

중금속 이온이 산개구리 난자성숙에 미치는 영향에 관한 연구^{1*}

고선근² · 이두표²

Effect of Heavy Metal Ions on the Oocyte Maturation of Frog, *Rana dybowskii* in vitro^{1*}

Sun-Kun Ko², Doo-Pyo Lee²

요 약

중금속 이온(Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}) 산개구리 여포난자의 성숙에 미치는 영향을 알아 보기 위해 배양액에 일정 농도의 이온들을 첨가한 후 여포난자들을 일정시간 배양하였다. 여포난자의 성숙을 유도하기 위하여 FPH(Frog pituitary homogenate: 0.1p.e./ml)를 사용하였으며 여포난자의 성숙율은 난자의 핵막 붕괴율로부터 구하였다. 실험 결과 Cd^{2+} 은 0.1ppm의 농도부터 여포난자의 성숙을 억제하였으며 Hg^{2+} 과 Cu^{2+} 는 1ppm부터, Pb^{2+} 는 5ppm에서 현저히 억제효과를 나타내기 시작하였다. 이들 중금속 이온 작용의 가역성을 조사하기 위해 3시간 동안 여포난자들을 중금속 이온에 노출시킨 후 보통 배양액으로 옮겨 계속 배양을 해 본 결과 Cd^{2+} 은 1ppm에서 가역성을 나타내었으나 2.5ppm에서는 비가역적인 손상을 주었다. Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} 의 효과는 2.5ppm까지는 가역성을 나타냈으나 5ppm에서는 비가역성을 나타냈다. 위 결과로부터 개구리 여포난자의 배양계는 환경오염물질의 독성 검정에 요긴하게 사용할 수 있을 것으로 생각되었다.

주요어 : 중금속 이온, 독성, 산개구리

ABSTRACT

In order to know the effect of the oocyte maturation with several heavy metal ions(Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}) on frog(*Rana dybowskii*) by FPH(Frog pituitary homogenate: 0.1 p.e./ml) in vitro, oocytes were cultured for 20 hours and examined the maturation rates with exposure of various concentrations of those ions. The results showed that Cd^{2+} at concentration of 0.1 ppm suppressed the maturation of the oocytes, while Hg^{2+} , Cu^{2+} and Pb^{2+} suppressed them significantly at 1 and 5 ppm respectively. To examine the reversibility of the inhibitory effects, the oocytes were exposed to the metal ions only for 3 hours and transferred to plain medium and cultured further for 17 hours. The oocytes were recovered from the toxic effect of the ions when they were exposed to 1 ppm of Cd^{2+} for 3 hours and not available to 2.5 ppm. The effect of 2.5 ppm of Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} were also reversible and not available to 5 ppm for 3 hours exposure.

* 이 논문은 광주과학기술원 에너지환경연구소의 연구비(1997)지원에 의해 연구되었음

1 접수 10월 30일 Received on Oct. 30, 1997

2 호남대학교 생명과학과 Dept. of Life Science, Honam Univ., Kwangju, 506-090, Korea

From the above results, it reveal that heavy metal ions in this study suppressed the maturation of oocytes at relatively low concentration. Therefore the oocyte culture system can be used as a useful tool to evaluate the toxicity of the pollutants in enviroment.

KEY WORDS : HEAVY METAL IONS, TOXICITY, *Rana dybowskii*

서 론

근래 환경의 오염이 자연의 생태계를 파괴하고 사람의 건강을 위협하는 요인으로 등장하자 여러 학자들은 각종 오염물질들이 생물계에 미치는 영향을 조사하게 되었다(Browne and Dumont, 1979; Guthrie and Perry, 1980). 그러나 이들 오염물질들이 생물체, 특히 인체에 어느 정도의 유해성을 띠고 있는지 그 정도를 단시간내에 관정해내는 것은 매우 어려운 문제이다. 이러한 오염물질들은 대개 간접적으로 우리와 접촉하게 되고, 식수 등을 통하여 직접 우리 몸에 들어 온다 하더라도 피해 상황이 여러 현상을 통해 복합적으로 나타나므로 그 유해도와 작용기작을 규명하는데 어려움이 있기 때문이다. 최근 일부의 학자들에 의해 동물의 발생계를 이용하여 오염물질들의 독성을 생물학적으로 검증하고 나아가 오염관정의 지표로 삼으려는 시도가 활발히 이루어지고 있다(Klein *et al.*, 1980; Storeng and Jonsen, 1980; Saksena, 1982; Iijima *et al.*, 1983).

본 연구에서는 개구리의 발생계 중에서 배양이 가능하고 특히 단시간 내에 뚜렷한 변화를 일으키는 산개구리의 여포난자를 이용하여 중금속 이온의 독성을 효율적으로 관정하고 중금속 이온의 생체 내에서의 작용기작을 알아보기 위해 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

산개구리(*Rana dybowskii*)는 11월~2월중 광주 근교에서 필요에 따라 암컷 성체(약 20g)를 채집하여 저온실(4℃)에서 물에 보관하여 사용하였다.

2. 호르몬 및 시약

배양액으로는 Amphibian Ringer's 용액(AR: NaCl, 6.6g/l; CaCl₂, 0.15g/l; KCl, 0.15g/l

l)에 penicillin G(30mg/l) streptomycin sulfate(50mg/l) 및 sodium bicarbonate 완충 용액(200mg/l)을 사용 직전에 첨가하여 사용하였다. 배양액의 pH는 0.1N HCl을 사용하여 7.4로 맞추었다. 난자의 성숙현상을 유도하기 위해 사용했던 뇌하수체 추출물(Frog pituitary homogenate: FPH)은 암컷 개구리 뇌하수체를 10개 정도 모은 다음 AR 용액에서 초음파 분쇄기로 부순 후(20sec), 원심분리(20 min, 1000rpm, 4℃)하여 상층액을 1 pituitary equivalent/ml 농도로 만들었으며 이를 소량씩(1ml) 분주하여 냉동보관(-20℃)하였다(Lin and Schuetz, 1985). 한 번 녹인 뇌하수체 추출물은 당일에 사용하였다. 배양액에 첨가한 중금속염들, CdCl₂, HgCl₂, CuCl₂, Pb(NO₃)₂ 등은 Junsei Chemical CO., Ltd.에서 이들 이온들이 1000ppm으로 제조된 것을 적절히 희석하여 배양액에 첨가하였으며 중금속을 포함하지 않은 배양액을 동시에 사용하여 대조군으로 사용하였다.

3. 여포난자의 배양

개구리 복부를 절개하여 난소를 채취한 다음 AR 용액으로 옮긴 다음 해부현미경(Nikon, 20×)아래서 난소로부터 여포난자를 분리해낸 다음 배양집시(Costa 3524)에 한 well당 2ml의 AR과 20여개의 여포난자를 넣고 22℃가 유지되는 진탕기에서 배양하였다. 개구리 여포는 여포강이 없으므로 난자에서 여포조직을 떼어내기가 용이하지 않다. 따라서 여포 세포가 붙어 있는 난자를 직접 배양하였으며 중금속을 포함하지 않은 배양액을 동시에 사용하여 대조군으로 삼았다. 배양 후 여포난자를 끊어 고정하여 해부현미경 아래서 이들을 쪼개어 핵(germinal vesicle: GV)의 유무를 관정하여 핵붕괴(germinal vesicle breakdown: GVB)가 일어난 여포난자를 성숙현상(oocyte maturation)이 진행된 것으로 간주하여 중금속 효과에 의한 난자의 성숙율을 측정하였다.

결 과

중금속 이온들이 FPH에 의해 유도된 여포난자의 성숙현상을 저해하는지의 여부를 알아 보기 위해 배양액에 Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} 그리고 Pb^{2+} 의 농도를 각각 0.1, 1, 10, 100 ppm이 되도록 첨가한 후 20시간 배양하여 보았다(Figure 1). 그림에서와 같이 Cd^{2+} 는 0.1 ppm에서부터 Hg^{2+} 과 Cu^{2+} 는 1 ppm에서 Pb^{2+} 는 10 ppm에서 난자의 성숙을 현저히 억제하였다. 예비 실험에서 중금속과 함께 염을 이루고 있던 이온들, 즉 Cl^{-} , NO_3^{-} 들은 25 ppm까지 배양액에 첨가하였어도 난자의 성숙현상에 아무런 영향을 미치지 않는 것을 관찰한 바 있다. 따라서 여포난자의 성숙현상에 나타난 저해작용은 중금속 이온들에 의해 나타났다는 것을 알 수 있었다.

중금속 이온들이 여포난자의 성숙현상을 일정 농도 이상에서 강력히 억제한다는 사실을 토대로 하여

중금속 이온들의 효과를 보다 자세히 분석하기 위하여 농도 구간을 세분하고 이 효과의 가역성 여부와 함께 난자의 성숙에 미치는 효과를 조사하였다. 여포난자를 중금속이 없는 대조군 배양액에서 20시간 배양했을 때 90%이상의 여포난자들이 성숙현상을 나타내었으나 Cd^{2+} 1ppm을 포함한 배양액에서 배양했을 때는 60%의 여포난자들만이 성숙현상을 나타냈고 2.5 ppm에서는 30%, 5ppm에서는 20%의 여포난자들이 성숙현상을 나타내어 농도가 증가함에 따라 난자 성숙율이 급격히 감소했다(Figure 2A). Cd^{2+} 의 저해효과가 가역성을 갖고 있는지의 여부를 조사하기 위해 동면중인 산개구리의 여포난자에 FPH (0.1 p.c/well)를 처리하여 3시간 배양하면 대부분의 여포난자들이 성숙현상을 나타낸다는 사실을 토대로하여(Kwon *et al.*, 1988) 카드미움 이온에 3시간 동안 노출시킨 후 중금속이 들어있지 않은 배양액으로 옮겨서 계속 17시간 동안 배양하여

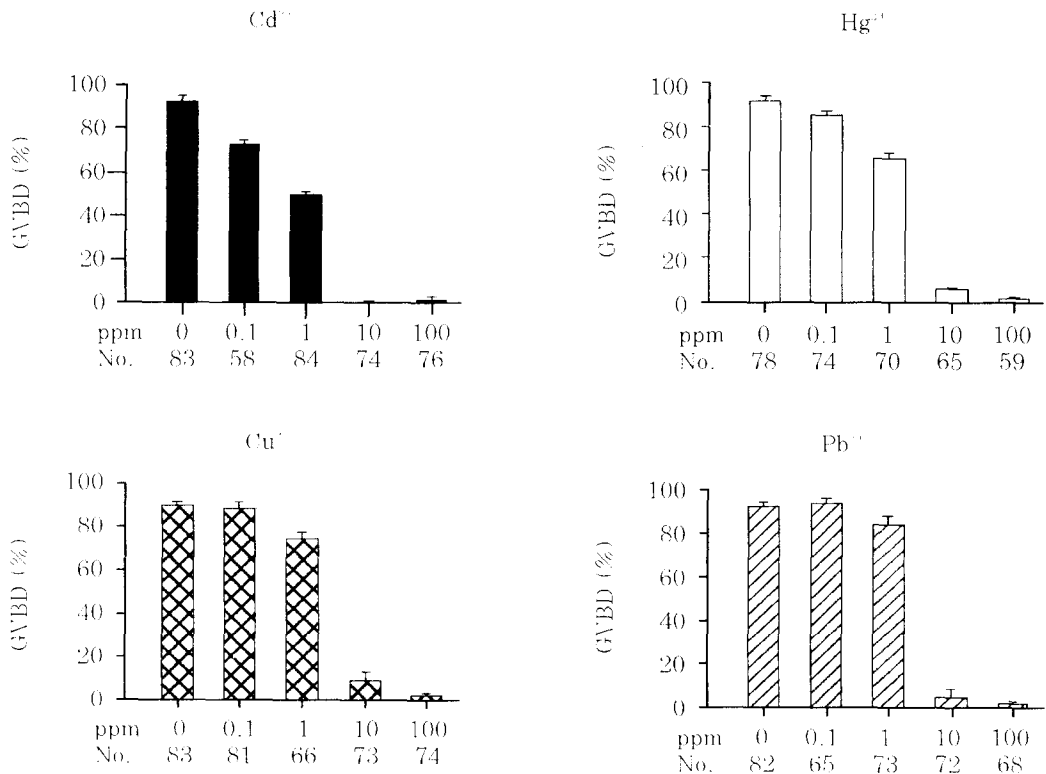


Figure 1. Effect of heavy metal ions on the meiotic maturation(GVBD) of frog oocytes *in vitro*
The oocytes were cultured for 20 hours in the presence of the ions and examined their maturation
No.: number of the oocytes tested

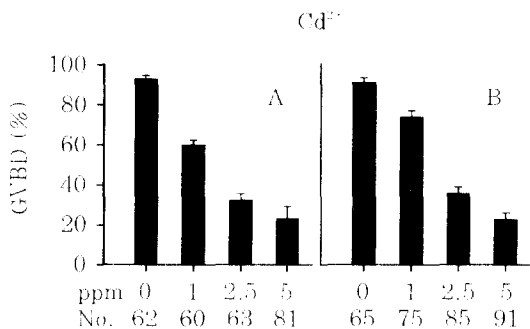


Figure 2. Effect of Cd²⁺ on the maturation of frog oocytes *in vitro*

A: The oocytes were incubated for 20 hours in continuous presence of the metal ions and examined the oocyte maturation

B: The oocytes were exposed to the metal ions for three hours and transferred to plain medium further for 17 hours

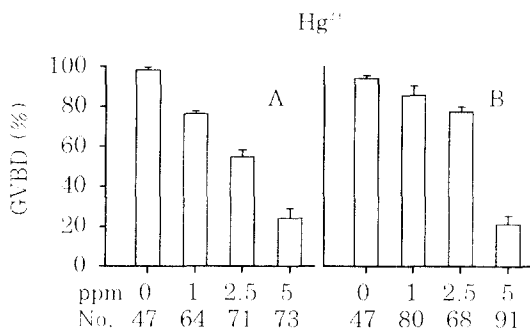


Figure 3. Effect of Hg²⁺ on the maturation of frog oocytes *in vitro*

A: The oocytes were incubated for 20 hours in continuous presence of the metal ions and examined the oocyte maturation

B: The oocytes were exposed to the metal ions for three hours and transferred to plain medium further for 17 hours

보았다. 카드미움 1 ppm에서 3시간 노출된 여포난자들은 카드미움의 영향으로부터 상당히 회복되어 70%이상의 여포난자들이 성숙현상을 나타내었다 (Figure 2B). 그러나 Cd²⁺의 농도가 2.5, 5 ppm으로 높아질수록 회복성이 급격히 떨어져 Cd²⁺ 5ppm에 노출된 여포난자들의 회복현상은 거의 일어나지 않았다.

수은의 경우에는 1 ppm의 농도에서부터 여포난자의 성숙현상을 저해하기 시작하여 2.5 ppm에서는 급격히 성숙율이 감소하였으며 5 ppm에서는 거의 완전하게 여포난자의 성숙현상을 억제하였다 (Figure 3A). 수은 이온의 2.5 ppm과 5 ppm에 3시간 동안만 노출되었던 여포난자들은 수은 이온이 첨가되지 않은 배양액으로 옮겨도 2.5 ppm에서만 약간의 회복만 나타나고 5 ppm에서는 거의 회복이 되지 못했다 (Figure 3B). 따라서 Hg²⁺도 역시 3시간 동안에 비가역적인 손상을 준 것으로 생각되었다.

구리의 경우에 20시간 계속 이 이온에 노출된 채 여포난자들을 배양하면 1 ppm에서부터 여포난자의 성숙현상을 억제하기 시작하여 5 ppm에서는 거의 억제하였다 (Figure 4 A). 구리이온 1 ppm과 2.5 ppm에 3시간 동안만 노출되었던 여포난자들은 난자의 성숙율이 대조군(약 90%)에 비해 커다란 차이 없이(80% 이상) 대부분의 여포난자들이 회복현상을 나타내어 Cu²⁺의 저해효과는 가역성이 다른 이온에 비해 강함을 알 수 있었다. 그렇지만 5 ppm이

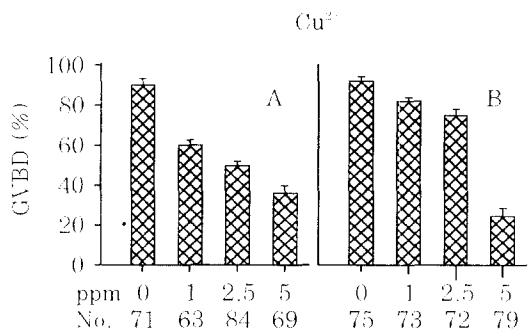


Figure 4. Effect of Cu²⁺ on the maturation of frog oocytes *in vitro*

A: The oocytes were incubated for 20 hours in continuous presence of the metal ions and examined the oocyte maturation

B: The oocytes were exposed to the metal ions for three hours and transferred to plain medium further for 17 hours

되었을 경우는 회복되지 못했다 (Figure 4B).

납의 경우에 2.5 ppm의 농도에서부터 여포난자의 성숙현상을 저해하기 시작하여 5 ppm에서는 대조군(90%)에 비해 현저히 억제하였다(30%) (Figure 5A). 구리이온의 1ppm이나 2.5ppm에 3

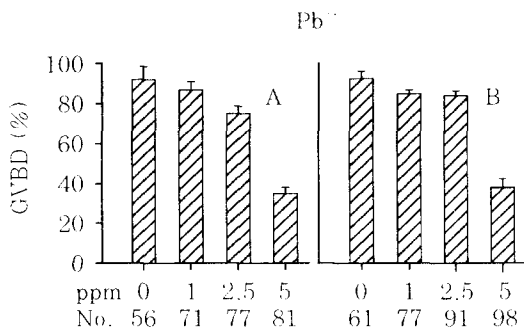


Figure 5. Effect of Pb²⁺ on the maturation of frog oocytes *in vitro*

A: The oocytes were incubated for 20 hours in continuous presence of the metal ions and examined the oocyte maturation

B: The oocytes were exposed to the metal ions for three hours and transferred to plain medium further for 17 hours

시간 동안만 노출되었던 여포난자들은 구리의 경우처럼 여포난자의 성숙율이 대조군(90%)에 비해 커다란 차이 없이(80% 이상) 대부분이 회복현상을 나타내어 Pb²⁺의 효과도 Cu²⁺와 같이 가역성이 강함을 알 수 있었으며 5 ppm에 노출되었던 여포난자들은 회복이 되지 않았다(Figure 5B). 따라서 이 농도에서는 회복이 불가능한 손상을 받은 것 같았다.

고 찰

본 실험의 결과로부터 산개구리의 여포난자는 중금속 이온에 매우 민감하게 반응한다는 사실을 알았으며 단시간 내에 이들의 독성효과를 판정할 수 있는 좋은 재료가 된다는 것을 알았다. 중금속이온들 중 Cd²⁺이 1ppm에서 여포난자의 성숙현상을 강력히 억제하므로 가장 독성효과가 강한 것으로 나타났으며 다음이 Hg²⁺와 Cu²⁺으로 2.5ppm에서 Pb²⁺가 5ppm의 수준에서 유의한 저해효과를 나타내었다. 위의 독성효과는 포유동물의 초기배아의 난할을 저해하는 효과농도와 대략 일치하는 것이다(Klein *et al.*, 1980; Saksena, 1982; Wui *et al.*, 1983). 그러나 포유동물의 초기배아는 2일 내지 3일 동안 배양해야하는데 비해 개구리의 여포난자는 20시간 만에 뚜렷한 결과를 얻을 수 있으므로 보다 유리한 검정방법으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 중

금속 이온들의 저해작용은 일부가 부분적으로 회복 가능한 구간도 있지만 일정농도의 이상에서는 거의 회복 불가능한 손상을 주는 것으로 나타났다. 그 예로 Cd²⁺ 2.5ppm에 노출되었던 여포난자들은 회복율이 현저히 낮아 불과 3시간 동안에 치명적인 손상을 입었다는 것을 알 수 있었다(Figure 2). Hg²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺의 경우에는 2.5ppm에 3시간 노출되었던 것은 회복이 가능하나 5ppm에 노출되었던 여포난자들은 성숙현상이 모두 억제된 상태에서 정지되어 있었다(Figure 3, 4, 5). 위의 결과들을 종합해보면 중금속 이온들은 비교적 낮은 농도에서 여포난자들의 생리적 변화, 즉 여포난자의 성숙현상을 강하게 억제를 하며 대부분 단시간 내(3시간)에 비가역적인 손상을 준다는 사실을 알았다. 동물의 발생계를 이용할 때에는 두 가지로 나누어 오염물질을 먹이나 음료에 섞거나 복강주사를 한 후 태아의 발생과정을 조사하는 *in vivo* system을 사용하는 방법과(Giavini and Vismara, 1980) 배아를 *in vitro*에서 배양하면서 오염물질에 직접 노출시켜 그 효과를 관찰하는 방법(Brown and Dumont, 1979; Storeng and Jonsen, 1980) 등이 있다. 이 두방법에서 모두 Pb, Cd, Ni 등의 중금속이온은 배아의 발생에 강한 저해작용을 나타낸다는 것이 보고된 바 있다. 개구리의 여포난자는 배아보다 채취가 용이하고 다량 얻을 수 있다는 등의 장점이 있고 단기간 배양을 통하여(20시간) 핵막 붕괴와 같은 뚜렷한 변화를 쉽게 조사할 수 있으므로 환경오염물질의 독성을 파악하는데 좋은 지표로 삼을 수 있다고 생각되었다. 또한 이 기간에 일어나는 생리적인 변화를 직접 조사할 수 있는 잇집도 가지고 있다. 따라서 본 실험실에서는 현재 중금속 이온의 작용기작을 연구하고 있는 중이며 이러한 연구가 이루어짐으로 해서 오염물질이 생물체에 미치는 영향을 파악하는데 좋은 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

- Browne, C. L. and J. N. Dumont(1979) Toxicity of selenium to developing *Xenopus laevis* embryos. *J. Toxicol. and Environ. Health* 5: 699-709.
- Giavini, E. M., and C. Vismara(1980) Effect of cadmium, lead and copper on rat preimplantation embryos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 702-705.

- Guthrie, F. E. and J. J. Perry(1980) Introduction to environmental toxicology. Elsevier New York.
- Iijima, S., A. Spindle, and R. A. Pedersen (1983) Developmental and cytogenic effect of potassium dichromate on mouse embryos in vitro. *Teratology* 27: 109-115.
- 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.
- Kwon, H. B., C. H. Choi, and C. G. Choi(1988) Studies on the oocyte maturation of korean frogs(*R. dybowskii* and *R. nigromaculata*) in vitro. *Korean J. Zool.* 31: 87-94.
- Lin, Y., and A. W. Schuetz(1985) Intrafollicular action of estrogen in regulating pituitary-induced ovarian progesterone synthesis and oocyte maturation in *Rana pipiens*: Temporal relationship and locus of action. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58: 421-435.
- 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: 183-187.
- Wui, I. S., H. B. Kwon, C. G. Choi, W. K. Lee, and G. S. Lee(1983) Effect of heavy metal ions on the early development of mouse embryos in vitro. *J. Environ. Protet. Inst. CNU.* 2(1).