이학석사 학위논문

에스트로겐성 내분비계장애물질이 문절망둑, *Acanthogobius flavimanus*의 난모세포 성숙과정에 미치는 영향

이 논문을 [illegible] 학위논문으로 제출함

2004년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 생 물 학 과

박 명 희

박명희의 이학석사 학위논문을 인준함

2003 년 12 월 24 일

주 심 이학박사 김 수 암

위 원 이학박사 남 기 완

위 원 이학박사 백 혜 자

목 차

Abstract i

Ⅰ. 서론 1

Ⅱ. 재료 및 방법 4

1. 실험어 및 난모세포 배양 4

2. 스테로이드 호르몬 전구물질/내분비계 장애물질 첨가 5

3. 성 스테로이드 호르몬 대사물질 분석 5

4. 스테로이드 호르몬 측정 6

5. 통계분석 8

Ⅲ. 결과 9

1. 성숙기 난모세포의 스테로이드 대사물질 추적 9

2. DES, NP, PCB104, BPA가 성 스테로이드 호르몬
생성과정에 미치는 영향 9

3. PCB104와 NP의 농도별 테스트 14

(1) PCB104의 효과 14

(2) NP의 효과 19

Ⅳ. 고찰 20

Ⅴ. 요약 24

Ⅵ. 감사의 글 25

Ⅶ. 참고문헌 26

In vitro Effect of Endocrine Disrupting Chemicals on Oocytes Maturation of Yellowfin goby, *Acanthogobius flavimanus*

Myoung-Hee Park

Department of Marine Biology, Graduate School,
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Abstract

To investigate the effects of xenoestrogens on steroidogenesis *in vitro*, the fully vitellogenic oocytes of yellowfin goby, *Acanthogobius flavimanus* were examined. Five steroid metabolites, 17α,20β dihydroxy-4-pregnen-3-one (17α20βOHP), androstenedione (Δ4), Testosterone (T), estrone (E1) and Estradiol-17β (E2) from ovarian oocytes were identified in the presence of ^{3}H-pregnenolone, ^{3}H-17α-hydroxyprogesterone, and ^{3}H-androstenedione. The fully vitellogenic oocytes were incubated in the presence of xenoestrogens such as diethylstilbestrol (DES), Nonylphenol (NP), bisphenol A (BPA) and 2,4,6,2',6' pentachlorobiphenyl (PCB104) at concentration of 100 ngml^{-1} with precursor 17α-hydroxyprogesterone (17αOHP) 50 ngml^{-1}. The major metabolites, T, E2 and 17α20βOHP were analyzed using radioimmunoassay. NP stimulated T synthesis, but inhibited 17α20βOHP synthesis. PCB 104 inhibited T and E2 synthesis weakly, but there were no significant differences. DES and BPA did not affect in T, E2 and 17α20βOHP. The effects of PCB104 and NP were tested under various concentrations (0.1, 1, 10, 100, and 1000 ngml^{-1}). Even though T and 17α20βOHP synthesis were increased at concentration 1000 ngml^{-1}, statistical difference were not found. However, 1 and 100 ngml^{-1} of NP stimulated 17α20βOHP production. The results of these experiments demonstrated that only PCB104 of the endocrine disrupting chemicals (EDCs) had antiestrogenic effect on steroidogenesis *in vitro* of yellowfin goby.

Ⅰ. 서 론

오늘날 환경의 중요성이 날로 부각되면서 환경호르몬이라 불리는 내분비계장애물질은 한정된 지역에 서식하고 있는 수서생물 집단에 커다란 위험요소로 인식되고 있다 (Woodward et al., 1993; Van Der Kraak et al., 1992; Yoon, 1998). 내분비계장애물질로는 각종 산업용 화학물질, 살충제 및 제초제 등의 농약류, 유기중금속류, 소각장의 다이옥신류 그리고 에스트로겐 호르몬 유사물질 등이 있는데, 이들 내분비계장애물질 중 DES (diethylstilbestrol), NP (nonylphenol), BPA (bisphenol A), PCBs (polychlorobiphenyl) 등은 에스트로겐 수용체와 결합함으로써 에스트로겐성 활성을 나타내는 내분비계장애물질들로 분류된다 (Matthiessen and Sumpter, 1998; Kime, 1998).

에스트로겐성 내분비계장애물질들에 노출된 수컷 어류에서는 암컷 어류의 주요 에스트로겐인 estradiol-17β (E2)가 혈장에서 높은 농도로 검출되었고 (Giesy et al., 2000), E2에 의해 합성되는 암컷 특이단백질인 난황전구물질, vitellogenin과 난각형성단백질인 zona radiata protein의 합성이 유도되었다고 보고하였다 (Ackermann et al., 2002; Christensen, 1999; Jones et al., 2000; Lindholst, 2000). 뿐만 아니라 정소의 발달을 억제시키고 testis-ova가 유도되는 등 암컷화 현상이 나타났으며 (Tabata et al., 2001; Yokota et al., 2000), 이러한 에스트로겐성 내분비계장애물질에 의한 수컷어류의 생식계 교란은 수서생태계의 교란을 야기시킴으로써 지금까지의 연구는 수컷을 중심으로 이루어

져 왔다.

에스트로겐성 내분비계장애물질들은 암컷어류에서도 생식소 크기 감소, 혈장 호르몬 농도 교란, 혈장 vitellogenin 농도 증가 그리고 산란율 감소 등의 생식기능장애를 일으켰다 (Janssen et al., 1997; Nimrod and Benson, 1998; Örn et al., 1998; Sohoni et al, 2001). 또한 이들 물질에 노출된 어미에게서 생산된 알과 자어의 초기 사망률이 아주 높게 나타났다. 이러한 암컷어류의 생식교란은 배란과 산란에 미치는 직접적인 영향뿐만 아니라 다음세대로도 이어질 가능성이 크므로 이에 대한 많은 연구가 요구되고 있다.

어류의 생식은 내분비계에 의한 복잡한 생리적 조절 과정을 거친다. 특히, 암컷 어류의 난모세포 성숙과정은 시상하부-뇌하수체-생식소의 내분비 호르몬 축에 의해 조절된다 (Nagahama et al., 1994). 즉, 난모세포의 난황형성에는 E2가, 난황형성 후 난모세포의 난핵포붕괴 (germinal vesicle breakdown; GVBD)와 배란의 최종 성숙 유도에는 17α,20β-dihydroxy 4-pregnen 3 one (17α20βOHP)가 작용한다고 알려져 있다 (Goetz et al., 1987; Van Der Kraak et al., 1984). 내분비계장애물질들은 시상하부-뇌하수체-생식소의 내분비 축에 작용하여 생식내분비 기능을 교란한다고 알려져 있지만 (Thomas, 1989 · 1990), 생식소의 구조와 기능장애는 생식소에서의 성 스테로이드호르몬에 의해 가장 크게 영향을 받는다.

문절망둑 (*Acanthogobius flavimanus*)은 농어목 (Perciformes)의 망둑어과 (Gobiidae)에 속하며 우리나라 서해와 남해, 중국, 일본 및 연해

주 등에 분포한다 (Chung, 1977). 문절망둑은 주로 수심이 얕은 하구와 연안의 갯펄 저질에 서식하는 정착성 어류이기 때문에 (Kim and Kang, 1993) 하천과 연안의 오염을 나타내는 지표종으로 인식될 뿐만 아니라 (Kwon et al., 2000) 내분비계장애물질에 의한 위해성 평가에 적합한 어종으로 알려지고 있다 (Ohkubo et al., 2003).

본 연구에서는 문절망둑을 대상으로 난모세포의 *in vitro* 배양을 통해 생성되는 성 스테로이드 호르몬을 밝히고, 에스트로겐성 내분비계장애물질이 이들 성 호르몬 생성과정에 어떤 영향을 미치는지 알아보고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험어 및 난모세포 배양

실험에 사용된 문절망둑은 산란기라고 추정되는 1월부터 3월 사이에 부산 다대포 부근에서 채집한 전장 14.8~21.4 cm, 체중 52.8~26.1 g인 성숙한 암컷을 대상으로 하였다. 실험어는 2-phenoxyethanol 0.3 ml/l로 마취시켜 전 채혈한 후 무균상태에서 실험어의 난소를 절취하여 TBSS (trout balanced salt solution)로 세척하였다. 난경이 0.72에서 0.79의 난황형성 후 난핵이 이동을 시작하는 단계에 있는 난모세포를 사용하였다. 절취된 난소는 가는 핀셋을 이용하여 각각의 난모세포로 분리한 후 24well plates에 well당 Leibovitz's L-15 (L-15) 배양액 (Gibco) 1 ml에 30 개의 난모세포를 각각 분주한 뒤 12℃에서 24시간 또는 48시간 배양하였다. TBSS와 L-15 배양액의 pH는 7.9, 삼투농도는 300 milliosmol로 조절하였다.

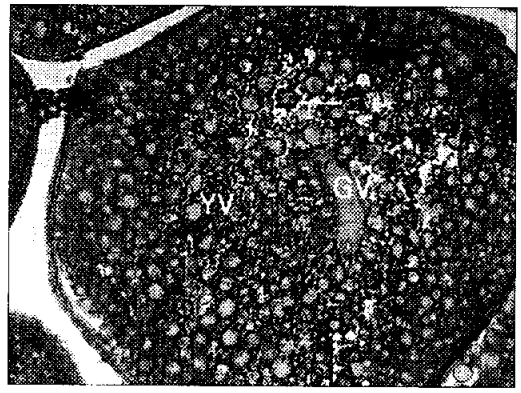

Fig. 1. Photomicrographs of fully vitellogenic oocyte in yellowfin goby. GV=germinal vesicle; YV = yolk vesicles (×100).

2. 스테로이드 호르몬 전구물질 및 내분비계 장애물질 첨가

난소에서 생성되는 스테로이드 호르몬을 조사하기 위해 방사선으로 표지된 스테로이드 전구물질인 ^{3}H-pregnenolone (1.3μCiml^{-1}) 또는 ^{3}H-17α-hydroxyprogesterone (1.9μCiml^{-1}), ^{3}H-androstenedione (1.3μCiml^{-1}) (Amersham)을 L-15 배양액에 녹여 배양초기에 첨가하였다.

또 내분비계장애물질이 난소의 성 스테로이드 호르몬 합성에 미치는 영향을 조사하기 위해, 비표지된 스테로이드 전구물질인 17α-hydroxyprogesterone 50 ngml^{-1} 및 내분비계장애물질인 bisphenol A (BPA, Aldrich), nonylphenol (NP, Aldrich), diethylstilbestrol (DES, sigma) 그리고 2,4,6,2′,6′-pentachlorobiphenyl (PCB104, Accustandard)를 각 실험 농도구별로 첨가하였다. *in vitro* 상태에서 이들 장애물질에 대한 난모세포의 반응효과를 높이기 위하여 사람태반성 성선자극호르몬 즉, HCG 50IUml^{-1}를 첨가한 실험구도 설정하였다.

3. 성 스테로이드 호르몬 대사물질 분석

배양 한 난모세포와 배양액은 함께 80% ethanol로 균질화하여 원심분리한 후 에탄올 상등액을 건조시킨 뒤 500 $\mu\ell$ 물에 용해시켜 다시 dichloromethane으로 2번 추출하여 스테로이드만을 얻었다.

스테로이드 추출물은 표준 스테로이드와 동시에 실리카겔을 입힌 얇은 막 지지체 (60F^{254}, Merck)에 점적시킨 후 밀폐된 혼합용매 (benzene : acctone = 80 : 20 와 benzene : ethylacetate = 80 : 20) 속에서 전개시켰다. 전개 후 얇은 막을 건조시킨 뒤 대사물질들의 반점

중 E1. E2는 요오드 증기로, P5와 17α OHP5는 발색시약을 뿌리고, 나머지는 254 nm의 자외선 하에서 확인하였다.

얇은 막에 나타난 대사물질들은 방사선 사진법 (autoradiography, Fuji Bas 3000)으로 재확인하였으며, 재확인 된 반점에 해당되는 실리카겔 밴드를 잘라 5 ㎖의 혼합용매 (dichloromethane : methanol = 9 : 1)로 용리하였다. 대사물질을 gaschromatography-mass spectrometry(GC-MS)로 재확인하였다.

본 실험에서 사용된 GC-MS 작동조건은 주입기 온도가 270℃, splitless mode를 이용하여 주입하였다. interface의 온도는 270℃이며, DB-5 column (30 m×0.32 mm I.D.)를 사용하였다.
분리관의 온도는 80℃에서부터 240℃까지 20℃/min으로, 240℃에서부터 260℃까지 2℃/min 그리고 265℃부터 300℃까지 15℃/min으로 상승시킨 후 5분 동안 유지하였다.

4. 스테로이드 호르몬 측정

배양한 난모세포와 배양액은 함께 균질화하여 혼합용매 (ethylacetate : cyclohexane = 50 : 50)로 2회 추출 후 estradiol-17β, testosterone (T), 17α,20β-dihydroxy-4 pregnen-3-one (17α20β OHP)을 국립수산과학원 수산생명물질정보센터에서 Aida et al. (1984)의 방법에 따라 방사선면역측정법 (radioimmunoassy)에 의해 측정하였다.

Rabbit anti-E2-6-CMO-BSA 항체, anti-T-6-CMO-BSA 항체, 그리고 anti-17α20βOHP-3-CMO-BSA 항체는 Cosmo-Bio Co. Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였고, standard 호르몬들은 Steraloids Inc. (Wilton, NH, USA)로부터 구입하였다. 또한 방사선표지 [2,4,6,7-^{3}H]-estradiol-17β, [2,4,6,7-^{3}H]-testo- sterone는 Amersham Life Science (England)로부터 구입하였고, 방사선표지 17α20βOHP는 Young et al. (1983)의 방법에 의해서 [1,2,6,7-^{3}H]-17α-hydroxyprogesterone로부터 효소적 전환으로 얻은 후 TLC에 의해 분리 한 것을 사용하였다.

E2, T 그리고 17α20βOHP RIA계에 있어서 최소 검출량은 각각 12.5 pgmℓ$^{-1}$, 10 pgmℓ$^{-1}$, 10 pgmℓ$^{-1}$ 이었고, 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) 그리고 17α20βOHP RIA계에서는 3.2 (n=4)와 9.5% (n=8) 이었다.

E2 항체의 교차율은 estron, estriol 그리고 T에 대하여 각각 0.5%, 0.9% 그리고 0.01% 이었고, 그 외의 다른 스테로이드호르몬들에 대해서 0.01% 이하의 교차율을 나타냈다. T 항체의 교차율은 dihydrotestosterone, androsten-3, 17-dione, 11-ketotestosterone 그리고 androstenedione에 대하여 각각 2.7%, 0.5%, 0.5% 그리고 0.35%이었고, 다른 스테로이드호르몬들과는 0.01% 이하의 교차율을 나타냈다. 17α20βOHP 항체의 교차율은 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one

(17α20αOHP), 17α,20β,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20β-S) 그리고 17α-OHP에 대하여 각각 3.9%, 1.8%, 0.8%이었고, Progesterone과 다른 스테로이드호르몬들과는 0.01%의 교차율을 나타냈다.

5. 통계분석

스테로이드 호르몬의 측정 결과는 17αOHP 대조구와 실험구간 및 각 실험구간의 차이 유무를 일원분산분석법 (사후검정방법 : LSD)으로 확인하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 성숙기 난모세포의 스테로이드 대사물질 추적

문절망둑의 성숙기 난소 (난경 0.79 mm)를 대상으로 ^{3}H-pregnenolone, ^{3}H-17α-hydroxyprogesterone 또는 ^{3}H-androstenedione을 전구물질로 첨가하여 생성된 스테로이드 대사물질은 Fig. 2와 같다.

^{3}H-pregnenolone로부터 생성된 스테로이드들의 TLC 상의 반점은 17α20βOHP, T + E2, pregnenolone (P5), estrone (E1) 등의 표준물질과 일치하였다 (Fig. 2-A). ^{3}H-17α-hydroxyprogesterone로부터 생성된 스테로이드는 17α20βOHP, T+E2 그리고 E1의 반점과 일치하였다 (Fig. 2-B). ^{3}H-androstenedione으로부터 생성된 스테로이드들은 E2와 Δ4, E1의 반점과 일치하였다(Fig. 2-C).

위의 세 가지 전구물질로부터 생성된 주요 대사물질들 즉, 17α20βOHP, Δ4, T, E1 그리고 E2는 GC-MS에 의해 재확인되었다 (Fig. 3.)

2. DES, NP, PCB104, BPA가 성 스테로이드 호르몬 생성과정에 미치는 영향

난황형성 후 난핵 (germinal vesicle)이 이동하기 시작하는 성숙 단계 (난경 0.72 mm)의 난모세포를 대상으로 스테로이드 전구물질, 17αOHP (50 ngml^{-1})과 에스트로겐성 내분비계장애물질 DES, NP, PCB104 그리고 BPA를 각각 100 ngml^{-1} 첨가하여 배양한 결과는 Fig 4, 5와 같다.

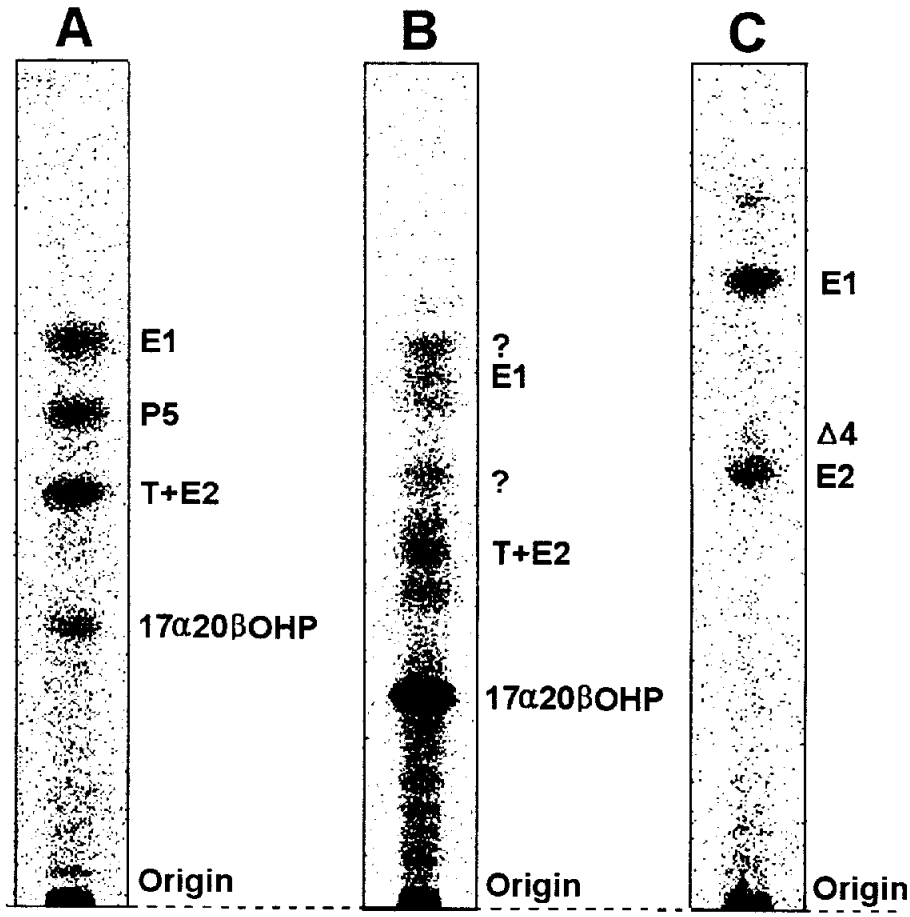

Fig. 2. Autoradiograms of steroid metabolites from mature ovarian oocytes of yellowfin goby incubated with ^{3}H-pregnenolone (A), ^{3}H-17α-hydroxyprogesterone (17αOHP) (B) and ^{3}H-androstenedione (Δ4) (C). The metabolites were separated by thin layer chromatography and developed with benzene : acetone (4:1) and benzene : ethylacetate (4:1).

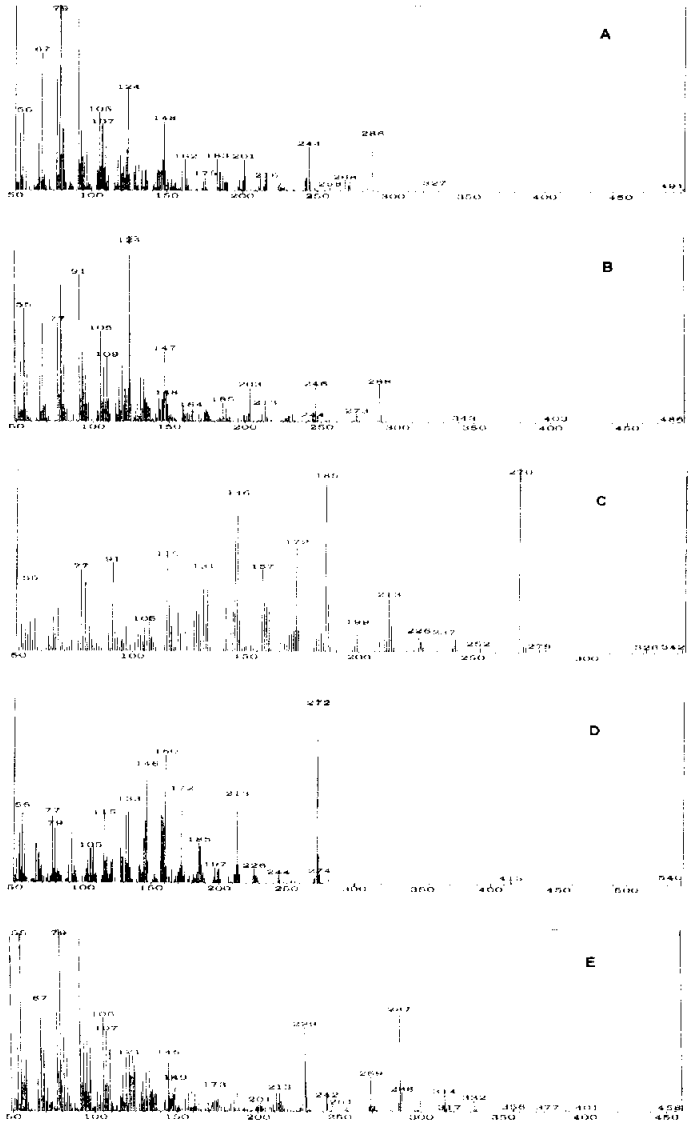

Fig. 3. Mass spectra of steroids produced by yellowfin goby oocytes identified as androstenedione (A), testosterone (B), estrone (C), estradiol-17β (D) and 17α20β-dihydroxyprogesterone (E).

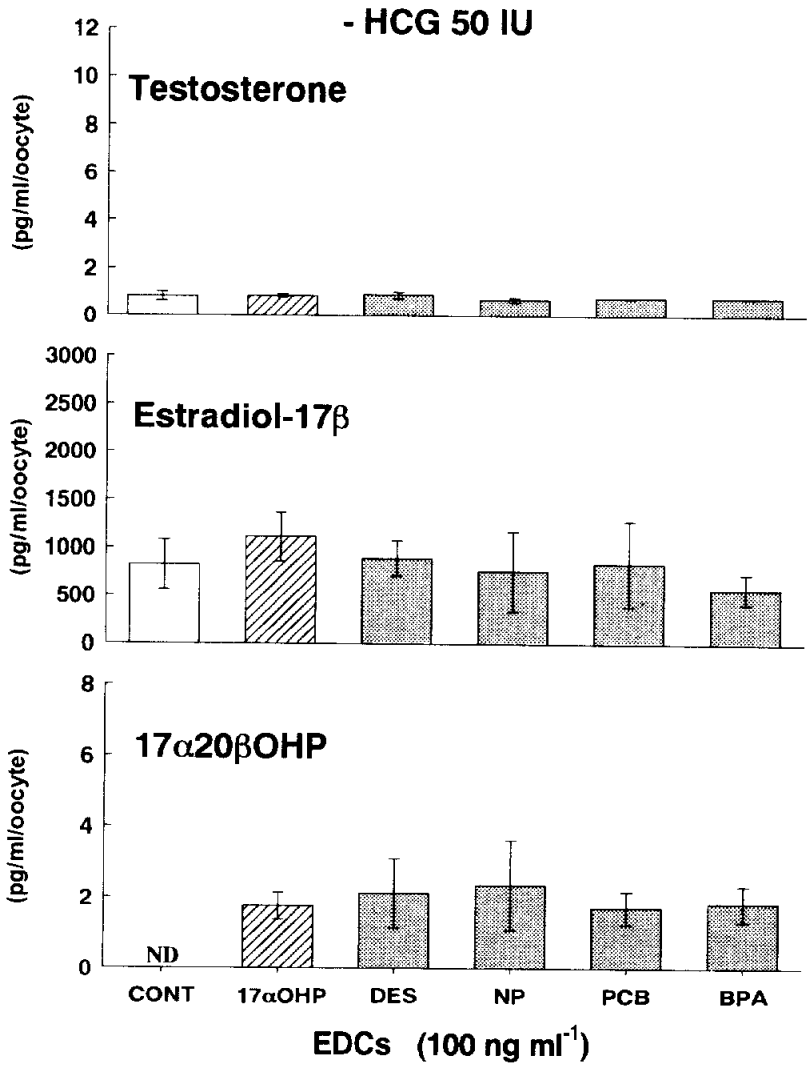

Fig. 4. Effects of DES, NP, PCB104 and BPA 100 ngml ^{1} on steroids synthesis of yellowfin goby oocytes. The fullly vitellogenic oocytes were cultured with precursor 17αOHP 50 ngml $^{-1}$ for 48 hrs.

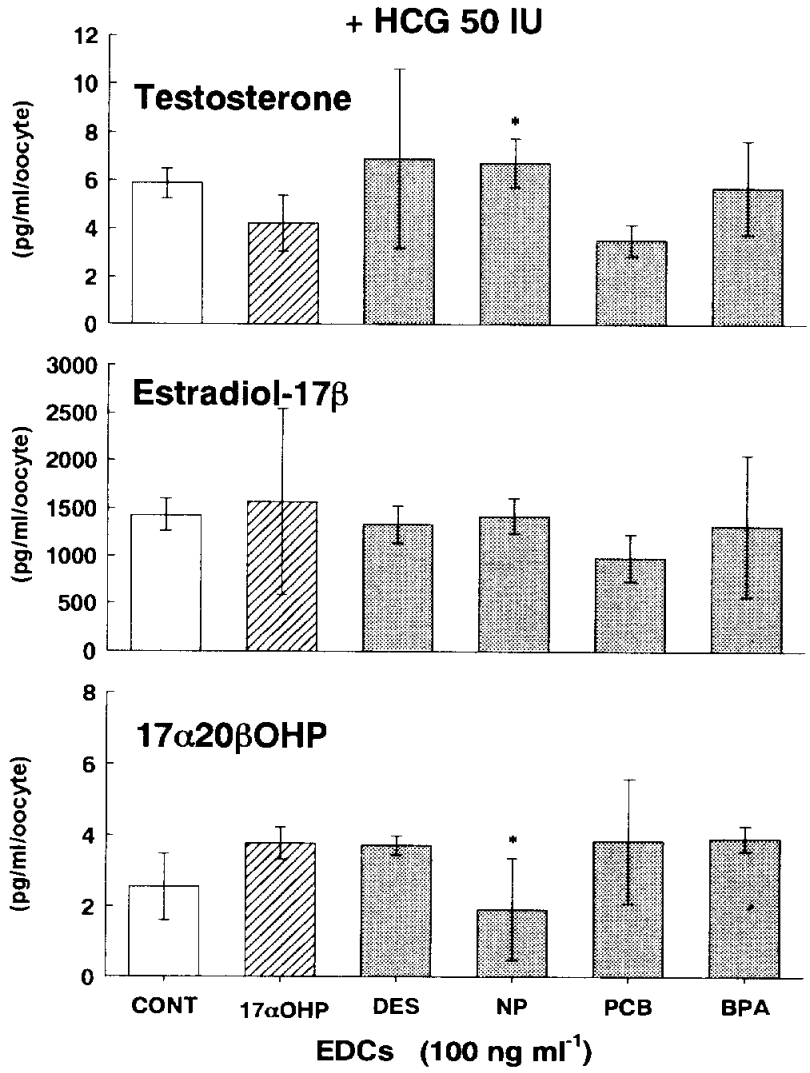

Fig. 5. Effects of DES, NP, PCB104 and BPA 100 ngml^{-1} on steroids synthesis of yellowfin goby oocytes. The fully vitellogenic oocytes were cultured with precursor 17αOHP 50 ngml^{-1} and HCG 50IUml^{-1} for 48 hrs. *: significant differences from 17αOHP control ($P<0.05$).

HCG로 자극하지 않은 실험구 즉, -HCG 하에서 DES, NP, PCB104 그리고 BPA는 17αOHP 대조구와 비교해 볼 때, T, E2, 17α20βOHP 생성에 아무런 영향을 미치지 않았다 (Fig. 4). HCG로 자극을 받은 실험구 즉, +HCG 하에서 T의 농도는 17αOHP 대조구와 비교해 볼 때, DES와 NP 실험구에서 유의하게 증가하였고 (각각 $p < 0.05$), BPA 실험구에서도 증가하였지만 유의한 차이는 없었다. PCB104에서는 약간의 감소현상을 보였으나 유의한 차이는 보이지 않았다. E2의 경우도 PCB104에서 약간의 감소현상이 관찰되었으나 17αOHP 대조구와의 유의한 차이는 없었다. 17α20βOHP 생성농도는 17αOHP 대조구와 비교해 볼 때, DES, PCB104 그리고 BPA 실험구와 차이가 없었으나 NP 실험구에서만 감소 현상을 보였다 (Fig. 5.) ($p < 0.05$).

3. PCB104와 NP의 농도별 테스트

난경이 0.76 mm인 난모세포를 대상으로 17αOHP 50 ngml^{-1}과 PCB104, NP를 각각 0.1, 1, 10, 100, 1000 ngml^{-1} 농도로 첨가한 후 성스테로이드 생성결과를 비교해 보면 Fig. 6 및 7, 8, 9와 같다.

(1) PCB104의 효과

-HCG 하에서 T의 생성 농도는 1000 ngml^{-1} 실험구에서 가장 높았으며, 1 ngml^{-1} 에서도 약간 증가하였으나 유의한 차이는 없었다. E2의 경우도 T와 유사한 경향을 보였다. 17α20βOHP의 생성량은 1과 1000 ngml^{-1} 농도에서 가장 높게 나타났다 (Fig. 6).

+HCG 하에서도 T의 생성 농도는 1000 ngml^{-1}에서 가장 높게 나타

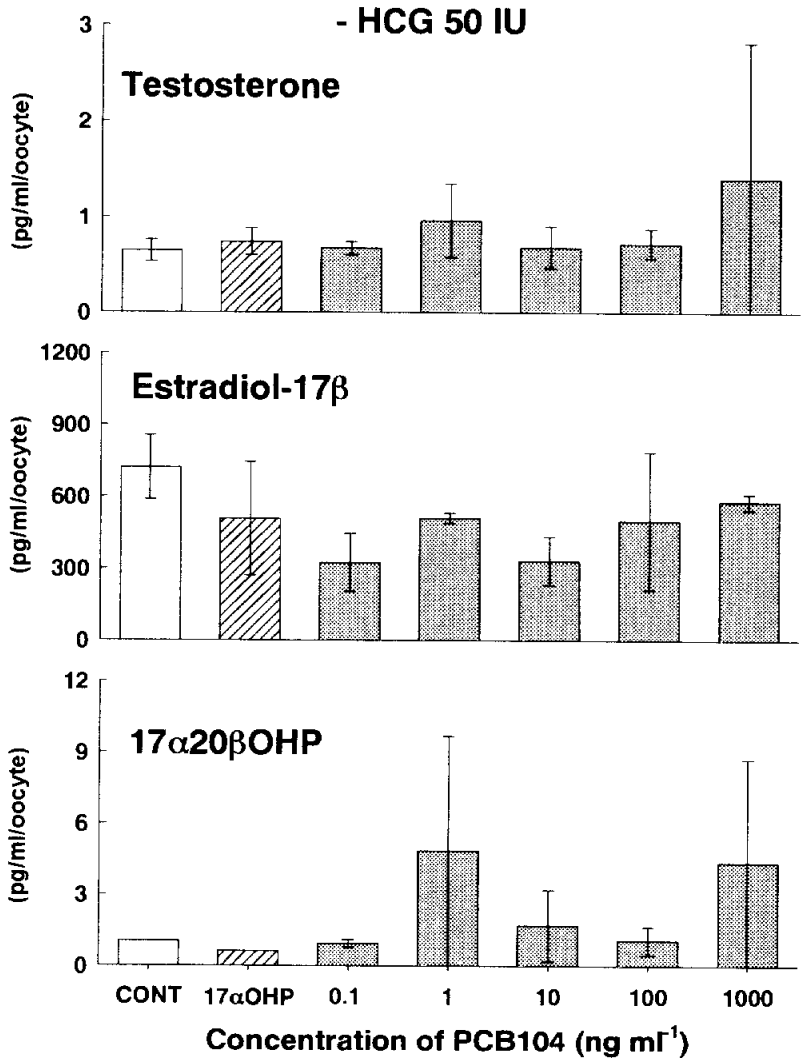

Fig. 6. Effects of PCB104 on steroid synthesis of yellowfin goby oocytes. The fully vitellogenic oocytes were cultured with precursor 17 αOHP 50 ngml ^{1} and various concentrations of the PCB104 (0.1 to 1000 ngml ^{1}) alone for 48hrs.

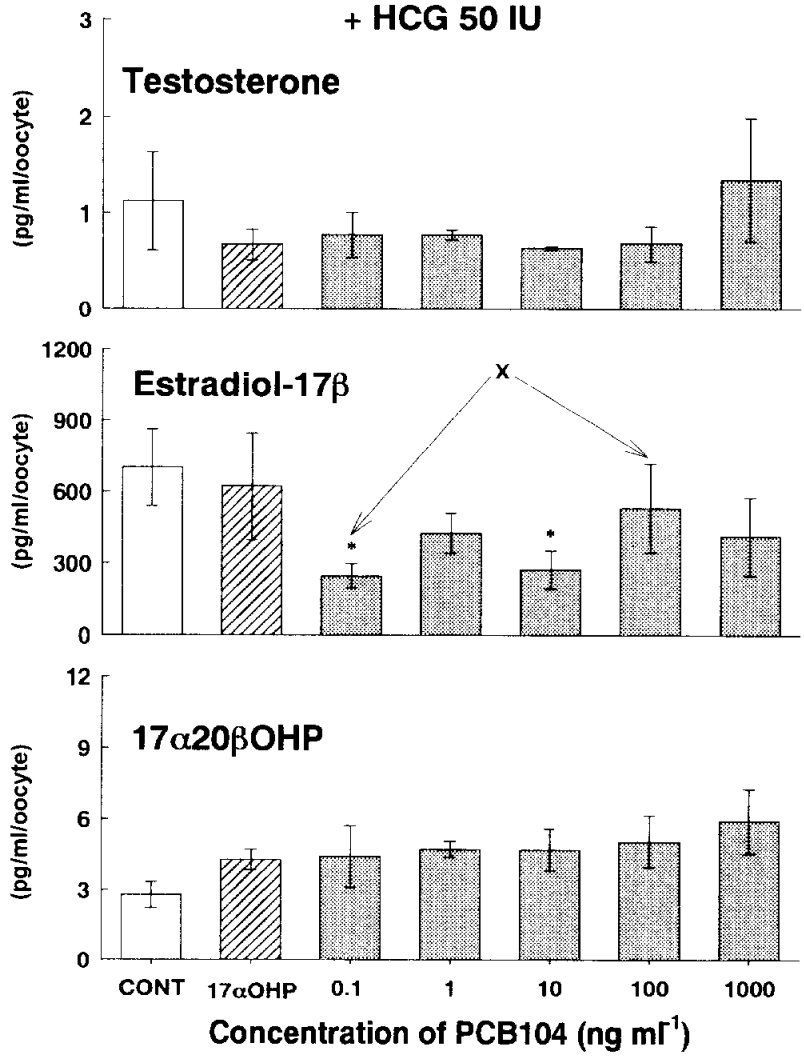

Fig. 7. Effects of PCB104 on steroid synthesis of yellowfin goby oocytes. The final vitellogenic oocytes were cultured with precursor 17 αOHP 50 ngml^{-1}, HCG 50IUml^{-1} and various concentrations of the PCB104 (0.1 to 1000 ngml^{-1}) for 48 hrs. *: significant differences from 17 αOHP control; ×: differences bewteen treatments ($P<0.05$).

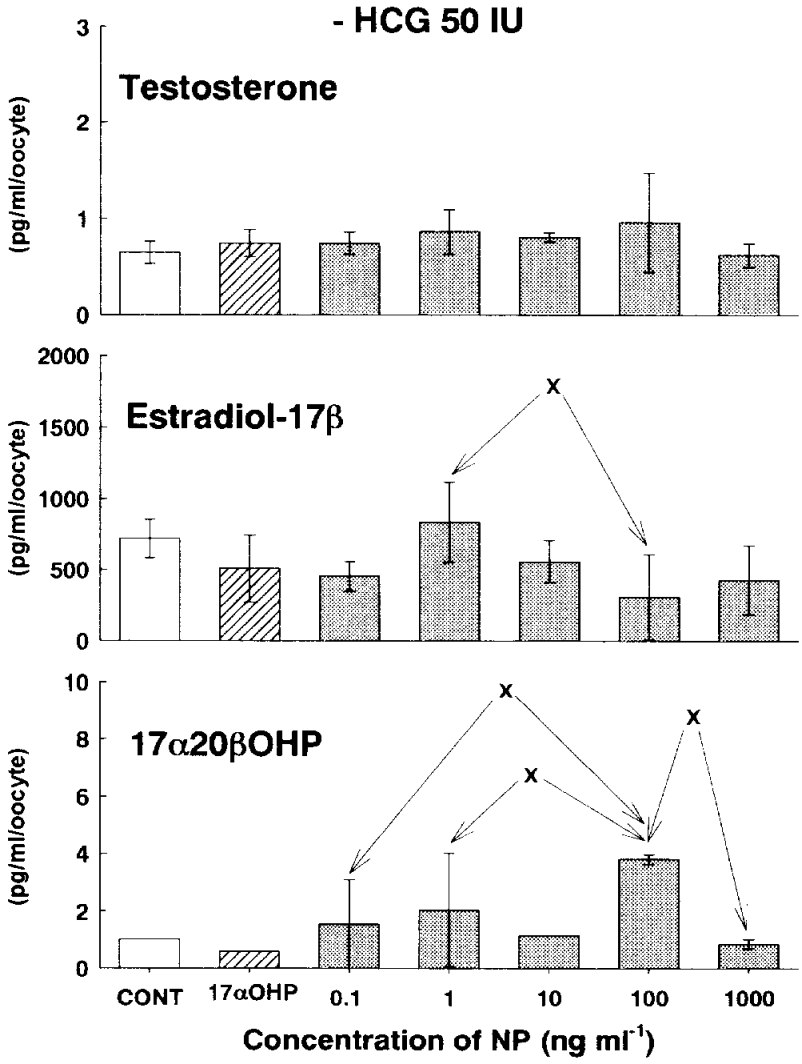

Fig. 8. Effects of NP on steroid synthesis of yellowfin goby's oocytes. The final vitellogenic oocytes were cultured with precursor 17αOHP 50 ngml ^{1} and various concentrations of the NP (0.1 to 1000 ngml ^{1}) alone for 48 hrs. $\times$: Differences between treatments ($P<0.05$).

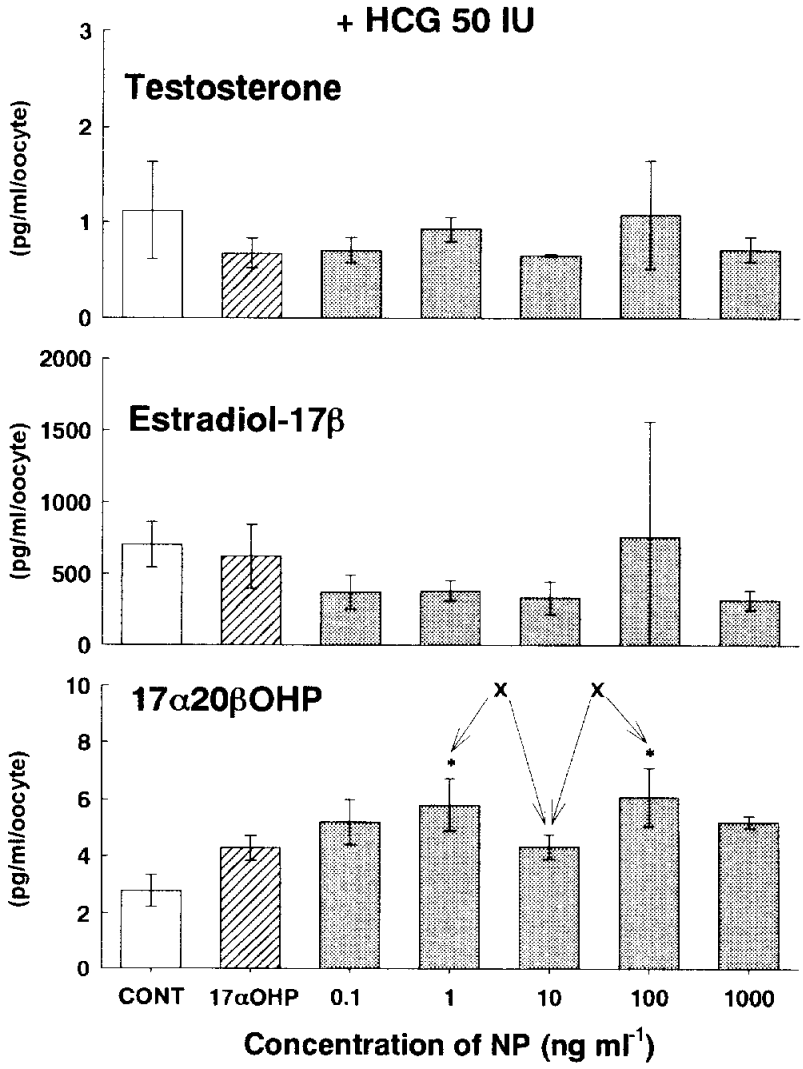

Fig. 9. Effects of NP on steroid synthesis of yellowfin goby's oocytes. The fully vitellogenic oocytes were cultured with precursor 17 α OHP 50 ngml $^{-1}$, HCG 50IUml $^{-1}$ and various concentrations of NP (0.1 to 1000 ngml $^{-1}$) with HCG 50IUml $^{-1}$. *: significant differences from 17 α OHP control; ×: differences bewteen treatments ($P<0.05$).

났다. E2의 생성은 17αOHP 대조구와 비교해 볼 때, 0.1과 10 ngml^{-1} 농도 실험구에서 저해현상을 나타났고 ($p < 0.05$), 0.1과 100 ngml^{-1} 실험구 간에 유의한 차이가 나타났다. 17α20βOHP의 경우도 T와 유사한 경향을 보였다 (Fig. 7).

(2) NP의 효과

-HCG 하에서 T와 E2의 생성량은 NP의 농도별 실험구들에 의한 영향이 없었으며, E2는 생성량이 가장 적은 100 ngml^{-1}과 가장 높은 1 ngml^{-1} 사이에 유의한 차이를 보였다. 그러나 17α20βOHP의 농도는 17αOHP 대조구와 비교해 볼 때 모든 실험구에서 증가 현상을 보였으며, 특히 100 ngml^{-1}에서 가장 높은 값을 보였다 (Fig. 8.)

+HCG 하에서도 T와 E2의 생성량은 실험 농도간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 특히 E2의 경우는 100 ngml^{-1} 실험구를 제외한 모든 NP 실험구에서 저해현상을 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다.

17α20βOHP의 생성량은 17αOHP 대조구와 비교해 1과 100 ngml^{-1}에서 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 9).

Ⅳ. 고 찰

본 연구는 연안 정착성인 문절망둑의 난소로부터 생성되는 성 스테로이드 호르몬 종류를 밝히고 에스트로겐성 내분비계 장애물질들이 난소의 성 스테로이드 호르몬 생성과정에 미치는 영향을 조사한 것이다.

난황형성이 끝난 시기의 난모세포를 대상으로 성 호르몬 즉, T와 난황의 합성·분비를 촉진하는 E2 그리고 난모세포의 최종성숙을 유도하는 17α20βOHP의 생성에 미치는 에스트로겐성 내분비계장애물질, DES, BPA, PCB104 그리고 NP의 영향을 조사하였다. DES와 BPA는 각각 수컷 sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*)와 무지개 송어에서 vitellogenin 합성을 유도하는 에스트로겐성 물질들로 알려져 있다 (folmar et al., 2002; Lindholst et al., 2000). 그러나 본 실험어종인 문절망둑의 난황형성기 직후 난소에서의 E2 합성에는 아무런 효과가 관찰되지 않았다.

PCB104는 에스트로겐수용체 (estrogen receptor; ER)와 결합율이 높아 에스트로겐성 활성이 높은 것으로 보고되었지만 (Fielden et al., 1997), 본 실험에서는 E2의 생성을 감소시키는 것으로 나타났다. PCB 혼합물인 Aroclor1254에 노출된 Atlantic Croaker 난모세포에서도 이와 동일한 결과가 보고되었다 (Thomas, 1989·1990). 성숙한 암컷어류의 난소에서 E2는 cytochrome P450 aromatase 효소에 의해 생성된다 (Young et al., 1983). 양서류, *Rana catesbeiana*의 경우 안드로겐이 이 효소의 활성을 저해하여 E2의 생성을 감소시킴이 보고되었다 (Yu

et al., 1993). 또한 안티에스트로겐성 물질인 polycyclic aromatic hydrocarbon이 넙치 난소의 cytochrome P450 aromatase 활성을 저해하여 E2의 생성을 억제시킨 것으로 알려졌다 (Monteiro et al., 2000). 문절망둑 난모세포에서의 E2 생성이 억제된 것은 PCB104가 cytochrome P450 aromatase의 활성을 억제시키는 안티에스트로겐성으로 작용한 것으로 생각된다.

또한 이러한 호르몬 합성의 변화는 수정란의 발생에도 영향을 미칠 것이다. 실제로 PCB 등에 노출된 어미에게서 생산된 자어의 높은 초기사망율, 기형유발 그리고 난황주머니의 크기 변화 등의 생식장애현상들이 보고되었다 (Billsson et al., 1998: Waring et al., 1996).

NP도 PCB104와 비슷하게 100 ngml^{-1}을 제외한 0.1, 1, 10, 1000 ngml^{-1} 농도에서 E2의 생성을 억제시켰지만 유의한 차이는 없었다 ($p>0.05$). 오히려 1과 100 ngml^{-1}에서 17α20βOHP의 생성촉진효과를 나타냈다. Giesy et al. (2000)의 보고에 의하면 NP에 노출된 어류의 E2 농도는 증가했고 또한 NP는 간접적으로 약한 에스트로겐으로 작용한다고 하였다. 4 nonylphenol에 노출된 무지개 송어의 경우, 혈장 E2와 T의 농도가 감소하였지만, 이것은 follicle stimulating hormone (FSH)의 감소로 인한 생식소의 성장이 저해된 때문이라고 하였다 (Harris et al., 2001). 본 실험도 NP는 난소의 aromatase 활성을 촉진시켜 E2 생성을 증가시키지는 않는 것 같다.

문절망둑의 난소성숙과정에서 생성되는 스테로이드 대사물질을 분석한 결과 17α20βOHP가 주요 성숙호르몬으로 나타났으며, 예비실험결

과 *in vitro*에서 난모세포의 GVBD와 배란유도에도 탁월한 효과가 있는 것으로 나타났다. 따라서 NP에 의한 17α20βOHP의 증가는 E2의 감소와 더불어 문절망둑의 난모세포 최종성숙에 영향을 줄 수 있을 것이라 사료된다. 안티에스트로겐성 내분비계 장애물질들을 포함한 종이 표백공장의 폐수는 17α20βOHP의 생성을 억제시켜 산란을 지연시키는 것으로 보고되었다 (Van der Kraak et al., 1992). 본 연구에서 NP는 17α20βOHP의 생성을 촉진하여 GVBD와 산란을 촉진하거나 조기 산란을 유도할 수 있을 것이라 생각된다.

문절망둑과 달리 17α,20β,21 trihydroxy-4-pregnen-3-one (20βS)가 성숙유도 호르몬인 Atlantic Croaker에서 PCB 혼합물인 Aroclor1254는 20βS의 GVBD와 배란유도를 억제시켰다 (Ghosh and Thomas, 1995). 그러나 Aroclor1254는 넙치에서는 HCG하에서의 성숙유도를 촉진시켰다 (Baek et al., 2001). 양서류인 *Xenopus laevis*의 난모세포 성숙유도과정에서 E2 및 xenoestrogen은 성숙유도에 효과가 없는 것으로 보고되었다 (Pickford and Morris, 1999).

어류의 생식에 미치는 에스트로겐성 내분비계장애물질들의 영향에 관한 연구들은 대부분 E2 농도 교란과 VTG 합성 유도효과에 대한 것들이다. 하지만 17α20βOHP와 같은 암컷어류의 난모세포의 최종성숙과 배란에 관여하는 성숙유도호르몬들에 관한 연구는 드물다. 따라서 NP처럼 17α20βOHP 생성을 교란하여 난모세포 성숙에 장애를 일으키는 기작에 관한 연구도 앞으로 요구된다.

문절망둑에서 PCB104가 E2의 생성을 억제하고 NP가 17α20βOHP

의 생성을 촉진한 결과, 실제 배란 등의 난모세포 성숙과정과 포란수 및 부화율 등의 생식기능이 어떻게 교란되는지 확인하기 위해서는 *in vivo* 실험을 통한 보다 세밀한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 요 약

문절망둑의 성숙기 난소 (난경 0.79 mm)를 대상으로 전구물질, ^{3}H-pregnenolone, ^{3}H 17α hydroxyprogesterone 그리고 ^{3}H androstenedione을 첨가하여 생성된 스테로이드 대사물질은 testosterone, androstenedione, estrone, estradiol 17β 그리고 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one로 확인되었다.

이들의 생성과정에 에스트로겐성 내분비계 장애물질들 즉, DES와 NP, PCB104, BPA (각각 100 ngml^{-1})가 성숙 난모세포의 스테로이드 호르몬 생성에 어떠한 영향을 미치는지 *in vitro* 실험을 통해 알아본 결과, NP는 T의 생성을 촉진시킨 반면 ($P<0.05$), 17α20βOHP의 생성은 저해하였다 ($P<0.05$). PCB104는 T와 E2의 생성에 있어 약간의 저해효과를 보였으나 유의차는 없었다. DES와 BPA는 뚜렷한 경향을 보이지 않았다.

에스트로겐성 내분비계 장애물질 중 난모세포의 스테로이드 호르몬 생성과정에 영향을 미친 PCB104와 NP의 농도별 (0.1, 1, 10, 100, 1000 ngml^{-1}) 테스트 결과, PCB104는 모든 농도에서 E2의 생성을 억제시켰으며 특히, 0.1과 10 ngml^{-1}의 저농도에서 뚜렷한 저해효과를 보였다 (각각 $P<0.05$).

NP는 100 ngml^{-1}에서 17α20βOHP의 생성 촉진효과를 보였다.

이러한 결과는 4가지 에스트로겐성 내분비계장애물질들 중에서 PCB104만이 안티에스트로겐성 작용을 함을 나타낸다.

Ⅵ. 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 끊임없이 넘치는 열성으로 지도해 주시고 깊은 사랑을 베풀어주신 백혜자 교수님께 진심으로 감사드리며, 바쁘신 와중에도 논문의 심사를 맡아 조언을 해주신 김수암 교수님, 남기완 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 따뜻한 격려와 관심으로 지도해 주신 홍성윤 교수님, 강용주 교수님, 유명숙 교수님께도 감사드립니다. 그리고 관심을 가지고 묵묵히 지켜봐 주신 진평 교수님께도 감사드립니다.

옆에서 논문 수정에 조언을 해준 김유나 선배님과 항상 관심을 가지고 도와준 인준, 수정, 영미에게 감사하며, 정구, 화정, 수연, 오미에게도 감사의 마음을 전합니다. 모자라는 점을 챙겨주신 이정아 선배님에게도 감사드립니다. 옆에 있어 큰 힘이 되어주고 용기를 준 권대현 선배님에게도 감사드립니다.

항상 묵묵히 믿어 주시고 깊은 사랑으로 길러주신 어머님과 늘 건강을 염려해 준 가족들에게도 깊은 사랑과 감사를 드립니다.

Ⅶ. 참고문헌

Ackermann, G.E., J. Schwaiger, R.D. Negele and Karl Fent. 2002. Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 60, 203-221.

Aida, K., T. Kato and M. Awaji. 1984. Effects of castration on the smoltification of precocious male masu salmon, *Oncorhynchus masou*. Nippon Suisan Gakkaishi, 50, 565-571.

Baek, H.J., J.H. Jung and J.K. Jeon. 2001. *In vitro* effects of TBT, TPhT and Aroclor 1254 on oocytes maturation and ovulation in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Korean Fish. Soc., 34(6), 584-587. (in Korean)

Billsson, K., I. Westerlund, M. Tysklind and P.E. Olsson. 1998. Developmental disturbances caused by polychlorinated biphenyls in zebrafish (*Brachydanio rerio*). Mar. Environ. Research, 46 (1-5), 461-464.

Christensen, L.J., B. Korsgaard and P. Bjerregaard. 1999. The effects of 4-nonylphenol in the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. Aquatic Toxicology, 46 (3-4), 211-219.

Chung, M.K. 1977. The fishes of Korea. Ilji-sa. Seoul, pp. 486. (in Korean)

Fielden, M.R., I. Chen, B. Chittim, S.H. Safe and T.R. Zacharewski. 1997. Examination of the estrogenicity of 2,4,6,2',6'-Pentachlorobiphenyl (PCB104), It's hydroxylated metabolite 2,4,6,2',6' pentachloro-4-biphenylol (HO-PCB 104), and a further chlorinated derivative, 2,4,6,2'4'6'-hexachlorobiphenyl (PCB 155). Environ. Health Perspectives, 105(11), 1238-1248.

Folmar, L.C., M.J. Hemmer, N.D. Denslow, K. Kroll, J. Chen, A. Cheek, H. Richman, H. Meredith and E.G. Grau. 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor *in vivo* and *in vitro*. Aquatic Toxicology, 60, 101-110.

Ghosh, S. and P. Thomas. 1995. Antagonistic effects of xenobiotics on steroid-Induced final maturation of atlantic croaker oocytes *in vitro*. Mar. Environ. Res., 39, 159-163.

Giesy, J.P., S.L. Pierens, E.M. Snyder, S. Miles Richardson, V.J. Kramer, S.A. Snyder, K.M. Nichols, and D.L. Villeneuve. 2000. Effects of 4 nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environ. Toxicol. Chem. 19(5), 1368-1377.

Goetz, F.W., A.Y. Fostier, B. Breton and B. Jalabert. 1987. Hormonal Changes during meiotic maturation and ovulation in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Fish Phy. and Bioche., 3(4), 203-211.

Guillette, L.J. Jr., D.A. Crain, A.A. Rooney and D.B. Pickford. 1995. Organization versus activation : the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. Environ. health Perspect. 103(7), 157-164.

Guillette, L.J. Jr., D.B. Pickford, D.A. Crain, A.A Rooney and H.F. Percival. 1996. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. Gen. Comp. Endocrinol. 101, 32-42.

Gutendorf, B. and J. Westendorf. 2001. Comparison of an array of *in vitro* assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. Toxicology, 166, 79-89.

Harris, C.A., E.M. santos, A. Janbakhsh, T.G. Pottiner, C.R. Tyler and J.P. Sumpter. 2001. Nonylphenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout. Environ. Sci. Technol, 35, 2909-2916

Janssen, P.A.H., J.G.D. Lambert, A.D. Vethaak and H.J.Th. Goos. 1997. Environmental pollution caused elevated concentrations of oestradiol and vitellogenin in the female flounder, *Platichthys flesus* (L.). Aquatic Toxicology, 39, 195-214.

Jones, P.D., W.M. De Coen, L. Tremblay and J.P. Giesy. 2000. Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. Water Scien. Tec., 42(7-8), 1-14.

Khan, I.A. and P. Thomas. 1998. Estradiol-17β and o,p'-DDT stimulate gonadotropin release in atlantic croaker. Mar. Environ. Res., 46(1-5), 149-152.

Khan, I.A. and P. Thomas. 2000. Lead and Aroclor 1254 disrupt reproductive neuroendocrine function in atlantic croaker. Mar. Environ. Res., 50, 119-123.

Kim, I.S. and Y.J. Kang. 1993. Coloured fishes of Korea. Academy of Publishing Co. Seoul, pp. 477 (in Korean)

Kime, D.E. 1998. Endocrine disruption in fish. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 396.

Kwon, Y.H., G.S. Hwang and C.C. Chang. 2000. Heavy Metal Content and Distribution of Bioorganisms in mankyeong · Dongjin River Area. Kor. J. Env. Hlth. Soc., 26 (2), 116 121. (in Korean)

Lindholst, C., K.L. Pedersen and S.N. Pedersen. 2000. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 48, 87-94.

Matthiessen, P. and J.P. Sumpter. 1998. Effects of estrogenic substances in the aquatic environment. *In* Braunbeck, T., D.E. Hinton and B. Streit. (Eds) Fish Ecotoxicology. Libray of Congress Cataloging in Publication Data. Boston, pp. 319-335.

Monteiro, P.R.R., M.A. Reis-Henriques and J. Coimbra. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit *in vitro* ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus L.*). Aquatic Toxicology, 48, 549-559.

Nagahama, Y., M. Yoshikuni, M. Yamashita and M. Tanaka. 1994. Regulation of oocyte maturation in fish. *In* Sherwood, N.M. and C.L. Hew. (Eds.) Fish physiology v. 13. Molecular endocrinology of fish. Academic Press, London, pp. 393-439.

Nimrod, A.C. and W.H. Benson. 1998. Reproduction and development of japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens. Aquatic Toxicology, 44, 141-156.

Ohkubo, N., K. Mochida, S. Adachi, A. Hara, K. Hotta, Y. Nakamura and T. Matsubara. 2003. Development of enzyme linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). Gen. Comp. Endocrinol. 131, 353-364.

Örn, S., P.L. Andersson, L. Förlin, M. Tysklind and L. Norrgren. 1998. The impact on reproduction of an orally administered mixture of selected PCBs in zebrafish (*Danio rerio*). Arch. Environ. contam. Toxicol., 35, 52-57.

Pickford, D.B. and L.D. Morris. 1999. Effects of Endocrine-disrupting contaminants on amphibian oogenesis: methoxychlor inhibits progesterone induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes in

vitro. Environ. Health Perspectives, 107(4), 285-292.

Sohoni, P., C.R. Tyler, K. Hurd, J. Caunter, M. Hetheridge, T. Williams, C. Woods, M. Evans, R. Toy, M. Gargas, and J.P. Sumpter. 2001. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) Environ. Sci. Technol., 35, 2917-2925.

Tabata, A., S. Kashiwada, Y. Ohnishi, H. Ishikawa, N. Miyamoto, M. Itoh and Y. Magara. 2001. Estrogenic influences of estradiol-17β, p-nonylphenol and bisphenol-A on japanese medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. Water Science and Technology, 43(2), 109-116.

Thomas, P. 1989. Effects of Aroclor 1254 and Cadmium on Reproductive endocrine function and ovarian growth in atlantic croaker. Mar. Environ. Res., 28, 499-503.

Thomas, P. 1990. Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function. J. Exp. Zool. Supplement, 4, 126-128.

Van Der Kraak, G., H.M. Dye, E.M. Donaldson and G.A. Hunter. 1985. Plasma gonadotropin, 17β-estradiol, and 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during luteinizing hormone-releasing hormone analogue and gonadotropin induced ovulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Can. J. Zool., 63, 824-833.

Van Der Kraak, G.J., K.R. Munkittrick, M.E. McMaster, C.B. Portt and J.P. Chang. 1992. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary gonadal axis of white sucker at multiple sites. Toxicol. Appl. Pharmacol., 115(2), 224-233.

Waring, C.P., R.M. Stagg, K. Fretwell, H.A. McLay, and M.J. Costello. 1996. The impact of sewage sludge exposure on the reproduction of the sand goby, *Pomatoschistus minutus*. Environmental Pollution, 93(1), 17-25.

Woodward, A.R., M.L. Jennings, H.F. Percival and C.T. Moore. 1993. Low clutch viability of American alligators on Lake Apopka. Florida Sci., 56, 52-63.

Yokota, H., Y. Tsuruda, M. Maeda, Y. Oshima, H. Tadokoro, A. Nakazono, T. Honjo and K. Kobayashi, 2000, Effect of bisphenol A on the early life stage in japanese medaka (*Oryzias latipes*), Environ. Toxicol. and Chemistry, 19(7), 1925-1930.

Yokota, H., M. Seki, M. Maeda, Y. Oshima, H. Tadokoro, T. Honjo, K. Kobayashi. 2001. Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*), Environ. Toxicol. Chem., 20(11), 2552-2560.

Yoon, Y.D. 1998. The effects of endocrine disrupters on reproduction ad development of wild animals. Dev. Reprod., 2(2), 115-133.

Young, G., L.W. Crim, H. Kagawa, A. Kambegawa, and Y.

Nagahama, 1983. Plasma 17α,20β dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): correlation with plasma gonadotropin and *in vitro* production by ovarian follicles. Gen. Comp. Endocr., 51, 96-105.

Yu, N.W., C.Y. Hsu, H.H. Ku, L.T. Chang and H.W. Liu. 1993. gonadal differentiation and secretions of estradiol and testosterone of the ovaries of *Rana catesbeiana* tadpoles treated with 4 hydroxyandrostenedione. J. Exp. Zool., 265, 310 315.