

[연구논문]

Japanese medaka에 있어 Quercetin의 난자성숙 저해에 대한 조직병리학적 연구

황 갑 수

군산대학교 공과대학 환경공학과

Histopathological Study on Inhibition of Oogenesis by Quercetin in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)

Gap-Soo Hwang

Dept. of Environmental Engineering, Kunsan National University

ABSTRACT

Endocrine disrupting chemicals probably cause the cytological or/and morphological changes of germinal cells in gonad. Accordingly, this study was aimed to make sure that the effect of hormone-mimicking chemicals on gonad morphology such as decrease of germinal cells, inhibition of cellular maturation and change in the ratio of germinal cells in the different developmental phase can be observed by histopathological procedures and can be a useful bio-indicator for the evaluation of endocrine disruption by environmental chemicals. In this experiment, female Japanese medaka were exposed to quercetin, a phytoestrogen, at the concentration of 100 µg/L. quercetin showed the significant decrease in the number and rate of vitellogenic follicular oocytes in the treated group for 4 and 6 weeks. The weak development of yolk could be also observed. We could conclude that quercetin has anti-estrogenic or androgen-like potency by exerting the inhibition effect on oogenesis in fish female-gonad. From the result of this study, the applied methods and techniques can be evaluated to be a useful biomonitoring means for water pollution, expecting a good result of the subsequent study on apoptosis.

서 론

고도의 산업화와 기술화에 의해 우리는 물질의 홍수속에 살고 있다. 이러한 인위적으로 합성, 개발된 많은 것들이 환경중에서 미생물들에 의한 분해 친화성을 갖지 못하고 오랫동안 환경 중에 잔류하면서 생체에 다양한 유해한 작용을 일으키

기 때문에 각종 환경문제들이 야기되고 있는 바 그와 같은 대표적 오염물질로서 우리는 흔히 PCB, DDT 등을 꼽게 된다.¹⁾

근래 이와 같은 인위적으로 합성된 오염물질들이 인간을 비롯한 생물체내에서 hormone과 유사한 작용을 발현시켜 생식계에 유해한 영향을 일으킬 수 있다는 연구보고와 함께 그에 의한 생태계 교란(disturbance)의 가능성에 대한 심각한

우려가 제기되고 있으며²⁾ 우리는 이러한 호르몬樣 화학물질들을 endocrine disrupters라고 부르고 있다. 이들 endocrine disrupter들에 관한 연구는 1970년대부터 출발되어 초기에는 소수의 공업원료물질들이 estrogenic effect를 갖고 있는 것으로 보고되었으나³⁾⁻⁴⁾ 근래 이와 관련된 연구가 새로이 주목을 받음에 따라 많은 화학물질들이 hormone樣 작용을 갖고 있음이 밝혀지고 있다.⁵⁾⁻⁷⁾ 현재 다수의 농약과 산업용 화학물질들을 포함한 적어도 60여종의 합성화학물질들이 이러한 endocrine disrupter들이 밝혀져 왔으며 최근 우리 생활과 밀접한 비이온성 계면활성제 성분, 용기 코팅제, 공업용 plasticizer, 천연 식물성분들이 endocrine disrupter임이 밝혀져 그에 관한 많은 연구결과들이 보고되고 있는데 이들 endocrine disrupter들 또는 그 분해산물들은 환경중에서 비교적 분해되기 어려운 특성을 갖고 있음으로서 수중환경 도처에 오염물질로서 존재하고 대부분 생물체에 대한 축적경향이 강하여 이들의 수중생태계 교란에 대한 많은 우려를 자아내게 하고 있다. 또한 17 β -estradiol과 같은 천연 hormone이 생체의 생식기능을 control할 뿐 아니라 breast cancer를 비롯한 여러 형태의 암 발생 및 성장에 관련되어 있다는 사실¹²⁾은 endocrine disrupter들이 정상적인 생체 hormone기능을 촉진, 저해하여 인간과 동물의 생체내에서 다양한 유해작용을 야기할지도 모른다는 심각한 우려를 뒷받침해 준다.

내분비계 장애물질들은 생체내에서 호르몬 합성의 저해, 호르몬 수용체 결합과 관련된 유사, 봉쇄, 촉발작용 또는 호르몬 대사, 분배 등에 대한 영향 등의 기전들을 통해 생식축(reproductive axis)에서의 정상적인 호르몬 균형을 교란시켜 다양한 생식장애 현상들을 야기하게 되므로 생식세포는 화학물질들에 의한 내분비계 장애현상을 평가, 규명함에 있어 필연적으로 중요한 실험관찰의 대상이 될 수 밖에 없다. 따라서 본 연구에서도 실험동물로서 소형어류인 Japanese medaka를 대상으로 생식선에서의 조직병리학적 관찰을 통해 화학물질의 내분비 장애 유발능을 평가하고자 하였으며 아울러 그 실험기법들을 환경 모니터링의 유용한 수단으로서 정립하고 활용할 수 있는지에 대한 실제적 가능성을 확인하고자

하였다.

이를 위해 본 연구에서는 실험동물로서 성숙 Japanese medaka (*Oryzias latipes*)를 천연 Phytoestrogen으로 의심되어지고 있는 Quercetin에 폭로시켜 생식선(난소)에 미치는 영향을 조직학적 관찰에 의해 확인하고 몇가지 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

실험 방법

1. 실험어류 및 사육조건

실험어류로서는 Japanese medaka (*Oryzias latipes*)를 구입하여 1주 동안 실험실내 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. Fish는 23~26 °C의 실내온도 및 16:8(light:dark)의 광주기조건으로 유지되어지며 매일 2회의 어육가루와 1회의 부화새우가 먹이로서 공급되었다. 사육수는 수돗물을 저장조에 받아 산소 aeration을 하면서 적어도 하루동안 방치하여 염소를 제거한 후 사용하였다.

2. 실험물질

실험물질로는 quercetin을 사용하였는데 quercetin은 식물성 flavonoid 배당체 성분으로서 coumestrol, equol, kaempferol 등과 함께 천연 phytoestrogen으로 의심되어 왔다. 실험물질은 모두 고순도의 특급시약(Sigma Co.)을 구입하여 사용하였다.

3. 실험조건

실험군은 각 실험물질에 대해 control군, 2주 폭로군, 4주 폭로군, 6주 폭로군으로 분류하여 각 군당 5마리씩의 female fish를 사용하였다. male과 female의 구별은 Japanese medaka의 특징적인 지느러미(dorsal fin을 중심으로) 형태의 차이에 의해 구별하였다. 폭로는 20 L의 수조내에서 수행되었으며 폭로농도는 관련문헌을 참조하여 100 μ g/L로 하였으며 실험물질인 quercetin은 지용성이 큰 물질이므로 acetone에 용해하여 투여농도로 조제하였다. 실험물질들의 수조수들은 24시간마다 전체 용량의 4/5씩이 교체되었다.

4. Fish의 처치

폭로기간이 완료된 실험군은 CO₂ gas에 의해 마취를 행하고 물기를 흡수, 제거한 후 길이와 중량을 칭량하였다. 두부와 꼬리를 절단한 후 tissue cassette에 넣어 4% paraformaldehyde 용액 (pH 7.4)내에서 24시간 방치하여 고정 (fixation)을 행하였다.

5. Slide 표본의 제작

고정을 완료한 sample에 대해 다음과 같은 순서에 따라 slide 표본을 제작하였다.

1) Decalcification

5% formic acid in 5% formalin 용액 내에 5일 동안 방치하였다.

2) Dehydration

Sample을 70% ethanol에 24시간 이상 방치하였다.

3) Embedding of tissue

70% ethanol 처리 조직에 대하여 90% ethanol (2~3시간) --- 100% ethanol I (2~3시간) --- 100% ethanol II (2~3시간) --- Xylene I (1시간) --- Xylene II (1시간) --- Paraffin I at 58°C --- Paraffin II at 58°C --- Block tissues in fresh paraffin and allow cool 등의 순서에 따라 embedding을 행하였다.

4) Microtome에 의한 조직의 Cutting

Micromtome상에서 조직을 5~7 μm 두께로 Cutting하였다.

5) Mounting on the slide

Tissue matwaterbath (Fisher Co.)에서 albumin-coated slide에 microtome에 의해 얻은 조직 sample을 mounting하고 slide warmer (Fisher Co.)상에서 건조시켰다.

6. 염색을 통한 조직학적 관찰

상기의 과정을 통해 제작한 slide 표본들에 대해 본 연구실에서 확립되어 있는 염색법의 절차에 의해 Hematoxylin and eosin 염색과 PAS 염색을 실시하고 현미경 (Olympus BH-2)을 사용하여 생식선의 형태학적 변화를 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. Japanese medaka의 평균 체중 및 체장

실험에 사용된 Japanese medaka의 각 폭로조건에 따른 처치시의 평균체중 및 체장은 표 1과 같다. 실험에 사용된 물고기는 동일 시기에 부화되어 암수격리 후 동일 조건에서 사육되었는데 폭로기간 중 평균 체중 및 체장의 변화를 보면 4주 폭로군에 있어 대조군 및 2주 폭로군에 비해 오히려 평균체중 및 체중/체장이 낮았으며 6주 폭로군에서는 다시 성장의 경향을 나타내었다. 그러나 6주 폭로군의 평균 체중, 체장, 체중/체장은 6주 대조군에 비해 상당히 낮은 결과를 나타냄으로서 앞으로 이와 관련하여 실험약물의 영향과 실험조건들에 대한 면밀한 검토가 있어야할 것이다.

Table 1. Mean weight and length of female medaka in experimental treatments at each time of sacrifice

Group (Duration of exposure)	N	Weight (g)	Length (mm)
Control (0 week)	5	0.407	34.6
2 week	5	0.405	35.2
4 week	5	0.375	34.8
6 week	5	0.453	35.3
Control (6 week)	5	0.512	36.8

2. Quercetin에 의한 female gonad에 있어 조직학적 변화

Female 어류에 있어 생식선의 발달과 생식세포의 성숙과정은 포유동물 female에 있어서와 거의 동일한 현상이나 어류의 경우는 특이하게 estrogen의 생리작용에 의해 vitellogenin이란 단백질이 간(liver)에서 생성되어 생식세포의 성숙에 관여한다는 점이 독특하다. 이 vitellogenin은 간에서 합성된 후 혈류를 타고 최종적으로 난소의 발달단계에 있는 oocyte에 의해 격리되므로 yolk 단백질이라고도 부르는데 이 yolk 단백질은 장래 난자가 정자와 수정 후 형성하는 embryo를 위한

energy 저장고로서 작용하게 되며 외부의 estrogen 물질에 의해서도 생성되므로 독성 및 오염평가를 위한 많은 연구에 응용되어 왔다. Female 어류에 있어 난세포의 성숙과정은 이 yolk 단백질의 영향과 함께 뚜렷이 구분되는 여러 단계들로 특징지어질 수 있는데 크게는 이러한 난세포의 성숙과정을 previtellogenic phase, vitellogenic phase 및 postvitellogenic phase로 구분할 수 있다. Iwamatsu 등¹⁸⁾은 좀더 구체적으로 Japanese medaka의 난소에 있어 난세포의 성숙과정을 10 stage로 세분화되는 5phase (early and late previtellogenic phase, early and late vitellogenic phase and postvitellogenic phase)로 분류하고 각 단계별에서 보여지는 특징적 관찰요소를 상세히 기술하였다. 이를 요약하면 Early previtellogenic phase에는 stage I (chromatin-nucleolar stage), stage II (perinucleolar stage), late previtellogenic phase (chorion formation)에는 stage III (chorion-rudiment stage), stage IV (attaching filament and oil-droplet formation stage), early vitellogenic phase (pre-yolk formation)에는 stage V (early yolk vehicle stage), stage VI (late yolk vehicle stage), late vitellogenic phase에는 stage VII (early yolk formation stage), stage VIII (late yolk formation stage), post vitellogenic phase에는 stage IX (maturation stage), stage X (postovulatory stage)가 각각 해당 분류되어졌다.

Quercetin¹⁹⁾⁻²²⁾은 citrus fruits와 green pepper, 토마토 등에서 유래하는 biflavonoid로서 모세혈관 강화작용, 항 allergy작용, 항 염증작용 및 항 산화작용등을 가지며 근래 그것의 항암작용에 대한 많은 관심이 집중되어 왔다. 본 실험에서는 hematoxylin and eosin 염색을 통해 Japanese medaka의 난소내 oocyte들에 대한 상기의 성숙과정에 따른 단계들의 식별이 광학 현미경관찰에 의해 가능하였다. 주요 관찰대상으로서 previtellogenic phase에서의 세포내 핵은 상대적으로 큰 면적비율로서 분홍색, 세포질은 청남색으로 염색되었고 이후 phase에서의 yolk는 진한 홍색으로 염색되었으며 yolk vesicle들은 염색되지 않은채 소포막에 의해 구분되었는데 성숙 단계별 oocyte의 식별은 이러한 염색 결과와 세

포크기를 대상으로 상기 Iwamatsu 등¹⁸⁾의 보고를 참고로 하여 수행되었다.

본 실험에서의 관찰결과 quercetin 100 µg/L에 2주 동안 폭로된 군의 Japanese medaka 난소에서는 대조군들에 비해 유의할만한 성숙과정에 따른 세포종별 구성비의 변화가 없었으나 4주 및 6주 동안 폭로된 군들에 있어서는 난소에 있어 vitellogenic phase의 oocyte가 대조군들의 경우에 비해 현저하게 감소함을 발견할 수 있었다. 대조군과 2주 폭로군에 있어서는 vitellogenic phase의 성숙과정을 진행중인 생식세포의 비율이 30% 내외였으나 4주 폭로군에 있어서는 15%, 10%내외 수준으로 각각 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 대조군들과 2주 폭로군들에 있어서는 yolk vesicle의 fusion에 의한 stage VIII와 stage IX의 yolk 발달이 선명하게 관찰되었으나 4주 및 6주 폭로군들에 있어서는 그러한 yolk의 발달이 매우 미약한 vitellogenic phase 중에서도 미숙단계의 stage에 속하는 난세포가 대부분이었으며 특히 stage IX의 성숙난자는 거의 발견하기 어려웠다. Quercetin 2주 폭로군들의 경우에 있어서는 대조군들에 비해 성숙 난세포의 degeneration 경향이 관찰되었다.

본 실험에서 이용한 또다른 염색법인 PAS 염색의 경우 previtellogenic phase에서의 세포내 핵은 청색, 세포질은 진한 남색으로 염색되었고 이후 phase에서의 yolk는 적색으로 염색되었으며 특히 phosphoglycoprotein인 yolk vesicle내의 vitellogenin들이 적색으로 염색됨으로서 그 존재를 확인할 수 있었다. PAS 염색에 의한 관찰에 의해서도 hematoxylin and eosin 염색의 경우처럼 4주 및 6주 폭로군에 있어서는 vitellogenic oocyte의 현저한 감소를 확인할 수 있었다.

이와 같은 실험결과로부터 quercetin은 female Japanese medaka의 난소에 있어 난자의 성숙을 저해하는 항 estrogenic 또는 androgenic effect를 가지고 있음이 명확히 판명되었다.

그간 여러 연구결과들을 통해 다수의 hormone樣 화학물질들이 성분화 및 성기관 발달의 주요 단계에 작용하여 생식교란을 야기함은 잘 입증되어 왔다. 그러나 이들 실험들은 분명한 실험결과와 도출을 전제로 한 실험조건들에 의해 거의 이루어져 왔으며 따라서 어류 성장과정상에 있어

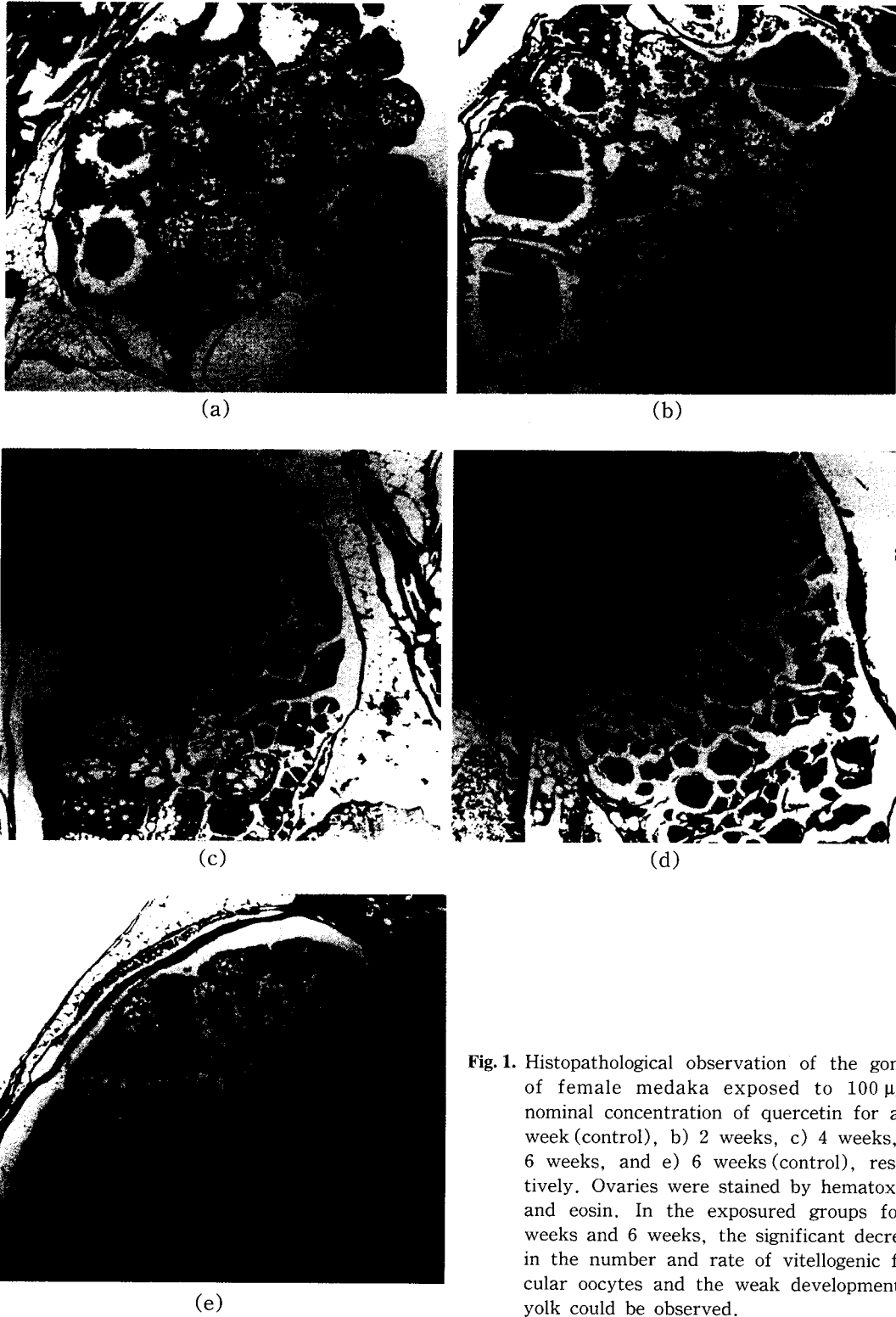


Fig. 1. Histopathological observation of the gonads of female medaka exposed to 100 µg/L nominal concentration of quercetin for a) 0 week (control), b) 2 weeks, c) 4 weeks, d) 6 weeks, and e) 6 weeks (control), respectively. Ovaries were stained by hematoxylin and eosin. In the exposed groups for 4 weeks and 6 weeks, the significant decrease in the number and rate of vitellogenic follicular oocytes and the weak development of yolk could be observed.

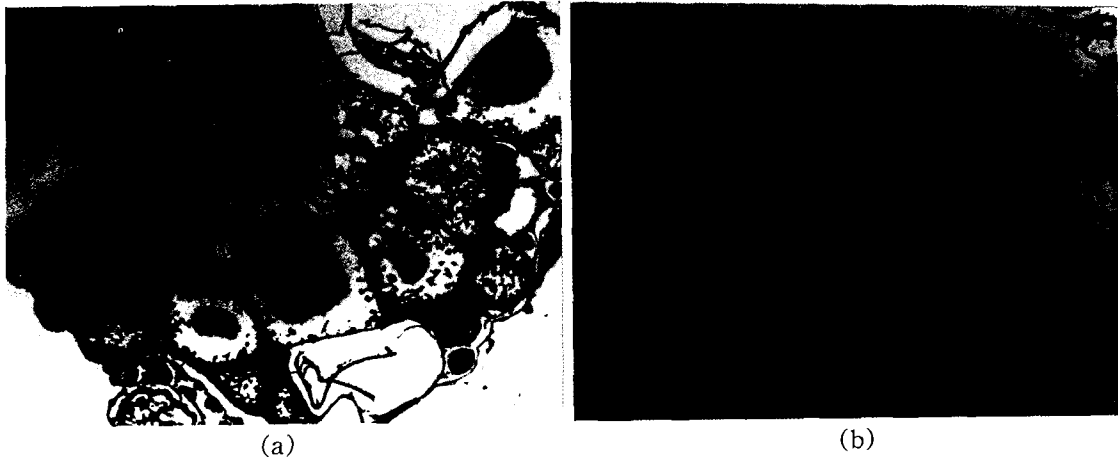


Fig. 2. Histopathological observation of the gonads of female medaka exposed to 100 µg/L nominal concentration of quercetin for a) 0 week (control), and b) 4 weeks. Ovaries were stained by PAS. Vitellogenin in the yolk vesicles were stained red.

화학물질에 대한 폭로시기의 제한성 등으로 인해 오염현장의 실제적 상황을 반영시킬 수 있는 실제적 평가수단으로서 그 연구기법을 활용할 수 있는가에 대해서는 앞으로 더 많은 연구노력에 의한 검증과 기술적 보완이 요구되어진다고 할 수 있다.

이러한 관점에서 금번 연구에서는 성숙된 성어를 사용하여 관련연구를 수행함으로써 hormone樣 화학물질들이 testis-ova의 발현과 같은 생식기관의 극단적인 변화를 야기하지 않더라도 그 endocrine effect에 의해 생식세포의 감소 및 성숙저해, 생식세포種의 구성변화 등을 야기하며 조직학적 기법에 의한 그와 같은 관찰요소들이 화학물질에 대한 endocrine effect의 평가에 중요한 지표항목으로 될 수 있음을 확인하고자 하였다.

Phytoestrogens²³⁾⁻²⁵⁾는 식물에 의해 천연적으로 생산되는 estrogen樣 화합물을 일컬으며 그들의 구조적 유사성들에 따라 isoflavonoids (genistein, equol, daidzein, Biochanin A 등), coumestrans (coumestrol), lignans (enterolactone) 등의 group들로 분류되어진다. Phytoestrogens는 clover, soybean 및 alfalfa 등에 고농도로 존재하며 MCF cell의 증식을 촉진시키고 estrogen 수용체에 직접 결합할 수 있으며 equol의 경우 est-

rogen 수용체에 결합하여 rat 자궁내 progesterone 수용체를 유도하고 자궁의 중량을 증가시키는 것으로 알려져 왔다. 또한 phytoestrogens에 의한 가축에 있어 수정능 저하와 정자수 감소 등이 알려져 있으며 어류인 male Siberian sturgeon에서 vitellogenesis를 유발함이 보고되는 등 phytoestrogens의 생체 호르몬 기능에 미치는 영향에 대한 많은 연구결과들이 그간 보고되어 왔다.¹²⁾ 반면 estrogenic樣 물질인 이들 phytoestrogens는 암세포의 증식에 필요한 estradiol, testosterone 등의 호르몬과 결합하여 이들 호르몬들의 생체 이용을 저해하는 globulin (SHBG)의 간에서의 합성을 촉진함으로써 breast cancer, prostate cancer 등에 대한 항암작용을 나타내는 것으로 추정되어지는 등 그간의 많은 연구노력과 함께 의약품 또는 건강식품으로서 유용하게 활용되어지고 있어 인간 건강 측면에서의 양면성을 제시²³⁾하고 있다.

Quercetin은 이러한 phytoestrogen의 일종으로서 본 실험에서는 어류 난소에서 난세포의 성숙을 저해하는 quercetin의 항 estrogenic effect가 조직병리학적 관찰에 의해 확인될 수 있었다. 본 실험에서 100 µg/L의 quercetin 농도에 4주, 6주 동안 폭로된 Japanese medaka의 난소에서는 현저한 난세포 성숙의 저해가 관찰되었는데 이와

같은 난세포 성숙의 저해에 대해서는 quercetin에 의한 내인성 estrogen인 vitellogenin의 합성 또는 이용율(vitellogenesis)의 억제, quercetin의 estrogen 수용체에 대한 결합특성, quercetin에 의해 유발된 apoptosis에 의한 난세포의 degeneration 등을 그 요인으로 추정할 수 있을 것이며 이에 대해 최근 quercetin의 apoptosis 유발능에 대한 다수의 연구결과들이 보고되고 있는 바 본 연구결과와 관련된 지속적인 연구노력이 요구된다. Csokay 등²⁶⁾은 K562 human leukemia cell에 대한 quercetin의 증식억제작용이 세포분화 및 apoptosis 유도에 기인하는 것으로 보고하였으며 Ferrandina 등²⁷⁾은 Hep2 및 CO-K3 laryngeal cancer cell line들에 대해 quercetin과 항estrogen인 tamoxifen이 apoptosis 유도능을 가짐을 TUNEL reaction에 의해 면역학적으로 명확히 확인하였다.

생체내 세포사의 독특한 기전으로서 necrosis와 apoptosis가 존재함은 잘 알려져 있다. 이 중 apoptosis는 정상조직의 발달 및 재구성에 연관되어 일어나며 수 개의 특정 유전자에 의한 발현(expression)을 요구하는 예정된 세포 자연사현상으로서 세포질 및 핵 응축, 세포막의 blebbing 등과 같은 특이한 세포학적 pattern을 나타내게 된다. 이와 함께 apoptotic과정은 세포내부의 특정 핵산분해효소(endonuclease)에 의해 매개되는 DAN의 제어된 절단에 의해 수반되어 세포 핵 내에 소위 apoptotic body의 형성을 결과하게 되는데 이 apoptotic body가 세포의 apoptosis를 확인하는 주요 지표가 되게 된다.

인간의 경우 여성의 난소에는 출생초기에 약 200만개의 난세포(oocyte)가 발견되고 사춘기의 시작시기에는 약 400,000개의 난포(follicle)들이 존재하게 된다. 그러나 이 중 여성의 전생식수명기간을 통해 약 400개의 난포만이 배란을 경험하게 되며 폐경기에는 어떠한 난세포나 난포도 여성의 난소내에 존재하지 않게 된다. 따라서 인간에 있어서는 99.9% 이상의 난포들이 배란에 도달하기전 퇴화적 변화과정(degenerative change)에 의해 소실되게 되는데 이러한 여성 생식세포의 퇴화현상을 atresia라고 한다. 즉 전술한 바와 같이 여성의 난세포는 배란을 위해 여러단계의 성숙과정을 거치게 되는데 최종 배란을 위해 선

택되지 않는 세포는 어느 단계에서든지 atresia에 의해 소실될 수 있다.²⁹⁾⁻³¹⁾

그간 많은 연구들에 의해 이러한 여성 생식세포의 atresia는 내부 hormone의 통제에 의해 이루어지며 많은 생리활성물질들이 난포의 atresia를 촉진하거나 억제하는 것으로 알려져 있다. 이와 관련하여 estrogen은 난포의 성장과 yolk 외부의 granulosa cell의 성장을 촉진하여 atresia 억제효과를 갖고 있고 반대로 androgen은 난포의 atresia를 촉진하는 주요 생리물질로 알려져 있으며 이와 같은 난포에 있어 atresia에 대해서는 yolk 외부의 granulosa cell의 apoptosis가 그 주요한 기전이 되는 것으로 인식되고 있다.²⁸⁾⁻³⁰⁾ 그간의 어류실험 결과들에 의하면 일반적으로 chrysin 등의 phytoestrogens는 체내 vitellogenesis를 촉진하는 등 female 생식선에 있어 estrogenic effect를 나타내는 것으로 알려져 왔으나²⁾ 본 실험결과 quercetin은 이와는 상이한 effect를 나타내었다.

Nonclercq 등²¹⁾은 male hamster에 estrogenic 물질인 diethylstilbesterol을 투여하여 testis의 위축 및 생식세포의 변화를 확인하고 DNA labeling을 이용한 면역측정법에 의해 생식세포의 apoptosis를 확인함으로써 diethyl stilbesterol에 의한 생식선의 형태학적 변화가 apoptosis와 연관이 있음을 규명하였다. 따라서 어류를 대상으로한 본 실험의 결과에 대해서도 이와같은 연구기법들에 의해 apoptosis와의 연관성이 명확히 규명되어야 할 것이다.

Apoptosis와 관련된 연구는 근래 전 세계적으로 활발히 수행되고 있으나 거의 모두가 rat, mouse 등과 같은 포유동물들을 대상으로 이루어지고 있고 어류를 대상으로 한 관련실험은 극히 미미한 실정이다. 따라서 quercetin에 대한 본 실험의 결과는 apoptosis가 어류에 있어서도 endocrine disrupter들에 의한 생식선의 형태학적 변화에 대한 기전을 해명해 줄 수 있을 것으로 기대되는 바 현재 진행 중인 TUNEL reaction을 이용한 면역화학적 연구결과와 함께 성숙 male어류에 있어 화학물질에 의한 생식선의 형태학적 변화와 apoptosis와의 연관성을 명확히 규명하여 향후 apoptosis가 환경내의 endocrine effect를 평가하는 유용한 생물모니터링 수단으로 활용될

수 있기를 기대한다.

결 론

실험어류로서 성숙 Japanese medaka를 대상으로 생식선에서의 조직병리학적 관찰을 통해 화학물질의 내분비 장애 유발능을 평가하고 아울러 그 실험기법들을 환경 모니터링의 유용한 수단으로서 활용할 수 있는지에 대한 실제적 가능성을 확인하고자 수행한 본 실험에서 female Japanese medaka를 100 µg/L의 quercetin에 폭로한 경우 2주 폭로군의 난소에서는 대조군들에 비해 유의할만한 변화가 없었으나 4주 및 6주 폭로군들에 있어서는 vitellogenic phase의 oocyte가 대조군들의 경우에 비해 현저하게 감소함을 발견할 수 있었다. 또한 대조군들과 2주 폭로군들에 있어서는 yolk 발달이 선명하게 관찰되었으나 4주 및 6주 폭로군들에 있어서는 yolk의 발달이 미약한 미숙단계의 stage에 속하는 난세포가 대부분이었으며 특히 stage IX의 성숙난자는 거의 발견하기 어려웠다.

이와 같은 실험결과들은 quercetin이 Japanese medaka의 난자의 성숙을 저해하는 항 estrogenic effect를 가지고 있음을 확인시켜주는 것으로 앞으로 apoptosis 등과 관련하여 그 기전에 대한 지속적인 연구가 요망된다.

감사의 글

이 논문은 한국과학재단의 핵심전문연구비(과제번호 981-1111-064-1) 지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 정오진, 환경화학, 신평 출판사, 1-10 (1999)
2. Herries, J.E., Jobling, S., Zaman N., Estrogenic activity in five united kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. Environ. Toxicol. Chem., 16(3), 534-542 (1997)
3. Bitman J, Cecil H.C., Estrogenic activity of DDT analogs and PCB. J. Agr. Food Chem., 18, 1108-1112 (1970)
4. Nelson J.A., Struck R.F., James R., Estrogenic activities of chlorinated hydrocarbons. J. Toxicol. Environ. Health., 4, 325-339 (1978)
5. Routledge, E.J., Sumpter, J.P., Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environ. Toxicol. Chem., 15(3), 241-248 (1996)
6. Krishnan, A.V., Feldman, D., p-nonylphenol : An aestrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinology., 132, 2279-2286 (1993)
7. Soto, A.M., Justicia, J.W., Sonnenschein, C., An estrogenic Xenobiotic released from modified polystyrene. Environ. Health Perspect., 92, 167-173 (1991)
8. Guillette, Jr., L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R., Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. Environ. Health Perspect., 102, 680-688 (1994)
9. Carlsen, E., Giwercman, N., Kieding, N., Evidence for decreasing quality of sperm during the past 50 years., BMJ 305, 609-613 (1992)
10. Hileman, B., Environmental estrogens linked to reproductive abnormalities, cancer. Chem. Eng., News 31, 19-23 (1994)
11. Sharpe, R.M., Fisher, J.S., Millar, M.M., Jobling, S., Sumpter, J.P., Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. Environ. Health Perspect., 103, 1136-1144 (1995)
12. Nimrod, A.C., Benson, W.H., Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. Critical Reviews in Toxicology., 26(3), 335-364 (1996)
13. Gimeno, S., Gerritsen, A., Feminization of male carp. Nature., 384(21), 221-222 (1996)
14. Gray, M.A., Metcalfe, C.D., Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. Environ. Toxicol. Chem., 16(5), 1082-1086 (1997)
15. Lee, P.C. Lee W., *In vivo* Estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. Bull.

- Environ. Contam. Toxicol., 57, 341-348 (1996)
16. Jobling, S., Sheahan, D., Sumpster, J.P., Inhibition of testicular growth in rainbowtrout exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(2), 194-202 (1996)
 17. Wester, P.W., Vos, J.S., Toxicological pathology in laboratory fish: an evaluation with two species and various environmental contaminants. *Ecotoxicology*, 2, 21-44 (1994)
 18. Iwamatsu, T., Sakai, N., Oogenesis in the Medaka *Oryzias latipes*-stages of oocyte development. *Zoological Science*, 5, 353-373 (1988)
 19. Manach, C., Morand, C. Texier, O., Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS LETT.*, 409(1), 12-16 (1997)
 20. Welton, A.F., Tobias, L.D., Fiedler-Nagy C., Effect of flavonoides on arachidonic acid metabolism. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 213, 231-242 (1986)
 21. Della Loggia R, Ragazzi, E, Tubaro, A., Anti-inflammatory activity of benzopyrones that are inhibitors of cyclo- and lipo-oxygenase, *Pharmacol. Res. Commun.*, 20, 91-94 (1988)
 22. Scambia, G., Ranelletti, F.O., Benedetti Panici P., Synergic antiproliferative activity of quercetin and cisplatin on ovarian cancer growth. *Anticancer drugs*, 1, 45-48 (1990)
 23. Barrett, J., Phytoestrogens: friends or foes? *Environ. Health antiproliferative*, 478-482 (1996)
 24. Makela, S.R., Santti, Salo, L., J, McLachlan, A., Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. *Environ, Health Perspect.*, 103(7), 123-127 (1995)
 25. Pelissero, C., Fluorite, G., Foucher, J.L., Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes: an in vitro test for the estrogenic potency of chemicals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 44, 263-272 (1993)
 26. Csokay, B., Prajda, N., Weber, G., Olah, E., Molecular mechanism in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci.*, 60(24), 2157-2163 (1997)
 27. Ferrandina, G., Almadori, G., Maggiano, N., Lanza, P., Ferlini, C., Cattani, P., Piantelli, M., Scambia, G., Ranelletti, F.O., Growth-inhibitory effect of tamoxifen and quercetin and presence of type II estrogen binding sites in human laryngeal cancer cell lines and primary laryngeal tumors. *Int. J. Cancer.*, 77(5), 747-754 (1998)
 28. Hsueh, A.J.W., Tsafiriri, A., Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*, 15(6), 707-724 (1994)
 29. Greenwald G.S. Roy S.K. Follicular development and it's control. *The Physiology of Reproduction*, Raven Press 2, 629-724 (1994)
 30. Amdur M.O., Doull, J., Klaassen, C.D., *Toxicology*, Pergamon Press 4th ed, 484-521 (1991)
 31. Nonclercq, D., Reverse, D., Steinnon, J.A., In situ Demonstration of apoptotic germ cells in an experimental model of chemical castration. *Biochemica*, 1, 12-15 (1997)
 32. Gavrieli, Y., Ben-Sasson, S.A., Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.*, 119, 493-501 (1992)