

## 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 *in vitro* 난모세포 성숙과 배란에 미치는 TBT, TPhT 및 Aroclor 1254의 영향

백혜자<sup>+</sup> · 정지현\* · 전중균\*\*

부경대학교 해양생물학과, \*동의대학교 생물학과, \*\*강릉대학교 해양생명공학부

### *In vitro* Effects of TBT, TPhT and Aroclor 1254 on Oocyte Maturation and Ovulation in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Hea-Ja BAEK<sup>+</sup>, Jee-Hyun JUNG\* and Joong-Kyun JEON\*\*

Dept. of Marine Biology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

\*Dept. of Biology, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

\*\*Dept. of Marine Biotechnology, Kangnung University, Kangnung 210-702, Korea

The effects of tributyltin (TBT), triphenyltin (TPhT) and Aroclor 1254 on germinal vesicle breakdown (GVBD) and ovulation of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) were investigated in *in vitro* bioassay. TBT, TPhT and Aroclor 1254 showed the inhibition effects on GVBD and ovulation in response to HCG. The oocyte response appeared to be more sensitive to TBT than Aroclor 1254. TBT was more effective in inhibiting GVBD at concentrations of 0.1 and 1 ppm. However, no significant inhibition was observed in concentrations tested (0.0001~1 ppm). Significant inhibition of ovulation in response to HCG occurred at TBT (0.01, 0.1, 1 ppm), TPhT (0.01, 0.1, 1 ppm) and Aroclor 1254 (0.01, 1 ppm, except 0.1 ppm), compared to HCG control. The lowest ovulation rate was measured at 1 ppm TBT. These data suggest that TBT (or TPhT) could possibly interfere the actions of progesterone to induce GVBD and ovulation in *in vitro* bioassay system.

Key words: Olive flounder, Tributyltin, Triphenyltin, Aroclor 1254, Oocyte maturation

## 서 론

환경에 방출되는 유해화학물질은 일정 지역에 서식하고 있는 생물집단에 위협요소로 인식되고 있다. 특히 이러한 물질은 수서 생물의 난발생, 유생이나 어린 치어의 성장과 발달에 치명적인 영향을 미칠 뿐만 아니라 성어의 생식기능 작용을 방해하여 생물자원 감소현상을 초래하고 있다 (Fent and Hunn, 1992; Van Der Kraak et al., 1995; Kime, 1998; Yoon, 1998).

선박이나 양식장 그물 등에 해양생물체의 부착을 막기 위한 방오용 페인트 성분으로 사용되고 있는 유기주석화합물 중 독성이 가장 큰 tributyltin (TBT)과 triphenyltin (TPhT) 그리고 전기 절연체 물질로 사용되고 있는 유기염화물, polychlorinated biphenyls (PCBs)의 일종인 Aroclor 1254 등은 해양생물들의 생태계를 오염시킬 뿐 아니라, 해양 무척추동물에서는 imposex를 유발시키고 (Ronis and Mason, 1996; Kime, 1998), 척추동물에서는 시상하부-뇌하수체-생식소 등의 부위에 작용하여 생식내분비 기능을 교란시킨다고 알려져 있다 (Thomas, 1990). 이들 물질은 생체막을 통과하여 어체에 축적될 뿐 아니라 난의 주요 구성물인 지질과 결합하여 난들의 분열, 성장을 감소시킨다고 하였다 (Black et al., 1988; Ungerer and Thomas, 1996).

TBT/TPhT에 관한 최근의 연구결과에 의하면, TBT/TPhT를 어류의 생식소 조직에 처리하면 aromatase 효소 활성을 저해하여 testosterone이 estradiol로 전환하는 것을 방해함으로써 androgen

의 축적을 일으키는 등 성성숙 호르몬의 생성과정에도 크게 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Morcillo and Porte, 1997). 그리고 Aroclor 1254는 Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) 암컷의 GSI 감소, 혈중 스테로이드 호르몬 농도 감소와 난소의 발달을 저해한다고 보고하였다 (Thomas, 1988; 1990).

위와 같은 연구결과들을 근거로 하여 본 연구에서는 내분비 장애물질의 잠재적 위해성 평가를 위한 근거자료를 제시하고자 우리나라 양식의 주 품종이며 바닥에 서식하는 넙치 어미를 대상으로 *in vitro*에서 TBT, TPhT와 Aroclor 1254에 의한 생식기능 저해효과 즉, 난모세포의 최종성숙 (GVBD, germinal vesicle breakdown)과 배란과정에 미치는 영향을 비교 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험어

실험에 사용된 넙치는 국립수산진흥원 수족배양실에서 4년째 사육중인 것으로 4~5월에 외관상 복부가 팽만한 개체 즉, 체중 1~1.7 kg, 전장 43~51 cm인 성숙 암컷 (평균 난경 650~700 μm)을 선택하였다.

### 2. 난소조직의 분리 및 배양

실험어는 2-phenoxyethanol 0.3 mL/L로 마취시켜 전체혈한 후 즉시 실험실로 옮겨져 무균상태에서 난소를 절취, 1%의 항생제 (streptomycin)를 포함한 TBSS (trout balanced salt solution)로 세척하였다. 절취된 난소는 핀셋으로 잘게 분리한 후 난소조직 절

\*Corresponding author: hjbaek@pknu.ac.kr

편 또는 난모세포 상태로 각각 well 당 42~60 mg 또는 66~100 oocytes가 되도록 분리하여 L-15 (Leibovitz's L-15) 배양액 1 mL씩 첨가한 뒤 15°C에서 배양하였다. 배양 세척액과 배양액의 pH는 7.0, 삼투농도는 360 milliosmol로 조절하였다.

3. TBT, TPhT, PCB (Aroclor 1254) 첨가

GVBD 유도 실험에서는 TBT, Aroclor 1254를 각각 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 ppm씩 첨가하여 72시간 배양하였고, 배란유도 실험에서는 TBT, TPhT, Aroclor 1254 각각 0.01, 0.1, 1 ppm 농도로 첨가하여 38시간 배양 후 같은 농도의 TBT, TPhT, Aroclor 1254가 첨가된 배양액을 24시간 간격으로 교환해주면서 실험 종료시까지 (약 1주일)의 총 배란율을 조사하였다. 배란효과를 상승시키기 위하여 HCG (human chorionic gonadotropin) 50 IU/mL/well로 자극 후 TBT, TPhT, Aroclor 1254를 각각 0.01, 0.1, 1 ppm의 농도가 되게 첨가하였다. 배란 유무는 현미경 (Olympus SZH 10)하에서 난모세포가 여포로부터 방출되어 난 중앙에 큰 유구를 가지는 것으로 판별하였다 (Fig. 1).

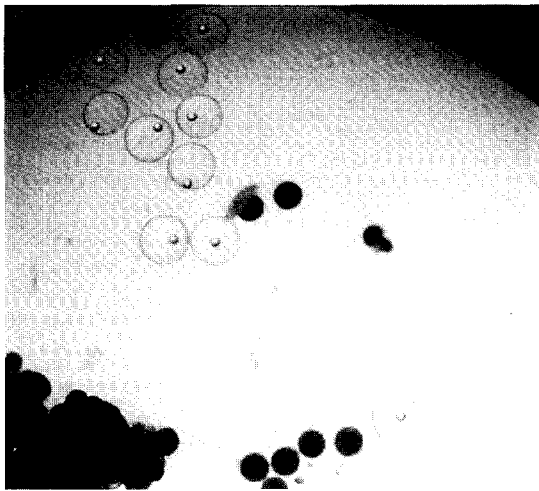


Fig. 1. *In vitro* response of ovulation in olive flounder oocytes (×20). Ovulated oocyte are transparent and have a large diameter.

4. 분석 결과의 통계처리

실험결과는 대조군과 각 실험구간의 평균치 차이 유무를 *t*-test 하였다. 각 실험구간의 측정치 차이 유무는 일원분산분석 (사후검정방법: LSD)으로 검정하였다.

결 과

넙치의 최종성숙 (GVBD) 유도 과정에 대한 TBT와 Aroclor 1254의 처리 농도별 실험 결과는 Fig. 2, 3과 같다. TBT로 처리한 모든 농도의 실험구 (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 ppm)에서 대조구와 비교하였을 때 유의적인 차이를 보였으며 ( $p < 0.05$ ), TBT 실험구 중 가장 높은 농도인 1 ppm에서 GVBD의 저해효과가 가장 크게

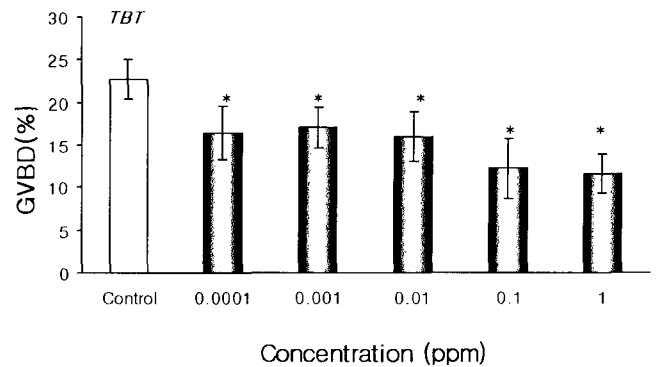


Fig. 2. The effects of tributyltin (TBT) on germinal vesicle breakdown (GVBD) in oocytes of the olive flounder. Each value represents the mean ± S.E.M. of three replicate incubations. Significant differences (\* $P < 0.05$ ) between treatment and control were determined by Student's *t*-test.

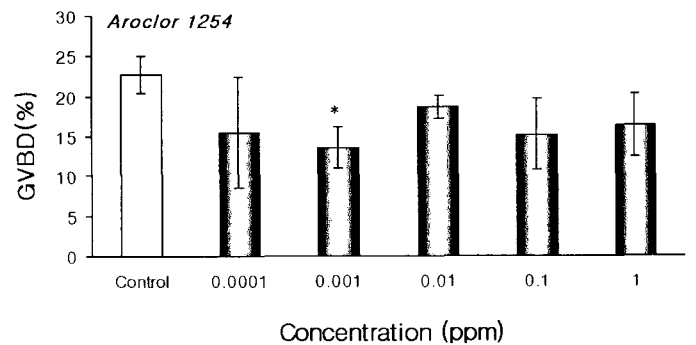


Fig. 3. The effects of Aroclor 1254 on germinal vesicle breakdown (GVBD) in oocytes of the olive flounder. Each value represents the mean ± S.E.M. of three replicate incubations. Significant differences (\* $P < 0.05$ ) between treatment and control were determined by Student's *t*-test.

나타났으나, 처리 농도에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다 (Fig. 2).

Aroclor 1254 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 ppm 농도로 처리한 경우, 모든 실험구 (13.6~18.7%)에서는 대조구 (22.7%)보다 낮은 저해효과를 보였으나 0.001 ppm 농도를 제외하고는 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 3).

넙치의 배란유도 효과에 대한 TBT, TPhT, Aroclor 1254의 영향을 처리 농도별 (0.01, 0.1, 1 ppm)로 나타낸 결과는 Fig. 4와 같다.

TBT, TPhT, Aroclor 1254를 각각 0.01, 0.1, 1 ppm 농도로 단독 처리한 모든 실험구들을 대조구와 비교하였을 때는 어떠한 유의적인 차이도 보이지 않았으나, HCG 단독 처리구는 대조구에 비해 높은 배란 유도율을 보였다 (각각 32.6%, 16.4%). HCG가 첨가된 TBT와 TPhT의 모든 실험구는 HCG구에 비해 낮은 배란율을 보였으며 ( $p < 0.05$ ), TBT 실험구간에는 1 ppm 농도에서 가장 낮은 값을 나타냈다 ( $p < 0.05$ ). TPhT 실험구간에는 유의적인 차이를

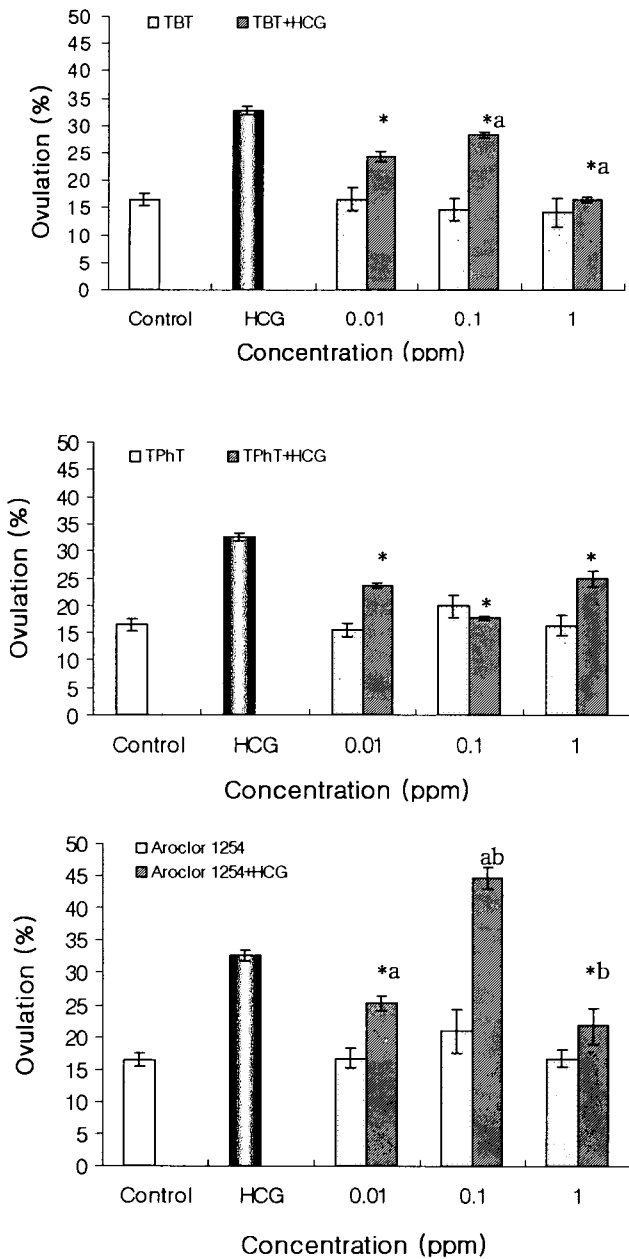


Fig. 4. The effects of tributyltin (TBT), triphenyltin (TPhT) and Aroclor 1254 in combination with 50 IU HCG on ovulation in ovarian fragments of the olive flounder. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of three replicate incubations. Significant differences ( $*P < 0.05$ ) between treatment (+HCG) and HCG were determined by Student's *t*-test. a<0.05 (LSD), b<0.05 (LSD).

보이지 않았다. Aroclor 1254의 경우 0.1 ppm 농도를 제외하고는 마찬가지로 낮은 배란율을 나타냈다.

고찰

환경에 방출된 유해 화학물질은 어류의 생식소에 직접적인 영

향을 미침으로써 생식세포의 발달을 저해하고, 간접적으로는 생식 내분비 호르몬계의 교란을 일으킬 수 있다고 하였다 (Freeman et al., 1980; Thomas, 1990). 어류 생식소의 기능변화를 초래하는 내분비장애물질의 위해성 조사는 대부분 생식소의 크기, 난경조사, 성성숙 지연, 성비의 변화, 수정율, 부화율, 초기 사망률 실험 등으로 이루어져 왔으며, 최근에는 생식과정에 관여하는 내분비 물질 변화와 이들의 작용 메카니즘을 조절함으로써 내분비장애물질의 효과를 스크린하는 방향으로 연구가 진행되고 있다 (Van Der Kraak et al., 1992; 1995).

어류를 대상으로 내분비장애물질 효과에 대한 *in vitro* 연구는 vitellogenin 생성과정을 포함하여 estrogens 활성화와 수용체의 상호작용 그리고 estrogens 대사과정에 관여하는 효소계 연구에 집중되고 있다 (Morcillo and Porte, 1997; Arcand-Hoy and Benson, 1998; Kime et al., 1999). 그러나 난모세포의 핵이동 (germinal vesicle migration)과 핵붕괴 (germinal vesicle breakdown)를 수반하는 최종성숙과 배란과정에 관여하는 progestogens의 활성화에 내분비장애물질이 어떠한 영향을 미치는지에 관한 연구는 거의 찾아보기 어렵다. 단지 Atlantic croaker, *M. undulatus* (Ghosh and Thomas, 1995)와 spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus* (Das and Thomas, 1999)에서 난모세포 성숙유도 호르몬으로 알려진 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 $\beta$ -S)의 내분비 활성화에 살충제의 일종인 Kepone 또는 o,p'-DDD가 길항 작용을 나타낼 수 있다는 보고가 있을 뿐이다. Ghosh and Thomas (1995)는 난모세포의 GVBD 유도율을 위하여 20 $\beta$ -S로 처리한 실험구를 Kepone 또는 o,p'-DDD에 노출시켰더니 GVBD 유도과정이 저지되었으며, 난모세포를 세척하여 Kepone 또는 o,p'-DDD를 제거시켰더니 GVBD가 다시 재개되었다고 보고하였다.

본 연구에서는 넙치 난모세포의 GVBD와 HCG로 전처리한 배란 유도 과정에 TBT/TPhT와 Aroclor 1254가 어떤 영향을 미치는지를 조사한 결과, TBT (또는 TPhT)와 Aroclor 1254 모두 GVBD와 배란유도 과정에 저해효과를 보였으며, 이 과정에서 보여준 난모세포의 반응은 Aroclor 1254보다는 TBT에 좀 더 민감한 것 같았다. 즉 이 과정의 주요 스테로이드 호르몬인 progestogens의 작용을 TBT가 저해하는 것으로 생각되며, Aroclor 1254의 저해 효과는 뚜렷하게 관찰되지 않았다. 오히려 배란유도 과정에서 HCG와 혼합처리 된 Aroclor 1254 0.1 ppm의 경우 HCG 처리구보다도 높은 배란율을 보였는데, Aroclor 1254가 이 농도에서 HCG의 효과를 증가시키는 것으로 생각되나 정확한 설명이 어려운 부분이다. Atlantic croaker의 경우 난소 회복기 때 1개월간 Aroclor 1254에 노출시켰더니 혈중 estradiol과 testosterone의 농도가 현저하게 감소하였으며, 난황형성 과정도 저지되었다고 하였다 (Thomas, 1990). 이러한 결과는 Aroclor 1254가 어류의 난소발달과정 중 최종성숙이나 배란시기보다도 난황형성기 때 더 깊이 관여하는 화학물질이 아닌가 생각되며 이러한 추측을 검증하기 위해서는 난소발달 단계별 실험이 이루어져야 할 것이다. 넙치 난모세포에 대한 TBT의 처리 농도별 차이는 GVBD의 경우 TBT 0.1과 1 ppm에서 가장 낮은 GVBD 유도율을 보였으나 0.0001~1 ppm 사이에 유의한 차이는 관찰할 수 없었다. TBT의 배란저해 효과는 HCG 단일 처리

구에 비해 HCG+TBT의 모든 실험구 (0.01, 0.1, 1 ppm)에서 뚜렷하게 나타났으며, HCG+TBT 1 ppm에서 가장 낮은 값을 보였다. 이러한 결과들은 비록 내분비장애물질의 종류는 다르지만 Ghosh and Thomas (1995)의 연구 결과와 유사하며, 단지 차이점은 Atlantic croaker와 spotted seatrout에서는 20β-S이 난모세포 성숙유도 호르몬으로 알려졌기 때문에 난모세포를 직접 20β-S로 처리한 후 내분비장애물질에 노출시켰지만 넙치의 경우 정확한 성숙유도 호르몬이 알려지지 않았으므로 HCG 처리하여 간접적인 성숙유도 작용이 이루어지도록 하면서 내분비장애물질에 노출시킨 것이다.

앞으로 어류의 생식소 발달과정 중에 중요한 역할을 하는 estrogens을 포함하여 progestogens 그리고 androgens 활성화 이들 스테로이드 수용체에 내분비장애물질이 어떤 영향을 미치는지 그 상호작용 기작을 밝히는 방향으로 좀 더 상세한 연구가 진행되어야 할 것이다.

### 요 약

성숙 시기의 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 어미를 대상으로 난모세포의 GVBD와 배란유도과정에 TBT/TPhT와 Aroclor 1254의 저해효과를 조사한 결과, TBT (또는 TPhT)와 Aroclor 1254 모두 GVBD 과정과 HCG로 전처리한 배란유도 과정에 저해효과를 보였으며, 난모세포의 반응은 Aroclor 1254보다는 TBT에 좀 더 민감한 것으로 나타났다. TBT의 처리 농도별 차이는 TBT 0.1과 1 ppm에서 가장 낮은 GVBD 유도율을 보였으나 0.0001~1 ppm 사이에 유의한 차이는 관찰할 수 없었다. TBT의 배란저해 효과는 HCG 처리구에 비해 HCG+TBT의 모든 실험구 (0.01, 0.1, 1 ppm)에서 뚜렷하게 나타났으며, TBT 처리구 중 가장 높은 농도인 HCG+TBT 1 ppm에서 가장 낮은 배란율을 보였다.

넙치의 GVBD와 배란과정을 유기주석화합물 (TBT, TPhT)이 방해함으로써 이 시기의 주요 호르몬인 progestogens 작용이 저해되는 것으로 생각되며, 앞으로 난소발달 단계별로 세분화하여 그 저해 작용 메커니즘에 대한 실험이 요구된다.

### 감사의 글

본 논문은 1998년 해양수산부의 특장과제 연구비 지원에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

Arcand-Hoy, L.D. and W.H. Benson. 1998. Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environ.*

*Toxicol. Chem.*, 17, 49~57.  
 Black, D.E., D.K. Phelps and R.L. Lapan. 1988. The effects of inherited contamination on egg and larval Winter Flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Marin. Environ. Res.*, 25, 45~62.  
 Das, S. and P. Thomas. 1999. Pesticides interfere with the nongenomic action of a progestogen on meiotic maturation by binding to its plasma membrane receptor on fish oocytes. *Endocrinology*, 140, 1953~1956.  
 Fent, K. and J. Hunn. 1992. Uptake and elimination of tributyltin in fish-yolk-sac larvae. *Marine Environ. Res.*, 65~71.  
 Freeman, H.C., J.F. Uthe and G. Sangalang. 1980. The use of steroid hormone metabolism studies in assessing the sublethal effects of marine pollution. *Rapports et Proces-Verbaux des Reunions Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, 179, 16~22.  
 Ghosh, S. and P. Thomas. 1995. Antagonistic effects of xenobiotics on steroid-induced final maturation of Atlantic croaker oocytes *in vitro*. *Mar. Environ. Res.*, 39, 159~163.  
 Kime, D.E. 1998. *Endocrine disruption in fish*. Kluwer, Boston, 397pp.  
 Kime, D.E., J.P. Nash and A.P. Scott. 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture*, 177, 345~352.  
 Morcillo, Y and C. Porte. 1997. Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the Western Mediterranean. *Aquat. Toxicol.*, 38, 35~46.  
 Ronis, -M.J.J. and -A.Z. Mason. 1996. The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorina*) *in vitro* and *in vivo*: Effects of tributyltin. *Mar. Environ. Res.*, 42, 161~166.  
 Thomas, P. 1988. Reproductive endocrine function in female Atlantic croaker exposed to pollutants. *Mar. Environ. Res.*, 24, 179~183.  
 Thomas, P. 1990. Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function. *J. Exp. Zool.*, 4, 126~128.  
 Ungerer, J. and P. Thomas. 1996. Transport and accumulation of organochlorines in ovaries of Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Mar. Environ. Res.*, 42, 167~171.  
 Van Der Kraak, G., K.R. Munkittrick, M.E. McMaster, C.B. Portt and J.P. Chang. 1992. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115, 224~233.  
 Van Der Kraak, G., M.E. McMaster and K.R. Munkittrick. 1995. Application of reproductive physiological testing to understand the mechanisms of environmental endocrine disruptors. In *Proceedings of the 5th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, Austin, Texas, pp. 173~175.  
 Yoon, Y.D. 1998. The effects of endocrine disrupters on reproduction and development of wild animals. *Dev. Reprod.*, 2(2), 115~133.

2001년 6월 13일 접수  
 2001년 10월 31일 수리