

17 β -Estradiol이 수컷 송사리의 성적 행위 및 생식능력에 미치는 영향

류지성 · 이철우 · 박응로 · 남성숙 · 남규찬 · 류홍일 · 전성환 · 나진균 · 최덕일 · 박광식*
국립환경연구원

Effect of 17 β -Estradiol on Sexual Behavior and Reproductivity of Male Medaka (*Oryzias latipes*)

Jisung Ryu, Chulwoo Lee, Eung-Roh Park, Seong-Sook Nam, Kyu-Chan Nam, Hong-Il Rhu, Seong-Hwan Jeon, Jin-Gyun Na, Doug Il Choi and Kwangsik Park*

National Institute of Environmental Research, Environmental Research Complex,
Kyungseo-dong Seo-gu, Incheon, 404-170, Korea
(Received May 4, 2001)
(Accepted June 14, 2001)

ABSTRACT : Sexual behavior and reproductivity of male fish were studied as an *in vivo* screening method of endocrine disruptors. Male medaka (*Oryzias latipes*) were exposed to 17 β -estradiol at nominal concentrations of 2 and 20 μ g/l for 14 days. After exposure of the chemical, sexual behavior between male medaka and normal female which were injected with prostaglandin F_{2 α} just before the test, was analysed by using video camera for one hour. Normal control male showed courtship dancing such as following, guarding, dancing and crossing while 17 β -estradiol treated male did not show any type of courtship dancing. Furthermore, fecundity and fertility were significantly decreased in the treated group. It was suggested that analysis of sexual behavior could be a useful endpoint for the screening of the endocrine disruptors.

Key Words : Endocrine disruptor, Screening method, Sexual behavior, Medaka

I. 서 론

동물에서 나타나는 '행위'는 동물이 가지고 있는 기본적인 특성으로서 동물의 특정 「행위 변화」를 관찰하는 것은 환경중에서 발생하는 자극에 대한 영향을 평가할 수 있는 하나의 지표가 된다(Ryu 등, 1999). 경골어류는 일반적으로 교미하지 않고 체외수정을 하는데 이때 산란을 유도하는 성적 행위로서 수컷의 구애춤이 보여지는 데 일반적으로 수컷 어류의 구애행위는 암컷을 따라다니거나, 암컷의 몸을 부딪히거나, 암컷 앞에서 한 바퀴 회전하는 춤을 춘다거나 혹은 알을 낳기 적당한 장소나 산란대로 유도하는 등 암컷의 산란을 자극하는 행위로 나타난다.

근래 많은 관심이 집중되고 있는 에스트로젠성 물질이 수계에 노출되면 어류의 성적 발달 및 생식에 영향을 줄 수 있으며 그 증거로서 암수 성비의 불균형, 수컷에서의 난모세포의 발달, 정소 크기의 감소, 난생의 암컷에서 발

현되는 단백질인 vitellogenin의 수컷에서의 발현 등이 보고(Jobling 등, 1996; Gray 등, 1997; Gray 등, 1999; Allen 등, 1999; Gronen 등, 1999)되고 있고, 뿐만 아니라 생식을 위한 중요한 요건인 성적 행위에도 영향을 미칠 수 있어 이는 결과적으로 한 개체군의 생식력을 감소시켜 생존을 위협할 수도 있다.

본 연구는 OECD의 대표적 시험어종의 하나이며 생식 및 발생독성에 널리 사용되고 있는 송사리(*Oryzias latipes*)의 수컷에 17 β -estradiol을 노출시켜 송사리 수컷의 성적 행위에 미치는 영향을 관찰함으로써 행위독성연구를 통한 내분비계장애물질의 검색법을 제시하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험어종

국립환경연구원 어류사육실에서 수온 25 \pm 1 $^{\circ}$ C, pH 7.5 \pm 0.2, 용존산소 7~8 mg/l 및 광주기 16시간/8시간(명/암)의

*To whom correspondence should be addressed

실험실 조건으로 제대 사육한 송사리(*Oryzias latipes*)를 시험어로 사용하였다. 먹이는 알테미아를 1일 1회 충분히 공급하였으며 본 시험에 사용된 개체는 부화 후 5개월 이상된 성숙한 개체로서 산란율이 높은 사육수조에서 외형상 기형이 없고 건강한 것만을 사용하였다.

2. 시험물질 및 노출방법

시험물질은 대표적인 에스트로젠인 17 β -estradiol(Sigma Chemical Co., USA)을 아세톤에 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 의 농도로 녹여 시험원액을 만들어 사용하였다. 시험물질의 노출농도는 최종농도가 2 $\mu\text{g}/\text{l}$ 및 20 $\mu\text{g}/\text{l}$ 가 되도록 시험원액을 희석수로 희석하여 노출시켰으며, 대조군의 경우 아세톤만을 0.1 ml/l 농도로 첨가하였다. 희석수는 본 연구실의 사육수로 사용하고 있는 pH 7.5의 탈염소한 수돗물을 사용하였다.

시험물질 처리를 위해 우선 송사리 수컷 15마리를 분리하여 4 l 원형수조에서 사육조건과 동일한 조건으로 1주일간 순화시킨 후, 2 l의 시험용액이 담긴 대조군 및 처리군 수조에 각각 수컷 5마리를 넣고 14일간 노출시켰다. 먹이는 1일 1회 알테미아를 일정량 공급하였다. 반지수식방법을 적용하여 2일에 1회 시험액을 교환하였으며, 시험액을 교환할 경우 먹이는 시험용액 교환 4시간 전에 공급하였다.

3. 성적 행위 관찰

시험물질에 노출시킨 수컷 송사리와 정상 암컷 사이의 성적 행위 관찰에 앞서 시험물질 노출이 종료되기 1주일 전에 건강한 암컷 30마리를 선별하여 10 l 원형수조에서 사육조건과 동일한 조건으로 순화시켰다. 순화된 암컷 중 9마리를 임의로 선별하여 마취하지 않은 상태로 등쪽 근육에 prostaglandin F_{2 α} (PGF) 유사체인 luprostitol(Intervet International B.V., Holland) 10 μl (75 μg luprostitol)를 일회용 주사기(1 cc, 29 G \times 1/2")를 사용하여 각각 주사한 후 사각수조[14(L) \times 12(W) \times 11(H)cm]에 세 마리씩 넣고, 30분 후 14일간 시험물질을 노출시킨 처리군 또는 대조군에서 임의로 선택한 수컷 두 마리를 세 마리의 암컷이 있는 각각의 사각수조에 넣은 후 비디오카메라를 이용하여 1시간 동안 녹화하고 수컷의 성적 행위를 분석하였다.

4. 생식능력에 미치는 영향 조사

17 β -Estradiol이 수컷의 생식능력에 미치는 영향을 알아보기 위해 17 β -estradiol을 노출시킨 수컷과 정상 암컷을 함께 일주일동안 사육시켰다. 대조군 및 각 처리군의 5마리 수컷을 3 l의 사육수가 담긴 원형수조로 옮기고, 일주일 동안 사육수에서 분리 순화시킨 암컷을 수컷이 있는 각 수

조에 7마리씩 넣은 후 일주일동안 생산되는 총 산란수 및 수정율을 조사하였다. 관찰기간중 물의 오염을 방지하기 위해서 2일에 1회 사육수를 교환하였으며, 투명하지 않고 혼탁해진 미수정란은 제거하였다. 이때 산란을 위해 광주기는 16시간/8시간(명/암)으로 하였고, 수온은 25 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다.

III. 결과 및 고찰

시험물질인 17 β -estradiol의 노출기간 중 사망한 수컷 송사리는 없었으며, 기타 유의한 이상 증상도 관찰되지 않았다. 성적 행위 관찰을 위해 정상 암컷에 PGF의 유사체인 luprostitol을 투여하였는데, PGF는 배란이 일어난 어류 암컷의 난소 또는 수란관에서 분비되는 것으로 여겨지며 순환계를 통해 이동하여 뇌에 작용하여 산란행위를 유도하고 동시에 수컷의 성적 행위를 자극하는 것으로 알려져 있다(Kobayashi 등, 1993; Zheng 등, 1997). 또한 북극 곤돌매기류인 *Salvelinus alpinus* 수컷에서 분비되는 PGF는 pheromone처럼 암컷의 성적 행위를 유도하는 것으로 보고된 바 있다(Sveinsson 등, 2000). 본 연구에서 수컷에 대한 14일 동안의 17 β -estradiol 노출 종료 후에 PGF를 주사한 정상적인 암컷과 2 $\mu\text{g}/\text{l}$ 및 20 $\mu\text{g}/\text{l}$ 농도의 17 β -estradiol을 노출시킨 수컷 사이에서는 Table 1에서 보는 바와 같이 교차(crossing)행위 뿐만 아니라 수컷의 어떠한 구애행위도 관찰되지 않았다. 그러나, 시험물질을 노출시키지 않은 수컷 대조군의 경우 Fig. 1에서 보는 바와 같이 전형적인 수컷의 구애행위인 암컷을 따라다니는 추적(following), 암컷 밑에서 한바퀴 원을 그리며 유영하는 구애춤(courtship dance) 및 교차(crossing) 등의 행위가 나타났으며, 비디오 카메라를 이용하여 1시간 동안 관찰한 결과 총 21회의 구애춤과 5회의 교차(crossing)가 관찰되었다. 추적행위는 빈도에 있어서 대조군과 명확한 차이가 나타나지만 17 β -estradiol 처리군에서도 수회 나타났다. 그러나 추적이후 구애춤으로 이어지지 않을 뿐 아니라 우연한 행위형태와 명확히 구별할 수 없었기 때문에 Table 1에서 추적에 대한 결과는 반영하지 않았다. 대조군 및 노출군 모두 교차행위를 제외한 기타 움직임의 정도에 있어서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 과거 몇몇 연구에서 금붕어(*Carassius*

Table 1. Effect of 17 β -estradiol on sexual behavior in male medaka

	Control	17 β -Estradiol	
		2 $\mu\text{g}/\text{l}$	20 $\mu\text{g}/\text{l}$
Courtship dance	21	0	0
Crossing	5	0	0

Data is the total number of courtship dance and crossing of 2 male and 3 female in each treatment and control aquarium during 1-hour observation using video camera.

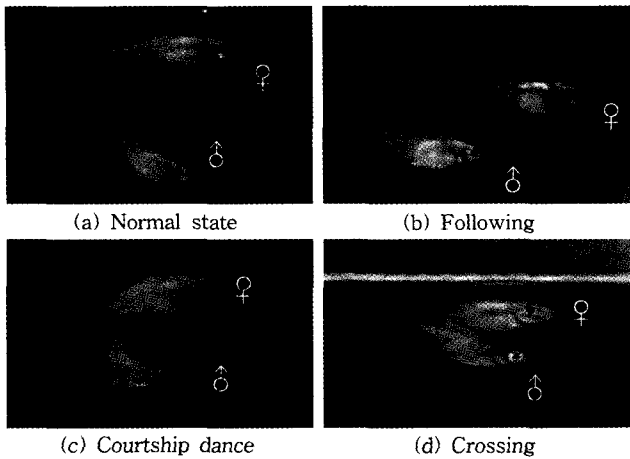


Fig. 1. Typical sexual behavior in male toward the female. This sexual behavior between normal medaka male and female was recorded by video camera for 1 hour.

auratus) 암컷에 PGF를 투여하여 산란행위를 유도하는 실험을 수행하였는데 암컷에 있어서의 이러한 성적 행위는 17β-estradiol과 같은 스테로이드성 성호르몬보다는 PGF에 의해 조절되는 것이 알려졌다(Kobayashi 등, 1993; Volkoff 등, 1999). 반면 금붕어 수컷의 성적 행위는 수컷 성호르몬의 일종인 11-ketotestosterone에 의해 유도되는 것으로 보고되었다(Stacey 등, 1996). 따라서 본 연구에서 17β-estradiol 노출에 의한 수컷의 성적 행위 억제에는 17β-estradiol에 의한 체내 호르몬 수준의 불균형에 의한 것으로 사료된다.

한편, 2 μg/l 및 20 μg/l의 농도로 17β-estradiol을 14일간 각각 노출시킨 수컷 5마리와 정상적인 암컷 7마리를 한 수조에 넣고 1주일 동안의 총산란수 및 수정율을 관찰한 결과 Fig. 2 및 Fig. 3에서 보는 바와 같이 2 μg/l의 17β-estradiol 처리군의 경우 대조군에 비해 다소 높은 산란율을 보였고, 수정율은 대조군에 비해 약간 감소한 결과

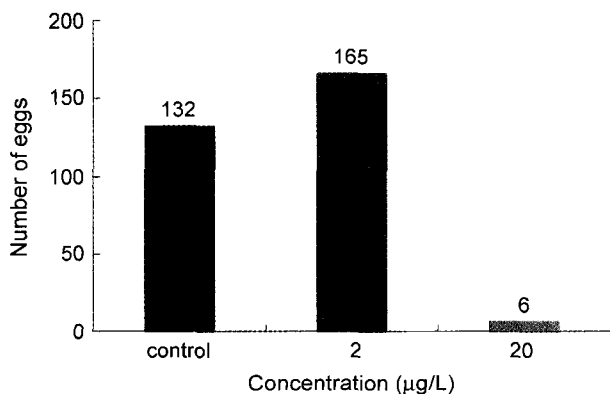


Fig. 2. Effect of 17β-estradiol on the total number of eggs spawned during 7-day mating period after 14-day exposure for male medaka.

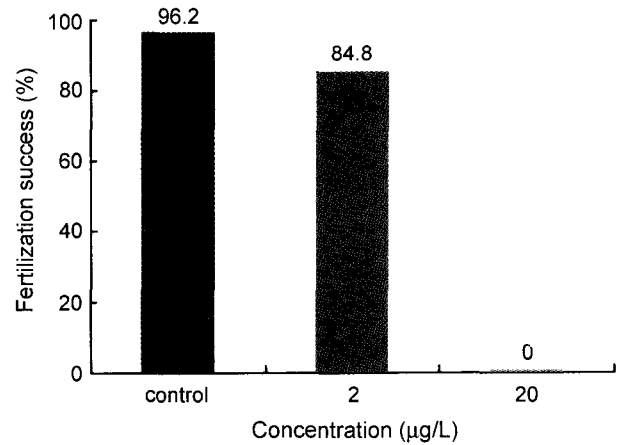


Fig. 3. Effect of 17β-estradiol on fertilization success during 7-day mating period after 14-day exposure for male medaka.

를 나타내었다. 반면에 20 μg/l 처리군의 경우 산란수가 현저히 저하되었을 뿐만 아니라 산란된 알도 전혀 수정이 되지 않았다. 따라서 17β-estradiol의 농도 증가에 따라 수컷의 생식기능이 억제되었음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 성숙한 송사리 수컷에 17β-estradiol을 14일간 1~100 nmol/l (약 0.27~27.24 μg/l)의 농도로 노출시킨 후 정상 암컷과 사육시켰을 때 산란율 및 부화율이 농도 의존적으로 감소된 연구보고와 일치하는 것이다(Shioda 등, 2000).

송사리 수컷 정소에 난소조직이 형성되는 testis-ova의 발생은 발생단계 초기에서부터 에스트로젠성 화학물질에 장기간 노출될 때 나타나며 성숙한 수컷 개체에 17β-estradiol을 36일간 본 연구에 사용된 농도보다도 높은 100 μg/l의 농도로 노출시켰을 때에도 발생되지 않음이 보고되었다(Gray 등, 1997; Gray 등, 1999). 따라서 성적 행위 관찰은 에스트로젠성 물질의 저농도 노출에 의한 아급 성적 영향을 평가하는데 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 판단되며 향후 이러한 결과를 바탕으로 내분비계장애 물질로 추정되는 산업용화학물질 등에 의한 성적 행위 변화를 조사함으로써 내분비계장애물질 검색시험으로서 행위변화를 주요한 종말점으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

Allen, Y., Scott, A.P., Matthiessen, P., Haworth, S., Thain, J.E. and Feist, S. (1999): Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**, 1791-1800.

Gray, M.A. and Metcalfe, C.D. (1997): Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to

- p-nonylphenol, *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 1082-1086.
- Gray, M.A., Niimi, A.J. and Metcalfe, C.D. (1999): Factors affecting the development of testis-ova in medaka, *Oryzias latipes*, exposed to octylphenol, *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**, 1835-1842.
- Gronen, S., Denslow, N., Manning, S., Barnes, S., Barnes, D. and Brouwer, M. (1999): Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol, *Environ. Health Perspect.*, **107**, 385-389.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P. and Sumpter, J.P. (1996): Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 194-202.
- Kobayashi, M. and Stacey, N. (1993): Prostaglandin-induced female spawning behavior in goldfish (*Carassius auratus*) appears independent of ovarian influence, *Horm. Behav.*, **27**, 38-55.
- Ryu, J.S., Lee, C.W., Choi, P.S., Choi, S.S., Rhu, H.I., Chung, K.H., Lee, K.C. and Park, K.S. (1999): Behavioral toxicity of Cd-treated *Oryzias latipes* using computer-automated video tracking system, *Kor. J. Environ. Toxicol.*, **14**, 217-222.
- Shioda, T. and Wakabayashi, M. (2000): Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*), *Chemosphere*, **40**, 239-243.
- Stacey, N. and Kobayashi, M. (1996): Androgen induction of male sexual behaviors in female goldfish, *Horm. Behav.*, **30**, 434-445.
- Sveinsson, T. and Hara, T.J. (2000): Olfactory sensitivity and specificity of Arctic char, *Salvelinus alpinus*, to a putative male pheromone, prostaglandin f(2)alpha, *Physiol. Behav.*, **69**, 301-307.
- Volkoff, H. and Peter, R.E. (1999): Actions of two forms of gonadotropin releasing hormone and a GnRH antagonist on spawning behavior of the goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **116**, 347-355.
- Zheng, W. and Stacey, N.E. (1997): A steroidal pheromone and spawning stimuli act via different neuroendocrine mechanisms to increase gonadotropin and milt volume in male goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **105**, 228-238.