

미성숙 암컷 흰쥐의 사춘기 개시에 미치는 Vinclozolin의 영향

안 나 경 · 이 성 호[†]

상명대학교 생명과학전공

Effect of Vinclozolin on the Onset of Puberty in Immature Female Rats

Na Kyung An and Sung-Ho Lee[†]

Dept. of Life Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

ABSTRACT : Vinclozolin(VCZ), a systemic dicarboximide fungicide, has been used in the control of diseases caused by microorganism of some species in fruits, vegetables and ornamental plants. Although VCZ itself is a very weak antagonist for androgen receptor binding, both melabolites M1 and M2 are effective antagonists. The present study was undertaken to examine whether prepubertal exposure to VCZ affects on the onset of puberty and the associated reproductive parameters such as hormone receptor expressions in female rats. VCZ(10 mg/kg/day) was administered daily from postnatal day 21(PND 21) through the day when the first vaginal opening(V.O.) was observed. Gross anatomy and weight of reproductive tissues were compared to test the VCZ's effects on the cell proliferation. Furthermore, histological studies were performed to assess the structural alterations in the tissues. To determine the transcriptional changes in progesterone receptor(PR), total RNAs were extracted and applied to the semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). As a result, delayed V.O. was shown in the VCZ group(PND 34.00±1.22) compared to the control group(PND 38.20±1.92; $p<0.01$). VCZ treatment significantly decreased the wet weight of ovaries and uteri compared to the control group($p<0.01$). Graafian follicles and corpora lutea were observed only in the ovaries from the control animals, while numerous primary, secondary follicles and small atretic follicles were observed in the ovaries from VCZ group. Similarly, hypotrophy of luminal and glandular uterine epithelium was found in the VCZ group. In the semi-quantitative RT-PCR studies, the transcriptional activity of PR in ovary($p<0.01$) from VCZ group were significantly lower than those from the control group while in uterus were similar compared with the control group. The present studies demonstrated that the acute exposure to VCZ during the critical period of prepubertal stage could inactivate the reproductive system resulting delayed puberty in female rats.

Key words : Vinclozolin(VCZ), Vaginal opening, Anti-androgenic, Progesterone receptor, Puberty onset.

요 약 : Dicarboximide계 살균제인 vinclozolin(VCZ)은 과일, 야채, 관상용 식물에서 미생물에 의해 유발되는 병들을 통제 하는데 사용되어왔다. VCZ의 대사산물인 M1과 M2는 흔히 토양, 식물, 포유류에 잔존하기 때문에 인간에게 노출될 가능성이 크다. VCZ가 갖는 항안드로겐성 활성 때문에 주로 수컷에 대한 연구가 이루어졌으며, 암컷의 사춘기와 생식계에 미치는 영향은 연구가 미비한 실정이다. 따라서 본 연구는 VCZ가 암컷 흰쥐의 사춘기 개시와 이와 관련된 생식 지표들의 변화에 미치는 효과를 조사하였다. 생후 21일부터 vehicle(DMSO) 또는 VCZ(10 mg/kg/day i.p.)를 사춘기 개시의 지표인 질구 개방(vaginal opening, V.O.)이 일어나는 날까지 투여하였다. 질구 개방이 일어난 날 이후에 희생시킨 후 난소와 자궁의 외양과 조직 무게를 측정하여 VCZ가 이들 조직에서의 세포 증식에 미치는 효과를 조사하였고, 현미경 관찰을 통해 해부학적인 변화 양상을 조사하였다. 또한, 면역조직화학법을 수행하여 단백질 수준에서의 유전자 발현을 조사하였다. 자궁 성숙의 지표인 프로게스테론 수용체(PR) 발현 양상은 정량적인 RT-PCR로 확인하였다. 결과로, VCZ 투여에 의해 질구

개방이 지연됨을 확인하였다(PND 34.00±1.22 in control group vs PND 38.20±1.92 in VCZ group, $p<0.05$). 그러나 체중 변화의 경우, 대조군과 VCZ군 간 유의한 차이가 나타나지 않았다. 난소와 자궁의 크기와 무게는 대조군에 비해 VCZ군에서 유의하게 감소하였다. 질구 개방이 일어

[†] 교신저자: 서울특별시 종로구 홍지동 7, 상명대학교 생명과학전공, (우) 110-743, (전) +82-2-2287-5139, (팩) +82-2-2287-0070, E-mail: shlee@smu.ac.kr

난 대조군의 난소에서는 성숙의 지표인 그라프 난포(Graafian follicle)와 황체가 관찰되었으나, VCZ군의 난소에서는 미성숙한 1차, 2차 난포 그리고 작은 퇴화 난포(atretic follicle)들만이 다수 관찰되었다. 자궁의 경우도 대조군에서는 내막층과 근막층은 물론 상피층까지 잘 발달된 과다 성장 상태와 함께 분비선 수의 증가가 관찰되었으나, VCZ군에서는 모든 세포층과 분비선의 발달이 미약한 상태였다. RT-PCR 결과, 난소($p < 0.01$)에서의 PR mRNA 수준은 VCZ 투여에 의해 유의한 발현 감소가 나타났다. 결론적으로, 본 연구는 사춘기 개시 전 특정시기에 단기적인 VCZ 투여에 의해 암컷 흰쥐의 생식계 활성화가 억제되고, 그 결과 사춘기 개시가 지연될 수 있음을 시사한다.

서 론

Vinclozolin(VCZ)는 dicarboximide계 살균제로써, 포도, 과일, 야채, 흙, 관상용 식물, 잔디에 있어서 *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* 에 의해 유발되는 병들을 제한하는데 사용되어 왔으며, 또한 전 세계 여러 나라에서 식용 식물 경작에도 사용되고 있다(Rankin et al., 1989). VCZ의 대사산물인 M1과 M2는 흔히 토양 식물 포유류에 잔존하며, 농도 의존적으로 안드로젠 수용체-매개 전사 활성을 억제하는 효력이 있는 항안드로젠(antiandrogen)이다. M2는 항안드로젠 물질인 hydroxyflutamide와 유사한 구조와 기능을 갖는 반면, 주요 대사산물인 M1은 활성은 더 적지만 더 높은 농도로 존재하므로 충분한 항안드로젠성 효과를 나타낸다. VCZ의 대사산물은 안드로젠 수용체에 결합하기 위해 테스토스테론 또는 dihydrotestosterone(DHT)와 경쟁하며(Kelce et al., 1994), 안드로젠-유도 유전자 발현과 생식계 발달을 억제한다(Kelce et al., 1997). 흰쥐 태아에 VCZ에 노출될 경우, 자궁 함요(vaginal pouch), 요도 하열과 유두 정체(nipple retention) 유도, 항문-생식기간 거리(anogenital distance, AGD) 감소, 전립선 무게 감소, 정소와 부정소 무게 감소, 수컷 새끼의 행동 변화가 초래된다(Hellwig et al., 2000; Hotchkiss et al., 2003). 또한, 고농도로 노출될 경우, 임신한 어미의 체중 증가율, 새끼의 크기 및 체중이 감소된다(Gray et al., 1999; Hellwig et al., 2000). 사춘기 이전(peripubertal)에 VCZ에 노출된 수컷 흰쥐는 사춘기 개시의 지연, 성 부속선과 부정소의 성장 지연을 나타내며(Monossion et al., 1999), 고농도(최대 400 mg/kg/day) 노출시 투여를 중지한 즉시 성 부속선 무게의 감소, 간질세포의 비대, 부정소 세포의 사멸이 나타났고, 또한 성체가 되었을 때 부정소의 정자 수가 감소하였다(Yu et al., 2004).

VCZ 생식 독성에 관한 연구는 대부분 수컷 또는 남성을 대상으로 한 것들로, 암컷이나 여성에 대한 연구 가운데서도

특히 사춘기 개시에 관한 연구는 극히 취약한 실정이다. 본 연구자들은 VCZ와 유사하게 항안드로젠 효과를 나타내는 내분비계 장애물질인 di(2-ethyl hexyl)phthalate(DEHP)에 의해 암컷 흰쥐의 사춘기 개시가 지연됨을 보고한 바 있다(Lee & Lee, 2006). 본 연구는 VCZ가 DEHP와 유사한 영향을 보이리라는 가정하에 현실적인 VCZ 노출 상황으로 여겨지는 저농도를 선택하여 암컷 흰쥐의 사춘기 개시에 미치는 효과를 조사한 것이다. 이를 위해, 저용량(10 mg/kg/day)의 VCZ를 비교적 단기간인 사춘기 이전(생후 21일)에서 질구 개방이 일어날 때까지 매일 투여하는 모델을 채택하였다. 실험대상의 체중 변화와 생식기관의 성숙 정도를 관찰하였고, 생식기관의 성적인 성숙과 관련된 프로게스테론 수용체(PR)의 발현 양상을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

상명대학교 실험동물 사육장에서 일정한 온도와 광주기(18~22°C; 12시간 조명, 12시간 소등), 먹이와 물 섭취가 자유로운 상태(*ad libitum*)에서 사육한 Sprague-Dawley(SD) strain 흰쥐를 사용하였다. 생후 21일(35~40 g B.W.)된 미성숙 암컷 흰쥐에 VCZ(10 mg/kg/day; Sigma, USA)를 매일 복강 주사하였고, 대조군으로는 DMSO(200 μ L/animal; Dusan, Korea)를 주사하였다. 동물들은 매일 오전 10시에 주사 후 체중을 측정하고 질구 개방 여부를 확인하였다. 질구 개방이 일어난 경우, 생리식염수를 사용한 질도말법(vaginal smear)으로 슬라이드에 도포한 질 상피세포를 현미경하에서 확인하고 오후 5시에 희생시켰다. 희생 후 즉시 조직 무게를 측정하고 RNA를 추출하였다.

2. 난소와 자궁의 조직학적 관찰

희생 후 채취한 난소와 자궁의 성적인 성숙 정도를 조사하

기 위하여 paraformaldehyde(4%)에 고정된 조직을 ethanol로 탈수한 다음 파라핀 포매 후 5~7 μm 두께로 연속 절편을 얻었다. 조직 절편들은 hematoxylin-eosin으로 대조 염색하여 광학현미경(Olympus)으로 관찰하였다.

3. RNA 추출과 Semi-quantitative RT-PCR

조직의 total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 방법(Chomczynski & Sacchi, 1987)에 따라 추출하였다. 1 μg의 total RNA를 주형으로 0.5 μg의 dT₂₀ primer와 AccuPower™ RT PreMix(Bioneer)를 사용하여 최종 반응 volume 20 μL로 역전사하였다. PCR 반응은 1 μL의 역전사 산물을 주형으로 하여 각각의 전사물에 해당하는 primer들과 Taq DNA polymerase(Takara)를 사용하였다. Table 1은 본 실험에서 사용된 primer들의 염기서열과 annealing 온도를 표시하였다. PCR 산물은 전기영동으로 분리하였고, ethidium bromide로 염색후 ImagerIII-1D main software(Bioneer)로 정량하였다. 정량을 위한 internal control PCR에서는 GAPDH primer를 사용하였다.

4. 통계 처리

실험 결과의 통계적 처리는 Student's *t*-test에 의해 이루어졌으며, *P*-value 0.05 이하를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

생후 21일부터 주사를 시작하여 암컷 흰쥐의 사춘기 개시 지표로 널리 사용되는 질구 개방이 일어난 날을 조사한 결과, 총 주사일수는 대조군(14.00±1.22회)에 비해 VCZ군(17.20±1.92회)에서 유의하게 증가하였다(*p*<0.01, Fig. 1). 따라서 질구 개방일은 각각 생후 34.00±1.22일(대조군)과 38.20±1.92일(VCZ)이었다. 체중의 경우, 주사 기간 동안 대조군과 VCZ

Table 2. Initial(PND 21) and final(PND 34) body weights and reproductive parameters in the peripubertal female rats treated with VCZ

		CTL	VCZ
Vaginal opening day (day)		34.00±1.22	38.20±1.92**
Initial body weight(g)	PND 21	35.71±3.96	34.90±2.11
Final body weight(g)	PND 34	99.30±4.13	92.64±5.57
Ovarian weight relative ratio (mg/g B.W.)	PND 34	0.38±0.06	0.24±0.02**
Uterine weight relative ratio (mg/g B.W.)	PND 34	1.45±0.34	0.52±0.12**

Values are expressed as mean±S.E.(n=5).

**Significantly different from control group, *p*<0.01.

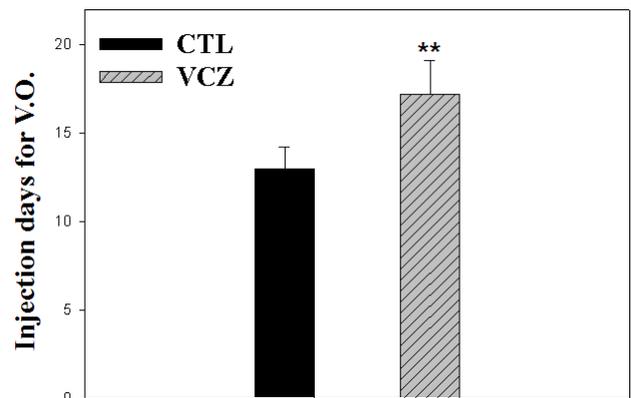


Fig. 1. Delayed vaginal opening(V.O.) in immature female rats treated with VCZ. CTL, control group; VCZ, VCZ-treated group(10 mg/kg/day i.p.). Bars are mean±S.E.(n=5 per group). **Significantly different from control group, *p*<0.01.

Table 1. Primer sets for semi-quantitative RT-PCR analysis

Gene	Nucleic acid sequences	Product size	A.T.(°C)
PR	F 5'-CAGCATGTCGTCTGAGAAAG R 5'-TATAGCATCTGTCCACTGAC	472 bp	62
GAPDH	F 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG R 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG	576 bp	50

PR: progesterone receptor, F: forward, R: reverse, A.T.: annealing temperature.

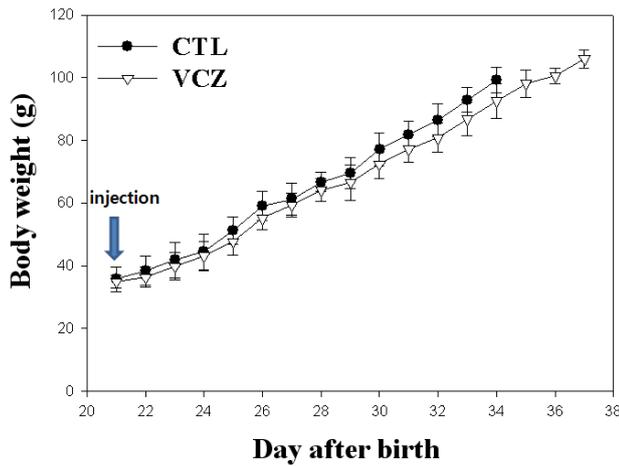


Fig. 2. Changes in body weight during the VCZ administration. Values are expressed as mean±S.E.(n=5 per group).

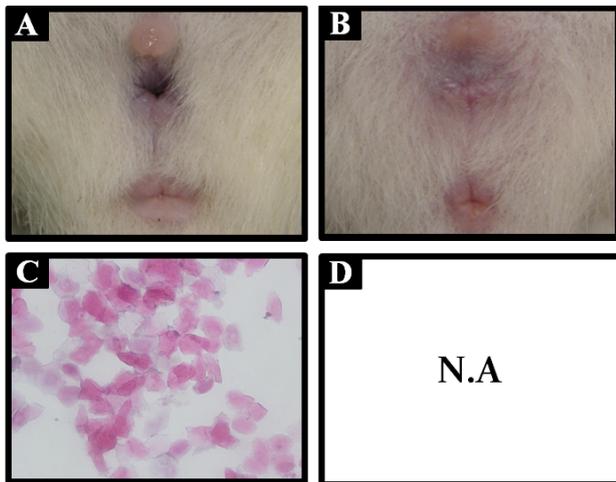


Fig. 3. Comparison of V.O. status and smeared vaginal cells between control and VCZ-treated rats. (A) V.O. is evident in control rats sacrificed on PND 34. (B) V.O. is not occurred in VCZ-treated rats sacrificed on same day. (C) Smeared vaginal epithelial cells from control rats. The cornified feature of cells represents estrus status. (D) Vaginal epithelial cells are not available in VCZ-treated rats.

군에서 유의한 차이가 없었다(Fig. 2). 대조군의 질구 개방일인 생후 34일에 질도말법으로 질 상피세포를 확인한 결과, 대조군에서는 발정주기에서 estrus 시기임을 나타내는 각질 세포들(cornified cells)이 나타났으나(Fig. 3 A, C), 질구 개방이 일어나지 않은 VCZ군은 상피세포를 채취할 수 없었다(Fig. 3 B, D). 조직 외형 관찰에서, 대조군의 난소는 VCZ군

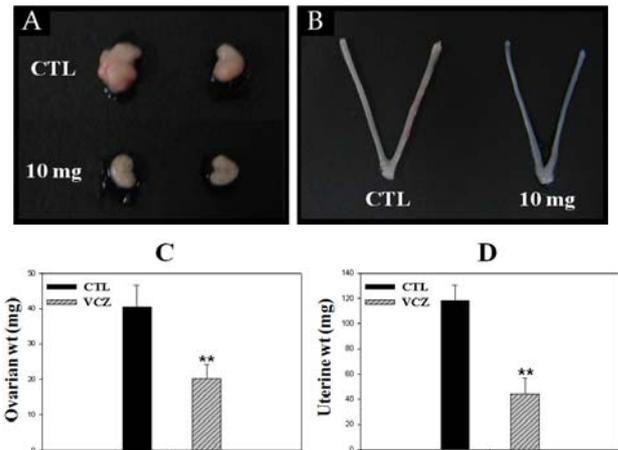


Fig. 4. Comparison of shape and weight of the organs between control and VCZ-treated rats at PND 34. Enlarged ovaries (A) and uteri(B) are shown in control group. (C) The ovarian weights in control(CTL) and VCZ-treated rats(VCZ). (D) The uterine weights in control and VCZ-treated rats. Values are expressed as mean±S.E.(n=5 per group), ** Significantly different from control group, $p < 0.01$.

에 비해 크고 바깥쪽으로 잘 발달된 난포들이 위치하였고, 자궁 역시 대조군에서 더 발달된 상태를 보였다(Fig. 4 A, B). 난소와 자궁의 무게 역시 예상대로 대조군에 비해 VCZ군에서 모두 유의하게 감소하였다(Fig. 4 C, D). 조직학적인 연구에서, 대조군의 난소는 성숙의 지표가 되는 그라프 난포와 황체가 다수 관찰되었으나, VCZ군에서는 작고 미성숙한 1차와 2차 난포들과 퇴화중인 난포(atretic follicle)들이 주로 관찰되었다(Fig. 5 A, B). 대조군의 자궁은 내강측 상피(luminal epithelium), 내막층과 근막층은 물론 외측 상피층까지 잘 발달된 상태이면서 동시에 분비선 수의 증가가 나타났으나, VCZ군의 자궁에서는 모든 세포층과 분비선의 발달이 미약한 상태(hypotrophy)였다(Fig. 5 C, D). 유전자 발현에 있어서 암컷 성성숙 개시의 지표가 되는 프로게스테론 수용체의 mRNA 수준을 조사한 결과, 난소에서 VCZ군이 대조군에 비해 유의하게 낮았으며, 자궁에서는 대조군과 VCZ군이 비슷한 수준으로 나타났다(Fig. 6 A, B).

고찰

전 세계적으로 널리 사용되는 살균제인 VCZ는 항안드로젠 활성을 나타내는 내분비계 장애물질이므로 생식 독성에

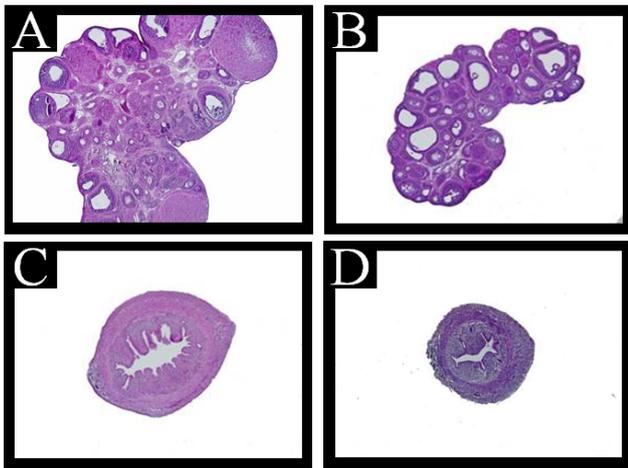


Fig. 5. Microphotographs of ovaries and uteri from control and VCZ-treated rats at PND 34. Note several Graafian follicles and corpora lutea in ovary from control rat. (A) Only a small follicle and some atretic follicles are apparent in the ovary from VCZ-treated rat. (B) Hypotrophy of both luminal and glandular uterine epithelium is evident in the uterus from VCZ-treated rat(D) compared to the control uterus(C). Hematoxylin and eosin staining, $\times 40$.

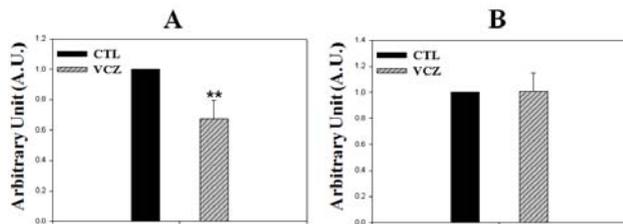


Fig. 6. Effects of prepubertal VCZ administration on the expression of PR in the ovaries(A) and uteri(B) in rats sacrificed on PND 34. Animals were sacrificed on the day after V.O. of control rats. Semi-quantitative RT-PCR was carried out as described in 'Materials and Methods'. Values are expressed as mean \pm S.E.(n=5 per group). **Significantly different from control group, $p < 0.01$.

대한 연구가 주로 수컷 혹은 남성을 대상으로 활발히 이루어졌다(Colbert et al., 2005; Gray et al., 1999; Hrelia et al., 1996). 비록 수컷에 비해 상대적으로 미약하겠지만 안드로젠 역시 암컷의 생식생리에서 그 자체 혹은 에스트로겐의 전구 물질로써 기능하므로(Palacios, 2007), VCZ에 노출된 암컷에서 일정 수준의 생식계 교란이 나타날 것으로 추정할 수 있다. 본 연구는 VCZ에 노출된 흰쥐 암컷에서 비교적 약한

생식 독성이지만, 신경내분비계 전반의 교란에 의해 초래되는 사춘기 개시 지연이 일어남을 보여주었다. 정상적인 사춘기가 일어나기 위해서는 성체에서 나타나는 GnRH-성선자극호르몬-성 스테로이드로 구성된 생식호르몬 축의 활성화가 일어나기 전에 다양한 중추 및 말초 신경들의 통합적 조절이 필요하다(Pawson et al., 2003). 태아기에 시상하부는 GnRH의 일시적인 분비를 시작하는데, 인간의 경우 생후 6~10개월경부터 childhood quiescence라고 알려져 수년간 맥동성 GnRH 발생원(GnRH pulse generator)이 약화된다고 한다(Plant & Baker-Gibb, 2004). 이러한 휴지기 후 성적 성숙이 일어나기 직전에 맥동성 GnRH 신호가 다시 재생되며, 이때 GnRH 방출에 중대한 역할을 하는 것은 GPR54와 그 리간드인 KiSS-1이다(Plant & Barker-Gibb, 2004; Seminara et al., 2003). 일반적으로 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley strain)의 경우 평균 질구 개방일은 31.6~35.1일이며(Blasberg, 1998), 첫 번째 배란은 그 후로부터 약 5일 이내에 일어난다고 보고되었다(Urbanski & Ojeda, 1985). 본 연구에서 생후 21일부터 VCZ (10 mg/kg/day)를 투여한 결과, 투여 후 38.20 \pm 1.92일에 질구 개방이 일어났으며(Fig. 1), 이러한 결과는 VCZ에 의해서 암컷 흰쥐의 평균 질구 개방일이 유의하게 지연됨을 의미한다. 에스트로겐은 암컷 생식기관의 성숙과 사춘기 개시에 있어서 매우 중요한 역할을 하는데, 에스트로겐 활성을 갖는 물질들은 질구 개방을 촉진시키며, 항에스트로겐 및 안드로젠 활성과 스테로이드 생합성에 영향을 미치는 물질들은 질구 개방을 지연시킨다(Willoughby et al., 2005; Presibella et al., 2005; Kim et al., 2002). 그러므로 본 연구 결과는 VCZ의 항안드로젠 효과에 의한 에스트로겐 생합성 저해로 인하여 사춘기가 지연된 것을 시사한다.

암컷 흰쥐의 성숙과정 동안 체중의 감소는 사춘기 개시의 지연 또는 성체 시기에 임신율 감소의 요인이 잘 알려져 왔다(Frisch et al., 1980; Bates et al., 1982). 인간의 경우에도 무월경과 불임이 칼로리 제한이나 격심한 운동에 의해 체중이 감소된 여성에서 나타남이 보고되었다(Warren et al., 1999). 이와 관련하여, 음식 섭취와 에너지 대사의 주요 조절인자로 알려진 leptin이 사춘기 개시에도 영향을 미침이 보고되었다(Cunningham et al., 1999; Idelli et al., 2002). 또한, Leptin 투여 시 ob/ob 생쥐 암컷의 LH 분비와 난소 및 자궁 무게의 증가가 나타났고(Barash et al., 1996), 인간의 생리주기 동안 혈중 LH와 leptin 수준간의 상관관계가 보고되었으며(Teirmaa et

al., 1998), 최근 leptin이 NMDA 수용체를 활성을 통하여 사춘기가 진행 중인 수컷 흰쥐의 LH 분비를 촉진함이 보고되었다(Carbone et al., 2005). 흥미롭게도 KiSS-1 뉴런에 leptin 수용체가 발현됨은 생식-대사 간의 밀접한 상호조절이 존재할 가능성을 보여준다(Tena-Sempere, 2006). 본 연구에서 생후 21일부터 대조군의 질구 개방이 일어나는 날까지 대조군과 VCZ 투여군의 체중을 측정 한 결과, 대조군과 VCZ 투여군 사이에서 유의한 차이가 나타나지 않았는데(Fig. 2), 이는 체중 감소에 의해서 사춘기가 지연된 것이 아님을 의미한다. 그런데 생후 25일부터 DEHP를 복강 주사한 실험에서는 투여 2일째부터 체중이 감소함이 보고되었는데(Lee & Lee, 2006), 이러한 차이는 VCZ가 DEHP보다 대사 독성은 적거나 없기 때문인 것으로 추정된다. VCZ 투여에 의해 체중 대비 난소와 자궁의 무게가 감소한 결과(Fig. 4, 5)는 VCZ에 의한 안드로겐 작용 결과와 에스트로겐 생합성 저해로 난소와 자궁의 성장이 지연되었기 때문으로 추정된다. 난소내 프로게스테론 수용체의 발현 감소(Fig. 6)는 체내에서 대사된 VCZ 대사 산물들인 M1과 M2가 안드로겐 수용체에 길항제로 작용하기 때문으로 추정되지만, 자궁에서는 발현 감소가 관찰되지 않는 점에서 보다 상세한 연구가 필요하다고 판단된다.

VCZ는 광범위하게 사용되는 살균제이므로, 여러 경로를 통하여 인체에 노출될 가능성이 크지만, VCZ가 갖는 항안드로겐 활성 때문에 주로 수컷에서 활발하게 연구가 되었고, 암컷이나 인간에게 미치는 영향에 대한 연구는 미미한 실정이다. 기존의 연구들이 현실적으로 체내에 존재하기 불가능한 약리학적인 고농도를 투여하여 수행된 반면 본 연구는 Wistar rat에서 NOAEL(No-Observed-Adverse-Effect-Level) 로 지정된 12 mg/kg/day(Nellemann et al., 2003) 보다 낮은 농도에서 수행되었다. 본 연구 결과는 NOAEL 수준 이하의 VCZ 노출에 의해서도 유의하게 암컷 사춘기 개시가 지연됨을 보인 것으로서, 적은 양의 VCZ 노출로도 인간과 실험동물의 생식계, 특히 암컷에도 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구자들은 동물 사육과 샘플 처리를 도운 이우철군에게 고마움을 표합니다.

인용문헌

- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DS, Steiner RA (1996) Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137:3144-3147.
- Bates GW, Bates SR, Whitworth NS (1982) Reproductive failure in women who practice weight control. *Fertil Steril* 37:373-378.
- Blasberg ME, Robinson S, Henderson LP, Clark AS (1998) Inhibition of estrogen-induced sexual receptivity by androgen: role of the androgen receptor. *Horm Behav* 34: 283-293.
- Chomzynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by RNA guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Colbert NK, Pelletier NC, Cote JM, Concannon JB, Jurdak NA, Minott SB, Markowski VP (2005) Perinatal exposure to low levels of the environmental antiandrogen vinclozolin alters sex-differentiated social play and sexual behaviors in the rat. *Environ Health Perspect* 113:700-707.
- Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA (1999) Leptin's actions on the reproductive axis: Perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 60:216-222.
- Frisch R, Wyshak G, Vincent L (1980) Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancers. *New Engl J Med* 303:17-19.
- Gray LE Jr, Ostby J, Monosson E, Kelce WR (1999) Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Ind Health* 15:48-64.
- Hellwig J, van Ravenzwaay B, Mayer M, Gembardt C (2000) Pre- and postnatal oral toxicity of vinclozolin in Wistar and Long-Evans rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 32:42-50.
- Hotchkiss AK, Ostby JS, Vandenberg JG, Gray LE Jr (2003) An environmental antiandrogen, vinclozolin, alters the organization of play behavior. *Physiol Behav* 79:151-156.
- Hrelia P, Fimognari C, Maffei F, Vigagni F, Mesirca R,

- Pozzetti L, Paolini M, Cantelli Forti G (1996) The genetic and non-genetic toxicity of fungicide Vinclozolin. *Mutagenesis* 11:445-453.
- Idelli R, Dieguez C, Casanueva FF (2002) The role of leptin in reproduction: experimental and clinical aspects. *Ann Med* 34:5-18.
- Ikeda A, Matsuyama S, Nishihara M, Tojo H, Takahashi M (1994) Changes in endogenous growth hormone secretion and onset of puberty in transgenic rats expressing human growth hormone gene. *Endocr J* 41:523-529.
- Kelce WR, Monosson E, Gamcsik MP, Laws SC, Gray LE (1994) Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by anti-androgenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 126:276-285.
- Kelce WR, Lambright CR, Gray LE, Roberts KP (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.
- Kin HS, Shin JH, Moon HJ, Kim TS, Kang IH, Seok JH, Kim IY, Park KL, Han SY (2002) Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague-Dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone, and flutamide. *Toxicol Sci* 67:52-62.
- Lee KY, Lee SH (2006) Effect of di(2-ethyl hexyl)phthalate (DEHP) on the onset of puberty in female rat. *Dev Reprod* 10:147-154.
- Monosson E, Kelce WR, Lambright C (1999) Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissue, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol Ind Health* 15:65-79.
- Nellemann C, Dalgaard M, Lam HR, Vinggaard AM (2003) The combined effects of vinclozolin and procymidone do not deviate from expected additivity *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol Sci* 71:251-263.
- Palacios S (2007) Androgens and female sexual function. *Maturitas* 57:61-65.
- Pawson AJ, Morgan K, Maudsley SR, Millar RP (2003) Type II gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in reproductive biology. *Reproduction* 126:271-278.
- Plant TM, Barker-Gibb ML (2004) Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. *Hum Reprod Update* 10:67-77.
- Presibella KM, Kita DH, Carneiro CB, Andrade AJ, Dalsenter PR (2005) Reproductive evaluation of two pesticides combined (deltamethrin and endosulfan) in female rats. *Reprod Toxicol* 20:95-101.
- Rankin, GO, Teets VJ, Nicoll DW, Brown PI (1989) Comparative acute renal effects of three N-(3,5-dichlorophenyl)carboxide fungicides: N-(3,5-Dichlorophenyl)-succinimide, vinclozolin and iprodione. *Toxicology* 56:263-272.
- Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New Engl J Med* 349: 1614-1627.
- Teirmaa T, Luukkaa V, Rouru J, Koulu M, Huupponen R (1998) Correlation between circulating leptin and luteinizing hormone during the menstrual cycle in normal-weight women. *Eur J Endocrinol* 139:190-194.
- Urbanski HF, Ojeda SR (1985) *In vitro* simulation of prepubertal changes in pulsatile luteinizing hormone release enhances progesterone and 17 beta-estradiol secretion from immature rat ovaries. *Endocrinology* 117:638-643.
- Warren MP, Voussoughian F, Geer EB, Hyle EP, Adberg CL, Ramos RH (1999) Functional hypothalamic amenorrhea: hypoleptinemia and disordered eating. *J Clin Endocrinol Metab* 84:873-877.
- Willoughby KN, Sarkar AJ, Boyadjieva NI, Sarkar DK (2005) Neonatally administered tert-octylphenol affects onset of puberty and reproductive development in female rats. *Endocrine* 26:161-168.
- Yu WJ, Lee BJ, Nam SY, Ahn B, Hong JT, Do JC, Kim YC, Lee YS, Yun YW (2004) Reproductive disorders in pubertal and adult phase of the male rats exposed to vinclozolin during puberty. *J Vet Med Sci* 66:847-853.