

## 송사리 초기 성장단계에서의 비스페놀 A에 의한 내분비계장애 영향

김은경, 류지성, 박수영, 김현미, 최광수, 나진균, 이철우\*

국립환경연구원 환경위해성연구부 위해성평가과

### Endocrine Disrupting Effects of Bisphenol A on the Early Life-Stage of Medaka (*Oryzias latipes*)

Eun-Kyoung Kim, Jisung Ryu, Soo-Young Park, Hyun-Mi Kim,  
Kwang-Soo Choi, Jin-Gyun Na and Chulwoo Lee\*

Environmental Risk Research Divison, National Institute of Environmental Research,  
Kyongseo-dong Seo-gu, Incheon 404-708, Korea

#### ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effects of bisphenol A (BPA), which is known to have estrogenic activity, on the early development of medaka fish (*Oryzias latipes*). The fertilized eggs of medaka were treated with BPA at different concentrations for 3 weeks. Embryonic growth, deformation, hatching success, and gonadal differentiation were determined to observe the effects of this chemical. Also we tried to measure the estrogenic activity of bisphenol A using ELISA and RT-PCR methods. By using this techniques, we evaluated the induction of vitellogenin, an estrogen-regulated gene from the whole body-homogenates of larvae. At results, a reduced blood circulation was seen in embryos and peritoneal edema and hindrance of yolk-sac absorption were observed in larvae of treated group. However, BPA at the concentrations tested (2~200 µg/L) did not have severe adverse effects on the early life-stages. According to the observation of gonadal histology, inter-sex or sex-reversal was not found in all test fish. After the exposure was ended, vitellogenin mRNA and protein levels were measured in larvae and then their levels were found to be increased in treated group with 200 µg/L. These results indicate that BPA can induce the expression of vitellogenin in early life-stages as well as in adult male fish.

**Key words** : medaka, bisphenol A, vitellogenin, ELISA, RT-PCR

#### 서 론

국제적으로 내분비계장애물질에 의한 독성과 위해성을 평가하기 위한 연구는 활발히 진행되고 있

으며, 이러한 작업은 OECD 시험법 제·개정 프로그램 중심으로 이루어지고 있다. 현재까지 OECD 어류 내분비계장애 시험법 전문가회의에서 필수종말점(core end-points)으로 합의된 관찰항목은 외부 형태적인 변화(gross morphology), 난황전구체인 비텔로제닌 측정(vitellogenin level) 그리고 생식기의 조직학적 변화(gonadal histology)이다

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-32-560-7116, E-mail: leecwoo@me.go.kr

(OECD, 2000). 외부 형태적인 변화는 관찰이 쉽고, 시간이 오래 걸리지 않아 스크리닝 하는데 시간·경제적으로 유리한 장점이 있으며, 생식소중량지수 (gonadosomatic index: GSI), 생식기의 외형적 관찰, 성체에서의 2차 성징 및 간중량지수 (hepatosomatic index: HSI) 등을 포함하고 있다. 비텔로제닌 측정은 각 국에서 생산된 수많은 연구 결과를 바탕으로 기초 자료가 풍부한 이유로 생화학적인 측정 지표로서 사용 가능성이 합의되었으며, 이에 따라 비텔로제닌의 단백질 수준에서의 검출 및 정량방법 기술은 현재 정립되어 있다. 생식소의 조직학적인 관찰은 암·수 생식기의 영향 및 성징의 변화를 직접적으로 관찰할 수 있는 장점이 있어 스크리닝 단계의 종말점으로 매우 중요하다고 볼 수 있다.

Bisphenol A (BPA)는 주로 식품이나 음료수캔의 코팅물질에 사용되는 epoxy, polycarbonate와 부식방지를 위한 불포화 polyester-styrene resin을 만들기 위한 원료로 사용되어 왔으며, 화학적으로 phenol-ring 구조를 가지고 있음으로써 에스트로젠 수용체에 대한 친화도가 비교적 높은 estrogenic chemical로 알려져 있다. 산업화가 가속화됨에 따라 BPA의 사용량은 전 세계적으로 증가하는 추세이며, 국내의 경우도 꾸준히 증가하여 환경부 통계자료에 따르면 2002년도 국내사용량은 192,024톤으로 보고되었다.

BPA는 1938년부터 에스트로젠 활성을 갖는 물질로서 연구가 시작되었고, 현재는 EPA 뿐만 아니라 WWF 등에서 endocrine disruptor로 규정하고 있는 대표적인 내분비계장애물질로 알려져 있다. 또한 BPA는 *in vitro* 시험을 통해 에스트로젠 수용체와 결합할 수 있는 것이 이미 확인되었고, 1993년에는 내분비계장애물질 스크리닝에 널리 사용되는 MCF-7 세포를 증식시킨다는 결과가 발표되었다 (Borrás *et al.*, 1996; Ren *et al.*, 1997; Singleton *et al.*, 2004). 한편, BPA는 프탈레이트와 더불어 *in vivo*에서도 많은 실험들이 실시되었는데 자극성 및 과민성 물질로 생식독성 및 기형 유발가능성이 높은 물질로 알려져 있으며, 설치류를 이용한 실험에서 수컷 정소의 크기 및 정자수를 감소시켰다는 결과가 보고된 바 있다 (Takao *et al.*, 2003; Takahashi and Oishi, 2003).

BPA를 포함한 내분비계장애물질에 대한 독성연

구는 여러 가지 시험생물을 대상으로 실시되었는데 특히 생태독성 측면에서 어류에서의 영향 연구는 그동안 꾸준히 증가되어 왔으며 다양한 시험어종을 사용하여 실시되었다. 예로 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*)의 vitellogenin 유도 (Christiansen *et al.*, 1998), 수컷 잉어 (*Cyprinus carpio*)의 간세포 배양에서 vitellogenin 발현 (Smeets *et al.*, 1999), 송사리 (*Oryzias latipes*)에서의 BPA 영향에 관한 연구 (Yokota *et al.*, 2000) 등 많은 연구가 이루어져 왔다. 특히 이러한 어류에서의 여러가지 연구 가운데 내분비계장애물질이 어류 초기단계에서의 발생 및 성장, 생식기관에 어떠한 영향을 나타내는지에 대한 연구는 매우 중요한 부분이라고 할 수 있다. 따라서 본 연구는 대표적인 내분비계장애물질로 알려진 BPA를 시험물질로 하여 환경오염물질에 매우 감수성이 높은 시기인 어류의 성장 초기단계 (embryo-larvae)에서의 영향을 필수종말점 (core end-points)을 중심으로 조사하였으며, 그 결과 수서생물의 초기단계에서 내분비계장애영향을 스크리닝 하기 위한 민감하고 적절한 종말점을 선정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험어종

국립환경연구원 어류사육실에서 수온  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH  $7.5 \pm 0.2$ , 용존산소  $7 \sim 8 \text{ mg/L}$  및 광주기 16시간/8시간 (명/암)의 조건으로 계대 사육한 일본산 개량송사리 (*Oryzias latipes*, Orange-red type)를 시험에 사용하였다. 먹이는 알테미아를 1일 1회 충분히 공급하였으며 부화 후 5개월 이상된 성숙한 개체중 외형상 기형이 없고, 건강한 것만을 골라 암:수, 2:1 비율로 수조에 넣은 후 교배·산란을 유도하여 수정란을 확보하였다.

### 2. 시험물질의 조제

시험물질은 bisphenol A (Sigma chemical Corp., USA)를 증류수에 용해시켜  $100 \text{ mg/L}$ 의 stock solution을 만든 후, 재차 희석수에 일정비율로 희석하여 시험에 적합한 농도로 제조하였다. 희석수는 본 연구실의 사육수로 사용하고 있는 탈염소한 수돗물을 사용하였으며, 이 경우 사육수의 pH는 7.4

이며 경도는 CaCO<sub>3</sub> 환산값 기준으로 68 mg/L 이었다.

### 3. 급성독성시험

급성독성시험에는 부화 후 3일 경과된 송사리 larvae를 사용하였으며, 시험물질의 처리는 bisphenol A (BPA) stock solution을 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 9.6 및 12.8 mg/L의 농도로 희석하여 대조군을 포함해 총 7개 농도의 시험군을 설정하여 노출하였다. 각 수조 내에는 400 mL의 시험용액이 일정하게 유지되도록 하였으며, 수온은 사육온도와 같은 25 ± 1°C를 유지하였고, 조명시간도 사육조건과 동일하게 유지하였다. 시험군당 16마리의 송사리를 처리하여 96시간동안 시험을 실시하였으며, 시험기간 동안 치사율과 행동반응을 관찰하였다. 시험도중 치사어는 발견 즉시 제거하였으며, 아가미 호흡이 멈춘 상태를 사망으로 간주하였다. 치사율에 따른 반수 치사농도(LC50)는 *Probits* 통계처리법을 사용하여 산출하였다.

### 4. 초기 생장단계에서의 내분비계장에 영향 시험

#### 1) 시험물질의 노출

시험물질의 처리는 BPA stock solution을 2, 20, 200 µg/L의 농도로 희석하여 대조군을 포함해 총 4개 농도의 시험군을 설정하여 노출하였다. 시험물질 처리를 위해 친어로부터 산란된 알 가운데 2~4 세포기 발생단계의 수정란을 채취하여 시험군별로 30개의 수정란을 유리 비이커에 넣어 200 mL의 시험용액을 첨가하여 노출시켰다. 노출기간은 대조군의 부화가 50% 완료된 시점에서 2주간의 노출을 더 시행하였다. 먹이는 부화 후 이틀이 지나는 시점부터 1일 1회 알테미아를 일정량 공급하였다. 반지수식방법을 적용하여 2일에 1회 시험액을 교환하였으며, 시험액을 교환할 경우 먹이는 시험용액 교환 4시간 전에 공급하였다.

#### 2) 배 발생과 부화율 관찰

초기 배발생 (embryo-larvae) 과정에서 BPA의 영향을 알아보기 위해 대조군과 처리군에서의 생장과정을 실체현미경 (Karl Zeiss Corp.)을 이용하여 24시간 마다 관찰하였으며, 관찰 사항으로는 생장 과정에서 나타나는 사망여부, 부화율, 장애영향, 기형

등을 조사하였다.

#### 3) 조직학적 영향 관찰

대조군 및 처리군의 생식소 조직을 관찰하기 위해 부화 후 2주일이 경과한 개체들 가운데 시험군당 10마리 개체씩을 Bouin's fluid에 고정하여 파라핀 절편법에 의해 4~6 µm 두께로 연속 박절하는 whole body section을 실시하였다. 조직관찰에 사용한 염색법은 Mayer's hematoxylin과 0.5% Eosin (H & E)의 비교염색을 실시하였으며, 염색이 완료된 후 광학현미경에서 검경하였다.

#### 4) ELISA 법에 의한 비텔로제닌 측정

송사리 비텔로제닌의 측정은 "Medaka vitellogenin ELISA Kit (EnBio Corp.)"를 사용하였으며, 비텔로제닌 항체를 이용하는 sandwich ELISA법을 사용하였다. 노출이 종료된 후 시험군 당 5개체의 송사리 larvae를 하나의 tube에 모아 300 µL의 TBS-1% BSA 버퍼에서 분쇄하여 whole body homogenates를 만든 후 5,000 g에서 20분간 원심분리하였다. 위 과정은 시험군 당 2 반복을 두어 실시하였으며, 원심분리 후 상등액은 새로운 tube에 옮겨 ELISA 시험 전까지 -20°C에서 보관하였다. ELISA 시험을 간단히 기술하면 96-well 플레이트를 washing buffer 200 µL로 3회 세척한 후, 세척액을 완전히 제거하고 비텔로제닌 표준용액 (100 ng/mL의 2 ×, 4 ×, 8 ×, 16 ×, 32 ×, 64 ×, 128 × 희석) 및 assay buffer로 희석한 시료를 각 well 당 50 µL를 첨가하고 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 각 well의 첨가액을 제거하고 well당 200 µL의 TBS-Tween (0.2%) washing solution을 사용하여 3차례 씻어낸 후 horse radish peroxidase-conjugated antibody 50 µL를 well에 분주하고 실온에서 1시간 동안 진탕 배양하였다. 용액을 제거하고 well당 200 µL의 washing solution을 사용하여 3차례 씻어내고, TMB가 첨가된 기질용액 50 µL를 well에 첨가하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 마지막으로 50 µL의 반응정지액을 첨가한 후 15분 이내에 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) RT-PCR 시험

노출이 종료된 송사리 몸체 (whole body)로부터 QIA-Shredder RNeasy mini-kit (QIAGEN Corp.)를 이용하여 total RNA를 추출하였으며, 방법은 제품

매뉴얼에 준하여 실시하였다. 정제한 총 RNA는 흡광도 260 nm의 파장으로 정량한 후 1 µg/µL로 희석하여 -70°C에 보관하였다. RT-PCR 반응의 적정성을 검증하기 위한 양성대조군으로는 송사리 암컷 (spawning female) 개체의 간을 사용하였으며, 간 추출 및 총 RNA 정제는 위와 동일한 방법을 사용해 실시하였다. RT-PCR은 30°C-10분, 42°C-30분, 99°C-5분의 조건으로 역전사 (reverse transcription) 반응을 실시하여 cDNA를 합성한 후, 94°C/30초-60°C/30초-72°C/1분에서 30회전의 조건으로 PCR 반응을 수행하였다. PCR에 사용된 VTG 프라이머는 5'-ggggcattgattgcaagcagt-3' (forward), 5'-ctcctgaagaccatggttagg-3' (reverse) 서열을 가지도록 제작하였으며, 대조반응을 위한 유전자로서 house keeping gene인 β-actin의 경우는 5'-cctgaccctgagtagcccca-3' (forward)와 5'-cgctcgcagctcatagctc-3' (reverse)의 서열을 갖는 프라이머를 제작하여 사용하였다. 반응이 끝난 후 1.0% 아가로오스 겔에서 전기영동하고 그 결과를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 급성독성시험

갯 부화한 송사리 larvae에 대한 bisphenol A (BPA)의 급성독성을 알아보기 위해 96시간 동안 BPA를 처리한 결과, 반수치사농도 (96h-LC50)는 8.2 mg/L로 나타났다. 12.8 mg/L 농도에서는 24시간 이내에 모든 개체 (16마리)가 사망하였으나, 대조군을 비롯한 0.8~3.2 mg/L 범위의 처리군에서는 시험기간 동안 사망한 개체가 하나도 없었으며, 유영장애 등 특이한 현상도 관찰되지 않았다 (Table 1). 과거 연구에 따르면, BPA에 대한 송사리 급성독성은 성어를 대상으로 48h-LC50값이 15 mg/L (Staples *et al.*, 2000), 96h-LC50값이 13 mg/L으로 보고된 바 있으며 (Yokota *et al.*, 2000), 본 시험 결과

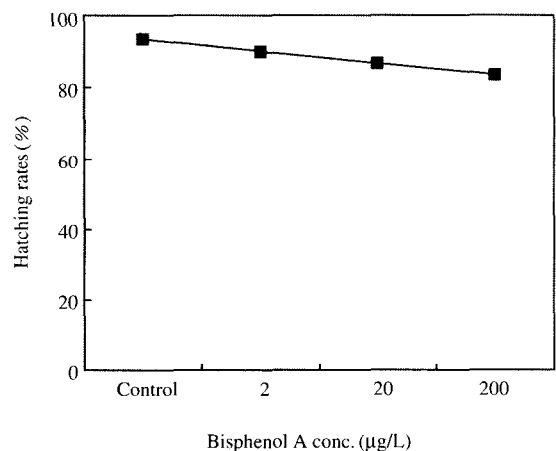
**Table 1.** Acute toxicity of bisphenol A to medaka larvae

BPA (mg/L)	Control	0.8	1.6	3.2	6.4	9.6	12.8	LC50 (mg/L)
Lethal rates (%) (48hr)	0	0	0	0	12.5	50	100	8.9
Lethal rates (%) (96hr)	0	0	0	0	12.5	62.5	100	8.2

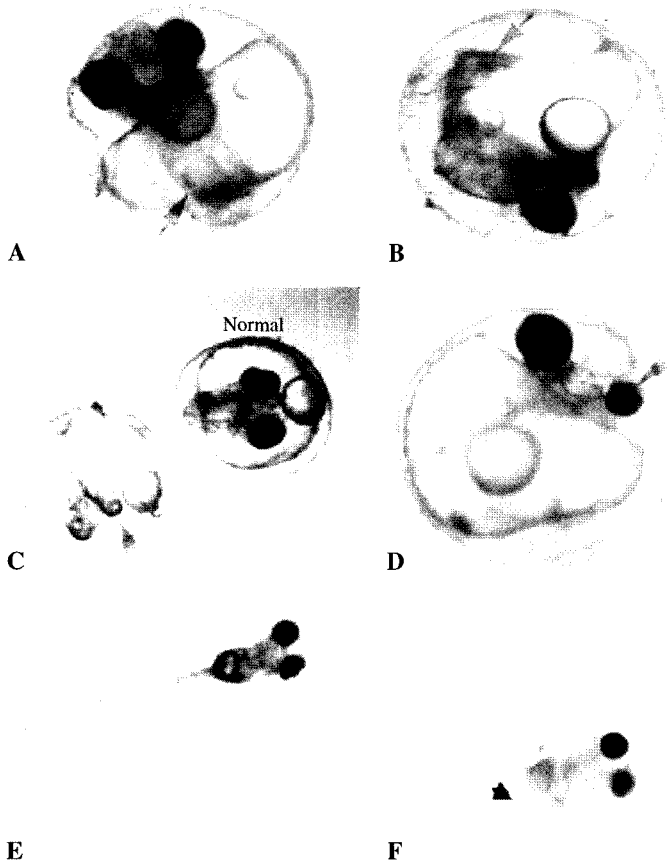
와 비교하여 송사리가 성장함에 따라 BPA 급성독성에 대한 저항성은 점차 증가하는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 화학물질의 급성독성에 대한 감수성 차이는 어종에 따라 다양하게 나타는 것으로 알려져 있는데, 대표적 시험어종 가운데 하나인 fathead minnow에서는 96h-LC50이 4.7 mg/L로 알려져 있어 BPA 역시 어종에 따른 급성독성 차이가 큰 것으로 나타났다 (Alexander *et al.*, 1988). 송사리를 이용한 급성독성시험 결과, 송사리 초기 성장단계의 형태 및 조직학적 영향을 조사하기 위해 설정한 2~200 µg/L 범위는 larvae 단계에서 BPA의 급성독성에 따른 치사를 유발하지 않는 농도임을 확인할 수 있었다.

### 2. 외부형태학적 영향 관찰

송사리 수정란에 BPA를 처리한 결과, 부화율은 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 본 시험농도 범위 (0~200 µg/L)에서는 대조군과 처리군에서 유의한 차이는 나타나지 않았다. 즉, 200 µg/L 처리군에서도 부화율이 약 80% 가까이 나타남으로써 시험물질의 농도가 증가할 수록 부화율이 낮거나 부화가 지연되는 현상은 뚜렷이 관찰되지 않았다. 그러나 200 µg/L 처리군에서 부화가 되지 않은 개체는 주로 embryo의 발달과정에서 나타난 장애에 기인하였으



**Fig. 1.** Effects of bisphenol A (BPA) on the hatching rate of the fertilized eggs of medaka (*Oryzias latipes*). BPA at the concentrations tested did not have severe adverse effects on the hatching and survival.



**Fig. 2.** Major types of lesions observed in embryos and larvae of medaka exposed to bisphenol A. A and B: reduced blood circulation and hemorrhage, C: uncolored and reduced eyeballs, D: dwarf and reduced eyeballs, E: normal larvae, F: hindrance of egg-yolk sac absorption and edema.

며, 증상으로는 출혈 (hemorrhage) 및 혈액순환 (blood circulation) 저해, 안구크기 감소 (reduced eyeball)가 관찰되었고 이들은 결국 부화하지 못하고 사망하였다. 혈액순환 저해는 대조군의 소수 embryo에서도 관찰되었으나 그 증상은 심하지 않았으며, 추후 회복됨으로써 정상적인 부화가 이루어졌다. 한편 대조군 및 처리군에서 부화된 송사리 larvae는 대부분 건강한 상태를 유지하였으며, 20 및 200 µg/L 처리군의 일부 larvae에서 난황흡수가 저해되거나 부종증상 (edema)이 발견되었으나 BPA 농도 증가에 따라 기형발생이 증가하는 유의적인 용량-반응 양상은 관찰되지 않았다 (Fig. 2). 본 연구실에서는 BPA를 처리한 수컷 송사리에서의 비

텔로제닌 (VTG) 측정을 실시한 바 있으며, VTG 발현유도에 대한 비스페놀 A의 NOEC (No observed Effect Concentration) 값이 20 µg/L로 산출되었다 (Lee *et al.*, 2003). 따라서 금번 시험에서는 이러한 생체지표 측정시험 결과와의 비교를 위해 2~200 µg/L 범위로 BPA 농도를 설정하였다. 그러나 본 농도범위는 앞서 제시한 larvae에서의 96h-LC50 (8.2 mg/L)보다 약 40배 이상 낮은 값으로써 부화 직후까지의 시험기간 동안 일부 개체를 제외하고는 대부분에 기형 (deformation) 등의 뚜렷한 외부형태적 장애현상은 관찰되지 않았다. 과거, Yokota 등도 상실기 단계의 송사리 (Japanese medaka) 수정란을 BPA에 3.2~2,000 µg/L 농도로 노출시킨 바 있는

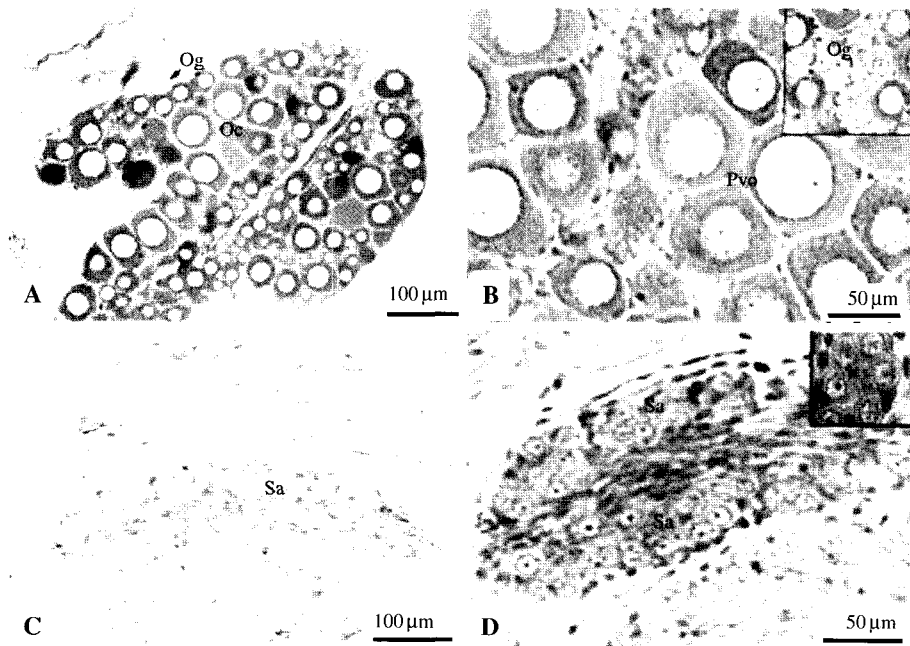
때 이 경우 역시 부화율과 부화 소요시간에 뚜렷한 영향은 발견하지 못하였다 (Yokota *et al.*, 2000). 송사리는 수정 후 약 9일 정도면 모든 내부장기의 발달이 완성되는 것으로 알려져 있는데, 따라서 이때부터 노출된 화학물질의 체내대사 또는 배설과정이 활발히 일어나게 된다 (Lobos *et al.*, 1992; Stephanie *et al.*, 2001). BPA의 경우 환경 중에서의 박테리아 등에 의한 대사(분해)과정은 알려져 있으나, 어류 생체내에서의 대사과정은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으며, 따라서 정확한 독성작용을 알기 위해서는 생체내에서의 BPA의 대사 기작에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

어류 수정란에 시험물질을 노출하는 방법은 물에 녹이거나 분산시켜 처리하는 방법 (waterborne exposure)과 수정란에 직접 주입하는 방법 (injection)이 있다. 본 시험에서는 전자의 방법을 사용해 시험물질을 처리하였는데, 일반적으로 물을 이용해 노출하는 방법은 수정란의 난막(chorion)에 의해 내부로의 물질 침투가 어느 정도 저해를 받을 우려가 있다. 그러나 난막은 반투과성(semi-perme-

able)인 것으로 알려져 있으며, 과거 연구결과에 따르면 물을 이용한 노출방법과 주입방법을 각각 사용하여 송사리 수정란에 TCDD를 처리한 결과, LC/LD50 값은 유사한 것으로 보고된 바 있다 (Wiegand *et al.*, 2000). 따라서 중합도가 크거나 수용성이 극히 낮은 물질이 아닌 경우 노출방법에 따른 차이는 그리 크지 않은 것으로 보여진다.

### 3. 생식소에서의 조직학적 영향 관찰

송사리의 생식소 형태는 난소와 정소 모두 각각 한 쌍의 원추형 모양으로 소화관과 등 쪽 체벽사이에서 신장과 함께 나란히 어체(魚體)의 후방으로 신장되어 있다. 그러나 부화 후 2주 가량 된 개체들은 크기가 매우 작기 때문에 생식소의 외부 형태를 통한 암·수 구분은 불가능하였다. 노출이 종료된 개체들의 생식소 조직을 관찰한 결과, 대부분의 난소는 결체성 섬유조직으로 구성된 다수의 난소소엽(ovarian lobule)으로 구성되어 있었으며, 소엽에는 핵이 세포의 대부분을 차지하는 난원세포



**Fig. 3.** Histological observation of testis and ovary in medaka larvae immediately after bisphenol A exposure (H & E stain). A and B: Ovary is composed of oogonia and oocytes of chromatin nucleolus stage. C and D: Testis is composed of spermatogonium.

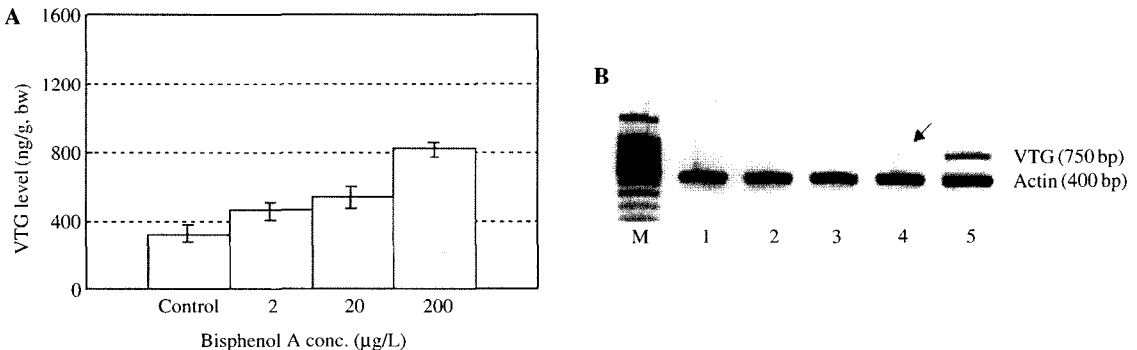
기 (oogonial stage)와 핵 내부에 큰 인과 다수의 인이 발견되기 시작하는 난황형성전기 (previtellogenic stage) 세포로 이루어져 있음을 관찰할 수 있었다. 대조군에서는 난황형성전기 세포가 난소의 80% 이상을 차지하고 있었으며, 모든 처리군의 난소 조직 역시 대조군과 동일한 양상이 나타남에 따라 내분비계장애물질의 영향이라고 볼 수 있는 증상들은 확인되지 않았다 (Fig. 3의 A, B). 수컷의 경우는 Fig. 3의 C와 D에서 보는 바와 같이 모든 정소 조직은 세포의 90% 이상이 핵으로 구성되어 있는 정원세포 (spermatogonium)들이 대부분을 차지하고 있음을 관찰할 수 있었으며, 핵의 크기가 작아지며 염색사들이 분열하는 감수분열 과정은 확인되지 않았다. 즉, 대조군 및 처리군 모두 spermatogenesis의 초기 단계로 나타나 발생단계의 차이는 관찰되지 않았으며, 내분비계장애물질에 의한 증상인 testis-ova를 포함한 생식소 조직의 이상 증상은 발견되지 않았다.

생식소의 조직학적 관찰은 내분비계장애물질에 의한 암·수 생식기의 영향 및 성징의 변화를 가장 직접적으로 확인할 수 있다는 측면에서 매우 중요한 종말점 (end-points)으로 인정되고 있다. 이 가운데 암수 생식조직이 혼재하고 있는 inter-sex 현상 (testis-ova)이 내분비계장애물질에 의한 성 전환 과정을 증명하는 대표적 증상으로 알려져 있다. 에스트로젠성 물질에 의한 수컷 어류에서의 inter-sex 현상은 여러 가지 연구에 의해 증명되어 왔으며,

BPA의 경우도 수정된 직후부터 1,820 µg/L 농도로 60일 이상 노출시킨 송사리 정소 조직에서 testis-ova가 발견된 보고가 있었다 (Yokota *et al.*, 2000). 그러나 90일 이상 BPA에 장기간 노출된 경우 10 µg/L 농도에서도 testis-ova가 발견된 사례 연구가 있었고 (Metcalf *et al.*, 2001), 따라서 내분비계장애물질에 의한 성 전환 현상은 내분비계장애물질의 농도뿐만 아니라 노출기간이 매우 중요하다는 것을 확인할 수 있었다.

#### 4. 비텔로제닌 측정

생식소 조직관찰 외에도 노출 종료 후 치어의 몸체로부터 단백질과 총 RNA를 추출하였으며, 정제된 단백질과 RNA로부터 비텔로제닌 (VTG)의 발현유도 정도를 각각 측정하였다. 특히, VTG 단백질은 일반적으로 혈액 또는 간 조직으로부터 측정하는데 본 시험에 사용된 송사리는 부화 후 약 2주된 치어로서 성어 (成魚)에 비해 상대적으로 크기가 매우 작기 때문에 혈액 또는 간이 아닌 몸체 (whole body)로부터 VTG 단백질을 측정하는 방법을 시도하였다. 대조군과 처리군에서의 VTG 단백질 측정 결과, BPA 농도가 증가할수록 VTG 수준이 증가하는 용량-반응 양상을 나타내었다 (Fig. 4). RT-PCR 방법을 사용한 RNA 측정 결과 200 µg/L BPA 농도에서 밴드가 관찰되었으며, 단백질 수준에서의 발현유도와 동일한 양상을 나타냄에 따라 VTG의 발현은 전사수준에서 유도되었음을 확인할



**Fig. 4.** Vitellogenin gene expression in medaka whole body after bisphenol A exposure at different concentrations. A: vitellogenin protein levels measured from the whole body. B: vitellogenin mRNA expression levels measured from the whole body (Reverse transcription-PCR was performed for 30 cycles) M: size markers, 1: control, 2: 2 µg/L of bisphenol A, 3: 20 µg/L, 4: 200 µg/L, 5: female medaka VTG (positive control). \*Actin was used as an internal standard gene.

수 있었다.

송사리를 포함한 어류에서의 VTG 측정은 내분비계장애물질의 에스트로젠 성질을 스크리닝할 수 있는 대표적 생체지표로 알려져 있으며, 그동안 국제적으로 많은 연구 자료의 확보를 통해 OECD EDTA에서 공식적으로 인정되고 있는 종말점 가운데 하나이다. 또한 난생 척추동물에서의 난황단백질 전구체인 VTG는 어류 외에도 파충류 및 양서류 모두에서 내분비계장애물질에 대한 생체지표로 사용가능한 것으로 알려져 있다(Palmer and Palmer, 1995; Sumpter and Jobling, 1995; Christensen *et al.*, 1998; Palmer *et al.*, 1998).

본 연구에서 VTG 발현을 조사하기 위해 사용된 송사리 치어의 몸체는 VTG가 유일하게 합성되고 있는 간 조직의 단백질 외에도 다른 내부 장기들의 단백질 성분이 측정시료에 다량 포함되어 있기 때문에 혈액으로부터의 측정에 비해 감도가 떨어지는 단점은 있다. 그러나 몸체로부터의 VTG 단백질 또는 RNA의 측정 시도는 송사리의 초기 성장 단계에서의 VTG 발현유도를 스크리닝할 수 있는 가능성을 얻는데 의의를 찾을 수 있었다.

이상의 모든 결과를 종합하였을 때 생체지표인 비텔로제닌은 어류의 초기 성장단계 (Early life-stage)에서의 내분비계장애물질에 의한 영향을 스크리닝 하는 과정에서 부화율, 기형 발생, 생식기관 조직관찰 등의 조직형태학적인 종말점들(end-points)과 비교해 민감한 지표임을 확인할 수 있었다.

## 결 론

내분비장애물질로 알려진 bisphenol A (BPA)에 의한 송사리 초기 성장단계에서의 영향을 필수종말점(core end-point)을 중심으로 조사하였다. 송사리 larvae에 대한 반수치사농도(96-LC50)는 8.2 mg/L로 나타남에 따라 송사리 초기 단계의 영향을 조사하기 위해 설정한 2~200 µg/L 범위는 BPA의 급성독성을 유발하지 않는 농도임을 확인할 수 있었다. 상기 농도에 노출된 송사리의 일부 수정란에서는 embryo 단계에서 출혈(hemorrhage), 혈액순환 저해, 안구크기 감소 및 larvae 단계에서 난황흡수가 저해되거나 부종증상(edema)이 발견되었으나 BPA 농도 증가에 따른 용량-반응적 장애 현상은

관찰되지 않았다. 부화 후 2주 가량 된 개체들의 생식소 조직을 관찰한 결과, 모든 시험군에서 생식소 발달과정의 이상 증상은 관찰되지 않았으며, 특히 내분비계장애물질에 의한 대표적 현상인 testis-ova 역시 발견되지 않았다. 이밖에 노출이 완료된 송사리 치어 몸체(whole body)로부터 VTG 단백질을 측정하였으며, BPA 농도가 증가할수록 VTG 수준이 소폭 증가하는 용량-반응 양상을 나타내었다. 또한 RT-PCR 방법을 사용한 RNA 측정결과, 200 µg/L BPA 농도에서 밴드가 관찰됨에 따라 VTG의 발현은 전사수준에서 유도되었음을 확인할 수 있었다. 상기 시험 결과, 생체지표인 비텔로제닌은 어류의 초기 성장단계(Early life-stage)에서의 내분비계장애물질에 의한 영향을 스크리닝 하는 과정에서 부화율, 기형발생, 생식기관 조직관찰 등의 조직형태학적인 종말점들(end-points)과 비교해 민감한 지표임을 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- Alexander HC, Dill DC, Smith LW, Guiney PD and Dorn PB. Bisphenol-A: Acute aquatic toxicity, *Environ Toxicol* 1988; 7: 19-26.
- Borras M, Laios I, Khissiin AE, Seo H-S, Lempereur F, Legros N and Leclercq G. Estrogenic and antiestrogenic regulation of the half-life of covalently labeled estrogen receptor in MCF-7 breast cancer cells, *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; 57: 203-213.
- Christiansen LB, Pedersen KL, Korsgaard B and Bjerregaard P. Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using *in vivo* synthesis of vitellogenin as a biomarker, *Mar Environ Res* 1998; 46: 137-140.
- Metcalf CD, Metcalf TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE and Potter T. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Environ Toxicol Chem* 2001; 20: 297-308.
- Lee CW, Park E-R, Song S-H, Ryu JS, Nam G-C, Bea H-S, Lee M-S, Park KS, Jeon S-H and Na J-G. Studies on the environmental risk assessment of endocrine disruptors using biomarkers (I), Report of NIER, Korea 2003; 25: 13-28.
- Lobos JH, Leib TK and Su T-M. Bidegradation of bisphenol-A and other bisphenols by a gram-negative aerobic



- bacterium, *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(6): 1823–1831.
- OECD. Draft report from the 2nd OECD expert consultation on Endocrine Disruptors Testing in Fish (EDF2), Tokyo, 15–16th March 2000, *Test Guidelines Programme*, Endocrine Disruptors Testing and Assessment Task Force.
- Palmer BD and Palmer SK. Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-eared turtle and African clawed frog, *Environ Health Perspect* 1995; 103: 19–25.
- Palmer BD, Huth LK and Selcer KW. Vitellogenin as a biomarker for xenobiotics estrogens in an amphibian model system, *Environ Health Perspect* 1998; 17: 30–36.
- Ren L, Marquardt MA and Lech JJ. Estrogenic effects of nonylphenol on pS2, ER and MUC1 gene expression in human breast cancer cells–MCF–7, *Chemico–Biological Interactions* 1997; 104: 55–64.
- Smeets JMW, Rankouhi TR, Nichols KM, Komen H, Kaminski NE, Giesy JP and van den Berg M. *In vitro* vitellogenin production by carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (anti) estrogenic activity of xenobiotics, *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 157(1): 68–76.
- Singleton DW, Feng Y, Chen Y, Busch SJ, Lee AV, Puga A and Khan SA. Bisphenol–A and estradiol exert novel gene regulation in human MCF–7 derived breast cancer cells, *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004; 221: 47–55.
- Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O’Block ST, Branson DR and Harris LR. Bisphenol A concentrations in receiving waters near US manufacturing and processing facilities, *Chemosphere* 2000; 40: 521–525.
- Stephanie DP, Villalobos SA, Kannan K and John PC. Morphological effects of bisphenol–A on the early life stages of medaka (*Oryzias latipes*), *Chemosphere* 2001; 45: 535–541.
- Sumpter JP and Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of aquatic environment, *Environ Health Perspect* 1995; 107: 173–178.
- Takahashi O and Oishi S. Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice, *Food and Chemical Toxicology* 2003; 41: 1035–1044.
- Takao T, Nanamiya W, Nazarloo HP, Matsumoto R, Asaba K and Hashimoto K. Exposure to the environmental estrogen bisphenol A differentially modulated estrogen receptor– $\alpha$  and– $\beta$  immunoreactivity and mRNA in male mouse testis, *Life Sciences* 2003; 72: 1159–1169.
- Wiegand C, Pflugmacher S, Giise M, Frank H and Steinberg C. Uptake, toxicity, and effects on detoxification enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish, *Ecotoxicol Environ Safety* 2000; 45: 122–131.
- Yokota H, Tsuruda Y, Daeda M, Oshima Y, Tadokora H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. Effect of bisphenol A on the early life stage in Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Environ Toxicol Chem* 2000; 19(7): 1925–1930.