

碩 士 學 位 論 文

넙치에 있어서 내분비교란물질의 노출에
따른 난황전구물질의 합성과 생체 내
스트레스 반응에 관한 연구



濟 州 大 學 校 大 學 院

海 洋 生 物 工 學 科

梁 文 休

2005年 7月

넙치에 있어서 내분비교란물질의 노출에
따른 난황전구물질의 합성과 생체 내
스트레스 반응에 관한 연구

指導教授 呂寅圭

梁文休

이 論文을 理學碩士 論文으로 提出함

2005年 7月



梁文休의 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 許文洙 印

委 員 林允圭 印

委 員 呂寅圭 印

濟州大學校 大學院

2005年 7月

Study of Vitellogenin Synthesis and Stress
Response Induction by EDCs in the Olive
Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Moon-Hyu Yang

(Supervised by Professor In-Kyu Yeo)

 제주대학교 중앙도서관
A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MARINE BIOTECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2005. 7.

목 차

List of Figures.....	i
List of Tables.....	iv
Abstract.....	v
I. 서 론.....	1
II. 재료 및 방법	
1. <i>In vivo</i> 의 급성 및 만성독성 실험.....	6
1-1. 급성독성실험.....	6
1-2. 만성독성실험.....	7
2. 초대간세포 배양.....	8
3. 항산화 효소 분석.....	10
4. Glutamic pyruvic transminase(GPT) 및 Glutamic oxalacetic transminase(GOT)분석.....	15
5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 이용한 VTG 분석.....	16
6. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electro-phoresis(SDS-PAGE)를 이용한 VTG Protein 분석.....	17
7. RT-PCR을 이용한 HSP70 mRNA 분석.....	20
8. 통계처리.....	22
III. 결 과	
1. <i>In vivo</i> 의 급성 및 만성독성 실험.....	23
1-1. 급성독성실험에서의 반수치사농도.....	23
1-2. 만성독성실험에서의 체중변화.....	24
2. EDCs의 첨가에 따른 배양 간세포의 변화.....	26
3. 만성독성 실험 및 간세포 초대배양에 있어서 EDCs의 효과 3-1. 항산화 효소 변화.....	28

3-2. Glutamic pyruvic transminase(GPT) 및 Glutamic oxalacetic transminase(GOT)변화.....	32
3-3. 만성독성에서의 ELISA를 이용한 VTG 발현.....	35
3-4. 간세포 초대배양에서 SDS-PAGE를 이용한 VTG 합성 변화...	36
3-5. RT-PCR을 이용한 HSP70 mRNA 발현.....	41
 IV. 고 찰.....	 43
 V. 요 약.....	 49
 VI. 참 고 문 헌.....	 51
 감사의 글.....	 59

List of Figures

- Fig. 1. Extraction of protein.
- Fig. 2. Procedures for protein assay by Lowery method.
- Fig. 3. Procedures for measurement of SOD activity.
- Fig. 4. Procedures for measurement of catalase activity.
- Fig. 5. Effect of median lethal concentration (96 hr-LC₅₀) of TBT, BaP, NP and BPA in olive flounder.
- Fig. 6. Effect of TBT, BaP, NP and BPA treatment of body weight of measured 62 days after 96 hr-LC₅₀ 5% concentration administration to olive flounder.
- Fig. 7. Effect of TBT, BaP, NP and BPA treatment of body weight of measured 62 days after 96 hr-LC₅₀ 10% concentration administration to olive flounder.
- Fig. 8. Morphology of olive flounder hepatocyte cultured for 1 hours (A), 24 hours (B), 48 hours (C) and treated with E₂ after 48 hours (D) (microscope, ×200).
- Fig. 9. Morphology of olive flounder hepatocyte cultured for treated with 2,4-D 10⁻⁵M(A), 10⁻⁶M(B), 10⁻⁷M(C) and 10⁻⁸M(D) after 48 hours (microscope, ×200).
- Fig. 10. Morphology of olive flounder hepatocyte cultured for treated with BPA 10⁻⁵M(A), 10⁻⁶M(B), 10⁻⁷M(C) and 10⁻⁸M(D) after 48 hours (microscope, ×200).
- Fig. 11. Effects of various concentration of TBT, BaP, NP and BPA on the activity SOD in liver tissue of olive flounder (L:Low, H:High).

- Fig. 12. Effect of various concentration of TBT, BaP, NP and BPA on the activity CAT in Liver tissue of olive flounder (L:Low, H:High).
- Fig. 13. Effect of various concentration of BPA, 2,4-D on the activity SOD in hepatocyte cultures of olive flounder.
- Fig. 14. Effect of various concentration of BPA, 2,4-D on the activity CAT in hepatocyte cultures of olive flounder.
- Fig. 15. Effect of various concentration of TBT, BaP, NP and BPA on the induction GPT in liver tissue of olive flounder(L:Low, H:High).
- Fig. 16. Effect of various concentration of TBT, BaP, NP and BPA on the induction GOT in liver tissue of olive flounder(L:Low, H:High).
- Fig. 17. Effect of various concentration of BPA, 2,4-D on the induction GPT in hepatocyte cultures of olive flounder.
- Fig. 18. Effect of various concentration of BPA, 2,4-D on the induction GOT in hepatocyte cultures of olive flounder.
- Fig. 19. Result of antibody level in serum during the immunization.
 Level of Vtg antibody in serum is expressed as ELISA value at 1:1,000 dilution using the Vtg antigen (L:LOW con., H:HIGH con.).
- Fig. 20. Effect of various concentration of on the induction of E₂ (arrow) in the olive flounder hepatocyte cultures.
 M: molecular weight (MW) maker. CBB stain.
- Fig. 21. Effect of various concentration of E₂ on Vtg production in primary cultures of olive flounder hepatocyte. ($P < 0.05$).
- Fig. 22. Effects of BPA concentration on the induction Vtg (arrow) in the olive flounder hepatocyte cultures.
 M: molecular weight(MW) maker. CBB stain.
- Fig. 23. Effect of 2,4-D concentration on the induction of Vtg (arrow) in the olive flounder hepatocyte cultures.
 M: molecular weight (MW) maker. CBB stain.

Fig. 24. Effect of various concentration of TBT, BaP, NP and BPA on the expression of HSP 70 in the olive flounder liver tissue (L:Low, H:High).

Fig. 25. Effect of various concentration of BPA, 2,4-D on the expression of HSP 70 in the olive flounder hepatocyte cultures.



List of Tables

Table 1. Concentration of EDCs.

Table 2. Chemical composition of medium related to cell culture.

Table 3. Compositions of reagents related to SDS-polyacrylamide gel.

Table 4. Compositions of buffers related to SDS-PAGE.

Table 5. Regents for preparaing gel for SDS-PAGE.

Table 6. Oligonucleotide of primers for heat shok protein-70 mRNA,
 β -actin mRNA.



Abstract

This study was conducted to investigate relation toxicological to an organism stress in endocrine disrupting chemical (EDCs), establishment of the basic physiological biomarker and indirectly Bio assessment in environmental pollution. Results of acute toxicity of LC_{50} decreased in TBT>BPA>BaP>NP order. When exposed olive flounder to EDCs such as TBT, BaP, NP and BPA, body weight was significantly low compared to the control counterpart. The growth rate and cell binding rate of hepatocytes were low when treated with high concentration of 2,4-D and BPA ($10^{-5}M$). During testing for chronic toxicity, both catalase(CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities were low in the samples exposed to EDCs compared to the control liver tissue. However, CAT and SOD activities were high in primary hepatocyte samples compared to the control. High values were observed for GOT and GPT during chronic toxicity and hepatocyte testing. ELISA results indicated high Vtg synthesis in the serum of olive flounder when treated with low concentration of BaP, NP and combination of TBT+NP+BPA. Estrogen concentration at $10^{-6}M$, BPA at $10^{-5}M$ and 2,4-D at $10^{-8}M$ were able to express the highest amount of Vtg in primary hepatocyte culture. HSP70 mRNA expression was high both in vivo and vitro when exposed to EDCs. In this result, it can be disrupting operation in endocrine, disrupting of defence faculty with a stress also destroy physiological defence ability by EDCs.

I. 서론

내분비계는 생체의 항상성 유지, 생식, 발생, 행동 등에 관여하는 각종 호르몬을 생산, 분비하는 기관으로서 내분비선에서 분비된 호르몬은 혈액을 통해 체내를 순환하며 표적이 되는 각 세포, 조직에 정보 및 명령을 전달하여 성장 및 발육, 생식 조절 등에 관여한다. 어류를 포함한 모든 척추동물은 내분비계를 가지고 있으며, 각기 유사한 호르몬을 분비하고 있다(EPA, 1997).

그러나 최근 이러한 내분비계 물질 이외에 환경으로부터 유입되어 유사한 작용을 나타내는 여러 화학물질이 알려지면서 이러한 물질의 유해성에 대한 연구가 진행되고 있다(McLachlan, 1985; Colborn et al., 1993; Stone, 1994; Sumpter, 1995; Arukwe and Goksoyr, 1998; Bjerregaard et al., 1998; Jobling et al., 1998; Andersen et al., 1999; Heemken et al., 2001; Ackermann et al., 2002; Hutchinson and Pickford, 2002). 이러한 화학물질들은 생체내의 내분비계를 교란함으로써 생물의 정상적인 기능을 방해하는 물질로 작용하며 내분비 교란물질(Endocrine disrupting chemicals; EDCs)이라고 알려져 있다(Crisp et al., 1998; Preziosi, 1998). 이러한 EDCs는 주로 에스트로겐의 수용체와 결합하여 Estradiol-17β (E₂)와 유사한 작용을 하여 인간의 생식기능 저하, 기형, 성장장애, 암 등을 유발하는 물질로, 생태계 및 생물의 호르몬계에 악영향을 끼치는 것으로 알려져 있다(Korach, 1993; Stone, 1994).

대부분의 EDCs는 불포화 벤젠고리를 가지며 분자 크기는 매우 작아 분자량 300 Da 정도로 E₂를 비롯한 성호르몬과 유사한 점이 많고 그 분자구조 또한 매우 흡사한 물질이다. 또한, 생물학적, 화학적 분해가 느리고 안정하여 환경 혹은 인체 등 수생생물의 체내 지방 및 조직에 농축되는 성질이 있는 것으로 알려져 있다(Colborn et al., 1993; Von westernhagen et al., 1981, 1987).

제초제 및 살충제 등의 농약류, 그리고 dioxins, polychlorinated biphenyl 및 bisphenol A 등을 포함하여 100여종이 넘는 물질들이 EDCs로 알려져 있다.. Nonylphenol (NP) 과 bisphenol A (BPA) 등은 알킬-페놀계 독성화학물질로서 생

물의 생식과 성장을 저해하고, 이들 성분에 노출된 잉어의 신장, 간 및 비장에서는 조직병리학적 병변에 기인한 조혈 기작의 이상 및 혈액학적 성상의 변화로 심각한 빈혈증이 유발한다는 알려져 있다(Schwaiger, 2000). 저농도에서는 미토콘드리아 산화적 인산화반응의 공역을 방해하는 작용을 나타내며(Bostrom and Johansson, 1972), 고농도에서는 전자수송 연쇄를 완전히 저해하는 것으로 알려져 있다(Desaiyah, 1978). 이러한 화학물질에 노출된 대부분의 어류에서는 아가미 상피세포의 손상과 다양한 형태로 어류의 생리기능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Jobling, 1994). 특히, BPA는 일상 생활에서 음식용기나 병원 및 실험실용 플라스틱 용기로 널리 사용되고 있는 플라스틱인 polycarbonate와 에폭시 수지의 합성원료로서 E₂ 유사작용의 발견은 Krishnan et al. (1993)에 의해서 알려지기 시작하였다. 제초제에 포함되어 있는 2,4-dichlorophenoxy acetic acid(2,4-D)는 1950년에 농약으로 등록되어 1995년까지 폭넓게 사용되어진 합성 auxin(식물호르몬의 일종)으로, 벼농사 및 밭농사는 물론 과일농사에 사용되어진 물질이다(Short and Colborn, 1999). Tributyltin (TBT)은 유기주석화합물로서 선박의 방오도료의 성분물질로 널리 이용되고, 수생생물에 대해서는 치사독성이 매우 높고 강력한 내분비장애물질로 알려져 있다(Demitriou et al., 2003). 다환방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)는 이미 200여 개의 이들 유도체 화합물들이 발암성이 있다고 밝혀졌으며(Andelman et al., 1970; Tilgner et al., 1969; Gunther et al., 1969) 그 중에서도 Benzo(a)pyrene[B(a)P]은 특히 발암성이 강한 것으로 알려져 있다(Cook et al., 1932; Mei-teim et al., 1977; Shubik et al., 1957). PAHs는 석유, 석탄 tar중에 존재하는 성분이지만 식품 중에서도 존재하지만 보통의 일상식을 통하여 상당량 섭취될 수 있다(Yoko et al., 1988; Kolarovic et al., 1982). PHAs가 식품에 존재할 수 있는 원인으로는 대기·바다·하천 및 토양으로부터 농작물에 오염되는 경우(Tilgner, D.J., 1970), 고온 가열을 수반하는 식품가공 및 조리과정에서 생성되는 경우 특히, 유지 또는 유지를 다량 함유한 식품을 굽거나 튀길 때 유기물의 불완전 연소와 열분해 등에 의해 식품내에 생성되어 존재하는 것으로 알려져 있다(Jose, 1988).

EDCs는 일반적으로 에스트로겐성 효과를 가지는 종류들이 많으며, 이러한 효과

에 의해 어류를 포함한 척추동물의 암컷 특이 단백질인 Vitellogenin(Vtg)를 합성시키는 것으로 알려져 있다(Lindholst et al., 2000; Shioda and Wakabayashi, 2000). Vtg는 난생동물의 난황전구체로, 여포세포로부터 분비된 E₂의 자극에 의해 간장에서 합성된 지질, 당, 인을 포함하는 고분자 단백질로서 혈액을 통하여 분비된다(Ng and Ider, 1983; Mommsen and Walsh, 1988). 미성숙 및 수컷의 어류에서는 체내에 Vtg가 발현될 정도의 에스트로젠은 존재하지 않기 때문에 Vtg는 난생동물의 암컷의 성숙기에만 발견되는 암컷 특이단백질로 알려져 있다(Bon et al., 1997). EDCs는 정상적인 성호르몬에 의해 유발되는 암컷 특이단백질인 Vtg의 합성을 수컷에서도 일으킬 수가 있는 것으로 알려져 있다(Korach, 1993; Stone, 1994). 그 예로, Allen et al. (1999)은 영국의 각 지역에 서식하는 넙치를 대상으로 조사를 벌인 결과 수컷 넙치에서 고농도의 (>100,000 ng/ml) Vtg가 검출되었음을 보고하였다. 이러한 원인으로 Vtg가 난황 단백질로서 정상적인 수컷에서는 만들어지지 않는 특성을 이용하여 EDCs의 에스트로젠성 작용을 평가하는데 매우 유용한 biomarker로 이용되고 있으며(Hansen et al., 1998), 이와 관련된 연구가 다수 보고되었다(Cope et al., 1985; Goodwin et al., 1991; Sumpter et al., 1995; Heppell et al., 1995; Hwang 2002).

한편, 화학물질의 생체내 반응은 내분비계로 작용하기 이전에 화학적 스트레스로서의 작용을 가질 가능성이 크다고 할 수 있다. 일반적으로 스트레스를 받게 되면 생체 내에 활성산소(superoxide, hydrogen peroxide, peroxy radical, hydroxy radical 등)가 발생하는 것으로 알려져 있다. 활성산소는 생체 내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 친화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시킨다(Ferraris et al., 2002). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD) 및 catalase(CAT)등을 생성하여 세포 기능손상을 막는 것으로 알려져 있다(Chance et al., 1979; Wendel and Feuerstein, 1981). 또한, 중금속 이온의 노출에 의해서도 항산화 효소 활성이 변화한다고 알려져 있다(Livingstone et al., 1992; Chen et al., 2000; Zikic et al., 2001). 이처럼 항산화 효소 활성은 생체내의 스트레스 반응과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.

또한, 열충격단백질(Heat shock protein; HSP)은 생명체들이 정상적인 범위 이상의 온도상승에 반응하여 주로 세포질에서 광범위하게 발현하는 일군의 단백질(Bienz와 Pelham, 1987 ; Bond와 Schlesinger, 1987 ; Lindquist, 1986 ; Ashburner and Bonner, 1979)이며 환경적 스트레스와 병리적 스트레스 상황에서도 발현되며 환경적 스트레스에는 고온 이외에도 중금속, 독소, 산화물에 세포가 노출되었을 경우 등이고, 병리적 스트레스에는 바이러스나 박테리아가 세포에 침입하여 노화나 염증을 유발하는 경우이다 (Morimoto et al., 1992). HSP는 스트레스에 의한 비가역적인 손상으로부터 세포 내 중요 요소들을 보호하고, 스트레스 동안 세포들의 생존이 가능하게 하며, 회복기의 세포의 정상적인 기능 회복을 유도하는 것으로 알려졌다(Hector 등, 1997). 여러 가지의 스트레스에 대해 발현하는 HSP들 중 HSP70이 가장 많은 반응을 보이는 HSP로 세포에 스트레스가 주어졌을 때 수 분 이내에 세포내에서 합성되며(Marx, 1983), 또한 세포를 보호하고(Laudry 등, 1982), 과도한 외부 자극 등의 부적절한 조건하에서 세포의 생존력을 증가 시켜주는 물질로도 알려져 있으며(Li et al., 1982), 수생환경내의 다양한 스트레스 요인으로의 노출에 의해 생체 내 방어기작의 일환으로 유도된다고도 알려져 있다(Sanders, 1990; Sanders. 1993; Ryan and Hightower, 1994; Ryan and Hightower, 1996; Williams et al., 1996). 한편, 간장은 glutamate-oxaloacetate transaminase(GOT)와 glutamate-pyruvate transaminase(GPT)의 두 아미노기 전이효소를 많이 포함하는 조직으로 특히 GOT를 많이 포함하고 있다. 간장 내 이들 효소가 정상적인 경우에는 혈청중에 포함된 농도가 낮으나 조직이 붕괴되면 혈청 중에 누출되어 그 농도가 높아지게 된다. GOT는 간장이나 심장질환을 임상적으로 진단하는데 유용한 지표로 이용되는 효소이며, Aspartate 전이효소는 세포성 효소로 조직이 손상 입었을 때 순환계로 누출되며, 혈장내의 GOT와 GPT는 간세포의 손상정도의 지표가 되는 중요한 효소이다 (Racicot et al., 1975; Vedel et al., 1998).

따라서, 본 연구에서는 다양한 내분비 교란 화학물질 중 B(a)P, BPA, 2,4-D, NP 및 유기주석화합물을 사용하여 그 위해성을 평가하고자 수행하였고, 내분비 교란 작용을 하는 EDCs가 생체내 스트레스 작용을 유발하는가를 확인하기 위하

여 실험을 수행하였다. 또한, 나아가서는 이러한 작용평가들이 환경오염 및 환경 파괴의 Biomarker로서의 기능을 확립하는데 의미가 있다고 사료되어 *in vivo*와 *in vitro* 실험을 병행하여 혈청중의 Vtg 발현정도를 조사하였으며 스트레스 발현의 지표가 되는 HSP 70 합성정도와 스트레스의 지표가 되는 SOD 및 CAT의 농도, 간 손상지수인 GOT 및 GPT의 변화를 조사하였다.



II. 재료 및 방법

1. *In vivo*의 급성 및 만성독성 실험

1-1. 급성독성실험

실험어는 여수수산대학 수산생명의학과 환경생리학연구실에서 사육된 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)로서 암수 52마리를 공시하였으며, 시험시작시 평균전장 16.1 ± 1.5 cm, 생체중량 42.3 ± 7.3 g인 것을 사용 하였다. 급성독성실험은 수온이 20°C 전후로 유지되는 항온실에 설치된 총 순환수량 7.5톤의 순환여과식 사육 시스템에서 3주간 적응 개체를 사용하였다. EDCs로 알려져 있는 tributyltin (TBT), benzo(a)pyrene (BaP), nonylphenol (NP) 및 bisphenol A (BPA)가 넙치에 미치는 반수치사농도 (median lethal concentration, LC_{50})측정은 Rand (1995)의 방법에 따라 측정하였다. 각 실험군당 각각 20마리를 수용하여 급성독성발현여부를 관찰하였으며, 시간경과에 따른 치사 개체를 확인하였다. 전시험기간 동안 수온은 $21.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$, 염분 31.1~31.8‰, pH는 7.87~7.94 및 용존산소는 5.89~6.14 mg/L 범위를 유지하였다.

1-2. 만성독성실험

EDCs로 알려진 TBT, NP, BaP 및 BPA에 단독 또는 복합 물질에 급성독성시험에서 나타난 96시간 반수치사농도 (96 hr-LC₅₀)의 10%(high con.)와 5%(low con.)가 되도록 Table 1과 같이 설정하여 장기간(62일) 폭로 실험을 실시하고 그 후 16일간 각 실험구에 자연해수 (EDCs-free sea water)만이 주입되게 하여 회복 실험을 실시하고 넙치의 간을 취하여 분석시료로 사용하였다. 실험어의 크기는 전장 17.5±2.3 cm 및 생체중량 71.2±6.9 g (n=37)이었다. 전기간 동안 수온은 21.1±0.3℃, 염분 31.1~31.8‰, pH는 7.87~7.94 및 용존산소는 5.89~6.14 mg/L로 맞추어 주었다.

Table 1. Cocentration of EDCs

Groups	Concentrations
Control	
NP-low conc.	NP 7ppb
NP-high conc.	NP 14ppb
TBT-low conc.	TBT 0.8ppb
TBT-high conc.	TBT 1.6ppb
Bap-low conc.	BaP 1.25ppb
Bap-high conc.	BaP 2.5ppb
NP + TBT-low conc.	NP 7ppb + TBT 0.8ppb
NP + TBT-high conc.	NP 14ppb + TBT 1.6ppb
NP + BPA + TBT-low conc.	NP 7ppb + BPA 55ppb + TBT 0.8ppb
NP + BPA + TBT-high conc.	NP 14ppb + BPA 110ppb + TBT 1.6ppb

2. 초대간세포 배양

제주도 남제주군 표선읍에 위치한 육상 수조식 양식장에서 사육중인 전장의 29.0±1.5 cm, 평균체중 640±25.0 g인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 사용하였다. 수온조절이 가능한 순환 여과식 사육시스템에서 실험 전 1주 동안 예비 사육하여 안정시킨 다음 실험에 사용하였으며, 이때 염분농도는 30.0±0.5‰, 수온은 20.0±1.0°C이었다.

간세포의 분리는 Kwon and Mugyia(1994)의 방법을 수정하여 행하였다. 넙치를 0.01% 2-phenoxyethanol을 가하여 실험어를 마취 시킨 후, 담낭과 간장을 분리하였다. 간문맥에 Ca^{2+} 이 포함되지 않은 관류용 buffer(Table 2중 Solution II)를 약 10분간 관류하였다(5~8 ml/min). 이 후 Collagenase(0.3 mg/ml; Sigma) 및 소혈청 알부민(0.98 mg/ml; Sigma)을 포함한 관류용 buffer에 약 20분간(5~8 ml/min), 2 mM EDTA를 첨가하여 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 을 제거한 관류용 buffer에 약 10분간 각각 관류하였다. 관류 후 간장은 100 ml 비이커에 넣어 Ca^{2+} -free 관류용 buffer(Table. 2의 Solution III)로 3회 세척한 후, 50 ml의 관류용 buffer내에서 해부가위로 잘게 분산시켰다. 분산된 간세포는 pipet으로 더욱 분리 여과시킨 후에 원심분리(700 rpm, 3분)를 3회 반복하여 간실질세포 이외의 성분(비실질세포, 파열세포, 세포의 파편 및 적혈구 등)을 제거하였다.

간세포는 양전하를 처리한 250 ml T/C 플라스크(Falcon)에 2×10^6 개를 넣어 배양하였다. 배양에는 Table 2의 Solution I 인 0.2 μ M bovine insulin(Sigma, USA), streptomycin(100 μ g/ml), penicillin (70 μ g/ml) 및 $NaHCO_3$ (23 mM)를 첨가한 Leibovitz's L-15 medium (GIBCO. Inc)을 이용하였다. E_2 (Sigma, USA), BPA (Aldrich Chem. Com. Inc) 및 2,4-D (Dr. Ethrenstofer GmbH)는 95% 에탄올로 용해한 후, 하루간의 사전배양 후에 $10^{-5}M \sim 10^{-8}M$ 의 농도를 첨가하여 실험을 행하였다.

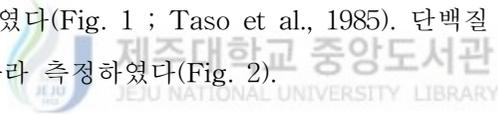
Table 2. Chemical composition of medium related to cell culture

Solution I			
Leibovitz's L-15 medium		10.1g	
Penicillin		69.9mg	
Streptomycin		99.96mg	
Insulin		1.66ml	
Hepes		2.38g	
Distilled water		Adjust to 1000ml	

Solution II		Solution III	
NaCl	43.75ml	NaCl	8.75ml
KCl	8.75 ml	KCl	1.75 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5.0ml	KH ₂ PO ₄	0.5ml
KH ₂ PO ₄	2.5ml	NaHCO ₃	5.75ml
NaHCO ₃	28.8ml	EDTA	1ml
Hepes	1.19g	Hepes	0.238g
Distilled water	Adjust to 500ml	Distilled water	Adjust to 100ml

3. 항산화 효소 분석

*In vivo*의 실험에서의 항산화 효소는 실험어로부터 간장을 적출하여 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase (CAT) 효소 활성을 분석하였다. 간장은 적출 후 약 1 g을 0.9% NaCl에 3회 세척 한 다음 KCl을 1.17% 되게 첨가한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화 시켰다. 균질화된 시료는 원심분리 (1,000 rpm, 15 min, 4°C)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 한편, *in vitro* 실험에서의 항산화 효소는 배양간세포에서 trypsin-EDTA로 처리하여 배양플라스크 바닥으로부터 세포를 떼어 낸 후 원심분리용 튜브에 모아 4°C, 1000 rpm에서 5분간 원심분리 후 PBS로 3회 세척한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화 하였다. 균질화된 간장의 균질액 및 세포 혼합액은 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C)한 후 상층액을 취해 효소액으로 사용하였다(Fig. 1 ; Taso et al., 1985). 단백질 함량은 Lowery et al. (1951)의 방법에 따라 측정하였다(Fig. 2).



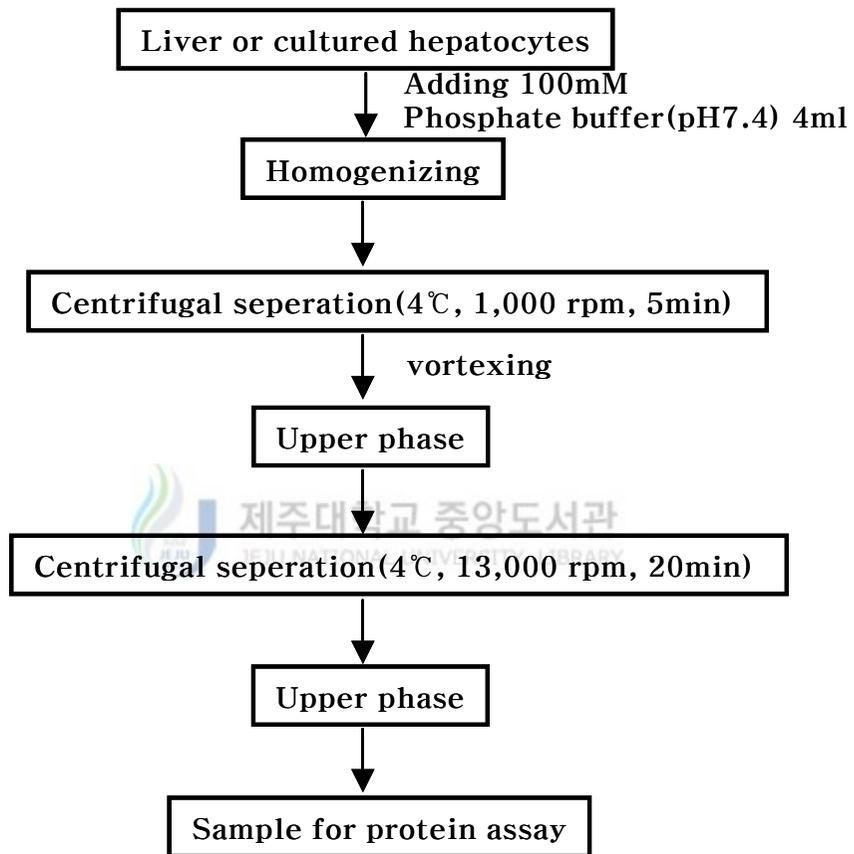


Fig. 1. Extraction of protein.

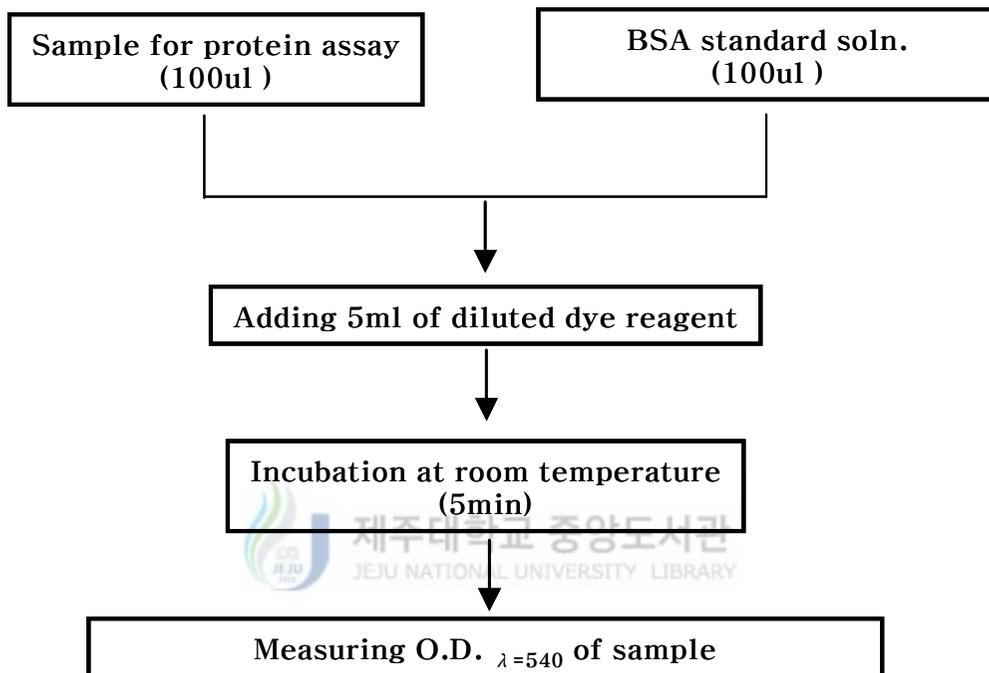


Fig. 2. Procedures for protein assay by Lowery method.

SOD는 Marklund and Marklund(1974)의 방법에 따라 측정하였다(Fig. 3). 즉, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 8.7 ml에 세포 균질액을 넣은 후 0.3 ml의 3 mM pyrogallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer를 이용 550 nm에서 측정하였다. 그리고 효소활성의 1단위는 1분간 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다. 측정된 결과로부터 다음 공식에 의해 활성도를 산출하였다.

$$\text{Activity of SOD} = \frac{\text{Activity units/mL}}{(\text{unit/min} \cdot \text{mg protein}) \text{ mg protein/mL of reaction mixture}}$$

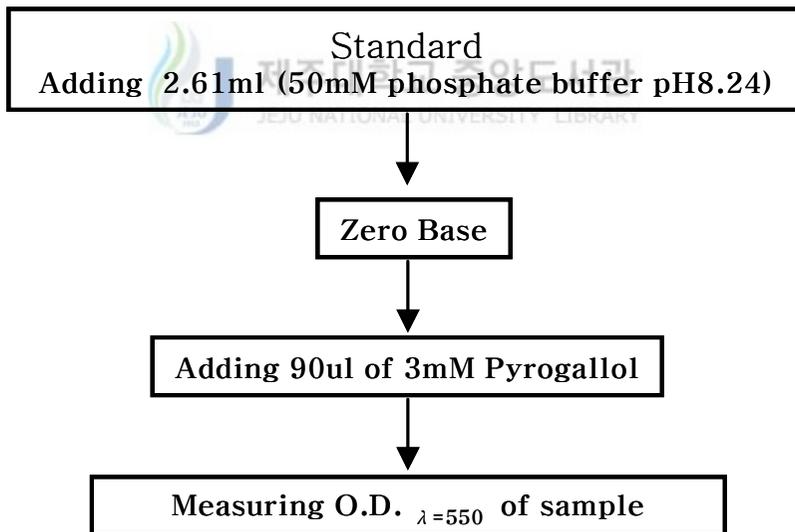


Fig. 3. Procedures for measurement of SOD activity.

CAT활성도의 측정은 Nelson and Kiesow(1972)의 방법에 의하여 측정하였다 (Fig. 4). 즉, H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer에 의해 240 nm 파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다. 측정된 결과로부터 다음 공식에 의해 활성도를 산출하였다.

$$\text{Activity of catalase} = \frac{\Delta \lambda_{240}/\text{min} \times \text{dilution factor}}{43.6 \times \text{mg protein/mL of reaction mixture}}$$

(unit/min · mg protein) (*: $\epsilon_{\lambda_{240}}$ of H₂O₂)

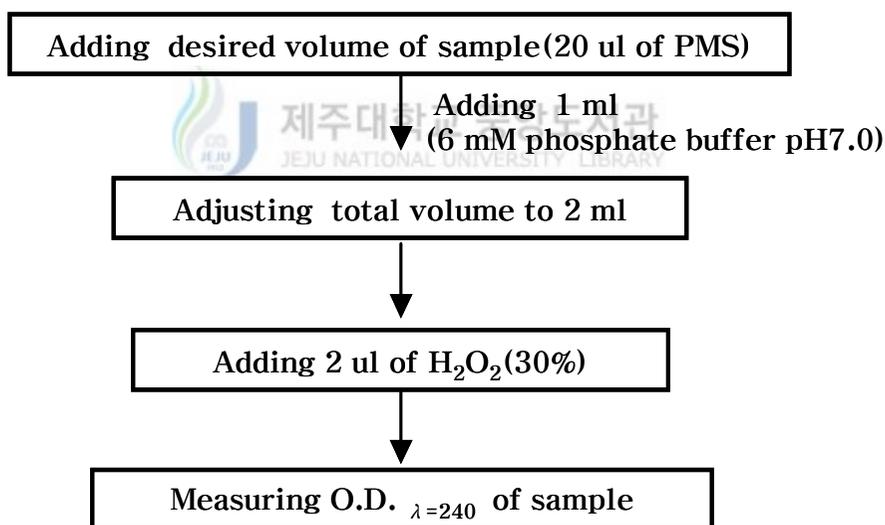


Fig. 4. Procedures for measurement of catalase activity.

4. Glutamic pyruvic transaminase(GPT) 및 Glutamic oxalacetic transaminase(GOT) 분석

Reitman-Frankel법(1957)에 의해 조제된 진단용 Kit(아산제약, 한국)를 사용하였다. 즉, 넙치에서 채혈된 혈청 및 배양 상층액은 간기능을 평가하기 위하여 GPT 및 GOT 분석에 사용하였다. GPT 및 GOT 효소활성측정은 GPT의 경우 L-alanine과 α -ketoglutaric acid, GOT의 경우 L-aspartic acid와 α -ketoglutaric acid를 기질로 사용하여 37°C에서 30분간 반응시킬 때 생성되는 pyruvic acid가 알칼리성 하에서 2,4-dinitrophenyl hydrazine과 작용하여 발색되는 hydrazine의 비색을 정량하여 파장 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.



5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 이용한 VTG 분석

In vivo 실험에서의 실험구별 혈청을 채혈한 후 coating buffer로 1000배 희석하여 이를 96well ELISA plate(Nunc, polysorb, USA)에 100 μ l씩 분주하고 4°C에서 16시간 흡착시켰다. 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 0.2% BSA가 포함되어 있는 blocking buffer 200 μ l를 각 well에 분주하여 4°C에서 2시간 정치하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 3회 세척 후 넵치 Vtg의 monoclonal anti body (정., 2003)는 sample dilution buffer(PBS containing 0.05% Tween 20, 0.2% BSA)로 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 으로 희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온에서 40분동안 반응시켰다. 반응 후 상층액을 제거하고 PBS로 3회 세척하고 Goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate Ig G를 conjugate buffer에 1000배로 희석시키고 100 μ l씩 분주하여 실온에서 40분동안 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척하였다.

발색제로는 ABTS(2-2'-azino-bis[3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid])용액을 사용하였으며 40분간 발색시킨 후 405 nm와 reference 492 nm에서 optical density를 측정하였다.

6. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electro-phoresis(SDS-PAGE)를 이용한 VTG 분석

SDS-PAGE는 VTG의 발현 확인을 위해 Laemmli (1970)의 방법을 이용하였다. 배양된 세포를 Collagenase-trypsin로 처리하여 배양플라스크 바닥으로부터 세포를 떼어 낸 후 원심분리용 튜브에 모아 4°C, 1000 rpm에서 5분간 원심분리 후 Tri-Reagent (Sigma)을 첨가한 후 homogenizer를 사용하여 4°C에서 균질화시켜 시료로 사용하였다. 처리된 시료는 7.5% 농도의 polyacrylamide gel에 Bio-Rad 사의 Mini Protein 과 Power PAC 300(protein electrophoresis system)을 사용하여 250V 55 mA로 4시간 동안의 전류조건으로 전기영동을 실시하였다. 전기영동을 한 후 Coomassie gel staining solution(0.136% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol 및 10% acetic acid)에 염색할 gel을 넣어 40분 동안 염색하고, gel destaining solution(7.5% methanol, 7.5% acetic acid)에 염색한 gel을 넣고 band와 background가 적정할 정도로 탈염색 될 때까지 shacking하였다. 탈염색 된 gel은 사진을 찍은 후 gel dryer를 사용하여 건조 시킨 후 보관하였다. 실험에 사용된 시약들은 Sigma Chemical Co. (USA)와 Bio Rad 사의 제품을 사용하였으며, 제조 시약 및 그 밖의 전기영동 관련시약은 Table 3, 4와 5에 나타내었다(Sambrook et al., 1988).

Table 3. Compositions of reagents related to SDS-polyacrylamide gel

Solution	Component	
30% acrylamide Stock solution	Bisacrylamide	1 g
	Acrylamide	20 g
	Distilled water	Adjust to 100 ml
	Whatman paper No.1. Filtration Store in a dark bottle at 4°C	
1.0M Tris/HCl (pH 6.8)	Trizma base	12.1 g
	Distilled water	Adjust to 100 ml
1.5M Tris/HCl (pH 8.8)	Trizma base	36.3 g
	Distilled water	200 ml
10% SDS	SDS(sodium dodecyl sulfate)	10 g
	Distilled water	Adjust to 100 ml
10% APS	Ammonium persulfate(APS)	0.1 g
	Distilled water	1 ml

Table 4. Compositions of buffers related to SDS-PAGE

Solution	Component	
5X TGS pH 8.3	Trizma base	15.1g
	Glycine	94g
	10%SDS	50ml
	Distilled water	Adjust to 1000ml
5×Sample buffer	1M Tris/HCl, pH6.8(60mM)	0.6ml
	50% glycerol(25%)	5 ml
	10%SDS(2%)	2ml
	β-mercaptoethanol (14.4mM)	0.5ml
	1% bromophenol blue(0.1%)	1ml
	Distilled water	0.9ml
Coomassie Gel staining solution	Coomassie Brilliant Blue R-250	1g
	Methanol	450ml
	Glacial acetic acid(CH ₃ COOH)	100ml
	Distilled water	450ml
Coomassie gel destaining solution	Methanol	300ml
	Glacial acetic acid	100ml
	Distilled water	600ml



Table 5. Regents for preparing gel for SDS-PAGE

Seperating Gel	7.5%	Stacking Gel	5%
30% Acrylamide	2,500ul	30% Acrylamide	1,000ul
1.5M Tris/HCl(pH 8.8)	2,500ul	1.5M Tris/HCl(pH 8.8)	750ul
10% SDS	100ul	10% SDS	60ul
10% APS	100ul	10% APS	60ul
TEMED	10ul	TEMED	10ul
Distilled water	4,790ul	Distilled water	4,120ul
Total volume	10ml	Total volume	6ml

7. RT-PCR을 이용한 HSP70 mRNA 분석

넙치의 간조직은 분쇄 완충용액 100 mM phosphate buffer에서 호모지나이저로 분쇄하여 12,000 rpm에서 원심분리하였다. 또한, 배양된 세포는 Collagenase-trypsin로 처리하여 배양플라스크 바닥으로부터 세포를 떼어 낸 후 원심분리용 튜브에 모아 4°C, 1000 rpm에서 5분간 원심분리 후 Tri-Reagent (Sigma)을 첨가한 후 homogenizer를 사용하여 4°C에서 균질화 하였다. 균질화된 시료에 chloroform을 가하고 얼음위에서 5분간 정치한 뒤 4°C에서 14,000 rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담고 isopropanol을 넣어 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA에서 total RNA는 tissue RNA Prep Mate Kit(주, Bioneer)를 사용하여 추출하였다. 추출된 total RNA는 -70°C에서 보관하여 실험에 사용하였으며, cDNA합성 Kit인 ImProm-II™ Reverse Transcriptase Kit A3800(주, PROMEGA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Taq DNA Polymerase in Storage buffer B-kit(주, PROMEGA)을 사용하여 증폭하였다. cDNA를 증폭시키기 위하여 cDNA 2 ul, 10×PCR buffer 5 ul, MgCl₂(25mM) 3 ul, dNTP(10mM) 1ul, primer (sense) 1 ul(50 pmol), antisense 1 ul(50 pmol), Taq DNA polymerase 0.5 ul 및 Nuclease-Free Water 36.5 ul를 혼합하여 94°C에서 5분간 predenaturation 시켜준 후 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension 조건으로 30회 증폭하고, 이 후 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. VTG 및 HSP-70 mRNA에 대한 oligonucleotide primer를 제작하여 합성주문하였고, 양성대조로 사용하기 위해 β -actin mRNA를 제작하였다(Table. 3). PCR로 증폭된 산물은 100 bp DNA ladder를 size marker로 사용하여 1% agarose가 첨가된 gel에 loading하여 1x TAE buffer하에서 100V로 20~25분간 전기영동한 후 0.002% ethidium bromide에 10분간 담가두었다가 UV transilluminator하에서 사진을 촬영하였고, 이미지 분석 프로그램(Labworks 4.5)을 이용하여 mRNA의 발현양을 정량하였다.

Table 6. oligonucleotide of primers for heat shock protein-70 mRNA , β -actin mRNA.

RNA species	Expected size	Primer sequence
β -actin mRNA	520bp	5-GCCAACAGGGAGAAGATGAC-3 5-ACGTCGCACTTCATGATGC-3
HSP-70 mRNA	627bp	5-GVACATTCTCAGACTTGTCWCC-3 5-CATCAATGAACCAACTGCTGC-3

bp: base pairs



8. 통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대해 값의 유의차 유무는 SPSS-통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여 Duncan's multiple range test로 검정하였다.



III. 결 과

1. In vivo의 급성 및 만성독성실험

1-1. 급성독성실험에서의 반수치사농도

TBT, BaP, NP 및 BPA에 96시간 노출된 넙치의 반수치사농도(LC₅₀)는 Fig. 5에 나타내었다. 평균수온 21.1℃에서 TBT, BaP, NP 및 BPA에 대한 넙치 치어의 LC₅₀은 는 각각 16, 250, 1,100 및 140 ppb로 나타났다.

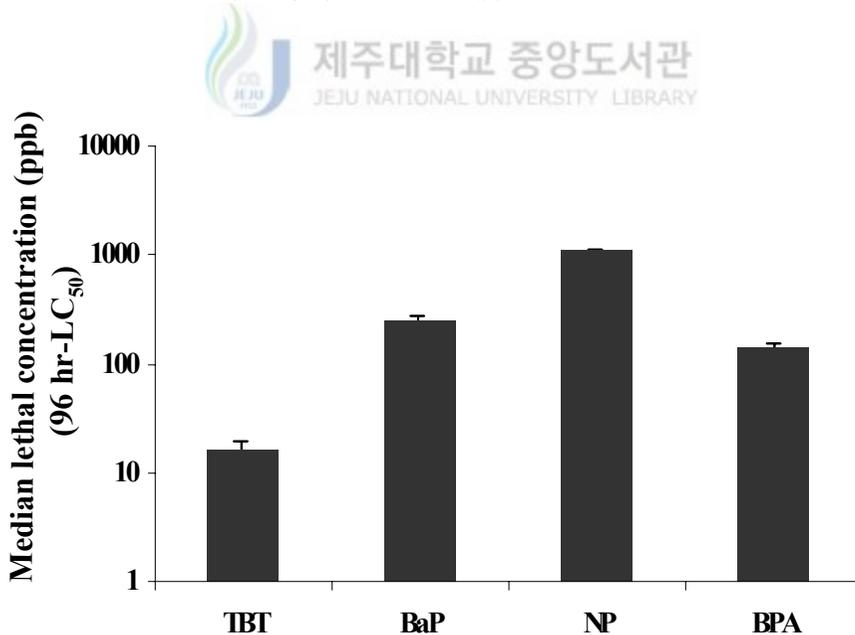


Fig. 5. Effect of median lethal concentration(96 hr-LC₅₀) of TBT, BaP, NP and BPA in olive flounder.

1-2. 만성독성실험에서의 체중변화

96 hr-LC₅₀ 값의 5%에 대응하는 TBT, BaP, NP 및 BPA에 노출되어진 넙치는 대조구에 비하여 TBT와 NP 단독구에서는 의미있게 낮은 체중성장을 보였다 (Fig. 6). BaP 단독구에서는 대조구과 차이가 없었으며, TBT+NP 복합구와 TBT+NP+BPA 복합구에서는 낮은 성장을 나타내었으나 유의한 차이는 없으므로 나타났다($P>0.05$). Fig. 7에서는 TBT, BaP, NP 및 BPA에 있어 96 hr-LC₅₀의 10% 농도에 각각 노출되어진 넙치는 대조구에 비하여 TBT, BaP, NP의 단독 농도구와 TBT+NP 및 TBT+ NP+BPA 복합 농도구에서는 모두 유의한 낮은 체중성장을 나타냈다($P<0.05$).

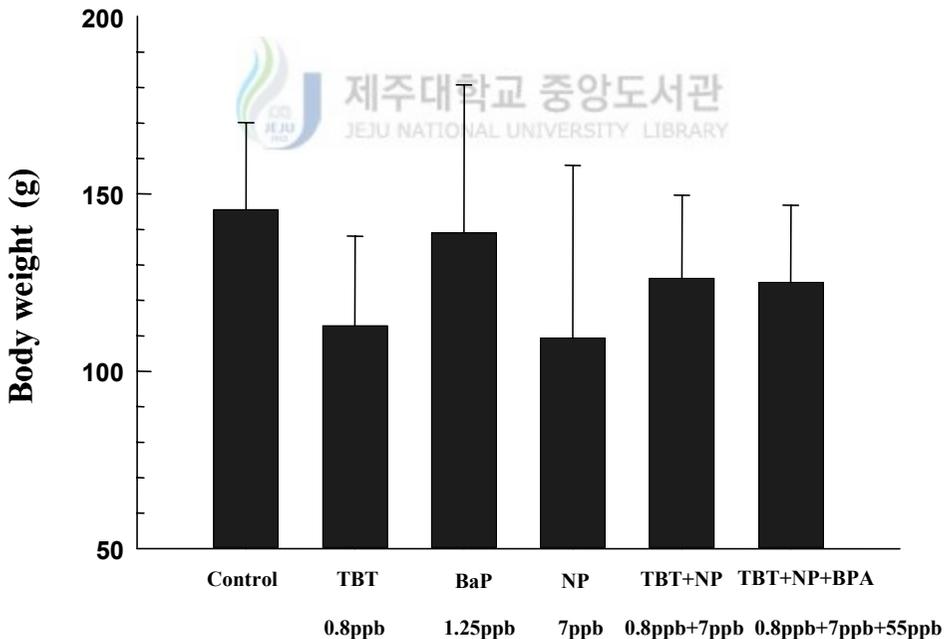


Fig. 6. Effect of TBT, BaP, NP and BPA treatment of body weight of measured 62 days after 96 hr-LC₅₀ 5% concentration administration to olive flounder.

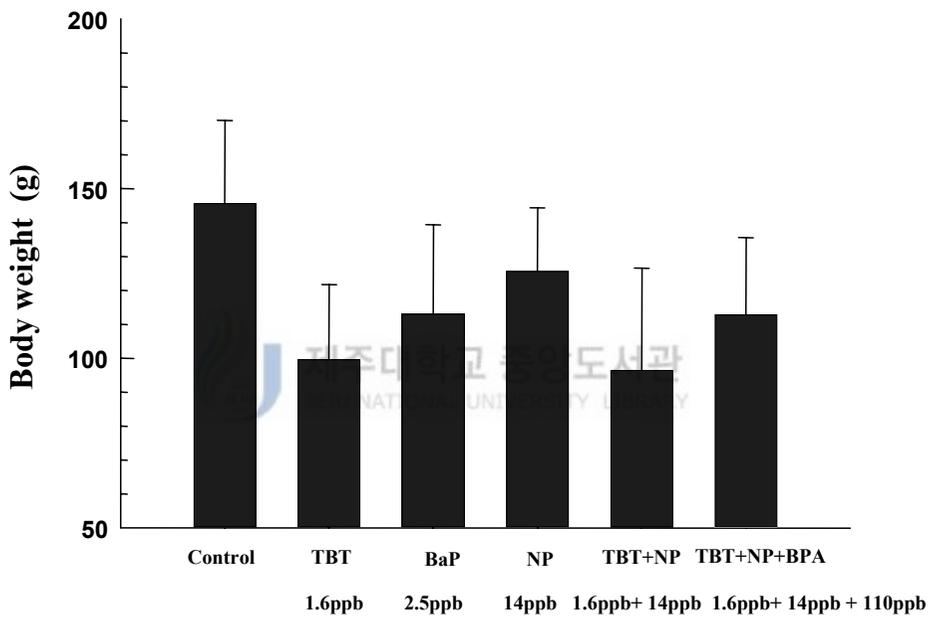


Fig. 7. Effect of TBT, BaP, NP and BPA treatment of body weight of measured 62 day after 96 hr-LC₅₀ 10% concentration administration to olive flounder.

2. EDCs의 첨가에 따른 배양 간세포의 변화

초대배양 간세포의 배양시간 경과에 따른 세포상태는 Fig. 8, 9 및 10에 나타내었다. 배양직후는 세포가 구형을 나타내었으며, 24시간 후에는 세포의 덩어리를 형성하여 안정적으로 배양용기면에 부착되었다. 그러나, EDCs를 투여 한 후 48시간 이후에는 BPA와 2,4-D의 고농도 처리구인 BPA 10^{-5} M, 2,4-D 10^{-5} M에서 대조구와 비교 하였을 때 단층의 균일함과 세포의 부착이 현저히 감소하였다.

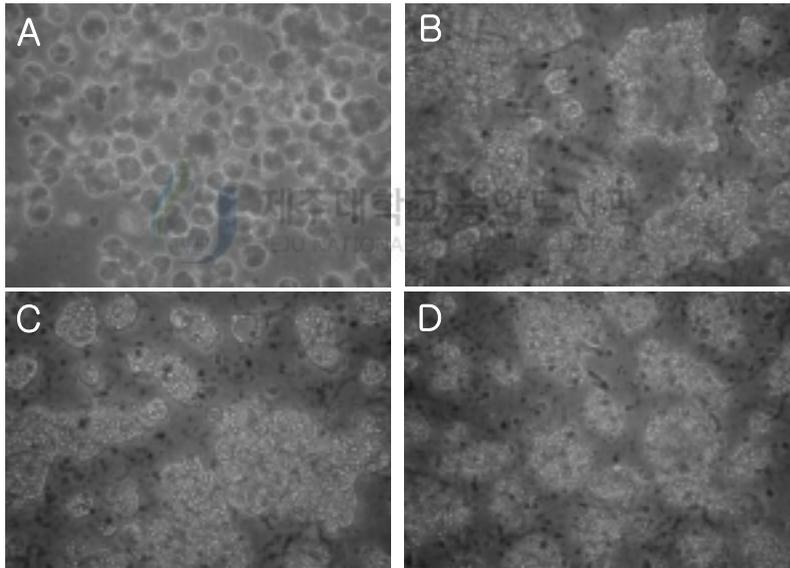


Fig. 8. Morphology of olive flounder hepatocyte cultured for 1 hours (A), 24 hours (B), 48 hours (C) and treated with E₂ after 48 hours (D)(microscope, ×200).

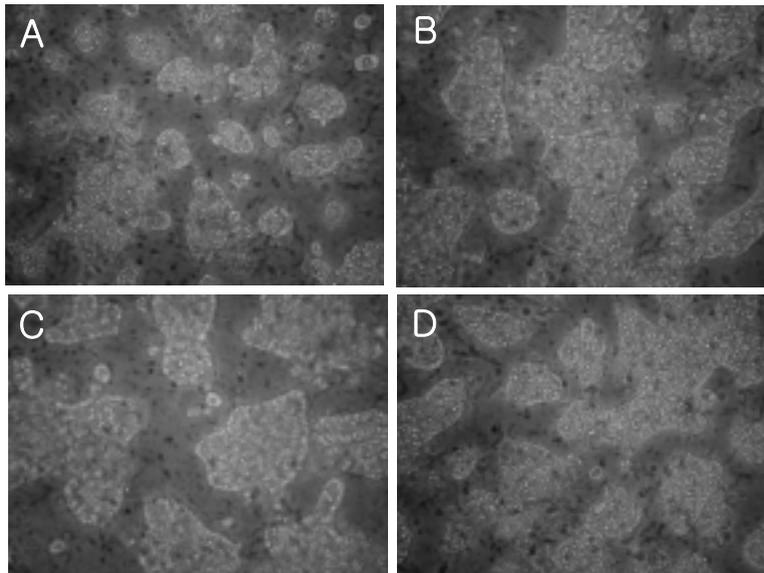


Fig. 9. Morphology of olive flounder hepatocyte cultured for treated with 2,4-D 10^{-5} M(A) , 10^{-6} M (B), 10^{-7} M(C) and 10^{-8} M(D) after 48 hours(microscope, $\times 200$).

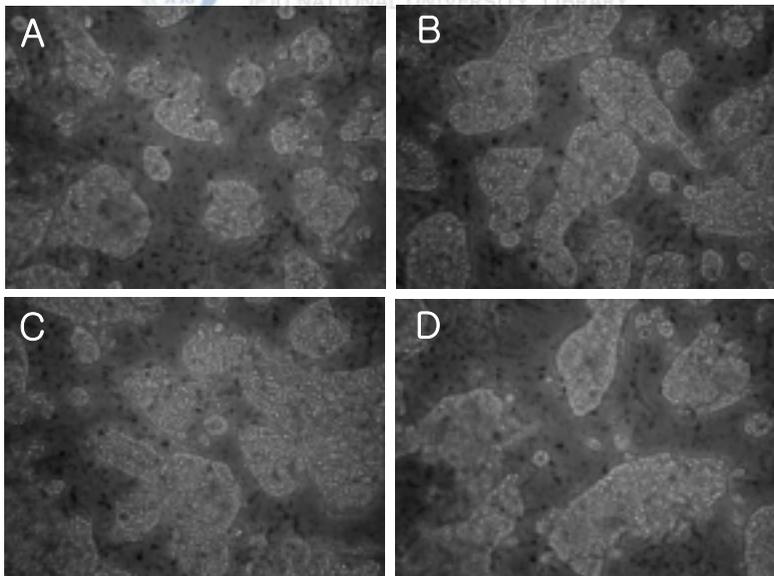


Fig. 10. Morphology of olive flounder hepatocyte cultured for treated with BPA 10^{-5} M (A) , 10^{-6} M (B), 10^{-7} M (C) and 10^{-8} M(D) after 48 hours(microscope, $\times 200$).

3. 만성독성 실험 및 간세포 초대배양에 있어서의 EDCs의 효과

3-1. 항산화 효소 변화

EDCs의 투여에 따른 넙치의 간조직 중 SOD 활성을 측정해 본 결과는 Fig. 11과 같다. 간조직의 활성은 모든 EDCs의 투여 그룹에서 모두 감소하였는데, 농도가 높은 그룹에서 SOD 활성이 더욱 감소하였다. 특히 NP+TBT 고농도 및 NP+BPA+TBT 고농도에서 가장 큰 SOD 활성 저해를 볼 수 있었는데, 각각 2.43 ± 0.15 unit/mg protein, 2.87 ± 0.20 unit/mg protein으로 대조그룹(4.01 ± 0.19 unit/mg protein)에 비하여 매우 유의차가 큰 활성 감소를 나타내었다.

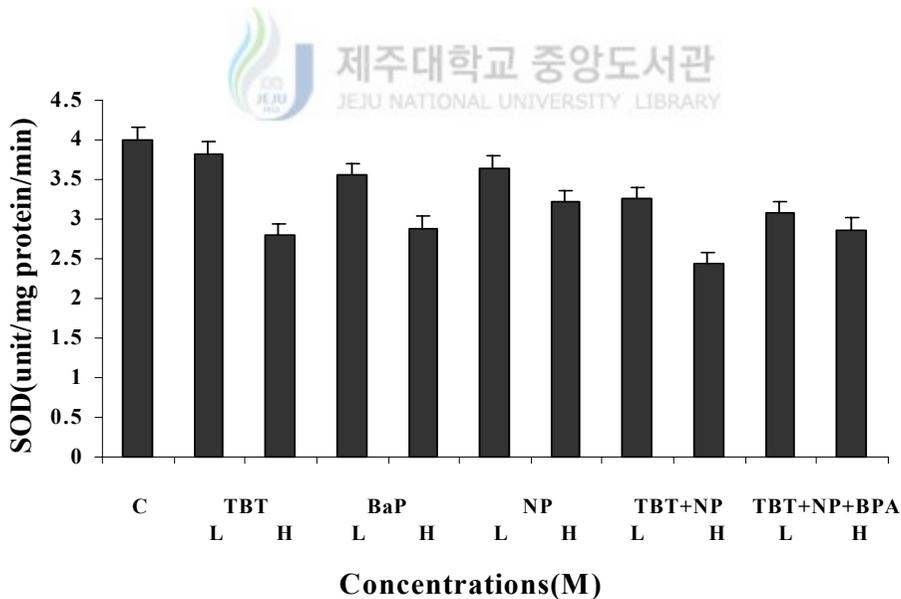


Fig. 11. Effect of various concentration of TBT, BaP, NP and BPA on the activity SOD in Liver tissue of olive flounder(L;Low con., H:High con.).

EDCs의 투여에 따른 넙치의 간조직 중 CAT 활성을 비교하여 결과는 Fig. 12와 같다. SOD의 경우와 마찬가지로 모든 시험구에서 CAT활성이 저해되었으며, 단독 고농도구 및 복합투여구의 경우 그 활성이 크게 저하 되었다. 그 중에서도 가장 낮은 활성을 나타내고 있는 복합투여군의 저농도구 및 고농도구의 경우 각각 $22.92 \pm 1.38 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$, $18.20 \pm 2.09 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 로 대조구의 CAT 활성 ($46.92 \pm 2.10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml protein}$)에 비해 매우 높은 CAT 활성 저해를 나타내었다($P < 0.05$).

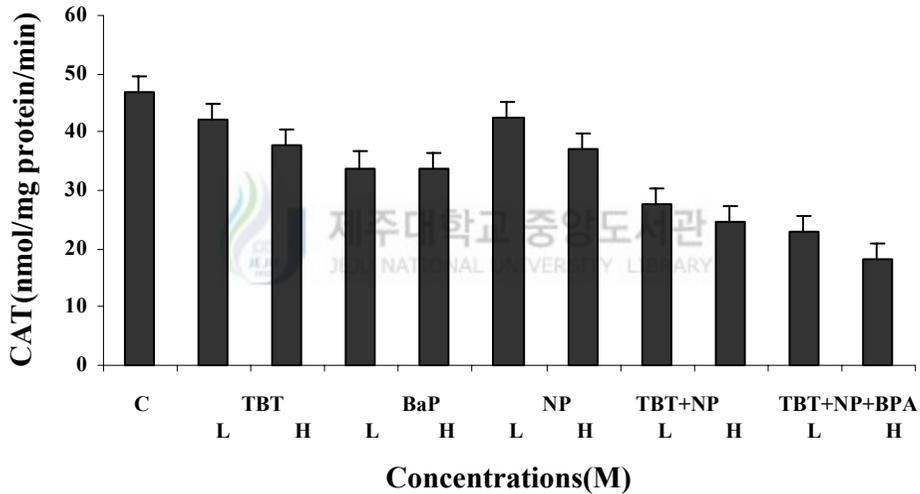


Fig. 12. Effect of various concentration of TBT, BaP, NP and BPA on the activity CAT in Liver tissue of olive flounder(L:Low con., H:High con.).

간세포 배양액에서의 SOD의 활성 변화를 관찰한 결과는 Fig. 13에 나타내었다. 효소활성의 1 unit은 1분간의 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다. BPA의 경우, SOD의 활성은 대조구에 비하여, $10^{-6} \sim 10^{-8} \text{M}$ 까지 증가하는 경향을 나타내었으나 E_2 와 2,4-D 투여구에서는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다($P < 0.05$).

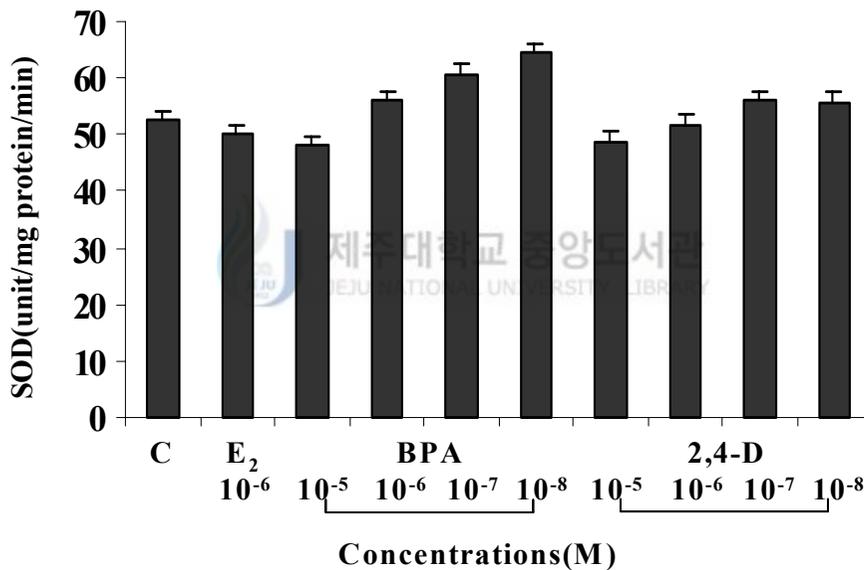


Fig. 13. Effect of various concentration of BPA, 2,4-D on the activity SOD in hepatocyte cultures of olive flounder .

간세포 배양액에서의 CAT의 활성 변화를 관찰한 결과는 Fig. 14과 같다. 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다. CAT의 활성은 E₂ 와 BPA 전구간 및 2,4-D 10⁻⁵M 투여구에서 대조구에 비하여 높은 활성을 나타내었다($P < 0.05$).

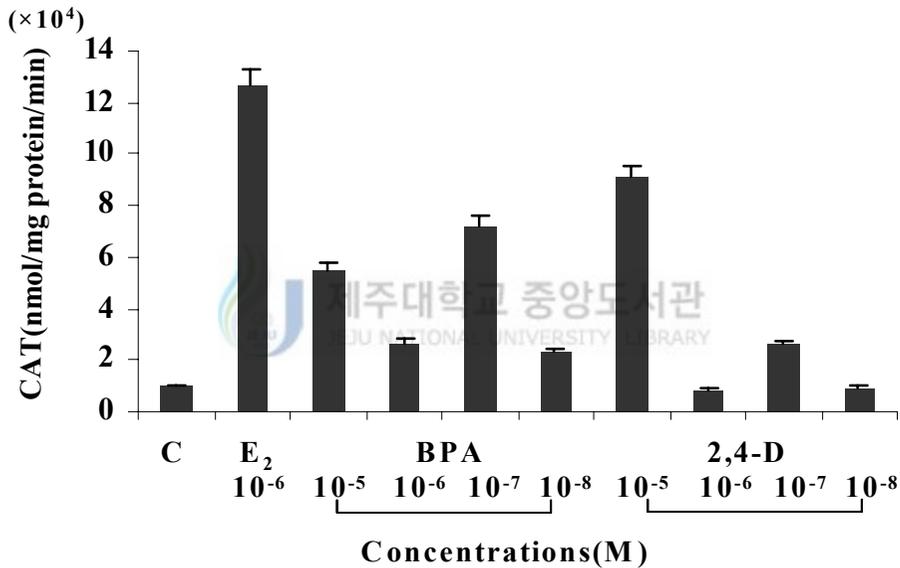


Fig. 14. Effect of various concentration of BPA, 2,4-D on the activity CAT in hepatocyte cultures of olive flounder .

3-2. Glutamic pyruvic transaminase(GPT) 및 Glutamic oxalacetic transaminase(GOT)변화

시험물질을 단독 또는 복합 투여시킨 넙치의 간에서 GPT 및 GOT를 비교한 결과는 Fig. 15, 16과 같다. GPT는 대조구에 비하여 모든 구에서 높게 나타났고 EDCs 단독 투여구의 고농도 구에서 높게 나타났다. 또한 복합 투여구에서는 고농도 보다 저농도에서 높게 나타났다. GOT 역시 GPT와 유사한 결과를 나타내었으나, NP의 고농도에서 특이적으로 높게 나타났다($P < 0.05$).

한편, 배양 간세포를 이용하여 BPA 및 2,4-D의 첨가에 따른 간독성에 대한 결과는 Fig. 17, 18와 같다. 그 결과, GPT의 활성도는 대조구에 비하여 BPA 10^{-6} , 2,4-D 10^{-5} 및 2,4-D 10^{-8} M은 유의성을 나타내었으나 위의 세구간을 제외한 전구간에서는 대조구와 비교하였을 때 별다른 유의성이 없는 것으로 나타났다. GOT는 대조구에 비하여 E₂ 10^{-6} M, BPA 10^{-5} M, BPA 10^{-7} M, 2,4-D 10^{-5} M, 2,4-D 10^{-6} M 및 2,4-D 10^{-8} M에서 높게 나타났다($P < 0.05$).



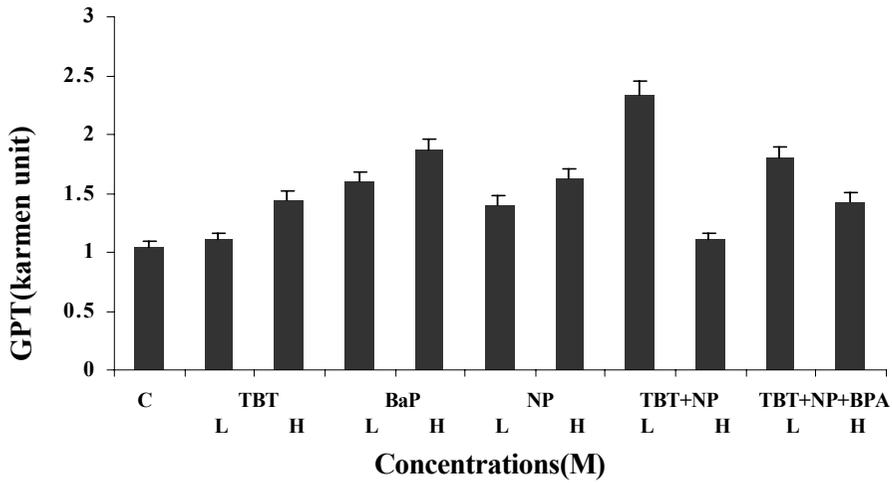


Fig. 15. Effect of various concentration of TBT, BaP, NP and BPA on the induction GPT in Liver tissue of olive flounder(L;Low con., H:High con.) .

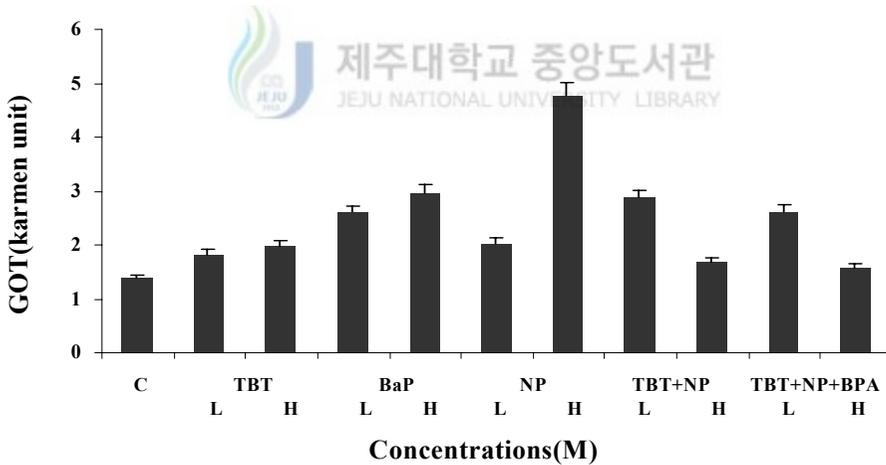


Fig. 16. Effect of various concentration of TBT, BaP, NP and BPA on the induction GOT in Liver tissue of olive flounder(L;Low con., H:High con.).

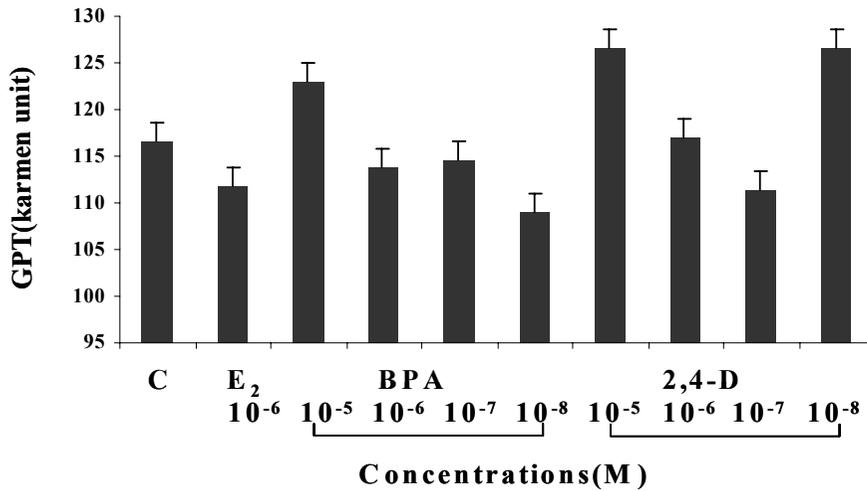


Fig. 17. Effect of various concentration of BPA, 2,4-D on the induction GPT in hepatocyte cultures of olive flounder.

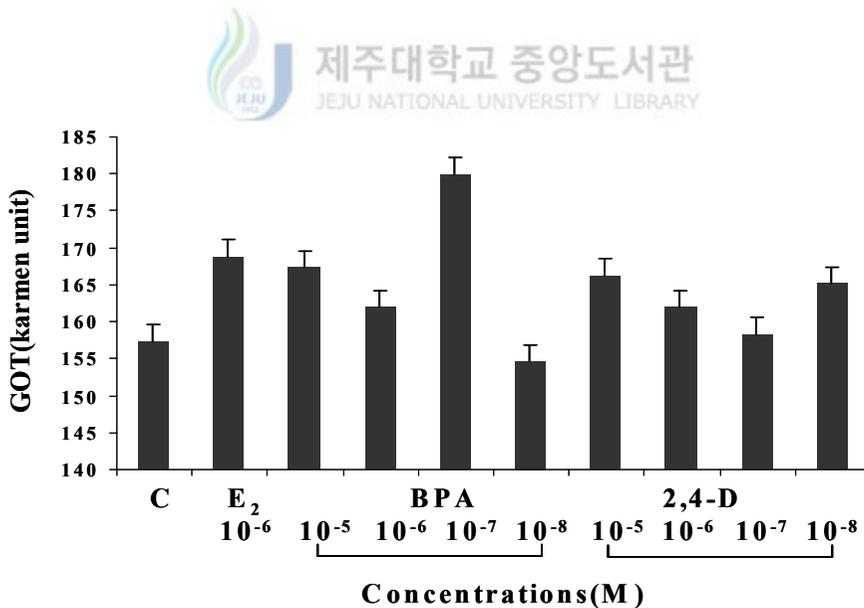


Fig. 18. Effect of various concentration of BPA, 2,4-D on the induction GOT in hepatocyte cultures of olive flounder.

3-3. 만성독성에서의 ELISA를 이용한 VTG 발현

EDCs의 만성독성처리에 따른 Vtg 합성량을 확인한 결과는 Fig. 19와 같다. Vtg 발현량은 양은 BaP의 저농도에서 가장 높은 값을 나타냈고 NP의 저농도, TBT+NP 복합구의 저농도에서도 높은 값을 나타내었다. 반면, TBT의 저·고농도, BaP, NP의 고농도 및 복합구의 저·고농도에서는 매우 낮은 값이 나타났다. 그러나 수컷혈청인 대조군(-)에 비하여 모든 구에서 Vtg 합성이 유의하게 높게 나타났다.

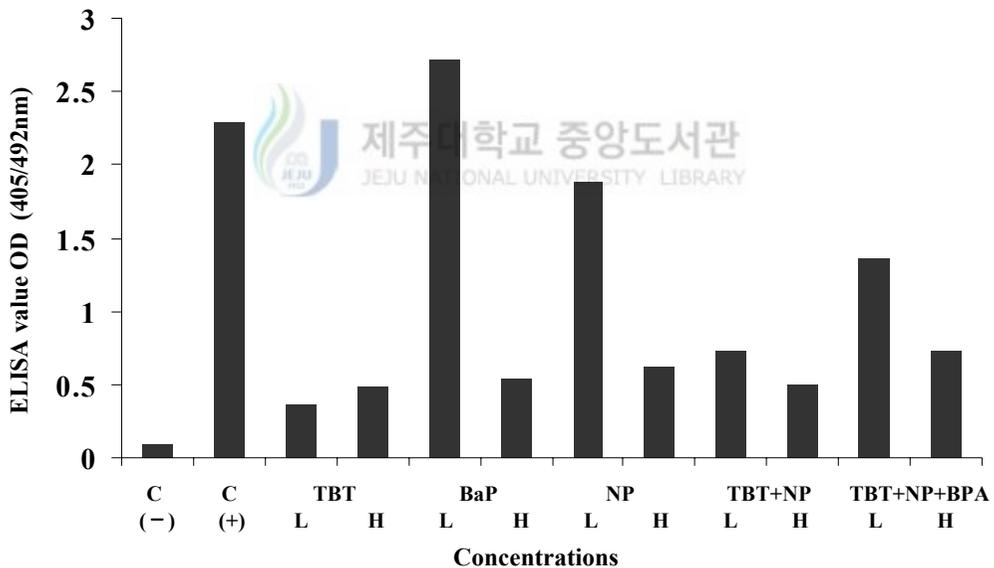


Fig. 19. Result of antibody level in serum during the immunization.
Level of VTG antibody in serum is expressed as ELISA value at 1:1,000 dilution using the VTG antigen(L:LOW con., H:HIGH con.).

3-4. 간세포 초대 배양에서의 SDS-PAGE를 이용한 VTG 합성 변화

E_2 를 $10^{-5}M \sim 10^{-8}M$ 의 농도가 되게 투여하여 합성된 VTG의 SDS-PAGE 결과는 Fig. 20과 같다. 배양액에 E_2 를 투여한 후 3일 간격으로 2회 교환 하였으며, 분석은 6일째의 배양액을 회수하여 실시하였다. 그 결과, VTG의 밴드는 E_2 농도의 증가에 따라 증가하여 $10^{-6}M$ 에서 최고치를 나타냈다. 반면, $10^{-5}M$ 의 농도에서는 오히려 염색강도가 다소 약해지는 결과를 나타냈다. 이때의 흡광도를 비교해보면, $10^{-8}M$, $10^{-7}M$ 및 $10^{-6}M$ 에서 각각 0.08, 0.14 및 0.26의 수치를 나타내었다 (Fig. 21).

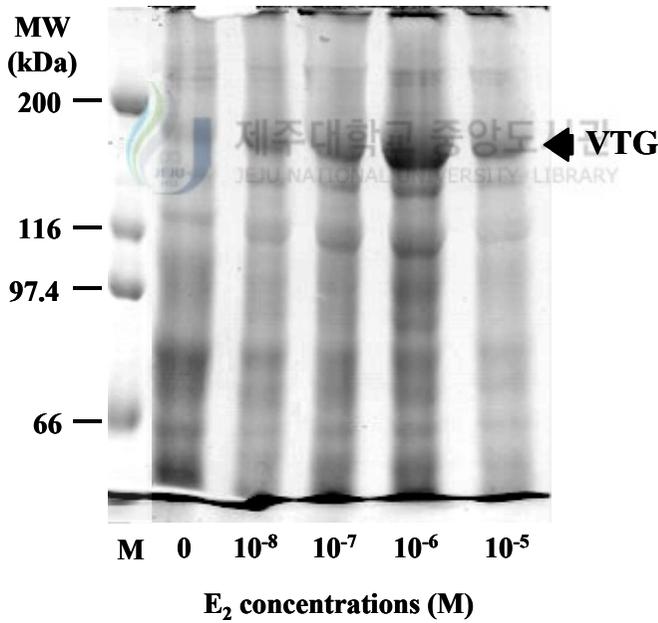


Fig . 20. Effect of various concentration of E_2 in the olive flounder hepatocyte culture on the induction of VTG (arrow). M: molecular weight(MW) maker. CBB stain.

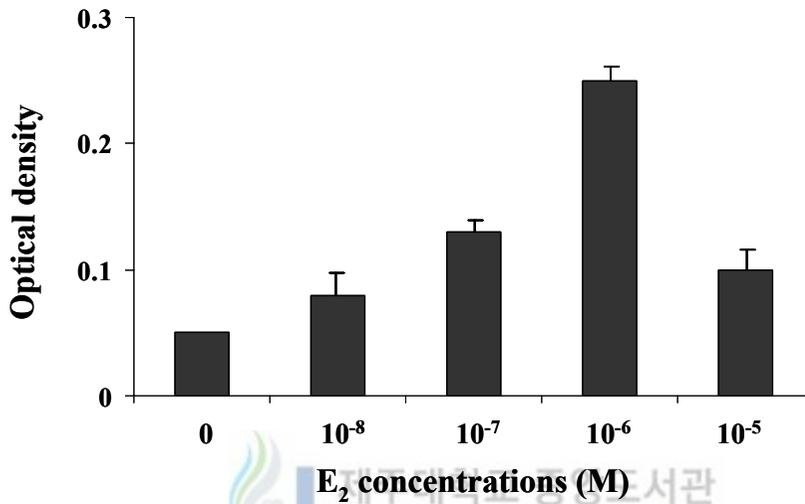


Fig. 21. Effect of various concentration of E₂ on VTG production in primary cultures of olive flounder hepatocyte ($p < 0.05$).

BPA의 SDS-PAGE의 결과, BPA의 첨가에 있어서는 10^{-8}M 및 10^{-7}M 의 농도에서 Vtg의 밴드가 나타나지 않았으나, 10^{-6}M 에서 약하게 Vtg의 밴드가 나타났으며 10^{-5}M 에서 강한 염색성을 띤 Vtg밴드가 나타났다(Fig. 22). 또한 E_2 와 BPA 10^{-6}M 을 동시에 투여한 경우에는 Vtg 합성의 상승 및 억제작용을 나타내지 않고 E_2 투여구와 동일한 수치를 나타내었다. 또한, 2,4-D의 SDS-PAGE의 결과, 2,4-D의 첨가에 있어서는 10^{-8}M 의 저농도의 첨가에 있어서는 Vtg의 합성이 나타났으나, 그보다 높은 10^{-7} , 10^{-6} 및 10^{-5}M 의 농도에서는 오히려 Vtg의 합성은 전혀 나타나지 않았다(Fig. 23). 그리고 E_2 10^{-6}M 과 2,4-D 10^{-6}M 을 동시에 첨가한 실험구에서는 Vtg 합성이 강하게 나타났다.



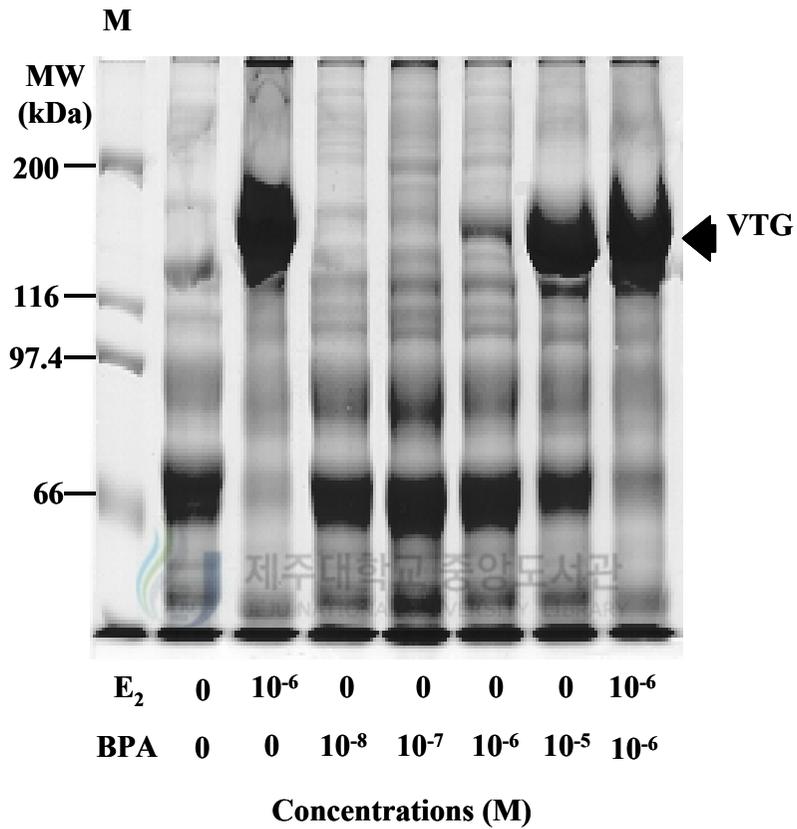
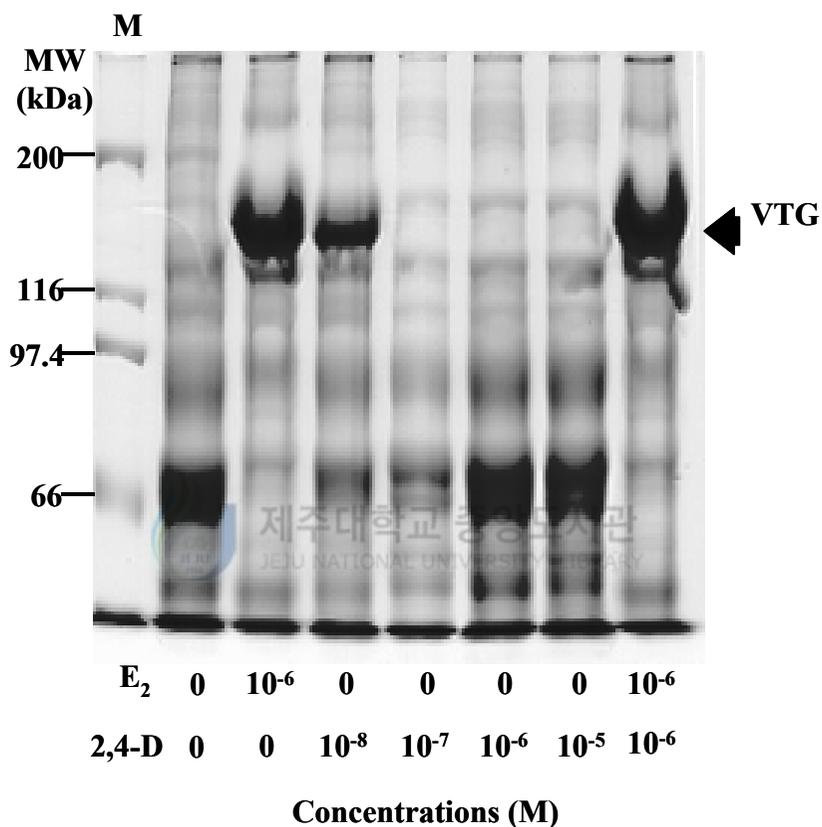


Fig. 22. Effects of BPA concentration on the induction VTG(arrow) in the olive flounder hepatocyte cultures.

M: molecular weight(MW) maker. CBB stain.



**Fig. 23. Effect of 2,4-D concentration on the induction VTG(arrow) in the olive flounder hepatocyte cultures.
M: molecular weight(MW) maker. CBB stain.**

3-5. RT-PCR을 이용한 HSP 70 mRNA 발현

TBT, NP, BaP 및 BPA의 단독 또는 복합 투여 후 간조직에서 HSP 70 mRNA 발현을 조사한 결과는 Fig. 24와 같다. 양성대조구인 β -actin mRNA(520 bp)과 HSP 70 mRNA(627 bp)의 발현양을 확인하였다. β -actin mRNA가 발현되었을 때 대조구인 정상암컷에 비하여 BaP 저·고농도 구간에서는 HSP 70 mRNA의 발현에 있어 유의한 차이를 나타내지 않았으나, TBT+NP 복합구의 저·고농도, TBT+NP+BPA의 저농도 구간에서 HSP 70 mRNA의 유의한 증가를 보였다. 이러한 HSP 70의 mRNA의 발현량의 증가는 BaP를 제외한 나머지 실험구에서 Vtg의 합성 증가와 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 19, Fig. 24).

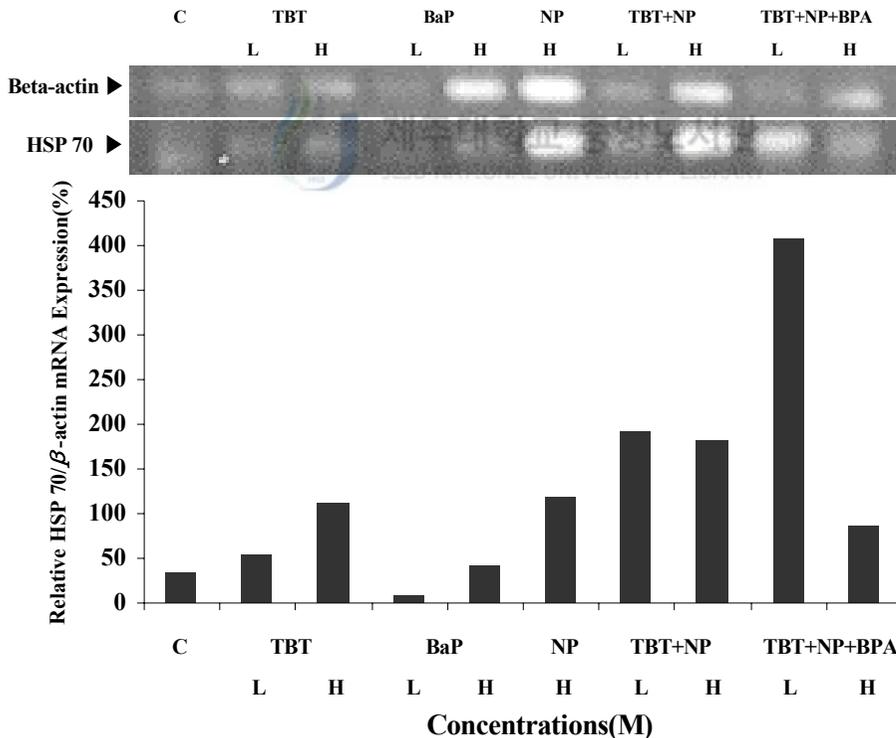


Fig. 24. Effect of various concentration of TBT, BaP, NP and BPA on the expression of HSP70 in the olive flounder Liver tissue (L;Low con., H:High con.).

배양 간세포에 EDCs를 노출 후 48시간이 경과한 후의 HSP 70 mRNA의 발현량은 Fig. 25에 나타내었다. HSP 70 mRNA의 영동상은 대조구를 제외하고 모든 실험구에서 밴드가 출현하였다. HSP 70 mRNA/ β -actin mRNA의 비를 분석한 결과, BPA의 모든구에서 농도가 감소함에 따라 증가되는 양상을 나타내었으며, 2,4-D는 반대로 농도 의존적으로 감소하였다. 이러한 결과는 Vtg의 합성정도와 반비례하는 결과로, Vtg가 합성되지 않은 BPA에서 가장 높게 나타났다(Fig. 22, Fig. 25). 2,4-D에 있어서도 Vtg의 합성농도인 10^{-7} M에서는 비례적으로 낮은 HSP 70 mRNA의 발현이 나타났으며, 10^{-5} M인 Vtg 비합성 농도에서는 높게 나타나, Vtg와 HSP 70의 발현이 상반되는 결과를 나타내었다(Fig. 23, Fig. 25).

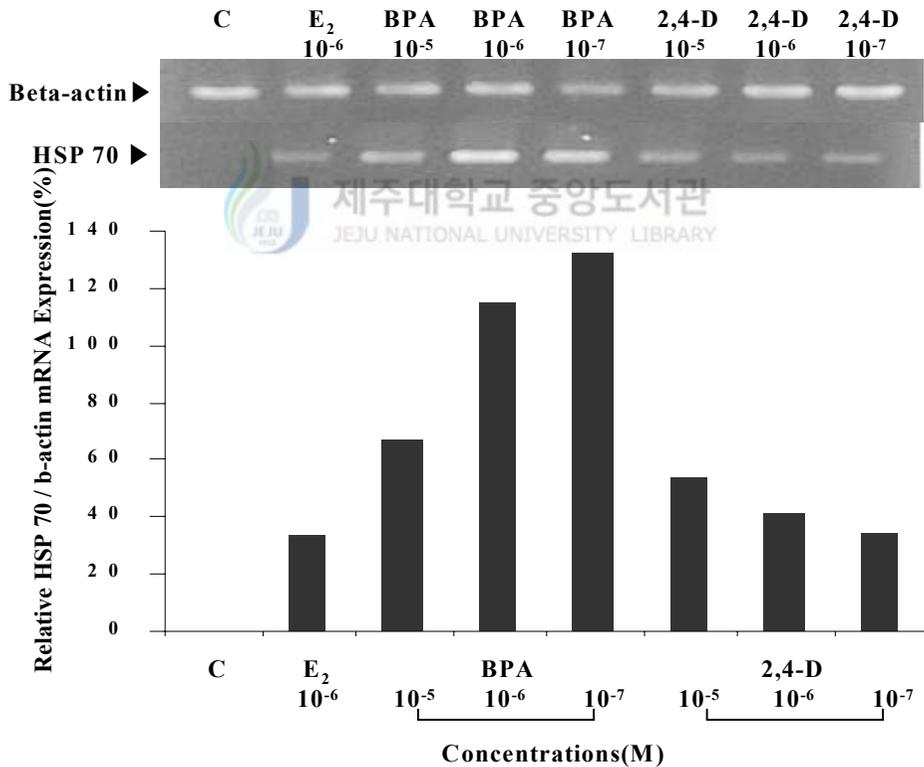


Fig. 25. Effect of various concentration of on the expression of HSP 70 in the olive flounder hepatocyte cultures.

VI. 고찰

우리 주변 환경에 존재하는 천연 또는 합성 화학 물질들 중에는 생체 내에서 만들어지는 호르몬과 유사한 작용을 나타내면서, 쉽게 분해되지 않고 지방친화성이 있어 체내에 축적되어 정상적인 내분비계의 기능을 저해하는 물질들이 다수 존재한다(Gaido et al, 1997; Collins et al, 1997; Breithofer et al, 1998). 이러한 화학 물질들을 일명, 환경호르몬 또는 내분비계 교란물질(EDCs)이라 하는데, 정상적인 생태계의 순환뿐만 아니라 인간에게도 큰 악영향을 미치고 있다(Korach, 1993; Stone, 1994). 그러나 이러한 유해물질의 작용에 대한 연구는 대부분 포유류를 비롯한 인체에 대한 연구가 주를 이루고 있어 상대적으로 유해물질이 직접적으로 유입되어 큰 영향을 미치게 되는 해양 생태계에 대한 연구는 상대적으로 낮은 실정이며, 해양 생태계의 파괴와 내분비 교란 물질에 의한 상관성의 유무를 파악하는 것은 매우 중요한 과제라 할 수 있을 것이다. 이러한 점에서 환경오염이 최종적인 정화작용이 되는 곳으로 알려진 해양의 서식 동물을 대상으로 EDCs의 유해성에 대한 기초 생리학적 연구를 하는 것은, 생태계의 보존 및 관리를 위한 Biomarker의 확립이 절실한 시점이라고 여겨진다. 본 연구에서는 실제적인 EDCs의 생체 내 작용농도 및 작용기전을 파악하는 기준으로 설정하기에는 어려운 점이 많기 때문에 생물의 내분비계를 교란하여 종의 번식에 악영향을 미치는 것으로 알려진 EDCs의 *in vitro* 및 *in vivo* 독성시험의 한 일환으로 몇 가지의 스트레스 및 내분비교란의 biomarker를 측정 하여 생체 내 스트레스와 내분비교란 상관성의 파악에 주안점을 두고 연구를 시행하였다.

우선, 초대간세포 배양에서 나타난 세포의 육안적 관찰소견에 있어서는 고농도의 BPA와 2,4-D를 처리한 군에서 대조군과 E₂의 군에 비하여 간세포의 융합, 세포의 부착 및 성장 저해를 비롯하여 세포절편과 같은 세포퇴행성 변화를 나타냈다. 2,4-D는 세포막에 손상을 가하여 세포로부터 아미노산의 대사산물을 방출시키는 것으로 보고(Cheney and Swinehart, 1984)되고 있다. 따라서 본 연구에서

나타난 세포 부착 및 성장의 저해는 고농도의 BPA와 2,4-D가 정상호르몬 수용체의 작용억제를 비롯하여 단백질합성 및 DNA의 합성억제 등을 유발함으로써 세포에 손상을 준 복합적인 결과라고 생각된다. 그러나 단순한 육안관찰보다는 세포의 직접적인 생존율과 세포막의 손상과 같은 조직학적인 연구가 보충되어야 할 것으로 여겨진다.

EDCs에 노출된 넙치의 96시간 반수치사농도를 평가한 급성독성결과를 바탕으로 독성실험을 한 결과, EDCs의 농도가 높을수록 대조구에 비하여 체중성장이 현저하게 낮아지는 결과를 나타내었다. 이와 같은 현상은 EDCs의 장기적인 노출에 의한 독성작용으로 인하여 생체내에서 복합적인 생리적 대사의 이상이 일어날 가능성이 큰 것으로 여겨진다.

GOT는 심근, 간, 골격근 등 체내의 모든 조직에 함유되어있고, GPT는 주로 간에 존재하여 주로 간염, 간기능 장애, 황달, 용혈성질환, 근질환 등에 유의한 지표로 사용된다. 지속적인 스트레스시 lipid peroxidation으로 인해 간세포 손상을 유발하여 GOT, GPT가 혈중으로 방출되어 상승된다(大韓病理學會 編., 1990). 따라서, 유해한 화학물질이나 EDCs와 같은 물질에 노출되었을 때 여러 독소를 받아들여 해독하는 간에 손상을 미치리라 생각된다. EDCs를 단독 또는 복합 노출한 *in vivo* 시험의 결과에서는 대조구에 비하여 GPT, GOT가 EDCs의 단독 투여구인 고농도 NP, BaP구에서 가장 큰 손상을 가지는 것으로 나타났다. 또한 복합 노출구의 저농도에서도 고농도로 노출하였을 때 보다는 강한 손상이 일어났음을 확인하였다. 배양 간세포의 EDCs 처리(BPA 및 2,4-D)에 따른 간 손상에 대해 확인한 결과 EDCs의 단독 및 복합 노출에서 확인된 결과와 유사하게 EDCs의 고농도에서 강한 간 손상 지수를 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 EDCs의 노출에 따라 간 조직내의 심각한 손상이 초래되는 것으로 판단된다.

한편, 스트레스에 의해 발생하는 활성산소는 어떤 유해물질이나 약물 등에 폭로되었을 때 superoxide radical, hydroxyl radical 및 hydrogen peroxide와 같은 oxygen free radicals이 과다하게 생성되어 지질 과산화반응, 단백질 파괴, 염색체 이상 및 적혈구 파괴등 조직에 손상을 입힐 수 있다(Goldberg and Stern, 1977; Simon et al., 1981; Moody and Hassan, 1982; Junqueira et al, 1986). 그

러나 정상적인 조직이나 세포는 내인성 제거제(endogenous scavengers)를 함유하고 있어 oxygen free radicals 손상으로부터 조직 및 세포를 보호하는 작용을 하는데, 내인성 제거제인 SOD 및 CAT가 활성산소를 형성하기 전에 생체에 무해한 분자들로 전환시킨다(Forman and Fridovich, 1973; Wendel and Feuerstein, 1981). 또한, 중금속 이온의 노출에 의해서도 항산화 효소 활성이 변화한다고 알려져 있다(Livingstone et al., 1992; Chen et al., 2000; Zikic et al., 2001). 이처럼 항산화 효소 활성은 생체내의 스트레스 반응과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 여러 가지 EDCs를 단독 또는 복합노출한 *in vivo*적 시험의 결과에서도 위의 연구보고와 유사하게 간조직의 방어시스템으로서 제거효소(scavenger enzymes)의 활성이 대조구에 비하여 복합 투여구의 고농도에서 가장 높은 SOD 활성 저해를 볼 수 있었다. 또한, CAT의 활성은 복합 투여구의 저농도 및 고농도에서 매우 높은 CAT 활성 저해를 나타내고 있다. 특히 간조직 중의 SOD 활성은 환경호르몬의 노출에 따라 크게 감소하였는데 이러한 결과는 활성 산소를 제거하는 SOD의 활성이 환경호르몬 노출에 상당한 영향을 받는 것으로 추정된다. 초대 간세포 배양세포에 EDCs를 농도별로 투여한 *in vitro* 시험의 결과에서도 대조구에 비하여 고농도의 화학물질의 투여에 따라 SOD 및 CAT양의 증가된 현상을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 EDCs와 같은 화학물질의 노출 스트레스에 기인하여 발생하는 활성산소에 대한 어체의 생리학적 방어 기작으로 인해 SOD 및 CAT가 증가한 결과로 생각되어진다. 이처럼 단기의 세포 생물학적 실험에서와 장기적 만성독성 실험에서는 상반된 결과를 나타내었다. 이러한 SOD 및 CAT의 증가와 감소의 이유는 외부적인 화학물질에 의하여 단기적으로는 즉, *in vitro*에서는 항산화효소의 일시적인 증가를 통하여 방어기작이 작동하게 되지만 *in vivo*의 장기적인 만성독성은 오히려 항산화효소의 활성저해를 초래해 더 이상 생체 내 방어기작으로 작용하지 못하여 생리적인 큰 저해를 초래할 것으로 판단된다.

생물의 내분비계를 교란하여 중의 번식에 악영향을 미치는 것으로 알려진 EDCs의 연구에 Vtg를 사용하였다. Vtg는 E₂와 유사행동을 하는 EDCs에 의해 미성숙어 및 수컷 어류에서도 합성되어 EDCs 노출에 대한 생물학적 지표로서

사용되고 있다(Sumpter and Jobling, 1995; Toppari et al., 1995). 또한, 외인성 노출에 의한 인위적인 Vtg 유발은 성 성숙 시기뿐만 아니라 연중 Vtg 합성을 조절할 수 있어 난황전구단백질과 관련된 내분비적 기능과 EDCs의 영향을 판단하기 위한 생물학 지표로 사용되어 왔다(Flouriot et al., 1996; Pakdel et al., 1997; Kramer et al., 1998). 넙치의 간세포를 배양하여 각각의 농도별로 투여된 E₂와 BPA 및 2,4-D에 의한 Vtg의 합성 및 분비에 대한 영향을 관찰하고 이를 토대로 유해농도를 간접적으로 판단하여 생체 내의 스트레스 작용기전에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서도 관찰하였다. 본 실험에서 사용한 가장 고농도인 E₂ 10⁻⁵M에서는 Vtg합성이 급격히 감소하여 0.10의 수치를 나타내었다. 그리고 E₂를 첨가하지 않은 대조군에 비해 E₂를 첨가한 모든 실험군에 있어 Vtg의 양이 유의하게 높은 수치를 나타내었다($P < 0.05$). 이러한 결과로 보아, 넙치의 간세포 배양을 이용한 Vtg의 합성에는 E₂ 10⁻⁶M전후가 가장 적합한 것으로 여겨진다. 플라스틱의 원재료로 이용되는 BPA가 Vtg합성에 미치는 영향을 조사한 결과 BPA 10⁻⁶ M의 농도에서 Vtg의 합성이 나타났고 10⁻⁵ M에서는 E₂ 10⁻⁶ M의 첨가군과 거의 유사한 수치를 나타내어, BPA의 농도 의존적으로 Vtg합성이 증가된 것으로 나타났다. 따라서 넙치에서의 BPA는 농도 의존적으로 Vtg를 합성하고 난황형성기에 Vtg합성을 유도할 가능성이 있다고 판단된다. 제조제에 포함되어 있는 2,4-D의 Vtg합성에 미치는 영향을 조사한 결과 2,4-D의 내분비계 작용은 저농도 또는 단기간의 노출에는 E₂와 유사한 작용을 나타내지만, 고농도에서는 오히려 그 작용이 억제되는 것으로 보고(Cheney et al., 1997)되고 있는데 본 연구에서는 Vtg는 10⁻⁶ M농도의 E₂를 첨가한 실험군에 비해 유의하게 낮은 수치이긴 하였으나, 10⁻⁸ M의 2,4-D를 단독으로 첨가한 실험군에서 합성이 이루어 졌다. 그러나 고농도에서는 Vtg의 합성은 거의 이루어지지 않았으며, 이것은 E₂를 첨가하지 않은 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 따라서 2,4-D의 작용은 E₂와 유사한 작용을 갖지만 Vtg합성에 있어서는 E₂의 수용체와의 작용과 서로 다른 것으로 판단된다. 이상의 결과들은 내분비교란물질의 종류와 농도에 따라 양상이 달라지는데 이러한 차이는 호르몬 수용체나 세포내에서의 또 다른 생리학적 차이를 동반한 결과라 생각되며, 모든 내분비 교란물질이 동일한 메커니즘을 통하

여 작용하지는 않는다는 것을 확인한 결과라 판단된다. 한편, *in vivo* 실험에서의 ELISA의 분석에 의한 Vtg의 정량분석 결과에서는 정상숫컷 혈청인 negative의 대조구에 비해 모든구에서 Vtg의 발현양을 확인할 수 있었는데 난황형성기의 개체로 판단되는 양성대조구과 BaP, NP 및 TBT+NP가 높은 값을 나타내었다. 모든실험구에서의 Vtg 발현은 EDCs 처리에 의해 여성호르몬인 E₂ 처리와 같은 Vtg 합성이 유도되는 것으로 판단되며, TBT의 경우에는 E₂ 유사작용이 없는 것으로 보고되어져 있어 본 연구에서 나타난 TBT의 투여구는 수컷에서도 나타날 수 있는 기준치에 해당 할 가능성도 시사된다.

HSP는 스트레스에 의한 비가역적인 손상으로부터 세포 내 중요 요소들을 보호하고, 스트레스 동안 세포들의 생존이 가능하게 하며, 회복기의 세포의 정상적인 기능 회복을 유도하는 것으로 알려졌다(Hector 등, 1997). 이 단백질은 세포가 열 이외에도 산소 결핍, 에틸알코올, 중금속과 여러 단백질 유도체, 독극물 등 세포에 스트레스로 작용하는 자극에 의해서도 생산된다고 밝혀짐에 따라 종종 스트레스 단백질이라 불리기도 한다(Lindquist., 1986; Schlesinger., 1990). 여러 가지의 스트레스에 대해 발현하는 HSP들 중 HSP70이 가장 많은 반응을 보이는 HSP로 세포에 스트레스가 주어졌을 때 수 분 이내에 세포내에서 합성되며 (Marx, 1983), 또한 세포를 보호하고(Laudry 등, 1982), 과도한 외부 자극 등의 부적절한 조건하에서 세포의 생존력을 증가 시켜주는 물질로도 알려져 있으며(Li et al., 1982), 수생환경내의 다양한 스트레스 요인으로의 노출에 의해 생체 내 방어기작의 일환으로 유도된다고도 알려져 있다. 현재까지 밝혀진 바로는 열충격 단백질은 일시적으로 세포내 단백질과 결합하여 단백질의 생산, 운반, 사멸까지의 안정화와 구조적 변화를 도와주는 하나의 chaperones으로 받아들여지고 있다 (Maytin., 1995). 이러한 점에서 본 연구에서는 Vtg의 내분비교란 뿐만 아니라 EDCs의 생체 내 스트레스의 작용정도를 간접적으로 파악하고자 스트레스 단백질을 측정하였다. 만성적인 EDCs의 단독 또는 복합 투여에 의해서도 일반적인 대조구과는 달리 실험구에서 HSP 70 mRNA의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 이러한 HSP 70 mRNA 발현량을 Vtg의 ELISA 결과와 비교하여 보았을 때

Vtg의 합성이 증가될 경우에는 HSP 70 mRNA 발현량이 감소하는 것으로 나타났다.

한편, *in vitro* 시험에서의 HSP 70 mRNA의 영동상은 대조구를 제외하고 모든 실험구에서 밴드가 출현하였으며 HSP 70 mRNA/ β -actin mRNA의 비는 BPA의 모든구에서 농도가 감소함에 따라 증가되는 양상을 나타내었으며, 2,4-D는 반대로 농도의존적으로 감소하였다. 그러나 이러한 결과의 공통점은 Vtg의 합성과 HSP 70 mRNA의 발현량은 반비례하는 것으로, Vtg가 합성되는 농도에서는 HSP 70 mRNA의 발현량은 감소하고, Vtg의 합성량이 감소하면 HSP 70 mRNA의 발현량은 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 간세포에서의 EDCs 반응은 hormone으로서의 기능을 할 수 있는 적절한 농도의 EDCs가 존재할 경우에는 세포내의 기능이 hormone 유사작용으로 기능을 하지만, 이 농도에 미치지 못하는 저농도 및 고농도에서는 hormone 기능보다는 단순한 독성작용으로만 작용할 가능성을 시사하는 것으로 추정된다. 그러나 이러한 결과는 단순한 표면적 결과에 대한 분석에 불과하므로 EDCs의 첨가에 따른 E₂ receptor의 발현 및 기능정도를 파악하여 보다 세부적인 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 EDCs 노출에 따라 *in vivo* 및 *in vitro* 시험에서 나타나는 결과들은 스트레스를 통한 개체수준에서의 체중감소, 간 조직내의 강한 손상으로 인한 간 기능 저해와 세포 level에서의 성장 및 합성저해, 단기적 독성 노출에 의한 항산화 방어기작의 증가와 장기적인 만성독성이 오히려 항산화효소 활성저해를 초래하여 생체 내 방어기작의 생리적 저해, HSP 70 mRNA 발현양상과 Vtg Protein 발현양상의 비교 분석을 통한 내분비교란과 스트레스의 상관성 규명과 같은 이 모든 결과들은 내분비교란화학물질이 내분비간의 교란작용 뿐만 아니라 이러한 물질들에 의한 스트레스로 인해 생체내 방어기작의 교란은 물론 생리적인 방어기능을 파괴할 가능성을 본 연구에서 제시하였다고 판단된다.

V. 요약

내분비계 교란물질에 의한 독성 및 내분비 교란작용 평가를 위한 조사와 함께 내분비계 교란물질에 의한 생물체의 스트레스 작용에 관한 조사를 통한 상관성을 규명하고 EDCs 유해성 측정에 있어 기초 생리학적인 Biomarker의 확립과 동시에 환경오염에 대한 간접적인 바이오 평가를 확립 하고자 본 연구를 시행하였다.

1. EDCs에 노출된 넙치의 96시간 반수치사농도 (96 hr-LC₅₀)를 평가한 급성독성 결과는 각각 16, 250, 1,100 및 140 ppb으로 평가되었고, 치사독성은 TBT>BPA>NP>BaP의 순서를 보여 주었다. TBT, BaP, NP 및 BPA에 노출되어진 넙치는 EDCs 종류별로 농도가 높을수록 대조군에 비하여 체중성장이 현저하게 낮은 결과를 나타내었다.

2. 간세포의 초대배양 과정 중 여러 가지 EDCs의 노출 후 대조군 뿐만 아니라 24시간 배양된 간세포는 세포의 덩어리를 형성하여 배양용기에 부착되어 자랐지만 48시간 이후에는 단층의 균일함과 세포의 부착이 BPA와 2,4-D의 고농도 처리군인 BPA 10⁻⁵M, 2,4-D 10⁻⁵M 에서는 현저히 감소함을 확인할 수 있었다.

3. EDCs의 노출에 의한 간조직의 방어시스템으로서 제거효소(scavenger enzymes)의 활성에 미치는 영향을 비교하여 보면 NP+TBT 고농도와 NP+BPA+TBT 고농도에서 가장 높은 SOD 활성 저해를 나타내었고, Catalase(CAT)의 활성은 NP+BPA+TBT 저농도와 NP+BPA+TBT 고농도 경우 각각 높은 CAT 활성 저하를 나타내고 있다. 간세포 배양의 세포에서 분리한 분획에서 SOD의 활성 변화를 관찰한 결과는 BPA 10⁻⁶~10⁻⁸M까지 증가하는 경향이 나타났고, CAT의 활성변화는 E₂ 와 BPA 전구간 및 2,4-D 10⁻⁵M 처리군에서 높은 활성을 나타내었다.

4. EDCs의 단독 또는 복합 투여에 따른 넙치의 간에서 GPT, GOT를 비교한 결과는 GPT, GOT 모두 유사한 결과를 나타내었는데 EDCs 단독 투여구의 고

농도구에서 높게 나타났고 복합 투여구에서는 고농도 보다 저농도에서 높게 나타났다. 배양 간세포에 EDCs 처리(BPA, 2,4-D)에 따른 간독성에 대한 결과를 확인한 결과는 GPT는 BPA 10^{-6} , 2,4-D 10^{-5} 및 2,4-D 10^{-8} M에서 유의성 있게 나타났다. GOT는 E₂ 10^{-6} M, BPA 10^{-5} M, BPA 10^{-7} M, 2,4-D 10^{-5} M, 2,4-D 10^{-6} M 및 2,4-D 10^{-8} M에서 높게 나타났다.

5. ELISA를 이용한 EDCs의 처리(TBT, BPA, NP의 저농도와 고농도)에 따른 Vtg 발현량은 양은 BaP의 저농도에서 가장 높은 값을 나타냈고 NP의 저농도, TBT+NP 복합구의 저농도에서도 높은 값을 나타내었다. 반면, TBT의 저·고농도, BaP, NP의 고농도 및 복합구의 저·고농도에서는 매우 낮은 값이 나타났다. 그러나 수컷혈청인 대조군(-)에 비하여 모든 구에서 Vtg 합성이 유의하게 높게 나타났다.

6. 낚치의 간세포를 배양하여 각각의 농도별로 투여된 E₂와 BPA 및 2,4-D에 의한 Vtg의 합성 및 분비에 대한 영향을 관찰한 결과 E₂ 10^{-6} M, BPA 10^{-6} M 및 2,4-D 10^{-8} M의 첨가구에서 Vtg 합성이 일어났다.

7. 만성독성실험에서 HSP 70 mRNA의 발현을 조사한 결과는 BaP 저·고농도 구간에서는 HSP 70 mRNA의 발현에 있어 유의한 차이를 나타내지 않았으나, TBT+NP 복합구의 저·고농도, TBT+NP+BPA의 저농도 구간에서 유의한 증가를 보였다. 배양 간세포에 EDCs를 노출 후 HSP 70 mRNA의 발현을 조사한 결과는 BPA의 전구간에서 농도가 감소함에 따라 유의성있게 증가된 경향을 나타내었으며, 2,4-D 역시 전구간에서 대조구에 비하여 증가된 경향을 나타내었다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 EDCs에 의한 *in vivo*와 *in vitro* 노출에 의해 발생하는 개체수준에서의 체중감소, 간기능의 손상, 항산화 효소의 변화, 간조직의 손상과 세포 level에서의 상해, Vtg의 발현 및 HSP의 발현양상은 모두 내분비교란화학물질이 내분비간의 교란작용 뿐만 아니라 이러한 물질들에 의한 스트레스로 인해 생체내 방어기작의 교란은 물론 생리적인 방어기능을 파괴할 가능성을 본 연구에서 제시하였다고 판단된다.

VI. 참고 문헌

- Allen Y., Matthiessen P., Scott A.P., Haworth S., Feist S. and Thain J.E., 1999. The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments further surveys of flounder. *Sci. Tot. Environ.*, 233: 5-20.
- Ackermann. G.E., Schwaiger, J., Negele, R.D. and Fent, K. 2002. Effects of long term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.*, 60: 203-221.
- Andelman, J.B. and Suess, M.J. 1970. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the water environment, *Bull. WHO.*, 43: 479.
- Anderson, H.R., Andersen, A.M., Arnold, S.F., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E.B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Moller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkeboek, N.E., Sonnenschein, C. and Soto, A.M. 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.*, 107(suppl. 1): 89-108.
- Arukwe, A. and Goksoyr, A. 1998. Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish. *Sarsia.*, 83: 225-241.
- Ashdurner, M., Bonner, J.J. 1979. The induction of gene activity in drosophila by heat shock, *Cell.*, 17(2): 241-54.
- Bienz, M., Pelham, H.R. 1987. Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes, *Adv Genet.*, 24: 31-72.
- Bjerregaard, P., Korsgaard, B., Christiansen, L.B., Pedersen, K.L., Christensen,

- L.J., Pedersen, S.N. and Horn, P. 1998. Monitoring and risk assessment for endocrine disruptors in the aquatic environment: a biomarker approach. *Arch. Toxicol.*, 20: 97-107.
- Bon, E., Barbe, U., Rodriguez, J., Cuisset, B., Pelissero, C., Sumpster, J.P. and Menn, F. 1997. Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): establishment and validation of an ELISA. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 117: 75-84.
- Bond, u., Schlesinger, M.J. 1987. Heat-shock proteins and development, *Adv Genet.*, 24: 1-29.
- Breithofer, A., Graumann, K., Scicchitano, M.S., Karathanasis, S.K., Butt, T.R. and Jungbauer, A. 1998. Regulation of human estrogen receptor by phytoestrogens in yeast and human cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 67: 421-429.
- Chance, B., Siec, H. and Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59: 527-605.
- Chen, Y., Cao, X.D., Lu, Y. and Wang, X.R. 2000. Effects of rare earth metal ions and their EDTA complexes on antioxidant enzymes of fish liver. *Environ. Contam. Toxicol.*, 65: 357-365.
- Cheney, M.A. and Swinehart, J.H. 1984. The effects of acid waters on the loss of divalent cations and primary amines from membranes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77A: 327-330.
- Cheney, M.A., Fiorillo, R. and Criddle, R.S. 1997. Herbicide and estrogen effects on the metabolic activity of *Rlliptio complanata* measured by calorespirometry. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118C: 159-164.
- Colborn, T., Saal, F.S. and Soto, A.M. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.*, 101: 378-384.

- Collins, B.M., McLachlan, J. and Arnold, S.F. 1997. The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast, *Steroids.*, 62: 365-372.
- Cook, J.W., Hieger, I., Kennaway, E.I. and Mayneord, W.V. 1932. *proc. R. Soc. London, Ser., B III*, 455.
- EPA, 1997. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Risk Assessment Forum, EPA., /630/R-96/012 : 1-99.
- Flouriot G., Pakdel, F. and Valotaire, Y. 1996. Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 124: 173-183.
- Forman, H.J. and Frodovich, I. 1973. Superoxide dismutase : A comparison of rate constant. *Arch. Biochem. Biophys.*, 158: 396.
- Gaido, K.W., Leonard L.S., Lovell S., Gould J.C., Babal D., Portier C.J. and McDonnell D.P. 1997. Evaluation of Chemicals with Endocrine Modulating Activity in Yeast-Based Steroid Hormone receptor Gene Transcription Assay.
- Goldber, B. and Stern, A. 1977. The role of the superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte. *Arch. Biophys.*, 178: 218-225.
- Gunther, F.A. and Buzzetti, F. 1965. Occurrence, isolation and identification of polynuclear hydrocarbons as residues, *ResidueRev.*, 9: 90-113.
- Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T. and Fujita, K. 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo bay, Japan. *Mar. Environ. Res.*, 49: 37-53.
- Hwang, U.G. 2002. Effects of 2, 4-Dichlorophenoxy acetic on vitellogenin synthesis and E₂-ER binding affinity of hepatocytes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. of Aquaculture.*, 15(1): 31-37.

- Heemken, O., Reincke, P., Stachel, B. and Theobald, N. 2001. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North sea. *Chemosphere.*, 45: 245-249.
- Hutchinson, T.H. and Pickford, D.B. 2002. Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment. *Toxicology.*, 181-182: 383-387.
- Iwama, G.K., Thomas, P.T., Forsyth, R.B. and Vijayan, M.M. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 8: 122.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. and Sumpter, J.P. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 2498-2506.
- Jose, M.C. 1988. Food toxicology in two parts, part A: principles and concepts, *Marcell Dekker., INC*
- Junqueira, V.B., Simiz, C.K., Videla, L.A. and Barros, S.B. 1986. Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver superoxide anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. *Toxicology.*, 41: 193-204.
- Kolarovic, L. and Traitler, H. 1982. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils by caffeine complexations and glass capillary gas chromatography. *J. Chrom.*, 237: 263-72.
- Korach, K.S. 1993. Editorial: Surprising places of estrogenic activity. *Endocrinology.*, 132: 2277-2278.
- Kramer, V.J., Miles-Richardson, S., Pierens, S.L. and Giesy, J.P. 1998. Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 β -estradiol. *Aquat. Toxicol.*, 40: 335-360.
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permth, S.F., Tokes, L. and Feldman, D. 1993. Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks

- during autoclaving. *Endocrinology.*, 132: 2279-2286.
- Kwon, H.C. and Mugiya, Y. 1994. Involvement of growth hormone and prolactin in the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the eel. *Anguilla japonica. Gen. and Comp. Endocrinol.* 93: 51-60.
- Landay, J., Bernier, D., Chretien, P., Nicole, L.M., Tanguay, R.M., Marceau, N. 1982. Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance, *Cancer Res.*, 42(6): 2357-61.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.*, 227: 680-685.
- Li S., Chien, S., Branemark, P.I. 1999. : Heat shock-induced necrosis and apoptosis in osteoblasts, *J Orthop Res.*, 17(6) : 891-9.
- Lindholm, C., Pedersen, K.L. and Pedersen, S.N. 2000. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 48: 87-94.
- Lindquist S. 1986. The heat-shock response, *Annu rev biochem.*, 55: 1151-1191.
- Livingstone, D.R., Archibald, S., Chipman, J.K. and Marsh, J.W. 1992. Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91: 97-104.
- Lowry, o.H., Rosenbrought, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Marklund, S. and Marklund, G. 1974. *Eur. J. Biochem.*, 47: 469-474.
- Maytin, E.W. 1995. Heat shock proteins and molecular chaperones: Implication for adaptive responses in the skin. *J Invest Dermatol.*, 104: 448-455.
- McLachlan, J.A. 1985. Estrogens in the environment II. p.435. In: *Influences in development* (J.A. McLachlan, ed.). Elsevier Science, New York.
- Mei-Teim, L. and Sandi, E. 1977. *Residue Rev.*, 65: 35-86.
- Moody, C.S. and H.M. Hassan. 1982. Mutagenicity of oxygen free radicals.

- Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 2855-2859.
- Morimoto, R.J., Sarge, K.D., Abravaya, K. 1992. : Transcriptional regulation of heat shock genes, A paradigm for inducible genomic responses, *J Biol Chem.*, 267(31): 21987-90.
- Nelson, D.P. and Kiesow, L.A. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Anal Biochem.*, 49: 474-478.
- Ng, T.B. and Ider, D.R. 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In: Hoar W.S., Randall D.J. and Donaldson E.M. (eds.), *Fish Physiology*. Vol.IX, Academic Press, San Diego., 379-404.
- Pakdel, F., Delaunay, F., Ducouret, B., Flouriot, G., Kern, L., Lazennec, G., Le Drean, Y., Petit, F., Salbert, G., Saligaut, D., Tujague, M. and Valotaire, Y. 1997. Regulation of expression and biological activity of rainbow trout estrogen receptor. *Fish Physiol. Biochem.*, 17: 123-133.
- Racicot, J.G., Gaudet, M. and Leray, C. 1975. Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with emphasis on their diagnostic use: A study of CCL₄, toxicity and a case of *Aeromonas* infection. *J. Fish Biol.*, 7: 725-835.
- Reitman, S. and Frankel, S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *J Biol Chem.*, 28: 56.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1988. *Molecular cloning : A laboratory manual second edition.*, CSH press.
- Sanders, B.M. 1993. Stress proteins in aquatic organisms : an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.*, 23, 4975.
- Schlesinger, M.J. 1990. Heat shock protein. *J Biol Chem.*, 265: 12111-12114.
- Shelby, M.D., Newbold, R.R., Tully, D.B., Chae, K. and Davis, V.L. 1996. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of

- in vivo and in vitro assays. Environmental Health perspectives., 104 (12) : 1296-1300.
- Shioda, T. and Wakabayashi, M. 2000. Effects of certain chemicals on the reproduction of medaka(*Oryzias latipes*). Chemosphere., 40: 239-243.
- Short, P. and Colborn, T. 1999. Pesticide use in the US and policy implications: A focus on herbicides. Toxicol. Ind. Health, 15: 240-275.
- Shubik, P. and Hartwell, J.L. 1957. Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity., Publ, 149.
- Simon, R.H., Scoggin, C.H. and Patterson, D. 1981. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. J. Biol. Chem., 256: 7181-7186.
- Stone, R. 1994. Environmental estrogens stir debate. Science., 265: 308-310.
- Sumpter, J.P. 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. Toxicol. Lett., 82/83: 737-742.
- Sumpter, J.P. and Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. Environmental Health Perspectives., 103(Suppl 7): 173-178.
- Taso, M.S., Grisham, J.W., nelson, K.G. and Smith, J.D. 1985. Phenotypic and Karyotypic changes induced in cultured rat hepatic epithelial cells that express the "oval" cell phenotype by expose to N-methyl-N'-nitro=N-nitrosoguanidine. Am. J. Pathol., 118: 306-315.
- Tilgner, D.J. and Daun, H. 1969. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods, Residue rev., 27: 19-41.
- Tilgner, D.J. 1970. Food in a carcinogenic enviroment, Food Manuf. 87: 47-50.
- Towbin, H., Staehelin, J.S. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76: 4350-4354.
- Vedel, N.E., Korsgaard, B. and Jensen, F.B. 1998. Isolated and combined

- exposure to ammonia and nitrite in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on electrolyte status, blood respiratory properties and brain glutamine/glutamate concentrations. *Aquat. Toxicol.*, 41: 325-342.
- Wendel, A. and Feuerstin, S. 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice-1. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem Pharmacol.*, 30: 2513-2520.
- Yoko, K., Eiichi, K., Yukio, O., Toyozo, K., Sadao, U., and Yukio. S. 1988. The effects of various foods in the interstitial absorption of benzo(a)pyrene in rats, *J. Food Hyg. Soc. Japan.*, 29: 11.
- Zikic, R.V., Stajn, A.S., Pavlovic, S.Z., Ognjanovic, B.I. and Saicic, Z.S. 2001. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish(*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiol. Res.*, 50: 105-111.
- 정우준. 2003. 넙치의 비텔로제닌에 대한 단일클론항체. 학위논문.



감사의 글

저에게 멀게만 느껴지던 졸업을 많은 분들의 도움으로 마치고자 합니다. 힘든 학위과정속에 그에 비할 수 없는 소중한 사람들이 있었기에 가능했으리라 생각됩니다.

본 논문이 완성되기까지 제가 고민하고 지쳐갈 때 언제나 용기와 희망으로 먼저 손 내밀어 이끌어 주시고 올바른 학구의 길을 열어주신 여인규 지도교수님께 먼저 감사드리며, 좀더 많은 가르침을 다 받지 못한 것이 지금 이 순간을 넘어서며 못내 아쉬움이 남습니다. 그리고 늘상 분주한 일정에도 아랑곳 하지 않고 기꺼이 시간을 할애하여 저의 논문의 심사와 논문의 수정을 도와주셨고 항상 참된 조언을 아끼지 않으신 허문수 교수님과 임윤규 교수님께도 다시금 머리 숙여 감사드립니다. 그리고 저를 학부 때부터 많은 가르침과 소중한 시간들을 할애하여 주신 송춘복 교수님, 이제희 교수님, 전유진 교수님께도 많은 감사를 드립니다.

저의 가족과 같은 어류분자생리학 실험실원인 정환, 태형, 경주, 기정, 지현, 현철, 혜영까지 모두 힘들 때 마다 서로 의지하며 격려와 수많은 조언들이 우리 실험실가족들이 화목과 발전이 아니었나 생각되며 우리 실험실원들께도 심심한 감사를 드립니다. 그리고 항상 저의 실험실과 동고공락하던 병원미생물학 실험실의 병규형, 철영이형, 용욱이형, 태원, 주상, 현식, 상혁, 민주, 수미, 선경, 승현이께도 감사합니다. 또한, 유전육종실험실원, 분자유전학실험실원, 해양자원이용공학 실험실원, 해양과환경연구소 선·후배님께도 감사드립니다.

저와 조교생활을 같이하던 도형, 대경, 수강, 재홍, 건, 영웅이형을 비롯한 여러 형님들과 현재 저의 학과의 조교인 진희에게도 감사드립니다.

학과시절부터 친한 친구로 오랜 시간 동고동락했던 나의 동기들인 정환, 영건, 수진, 철홍, 영빈, 맵진이형과 나의 동기들처럼 편했던 나의 후배 만철, 태형, 상규, 길남, 호진, 경임에게 진심으로 감사합니다.

여기에 상세히 이름을 나열할 수는 없지만 어쩌면 그냥 스쳐지나간 많은 만남 일수도 있었지만 지금까지 공부하는데 알게 모르게 마음 써주신 모든 분들에게 사랑과 감사의 마음을 전합니다.

저를 무엇보다도 늘 겸손하고 남을 먼저 배려하라고 가르쳐주신 저의 어머니와 저에게는 아버지 와 누나, 형 같은 존재와 같은 이세상의 단 하나뿐인 누나와 매형 그리고 나의 사랑스런 조카 소현, 나의 사랑스런 동생 철휴, 은경에게 사랑과 감사의 맘을 전하고, 언제나 제 곁에서 힘이 되어준 해정에게도 감사드리며 이 논문을 바칩니다.