

## Di-2-ethylhexyl phthalate 처리 남아프리카산발톱개구리에서의 vitellogenin 발현

박응로, 이철우, 류지성, 남성숙,  
전성환, 나진균, 최덕일, 박광식

국립환경연구원 환경위해성연구과

### Vitellogenin mRNA Induction in Male African Clawed Frog Treated with di-2-ethylhexyl Phthalate

Eung-Roh Park, Chulwoo Lee, Jisung Ryu, Seong-Sook Nam,  
Seong-Hwan Jeon, Jin-Gyun Na, Doug Il Choi and Kwangsik Park

National Institute of Environmental Research, Environmental Research Complex,  
Kyungseo-dong Seo-gu, Incheon, 404-170 Korea

#### ABSTRACT

The estrogenic potency of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) using reverse transcriptase-PCR response of liver vitellogenin mRNA in male African clawed frog (*Xenopus laevis*) was studied. Male frogs were injected with DEHP at dose of 300 µg/kg and 300 mg/kg body weight through the dorsal lymph sac. After 4 days, using suitable pair of RT-PCR primers, vitellogenin mRNA induction in the liver was measured and DEHP showed vitellogenin mRNA induction in only the group treated with 300 mg/kg. Any significant histological abnormalities by the exposure of DEHP was not shown in both testis and liver.

**Key words :** DEHP, endocrine disruptor, *Xenopus laevis*, vitellogenin, RT-PCR

#### 서론

최근 20년간 개구리 개체수의 감소가 세계의 많은 지역에 걸쳐서 보고되고 있다 (Blaustein *et al.*, 1995). 그 이유에 대해 산성비, 외래종에 의한 생태계 변화 (Wake D.B., 1991), 오존층 파괴에 따른 자외선 조사의 증가 (Blaustein *et al.*, 1994), 환경 오염물질에 의한 영향 (Carey *et al.*, 1995) 등 많은 설명이 있지만 아직까지 정확한 원인은 밝혀지지 않고 있다. 그러나 개구리는 전 생애에 걸쳐 물과 접촉하며 생활하고 피부호흡을 하기때문에

수중의 오염물질에 노출되기 쉬운 특성을 가지고 있어 분명한 이유가 없는 개구리 개체수의 감소에는 호르몬을 저해하는 화학물질이 원인일 것으로 추정되고 있다 (Boyer R. *et al.*, 1995). 실제로 환경중으로 유출된 내분비계 장애물질에 의한 파충류, 어류, 양서류, 조류 및 포유류 등의 개체수 감소 및 성의 혼란 사례가 보고되고 있으며 (Wake, 1991; Guillette *et al.*, 1994; Purdom *et al.*, 1994; Bauer *et al.*, 1995; Blaustein *et al.*, 1995) 우리나라에서도 1999년부터 환경부 주관으로 국내에 서식하는 담수어류와 양서류 (개구리)를 대상으로 내분비계 장애물질이 수서 생태계에 미치는 영향을

조사하고 있다.

본 연구에서는 DEHP를 수컷의 남아프리카산발톱개구리 (*Xenopus laevis*)에 처리한 후 reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)법을 이용하여 vitellogenin mRNA의 발현에 대하여 조사하고 간과 testis를 대상으로 조직학적 조사를 수행함으로써 DEHP가 내분비계 장애 영향을 나타내는지를 검토하였다. 아울러 RT-PCR법을 이용하여 양서류에서 내분비계 장애물질의 영향을 평가할 수 있는 분자생물학적 지표를 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험생물

시험생물로는 Ann Arbor Biological Center (Michigan, USA)에서 수입하여 국립환경연구원 수서생물사육실에서 1년간 유지, 관리한 남아프리카산발톱개구리 (*Xenopus laevis*) 수컷을 사용하였으며 시험에는 완전히 성숙한 체중  $50.9 \pm 5.8$  g의 성체를 사용하였다. 시험 개체는 탈염소한 수돗물에서 사육하고 잘게 자른 소간을 주 3회 급이하였다.

### 2. 시험물질 및 노출방법

시험물질은 DEHP를 사용하였다. 노출농도는 DEHP를 에탄올에 녹인 후 국내산 개구리의 체내에서 검출된 적이 있는 최대 농도인 300 µg/kg, 그보다 1,000배 높은 농도인 300 mg/kg의 2개 농도군으로 하여 50 µl씩 등쪽의 림프주머니에 주사하였으며 96시간이 지난 후 장기를 적출하여 시료로 사용하였다 (국립환경연구원, 2000). Vitellogenin mRNA의 발현을 조사하기 위하여 간을 적출하고 total RNA를 추출하였으며, 간과 testis의 조직학적 관찰을 위해 장기를 적출한 후 Bouin 용액에 고정하였다. 양성대조군으로는 17β-estradiol을 개구리 체중당 300 µg/kg으로 처리하였으며 무수에탄올만을 주사한 것을 음성대조군으로 사용하였다. 한편 시험수는 사육조건과 마찬가지로 탈염소한 수돗물을 사용하였다.

### 3. RNA추출 및 RT-PCR

시험물질의 처리가 완료된 개체를 에탄올에

0.05% 농도로 녹인 benzocaine (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액에서 마취시킨 후, 해부하여 간을 50~100 mg 적출하고 TRIzol® reagent (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 260 nm에서 흡광도를 측정하여 추출한 RNA의 농도를 계산하였으며 이 중 1 µg을 RT-PCR 반응에 사용하였다. Vitellogenin primer로는 forward 5'-cgg cta tat caa act ttt tgg c-3', reverse 5'-gtt ttc ttg aaa tgg agg c-3'의 서열을 가지는 남아프리카산 발톱개구리의 vitellogenin primer (Kloas *et al.*, 1999)를 합성하였으며, 대조 프라이머로는 elongation factor 1α primer (forward 5'-tgc caa ttg ttg aca tga tcc c-3', reverse 5'-tac tat taa act ctg atg gcc-3')를 합성하여 사용하였다 (Kloas *et al.*, 1999).

2 µg의 RNA와 5U의 AMV Reverse Transcriptase XL (Takara Shuzo Co., Ltd. Otsu, Shiga, Japan)을 사용하여 30°C (10분), 55°C (30분), 99°C (5분), 5°C (5분)의 조건에서 반응시켜 20 µl의 cDNA를 합성하였다. PCR 반응은 10×buffer 10 µl (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), dNTP 0.8 mM, 각각의 primer 1 µM, 2.5U의 Taq polymerase를 혼합하여 반응시켰다. 이 때의 총부피는 100 µl이었으며 94°C (60초), 59°C (60초), 72°C (120초)를 1주기로 하여 총 36회 반응시켰다. 증폭된 cDNA 단편 중 5 µl를 취하여 ethidium bromide (5 µl/100 ml)가 포함된 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 그 결과를 확인하였다.

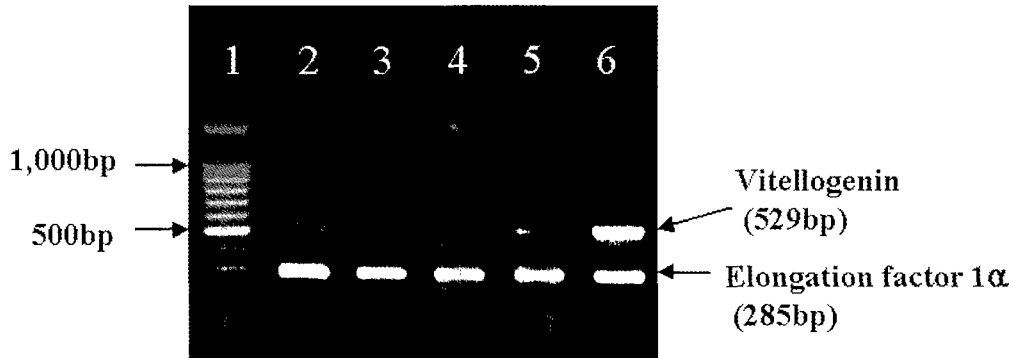
### 4. 조직병리학적 조사

간과 정소를 적출한 후 Bouin 용액에 12시간씩 2회 고정하고 에탄올 시리즈 (70%, 80%, 90%, 95%, 무수에탄올)로 조직을 탈수시킨 후 xylen 투명과정을 거쳐 파라핀을 침투시켰다. Embedding center (RMC TEC)를 이용하여 포매하고 5 µm 두께로 박절한 후, hematoxylin과 eosin으로 염색하여 현미경으로 검정하였다.

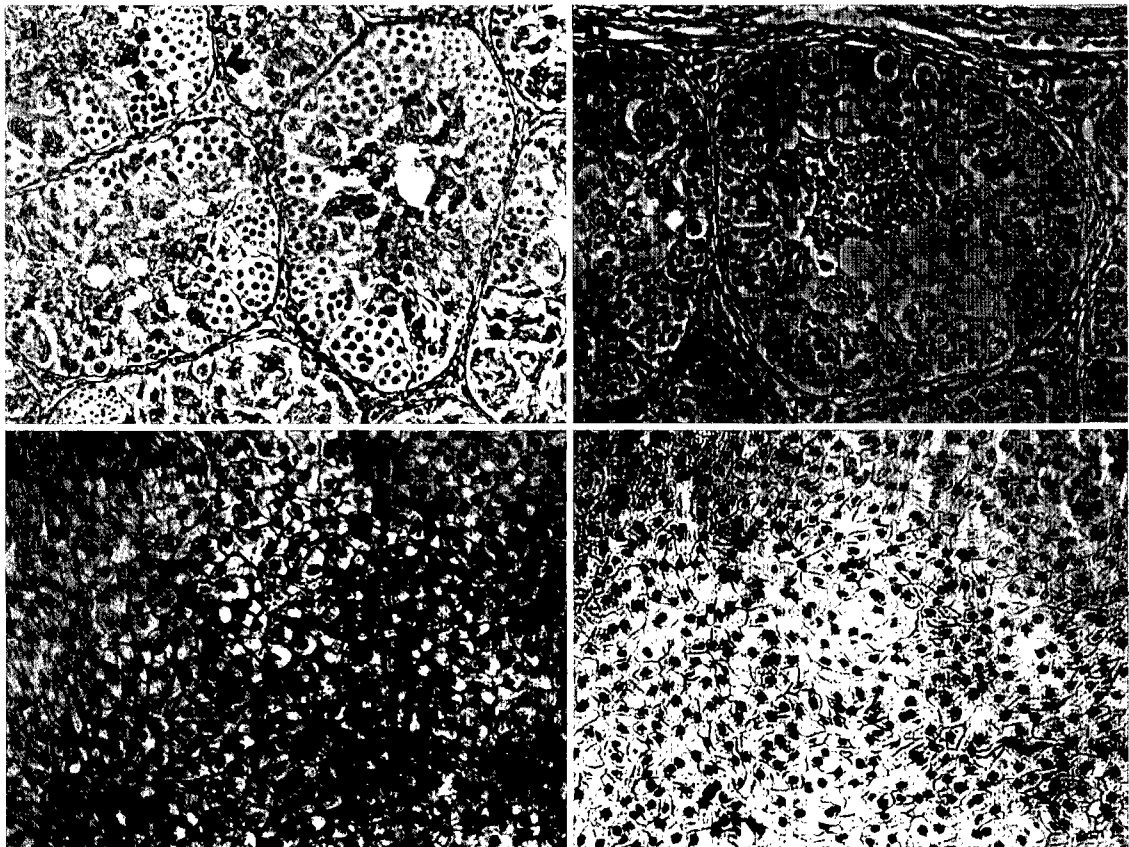
## 결 과

남아프리카산발톱개구리 수컷의 림프주머니에 DEHP를 주사하고 96시간이 경과한 후 RT-PCR을 이용하여 vitellogenin mRNA의 발현을 조사하

K



**Fig. 1.** Vitellogenin cDNA produced by RT-PCR from DEHP, 17 $\beta$ -estradiol injected *Xenopus laevis* livers. Lane 1; 100bp cDNA ladder, Lane 2; control group, Lane 3; vehicle (absolute ethanol) treated group, Lane 4; DEHP 300  $\mu$ g/kg treated group, Lane 5; DEHP 300 mg/kg treated group, Lane 6; 17 $\beta$ -estradiol 300  $\mu$ g/kg treated group



**Fig. 2.** Histology of testis and liver from *Xenopus laevis*.

- (a) Transverse section of testis from *Xenopus laevis* nontreated ( $\times 100$ ).
- (b) Transverse section of testis from *Xenopus laevis* treated with 300 mg/kg of DEHP ( $\times 100$ ).
- (c) Transverse section of liver from *Xenopus laevis* nontreated ( $\times 200$ ).
- (d) Transverse section of liver from *Xenopus laevis* treated with 300 mg/kg of DEHP ( $\times 200$ ).

였다. 모든 시험군에서 elongation factor 1 $\alpha$  cDNA가 기 보고된 것과 일치된 285 bp 위치에서 나타났으며 그 발현 정도도 거의 일정하였다. 또한 17 $\beta$ -estradiol 처리군에서 vitellogenin A2 유전자 단편과 같은 크기인 529 bp에서 band가 검출되었다. 한편 DEHP를 처리한 시험군은 300 mg/kg을 주사한 경우에서 529 bp 크기의 cDNA 단편이 검출되었으나 그 양은 17 $\beta$ -estradiol 처리군에 비해 매우 적었으며 300  $\mu$ g/kg을 주사한 개체에서는 vitellogenin 유전자로 추정되는 어떠한 PCR 산물도 관찰되지 않았다. 또한 무처리군과 무수에탄올만을 처리한 음성대조군에서도 elongation factor 1 $\alpha$  이외의 어떠한 유전자 단편도 검출되지 않았다 (Fig. 1).

한편 hematoxylin, eosin 염색을 통해 조직학적 이상을 조사한 결과에서는 모든 시험군에서 무처리 개체와의 차이점을 발견할 수 없었다 (Fig. 2). 간 조직의 경우 세포 모양의 이상이나 eosinophilic substance의 축적, 비정상적인 단백질 과다 생성으로 인한 hypertrophy 및 hyperplasia 등의 소견이 발견되지 않았으며, testis의 경우에서도 germ cell의 감소나 spermatozoa 발달 이상, oocyte 및 oviduct의 발달 등 어떠한 특이 소견도 관찰할 수 없었다.

## 고 찰

간세포 배양을 통한 *in vitro* RT-PCR시험 (Kloas *et al.*, 1999), ELISA (Pelissero *et al.*, 1993) 또는 Western blotting을 이용한 시험 (Palmer and Palmer, 1995), Northern blot을 이용한 mRNA 시험 등 vitellogenin 발현을 측정하여 내분비계 장애영향을 평가하기 위한 많은 시험법이 개발되어 있지만, RT-PCR을 이용하여 vitellogenin mRNA의 발현을 조사하는 방법은 감도가 뛰어나 극소량 발현되는 mRNA도 검출할 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 시험에서는 남아프리카산발톱개구리의 간에서 추출한 RNA에 Kloas 등 (1999)이 사용한 primer를 적용, RT-PCR을 수행하여 vitellogenin mRNA의 발현을 조사함으로써 내분비계 장애영향 평가에 RT-PCR을 이용한 vitellogenin mRNA 검출법의 적용 가능성을 조사하고, 이 방법을 이용하여 DEHP의 estrogenicity를 검토하였다.

시험 결과 Fig. 1에 보인 바와 같이 모든 시험군에서 거의 일정한 양의 elongation factor 1 $\alpha$  cDNA가 285 bp 크기에서 발현되었으며 17 $\beta$ -estradiol 처리군에서 vitellogenin cDNA가 529 bp 크기에서 검출되었다. 이것은 Kloas 등 (1999)이 보고한 것과 같은 크기로서 외부 estrogen 자극에 의해 유도된 vitellogenin mRNA가 *in vivo* 시험에서 효과적으로 검출되었음을 보여준다. 본 시험에서는 생태 영향 조사 결과를 바탕으로 개구리의 체내에서 검출된 DEHP의 최고 검출농도인 300  $\mu$ g/kg과 이보다 1,000배 높은 300 mg/kg을 노출 농도로 결정하고 남아프리카산발톱개구리의 림프주머니에 주사한 뒤 96시간이 지난 후 RT-PCR법을 이용하여 vitellogenin mRNA의 발현을 조사하였다. 전기영동으로 분석한 결과 300  $\mu$ g/kg 처리군에서는 mRNA의 발현이 전혀 검출되지 않았으며 300 mg/kg 처리군에서 529 bp 크기의 band가 확인되었다. 그러나 대조군으로 사용한 17 $\beta$ -estradiol (300  $\mu$ g/kg)의 경우와 비교하였을 때보다도 발현량이 훨씬 약한 것으로 보아 DEHP의 vitellogenin 유도능은 17 $\beta$ -estradiol의 1/1000 이하인 것으로 판단된다.

한편, DEHP 처리 후 조직학적 이상을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 그림에서 보듯이 간과 정소에서 무처리군에 비해 어떠한 이상도 관찰되지 않았다. 일반적으로 수컷의 물고기가 외인성 estrogen에 노출된 경우 testis 발달 억제, oviduct의 발달, testis 내에서 oocyte의 발달 등의 조직 소견이 발생하는 것으로 알려져 있으며 간 조직에서는 세포 모양의 이상이나 eosinophilic substance의 축적, 단백질 과다 생성으로 인한 hypertrophy 및 hyperplasia 등의 소견이 발견된다. 실제로 무지개송어를 이용한 연구에서 17 $\beta$ -estradiol를 혼합한 먹이를 5개월간 먹인 결과 testis의 발달 억제가 관찰되었으며 (Billard *et al.*, 1981),  $\beta$ -hexachlorocyclohexane을 장기간 투여하여 송사리에서 testis-ova를 유발하고 (Wester *et al.*, 1986), coho salmon에서 estrogen을 노출시킨 결과 수컷에서 암컷의 phenotype이 유의적으로 증가하였다고 하는 등 (Piferrer *et al.*, 1989) 수컷의 어류에 estrogen성 물질이 작용하여 testis의 조직학적 변화를 초래한 많은 연구 결과가 보고되고 있다. 또한 testis 이외의 조직에서도 신장의 eosinophilic substance의 증

가, 간세포 변형, hyperplasia 유발, rough 골지체의 hypertrophy 등 다양한 변화가 보고된 바 있다 (Wester *et al.*, 1985; Herman *et al.*, 1988). 그러나 기존의 연구에서 언급한 것처럼 외인성 estrogen에 의해 조직학적 변화가 유발하려면 노출 시기와 노출 기간이 충분히 고려되어야 한다. 본 실험에서는 DEHP 뿐만 아니라 17 $\beta$ -estradiol을 처리한 경우에도 아무런 이상이 나타나지 않았다. 이는 시험물질을 1회 주사한 후 4일 후에 조직을 조사한 결과로서 성분화에 민감한 노출 시기가 고려되지 않고 노출 기간 또한 너무 짧았기 때문으로 풀이된다.

DEHP는 급성독성은 매우 약하지만 (rat의 경구 LD<sub>50</sub> = 30,600 mg/kg) 발암성, 변이원성, 생식독성을 가지는 것으로 알려져있다 (국립환경연구원, 1999). 본 실험의 결과로부터 국내산 개구리 및 어류의 체내에서 검출된 농도의 DEHP에 의해 단기기간에 vitellogenin의 유도나 조직학적인 이상은 발생하지 않을 것으로 판단되지만 DEHP 노출 이후 시간경과에 따른 vitellogenin 유도와 다른 물질과 혼재할 경우의 상승효과, 지속적인 노출에 의한 영향 등은 검토되지 않았고, vitellogenin mRNA 유도가 아닌 다른 측면의 내분비계 장애영향에 대해서는 조사된 바가 없으므로 이에 대한 종합적인 연구가 수행될 때까지는 국내산 수서생물의 DEHP 오염 결과에 주목하여야 할 것이다.

한편 단기 노출의 결과를 평가한 본 연구에서 조직학적인 변화는 전혀 나타나지 않았음에도 RT-PCR로는 vitellogenin mRNA의 발현을 검출할 수 있었다. 본 실험에 사용한 프라이머가 참개구리, 산개구리, 황소개구리와 같은 국내 서식 개구리에도 적용될 수 있는지는 검토되어야 하겠지만 RT-PCR법을 이용한 비텔로제닌 검출 방법은 양서류에서 내분비계 장애물질의 영향을 모니터링 하는데 좋은 지표가 될 수 있을 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

- 국립환경연구원. 내분비계장애물질에 의한 생태영향 조사 보고서. 2000. 7.
- 국립환경연구원. 내분비계장애물질의 이해와 대응 (행정간행물 38010-67030-56-146). 1999; 5 : 89, 97.
- Bauer B, Fioroni P, Ide L, Liebe S, Oehlmann J, Stroben E and Watermann B. TBT effects on the female genital system of *Littorina littorica* : a possible indicator of tributyltin pollution. *Hydrobiology*. 1995; 309 : 15-27.
- Billard R, Breton B and Richard M. On the inhibitory effect of some steroids on spermatogenesis in adult rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J Zool*. 1981; 59 : 1479-1487.
- Blaustein AR, Hoffman PD, Hokin DG, Kiesecker JM, Walls SC and Hays JB. UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs : a link to population declines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91 : 1791-1795.
- Blaustein AR and Wake DB. The puzzle of declining amphibians populations. *Sci. Am*. 1995; 272 : 52-63.
- Boyer R and Grue CE. The need for water quality criteria for frogs. *Environ. Health. Perspect*. 1995; 103 : 352-357.
- Carey C and Bryant CJ. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. *Environ. Health. Perspect*. 1995; 103 (suppl 4) : 13-17.
- Guillette LJ Jr, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF and Woodward AR. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormones concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect*. 1994; 102 : 680-688.
- Herman RL and Kincaid HL. Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. *Aquaculture*. 1988; 72 : 165-172.
- Kloas W, Ilka Lutz and Ralf Einspanier. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. *Sci. Total Environ*. 1999; 225 : 59-68.
- Palmer BD and Palmer SK. Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-ear turtle and african clawed frog. *Environ. Health perspect*. 1995; 103 : 19-25.
- Pelissero C, Flouriot G, Foucher JL *et al.* Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals. *J. Steroid Biochem*. 1993; 44: 263-272.
- Piferrer F and Donaldson EM. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at differential stages during ontogenesis. *Aquaculture*. 1989; 77 : 251-262.
- Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR and Sumpter JP. Estrogenic effects of effluents from sewage treatments work. *Chem. Ecol*. 1994; 8 : 275-285
- Wake DB. Declining amphibian populations. *Science*. 1991; 253 : 860.
- Wester PW, Canton JH and Bisschop A. Histopathological

study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term  $\beta$ -hexachlorocyclohexane exposure. *Aqua. Toxicol.* 1985; 6 : 271-296.

Wester PW and Canton JH. Histopathological study of *Ory-*

*zias latipes* (medaka) after long-term  $\beta$ -hexachlorocyclohexane exposure. *Aqua. Toxicol.* 1986; 9 : 21-45.