Korean J. Ichthyol. 12(3), 173~179, 2000

넙치 *Paralichthys olivaceus* 초대 배양 간세포의 난황 전구물질 합성에 미치는 estradiol-17β와 2,4-D의 영향

여인규 · 최미경* · 이영돈** · 임윤규*** · 허문수 · 이제희 · 송춘복

제주대학교 해양생산과학부, *국립수산진흥원,
**제주대학교 해양연구소, ***제주대학교 수의학과

Effects of Estradiol-17β and 2,4-D on Vitellogenin Synthesis in the Hepatocytes Primary Culture of the Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

In-Kyu Yeo, Mi-Kyung Choe*, Young Don Lee**, Yoon-Kyu Lim***, Moon-Soo Heo, Je Hee Lee and Choon Bok Song

Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea
*National Fisheries Research and Development Institute, Pusan 619-900, Korea
**Marine Research Institute, Cheju National University, Cheju 695-810, Korea
***Dept. of Veterinary Medicine, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

Effects of estradiol-17β (E_2) and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) on vitellogenin (VTG) production were investigated in primary hepatocyte culture of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Highest survival rate of hepatocyte were observed at 27°C, which markedly declined equal to 50% of those of 15°C. Vitellogenin production peaked at the concentration of 10^{-6} M E_2. No effect was observed on VTG production at various concentrations of 2,4-D. However, a low concentration of 2,4-D (ie, 10^{-8} M) only appeared increased VTG production. E_2 or 10^{-8} M 2,4-D-primed VTG production was markedly inhibited by the addition of 10^{-6} M tamoxifen to the culture medium ($P<0.01$). Inhibition was not affected by combinational treatment with 10^{-6} M E_2 and 10^{-6} M 2,4-D. These results from the current investigation suggest that 2,4-D mimics E_2, but the mechanism of reaction in inducing the E_2 receptor are different in VTG production in oliver flounder hepatocytes.

Key words : 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, vitellogenin synthesis, tamoxifen, hepatocyte primary culture, *Paralichthys olivaceus*

서 론

Vitellogenin (VTG)은 난생동물의 난황 전구체로, 여포세포로부터 분비된 estradiol-17β (E_2)의 자극에 의해 간장에서 합성되어 혈액으로 분비된다 (Ng and Ider, 1983; Mommsen and Walsh, 1988). 일반적으로 VTG의 합성은 E_2의 작용에 의한 것으로 알려져 있으나, 최근 환경 오염을 일으키는 화학물질에 의해서도 그 합성이 유발되는 것으로 알려지고 있다. 이에 따라 수 · 해양 동물을

대상으로 환경오염에 대한 biomarker로서 VTG에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Sumputer and Jobling, 1995; Hashimoto *et al.*, 2000).

VTG는 어류의 종에 따라 합성 유도하는 호르몬의 종류가 다양한 것으로 알려져 있다. 무지개송어 *Oncorhynchus mykiss*에 있어서의 VTG 합성은 E_2의 단독 투여만으로 유도되어지지만(여, 1998), 뱀장어 *Anguilla japonica*의 경우에 있어서는 E_2의 단독 투여로는 합성이 이루어지지 않고 growth hormone 또는 prolactin을 동시 투여하여야 만이 합성되는 것으로 알려져 있다(Kwon and Mugiya, 1994). 그리고, 금붕어 *Carassius auratus*와 망둥어 *Gobius niger*에 있어서는 testosterone, methyltestosterone 및 methylandrostenediol과 같은 웅성호르몬에 의해 VTG의 합성이 유도되는 것으로 보고되고 있다(Hori *et al.*, 1979; Le Menn *et al.*, 1980).

더욱이 최근 환경의 오염에 따라 화학합성 물질, 가정 및 산업 폐기물들이 해양으로 유입되어 축적됨으로써 생태계를 파괴시키고 있다. 이러한 오염물질들 중 E_2와 유사한 작용을 하여 내분비계를 교란함으로서 생물의 번식능력을 파괴시키는 물질들을 환경호르몬이라고 한다. 환경호르몬에는 제초제 및 살충제 등의 농약류, 그리고 dioxins, polychlorinated biphenyl 및 bisphenol A 등을 포함하여 100여 종이 넘는 물질들이 포함되어 있다. 그 중 제초제에 포함되어 있는 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D)는 1950년에 농약으로 등록되어 1995년까지 폭넓게 사용되어진 합성 auxin(식물호르몬의 일종)으로, 벼농사 및 밭농사는 물론 과실농사에 이용되어진 물질이다(Short and Colborn, 1999). 또한 저농도의 2, 4-D는 해조류의 성장을 촉진시키는 것으로 알려져 해조류의 배양에도 이용되는 것으로 알려져 있다(Joseph and Chennubhotla, 1999). 랫트에 있어서는 적혈구의 소형화, 혈중 triiodothyronine 및 trtraiodothyronine의 감소, 난소 및 정소 중량의 감소, 간장, 신장 및 갑상선의 비대 등이 보고되고 있다(Charles *et al.*, 1996). 또한 장시간 2, 4-D에 노출된 Leydig세포에서는 steroid 합성이 촉진된 반면, *in vivo*에서의 혈장 testosterone 농도는 감소되었다고 보고되고 있다(Zhavoronkov *et al.*, 1998). Cheney *et al.* (1997)은 담수 패류에 있어서 2, 4-D는 저농도 또는 단기간의 노출에는 E_2와 유사한 대사작용을 나타내었으나, 고농도에서는 오히려 억제하는 것으로 보고하고 있다. 이와 같이 2, 4-D는 내분비를 교란하는 물질인 것으로 알려져 있으나, 어류에 미치는 영향에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다.

그리고, 해양동물의 환경호르몬 연구는 대부분 *in vivo*에 의한 것으로 그 기전을 밝히기에는 불충분한 형편으로, 작용기전의 해명을 위해서는 무엇보다도 *in vitro*의 연구가 수행되어져야 할 것이다. 이에 따라 biomarker로 사용되어지는 VTG의 합성 기관인 간세포의 배양이 필요하지만, 아직까지 뱀장어 및 일부 담수어류를 제외한 어류의 간세포배양은 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 양식어류인 넙치 간세포의 최적 배양조건을 밝히고, E_2의 농도에 따른 VTG의 합성 변화를 조사하였다. 그리고 합성 식물호르몬의 일종인 2, 4-D를 이용하여 *in vitro*에서의 E_2 유사작용에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 간세포의 배양

넙치 *Paralichthys olivaceus*는 2000년 2월에서 6월에 걸쳐 제주대학교 해양연구소에서 사육한 체중 640±24 g인 개체를 사용하였다. 넙치는 0.01% 2-phenoxyethanol로 마취를 시킨 후, 담낭과 함께 간장을 분리하였다. 간문맥에 Ca^{2+}을 첨가하지 않은 관류용 buffer(120 mM NaCl, 1.22 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4.7 mM KCl, 1.25 mM KH_2PO_4, 23 mM $NaHCO_3$, pH 7.4)를 약 10분간 관류하였다(5~8 ml/min.). 그 후 0.3 mg/ml collagenase (Sigma) 및 0.98 mg/ml 소 혈청 알부민(Sigma)을 포함한 관류용 buffer에 약 20분간(5~8 ml/min.), 그리고 2 mM EDTA를 첨가하여 Ca^{2+} 및 Mg^{2+}을 제거한 관류용 buffer에 약 10분간 각각 관류하였다. 관류 후 간장은 100 ml 비이커에 넣어 Ca^{2+}-free 관류용 buffer로 3회 세척한 후, 50 ml의 관류용 buffer 내에서 해부가위로 잘게 분산시켰다. 분산된 간세포는 피펫으로 더욱 분리하여 가제로 여과시킨 후에 원심분리(700 rpm, 2분)를 3회 반복하여 간실질세포 이외의 성분(비실질세포, 파열 세포, 세포의 파편 및 적혈구 등)을 제거하였다.

간세포는 양전하를 처리한 250 ml T/C 플라스크(Falcon)당 2×10^{-6}개의 세포 밀도로 배양하였다. 배양에는 0.2 μM Bovine insulin (Sigma), Streptomycin (100 μg/ml), Penicillin (70 μg/ml) 및 $NaHCO_3$ (23 mM)을 첨가한 William's medium (Life Technol. Inc.)을 이용하였다. 간세포는 배양액 20 ml를 첨가하여 배양하였다. 사전 배양은 3일간 행하고, 배양액은 3일 간격으로 교환하였다. 배양온도는 15~30°C의 범위에서 2.5°C 간격으로 7구간을 설정하여 최적 온도를 조사하였다.

2. 배양세포의 생존율

배양세포의 생존율 파악을 위해 실험 종료 후 0.03%

EDTA를 포함한 인산 buffer (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.09 mM Na_2HPO_4, 1.47 mM KH_2PO_4)를 첨가해 진동시켜 배양접시로부터 배양세포를 분리시켰다. 0.05 % crystal violet이 포함된 0.1 M citric acid로 분리된 배양세포를 2시간 동안 염색하였고, 생존한 세포 수는 Thomas 혈구계산판을 이용하여 계산하였다.

3. E_2 및 2,4-D의 농도 변화에 따른 VTG 합성

E_2 (Sigma) 및 2,4-D (Dr. Ethrenstofer GmbH)는 95% 에탄올로 용해한 후, 3일간의 사전 배양 후에 10^{-8}M~10^{-5}M의 농도를 첨가하여 실험을 행하였다. 배양액은 E_2 첨가 0, 3, 6 및 9일째를 회수하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리를 하였다. 그리고, 2,4-D의 작용기전에 대하여 조사하기 위하여 6일 동안 E_2 및 2,4-D에 의해 VTG의 합성을 유도한 후 E_2 길항제로 알려진 tamoxifen (Sigma) 10^{-5} M을 첨가하였다. 단백질 분석을 위해 Laemmli (1970)의 방법에 따라 7.5% SDS-PAGE로 분리하여, coomassie brilliant blue R-250으로 40분간 염색하였다. 넙치 VTG의 판별은 SDS-PAGE 후 성성숙기에 나타나는 암컷 혈청 특이 단백질인 분자량 175 kDa의 결과에 따랐다.

4. 통계분석

실험 결과는 Student's t-test 또는 One-way ANOVA를 실시하여 Fisher's PLSD-test를 행하였으며, 통계적 유의성은 $P<0.01$로 판단하였다. 퍼센트 결과는 우선 arcsine의 수치로 전환 후 통계 분석을 하였다.

결 과

1. 배양세포의 생존율

넙치의 간세포는 collagenase에 의해 한 마리 당 8.5 × 10^8개의 간세포가 분리되었으며, 그때의 생존율은 90% 이상으로 나타났다. Fig. 1은 15~30°C의 7구간의 실험군에 대한 배양 간세포의 생존율을 나타낸 것이다. 넙치의 배양 간세포는 27.5°C에서 배양 후 4일 및 8일에 각각 14.9% 및 17.9%로 감소하여 가장 높은 생존율을 나타내었다. 그러나, 20~27.5°C에서의 배양조건에서는 유의한 차이는 나타나지 않았다. 17.5°C에 있어서는 생존율이 가장 높은 27.5°C 실험군에 비해 유의하게 낮은 생존율을 나타내었다 ($P<0.05$). 특히, 15°C의 저온에서는 배양 후 4일 및 8일에 각각 39.6% 및 47.6%로 급격히 생존율이 감소하였으며, 생존 세포에 있어서도 간세포배양에서 나타나는 작은 세포 덩어리를 형성하지

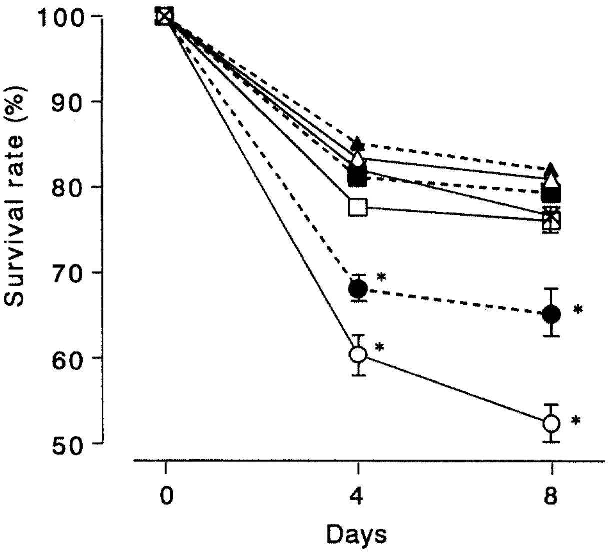

Fig. 1. Effect of temperature on the survival rate in primary culture of oliver flounder hepatocytes for 8 days. Vertical bars represent the average (mean ± SE) percentage of five experiments. $*P<0.01$ for 27.5°C. (—○—, 15°C; —●—, 17.5°C; —□—, 20°C; —■—, 22.5°C; —△—, 25°C; —▲—, 27.5°C; —×—, 30°C)

못하였다.

2. E_2 및 2,4-D의 농도변화에 따른 VTG 합성

E_2 10^{-8}M~10^{-5}M의 농도를 첨가하여 합성된 VTG의 SDS-PAGE 결과는 Fig. 2와 같다. 합성 단백질은 배양액에 E_2를 첨가한 후 3일 간격으로 2회 교환하였으며, 분석은 6일째의 배양액을 회수하여 실시하였다. 그 결과, VTG의 밴드는 E_2 농도의 증가에 따라 염색성이 높아져 10^{-6}M에서 가장 진하게 나타났다. 반면, 10^{-5}M의 최고농도에서는 오히려 염색강도가 다소 약해지는 결과를 나타내었다. 이때의 optical density를 비교해 보면, 10^{-8}M, 10^{-7}M 및 10^{-6}M에서 각각 0.08, 0.14 및 0.26의 수치를 나타내었다 (Fig. 3). 본 실험에서 사용한 가장 고농도인 E_2 10^{-5}M에서는 VTG 합성이 급격히 감소하여 0.10의 수치를 나타내었다. 그리고 E_2를 첨가하지 않은 대조군에 비해 E_2를 첨가한 모든 실험군에 있어 VTG의 양이 유의하게 높은 수치를 나타내었다 ($P<0.01$). 이러한 결과로 보아, 넙치의 간세포 배양을 이용한 VTG의 합성에는 E_2 10^{-6}M 전후가 가장 적합한 것으로 여겨진다.

2,4-D는 10^{-8}M~10^{-5}M의 농도를 사용하였으며, 배양액은 3일 간격으로 교환하여 배양 후 0일째와 6일째의 합성 단백질의 SDS-PAGE상을 나타내었다 (Fig. 4). 2,4-D의 첨가에 따른 배양 간세포의 생존율은 E_2를 첨

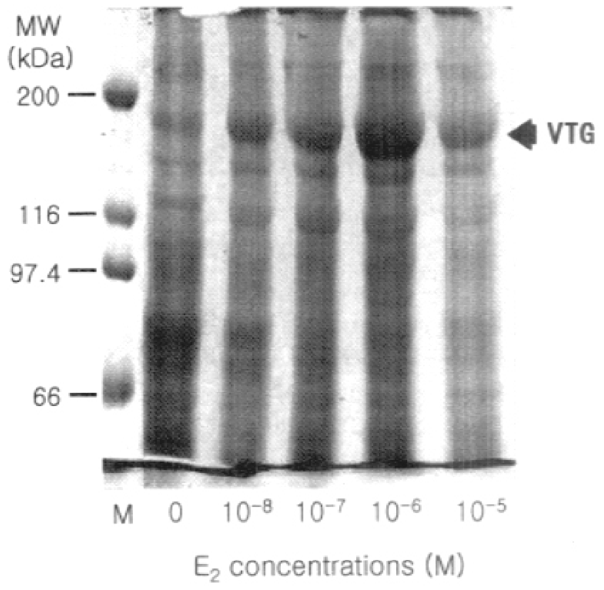

Fig. 2. SDS-PAGE showing the effect of various concentrations of E_2 in the oliver flounder hepatocyte culture on the induction of VTG (arrow). Spent media were analyzed on day 6 after E_2 addition. M: molecular weight (MW) marker. CBB stain.

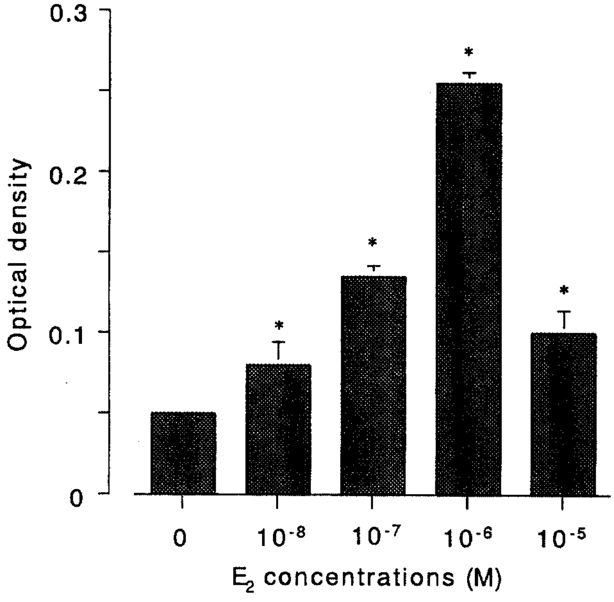

Fig. 3. Effects of various concentrations of E_2 on VTG production in primary cultures of oliver flounder hepatocytes. Spent media were analyzed on day 6 after E_2 addition. Vertical bars represent the average (mean±SE) of three experiments. *$P<0.01$ for E_2-free culture.

가하지 않은 대조군과 동일한 수치를 나타내었다. 3일간 사전배양을 한 배양 간세포에서는 VTG의 합성이 이루

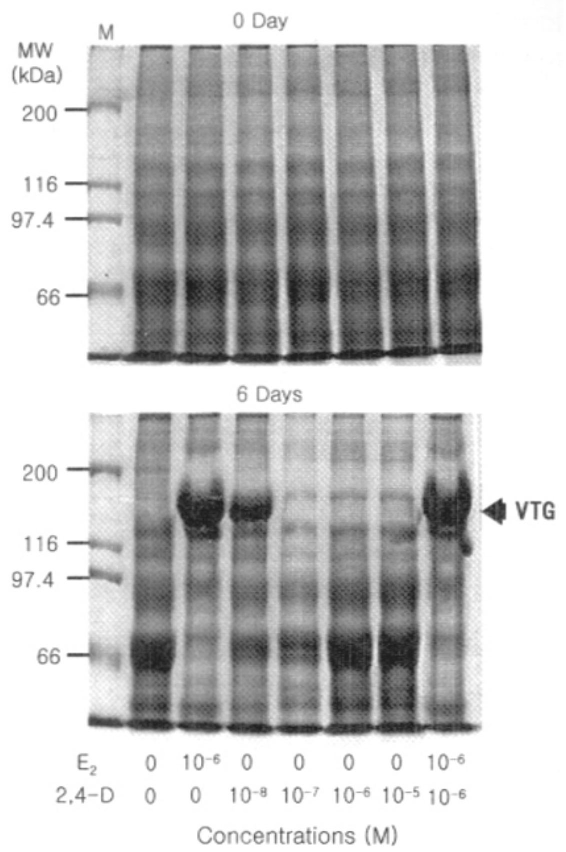

Fig. 4. SDS-PAGE showing the effect of various concentrations of on the induction VTG (arrow) in the oliver flounder hepatocyte cultures. Spent media were analyzed on day 0 (upper) and day 6 (lower) after 2, 4-D addition. M: molecular weight (MW) marker. CBB stain.

어지지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4). 여기에 E_2를 첨가함에 따라 VTG의 합성이 이루어져 175 kDa 부근에 강한 염색성을 가진 VTG의 밴드가 나타났다. 2, 4-D의 첨가에 있어서는 10^{-8} M의 저농도의 첨가에 있어서는 VTG의 합성이 나타났으나, 그 보다 높은 10^{-7}, 10^{-6} 및 10^{-5} M의 농도에서는 오히려 VTG의 합성은 전혀 나타나지 않았다. 그리고, E_2 10^{-6} M과 2, 4-D 10^{-6} M을 동시에 첨가한 실험군에서는 VTG의 합성이 강하게 나타났다. 총 단백질에 대한 VTG의 합성양은 E_2의 첨가에 의해 30.1±2.3%의 수치를 나타내었으며, 2, 4-D 10^{-8}M의 첨가에 의해서는 18.4±1.8%의 수치를 나타내었다(Fig. 5). 그리고, E_2와 동시에 10^{-6} M의 2, 4-D를 첨가한 실험군에서는 VTG의 합성양이 30.2±2.3%를 나타내어 E_2를 단독으로 첨가한 실험군과 유의한 차이를 나타내지

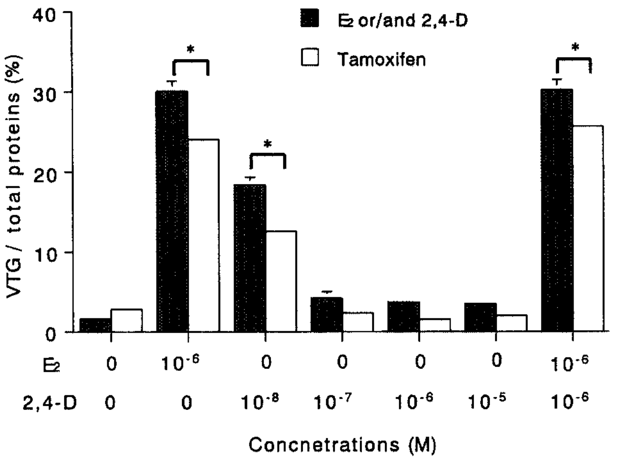

Fig. 5. Effects of tamoxifen (10^{-6} M) on the production of VTG in the oliver flounder hepatocyte cultures stimulated by E_2 and 2, 4-D for 6 days. Hepatocytes were primed for VTG production by incubating with E_2 or/and 2, 4-D for 6 days and then tamoxifen was added. The activity of VTG production was estimated for the relative optical density of VTG to total proteins after SDS-PAGE. Vertical bars represent the average (mean±SE) of three experiments. $^*P<0.01$.

않았다. Tamoxifen은 E_2 수용체(ER)와의 결합에 대해 길항작용을 가진 길항제로 알려져 있다(Jobling and Sumpter, 1993). 본 연구에서는 E_2 또는 2, 4-D의 첨가에 의해 합성된 VTG는 tamoxifen의 첨가에 의해서 VTG 합성이 유의하게 억제되었다($P<0.01$) (Fig. 5).

고 찰

간세포의 배양은 포유류의 독성시험에 널리 사용되고 있으며(Inoue *et al.*, 1989; Guyomard *et al.*, 1990), 난생동물인 조류, 양서류 등에서도 스테로이드 호르몬의 작용에 관한 연구를 위해 폭넓게 이용되고 있다(Kawahara *et al.*, 1987; Liang and Jost, 1991). 어류에 있어서의 간세포 배양은 뱀장어, 무지개송어를 대상으로 이루어져 왔으나(Peyon *et al.*, 1993; 여, 1998), 포유류의 세포배양에 비해 세포의 부착 및 성장에 있어 미흡한 점이 많다. 특히, 본 연구에서 사용된 넙치와 같은 해산어류를 대상으로 한 간세포 배양에 관한 연구는 전무한 상태이다. 어류는 그 종에 따라 서식 환경, 특히 적정수온이 다름으로 인해 간세포배양에 이용되는 콜라겐 가수분해효소(collagenase)의 작용과 세포에 적합한 온도 설정에 관한 면밀한 사전연구가 이루어져야 한다. 본 연구의 15~30°C 배양 범위에서 간세포를 배양한 결과, 27.5°C의 배양온도에서 간세포가 가장 높은 생존율을 나타내었고, 배양 간세포의 생존율은 17.5°C 이하에서 급격히 낮아지는 경향을 나타내었다. 일반적으로 넙치의 산란기 수온은 11~23°C로 알려져 있으므로(국립수산진흥원, 1987), VTG의 합성을 위한 간세포 배양 적정온도는 27.5°C에서의 생존율과 유의한 차이를 나타내지 않은 20~25°C의 범위가 적합한 것으로 여겨진다.

최근 생물의 내분비계를 교란하여 종의 번식에 악영향을 미치는 것으로 알려진 환경호르몬의 연구는 주로 VTG를 biomarker로써 사용하여 진행되고 있다(Sumputer and Jobling, 1995; Hashimoto *et al.*, 2000). 그러나, 그 대부분이 *in vivo*의 연구로는 실제적인 작용기전을 파악하거나, 환경호르몬의 생체내 작용농도를 기준으로 설정하기에는 어려운 점이 많다. 이에 본 연구에서는 넙치의 간세포를 배양하여 제초제에 포함되어 있는 2, 4-D에 의한 VTG의 합성 및 분비에 대한 영향을 관찰하였다. 2, 4-D는 세포막에 손상을 가하여 세포로부터 아미노산의 대사산물을 방출시키는 것으로 보고되고 있다(Cheney and Swinehart, 1984). 따라서 본 연구에서도 간세포의 배양에 있어 2, 4-D에 의한 세포막 손상을 통한 간세포의 생존율이 낮아질 것으로 예상을 하였으나, 2, 4-D 10^{-8}~10^{-5} M의 농도에서는 E_2 첨가구와 생존율에 있어서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 배양기간이 12일인 점을 감안할 때, 2, 4-D에 대한 세포막의 손상 등에 대해서는 조직학적인 연구가 보충되어져야 할 것으로 여겨진다.

2, 4-D의 내분비계 작용은 저농도 또는 단기간의 노출에는 E_2와 유사한 작용을 나타내지만, 고농도에서는 오히려 그 작용이 억제되는 것으로 보고되고 있다(Cheney *et al.*, 1997). 본 연구에서 VTG는 10^{-6} M 농도의 E_2를 첨가한 실험군에 비해 유의하게 낮은 수치이긴 하였으나, 10^{-8} M의 2, 4-D를 단독으로 첨가한 실험군에서 합성이 이루어졌다. 그러나, 고농도에서는 VTG의 합성은 거의 이루어지지 않았으며, 이것은 E_2를 첨가하지 않은 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그리고 ER과의 결합을 저해하는 것으로 알려진 tamoxifen의 첨가에 의해 VTG의 합성이 저해되는 것으로 나타나, 2, 4-D는 E_2와 유사한 작용을 통해 VTG 합성을 유도하는 것으로 추정된다. 그러나, 2, 4-D의 VTG 합성 작용이 E_2와 동일한 작용에 의한 것일 경우, E_2와 2, 4-D의 동시 투여는 VTG합성을 저해할 것으로 추측되어졌으나, VTG합성의 억제효과는 나타나지 않았다. 이러한 점은 2, 4-D의 작용이 VTG의 합성을 유도하기는 하지만, E_2의 작용과는 다소 다를 것으로 여겨진다.

간세포에서의 ER은 ERα 및 ERβ가 각각 존재하며,

일반적으로, E_2의 경우에는 ERα 및 ERβ를 균등한 비율로 결합하는 것으로 알려져 있다(Ikeuchi *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 1999). 그러나, nonylphenol은 ERα에 비해 ERβ에 많은 결합을 하며(Kuiper *et al.*, 1998), E_2가 ER과의 결합을 저해한다고 보고되고 있다(Lutz and Kloas, 1999). 2,4-D의 경우는 어떠한 ER과 어떠한 비율로 결합을 하는가에 대해서는 아직 불명확하다. 본 연구에서 2,4-D의 10^{-8}M의 단독 농도에서의 VTG합성 분비와 E_2와 2,4-D의 동시 첨가에서도 VTG합성 억제효과가 나타나지 않는 것은, 이러한 수용체와의 결합양식의 차이에 의해 E_2의 작용과는 다소 다른 작용경로를 통한 기전이 존재하는 것으로 추정되어진다.

한편, 2,4-D는 다이옥신을 불순물로 포함하고 있는 것으로 알려져 있다(田中, 1998). 다이옥신은 방향족 탄화수소 수용체에 결합하여 내분비계에 영향을 미치며(Hankinson, 1995), cytochrome P450을 유도하는 것으로 여겨지고 있다(Heimler *et al.*, 1998). 따라서 2,4-D에 의한 VTG의 합성은 ER과는 별도의 세포내 효소작용을 경유한 합성 및 분비 유도의 가능성도 내포하고 있는 것으로 여겨진다. 이러한 부분의 해명을 위해 ER, VTG 유전자 및 cytochrome P450에 대한 자세한 연구가 이루어져야 할 것이다.

이상의 결과에서와 같이, 넙치의 배양 간세포에 있어서의 VTG합성은 E_2를 10^{-6}M 농도로 처리하였을 때 최대치를 나타낸다는 것이 밝혀졌다. 그리고, 2,4-D의 첨가에 있어서는 저농도인 10^{-8}M에서 E_2와 유사한 작용을 가진다는 것이 밝혀졌다. 그러나, 고농도에서는 VTG의 합성이 전혀 이루어지지 않는 점 등을 고려할 때, 2,4-D와 ER과의 관련에 대한 보다 세부적인 연구가 필요한 것으로 여겨진다.

적 요

Estradiol-17β(E_2)와 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)가 난황 전구물질의 합성에 미치는 영향을 넙치 Paralichthys olivaceus 간세포의 초대 배양을 통하여 조사하였다. 배양간세포의 생존율은 배양온도 27°C에서 가장 높게 나타났으며, 15°C에서는 생존율이 급격히 감소하여 약 50%의 생존율을 나타내었다. E_2에 의한 VTG의 합성은 10^{-6}M에서 최대치를 나타내었다. 2,4-D 10^{-7}~10^{-5}M의 첨가에 의해 VTG의 합성은 이루어지지 않았다. 그러나, 저농도인 10^{-8}M에서는 VTG의 합성이 증가하였다. E_2 및 2,4-D에 의해 합성된 VTG는 10^{-6}M tamoxifen의 첨가에 의해 유의하게 억제되었다($P<0.01$). 본 연구 결과에서 E_2와 2,4-D의 동시 첨가는 VTG의 합성을 억제하지 않았다. 이러한 결과는 2,4-D의 작용이 E_2와 유사한 작용을 가지지만, VTG의 합성에 있어서 E_2 수용체에의 작용 양식은 서로 다른 것으로 추정된다.

사 사

본 연구는 1999년 5월~2000년 4월에 실시된 제주대학교 해양연구소 발전기금 연구과제로 수행되었음.

인 용 문 헌

Charles, J.M., H.C. Cunny, R.D. Wilson and J.S. Bus. 1996. Comparative subchronic studies in 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, amine, and ester in rats. Fund. Appl. Toxicol., 33 : 161~165.

Cheney, M.A. and J.H. Swinehart. 1984. The effects of acid waters on the loss of divalent cations and primary amines from membranes. Comp. Biochem. Physiol., 77A : 327~330.

Cheney, M.A., R. Fiorillo and R.S. Criddle. 1997. Herbicide and estrogen effects on the metabolic activity of *Rlliptio complanata* measured by calorespirometry. Comp. Biochem. Physiol., 118C : 159~164.

Guyomard, C., C. Chesne, B. Meunier, A. Fautrel, C. Clerc, F. Morel, M. Rissel, J.P. Campoin and A. Guillouzo. 1990. Primary culture of adult rat hepatocytes after 48-hour preservation of the liver with cold UW solution. Hepatology, 12 : 1329~1336.

Hankinson, O. 1995. The aryl hydrocarbon receptor complex. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 35 : 307~340.

Hashimoto, S., H. Bessho, A. Hara, M. Nakamura, T. Iguchi and K. Fujita. 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo bay, Japan. Mar. Environ. Res., 49 : 37~53.

Heimler, I., R.G. Rawlins, H. Owen and R.J. Hutz. 1998. Dioxin perturbs, in a dose- and time-dependent fashion, steroid secretion, and induces apoptosis of human luteinized granulosa cells. Endocrinology, 139 : 4373~4379.

Hori, S.H., T. Kodama and K. Tanahashi. 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. Gen. Comp. Endocrinol., 37 : 306~320.

Ikeuchi, T., T. Todo, T. Kobayashi and Y. Nagahama. 1999. cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype. J. Biol. Chem., 274 : 25205~25209.

Inoue, C., H. Yamamoto, T. Nakamura, A. Ichihara and H. Okamoto. 1989. Nicotinamide prolongs survival of pri-

mary cultured hepatocytes without involving loss of hepatocyte-specific functions. J. Biol. Chem. 264 : 4747 ~ 4750.

Jobling, S. and J. Sumpter. 1993. Detergent components in sewage effluent are wealky oestrogenic to fish: an *in vitro* study rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Aquat. Toxicol., 27 : 361 ~ 372.

Joseph, I. and V.S.K. Chennubhotla. 1999. Gibberellic acid and 2, 4-D as regulators in laboratory culture of seaweeds. Indian J. Mar. Sci., 28 : 66 ~ 69.

Kawahara, A., S. Kohara, Y. Sugimoto and M. Amano. 1987. A chage of the hepatocyte population is responsible for the progressive increase of vitellogenin synthetic capacity at and after metamorphosis of *Xenopus laevis*. Dev. Biol., 122 : 139 ~ 145.

Kuiper, G.J.M., J.G. Lemmen, B. Carlsson, J.C. Corton, S.H. Safe, T. Van Der Saag, B. Van Der Burg and J.A. Gustafsson. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptorβ. Endocrinology, 139 : 4252 ~ 4263.

Kwon, H.C. and Y. Mugiya. 1994. Involvement of growth hormone and prolactin in the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the eel, *Anguilla japonica*. Gen. Comp. Endocrinol., 93 : 51 ~ 60.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bateriophage T_4. Nature, 227 : 680 ~ 685.

Le Menn, F., H. Rochefort and M. Garcia. 1980. Effect of androgen mediated by estrogen receptor of fish liver: Vitellogenin accumulation. Steriods, 35 : 315 ~ 328.

Liang, H. and J.P. Jost. 1991. An estrogen-dependent polysomal protein binds to the 5′ untranslated region of the chicken vitellogenin mRNA. Nucleic Acids Res., 19 : 2289 ~ 2294.

Lutz, I. and W. Kloas. 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: 1. Environmental pollution and estrogen receptor binding. Sci. Total Environ., 225 : 49 ~ 57.

Mommsen, T.P. and P.J. Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Hoar W.S. and Randall D.J. (eds.), Fish Physiology. Vol. XIA, Academic Press, San Diego, pp. 347 ~ 406.

Ng, T.B. and D.R. Ider. 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In: Hoar W.S., Randall D.J. and Donaldson E.M. (eds.), Fish Physiology. Vol. IX, Academic Press, San Diego, pp. 379 ~ 404.

Peyon, P., S. Baloche and E.B. Gerard. 1993. Synthesis of vitellogenin by eel (*Angulla angulla* L.) hepatocytes in primary culture: Requirement of 17β-estradiol priming. Gen. Comp. Endocrinol., 91 : 318 ~ 329.

Short, P. and T. Colborn. 1999. Pesticide use in the US and policy implications: A focus on herbicides. Toxicol. Ind. Health, 15 : 240 ~ 275.

Sumputer, J.P. and S. Jobling. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic enviroment. Eviron. Health Perspect., 103 : 173 ~ 178.

Xia, Z., R. Patino, W.L. Gale, A.G. Maule and L.D. Densmore. 1999. Cloning, in vitro expression, and novel phylogenetic classification of a channel catfish estrogen receptor. Gen. Comp. Endocrinol., 113 : 360 ~ 368.

Zhavoronkov, A.A., L.N. Malysheva, S.N. Galimov, F.K. Kamilov and E.G. Davletov. 1998. Morphofunctional description of white rat gonads exposed to the herbicide 2, 4-D containing dioxin. Arkhiv-Patologii, 60: 51 ~ 53.

국립수산진흥원. 1987. 어류양식(넙치). 수산기술지 22. 예문사, 부산, 64 pp.

여인규. 1998. 무지개송어의 간세포 초대배양에 의한 Vitellogenin 합성 유도. 한국양식학회지, 11 : 557 ~ 564.

田中勝. 1998. 環境ホルモン&ダイオキシン. 化學同人, 東京, pp. 130 ~ 141.

Received : June 29, 2000
Accetped : August 19, 2000