

## 붕어 수정란을 이용한 다이옥신의 초기발생단계 독성평가

박용주, 김하룡, 이민지, 이완옥<sup>1</sup>, 이정식<sup>2</sup>, 정규혁, 오승민<sup>3,\*</sup>

성균관대학교 약학부, <sup>1</sup>청평 중앙 내수면 연구소,  
<sup>2</sup>전남대학교 수산생명의학부, <sup>3</sup>호서대학교 GLP 센터

## Early Life Stage Toxicity for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in Crucian Carp (*Carassius auratus*)

Yong Joo Park, Ha Ryong Kim, Min Jee Lee, Wan-Ok Lee<sup>1</sup>,  
Jung Sick Lee<sup>2</sup>, Kyu Hyuck Chung and Seung Min Oh<sup>3,\*</sup>

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University

<sup>1</sup>Inland Fisheries Research Institute

<sup>2</sup>Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University

<sup>3</sup>GLP Center, Hoseo University

### ABSTRACT

Crucian carp (*Carassius auratus*) has been used as the sentinel species for POPs (Persistent Organic Pollutants) monitoring in aquatic environment. However, there is little information for dioxin toxicity and especially, early life stage toxicity in crucian carp have been never carried out. In this study, we investigated several toxic effects for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) in fertilized egg obtained by natural fertilization from crucian carp. The embryos at 3 h post-fertilization (hpf) were treated with 0.039, 0.156, 0.625, and 2.5 ( $\mu\text{g/L}$ ) TCDD by waterborne exposure for 60 minutes and changed with fresh water 2 times per day. Fertilized eggs started hatching at 51 hpf and TCDD exposed embryo showed decrease of hatching rate in a dose-dependent manner at 75 hpf. Pericardial edema was continuously observed in larvae exposed to TCDD from hatching start time (51 hpf), followed by the onset of mortality. In addition, AhR-related gene, CYP1A was clearly increased by TCDD in a dose dependent manner. These results indicated that fertilized eggs obtained from crucian carp have the TCDD related gene regulation and a distinct TCDD developmental toxicity syndrome by TCDD exposure. Therefore, we suggested that early life stage test in crucian carp could be used as test methods on dioxins toxicity.

**Key words :** *Carassius auratus*, Early life stage, TCDD developmental toxicity, CYP1A

---

접수일: 2010년 8월 23일, 채택일: 2010년 9월 17일

※ To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-41-540-9697, Fax: +82-41-540-9562

E-mail: ohsm0403@hoseo.edu

## 서 론

Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) 및 dibenzofurans (PCDFs)와 같은 halogenated aromatic hydrocarbons (HAHs)는 환경 중에 폭넓게 분포되어 있는 난분해성 물질로서 (Safe, 1994), 먹이 연쇄를 통해 생물들에 축적되고 지속적으로 독성을 유도하는 물질로 알려져 있다 (Cook *et al.*, 1993, 1997; Zabel *et al.*, 1995). 이러한 물질은 세포질에 존재하는 AhR (Arylhydrocarbon receptor)과 결합하고, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)와 2분자체를 이루어 dioxin response element (DRE)라는 특정한 DNA 서열에 결합을 통해 cytochrome P4501A1 (CYP1A) 효소 및 다양한 독성을 유도한다고 알려져 있다 (Sutter and Greenlee, 1992).

다이옥신류에 노출된 어류 종의 경우에는 산란율 감소, 부화율 감소, 생식소 발달 억제, 난세포 성숙 억제, 성호르몬과 난황전구물질 농도 감소를 초래하고 성 결정에 영향을 미친다 (Westernhagen *et al.*, 1981; Andersson *et al.*, 1988; Thomas, 1989; Monosson *et al.*, 1994; Matta *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2004). 특히 다이옥신에 노출된 어류 수정란은 초기생활단계 (early life stage, ELS)에서 부화율 감소, 성장장애, 심장의 기형, 심혈류량의 감소, 심막부종, 난황부종, 출혈, 안면기형 및 사망률 증가를 유도하는 민감한 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Helder, 1980; Wisk and Cooper, 1990; Spitsbergen *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1994; Henry *et al.*, 1997; Teraoka *et al.*, 2002). 따라서 이러한 어류에 대한 다이옥신류의 민감성은 인간과 수생 생물 종들의 위해성 평가에 좋은 모델로서 제시되고 있다 (Peterson *et al.*, 1993; Stegeman and Hahn, 1994; Walker and Peterson, 1994).

현재 rainbow trout, killifish, medaka 및 zebrafish와 같은 다양한 종에서 다이옥신 독성에 대한 초기 생활단계 독성 평가가 이루어지고 있으나 (Walker *et al.*, 1994; Elonen *et al.*, 1998; Hahn, 2001), 국내에서는 POPs (Persistent organic pollutants) 모니터링 중으로서 활용되고 있으며 다이옥신류에 대한 민감성이 있는 것으로 연구 (Oh *et al.*, 2009a)된 붕어 (Crucian carp, *Carassius auratus*)의 경우 아직까지

다이옥신류에 대한 초기생활단계의 독성에 관한 연구가 수행된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 중부 내수면연구소에서 붕어 친어를 분양받아 산란, 수정, 부화 및 치어까지의 초기생활사 변화 단계에서 다이옥신(TCDD) 노출에 따른 독성변화를 관찰하였으며, 다이옥신 초기 생활단계 독성시험에 붕어 종을 활용할 수 있을지를 평가하였다.

## 방 법

### 1. 붕어의 난 채취 및 배양시간별 발달단계 확인

실험용 붕어는 다이옥신류, PCB류, 알킬페놀류가 검출되지 않은 국립수산과학원 중부내수면연구소의 친어를 분양받아 사용하였으며 암수는 상대적으로 볼록한 배와 큰 크기를 지니는 것을 통해 1차적으로 구분하였다. 수정란은 친어로부터 자연수정을 통해 확보하였으며 (2008년 7월), 광조건은 자연 조건으로 하였다. 먼저 사육수의 온도는 수족관용 자동히터를 이용하여 23°C 정도로 맞추었으며, 난 수집망을 설치하고 암컷과 수컷의 합사 후 매시간 수정을 관찰하였다. 합사 후 7시간 정도 지난 다음 수집망에서 얇은 노란색을 띄고 있는 수정된 난을 확보할 수 있었으며 수정란이 확인된 후 얼음 위에 옮겨 다이옥신(TCDD) 노출시간까지 난 발생의 시간지체를 유도하여 실험을 진행하였다.

### 2. 붕어 수정란에 대한 다이옥신(TCDD) 노출 및 흡수율 확인

수정 후(hours post fertilization) 3시간(hpf)된 난들은 비노출군, 0.1% Toluene(대조군), TCDD (Supelco, 10 mg/mL, 99% purity) 0.039, 0.125, 0.625 및 2.5 µg/L의 노출군인 여섯 그룹으로 나누어 사육수가 5 mL 들어있는 6-well plate에 well당 각각 15~20개씩 넣어 1시간 동안 다이옥신(TCDD)을 정적 노출시켰다. 노출시킨 후 모든 난은 사육수로 3회 세척하였으며 21°C에서 배양하였다. 관찰 종료 75 hpf까지 모든 군의 난들은 매일 두 번씩 산소 포화된 사육수로 세척하여 산소결핍이 유도되지 않도록 하였다. 또한 정적 노출시킨 다이옥신(TCDD)의 수

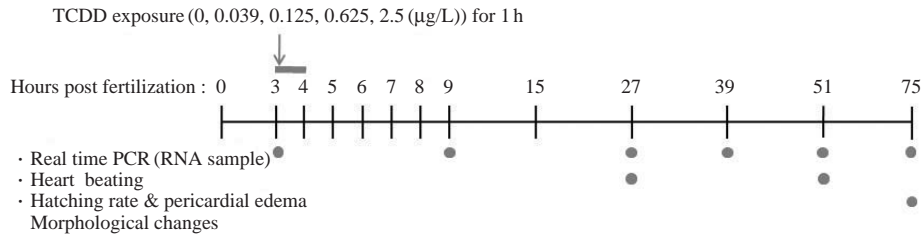


Fig. 1. Experimental design of embryo-toxicity test.

정란에 대한 실제 노출농도를 확인하기 위해 [<sup>3</sup>H]으로 표지된 TCDD를 2.5 µg/L에 1시간 노출시킨 난을 cocktail에 녹인 후 liquid scintillation counter (LS-6500, Beckman, instrument, [<sup>3</sup>H], 27.5 Ci/mmol)를 이용하여 그 흡수율을 측정하였다.

### 3. 다이옥신 노출 붕어 수정란의 외부 형태 및 조직학적 독성영향 평가

다이옥신(TCDD) 노출 후 나타난 다양한 독성은 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 배양 시간대 별(3, 9, 27, 39, 51 및 75 hpf)로 관련 치사율, 부화율, 난황부종 및 심막부종 등의 마커를 관찰하였다. 난의 외관상 형태학적인 독성은 BX40-Olympus 현미경과 DP70-Olympus 디지털 카메라를 이용하여 관찰 촬영하였으며 좀 더 세부적인 관찰을 위해 4%의 paraformaldehyde이 함유된 PBS에 각 군의 난 및 치어를 각각 고정시켜 4°C에서 보관하였다. 또한 다이옥신 관련 유전자의 발현을 확인하기 위해 각 군의 시료를 액화질소에 급성 냉동시켜 -70°C에 보관하였다.

#### 1) 조직표본의 제작

광학현미경 관찰용 조직표본은 Bouin's solution에 24시간 동안 고정하여 Drury and Wallington (1980)의 방법에 따라 파라핀절편법으로 제작하였다.

#### 2) 광학현미경 관찰에 대한 체표면 및 피부계 구조 독성의 분석

해부현미경(Olympus SZX12, Japan)하에서 외부 형태의 변화를 관찰한 개체는 0.1 M phosphate buffer를 이용하여 1시간 동안 3회 수세한 후, 충분한 양의 Bouin's solution으로 6시간 동안 3차 고정하였다. 수세과정을 통해 조직에서 여분의 고정액을 제거한 다음, 일련의 알코올을 이용한 탈수과정

을 통해 조직 내부의 수분을 제거하였다. 이어서 xylene을 사용하여 조직을 투명화시키고, 파라핀을 침투시켜 조직을 포매하였다. 포매된 조직은 마이크로톰(Microtome RM2235, Leica, Germany)으로 4~6 µm 두께로 연속 절편을 제작하였다. 제작된 조직 절편은 탈파라핀하고 친수화 처리를 거쳐 점액다당류를 검출하기 위한 Alcian blue-periodic acid and Schiff's solution (AB-PAS, pH 2.5) 반응을 실시하였다. 조직화학적 반응 후 점액세포의 염색 친화도 판정은 Pantone coated formula guide (Pantone Inc., USA)를 기준으로 고유번호를 팔호 안에 표시하였다.

### 4. 다이옥신 노출 붕어 수정란의 다이옥신 관련 유전자 발현 확인

냉동보관된 시료를 Trizol (GIBCO)을 이용해서 total RNA를 분리하였으며 reverse transcription (RT) 및 real-time PCR을 통해 다이옥신 관련 유전자 (ARNT, AhR1, AhR2 및 CYP1A)의 발현을 관찰하였다. RT반응은 분리한 1µg total RNA, 1µL AMV reverse transcriptase (9 unit/mL), 4µL AMV RT 5X Buffer, 0.5µL RNase inhibitor, 1µL 10 mM dNTPs 및 1µL Random Hexamer (0.5 mg/mL)를 총 20µL로 하여 상온에 10분간 방치시키고 42°C에서 50분 반응시킨 후 94°C에서 5분간 반응시켰다. 모든 RT 관련 시약은 Promega제품(Madison, WI)을 사용하였다. RT를 통해 얻어진 cDNA는 real-time PCR에 활용하였으며 관찰하고자 하는 유전자의 specific primer를 2X SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara BIO INC, Japan)에 0.5 µM씩 첨가하여 최종적으로 20 µL의 반응액을 만든 후 real-time PCR을 수행하였다. PCR은 Smart cycler system (Cepheid, USA)을 사용하여 처음 94°C에서 10초간 반응시킨 후 94°C

에서 5초, 51°C ( $\beta$ -actin) 또는 53.5°C (CYP1A), 57°C (AhR1), 56.4°C (AhR2), 47°C (ARNT)에서 15초, 72°C에서 15초씩 PCR과정을 실시하였다. 실험은 2회 반복하여 평균값을 구하였다. 사용된 ARNT, AhR1 (Accession number: FJ554571), AhR2 (Accession number: FJ554572), CYP1A (Accession number: DQ517445) 및  $\beta$ -actin (Zhang *et al.*, 2003)의 프라이머 서열은 다음과 같다.

ARNT upstream:

5'-GGCAAGCGGAGATCAGT-3'

ARNT downstream:

5'-AGTTCCTGTTTCGGTCAG-3'

AhR1 upstream:

5'-GAGCTCGTTCACACTGAAG-3'

AhR1 downstream:

5'-ATTGATAGCCTGAGCCGCG-3'

AhR2 upstream:

5'-CCAGAGAAACCTACAAACCG-3'

AhR2 downstream:

5'-GTGCCCTGCAATAGAGGACTTT-3'

CYP1A upstream:

5'-CCTGACCGCCATGAGTAAGT-3'

CYP1A downstream:

5'-TTGAGGAGAGCTTGACGGAT-3'

$\beta$ -actin upstream:

5'-CACTGTGCCATCTACGAG-3'

$\beta$ -actin downstream:

5'-CCATCTCCTGCTCGAAGTC-3'

## 결과 및 고찰

### 1. 붕어 수정란의 확보 및 정상 발달단계 확인

붕어의 수정란은 산란시기인 7월경에 앞 지느러미에 돌아 있는 흰색돌기를 통해 암·수를 구별한 후(Fig. 2), 수집망을 설치하여 수확하였다. 붕어의 암수구별은 금붕어의 지느러미의 돌기를 확인하여 암수구별을 한 선행연구(Oh *et al.*, 2009b)와 동일하게 확인할 수 있었다. 붕어의 정상 발달과정은 자연 수정을 통해 얻은 수정란을 BX40-Olympus 현미경과 DP70-Olympus 디지털 카메라를 사용하여 확인하였다(Fig. 3). 수정 후 9시간(hpf) 때에 척추가 관

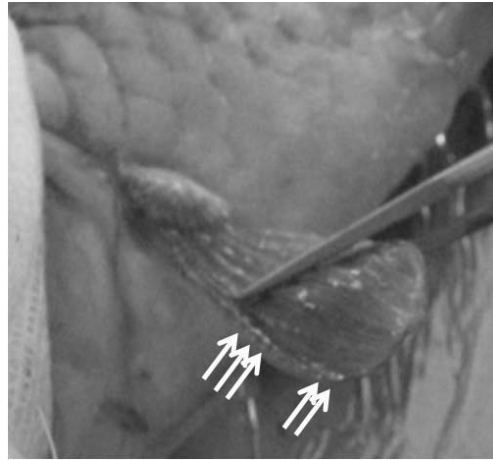


Fig. 2. The characterization of male crucian carp. White arrow: Small white breeding tubercles in male crucian carp.

찰되었으며 15시간에는 꼬리가 뚜렷하게 관찰되었다. 또한 27시간 때에는 분명한 눈의 형태와 심장의 박동을 확인할 수 있었다. 수정 후 39시간(hpf) 부터는 막 내부에 치어의 완벽한 형태가 관찰되었으며 51시간부터는 부화가 시작되었으며 75시간에는 무정란을 제외한 비노출군의 모든 개체에서 100% 부화율을 보였다.

### 2. 다이옥신 노출 붕어 수정란의 다이옥신 축적 및 다이옥신 관련 발달 단계 독성평가

다이옥신(TCDD)의 노출 후 수정란에서의 축적량을 측정하기 위해 [ $^3$ H]-TCDD를 수정란에 1시간 노출 후 수정란에서 나타나는 방사선 양 [ $^3$ H]을 scintillation counter로 측정하였다. 먼저 2.5  $\mu$ g/L ([ $^3$ H]-TCDD)에 노출된 수정란 10개를 TCDD가 포함되지 않은 사육수로 3회 세척한 후 5 mL cocktail에 넣어 lysis시킨 후 수정란에 축적된 [ $^3$ H]-TCDD를 측정하였다. 그 결과 수정란에 축적된 TCDD 양은 50.59 pg/g wet weight로 전체 노출량의 0.0633% 정도 축적된 것으로 나타났다. 이러한 축적량은 Yamauchi *et al.* (2006)이 red seabream으로 실험한 결과와 유사한 수준으로 나타나 본 실험에서 TCDD의 노출이 제대로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

다이옥신 노출 초기에는 노출군과 비노출군 사이에 독성 차이가 나타나지 않았으나 대조군에서

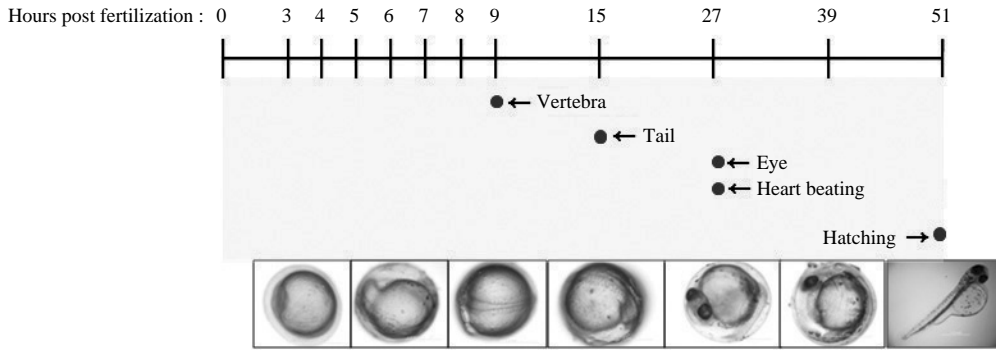


Fig. 3. Developmental stage of non-exposed egg of crucian carp.

Table 1. TCDD effects on heart beating

TCDD conc.	Beating N/ Total N	Heart rates (beat/sec, mean ± SD)
Con	8/10 (80%)	1.65 ± 0.19
0.039	4/10 (40%)	1.61 ± 0.25
0.156	1/10 (10%)	1.67
0.625	2/10 (20%)	1.78 ± 0.04
2.500	1/10 (10%)	1.65

무정란을 제외한 모든 개체에서 심장 박동을 보인 39 hpf 짜에서부터 TCDD 노출군에 대한 심장박동 유도 개체가 현저히 감소됨을 확인하였으며 심장박동율에는 노출군별 차이가 나타나지 않았다(Table 1). 수정란이 부화하기 시작하는 51 hpf부터는 TCDD에 대한 부화율의 저하가 나타나기 시작하여 대조군에서 모든 개체의 부화가 일어난 시기인 75 hpf에서 부화율을 관찰한 결과 용량 의존적으로 TCDD 노출에 따라 부화율이 현저히 감소되고 있음을 확인하였다(Fig. 4). 대조군의 부화율이 84.2% 인 반면 2.5 µg/L TCDD 노출군의 경우 12.5% 정도의 부화율을 보여 TCDD 노출에 의한 부화율의 현저한 감소를 확인할 수 있었다. 대부분 부화되지 않은 수정란의 경우 심장박동이 관찰되지 않아 부화 직전에 모두 사망한 것으로 확인되었으며 현미경 관찰시 외막을 제거하여 관찰한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 정상보다 발달되지 않은 미성숙 개체들이 관찰되었으며 척추측만증(scoliosis), 심막부종(pericardial edema) 등이 나타났다. TCDD의 심장독성은 zebrafish를 이용한 연구에서 심장박동수에는 영향이 없으나, 심장 1회 박출량을 감소시켜 총 심

박출량이 감소되어 심장 독성이 나타남이 보고되었다(Carney *et al.*, 2006). 이러한 심박출량의 감소는 심혈류량의 감소를 유도하여 혈류의 흐름을 방해하여 어류의 발달 단계시 필요한 산소 및 영양분 공급의 부족을 가져와 발달단계를 더디게 할 수 있으며 최종적으로 부화율 감소 및 사망률의 증가를 보이는 것으로 알려져 있다(Carney *et al.*, 2006).

일반적으로 부종은 TCDD의 발생독성에 대한 주요 지표로서 어류, 조류 및 몇몇 포유류에서 관찰되어 왔다(Peterson *et al.*, 1993). TCDD에 대한 발생독성 연구에 우수한 모델로 알려져 있는 zebrafish의 경우 수정 직후 노출되었을 경우에는 수정 후 72시간 내에 부종이 관찰되나, 부화 이후인 96시간이 경과한 이후에 노출되었을 경우에는 부종이 관찰되지 않는다고 보고된 바 있다(Henry *et al.*, 1997; Belair *et al.*, 2001; Andreassen *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2002; Tanguay *et al.*, 2003). 이와 같이 다이옥신에 의해 유도되는 부종은 발생 과정상 민감하게 영향을 미치는 독성반응임이 보고되었다(Belair *et al.*, 2001).

대부분 TCDD에 노출된 수정란의 경우 물을 흡수시키는 permeability barrier 이상에 의한 수분의 과 유입으로 심막부종 및 난황부종(yolk sac edema)을 형성하는 것으로 알려져 있다(Hill *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2005). 본 실험에서는 부화 후 75시간에 심막부종이 TCDD 노출군에서 용량 의존적으로 뚜렷하게 확인되었으나(Fig. 6), 난황부종은 TCDD 노출군에서 확인할 수 없었다. 일반적으로 난황부종은 심막부종보다 늦은 시기 즉 사멸이 유도되기 직전에 관찰되는 것으로 알려져 있는데(Henry *et al.*,

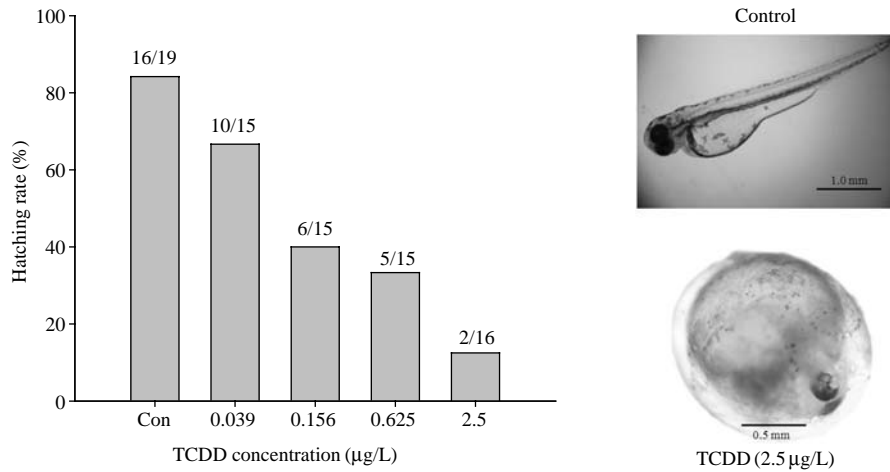


Fig. 4. Effects of TCDD on the hatching rate (%) at 75 hpf in crucian carp embryos exposed to TCDD.

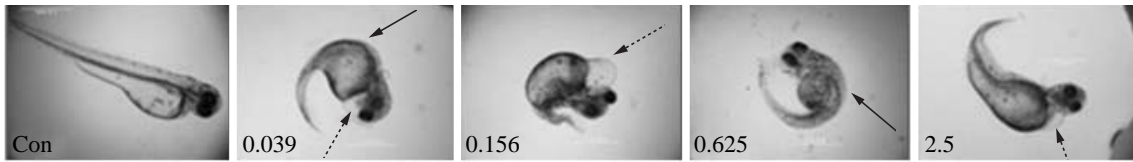


Fig. 5. Morphological changes after hatching of crucian carp embryos exposed to TCDD. — : scoliosis; ---- : pericardial edema.

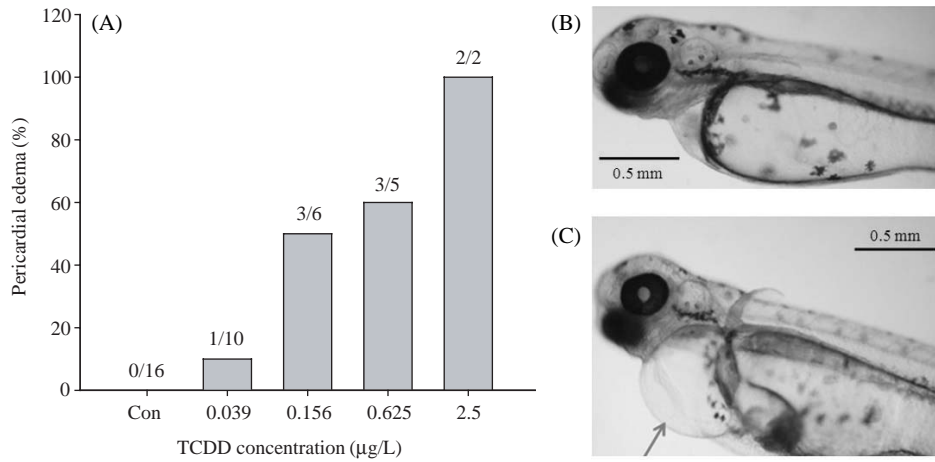
1997), 본 실험에서는 TCDD 노출 개체의 경우 심막부종 유도가 관찰되자마자 모두 사멸되어 난황부종이 관찰되지 않은 것으로 판단되었다.

### 3. 다이옥신 노출 붕어 수정란에서 부화된 자어의 피부조직 변화

어류의 피부는 수서환경과 생물체의 경계로서 많은 독성물질들에 대해서 주요한 침입경로가 된다. 부화 직후 자어는 대부분 산소호흡과 이온조절을 피부에서 수행한다고 알려져 있으며(Daye and Gar-side, 1980; Conklin *et al.*, 1992; Rombough, 1998) 부화 직후 가자미류(*Pleuronectes platessa*) 자어의 피부는 여러 중요한 생리적 기능으로 피부 표면의 기본적인 방어 역할 이외에 선택적인 삼투조절막과 호흡수송 부위로서 작용한다고 보고되어 있다(Roberts *et al.*, 1973).

따라서 부화 자어의 피부조직의 변화를 광학현미

경에 의해 관찰한 결과 피부의 상피층은 단층의 편평형 상피세포와 점액세포로 구성되어 있었다. 이들 점액세포들은 AB-PAS (pH 2.5) 반응에서 푸른색으로 반응하는 산성점액물질(2726c)과 붉은색으로 반응하는 중성점액물질(2572c)을 동시에 함유하고 있었다. 초기의 점액세포는 산성 점액물질로 AB-PAS (pH 2.5)반응에 의해 푸른색으로 나타나지만 스트레스 등으로 노화된 점액세포는 중성 점액물질로 붉은색으로 반응이 나타난다(Gona *et al.*, 1979). 대조군에서는 산성점액물질 상피층의 하단에는 얇은 기저막이 존재하고 있으며, 기저막 아래에는 가로무늬근으로 구성된 근육층이 존재하고 있었다 (Fig. 7A). TCDD에 노출된 수정란에서 부화된 자어들의 피부는 0.039 µg/L의 개체들의 경우 소수의 편평형 상피세포들이 비대되었으며 AB-PAS (pH 2.5) 반응에서 푸른색(2746c)으로 반응하는 점액세포들이 관찰되었다(Fig. 7B). 0.156 µg/L의 개체들은 대부분의 상피세포들이 비대되고, 점액세포 내에는



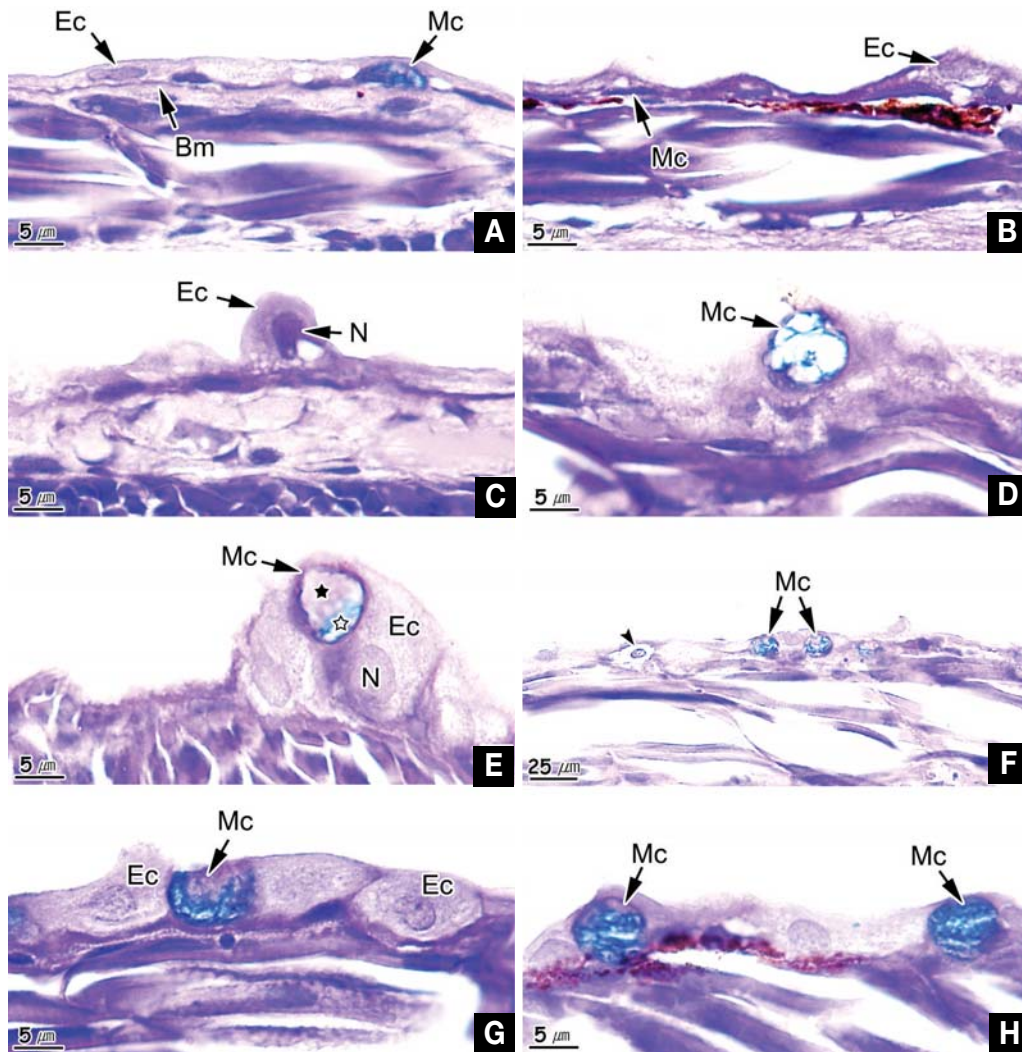
**Fig. 6.** Effects of TCDD on pericardial edema in crucian carp larvae exposed as fertilized eggs to TCDD. (A) Pericardial edema (%) at 75 hpf (B) Hatched crucian carp in non-exposed group (C) TCDD-induced Pericardial edema (arrow) in TCDD-exposed group (2.5 µg/L).

AB-PAS (pH 2.5) 반응에서 푸른색(7462c)으로 반응하는 소량의 점액물질들이 관찰되었다. 0.625 µg/L의 개체들은 상피세포의 비대가 심화되어 입 방향으로 변형되었으며, 이들의 핵 또한 비대되었다. 상피층에 존재하는 점액세포들은 AB-PAS (pH 2.5) 반응시 푸른색(647c)으로 반응하는 점액물질과 붉은색(7438c)으로 반응하는 점액물질이 함께 존재하였으나 붉은색으로 반응하는 점액물질의 비율이 더 높게 나타났다(Fig. 7E). 2.5 µg/L의 개체들은 상피층에서 점액세포가 증가하였으며, 몇몇 상피세포들에서 부종이 관찰되었다. 비대된 상피세포 사이에서 존재하는 점액세포들에 존재하는 점액물질의 비율은 AB-PAS (pH 2.5) 반응에서 붉은색(252c)으로 반응하는 점액물질과 푸른색(2736c)으로 반응하는 점액물질 모두 관찰되었다(Fig. 7H).

#### 4. 다이옥신 노출 붕어 수정란의 다이옥신 관련 유전자 발현 확인

TCDD의 독성은 ligand에 의해 활성화된 AhR complex가 ARNT와 결합하고, CYP1A의 promoter 부분을 인지하여 결합한 후, 독성작용이 나타난다고 알려져 있어 이에 관련된 유전자인 AhR1, AhR2, ARNT 및 CYP1A의 역할이 매우 중요하다. 본 실험에서는 수정란의 수정부터 부화 직후의 치어에

이르기까지 다이옥신 독성 관련 유전자의 발현양상을 확인하기 위해 AhR1, AhR2, ARNT 및 CYP1A mRNA 발현을 75 hpf까지 real-time PCR을 이용하여 정량적으로 확인하였다. 그 결과 AhR1, AhR2 및 ARNT는 TCDD 노출 농도에 따른 발현 변화가 나타나지 않았으나 (data not shown), CYP1A mRNA의 발현은 농도 및 시간 의존적으로 발현되는 것으로 확인되었다(Fig. 8). CYP1A는 TCDD 노출에 의한 독성을 이해하는 데 가장 유용한 유전자이며 (Nebert *et al.*, 1990), AhR pathway에 의해 유도되는 유전자로서 TCDD에 노출된 어류(zebrafish, lake trout)에서 부종이 유발되기 이전에 vascular endothelium에 발현되어 있는 것이 알려져 있다 (Hornung *et al.*, 1999; Andreasen *et al.*, 2002). 본 연구에서도 부화와 부종이 발생하기 시작되는 51 hpf 이전인 39 hpf에서 TCDD 용량 의존적으로 가장 높은 CYP1A mRNA 발현이 나타나는 것으로 확인되었다(Fig. 8). 39 hpf에서 최대의 CYP1A 발현을 보인 이후에는 TCDD 용량 의존성은 보이나 그 발현량이 점차 감소함을 보였는데(Fig. 8), 대체적으로 TCDD 독성을 매개하며 초기에는 증가하는 경향을 보이지만 특정 시간이 흐른 후에는 결국 체내 축적과 대사로 인해 CYP1A의 발현이 감소되는 것으로 알려져 있다(Wu *et al.*, 2008). CYP1A knock-down 연구에서는 어류 배발생과정에서 TCDD에 의해 유

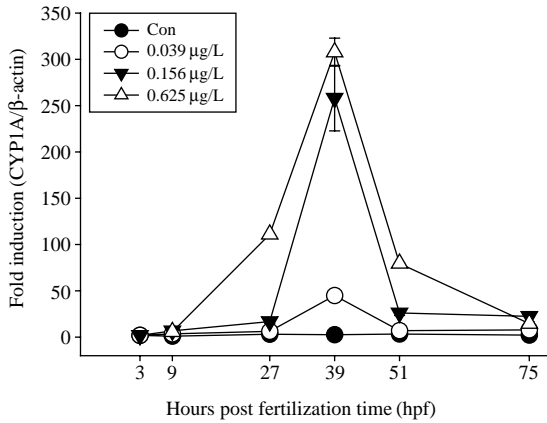


**Fig. 7.** Histologic lesions in skin of crucian carp larvae exposed as fertilized eggs to TCDD and sacrificed at 75 hr postfertilization. A: Con, B: 0.039 µg/L, C: 0.156 µg/L, D: 0.156 µg/L, E: 0.625 µg/L, F: 2.5 µg/L, G: 2.5 µg/L, H: 2.5 µg/L; open asterisk, alcian blue positive; black asterisk, alcian blue negative; Bm (Base membrane); Ec (Epithelial cell); Mc (Mucous cell); N (Nucleus).

도된 CYP1A가 다이옥신의 독성에 중요하게 작용함을 확인한 바 있다(Cantrell *et al.*, 1996; Teraoka *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2004). 반면, 다른 연구에서는 어류에서의 다이옥신에 의한 CYP1A 발현이 다이옥신의 teratogenesis와 관련이 없으며(Carney *et al.*, 2004) 보호 효과까지 있다고 보고되고 있다(Wassenberg and Di Giulio, 2004; Billiard *et al.*, 2006; Hodson *et al.*, 2007; Billiard *et al.*, 2008). 최근 Ale-

xeyenko *et al.*, 2010)의 보고에서 zebrafish의 초기 발생과정에서의 다이옥신 독성 영향을 다양한 유전자의 발현 패턴과 비교한 결과, 발생과정에서 두드러진 기형발생이 나타나지 않아도 CYP1A 발현에 의한 다양한 발생독성이 유도될 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서 대조군에 비해 TCDD 노출군에서 CYP1A의 발현이 유의하게 증가되었으며, TCDD 노출과 관련된 것으로 알려져 있는 다양한 형태학





**Fig. 8.** CYP1A mRNA expression in crucian carp fertilized egg exposed to vehicle (DMSO) and TCDD by quantitative realtime PCR. Values for each primer pair were normalized to  $\beta$ -actin mRNA levels. Each bar represents mean  $\pm$  SD.

적인 독성이 나타나는 것으로 보아 붕어의 배발생 과정에 TCDD가 민감하게 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

### 결론

붕어는 국내 토종어종으로 국내의 하천에 고르게 분포하고 있으며, 개체 크기가 커서 내분비계 장애 물질 등 환경오염물질의 체내 축적을 측정하기에 적합하여 환경모니터링 지표종으로 사용되고 있다. 그러나 붕어의 생리생화학적 특성과 수계 오염물질의 노출에 의한 독성발현에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 붕어의 발생단계에서의 다이옥신 노출에 의한 독성발현을 규명하기 위해 붕어의 수정란에 다이옥신을 노출시켜 치어까지의 성장과정에서의 독성발현을 확인하였다. 그 결과로서 충주 내수면연구소에서 분양받은 붕어의 자연 수정 후 나타나는 시간별 발달단계를 처음으로 확인하였으며, 특징적 어독성인 심장독성, 부화율의 감소, 부종 생성 및 다이옥신 관련 유전자(CYP1A) 조절이 농도 의존적으로 유도됨을 확인하였다. 따라서 본 연구는 향후 붕어를 이용한 어류 초기발생단계의 독성평가 및 기전연구에 근거로서 활용할 수 있다.

### 감사의 글

본 연구는 한국환경기술진흥원의 차세대핵심환경기술개발사업(과제번호: 091-071-054)지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

Alexeyenko A, Wassenberg DM, Lobenhofer EK, Yen J, Linney E, Sonnhammer EL and Meyer JN. Dynamic zebrafish intercome reveals transcriptional mechanisms of dioxin toxicity, PLoS One 2010; 5(5): e10465.

Andersson T, Förlin L, Härdig J and Larsson A. Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents, Can J Fish Aquat Sci 1988; 45: 1525-1536.

Andreasen EA, Spitsbergen JM, Tanguay RL, Stegeman JJ, Heideman W and Peterson RE. Tissue-specific expression of AHR2, ARNT2, and CYP1A in zebrafish embryos and larvae: effects of developmental stage and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure, Toxicol Sci 2002; 68(2): 403-419.

Belair CD, Peterson RE and Heideman W. Disruption of erythropoiesis by dioxin in the zebrafish, Dev Dyn 2001; 222(4): 581-594.

Billiard SM, Timme-Laragy AR, Wassenberg DM, Cockman C and Di Giulio RT. The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish, Toxicol Sci 2006; 92(2): 526-536.

Billiard SM, Meyer JN, Wassenberg DM, Hodson PV and Di Giulio RT. Nonadditive effects of PAHs on early Vertebrate Development: mechanisms and implications for risk assessment, Toxicol Sci 2008; 105(1): 5-23.

Cantrell SM, Lutz LH, Tillitt DE and Hannink M. Embryotoxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD): the embryonic vasculature is a physiological target for TCDD-induced DNA damage and apoptotic cell death in Medaka (*Orizias latipes*), Toxicol Appl Pharmacol 1996; 141(1): 23-34.

Carney SA, Peterson RE and Heideman W. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin activation of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish, Mol Pharmacol 2004; 66(3): 512-521.

- Carney SA, Chen J, Burns CG, Xiong KM, Peterson RE and Heideman W. Aryl hydrocarbon receptor activation produces heart-specific transcription and toxic responses in developing zebrafish, *Mol Pharmacol* 2006; 70(2): 549-561.
- Conklin DJ, Mowbray RC and Gingerich WH. Effects of chronic exposure to soft, acidic water on gill development and chloride cell numbers in embryo-larval brook trout, *Salvelinus fontinalis*, *Aquat Toxicol* 1992; 22(1): 39-52.
- Cook PM, Erickson RJ, Spehar RL, Bradbury SP and Ankley GT. Interim report on data and methods for assessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin risks to aquatic life and associated wildlife. EPA/600/R-93/055. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC 1993.
- Cook PM, Zabel EW and Peterson RE. The TCDD toxicity equivalence approach for characterizing risks for early life stage mortality in trout. In: Rolland RM, Gilbertson M, Peterson RE (eds), chemically induced alterations in functional development and reproduction of fishes, SETAC, Pensacola, FL, USA 1997; pp. 9-27.
- Daye PG and Garside ET. Structural alterations in embryos and alevins of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L., induced by continuous or short-term exposure to acidic levels of PH, *Can J Zool* 1980; 58(1): 27-43.
- Dong W, Teraoka H, Yamazaki K, Tsukiyama S, Imani S, Imagawa T, Stegeman JJ, Peterson RE and Hiraga T. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: local circulation failure in the dorsal mid-brain is associated with increased apoptosis, *Toxicol Sci* 2002; 69(1): 191-201.
- Dong W, Teraoka H, Tsujimoto Y, Stegeman JJ and Hiraga T. Role of aryl hydrocarbon receptor in mesencephalic circulation failure and apoptosis in zebrafish embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Toxicol Sci* 2004; 77(1): 109-116.
- Elonen GE, Spehar RL, Holcombe GW, Johnson RD, Fernandez JD, Erickson RJ, Tietge JE and Cook PM. Comparative toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to seven freshwater fish species during early life-stage development, *Environ Toxicol Chem* 1998; 17(3): 472-483.
- Gona O. Mucous glycoproteins of teleostean fish: a comparative histochemical study, *Histochem J* 1979; 11(6): 709-718.
- Hahn ME. Dioxin toxicology and the aryl hydrocarbon receptor: insights from fish and other non-traditional models, *Mar Biotechnol* 2001; 3(Suppl 1): S224-S238.
- Hawkes JW. The structure of fish skin. I. General organization. *Cell Tissue Res* 1974; 149(2): 147-158.
- Helder T. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on early life stage of the pike (*Esox lucius*, L.), *Sci Total Environ* 1980; 14(3): 255-264.
- Henry TP, Spitsbergen JM, Hornung MW, Abnet CC and Peterson RE. Early life stage toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in zebrafish (*Danio rerio*), *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 142(1): 56-68.
- Hill AJ, Bello SM, Prasad AL, Peterson RE and Heideman W. Water permeability and TCDD-induced edema in zebrafish early-life stages, *Toxicol Sci* 2004; 78(1): 78-87.
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W and Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity, *Toxicol Sci* 2005; 86(1): 6-19.
- Hodson PV, Qureshi K, Noble CA, Akhtar P and Brown RS. Inhibition of CYP1A enzymes by alpha-naphthoflavone causes both synergism and antagonism of retene toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquat Toxicol* 2007; 81(3): 275-285.
- Hornung MW, Spitsbergen JM and Peterson RE. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters cardiovascular and craniofacial development and function in sac fry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Toxicol Sci* 1999; 47(1): 40-51.
- Jeong SY, Jin YG and Lee JS. Effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) on the reproduction of the oily bitterling, *Acheilognathus koreensis* (Teleostei: Cyprinidae), *Korean J Environ Biol* 2004; 22(1): 159-166.
- Matta MB, Cairncross C and Kocan RM. Possible effects of polychlorinated biphenyls on sex determination in rainbow trout, *Environ Toxicol Chem* 1998; 17(1): 26-29.
- Monosson E, Fleming WJ and Sullivan CV. Effects of the planar PCB 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) on ovarian development, plasma levels of sex steroid hormones and vitellogenin, and progeny survival in the white perch (*Morone americana*), *Aquat Toxicol* 1994; 29(1-2): 1-19.
- Nebert DW, Petersen DD and Formace AJ, Jr. Cellular responses to oxidative stress: the [Ah] gene battery as a paradigm. *Environ Health Perspect* 1990; 88: 13-25.
- Oh SM, Ryu BT, Kim HR, Choi KC and Chung KH. Molecular cloning of CYP1A gene and its expression by benzo(a)pyrene from goldfish (*Carassius auratus*), *Environ Toxicol* 2009a; 24(3): 225-234.
- Oh SM, Ryu BT, Kim HR and Chung KH. Early life stage toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in Goldfish (*Carassius auratus*), *J Environ Toxicol* 2009b; 24(1): 1-8.
- Peterson RE, Theobald HM and Kimmel GL. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons, *Crit Rev Toxicol*

- 1993; 23(3): 283-335.
- Roberts RJ, Bell M and Young H. Studies on the skin of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) II. The development of larval plaice skin. *J Fish Biol* 1973; 5(1): 103-108.
- Rombough PJ. Partitioning of oxygen uptake between the gills and skin in fish larvae: a novel method for estimating cutaneous oxygen uptake, *J Exp Biol* 1998; 201(11): 1763-1769.
- Safe SH. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment, *Crit Rev Toxicol* 1994; 24(2): 87-149.
- Spitsbergen JM, Walker MK, Olson JR and Peterson RE. Pathologic alterations in early life stages of lake trout, *Salvelinus namaycush*, exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin as fertilized eggs, *Aquat Toxicol* 1991; 19(1): 41-71.
- Stegeman JJ and Hahn ME. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Ostrand GK, Malins DD (eds.), *Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives*. Lewis Publishers, BocaRaton, FL, USA 1994; pp. 87-206.
- Sutter TR and Greenlee WF. Classification of members of the Ah gene battery, *Chemosphere* 1992; 25(1-2): 223-226.
- Tanguay RL, Andreason EA, Walker MK and Peterson RE. Dioxin toxicity and arylhydrocarbon receptor signaling in fish. In Schechter A and Gasiexicz TA, *Dioxins and health*, John Wiley & Sons, New York 2003; pp. 603-628.
- Teraoka H, Dong W, Ogawa S, Tsukiyama S, Okuhara Y, Niiyama M, Ueno N, Peterson RE and Hiraga T. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: altered regional blood flow and impaired lower jaw development, *Toxicol Sci* 2002; 65(2): 192-199.
- Teraoka H, Dong W, Tsujimoto Y, Iwasa H, Endoh D, Ueno N, Stegeman JJ, Peterson RE and Hiraga T. Induction of cytochrome P450 1A is required for circulation failure and edema by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in zebrafish, *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304(1): 223-228.
- Thomas P. Effects of Aroclor 1254 and cadmium on reproductive endocrine function and ovarian growth in Atlantic croaker, *Mar Environ Res* 1989; 28(1-4): 499-503.
- von Westernhagen H, Rosenthal H, Dethlefsen V, Ernst W, Harms U and Hansen PD. Bioaccumulating substances and reproductive success in Baltic flounder (*Platichthys flesus*), *Aquat Toxicol* 1981; 1(2): 85-99.
- Walker MK and Peterson RE. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) during early development, *Environ Toxicol Chem* 1994; 113(5): 817-820.
- Wassenberg DM and Di Giulio RT. Teratogenesis in *Fundulus heteroclitus* embryos exposed to a creosote-contaminated sediment extract and CYP1A inhibitors, *Mar Environ Res* 2004; 58(2-5): 163-168.
- Wisk JD and Cooper KR. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on benzo(a)pyrene hydroxylase activity in embryos of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Arch Toxicol* 1990; 66(4): 245-249.
- Wu YD, Jiang L, Zhou Z, Zheung MH, Zhang J and Liang Y. CYP1A/regulation gene expression and edema formation in zebrafish embryos exposed to 2,3,7,8-trtrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Bull Environ Contam Toxicol* 2008; 80(6): 482-486.
- Yamauchi M, Kim EY, Iwata H, Shima Y and Tanabe S. Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in developing red seabream (*pagrusmajor*) embryo: An association of morphological deformities with AHR1, AHR2 and CYP1A expressions, *Aquat Toxicol* 2006; 80(2): 166-179.
- Zabel EW, Cook PM and Peterson RE. Toxic equivalency factors of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran and biphenyl congeners based on early life stage mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquat Toxicol* 1995; 31(4): 315-328.
- Zhang YB, Hu CY, Zhang J, Huang GP, Wei LH, Zhang QY and Gui JF. Molecular cloning and characterization of crucian carp (*Carassius auratus* L.) interferon regulatory factor 7, *Fish Shellfish Immunol* 2003; 15(5): 453-466.