

2-Ethylhexyl Diphenyl Phosphate가 제브라피쉬 치어의 발달과 성장호르몬 내분비계에 미치는 영향

박채운¹ , 이다영² , 지경희^{1,2*} ¹용인대학교 일반대학원 환경보건학과, ²용인대학교 산업환경보건학과

Effects of 2-Ethylhexyl Diphenyl Phosphate on the Development and Growth Hormone Endocrine System in Zebrafish Larvae

Chaeun Park¹, Da Yeong Lee², and Kyunghee Ji^{1,2*}¹Department of Environmental Health, Graduate School, Yongin University, ²Department of Occupational and Environmental Health, Yongin University

ABSTRACT

Background: 2-Ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPP) is widely used as a flame-retardant plasticizer in the production of polyvinyl chloride, adhesives, and food packaging. This chemical has been frequently detected in water, sediment, and indoor environments, and its lipophilicity raises concerns about bioaccumulation.

Objectives: In this study, the effects of EHDPP on the development, behavioral changes, and growth hormone (GH) endocrine system of zebrafish larvae were investigated.

Methods: Fertilized embryos were exposed to various concentrations (control, solvent control, 0.07, 0.7, 7, 70, and 700 µg/L) of EHDPP for 96 h. Developmental toxicity endpoints were observed daily. Behavioral changes under light-dark-light conditions and changes in hormones and genes related to GH/insulin-like growth factors (IGFs) axis were determined.

Results: Significant decreases in survival, body length and moving distance were observed in zebrafish larvae exposed to 70 and 700 µg/L EHDPP. The concentrations of GH and IGF-1 were significantly decreased in zebrafish larvae exposed to 70 and 700 µg/L EHDPP. This change was well supported by changes in the transcription of genes involved in GH, IGF, IGF receptors, and IGF binding proteins.

Conclusions: Our observations showed that exposure to 70 and 700 µg/L EHDPP could disrupt the feedback circuits of the GH/IGFs axis, ultimately leading to developmental toxicity, hypoactivity, and mortality.

Key words: Behavior, flame retardants, growth hormone, insulin-like growth factor, zebrafish

Received May 18, 2024

Revised June 7, 2024

Accepted June 12, 2024

Highlights:

- 2-Ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPP) significantly decreased body length and weight in larvae.
- EHDPP reduced the concentrations of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF)-1.
- GH and IGF-1 were well supported by changes in transcription of genes involved in GH/IGFs axis.

*Corresponding author:

Department of Occupational and Environmental Health, Yongin University, 134 Yongindaehak-ro, Cheoin-gu, Yongin 17092, Republic of Korea
Tel: +82-31-8020-2747
Fax: +82-31-8020-2886
E-mail: kyungheeji@yongin.ac.kr

I. 서 론

난연제(flame retardants)는 연료나 산소의 가용성(availability)을 줄이거나 불꽃의 온도를 낮추어 연소를 방해하는 화학 물질의 한 종류이다.¹⁾ 일반적으로 난연제는 질소 기반 난연제, 무기 난연제, 브롬계 또는 염소계 난연제, 유기인계 난연제로

구분할 수 있다.¹⁾ 폴리브롬화 다이페닐 에테르(polybrominated diphenyl ethers)와 같은 브롬계 난연제의 발달신경독성이 알려지면서, 유기인계 난연제가 그 대체제로 사용되기 시작했다.²⁾ 유기인계 난연제는 아릴(aryl)-, 알킬(alkyl)-, 할로젠화(halogenated) 유기인계 난연제로 분류될 수 있다.³⁾ 2-에틸헥실 디페닐 포스페이트(2-ethylhexyl diphenyl phosphate, EHDPP)는 대표

적인 아릴 유기인계 난연제 중 하나로, 물환경 중에서 다빈도, 고농도로 검출되고 있으나 독성자료가 부족한 물질이기에 본 연구의 대상물질로 선정하였다.

EHDPP는 폴리염화비닐(polyvinyl chloride) 플라스틱의 제조나 접착제, 페인트, 식품 포장재 등에 사용되고 있다.¹⁾ 현재까지 국내에서 생산량은 보고된 바 없으나, 호주에서는 연간 100톤 미만으로 생산되고 있다.⁴⁾ EHDPP는 지표수,⁵⁻¹⁴⁾ 수돗물,¹⁵⁾ 퇴적물,¹³⁾ 토양¹⁶⁾ 등에서 다빈도로 검출되고 있다(Table 1). 예를 들어, 한국의 시화호에서는 최대 94.8 ng/L,⁵⁾ 중국의 태호(Taihu lake)에서는 최대 12 ng/L,⁶⁾ 중국의 송화강(Songhua river)에서는 최대 94 ng/L,¹⁰⁾ 스페인의 나론강(Nalón river), 아르가강(Arga river), 베소스강(Besòs river)에서는 최대 46 ng/L,¹³⁾ 우간다의 빅토리아호(Victoria lake)에서는 최대 730 ng/L¹⁴⁾의 농도로 검출되었다. 미국의 수돗물에서는 최대 16.7 ng/L,¹⁵⁾ 베트남의 토양에서는 최대 69 ng/g¹⁶⁾ 검출되었음이 보고된 바 있

다.

EHDPP의 사용과 환경 중 검출 보고가 급증하면서 독성에 대한 우려가 커지고 있지만, 이러한 독성 연구는 주로 생식 내분비계에 초점이 맞추어져 진행되었다. 예를 들어, EHDPP와 수산화 대사산물은 항안드로젠성을 지니며, 수컷 일본산 송사리의 생식을 저해함이 보고되었다.¹⁷⁾ 어미세대에서 EHDPP에 노출된 자손세대의 일본산 송사리에서는 레티노산 수용체가 차단되어 발달 독성이 유발되었다.¹⁸⁾ EHDPP는 암컷 제브라피쉬의 산란율을 감소시키고 배아의 발달을 억제하였으며,¹⁹⁾ 초기 제브라피쉬 발달 단계의 당 지질 대사과 심장 발달에도 영향을 미쳤다.¹⁾

일반적으로 치어의 체장은 어류배아 급성독성시험(fish embryo acute toxicity test)의 필수적인 평가 지표로 사용된다.²⁰⁾ 어류의 체세포 성장은 주로 성장호르몬(growth hormone, GH)과 인슐린유사성장인자(insulin-like growth factor, IGF) 축의

Table 1. Concentration in the water, sediment, and soil environment of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate

Media or biota	Location	N	DF (%)	Concentration mean (min-max) unit	Sampling time	Ref.
Surface water	Shihwa Lake, Korea (creeks)	13	65	9.87 (1.91~59.2) ng/L	May, 2015	5)
	Shihwa Lake, Korea (inshore)	16	65	1.25 (<LOQ~14.0) ng/L	May, 2015	5)
	Shihwa Lake, Korea (offshore)	7	65	17.3 (<LOQ~94.8) ng/L	May, 2015	5)
	Shihwa Lake, Korea (near WWTP)	7	65	2.14 (<LOQ~14.1) ng/L	May, 2015	5)
	Taihu Lake, China	25	100	2.80 (0.88~12.0) ng/L	Nov, 2016	6)
	Luoma Lake, China	14	88	1.86 (<LOD~3.39) ng/L	Nov, 2016	7)
	Poyang Lake, China	NA	NA	NA (<LOD~3.85) ng/L	Sep, 2019	8)
	Northern Lake, China	NA	NA	NA (<LOD~0.65) ng/L	Sep, 2019	8)
	Southern Lake, China	NA	NA	NA (<LOD~0.49) ng/L	Sep, 2019	8)
	Yangtze River, China	NA	NA	NA (<LOD~0.45) ng/L	Sep, 2019	8)
	Xiushui River, China	NA	NA	NA (<LOD~0.95) ng/L	Sep, 2019	8)
	Ganjiang River, China	NA	NA	NA (<LOD~9.31) ng/L	Sep, 2019	8)
	Fuhe River, China	NA	NA	NA (<LOD~0.49) ng/L	Sep, 2019	8)
	Roahe River, China	NA	NA	NA (<LOD~0.51) ng/L	Sep, 2019	8)
	Taihu Lake, China	9	44	NA (<LOQ~0.252) ng/L	Jun, 2016	9)
	Songhua River, China	17	100	NA (4.30~94.0) ng/L	NA	10)
	Haihe River, China	28	NA	0.88 (<LOD~13.88) ng/L	Nov, 2017	11)
	Yangtze River, China (mainstream)	16	87	11.9 (<LOD~22.1) ng/L	Jan, 2019	12)
	Yangtze River, China (inflowing rivers)	88	84	11.3 (<LOD~29.6) ng/L	Jan, 2019	12)
	Tap water	Nalón, Arga, and Besòs River, Spain	32	31	NA (<LOD~46) ng/L	2012 (spring)
Victoria Lake, Uganda		72	100	31* (7.7~730) ng/L	NA	14)
Tap water	New York, USA	58	3	0.29 (<LOQ~16.7) ng/L	Jun, 2016~ Sep, 2017	15)
Sediment	Nalón, Arga, and Besòs River, Spain	21	57	NA (<LOD~63) ng/g	2012 (spring)	13)
Soil	Open burning site, Vietnam	3	33	69 (<LOQ~69) ng/g	Jan, 2012	16)
	E-waste recycling workshop, Vitenam	10	70	24 (<LOQ~67) ng/g	Jan, 2012	16)

*Median concentration.

DF: detection frequency, LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantification, lw: lipid weight, NA: not available, Ref.: reference.

다양한 호르몬과 유전자의 발현으로 조절된다.²¹⁾ 시상하부의 자극을 받아 뇌하수체에서 합성 및 방출되는 GH는 주로 어류의 신체 성장과 생리학적 대사에 관여한다.²²⁾ GH는 어류 간에 있는 상응하는 수용체와 결합해 IGF-1의 생성을 촉진할 수 있다.²³⁾ 몸 전체에 분포된 IGF-1은 IGF 수용체(IGF receptor, IGF-R)와 IGF 결합 단백질(IGF binding protein, IGFBP)의 생성을 조절하여 어류의 신체 성장을 조절한다.²⁴⁾ 몇몇 연구들에서는 GH/IGFs 축이 유기인계 난연제의 표적이 되어 성장 및 발달 지연에 영향을 미칠 수 있다고 보고하였으나,^{25,26)} EHDPP가 GH/IGFs 축에 미치는 영향에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 제브라피쉬 배아/치어를 활용하여 EHDPP가 생존, 발달, 행동, GH/IGF 축에 미치는 영향을 살펴보았다. 제브라피쉬는 발달 과정의 기본이 되는 호르몬과 유전자 수준의 변화를 이해하는 데 이상적인 시험동물로, 내분비계 교란물질의 독성기전을 평가하는 데 활용되어 왔다.²⁷⁾ OECD 시험지침 236²⁰⁾에 따라 96시간 제브라피쉬 배아/치어에 노출하여 기형, 성장 지연, 급성 치사 영향을 관찰하였다. 또한 빛/어둠 조건 변화에 따른 행동 영향과 호르몬(GH, IGF-1) 및 GH/IGFs 축과 관련된 19개 유전자의 변화를 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질과 제브라피쉬 배양

시험물질인 EHDPP (CAS no. 1241-94-7; 순도 >99%)의 물리화학적 특성을 Table 2에 제시하였다. EHDPP와 용매로 사용한 디메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)는 Merck Korea (Seoul, Korea)에서 구입하였다. DMSO에 시험물질을 녹여 저장용액(stock solution)을 제조하였고, 시험용액(test solution)은 배양수와 혼합하여 제조하였다.

제브라피쉬(AB strain)는 일정한 온도(26±1°C)와 광주기(14시간 명: 10시간 암)가 유지되는 항온실 내에 설치된 유수식 ZebTec 시스템(Tecniplast, Italy)에서 배양하였다. 매일

Table 2. Physicochemical properties of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate

Characteristics	Contents
CAS number	1241-94-7
Physical form	Liquid
Molecular formula	C20H27O4P
Molecular weight (g/mol)	362.4
Melting point (°C)	-60
Boiling point (°C)	375
Water solubility (mg/L)	0.050 (at 23.5°C)
LogKow	5.87 (at 25°C)

두 차례 갓 깨어난 새우(Primo aquaculture, Deception Bay, Queensland)와 GEMMA Micro (Skretting, Tooele, UT, USA)를 먹이로 공급하였다.

2. 제브라피쉬 노출

경제협력개발기구(Organization for Economic Co-operation and Development) 시험지침 236²⁰⁾을 일부 수정하여 건강할 수 정란을 24-well 플레이트(ThermoFisher Scientific)의 각 well에 하나씩 배치하였다. 노출농도는 선행 연구에서 보고된 물환경 중 검출 농도(지표수에서 최대 94.8 ng/L 검출)⁵⁾와 사전 연구(preliminary test)를 통해 선정하였다. 배아를 대조군, 용매 대조군(DMSO 0.01%), EHDPP 5개 농도군(0.07, 0.7, 7, 70, 700 µg/L)에 96시간 노출하였다. 각 농도군 당 20마리의 반복군(대조군은 24마리)을 두었으며, 3번의 반복 실험을 통해 총 60마리의 반복군(대조군은 72마리의 반복군)을 확보하였다. 매일 배아의 응집 여부, 부화 여부, 기형발생 여부를 확인하였고, 죽은 개체는 확인하는 즉시 제거하였다. 노출이 종료된 후에는 현미경이 부착된 사진기로 사진을 찍은 후 IMT iSolution Lite software (IMT Inc., Burnaby, BC, Canada)를 이용하여 체장을 측정하였다. 각 반복군 별로 15마리씩의 치어를 1.5 mL 튜브(Eppendorf)에 수집하였고, 습중량을 측정한 뒤 유전자 발현을 측정하기 전까지 -80°C 냉동고에 보관하였다.

GH와 IGF-1을 측정하기 위한 시료는 추가적인 노출 세트를 만들어 수집하였다. 각 농도군 당 750마리(각 반복군 당 250마리씩 3개의 반복군)를 동일한 농도(대조군, 용매 대조군, EHDPP 0.07, 0.7, 7, 70, 700 µg/L)에 96시간 노출하였고, GH 분석용으로 각 농도군 당 540마리(각 반복군 당 180마리씩 3개의 반복군), IGF-1 분석용으로 각 농도군 당 60마리(각 반복군 당 20마리씩 3개의 반복군)를 수집하였다.

3. 빛 조건에 따른 행동 변화 시험

Daniovision 및 EthoVision XT 소프트웨어(Noldus, Wageningen, Netherlands)를 사용하여 빛 조건과 어둠 조건을 급격히 변화시키며 제브라피쉬 치어의 행동 변화를 측정했다. 각 농도군 당 12마리의 반복군을 두었으며, 3번의 반복 실험을 통해 총 36마리의 반복군을 확보하였다. 대조군, 용매대조군, EHDPP 농도군(0.07, 0.7, 7, 70, 700 µg/L)에 96시간 노출한 제브라피쉬 치어를 유리로 자체 제작한 96-well 플레이트의 각 well에 한 마리씩 넣고 실험조건에서 1시간 정도 두었다. 10분간 어둠 조건에서 사전 적응시킨 후, 20분간 빛 조건-20분간 어둠 조건-20분간 빛 조건을 변화하면서 총 이동거리와 속도를 측정하였다.

4. 성장호르몬과 인슐린유사성장인자 측정

GH 및 IGF-1 분석용 시료를 해동한 뒤 PBS 250 µL를 넣어

Table 3. Sequences of primers for the gene measurements

Function	Name	Accession no.	Full name	Sequences
Reference	<i>actb1</i>	NM_131031	<i>beta actin</i>	F: TGC TGT TTT CCC CTC CAT TG R: TCC CAT GCC AAC CAT CAC T
	<i>rpl8</i>	NM_200713	<i>ribosomal protein L8</i>	F: TTG TTG GTG TTG TTG CTG GT R: GGA TGC TCA ACA GGG TTC AT
Growth hormone	<i>gh1</i>	NM_001020492	<i>growth hormone 1</i>	F: TCG TTC TGC AAC TCT GAC TCC R: CCG ATG GTC AGG CTG TTT GA
	<i>ghrh</i>	NM_001080092	<i>growth hormone releasing hormone</i>	F: TGG AAG ACA TGC TGA TGC CA R: TCC ACA TCT TGC TTG TAG GTG T
	<i>ghra</i>	NM_001083578	<i>growth hormone receptor a</i>	F: GGC CGA AAA TTC CTT ACT GTT R: GCT GGC GTT GCT GAT TGT
	<i>ghrb</i>	NM_001111081	<i>growth hormone receptor b</i>	F: GCT GCG CTC TGT TGA TAA TGT R: GGC GGA GGG AGG TGG AT
Insulin-like growth factor	<i>igf1a</i>	NM_131825	<i>insulin-like growth factor 1</i>	F: AGT GTA CCA TGC GCT GTC TC R: AAA AGC CCC TGT CTC CAC AC
	<i>igf1ra</i>	NM_152968	<i>insulin-like growth factor receptor 1a</i>	F: GCC CGT GGA GAA GTC TGT GG R: GTG TGC GAA AGT GTT CCT GGT T
	<i>igf1rb</i>	NM_152969	<i>insulin-like growth factor receptor 1b</i>	F: ATC CTC CCG GCC TTA CTG TT R: CCT GTC ATT GTT TCG GTT CTT GT
	<i>igf2a</i>	NM_131433	<i>insulin-like growth factor 2a</i>	F: ACA GGC TCT TCA CAA GGA CAC R: TTC GGG CCA ACA GAA TGG AT
	<i>igf2b</i>	NM_001001815	<i>insulin-like growth factor 2b</i>	F: AAC CTG CCA AGT CAG AGA GGG R: GGA CCT CCT GTT TTA ATG CGG
	<i>Igf2r</i>	NM_173283	<i>insulin-like growth factor 2r</i>	F: TCA CGG ACA GCT CCA TTT CC R: TTG CTG GAG GAG CCG ATT TT
	<i>igfbp1a</i>	NM_173283	<i>insulin-like growth factor binding protein 1a</i>	F: AAC TCC AGA CAG CCC TTG AC R: TGT TTG TCG CAG TTT GGC AG
	<i>igfbp1b</i>	NM_001098257	<i>insulin-like growth factor binding protein 1b</i>	F: GTC ACA ACT CAA CGC CAT CC R: GAA CTT CTC TCC CAA CGC CT
	<i>igfbp2a</i>	NM_131458	<i>insulin-like growth factor binding protein 2a</i>	F: TAC CGC TCG CTC AGA AAT GG R: ACA ATC TCT CCG CAC GTC TC
	<i>igfbp2b</i>	NM_001126464	<i>insulin-like growth factor binding protein 2b</i>	F: CGG ACG ATG CGA GAA CAA AG R: GAC CGC GTG CCA TTT ACT TC
	<i>igfbp3</i>	NM_205751	<i>insulin-like growth factor binding protein 3</i>	F: GTG GGT CGT CTC ACC CTT TG R: TGA GAC AGC GAC ACA AGT CC
	<i>igfbp5a</i>	NM_001098754	<i>insulin-like growth factor binding protein 5a</i>	F: CCA TGC GAA AGG ATC GGA AG R: TCT TCG GCA TGG ACC AAT GT
	<i>igfbp5b</i>	NM_001126463	<i>insulin-like growth factor binding protein 5b</i>	F: CAG GGG AGT GTG TAC GAA CG R: AGT CGT GTC TGG CTT CAC TG
	<i>igfbp6a</i>	NM_001161401	<i>insulin-like growth factor binding protein 6a</i>	F: TTC AGG AGG AAG CAG TGT CG R: CAT CGC TTC TCC TAC GGG AC
	<i>igfbp6b</i>	NM_001161402	<i>insulin-like growth factor binding protein 6b</i>	F: GGG GTC TCG AAC TCA CCA TT R: CTT TGA GGA CCG ACA CTG CT

F: forward, R: reverse.

균질화하였고, 4°C에서 5,000×g으로 5분간 원심분리하여 상등액을 수집하였다. 효소결합면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 키트의 매뉴얼에 따라 GH (Cat no. E12121Fh, Cusabio, Houston, TX, USA) 및 IGF-1 (Cat no. E12122Fh, Cusabio)을 분석하였다. GH와 IGF-1은 Quick Start™ Bradford Protein Assay 키트(BIORAD, Hercules, CA, USA)로 측정된 단백질 수준으로 보정하였다.

5. GH/IGF 축 유전자 발현 측정

수집한 15마리씩의 제브라피쉬 치어를 균질화한 후 GH/IGFs 축에 관련된 19개 유전자의 발현을 측정하였다. NucleoSpin RNA Mini 키트(Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Duerren, Germany)를 이용하여 메신저 RNA (messenger RNA, mRNA)를 추출하였고, Synergy H1 multimode reader (BioTek Instrument Korea Ltd)를 이용하여 mRNA의 질과 양을 측정하였다. 260/280 비가 1.8 이상인 시료를 선택하여 PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis 키트(Takara Korea Biomedical Inc., Seoul, Korea)로 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA)를 합성하였다.

정량적 실시간 중합효소연쇄반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)을 이용하여 기준 유전자 및

GH/IGFs 축 유전자의 발현을 측정하였다. 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머의 서열은 Table 3에 제시하였다. 96-well qPCR 플레이트에 희석한 cDNA, 프라이머, SYBR Green real-time PCR master mix (Thermo Fisher Scientific Korea, Seoul, Korea)를 넣고, ABI 7500 Fast RT-PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용해 증폭하였다. qPCR은 50°C에서 2분 1 cycle, 95°C에서 10분 1 cycle을 구동한 뒤, 95°C 15초 및 60°C 15초의 조건에서 40 cycles을 구동하였다. 기준 유전자의 역치 주기(threshold cycle)를 기준으로 대상 유전자의 발현 변화를 정규화(normalization)한 후, 대조군과 비교하여 농도군의 발현 변화를 상대 정량하였다.

6. 통계분석

SPSS 프로그램 version 20 (IBM SPSS Korea Inc., Korea)을 이용하여 통계분석의 유의성을 판단하였다. 대조군과 노출군 간의 차이를 조사하기 위해 일원분산분석(one-way analysis of variance)을 수행하였으며, 사후검정으로는 Dunnett's t-test를 활용하였다. 일원분산분석을 수행하기 전에 정규성과 동질성을 확인하기 위해 Kolmogorov-Smirnov 검정과 Levene 검정을 사용하였다. 통계적 유의성의 기준으로 $p < 0.05$ 를 사용하였으며, 제시된 모든 자료는 평균±표준편차로 표현하였다.

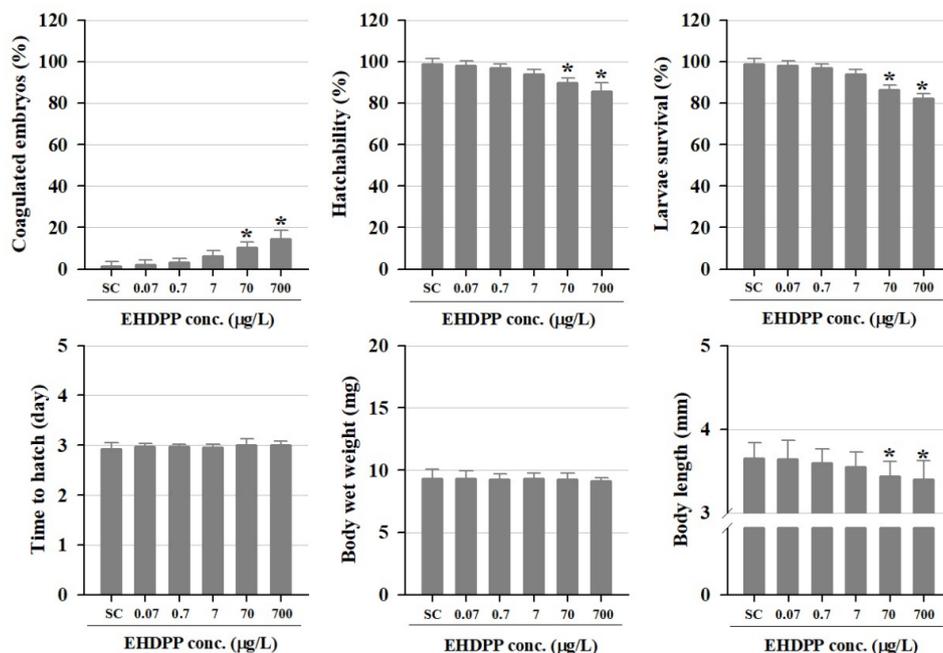


Fig. 1. Effects of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate on embryo coagulation, hatchability, larvae survival, hatching time, body wet weight, and body length. The values represent mean±standard deviation. A total of 60 larvae (20 larvae with triplicates, treatment and solvent control groups) or 72 larvae (24 larvae with triplicates, control group) was used for assessing coagulated embryo, hatchability, larvae survival, and time to hatch. A total of 45 larvae (15 larvae with triplicates) was used for investigating body length. Body wet weight was measured by pooling 15 larvae, and the values of three replicate groups were demonstrated. The asterisk (*) indicates significant difference between solvent control and exposure groups ($p < 0.05$).

III. 결 과

1. 제브라피쉬 배아/치어의 발달독성

EHDPP에 노출된 제브라피쉬의 배아 응고, 부화율, 부화 시간, 치어의 생존율, 체장, 습중량의 변화를 Fig. 1에 제시하였다. EHDPP 70, 700 µg/L에 노출된 제브라피쉬 배아의 응고율은 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 부화율, 치어의 생존율과 체장은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 부화시간과 습중량은 시험농도 범위 내에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

2. GH/IGFs 축 호르몬 및 유전자 발현 변화

EHDPP에 노출된 제브라피쉬의 GH, IGF-1, GH/IGFs 축 19개 유전자들의 발현 변화를 Fig. 2에 제시하였다. EHDPP 70, 700 µg/L에 노출된 제브라피쉬 치어에서 GH, IGF-1이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. EHDPP에 노출된 제브라피쉬 치어에서 *gh1*, *ghra*, *ghrb*, *igf1a*, *igf2a*, *igf1ra*, *igf1rb*, *igfbp1a*, *igfbp1b*, *igfbp2b*, *igfbp3*, *igfbp5b*, *igfbp6a*, *igfbp6b* 유전자

는 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며, *ghrh*, *igf2b*, *igf2r*, *igfbp2a* 유전자는 대조군에 비해 유의하게 증가하였다.

3. 빛 조건에 따른 행동 변화

총 이동거리는 첫 번째 암반응 시 EHDPP 70 µg/L, 700 µg/L에 노출된 제브라피쉬 치어에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 두 번째 명반응에서는 EHDPP 700 µg/L에 노출된 제브라피쉬 치어에서 유의하게 감소하였다(Fig. 3A). 이동 속도는 EHDPP 700 µg/L 노출군에서 첫번째 암반응 및 두 번째 명반응 시 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 3B).

IV. 고 찰

EHDPP에 노출된 제브라피쉬의 부화율, 치어 생존율, 체장 및 활동성 감소는 GH/IGFs 축의 내분비계 교란과 관련이 있었다. EHDPP 노출로 인해 치어의 체장이 유의하게 감소한 최저 농도(lowest observed effect concentration, LOEC)는 70 µg/L

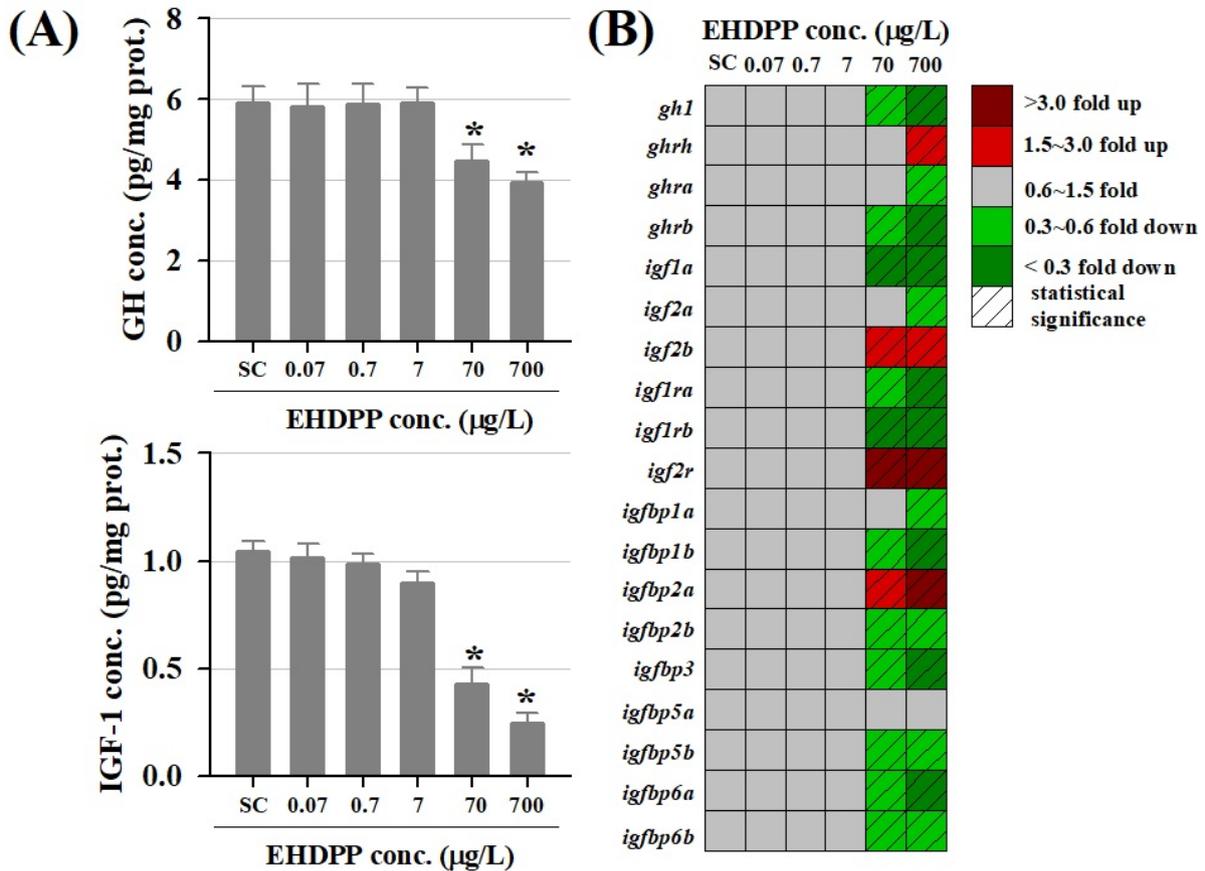


Fig. 2. Effects of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate on (A) growth hormone (GH), insulin-like growth factor (IGF)-1, and (B) transcription of 19 genes related to GH/IGF axis. The values represent mean±standard deviation. A total of 540 larvae (180 larvae/replicates with triplicates) and 60 larvae (20 larvae/replicates with triplicates) were used to analyze GH and IGF-1, respectively. The asterisk (*) indicates significant difference between solvent control and exposure groups (p<0.05).

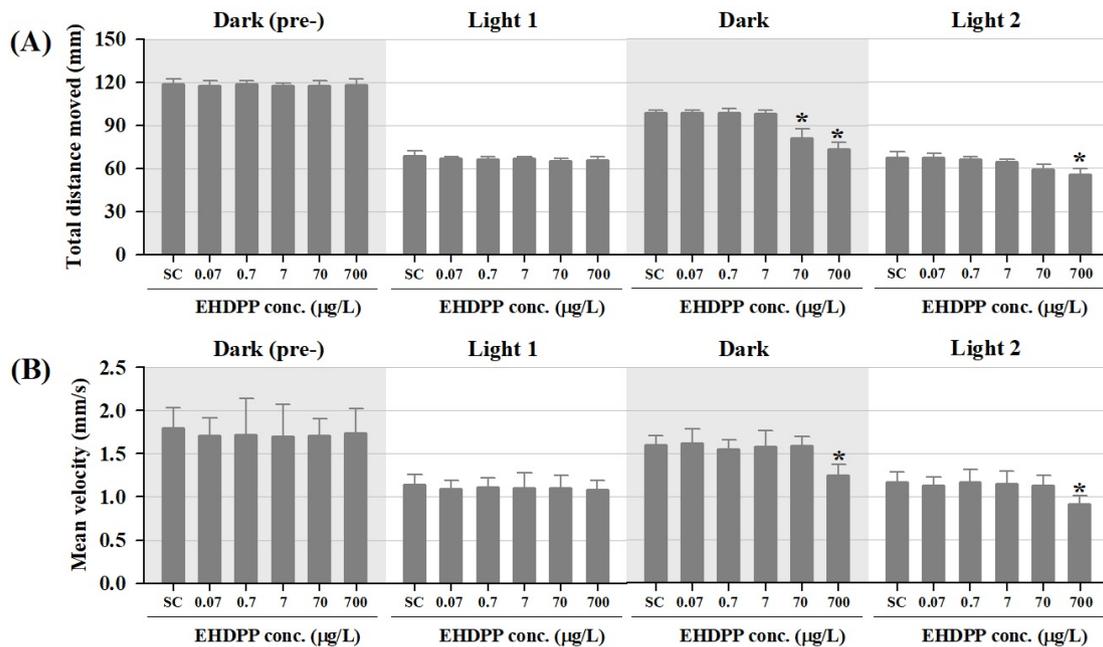


Fig. 3. Effects of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate on total distance moved and mean velocity. The values represent mean±standard deviation (n=36). The asterisk (*) indicates significant difference between control and exposure groups (p<0.05).

이었으며, 이 농도는 이전 문헌에서 관찰한 체장 감소의 LOEC (100 µg/L)와 유사하였다.⁸⁾ 제브라피쉬 치어의 체장 감소에 대한 다른 유기인계 난연제의 시험결과와 비교해 보면, tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) 20 µg/L²⁸⁾보다는 둔감하지만, tris(2-butoxyethyl) phosphate (TBEP) 200 µg/L,²⁹⁾ tris(1,3-dichloroisopropyl) phosphate (TDCIPP) 1.2 µM (=500 µg/L)²⁵⁾ 보다는 민감하게 나타났다. 이 결과는 발달독성이 유기인계 난연제 성분들이 지닌 공통적인 독성 특성이며, EHDPP는 TBEP, TDCIPP 등에 비해 독성이 작지 않음을 나타낸다.

EHDPP가 유발한 체장 감소의 독성 기전으로 이전 연구에서는 지질 친화성으로 인한 생체 내 축적^{17,18)}과 갑상선호르몬(T3, T4)의 감소³⁰⁾ 등이 제시되었다. 본 연구에서는 발달과 성장을 조절하는 주요 경로 중 하나인 GH/IGFs 축의 변화로 EHDPP가 유발하는 발달 독성을 설명하고자 하였다. 이전 연구에서도 TDCIPP,²⁵⁾ TBEP²⁶⁾ 등이 GH/IGFs 시스템과의 상호작용을 방해하여 제브라피쉬에서 발달 독성을 유발했다고 보고한 바 있다. GH는 뇌하수체 전엽에서 분비되는 펩타이드 호르몬으로, 제브라피쉬 치어를 균질화한 시료를 활용하여 ELISA 키트로 호르몬을 측정하거나 유전자 수준에서 *gh1*의 발현을 측정하여 확인되고 있다.^{25,29)} 제브라피쉬는 GH와 결합할 수 있는 2개의 수용체(GHRa, GHRb)를 지니고 있으며, 96 시간 치어에서 *ghra*, *ghrb* 유전자 발현을 측정함으로써 확인할 수 있다.³¹⁾ EHDPP에 노출된 제브라피쉬 치어에서 GH 및 *gh1*, *ghra*, *ghrb* 유전자 발현이 모두 감소한 것은 EHDPP가 성장호르몬 합성과 분비, 수용체 결합을 저해함을 나타낸다.

GH가 표적 기관의 수용체에 결합하면 IGF의 합성과 방출이 자극된다.³²⁾ 사람을 포함한 대부분의 척추동물에서는 주로 IGF-1, IGF-2 유전자가 발현되며, 제브라피쉬에서는 *igf1a*, *igf1b*, *igf2a*, *igf2b*의 4가지 유형이 확인된다.³³⁾ 본 연구에서는 EHDPP 노출로 인해 여러 IGF 중에서 *igf1a* 유전자 발현이 유의하게 감소하였고, 이러한 변화는 IGF-1의 감소 결과를 뒷받침할 수 있다. IGF-1은 특정한 IGFBP에 결합하며, 제브라피쉬에서는 6개의 IGFBP가 확인되었다.³⁴⁾ EHDPP에 노출된 제브라피쉬 치어에서 IGFBP 관련 유전자들(*igfbp1a*, *igfbp1b*, *igfbp2b*, *igfbp3*, *igfbp5b*, *igfbp6a*, *igfbp6a*, *igfbp6b*)의 발현이 감소한 결과는 이 물질이 IGF-1 뿐만 아니라 결합단백질에 관련된 유전자 발현을 저해함을 나타낸다.

밝고 어두운 빛 조건을 변화할 때의 운동거리와 속도는 신경 발달 독성의 중요한 생체지표로 사용된다.³⁵⁾ 본 연구의 대상물질인 EHDPP³⁶⁾를 포함하여 trimethyl phosphate (TMP),²⁹⁾ triethyl phosphate (TEP),²⁹⁾ TBEP,²⁹⁾ triphenyl phosphate (TPP),³⁷⁾ tris(1-chloro-2-propyl) phosphate (TCPP),³⁸⁾ TDCIPP,³⁹⁾ resorcinol bis(diphenyl) phosphate (RDP)⁴⁰⁾ 등 다양한 유기인계 난연제의 신경행동 영향을 조사하기 위해 이동거리와 속도의 변화가 측정되기도 했다. EHDPP³⁶⁾와 할로젠계 유기인계 난연제인 TCPP,³⁸⁾ TDCIPP³⁹⁾는 과잉행동을 유발했으나, 알킬 유기인계 난연제인 TEP, TBEP,²⁹⁾ 아릴 유기인계 난연제인 TPP,³⁷⁾ 신중 유기인계 난연제인 RDP⁴⁰⁾는 저활동을 유발하였다. 본 연구에서 아릴 유기인계 난연제인 EHDPP 70 µg/L에 노출된 제브라피쉬에서 저활동이 유발된 결과는 선행 연구의 결과³⁶⁾

와 차이가 있으며, 이는 노출농도가 다르기 때문으로 판단된다. 즉, EHDPP의 과잉행동이 관찰된 최소 농도는 10 μM (=약 3.6 mg/L)로, 본 연구의 노출농도보다 약 50배 높다. 그러나 EHDPP의 노출로 저활동이 유발된 본 연구의 결과는 다른 아릴 유기인계 난연제인 TPP (100 $\mu\text{g/L}$ 에서 확인),³⁷⁾ RDP (90 nM [=약 51 $\mu\text{g/L}$ 에서 확인])에서 저활동이 유발된 결과와 유사하다. 이러한 행동 둔화는 포식자 회피 등 치어가 급한 상황에 도망가지 못할 수 있음을 나타낸다.

본 연구는 연구 방법 측면에서 몇 가지 제한점이 있다. EHDPP가 폴리염화비닐 플라스틱의 제조에 사용될 수 있으나 플라스틱 재질의 플레이트와 튜브를 사용하였기에 본 연구의 결과에 다른 환경 노출의 가능성이 일부 반영될 수 있다. 또한 생존율이 통계적으로 유의하게 감소한 농도(70, 700 $\mu\text{g/L}$)에서 발달 지연, GH/IGF 축의 분자생물학적 지표 변화, 행동 변화를 확인한 것이 결과를 해석하는 데 제한점이 될 수 있다.

V. 결 론

EHDPP 노출로 인한 생존 및 성장 저해와 행동 둔화는 잠재적으로 GH/IGF 축의 피드백 조절 작용과 관련이 있다. EHDPP가 생존 및 성장 저해와 행동 둔화를 유발하는 최저 농도(70 $\mu\text{g/L}$)는 담수환경 중에서 검출이 가능한 최대 농도(0.73 $\mu\text{g/L}$)¹⁴⁾보다 높기에 환경 위해성이 크게 우려되는 상황은 아니다. 그러나 EHDPP의 높은 생물 농축성³⁰⁾과 다른 유기인계 난연제(예: TBEP, TDCIPP)의 독성에 비해 독성 유발 농도가 낮은 점 등을 고려해 지속적인 모니터링과 독성 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단(RS-2023-00251751)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- Xu S, Yu Y, Qin Z, Wang C, Hu Q, Jin Y. Effects of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate exposure on the glucolipid metabolism and cardiac developmental toxicity in larval zebrafish based on transcriptomic analysis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2023; 267: 109578.
- Greaves AK, Letcher RJ. A review of organophosphate esters in the environment from biological effects to distribution and fate. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2017; 98(1): 2-7.
- Zhou Y, Liao H, Yin S, Wang P, Ye X, Zhang J. Aryl-, halogenated- and alkyl- organophosphate esters induced oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome activation in HepG2 cells. *Environ Pollut*. 2023; 316(Pt 1): 120559.
- Australian Government. 2-ethylhexyl phosphates: evaluation statement, 15 April 2024. Sydney: Department of Health and Aged Care, Australian Industrial Chemicals Introduction Scheme; 2024.
- Lee S, Cho H, Choi W, Moon H. Organophosphate flame retardants (OPFRs) in water and sediment: occurrence, distribution, and hotspots of contamination of Lake Shihwa, Korea. *Mar Pollut Bull*. 2018; 130: 105-112.
- Liu Y, Song N, Guo R, Xu H, Zhang Q, Han Z, et al. Occurrence and partitioning behavior of organophosphate esters in surface water and sediment of a shallow Chinese freshwater lake (Taihu Lake): implication for eco-toxicity risk. *Chemosphere*. 2018; 202: 255-263.
- Xing L, Zhang Q, Sun X, Zhu H, Zhang S, Xu H. Occurrence, distribution and risk assessment of organophosphate esters in surface water and sediment from a shallow freshwater Lake, China. *Sci Total Environ*. 2018; 636: 632-640.
- Lv J, Guo C, Luo Y, Liu Y, Deng Y, Sun S, et al. Spatial distribution, receptor modelling and risk assessment of organophosphate esters in surface water from the largest freshwater lake in China. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2022; 238: 113618.
- Wang X, Zhu L, Zhong W, Yang L. Partition and source identification of organophosphate esters in the water and sediment of Taihu Lake, China. *J Hazard Mater*. 2018; 360: 43-50.
- Wang X, Liu J, Yin Y. Development of an ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for high throughput determination of organophosphorus flame retardants in environmental water. *J Chromatogr A*. 2011; 1218(38): 6705-6711.
- Niu Z, Zhang Z, Li J, He J, Zhang Y. Threats of organophosphate esters (OPEs) in surface water to ecological system in Haihe River of China based on species sensitivity distribution model and assessment factor model. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019; 26(11): 10854-10866.
- Xing L, Tao M, Zhang Q, Kong M, Sun J, Jia S, et al. Occurrence, spatial distribution and risk assessment of organophosphate esters in surface water from the lower Yangtze River Basin. *Sci Total Environ*. 2020; 734: 139380.
- Cristale J, García Vázquez A, Barata C, Lacorte S. Priority and emerging flame retardants in rivers: occurrence in water and sediment, Daphnia magna toxicity and risk assessment. *Environ Int*. 2013; 59: 232-243.
- Nantaba F, Palm WU, Wasswa J, Bouwman H, Kylin H, Kümmerer K. Temporal dynamics and ecotoxicological risk assessment of personal care products, phthalate ester plasticizers, and organophosphorus flame retardants in water from Lake Victoria, Uganda. *Chemosphere*. 2021; 262: 127716.
- Kim UJ, Kannan K. Occurrence and distribution of organophosphate flame retardants/plasticizers in surface waters, tap water, and rainwater: implications for human exposure. *Environ Sci Technol*. 2018; 52(10): 5625-5633.

16. Matsukami H, Tue NM, Suzuki G, Someya M, Tuyen LH, Viet PH, et al. Flame retardant emission from e-waste recycling operation in northern Vietnam: environmental occurrence of emerging organophosphorus esters used as alternatives for PBDEs. *Sci Total Environ.* 2015; 514: 492-499.
17. Li Y, Kang Q, Chen R, He J, Liu L, Wang L, et al. 2-ethylhexyl diphenyl phosphate and its hydroxylated metabolites are anti-androgenic and cause adverse reproductive outcomes in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Sci Technol.* 2020; 54(14): 8919-8925.
18. Li Y, Ma H, Chen R, Zhang H, Nakanishi T, Hu J. Maternal transfer of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate leads to developmental toxicity possibly by blocking the retinoic acid receptor and retinoic X receptor in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Sci Technol.* 2021; 55(8): 5056-5064.
19. Yang R, Wang X, Wang J, Chen P, Liu Q, Zhong W, et al. Insights into the sex-dependent reproductive toxicity of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate on zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Int.* 2022; 158: 106928.
20. Organisation for Economic Co-operation and Development. Test no. 236: fish embryo acute toxicity (FET) test. Available: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en [accessed 14 May 2024].
21. Fuentes EN, Valdés JA, Molina A, Björnsson BT. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone--insulin-like growth factor system. *Gen Comp Endocrinol.* 2013; 192: 136-148.
22. Zhu Y, Song D, Tran NT, Nguyen N. The effects of the members of growth hormone family knockdown in zebrafish development. *Gen Comp Endocrinol.* 2007; 150(3): 395-404.
23. Reindl KM, Kittilson JD, Bergan HE, Sheridan MA. Growth hormone-stimulated insulin-like growth factor-1 expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes is mediated by ERK, PI3K-AKT, and JAK-STAT. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011; 301(1): R236-R243.
24. Moriyama S, Ayson FG, Kawachi H. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000; 64(8): 1553-1562.
25. Dang Y, Wang F, Liu C. Real-time PCR array to study the effects of chemicals on the growth hormone/insulin-like growth factors (GH/IGFs) axis of zebrafish embryos/larvae. *Chemosphere.* 2018; 207: 365-376.
26. Zeng X, Sun H, Huang Y, Liu J, Yu L, Liu C, et al. Effects of environmentally relevant concentrations of tris (2-butoxyethyl) phosphate on growth and transcription of genes involved in the GH/IGF and HPT axes in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 2018; 212: 376-384.
27. Segner H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2009; 149(2): 187-195.
28. Hu F, Zhao Y, Yuan Y, Yin L, Dong F, Zhang W, et al. Effects of environmentally relevant concentrations of tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP) on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Pharmacol.* 2021; 83: 103600.
29. Yun K, Jeon H, Kho Y, Ji K. Potential adverse outcome pathway of neurodevelopmental toxicity, inflammatory response, and oxidative stress induction mediated by three alkyl organophosphate flame retardants in zebrafish larvae. *Chemosphere.* 2024; 356: 141901.
30. Shu Y, Yuan J, Hogstrand C, Xue Z, Wang X, Liu C, et al. Bioaccumulation and thyroid endocrine disruption of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate at environmental concentration in zebrafish larvae. *Aquat Toxicol.* 2024; 267: 106815.
31. Di Prinzio CM, Botta PE, Barriga EH, Rios EA, Reyes AE, Arranz SE. Growth hormone receptors in zebrafish (*Danio rerio*): adult and embryonic expression patterns. *Gene Expr Patterns.* 2010; 10(4-5): 214-225.
32. Wang L, Yan R, Yang Q, Li H, Zhang J, Shimoda Y, et al. Role of GH/IGF axis in arsenite-induced developmental toxicity in zebrafish embryos. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020; 201: 110820.
33. Zou S, Kamei H, Modi Z, Duan C. Zebrafish IGF genes: gene duplication, conservation and divergence, and novel roles in midline and notochord development. *PLoS One.* 2009; 4(9): e7026.
34. Zhang C, Lu L, Li Y, Wang X, Zhou J, Liu Y, et al. IGF binding protein-6 expression in vascular endothelial cells is induced by hypoxia and plays a negative role in tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 2012; 130(9): 2003-2012.
35. Basnet RM, Zizioli D, Taweedit S, Finazzi D, Memo M. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. *Biomedicines.* 2019; 7(1): 23.
36. Alzualde A, Behl M, Sipes NS, Hsieh JH, Alday A, Tice RR, et al. Toxicity profiling of flame retardants in zebrafish embryos using a battery of assays for developmental toxicity, neurotoxicity, cardiotoxicity and hepatotoxicity toward human relevance. *Neurotoxicol Teratol.* 2018; 70: 40-50.
37. Shi Q, Wang M, Shi F, Yang L, Guo Y, Feng C, et al. Developmental neurotoxicity of triphenyl phosphate in zebrafish larvae. *Aquat Toxicol.* 2018; 203: 80-87.
38. Xia M, Wang X, Xu J, Qian Q, Gao M, Wang H. Tris (1-chloro-2-propyl) phosphate exposure to zebrafish causes neurodevelopmental toxicity and abnormal locomotor behavior. *Sci Total Environ.* 2021; 758: 143694.
39. Oliveri AN, Bailey JM, Levin ED. Developmental exposure to organophosphate flame retardants causes behavioral effects in larval and adult zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 2015; 52(Pt B): 220-227.
40. Shi Q, Yang H, Zheng Y, Zheng N, Lei L, Li X, et al. Neurotoxicity of an emerging organophosphorus flame retardant, resorcinol bis(diphenyl phosphate), in zebrafish larvae. *Chemosphere.* 2023; 334: 138944.

〈저자정보〉

박채운(대학원생), 이다영(학부생), 지경희(교수)