

## 세포배양 생화학적 기법에 의한 수환경오염 평가

오승민 · 정규혁\*  
성균관대학교 약학부

### Cell Culture Microbioassay for the Water Pollution Monitoring

Oh, S.M. and Chung, K.H.\*

College of Pharmacy, SungKyunKwan University, Suwon, Kyonggi-do 440-746, Korea  
(Received November 25, 2000)  
(Accepted December 22, 2000)

**ABSTRACT** : So far, investigation of environmental pollution has been achieved in field study. This remains the most exhaustive approach, current dimensions of environmental researches and their inherent complexity require that relatively inexpensive and simple laboratory procedures are developed to make possible the screening of large numbers of sites and samples. At this point, microbioassay has been highlighted. The purpose of this study is to evaluate the water pollution using microbioassay. Two microbioassay methods were optimized and validated for the sensitive and quantitative determination of total toxic effects in the water. EROD(Ethoxyresorufin-O-deethylase) microbioassay was focused to detect PAHs, PCBs and dioxinlike components in the water and E-screen assay to xenoestrogens. The EROD microbioassay was executed in rat hepatoma cell line, H4IIE and E-screen assay in MCF7-BUS cell line. Kumho river was selected for this study. 5 l of river water was extracted using combined solid-phase extraction in static adsorption mode with soxhlet extraction. Pollutants adsorbed to the XAD-4 resin were recovered by elution with ethyl acetate and methylene chloride (1 : 9). Toxic effects of extracts were determined by EROD-microbioassay and E-screen assay. EROD activities of water samples were 7.24~72.24 ng/l MEQ. The estrogenic effect of various water samples is quantitatively evaluated by EEQ. The EEQ of samples range from 0.05 to 6.07 ng-EEQ/l. These results suggested that Kumho river was highly polluted with organic toxic chemicals.

**Key Words** : Microbioassay, EROD, E-screen assay, Water pollution, Kumho river

### I. 서 론

최근 환경문제의 심각성이 대두되면서 이미 알려진 독성물질에 폭로되지 않도록 예방하고 그에 대처하는 방안을 연구하는 물론, 새로운 화학물질과 위험성이 분명하지 않은 물질에 대한 실험실에서의 사전 예측 연구가 필수적으로 요구되어 환경 시료에 대한 신속, 정확하며 간편한 모니터링 방법의 연구가 진행되고 있다.

환경오염에 대한 모니터링에는 크게 두 가지 방법이 있다. 기기를 이용한 화학적인 분석과 생물학적인 모니터링이 그것이다. 분석화학 분야는 그간 대단한 진보를 이루어 대기, 수계, 토양 등의 환경 시료 중에 존재하는 유기, 무기성분의 오염물질을 미량까지 검출하고 측정이 가능하도

록 하였다. 그러나, 이러한 분석 작업의 결과로 환경 시료 중의 유기, 무기 화학물질 자체에 대한 자료는 많이 얻을 수 있게 되었지만 이를 생물학적 개념으로 해석하는 것이 문제가 되었다. 즉, 분석된 화학물질이 생물체에 미치는 유해한 영향은 아직 밝혀지지 않은 채로 남아있는 것이다.

따라서 생물학적 모니터링의 중요성이 인식되었으며 특히 초기의 변화를 감지할 수 있을 뿐 아니라 오염물질의 종류와 노출량 및 독성효과를 알려 준다는 장점으로 인하여 분지수준의 생화학적 변화를 정량화하여 활용하기 위한 연구가 진행되고 있다. 생물체가 환경오염물질에 의하여 노출되면 초기에는 생물체의 체내 대사에 의하여 오염물질의 대사체가 생성되기 시작하고, 여러 효소계의 변화가 나타나게 되며, 유전 및 세포 독성학적인 변화가 일어나고 병리학적인 변화에 이어서 최종적으로 생물체의 개체, 군집, 다양성의 변화가 나타나게 된다. 최근의 세포배

\*To whom correspondence should be addressed

양 생화학적 기법에 의한 오염도 평가는 병변이 유발되기 이전의 초기 노출단계를 평가하는 사전예보 및 예방의 의미를 가지게 된다.

우리나라는 하수처리율이 아직도 매우 낮아 하천수가 다양한 화학물질로 오염되어 있음은 주지의 사실이다. 특히 환경에 방출되고 있는 많은 화학물질들 중에는 생태계 및 사람의 발암 유도 및 내분비계를 교란시킬 수 있는 물질이 있어 그에 대한 관심이 증가하고 있다(Soto 등, 1995; Colborn 등, 1993; Waller 등, 1995; Hileman B, 1993, 1994).

EROD-microbioassay와 E-screen assay는 이러한 작용을 지닌 환경오염물질을 모니터링하기에 적합한 수단으로서 많은 관심이 기울여지고 있다. EROD(Ethoxyresorufin-O-deethylase)는 CYP1A 계열의 대사활성효소로서 EROD를 유도시키는 물질로는 polychlorinated biphenyls(PCBs), polyaromatic hydrocarbons(PAHs) 및 dioxin류가 있는데 EROD 유도는 돌연변이원성, 최기형성 및 발암성과의 깊은 연관성이 연구되어 오고 있다(Nebert 등, 1989). EROD를 유도시키는 화학물질은 도시하수에는 대부분 소량 존재하나 종종 공장폐수에서 하천으로 과량 흘러 들어와 하천을 오염시키는 주범으로 작용하기도 한다.

E-screen assay는 사람 유방암세포인 MCF-7 세포가 에스트로겐에 의해 성장이 촉진되는 효과를 이용한 세포배양 생화학적 방법으로서 에스트로겐 작용을 지닌 화학물질을 검색하는데 우수하다고 알려져 있다(Soto 등, 1995; Nagel 등, 1997). 이 방법은 매우 민감하게 단일 및 복합 물질을 동시에 신속히 조사할 수 있을 뿐만 아니라 그 효과를 정량적 평가할 수 있어 하천 등 환경시료 중에 함유된 내분비계 장애물질을 검출하는데 적합할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 EROD 및 E-screen assay의 두가지 microbioassay 기법을 이용한 하천수의 오염도 측정을 체계화하기 위해 환경시료에 대한 적용성을 최적화하고 정량화하였으며 1999년 6월부터 10월까지 금호강 5개 지점에서 채취한 시료를 대상으로 오염도를 평가하였다.

## II. 재료 및 실험방법

### 1. 시료채취

Fig. 1에서 보는 바와 같이 금호강 유역의 상류에서부터 하류에 걸쳐 금창교(KH1), 안심교(KH2), 팔달교(KH3), 금호대교(KH4) 및 세천교(KH5)의 5개 지점을 대상으로 1999년 6월, 7월, 8월 및 10월에 하천수를 채취하여 EROD 활성 측정 및 E-screen assay를 하였다.

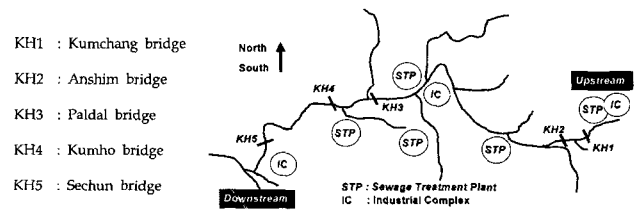


Fig. 1. The location of the water sampling stations in Kumho River.

### 2. 시료의 전처리

시료수는 채취하여 실험실로 운반 즉시 5L씩을 취하여 농황산으로 pH 3으로 조정후 실험하였다. 산성화된 시료수 1량 0.5 g의 Amberlite XAD-4 resin을 넣고 24시간 동안 흡착시키는 static adsorption mode에 의한 combined solid-phase extraction 방법으로 유효성분을 흡착시켰다. 유효성분이 흡착된 resin은 Soxhlet 장치에 넣은 후 methylene chloride와 ethyl acetate(9:1) 혼합용매를 이용하여 유기성분을 추출하여 감압 증발 건조시켰다. 건조시키고 남은 잔사는 최종적으로 100% DMSO에 녹여 사용하였다. 최종 실험계에 적용한 시료수는 100 ml의 최종농도로 시험에 적용되었다. 공시험의 경우에는 증류수를 이용하여 시료 전처리법과 동일한 방법으로 준비하였다.

EROD 활성유도물질의 대표물질인 benzo(a)pyrene과 에스트로겐 작용물질의 대표물질인 17 $\beta$ -estradiol에 대해 회수율 시험을 한 결과 105.5 $\pm$ 9.18 및 98.24 $\pm$ 5.90로 나타나 전처리 시험법이 적합함이 확인되었다. 또한 공시험의 경우에는 EROD 활성 및 E-screen assay에 의해 활성이 유도되지 않았다.

### 3. 세포배양

본 실험에서는 H4IIE(Rat hepatoma cell)와 MCF7-BUS (Human breast cancer cell) cell을 사용하였으며, H4IIE 세포는 American Type Culture Collection으로부터 MCF7-BUS 세포는 미국 Tuft 대학의 Dr. Soto로부터 분양받아 사용하였다.

H4IIE과 MCF7-BUS 세포는 각각 MEM(Eagle's minimum essential medium, Gibco)과 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)에 5% fetal bovine serum(FBS, Hyclone, Logan, UT)을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific, U.S.A.)에서 배양하였다.

### 4. EROD 활성 측정

Ethoxyresorufin-O-deethylase에 의해 ethoxyresorufin이

형광을 띠는 resorufin으로 대사되는 성질을 이용한 EROD 활성 측정은 Burke and Mayer의 방법을 변형시킨 Drenth 등(1998)의 방법으로 하였다.

24-well plate에 세포를  $4 \times 10^5$  cell/ml씩 seeding한 후 80% 정도 잘 때까지 배양한다. 세포가 적절히 성장하였을 때 전처리한 시료를 각 well의 배양액 1 ml당 1  $\mu$ l씩 가하여 vehicle량이 0.1%가 넘지 않도록 처리한 후 48시간 배양하였다. 48시간 배양 후 각 well을 PBS로 2회 세척하고, 5  $\mu$ M dicumarol 및 4  $\mu$ M ethoxyresorufin이 첨가된 배양액을 가하여 37°C에서 30분간 배양하였으며 각 well의 배양액을 분리하여 excitation 530 nm, emission 588 nm에서 형광을 측정하였다.

EROD 활성을 정량적으로 평가하기 위해 양성대조군인 3-methylcholanthrene(3-MC)과의 상대 비교인 MIR(Maximum induction response) 및 MEQ(3-MC equivalent concentration)를 계산하였다. 먼저 MIR은 3-MC의 EROD 활성 최대치인  $10^7$  M에 대한 EROD 활성 값을 100으로 놓고 각 시료의 EROD 활성에 대한 상대치를 구하여 측정 한 시료가 나타낼 수 있는 최대 독성 영향을 간접 추정할 수 있다. MEQ는 시료 중의 EROD 활성 물질량을 3-MC 량으로 환산하여 정량하는 방법으로서 표준물질인 3-MC의 용량반응 곡선의 1차 함수로부터 산정하여 ng(3-MC)/L-시료의 단위로 나타내었다.

### 5. E-screen assay

MCF7-BUS cell을 이용한 E-SCREEN assay는 Perez 등(1998)의 논문에 의해 실험하였다. 계대중인 세포를 0.05% 트립신-0.53 mM EDTA·4Na 용액(Gibco)으로 부착면으로부터 탈리시킨 후에 5% FBS(Fetal bovine serum)가 함유되어 있는 DMEM으로 현탁시켜 24 well plate에 각 well 당 세포수가 10,000 cell이 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 바닥에 부착시켰다. 48시간 정도 세포를 부착시킨 후 배양액은 phenol-red가 없는 DMEM으로 2번 씻은 후 10% CDFBS(Charcoal-dextran fetal bovine serum)가 함유되어 있는 phenol red가 없는 DMEM으로 교체시켜 시험용액을 처리하였다. 144시간 동안 시험물질에 노출시킨 후 SRB(Sulforhodamin B) 방법에 의해 세포 성장을 측정하였다.

에스트로겐 효과를 정량적으로 평가하기 위해 양성대조군인 17 $\beta$ -estradiol과 상대비교를 하였다. 이 방법은 17 $\beta$ -estradiol에 의한 최대 세포증식상태의 세포수에 대한 시험물질의 최대 세포증식상태의 세포수를 백분율로 환산한 세포증식 효과 상대비(relative proliferative effect, RPE)를 구하여 비교하는 것이다. EEQ는 시료 중의 세포증식 물질량을 17 $\beta$ -estradiol량으로 환산하여 정량하는 방법으

로서 표준물질인 17 $\beta$ -estradiol의 용량반응 곡선의 1차 함수로부터 산정하여 ng(17 $\beta$ -E2)/L-시료의 단위로 나타내었다.

## 6. 데이터 분석 및 통계처리

EROD 활성 및 세포독성 값은 모두 평균과 표준편차를 구하여 표시하였다. 본 실험결과와의 구간 유의성 검정은 ANOVA-test를 실시하였으며, 유의적인 차이가 있는 경우에 Duncan test를 통해 유의성을 검증하였다.

## III. 실험 결과

### 1. EROD-microbioassay에 의한 수환경 오염평가

6, 7, 8 및 10월의 금호강 5개 지점의 강물 시료를 5, 10, 50 및 100 ml에 해당하는 물의 양으로 EROD-microbioassay를 실시한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 금창교(KH1), 안심교(KH2), 팔달교(KH3), 금호대교(KH4) 및 세천교(KH5) 모두 용량의존적인으로 대조군에 비해 유의성있는 증가가 나타났다. 최고 EROD 활성이 보이는 농도는 모든 물시료의 50 ml에 해당하는 용량에서 나타났다(Table 1).

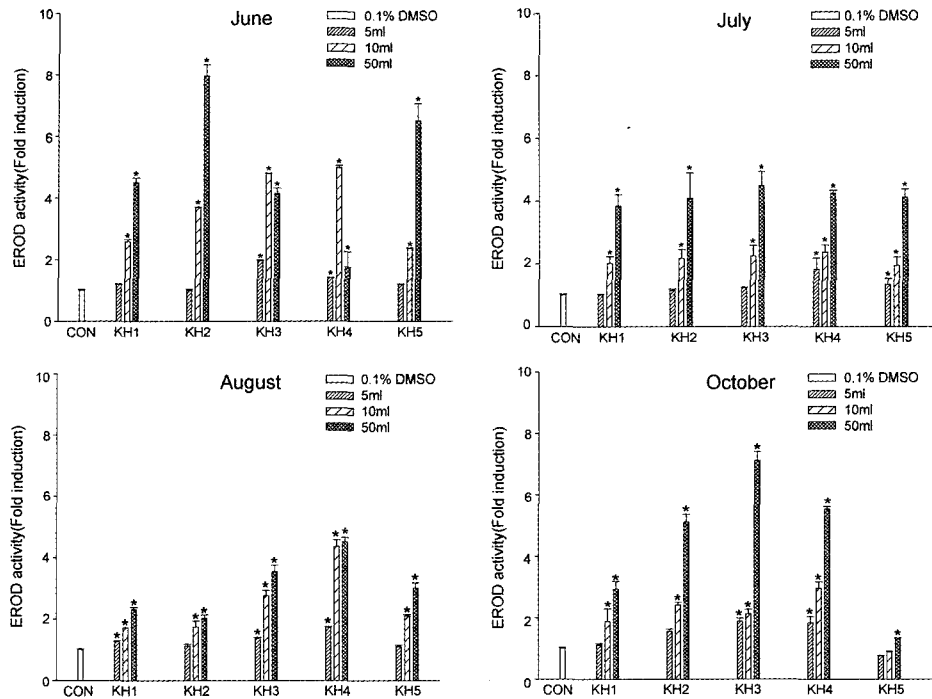
EROD 활성시험에 의한 수환경의 오염도를 평가하기 위한 정량적 방법으로는 EROD 활성의 양성유도물질인 3-MC의 EROD활성에 대한 비교치인 MIR 및 MEQ로 산정하였다.

그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 각 시료에서의 MIR은 1.29%에서 27.23%로 다양하게 나타났으며 MEQ 농도로는 대부분의 금호강 물시료에서 ng/l 농도로 검출되어 ppt 농도의 EROD 활성 물질이 존재하는 것으로 판단되었다.

### 2. E-screen assay에 의한 수환경 오염평가

6, 7, 8 및 10월의 금호강 5개 지점의 강물 시료를 0.1, 1.0, 10, 50 및 100 ml에 해당하는 물의 양으로 E-screen assay를 실험한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 금창교(KH1), 안심교(KH2), 팔달교(KH3), 금호대교(KH4) 및 세천교(KH5) 모두 용량 의존적으로 대조군에 비해 유의성 있는 증가가 나타났다. 최고 활성이 보이는 농도는 각 시료에 따라 10~100 ml로 다양하게 나타났다(Table 2).

E-screen assay에 의한 수환경의 오염도를 정량적으로 평가하기 위해 양성대조물질인 17 $\beta$ -estradiol의 세포증식에 대한 비교치인 RPE 및 EEQ로서 산정하였다. 각 지점의 물시료에 대한 반응성을 정량화한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 RPE는 21.95%에서 89.30%로 partial에서



**Fig. 2.** Concentration-response for EROD activity of Kumho river water by EROD-microbioassay using H4IIE cell line. All the samples were dissolved in DMSO and 1  $\mu$ l of this solution were added to the cell culture medium (1 ml) for treatments, that were done in 24-well plates and lasted 48 hrs. The data represent mean $\pm$ S.D. of three independent experiment. Statistically different from the control group (0.1% DMSO): \*p < 0.05.

**Table 1.** Quantification of CYP1A induction of Kumho river water samples according to the EROD-microbioassay

Sites	Periods	Vol <sup>1)</sup> (ml)	Fold induction	MIR <sup>2)</sup> (%)	MEQ <sup>3)</sup> (ng/l)
KH1	June	50	4.51 $\pm$ 0.15**	13.73 $\pm$ 0.46	13.18 $\pm$ 0.44
	July	50	3.84 $\pm$ 0.37**	11.11 $\pm$ 1.07	11.74 $\pm$ 1.13
	August	50	2.32 $\pm$ 0.07**	5.16 $\pm$ 0.16	8.70 $\pm$ 0.26
	October	50	2.93 $\pm$ 0.25**	7.55 $\pm$ 0.64	9.77 $\pm$ 0.83
KH2	June	50	7.96 $\pm$ 0.37**	27.23 $\pm$ 1.27	25.10 $\pm$ 1.17
	July	50	4.09 $\pm$ 0.82**	12.09 $\pm$ 2.42	12.30 $\pm$ 2.47
	August	50	2.03 $\pm$ 0.31**	4.03 $\pm$ 0.62	8.31 $\pm$ 1.27
	October	50	5.12 $\pm$ 0.25**	16.12 $\pm$ 0.79	14.78 $\pm$ 0.72
KH3	June	10	4.79 $\pm$ 0.02**	14.83 $\pm$ 0.06	68.97 $\pm$ 0.29
	July	50	4.49 $\pm$ 0.46**	13.65 $\pm$ 1.40	13.17 $\pm$ 1.35
	August	50	3.54 $\pm$ 0.22**	9.94 $\pm$ 0.62	10.96 $\pm$ 0.68
	October	50	7.11 $\pm$ 0.29**	23.90 $\pm$ 0.98	21.37 $\pm$ 0.87
KH4	June	10	4.98 $\pm$ 0.07**	15.57 $\pm$ 0.22	72.24 $\pm$ 1.02
	July	50	4.26 $\pm$ 0.09**	12.75 $\pm$ 0.27	12.58 $\pm$ 0.27
	August	50	4.51 $\pm$ 0.14**	13.73 $\pm$ 0.43	13.17 $\pm$ 0.41
	October	50	5.54 $\pm$ 0.08**	17.76 $\pm$ 0.26	16.21 $\pm$ 0.23
KH5	June	50	6.50 $\pm$ 0.57**	21.52 $\pm$ 0.07	19.04 $\pm$ 0.06
	July	50	4.13 $\pm$ 0.26**	12.25 $\pm$ 0.77	12.30 $\pm$ 0.77
	August	50	3.01 $\pm$ 0.17**	7.86 $\pm$ 0.44	9.99 $\pm$ 0.56
	October	50	1.33 $\pm$ 0.01**	1.29 $\pm$ 0.01	7.24 $\pm$ 0.05
3-MC		10 <sup>-7</sup> M	26.56 $\pm$ 0.23**	100.00 $\pm$ 11.48	

Data are presented as mean $\pm$ S.D. and represent three independent experiments of three replicates each.

<sup>1)</sup>Volume : Maximum EROD activity volume of water samples of Kumho river.

<sup>2)</sup>MIR : Maximum induction response.

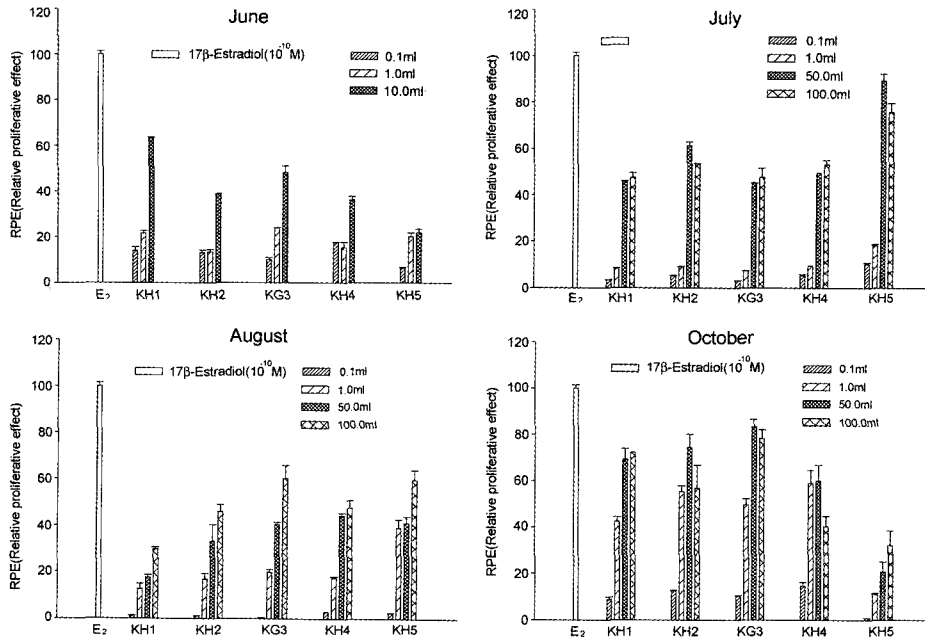
<sup>3)</sup>MEQ : 3-MC equivalent concentration.

Statistically different from the control (0.1% DMSO) : \*\*P < 0.01.

full agonist로 에스트로겐 작용이 다양하게 나타났으며 대부분의 금호강 물시료에는 EEQ값으로 ng/l 농도 즉, ppt 농도의 에스트로겐 작용 물질이 존재하는 것으로 판단되었다.

### 3. 조사지점 및 시기별 오염도

조사기간 동안의 금호강 상류부터 하류까지의 EROD 활성 측정치(MEQ)의 지점별 평균치를 비교한 결과 상류에 비해 하류 지역인 팔달교(KH3) 및 금호대교(KH4) 부근에서 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, EROD활성이 증가하는 경향이 나타나 이들 지점 부근에서 EROD활성 유도물질이 함유된 폐하수의 유입이 많은 것으로 추정되었다(Fig. 4, left). 그러나 estrogen활성 측정치(EEQ)의 경우에는 지점별 차이가 나타나지 않는 특이한 현상을 보였다(Fig. 5, left). 시기별로 MEQ 및 EEQ의 평균치를 구하여 오염도를 비교한 결과 모두 6월 > 10월 > 7월 > 8월 순으로 EROD 활성 및 estrogen 활성이 낮아졌다(Figs. 4, 5, right). 6, 7, 8 및 10월의 월 평균 강우량을 보면 각각 153, 128, 398 및 60 mm/month로써 특히 7월, 8월의 시료 채취일을 전후하여 강우량이 많았던 시기에는 EROD 활성이 저하되었다가 강우량이 감소한 10월에는 다시 활성이 증가되었으므로 월별 변화는 강우량의 변화에 기인한 것으로 판단되었다.



**Fig. 3.** Concentration-response for estrogenic activity of Kumho river water by E-screen assay using MCF7-BUS cell line. All the samples were dissolved in DMSO and 1  $\mu$ l of this solution were added to the cell culture medium (1 ml) for treatments, that were done in 24-well plates and lasted 144 hrs. The data represent mean $\pm$ S.D. of three independent experiment.

**Table 2.** Quantification of estrogenic effect of Kumho river water samples according to the E-screen assay

Sites	Periods	Vol. <sup>1)</sup> (ml)	PE <sup>2)</sup>	RPE <sup>3)</sup> (%)	EEQ <sup>4)</sup> (ng/l)
KH1	June	10	6.04 $\pm$ 1.28**	63.45 $\pm$ 13.40	6.07 $\pm$ 1.28
	July	100	4.79 $\pm$ 0.20**	47.70 $\pm$ 2.00	0.57 $\pm$ 0.02
	August	100	3.36 $\pm$ 0.10**	29.76 $\pm$ 0.85	0.05 $\pm$ 0.00
	October	100	6.73 $\pm$ 0.01**	72.19 $\pm$ 0.10	0.66 $\pm$ 0.00
KH2	June	10	4.08 $\pm$ 0.00**	38.78 $\pm$ 0.02	3.69 $\pm$ 0.00
	July	50	5.87 $\pm$ 0.17**	61.30 $\pm$ 1.76	1.13 $\pm$ 0.03
	August	100	4.65 $\pm$ 0.31**	45.91 $\pm$ 3.04	0.38 $\pm$ 0.03
	October	50	6.90 $\pm$ 0.53**	74.36 $\pm$ 5.73	1.97 $\pm$ 0.15
KH3	June	10	4.83 $\pm$ 0.29**	48.29 $\pm$ 2.86	3.76 $\pm$ 0.22
	July	100	4.79 $\pm$ 0.39**	47.70 $\pm$ 3.91	0.54 $\pm$ 0.04
	August	100	5.75 $\pm$ 0.41**	59.84 $\pm$ 4.26	0.70 $\pm$ 0.05
	October	50	7.61 $\pm$ 0.31**	83.18 $\pm$ 3.34	2.03 $\pm$ 0.08
KH4	June	10	3.88 $\pm$ 0.16**	36.29 $\pm$ 1.53	3.43 $\pm$ 0.14
	July	100	5.23 $\pm$ 0.17**	53.30 $\pm$ 1.70	0.58 $\pm$ 0.02
	August	100	5.79 $\pm$ 0.55**	60.32 $\pm$ 5.69	0.54 $\pm$ 0.05
	October	50	5.77 $\pm$ 0.63**	60.10 $\pm$ 6.55	2.47 $\pm$ 0.27
KH5	June	10	2.74 $\pm$ 0.21**	21.95 $\pm$ 1.65	3.76 $\pm$ 0.28
	July	50	8.09 $\pm$ 0.25**	89.30 $\pm$ 2.80	3.34 $\pm$ 0.10
	August	100	4.78 $\pm$ 0.10**	47.65 $\pm$ 3.23	0.43 $\pm$ 0.03
	October	100	3.55 $\pm$ 0.70**	32.07 $\pm$ 6.32	0.16 $\pm$ 0.03
17 $\beta$ -Estradiol	10 <sup>-10</sup> M		8.94 $\pm$ 0.13**	100.00 $\pm$ 1.44	

Data are presented as mean $\pm$ S.D. and represent three independent experiments of three replicates each.

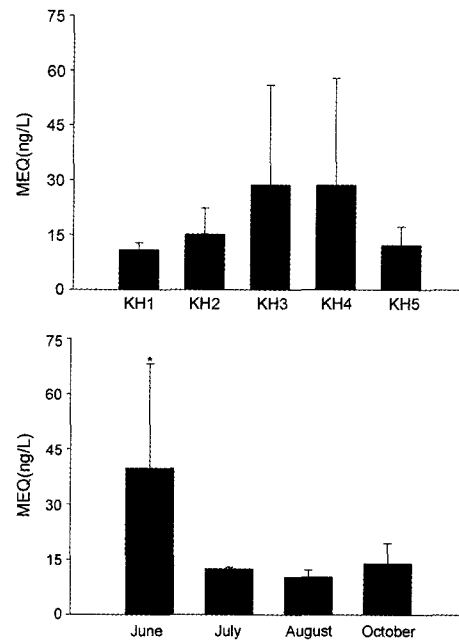
<sup>1)</sup>Volume : Maximum cell proliferative volume of water samples of Kumho river.

<sup>2)</sup>PE : Proliferative Effect.

<sup>3)</sup>RPE : Relative proliferative effect.

<sup>4)</sup>EEQ : 17 $\beta$ -estradiol equivalent concentration.

Statistically different from the control (0.1% DMSO) : \*\*P < 0.01.



**Fig. 4.** Site and period variation of MEQ (3-MC equivalent concentration) in the Kumho river water samples. Statistically different from the groups : \*P < 0.05.

#### IV. 고 찰

기존의 수질환경기준이나 수질오염물질의 배출허용기준 등에 제시된 수환경에 대한 오염도 평가는 생물화학적 산

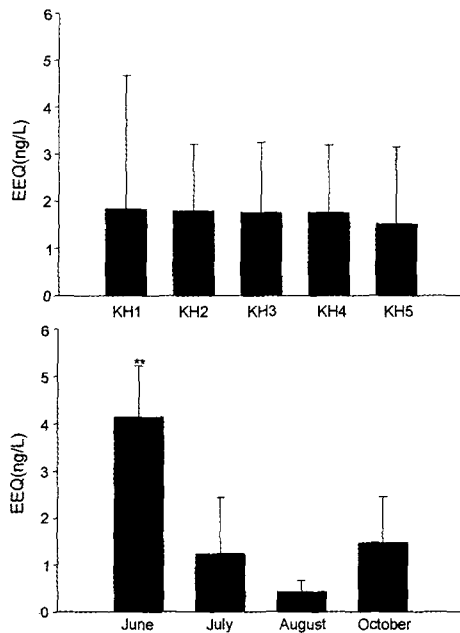


Fig. 5. Site and period variation of EEQ (17 $\beta$ -estradiol equivalent concentration) in the Kumho river water samples. Statistically different from the groups : \*\*P < 0.01.

소 요구량(Biochemical Oxygen Demand), 화학적 산소 요구량(Chemical Oxygen Demand), 부유물질량(Suspended Solid) 등 이화학적 수질 항목으로 구성되어 있다. 그러나, 이러한 평가항목은 실제 생태 환경에 대한 영향을 반영하는 데에는 미흡한 면이 많다. 따라서 이를 보완하고자 하는 시도가 다양하게 이루어지고 있는데 microbioassay를 이용한 생물학적 모니터링은 그 대표적인 예이다(Gelardi 등, 1996; Peakall 및 Walker, 1994; Walker, 1998). 이것은 생물체에 대해 어떤 치명적인 영향이 나타나기 전에 그 효과를 감지할 수 있고, 적은 농도의 오염물질에 의한 만성적인 영향을 평가하는데 유용한 방법으로(Peakall 및 Walker, 1994; Walker, 1998) 노출 초기 단계에 나타나는 무독화 과정에 관여하는 효소나 세포증식의 정도를 감지함으로써 그 노출정도를 간접적으로 나타낼 수 있는 것이다. 본 연구에서는 EROD-microbioassay와 E-screen assay를 이용하여 수환경 중 발암성이나 최기형성을 유발할 수 있는 물질과 내분비계 장애작용이 있는 물질(에스트로겐 작용이 있는 물질)을 검색하고자 하였다.

H4IIE rat hepatoma cell을 이용한 EROD bioassay는 CYP1A 유도물질 즉, PCB, PAH 및 dioxin류 등을 민감하게 검출하는데 주로 이용되고 있다(Gelardi 등, 1996). 또한 대부분 어류에서의 외부물질에 대한 대사 특징과 포유류에서의 대사가 정량적으로 매우 유사함이 연구되어 이러한 민감도가 좋은 포유류 세포에 대한 자료를 생태 독성에 대한 자료로서 간접이용이 가능하다고 할 수 있다

(Andersson 및 Forlin, 1985). 따라서 H4IIE는 다양한 하천시료에 대한 EROD 유도시험을 통해 PCBs, PAHs 및 dioxin류의 오염여부를 간접적으로 측정하여 생태 및 인체 위해성 여부를 판단하는데 적합한 세포주라고 할 수 있다.

MCF7-BUS cell은 특수하게 clone된 세포주으로써 에스트로젠 및 그 유사물질이 아닌 천연 또는 합성 progestagen, glucocorticoid와 mirex, chlordane, heptachlor 등 비에스트로젠 화합물에 의해 영향을 받지 않아 false positive가 나타나지 않으므로 다양한 물질을 함유하고 있는 환경 시료 중 에스트로젠 활성 물질의 복합영향을 평가하기에 적합하다고 보고하고 있다(Soto 등, 1995).

EROD-microbioassay에 의해 금호강에서 채취한 물 시료 추출물의 활성을 측정한 결과 대조군에 비해 유의하게 효소 유도 수준이 증가한 것으로 나타났으며, E-screen assay의 경우에도 시료처리군에서 MCF7-BUS 세포의 증식이 대조군에 비해 유의한 증가를 보이는 것으로 나타났다. 따라서 조사대상 지점의 수역이 발암성 및 내분비계 장애작용을 나타내는 물질로 인해 상당히 오염되어 있음을 추정할 수 있었다. 지점별로는 공단이 밀집되어 있는 팔달교 이후 지점에서 오염이 심해짐을 알 수 있었으며 시기별로는 갈수기에 오염이 심한 상태임을 알 수 있었다.

금호강 유역은 하천 지역을 중심으로 산업공단이 발달되어 하천 오염의 우려가 매우 높다. 특히 주변의 오염시설 및 환경으로부터 유입되는 물질들이 매우 다양하여 이전에 주로 사용했던 이화학적 평가 방법으로는 그 독성 영향에 대한 근본적인 규제가 어렵다.

본 실험결과 세포생화학적 microbioassay에 의해 수환경 오염물질의 독성배양영향을 정량화함으로써 유해화학물질로 인한 수환경 오염을 효과적으로 모니터링할 수 있으며 이들 시험법의 표준화에 의해 수환경의 구체적인 실태조사가 가능하게 될 전망이다.

## V. 결 론

세포배양 생화학적 기법에 의한 수질오염 평가를 확립하기 위해 두 가지의 microbioassay를 이용한 생물학적 모니터링을 금호강을 대상으로 실험하였다. EROD-microbioassay와 E-screen assay는 수환경 중 발암성이나 최기형성을 유발할 수 있는 물질과 내분비계 장애작용이 있는 물질(에스트로겐 작용이 있는 물질)을 검색하는데 유용한 방법으로서 수환경 시료의 분석에 적합하도록 최적화하였다.

EROD-microbioassay를 시행한 결과 대부분의 시료에서 대조군에 비해 유의하게 효소 유도 수준이 증가한 것으로 나타났으며, E-screen assay의 경우에도 MCF7-BUS 세포의 증식이 대조군에 비해 유의한 증가를 보여 발암성 또는 내분비계 장애작용을 나타내는 물질로 상당히 오염되

어 있음을 알 수 있었다. EROD-microbioassay의 결과를 정량화한 MEQ와 E-screen assay를 정량화한 EEQ는 시료의 독성작용을 정량적으로 평가함으로써 기존의 수환경오염 평가 항목으로는 분석하기 어려운 수환경의 환경영향을 bioassay에 의해 분석 및 평가할 수 있어 세포배양 생화학적 기법이 유용한 도구가 될 수 있는 것으로 기대되었다.

### 감사의 말씀

본 연구는 G-7 환경기술 개발사업 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Andersson, T. and Forlin, L. (1985): Many of the Features of Xenobiotic Metabolism in Fish Appear to Be Qualitatively Similarly to the Better Known Systems in Mammals, *Biochemical Pharmacology*, **34**(9), 1407-1413.
- Colborn, T., vom Saal, F. and Soto, A.M. (1993): Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans, *Environ Health Perspect.*, **101**, 378-384.
- Drenth, H.J., Bouwman, C.A., Seinen, W. and van den Berg, M. (1998): Effects of Some Persistent Halogenated Environmental Contaminants on Aromatase (CYP19) Activity in the Human Choriocarcinoma Cell Line JEG-3, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **148**, 50-55.
- Gelardi, A., Federa, R., Ferro, M., Rindone, B., Viganò, L. and Arillo, A. (1996): An "In vitro" Approach To Water Pollution Monitoring, *J. Biol. Res.*, 125-132.
- Hileman, B. (1993): Concerns Broaden over Chlorine and Chlorinated Hydrocarbons, *Chem Eng News*, **71**, 11-20.
- Hileman, B. (1994): Environmental Estrogens Linked to Reproductive Abnormalities, Cancer, *Chem Eng News*, **72**, 19-23.
- Nagel, S.C., Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., Boechler, M. and Welshons, W.V. (1997): Relative Binding Affinity-Serum Modified Access (RBA-SMA) Assay Predicts the Relative in vivo Bioactivity of the Xenoestrogens Bisphenol A and Octylphenol, *Environ Health Perspect.*, **105**, 70-76.
- Nebert, D.W. (1989): The Ah Locus: Genetic Differences in Toxicity, Cancer, Mutation and Birth defects, *CRC Crit Rev Toxicol.*, **20**, 153-174.
- Peakall, D.B. and Walker, C.H. (1994): The Role of Biomarkers in Environmental Risk Assessment, 3 : Vertebrates. *Ecotoxicology*, **3**, 173-179.
- Perez, P., Pulgar, R., Olea-Serrano, F., Villalobos, M., Rivas, A., Metzler, M., Pedraza, V. and Olea, N. (1998): The Estrogenicity of Bisphenol A-Related Diphenylalkanes with Various Substituents at the Central Carbon and the Hydroxy Groups, *Environ Health Perspect.*, **106**(3), 298-305.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N. and Serrano, F.O. (1995): The E-SCREEN Assay as a Tool to Identify Estrogens: An Update on Estrogenic Environmental Pollutants, *Environ Health Perspect.*, **103**(Suppl 7), 113-122.
- Walker, C.H. (1998): Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals, *Environmental Health Perspectives*, **106**(2), 613-620.
- Waller, A.M., Minor, D.L. and McKinney, J.D. (1995): Using Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships to Examine Estrogen Receptor Binding Affinities of Polychlorinated Hydroxybiphenyls, *Environ Health Perspect.*, **103**, 702-707.