

Bisphenol-A와 octylphenol이 체외배양된 생쥐정소세포에서 steroidogenesis관련 효소의 발현에 미치는 영향
: Cytochrome P450_{scc}, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase, CytochromeP450_{17α} mRNA의 발현변화

김묘경¹, 강희규¹, 김동훈¹, 한성원¹, 고덕성¹, 이호준¹

¹ 노원을지병원 의과학연구소, ² 을지의과대학 생리학교실

서론

최근 환경으로부터 합성되어진 여러가지 화학물질들 중 생체내 호르몬작용을 모방하거나, 방해, 변형시켜 정상적인 기능을 저해하는 내분비장애물질(endocrine disruptors: EDs)의 문제점이 많이 대두되고 있다(White 등, 1994). 이 물질들의 대부분이 여성호르몬 또는 반여성호르몬적인 작용능력을 가지고 있어 생식 호르몬의 표적기관이나 표적세포에 작용하여 생식기관의 발달과 성숙 및 기능을 저하시키고, 또한 단계별로 발현되는 특정유전자들의 발현에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Saunders 등, 1997). EDs가 포유동물의 음성생식기관에 미치는 영향으로 정소수축, 정자형성과정의 방해로 인한 정자수 감소, 및 호르몬분비 이상등이 알려져 있으며(Boockfor 등, 1997), 성인 남성들에 있어서도 요도하열, 잠복정소 정소외소증, 정자의 기형 증가 및 수감소 등의 보고가 있었다(Gill 등, 1979). 또한 임신한 흰쥐에 OP를 투여하게 되면 cytochrome P450 17α-hydroxylase/C17-20 lyase와 steroidogenic factor-1의 발현이 새끼 쥐의 정소에서 줄어드는 것을 확인하였다(Majdic 등, 1996). 이와같이 EDs의 접촉에 따른 생체내 또는 체외에서 특히 생식기관에서 일어나는 변화에 관한 연구가 활발이 이루어지고 있으며, 그 작용기전을 밝히기 위한 많은 연구가 진행중이다(Lee 등, 2000).

따라서 본 연구에서는 EDs로 잘 알려진 BP-A와 OP가 남성생식기내 세포기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 음성 생식기관인 생쥐의 정소를 분리하여 그 구성 세포들을 체외에서 배양하는 동안 BP-A와 OP를 처리하였을 때, 세포의 생존과 증식에 미치는 영향과 남성호르몬인 testosterone 합성에 관여하는 cytochrome P450 side chain cleavage enzyme(CYP_{scc}), 3β-hydroxysteroid dehydrogenase(3β-HSD)와 17α-hydroxylase/C17-20 lyase(CYP_{17α}) mRNA의 발현변화를 알아보았다.

재료 및 방법

1. 생쥐정소내 세포의 배양

생후 15일령된 ICR 음성생쥐의 정소를 분리하여

0.1% collagenase 와 20 ng/ml DNase와 0.25% trypsin 과 20 ng/ml DNase가 들어 있는 PBS용액과에 각각 15분간 처리하여 조직내 세포들을 단일세포부유액으로 만들었다. 세포부유액은 DMEM과 10% FBS와 0.05 IU/ml FSH (Metrodin-HP, Serono, Swizerland)이 함유된 배양액에 2일동안 6-well culture dish에서 배양하였다. 정소내 체세포들이 바닥에서 sub-confluent하게 자라게 되면 위의 방법에 따라 정자세포의 배양을 위해 생후 15일령의 생쥐의 정소로부터 생식세포를 분리하여 준비된 체세포와 공배양을 실시하였다. 공배양은 위의 배양액에 0.1 IU/ml 의 FSH 첨가하여 배양하였다.

2. 내분비장애물질의 처리

내분비장애물질인 bisphenol A (BP-A) (4,4'-isopropyl-idenediphenol; I-0635, Sigma), octylphenol (OP) (4-tert-octylphenol; Fluka)과 생체내 여성호르몬인 estrogen (E₂)를 1 mM 농도로 에탄올에 녹인 후 각각 10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M 농도로 배양액내에 처리하여 생쥐 정소내 세포를 32°C 배양기에서 48시간동안 배양하였다. 이를 배양후 정소내 세포들의 생존율은 0.4% trypan blue 염색법을 이용하여 관찰하였다.

3. 전체 RNA 분리와 RT-PCR

48시간동안 배양된 정소내 세포들의 전체 RNA는 acid guanidinium phenol chloroform 방법을 응용하여 분리하였다. 역전사중합효소 연쇄반응(RT-PCR)은 1st strand cDNA synthesis kit (Boehringer mannheim, Germany)를 이용하여 42°C 에서 1 시간 동안 실시하였다. 합성된 cDNA는 각각의 primer (Bioneer, Korea)를 이용하여 β-actin, CYP_{scc}, 3β-HSD 와 CYP_{17α}의 PCR 을 수행하였다. 반응이 끝난 증폭 산물은 2% agarose gel에서 확인하였다.

4. CYP_{scc}, 3β-HSD와 CYP_{17α} mRNA의 상대적인 발현양 변화

RT-PCR로 얻어진 CYP_{scc}, 3β-HSD, CYP_{17α}와 β-actin mRNA의 상대적인 비율을 image

analysing software (Vilber Lourmat, France)을 이용하여 측정하였다.

5. 통계

각 군간의 유의성은 student t- test로 검정하였다.

결과 및 고찰

15일령 생쥐정소세포에 E₂, BP-A와 OP를 처리하였을 때, 세포의 생존율은 table 1에서와 같이 E₂, BP 10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M 첨가군에서는 생존율에 차이가 없었으며, E₂와 BP-A 10⁻⁴ M 첨가된 군과 OP 10⁻⁵, 10⁻⁴ M 군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 그리고 전체 증식된 세포수에 있어서는 E₂와 BP-A가 처리된 군에서는 대조군과 차이가 없었으며, OP 처리군에서는 10⁻⁷ M 이상의 농도에서 세포수가 대조군에 비해 유의하게 적은 것을 확인하였다.

CYPsc, 3β-HSD 와 CYP17α 유전자의 β-actin 유전자에 대한 상대적인 발현변화는 Fig 1에 나타내었다. CYPsc mRNA의 발현은 모든 처리군에서 대조군에 비해 유의한 변화는 보이지 않았으며, 3β-HSD mRNA 발현은 E₂가 첨가된 군은 대조군과 비슷한 정도의 발현을 보였으며, BP-A 10⁻⁵, 10⁻⁴ M 농도와 OP 10⁻⁴ M 첨가된 군에서 대조군에 비해 유의하게 낮은 발현을 보였다. CYP17α mRNA의 발현변화는 E₂가 첨가된 군에서는 대조군에 비해 유의한 발현변화를 보이지 않았으며, BP-A첨가군에서는 농도가 높아질수록 대조군에 비해 낮은 발현을 보였으며 (10⁻⁵, 10⁻⁴ M), OP 모든 첨가군에서 대조군에 비해 유의하게 낮은 발현을 보였다.

이상의 결과로 보아 BP-A와 OP는 저농도에서는 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었으며, OP의 처리는 세포 증식을 억제시키는 것으로 관찰되었다. 또한 음성생식기인 정소에서 이루어지는 주요기능중의 하나인 testosterone을 만드는 과정에 관여하는 효소의 일종인 CYPsc, 3β-HSD와 CYP17α mRNA의 발현이 BP-A와 OP를 첨가하였을 때 줄어드는 것으로 확인되어 EDs가 leydig cell에 작용하여 정상적인 steroidogenesis를 방해하는 것으로 사료되며, 이러한 작용억제는 정자형성이나 정소의 다른 세포의 기능에도 영향을 미칠 것으로 여겨진다. 그리고 여성호르몬인 E₂를 처리하면, 10⁻⁴ M 이상의 고농도를 처리하였을 때 세포의 생존에는 영향을 미치는 것을 알 수 있었으나, 그 이하의 농도에서 CYPsc, 3β-HSD와 CYP17α mRNA의 발현에는 영향을 미치지 않아서, BP-A와 OP와는 다른 대사를 하는 것으로 사료된다. 이와 같은 EDs의 steroidogenesis의 억제가 태아기나 사춘기의 성숙시기에 일어난다면, 성인보다 더욱 치명적인 해를 입게 될 것으로 생각되어지며, 앞으로 내분비교란물질

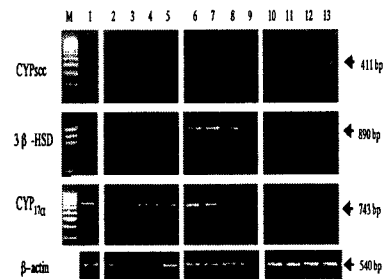
의 규정에 대한 screening방법과 이의 체내/ 체외 실험을 통한 정확한 기전에 관한 연구와 대책이 필요할 것이다.

Table 1. The viability and cell number of testicular cells treated with E₂, BP and OP.

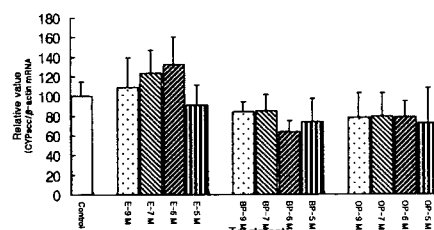
Treatment	Viability (%)	Cell count (×10 ⁶ /ml)
control	72.0 ± 8.5	2.6 ± 0.12
E ₂ 10 ⁻⁹ M	74.2 ± 6.7	2.5 ± 0.15
E ₂ 10 ⁻⁷ M	72.9 ± 7.4	2.5 ± 0.21
E ₂ 10 ⁻⁶ M	72.8 ± 6.1	2.5 ± 0.08
E ₂ 10 ⁻⁴ M	66.3 ± 5.3 *	2.4 ± 0.19
BP-A 10 ⁻⁹ M	73.0 ± 5.4	2.7 ± 0.11
BP-A 10 ⁻⁷ M	72.5 ± 8.4	2.7 ± 0.16
BP-A 10 ⁻⁶ M	71.7 ± 9.8	2.4 ± 0.11
BP-A 10 ⁻⁵ M	60.7 ± 15.7	2.4 ± 0.13
BP-A 10 ⁻⁴ M	44.9 ± 10.0 *	2.3 ± 0.14 *
OP 10 ⁻⁹ M	70.5 ± 5.4	2.4 ± 0.33
OP 10 ⁻⁷ M	69.3 ± 10.9	1.9 ± 0.20 *
OP 10 ⁻⁶ M	65.6 ± 9.7	1.7 ± 0.07 *
OP 10 ⁻⁵ M	56.3 ± 11.4 *	1.7 ± 0.15 *
OP 10 ⁻⁴ M	20.7 ± 10.1 *	1.7 ± 0.12 *

Note. Data represent the results of three studies. Cell viability/count was determined after 48 hr. of treatment. Data are expressed as means ± SE. The symbols *, ** indicates *P<0.05, **P<0.01 vs control.

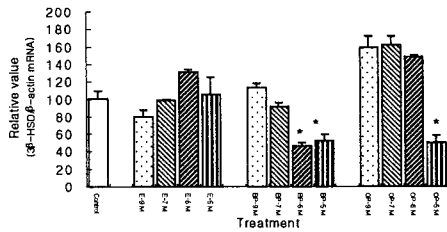
(A)



(B)



(C)



(D)

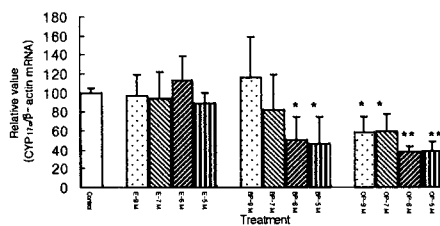


Figure 1. The relative mRNA levels of CYP_{scc}, 3β-HSD and CYP_{17α} in E₂, BP and OP treated pre-pubertal mouse testicular cells for 48 hr. A. RT-PCR amplification of CYP_{scc}, 3β-HSD, CYP_{17α} and β-actin mRNA. M : 100 bp ladder, lane 1: control, 2-5: E₂, 6-9 : BP-A, 10-13: OP (10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M, respectively). B. Relative changes in the amount of CYP_{scc} 3β-HSD and CYP_{17α} mRNA (relevant to β-actin) (*P < 0.05, **P < 0.01 vs control).

참고문헌

Boockfor FR, Blake CA, 1997, Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testis and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis and increases the incidence of sperm deformities. Biol. Reprod., 57, 267-277.

Gill W, Schumacher G, Bibbo M, Straus F, Schoenberg H, 1979. Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. J. Urol. 122:36-39.

Majdic G, Sharpe RM, O'S haughnessy PJ, Saunders PTK. 1996, Expression of cytochrome P450 17α-hydroxylase/C17-20 lyase in the fetal rat testis is reduced by maternal exposure to xenogenous estrogens. Endocrinology, 137, 1063-1070.

Saunders PTK, Majdic G, Parte P, Millar MR, Fisher JS, Turner KJ, Sharpe RM. 1997. Fetal and perinatal influence of xenoestrogens on

testis gene expression. Adv. Exp. Med. Biol. 424, 99-110.

White R, Jobling S, Hoare Sa, Sumpster JP, Parker MG. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology, 135, 175-182.

Lee Hj, MK Kim, HG Kang, DH Kim SW Han and DS Ko. 2000, Effects of bisphenol and octylphenol on TM3 cell : Expression of cytochrome p450_{scc} and estrogen receptor α mRNA. Dev. Reprod. 4(2):215-220.