

## E-SCREEN Assay 를 이용한 내분비계 장애물질의 정량적 평가

오승민 · 이상기\* · 정규혁#  
성균관대학교 약학부, \*국립과학수사연구소  
(Received July 11, 2000)

### Quantitative Assessment of Xenoestrogenic Environmental Pollutants using E-SCREEN Assay

Seung-Min Oh, Sang-Kee Lee\* and Kyu-Hyuck Chung#  
College of Pharmacy, Sungkyunkwan University  
\*National Institute of Scientific Investigation

**Abstract** — There is a growing concern that a wide variety of chemicals released into the environment can disrupt the endocrine system of fish, wildlife and humans. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) include pesticides such as DDT, lindane and atrazine, the food packaging chemicals, phthalates and bisphenol A, alkylphenol ethoxylate detergents and the chemical industry by-products, dioxins. Xenoestrogens in the environment have been argued about health risk, because of estrogen mimetic chemicals are exposed only small amounts to human. A number of in vivo and in vitro assays are now in use to assess the activity of xenoestrogens in the environment. A human breast cancer cell line (MCF-7) was used to develop in vitro screening assay for the detection of xenoestrogenic environmental pollutants. The E-SCREEN (MCF7-BUS) assay is proposed as a reliable, easy and rapid-to-perform method. To optimize and validate this method before it can be used routinely, several phenol compounds and pesticides suspected to be estrogenic were tested using E-SCREEN assay. The results showed that this method is a valuable tool for screening potential estrogen-mimicking environmental pollutants and quantitative determination of estrogenicity.

**Keywords** □ E-SCREEN assay, MCF7-BUS cell, xenoestrogens, phenol compounds, pesticides, endocrine disrupting chemicals.

산업 발달과 더불어 다양한 화학물질이 환경계에 방출되어 공기, 물 및 식품을 통해 인체 및 생태계에 노출되어 나타나는 여러 가지 영향이 관심의 대상이 되어 왔으며, 최근에는 내분비계에 장애작용을 나타내는 화학물질에 대한 관심이 증가하고 있다. 이들 중 대부분은 저농도의 노출에 의해서도 생식기능 장애 및 손상을 유발하게 되며 에스트로겐 등 체내 호르몬의 변화를 초래하여 생태 및 인간에게 미치는 유해한 영향과의 관련성이 제기되는 등 논란이 되고 있다.<sup>1-5)</sup>

현재, 우리나라를 비롯하여 미국 EPA, 일본 후생성, 세계야생생물보호기금(World Wildlife Fund: WWF) 등에서 내분비계 장애물질로 추정하고 있는 물질은 100여종에 달하고 있다. 환경 중에 존재하고 있는 내분비계 장애물질은 대부분이 에스트로겐 작용을 나타내고 있는데 이들 에스트로겐 작용 화학물질 중에는 에스트로겐과 구조가 유사하지 않은 것도 많으므로 단순히 구조만으로는 그의 작용을 예측하기가 어렵다.<sup>1,6,7)</sup>

내분비계 장애작용을 나타내는 화학물질을 검색하는 방법은 *in vivo* 및 *in vitro* 시험법으로 구분할 수 있으며 *in vivo* assay는 미성숙 암컷 흰쥐에서 자궁증식을 측정하는 방법과 vaginal cell cornifi-

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 031-290-7714 (팩스) 031-292-8800

cation assay가 대표적이다.<sup>8)</sup> 이들 *in vivo* assay의 단점은 실험 개체수가 제한되어 있고, 민감도가 떨어지며 내분비계 장애물질이 어떤 장기에 특이하게 영향을 미치는 경우에는 한 가지 방법으로는 그 영향을 알 수 없다는 것이다. 따라서 *in vitro* 실험결과를 *in vivo* 효과로 외삽하기에 여러 제한성이 있음에도 불구하고 간편하면서도 민감한 장점을 지닌 세포생화학적 검색법이 개발되고 있다. 내분비계 장애물질의 *in vitro* 시험법에는 첫째 steroid 합성에 관여하는 효소의 활성을 측정하는 방법, 둘째 결합 globulin이나 수용체를 이용한 경쟁 결합 시험, 셋째 세포중식 측정법, 넷째 포유동물세포나 yeast에서의 유전자 발현시험 등이 있다.<sup>8)</sup>

E-SCREEN assay는 사람 유방암세포인 MCF-7세포가 에스트로겐 작용이 있는 화학물질에 의해 성장이 촉진되는 효과를 이용하는 시험법으로 내분비계 장애물질 검색법으로 적합하다고 알려져 있다.<sup>1,9)</sup>

MCF-7 BUS 세포는 MCF-7 세포의 에스트로겐에 대한 반응성을 향상시킴으로써 E-SCREEN assay의 민감성을 증가시켰다. 세포를 이용한 생화학적 검색법은 실험실 및 실험자의 조건에 따라 결과의 차이가 나타날 수 있어 실험실간의 표준화가 이 방법을 실용화하기 위한 관건이 된다. 따라서 본 조사에서는 MCF7-BUS 세포를 사용한 E-SCREEN assay를 본 연구실 조건에 적합하도록 체계화하여 기존의 보고된 연구결과와 비교 검토하였으며, 에스트로겐 효과에 대한 정량적 평가를 확립하여 현재 내분비계 장애물질로 의심되고 있는 농약류 및 phenol류에 대하여 에스트로겐 효과를 확인하고 정량적으로 평가하였다.

### 실험방법

**세포배양** - E-SCREEN assay는 미국 Tufts대학의 Dr. Soto에게서 분양 받은 에스트로겐에 민감한 MCF-7 BUS cell(Human breast cancer estrogen-sensitive MCF-7 cell)을 사용하였다. 배양은 5% fetal bovine serum(FBS)(Hyclone, Logan, UT)이 첨가된 Dulbeccos Modified Eagles Medium(DMEM, Gibco)으로 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기(Forma scientific, U.S.A.)에서 배양하였다.

**시험물질의 조제** - 17β-estradiol(E<sub>2</sub>), diethylstilbe-

strol(DES)은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였으며 *p,p'*-DDT, aldrin, endrin, dieldrin은 Wako에서 구입하였고, γ-BHC, endosulfan, methoxychlor는 Polyscience에서 구입하였으며, pyrethroid살충제는 ICN Biomedicals Inc.에서 구입하였다. Atrazine과 simazine은 미국 EPA에서 표준물질을 공급받아 사용하였다. 4-Nonyl-phenol, bisphenol A, parachlorophenol, 2,4-chlorophenol 및 pentachlorophenol은 Aldrich에서 구입하였다. 모든 시험물질은 에탄올에 녹여 -20°C에서 저장 후 사용하기 직전에 배양액에 희석하여 사용하였다. 배양액에 처리되는 에탄올의 농도는 0.1%를 넘지 않게 하였다.

**CDFBS조제** - 에스트로겐 효과를 최대화하기 위해 시험에 쓰이는 FBS는 charcoal-dextran(5%~0.5%)으로 처리하여 steroid를 제거하여 사용하였다.<sup>10)</sup> 먼저 charcoal(Acid washed; Sigma)을 차가운 멸균 증류수로 활성화시킨 후 dextran(Pharmacia)을 첨가하여 5% charcoal-0.5% dextran T70 현탁액을 만들었다. 이 현탁액에 동일량의 Fetal Bovine Serum(Hyclone)을 넣어 37°C에서 1시간 정도 6 cycles/min으로 회전하여 반응시켰다. 이 현탁액의 반응이 끝난 후 2,000 × g로 20분간 원심분리하여 그 상층액을 분리시켜 0.45 μm와 0.20 μm syringe filter(Axygen)로 여과하여 사용할 때까지 -20°C에 보관한다.

**E-SCREEN assay** - MCF7-BUS cell을 이용한 E-SCREEN assay는 Perez 등<sup>11)</sup>의 논문에 의해 실험하였다. 계대 중인 세포를 0.05% 트립신-0.53 mM EDTA · 4Na용액(Gibco)으로 기기부착면으로부터 탈리시킨 후에 5% FBS가 함유되어 있는 DMEM으로 현탁시켜 24 well plate에 각 well 당 세포수가 10,000 cell이 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 바닥에 부착시켰다. 24시간 정도 세포를 부착시킨 후 배양액은 phenol-red가 없는 DMEM으로 2번 씻은 후 10% CDFBS가 함유되어 있는 phenol red가 없는 DMEM으로 교체시켜 시험용액을 처리하였다. 144시간동안 시험물질에 노출시킨 후 SRB방법에 의해 세포성장을 측정하였다. 먼저 배양액을 제거하고, PBS로 2번 씻은 후 10% trichloroacetic acid(TCA)를 500 μl씩 가하여 4°C에서 30분간 방치하여 세포들을 plate의 바닥면에 고정시켰다. 세포고정이 끝난 후에 plate를 증류수로 5~6회 세척하여 남아있는 TCA용액을 완전히 제거하고 실온

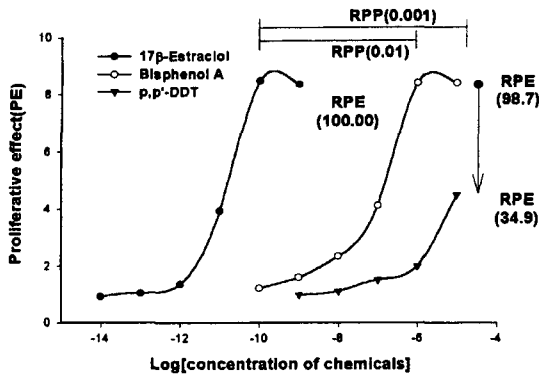


Fig. 1 – Schematic representation of the dose response curve to E<sub>2</sub>, bisphenol A and p,p'-DDT. RPE(%) : Relative proliferative potency, RPE(%) : Relative proliferative effect =  $100 \times (PE_{\text{chemical}} - 1) / (PE_{E_2} - 1)$ .

에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 well당 300  $\mu$ l의 1% 초산용액에 0.4% SRB용액을 녹인 염색액을 가하여 15분간 세포를 염색한 후, 다시 1% 초산으로 5~6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 과량의 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 cell plate들을 다시 실온에서 건조한 후, well당 1ml의 10 mM tris base (pH 10.5)용액을 가하여 염색액을 용출시켜 microplate reader(Multiscan MCC/340 Pversion 2.3, Labsystems, Finland)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**에스트로겐 효과의 정량적 평가** – 에스트로겐 효과를 정량적으로 평가하기 위해 양성대조군인 17 $\beta$ -estradiol과 상대비교를 하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 17 $\beta$ -estradiol에 의해 최대 세포증식을 나타내는 최소 농도를 기준으로 하여 시험물질에 의해 최대 세포증식을 나타내는 최소 농도와의 상대 비교를 백분율 환산한 세포증식 효력 상대비(relative proliferative potency, RPP)와 17 $\beta$ -estradiol에 의한 최대 세포증식상태의 세포수에 대한 시험물질에 의한 최대 세포증식상태의 세포수를 백분율로 환산한 세포증식 효과 상대비(relative proliferative effect, RPE)를 구하여 비교하는 방법을 사용하였다.

**데이터 분석** – 각 데이터는 1회 시험에서 각 농도당 4개 well로 3회 단독 시험한 결과이다. 모든 수치는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였다. 본 실험의 유의성 검정은 Student's t-test로 실시하였으며, p<0.05일 때 유의적인 차이를 인정하였다.

## 실험결과 및 고찰

**17 $\beta$ -Estradiol에 의한 MCF7-BUS 세포의 증식** – 사람 유방암세포인 MCF-7세포가 에스트로겐에 의해 성장이 촉진되는 효과를 이용한 E-SCREEN assay는 *in vivo* 시험인 자궁증식 및 에스트로겐 수용체에 대한 상대적 결합 친화성과 상관성이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 노출시킨 화학물질에 의한 세포증식을 실험함으로써 에스트로겐 작용이 있는 물질을 검색하기에 적합하다고 한다.<sup>1,9)</sup>

본 시험에서는 MCF7 세포의 민감도를 향상시킨 MCF7-BUS 세포를 Dr. Soto로부터 제공받아 E-SCREEN assay에 이용하였다. 우선 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>)를 농도별로 MCF7-ATCC 세포와 MCF7-BUS 세포에 투여한 후 세포 증식을 관찰하여 민감도를 비교하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 두 종류의 세포 모두 농도 의존적인 세포증식을 나타내어 10<sup>-10</sup> M 농도 이후에 최고 증식을 나타내었고 이때 MCF7-BUS 세포가 MCF7-ATCC 세포에 비해 약 4 배 이상의 증식을 나타내어 MCF7-BUS 세포가 에스트로겐 작용에 대해 매우 민감함을 알 수 있었다. 또한 MCF7-BUS 세포가 MCF7-ATCC 세포보다 세포 성장속도가 빠르며 재현성이 높은 결과를 얻을 수 있어 신속, 민감하면서도 정확한 결과를 얻는데 적당함을 알 수 있었다.

17 $\beta$ -Estradiol을 농도별로 MCF7-BUS 세포에 투여한 후 배양시간에 따른 세포 증식패턴을 관찰한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 배양 후 6일에 관

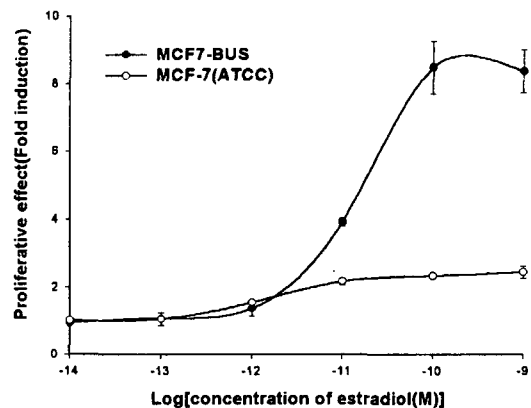


Fig. 2 – Comparison of cell proliferation of MCF7-BUS and MCF-7 cell.

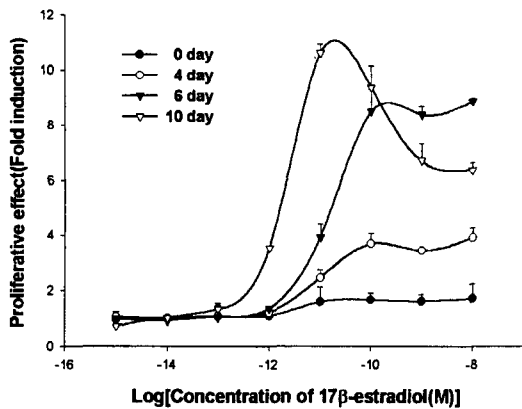


Fig. 3 - Dose-response curves of E-SCREEN assay for 17β-estradiol.

찰한 세포 성장이 농도 증가에 따라 현저한 차이를 나타내었으며 배양 후 10일 후 시료에서는 고농도에서의 세포사망으로 인하여 오히려 세포 증식이 감소되는 것으로 측정되었다. 따라서 배양 후 6일째에 세포 증식을 측정하는 것이 가장 적당한 것으로 나타났다.

**E-SCREEN assay에 의한 에스트로겐 효과 탐색** - 현재 내분비계 장애작용이 추정되고 있는 수종의 phenol화합물과 농약류에 대하여 E-SCREEN assay를 이용하여 에스트로겐 효과를 측정하였다.

**Phenol 화합물의 에스트로겐 효과** - Alkylphenol 중 bisphenol A와 nonylphenol은 자궁증식을 유도하여 에스트로겐 작용이 있다고 추정되고 있는 물질로 Fig. 4에서 보는 바와 같이 각 물질에 대해 E-SCREEN assay를 한 결과 MCF7-BUS cell의 높은 증식을 보였다. 이러한 효과를 RPP 및 RPE값을 이용하여 정량적으로 평가한 결과 두 물질 모두 10<sup>-6</sup> M에서 최대의 효과를 보였으며, RPP는 0.01%, RPE는 각각 98.91±1.31% 및 94.91±7.47%로 나타나, 각 물질의 RPE값을 양성대조군인 17β-estradiol과 비교해 보았을 때 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 또한 chlorophenol 화합물에 대해 실험한 결과 parachlorophenol, dichlorophenol 및 pentachlorophenol의 경우 각각 RPP 0.01% 즉 최고 효과농도가 10<sup>-6</sup>M에서 RPE값이 1.80±0.05%, 9.52±0.20% 및 14.49±0.79%로 나타났는데 염소수가 증가할수록 그 에스트로겐 효과가 증가되는 것으로 관찰되었다.

**농약류의 에스트로겐 효과** - 유기염소계 농약은 대사

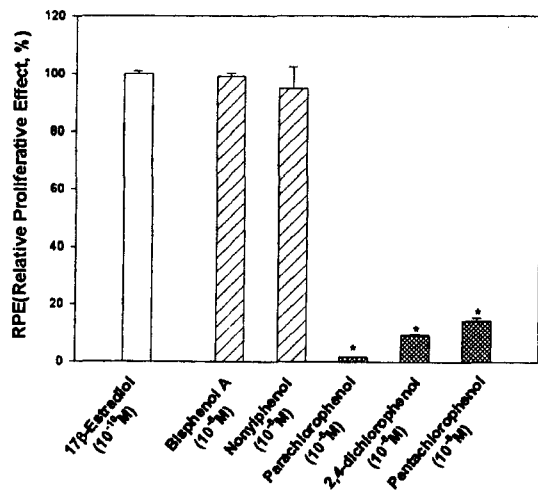


Fig. 4 - Estrogenic effect of phenol compounds by E-SCREEN assay. All samples were dissolved in ethanol and 1 μl of this solution were added to the cell culture medium (1 mL) for treatment, that were done in 24-well plates and lasted 144 hrs. The data represent means of three independent. Statistically different from the corresponding 17β-estradiol group (\*p<0.05).

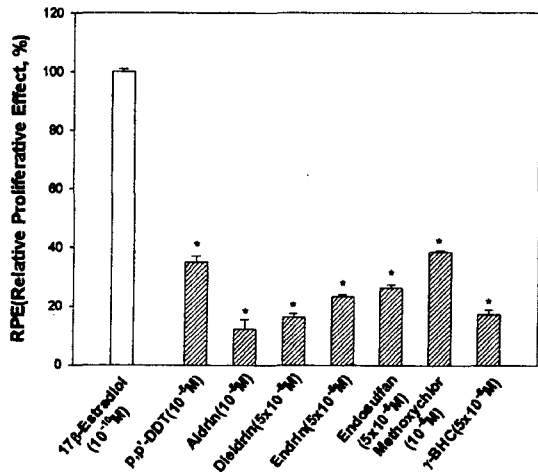


Fig. 5 - Estrogenic effect of organochlorine pesticides by E-SCREEN assay. All samples were dissolved in ethanol and 1 μl of this solution were added to the cell culture medium (1 mL) for treatments, that were done in 24-well plates and lasted 144 hrs. The data represent means of three independent experiment. Statistically different from the corresponding 17β-estradiol group (\*p<0.05).

가 느리고 지방조직의 축적이 많이 보고되어 있어 관심 대상이 되고 있으며, 이 중 내분비계 장애물질로

분류되고 있는 *p,p'*-DDT, aldrin, dieldrin, endrin, endosulfan, methoxychlor 및  $\gamma$ -BHC에 대하여 E-SCREEN assay를 수행하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 RPE값이 각각  $34.94 \pm 2.34\%$ ,  $12.36 \pm 3.34\%$ ,  $16.36 \pm 1.20\%$ ,  $23.52 \pm 0.92\%$ ,  $26.36 \pm 1.37\%$ ,  $38.66 \pm 0.33\%$  및  $17.41 \pm 1.69\%$ 로 나타났다. 대체적으로 이러한 효과는  $10^{-6}$  M에서  $10^{-5}$  M의 높은 농도에서 나타났는데 각각의 RPP값은 aldrin, endrin, endosulfan 및  $\gamma$ -BHC의 경우에는 0.002%, *p,p'*-DDT, methoxychlor의 경우에는 0.001%로 나타났다. Aldrin의 대사물질인 dieldrin은 RPE가  $16.36 \pm 1.20\%$ 로 두 물질의 에스트로겐 효과는 유사하였으나, RPP값의 경우에는 Aldrin과 dieldrin 각각  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M에서 최대효과를 나타내 RPP값이 0.001%, 0.002%로 2배정도 차이가 나타났다. 따라서 dieldrin이 aldrin에 비해 에스트로겐 효과가 약간 더 높은 것으로 평가되었다.

대표적인 s-triazine계 제초제 중 미국에서 널리 쓰이고 있는 atrazine은 female rat에서 mammary tumor를 형성하고 다양한 uterine response를 보이는 것으로 알려져 있으며 내분비 장애물질로 구분되어져 있다.<sup>12-14)</sup> 현재 국내에서 atrazine 대신 사용되고 있는 제초제인

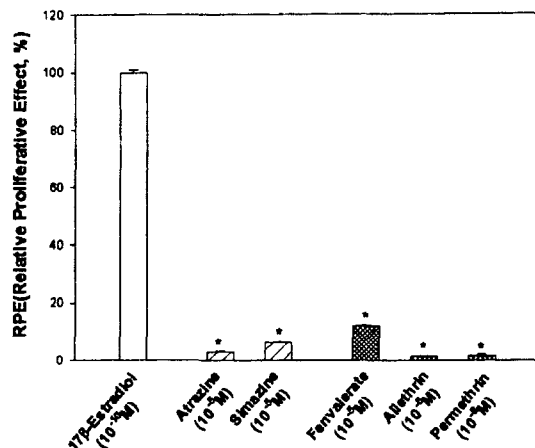


Fig. 6 - Estrogenic effect of s-triazine herbicides and pyrethroid insecticides by E-SCREEN assay. All samples were dissolved in ethanol and  $1 \mu\text{L}$  of this solution were added to the cell culture medium (1 mL) for treatments, that were done in 24 well plates and lasted 144 hrs. The data represent means of three independent experiment. Statistically different from the corresponding  $17\beta$ -estradiol group (\* $p < 0.05$ ).

simazine의 경우에는 atrazine과 그 구조가 유사한 물질로 일본 후생성에서만 내분비 장애물질로 분류하고 있다. 따라서 이들 두 물질에 대해 E-SCREEN assay를 수행하여 에스트로겐 효과가 나타나는지에 대하여 실험하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 atrazine과 simazine의 RPP는 모두 0.001%로 나타났으며, RPE값은 각각  $2.90 \pm 0.15\%$ 와  $6.31 \pm 0.17\%$ 로 나타났다.

합성 pyrethroid계 살충제 중에서 일반적으로 널리 사용되고 있는 물질로는 야채·과일류에 사용되는 fenvalerate, 모기향의 성분인 allethrin 및 바퀴벌레 spray의 성분인 permethrin이다. 이들 물질 모두 WWF 및 일본 후생성에서 모두 내분비 장애물질로 구분되어 있으며 현재 Go 등<sup>15)</sup> 및 Garey 등<sup>16)</sup>에 의해 에스트로겐 효과에 대하여 연구되었다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 fenvalerate, permethrin 및 allethrin에 대해 E-SCREEN assay한 결과 RPE값은 각각  $11.87 \pm 0.19\%$ ,  $1.31 \pm 0.30\%$  및  $1.52 \pm 0.48\%$ 로 나타났으며 RPP값은 fenvalerate는 0.001%, permethrin과 allethrin은 0.01%로 나타났다.

**E-SCREEN assay에 의한 정량적 평가** - E-SCREEN assay에 대한 결과를 Soto 등<sup>1)</sup>은 세포증식 효력 상대비(relative proliferative potency, RPP)와 세포증식 효과 상대비(relative proliferative effect, RPE)라는 방법을 통해 정량화하였는데 이러한 E-SCREEN assay를 이용하여 에스트로겐 작용을 하는 화학물질에 대한 평가에 있어 동일 세포일지라도 실험실 조건에 따라 그 반응정도가 다르게 나타난다. Soto 등<sup>1)</sup>의 경우에는 RPE값이  $17\beta$ -estradiol의 효과가 비슷하면 full agonist효과, 이에 비해 RPE값이 유의적으로 낮아지면 partial agonist효과를 지니는 물질로 구분하였는데, 대체적으로 RPE값이 70이상이면 full agonist효과, 70~25이면 partial agonist효과, 25이하이면 no effect로 구분하고 있다. 그러나 본 연구에서는 Table I에서 보는 바와 같이 human serum대신에 fetal bovine serum(FBS)을, 12 well-plates 대신에 24 well-plates를 사용하였고 세포 증식은 Coulter counter를 이용한 nuclei count대신 세포의 단백을 염색하여 측정하는 SRB 방법으로 하는 등 Soto 등<sup>1)</sup>이 사용한 방법을 약간 변형하여 사용함에 따라 이에 대한 비교 평가가 요구되었다.

Soto 등<sup>1)</sup>의 결과와 본 실험결과를 비교한 결과

Table I – Comparison of test condition of E-SCREEN assay

	Soto <i>et al.</i> (1995)	Our lab.
Test medium(Serum)	Human serum	Fetal bovine serum
Test plate	12-well plates	24-well plates
Cell proliferation measurement	Counting the nuclei (Coulter Counter Apparatus)	Protein staining (ELISA READER)

Table II – Comparison of relative potencies of several xenoestrogen derived from E-SCREEN assay

Compound	Soto <i>et al.</i> (1995)			Our lab.		
	Conc. <sup>1)</sup>	RPP (%)	RPE (%)	Conc.	RPP (%)	RPE (%)
17-Estradiol	10 <sup>-11</sup> M	100	100.00	10 <sup>-10</sup> M	100	100.00
Nonylphenol A	10 <sup>-6</sup> M	0.0010	100.00	10 <sup>-6</sup> M	0.010	94.91
p,p'-DDT	10 <sup>-5</sup> M	0.0001	71.00	10 <sup>-5</sup> M	0.001	34.94
Dieldrin	10 <sup>-5</sup> M	0.0001	54.89	510 <sup>-6</sup> M	0.002	16.36
Aldrin	-	-	-	10 <sup>-5</sup> M	0.010	12.36
Atrazine	-	-	-	10 <sup>-5</sup> M	0.001	2.90
Simazine	-	-	-	10 <sup>-5</sup> M	0.001	6.31

<sup>1)</sup>Conc. : Maximum responsive concentration  
- : No data

Table II에서 보는 바와 같이 E-SCREEN assay에 의해 에스트로젠 반응성을 나타내는 대표적인 물질인 nonylphenol A, p,p'-DDT 및 dieldrin과 에스트로젠 반응성이 나타나지 않는 atrazine 및 simazine에 대한 실험 결과를 Soto 등<sup>1)</sup>의 결과와 비교하였을 때 full agonist 물질인 nonylphenol A의 경우에는 비슷한 RPE값을 보였으나, partial agonist 물질인 p,p'-DDT 및 dieldrin의 경우에는 본 실험에서 RPE값이 2~3배 정도 낮게 나타나는 것으로 나타나 시험법의 변형에

따른 차이가 있는 것으로 나타났다. 본 실험에서는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 17β-estradiol에 대한 RPE값과의 student t-test결과 p<0.05이하의 유의적인 차이가 보이는 부분을 기준으로 partial과 full agonist를 구분하였다. No effect의 구분을 하기 위한 경계를 정하기는 어려움이 있으나, Soto 등<sup>1)</sup>이 no effect로 규정한 atrazine 및 simazine의 경우가 2.90% 및 6.31%의 낮은 RPE값을 나타내었으며 17β-estradiol의 용량 반응곡선 Fig. 2에서 보는 바와 같이 반응을 나타내는 최소 한계농도인 10<sup>-12</sup> M에서 RPE값이 7.44±0.66%를 고려하여 본 실험에서는 RPE값 8이하를 no effect level로 정하였다.

이상과 같이 총 17개의 화학물질에 대하여 E-SCREEN assay를 수행한 결과를 Table III에 정리하였다. Bisphenol A, nonylphenol, pentachlorophenol, 2,4-dichlorophenol, p,p'-DDT, aldrin, dieldrin, endrin, endosulfan, methoxychlor, γ-BHC, 및 fenvalerate는 xenoestrogen으로 평가되었으며, parachlorophenol, atrazine, simazine, allethrin 및 permethrin은 xenoestrogen이 아닌 것으로 평가되었다. Xenoestrogen으로 평가된 화학물질 중에 bisphenol A와 nonylphenol은 full agonist, p,p'-DDT, endrin, endosulfan 및 methoxychlor는 강한 partial agonist로 나타났으며, 2,4-chlorophenol, pentachlorophenol, aldrin, dieldrin, γ-

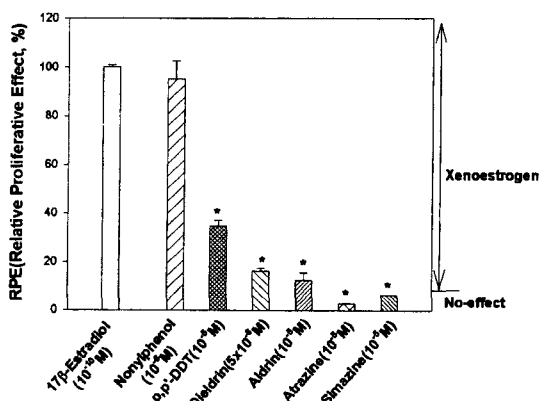


Fig. 7 – Assessment of xenoestrogen using E-SCREEN assay. Statistically different from the corresponding 17β-estradiol group (\*p<0.05).

Table III – Evaluation of xenoestrogen by the E-SCREEN assay

Xenoestrogen		Nonxenoestrogen	
Compounds	RPE*, %	Compounds	RPE, %
	17 $\beta$ -Estradiol		100.00
Phenol compounds	Bisphenol A	Parachlorophenol	1.80
	Nonylphenol		
	Pentachlorophenol		
	2,4-Dichlorophenol		
s-Triazine (Herbicides)		Atrazine	2.90
		Simazine	6.31
Organochlorine (Pesticides)	p,p'-DDT		
	Aldrin		
	Dieldrin		
	Endrin		
	Endosulfan		
	Methoxychlor		
	$\gamma$ -BHC		
Pyrethroids (Insecticides)	Fenvalerate	Allethrin	1.31
		Permethrin	1.52

\*RPE : Relative proliferation effect

BHC 및 fenvalerate는 약한 partial agonist로 평가되었다.

한 partial agonist로 나타났으며, 2,4-chlorophenol, pentachlorophenol, aldrin, dieldrin,  $\gamma$ -BHC 및 fenvalerate은 약한 partial agonist로 나타났다.

## 결 론

내분비계 장애물질 검색 시스템을 확립하기 위해 MCF7-BUS세포의 반응성을 검토하고 최적화하여 페놀화합물, 농약류 등 총 17개 화학물질에 대한 검색을 하였다. 또한 정량적 평가를 위해 Soto 등<sup>1)</sup>의 방법과 비교하여 에스트로겐 효과를 full agonist, partial agonist 및 no-effect로 구분하였다. Soto 등<sup>1)</sup>의 방법을 개량한 결과 full agonist에 의한 반응성은 유사하였으나, partial agonist 및 no-effect에 의한 반응성은 저하되어 partial agonist의 경계는  $10^{-10}$ M의 17 $\beta$ -estradiol에 대하여 student t-test결과  $p < 0.05$ 이하의 유의적인 차이가 보이는 부분으로 하였으며, no-effect의 경계는 17 $\beta$ -estradiol의 세포증식에 대한 최소한계농도인  $10^{-12}$  M의 RPE값을 고려하여 RPE값 8 이하로 하였다.

그 결과 bisphenol A와 nonylphenol은 full agonist, p,p'-DDT, endrin, endosulfan 및 methoxychlor는 강

## 문 헌

- 1) Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez M. F., Olea, N. and Serrano, F. O. : The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* **103**(Suppl 7), 113 (1995).
- 2) Colborn, T., vom Saal, F. and Soto, A. M. : Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* **101**, 378 (1993).
- 3) Waller, A. M., Minor, D. L. and Mckinney, J. D. : Using three-dimensional quantitative structure-activity relationships to examine estrogen receptor binding affinities of polychlorinated hydroxybiphenyls. *Environ. Health Perspect.* **103**, 702 (1995).
- 4) Hileman, B. : Concerns broaden over chlorine and chlorinated hydrocarbons. *Chem. Eng. News* **71** 11

- (1993).
- 5) Hileman, B. : Environmental estrogens linked to reproductive abnormalities, cancer. *Chem. Eng. News* **72**, 19 (1994).
  - 6) Blom, A., Ekman, E., Johannisson, A., Norrgren, L. and Pesonen, M : Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **34**, 306 (1998).
  - 7) Soto, A. M., Justicia, H., Wray, J. W. and Sonnenschein, C. : p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.* **92**, 167 (1991).
  - 8) Zacharewski, T. : Identification and assessment of endocrine disruptors: Limitations of in vivo and in vitro assays. *Environ. Health Perspect.* **106**(2), 577 (1998).
  - 9) Nagel, S. C., Saal, F. S., Thayer, K. A., Dhar, M. G., Boechler, M. and Welshons, W. V. : Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ. Health Perspect.* **105**, 70 (1997).
  - 10) Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Serrano, F. O., Rivas, A., Fertil, A. N., Pedraza, V., Soto, A. M., and Sonnenschein, C. : Estrogenicity of resinbased composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* **104**(3), 298 (1996).
  - 11) Perez, P., Pulgar, R., Serrano, F. O., Villalobos, M., Rivas, A., Metzler, M., Pedraza, V., and Olea, N. : The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ. Health Perspect.* **106**(3), 167 (1998).
  - 12) Wetzel, L. T., Luempert, L. G., Breckenridge, C. B., Trisdel, M. O., Stevens, J. T., Thakur, A. J., Extrom, P. C., and Elderidge, J. C. : Chronic effects of atrazine on estrus and mammary formation in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health* **43**, 169 (1994).
  - 13) Stevens, J. T., Breckenridge C. B., Wetzel L. T., Gillis, J. H., Luempert, L. G., III, and Elderidge, J. C. : Hypothesis for mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats exposed to certain triazine herbicides. *J. Toxicol. Environ. Health* **43**, 139 (1994).
  - 14) Tennant, M. K., Hill, D. S., Elderidge, J. C., Wetzel, L. T., Breckenridge, C. B., and Steven, J. T. : Possible antiestrogenic properties of chloro-S-triazines in rat uterus. *J. Toxicol. Environ. Health* **43**, 183 (1994).
  - 15) Go, V., Garey, J., Wolff, M. S., and Pogo, B. G. T. : Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ. Health Perspect.* **107**, 173 (1999).
  - 16) Garey, J. and Wolff, M. S. : Estrogenic and antiestrogenic activities of pyrethroid insecticides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 855 (1998).