

넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 자어의 피부 및 아가미 발달에 미치는 PCBs의 영향

김재원[†], 강주찬 · 마경화* · 이정식*
부경대학교 수산생명의학과, *여수대학교 어병학과

Effect of PCBs on the Skin and Gill Development in the Larval Stage of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Jae Won KIM[†], Ju Chan KANG, Kyung Hwa MA* and Jung Sick LEE*
Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
*Department of Fish Pathology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

Effect of PCBs on the skin and gill development of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* were investigated by histological methodology and morphometric data. The olive flounder were exposed to limit concentration of effluent of PCBs (3.0 µg/L) for 60 days. Skin development can be classified into four stages: SSEL (simple squamous epithelial layer), MCA (mucous cell appearance) & CCA (club cell appearance), DLA (dermal layer appearance), and SEL (startification of epidermal layer) stages. Gill development had five stages: GFA (gill filament appearance), IGFE (identification of early gill filament epithelial cell), MCA (mucous cell appearance), PCA (pillar cell appearance), and FGL (formation of gill lamella) stages. The periods of structural completion of skin and gill were 22-30 days and 23-30 days after hatching in the exposure group, respectively. The process of development of skin and gill of the exposure group was very similar to that of the control group. Therefore, PCBs (3 µg/L) have no influence on the development of skin and gill in the larval stage of olive flounder.

Key word: PCBs, *Paralichthys olivaceus*, Skin, Gill, Development

서론

PCBs는 스테로이드 호르몬과 유사한 기능으로 생체내 호르몬의 작용에 다양한 방법으로 영향을 미쳐 수컷의 생식력을 저하시키는 내분비 장애물질 (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs) 중 하나로 알려지고 있다 (Kavlock et al., 1996). 현재까지 생산된 PCBs의 31% 정도가 전 지구환경에 존재하는데 수서환경으로 계속 유출되면서 그 심각성을 더하고 있다.

PCBs는 이론적으로 209 가지의 이성체가 존재하지만 상용적으로 Aroclor라는 이름으로 100여 가지의 제품이 시판되고 있으며, 이중 Aroclor 1248과 1254가 가장 많이 생산되고 있어서 연안에도 가장 많이 분포한다 (Joo et al., 1998).

어류가 이러한 환경에 노출될 경우, 다른 척추동물과는 달리 피부와 아가미가 물이라는 외부환경과 직접 접촉하기 때문에, 삼투압의 불균형과 환경유해성분 등에 직면하게 되어 상피층의 이상증식을 유발한다 (Hawkes, 1974). 어류 자어의 피부계 발달에 관해서는 가자미류, *Pleuronectes platessa*에서 상피층, 진피층, 염세포 등의 발달과정에 대한 보고 (Roberts et al., 1973)와 청어류, *Clupea harengus* 자어 시기에 철의 영향으로 인해 피부계 미토콘드리아가 위축되

며, 활면소포체가 감소된다는 보고 (Somasundaran, 1985) 등이 있다. 그리고 아가미 형성과정은 감성돔, *Acanthopagrus schlegeli* (Iwai and Hughes, 1977)과 참돔, *Pagrus major* (Yamashita, 1978)의 새엽과 새관형성 과정에 대하여 연구된 바 있으나, 어류 자어의 피부와 아가미에 미치는 오염원의 영향에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 연안 수역에 분포하는 PCBs 등의 오염물질에 발달 초기의 넙치 자어가 노출될 경우, 직접적으로 영향을 받게 되는 피부와 아가미 조직의 변화를 살펴보기 위하여 현재 배출수 허용농도로 알려진 PCBs 3.0 µg/L 농도에서 부화직후부터 변태기에 이르는 자어를 노출시켜 이들의 피부와 아가미 형성에 미치는 PCBs 영향을 조직학적으로 조사하였다.

재료 및 방법

인공수정 시킨 넙치 수정란을 남해안 소재 육상수조식 양어장에서 FRP수조 (Φ=180 cm, 200 L)에서 부화시킨 후 사육하면서 재료로 사용하였다. 먹이생물은 Rotifer, *Artemia* sp. 유생 (26°C, 24시간 부화)을 공급하였으며, 사육수는 미공 여과 (Φ=3 µm) 시킨 자연해수를 사용하였다. 실험에 사용된 재료는 30일간 사육하면서 매일 무작위 추출하였다 (N=120).

본 연구에 사용된 실험용액은 PCBs (Aroclor 1254, Dr.

[†]Corresponding author: kjwol@hanmail.net

Ehrenstorfer GmbH, Germany)를 acetone에 1:1로 녹인 후 중류수로 1 g/L의 표준용액을 만든 다음, 희석하여 조제하였다. 대조구는 PCBs를 첨가하지 않은 일반 해수를 사용하였으며, 노출구의 농도는 현재 배출수 허용농도인 3.0 (± 0.1) $\mu\text{g/L}$ 로 설정하였다.

조직표본은 파라핀 절편법으로 제작하였으며, 제작된 조직표본은 Mayer's Hematoxylin과 0.5% Eosin (H-E)의 비교 염색과 PAS 반응을 실시하였다.

대조구와 노출구의 각 단계의 평균 부화일수의 결과 처리는 spss 통계프로그램 (spss Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시한 후 사후 다중비교는 최소 유의치 검정 (Least-significant difference test)으로 유의성 ($p < 0.05$)을 검정하였다.

결 과

피부계 발달과정

자어기 피부계 발달과정은 크게 4 단계: 단층편평상피 (SSEL, simple squamous epithelial layer) 단계, 점액세포 출현 (MCA, mucous cell appearance)과 곤봉상세포 출현 (CCA, club cell appearance) 단계, 진피층 출현 (DLA, dermal layer appearance) 단계 및 중층상피 (SEL, stratification of epidermal layer) 단계로 구분할 수 있었다. 부화직후 전기 자어의 등쪽과 배쪽에 편평상피세포들이 일자형으로 길게 늘어서고, 부화후 5일에서 9일된 대조구 개체 (3.7-4.9 mm)와 노출구 개체 (3.6-4.7 mm)에서 점차적으로 단층의 편평상피들이 줄지어 나타나는 단층편평상피 (SSEL, simple squamous epithelial layer) 단계가 관찰되었다 (Fig. 1. A).

부화후 11일에서 17일된 대조구 개체 (4.9-6.4 mm)와 노출구 개체 (5.1-6.5 mm)에서 PAS 반응에 양성반응을 나타내는 점액세포 (mucous cell)와 음성 반응을 나타내는 곤봉상 세포 (club cell)가 출현하는 점액세포 출현 (MCA, mucous cell appearance)과 곤봉상세포 출현 (CCA, club cell appearance) 단계가 관찰되었다 (Fig. 1. B).

부화후 18일에서 25일된 대조구 개체 (7.2-9.0 mm)와 부화후 16일에서 22일된 노출구 개체 (6.5-8.9 mm)에서 기저막 아래에 진피층이 나타나는 진피층 출현 (DLA, dermal layer appearance) 단계가 관찰되었다 (Fig. 1. C).

부화후 24일에서 30일된 대조구 개체 (8.8-10.1 mm)와 부화후 22일에서 30일된 노출구 개체 (8.9-10.9 mm)에서

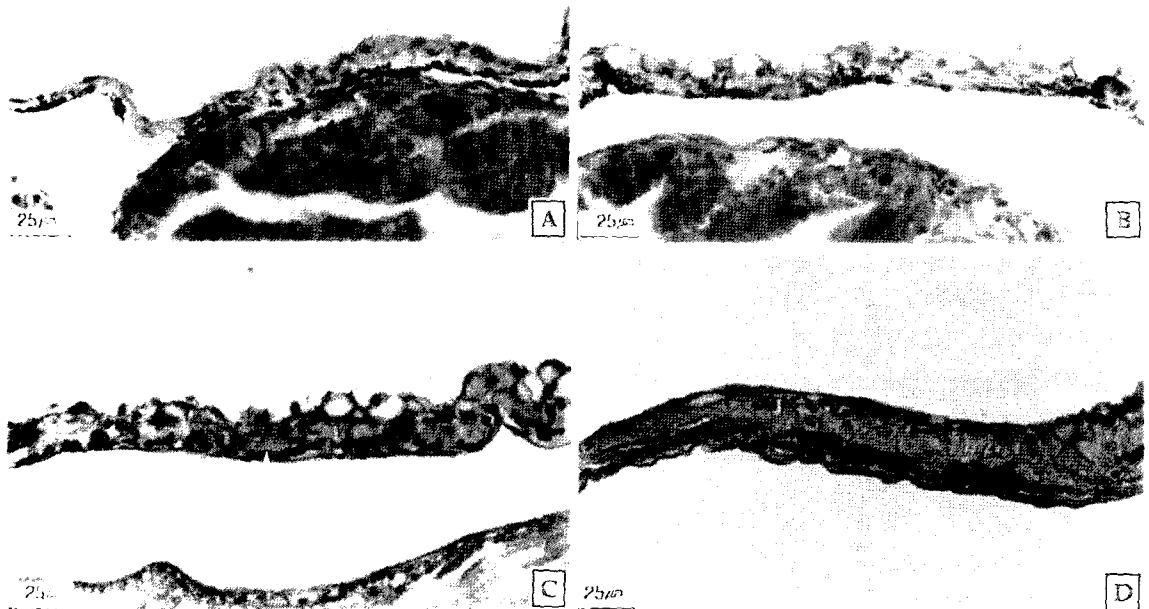


Fig. 1. Development of the skin in the larval stage of *paralichthys olivaceus* by control and exposure (3 $\mu\text{g/L}$ of PCBs) group. A, Section of PAS stain showing simple squamous epithelial layer (control and exposure: 5-9 days after hatching); B, Section of PAS stain showing mucous cell and club cell appearance (control and exposure: 11-17 days after hatching); C, Section of H-E stain showing dermal layer appearance (control: 18-25 days after hatching; exposure: 16-22 days after hatching); D, Section of H-E stain showing stratified epidermal layer (control: 24-30 days after hatching; exposure: 22-30 days after hatching); Note the degenerated epidermal layer. Abbreviations: Bm, basal membrane; Cc, club cell; Ec, epithelial cell; Mc, mucous cell.

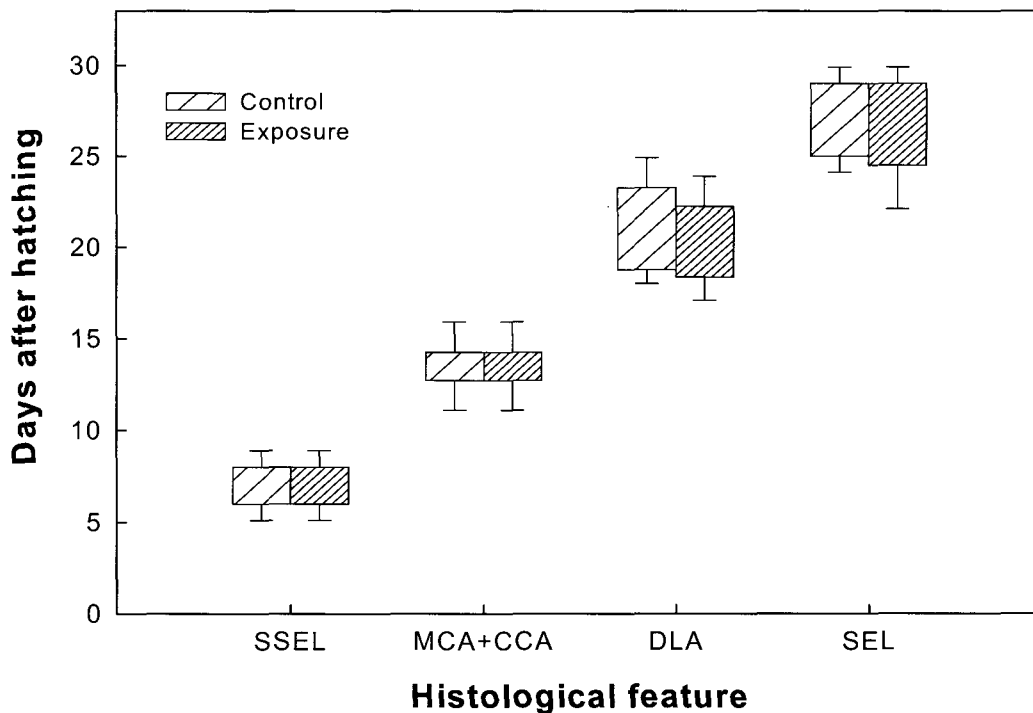


Fig. 2. Comparison of skin development between the control and the exposure (3 µg/L of PCBs) groups in the larval stage of *Paralichthys olivaceus*. CCA, club cell appearance; DLA, dermal layer appearance; MCA, mucous cell appearance; SEL, stratification of epidermal layer; SSEL, simple squamous epithelial layer.

상피층이 다층화되면서 편평형, 입방형 및 원주형 상피세포의 구분이 가능한 중층상피 (SEL, stratification of epidermal layer) 단계가 관찰되었다 (Fig. 1. D).

이와 같은 결과를 Fig. 2에서 보면, 두 실험구 사이에서 넙치의 피부형성은 진피층 형성단계와 상피층 다층화 단계가 노출구에서 대조구보다 약간 빠르게 나타나지만 유의적인 차이는 볼 수 없었다 ($p>0.05$).

아가미 발달과정

자어기 아가미 발달과정은 크게 5 단계: 새엽출현 (GFA, gill filament appearance) 단계, 초기새엽 상피세포 (IGFE, identification of early gill filament epithelial cell) 단계 점액세포 출현 (MCA, mucous cell appearance) 단계, 지주세포 출현 (PCA, pillar cell appearance) 단계 및 새판형성 (FGL, formation of gill lamella) 단계로 구분할 수 있었다.

부화후 1일에서 3일된 대조구 개체 (2.2-3.1 mm)와 노출구 개체 (2.2-3.0 mm)의 전기 자어의 새궁에서 새엽의 분화가 시작되는 것을 알 수 있는 새엽출현 (GFA, gill filament appearance) 단계가 관찰되었다 (Fig. 3. A).

부화후 4일에서 5일된 대조구 개체 (3.5-3.7 mm)와 노출구 개체 (3.3-3.6 mm)에서 각 새궁으로부터 나온 초기 새엽들과 그들을 구성하는 상피세포를 구분할 수 있고 (Fig. 3. B), 후기 자어의 새엽이 더욱 신장되는 (Fig. 3. C) 초기새엽 상피세포 (IGFE, identification of early gill filament

epithelial cell) 단계가 관찰되었다.

부화후 17일에서 22일된 대조구 개체 (6.4-8.5 mm)와 부화후 15일에서 20일된 노출구 개체 (5.9-8.5 mm)에서 점액세포는 PAS반응에 적색의 양성반응을 보이고 모세혈관이 나타나는 진정한 새엽의 형성이 관찰되는 점액세포 출현 (MCA, mucous cell appearance) 단계가 관찰되었다 (Fig. 3. D).

부화후 19일에서 24일된 대조구 개체 (7.6-8.8 mm)와 부화후 17일에서 22일된 노출구 개체 (6.7-8.9 mm)에서 지주세포와 불완전한 새판을 형성하는 지주세포 출현 (PCA, pillar cell appearance) 단계가 정상적으로 관찰되었다 (Fig. 3. E).

부화후 25일에서 30일된 대조구 개체 (9.0-10.1 mm)와 부화후 23일에서 30일된 노출구 개체 (9.0-10.9 mm)에서 진정한 새판을 형성하여 성체와 같은 아가미로 되는 새판형성 (FGL, formation of gill lamella) 단계가 관찰되었다 (Fig. 3. F).

그런데, Fig. 4에서 보는 바와 같이 노출구 자어의 점액세포 및 지주세포 형성단계와 새판 형성단계를 포함한 아가미 발달은 대조구와 유의적인 차이는 없었다 ($p>0.05$).

고 찰

PCBs 농도는 수중에서 보다는 그 수중에 서식하는 수서생물체의 지방 조직에 많이 나타나고 있는데, 이러한 PCBs와 오염물질이 갖는 문제점은 장기간 환경에 존속함으로써 수년간에 걸쳐 생태계에서 끊임없이 순환한다는 점이다.

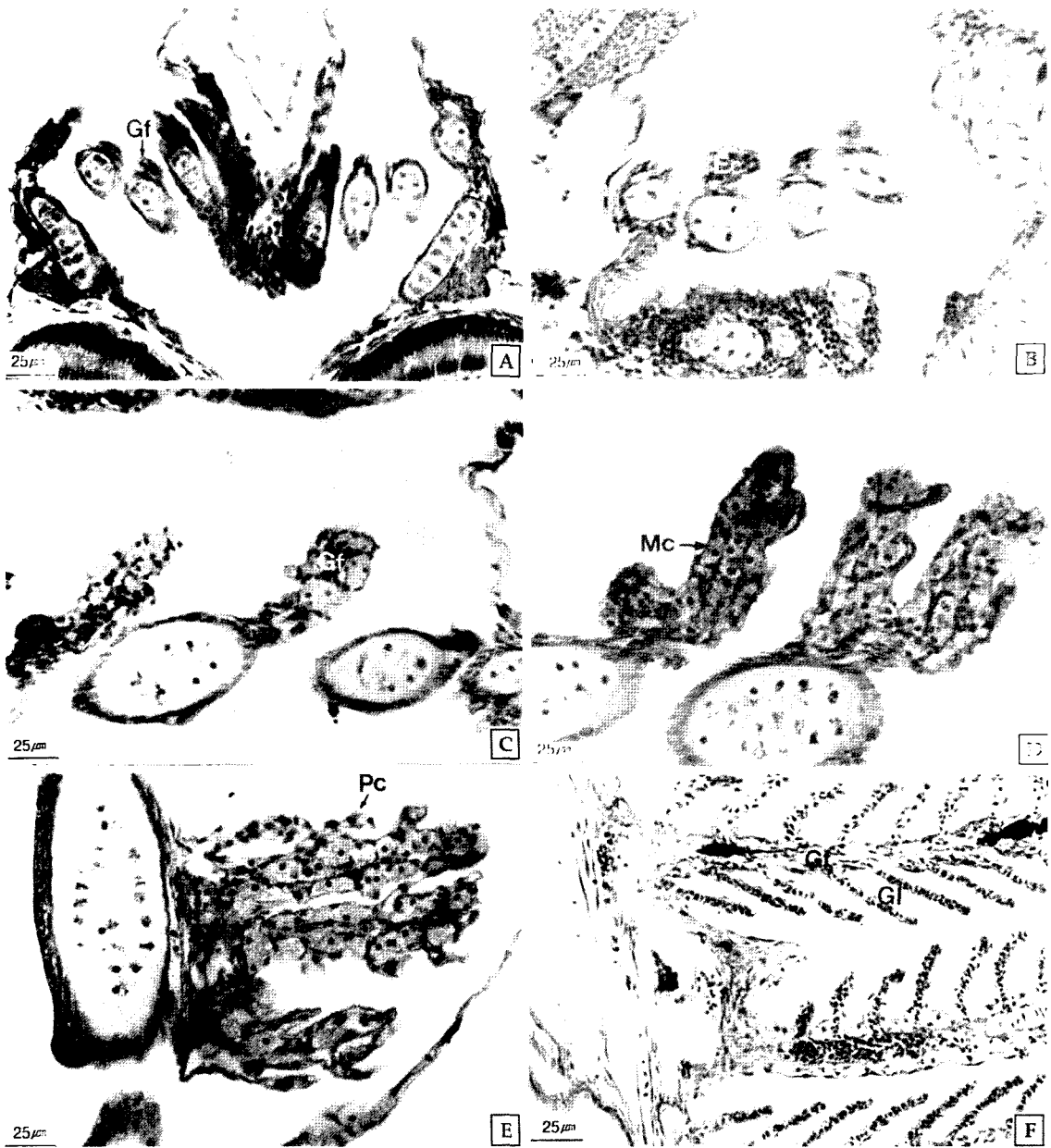


Fig. 3. Development of the gill in the larval stage of *Paralichthys olivaceus* by control and exposure ($3 \mu\text{g/L}$ of PCBs) group. Section of H-E stain showing gill filament appearance (control and exposure: 1-3 days after hatching); B, Section of H-E stain showing identification of epithelial cell of early gill filament (control and exposure: 4-5 days after hatching); C, Section of PAS stain showing elongated gill filament (control and exposure: 4-5 days after hatching); D, Section of H-E stain showing mucous cell appearance (control: 17-22 days after hatching; exposure: 15-20 days after hatching); E, Section of H-E stain showing pillar cell appearance and formation of gill lamella (control: 19-24 days after hatching; exposure: 17-22 days after hatching); F, Section of PAS stain showing the formation of adult gill type (control: 25-30 days after hatching; exposure: 23-30 days after hatching). Abbreviations: Ec, epithelial cell; Gf, gill filament; Gl, gill lamella; Mc, mucous cell; Pc, pillar cell.

대부분 유기화학물질들은 독성영향을 미칠수 있기 전에 체내로 들어가는데, 먹이체인을 통하여 섭취되거나 피부와 아가미를 통하여 직접적으로 섭취된다 (Randall et al., 1996).

따라서 본 연구는 주요 양식 대상어류인 넙치를 대상으로 PCBs에 대하여 직접적인 반응을 보일 것으로 판단되는

피부와 아가미에 대해서 살펴보았다.

피부는 수서환경과 생물체의 경계로서 많은 독성물질들에 대해서 주요한 침입경로가 된다. 부화직후 자어는 대부분 산소흡수와 이온조절을 피부에서 수행한다고 하였으며 (Daye and Garside, 1980; Rombough, 1988; Conklin et al.,

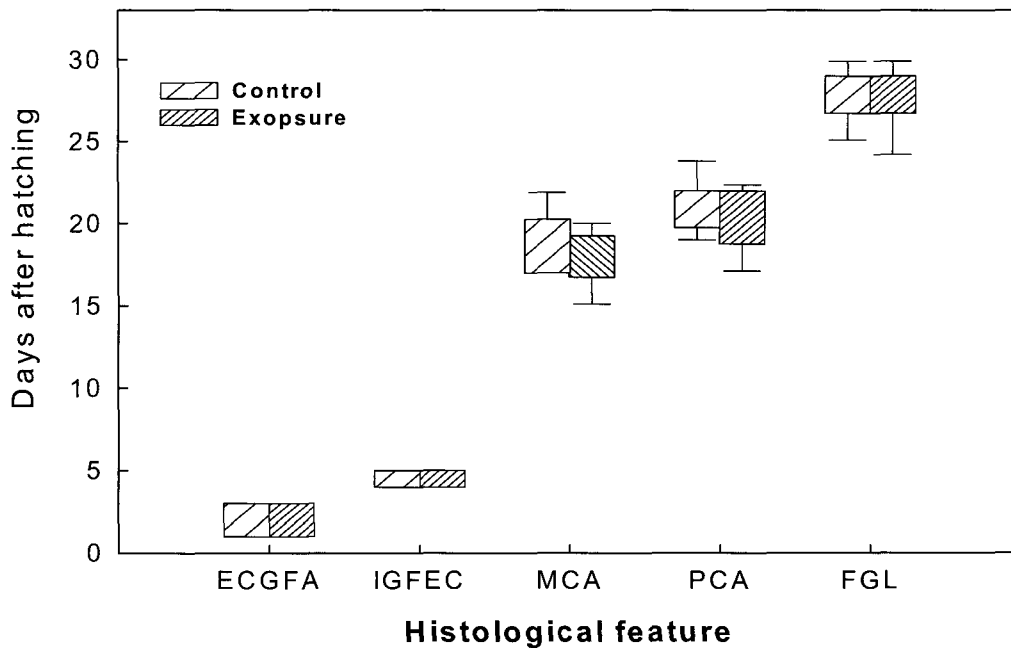


Fig. 4. Comparison of gill development between the control and the exposure (3 µg/L of PCBs) groups in the larval stage of *Paralichthys olivaceus*. ECGFA, epithelial cell of gill filament appearance; FGL, formation of gill lamella; IG FEC, identification of early gill filament epithelial cell; MCA, mucus cell appearance; PCA, pillar cell appearance.

1992), 부화직후 가자미류, *Pleuronectes platessa* 자어의 피부는 여러 중요한 생리적 기능으로 피부 표면의 기본적인 방어 역할 이외에 선택적인 삼투조절막과 호흡수송 부위로 작용한다고 한다. 이 종의 피부의 발달과정을 살펴보면, 부화직후의 표피두께는 5 µm로서 불규칙하였으며 부화후 10일에 점액세포가 나타나고 부화후 40일에 성체와 같은 형태를 갖추었다고 보고하였다 (Roberts et al., 1973).

본 실험에서는 넙치 부화직후의 두께는 약 5-10 µm였으며 점액세포는 대조구와 노출구에서 부화후 11-17일에 관찰되었고 성체와 같은 피부 형태는 부화후 30일에 나타났으나 PCBs에 따른 피부 발달양상에 대해서는 큰 차이를 볼 수 없었다.

아가미는 호흡의 주요 부위로서, 항상 물과 항상 밀접하게 접촉되어 있어 수중에 녹아있는 중요한 오염물의 표적으로 되는 대표적인 기관이며 (Pawert et al., 1998), 물과 혈액 사이의 밀접한 관련성 때문에 환경 오염물질에 강하게 영향을 미친다 (Abel, 1974; Rombough and Garside, 1977). 대부분 수중에 녹아있고 부유입자와 결합된 오염물들은 호흡이나 먹이섭취에 의해 인두를 경유하여 체내로 들어간다.

지금까지 보고된 어류의 아가미 발달과정을 보면, 참돔, *Pagrus major*의 경우 부화 후 60시간에 새엽이 형성되었고, 부화 후 15일에 이차새엽이 형성되었으며, 부화 후 20일에 성체와 같은 구조를 형성한다고 하였다 (Yamashita, 1978). 그리고 감성돔, *Acanthopagrus schlegelii*의 경우는 부화 후 20일에 새엽이 완전하게 형성된다고 하였다 (Iwai and

Hughes, 1977). 본 실험에서는 부화 후 1-3일에 새엽 원기를 볼 수 있고, 부화 19일에 새관형성이 관찰된 후 노출구에서는 부화 후 23일, 대조구에서 부화 후 25일에 성체와 같은 아가미를 처음으로 관찰할 수 있었으며 PCBs가 아가미 조직의 분화에 미치는 영향은 큰 차이를 볼 수 없었다. 한편, 아가미 세포에 의해 분비되는 점액의 중요한 생리적인 기능은 xenobiotics와 같은 환경 영향물질로부터 얇고 민감한 아가미 상피를 방어하는데, 점액의 과다분비는 아가미상피의 가스교환을 방해하는 원인이 된다 (Pawert et al., 1998)고 하였으나, 본 실험에서는 점액세포가 대조구 17-22일, 노출구 15-20일에 관찰되었지만 점액세포의 이상은 관찰되지 않았다. 청어, *Clupea harengus*에서 아가미는 난황낭을 가진 자어 단계중에 존재하지 않고, 호흡교환은 거의 체표면에서 발생된다는 보고 (Blaxter and Holliday, 1963)에서 보듯이 부화직후 단계의 자어에서 아가미보다는 피부에서 모든 생리적 기능을 담당하는 것으로 사료된다.

본 실험 결과는 생존율이 가장 낮은 민감한 시기에 넙치 자어가 수중의 배출허용농도인 3.0 µg/L의 PCBs에 노출된 경우에 1차적인 영향을 받을 것으로 판단되는 피부와 아가미의 발달과정에 대한 특징과 기능을 살펴본 것으로 대조구와 비교하여 차이점을 보여주지 않았다.

사 사

본 연구는 1999년 학술진흥재단의 신진연구인력 연구장려금에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Abel, P.D. 1974. Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. *J. Fish Biol.*, 6, 269-278.
- Blaxter, J.H.S. and F.G. Holliday. 1963. The behaviour and physiology of herring and other clupeids. *Adv. Mar. Biol.*, 1, 261-393.
- Conklin, D.J., R.C. Mowbray and W.H. Gingerich. 1992. Effects of chronic exposure to soft, acidic water on gill development and chloride cell numbers in embryonal larval brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Aquat. Toxicol.*, 22, 39-52.
- Daye, P.G. and E.T. Garside. 1980. 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.*, 58, 27-43.
- Hawkes, J.W. 1974. The structure of fish skin. I. General organization. *Cell Tiss. Res.*, 149, 147-158.
- Iwai, T. and G.H. Hughes. 1977. Preliminary morphometric study on gill development in black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 43(8), 929-934. (in Japanese)
- Joo, Y.J., M.O. Gu, J.H. Jeong and G.H. Jeong. 1998. Distribution status of PCBs in fishes of Høedong reservoir and in the sediments of upper stream of the Sooyoung river. *Environ. Anal.*, 1(1), 75-82.
- Kavlock, R.J., G.P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L.E. Gray, S. Kaatari, G. Lucier, L. Luster, M.J. Mac, C. Macza, R. Miller, J. Moore, R. Rolland, G. Scott, D.M. Sheehan, T. Skins and H.A. Tilison. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Persp.*, 104, 715-740.
- Pawert, M., E. Müller and R. Triebkorn. 1998. Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. *Tiss. Cell.*, 30, 617-626.
- Randall, D.J., C.J. Brauner, R.V. Thurston and J.F. Neuman. 1996. Water chemistry at the gill surfaces of fish and the uptake of xenobiotics. In: *Toxicology of Aquatic Pollution*. E.W. Taylor, ed. Cambridge University Press, U.K., pp. 1-14.
- Roberts, R.J., M. Bell and H. Young. 1973. Studies on the skin of plaice *Pleuronectes platessa*. II. The development of larval plaice skin. *J. Fish Biol.*, 5, 103-108.
- Rombough, P.J. and E.T. Garside. 1977. Hypoxial death inferred from thermally induced injuries at upper lethal temperatures, in the banded killifish, *Fundulus diaphanus*. *Can. J. Zool.*, 55, 1705-1719.
- Rombough, P.J. 1988. Respiratory gas exchange, aerobic metabolism, and effects of hypoxia during early life. In: *Fish Physiology*, W.S. Hoar and D.J. Randall, ed. Academic Press, New York, pp. 59-161.
- Somasundaran, B. 1985. Effects of zinc on epidermal ultrastructure in the larva of *Clupea harengus*. *Mar. Biol.*, 85, 199-207.
- Yamashita, K. 1978. Differentiation of the gill structure in larvae of the red seabream, *Pagrus major*. *Japan. J. Ichthol.*, 25, 141-148. (in Japanese)

2002년 10월 8일 접수
2003년 4월 4일 수리