

과량의 아연에 의한 아프리카 발톱개구리 (*Xenopus laevis*)의 배발생 이상과 독성

윤 춘 식 · 진 정 효¹ · 정 선 우^{1,*}

(창원대학교 유전공학연구소, ¹창원대학교 자연과학대학 생물학과)

Embryotoxicity and Teratogenicity of Excess Zinc on *Xenopus laevis*. Yoon, Chun-Sik, Jung-Hyo Jin¹ and Seon-Woo Cheong^{1,*} (Institute of genetic engineering, Changwon National University, Changwon, Kyungnam 641-773, Korea, ¹Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Changwon National University, Changwon, Kyungnam 641-773, Korea)

Concentrated releases of zinc into water usually results from discharges associated with industrial purpose. The released zinc into soil is corroded and released into water. In aquatic environment, excess zinc is toxic to the organisms and causes the growth inhibition and malformation of them as a heavy metal. In this study, excess zinc toxicity was tested by FETAX (frog embryo teratogenetic assay with *Xenopus*) as *in vivo* system. *Xenopus* embryos at st. 9 were exposed to 100~900 μM of zinc for 7 days and 81% of individuals were survived in 100 μM, and 25% were survived in 1000 M of zinc solution. In external malformations, swelled belly and intestinal dysplasia were common, and all of tested individuals showed these malformations in 200 μM or higher concentration of zinc. In 400 μM or higher concentration, all of tested tadpoles showed faded heart. Also, hypo-pigmentation, lens hernia and loose digestive track were very frequently found in 100 μM of zinc. The histological study with paraffin section of zinc treated tadpoles showed following abnormalities; regeneration of photoreceptor on retina, reduced vitreous chamber in eye, reduction of red blood cells in heart, abnormal liver, swelling of pronephric cell, muscle dysplasia and palatal papilloma. These abnormalities may be caused by the degeneration of mitochondria, inhibition of cell adhesion, and the formation of leghemoglobin by zinc due to the substitution of Ca²⁺ by Zn²⁺. The body length was reduced due to the excess zinc. From a statistical result, body lengths of 300 μM or higher concentrative groups was significantly reduced comparing that of control group. Recently, many spontaneous malformations and reduction of amphibians are reported. From the results of present study, excess zinc might be a factor of amphibian reduction, and the control of zinc discharges is very important.

Key words : *Xenopus laevis*, excess zinc, teratogenesis, FETAX

서 론

척추동물의 배 발생에 필요한 물질 중 미량이 요구되

면서도 결핍에 의해서는 다양한 선천적 기형을 초래하는 것 중 하나가 아연이다. 아연은 미성숙 난 시기부터 발생 후 신체 여러 기관에 걸쳐 분포되어 있으며 눈에 있어서는 돼지에서 색소상피와 맥락막에 풍부하게 분포

* Corresponding author: Tel: 055)279-7444, Fax: 055) 279-7449, E-mail: swcheong@sarim.changwon.ac.kr

하는 것으로 보고된 바 있다 (Samuelson *et al.*, 1993; Tjalve and Frank, 1984). *Xenopus*의 미성숙 난에서는 초기에서 말기 미성숙 난으로 가면서 아연의 양이 증가되고 수정 후 기관형성기를 거치면서 변화가 없는 것으로 알려져 있다 (Nomizu *et al.*, 1993). 특히 *Xenopus*의 난세포 가운데 vitellogenin에 풍부하며 (Falchuk *et al.*, 1995), *Xenopus* 난세포와 배에서 카드뮴과 함께 아연과 결합하는 단백질이 있음을 밝힌 연구가 있고 그 단백질은 lipovitellin I이라고 보고되었다 (Sunderman *et al.*, 1995). 동물과 기관에 따른 아연의 국제나 그 양에 대한 전반적인 연구가 이루어진바 있으며 (Bert *et al.*, 1993), 기관 내 아연의 축적은 조직, 성별, 나이에 따라 변화하며 특히 성장초기와 배시기에 아연이 더 빈번히 검출되는 것으로 알려졌다 (Takahashi *et al.*, 2000). 아연이 축적되는 조직은 신장, 간, 폐, 생식기, 췌장, 대퇴골, 위장, 심장 등이며 (Komarnicki, 2000). 아연은 성장발달 뿐 아니라 신경계나 면역체계에 필수원소이며 임파구와 단핵구의 선천적 면역기능의 조절이 아연 농도에 의존적이라는 것이 알려졌다 (Wellinghausen and Rink, 1998).

과잉 아연이 수중생태계에서 독성을 유발하는 경우로는 자연상태에서 아연광으로부터 생태계로 유입될 수 있으며, 아연광 주변의 토양에서 재배된 식물에서 높은 아연함량이 보고된 바 있고 (Pugh *et al.*, 2002), 주변 수계에 유입되었을 때 식용조류 (algae)에 흡수되어 인체에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 아연은 아연도금 등의 공업적 목적으로 광범위하게 사용되어 생태계에 누출될 위험이 있고 이로 인해 심각한 영향을 초래할 수 있는 물질이다. 그 외에도 아연은 토양내에 존재하던 것이 부식되어 침출수로서 수계로 유입되며 이때 패류나 갑각류의 체내에 중금속으로서 농축되는 것으로 보고된 바 있다 (Biddinger and Gloss, 1984; Hegstrom and West, 1989; Levine *et al.*, 1989). 이 경우 아연의 농도는 정상농도의 50배에서 1000배 정도로 알려져 있으며 이들의 생존을 위협함과 동시에 이들의 섭취에 의한 인체에서의 농축은 심각한 위험을 초래할 수 있다. 이때 나타나는 독성은 구리에 의한 중독현상과 유사하다고 알려져 있다 (Barceloux, 1999).

아연이 생물에 미치는 악영향에 대한 연구는 과잉보다는 결핍에 대하여 더욱 자세히 이루어졌으며 그 연구들은 다양한 방향에 초점을 맞추어 이루어졌다. 먼저 rat에서 아연의 결핍은 타액분비대사를 저해하는 것으로 밝혀졌으며 (Ishii *et al.*, 1999), 역시 rat의 적혈구에서 아연결핍은 과산화적 손상을 일으킨다 (Record *et al.*, 1990). 또한 소장 상의 paneth cell은 아연 결핍에 의해 이

상을 일으키며 (Bohane, 1977), 그 외 대다수의 기관발생에서 아연 결핍시 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다.

한편, 과잉 아연에 대한 보고로는 아연을 신경세포에 1 M, 5분 노출시키면 높은 세포독성을 유발하는 것으로 알려졌다 (Dineley *et al.*, 2000), 뇌에서의 과잉 아연은 알츠하이머병과 관련이 있는 것으로, 즉 비정상적 아연의 대사가 알츠하이머병의 원인이 될 수 있다는 보고도 있다 (Suh *et al.*, 2000). 또한 세포내에서는 미토콘드리아의 심한 붕괴를 초래하여 하나의 약제나 화학물질에 의한 중독성 또는 과민성 반응으로서 나타나며, 이는 신경세포에 대한 아연의 독성 실험에서 과량 아연이 미토콘드리아 이중막의 힘에 영향을 미치는 것으로 밝혀져 있다 (Dineley *et al.*, 2000). 과잉 아연이 양서류에 미치는 영향에 대해서는 *Xenopus laevis*의 embryo를 모델동물로 하여 독성실험을 하는 FETAX법 (frog embryo teratogenic assay with *Xenopus*)으로 아연에 대한 독성이 알려진 바 있다.

Xenopus laevis (아프리카발톱개구리)는 양서류의 발생학 관련 연구에 이용되는 대표적인 동물로서, 최근에는 수서생태계에 대한 독성학연구의 재료로서 확립되어 있다. 이 동물은 발생단계에 따른 구조 및 생리가 잘 밝혀져 있고 평생 물 속에서 살고 울지 않으며 인공사료로 사육가능한 점 등 실험실내 유지가 편리하므로 다양한 실험이 가능하다. 또한 초기 배는 animal cap assay 등의 primary culture 방법이 확립되어 있으므로 *in vitro* 실험도 가능한 것이 이점이다. FETAX법에 의한 과량 아연이 양서류에 미치는 영향에 대한 타 연구에서, *Xenopus*의 발생초기 즉 st. 6시기에 다양한 농도의 $ZnCl_2$ 를 4일간 처리하였을 때 1080 μM 의 농도가 LC₉₀이었으며 두 부외형의 변화, 지느러미의 변화, 저색소증, 복부 팽대 및 장의 회전이상, 장의 비후, 눈의 맥락막 헤르니아 등의 이상을 일으키며, 정상농도의 Mg^{2+} 의 존재 하에서 300 μM 농도의 $ZnCl_2$ 에 노출시키면 배가 치사되었다는 보고가 있다 (Luo *et al.*, 1993). 이러한 연구에서는 일반적인 이상발생의 외형적 패턴과 종류만을 열거하였고 아연의 농도증가에 따른 자세한 기관별 변화경향을 밝힌 바 없으며 조직학적 이상에 대한 연구는 전혀 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 *in vivo* 독성실험으로서 *Xenopus laevis*의 포배기에 아연을 100~1000 μM 의 생존범위 내에서 7일간 처리하였을 때의 독성을 밝히고, 개체 발생 시 기관형성에 과량의 아연이 미치는 외형적 이상 및 조직학적 이상을 밝히고자 하였다. 그리고 과량의 아연이 함유된 수환경이 양서류에게 초래하는 독성 및 이

상을 밝힘으로써 최근 양서류의 격감원인을 규명하는데 도움을 줄 것으로 생각한다.

재료 및 방법

1. *Xenopus Embryo*에 대한 아연 처리 및 외형적 이상관찰

*Xenopus laevis*는 수입하여 (*Xenopus I* : USA) 실험실 20~23°C 수조에서 유지하였다. 3년 이상 성적으로 성숙된 암수개체를 사용하여, 산란을 위해 암수 공히 500~800 IU씩 HCG (human chorionic gonadotrophin)를 주사하여 수정란을 얻고 3% cystein hydrochloride (pH 7.8)로 젤리층을 제거한 뒤에 멸균된 Steinberg's 생리식염수 (pH 7.4)로 수 회 세척하였다.

멸균된 petri dish에서 stage. 9(후기포배기)의 난을 선별하여 Steinberg's 생리식염수로 20°C에서 1주일간 배양한 정상배를 대조구로 하였다. 처리구는 zinc chloride (Sigma) 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µM (in Steinberg's solution)의 농도에서 각 농도당 100개체씩 처리한 뒤, 역시 20°C에서 1주일 배양하였다. 이 때 참고로 최고 농도의 ZnCl₂ 처리시 주어지는 Cl의 양의 증가는 *Xenopus* 배에 영향을 주지 않을 정도이다. 실험중 먹이 공급은 하지 않았으며 배양용기는 무처리 표면 및 멸균 96-well plate를 사용하였고 1 well당 1개씩의 배를 넣고, 대조구 및 처리배양액은 120 µl씩 분주하였다. *Xenopus*의 배 발생단계는 Nieuwkoop과 Faber (1956)를 따랐다. 배의 독성실험은 배의 초기 상태에 따라 약간씩 그 결과가 달라지며 초기 배의 대조군이 모두 생존하는 경우를 가장 이상적인 상태의 재료로 간주하였다. 실험은 7회 하였으며 대조군의 올챙이가 모두 생존한 경우의 결과 중 하나를 택하였다. 일주일 배양된 올챙이는 투명하여 외부에서 거의 모든 기관이 관찰되며 농도별로 수거하여 실체현미경하에서 박동하는 심장의 색을 관찰, 심장내 혈액의 변화를 기록하였다. 그리고 외형적 이상을 관찰하여 농도별로 그 비율을 기록하였다.

2. 조직학적 연구

후기포배기부터 일주일간 배양한 대조구 및 처리구의 올챙이를 Bouin's solution (Picric acid 15 : Formalin 5 : Acetic acid 1)에 3~16시간 고정한 후, 70%, 90%, 100% ethanol로 탈수하고 paraffin (Paraplast Plus: Sigma) 포

매하여 microtome으로 6~8 µm로 절편한 후 xylene으로 paraffin을 제거하고 100%, 90%, 70%, 50% ethanol로 탈수한 다음, hematoxylin-eosin으로 염색하였다. 다시 50%, 70%, 90%, 100% ethanol 탈수과정을 거친 후 mount 용액 (Permount)으로 봉입하여 광학현미경 (Olympus Bx50)으로 관찰하였다. 조직표본은 대조군, 800 µM과 1000 µM 처리 개체 중 20개체씩 작성하여 현미경하에서 조직판독 후 이상조직의 비율을 기록하였다.

3. 통계분석

대조구 및 아연에 7일 처리한 올챙이 중 생존한 개체의 고정표본을 농도별 정리한 후 100개체씩 무작위 추출하고, 체장을 해부현미경하에서 micrometer로 측정하였다. 측정을 위해 이동되는 도중 파손된 표본은 측정대상에서 제외되었으며 각 농도별 개체에 대하여 평균길이와 표준편차를 구하여 대조군에 비해 유의미한 체장변화를 나타내기 시작하는 농도를 구하였다. 유의성 검증을 위해서 Student's t-test의 독립표본 검증법을 사용하였다.

결 과

1. 초기배에 처리한 과량 아연의 독성 및 외형적 발생이상

St. 9시기에 100 µM부터 1000 µM까지 100 µM 간격으로 아연을 처리한 결과 각 농도별 100개체에 대한 독성 효과를 생존율로 파악할 수 있었다. 대조구에서 7일간 100% 생존하는 초기유생이 아연의 처리농도에 따라 100 µM에서는 81%가 생존하였고 200 µM에서는 85%, 300 µM에서는 85%, 400 µM에서는 77%, 500 µM에서는 71%가 생존하였고 아연농도가 높아짐에 따라 생존율이 점차로 낮아져 1000 µM (=1 mM)에서는 25%의 낮은 생존율을 보였다. 그리고 1100 µM의 농도 처리도 하였으나 모든 개체가 치사되지는 않았고 10% 이상의 생존율을 보였다. 본 연구에서는 정확한 LD (lethal density)를 찾는 것이 목표가 아니므로 올챙이가 약간의 운동을 하면서 생존할 수 있는 1000 µM까지만 기록하였다 (Table 1).

초기 배에 대한 과량 아연의 기형발생 실험결과 생존한 개체를 대상으로 외형적 결함을 조사한 결과 복부가 부풀어오르는 현상과 체장 (body length)이 아연농도 상승에 따라 짧아지는 현상이 뚜렷하였다 (Fig. 1, Plate 1).

또한 몸의 색소저하, 몸이 전체적으로 줄어들면서 지느러미는 더 커지고 주름이 지는 현상 (Fig. 1, Plate 2), 피부에 수포가 생기는 현상, 눈의 수정체 헤르니아, 굽어지고 짧아져 회전이 감소한 소화관 (Fig. 1, Plate 4), 눈의 발생저해 및 안배의 발달 이상으로 두폭이 넓어지는 현상 (Fig. 1, Plate 3), 눈의 맥락막 열구 (opened choroid), 외부에서 관찰이 되는 심장내의 붉은 색 저하, 안배의 색소상피이상 등 10가지의 외형적 이상이 아연농도의 존적으로 나타났다. 아연 처리에 의해 복부가 부풀어오르고 복수가 차는 현상은 아연농도에 따라 매우 민감하게 나타났으며 200 μM 이상의 농도에서는 100%로 나타났으며, 농도가 높을수록 정도가 더 심하였다 (Fig. 1, Plate 2). 색소저하 현상은 정상 배의 멜라닌 색소가 등쪽 중추신경계주변과 복막주변에 풍부하게 분포된 반면 색소 부족 현상으로 흰색으로 보이는 것을 말한다. 이는 아연 100 μM 에서부터 23% 나타나기 시작하여 아연농도가 높아질수록 순차적으로 비율이 높아졌고 400 μM 이상에서는 100%로 나타났다. 몸통에서는 몸길이가 줄어들고 지느러미의 주름이 생기며 넓어지는 현상을 보였는데, 일주일 배는 100 μM 부터 12%로 나타나기 시작하여, 300 μM 에서는 43%, 500 μM 부터는 100%로 나타났다. 또한 500 μM 이상의 아연처리에서 피부의 수포형성이 나타나기 시작하여 1000 μM 에서는 100%로 나타났다. 수정체 헤르니아는 정상 배의 수정체가 맥락막으로 둘러싸인 안배 (optic cup)에 함몰되어 있는 반면, 초지방이 없어지면서 수정체가 안배 밖으로 돌출하고 있는 현상으로 400 μM 처리부터는 모든 개체에서 나타났다. 소화관은 3일 배 (st. 43)를 관찰한 경우에도 발달 및 회전이 잘 관찰됨에도 불구하고 아연처리개체에서는 1주일 유생에서도 소화관의 회전이 잘 일어나지 않으며 직장이 길어지는 현상을 보였다. 이 현상은 100 μM 농도에서 44%로 높게 나타났고 200 μM 부터는 100%로 나타나 아연처리에 의해 매우 강하게 나타나는 이상이였다. 두폭이 정상보다 넓어지는 현상은 안배의 비정상적인 형태형성에 의하여 생기며 본 실험에서는 정상안배보다 길고 가늘게 나타났다. 이 기형은 100 μM 에서 54%로 발생하여 300 μM 이상에서는 100%로 나타났다. 눈의 안배는 멜라닌 색소로 둘러싸여야 정상이며 외부에서 보았을 때 수정체의 둘레에 검은색 연속 환으로 나타난다. 그러나 아연 처리 시 색소의 불연속적 분포를 보이며 200 μM 이상에서는 2%로 나타나기 시작하여 700 μM 부터는 100%로 나타났다. 아연을 처리한 개체는 해부현미경하에서 생체 관찰을 했을 때 박동심장 및 새궁혈관의 붉은 색이 열어져 고농도에서는 무색으로 바뀐다는

것을 알았다. 즉 100 μM 농도에서는 9%의 무색심장이 관찰되었으며 이 때는 완전한 무색이 아니라 약간의 붉은 색이 도는, 그러나 정상심장과는 뚜렷이 구분되는 무색에 가까운 심장 및 혈관을 보여 주었다. 이러한 무색심장은 200 μM 아연농도에서 급격히 증가하여 66%로 나타났다. 그리고 400 μM 이상의 고농도부터는 붉은색이 거의 없는 심장이 100%로 나타났다. 고농도로 갈수록 심장탈색의 정도는 심하였고 이에 대한 조직학적 확인은 다른 신체기관과 함께 행하였다. 안배의 기부, 즉 망막의 외측에는 멜라닌색소 층이 두텁게 배열되어 있는 것이 정상적이나 아연처리시 색소층이 얇아졌으며 이 현상은 500 μM 부터 낮은 비율로 나타나기 시작하여 1000 μM 에서는 44%로 나타나 인접하여 연속된 맥락막보다는 아연의 영향을 훨씬 덜 받는 것으로 나타났다 (Table 2).

2. 조직학적 이상

먼저 외형적으로는 확인이 되지 않는 조직학적 이상을 확인하기 위해 paraffin 절편을 하였으며 그 결과 구전정상피, 등쪽 체절 즉 근육의 분화정도, 안배 형성 및 광수용세포 (photoreceptor)의 형성, 신장, 심장 및 혈액에 이상이 나타난 것으로 확인되었다. 허가 보이는 조직 절편에서 구강전정을 확인하여 정상개체의 구전정은 단층의 편평 상피인 것을 관찰하였다 (Fig. 1, Plate 5). 과량 아연 처리에 의해 구전정은 다층의 papilloma 유사 구조를 보여주었으며 각 세포의 형태는 둥글게, 또는 비정형으로 부풀어 있었다 (Fig. 1, Plate 6). 등쪽 체절은 정상개체에서 척색의 좌우에 잘 발달되어 있고 등쪽 선단부까지 근육다발이 조밀하게 연속되어 있었으나 (Fig. 1, Plate 15), 처리 개체에서는 근육다발이 척색 좌우측에는 밀집되어 있으나 등쪽으로 갈수록 붕괴 또는 형성 부전이 일어나 불연속적인 근육다발의 분포를 보여주었다 (Fig. 1, Plate 16). 눈의 형성은 안배와 렌즈 그리고 초자체 방의 완전한 확보를 보여주어야 정상이며 Fig. 1의 Plate 11에서는 망막층의 완전한 분화와 광수용세포층의 정상발달 및 균일한 pigment epithelium의 형태를 보여주었다. 그러나 아연 처리개체는 정상적인 눈의 방향, 즉 렌즈의 정상 방향발달을 보여주지 못하여 꼬리쪽을 향하고 있고 초자체방 소실에 의한 수정체 헤르니아가 확인되었다. 또한 광수용세포의 붕괴가 뚜렷하게 관찰되었으며 색소상피는 불균일하게 망막층내에 분산되어 있어 정상적인 시각형성을 할 수 없음을 시사하였다 (Fig. 1, Plate 12). 신관은 정상적인 경우 세포가 팽대되

Table 1. The survival ratio of *Xenopus* tadpoles treatment with zinc chloride for 7 days.

Concentration of zinc (μM)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Tested embryos	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Survival rates (%)	100	81	85	85	77	71	69	69	75	56	25

Table 2. The ratio of external abnormality due to the excess zinc in 7 day-tadpoles.

Concentration of zinc (μM)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Number of tested embryos	100	81	85	85	77	71	69	69	75	56	25
Abnormality (%)											
Swelled belly	0	41	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Hypopigmentation of body	0	23	67	81	100	100	100	100	100	100	100
Wrinkled fin	0	12	36	44	62	100	100	100	100	100	100
Blister formation on integument	0	0	0	0	0	1	4	10	21	50	100
Hernia of lens	0	2	29	76	100	100	100	100	100	100	100
Thick and loose digestive track	0	44	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Wide-head with abnormal optic cup	0	58	89	100	100	100	100	100	100	100	100
Opened choroid	0	0	4	18	23	42	67	100	100	100	100
Faded heart	0	9	66	76	100	100	100	100	100	100	100
Abnormal pigmentepithelium of optic cup	0	0	0	0	0	1	1	4	12	23	44

어 있지 않고 핵은 가운데에 위치하며 세포내 함유물이 과다하게 포함되어 있지 않았다 (Fig. 1, Plate 7). 그러나 아연 처리개체에서 신관 세포는 크게 부풀어 있었고 H-E염색에 의해 eosin 호성의 세포함유물이 크게 증가 된 것이 관찰되었다 (Fig. 1, Plate 8). 정상개체의 심장은 (Fig. 1, Plate 13) 적혈구가 풍부하게 차 있는 반면, 아연

처리한 개체의 심장에서 심장벽은 구성세포들이 매우 변형되어 있었으며 혈구자체가 대부분 붕괴되고 그 수가 매우 빈약하였으며 적혈구의 염색성은 정상혈구와는 달리 eosin에 염색이 되지 않았다 (Fig. 1, Plate 14). 정상 개체의 간조직은 조밀하게 발달되어 있었으며 적혈구가 풍부하게 분포하였다 (Fig. 1, Plate 9 and 15). 그러나 아연처리개체의 간조직은 매우 성글며 적혈구수의 감소, 적혈구 변형을 보였다 (Fig. 1, Plate 10 and 16). 이러한 조직학적 이상의 구체적 경향을 파악하기 위해 대조군과 800 μM, 1000 μM의 고농도 아연처리 개체에 대하여 농도별 20개체씩의 절편표본으로 7종류의 조직학적 이상에 대하여 비율을 조사하였다. 눈의 망막에서 광수용 세포는 최고 83%의 개체에서 붕괴를 보였고 초자체방 (vitreous chamber)의 소실은 88%까지 나타났으며 적혈구수의 감소는 1000 μM에서 100%로 나타났다. 원신관 세포와 간조직의 붕괴는 매우 심각했으며 근육형성부전 도 대부분의 개체에서 나타났다. 그러나 구전정의 유두

Table 3. The t-test from the data of body length variation of 7 day-tadpoles treated with 0 and 300, and between 0 and 1000 μM of zinc.

Zinc (μM)	N	M	S.D.	t
0	95	10.2653	0.8621	-
300	98	9.8490	0.3540	4.364***
0	95	10.2653	0.8621	-
1000	86	7.2314	0.9892	21.895***

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$

The difference of body length between the two groups were significant. N: number of tested individuals, M: Mean length of the tadpoles, S.D.: standard deviation, t: value of t.

Table 4. Histological abnormality due to excess zinc.

Zinc (μM)	Abnormality (%)	Regeneration of photoreceptor	Reduced vitreous chamber	Reduction of RBC in heart	Abnormal liver	Swelling of nephric cell	Papilloma of oral cavity	Muscle dysplasia
0		0	0	0	0	0	0	0
800		87	73	100	93	87	67	93
1000		83	88	100	94	94	67	94

The tested tadpoles of each concentration were 20 individuals.

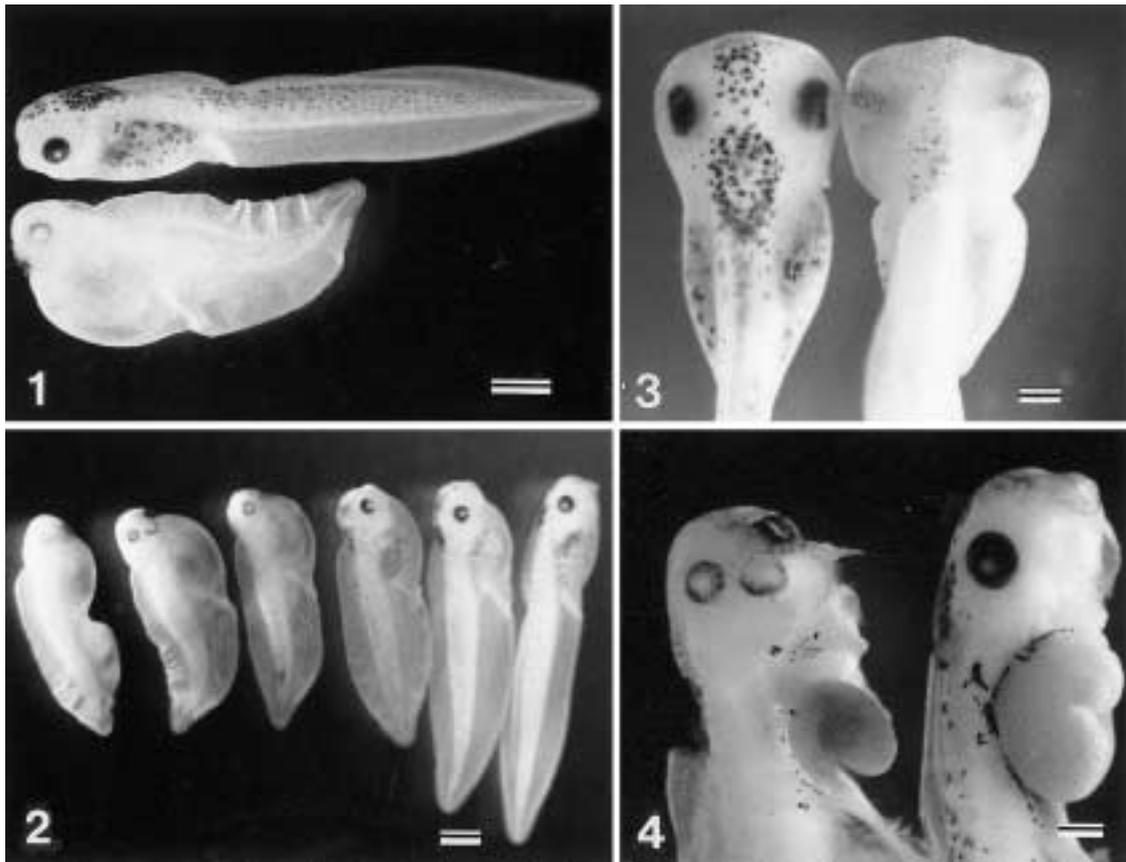
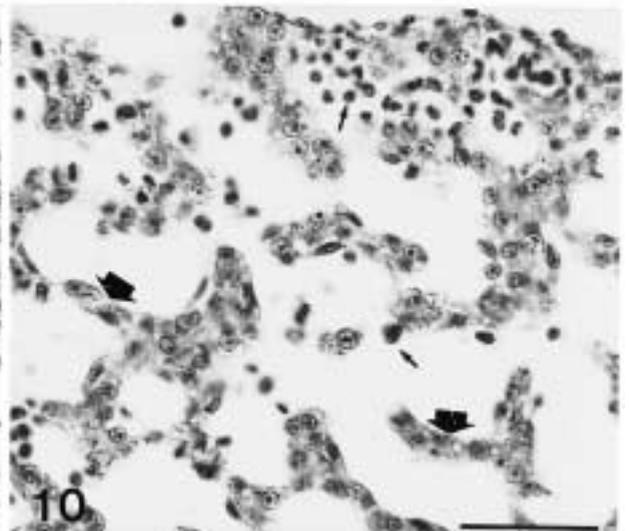
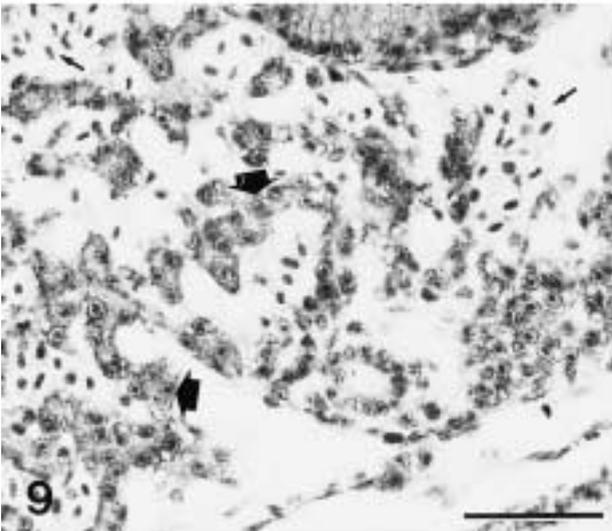
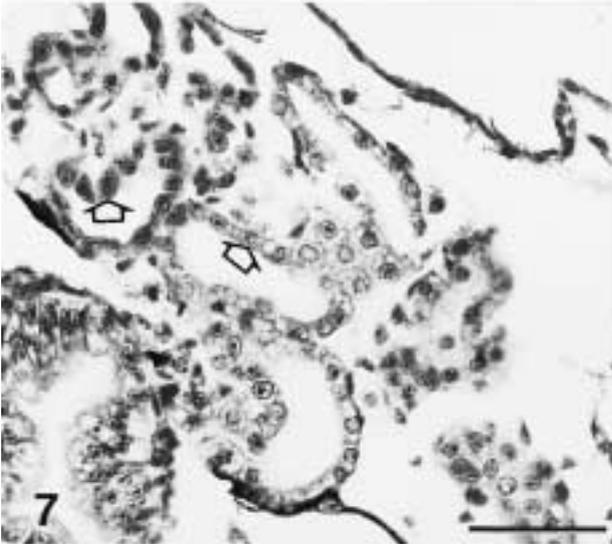
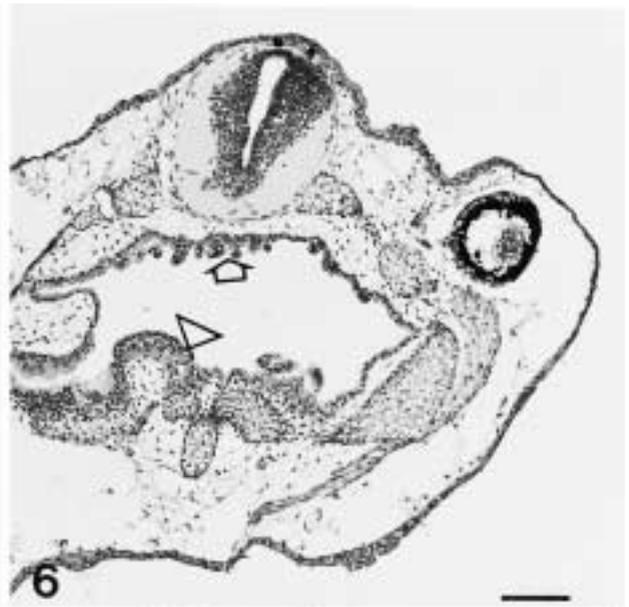
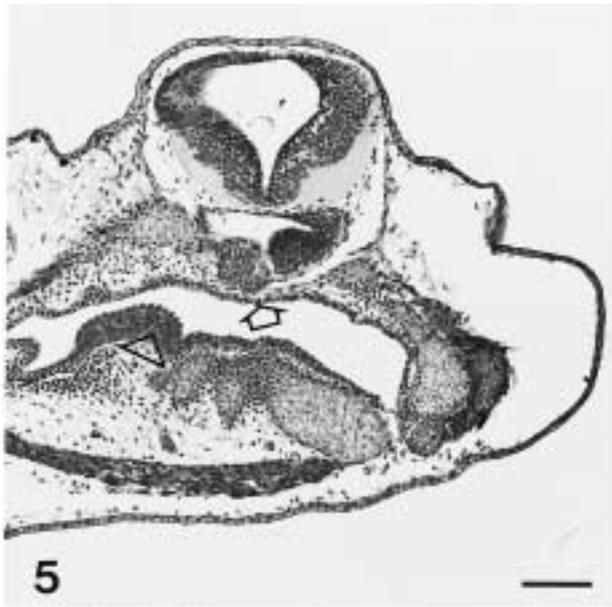
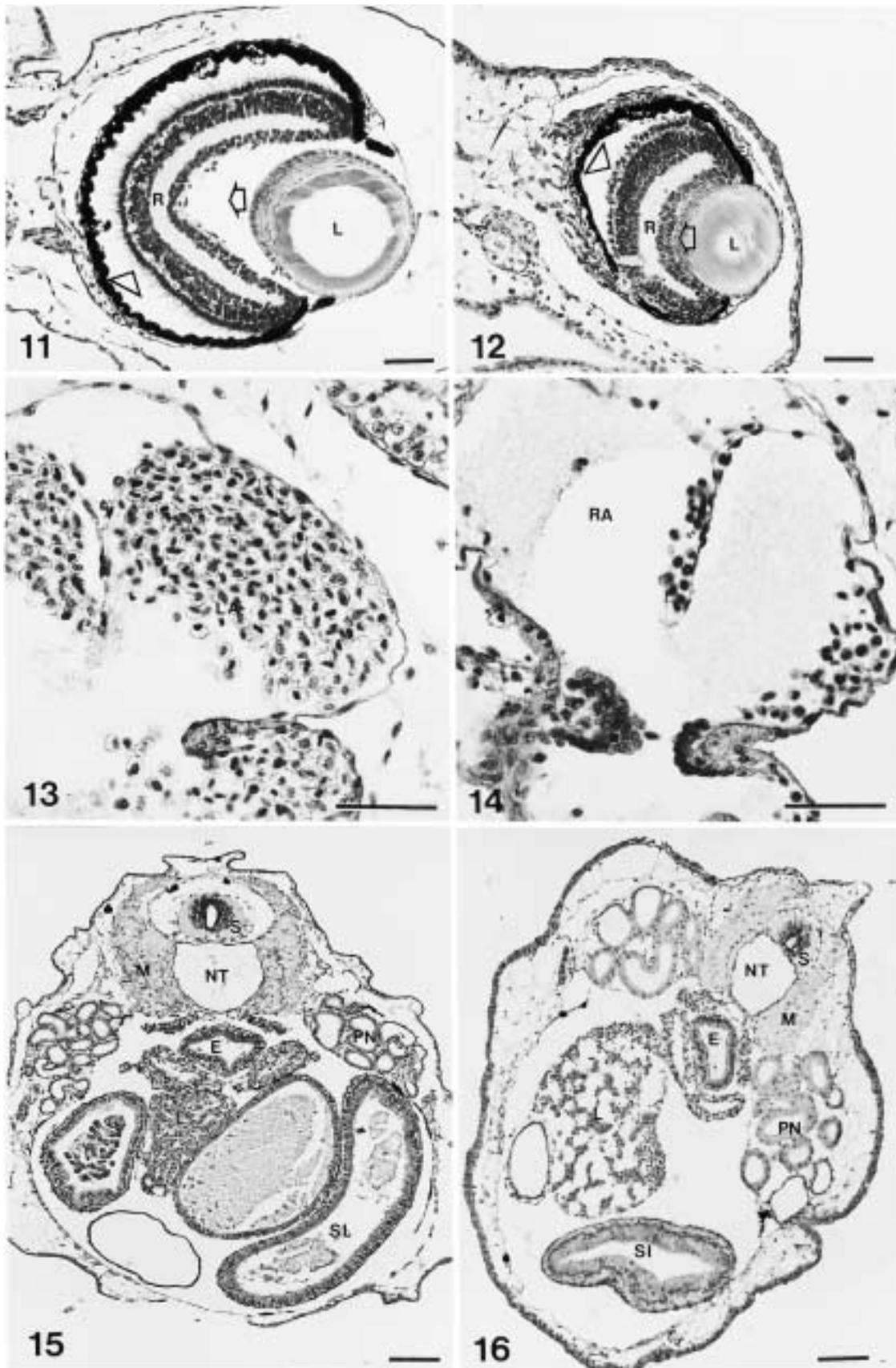


Fig. 1. Plates 1-16. Embryotoxicity and teratogenicity due to excess zinc in *Xenopus laevis*; **Plate 1.** 7 day-normal tadpole (up) and zinc treated abnormal individual (down) of *Xenopus laevis*. Normal tadpole is longer, darker, slim and with distinct eyes than abnormal tadpole. The hypo-pigmentation is distinct in eye, in dorsal region and in abdomen of abnormal tadpole. bar: 1 mm; **Plate 2.** The serial changes were seen in 7 day-tadpoles to the concentration of zinc. From the right side, the tadpoles exposed to Steinberg's solution (saline), 200, 400, 600, 800 and 1000 μM of zinc, respectively. The higher concentration of zinc makes the shorter body length. bar: 1 mm; **Plate 3.** Normal head (left) and zinc treated wide head. The wide head caused by the formation of abnormal optic cup. bar: 100 μm ; **Plate 4.** Dissect abdomens of *Xenopus* tadpoles. Abnormal digestive track (left) caused by zinc is weakly developed and the rectum is long and slim. Normal digestive track (right) is well developed and coiled. bar: 100 μm ; **Plate 5.** Simple squamous palatal epithelium (open arrow) is observed in 7 day-normal tadpoles. Paraffin section and H-E stain. Open arrow head: tongue, bar: 50 μm ; **Plate 6.** The papilloma-like malformation on palate (open arrow) caused by excess zinc. Paraffin section and H-E stain. Open arrow head: tongue, bar: 50 μm ; **Plate 7.** Normal pronephric duct are seen in 7 day-tadpoles. Nucleus is located centrally and the cell inclusions are somewhat basic and clear. Paraffin section and H-E stain. bar: 50 μm ; **Plate 8.** Swelled pronephric duct due to excess zinc. Each cell size is increased and cell inclusions are rich. Nucleus of each cell is centrifugal. Paraffin section and H-E stain. bar: 50 μm ; **Plate 9.** Normal hepatic cords (big arrows) and numerous erythrocytes (small arrows). The distances among hepatic cords are short. bar: 50 μm ; **Plate 10.** The abnormalities of hepatic cord caused by excess zinc (big arrows) and showed numerous leukocytes (small arrows). Leukocytes are increased but erythrocytes are severely decreased. bar: 50 μm ; **Plate 11.** Normal eye is seen in 7day-tadpole. Vitreous chamber (blank arrow) is distinct. The development of retinal layer is clear and the photoreceptor cells (open arrowhead) are clearly seen. bar: 50 μm ; **Plate 12.** Lens hernia due to excess zinc. Vitreous chamber is appeared, and lens and retinal layer are attached each other. Photoreceptor cells (open arrowhead) are degenerated. bar: 50 μm ; **Plate 13.** Many of mature erythrocytes in atrium of normal tadpole. LA: left atrium. bar: 50 μm ; **Plate 14.** Red blood cells of atrium are reduced by excess zinc. Erythrocytes are degenerated and leukocytes are increased. RA: right atrium. bar: 50 μm ; **Plate 15.** Crossly sectioned normal tadpole. NT: notochord M: muscle PN: pronephric duct E: esophagous L: liver SI: small intestine S: spinal cord. bar: 100 μm ; **Plate 16.** The abnormalities in abdomens were caused by excess zinc. Swelled pronephric duct (PN), loose liver tissue (L), muscular dysplasia (M), and eosinophilic small intestine (SI) are observed. bar: 100 μm





중은 최고 67% 정도로 다른 이상에 비해 덜 높은 것으로 나타났다(Table 4).

3. 심장의 혈액복구

*Xenopus*의 심장은 투명한 피부 때문에 외부에서 박동을 관찰할 수 있다. 포배기부터 1주일간 100~1000 μM 까지 아연 처리한 개체를 다시 Steinberg's solution에서 7일간 키웠을 때 심장의 혈액색의 회복율을 조사하였다. 그 결과 100 μM 전처리개체에서조차도 완전하게 심장색을 회복한 개체는 없었으며 저농도 전처리 개체일수록 약간씩의 회복은 관찰되었다. 그러나 600 μM 이상의 고농도 전처리개체들은 전혀 회복되지 않았다. 그 상태에서 심장은 박동하였고 올챙이들은 옆으로 누운 채 외부자극에 반응을 보이는 정도의 운동만을 할 수 있었다.

4. 유생의 체장변화

아연처리를 포배기로부터 일주일 한 유생은 정상개체의 평균길이가 10.26 mm인데 반해 1000 μM 아연처리군에서 평균길이는 7.23 mm로 줄어들었다. 유생은 아연의 농도가 증가할수록 길이는 감소하고 폭은 오히려 증가하는 양상을 보였으며 이의 유의성을 검증하기 위해 t-test를 행하였다. 그 결과 대조군과 100 μM 처리군, 대조군과 200 μM 처리군 사이에는 각각 비교시 유의도가 낮아 그 차이에 대한 의미가 없는 것으로 나타났다. 그러나 300 μM 처리군부터는 대조군과 비교시 매우 유의미한 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 3).

고 찰

양서류는 수서 생태계 중 지상으로부터의 영향을 가장 먼저, 그리고 강하게 받는 소량의 육수환경에서 생활하며 그 환경에서 생활하는 소형 동·식물을 모두 이용하여 살아가는 소비자이다. 수계에 독성 물질로 작용하는 것은 농약 외에도 중금속 등 다양하며 중금속은 내분비장애물질과 더불어 수계에 많은 악영향을 끼친다. 수서 생물에게 독성을 나타내는 물질로서 주로 연구되는 중금속은 Ni, Cr, Co, Zn, Mn, Pb, Cd, Cu, Ba, Al, 등이며 (Interlandi, 2002; Samecka-Cymerman and Kempers, 2002; Skaggs and Henry, 2002) 과량 아연이 수서 생태계에 영향을 미치는 사례는 담수조류의 성장을 억제하고 (Heijerick *et al.*, 2002), 어류의 성장을 억제

하는 것 등 (Woodling, 2002)이 보고되고 있으며 동물의 체내에 농축된 후 먹이 사슬을 통해 고차 소비자에 농축되어 다양한 독성을 유발하게 된다. 아연은 농약과 같이 시간의 흐름에 따라 각 대사산물이 서로 다른 패턴의 이상을 초래하는 것이 아니라 중금속의 일종으로서 수서생태계에 미치는 악영향은 수서 동물에게 매우 중요하고도 심각하다고 할 수 있다. 또한 아연은 체내에 생존에 필요한 물질로서 가지고 있으면서도 인간의 간섭에 의해 수중 생물에 독성을 유발할 수 있으므로 수서 환경오염원으로서 매우 중요한 물질이라 할 수 있다. 본 연구에서는 수서 생태계에서 소량의 육수에서 살면서 육상으로부터의 영향을 평생 받고 그 자손에게까지 영향을 물려주게 되는 양서류에 대한 아연의 영향에 초점을 맞추었으며 국내의 양서류종으로 초기발생 이상을 연구하는 것이 더욱 이상적일 수 있겠으나, 다수 개체로 반복실험을 해야 하는 특성상 양서류로서 독성실험 재료로 확립된 *Xenopus laevis*에 대하여 아연의 독성을 연구하게 되었다.

동물의 배 발생과 성장에 필요한 물질인 아연이 과량 처리되었을 때 *Xenopus* 초기 유생에서는 다양한 조직에서 이상 발생을 보여주었다. 과량 아연처리에 의해 가장 민감하게 영향받는 신체부위 및 이상을 순서대로 나열하면, 복부수종과 소화관 발달이상이 가장 심하고 안배 발달이상이 그 다음이며 수정체 헤르니아와 체색감소, 그리고 심장혈구수 감소가 그 다음으로 심각하고, 그 외 몸의 길이축소에 의한 지느러미 확대와 주름, 맥락막 열구, 피부수포형성, 안배의 색소저하 등의 순서였다. 아연 처리한 유생에서 외관상 나타나는 특징 중 심장과 새동맥의 탈색은 심장내 혈구수 자체의 급격한 감소가 주된 원인이었고 적혈구의 철 결합에 의한 변성이 그 원인이라 할 수 있다. Human 적혈구 세포막에서 아연은 Ca^{2+} -ATPase의 활성을 억제하는 독성을 보여주며 (Hogstrand *et al.*, 1999), hypochromic RBC는 적혈구내 hemoglobin 함량이 저하되기 때문이다 (Braun *et al.*, 1997). 아연의 과량 처리는 RBC내로의 철의 진입을 방해하며 (Friel *et al.*, 1998), 아연을 처리하였을 때 이는 적혈구의 hemoglobin내 porphyrin-protein pocketing에서 철복합체 대신 아연이 치환되는, leghemoglobin 형성을 보이며 (Dalvit *et al.*, 1986) 이는 alpha chain에 철 대신 아연이 치환되기 때문이다 (Martineau and Craescu, 1993). 척추동물에서 아연과 철의 치환은 골내 골수에서 주로 발생하는 것으로 알려져 있으나 (Labbe *et al.*, 1999) 본 연구에서 경골 발생 이전 심장내 적혈구 변형 및 치환가능성이 제시된 것은 의의 있는 일이라 할 수 있다. 이의

증명을 위해서는 ICP를 이용한 체내 철과 아연의 함량 비교 및 적혈구의 iron stain에 의한 판별이 유용하며 본 연구에서는 확인된 바 없으나 계속 연구 중이다. *Xenopus*는 발생부터 평생 물 속에서만 사는 양서류로서 초기에 아연 과량 처리에 의해 가장 영향을 많이 받고 있는 부분은 물의 접촉이 빈번한 피부, 구강, 인두 등이라 할 수 있다. 본 연구에서 구전정 상피는 그러한 생각에서 관찰되었으며 예상대로 심각한 Papilloma-like structure를 보여주었다.

눈의 성장과 발달에도 아연은 필요하며 눈의 각 부위에서 아연의 국재는 확인되고 있다 (Hirayama, 1990). Melanosome 형성에도 아연은 필수적이라는 보고가 있으나 (Borovansky, 1994) 과량의 아연을 처리한 본 연구에서는 안배형성 자체가 저해 받으며 경미하게는 이미 다른 연구에서 알려진 결과인 렌즈 헤르니아도 확인되었지만 그 외 새로운 사실로서 망막층의 분화가 저해되고 photoreceptor cell의 붕괴 또는 형성부전이 발견되었다. 이러한 결과는 rat에 아연을 과잉공급 했을 때 시각계에 이상이 없었다는 보고 (Hirayama, 1990)와는 차이가 있는 부분이다. 두더지에 아연을 처리하였을 때 아연이 축적되는 기관의 연구에서 신장이 포함되었으며 (Komarnicki, 2000), Metallothionein null mouse에 대한 아연 실험에서 신장의 보오만낭이 부풀어오르는 것이 보고되었다 (Kelly et al., 1996). 본 실험에서도 *Xenopus* 중신의 초기 기관인 원신관의 구성세포가 부풀어올라 이와 동일한 결과가 나타났으며 paraffin section에서는 eosin 호성과립이 증가된 것이 특징이었다. 아연에 의한 근육의 발달부전에 대해서는 자세히 연구된 바 없으며 본 연구에서 아연에 의해 근섬유 다발이 가늘어진 것이 확인되었고 Ca^{2+} 의 저장고인 근형질세망이 상대적으로 빈번하게 분포하여 정상적인 근수축에도 영향을 미칠 것으로 생각한다. 아연에 의해 심장 탈색을 일으킨 7일 유생을 생리식염수에서 다시 7일 키웠을 때 $600 \mu M$ 이상의 고농도 전처리 개체에서는 적혈구의 수와 심장의 상태에서 전혀 회복되지 않았으며 이는 지나친 고농도의 아연 전처리에 의해 혈구형성자체가 저해되어 혈구가 고갈되는 것으로 보인다. 이러한 현상은 세포내 미토콘드리아의 파괴, Ca^{2+} 과 Zn^{2+} 의 치환에 의한 세포접착 저해 등이 그 원인으로 생각된다. 또한 많은 독성물질에서 나타나는 다양한 현상에서 신경계에 미치는 영향은 매우 심각하며, 비정상적인 아연대사가 알츠하이머병을 유발하며, 신경세포에 대한 독성을 가진다는 타 연구내용과 비교했을 때 본 연구에서는 *Xenopus*의 중추신경계에 미치는 조직학적 영향은 경미한 것으로 보인다.

현재 세계적으로 양서류의 개체수가 격감하고 있으며 자연상태에서 포획된 양서류의 기형 패턴을 보고하는 외국의 인터넷 사이트들도 있는 실정이다. 이러한 양서류의 발생이상은 내분비장애물질 등의 영향도 있을 수 있으나 수계에 존재하는 중금속의 영향도 매우 크다고 할 수 있다. 따라서 아연이 양서류에 대하여 나타내는 본 연구의 독성효과로 판단하여, 과잉 아연이 우리나라 양서류의 수적 감소의 한 원인이 될 수 있다고 생각되며, 공업적 목적으로 사용된 아연이 수계로 유입되는 일이 없도록 더욱 철저한 관리가 필요하다고 사료된다. 외국에서는 수계의 과잉 아연을 제거하는 기술이 발표되는 등 (Abdel-Halim et al., 2003) 아연을 수계의 중요한 오염원으로 생각하고 관심을 가지므로 국내에서도 아연의 폐기물 관리에 많은 관심을 가져야 할 것으로 생각된다.

본 연구에 이어 과량 아연에 대한 독성의 *in vitro* 연구는 저자들이 현재 *Xenopus* 동물극 분리배양방법 (animal cap assay)으로 행하고 있으며 *in vitro*에서 과량 zinc에 의한 독성을 경감할 수 있는 물질을 탐색중이다.

적 요

공업적 목적으로 사용된 후의 아연은 육지와 수계로 유입되며, 토양으로 유입된 후의 아연은 부식되어 수계로 유입된다. 과량의 아연은, 수서생물에 대해 중금속으로서 독성을 가지며 수서 동·식물의 성장억제를 유발하고, 나아가서는 동물의 기형발생을 초래한다. 본 연구에서는 FETAX (frog embryo teratogenic assay with *Xenopus*) 방법에 의해 *in vivo*에서 과량 아연의 독성을 밝혔다. st. 9 시기에 있는 *Xenopus* 개구리의 배를 $100 \sim 900 \mu M ZnCl_2$ 용액에 7일간 노출시켰을 때 $100 \mu M$ 아연에서는 81%의 개체가 생존하였고 $1000 \mu M$ 에서는 25%가 생존하였다. 그 결과 외형적 이상은 복부팽만과 소화관 형성부전이 일반적으로 나타났고 $200 \mu M$ 이상의 아연처리 시 모든 개체에서 이러한 현상이 나타났다. $400 \mu M$ 이상의 농도에서는 모든 개체에서 심장탈색을 보였다. 또한 신체의 탈색과 눈의 수정체 헤르니아, 그리고 느슨한 소화관은 $100 \mu M$ 이상의 아연처리에서 매우 빈번히 나타났다. 아연처리 된 유생의 파라핀 조직절편에서는 망막의 광수용기의 파괴, 눈의 초자체방 축소, 심장 적혈구수의 감소, 비정상적 간조직, 원신관 세포의 팽윤, 근육형성부전, 그리고 구전정의 유두종 형성 등의 이상을 보였다. 이러한 이상은 미토콘드리아의 파괴, Ca^{2+} 과

Zn²⁺의 치환에 의한 세포결합의 저해, 그리고 아연에 의한 적혈구내 leghemoglobin의 형성 등이 원인일 것이다. 과량 아연에 의해 유생의 체장은 감소하였고, 통계분석 결과 체장은 대조군의 체장과 비교했을 때, 300 µM 아연처리 군부터 매우 유의미하게 체장의 감소가 나타났다. 현재 자연상태에서 양서류의 수적감소와 기형발생이 세계적으로 보고되고 있으며, 본 연구의 결과로 고려했을 때, 과잉 아연은 수계를 오염시켜 양서류의 수적 감소를 일으키는 중요한 원인물질로 생각되므로 이의 관리에 관심을 두어야 할 것이다.

사 사

이 논문은 2001년도 창원대학교 연구비에 의하여 연구되었음.

인 용 문 헌

- Abdel-Halim, S.H., A.M.A. Shehata and M.F. El-Shahat. 2003. Removal of zinc and floride from industrial waste water plants around Cairo. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **70**: 262-267.
- Barceloux, D.G. 1999. Zinc. *Clinical Toxicology* **37**(2): 279-292.
- Bert, L., H. Vallee and K.H. Falchuk. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews* **73**: 79-115.
- Biddinger, G.R. and S.P. Gloss. 1984. The importance of trophic transfer in the bioaccumulation of chemical contaminants in aquatic ecosystems. *Residue Rev.* **91**: 103-145.
- Bohane, T.D., E. Cutz, J.R. Hamilton and D.G. Gall. 1977. Acrodermatitis enteropathica, zinc, and the paneth cell. A case report with family studies. *Gastroenterology* **73**: 587-592.
- Borovansky, J. 1994. Zink in pigmented cells and structures, interactions and possible roles. *Sb. Lek.* **95**: 309-320.
- Braun, J., K. Lindner, M. Schreiber, R.A. Heidler and W.H. Horl. 1997. Percentage of hypochromic red blood cells as predictor of erythropoietic and iron response after i.v. iron supplementation in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol. dial. Transplant.* **12**: 1173-1181.
- Dalvit, C., L. Tennant and P.E. Wright. 1986. IH NMR studies of heme pocket conformation in zinc-substituted leghemoglobin, a diamagnetic analog of deoxyleghemoglobin. *J. Inorg. Biochem.* **28**: 303-309.
- Dineley, K.E., J.M. Scanlon, G.J. Kress, A.K. Stout and I.J. Reynolds. 2000. Astrocytes are more resistant than neurons to the cytotoxic effects of increased [Zn(2+)] (i). *Neurobiol. Dis.* **7**: 310-320.
- Falchuk, K.H., M. Montorzi and B.L. Vallee. 1995. Zinc uptake and distribution *Xenopus laevis* oocytes and embryos. *Biochemistry* **19**: 16524-16531.
- Friel, J.K., R.E. Serfass, P.V. Fennessey, L.V. Miller, W.L. Andrews, B.S. Simmons, G.F. Downton and P.G. Kwa. 1998. Elevated intakes of zinc in infant formulas do not interfere with iron absorption on premature infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **27**: 312-316.
- Hegstrom, L.J. and S.D. West. 1989. Heavy metal accumulation in small mammals following sewage sludge application to forests. *J. Environ. Qual.* **18**: 345-349.
- Heijerick, D.G., C.R. Janssen, C. Karlen, I.O. Wallinder and C. Leygraf. 2002. Bioavailability of zinc in runoff water from roofing materials. *Chemosphere* **47**(10): 1073-1080.
- Hirayama, Y., 1990. Histochemical localization of zinc and copper in rat ocular tissues. *Acta. Histochem.* **89**: 107-111.
- Hogstrand, C., P.M. Verboost and S.E. Wendelaar Bonga. 1999. Inhibition of human erythrocyte Ca²⁺-ATPase by Zn²⁺. *Toxicology* **133**: 139-145.
- Interlandi, S.J. 2002. Nutrient-toxicant interactions in natural and constructed phytoplankton communities: results of experiments in semi-continuous and batch culture. *Aquat. Toxicol.* **61** (1-2): 35-51.
- Ishii, K., M. Sato, M. Akita and H. Tomita. 1999. Localization of zinc in the rat submandibular gland the effect of its deficiency on salivary secretion. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **108**: 300-308.
- Kelly, E.J., C.J. Quaipe, G.J. Froelick and R.D. Palmiter. 1996. Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *J. Nutr.* **126**: 1782-1790.
- Komarnicki, G.J. 2000. Tissue, sex and age specific accumulation of heavy metals (Zn, Cu, Pb, Cd) by populations of the mole (*Talpa europaea* L.) in a central urban area. *Chemosphere* **41**: 1593-1602.
- Labbe, R.F., H.J. Vreman and D.K. Stevenson. 1999. Zinc protoporphyrin : A metabolite with a mission. *Clin. Chem.* **45**: 2060-2072.
- Levine, M.B., A.T. Hall, G.W. Barrett and D.H. Tayler. 1989. Heavy metal concentrations during ten years of sludge treatment to an old-field community. *J. Envi-*

- ron. *Qual.* **18**: 411–418.
- Luo, S.Q., M.C. Plowman, S.M. Hopfer and F.W.Jr. Sunderman. 1993. Embryotoxicity and teratogenicity of Cu^{2+} and Zn^{2+} for *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure. *Ann. Clin. Lab.* **23**: 111–120.
- Martineau, L. and C.T. Craescu. 1993. Sequential assignment of proton resonances in the NMR spectrum of Zn-substituted alpha chains from human hemoglobin. Ligand-induced tertiary changes in the heme pocket. *Eur. J. Biochem.* **214**: 383–393.
- Nieukoop, P.D. and J. Faber 1956. Nomal table of *Xenopus laevis*, p. 162–188. In: External and internal stage criteria in the development *Xenopus laevis*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Nomizu, T., K.H. Falchuk and B.L. Vallee. 1993. Zinc, iron, and copper contents of *Xenopus laevis* oocytes and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **36**: 419–423.
- Pugh., R., D. Dick and A. Fredeen. 2002. Heavy Metal (Pb, Zn, Cd, Fe, and Cu) Contents of Plant Foliage near the Anvil Range Lead/Zinc Mine, Faro, Yukon Territory. *Ecotoxicol Environ. Saf.* **52**(3): 273–279.
- Record, I.R., S.E. MacQueen and I.E. Dreosti. 1990. Zinc, iron, vitamin E and erythrocyte stability in the rat. *Biol. Trace. Elem. Res.* **23**: 89–96.
- Samecka-Cymerman, A. and K.K. Kempers. 2002. Heavy metals in aquatic bryophytes from the Ore mountains (Germany). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **52**(3): 203–210.
- Samuelson, D.A., D. Smith, R.J. Ulshafer, D.G. Hendricks, R.D. Whitley, H. Hendricks and N.C. Leone. 1993. X-ray microanalysis of ocular melanin in pigs maintained on normal and low zinc diets. *Exp. Eye Res.* **56**: 63–70.
- Skaggs, H.S. and R.P. Henry. 2002. Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **133** (4): 605–612.
- Suh, S.W., K.B. Jensen, M.S. Jenden, D.S. Silva, P.J. Kesslak, G. Danscher and C.J. Frederickson. 2000. Histochemically-reactive zinc in amyloid plaques, angiopathy, and degenerating neurons of Alzheimer's diseased brains. *Brain Res.* **852**: 274–278.
- Sunderman, F.W.Jr., K. Antonijczuk, A. Antonijczuk, S. Grbac-Ivankovin, A.H. Varghese, G. Korza and J. Ozols. 1995. *Xenopus* lipovitellin I is Zn (2+)- and Cd (2+)-binding protein. *Mol. Reprod. Dev.* **42**: 180–187.
- Takahashi, S., I. Takahashi, H. Sato, Y. Kubota, S. Yoshida and Y. Muramatsu. 2000. Determination of major and trace elements in the liver of *Wistar* rats by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry and mass spectrometry. *Lab. Anim.* **34**: 97–105.
- Tjalve, H. and A. Frank. 1984. Tapetum lucidum in the pigmented and albino ferret. *Exp. Eye Res.* **38**: 341–351.
- Wellinghausen, N. and L. Rink. 1998. The significance of zinc for leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.* **64**: 571–577.
- Woodling, J., S. Brinkman and S. Albeke. 2002. Acute and chronic toxicology of zinc to the mottled sculpin *Cottus bairdi*. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**(9): 1922–1926.

(Received 4 Nov. 2002, Manuscript accepted 1 Feb. 2003)