



## 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

교 육 학 석 사 학 위 논 문

다환방향족 탄화수소, benzo[a]pyrene이  
점망둑, *Chamichthys dolichognathus*의  
난모세포 성숙에 미치는 영향



2012년 8월

부 경 대 학 교 교 육 대 학 원

생 물 교 육 전 공

황 선 지

교 육 학 석 사 학 위 논 문

다환방향족 탄화수소, benzo[a]pyrene이  
점망둑, *Chamichthys dolichognathus*의  
난모세포 성숙에 미치는 영향

지도교수 백 혜 자

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함.



2012 년 8 월

부 경 대 학 교 교 육 대 학 원

생 물 교 육 전 공

황 선 지

황선지의 교육학석사 학위논문을 인준함.

20012년 8월



주 심 수산학박사 박 원 규 (인)

위 원 이학박사 김 진 구 (인)

위 원 이학박사 백 혜 자 (인)

# 목 차

List of figures .....	ii
List of tables .....	iii
Abstract .....	iv
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
1. 실험어 .....	4
2. 난모세포 배양 .....	6
3. 난모세포의 형태학적 관찰 및 GVBD 효과 조사 .....	7
4. 스테로이드 호르몬 농도 측정 .....	7
5. 통계분석 .....	8
III. 결과 .....	9
1. 난모세포의 조직형태학적 관찰 .....	9
2. B[a]P 노출에 따른 난모세포의 사망률과 GVBD 효과 조사 .....	11
3. B[a]P 노출에 따른 성 스테로이드 호르몬 농도 변화 .....	13
IV. 고찰 .....	18
V. 요약 .....	22
VI. 참고문헌 .....	23
VII. 감사의 글 .....	30

## List of Figures

Fig. 1. Mature female longchin goby, <i>Chasmichthys dolichognathus</i> .....	4
Fig. 2. Morphological observations of oocytes from longchin goby, <i>Chasmichthys dolichognathus</i> .....	10
Fig. 3. Effects of different benzo[a]pyrene concentrations on <i>in vitro</i> GVBD and mortality in longchin goby oocytes (oocyte diameter = 0.74 mm, A, 0.88 mm, B, and 0.93 mm, C) after 24 h incubation .....	12
Fig. 4. Effects of different benzo[a]pyrene concentrations on <i>in vitro</i> steroid hormone production in longchin goby oocytes (oocyte diameter = 0.74 mm) after 24 h incubation .....	14
Fig. 5. Effects of different benzo[a]pyrene concentrations on <i>in vitro</i> steroid hormone production in longchin goby oocytes (oocyte diameter = 0.88 mm) after 24 h incubation .....	15
Fig. 6. Effects of different benzo[a]pyrene concentrations on <i>in vitro</i> steroid hormone production in longchin goby oocytes (oocyte diameter = 0.93 mm) after 24 h incubation .....	16
Fig. 7. Effects of different benzo[a]pyrene concentrations on <i>in vitro</i> E2/T and E2/17 $\alpha$ 20 $\beta$ P ratio in longchin goby oocytes (oocyte diameter = 0.74 mm, A, 0.88 mm, B, and 0.93 mm, C) after 24 h incubation .....	17

## List of Tables

Table 1. Measurements of longchin goby, <i>Chasmichthys dolichognathus</i> used in this study .....	5
---	---



The effect of benzo[a]pyrene on *in vitro* oocyte maturation of  
longchin goby, *Chasmichthys dolichognathus*

Sun Ji Hwang

Graduate School of Education,  
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Abstract

Benzo[a]pyrene (B[a]P), one of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is lipophilic and organic environmental pollutant derived from crude oil and incomplete combustion of carbon. B[a]P has been demonstrated to be potentially mutagenic, carcinogenic and teratogenic as well as to impair some functions of the reproduction of fish. This study investigated the effect of B[a]P *in vitro* during oocyte maturation in the marine fish, *Chasmichthys dolichognathus*, using steroid hormone assays and GVBD assay. Maturing oocytes (oocyte diameter = 0.74, 0.88 and 0.93 mm) were incubated with 1, 10 and 100 ng/mL of B[a]P for 24 hours. In oocytes 0.74 mm diameter (vitellogenic oocytes), B[a]P had no significant effect on GVBD at the concentrations tested. In oocytes 0.88 mm diameter (fully vitellogenic oocytes), B[a]P inhibited GVBD significantly at 1 and 100 ng/mL, significantly decreased T production and increased the ratio of E2/T at 1 and 10 ng/mL compared with control. In 0.93 mm diameter oocytes (germinal vesicle located near the center of oocytes), B[a]P induced GVBD



significantly at 10 and 100 ng/mL and decreased the ratio of E2/T significantly at 1 and 10 ng/mL compared with control. The results from this study suggested that B[a]P may act either estrogenic or anti-estrogenic effects according to ovarian developmental stage.



# I. 서론

다환방향족 탄화수소류(polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs)는 2개 이상의 벤젠 고리를 갖고 있는 중성 또는 알칼리성 유기화합물로서, 원유의 주성분이며, 탄소화합물의 불완전 연소와 같은 다양한 과정에서 생성되어 해양에서 흔히 발견된다(Blumer, 1976; Menzie et al., 1992; Collins et al., 1998). 특히 도시화된 하구와 해안 지역의 퇴적물과 해수에서 흔하게 발견되는 PAHs는 쉽게 분해되지 않아서 어류를 비롯한 해양생물들에게 높은 농도로 축적되어(Varanasi et al., 1982; Meador et al., 1995), 성장과 성숙을 억제시킨다(Maccubbin, 1994; Carlson et al., 2004). 또한 포유류에서 PAHs 노출이 생식독성, 면역억제, 발암, 그리고 돌연변이와 관련 있다고 보고되고 있다(Mackenzie and Angevine, 1981; Hardin et al., 1992; Zenzes et al., 1998; Kawanishi et al., 2009).

Benzo[a]pyrene (B[a]P)은 대표적인 PAHs로, 미국의 CERCLA's priority list of hazardous substances (<http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>)에서는 PAHs와 Benzo[a]fluoranthene과 함께 B[a]P을 독성이 가장 강한 상위 10가지 물질에 포함시키고 있다. 또한 국제암연구소(International Agency For Research on Cancer, IARC)에서는 B[a]P을 인체발암물질로 분류하였다(IARC, 2010). B[a]P은 cytochrome P450 1A (CYP1A1/A2) 산화효소에 의해 anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy 7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene (BPDE)로 대사되며 DNA와 공유결합한 후 BPDE-DNA 형성하여, 돌연변이를 포함한 유전 독성을 나타낸다(Huberman et al., 1976; Baird et al., 2005). 특히 해양 유류 사고 등에 의해 유출된 B[a]P은 수용성 독성물질(water soluble fraction; WSF)로 전환되어 어류를 비롯한 해양 생물들에게 생식독성, 면역억제, 발암, 그리고 돌연변

이를 일으킬 뿐 아니라 성장과 성숙에 관여하는 내분비 기작을 교란시킨다고 알려져 있다(Buhler and Williams, 1989; Carlson et al., 2004; Wills et al., 2010). B[a]P은 또한 xenoestrogen 행동을 한다고 알려져 있으며(Monteiro et al., 2000a), 현재 내분비계장애물질(endocrine disrupting compounds; EDCs)로 생식에 부정적인 영향을 준다고 고려되어지고 있다.

경골어류의 난모세포 성숙은 시상하부-뇌하수체-생식소의 축을 따라, 뇌하수체의 생식선자극호르몬(gonadotropin; GTH)의 자극에 의해, 난모세포의 여포층에서 생성·분비되는 성 스테로이드 호르몬에 의해 조절된다. 난황전구물질인 vitellogenins(Vtgs)이 난소에 난황으로 축적되기 시작하는 난황형성기(vitellogenesis)에는 estradiol-17 $\beta$  (E2)가 주요 호르몬으로 작용해서 간의 estrogen receptor (ER)에 결합하여 Vtgs의 합성을 유도한다(Young et al., 1982; Patiño and Sullivan, 2002). 난황형성이 끝난 직후부터 배란까지는 progesterone의 유도체인 maturation-inducing hormone (MIH)에 의해 조절되며, 난모세포 막의 maturation promoting factor (MPF)를 활성화시킴으로써 핵막 붕괴(germinal vesicle break down; GVBD)와 감수분열을 재개하게 하고 마지막으로 배란시키는데 관여한다(Young et al., 1982; Patiño and Sullivan, 2002). 어류의 주된 MIH에는 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 $\alpha$ 20 $\beta$ P)과 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (17 $\alpha$ 20 $\beta$ 21P)이 성숙유도 과정에 효과적인 성 스테로이드 호르몬으로 알려져 있다. 17 $\alpha$ 20 $\beta$ P는 연어류, 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), 점망둑(*Chamichthys dolichognathus*) 그리고 기타 경골어류(Nagahama and Adachi, 1985; Baek, 1990; Nagahama, 1997; Baek, 2008)에서, 17 $\alpha$ 20 $\beta$ 21P는 민어류와 농어류(Thomas and Trant, 1989; King et al., 1997; Nagahama, 1997)에서 MIH로 알려져 있다. 사람을 비롯한 포유류를 B[a]P 노출시킨 실험에서 B[a]P이 여포의 성장을 억제하고, androgen을 estrogen으로 전환시키는데 필요한 aromatase의 mRNA의 발현량을 저해해 혈중 E2의 농도를 감

소시키는 antiestrogenic effect를 가지는 것으로 알려져 있다(Arcaro et al., 1999; Neal et al., 2010; Xu et al., 2010). *In vitro*에서 어류를 대상으로 한 실험에서도 B[a]P 노출에 따라 난소 조직에서 E2의 생성 농도가 억제되었다(Monteiro et al., 2000a; Monteiro et al., 2000b).

최근엔 fathead minnow (*Pimephales promelas*), medaka (*Oryzias latipes*), 그리고 zebrafish (*Danio rerio*)와 같은 몇몇 담수어를 model fish로 해서 B[a]P을 포함한 EDCs의 다양한 스크리닝과 테스트 시스템이 이루어지고 있으나(U.S. Environmental Protection Agency, 1998; Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004), 해산어를 대상으로 하는 연구는 부족하다. 따라서 본 연구에서는 실험어종으로서 연안정착성 어종인 점망둑, *Chamichthys dolichognathus*을 대상으로 하였다. 점망둑은 농어목 망둑어과에 속하는 소형어류로 한국남부 및 북해도 이북의 일본 연안 조간대의 암초 사이나 tide pool에서 흔히 볼 수 있는 연안정착성 어종이다 (Chung, 1977). 점망둑은 오염물질에 노출되기 쉬운 연안에 서식해 채집하기에 쉽고, 개체의 크기가 작아 실험하기에 용이하다.

본 연구에서는 성숙한 점망둑 암컷의 난소를 대상으로 *in vitro* 조건에서 다양한 농도의 B[a]P에 노출시킨 후, B[a]P가 최종성숙 과정인 GVBD와 이 과정에 관여하는 성 스테로이드 호르몬 농도 변화에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

## Ⅱ. 재료 및 방법

### 1. 실험어

점망독 (Fig. 1)은 산란기로 추정되는 2011년 5월 (Baek and Lee, 1985) 부산 청사포에서 채집하였다. 점망독의 전장과 체중은 0.1 cm, 체중은 0.01 g까지 측정하였다 (Table 1).



Fig. 1. Mature female longchin goby, *Chasmichthys dolichognathus*.

Table 1. Measurements of longchin goby, *Chasmichthys dolichognathus* used in this study.

	Total length (cm)	Total weight (g)	Oocyte diameter (mm)
Fish 1	6.0	2.22	0.74
Fish 2	5.3	1.68	0.88
Fish 3	6.0	2.33	0.93





## 2. 난모세포 배양

실험어는 0.5 mL/L의 2-phenoxyethanol로 마취시켜 무균상태에서 난소를 절취하여 ice-cold balanced salt solution (132.96 mM NaCl, 3.09 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.98 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 3.40 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 3.65 mM HEPES)으로 세척하였다. 절취된 난소는 가는 핀셋을 이용하여 난경별로 각각의 난모세포로 분리하였다. 각 실험어의 난소에서 난경별로 분리한 난모세포의 난경은 Table 1과 같다. 분리된 난모세포는 24-well plate에 well당 Leibovitz L-15 (L-15) 배양액 (Gibco) 1mL에 20개의 난모세포를 각각 분주한 후 B[a]P를 농도별로 (1, 10, 그리고 100 ng/mL) 첨가하여 18 °C에서 24시간 배양하였다. balanced salt solution과 L-15 배양액의 pH는 7.7, 삼투농도는 300 milliosmol로 조절하였다.

B[a]P은 분말 형태의 시약용 B[a]P (WAKO, Japan) 5 mg을 여과시킨 ethanol (Merck, Germany)에 용해시켜 mg/mL의 표준용액을 만들어 농도구별로 희석하여 사용하였다.

### 3. 난모세포의 형태학적 관찰 및 GVBD 효과 조사

난소발달의 조직학적 관찰을 위해 적출한 난소의 일부를 Bouin's solution에 고정하여 파라핀으로 포매한 후 5-6  $\mu\text{m}$  두께로 연속절편을 만들어 Mayer's hematoxylin과 eosin으로 비교 염색하여 광학현미경 (BX-50, Olympus, Japan) 하에서 관찰하였다. 농도별 B[a]P에 노출된 난모세포들은 일정시간 배양 후, 난모세포는 clearing solution (ethanol : formalin : glacial acetic acid = 6 : 3 : 1)을 첨가하여 GVBD와 사망의 유무를 관찰하였으며, 전체 난모세포의 수에서 사망한 난모세포 수를 제외한 수치에 대한 GVBD가 관찰된 난모세포의 수를 백분율로 나타냈다

### 4. 스테로이드 호르몬 농도 측정

난모세포 배양 후 배양액은 혼합용매 (ethylacetate : cyclohexane = 50 : 50)로 2회 추출 후 E2, T 그리고 17 $\alpha$ 20 $\beta$ P의 농도를 Aida et al. (1984)의 방법에 따라 방사면역측정법 (radioimmunoassay, RIA)으로 분석하였다.

실험에 사용된 항체는 E2와 T는 Cosmo-Bio Co. Ltd. (Tokyo, Japan) 그리고 17 $\alpha$ 20 $\beta$ P는 INRA (Rennes, France)로부터 얻었다. standard 호르몬들은 Steraloids Inc. (Wilton, NH, USA)와 Sigma Chemical (St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 또한 방사표지된 [2,4,6,7- $^3\text{H}$ ]-E2, [2,4,6,7- $^3\text{H}$ ]-T은 Amersham Life Science (England)로부터 구입하였고, 방사표지된 17 $\alpha$ 20 $\beta$ P는 Scott et al. (1982)의 방법에 의해서 [1,2,6,7- $^3\text{H}$ ]-17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone로부터 효소적 전환으로 얻은 후 TLC에 의해 분리한 것을 사용하였다.



E2, T 그리고 17 $\alpha$ 20 $\beta$ P RIA계에 있어서 최소 검출량은 각각 12.5 pg/mL, 10 pg/mL, 10 pg/mL이었고, assay 내 (intra-assay)와 assay 간 (inter-assay) 변동계수를 50% 상대결합율에서 조사한 결과, E2 RIA계에서는 3.4 (n=3)와 11.5% (n=6), T RIA계에서는 2.3 (n=3)와 12.5% (n=6), 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP RIA계에서는 3.2 (n=4)와 9.5% (n=8)였다.

## 5. 통계분석

모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타냈다. 모든 통계는 SPSS 12.0 for Windows를 이용하여 분석하였으며, Kruskal-Wallis test를 실시하였다. 사후분석은 Bonferroni test를 이용하여  $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

### Ⅲ. 결과

#### 1. 난모세포의 조직형태학적 관찰

실험에 사용된 성숙기 점망둑의 난소 내 난모세포의 평균 난경은 0.74, 0.88, 그리고 0.93 mm이었다(Fig. 2-A, C, and E). 이들 난모세포의 조직학적 관찰결과는 Fig. 2-B, D and F와 같다. 평균 난경 0.74 mm 난모세포는 핵이 세포질 중앙에 위치해있으며, 세포질 내 난황이 축적되고 있었다. 평균 난경 0.88 과 0.93 mm 난모세포는 모두 세포질 내 난황과립이 충만하였다. 평균 난경 0.88 mm 인 난모세포에서는 핵이 세포질 중앙에 또는 세포질 주변부로 막 이동하려는 찰나였으며, 평균 난경 0.93 mm 인 난모세포에서는 평균 난경 0.88 mm 에서와 유사하나 핵의 위치가 세포질 주변부에서 더 많이 관찰되었다.

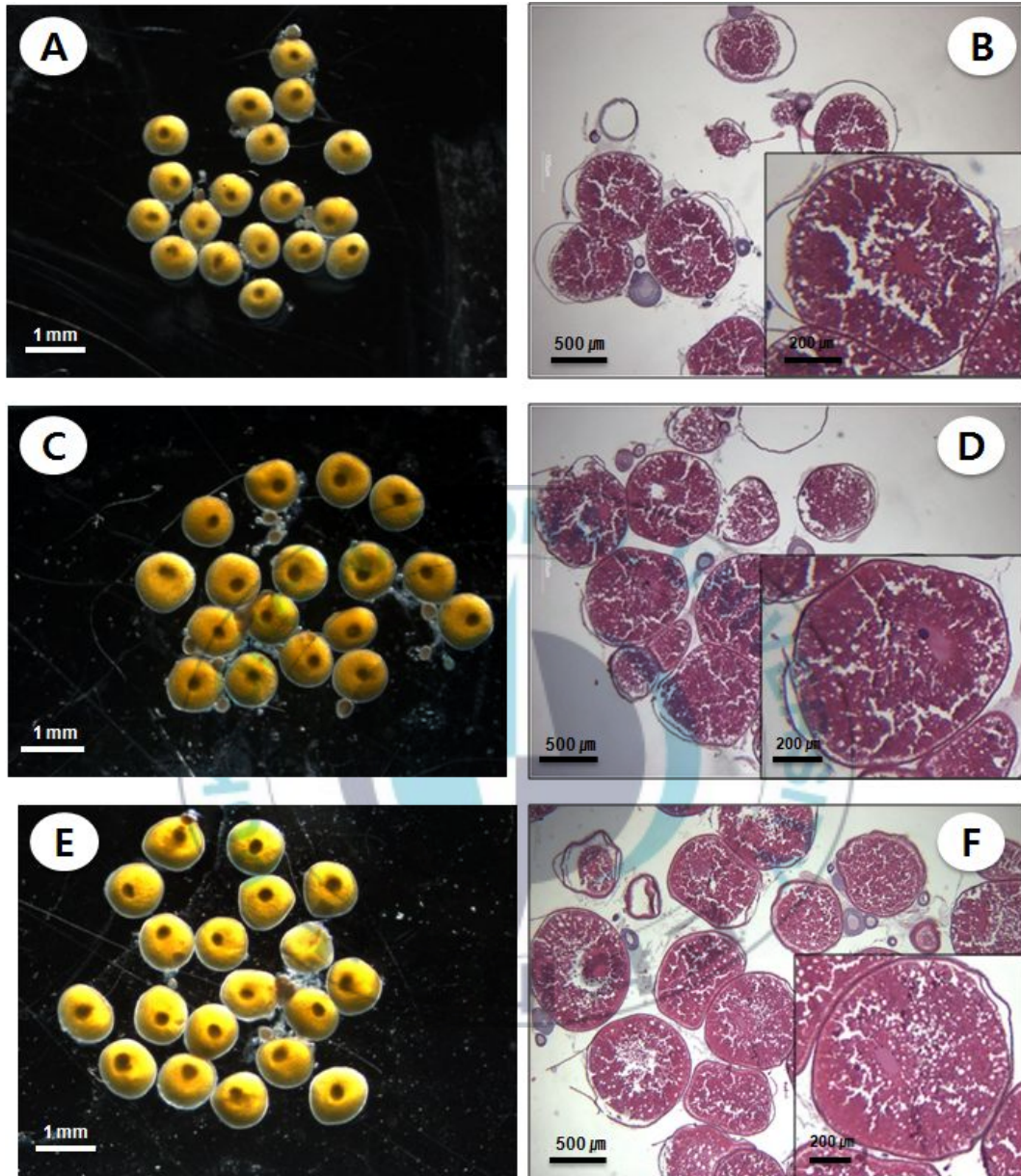


Fig. 2. Morphological observations of oocytes from longchin goby, *Chasmichthys dolichognathus*. A and B, oocytes of 0.74 mm; C and D, oocytes of 0.88 mm; E and F, oocytes of 0.93 mm

## 2. B[a]P 노출에 따른 난모세포의 사망률과 GVBD 효과 조사

농도별 B[a]P에 24시간 배양한 후 점망дук 난모세포의 사망률은 Fig. 3과 같다. 평균 난경 0.74 mm의 난모세포에서는 사망한 난모세포가 없었다. 평균 난경 0.88 mm의 난모세포에서는 B[a]P 1 ng/mL 농도에서 가장 높은 사망률을 보였으며, 평균 난경 0.93 mm의 난모세포의 경우에는 대조구에서  $1.8 \pm 1.8\%$ , 10 ng/mL에서  $3.3 \pm 3.3\%$ 를 보였다.

농도별 B[a]P에 24시간 배양한 후 GVBD 관찰 결과는 Fig. 3과 같다. 평균 난경 0.74 mm인 난모세포에서는 GVBD 효과는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 평균 난경 0.88 mm의 난모세포에서는 B[a]P를 1 과 100 ng/mL로 처리한 실험구에서 GVBD가 각각  $24.70 \pm 2.39\%$  와  $18.68 \pm 1.87\%$ 로 대조구 ( $34.44 \pm 2.94\%$ )에 비해 유의하게 감소하였다 ( $P < 0.05$ ). 또한 평균 난경 0.93 mm의 난모세포에서는 B[a]P를 10 과 100 ng/mL로 처리한 실험구에서 GVBD가 각각  $44.81 \pm 2.89\%$  와  $47.37 \pm 2.63\%$ 로 대조구 ( $26.36 \pm 0.80\%$ )에 비해 유의하게 증가하였다 ( $P < 0.05$ ).

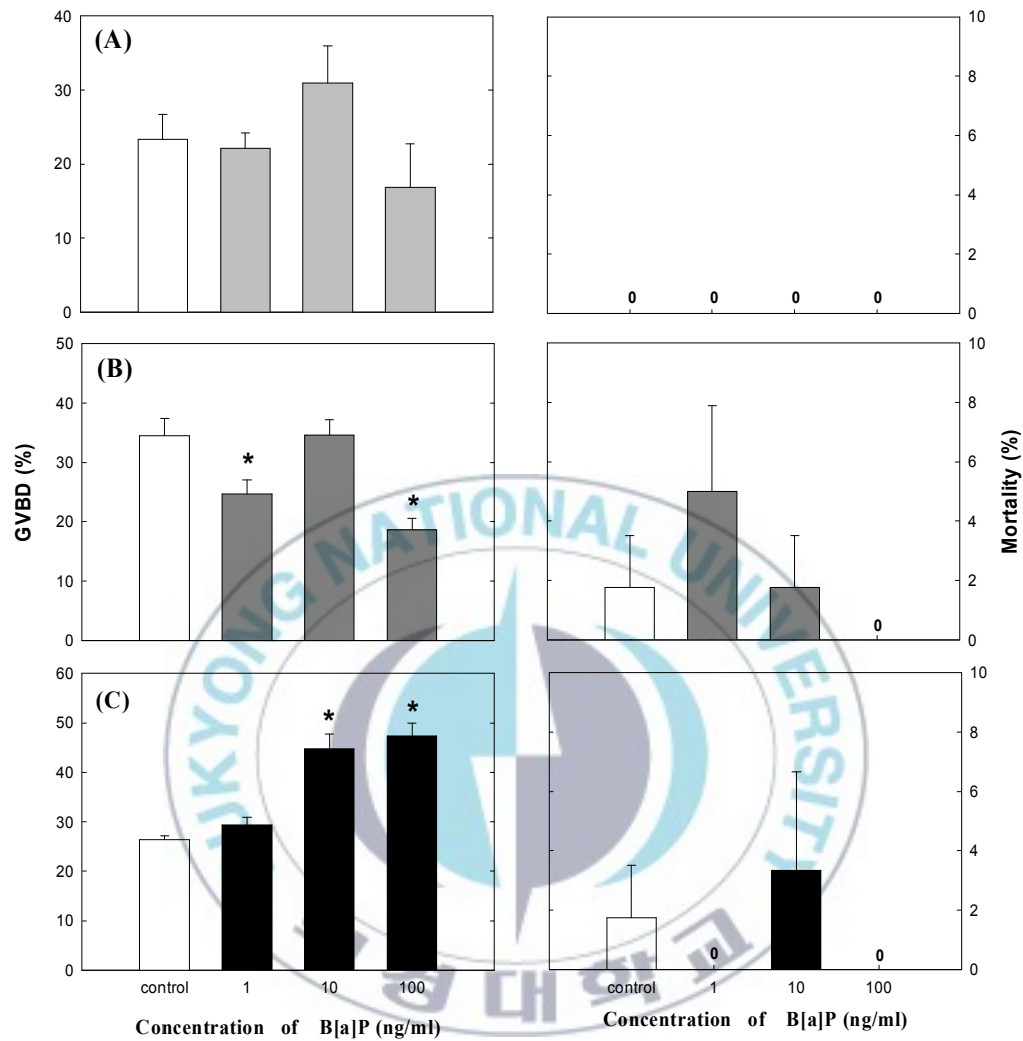


Fig. 3. Effects of different benzo[a]pyrene concentrations on *in vitro* GVBD and mortality in longchin goby oocytes (oocyte diameter = 0.74 mm, A, 0.88 mm, B, and 0.93 mm, C) after 24 h incubation. Values are mean $\pm$ SE of each GVBD in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test and Bonferroni's adjustment. Asterisks indicate significant differences from controls ( $P < 0.05$ ).



### 3. B[a]P 노출에 따른 성 스테로이드 호르몬 농도 변화

평균 난경 0.74 mm인 난모세포를 이용하여 농도별 B[a]P에 24시간 노출시킨 후 생성된 성 스테로이드 호르몬의 농도변화는 Fig. 4와 같다. T 농도는 모든 농도 (1, 10 그리고 100 ng/mL) 처리에서 대조구와 비교하여 뚜렷한 변화를 보이지 않았다. E2와 17 $\alpha$ 20 $\beta$ P 농도는 B[a]P 농도가 높을수록 증가하였으나 유의한 차이는 보이지 않았다.

평균 난경 0.88 mm인 난모세포를 이용하여 농도별 B[a]P에 24시간 노출시킨 후 생성된 성 스테로이드 호르몬의 농도변화는 Fig. 5과 같다. T 농도는 B[a]P 1 과 10 ng/mL에서 각각  $390.10 \pm 17.69$  와  $335.18 \pm 55.72$  pg/mL로 대조구 ( $575.35 \pm 49.25$  pg/mL)에 비해 유의하게 감소하였다 ( $P < 0.05$ ).

평균 난경 0.93 mm인 난모세포를 이용하여 농도별 B[a]P에 24시간 노출시킨 후 생성된 성 스테로이드 호르몬의 농도변화는 모든 농도 (1, 10 그리고 100 ng/mL) 처리에서 뚜렷한 변화를 보이지 않았다 (Fig 6).

측정된 T와 E2의 농도는 E2/T와 E2/17 $\alpha$ 20 $\beta$ P의 비율로 환산하였다. 이 비율은 성 스테로이드 호르몬 농도 변화에 따른 내분비 교란의 지표로 이용되고 있다 (Folmar et al. 1996; Hwang et al. 2010). E2/T의 비율 (Fig. 7)에서는 B[a]P 1 과 10 ng/mL는 평균 난경 0.88 mm에서 대조구에 비해 유의하게 증가되었으며, 평균 난경 0.93 mm에선 B[a]P 1 과 10 ng/mL에서 대조구에 비해 유의하게 감소되었다 ( $P < 0.05$ ). E2/17 $\alpha$ 20 $\beta$ P의 비율 (Fig. 7)에서는 모든 구간에서 뚜렷한 변화를 보이지 않았다.

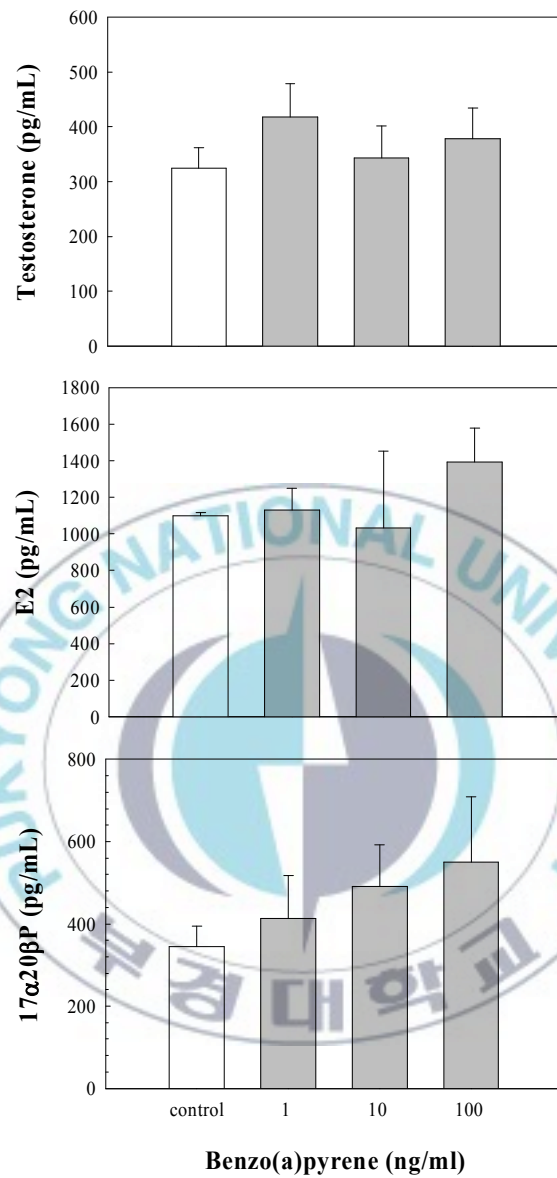


Fig. 4. Effects of different benzo[a]pyrene concentrations on *in vitro* steroid hormone production in longchin goby oocytes (oocyte diameter = 0.74 mm) after 24 h incubation. Values are mean±SE of each steroid levels in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test and Bonferroni's adjustment. Asterisks indicate significant differences from controls ( $P<0.05$ ).

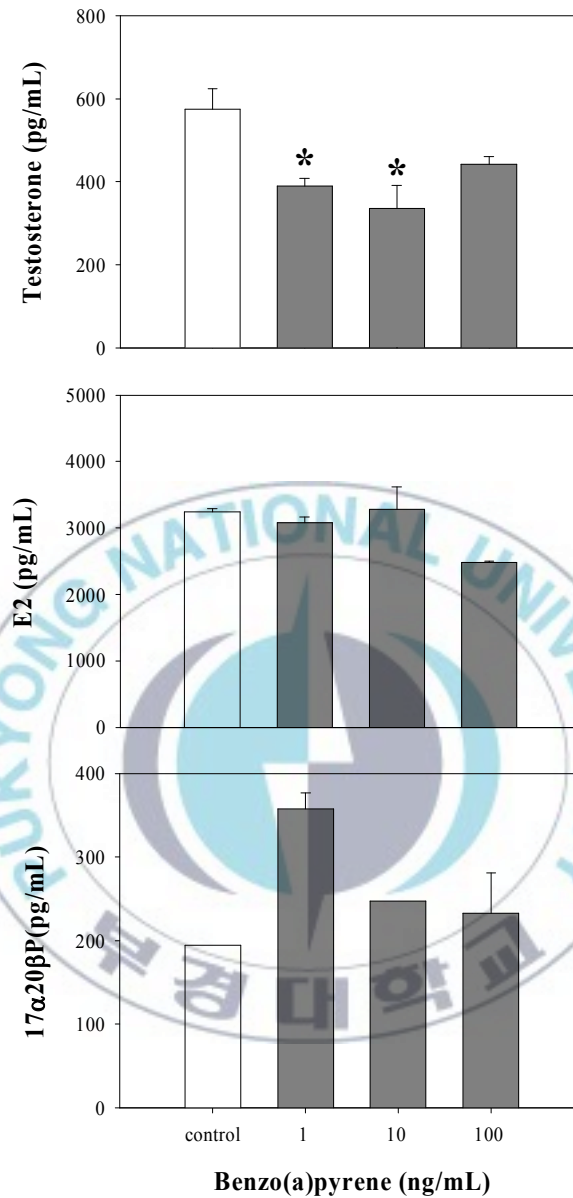


Fig. 5. Effects of different benzo[a]pyrene concentrations on *in vitro* steroid hormone production in longchin goby oocytes (oocyte diameter = 0.88 mm) after 24 h incubation. Values are mean±SE of each steroid levels in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test and Bonferroni's adjustment. Asterisks indicate significant differences from controls ( $P<0.05$ ).



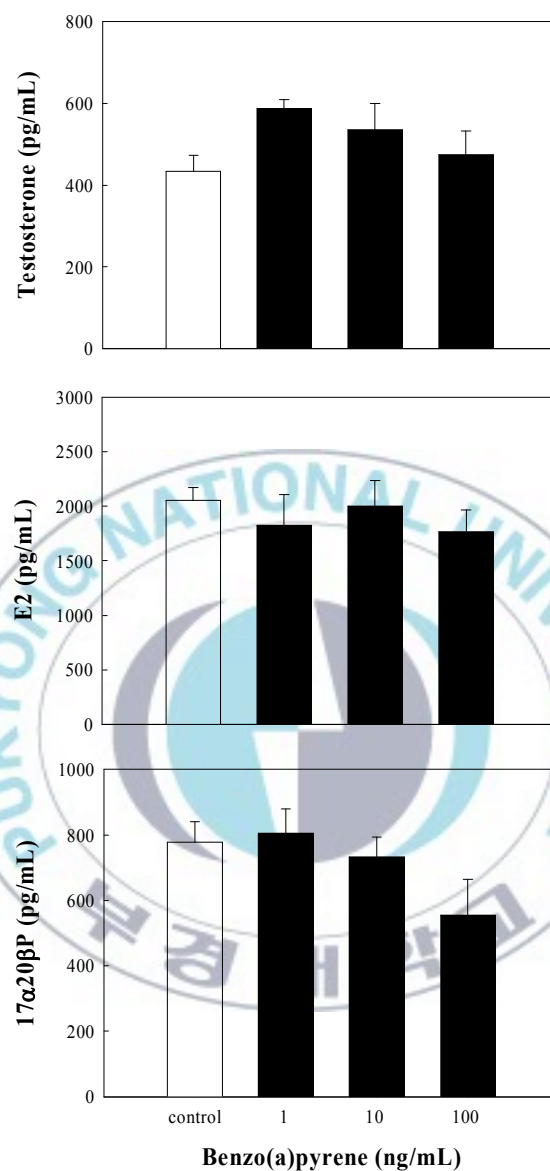


Fig. 6. Effects of different benzo[a]pyrene concentrations on in vitro steroid hormone production in longchin goby oocytes (oocyte diameter = 0.93 mm) after 24 h incubation. Values are mean $\pm$ SE of each steroid levels in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test and Bonferroni's adjustment. Asterisks indicate significant differences from controls ( $P<0.05$ ).

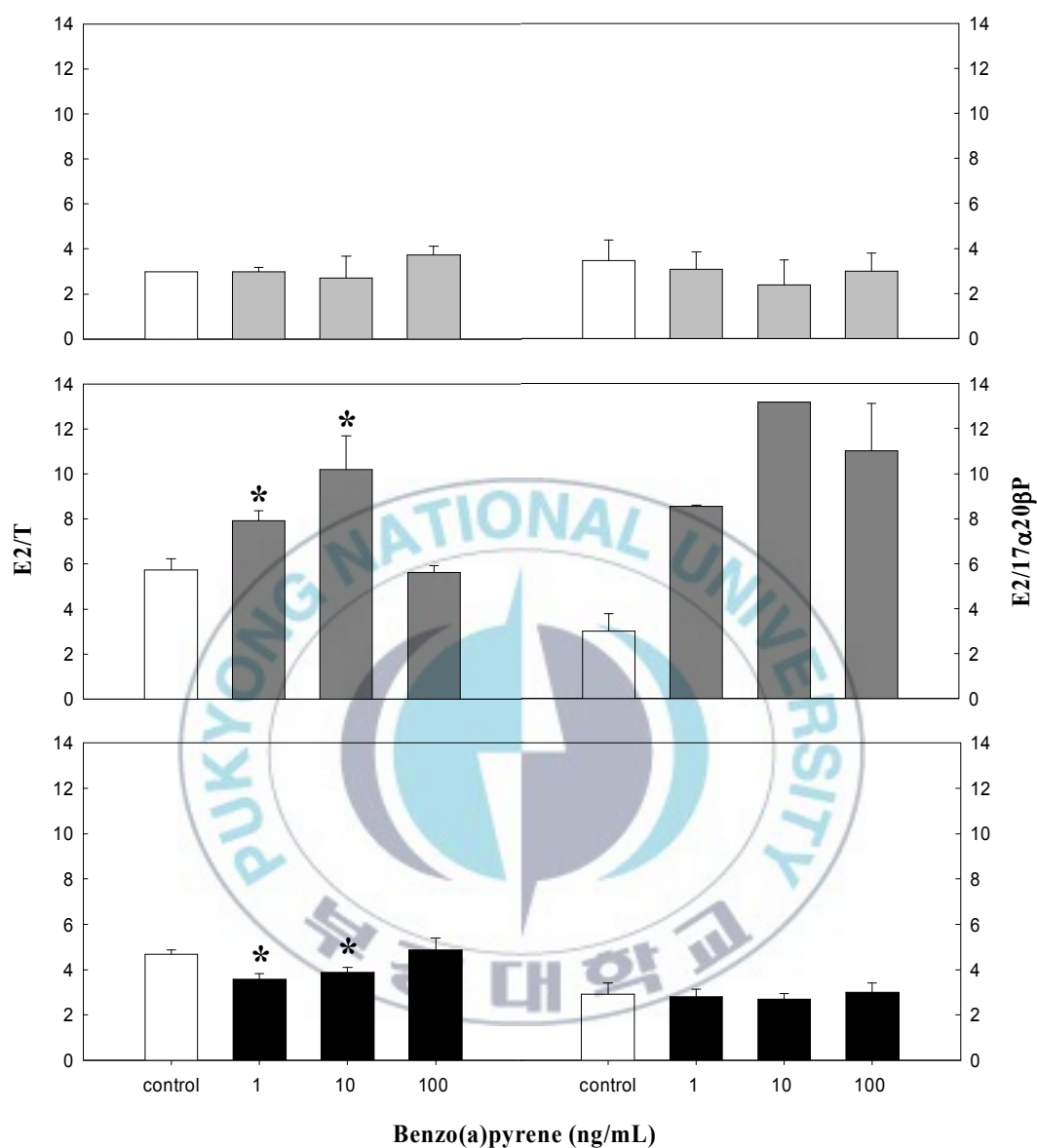


Fig. 7. Effects of different benzo[a]pyrene concentrations on in vitro E2/T and E2/17α20β P ratio in longchin goby oocytes (oocyte diameter = 0.74 mm, A, 0.88 mm, B, and 0.93 mm, C) after 24 h incubation. Values are mean±SE of each steroid levels in three replicate wells with 20 oocytes/well. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test and Bonferroni's adjustment. Asterisks indicate significant differences from controls ( $P<0.05$ ).

## IV. 고찰

B[a]P은 5개의 벤젠고리를 가진 대표적인 PAH로서, 체내 대사 과정에서 생성된 B[a]P-대사 유도체들은 돌연변이와 발암을 일으킨다고 알려져 있다 (Huberman et al., 1976; Baird et al., 2005). 최근엔 B[a]P는 성장과 성숙에 관여하는 내분비 기작을 교란시키는 EDCs로 알려져 있다(Patel et al., 2006; Dong et al., 2008). 본 연구에서는 성숙기 점망둑의 난모세포(평균난경 0.74, 0.88 그리고 0.93 mm)를 이용하여 *in vitro* 조건에서 B[a]P이 난모세포의 성숙과정에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해, GVBD 효과와 배양액 내의 스테로이드 호르몬의 농도 변화를 조사하였다. GVBD 효과와 배양액 내의 스테로이드 호르몬의 농도 조사는 여러 종류의 오염 물질에 대한 내분비 교란 지표로 사용되어져 왔다(Tokumoto et al., 2005; Baek et al., 2007; Hwang et al., 2010).

본 연구결과, 모든 난경에서 B[a]P 노출에 따른 난모세포의 사망률 변화는 10 % 이하의 낮은 수치로 나타났다. *In vitro* 조건에서 bovine oocytes를 대상으로 B[a]P 10 과 20  $\mu$ M로 노출시킨 연구에서도 oocyte maturation과 cytotoxicity에는 뚜렷한 변화가 없었다(Lazzari et al., 2008; Luciano et al., 2010).

평균난경 0.74 mm의 난모세포에서 B[a]P 노출에 따른 스테로이드 호르몬 농도와 GVBD 효과를 보면 dose-dependently manner는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 평균난경 0.88 mm인 난모세포에서는 GVBD가 저해되었으며, 이와 유사하게 T의 농도가 낮게 검출되었다. 대조적으로 0.93 mm인 난모세포에서는 GVBD가 촉진되는 상반되는 결과가 나왔다.

E2/T 비율은 내분비교란 물질 또는 외부 오염 물질 노출에 따른 성 스테로이드 호르몬 변화에 대한 지표로 사용되며(Folmar et al., 1996; Hwang et al., 2010), E2/17 $\alpha$ 20 $\beta$ P 비율은 난황형성기 이후의 E2 생성과 progestin 생성 변화에

대한 지표로 사용되고 있다(Sretarugsa and Wallace, 1997; Baek and Park, 2009). E2/T 비율에서 평균난경 0.88 mm과 0.93 mm인 난모세포에서 GVBD 결과와 유사한 결과가 나왔다. 평균난경 0.88 mm인 난모세포에서는 B[a]P 100 ng/mL 을 제외한 모든 처리구(1, 10 ng/mL)에서 E2/T 비율이 증가되었지만, 평균난경 0.93 mm인 난모세포에서는 E2/T 비율이 감소되었다. 따라서 B[a]P은 fully vitellogenic stage 상태의 점망둑의 난모세포에서는 estrogenic activity을 증가시키지만, 난황형성 종료 직후의 점망둑의 난모세포에서는 E2/T가 감소하는 결과는 기존에 알려진 B[a]P의 estrogenic activity과는 다른 기작이 작용한 것으로 생각된다. 하지만 E2/17 $\alpha$ 20 $\beta$ P 비율과 GVBD 효과가 뚜렷한 연관성을 나타내지 않았다. 또한 GVBD 효과가 MIH으로 생각되는 17 $\alpha$ 20 $\beta$ P의 농도와는 뚜렷한 연관성을 보이지 않았지만, T의 농도가 GVBD와 비슷한 양상을 보이고 있다. Nagahama and Yamashita (2008)는 E2는 난 성숙 유도에 영향이 없지만, 17 $\alpha$ 20 $\beta$ P 뿐만 아니라 T 또한 높은 농도로 존재할 때 GVBD를 유도한다고 보고했다. 따라서 점망둑의 난모세포에서는 17 $\alpha$ 20 $\beta$ P가 아닌 다른 스테로이드 호르몬이 MIH으로 작용했을 가능성도 생각해 볼 수 있다. 이를 위해서 *in vitro* 조건에서 난소 발달 단계별 난모세포 배양을 통해 난모세포의 최종 성숙과정에 T와 다른 스테로이드 호르몬이 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구가 필요하다.

Estrogenic 또는 anti-estrogenic effect는 내분비 교란 효과로써, 일반적으로 생식 주기의 호르몬 조절을 교란시켜 estrogen과 유사한 반응을 나타내는 것을 의미한다(Nicolas, 1999). Estrogenic effect를 가지는 EDCs는 estrogen과 유사한 작용을 해서 ER에 직접적으로 결합해 그에 반응하는 유전자를 활성화시키거나, E2 합성의 최종 단계에 작용하는 aromatase의 활성화와 발현을 촉진시켜 혈장 내 E2의 농도가 증가하여 난모세포의 최종성숙과정을 저해시키는 것으로 알려져 있다(Danzo, 1997; Tollefsen, 2002; Scholz and Mayer, 2008). 만성적으로

PAHs에 노출된 암컷 가자미에서는 혈장의 vitellogenin, T, 그리고 E2의 농도가 상승했고(Janssen et al., 1997), zebrafish에서는 B[a]P이 vitellogenin과 aromatase의 활성을 촉진시켜 estrogenic 영향을 가진다고 보고했다(Hoffmann and Oris, 2006). 반면에 anti-estrogenic effect를 나타내는 물질은 ER에 경쟁적으로 결합할 수 있지만, estrogenic effect가 나타나지 않거나 아주 약한 물질을 뜻하고, aromatase의 활성화와 발현을 저해해 E2의 생성농도를 감소시키는 물질을 말한다(Arcaro et al., 1999; Hirose et al., 2001). *In vitro*에서 가자미 (*Platichthys flesus* L.)의 난황형성후기에 해당하는 난소를 B[a]P에 처리한 결과 B[a]P이 난소의 스테로이드 대사를 억제시키고 T와 E2 수치가 감소시켰고(Monteiro et al., 2000b), PAHs에 노출된 대서양 민어의 혈중 E2 농도도 감소되었다(Thomas, 1990). Dong 등(2008)은 송사리를 B[a]P에 노출시킨 결과, B[a]P은 생식소와 뇌의 aromatase의 활성을 억제시켜서 antiestrogenic effect를 가진다고 보고했다. 최근엔 estrogenic effect과 antiestrogenic effect를 동시에 가지는 EDCs가 보고되고 있다. Bisphenol A (BPA)에 노출시킨 점망둑의 난모세포 경우, 난황형성기에는 BPA 처리가 E2의 분비를 억제하며, 최종성숙기에는 E2와 17 $\alpha$ 20 $\beta$ P 분비를 억제하는 것으로 보아, BPA가 estrogenic effect과 antiestrogenic effect를 동시에 가진다고 보고하였다(Baek et al., 2004).

본 연구 결과, B[a]P은 점망둑의 난모세포의 발달 단계에 따라 그 활성이 다른 것으로 생각된다. Fully vitellogenic stage의 난모세포에서는 B[a]P이 estrogenic activity를 증가시키며 최종 성숙을 저해시키는 효과를 나타냈지만, 난황형성이 막 끝난 난모세포에서는 antiestrogenic effect를 보였다. 따라서 본 연구에서는 B[a]P은 난모세포의 성숙 내지 발달 단계에 따라, 난모세포 성숙에 estrogenic effect 뿐만 아니라 antiestrogenic effect를 나타내는 것으로 생각된다. B[a]P이 난모세포 성숙에 미치는 영향에 대한 정확한 기작을 알기 위해서는 향후 연구에서 E2와 17 $\alpha$ 20 $\beta$ P 등의 steroid receptor에 관한 분자생물학적 연구

가 수반되어야 할 것이다. 또한 이 결과를 토대로 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo* 조건에서 실험을 수행해 점망독을 포함한 연안정착성 해산어류가 B[a]P과 같은 EDCs에 의해 어떻게 교란되는지 확인해야 할 것이다.



## V. 요약

Benzo[a]pyrene (B[a]P)은 다환방향족 탄화수소류(polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs)에 속하는 대표적인 독성 물질로, 원유의 주성분이며 탄소 화합물의 불완전 연소와 같은 다양한 과정에서도 생성되는 소수성 유기 오염 물질이다. 특히 해양 유류 사고 등에 의해 유출된 B[a]P은 수용성 독성물질 (water soluble fraction; WSF)로 전환되어 어류를 비롯한 해양 생물들에게 생식 독성, 면역억제, 발암, 그리고 돌연변이를 일으킬 뿐 아니라 성장과 성숙에 관여하는 내분비 기작을 교란시킨다고 알려져 있다. 본 연구에서는 성숙한 점망 독 암컷의 난소를 대상으로 *in vitro* 조건에서 다양한 농도의 B[a]P에 노출시킨 후, 최종성숙 과정인 GVBD (germinal vesicle breakdown; 핵막붕괴)와 이 과정에 관여하는 성 스테로이드 호르몬 농도 변화를 조사하였다. 평균난경 0.74, 0.88 그리고 0.93 mm인 성숙한 난모세포들을 24시간 배양 후 GVBD 관찰한 결과, 평균난경 0.88 mm의 난모세포에서는 B[a]P을 1 과 100 ng/ml로 처리한 실험구에서 GVBD가 각각 대조구에 비해 유의하게 감소하였다. 또한 평균난경 0.93 mm의 난모세포에서는 B[a]P을 10 과 100 ng/ml로 처리한 실험구에서 GVBD가 각각 대조구에 비해 유의하게 증가하였다. 농도별 B[a]P에 24시간 노출시킨 후 생성된 성 스테로이드 호르몬의 농도변화에서는 평균난경 0.88 mm에서는 T 농도는 B[a]P 1 과 10 ng/ml에서 각각 대조구에 비해 유의하게 감소하였다. E2/T의 비율은 B[a]P 1과 10 ng/ml 농도에서 평균난경 0.88 mm는 대조구에 비해 유의하게 증가하였으나, 평균난경 0.93 mm에선 대조구에 비해 유의하게 감소하였다. 위의 결과를 종합하면, B[a]P은 난모세포의 성숙 내지 발달 단계에 따라, 난모세포 성숙에 estrogenic effect 뿐만 아니라 antiestrogenic effect를 나타내는 것으로 생각된다.



## VI. 참고문헌

- Aida K, Awaji M, Kato T. 1984. Effects of castration on the smoltification of precocious male masu salmon *Oncorhynchus masou*. Bull Jap Soc Sci Fish 50, 565-571
- Arcaro KF, O'Keefe PW, Yang Y, Clayton W, Gierthy JF. 1999. Antiestrogenicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast cancer cells. Toxicol 133, 115-127.
- Baek HJ. 1990. Biosynthese du steroïde inducteur de la maturation ovocytaire par les cellules de granulosa du follicule ovarien de truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*. These de docteur de l'Universite Pierre et Marie Curie, Paris 6.
- Baek HJ. 2008. Production of C<sub>21</sub>-steroids in longchin goby, *Chasmichthys dolichognathus* during oocyte maturation. Dev Reprod 12, 107-112.
- Baek HJ, Hwang IJ, Kim KS, Lee YD, Kim HB, Yoo MS. 2007. Effects of BPA and DES on longchin goby (*Chasmichthys dolichognathus*) *in vitro* during oocyte maturation. Mar Environ Res 64, 79-86.
- Baek HJ, Hwang IJ, Park MH, Kim HB. 2009. Effects of nonylphenol and 2,2',4,6,6'-pentachlorobiphenyl on *in vitro* sex steroid production in maturing oocytes of the yellowfin goby, *Acanthogobius flavimanus*. Fish Aqua Sci 12(4), 293-298.
- Baek HJ, Lee TY. 1985. Experimental studies on the mechanism of reproductive cycle in the longchin goby, *Chasmichthys dolichognathus*. Bull Kor Fish Soc 18, 243-252.
- Baek, H.J., Park, M.H., 2009. Effects of Nonylphenol and 2, 2, 4, 6, 6-pentachlorobiphenyl on *in vitro* Sex Steroid Production in Maturing Oocytes of the Yellowfin Goby, *Acanthogobius flavimanus*. Fisheries and Aquatic Sciences



12, 293-298.

Baek HJ, Park MH, Lee YD, Kim HB, Kim JW, Yoo MS. 2004. Effect of bisphenol A on ovarian steroidogenesis in longchin Goby (*Chamichthys dolichognathus*). J Kor Fish Soc 37(3), 192-196.

Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. Environ Mol Mutagen 45, 106-114.

Blumer M. 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. Sci Am 234, 35-45.

Buhler DR, Williams DE. 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animals: Part I, oxidative enzymes (or phase I enzymes). In: Varanasi U (ed) Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment, CRC Uniscience Series, CRC Press Inc, Boca Raton, FL, pp 151-184.

Carlson EA, Li Y, Zelikoff JT. 2004. Benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): relationship between lymphoid CYP1A activity and humoral immune suppression. Toxicol Appl Pharmacol 201, 40-52.

Chung MK. 1977. The fishes of Korea. Iljisa, Seoul, pp 468-492

Collins JF, Brown JP, Alexeeff GV, Salmon AG. 1998. Potency equivalency factors for some polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives. Regul toxicol pharmacol 28, 45-54.

Danzo BJ. 1997. Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. Environ Health Perspect 105, 294-301.

Dong W, Wang L, Thornton C, Scheffler BE, Willett KL. 2008. Benzo(a)pyrene decreases brain and ovarian aromatase mRNA expression in *Fundulus heteroclitus*. Aqua Toxicol 88, 289-300.

- Folmar LC, Denslow ND, Rao V, Chow M, Crain DA, Enblom J, Marcino J, Guillette LJ. 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* 104, 1096-1101.
- Hardin JA, Hinoshita F, Sherr DH. 1992. Mechanisms by which benzo[a]pyrene, an environmental carcinogen, suppresses B cell lymphopoiesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 117, 155-164.
- Hirose T, Morito K, Kizu R, Toriba A, Hayakawa K, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. 2001. Estrogenic/antiestrogenic activities of benzo[a]pyrene monohydroxy derivatives. *J Health Sci* 47, 552-558.
- Hoffman JL, Oris JT. 2006. Altered gene expression: a mechanism for reproductive toxicity in zebrafish exposed to benzo[a]pyrene. *Aquat Toxicol* 78, 332-340.
- Huberman E, Sachs L, Yang SK, Gelboin V. 1976. Identification of mutagenic metabolites of benzo[a]pyrene in mammalian cells. *Proc Nat Acad Sci* 73, 607-611.
- Hwang IJ, Kim HW, Kim JK, Lee YD, Baek HJ. 2010. Estrogenicity of 4-nonylphenol and diethylstilbestrol on *in vitro* oocyte maturation of the dusky tripletooth goby, *Tridentiger obscurus*. *Animal Cells and Systems* 14, 161-167.
- IARC. 2010. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 92.
- Janssen PAH, Lambert JGD, Vethaak AD, Goos HJTh. 1997. Environmental pollution caused elevated concentrations of oestradiol and vitellogenin in the female flounder, *Platichthys flesus* (L.). *Aquat Toxicol* 39, 195-214.
- Kawanishi M, Watanabe T, Hagio S, Ogo S, Shimohara C, Jouchi R, Takayama S, Hasei T, Hirayama T, Oda Y, Yagi T. 2009. Genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, a novel mutagen in ambient air and surface soil, in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Mutagenesis* 24, 279-284.

- King W, Ghosh S, Thomas P, Sullivan CV. 1997. A receptor for the oocyte maturation-inducing hormone 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one on ovarian membranes of striped bass. *Biol Reprod* 56, 266-271.
- Lazzari G, Tessaro I, Crotti G, Galli C, Hoffmann S, Bremer S, Pellizzer C. 2008. Development of an *in vitro* test battery for assessing chemical effects on bovine germ cells under the ReProTect umbrella. *Toxicol Appl Pharmacol* 233, 360-370.
- Luciano AM, Franciosi F, Lodde V, Corbani D, Lazzari G, Crotti G, Galli C, Pellizzer C, Bremer S, Weimer M, Modina SC. 2010. Transferability and inter-laboratory variability assessment of the *in vitro* bovine oocyte maturation (IVM) test within ReProTect. *Reprod. toxicol* 30, 81-88.
- Maccubbin AE. 1994. DNA adduct analysis in fish: laboratory and field studies. In: Malins DC, Ostrander GK. (Eds.), *Aquatic Toxicology and Cellular Perspectives*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 267-294.
- Mackenzie KM, Angevine DM. 1981. Infertility in Mice Exposed in Utero to Benzo(a)pyrene. *Biol Reprod* 24, 183-191.
- Meador JP, Stein JE, Reichert WL, Varanasi U. 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev Environ Contam Toxicol* 143, 79-165.
- Menzie CA, Potocki BB, Santodonato J. 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ Sci Technol* 26, 1278-1284.
- Monteiro PRR, Reis-Henriques MA, Coimbra J. 2000a. Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Res* 49, 453-467.
- Monteiro PPR, Reis-Henriques MA, Coimbra J. 2000b. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit *in vitro* ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquat Toxicol* 48, 549-559.

- Nagahama Y. 1997.  $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62, 190-196.
- Nagahama Y, Adachi S. 1985. Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev Biol* 109, 428-435.
- Nagahama Y, Yamashita M. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Develop Growth Differ* 50, S195-S219.
- Neal MS, Mulligan Tuttle AM, Casper RF, Lagunov A, Foster WG. 2010. Aryl hydrocarbon receptor antagonists attenuate the deleterious effects of benzo[a]pyrene on isolated rat follicle development. *Reprod Biomed Online* 21, 100-108.
- Nicolas JM. 1999. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. *Aquat Toxicol* 45, 77-90.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. 2004. Detailed review paper on fish screening assays for the detection of endocrine active substances. 47.
- Patel MR, Scheffler BE, Wang L, Willett KL. 2006. Effects of benzo(a)pyrene exposure on killifish (*Fundulus heteroclitus*) aromatase activities and mRNA. *Aquat Toxicol* 77, 267-278.
- Patiño, R, Sullivan CV. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol Biochem* 26, 57-70.
- Scholz S, Mayer I. 2008. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Mol Cell Endocrinol* 293, 57-70.
- Scott AP, Sheldrick EL, Flint APF. 1983. Measurement of  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in plasma of trout (*Salmo gairdneri* Richardson):

Seasonal changes and response to salmon pituitary extract. Gen Comp Endocrinol 49, 128-134.

Sretarugsa P, Wallace RA. 1997. The developing *Xenopus* oocyte specifies the type of gonadotropin-stimulated steroidogenesis performed by its associated follicle cells. Develop Growth Differ 39, 87-97.

Thomas P. 1990. Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function. J Exp Zool Suppl 256, 126-128.

Thomas P, Trant JM. 1989. Evidence that 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one is a maturation-inducing steroid in spotted seatrout. Fish Physiol Biochem 7, 185-191.

Tokumoto T, Tokumoto M, Nagahama Y. 2005. Induction and inhibition of oocyte maturation by EDCs in zebrafish. Reprod. Biol. Endocrinol. 3, 69.

Tollefsen KE. 2002. Interaction of estrogen mimics, singly and in combination, with plasma sex steroid-binding proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat Toxicol 56, 215-225.

U.S. Environmental Protection Agency, 1998. Endocrine disruptor screening program: statement of policy notice. Fed Regist 248, 71542-71568.

Varanasi U, Nishimoto M, Reichert WL, Stein JE, 1982. Metabolism and subsequent covalent binding of benzo[a]pyrene to macromolecules in gonads and liver of ripe english sole (*Parophrys vetulus*). Xenobiotica 12, 417-425.

Wills LP, Jung D, Koehn K, Zhu S, Willett KL, Hinton DE, Di Giulio RT. 2010. Comparative chronic liver toxicity of benzo[a]pyrene in two populations of the atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) with different exposure histories. Environ Health Perspect 118, 1376-1381.

Xu C, Chen JA, Qiu Z, Zhao Q, Luo J, Yang L, Zeng H, Huang Y, Zhang L, Cao J, Shu W. 2010. Ovotoxicity and PPAR-mediated aromatase downregulation in female Sprague-Dawley rats following combined oral exposure to benzo[a]pyrene

and di-(2-ethylhexyl) phthalate. Toxicol Lett 199, 323-332.

Young G, Kagawa H, Nagahama Y. 1982. Oocyte maturation in the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): *In vitro* effects of salmon gonadotropin, steroids, and cyanoketone (an inhibitor of  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -steroid dehydrogenase). J Exp Zool 224, 265-275.

Zenzes MT, Puy LA, Bielecki R. 1998. Immunodetection of benzo[a]pyrene adducts in ovarian cells of women exposed to cigarette smoke. Mol Hum Reprod 4, 159-165.





## VII. 감사의 글

많은 일이 일어났던 짧고도 긴 2년 반의 대학원 생활이었습니다. 큰 포부와 열정으로 시작했지만 아쉬움이 많이 남는 것 같습니다. 하지만 앞으로 제 자신을 이끌어 갈 소중한 경험이었습니다.

우선 저의 실험을 지도해 주시고 무사히 실험을 마칠 수 있도록 이끌어주신 백혜자 교수님에게 진심으로 감사드립니다. 교수님 수업에 매료되어 열정만 가지고 실험실에 들어온 저를 지금까지 가르쳐주시고 논문을 완성할 수 있도록 격려해주셔서 감사드립니다. 또한 여성으로서 그리고 한 사회인으로서 나아갈 수 있도록 아낌없는 조언을 해주신 따뜻한 교수님의 마음에 존경어린 감사를 드립니다. 교수님에게 배운 가르침으로 좋은 선생님이 되도록 노력하겠습니다. 사랑합니다! 백혜자 교수님.

바쁘신 일정에도 꼼꼼하게 논문심사를 해주시고 애정 어린 조언을 해주신 박완규 교수님과 김진구 교수님에게 진심으로 감사드립니다. 자원생물학과 남기완 교수님, 김수암 교수님, 오철웅 교수님, 그리고 김현우 교수님께도 감사드립니다.

발생생식내분비 연구실의 가족들에게도 감사한 마음을 전합니다. 오빠처럼 따뜻하게 격려해주신 상준선배, 태양처럼 어려운 일이 있으면 도움을 준 슬기, 이제 막 대학원에 들어와 실험실을 이끌어 갈 대근, 효은, 그리고 묵묵히 도움을 준 우리 학부생 현철, 준규 그리고 진형에게 감사함을 전합니다. 지금은 취업해 더 큰 꿈을 꾸고 있는 실험실의 정신적 지주 인준선배에게 고마운 마음을 전합니다. “아줌마! 아줌마!”하며 까칠하지만 끝까지 졸업할 수 있도록 도움을 주신 것 잊지 않겠습니다.

교육대학원 10명 동기들 모두들 감사하고 사랑합니다. 이제 막 시집가서 신

혼재미에 폭 빠진 유린, 꼼꼼하게 대학원 과정을 챙겨준 경실, 귀염둥이 막내 혜진, 그리고 교육대학원생 대표로 고생한 주희와 주영에게 감사드립니다. 내림, 유미, 현정, 은정, 청일점 민규에게도 감사드립니다. 2년 반 동안 배운 결실로 사회에 나가 좋은 선생님이 되기를 바랍니다.

새로운 가족이 되어 저에게 힘을 주신 아버님, 어머님에게 사랑과 감사의 마음을 전합니다. 늘 논문 때문에 바쁘다는 핑계로 자주 찾아뵙지 못하지만 항상 저에게 힘을 주셔서 송구스럽습니다. 그리고 막내라고 항상 귀엽게 봐주시는 큰아주버님들과 형님들에게 감사드립니다.

저에게 항상 잔소리를 하지만 언제나 친동생처럼 걱정해주는 쌍둥이언니들과 멀리서 응원해주는 친구들에게도 감사의 마음을 전합니다. 저에게 항상 미안한 마음을 가지고 있는 우리 엄마에게 감사와 사랑을 보냅니다.

철없는 딸을 30년 넘게 뒷바라지를 하시고 계신 아빠에게 진심으로 감사드립니다. 무뚝뚝하지만 속은 바다와 같은 마음으로 저를 항상 사랑해주시고 저의 대학원 생활을 누구보다 응원하며 격려해주셨습니다. 아빠! 사랑하고 존경합니다.

배 속에서부터 지금까지 함께한 우리 딸 아윤에게 사랑을 전합니다. 건강하고 무럭무럭 자란 우리 효녀 아윤아! 고마워. 그리고 마지막으로 지금 태평양을 향해하고 있을 내 사랑 최원삼에게 이 논문을 드립니다.