

Bisphenol A가 점망둑 (*Chasmichthys dolichognathus*)의 난소 스테로이드 호르몬 대사에 미치는 영향

백혜자* · 박명희 · 이영돈¹ · 김형배² · 김재원 · 유명숙
부경대학교 자원생물학과, ¹제주대학교 해양과환경연구소
²강원도립대학 해양생물자원개발과

Effect of Bisphenol A on Ovarian Steroidogenesis in Longchin Goby (*Chasmichthys dolichognathus*)

Hea-Ja BAEK*, Myoung-Hee PARK, Young-Don LEE¹, Hyung-Bae KIM²
Jae-Won KIM and Myoung-Suk YOO

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

¹Marine and Environmental Research Institute, Cheju National University,
Jeju 695-814, Korea

²Department of Marine Bio-resources, Gangwon Provincial University,
Gangnung 210-804, Korea

The *in vitro* effect of bisphenol A (BPA) on ovarian steroidogenesis of the longchin goby (*Chasmichthys dolichognathus*) was investigated. Oocytes taken during the maturing phase (vitellogenic, fully vitellogenic or germinal vesicle breakdown stage) were incubated with BPA (100 ng/mL) in the presence of exogenous precursor ³H-17 α hydroxyprogesterone (³H-17 α OHP). Steroids were extracted from the media and the isolated oocytes, and the extracts were separated and identified by thin layer chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. The identities of the major metabolites were progestogens [17 α -hydroxy,20 α -dihydroprogesterone (17 α 20 α OHP) and 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone (17 α 20 β OHP)], androgens [androstenedione (A4) and testosterone (T)] and estrogens [estrone (E₁) and estradiol-17 β (E₂)]. BPA treatment inhibited production of estrogens in all the maturing phases and progestogens in the germinal vesicle migrating stage. Percentage yield of estrogens was decreased with increased yield of androgens. In conclusion, BPA had an inhibitory effect on the conversion of ³H-17 α OHP to estrogens and progestogens. These results demonstrate that BPA can act either estrogenic or anti-estrogenic effects.

Key words: Bisphenol A, *Chasmichthys dolichognathus*, Vitellogenesis, Estrogenic activity, GVBD, Estrogen, Progestogen

서 론

오늘날 환경호르몬이라 불리는 내분비계장애 또는 교란 물질은 한정된 지역에 서식하고 있는 생물집단에 커다란 위협 요소로 인식되고 있으며, 특히 이러한 물질은 수서생물의 난 발생, 유생이나 어린 치어의 성장과 발달에 치명적인 영향을 미칠 뿐 만 아니라 모패나 성어의 생식기능 작용을 방해하여 생물자원 감소현상을 초래하고 있다 (Fent and Hunn, 1992; Van Der Kraak et al., 1995).

어류를 대상으로 한 연구에서는 내분비계장애물질이 직접적으로 생식세포의 발달을 저해하고, 간접적으로는 생식내분비 호르몬 작용을 방해하여 생식소의 크기 감소, 수컷의 암컷화, 성 호르몬의 분비 불균형 그리고 성숙을 지연시킨다고 하였다 (Thomas, 1990; Kime, 1998). 이러한 교란물질중의 많은 양은 에스트로겐과 유사한 작용을 일으키는 에스트로겐성 물질로 알려져 있다 (Sumpter and Jobling 1995).

Bisphenol A (BPA)는 에스트로겐성 활성을 가진 물질중의

하나로 폴리카보네이트 플라스틱과 에폭시수지의 원료로, 세계적으로 널리 사용되고 있는 화학물질이다. 폴리카보네이트 플라스틱은 음식용기와 음료 포장 재료로, 에폭시수지는 캔용기, 병뚜껑 그리고 물 공급용 파이프의 코팅 재료로 (Brotons et al., 1995), 또한 치과 재료에도 많이 사용되고 있다 (Olea et al., 1996).

어류의 생식기능 교란에 대한 BPA의 작용은 난황형성기에 국한되어 혈중 vitellogenin의 농도 증가, vitellogenin 합성 유도, 난막형성 단백질인 zona radiata protein 합성 유도, 그리고 에스트로겐 활성화와 수용체의 상호 작용 및 에스트로겐 대사과정에 관여하는 효소계 연구 등에 집중되어 왔다 (Kime, 1998; Yokota et al., 2000; Arukwe et al., 2000; Lindholst et al., 2000; Christiansen et al., 2000).

본 연구는 BPA가 연안정착성 어류인 점망둑 (*Chasmichthys dolichognathus*)의 생식소 발달과정, 특히 난황형성기와 난모세포성숙기에 중요한 역할을 하는 성 스테로이드 호르몬 대사 과정에 어떤 영향을 미치는지 조사하여 (*in vitro* 실험) 이 물질의 생식기능에 대한 잠재적 위해성을 평가하고자 한다.

*Corresponding author: hjbaek@pknu.ac.kr

재료 및 방법

실험 어류

실험에 사용된 점망독은 산란기로 추정되는 4-5월에 부산 동백섬에서 채집한 전장 5.4-7.2 cm, 체중 1.4-3.9 g의 성숙한 암컷들이다.

난모세포 분리 및 배양

실험어는 2-phenoxyethanol로 마취 후 무균상태로 옮겨졌다. 난소조직을 절취하여 TBSS (trout balanced salt solution, Jalabert and Fostier, 1984)로 세척한 뒤 얼음위에서 난모세포들을 하나씩 분리하였다. 난소로부터 난모세포를 분리한 후 24 well plates에 well당 Leibovitz's L-15 (L-15) 배양액 (Gibco) 1 mL에 20개의 난모세포를 각각 분주한 뒤 방사선으로 표지된 스테로이드 전구물질인 ^3H -17 α -hydroxyprogesterone (^3H -17 α OHP, 1.5 $\mu\text{Ci/mL}$)와 bisphenol-A (100 ng/mL, Aldrich)을 첨가하여 18°C에서 24시간 배양하였다. TBSS와 L-15 배양액의 pH는 7.7, 삼투질농도는 300 mOsm로 조절하였다.

스테로이드 호르몬 대사물질 분석

80% 에탄올로 난모세포와 배양액을 함께 균질화하여 원심 분리한 뒤 에탄올 상등액을 건조시킨 후 500 μL 물에 용해시켜 다시 dichloromethane 으로 2번 추출하여 스테로이드만을 얻었다. 스테로이드 추출물은 표준 스테로이드와 동시에 실리카겔을 입힌 얇은막 지지체 (60F²⁵⁴, Merck)에 점적된 후 밀폐된 혼합용매 (benzene:acetone=80:20)속에서 2-3회 전개되었다. 일정시간 후 얇은 막을 건조시킨 뒤 자외선 (254 nm)으로 또는 요오드 증기로 대사물질의 반점을 확인하였다. 얇은 막에 나타난 물질들은 방사선사진법 (autoradiography, Fuji Bas 3000)으로 재확인하였으며, 재확인 된 반점에 해당하는 실리카겔 밴드를 잘라 5 mL의 혼합용매 (dichloromethane:methanol=9:1)로 용리한 후, gas chromatography-mass spectrometry (Shimadzu GCMS-QP2010)을 이용하여 각 대사물질을 동정하였다. 사용한 column은 DB-5MS (60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm), 온도 프로그램은 injector 온도는 280°C, oven 온도는 80°C에서 2분간 유지하였고, 증온 온도를 5°C/min으로 하여 최종온도가 300°C가 되도록 한 후 5분간 300°C를 유지하도록 하였다.

결 과

난황형성이 한창 진행 중인 (난경 0.74 mm) 난모세포로부터 생성된 TLC상의 대사물질은 testosterone (T) + estradiol-17 β (E₂)와 androstenedione (A4) + estrone (E₁) 등의 표준 물질과 일치하였으며, 난황형성 완료 직후의 난모세포 (난경 0.80 mm)와 배란직전의 핵이 붕괴되는 시점인 GVBD (난경 0.97 mm) 난모세포의 경우에는 17 α -hydroxy, 20 α -dihydroprogesterone (17 α 20 α OHP), 17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone (17 α 20 β OHP), T + E₂ 그리고 A4 + E₁ 등의 표준물질과 일치하였다 (Fig. 1).

난모세포 발달 과정에 따라 생성된 대사물질, A4 + E₁, T

+ E₂, 17 α 20 α OHP와 17 α 20 β OHP에 해당되는 TLC 상의 반점을 용리한 후 GC-MS로 분석한 결과, A4, T, E₂, E₁, 17 α 20 α OHP 그리고 17 α 20 β OHP이 ^3H -17 α OHP의 대사물질로 확인되었다. 이들 물질 생성과정에 대한 BPA의 효과를 스테로이드 대사율로 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다.

난경 0.74 mm인 난모세포의 경우, BPA 처리구는 estrogens (E₁과 E₂)으로의 대사율이 5.61%로 대조구 15.12%에 비해 낮은 값을 보였다. 난황형성 말기, 즉 난경 0.80 mm의 난모세포에서도 마찬가지로 estrogens으로의 대사율이 BPA는 19.54%, 대조구는 23.69%로 나타났으며, progestogens (17 α 20 α OHP와 17 α 20 β OHP)으로의 대사율에는 변화가 없는 것으로 나타났다. GVBD 단계의 난경 0.97 mm인 경우에는 BPA가 progestogens과 estrogens으로의 대사율 모두 저해하는 것으로 관찰되었다. 반면 androgens (A4와 T)으로의 대사율은 대조구에 비해 높게 나타났다.

고 찰

산업화가 진행됨에 따라 BPA의 사용량은 증가하고 있으나 이러한 물질이 수서환경과 인간에 미치는 영향에 대한 명확한 규명, 위해성 평가 방법이나 환경 중 규제치를 감시할 수 있는 생물학적 지표개발은 드문 실정이다.

지금까지 포유류를 대상으로 한 *in vivo*, *in vitro* 실험 결과를 보면 BPA는 estrogen 활성을 나타낸다고 알려져 있으며 (Krishnan et al., 1993; Brotons et al., 1995; Milligan et al., 1998), 어류에서도 estrogen 유사작용을 하는 것으로 보고되었다 (Sumpter and Jobling, 1995). 어류를 포함한 척추동물에서 estrogen은 성장과 생식기능, 성분화, 2차성징 발달, 배란과 산란행동에 중요한 역할을 한다 (Fairbrother, 2000). 특히 어류에서는 vitellogenin 생성 정도가 estrogen 활성을 나타내는 indicator로 사용되어 왔으며 (Sumpter and Jobling, 1995; Smeets et al., 1999; Arukwe et al., 2000), vitellogenin 생성에 자극제 역할을 하는 E₂ 농도 변화도 estrogen 활성 척도로 사용되었다 (Giesy et al., 2000; Monteiro et al., 2000).

본 연구에서는 estrogen뿐만 아니라 최종성숙과 배란에 관여하는 progestogen 활성과 이들의 상호작용에 BPA가 어떤 영향을 미치는지 steroidogenesis bioassay를 이용하여 조사하였다. 실험어인 점망독의 난황형성기에 BPA 처리는 estrogens (E₁과 E₂)으로의 분비 억제를, 그리고 최종성숙기에는 estrogens (E₁과 E₂)과 progestogens (17 α 20 α OHP와 17 α 20 β OHP) 분비 모두를 억제하였다. 특히 후자의 경우, E₁과 17 α 20 α OHP 보다는 E₂와 17 α 20 β OHP로의 대사율이 더 크게 감소되었다.

본 실험 결과는 점망독의 난황형성기부터 GVBD 과정동안에 생성되는 E₂ 농도에 BPA가 저해작용을 하며, 또한 GVBD 과정에서 생성되는 주요 스테로이드, 17 α 20 β OHP의 농도에도 저해작용을 하는 것으로 관찰되었다. 난황형성기부터 배란 직전까지 이어지는 E₂로의 대사율 감소와 17 α 20 β OHP의 감소는 BPA가 estrogen 활성과 동시에 anti-estrogen 활성도 나타낼

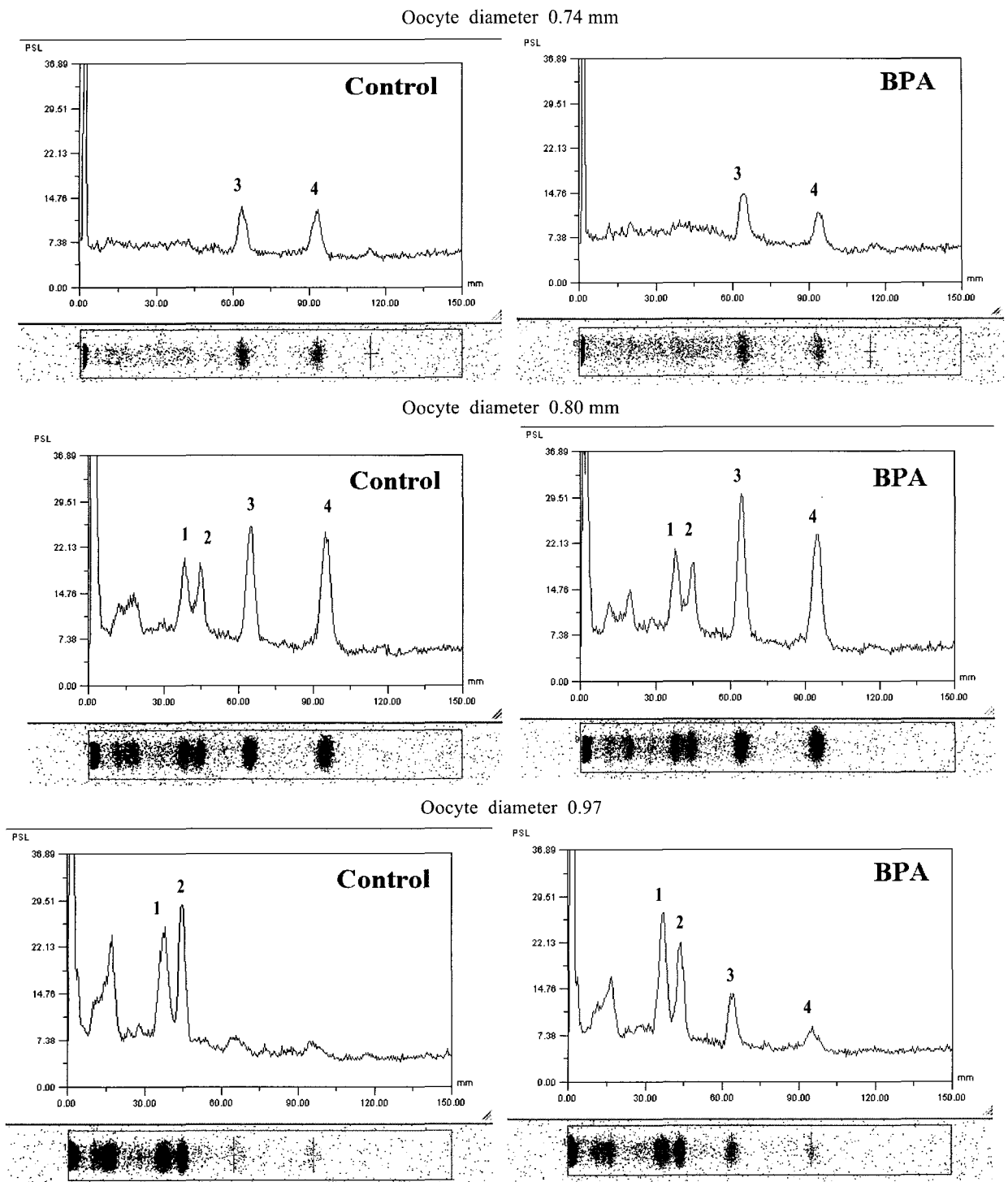


Fig. 1. Autoradiograms of radioactive steroid metabolites produced from ^3H -17 α hydroxyprogesterone after 24 hours incubation with isolated oocytes (20 oocytes/mL/well). 1, 17 α -hydroxy,20 α -dihydroprogesterone; 2, 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone; 3, testosterone+estradiol-17 β ; 4, androstenedione+estrone

수 있는 것으로 생각된다.

지금까지 배란직전의 최종성숙단계 (GVBD)를 포함하여 결과를 제시한 연구는 몇 편에 불과하다. 대서양산 민어

(atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*)의 성숙기 난모세포를 BPA와 유사한 작용을 하는 Aroclor 1254에 노출시켰더니 GVBD와 배란유도가 억제되었으며 (Ghosh and Thomas,

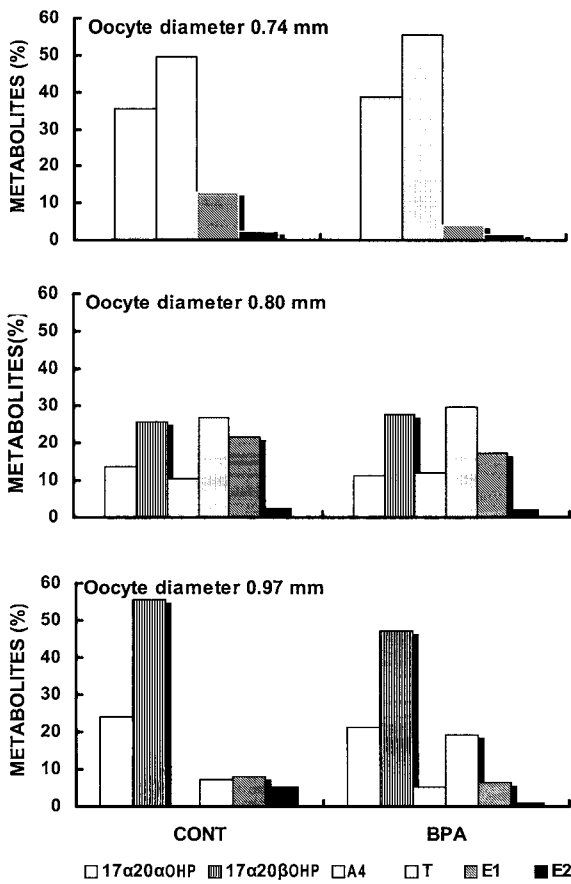


Fig. 2. Effects of bisphenol A (BPA, 100 ng/mL) on ^3H - 17α -hydroxyprogesterone metabolism by isolated oocytes. The percentage of radioactivity associated with each isolated steroid was calculated to the percentage of total steroid recovered from initial TLC. $17\alpha,20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one; $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one; A4 (androstenedione); T (testosterone); E₁ (estrone); E₂ (estradiol-17 β).

1995), 낚치의 난모세포도 TBT와 Aroclor 1254 처리에 의해 GVBD와 배란이 억제되었다 (Baek et al., 2001). 이러한 작용기작은 대서양산 민어의 경우, GVBD 시기에 중요한 역할을 하는 스테로이드 호르몬, $17\alpha,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha,20\beta,21$ OHP)의 막수용체에 Aroclor 1254이 결합하여 $17\alpha,20\beta,21$ OHP와 길항작용을 함으로써 GVBD를 방해한다고 설명하였다 (Ghosh and Thomas, 1995).

접망둑의 경우, exogenous precursor인 ^3H - 17α OHP로부터의 대사과정에 관여하는 효소 활성화에 BPA가 직접적인 영향을 미치는 것으로 생각되나 정확한 기작 구명을 위해서는 스테로이드 수용체에 대한 앞으로의 연구가 요구된다.

BPA와 유사한 작용을 하는 다른 estrogen 물질, PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons)는 가자미류의 일종인 *Platichthys flesus*의 난소 스테로이드 호르몬 합성을 방해 (*in vitro* 실험)하여 T와 E₂의 생성을 저해한다고 하였다. 이러한

작용기작은 스테로이드의 막수용체를 통해 매개되기보다는 난소의 스테로이드 효소 활성화에 화학물질이 직접적으로 저해 작용을 함으로써 결과적으로 스테로이드 생성이 감소된다고 하였다 (Monteiro et al., 2000). PAHs에 의한 같은 결과가 coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)의 난모세포에서도 관찰되었다 (Afonso et al., 1997). 그러나 이들의 실험에 사용된 어류의 난소 발달 단계는 난황형성기나 난황형성이 끝난 직후의 난모세포들이었으므로 E₂의 생성 변화에 초점을 두었다. 본 연구에서도 BPA에 노출된 접망둑의 난황형성기 난모세포는 estrogens (E₁과 E₂) 생성이 억제되었다. 이러한 연구결과들은 *in vitro* 실험을 통하여 이루어졌는데, *in vivo* 실험에서도 PAHs에 노출된 대서양산 민어의 혈중 E₂ 농도가 감소되었다고 하였다 (Thomas, 1990).

그러나 양서류인 *Xenopus laevis*의 난모세포 성숙과정은 estrogenic 화학물질 노출에도 아무런 영향을 받지 않는 것으로 보고되었다 (Pickford and Morris, 1999). Arukwe et al. (2000)은 어린 대서양산 연어(*Salmo salar*)에 대한 *in vivo* BPA 처리는 혈중 vitellogenin과 zona radiata protein 농도변화에 아무런 영향을 미치지 못하였으나, 고농도 (25, 125 mg/kg) 처리는 이들의 농도를 증가시킴으로써 estrogen 활성을 나타낸다고 하였다. Sohoni et al. (2001)은 fathead minnows (*Pimephales promelas*)를 대상으로 BPA의 농도별 (1-1280 $\mu\text{g/L}$) 그리고 노출시간별 (43, 71, 164일) 실험 결과, BPA 64 $\mu\text{g/L}$ 농도로 164일 노출 후에 암컷의 혈중 vitellogenin 농도가 증가하였으며, 이는 실제 수서생태계에서 BPA의 estrogen 활성화는 매우 약하다고 설명하였다.

Sumpter and Jobling (1995)은 BPA가 미성숙한 무지개송어의 간세포에서 vitellogenin 합성을 유도하여 성장을 억제시켰는데, 결과적으로 BPA에 노출된 어류는 난소성숙을 촉진시킬 수 있다고 하였다. 그 이유는 BPA가 어류 체세포 성장과 생식소 발달 사이의 에너지 분배를 교란시키기 때문이라고 설명하였다.

이와 같이 BPA의 estrogenic effects에 대한 상반된 결과는 앞으로 *in vivo*와 *in vitro* 실험을 동시에 요구하며, 난소발달을 저해할 수 있는 농도별 테스트 실험도 이루어져야 할 것이다.

사 사

이 논문은 2001학년도 부경대학교 기성회 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- Afonso, L.O.B., P.M. Campbell, G.K. Iwama, R.H. Devlin and E.M. Donaldson. 1997. The effect of the aromatase inhibitor fadrozole and two polynuclear aromatic hydrocarbons on sex steroid secretion by ovarian follicles of coho salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 106, 169-174.

- Arukwe, A., T. Celius, B.T. Walther and A. Goksoyr. 2000. Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.*, 49, 159-170.
- 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. Kor. Fish. Soc.*, 34(6), 584-587. (in Korean)
- Brotons, J.A., S.M.F. Olea, M. Villalobos, V. Pedraza and N. Olea. 1995. Xenoestrogens released from lacquer coating in food can. *Environ. Health Perspect.*, 103, 608-687.
- Christiansen, L.B., K.L. Pedersen, S.N. Pedersen, B. Korsgaard and P. Bjerregaard. 2000. *In vivo* comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system. *Environ. Toxicol. Chem.* 19(7), 1867-1874.
- Fairbrother, A. 2000. Comparative aspects of estrogen functions and measurements in oviparous and viviparous vertebrates. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 6, 73-102.
- Fent, K and J. Hunn. 1992. Uptake and elimination of tributyltin in fish-yolk-sac larvae. *Mar. Environ. Res.* 65-71.
- 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.M. 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.
- Jalabiet, B. and A. Foistier. 1984. The modulatory effect *in vitro* of oestradiol-17 β , testosterone or cortisol on the output of 17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ovarian follicles stimulated by the maturational gonadotropins. *Reprod. Nutr. Develop.* 24, 127-136.
- Kime, D.E. 1998. *Endocrine disruption in fish*. Kluwer, Boston, pp. 397.
- Krishnan, A.V., P. Stathis, S.F. Permuth, L. Tokes and D. Feldman. 1993. Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132, 2279-2286.
- Lindholst, C., K.L. Pedersen and S.N. Pedersen. 2000. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 48, 87-94.
- Milligan, S.R., A.V. Balasubramanian and J.C. Kalita. 1998. Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute *in vivo* mammalian assay. *Environ. Health Perspect.*, 106, 23-26.
- 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.). *Aquat. Toxicol.*, 48, 549-559.
- Olea, N, R. Pulgar, P. Perez, S.F. Olea, A. Rivas, F.A. Novillo, V. Pedraza, A.M. Soto and C. Sonnenschein. 1996. Estrogenicity of resin based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.*, 104, 298-305.
- 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 Perspect.*, 107(4), 285-292.
- Smeets, J.M.W., T.R. Randkouhi, K.M. Nichols, H Komen, N.E. Kaminski, J.P. Giesy and M. van den Berg. 1999. *In vitro* vitellogenin production by carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (anti) estrogenic activity of xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 157(1) 68-76.
- 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.
- Sumpter, J.P. and Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.*, 103, 173-179.
- Thomas, P. 1990. Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function. *J. Exp. Zool.*, 4, 126-128.
- Van Der Kraak, G., M.E. McMaster and K.R. Munkittrick. 1995. Application of reproductive physiological testing to understand the mechanisms of environmental endocrine disruptors. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Goetz, F.W. and P. Thomas, eds. Austin, Texas, pp. 173-175.
- 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. Chem.*, 19(7), 1925-1930.

2004년 4월 23일 접수

2004년 6월 25일 수리