

스테로이드 합성을 교란하는 내분비계장애물질 검색을 위한 라이디히 세포 분리 및 배양조건 확립

강일현¹ · 강태석¹ · 강호일¹ · 문현주¹ · 김태성¹ · 기호연¹ · 류혜원¹ · 신재호¹
동미숙² · 한순영¹ · 김승희¹ · 홍진환^{1*}

¹식약청 국립독성연구원 독성연구부 내분비장애물질팀

²고려대학교 생명공학부

Establishment of Purification and Incubation Conditions of Leydig Cells for Screen Endocrine Disruptors Altering Steroidogenesis

Il Hyun Kang¹, Tae Seok Kang¹, Ho Il Kang¹, Hyun Ju Moon¹, Tae Sung Kim¹, Ho Hyun Ki¹,
Hye Won Ryu¹, Mi Sook Dong², Soon Young Han¹, Seung Hee Kim¹, and Jin Hwan Hong^{1*}

¹Endocrine Toxicology Team, Department of Toxicological Research, NITR, KFDA, Seoul 122-704, Korea

²School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, 1, 5-Ka, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea

(Received May 20, 2006 / Accepted June 30, 2006)

ABSTRACT : Normally, environmental toxicants are classified as endocrine disruptors if they interfere with regulation of cellular function by endogenous steroids through inhibition of receptor binding and/or transcriptional activation. So, many studies have been performed about agonist/antagonist of hormone receptor to study mechanisms of endocrine disruptors. If toxicants affect steroid biosynthesis and/or degradation and alter hormone homeostasis, these also are classified as endocrine disruptors. But there are not many studies of the mechanisms of endocrine disruptors on the basis of alteration of steroid biosynthesis and/or degradation. Isolation and culture of Leydig cells from testis is one of methods for the steroidogenesis screening assays to evaluate a substance for altering steroidogenesis. Leydig cells were harvested using the method described by Klinefelter with modifications. Leydig cells were purified by perfusion of testis and incubation (34°C, 80cycles/minute, 20 minutes) with collagenase (0.25 mg/kg), centrifugal elutriation, percoll gradient centrifugation and BSA multi-density gradient centrifugation. To confirm if this method is one of appropriate tools to evaluate a substance for altering steroidogenesis, ketoconazole, positive control was administered to purified Leydig cells. Ketoconazole (10⁻⁸M and above) significantly reduced testosterone production in purified Leydig cells. From above results, we suggest that this method for steroidogenesis screening assay appears to be a appropriate tool to detect suspected compounds for altering steroidogenesis.

Key words : Endocrine disruptor, Leydig cell, steroidogenesis, screening method, ketoconazole

서 론

내분비계장애물질은 자연상태에서 잘 분해되지 않고 저농도로 장기간에 걸쳐서 생체에 노출되어 정상호르몬처럼 작용하여 생체내 항상성 유지, 성장, 발육 및 생식기관의 발달 등을 조절할 뿐 아니라 정상호르몬의 생합성 및 대사과정에도 작용하는 것으로 보고되었다 (Kavlock, R.J. *et al.*, 1996).

지금까지의 내분비계장애작용 기전 연구는 대부분 호르몬 수용체에 대한 아고니스트와 안타고니스트의 작용을 중심

으로 수행되었다. 그러나 미국 환경보호청 (Environmental protection agency, EPA)의 Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC)에서는 내분비계장애물질에 의해 estrogen, testosterone, triiodothyronine의 생화학적 합성과 대사 그리고 이들의 항상성의 교란을 중요한 작용기전의 하나로 보고 있다 (EDTA, 1996).

수컷의 정상적인 생식주기에 내분비계 장애물질이 작용하면 다양한 생리적인 변화를 일으켜 정자형성과정의 억제 등의 생식계 이상을 초래하게 되는 데 이런 현상은 생체내 호르몬의 항상성 변화에 의한 것이다. 그 원인 중 하나로 steroidogenesis (스테로이드 합성)에서의 이상을 고려할 수 있다. Steroidogenesis란 활성이 낮은 콜레스테롤이 보다 활

*To whom correspondence should be addressed

성이 높은 스테로이드 호르몬으로 전환되는 과정으로 테스토스테론과 에스트라디올 등의 호르몬이 합성되는 과정이다. Steroidogenesis는 주로 부신피질, 생식선, 태반에서 일어나며, 여러 가지 효소가 복합적으로 관여한다. 포유동물의 테스토스테론은 스테로이드 합성 과정을 거쳐서 고환에서 95%가, 부신에서 5%가 만들어진다.

고환에서의 스테로이드 합성은 라이디히 세포에서 이루어지는데, LH의 자극에 의해 cholesterol에서 성호르몬이 생성되어 표적기관에 작용하게 되며 이때 필요한 cholesterol은 Steroidogenic Acute Regulatory (StAR)에 의해 미토콘드리아의 세포질외막에서 세포질 내막으로 이동하게 된다. 이동한 cholesterol은 여러 가지 스테로이드 합성 효소에 의해 testosterone이 만들어지며 이것은 혈액을 타고 여러장기로 가서 여러 형태의 유도체로 전환되어 작용한다.

따라서 내분비계장애물질이 steroidogenesis에 관여하는 효소의 활성 및 발현에 영향을 주게 되면 합성되는 호르몬 양의 변화로 인한 표적 생식장기의 발달 장애 및 기능 장애 등을 유발할 수 있다.

현재 미국 환경보호청 (EPA)과 OECD (국제경제협력개발기구)에서 고환조직을 이용한 스테로이드 합성에 미치는 영향에 대한 검색시험법이 연구되어 지고 있지만 이 시험법에서는 고환조직을 구성하는 다양한 세포 (Leydig cell, sertoli cell, 정자, 적혈구, 마크로 파지 등)의 영향이 상존하고 있어 시험물질이 스테로이드 합성 세포에서 스테로이드 합성 및 대사에 미치는 영향을 직접적으로 관찰하기가 어려우며, 특히 배양시 교반하여 배양해야 하는 어려움이 있어서 기존의 안정적인 세포주의 배양시스템을 적용하기 힘든 문제점을 안고 있다. 따라서 본 연구에서는 고환조직에서 스테로이드 합성이 이루어지는 라이디히 세포 (Leydig cell)만을 순수분리 내분비계장애물질이 스테로이드 합성에 미치는 영향을 명확히 관찰하고 배양시에도 기존의 세포주 배양 시스템을 적용하여 더욱 용이하게 관찰할 수 있는 시험법을 확립하여 기존의 에스트로겐, 안드로겐 수용체를 이용한 시험법, 고환조직을 이용한 스테로이드 합성에 미치는 영향에 대한 검색시험법 및 동물을 이용한 시험법을 보완하고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험 동물

(주)샘타코 (대전, 대한민국)에서 생산된 4주령, 7주령의 Sprague-Dawley 계열의 수컷 흰쥐를 분양 받아 사용하였으며, 사육은 온도 $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ 및 12시간 주기로 명암이 자동 조절되는 미국 실험동물관리 인증협회 (Association for Assessment and Accreditation of Labora-

tory Animal Care; AAALAC)가 인증한, 식품의약품안전청 국립독성연구원 청정사육시설 내에서 1주일간 순화하였다. 모든 시험동물의 체중은 평균체중 $\pm 10\%$ 의 동물만을 선별하여 사용하였으며, 한 군당 10마리씩 총 50마리를 사용하였다.

라이디히 세포 분리 및 testosterone production assay

성숙한 랫드 (90일령)을 에테르 (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 마취시킨 후 고환을 분리하여 라이디히 세포를 분리하여 testosterone 생산능력을 관찰하였다. 라이디히 세포 분리는 Klinefelter 등의 방법으로 수행하였다 (Klinefelter *et al.*, 1993). 간략히 요약하면, 랫드에서 정소를 분리한 후 1 mg/ml collagenase를 함유한 dissociation buffer를 사용하여 정소의 동맥을 관류하여 혈액을 제거하였다. 정소 피막을 제거한 후 0.25 mg/ml collagenase를 함유한 dissociation buffer를 첨가하여 진탕 수조 (HANBAEK Scientific Co., HB-205SWL)에서 34°C , 80 cycles/min로 배양후 separation buffer로 seminiferous tubules를 분리한 후 원심분리 (800 × g, 20분)하여 pellet (Leydig cell, sperm, 적혈구 등)을 얻었으며, 이것은 55% pH 7.4 SIP (stock isotonic Percoll)를 사용하여 percoll (Sigma, St. Louis, MO, USA) 밀도구배 원심분리법을 수행하고, Bovine serum albumin (BSA) 다구배 원심분리법 (1%, 2.5%, 5%, 10% BSA) 수행하였다. 10% 층에서 Leydig cell만을 수확하였다. 분리한 Leydig cell은 0.4mM etiocholan-3 β -ol-17-one을 기질로 사용하여 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD)의 조직화학적 염색을 통해 순도를 측정하였다. Testosterone 합성능력을 보기 위해 Leydig cell을 1×10^5 세포의 농도로 34°C , 3시간 배양하여 원심분리후 상등액을 모아 테스토스테론 농도를 측정하였다.

라이디히 세포 (Leydig cell) 배양 및 내분비계장애물질 검색

분리된 Leydig cell (1×10^5 cells/well)을 LCM (Leydig cell medium) 배지 (lypoprotein(0.5 mg/ml), LH(1IU/ml) 포함)를 사용하여 60 mm dish에 분주하여 34°C , 5% CO₂, 95% 공기에서 9시간 배양 후 약물을 처리한 후 새배지로 교환한 후 다시 12시간을 배양한 후 배지 상등액을 모아 호르몬 측정을 위해 -20°C 에서 보관하였다.

분리한 라이디히 세포가 내분비계장애물질 검색을 위해 유용한 지를 측정하기 위해 양성대조물질로 케토코나졸 (Ketoconazole)을 사용하였다. Ketoconazole (Sigma, St. Louis, MO, USA)은 10^{-12}M , 10^{-8}M , 10^{-4}M , 10^{-3}M 의 농도로 DMSO에 녹여 사용하였으며, DMSO 최종농도는 0.1%를 넘지 않도록 시험하였다. 시험물질에 의한 라이디히 세포의 스테로

이드 합성능력을 관찰하기 위하여 testosterone production assay를 실시하였다. 시험물질 처리가 끝난 세포를 다시 수확하여 1×10^5 cells/ml로 조정된 후 1.5 ml 원심분리 tube에 LH(1IU)와 함께 넣은 후 3시간 다시 배양한 후 testosterone 생성량을 측정하였다.

호르몬 측정

랫드 고환에서 라이디히 세포를 분리배양 후 테스토스테론 합성능력을 평가할 때에는 호르몬 측정을 radioimmuno assay kit (DPC)를 이용하였다. Total testosterone Ab-coated tube에 혈청 50 μ l와 1 ml 125 I total testosterone을 넣어 혼합한 후 37°C, 3시간 동안 항온수조에서 반응하였다. 이후 aspirator를 이용하여 tube에 남은 용액을 제거한 후 gamma counter (PACKARD Co., COBRA II)로 혈청내의 total 테스토스테론 농도를 측정하였다.

통계학적 분석

얻어진 모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, MS-Excel (Ver. Office 2000)을 이용하여 one way analysis of variance (ANOVA) 검정을 실시하여 유의성이 인정된 경우, Dunnett's test로 대조군과 각 투여 군간 다중비교를 실시하였다. $P < 0.05$ 수준 이하에서 유의성을 검정하였다.

연구결과

Collagenase 처리시간이 테스토스테론 합성에 미치는 영향

성숙한 Sprague-Dawley 랫드 (90일령)에서 고환을 분리하여 Leydig cell를 klinefelter 방법을 변형하여 분리하였다. Collagenase 처리시간에 따라 세포수는 증가하였으나 (Data

not shown) 라이디히 세포의 호르몬 합성능력은 감소하는 것으로 나타났다. Collagenase 처리 시간을 20분과 30분으로 다르게 한 후 분리한 라이디히 세포의 배양액에서 테스토스테론을 측정된 결과, 30분 처리한 경우 20분 처리한 것에 비해 유의하게 감소하였다 (Fig. 1). 또한, 테스토스테론 합성능력을 평가한 결과에서도 20분, 30분 처리한 것은 5분 처리한 것에 비해 라이디히 세포의 테스토스테론 합성능력이 유의적으로 감소하였다 (Fig. 2).

LH 처리농도가 테스토스테론 합성에 미치는 영향

라이디히 세포는 LH의 촉진에 의해 스테로이드 합성이 개시된다. 따라서 분리한 라이디히 세포의 최적의 테스토스테론 합성 조건을 확립하기 위해 LH를 농도별로 처리한 결과, 1IU에서 최고의 테스토스테론 합성을 보였으며, 그 이상에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3).

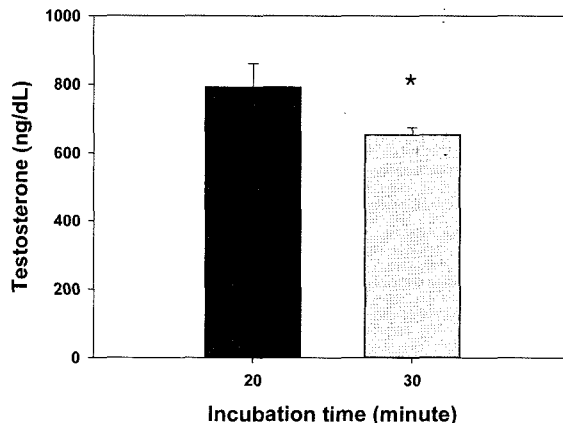


Fig. 1. Effects of collagenase on testosterone levels in culture medium of purified Leydig cells. *: Significantly different from control by Dunnett's Test ($P < 0.05$).

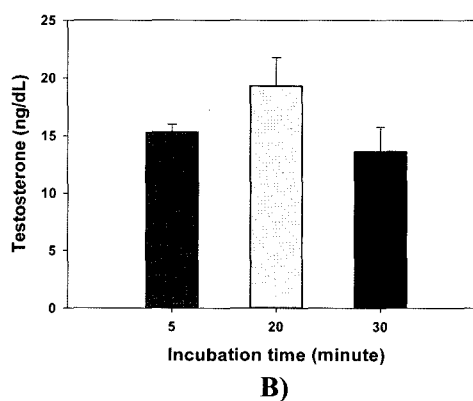
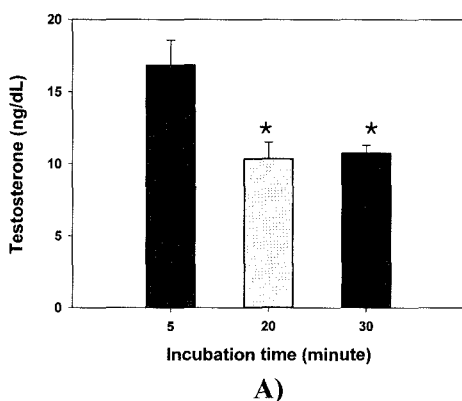


Fig. 2. Effects of collagenase on testosterone production in purified Leydig cells (A, without LH, B, with LH). *: Significantly different from control by Dunnett's Test ($P < 0.05$).

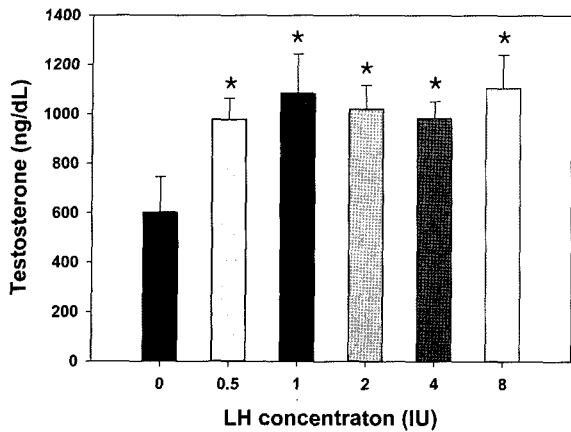


Fig. 3. Dose-related effects of LH on the production of testosterone by purified Leydig cells. *: Significantly different from control by Dunnett's Test ($P < 0.05$).

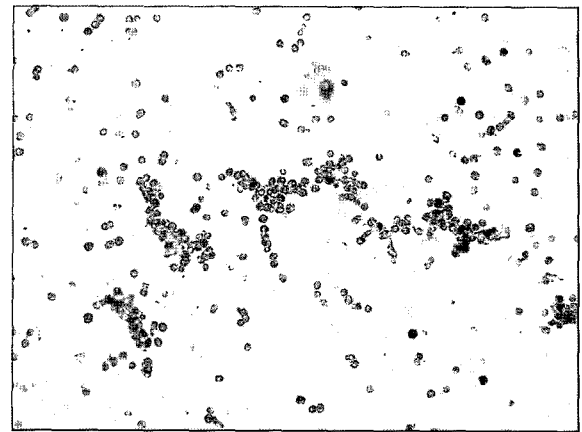
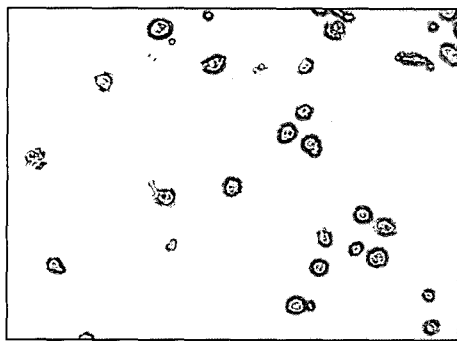
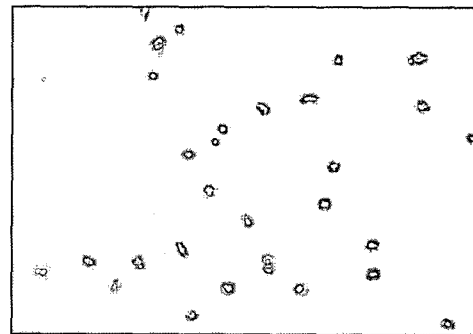


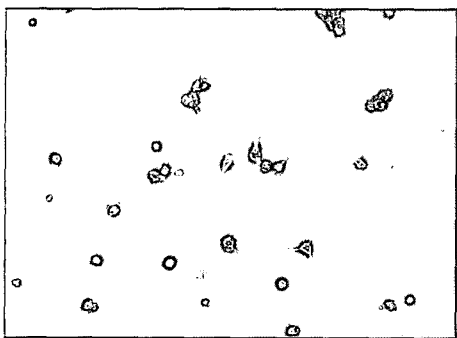
Fig. 4. Light micrograph of Leydig cell-enriched fraction during BSA multigradient centrifugation ($\times 20$).



A)



B)



C)



D)

Fig. 5. Morphology of purified Leydig cells in various incubation time. ($\times 40$) (A, 3 hr, B, 6 hr, C, 9 hr, D, 12 hr).

분리한 라이디히 세포의 3β -HSD 염색

고환에서 여러단계의 효소처리 및 percoll 밀도구배 원심분리를 거쳐 최종 BSA 다구배 원심분리하여 얻은 라이디히 세포를 3β -HSD 염색을 실시한 결과 그림에서와 같이 90% 이상의 라이디히 세포만을 얻었다 (Fig. 4).

라이디히 세포의 배양시간에 따른 형태 변화

분리된 Leydig cells (1×10^5 cells/well)를 LCM (Leydig cells culture medium) 배지 (lipoprotein (0.5 mg/ml))에서 배양하였다. 시간에 따른 배양상태를 검토한 결과, 3시간 이후부터 monolayer 형태로 성장하였으며 시간이 지나갈수록

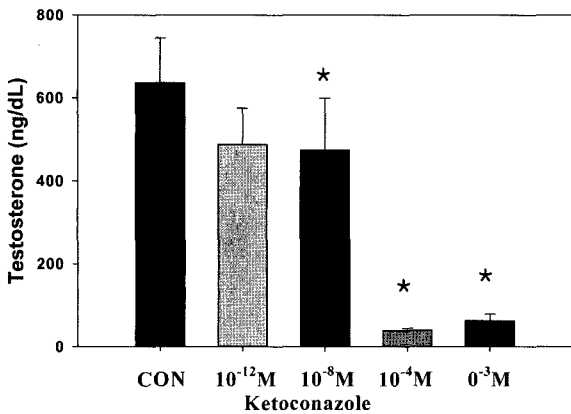


Fig. 6. Effects of ketoconazole on testosterone levels in culture medium of purified Leydig cells. *: Significantly different from control by Dunnett's Test ($P < 0.05$).

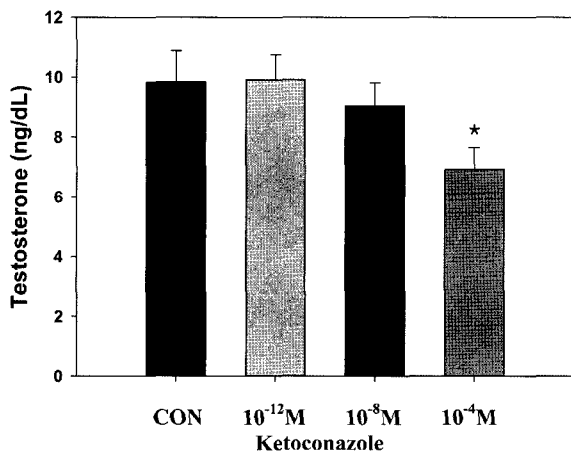


Fig. 7. Effects of ketoconazole on testosterone production in purified Leydig cells. *: Significantly different from control by Dunnett's Test ($P < 0.05$).

뻗는 정도와 세포수가 증가하였다 (Fig. 5).

케토코나졸이 라이디히 세포의 테스토스테론 합성능력에 미치는 영향

성숙한 90일령 랫드의 고환에서 분리한 라이디히 세포를 이용하여 내분비계장애물질의 스테로이드 호르몬 합성능력을 저해하는 정도를 평가할 수 있는지를 알아보기로 스테로이드 합성을 저해하는 것으로 알려져 있는 케토코나졸을 양성대조물질로 사용하여 평가하였다. 케토코나졸을 라이디히 세포에 처리하여 배양한 후 배양액에서 테스토스테론 양을 측정된 결과, 10⁻⁸M 이상부터 용량의존적으로 유의하게 감소되었다 (Fig. 6). 이것은 테스토스테론 합성능력 시험에서도 비슷한 결과를 보였다. 케토코나졸로 처리한 라이디히

세포를 배양한 후 다시 수확하여 테스토스테론 합성능력 시험을 한 결과, 10⁻⁸M에서부터 감소하였지만 유의성은 10⁻⁴M에서만 나타났다 (Fig. 7).

고 찰

내분비계장애물질 검색을 위한 시험법은 현재 국제경제협력개발기구 (OECD)를 중심으로 국제협력연구를 통해 수행되고 있다. 대부분의 연구가 호르몬 수용체에 대한 아고티스트와 안타고니스트 작용을 중심으로 이루어지고 있다. 따라서 현재 에스트로겐 및 항에스트로겐 활성을 검색하는 자궁비대반응시험 (Uterotrophic assay)와 안드로겐 및 항안드로겐 활성을 검색하는 성선비대반응시험 (Hershberger assay)에 관한 연구가 진행되고 있다. 따라서 스테로이드 합성 및 저해를 교란함으로써 나타나는 호르몬의 항상성 파괴에 영향을 주는 내분비계장애물질을 검색하는 시험법에 관한 연구는 많이 부족한 상황이다. 따라서 본 연구에서는 스테로이드 합성을 저해함으로써 호르몬의 항상성을 파괴하는 내분비계장애물질 검색을 위한 라이디히 세포의 분리 및 배양조건을 확립하고자 하였다.

라이디히 세포는 테스토스테론 합성이 이루어지는 세포로서 고환에서 서틀리 세포 (sertoli cell), 점 세포 (germ cell), 정세관 (seminiferous tubules) 등 다른 여러 가지 세포와 함께 존재한다. 따라서 여러 가지 과정이 필요하다. 우리는 Klinefelter 등의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. Collagenase (0.25 mg/ml) 처리시간에 따라 테스토스테론 합성능력과 라이디히 세포 수확율을 관찰한 결과 처리시간이 길면 길수록 라이디히 세포수는 증가하였지만 (Data not shown) 테스토스테론 합성능력은 떨어졌다. Collagenase 처리시간을 30분으로 하는 것 보다는 20분, 20분 보다는 5분 할 때 테스토스테론 합성능력이 좋았다. 그러나 5분 처리의 경우 라이디히 세포 수확율이 너무 낮아 다음 실험을 진행하기가 어려웠다. 따라서 Klinefelter 등은 collagenase (0.25 mg/ml)를 34°C, 9cycles/min, 10분 처리하여 라이디히 세포를 분리하였지만 (Klinefelter *et al.*, 1987) 우리의 경우 세포 수확율과 테스토스테론 합성능력을 고려해 볼때 collagenase (0.25 mg/ml)를 34°C, 80cycles/min, 20분 처리하는 것이 가장 적절한 것으로 사료되었다.

라이디히 세포의 테스토스테론 합성능력은 여러 가지 요인에 의해 영향을 받는다. 정세관의 배양액 (seminiferous tubule culture media) (Papadopoulos *et al.*, 1986)은 서틀리 세포 (Carreau *et al.* 1988)와 점 세포 (germ cell) (Boujrad *et al.*, 1995)와 함께 라이디히 세포의 테스토스테론 합성능력을 조절한다. 또한, luteinizing hormone (LH)도 라이디히 세포의

테스토스테론 합성능력에 크게 영향을 준다 (Saez, 1994). 따라서 LH의 농도에 따른 라이디히 세포의 테스토스테론 합성능력을 관찰하였다. LH는 0.5IU 이상부터 유의적으로 라이디히 세포의 테스토스테론 합성을 증가시켰으며 1IU에서 가장 높은 합성능력을 보이다가 그 이상부터는 점점 감소하는 경향을 보였다. 이것은 Bilinska 등이 Percoll을 사용하여 분리한 라이디히 세포에서 hCG 1IU가 테스토스테론 합성능력이 가장 높게 나타났다는 보고와 일치하였다 (Bilinska *et al.*, 1997). 따라서 라이디히 세포 분리를 위해 collagenase (0.25 mg/ml)는 34°C, 80cycles/min, 20분 배양하고 LH 농도는 1IU로 하며, 스테로이드 합성을 교란하는 내분비계장애물질 검색을 위해 라이디히 세포를 9시간 배양한 후 시험물질 처리하여 다음 실험을 진행하였다.

분리배양한 라이디히 세포를 내분비계장애물질 검색에 활용할 수 있는지를 확인하기 위해 imidazole계 살균제이며, 스테로이드 합성을 저해하여 전립선 암 등의 치료제로 연구되어 온 케토코나졸을 시험물질로 사용하여 검증하였다. 케토코나졸은 분리한 라이디히 세포에서 10^{-8} M 이상부터 유의적인 테스토스테론 합성을 감소시켰다. 또한 테스토스테론 합성 능력 시험 (testosterone production assay)에서도 10^{-8} M 이상부터 테스토스테론 합성능력이 감소하는 경향을 보였으며, 유의적인 감소는 10^{-4} M에서 나타났다. 이것은 강태석 등이 고환조직을 이용하여 케토코나졸의 스테로이드 합성능력을 평가한 결과, 10^{-7} M 이상부터 테스토스테론 합성이 유의적으로 저해되었다는 보고와 일치하였다 (강태석 등, 1999). 한편 마우스 라이디히 암세포주인 MA-10 세포에서 케토코나졸은 2×10^{-6} M 이상에서 스테로이드 호르몬 (프로게스테론)의 합성을 저해하였다 (Chang *et al.*, 2002).

이상의 결과로부터 내분비계장애물질 검색을 위한 라이디히 세포 분리 및 배양법을 확립하였으며, 이 방법은 내분비계장애물질 검색에 유용한 방법임을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 내분비계장애물질 평가사업 (05141 내분비 499)으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, D., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G. and Luster, M. (1996). Research need for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors : a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104[Suppl. 4] : 715-740.
- EDSTAC Final Report. (1998). Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee Final Report. U.S. Environmental Protection Agency. Internet access at URL : <http://www.epa.gov/oscpmont/history/finalrpt.htm>.
- Klinefelter, G.R., Kelce, W.R. and Hardy, M.P. (1993). Isolation and culture of Leydig cells from adult rats, *Methods Toxicol.* 3A, 166-181.
- 강태석, 장인석, 황진희, 채감용, 김용규, 신동환, 황대연, 김철규, 이도영, 윤영원, 조정식 (1999). 내분비계장애물질 검색 및 시험법 확립 VI. 내분비계장애물질 연구보고서 1(1), 245-262.
- Klinefelter, G.R., Hall, P.F. and Ewing, L.L. (1987). Effect of luteinizing hormone deprivation in situ on steroidogenesis of rat Leydig cells purified by a multistep procedure. *Biol Reprod.*, 36(3), 769-83.
- Bilinska, B., Genissel, C. and Carreau, S. (1997). Paracrine effect of seminiferous tubule factors on rat Leydig cell testosterone production: role of cytoskeleton. *Biol Cell.*, 89(7), 435-42.
- Carreau, S., Papadopoulos, V. and Drosdowsky, M.A. (1988). Stimulation of adult rat Leydig cell aromatase activity by a Sertoli cell factor. *Endocrinology*, 122(3), 1103-9.
- Papadopoulos, V., Carreau, S. and Drosdowsky, M.A. (1986). Effects of seminiferous tubule secreted factor(s) on Leydig cell cyclic AMP production in mature rat. *FEBS Lett.*, 202(1), 74-8.
- Boujrad, N., Hochereau-de Reviers, M.T. and Carreau, S. (1995). Evidence for germ cell control of Sertoli cell function in three models of germ cell depletion in adult rat. *Biol Reprod.*, 53(6), 1345-52.
- Carreau, S., Papadopoulos, V. and Drosdowsky, M.A. (1988). Stimulation of adult rat Leydig cell aromatase activity by a Sertoli cell factor. *Endocrinology*, 122(3), 1103-9.
- Saez, J.M. (1994). Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev.*, 15(5), 574-626.
- Chang, C.L. and Fung, H.P. (2002). Effects of ketoconazole on progesterone and cAMP production in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Biol Pharm Bull.*, 25(6), 794-7.

NOTES FOR CONTRIBUTORS

Editorial Policy

Papers will be considered for publication on the condition that they are submitted solely to *Environmental Mutagens and Carcinogens*. Each manuscript will be read by one of Associate Editors before being sent to referees. At the time of submission, the corresponding author must include a statement indicating that the final manuscript has been read by all co-authors and received full consent from all authors to submit the manuscript to *Environmental Mutagens and Carcinogens*. There will be no formal limit on the number of pages. Authors whose manuscripts have been accepted for publication in *Environmental Mutagens and Carcinogens* will be asked to transfer copyright to the Korean Environmental Mutagen Society (KEMS).

Submission of Manuscripts

Original articles, review articles, editorials, invited commentaries on previously published article, short communications and scientific correspondence will be included in *Environmental Mutagens and Carcinogens*. The manuscript written in Korean or English by Hangul Word Processor or Microsoft Word should be sent to **Editorial Office**, electronically using the Online System available at <http://toxmut.or.kr>. Revised manuscripts returned to the Editor-in-Chief after weeks will be considered as newly submitted manuscripts. Manuscripts which do not fully comply with the style of *Environmental Mutagens and Carcinogens* will be returned to the authors without review by referees. Rejected manuscripts will not be returned to the authors unless a specific request is made.

Organization of Manuscript

Manuscripts should be divided into the following sections and in the order of: (a) Title page, (b) Abstract, (c) Key words and short Running Title with less than 50 characters and the List of Abbreviations, (d) Introduction, (e) Materials and Methods, (f) Results, (g) Discussion, (h) Acknowledgments, (i) References, (j) Tables with legends, (k) Figures and (l) Legends for figures (more than one legend may be on the same page). Each section should begin on a separate page and all pages should be numbered consecutively starting with the Title page. In some cases, presentation may be more effective if the Results and Discussion sections are combined, particularly for short papers. Papers should be written concisely in Korean or English. Manuscripts should be typed on A4 paper, double spaced with ample margins on the top, bottom, left and right sides.

(a) Title page

The title page includes an informative title with no abbreviations, the names of all authors and their affiliations without their degrees and appointments, the name and complete mailing address of the corresponding author.

(b) Abstract

The abstract should contain no more than 350 words and should include the purpose of the study, experimental procedures, obtained findings and the principal conclusion.

(c) Key words, Running title and List of abbreviations.

Three to six key words are required for indexing and information retrievals. Also, a short running title with no more than 50 characters is needed. Further, the list of abbreviations is needed on this page.

(d) Text

Text should comprise Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Acknowledgments. The Introduction should contain a clear statement of the reason why the work was done, but without extensive review on the subject, findings or conclusions. The Materials and Methods should be described in sufficient detail with precise referencing to permit other laboratories to repeat the work. Where human volunteers or materials are used, a statement regarding the acquisition of ethical approval must be given. Results should contain the findings presented in a logical sequence appearing in the text, tables and figures. Do not repeat the data given in tables and illustrations in the text. Discussion should not repeat the results but should contain the discussions leading to support the conclusions drawn from the data presented.

(e) References

References must include all relevant but recently published works and accepted (in press) papers. In the text, all listed references should be cited by the name of authors and the year of publication. For more than two authors, use et al.. The list of references should be arranged in alphabetical order with each reference given as follows. The name of the journal should be abbreviated according to Index Medicus: examples are given below;

Journal:

Chang, L-M., Ryu, J.C. and Park, Y.C. (1988) Effect of T-2 toxin on lipid peroxidation in rats. *Tox. Lett.*, 40, 275-280.

Book:

Tyler, V.E., Brady, I.R. and Robbers, J.E. (1993) *Modern Pharmacognocny* (2nd edition), Blackwell Press, New York, pp 000-000.

Chapters in Books:

Chang, I-M., Park, C.-W. and Kim, S.K. (1987) Toxicity of traditional Drugs. in *Procedures Involving Risk Assessment of Toxic Chemicals* (Chang, I-M and Park, C.-W. eds.). Publishing Co., City, pp. 000-000.

(f) Tables

Tables should be typed in English and on separate pages and numbered consecutively in the order cited in the text. Each table should have a concise descriptive title. Legend can be given below the table or on a separate page along with legends for other tables as Legends for Tables.

(g) Illustrations and Figures

A set of original figures must accompany the manuscript. Both black and white photographs and laser-printed line drawings must be camera ready and of high contrast. Labelling should be of sufficient size to be legible after reduction (usually 2/3 or half reduction is practiced) to fit the page. All illustrations should be numbered on the back-side with soft pencil and also include the name of first author and an arrow to designate the top-side. Also, mark clearly in the margin of the text where the figure and table should be inserted. Color prints are charged to the author.

(h) Nomenclature and abbreviations

The standard international units should always be used. Genetic notations and symbols for human genes should conform to those approved by Human Gene Mapping (HGM); see *Cytogenet Cell Genet* 1987: 46, 11-28; *ibid.* 1988: 49, 4-38; *ibid.* 1988: 49, 132-218.

For cytochrome P450 gene, transcript and protein nomenclature, authors are directed to Nebert DW et al., *DNA Cell Biol* 1991: 10, 1-14.

Abbreviations should be given in parenthesis after their first use in the text and also, should be listed in the page along with Key Words and Running Title.

(i) Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author along with a reprint order form. Proofs must be checked immediately and returned to the editor by express mail within 72 hr. Authors will be charged for extensive alterations made on the proofs.

(j) Page Charges

Page charges are levied after acceptance of the manuscript for publication. Payment is not a condition for publication and articles are accepted or rejected on merit alone.

원고접수 및 편집문의

한국환경성 돌연변이 · 발암원학회 편집사무실

서영준 편집위원장

151-836 서울 관악구 봉천 4동 875-1 관악 캠퍼스타워
508호

Tel:82-2-888-3248

Fax:82-2-888-3249

E-mail:toxmut82@hanmail.net

*한국환경성돌연변이 · 발암원학회지 발간은 3월, 6월, 9월,
12월입니다.

Editorial Office

Korean Society of Environmental Mutagens and
Carcinogens

Young-Joon Surh, Ph.D.

Editor-in-Chief

Rm 508, Gwanak Campus Tower, 875-1 Bongcheon
4-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-836, South Korea

Tel: 82-2-888-3248

Fax: 82-2-888-3249

E-mail: toxmut82@hanmail.net