

PB6 에스트로젠성 환경화학물질이 zebrafish 발생 단계에 미치는 영향

여민경

경희대학교 환경응용화학대학

1. 서 론

내분비계 교란물질은 정상적인 호르몬 기능에 영향을 주는 합성, 혹은 자연 상태의 화학물질을 말하며, 환경호르몬이라고도 한다. 내분비 교란물질 중 에스트로젠성 물질로 알려진 물질로 bisphenol A, 비이온계 계면활성제인 nonylphenol 류는 수생생물에 위해성을 나타내며, 생식계 이상과 조기 성장에 영향을 주는 것으로 보고되었다(Colborn et al., 1993, Krishnan et al., 1993, Sax, 1975). 이는 에스트로젠성 환경호르몬이 생체에서 에스트로젠 수용체와 결합 또는 교란하기 때문인 것으로 생각되고 있다. 일반적으로 estradiol의 생물학적 활성은 ER α 와 ER β 라는 steroid/retinoid receptor gene superfamily에 의해 조절된다(Williams, 1989). 이러한 에스트로젠의 특성을 이용하여 발광단백질 효소인 luciferase에 에스트로젠 수용체를 삽입하여 *in vitro* 조건에서 미량의 환경호르몬까지 추적 조사할 수 있는 luciferase reporter assay가 환경호르몬의 에스트로젠성 특성을 확인, 검정하는 방법으로 사용되고 있다(Holland, 1996).

본 연구에서는 인간세포주인 U2OS에 luciferase reporter assay법을 이용하여 bisphenol A와 nonylphenol의 에스트로젠 수용체와의 결합특성을 확인하고, 에스트로젠성이 나타난 농도 중 자연상 존재농도 또는 자연상 존재 농도 이하의 bisphenol A와 nonylphenol 환경 하에서 zebrafish의 발생단계에 미치는 영향을 알아보하고자 한다.

2. 재료 및 방법

본 연구에서 0.1ng~1000ng 농도의 bisphenol A를 인간세포주인 U2OS 세포를 이용한 에스트로젠수용체 결합 반응을 확인, 검정하였다.

ER- α , ER- β 를 발현하는 플라스미드를 제조하여 ERE/ Luciferase 와 ER- α , ER- β 를 발현하는 stable U2OS 사람 세포주를 확립하였다. 이렇게 확립된 배양세포주를 이용하여 luciferase assay에 의한 bisphenol A와 nonylphenol의 에스트로젠성 특성을 이용하여 측정하였다. Luciferase assay (Promega)는 다음과 같이 측정하였다. 세포를 harvest 한 후 PBS로 2번 씻어준 다음 Report lysis 1x buffer (Promega)를 첨가한후 상온에서 5분간 vortexing 하고 12,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 상층액을 새로운 tube에 담고, cell extract 20 μ l를 luciferin이 포함된 luciferase assay reagent 100 μ l와 혼합한다. Luminometer(Turner Design)로 luminescence를 혼합한 후 10초에서 1분 사이에 측정한다. 측정은 sample 당 3회씩 두 번 반복하여 측정하였으며, 이렇게 측정된 값은 평균값

을 구했다. Bisphenol A와 nonylphenol의 에스트로젠성이 확인된 농도에서 zebrafish의 발생 단계를 현미경 하에서 관찰하고 부화율을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

U2OSER β 인간세포주에서 bisphenol A의 에스트로젠성이 확인되는 최소농도는 1000 ng에서 1ng 까지였다. 자연상 검출되는 농도 이하인 bisphenol A(1000ng/l)에 처리된 군과 자연상 검출농도인 10000 ng/l에 처리된 군에서 배발생 단계의 차이는 크게 나타나지 않았다. 그러나 양쪽 농도 모두에서 bisphenol A처리 시점에 따라 부화율에 차이를 보이는 것으로 나타났다. Nonylphenol 처리군 (1000 ng/l, 10000 ng/l)에서도 농도에 차이에 따른 발생과정의 변화 보다는 처리 시점에 따라 부화율에 차이를 보이는 것으로 나타났다.

4. 요약

Bisphenol A와 nonylphenol 의 영향이 나타나지 않는다고 알려진 우리나라 자연상 검출 되는 농도보다 낮은 농도에서 에스트로젠 수용체와 결합하는 반응이 나타나는지에 대한 최저농도를 인간세포주 U2OSER β 를 이용하여 조사하였다. 조사된 농도 중 bisphenol A와 nonylphenol 의 자연상 검출농도(10000 ng/l)와 자연상 검출되는 농도이하(1000 ng/l) 에서의 zebrafish발생단계에 관한 영향을 관찰한 결과 농도의 차이에 따른 관련성 보다는 발생의 특정시기에 노출된 시점에 따라 차이가 나타났다.

참 고 문 헌

- Colborn, T., F. S. Von Saal, and A. M. Soto, 1993, Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect* 101, 378-384.
- Holland M, D. Roy, 1996, Antiproliferative activity of naturally occurring edible plant flavone-induced cell proliferation in the mammary gland of Noble rats. In *Hormonal carcinogenesis*. Ed., Li JJ, Nandi S, Li SA 471-474.
- Krishnan, A., P. Stathis, S. Permuth, L. Tokes, and Feldman, 1993, Bisphenol-A, an estrogenic substances is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132(8), 2279-2286.
- Sax N. I., 1975, Toxicology of phenols, In *Dangerous properties of industrial chemicals*. New York, A Wiley Company, 458-1008.
- Williams, B. A., K. T. Mills, C. D. Bruuoughs, and H. A. Bem, 1989, Reproductive alterations in female C57BL/Dr g 1 mice exposed neonatally to zearalonone, an estrogenic mycotoxin. *Cancer Lett.*, 46, 225-230.