

Nonylphenol이 CYP17 및 CYP19발현에 미치는 영향

김희진, 안미영, 김인영¹, 강태석¹, 김태성¹, 강일현¹, 문현주¹,
기호연¹, 김순선¹, 이이다¹, 박귀례¹, 한순영¹, 김형식*

부산대학교 약학대학
¹식품의약품안전청, 국립독성연구원

Effects of Nonylphenol on CYP17 and CYP19 Expression in the Ovary of Sprague-Dawley Female Rats

Hee Jin Kim, Mee Young Ahn, In Young Kim¹, Tae Seok Kang¹, Tae Sung Kim¹,
Il Hyun Kang¹, Hyun Ju Moon¹, Hoyun Ki¹, Soon Sun Kim¹, Rhee Da Lee¹,
Kui Lea Park¹, Soon Young Han¹ and Hyung Sik Kim*

Laboratory of Molecular Toxicology, College of Pharmacy, Pusan National University
¹Korea Food & Drug Administration, National Institute of Toxicological Research

ABSTRACT

Cytochrome P450 17 α -hydroxylase (CYP17) and cytochrome P450 aromatase (CYP19) are key steroidogenic enzymes in androgen and estrogen synthesis. This study evaluated the effects of nonylphenol (NP) on CYP17 and CYP19 expression in the ovary of Sprague-Dawley rats. All female rats were administered orally with the vehicle (control, corn oil), diethylstilbestrol (DES, 5.0 μ g/kg) and NP (50, 100, or 200 mg/kg/day), which was starting when they were weaned at 21 days of age for 20 days. Twenty four hours after final dose, the animals were anesthetized with ether. Significant decreases in the uterus (wet weight) were observed with 5.0 μ g/kg/day DES (78% of control) and 200 mg/kg/day NP (62% of control), respectively. Additionally, ovarian weight was significantly decreased with 5.0 μ g/kg/day DES (63% of control) and 200 mg/kg/day NP (72% of control). The serum estradiol levels were slightly lower in DES and high dose NP treatment groups, but the T4 levels were not affected by DES and NP. The expression of the ovarian CYP19 gene increased with low doses (50 and 100 mg/kg/day) of NP, while DES and high dose of NP (200 mg/kg/day) did not affect on the CYP19 mRNA levels. In contrast to the CYP19 gene, the CYP17 gene expression level was significantly down-regulated by the DES and 200 mg/kg/day NP. This result suggests that NP inhibits ovarian estrogen synthesis by suppressing CYP17 mRNA expression, and different mechanisms might exist for the expression of steroidogenic CYP17 and CYP19 genes in the ovary of Sprague-Dawley rats in response to NP.

Key words : Nonylphenol, diethylstilbestrol, estrogen synthesis, T4, CYP17, CYP19

서 론

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-51-510-2816, E-mail: hkims@pusan.ac.kr

내분비계 장애물질 (일명, 환경호르몬성 물질)이

란 사람과 동물에서 내분비계 기능에 이상을 일으킴으로써 생체내 항상성 유지와 발달에 위해한 영향을 미칠 가능성이 있는 외부로부터 노출되는 물질들을 말한다(EDSTAC, 1998). 현재까지 보고된 바에 의하면 내분비계 장애물질의 작용기전으로는 표적기관에서 에스트로겐 또는 안드로겐 수용체와 직접적으로 결합하여 생체내 호르몬의 모방, 차단 및 호르몬 의존성 유전자 발현에 변화를 일으키며 간접적으로는 호르몬의 합성, 저장, 배설, 분비 및 이동에 영향을 미침으로써 정상적인 내분비계 기능을 방해하는 것으로 알려져 있다(Kavlock, 1999; Safe, 2000). 특히, 이와 같이 외부로부터 노출되는 내분비계 장애물질은 정소 및 난소에서 스테로이드 호르몬 합성 경로에 대하여 직, 간접적으로 영향을 미칠 가능성도 제기되고 있다(Cook *et al.*, 1997). 그럼에도 불구하고 일반적으로 많은 추정 내분비계 장애물질들에 대한 작용기전 연구가 그

물질의 에스트로겐성 또는 항 에스트로겐성 효능에 대해서만 중점 되고 있다(Odum *et al.*, 1997, 2001). 이들 물질들은 내분비계 장애물질 검색 시험법(예, 자궁비대반응 시험 및 성성숙 시험)에서도 대부분 에스트로겐 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Goldman *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002a; O'Connor *et al.*, 1998). 그러나 에스트로겐성 물질이 난소에서의 steroidogenesis에 관여하는 효소인 cytochrome P450 17 α -hydroxylase (CYP17) 및 cytochrome P450 aromatase (CYP19) 발현에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 아직까지 많은 연구가 이루어지지 않았다. 일반적으로 에스트로겐은 콜레스테롤로부터 합성되며 이 과정에는 각각의 단계를 조절하는 많은 효소들이 관여한다(Fig. 1). 이중 CYP17은 pregnenolone 및 progesterone을 각각 dehydroepiandrosterone 및 androstenedione으로의 전환을 촉매하는 효소로 테스토스테론 및 에스트

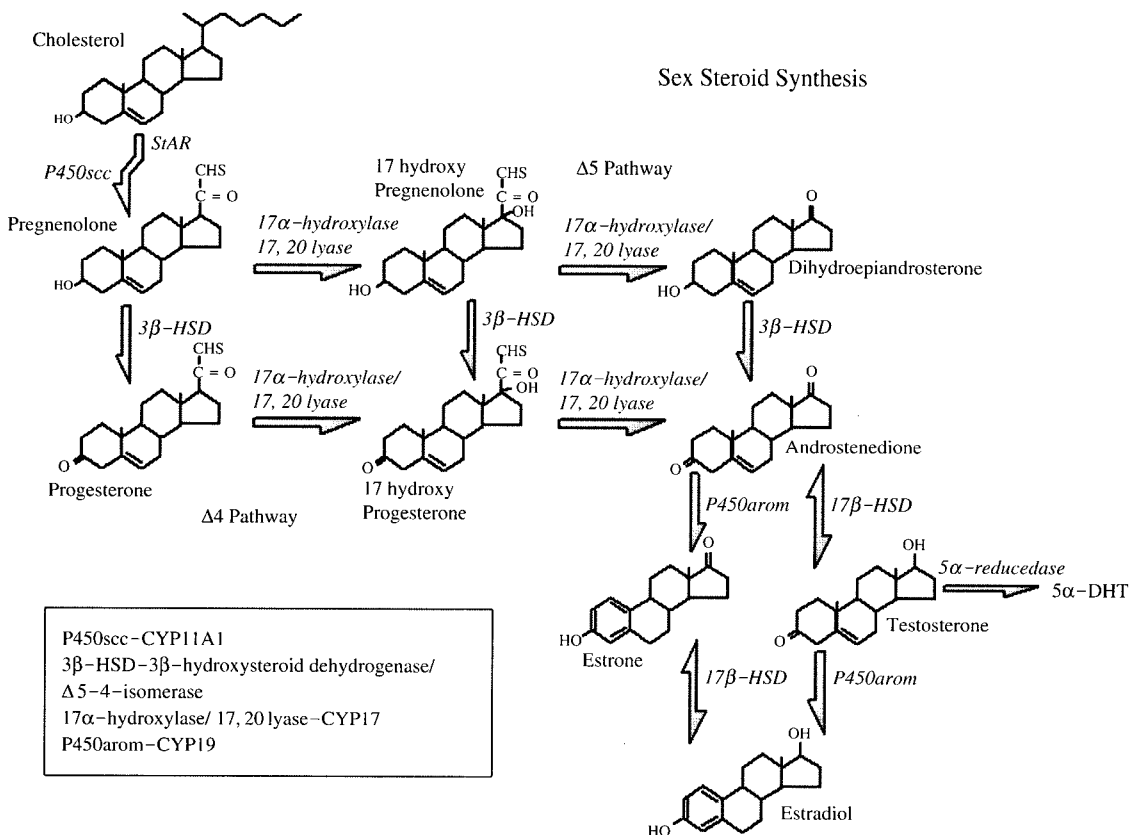


Fig. 1. Enzymatic conversions of cholesterol and intracellular estradiol synthesis pathway (see Kristensen *et al.*, 2001).

로겐의 생합성에 중요한 역할을 한다. 한편 CYP19는 국소적인 에스트로겐 합량을 결정하는 효소로 androstenedione으로부터 estrone으로의 전환 및 테스토스테론의 에스트로겐으로의 전환을 유도한다. 따라서 생체내 에스트로겐 농도는 steroidogenesis 과정에 관여하는 여러 효소들의 활성에 따라 그 합량이 증가되거나 또는 감소될 수 있다. 그 외에도 이들 물질들은 또한 cytochrome P450 (CYP) 유전자 발현에 이상을 유발함으로써 성 호르몬의 합성에 영향을 미칠 가능성이 제기되고 있다(Hurd *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 2003). 예를 들면 1, 1-dichloro-2, 2-bis (p-chlorophenyl) ethylene (DDE) 및 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (p-chloro-phenyl) ethane (DDT)는 항안드로겐성 작용 이외에도 CYP 효소 발현에 영향을 주어 호르몬 대사과정에 변화를 일으킨다는 것이 보고된바 있다(You *et al.*, 1999).

내분비계 장애물질들은 다양한 호르몬 수용체의 조절에 영향을 주어 세포주기 조절에 관여하는 유전자의 활성을 증가시키거나 oncogene을 활성화시킨다(Hurd *et al.*, 1997; Hankinson *et al.*, 1998). 따라서 생체내 에스트로겐 농도는 내분비계 장애물질의 노출에 의해 영향을 받을 수 있으며 이는 각종 내분비계 관련 질환 및 암을 유발하는 원인이 될 수 있다. Nonylphenol (NP)은 alkylphenol ethoxylates로서 플라스틱, 농약, 페인트 및 화장품 등과 같은 일상용품 등의 생산에 이용되는 계면활성 성분이다. 이들 중 60% 이상이 NP 및 octylphenol이 차지하며 환경 중에 분포농도도 가장 높다고 보고되어 있다(Naylor *et al.*, 1992; Nimrod and Benson, 1996). Laurenzana *et al.*(2002)은 미성숙 랫드에 NP를 투여한 후 수컷의 정소에서 CYP17의 활성을 측정된 결과 고농도의 NP 투여군에서 유의하게 감소하는 경향을 나타내었다고 보고한 바 있다. 또한 Majdic *et al.*(1996)은 임신기간 동안 octylphenol을 투여한 후 신생자의 정소에서 CYP17 mRNA, 단백질 합량 및 효소 활성을 측정된 결과 유의하게 감소하였다고 보고한 바 있다. 그러나 NP이 암컷의 난소에서 steroidogenesis에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 연구된바가 없다.

따라서 본 연구에서는 에스트로겐성 활성을 나타내는 NP이 생체내 호르몬 합성에 관여하는 유전

자들(CYP17 및 CYP19)의 발현에 대하여 어떠한 영향을 미치는지를 규명하고자 하였으며 NP에 의해 유도되는 에스트로겐 활성과의 상관성에 대하여 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질

본 연구에 사용된 시험물질인 NP 및 diethylstilbestrol (DES)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하였으며, 그 밖의 모든 시약은 시판용 특급시약을 사용하였다.

2. 실험동물 및 군분리

본 연구에서는 실험동물로 가장 일반적으로 널리 이용되는 Sprague-Dawley계 특정병원균 부재(Specific Pathogen Free) 랫드를 사용하였다. 임신 모체(임신 15일령)를 오리엔탈 바이오텍(서울)으로부터 구입하여 polycarbonate cage에 1마리씩 사육하였다. 실험동물의 사육실 조건은 온도 23 ± 0.5°C, 습도 55 ± 5% 및 12시간 주기로 명암이 자동 조절되는 부산대학교 실험동물센터에서 사육하였다. 사료와 물은 각각 멸균된 고형사료와 염소 살균시킨 정제수를 자유급식 시켰다. 모든 실험동물의 체중을 일정하게 유지하기 위해 출산일을 정확하게 기록하여 출생 후 4일(교배일을 임신 0일로 산정)에 모체 당 8마리씩 균등하게 선별하였다. 출생 후 21일에 암컷 동물만을 선별한 후 체중을 측정하여 평균체중에서 ±5%의 범위에 속하는 동물만을 선별하여 군분리를 실시하였다. 시험군의 분리는 NP 투여군(50, 100 및 200 mg/kg/day), 양성 대조물질인 DES (5 µg/kg/day) 투여군 및 대조군을 포함하여 각 군당 각각 6마리의 실험동물을 선정하였다.

3. 투여기간 및 방법

모든 시험물질을 먼저 소량의 에탄올에 용해시킨 후 일정한 비율로 희석하여 corn oil을 가한 후 최종 투여 농도를 조절하였다. 시험물질 투여는 경구로 하였으며, 투여기간은 생후 21일부터 20일간 매일 1일 1회씩 연속하여 투여하였다. 투여량(5

mL/kg 체중)은 매일 체중을 측정하여 산출한 후 동일한 시간에 투여하였다. 시험물질의 조제는 투여직전에 매일 조제하였다.

4. 임상증상, 체중 및 장기무게

시험기간 동안 시험물질 투여와 직접적으로 관련된 임상증상 및 독성증상 등에 대하여 적어도 1일 1회씩 관찰하였다. 체중은 매일 측정하여 기록하였으며, 투여종료 후 24시간에 모든 동물을 ether로 마취한 후 복부대동맥으로부터 혈액을 채취한 후 호르몬 측정을 위해 혈청을 분리하였다. 그 후 생식관련 장기인 난소, 자궁 및 갑상선을 적출하여 무게를 측정하였다. 기타 관련 장기들에 대해서도 지방을 제거한 후 즉시 무게를 측정하였다.

5. 호르몬 분석

성호르몬(estradiol 및 T4) 분석은 상품화된 호르몬 분석용 Kit (Coat-A-Count, Diagnostic Products Corp.)를 이용하여 radioimmuno assay (RIA)법에 의해 실시하였다. 각각의 시험방법은 주어진 계획서에 따라 분석하였다.

6. CYP17 및 CYP19 발현측정

난소에서 CYP17 및 CYP19 mRNA의 발현정도는 reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법을 이용하여 정량하였다. 난소를 적출하여 액체질소에 고정된 후 TRIzol (Invitrogen)을 첨가하여 총 RNA를 분리하였다. 분리된 각각의 RNA는 spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 정량한 후 formaldehyde agarose gel electrophoresis에 의해 확인하였다. 분리한 총 RNA를 First strand cDNA synthesis kit (Invitrogen)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 즉, RNA를 65°C에서 15분간 방치한 후 ice bath에서 식힌 다음 미리 준비한 RT mixture (10x RT buffer, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP mix, random primer, RNase inhibitor, 0.1 M DTT, 200 unit SuperScript II)에 2 µg의 RNA를 첨가하여 42°C에서 50분간, 94°C에서 5분간 반응시킨 후 ice에 5분간 보관하여 RNase H를 첨가하여 37°C에서 incubation한 후 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template DNA로 하여 PCR 반응 시

약과 혼합하여 CYP17 primer (forward primer, TCATCAAGAAGGGAAAAGAA; reverse primer, TGAAGCAGATAGCACAG ATG) 및 CYP19 primer (forward primer, GCTTCT CATCGCAGAG-TATCCGG; reverse primer, CAAGGGTAAATTCA-TTGGG CTTGG)를 이용하여 PCR 반응을 실시하였다. 각 시료에서 CYP mRNA의 발현 정도를 표준화하기 위해 β-actin (forward primer, GCTCG-TCGTCGACAACGGCTC; reverse primer, CAAACATGATCTGGGTCA TCTTCTC)를 internal standard로 사용하였다. CYP17의 PCR 반응 조건은 94°C에서 3분 denaturing 한 후 94°C에서 30초, 55°C에서 1분 및 72°C에서 45초를 1 cycle로 하여 26 cycles한 다음 72°C에서 7분간 extension을 실시하였다. CYP19의 경우는 94°C에서 3분 denaturing 한 후 94°C에서 45초, 62°C에서 30초 및 72°C에서 45초를 1 cycle로 하여 24 cycles한 다음 72°C에서 7분간 extension시켰다. 각 PCR 반응 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동시켜 상대적 발현량을 정량하였다.

7. 통계학적 분석

대조군과 시험물질 투여군 간의 통계학적 분석

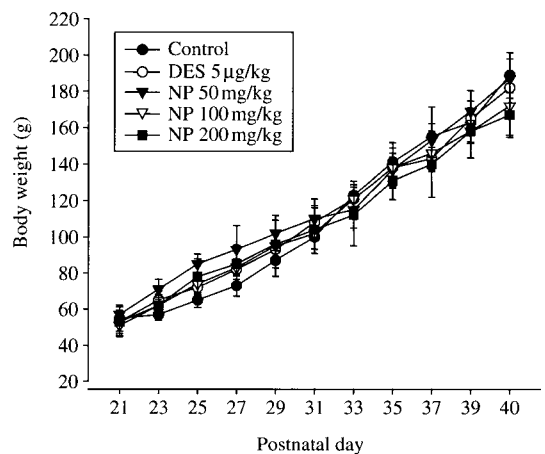


Fig. 2. Body weight changes in Sprague-Dawley female rats treated with diethylstilbestrol (5 µg/kg) and nonylphenol (50, 100, and 200 mg/kg). Animals were dosed daily starting at 21 days of age and this was continued until necropsy on day 41. Data are expressed as means \pm SE of 8 animals per treatment group.

은 ANOVA analysis를 실시하여 $p < 0.05$ 이하인 경우 유의성 있는 것으로 평가하였다.

연구 결과

1. 임상증상, 체중변화 및 장기중량

모든 시험물질 투여 후 임상증상을 관찰한 결과 시험물질 투여와 직접적으로 관련된 외견상의 이상 소견은 관찰되지 않았다. 실험기간동안 체중의 변화는 DES 및 NP 투여군 모두 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2). 성성숙 이전에 내

분비계 장애물질의 투여는 에스트로겐 또는 항에스트로겐 활성 검색 뿐만 아니라 갑상선 기능을 동시에 검색할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서도 DES 및 NP 투여에 의해 스테로이드 호르몬에 민감하게 작용하는 생식관련 장기 및 갑상선 무게를 측정하였다. 모든 동물을 부검 후 즉시 장기무게를 측정한 결과 고용량의 NP (200 mg/kg/day) 및 DES 투여군에서 자궁 및 난소 무게가 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 3A와 3B). 반면에 갑상선 무게는 DES 투여군에서 유의하게 증가하였으며, 고용량의 NP 투여에 의해서도 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 3C).

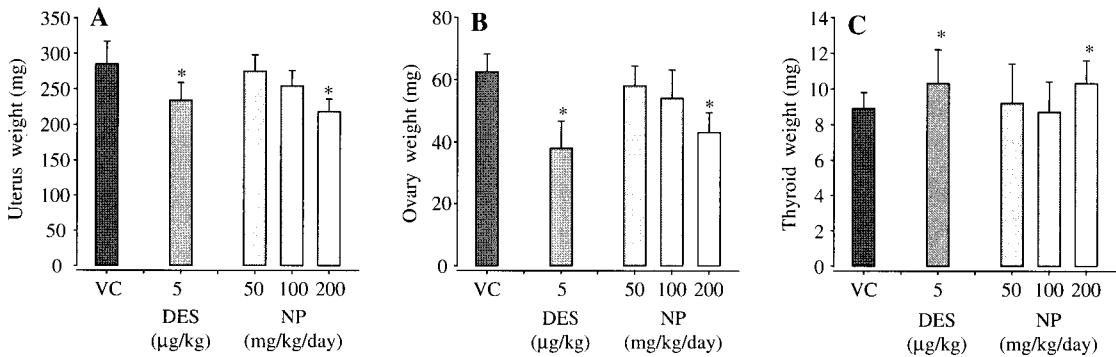


Fig. 3. Effect of diethylstilbestrol (5 µg/kg) and nonylphenol (50, 100, and 200 mg/kg) on uterus (A), ovary (B), and thyroid glands (C) weights. Animals were dosed daily starting at 21 days of age and this was continued until necropsy on day 41. The data shown are means ± SD for 8 animals/group. Asterisk indicates significantly different from control ($p < .05$).

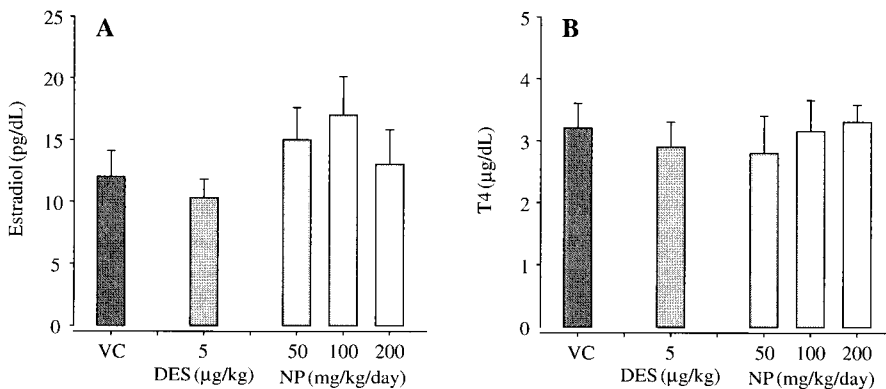


Fig. 4. Effect of diethylstilbestrol (5 µg/kg) and nonylphenol (50, 100, and 200 mg/kg) on plasma concentrations of estradiol and T4 in Sprague-Dawley female rats. Animals were dosed daily starting at 21 days of age and this was continued until necropsy on day 41. The data shown are means ± SD for 8 animals/group.

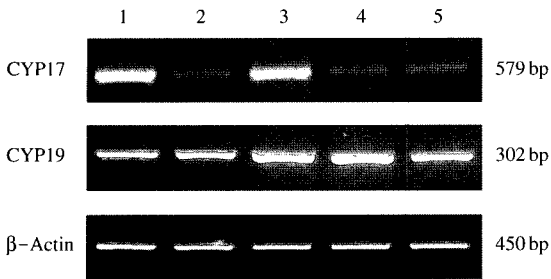


Fig. 5. Alterations in the gene expression in the ovaries of Sprague-Dawley rats treated with diethylstilbestrol (5 µg/kg) and nonylphenol (50, 100, and 200 mg/kg). The expression of CYP17, CYP19, and b-actin mRNAs was analyzed by RT-PCR. Lane 1, control; lane 2, diethylstilbestrol (5 µg/kg); lane 3, NP 50 mg/kg; lane 4, NP 100 mg/kg; lane 5, NP 200 mg/kg. Animals were dosed daily starting at 21 days of age and this was continued until necropsy on day 41.

2. 호르몬 농도

혈중 호르몬 함량을 RIA법을 이용하여 측정한 결과 DES (5 µg/kg/day) 투여 후 estradiol 함량은 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었으며, 혈중 T4 함량은 대조군과 유사하였다. NP투여에 의해서는 혈중 estradiol 및 T4 함량 변화에는 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 4).

3. CYP17 및 CYP19 발현

DES 및 NP투여 후 난소에서 CYP17 및 CYP19 발현에 미치는 영향을 규명하기 위해 RT-PCR법에 의해 mRNA 함량을 측정하였다. 이 결과 CYP19의 발현량은 DES 투여에 의해 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았으나 저용량의 NP 투여군 (50 및 100 mg/kg)에서는 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타내었다. 반면에 CYP17의 경우는 DES 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며, NP 100 및 200 mg/kg 투여군에서 유의하게 감소하였다 (Fig. 5).

고 찰

본 실험은 스테로이드 호르몬의 합성에 관여하는 CYP17 및 CYP19 유전자 발현에 미치는 내분비계장애물질의 영향을 평가하기 위하여 실시하였

다. 연구결과 21일령의 미성숙 랫드에 합성에스트로젠인 DES 투여에 의해서는 기대한바와 같이 난소 무게를 유의하게 감소시켰다. 또한 자궁비대반응시험 등에서 약한 에스트로겐 활성이 있는 것으로 알려진 NP 투여군에 의해서도 용량-의존적으로 난소 무게를 감소시키는 결과를 나타내었으며 이 결과는 기존의 연구에서와 일치하였다 (Kim *et al.*, 2002b). Piacsek and Streur (1975)는 에스트로겐 성 물질인 17β-estradiol (E2) 고용량을 미성숙 랫드에 투여한 결과 대조군에 비해 체중증가를 및 난소무게가 유의하게 감소하였다고 보고한 바 있다. 고용량에서의 효과와는 다르게 E2 저용량 (0.1 mg/kg) 투여에 의해서는 질개구일, 질개구시의 체중 및 난소와 자궁무게에 영향을 미치지 않았으나 자궁비대반응시험에서 저용량의 E2 (0.1 mg/kg/day)는 자궁무게를 대조군에 비해 3배 이상 증가시키는 효과를 나타내었다고 한다 (Odum *et al.*, 1997). 본 연구에서는 양성대조물질로서 DES를 투여하였다. 그 결과는 기존에 보고된바와 같이 E2에서 나타난 영향과 동일하였으나 자궁 무게는 DES 및 고용량 (200 mg/kg/day)의 NP 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 감소되었다. 현재 여러 종류의 외인성 에스트로겐 및 식물성 에스트로겐에 대한 에스트로겐 활성 검색시험법에서 자궁 및 난소 무게 변화를 측정하고 있으나 (Branham *et al.*, 1993) 이들 지표가 steroidogenesis에 어떠한 영향을 미치는지 평가하기는 매우 어렵다. 일반적으로 자궁의 발달 및 성장의 유도는 에스트로겐 투여 후 24시간 이내에 자궁관 및 상피세포의 과증식과 관련이 있다. 이 기간동안 상피세포는 6~8 세포층까지 증가할 수 있다고 한다 (Padykula *et al.*, 1981). 비록 자궁조직조건이 내인성 에스트로겐 작용을 배제하여 에스트로겐 활성을 특성화하기에 유용한 방법이나 부검시에 동물의 호르몬 변화를 고려하지 않는다면 이들 지표는 정확하지 않을 수도 있다. 따라서 혈중 호르몬 농도 변화와 steroidogenesis와의 상관성을 밝힐 필요가 있다. Spornitz *et al.* (1999)은 estrous cycle 기간동안 자궁 상피세포에서 병리학 적 변화에 대하여 상세하게 보고하였으며 이들 변화는 혈중 스테로이드 호르몬 변화와 상관성이 있다는 것을 보고하였다. 따라서 본 연구에서도 DES 및 NP를 투여한 후 혈중 에스트로겐 함량을 측정 한 결과 DES 및 고용량의 NP 투여에 의해 혈중

E2 함량이 감소하는 경향을 나타내었다. 본 연구 결과는 Myllymaki (2005) 등의 연구에서와 유사하였다. 이와 같이 에스트로겐 활성을 갖는 내분비계 장애물질에 의한 혈중 E2 함량 변화는 에스트로겐성 물질이 ER에 결합하여 유리 E2 함량이 증가되고 피드백 작용에 의해 성 호르몬의 합성에 영향을 미친다고 보고하였다. 그러나 일부 연구에서는 이들 물질 자체가 스테로이드 호르몬의 합성 및 대사에 관여하는 효소의 활성을 저해한다는 것이 보고되고 있다 (Majdic *et al.*, 1996; Laurenzana *et al.*, 2002). 내분비계 장애물질에 의한 CYP 효소 발현 변화는 또한 그 대사산물이 스테로이드 호르몬 합성에 영향을 미쳐 발달 뿐만 아니라 내분비계 교란 등을 유발할 가능성이 있다. You *et al.* (1999)은 *p,p*-DDE는 안드로겐 수용체 길항작용을 나타낼 뿐만 아니라 CYP 효소 조절제로서도 작용하여 내분비계를 교란시킨다고 보고하였다. 한편 Thoreux-Manlay *et al.* (1995)은 Sprague-Dawley 랫드에 낱을 노출시킬 때 Leydig 세포에서 steroidogenesis가 억제되며 이는 CYP17 발현 감소와 관련이 있다는 것을 보고하였다. 이는 낱에 노출시 스테로이드 호르몬 합성에 영향을 미침을 나타내며 CYP17 발현 감소와의 관련성이 있다는 것을 시사하는 것이다. 따라서 이와 같은 결과는 에스트로겐성 물질이 CYP17 발현에 직접적인 영향을 미칠 가능성이 있음을 시사한다. 또한 성 호르몬 생합성에 있어 CYP 효소 발현은 LH 및 FSH에 의하여 영향을 받는 것이 보고되어 있다. 인슐린은 CYP17 효소 활성을 유도하여 난소에서의 안드로겐 합성이 증가되며 LH agonist인 deslorelin을 투여한 후 CYP17의 mRNA 함량이 대조군에 비하여 3~6배 증가되었다고 한다 (Aspden, 1998). 또한 랫드의 난소 과립세포에서 FSH 투여에 의해 CYP19 및 CYP11A1의 활성도가 증가된다는 것이 보고되었다 (Dasmahapatra, 2000). 한편 Ikeda *et al.* (2001)의 연구 결과에 의하면, estradiol benzoate (EB)를 신생자 랫드에 투여한 후 steroidogenesis에 관여하는 steroidogenic factor-1 (SF-1) 및 steroidogenic acute regulatory factor (StAR) 발현을 관찰하였다. 그 결과 EB는 난소의 성장 및 분화를 유의하게 억제시켰으며 SF-1, StAR 및 P450scc의 발현을 유의하게 감소시켰다고 한다. 본 연구에서는 비록 난소에서의 steroidogenesis에 관여하는 모든 유전자의 발현을

조사하지는 않았으나 에스트로겐성 물질의 투여 후 CYP17 발현이 유의하게 감소되었으며 이 결과는 기존의 연구에서와 일치하였다 (Majdic *et al.*, 1996). 에스트로겐성 물질 투여에 의한 P450scc 및 StAR gene의 발현 감소는 시상하부-뇌하수체-난소 축에 의해 조절되는 피드백 작용기작에 의해 조절되는 이차적인 결과로 볼 수 있다. 그러나 고용량의 NP투여 후 CYP17 발현 감소가 생체내 에스트로겐 유사작용에 의한 간접적인 작용인지 또는 직접적인 작용인지에 대해서는 본 연구 결과로부터 명확하게 증명할 수 없었다. 향후 이에 대한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것으로 사려된다.

안드로겐으로부터 E2로의 전환에 관여하는 효소는 CYP19 (aromatase)이다. 지금까지 에스트로겐성 물질이 CYP19의 저해작용이 있는지에 대해서는 명확한 보고는 없다. 따라서 본 연구에서는 난소에서 CYP19의 발현에 미치는 내분비계 장애물질의 영향을 조사하였다. 그 결과 DES 및 NP투여 후 CYP19 발현에 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 이는 에스트로겐성 물질 투여에 의해 난소에서 aromatase 효소의 활성 및 유전자 발현에 유의한 차이를 나타내지 않는다는 것을 간접적으로 시사한다고 본다.

본 연구진은 DES 및 NP 등이 성 호르몬 생합성에 중요한 단계인 CYP17 및 CYP19 효소 발현에 대하여 어떠한 영향을 미치는지를 규명하고자 하였다. 그러나 시험물질 투여 종료 후 각각의 랫드에서 estrus cycle (proestrus, estrus, metestrus 및 diestrus)에 대한 정보를 알 수 없었으나 이들 물질들은 CYP17 발현을 유의하게 억제시킨다는 것을 알 수 있었다. 따라서 NP에 노출시 에스트로겐 유사작용에 의한 자궁내막증식 뿐만 아니라 스테로이드 호르몬의 합성을 교란시킬 가능성이 있다는 것을 시사한다고 할 수 있다. 또한 내분비계 장애물질에 의한 estrus cycle의 변화와 steroidogenesis 관련된 유전자 발현 변화와의 상관성을 규명할 필요가 있으며 이는 호르몬 유사물질과 같이 호르몬 수용체에 직접 영향을 미치지 않은 물질들의 교란 기전을 이해함에 중요한 자료를 제시해 줄 것이다.

결론

에스트로겐은 생식기관의 발달 및 기능 유지에

있어서 매우 중요한 역할을 한다. 특히, 성성숙 단계에서는 다량의 에스트로겐 함량이 요구되며 이와 같은 성 호르몬의 합성은 난소에서 여러 단계의 steroidogenesis에 관여하는 효소들의 작용에 의해 이루어진다. 따라서 성성숙 기간 동안 외부로부터 노출되는 에스트로겐성 물질은 난소의 steroidogenesis에 영향을 미칠 가능성이 제기되고 있다. 본 연구에서는 에스트로겐 활성이 알려진 NP를 성성숙 기간 동안 투여한 후 난소에서 에스트로겐 합성에 관여하는 효소인 CYP17 및 CYP19 발현 양상을 관찰하였다. 암컷 Sprague-Dawley rat에 NP (50, 100, 200 mg/kg/day)를 투여한 후 혈중 호르몬 (estradiol 및 T4) 함량을 분석하고 난소에서 CYP17 및 CYP19 mRNA의 발현 정도를 RT-PCR 방법을 이용하여 정량하였다. 본 연구결과 DES 및 고용량의 NP는 난소 및 자궁 위축을 유발하였으며, 이는 난소에서의 steroidogenesis를 억제하여 에스트로겐의 합성이 저해된다는 것을 알 수 있었다. 본 연구결과 DES 및 NP 투여에 의해 세포내 스테로이드 호르몬 생합성 과정에서 피드백 기작에 의해 이차적으로 난소에서의 CYP17의 발현 감소와 밀접한 상관성이 있음을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 부산대학교 약학대학 신약 개발연구소의 연구지원비 및 식품의약품안전청 국립독성연구원 내분비계 장애물질 평가사업의 연구비로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Aspden WJ, Rodgers RJ, Stocco DM, Scott PT, Wreford NG, Trigg TE, Walsh J and D'Occhino MJ. Changes in testicular steroidogenic acute regulatory (stat) protein, steroidogenic enzymes and testicular morphology associated with increased testosterone secretion in bulls receiving the luteinizing hormone releasing hormone agonist deslorelin. *Domest Anim Endocrinol* 1998; 15: 227-238.
- Branham WS, Zehr DR and Sheehan DM. Differential sensitivity of rat uterine growth and epithelium hyper trophy to estrogens and antiestrogens. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 203: 297-303.
- Cook JC, Kaplan AM, Davis LG and O'connor JC. Development of a Tier I Screening Battery for Detecting Endocrine-Active Compounds (EACs). *Regul Toxicol Pharmacol* 1997; 26: 60-68.
- Dasmahapatra AK, Wimpee BAB, Trewin AL, Wimpee CF, Ghorai JK and Hutz RJ. Demonstration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin attenuation of P450 steroidogenic enzyme mRNAs in rat granulosa cell in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 164: 5-18.
- EDSTAC. Endocrine Disruptor Screening and Testing Adversory Committee (EDSTAC) Final Report, August 1998.
- Goldman JM, Laws SC, Balchak SK, Cooper RL and Kavlock RJ. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Crit Rev Toxicol* 2000; 30: 135-196.
- Hankinson SE, Willett WC, Manson JE, Colditz GA, Hunter DJ, Spiegelman D, Barbieri RL and Speizer FE. Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1292-1299.
- Hurd C, Khattree N, Dinda S, Alban P and Moudgil VK. Regulation of tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma, by estrogen and antiestrogens in breast cancer cells. *Oncogene* 1997; 15: 991-995.
- Ikeda Y, Nagai A, Ikeda MA and Hayashi S. Neonatal estrogen exposure inhibits steroidogenesis in the developing rat ovary. *Dev Dyn* 2001; 221: 443-453.
- Kavlock RJ. Overview of endocrine disruptor research activity in the United States. *Chemosphere* 1999; 39: 1227-1236.
- Kim HS, Shin JH, Moon HJ, Kim TS, Kang IH, Seok JH, Kim IY, Park KL and Han SY. Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague-Dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone, and flutamide. *Toxicol Sci* 2002a; 67: 52-62.
- Kim HS, Shin JH, Moon HJ, Kang IH, Kim TS, Kim IY, Seok JH, Pyo MY and Han SY. Comparative estrogenic effects of p-nonylphenol by 3-day uterotrophic assay and female pubertal onset assay. *Reprod Toxicol* 2002b; 16: 259-268.
- Kristensen VN, Kure EH, Erikstein B, Harada N and Borresen-Dale A. Genetic susceptibility and environmental estrogen-like compounds. *Mutat Res* 2001; 482: 77-82.

- Laurenzana EM, Balasubramanian G, Weis C, Blaydes B, Newbold RR and Delclos KB. Effect of nonylphenol on serum testosterone levels and testicular steroidogenic enzyme activity in neonatal, pubertal, and adult rats. *Chem Biol Interact* 2002; 139: 23-41.
- Majdic G, Sharpe RM, O'Shaughnessy PJ and Saunders PT. Expression of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase in the fetal rat testis is reduced by maternal exposure to exogenous estrogens. *Endocrinology* 1996; 137: 1063-1070.
- Myllymaki S, Haavisto T, Vainio M, Toppari J and Paranko J. In vitro effects of diethylstilbestrol, genistein, 4-*tert*-butylphenol, and 4-*tert*-octylphenol on steroidogenic activity of isolated immature rat ovarian follicles. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204: 69-80.
- Nagai A, Ikeda Y, Aso T, Eto K and Ikeda MA. Exposure of neonatal rats to diethylstilbestrol affects the expression of genes involved in ovarian differentiation. *J Med Dent Sci* 2003; 50: 35-40.
- Naylor CG, Mierure JP, Weeks JA, Castaldi FJ and Romano RR. Alkylphenol ethoxylates in the environment. *J Am Oil Chemists Soc* 1992; 69: 695-703.
- Nimrod AC and Benson WH. Estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Crit Rev Toxicol* 1996; 26: 335-364.
- O'Connor JC, Frame SR, Biegel LB, Cook JC and Davis LG. Sensitivity of a Tier I screening battery compared to an in utero exposure for detecting the estrogen receptor agonist 17 beta-estradiol. *Toxicol Sci* 1998; 44: 169-184.
- Odum J, Lefevre PA, Tittensor S, Paton D, Routledge EJ, Beresford NA, Sumpter JP and Ashby J. The rodent uterotrophic assay: critical protocol features studies with nonylphenol, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997; 25: 176-188.
- Odum J, Tinwell H, Van Miller J, Joiner R and Ashby J. The uterotrophic activity of nonylphenol in the rat is not mediated by aromatase enzyme induction. *Toxicol Lett* 2001; 118: 165-169.
- Padykula HA, Fitzgerald M, Clark JH and Hardin JW. Nuclear bodies as structural indicators of estrogenic stimulation in uterine epithelial cells. *Anat Res* 1981; 201: 679-696.
- Piacsek BE and Streur WJ. Effect of exposure to continuous light on estrogen-induced precocious sexual maturation in female rats. *Neuro-endocrinology* 1975; 18: 86-91.
- Safe SH. Endocrine disruptors and human health-is there a problem? An update. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 487-493.
- Spornitz UM, Socin CD and Dravid AA. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *Anat Res* 1999; 254: 116-126.
- Thoreux-Manlay A, Le Goascogne C, Segretain D, Jegou B and Pinon-Lataillade, G. Lead affects steroidogenesis in rat Leydig cells in vivo and in vitro. *Toxicology* 1995; 103: 53-62.
- You L, Chan SK, Bruce JM, Archibeque-Engle S, Casanova M, Corton JC and Heck H. Modulation of testosterone-metabolizing hepatic cytochrome P-450 enzymes in developing Sprague-Dawley rats following in utero exposure to p, p'-DDE. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 158: 197-205.