

F-4

버들치 초기 간실질세포 배양에 의한 난황전구물질 합성에 있어서 페놀류의 영향

박창범 · 김병호 · 나오수 · 이영돈 · 백혜자* · 김형배**

제주대학교 해양과환경연구소 · *부경대학교 자원생물학과 ·

**도립강원전문대학 해양자원개발학과

서론

어류의 성 성숙중의 암컷 혈액에는 수컷에서는 출현하지 않는 암컷 특이 난황 단백질, 즉 난황 전구 물질 (vitellogenin, VTG)이 출현한다. 이 물질은 자성호르몬 (17β -estradiol, E2)의 영향에 의해 간에서 합성되며 발달중인 난소에 들어간 후 난모세포의 난황물질을 구축하고, 수정 후 배 발생 중에 영양물질로써 이용된다(Wallace and Selman, 1981). 또한, VTG는 미성숙한 암컷 및 수컷에 E2처리에 의해 합성되어지기도 한다(Mommsen and Walsh, 1988). 최근 이 물질은 내분비교란물질들(bisphenol A, BPA; nonylphenol, NP; 4-tert-octylphenol, OP)의 자성호르몬 같은 영향을 조사하는데 biomarker로써 많이 이용되고 있다.

버들치는 산간 계곡의 맑고 찬 1급수의 물에서 주로 서식한다. 이 실험은 하천의 오염에 쉽게 노출이 가능한 버들치를 실험어로 선정하여, 간실질세포 초대 배양법 및 VTG를 측정하기 위한 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 개발하여 3종류의 페놀류들이 *in vitro* VTG 합성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험어는 제주도 한라산 계곡에서 채집하여 제주대학교 해양과환경연구소의 순환여과식 수조에서 사육하였다. 버들치의 암컷 특이 난황단백질의 항체를 제작하기 위하여 성숙한 난소로부터 난황단백질을 추출한 후 뉴질랜드산 토끼에 일주일 간격으로 4회 주사하였다. 마지막 주사 일주일 후 토끼로부터 채혈한 혈청은 수컷 특이 단백질을 제거하기 위해 버들치 수컷 혈청을 4 : 1 비율로 혼합하였다. 제작된 항체(ab.a-egg)의 특징은 이중면역확산법(double-immunodiffusion)을 통해 조사하였다. 간실질세포 초대배양을 위해 20-30마리의 실험어로부터 간을 적출한 후 collagenase에 의해 간세포를 분리하였고, 분리된 간세포들은 Leibovize-15 medium (L-15)을 이용하여 배양하였다. 배양 이틀 후 E2 및 3종류의 페놀류(BPA, bisphenol A; NP, nonylphenol과 OP, 4-tert-octylphenol)를 처리하여 배양액에 분비된 VTG은 ELISA에 의해 측정하였다.

결과 및 요약

제작된 항체 (ab.a-egg)의 특징을 이중면역확산법에 의해 조사한 결과, 난 추출물(egg homogenate) 과 암컷 그리고 E2를 투여한 plasma 에서는 응집반응이 관찰되었으나 미성숙한 암컷 및 수컷 plasma에서는 응집반응이 없었다. 버들치의 간실질세포는 collagenase에 의해 분리가 가능하였으며, 분리된 간실질 세포는 L-15 배양액에 의해 2주 이상 배양이 가능하였다. 배양 이틀 후 E2 및 3종류의 페놀류를 배양액에 처리한 후 세포의 viability를 조사한 결과, NP 10^3 M, BPA 10^4 , 10^3 M 그리고 OP 10^4 M 농도에서 치사독성을 보였다. 그리고 배양액에 분비된 VTG을 ELISA에 의해 측정된 결과, E2는 10^6 M과 10^5 M, NP는 10^4 M, BPA는 10^5 M 그리고 OP는 10^4 M 농도 처리구에서 VTG합성이 유도되었다. 위의 결과로 3 종류의 페놀류 중 BPA가 가장 강한 estrogenic effect를 보였다. 이러한 결과는 3종류의 페놀류는 버들치의 간실질세포에 있어서 자성호르몬과 유사한 효과를 갖는 것으로 보여지며, 앞으로 간실질세포의 초대배양법 및 ELISA에 의한 VTG 측정 시스템은 환경오염에 의한 내분비교란물질 (특히 자성호르몬)의 영향을 조사하는데 이용 할 수 있을 것으로 사려된다.

참고문헌

Wallace, R.A. and Selman, K. (1981). Cellular and dynamics aspects of oocyte growth in teleost. Amer. Zool., 21: 325-343.

Mommsen, T.P. and Walsh, P.L. (1998). vitellogenesis and oocyte assembly. In Fish Physiology, vol. 11A(ed. W.S. Hoar and D.J. Randall), pp. 347-406. New York: Academic Press