

설치류 수컷 생식력에 미치는 에스트로겐의 효과

김지향 · 김진규 · 윤용달^{1*}

·한국원자력연구소 방사선연구원, ¹한양대학교 생명과학과

Estrogen Function in Male Rodents Fertility

Ji Hyang Kim, Jin Kyu Kim and Yong-Dal Yoon¹

Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

¹Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

ABSTRACT : Estrogens are known as the steroid hormones and essential regulators of developments, differentiations, and fertility in animals including humans. Recently, classic focus on estrogens which are considered as female hormone is changing in the whole field of reproductive endocrinology. Especially, interest in estrogen functions in male reproduction is increasing more and more, as numerous studies about the endocrine disruptors, interrupting the endocrine system, are being carried out. To understand exactly the function of estrogen in a male reproductive system, a summary for estrogen receptors upon developmental distributions in testis will be useful. In addition to the regulatory roles of estrogen in male, unexpected exposure to exogenous estrogens causes defects of differentiation of male reproductive system and an injury of spermatogenesis. Also, this review highlights the indicator of exogenous estrogens to perturb male fertility. These approaches would give the practical information about estrogen roles in male development and reproduction.

Key words : Estrogen, Estrogen receptor, Endocrine disruptor, Fertility, Male.

요약 : 스테로이드 호르몬인 에스트로겐은 여러 조직의 발생 및 분화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 최근 에스트로겐의 영향을 평가하는데 있어 전통적인 여성 호르몬이라는 인식을 탈피하여 수컷 생식계상의 역할에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 특히 내분비계 교란물질에 관한 다양한 연구 결과가 보고되면서, 수컷에서의 에스트로겐 역할에 대한 관심이 증대되고 있는 실정이다. 따라서 에스트로겐의 정확한 역할을 파악하기 위해서 발생 단계에 따른 에스트로겐 수용체의 수컷 생식기관 내 분포를 정리해 보고, 내분비계 교란물질의 노출에 따른 수컷 생식계의 발생 및 분화 이상과 정자형성과정의 장애 등을 알아보려고 하였다. 끝으로 외인성 화학물의 에스트로겐성을 평가하기 위한 지표인자들을 정리하여, 남성 생식기관의 발생, 분화, 기능에 관련된 에스트로겐의 역할에 대한 실제적인 정보를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

서론

스테로이드 호르몬인 에스트로겐은 초기 배아에서 조직의 발생, 분화, 골교체(bone turnover), 심혈관계, 행동 등에 영향을 준다(Kuiper et al., 1998). 생체 내 에스트로겐은 테스토스테론(testosterone)과 안드로스테네디온(androstenedione)이 aromatization을 통해 각각 에스트라디올(estradiol)과 에스트론(estrone)으로 전환되어 형성된다. 이 과정을 중재하는 효소가 P450 mono-oxygenase 효소 복합체이다. P450 아

로마타제(aromatase)는 CYP19 유전자의 생산물로서 최소 16개의 엑손(exons)으로 구성되어 있으며, 사람의 경우 15번 염색체에 위치해 있다(O'donnell et al., 2001). 사람의 경우 여러 조직에서 아로마타제가 발현되어 에스트로겐을 합성할 수 있다. 이러한 조직에는 난소, 정소, 태반, 태아 간장, 지방 조직, 연골모세포, 조골세포, 뇌하수체, 대뇌변연계, 대뇌피질 등의 다양한 뇌조직이 해당된다. 체내에서 에스트로겐은 시상하부에서 분비된 gonadotropin releasing hormone(GnRH)이 뇌하수체 전엽을 자극하면 생산되는 성선자극호르몬(gonadotropin)에 의해서 분비가 촉진되고, 역으로 에스트로겐이 많을 경우에는 음성피드백 작용을 통해서 성선자극호르몬을 제어하게 된다. 이렇게 만들어진 에스트로겐은 수용체와 결합하여 신호 전달을 하게 된다.

여성호르몬으로 인식되던 에스트로겐은 과다 노출에 의해 수컷 생식 기관의 발생에 영향을 줄 수 있다는 사실이 1930

* 본 논문은 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2003-0005-C0051, ABRL)을 받아 수행되었음.

[†] 교신저자: 서울특별시 성동구 행당동 17번지, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과. (우) 133-791, (전) 02-2220-0955, (팩) 02-2294-0955, E-mail: ydyoon@hanyang.ac.kr

년대에 보고(Wolff & Ginglinger, 1935; Burrows, 1935)되면서, 수컷에서 에스트로겐에 대한 인식의 전환이 시작되었다. 이 후의 연구들에서 남성 불임의 원인 기전 중 하나가 에스트로겐임이 알려져 수컷 생식계에서 에스트로겐의 역할이 연구의 초점이 되었다. 또한 최근 내분비계 교란물질(endocrine disruptors)과 같은 외인성 오염원 중 일부가 에스트로겐의 특징을 갖고(Yoon, 1998), 내재성 에스트로겐의 역할을 방해하는 영향을 주는 것이 알려지면서 수컷에서 에스트로겐의 역할에 대한 관심이 증대되고 있는 실정이다. 따라서 본 증설에서는 발생 단계에 따른 에스트로겐 수용체의 조직 내 분포 변화를 통해 그 역할을 정리해 보고, 설치류 정소가 에스트로겐성 교란물질에 노출될 시 나타나는 결함을 통해 에스트로겐이 수컷 생식소에 미치는 영향을 정리해 보고자 한다.

에스트로겐 수용체 및 신호 전달 기전

에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)는 1970년대에 Jensen & DeSombre에 의해 최초로 규명되었다(Jensen & DeSombre, 1973). 그 후, 두 번째 새로운 형태가 1996년에 흰쥐, 생쥐, 인간의 여러 종에서 보고되었다. 이 새롭게 발견된 수용체를 에스트로겐-베타(ER β)라고 구분하고, 기존의 에스트로겐 수용체는 ER α 라고 재명명하였다.

이 수용체는 서로 동형이 아니며, 유전자가 위치하는 염색체도 다르다. 인간의 ER α 에 대한 유전자는 6번 염색체의 long arm에 위치하나 ER β 에 대한 유전자는 14번 염색체의 q22-24의 밴드에 위치하고 있는 것으로 알려져 있다(O'donnell *et al.*, 2001). 이 두 수용체가 세포 내에서 어떠한 기전을 통해서 신호를 조절하고 영향을 주는가에 대해서는 크게 두 가지 형태로 나누어 볼 수 있다. 하나는 수용체 결합 복합체를 이룬 후 핵 내 작용을 통한 세포 내 전사를 조절하는 과정이고, 다른 하나는 계놈과는 무관한 비핵 작용이다(Luconi *et al.*, 2002; Simoncini *et al.*, 2004).

핵 내에서 에스트로겐 수용체는 대상 유전자의 발현을 조절하는 전사 인자로 작용한다(Truss & Beato, 1993). ER 결합부위(ligand binding domain, LBD)와 특정 스테로이드 호르몬의 결합은 수용체의 형태적 변형이 일으키고 heat shock protein 90(HSP 90)과 같은 세포질 내 샤페론 단백질이 수용체로부터 분리되며 핵 내 위치 서열(nuclear localization sequences, NLS)의 노출을 일으킨다. 이러한 리간드-결합 수용체의 homo/heterodimerization과 핵 내 이동 후, 대상 유전자의 조절자(promoter) 부위의 estrogen response elements(ERE)에 결합하여 전사 과정을 제어하게 된다. 이 전통적인

ER 신호전달 과정인 핵 내 전사과정을 조절하는 'genomic action'은 많은 연구가 되어온 반면 extracellular signals를 유도하는 능력에 관한 연구는 확실하게 밝혀져 있지 않다(Mangelsdorf *et al.*, 1995; Mosselman *et al.*, 1996). ER의 non-genomic action은 1970년대 말 세포막에 estradiol의 결합부위가 존재한다는 것이 보고된 것을 시점으로(Pietras and Szego, 1977), ER α 와 ER β 모두 혈관계에 존재하는 것이 확인되었고(Venkov *et al.*, 1996; Simoncini *et al.*, 2000) 실제로 ER α 의 경우, non-functional mutation이 발생한 경우에 초기 죽상경화증(atherosclerosis)과 같은 손상된 혈관 기능 이상을 보였다(Sudhir *et al.*, 1997). 즉, 세포의 전사 및 단백질 합성 과정을 조절하는 에스트로겐의 작용과는 별도로 세포막에서 일어나는 에스트로겐의 작용은 많은 연구가 뒷받침되어 있지 못해 정확한 이해가 어렵기는 하나, 이온의 변화나 기타 세포막 신호전달 체계와 관련하여 급격하며 신속한 반응을 이끌어내며 스테로이드의 주된 표적기관이 아닌 부위(endothelial cells, smooth muscle cells, stromal vascular cells)에서 특정 역할을 수행하는 시스템으로 정리해 볼 수 있다.

수컷 생식기관 내의 에스트로겐 수용체 분포와 역할

수정 후 초기 배아 발생과정 및 이후의 성장 기간 동안의 에스트로겐 수용체의 분포를 확인하는 것은 수컷 생식기관의 발생 및 분화에서 에스트로겐의 효과를 예측해 볼 수 있는 단서가 될 수 있다. ER α 는 설치류 태자 시기의 정소 내 Leydig 세포에서 androgen receptor가 발현 전에 분포하는 것이 확인되었다. 또한 ER α 는 태자 시기의 efferent ductules와 부정소에서도 발현하는 것으로 알려져 있다. 그러나 태자 시기의 세정관 내부에서 ER α 가 발현하는지는 아직 밝혀져 있지 않다(Carreau *et al.*, 2002). 이러한 보고들은 태자 시기의 초기 수컷 생식기관의 발생과정에 에스트로겐에 의한 영향을 보여 준다(Cooke *et al.*, 1991). 즉, ER α 의 경우는 생쥐의 미분화 생식소에서 태자 10일자와 11.5일자에서 확인되어, 초기 생식소 분화 과정 및 Leydig cells의 분화와 관련하는 것을 확인 할 수 있다(Nielsen *et al.*, 2000). ER β 의 태자 내 발현 장소는 gonocyte, Sertoli cells, Leydig cells에서 확인되며, gonocytes에서 가장 높은 발현을 보여 ER α 와는 다르게 생식세포의 분화 및 성숙과 관련된 역할을 하는 것으로 보인다(Carreau *et al.*, 2002). 태자 시기 동안의 두 수용체 사이의 발현 분포의 차이가 분명하게 발생하며, 이것은 이 두 수용체가 초기 배아 발생과정에 맡은 역할이 확연히 다름

을 시사해 주는 것이다.

신생자 시기를 거쳐 미성숙 시기의 정소 내에서 발현 양상도 태자 시기의 것과 유사하다. ER α 는 정소 내 세정관 내부에서 발현은 보이지 않으나 Leydig cells, rete testis, efferent ductules, 부정소 등에서 강하게 발현한다. ER β 의 경우에 단백질과 mRNA 형태로 세정관 내 생식세포와 Sertoli cells에서 확인되었다(van Pelt *et al.*, 1999). 실제 신생자 시기의 정소 내 Sertoli cells에서의 에스트로겐 합성은 Leydig cells이나 성체의 Sertoli cells에서보다 높은 것으로 알려져 있으므로(Rommerts *et al.*, 1982), 신생자 시기 및 성적 성숙기로 전환되는 시기의 에스트로겐은 Sertoli cells의 기능과 연계되어 발생을 조절하는 것으로 보인다.

미성숙기로 접어들면서 흰쥐 정소 내 Sertoli cells와 Leydig cells는 분열을 통해 기능적인 성숙기로 들어가게 된다. 이 시기의 ER α 는 앞 시기와 유사하게 세정관 내에서는 확인할 수 없으며, ER β 의 경우는 epithelium에 고루 분포되어 있다. 이 시기에 흰쥐에서 특이적으로 pachytene spermatocytes에서 ER β 가 강한 발현을 보이며(Saunders *et al.*, 1998), 생쥐와 흰쥐의 경우에는 Leydig cells에서 ER α 의 발현이 이전 시기보다는 낮아진 수준이나 꾸준히 발현하는 것으로 보고되고 있다(Nielsen *et al.*, 2000). 이러한 수용체의 분포는 미성숙 흰쥐에 에스트로겐이 교란되었을 때 태사기 정세포(pachytene spermatocytes)가 주로 영향을 받을 수 있으며, 이로 인해 태사기 정원세포의 발생 및 성숙에 손상이 올 수 있음을 추측해 볼 수 있다. Fig. 1은 미성숙 생쥐가 저농도의 bisphenol-A이나 diethylstilbestrol에 노출되었을 때 24시간 후의 세정관 내 손상을 보여준다. 에스트로겐의 성질을 모방하여 내분비계를 교란시키는 두 화학물질은 세정관 내 퇴화세포를 현저하게 증가시키고, 조직병리학적으로 다핵세포의 형성을 초래한다(Kim *et al.*, 2001).

성체를 대상으로 ER 분포에 대한 연구는 다양하게 시도되었으나 결과들의 중간 차이가 뚜렷할 뿐 아니라 실험자들에 따라서 동일 종에 대한 결과들도 다양하게 보고되었다(O'donnell *et al.*, 2001). 성체 정소 내 ER α 의 경우, 생쥐와 흰쥐의 Leydig cells에서는 발현이 되나(Fisher *et al.*, 1997), 일부 영장류와 사람에서는 아직 논쟁의 여지가 있다. ER β 의 경우도 생쥐의 Leydig cells에서는 발현이 확인되었으나 성체 흰쥐의 경우에는 발현이 되지 않는 것으로 보고되어 있다. 사람의 경우에는 ER α 와 마찬가지로 실험자간의 상이한 결과를 보인다. 성체 정소 내 Sertoli cells에서는 ER β 발현이 흰쥐와 사람에서는 확인이 되나(Pelletier *et al.*, 2000), 생쥐의 경우에는 보고된 바 없다. 성체 내 이러한 ER 분포에

의해 에스트로겐의 이상 노출은 Leydig cells의 스테로이드 합성 과정을 직접적으로 방해하며, 직접 정자형성과정의 손상을 초래할 수 있음을 보여준다. 장기간에 걸쳐 고농도의 내분비계 교란물질인 octylphenol에 노출된 경우, 테스토스테론의 혈중 농도 감소뿐만 아니라 정자형성과정의 비가역적 손상이 초래되는 것을 Fig. 2와 3에서 확인할 수 있다(Kim *et al.*, 2004). 특히 Fig. 3의 경우 octylphenol의 농도에 비례하여 정소 내 구조적 손상, 생식세포의 유실, 세포자연사 세포의 증가 등을 뚜렷이 확인할 수 있다.

생식세포 내에서는 에스트로겐 수용체의 분포뿐만 아니라 아로마타제도 같이 존재하여 더욱 눈여겨 볼만하다. 일반적으로 ER β 는 생식세포의 각 정자형성단계 세포에 전반적으로 분포하고 있으나, ER α 의 분포에 대한 연구는 흰쥐 정소 내 정모세포와 정세포 내에서의 위치를 확인한 실험은 단 한 건에 불과하다(Pelletier *et al.*, 2000). 정자 내의 생식세포 중 elongating spermatids를 제외하고, 정원세포(A type, B type, intermediated spermatogonia), pachytene spermatocytes, round spermatids에서 ER β 가 존재한다. 에스트로겐을 합성하는 아로마타제의 경우는 생식세포 중 pachytene spermatocytes에서 발견되어, 정세포로 성숙되는 과정에서 round spermatids까지 강한 발현이 확인된다(Hess, 2003). Spermiation을 거치면서 elongated spermatid의 잔여체(residual bodies) 내 아로마타제의 활성은 Sertoli cells에 의해 소멸될 때까지 유지될 뿐만 아니라, 부정소로 내보내진 정세포의 편모에 남아있는 세포질 소적(cytoplasmic droplet)에서도 여전히 활성을 보인다(Janulis *et al.*, 1998; Nitta *et al.*, 1993). 따라서 정세포는 에스트로겐을 합성할 수 있는 능력을 갖고 스스로가 분비를 조절할 수 있음을 알 수 있다. 성체의 efferent tubules에는 ER α 가 특히 많이 분포하는 것으로 알려져 있으므로(Hess *et al.*, 1997), 정관 내 ER α 와 정세포에서 만들어낸 에스트로겐간의 상호 기능에 대한 연구가 이루어진다면 그 정확한 역할을 이해할 수 있을 것이다.

정자 형성 과정과 에스트로겐

정소 내에서 에스트로겐에 대한 역할을 알아보기 위한 많은 연구 결과들이 보고되었음에도 불구하고, 정자 형성 과정에서 에스트로겐이 정확하게 어떠한 효과를 나타내는지는 명료하지가 않다. 그러나 에스트로겐과 관련된 유전자의 knockout model(ER α , ER β , aromatase)이 개발됨으로써, 이를 이용한 실제적인 연구가 진척되었다(O'donnell *et al.*, 2001). ER α 의 knockout model(ER α KO)은 불임을 보이고,

위축된 정소와 생식세포의 손실로 인한 정자 형성 과정의 비가역적 쇠퇴, 세정관의 퇴화, Na^+/H^+ exchanger-3(NHE3)의 발현 감소, 부정소와 정관의 다양한 형태학적 이상 및 재흡수 기능 약화, 혈청 내 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH)과 테스토스테론의 이상적 증가가 보고되어 있다(Couse & Korach, 1999). ER α KO와 다르게 ER β knockout model (ER β KO)의 경우에는 일부 epithelium cells의 비정상적 형태를 제외하고는 부정소 내 정세포의 수치도 정상 범위 이내에 해당하고 기타 생식기관 내의 형태학·조직학적 양상이 정상적이며 가임 능력도 소실되지 않았다(Krege *et al.*, 1998). 그러나 두 수용체가 모두 knockout된 상태의 모델인 (ER $\alpha\beta$ KO)의 경우에는 전반적인 정소 내 표현형이 ER α KO의 것과 유사하게 나타나며, 역시 불임인 것이 확인되었다(Couse *et al.*, 1999). 특히 ER $\alpha\beta$ KO를 암컷 생쥐에서는 난소 내에 체세포들이 Leydig cells과 Sertoli cells로 전향되는 특징을 보이는 것으로 확인됨으로써(Britt & Findlay, 2003), ER α 와 ER β 의 기능은 생식소 내 세포들의 발생 방향을 결정하고 분화시키는 것에 결정적 역할을 담당하는 것으로 보인다. 그러나 ER β 와 관련한 연구가 상대적으로 미흡한 상태이기 때문에, 생식력과 관련하여 ER β 의 역할을 정확히 파악하기에는 어려운 실정이다. 에스트로겐을 생성하지 못하는 aromatase knockout model(ArKO)의 경우, 초기에는 가임 상태이나 연령이 증가함에 따라 생식력은 급격히 떨어져서, 7개월령의 ArKO 생쥐는 불임의 양상을 보이며, 부정소의 정자수에 있어서도 1년령의 경우 현저하게 감소한다(Fisher *et al.*, 1998). 또한 14주령 ArKO 생쥐의 경우 정소의 세정관 내 부피에는 차이가 나타나지 않으나 정모세포의 수가 감소하며, round spermatids의 acrosomal dysgenesis 등에서 세포 자연사 양상을 보이는 것으로 보고되었다(Murata *et al.*, 2002).

외인성 에스트로겐에 의한 영향

외인성 에스트로겐은 내분비계 교란물질에 속하며 특히 에스트로겐의 정상적인 기능을 교란시키는 물질이다. 내분비계 교란물질은 생체의 항상성 유지와 성장 발달 과정을 조절하는 체내 자연 호르몬의 합성, 분비, 운반, 대사, 수용체와의 결합 및 결합 후의 작용기작을 교란시키는 체외물질로 정의된다(Yoon, 1998). 일반적으로 내분비계 장애물질은 체내 유입 후 내인성 호르몬과 수용체간 결합을 모방, 차단, 촉발 및 기타 간접 영향 등의 유발에 의해 체내 항상성을 교란시키는 것으로 추측되고 있다(Sharpe & Skakkebaek, 1993;

Skallebaek *et al.*, 2001; Yoon, 1998). 내분비계 장애물질의 일반적인 영향은 내인성 호르몬과 수용체 상호작용 저해, 수용체의 발현 및 기능 방해, 내인성 호르몬과의 작용을 통한 이상 기능, 내인성 호르몬의 생성 저해 등으로 나타난다.

1. 에스트로겐 교란 물질 분류를 위한 평가 방법

최근에는 내분비계 교란물질이 한 가지의 고정된 특성(estrogen 혹은 anti-androgen)만을 지니는 것이 아니라는 보고도 일부 제시되었으나, 일반적으로 내분비계 교란물질은 생체 내 특정 수용체에 대해 어떤 리간드로 작용하는가에 따라서 크게 estrogenic 혹은 anti-androgenic으로 나뉜다. 여기에서는 에스트로겐 의심 물질의 에스트로겐성(estrogenicity)을 평가하는 방법에 대해 정리해 보고자 한다. 평가 방법에는 *in vivo/in vitro* bioassay로 나뉜다(Eertmans *et al.*, 2003).

먼저 *in vitro* bioassay로는 수용체 결합 시험, 세포 증식 시험, 리포트 유전자(reporter gene assay)를 이용한 실험 등이 포함된다. 에스트로겐 수용체에 직접 작용·결합하는 화합물질을 찾는 방법인 수용체 결합 시험은 특정 리간드와 수용체간의 결합 친화력을 평가하는 방법이라고 할 수 있다. 세포 증식 평가방법으로 가장 잘 알려진 것이 E-Screen assay로서, 사람의 유방암 세포주(MCF-7)가 에스트로겐 등에 반응하여 증식하는 특성을 이용하여 물질의 특성을 파악할 때 사용하는 방법이다. 리포터 유전자를 이용하는 방법은 호르몬 수용체 활성화 후 세포 내 유전자 전사의 유도를 측정하는 방법이다. 이 때 사용되는 플라스미드에는 hormone response element (HRE)가 리포터 유전자와 함께 들어가며 일반적으로 사용되는 리포터 유전자는 β -galactosidase나 luciferase 등이 있다(Hoogenboom *et al.*, 2001). *In vivo* bioassays에는 호르몬에 대한 생식기관의 반응을 통해 검사해 보는 rodent 3-day uterotrophic assay, 5~7-day Hershberger, 20-day pubertal female or male assay, fish reproduction assay 등이 있다. 설치류의 자궁이나 전립선 혹은 정낭 등의 무게를 통해 에스트로겐에 의한 비대를 측정하는 방법에 해당하는 것이 암컷에서는 uterotrophic assay이고, 수컷에서는 Hershberger assay이다(Owen & Ashby, 2002; Dorfman, 1962). 발정기로 접어드는 시기의 암컷과 수컷의 2차적 성징과 생식기관의 발달을 에스트로겐과 갑상선호르몬(thyroid hormone)의 수준을 통해 확인해 보는 방법이 pubertal female or male assay 이다(Gray *et al.*, 2002). 어류에서는 생식력에 미치는 에스트로겐이나 안드로젠 효과를 알아보기 위한 방법으로, 총 42일간에 걸쳐서 전반 21일간

성체를 화합물에 노출시킨 후에 생존, 생식 행동, 이차 성징, 다산성을 통해 영향을 평가한다(Hutchinson *et al.*, 2000).

전통적으로 에스트로겐 의심 물질을 평가하는 방법과 함께 최근에는 다양한 분자수준의 biomarkers를 개발하여 평가에 사용하고 있다. 대표적인 분자가 cathepsin D(CAT D), heat shock protein 70(HSP 70), calbindin-D_{9k}(CaBP-9k) 등이다. CAT D는 aspartic protease family에 속하며 생체 내 다양한 proteolysis 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다(Barret, 1977). 암컷에서는 난소 내 난황 형성 과정(vitellogenesis)에 기능하고 수컷에서는 정소 내 세포의 재생과 관련하여 Leydig cells과 Sertoli cells에 다량 존재하고 정세포와 정모세포의 퇴화에 관련한다고 보고되고 있다(Oliana & Francesca, 2003). 유방암의 원인이 되는 CAT D는 에스트로겐에 의해 발현이 증가하는 특징(Cavailles *et al.*, 1998)을 갖고 있는 것으로 알려져 있어 에스트로겐 의심 물질의 확인에 적합하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다. HSP 70의 경우는 다양한 내·외부의 스트레스에 민감하게 반응하여 발현하는 단백질로 널리 알려져 있다(Iwama *et al.*, 1998). HSP 70 mRNA 구조의 특징상 인트론이 거의 없기 때문에 빠른 속도로 스트레스에 반응하여 HSP 70 단백질의 양을 급격히 증가시킨다. 내분비계 교란물질에 노출 시에도 현저한 증가를 보이는 것이 실험적으로 증명되나(Snyder & Mulder, 2001), 이러한 증가의 원인이 에스트로겐 특성으로 인한 것인지는 확인할 수가 없기 때문에 HSP 70의 수준을 평가하는 것만으로 내분비계 교란물질로 분류하기는 어려울 것으로 보인다. 이 밖에 biomarker로 보고된 CaBP-9k는 세포질 내 단백질의 하나로 칼슘과 높은 친화력을 갖고 있어 세포 내 칼슘 농도를 조절하는 기능을 한다(Christakos *et al.*, 1989). 자궁근층(myometrium)에 집중적으로 분포하는 CaBP-9k는 스테로이드 호르몬에 특이적인 반응을 보이는 것으로 알려져 있다(L'Horset

et al., 1994). 흰쥐를 이용한 실험에서 CaBP-9k는 에스트로겐에 의해 증가되나 황체호르몬(progesterone)에 의해서는 농도가 감소하는 반응을 보여(Choi & Jeung, 2003), 이를 통해 추정 물질의 에스트로겐성 확인에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

2. 에스트로겐성 교란물질에 대한 정소 반응

에스트로겐에 과다 노출 혹은 비정상적으로 노출되었을 때 나타나는 정소 내 특징들은 내분비계 교란물질의 피해에 관한 연구를 통해 더욱 구체적으로 파악하게 되었다. 이 중 에스트로겐성으로 가장 대표적인 것이 diethylstilbestrol (DES), phthalate(PHT)와 octylphenol(OTP), bisphenol A (BPA) 등의 alkylphenol 종류이다. DES는 합성에스트로겐으로서 1938년 영국에서 합성되어 유산과 조산 방지, 출산 후 모유량 억제, 갱년기 장애의 경감, 전립선 암 등의 치료제로 사용되었으나, 1970년대에 유산방지제로 복용하였던 임신부들의 딸에게서 이상적 질환이 확인되면서 문제가 제기되었다(Toppari & Skakkebaek, 1998; Visser *et al.*, 1998; Yoon, 1998). 저농도 DES에 노출되었을 시에도 Fig. 1에서 보여진 것처럼, 정소 내 퇴화세포의 증가, 다핵성 세포 출현 등의 손상이 일어나는 것을 확인할 수 있었다(Kim *et al.*, 2001). 플라스틱 가소제로 사용되는 PHT의 경우에는 유아의 놀이기구, 식품 포장재, 의료용 장치 등에 널리 사용되는 물질로 생체 내로 유입시 간에서 di(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP)와 mono(2-ethylhexyl) phthalate(MEHP)로 분해가 된다. 이 물질들에 의해 신체 내 내분비계의 교란이 발생되어 정소에서는 경구 투여 후 24시간 이내에 테스토스테론의 이상 증가와 세포자연사로 생식세포들이 사멸되는 현상을 확인할 수 있었다(Table 1). 일반적으로 흔히 사용되는 세제, 페인트, 플라스틱 등의 산업 제조과정에 계면활성제로 널리 사용되

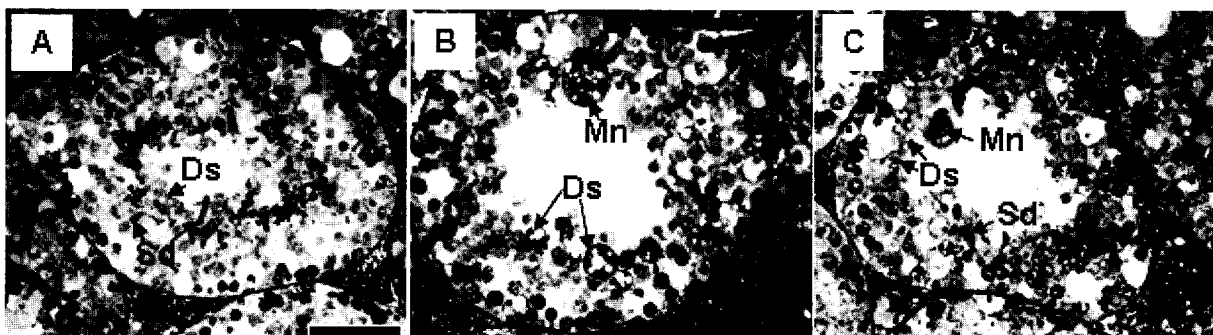


Fig. 1. Microphotographs of the seminiferous tubules in the prepubertal mouse testes. A, the control group(corn oil treated, vehicle group); B, the bisphenol A treated group; C, the diethylstilbestrol treated group. Ds, degenerating spermatocytes; Sd, spermatid head, and Mn, multinucleated cells. Scale bar indicates 50 μ m.

Table 1. Arbitrary representation of the relationship between the apoptotic germ cells and the expression fas and fas ligand gene in the prepubertal mouse testes after the treatment of DEHP

Time(hr)	No. of apoptotic germ cell	Expression of	
		Fas	Fas ligand
0	+++	+	+
3	++	++	+++++
6	+++++	+++++	++
9	+++	+++	++
12	+++++	+++	++
24	+++	+++++	+++++

The number of '+' shows the level of mRNA expression of fas or fas ligand in testis and a number of apoptotic germ cell in TUNEL processed seminiferous tubules after DEHP treatment.

고 있는 alkylphenol polyethoxylates류는 환경중으로 유입되어 미생물에 의해 구조적으로 안정된 alkylphenols로 대사가 된다. 이 alkylphenols의 대표적인 것으로 OTP와 BPA를 들 수 있다. 특히 BPA의 경우 식품 포장재, 치과용 약품, 폴리스틸렌 수지의 원료로 사용되어 노출 위험이 높은 위험원이다. 미성숙 생쥐에 저농도의 BPA를 경구 투여했을 때 세정관 내 퇴화 세포가 현저하게 증가하는 것을 확인(Fig. 1)할 수 있으며, 세포 내 칼슘의 급격한 증가, 테스토스테론의 감소, 세포 자연사 증가(Roman-Wilms *et al.*, 1995) 등이 관찰되었다. OTP의 경우에는 장기간 흰쥐에 노출시킨 결과 Fig. 2와 3에서 보여진 것과 같이 세정관 내 생식세포의 비가역적

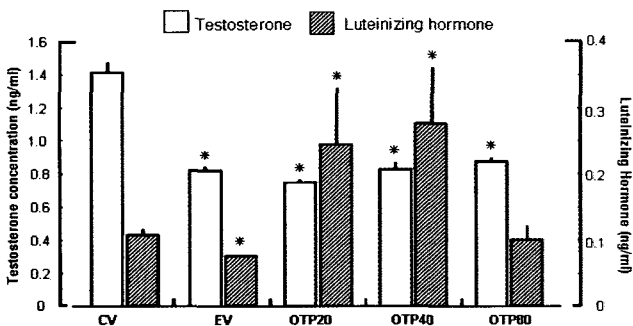


Fig. 2. Circulating levels of testosterone and luteinizing hormone in the OTP-treated F344 rats. Fischer 344 rats were injected s.c. with 0.2mL olive oil alone or containing the OTP(20, 40, 80mg) thrice weekly for 1 month. Estradiol valerate(1,3,5[10]-estratriene-3,17β-diol 17-valerate) used for the positive control group(EV). Asterisk, $P < 0.05$.

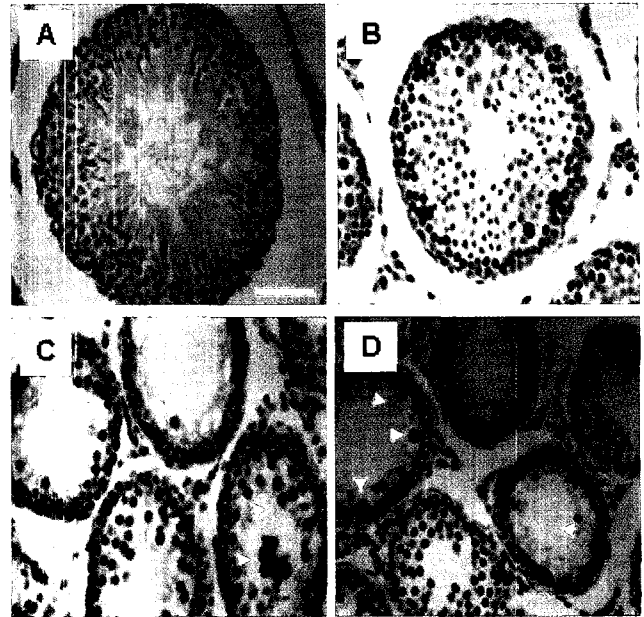


Fig. 3. Morphological changes in the seminiferous tubules by the octylphenol(OTP) exposure. Fischer 344 rats were injected s.c. with 0.2mL olive oil alone or containing the OTP thrice weekly for 1 month. A, the control group (olive oil treated, vehicle group); B, 20mg of the OTP treated group; C, 40mg of the OTP treated group; D, 80mg of the OTP treated group. Arrow heads indicate apoptotic germ cells by TUNEL method. Scale bar indicate 100 μm.

손상이 발생하였다(Kim *et al.*, 2004). 이와 같은 비정상적 에스트로겐성 물질에 대한 노출은 동물의 생식력 소실로 연결됨을 알 수 있다(Toppari *et al.*, 1996; Pflieger-Bruss *et al.*, 2004).

결론

에스트로겐의 수컷 내 역할을 알아보기 위해 본 종설에서는 에스트로겐의 합성, 발생 전 단계에 따른 정소 내 에스트로겐 수용체 분포, 내분비계 교란물질에 대한 에스트로겐성 검증을 위한 방법, 에스트로겐성 교란물질에 노출 시 발생하는 정소 내 이상들에 대한 실험적 자료들을 검토해 보았다. 에스트로겐은 동물의 초기 배아 발생과정뿐만 아니라 생식력의 획득 및 유지에 결정적 역할을 수행하였다. 특히 내분비계 장애물질과 같은 비정상적인 에스트로겐에 노출은 내생적 에스트로겐 생합성, 아로마타제의 활성화, 에스트로겐 수용체 기전에 손상을 일으켜, 정소 내 퇴화세포의 증가, 세포 자연사 세포의 증가, 정자형성과정의 이상 등을 낳게 되고, 이것은 동물 정자수의 감소, 수컷의 암컷화 행동, 생식 이상,

불임화 등으로 연결된다. 이러한 내분비계 교란물질에 대한 연구를 통해서 에스트로겐의 수컷에서의 역할에 대한 정보를 얻을 수 있었고, 이를 기반으로 수컷 생식에 미치는 에스트로겐의 영향에 대한 이해의 폭을 넓힐 수 있을 것이라 사료된다.

인용문헌

- Barret AJ (1977) Cathepsin D and other carboxyl proteinases. In: Barret SJ (Ed.), Proteinases in Mammalian Cells and Tissues. Biomedical Press, Elsevier, London, pp.209-248.
- Britt KL, Findlay JK (2003) Regulation of the phenotype of ovarian somatic cells by estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 202:11-17.
- Burrows H (1935) Pathological conditions induced by oestrogenic compounds in the coagulating gland and prostate of the mouse. *Am J Cancer* 23: 490-512.
- Carreau S, Bourguiba S, Lambard I, Galeraud-Denis I, Genissel C, Levallet J (2002) Reproductive system: aromatase and estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 193: 137-142.
- Cavaillès V, Augereau P, Garcia M, Rochefort H (1998) Estrogens and growth factors induce the mRNA of the 52K- procathepsin-D secreted by breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 16:1903-1919.
- Choi KC, Jeung EB (2003) The biomarker and endocrine disruptors in mammals. *J Reprod Dev* 49:337-345.
- Christakos S, Gabrielides C, Rhoten WB (1989) Vitamin D-dependent calcium binding proteins: Chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocr Rev* 10:3-26.
- Cooke PS, Young P, Hess RA, Cunha GR (1991) Estrogen receptor expression in developing epididymis, efferent ductules, and other male reproductive organs. *Endocrinology* 128:2874-2879.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS (1999) Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors α and β . *Science* 286:2328- 2331.
- Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Rev* 20:358-417.
- Dorfman R (1962) Androgens and anabolic agents. In: Dorfman, R. (Ed.), *Methods in Hormone Research, Bioassays II*. Academic Press, New York, pp 272-313.
- Eertmans F, Dhooge W, Stuyvaert S, Comhaire F (2003) Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. *Toxicol in vitro* 17: 515-524.
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER (1998) Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6965-6970.
- Fisher JS, Millar MR, Majdic G, Saunders PT, Fraser HM; Sharpe RM (1997) Immunolocalization of estrogen receptor- alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmosetd monkey from perinatal life to adulthood. *J Endocrinol* 153:485-495.
- Gray LEJ, Ostby J, Wilson V, Lambright C, Bobseine K, Harting P, Hotchkiss A, Wolf C, Furr J, Price M, Parks L, Cooper RL, Stoker TE, Laws SC, Degitz SJ, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen EA, Tietge JEM, Ankley GT (2002) Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing. *Toxicology* 27:371-382.
- Hess RA (2003) Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1:52.
- Hess RA, Gist DH, Bunick D, Lubahn DB, Farrell A, Bajr JM (1997) Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *J Androl* 18:602-611.
- Hoogenboom LAP, DeHaan L, Hooijerink D, Bor G, Murk AJ, Brouwer A (2001) Estrogenic activity if estradiol and its metabolites in the ER-CALUX assay with human T47D breast cells. *APMIS* 109:101-107.
- Hutchinson TH, Brown Rm, Brugger KE, Campbell PM, Holt M, Lange R, McCahon P, Tattersfield LJ, van Egmond R (2000) Ecological risk assessment of endocrine disruptors. *Environ Health Perspect* 108:1007-1014.
- Iwama GK, Thomas PT, Forsythe RB, Vijayan MM (1998) Heat-shock protein expression in fish. *Rev Fish Biol Fish* 8:35-56.
- Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Janssen S, Osawa Y, Bunick

- D (1998) Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *J Andrology* 19:65-71.
- Jensen EV, DeSombre ER (1973) Estrogen-receptor interaction. *Science* 182:126-134.
- Kim JH, Lee CJ, Yoon YD (2001) Effect of bisphenol A on testicular cells in prepubertal mice. In: Proc. The 34th Annual Meeting of the Society of the Study of Reproduction, Ottawa, Canada, pp 343.
- Kim SK, Lee HJ, Yang H, Kim HS, Yoon YD (2004) Prepubertal exposure to 4-tert-octylphenol induces apoptosis of testicular germ cells in adult rat. *Arch Androl* 50:427-441.
- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15677-15682.
- Kuiper G, Lemmen J, Carlsson B, Corton J, Safe S, Saag P, Burg B, Gustafsson J (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinol* 139:4252-4263.
- L'Horset F, Blin C, Colont S, Lambert M, Thomasset M, Perret C (1994) Calbindin-D9k gene expression in the uterus: Study of the two messenger ribonucleic acid species and analysis of an imperfect estrogen-responsive element. *Endocrinology* 134:11-18.
- Luconi M, Forti G, Baldi E (2002) Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80:369-381.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996) ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392:49-53.
- Murata Y, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2002) Effect of estrogen deficiency in the male: the ArKO mouse model. *Mol Cell Endocrinol* 193:7-12.
- Nielsen M, Bjornsdottir S, Hoyer PE, Byskov AG (2000) Ontogeny of oestrogen receptor in gonads and sex ducts of fetal and new born mice. *J Reprod Fertil* 118:195-204.
- Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Millette CF, Osawa Y, Shizuta Y, Toda K, Bahr JM (1993) Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* 132:1396-1401.
- O'donnell L, Robertson K, Jones M, Simpson E (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Rev* 22:289-318.
- Oliana C, Francesca M (2003) Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers. *General & Comparative Endocrinol* 131:203-209.
- Owens JW, Ashby J (2002) Critical review and evaluation of the uterotrophic bioassay for the identification of possible estrogen agonists and antagonists in support of the validation of the OECD uterotrophic protocols for the laboratory rodent. Organization for economic cooperation and development. *Critical Reviews in Toxicology* 32:445-520.
- Pelletier G, Labrie C, Labrie F (2000) Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptor in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 165:359-370.
- Pflieger-Bruss S, Schuppe HC, Schill WB (2004) The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. *Andrologia* 36:337-345.
- Pietra RJ, Szego CM (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265:69-72.
- Raman-Wilms L, Lin-in Tseng A, Wighardt S, Einarson TR, Gideon K (1995) Fetal genital effects of first trimester sex hormone exposure: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 85:141-149.
- Rommerts FF, de Jong FH, Brinkmann AO, van der Molen HJ (1982) Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *J Reprod Fertil* 65:281-288.
- Sanders PT, Fisher JS, Sharpe RM, Millar MR (1998) Expression of oestrogen receptor β (ER β) occurs in multiple in cell types, including some germ cells, in the rat testis. *J Endocrinol* 156:R13-17.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341:1392-1395.

- Simoncini T, Maffei S, Basta F, Barsacchi G, Genezzani AR, Liao JK, De Caterina R (2000) Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circ Res* 87:19-25.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR (2004) Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 69:537-542.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De ME, Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrome an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reprod* 16:972- 978.
- Snyder MJ, Mulder EP (2001) Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure. *Aquat Toxicol* 55:177-190.
- Sudhir K, Chou TM, Chatterjee K, Smith EP, Williams TC, Kane JP, Malloy MJ, Korach KS, Rubanyi GM (1997) Premature coronary artery disease associated with a disruptive mutation in the estrogen receptor gene in a man. *Circulation* 96:3774-3777.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette Jr LJ, Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Persp* 104:741-803.
- Toppari J, Skakkebaek NE (1998) Sexual differentiation and environmental endocrine disruptors. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12:143-155.
- Truss M, Beato M (1993) Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 14:459-479.
- van Pelt MM, de Rooij DF, van der Burg B, van der Saag PT, Gustafsson JA, Kuiper GJM (1999) Ontogeny of estrogen receptor beta expression in rat testis. *Endocrinology* 140:478-483.
- Venkov CD, Rankin AB, Vaughan DE (1996) Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation* 94:727-733.
- Visser JA, McLuskey A, Verhoef-Post M, Kramer P, Grootegoed JA, Themmen APN (1998) Effect of prenatal exposure to diethylstilbestrol on Mullerian duct development in fetal male mice. *Endocrinology* 139: 4244-4251.
- Wolff E and Ginglinger A (1935) Sur la transformation des Poulets males en intersexues par injection d'hormone femelle (folliculine) aux embryons. *Archs Anat histol Embryol.* 20:210-278.
- Yoon YD (1998) The effects of endocrine disruptors on reproduction and development of wild animals. *Dev Reprod* 2:115-133.