

비스페놀 A에 대한 기수산 물벼룩의 항산화 시스템의 변화

유제원, 차주선, 김혜리, 표진우, 이영미*

상명대학교 자연과학대학 생명과학과

Modulation of antioxidant defense system in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis* exposed to bisphenol A

Jewon Yoo, Jooseon Cha, Hyeri Kim, Jinwoo Pyo and Young-Mi Lee*

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Sangmyung University, Seoul 03016, Republic of Korea

*Corresponding author

Young-Mi Lee

Tel. 02-2287-5448

E-mail. ymlee70@smu.ac.kr

Received: 22 February 2019

Revised: 8 March 2019

Revision accepted: 12 March 2019

Abstract: Bisphenol A (BPA), a representative endocrine disrupting chemicals, has adverse effects on growth, development and reproduction in aquatic organisms. The object of this study was to investigate the modulation of antioxidant enzyme-coding genes using quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR), enzyme activity and total protein content, to understand oxidative stress responses after exposure to BPA for 48 h in brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*. The BPA (3 mg L^{-1}) significantly up-regulated the expression of *Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD*, and catalase (*CAT*) mRNA. Three GST isoforms (*GST-kappa*, *GST-mu*, and *GST-theta*) mRNA levels significantly increased at the rate of 0.12 mg L^{-1} of BPA. In particular, *GST-mu* showed the highest expression level, indicating its key role in antioxidant response to BPA. SOD activity was induced with a concentration-dependent manner, and total protein contents was reduced. These findings indicate that BPA can induce oxidative stress in this species, and these antioxidants may be involved in cellular protection against BPA exposure. This study will provide a better understanding of molecular mode of action of BPA toxicity in aquatic organisms.

Keywords: antioxidants, bisphenol A, brackish, *Diaphanosoma celebensis*, water flea

서 론

비스페놀 A (Bisphenol A; BPA)는 2개의 페놀고리가 메틸기에 의해 연결되어 있는 화학물질로 1950년대 이후 폴리카보네이트(PC; polycarbonate)나 에폭시 수지 등의 플라스틱 제조를 위한 원료로 널리 쓰여 온 물질이다 (Staples *et al.* 1998; Burridge 2003; Kitamura *et al.* 2005).

에폭시수지와 PC를 함유한 물건들의 사용이 증가하며 BPA는 다양한 경로를 통해 해양에 유출되기 때문에 수생환경에서 지속적으로 검출되고 있다 (Kang *et al.* 2007; Oehlmann *et al.* 2009). 특히, PC에 들어있는 BPA는 담수보다 바닷물에서 더 많이 용출된다고 보고된 바 있다 (Sajiki and Yonekubo 2003).

BPA는 체내에서 에스트로겐과 유사하게 작용하여 에스

트로젠 수용체 (estrogen receptors; ERs)에 결합하는 것으로 알려져 있으며, 이로 인해 BPA는 동물이나 인간의 체내로 유입 시 정상적인 내분비계의 기능 및 생식기관에 장애를 줄 수 있다 (Hejmej *et al.* 2011). 예를 들어, freshwater snail *Marisa cornuarietis*를 이용한 실험에서는 BPA 처리군에서 초여성화 현상 (super feminization syndrome)이 나타났으며 (Oehlmann *et al.* 2000), 담수산 물벼룩 *Daphnia magna*를 이용한 실험에서도 BPA를 처리한 실험군에서 배아의 발육저해, 형태이상을 유발하며 molting을 지연시킨다고 알려져 있다 (Mu *et al.* 2005; Hwang 2006). 척추동물인 어류와 양서류를 이용한 실험에서는 BPA를 처리한 수컷 개체에서 비텔로제닌 (VTG; vitellogenin)의 함량이 증가하는 등 내분비계의 교란이 관찰되었다 (Nomura *et al.* 2006; Mandich *et al.* 2007).

최근 여러 연구들을 통해 BPA가 생물체 내에 유입되면 산화스트레스를 유발한다는 것이 밝혀졌다 (Kabuto *et al.* 2003; Ke *et al.* 2013; Eid *et al.* 2015). BPA에 의한 산화스트레스 작용 기전은 다음과 같다. 생체 내로 유입된 BPA는 제1상 효소에 의해 대사된 후 제2상 효소인 UDP-glucuronosyltransferase (UGT)에 의해 외부로 배출되기 쉬운 형태인 BPA-glucuronide로 전환된다 (Yokota *et al.* 1999). 이때 생체 내의 BPA 및 BPA glucuronide는 전자공여체로 작용하는 OH기를 가지고 있어 유리산소 (free oxygen)에 전자를 전달하고, 전자를 받은 유리산소는 활성산소종 (superoxide free anion radical, $O_2^{\cdot-}$)으로 전환되며 이렇게 생성된 활성산소종은 생체 내에서 산화스트레스를 유발한다 (Hassan *et al.* 2012; Dutta and Paul 2018). 제거되지 않은 활성산소종은 세포 내 고분자물질인 단백질, 지질, 핵산 등을 산화시켜 노화, 질병, 나아가 세포 죽음을 초래할 수 있다 (Barzilai and Yamamoto 2004; Nunomura *et al.* 2006; Pinto *et al.* 2018).

이러한 산화스트레스를 줄이기 위해서 생물은 다양한 항산화 방어 체계를 발전시켜왔다. Superoxide dismutase (SOD)는 superoxide anion을 H_2O_2 로 변환시키고 변환된 H_2O_2 는 다시 catalase (과산화수소분해효소, CAT)에 의해 상대적으로 독성이 적은 산소와 물로 변환된다 (Bindhumol *et al.* 2003). 또한 강한 전자공여체를 가지고 있는 BPA를 외부로 배출시키기 위해 glutathione S-transferase (GST)가 BPA와 glutathione (GSH)을 결합시켜 생체 외부로의 배출을 용이하게 한다 (Strange *et al.* 2001). 이러한 항산화 효소는 생물체 내에 유입되어 산화

적 스트레스를 유발할 수 있는 열충격, 저산소, 화학물질 등 다양한 환경 스트레스에 의해 이들의 유전자 발현과 단백질 활성이 변화하는 것으로 알려져 있어 산화적 스트레스를 확인하는 분자 지표로 사용되고 있다 (Valavanidis *et al.* 2006). 담수산 물벼룩 *Daphnia magna* 및 해양 rotifer *Brachionus koreanus*를 통한 실험에서 BPA에 의해 산화적 스트레스가 나타나는 것을 확인하였으나 (Kim *et al.* 2017; Park *et al.* 2018b), 해양 지각류에서 BPA에 의해 유도되는 산화적 스트레스에 관한 분자적 수준의 영향 연구는 거의 전무하다.

기수산 물벼룩인 *Diaphanosoma celebensis*는 광염성 갑각류 (euryhaline crustacean)이며, 해양 생태계의 1차 소비자로서 먹이사슬에서 중요한 역할을 담당한다. 또한 실험실 배양이 용이하고, 생활사가 짧으며 (4~5일), 단성생식 (parthenogenesis)을 하는 등 생태독성연구를 위한 모델 생물로서의 장점을 가지고 있다 (Marcial and Hagiwara 2007). 최근 카드뮴과 벤조피렌에 노출된 *D. celebensis*의 전사체 분석 결과로부터 SOD, catalase, GST 등 항산화 효소에 대한 유전자 정보를 확보하였다 (Kim *et al.* 2018). 또한 중금속에 노출된 *D. celebensis*에서 이들 항산화 효소의 유전자 및 활성이 산화적 스트레스에 의해 조절될 수 있음을 확인한 바 있다 (Bae *et al.* 2018).

본 연구에서는 BPA가 해양 생물에 미치는 산화적 스트레스 영향을 알아보기 위해 기수산 물벼룩 *D. celebensis*를 BPA에 노출시킨 후 6종의 항산화 효소 유전자 (GST-kappa, GST-theta, GST-mu, Mn-SOD, CuZn-SOD, CAT)의 발현 변화, SOD 효소의 활성도, 그리고 총 단백질 함량의 변화를 분석하였다. 본 연구는 BPA가 해양생물에 미치는 산화적 스트레스 반응에 대한 분자기전을 이해하는데 도움이 될 것이다.

재료 및 방법

1. 시험생물

본 연구에서 실험생물로 사용한 기수산 물벼룩 (*Diaphanosoma celebensis*)은 한국해양과학기술원 (KIOST) 이균우 박사로부터 분양 받아 상명대학교 분자독성학실험실에서 배양하고 있는 것을 사용하였다. 배양액은 인공해수염 (Instant Ocean, Aquariumsystems, Sarrebourg, France)을 증류수에 녹인 후 0.2 μ m 필터로 걸러 15 psu의 인공해수를

제조하였다. 기수산 물벼룩의 사육을 위하여 수온은 25 ± 1°C, 광주기는 12L:12D (light:dark)로 유지하였고, 먹이는 녹조류인 *Chlorella vulgaris*를 1.0 × 10⁵~3.0 × 10⁵ cells mL⁻¹의 밀도로 매일 공급하였다.

2. 노출시험

BPA (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 포함한 모든 시약은 molecular grade를 사용하였다. BPA stock solution은 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, MO, USA)에 30 mg mL⁻¹로 제조하였으며, working solution은 DMSO에 0.12, 0.6, 3 mg mL⁻¹의 농도로 희석하여 사용하였다. DMSO의 최종 농도는 독성이 나타나지 않는 것으로 알려진 0.01%를 넘지 않도록 처리하였다(Barbosa *et al.* 2003). *D. celebensis*의 neonate (<24 h)를 3일간 배양하여 4일차 개체를 실험에 사용하였다. 항산화 유전자 발현 실험을 위해 200마리의 기수산 물벼룩을 200 mL의 BPA용액(0.12, 0.6, 3 mg L⁻¹)에 48시간 처리하였다. Superoxide dismutase (SOD)의 활성과 총 단백질 함량 측정을 위해 400마리의 기수산 물벼룩을 400 mL의 BPA용액(0.6, 3 mg L⁻¹)에 48시간 처리하였다. 실험은 모두 500 mL 비이커를 사용해 진행하였으며, 노출기간 동안 먹이는 공급하지 않았다. BPA의 최종 처리 농도는 예비실험을 통해 구한 24시간 LC₁₀ 값(5.715 mg L⁻¹)을 토대로 아치사 농도에서 결정하였다 (unpublished data).

3. RNA 추출 및 cDNA 합성

BAP에 노출 후 대조군 및 실험군의 sample은 Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Ambion, MA, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 총 RNA를 추출하였다. 추출한 총 RNA는 1% agarose gel electrophoresis와 MaestroNano Spectrophotometer (Maestrogen Inc., Hsinchu, Taiwan)을 이용하여 정량 및 순도 측정을 하였다. cDNA 합성은 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo Co., Osaka, Japan)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 진행하였다. 간단하게 총 RNA 500 ng을 이용하여, total volume은 20 µL로 하여 cDNA를 합성하였다.

4. Quantitative real time reverse transcription - polymerase chain reaction (qRT-PCR)

qRT-PCR은 KAPA SYBR FAST (Kapa Biosystems Inc., MA, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 진행하였다. *GST-kappa*, *GST-theta*, *GST-mu*, *Mn SOD*, *CuZn SOD*, *CAT*의 유전자의 증폭을 위해 사용된 primer set에 대한 정보는 Table 1에 나타내었다. qRT-PCR 반응을 위해 primer set (각 10 pmol), cDNA (500 ng), 그리고 premix (5 µL)을 포함하여 최종 용량을 10 µL로 제조하였다. PCR의 반응 조건은 95°C 3분, 95°C 10초, 54°C 30초, 72°C 30초를 40회 반복하였고, 특이적인 반응산물의 확인을 위하여 반응의 끝에 melting curve 반응을 65°C에서 95°C까지 5초당 0.5°C씩 올려 진행하였다. qRT PCR은 CFX96 real-time PCR system

Table 1. Primers used in this study

Gene	GenBank Accession No.	Primer sequences (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>CuZn-SOD</i>	MG948607	F: GCAACATTGTGGCCGACGAG R: GGCCACAACCGAATCAGA	90
<i>Mn-SOD</i>	MG948606	F: GAAGGTGAAGTACTGATGACTGC R: GTTTTGTATAGCCCAGCC	126
<i>GST-Mu</i>	MG948609	F: TGTTGGACATTCACAGCACTC R: GTAAGCAGCCACATTTTCCA	104
<i>GST-kappa</i>	MG948610	F: GGGGCTCCAACAATTGTGGT R: CCCTTCCACTGCGCATTTCAT	104
<i>GST-theta</i>	MG958608	F: GCTACCTGGCAGAGAAAGA R: AGAACGGAAGAACATGGCAC	134
<i>Catalase</i>	MG948612	F: ACCCCAACACTTCCCCAAC R: TCATCGGCAGAGTTGTAGCG	109
<i>18S</i>	AF144210.1	F: TGGAAGGATTGACAGATTGA R: AAATCGCTCCACCAACTAAG	81

(Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)을 사용해 진행하였으며, 상대적 유전자 활성의 비교는 Livak and Schmittgen의 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하여 계산하였다(Livak and Schmittgen 2001). Reference gene으로는 18S rRNA 유전자를 사용하였다. 실험은 3회 반복하였다.

5. SOD 활성 측정

BPA 노출 후 대조군 및 실험군의 sample을 모아 1X PBS 용액 200 μ L에서 homogenizer를 이용해 균질화 하였다. 균질화 한 용액은 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. SOD 활성은 SOD determination kit (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 진행되었다. 원리는 xanthine oxidase (XO)의 활성에 의해 생성된 $O_2^{\cdot-}$ 는 water-soluble tetrazolium salt (WST-1)에 작용하여 water soluble formazan 염료(WST-1 formazan)를 생산할 수 있다. SOD는 $O_2^{\cdot-}$ 를 제거해 WST-1 formazan의 생성을 저해시키며, 이를 통해 SOD의 활성을 측정할 수 있다. WST-1 formazan은 450 nm에서 흡광도에서 측정하였다. 실험은 3회 반복하였으며, microplate absorbance spectrophotometer (xMarkTM, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 진행하였다.

6. 총 단백질 함량 분석

BPA 노출 후 대조군 및 실험군의 sample을 모아 1X PBS

용액 200 μ L를 넣고 homogenizer를 이용해 균질화 하였다. 균질화 한 용액은 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 단백질 정량은 Bio-rad protein assay dye reagent concentrate (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하였다. 표준물질로 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였고 제조사의 프로토콜에 따라 96 well plate를 이용하여 진행하여 흡광도 595 nm에서 측정하였다.

7. 통계분석

모든 실험은 3반복으로 수행하였고, 데이터는 평균(mean) \pm 표준편차(S.D.)로 표시하였다. 통계분석은 PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)에서 Turkey의 방법을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다. 0.05보다 낮은 *p*값을 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

*Mn-SOD*와 *CuZn-SOD* 유전자의 발현양상은 0.6 mg L⁻¹ BPA 처리된 실험군에서 유전자 발현이 유의하게 감소하는 경향을 보였으나(*p* < 0.05), 가장 높은 농도인 3 mg L⁻¹의 BPA가 처리된 실험군에서는 크게 증가하는 양상을 보였다(Fig. 1A). *CAT* 유전자의 경우 0.6 mg L⁻¹과 3 mg L⁻¹ BPA 노출에서 높게 발현되었으며 발현 양은 0.6 mg L⁻¹에서 조금 더 높게 나타났다(*p* < 0.001) (Fig. 1A). 세 유전자

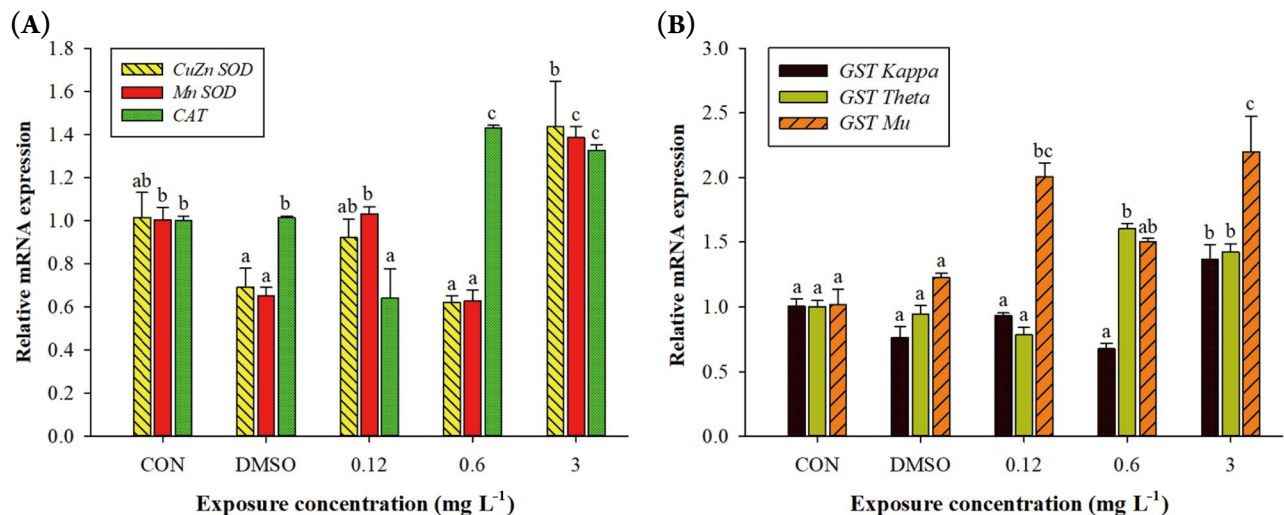


Fig. 1. Relative gene expression of (A) *Mn SOD*, *CuZn SOD*, and *Catalase (CAT)*, (B) *GST-kappa*, *GST-theta*, *GST-mu* after exposure to bisphenol A (0.12, 0.6, 3 mg L⁻¹) for 48 h in *Diaphanosoma celebensis*. Data are shown as means \pm S.D. of 3 replicates. Different lowercase letters indicate significant differences among concentrations, and were determined using a one-way ANOVA followed by Turkey's test.

모두 0.12 mg L^{-1} BPA에 대해서는 유의한 반응을 보이지는 않았다.

GST는 3개의 isoform (*GST-kappa*, *GST-theta*, *GST-mu*)의 유전자 발현을 조사하였다(Fig. 1B). 이들 중 *GST-mu*의 발현이 가장 낮은 농도인 0.12 mg L^{-1} BPA에서 2배 증가한 양상을 보였으며 중간 농도인 0.6 mg L^{-1} 에서 1.5배로 낮아지기는 했지만 고농도까지 발현이 높게 유지되는 양상을 보였다($p < 0.01$). 반면 *GST theta*는 0.6 mg L^{-1} , *GST kappa*는 3 mg L^{-1} 에서 각각 발현양이 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

BPA (0.6 와 3 mg L^{-1})에 48시간 노출된 *D. celebensis*에서 SOD 효소의 활성은 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보였다($p < 0.01$; Fig. 2). 이때 총 protein 함량은 대조군에 대비하여 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 결과를 나타내지는 않았다($p > 0.05$).

고 찰

BPA는 BP analogues 중 환경 내에서 가장 많이 검출되는데 국내에서 조사한 바에 따르면 해양 퇴적물 내 BPA 농도가 마산만에서는 $2.70 \sim 50.3 \text{ ng dw}^{-1}$ 였고(Khim et al. 1999), 시화호에서는 LOQ(limit of quantitation) $13,370 \text{ ng dw}^{-1}$ 로 나타났다(Liao et al. 2012). BPA는 생체 내 축적된다고 알려져 있으며(Chen et al. 2016), 담수 및 해양 생물에 대해 급성 독성, mutagenicity, 그리고 estrogenicity를 나타낸다고 보고된 바 있다(Alexander et al. 1988; Chen et al. 2002). 본 연구에서는 BPA 독성 기전 중 산화적 스트레스와 관련하여 기수산 물벼룩 *D. celebensis*의 항산화 시스템에 미치는 영향을 분자적 수준에서 조사하였다.

SOD는 대사 과정 중에 발생하는 활성산소종(ROS; Reactive Oxygen Species) 제거의 제1차 방어기전에 참여하는 효소이다. 효소 활성부위에 존재하는 금속의 종류에 따라 Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD 등 3가지 타입으로 구분되며, Cu/Zn-SOD는 세포질 내에 위치하는 반면, Mn-SOD는 주로 미토콘드리아에 위치한다(Miller 2018). CAT는 SOD 반응 이후 생성되는 H_2O_2 의 제거에 관여한다. 본 연구에서 BPA의 48시간 처리 결과 3 mg L^{-1} 의 농도에서 SODs와 CAT 유전자 활성이 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 1A). 유사한 결과로 예쁜꼬마선

충 *Caenorhabditis elegans*에 BPA를 0.05, 0.5, 5, 50, 500, 5000 μM 의 농도로 처리한 결과 모든 농도에서 SOD-1와 SOD-4 유전자의 발현이 대조군에 비해 증가하였으며, 유전자 발현의 증가율은 농도에 의존적이지 않은 양상으로 나타났다(García-Espiñeira et al. 2018). 또한 Kim et al. (2017)의 보고에 따르면 담수산 물벼룩 *D. magna*에 BPA를 0.2, 0.1, 5 mg L^{-1} 농도로 24시간 처리한 결과 0.2 mg L^{-1} 의 농도에서 Mn-SOD 유전자의 발현이 증가했으며, 5 mg L^{-1} 의 농도에서 Mn-SOD 및 catalase 유전자의 발현이 증가하였다. 같은 연구에서 48시간 처리 결과 0.2, 1 mg L^{-1} 의 농도에서 Cu/Zn SOD의 발현이 증가하였고, 0.2 mg L^{-1} 에서 Mn-SOD, 1 mg L^{-1} 의 농도에서 catalase 유전자의 발현의 증가가 관찰되었다. 이러한 결과들은 BPA가 생물체 내에 유입되어 활성산소를 생성함으로써 이들 항산화 유전자의 발현을 유도한 것이라고 볼 수 있다.

GST는 phase II 대사에 관련하는 효소로 화학물질의 제1상 대사의 결과로 나타나는 반응성 높은 대사산물을 친수성 물질로 변환시키는데 관여하며 생물체의 산화적 스트레스는 감소시키는데 중요한 역할을 한다(Regoli et al. 1997; Lee et al. 2008). 본 연구에서는 GST isoform 중 *GST-kappa*, *-theta*, *-mu*에 대해 BPA 노출에 따른 발현 양상을 조사하였다. Fig. 1B에서 보는 바와 같이 *GST-mu*의 발현이 다른 *GST-kappa*와 *GST-theta* 보다 모든 BPA 처리군에서 높게 발현되었다. GST는 지금까지 다양한 생물에서 24개의 isoform이 존재하며, 넓은 기질 특이성을 나타낸다고 알려져 있다(Blanchette et al. 2007). *GST-mu*의 존재는 shrimp (Contreras-Vergara et al. 2004), Pacific oyster (Boutet et al. 2004), Icelandic scallop (Myrnes and Nilsen 2007), rock shell *Thais clavigera* (Rhee et al. 2008), rotifer (Park et al. 2018a), copepod (Park et al. 2019)와 같은 해양 무척추 생물에서 보고된 바 있다. 최근 Kim et al. (2019)은 담수산 물벼룩 *D. magna*에 4-nonylphenol (4-NP)과 BPA를 처리한 결과 *GST-mu*를 비롯한 *GST-delta*, *-sigma*, *-zeta*의 유전자 발현이 증가하는 양상을 보고하였다. 저자들은 이러한 결과를 통해 GST가 4-NP와 BPA에 의해 유도되는 산화적 스트레스에 대한 방어 기전에 참여할 것이라 제시하였다. 카드뮴과 구리에 노출된 *D. celebensis*에서 *GST-mu*는 가장 높은 발현 양상을 보였다(Bae et al. 2018). 두 종류의 copepods에 구리를 노출시켰을 때 *GST-mu* 유전자 발현은 *T. japonicus*에서는 감소한 반면, *P. nana*에서는 증가

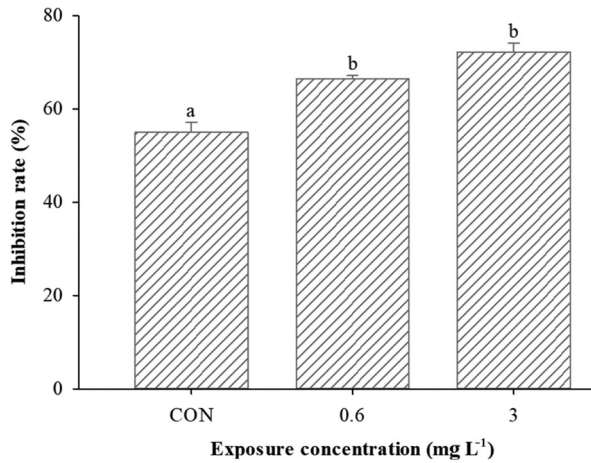


Fig. 2. Relative SOD enzyme activity of *D. celebensis* exposed to BPA (0.6 and 3 mg L⁻¹) for 48 h. Data are shown as means ± S.D. of 3 replicates. Control is solvent control (DMSO). Different lowercase letters indicate significant differences among concentrations, and were determined using a one-way ANOVA followed by Turkey's test.

하는 경향을 보였다 (Park *et al.* 2019). 이러한 결과는 GST isoform 별 유전자 발현의 차이는 기질, 종, 노출 조건 등에 영향을 받는다는 것을 의미한다.

해양무척추동물에서 rotifer와 copepods에서 GST isoforms 중 가장 많은 부분을 차지하는 것이 GST-sigma이다 (Park *et al.* 2018a, 2019). Rotifer *B. koreanus*에 BPA를 처리한 결과 6시간 처리 후 8개의 GST-sigma 유전자들의 발현이 모두 증가하였다 (Park *et al.* 2018b). 또한 BPA (0.2, 1, 5 mg L⁻¹)와 4-NP (0.6, 3, 15 mg L⁻¹)에 노출된 *D. magna*에서 GST delta, mu, sigma, 그리고 zeta 유전자의 발현 변화를 분석한 결과 대부분 발현이 증가하였으나, 특히 GST-sigma가 가장 높은 발현양을 나타내었다 (Kim *et al.* 2019). 이는 두 GST isoform이 BPA와 4-NP에 의한 산화적 스트레스에 대한 생물 방어에서 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 그러나 본 연구에서는 *D. celebensis*의 local transcriptome database로부터 GST-sigma나 -omega 유전자를 찾지 못했다. 따라서 향후 이들 isoform에 대한 추가 연구가 필요하다.

SOD 활성의 측정결과 농도 의존적으로 활성이 증가하는 모습이 관찰되었다 (Fig. 2). 증가한 SOD의 활성은 체내에서 활성산소종, 특히 O₂·⁻의 생성이 유도되었음을 의미하며, BPA에 의해 야기된 산화스트레스의 방어기전으로 SOD의 발현이 증가한 것으로 생각된다. 유사한 결과로 Peng *et al.* (2018)의 연구에서는 Asian paddle crab에

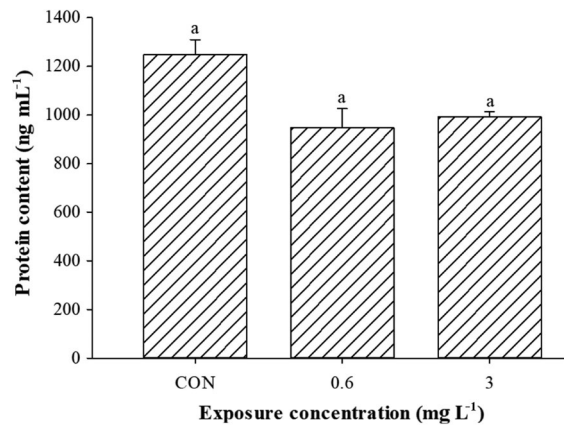


Fig. 3. Total protein contents of *D. celebensis* exposed to BPA (0.6 and 3 mg L⁻¹) for 48 h. Data are shown as means ± S.D. of 3 replicates. Control is solvent control (DMSO). Different lowercase letters indicate significant differences among concentrations, and were determined using a one-way ANOVA followed by Turkey's test.

0.125, 0.25, 0.5, 1 mg L⁻¹의 농도로 BPA를 처리하여 1, 3, 6, 9, 15일간 SOD의 활성 변화를 측정된 결과 모든 실험군의 haemolymph에서 SOD 활성이 증가되었으며, 간췌장 (hepatopancreas)에서는 0.125 mg L⁻¹ 농도의 BPA를 1일간 처리한 경우를 제외하고 모든 실험군에서 SOD의 활성이 대조군에 비해 증가한 것을 확인하였다. BPA에 대한 해양무척추동물의 SOD 효소 활성 변화와 관련된 연구는 거의 전무하다. 그 외 다른 생물 군에서 BPA 노출에 따른 SOD 활성 변화에 대한 연구 결과는 다음과 같다. 예를 들어, nematode *Caenorhabditis elegans*에 10, 25, 50 μM의 BPA를 처리한 결과 50 μM의 BPA 처리군에서 유의한 SOD의 활성이 증가했다 (Tan *et al.* 2015). 또한 담수산 진주 승어 *Alburnus tarichi*의 간세포를 배양하여 25, 50, 100 μM의 BPA를 처리한 결과 50과 100 μM의 농도에서 SOD의 활성이 대조군에 비해 증가한 것을 확인하였다 (Kaya and Kaptaner 2016). 또한 이러한 결과는 SOD가 BPA 노출에 의해 발생하는 활성산소 제거에 관여한다는 것을 의미한다.

활성산소종에 장기적으로 노출되면 생체 내 고분자물질인 단백질, 지질, 핵산 등을 산화시켜 생물의 성장과 생존에 영향을 미치게 된다. 특히 단백질은 에너지원으로 세포 보호 및 영양소로서 기능을 가지기 때문에 여러 독성물질에 대한 단백질 함량의 변화는 여러 생물에서 건강 상태를 평가하는 주요 지표로 사용되어 왔다 (Manoj

1999; Inyang *et al.* 2010; Edori *et al.* 2013). 본 연구결과에서는 BPA를 0.6과 3 mg L⁻¹로 48시간 처리한 *D. celebensis*에서 총 단백질 함량이 감소하는 경향이 관찰되었으나 통계적으로 유의성을 보이지는 않았다(Fig. 3). Squier (2001)에 따르면 활성산소종은 단백질을 산화시키고 단백질 회복 기작이 충분히 작용하지 않으면 순차적으로 단백질의 응집을 야기할 수 있다고 제시한 바 있다. 이와 유사하게 Geetharathan and Josthna (2016)에 의하면 알비노 쥐에 높은 함량(500 mg kg⁻¹)의 BPA를 처리했을 때 대조군에 비해 낮은 단백질 함량이 나타났다. 이와 관련하여 저자들은 BPA에 의해 발생하는 활성산소종에 의해 단백질이 손상 될 수 있고, 또는 산화적 스트레스에 의해 나타나는 다양한 대사 과정에 아미노산이 사용되면서 총 단백질 함량에 영향을 주었을 것으로 설명하고 있다. 한편 BPA에 의한 단백질 함량의 저하는 BPA 대사 산물인 bisphenol O-quinone은 DNA 결합을 통해 전사를 막고, 이는 결과적으로 단백질 합성을 저해시켜 세포 괴사를 초래할 수 있다고 알려져 있다(Atkinson and Roy 1995; Izzotti *et al.* 2009). 그러나 본 연구에서 BPA 노출에 의한 단백질 함량의 변화가 특별히 관찰되지 않은 이유로는 충분한 노출 용량 및 노출 기간과 관련이 있을 것으로 판단된다. 한편 SOD 단백질 활성이 높아진 결과에서처럼 방어기전에 관여하는 단백질의 증가 때문에 손상된 단백질의 양이 결과에 반영되지 않았을 수도 있을 것이다.

본 연구에서는 해양생물에 대한 BPA의 산화적 스트레스 영향에 대하여 알아보기 위하여, 기수산 물벼룩 *D. celebensis*에 BPA를 아치사농도로 48시간 처리한 후 항산화 유전자의 발현 변화와 SOD 활성, 그리고 총 단백질의 함량을 분석하였다. 유전자 발현의 경우 3 mg L⁻¹ BPA에 노출시켰을 때, 조사한 모든 항산화 유전자의 발현이 크게 증가하는 양상을 보였고, SOD 활성이 농도 의존적으로 증가되었으며, 총 단백질 함량은 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 이들 항산화 효소가 BPA에 의해 유도되는 산화적 스트레스 반응에 참여한다는 것을 제시한다. 특히 *GST-mu*의 경우 저농도인 0.12 mg L⁻¹ BPA 노출에서도 유의하게 증가하는 양상을 나타내어 BPA 노출에 따른 생물 반응에서 다른 *GST* isoform 보다 대사 및 산화적 스트레스 반응에서 중요한 역할을 담당하며, 분자 지표로서의 활용가능성이 높다고 판단된다.

적 요

Bisphenol A (BPA)는 대표적인 내분비계장애물질로 수서생물의 성장, 발생, 그리고 생식에 유해한 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 기수산 물벼룩 (*Diaphanosoma celebensis*)에서 48시간 BPA 노출 후 산화적 스트레스 반응을 조사하기 위하여 qRT-PCR을 이용한 항산화 유전자 발현 변화, 항산화 효소 활성, 총 단백질 함량 분석을 수행하였다. 3 mg L⁻¹의 BPA에 48시간 노출된 *D. celebensis*에서 모든 항산화 유전자(*Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD*, *CAT*)의 발현량이 유의하게 증가하였다. 특히 세 종류의 *GST* isoforms (*GST-kappa*, *GST-mu*, *GST-theta*)는 가장 낮은 농도인 0.12 mg L⁻¹ BPA에 48시간 노출된 실험군에서도 유의하게 증가하였으며, *GST-mu*의 발현량이 상대적으로 가장 높게 나타났다. SOD 활성은 BPA 농도에 의존적으로 유의하게 증가하였으며, 총 단백질 함량은 BPA 노출에 대해 감소되는 양상을 보였다. 이러한 결과는 BPA가 *D. celebensis*에서 산화적 스트레스를 유발하였고, 이 과정에서 이들 항산화 유전자가 생물방어기전으로 참여한다는 것을 의미한다. 본 연구는 BPA가 해양생물에 미치는 영향에 대한 분자적 기전을 이해하는 데 도움이 될 것이다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 과제 (NRF-2016R1A2B4009 939) 연구비 지원을 받아 수행하였다.

REFERENCES

- Alexander HC, DC Dill, LW Smith, PD Guiney and P Dorn. 1988. Bisphenol A: Acute aquatic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 7:19-26.
- Atkinson A and D Roy. 1995. In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol-A to DNA binding metabolites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210:424-433.
- Bae C, RO Kim, JS Kim and YM Lee. 2018. Acute toxicity and modulation of an antioxidant defence system in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis* exposed to cadmium and copper. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 10:186-193.
- Barbosa IA, RM Martins, ML Sá e Melo and AMVM Soares.

2003. Acute and chronic toxicity of dimethyl sulfoxide to *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 70:1264–1268.
- Barzilai A and K Yamamoto. 2004. DNA damage responses to oxidative stress. DNA Repair 3:1109–1115.
- Bindhumol V, KC Chitra and PP Mathur. 2003. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. Toxicology 188:117–124.
- Blanchette B, X Feng and BR Singh. 2007. Marine glutathione S-transferase. Mar. Biotechnol. 5:513–542.
- Boutet I, A Tanguy and D Moraga. 2004. Characterization and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. Mar. Biol. 146:53–64.
- Burridge E. 2003. Bisphenol A: product profile. Eur. Chem. News 17:14–20.
- Chen D, K Kannan, H Tan, Z Zheng, YL Feng, Y Wu and M Widelka. 2016. Bisphenol analogues other than BPA: Environmental occurrence, human exposure, and toxicity – A review. Environ. Sci. Technol. 50:5438–5453.
- Chen MY, M Ike and M Fujita. 2002. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. Environ. Toxicol. 17:80–86.
- Contreras-Vergara CA, C Harris-Valle, RR Sotelo-Mundo and G Yepiz-Plascencia. 2004. A mu-class glutathione S-transferase from the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and active-site structural modeling. J. Biochem. Mol. Toxicol. 18:245–252.
- Dutta M and G Paul. 2018. Bisphenol A dose- and time-dependently induces oxidative stress in rat liver mitochondria ex vivo. Asian J. Pharm. Clin. Res. 11:98.
- Edori OS, IB Nwoke and ES Edori. 2013. Sublethal effects of diesel on total protein levels and cholesterol in *Tympanotonus Fuscatus*. J. Appl. Sci. Environ. Manage. 17:21–26.
- Eid JI, SM Eissa and AA El-Ghor. 2015. Bisphenol A induces oxidative stress and DNA damage in hepatic tissue of female rat offspring. J. Basic Appl. Zool. 71:10–19.
- García-Espiñeira MC, LP Tejada-Benítez and J Olivero-Verbel. 2018. Toxic effects of bisphenol A, propyl paraben, and triclosan on *Caenorhabditis elegans*. Int. J. Environ. Res. Public Health 15:684.
- Geetharathan T and P Josthna. 2016. Effect of BPA on protein, lipid profile and immuno-histochemical changes in placenta and uterine tissues of albino rat. Int. J. Pharm. Clin. Res. 8:260–268.
- Hassan ZK, MA Elobeid, P Virk, SA Omer, M ElAmin, MH Daghestani and EM AIOlayan. 2012. Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. Oxid. Med. Cell. Longev. 2012:194829.
- Hejmej A, M Kotula-Balak and B Bilinsk. 2011. Antiandrogenic and estrogenic compounds: Effect on development and function of male reproductive system. Steroids – Clinical Aspect. doi:10.5772/28538
- Hwang GS. 2006. Embryotoxicity of bisphenol A in *Daphnia magna*. J. Environ. Toxicol. 21:81–86.
- Inyang IR, ER Daka and EN Ogamba. 2010. Effect of sub-lethal concentrations of diazinon on total protein and transaminase activities in *Clarias gariepinus*. Curr. Res. J. Biol. Sci. 2:390–395.
- Izzotti A, S Kanitz, F D'Agostini, A Camoirano and S De Flora. 2009. Formation of adducts by bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA in vitro and in liver and mammary tissue of mice. Mutat. Res. 679:28–32.
- Kabuto H, S Hasuike, N Minagawa and T Shishibori. 2003. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. Environ. Res. 93:31–35.
- Kang JH, D Aasi and Y Katayama. 2007. Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. Crit. Rev. Toxicol. 37:607–625.
- Kaya Ö and B Kaptaner. 2016. Antioxidant defense system parameters in isolated fish hepatocytes exposed to bisphenol A - Effect of vitamin C. Acta Biol. Hung. 67:225–235.
- Ke C, X Liu, H Zuo, J Zhao, X Yang and J Yuan. 2013. The oxidative damage of Bisphenol A on the organs of the mice. Health 5:1190–1194.
- Khim JS, K Kannan, DL Villeneuve, CH Koh and JP Giesy. 1999. Characterization and distribution of trace organic contaminants in sediment from Masan Bay, Korea. 1. Instrumental analysis. Environ. Sci. Technol. 33:4199–4205.
- Kim BM, S Kang, RO Kim, JH Jung, KW Lee, JS Rhee and YM Lee. 2018. De novo transcriptome assembly of brackish water flea *Diaphanosoma celebensis* based on short-term cadmium and benzo[a]pyrene exposure experiments. Hereditas 155:36.
- Kim H, BR Yim, CH Bae and YM Lee. 2017. Acute toxicity and antioxidant responses in the water flea *Daphnia magna* to xenobiotics (cadmium, lead, mercury, bisphenol A, and 4-nonylphenol). Toxicol. Environ. Health Sci. 9:41–49.
- Kim H, JS Kim, PJ Kim, EJ Won and YM Lee. 2018. Response of antioxidant enzymes to Cd and Pb exposure in water flea *Daphnia magna*: Differential metal and age—Specific patterns. Comp. Biochem. Physiol. C 209:28–36.
- Kim RO, H Kim and YM Lee. 2019. Evaluation of 4-nonylphenol and bisphenol A toxicity using multiple molecular biomarkers in the water flea *Daphnia magna*. Ecotoxicology 28:167–174.
- Kitamura S, T Suzuki, S Sanoh, R Kohta, N Jinno, K Sugihara, S Yoshihara, N Fujimoto, H Watanabe and S Ohta. 2005. Com-

- parative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol. Sci.* 84:249–259.
- Lee JS and S Raisuddin. 2008. Modulation of expression of oxidative stress genes of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* after exposure to environmental chemicals. pp. 95–105. In *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry-Biological Responses to Chemical Pollutants* (Murakami *et al.* eds.). TERRAPUB, Tokyo.
- Liao C, F Liu, HB Moon, NYamashita, SYun and K Kannan. 2012. Bisphenol analogues in sediments from industrialized areas in the United States, Japan, and Korea: spatial and temporal distributions. *Environ. Sci. Technol.* 46:11558–11565.
- Livak KJ and TD Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408.
- Mandich A, S Bottero, E Benfenati, A Cevasco, C Erratico, S Maggioni, A Massari, F Pedemonte and L Viganò. 2007. *In vivo* exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153:15–24.
- Manoj K. 1999. Mercury, copper and cadmium induced changes in the total protein levels in muscle tissue of an edible estuarine fish *Boleophthalmus dussumieri* (Cuv). *J. Environ. Biol.* 20:231–234.
- Marcial HS and A Hagiwara. 2007. Multigenerational effects of 17β-estradiol and nonylphenol on euryhaline cladoceran *Daphanosoma celebensis*. *Fish. Sci.* 73:324–330.
- Miller AF. 2012. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.* 586:585–595.
- Mu X, CV Rider, GS Hwang, H Hoy and GA LeBlanc. 2005. Covert signal disruption: anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 146–152.
- Myrnes B and IW Nilsen. 2007. Glutathione S-transferase from the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*): isolation and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 144C:403–407.
- Nomura Y, N Mitsui, UK Bhawal, M Sawajiri, O Tooi, T Takahashi and M Okazaki. 2006. Estrogenic activity of phthalate esters by *In Vitro* VTG assay using primary-cultured *Xenopus* Hepatocytes. *Dent. Mater. J.* 25:533–537.
- Nunomura A, RJ Castellani, X Zhu, PI Moreira, G Perry and MA Smith. 2006. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65:631–641.
- Oehlmann J, U Schulte-Oehlmann, M Tillmann and B Markert. 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology* 9:383–397.
- Oehlmann J, U Schulte-Oehlmann, W Kloas, O Jagnytsch, I Lutz, KO Kusk, L Wollenberger, EM Santos, GC Paull, KJ Van Look and CR Tyler. 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 364:2047–2062.
- Park JC, DH Kim, MC Lee, J Han, HJ Kim, A Hagiwara, UK Hwang, HG Park and JS Lee. 2018a. Genome-wide identification of the entire 90 glutathione S-transferase (GST) subfamily genes in four rotifer *Brachionus* species and transcriptional modulation in response to endocrine disrupting chemicals. *Comp. Biochem. Physiol. D* 28:183–195.
- Park JC, MC Lee, DS Yoon, J Han, M Kim, UK Hwang, JH Jung and JS Lee. 2018b. Effects of bisphenol A and its analogs bisphenol F and S on life parameters, antioxidant system, and response of defenseome in the marine rotifer *Brachionus koreanus*. *Aquat. Toxicol.* 199:21–29.
- Park JC, MC Lee, DS Yoon, J Han, HG Park, UK Hwang and JS Lee. 2019. Genome-wide identification and expression of the entire 52 glutathione S-transferase (GST) subfamily genes in the Cu²⁺-exposed marine copepods *Tigriopus japonicus* and *Paracyclopina nana*. *Aquat. Toxicol.* 209:56–69.
- Peng YQ, MJ Wang, HG Chen, JH Chen, H Gao and HH Huang. 2018. Immunological responses in haemolymph and histologic changes in the hepatopancreas of *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards, 1861) (Decapoda: Brachyura: Portunidae) exposed to bisphenol A. *J. Crust. Biol.* 38:489–496.
- Pinto S, VN Sato, EA De-Souza, RC Ferraz, H Camara, APF Pinca, DR Mazzotti, MT Lovci, G Tonon, CM Lopes-Ramos, RB Parmigiani, M Wurtele, KB Massier and MA Mori. 2018. Enoxacin extends lifespan of *C. elegans* by inhibiting *miR-34-5p* and promoting mitohormesis. *Redox Biol.* 18:84–92.
- Regoli F, GB Principato, E Bertoli, M Nigro and E Orlando. 1997. Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. *Polar Biol.* 17:251–258.
- Rhee JS, S Raisuddin, DS Hwang, T Horiguchi, HS Cho and JS Lee. 2008. A Mu-class glutathione S-transferase (GSTM) from the rock shell *Thais clavigera*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 148:195–203.
- Sajiki J and J Yonekubo. 2003. Leaching of bisphenol A (BPA) to seawater from polycarbonate plastic and its degradation by reactive oxygen species. *Chemosphere* 51:55–62.
- Squier TC. 2001. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp. Gerontol.* 36:1539–1550.
- Staples CA, PB Dome, GM Klecka, ST Oblock and LR Harris. 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36:2149–2173.
- Strange RC, MA Spiteri, S Ramachandran and AA Fryer. 2001. Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mutat. Res.* 482:21–26.
- Tan L, S Wang, Y Wang, M He and D Liu. 2015. Bisphenol A

- exposure accelerated the aging process in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Lett.* 235:75–83.
- Valavanidis A, T Vlahogianni, M Dassenakis and M Scoullou. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64:178–189.
- Yokota H, H Iwano, M Endo, T Kobayashi, H Inoue, S Ikushiro and A Yuasa. 1999. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem. J.* 340:405–409.