

# Cd<sup>2+</sup>이 북방산개구리의 난자성숙과 배아발달에 미치는 영향<sup>1</sup>

고선근<sup>2</sup>

## Effect of Cd<sup>2+</sup> on the Oocyte Maturation and Developmental Stages of Brown Frog Embryo, *Rana dybowskii* in vitro<sup>1</sup>

Sun-Kun Ko<sup>2</sup>

### 요약

본 연구는 북방산개구리의 난자 및 배아를 활용하여 난자성숙현상과 배아발달과정에 미치는 Cd<sup>2+</sup>의 독성효과를 조사하였다. 결과 Cd<sup>2+</sup> 0.1 ppm에서 난자의 성숙현상을 억제하였으며 Cd<sup>2+</sup> 작용의 가역성을 조사하기 위해 3시간 동안 난자들을 Cd<sup>2+</sup>에 노출시킨 후 보통배양액으로 옮겨 17시간 배양한 결과 1 ppm에서는 가역성을 나타내었으나 2.5 ppm에서는 비가역적인 손상을 주었다. 발달 중인 2세포 배아를 Cd<sup>2+</sup>의 여러 농도에 노출시킨 결과 0.1ppm에서 발달이 억제되었으며 노출시간이 길어진 32세포 시기에는 세포붕괴현상을 유발하였다. 한편, 포배기 배아를 Cd<sup>2+</sup>의 여러 농도에 노출시켜 96시간 배양한 후 유생의 치사율 및 기형율을 대상으로 probit 분석법으로 조사한 결과 LC50은 0.1ppm, EC50은 0.08ppm, TI는 5.0을 나타내어 Cd<sup>2+</sup>은 높은 치사율을 나타내는 물질로 나타났다. 기형양상은 척추기형이 0.05ppm에서 14.3%, 꼬리기형이 0.1ppm에서 75.0%, 복부기형이 0.01ppm에서 66.7%를 나타내었고 profound 기형이 0.1ppm에서 25.0%를 각각 나타냈으며 Cd<sup>2+</sup> 0.1ppm에서 머리에서 꼬리까지의 성장을 억제하였다. 결론적으로 본 연구의 결과들은 Cd<sup>2+</sup>이 난자성숙, 난할 및 배아의 발달과정에 높은 독성의 효과를 가짐을 나타낸다.

주요어 : 독성, 산개구리

### ABSTRACT

This study investigates the toxic effects of Cd<sup>2+</sup> on frog (*Rana dybowskii*) by the determination of oocyte maturation and development of embryo exposure to different concentrations of the toxicant. The results show that Cd<sup>2+</sup> concentration of 0.1 ppm suppressed the maturation of the oocytes. To examine the reversibility of the inhibitory effects, the oocytes were exposed to the Cd<sup>2+</sup> only for 3 hours, and then transferred to plain medium and cultured further for 17 hours. The oocytes were recovered from the toxic effect of the Cd<sup>2+</sup> when they were exposed to 1 ppm, but not to 2.5 ppm of the Cd<sup>2+</sup>. The development of 2 cell embryos to 32 cell was completely suppressed at 0.1ppm and the longer the embryos were exposed to the Cd<sup>2+</sup>, the more damage appeared to

1 접수 6월 27일 Received on Jun. 27, 2006

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

the embryos and the cytolysis of the 32 cell was induced by  $Cd^{2+}$  at 0.1ppm.

On the other hand, the embryos of blastula stage were cultured 96 hours in presence of the  $Cd^{2+}$  at various concentrations and were examined. The rates of mortality and malformed larvae were investigated by probit analysis. From the results of  $LC_{50}$  of 0.1ppm and  $EC_{50}$  of 0.08ppm, TI of 5.0 was derived, which indicates  $Cd^{2+}$  is to be considered a teratogenic compound. Such specific malformations occurred in 14.3% as spine deformations at the 0.05ppm, in 75.0% as tail deformations at the 0.1ppm, in 66.7% as abdominal deformations at the 0.01ppm and in 25.0% as profound deformations at the 0.1ppm of  $Cd^{2+}$  concentration which living embryos were exposed to.  $Cd^{2+}$  suppressed growth to head-tail length at 0.1ppm. In conclusion, The study results reveal that  $Cd^{2+}$  must be considered highly toxic effect to oocyte maturation and embryonic development.

**KEY WORDS : TOXICITY, RANA DYBOWSKII**

## 서론

중금속이온들은 생물체의 조직 내에 축적되어져 강한 독성을 나타내어 생명현상을 위협하고 있다. 중금속 이온들이 오염을 유발하는 주요 요인으로 유기물질과 무기물질들을 포함하는 가정 및 각종 산업 폐기물이 주요 요인으로 알려져 있다(McCarthy and Shugart, 1998). 중금속이온들은 생명현상의 유지에 필수적인 요소이나 생물체 및 인체에 축적되어지면 독성을 나타내 암, 돌연변이 및 기형 등을 유발하는 것으로 알려져 있으며 특히 카드뮴의 독성은 신장, 폐, 뼈, 면역계에 주로 작용하며 주로 간이나 신장, 비장 등에 축적되어지는 것으로 알려져 있다(Alloway, 1990; Allen, 1994). 또한 중금속 및 오염물질들은 동물의 생식 및 발생계에 노출이 되면 그 저해효과가 그 세대에서만 나타나는 것이 아니라 후대까지 심각한 영향을 미치므로 일부의 학자들에 의해 동물의 발생계를 이용하여 오염물질의 독성을 생물학적으로 검정하고 나아가 오염의 지표로 삼으려는 시도가 활발히 이루어지고 있다(Klein *et al.*, 1980; Storeng and Jonsen, 1980; Saksena, 1982; Iijima *et al.*, 1983; Ko and Lee, 1997).

시험동물 중 양서류의 난자 및 배아와 올챙이는 공기와 물의 투과성이 양호한 피부를 가지고 있고 알과 올챙이 시기에는 물 속에서 발생하여 성장하는 특성이 있으며 식성도 올챙이 단계에는 식물성을 주로 섭취하지만 개구리로 변태 후에는 육식성으로 변하는 독특한 생활사 때문에 중금속 같은 오염물질에 노출되기 쉬운 특징을 나타내어 오염물질에 대한 이들의 발생 및 성장저해, 사지의 재생 및 기형성 등을 평가하여 오염에 대한 모니

터링의 생물지표로 활용하고 있다(Wassersug, 1975; Henle, 1981; Duelman and Traub, 1986; Nebeker *et al.*, 1994a, 1994b). 이러한 개구리의 여포난자를 배양하면서 뇌하수체 호르몬 등을 첨가하여 20시간 배양하면 핵막붕괴(germinal vesicle breakdown: GVBD)와 같은 뚜렷한 현상을 관찰할 수 있으며(Ko and Lee, 2003) 수정 후의 배아는 배양이 가능할 뿐 아니라 세포분열을 왕성히 하고 있어 단시간 내에 오염물질들의 독성을 측정하는데 좋은 재료가 되고 있다(Ko, 2004; Ko and Joung, 2004). 본 연구에서는 북방산개구리(*Rana dybowskii*)의 여포난자 및 배아를 배양하면서  $Cd^{2+}$ 을 배양액에 첨가하여  $Cd^{2+}$ 이 여포난자의 성숙 및 배아의 각 발생 단계에 미치는 직접적인 영향을 조사하고 효과농도를 구하여  $Cd^{2+}$ 의 독성정도를 파악하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

북방산개구리(*Rana dybowskii*)는 2003년 11월~2004년 2월중 광주 근교에서 필요에 따라 암컷 성체(20g 이상)와 수컷 성체(15g 이상)를 채집하여 저온실(4℃)에 보관하면서 난자채취 및 배양과정과 배아채취 과정에 각각 암컷 2개체와 수컷 1개체를 사용하여 3회 반복 실험에 사용하였다.

### 2. 호르몬 및 시약

배양액으로는 Amphibian Ringer's 용액(AR: NaCl,

6.6g/l; CaCl<sub>2</sub>, 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 맞추었다. 암컷의 배란을 유도하기 위해 사용했던 뇌하수체 추출물(Frog pituitary homogenate: FPH)은 암수컷 개구리의 뇌하수체 1개씩을 모아 AR 용액에서 초음파 분쇄기로 부순 후(20sec) 사용하였다. 배양액에 첨가한 CdCl<sub>2</sub>는 Junsei Chemical CO. Ltd.에서 1000ppm으로 제조된 것을 구입하여 농도별로 희석하여 배양액에 직접 첨가하였으며 Cd<sup>2+</sup>을 포함하지 않은 배양액을 동시에 사용하여 대조군으로 활용하였다.

### 3. 여포난자 배양

암컷 개구리의 복부를 절개한 후 난소를 채취하여 AR 용액으로 옮겨 해부현미경(Nikon, ×20) 하에서 난소로부터 여포난자를 분리하여 배양접시의 한 well당 2ml의 AR과 FPH 0.1 p.e/ml (pituitary equivalent/ml) 및 20여 개의 여포난자를 넣고 22°C가 유지되는 진탕 배양기에서 배양하였다. 개구리 여포는 여포 강이 없으므로 여포 세포가 붙어있는 난자를 직접 배양하였다.

### 4. 수정난의 채취 및 배양

수정난의 채취를 위해 뇌하수체 추출물을 암컷의 복부에 주사하여 20~24°C를 유지하는 곳에 24~48시간 방치한 후 암컷의 복부를 압박하여 배란을 유도하였으며 한편, 10% AR 용액이 포함된 배양접시에서 수컷의 정소를 터트린 다음 광학현미경으로 정자의 운동성(70% 이상)을 조사하여 이들의 현탁액을 배란된 난자에 뿌려 수정을 유도하였다(Johnson and Volpe, 1973). 20분 후 정자 현탁액을 제거하고 수정과정이 완료되어 2세포 배아가 출현하면 균등한 할구가 형성된 배아들을 골라 10% AR에 Cd<sup>2+</sup>이 농도별로 첨가된 배양액에 15시간 배양하여 2~32세포 배아의 난할과정에 미치는 효과를 조사하였다. 아울러 포배기 배아를 96시간 배양하면서 24시간 마다 새로운 용액으로 교환하여 기관형성에 미치는 효과를 조사하였으며 이들의 효과를 각각 다른 개체의 배아를 활용하여 3회 반복 조사하여 Cd<sup>2+</sup>이 난할과정 및 성장에 미치는 효과를 관찰하였다.

### 5. 결과 처리 및 분석

Cd<sup>2+</sup>이 난자성숙에 미치는 효과를 조사하기 위해 배양 후 여포난자를 끊어 고정하고 해부현미경 아래서 이

들을 조개어 핵(germinal vesicle: GV)의 유무를 확인한 후 핵막붕괴(germinal vesicle breakdown: GVBD)가 일어난 여포난자를 성숙현상(oocyte maturation)이 진행된 것으로 간주하여 Cd<sup>2+</sup>효과에 의한 난자의 성숙을 조사하였으며 2~32세포 배아의 난할과정에 미치는 효과는 난할의 정지 상태(ceased)와 난할의 지연 상태(retardation) 및 세포붕괴 현상(cytolysis)을 각 난할단계의 농도별로 조사하였다. 또한 기관형성에 미치는 효과를 조사하기 위해 각 농도별로 사망률을 조사하고 96시간 후 Formalin에 고정하였다. Rayburn 등(1990)의 방법에 따라 고정된 개체들을 대상으로 기형 개체 수 및 양상을 조사하고 그 결과들을 %로 환산하여 Probit analysis Program으로 분석하여 LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>을 구하였다. 아울러 LC<sub>50</sub> 값을 EC<sub>50</sub> 값으로 나누어 Teratogenic Index (TI)를 구하여 TI 값이 1.5 이상이 되면 유해성이 있는 물질로 판정하였다. Cd<sup>2+</sup>이 난자성숙과 난할과정과 유생의 성장에 미치는 효과의 실험군에 대한 유의성 검정은 ANOVA를 사용하여 유의성을 검정하였다. 기형의 종류는 정상발생 올챙이를 기준으로 꼬리가 파상을 나타내는 양상, 꼬리가 휘어지는 양상 등을 관찰하여 꼬리 기형으로 판정하였고 복부의 돌출현상 등을 관찰하여 복부 기형으로 판정하였으며 개체 전체적으로 복합적인 기형 양상을 나타내는 개체는 profound형 기형 등으로 각각 판정하였다.

## 결 과

### 1. Cd<sup>2+</sup>이 난자성숙에 미치는 효과

Cd<sup>2+</sup>이 FPH에 의해 유도된 여포난자의 성숙현상을 저해하는지의 여부를 알아보기 위해 배양액에 Cd<sup>2+</sup>의 농도를 각각 0.1, 1, 10, 100 ppm이 되도록 첨가한 후 20시간 배양하였다. Figure 1에서와 같이 Cd<sup>2+</sup>는 0.1ppm에서부터 대조군에 비해 난자의 성숙을 현저히 억제하였다(P < 0.05). 예비 실험에서 Cd<sup>2+</sup>과 함께 염을 이루고 있던 이온, 즉 Cl<sup>-</sup>은 25ppm까지 배양액에 첨가하였어도 난자의 성숙현상에 아무런 영향을 미치지 않는 것을 관찰한 바 있다. 따라서 여포난자의 성숙현상에 나타난 저해작용은 Cd<sup>2+</sup>에 의해 나타났다는 것을 알 수 있었다.

Cd<sup>2+</sup>이 여포난자의 성숙현상을 일정 농도이상에서 강력히 억제한다는 사실을 토대로 하여 Cd<sup>2+</sup>의 효과를 보다 자세히 분석하기 위하여 농도 구간을 세분하고 이 효과의 가역성 여부와 함께 난자의 성숙에 미치는 효과를 조사하였다. 여포난자를 Cd<sup>2+</sup>이 없는 대조군 배양액에서 20시간 배양했을 때 90% 이상의 여포난자들이

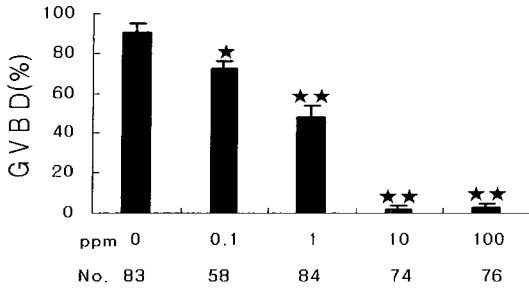


Figure 1. Effect of Cd<sup>2+</sup> on the meiotic maturation(GVBD) of frog oocytes *in vitro*. The oocytes were cultured for 20 hours in the presence of the ions and examined their maturation. No.: number of the oocytes tested.

★★ P < 0.01, When compared with control group(0). ★ P < 0.05

성숙현상을 나타내었으나 Cd<sup>2+</sup> 1ppm을 포함한 배양액에서 배양했을 때는 60%의 여포난자들만이 성숙현상을 나타냈고 2.5ppm에서는 30%, 5ppm에서는 20%의 여포난자들이 성숙현상을 나타내어 Cd<sup>2+</sup>의 농도가 높아짐에 따라 난자의 성숙율은 급격히 감소하였다 (Figure 2A).

이러한 Cd<sup>2+</sup>의 난자성숙에 대한 저해효과가 가역성을 갖고 있는지의 여부를 조사하기 위해 여포난자에 FPH(0.1 p.e/well)를 처리하여 3시간 배양하면 대부분의 여포난자들이 성숙현상을 나타낸다는 사실을 토대로 하여(Kwon *et al.*, 1998) Cd<sup>2+</sup>에 3시간 동안 노출시킨 후 Cd<sup>2+</sup>이 들어있지 않은 배양액으로 옮겨서 계속 17시간 동안 배양하였다. Cd<sup>2+</sup> 1ppm에서 3시간 노출된 여포난자들은 Cd<sup>2+</sup>의 영향으로부터 상당히 회복되어 70% 이상의 여포난자들이 성숙현상을 나타내었다(Figure 2B). 그러나 Cd<sup>2+</sup>의 농도가 2.5ppm, 5ppm으로 높아질수록 회복성이 급격히 떨어져 2.5ppm에서는 약 30%의 여포난자들이 성숙현상을 나타내었고 5ppm에 노출되었던 여포난자들은 20%의 난자 성숙율을 나타내어 회복현상이 거의 일어나지 않았다.

## 2. Cd<sup>2+</sup>이 2~32세포 배아의 난할과정에 미치는 효과

Cd<sup>2+</sup>이 배아의 난할과정에 미치는 효과를 알아보기 위해 배양액에 Cd<sup>2+</sup>의 농도를 각각 0.1, 1, 10, 100ppm 이 되도록 첨가한 후 2세포 형성율을 조사하였다. 그 결과

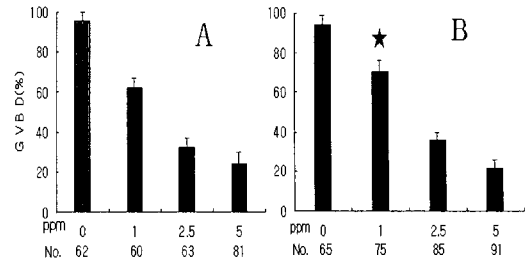


Figure 2. Effect of Cd<sup>2+</sup> on the maturation of frog oocytes *in vitro*.

A: The oocytes were incubated for 20 hours in continuous presence of the Cd<sup>2+</sup> and examined the oocyte maturation.

B: The oocytes were exposed to the Cd<sup>2+</sup> for three hours and transferred to plain medium further for 17 hours. No.: number of the oocytes tested. ★ P < 0.05, When compared with A group(1ppm).

Cd<sup>2+</sup> 10 ppm 이상의 농도에서는 난할이 정지 되어 나타났고 0.1ppm, 1ppm에서는 세포붕괴(cytolysis) 현상을 나타내어 2세포의 난할을 현저히 억제하였다(Figure 3).

Cd<sup>2+</sup>이 배아의 난할과정을 일정 농도 이상에서 강력히 억제한다는 사실을 토대로 하여 Cd<sup>2+</sup>의 저해효과에 대한 감수성이 난할과정에 미치는 영향을 알아보기 위해 2세포기의 배아들을 0.01, 0.1, 1, 2.5, 5ppm으로 농도 구간을 세분화하여 Cd<sup>2+</sup>을 포함한 배양액에서 4, 8, 16, 32 세포 배아까지 배양하면서 Cd<sup>2+</sup>에 의한 정상배아 형성 비율을 조사하였다. Cd<sup>2+</sup> 2.5ppm에서는 모든 발생단

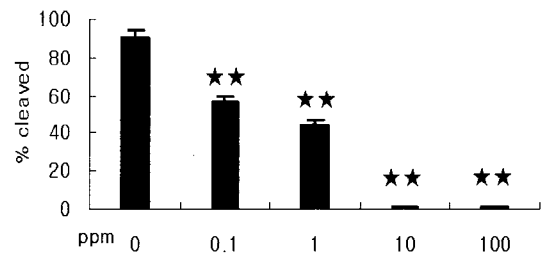


Figure 3. Effect of Cd<sup>2+</sup> on the 2 cell of frog embryos *in vitro*. The embryos were cultured for 3.5 hours in the absence or presence of metal ions examined their cleavage.

★★ P < 0.01, When compared with control group(0).

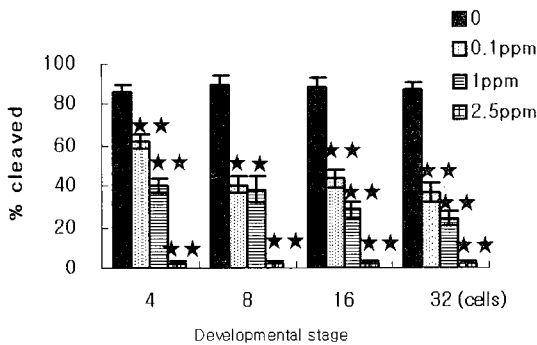


Figure 4. Effect Cd<sup>2+</sup> on the cleavage of frog embryos *in vitro*. The embryos were cultured for 3.5-8.0 hours in continuous absence or presence of the Cd<sup>2+</sup> and examined the cleavage.

★★ P < 0.01, When compared with each developmental stage control group(0).

계의 배아들이 난할을 정지한 상태로 나타났으며 1ppm, 0.1ppm 에서는 4세포기에 도달한 배아들이 각각40%, 62%를 나타내었으나 난할이 계속 진행됨에 따라 세포 분괴 현상이 유발되어 현저한 저해현상을 나타냈다. 그러나 0.01ppm에서는 대조군(85% 이상)과 비슷한 비율(약 80% 이상)을 나타내었다(Figure 4). 이러한 결과들로 보아 Cd<sup>2+</sup>의 저해효과는 0.1ppm에서부터 저해효과가 뚜렷하게 나타남을 알 수 있었으며 난할 지연과 같은

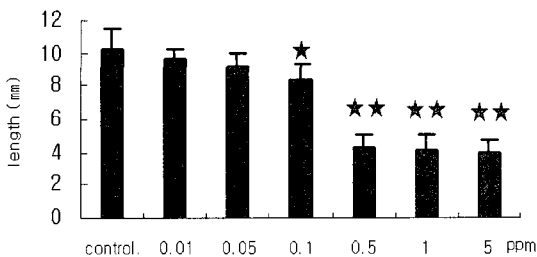


Figure 5. Mean embryo lengths as an indicator of growth inhibition following exposure to Cd<sup>2+</sup>. Embryos were cultured for 96hr in wells contained 10ml AR in the different concentrations of Cd<sup>2+</sup>. Result depicted in the bar graphs represents embryo length of 30 embryos(3 animals).

★★ P < 0.01, When compared with control group(0). ★ P < 0.05

현상이 없이 세포분괴 현상을 유발하는 효과가 두드러짐을 알 수 있었다(Figure 4).

### 3. Cd<sup>2+</sup>이 포배기~유생(올챙이) 시기에 미치는 효과

Cd<sup>2+</sup>이 북방산개구리 유생의 기관형성 및 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해 난자 성숙 및 난할과정에 미치는 효과를 중심으로 농도를 세분화하여(0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5ppm) 포배기 배아를 96시간 배양한 후 전장 길이를 측정하여 대조군과 비교한 결과 Cd<sup>2+</sup>이 첨가되지 않는 대조군(전장길이: 평균 10.3mm)에 비해 0.1ppm(8.4mm)에서부터 성장을 억제하기 시작하여 0.5ppm(4.2mm), 1ppm(4.2mm), 5ppm(3.9mm)으로 농도가 높아짐에 따라 급격히 성장을 억제하였다(Figure 5).

한편 Cd<sup>2+</sup>효과에 의한 사망률을 조사한 결과 0.01ppm에서부터 죽는 배아들이 6.7%의 비율로 나타나기 시작하였으며 0.1ppm(50%), 0.5ppm(70%)으로 농도가 높아지면서 이들의 비율도 증가하였고 1ppm, 5ppm에서는 100%의 치사율을 나타내었다. 기형은 0.01ppm에서부터 21.0%의 비율로 나타나기 시작하였으며 0.1ppm(27.0%), 0.5ppm(77.8%)으로 농도가 높아지면서 그 비율이 증가하였다. Cd<sup>2+</sup>의 영향에 의해 나타난 기형의 종류는 척추기형, 꼬리기형, 복부기형, profound형 기형이었으며 척추기형의 경우 0.5ppm에서 14.3%로 가장 높게 나타났으며 꼬리기형은 0.1ppm에서 75.0%, 복부기형은 0.01ppm에서 66.7%, profound형 기형은 0.1ppm에서 25.0%로 가장 높은 비율을 나타내었다(Figure 6).

또한 Teratogenic Index (TI)를 구하여 유해성을 조사한 결과 Cd<sup>2+</sup>에 의한 LC<sub>50</sub>은 0.4ppm, EC<sub>50</sub>은 0.08ppm을

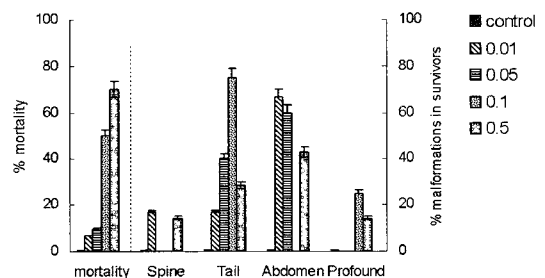


Figure 6. Mortality and percentage of malformation in survivors of *Rana dybowskii* embryo after 96h exposure to Cd<sup>2+</sup>.

Table 1. LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>(malformation) and TI of *Rana dybowskii* embryos exposed to Cd<sup>2+</sup>.

	Exposure time(hr)	LC <sub>50</sub> (ppm)	EC <sub>50</sub> (ppm)	TI (LC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )
Heavy Metal				
Cd <sup>2+</sup>	96	0.4	0.08	5.0

나타내었고 TI는 5.0을 나타내어 Cd<sup>2+</sup>은 북방산개구리 배아의 기관형성에 강력한 최기형성 물질로 작용함을 알 수 있었다(Table 1).

## 고 찰

환경오염물질의 독성을 동물의 발생계를 이용하여 연구하는 데는 대략 두 가지 방법이 사용되고 있다. 하나는 오염물질이나 어떤 독성물질을 사료나 음료에 섞어 먹이거나 피하주사를 한 후 태아의 착상 및 발생과정을 조사하는 *in vivo* 방법(Saksena, 1982)과 다른 하나는 배아를 시험관내에서 배양을 하면서 오염물질에 직접 노출시켜 그 효과를 관찰하는 방법(Storeng and Jonsen, 1980; Klein *et al.*, 1980) 등이 있다. 이 두 방법에서 모두 Cd<sup>2+</sup>은 배아의 발생 및 심장 기형, 조기부화, 성장저해, 기형 발생을 증가(Woodworth and Pascoe, 1982) 등 다양하게 그 저해작용이 보고 되어지고 있다.

실험동물 중 개구리의 발생계를 활용하여 환경오염물질의 독성효과 및 이들의 작용기작을 파악하는 방법으로는 개구리의 배아를 올챙이 단계까지 배양하여 성장과정을 보면서 화학물질이나 혼합물질의 기형 유발능 또는 발생독성을 평가하는 FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay -Xenopus)방법(Gutleb *et al.*, 1999; Fischer and Dietrich, 2000)과 올챙이 단계에서 개구리로 변태(metamorphosis)되는 과정인 tail resorption 현상을 활용하는 방법 등이 이용되어지고 있다(Takeda, 1997; Fritz *et al.*, 1996).

본 실험에 사용했던 한국산개구리 중 북방산개구리의 개구리의 난자는 다량 채취가 용이하고(약 1,000개 이상) 20시간 배양을 통해 난자내의 뚜렷한 구조 변화를 조사할 수 있으며 배아의 경우 수정 후 8시간의 배양을 통해 32세포기에 달하는 뚜렷한 결과를 얻을 수 있다. 또한 포배기의 배아를 배양할 경우 96시간 이내에 뚜렷한 기관의 기형양상 등을 조사할 수 있어 생식세포 시기부터 기관형성시기까지 다양한 발생단계별 조사가 가능하여 다른 시험 동물에 비해 보다 유리한 검정방법으로서

용될 수 있을 것으로 생각된다.

Cd<sup>2+</sup>의 난자성숙에 대한 저해 작용은 일부가 부분적으로 회복 가능한 구간도 있지만 일정농도의 이상에서는 거의 회복 불가능한 손상을 주는 것으로 나타났다. 그 예로 Cd<sup>2+</sup> 2.5ppm에 노출되었던 여포 난자들은 회복율이 현저히 낮아 불과 3시간 동안에 치명적인 손상을 입었다는 것을 알 수 있었으며(Figure 2) Cd<sup>2+</sup>은 낮은 농도에서 여포 난자들의 생리적 변화, 즉 여포난자의 성숙현상을 강하게 억제하며 대부분 단시간 내(3시간)에 비가역적인 손상을 준다는 사실을 알았다.

또한 배아들의 난화과정에 미치는 효과를 살펴보면 Cd<sup>2+</sup> 2.5ppm에서는 난화과정이 정지된 상태로 났으며 1ppm, 0.1ppm에서는 난화가 계속 진행됨에 따라 세포 붕괴 현상이 유발되어 현저한 저해현상을 나타냈다. 그러나 0.01ppm에서는 대조군(85% 이상)과 비슷한 비율(약 80% 이상)을 나타내어 Cd<sup>2+</sup> 저해효과는 0.1ppm에서부터 세포붕괴를 유발하는 저해효과가 뚜렷하게 나타남을 알 수 있었다(Figure 4).

Cd<sup>2+</sup>의 효과 농도에 대해 Saksena(1982)는 CdCl<sub>2</sub>를 햄스타에 피하주사를 했을 때(2.5~5mg/kg) 배란된 난자의 수가 줄어든 것을 발표한 바 있으며 Storeng과 Jensen(1980)은 *in vitro*에서 2세포기 배아를 배양하면서 Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>를 배양액에 첨가한 결과 10μM에서 난화에 저해효과를 나타내기 시작하여 50μM에서 완전히 억제함을 보고한 바 있다. 이러한 Cd<sup>2+</sup>의 효과 농도는 본 실험에서 나타난 효과 농도와 대략 일치한다.

한편 포배기의 배아를 올챙이 단계까지 배양하면서 Cd<sup>2+</sup>의 효과를 조사한 결과 0.01ppm에서부터 죽는 배아들이 나타나기 시작하였으며 1ppm, 5ppm에서는 100%의 치사율을 나타내었다. 기형은 0.01ppm에서부터 나타나기 시작하였으며 기형의 종류는 척추기형, 꼬리기형, 복부기형, profound형 기형 등이었으며 TI는 5.0을 나타내어 Cd<sup>2+</sup>은 북방산개구리 배아의 기관형성에 강력한 최기형성 물질로 작용함을 확인할 수 있었다(Table 1). 이러한 올챙이의 기형유발(0.01ppm) 및 난화를 저해하는 효과농도(0.1ppm)와 난자의 성숙현상을 저해하는 효과농도(1ppm)를 비교해 보면 난자의 성숙현상보다 수정 이후 난화과정에서 보다 민감하게 반응함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 수정 후 다양하고 활발하게 외부와 진행되는 물질대사의 결과 이러한 Cd<sup>2+</sup>이 배아 내에 흡수되어 저해현상을 나타낼 가능성을 클 것으로 생각된다. 본 실험의 결과에서도 이러한 Cd<sup>2+</sup>에 노출된 배아들은 노출된 기간이 길수록 심한 저해를 받고 있었다(Figure 2). 이는 난화가 완전히 억제되거나 치사되기 이전에 이들 Cd<sup>2+</sup>에 의해 부분적인 손상이 조금씩

축적된다는 것을 의미하는 것 같으며 따라서 형태적으로는 잘 나타나지 않아도 효과농도 보다 낮은 농도에서 생리적 변화가 일어났을 가능성이 크다고 볼 수 있겠다. 그러나 본 연구의 실험은 주로 형태적인 변화를 기준으로 하여 저해효과를 판정하고 있으므로 그에 앞서 진행되어지는 생리화학적 변화를 함께 조사하면 보다 정밀한 기준을 마련할 수 있을 것으로 생각되며 본 결과들은 Cd<sup>2+</sup>이 생물체에 미치는 영향을 파악하는데 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 인용문헌

- Allen, D.(1994) Mercury accumulation profiles and their modification by interaction with cadmium and lead in the soft tissues of the cichlid *areochromis* during chronic exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 684-692.
- Alloway, B. J.(1990) Cadmium In: Alloway(Ed), *Heavy Metals in Soils*, Blackie, Glasgow and London. John Wiley & Sons, New York, 100-124 pp.
- Duelman, W. and L. Traub(1986) *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York.
- 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.
- Fritz, A., D. L. Gorlick, and G. D. Burd (1996) Neurogenesis in the olfactory bulb of the frog *Xenopus laevis* shows unique patterns during embryonic development and metamorphosis. *Int. J. Devel. Neuroscience*. Vol. 14: 931-943.
- Gutleb, A. C., J. Appelman, M. C. Bronkhorst, J. H. J. van den Berg, A. Spenkelink, A. Brouwer, A. J. Murk(1999) Delayed effect 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.
- Henle, K.(1981) A unique case malformation in a natural population of the Green Toad (*Bufo viridis*) and its meaning for environmental politics. *Brit. Herpet. Soc. Bull.* 4: 48-49.
- Iijima, S., A. Spindle, and R. A. Pedersen(1983) Developmental and cytogenic effect of potassium dichromate on mouse embryos *in vitro*. *Toxicology* 27: 109-115.
- Johnson, R. E. and Volpe, E. P.(1973) Patterns and Experiments in developmental biology. In: *Observation and experiments on the living frog embryo*. W. M. C. Brown Co. 215-227 pp.
- Klein, N. W., M. A. Vogler, C. L. Chatot. and L. J. Pierro (1980) The use of cultured rat embryos to evaluate the teratogenic activity of serum: cadmium and cyclophosphamide. *Teratology* 21: 199-208.
- 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. 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.
- Ko, S. K.(2004) A Study on the Evaluation of Teratogenicity of Chemical by Korean Brown Frog Embryo, *Rana dybowskii*. *Kor. J. Env. Eco.* 18(3): 333-339
- Ko, S. K. and S. Y. Joung(2004) The Effects of PCB on the Embryonic Development of a Korean Frog, *Rana dybowskii*. *Kor. J. Env. Eco.* 18(3): 340-345
- Kwon, H. B., C. H. Choi. and C. G. Choi(1998) Studies on the oocyte maturation of Korean frogs (*R. dybowskii* and *R. nigromaculata*) *in vitro*. *Korean J. Zool.* 31: 87-94
- McCarthy, J. F., Shugart, L. R.(1998) *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publishers, FL.
- Nebeker, A. V., G. S. Schuytema, S. L. Ott (1994a) Effect of cadmium on growth and bioaccumulation in the North-western salamander *Ambystoma gracile*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 492-499.
- Nebeker, A. V., G. S. Schuytema, S. L. Ott(1994b) Effect of cadmium on limb regeneration in the North-western salamander *Ambystoma gracile*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 318-322.
- Rayburn, J. R., D. J. Fort, R. McNew and J. A. Bantle(1990) Synergism and antagonism induced by three carrier solvents with retinoic acid and 6-aminonicotinamide using FETAX. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 625-632.
- Saksena, S. K.(1982) Cadmium: Its effect on ovulation, egg transport and pregnancy in the rabbit. *Contraception* 26: 181-192.
- Storeng, R. and J. Jonsen(1980) Effect of nickel chloride and cadmium acetate on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Toxicology* 17: 173-187.
- Takeda, N.(1997) The metabolism of biogenic monoamines during embryogenesis and metamorphosis in two anuran species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106: 361-373.
- Wassersug, R.(1975) The Adaptive significance of the tadpole stage with comments on the maintenance on complex life cycles in anurans. *Am. Zool.* 15: 405-417.
- Woodworth, J. and D. Pascoe(1982) Cadmium toxicity to rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: a study of egg and alevin. *J. Fish Biol.* 21: 47-57.