

무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* 초대 간세포 배양에서 Bisphenol-A가 vitellogenin 합성에 미치는 영향

황운기 · 김재원 · 지정훈 · *박기영 · 강주찬

부경대학교 수산생명의학과, *강릉대학교 해양생명공학부

서론

최근, 눈부신 화학기술의 발전에 의해 수많은 합성화학 물질들이 만들어지고 있으며 실용화되어 사용되어지는 것만 해도 10만 종류에 이르고 이들 물질 중 70여종은 생물의 내분비계에 이상을 초래하는 내분비장애 물질 (Endocrine Disrupting Chemicals, EDC)로 의심되어지고 있다 (宮崎, 1999).

Bisphenol-A (BPA, 4,4'-isopropylidenediphenol; $C_{15}H_{16}O_2$; mol wt, 228)는 EDC로 의심되어지는 물질로 식기나 캔류의 내부 코팅제로 사용되고 있을 뿐만 아니라 그 사용 양이 날로 증가하고 있는 물질로 쥐의 자궁세포에서 estrogen (estradiol-17 β , E_2) 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Steinmetz et al., 1998). 합성 화학물질의 estrogenic activity에 관한 연구 (Krishman et al., 1993; Steinmetz et al, 1998; Stone, 1994)는 많이 이루어져 있지만 vitellogenin (VTG) 합성과 합성 기전을 직접적으로 조사한 연구는 거의 전무한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 무지개송어의 간세포 배양을 이용해 BPA가 VTG합성에 미치는 영향을 조사했으며 또한, 4-hydroxy-tamoxifen (4-OHT, antiestrogen)를 첨가해 BPA에 의한 VTG 합성이 E_2 유사작용으로 estrogen receptor (ER) 단계에서 유발되는지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

2일간 전 배양한 간세포에 E_2 (2×10^{-6} M) 또는 BPA ($10^{-5} \sim 10^{-8}$ M)을 첨가하여 5일간 배양한 후 BPA가 세포의 생존률에 미치는 영향을 조사하기 위하여 dish로부터 세포를 분리시킨 후 0.05% crystal violet가 포함된 0.1 M citric acid로 2시간동안 핵을 염색하여 혈구판을 이용하여 측정하였다. 사용된 배지는 Hwang et al (2000)의 방법으로 단백질을 침전시킨 후, BPA가 VTG 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 SDS-PAGE로 VTG 밴드를 분리하였다. 분리 된 VTG 밴드는 Bio Image를 이용해 총 단백질에 대한 VTG의 Intergrated Optical Density (IOD) 값을 퍼센트로 나타내었다.

BPA에 의한 VTG 합성작용이 ER 단계에서 유발되는지를 밝히기 위하여 4-OHT (10^{-6} M) 단독 첨가한 실험구와 E_2 (2×10^{-6} M)와 4-OHT (10^{-6} M) 및 BPA (10^{-5} M)와 4-OHT

(10^6 M)를 동시 첨가한 실험구의 VTG를 분석하였다.

결과 및 요약

BPA를 첨가해 3일간 배양한 세포의 생존율은 71~79%를 나타냈으며 BPA를 첨가하지 않은 대조구의 세포 생존율은 72%를 나타내 5일간 배양한 간세포에서 BPA에 의한 세포의 생존율은 아무런 변화가 없었다. 10^8 과 10^7 M을 첨가한 BPA 실험구에서 전체 단백질에 대한 VTG 합성량이 거의 0%를 나타냈지만, 10^6 M에서는 2.63 %, 10^5 M에서는 4.66%로 급격히 상승해 대조구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다 ($P < 0.01$). BPA농도가 증가할수록 VTG 합성률이 증가해 10^5 M에서는 E_2 와 유의적인 차이가 없을 만큼 높은 비율을 나타내었다. 그러나, 4-OHT을 E_2 및 BPA와 동시 첨가해 배양한 모든 실험구에서는 VTG 밴드가 관찰되지 않았다.

따라서, BPA에 의한 VTG의 합성 유발은 BPA의 E_2 유사작용으로 ER단계에서 유발되어진 결과로 생각되어진다.

참고문헌

- Hwang, U.G., N. Kagawa and Y. Mugiya. 2000. Aluminium and cadmium inhibit vitellogenin and its mRNA induction by estradiol- 17β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol., 119, 69~76.
- Krishnan, A.V., P. Stathis, S. Permuth, L. Tokes and D. Feldman. 1993. Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinol., 132, 11~22.
- Steinmetz, R., N.G. Brown, D.L. Allen, R.M. Bigsby and N. Ben-Jonathan. 1998. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. Endocrinol., 138, 1780~1786.
- Stone, R. 1994. Environmental estrogens stir debate. Science, 265, 308~310.
- 宮崎 泰之. 1999. 内分泌かく亂化學物質データ集. 東京都立衛生研究所, pp. 1~72.