannitracin and Tolazoline on the weight and DNA content of the testosterone-induced hyperplastic prostate of the rat, *Urol. Res.*, **16**(5), 363-336.
- Colborn, T., vom Saal, F.S. and Soto, A.M. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.*, **101**, 378-384.
- Dalkin, A.C., Gilrain, J.T., Bradshaw, D. and Myers, C.E. (1996): Activin Inhibition of prostate cancer cell growth : selective actions on androgen-responsive LNCap cells, *Endocrinology*, **137**(12), 5230-5235.
- Grant, E.S., Batchelor, K.W. and Habib, F.K. (1996): Androgen independence of primary epithelial culture of the prostate is associated with a down-regulation of androgen receptor gene expression, *The Prostate*, **29**, 339-349.
- Gray, L.E. Jr. (1998): Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens, *Toxicol. Lett.*, **102-103**, 677-680.
- Guzelian, P.S. (1982): Comparative toxicology of chlo-rodecone (epone) in humans and experimental animals, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 89-113.
- Hammond, G.L., Lahteenmaki, P.L.A. (1983): A versatile method for the determination of serum cortisol globulin binding capacities, *Clin. Chim. Acta.*, **132**, 101-110.
- Ho, K.C., Marschke, K.B., Tan, J., Power, S.G., Wilson, E.M. and French, F.S. (1993): A complex response element in intron 1 of the androgen-regulated 20-kDa protein gene displays cell type-dependent androgen receptor specificity, *J. Biol. Chem.*, **268**(36), 27226-27235.
- Ide, H., Yoshida, T., Matsumoto, N., Aoki, K., Osada, Y., Sugimura, T. and Terada, M. (1997): Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-21, *Cancer Res.*, **57**, 5022-5027.
- Kelce, W.R., Gray, L.E. and Wilson, E.M. (1998): Anti-androgens as environmental endocrine disruptors, *Reprod. Fertil. Dev.*, **10**(1), 105-11.
- Kelce, W.R., Lambright, C.R., Gray, L.E. Jr. and Roberts, K.P. (1997): Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression : *in vivo* confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **142**(1), 192-200.
- Kim, I.Y., Kim, J.H., Zelner, D.J., Ahn, H.J., Sensibar, J.A. and Lee, C. (1996): Transforming growth factor-beta 1 is a mediator of androgen-regulated growth arrest in an androgen-responsive prostatic cancer cell line, LNCaP. *Endocrinology*, **137**(3), 991-999.
- Kurata, Y., Kidachi, F., Yokoyama, M., Toyota, N., Tsuchitani, M. and Katoh, M. (1998): Subchronic toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate in common marmosets: lack of hepatic peroxisome proliferation, testicular atrophy, or pancreatic acinar cell hyperplasia, *Toxicol. Sci.*, **42**(1), 49-56.
- Lim, D.J., Liu, X., Sutkowski, D.M., Braun, E.J., Lee, C. and Koslowski, J.M. (1993): Growth of an androgen-sensitive human prostate cancer cell line., LNCaP, in nude mice, *The Prostate*, **226**, 109-118.
- Mylchreest, E., Cattley, R.C. and Foster, P.M. (1998): Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to Di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol. Sci.*, **43**(1), 47-60.
- Olsen, G.W., Bodner, K.M., Ramlow, J.M., Ross, C.E. and Lipshultz, L.I. (1995): Have sperm counts been reduced 50 percent in 50 years? A statistical model revisited, *Fertil. Steril.*, **63**(4), 887-893.
- O'Connor, J.C., Davis, L.G., Frame S.R., Cook J.C., Ross, C.E. and Lipshultz, L.I. (2000): Evaluation of a Tier I screening battery for detecting endocrine-Active compounds (EACs) using the positive controls testosterone, coumestrol, progesterone, and RU 486, *Toxicol. Sci.*, **54**, 338-354.
- Safe, S., Connor, K., Ramamoorthy, K., Gaido, K. and Maness, S. (1997): Human exposure to endocrine-active chemicals: hazard assessment problems, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **26**, 52-58.
- Sonnenschein, C. and Soto, A.M. (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **65**, 143-150.
- Sonnenxchein, C., Olea, N., Pasanen, M.E. and Soto, A.M. (1989): Negative controls of cell proliferation : human prostate cancer cells and androgens, *Cancer Res.*, **49**, 3474-3481.
- Sunger, O.L. (1949): Occupational oligospermia. *T. A. M. A.*, **140**, 1249.
- Tan, J., Marschke, K.B., Ho, K.C., Perry, S.T., Wilson, E.M. and French, F.S. (1992): Response elements of the androgen-regulated C3 gene, *J. Biol. Chem.*, **267**(11), 7958.
- Wong, C., Kelce, W.R., Sar, M. and Wilson E.M. (1995): Androgen receptor antagonist versus agonist activities

- of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide, *J. Biol. Chem.*, 25; **270**(34), 19998-20003.
- Zacharewski, T. (1998): Identification and assessment of endocrine disruptors : limitations of *in vivo* and *in vitro* assays, *Environ. Health. Perspect.*, **106** Suppl. (2), 577-582.
- Zhou, Z.X., Lane, M.V., Kemppainen, J.A., French, F.S. and Wilson, E.M. (1995): Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability, *Mol. Endocrinol.*, **9**(2), 208-218.