

# EDC Studies in Korean Endemic Amphibian Species

강 한 승, 김 문 규, 계 명 찬  
한양대학교 자연과학대학 생명과학과

## 서 론

양서류는 먹이 연쇄의 2차 포식자로 먹이연쇄를 통해 내분비계 장애물질(endocrine disruptors)의 생체 내 축적이 예상되는 표적생물이다. 상위의 포식자들의 주요 먹이 생물로서 이용되므로 내분비계 장애물질의 순환 및 생체축적 회로의 중간자로 중요한 위치를 갖는다. 양서류는 농경지나 계류 등에서 서식하는 점과 매 년 같은 장소에 산란하는 특이한 습성으로 인해 농약 등의 환경오염 물질에 노출되어 영향을 받기 쉬우므로 환경지표로서의 역할을 할 수 있다. 또한 환경의 질을 평가하는데 있어 매우 신빙성 있는 척도로 취급되고 있다. 최근 세계 각 지역에서는 개구리의 수가 현저히 감소하는 것이 발견되고 있다. 이런 현상은 개발사업의 영향도 있으나, 주로 내분비계 장애물질의 영향이라고 보고되고 있다(Stebbin and Cohen 1995; Burkhart *et al.* 1998). 개구리 등 양서류는 피부호흡을 하므로 내분비계 장애물질의 흡수가 빠르고, 갑상선 호르몬의 작용으로 변태하기 때문에 내분비계 장애물질의 영향을 가장 많이 받는 동물 중의 하나이다(Stebbin and Cohen 1995).

내분비계 장애물질이란 미국 EPA에 의하면 ‘항상성의 유지와 발달의 조절을 담당하는 체내의 자연 호르몬의 생산, 방출, 이동, 대사, 결합 및 배설을 간섭하는 체외물질’을 말한다. 즉 ‘내분비 기능에 변화를 일으켜, 생체 또는 그 자손의 건강에 위대한 영향을 나타내는 외인성 물질’이라 정의된다. 내분비계 장애물질이 생물의 내분비계를 교란하여 무척추동물, 어패류, 양서류, 파충류, 조류, 포유류 등의 생식호르몬의 생산, 저장과 분비, 이동, 대사, 수용체 결합의 방해 등등의 장애를 유발하고, 그 결과로 발생과정의 이상을 초래하며, 성행동, 신경과 면역계의 이상 발생, 암의 발생을 야기한다는 보고들이 급증하고 있다(Colborn *et al.* 1996; Cadbury 1997).

내분비계 장애물질은 종류에 따라 교란시키는 호르몬의 종류 및 교란 방법이 서로 다르다고 알려져 있다. 내분비계 장애물질의 특성은 생태계 내 소비자에 의해 쉽게 분해되지 않고, 매우 안정하여 인체 또는 생물의 지방조직에 농축되어 대물림 된다는 것이다. 그러므로 그 개체가 죽더라도, 환경 생태계내에 잔류하여 지속적인 위협을 준다. 현재 세계 야생생물보호기금(World Wildlife Fund; WWF)의 목록에는 67종의 화학물질이 등재되어 있으며, 일본 후생성에서는 산업용 화학물질, 의약품, 식품첨가물 등 142종의 물질을 내분비계장애물질로 분류하고 있다. 내분비계 장애물질로 분류된 화학물질 중에는 많은 종류의 농약이 포함되어 있으며 농약의 사용은 자연생태계에 엄청난 파급효과를 가져온다. 농

약에 의해 일어나는 동물기형의 보고는 매우 많다. Carbamate계 살균제인 mancoze은 생쥐에서 자궁의 무게를 감소시키고, 호르몬의 불균형을 초래하여 착상을 억제 시킨다는 보고가 있다(Bindali and Kaliwal 2002). 살충제 methoxychlor은 xenopus 성체에 노출시 생식기관과 내분비계의 장애를 일으키며, progesterone에 의한 oocyte 성숙을 억제시키는 것으로 알려져 있으며(Pickford and Morris 1999, 2003), 생쥐에 있어 follicle의 atresia를 증가시키는 것으로 보고되었다(Borgeest *et al.* 2002). 살충제인 mirex는 생쥐 배아에 노출시 기형을 유발한다고 알려져 있다(El-Bayomy *et al.* 2002).

내분비계 장애물질이 발생 및 생식에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 중요하다. 생식과정은 종의 유지를 통한 생태계의 기능과 안정성 유지에 필수적인 생명활동으로 다양한 오염물질 및 독성물질에 매우 민감하다. 따라서 내분비계 장애물질에 의한 발생 및 생식위해성 평가는 매우 중요한 연구 주제이다. 또한 발생과정에 수반하는 감수분열, 생식세포의 형성과 분화, 수정과 난할 등은 생명현상의 이해를 목표로 하는 생명과학 영역의 전통적인 연구 분야이다. 따라서 야생생물 종을 대상으로 내분비계장애물질이 발생 및 생식에 미치는 영향에 대한 연구는 생명현상의 다양성 및 공통성을 연구하는 비교 연구 측면에서 중요한 의미를 갖는다. 본 연구는 한국 토착 양서류종의 하나인 무당개구리에 대한 내분비계 장애물질이 배의 발생에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 무당개구리(*Bombina orientalis*)는 구북구계에 속하는 종으로 우리나라에서는 저지대에서 고지대의 계류에 이르기까지 전역에 많이 분포하고 있다. 5월부터 7월까지 논이나 물가의 웅덩이나 낙엽이 쌓인 곳에서 산란을 한다. 실험에 사용한 내분비계 장애물질은 우리나라에서 많이 사용하는 농약 중 제초제와 살충제로 이용되고 있는 alachlor와 endosulfan을 사용하였다. Alachlor은 라쏘(Lasso)라는 상품명으로 판매되고 있으며, 담배나 옥수수, 땅콩 재배시 제초제 농약으로 사용한다. 작용기전은 식물의 단백질합성을 억제하여 뿌리의 성장을 방해한다. Endosulfan은 우리나라에서 지오릭스라는 상품명으로 판매되고 있다. 배추의 잎벌레, 거세미나방 등등의 토양 살충제로 사용된다. 포유동물에 대한 독성이 다소 높은 편이며 어패류, 야생동물에 대한 독성도 비교적 높은 편이다. 중추신경계, 신장, 간, 혈액, 그리고 부갑상선등에 영향을 끼쳐 생식능력의 감소, 돌연변이를 유발시킨다(Hincal *et al.* 1995; Venkateswarlu *et al.* 2000; Kang *et al.* 2001).

## 재료 및 방법

### 무당개구리 사육

실험에 사용된 무당개구리는 강원도 홍천에서 채집하여 한양대 실험동물 사육실에서 사육하면서 실험재료로 사용하였다. 사육수는 염소성분을 제거시킨 수돗물을 사용하였으며, 주 1회 교환해 주었다. 실험기간동안 사육수온은 20~23°C 범위였다. 먹이는 주 3회 mealworm을 공급하였다.

## 인공산란 및 정자 성숙 유도

무당개구리 수정란을 얻기 위하여 인공수정 24시간 전에 암컷에게는 750 IU의 HCG를 주사하여 과배란을 유도하였으며, 수컷은 500 IU의 HCG를 주사하여 정자의 성숙을 유도하였다.

## 수정 및 배 발생이상 조사

HCG주사 24시간 경과 후 암컷에서는 복부를 압박하는 방법으로 알을 채취하였다. 수컷은 정소를 해부, 수집한 후 정소에서 정자를 분리하였다. 채취한 알과 정자는 1X MMR (Marc's Modified Ringer Solution) 용액에 보관하였다. 준비된 알과 정자는 0.1X MMR 용액에서 인공수정을 시행하였다. 수정방법은 0.1X MMR 용액에 담겨진 알에 정자를 직접 뿌린 후 5분간 잘 섞어주면서 수정시켰다. 수정란은 0.1X MMR 용액으로 3번 세정한 후, 배양온도 18°C 조건 하에서 배양하였다. Alachlor독성에 의한 발생이상 및 치사농도를 조사하기 위해 수정란을 5 µM, 10 µM, 20 µM 그리고 40 µM의alachlor에 각각 처리하여 대조구와 비교 관찰하였다. Endosulfan 은 1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM 농도를 준비하여, 수정란을 처리하였으며, 대조구와 비교 관찰하였다. 실험용액인 0.1X MMR 용액은 3일에 한번씩 새 용액으로 교환하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Alachlor에 의한 배 발생 이상

무당개구리 수정란을alachlor에 노출시킨 후, 배양한 결과 여러 가지 기형의 배아 발생을 관찰할 수 있었다. 또한alachlor 농도에 따라 생존율이 다르게 나타남을 확인하였다. Alachlor를 처리한 배양액에서의 배아는 생존율에 있어서 대조군의 81.3%의 생존율에 비하여,alachlor 농도가 높을수록 생존율은 감소하였다. Alachlor 처리농도 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM에서 13일간 배양한 무당개구리 배아의 생존율은 각각 71%, 56.8%, 18.8%, 0%를 나타내었다. 특히alachlor 10 µM 농도에서 배양한 배아는 56.8% 정도의 생존율을 보임에 따라 무당개구리 배아에 대한alachlor의 화학물질에 대한 독성 지표인 LD<sub>50</sub>(반수치사량)은 10 µM 정도임을 알 수 있다.

Alachlor은 무당개구리 배아 발생에 있어 기형을 유발하였다. 고농도의 배양액에서 자란 배아는 기형의 발생율이 저농도에 비하여 증가하였다. 기형은 여러 가지 형태로 나타났는데, 그 중에서 몸통 휜 (43.18%), 꼬리 형성장애 (34.09%), 꼬리 휜 (11.36%) 등의 기형 형태가 높은 빈도로 나타났다.

### 2. Endosulfan에 의한 배 발생 이상

무당개구리 수정란에 endosulfan을 처리한 결과 처리 농도에 따라 생존율이 다르게 나타나며, 다양한 기형의 배아들이 관찰되었다. 생존율에 있어서는 대조군이 71.8%의 생존

율을 나타냈으나, 처리농도 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ 에서의 생존율은 64.4%, 54.3%, 47.2%, 20.8%로 농도가 높을수록 생존율은 감소하는 것으로 나타났다. 무당개구리 배아에 대한 endosulfan의 LD<sub>50</sub>(반수치사량)은 5~10  $\mu\text{M}$  정도임을 알 수 있었다. Endosulfan은 배아 발생에 있어 기형을 유발 하였으며, 기형 발생은 농도가 높을수록 기형율은 증가하였다. 기형의 형태는 꼬리 형성장애(41.56%), 가슴수포(19.48%), 몸통 휜(12.99%) 등의 빈도순으로 나타났다.

본 연구결과 우리나라에서 제초제 및 살충제로 많이 사용하는 alachlor와 endosulfan은 양서류의 초기 배 발생에 있어 생존 및 기형에 많은 영향을 미치는 것으로 보아 생태계의 야생 생물 및 인간에게 위대한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Bindali BB and BB Kaliwal. 2002. Anti-implantation effect of a carbamate fungicide mancozeb in albino mice. *Ind Health* 40(2): 191-197.
- Borgeest C, D Symonds, LP Mayer, PB Hoyer and JA Flaws. 2002. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. *Toxicol Sci* 68(2): 473-478.
- Burkhart JG, JC Helgen, DJ Fort, K Gallager, D Bowers, TL Propst, M Gernes, J Magner, MD Shelby and G Lucier. 1998. Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities. *Environ. Health Perspect* 106: 841-848.
- Cadbury D. 1997. *The feminization of nature; our future at risk*, Penguin Books Ltd.
- Colborn T, D Dumanoski and JP Myers. 1996. *Our stolen future*. The Spieler Agency.
- El-Bayoma AA, IW Smoak and S Branch. 2002. Embryotoxicity of the pesticide mirex in vitro. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 22(4): 239-249.
- Hincal F, A Gurbay and B Giray. 1995. Induction of lipid peroxidation and alteration of glutathione redox status by endosulfan. *Biol Trace Elem Res.* 47(1-3): 321-326.
- Kang KS, JE Park, DY Ryu and YS Lee. 2001. Effects and neuro-toxic mechanism of 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl and endosulfan in neuronal stem cells. *J Vet Med Sci.* 63(11): 1183-1190.
- Pickford DB and ID Morris. 2003. Inhibition of gonadotropin-induced oviposition and ovarian steroidogenesis in the African clawed frog (*Xenopus laevis*) by the pesticide methoxychlor. *Aquat. Toxicol.* 12:62(3): 179-194.
- Pickford DB and ID Morris. 1999. Effects of endocrine-disrupting contaminants on amphibian oogenesis: methoxychlor inhibits progesterone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes in vitro. *Environ Health Perspect.* 107(4): 285-292.
- Stebbins R and N Cohen. 1995. *A natural history of amphibians*, Princeton Univ. Press.
- Venkateswarlu K, K Suryarao, V Srinivas, N Sivaprakash, NR Jagannadharao and A Mythilai. 2000. Endosulfan poisoning-a clinical profile. *Assoc Physicians India.* 48(3): 323-325.