

에스트로겐과 다이옥신 수용체 효모를 이용한 내분비계장애 영향 평가

이병천 · 김수진 · 윤준현 · 김은주 · Duong NC · 엄익춘 · Shiraishi F.* · 최경희†

국립환경과학원 위해성평가과, *일본 국립환경연구원 환경위해성연구센터

Estrogenic and Dioxin Activities of Endocrine Disrupting Chemicals in River Water and Sewage Treatment Plants

Byoung-cheun Lee, Suejin Kim, Junheon Yoon, Eunju Kim, Duong NC, Igchun Eom, Shiraishi Fujio*, and Kyunghee Choi†

Risk Assessment Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 404-708, Korea

*Research Center for Environmental Risk, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba 305-8506, Japan

Received June 15, 2010/Accepted September 6, 2010

Estrogenic and dioxin activities in river water and effluents of sewage treatment plants were evaluated by different *in vitro* assays. The expression of β -galactosidase in yeast cells (Yeast two-hybrid assay) was used as an indicator of pollutants effects. Estrogenic activities were estimated using medaka estrogen receptor (mER) and human estrogen receptor (hER) yeast while the dioxin activities were measured by Aryl hydrocarbon receptor (AhR) yeast. Five samples were collected including two river water (RW) samples and three effluents (MW) samples. Target chemicals were extracted using a series of solvents which are hexane/dichloromethane, acetone/dichloromethane and methanol. Standard dose-response curves were established with 3 estrogenic chemicals (estradiol, nonylphenol and bisphenol A) and 3 dioxin-like chemicals (naphthoflavone, comestrol and equol). The results showed that both estrogen receptors (i.e., mER and hER) were suitable to be applied into the assessment of micropollutants' estrogenicity, in which, the sensitivity of mER to estrogenic activity was higher than that of hER. AhR also showed a suitable sensitivity to target dioxins. Estrogenic activity of MW-1 was highest among the samples in both mER and hER yeast assays. The estrogenic activities of two other effluents samples, however, were lower than that of MW-1 and other RW samples. This indicates that river water may receive estrogenic-polluted water other than the effluents of STPs. Similarly, dioxin activities in RW samples were higher than that of effluents. It is suggested that the untreated agriculture wastewater could be the reason. This study contributes to the establishment and application of risk assessment of micropollutant in the environment.

Key words: aryl hydrocarbon, dioxin activity, estrogen activity, human receptor, medaka receptor

1. 서 론

내분비계장애물질(Endocrine Disrupting Chemicals: EDCs)은 내분비계의 정상적인 기능을 방해하는 물질을 말하며, 환경으로 배출된 화학물질이 생물의 체 내에 유입되어 마치 호르몬과 같은 작용을 하여 일명 환경호르몬이라고도 불리고 있다. 1995년에 미국의

Teodo Colborn이 “도둑맞은 미래”에서 화학물질의 생태계 영향에 미치는 악영향에 대한 논의를 제기한 이후 내분비계장애물질이 인체와 생태계에 미치는 영향에 관하여 수많은 연구가 진행되어 왔으며, 그 관리대책 또한 어느 정도 틀을 잡아왔다. 그러나 여전히 내분비계장애물질로 인한 피해의 정도는 명확하게 알려져 있지 않으며, 실제로 환경 중에는 내분비계장애물질이

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: nierchoi@korea.co.kr

많이 존재하기 때문에 생태 및 인체에 대한 위해성을 규명하는 것은 매우 어려운 실정이다.

우리나라는 환경부에서 1999년부터 전국을 대상으로 환경매체 및 어류를 대상으로 내분비계장애물질에 대한 조사가 진행되어 왔다. 그 결과에 의하면 환경 중 잔류 수준은 점차 물질별로 차이가 있지만 전반적으로 외국과 비교하여 우려할 수준이 아닌 것으로 나타났다. 또한 매년 지속적으로 국내 환경 중 검출되는 내분비계장애물질은 10여 종에 불과한 것으로 나타나고 있다. 그러나 어류의 경우는 생체 중에서 이성생식세포의 발현 등 내분비계장애현상이 여전히 확인되고 있으므로 내분비계장애물질에 의한 영향에 대해서는 아직 명쾌한 결론을 내릴 수 없는 상황이다^{1,2)}.

내분비계장애현상을 유발하는 물질에 대한 모니터링 결과는 여러 연구자들이 보고하였다. 연구결과에 따르면, E1(estrone)과 E2(17 β -estradiol)와 같은 천연호르몬과 NP(nonylphenol), BPA(bisphenol A), EE2(17 α -ethynylestradiol) 등과 같은 합성 내분비계장애물질은 대부분 하천에서 2.8~211 ng/L 수준으로 검출되고 있으며, 퇴적물에서는 3.1~289 μ g/kg 수준으로 검출되고 있다. 한편 생물체 내에서는 EE2와 NP가 7.2~240 ng/g 범위로 검출되었다고 보고되었다. 환경매체별로 노출농도가 높은 물질을 살펴보면 물에서는 E2와 EE2가 평균 25 ng/L EEQ(estradiol equivalent concentration)로 높게 나타났으며, 퇴적물에서는 합성 내분비계장애물질인 EE2가 평균 71 μ g/kg EEQ를 나타내었다⁶⁾. 또한 Park 등³⁾은 일반 하천수에서 흔히 검출되는 구리가 농도에 따라서 내분비계장애물질인 17 β -estradiol 등과 결합하여 에스트로겐 활성을 변화시키는 것으로 보고하였다. 이와 같이 개별 내분비계장애물질에 대한 영향을 밝히는 것으로는 환경 중에서 복합적으로 존재할 때 인과관계를 설명하는데는 한계가 있다. 따라서 복합적으로 노출된 내분비계장애의 정도를 파악할 수 있는 기법을 개발할 필요성이 높아지고 있다. 또한, 최근에는 내분비계장애물질 현상을 나타내는 원인물질로서 기존에 관심대상이었던 농약, 중금속 등의 화학물질 뿐 아니라 자연 중 존재하는 식물성 에스트로겐 및 의료처방용으로 사용되는 호르몬제의 내분비계교란현상에 대한 연구 필요성이 대두되고 있다. 현재 E-screen assay 등 수종의 bioassay 기법이 이러한 영향을 신속하게 평가할 수 있는 장점을 가진 것으로 알려져 있으며, 환경 중의 다양한 물질에 대하여 통합적으로 영향을 측정하는데 이용되고 있다^{4,5)}.

내분비계장애물질의 영향을 평가하기 위한 bioassay 연구에는 *in vitro* assay가 많이 연구되고 있는데, 특히 기존의 yeast estrogen system으로부터 발전시킨 yeast two-hybrid system을 이용한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 이 기법은 화학물질이나 환경시료에서 에스트로겐 활성을 평가하기 위하여 96 well plate 상에서 배양·측정하여 상대적인 활성도를 나타내는 방법이다^{7,8,9,10)}. 따라서 본 연구에서는 내분비계장애현상을 복합적, 통합적으로 평가할 수 있는 *in vitro* bioassay 기법을 이용하여 화학물질의 내분비계장애물질뿐 아니라 하천수 및 하수처리장 방류수 중에 나타나는 내분비계장애영향을 평가하는 것을 목적으로 하였다.

2. 실험 방법

2.1. Yeast two-hybrid system

Yeast two-hybrid system은 효모에 포유류의 에스트로겐 수용체(estrogen receptor: ER)를 도입시켜 형질 전환시킴으로써 에스트로겐 활성을 측정하는 방법으로 내분비계장애물질의 영향을 포괄적으로 측정하는데 중요한 방법으로 인식되고 있다¹¹⁾. 시험에 사용한 Cell line은 Y190 cell로서 일본 국립환경연구소의 Shiraishi F로부터 세포를 분양받아 사용하였다. 분양받은 효모세포는 핵 내 수용체에 사람의 에스트로겐 수용체를 도입한 hER(human Estrogen Receptor)와 핵 내에 Japanese medaka의 에스트로겐 수용체를 도입한 mER(medaka Estrogen Receptor) 2가지 종류였다. 또한 내분비계장애물질의 대표적인 물질인 다이옥신이 세포내에서 결합하게 되는 아릴탄화수소 수용체(Aryl hydrocarbon Receptor: AhR)를 효모(YCM3)에 도입하여 사용하였다. YCM3은 Miller 등¹²⁾에 의해 human AhR 유전자를 효모에 도입하여 개발된 것으로서 이 세포주를 이용하여 96 well plate 상에서 분석하였다. 즉, 본 연구에서는 hER, mER 및 AhR 세 종류의 효모세포를 이용하여 화학물질 및 환경수에 대한 내분비계장애 영향을 평가하였다. 이 실험 방법은 효모의 수용체에 내분비계장애물질이 결합되면, 그 정보가 기본전사인자(transcription machinery)에 전해지게 되는데, 이때 전달역할을 하는 단백질로서 co-activator, TIF2를 이용하였다. 기존의 YES(Yeast Estrogen Screening)법에서 사용하는 효모에 co-activator와 ER 단백질의 발현유전자를 도입함으로써 민감도를 향상하였으며,

reporter 유전자로는 β -galactosidase를 이용하였다.

2.2. β -galactosidase 측정

수용체를 변형한 효모를 배양하기 위하여 배지는 포도당 7.5 g, yeast nitrogen base(w/o Amino acids, Difco) 5.8 g, 아미노산 혼합용액(-Trp, -Leu) 174 mL, 초순수 1000 mL를 혼합하여 멸균하여 만들었다. -80°C에서 동결 보존된 효모액 0.5 mL을 배양매지 30 mL에 접종하여 30°C에서 24 hr 동안 shaking하면서 배양하였다. 이때 사용된 아미노산 혼합용액(-Trp, -Leu)은 Sigma Aldrich(USA)로부터 구매한 L-Isoleucine 300 mg, L-Valine 1500 mg, L-Arginine HCl 200 mg, L-Adenine hemisulfate salt 200 mg, L-Histidine HCl monohydrate 200 mg, L-Methionine 200 mg, L-Phenylalanine 500 mg, L-Threonine 2000 mg, L-Lysine HCl 300 mg, L-Tyrosine 300 mg, L-Uracil 200 mg을 초순수 2 L에 녹인 다음 멸균하여 제조하였으며 냉장 보관하여 사용하였다.

화학물질 및 전처리된 환경 시료를 효모에 노출시키는 것은 96 well plate를 이용하였다. 먼저 96 well plate에 2% DMSO가 함유된 배양매지 30 μ L를 주입하였으며, 100%의 DMSO에 용해된 화학물질 및 환경 시료를 배양매지로 50배 희석한 시료 30 μ L를 well plate에 주입하였다. 이때 각 시험마다 효모농도를 일정하게 유지하여 오차를 줄이기 위하여 24시간 동안 배양된 효모의 OD₅₉₅(595 nm 흡광도)값을 구하여 1.7 cm⁻¹이 되도록 배양매지로 희석하였다. 일정한 농도로 조정된 효모를 시험 well plate에 60 μ L씩 첨가한 다음 well plate의 최종 DMSO 농도가 1%가 되도록 조정하여 DMSO에 의한 효모의 증식에 미치는 영향을 최소화하였다. 이때 화학물질과 환경시료는 8단계로 희석하였으며, 각 농도별 3회 반복하여 노출시험을 수행하였고, 배양매지만을 주입한 무침가 대조군 시험을 동시에 진행하였다. 시료 주입이 끝나면 효모를 첨가한 well plate는 40초간 교반하여 30°C에서 4시간 동안 반응시켰다.

반응이 끝난 다음에는 효모 세포벽을 용해시키기 위하여 Lysis 용액 7 mL과 β -galactosidase 측정키트의 반응완충액 3 mL(Reaction buffer, AuroraTM GAL-XE, ICN Biomedicals, Inc. CA, USA)를 혼합한 다음 이 혼합액을 80 μ L씩 각 well에 첨가하고 교반 후, 37°C에서 1시간 정치하였다. 이때 세포벽을 분해하기 위한 효소로는 zymolyase를 이용하였다. 즉, Lysis 용

액은 zymolyase 100T 2 mg을 Z-buffer 7 mL에 녹여서 제조한 다음 -80°C의 냉동고에 보존하여 사용하였으며, 실험전에 실온에 약 1시간 보관하여 따뜻하게 하여 사용하였다. Z-buffer는 Na₂HPO₄·12H₂O 21.5 g, NaH₂PO₄·2H₂O 6.2 g, KCl 0.75 g, MgSO₄·7H₂O 0.246 g를 1 L 증류수에 용해하여 만든 후 사용하였다. 1시간 동안의 반응이 끝난 다음에는 발광촉진액(light emission accelerator, AuroraTM GAL-XE, ICN Biomedicals, Inc., USA)을 50 μ L씩 첨가하면서 발광강도(luminescence intensity)를 Luminometer(Infinite F200, Tecan, Austria)를 이용하여 측정하였다. 측정된 시료의 발광강도는 표준물질로 사용된 E2의 발광강도와 비교하여 E2농도로 나타내었다. AhR 활성도 측정은 에스트로겐 활성도를 측정하는 방법과 동일하게 yeast two-hybrid system으로 수행되었으며, 표준물질로서는 β -Naphthoflavone을 이용하여 나타냈다.

2.3. 환경시료의 채취 및 전처리

환경시료 중의 내분비계장애 영향을 측정하기 위하여 내분비계장애물질의 대표적인 배출원이 되는 가정 하수처리장 방류수(MW-1, MW-2, MW-3) 세 지점과 공단유역의 하천수 2지점(RW-1, RW-2)을 대상으로 하였다.

시료의 전처리는 '내분비계장애물질 측정분석 방법(2002)'과 일본 환경성 '외인성 내분비계교란 화학물질 조사 잠정매뉴얼'을 기초로 하였으며¹³⁾, 시료용 채수병은 비이온계면활성제로 초음파 세척 후, 에탄올, 증류수의 순서로 세척하여 사용하였다. 채취된 시료는 아이스박스에 넣어 운반한 다음, 전처리와 bioassay전까지 냉장 보관하였다. 채취된 시료는 입자성분을 분리하기 위하여 시료 2 L를 GF/C(0.45 μ m Whatman, UK)로 여과한 후, 추출 전까지 냉장 보관하였다. 여과에 사용된 GF/C도 메탄올과 증류수로 20분간 초음파 세척 후 건조하여 분석에 사용하였다. 시료 추출은 고상 추출법(Solid Phase Extraction: SPE)을 사용하였으며, 카트리지는 1 g HLB cartridge(Oasis, Island)를 사용하여 최대 100배까지 농축하였다. 내분비계장애물질은 다양한 물-옥탄올 분배계수를 가지므로 추출 용매는 세 가지 종류의 용매를 이용하여 순차적으로 추출하였다. 헥산과 디클로로메탄 3:1 비율(Hx/DCM), 아세톤과 디클로로메탄 1:1 비율(Ac/DCM), 메탄올(MeOH) 순으로 소수성에서부터 친수성 용매로 전환하면서 각각 20 mL씩 연속 추출하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 hER 및 mER에 의한 내분비계장애물질의 반응

Fig. 1과 2에 나타난 바와 같이 E2, NP 및 BPA 3종의 내분비계장애물질에 대한 에스트로겐 활성도를 hER와 mER를 이용하여 농도반응 곡선으로 작성하였다. E2를 0.000272~1.09 µg/L 범위에서 hER와 mER에 동일한 농도로 노출시켰을 때, 에스트로겐 활성도는 hER는 233을 나타냈으나, mER는 1,034까지 증가하는 것을 볼 수 있었다. NP는 0.034~2.2 µg/L 범위에서, BPA는 0.071~4.56 µg/L 범위에서 에스트로겐 활성도를 측정된 결과, mER의 에스트로겐 활성도가 더욱 높게 나타내어, mER이 hER보다 더욱 민감하게 내분비계장애물질과 반응하는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 1 및 2에서 알 수 있듯이 mER와 hER에 대하여 각 물질은 농도 의존적으로 에스트로겐 활성도가 효과적으로 증가하는 것으로 나타났다. Table 1에는 에스트로겐 수용체별로 내분비계장애물질의 활성도를 객관적으로 표현하기 위하여 에스트로겐활성도 10의 값을 나타내는 농도를 EC₁₀(µg/L)으로 나타냈다. 그러므로

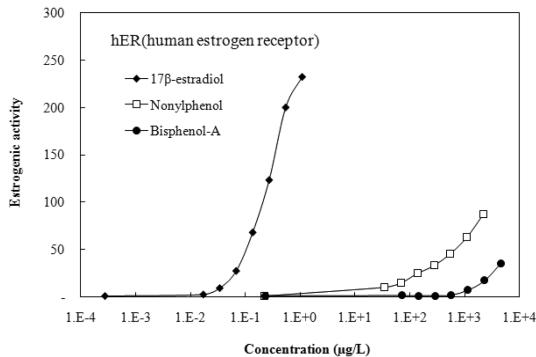


Fig. 1. Dose-response curve of 3 EDCs for hER yeast.

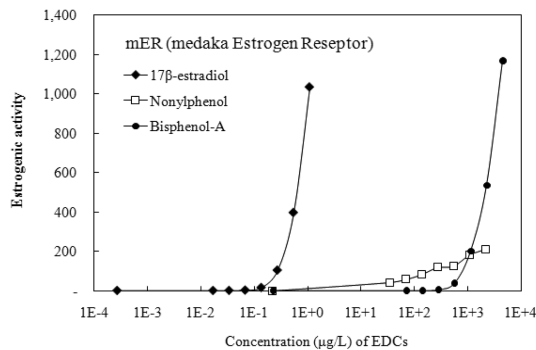


Fig. 2. Dose-response curve of 3 EDCs for mER yeast.

Table 1. Comparison of relative potency hER and mER by yeast two-hybrid system

| Items | EC×10 (µg/L) | | Relative potency | |
|---------------|--------------|---------|-----------------------|-----------------------|
| | hER | mER | hER | mER |
| 17β-estradiol | 0.033 | 0.099 | 1 | 1 |
| nonylphenol | 33.895 | 7.557 | 9.82×10^{-4} | 1.31×10^{-2} |
| bisphenol-A | 1495.409 | 279.968 | 2.23×10^{-5} | 3.52×10^{-4} |

EC₁₀ 값이 낮을수록 더욱 높은 에스트로겐 활성도를 나타내게 된다. Relative Potency는 E2의 에스트로겐 활성도 값을 1로 두었을 때의 상대적인 활성도를 의미한다. 즉, mER를 이용했을 때 NP는 E2에 비하여 1.31×10^{-2} 배의 활성을 가지며, BPA는 E2에 비하여 3.5×10^{-4} 배로서 상대적으로 낮은 활성도를 나타냈다. 또한, hER의 경우에도 E2의 활성도를 1로 하였을 때, NP는 9.8×10^{-4} 배, BPA는 2.2×10^{-5} 배의 활성도 크기를 나타냈다.

3.2. 환경시료에 대한 에스트로겐 활성도

다양한 내분비계장애물질이 포함되어 있는 하천수와 하수처리장방류수를 대상으로 hER와 mER를 이용한 시험결과는 Fig. 3에 나타내었다. 각 환경시료의 에스트로겐 활성도는 E2의 농도반응 곡선을 바탕으로 E2의 농도로 환산한 값으로 나타낸 것이다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 hER를 이용했을 때 하천수에서는 에스트로겐성 물질이 검출되지 않았고, 하수처리장 방류수인 MW-1에서만 5.1 ng/L(as E2)로 나타났다. 또한 에스트로겐 활성도는 아세트산과 디클로로메탄을 1 : 1로 혼합한 용매를 이용하여 추출한 시료에서만 검출되었다. 한편 Fig. 3에서 보면 mER 효모를 이용하여 측정된 에스트로겐 활성도 결과는 전체 지점에서 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 용매별로 추출한 시료에 대하여 hER에 의한 에스트로겐 활성도는 하천수 및 하수처리장 방류수의 Hx/DCM 및 MeOH 분획시료에서 에스트로겐 활성도가 검출되지 않았다. 반면에 mER에 의한 Ac/DCM 분획시료 뿐만 아니라 MeOH로 분획한 시료에서 더 많은 에스트로겐 활성도를 나타내었다. 하천수인 RW-1과 RW-2에서 E2농도로 환산한 에스트로겐 활성도는 각각 6.2 및 9.0 ng/L(as E2)로 나타났으며, 하수처리장 방류수 중에서는 MW-1에서 17.4 ng/L(as E2)로 가장 높은 활성도가 나타나 하수처리장에 따라 검출되는 활성도 차이가 큰 것으로 나타났다.

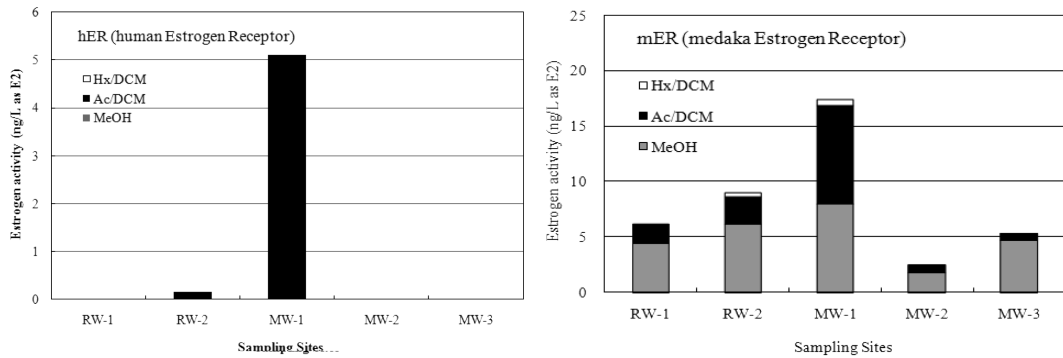


Fig. 3. Estrogenic activities of hER and mER yeast in river water and municipal wastewater samples.

중국의 연구결과에 따르면 유전자재조합 효모를 이용하여 북경의 하수처리장의 유입수와 유출수를 분석한 결과, 각각 15.7, 10.4 ng/L(as E2)로 보고되고 있어, 본 연구의 결과와 유사한 범위로 나타났다¹⁴. 한편 YES(yeast estrogen screen)방법을 이용한 연구결과에서는 하수처리장 방류수에서 34.1~65.9 ng/L(as E2)로 검출되었으며, 라인강에서는 11.9~17.4 ng/L(as E2)로 검출되어 본 연구결과보다 높은 것으로 나타났다¹⁵. 내분비계장에 물질의 Kow 값은 estriol 2.45, 17β-estradiol 4.01, nonylphenol 5.71 등 물질에 따라 특성이 다양하다¹⁶. 따라서 좀 더 정확한 내분비계장에 영향을 평가하기 위해서는 물질에 따라서 용출 용매도 또한 다양하게 할 필요가 있다. Fig. 3의 결과에서 알 수 있듯이 용매에 따른 에스트로겐 활성도를 나타내는 비율이 다르게 존재하고 있으므로 mER을 이용했을 때는 단일 용매만으로는 충분한 활성도를 평가하기 어렵다¹⁷. 동일한 환경시료를 비교해보면 hER을 이용했을 때 MW-1의 활성도가 5.1 ng/L(as E2)였으며, mER은 17.4 ng/L(as E2)로서 mER의 효모를 이용했을 때 hER보다 3배 이상 높게 반응하는 것으로 나타났다. 반면에 동일한 시료에서 MeOH 용출시료에서 hER 효모를 이용했을 때는 활성도가 없었으나, mER 효모에서는 모든 지점에서 활성도를 나타내어 친수성이 높은 MeOH 용출시료가 Ac/DCM 용출시료보다 높은 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

3.3. 다이옥신 수용체를 이용한 화학물질과 환경시료의 활성도

수생태계에서는 다이옥신뿐만 아니라 방향족탄화수소류(PAHs), PCB와 같은 유기오염물질을 섭취함으로써 어류와 포유류에서 오염물질과의 반응으로 다양한

효소의 변화가 생긴다. 환경 내에서 오염물질이 존재하게 되면, 오염물질은 체내로 흡수 또는 간으로 운반되며 AhR 수용체와 반응함으로써 다이옥신의 영향을 나타낸다. 따라서 아릴하이드로카본 수용체(Aryl hydrocarbon Receptor, AhR)가 도입된 효모를 사용하여 화학물질 및 환경시료 중의 다이옥신 활성도를 분석하였다.

Fig. 4는 화학물질로서 β-naphthoflavone, coumestrol, equol 3종의 화학물질에 대한 AhR의 용량-반응 곡선을 작성한 것으로 농도증가에 따라 AhR 활성이 농도의 존적으로 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. β-Naphthoflavone은 CYP1A를 유발하는 유도제로 알려져 있으며, CYP1A 효소는 PCB(polychlorinated biphenyls), 다이옥신과 같은 내분비계장에 물질에 의해 유도되어 급격히 증가하게 된다. 본 연구에서 사용한 yeast two-hybrid system에서는 β-Naphthoflavone의 농도가 0.17 μg/L에서 활성도가 약 3이었으며, 농도를 2.7 μg/L까지 증가시켰을 때 활성도는 약 23까지 급격하게 증가하였다. Coumestrol의 경우에는 콩, 알팔파 등에 많이 함

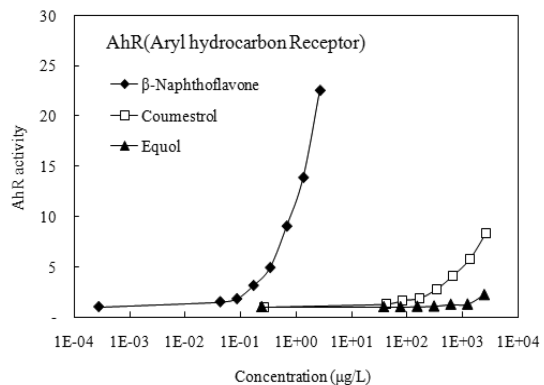


Fig. 4. Dose-response curve of 3 EDCs for AhR yeast.

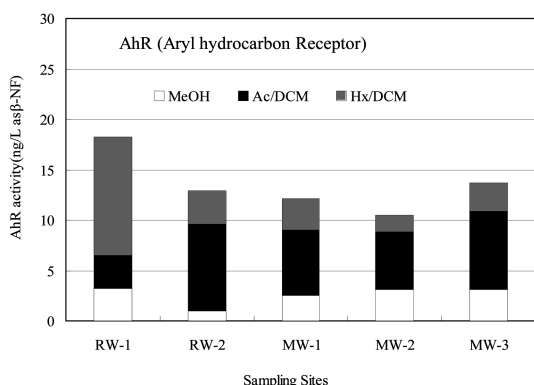


Fig. 5. Aryl hydrocarbon receptor activities in river water and municipal wastewater samples.

유된 식물성 에스트로겐으로서 670.5 $\mu\text{g/L}$ 이 노출되었을 때 4.0의 AhR 활성도를 보였으며, 농도의 증가에 따라 활성도가 증가하는 현상을 나타냈다. 식물성 에스트로겐인 equol의 경우에는 농도가 2,423 $\mu\text{g/L}$ 일 때 활성도가 2.2로서 coumestrol보다는 낮은 활성도를 나타냈다.

Fig. 5는 하천수와 하수처리장 방류수를 최대 100배 농축시킨 후 8단계로 반복 희석하여 AhR 활성도를 측정 한 결과로서, Fig. 4의 β -naphthoflavone의 용량반응 곡선을 바탕으로 환경수의 AhR 활성도를 β -naphthoflavone의 농도로 나타낸 것이다. 하천수인 RW-1, RW-2에서는 AhR 활성도가 각각 18.3, 12.9 ng/L(as β -naphthoflavone)로 나타났으며, 하수처리장에서는 평균 12.1 ng/L(as β -naphthoflavone)를 나타냈다. 대상 시료의 전체평균의 AhR 활성도는 13.5 ng/L(as β -naphthoflavone)로 나타났으며, Fig. 4와 비교하면 AhR 활성도가 3 이하로서 거의 나타나지 않는 것을 알 수 있었다. 시료를 세 종류의 용매별로 연속 추출했을 때 전체의 평균농도는 MeOH(2.6 ng/L), Hx/DCM(4.5 ng/L), Ac/DCM(6.4 ng/L) 순으로 증가하여, Ac/DCM으로 용출된 시료에서 가장 많은 AhR 수용체 반응물질이 존재하는 것으로 나타났다.

4. 결 론

내분비계장애물질의 에스트로겐 및 다이옥신 활성도를 측정하기 위하여 yeast two-hybrid assay를 사용하여 내분비계장애물질 및 환경시료에 대한 활성도를 분석하였다. hER, mER 및 AhR 수용체 효모를 이용하여 에스트로겐과 다이옥신 활성도를 측정, 비교한 결과

다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 화학물질에 대하여 mER이 hER보다 EC10 값을 기준으로 약 5배 낮은 값을 나타내었고, 실제 하천수와 하수처리장 방류수에 대한 결과에서도 mER이 더욱 민감한 에스트로겐 활성도를 나타내었다. 환경시료 중에 내분비계장애물질은 다양한 유·무기물질과 혼합되어 있고, 환경 중에 낮은 농도로 존재하므로 mER를 이용하면 환경중의 에스트로겐물질을 더욱 정확하게 평가할 수 있을 것으로 판단된다.

2) 환경시료를 고상추출할 때 용출용매를 친수성부터 소수성까지 세 종류의 용매로 추출하여 처리한 결과, mER의 활성도는 MeOH(62%) > Ac/DCM(35%) > Hx/DCM(3%) 순으로 나타나 환경시료 중의 내분비계장애물질 평가를 위해서는 다양한 적정용매를 사용해야 하는 것으로 나타났다. mER에 의한 분석결과 하천수에서 최대 9.0 ng/L(as E2), 하수처리장 방류수에서는 최대 17.4 ng/L(as E2) 수준으로 검출되었다.

3) AhR 수용체 효모를 이용한 β -naphthoflavone, coumestrol, equol의 bioassay결과를 용량-반응 곡선으로 작성한 결과 농도증가에 따라 AhR 활성이 농도의 존적으로 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 하천수에서는 최대 18.3 ng/L(as β -naphthoflavone)로 나타났으며, 하수처리장에서는 최대 13.7 ng/L(as β -naphthoflavone)를 나타내어 β -naphthoflavone에 대한 활성도가 3 이하로서 다이옥신 활성도는 거의 나타나지 않았다.

참고문헌

1. 국립환경연구원, 2002, 내분비계장애물질 측정분석 방법.
2. 국립환경과학원, 2007, 내분비계장애물질에 의한 생태 영향 정밀조사.
3. Park, J.Y., Lee, B.C., Ra, J.S., Lee, J.H. and Kim, S.D., *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(3), 535-541.
4. Lee, J.H., Lee, B.C., Ra, J.S., Cho, J., Kim, I.S., Chang, N.I., Kim, H.K. and Kim, S.D., *Chemosphere*, 2008, 71, 1582-1592.
5. Cunningham, M.J. and Shah, M., Chapter 3.1 "Toxicogenomics" in "Handbook of Pharmaceutical Biotechnology". 2007, John Wiley & Sons, Inc.
6. Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N. and Marcomini, A., *Environment International*, 2007, 33, 929-936.
7. Shiraishi, F., Shiraishi, H., Nishikawa, J., Nishihara, T. and Morita, M., *Journal of environmental chemistry*,

- 2000, 10(1), 57-64.
8. Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T., *Toxicology and applied pharmacology*, **1999**, 154, 76-83.
 9. Kamata, R., Shiraishi, F., Nishikawa, J., Yonemoto, J. and Shiraishi, H., *Toxicology*, **2008**, 22, 1050-1061.
 10. Kamata, R., Shiraishi, F., Nakajima, D., Takigami, H. and Shiraishi, H., *Toxicology*, **2009**, 23, 736-743.
 11. Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F., Imagawa, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Hori, S. and Utsume, H., *Journal of Health Science*, **2000**, 46 (4), 282-298.
 12. Miller III, CA., *Toxicology and Applied Pharmacology*, **1999**, 160, 297-303.
 13. 일본 환경성, **1998**, 외인성 내분비계교란 화학물질조사 잠정매뉴얼.
 14. Sun, Qingfeng, Deng, Shubo, Huang, Jun, Shen, Gang and Yu, Gang, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2008**, 25, 20-26.
 15. Pawlowski, S., Ternesb, T.A., Bonerzb, M., Rastallc, A.C., Erdingerc, L. and Braunbecka, T., *Toxicology*, **2004**, 18(1), 129-138.
 16. 이지호, 박종열, 나진성, Cuong N. Duong, 이병천, 김상돈, *대한환경공학회지*, **2006**, 28(7), 697-703.
 17. Liu, Z., Kanjo, Y. and Mizutani, S., *Science of the total environment*, **2009**, 407, 731-748.