



이 학 석 사 학 위 논 문

강도다리, *Platichthys stellatus*의 항산화, 면역 반응 및 HSP70에 미치는 Bisphenol A의 독성영향



국립부경대학교대학원

수산생명의학과

김 민 재

이 학 석 사 학 위 논 문

# 강도다리, *Platichthys stellatus*의 항산화, 면역 반응 및 HSP70에 미치는 Bisphenol A의 독성영향

지도교수 강 주 찬



국립부경대학교대학원

수산생명의학과

김 민 재

김민재의 이학석사 학위논문을 인준함

## 2024년 2월 16일



## 위원장 이학박사 김광일 (인)

위 원 농학박사 허민도 (인)

위 원 이학박사 강주찬 (인)

목 차
표 목차 ······i
그림 목차
영문 요약viii
I. 서 론
П ЛЭ П ННН
11. 새료 옷 강합···································
1. 결함의 옷 결합환경 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
2. 성상 표···································
3. 열액약식 성장 군식 ···································
4. 양산와요소 문식 ···································
4-1. Superoxide dismutase (SOD)
4-2. Catalase (CAT)
5. 번역반응 군식 ···································
6. Cortisol 😤 Heat Sock Protein 70
7. 유의정 검정
III. 결과 ···································
I. 성상률
2. 열액 상상 ·································
3. 열상 문식 ···································
4. 양산와요소 분석····································
4-1. Superoxide dismutase (SOD)
4-2. Catalase (CAT)
5. 면역반응 ····································
5-1. Immunoglobulin M ···································
5-2. Lysozyme 활성 ···································
6. Cortisol 및 Heat Sock Protein 70 ···································
6-1. Cortisol
6-2. HSP70
IV. 고 찰
V. 참고 문헌

Table	1.	The	chemical	components	of	seawater	and	experimental	condition
		used	in the ex	periments					



#### 그림 목차

- Fig. 6. Calcium of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical

bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test. 21

- Fig. 12. SOD activity in gill of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test. ·· 28</p>
- Fig. 13. SOD activity in intestine of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test.29</p>
- Fig. 14. SOD activity in liver of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test. ·· 30</li>
- Fig. 15. CAT activity in gill of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test. ··31</p>
- Fig. 16. CAT activity in intestine of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test.32</p>
- Fig. 17. CAT activity in liver of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20

days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test.  $\cdot \cdot 33$ 

- Fig. 19. IgM level in intestine of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test. 36</p>
- Fig. 21. Lysozyme activity in gill of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test.38</p>
- Fig. 22. Lysozyme activity in intestine of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test. 39</p>

- Fig. 23. Lysozyme activity in liver of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test.40</p>
- Fig. 24. Cortisol level in gill of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test. ·· 42</p>
- Fig. 25. Cortisol level in intestine of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test.43</p>
- Fig. 26. Cortisol level in liver of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test. 44</p>
- Fig. 27. Heat Shock Protein 70 in gill of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test. 45</p>
- Fig. 28. Heat Shock Protein 70 in intestine of starry flounder, *Plyatichthys* stellatus exposed different levels of BPA for 10 and 20 days.

Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test. 46

Fig. 29. Heat Shock Protein 70 in liver of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean ± S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P < 0.05) as determined by Tukey's multiple range test. 47</p>



## Toxic effects of BIsphenol A on the antioxidant, immune responses and HSP70 in starry flounder, *Platichthys stellatus*

Min Jae Kim

Department of Fish Pathology, Graduate School Pukyung National University

# Abstract

Bisphenol A (BPA) is a representative endocrine disruptor used in various industries and is known to destroy the endocrine system of fish and cause developmental and metabolic disorders. This study was conducted to investigate the effect of BPA on growth performance, hematological parameters, antioxidant, stress and immune response in starry flounder, *Platichthys stellatus* (mean weight,  $38.6 \pm 6.8$  g; mean length,  $14.8 \pm 0.6$  cm). Starry flounder, *Platichthys stellatus* were exposed for 20 days with differen levels of Bispenol A (0, 100, 200, 400 and 800 ug/L).

Growth performances such as body weight gain (BWG), specific growth rate (SGR) and hepatosomatic index (HSI) were significantly decreased by BPA exposure. Hematological parameters such as red blood cell (RBC) count and hemoglobin were also significantly decreased. In plasma inorganic components, calcium and magnesium were significantly decreased by BPA exposure. In enzyme plasma components, glutamic oxalate transaminase (GOT) and glutamic pyruvate transaminase (GPT) were significantly increased. The superoxide dismutase activity (SOD), catalase activity (CAT) were significantly decreased compared with control group. Immune response such as lysozyme activity and IgM were also significantly decreased. Stress response such as cortisol and heat shock protein 70 (HSP70) were significantly increased by BPA exposure.

### I. 서 론

환경호르몬으로 알려져 있는 내분비교란물질(Endocrine disrupting chemicals, EDCs)는 체내의 내분비계에 영향을 미쳐 호르몬의 생산, 수송, 결합, 대사, 그리고 방출작용을 방해하는 화합물이다(Scholz et al., 2008). 이는 어류를 포함한 다양한 생물들의 다양한 조직에 성장과 발달에 관여하는 호르몬 항상성을 교란시켜 여러 기관에 기능 장애를 유발한다(Sharma et al., 2021). Bisphenol A(BPA)는 대표적 인 내분비 교란 물질중 하나로 식품과 음료의 용기, 전기 전자 부품, 컴퓨터 부품 등 플라스틱 및 플라스틱 파생 제품 생산에 많이 사용 된다(Faheem et al., 2021). 2018년을 기준으로 BPA는 전 세계적으로 7.200킬로톤 수준으로 광범위하게 사용되며, 사용량은 매년 4.6%가 증가할 것으로 보인다(Wang et al., 2021). BPA는 하 수 처리 공정, 폐수 처리장, 매립지 침출수 등을 통해 해양으로 방출되어 해양생물 에게 노출될 위험이 있다(Krishnapriya et al., 2017; Ribeiro et al., 2009; Lu et al., 2015).

BPA는 화학적으로 phenol ring 구조를 가지고 있어 에스트라디올 수용체에 친 화도를 보인다. 이로 인해 어류의 난소 성장을 억제하는 등 배아발달 및 생식에 영향을 미친다(Kang et al., 2007). 또한, 최근 연구에 따르면 BPA는 대사활동을 방해하여 췌장 및 지방 조직과 같은 기관에 영향을 미칠뿐만 아니라 비만과 같은 대사 증후군을 유발하는 것으로 나타났다(Faheem et al.,2021). 그 외에도 BPA는 어류의 ROS를 증가시켜 세포를 파괴하고 내분비계를 파괴하여 혈액, 신경 그리고 면역독성을 유발시킨다(Rangasamy et al., 2023).

독성물질들은 체내에서 활성 산소(Reactive oxygen species, ROS)를 발생시키 고 물리적, 화학적 산화 스트레스를 유발시킨다(Yu et al., 2023). 과도한 ROS는 세포의 항산화 시스템을 파괴하여 세포의 산화환원 항상성 기능을 잃게 하고 이 로 인해 발생된 산화스트레스가 세포조직을 파괴하여 자체 항산화 능력이 붕괴된

- 1 -

다(Yu et al., 2023). 어류가 독성물질에 노출되거나 물리적인 스트레스를 받게 되 면 세포 내에서 발생하는 ROS를 제거하고 항상성을 유지하기 위해서 여러 가지 항산화효소가 작용하게 된다(Kim et al., 2021). 항산화효소로는 Superoxide dismutase(SOD), Catalase(CAT), Glutathione S-transferase(GST), Glutathione peroxidase(GPx)와 Glutathione reductase(GR) 등이 있으며 활성 산소로부터 조직 을 보호하는 역할을 가지고 있어 독성물질 노출로 인한 산화 스트레스를 평가하 는 중요한 지표로 사용된다(Yu et al., 2023). BPA 노출은 어류에서 ROS의 과잉 생산을 유발할 수 있으며, 항산화 반응의 자극은 어류의 BPA 노출로 인한 산화스 트레스를 평가하는 중요한 지표로 사용될 수 있다(Akram et al., 2021).

Lysozyme은 어류의 중요한 면역 요소 중 하나이며 그람 양성균과 그람 음성균 모두 활성을 가지는 면역 기능을 수행한다(Choi et al., 2021). 어류의 Lysozyme은 주로 호중구와 단핵구에 존재하며 혈액, 점액, 조직에 골고루 분포하며 대식세포와 호중구에서 식세포 작용을 돕는다(Yu et al., 2020). Lysozyme은 그람양성균의 세 포벽에 있는 N-acetylmuramic acid 과 N-acetyl-D-glucosamine 1,4-베타 결합을 분해하는 역할을 하여 세균의 침입을 막는다(Saurabh et al., 2008). BPA와 같은 독성물질이 어류의 체내에서 면역체계를 교란시키고 이때 Lysozyme이 활성화 되 어 이를 방지하는 역할을 한다(Qiu et al., 2016). 따라서 Lysozyme의 활성은 독성 물질이 어류에 미치는 영향에 대한 중요한 지표가 될 수 있다(Choi et al., 2021).

Immunoglobulin M(IgM)은 연골어류의 혈칭 단백질의 50% 이상을 차지하는 주 요 혈칭 단백질로써 체액성 면역의 주요 구성 요소이다(Mashoof et al., 2016). IgM은 일반적으로 눈, 아가미, 장, 간, 췌장, 혈액, 비장 등 여러 조직에서 발현되 며 병원체의 불활화, 보체 경로의 활성 등의 기능을 수행하고 식균작용과 세포독 성에 대한 응집을 매개하는 주요한 면역체계 요소이며 다양한 어류 스트레스 요 인의 독성영향을 평가하는 주요 생체지표로 사용될 수 있다(Mashoof et al., 2016).

일반적으로 어류 스트레스는 모든 척추동물과 마찬가지로 위협적인 상황에 대 한 일반적인 반응이다. 어류의 지속적인 스트레스 노출은 RBC count, hematocrit 및 hemoglobin 수치에 영향을 주는 등 혈액 성분이 감소하며 빈혈을 유발하고 비

- 2 -

특이적 면역을 담당하는 림프구와 대식세포의 감소로 면역 시스템에도 손상을 가 져온다(Bonga et al., 1997). 스트레스로 인한 이러한 생리적 변화들은 어류에게 질병을 가져오고 성장을 저해하며 극단적으로는 폐사에 이르기까지 한다(Schreck et al., 2016). Cortisol은 이러한 스트레스 반응에 대한 평가로 이용될 수 있는 대 표적인 호르몬으로 부신피질에서 생성되어 혈액으로 방출된다(Sadoul et al., 2019). Cortisol은 어류의 물리적, 환경적 스트레스에 반응하여 간에서 작용하여 포 도당의 신생합성을 촉진하여 항상성을 유지하는데 에너지를 공급한다. 이렇게 어 류 cortisol의 수치는 어류 스트레스 반응에 대한 중요한 지표로 사용되고 있다 (Sadoul et al., 2019).

Heat Shock Protein(HSP)은 온도 변화, 조직 외상, 감염, 금속 독성 등 다양한 물리적, 화학적, 생물학적 스트레스 요인에 의해 유도되는 생리적 지표로 환경 독 성을 평가하는데 널리 사용된다(Lee et al., 2022). HSP70은 단백질의 접힘과 수송 에 필요한 주요 구성성분으로 스트레스를 받으면 일반적으로 스트레스를 받는 세 포를 복구하기 위한 해독 메커니즘의 일부로 활성화 된다(Lee et al., 2022). 따라 서 스트레스 반응을 결정하는 것은 BPA에 노출된 어류의 독성영향을 평가하는 데 유용할 수 있다.

강도다리(*Platichthys stellatus*)는 냉수성 어종으로 낮은 염도에서도 잘 적응하는 광염성 어류이기 때문에 한국, 일본, 미국, 알래스카, 캘리포니아 등 여러 나라의 해양 환경에 서식한다(Yu et al., 2020). P. *stellatus*는 질병 저항력이 높고 성장이 빨라 고밀도 성장이 가능하여 국내에서 매년 양식량이 꾸준히 늘고 있다 (Won et al.,2023). 따라서, 본 연구는 현재까지 BPA에 노출에 대한 독성영향 연구가 많이 진행되지 않은 *P. stellatus*에 BPA를 water born 형식으로 노출 시켜 성장률, 혈액학적 성상, 항산화 반응, 면역 반응 및 스트레스 지표를 분석하여 BPA노출에 대한 *P. stellatus*의 독성영향을 평가하였다.

## II. 재료 및 방법

#### 1. 실험어 및 실험환경

본 실험에 사용한 실험어는 포항시 북구 죽도동에서 구입한 강도다리, *Platichthys stellatus*로 부경대학교 수산질병 관리원에서 500L 원형 수조 3개에서 1 주일간 순치하였다. 전장 14.8 ± 0.6 cm, 체중 38.6 ± 6.8 g의 외관상 건강한 개체를 선별하여 20마리씩 250L 원형 수조 5개에 나누어 담고 사료는 하루에 2회 어체중의 1%만큼 급이를 하였다. 실험에 사용한 수질 성분은 Table. 1과 같다.

실험에 사용한 Bisphenol A(Sigma-Aldrich. Inc., USA)일정량을 Ethyl alcohol(Sigma-Aldrich. Inc., USA)에 용해시킨 후, 사육수조에 혼합하여 각각의 노출농도가 0, 100, 200, 400 및 800 µg/L가 되도록 설정하였다. 실 험 기간은 총 20일간 실시하였으며, 10일 차마다 시료를 샘플링 하였다.

CH OL W

Table	1.	The	chemical	components	of	seawater	and	experimental
conditi	on ı	used in	n the expe	riments.				

Item	Value			
Temperature (°C)	$17 \pm 1.0$			
рH	8.21 ± 0.5			
Salinity (%)	31.85 ± 0.6			
Dissolved Oxygen (mg/L)	7.91 ± 0.81			
Chemical Oxygen Demand (mg/L)	$1.34 \pm 0.65$			
Ammonia (µg/L)	$10.1 \pm 1.1$			
Nitrite ( $\mu$ g/L)	$9.8 \pm 0.6$			
Nitrate (µg/L)	10.81 ± 1.24			
श्रित मा हो गा				

#### 2. 성장률

장도다리 순치 후 실험어의 전장과 체중을 선별과정에서 측정하여 사료 급이 후 10일차와 20일차에 각각 전장 및 체중 그리고 간중량을 측정하였다. Body weight gain (BWG), Specific growth rate (SGR), Hepatosomatic index (HSI)를 측정 하였으며 측정 방법은 다음과 같다.

BWG(%) = 100 \* (Final weight - Initial weight) / (Initial weight)
SGR(%) = 100 \* (In(Final weight) - In(Initial weight)) / (Duration)
HSI(%) = 100 \* (liver weight / total weight)

or u

#### 3. 혈액학적 성상 분석

혈액은 샘플의 응고를 방지하기 위해 heparin\_Na (5000 I.U., 중외제약) 을 처리한 1회용 주사기를 이용하여 실험어의 미부정맥으로 부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 즉시 이용하여 RBC count와 hemoglobin 농도 를 측정하였다.

RBC count는 Hendrick's solution으로 400배 희석 후, hemo-cytometer (Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학현미경으로 계수한 뒤 다 시 희석배수를 곱하여 계산하였다. Hb농도는 임상용 kit(Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하여 Cyan-methemoglobin법으로 측정하였다.

채취한 혈액은 혈청 무기성분, 유기성분, 효소활성의 변화를 확인하기 위 해 4℃, 3,000g에서 5분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다.

무기성분은 칼슘 및 마그네슊을 측정하였고 칼슘은 OCPC (o-cresolphthalein-complexon)법, 마그네슘은 Xylidyl blue-I법을 이용하 는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하였다. 유기성분은 glucose, total protein을 측정하였으며 혈당은 GOD/POD 법을, total protein은 Biuret법을 이용하는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하였다. 혈 활성은 GOT와 GPT를 측정하였고 GOT, GPT는 청 내 효소 Retiman-Frankel법을 이용한 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용 하였다.

- 7 -

#### 4. 항산화효소 분석

분석을 위해서 간, 아가미 그리고 장을 채취하여 Washing buffer(0.1M KCI, pH 7.4)를 이용하여 세척하였다. 세척한 조직을 Homogenizing buffer (0.1M KCI, pH 7.4)와 1:10의 비율이 되도록 넣고 Teflon-glass homogenizer (099CK4424, Glass-Col, Germany)를 이용하여 균질화하였다. 균질된 용액을 10,000g, 4 ℃에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 분리하 여 - 80 ℃에서 보관하였다.

조직의 단백질 함량을 측정하기 위해 Bio-rad protein assay kit (Bio-rad laboratories GmbH, Munich, Germany)를 이용하여 Bradford (1976) 방법으로 측정하였다.



#### 4-1. Superoxide dismutase (SOD)

SOD 활성은 WST-1의 환원에 대한 50% Inhibitor rate로 측정하는 SOD Assay kit (Dojindo Molecular Technologies, Inc.)를 이용하여 측정 하였다. 조직액을 0.1M의 PBS로 5배수 희석 후 37 ℃에서 20분간 배양한 후 분광광도계를 이용하여 450nm의 흡광도에서 흡광도를 측정하였다. SOD 단백질 활성 단위는 50% inhibitor rate를 구하여 unit/mg protein으 로 나타내었다.

#### 4-2. Catalase (CAT)

CAT 활성은 OxiSelect<sup>TM</sup> CAT Assay Kit (Cell Biolabs. Inc.)를 이용하 여 분석하였다. 과산화수소수와 반응하는 생성물인 quinonimine dye coupling 생성물을 분광광도계를 이용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였 다. 1분당 과산화수소수 1 µM을 분해하는 효소의 양을 1 unit으로 표기하 여 unit/mg protein으로 나타내었다.

#### 5. 면역반응 분석

조직 내 IgM (immunoglobulin M) 농도는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 정량 kit (MyBioSource Inc. San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. igM 특이항체가 도말되어 있는 96well 에 표준물질과 반응액을 넣어 igM 효소를 항체에 결합시킨 다음 세척해준 다. 세척 후 Horseradish Peroxidase (HRP)을 well에 첨가하여 발색시킨 다음 분광광도계를 통해 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

Lysozyme 활성은 Fish LZM ELISA Kit (Catalog number: MBS099538; MyBioSource; San Diego; USA)를 사용하여 측정하였다. Lysozyme 항체 - Lysozyme 항원 면역흡착성과 horseradish peroxidase (HRP) 비색 검 출 시스템을 이용하여 샘플 내 Lysozyme 항원 표적을 검출하였다. 이후 분광광도계를 통해 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 6. Cortisol 및 Heat Sock Protein 70

Cortisol 활성은 억제 효소 면역분석 기술을 이용하는 Fish Cortisol ELISA Kit(Catalog number: MBS704055; MyBioSource; San Diego; USA)를 사용하여 측정하였다. 항원으로 코팅되어 있는 96well 플레이트 에 샘플과 Horseradish Peroxidase(HRP)를 넣어 반응시켰다. 여기서 발생 된 경쟁적 억제 반응을 TMB 기질용액으로 발색시켜 분광광도계를 통해 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

Heat Sock Protein 70은 Fish Heat Shock Protein 70 (HSP70) ELISA Kit (MYBioSource, Inc.)로 분석하였다. 키트에 포함된 HRP 결합시약, Chromogen Solution A, Chromogen Solution B, Stop Solution을 샘플과 반응시킨 후 흡광도를 450 nm에서 측정하여 ng/mg으로 표기하였다.

### 7. 유의성 검정

실험은 노출 기간의 10, 20일 차에 수행하였다. 통계 분석 결과의 통계학 적 유의성은 SPSS (SPSS Ince, Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용 하여 나타내었고, ANOVA test를 실시하여 Tukey's multiple range test를 통해 *P* < 0.05일 때 유의성이 있다고 간주하였다.



## III. 결과

#### 1. 성장률

농도별 BPA 노출에 따른 강도다리의 BWG, SGR 및 HSI는 Fig. 1 - 3 에 나타내었다. BWG의 경우 10일 차 800µg/L 농도에서 유의한 감소를 나 타내었으며 20일 차에서 400 µg/L 이상의 농도에서 유의한 감소가 나타났 다. SGR의 경우 10일 차 800 µg/L 농도에서 유의한 감소를 나타내었으며 20일 차에서 400 µg/L 이상의 농도에서 유의한 감소가 나타났다. HSI의 경우 10, 20일 차의 800 µg/L의 농도에서 유의한 감소가 나타났다.





Fig. 1. BWG of starry flounder, Plyatichthys stellatus exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\leq$  0.05) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 2. SGR of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\leq$  0.05) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 3. HSI of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\leq$  0.05) as determined by Tukey's multiple range test.

#### 2. 혈액 성상

농도별 BPA 노출에 따른 강도다리의 RBC count와 hemoglobin은 Fig. 4 - 5에 나타내었다. RBC count는 10일 차 800 µg/L 농도에서 유의한 감 소를 나타내었으며 20일 차에서 400 µg/L 이상의 농도에서 유의한 감소가 나 타났다. Hemoglobin 또한 10일 차 800µg/L 농도에서 유의한 감소를 나타내 었으며 20일 차에서 400µg/L 이상의 농도에서 유의한 감소가 나타났다.





Fig. 4. RBC count of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 5. Hemoglobin of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

#### 3. 혈장 분석

농도별 BPA 노출에 따른 강도다리의 혈장 성분 (calcium, magnesium, glucose, total protein, GOT and GPT) 분석은 Fig. 6 - 11에 나타내었다.

혈장 calcium의 경우 10일 차에서 800 μg/L, 20일 차에서 400 μg/L의 농 도 구간에서 유의한 감소가 나타났으나, magnesium의 유의한 변화는 발견 하지 못했다.

혈장 glucose의 경우 10일 차에서 800 μg/L, 20일 차에서 400 μg/L의 농 도 구간에서 유의한 증가가 나타났고 total protein은 10일 차에서 800 μg /L, 20일 차에서 400 μg/L의 농도 구간에서 유의한 감소가 나타났다.

혈장 GOT의 경우 10일 차에서 800 μg/L, 20일 차에서 400 μg/L의 농도 구간에서 유의한 증가가 나타났다. 혈장 GPT의 경우는 10일 차에서 400 μg/L, 20일 차에서 200 μg/L의 농도 구간에서 유의한 증가가 나타났다.



Fig. 6. Calcium of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 7. Magnesium of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 8. Glucose of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.


Fig. 9. Total protein of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 10. GOT of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\leq$  0.05) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 11. GPT of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\leq$  0.05) as determined by Tukey's multiple range test.

# 4. 항산화효소 분석

## 4-1. Superoxide dismutase (SOD)

BPA에 노출된 강도다리의 아가미와 장 그리고 간 조직의 SOD 활성은 Fig. 12-14에 나타내었다. 아가미, 장 그리고 간의 SOD 활성은 10일 차에 서 800 μg/L, 20일 차에서 400 μg/L의 농도 구간에서 유의한 감소가 나타 났다.

## 4-2. Catalase (CAT)

BPA에 노출된 강도다리의 아가미와 장 그리고 간 조직의 CAT 활성은 Fig. 15-17에 나타내었다. 아가미, 장 그리고 간의 CAT 활성은 10일 차에 서 800 µg/L, 20일 차에서 400 µg/L의 농도 구간에서 유의한 감소가 나타 났다.



Fig. 12. SOD activity in gill of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 13. SOD activity in intestine of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 14. SOD activity in liver of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 15. CAT activity in gill of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 16. CAT activity in intestine of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 17. CAT activity in liver of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.

#### 5. 면역반응

### 5-1. Immunoglobulin M

BPA에 노출된 강도다리의 아가미와 장 그리고 간 조직의 igM 수치는 Fig. 18-20에 나타내었다. 아가미의 IgM 수치는 10일 차에서 800 μg/L, 20 일 차에서 200 μg/L의 농도 구간에서 유의한 감소가 나타났고 장에서는 10 일 차 800 μg/L, 20일 차에서 400μg/L의 농도에서 유의한 감소가 나타났 다. 그리고 간에서는 10. 20일 차에서 400 μg/L의 농도에서 유의한 감소가 나타났다.

#### 5-2. Lysozyme 활성

BPA에 노출된 강도다리의 아가미와 장 그리고 간 조직의 Lysozyme 활 성은 Fig. 21 - 23에 나타내었다. 아가미의 Lysozyme 활성은 10일 차에서 800 μg/L, 20일 차에서 200 μg/L의 농도 구간에서 유의한 감소가 나타났고 장에서는 10일 차 800 μg/L, 20일 차에서 400 μg/L의 농도에서 유의한 감 소가 나타났다. 그리고 간에서는 10일 차 400 μg/L, 20일 차에서 200 μg/L 의 농도에서 유의한 감소가 나타났다.



Fig. 18. IgM level in gill of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 19. IgM level in intestine of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 20. IgM level in liver of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 21. Lysozyme activity in gill of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 22. Lysozyme activity in intestine of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\leq$  0.05) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 23. Lysozyme activity in liver of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\leq$  0.05) as determined by Tukey's multiple range test.

## 6. Cortisol 및 Heat Sock Protein 70

#### 6-1. Cortisol

BPA에 노출된 강도다리의 아가미와 장 그리고 간 조직의 Cortisol 수치 는 Fig. 24 - 26에 나타내었다. 아가미 그리고 장에서의 Cortisol 수치는 10일 차 800 μg/L, 20일 차에서 400 μg/L의 농도에서 유의한 증가가 나타 났고 간에서 10일 차 400 μg/L, 20일 차에서 200 μg/L의 농도에서 유의한 증가가 나타났다.

## 6-2. HSP70

BPA에 노출된 강도다리의 아가미와 장 그리고 간 조직의 Cortisol 수치 는 Fig. 27 - 29에 나타내었다. 아가미 그리고 간에서의 HSP70 수치는 10 일 차에서 800 μg/L, 20일 차에서 400 μg/L의 농도에서 유의한 증가가 나 타났고 장에서는 20일 차에서 800 μg/L의 농도에서 유의한 증가가 나타났 다.



Fig. 24. Cortisol level in gill of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 25. Cortisol level in intestine of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\leq$  0.05) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 26. Cortisol level in liver of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\langle 0.05 \rangle$ ) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 27. Heat Shock Protein 70 in gill of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\leq$  0.05) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 28. Heat Shock Protein 70 in intestine of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\leq$  0.05) as determined by Tukey's multiple range test.



Fig. 29. Heat Shock Protein 70 in liver of starry flounder, *Plyatichthys stellatus* exposed different levels of BPA for 10 and 20 days. Values are mean  $\pm$  S.D. Vertical bar denotes a standard error. Values with a different superscript are significantly different from others at 10 and 20 days (P  $\leq$  0.05) as determined by Tukey's multiple range test.

# IV. 고 찰

BPA는 지표수, 퇴적물 및 생물에서 검출되는 수생환경에서 어디에나 존 재하는 오염물질이며, 수생생물의 먹이사슬에 BPA가 축적되면 해산물 섭 취를 통해 인간에게도 영향을 미칠 수 있다는 점에서 큰 문제가 될 수 있 다(Krishnapriya et al., 2017). BPA는 어류와 인간의 내분비계를 방해하고 특히 척추동물에서 기형을 유발하는 물질로 작용하여 수생 생태계에 많은 우려를 불러일으켰다(Krishnapriya et al., 2017).

어류의 성장률은 독성 영향 평가 연구에서 널리 사용되는 평가지표이다. 일반적으로 어류는 영양분 섭취와 흡수를 통해 성장한다. 그러나 BPA는 어류의 대사 및 생물학적 활동을 방해할 수 있다(Abdel-Tawwab et al., 2018). 본 연구에서는 성장률의 변화를 관찰하기 위해 BWG, SGR 및 HSI 를 측정하였고, 높은 농도의 BPA에 노출될수록 성장률이 유의하게 감소하 였다. 다른 연구에서도 BPA의 농도가 증가함에 따라 나일 틸라피아의 성 장과 사료섭취가 감소했다는 보고가 있다(Abdel-Tawwab et al., 2018).

성장률과 같이 혈액학적 성상도 독성 평가 지표로 많이 사용된다. 이는 혈액학적 성상의 변화가 독성 물질로 인한 스트레스 요인의 여부를 나타낼 수 있기 때문이다(Krishnapriya et al., 2017). 본 연구에서는 BPA에 노출 된 강도다리의 혈액학적 지표인 RBC count와 hemoglobin의 수치가 고농 도에서 모두 크게 감소했다. 이는 BPA의 영향으로 강도다리의 아가미나 적혈구에 손상을 주어 빈혈을 일으키는 것으로 보인다. 다른 연구에서도 BPA의 농도가 증가함에 따라 잉어의 RBC와 hemoglobin 수치가 감소했다 는 보고가 있다(Krishnapriya et al., 2017). 이러한 혈액학적 변화는 BPA

- 48 -

가 기능을 상실하여 Hb 수치에 변화를 초래하는 것으로 보인다.

혈장 내 무기성분인 칼슘과 마그네슘 역시 독성 평가 지표로 널리 사용 되며, 이들은 항상성을 유지하기 위한 이온 조절에 관여한다(Rogers et al., 2003). 어류에게 독성영향으로 인해 산화스트레스가 발생되면 그로인해 칼 슘과 마그네슘 수치에 영향을 줄 수 있으며 마그네슘의 결핍은 성장 지연. 척추 이상 및 지질과산화를 유발한다(Sales et al., 2014). 다른 연구에서는 BPA의 노출이 금붕어의 혈장 칼슘 항상성을 파괴하여 칼슘의 수치를 감 소시킨다는 결과가 있다(Suzuki et al., 2003). 본 연구 또한 BPA의 농도가 증가함에 따라 혈장의 칼슘의 수치가 감소하였고 이는 BPA독성으로 인해 발생된 산화스트레스로 인해 이온 조정 기능에 문제가 발생하여 칼슘 항상 성이 파괴된 것으로 보인다. 본 연구에서는 BPA노출에 따라 강도다리의 혈장 glucose 수치가 유의하게 증가하였다. BPA가 체내에 유입되면 스트 레스가 발생할 수 있으며, 대사 요구 증가에 필요한 에너지를 공급하기 위 해 포도당 신생합성에 의한 glucose가 증가할 수 있다(Srivastava et al., 2020). 본 연구 또한 BPA에 의한 스트레스를 극복하기 위한 효과로써 혈 장의 glucose 수치가 변화 한 것으로 보인다. 독성 스트레스로 인한 신진 대사를 평가하는 중요한 매개변수 중 하나로 혈장의 총단백질을 들수 있다 (Akram et al., 2021). BPA의 축적으로 인해 혈장 단백질이 감소하면 단백 질 합성장애가 일어날 수 있으며 독성물질로 인해 발생된 산화 스트레스를 극복하기 위해 조직과 단백질의 소모가 증가한다(Akram et al., 2021). 본 연구 또한 BPA의 농도가 상승함에 따라 혈장의 total protein 수치가 감소 하는 것을 확인할 수 있었고 이는 BPA의 독성에 대하여 항상성을 유지하 기 위한 단백질 소모로 해석할 수 있다. 산화스트레스로 인한 간 독성에 대한 지표로 확인한 GOT, GPT 값은 간에서 생성되는 효소로 산화스트레 스로 인해 간에 독성이 생기면 배설이 많아지고 혈액 내 농도가 높아진다 (Narra, 2017). 본 연구에서는 강도다리에 BPA를 노출시켰을 경우 노출시 간과 농도가 증가함에 따라 GOT와 GPT 값이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 간에 축적된 BPA는 독성을 유발하여 간에서 GOT와 GPT의 분 비가 증가한 것을 알 수 있다.

여러 연구에서 나타난 바와 같이. BPA와 같은 내분비교란물질은 ROS생 성을 촉진하여 체내에 많은 세포에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Akram et al., 2021; Sharma et al., 2021). Sharma(2021)의 연구에는 BPA 노출이 ROS 생산과 항산화 반응 사이에서 불균형을 일으켜 산화스트레스 를 유발한다는 보고가 있다. 어류에는 ROS의 과도한 생산을 방지하기 위 한 방어 수단인 SOD, CAT와 같은 항산화효소가 있다(Kim et al., 2020). SOD는 과산화물 라디칼(O2<sup>-</sup>)이 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)는 CAT에 의해 물로 전 환된다(Yu & Kang, 2020). 이와 같이 SOD 및 CAT와 같은 항산화효소는 활성 산소 독성에 대한 1차 방어이기 때문에 이러한 효소를 억제하면 유기 체에 과산화수소 또는 분해 생성물이 축적될 수 있다(Yu et al., 1994, Halliwell., 1994). 본 연구에서는 이러한 변화를 관찰하기 위해 SOD 및 CAT를 분석하였다. 본 연구에서 SOD 및 CAT는 아가미, 장 그리고 간 모두에서 노출 기간이 길어질수록, 농도가 높아질수록 유의하게 감소하는 것을 확인되었다. 이러한 항산화효소의 변화는 BPA 독성으로 인해 생성된 산화스트레스에 대한 1차적인 반응으로 판단된다. Akram. (2021)의 연구에 따르면 어류에게 BPA 노출은 ROS를 생성을 촉진 시켜 지질 과산화 과정 을 통해 궁극적으로 세포막 이상과 지질 과산화 (TBARS)생성을 초래하고 이는 항산화효소의 고갈과 불균형을 가져온다는 보고가 있다. 또 다른 연 구에서는 BPA 독성으로 인해 충분한 SOD를 생성할 수 없었고, 이는 심각 한 세포 손상 또는 과도하게 발생된 산화스트레스를 제거하기 위한 반응으 로 SOD값이 저하했다는 보고도 있다(Sharma et al., 2021).

어류의 면역글로불린(Ig)은 어류의 면역 기능을 담당하는 주요 항체이며, 체액성 면역체계의 구성 요소로 B 림프구에서 분비되는 면역글로불린에는 3가지 유형(IgM, IgD, IgT/IgZ)이 있다(Kim et al., 2018). 면역글로불린 중 IgM은 매개 세포 독성 반응 및 보체 경로 활성과 같은 다양한 기능을 갖 는 어류의 선천성 면역반응의 일부로 BPA를 포함한 내분비교란물질, 생체 이물질, 병원체 및 환경 스트레스(수온, 염분, 산소, pH)에 의해 감소될 수 있다는 보고가 있다(Choi et al., 2016). 본 연구 또한 BPA의 노출에 있어 노출 기간이 길어지거나 노출 농도가 높아질수록 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 이는 BPA의 독성이 면역억제를 유발하는 것으로 보여지며 낮 은 IgM의 수치는 박테리아 및 바이러스와 같은 병원체에 취약해지며 면역 체계의 장애를 불러올 수 있다.

어류에 함유된 Lysozyme은 독성 물질이 어류의 비특이적 면역에 미치는 영향을 나타낼 수 있는 면역 물질로 혈장에서 가장 많이 측정된다. Lysozyme은 그람 양성균과 일부 그람 음성균의 세포벽에 있는 펩티도글 리칸층을 파괴한다(Saurabh and Sahoo., 2008). Qiu et al. (2018)의 연구에 따르면 높은 농도의 BPA가 잉어 친어의 Lysozyme을 크게 저하 시킨다는 보고가 있다. 본 연구에서는 BPA에 노출된 강도다리의 Lysozyme 활성이 모든 장기에서 유의하게 수치가 감소하였다. 이러한 결과는 BPA에 장기간 노출되면 낮은 농도에서도 어류의 면역체계에 영향을 미쳐 박테리아 감염 등 병원체에 취약한 상태로 환경에 노출될 위험이 있다(Qiu et al., 2018)..

Cortisol은 어류의 신장의 신장간 세포에서 분비되는 주요 스트레스 호르 몬이며, 스트레스를 받은 어류에서 이온 수송 펌프를 활성화 하여 삼투압 및 이온 균형을 유지하는 역할을 한다(Choi et al., 2023). 세포막을 통해 확산될 수 있는 glucocorticoid인 cortisol은 환경 변화, 오염 물질 노출, 스 트레스 유발 등의 자극에 반응하여 시상하부-뇌하수체-신간의 활성화를 통해 방출된다(Aguiar et al., 2023). 이는 스트레스 반응을 평가하는 많은 지표중에 cortisol수치는 시상하부, 뇌하수체의 기능적 변화를 나타내는 중 요한 지표가 될 수 있으며 어류의 cortisol수치의 증가는 환경적 스트레스 뿐만 아니라 BPA 노출 등 독성물질 노출과도 관련이 높다(Minaz et al., 2022). 다른 연구에서는 BPA노출이 어류의 혈장 cortisol수치를 증가 시켰 다고 보고 하였다(Aluru et al., 2010, Hussein et al., 2021). 본 연구 또한 BPA의 노출농도가 증가함에 따라 cortisol 수치가 유의하게 증가하였는데, 이는 BPA 노출로 인해 지속적인 스트레스가 발생한 것으로 보여진다.

Heat Shock Protein(HSP)은 온도 변화, 독성 물질 노출 등 다양한 스트 레스 요인으로부터 신체를 방어하기 위해 합성된다(Lee et al., 2022). HSP 는 단백질 항상성과 세포 스트레스 반응 에 중요한 역할을 하며, 정상적인 세포 활동이 중단되면 HSP 합성이 급격히 증가할 수 있다(Wali and Balkhi., 2016). 단백질 변성을 유발하는 스트레스 요인에 의해 유도된 HSP70은 변형된 단백질에 결합하여 복구, 분해를 통해 보호하는 역할을 하는 동시에 면역조절을 통해 환경 스트레스 요인으로부터 세포를 보호한 다(Giffard and Yenari, 2004, Yamashita et al., 2010). 환경 독성 물질은 세포의 단백질 안정성을 저해하고 산화스트레스, 세포사멸 및 염증 반응을 유발할 수 있으며, 항상성을 유지하기 위한 방어 메커니즘으로 HSP70 생 산이 유도된다(Choi et al 2023). 내분비교란물질 중 하나인 BPA는 화학적 스트레스 요인으로도 작용하여 산화스트레스나 질산화스트레스를 유발하 며, 이로 인해 지질, 단백질, RNA, DNA에 손상을 일으킬 수 있다(Akram et al., 2021). 이 과정에서 과도하게 생성된 할성산소종(ROS)과 활성질소 종(RNS)에 대응하기 위해 HSP70과 같은 여러 효소가 발현된다(Filice et al., 2021, Choi et al 2023). 본 연구에서 HSP70의 수치는 각 장기에서 BPA의 농도가 높아질수록 유의한 증가를 보였고 이는 BPA독성에 의해

- 52 -

과도하게 생성된 산화스트레스로 인한 HSP70의 자극으로 보여진다.

결론적으로, 본 연구는 Water born 방식을 통해 Bisphenol A에 노출된 강도다리의 성장률(BWG, SGR, SHI), 혈액학적 성상, 항산화 반응(SOD, CAT)에 부정적인 영향을 미칠 수 있음을 보여준다. 또한, igM과 Lysozyme을 포함한 면역반응에도 유의하게 감소하는 모습을 보였고, Cortisol과 Heat Shock Protein을 포함한 스트레스반응도 유의하게 증가하 는 모습을 보였다. 본 연구 결과는 일반적으로 400µg/L이상의 BPA 농도에 서 강도다리에게 부정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

현재 여러 국가에서 지정하여 관리하는 유해한 내분비교란물질중 하나인 BPA이지만, 아직 BPA를 사용하는 많은 산업들이 활발하게 진행되고 있어 환경적으로 BPA의 농도는 수계에 언제든 고농도로 노출될 위험을 가지고 있다. 이러한 수계의 오염은 단순히 수생 생태계의 오염을 넘어 먹이 연쇄 작용으로 인해 인간에게도 영향을 미칠 수 있다. 또한, 이러한 독성물질에 대한 독성 정도는 독성의 종류, 온도, 염분, 노출 정도, 해당 어종의 종별 특이성, 성장 상태 등 여러 가지 영향을 받고 그에 따라 지속적인 모니터 링이 필수적이다. BPA 또한 이러한 다양한 관점으로 독성연구가 추가적으 로 이루어져야 할 것으로 판단된다.

# V. 참고 문헌

- Abdel Tawwab, M., & Hamed, H. S. (2018). Effect of bisphenol A toxicity on growth performance, biochemical variables, and oxidative stress biomarkers of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 34(5), 1117–1125.
- Aguiar, D., Marques, C., & Pereira, A. C. (2023). The Importance of Monitoring Cortisol in the Agri-Food Sector-A Systematic Review. *Metabolites, 13*(6), 692.
- Akram, R., Iqbal, R., Hussain, R., Jabeen, F., & Ali, M. (2021). Evaluation of oxidative stress, antioxidant enzymes and genotoxic potential of bisphenol A in fresh water bighead carp (*Aristichthys nobils*) fish at low concentrations. *Environmental pollution, 268*, 115896.
- Aluru, N., Leatherland, J. F., & Vijayan, M. M. (2010). Bisphenol A in oocytes leads to growth suppression and altered stress performance in juvenile rainbow trout. *PloS one*, 5(5), e10741.
- Choi, J. H., Lee, J. H., Jo, A. H., Choi, Y. J., Choi, C. Y., Kang, J. C., & Kim, J. H. (2023). Microplastic polyamide toxicity: Neurotoxicity, stress indicators and immune responses in crucian carp, *Carassius carassius. Ecotoxicology*

and Environmental Safety, 265, 115469.

- Choi, J. Y., Kim, T. H., Choi, Y. J., Kim, N. N., Oh, S. Y., & Choi, C. Y. (2016). Effects of various LED light spectra on antioxidant and immune response in juvenile rock bream, *Oplegnathus fasciatus* exposed to bisphenol A. *Environmental toxicology and pharmacology*, 45, 140–149.
- Faheem, M., & Bhandari, R. K. (2021). Detrimental effects of bisphenol compounds on physiology and reproduction in fish: a literature review. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 81*, 103497.
- Filice, M., Leo, S., Mazza, R., Amelio, D., Garofalo, F., Imbrogno, S., ... & Gattuso, A. (2021). The heart of the adult goldfish Carassius auratus as a target of Bisphenol A: A multifaceted analysis. *Environmental Pollution, 269*, 116177.
- Giffard, R. G., & Yenari, M. A. (2004). Many mechanisms for hsp70 protection from cerebral ischemia. *Journal of neurosurgical anesthesiology*, *16*(1), 53-61.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *The lancet, 344*(8924), 721-724.

Kang, C. G., Lee, S. H., & Kim, E. K. (2007). Endocrine disruptors. Journal of

the Korean Medical Association, 50(4), 359-368.

- Kim, J. H., Kim, S. K., Hur, Y. B. 2020. Toxic effects of waterborne nitrite exposure on antioxidant responses, acetylcholinesterase inhibition, and immune responses in olive flounders, *Paralichthys olivaceus*, reared in bio-floc and seawater. *Fish & Shellfish Immunology*, *97*, 581–586.
- Kim, J. H., Kim, S. K., & Kim, J. H. (2018). Bio-floc technology application in flatfish *Paralichthys olivaceus* culture: Effects on water quality, growth, hematological parameters, and immune responses. *Aquaculture*, 495, 703–709.
- Kim, J. H., Yu, Y. B., & Choi, J. H. (2021). Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in fish exposed to microplastics: A review. *Journal of Hazardous Materials, 413,* 125423.
- Krishnapriya, K., Shobana, G., Narmadha, S., Ramesh, M., & Maruthappan, V. (2017). Sublethal concentration of bisphenol A induces hematological and biochemical responses in an Indian major carp *Labeo rohita*. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 17(4), 306–313.
- Lee, D. C., Choi, Y. J., & Kim, J. H. (2022). Toxic effects of waterborne cadmium exposure on hematological parameters, oxidative stress, neurotoxicity, and heat shock protein 70 in juvenile olive flounder,

Paralichthys olivaceus. Fish & Shellfish Immunology, 122, 476-483.

- Lee, J. W., Kim, J. H., Lee, D. C., Lim, H. J., & Kang, J. C. (2022). Toxic effects on oxidative stress, neurotoxicity, stress, and immune responses in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, exposed to waterborne hexavalent chromium. *Biology*, 11(5), 766.
- Lu, Z., Letcher, R. J., Chu, S., Ciborowski, J. J., Haffner, G. D., Drouillard, K. G., ... & Marvin, C. H. (2015). Spatial distributions of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, tetrabromobisphenol A and bisphenol A in Lake Erie sediment. *Journal of Great Lakes Research*, 41(3), 808–817.

Mashoof, S., & Criscitiello, M. F. (2016). Fish immunoglobulins. *Biology*, 5(4), 45.

- M Hussein, N., MA Saeed, R., A Shaheen, A., & S Hamed, H. (2021). Ameliorative role of chitosan nanoparticles against bisphenol-A induced behavioral, biochemical changes and nephrotoxicity in the African catfish, *Clarias gariepinus. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 25(1), 493–510.
- Minaz, M., Er, A., Ak, K., Nane, I. D., Ipek, Z. Z., Yalcın, A., ... & Kayis, S. (2022). Investigation of long-term bisphenol A exposure on rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*): Hematological parameters, biochemical indicator, antioxidant activity, and histopathological examination. *Chemosphere, 303*, 135136.

- Narra, M. R. (2017). Haematological and immune upshots in Clarias batrachus exposed to dimethoate and defying response of dietary ascorbic acid. *Chemosphere, 168,* 988–995.
- Qiu, W., Chen, J., Li, Y., Chen, Z., Jiang, L., Yang, M., & Wu, M. (2016). Oxidative stress and immune disturbance after long-term exposure to bisphenol A in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and environmental safety, 130*, 93-102.
- Qiu, W., Chen, J., Li, Y., Chen, Z., Jiang, L., Yang, M., & Wu, M. (2016). Oxidative stress and immune disturbance after long-term exposure to bisphenol A in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and environmental safety, 130*, 93–102.
- Ribeiro, C., Pardal, M. Â., Martinho, F., Margalho, R., Tiritan, M. E., Rocha, E., & Rocha, M. J. (2009). Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment, 149*, 183–193.

Rogers, J. T., Richards, J. G., & Wood, C. M. (2003). Ionoregulatory disruption

as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic toxicology, 64(2), 215–234.

- Sadoul, B., & Geffroy, B. (2019). Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *Journal of Fish Biology*, *94*(4), 540–555.
- Sales, C. H., dos Santos, A. R., Cintra, D. E. C., & Colli, C. (2014). Magnesium-deficient high-fat diet: Effects on adiposity, lipid profile and insulin sensitivity in growing rats. *Clinical Nutrition*, 33(5), 879–888.
- Saurabh, S., & Sahoo, P. K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture research*, *39*(3), 223–239.
- Schreck, C. B., & Tort, L. (2016). The concept of stress in fish. In Fish physiology (Vol. 35, pp. 1–34). Academic Press.
- Scholz, S., & Mayer, I. (2008). Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Molecular and cellular endocrinology*, 293(1–2), 57–70.
- Sharma, P., & Chadha, P. (2021). Bisphenol A induced toxicity in blood cells of freshwater fish *Channa punctatus* after acute exposure. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8), 4738–4750.
- Srivastava, B., & Reddy, P. B. (2020). Haematological and Serum Biomarker Responses in *Heteropneustes fossilis* Exposed to Bisphenol A. *Nature Environment and Pollution Technology*, 19(4), 1577–1584.
- Suzuki, N., Kambegawa, A., & Hattori, A. (2003). Bisphenol A influences the plasma calcium level and inhibits calcitonin secretion in goldfish. *Zoological science*, *20*(6), 745–748.
- Wali, A., & Balkhi, M. H. (2016). Heat shock proteins, importance and expression in fishes. *Eur J Biotechnol Biosci, 4*, 29–35.
- Wang, C., He, J., Xu, T., Han, H., Zhu, Z., Meng, L., ... & Fan, R. (2021). Bisphenol A (BPA), BPS and BPB-induced oxidative stress and apoptosis mediated by mitochondria in human neuroblastoma cell lines. *Ecotoxicology* and environmental safety, 207, 111299.

Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological* reviews, 77(3), 591-625.

Won, T. J., Yu, Y. B., Kang, J. H., Kim, J. H., & Kang, J. C. (2023). Effects on Bioaccumulation, Growth Performance, Hematological Parameters, Plasma Components, and Antioxidant Responses in Starry Flounder (*Platichthys stellatus*) Exposed to Dietary Cadmium and Ascorbic Acid. Antioxidants, 12(1), 128.

- Yamashita, M., Yabu, T., & Ojima, N. (2010). Stress protein HSP70 in fish. Aqua-BioScience Monographs, 3(4), 111-141.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 74(1), 139–162.
- Yu, Y. B., Choi, J. H., Choi, C. Y., Kang, J. C., & Kim, J. H. (2023). Toxic effects of microplastic (polyethylene) exposure: Bioaccumulation, hematological parameters and antioxidant responses in crucian carp, *Carassius carassius. Chemosphere, 332,* 138801.
- Yu, Y. B., Park, H. J., & Kang, J. C. (2020). Effects of dietary ascorbic acid on growth performance, hematological parameters, antioxidant and non-specific immune responses in starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Aquaculture Reports, 18*, 100419.