



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

이학석사 학위논문

유기 자외선 차단제, Benzophenone-3 와 Octinoxate 및
수은 조합이 점망둑 (*Chaenogobius annularis*)의
최종성숙 과정에 미치는 영향



2023년 2월

부경대학교대학원

해양생물학과

최진성

이학석사 학위논문

유기 자외선 차단제, Benzophenone-3 와 Octinoxate 및 수온
조합이 점망둑 (*Chaenogobius annularis*)의 최종성숙 과정에
미치는 영향

지도교수 백혜자

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2023년 2월

부경대학교대학원

해양생물학과

최진성

최진성의 이학석사 학위논문을 인준함.

2023년 2월 17일



위원장

이학박사

김진구



위원

이학박사

김현우



위원

이학박사

백혜자



목 차

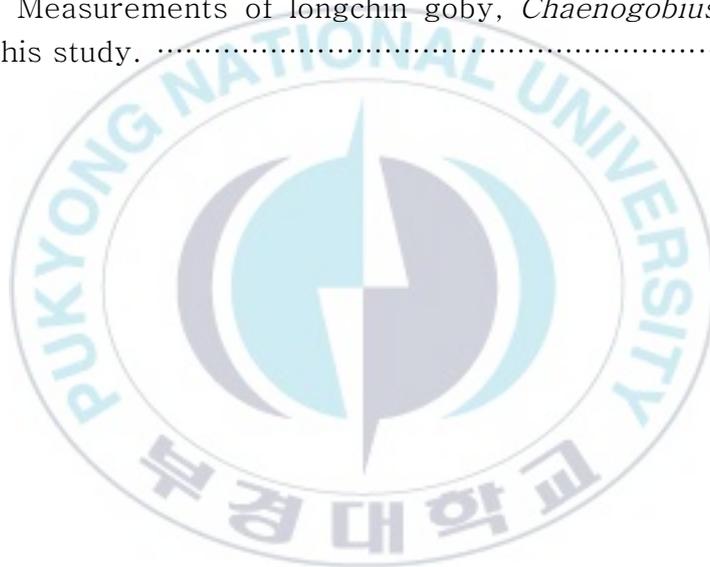
List of figures	ii
List of tables	iii
Abstract	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	8
1. 화학물질	8
2. 실험어 채집 및 난모세포 배양	9
3. 난모세포의 현미경적 관찰	13
4. 에스트로젠 분석 (방사면역측정법)	14
5. 통계처리	15
III. 결 과	16
1. BP-3 + EHMC 혼합구에 미치는 수온의 영향; GVBD 유도효과 ...	16
2. BP-3 + EHMC 혼합구에 미치는 수온의 영향; 에스트로겐의 농도 변화	22
IV. 고 찰	25
V. 참고문헌	30
Acknowledgements	42

List of figures

Fig. 1. Location of the sampling area; Cheongsapo, Busan, Korea. ...	11
Fig. 2. Morphological observations of oocytes in longchin goby, <i>Chaenogobius annularis</i> before incubation.	17
Fig. 3. Morphological observation of 730 μm oocytes group in longchin goby, <i>Chaenogobius annularis</i> after 24 h incubation.	18
Fig. 4. Morphological observation of 770 μm oocytes group in longchin goby, <i>Chaenogobius annularis</i> after 24 h incubation.	19
Fig. 5. Morphological observation of 800 μm oocytes group in longchin goby, <i>Chaenogobius annularis</i> after 24 h incubation.	20
Fig. 6. GVBD rate of longchin goby, <i>Chaenogobius annularis</i> oocytes after 24 h exposed in BP-3 with EHMC mixture treatment and water temperature conditions.	21
Fig. 7. Estrone (E_1) concentration of longchin goby, <i>Chaenogobius annularis</i> oocytes secrete to culture media after 24 hours exposed in BP-3 with EHMC mixture treatment and water temperature conditions.	23
Fig. 8. Estradiol-17 β (E_2) concentration of longchin goby, <i>Chaenogobius annularis</i> oocytes secrete to culture media after 24 hours exposed in BP-3 with EHMC mixture treatment and water temperature conditions.	24

List of tables

Table 1. Summary of environmental concentrations of BP-3 in reported studies.	6
Table 2. Summary of environmental concentrations of EHMC in reported studies.	7
Table 3. Measurements of longchin goby, <i>Chaenogobius annularis</i> used in this study.	12



Effect of Organic UV filters, Benzophenone-3 and Octinoxate, and
Water Temperature Combination on the Final maturation
of longchin goby (*Chaenogobius annularis*)

Jin Sung Choi

Department of Marine Biology, The graduate School,
Pukyong National University

Abstract

2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (benzophenone-3, BP-3) and 2-ethyl-hexyl-4-methoxycinnamate (octinoxate, EHMC) are one of the major compounds of sunscreens for protect skin or products from UV radiation. BP-3 and EHMC are known endocrine disrupting chemical (EDC) and have been shown to cause endocrine disorders in a variety of organisms. In previous study, the effect of BP-3 (0.5, 5, 50 and 500 ng mL⁻¹) and/or EHMC (0.5, 5, 50 and 500 ng mL⁻¹) were examined in the maturing oocytes of longchin goby (*Chaenogobius annularis*); showed a significant increase of estradiol (E₂) level in the BP-3, 5 ng mL⁻¹. Therefore, in this study, we investigated the effects of mixture (BP-3 and EHMC) on estrogens (estrone, E₁; E₂) levels and GVBD using maturing oocytes of longchin goby. We performed two separate similar experiments. The oocytes with average diameters of 730, 770 and 800 μm were incubated with different concentrations (BP-3, 5 ng mL⁻¹ with EHMC, 0, 5, 50, and 500 ng mL⁻¹) for 24 hours under 15 °C and 20 °C water temperature

(WT). GVBD was observed under a microscope, E₁ and E₂ levels were measured by radioimmunoassay (RIA). GVBD induction was significantly increased in 15 °C, 770 μm, BP-3, 5 ng + EHMC, 50 ng mL⁻¹ compared to the control. E₁ level was significantly increased in 20 °C, 770 μm, BP-3, 5 ng mL⁻¹ and E₂ level was increased in 15 °C, 770 μm, BP-3, 5 ng mL⁻¹ compared to the control.



I. 서론

자외선 (ultraviolet radiation, UVR)에 의하여 생성되는 활성산소종 (산화 스트레스)은 피부에 해로운 영향을 줄 수 있다 (Pozo et al., 2021). 이를 방지하기 위하여 자외선 차단물질을 사용하는데, 벤조페논계 (benzophenone, BP) 자외선 차단제 (UV filter)는 로션, 샴푸, 헤어 스프레이와 같은 개인 미용 및 위생용품과 섬유, 플라스틱, 페인트, 식품 포장재와 같이 다양한 제품에 사용되고 있다 (Kang et al., 2016). BPs 중 벤조페논-3 (benzophenone-3, BP-3)과 옥티노세이트 (octinoxate, EHMC)는 일반적으로 폴리머의 광화학적 분해를 방지하고 포장재의 빛에 대한 안정성을 높이기 위해 가정 및 산업 제품에 널리 사용된다 (Vione et al., 2013). BP-3와 EHMC는 전세계적으로 널리 이용되지만, 환경오염 문제 또한 시사되고 있다 (Mao et al., 2022). 이들은 잠재적으로 생체내에 농축이 가능하며 이들은 환경수 및 인간을 포함한 생물군 모두에서 자주 검출되고 있다 (Table 1.; Table 2.). 어류의 경우 일반적으로 체내에 여러 BPs가 축적되어 있다 (Balmer et al., 2005). 또한 BPs는 약 25 %의 해양 생물 서식지인 산호초에게도 영향을 준다. BPs가 바다로 유입되어 산호의 내분비계를 교란시켜 성장과 번식에 영향을 미친다는 연구 보고가 있으며 (Spalding et al., 1997; Moeller et al., 2021; Bongiorno et al., 2008), 최근에는 하와이에서 BP-3와 EHMC를 함유한 자외선 차단제의 판매가 처방전이 있는 경우를 제외하고 대부분의 경우 금지되었다 (Dos, 2018; Hawaii State Legislature,

2021).

생물체내로 유입된 BPs의 일부는 안드로젠, 에스트로젠 및 갑상선 호르몬 수용체에 작용하여, 성장 및 성숙에 관여하는 내분비 기작에 부정적인 영향을 미치는 내분비교란물질 (endocrine disrupting chemicals, EDCs) 로 여겨진다 (Wang et al., 2016; Arya et al., 2020). 이전 연구에서 인간이 BPs 계열의 자외선 차단제에 높은 수준으로 노출될 경우 에스트로젠 관련 질병이 생길 수 있음을 시사하였다 (Gago-Ferrero et al., 2013; Zhang et al., 2013). 이매패류 (*Mytilus galloprovincialis*)에서 BP-3가 체내 농축되었고 (Regalado et al., 2021), 이를 섭취한 붉은바다거북 (*Caretta caretta*)의 내분비 교란 및 발달에 부정적인 영향을 미칠 가능성이 제기되기도 하였다 (Cocci et al., 2020). BP-3와 EHMC를 비롯한 여러 자외선 차단제는 산호에게 노출되었을 경우 유전독성, 내분비 교란 및 백화현상 등의 영향을 미치는 것으로 알려졌다 (Downs et al., 2022).

경골어류는 매우 낮은 농도의 호르몬 노출만으로 발생 초기 단계에서 민감성을 나타낸다 (Leet et al., 2011). 경골어류의 난모세포 성숙 과정은 시상하부에서 분비되는 성선 자극 호르몬 방출 호르몬 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH)에 의해 뇌하수체 전엽에서 난포자극호르몬 (follicle stimulating hormone, FSH)과 황체 형성 호르몬 (luteinizing hormone, LH)의 방출을 촉진한다. 난황형성기에는 난모세포에서 분비된 estradiol-17 β (E₂)가 간의 에스트로젠 수용체 (estrogen receptor, ER)에 작용하여 비텔로제닌 (vitellogenin, VTG)

의 합성을 유도한다 (Zhou et al., 2021; Hwang, 2012). 난황형성기가 끝난 후 난모세포의 최종성숙이 일어나는 과정에는 maturation-inducing hormone (MIH)에 의해 조절되며, maturation promoting factor (MPF)를 활성화 시켜 핵막 붕괴 (germinal vesicle break down, GVBD) 및 배란을 유도한다 (Young et al., 1982; Hwang, 2012). 즉, 성 스테로이드는 ER 및 안드로젠 수용체 (androgen receptor, AR)를 포함한 특정 핵 수용체에 결합하여 작용하며, 외인성 성 스테로이드에 노출될 경우 ER 및 AR의 발현이 변경될 수 있다 (Sandra and Norma, 2010). ER 및 AR은 어류의 초기 단계에서도 발견되어 내인성 또는 외인성 스테로이드 호르몬이 작용하는 경로를 제공한다 (Devlin and Nagahama, 2002). 어류의 초기생활사에 에스트로겐 활성을 나타내는 오염 물질에 노출될 경우 생식선 발달 감소, 정자 형성, 번식력 감소, 수컷의 2차 성징 감소, 및 편향된 성비 등의 효과가 나타났다 (Filby et al., 2007). BP-3는 수컷 어류에서의 VTG 생성을 유도하였는데, 이는 체내에서 BP-3가 에스트로겐과 같은 효과를 나타낼 가능성이 있음을 나타낸다 (Coronado et al., 2008). 보고에 따르면 저농도 BP-3에 노출된 제브라피쉬 (*Danio rerio*, zebra fish)의 스테로이드 생성 및 호르몬 경로와 관련된 유전자에 변화가 있었다 (Blüthgen et al., 2012). 또한 BP-3 및 EHMC를 포함한 여러 종류의 자외선 차단제를 복합적으로 제브라피쉬의 수정란에게 노출시킨 결과 심박수 및 부화율이 농도 의존적으로 감소하였다 (Li et al., 2018). 제브라피쉬의 자어 및 성체 수컷에게 BP-3를 노출시킨 결과 부화율, 성장률 및 생존율에는 차이가 없었으나

자어는 성장 과정에서 성숙기에 난소를 가지는 개체가 유의하게 증가하였고 수컷 성어는 고농도 실험구에서 난소가 생성되었으며, 수컷 성어에게서 VTG 농도의 유의한 증가가 있었다 (Kinnberg et al., 2015). EHMC는 항에스트로젠, 항안드로젠 및 안드로젠 활성을 나타내며, *Pimephales promelas*의 생식선 조직과 메다카 (*Oryzias latipes*) 및 제브라피쉬에서 vtg1의 mRNA 발현을 변경하는 것으로 보고 되었다 (Kunz and Fent, 2006; Inui et al., 2003; Christen et al., 2011; Zucchi et al., 2011). 또한 EHMC에 노출된 *P. promelas* 암컷의 난자는 스테로이드 호르몬 생성과 관련 있는 유전자인 3 β -HSD의 하향 조절 경향이 나타났다 (Christen et al., 2011).

어류의 생식에 있어서 자외선 차단제의 영향과 함께 수온 또한 큰 영향을 주기도 한다 (Wood, 1997). 수온 상승은 춘계 및 하계 산란 어류의 생식소 발달과 밀접한 관련이 있으며 난모세포의 최종성숙 및 배란을 제한할 수 있다 (Shein et al., 2004). Arantes et al. (2011)의 연구에서 수온 변화가 *Prochilodus argenteus* 암컷의 배란 및 산란에 부정적인 영향이 있음을 확인하였고, Dou et al. (2008)의 실험에서 *Anguilla japonica*의 배란 및 산란이 수온 변화에 의해 교란되었다. 또한 *Epinephelus septemfasciatus* 암컷의 혈장 E₂ 농도는 수온에 대하여 유의한 차이는 없었으나 수온에 따라 증가하는 경향을 보였다 (Shein et al., 2004).

본 연구에 사용된 점망둑 (*Chaenogobius annularis*)은 농어목 (Perciformes) 망둑어과 (Gobiidae)에 속하며 한국 남부 및 일본 북해

도 이북의 연안 조간대 암초 사이에서 흔히 볼 수 있는 연안정착성 어류이다 (Chung, 1977). 점망독은 화학물질에 노출되기 쉬운 연안에 서식하여 독성노출 실험을 하기에 적합한 어종이다 (Baek, 2003; Baek, 2008). 현재까지 수온, BP-3 및 EHMC의 복합적인 효과가 해산어류에게 미치는 영향은 거의 조사되지 않았다. 이러한 조건은 난모세포의 생존율, GVBD 유도 및 에스트로젠 (estrone, E₁ 및 E₂) 수치를 변화시킬 수 있다 (Woo, 2021). Woo (2021)의 실험에서 점망독의 성숙한 난모세포를 5 ng mL⁻¹의 BP-3 농도에 24 시간 노출시킨 결과, 난모세포의 스테로이드 대사가 대조구에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었으며 ($p < 0.05$), 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 BP-3 농도 의존적으로 E₂ 대사율이 대조구에 비하여 증가하는 경향을 보였다. 이를 토대로 본 실험에서는 5 ng mL⁻¹의 BP-3 농도에 환경에 존재하는 EHMC 농도 (Table 2.)를 기준으로 설정한 농도 (5, 50, 그리고 500 ng mL⁻¹)를 첨가하여 점망독의 성숙기 난모세포에 노출시켰고, 두 가지 자외선차단제에 복합적으로 노출되었을 때의 난모세포의 생존율, GVBD, 에스트로젠 농도 변화를 조사하였다. 또한 이와 병행하여 15 °C 및 20 °C 수온에 따른 변화도 조사하였다.

Table 1. Summary of environmental concentrations of BP-3 in reported studies.

Environmental sample	Location	Concentration of compound (ng L ⁻¹)	Reference
Surface water	Norway	670–6,700	Langford et al., 2015
Lakes and rivers	Switzerland	3	Fagervold et al., 2019
	Switzerland	125	Poiger et al., 2004
	Switzerland	35	Balmer et al., 2005
Sea water	U.S.	2.6–7.3	Bargar et al., 2015
Wastewater	Antarctic	16.7–195	Emnet et al., 2020
Sediments	China	0.8–1.6	He et al., 2016
Fish	Switzerland	123 (ng g ⁻¹)	Balmer et al., 2005
	Norway	20–1,037 (ng g ⁻¹)	Langford et al., 2015

Table 2. Summary of environmental concentrations of EHMC in reported studies.

Environmental sample	Location	Concentration of compound (ng L ⁻¹)	Reference
Surface water	Japan	21–260	Kameda et al., 2011
Lakes and rivers	Japan	18	Kameda et al., 2011
Sea water	Japan	12–1,040	Kameda et al., 2011
	Ionian Sea	nd	Giokas et al., 2004
	Polynesia	13–92	Goksoyr et al., 2009
Wastewater	Greece	4.1	Giokas et al., 2004
Sediments	Germany	nd–4	Ricking et al., 2003
	Japan	2.2–30.0	Kameda et al., 2011
Swimming pool water	Greece	4.5	Lambropoulou et al., 2002
Fish	Switzerland	56.5–61.3 (ng g ⁻¹)	Fent et al., 2010
Invertebrate	Switzerland	22–150 (ng g ⁻¹)	Fent et al., 2010
	France	79–99 (ng g ⁻¹)	Bachelot et al., 2012

II. 재료 및 방법

2.1 화학물질

본 실험에서 노출에 사용한 화학물질은 벤조페논-3 (2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone, BP-3, CAS number: 131-57-7) 및 옥티노세이트 (2-Ethylhexyl 4-methoxycinnamate, EHMC, CAS number: 5466-77-3)은 Sigma-Aldrich (Saint Louise, MO, USA)로부터 구매하였으며, 각각 1 mg mL^{-1} 농도로 에탄올 (ethanol, EtOH, CAS number: 64-17-5)에 용해시켜 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

에스트론 (estrone, E_1) 및 에스트라디올 (estradiol- 17β , E_2) 분석에 필요한 항체는 각각 anti Estrone-6-CMO-BSA serum 및 anti Estradiol-3-carboxymethylether-BSA를 Cosmo-bio co. Ltd (Tokyo, Japan)으로부터 구매하여 사용하였다. 방사표지된 호르몬은 Estrone [2,4,6,7- $^3\text{H(N)}$] 및 Estradiol [2, 4, 6, 7- $^3\text{H(N)}$]을 Amersham Biosciences (London, England)로부터 구매하여 사용하였다.

실험어 마취에 이용한 2-페녹시에탄올 (2-Phenoxyethanol, CAS number: 122-99-6)은 Sigma-Aldrich에서 구매하였다.

2.2 실험어 채집 및 난모세포 배양

실험에 사용된 점망둑 (*Chaenogobius annularis*)은 2022년 2월부터 2022년 4월까지 부산 청사포의 갯바위에서 간조시간에 뜰채를 이용하여 채집한 후 실험실로 옮겨와 인공해수가 담긴 20 L 수조로 옮겼다 (Fig. 1).

하루 동안 안정시킨 점망둑의 전장 (평균 5.90 ± 0.34 cm), 체장 (평균 5.10 ± 0.14 cm) 및 체중 (평균 2.23 ± 0.56 g)을 측정된 뒤 2-페녹시에탄올 (0.5 mL L^{-1})로 마취시키고 70 % EtOH로 소독한 해부가위를 이용하여 복부를 절개하여 난소를 절취하였다. 절취한 난소는 ice-cold balanced salt solution (pH 7.7, 삼투농도 300 milliosmol)에 넣어 혈병, 혈관 및 막을 제거한 후 난모세포를 분리하여 얻어진 난모세포 중 약 10 개를 취하여 실체현미경 (GmbH 37081, Zeiss, Berlin, Germany)과 현미경 카메라 (AxioCam ICc1, Zeiss, Berlin, Germany)를 15 배율로 하여 Zen 2.3 lite 프로그램으로 난경을 $1 \mu\text{m}$ 까지 측정하여 평균을 구하였다. 측정된 난모세포의 평균 난경은 각각 $734 \pm 23 \mu\text{m}$ ($730 \mu\text{m}$), $772 \pm 34 \mu\text{m}$ ($770 \mu\text{m}$), 그리고 $803 \pm 41 \mu\text{m}$ ($800 \mu\text{m}$)였다 (Table 3.).

24-well plate에 각 웰 당 Leibovitz L-15 (Leibovitz' s L-15 Medium, Gibco, Massachusetts, USA) 배양액 (pH 7.7, 삼투농도 300 milliosmole) 1 mL에 분리된 난모세포를 약 20 개씩 넣은 후 BP-3 및 EHMC를 농도별로 (BP-3, 5 ng mL^{-1} ; BP-3, $5 \text{ ng} + \text{EHMC}$, 5 ng mL^{-1} ;

BP-3, 5 ng + EHMC, 50 ng mL⁻¹; BP-3, 5 ng + EHMC, 500 ng mL⁻¹)
넣은 뒤 배양기 (Multi-Room Incubator VS-1203P4S, VISION
scientific co., LTD, Seoul, Korea)에서 배양 온도 15.0 ± 0.5 °C 및
20 ± 0.5 °C로 24 시간 동안 배양하였다. 배양실험은 3 반복으로 실행
하였다.



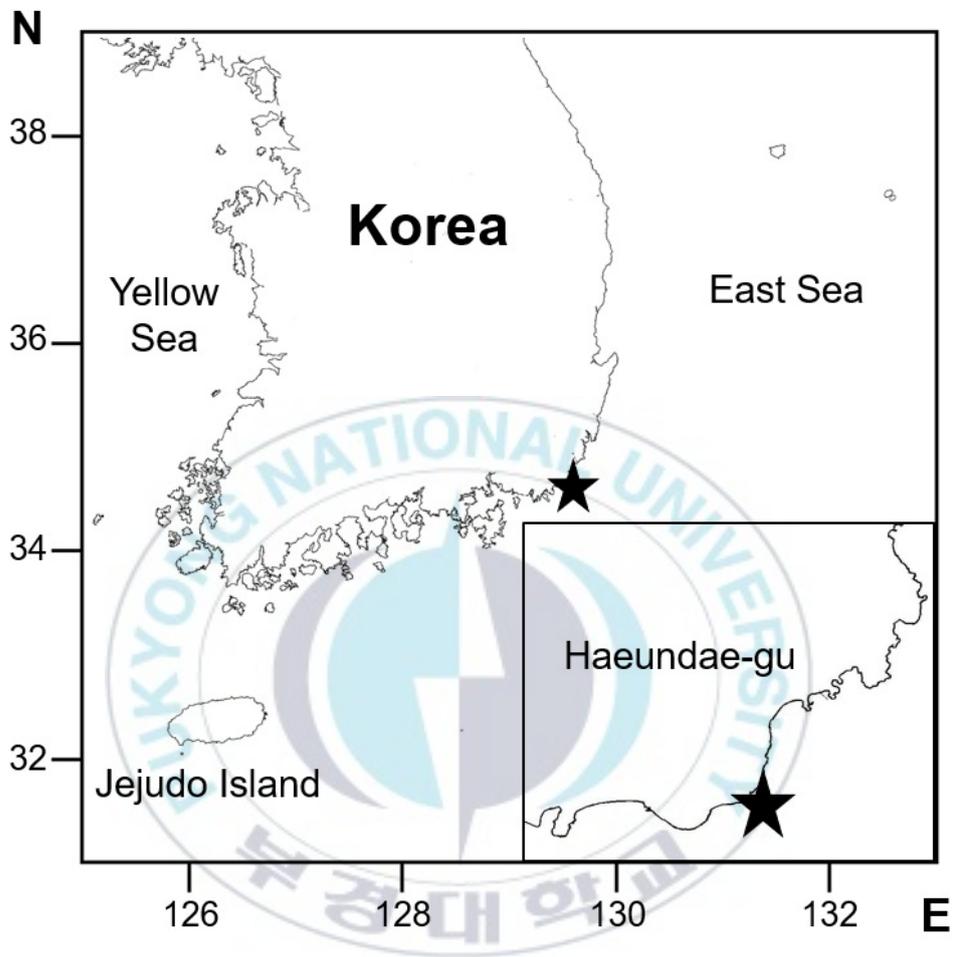


Fig. 1. Location of the sampling area; Cheongsapo, Busan, Korea.

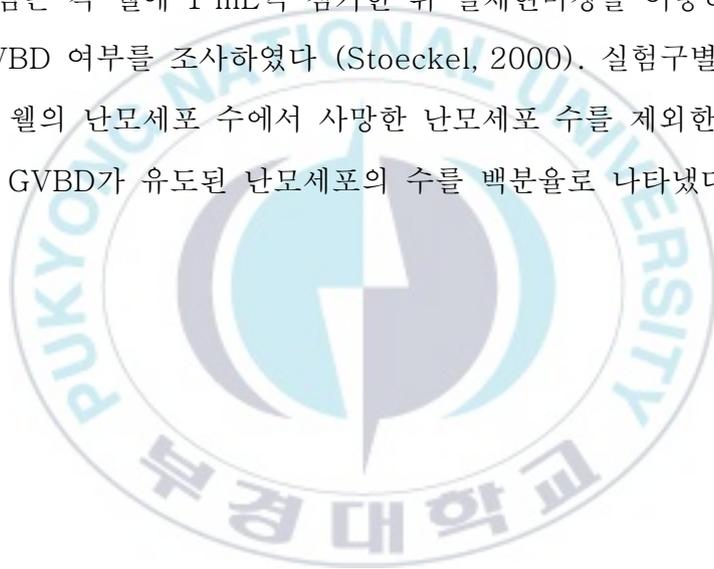
Table 3. Measurements of longchin goby, *Chaenogobius annularis* used in this study.

	Total length (cm)	Body length (cm)	Total weight (g)	Oocyte diameter (μm)
Fish 1	6.1	5.2	2.38	734 \pm 23
Fish 2	5.4	4.9	1.45	773 \pm 34
Fish 3	6.1	5.2	2.32	803 \pm 42



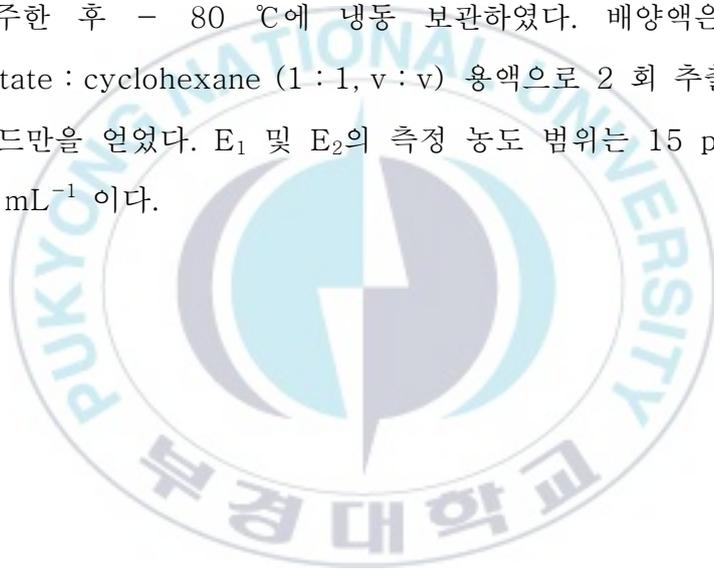
2.3 난모세포의 현미경적 관찰

점망독의 난모세포에 BP-3 단독 또는 BP-3 + EHMC 혼합 노출 실험구에 수온을 결합시킨 후의 생존율과 GVBD 유도 효과를 관찰하였다. 난경크기별 (730 μm ; 770 μm ; 800 μm)로 배양한 후, clearing solution (ethanol: formalin: glacial acetic acid = 6:3:1)을 배양액을 취하고 남은 각 웰에 1 mL씩 첨가한 뒤 실체현미경을 이용하여 난모세포의 GVBD 여부를 조사하였다 (Stoeckel, 2000). 실험구별 GVBD 유도는 각 웰의 난모세포 수에서 사망한 난모세포 수를 제외한 생존 난모세포 중 GVBD가 유도된 난모세포의 수를 백분율로 나타냈다.



2.4 에스트로겐 분석 (방사면역측정법)

BP-3 단독 및 BP-3 + EHMC 혼합 실험구에 24 시간 노출된 난모세포의 배양액으로 분비한 E_1 및 E_2 의 농도를 방사면역측정법 (radioimmunoassay, RIA)으로 분석하였다 (Kobayashi et al., 1987). 배양이 끝난 후 배양액 800 μL 를 피펫을 이용하여 2 mL micro tube에 각각 분주한 후 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 에 냉동 보관하였다. 배양액은 해동 후 ethylacetate : cyclohexane (1 : 1, v : v) 용액으로 2 회 추출하여 유리 스테로이드만을 얻었다. E_1 및 E_2 의 측정 농도 범위는 $15\text{ pg mL}^{-1} \sim 3840\text{ pg mL}^{-1}$ 이다.



2.5 통계처리

두 가지 온도 조건 (15 °C 및 20 °C)에서 BP-3, BP-3 + EHMC 혼합 실험구 노출에 따른 점망독 난모세포의 생존율, GVBD 유도, 배양액에서의 E₁ 및 E₂ 농도는 모두 평균 ± 표준편차로 나타냈다. IBM SPSS Statistic (version 27)을 이용하여 같은 온도구에서 일원분산분석 (one-way analysis of variance, ANOVA)을 실시하였고, 다른 온도구와의 유의차를 확인하기 위해 이원분산분석 (two-way analysis of variance, two-way ANOVA)을 실시하였으며, 사후 분석으로 Turkey test를 실시하여 95 % 신뢰수준에서 다른 온도 및 자외선 차단제 혼합물 노출에 따른 대조구와 실험구간의 유의차 검정을 실시하였다.

Ⅲ. 결 과

3.1 BP-3 + EHMC 혼합구에 미치는 수온의 영향; GVBD 유도효과

배양 직전 점망독의 난모세포의 난경은 각각 $734 \pm 23 \mu\text{m}$ ($730 \mu\text{m}$), $772 \pm 34 \mu\text{m}$ ($770 \mu\text{m}$), 그리고 $803 \pm 41 \mu\text{m}$ ($800 \mu\text{m}$) 였다 (Fig. 2.). 이들 난모세포를 수온조건과 BP-3 및 EHMC 혼합구에 24 시간 노출시킨 후 실체현미경으로 관찰하여, 난모세포의 핵 (germinal vesicle, GV)의 위치, GVBD 및 사망 (백탁 또는 난막이 파괴된 난모세포)을 구분하였다. 모든 실험구에서 생존율은 대조구를 포함하여 평균 $99.1 \pm 1.1 \%$ 였다.

15 °C의 조건에서 GVBD는 $730 \mu\text{m}$ 와 $800 \mu\text{m}$ 의 모든 실험구는 대조구에 비하여 유의한 차이가 없었으나, $770 \mu\text{m}$ 의 BP-3, 5 ng + EHMC, 50 ng mL^{-1} 실험구에서 GVBD 유도 ($41.4 \pm 7.2 \%$) 효과가 관찰되었으며, 이는 대조구 ($13.1 \pm 9.2 \%$)에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다 (Fig. 6B, $p < 0.05$).

20 °C 배양조건의 모든 실험구에서는 GVBD의 유도효과가 관찰되지 않았다.

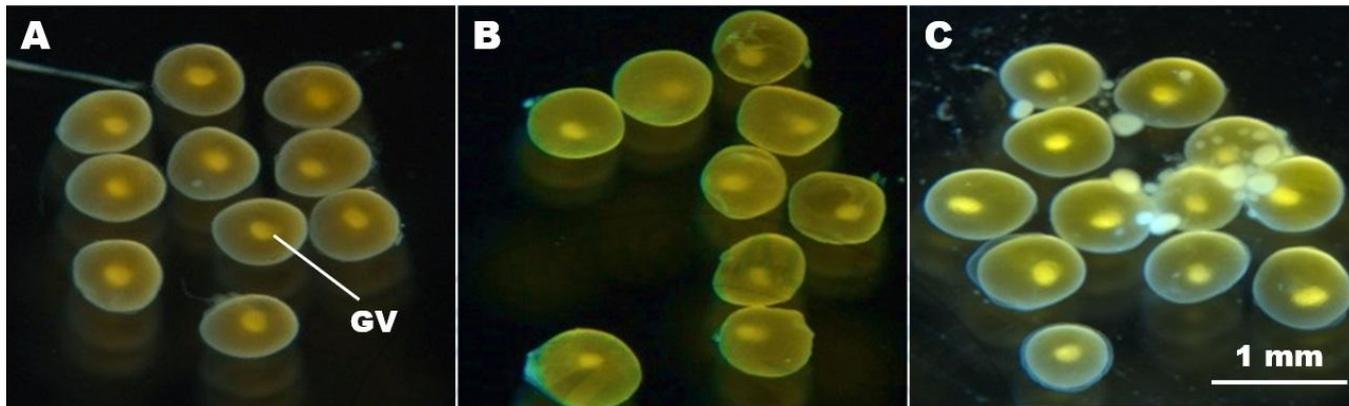


Fig. 2. Morphological observations of oocytes (A, 730 μm ; B, 770 μm ; C, 800 μm) in longchin goby, *Chaenogobius annularis* before incubation. (GV, germinal vesicle)

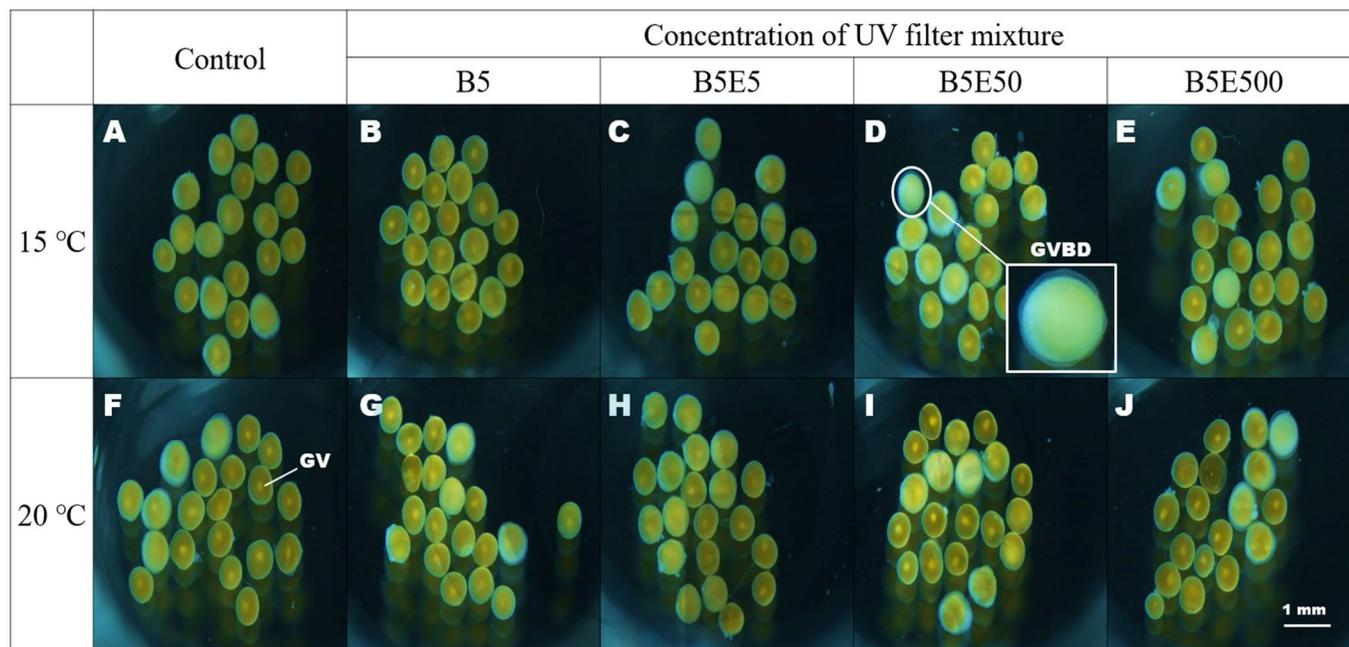


Fig. 3. Morphological observation of 730 μm oocytes group in longchin goby, *Chaenogobius annularis* after 24 h incubation. Oocytes exposed in BP-3 with EHMC mixture treatment (B5, 5 ng of BP-3 mL^{-1} ; B5E5, 5 ng of BP-3 + 5 ng of EHMC mL^{-1} ; B5E50, 5 ng of BP-3 + 50 ng of EHMC mL^{-1} ; B5E500, 5 ng of BP-3 + 500 ng of EHMC mL^{-1}) and water temperature conditions. (GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown)

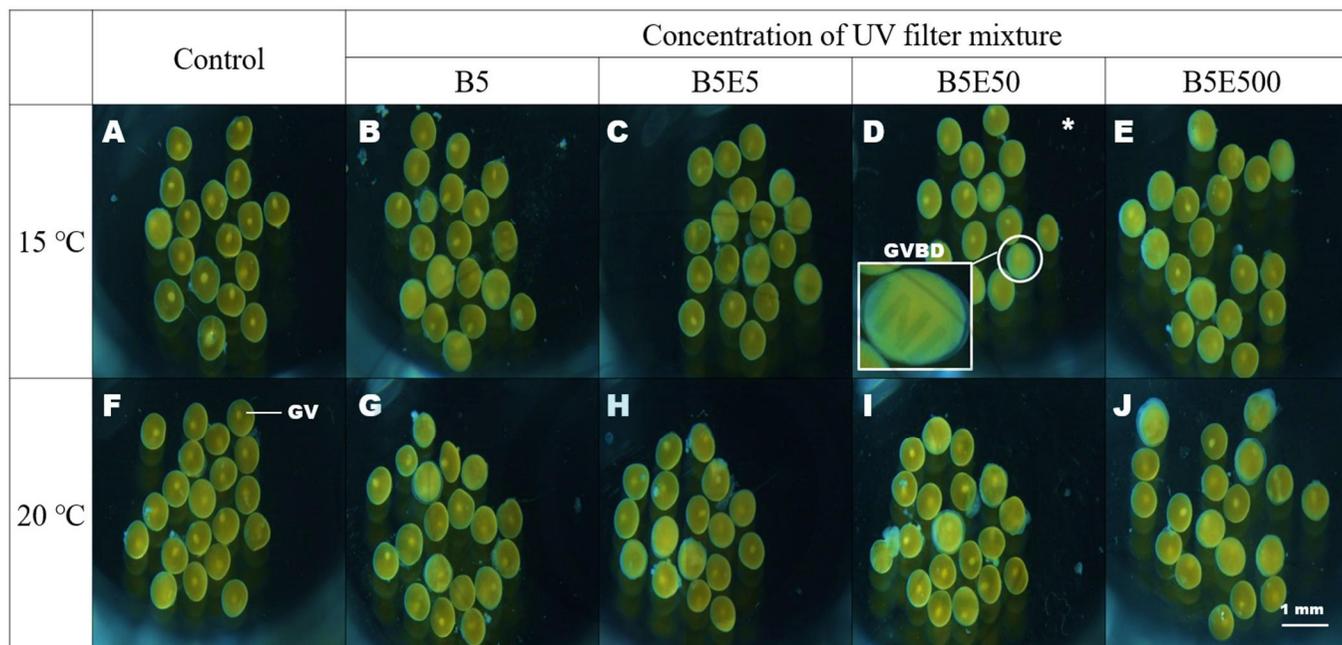


Fig. 4. Morphological observation of 770 μm oocytes group in longchin goby, *Chaenogobius annularis* after 24 h incubation. Oocytes exposed in BP-3 with EHMC mixture treatment (B5, 5 ng of BP-3 mL^{-1} ; B5E5, 5 ng of BP-3 + 5 ng of EHMC mL^{-1} ; B5E50, 5 ng of BP-3 + 50 ng of EHMC mL^{-1} ; B5E500, 5 ng of BP-3 + 500 ng of EHMC mL^{-1}) and water temperature conditions. Asterisk indicate significant difference from control. (GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown)

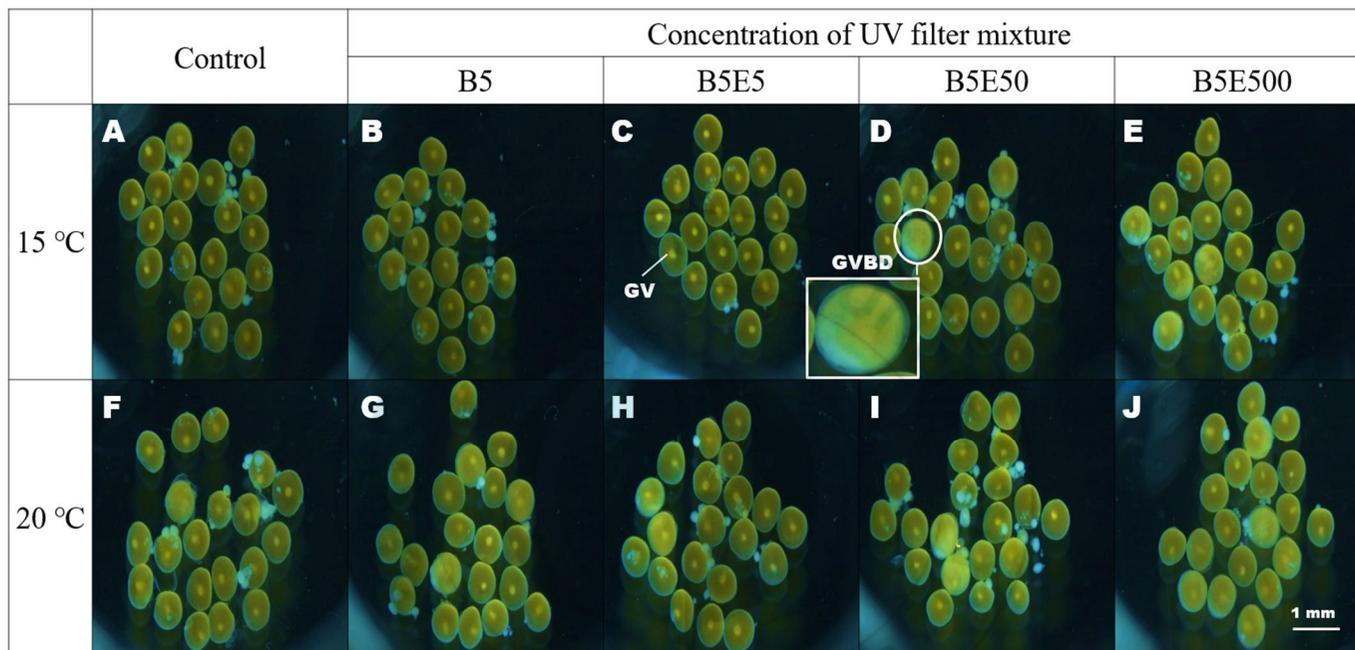


Fig. 5. Morphological observation of 800 μm oocytes group in longchin goby, *Chaenogobius annularis* after 24 h incubation. Oocytes exposed in BP-3 with EHMC mixture treatment (B5, 5 ng of BP-3 mL^{-1} ; B5E5, 5 ng of BP-3 + 5 ng of EHMC mL^{-1} ; B5E50, 5 ng of BP-3 + 50 ng of EHMC mL^{-1} ; B5E500, 5 ng of BP-3 + 500 ng of EHMC mL^{-1}) and water temperature conditions. (GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown)

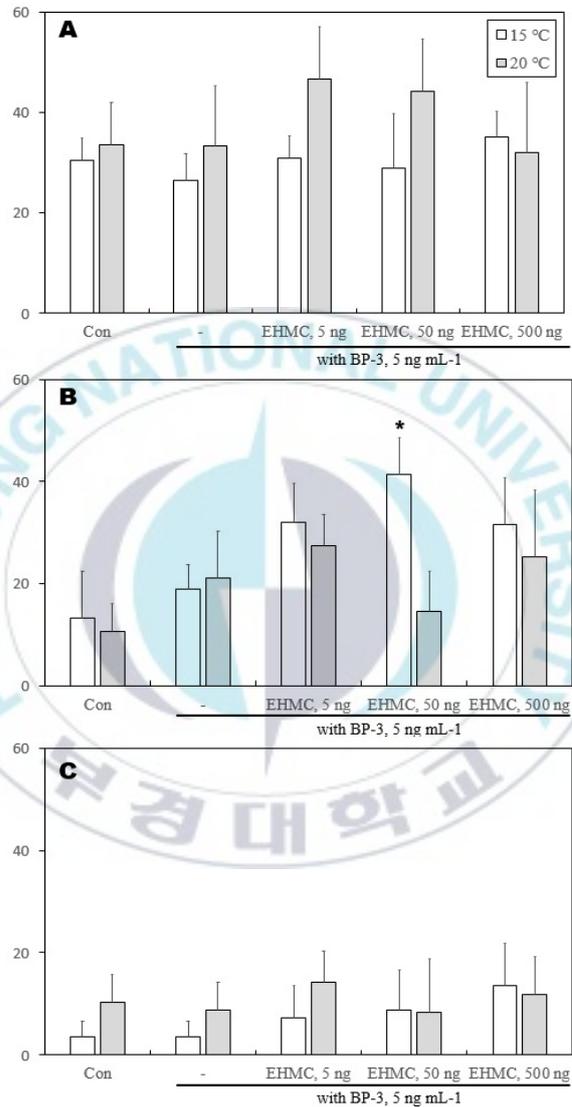


Fig. 6. GVBD rate of longchin goby, *Chaenogobius annularis* oocytes (A, 730 μm; B, 770 μm; C, 800 μm) after 24 h exposed in BP-3 with EHMC mixture treatment and water temperature conditions. Asterisk indicate significant difference from control ($p < 0.05$).

3.2 BP-3 + EHMC 혼합구에 미치는 수온의 영향; 에스트로겐의 농도 변화

15 °C와 20 °C의 배양 조건에서 BP-3 및 EHMC 혼합구에 24 시간 노출된 점망독의 난모세포 (730 μm ; 770 μm ; 800 μm)의 배양액으로부터 에스트로겐 농도를 분석하였다. Estrone (E_1)의 경우, 난경 770 μm , 수온 20 °C 조건의 BP-3, 5 ng mL⁻¹ 농도구 (931.60 ± 102.09 pg mL⁻¹)는 같은 온도의 대조구 (405.58 ± 124.86 pg mL⁻¹)에 비하여 유의한 차이를 나타냈다 (Fig. 7B, $p < 0.05$). 난경 770 μm 와 800 μm 의 모든 실험구에서는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 7A and C). 반면 estradiol-17 β (E_2) 농도는 난경 770 μm , 수온 15 °C, BP-3, 5 ng mL⁻¹에서 가장 높은 농도 ($5,916.25 \pm 2,350.31$ pg mL⁻¹)를 나타냈으며, 이는 같은 온도의 대조구 ($1,081.77 \pm 749.77$ pg mL⁻¹)에 비하여 유의한 차이가 있다 (Fig. 8B, $p < 0.05$). 난경 730 μm 와 800 μm 의 모든 실험구에서는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 8A and C).

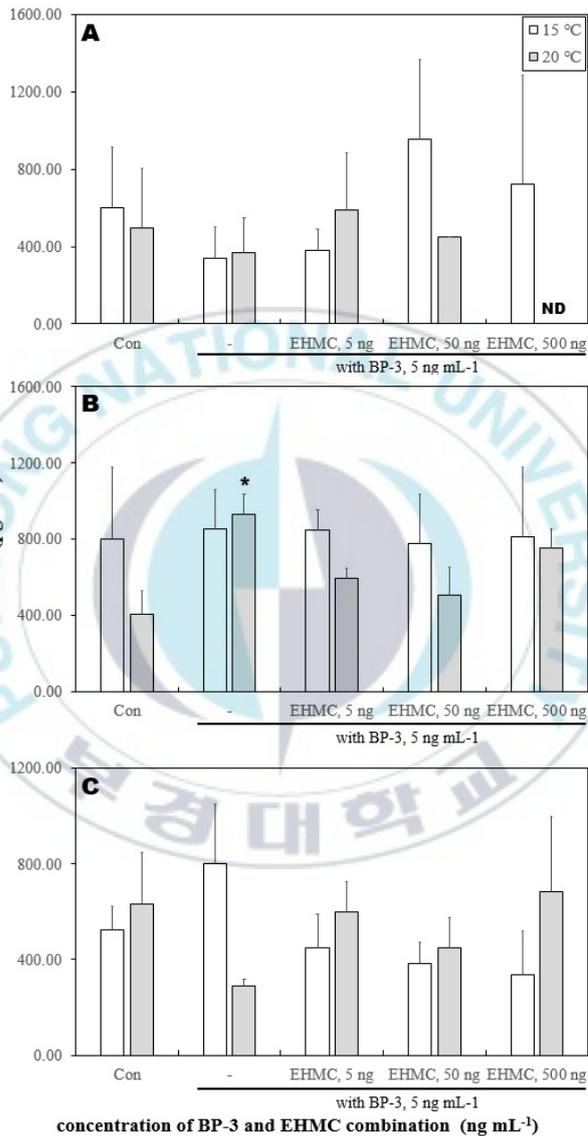


Fig. 7. Estrone (E₁) concentration of longchin goby, *Chaenogobius annularis* oocytes (A, 730 μm; B, 770 μm; C, 800 μm) secrete to culture media after 24 hours exposed in BP-3 with EHMC mixture treatment and water temperature conditions. Asterisk indicate of significant difference from controls ($p < 0.05$).

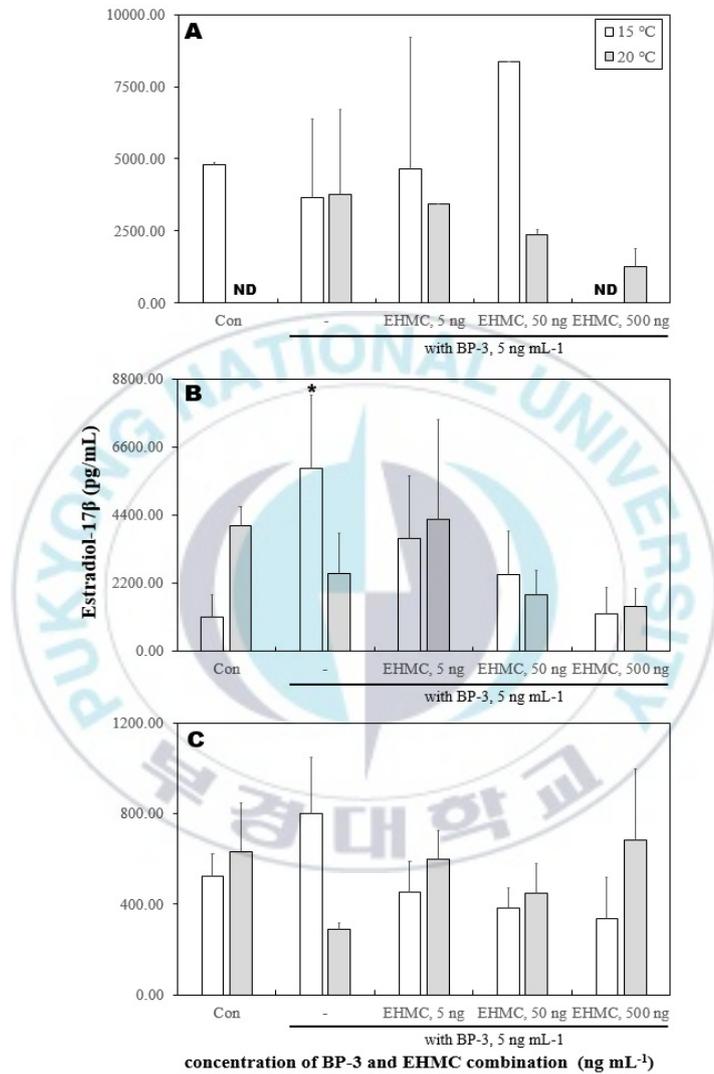


Fig. 8. Estradiol-17β (E₂) concentration of longchin goby, *Chaenogobius annularis* oocytes (A, 730 μm; B, 770 μm; C, 800 μm) secrete to culture media after 24 hours exposed in BP-3 with EHMC mixture treatment and water temperature conditions. Asterisk indicate of significant difference from controls ($p < 0.05$).

IV. 고찰

본 연구는 번식기 점망둑 (*Chaenogobius annularis*)의 난소로부터 난모세포를 분리하여 각각 평균 난경 $734 \pm 23 \mu\text{m}$ ($730 \mu\text{m}$), $772 \pm 34 \mu\text{m}$ ($770 \mu\text{m}$), 그리고 $803 \pm 41 \mu\text{m}$ ($800 \mu\text{m}$)의 난모세포를 얻어, 자외선차단제 benzophenone-3 (BP-3) 및 octinoxate (EHMC) 농도별 (BP-3, 5 ng mL^{-1} ; BP-3, $5 \text{ ng} + \text{EHMC}$, 5 ng mL^{-1} ; BP-3, $5 \text{ ng} + \text{EHMC}$, 50 ng mL^{-1} ; BP-3, $5 \text{ ng} + \text{EHMC}$, 500 ng mL^{-1}) 그리고 수온 조건 ($15 \text{ }^\circ\text{C}$ 및 $20 \text{ }^\circ\text{C}$)이 GVBD 유도, 생존율 및 에스트로겐 농도 (estrone, E_1 및 estradiol- 17β , E_2)에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

본 연구의 결과로 난모세포의 생존율에 BP-3 및 EHMC 혼합물과 수온 조건은 대조구에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았다. Wood(1997)는 어류의 생식소 발달 과정에서 난모세포의 성숙기에 온도가 영향을 미칠 수 있으며 그 정도는 종에 따라 다를 수 있다고 주장하였다. 본 실험에서 설정된 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 는 점망둑 채집을 진행한 기간 중 채집지의 최고 수온이었던 $14.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 보다 약 $5.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 가 높은 수온임에도 난모세포의 생존율에는 영향을 미치지 않았으며, 이는 열대성 해수어종인 damselfish (*Pomacentrus amboinesis*)의 수정란이 $2 \text{ }^\circ\text{C}$ 의 수온 차이로 극적인 사망률 증가를 나타낸 것과 대조적이다 (Gagliano et al., 2007; NIFS, 2022).

본 실험에서 GVBD 유도 효과는 평균 난경 $770 \mu\text{m}$ 난모세포의 수온 $15 \text{ }^\circ\text{C}$, BP-3, $5 \text{ ng mL}^{-1} + \text{EHMC}$, 50 ng mL^{-1} 실험구에서 대조구에 비하여 유의하게 증가하였는데, 동일 그룹의 다른 실험구 (BP-3, 5 ng mL^{-1} ; BP-3, $5 \text{ ng} + \text{EHMC}$, 5 ng mL^{-1} ; BP-3, $5 \text{ ng} + \text{EHMC}$, 500 ng mL^{-1})는

대조구와 비교하여 유의한 차이가 없었다. 이전에 보고된 연구에서 여러 종류의 자외선 차단제 물질을 혼합하여 제브라피쉬의 수정란에 노출시킨 결과, 자외선 차단제를 혼합할 경우 (EHMC 및 octocrylene) 두 물질이 서로 상호 작용하여 단일 화합물에 의한 효과에 비하여 배아 발달에 대한 독성 영향이 감소할 수 있다고 보고하였다 (Li et al., 2018). 자연 환경에서 유기체는 두 가지 이상의 화학물질 혼합물에 노출될 경우 여러 종류의 상호 작용을 하는 것으로 나타났다 (Gomez-Eyles et al., 2009). 예를 들어, 살충제인 imidacloprid 및 thiacloprid 의 저농도 혼합물에 노출된 *Caenorhabditis elegans* 의 번식율이 대조구에 비하여 증가하였고 고농도 혼합물에 노출된 실험구에서는 길항작용이 일어나 대조구에 비하여 번식율의 유의한 차이가 없었다 (Gomez-Eyles et al., 2009). 본 실험의 BP-3 단독 노출 실험구 (BP-3, 5 ng mL⁻¹) 및 저농도 혼합 실험구 (BP-3, 5 ng + EHMC, 5 ng mL⁻¹)에서는 점망독의 GVBD 유도에 영향을 주기 않았으나, 중간 농도의 혼합 실험구 (BP-3, 5 ng + EHMC, 50 ng mL⁻¹)에서 GVBD 유도가 유의하게 증가하였고, 고농도의 혼합 실험구 (BP-3, 5 ng + EHMC, 500 ng mL⁻¹)에서는 유의한 차이가 없었다. 이는 Gomez-Eyles et al. (2009)의 실험에서처럼 본 실험의 고농도 실험구에서 두 화학물질 간의 상호작용에 의하여 GVBD 유도를 촉진하는 효과가 감소한 것으로 추정된다. 또한 모든 난경 그룹에서 BP-3, 5 ng mL⁻¹ 단독 실험구는 대조구와 비교하여 GVBD 유도에 유의한 차이를 나타내지 않았는데, 이는 제브라피쉬 암컷 성어에게 BP-3 를 노출시킨 결과, 191 ng mL⁻¹ 농도에서는 난모세포의 성숙이 유도되지 않아 본 실험의 5 ng mL⁻¹ 농도의 BP-3 는 GVBD 유도에 영향을 주지 않는 농도로 생각된다 (Kinnberg et al., 2015). 또한 메다카 성어를

BP-3 (10 ng mL^{-1} ; 100 ng mL^{-1} ; $1,000 \text{ ng mL}^{-1}$)에 노출시킨 결과, 고농도 ($1,000 \text{ ng mL}^{-1}$) 실험구에서 난모세포 수 및 부화율의 유의한 감소가 나타났으며, 저농도 (10 ng mL^{-1})에서는 변화가 없는 것이 본 실험의 결과와 유사하였다 (Coronado et al., 2008). 또한 벤조페논 계열의 다른 자외선 차단제인 benzophenone-2 를 *Pimephales promelas* 의 성어에게 노출시킨 결과, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ 및 $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 농도에서 난모세포의 모든 발달 단계 (전기, 초기 및 후기)에서 정상 빈도를 나타낸 것과 유사하였으나, 그보다 높은 농도에선 배란에 이르지 못하고 퇴화된 폐쇄난포 (atretic follicle)가 관찰되었으며 $1,200 \mu\text{g mL}^{-1}$ 및 그 이상의 농도에선 후기 난모세포가 유의하게 감소하여 난모세포의 성숙에 부정적인 영향을 보였다 (Weisbrod et al., 2007).

본 실험에서는 난경 $770 \mu\text{m}$ 의 난모세포의 $15 \text{ }^\circ\text{C}$, BP-3, 5 ng mL^{-1} 실험구의 E_2 농도와 $20 \text{ }^\circ\text{C}$, BP-3, 5 ng mL^{-1} 실험구의 E_1 농도가 증가하였다. E_2 는 다양한 어종에서 후기 난황형성기의 난모세포의 출현에 따라 증가하기 시작하여 후기 난황형성기 이후 급격한 감소를 나타낸다 (Lee and Yang, 2002). Woo (2021)의 연구에서 점망둑의 난모세포 (평균 난경 $770 \mu\text{m}$; $870 \mu\text{m}$)를 BP-3, 5 ng mL^{-1} 에 노출시키고 스테로이드 물질대사율을 확인한 결과, $770 \mu\text{m}$ 그룹에서는 유의한 차이가 없었으나 $870 \mu\text{m}$ 난모세포에서는 물질대사율이 증가하였다. Coronado et al. (2008)의 연구에서 메다카의 내분비 기능이나 생식 기능을 손상시키기 위해선 $16\text{--}620 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 BP-3 농도가 필요했으나 본 실험에서는 5 ng mL^{-1} 의 더 낮은 농도에서도 에스트로겐 농도의 변화를 나타내어 어종간의 민감도에 차이가 있는 것으로 생각된다. 또한 메다카 성어를 BP-3 에 노출시킨 다른 실험에서 수컷 및 암컷 모두에서 E_2/T (testosterone, T) 비율이 현저히 감소하였으며

이는 BP-3 의 성 스테로이드 호르몬 변경 가능성을 나타낸다. 이러한 성호르몬 균형의 변화는 난 생식의 현저한 감소와 관련이 있을 수 있다. 추가적으로 E₂ 의 감소 및 T 농도의 증가와 같은 성 호르몬의 변화는 스테로이드 생성 유전자 발현의 변경으로 설명될 수 있다 (Kim et al., 2014). Cytochrome P450 aromatase 효소는 안드로겐을 에스트로겐으로 전환하는 역할을 하며, 어류의 성숙한 난소에서 E₂ 는 cytochrome P450 aromatase 효소에 의해 생성된다. (Young et al., 1983). 따라서 Cytochrome P450 aromatase 유전자 cyp19a 의 하향 조절은 어류 혈장에서 T 의 상대적인 증가 또는 E₂ 의 감소를 나타낸다 (Kim et al., 2014). 본 실험에서의 E₂ 농도 증가는 BP-3 가 cytochrome P450 aromatase 를 활성화시키는 에스트로겐성으로 작용했을 가능성이 있다. 다른 연구에서 BP-3 를 성 분화가 일어나지 않은 *P. promelas* 유어에게 노출시킨 결과, 항안드로겐 활성화, 항에스트로겐 활성화 및 에스트로겐 활성을 나타냈다. BP-3 는 안드로겐 수용체의 길항제인 플루타미드와 동등한 효과를 나타내며, 항안드로겐 특성은 간접적인 피드백 고리의 파괴 및 에스트로겐 활성을 유발할 수 있다. 이 에스트로겐 활성화는 BP-3 가 4-하이드록시 페놀 대사로 탈메틸화되어 발생할 수 있으며, 모체화합물 보다 더 강력하게 에스트로겐 수용체에 작용할 수 있다 (Kunz and Fent, 2006). 제브라피쉬의 성어에게 BP-3 및 EHMC 를 혼합하여 노출시킨 결과 그 자손들의 사망률, 심박수 및 부화율이 크게 저하되었는데, 내분비계를 교란시키는 것으로 알려진 자외선 차단제가 부모 개체의 생식 기관을 손상시켜 정상적이지 않은 자손이 나타났을 가능성이 제기되기도 하였다 (Li et al., 2018). 한편 EHMC 를 메다카 성어에게 노출시킨 결과 5 mg L⁻¹ 에서 번식율이 현저히 감소하였으나, 혈장 E₂ 농도의 변화는

관찰되지 않았고 갑상선 호르몬이 하향 조절되는 경향을 보였다. 갑상선 호르몬은 성성숙에도 중요한 역할을 하는데, EHMC 의 갑상선 교란 효과는 생식 능력 감소에 부분적으로 영향을 미쳤을 수 있다 (Lee et al., 2016; Castañeda Cortés et al., 2014; Tovo-Neto et al., 2018). 제브라피쉬 성어를 EHMC 에 노출시킨 후 F₀ 및 F₁ 자손을 관찰한 결과, 성어의 혈장 E₂ 농도가 감소하였으며, 치어의 성장 및 발달에 독성 효과가 있었고, EHMC 는 또한 항에스트로겐 및 안드로젠 효과를 나타냈으며 자손은 지속적인 노출 여부에 관계없이 성어 보다 더 강한 생화학적 반응을 나타냈다 (Zhou et al., 2019).

본 연구는 자외선 차단제 BP-3 및 EHMC 혼합물 및 수온 조건의 조합이 점망둑 난모세포의 GVBD 유도를 촉진할 수 있으며, 에스트로겐 농도를 증가시킬 수 있음을 보여준다. 이는 이전의 연구에서 BP-3 에 노출된 난모세포가 에스트로겐 활성이 증가한 것과 유사하였다 (Woo, 2021). 또한 환경농도 수준의 BP-3 및 EHMC 의 혼합물에 의하여 GVBD 유도가 촉진되기도 한 것으로 보아, 이러한 자외선 차단제가 EDC 로 작용했을 것으로 생각된다. 하지만 본 연구에서는 E₂ 를 생성하는 T 그리고 그 생성을 유도하는 효소, cytochrome P450 aromatase 의 유전자인 cyp19a 의 발현에 관한 분석은 이루어지지 않았으며, GVBD 유도에 직접적인 영향을 주는 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α ,20 β -P) 또한 측정하지 않았다 (Kagawa et al., 1995; Trant et al., 2001). 따라서 생식기능 교란에 대한 메커니즘을 파악하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 참고문헌

- Arya, S., Dwivedi, A. K., Alvarado, L., & Kupesic-Plavsic, S. (2020). Exposure of U.S. population to endocrine disruptive chemicals (Parabens, Benzophenone-3, Bisphenol-A and Triclosan) and their associations with female infertility. *Environmental Pollution*, 265, 114763.
- Arantes, F. P., Santos, H. B., Rizzo, E., Sato, Y., & Bazzoli, N. (2011). Influence of water temperature on induced reproduction by hypophysation, sex steroids concentrations and final oocyte maturation of the “curimatã-pacu” *Prochilodus argenteus* (Pisces: Prochilodontidae). *General and Comparative Endocrinology*, 172(3), 400-408.
- Bachelot, M., Li, Z., Munaron, D., Le Gall, P., Casellas, C., Fenet, H., & Gomez, E. (2012). Organic UV filter concentrations in marine mussels from French coastal regions. *Science of the Total Environment*, 420, 273-279.
- Baek, H. J., Park, M. H., Lee, Y. D., & Kim, H. B. (2003). Effect of in vitro xenoestrogens on steroidogenesis in mature female fish, *Chasmichthys dolichognathus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4), 413-414.
- Baek, H. J. (2008). Production of C₂₁-Steroids in Longchin Goby, *chasmichthys dolichognathus* during Oocyte Maturation. *Development and Reproduction*, 12(1), 107-112.

- Balmer, M. E., Buser, H. R., Müller, M. D., & Poiger, T. (2005). Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes. *Environmental Science and Technology*, 39(4), 953–962.
- Bargar, T. A., Alvarez, D. A., & Garrison, V. H. (2015). Synthetic ultraviolet light filtering chemical contamination of coastal waters of Virgin Islands national park, St. John, U.S. Virgin Islands. *Marine Pollution Bulletin*, 101(1), 193–199.
- Blüthgen, N., Zucchi, S., & Fent, K. (2012). Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263(2), 184–194.
- C. M. Wood, D. G. McDonald (1997). *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Castañeda Cortés, D. C., Langlois, V. S., & Fernandino, J. I. (2014). Crossover of the hypothalamic pituitary adrenal/interrenal, thyroid, and gonadal axes in testicular development. *Frontiers in Endocrinology*, 5(AUG), 1–11.
- Christen, V., Zucchi, S., & Fent, K. (2011). Effects of the UV-filter 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) on expression of genes involved in hormonal pathways in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and link to vitellogenin induction and histology. *Aquatic Toxicology*, 102(3–4), 167–176.

- Chung, M., 1977. The fishes of korea. Iljisa, Seoul, 727pp
- Cocci, P., Mosconi, G., & Palermo, F. A. (2020). Sunscreen active ingredients in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) and their relation to molecular markers of inflammation, oxidative stress and hormonal activity in wild populations. *Marine Pollution Bulletin*, 153(February), 111012.
- Coronado, M., De Haro, H., Deng, X., Rempel, M. A., Lavado, R., & Schlenk, D. (2008). Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-4-methoxyphenyl-methanone) in fish. *Aquatic Toxicology*, 90(3), 182-187.
- Danovaro, R., Bongiorno, L., Corinaldesi, C., Giovannelli, D., Damiani, E., Astolfi, P., ... Pusceddu, A. (2008). Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environmental Health Perspectives*, 116(4), 441-447.
- Dos, A., In, M., & Engineering, E. (2018). Photodegradation of Commonly used Ultraviolet Filters-Degradation Kinetics in Different Matrices. University of Porto. Portugal.
- Downs, C. A., Bishop, E., Diaz-Cruz, M. S., Haghshenas, S. A., Stien, D., Rodrigues, A. M. S., Woodley, C. M., Sunyer-Caldú, A., Doust, S. N., Espero, W., Ward, G., Farhangmehr, A., Tabatabaee Samimi, S. M., Risk, M. J., Lebaron, P., & DiNardo, J. C. (2022). Oxybenzone contamination from sunscreen pollution and its

ecological threat to Hanauma Bay, Oahu, Hawaii, U.S.A. *Chemosphere*, 291(November 2021).

- Emnet, P., Mahaliyana, A. S., Northcott, G., & Gaw, S. (2020). Organic Micropollutants in Wastewater Effluents and the Receiving Coastal Waters, Sediments, and Biota of Lyttelton Harbour (Te Whakaraupō), New Zealand. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(4), 461–477.
- Fagervold, S. K., Rodrigues, A. S., Rohée, C., Roe, R., Bourrain, M., Stien, D., & Lebaron, P. (2019). Occurrence and Environmental Distribution of 5 UV Filters During the Summer Season in Different Water Bodies. *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(7).
- Fent, K., Zenker, A., & Rapp, M. (2010). Widespread occurrence of estrogenic UV–filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environmental Pollution*, 158(5), 1817–1824.
- Filby, A. L., Thorpe, K. L., Maack, G., & Tyler, C. R. (2007). Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti–androgen– and estrogen–induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology*, 81(2), 219–231.
- Gagliano, M., McCormick, M. I., & Meekan, M. G. (2007). Temperature induced shifts in selective pressure at a critical developmental transition. *Oecologia*, 152(2), 219–225.
- Gago–Ferrero, P., Demeestere, K., Silvia Díaz–Cruz, M., & Barceló, D. (2013). Ozonation and peroxone oxidation

of benzophenone-3 in water: Effect of operational parameters and identification of intermediate products. *Science of the Total Environment*, 443, 209-217.

- Giokas, D. L., Sakkas, V. A., & Albanis, T. A. (2004). Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-photodiode array detection and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1026(1-2), 289-293.
- Goksøyr, A., Tollefsen, K. E., Grung, M., Løken, K., Lie, E., Zenker, A., ... Huber, S. (2009). Balsa raft crossing the pacific finds low contaminant levels. *Environmental Science and Technology*, 43(13), 4783-4790.
- Gomez-Eyles, J. L., Svendsen, C., Lister, L., Martin, H., Hodson, M. E., & Spurgeon, D. J. (2009). Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(1), 71-79.
- Gómez-Regalado, M. C., Martín-Pozo, L., Cantarero-Malagón, S., Hidalgo, F., & Zafra-Gómez, A. (2021). Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of UV filters in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the southern coast of Spain. *Microchemical Journal*, 171(September).
- Hawaii State Legislature (2021). House of Representatives Thirty-first Legislature, 2021. Retrieved from <https://www.capitol.hawaii.gov/> on Jan 16, 2022.

- He, Z., Cheng, X., Kyzas, G. Z., & Fu, J. (2016). Pharmaceuticals pollution of aquaculture and its management in China. *Journal of Molecular Liquids*, 223, 781–789.
- Hwang, S.J. (2012). The effect of benzo[a]pyrene on *in vitro* oocyte maturation of longchin goby, *Chamichthys dolichognathus*. Pukyong National University, Busan, Korea.
- Inui, M., Adachi, T., Takenaka, S., Inui, H., Nakazawa, M., Ueda, M., … Miyatake, K. (2003). Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology*, 194(1–2), 43–50.
- Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Okuzawa, K., & Hirose, K. (1995). In Vitro Effects of 17 α -hydroxyprogesterone and 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one on Final Maturation of Oocytes at Various Developmental Stages in Artificially Matured Japanese Eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, 61(6), 1012–1015.
- Kameda, Y., Kimura, K., & Miyazaki, M. (2011). Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environmental Pollution*, 159(6), 1570–1576.
- Kang, H. S., Ko, A., Kwon, J. E., Kyung, M. S., Moon, G. I., Park, J. H., … Hwang, I. G. (2016). Urinary benzophenone concentrations and their association

with demographic factors in a South Korean population. *Environmental Research*, 149, 1–7.

- Kim, S., Jung, D., Kho, Y., & Choi, K. (2014). Effects of benzophenone–3 exposure on endocrine disruption and reproduction of japanese medaka (*Oryzias latipes*) – A two generation exposure study. *Aquatic Toxicology*, 155, 244–252.
- Kinnberg, K. L., Petersen, G. I., Albrektsen, M., Minghlani, M., Awad, S. M., Holbech, B. F., ... Holbech, H. (2015). Endocrine–disrupting effect of the ultraviolet filter benzophenone–3 in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(12), 2833–2840.
- Kunz, P. Y., & Fent, K. (2006). Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl–4–aminobenzoate in fish. *Aquatic Toxicology*, 79(4), 305–324.
- Lambropoulou, D. A., Giokas, D. L., Sakkas, V. A., Albanis, T. A., & Karayannis, M. I. (2002). Gas chromatographic determination of 2–hydroxy–4–methoxybenzophenone and octyldimethyl–p–aminobenzoic acid sunscreen agents in swimming pool and bathing waters by solid–phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 967(2), 243–253.
- Langford, K. H., Reid, M. J., Fjeld, E., Øxnevad, S., & Thomas, K. V. (2015). Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. *Environment International*, 80, 1–7.

- Lee, Inae. (2016). Reproduction and endocrine related effects of life-cycle exposure to 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EHMC), a sunscreen agent, in Japanese medaka (*Oryzias latipes*).
- Lee, W. K., & Yang, S. W. (2002). Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). *Aquaculture*, 207(1-2), 169-183.
- Leet, J. K., Gall, H. E., & Sepúlveda, M. S. (2011). A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early life stages: Effects on gene and hormonal control of sexual differentiation. *Journal of Applied Toxicology*, 31(5), 379-398.
- Li, A. J., Law, J. C. F., Chow, C. H., Huang, Y., Li, K., & Leung, K. S. Y. (2018). Joint Effects of Multiple UV Filters on Zebrafish Embryo Development. *Environmental Science and Technology*, 52(16), 9460-9467.
- Mao, J. F., Li, W., Ong, C. N., He, Y., Jong, M. C., & Gin, K. Y. H. (2022). Assessment of human exposure to benzophenone-type UV filters: A review. *Environment International*, 167(February), 107405.
- Martín-Pozo, L., Gómez-Regalado, M. del C., Cantarero-Malagón, S., Navalón, A., & Zafra-Gómez, A. (2021). Determination of ultraviolet filters in human nails using an acid sample digestion followed by ultra-high

performance liquid chromatography–mass spectrometry analysis. *Chemosphere*, 273.

- Moeller, M., Pawlowski, S., Petersen–Thiery, M., Miller, I. B., Nietzer, S., Heisel–Sure, Y., ... Schupp, P. J. (2021). Challenges in Current Coral Reef Protection – Possible Impacts of UV Filters Used in Sunscreens, a Critical Review. *Frontiers in Marine Science*, 8(April), 1–16.
- Poiger, T., Buser, H. R., Balmer, M. E., Bergqvist, P. A., & Müller, M. D. (2004). Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: Regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere*, 55(7), 951–963.
- Ricking, M., Schwarzbauer, J., & Franke, S. (2003). Molecular markers of anthropogenic activity in sediments of the Havel and Spree Rivers (Germany). *Water Research*, 37(11), 2607–2617.
- Robert H. Devlin, Yoshitaka Nagahama (2002). Sex determination and sex differentiation in fish; an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191–364.
- Sandra, G. E., & Norma, M. M. (2010). Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20(1), 101–121.
- Shein, N. L., Chuda, H., Arakawa, T., Mizuno, K., & Soyano, K. (2004). Ovarian development and final oocyte

maturation in cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fisheries Science*, 70(3), 360–365.

Shuo–Zeng Dou, Yoshiaki Yamada, Akihiro Okamura, Akira Shinoda, Satoru Tanaka, Katsumi Tsukamoto (2008). Temperature influence on the spawning performance of artificially–matured Japanese eel, *Anguilla japonica*, in captivity. *Environmental Biology of Fishes* 82, 151–164.

Spalding, M. D., & Grenfell, A. M. (1997). New estimates of global and regional coral reef areas. *Coral Reefs*, 16(4), 225–230.

Stoeckel, J. N. (2000). A Method for Viewing the Germinal Vesicle in Oocytes of Commercial Catfishes. *North American Journal of Aquaculture*, 62(3), 240–247.

Tovo–Neto, A., da Silva Rodrigues, M., Habibi, H. R., & Nóbrega, R. H. (2018). Thyroid hormone actions on male reproductive system of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 265(December 2017), 230–236.

Trant, J. M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B. C., & Place, A. R. (2001). Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CPY19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Zoology*, 290(5), 475–483.

Vione, D., Caringella, R., De Laurentiis, E., Pazzi, M., & Minero, C. (2013). Phototransformation of the sunlight filter benzophenone–3 (2–hydroxy–4–methoxybenzophenone) under conditions relevant to

surface waters. *Science of the Total Environment*, 463–464, 243–251.

- Wang, J., Pan, L., Wu, S., Lu, L., Xu, Y., Zhu, Y., ... Zhuang, S. (2016). Recent advances on endocrine disrupting effects of UV filters. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(8), 1–11.
- Weisbrod, C. J., Kunz, P. Y., Zenker, A. K., & Fent, K. (2007). Effects of the UV filter benzophenone–2 on reproduction in fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225(3), 255–266.
- Woo, H.W. (2021). In vitro steroid production in maturing oocyte of longchin goby (*Chasmichthys dolichognathus*) after exposure to organic UV filters. Pukyong National University, Busan, Korea.
- Young G, Kagawa H, Nagahama Y. (1982). Oocyte maturation in the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): In vitro effects of salmon gonadotropin, steroids, and cyanoketon (an inhibitor of 3β – hydroxy– Δ^5 steroid dehydrogenase). *J Exp Zool* 224, 265–275.
- Young, G., Kagawa, H., & Nagahama, Y. (1983). Evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulosa cells of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) associated with final oocyte maturation. *Biology of Reproduction*, 29(2), 310–315.
- Zhang, T., Sun, H., Qin, X., Wu, Q., Zhang, Y., Ma, J., & Kannan, K. (2013). Benzophenone–type UV filters in

urine and blood from children, adults, and pregnant women in China: Partitioning between blood and urine as well as maternal and fetal cord blood. *Science of the Total Environment*, 461-462, 49-55.

Zhou, H., Chen, A., & Lu, W. (2021). Corticotropin-releasing hormone reduces basal estradiol production in zebrafish follicular cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 527(August 2020).

Zhou, R., Lu, G., Yan, Z., Jiang, R., Shen, J., & Bao, X. (2019). Parental transfer of ethylhexyl methoxy cinnamate and induced biochemical responses in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 206(November 2018), 24-32.

Zucchi, S., Oggier, D. M., & Fent, K. (2011). Global gene expression profile induced by the UV-filter 2-ethylhexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 159(10), 3086-3096.

수산분야 기후변화 영향 및 취약성 평가 연구 (2022).

https://www.nifs.go.kr/rsh/result/rsltPblcPop.do?ORD=0012770&RSLTPUB_SEQ=19884

Acknowledgements

먼저 저를 항상 올바른 방향으로 지도해 주시고 성장시켜주신 백혜자 교수님께 진심으로 감사드립니다. 바쁘신 와중에도 저의 부족한 논문을 꼼꼼히 살펴보시고 조언해 주신 김진구 교수님과 김현우 교수님께 감사드립니다. 학부 전공지식을 가르쳐 주신 김형배 교수님, 김재원 교수님, 배승철 교수님 그리고 대학원 전공지식을 가르쳐 주신 남기완 교수님, 오철웅 교수님께 감사드립니다.

이 연구실의 실험에 대해 아무것도 모를 때 가르쳐 주었던 우희원 선배와 미혜, 여러가지로 도와준 재환이, 민설이, 태연이, 재욱이, 그리고 많은 조언을 해 주신 황인준 선배님, 김대근 선배님, 김효원 선배님, 김소라 선배님, 강민주 선배님께도 감사드립니다. 또한 채집과 여러 조언을 해준 같은 석사과정인 강현씨에게도 감사합니다.

마지막으로 언제나 힘이 되어준 부모님과 형에게도 깊이 감사드리며, 앞으로 더 발전하는 모습으로 보답하겠습니다.