

Establishment of an *In Vitro* TCD (Testosterone Compound Detection) System

Dong-Geun Lee^{1,2}, Jung-Kwon Jo² and Sang-Hyeon Lee^{1,2*}

¹Major in Pharmaceutical Engineering, Division of Bioindustry, Silla University, Busan 46958, Korea

²Department of Bioscience, Graduate School, Silla University, Busan 46958, Korea

Received July 10, 2019 / Revised August 1, 2019 / Accepted August 2, 2019

Although there is a growing interest in male menopause, a phenomenon associated with male hormone depletion, current kits using antibodies to quantify male hormones are expensive. In this study, we constructed an *in vitro* system for verifying the activity or concentration of male steroid hormones using a transcriptional activity test. A reporter plasmid, pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA, which reacts to testosterone, was constructed. In this plasmid, the ARE-AdE1bTATA sequences can be bounded by the testosterone - androgen receptor complex to express luciferase as a reporter. Then, a stable transfection was performed on the human prostate cancer cell line, LNCap-LN3. The constructed LNCap-LN3/pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA testosterone compound detection (TCD) system showed quantitatively proportional luciferase activities to concentrations of 10^{-13} to 10^{-8} M of standard testosterone. The established *in vitro* TCD system will contribute to the development of materials for health/functional foods and drugs as it will be possible to search en masse for testosterone-like or testosterone-inhibiting substances derived from natural materials.

Key words : Androgen, luciferase, reporter, testosterone

서 론

2017년 기준 우리나라의 평균수명은 여성 85.70세, 남성 79.70세로 평균 82.36세이다[3]. 우리나라에서 남성갱년기 장애를 경험하고 있는 40세에서 70세의 남성의 비율이 64.6% 정도로 3명중 2명이 경험하는 것으로 나타났다. 갱년기 장애가 치명적인 질병을 유도하지는 않지만, 갱년기로 자존감 저하나 우울감 등의 심리적 문제와 함께 지질대사 이상 등 육체적 문제도 일으킬 수 있다. 즉, 경제성장과 의료기술의 발달로 평균수명이 증가하는 정량적으로 긍정적인 측면과 함께 노인 인구의 증가에 따라 삶의 질 향상과 건강한 삶이라는 정성적 측면도 중요하며 갱년기 장애의 완화 및 개선에 대한 요구가 높다[10]. 갱년기 장애 개선 방법에 대한 연구가 빠르게 진행되고 있으며, 국내에서도 갱년기 장애와 호르몬의 관계에 관한 연구 등이 진행 중이다[7, 19].

이러한 남성의 갱년기 증상은 남성호르몬의 감소로 인하여 나타나고 골밀도 감소, 동맥경화 증가, 인슐린 저항성 증가, 우울증, 발한 등과 관계가 있어 건강을 해칠 수 있다[4]. 성호르몬 수용체를 가지는 조직과 기관의 항상성이 변화되어 갱년기

증상이 나타나는 것으로 알려져 있다. 호르몬이 작용하기 위해서는 호르몬이 작용하는 표적세포에 호르몬의 수용체가 있어야 한다. 여성호르몬 수용체인 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)와 남성호르몬 수용체인 안드로겐 수용체(androgen receptor, AR)가 뇌를 포함한 몸 전체에 분포한다[2].

남성의 갱년기 증상을 완화시키거나 치료를 위해 음주감소나 운동 같은 행동치료와 함께 화학적으로 합성한 호르몬 보충요법(testosterone replacement therapy, TRT)을 사용한다[9, 16]. 하지만 이를 장기적으로 사용하면 전립선 암이나 허부요로증상의 악화, 간독성, 적혈구증가증, 수면무호흡증 등의 부작용이 있어 주의가 필요하다[16]. 따라서 부작용이 없는 대체요법으로 식물성 테스토스테론에 대한 연구가 필요하며, 식품의약품안전처의 개별인정형 기능성원료 중에서 갱년기 남성 건강에 도움이 되는 것으로 마카젤라틴화 분말, MR-10 민들레 등 복합추출물, 옷나무 추출분말 등이 2016년 현재 허가가 난 상태이다[5]. 또한 호로과, 산수유, 오자, 비수리 등 천연물 유래의 테스토스테론 유사물질 탐색 연구가 많다[8, 12, 14, 17].

잠재적인 기능성물질의 효능을 파악하려면 검출시스템이 필요한데, 현재 남성호르몬인 테스토스테론을 측정하는 방법은 *in vitro* 방법과 *in vivo* 방법이 있고, 실험의 난이도 및 비용과 시간 측면에서 *in vivo* 보다 *in vitro* 방법이 유리하다. 성호르몬의 *in vitro* 검증법은 수용체 결합반응 시험법과 수용체 전사활성 시험법으로 나눌 수 있다. 수용체 결합반응 시험법은 항원항체반응을 이용하는 것으로 호르몬에 반응하여 활성화되는 수용체 등을 항원으로 하는 항체에 효소를 표지한 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 또는 효소면역

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5628

E-mail : slee@silla.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

측정법이라고 한다. 수용체 전사활성 시험법은 호르몬이 표적 세포의 세포막을 통과한 후 호르몬 수용체와 결합하고, 결합된 복합체가 핵으로 이동하여 DNA의 호르몬반응 유전자에 결합하여 전사활동을 촉진하는 것을 리포터 단백질로 파악하는 것이다. 수용체 전사활성 시험법에 비해 수용체 결합반응 시험법은 실험이 어려우며 고가의 kit로 비용과 시간이 많이 드는 단점이 있다.

본 연구진은 CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 리포터를 이용한 *in vitro* 에스트로겐 검출시스템을 구축하고 오미자, 택사, 지황, 산약, 복령 등의 에스트로겐 유사활성을 검증하였다[6, 18]. 이 방법은 수용체 전사활성 시험법의 일종이지만, CAT을 항원으로 반응하는 항체를 필요로 하는 CAT ELISA Kit를 사용하여 시간과 비용이 비교적 많이 드는 한계가 있었다. 이에 항체를 사용하지 않으면서 수용체 전사활성 시험법을 수행할 수 있는 시스템을 마련하고자, 에스트로겐 수용체를 다량 생산하는 인체유방암 세포주를 이용하여 구축하였고 이를 이용하여 감초, 황기 및 산약의 에스트로겐 유사활성을 검증하였다[11].

수용체전사활성 시험법은 많은 시료를 한꺼번에 처리할 수 있는 장점이 있음에도, 국내에서는 수용체 전사활성 시험법으로 에스트로겐 유사활성 검출에 대한 보고는 있었지만 테스토스테론 유사활성 검출에 관한 보고는 거의 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 수용체 전사활성 시험법으로 남성호르몬 활성을 측정할 수 있는 TCD (testosterone compound detection) 시스템을 구축하고 표준물질인 테스토스테론을 사용하여 시스템의 유용성을 파악하였다.

재료 및 방법

Luciferase 리포터 플라스미드 구축

Luciferase 유전자를 포함한 리포터 벡터는 이전 연구에서 제조한 pGL2-Neo 플라스미드를 이용하였다[18]. 테스토스테론 유사활성을 검증하는 염기서열(ARE-AdE1BTATA)의 클로닝을 위해 첫째, ARE-AdE1BTATA (GCT AGC AGA ACA GTT TGT AAC GAC GTT ACA AAC TGT TCT AGC TCG TTA CAA ACT GTT CTA AGC TCA GAT CTG GGT ATA TAA TAA GCT T) (밑줄부분에 각각 *NheI*과 *HindIII*의 인식서열 첨가)에 해당하는 sense와 antisense oligo-DNA를 (주)바이오니아(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다. 이들을 annealing하여 이중가닥 DNA로 만든 후, T4 polynucleotide kinase (Takara, Japan)를 이용하여 5' 말단에 인산을 첨가하였다. 둘째, 이전의 연구[11]에서 구축한 pGL2-Neo 플라스미드를 가진 대장균(*E. coli*/pGL2-Neo)을 kanamycin (30 mg/ml) 4 µl가 첨가된 Luria Bertani (LB) 액체배지 4 ml에 백금으로 접종한 후 진탕배양(37°C, 250 rpm, O/N)하였다. *E. coli*/pGL2-Neo 배양액을 원심분리(3,000× g, 30분)로 균체만을 수

집한 후, Favor Prep plasmid extraction mini kit (Favorgen biotech corp. Austria)를 이용하여 벡터 DNA를 정제하였다. ARE 리포터 플라스미드 제작용 벡터는 정제된 벡터 DNA를 제한효소 *NheI* (Takara, Japan)과 *HindIII* (Takara, Japan)로 처리한 후에 BAP (bacterial alkaline phosphatase) 처리와 정제를 수행하였다. 셋째, ARE-AdE1BTATA DNA 단편을 pGL2-Neo 벡터와 ligation하여 얻은 재조합 플라스미드 pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA로 *E. coli* DH5α 세포를 형질전환시켰다. 형질전환된 *E. coli* DH5α 세포를 배양한 후, FavorPrep plasmid extraction mini kit (Favorgen Biotech Corp. Austria)로 pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA 플라스미드를 정제하였고, 제한효소 *NheI*과 *HindIII*로 처리한 후, 아가로스겔 전기영동을 수행하여 ARE-AdE1BTATA DNA 단편을 확인하였다.

Stable transfection

인체 전립선암 세포인 LNCap-LN3 세포를 25T Flask에서 10% fetal bovine serum (FBS, Corning, USA) 및 1% penicillin/streptomycin (100 units/ml, Corning, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Corning, USA)을 이용하여 90% 세포밀도(confluent)가 되도록 배양하고 phosphate buffered saline (PBS) 4 ml로 1회 세척한 후, pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA 플라스미드 5 µg이 혼합된 Superfect Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 FBS 및 penicillin/streptomycin이 포함되지 않은 DMEM에 첨가하여 37°C, 5%의 CO₂ 배양기에서 3시간 동안 배양한 후, PBS 4 ml로 1회 세척한 후 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin (100 units/ml, Corning, USA) 및 0.08 mg/ml 농도의 G418 (LPS Solution, Korea)이 포함된 DMEM 5 ml를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였으며, 세포군집이 형성될 때까지 3일 간격으로 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin 및 0.08 mg/ml 농도의 G418을 포함하는 DMEM으로 교환하며 배양하였다. Stable transfection의 결과로 확립된 G418 저항성 및 테스토스테론 검증 시스템을 가지는 LNCap-LN3 세포를 LNCap-LN3/pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA 세포로 명명하였다.

테스토스테론 활성 측정

테스토스테론 유사물질 검증용 LNCap-LN3/pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA 세포를 10% Charcoal stripped FBS (CSF) 및 1% penicillin-streptomycin (100 units/ml, Corning, USA)이 포함된 DMEM에서 세포밀도가 약 90%가 될 때까지 배양한 후, 1X PBS (Corning, USA) 4 ml로 세척하고 10% CSF 및 1% penicillin-streptomycin (100 units/ml)을 포함하는 DMEM 배지로 교환하였다. 테스토스테론 유사활성 측정을 위한 세포배양에 FBS에 포함되어 있는 스테로이드를 Dextran-coated charcoal (Sigma, USA)로 미리 제거한 CSF를 사용하여

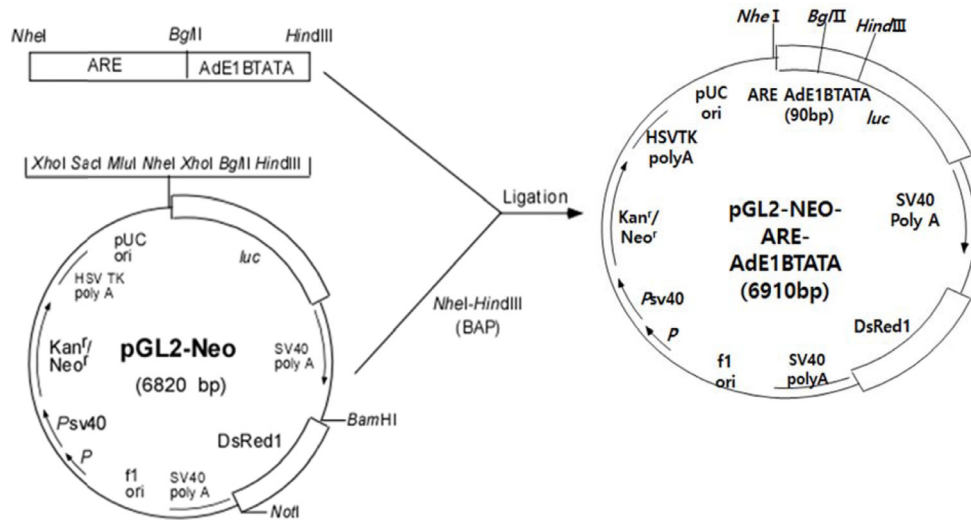


Fig. 1. Construction of a testosterone responsive reporter plasmid. An ARE-AdE1BTATA fragment was inserted in the *NheI-HindIII* sites of pGL2-Neo.

테스토스테론 활성 측정에 방해가 없도록 하였다. 여기에 표준물질로서 대표적인 테스토스테론 물질인 5- α -DHT (dihydroxy-testosterone, Sigma, USA)를 95% 에탄올에 녹여 최종 농도가 10^{-13} ~ 10^{-8} M이 되도록 첨가하였으며, 음성대조군은 에탄올 만을 동일한 양으로 첨가하였다. 그 후 37°C, 5%의 CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 다음 세포를 회수하였고, 1X PBS 4 ml로 세포를 세척한 후 원심분리(3,000 ×g, 5분)하여 상등액을 제거하는 과정을 2회 실시하였다. 이후 Luciferase Assay System (Promega, USA)에 포함되어 있는 1X Lysis buffer 250 μ l를 첨가하여 실온에서 30분간 세포를 용해시킨 후 원심분리 (13,000×g, 5분)하여 얻어진 세포추출액 20 μ l와 Luciferase assay substrate (Promega, USA) 100 μ l를 거품이 생기지 않게 첨가한 직후 Luminometer (TD-20/20, Turner Designs, USA)를 이용하여 발광을 측정하였다.

통계처리

모든 결과는 Macintosh용 통계프로그램 Aabel 2.0 (Gigawiz Ltd Co., USA)으로 one-way ANOVA를 수행하였고 Fisher's PLSD의 다중범위 유의성 검증을 실시하였다. 유의성은 $p < 0.001$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

테스토스테론 활성 검증 리포터 플라스미드

현재 많은 연구에서 테스토스테론 농도 측정은 시판되는 kit를 이용하는데[8, 12], 이들은 항체를 이용하며 시험에 비용이 많이 들어 시료의 대량처리에 한계가 있을 수 있다. 수용체 전사활성 시험법은 세포를 배양하지만 항체를 이용하지 않을 수도 있고 많은 시료를 한꺼번에 처리할 수 있는 장점이 있다.

본 연구진이 수용체전사활성 시험법으로 천연물의 에스트로겐 유사활성을 측정할 때, 리포터로 CAT (chloramphenicol acetyltransferase)를 사용하고 CAT을 정량하기 위해 항체를 이용하는 CAT-ELISA Kit를 사용하다가[6, 18] 항체를 이용하지 않게 리포터로 luciferase를 사용하여 실험의 난이도와 비용의 한계를 극복할 수 있었다[11]. 이에 본 연구에서 테스토스테론 활성 혹은 테스토스테론 유사활성을 검증하기 위해 luciferase를 리포터로 이용하는 시스템을 개발하였다.

테스토스테론-안드로겐 수용체 복합체와 반응하는 ARE-AdE1BTATA 염기서열이 삽입된 테스토스테론 유사활성 검증 리포터 플라스미드인 pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA의 제작과정을 Fig. 1에 나타내었다. ARE-AdE1BTATA는 안드로겐 수용체가 결합하는 염기서열인 androgen response element (ARE)와 아데노바이러스 유래의 프로모터 염기서열인 E1b

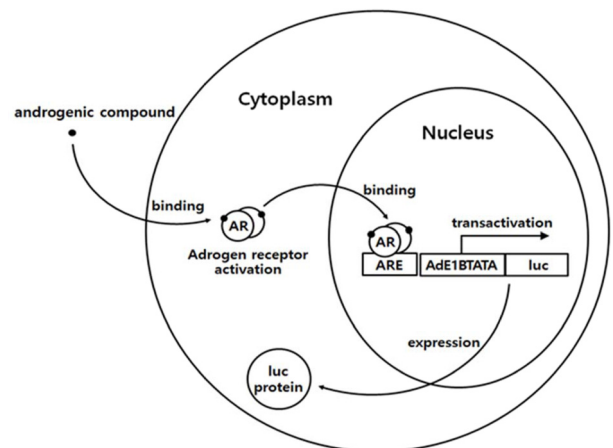


Fig. 2. Responsive diagram of LNcap-LN3/pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA to testosterone.

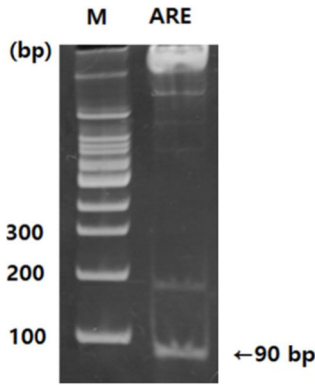


Fig. 3. DNA-PAGE of plasmid. pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA plasmid was separated by 8% DNA-PAGE and stained with EtBr after treated with *NheI* and *HindIII* restriction enzyme. Lanes: M; Maker, ARE; ARE-AdE1BTATA.

TATA 서열이 결합된 것이다[1].

테스토스테론 수용체를 과다 생산하는 남성전립선암 세포주 LNCap-LN3의 염색체에 pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA 플라스미드를 stable transfection 방법으로 도입시켜 TCD system을 구축하였다(Fig. 2). 테스토스테론 혹은 유사물질이 LNCap-LN3 세포의 세포질에 들어가면 안드로젠 수용체(AR, androgen receptor)와 결합한다. 테스토스테론-AR 복합체는 핵으로 들어가 재조합된 ARE부분에(Fig. 1, Fig. 2) 전사인자로 결합하여 전사를 촉진한다. 이때 luciferase가 리포터유전자로 사용되어, 테스토스테론의 활성이 높을수록 luciferase가 많이 만들어지는 것이다.

테스토스테론 혹은 그 유사물질이 결합하는 수용체로 테스토스테론 수용체를 사용하지 않고 안드로젠 수용체를 사용한 이유는 테스토스테론 수용체가 여성호르몬인 프로게스테론과도 결합하며, 안드로젠 수용체는 테스토스테론과 디하이드로테스토스테론(DHT)에 결합하기 때문이었다[15].

본 연구진이 구축한 *in vitro* 에스트로젠 유사활성 검증 시스템과[11] 함께 사용하면 후보물질의 남성호르몬 혹은 여성호르몬 유사활성의 및 저해활성의 정도를 파악할 수 있을 것이다.

테스토스테론 유사활성 검증 플라스미드 확인

pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA 재조합벡터에 *NheI-HindIII* 제한효소를 처리한 후 전기영동으로 90 bp의 ARE-AdE1BTATA 염기서열이 확인된 결과를 Fig. 3에 나타냈다.

테스토스테론 반응성 정량곡선

테스토스테론 및 그 유사활성 검증시스템으로 개발된 *in vitro* TCD 시스템을 이용하여 테스토스테론에 대한 반응성을 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 구축된 *in vitro* TCD 시스템은 5- α -DHT의 농도 증가에 비례하며 최소 10^{-13} M의 농도까지 유의성이 있게 검출할 수 있었다(ANOVA, $p < 0.001$). 에탄

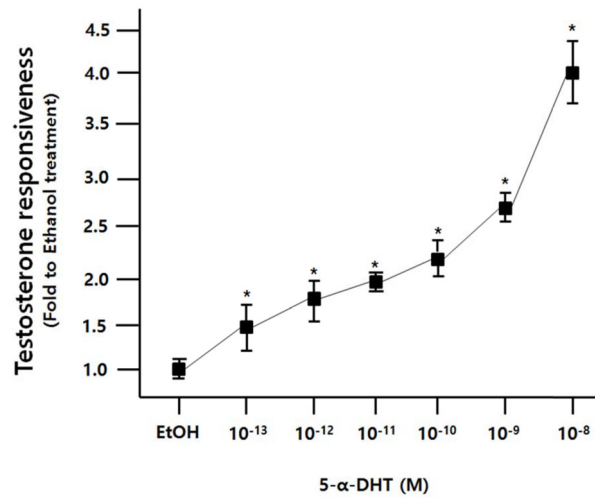


Fig. 4. Testosterone-responsive quantitative curve of constructed TCD system. Star marks represent the significance of ANOVA with Duncan's *post-hoc* test ($p < 0.001$) compared with negative control. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results ($R^2 = 0.8364$).

올만 처리한 음성대조군과 비교하면, 5- α -DHT의 10^{-10} M의 농도에서 약 2배 높은 활성을 보였고, 10^{-9} M과 10^{-8} M의 농도에서 각각 약 3배, 4배의 활성을 보였다. Laczka 등[13]은 chronoamperometry법으로 testosterone 검출 한계가 10^{-11} M의 수준이었는데 본 연구에서 개발된 시스템은 100배 정도 높은 민감도를 보였다.

본 연구에서 개발된 LNCap-LN3/pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA TCD (testosterone compound detection) 시스템은 테스토스테론의 농도에 비례하는 활성을 보였다. 본 연구진이 구축한 *in vitro* 에스트로젠 유사활성 검증 시스템은 estrogen의 농도에 정량적인 luciferase 활성을 보였으며 감초, 황기 및 산약의 경우 에스트로젠 유사활성을 보였다[11]. 본 연구에서 구축된 *in vitro* TCD 시스템으로 식약처에 등록된 남성갱년기 완화용 건강식품 재료에 속하는 민들레추출물을 검증하니, 추출물 농도에 비례하는 테스토스테론 유사활성을 보였다(자료미제시). 따라서 본 연구에서 구축된 *in vitro* TCD 시스템으로 천연물 유래의 테스토스테론 유사물질 그리고 테스토스테론 저해물질의 대량 탐색 등이 항체이용법보다 낮은 비용으로 가능할 것이므로, 건강기능성 식품이나 의약품 신소재의 개발에 기여할 것으로 판단된다.

References

- Allgood, V. E., Oakley, R. H. and Cidlowski, J. A. 1993. Modulation by vitamin B6 of glucocorticoid receptor-mediated gene expression requires transcription factors in addition to the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 20870-20876.
- Handa, R. J., Roselli, C. E. and Resko, J. A. 1998. Distribution

- of androgen receptor in microdissected brain areas of the female baboon (*Papio cynocephalus*). *Brain Res.* **29**, 111-116.
3. http://www.index.go.kr/potal/info/idxKoreaView.do?idx_cd=2758
 4. http://www.nifds.go.kr/brd/m_15/view.do?seq=10043
 5. <https://www.khsa.or.kr/user/info/InfoHealthFood.do?menuNo=225>
 6. Jeon, M. J., Kim, S., Kim, B. K., Cheon, J., Park, S. H., Oh, E., Lee, S. H. and Kim, M. 2013. The effects of seaweed gongjindan on estrogen like activities, platelet aggregation and serum lipid levels in ovariectomized rats. *J. Life Sci.* **23**, 1155-1162.
 7. Kim, E. T., Lee, J. H., Jung, J. H., Jo, H. W., Ju, H. T., Park, J. S., Woo, S. H. and Kim, D. K. 2010. Testosterone replacement in men with late-onset hypogonadism symptoms and loss of diurnal rhythm of total testosterone. *Kor. J. Androl.* **28**, 190-196.
 8. Kim, G. Y., Lee, H. G. and Kim, E. J. 2015. Effects of extracts from oja on testosterone synthesis in Leydig cells. *J. Physiol. Pathol. Kor. Med.* **29**, 403-408.
 9. Kim, J. J. 2004. PADAM (Partial Androgen Deficiency in the Aging Male) and hormone replacement therapy. *Kor. J. Androl.* **22**, 45-51
 10. Kim, K. M. 2013. Late-onset hypogonadism. *Kor. J. Fam. Pract.* **3**, 245-254
 11. Kim, M. H., Kim, B. K., Kim, J. D., Kang, A. R., Lee, C. E., Seo, J. M., Lee, D. G., Jo, J. K., Kim, Y. Y., Yu, K. H. and Lee, S. H. 2017. The effects of medicinal herbs extracts on estrogen-like activities and osteoblast proliferation and differentiation. *J. Life Sci.* **27**, 456-463.
 12. Kim, T. M., Jung, H. K., Jang, J. H., Sim, M. O., Lee, M. J., Cho, J. H. and Cho, H. W. 2016. Effect of *Corni fructus* on testosterone deficiency syndrome in *in vitro* and *in vivo*. *Kor. J. Pharmacogn.* **47**, 264-272.
 13. Laczka, O., del Campo, F. J., Munoz-Pascual, F. X. and Baldrich, E. 2011. Electrochemical detection of testosterone by use of three-dimensional disc - ring microelectrode sensing platforms: application to doping monitoring. *Anal. Chem.* **83**, 4037-4044.
 14. Lee, K. S., Lee, E. K., Kim, S. Y., Kim, T. H. and Kim, H. P. 2015. Effect of a mixed extract of fenugreek seeds and *Lespedeza cuneata* on testosterone deficiency syndrome. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **47**, 492-498.
 15. Marhefka, C. A., Moore, B. M., Bishop, T. C., Kirkovsky, L., Mukherjee, A., Dalton, J. T. and Miller, D. D. 2001. Homology modeling using multiple molecular dynamics simulations and docking studies of the human androgen receptor ligand binding domain bound to testosterone and nonsteroidal ligands. *J. Med. Chem.* **44**, 1729-1740.
 16. Min, K. S. and Kang, D. L. 2011. Testosterone replacement therapy and monitoring for the male patients with testosterone deficiency syndrome. *J. Kor. Med. Assoc.* **54**, 197-204.
 17. Park, J. S., You, G. D., Seo, S. M., Han, S. B., Hong, J. T. and Han, K. 2013. Inhibition effect of testosterone metabolism of some natural products containing yacon and their ameliorative effect of benign prostatic hyperplasia symptom. *Yakhak Hoeji* **57**, 241-249.
 18. Park, S. H., Jeon, M. J., Jang, M. K., Lee, S. J., Kim, B. K., Jeon, M. J., Kim, S. Y., Kim, M. H., Lee, D. G., Lee, T. H., Nam, J. S., Hur, W. J. and Lee, S. H. 2013. Verification of estrogen like activities of herbal medicines using an *in vitro* detection system. *Kor. J. Ori. Physiol. Pathol.* **27**, 752-758.
 19. Seo, K. K., Yoon, S. Y. and Kim, S. C. 1998. Efficacy and safety of Androderm™ in partially androgen-deficiency aging men with erectile dysfunction. *Kor. J. Androl.* **16**, 79-85.

초록 : 테스토스테론 물질 검출을 위한 *in vitro* TCD 시스템 구축

이동근^{1,2} · 조정권^{1,2} · 이상현^{1,2*}

(¹신라대학교 제약공학과, ²신라대학교 일반대학원 생명과학과)

남성호르몬 감소와 관련된 남성갱년기에 대한 관심이 고조되고 있지만, 남성호르몬의 정량을 위해 항체를 이용하는 고가의 kit가 이용되고 있다. 본 연구에서는 *in vitro* 전사 활성 시험법을 이용하여 남성 스테로이드호르몬의 활성 혹은 농도를 검증하는 시스템을 구축하였다. 테스토스테론-AR (androgen receptor) 복합체와 반응하는 ARE-AdE1bTATA 염기서열이 삽입되고 리포터로 luciferase를 발현하는 테스토스테론 유사활성 검증 리포터 플라스미드인 pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA를 제조하고, 인체 전립선암 세포인 LNCap-LN3 세포에 stable transfection을 실시하였다. 구축된 LNCap-LN3/pGL2-Neo-ARE-AdE1BTATA TCD (testosterone compound detection) 시스템은 표준물질인 테스토스테론의 10^{-13} ~ 10^{-8} M 범위에서 농도 증가에 비례하는 정량성을 보였다. 이 연구에서 확립된 *in vitro* TCD 시스템을 이용하면 천연물 유래 테스토스테론 유사물질 및 테스토스테론 저하물질의 대량 탐색 등이 가능할 것이므로, 건강기능성 식품이나 의약품 신소재의 개발에 기여할 것이다.