

Nonylphenol이 넘치, *Paralichthys olivaceus*의 생식소 발달과 성장에 미치는 영향

문순주, 이치훈, 나오수, 김병호¹, 이영돈*

제주대학교 해양과환경연구소, ¹류큐대학 열대생물원연구센터

Effects of Nonylphenol on Gonadal Development and Growth of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Soon Ju Moon, Chi Hoon Lee, Oh Soo Na, Byung Ho Kim¹ and Young Don Lee*

Marine and Environmental Research Institute, Cheju National University, Jeju 695-814, Korea
¹Sesoko Station, Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus, Motobu, Okinawa, Japan

ABSTRACT

Effects of nonylphenol (NP) on gonadal development and growth of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* were investigated. NP treatment was carried out to fry fish (during 55 to 64 days after hatching) using oral administration at nominal NP concentrations of 50, 100 and 150 µg/g BW. Gonad before NP treatment was sexually undifferentiated as observed with mostly gonia cells. At 159 days after hatching, ovarian lamella of ovary were filled with oogonia and perinucleolus oocytes. On the other hand, testicular lobules of the testis were occupied by spermatogonia, spermatocytes and spermatids. Histological observation of ovary and testis development was any different between the control and NP treated groups. However, growth was significantly increased in NP treated groups than control groups ($P < 0.05$). These results considerate that NP has any effect for sex differentiation and gonadal development, but act for early growth in olive flounder.

Key words : Nonylphenol, Gonadal development, Growth, *Paralichthys olivaceus*

서 론

Nonylphenol (NP)은 담황색의 점성이 있는 겔 상태로 끓는점이 290~310°C, 인화점이 141~155°C, 밀도가 0.95 g/mL (20°C), 옥탄올-물 분배계수가 4.48인 물질이다. NP는 phenol과 nonene의 혼합 반응에 의해 생성되어 유화제, 살충제 제조, 금속 세제, 산화방지제와 그 외의 화학물질 등에 광범위하게 사용된다 (Liber *et al.*, 1997). NP는 화학

물질의 중간 생성물과 생산품으로 환경에 유출되어, 주로 수계 (95%) 등에서 검출되고, 토양 (4%)이나 공기 (1%) 등에서도 검출된다 (EU-RAR, 1998). 환경으로 유출된 내분비계장애물질은 독성이 강하고 수서 생물에 축적되어 (Von Westernhagen *et al.*, 1981; Comber *et al.*, 1993; Rouleau *et al.*, 2000), 생물의 발달 및 생식 이상과 내분비계 기능장애를 일으킨다 (Colborn *et al.*, 1993; Jobling and Sumpter, 1993). NP는 testis-ova 유도 (Gray and Metcalfe, 1997), 정소의 성장 억제 (Jobling *et al.*, 1996)와 sertoli 세포의 발달 저해 (Christiansen *et al.*, 1998), estrogen 수용체와의 결합 (White *et al.*, 1994) 등과

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-64-782-8922, E-mail: leemri@cheju.ac.kr

같이 생식내분비계를 저해하는 내분비계장애물질이다.

이 연구는 내분비계장애물질인 NP를 성적으로 미분화시기에 있는 넙치, *Paralichthys olivaceus*에 처리하였을 때 생식소 발달과 성장에 미치는 영향에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험어 및 NP 경구투여

넙치 치어는 제주도 소재 종묘배양장에서 구입하였다. 부화 후 45일된 치어(전장 3.9 ± 0.5 cm)를 제주대학교 해양과환경연구소의 사육동 실험 수조($\phi 60 \times 30$ cm)로 옮겨, 각 실험구 수조 당 80마리씩 나누어 수용하였다. 실험에 사용한 NP는 Aldrich (Milwaukee, Wisconsin, USA)에서 구입하였으며, 10 mg/mL NP stock solution을 만들어 사용하였다. NP의 경구투여 농도는 NP 1 g를 methanol 100 ml에 용해시킨 후, 각 처리구별로 50, 100 및 150 μ g/g BW가 되도록 각 수조 당 10 g의 사료에 흡착시켰다. NP를 흡착시킨 사료의 투여는 Lee and Lee (1990)의 성분화 결과를 참고하여 성적 미분화 시기인 부화 후 55일부터 64일까지 10일간 하루에 한 번 공급하였다. 대조구 I은 시판용 고압팽창사료(extruded pellet, EP: Nissin Flour Milling, Co. Inc., Japan)만을 공급하였고, 대조구 II는 시판용 고압팽창사료에 methanol 150 μ g/g BW로 처리한 사료를 공급하였다. 먹이는 시판용 고압팽창사료를 하루 5회 공급하였다. 사육수는 자연해수를 사용하였고, 사육기간 중 수온은 16.7~19.3°C, pH는 7.8~8.1, DO는 5.0~6.0 mg/L의 범위였다.

조직학적 관찰

조직표본 제작은 실험어를 전장과 체중을 측정 한 후 생식소를 절개하여 Bouin's solution에 고정하였다. 고정된 생식소 조직은 파라핀 절편법에 의하여 두께 5 μ m의 절편을 만든 후, Hansen's hematoxylin과 0.5% eosin (H-E)으로 비교염색하였다. 제작된 조직표본은 생물현미경으로 관찰하였다.

통계분석

실험구는 3회 반복 실험하였다. 각각의 실험 결과는 Statistical Analysis (SAS Institute North Caroline, USA) 통계처리 프로그램을 이용하여 ANOVA-test를 실시한 후 Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성을 검정하였고, 성비는 χ^2 -test를 실시하였다.

결과 및 고찰

NP 경구투여에 따른 생식소 발달

넙치의 원시생식소는 부화 후 40일을 전후하여 난소와 정소로 분화 발달하는데, 난소가 정소보다 다소 빠르게 초기 분화가 일어난다. 난소는 부화 후 45일 경부터 난소의 구조적 체제를 갖추고, 정소는 부화 후 80일 쯤에 생식세포의 분열증식상이 나타나기 시작하는 것으로 알려져 있다(Lee and Lee, 1990). 이 실험에서 NP 경구투여 시기 전인 부화 후 55일째 치어의 생식소는 중신 후단의 복막 상피로부터 방광의 후단까지 선상구조를 보이는 원시생식소를 형성하고 있으며(Fig. 1-A), 생식원세포들은 체세포 무리와 원시생식소 기질의 섬유성 간층직 사이에 둘러 싸여 있다(Fig. 1-B). 부화 후 85일째 자어의 생식소는 대조구와 NP 처리구에 있어서 생식소 발달의 차이가 없이, 난소는 난소강이 형성되어 난소의 구조적 체제를 갖추고, 기부에 난원세포들이 드문드문 섬유성 기질에 둘러 싸여 있으며, 난소강의 수질층이 부분적 함입으로 주름이 형성되어 난소박판을 형성하고 있다(Fig. 1-C). 정소는 피질층에서 간질세포에 둘러싸인 정원세포들이 분포하고 있다(Fig. 1-D). 부화 후 159일 쯤 치어의 생식소도 대조구와 NP 처리구에 있어서 생식소 발달의 차이가 없이, 난소는 소낭상피 상에 분열 증식하는 난원세포와 핵 내에 인이 2~3개씩 존재하는 초기성장중인 주변인기 난모세포들이 대부분이었다(Fig. 1-E). 정소는 후단 부분이 비후 신장된 삼각형의 엽상 구조로 피질부에는 많은 정소 소엽이 형성되어 있고, 분열증식중인 정원세포, 성장중인 정모세포, 정세포들이 존재하였다. 이들 주위에는 타원형의 간질세포와 결합성 섬유조직들이 발달하였다(Fig.

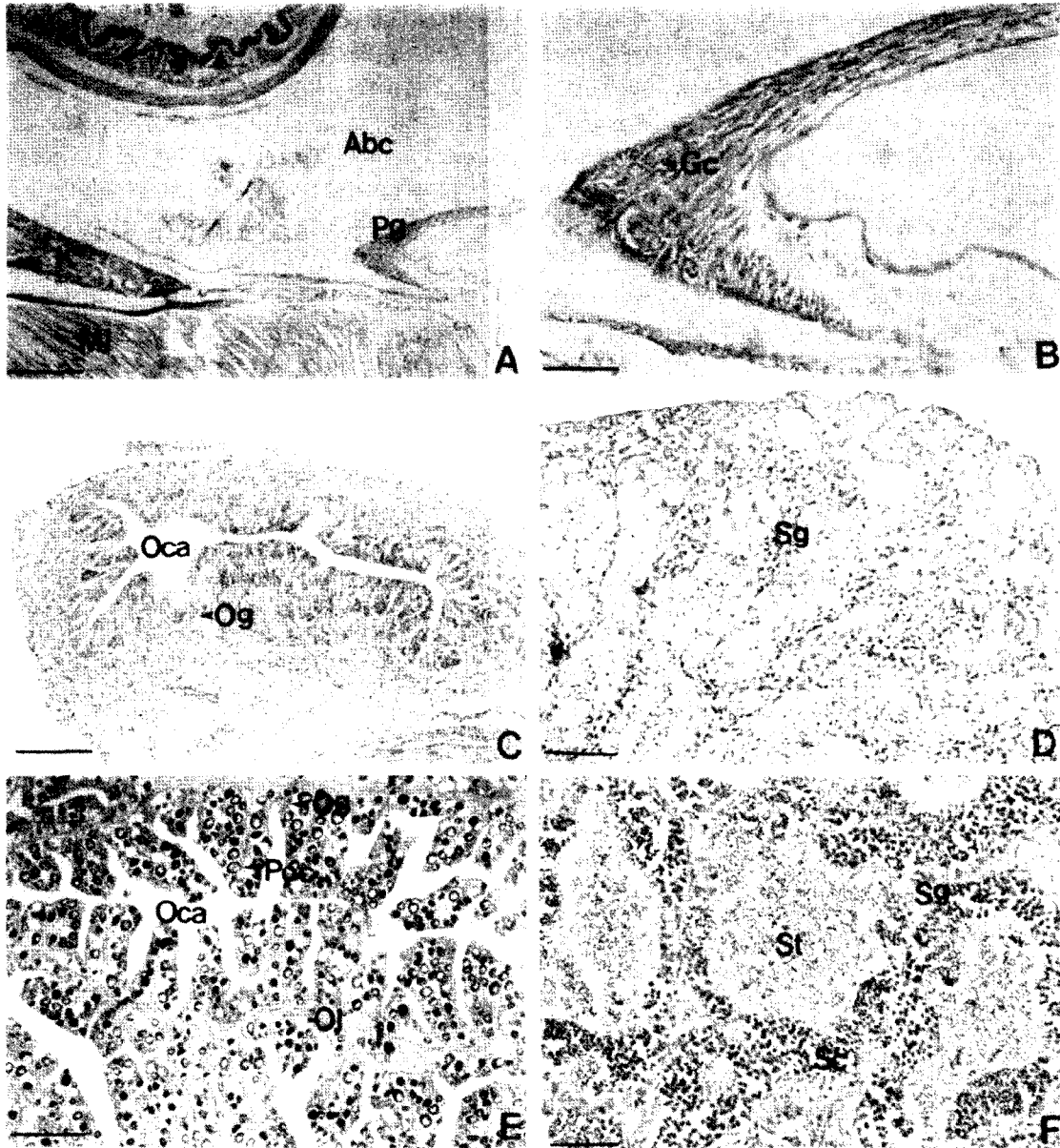


Fig. 1. Photomicrographs of gonadal tissue by oral administration of NP in olive flounder, *P. olivaceus*. Oral administration of NP was carried out from 55 to 64 days after hatching; A, B: gonads before NP treatment (55 days after hatching); C, D: gonads of 30 days after NP treatment (85 days after hatching); E, F: gonads of 104 days after NP treatment (159 days after hatching). (A) Primitive gonad (Pg) was observed in retroperitonium. Scale bar = 100 μ m. (B) Magnified photomicrograph of Fig. 1-A. The primitive gonad was composed with a gonial cells (Gc) and somatic cells. Scale bar = 25 μ m. (C) Differentiated ovary was formed a ovarian cavity (Oca) and ovarian lamella (Ol) with scattered oogonia (Oo). Scale bar = 50 μ m. (D) Differentiated testis was formed a testicular lobules with scattered spermatogonia (Sg) in epithelium. Scale bar = 25 μ m. (E) In the ovarian lamella (Ol) of ovary was observed oogonia (Oo) and perinucleolus oocytes (Poc). Scale bar = 100 μ m. (F) Testis was occupied by spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc) and spermatids (St). Scale bar = 25 μ m. Abc: Abdominal cavity, K: Kidney, Ml: Muscle layer, S: Stomach.

1-F). 이 실험에서 NP 경구 투여에 따른 대조구와 NP 처리구간의 생식소 발달은 광학현미경상에서 뚜렷한 차이가 없었으며, 성비도 대조구와 처리구 모두에서 암수 비율이 1:1이었다 ($P < 0.05$). Norrgren *et al.* (1999)은 NP 300과 1500 mg/kg의 농도로 4 주 동안 Atlantic salmon 자어에 경구투여 하였을 때, 성비가 대조구와 비교하여 차이는 없었지만, 간 중량지수가 증가하였다고 보고하였다. 그리고, NP를 처리한 platyfish, *Xiphophorus maculatus*의 정소에서 대조구와 비교하여 sertoli 세포의 비대와 정자형성세포의 소낭 수가 감소하였으며 (Kinnberg *et al.*, 2000), 10과 100 $\mu\text{g/g}$ 의 농도로 NP를 복강 주사한 eelpout, *Zoarces viviparus*에서 GSI의 감소, 혈장 vitellogenin의 농도 증가, sertoli 세포 기능 저해 (Christiansen *et al.*, 1998)가 일어나 NP가 생식소 발달에 영향을 끼친다는 것을 제시하고 있다. 또한, PAHs, PCBs와 그 외 다른 유기화학물질에 노출된 flounder, *Pleuronectes flesus*는 난군 동기 발달형 (synchronous)인 난소조직이 난군 비동기 발달형 (asynchronous)의 난모세포 발달을 보이거나 (Janssen *et al.*, 1995), 이 실험에서 NP 처리에 의한 생식소 발달의 변화는 관찰되지 않았다.

성장

부화 후 85일 째 넙치 치어의 NP 처리구와 대조구간의 성장을 비교 분석한 결과, 전장과 체중에 있어서 NP 처리구간에는 유의차가 없었으나, NP 처리구에서 실험어의 전장과 체중은 각각 10.03~10.18 cm, 10.12~10.35 g로 대조구 I 실험어의 전장 9.64 cm, 체중 8.66g에 비해 높았다 ($P < 0.05$, Table 1).

부화 후 159일 째 넙치 치어의 NP 처리구와 대조구간의 성장을 비교 분석한 결과, 전장은 대조

구 I 20.66 cm, 대조구 II 21.38 cm, NP 50 $\mu\text{g/g}$ BW 처리구 22.38 cm, NP 150 $\mu\text{g/g}$ BW 처리구 22.25 cm로 대조구 I와 NP 처리구간에 유의차가 있었고 ($P < 0.05$), NP 50 $\mu\text{g/g}$ BW 처리구와 NP 150 $\mu\text{g/g}$ BW 처리구간에는 유의차가 없었다. 체중도 NP 처리구간에는 유의차가 없었으나, NP 처리구와 대조구간에는 대조구 I 88.7 g, NP 처리구 114.9~127.3 g로 대조구보다 NP 처리구가 성장이 높았다 ($P < 0.05$, Table 1). NP는 17 β -estradiol (E2)와 유사한 작용을 하는 환경성 estrogen (environmental estrogen) 또는 외인성 estrogen (xenoestrogen)이다 (Giesy *et al.*, 2000). Estrogen 혼합물은 신진대사 호르몬의 방출 또는 작용에 의한 영향으로 먹이를 소비하려는 자극을 증진시켜 성장을 촉진시키고 (Malison *et al.*, 1988), 이 실험에서도 NP의 농도별 경구투여에 따른 처리구와 대조구간의 성장은 NP 처리구가 대조구보다 성장이 빠르게 나타났지만 ($P < 0.05$), NP의 농도에 따른 처리구간의 성장의 유의차는 없었다 (Table 1).

이 실험에서 처리한 NP의 농도와 시기 및 기간에서는 넙치의 생식소 분화 발달에 미치는 영향이 관찰되지 않았으나, 초기 성장에 있어서는 NP 처리구가 대조구보다 빠른 경향을 보였다. NP가 넙치의 성분화와 생식소 발달에 미치는 영향을 탐색하기 위해서는 처리시기, 처리농도 그리고 처리기간 등에 관한 연구가 앞으로 지속적으로 이루어져야 한다고 사려된다.

결론

내분비계장애물질로 알려진 nonylphenol (NP)이 넙치, *P. olivaceus*의 생식소 발달과 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 실험어는 부화 후 55일부터

Table 1. Changes of total length (TL) and body weight (BW) by oral administration of NP in olive flounder, *P. olivaceus*

Experimental group	55 days		85 days		159 days	
	TL (cm)	BW (g)	TL (cm)	BW (g)	TL (cm)	BW (g)
Control I	3.88 \pm 0.1	0.52 \pm 0.02	9.64 \pm 0.37 ^b	8.66 \pm 3.37 ^b	20.66 \pm 1.43 ^c	88.75 \pm 18.91 ^c
Control II	3.85 \pm 0.1	0.56 \pm 0.02	10.10 \pm 0.55 ^a	9.94 \pm 5.05 ^a	21.38 \pm 1.23 ^b	102.05 \pm 18.81 ^b
NP 50 $\mu\text{g/g}$ BW	3.92 \pm 0.1	0.53 \pm 0.02	10.03 \pm 0.30 ^a	10.12 \pm 3.10 ^a	22.38 \pm 1.23 ^a	124.03 \pm 18.33 ^a
NP 100 $\mu\text{g/g}$ BW	3.89 \pm 0.1	0.54 \pm 0.02	10.05 \pm 0.27 ^a	10.35 \pm 3.65 ^a	21.40 \pm 1.25 ^b	114.91 \pm 20.08 ^a
NP 150 $\mu\text{g/g}$ BW	3.86 \pm 0.1	0.57 \pm 0.02	10.18 \pm 0.32 ^a	10.25 \pm 3.73 ^a	22.25 \pm 1.03 ^a	127.30 \pm 17.68 ^a

Values (mean \pm S.D) within a column superscript with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

64일까지 NP를 50, 100 및 150 µg/g BW 농도로 경구 투여하였다. 부화 후 55일된 실험어의 생식소는 대부분 생식원세포로 구성되어 성적으로 미분화 단계였다. 부화 후 159일째 난소는 소낭 상피상에 분열 증식하는 난원세포와 주변인기 난모세포들이 분포하였고, 정소는 피질부에 정소 소엽이 형성되어 정원세포, 정모세포, 정세포들이 존재하였다. 대조구와 NP 처리구에서 생식소 발달은 차이가 없었다. 그러나, 대조구와 NP 처리구의 전장과 체중을 조사한 결과, 대조구보다 NP 처리구가 성장이 빨랐다($P < 0.05$). 이 연구의 NP 처리 농도나 처리 기간에서, NP가 넙치의 성분화와 생식소 발달에 영향을 주지는 않지만, 성장에 영향을 끼치는 것으로 보인다. 따라서, 앞으로 넙치의 성분화와 생식소 발달에 미치는 NP의 농도와 처리기간 및 처리 방법에 대한 더 많은 연구가 이루어져야 한다고 사려된다.

감사의 글

이 연구는 2001년 두뇌한국21사업 핵심분야에 의하여 지원되었습니다.

참 고 문 헌

- Christiansen T, Korsgaard B and Jespersen A. Induction of vitellogenin synthesis by nonylphenol and 17β-estradiol and effects on the testicular structure in the eelpout, *Zoarces viviparus*. Mar. Environ. Res. 1998; 46: 141-144.
- Colborn T, Saal FS vom and Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ. Health Perspect 1993; 101: 378-384.
- Comber MHI, Williams TD and Stewart KM. The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. Wat. Res. 1993; 27(2): 273-276.
- EU-RAR. Risk assessment draft 1998.
- Giesy JP, Pierens LS, Snyder EM, Miles-Richardson SM, Kramer VJ, Synder SA, Nichols KM and Villeneuve DA. Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows, *Pimephales promelas*. Environ. Toxicol. Chem. 2000; 19(5): 1368-1377.
- Gray MA and Metcalfe CD. Induction of testis-ova in Japanese medaka, *Oryzias latipes* exposed to *p*-nonylphenol. Environ. Toxicol. Chem. 1997; 16: 1082-1086.
- Janssen PAH, Lambert JGD and Goos HJTh. The annual ovarian cycle and the influence of pollution on vitellogenesis in the flounder, *Pleuronectes flesus*. Journal of Fish Biology 1995; 47: 509-523.
- Jobling S and Sumpter JP. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* hepatocytes. Aqua. Toxic. 1993; 27: 361-372.
- Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Mattiessen P and Sumpter JP. Inhibition of testicular growth in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 1996; 15: 194-202.
- Kinnberg K, Korsgaard B, Bjerregaard P, Jespersen A. Effects of nonylphenol and 17β-estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*. J. Exp. Biol. 2000; 203(2): 171-181.
- Lee YD and Lee TY. Sex differentiation and development of the gonad in the flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). Bull. Mar. Res. Inst. Cheju Nat. Univ. 1990; 14 : 61-86.
- Liber K, Gangl AG, Carry TD, Heinis LJ and Stay FS. Lethality and bioaccumulation of 4-nonylphenol in bluegill sunfish in littoral enclosures. Environ. Toxic. Chem. 1997; 18(3): 394-400.
- Malison JA, Kayes TB, Wentworth BC and Amundson CH. Growth and feeding responses of male versus female yellow perch, *Perca flavescens* treated with estradiol-17β. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1988; 45: 1942-1948.
- Norrgren L, Blom A, Andersson PL, Börjeson H, Larsson DGJ and Olsson PE. Effects of potential xenoestrogens (DEHP, nonylphenol and PCB) on sexual differentiation in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquat. Ecosyst. health. Manage. 1999; 2(3): 311-317.
- Rouleau C, Gobeil C and Tjälve H. Accumulation of silver from the diet in two marine benthic predators: The sow crab, *Chionoecetes opilio* and American plaice, *Hippoglossoides platessoides*. Environ. Toxic. Chem. 2000; 19(3): 631-637.
- Von Westernhagen H, Rosenthal H, Dethlefsen V, Ernst W, Harms UL and Hansen PD. Bioaccumulating substances and reproductive success in Baltic flounder, *Platichthys flesus*. Aqua. Toxic. 1981; 1: 85-99.
- White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP and Parker MG. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology 1994; 135: 175-182.