

제 51차 KIST-KITA 협동공개강좌

진보된 안전성 평가와 환경호르몬 검출기법

2000. 5.

주최 한국과학기술연구원
 한국산업기술진흥협회

E-screen assay

류재천.박효정

한국과학기술연구원
독성연구팀

Tel: 958-5070, 5080

Fax: 958-5059

E-mail: 류재천 ryujc@kist.re.kr

박효정 phjdream@kist.re.kr

1. 서론

환경에 존재하는 environmental chemical들이 생체내의 내분비계에 작용하여 생물체에게 breast cancer, testicular cancer 및 reproductive system에 문제를 일으켜 차세대의 생태계까지 심각한 문제를 야기 시키고 있다. 이와 같은 environmental chemical을 빠르고 간편하게 screening 하여 물질의 estrogenicity를 밝히고자 하는 노력이 계속되고 있다. Estrogen은 adult female의 genital track, mammary gland와 같은 생식기관 발달에 관여하여 menstrual cycle, pregnancy, lactation과 같은 생식기능에 중요한 생리 작용을 나타낸다. 세포수준에서는 cell proliferation과 female secondary sex organ의 hypertrophy를 촉진시키며 cell type-specific protein의 합성과 분비를 유도시킨다고 보고되었다 (1). 이러한 estrogenic effect는 estrogen receptor와의 반응을 통해서 일어나며 estrogen receptor는 기존에 알려진 고전적인 receptor인 estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) 이외에 1996년 estrogen receptor beta ($ER\beta$)도 발견되었다 (2-3). E-screen assay는 environmental chemical의 estrogenicity를 in vitro 방법으로 평가하는 방법으로서 Soto등이 개발하였으며 chemical이 MCF-7 cell (Bus cell)에 미치는 cell proliferative effect를 parameter로 하여 chemical의 estrogenicity를 평가하는 방법으로서 estrogen-induced gene expression에 기초한 assay 방법이며 cloned MCF-7 Bus cell을 사용하여 실험한다 (4-7). 여성 유방암유래 MCF-7 cell은 estrogen receptor를 가지고 있으며 estrogen-like chemical 첨가에 의해 세포 증식이 촉진된다는 사실이 알려져 있으며 Pedraza의 보고에 의하면 여러 MCF-7 세포 중 가장 민감성을 보인 세포는 Soto등이 cloning한 MCF-7 Bus cells 이었다 (8). E-screen assay에 의해서 alkylphenol류, antioxidants, polychlorinated biphenyl, pesticides, bisphenol-A, plasticizer등이 MCF-cell proliferation을 증가시키는 것으로 밝혀졌다 (4). In vitro assay가 생체 내에서 chemical의 metabolism, plasma-protein binding, pharmacokinetics에 의한 효과는 입증 할 수 없으며 cell proliferation effect가 모두 estrogenicity에 의한 것인지에 대한 mechanism 여부는 직접적으로 알 수는 없지만 이는 estrogen receptor binding assay나 다른 transcriptional assay를 통해서 밝혀

질 수 있다. E-screen assay는 수많은 chemical의 estrogenicity를 저렴하고 민감하게 간편하고 신속히 screening 할 수 있는 방법이며 agonist와 antagonist를 구분할 수 있다는 장점도 갖고 있어 실험법의 정립을 통해 널리 활용되리라 기대된다.

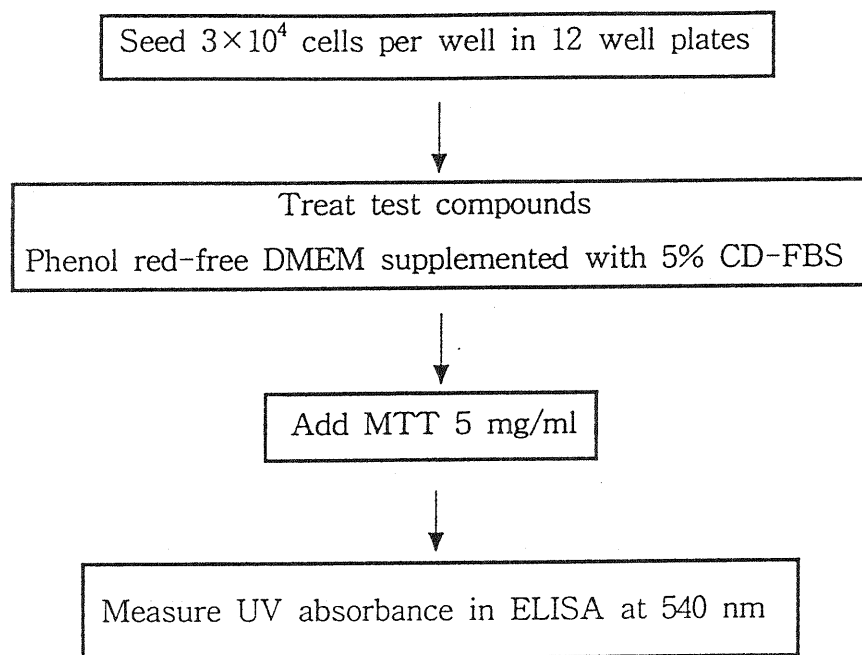
2. 실험재료 및 방법

(1) 세포 및 세포 배양액

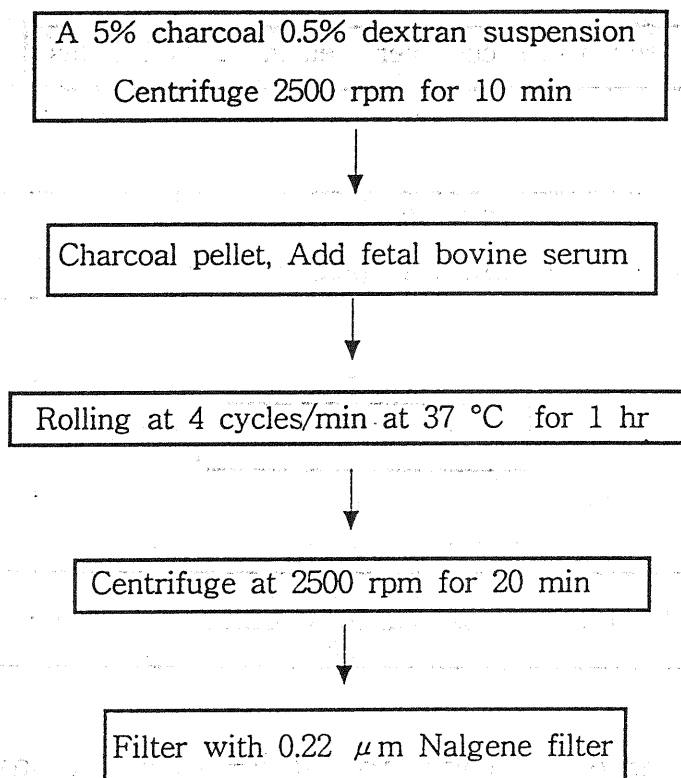
본 연구에 사용되는 세포주는 estrogen-sensitive human breast cancer cell line으로 Soto 등에 의해 cloned된 MCF-7 cells을 분양 받아 사용하였다. 배양을 위해 사용한 배지는 5% FBS Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)이며 시험 시에는 5% charcoal dextran treated fetal bovine serum을 포함한 phenol red free-DMEM 배지를 사용하였다.

(2) 실험방법

실험방법은 Soto 등에 의해 소개된 방법 (4-7)을 수정하여 본 연구실에 맞게 정립하였다. 6-7일간 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지로 배양한 MCF-7 세포를 12 well plate에 3×10^4 cells/well이 되도록 seeding 하였다. 24 시간 후 배지를 제거하고 시험물질을 포함한 5% charcoal dextran으로 처리된 FBS를 함유하는 phenol red free-DMEM 배지 (CD-DMEM)로 교환하였다. 시험물질을 포함한 CD-DMEM medium은 ethanol에 녹인 chemical stock solution을 사용하기 바로 직전에 CD-DMEM medium으로 희석하여 만들어 사용하였다. Control은 CD-DMEM만을 가하고 positive control은 10^{-10} M 17β -estradiol를 처리하였으며 실험 계에서의 용매의 최종농도는 0.5% 이하로 하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 late exponential phase에 도달하는 144 시간에 MTT assay를 시행하였다 (9). 즉 MTT [2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma]를 0.1 mg/well이 되도록 처리하고 4 시간 더 배양한 후 배지를 버리고 DMSO를 넣어 생성된 결정을 녹인 다음 ELISA Plate Reader (UVmax, U.S.A)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.



Scheme 1. Procedure of E-screen assay



Scheme 2. Preparation of charcoal dextran-treated FBS

실제 위와같은 방법을 통하여 대조 물질로서 17β -estradiol을 사용하기 위하여 세포 증식작용을 검토한 결과 배지만을 첨가한 control군에 비해 17β -estradiol ($10^{-12}\text{M} - 10^{-8}\text{M}$)에 의해 세포증식이 약 5-6 배 가량 촉진되었다.

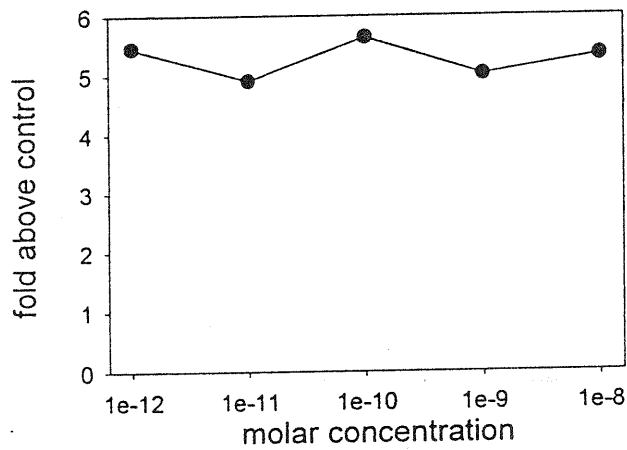


Figure 1. Effects of 17β -estradiol on proliferation of MCF-7 cells expressed as fold increase in cell number above hormone-free controls as a function of the log concentration of the test compound.

3. 참고문헌

1. Hertz, R., The estrogen problem; retrospect and prospect. In *Estrogens in the Environment. II. Influences on Development*, J.A. McLachlan. ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1985, pp. 1-11.
2. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996, 93 (12): 5925-30.
3. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA., Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor alpha and beta. *Endocrinology.* 1997, 138(3): 863-70.
4. Sonnenschein C and Soto AM, An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1998, 65(1): 143-150.
5. Soto AM, Sonnenschein C, The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1985, 23(1): 87-94.
6. Soto AM, Sonnenschein C, Mechanism of estrogen action on cellular proliferation: evidence for indirect and negative control on cloned breast tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984, 122(3): 1097-1103.
7. Soto AM, Fernandez MF, Luizzi MF, Oles Karasko AS, Sonnenschein C, Developing a marker of exposure to xenostrogen mixture in human serum. *Environ. Health. Perspect.* 1997, 105 (suppl 3): 647-54.
8. Pedraza V et al., The E-screen assay: A comparison of different MCF-7 cell stocks. *Environ. Health. Perspect.* 1991, 103: 844-850.
9. Perez P, Pulgar R, Olea-Serrano F, Villalobos M, Rivas A, Metzler M, Pedraza V, Olea N, The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ. Health. Perspect.* 1998, 106(3): 167-74.
10. Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon in vivo by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. Yadetie F. Arukwe A.

Goksoyr A. Male R. *Science of the Total Environment*. 233(1-3):201-210, 1999.

11. Strain differences in vaginal responses to the xenoestrogen bisphenol A. Long XH. Steinmetz R. Ben-Jonathan N. Caperell-Grant A. Young PCM. Nephew KP. Bigsby RM. *Environmental Health Perspectives*. 108(3):243-247, 2000
- 12.. Arcaro KF. Yang Y. Vakharia DD. Gierthy JF. Toxaphene is antiestrogenic in a human breast-cancer cell assay. [Article] *Journal of Toxicology & Environmental Health. Part A*. 2000,2 ,59(3):197-210,
13. Garrett SD. Lee HA. Morgan MRA. A nonisotopic estrogen receptor-based assay to detect estrogenic compounds. [Article] *Nature Biotechnology*.1999 11. 17(12):1219-1222,
14. Screening of selected pesticides for oestrogen receptor activation in vitro
Vinggaard AM. Breinholt V. Larsen JC. *Food Additives & Contaminants*. 16(12):533-542, 1999.
15. Phylogenetic analyses reveal ancient duplication of estrogen receptor isoforms. Kelley ST. Thackray VG. *Journal of Molecular Evolution*. 49(5):609-614, 1999.
16. Toxaphene is antiestrogenic in a human breast-cancer cell assay. Arcaro KF. Yang Y. Vakharia DD. Gierthy JF. *Journal of Toxicology & Environmental Health. Part A*. 59(3):197-210, 2000.
17. Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples. Rehmann K. Schramm KW. Kettrup AA. *Chemosphere*. 38(14):3303-3312, 1999.
18. Toxaphene is antiestrogenic in a human breast-cancer cell assay. Arcaro KF. Yang Y. Vakharia DD. Gierthy JF. *Journal of Toxicology & Environmental Health. Part A*. 59(3):197-210, 2000.