

PCB가 산개구리의 배아발생에 미치는 영향¹

고선근² · 정성용³

The Effects of PCB on the Embryonic Development of a Korean Frog, *Rana dybowskii*¹

Sun-Kun Ko², Soung-Yung Joung³

요 약

본 연구에서는 FETAX의 방법에 따라 PCB(Aroclor)가 산개구리의 배아발생에 미치는 효과를 조사하였다. 배아의 치사율과 기형률은 probit 분석법으로 조사하였다. PCB에 의한 LC₅₀은 1.48ppb를 나타냈고 EC₅₀은 0.25ppb를 나타냈으며 TI는 5.7을 나타내어 PCB는 높은 치사율을 나타내는 최기형성 물질로 판단된다. 기형양상은 수포형성 기형이 0.1ppb에서 62.0%, 꼬리기형이 1ppb에서 32.0%, profund형의 기형이 5ppb에서 68.0%를 나타냈다. PCB는 비교적 낮은 농도인 1.0ppb에서 머리에서 꼬리까지의 성장을 저해하는 결과를 나타내어 이러한 배아의 성장억제에 의한 평가는 환경오염물질의 독성을 평가하는 데 민감한 지표로 사용되어질 수 있을 것으로 생각된다. 결론적으로 이러한 결과는 PCB가 산개구리 배아발생과정에 높은 독성을 지닌 것을 나타낸다.

주요어 : 최기형성

ABSTRACT

The embryotoxic effects of PCB (Aroclor 1248) on a Korean frog, *Rana dybowskii* was determined by using the FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus) protocol. The rates of mortality and malformed larvae were investigated by probit analysis. The results showed that PCB is highly embryoethal. From LC₅₀ of 1.48ppb and from EC₅₀ of 0.25ppb and TI of 5.7 were derived, which indicates PCB is to be considered a teratogenic compound. Specific malformations occurred in 62.0% as edema at the 0.1ppb, in 32.0% as tail deformations at the 1ppb, and in 68.0% as profound deformations at the 5ppb of PCB concentration which living embryos were exposed to. PCB suppressed the growth of head-tail length at a relatively low concentration (1.0ppb), and therefore growth inhibition as assessed by embryo length can be used as a sensitive indicator to evaluate the toxicity of pollutants in the environment. In conclusion, PCB must be considered highly embryotoxic to *Rana dybowskii*.

KEY WORDS : TERATOGENESIS

1 접수 6월 25일 Received on Jun. 25, 2004

2 호남대학교 생명과학과 Dept. of Biological Science, Honam Univ., Gwngui (506-714), korea(sunkun@honam.ac.kr)

3 호남대학교 대학원 생물학과 Dept. of Biology, Graduate School, Honam Univ., Gwngui (506-714), korea(any-8569@daum.net)

서론

최근 양서류의 생태학적·발생학적 특징을 이용하여 오염물질에 의한 기형발생과 호르몬의 작용양상에 미치는 영향에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Polychlorinated biphenyls(PCB 126)을 *Xenopus laevis*와 *Rana temporaria*의 올챙이에 노출시키면 기형을 유발하는 것으로 알려져 있으며(Gutleb *et al.*, 1999), 갑상선 호르몬의 교란에 의한 변태(metamorphosis) 지연과 호르몬 분비를 조절하는 유전자의 이상으로 인한 변태중지 등이 알려져 있다(Bray and Sicard, 1982; Galton, 1992). 포유류 및 조류의 경우에도 PCB는 물질대사에 영향을 주어 갑상선호르몬계를 교란시키는 것으로 알려져 있다(Brouwer *et al.*, 1988; Murk *et al.*, 1994).

개구리의 배아를 활용하여 환경오염물질의 독성 및 기형유발에 대한 시험법으로 Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus(FETAX) 방법이 널리 사용되고 있으며(Bantle *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1996), 이러한 FETAX 방법에 따라 외국에서는 그 나라에 서식중인 개구리의 배아를 활용한 연구가 진행되고 있다(Gutleb *et al.*, 1999; Mann and Bidwell, 2000). 본 연구에서는 한국산개구리 중 정자형성주기와 번식기의 난자 내 호르몬 변화 양상 및 난자의 성숙현상 등이 알려져 있는 산개구리(*R. dybowskii*)(Ko *et al.*, 1997; Ko and Lee, 1997; Ko *et al.*, 1998) 배아의 발생과정을 이용하여 FETAX 방법에 따라 PCB(Arochlor)가 산개구리 배아발생에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에 이용된 실험동물은 2002년 11월~2003년 1월 동안 광주 및 전남 일대에서 산개구리(*R. dybowskii*) 암컷(약 30g 이상)과 수컷(약 20g 이상)의 성체를 각각 30개체씩 채집하여 암수를 분리한 후 4~5°C가 유지된 냉장실에서 가 동면을 유도하며 보관하여 실험에 사용하였다.

2. 배양액 및 시약

배양액으로는 Amphibian Ringer's 용액(AR: NaCl, 6.6g/l; CaCl₂, 0.15g/l; KCl, 0.15g/l)에 Penicillin G(30mg/l), Streptomycin sulfate(50mg/l) 및 Sodium

bicarbonate 완충용액(200mg/l)을 사용 직전에 첨가하여 사용하였으며, 배양액의 pH는 0.1N HCl을 사용하여 7.4로 맞추어 사용하였다. 암컷의 배란을 유도하기 위한 뇌하수체 추출물(Frog Pituitary Homogenate: FPH)은 암컷 개구리 뇌하수체를 10개 정도 모은 다음 AR용액에서 초음파 분쇄기로 부순 후(20sec), 원심분리(20min, 1000rpm, 4°C, VISION, VS-15000CF)하여 상층액을 1 pituitary equivalent/ml(pit. equiv./ml) 농도로 만들었으며, 이를 소량씩(1ml) 분주하여 냉동보관(-20°C)하여 사용하였다. 배양액에 첨가한 polychlorinated biphenyls(Arochlor: AccuStandard Co)는 hexane에 녹인 후 hexane만을 제거하고 dimethyl sulfonyl oxaloacetate(DMSO)로 재구성하여 Stock solution으로 제조하고 이를 AR용액으로 희석하여 직접 배양액에 첨가하였다. 배양액 내의 DMSO양은 배아발달과정에 손상을 받지 않는 농도(0.02%)를 사용하였으며, PCB를 포함하지 않은 배양액을 동시에 사용하여 대조군으로 사용하였다.

3. 배란유도 및 인공수정

암컷의 배란 유도를 위해 뇌하수체 추출물을 암컷의 복부에 주사하고 24시간 후에 배란을 유도하였으며, 수컷의 정소를 적출하여 AR 2ml이 포함된 배양접시에 정소를 더뜨려 정자들을 배양액 내로 방출시켜 정자현탁액을 준비한 후 정자들의 운동성을 확인한 다음(약 70% 정도) 정자의 현탁액을 배란된 난자에 뿌려주어 수정을 유도하였다.

4. 수정란의 채취 및 배양

수정란을 채취하기 위해 수정을 유도한 후 3시간 이내에 2세포의 배아들이 출현하기 시작하면(Johnson and Volpe, 1973), 2세포의 배아들 중 세포질들이 정확히 나누어져 균일한 할구들을 가진 배아들만을 선택하여 포셋으로 젤리층을 제거하고 18°C에서 포배기에 서 낭배기까지 배양하여 실험에 사용하였다.

5. 시험물질 처리

배아의 발달과정에 미치는 PCB의 효과를 파악하기 위해 유리 배양접시에 시험물질이 농도별로 포함된 실험군과 시험물질이 포함되지 않는 대조군의 배양액 10ml에 포배기에서 낭배기 사이까지 배양된 배아들을 각 농도별로 25개씩 넣고 18±2°C의 온도에서 96시간 배양하면서 24시간마다 새로운 용액으로 교환하였

으며 시험물질의 농도는 5개 이상으로 정하여 실시하고 모든 농도구간에 대해 각기 다른 개체에서 채취한 배아들을 사용하여 3회 반복 실험하였다.

6. 결과처리 및 분석

시험물질 처리에 대한 결과처리 및 분석을 위해 각 농도별로 사망률을 조사하여 죽은 것을 제거하고 96 시간 후 생존한 개체들을 대상으로 기형 개체 수 및 양상을 조사하였다. ASTM(1993)의 방법에 따라 그 결과들을 %로 환산한 후 Probit analysis Program으로 분석하여 LC₅₀, EC₅₀을 구하였으며 아울러 96h LC₅₀ 값을 96h EC₅₀ 값으로 나누어 Teratogenic Index(TI)를 구하여 TI 값이 1.5 이상이 되면 유해성이 있는 물질로 판정하였다. 기형의 종류는 Bantle 등(1991)의 방법에 따라 정상발생 올챙이를 기준으로 올챙이 꼬리가 파상을 나타내는 양상, 꼬리가 휘어지는 양상 등을 관찰하여 꼬리기형으로 판정하였고, 복부의 돌출현상 등을 관찰하여 복부기형으로 판정하였다. 또한 몸 전체에 형성된 수포(물집)의 형성을 관찰하여 수포형성기형(Edema)으로 판정하였으며 머리와 복부 및 꼬리 등이 명확히 구분되지 않는 경우는 profound형의 기형으로 판정하였다. 배아의 성장률은 도립현미경(inverted microscope; Zeiss) 아래서 접안눈금자(ocular meter)를 이용하여 머리에서 꼬리까지의 길이를 측정한 후 결과는 student's t-test로 통계적 유의성(p < 0.05)을 검정하였다.

결 과

실험에 사용했던 포배기의 배아는 산개구리의 뇌하수체 추출물을 주사한 후 배란을 유도하고 정자현탁액을 뿌려 인공수정을 유도하여 채취했으며 배아의 크기는 그 직경이 2.1~2.3mm 정도였다. 산개구리의 배아 발생에 미치는 PCB의 효과를 알아보기 위해 산개구리의 포배기 배아들을 PCB가 첨가되지 않는 대조군과 PCB를 각 농도별로 처리하여 96시간 배양 후 배아들에게 나타난 치사율, 기형률, 기형의 종류 등을 조사하였다. 그 결과 PCB가 포함되지 않는 대조군에서는 죽는 개체가 거의 나타나지 않았으나 PCB 0.1ppb에서부터는 죽는 배아들이 3.0%의 비율로 나타나기 시작하여 1ppb(20%), 5ppb(71%)로 농도가 높아지면서 그 비율도 증가하였고(Figure 1), 배양 후 생존한 일부의 개체들은 0.1ppb 농도에서부터 기형이 관찰되었으며(Figure 2), 10ppb의 농도에서는 대부분의 배아들이 치사되는 현상을 나타냈다.

이러한 농도별 비율을 Probit analysis Program을 활용하여 분석한 결과 산개구리의 배아 발달에 대한 PCB 영향의 LC₅₀은 1.48, EC₅₀은 0.26을 나타냈으며, LC₅₀ 값을 EC₅₀ 값으로 나누어 Teratogenic Index(TI)를 구한 결과 5.7을 나타냈다(Table 1).

한편 PCB의 영향에 의해 나타난 기형양상은 수포형성기형, 꼬리기형, 복부기형, 척추기형, profound형 등 다양한 양상을 나타냈으며(Figure 2), 이러한 양상은 노출된 PCB의 농도에 따라 각기 다른 비율을 나타냈

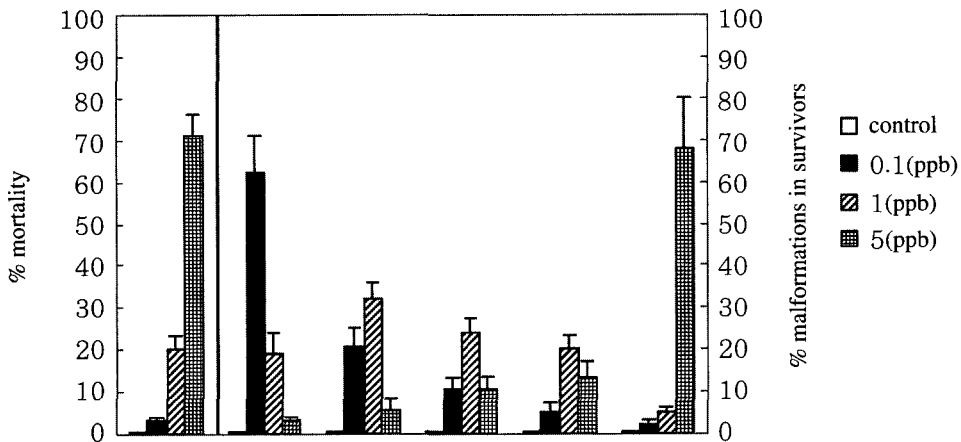


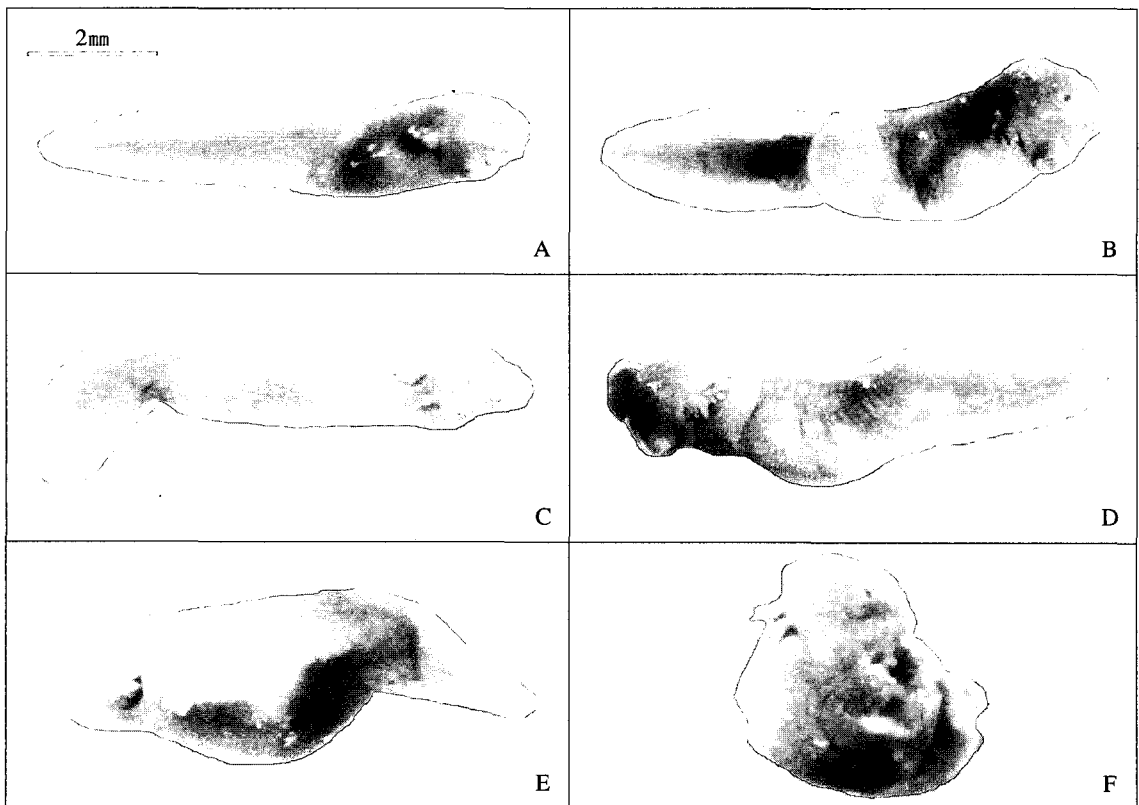
Figure 1. Mortality and percentage of malformation in survivors of *R. dybowskii* embryos after 96h exposure to PCB

Table 1. LC₅₀, EC₅₀(malformation) and TI of *R. dybowskii* embryos exposed to PCB(Aroclor)

	Exposure time(hr)	LC ₅₀ (ppb)	EC ₅₀ (ppb)	TI(LC ₅₀ /EC ₅₀)
PCB (Aroclor)	96	1.48	0.26	5.7

다. 즉, PCB 0.1ppb에서는 수포형성기형(62%), 꼬리 기형(20.5%)의 순으로 다른 기형 종류(10% 미만)에 비해 높았고, PCB 1ppb에서는 꼬리기형(32%), 복부 기형(24%), 척추기형(20%), 수포형성기형(19%), profound형(5%)을 각각 나타냈으며, PCB 5ppb에서는 profound형(68%)이 가장 높은 비율을 나타냈다. PCB가 일정농도에서 배아들을 치사시키고 다양한 기형을 유발한다는 사실을 토대로 PCB의 농도를 세분화하여

배아의 성장에 미치는 효과를 조사하기 위해 각 농도 별 개체들의 체장을 측정 한 결과 대조군에서는 약 7.5 mm를 나타냈고 0.01ppb, 0.1ppb, 0.05ppb의 농도에서는 약 7.3~7.4mm를 나타내어 대조군과 유사한 크기를 나타냈으나 1ppb, 2ppb의 농도에서는 PCB의 영향에 의해 약 6.0mm 정도로 대조군에 비해 그 크기가 작게 나타났었다(p < 0.05). PCB의 농도가 높아짐에 따라 대조군에 비해 커다란 차이를 나타내어 개체들의 성장에



(A) *R. dybowskii* embryo of control approximately 130 hours after fertilization.
 (B) *R. dybowskii* embryo after 96 hours exposure to 0.1ppb PCB displaying severe edema.
 (C) *R. dybowskii* embryo after 96 hours exposure to 0.1ppb PCB displaying flexure of the tail.
 (D) *R. dybowskii* embryo after 96 hours exposure to 1ppb PCB displaying spine abnormality.
 (E) *R. dybowskii* embryo after 96 hours exposure to 1ppb PCB displaying abdominal abnormality.
 (F) *R. dybowskii* embryo after 96 hours exposure to 5 ppb PCB displaying profound.

Figure 2. Morphology of *R. dybowskii* exposure to PCB

심한 저해현상을 나타냈다(Figure 3).

고 찰

세계적으로 양서류들의 개체 수는 감소되어가는 경향을 보이고 있으며, 그 원인으로는 서식지 파괴, 자외선 양의 증가 같은 물리적인 위협뿐만 아니라 PCB와 같은 난분해성 유기화합물 등의 환경오염물질도 중요한 원인으로 거론되고 있다(Blaustein, 1994; Pechman and Wilbur, 1994).

야생동물 중 특히 양서류는 투과성이 양호한 피부를 가지고 있는데 배란된 난자의 경우 난각(egg capsule)을 가진 동물들의 난자와는 달리 개구리의 난자는 투과성이 높은 젤리층(jelly coat)에 의해 둘러싸여 있다. 이러한 젤리층 안에서 초기발생과정을 거쳐 걸아가미가 출현되어지는 시기에 부화(hatching) 과정을 거쳐 올챙이 시기를 물속에서 지내며 성장하여 개구리로 변태(metamorphosis)되어지는 특성을 가지며 식성도 올챙이 단계에는 식물성을 주로 섭취하지만 개구리 변태 후에는 육식성으로 변하는 독특한 생활사 때문에 PCB와 같은 난분해성 오염물질에 노출되기 쉽다.

FETAX 기법에 사용되어지는 *Xenopus*의 배아는 산란유도제로 human chorionic gonadotropin(HCG)를 성체 암·수컷에 각각 주입하여 산란 및 수정을 유도하여 배아를 채취하는 것으로 알려져 있다(Gutleb *et al.*, 1999; Fischer and Dietrich, 2000). 본 실험에 사용된 산개구리의 배아는 산개구리의 뇌하수체 추출물을 주사하여 효율적인 배란을 유도하였으며 대조군의 배아

들은 정상적인 발달상태를 나타냈다(Figure 2, A). 높은 지질친화성과 낮은 생분해성을 나타내어 난분해성 물질로 알려진 PCB를 산개구리의 배아 발달과정에 노출시킨 본 실험의 결과로부터 중금속이나 농약의 종류의 효과(unpublished data)와는 다르게 매우 낮은 농도인 수ppb 농도 수준에서 배아를 치사시키거나(Figure 1) 심한 기형을 유발하며(Figure 2) 배아의 성장을 저해하여(Figure 3) PCB는 산개구리 배아발달과정에 치사 및 기형유발, 성장억제 등의 뚜렷한 형태적 변화를 유발하는 치명적인 효과를 나타낸다는 사실을 알 수 있었다(Figure 1, 2). 또한 PCB를 처리한 0.1ppb 농도에서부터는 죽는 배아들이 나타나기 시작하였고 생존한 개체들 중 일부 개체들에서 기형이 나타나기 시작하여 LC₅₀은 1.48을 나타내었고 EC₅₀은 0.26을 나타내었으며 TI는 5.7을 나타내어 PCB는 산개구리의 배아발달에 치명적인 영향을 미칠 수 있는 강력한 최기형성 물질임을 확인할 수 있었다.

이러한 배아의 발생과정에서 배아의 성장을 억제하거나 기형을 유발시켰던 PCB의 농도는 산개구리 난자 성숙 현상 및 progesterone(P4) 분비현상을 억제했던 5ppb의 농도와 거의 일치하였다(Ko and Lee, 2003). 이러한 현상은 PCB가 산개구리의 생식세포의 발달 및 성숙과정, 배아의 발생과정, 유생의 성장 등 전반적인 과정에 치명적인 영향을 나타낼 것으로 추측되나 본 실험의 결과로는 PCB의 구체적인 작용기작을 파악하기에는 아직 역부족이다. 이러한 PCB의 작용기작을 파악하기 위해서는 보다 많은 연구가 더 필요한 것으로 생각된다.

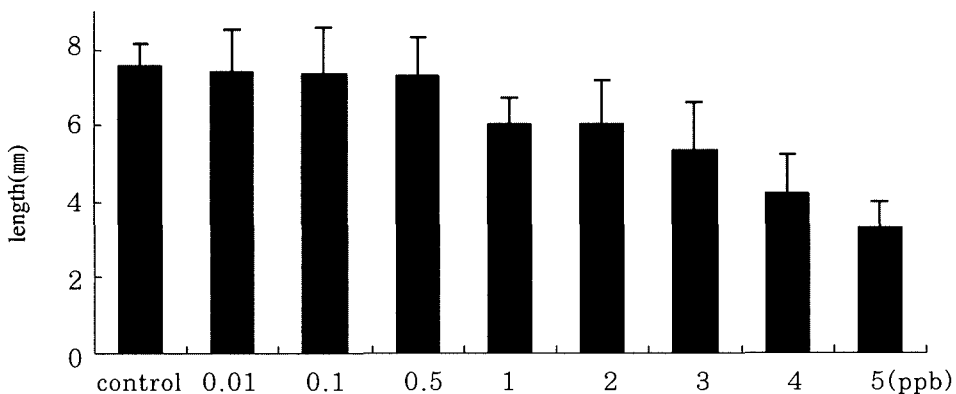


Figure 3. Mean embryo lengths as an indicator of growth inhibition following exposure to PCB. Embryos were cultured for 96 hours in wells contained 10ml AR in the different concentrations of PCB. Result depicted in the bar graphs represents embryo length of 75 embryos(3 animals)

인용문헌

- ASTM(1993) Standard guide for conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus(Fetax). ASTM Standards on Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation ASTM, Philadelphia, PA, 457-467pp.
- Bantle, J.A., J.N. Dumont, R.A. Finch and G. Linder(1991) Atlas of Abnormalities: a Guide the Performance of FETAX. Oklahoma State Publications Department.
- Bantle, J.A., D.J. Fort, J.R. Rayburn, D.J. Deyoung, S.J. Bush(1990) Further validation of FETAX: evaluation of the developmental toxicity of five known mammalian teratogens and non-teratogens. Drug. Chem. Toxicol 13: 267-282.
- Blaustein, A.R.(1994) Chicken Little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. Herpetologica 50(1): 85-97.
- Bray T., R.E. Sicard(1982) Correlation among the changes in the levels of thyroid hormones, thyrotropin and thyrotropin releasing hormone during the developing of *Xenopus laevis*. Exp. Cell Biol. 50: 101.
- Brouwer, A., W.S. Blaner, A. Kukler, K.J. Van den Berg(1988) Study on the mechanism of interference of 3, 4, 3', 4' -tetrachlorobiphenyl with the plasma retinol-binding proteins in rodents. Chem-Biol Interactions 68: 203.
- Fischer, W.J. and D.R. Dietrich(2000) Toxicity of the cyanobacterial cyclic toxins microcystin-LR and RR in early life-stages of the African clawed frog(*Xenopus laevis*). Aquatic Toxicology 49: 189-198.
- Galton, V.A.(1992) The role of thyroid hormone in amphibian metamorphosis. TEM 3: 96.
- Gutleb, A.C., J. Appelman, M.C. Bronkhorst, J.H.J. Van den Berg, A. Spenkelink, A. Brouwer, A.J. Murk(1999) Delayed effects of pre-and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species(*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). Environmental Toxicology and Pharmacology 8: 1-14.
- Johnson, R.E. and E.P. Volpe(1973) Patterns and Experiments in developmental biology. In: Observation and experiments on the living frog embryo. W.M. C. Brown Co, 7-9, 215-227pp.
- Ko, S.K., H.M. Kang, J.W. Kim and H.B. Kwon(1997) Testicular cycles in the Korean frogs: Annual spermatogenic patterns, seasonal changes in the steroidogenic competence, and responsiveness to gonadotropins in vitro. Korean J Biol Sci, 99-105pp.
- Ko, S.K. and D.P. Lee(1997) Effect of heavy metal ions on the Oocyte maturation of frog, *Rana dybowskii* in vitro. Kor. J. Env. Eco. 11(3): 310-315.
- Ko, S.K., H.M. Kang, W.B. Im and H.B. Kwon(1998) Testicular cycles in three species of Korean frogs: *Rana nigromaculata*, *Rana rugosa*, *Rana dybowskii*. Gen. and Comp. Endocrinol, 111, 347-358pp.
- Ko, S.K. and D.P. Lee(2003) Effect of PCB on the Oocyte maturation and progesterone production of frog, *Rana dybowskii* in vitro. Kor. J. Env. Eco., 17(1): 18-25.
- Mann, R. M. and J. R. Bidwell(2000) Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs. Aquatic Toxicology 51: 19-29.
- Morgan, M.K., P.R. Scheuerman, C.S. Bishop, R.A. Pyles(1996) Teratogenic potential of atrazine and 2,4-D using FETAX. J. Toxicol. Environ. Health 48: 151-168.
- Murk, A.J., A.T.C. Bosveld, M. van den Berg, A. Brouwer(1994) Effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons(PHAHs) on biochemical parameters in chicks of the common tern(*Sterna hirundo*). Aquat Toxicol, 30: 91.
- Pechman, J.H.K. and H.M. Wilbur(1994) Putting declining amphibian populations into perspective: Natural fluctuations and human impacts. Herpetologica 50: 65-84.