(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0124364
(43) 공개일자 2009년12월03일

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/49* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0050530
(22) 출원일자 2008년05월30일
심사청구일자 2008년05월30일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
김곤섭
경남 진주시 평거동 들말대경아파트 101-1402
(74) 대리인
김형준

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 내분비계장애물질인 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법

(57) 요 약

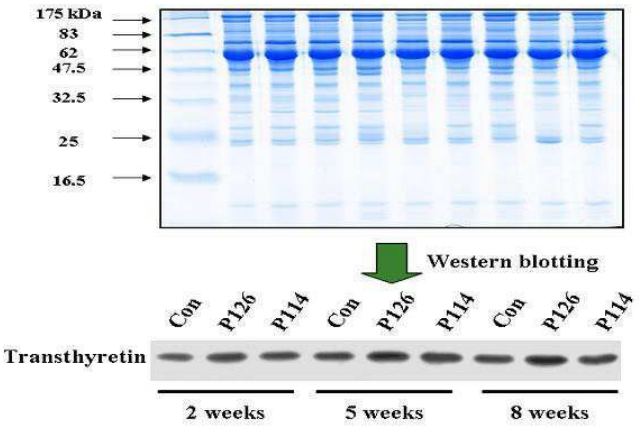
본 발명은 내분비계장애물질인 폴리염화비페닐류(PCBs)의 생물학적 분석방법에 관한 것이다.

본 발명의 내분비장애물질인 PCBs의 생물학적 분석은 혈청에서 트랜스티레틴(Transthyretin) 단백질의 발현을 측정하는 단계; 또는 테스토스테론의 합성에 관여하는 효소 P450scc와 P45017α의 mRNA와 단백질 발현을 측정하는 단계;를 포함하는 것으로 구성된다.

또한, 정자형성(spermatogenesis)에 중요한 역할을 하는 HSP70 및 HSP70-2 유전자 발현을 측정하는 단계; 또는 정세관의 조직학적 변화를 측정하는 단계;를 포함하는 것으로 구성된다.

본 발명에 의해 내분비계장애물질인 PCBs의 인체 내 작용기작을 밝혀, 간편하고 경제적인 방법으로 PCBs를 분석하는 생물학적 분석방법이 제공된다.

대 표 도 - 도17



특허청구의 범위

청구항 1

내분비계장애물질인 폴리염화비페닐류(PCBs)의 분석방법에 있어서,

혈청에서 트랜스티레틴(Transthyretin) 단백질의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 것으로 구성되며, 폴리염화비페닐류에 노출시 혈청 내 트랜스티레틴(Transthyretin) 단백질의 발현이 증가하는 것으로 나타나는 것이 특징인,

내분비장애물질인 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법.

청구항 2

내분비계장애물질인 폴리염화비페닐류(PCBs)의 분석방법에 있어서,

테스토스테론의 합성에 관여하는 효소 P450scc와 P45017α의 mRNA와 단백질 발현을 측정하는 단계를 포함하는 것으로 구성되며,

폴리염화비페닐류에 노출시 P450scc와 P45017α의 mRNA와 단백질 발현이 감소하는 것이 특징인,

내분비장애물질인 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법.

청구항 3

내분비계장애물질인 폴리염화비페닐류(PCBs)의 분석방법에 있어서,

간의 조직학적 변화를 측정하는 단계를 포함하는 것으로 구성되며,

폴리염화비페닐류에 노출시 간에서 황달, 점상출혈, 간소엽의 구조 파괴, 지방침착 중 1 종 이상의 변화가 나타나는 것이 특징인,

내분비장애물질인 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법.

청구항 4

내분비계장애물질인 폴리염화비페닐류(PCBs)의 분석방법에 있어서,

세포사멸 신호기작(Apoptotic signaling)에 관여하는 Bcl-xL 단백질의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 것으로 구성되며,

폴리염화비페닐류에 노출시 Bcl-xL 단백질의 발현이 감소하는 것이 특징인,

내분비장애물질인 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법.

청구항 5

내분비계장애물질인 폴리염화비페닐류(PCBs)의 분석방법에 있어서,

정자형성(spermatogenesis)에 중요한 역할을 하는 HSP70 및 HSP70-2 유전자 발현을 측정하는 단계를 포함하는 것으로 구성되며,

폴리염화비페닐류에 노출시 HSP70 및 HSP70-2 유전자의 발현이 감소하는 것이 특징인,

내분비장애물질인 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법.

청구항 6

내분비계장애물질인 폴리염화비페닐류(PCBs)의 분석방법에 있어서,

정세관의 조직학적 변화를 측정하는 단계를 포함하는 것으로 구성되며,

폴리염화비페닐류에 노출시 정세관의 위축, 비정상적인 정자발생, 정세포 수의 감소, 정세포의 탈착현상 중 1종 이상의 변화가 나타나는 것이 특징인,

내분비장애물질인 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법.

청구항 7

내분비계장애물질인 폴리염화비페닐류(PCBs)의 분석방법에 있어서,

혈청 내 티록신(Thyroxine)의 농도 변화를 측정하는 단계를 포함하는 것으로 구성되며,

폴리염화비페닐류에 노출시 혈청 내 티록신의 농도가 감소하는 것이 특징인,

내분비장애물질인 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법.

청구항 8

내분비계장애물질인 폴리염화비페닐류(PCBs)의 분석방법에 있어서,

혈청 내 테스토스테론(Testosterone)의 농도 변화를 측정하는 단계를 포함하는 것으로 구성되며,

폴리염화비페닐류에 노출시 혈청 내 테스토스테론의 농도가 감소하는 것이 특징인,

내분비장애물질인 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

폴리염화비페닐류(PCBs)는 PCB-114(2,3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl), PCB-126(3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl), PCB-105(2,3,3',4,4'-Pentachloro-biphenyl), PCB-118(2,3',4,4',5-Pentachloro-biphenyl) 중 선택된 1종인 것이 특징인,

내분비장애물질인 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 내분비계장애물질인 폴리염화비페닐류(PCBs)의 생물학적 분석방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 유기염소계 화합물은 생물체 내에서 항상성 유지와 생식, 발달, 행동 등을 조절하는 호르몬의 합성, 분비, 대사, 제거를 방해할 수 있어 '내분비계 장애물질(eddocrine disruptors)'로 불린다.

<3> 내분비계장애물질에 대한 미국, 일본 등의 공식적인 입장은 대상물질의 종류, 시험방법, 노출형태, 생체 내에서의 작용기전 등이 과학적으로 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다는 견해이며, OECD, 미국 환경청(US EPA), 일본 환경청 등에서 이들의 규명 및 영향 연구를 위해 연구 계획을 수립, 진행하고 있다.

<4> 이러한 장애물질은 그 영향이 몇 세대 뒤에 나타난다는 점에서 실증적 연구가 쉽지 않지만 호르몬 교란은 전 종족의 절멸을 초래할 수 있다는 점에서 이러한 장애물질의 명확한 작용기전의 규명과 예방적 대책이 절실히 필요하고, 그런 점에서 지금까지의 환경-보건 문제와는 전혀 차원이 다르다.

<5> 특히, 환경이 심각하게 오염되어 있는 한국의 경우 호르몬 교란 상황도 심각할 것으로 여겨진다.

<6> 인체에 대한 대부분 내분비계장애물질에 대한 노출영향은 현재로는 정확히 증명되지는 않았으며, 내분비계장애물질 가운데 가장 많이 알려진 외인성 에스트로젠의 잠재적 인체영향은 여성에게는 유방 및 생식기관의 암, 내분열증(endometriosis), 자궁섬유종(uterine fibroid), 유방의 섬유세포 질환, 골반염증성 질환(pelvic inflammatory disease) 등이 발생할 수 있으며, 남성에게는 정자수 감소, 정액감소, 정자운동성감소, 기형정자 발생증가, 생식기 기형, 정소암, 전립선질환, 기타 생식에 관련된 조직의 이상을 나타낼 수 있으며, 최근 한국에서는 1회 정액 배출시 정자수가 최소한 1억개는 되어야 하지만, 6천만개 이하이며 정자의 운동성 감퇴가 심각한 약정자증 환자가 늘고 있다.

<7> 유기염소계 화합물 등의 환경에스트로젠성 화합물의 고농도 노출은 유아의 성장기 지능발달의 저하를 가져오는 것으로 알려져 있다.

<8> 대만에서는 PCDF를 함유한 PCB에 의해 모체가 임신 중에 노출된 아이나 신생아시기에 노출된 아이에게서 성장장애가 나타났고, 스웨덴에서는 PCB에 오염된 물고기를 섭취한 엄마로부터 태어난 아이의 체중이 저체중인 경우가 많았다.

<9> PCB 노출의 생물지표인 CB-153 농도와 저체중의 상관성이 인정되었다.

<10> 네덜란드에서는 임신 및 생후 6주간의 수유기에 PCB에 노출된 모체로부터 태어난 아이는 출생시 체중저하와 생후 3개월까지 성장억제가 관찰되었고, 탯줄 속의 혈액이나 모체혈액의 PCB 수준과 이런 장애의 상관성이 관찰되었다.

<11> 신경학상 발달의 지표들로 313명의 신생아를 평가한 실험에서는 이 유아 중에서, PCBs에 노출된 산모혈에서의 PCB 수준 평균이 노출되지 않은 산모에 비해 월등히 높았으며, 모유의 PCBs 평균 또한 노출된 사람의 모유에서 유의하게 높았다.

<12> 또한, 출생시와 생후 3개월에 NBAS(Neonatal Behavioral Assessment Scale, 신생아 행동평가 척도)를 측정하였는데, 오염된 생선을 먹은 군에서 유의하게 신경근육성숙도(neuromuslar maturity)가 감소되었다.

<13> 동물에 관한 신경행동학적 연구는 PCBs에 노출된 암컷에 의해 태어나는 원숭이에서 수행되었는데 생후 44개월에서 검사된 같은 원숭이는 대조군과 비교하여 소극적인 행동을 나타내었다.

<14> 따라서, 내분비계장애물질인 PCBs에 대한 연구가 더욱 필요한 실정이며, 인체내에서 내분비계장애물질을 제거하기 위한 전 단계로서 생물학적 분석방법에 대한 연구가 먼저 이뤄져야 하는 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<15> 본 발명은 상기의 문제를 해결하기 위해 내분비계장애물질인 PCBs을 생물학적 방법을 이용하여 간단하고 경제적으로 분석하는 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

<16> 본 발명은 내분비계 장애물질인 폴리염화비페닐류(PCBs)의 생물학적 분석방법에 관한 것이다.

<17> 본 발명은 혈청에서 트랜스티레틴(Transthyretin) 단백질의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법을 제공한다.

<18> 또한, 본 발명은 테스토스테론의 합성에 관여하는 효소 P450scc와 P45017α의 mRNA와 단백질 발현을 측정하는 단계를 포함하는 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법을 제공한다.

<19> 또한, 본 발명은 간의 조직학적 변화를 측정하는 단계를 포함하는 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법을 제공한다.

<20> 또한, 본 발명은 세포사멸 신호기작(Apoptotic signaling)에 관여하는 Bcl-xL 단백질의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법을 제공한다.

<21> 또한, 본 발명은 정자형성(spermatogenesis)에 중요한 역할을 하는 HSP70 및 HSP70-2 유전자 발현을 측정하는 단계를 포함하는 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법을 제공한다.

<22> 또한, 본 발명은 정세관의 조직학적 변화를 측정하는 단계를 포함하는 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법을 제공한다.

<23> 또한, 본 발명은 혈청 내 티록신(Thyroxine)의 농도 변화를 측정하는 단계를 포함하는 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법을 제공한다.

<24> 또한, 본 발명은 혈청 내 테스토스테론(Testosterone)의 농도 변화를 측정하는 단계를 포함하는 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석방법을 제공한다.

<25> 이때, 본 발명의 상기 폴리염화비페닐류(PCBs)는 PCB-114(2,3,4,4',5- Pentachlorobiphenyl), PCB-

126(3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl), PCB-105 (2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl), PCB-118(2,3',4,4',5-Pentachloro-biphenyl) 중 선택된 1종이다.

<26> 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명하면 다음과 같다.

<27> 본 발명의 발명자들은 내분비계장애물질로 인한 호르몬 교란은 전 종족의 절멸을 초래할 수도 있는 극도로 위험한 것이므로, 이러한 장애물질의 명확한 작용기작을 규명하고 예방해야 할 필요성을 느끼고, 이를 위해 먼저 내분비계장애물질을 간편하면서 경제적으로 분석할 수 있는 방법을 찾기 위해 수년간의 시행착오를 거치며 연구하던 끝에 본 발명을 완성하였다.

<28> 본 발명의 발명자들은 내분비계장애물질 중 PCBs를 투약한 쥐에서 경시별로 프로테오믹스(proteomics)에 의한 단백질발현 패턴을 연구하고, PCB가 성호르몬 (FSH, LH)농도에 미치는 변화 및 생식기관에 미치는 조직학적(광학현미경적, 전자현미경적) 변화를 연구하며, PCB가 생식기관의 유전자 발현에 미치는 변화에 대해 연구한 다음 검증하는 단계를 거쳐 본 발명의 PCBs의 생물학적 분석방법을 완성하였다.

<29> 즉, 본 발명의 내분비장애물질인 PCBs의 생물학적 분석은 혈청에서 트랜스티레틴(Transthyretin) 단백질의 발현을 측정하는 것으로 구성되며, 이때 PCBs에 노출된 경우에는 혈청 내 트랜스티레틴(Transthyretin) 단백질의 발현이 증가한다는 사실을 알 수 있었다.

<30> 또한, 테스토스테론의 합성에 관여하는 효소 P450scc와 P45017α의 mRNA와 단백질 발현을 측정함으로써, PCBs에 노출된 경우에는 P450scc와 P45017α의 mRNA와 단백질 발현이 감소한다는 사실을 알 수 있었다.

<31> 또한, 간의 조직학적 변화를 측정함으로써, PCBs에 노출된 경우에는 간에서 황달, 점상출혈, 간소엽의 구조 파괴, 지방침착 등의 변화가 나타난다는 사실을 알 수 있었다.

<32> 또한, 세포사멸 신호기작(Apoptotic signaling)에 관여하는 Bcl-xL 단백질의 발현을 측정함으로써, PCBs에 노출된 경우에는 Bcl-xL 단백질의 발현이 감소한다는 사실을 알 수 있었다.

<33> 또한, 정자형성(spermatogenesis)에 중요한 역할을 하는 HSP70 및 HSP70-2 유전자 발현을 측정함으로써, PCBs에 노출된 경우에는 HSP70 및 HSP70-2 유전자의 발현이 감소한다는 사실을 알 수 있었다.

<34> 또한, 정세관의 조직학적 변화를 측정함으로써, PCBs에 노출된 경우에는 정세관의 위축, 비정상적인 정자발생, 정세포 수의 감소, 정세포의 탈착현상 등의 변화가 나타난다는 사실을 알 수 있었다.

<35> 또한, 혈청 내 티록신(Thyroxine)의 농도 변화를 측정함으로써, PCBs에 노출된 경우에는 혈청 내 티록신의 농도가 감소한다는 사실을 알 수 있었다.

<36> 또한, 혈청 내 테스토스테론(Testosterone)의 농도 변화를 측정함으로써, PCBs에 노출된 경우에는 혈청 내 테스토스테론의 농도가 감소한다는 사실을 알 수 있었다.

효 과

<37> 본 발명에 의해 내분비계장애물질인 PCBs의 인체 내 작용기작을 밝혀, 간편하고 경제적인 방법으로 PCBs를 분석하는 생물학적 분석방법이 제공된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<38> 이하, 본 발명에 대하여 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세히 설명하나 이들이 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

<39> <실시예 1> 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석 1

<40> SPF(speeific pathen free) 동물을 아래와 같이 2 군으로 나누어 실험하였다.

<41> * 대조군 : Sprague-Dawley , Male, Female 150 마리

<42> * 처리군 : Sprague-Dawley, Male, Female 150 마리

<43> 대조군에는 옥수수유 0.1 ml 씩 주 1 회씩 7회 복강내로 투여하였다.

<44> 처리군에는 PCB-114를 0.2 mg/kg 의 농도로 주 1회씩 7회 복강내로 투여하였다.

<45> 각각의 혈청을 준비하여 2-DE와 웨스턴블랏팅을 통해 트랜스티레틴 단백질의 발현을 측정하였다.

<46> 그 결과, 처리군의 트랜스티레틴(Transthyretin) 단백질 발현량이 증가한 것을 확인하였다.

<47> <실시예 2> 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석 2

<48> 수컷의 Sprague-Dawley계 쥐에 PCB-118을 20㎎/㎏ 씩 매주 1회씩 7회 경구 투여하였다.

<49> 또한, PCB-126을 20㎎/㎏ 씩 주 1회씩 7회 경구투여하였다.

<50> 정상 랫드의 고환과 PCB를 투여한 쥐의 고환에서 시료를 채취하였다.

<51> 각 채취한 시료을 사용하여 RT-PCT과 웨스턴블랏팅을 시행하였다.

<52> 그 결과 PCB를 처리한 군에서 P450scc와 P45017α의 mRNA와 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

<53> <실시예 3> 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석 3

<54> 쥐에 PCB-126(비교실험: 0.2㎎/㎏)과 PCB-105(20㎎/㎏), 그리고 대조군으로 옥수수유를 0.1 ㎖ 씩 주 1회씩 7회 복강 내로 투여하였다.

<55> 부검은 마지막 투여 1주일 후(2, 5, 8주)에 실시하여 생식기관의 조직학적 변화를 관찰하였다.

<56> 그 결과, PCB 투여 8주 후 간 조직에서 황달소견과 점상출혈이 관찰되었고, 간소엽의 구조가 심하게 파괴되었고, 곳곳에 지방침착이 나타났음을 확인하였다.

<57> 정세관의 조직학적 변화는 PCBs를 5주 또는 8주 동안 투여한 처리군에서는 정상대조군에 비해 정세포의 수가 감소하는 경향이 관찰되었고, 정세포의 탈착현상이 처리군에서 많이 관찰되었다.

<58> PCBs를 투여한 후 티록신(thyroxine)의 농도를 조사한 결과에서 PCBs를 2주 및 5주 동안 투여한 군에서 대조군에 비해 PCBs 투여군 모두 유의적인 감소를 나타냈으며, 테스토스테론(testosterone)의 농도를 조사한 결과에서 대조군에 비해 PCB-105를 2주 동안 투여한 군에서 유의적인 감소를 나타내었고, PCB-126을 5주 동안 투여한 군에서도 유의적인 감소를 나타내었다.

<59> 또한, 성샘자극호르몬인 LH(luteinizing hormone)와 의 농도를 조사한 결과 PCB-105를 투여한 군이 대조군에 비해 농도가 증가하였고, FSH(follicle stimulating hormone)의 농도를 조사한 결과 PCB-105을 2주 동안 투여한 군이 대조군에 비해 농도가 감소한다는 것을 확인하였다.

<60> <실시예 4> 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석 4

<61> 수컷의 Sprague-Dawley계 쥐에 PCB-114를 경구 투여하고 PCB-126과 비교 분석하여, 정상 랫드의 고환과 PCB투여한 쥐에서 웨스턴블랏팅을 시행하였다.

<62> 그 결과, 세포사멸에 관여하는 Bcl-xL 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

<63> <실시예 5> 폴리염화비페닐류의 생물학적 분석 5

<64> 수컷의 Sprague-Dawley계 쥐에 PCB-114를 경구 투여하고 PCB-126과 비교 분석하여, 정상 랫드의 고환과 PCB투여한 쥐에서 웨스턴블랏팅을 시행하였다.

<65> 그 결과, 정자형성(spermatogenesis)에 중요한 역할을 하는 HSP70 및 HSP70-2 유전자 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

<66> <실험예 1> PCBs 노출에 따른 생식기관에 미치는 조직학적 변화실험

<67> 1. 실험방법

<68> 렛드 수컷과 암컷에 각각 PCB-114를 경구 투여하여 생식장기의 발달과정에서 정소 및 난소의 조직학적인 변화를 광학현미경적, 전자현미경적으로 조사하였다.

<69> PCB 투여는 매주 1회 월요일에 실시하였으며, PCB-126(비교실험: 0.2㎎/㎏)과 PCB-114(20㎎/㎏), 그리고 대조군으로 옥수수유를 0.1 ㎖ 씩 복강 내로 투여하였다. 부검은 마지막 투여 1주일 후(2, 5, 8주)에 실시하여 샘플링을 실시하였다.

<70> 실험동물을 졸레틸(Zoletil)을 이용하여 복강 내 주사로 마취시킨 후 실험동물은 즉시 복강을 열고 생식관련 장기(난소, 정소 등)를 채취하였다.

<71> 채취한 조직은 고정액으로 전고정한 후 4 ℃에서 12 시간 동안 후고정하였다.

<72> 내분비장애물질이 생식장기에 미치는 영향을 광학현미경적으로 조사하기 위하여 후고정이 끝난 조직은 일반적인 조직포매과정을 거쳐 4-5 ㎛ 두께의 조직절편을 제작하여 슬라이드에 부착하였다.

<73> H&E(Hematoxylin and Eosin) 염색을 수행하여 각 생식관련 장기의 조직학적인 변화를 세포의 형태 및 분포상태를 관찰하였다..

<74> 적출한 조직을 우선 2~3 ㎜ 정도의 크기로 잘라 2.5 % Glutaraldehyde(pH 7.4)에 침지하여 4 ℃에 전고정 상태로 보관한 후, 0.2M phosphate buffer (pH 7.2)로 수세한 다음 1 % 사산화오스뮴(osmium tetroxide)에 1시간 동안 후고정하였다.

<75> 일반적인 알코올 농도의 단계에 따라 탈수하고 epon 812에 포매하여 ultratome (Rechert Jung Co)을 이용하여 70 ㎚ 두께의 초박절편을 만들어 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)와 질산 납(lead nitrate)로 이중 염색하여 투과전자현미경(Hitachi H-600)에서 75KV에서 사진을 촬영하여 관찰하였다.

<76> 2. 결과

<77> 1) 간 부검결과

<78> PCB 투여 8주 후, PCB-126 투여군에서 황달소견과 점상출혈이 관찰되었다(도 1).

<79> 2) 간의 조직학적 변화

<80> PCBs를 8주 동안 투여한 군에서 간의 조직학적 변화를 관찰한 결과에서 PCB-126 투여군의 간소엽의 구조가 심하게 파괴되었고, 곳곳에 지방침착이 나타났다. PCB-114 투여군에서도 간소엽의 구조가 약간 파괴된 것이 관찰되었다(도 2).

<81> 3) 고환조직의 광학현미경적 변화

<82> PCB-126과 PCB-114를 흰쥐에 투여한 후 PCB-126, PCB-114를 각각 2~8 주 동안 투여하여 고환조직의 정세관내 생식세포의 변화양상을 조사하였다.

<83> PCB-126과 PCB-114를 매주 복강으로 주사한 결과 2주, 5주, 8주에서 정세관이 약간 위축되었고, 비정상적인 정자발생 및 정자세포의 감소를 나타내었으나 대조군과 처리군 모두에서 정자세포가 존재하는 것으로 보아 심각한 정자형성과정의 변화는 없었다(도 3).

<84> 정세관의 조직학적 변화는 PCBs를 5주 또는 8주 동안 투여한 처리군에서는 정상대조군에 비해 정세포의 수가 감소하는 경향이 관찰되었고, 정세포의 탈착현상이 처리군에서 많이 관찰되었다.

<85> 4) PCB 투여후 고환무게의 변화에 미치는 영향

<86> 흰쥐에 내분비계장애물질인 PCB-126과 PCB-114를 매주 투여하여 대조군과 처리군의 체중과 고환의 무게를 각각 측정하였다.

<87> PCB-126과 PCB-114를 각각 2주~5주 동안 투여한 후 체중은 약간 증가하였으나 유의한 차이는 없었다.

<88> 도 4는 고환의 무게를 체중에 대한 상대적인 값으로 나타내었는데, PCB-126을 8주 동안 투여한 군에서는 대조군에 비해 유의적인 증가를 나타내었으나 PCB-114를 2~8 주 동안 투여한 군에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다.

<89> 5) PCB 투여후, Total T4(Thyroxine)의 혈청 내 농도 변화

<90> PCBs를 투여한 후 티록신(thyroxine)의 농도를 조사한 결과에서 PCBs를 2주 및 5주 동안 투여한 군에서 대조군에 비해 PCBs 투여군 모두 유의적인 감소를 나타내었다(도 5).

<91> 6) PCB 투여후 혈청 테스토스테론의 농도변화

<92> PCBs를 투여한 후 테스토스테론(testosterone)의 농도를 조사한 결과에서 대조군에 비해 PCB-114를 2주 동안 투여한 군에서 유의적인 감소를 나타내었고, PCB-126을 5주 동안 투여한 군에서도 유의적인 감소를 나타내었다(도 6).

<93> 7) PCB 투여 후 혈청 LH의 농도변화

<94> PCBs를 투여한 후 성샘자극호르몬인 LH(luteinizing hormone)의 농도를 조사한 결과에서 PCB-114를 5주 동안 투여한 군이 대조군에 비해 유의적인 증가를 나타내었으나 PCB-126 투여군에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다(도 7).

<95> 8) PCB 투여 후 혈청 FSH의 농도변화

<96> PCBs를 투여한 후 성샘자극호르몬인 FSH(follicle-stimulating hormone)의 농도를 조사한 결과에서 PCB-114를 2주 동안 투여한 군이 대조군에 비해 유의적인 감소를 나타내었으나, PCB-126 투여군에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

<97> <실험예 2> PCBs 노출에 따른 생식기관의 유전자 발현에 미치는 변화

<98> PCB-114를 투약한 랫드에서 경시별로 프로테오믹스에 의한 발현 패턴이 변화하는 특정단백질을 분리, 동정 하거나 또는 생식기관에서 성 결정인자 혹은 생식세포 발달에 영향을 미치는 유전자들을 동정하고 PCB의 처리에 의한 이들 유전자의 세포 및 생체 내에서의 기능 탐구와 성의 결정 과정에서 그 역할을 확립하기 위하여 고환조직의 RT-PCR과 western blotting를 시행하였다.

<99> 1. 유전자 동정 및 발현패턴 확인

<100> 2차 젤 전기영동법에 의해 동정된 유전자들의 mRNA 발현을 비교분석하기 위해 RT-PCR과 Northern blot 분석을 실시하고, 표적 유전자들의 정확한 발현 세포를 동정하기 위해 ISH(in situ hybridization)를 실시하였다.

<101> 단백질의 발현은 Western blot 분석과 ELISA로써 PCB 을 처리한 재료와 처리하지 않은 재료에서 발현량 차이를 확인하였다.

<102> 또한, 표적유전자 발현세포에서 내분비계장애물질(PCB-114)의 처리에 의한 발현이 증가한 표적유전자에 대한 siRNA(small-interfering RNA)를 사용하여 발현을 재억제시킨 후에 표적 유전자의 기능을 검정하였다.

표 1

RT-PCR용 프라이머

<103>

Gene	Direction	Sequence (5'-3')	Product length (bp)
P450scc	Forward Reverse	CTGAGGGAGAACGGAACACAC AGGCAAAGCGGAATAGGTCAT	424
P45017α	Forward Reverse	GCCAGGGAGGTGCTCATCAAG GGCGTGGACAGGTCTATGGACT	263
5α-reductase 1	Forward Reverse	TCCTGGTCACCTTTGTCTTGGC GTTTCCCCTGGTTTTCTCAGATTC	205
AR	Forward Reverse	CTAGCGCGTGCCTTCCTTTACA CCCACCTGCGGGAAGCT	96
SRB1	Forward Reverse	ATGGTACTGCCGGGCAGAT CGAACACCCTTGATTCCTGGTA	116
ß-actin	Forward Reverse	CAGCCTTCCTTCCTGGGTATG TAGAGCCACCAATCCACACAG	246

표 2

RT-PCR을 위한 변수(Cycling parameter)

Gene	No. of Cycles	Denaturation Time, s	Annealling TM, ℃	Annealling Time, s	Extension Time, s
P450scc	31	40	56	50	50
P45017α	31	40	58	50	80
5α-reductase 1	31	40	56	50	50
SRB1	31	40	56	50	50
AR	31	40	55	50	40
ß-actin	30	40	56	50	50

<104>

<105> 2. 결과

<106> PCBs가 성숙쥐의 테스토스테론(testosterone)을 감소시킨다는 결과는 잘 알려져 있다.

<107> 테스토스테론은 정소(testis)의 레이디그셀(leydig cell)에서 콜레스테롤로부터 일련의 효소들, SRB, p450scc, StAR, 3beta-HSD, P45017α, 17beta-HSD의 연속적인 반응에 의하여 testosterone을 합성된다.

<108> 성숙쥐에서 PCBs의 처리에 의한 테스토스테론의 합성에 관여하는 이들 효소들의 발현을 검토하기 위해서 대조군군과 PCB-126처리군, PCB-114 처리군에서 mRNA와 단백질의 발현의 차이를 대조군과 PCB-126처리군, PCB-114 처리군에서 각각 관찰하였다.

<109> 처리 6주령에서 테스토스테론의 합성에 관련하는 효소, P450scc, P45017α가 RT-PCR과 웨스턴블랏팅에서는 대조군에 비해 PCB 투여군에서 유의적인 감소를 나타내었고, PCB-126 투여군에서는 114 투여군 보다 빠른 일령에서 이들 유전자의 발현이 현저히 감소하는 것으로 나타났다(도 9, 10).

<110> 따라서 PCBs는 레이디그 셀(Leydig cell)에서의 테스토스테론 생합성에 직접적으로 영향을 주어 혈청 테스토스테론의 농도를 감소시키는 것으로 사료되며, PCB-126는 수컷 쥐의 고환에서 테스토스테론 합성에 보다 심각한 영향을 미칠 것으로 사료되며 나아가 정자형성(spematogenesis)에도 영향을 미치게 될 것으로 생각된다.

<111> 또한, PCB에 처리에 의한 세포독성을 검토하기 위해 세포사멸(apoptosis), HSP(heat-shock protein)들에 대한 웨스턴블랏팅을 실시했다.

<112> 세포사멸 신호기작(Apoptotic signaling)에 관여하는 단백질인 Bcl-xL의 PCB 처리에 의한 유의적인 감소가 나타났고, HSP70 과 정자형성(spermatogenesis)에서 중요한 역할을 하는 HSP70-2가 유의적인 감소를 나타내었다(도 11).

<113> 이는 PCBs가 고환세포의 사멸(apoptosis)에도 영향을 미치는 것으로 볼 수 있다.

<114> <실험예 3> PCBs 노출에 따른 생식기관의 단백질 발현 변화에 대한 실험

<115> 1. 실험동물

<116> SPF(speeific pathen free) 동물을 아래와 같이 2 군으로 나누어 실험하였다.

<117> 대조군과 처리군에 Sprague-Dawley 수컷과 암컷 각각 150 마리씩 준비하였다.

<118> 2. 프로테옴 분석

<119> (1) 이차원 전기영동(2-DE)의 시료 사용조건

<120> 혈청을 12 시간 예비 배양한 후 100 ㎕를 50 ㎖의 LB broth에 접종하고, 37 ℃에서 220 rpm으로 24 시간 동안 진탕 배양하였다.

<121> 세균의 배양액은 4 ℃에서 6000 rpm 15 분 동안 원심 침전시키고 침전된 균괴는 40 mM tris-HCl buffer(pH 7.2)로 50 ㎖ 부여시킨 다음 4 ℃에서 6000 rpm으로 10 분간 3 회 세척한 후 흡광도 1.0(λ=610nm)수준으로 희석하였다.

<122> 희석된 세균액은 각각 8 ㎖으로 분주하고, 다시 원심침전시켜 이차원 전기영동의 시료로 사용하였다.

<123> (2) 이차원 전기영(2-DE)동을 위한 시료 준비

<124> 이차원 전기영동을 위한 단백질 추출은 O' Farrell의 방법을 준용하였으며, 준비된 시료에 500 ㎕의 lysis buffer(9M urea, 4%CHAPS, 40 mM Tris-HCl)을 첨가하여 얼음에서 1 시간 반응시킨 다음 13,000×g에서 1 시간 원심시켜 상층액을 회수하고, 회수된 상층액은 Bradford 법을 준용하여 단백질을 정량하였다.

<125> (3) 이차원 전기영동(2-DE)

<126> 1) 1차원 등전점 전기영동(IEF)

<127> IPGphor system을 이용하여 IEF를 수행하였다.

<128> Rehydration buffer(9M urea, 4% CHAPS, 40mM Tris-HCL, 65mM DTT, and 0.5% IPG buffer, bromophenol blue)에 정량한 시료의 단백질을 IPGphore strip holder 에 250 ㎕ 로딩한 후 13 cm immobilized pH Grient (IPG) strip을 잘 올려놓고, 시료가 건조되지 않도록 cover fluid oil을 가하였다.

<129> IEF 조건은 전류가 IPG strip 당 50 ㎂가 넘지 않도록 하였으며, 20 ℃의 온도조건에서 12 시간 rehydration 후, 30 V에서 2 시간, 200 V에서 1 시간, 500 V에서 1 시간, 1000 V에서 1 시간, 2000 V에서 2 시간, 8000 V에서 10 시간 통전하여 최종 83760 Vhr까지 실시하였다.

<130> IEF가 끝난 IPG strip은 2차원 SDS-PAGE를 수행하였다.

<131> 2) 2차원 SDS-PAGE

<132> IEF가 끝난 IPG strip은 1 %(w/v) DTT를 첨가한 equilibration buffer(1.5M tris-HCl, pH 8.8, 6M urea, 30 % glycerol, 2 % SDS, bromophenol blue)에 15 분간 반응시키고 다시 1.25 %(w/v)의 iodoacetamide를 첨가한 equilibration buffer에 15 분간 반응시킨 다음 IPG strip을 12.5 % acrylamide gel의 상단부에 loading 시키고 빈공간은 phenol red를 첨가한 low melting agarose gel을 분주하였다.

<133> 10mA의 조건으로 agarose gel의 붉은색 dye가 strip을 완전히 빠져나가면 20mA로 변환시켜 bromophenol이 gel 하단부에 도달할 때까지 전개하였다.

<134> 3) 도은 염색

<135> 이차원 전기영동을 마친 젤에서 단백질 스팟을 검출하기 위해 도은염색을 하였다.

<136> 젤을 고정용액(50% MeOH, 12% AcOH, 37% HCOH)으로 1 시간 이상 처리한 후, 50 % EtOH으로 20 분간 3 회 반복 세척한 다음 $Na_2S_2O_3.5H_2O$로 1분간 전 처리하였다.

<137> 젤을 3차 증류수로 20 초간 3 회 세척한 다음 $AgNO_3$와 37 % HCOH로 30 분간 처리하여 Na_2CO_3와 37 % HCOH로 발색시키고, 스팟을 확인한 후 고정용액(50 % MeOH, 12 % AcOH)으로 발색을 중지하였다.

<138> 4) ECL을 이용한 면역블랏팅법(Immunoblotting)

<139> 이차원 전기영동을 한 젤에서 항원 스팟을 검출하기 위하여 15 초 동안 MeOH에 전 처리한 PVDF membrane에 60 V에서 70 분동안 전사시킨 후 5 % skim milk를 가하여 4 ℃에서 하루 동안 blocking 하였다.

<140> 5 % skim milk에 1:200으로 희석한 S. enteritidis 특이 다가 혈청을 가하여 2 시간 동안 진탕 배양하면서 반응시킨 후 폴리옥시에틸렌솔비탄모노올레이트 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate, Tween 20)을 0.1 % 첨가한 tris buffered saline으로 세척한 후 다시 5 % skim milk에 1:2000으로 희석한 anti rabbit horse radish conjugated IgG를 가하여 1시간동안 진탕하여 반응시킨 후 ECL kit를 이용하여 항원을 검출하였다.

<141> 5) 통계처리

<142> 도은 염색한 젤과 면역블랏팅 결과는 스캐닝 한 후 전용이미지 분석프로그림인 Phoretix 2D program(Ver. 5.01)을 이용하여 재료를 분석하였다.

<143> 6) MALDI-TOFMS 시료준비

<144> 7) 스팟 절제(excising)

<145> Proetix 2D program을 통해 분석된 2-D gel을 분석한 후, 관심 있는 단백질의 검증을 위해 관련 스팟을 피펫 팁을 이용하여 1 ㎟ 크기로 잘라내었다.

<146> 8) 탈염색과정

<147> 잘라낸 스팟은 도은 염색 상태이므로 30 mM 칼륨 시안화제2철(Potassium ferricyanide)과 100 mM 티오황산나트륨(Sodium thiosulfate)을 1:1로 혼합한 용액에 넣어 5 분 동안 반응시켜 탈색해 준다.

<148> 탈색한 젤은 증류수를 이용하여 5 분 동안 3 ~ 4 회 세척해준다.

<149> 젤 내부의 수분을 제거시켜주기 위해 아세토니트릴(acetonitrile)을 넣어 15 분 동안 반응시킨 후 젤이 하얀색으로 탈수상태가 된 것을 확인한 후 아세토니트릴(acetonitrile)을 제거시켜주고 젤은 진공원심분리기를 이용하여 완전 건조한다.

<150> 9) 젤로 환원 및 알킬레이션(Alkylation)

<151> 건조된 젤에 10 mM DTT가 함유된 100 mM NH_4HCO_3를 넣어 30분간 반응시킨 후 다시 55 mM iodoacetamide가 함유된 100 mM NH_4HCO_3를 넣어 암실에서 30분간 다시 반응시킨다. 100mM NH_4HCO_3를 이용하여 한 번 더 세척한 후 아세토니트릴 (acetonitrile)을 이용하여 젤을 탈수시킨다.

<152> 10) 젤로 흡수(Digestion)

<153> 건조된 젤에 50 mM NH_4HCO_3와 5 mM $CaCl_2$의 흡수버퍼를 넣어 녹인 12.5 ng/㎕의 트립신(trypsin)을 15 ㎕를 넣어 45 분 동안 아이스에서 정치시키고 흡수되지 않고 남은 용액은 모두 제거한 후 20 ㎕의 트립신이 포함되지 않은 흡수버퍼를 넣어 37 ℃에서 16 시간 정도 흡수시킨다.

<154> 11) 펩타이드 추출

<155> 15 ㎕의 증류수를 넣어 30 분간 회전(vortex) 시킨 후 20 ㎕의 아세토니트릴(acetonitrile)을 넣어 다시 30 분간 회전(vortex) 시킨 후 상층액만 수거, 진공원심분리기(vacuum centrifuge)를 이용하여 건조시킨다.

<156> 12) 타겟 시료 준비(Dried-Droplet Method)

<157> 기질용액(Matrix solution)으로 40 mg의 HCCA(α-cyano-4-hydroxycinnamic acid)를 50 % 아세토니트릴(acetonitrile)과 0.3 % TFA 1 ㎖에 녹인 상층액에 적당량의 교정액(브라디키닌, 안지오텐신)을 섞어 건조된 샘플과 혼합한 후 MALDI target에 2 ㎕ 타겟팅 한 후 건조시켜 MALDI-TOF를 시행한다.

<158> 13) 자료 분석

<159> 얻어진 펩타이드의 질량은 단백질 탐색기(Prospector)에 있는 MS-Fit 프로그램을 이용하여 NCBInr 데이타베이스에 접속하여 단백질을 동정하였다.

<160> 이때 mass tolerance 는 50ppm 이내로 하였고 최소 4개 이상의 펩타이드가 일치된 단백질만을 선택하였다.

<161> 3. 결과

<162> 1) 고환조직의 2-DE의 참조지도(reference map)

<163> 각 단백질의 용해도에 따라 총 5장 젤에 나누어 분석하여, 분해능과 단백질 동정율을 높였다.

<164> 총 244개의 단백질 스팟(도 12, 표 3)이 MALDI-TOF MS 를 이용하여 성공적으로 동정되었다.

표 3

Spot No.	Accession No.*	Protein name	Theoretical MW/pI §	Taxonomy
1**	19705431 + 450934	Albumin + heat shock protein 70	70670/6.09 + 70904/5.91	Rattus norvegicus
2	13242237	heat shock protein 8	71055/5.37	Rattus norvegicus
3	11177910	heat shock protein 2	69771/5.44	Rattus norvegicus
4	6678465	tubulin, alpha 1a	50612/4.97	Mus musculus
5	38328248	Tubulin, alpha 1	50816/4.94	Rattus norvegicus
6	40018568	tubulin, beta, 2	50225/4.79	Rattus norvegicus
7	1374715	ATP synthase beta subunit	51171/4.92	Rattus norvegicus
8	109492380	similar to Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	59163/5.67	Rattus norvegicus
9	109493232	similar to p90 autoantigen	103633/5.83	Rattus norvegicus
10	40018616	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	61179/6.23	Rattus norvegicus
11	450934	heat shock protein 70	70904/5.91	Rattus norvegicus
12	1850592	carnitine palmitoyltransferase II	74602/7.08	Rattus norvegicus
13	84781664	hypothetical protein LOC361730	59691/7.12	Rattus norvegicus
14	62662888	similar to pyruvate kinase 3	58264/7.15	Rattus norvegicus
15	76253725	chaperonin subunit 6a (zeta)	58437/6.63	Rattus norvegicus
16	13928850	3-phosphoglycerate dehydrogenase	57256/6.28	Rattus norvegicus
17	6981642	t-complex protein 1	60835/5.86	Rattus norvegicus
18	1352384	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	57044/5.88	Rattus norvegicus
19	54400730	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	57764/6.01	Rattus norvegicus
20	45737866	mitochondrial aldehyde dehydrogenase precursor	56079/6.69	Rattus norvegicus
21	56757324	Alpha-enolase	47440/6.16	Rattus norvegicus
22	51948418	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	50371/6.31	Rattus norvegicus
23	40254781	GDP dissociation inhibitor 2	51018/5.93	Rattus norvegicus
24	9790083	RuvB-like protein 1	50524/6.02	Mus musculus
25**	109459347 + 109460227	similar to Tu translation elongation factor, mitochondrial + similar to Alpha-centractin	49890/7.23 + 54967/8.27	Rattus norvegicus
26**	109459347 + 11177910	similar to Tu translation elongation factor, mitochondrial + heat shock protein 2	49890/7.23 + 69771/5.44	Rattus norvegicus
27	4139571	Chain A, Rat Liver S-Adenosylhomocystein Hydrolase	47889/6.08	Rattus norvegicus
28	109492380	similar to Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	59163/5.67	Rattus norvegicus
29	109467991	similar to Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B	36879/5.88	Rattus norvegicus
30	142349612	glutamine synthetase 1	42982/6.64	Rattus norvegicus

<165>

31	58865830	phosphoglycerate kinase 2	45380/7.55	Rattus norvegicus
32	58865830	phosphoglycerate kinase 2	45380/7.55	Rattus norvegicus
33	27465521	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	57332/8.86	Rattus norvegicus
34	18426866	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	42244/8.09	Rattus norvegicus
35	28460696	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	50424/9.10	Rattus norvegicus
36	6754994	poly(rC) binding protein 1	37987/6.66	Mus musculus
37	27662120	similar to tissue specific transplantation antigen P35B	36059/6.26	Rattus norvegicus
38	13591894	aldo-keto reductase family 1, member A1	36711/6.84	Rattus norvegicus
39	6978491	aldehyde reductase 1	36230/6.26	Rattus norvegicus
40	57527919	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	38112/6.16	Rattus norvegicus
41	13786202	voltage-dependent anion channel 2	32353/7.44	Rattus norvegicus
42	11968070	palmitoyl-protein thioesterase	34946/7.10	Rattus norvegicus
43	9506467	carbonyl reductase	30844/8.22	Rattus norvegicus
44	13786202	voltage-dependent anion channel 2	32353/7.44	Rattus norvegicus
45	1170741	L-lactate dehydrogenase C chain	36063/7.56	Rattus norvegicus
46	62653546	similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36045/8.44	Rattus norvegicus
47	8393418	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36090/8.14	Rattus norvegicus
48	66911967	Hagh protein	34036/7.75	Rattus norvegicus
49	34867525	similar to T-complex protein 1 subunit theta	60121/5.38	Rattus norvegicus
50	11693160	quinoid dihydropteridine reductase	25764/7.67	Rattus norvegicus
51	51948412	electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	27898/7.60	Rattus norvegicus
52	204728	IgE binding protein	15717/9.47	Rattus norvegicus
53	13928688	glutathione S-transferase A5	25360/8.78	Rattus norvegicus
54	204503	glutathione S-transferase Yb-1 subunit	26127/7.63	Rattus norvegicus
55	16923958	peroxiredoxin 1	22323/8.27	Rattus norvegicus
56	28933457	glutathione S-transferase, mu 2	25857/6.90	Rattus norvegicus
57	25282395	glutathione-S-transferase, mu 5	27067/6.33	Rattus norvegicus
58	109465364	similar to Glutathione S-transferase Mu 6	25781/5.99	Rattus norvegicus
59	16758348	peroxiredoxin 6	24860/5.64	Rattus norvegicus
60	16924002	DJ-1 protein	20190/6.32	Rattus norvegicus
61	8393910	phosphatidylethanolamine binding protein	20902/5.48	Rattus norvegicus

<166>

62	27720723	similar to Glutathione S-transferase alpha-4	25550/6.77	Rattus norvegicus
63	5453555	ras-related nuclear protein	24579/7.01	Homo sapiens
64	57114330	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	29712/9.04	Rattus norvegicus
65	25453412	glutathione S-transferase, pi 2	23652/6.89	Rattus norvegicus
66	62078533	protein disulfide isomerase-like protein of the testis	68509/5.62	Rattus norvegicus
67	11177910	heat shock protein 2	69771/5.44	Rattus norvegicus
68	13242237	heat shock protein 8	71055/5.37	Rattus norvegicus
69	19705431	albumin	70670/6.09	Rattus norvegicus
70	40018616	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	61179/6.23	Rattus norvegicus
71	1850592	carnitine palmitoyltransferase II	74602/7.08	Rattus norvegicus
72	84781664	hypothetical protein LOC361730	59691/7.12	Rattus norvegicus
73	109518938	similar to pyruvate kinase 3 isoform 1	48470/7.63	Rattus norvegicus
74	67846036	aspartyl aminopeptidase	53092/6.82	Rattus norvegicus
75	1352384	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	57044/5.88	Rattus norvegicus
76	19527358	nuclear matrix protein SNEV	55661/6.14	Mus musculus
77	6981642	t-complex protein 1	60835/5.86	Rattus norvegicus
78	56757324	Alpha-enolase	47440/6.16	Rattus norvegicus
79	45737866	mitochondrial aldehyde dehydrogenase precursor	56079/6.69	Rattus norvegicus
80	54400730	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	57764/6.01	Rattus norvegicus
81	56757324	Alpha-enolase	47440/6.16	Rattus norvegicus
82	56404326	E3 SUMO-protein ligase PIAS2	64303/8.37	Rattus norvegicus
83	51948418	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	50371/6.31	Rattus norvegicus
84	109492380	similar to Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	59163/5.67	Rattus norvegicus
85	1374715	ATP synthase beta subunit	51171/4.92	Rattus norvegicus
86**	4139571 + 515499	Chain A, Rat Liver S-Adenosylhomocystein Hydrolase + microtubule-associated protein-2 kinase	47889/6.08 + 42456/6.16	Rattus norvegicus
87	71620	actin beta	42066/5.29	Rattus norvegicus
88	109467991	similar to Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit	36879/5.88	Rattus norvegicus
89	142349612	glutamine synthetase 1	42982/6.64	Rattus norvegicus
90	11265288	proteasome protein p45/SUG	42174/8.76	Rattus norvegicus
91	974168	aldehyde dehydrogenase	55013/7.14	Rattus norvegicus
92	27465521	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	57332/8.86	Rattus norvegicus
93	18426866	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial	42244/8.09	Rattus norvegicus

<167>

		3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)		
94	109472290	similar to T-complex protein 1 subunit eta	60133/8.21	Rattus norvegicus
95	6729934	Chain A, Rat Liver F1-Atpase	55361/8.28	Rattus norvegicus
96	109479851	similar to Protein C14orf102 homolog	133728/7.86	Rattus norvegicus
97	109459549	similar to GTP binding protein 7 (putative) isoform 3	36995/9.39	Rattus norvegicus
98	58865830	phosphoglycerate kinase 2	45380/7.55	Rattus norvegicus
99	18543177	citrate synthase	52176/8.53	Rattus norvegicus
100	34867525	similar to T-complex protein 1 subunit theta	60121/5.38	Rattus norvegicus
101	6981146	lactate dehydrogenase B	36874/5.70	Rattus norvegicus
102	6978491	aldehyde reductase 1	36230/6.26	Rattus norvegicus
103	57527919	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	38112/6.16	Rattus norvegicus
104	13591894	aldo-keto reductase family 1, member A1	36711/6.84	Rattus norvegicus
105	62653546	similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36045/8.44	Rattus norvegicus
106	8393418	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36090/8.14	Rattus norvegicus
107	13786202	voltage-dependent anion channel 2	32353/7.44	Rattus norvegicus
108	1170741	L-lactate dehydrogenase C chain	36063/7.56	Rattus norvegicus
109	204728	IgE binding protein	15717/9.47	Rattus norvegicus
110	13928688	glutathione S-transferase A5	25360/8.78	Rattus norvegicus
111	204503	glutathione S-transferase Yb-1 subunit	26127/7.63	Rattus norvegicus
112	6435547	Chain A, Crystal Structure Of A Mammalian 2-Cys Peroxiredoxin, Hbp23	22250/8.34	Rattus norvegicus
113	28933457	glutathione S-transferase, mu 2	25857/6.90	Rattus norvegicus
114	13592152	glutathione S-transferase, mu type 3	25835/6.84	Rattus norvegicus
115	56961640	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1	24683/7.14	Rattus norvegicus
116	25453412	glutathione S-transferase, pi 2	23652/6.89	Rattus norvegicus
117	5453555	ras-related nuclear protein	24579/7.01	Homo sapiens
118	27720723	similar to Glutathione S-transferase alpha-4	25550/6.77	Rattus norvegicus
119	66911967	Hagh protein	34036/7.75	Rattus norvegicus
120	25282395	glutathione-S-transferase, mu 5	27067/6.33	Rattus norvegicus
121	109465364	similar to Glutathione S-transferase Mu 6	25781/5.99	Rattus norvegicus
122	16758274	peroxiredoxin 4	31216/6.18	Rattus norvegicus
123	16758348	peroxiredoxin 6	24860/5.64	Rattus norvegicus
124	8393910	phosphatidylethanolamine binding protein	20902/5.48	Rattus norvegicus
125	8394432	peroxiredoxin 2	21941/5.34	Rattus norvegicus
126	16924002	DJ-1 protein	20190/6.32	Rattus norvegicus
127	12408304	fatty acid binding protein 9,	15308/7.63	Rattus norvegicus

<168>

		testis		
128	8394009	peptidylprolyl isomerase A	18091/8.34	Rattus norvegicus
129	62078533	protein disulfide isomerase-like protein of the testis	68509/5.62	Rattus norvegicus
130	19705431	albumin	70670/6.09	Rattus norvegicus
131	11177910	heat shock protein 2	69771/5.44	Rattus norvegicus
132	6981642	t-complex protein 1	60835/5.86	Rattus norvegicus
133	8393322	glucose regulated protein, 58 kDa	57010/5.88	Rattus norvegicus
134	51890219	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	59955/5.51	Rattus norvegicus
135	76253725	chaperonin subunit 6a (zeta)	58437/6.63	Rattus norvegicus
136	84781664	hypothetical protein LOC361730	59691/7.12	Rattus norvegicus
137	21703842	hypothetical protein LOC28088	55727/6.77	Rattus norvegicus
138	40786469	dihydrolipoamide dehydrogenase	54574/7.96	Rattus norvegicus
139	400269	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	58227/8.47	Rattus norvegicus
140	9790083	RuvB-like protein 1	50524/6.02	Mus musculus
141	51948418	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	50371/6.31	Rattus norvegicus
142	54400730	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	57764/6.01	Rattus norvegicus
143	45737866	mitochondrial aldehyde dehydrogenase precursor	56079/6.69	Rattus norvegicus
144	56757324	Alpha-enolase	47440/6.16	Rattus norvegicus
145	142349612	glutamine synthetase 1	42982/6.64	Rattus norvegicus
146	40254781	GDP dissociation inhibitor 2	51018/5.93	Rattus norvegicus
147	1906013	adenosine kinase	40415/5.84	Rattus norvegicus
148	109492380	similar to Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	59163/5.67	Rattus norvegicus
149	71620	actin beta	42066/5.29	Rattus norvegicus
150	109467991	similar to Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit	36879/5.88	Rattus norvegicus
151	6754994	poly(rC) binding protein 1	37987/6.66	Mus musculus
152	58865830	phosphoglycerate kinase 2	45380/7.55	Rattus norvegicus
153	6978491	aldehyde reductase 1	36230/6.26	Rattus norvegicus
154	62653546	similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36045/8.44	Rattus norvegicus
155	8393418	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36090/8.14	Rattus norvegicus
156	25282395	glutathione-S-transferase, mu 5	27067/6.33	Rattus norvegicus
157	109465364	similar to Glutathione S-transferase Mu 6	25781/5.99	Rattus norvegicus
158	16758348	peroxiredoxin 6	24860/5.64	Rattus norvegicus
159	16924002	DJ-1 protein	20190/6.32	Rattus norvegicus
160	8393910	phosphatidylethanolamine binding protein	20902/5.48	Rattus norvegicus
161	28933457	glutathione S-transferase, mu 2	25857/6.90	Rattus norvegicus
162	13928688	glutathione S-transferase A5	25360/8.78	Rattus norvegicus
163	204503	glutathione S-transferase Yb-1	26127/7.63	Rattus norvegicus

<169>

		subunit		
164	6435547	Chain A, Crystal Structure Of A Mammalian 2-Cys Peroxiredoxin, Hbp23	22250/8.34	Rattus norvegicus
165	205374	Metalloendopeptidase	74011/6.40	Rattus norvegicus
166	19705431	albumin	70670/6.09	Rattus norvegicus
167	8393296	eukaryotic translation elongation factor 2	96192/6.41	Rattus norvegicus
168	61556986	transferrin	78512/7.14	Rattus norvegicus
169	42714644	nucleophosmin/nucleoplasmin 2	23470/5.05	Rattus norvegicus
170	2541906	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	64705/6.72	Rattus norvegicus
171	92053	carboxylesterase (EC 3.1.1.1) ES-10 precursor, microsomal	62376/6.21	Rattus norvegicus
172	109464193	similar to Myosin-4 (Myosin heavy chain B)	43051/8.65	Rattus norvegicus
173	40786469	dihydrolipoamide dehydrogenase	54574/7.96	Rattus norvegicus
174	56757324	Alpha-enolase	47440/6.16	Rattus norvegicus
175	62078495	myo-inositol 1-phosphate synthase A1	48551/5.67	Rattus norvegicus
176	974168	aldehyde dehydrogenase	55013/7.14	Rattus norvegicus
177	56757324	Alpha-enolase	47440/6.16	Rattus norvegicus
178	109459058	similar to pre-mRNA cleavage complex II protein Pcf11	204848/9.20	Rattus norvegicus
179	109492380	similar to Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	59163/5.67	Rattus norvegicus
180	109487833	similar to pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) phosphatase	44839/7.93	Rattus norvegicus
181	55741502	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	41538/6.86	Rattus norvegicus
182	62078615	aldolase A-like 1	39923/7.07	Rattus norvegicus
183	109503376	similar to pericentriolar material 1	229962/4.96	Rattus norvegicus
184	68163509	threonine synthase-like 1	83668/6.75	Rattus norvegicus
185	4699607	Chain A, Dienoyl-Coa Isomerase	30702/7.08	Rattus norvegicus
186	8394060	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1	29784/6.15	Rattus norvegicus
187	24159081	Chain A, Crystal Structure Analysis Of Rat Enoyl-Coa Hydratase In Complex With Hexadienoyl-Coa	28498/6.41	Rattus norvegicus
188	8394076	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6	27838/6.34	Rattus norvegicus
189	13928866	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 4	25892/6.33	Rattus norvegicus
190	8394063	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2	26024/6.92	Rattus norvegicus
191	5453555	ras-related nuclear protein	24579/7.01	Homo sapiens
192	6435547	Chain A, Crystal Structure Of A Mammalian 2-Cys	22250/8.34	Rattus norvegicus

<170>

		Peroxiredoxin, Hbp23		
193	37231712	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 1	26618/7.66	Rattus norvegicus
194	1051270	14-3-3 zeta isoform	27955/4.73	Rattus norvegicus
195	57164029	tripartite motif protein 25	73445/8.62	Rattus norvegicus
196	285140	proteasome endopeptidase complex (EC 3.4.25.1) delta chain	21864/4.98	Rattus norvegicus
197	348457	aconitate hydratase	98750/6.72	Rattus norvegicus
198	61556986	transferrin	78512/7.14	Rattus norvegicus
199	1729977	Transketolase	68342/7.23	Rattus norvegicus
200	19705431	albumin	70670/6.09	Rattus norvegicus
201	266504	NADP-dependent malic enzyme	64589/6.49	Rattus norvegicus
202	92053	carboxylesterase (EC 3.1.1.1) ES-10 precursor, microsomal	62376/6.21	Rattus norvegicus
203	58865398	leucine aminopeptidase 3	56521/6.77	Rattus norvegicus
204	40786469	dihydrolipoamide dehydrogenase	54574/7.96	Rattus norvegicus
205	18266692	selenium binding protein 2	53069/ 6.10	Rattus norvegicus
206	56757324	Alpha-enolase	47440/6.16	Rattus norvegicus
207	203063	alpha-1-antitrypsin precursor	45978/5.70	Rattus norvegicus
208	7533042	guanine deaminase	51439/5.48	Rattus norvegicus
209	14192935	aldehyde dehydrogenase	54994/7.94	Rattus norvegicus
210	57406	unnamed protein product	23589/4.61	Rattus norvegicus
211	13928824	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	29274/4.55	Rattus norvegicus
212	1051270	14-3-3 zeta isoform	27955/4.73	Rattus norvegicus
213	6981146	lactate dehydrogenase B	36874/5.70	Rattus norvegicus
214	6978491	aldehyde reductase 1	36230/6.26	Rattus norvegicus
215	91997	aspartate transaminase	46627/6.73	Rattus norvegicus
216	62078615	aldolase A-like 1	39923/7.07	Rattus norvegicus
217	21489983	asparaginase-like sperm autoantigen	34845/8.04	Rattus norvegicus
218	42476181	malate dehydrogenase, mitochondrial	36117/8.93	Rattus norvegicus
219	2920694	ALCAM	7254/5.37	Rattus norvegicus
220	1170741	L-lactate dehydrogenase C chain	36063/7.56	Rattus norvegicus
221	9506467	carbonyl reductase	30844/8.22	Rattus norvegicus
222	109463441	similar to Hook-related protein 1	166474/5.16	Rattus norvegicus
223	8393948	phosphoglycerate mutase 2	28908/8.85	Rattus norvegicus
224	204503	glutathione S-transferase Yb-1 subunit	26127/7.63	Rattus norvegicus
225	37231712	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 1	26618/7.66	Rattus norvegicus
226	8394331	superoxide dismutase 2	24887/8.96	Rattus norvegicus
227	28933457	glutathione S-transferase, mu 2	25857/6.90	Rattus norvegicus
228	13592152	glutathione S-transferase, mu type 3	25835/6.84	Rattus norvegicus
229	94369185	similar to Phosphoglycerate mutase 1	28928/6.67	Rattus norvegicus
230	8394063	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2	26024/6.92	Rattus norvegicus

<171>

231	8394079	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 2	23069/6.96	Rattus norvegicus
232	34869683	similar to purine-nucleoside phosphorylase	32566/6.46	Rattus norvegicus
233	8394060	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1	29784/6.15	Rattus norvegicus
234	51092266	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	24690/6.07	Rattus norvegicus
235	8394076	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6	27838/6.34	Rattus norvegicus
236	25072205	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4	26333/8.38	Rattus norvegicus
237	83320109	p55 protein	51317/6.01	Rattus norvegicus
238	62647308	similar to pleckstrin homology domain containing, family A	58686/5.00	Rattus norvegicus
239	19924089	expressed in non-metastatic cells 1, protein (NM23A) (nucleoside diphosphate kinase)	17296/5.96	Rattus norvegicus
240	55926145	expressed in non-metastatic cells 2	17386/6.92	Rattus norvegicus
241	12408304	fatty acid binding protein 9	15308/7.63	Rattus norvegicus
242	546056	beta 1 globin	15938/7.98	Rattus norvegicus
243	6981010	hemoglobin alpha 1 chain	15490/7.82	Rattus norvegicus
244	8393296	eukaryotic translation elongation factor 2	96192/6.41	Rattus norvegicus

<172>

<173> * 단백질 서열의 번호는 NCBI(USA)에 등록된 데이터베이스.

<174> ** 스팟은 최소한 2 단백질 이상 오버랩된 것임.

<175> § 이론상 MW/pI 는 측정된 MW/pI과 다소 차이가 날 수 있음.

<176> 2) 혈청 단백질의 2-DE 참조지도(reference map)

<177> 총 29개의 단백질 스팟(도 13, 표 4)이 MALDI-TOF MS 를 이용하여 성공적으로 동정되었다.

표 4

Spot No.	Accession No.*	Protein name	Theoretical MW/pI §	Taxonomy
1**	12831225+ 83816939	Murinoglobulin 1 homolog +alpha-1-inhibitor ?	166590/5.68 +165038/5.70	Rattus norvegicus
2	6970046	GPI-anchored ceruloplasmin	124469/5.39	Rattus norvegicus
3	202857	Alpha-1-macroglobulin	168388/6.46	Rattus norvegicus
4	8393024	Complement component 3	187825/6.12	Rattus norvegicus
5	27229290	Afamin	71172/5.87	Rattus norvegicus
6	57529187	Esterase 2	60529/5.36	Rattus norvegicus
7	57231	Unnamed protein product	45419/5.48	Rattus norvegicus
8	60392582	T-kininogen 1 precursor	48828/6.08	Rattus norvegicus
9	231468	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor	38757/6.05	Rattus norvegicus
10	13928716	Serine protease inhibitor 2c	45640/5.39	Rattus norvegicus
11	203063	Alpha-1-antitrypsin precursor	45978/5.70	Rattus norvegicus
12	60688311	Hemopexin	52060/7.58	Rattus norvegicus
13	19705431	Albumin	70670/6.09	Rattus norvegicus
14	61556986	Transferrin	78512/7.14	Rattus norvegicus
15**	6978879+ 203941	Group specific component +vitamin D-binding protein precursor	55106/5.65+ 55079/5.76	Rattus norvegicus
16	17865327	Fetuin beta	42361/6.71	Rattus norvegicus
17	114008	Apolipoprotein A-IV precursor	44429/5.12	Rattus norvegicus
18	19705431	Albumin fraction	70670/6.09	Rattus norvegicus
19	554423	Complement component C3	32414/5.73	Rattus norvegicus
20	33086640	Ba1-647	43075/6.11	Rattus norvegicus
21	60097941	Haptoglobin	39052/6.10	Rattus norvegicus
22	2145145	Apolipoprotein A-I	29956/5.51	Rattus norvegicus
23	3212532	Chain A, Rat Transthyretin	13122/6.04	Rattus norvegicus
24	2145145	Apolipoprotein A-I	29956/5.51	Rattus norvegicus
25	554423	Complement component C3	32414/5.73	Rattus norvegicus
26	14091667	LEK1	39504/4.86	Rattus norvegicus
27	114008	Apolipoprotein A-IV precursor	44429/5.12	Rattus norvegicus
28	203941	Vitamin D-binding protein precursor	55079/5.76	Rattus norvegicus
29	3212532	Chain A, Rat Transthyretin	13122/6.04	Rattus norvegicus

<178>

<179> * 단백질 서열의 번호는 NCBI(USA)에 등록된 데이터베이스.

<180> ** 스팟은 최소한 2 단백질 이상 오버랩된 것임.

<181> § 이론상 MW/pI 는 측정된 MW/pI과 다소 차이가 날 수 있음.

<182> 3) 혈청 단백질 발현양상 비교

<183> 2-DE 참조지도를 기반으로 하여 PCB-126 투여군과 대조군 간의 단백질 발현차를 비교해 보니, PCB-126 투여군에서 하나의 스팟이 대조군에 비해 발현이 증가되었다.

<184> 이 스팟으로부터 단백질을 추출한뒤 MALDI-TOF MS 로 질량스펙트럼을 분석하였다(도 14).

<185> 분석한 스펙트럼으로 PMF(peptide mass fingerprinting)를 실시하였으며, 그 결과 유의수준 95 %에서 렛 트랜스티레틴(rat transthyretin) 이라는 단백질로 동정되었다(도 16, 17).

<186> 4) 트랜스티레틴의 웨스턴블랏팅 결과

<187> 위에 동정된 트랜스티레틴(transthyretin)의 발현양상을 전이수준 (translation level)에서 조사해 보았다.

<188> 대조군에 비해 PCB-126 투여군에서 유의적인 증가를 나타내었으며, PCB-114 투여군에서도 약간의 증가를 보였다(도 17).

<189> 트랜스티레틴(transthyretin)은 간세포에서 합성되어 혈액내로 분비되는 것으로 알려져 있다.

<190> 따라서 간암세포인 HepG2 cell에 PCB를 직접 처리하여 그 media에서 분비되어져 나오는 단백질을 가지고 웨스턴

블랏팅을 실시하였다.

<191> 그 결과 DMSO를 처리한 대조군에 비해 PCB투여군에서 모두 유의적인 증가를 나타내었다(도 18).

<192> 종합해보면, 혈청에서의 2-DE와 웨스턴블랏팅, 그리고 간암세포 media를 이용한 웨스턴블랏팅에서 모두 일관성 있는 결과를 얻을 수 있었다.

<193> 따라서 PCBs는 트랜스티레틴의 발현증가에 직접적으로 영향을 미친다고 할 수 있다.

<194> 트랜스티레틴은 혈액내 갑상선호르몬의 중요한 운반단백질로 알려져 있다.

<195> 따라서, 트랜스티레틴(transthyretin)의 증가는 갑상선호르몬의 감소와도 밀접한 연관성이 있을것으로 사료되며 그 매커니즘에 대해서는 좀 더 명확한 연구가 진행되어야 할 것이다.

도면의 간단한 설명

<196> 도 1은 내분비장애물질인 PCBs 투여 8주 후 간의 부검사진

<197> A : 대조군, B : PCB-114 투여군, C : PCB-126 투여군

<198> 도 2는 내분비장애물질인 PCBs 투여 8주 후 간조직의 광학현미경 사진

<199> 도 3은 내분비장애물질인 PCBs 투여 후 고환조직의 광학현미경 사진

<200> A : 대조군(2주), B : PCB-126(2주), C : PCB-114(2주)

<201> D : 대조군(5주), E : PCB-126(5주), F : PCB-114(5주)

<202> G : 대조군(8주), H : PCB-126(8주), I : PCB-114(8주)

<203> 도 4는 내분비장애물질인 PCBs 투여 후 쥐의 고환무게 변화를 나타내는 그래프

<204> 도 5는 내분비장애물질인 PCBs 투여 후 쥐 혈청 내 티록신의 농도변화를 나타내는 그래프

<205> 도 6은 내분비장애물질인 PCBs 투여 후 쥐 혈청 내 테스토스테론의 농도변화를 나타내는 그래프

<206> 도 7은 내분비장애물질인 PCBs 투여 후 쥐 혈청 내 LH의 농도변화를 나타내는 그래프

<207> 도 8은 내분비장애물질인 PCBs 투여 후 쥐 혈청 내 FSH의 농도변화를 나타내는 그래프

<208> 도 9는 테스토스테론 합성에 관여하는 효소에 대한 mRNA 웨스턴블랏팅사진

<209> 도 10은 테스토스테론 합성에 관여하는 효소에 대한 단백질의 웨스턴블랏팅사진

<210> 도 11은 세포사멸 신호기작에 관여하는 단백질의 웨스턴블랏팅 사진

<211> 도 12는 내분비장애물질인 PCBs 투여 후 쥐 고환조직의 2-DE 참조지도

<212> 도 13은 내분비장애물질인 PCBs 투여 후 쥐 혈청단백질의 2-DE 참조지도

<213> 도 14는 혈청 2-DE 젤에서 유의하게 발현된 스팟 사진

<214> 도 15는 유의하게 발현된 스팟의 질량스펙트럼 결과를 나타내는 그래프

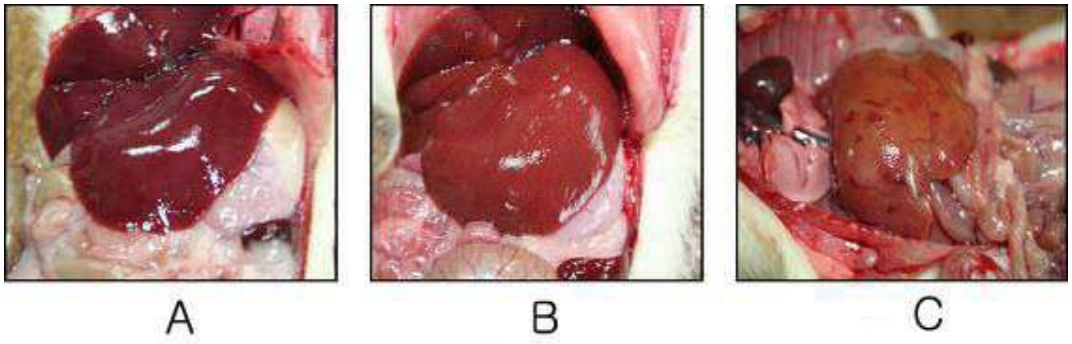
<215> 도 16은 펩타이드 질량지문검사 결과사진

<216> 도 17은 쥐 혈청에서 트랜스티레틴의 웨스턴블랏팅 사진

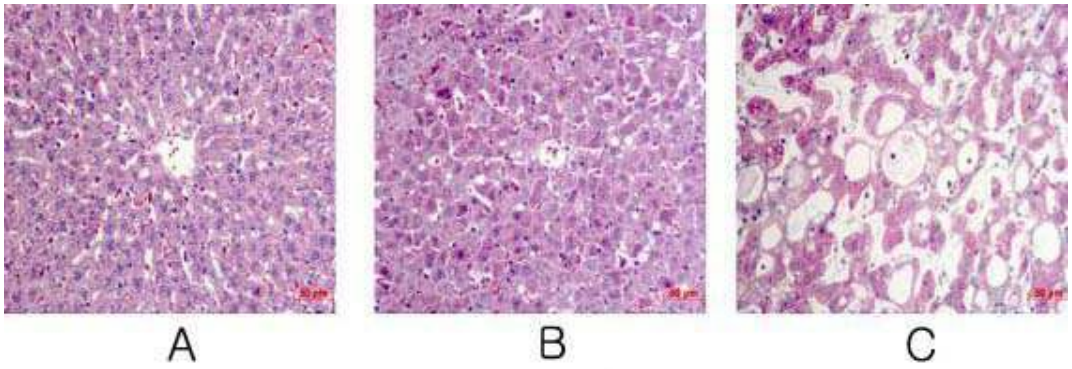
<217> 도 18은 HepG2 세포주에서 쥐 트랜스티레틴의 웨스턴블랏팅 사진

도면

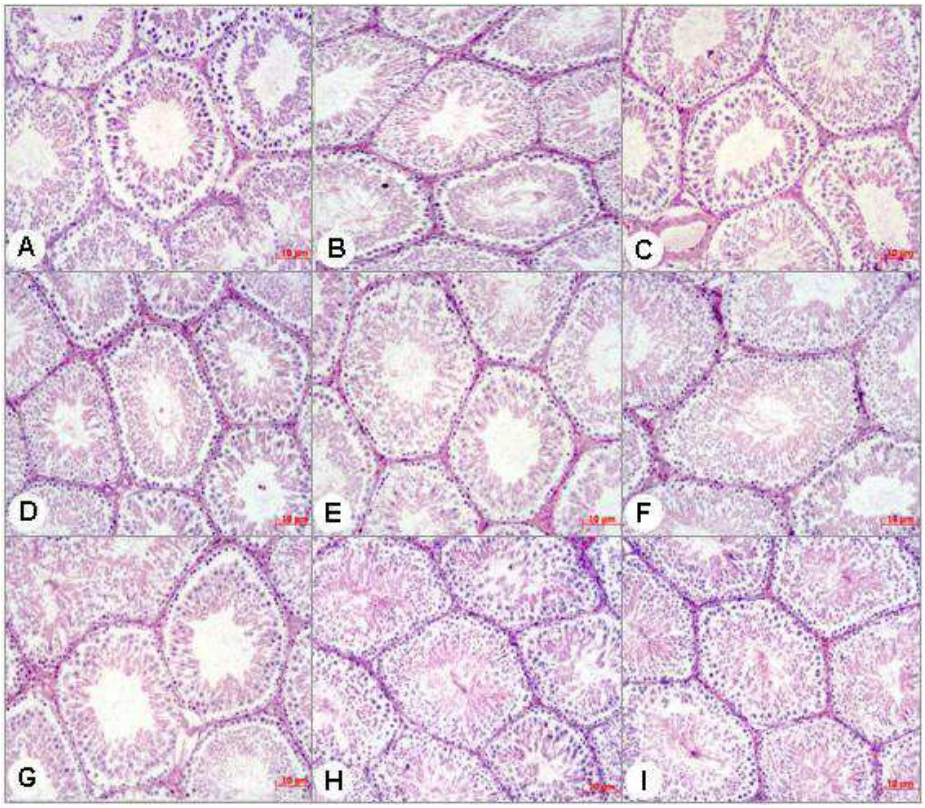
도면1



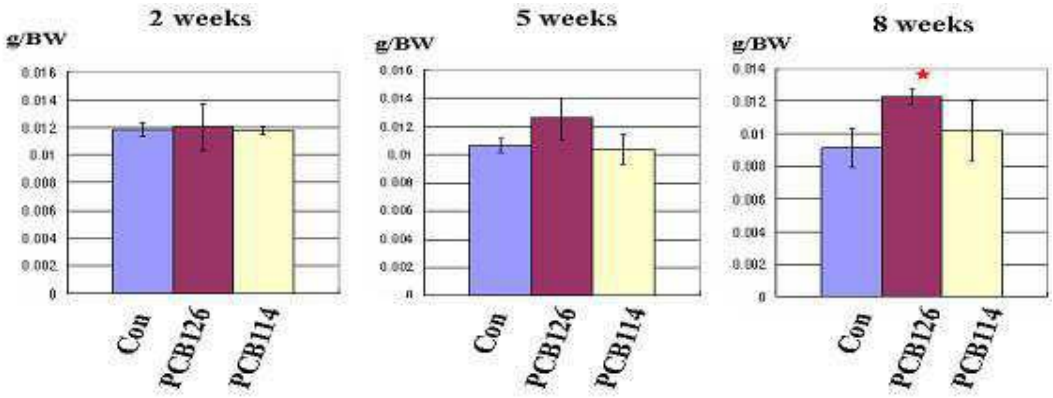
도면2



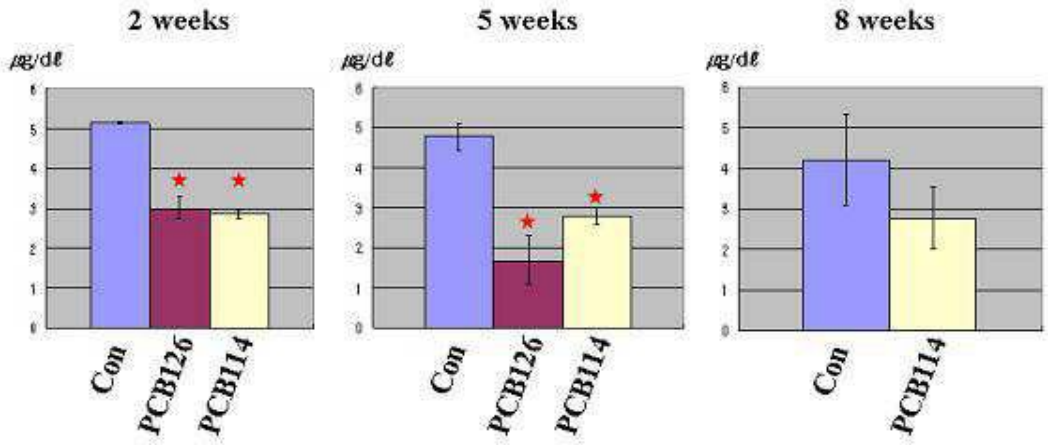
도면3



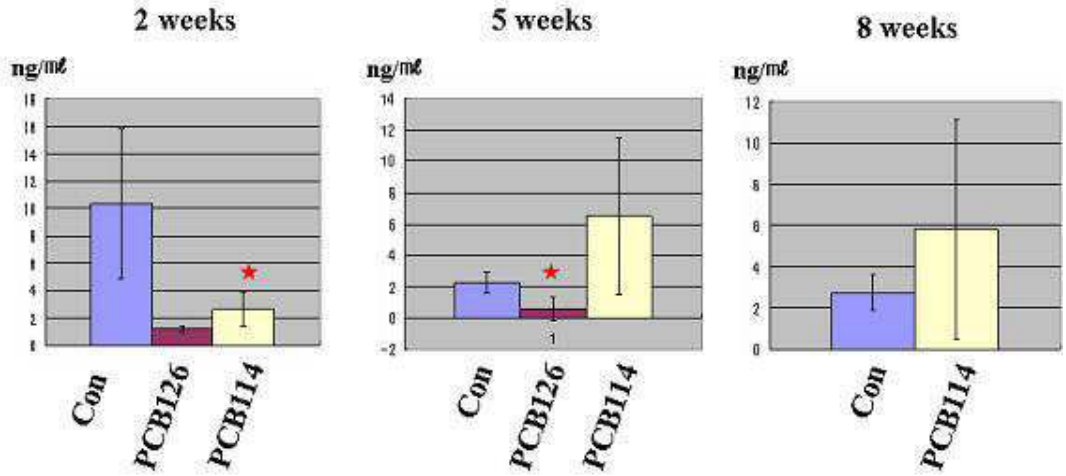
도면4



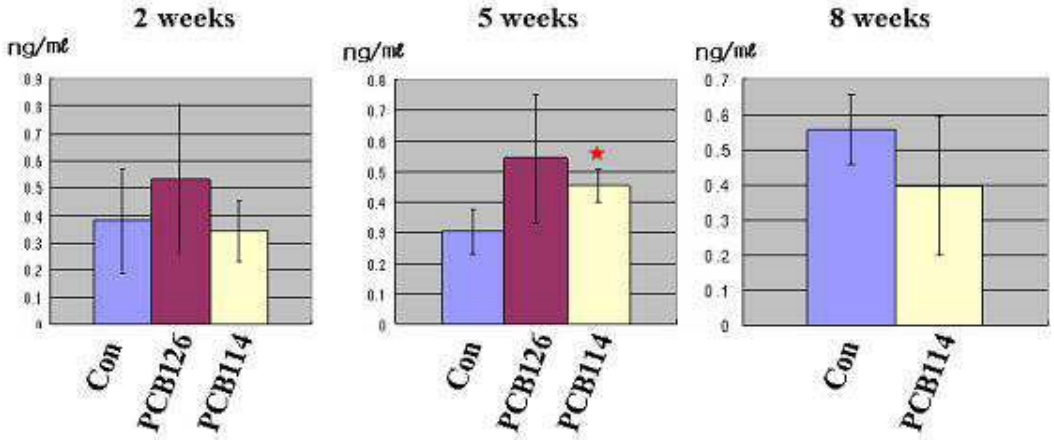
도면5


2 weeks
5 weeks
8 weeks
μg/dℓ
Con
PCB126
PCB114

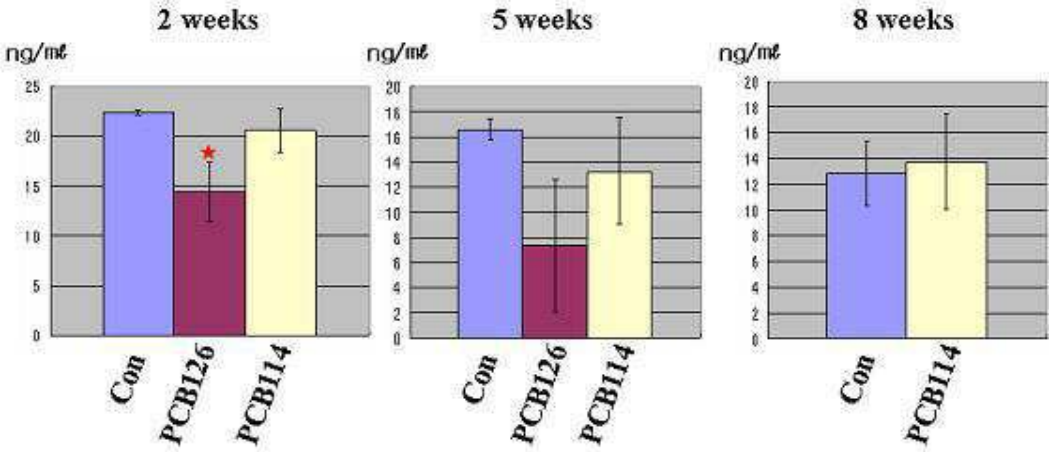
도면6


2 weeks
5 weeks
8 weeks
ng/mℓ
Con
PCB126
PCB114

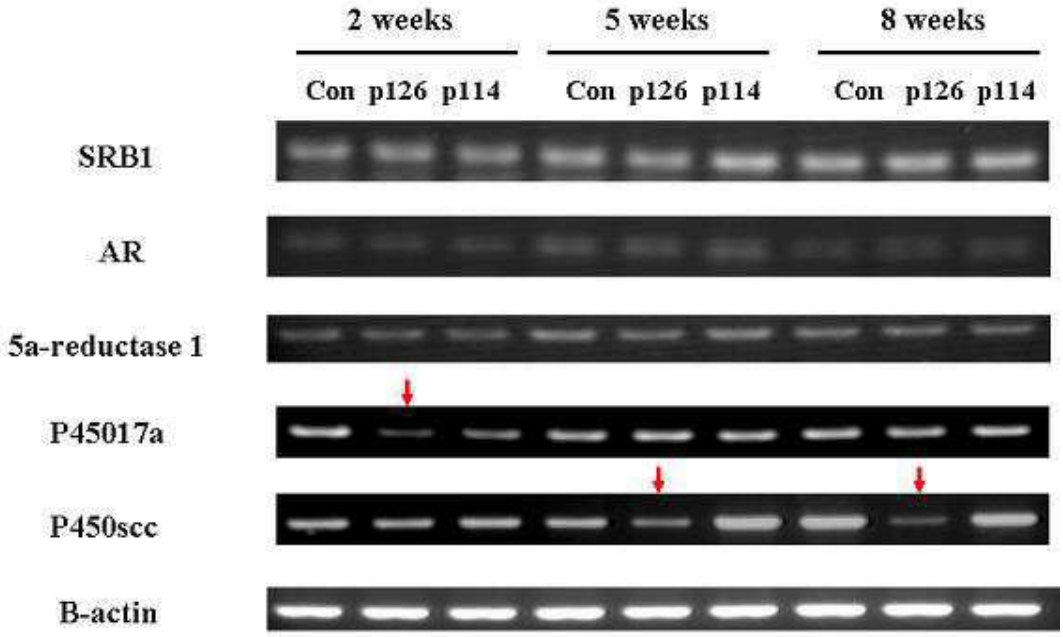
도면7


2 weeks
5 weeks
8 weeks
ng/mℓ
Con
PCB126
PCB114

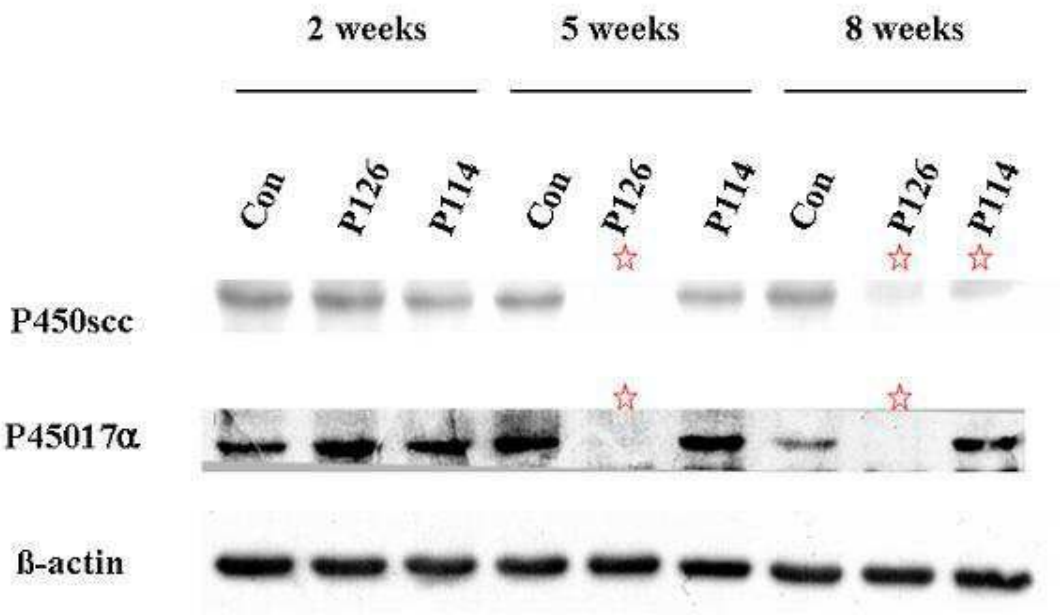
도면8


2 weeks
5 weeks
8 weeks
ng/㎖
Con
PCB126
PCB114

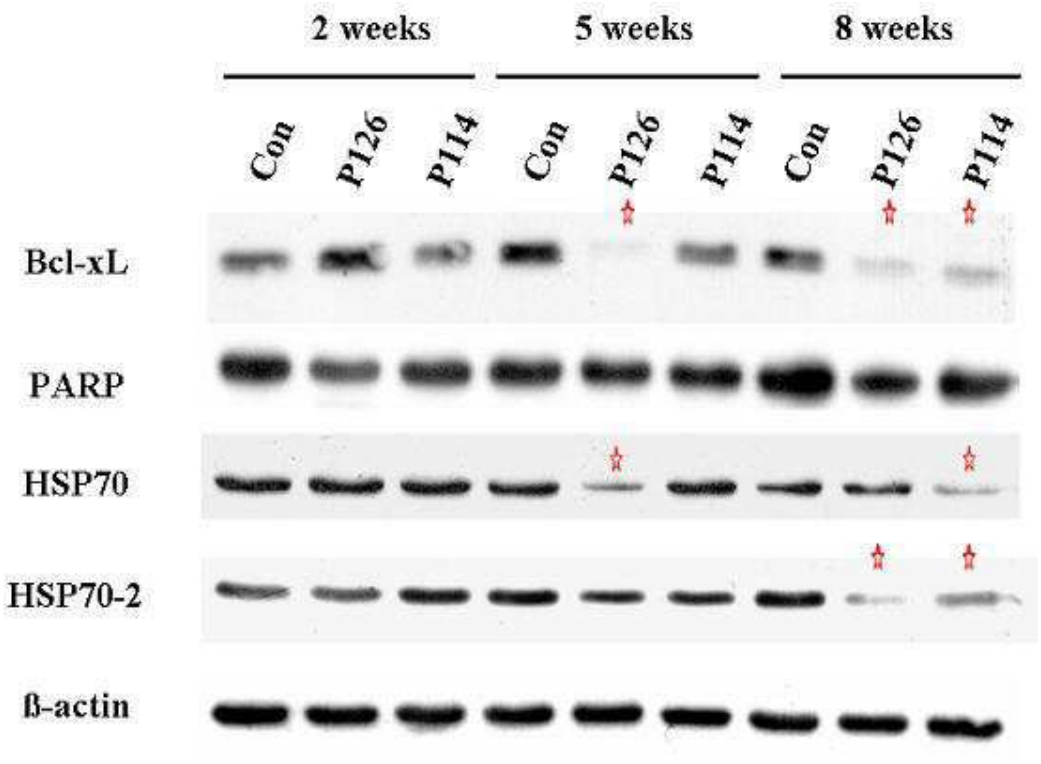
도면9


2 weeks
5 weeks
8 weeks
Con p126 p114
Con p126 p114
Con p126 p114
SRB1
AR
5a-reductase 1
P45017a
P450scc
B-actin

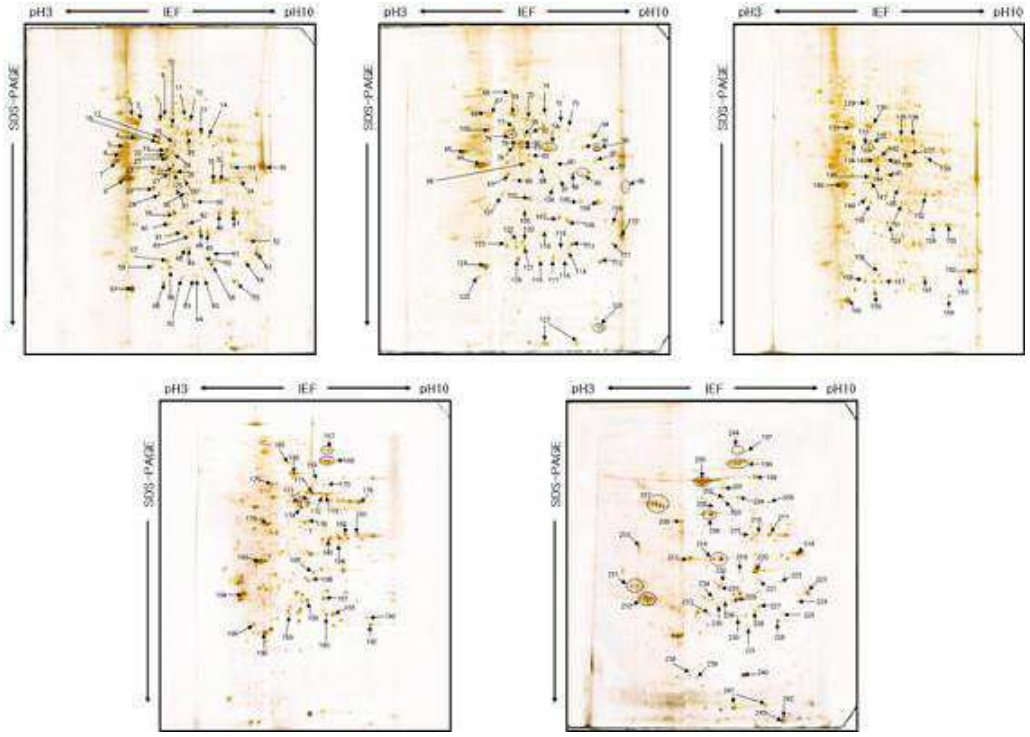
도면10


2 weeks
5 weeks
8 weeks
Con
P126
P114
Con
P126
P114
Con
P126
P114
P450scc
P45017α
ß-actin

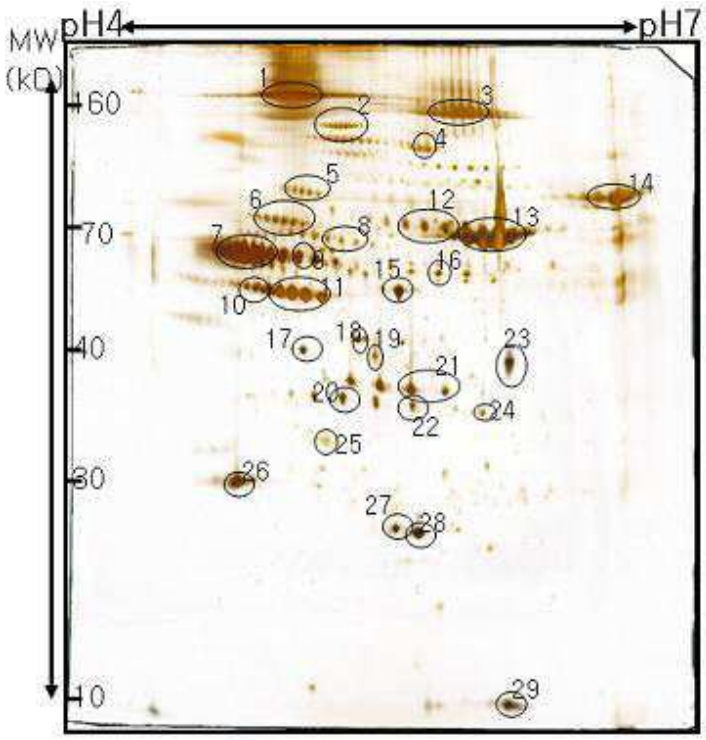
도면11


2 weeks
5 weeks
8 weeks
Con
P126
P114
Con
P126
P114
Con
P126
P114
Bcl-xL
PARP
HSP70
HSP70-2
ß-actin

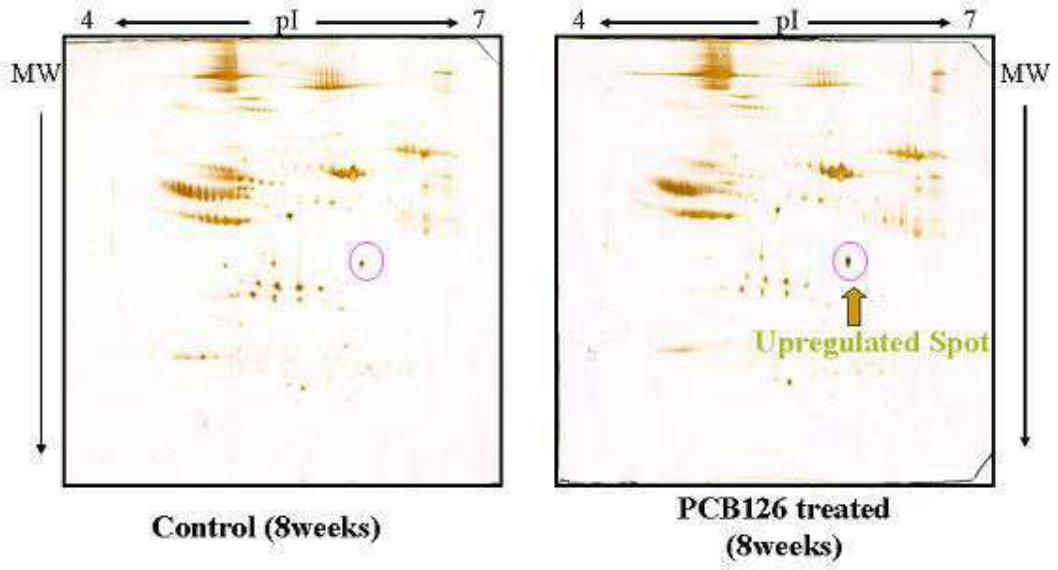
도면12


pH3
IEF
pH10
SDS-PAGE

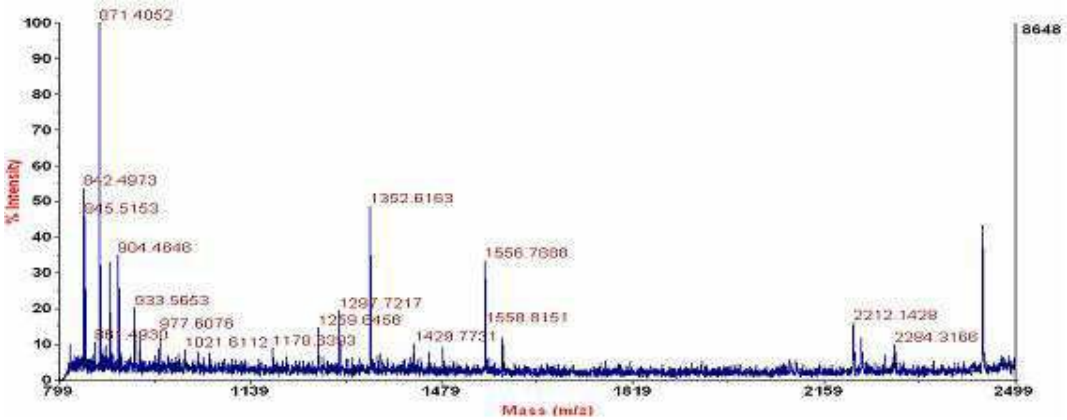
도면13


MW
(kD)
pH4
pH7
60
70
40
30
10
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

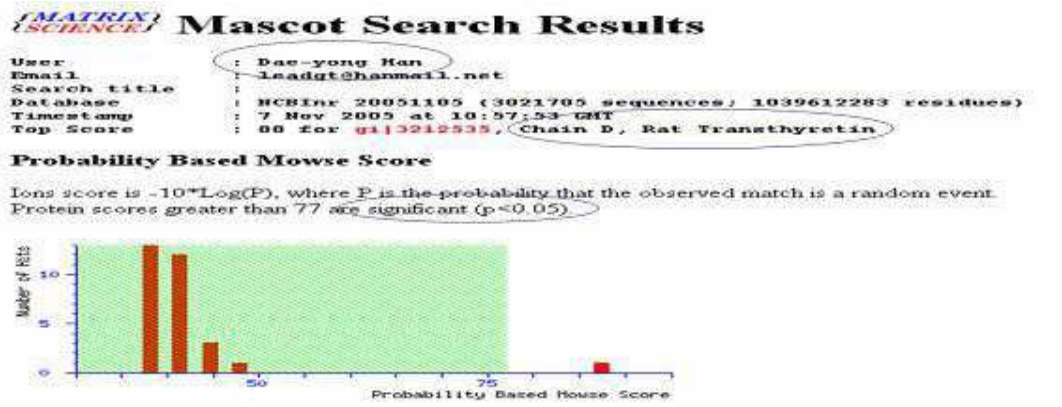
도면14



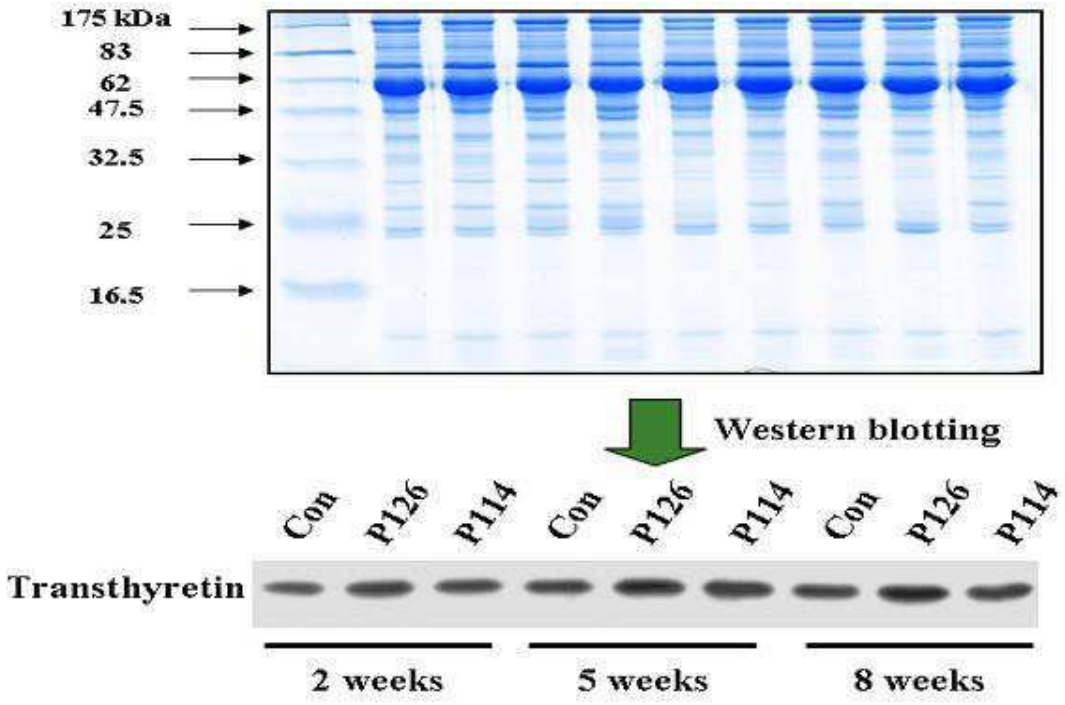
도면15



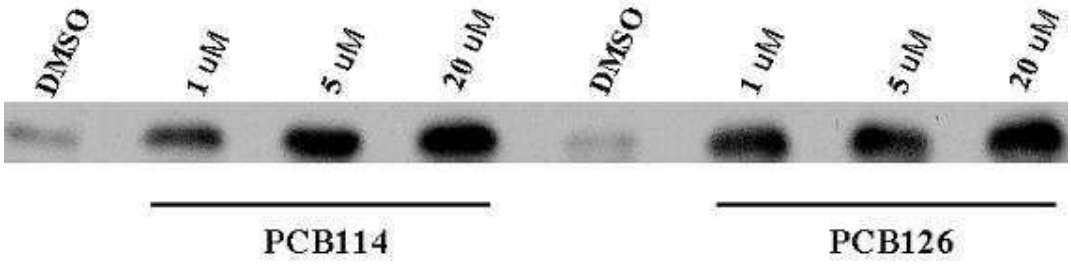
도면16



도면17


175 kDa
83
62
47.5
32.5
25
16.5
Western blotting
Con
P126
P114
Con
P126
P114
Con
P126
P114
Transthyretin
2 weeks
5 weeks
8 weeks

도면18


DMSO
1 uM
5 uM
20 uM
DMSO
1 uM
5 uM
20 uM
PCB114
PCB126