

## 무당개구리에서 내분비계장애물질에 의한 발생독성 평가

강한승, 계명찬, 김문규  
한양대학교 자연과학대학 생명과학과

### 요 지

내분비계 장애물질 (Endocrine Disruptors: EDs)이란 “내분비 기능에 변화를 일으켜, 생체 또는 그 자손의 건강에 위대한 영향을 미치는 외인성 물질”로서 세계야생생물보호기금 (World Wildlife Fund; WWF)의 목록에는 67 여종, 일본 후생성에서는 142 여종의 물질을 내분비계 장애물질로 분류하고 있다. 이렇게 분류된 내분비계장애물질 가운데에는 많은 종류의 농약이 포함되어 있으며, 이들이 자연상태계에 미치는 영향에 대한 많은 보고가 있다. 양서류는 먹이연쇄의 중위 포식자로 내분비계 장애물질의 순환 및 생체축적 회로에서 중요한 위치를 갖는다. 또한 농경지나 계류 등에 서식하며 산란하는 습성이 있다. 이러한 서식지는 농약 등에 노출받기 쉬우므로 환경오염평가 대상동물로 중요하다. 본 연구에서는 국내에서 사용되고 있는 제초제, 살충제 등이 양서류 발생에 미치는 영향을 평가하고, 이들 물질에 의한 노출을 평가할 수 있는 biomarker 유전자를 발굴하고자 하였다. 우리나라 전역에 많이 분포하는 무당개구리(*Bombina orientalis*)의 초기 배아발생 과정에서 이들 농약을 처리하였을 때, 물질의 종류에 따라 정도의 차이는 있으나 농도 의존적으로 배아 및 올챙이의 치사율이 높게 나타났다. 또한 농약은 배아 및 올챙이의 기형을 유발하였다. 기형의 종류는 농약에 따라 서로 상이한 형태로도 나타났으나, 특히 몸통휨 또는 꼬리휨등의 척추골 기형이 많이 나타났다. 환경 위해성 평가 biomarker 유전자로서 골격계 형성에 관여하는 Sox9 유전자를 선택하였다. 무당개구리에서 처음으로 Sox9 유전자를 동정하였으며, 농약을 처리한 실험군에서의 Sox9 유전자의 발현 양상은 대조군에 비하여 높게 나타났다. 본 연구결과 생태계에서 내분비계 장애물질의 위해성 평가를 위해 양서류 초기배아의 치사 및 기형의 정도를 관찰하는 방법이 유효할 것으로 사료된다. 또한 야생동물의 biomarker 유전자를 발굴과 이를 이용한 위해성 평가는 더욱 정밀한 평가법으로 유용할 것이다.

### 서 론

내분비계 장애물질 (Endocrine Disruptors: EDs)이란 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 등의 장애를 유발하고, 그 결과로 발생과정의 이상을 초래하며, 성 행동, 신경과 면역계의 이상 발생, 암의 발생을 유발한다는 보고들이 많이 있다 (Colborn *et al.* 1996; Cadbury 1997). 내분비계 장애물질은 종류에 따라 교란 시키는 호르몬의 종류 및 교란 방법이 서로 다르다고 알려져 있다. 이들의 작용은 수용체 결합과정에서의 호르몬 모방작용, 차단작용, 촉발작용, 간접영향작용 등으로 크게 구별된다. 내분비계 장애물질은 생체 내에서 합성되는 호르몬과 비교하여 다음과 같은 특성이 있다. 이들은 생태계내 소비자에 의해 쉽게 분해되지 않고, 매우 안정하여 인체 또는 생물의 지방조직에 농축되어 대물림 된다는 것이다. 그러므로 그 개체가 죽더라도, 환경 생태계 내에 잔류하여 지속적인 위협을 준다. 이러한 내분비계 장애물질은 세계야생생물보호기금 (World Wildlife Fund; WWF)의 목록에는 67 여종의 화학물질이 등재되어 있으며, 일본 후생성에서는 산업용 화학물질, 의약품, 식품첨가물 등 142 여종의 물질을 내분비계 장애물질로 분류하고 있다. 내분비계 장애물질로 분류된 화학물질 중에는 많은 종류의 농약이 포함되어 있으며 농약의 사용은 자연생태계에 엄청난 파괴 효과를 가져온다. 농약이 자연생태의 동물에 미치는 영향에 대한 보고는 매우 많다. Carbamate계 살균제인 mancozeb은 생쥐에서 자궁의 무게를 감소시키고, 호르몬의 불균형을 초래하여 착상을 억제시킨다는 보고가 있다 (Bindali and Kaliwal 2002). 살충제 methoxychlor은 Xenopus에 노출 시 생식기관과 내분비계의 장애를 일으켜, 난자 성숙을 억제시키는 것으로 알려져 있으며 (Pickford and Morris 1999; 2003), 생쥐에 있어서 follicle의 atresia를 증가시키는 것으로 보고되고 있다 (Borgeest *et al.* 2002). 살충제인 mirex는 생쥐 배아에 노출시 기형을 유발한다고 알려져 있다 (El-Bayomy *et al.* 2002).

양서류는 먹이연쇄의 중위 포식자로 먹이연쇄를 통해 내분비계 장애물질의 생체 내 축적이 예상되는 표적생물이다. 상위 포식자들의 주요 먹이 생물이 되므로 내분비계 장애물질의 순환 및 생체축적 회로의 중간자로 중요한 위치를 갖는다. 양서류는 농경지나 계류 등에서 서식하는 점과 매년 같은 장소에 산란하는 특이한 습성으로 인해 농약 등의 환경오염 물질에 노출되어 영향을 받기 쉬우므로 환경지표로서의 역할을 할 수 있다. 또한 환경의 질을 평가하는 데 있어서 매우 신빙성 있는 척도로 취급되고 있다. 최근 세계 각 지역에서는 개구리의 수가 현저히 감소하는 것이 발견되고 있다. 이런 현상은 개발사업의 영향도 있으

나, 주로 내분비계 장애물질의 영향이라고 보고되고 있다(Stebbin and Cohen 1995; Burkhardt *et al.* 1998). 개구리 등 양서류는 피부호흡을 하므로 내분비계 장애물질의 흡수가 빠르고, 갑상선 호르몬의 작용으로 변태하기 때문에 내분비계 장애물질의 영향을 가장 많이 받는 동물중의 하나이다 (Stebbin and Cohen 1995). 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 발생과정에 수반하는 생식세포의 형성과 분화, 수정과 난할 등에 대한 위해성 평가는 매우 중요하다. 그리고 야생생물 종을 대상으로 내분비계 장애물질이 발생 및 생식에 미치는 영향에 대한 연구는 생명현상의 다양성 및 공통성을 연구하는 비교 연구 측면에서 중요한 의미를 갖는다. 지금까지 야생동물이 내분비계 장애물질에 의해 영향을 받은 것으로 관찰된 현상으로서 악어의 성기크기 왜소화, 붉은귀 거북의 부화수 감소, 어류 수컷의 생식소 발달 저해 및 생식능 감소, 조류의 생식능력 감소 및 부리기형, 등의 생식기계 이상, 기형 등이 있으며, 개구리에 있어서는 기형의 발생등이 있다.

본 연구는 한국 토착 양서류중의 하나인 무당개구리 (*Bombina orientalis*)를 모델로 내분비계 장애물질이 양서류 배아의 발생 및 생존에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 무당개구리 (*B. orientalis*)는 우리나라에서 저지대에서 고지대의 계류에 이르기까지 전역에 많이 분포하며 3월부터 7월까지 비교적 장기간에 걸쳐서 논이나 물가의 웅덩이나 낙엽이 쌓인 곳에서 산란을 한다. 이 시기는 작물의 재배를 위한 농약의 사용이 많은 시기로서 무당개구리를 비롯한 양서류의 서식지 및 산란장소가 논이나 물가의 웅덩이 이기 때문에 이들 농약이 배 발생에 영향을 미치리라 생각된다. 생태계에서 나타나는 내분비계 장애물질의 위해성을 평가하기 위하여 한국형 토착 양서류의 내분비계 장애물질에 대한 biomarker 유전자를 발굴하고자 하였다. 농약과 같은 내분비계 장애물질은 동물의 초기 배아 발생과정에 노출되었을 때 배아의 기형을 유발하거나 죽음을 초래시킨다. 내분비계 장애물질에 의해 생성된 기형의 형태는 여러 가지가 있으나 그중에서 많이 나타나는 기형의 종류는 신경계 및 척추골 기형이다. 따라서 무당개구리 (*B. orientalis*)와 같은 양서류를 이용하여 내분비계 장애물질에 의하여 생성된 기형 올챙이에서 신경계 및 척추골 기형과 관련한 biomarker 유전자를 발굴하고자 하였다. 이러한 biomarker 유전자는 정상과 비교하여 내분비계 장애물질에 노출된 배아 및 올챙이에서 차별적으로 발현이 나타남으로서 내분비계 장애물질에 대한 위해성 평가에 매우 유용하게 이용되리라 생각된다. 또한 이렇게 발굴한 biomarker 유전자는 무당개구리 (*B. orientalis*)뿐만 아니라 한국형 토착 양서류의 다른 개체에도 적용이 가능하리라 생각된다. 현재 한국산 양서류에서

biomarker 유전자를 이용한 위해성 평가에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

무당개구리 (*B. orientalis*)를 이용한 내분비계 장애물질에 대한 위해성 평가와 관련한 biomarker 유전자로 Sox9 유전자를 선택하였다. Sox9 유전자는 배아 발생 과정 중에서 전사인자로 작용하는 SOX 유전자중의 하나로서 연골형성과 신경관형성에 관여하며 또한 연골세포 합성에 관여하는 collagen type II (Col2a1)의 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Bi et al. 1999). 사람에서는 척추기형을 일으키는 Campomelic Dysplasia (CD) 질병에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Wagner et al. 1994). Sox9 유전자의 과발현은 왜소증과 척추 기형을 유발한다는 보고가 있다 (Akiyama et al. 2002). 따라서 농약이 초기 배아 발생에 영향을 미쳤을 경우 신경계에 영향을 미치며, 척추 기형을 유발하는 경우가 많으므로 Sox9 유전자는 biomarker로 적합하리라 생각된다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 채집 및 사육

실험에 사용된 무당개구리(*B. orientalis*)는 강원도 홍천에서 채집하여 한양대학교 실험동물실에서 사육하였다. 실험동물실 수조환경은 온도 20-22℃, 조명 시간 14L:10D로 유지하였다. 먹이로는 mealworm을 주 3회 공급하였으며, 이 시기에 염소성분을 제거시킨 수돗물을 사육수로 사용하여 교환해주었다.

### 2. 무당개구리 난자 및 정자성숙 유도

무당개구리(*B. orientalis*) 난자의 성숙을 유도하기 위하여, 인공수정 24시간 전에 암컷에게 750 IU의 human chorionic gonadotropin (hCG 대성미생물, 경기도, 한국)를 복강에 주사하여 과배란을 유도하였다. 성숙한 정자의 준비를 위하여 수컷에 500 IU의 hCG를 인공수정 24시간 전에 주사하여 정자의 성숙을 유도하였다.

### 3. 인공수정

무당개구리(*B. orientalis*)의 수정란은 인공수정을 통하여 준비하였다. 암컷의 복부를 압박하는 방법으로 난자를 채취하였으며, 정자는 수컷의 정소를 해부, 수집한 후 정소에서 정자를 분리하였다. 준비된 난자와 정자는 0.1X MMR (10 mM NaCl, 0.2 mM KCl, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM HEPES (pH 7.8), 0.01 mM EDTA)용액에서 인공수정을 시행하였다. 수정 방법은 0.1X MMR 용액으로 난자를 3회 세척한 후, 소량의 0.1X MMR 용액에 난자를 담가두었다.

수집한 정소는 1X MMR (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES (pH 7.8), 0.1 mM EDTA) 용액을 이용하여, 정자 현탁액을 만든다. 정자 현탁액을 0.1X MMR 용액에 담겨진 난자에 뿌린 후, 5분간 잘 섞어주면서 수정시켰다. 수정란은 0.1X MMR 용액으로 3회 세척한 후, 배양기(MIR550, Sanyo, Japan)에서 18℃ 조건 하에서 13일간 배양하였다.

#### 4. 약제노출 및 관찰

실험에 사용한 molinate (CAS No. 2212-67-1)과 carbaryl (CAS No. 63-25-2)은 Riedel-de Han (Seelze, Germany)로부터 구입하였으며, 에탄올에 녹여 사용하였다. Molinate 및 carbaryl에 의한 생존율을 조사하기 위하여, 수정란을 molinate (5 uM, 10 uM, 50 uM, 100 uM)와 carbaryl (5 uM, 10 uM, 50 uM, 100 uM)을 처리한 0.1X MMR 용액 0.5L가 들어있는 수조에 넣어 배양기(MIR550, Sanyo, Japan)에서 18℃ 조건 하에서 13일간 배양하였으며, 대조군과 비교 관찰하였다. Molinate 실험군과 carbaryl 실험군의 대조군 수조에는 각각 0.00004%의 에탄올을 처리하였다. 배양액 0.1X MMR 용액은 각각의 약제를 농도별로 처리한 후, 주 3회 교환하였으며, 치사한 배아는 매일 제거하면서 관찰하였다. 본 연구는 각각의 약제 노출에 대하여 4회 반복 실험을 하였다. 유의적 통계 분석은 chi square test와 Fisher's exact를 이용하였다.

#### 5. 무당개구리 Biomarker 유전자 발굴

내분비계 장애물질에 대한 biomarker 유전자 발굴은 척추기형에 관여하는 유전자로서 SOX9 유전자를 선택하였다. 무당개구리에서 SOX9 유전자는 아직 밝혀져 있지 않은 상태이다. 따라서 하등척추동물부터 포유류에 이르기까지 SOX9 유전자의 상동성이 존재하는 유전자 부위를 선택하여 degenerated primer를 제작하여 PCR을 시행하였다. Degenerated primer의 primer sequence는 Forward 5'-CMG RCC CCA AGA RAA CAC YT -3', Reverse 5'-ARA TKG CRT TRG GRG AGA TG -3'이다. PCR은 척추기형이 발생한 무당개구리 올챙이와 정상인 올챙이를 Tri-reagent를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 reverse transcriptase와 oligo-dT primer를 이용하여 42℃에서 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Taq-polymerase, degenerated SOX9 primer와 혼합한 후 PCR 기기를 이용하여 annealing temperature 60℃에서 30 cycle로 시행하였다. PCR 산물은 pGEM T-easy vector에 cloning한 후, sequencing 분석에 의해 무당개구리 SOX9 sequence를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Molinate에 의한 무당개구리 배아의 발생이상

무당개구리 (*B. orientalis*) 수정란을 molinate에 노출시킨 후, 배양한 결과 molinate 농도에 따라 처리한 실험군간의 생존율은 명확히 다르게 나타났다 ( $P < 0.0001$  by chi square test). 13일간 배양한 무당개구리 배아의 생존율은 대조군이 64.2%를 보였으며, molinate 5 uM, 10 uM, 50 uM, 100 uM 처리군에서 배아의 생존율은 각각 52.4%, 43.8%, 33.0%, 23.4%를 나타내었다. 배아의 생존율은 molinate 처리농도에 따라 감소하는 경향을 나타내었는데, 특히 처리농도 50 uM 이상에서는 농도가 높아짐에 따라 생존율은 유의적으로 감소하였다 ( $P < 0.05$ )(Table 1). Molinate를 처리한 배아에서는 몇 가지 유형의 기형이 관찰되었다. Molinate 처리 농도에 따른 기형의 발생은 대조군, 5 uM, 10 uM, 50 uM, 100 uM에서 각각 15.1%, 22.3%, 23.2%, 25.2%, 41.5%의 기형 발생율을 나타내었다 (Table 2). Molinate에 의해 나타난 기형의 유형은 몸통 휨 (bent trunk), 난황마개존재 신경배 (neurulae with yolk plug), 꼬리 휨 (bent tail), 꼬리형성장애 (tail dysplasia), 복부수포 (ventral blister), 눈 미형성 (eye dysplasia), 성장장애 (thick-set body) 및 두부 미형성 (Cephalic dysplasia) 등이 각각 30.0%, 20.0%, 12.3%, 10.8%, 10.8%, 6.2%, 6.2%, 3.8%의 빈도순으로 나타났다 (Table 3, Fig. 1).

### 2. Carbaryl에 의한 무당개구리 배아의 발생이상

무당개구리 (*B. orientalis*) 수정란을 carbaryl에 노출시킨 후, 배양한 결과 처리농도에 따라 실험군간의 생존율은 명확히 다르게 나타났다 ( $P < 0.0001$  by chi square test). 13일간 배양한 무당개구리 배아의 생존율은 대조군이 64.1%를 보였으며, 처리농도 5 uM, 10 uM, 50 uM, 100 uM에서 배아의 생존율은 각각 38.0%, 27.4%, 21.7%, 8.7%를 나타내었다. 배아의 생존율은 carbaryl 처리농도에 따라 감소하는 경향을 나타내었으며, 처리농도 10 uM 이상에서는 농도가 높아짐에 따라 생존율은 유의적으로 감소하는 결과를 보였다 ( $P < 0.05$ ) (Table 4). Carbaryl를 처리한 배아에서는 몇 가지 유형의 기형이 관찰되었는데 carbaryl 처리 농도에 따른 기형의 발생은 대조군, 5 uM, 10 uM, 50 uM, 100 uM에서 각각 14.1%, 21.7%, 11.6%, 15.2%, 2.2%의 기형 발생율을 나타내었다 (Table 5). Carbaryl에 의해 나타난 기형의 유형은 몸통 휨 (bent trunk), 형태이상 (Shape abnormality), 복부수포 (ventral blister), 꼬리 휨 (bent tail), 성장장애 (thick-set body) 등의 기형이 51.7%, 16.7%, 13.3%, 13.3%, 5.0%의 빈도 순으로 나타났다 (Table 6, Fig. 1).

**Table 1** Survival rates of *B. orientalis* embryos exposed to molineate

Molineate ( $\mu$ M)	No of embryos	Surviving embryos (%)							
		Time after fertilization (h)							
		24	48	72	96	144	168	192	312
		Lb	Np	Tb	Mr	Mo	Tc	Tc	Oc
0	106	105 (99.1)	105 (99.1)	98 (92.5)	87 (82.1)	86 (81.1)	74 (69.8)	73 (68.9)	68 (64.2)
5	103	103 (100)	101 (98.1)	97 (94.2)	84 (81.6)	78 (75.7)	68 (66.0)	63 (61.2)	54 (52.4)
10	112	112 (100)	106 (94.6)	93 (83.0)	85 (75.9)	65 (58.0)	59 (52.7)	50 (44.6)	49 (43.8)
50	103	103 (100)	99 (96.1)	89 (86.4)	76 (73.8)	56 (54.4)	55 (53.4)	37 (35.9)	34* (33.0)
100	94	94 (100)	87 (92.6)	78 (83.0)	67 (71.3)	44 (46.8)	43 (45.7)	27 (28.7)	22* (23.4)

Survival of embryos are significantly different among the groups by chi square test  
( $P < 0.0001$ )

\* Significantly different from control by Fisher's exact test ( $P < 0.05$ )

Lb Late blastula, Np Neural plate, Tb Tail bud, Mr Muscle response, Mo Mouth open  
Tc Tail fin circulation, Oc Operculum complete

**Table 2** Frequency of abnormal embryos after molineate treatment

Abnormal conditions	Molineate ( $\mu$ M)						Sum
	0	5	10	50	100		
Bent trunk	6	11	11	3	8		39
Neurulae with yolk plug	0	4	4	12	6		26
Bent tail	2	3	1	2	8		16
Tail dysplasia	0	3	0	4	7		14
Ventral blister	2	0	6	1	5		14
Eye dysplasia	0	2	2	0	4		8
Thick-set body	2	0	2	4	0		8
Cephalic dysplasia	4	0	0	0	1		5
No of abnormal embryos (%)	16 (15.1)	23 (22.3)	26 (23.2)	26 (25.2)	39 (41.5)		130 (25.1)
No of test embryos	106	103	112	103	94		518

**Table 3** Major developmental abnormalities of embryos exposed to molinate

Abnormal conditions	No. of abnormal embryos	% of abnormal embryos
Bent trunk	39	30.0
<u>Neurulae</u> with yolk plug	26	20.0
Bent tail	16	12.3
Tail <u>dysplasia</u>	14	10.8
Ventral blister	14	10.8
Eye <u>dysplasia</u>	8	6.2
Thick-set body	8	6.2
Cephalic <u>dysplasia</u>	5	3.8
Total	130	100.0

**Table 4.** Survival rates of *B. orientalis* embryos exposed to carbaryl

<u>Carbaryl</u> ( $\mu$ M)	No of embryos	Surviving embryos (%)							
		Time after fertilization (h)							
		24	48	72	96	144	168	192	312
		Lb	Np	Tb	Mr	Mo	Tc	Tc	Oc
0	92	91 (98.9)	87 (94.6)	84 (91.3)	81 (88.0)	66 (71.7)	66 (71.7)	64 (69.6)	59 (64.1)
5	92	87 (94.6)	80 (87.0)	74 (80.4)	70 (76.1)	42 (45.7)	42 (45.7)	42 (45.7)	35 (38.0)
10	95	93 (97.8)	83 (87.3)	74 (77.9)	65 (68.4)	31 (32.6)	28 (29.5)	27 (28.4)	26* (27.4)
50	92	87 (94.6)	71 (77.2)	58 (63.0)	52 (56.5)	26 (28.2)	24 (26.0)	23 (25.0)	20* (21.7)
100	92	86 (93.4)	67 (72.8)	51 (55.4)	48 (52.1)	12 (13.0)	9 (9.7)	9 (9.7)	8* (8.7)

Survival of embryos are significantly different among the groups by chi square test (P < 0.0001)

\* Significantly different from control by Fisher's exact test (P < 0.05).

Lb: Late blastula, Np: Neural plate, Tb: Tail bud, Mr: Muscle response, Mo: Mouth open  
Tc: Tail fin circulation, Oc: Operculum complete



**Table 5** Frequency of abnormal embryos after carbaryl treatment

Abnormal conditions	Carbaryl ( $\mu\text{M}$ )					Sum
	0	5	10	50	100	
Bent trunk	10	13	3	5	0	31
Shape abnormality	0	3	3	2	2	10
Bent tail	2	2	3	1	0	8
Ventral blister	1	2	2	3	0	8
Thick-set body	0	0	0	3	0	3
No of abnormal embryos (%)	13 (14.1)	20 (21.7)	11 (11.6)	14 (15.2)	2 (2.2)	60 (13.0)
No of test embryos	92	92	95	92	92	463

**Table 6** Major developmental abnormalities of embryos exposed to carbaryl

Abnormal conditions	No of abnormal embryos	% of abnormal embryos
Bent trunk	31	51.7
Shape abnormality	10	16.7
Bent tail	8	13.3
Ventral blister	8	13.3
Thick-set body	3	5.0
Total	60	100.0



Fig. 1. Various malformations in embryos and tadpoles of *B. orientalis*. (A) Normal, (B) Bent trunk, (C) Bent tail, (D) Cephalic dysplasia, (E) Pectoral blister, (F) Ventral blister, (G) Tail dysplasia, (H) Thick-set body.

### 3. 무당개구리 Biomarker 유전자 발굴

현재까지 Sox9 유전자가 무당개구리 (*B. orientalis*)에서 밝혀지지 않았기 때문에 무당개구리 (*B. orientalis*)에서 Sox9 유전자의 발현을 확인하기 위하여, conserved degenerated primer를 제작하여 Sox9 유전자 발굴을 시도하였으며, 예상되는 PCR 산물 470 bp의 발현을 확인하였다 (Fig. 2). PCR 산물은 염기서열 분석을 하여 무당개구리 특이한 Sox9 유전자임을 밝혀냈으며 양서류인 옴개구리 (*Rana rugosa*), 아프리카물두꺼비 (*Xenopus laevis*) 등의 Sox9 유전자와 염기서열을 비교 분석한 결과 약 85% 정도의 동질성을 보였다. 정상인 올챙이와 약제노출 후 척추골 기형이 유도된 올챙이에서 Sox9 유전자의 발현 양상을 비교한 결과 정상인 대조군에 비하여 척추골 기형이 유도된 올챙이에서 Sox9 유전자의 발현이 4배에서 16배 정도 증가된 발현양상을 보였다. 이러한 결과는 Sox9이 무당개구리 (*B. orientalis*)를 이용한 biomarker 유전자로 사용이 가능함을 제시한 결과이다.

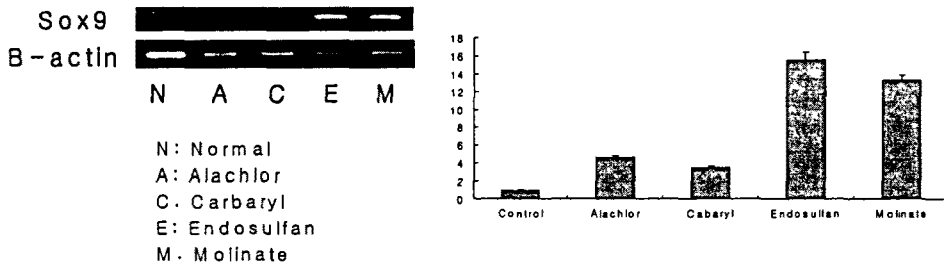


Fig. 2. Expression of sox9 in tadpoles of *B. orientalis*

내분비계 장애물질로 분류된 Molinate와 carbaryl은 우리나라를 비롯하여 전 세계에서 제초제 및 살충제로 많이 사용하는 농약이다. 따라서 이러한 화학물질들은 경작 시기에 농경지나 웅덩이 등의 수서환경에서 산란 및 서식을 하는 양서류에게는 성체뿐만 아니라 배아의 생존에 있어서도 치명적인 영향을 미칠 것이 자명한 사실이다. 본 연구 결과 제초제 molinate를 수정란에 처리한 후, 생존율을 관찰한 결과 처리 농도가 높아질수록 생존율은 감소하는 양상을 보여주었다 (Table 1). 또한 살충제 carbaryl의 경우도 molinate와 마찬가지로 생존율이 처리농도에 의존적인 결과를 나타내었다 (Table 4). 이러한 연구결과는 다른 연구자의 연구 결과인 alachlor (Osano *et al.* 2002; Kang *et al.*, 2004; 2005), endosulfan (Broomhall and Shine 2003; Gendron *et al.* 2003; Goulet and Hontela 2003; Kang *et al.*, 2004), benomyl (Yoon *et al.* 2003) 그리고 diuron (Schuyttema and Nebeker 1998) 등의 농약이 개구리 배아의 발생에서 배아에 유해하게 작용하며, 이들 화학물질의 농도에 의존적으로 생존율이 감소한다는 사실과 유사하다. 이상의 결과를 고찰해보면 이러한 화학물질들은 종류에 따라 정도의 차이는 있지만 양서류 초기배아의 발생에 있어서 유해하게 작용한다는 사실을 인지할 수 있다.

Molinate와 carbaryl은 배아의 발생에 있어서 생존의 영향뿐만 아니라 기형을 유발하는 것으로 나타났다. 본 연구결과 molinate와 carbaryl에 노출된 배아에서는 몇 가지 유형의 기형이 관찰되었다. Molinate에 의해 나타난 기형의 유형은 몸통 휜 (bent trunk), 난황마개존재 신경배 (neurulae with yolk plug), 꼬리 휜 (bent tail), 꼬리형성장애 (tail dysplasia), 복부수포 (ventral blister), 눈 미형성 (eye dysplasia), 성장장애 (thick-set body) 및 두부 미형성 (Cephalic dysplasia) 등이 나타났으며 (Table 2, 3), carbaryl에 의해 나타난 기형의 유형은 몸통 휜 (bent trunk), 형태이상 (Shape abnormality), 복부수포 (ventral blister), 꼬리 휜 (bent tail), 성장장애 (thick-set body) 등의 기형이 나타났다 (Table 5, 6). 이러한 결과는 molinate 및 carbaryl이 무당개구리의 배아 발생과정에 있어 다양한 표적

기관에 작용하여 기형을 유발하는 것으로 생각된다. 또한 이들 화학제에 노출에 의한 배아의 기형에는 유형 및 발생빈도에 차이점을 나타내었지만, 공통적으로 골격계 기형의 발생이 높은 빈도로 나타났다. 이전의 연구에 의하면 Roth (1991)는 골격계 이상은 기형형성물질이 신경계에 영향을 미치기 때문이라고 보고하였다. 또한 Alvarez등 (1995)은 *R. perezii*의 올챙이에 살충제 ZZ-Aphox를 처리하였을 때 골격계의 기형이 나타남을 보고하였다. 따라서 molinate 및 carbaryl등의 화학물질들은 신경계에 기형형성물질로 작용하여 골격계 기형에 많은 영향을 미치는 것으로 사료된다.

생태계에서 나타나는 내분비계 장애물질의 위해성을 평가하기 위해서는 야생동물의 초기배아를 통해서 생존 및 기형의 정도를 관찰하는 것도 매우 중요한 평가방법이다. 그러나 초기배아의 배양을 통한 평가방법은 많은 시간과 노력이 필요한 방법이다. 그래서 위해성 평가를 빠른시간에 할 수 있는 방법으로는 유전자를 통한 평가방법이다. 따라서 한국형 토착 양서류를 이용한 내분비계 장애물질에 대한 biomarker 유전자 개발은 중요하다. 내분비계 장애물질로 작용하는 화학물질들은 여러 가지 기형을 유발시키지만 특히 신경계에 기형형성물질로 작용하여 골격계 기형에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 biomarker로 사용할 수 있는 유전자는 골격계형성에 관여하는 유전자가 가장 적합하리라 생각된다. Sox9 유전자는 연골형성 및 척추기형에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Wagner *et al.* 1994). 무당개구리에서 Sox9 유전자를 확인한 결과 움개구리 (*Rana rugosa*), 아프리카물두꺼비 (*Xenopus laevis*)등의 Sox9 유전자와 약 85% 정도의 동질성을 보였다. 정상인 올챙이와 약제노출 후 척추골 기형이 유도된 올챙이에서 Sox9 유전자의 발현 양상을 비교하였다. 실험결과 정상인 대조군에 비하여 척추골 기형이 유도된 올챙이에서 Sox9 유전자의 발현이 높게 나타났다. 이러한 결과로서 척추골 기형의 무당개구리에서는 정상인 실험군에 비교하여 Sox9 유전자의 발현이 높게 나타나며, 이러한 발현정도로서 내분비계 장애물질의 위해성을 평가할 수 있는 biomarker로 이용이 가능하다고 생각된다.

양서류를 이용한 농약등과 같은 내분비계 장애물질에 대한 위해성 평가에 대한 연구는 *Xenopus laevis*등의 실험 동물로 사육화된 개구리 및 우리나라에 서식하지 않는 개구리를 대상으로 한 연구들이 대부분이다. 그러나 실험동물로 정형화된 모델 (model)동물을 이용한 연구도 중요한 의미를 가질 수 있으나, 우리나라 전역에 걸쳐 서식하는 토착 양서류인 무당개구리의 특성을 이용하여 무당개구리의 서식지 및 산란장소에서의 초기배아와 biomarker 유전자를 이용한 지역의 환경오염에 대한 위해성 평가는 더욱 더 중요한 의미를 가지리라 생각된다. 따라서 본 연구결과는 무당개구리를 비롯한 한국 토착 양서류를 이용한 내분비계 장애물질의 위해성 연구에 있어 중요한 기반이 되리라 사료된다.

## 참고문헌

- Akiyama H, MC Chaboissier, JF Martin, A Schedl and de Crombrughe. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16: 2813-2828.
- Alvarez R, MP Honrubia and MP Herraiez. 1995. Skeletal malformations induced by the insecticides ZZ-Aphox and folidol during larval development of *Rana perezi*. *Arch Environ Contam Toxicol* 28: 349-356.
- Bi W, JM Deng, Z Zhang, RR Behringer and B de Crombrughe. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22: 85-89.
- Bindali BB and BB Kaliwal. 2002. Anti-implantation effect of a carbamate fungicide mancozeb in albino mice. *Ind Health* 40: 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: 473-478.
- Broomhall S and R Shine. 2003. Effects of the insecticide endosulfan and presence of congeneric tadpoles on Australian treefrog (*Litoria freycineti*) tadpoles. *Arch Environ Contam Toxicol* 45: 221-226.
- Burkhart JG, JC Helgen DJ Fort, K Gallager, D Bowers, TL Propst, M Gernes, J Magner, MD Shelby and GLucier. 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: 239-249.
- Gendron AD, DJ Marcogliese, S Barbeau, MS Christin, P Brousseau, S Ruby, D Cyr and M Fournier. 2003. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia* 135 469-476.
- Goulet BN and A Hontela. 2003. Toxicity of cadmium, endosulfan, and atrazine in adrenal steroidogenic cells of two amphibian species, *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana*. *Environ Toxicol Chem* 22: 2106-2113.

- Kang HS, MC Gye, J-S Lee, Y-D Yoon and MK Kim. 2004. Effects of alachlor and endosulfan on the survival and malformation of *Bombina orientalis* embryos. Korean J. Environ. Biol. 22:300-307.
- Kang HS, MC Gye and MK Kim. 2005. Effects of alachlor on survival and development of *Bombina orientalis* (Boulenger) Embryos. Bull Environ Contam Toxicol 74:1199-1206.
- Osano O, W Admiraal and D Otieno. 2002. Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloroacetanilide herbicides and their degradation products. Environ Toxicol Chem 21: 375-379.
- 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: 285-292.
- 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. 62: 179-194.
- Schuytema GS. and AVNebeker. 1998. Comparative toxicity of diuron on survival and growth of pacific treefrog, bullfrog, red-legged frog, and African clawed frog embryos and tadpoles. Arch Environ Contam Toxicol 34: 370-376.
- Stebbins R and N Cohen. 1995. A natural history of amphibians. Princeton Univ. Press.
- Wagner T, J Wirth, J Meyer, B Zabel, M Held, J Zimmer, J Pasantes, F Dagna Bricarelli, J Keutel and E Heustert. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. Cell 79: 1111-1120.
- Yoon CS, JH Jin, JH Park, HJ Youn and SW Cheong. 2003. The fungicide benomyl inhibits differentiation of neural tissue in the *Xenopus* embryo and animal cap explants. Environ Toxicol. 18: 327-337.