

내분비 장애물질 검출을 위한 *In Vitro* Bioassay 개발 : 어류 혈청을 이용한 간세포 단층배양

권혁주^{1*} · 맹준호¹ · 김은희¹ · 최성희²

¹선문대학교 수산생명의학과, ²선문대학교 식품과학과

Development of *In Vitro* Bioassay for Detection of Estrogenic Activity of Xenobiotics : Monolayer Culture of Hepatocytes using Fish Serum

Hyuk Chu Kwon^{1*}, Joon Ho Maeng¹, Eun Hee Kim¹ and Seong Hee Choi²

¹Dept. of Aquatic Life Medical Science, Sun Moon University, Asan 336-708, Korea

²Dept. of Food Science, Sun Moon University, Asan 336-708, Korea

ABSTRACT : Effects of sera from several fish species on monolayer formation, viability and functions of catfish hepatocytes were investigated to establish a primary hepatocyte culture system for screening endocrine disruptors. Hepatocytes of Korean catfish (*Silurus asotus*) were attached and formed monolayer using the media supplemented with their own serum or sera from eel and tilapia, but not with fetal bovine serum (FBS). The amount of fish sera (0.5~3%) for monolayer culture of the catfish hepatocytes was less than 1/10 of FBS (5~20%) that is commonly used for primary culture of hepatocytes of other species. The results indicate that FBS can be replaced with sera from some fish species and the fish sera are more effective than FBS in maintaining the shape and functions of the hepatocytes. The primary culture of catfish hepatocytes was maintained monolayer with fish sera for at least 10 days, which makes possible to be used for screening the activities of endocrine disruptors. In conclusion, the primary culture system of hepatocytes with fish sera in the present study could be a useful tool for screening and studying endocrine disruptors.

Key words : Catfish (*Silurus asotus*) hepatocyte, Monolayer culture, Endocrine disruptors, Fish serum, Vitellogenin.

요 약 : 본 연구는 내분비 장애물질의 검출을 위하여 간세포의 단층 형성, 생존 및 기능에 미치는 어류 혈청의 영향에 대해 검토하였다. 한국산 메기의 간세포는 자신의 혈청 및 뱀장어, 틸라피아 등 타어종의 혈청에 의해 부착 및 단층이 형성되었으나, FBS는 메기 간세포의 단층을 형성시키지 못했다. 0.5에서 3%의 어류 혈청으로 메기 간세포의 단층을 형성시킬 수 있는데, 이것은 FBS(5~20%) 사용의 1/10 이하로 적은 양이며, 어류 혈청이 FBS를 대체할 수 있고, FBS보다 간세포의 형태 및 기능 유지에 효과적인 것으로 나타났다. 어류 혈청이 첨가된 배양액에서 메기 간세포는 적어도 10일 이상 단층 형성을 유지할 수 있어, 내분비 장애물질 연구에 이용될 수 있을 것이다. 결론적으로 본 연구에서 개발된 어류 혈청을 사용한 메기 간세포 배양시스템과 효소면역측정법(ELISA)은 bisphenol A 등의 내분비 장애물질의 검출 및 연구를 위한 유용한 도구로서 이용될 수 있다고 생각된다.

서 론

수생생태계는 수많은 화학 오염물질들에 의해 영향을 받는다. 최근 수생생물에 영향을 미치는 환경오염물질들의 탐색

기술 및 독성 평가 방법들이 많이 개발되어 왔다. 특히 에스트로젠 유사작용을 하는 내분비 장애물질들(EDCs)은 동물의 내분비계를 교란하고 면역계 및 생식기 이상을 초래하여 많은 연구자들의 주목을 받아왔다(Tyler et al., 1998; Guillette et al., 1999). 어류, 양서류, 파충류 및 조류의 난황전구물질인 vitellogenin(Vg)은 에스트로젠(E₂), 합성 에스트로젠(ethynlestradiol) 및 bisphenol, nonylphenol 등의 EDCs 등에 의

* 교신저자: 아산시 탕정면 갈산리 100번지 선문대학교 수산생명의학과. (우) 336-708, (전) 041-530-2283, (팩) 041-530-2917, E-mail: hckwon@sunmoon.ac.kr

해 간에서 합성 유도되어진다. 따라서 *in vivo* 및 *in vitro*에서 Vg의 유무를 효소면역측정법(ELISA) 및 RT-PCR을 이용하여 측정함으로써 EDCs의 검색이 가능하다(Kwon et al., 1993; Marin & Matozzo, 2004; Fossi et al., 2002; Kordes et al., 2002; Rutishauser et al., 2004; Nakari & Pessala, 2005; Burki et al., 2006; Navas & Segner, 2006).

어류 배양 간세포를 이용하는 *in vitro*법은 EDCs의 검출을 위해 매우 유용한 수단이 되고는 있지만, 어류의 경우 송어, 붕어, 뱀장어, 틸라피아 등 실지로 이용되고 있는 어종은 많지 않다. 또한 대부분의 어류 배양간세포는 단층을 형성하지 않고, 원형의 상태를 유지하면서 세포끼리 서로 연결되어 다층을 이루거나 집합체의 덩어리를 형성한다(Mommsen et al., 1994; Segner, 1998; Vaillant et al., 1998). 간세포의 단층배양은 다층 또는 조직배양보다 배양액의 세포내 교환이 용이하고, 배양 중 세포 사멸 및 탈락이 현저히 줄어들어 물질대사 연구의 정확성을 높여준다. 배양 간세포는 생체간과 유사한 기능을 유지할 수 있어야 하며, 특히 장기간의 배양을 요하는 물질대사 연구에 배양 간세포의 기능 유지 및 생존을 향상을 위해 간세포 단층배양법은 매우 중요하다. 이러한 중요성에도 불구하고 어류 간세포 배양법은 완전히 확립되어 있지 않다(Segner, 1998; Navas & Segner, 2006).

어류는 담수 및 해수어류로 나뉘어져 있고, 온수성, 냉수성 등 살고 있는 환경이 달라 배양 간세포의 생존을 위해서는 어종에 따라 배양액의 종류, pH, 삼투압, 온도 등의 조건이 적절해야 한다. 또한 배양액내에 혈청 및 인슐린 등의 포함 유무, 세포 부착 및 단층 형성을 위한 세포외 기질(collagen, fibronectin 등)들이 간세포의 생존 및 형태 형성에 크게 영향을 미친다(Kim & Takemura, 2003; Kwon et al., 2006). 특히 간세포의 단층배양을 위해 육상 척추동물들은 배양액내에 10~20%의 송아지 혈청(FBS)을 포함하고 있지만, 어류의 경우 뱀장어(Hayashi & Ooshiro, 1975)를 제외하고 FBS에 의해 단층을 형성한 경우는 거의 없다. 어류 간세포 배양에 대한 FBS의 사용은 광우병 등에 의해 유통이 제한되거나 가격이 비싸고 어류 간세포의 단층배양이 불가능하여 이를 대체할 수 있는 어류 혈청과 같은 대체물질이 필요하다. 최근 Kwon 등(2006)은 메기 간세포 배양에 메기 자신의 혈청을 사용하여 단층을 형성하였다. 그러나 간세포의 단층 형성을 위한 최저 혈청농도에 대한 검토 및 메기 간세포 배양에 다른 어종의 혈청들이 단층 형성에 영향을 미치는지에 대한 검토가

필요하다.

따라서 본 연구는 어류 간세포 배양의 단층 형성 및 생존을 위해 어류 혈청들이 유효한가를 검토하고, 확립된 간세포 배양계가 내분비장애물질의 검출을 위한 도구로서 이용될 수 있는지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험어류 및 혈액처리

한국산 메기는 자체 생산하여 사육한 2~3년생 수컷 메기를 사용하였으며, 뱀장어와 틸라피아는 1~2년생의 양식산을 구입하여 사용하였다. 각 어류의 미부에 주사기를 사용하여 혈액을 채취하여 실온에 30분간 방치 후 원심분리에 의해 혈청을 분리하여 사용시까지 -70°C 에 보관하였다. LDH, GOT, GPT의 분석은 각각 $10\ \mu\text{l}$ 의 배양액을 분석용 kit(Fuji Film)를 이용하여 자동 혈액분석기(Fuji DRI-CHEM 3500i)에서 측정하였다.

2. 호르몬 및 시약 처리

Estradiol- 17β (E_2), nonylphenol, bisphenol A(Sigma) 등의 호르몬 및 환경케미컬들은 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma)에 녹여 사용하였으며, 배양액내의 DMSO 농도는 0.01%를 넘지 않았다.

3. 간세포 분리

약 200 g의 수컷 메기의 간을 세포배양에 이용하였다. 우선 2-penoxethanol(Sigma)로 마취한 메기의 복부를 절개한 후 간을 적출하여 동맥구에 가까운 부분의 혈관에 가는 튜브를 연결하였다. Ca^{2+} -Ringer액(120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM KH_2PO_4 , 23 mM NaHCO_3 , pH 7.4)으로 5분간 관류하여 혈액 등의 불순물을 제거하였다. 이어서 collagenase (0.4 mg/ml, Sigma)를 포함하는 Ca^{2+} -free Ringer액으로 실온에서 약 25분간 관류하여 간을 소화시켰으며, Ca^{2+} , Mg^{2+} -free Ringer 액으로 효소활성을 억제하였다. 쓸개를 제거한 간을 50 ml의 Ca^{2+} -free Ringer 액에 넣어 피펫팅에 의해 세포 현탁액으로 만들었다. 나일론 거즈를 이용하여 세포 현탁액을 50 ml 용 원심관내로 여과시킨 후 세포현탁액을 800 rpm으로 2분간 원심 분리하여 펠렛 부분의 간세포를 얻었다. 이 절차를 3번 반복하여 얻어진 세포에 미리 준비한 배양액을 첨가하여 10 ml

의 현탁액으로 하였다. 세포의 생존율은 Trypan Blue를 이용하여 판별하였으며, 세포 수는 혈구계산판을 이용하여 계산하였다.

4. 간세포 배양

간세포 배양은 $3 \times 10^5/cm^2$ 개의 간세포를 3 ml의 배양액에 넣어 60 mm plastic petri dish(Falcon)에서 배양하였다. 배양액은 0.2 μ m insulin(Sigma), streptomycin(100 μ g/ml)과 penicillin (70 μ g/ml)을 포함하는 L-15 medium(Sigma)을 이용하였으며, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양온도는 25°C를 유지하였으며, 배양액은 24~48시간마다 새로운 배양액으로 교환하였다.

5. Vitellogenin(Vg)의 정제

메기 Vg은 E₂(5 mg/kg BW) 주사한 수컷의 혈청으로부터 분리하였다. 먼저 Vg을 포함하는 혈청 10 ml를 Mg-EDTA 법(Kwon & Mugiya, 1994)에 의해 전처리한 후 Sepharose 6B column(1M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)을 이용하여 Vg을 분리하였다. 보다 순수한 정제를 위해 Sepharose 6B column을 통해 얻은 Vg 분획을 FPLC(Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피 Mono Q column과 gel filtration인 Superose 6 HR 10/30 column을 이용하였다. 이온교환크로마토그래피는 Sepharose 6B column을 통해 얻은 Vg 분획을 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액에 NaCl 0~1 M의 linear gradient에 의해 용출시켰다. 유속은 분당 1 ml로 하였고, 분획 당 1 ml씩 수집하여 흡광도 280 nm에서 측정하였다. 이어서 Vg을 포함하는 분획을 speed vac concentrator를 이용하여 농축시킨 후 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 투석 후 Superose 6 HR 10/30 column(20 mM Tris-HCl, pH 8.0)을 이용하여 Vg을 분리하였다. 정제된 Vg 분획은 10% SDS-전기영동을 통해 분석하였다.

6. Peroxidase-IgG Conjugation

정제된 Vg(250 μ g/ml)과 Freund's complete adjuvant(Sigma)를 혼합하여 토끼에 주사하였다. 항원은 1주일 간격으로 4회 주사하여, 최종주사 1주일 후에 토끼 귀의 정맥을 통하여 항혈청을 채취하였다. 항혈청은 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

Vg 항혈청에 대한 효소 표식은 Kwon 등(1990)의 방법을 다소 변형하여 시행하였다. 먼저 Vg에 대한 토끼 IgG를 10

ml의 Vg 항혈청을 황산암모늄으로 침전시킨 후 DE52(diethylaminoethyl cellulose ion exchange chromatography, Whatman) column에 용출시켜 얻었다. Horseradish peroxidase(HRP, Sigma) 4 mg을 1 ml의 증류수에 녹여 0.1 M NaIO₄ 용액 0.2 ml를 더해 20분간 실온에서 교반하면서 반응시켰다. HRP 용액을 1 mM acetate buffer(pH 4.5)로 투석한 후 0.2 M carbonate buffer(pH 9.5) 20 μ g를 더해 pH를 알칼리성으로 변화시켰다. 여기에 0.01 M carbonate buffer(pH 9.5)로 투석시킨 IgG(10 mg) 용액을 더해 2시간 동안 실온에서 교반시켰다. NaBH₄ 환원을 2시간 행하였으며, PBS로 투석시킨 후 Sephadex G 200(0.01 M PBS, pH 7.2) column에 의해 용출된 분획을 280 nm와 403 nm에서 각각 측정하여 표식 항체를 얻었다.

7. Sandwich ELISA

ELISA는 Kwon 등(1990)의 방법에 따라 실시하였다. PBS에 용해한 a-Vg IgG 100 μ l(20 μ g/ml)를 96 well microplate(Falcon)에 코팅하여 4°C에서 16 h 동안 배양하였다. 0.05% Tween을 포함한 PBS(PBS-T)로 3번 씻은 후, PBS에 용해한 1% BSA(BSA-P) 150 μ l를 넣어 37°C에서 1 h 동안 blocking하였다. PBS-T로 3번 씻어낸 후 100 μ l의 원액 또는 적당히 희석한 샘플을 넣고 37°C에서 2 h 동안 배양하였다. 표준용액으로서 정제한 Vg(1~1,000 ng/ml)을 100 μ l씩 넣고 샘플과 같은 조건으로 배양하였다. PBS-T로 3번 씻은 후 peroxidase 표식한 IgG(OPD-IgG)를 BSA-P로 500배 희석한 용액을 100 μ l 넣고 37°C에서 2 h incubate하였다. PBS-T로 3번 씻어 낸 후 0.02% H₂O₂를 포함한 0.1 M citric acid-phosphate(pH 5.0) 용액으로 녹인 o-phenylenediamine(3 mg/ml)를 150 μ l씩 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다. 4N HCl 100 μ l를 넣어 반응을 정지시킨 후 흡광도 492 nm에서 ELISA reader(Molecular Devices)로 측정하였다.

8. 통계분석

실험결과는 SPSS program을 이용하여 각 실험군 간의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 통하여 분석하였다.

결 과

1. 혈청으로부터 Vg 분리

E_2 를 주사하여 얻은 메기 혈청을 Mg-EDTA법에 의해 전처리한 후 Sepharose 6B column을 이용하여 Vg을 분리한 결과 Fig. 1A에서와 같이 단일 peak를 나타내었다. 보다 순수한 정제를 위해 Vg 분획을 FPLC를 이용한 Mono Q 음이온 교환 column에 용출시킨 결과, 0.4M NaCl에서 Vg이 용출되었다(Fig. 1B). 이어서 얻어진 Vg 분획을 Superose 6 column을 이용하여 다시 분리하였다(Fig. 1C). 정제된 Vg 분획은 SDS-전기영동을 통해 분석한 결과 단일 밴드를 나타

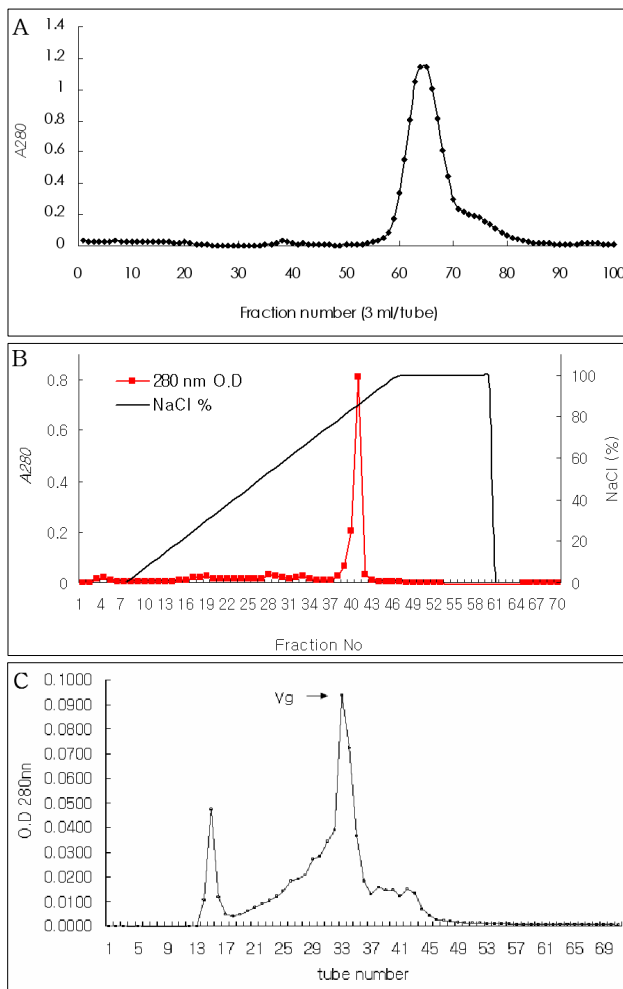


Fig. 1. Purification of catfish Vg by column chromatography.

A, gel filtration on Sepharose 6B of catfish Vg obtained by Mg-EDTA precipitation. The protein was eluted with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 0.35 M NaCl. B, anion-exchange FPLC on a DEAE Mono-Q HR5/5 column. Gradient elution was performed with a 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0 to 1 N NaCl. C, high speed gel filtration on Superose 6 HR 10/30 column.

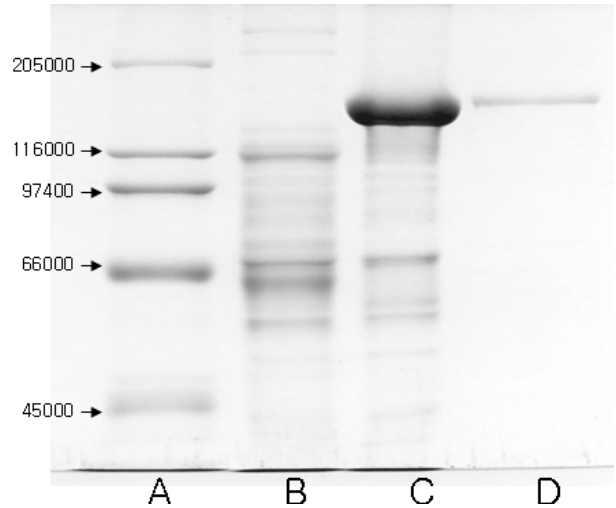


Fig. 2. SDS-PAGE of catfish vitellogenin (Vg) purified by column chromatography. A, molecular weight standard; B, male serum; C, E_2 -induced male serum; D, the catfish Vg purified by column chromatography.

냈으며, 분자량은 144 kDa으로 암컷 혈청의 Vg 부분과 이동도가 일치하는 것을 확인하였다(Fig. 2).

2. Sandwich ELISA System 개발

메기 Vg 항혈청으로부터 IgG를 분리하여 1차 항체로 이용하였으며, IgG-peroxidase conjugates의 Sephadex G-200 column에 의한 용출 pattern을 Fig. 3에 나타냈다. 첫 번째 peak는 blank치가 높아 두 번째 peak를 500~1,000배 희석하여 2차 항체로 이용하였다. Microplate에 coating하는 1차 항체(a-Vg IgG)의 적정농도는 10~40 $\mu\text{g/ml}$ 까지의 조사에

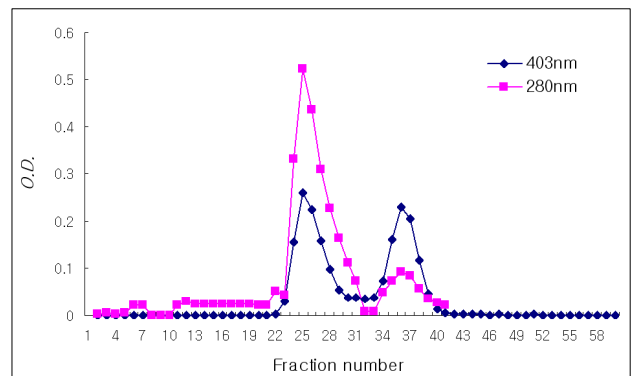


Fig. 3. Elution profiles of the anti-Vg IgG-peroxidase complex on a Sephadex G-200 column.

서 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 적절한 것으로 나타났다. 본 시스템에 의한 Vg 검출 한계는 적어도 10 ng/ml 로 Vg에 대한 특이성이 대체로 감도가 높은 것으로 나타났다.

3. 어류 및 송아지 혈청이 메기 간세포 단층배양에 미치는 영향

어류 혈청들이 간세포 배양에 미치는 영향을 조사하기 위해 collagenase에 의해 분리된 메기 간세포에 메기, 뱀장어, 틸라피아 및 송아지 혈청(FBS)을 각각 넣은 후 12일 동안 배양하였으며, Fig. 4에는 배양 4일째의 간세포 배양결과를 나타내었다. 간세포는 간에서 분리된 직후 둥근 형태를 갖고 있다. 배양 1일후에는 모든 실험구에서 세포들은 3~10개 정

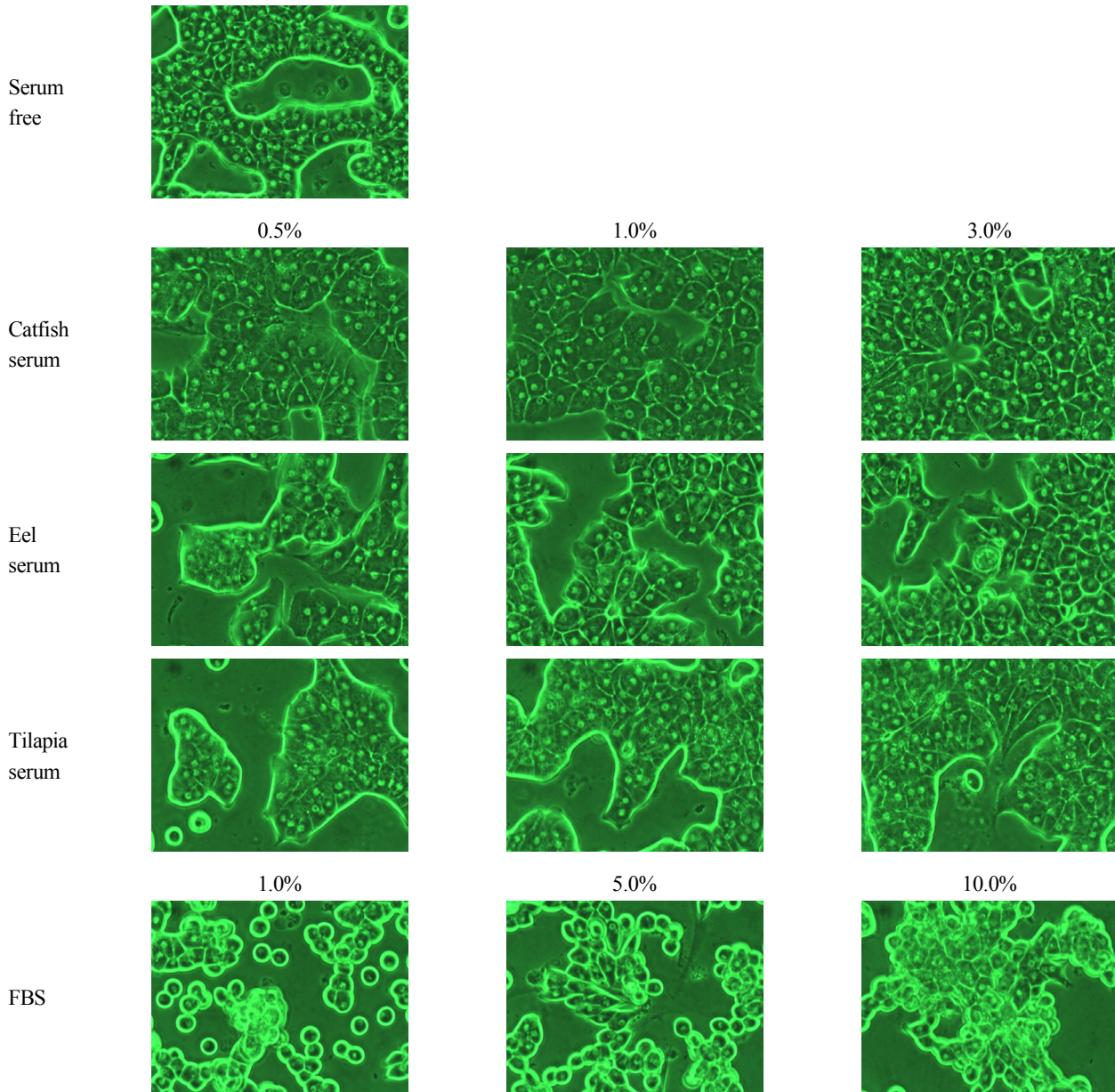


Fig. 4. Phase contrast photomicrographs of catfish hepatocytes cultured in L-15 medium or L-15 medium with 0.5~3% catfish serum (or tilapia or eel serum) or L-15 medium with 1~10% FBS. Hepatocytes were cultured in the presence of insulin for 12 days. The original magnification was $\times 400$.

도로 서로 연결되어 있었다. 배양 2일째의 무혈청구는 더 많은 세포가 연결되었으며, 1과 3%의 메기 혈청구에서는 이미 세포끼리 서로 연결되고 신전(伸展)되어 다각형의 단층을 형성하였으나, 0.5%의 메기 혈청구는 다소 느리지만 단층 형성이 진행되고 있었다. 1과 3%의 뱀장어 혈청구에서도 약간의 단층 형성이 관찰되었으나 0.5% 뱀장어 혈청구는 단층 정도가 미미하였다. 배양 2일째의 틸라피아 및 FBS 혈청구에서는 단층 형성을 관찰하지 못했다. 배양 3일째의 0.5, 1 및 3%의 메기 혈청구 모두에서 완전한 다각형의 단층 형성이 관찰되었고, dish내 빈 공간은 찾아볼 수 없었다. 뱀장어 1과 3%의 혈청 첨가구에서 불완전하지만 단층 형성이 관찰되었으나, 0.5%구에서는 부분적인 단층 형성만이 관찰되었다. 틸라피아 혈청구에서는 다각형의 형태를 띠는 듯 했으나 2~3개의 세포가 엉켜 다층을 형성하였다. FBS 첨가구에서 세포가 둥근 형태를 띤 채 서로 연결되어 덩어리를 형성하기 시작했다. 배양 6일 이후 틸라피아 혈청 첨가구에서도 다각형의 단층이 관찰되었으며, FBS 처리구는 둥근 형태를 띤 채 세포 덩어리를 형성하였다. 배양 8일째까지 모든 실험구에서 특이한 변화가 없었으나, FBS 처리구에서 세포의 응집과 탈락이 관찰되었다. 배양 12일 후에는 뱀장어 및 틸라피아 혈청 첨가구는 다각형의 형태 붕괴가 관찰되었고, 약간의 세포 탈락으로 dish 내 빈공간이 관찰되었으나, 메기 혈청 첨가구는 양호한 상태를 유지하였다. 무혈청 실험구는 하나의 커다란 세포덩어리를 형성하였다. 배양 10일 이후의 1과 5% FBS 첨가구는 서로 뭉쳐 세포 덩어리를 형성하였고, dish로부터 세포 탈락이 관찰되었으며, 10%의 첨가구는 심한 세포 탈락에 의해 관찰이 불가능하였다.

4. 배양시간 및 혈청 종류에 따른 배양액내 LDH, GOT 및 GPT 활성 변화

메기 간세포를 메기, 뱀장어, 틸라피아 혈청 및 FBS가 포함된 배양액에서 10일간 배양하며, 배양시간 및 혈청의 종류에 따른 간세포의 손상 정도를 알아보기 위해 배양액내의 LDH, GOT 및 GPT 수치를 측정하였다(Fig. 5A~C). 혈청의 포함 유무에 관계없이 모든 실험구에서 배양 2일째의 LDH, GOT 및 GPT의 수치가 높았다. 이는 간세포 분리 시 collagenase에 의한 세포 손상이 아직 회복되지 않았기 때문으로 추정된다. 어류 혈청이 포함된 모든 구에서 배양 4일에서 10일까지 이들 수치는 대체로 안정되었으나, 무혈청 배양에서는 8일 이

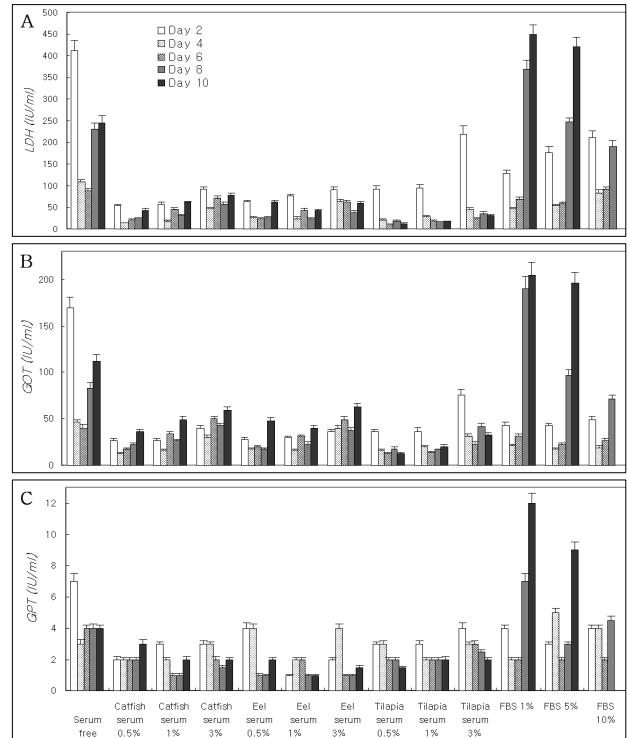


Fig. 5. Lactic dehydrogenase (LDH) (A), GOT (B) and GPT (C) released into the medium as a function of culture time. Cells were plated in 60 mm petri dishes at a density of 0.3×10^6 cells/cm².

후 수치가 급격히 증가하여 배양시간에 따른 간세포의 손상이 증가된 것으로 생각된다. 1~10%의 FBS 첨가된 실험구에서도 배양 8일 이후 이들 수치가 급격히 증가하였다. 배양 10일째의 10% FBS 함유 실험구에서는 세포 탈락이 심해 이들 수치를 측정할 수 없었다.

5. 혈청이 Vg 합성에 미치는 영향

무혈청, 3% 메기 수컷 혈청(CS) 및 5% FBS를 포함하는 배양액에 각각 $E_2(10^{-6}M)$ 를 첨가한 후 10일간 배양하여 E_2 에 의한 Vg 합성량을 비교하였다(Fig. 6). E_2 에 의해 합성된 Vg량은 배양 2일째 약 30 ng/ml, 배양 4일째 약 90 ng/ml, 배양 6일째 약 180 ng/ml로 혈청의 첨가 유무 및 종류에 관계없이 유사하게 증가하는 경향을 보였다. 그러나 배양 8일째에 무혈청 201 ± 12 ng/ml, CS 220 ± 9 ng/ml, FBS 178 ± 11 ng/ml로 CS 처리구에서 가장 높았고, FBS 처리구에서 가장 낮은 Vg 합성량을 나타냈다. 배양 10일째에는 FBS 처리구에서 현격한 Vg 합성 저하가 관찰되었다.

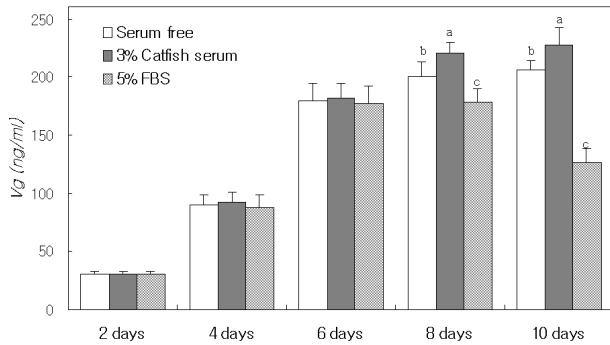


Fig. 6. Effect of E₂ treatment on vitellogenin (Vg) synthesis in male catfish hepatocytes cultured in L-15 media with catfish serum (CS) or fetal bovine serum (FBS). Hepatocytes were cultured for 10 days with E₂ (10⁻⁶M) in media containing 3% male catfish serum or 5% FBS. The level of Vg in the medium was measured by ELISA. Values were expressed as mean±SD (n=3).

6. Vg 합성에 대한 Nonylphenol과 Bisphenol A의 영향

메기 간세포를 nonylphenol(10⁻⁶~10⁻⁵M) 또는 bisphenol A(10⁻⁶~10⁻⁵M)를 L-15 배양액(3% 메기 혈청이 포함)에서 6일간 배양한 후 Vg 합성량을 조사했다(Fig. 7). Nonylphenol에 의한 Vg 합성량은 10⁻⁶M에서 20±1.8 ng/ml, 10⁻⁵M에서 27±2.3 ng/ml로 낮게 나타났으며, bisphenol A는 10⁻⁶M에서 31±2.5 ng/ml, 10⁻⁵M에서 43±2.7 ng/ml로 나타났다. 이러한 결과는 E₂(10⁻⁶M)에 의해 유도된 Vg량의 1/10 정도였다.

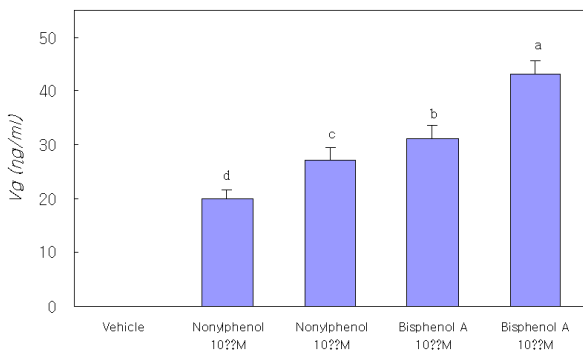


Fig. 7. Effects of nonylphenol and bisphenol A on vitellogenin (Vg) synthesis in catfish hepatocyte cultures. Hepatocytes were cultured for 6 days with nonylphenol (10⁻⁶~10⁻⁵M) and bisphenol A (10⁻⁶~10⁻⁵M). The level of Vg in the medium was measured by ELISA. Values were expressed as mean±SD (n=3).

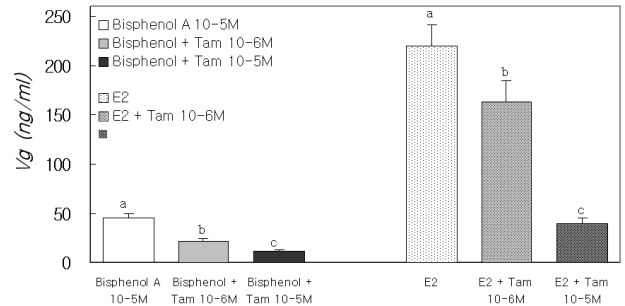


Fig. 8. Effects of tamoxifen (Tam) on Vg synthesis in catfish hepatocyte cultures. Hepatocytes were cultured for 6 days with E₂ (10⁻⁶M) or bisphenol A (bis, 10⁻⁶~10⁻⁵M) and then were cultured for another 2 days with E₂+Tam (10⁻⁶~10⁻⁵M) or bis+Tam (10⁻⁶~10⁻⁵M). The level of Vg in the medium was measured by ELISA. Values were expressed as mean±SD (n=3).

7. Vg 합성에 대한 Tamoxifen의 영향

E₂ 및 bisphenol A의 Vg 합성에 대한 tamoxifen의 영향을 조사하였다. 3% 메기 혈청이 포함된 배양액에 E₂(10⁻⁶M) 및 bisphenol A(10⁻⁵M)를 첨가하여 배양하였다. 배양 6일째에 E₂, bisphenol A 및 tamoxifen(10⁻⁶~10⁻⁵M)을 각각 또는 혼합하여 첨가한 후 2일간 더 배양한 결과를 Fig. 8에 나타냈다. Tamoxifen은 E₂와 bisphenol A에 의한 Vg 합성을 저해하였으며, tamoxifen 10⁻⁶M보다 10⁻⁵M에서 현저한 저하가 관찰되었다.

고 찰

어류는 포유류, 조류, 파충류 및 양서류와 달리 간의 모양과 크기가 다양하고, 서식 환경이 달라 간세포 배양법을 확립하기가 매우 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서 어종에 따라 간세포의 조제 방법, 배양액의 종류, pH, 삼투압, 온도 등의 조건이 달라야 한다(Segner, 1998; Kim & Takemura, 2003; Kwon et al., 2006). 또한 배양액내에 혈청, 인슐린 등의 포함 유무, 세포 부착 기질 등이 어류 간세포의 기능과 형태 그리고 생존에 커다란 영향을 미친다. 간이 생체내 많은 물질대사를 담당하기 때문에 *in vitro*에서 이들 물질들을 연구하기 위해 간세포 배양은 매우 중요한 도구가 될 수 있다. 단백질, 지질대사, vitellogenin 합성 메커니즘 및 내분비계 장애물질 등의 검출을 위해 어류 간세포 배양계가 많이 사용

되어 왔지만, 정작 어류 배양 간세포의 생존 및 형태에 관한 연구는 많지 않다(Segner, 1998).

따라서 안정적이고 장기적인 어류 간세포 배양법의 필요성을 인식하고 이를 확립하기 위해 간세포의 단층 형성에 어류 혈청이 유효한가를 검토하고, 확립된 간세포 배양계가 estrogenic 유사물질들의 효율적 검출에 이용 가능한가를 조사했다.

메기 간세포 배양법을 확립하기 위해 메기, 틸라피아, 뱀장어의 혈청 및 FBS가 메기 간세포의 부착 및 단층 형성에 미치는 영향을 검토하였다. 메기 간세포 배양에 자신의 혈청 첨가는 배양 2일 째에 단층 형성을 시작하여 틸라피아와 뱀장어보다 빠른 단층 형성이 관찰되었으며, 12일 간의 배양 기간 중 양호한 세포 부착 및 형태를 유지하고 있었다. Medium에 첨가되는 메기 혈청의 농도는 0.5%의 적은 농도에도 단층 형성이 가능하지만 1% 이상 포함되는 것이 세포의 기능 및 형태 유지에 적합한 것으로 판단된다. 포유류에서 보이는 완전한 다각형의 세포 형태 관찰은 뱀장어 이외의 어류에서 좀처럼 찾아보기 어렵다. 뱀장어 간세포의 경우 fibronectin을 기질로 하고 5~10% FBS에 의해 단층이 형성되지만(Hayashi & Ooshiro, 1975), collagen 및 fibronectin 등의 기질을 coating하지 않고 어류에서 완전한 단층을 형성한 것은 메기가 처음이다. 따라서 메기 간세포 배양에 있어 FBS를 사용하지 않고, 적은 양의 메기 혈청에 의해 단층을 형성할 수 있는 것은 매우 중요한 의미를 갖는다. 메기 간세포 배양에 다른 어종 즉 틸라피아와 뱀장어 등의 혈청을 이용하여도 메기 간세포의 단층이 형성되어지는 것이 관찰되었다. 다른 어종의 혈청은 메기 자신의 혈청보다는 단층 형성이 다소 느리게 진행되고 메기에 비해 명확한 다각형의 형태를 보이지 않았으나, 메기 간세포 배양 및 단층 형성에 이용 가능한 것으로 판단된다. 그러나 FBS의 경우, 배양 12일 동안 메기 간세포의 단층 형성을 관찰하지 못했으며, 세포끼리 응집되어 커다란 세포덩어리를 형성하였으며, 세포배양 시간에 따라 세포들이 dish로부터의 탈락이 어류 혈청을 사용하는 것보다 빨랐다. 따라서 FBS는 메기 간세포 배양에 적합하지 않은 것으로 판단된다.

현재 nonylphenol류, bisphenol A, PCBs 등은 estrogen 유사 작용을 하는 내분비계 장애물질들로서 육상 및 수중 동물들의 생식 및 면역계 이상을 초래한다. 따라서 estrogen 유사물질들을 스크린하기 위한 여러 가지 방법이 연구되어 왔

데, 그 중 난황물질의 전구체인 Vg을 이용한 검정법은 내분비 장애물질들의 estrogenic 활성을 평가하는데 유용한 biomarker로서 이용되고 있다(Fossi et al., 2002; Kordes et al., 2002; Marin & Matozzo, 2004). 간세포 배양에 따른 medium 내 Vg 측정은 방사면역측정법(RIA), ELISA 및 Western blotting 법 등이 개발되어 왔으나, 그 중 ELISA가 가장 많이 이용되고 있다(Kwon et al., 1990; Bon et al., 1997; Jobling et al., 1998; Sole et al., 2000). ELISA는 단클론 항체 및 다클론 항체를 이용하여 경합법, 비경합법 및 sandwich 법 등이 사용되고 있는데, 본 연구에서 개발된 다클론 항체를 이용한 sandwich ELISA법은 적어도 10 ng/ml 감도를 갖고 있는 것으로 나타나 환경오염물질들의 estrogenic 활성 여부를 테스트하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다. 따라서 본 연구에서 확립된 ELISA 법에 의해 무혈청, 어류 혈청 및 FBS 등이 포함된 간세포 배양계에서 Vg 합성능을 비교하였는데, 6일간의 배양기간 중에는 E₂에 의한 Vg 합성은 3가지 조건에서 커다란 차이를 보이지 않았으나 8일 이후의 배양에서는 3%의 메기 혈청이 가장 높은 수치를 나타냈으며, 무혈청 배양도 메기 혈청 첨가구에 비해 낮은 Vg 합성을 나타냈으나 사용 가능한 것으로 판단되며, FBS 첨가구는 무혈청 및 메기 혈청 첨가구에 비해 Vg 합성능에 있어 유의적으로 낮아 장기간의 배양에는 FBS 첨가는 적합하지 않은 것으로 나타났다. FBS 첨가구에 Vg 합성이 낮게 나타난 것은 FBS 첨가에 의한 세포 손상 및 탈락에 의한 결과로 생각된다. 본 연구의 결과에는 제시하지 않았으나 어류 혈청 및 FBS내에 미량의 E₂가 포함되어 있을 가능성에 대해 조사한 바, E₂ 첨가 없는 dish에서 Vg 합성을 관찰할 수 없었다. 따라서 내분비 장애물질 검출을 위한 단기간의 배양은 FBS 첨가 없이 무혈청 배양도 가능하며, 보다 장기간의 배양에는 어류 혈청 첨가가 필요하다. 또한 본 연구에서 개발된 어류 혈청을 이용한 간세포 배양계와 sandwich ELISA법이 내분비 장애물질을 효율적으로 검출하는데 이용될 수 있음이 nonylphenol, bisphenol A, tamoxifen 등을 사용하여 확인할 수 있었다. 여기에서 tamoxifen은 E₂ 수용체와 결합하여 Vg 합성을 저해하는 것으로 알려져 있는데, 내분비 장애물질인 bisphenol A 역시 tamoxifen에 의해 Vg 합성이 저해되는 것으로 보아 bisphenol A와 같은 내분비 장애물질들이 E₂ 수용체를 매개하여 Vg 합성하는 것으로 생각되어진다.

결론적으로 내분비 장애물질의 검출을 위한 메기 간세포

의 단층 형성, 생존 및 기능에 어류 혈청이 크게 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 0.5에서 3%의 어류 혈청으로 메기 간세포의 단층을 형성시킬 수 있는데, 이것은 FBS(5~20%) 사용의 1/10 이하로 적은 양이며, 어류 혈청이 FBS 를 대체할 수 있고, FBS 보다 간세포의 형태 및 기능 유지에 효과적인 것으로 나타났다. 또한 태어종의 혈청이 메기 간세포의 다각형의 단층을 형성하지만, 메기 자신의 혈청에 비해 완전하지 못한 것으로 나타나 어종간 혈청성분의 차이점에 대해 조사할 필요가 있다고 본다. 본 연구에서 개발된 어류 혈청을 사용한 메기 간세포 배양시스템과 ELISA법은 내분비계 장애물질의 검출 및 연구를 위한 유용한 도구로서 이용될 수 있다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-2556-C00525).

인용문헌

- Bon E, Barbe U, Nunez Rodriguez J, Cuisset B, Pelissero C, Sumpter JP, Le Menn F (1997) Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): establishment and validation for an ELISA. *Comp Biochem Physiol* 117B:75-84.
- Burki R, Vermeirssen ELM, Koerner O, Joris C, Burkhardt-Holm P, Seger H (2006) Assessment of estrogenic exposure in brown trout (*Salmo trutta*) in a Swiss midland river: integrated analysis of passive samplers, wild and caged fish, and vitellogenin mRNA and protein. *Environ Toxicol Chem* 25:2077-2086.
- Fossi MC, Casini S, Marsili L, Neri G, Mori G, Ancora S (2002) Biomarkers for endocrine disruptors in three species of Mediterranean large pelagic fish. *Mar Environ Res* 54:667-671.
- Guillette LJ, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR (1999) Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 102:680-688.
- Hyashi S, Ooshiro Z (1975) Gluconeogenesis and glycolysis in isolated perfused liver of the eel. *Bull Jap Soc Fish* 41:201-208.
- Jobling S, Nolan M, Tyler C, Brighty G, Sumpter JP (1998) Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Technol* 32:2498-2506.
- Kim BH, Takemura A (2003) Culture conditions affect induction of vitellogenin synthesis by estradiol-17 β in primary cultures of tilapia hepatocytes. *Comp Biochem Physiol* 135B:231-239.
- Kordes C, Rieberb EP, Gutzeit HO (2002) An *in vitro* vitellogenin bioassay for oestrogenic substances in the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 58:151-164.
- Kwon HC, Hara A, Mugiya Y, Yamada Y (1990) Enzyme linked immunosorbent assay of vitellogenin in white spotted charr. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* 41:162-180.
- Kwon HC, Hayashi S, Mugiya Y (1993) Vitellogenin induction by estradiol-17 in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol* 104B:381-386.
- Kwon HC, Mugiya Y (1994) Involvement of growth hormone and prolactin in the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the *Anguilla japonica*. *Gen Comp Endocrinol* 93:51-60.
- Kwon HC, Choi SH, Kim EH, Han DW, Kwon JY (2006) Effect of fish serum on the primary monolayer culture of catfish hepatocytes. *J Kor Fish Soc* 39:23-26.
- Marin MG, Matozzo V (2004) Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin* 48:835-839.
- Mommsen TP, Moon TW, Walsh PJ (1994) Hepatocytes: isolation maintenance and utilization. In: Hochachka PW, Mommsen TP, eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Analytical Techniques*, vol. 3. p355-372, Amsterdam, Elsevier.

- Nakari T, Pessala P (2005) *In vitro* estrogenicity of polybrominated flame retardants. *Aquatic Toxicology* 74: 272-279.
- Navas JM, Segner H (2006) Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for *in vitro* screening of the (anti) estrogenic activity of chemical substances. *Aquatic Toxicology* 80:1-22.
- Rutishauser BV, Pesonen M, Escher BI, Ackermann GE, Aerni HR, Suter MJ, Eggen RI (2004) Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three *in vitro* assays and chemical analysis of steroids. *Environ Toxicol Chem* 23:857-864.
- Segner H (1998) Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comp Biochem Physiol* 120:71-81.
- Sole M, Porte C, Barcelo D (2000) Vitellogenin induction and other biochemical responses in Carp, *Cyprinus carpio*, after experimental injection with 17 α -ethynlestradiol. *Arch Environ Contam Toxicol* 38:494-500.
- Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP (1998) Endocrine disruption in wildlife: a critical review of evidence. *Crit Rev Toxicol* 28:319-361.
- Vaillant C, Le Guellec C, Pakdel F, Valotaire Y (1998) Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol* 70:284-290.

(received 2 September 2009, received in revised form 31 October 2009, accepted 1 November 2009)