KOR. J. ENVIRON. TOXICOL.
Vol. 16, No. 1, 21~28 (2001)

17β-estradiol 처리에 따른 해산 어류의 vitellogenin 생성

황 인 영, 박 정 규*, 이 은 경

인제대학교 자연과학대학 환경시스템학부, *한국환경정책·평가연구원

Vitellogenin Production of Marine Fishes Exposed to E2

In-Young Hwang, Jeong-Gue Park* and Eun-Kyoung Lee

*School of Environmental Science Engineering, INJE University, *Korea Environment Institute*

ABSTRACT

A common used endpoint in bioassays testing the estrogenicity of chemicals including endocrine disruptors is the induction of egg yolk precursor vitellogenin in male fish. Two marine fishes (*Sebastes schlegeli* and *Paralichthys olivaceus*) were exposed to the 17β-estradiol (E2) to determine the vitellogenin production. Vitellogenin was measured in fish blood using SDS-PAGE and Densimetry. Results showed that exposure to E2 caused vitellogenin in male fish. Especially, vitellogenin levels in young fish were about 4 times higher than in adult fish, which means young fish are more sensitive to E2 exposure. And plasma vitellogenin in fish increased related to E2 concentration and exposure duration.

Key words : 17β-estradiol, vitellogenin, endocrine disruptors, biomarker

서 론

내분비계 장애물질은 인체나 생태계의 생물들에게 호르몬 분비의 불균형, 생식능력 저하 또는 생식기관의 기형 발생, 성장 저해, 암 유발, 그리고 면역 기능의 저해 등의 효과를 나타내는 것으로 추정되는 화학물질들을 뜻한다 (국립환경연구원 내분비계 장애물질의 정의). 내분비계 장애물질의 일반적 특성은 첫째, 생체 호르몬과는 달리 생체 또는 환경 매체 내에서 분해 속도가 매우 느리고, 둘째, 물질이 유입된 환경 매체 내에 장기간 지속하여 존재하며, 셋째, 인체나 생체의 지방층에 농축되는 성질을 갖고 있는 점이다. 현재까지 알려진 내분비계 장애물질들은 크게 산업용 화학물질, 농약류, 환경오염물질, 식물성 물질, 산업 폐기물질 등으로 구분된다 (NIER).

지난 수 십년간 내분비계 장애물질이 인간의 건강과 생태계내 생물을 위협한다는 많은 증거들이 밝혀지고 있으며, 이는 생물체들이 이들 물질에 노출되었을 때 내분비계 장애효과가 발생되었는지를 판단하는 지표에 의해 확인되고 있다. 특히 어류에 대한 내분비계 장애효과는 주로 혈장내 성호르몬, 총 체중에 대한 정소(精巢)의 중량비인 성성숙도지수 (Gonadosomatic Index, GSI), 정소의 성숙 여부, 암수 성비 (性比), 혈중 vitellogenin (비텔로게닌, 이하 VTG) 농도 등의 다양한 생물지표 (biomarkers)에 의해 결정된다 (Kendall *et al.*, 1998).

이 중 VTG는 야생 조류 (avian), 또는 양서류 (amphibian) 등 산란성 척추동물의 난황 전구체이며 성숙한 암컷에서 생식 시기에 분비되는 에스트로겐 호르몬에 의해 간에서 합성되는 단백질이

다. 간에서 만들어진 VTG는 혈관을 따라 분화중인 난소에 들어가 난황형성 과정에 관여하므로, VTG의 혈장 농도는 연중 vitellogenesis기간 동안에 가장 높은 수준을 유지한다 (Kime, 1998). VTG 형성에 관여하는 호르몬인 에스트로겐은 자연상태의 수컷이나 어린 물고기에서는 분비되지 않아 이들의 간에서 VTG가 생성되지 않지만, 에스트로겐 또는 에스트로겐 유사 물질에 노출시킨 수컷 또는 어린 물고기에서는 VTG가 간에서 합성된다. VTG는 이런 생식학적 배경으로 에스트로겐 유사물질, 즉 내분비계 장애물질에 의한 환경오염을 측정할 수 있는 주요 생물지표로 이용되고 있다.

따라서 많은 연구자들이 생물지표로써의 VTG를 실제 현장실험에 적용하여 환경오염도 수준을 판정하고 있다. 그 실례로 McArdle는 미국 뉴욕주-뉴저지주 항구의 토양에 잔류하고 있는 에스트로겐 유사물질을 추출하여 수컷 *Fundulus heteroclitus*에 직접 주사한 결과 VTG이 생성됨을 확인하였다 (McArdle, 1999). 또한 산업 쓰레기와 가정 쓰레기에 의해 피해를 입고 있는 대표적 지역인 미국 Hamilton Harbour의 환경오염도 조사시에는 생물지사자 (biomarker)로서 VTG이 사용되었다. 자연 에스트로겐과 alkylphenol 그리고 그 분해산물을 포함한 쓰레기 처리 공장 배출수가 나오는 지역인 Hamilton Harbour와 Ontario호수의 여섯 장소에 각각 무지개 송어를 노출시킨 결과 Hamilton Harbour에 노출시킨 물고기에서 VTG가 생성되는 것이 확인되었다. 즉, 수컷의 혈중 VTG는 에스트로겐 유사 물질이 해당 생물로 흡수되어 생물학적 효과를 나타내고 있는 생물지시자로 유용하게 활용되고 있다.

이와 같이 VTG에 대한 환경 독성학적 관심이 늘어나면서 VTG를 정량 분석하는 방법이 다양하게 개발되었다. 초기 분석방법으로 혈청에서의 VTG 농도는 고농도의 phosphoprotein phosphorus와 calcium에 의존하여 측정하였다 (Janssen and Lambert, 1997). 최근에는 주로 항체를 이용하는 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 방법이 사용되고 있는데, 이는 VTG나 난황단백질로 쥐나 토끼에서 다량 만들어진 polyclonal antibodies (현재는 monoclonal antibodies)를 이용해서 물고기 VTG에 대해 immunoassay를 실시하는 방법이다 (Benfey *et al.*, 1989; Tyler and Sumpter 1990). VTG에 대한 항체를 만들어 ELISA방법을 이용하기 전에 쉽게 VTG를 확인하는 방법으로는 SDS-PAGE상에서 혈청 단백질의 형태를 보고 VTG 밴드를 확인하는 방법이 있다. 이 방법은 항체가 없어도 가능하므로 ELISA방법을 사용하기 전 VTG를 사전에 확인하는 방법으로 이용될 수 있을 것이다. 게다가 SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리한 단백질에서 VTG 단백질만을 Densitometry를 이용해 표준 단백질 값과 비교하여 정량할 수 있다는 장점이 있다.

따라서 본 연구에서는 어류에서의 주요 생물지표로 널리 활용되고 있는 VTG의 생성을 확인하기 위하여, 국내의 대표적인 양식어종인 조피볼락과 넙치를 선정하여 암수 모두에게 에스트로겐 유사물질인 17β-estradiol (이하 E2)을 처리한 후 그 결과를 관측하였다. VTG 생성량과 E2 처리량 및 처리 방법간의 상관관계를 확인하였으며, 생성된 VTG는 SDS-PAGE를 사용하여 분석하였다. 특히 조피볼락의 경우, 생물의 연령에 따른 E2 효과를 병행하여 실험하였다. 향후 본 연구에서 수행된 연구결과는 내분비계 장애물질이 어류에 미치는 영향을 판단하는데 주요 지표로 활용될 수 있을 것으로 예측된다.

재료 및 방법

1. 조피볼락 및 넙치의 혈중 Vitellogenin 확인 실험

1) 조피볼락의 성별과 나이에 따른 혈청 vitellogenin 유도량 차이

알이 있는 배란기의 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*) 암컷 여러 마리와 수컷 여러 마리의 혈청을 비교하였다. 암컷의 혈청과 VTG 생성을 유도하는 것으로 알려진 E2 (1,3,5 [10]-Estratriene-3,17β-diol, E-8875, Sigma)를 물고기의 복강에 직접 주사하여 얻은 혈청을 비교하였다. E2는 ethyl alcohol에 15 mg/ml되게 녹여서 15 mg/kg b.w.로 물고기에 한번 주사하고 3일 뒤에 혈액을 채혈하였다. 게다가 어린 물고기와 성숙한 물고기에 같은 E2를 처리하였을 때 어린 물고기에서의 VTG 생성도 알아보았다.

2) E2 처리 횟수 및 처리시간에 따른 VTG 유도량 변화

조피볼락과 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에 E2 (15 mg/kg b. w.)를 처리한 다음 시간별 VTG 생성 정도를 알아보기 위해 한 번 주사하고 3일 뒤에 채혈하고 두 번 주사한 다음, 6일째 되는 날 채혈하여 VTG양을 측정하였다. 이때 같은 물고기로 하지 않고 조건당 무작위로 3～5마리를 잡아 암·수 구별한 후 채혈한 혈액과 비교하였다.

3) E2처리 농도가 VTG 생성량에 미치는 영향

E2에 의한 시간별 VTG 생성정도를 알아본 것과 같이 E2양에 따라서 VTG 생성이 달라지는지 확인하기 위해서 15 mg/ml의 100배 희석한 양을 주사하였다. 따라서 원래 15 mg/kg b.w. 되게 한 번 주사한 것 (총주사량 15 mg/kg)과 15 mg/kg을 두 번 주사한 것 (총주사량 30 mg/kg) 그리고 0.15 mg/kg되게 세 번 주사한 것 (총주사량 0.65 mg/kg)을 서로 비교하였다. 이때 같은 물고기로 하지 않고 조건당 무작위로 3～5마리를 선택하여 암·수 구별한 후, 채혈한 혈액과 비교하였다.

2. Vitellogenin 분석

1) 전기영동 (SDS-PAGE)

혈청 VTG 농도는 전기영동을 한 후, 특이한 VTG 밴드를 Densitometry를 이용해 측정하였다. SDS-PAGE는 Laemmli와 Van Bohemen *et al.* (Molecular Cloning, second edition)가 수행한 방법으로 하였다. 혈청 sample은 Tris-EDTA buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 5배나 10배 정도 희석하여 사용하였다. 계속하여 모든 sample은 sample buffer (0.0625 M Trizma-HCl, pH 6.75, 2% SDS, 5% mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue)로 1 : 1로 희석하고 단백질의 disulfide bond를 자르기 위해서 끓는 물에 10분간 끓였다. β- mercaptoethanol이 VTG를 분해하여 두 개의 성분인 polypeptide 가닥으로 만들기 때문에, 이중 가닥인 단백질의 분자량을 알고 싶을 때는 β-mercaptoethanol이 없는 sample buffer로 1 : 1로 희석하여 사용한다.

Running gel (6%; pore size), 0.75 mm thick은 29 : 1비율로 acylamide와 N′, N′-bis-methylene acylamide를 섞은 것, running buffer (1.5 M Tris, pH 8.8) 그리고 0.1% SDS를 조성대로 섞었다. 이때 중합화 (젤화)는 0.1% ammonium persulfate (APS)와 0.08%의 촉매제인 N, N, N′, N′,-Tetramethylethylenediamine (TEMED)를 첨가하면 시작되어지므로 바로 틀에 넣어 굳힌다. Stacking gel, 0.75 mm은 29 : 1비율로 acylamide와 N′,N′-bis-methylene acylamide를 섞은 것, stacking buffer (1.0 M Tris, pH 6.8) 그리고 0.1% SDS를 조성대로 섞었다. 이것도 중합화 (젤화)는 0.1% APS와 0.1% TEMED를 첨가하면 시작되어진다.

이 두 gel을 Hoefer® Mighty Small II 전기영동기기 (SE 250 Mini-Vertical Gel Electrophoresis Units, Pharmacia Biotech)에 함께 부어서 굳힌 다음, 300 ml electrophoresis buffer (25 mM Tris-250 mM glycine, pH 8.3, 0.1% SDS)를 첨가하였다. 위에서 준비한 혈청 sample 10 μl를 gel lane에 넣고 10 μl 분자량 표시제를 다른 lane에 넣어 전기영동을 하였다. 이때 sample이 running gel바로 위까지 전기영동될 때까지는 100 V로 하고 그 이후로는 120 V로 높여서 tracking dye (bromophenol blue)가 gel 바닥에 가까워 질 때까지 전기영동을 실시하였다.

전기영동이 끝난 gel을 methanol, acetic acid 그리고 증류수가 50 : 10 : 40의 비율로 섞인 0.025% Coomassie brilliant blue R-250에서 2시간 동안 염색하고 methanol, acetic acid 그리고 증류수가 25 : 10 : 65로 섞인 탈염색 용액에 2시간 이상 탈염색시켰다.

2) Densitometry를 이용한 VTG의 정량

전기영동 결과 나타난 VTG를 정량하기 위해서, LKB 2221 Integrator가 장착된 LKB2202 UltroScan Laser Densitometer (LKB)를 사용하였다. 정확한 정량을 위하여 시료당 3～5번 반복 실험하였다. 단백질의 상대적인 양이 표준 단백질값에 비교해서 정량되어질 수 있도록 하였다. 이때, 사용된 표준 단백질은 VTG와 크기가 비슷한 myosin (from rabbit muscle, M.W : 205,000, M-3889, Sigma Chem. Co.)을 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml 그리고 0.125 mg/ml순으로 앞서 서술한 SDS-PAGE와 동일 조건으로 행하고, myosin band를 Densitometry로 정량하였다. VTG 정량은 VTG와 크기가 비슷한 Myosin을 사용하여 읽은 Densitometry값을

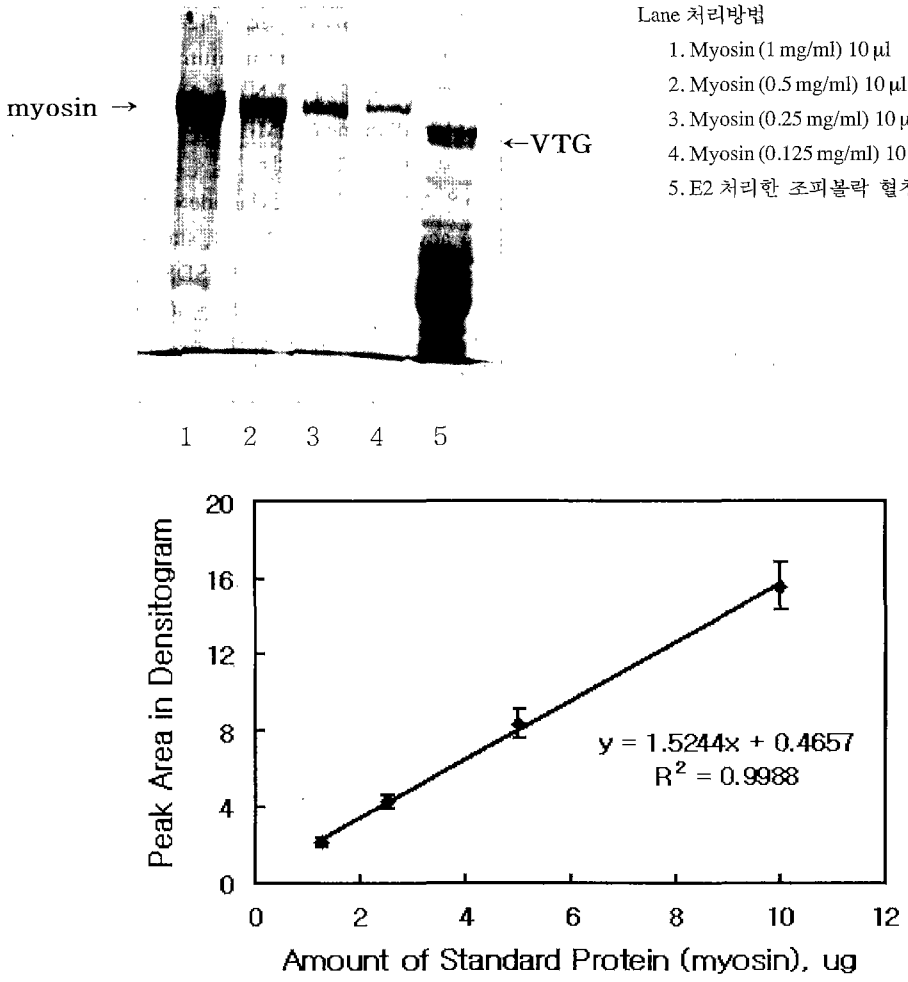

Fig. 1. VTG 분자량 결정을 위한 표준단백질, myosin의 SDS-PAGE /Densitometry상에서의 농도-반응곡선.

기준으로 상대적인 값을 구하였다(Fig. 1).

결과 및 고찰

1. 조피볼락의 성별과 나이에 따른 혈청 vitellogenin 유도량 차이

E2를 조피볼락 복강에 한 번 주사한 후 3일 뒤에 채혈한 결과, SDS-PAGE상에 VTG 밴드가 생겼다. 이 밴드가 VTG인지 확인하기 위해서 배란기의 암컷 혈청과 비교하였을 때, 같은 위치에서 밴드가 확인되었고 수컷과 어린 물고기에서는 이 밴드가 확인되지 않았다(Fig. 2). 즉, E2를 복강 처리한 모든 조피볼락에서 VTG가 생성되었으며, 이는 무지개송어 (*Onchorynchus mykiss*), 잉어 (*Cyprinus carpio*), 농어 (*Cyprinodon variegatus*) 등 일반적으로 VTG 생성이 관찰되는 어류 이외에도 국내 양식어종인 조피볼락에서도 E2가 VTG 생성을 유도함을 확인할 수 있었다(Carson and Williams, 1999, Schultz *et al.*, 2001).

한편 동일한 양의 E2를 처리한 후 VTG 생성량을 관찰한 결과, 성숙된 물고기보다 어린 개체에서 4배 이상의 VTG가 생성됨이 확인되었다(Fig. 2). E2 또는 에스트로겐과 유사한 환경오염물질은 어류의 성장단계에 따라 미치는 영향의 강도가 차이가 나며, 특히 성분화(sex differentiation) 시기

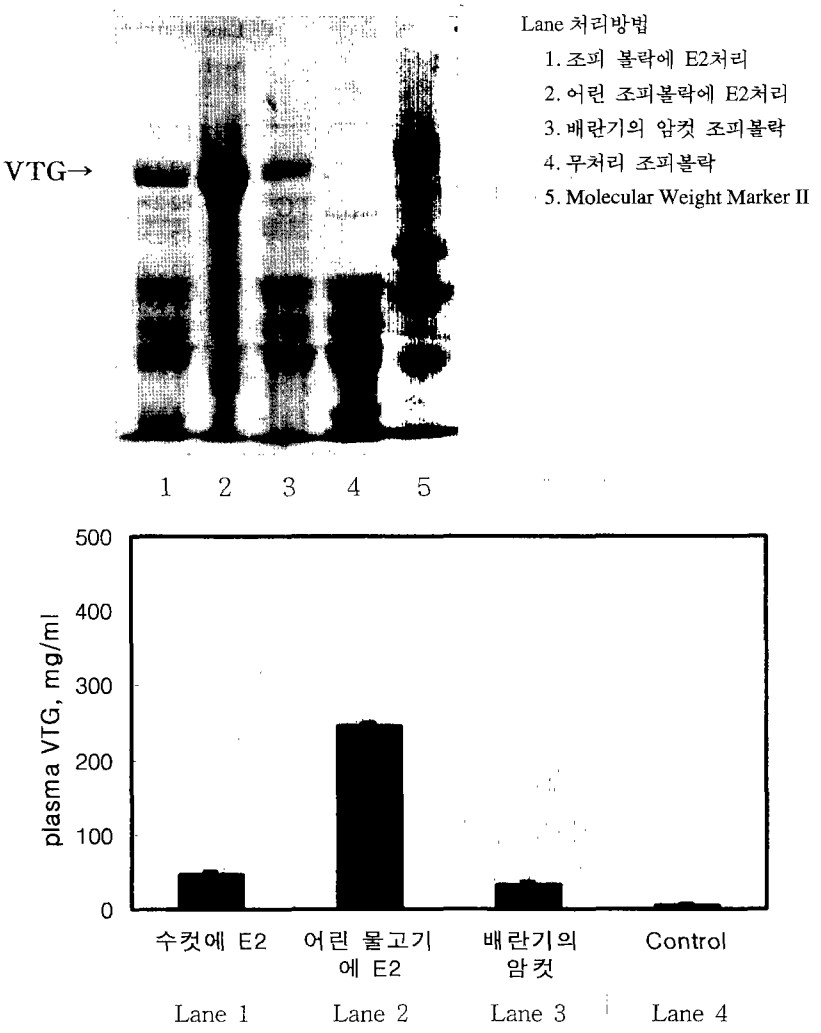

Fig. 2. E2 처리된 조피볼락 혈청단백질의 SDS-PAGE결과.

에 가장 민감한 것으로 밝혀졌다. 어류의 성분화가 발생하는 시기와 양상은 어종마다 큰 차이를 나타내는데, 송사리의 경우 부화하면서 바로 생식선이 분화되어 생식소의 암수구별이 나타나는데 비해 조피볼락과 같은 대부분의 어류는 부화 후 1~2개월이 지나야 생식선의 성분화가 발생된다 (Kendall *et al.*, 1998). 본 실험에서 사용된 조피볼락의 정확한 나이 및 성분화 여부를 확인하지는 못하였으나 실험결과 미성숙된 어류일수록 VTG 생성량이 많았으며, 이는 E2와 기능이 유사한 내분비계 장애물질에 노출될 경우 성숙된 개체보다 미성숙된 개체에서 더 큰 위해가 발생됨을 의미한다.

2. E2 처리 횟수 및 처리 시간에 따른 VTG 유도량 변화

조피볼락에 E2 (15 mg/kg)를 한번 주사하고 주사한 날을 0일로 하고 3일째 되는 날 채혈한 후 두 번째 주사하고 6일째 되는 날 채혈하여 시간에 따른 VTG 생성정도의 차이를 확인한 결과, 시간이 경과할수록 VTG 유도량은 현저히 증가되었다 (Fig. 3).

조피볼락의 결과를 토대로 넙치에서도 조피볼락과 동일한 실험을 실시하였다. 넙치에 E2 (15

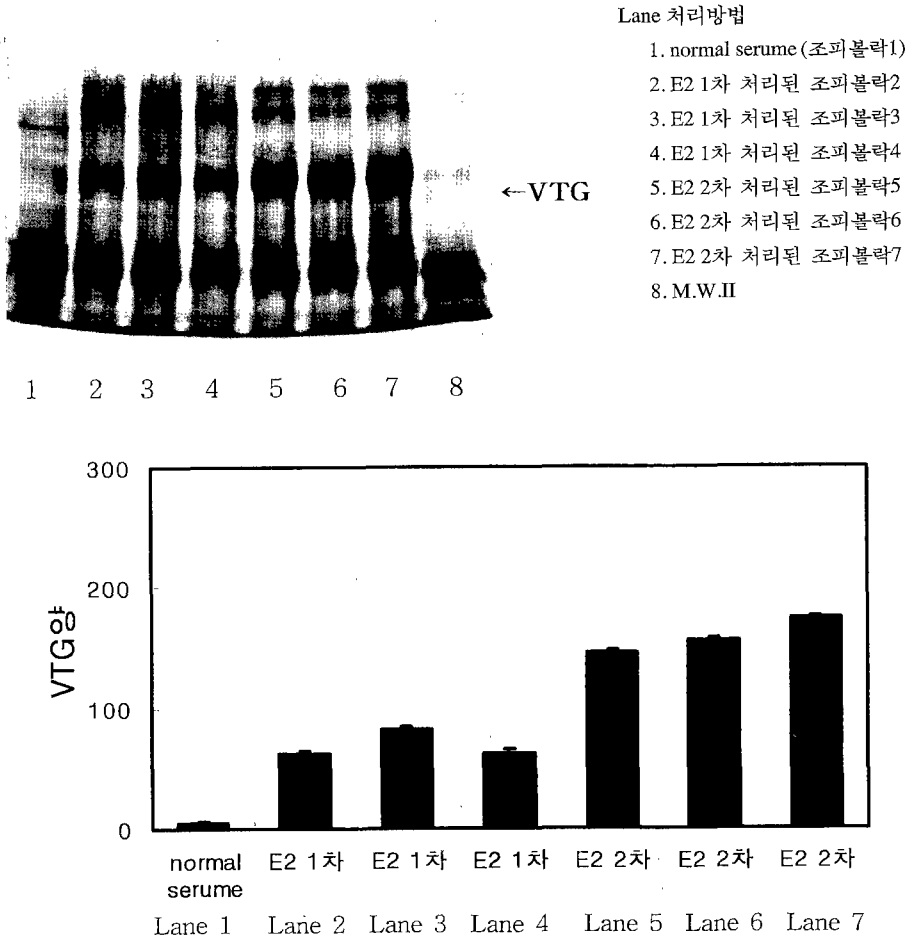

Fig. 3. E2의 처리횟수에 따른 조피볼락 혈중 VTG 유도량 변화

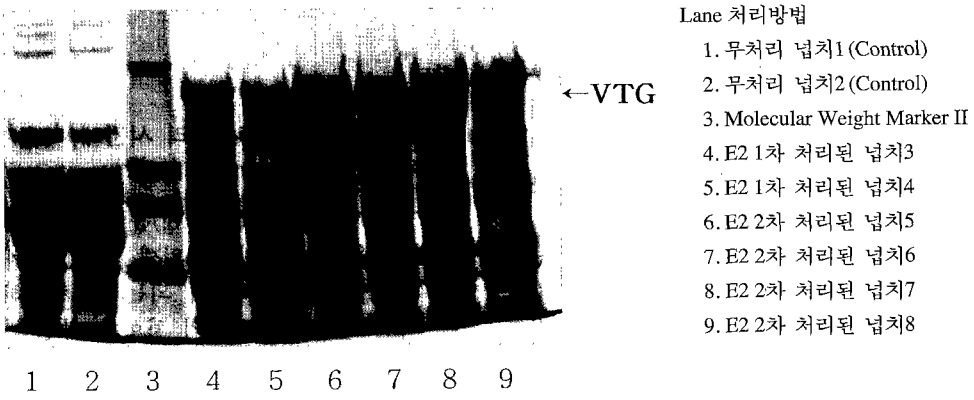

Fig. 4. E2의 처리횟수에 따른 넙치의 혈중 VTG 유도량변화

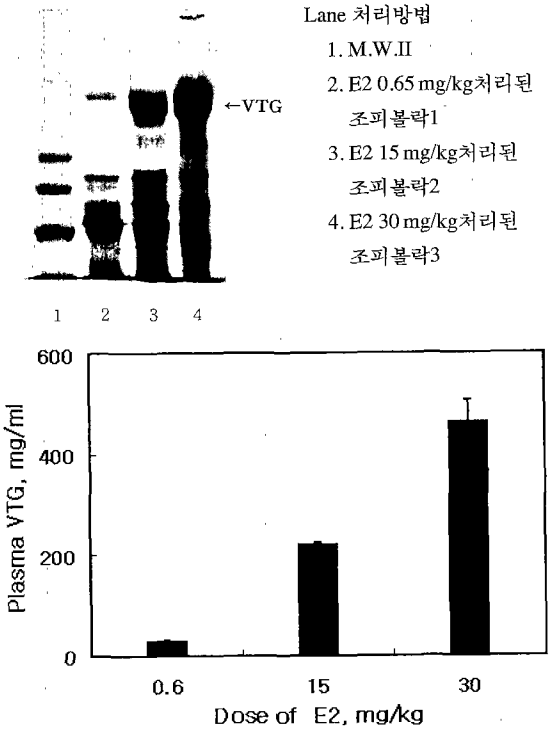

Fig. 5. E2의 처리농도에 따른 조피볼락의 혈중 VTG 유도량변화

mg/kg)를 한번 주사하고 주사한 날을 0일 날로 하고 3일째 되는 날 채혈하고 두 번째 주사하고 6일째 되는 날 각각 채혈하여 시간에 따른 VTG 생성정도의 차이를 확인한 결과, 조피볼락과 동일한 결과를 얻었다(Fig. 4).

대부분의 어류에서 E2를 처리하는 횟수가 증가할수록 발생되는 총 VTG량도 비례하여 증가한다(Former *et al.*, 2001). 그러나 각 처리횟수별로 증가량을 측정하면, 초기에 처리된 E2에 의해 가장 많은 VTG가 생성됨이 *in vivo*와 *in vitro* 모두에서 관찰되고 있다. 이와 같은 사실은 E2가 VTG의 생성에 직접 관여하지만, 다른 한편으로는 VTG의 생성을 억제하는 ER (Estrogen Receptor)의 생성도 동시에 유도하기 때문에 발생된다(Vaillant *et al.*, 1988; Pakdel *et al.*, 1991). 즉, 처리 횟수가 증가할수록 ER의 생성으로 인해 VTG의 발생율이 둔화되나, 총 VTG 발생량은 처리횟수에 비례하여 증가됨을 본 연구결과에서 확인하였다.

3. E2 처리 농도가 VTG 생성량에 미치는 영향

조피볼락에 E2을 0.65 mg/kg, 15 mg/kg, 그리고 30 mg/kg으로 각각 복강 주사하여 E2 처리량에 의한 VTG 생성량이 어떻게 달라지는지 확인한 결과, 처리되는 E2양이 증가할수록 VTG 생성량도 35 mg/ml, 200 mg/ml, 그리고 450 mg/ml로 처리된 E2양에 비례하여 증가함을 알 수 있었다(Fig. 5).

본 연구결과에서 확인된 바와 같이 E2는 처리농도에 따라 VTG 생성이 증가하며, 이는 많은 다른 연구에서 확인된 바 있다(Kendall *et al.*, 1995; Smeets *et al.*, 1999; Folmer *et al.*, 2001). 처리된 E2 농도별로 발생되는 VTG 양은 어류 종류에 따라 매우 다양하나 거의 모든 어류에서 E2 처리농도에 비례하여 VTG가 생성되었으며, 본 연구에서도 동일한 결과가 관찰되었다.

요약 및 결론

1. 배란기의 암컷과 수컷의 혈청은 SDS-PAGE 상에서 분리 형태가 달랐다. 수컷에서는 없는 단백질 밴드가 암컷의 혈청에서 나타났다. E2에 노출된 수컷의 혈청에서도 동일한 밴드가 나타났다. 따라서, 배란기의 암컷과 E2에 노출된 물고기의 혈청에서 나타나는 단백질이 VTG임을 확인할 수 있었다. 또한, 어린 물고기도 E2에 노출되었을 때, VTG가 생성되어지며, 그 E2에 대한 VTG 생성정도가 성숙한 물고기에 비해 크다는 것을 알 수 있었다. 그 외에도 VTG는 시간과 E2양에 따라 달라졌다. E2를 복강 주사하고 시간이 지날수록 VTG양도 비례하여 증가하는 한편 E2처리량이 증가할수록 VTG 유도량도 따라서 증가하였다.

2. E2에 노출된 물고기의 혈청 속의 VTG를 SDS-PAGE로 확인하고, Densitometry로 정량하여 VTG 생성정도의 차이를 양적으로 나타낼 수 있었다. 이때 정량은 알려진 myosin의 양을 기준으로 표준곡선을 그려 이를 기준으로 값을 정량하였다. 따라서 SDS-PAGE/Densitometry로 손쉽게 VTG를 확인하고 정량할 수 있는 방법을 만들었으며 이것으로 본 실험에 사용하였다.

이와 같은 연구 결과로부터 VTG는 수컷어류에서는 발견되지 않는 단백질이지만 E2에 노출되었을 때에는 성에 관계없이 생성되어진다는 것과

E2 노출량에 영향을 받는다는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 인제대학교 인제연구장학기금의 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Benfey TJ, Donaldson EM and Owen TG. An homologous radioimmunoassay for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) vitellogenin, with general applicability to other pacific salmonids, Gen Comp Endocrinol, 1989; 75 : 78-82.

Carson DB and Williams DE. Sex-specific vitellogenin production in immature Rainbow trout, Environ. Toxicol. Chem, 1999; 18(10) : 2361-2364.

Former LC, Gardner GR, Schreibman MP, Magliulo-Cepriano L, Mills LJ, Zaroogian G, Gutjahr-Gobell R., Haebler R, Horowitz DB and Denslow ND. Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*), Aquat. Toxicol. 2001; 51 : 431-441.

Janssen PAH and Lambert JGD. Environmental pollution caused elevated concentration oestradiol and vitellogenin in the female flounder, *Platichthys flesus*, Aquatic Toxicology, 1997; 39 : 195-214.

Kendall R, Dickerson R, Giesy J and Suk W. Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife. SETAC Press, 1998.

Kime DE. Endocrine disruption in fish, Kluwer Academic Publishers. 1998.

McArdle ME, McElroy AE, Elskus AA. In WC Neider and JR Waldman. Final reports of the Tibor T. Polgar Fellowship Program 1998; pp. 1-30, 1999.

Pakdel F, Feon S, Le Gac F, Le menn F. and Valotaire Y. *In vivo* estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout. Mol. Cell. Endocrinol. 1991; 75 : 205-212.

Schultz IR, Oener G, Merdink JL and Skillman A. Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascular administration of 17α-ethynylestradiol. Aquat. Toxicol. 2001; 51 : 305-318

Smeets JM, Rankouhi TR, Nichols KM, Komen H, Kaminski NE, Giesy JP and van den Berg M. *In vitro* vitellogenin production by carp hepatocytes as a screening method for determining (anti) estrogenic activity of xenobiotics, Toxicology & Applied Pharmacology, 1999; 157 : 68-76.

Tyler CR and Sumpter JP. The development of a radioimmunoassay for carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin, Fish Physiol Biochem. 1990; 8 : 129-140.

Vaillant C, Le Guellec C, Pakdel F and Valotaire Y. Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes, Gen Comp Endocrinol, 1988; 70 : 284-290.