

항안드로겐성 물질이 성 성숙 이전 단계의 정소에서 미치는 영향 연구

홍 진, 한순영, 문현주, 강태석,
강일현, 김태성, 김승희, 권기성*

국립독성연구원 내분비장애물질팀

Early Exposure to Anti-androgen Compounds Induces the Delay in the Testis Development in Immature Male Rat

Jin Hong, Soon Young Han, Hyun Ju Moon, Tae Seok Kang,
Il Hyun Kang, Tae Sung Kim, Seung Hee Kim and Ki-Sung Kwon*

National Institute of Toxicological Research Endocrine Toxicology Division

ABSTRACT

The experiments investigated whether early exposure to testosterone propionate (TP) during prepuberty alters testis development in Sprague-Dawley male rats. We performed Hershberger assay using the stimulated weanling male rats by OECD protocols, cDNA microarray, and Western blot. TP was subcutaneously injected to uncastrated Sprague-Dawley male rat of 22 days old for 10 consecutive days at doses of 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6 mg/kg per day. At necropsy, the following tissues were removed and weighed: combined testes, epididymides (Epi), Cowper's glands (COW), levator ani, and bulbocavernosus muscles (LABC), seminal vesicles, together with coagulating gland (SV) and ventral prostate (VP). We found that TP increased the weights of Epi, VP, SV, COW, and LABC, while testis was decreased in a dose-dependent manner. In cDNA microarray analysis of testis, there were significant reductions in the expression of cytochrome P450 11A (CYP11A), the rate-limiting enzyme of steroidogenesis.

Taken together these results, TP exposure before puberty in male rats may produce the delay in testis development by inhibiting the CYP11A gene expression.

Key words : OECD validation, Hershberger assay, TP, immature male rat

서 론

내분비계장애물질은 어류, 거북이, 악어 등 야생
생물의 암컷화 현상이나 사람에서의 남성 정자수

감소 현상, 여성의 유방암 등 내분비 관련 질환 증
가의 주요한 원인으로 의심되는 물질로서 내분비
계를 변화시키거나 혼란을 야기시켜 동물이나 사
람의 정상적인 성분화나 발생을 억제하는 작용이
있는 것으로 보고되고 있다(Ashby *et al.*, 2000). 내
분비계장애물질은 현재 약 140여종으로 추정되고
있고, 매우 낮은 농도라 하더라도 수생동물의 조직
에 농축되어 먹이사슬을 통해 다른 수생생물로 이

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-380-1879, Fax: +82-2-380-1878
E-mail: kisungk@kfda.go.kr

동하면서 그 축적량이 증가할 수 있어 말단인 사람에서의 그 영향은 크게 증폭되어 나타날 가능성이 있으므로 미국, 일본, OECD를 비롯한 선진각국들은 막대한 예산투입과 인력투입으로 적극적인 대처에 나서고 있다. 내분비계작용기전 연구는 대부분 호르몬 수용체에 대한 효능제 (agonist)와 길항제 (antagonist)의 작용을 중심으로 수행되었다. 조만간 세계적으로 신규 화학물질의 허가, 등록 및 수출입 등에 내분비계 영향에 대한 독성자료가 요구 될 것으로 예상되어 국제적으로 표준화된 검색 시험법의 확립 및 기술습득은 중요한 사안으로 제시된다.

OECD (국제경제협력개발기구)는 내분비계장애 물질을 동정하고 분석하기 위하여 1998년에 내분비계장애물질 검색시험법 표준화 작업을 위한 연구조정협의회 및 task force 팀을 구성하여 포유동물을 이용한 내분비계장애물질 검색시험법 확립을 위한 각 국의 참여 연구기관 선정 및 동 시험법에 대한 pre-validation 또는 validation 시험연구를 계획하였다.

안드로겐성 및 항안드로겐성 물질을 검색하기 위해 OECD에서 제안한 Hershberger assay는 부생식선 및 남성생식장기에서의 안드로겐 활성을 측정하는 방법이다. 1930년대 Korenchevsky 등이 고환 및 부고환을 절제한 수컷 랫드에서 안드로겐성 물질에 의해 여러 남성생식장기 및 부생식선이 변화한다고 보고한 이후, 거세동물을 이용한 여러 가지 시험이 진행되었다. 처음에는 복측전립선 (ventral prostate), 정낭 (seminal vesicles and coagulating gland)이 주요한 지표였으나, 후에 요도구선 (bulbourethral gland; Cowper's gland), 음경귀두 (glans penis) 및 항문거근 (LABC: levator ani and bulbocavernosus muscles)의 무게가 안드로겐성 물질작용에 의해 변화로 여러 연구자에 의해 보고되었다. Hershberger 등에 의해 거세동물을 이용한 시험법이 안드로겐성 물질뿐만 아니라 에스트로겐 또는 프로게스테론을 포함한 물질에 의해서도 전립선, 정낭 및 항문거근의 무게변화가 있는 것이 알려지면서 이 시험법이 보다 광범위하게 사용되기 시작했으며, 이 시험법 및 이 시험법에 이용된 부생식선의 무게 변화는 현재까지도 여러 연구자에 의해 안드로겐성 및 항안드로겐성 물질검색을 위한 유용한 지표로서 많이 사용되고 있다. OECD

에서는 동물보호 (animal welfare)차원에서 거세수술과정이 없는 비거세 미성숙 동물을 이용한 stimulated weanling male rat Hershberger assay를 phase-3 validation study에 추가하여 2004년부터 추진 중에 있다.

따라서 본 연구에서는 OECD phase-3 프로토콜에 따라 testosterone propionate가 성 성숙 이전단계의 고환에 미치는 영향을 조사하여 안드로겐성, 항안드로겐성 물질 노출로 인한 장기 발달에 문제점을 관찰 하고자 한다.

연구 및 방법

본 연구에서는 안드로겐성과 항안드로겐 활성 평가를 위한 *in vivo* 단기검색법인 Hershberger assay를 실시하였다.

1. 실험 동물

실험 동물은 국립독성연구소의 청정사육 시설 내에서 생산·사육된 특정 병원성 부재 (specific pathogen free) Sprague-Dawley계 랫드를 일정 사육 조건 (온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 명암 교대시간 12시간)하에서 사육하였으며 사료와 물은 자유 섭취 시켰다. 본 실험동물은 미국 실험동물관리 인증 협회 (American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care: AAALAC)가 인증한 시설에서 사육되었다.

본 연구에 사용된 실험동물로는 Sprague-Dawley (SD)계 22일령 랫드를 사용하였으며, 수컷과 암컷을 1:2로 교배시킨 후 임신이 확인된 동물을 polycarbonate cage에 1마리씩 개별 사육하였다. 임신기간 동안은 일반상태를 관찰 하였으며, 출산일은 생후 0일로 판정하였다.

2. 약물 투여 및 투여 용량

실험군은 각 군당 6마리씩 사용하여 실험을 하였다.

재현성을 살펴보기 위하여 동일한 프로토콜로 2회 반복 실험하였다.

안드로겐성 물질 실험은 testosterone propionate 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6 mg/kg/day의 농도로 피하 투여

(s.c 3 mL/kg/day)하여 10일간 투여하였다.

항안드로젠성 물질 실험은 flutamide 10 mg/kg/day, Linurone 100 mg/kg/day, *p, p'*-DDE 160 mg/kg/day, procymidone 100 mg/kg/day의 농도로 경구 투여(oral 5 mL/kg/day)하여 10일간 투여하였다.

안드로젠성 물질과 항안드로젠성 물질 병행 투여 실험은 testosterone propionate 1.0 mg을 피하 투여(s.c 3 mL/kg/day)한 후 5분이 지나서 flutamide 0.3, 1.0, 10, 30 mg/kg/day의 농도로 경구 투여(oral 5 mL/kg/day)하였다.

3. 시험 물질

안드로젠성 물질로 사용한 testosterone propionate (purity > 97%, Catalog # 205-08432)은 Wako Chemical (Japan)사 이다.

항안드로젠성 물질로 사용한 flutamide (purity > 97%, Catalog # F-9397)는 Sigma (St. Louis, MO, USA), procymidone (purity > 98.7%, Catalog # PS-2126), linuron (purity > 99%, Catalog # PS-372)는 Supelco Chemical (St. Louis, MO, USA), *p, p'*-DDE (purity > 99%, Catalog # 12,389-7)사 이다.

물질의 희석과 음성대조군으로 사용한 물질은 corn oil는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사 이다.

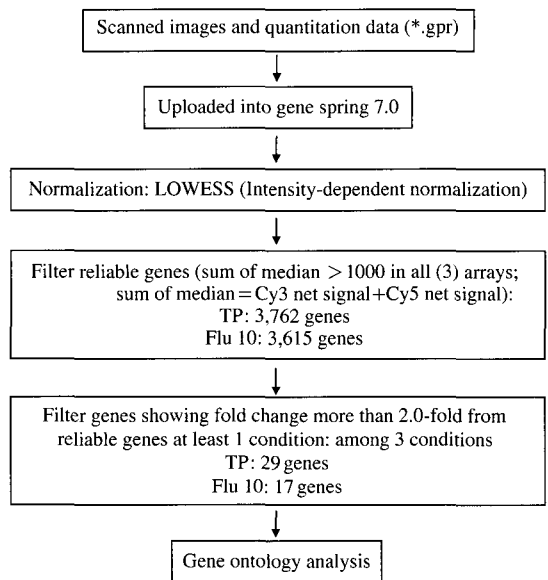
실험을 위한 모든 물질들은 실온에 보관 하였다.

4. 관찰 항목 및 부검

시험 기간동안 모든 동물에 대하여 사망여부 및 일반 증상을 관찰하였다. 또한 체중은 1일 1회 매일 측정하였다, 시험물질을 마지막 투여한 후 24시간째 모든 동물을 ether로 마취하여 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 모든 동물에 대하여 생식장기(고환, 부고환, 복측 전립선, 정낭, 항문거근, 요도구선), 일반장기(신장, 부신, 간)를 분리하여 무게를 측정하였다. 체중변화량, 사료 섭취변화량은 매일 측정하고 난 후 투여를 하였다.

5. cDNA microarray 분석

(주)지노믹트리에 cDNA microarray 분석의뢰 하여 다음의 scheme와 같이 실시하였다.



6. 통계학적 분석

얻어진 모든 시험결과는 평균±표준편차로 표기하였고, TP시험은 음성대조군간에, 항안드로젠성 물질은 양성대조군과 비교하였다.

통계학적 분석은 ANOVA 분석을 실시한 후 구간 비교는 Dunnett's test를 실시하여, $p < 0.05$ 이하인 경우 유의성 있는 것으로 평가하였다.

결 과

1. Testosterone propionate (TP)투여에 의한 생식장기 무게의 변화

TP투여군의 경우, 용매대조군에 비해 유의적인 체중변화는 관찰되지 않았으며 (Data not shown), 투여 기간 동안 약물투여와 관련된 어떠한 이상 증상도 관찰 되지 않았다.

TP 0.4~1.6 mg 투여시 생식장기 무게 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과 생식 장기 무게 변화들 중 고환 무게만 용량 의존적으로 감소하였다 (Table 1, 2). 절대 무게 변화에서는 1.0~1.6 mg 투여군 (Table 1), 상대 무게에서는 0.8~1.6 mg 투여군에서 유의성 있게 감소하였다 (Table 2). 기타 생식 장기들(복측 전립선, 정낭, 항문거근, 요도구선)

Table 1. Effects of testosterone propionate (TP) on the absolute organ weights in Sprague Dawley (mg/kg/d)

Treatment	Testes	Epididymis	Ventral prostate	Seminal vesicle	LABC	Cowper's glands
Control	935.8±3.4	114.8±8.9	765.4±3.0	54.4±3.3	123.8±3.6	9.4±0.2
TP 0.4 mg	928.3±12.6	130.1±7.9	105.9±2.2*	147.2±15.2*	234.3±13.5*	22.6±2.5*
TP 0.8 mg	900.5±0.4	135.5±9.7*	111.2±7.2*	194.1±5.5*	231.8±8.3*	23.7±2.0*
TP 1.0 mg	621.9±37.3*	146.0±12.3*	121.1±15.9*	240.6±18.5*	250.3±32.7*	26.1±3.1*
TP 1.2 mg	469.4±45.6*	148.0±12.0*	124.4±15.1*	263.2±30.6*	252.0±31.9*	25.0±3.8*
TP 1.6 mg	454.4±34.7*	149.9±8.4*	139.4±16.8*	282.6±17.4*	297.9±2.9*	27.7±2.9*

Values are means derived from 6 animals, ±SD

*Significantly different from the control value ($p < 0.05$)

Table 2. Effects of testosterone propionate (TP) on the relative organ weights in Sprague Dawley (mg/kg/d)

Treatment	Testes	Epididymis	Ventral prostate	Seminal vesicle	LABC	Cowper's glands
Control	752.4±29.8	92.1±4.1	61.5±4.0	43.8±3.8	99.5±3.3	7.6±0.2
TP 0.4 mg	709.2±24.2	99.3±5.6	80.9±3.1*	112.8±15.6*	178.9±8.4*	17.3±2.3*
TP 0.8 mg	675.7±21.6*	101.5±6.1	83.3±4.9*	145.7±7.4*	174.0±9.4*	17.8±1.8*
TP 1.0 mg	469.9±30.7*	110.3±9.0*	91.6±13.6*	181.7±13.4*	189.1±24.7*	19.8±3.1*
TP 1.2 mg	347.6±35.4*	109.5±8.8*	92.1±11.6*	195.0±24.5*	186.8±26.5*	18.5±2.5*
TP 1.6 mg	343.2±29.0*	113.3±6.5*	105.2±11.4*	213.9±19.8*	225.2±8.6*	20.9±1.7*

Values are means derived from 6 animals, ±SD

*Significantly different from the control value ($p < 0.05$)

에서는 0.4 mg 투여 군에서부터 용량 의존적으로 증가하였다. 부고환의 경우 절대 무게에서는 0.8~1.6 mg 투여 군, 상대 무게에서는 1.0~1.6 mg 투여 군부터 증가 하였다(Table 1, 2).

동일한 프로토콜로 실시한 2회 실험결과 모두, 유사한 형태의 결과를 나타내어 시험 간 편차는 관찰되지 않았다.

2. 항안드로겐성 투여에 의한 생식 장기의 변화

항안드로겐성 물질(Flutamid 10 mg, Linuron 100 mg, *p*, *p'*-DDE 160 mg, Procymidone 100 mg) 투여 군의 체중 변화에서는 음성대조군에서 비해 유의성있는 경향을 보이지 않았다(Data not shown). 투여기간 동안 약물투여와 관련된 어떠한 이상 증상도 관찰되지 않았다.

항안드로겐성 물질 투여 군(FLU 10 mg, LIN 100 mg, DDE 160 mg, PRO 100 mg)의 생식장기 무게 변화에 미치는 영향을 조사한 결과 고환 무게는 음성대조군과 항안드로겐성 물질 투여 군들을 비교 하였으나 아무런 영향을 나타내지 않았다

(Table 3, 4). 부고환, 정낭에서는 음성대조군과 항안드로겐성 물질 투여 군들을(FLU 10 mg, LIN 100 mg, DDE 160 mg, PRO 100 mg) 비교 하였을 때 유의성 있게 감소하는 반면, 복측 전립선에서는 정소와 마찬가지로 변화가 없었다. 항문거근은 FLU 10 mg 투여군, DDE 160 mg 투여 군에서, 요도구선은 FLU 10 mg 투여 군에서 유의성 있는 감소를 나타냈다(Table 3, 4).

동일한 프로토콜로 실시한 2회 실험결과 모두, 유사한 형태의 결과를 나타내어 시험 간 편차는 관찰되지 않았다.

3. Testosterone propionate (TP)와 flutamide (FLU)의 병행 투여에 의한 변화

체중은 최고 용량군인 FLU 10 mg 투여 군에서 투여기간 동안 양성대조군인 TP투여 군에 비해 감소하는 경향을 보였다(Data not shown). 투여 기간 동안 약물 투여와 관련된 어떠한 이상 증상도 관찰되지 않았다.

TP와 FLU를 병행 투여한 생식 장기 무게 변화를 조사한 결과 고환 무게 변화는 용량-반응적으로

Table 3. Effects of anti-androgen on the absolute organ weight in Sprague Dawley (FLU 10 mg DDE 160 mg PRO 100 mg LIN 100 mg) (mg/kg/d)

Treatment	Testes	Epididymis	Ventral prostate	Seminal vesicle	LABC	Cowper's glands
Control	1249.4±98.6	124.6±13.0	79.6±16.2	52.9±10.9	150.0±15.0	6.1±1.9
TP 1.0 mg	550.2±46.5*	194.6±1.5*	153.3±6.5*	307.2±30.9*	318.3±11.5*	28.9±0.3*
FLU 10 mg	1224.8±10.0	89.4±6.2*	65.5±16.7	33.5±4.0*	123.6±16.1*	2.7±1.4*
DDE 160 mg	1132.2±357.2	93.5±10.9*	72.3±15.8	39.2±4.4*	116.2±13.1*	4.4±1.1
PRO 100 mg	1268.4±134.4	95.0±7.3*	75.2±17.2	38.5±5.0*	130.0±22.1*	3.7±2.3
LIN 100 mg	1221.7±212.7	101.5±10.7*	77.8±15.3	39.3±4.3*	136.2±17.4*	4.2±1.9

Values are means derived from 6 animals, ±SD

*Significantly different from the control value (p<0.05)

Table 4. Effects of anti-androgen on the relative organ weights in Sprague Dawley (FLU 10 mg DDE 160 mg PRO 100 mg LIN 100 mg) (mg/kg/d)

Treatment	Testes	Epididymis	Ventral prostate	Seminal vesicle	LABC	Cowper's glands
Control	895.9±51.3	89.2±6.7	56.8±9.2	37.7±6.0	107.5±8.3	4.3±1.3
TP 1.0 mg	370.4±30.4*	131.1±4.7*	103.3±6.8*	206.9±21.5*	214.4±10.4*	19.4±0.5*
FLU 10 mg	869.2±77.8	63.5±5.5*	46.8±13.6	206.9±21.6*	214.4±10.5*	1.9±1.0*
DDE 160 mg	863.5±139.7	73.3±8.4*	52.2±12.7	206.9±21.7*	214.4±10.6*	3.1±0.7
PRO 100 mg	798.3±252.4	66.0±8.0*	53.1±12.7	206.9±21.8*	214.4±10.7*	2.6±1.7
LIN 100 mg	902.4±94.5	67.6±6.0*	55.6±11.4	206.9±21.9*	96.7±10.1	3.0±1.4

Values are means derived from 6 animals, ±SD

*Significantly different from the control value (p<0.05)

Table 5. Effects of FLU on the absolute organ weight in Sprague Dawley treated with testosterone propionate (TP) (mg/kg/d)

Treatment	Testes	Epididymis	Ventral prostate	Seminal vesicle	LABC	Cowper's glands
Control	1105.5±71.7	112.8±4.4	73.8±13.8	50.9±17.6	125.7±12.9	7.5±4.2
TP 1.0 mg	593.8±111.8*	154.1±12.9*	122.1±17.1*	224.7±34.6*	279.6±13.8*	21.7±3.8*
FLU 0.1 mg	496.1±54.4	151.1±5.6	137.2±8.4	234.6±52.5	277.7±16.2	25.8±2.8
FLU 0.3 mg	554.9±129.7	137.7±13.9	114.6±10.0	224.2±39.3	256.5±7.6	20.6±2.7
FLU 1.0 mg	667.1±105.6	121.2±8.0*	109.9±4.9	154.9±22.8*	228.7±12.2*	16.7±2.4*
FLU 3.0 mg	956.4±163.2*	118.1±8.3*	102.1±11.5	125.8±17.5*	219.5±11.0*	14.6±1.1*
FLU 10 mg	1015.1±80.6*	102.4±12.8*	73.1±14.6*	77.0±12.7*	185.9±25.9*	9.8±2.7*

Values are means derived from 6 animals, ±SD

*Significantly different from the control value (p<0.05)

증가하는 경향을 보였다 (Table 5, 6). 특히, FLU 3.0 mg투여 군, 10 mg투여 군에서 유의성 있는 변화를 나타냈다 (Table 5, 6).

부고환, 정낭, 항문거근, 요도구선은 FLU 1.0 mg 투여 군에서부터 유의성 있는 감소를 보였다 (Table 5, 6). 복측 전립선의 경우 기타 생식 장기들

에 비해 덜 민감하게 반응을 보여 절대 무게에서는 FLU 10 mg투여 군, 상대 무게에서는 FLU 3.0 mg투여 군에서부터 유의성 있게 감소하였다.

동일한 프로토콜로 실시한 2회 실험결과 모두, 유사한 형태의 결과를 나타내어 시험 간 편차는 관찰되지 않았다.

Table 6. Effects of FLU on the relative organ weights in Sprague Dawley treated with testosterone propionate (TP) (mg/kg/d)

Treatment	Testes	Epididymis	Ventral prostate	Seminal vesicle	LABC	Cowper's glands
Control	845.5±94.1	86.2±7.0	55.9±8.0	39.2±15.0	95.6±7.7	5.6±2.9
TP 1.0 mg	399.6±75.1*	103.5±7.1*	82.4±13.1*	150.7±20.2*	187.9±8.1*	14.6±2.3*
FLU 0.1 mg	344.7±44.6	105.0±7.2	95.3±7.8	162.3±34.5	192.5±8.1	17.9±2.0
FLU 0.3 mg	397.8±79.3	99.4±7.8	82.7±6.2	162.7±32.6	185.5±8.7	14.9±2.2
FLU 1.0 mg	469.7±52.1	86.0±8.4*	78.0±6.9	110.3±21.3*	162.2±13.0*	11.9±2.0*
FLU 3.0 mg	681.4±85.3*	84.7±7.0*	73.2±8.8*	89.9±11.3*	157.8±15.5*	10.4±0.8*
FLU 10 mg	733.5±55.6*	73.9±8.6*	52.7±10.1*	55.5±8.3*	133.7±12.8*	7.1±1.9*

Values are means derived from 6 animals, ±SD
 *Significantly different from the control value (p < 0.05)

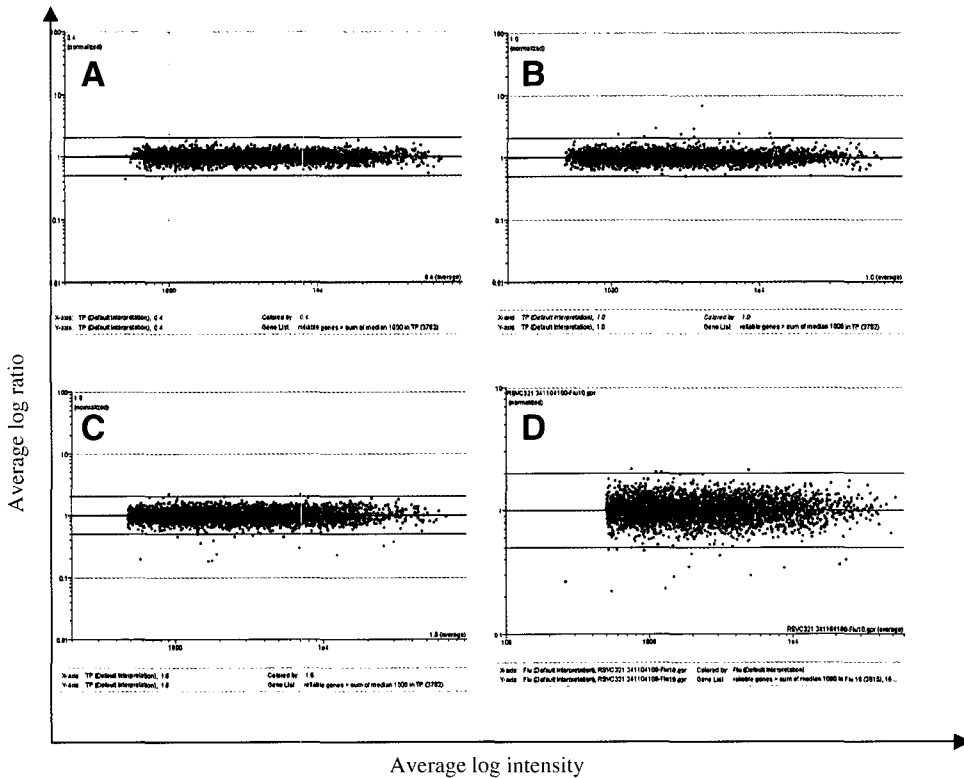


Fig. 1. MA plot of cDNA microarray treated TP, FLU. X-axis is average of log intensity((cy3+cy5 intensity)/2). And Y-axis is average log ratio (normalized ratio=cy5/cy3). A: TP 0.4 mg, B: TP 1.0 mg C: TP 1.6mg D: FLU 10 mg

4. Testosterone propionate와 flutamide의 병행 투여에 의한 cDNA microarray 유전자의 차별적 발현 분석

TP와 FLU의 병행 투여에 의한 cDNA microar-

ray분석을 통해 2배 이상 변화된 유전자들을 관찰하였다.

TP에 의한 변화는 23개의 up regulated와 40개의 down regulated 유전자들, Flu에 의한 변화는 11개

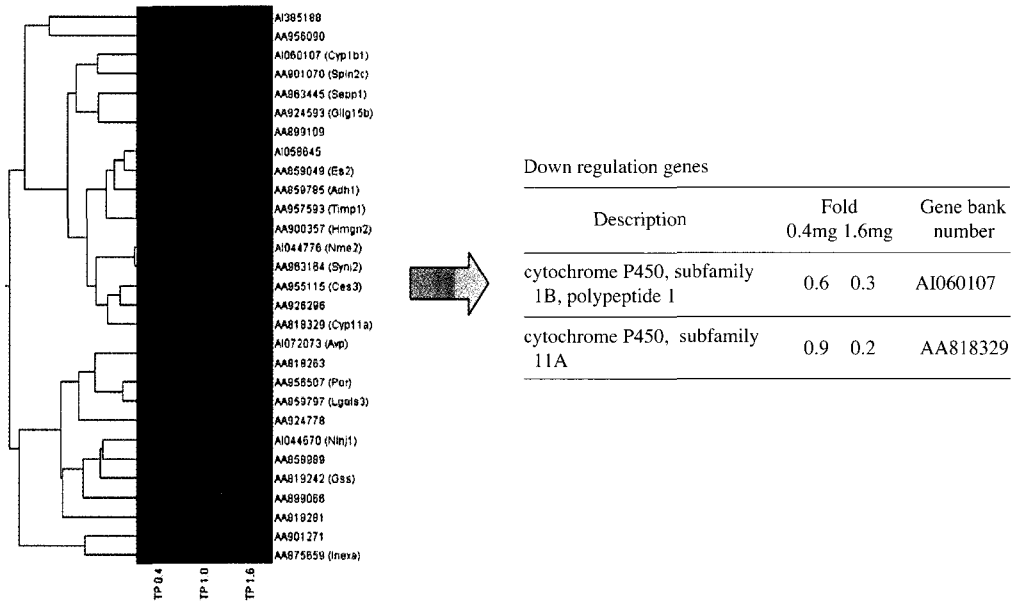


Fig. 2. 2 fold hierarchical cluster diagram of testis treated TP and FLU.

의 up regulated와 31개의 down regulated 유전자들을 관찰 할 수 있었다.

유전자 변화들 중에서 steroidogenesis에 관련 인자들을 중심으로 본 결과, cholesterol에서 pregnenolone으로 넘어가는 단계에 관여하는 CYP11A의 감소를 것을 확인 할 수 있었다(Figs. 1, 2). 1.5배 이상 변화된 유전자들에서는 CYP11A 외에 Insulin like growth factor-I, II도 추가로 관찰 할 수 있었다(Data not shown).

고찰

많은 환경독성물질 중 일부는 내분비계장애물질로 구분되는데 내분비계장애물질은 수용체의 결합 및 전사활성을 저해함으로써 내인성 스테로이드의 세포 조절기능을 방해하거나 또는 스테로이드의 생합성 및 분해에 영향을 주는 것으로 보고 되어졌다. Hershberger assay는 설치류에서 항문거근, 정낭 및 전립선을 성장시킬 수 있는 스테로이드 물질의 안드로겐성과 근중식성(myotroph)을 검색하기 위해 고안된 시험법으로서, 여러 차례 수정되어 지금은 가장 널리 사용되는 안드로겐성/항안드로젠

성 물질 검색시험법이 되었다(Kang *et al.*, 2004). 이 시험법은 안드로겐성 물질 검색뿐만 아니라 대조시험 물질로 안드로겐성과 항안드로겐성 물질은 거세 랫드에 동시 투여하여 안드로겐에 의해 유도된 부생식선의 성장이 얼마나 저해되는가를 조사하는 시험방법으로, 동물을 거세시키는 시기나, 투여 경로, 투여시간, 대조 시험 물질의 농도 등에 따라 시험결과가 다양한 것으로 연구되었다(Ashby *et al.*, 2000). Hershberger assay를 통해서 내분비계장애물질에 미치는 영향에 대해 성 성숙 단계에서 안드로겐성/항안드로겐성 물질들은 대부분 보고가 되어 있다(Ashby *et al.*, 2000). 내분비계장애물질의 기전연구를 스테로이드 호르몬의 생합성 및 그 대사의 교란을 중심으로 수행된 사례는 아직까지 많지 않다. 지금까지 스테로이드 생합성 및 대사에 관여하는 물질들로 연구가 되어졌다(Gray *et al.*, 1999). Hershberger assay Phase 1의 경우 단일 물질로 실험을 하여 효능제(TP)와 길항제(FLU)를 선정하여 생식 장기 감소를 확인 하였으며, Phase 2는 이를 바탕으로 아고니스트(methyltestosterone, trebolone)와 안타고니스트(vinclozolin, procymidone, linuron, DDE, finasteride)추가로 선정하여 생식 장기 무게 변화, 28일 반복 투여를 통한 독성

실험을 하였다(Hershberger *et al.*, 1953). Phase 3에서는 수술에서의 기술 문제점과 동물 보호 차원을 고려하여 미성숙 랫드로 대체 할 수 있는 방법을 모색하는데 중점을 두었다. 미성숙 랫드의 경우 음성 대조군과 양성대조군의 선정도 중요한 작용을 하게 되었다. 음성대조군(Olive oil, Sesame oil, Peanut oil)인 경우에는 oils 투여 군의 경우 몸무게 증가와 상대적 정소 무게가 감소를 보였으며, 특히 peanut oil 투여군의 경우 7일 후부터 전립선 무게가 증가하고, 10일 이후에는 변화가 없었다. 이것은 oils와 직접적인 관계가 있다고 할 수 없는 부분이며, 생식 장기 무게변화는 몸무게의 증가로 인한 것이라는 논란이 제기 되었다. 따라서 untreated군과 유사한 결과를 얻은 corn oil로 선정하였다. 양성대조군의 경우에는 17 α -methyltestosterone (17MT)와 testosterone propionate (TP)의 차이이다(van Roijen *et al.*, 1997). 17MT를 양성대조군으로 한 경우에는 flutamide (FLU), procymidone (PRO)는 낮은 용량에서 거의 변화가 없고, DDE는 5 mg부터 유의성 있는 감소를 하고, finasteride는 정소 무게만 변했다. TP의 경우에는 Hershberger assay와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. Flutamide 3 mg, DDE 16 mg, finasteride 1.0 mg, procymidone 3 mg에서 부터 유의적으로 감소하였다. 안드로겐은 남성 생식 기관에서 중요한 역할을 하고 있으며, LH/FSH secretion의 feedback 조절과 부생식선 발달에도 관여를 하고 있다. 테스토스테론은 LH조절 하에서 leydig cells를 합성 하며, testicle은 남성에서 테스토스테론 합성과 sperm 생성에 중요한 작용을 한다(Jing *et al.*, 2003). Endocrine feedback loop에서 central nervous system (CNS)을 자극 하여 LH, FSH 호르몬에 영향을 준다(Ashby *et al.*, 1997). LH는 테스토스테론의 합성에서 testicular interstitium에서 leydig cells에서 주로 역할을 하고, FSH의 경우 spermatogenesis생성에 주요한 역할을 담당하고 있다(Dufau *et al.*, 1989).

성 성숙 이전에는 안드로겐성 물질(testosterone propionate, testosterone enanthate)에 고용량 노출되면, 용량-반응적으로 고환 발달에 저해를 주며(Holtz *et al.*, 1981), 기타 생식 장기들에서는 증가하는 결과를 볼 수 있다. 이것은 테스토스테론 호르몬이 증가되고 LH는 감소하면서 negative feedback이 일어나서 이와 같은 현상이 나타난다고 보

고되어 진 바 있다. 성 성숙 이전에 LH/FSH를 억제 시켜 실험한 결과들에서도 사춘기 시기가 지연되었다(Gancarczyk *et al.*, 2003). 이 결과들은 호르몬과 고환 발달은 밀접한 관련이 있음을 알려 주고 있다(Holtz *et al.*, 1981). 이전의 대부분 보고 된 것은 태아, 신생아시기로 호르몬 생성 직전인 미성숙(22~23일)시기에서도 같은 결과를 얻을 수 있는지 확인 할 필요성이 있었다(Gray *et al.*, 1989).

안드로겐성 물질이 미성숙(22~23일)시기에 노출 되었을 때에도 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 특히, TP 1.0 mg 이상 노출이 되면 고환 발달에 영향을 주는 것을 확인 할 수 있었다. 미성숙 시기에 안드로겐성 물질이 노출이 되면 혈류를 통해 부생식장기 호르몬 수용체들에 반응을 주어 증가 한 반면, 테스토스테론 생성 기관에서는 LH에 영향으로 감소하는 것으로 사료되어진다(Almiron *et al.*, 1988). 안드로겐성 물질에서만 고환 발달에 저해를 주는 것 인지 확인 하고자 항안드로겐성 물질로 알려진 FLU, DDE, LIN, PRO를 선정하여 실험을 하였다. 각각 단독 투여 한 결과 고환 발달에 영향을 미치지 않는 것을 확인 할 수 있었고, 부생식장기들에서는 감소하는 경향을 보여 주었다(Gray *et al.*, 1989). 항안드로겐성 물질이 고환 발달에 영향이 없다면 병행 투여 하였을 때는 어떠한 영향이 있는지 확인하였다. 대표적인 항안드로겐성인 FLU를 가지고 병행 투여하여 고환 발달을 관찰 하였다. FLU는 안드로겐 수용체와 안드로겐 사이의 결합을 경쟁적으로 저해하는 길항제로서 생식장기 및 외부 생식기 발달에 저해 하는 것으로 보고가 되었다. 그 결과 고환 무게가 FLU 1.0 mg에서 부터 회복 되는 경향을 보여 이것은 FLU와 TP가 각각 androgen receptor에 경쟁적으로 반응을 하여 증가하는 것으로 사료되어진다. TP와 FLU의 병행 투여 이외에 다른 항안드로겐성 물질들의 병행 투여에서도 고환의 무게가 용량 의존적으로 증가 된다는 결과들과 일치 하였다.

위의 3가지의 *in vivo* 실험을 통해서 미성숙 시기에 안드로겐성 물질이 노출이 되었을 때 고환 발달에 영향을 주는 것을 확인 할 수 있었다.

고환 발달 과정 중 steroidogenesis 기전 중 어떠한 변화에 의해 일어나는 지를 cDNA microarray, 단백질 변화에서 관찰 하였다.

유전자 발현에서도 steroidogenesis에 관련이 있

는 CYP11A 즉, pregnenolone 단계에서 억제 되는 것을 확인 할 수 있었다. Cholesterol은 pregnenolone 단계를 거쳐서 leydig cell에서 고환을 발달시킨다. 또한 pregnenolone은 prgesterone, hydroxylated 17 α -hydroxypregnenolone으로 변화된다.

미성숙 (22~23일)시기에 TP가 노출이 되면, 기타 생식 기관에서는 증가 된 반면, 테스토스테론 생성 기관에서는 호르몬 자체로 인식을 하여 LH에서 negative feedback 현상으로 성장·발달에 영향을 주어 고환 발달 변화로 형태, 길이 등 외형적인 변화로 인해 무게 감소가 나타나는 것으로 사료 되며, 고환 발달에는 CYP11A가 주요하게 관여 한다는 사실을 알 수 있었다.

결 론

안드로겐성 물질이 성 성숙 이전 단계에 노출 될 경우 고환 발달에 영향을 준다고 사료된다. 미성숙 시기에 안드로겐성 물질이 노출이 되면, 고환 발달 변화로 형태, 길이 등 외형적인 변화로 인해 무게 감소가 나타나는 것으로 사료 되어진다. 또한, 고환 발달에는 CYP11A가 주요하게 관여하는 것으로 사료 되어져 앞으로 고환발달 장애에 추가적 연구를 요하는 것으로 생각합니다.

감사의 글

본 연구는 국립독성연구원 내분비장애물질평가 사업의 일환으로 수행되었습니다. (04131내분비303)

참 고 문 헌

- Almiron I and Chemes H. Spermatogenic onset. II. FSH modulates mitotic activity of germ and sertoli cells in immature rats, *Int J Androl* 1988; 76: 235-46
- Ashby J and Lefevre PA. The weanling rat as an assay for endocrine disruption Preliminary finding, *Reg. Tox. Pharmacol.* 1997; 26: 330-337
- Ashby J and Lefevre PA. The peripubertal male rat assay as an alternative to the Hershberger castrated male rat assay for the detection of antiandrogens, oestrogens and metabolic modulators, *J. Appl. Toxicol.* 2000; 20: 35-47
- Dufau ML, Ulisse S, Khanum A, Buczko E, Kitamura M, Fabbri A and Namiki M. LH action in the Leydig cell :modulation by angiotensin II and corticotropin releasing hormone, and regulation of P450(17) alpha mRNA, *J steroid Biochem* 1989; 205-17
- Gancarczyk M, Tworzydło W, Szlachta A, Sadowska J and Bilinska B. Hormonal regulation of oestrogen formation by Leydig cells in vitro: immunocytochemic approach, *Folia Biol (Krakow)* 2003; 181-8
- Gray Jr LE, Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL and Ostby J. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidon, linuron, iprodion chlozolate, *p, p'*-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat, *Toxicol. Ind. Health* 1999; 15: 94-118
- Gray LE, Ostby J, Ferrell J, Rehnberg G, Linder R, Cooper R, Goldman J, Slott V and Laskey J. A dose-response analysis of methoxychor-induced alterations of reproductive development and uncton in rat, *Fundam. Appl. Toxicol.* 1989; 12: 92-108
- Holtz A, Brennan RG, Battiste D and Terner C. Androgen control of an inhibitory modulator of phosphodiesterase in rat epididymis and prostate, *Endocrinology* 1981; 1538-44
- Hershberger L, Shipley E and Meyer R. Myotrophic activity of 19-nor-testosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1953; 83: 175-180
- Kang IH, Kim HS, Shin JH, Kim TS, Moon HH, Kim IY, Choi KS, Kil KS, Park YI, Dong MS and Han SY. Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron, and *p, p'* DDE in rodent 10-day Hershberger assay, *Toxicology* 2004; 146-159
- Jing Cheng, Fu Juan-Ling, Zhou Zong-can. The inhibitor effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Toxicology* 2003; 1-10
- van Roijen JH, Ooms MP, Weber RF, Brinkmann AO, Grootegeod JA and Vreeburg JT. Comparison of the response of rat testis and accessory sex organs to treatment with testosterone and synthetic androgen methyl-steroidolone (R1881), *J Androl* 1997; 51-61