

외인성 Estrogen에 노출된 조피볼락, *Sebastes schlegeli* 치어의 혈장 VTG과 GPT의 변화

황운기*, 강주찬

부경대학교

Changes of Plasma Vitellogenin (VTG) and Glutamate Pyruvate Transaminase (GPT) in the Juvenile Rockfish, *Sebastes schlegeli* Exposed to Exogenous Estrogen

Un-Gi Hwang* and Ju-Chan Kang

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT

Changes of plasma vitellogenin (VTG) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) were examined for determining whether hepatocyte was damaged during the process of VTG induction in the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to exogenous estrogen (estradiol-17 β , E₂). Rockfishes were intraperitoneally injected with E₂ (5 mg/kg B.W.) in 70% ethanol and plasma sampling were extracted at 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15 days after E₂ administration. VTG and GPT were then analyzed by SDS-PAGE and Reitman-Frankel method, respectively. VTG band was detected at a molecular weight position of 175 kDa on Day 3 after E₂ administration. This band became more distinct at 6 days, but its was gradually thinned with time-course, and not detected at 15 days. GPT was suddenly increased at 1 days after E₂ administration and highest GPT was detected at 3 days. However, GPT was gradually decreased with time-course as the change of VTG. These results suggest that the process of VTG induction by exogenous E₂ damage to hepatocyte, and plasma GPT was temporarily increased in the juvenile rockfish.

Key words : *Sebastes schlegeli*, Exogenous estrogen, VTG, GPT

서론

Estrogen (estradiol-17 β , E₂)은 어류를 포함한 난생동물의 성숙한 암컷의 뇌하수체에서 방출되는 생식선자극 호르몬에 의해 난소에서 생합성되는 호르몬으로, 생식세포의 발달이나 성숙을 조절하는

내분비적 기구에 있어 중요한 역할을 담당할(Wallace, 1985; Mommsen and Walsh, 1988) 뿐만 아니라 간세포 내에서 배와 유생의 발달시기에 영양성분으로 사용되는 난황 전구단백질(vitellogenin, VTG)의 합성을 유발한다(Hara *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 2000). 최근에는 VTG 합성 과정을 밝히기 위한 분자단계의 연구를 위해 미성숙 암컷과 수컷을 E₂에 노출시켜 인위적으로 VTG 합성을 유발시키고 있으며(James *et al.*, 1987; Hwang *et al.*, 2000; Nakao

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: 051-620-6146, E-mail: ungi2222@yahoo.co.kr

et al., 2002), 또한 E₂와 유사행동을 하는 내분비 장애물질 (endocrine disrupting compounds, EDCs)에 의해서도 유발되어, EDCs 노출에 대한 생물학적 지표로도 사용된다(Sumpter and Jobling, 1995; Toppari et al., 1995; Hwang, 2002).

E₂는 간세포 내에서 VTG 유발을 위한 첫 단계로 핵 속에 존재하는 estrogen receptor (ER)와 결합해, ER mRNA 및 E₂-ER의 결합활성을 증가시킨다(Flouriot et al., 1996; Pakdel et al., 1997). 이러한 과정이 성숙한 암컷에서 자연적으로 합성되어진 E₂가 아니라 인위적인 E₂ 투여에 의해 이루어질 경우, VTG 유발을 위한 E₂의 행동은 간세포의 일시적 손상을 야기 시킬 것으로 사료된다. 혈장 전이 효소인 glutamate pyruvate transaminase (GPT)는 간세포가 손상되거나 독성에 노출되었을 때 증가해, 간세포의 손상을 판단하는 지표로 사용된다(Racicot et al., 1975; Vedel et al., 1998).

따라서, 조피볼락, *Sebastes schlegeli* 치어가 외인성 E₂에 의해 VTG을 유발할 때 간세포가 손상된다면 혈장 내 GPT는 증가할 것이다. 본 연구에서는 외인성 E₂에 노출된 조피볼락의 VTG 합성 과정이 간세포에 미치는 영향을 조사하기 위해 혈장 내 VTG와 GPT의 경시적 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 어류는 부경대학교 수산과학연구소에서 사육해온 체중 약 50 g의 미성숙 조피볼락, *Sebastes schlegeli*으로서 외관상 질병에 대한 증세가 없는 건강한 개체를 사용하였다. 실험기간동안 약 18°C의 수온을 유지하는 유수식 사육수조 내에서 실험이 행하여졌으며 실험 기간동안 사료는 공급하지 않았다.

1. E₂의 투여 및 혈장분리

실험어의 복강에 70% ethanol에 용해한 E₂ (5 mg/kg B.W.)를 주사한 후 0, 1, 3, 6, 9, 12 및 15일에 각기 다른 3마리의 어류로부터 혈액을 채집하였다. 혈액의 채취는 2-phenoxyethanol에 마취시킨 어류의 꼬리혈관에 heparin-Na (25,000 I.U., 중외제약)을 처리한 1회용 주사기를 사용하였다.

채혈된 혈액은 1시간동안 실온에 보관한 후 4°C

에서 2시간 방치시킨 다음 6,000 rpm에서 5분간 원심 분리해 혈장을 분리하였으며 분리된 혈장은 -20°C에서 냉동보관 후 3일 이내 VTG와 GPT 변화를 조사하였다.

2. 단백질의 정량 및 전기영동

혈장 내 단백질 양은 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 coomassie brilliant blue (CBB) G-250을 사용한 Bradford (1976)의 방법으로 이루어졌다.

혈장 내 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 의해 5~20% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 이용하여 분석하였다. 혈장 0.5 µl (단백질 16~25 µg)를 sample buffer (0.175 M Tris-HCl, 8 M urea, 1% SDS 및 0.5% 2-mercaptoethanol, pH 7.4) 5 µl에 혼합한 후, 100°C에서 3분간 가열해 용해시켜 SDS-PAGE를 이용하여 30 mA의 속도로 분리한 후, 0.25% coomassie brilliant blue G-250으로 1시간 동안 염색하였다. VTG를 판별하기 위하여 사용된 표준 단백질의 분자량은 carbonic anhydrase (MW 29,000), ovalbumin (45,000), bovine serum albumin (66,000), phosphorylase b (97,400), β-galactosidase (116,000) 및 myosin (205,000)을 사용하였다.

3. 혈장 VTG와 GPT의 변화

조피볼락의 혈장 내 VTG 판별은 성 성숙시기에 SDS-PAGE에서 나타나는 암컷 특이 혈장 단백질인 175 kDa의 밴드로 판단하였다.

혈장 내 GPT는 Reitman-Frankel의 방법을 이용한 kit (Asan Pharm. Co.)로 측정하였으며, 이 kit는 표준곡선용 시액, 기질액, 정색시액 및 4 N NaOH 용액을 포함하고 있다. 실험 방법을 간략히 설명하면, 기질액 1 ml를 37°C에서 5분간 방치한 후 E₂를 투여한 조피볼락의 혈장 0.2 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 방치하고, 정색시액 1 ml 첨가해 잘 혼합한다. 20분 후에 0.4 N NaOH 10 ml를 첨가하여 10분간 방치한 다음 505 nm에서 증광수를 대조로 흡광도를 측정 (DR/4000, HACH)한 후, 표준곡선용 시액으로부터 작성된 표준곡선을 이용하여 GPT를 측정하였다.

결과 및 고찰

E_2 를 투여한 조피볼락의 혈장에서 0와 1일째 보이지 않던 175 kDa에 염색성을 가진 VTG 밴드가 3일째 관찰되었다(Fig. 1). 이 VTG 밴드의 염색성은 6일째 더욱 분명하게 나타났지만 시간이 경과할수록 흐려져, 15일째는 밴드를 확인할 수 없었다(Fig. 1). 조피볼락의 혈장 내 GPT는 투여 1일째부터 급격히 증가해 3일째 최고치를 나타냈으나, 시간이 경과할수록 점점 감소해 15일째는 E_2 투여 전 만큼 감소하였다(Fig. 2).

E_2 와 화학구조식이 비슷해 ER와 결합하여 난막 단백질과 VTG 합성을 유발하는 것으로 알려진 4-nonylphenol (4-NP) (Arukwe *et al.*, 2000)이 수컷 넙치, *Platichthys flesus*에서 VTG을 유발할 때, 간세포가 손상되어 혈장 내 GPT가 일시적으로 급격히 증가하는 것으로 보고되고 있다(Christensen *et al.*, 1999). 또한, Hwang 등(2002)도 100과 200 (mg/kg)의 4-NP를 투여 한, 조피볼락에서 대조구에 비해 혈장 내 GPT가 급격히 증가하는 것으로 보고

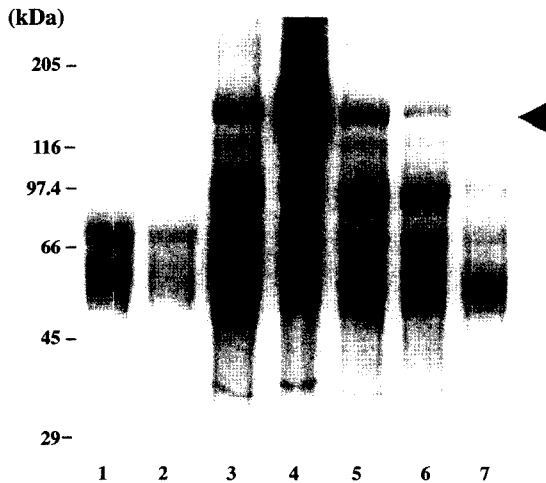


Fig. 1. SDS-PAGE of E_2 -administered juvenile rockfish, showing the expression of VTG bands (arrowhead). Lane 1: control; Lane 2: 1 days after administration; Lane 3: 3 days after administration; Lane 4: 6 days after administration; Lane 5: 9 days after administration; Lane 6: 12 days after administration; Lane 7: 15 days after administration.

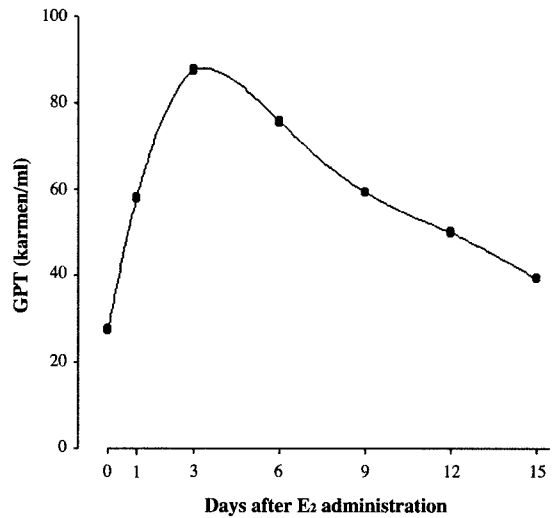


Fig. 2. Temporal changes of GPT in the plasma of E_2 -administered juvenile rockfish. Point represent the mean of three determinations. Error bars are omitted.

하였다. 본 연구에서도 E_2 를 투여한 조피볼락에서 VTG와 GPT가 급격히 증가하는 비슷한 결과가 나타났다. VTG와 GPT가 시간적으로 증·감의 차이를 나타냈다. VTG의 경우에는 3일째에 관찰되어 6일째 급격히 증가한 후 감소하는 경향을 나타냈지만, GPT의 경우에는 1일에 급격히 증가해 3일째에 최대치를 나타낸 후에 감소하는 경향을 나타내었다. VTG 합성은 간세포 내에서 ER와 VTG mRNA의 축적이 필요하며(Pakdel *et al.*, 1997) 실제로, 무지개송어의 간세포 배양에 있어서도 E_2 를 첨가했을 때 1일 후에 ER와 VTG mRNA가 발현되는 것으로 보고되고(Flouriot *et al.*, 1996; Hwang, 2001) 있으나, VTG의 경우에는 2~3일은 지나야 SDS-PAGE에서 밴드를 확인할 수 있다(Kwon *et al.*, 1993; Hwang, 2001).

복강 내 투여된 E_2 가 혈장 내에서 albumin이나 steroid 결합 단백질과 결합해 표적기관인 간으로 운반되어 핵속에 존재하는 ER와 결합한 후, 전사(transcription)와 번역(translation) 단계를 거쳐 VTG가 합성된다(Flouriot *et al.*, 1996; Pakdel *et al.*, 1997). 따라서, 투여된 E_2 가 간세포에 직접적으로 영향을 미치는 단계는 VTG 합성의 가장 상위단계인 ER 단계로, 간세포에 직접적으로 미치는 영향과 합성된 VTG가 혈장에 방출되기까지는 다소의 시

간적 차이가 있을 것으로 사료된다. 이것이 VTG와 GPT가 시간적으로 증·감의 차이를 나타내는 하나의 원인으로 생각되어진다. 하지만, GPT가 3일째에 VTG가 6일째에 급격히 증가함으로 외인성 E₂의 VTG 유발행동으로부터 합성까지 3일이 소요된다는 것을 의미하는 것은 아니다. 실험 방법상 3일의 간격으로 조사되었기 때문에, GPT가 4일이나 5일째까지 급격히 증가할 수도 있을 것이다. 또한, 간세포의 손상은 GPT 변동 이외에 단백질 합성과 유전자 발현을 억제할 수 있으나(Hwang *et al.*, 2000), 현 연구에서는 단백질 합성의 억제는 나타나지 않았으며 다른 단백질보다도 E₂에 의하여 유발되는 VTG 밴드의 증·감이 뚜렷한 것을 알 수 있었다.

지금까지 어류에 있어 E₂의 내분비적 기능에 관한 연구는 사육이나 관리가 쉬운 담수산 어류를 중심으로 활발한 연구가 이루어져(Flouriot *et al.*, 1996; Hwang *et al.*, 2000), 해산어류를 이용하는데 있어 많은 문제점이 있다. 그 중에 하나가 해산어류에 대한 VTG 항체를 쉽게 구할 수 없기 때문에 SDS-PAGE에서 VTG 밴드를 쉽게 확인하기 어렵다는 것이다. 본 연구에서는 조피볼락의 성 성숙시기에 나타나는 암컷 특이 단백질인 175 kDa의 밴드를 VTG로 사용하였으며, 이 밴드의 증·감이 E₂ 투여 후 급격히 변화는 것으로 보아 조피볼락의 VTG 밴드가 확실한 것으로 판단된다. 어종은 다르지만 E₂를 첨가한 무지개송어의 간세포배양에서 5~7일까지 VTG 양이 증가하는 것으로 알려지고 있으며(Kwon *et al.*, 1993; Hwang, 2001), 본 연구에서도 6일째 175 kDa의 밴드가 더욱 강하게 나타나, 이 밴드가 VTG라는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 조피볼락의 간세포 내에서 VTG 유발을 위한 외인성 E₂의 행동은 간세포를 일시적으로 손상시켰으며, 이로 인해 혈장 내 GPT가 증가한 것으로 사료된다.

결 론

연안정착성 어류이며 양식대상 어종으로 경제적 가치가 높은 조피볼락, *Sebastes schlegeli* 치어가 외인성 estrogen (estradiol-17 β , E₂)에 노출되어 인위

적으로 VTG이 유발될 때, 간세포가 일시적으로 손상되는 지를 판단하기 위하여 혈장 내 VTG와 GPT의 경시적 변동이 SDS-PAGE와 Reitman-Frankel 방법에 의해 각각 조사되었다. E₂ 투여 후, 조피볼락의 혈장에서 0와 1일째에 나타나지 않았던 VTG 밴드가 3일째 175 kDa의 위치에서 관찰되었으며, 6일째 VTG 밴드는 더욱 분명하게 나타났지만 시간이 경과할수록 감소해 15일째는 밴드를 확인할 수 없었다. GPT는 E₂ 투여 1일째부터 급격히 증가하여 3일째 가장 높은 수치를 나타내었다. 하지만, GPT도 VTG 변화와 비슷하게 시간이 경과할수록 점점 감소해 15일째는 E₂ 투여 전과 비슷하게 감소했다.

이상의 결과는 외인성 E₂가 VTG 유발과정에서 간세포를 손상해 혈장 GPT가 일시적으로 증가한다는 것을 제시한다.

참 고 문 헌

- Bradford MM. A rapid and sensitive methods of the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analy. Biochem.* 1976; 72 : 248-254.
- Christensen LJ, Korsgaard B and Bjerregaard P. The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. *Aquat. Toxicol.* 1999; 46 : 211-219.
- Flouriot G, Pakdel F and Valotaire Y. Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1996; 124 : 173-183.
- Hara A, Sullivan CV and Dickhoff WW. Isolation and some characterization of vitellogenin and its related egg yolk proteins from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zool. Sci.* 1993; 10 : 245-256.
- Hwang UG. Vitellogenin and its mRNA induction by estradiol-17 β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish. Sci. Tech.* 2001; 4(4) : 186-191.
- Hwang UG. Effect of 2, 4-Dichlorophenoxy acetic acid on vitellogenin synthesis and E₂-ER binding affinity of hepatocytes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. of Aquaculture.* 2002; 15(1) : 31-37.
- Hwang UG, Kagawa N and Mugiya Y. Aluminium and cadmium inhibit vitellogenin and its mRNA induction by estradiol-17 β in the primary culture of hepatocytes in

- the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 2000; 119 : 69-76.
- Hwang UG and Kang JC. Effect of nonylphenol on plasma glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) in the juvenile rockfish *Sebastes schlegeli*. J. Fish. Sci. Tech. 2002; in submission.
- James JN, Sylvia MR, David RD and Ying PS. Serum phosphoproteins phosphorus and calcium levels as reproductive indicators of vitellogenin in highly vitellogenic mature female and estradiol-injected immature rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Zool. 1987; 65 : 2421-2425.
- Kwon HC, Hayashi S and Mugiya Y. Vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol. 1993; 104B : 381-386.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227 : 680-685.
- Mommsen TP and Walsh PJ. Vitellogenesis and oocyte assembly. In Fish Physiology, Vol IIA (W. S. Hoar and D. J. Randall, eds.), pp. 347-406, Academic Press, San Diego. 1998.
- Nakao W, Hwang UN, Tohse H and Mugiya Y. Aluminium inhibits protein kinase C activity in the liver without any effect on vitellogenin production in salmon *Oncorhynchus mykiss*. Bull. Fish. Sci. Hokkaido Univ. 2002; 53 (1) : 31-36.
- Pakdel F, Delaunay F, Ducouret B, Flouriot G, Kern L, Lazennec G, Le Drean Y, Petit F, Salbert G, Saligaut D, Tujague M and Valotaire Y. Regulation of gene expression and biological activity of rainbow trout estrogen receptor. Fish Physiol. Biochem. 1997; 17 : 123-13.
- Racicot JG, Gaudet M and Leray C. Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with emphasis on their diagnostic use: A study of CCl₄, toxicity and a case of *Aeromonas* infection. J. Fish Biol. 1975; 7 : 725-835.
- Sumpter JP and Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environ. Health Persp. 1995; 103 : 173-178.
- Toppari, J, Larsen JC and Christiansen P. Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. Miljøprojekt 290, pp. 166, Copenhagen: Ministry of the environment and energy, Danish Environmental Protection Agency. 1995.
- Vedel NE, Korsgaard B and Jensen FB. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on electrolyte status, blood respiratory properties and brain glutamine/glutamate concentrations. Aquat. Toxicol. 1998; 41 : 325-342.
- Wallace RA. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In Developmental Biology, Vol. I (L. W. Browder, eds.), pp. 127-177, Pregamon, New York. 1985.