

## Phenoxy계 화합물의 내분비장애작용 검색 및 기전연구

김현정<sup>1</sup> · 김원대<sup>1</sup> · 권택현<sup>1</sup> · 김동현<sup>2</sup> · 박영인<sup>1</sup> · 동미숙<sup>1\*μ</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 생명공학원, <sup>2</sup>한국과학기술연구원 생체대사연구센터

## Mechanism of Phenoxy Compounds as an Endocrine Disruptor

Hyun-Chung Kim<sup>1</sup>, Won-Dai Kim<sup>1</sup>, Taik-Hun Kwon<sup>1</sup>, Dong-Hyun Kim<sup>1</sup>,  
Yong In Park<sup>1</sup> and Mi-Sook Dong<sup>1\*μ</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Toxicology

<sup>2</sup>Graduate School of Biotechnology, Korea University,  
Bioanalysis and Biotransformation Research Center, KIST

(Received September 3, 2002)

(Accepted September 27, 2002)

**ABSTRACT :** Phenoxoy compounds, 2,4-Dichlorophenol acetoxy acid (2,4-D) and 2,4-dichlorophenol (DCP), are widely used as a hormonal herbicide and intermediate for pesticide manufacturing, respectively. In order to assess the potential of these compounds as endocrine disruptors, we studied the androgenicity of them using in vivo and in vitro androgenicity assay system. Administration of 2,4-D (50 mg/kg/day, p.o.) or DCP (100 mg/kg/day, p.o.) to rats caused an increase in the tissue weight of ventral prostate, Cowpers gland and glands penis. These increase of androgen-dependent tissues were additively potentiated when rats were simultaneously treated with low dose of testosterone (1 g/kg, s.c.). 2,4-D increased about 350% of the luciferase activity in the PC cells transiently cotransfected phAR and pMMTV-Luc at concentration of 10<sup>-9</sup> M. In 2,4-D or DCP-treated castrated rats, testosterone 6β-hydroxylase activity was not significantly modulated even when rats were co-treated with testosterone. In vitro incubation of 2,4-D and DCP with microsomes at 50 μM inhibited testosterone 6β-hydroxylase activity about 27% and 66% in rat liver microsomes, about 44% and 54% in human liver microsomes and about 50% and 45% in recombinant CYP3A4 system, respectively. The amounts of total testosterone metabolites were reduced about 33% and 75% in rat liver microsomes, 69% and 73% in human liver microsomes and 54% and 64% in recombinant CYP3A4 by 2,4-D or DCP, respectively. Therefore, the additive androgenic effect of 2,4-D or DCP by the co-administration of the low dose of testosterone may be due to the increased plasma level of testosterone by inhibiting the cytochrome P450-mediated metabolism of testosterone. These results collectively suggested that 2,4-D and DCP may act as androgenic endocrine disruptor by binding to the androgen receptor as well as by inhibiting the metabolism of testosterone.

**Key Words :** 2,4-Dichlorophenol acetoxy acid, 2,4-dichlorophenol, Endocrine disruptor, Androgenicity, Testosterone 6β-hydroxylase

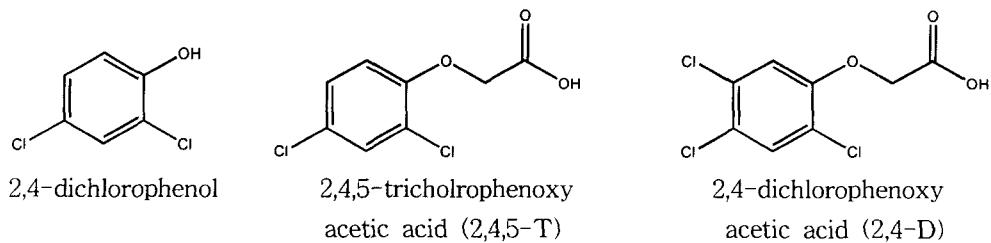
### I. 서 론

산업 발달에 따라 살충제를 비롯한 농약 등 합성화학물질 사용의 증가로 심각한 환경오염과 성호르몬의 고유한 기능과 비슷한 작용을 하는 내분비계 장애물질의 문제가 전세계적으로 표면화되고 있다. 환경오염물질에 노출된 물고기, 야생동물 및 사람에서 여러 형태의 내분비계 장애가 야기되었다는 많은 보고가 있으며, 이러한 내분비계 장애

물질에 대한 지속적인 사용에 대한 많은 논란이 되고 있다(Sonnenschein과 Soto, 1998; Kelce 등, 1997; Mylchreest 등, 1998).

내분비계 장애물질의 많은 경우가 우리 주변에서 사용되는 물질로써 자연 상태에서는 잘 분해되지 않고 또한 지용성이어서 대기나 토양, 식품 등 다양한 경로를 통하여 체내로 유입되고 있다(Ashby 등, 1997). 현재까지 내분비계 장애를 일으키거나 일으킬 가능성이 있는 물질은 약 100여종이 넘는 것으로 추정되고 있으며, 그 예로 유기인 제 살충제(DDT 및 그 유도체, endosulfan, toxaphene, β-

\*To whom correspondence should be addressed



**Fig. 1.** Chemical structures of phenoxy compounds.

HCH, dieldrin 등), polychlorinated biphenyl(PCBs), 다이옥신류(TCDD 및 TCDFs), phenoxy 계(2,4-D, 2,4,5-T, DCP), bisphenol A(폴리카보네이트 및 epoxy resin 생산 공장에서 주로 사용), alkylphenol류, vinclozolin, tributyl tin(TBT), 몇몇 phthalates류, phytoestrogen 등을 들 수 있다(Tyler 등, 1998).

2,4-D, 2,4,5-T 및 2,4-dichlorophenol(DCP)(Fig. 1) 등 phenoxy 계 물질들은 주로 제초제나 중간 합성체로서 사용되는 물질이다. 이들 중 2,4,5-T는 독성이 강해 현재는 국내에서 사용이 금지되었으며, 이는 2,4-D와 1 : 1로 혼합되어 Agent Orange란 이름으로 1960년대 초 월남전에서 고엽제로 사용되어 현재 베트남에서 기형아 출산의 원인으로 보이는 dioxin을 방출하는 물질로 의심을 받는 성분의 하나인 phenoxy계 제초제이다(Michalek 등, 1998; Schecter 등, 1996; Wolfe 등, 1995). 2,4-D는 상대적으로 값싸고 효과도 좋아 주로 벼, 옥수수, 배류 및 잔디 등의 제초제로 1940년대 이후 세계적으로 널리 사용되고 있으며, 2,4,5-T 외는 달리 TCDD와 같은 dioxin을 생성하지 않으며 발암성도 없는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 제초제의 사용은 직접 또는 간접적으로 곡물의 생산량은 증가시키기는 하나 곡류 뿐 아니라 토양, 지표수 등에도 축적될 수 있으며, 특히 물리적, 화학적 그리고 생물학적 과정을 통하여 한 가지 이상의 변형 산물을 형성할 수 있으며 그 중 일부는 원래 물질보다도 더 독성이 강하거나 오랜 기간동안 환경에 존재할 수 있다고 보고되었다 (Marchese 등, 2002). DCP는 여러 염료 및 제초제의 합성 중간체나 2,4-D의 생산, 살균제나 소독제, 촘약 등으로 사용되고 있으며(김, 1996), 2,4-D의 분해산물로서 토양 중에서 검출되기도 하며, 정수과정에서 폐물을 함유한 하천 수를 염소처리 할 경우 염소이온과 반응하여서도 생성이 될 수 있다고 보고되어 있다(WHO, 1989).

2,4-D는 합성 auxin (식물성장호르몬)으로서 고농도에서는 식물의 성장을 조절할 수 없게 하여 제초작용을 하는 것으로 보고되었다(Di Paolo 등, 2001). 2,4-D에 노출된 남성에서 정액량, 정자 수, 운동성 및 형태학적 분석을 실시하였을 때 정자무력증(asthenospermia), 정자사멸증 (necrospermia), 기형정자증(teratospermia)의 비율이 대조군에

비하여 유의적으로 높다고 보고되어 있다(Lerda와 Rizzi, 1991). 암수 rat에 2,4-D를 투여하였을 때 수컷에서는 혈청 중의 T3 농도와 정소중량이 저하하였고, 암컷에서는 T3와 T4의 농도저하와 갑상선 중량이 증가하였다(Charles 등, 1996). 미국에서 1,000명의 성인 뇨 중에서 살충제를 분석한 결과 64%에서 DCP이 검출(최고 450 µg/l) 되었다(Hill 등, 1985). F344 rat의 임신 6~15일에 DCP를 0, 200, 500, 750 mg/kg 농도로 경구투여 했을 때 모든 치치군에서 모체의 체중 증가가 억제되었으며(Rodwell 등, 1989), Schechter 등(1996)은 Swiss male mouse에 2,4,5-T 0, 6.25, 12.5, 25 mg/kg/day를 10일간 경구투여하자 전립선에서의 testosterone의 축적이 감소되었다고 보고하였다.

이러한 phenoxy계 화합물의 내분비계에 대한 영향 연구 보고를 통하여 이들 물질이 thyroid hormone과 androgen hormone 계통의 내분비계를 교란시킬 수 있을 것으로 사료되었으나 현재까지 이들 물질이 내분비 장애물질로 구분은 되어 있으나 이에 대한 내분비 작용기전이 밝혀진 바가 없었다. 따라서 본 연구에서는 현재 사용되고 있는 phenoxy계 물질 중 2,4-D와 DCP의 내분비 장애물질로의 작용 및 기전을 *in vivo*와 *in vitro* 실험을 통하여 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

## 1. 시험물질

Sulforhodamine-B, dimethylsulfoxide(DMSO), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, 2,4-dichlorophenol, trizma base, D-glucose 6-phosphate,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, D-glucose 6-phosphate dehydrogenase 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. HPLC 분석 시 사용한 Methanol은 Fisher Scientific에서 구입하였다. 동물세포 발현 vector인 pcDNA3.1(+)는 Invitrogen사 제품(USA)을, pMSG vector는 Amersham Pharmacia Biotech사 제품(USA)을 사용하였다. Protein assay에 사용한 bредford 시약은 Bio-Rad사에서 구입하였다. RPMI 1640 배지와 phenol red free RPMI 1640 및

fetal bovine serum(FBS)는 Gibco BRL 사(USA)에서 구입하였다. 모든 제한효소들과 DNA중합효소는 Promega 사나 Boehringer Mannheim사에서 구입하였으며, androgen receptor antibody는 NeoMarkers사에서 구입하였다. [<sup>3</sup>H] dihydrotestosterone은 NEN사에서, cocktail solution은 packard 사에서 구입하였다. 기타 일반적으로 실험에 사용한 시약들은 일제 특급시약을 사용하였다.

## 2. 시험동물 및 세포주

Hershberger assay를 위한 시험동물은 5주된 (약 150~160 g)의 건강한 SPF Sprague-Dawley male rats를 대한 바이오링크에서 분양받아 고려대학교 생명공학원 동물사육실내에 설치된 animal chamber 내에서 1주일 동안 순화한 후 시험에 사용하였다. 동물은 물과 사료(purina)를 마음껏 먹게 하였으며, animal chamber는 온도 22±1°C, 습도 50±5% 및 12시간 밤과 낮의 cycle을 유시시켜 주었다.

사람의 전립선암에서 유래한 PC-3 세포주(CRL-1435)는 생명공학연구원 생물활성 평가연구실 cancer bank(Taejon, Korea)로부터 구입하였으며, RPMI 1640 배지(10% FBS, 10 mM N-2-hydroxy ethylpiperaquine-N-2-ethane sulfonic acid, 100 units/ml penicillin 및 100 mg/ml streptomycin)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다. 증식된 세포는 trypsin 용액(0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA 4Na)을 처리하여 계대 배양하였다.

## 3. Hershberger assay

Hershberger assay는 Hershberger 등(1953)의 방법에 따라 실시하였다. 6주령 SPF male Sprague-Dawley rat을 거세(고환 및 부고환을 제거)하고 2주간 회복시킨 후 각 군 당 6마리의 rat을 사용하여 vehicle, testosterone 1 µg/kg(피하투여), 2,4-D 50 mg/kg나 DCP 100 mg/kg(경구투여)을 단독으로 또는 testosterone과 2,4-D 또는 DCP를 동시에 10일간 매일 투여하였다. 마지막 시험물질 투여 후 24시간에 모든 동물을 투여순서와 동일한 순서로 마취시켜 희생시킨 후 생식부속장기(seminal vesicles, coagulating gland, ventral prostate, Levaror anibulbocavernous gland, glans penis, Cowper's gland)를 조심스럽게 적출하여 지방을 제거하고 무게를 측정하였다.

## 4. PC-3 세포증식시험

시험 하루 전에 시험에 사용될 세포의 배지를 교환하고, 실험 당일 세포가 들어있는 plate의 배지를 흡인 제거한 다음 PBS buffer로 1회 세정하였다. 0.25% trypsin 용액을

첨가하여 PC-3세포를 분리하고, 배지를 교환하여 세포 수를 측정하였다. 96 well plate에 1,500 cell/well로 분주하고 배양기에서 24시간 배양시킨 후, well에 들어 있는 배지를 흡인 제거하였다. Charcoal-dextran으로 혈청 중 함유된 세포증식인자를 제거한 FBS를 5% 함유한 RPMI1640 배지를 well에 넣고 시험물질의 농도를 조제하여 각 well에 첨가하였다. 시료가 첨가된 96 well plate를 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 48시간 배양하고, sulforhodamine-B(SRB) assay로 세포증식을 측정하였다.

## 5. Androgen receptor binding/transcriptional activation assay

### 가) Cloning of human androgen receptor(hAR) into expression vector

Androgen receptor를 PC-3 cell line에 overexpression시키기 위하여, mammalian expression vector인 pCDNA3.1(+) plasmid를 BamHI과 XbaI site 자른 후 androgen receptor cDNA를 cloning하였다(phAR).

### 나) Luciferase reporter plasmid construction

hAR과 결합한 내분비장애물질의 검출을 위하여 androgen과 glucocorticoid responsive mouse mammary tumor virus(MMTV)의 transcriptional control 하에 있는 luciferase gene을 함유하는 reporter plasmid를 제조하였다. Luciferase cDNA는 pGL3 basic vector로부터 sense primer 5'-ggatggatggacgcacaaaacataaa ag-3', antisense primer 5'-ttacacggcgatcttcgc-3'를 이용하여 PCR 방법으로 얻었으며, 이를 pMSG(Amersham Pharmacia Biotech사) vector의 SmaI site에 cloning하여 얻었다.

### 다) 세포내 hAR과 reporter plasmid 발현

human PC-3 androgen insensitive prostate cell 내에 hAR과 reporter plasmid를 calcium phosphate-DNA coprecipitation 방법(Tackray 등, 1998)에 따라 transfection하여 발현시켰다. 즉, 24 well culture plate로 세포를 분주하기 하루 전에 시험에 사용될 세포의 배지를 교환한 후 실험 당일에 세포가 들어있는 plate내의 배지를 제거하여 PBS buffer로 1회 세정한 후, trypsin을 처리하여 세포를 분리하였다. 세포의 밀도에 따라 일정량의 배지를 가한 후 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였다. 세포수는  $6 \times 10^4$  cells/well로 맞추어 일정량의 세포를 분주하였다. Plating된 세포는 5% CO<sub>2</sub>가 일정하게 유지되는 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, transfection하기 2시간 전에 fresh한 배지로 교환하였다. hAR과 reporter plasmid DNA는 calcium phosphate 법이나 lipofectamine

(Promega 사, USA)을 사용하여 PC-3 세포에 transfection 시켰다. Calcium phosphate 법은 hAR과 reporter plasmid DNA를 약 1  $\mu$ g으로 맞추어 CaCl<sub>2</sub> 용액과 섞은 후, 동량의 2×HBS에 air bubbling 하면서 한 방울씩 천천히 떨어뜨려 주었다. calcium phosphate와 DNA가 침전하여 뿌옇게 되도록 30분 동안 상온에 방치하였다가, 세포가 있는 plate에 천천히 떨어뜨려 주고, 4시간 동안 배양한 후 glycerol shock을 주었다. Lipofectamine 방법은 Promega 사의 manual에 따라 실시하였다. DNA 가 transfection된 세포는 2일간 배양되었고, hAR의 세포 내 발현은 western blot assay를 통해 확인하였다.

#### 라) Androgen receptor binding/transcriptional activation assay

Transfection된 세포를 2일간 배양한 후, well에 들어있는 배지를 제거하고, 시험용 배지인 5% Charcoal-dextran activated FBS을 포함하는 Phenol red free RPMI1640 배지를 각 well에 가하고 시험물질의 농도를 조제하여 각 농도별로 well에 첨가하였다. 시험물질 처리 24시간이 경과된 후 배양액을 제거하고 100  $\mu$ l lysis buffer를 골고루 첨가하여 세포를 용해 시켰다. Luciferase activity는 dual luciferase assay system(Promega사, USA)을 이용하여 생성된 luminescence를 측정하였다.

### 6. Phenoxy계 화합물을 의한 CYP3A4의 발현 및 활성도 변화 측정

Phenoxy계 화학 물질인 2,4-D(100 mg/kg)와 2,6-dichlorophenol(100 mg/kg)를 단독 또는 testosterone(1  $\mu$ g/kg)과 동시에 전처리한 거세한 male rat으로부터 간을 적출하여 differential centrifugation에 의하여 간 microsome 분획을 얻은 후 간 microsome에서의 testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation 활성도를 측정하였다.

2,4-D와 2,6-dichlorophenol이 직접 CYP3A4 활성도에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 rat microsome과 사람의

CYP3A4, NADPH-P450 reductase 및 사람의 cytochrome b<sub>5</sub>를 동시에 발현시킨 *E. coli* membrane system을 이용하여 testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation 활성도를 측정하였다.

Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase 활성도 측정법은 다음과 같다. 총 500  $\mu$ l 반응액에 0.2 mg protein의 rat microsome 또는 25 pmol CYP를 함유하는 *E. coli* membrane system에 NADPH generating system(NADP<sup>+</sup>, glucose 6-phosphate, glucose 6-phosphate dehydrogenase)과 0.2 mM testosterone을 첨가한 후 37°C shaking water bath에서 30분간 반응시켰다. 이때 phenoxy계 화합물을 의한 CYP3A4의 영향을 관찰하기 위하여 여러 농도(10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M)의 phenoxy계 화합물을 반응액에 함께 첨가한 후 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 ml를 첨가하여 1분간 vortexing 하여 대사물질을 extraction시킨 후, 5,000×g에서 10분간 원심 분리한 다음 저층의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 용액 0.8 ml를 취하여 전조시켰다. 대사물질은 50  $\mu$ l methanol(HPLC grade)에 용해시켜 그 중 20  $\mu$ l를 HPLC에 injection 하였다. 150×4.6 mm C18 YMC-Pack ODS (YMC Co. Ltd.) column에 acetonitril, methanol 및 중류수를 4.5 : 4.5 : 1로 섞은 용매 A와 DW를 용매 B를 gradient로 용매비율을 변형시키면서 유속을 분당 1 ml/min로 흘려 대사체를 분리하였고, PDA detector를 사용하여 254 nm 파장에서 측정하였다. 전체 testosterone 대사량 측정은 반응이 끝난 후 internal standard로 dexametason을 첨가하여 대사체를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 용액으로 추출한 후 대사체를 HPLC로 분석하여 나오는 여러 대사체들 생성량을 합하여 구하였다.

### III. 결 과

#### 1. Hershberger assay

거세한 rat에 10일간 corn oil이나 testosterone(1  $\mu$ g/kg)을 피하주사하고 동시에 물, 2,4-D(50 mg/kg)나 DCP(100 mg/kg)를 경구 투여한 후 생식부속장기를 적출하여 무게

**Table 1.** Effects of phenoxy compounds with or without testosterone on the organ weights in castrated rats

	Control	T	2,4-D	DCP	T + 2,4-D	T + DCP
VP <sup>a</sup>	7.66± 2.92	12.86± 1.55*	8.98± 3.49	14.46± 6.36	17.98± 4.59*** <sup>t</sup>	25.48± 5.88*** <sup>++</sup>
SV + CG	65.83±14.98	88.30±17.02*	81.62± 3.41*	88.62±14.68*	148.28±30.21*** <sup>++</sup>	142.82±15.23*** <sup>++</sup>
LA + BG	151.18±22.08	171.00± 7.99	164.70±26.12	144.03±10.67	239.70±14.94*** <sup>++</sup>	214.07±22.54*** <sup>++</sup>
GP	29.47± 3.87	30.18± 2.91	36.78± 6.40	41.53± 5.25*	51.50± 6.79*** <sup>++</sup>	50.63± 2.64*** <sup>++</sup>
CG	2.28± 0.94	2.73± 1.60	5.14± 1.08**	4.30± 1.36**	6.93± 2.85*** <sup>++</sup>	5.87± 1.22*** <sup>++</sup>

<sup>a</sup>VP, ventral prostate; SV + CG, seminal vesicles + coagulating gland; LA + BG, Lavator ani + bulbocavernous gland; GP, glans penis; and CG, Cowper's gland.

\*Significant difference at P > 0.05 level compared with the control group.

\*\*Significant difference at P > 0.01 level compared with the control group.

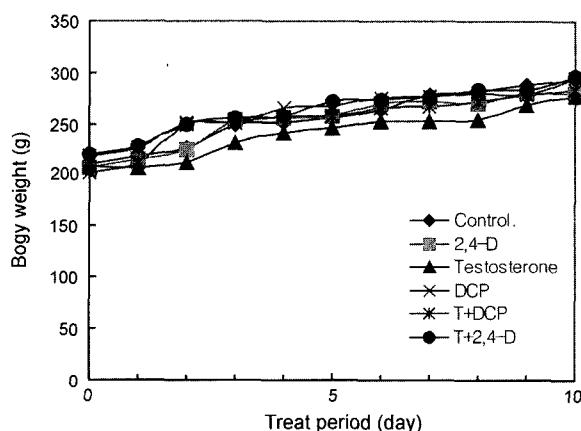
<sup>t</sup>Significant difference at P > 0.05 level compared with the testosterone treated group.

<sup>++</sup>Significant difference at P > 0.05 level compared with the testosterone treated group.

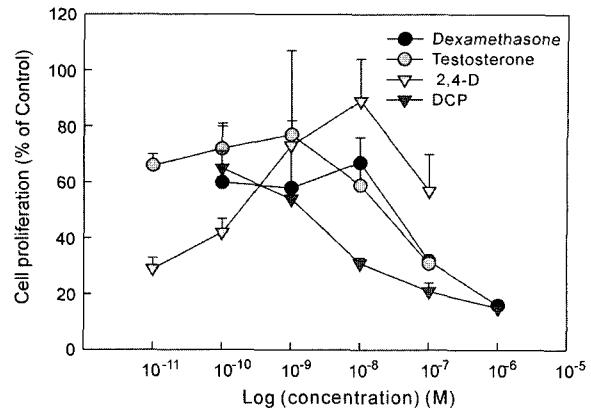
를 측정하였을 때, Table 1과 같은 결과를 나타내었다. 양성 대조 물질인 testosterone에 의해 glands penis와 Levaror anibulbocavernous gland의 무게는 증가되지 않았으나 ventral prostate, seminal vesicle, Cowpers gland 등의 생식 장기들의 무게는 각각 67%, 32%, 25% 정도 유의적으로 증가되었다. 그러나 사용한 testosterone 량이 너무 적어서(1 µg/kg) 다른 보고들보다는 증가량이 매우 작았다. 또한 Levator anibulbocavernous gland와 seminal vesicles, coagulating gland를 제외한 나머지 생식 장기들에서 2,4-D 와 DCP 단독 투여에 의하여 조직 무게가 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었으며, 2,4-D 보다는 DCP에 의하여 더욱 크게 증가되는 경향을 나타내었다. 2,4-D 와 DCP에 의한 생식부속장기들의 무게는 testosterone과 동시에 투여하였을 때 상가적으로 증가하였으며, 특히 ventral prostate의 경우에는 동시투여에 의하여 각각 그 무게가 235%와 333% 증가되었다. 그리고 ventral prostate와 glans penis의 경우에는 2,4-D 보다는 DCP에 의한 영향이 더욱 크게 나타났다. 한편, 약물에 의한 생식 부속장기들의 유의적인 무게 증가와는 달리, rat 자체의 몸무게는 약물투여 기간동안 대조군과 비슷한 증가를 나타내었다 (Fig. 2). 이상의 결과로 보아 2,4-D와 DCP는 *in vivo*에서 androgenic 효과를 나타내는 것을 알 수 있었으며 저농도의 testosterone 농도와 동시투여에 의하여 상가작용을 나타내는 것을 알 수 있었다.

## 2. 세포증식 시험

본 연구에서는 안드로겐 작용물질로서 알려져 있는 testosterone을 양성대조물질로서 사용하여 2,4-D와 DCP



**Fig. 2.** Effect of phenoxy compounds on the body weights during the treatment of them into castrated 6-week-old rats. Sprague-Dawley rats were treated an oral dose of vehicle, 2,4-D (50 mg/kg/day) or DCP (100 mg/kg/kda) together with sc injections of vehicle (corn oil) or testosterone (1 mg/kg/day) from 15 to 24 days after castration. Data represent means±SD (n = 6).



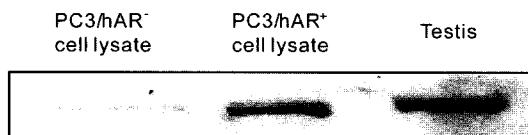
**Fig. 3.** Effect of the phenoxy chemicals on the growth of hormone-independent PC-3 prostate cancer cells. Cells were grown in phenol red free RPMI1640 containing 5% charcoal-dextran treated serum for 1 day before plating and were incubated for 48 h in the presence of various concentrations of dexamethasone, testosterone, 2,4-D and DCP.

그리고 pMMTV-Luc의 MMTV promoter를 유도하는데 사용되는 dexamethasone 등이 PC-3 세포의 증식에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 3에서와 같이 androgen receptor 가 발현되지 않는 PC-3 세포주에서 모든 처리군이 대조군에 비하여 그 증식속도가 매우 낮아졌으며, testosterone은 10<sup>-11</sup> M에서는 세포증식이 다소 낮으나 농도가 증가함에 따라 세포증식을 촉진하다가 10<sup>-8</sup> M부터는 세포증식이 크게 저해된 것으로 나타났다. Testosterone 군에서 보여준 것과 같은 세포증식 양상, 즉 저농도에서 세포증식이 저해되다가 농도 의존적으로 세포증식이 증가되고 다시 농도가 높아지면 세포증식이 크게 저해되는 현상은 DCP 군만 제외하고는 동일한 양상을 나타내었으나 DCP군의 경우에도 처리 농도를 더욱 낮춰주면 같은 양상을 나타낼 것으로 사료되었다.

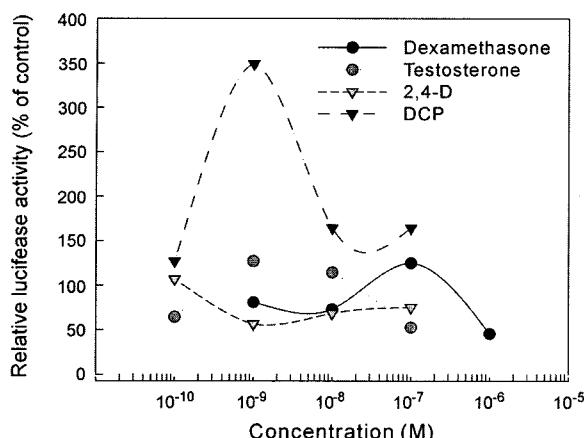
## 3. Androgen receptor binding/transcriptional activation assay

Human PC-3 androgen insensitive prostate 세포주에 hAR과 MMTV-luciferase reporter plasmid를 transfection 하여 동시에 발현시킨 후 hAR의 발현을 western blot으로 확인하였다(Fig. 4). Testis 균질액을 10,000×g로 원심분리하여 상등액을 사용하여 PC-3/hAR<sup>+</sup>에서 hAR의 발현을 PC-3 cell lysate와 비교하였을 때 testis 내에서의 발현이 가장 강하게 나타났으며, PC-3/hAR<sup>+</sup> cell lysate 내에서도 그 발현이 되었으나 두개의 band가 나타났으며, PC-3에서도 그 발현이 되었으나 두개의 band가 나타났으며, PC-3에서도 그 발현이 매우 낮게 나타났다.

화학물질들의 androgenicity를 측정하기 위하여 hAR과 reporter gene인 pMMTV-Luc을 함께 PC-3 세포에 trans-



**Fig. 4.** Western blot analysis of expression of hAR in PC-3 cells transiently co-transfected with phAR and pMMTV-Luc.

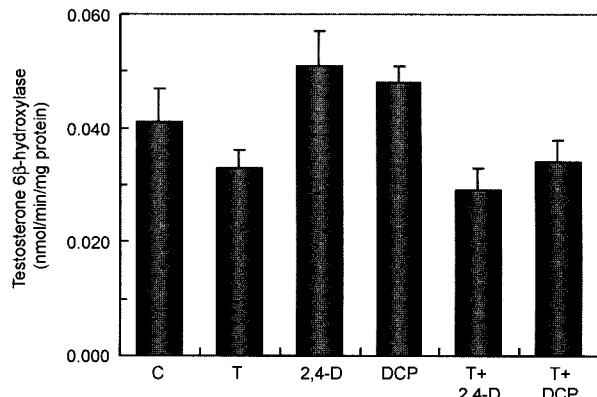


**Fig. 5.** The effect of chemicals on activation of luciferase in PC-3 Luc<sup>+</sup>/AR<sup>+</sup> cells.

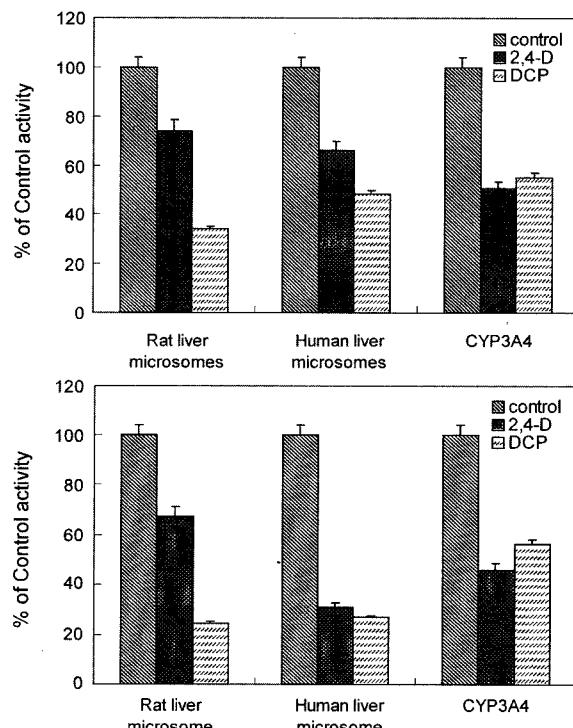
fection한 후 여러 농도의 시험물질을 처리하고 luciferase assay를 실시하였다. Dexamethasone과 2,4-D는 각 농도에서 약한 androgenicity를 보였고, DCP는 매우 강한 androgenicity를 나타내었다. 특히 1 nM의 농도에서는 다른 물질들의 약 3배에 가까운 증가를 보였다 (Fig. 5). 그러나 hAR을 함께 transfection 하기 않은 PC-3 세포를 사용한 system에서는 dexamethasone을 제외한 testosterone이나 2,4-D 및 DCP 처리에 의하여 luciferase 활성도가 측정되지 않았다(data not shown).

#### 4. Phenoxy계 화학물질에 의한 testosterone 대사 관련 CYP3A의 발현 및 활성도 측정

2,4-D와 DCP가 androgenicity를 나타내는 기전 연구를 위하여 먼저 2,4-D나 DCP 투여에 의하여 testosterone 대사에 관여하는 CYP3A 효소 활성도의 변화를 관찰하였다. 거세한 rat에 2,4-D, DCP를 단독으로 또는 testosterone 과 함께 투여한 rat으로부터 적출한 간 microsome 분획에서의 CYP3A의 활성도를 testosterone 6β-hydroxylation 정도로 측정하였다(Fig. 6). 저농도 testosterone 1 μg/kg 투여에 의하여 testosterone 6β-hydroxylation 활성도가 약 19% 정도가 감소되었으나, 2,4-D와 DCP 투여에 의하여 testosterone 6β-hydroxylase 활성도가 각각 24.5와 17%가 증가하였다. 그러나 testosterone과 2,4-D나 DCP를 동시에



**Fig. 6.** The effect of 2,4-D or DCP on the activity of testosterone 6β-hydroxylase in the hepatic microsome obtained from castrated rats co-treated with or without testosterone. Sprague-Dawley rats were treated an oral dose of vehicle, 2,4-D (50 mg/kg/day) or DCP (100 mg/kg/kda) together with sc injections of vehicle (corn oil) or testosterone (1 mg/kg/day) from 15 to 24 days after castration. Data represent means±SD ( $n=3$ ).



**Fig. 7.** The effect of 2,4-D or DCP on (A) testosterone 6β-hydroxylase activity and (B) the formation of total tetosterone metabolites in rat liver microsomes, human liver microsomes, and the membranes of *E. coli* coexpressed CYP3A4, NADPH-P450 reductase and cytochrome b<sub>5</sub>. Testosterone 6β-hydroxylase activity and the amount of total testosterone metabolites were determined by HPLC described in the section of materials and methods. Data represent mean±SD ( $n=3$ ).

투여하였을 때에는 2,4-D나 DCP에 의한 효소활성도 증가가 억제되는 경향을 나타내었다.

2,4-D나 DCP가 직접 testosterone  $\beta$ -hydroxylase 활성도 및 총 testosterone 대사체 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 rat liver microsome, 사람 liver microsome 및 사람의 CYP3A4, NADPH-P450 reductase 및 사람의 cytochrome  $b_5$ 를 동시에 발현시킨 *E. coli* membrane system을 이용하여 효소활성도를 측정하였다(Fig. 7A). rat liver microsome에서 testosterone는 주로  $6\beta$ -,  $16\alpha$ -,  $16\beta$ -hydroxy testosterone, androstendione이 주 대사체로 사람 간 microsome에서 약 75% 정도가  $6\beta$ -hydroxy testosterone, 약 7% 정도가 androstendione으로 대사되는 것과 대조를 이루었다. 또한 CYP3A4에 의하여 약 70% 정도가  $6\beta$ -hydroxy testosterone, 약 17% 정도가 androstendione으로 대사되었다(data not shown). 50  $\mu$ M의 2,4-D나 DCP를 처리하였을 때  $6\beta$ -hydroxy testosterone 생성량은 Fig. 7B에서와 같이 rat liver microsome에서 각각 27%와 66% 정도가 감소되었으며, human liver microsome에서는 각각 44% 52% 정도가 감소되었다. 그리고 recombinant CYP3A4에서는 각각 50%, 45%가 감소되었다. 전체 testosterone 대사량은 50  $\mu$ M의 2,4-D나 DCP에 의하여 rat liver microsome에서는 약 67%와 25% 수준으로 감소하였으며, 사람 microsome에서는 각각 31%, 27% 정도로 또한 recombinant CYP3A4에 의하여는 각각 46%, 56% 수준으로 감소되었다.

#### IV. 고 칠

내분비계 장애물질로 알려진 Phenoxy계 화학물질들인 2,4-D과 DCP는 남성 생식독성이나 갑상선 중량 증가(Lerda와 Rizzi, 1991; Charles 등, 1996; Schecter 등, 1996) 등에 대한 보고가 되었으나 그 작용 기전이나 내분비계 장애정도에 대한 연구 결과가 보고되어있지 않다. 2,4-D나 DCP를 거세한 rat에 투여한 Hershberger 시험에서 Fig. 1에서와 같이 ventral prostate, glans penis 및 Cowper's gland 등의 생식부속장기 중량이 대조군에 비하여 유의적으로 증가되어 이들 물질이 androgenic 내분비 장애물질로 작용할 수 있음을 나타내었다. 그리고 저농도의 testosterone(1  $\mu$ g/kg)을 동시에 처리하였을 때 생식부속장기 중량이 상가적으로 증가되는 양상이 나타나 이들 phenoxy계 화학물질이 androgen 유사 효과를 나타낼 것으로 추정되었다. 그러나 이들 물질에 의한 androgen 유사 작용이 고용량의 testosterone와 동시에 투여하였을 때도 나타날 것인가에 대한 것은 연구가 더 필요하였다.

내분비장애물질에 의한 androgenic 유사 효과가 나타날 수 있는 것은 물질 자체가 androgen receptor와 결합하여 androgenic 효과를 나타내는 hormone 유사작용에 의한 것과 호르몬의 합성을 크게 증가시키거나 대사를 저해시키

는 것 등의 다양한 작용에 의하여 나타날 수 있을 것이다. Phenoxy계 물질의 androgenic 유사 효과를 관찰하기 위하여 androgen receptor binding/transcriptional activation assay를 실시하였을 때 2,4-D에 의하여  $10^{-10}$  M 이하 저농도에서 androgenic 효과를 나타낼 것으로 사료되었으며, DCP에 의하여는  $10^{-9}$  M에서 최대로 나타나 약 350% 정도 luciferase 활성이 증가되어 2,4-D와 DCP가 androgen receptor가 매개된 androgenicity를 갖고 있는 것으로 생각되었다. 그러나 2,4-D와 DCP가 androgen receptor에 대하여 anti-androgenic 또는 androgenic 작용을 할 것인가에 대해서는 testosterone과 동시에 투여 또는 androgen receptor에 대해 친화력이 큰 것으로 알려진 dihydrotestosterone을 사용하여 2,4-D나 DCP와 동시에 또는 단독으로 처리하여 androgen receptor binding 및 androgen receptor binding/transcriptional activation assay가 더 요구되었다.

특히 testosterone과 동시에 투여 2,4-D와 DCP가 상가작용을 나타내는 기전을 testosterone의 생합성과 대사 관점에서 추론해 보면 2,4-D나 DCP에 의한 testosterone의 합성을 증가시키거나 대사를 저해함으로서 혈 중 testosterone량을 증가시킬 수 있을 것으로 사료되었다. testosterone의 대사는 cytochrome P450에 의하여 steroid ring이 hydroxylation 된 후 sulfate conjugation 또는 glucuronide conjugation 된 후 체외로 배설된다(Norman and Litwack, 1997). Testosterone의 주 대사체로 알려져 있는  $6\beta$ -hydroxy testosterone은 rat에서는 주로 CYP3A1과 CYP3A2, 사람에서는 CYP3A4에 의하여 전환된다(Kawai 등, 2000; Xu 등, 2001; Whalley 등, 2001). 본 실험에 사용한 사람의 microsome에서는 testosterone 대사가 70% 이상이 CYP3A4에 의하여  $6\beta$ -hydroxy testosterone으로 대사되는 것과는 대조적으로 rat에서  $6\beta$ -hydroxy testosterone으로 되는 량은 총대사량의 약 21% 정도 밖에 되지 않았다(data not shown). 따라서 DCP나 2,4-D가 CYP3A에 의하여 testosterone이  $6\beta$ -hydroxy testosterone으로 전환되는 것을 저해하는 것이 rat에서는 사람보다 영향이 적을 것으로 사료되었으며,  $6\beta$ -hydroxy testosterone 생성량의 측정 보다는 전체 대사체 생성량을 측정하는 것이 필요하였다. 2,4-D나 DCP에 의하여 testosterone이  $6\beta$ -hydroxy testosterone으로 생성되는 량과 총 대사체 생성량이 저해되는 정도를 비교하였을 때 두 물질 모두에서 총 대사체 생성량 저해가 크게 나타났다. 이는 이 두 물질들이 CYP3 계통을 저해하기도 하지만 다른 isozyme들을 더 많이 저해함을 알 수 있었으며, 50  $\mu$ M 정도의 농도에서 cytochrome P450에 의한 testosterone 대사가 50% 이하로 떨어질 수 있음을 나타내었다. 따라서 이들 phenoxy계 내분비 장애물질의 작용기전 중의 하나는 testosterone 대사저해에 의한 testosterone의 혈중 농도 증가에 의한 것으로 사료되

었다.

Rat microsome에서 DCP가 2,4-D 보다 testosterone 대사를 크게 저해하였으나(Fig. 7), 내분비장애작용 정도는 Table 1의 Hershberger assay 결과에서와 같이 1 µg/kg testosterone과 각각 50 µg/kg 2,4-D나 100 µg/kg DCP를 동시에 투여하였을 때 ventral prostate 무게 증가를 제외한 다른 생식장기의 무게는 2,4-D에 의하여 DCP 보다는 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 2,4-D는 생체 내에서 대부분이 DCP로 대사된 후 DCP가 CYP2E1 및 CYP3A에 의하여 2-chloro-1,4-hydroxyquinone이나 2-chloro-1,4-benzoquinone으로 대사된다(Bogaards 등 1995; Mehmood 등 1997). 이러한 결과는 2,4-D 자체가 testosterone 대사를 저해함과 동시에 주 대사체인 DCP 역시 강력하게 testosterone의 대사를 저해하기 때문일 것으로 사료되었다. 그리고 사람 microsome에서의 testosterone은 주로 CYP3A4에 의해서 대사되었으며 50 µM의 2,4-D나 DCP에 의해서 유사하게 약 70% 정도 저해되는 양상을 나타내었다(Fig. 8). 이는 DCP에 의한 rat이나 사람의 microsome에서 2,4-D에 의한 testosterone 대사저해정도는 유사하였으나 2,4-D에 의한 testosterone의 대사는 사람에서 더욱 크게 저해되었다. 이러한 결과는 사람에서의 testosterone 대사에 관여하는 cytochrome P450 isozyme들이 rat의 isozyme들과 비교하였을 때 2,4-D에 의하여 크게 저해된다는 것을 나타내었으며, 따라서 2,4-D에 의한 내분비 장애작용은 rat에서 나타나는 것 보다 사람에게서 더욱 크게 나타날 수 있을 것으로 사료되었다.

본 연구의 결과를 종합하여 볼 때 phenoxy계 화합물인 2,4-D와 DCP는 그 자체가 androgen receptor를 매개로 한 androgenic activity를 갖고 있으며 아울러 cytochrome P450에 의한 testosterone 대사 또한 저해함으로써 혈중 testosterone 량을 증가시키는 작용을 갖는 내분비장애물질로서 작용할 것으로 사료되었다.

### 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 2001년도 내분비계 장애 물질 연구사업(ED2001-10)과 과기부 한국과학재단의 우수연구센터 “지능형 생체계면공학연구센터”의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

Arrhenius, E., Renberg, L., Johansson, L. and Zetterqvist, M.A. (1977): Disturbance of microsomal detoxication mechanisms in liver by chlorophenol pesticides, *Chem. Biol. Interact.*, **18**, 35-46.

- Ashby, J., Houthoff, E., Kennedy, S.J., Stevens, J., Bars, R., Jekat, F.W., Campbell, P., Miller, J.V., Carpanini, F.M. and Randall, G.L.P. (1997) The Challenge Posed by Endocrine-disrupting Chemicals, *Environ. Health Persp.*, **105**, 164-169.
- Bogaards, J.J., van Ommen, B., Wolf, C.R. and van Bladeren, P.J. (1995): Human cytochrome P450 enzyme selectivities in the oxidation of chlorinated benzenes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **132**, 44-52.
- Charles, J.M., Cunny, H.C., Wilson, R.D. and Bus, J.S. (1996): Comparative subchronic studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, amine, and ester in rats, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **33**, 161-165.
- Colborn, T., vom Saal, F.S. and Soto, A.M. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.*, **101**, 378-384.
- Di Paolo, O., de Duffard, A.M.E. and Duffard, R. (2001): *In vivo* and *in vitro* binding of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to a rat liver mitochondrial protein, *Chem Biol Interact.*, **137**, 229-241.
- Hershberger, L.G., Shipley, E.G. and Meyer, R.K. (1953): Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroidis determined by modified levator ani muscle methods, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **83**, 175-180.
- Hill, R.H. Jr., Head, S.L., Baker, S., Gregg, M., Shealy, D.B., Bailey, S.L., Williams, C.C., Sampson, E.J. and Needham, L.L. (1995): Pesticide residues in urine of adults living in the United States: reference range concentrations, *Environ. Res.*, **71**, 99-108.
- Kawai, M., Bandiera, S.M., Chang, T.K. and Bellward, G.D. (2000) Growth hormone regulation and developmental expression of rat hepatic CYP3A18, CYP3A9, and CYP3A2, *Biochem Pharmacol.*, **59**, 1277-87.
- Kelce, W.R., Lambright, C.R., Gray, L.E. Jr. and Roberts, K.P. (1997): Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: *in vivo* confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **142**, 192-200.
- Lerda, D. and Rizzi, R. (1991): Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), *Mutat. Res.*, **262**, 47-50.
- Long, B.J., Grigoryev, D.N., Nnane, I.P., Liu, Y., Ling, Y.Z. and Brodie, A.M. (2000): Antiandrogenic effects of novel androgen synthesis inhibitors on hormone-dependent prostate cancer, *Cancer Res.*, **60**, 6630-6640.
- Marty, M.S., Crissman, J.W. and Carney, E.W. (1999): Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17 $\beta$ -estradiol, steroid biosynthesis inhibitors, and a thyroid inhibitor, *Toxicol. Sci.*, **52**, 269-77.
- Marty, M.S., Crissman, J.W. and Carney, E.W. (2001): Evaluation of the male pubertal onset assay to detect

- testosterone and steroid biosynthesis inhibitors in CD rats. *Toxicol. Sci.*, **60**, 285-95.
- Michalek, J.E., Rahe, A.J. and Boyle, C.A. (1998): Paternal dioxin, preterm birth, intrauterine growth retardation, and infant death. *Epidemiology*, **9**, 161-167.
- Mylchreest, E., Cattley, R.C. and Foster, P.M. (1998): Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to Di(n-butyl) phthalate, an antiandrogenic mechanism?. *Toxicol. Sci.*, **43**, 47-60.
- Norman, A.W. and Litwack, G. (1997): Hormones, 2nd Ed. Academic Press, New York, USA, pp. 75-86.
- Penttinen, O.-P., Kukkonen, J. and Pelinen, J. (1996): Preliminary study to compare body residues and sublethal energetic responses in benthic invertebrates exposed to sediment-bound 2,4,5-trichlorophenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 160-166.
- Rodwel' D.E., Wilson, R.D., Nemec, M.D. and Mercieca, M.D. (1989): Teratogenic assessment of 2,4-dichlorophenol in Fischer 344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **13**, 635-640.
- Schechter, A., McGee, H., Stanley, J.S., Boggess K. and Brandt-Rauf, P (1996): Dioxins and dioxin-like chemicals in blood and semen of American Vietnam veterans from the state of Michigan, *Am. J. Ind. Med.*, **30**, 647-654.
- Schrader, T.J. and Cooke, G.M. (2000): Examination of selected food addities and organochlorine food contaminants for androgenic activity *in vitro*, *Toxicol. Sci.*, **53**, 278-288.
- Sonnenschein, C. and Soto, A.M. (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **65**, 143-150.
- Thackary, V.G., Lieberman, B.A. and Nordeen, S.K. (1998): Differential gene induction by glucocorticoid and progesterone receptors, *J. Steroid Biochem. Biol.*, **66**, 171-178.
- Whalley, P.M., Bakes, D., Grime, K. and Weaver, R.J. (2001): Rapid high-performance liquid chromatographic method for the separation of hydroxylated testosterone metabolites, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **760**, 281-288.
- WHO (1989): Chlorophenols, Geneva, Environmental Health Criteria, No. 93 Chlorophenols, Washington DC., US Environmental Protection Agency, EPA 600/1-79-012.
- Wolfe, W.H., Michalek, J.E., Miner, J.C., Rahe, A.J., Moore, C.A., Needham, L.L. and Patterson, D.G. Jr. (1995): Paternal serum dioxin and reproductive outcomes among veterans of Operation Ranch Hand, *Epidemiology*, **6**, 17-22.
- Xu, Z., Kawai, M., Bandiera, S.M. and Chang, T.K. (2001): Influence of dietary zinc deficiency during development on hepatic CYP2C11, CYP2C12, CYP3A2, CYP3A9, and CYP3A18 expression in postpubertal male rats. *Biochem Pharmacol.*, **62**, 1283-91.
- 김종택 (1996): 수질오염공정시험방법해설, 초판, 신광출판사, 서울, pp. 284-288.