

Simazine이 정소세포에서 Apoptosis와 Steroidogenesis 조절 유전자들의 발현에 미치는 영향

박호욱¹ · 고정재² · 배지현^{1,†}

¹차의과학대학교 약학대학 약학과, ²차의과학대학교 의생명대학 의생명과학과

Simazine-induced Alteration of the Expression Levels of Apoptosis- and Steroidogenesis-regulating Genes in Testicular Cells

Ho-oak Park¹, Jeong-Jae Ko² and Jeehyeon Bae^{1,†}

¹Dept. of Pharmacy, CHA University, Seongnam 463-836, Korea

²Dept. of Biomedical Science, CHA University, Seongnam 463-836, Korea

ABSTRACT : Simazine (6-chloro-N,N'-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) is a triazine herbicide that has been applied worldwide including Korea for agricultural purposes. Simazine is the second most commonly detected pesticide in surface- and ground-water in the United States, Europe and Australia. It has been shown that simazine is a potent endocrine disruptor in wildlife and laboratory animals. Although many endocrine disruptors can induce apoptosis in various types of cells, the effects of simazine on apoptosis and on the expression of Bcl-2 family genes are not known. Also it is unknown the effect of simazine on the expression of steroidogenesis-regulating genes in testicular cells. In this study, we investigated the effect of simazine on the expression levels of apoptosis- and steroidogenesis-regulating genes in testicular cells. We found that a low concentration of simazine can alter the mRNA expression levels of steroidogenesis-related genes and Bcl-2 family genes in mouse Sertoli cells and rat Leydig cells. Thus, our results suggest that simazine can disturb normal testicular development and reproductive function by altering the expression of genes that are critical for the regulation of apoptosis and steroidogenesis.

Key words : Simazine, Steroidogenesis, Apoptosis, Bcl-2, Testis

요약 : Simazine은 triazine계 제초제로서, 잡초와 일년생 풀들을 통제하는데 우리나라를 포함하여 세계적으로 널리 사용되고 있으며, 미국, 유럽, 오스트레일리아의 경우, 물에서 두 번째로 많이 검출되는 살충제로 알려져 있다. Simazine에 오염된 토양과 물을 통하여 사람에게 노출되어 이후 생체 내에 수년간 잔존하며 특히, 생물체의 지방 및 조직에 농축되는 특징을 갖는 내분비계 장애물질로 분류되어졌다. 하지만 simazine이 정소세포의 사멸 또는 생존에 미치는 영향과 세포에 정사를 관장하는 Bcl-2 family 유전자 발현에 미치는 영향을 보고한 연구는 없다. 또한 simazine이 성의 분화와 생식기관 발달에 중요한 steroidogenesis 관련 유전자의 발현에 미치는 영향 분석에 관한 연구도 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구진은 이번 연구에서 simazine이 mouse Sertoli 세포와 rat Leydig 세포에서 세포사멸을 관장하는 Bcl-2 family 유전자군의 발현과 steroidogenesis 조절관련 유전자군의 발현 변화에 미치는 영향을 조사하였고, simazine이상기 유전자군의 정상적인 발현을 저해함을 확인하였다. 그러므로 본 연구의 결과로 미루어 볼 때, 사람이나 기타 동물 등이 simazine에 장시간 노출될 경우, 생식 세포에 apoptosis가 유도될 수 있는 가능성을 제시하였으며, steroidogenesis 조절관련 유전자군의 발현을 교란시킴으로써, 정상적인 testis의 발달을 저해하여 남성 생식계의 기능장애를 유도할 가능성이 있음을 제시하였다.

서론

[†] 교신저자: 경기도 성남시 분당구 야탑동 222번지 차의과학대학교 약학대학 약학과. (우) 463-836, (전) 031-725-8377, (팩) 031-725-8350, E-mail: jeehyeon@cha.ac.kr

Simazine은 triazine계 제초제로 잡초와 일년생 풀들을 통제하는데 세계적으로 널리 사용되고 있으며, 미국 플로리다

와 캘리포니아에서는 과일, 견과류와 옥수수 작물에 주로 사용된다(Tierney et al., 1998; Inoue et al., 2006). 우리나라의 경우, 일년생 광엽 잡초를 대상으로 화분과 작물 재배 시 사용되고 있다. 토양과 물에서 비교적 높은 지속성, 용해성과 흡수 등의 특징을 가진 내분비계 장애물질로서 유럽, 미국 호주에서는 지하수와 표층수에서 두 번째로 흔히 발견된다(Inoue et al., 2006). 현재 미국에서 최대 오염 정도는 $4 \mu\text{g}/\ell$ 로 규정하였으며, LD_{50} 은 $5 \text{ g}/\text{kg}$ 인 것으로 알려져 있다(Gunasekara et al., 2006). 이처럼 인체 독성이 낮고 안전한 제초제로 알려져 있지만 지하수나 음용수에 오염되어 생체 내에 잔존하며, 심지어 수년간 지속되어 인체 등 생물체의 지방 및 조직에 농축되는 특징을 가지고 있으므로 낮은 농도로 노출되었을 때 변화를 관찰할 수 있을 것이다.

내분비계 장애물질(endocrine disruptors)은 1997년 EPA (US Environmental Protection Agency)에서 신체의 항상성 유지 및 생식, 발달 행동에 관련된 natural hormone의 합성, 분비, 이동, 활성 또는 제거 기작을 방해하는 외부물질로 명명하였다. 대략 60개 정도가 알려져 있으며, 대부분의 내분비계 장애물질은 성호르몬의 활성과정에 영향을 끼쳐 내분비계 붕괴를 일으켜 reproductive health에 영향을 미친다. Bisphenol A, nonylphenol, di(2-ethylhexyl)phthalate와 같은 내분비계 장애물질은 세포 사멸을 유발하는 것으로 보고되어졌으나(Iida et al., 2003; Wang et al., 2003; Han et al., 2004; Kim et al., 2004), 세포 사멸의 메카니즘 연구는 아직 미흡한 실정이다(Beppu et al., 2006). Bcl-2 family 단백질은 세포 예정사(apoptosis) 신호 전달 체계에서 중추적인 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 세포 생존을 유도하는 단백질(pro-survival protein)로는 Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1이 있으며, 세포 사멸을 유도하는 단백질(pro-apoptotic protein)로는 Bax, Bak, Bad, Bim 등이 있다.

Simazine의 화학적 구조는 atrazine과 prometryn을 포함한 다른 triazine들과 유사하기 때문에(Stoker, 1999; Cooper et al., 2000; Laws et al., 2000) 내분비계 장애물질로서 영향을 미칠 것으로 예상된다. Atrazine의 노출은 난소의 배란 주기를 방해하며(Cooper et al., 2000; Laws et al., 2000; Laws et al., 2003), H295R 세포와 JEG-3 세포에서 simazine과 atrazine을 고농도($0 \sim 30 \mu\text{M}$)로 처리하였을 때, steroidogenic factor-1(SF-1)에 의존적으로 aromatase(Cyp19a1)의 발현을 증가시키는 것으로 보고되었다(Sanderson et al., 2000,

2001; Laws et al., 2003). 그러나 testis 세포에서 steroidogenesis 과정에 미치는 영향에 대한 연구는 전무한 실정이다. Cholesterol은 steroid hormone 합성에 필요하며, 세포내에서 SR-B1을 통해 저장된 intra-cellular lipid로 부터 합성되어진다. Inner mitochondrial membrane으로 전달된 cholesterol은 Cyp11a1에 의해 쪼개지고, 형성된 pregnenolone은 endoplasmic reticulum(ER)로 이동하게 되어 여러 효소에 의해 분해되어지면서 남성호르몬인 testosterone이 합성되어진다. 합성되어진 testosterone과 androstenedione은 Cyp19a1에 의해 생식의 발달에 영향을 미치는 여성의 필수 hormone인 estrone 또는 estradiol로 전환되게 된다. Aromatase는 생체 내에서 androgen을 estrogen으로 변환시키는 중요한 효소로서, 생식계 발달 단계에서 이 효소를 억제시키거나 증가시킬 수 있는 simazine이 성의 분화(sex differentiation)와 생식계 발달에 심각한 유해성을 일으킬 수 있음을 시사한다.

Simazine은 $\text{LD}_{50} > 5 \text{ g}/\text{kg}$ 으로 인체독성은 낮지만 지하수나 음용수를 통해서 인체 등에 잔존하고 농축되는 특징을 가지며, 현재 미국에서는 최대오염 정도를 $4 \mu\text{g}/\ell$ 규정하고 있다. 그러나 저농도에 대한 연구는 미비한 실정이므로, 저농도에서 미치는 영향을 연구하였다.

본 연구에서는 mouse testis Sertoli 세포(TM4)와 rat testis Leydig 세포(LC540)에서 simazine을 저농도($0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 \mu\text{M}$)로 처리하였을 때, Bcl-2 family 유전자와 steroidogenesis 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하였다. Simazine이 TM4 세포와 LC540 세포에서 유의성 있게 세포 사멸을 유도하지는 않았지만, $0.1 \mu\text{M}$ 에서 세포 사멸이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 세포 사멸을 관장하는 Bcl-2 family 유전자군의 발현 변화를 교란시키는 것을 규명하였다. 그러므로 사람이나 기타 동물들에게 낮은 농도로 장시간 노출시킬 경우, apoptosis를 유도할 수 있는 가능성을 제시하였다. 또한, simazine은 testosterone에서 estradiol로 전환시키는 효소, Cyp19a1의 발현 또는 androgen과 결합하는 androgen receptor(Ar)의 발현 등 steroidogenesis에 관여하는 주요 유전자군의 발현을 교란시켰으므로 나아가 생식계의 기능 장애를 유발할 가능성이 있으므로 사료된다.

재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

Mouse Sertoli TM4 세포와 rat Leydig LC540 세포를 한국 세포주 은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)으로부터 구입하였다. 세포 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS)와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM(Welgene, Korea)과 MEM(Welgene) medium에 37°C, 5% CO₂의 환경 하에서 배양하였다.

2. Chemical 처리

TM4 세포와 LC540 세포를 60 mm dish를 사용하여 well 당 1×10^5 개로 분주하고, 배양액을 첨가하여 세포주를 배양하였다. 12시간 배양한 후, simazine(Sigma, USA)을 0, 0.001, 0.01, 0.1 그리고 $1 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리하여 36시간 배양한 후 실험을 진행하였다.

3. Total RNA 분리 및 Real-time PCR

Simazine이 처리된 세포로부터 easy spin RNA kit(Intron, Korea)으로부터 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 nanodrop spectrophotometer(Thermo Scientific, USA)를 이용하여 정량하였다. 추출한 $1 \mu\text{g}$ 의 RNA를 iScriptTM cDNA Synthesis kit(BIO-RAD Laboratories, USA)를 이용하여 5X iScript Reaction Mix, iScript Reverse Transcriptase, Nuclease-free water를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 30분, 85°C에서 5분간 반응하여 cDNA 합성하였다. 합성된 cDNA는 프라이머(Table 1)와 iQTM SYBR Green Supermix(BIO-RAD)를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. 발현 차이를 규명하기 위해서 intensity를 Quantity One program(BIO-RAD)을 이용하여 발현량을 측정하였다. β -actin을 발현 기준으로 발현 정도를 정량화하여 유전자의 발현 양상을 비교 분석하였다.

4. Apoptosis 세포분석

Apoptotic 세포를 분석하기 위해서 FACS(fluorescent activated cell sorter)를 이용하였다. 60 mm dish에 1×10^5 개의 세포를 분주하고 배양액을 첨가하여 세포주를 배양하였다. 세포주가 70% 정도 배양되었을 때 simazine을 처리하였다. 36시간 후에 Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 수거하여 AposcanTM (BioBud, Korea)를 이용해 Annexin V를 염색을 실시하였다. 15분간 상온에서 FITC-conjugated Annexin V를 염색하고 PBS를 이용하여 세척하였다. 그 다음 propidium iodide(PI)

를 첨가하여 FACS Caliber(BD Biosciences, USA)를 통해서 Annexin V-positive하고 PI-negative한 세포의 분포를 분석하였다.

5. 통계학적 분석(Statistical Analysis)

mRNA 발현 변화분석은 각 실험 시 triplicate로 3회 반복 실시하여 평균값 및 표준 오차를 계산하였다. 각 실험에서 통계학적 분석은 SAS statistical software(SAS Enterprise Guide, USA)를 이용하여 Student's *t*-test를 통해 분석하였으며, $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 해석하였다.

결 과

1. Simazine에 의한 세포 사멸 및 Bcl-2 Family 유전자의 mRNA 발현 분석

TM4 세포와 LC540 세포에서 simazine의 세포사멸 조절 기능을 확인하기 위해 simazine을 0, 0.001, 0.01, 0.1 그리고 $1 \mu\text{M}$ 농도로 처리한 후 36시간 후에 세포 예정사에 의한 세포 사멸인지를 확인하기 위하여 Annexin V-staining 방법을 통하여 그래프로 정량화하여 확인하였다. TM4 세포와 LC540 세포에서 Control과 비교하였을 때, Annexin V에 염색된 세포의 수가 변화 없는 것을 확인하였다(Fig. 1A, 1C). 또한 세포 예정사와 관련된 Bcl-2 family 유전자의 발현 분석을 확인하기 위해 cDNA를 합성하여 β -actin 발현량을 기준으로 real-time PCR 분석을 실시한 결과, TM4 세포에서는 세포 생존 단백질로 알려진 유전자 중에 Bcl-2는 증가하고 Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1은 감소하였으며, 세포 사멸 단백질로 잘 알려진 Bax, Bak의 발현에 있어서 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 1B). LC540 세포에서는 Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1, Bax 그리고 Bad의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 1D).

2. Simazine에 의한 Steroidogenesis 조절 유전자의 mRNA 발현 분석

TM4 세포와 LC540 세포에서 simazine에 의한 steroidogenesis 유전자의 mRNA 발현을 분석하기 위해 simazine을 처리하고 36시간 배양한 후, cDNA를 합성하여 β -actin 발현량을 기준으로 real-time PCR 분석을 실시한 결과, TM4 세포에서는 Star, Cyp11a1, Srd5 a1가 증가하는 양상

Table 1. Oligonucleotide sequences of primers used

Genes		Sequences	Genes		Sequences
<i>Star</i>	mus	F : GGCCATGGGAGAGTGGAAACC R : CTTGGTACAGCGCACGCTCA	<i>Bcl-2</i>	mus	F : CGTCGTGACTTCGCAGAGAT R : CTCCACACACATGACCCAC
	rat	F : ACCTCAAGGGGTGGCTGCCA R : CAGGGCTGGACTCCAAGCGC		rat	F : GACACGGCTGCCAGGACGTC R : CGCGACGGTAGCGACGAGAG
<i>Cyp11a1</i>	mus	F : CAGTGATCTACCTATTCCGCT R : GCATGGTCCCTTCCAGGTCTT	<i>Bcl-xl</i>	mus	F : GACAAGGAGATGCAGGTATTGG R : TCCCGTAGAGATCCACAAAAGT
	rat	F : AGGGTCCTAACCCGAGCGC R : TCAGGGGCCATCACCTCTTGGT		rat	F : AAGGGAGACCCCCAGTGCCA R : TGGGGATTACCTCCC CGCA
<i>Hsd17b1</i>	mus	F : TGTTGGAGGCCGCCAGGACT R : AGCCGCGGCCAGCATTACAG	<i>Bcl-w</i>	mus	F : GCTGCTGGAGACGAGTTTGA R : ACTCTCAGCACACAGGGCAG
	rat	F : TGGCCGAATGCGCACAGAG R : GGGGCGTGTCTGGATCCCCT		rat	F : CCCAGGCTCAGCCCAGCAAC R : CTCAGCACACAGGGCAGCCC
<i>Hsd3b1</i>	mus	F : TTCAAGCAAGTGTGCCAGCCT R : TCAGCATGCTCCCATTGGCT	<i>Bfl-1</i>	mus	F : TGGCATCATTAAGTGGGGAAGG R : AGCACATACATCCAGGGCAAT
	rat	F : GGAGAGCGTGCCAGGGCATC R : ACACTGGCTTCGACGCAGGC		rat	F : CCACAAGAGCAGATTGGCCTGG R : TGAAGCCATCTTCCCAGCCTCCA
<i>Cyp19a1</i>	mus	F : TCGCTGAGAGACGTGGAGAC R : GATTGCTGCTTCGACCTCTG	<i>Mcl-1</i>	mus	F : GACGACCTATACCGCCAGTC R : TCGCCTTCGTTTTTAATGTCCA
	rat	F : GCTCTGACGGGCCCTGGTCT R : CACGTCCACGTAGCCCAGT		rat	F : GTCACCGCGTCGGCAGAGAG R : AGCCGTCCAGTCTCTCTCG
<i>Cyp17a1</i>	mus	F : CCTGGCCTATTTCTTTTGGC R : CTGCAGTTGTGGTACCCAGG	<i>Bax</i>	mus	F : TGAAGACAGGGGCTTTTTTG R : AATTCGCCGGAGACTCG
	rat	F : GGAGAGGCTCTGGCCCGTCA R : GGATCACCTCCAGGCGGGG		rat	F : TGAGCGAGTGTCTCCGGCGAA R : GGCCCCAGTTGAAGTTGCCATCA
<i>Srd5a1</i>	mus	F : CCTGGCCGCTGTACGAGTGC R : GGTGGGCTTCCCTCCCCTGA	<i>Bak</i>	mus	F : AGCAGTTGCCCAGGACACA R : TCCGATGAGAGCAAGCTGCC
	rat	F : GCGCGACCTGCCTGGTTCAT R : GCAGGACGCGTTAGGCAGG		rat	F : TTGGGTCAGGTGGGTCGGCA R : CCAGCGGTGGGCTGAAGCTG
<i>Ar</i>	mus	F : GAATGTCAGCCTATCTTTCTTA R : GAATGACCGCCATCTGGTCATC	<i>Bad</i>	mus	F : TGAGCCGAGTGAGCAGGAAG R : TGAGCCGAGTGAGCAGGAAG
	rat	F : AAGGGTCTACCCACGGCCCC R : GGCACCGGGAGGTGCTATGC		rat	F : CCCGGAGTCGCCACAGTTCG R : CGGAGCTCACGGCCATAGCG
<i>Era</i>	mus	F : AGACTGTCCAGCAGTAACGAG R : TCGTAACACTTGCGCAGCCG	<i>Bim</i>	mus	F : CCCTGGCCCTTTTGCTACC R : ACTTGTCAAACTCATGGGTG
	rat	F : AGCTCAACAGCGTGTGCGCC R : CGTACAGCGTAGGCGCTGGG		rat	F : ACAGAGAAGGTGGACAATTGCAGC R : GCCGGGCTCCTGTCTTGCG
<i>Sf-1</i>	mus	F : TAACCGCACCATCAAGTCTG R : ATTCTGCAGAGGAGGCTGAA	β -actin	mus	F : GGGTCAGAAGGACTCCTATG R : CACGGTTGGCCTTAGGGTTCA
	rat	F : GGGGCGGCCGGAACAAGTTT R : CCCATCGGTGGTCCGGTCT		rat	F : AACGGCTCCGGCATGTGCAA R : CTTGCTCTGGGCTCGTCGC

mus; *Mus musculus*, rat; *Rattus norvegicus*.

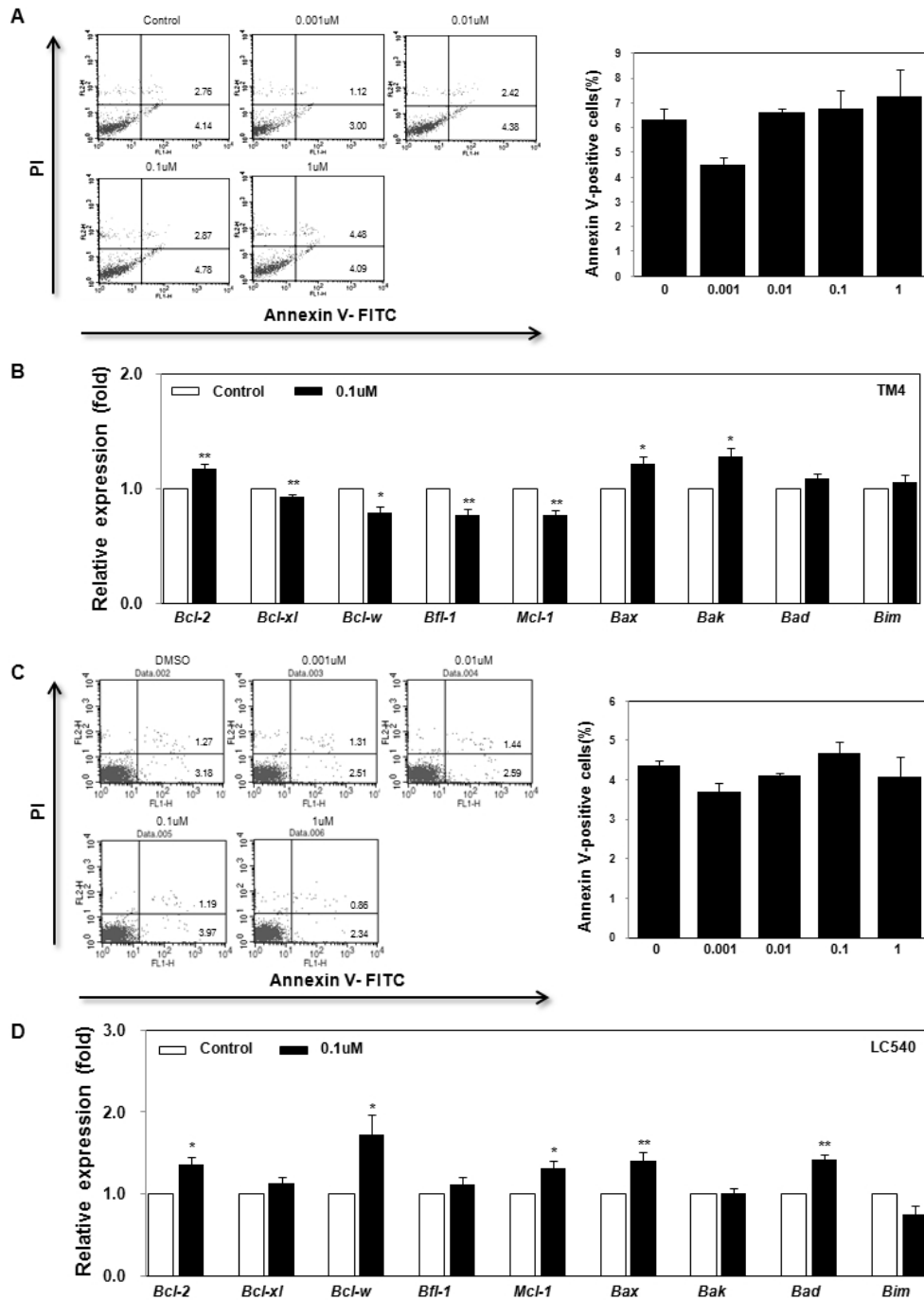


Fig. 1. Changes of apoptosis and the expression of apoptosis-regulating genes in TM4 and LC540 cells exposed to simazine. The TM4 cells (A) and LC540 cells (C) were treated with DMSO (0.1%) as a solvent control, 0.001, 0.01, 0.1, or 1 μM of simazine for 36 h, and apoptotic cells were analyzed by flow cytometric evaluation of Annexin V-FITC-conjugated binding to phosphatidylserine in non-permeabilized cells. The representative dot plots of the cells analyzed for apoptotic cells are shown in the left panel. Graphical data (right panel: mean±SEM) are from three independent experiments conducted in triplicate. The mRNA expression levels of BCL-2 family genes in TM4 cells (B) and LC540 cells (D) upon simazine exposure (0.1 μM) for 36 h are shown. Control cells received 0.1% DMSO (*p<0.05, **p<0.005).

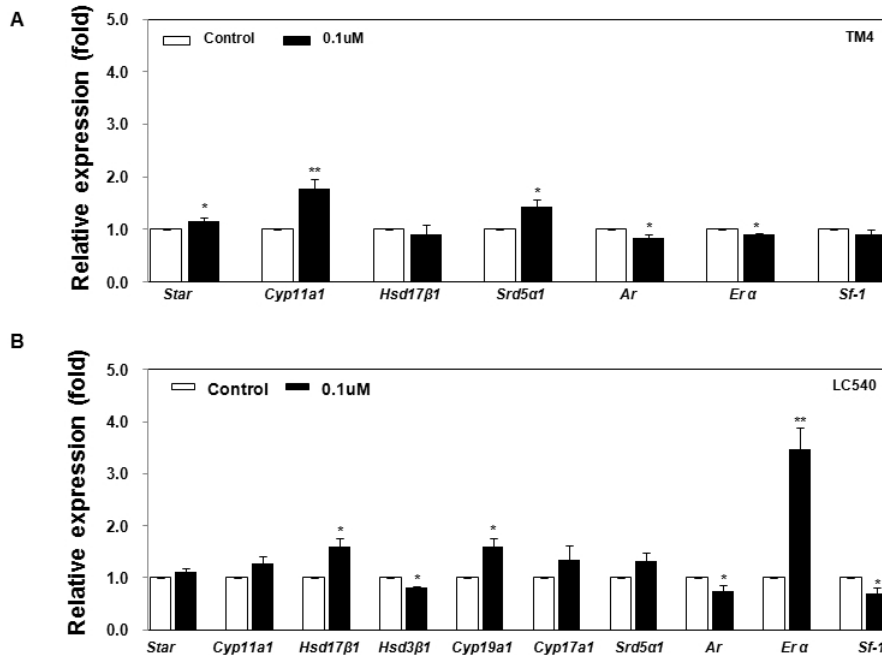


Fig. 2. Changes of apoptosis and the expression of steroidogenesis-related genes in TM4 and LC540 cells exposed to simazine. The mRNA expression levels of steroidogenesis related genes in TM4 cells (A) and LC540 cells (B) upon simazine exposure (0.1 μ M) for 36 h are shown. Control cells received 0.1 % DMSO (* p <0.05, ** p <0.005).

을 관찰하였으며 *Ar*, *Era*가 감소되는 것을 확인하였다. LC540 세포에서는 *Hsd17β1*, *Cyp19a1*, *Era*가 증가하는 양상이 나타났으며, *Hsd3β1*, *Ar*, *SF-1*은 감소하는 양상을 나타내었다(Fig. 2B). Testis에서 *Hsd3β1*, *Cyp17a1*과 *Cyp19a1*의 발현 위치가 Leydig 세포내에서 주로 존재(Almeida et al., 2010)하기 때문에, TM4 세포에서는 *Hsd3β1*, *Cyp17a1*과 *Cyp19a1*의 발현이 미비하여 확인할 수 없었다(Fig. 2B).

고찰

Simazine은 국내 외적으로 널리 사용되고 있는 제초제로서, 농산물, 지하수와 표층수 오염 등 식품에서의 검출과 수질오염에 대한 심각성 등으로 인해 인체에 노출 가능성이 높다. *In vitro* assay에서 *Cyp19a1* 발현을 증가시키는 내분비계 장애물질로서 세계적인 관심이 대두되고 있다(Fan et al., 2007). 본 연구는 mouse Sertoli 세포와 rat Leydig 세포에서 성의 분화와 생식기계에 관련된 steroidogenesis 유전자의 발현과 세포의 사멸과 생존에 중추적인 역할을 담당하는 것으로 알려진 Bcl-2 family 유전자에 대한 기초적인 이해를 통해

낮은 농도의 simazine이 생식계 발달에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 특정 내분비계 장애물질은 세포 사멸을 유발하는 것으로 보고되었다(Lida et al., 2003; Wang et al., 2003; Han et al., 2004; Kim et al., 2004). 그러나 유도되어진 세포 사멸의 메커니즘 연구는 아직 미흡한 실정이며(Beppu et al., 2006), 특히 simazine은 내분비계 장애물질로 명명되어졌지만 simazine에 의한 세포 사멸 관련 독성효과는 현재까지 보고되어진 바가 없다. 본 연구 결과에 의하면 simazine은 TM4 세포와 LC540 세포에서 현저한 세포 사멸을 유도하지는 않았지만, Bcl-2 family의 유전자군들 중 특히 미토콘드리아에서 중합체를 형성하여 미토콘드리아의 membrane potential의 변화를 유도하여 세포질로 cytochrome *c*를 분비하여 caspase 9와 3을 활성화 시켜 세포 사멸을 유도하는 유전자로 알려진 *Bax*와 *Bak*의 mRNA level을 증가시키는 것을 규명하였다(Fig. 1). 따라서 낮은 농도의 simazine에 장시간 노출되면 사람이나 기타 동물들에게 있어서 세포사멸을 유도할 가능성을 제시하였다.

Simazine은 H295R 세포와 JEG-3 세포에서 SF-1에 의존적으로 *Cyp19a1*의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있으며(Sanderson et al., 2001, 2000; Laws et al., 2003), simazine과

유사한 atrazine은 물고기 정소 homogenate에서 *5 α -reductase*를 억제시키고(Thibaut et al., 2004) 쥐의 뇌하수체 세포에서 분리되어 배양된 세포내에서 *Hsd3 β 1/Hsd17 β 1* 활성을 억제시킨다고 알려져 있다(Babic, Gojmerac et al., 1989). 또한 atrazine은 양서류에서는 생식선의 기형을 야기 시킨다고 알려져 있다(Hayes et al., 2003; Orton et al., 2006).

Testosterone은 정자를 성숙시키며, 주로 *Hsd3 β 1*와 *Cyp17a1*에 의해서 조절된다. *Cyp17a1*에 의해 만들어진 androgen은 estrogen 합성을 위한 기질로서 도움을 주기 때문에, testis에서 *Hsd3 β 1*와 *Cyp17a1*의 연구는 androgen 합성을 이해하는데 필수적이다(Almeida et al., 2011). 본 연구에서는 simazine이 정소세포에서 *Hsd17 β 1*, *Cyp17a1*과 *Cyp19a1*의 발현을 증가시킴으로써 정상적인 androgen과 estrogen의 합성을 dysregulation시킬 것으로 생각된다.

최근, 농업과 원예에 흔히 사용되는 22개의 제초제는 *Er*과 *Ar*의 활성을 방해하며, 유방암세포(MCF-7)에서 증식과 *Cyp19a1*의 활성에 영향을 준다고 보고되었으며(Andersen et al., 2002), 특히 simazine은 receptor-mediated activity assay와 steroidogenic activity assay의 두 가지 *in vitro* assay를 통해 anti-androgenic 활성을 가진다고 알려져 있으나(Routledge et al., 1996; Orton et al., 2009), simazine이 정소세포에서 미치는 독성효과에 관한 연구는 전무하다. 본 연구 결과에 의하면 정소세포인 TM4 세포와 LC540 세포에서 *Ar*의 mRNA 발현 양상과 testosterone이 estradiol로 전환하는데 필요한 *Cyp19a1*의 발현 양상이 simazine에 의해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2A, B). 그러므로 simazine이 정소세포에서 androgen 영향의 정도를 감소시키는 것으로 사료되고 anti-androgenic한 기능을 발휘할 가능성을 제시하였다.

본 연구에서 사용한 농도에서 simazine은 mouse Sertoli 세포와 rat Leydig 세포에서 현저한 세포 사멸을 유도하지는 않았지만, 세포 사멸을 관장하는 Bcl-2 family 유전자군의 발현을 교란시키는 것을 규명함으로써, 사람이나 기타 동물들에게 낮은 농도로 장시간 노출시킬 경우, 세포 사멸을 유도할 수 있는 가능성을 제시하였다. 따라서 *in vivo* 실험을 통한 연구들이 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 한국의 한국연구재단(NRF) 교육, 과학기술부를

통해 Priority Research Centers Program(2009-0093821)에 의해 지원되었음.

인용문헌

- Almeida J, Conley A, Mathewson L, Ball BA (2011) Expression of steroidogenic enzymes during equine testicular development. *Reproduction*.
- Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, GjErmandsen IM, Bonefeld-Jorgensen EC (2002) Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and Aromatase activity *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 179:1-12.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK (2005) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308:1466-1469.
- Babic-Gojmerac T, Kniewald Z, Kniewald J (1989) Testosterone metabolism in neuroendocrine organs in male rats under atrazine and deethylatrazine influence. *J Steroid Biochem* 33:141-146.
- Birkhoj M, Nellemann C, Jarfelt K, Jacobsen H, Andersen HR, Dalgaard M, Vinggaard AM (2004) The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 201:10-20.
- Cooper RL, Stoker TE, Tyrey L, Goldman JM, Mcelroy WK (2000) Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol Sci* 53:297-307.
- Han X, Tu Z, Wang X, Shen S, Hou Y (2004) Nonylphenol induced apoptosis in rat testis through the Fas/FasL pathway. *Bull Environ Contam Toxicol* 73:620-627.
- Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A (2003) Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environ Health Perspect* 111:568-575.
- Iida H, Maehara K, Doiguchi M, Mori T, Yamada F (2003) Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells. *Reprod Toxicol* 17:457-464.
- Inoue MH, Oliveira RS, Jr., Regitano JB, Tormena CA,

- Constantin J, Tornisielo VL (2006) Sorption-desorption of atrazine and diuron in soils from southern Brazil. *J Environ Sci Health B* 41:605-621.
- Kim SK, Lee HJ, Yang H, Kim HS, Yoon YD (2004) Pre-pubertal exposure to 4-tert-octylphenol induces apoptosis of testicular germ cells in adult rat. *Arch Androl* 50: 427-441.
- Laws SC, Ferrell JM, Stoker TE, Cooper RL (2003) Pubertal development in female Wistar rats following exposure to propazine and atrazine biotransformation by-products, diamino-S-chlorotriazine and hydroxyatrazine. *Toxicol Sci* 76:190-200.
- Laws SC, Ferrell JM, Stoker TE, Schmid J, Cooper RL (2000) The effects of atrazine on female wistar rats: an evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. *Toxicol Sci* 58:366-376.
- Orton F, Carr JA, Handy RD (2006) Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation in the northern leopard frog *Rana pipiens*. *Environ Toxicol Chem* 25:65-71.
- Orton F, Lutz I, Kloas W, Routledge EJ (2009) Endocrine disrupting effects of herbicides and pentachlorophenol: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Environ Sci Technol* 43:2144-2150.
- Sanderson JT, Letcher RJ, Heneweer M, Giesy JP, van den Berg M (2001) Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ Health Perspect* 109:1027-1031.
- Sanderson JT, Seinen W, Giesy JP, van den Berg M (2000) 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol Sci* 54:121-127.
- Stoker TE, Robinette CL, Cooper RL (1999) Maternal exposure to atrazine during lactation suppresses suckling-induced prolactin release and results in prostatitis in the adult offspring. *Toxicol Sci* 52:68-79.
- Thibaut R, Porte C (2004) Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92:485-494.
- Tierney D, Clarkson JR, Christensen BR (1998) Exposure to the herbicides atrazine and simazine in drinking water. In: Ballantine L, McFarland JE, Hackett DS, editors. *Triazine Herbicide Risk Assessment*. Washington, DC: Oxford University Press.
- Wang X, Han X, Hou Y, Yao G, Wang Y (2003) Effect of nonylphenol on apoptosis of Sertoli cells *in vitro*. *Bull Environ Contam Toxicol* 70:898-904.

(Received 21 May 2011, Received in revised form 8 April 2011, Accepted 14 June 2011)