

## 에스트로젠리셉터에 반응하는 내분비교란성물질의 신속 균일액상형광편광분석법 개발

이정란 · 최정은 · 최명자

한국과학기술연구원 생체대사연구센터

## Development of Rapid Homogeneous Fluorescence Polarization Assay for Estrogen Receptor Binding of Endocrine Disrupters

Jung Ran Lee, Jeongeun Choi and Myung Ja Choi

Bioanalysis & Biotransformation Research Center, Korea Institute of Science and Technology  
39-1 Hawolgok-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-791, Korea

A simple homogeneous fluorescence polarization receptor assay(FPRA) was developed to measure the receptor binding activities of various endocrine disrupters using ethylenediamine fluoresceinthiocarbamyl (EDF)-labeled estrogen and estrogen receptor. Cytosolic receptor was isolated from rat uterine and EDF-estrogen tracers were synthesized by EDC coupling reaction. After selection of a best matching pair of uterine cytosolic receptor and EDF-estrogen tracer, calibration curve of FPRA was established using  $17\beta$ -estradiol( $K_d=4.6 \times 10^{-8}$  M) which can bind with estrogen receptor in the range between 100 nM and 1 mM. Using this system, the receptor binding activities of various endocrine disrupting chemicals were investigated and relative estrogen binding activities were characterized. This FPRA system, which needs no separation step between free tracer and receptor-bound tracer, takes 20 minutes for 10 samples using photocheck mode of fluorescence polarization analyser.

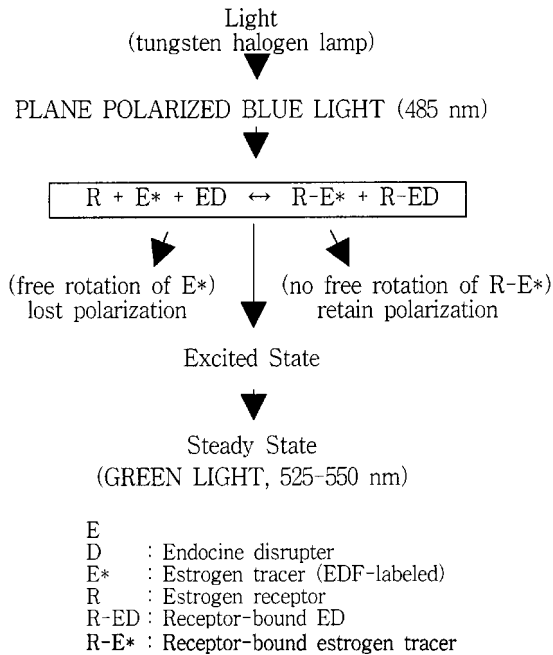
**Key words:** estrogen, receptor, fluorescence tracer, fluorescence polarization assay, endocrine disrupter

### 1. 서 론

최근 내분비교란성물질(endocrine disrupting chemicals; EDC)이 동물 또는 인체에 작용하여 호르몬균형을 교란시켜 정상적인 기능을 방해하거나, 생식 및 생육에 영향을 미친다는 사실이 밝혀지면서 새로운 환경문제로 대두되어 세계적 관심이 고조되고 있다.<sup>1)</sup> EDC의 작용은 estrogen 리셉터나 androgen 리셉터에 binding하므로써 여성호르몬인 estrogen이나 남성호르몬인 androgen의 작용을 저해하며, 또한 hypothalamic pituitary gonadal에 작용하므로써 feed-back으로 반응하는 이들 스테로이드 호르몬의 합성을 방해하여 생식 스테로이드호르몬의 교란을 일으킨다고 알려져 있다.<sup>1-4)</sup> 이에 따라 EPA와 OECD에서 다방면으로 연구를 전개하고 있으며, 다양한 환경화학물질 및 공업용 화학물질의 내분비교란성을 추정할 수 있는 스크리닝법 연구가

활발히 진행되고 있다.

그 계획의 일차적 연구로서 신속스크리닝법 개발의 필요성이 대두되었으며, hormone 리셉터에 대한 EDC의 결합반응정도를 리셉터반응분석을 통해 신속하게 검출할 수 있는 방법이 활발히 연구되고 있다.<sup>1,5-6)</sup> EDC 스크리닝에서 사용하는 in-vitro 분석법은 2 가지로 나누어 수행할 수 있다. 하나는 호르몬 리셉터에 대한 반응성 측정이며, 다른 하나는 transfected microbe을 이용한 transcriptional activity를 측정하는 방법이다. 이 중 EDC의 in-vitro 리셉터반응분석의 특징은 호르몬에 대한 리셉터의 반응특이성 때문에 호르몬의 리셉터 반응감도가 매우 좋은 데에 기대하고 있다. 이 방법은 예민한 경쟁반응성으로 EDC의 낮은 농도까지도 리셉터와의 결합여부를 측정할 수 있으며, 저렴한 가격과 소량의 시료를 사용하여 빠른 결과를 얻을 수 있으며, 스크리닝법의 자동화가 가능하므로, 여러 종류의 EDC를



**Scheme 1.** Principle of fluorescence polarization binding assay.

동시에 스크리닝하는데 가장 적합한 방법으로 생각할 수 있다.

특히 스크리닝의 첫 단계로서의 리셉터반응분석은 다수의 시료를 단시간에 처리할 수 있는 신속한 검색법이 필수적인 조건으로 대두되고 있으므로, 이와 같은 필요성에 입각한 자동화스크리닝법은 기기자동화에 따른 pipeting이나 incubation time 등 manual type에서 나타나는 분석자 간의 오차를 최소화 할 수 있다.<sup>7-8)</sup>

지금까지의 in-vitro 에스트로젠리셉터 반응분석은 동물이나 인체의 estrogen 리셉터를 사용하여 방사선동위원소가 label된 estrogen과의 반응성을 외인성 환경호르몬이 binding site에서 경쟁반응에 의해 치환되는 정도를 측정하는 방법이었다.<sup>8-10)</sup> 이 방법은 환경 및 보건에 위해한 radio-labeled estrogen ligand를 사용할 뿐 아니라 batch type의 수동분석법으로서 리셉터에 결합된 estrogen을 free estrogen과 분리하여 반응 정도를 측정하는 범으로서, 이 분리과정에서 PEG나 다른 고분자 물질을 사용하여 bound된 form을 침전시키거나, 활성탄소를 이용하여 free estrogen을 흡수시킨 후 원심분리해야 하므로 매우 숙련된 기술이 필요한 방법이다. 또한 다단계의 수작업으로 인한 human error 및 방사선 작업시설의 완비, 방사선 취급교육을 받은 인력, 방사선

동위원소의 폐기물 처리와 같은 문제점을 안고 있다.

여기에서 수행한 신속자동화법은 에스트로젠에 형광 물질을 label하여 estrogen tracer로 사용하는 범으로서 형광편광바인딩분석법 원리를 이용하는 homogeneous receptor binding assay이다.<sup>1,7,11)</sup> 즉 receptor-bound estrogen과 free estrogen을 분리한 후 측정하는 것이 아니고, fluorescence-labeled estrogen tracer와 그 리셉터의 반응성을 receptor-bound estrogen과 free estrogen이 공존하는 균일용액상에서 원심분리없이 직접 그 반응성을 측정할 수 있으며, homogeneous competitive binding assay의 원리를 이용한 분석법이다. 이 분석법은 리셉터와 반응하는 estrogen이 EDC에 의해 그 반응성이 유실되는 정도를 fluorescence-labeled estrogen tracer를 사용하여 측정하고 있으며, receptor-bound estrogen tracer와 free fluorescence-labeled estrogen tracer의 양에 따라 편광이 유실되는 정도가 상이한 것을 정량화 하는 법이다(Scheme 1).

본 연구에서는 에스트로젠리셉터에 반응하는 내분비교란성물질의 신속자동화검출을 위해 bound-receptor와 free receptor의 분리조작없이 균일액상 형광편광바인딩분석법을 응용하여 EDC의 신속자동화검출법을 연구하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약 및 기기

17 $\beta$ -estradiol(E<sub>2</sub>) 및 합성에 사용한 시약들, 그리고 diethylstilbesterol, tamoxifen, flutamide를 포함한 EDC중 다음에서 언급한 시약 외 나머지는 Sigma Chemical사(St. Louis, Mo., USA)에서 구입하였다. Methyltestosterone는 Fluka Chemie사(Neu-Ulm, Switzerland)에서 구입하였고, atrazine, methoxychlor, endosulfan, vinclozolin, alachlor, pentachlorophenol, BBP, DBP, PCB(Arochlor 1254)는 Chem Service사(West Chester, PA, USA)에서 구입하였다. o,p'-DDT, p,p'-DDT, permethrin, trifluralin은 Ehrenstorfer사(Augsburg, Germany)에서, benzene은 J.T.Baker사(Houston, TX, USA)에서 구입하였다. Tracer 분리시 사용되는 precoated preparative TLC plates(PSC-Fertigplatten kieselgel 60F254 for preparative chromatography, 20 × 20 cm, 1 mm thickness)는 Merck사(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 에스트로젠 리셉터의 분리는 대한바이오링크(충북)에서 구

입한 immature female Sprague-Dawley rats(23 days old)을 이용하였다. 실험에 사용된 나머지 시약은 특급시약을 사용하였다. TEDG 완충액(pH 7.6)는 3차 증류수 11에 10 mM Tris base, 1.5 mM EDTA, 1.0 mM dithiothreitol과 10% glycerol을 넣어 제조하였다.

에스트로젠 리셉터의 분리단계에서 사용된 기기에는 Ultra Turrax T25 homogenizer(Ika-Labortechnik, Staufen, Br)이외에 Sorvall RC5C centrifuge(Du Pont, Wilmington, DE, USA)와 Centrikon T-2180 ultracentrifuge(Kontron Instruments, Inc., Milano, Italy)를 사용하였다. 형광편광리셉터분석에 사용한 형광편광분석기는 TDx analyzer(Abbott, Irving, TX, USA)로서 photo check mode를 이용하였다.

## 2.2. 표준용액의 조제

17 $\beta$ -estradiol을 1 mg/ml로 에탄올에 녹인 stock 용액을 단계적으로 10 pg/ml 까지 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 같은 방법으로, 28가지 EDC의 stock 용액을 그 특성에 따라 에탄올과 메탄올에 대하여 각각 0.1 mg/ml-1 mg/ml로 만든 후, 1 pg/ml까지 단계적으로 희석하여 농도별로 교차반응 표준용액을 제조하였으며, 4°C에서 보관하여 사용하였다.<sup>12)</sup>

## 2.3. Estrogen receptor의 분리정제

미성숙 female Sprague-Dawley rats를 생후 23일 될 때까지 정상사료로 사육하여 자궁조직만을 모아 무게를 측정하였다. 모든 실험과정에서의 조건과 사용한 완충액은 ice-cold한 상태를 유지하였다. Rat 한 마리 당 30 mg 정도의 자궁조직을 얻었으며, 50 mg 당 1 ml의 ice-cold TEDG 완충액을 가한 후, Ultra Turrax T25 homogenizer를 사용하여 50% output에서 3×20-s bursts으로 균질화한 후, 4°C에서 3,000×g로 10분간 원심분리시켰다. 상등액을 취하여 105,000×g로 1시간 4°C에서 원심분리하여 uterine cytosol 상등액을 조심스럽게 취하였다.<sup>13)</sup>

이 uterine cytosol의 단백질 농도를 Bradford binding assay로 정량하였다. 측정 한 uterine cytosol estrogen 리셉터의 protein 농도를 ml 당 1.0 mg으로 조절하였으며, 즉시 microfuge tube 당 적당량씩 분별하여 -80°C에 저장한 후 필요에 따라 꺼내 사용하였다.

## 2.4. estrogen-6-EDF tracer의 합성

먼저 ethylenediamine fluoresceinthiocarbonyl (EDF)의 합성은 Pourfarzaneh et al. 방법<sup>14)</sup>을 토대로 수행하였다. Ethylenediamine 용액에 FITC 용액을 30분에 걸쳐 방울방울 가했다. 계속 1시간 더 stirring하고 Whatman No. 1 filter paper를 사용하여 여과하여 주황색 침전을 얻은 다음 메탄올 10 ml로 세척하고 질소 가스 하에서 건조시켜 EDF를 얻었다.

그 다음, estrogen tracer로서 fluorescein-labeled estrogen을 제조하였다. Estrogen 유도체로서 6-ketoestradiol-6(o-carboxymethyl)-oxime(E-6-CMO)를 사용했으며, fluorescence label로서 EDF를 사용하였다.<sup>3,14-15)</sup> E-6-CMO를 dimethylformamide(DMF)에 녹이고 N-hydroxysuccinimide(NHS)와 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC)를 가하여 active estrogen을 합성하였다. 위에서 합성한 EDF를 DMF에 현탁시키고 여기에 active estrogen을 가했다. 반응액을 차광하고 실온에서 2시간 반응시킨 뒤, 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 용매를 감압증류하여 제거하고, 메탄올로 2번 세척, 증발시켰다. 다시 소량의 메탄올에 녹이고 analytical TLC로 yellow tracer를 분리하였다. TLC 전개액은 methanol/chloroform mixture (1: 5)을 사용하였고 EDF와 동시에 적용하여 비교하였다. UV lamp를 사용하여 형광을 나타내는 band로서 EDF( $R_f_{365nm}=0.8$ )와 estrogen tracer band(E-6-F:  $R_f_{365nm}=0.58$ )를 구별하였다.

이와 같이, E-6-F band를 확인한 후 preparative TLC를 수행하여 E-6-F( $R_f_{365nm}=0.58$ )를 다량으로 분리하였다. 이때, 사용한 TLC 전개액은 ethylacetate/methanol/acetic acid(130/10/1)이며, silica gel 상에 나타난 band를 긁어모아 메탄올로 추출하고 냉장고에 차광보관하였다. E-6-F(MW 790)의 분자량 확인은 electrospray ionization /mass spectrometry(ESI/MS)를 사용하였으며, estrogen tracer의 농도는 492 nm에서 흡광계수(50 mM carbonate buffer, pH 9.0에서  $8.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}$ )를 이용하여 구하였다.<sup>16-17)</sup>

## 2.5. 형광편광리셉터바인딩 분석법

형광편광리셉터바인딩 분석법은 uterine cytosolic 리셉터와 estrogen-EDF tracer(E-6-F)를 사용하여 수행하였다.<sup>15)</sup> 리셉터에 대한 적정곡선을 작성한 후, 최대 편광 값의 70% binding에 해당하는 리셉터의 양을 구하여 이를 estradiol displacement assay에 이용하였다. Estradiol 검정곡선을 작성하기 위해 estrogen 리셉터에

- Uterine estrogen receptor (protein: 1 mg/ml): 500µl
- E-6-F tracer (12 nM): 500 µl (intensity = 3,600 unit)
- Estradiol or EDC: 10µl

↓ - vortex.  
- incubate RT, 15 min.

mP measurement  
(fluorescence polarization analyzer)

**Scheme 2.** Fluorescence polarization binding assay using estrogen receptor and fluorescence-labeled estrogen tracer

대한 E-6-F tracer와 17β-estradiol(E<sub>2</sub>) 사이의 경쟁 반응시킬 때의 최적조건을 탐색했으며,<sup>12,16)</sup> 이때 50 mM borax로 원하는 농도 희석에 사용하였다. 이와 같이 실험을 수행하여 얻은 최적조건은 다음과 같다. 적정 level의 uterine estrogen receptor(protein 1 mg/ml) 500 µl와 tracer(12 nM, intensity 3,600 unit) 500 µl를 각각 넣고, 여기에 17β-estradiol(또는 EDCs 용액) 10 µl를 가한 후, 실온에서 15분간 반응시켜, 현광편광분석기의 photo check mode로 형광편광을 측정하였다 (Scheme 2).

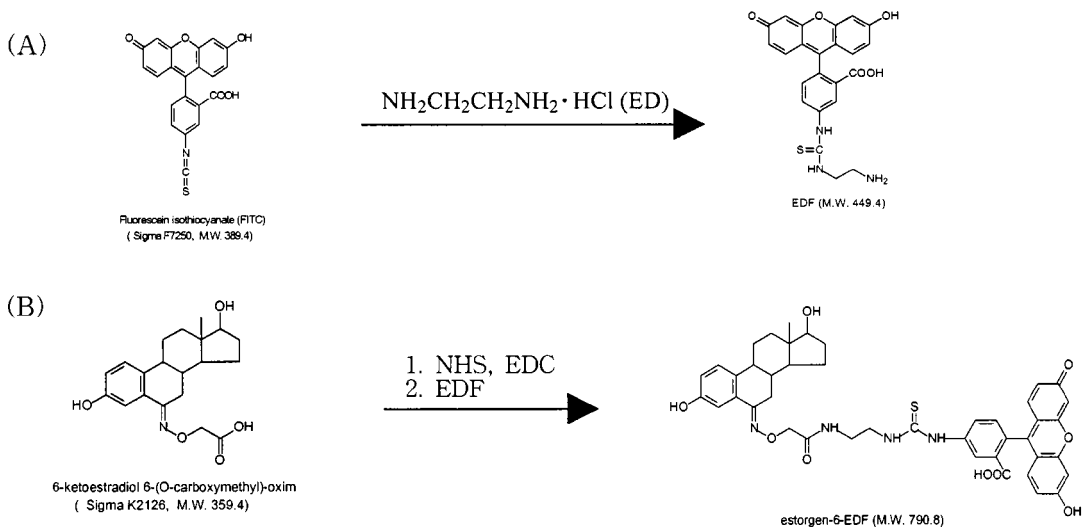
### 3. 결과 및 고찰

형광편광리셉터바인딩분석법(fluorescence polarization binding assay, FPBA)은 균일액상의 competitive

binding assay의 원리를 이용한 신속검출법이다. 이 분석법은 리셉터와 반응하는 estrogen이 내분비교란성물질에 의해 그 반응성이 유실되는 정도를 fluorescence-labeled estrogen tracer를 사용하여 측정하고 있으며, receptor-bound estrogen tracer와 free estrogen tracer의 양에 따라 편광이 유실되는 정도가 상이한 것을 정량화 하는 homegeneous receptor assay 법이다.<sup>2,11-12)</sup>

#### 3.1. Fluorescein-labeled estrogen의 합성

형광편광 리셉터바인딩분석법을 개발하기 위하여, 먼저 estrogen-EDF tracer를 합성하였으며, 그 반응성을 estrogen 리셉터를 이용하여 확인하였다. Estradiol에 형광물질을 label하기 위한 방법으로 estradiol carboxyl 유도체와 FITC에 amino기를 도입한 ethylenediamine fluoresceinthiocarbamyl(EDF)을 반응시켜 estrogen-EDF를 합성하였다. 이때 estrogen carboxyl 유도체로서 6-ketoestradiol-6-(o-carboxymethyl) oxime(E-6-CMO)과 17β-estradiol 17-hemisuccinate (E-17-HS)를 사용하여 각각 estrogen-6-position과 estrogen-17-position에 EDF를 label한 결과에 의하면,<sup>18)</sup> estrogen-6-EDF(E-6-F) tracer는 estrogen 리셉터와 estrogen antibody 모두에서 결합반응을 나타낼 뿐 아니라, free estrogen과 경쟁반응성을 나타내어



Rf<sub>365nm</sub> = 0.58  
ESI confirmation: [M]<sup>-1</sup> = 790

**Fig. 1.** Synthesis of fluorescein-labeled estrogen tracer (A) Synthesis of EDF (B) Synthesis of estrogen-6-EDF tracer

estrogen 농도에 따른 dose-response 반응을 나타내었다. 반면에 estrogen-17-EDF (E-17-F) tracer는 estrogen 리셉터와 estrogen 항체 모두에서 결합반응을 나타내고 있으나, free estrogen과의 경쟁반응성이 미약하여 dose-response 반응성이 없으므로 tracer로 사용할 수가 없었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, estrogen의 17-position은 리셉터나 항체에 대해 필수적인 binding epitope로 생각되며, 이 17-position이 변하면 binding epitope로서의 반응성이 유실되는 것으로 보인다. 따라서 E-6-F tracer를 합성하여 본 연구에 이용하였다. E-6-F tracer는 E-6-CMO의 carboxyl 기를 NHS와 EDC 하에서 EDF의 amino기와 반응시켜 얻었으며 TLC로 분리정제하였다 (Fig. 1). TLC chromatography의 여러 band중  $R_{f,365nm}$  0.58의 주분획을 메탄올로 추출하여 ESI/MS로 분자량을 확인했으며, E-6-F (MW: 790.8)의  $[M]^{-1}$  분자량인 790을 확인할 수 있었다.

### 3.2. estrogen-EDF tracer의 평가

합성한 E-6-F의 반응성은 이미 발표한 논문에서 그 특성이 매우 자세히 기술된 바 있으며,<sup>18)</sup> 이 tracer의 estrogen 항체와 estrogen 리셉터와의 반응성을 형광편광 반응분석으로 평가하였다.

또한 리셉터에 대한 binding affinity를 Scatchard plot를 통해 estradiol 농도에 대한 bound 농도를 조사하여 bound vs bound/free로 plot한 후, 해리상수 ( $K_d$ )와 binding capacity를 구하였다.<sup>11,13-14,16)</sup> Total-bound에 따른 E-6-F tracer의 농도범위를 정하고서, saturation ligand binding assay를 실시하였다. E-6-F tracer 농도별에 대한 total count, tracer 농도별에 따라 리셉터에 반응하는 total bound,  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ )를 사용하여 tracer 농도별에 따라 리셉터에 specific하게 결합하는 non-specific binding(NSB)를 형광편광마인딩분석법(FPBA)로 각각 측정하였다. Total count, total bound, non-specific binding(NSB)에서 얻어진 data들은 리셉터에 대한 protein 농도, tube당 들어간 protein량을 가지고서 specific binding 값을 구하였다. 그 결과, 최종적으로  $K_d$  값과 binding capacity를 계산하여 측정된 값은  $K_d=4.6 \times 10^{-8}M$ 과 binding capacity가  $2.0 \times 10^{-11}$  mol/mg으로 높은 affinity를 나타내었다. 이 FPBA에 의한 binding affinity 결과는 radioreceptor assay에 의해 Kuiper et al.이 보고한 0.1-0.6 nM,<sup>1,8,11,13)</sup> 보다 2 orders 정도 낮은 것

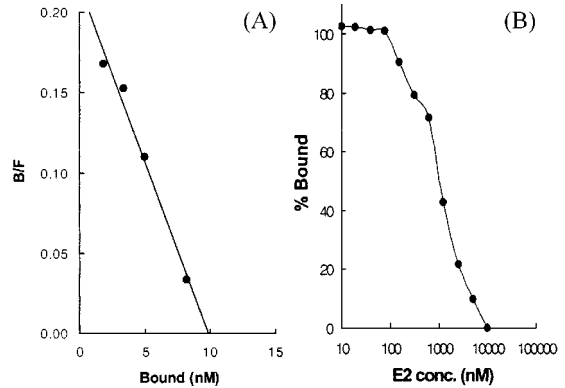


Fig. 2. Scatchard plot and dose-response curve of estradiol for receptor by FPBA  
(A) Scatchard plot (B) Dose-response curve

을 알 수 있었다(Fig. 2A). 그 원인으로서는 추출한 리셉터가 crude한 상태이고, 또한 free tracer와 bound tracer를 분리하지 않고 측정하는 homogeneous FPBA의 affinity가 free tracer와 bound tracer를 분리하여 측정하는 heterogeneous radioassay보다 대략 2 order 정도 반응성이 낮은 경향이 있는 때문으로 추정된다.

### 3.3. Estradiol의 표준반응곡선

FPBA 분석법을 확립하기 위해, 정해진 최적조건에 따라 E-6-F tracer를 사용하여 리셉터에 대한 binding 특성을 연구하였으며, estradiol 농도에 따른 competitive displacement 반응성을 연구하여  $17\beta$ -estradiol( $E_2$ ) 농도에 따른 % bound를 plot하여 표준곡선을 작성하였다.<sup>3,12,16)</sup>

합성한 E-6-F( $R_f=0.58$ ) tracer를 TDx로 측정하여 intensity가 3,600 unit되는 E-6-F 농도는 12 nM 이었다. 측정된 농도의 E-6-F tracer를 estrogen 리셉터에 반응시켰을 때 그 최적농도는 1 mg/ml이었다.  $E_2$  농도에 따른 반응시간별 최적조건은 15분이었다. 위의 조건을 토대로, estrogen 농도에 따른 dose-response 반응성을  $E_2$  concentration vs. polarization(mP)으로 plot 하여 표준곡선을 얻었으며 (Fig. 2B), 50% bound concentration은 1,080 nM으로 나타났다.

### 3.4. 형광편광리셉터바인딩분석법에 의한 EDC 반응성 연구

위의 uterine estrogen 리셉터와 E-6-F를 사용한 형

**Table 1.** Relative-reactivity of estradiol and endocrine disrupters for receptor by FPBA

EDC	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (M)	Relative-reactivity <sup>b</sup> (%)
17β-estradiol	2.8 × 10 <sup>-4</sup>	100
<i>Estrogenic chemicals</i>		
Diethylstilbesterol	7.4 × 10 <sup>-5</sup>	72.7
Tamoxifen	0.6 × 10 <sup>-6</sup>	8687
<i>Androgenic chemicals</i>		
Methyltestosterone	-	N/R <sup>c</sup>
Flutamide	-	N/R
<i>Phytoestrogen</i>		
Genistein	3.7 × 10 <sup>-1</sup>	0.1
Daidzein	4.8 × 10 <sup>-1</sup>	0.1
<i>BTEX</i>		
Benzene	-	N/R
Toluene	-	N/R
Ethylbenzene	-	N/R
o-xylene	-	N/R
<i>Pesticides</i>		
o,p'-DDT	-	N/R
p,p'-DDT	-	N/R
Atrazine	-	N/R
Methoxychlor	9.6 × 10 <sup>-2</sup>	0.3
Endosulfan	4.9 × 10 <sup>-1</sup>	0.1
Vinclozolin	3.8 × 10 <sup>-1</sup>	0.1
Alachlor	-	N/R
Pentachlorophenol	7.3 × 10 <sup>-3</sup>	3.8
Permethrin	9.8 × 10 <sup>-3</sup>	2.8
Trifluralin	4.2 × 10 <sup>-2</sup>	0.7
<i>Phenols</i>		
4-(n)-octylphenol	6.9 × 10 <sup>-4</sup>	40.1
Bisphenol A	6.5 × 10 <sup>-4</sup>	42.6
4-tert-octylphenol	4.6 × 10 <sup>-4</sup>	59.9
<i>Phthalates</i>		
Butylbenzylphthalate	4.5 × 10 <sup>-2</sup>	0.6
Di-n-butylphthalate	3.5 × 10 <sup>-4</sup>	79.9
<i>Synthetic estrogens</i>		
Ethinyl estradiol	5.3 × 10 <sup>-5</sup>	520.4
<i>Phenols</i>		
Arochlor 1254	1.4 × 10 <sup>-1</sup>	0.2
6-n-propyl-2-thiouracil	3.5 × 10 <sup>-1</sup>	0.1

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>: The concentration that inhibits 50% of maximum reactivity between E<sub>2</sub> receptor and tracer.

<sup>b</sup> Relative-reactivity: The concentration ratio of IC<sub>50</sub> for EDC over E<sub>2</sub>

<sup>c</sup> N/R: No response

광편광리셉터바인딩분석법(FPBA) 결과를 통하여, estradiol 뿐만 아니라, 다양한 내분비계장애물질(endocrine disrupting chemicals, EDC)를 검색하여

estrogen 리셉터 반응특성을 조사하였다. FPBA 방법을 이용하여 uterine 리셉터에 대한 EDC의 각각의 화학물질이 반응하는 농도 범위를 조사하였다. 위에서 얻은 각 EDC의 범위에서 IC<sub>50</sub>(maximum binding에서 50% inhibition되는 농도) 값을 구하였고, 각각의 EDC에 대한 relative binding affinity(RBA)는 17β-estradiol (E<sub>2</sub>)의 IC<sub>50</sub> 값을 기준으로 하였을 때 상대적으로 반응하는 각각의 EDC의 IC<sub>50</sub> 값에 대한 값을 구한 것이다.<sup>5,9,19)</sup>

리셉터에 대한 EDC의 반응성을 각각의 물질농도 vs. % bound로 plot 했을 때, 각 EDC에 대한 상대적인 반응성은 Table 1과 같다. 그 결과, estrogenic chemicals인 tamoxifen이 가장 endocrine disrupting activities를 지니고 있었으며, 그 다음으로 합성에스트로젠에 속하는 ethinyl estradiol(EE2) 순이었다. 그 밖에, phthalates로서 di-n-butylphthalate와 estrogenic chemicals에 속하는 diethylstilbesterol, 그리고 phenols 류등이 estrogen 리셉터와의 반응성이 큰 경향을 나타내었다. 또한, FPBA에 의한 리셉터반응분석은 diethylstilbesterol, tamoxifen과 같은 estrogenic chemicals에 대해서 반응성을 보여주었지만, androgen chemical로 알려진 methyltestosterone, flutamide에서는 전혀 반응성이 나타나지 않았다.<sup>6,12,20)</sup>

#### 4. 결 론

Estrogen 리셉터와 EDC-labeled estrogen tracer를 이용한 형광편광리셉터바인딩분석법은 다양한 내분비교란성물질을 30분 이내에 20개 시료를 동시에 한 batch로서 기기자동화하여 data를 얻을 수 있으므로 내분비교란성물질의 스크리닝법으로서의 유용함을 보여주었다. 이 방법은 radio tracer를 사용하지 않고 원심분리과정 이 없는 균일액상분석법으로서 짧은 시간에 간단히 분석할 수 있는 신속자동화검출법으로 실용화가가능성을 제시하였다.

#### 참고문헌

- 1) R. Bolger, T.E. Wiese, et al, *Environ Health Perspect.*, **1998**, 106(9), 551-557.
- 2) P. Aucouturier, J.L. Preudhomme and B. Lubochinsky, *Diagn. Immunol.*, **1983**, 1(4), 310-314.
- 3) M. J. Choi, J. Choi, et al, *Biol. Pharm. Bull.*, **1997**, 20(4), 309-314.
- 4) J. Choi, C. Kim and M. J. Choi, *Electrophoresis*, **1998**,

- 19(16-17), 2950-2955.
- 5) K. Hwang, K.E. Carlson, G.M. Anstead and J.A. Katzenellenbogen, *Biochemistry*, **1992**, 31, 11536 - 11545.
- 6) G.J. Parker, T.L. Law, F.J. Lenocho and Bolger, *J. Biomol. Screen.*, **2000**, 5(2), 77-88.
- 7) J.P. Andrew, M.H. Ulrich and Keith, *Drug Discovery Today*, **1999**, 4(8), 350-362.
- 8) F.A. George, H. Amy and C. Joanna, *Analytical Biochem.*, **1999**, 275(2), 243-247.
- 9) G. G. J. M. Kuiper, B. Carlsson, K. Grandien, et al, *Endocrinol.*, **1997**, 138(3), 863-870.
- 10) P. Matthew and M.T. Abdulmaged, *Steroids*, **2001**, 66, 1-16.
- 11) C.V. Gary and G.S. Stephen, *J. Pharm. Sci.*, **1981**, 70(5), 469-475.
- 12) S.A. Eremin, G. Gallacher, H. Lotey, D.S. Smith and J. Landon, *Clin. Chem.*, **1987**, 33, 1903-1906.
- 13) T.R. Zacharewski, M.D. Meek, et al. *Toxicol. Sci.*, **1998**, 46, 282-293.
- 14) G. W. Pourfarzaneh, J. White, J. Landon and D. S. Smith, *Clin. Chem.*, **1980**, 26(6), 730-733.
- 15) M. J. Choi, J. Choi, J. Park and S. A. Eremin, *J. Immunoassay*, **1995**, 16(3), 263-278.
- 16) C. Bicamumpaka and M. PagÈ, *J. Immunological Methods*, **1998**, 212(1), 1-7.
- 17) W.B. Dandliker, R. James Brawn, M. Hsu, et al. *Cancer Research*, **1978**, 38, 4212-4224.
- 18) J. R. Lee, J. E. Choi, M. J. Choi, *Microchem J.*, **2001**, 70, 229-238
- 19) L. C. Harrison and J. C. Venter, *Receptor Biochemistry and Methodology*, **1988**, Vol. 11, 43-62. Alan R. Liss, Inc. Press, New York,
- 20) d.l.T. Rafael, B. Roser, G. Gerard, G. Montse, J.P. Maria, F. Magi and S. Jordi, *J. Anal. Toxicol.*, **1996**, 20(3), 165-170.