

산개구리 배아를 활용한 화학물질의 기형성 평가

Evaluation of teratogenicity of chemical by Korean frog embryo, *Rana dybowskii*

고선근^{1*}

¹호남대학교 자연과학대학 생명과학과

I. 연구목적

화학물질에 대한 독성평가와 환경오염물질의 독성 및 기형유발에 대한 연구는 개구리의 배아를 활용 하는 Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*(FETAX) 방법이 널리 사용되어지고 있으며 이러한 FETAX 방법에 따라 다른 여러 나라에서 그 나라에 서식중인 개구리들의 배아를 활용하려는 연구가 진행되어지고 있다 그러나 우리나라에서는 아직 국내에 서식 중인 개구리의 배아를 활용하여 화학물질 및 환경오염물질의 독성을 평가 할 수 있는 연구는 거의 진행된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 한국산개구리 중 정자형성주기 등의 번식기와 번식기의 여포 내 호르몬 변화 양상 및 난자의 성숙현상 등이 알려져 있는 산개구리(*Rana dybowskii*) 배아의 정상발생과정을 조사하고 FETAX 방법에 따라 이들 배아를 배양하면서 중금속 및 농약을 처리하여 일정시간 후 LC50, EC50 및 Teratogenic Index(TI)를 구하고 기형양상 등을 조사하여 환경오염물질의 효과를 평가할 수 있는 기법으로 활용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

산개구리(*Rana dybowskii*)를 광주 및 전남 일대에서 동면 직후인 11월 중순에 암컷(약 30g 이상)과 수컷(약 20g 이상)의 성체를 야생에서 직접 채집하여 사용하였다.

2. 호르몬 및 시약

암컷의 배란을 유도하기 위하여 산개구리의 뇌하수체 추출물을 제조하여 사용하

였다. 배아의 발생단계에 미치는 영향을 보기 위해 사용했던 NiCl₂은 1000 ppm Stock solution(Aldrich Chem.)을 구입하여 사용하였으며 Carbofuran (Sigma Chem.)과 Diazinon(농업과학기술원)은 DMSO에 녹여 Stock solution으로 제조하고 이를 AR용액으로 희석하여 사용하였다.

3. 정상발생과정 조사

유리 배양접시에 배양액을 10ml씩 넣고 25개의 배아를 배양하면서 2세포기 에서 올챙이의 꼬리지느러미 순환시기까지 발생과정을 조사하였다.

4. 시험물질 처리

시험군과 대조군의 배양액 10ml에 포배기에서 낭배기 사이의 배아들을 각 농도 별로 25개씩 넣고 18±2℃의 온도에서 96시간 배양하였으며 시험물질의 농도 구간 은 5개 이상으로 정하여 3회 이상 반복 시험하였다.

5. 결과처리 및 분석

배양 후 기형 개체 수 및 양상을 조사하고 그 결과들을 %로 환산하여 Probit analysis Program으로 분석하여 LC₅₀, EC₅₀을 구하였으며 LC₅₀ 값을 EC₅₀ 값으로 나누어 Teratogenic Index(TI)를 구하여 TI 값이 1.5 이상이 되면 유해성이 있는 물질로 판정하였다. 기형의 종류는 정상발생 올챙이를 기준으로 꼬리기형, 복부 기형, 수포형성기형(Edema)등으로 판정하였다.

III. 결과

1. 산개구리의 발생과정

배아는 낭배기(gastruation)에 대략 2.3~2.5 mm 정도의 크기를 나타내었고 이후 신경관, 신경습, 신경구 등을 형성하는 기관형성단계에서는 그 크기가 다소 증가되어 약 2.6~2.8 mm 정도를 나타내었으며 수정이후 신경관이 완성되는 시기까지는 대략 72시간 정도를 필요로 했다.

2. NiCl₂의 효과

NiCl₂의 LC50은 17.5를 나타내었고 EC50은 0.4를 나타내었으며 TI는 43.8을 나타내었다. NiCl₂의 영향에 의해 나타난 기형의 종류는 수포형성, 꼬리기형, 복부기형 등을 나타내었으며 꼬리기형의 비율이 다른 기형 종류에 비해 높았다.

3. Carbofuran의 효과

Carbofuran의 LC50은 41.5를 나타내었고 EC50은 1.6를 나타내었으며 TI는 26.0를 나타내었다. Carbofuran의 영향에 의해 나타난 기형의 종류는 대개가 꼬리기형, 복부기형 등을 나타내었으며 복부기형의 비율이 다른 기형 종류에 비해 높았다.

4. Diazinon의 효과

Diazinon의 LC50은 20.2를 나타내었고 EC50은 1.9를 나타내었으며 TI는 10.6을 나타내었다. Diazinon의 영향에 의해 나타난 기형의 종류는 수포형성기형, 꼬리기형, 복부기형 등을 나타내었으며 수포형성 기형의 비율이 다른 기형 종류에 비해 높았다.

IV. 고찰

산개구리의 뇌하수체 주입에 의한 배란 유도과 인공수정에 의한 배아의 채취법을 확립 할 수 있었고 배아들의 배양을 통하여 발생과정을 확인 할 수 있었으며 산개구리 발생의 전반적인 과정은 *Xenopus laevis*와 거의 유사한 경향을 나타내었다. 본 시험에 사용했던 시험물질 모두가 산개구리 배아의 발생과정에 매우 민감하게 반응하여 배아들을 치사시키거나 매우 낮은 농도에서도 발생을 저해하고 기형을 유발하였다. 이러한 사실들로 보아 본 실험에 사용했던 시험물질들은 모두가 산개구리의 발생에 심각한 영향을 미칠 수 있는 강력한 최기형성 물질임을 확인할 수 있었으며 산개구리의 배아는 발생과정에서 여러 화학물질에 매우 민감하게 반응한다는 사실과 매우 짧은 시간의 배양을 통하여 화학물질 및 환경오염물질들의 독성 등을 파악하는데 좋은 모델로 사용되어 질 수 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

- Deucher EM. 1972. "*Xenopus laevis* and Developmental Biology" Biological Reviews, 47, 37-112.
- Fort DJ, Dawson DA, Bantle JA. 1988. Development of ametabolic activation system for the frog embryo teratogenesis assay *Xenopus*(FETAX). *Teratog. Carcinog. Mutagen* 8:251-264.
- Ko SK and Lee DP. 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 SK, Kang HM, Im WB, and Kwon HB. 1998. Testicular cycles in three species of korean frogs: *Rana nigromaculata*, *Rana rugosa*, *Rana dybowskii*. *Gen. and Comp. Endocrinol.* 111, 347-358.
- Ko SK, Kang HM, Kim JW, and Kwon HB. 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* :99-105.