

## 알킬페놀류 화합물의 양서류 발생독성: 종설

박찬진 · 안혜선 · 안효민 · 계명찬\*

(한양대학교 자연과학대학 생명과학과)

**Developmental Toxicity of Alkylphenols in Amphibians: A Review. Park, Chan Jin, Hae Sun Ahn, Hyo Min Ahn and Myung Chan Gye\* (Department of Life Science and Institute for Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)**

Aquatic contamination by organic pollutants has been a suspected reason for rapid decrease of amphibian populations whose embryonic and larval stages are in an aquatic environment. Amphibian embryos can be a useful model to study the ecotoxicological impacts of aquatic pollutants. The obtained toxicological data are useful references for the management of aquatic pollutants in public health because amphibia share many developmental events with terrestrial vertebrates including humans. Safety guidelines for the toxicological effects of aquatic contaminants of chemicals identified as hazardous should be addressed at multiple endpoints. Alkylphenols have been widely-used in agricultural, industrial, and household activities; they contaminate and can persist in aquatic environments. Exposure to alkylphenols results in endocrine disruption in aquatic animals. In this review, we summarize the developmental toxicities of alkylphenols in amphibian embryos and larva according to the exposure route, chemical concentration, duration of exposure, and affected developmental stage together with mechanisms of toxicity and typical patterns of developmental abnormality. The merits of amphibian embryos as a toxicity test model for mid- to long-term exposure to aquatic pollutants are discussed and proposed.

**Key words : developmental toxicity, alkylphenols, amphibia**

## 서 론

양서류는 초기발생과 유생시기를 수중에서 보내고, 변태를 거친 이후 특정 수생양서류를 제외한 대부분의 종이 육상생활을 하는 척추동물이다. 이러한 생활사적인 특징으로 인해 진화적, 생태학적으로 육상과 수생태계의 매개자로서의 역할을 갖는다. 양서류 배아는 모체로부터 독립적으로 수환경 내에서 초기발생을 진행하기 때문에 양서류는 수정 이후부터 변태를 마치기까지 수환경에 존재하는 다양한 화학물질에 노출될 수 있다. 특히 대부분의 무미양서류의 유생은 수중 퇴적층에 존재하는 영양입자

를 섭식하거나 유기물을 갉아먹는 습성을 갖기 때문에 용존오염물질 뿐 아니라 저층 퇴적물에 흡착되어 있는 비용존 오염물질에 쉽게 노출된다. 또한, 변태를 마친 개체들은 육상생태계의 먹이사슬에서 중간소비자로서 역할하며, 이 과정에서 생물농축 효과가 나타날 수 있다. 이처럼 다양한 경로를 통해 물속의 오염물질에 노출될 수 있는 양서류는 수생태계의 건강도를 대변하는 지표로서 배아 또는 유생을 이용한 독성평가가 비교적 용이하며, 이를 활용한 생물학적 독성분석에 적극적으로 활용되고 있다(Boyer and Grue, 1995; Lahr, 1997; Loeffler *et al.*, 2001; Bogi *et al.*, 2003; Kloas and Lutz, 2006). 양서류 배아를 이용한 대표적인 발생독성시험법으로서 Frog Em-

\* Corresponding author: Tel: 02) 2220-0958, Fax: 02) 2298-9646, E-mail: mcgye@hanyang.ac.kr

bryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX)가 개발되었다. 이 시험법은 화학물질 및 환경시료의 독성을 평가하는 시험법으로 아프리카발톱개구리(*Xenopus laevis*) 포배 단계 배아에 시험대상 물질을 96시간 처리 후 반수치사 농도(LC<sub>50</sub>; Median Lethal Concentration), 기형 발생율에 근거한 반수유효농도(EC<sub>50</sub>; Median Effective Concentration)를 산출하여 이를 통해 최기형성지수(TI; Teratogenicity Index)를 산출하고 최소성장저해농도(MCIG; Minimum Concentration to Inhibit Growth)를 제시하는 시험법이다(ASM; American Society For Testing Materials, 1993).

내분비계장애물질(Endocrine Disrupting Chemical, EDCs)은 생물체 내부의 호르몬의 작용을 교란하여 다양한 독성효과를 발휘한다. 최근 EDCs는 이 지구적 양서류 감소의 원인 중 한가지로 지목받고 있다(Blaustein and Wake, 1995; Carey and Bryant, 1995; Houlihan *et al.*, 2000). 알킬페놀류 화합물(alkylphenols; APs)은 대표적인 EDCs로서 이들이 양서류의 발생에 미치는 영향은 다양한 종을 통해 분석되었다(Mann and Bidwell, 2000; Sone *et al.*, 2004; Hogan *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2010). 알킬페놀류 화합물은 양서류 배아의 생존, 기형발생, 성장, 기관분화 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 그 독성의 강도 및 작용 메커니즘은 물질에 따라 차이가 있다. EDCs는 수환경에 잔류하며, 양서류를 비롯한 다양한 수서생물의 발생을 교란 할 수 있기 때문에 이들 화합물에 의한 생물독성을 정확히 평가하고 이들 물질의 생산 및 사용에 대한 허용기준 및 규제방안을 설정하는 것은 육수환경의 보존과 관리에 매우 중요하다. 본 소고에서는 현재까지 수행된 다양한 양서류 배아독성평가 연구자료를 분석하고 이를 기반으로 국내 토종양서류를 이용한 독성연구에 활용될 수 있도록 4가지 주요 알킬페놀류 화합물의 양서류 발생독성 연구자료를 분석하였으며, 알킬페놀류가 에스트로젠과 유사한 생물학적 효과를 갖기 때문에 천연에스트로젠의 배아발생독성에 대해서도 조사하였다.

## 문헌자료의 검색

APs의 양서류 배아에 대한 발생독성 연구결과 분석을 위해 NCBI(National Center for Biotechnology Information), Pubmed(www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed), NDSL(National Discovery for Science Leaders; www.ndsl.kr)을 통해 자료를 수집하였다. 자료수집에 사용된 키워드는

'Amphibia(양서류)', 'Frog(개구리)', 'Urodela(유미목)', 'Anura(무미목)', 'Embryo(배아)', 'Alkylphenol(알킬페놀)', 'Bisphenol(비스페놀)', 'Nonylphenol(노닐페놀)', 'Octylphenol(옥틸페놀)', 'Toxicity(독성)', 'Malformation(기형)', 'Estrogenic(에스트로젠성)', 'Survival(생존)', 'Development(발생)', 'FETAX' 등을 다양하게 조합하여 사용하였다. 이를 통해 알킬페놀류에 의한 양서류 배아발생 독성정보를 제공하는 국외 24편의 논문이 검색되었고, 국내논문은 검색되지 않았다. 이외에 양서류 배아를 이용한 독성시험과 관련하여 시험법 및 모델 양서류의 발생단계 설명을 위해 3개의 문헌을 추가로 참조하였다(Gosner, 1960; Nieuwkoop and Faber, 1967; ASTM, 1993). 검토한 문헌들은 1993~2011년까지의 연구결과들로서 대상 물질의 종류는 17 $\beta$ -estradiol(E2)을 포함하여 bisphenol A(BPA), nonylphenol(NP), nonoylphenol ethoxylate(NPE), octylphenol(OP) 등 5가지였다. 실험양서류 종 수는 *X. laevis*를 포함하여 5종으로 이들에게서 나타난 발생독성 자료를 정리하였다(Table 1).

## 양서류 발생독성

### 1. Bisphenol A

수정 후 4일이 경과 된 Nieuwkoop Faber stage(NF stage) 43~45 *X. laevis* 유생에 BPA를 유수식으로 90일간 노출시킨 장기독성실험에서 유생의 생존율에 대한 최저영양농도(LOEC; Lowest Observed Effect Concentration)는  $>0.5 \text{ mg L}^{-1}$ , 무영양농도(NOEC; No Observed Effect Concentration)는  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ 였으나, 유생의 성장에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Pickford *et al.*, 2003). *X. laevis* 배아를 이용해 BPA와 E2의 발생독성을 비교한 연구에서는  $10 \mu\text{M}$ 의 BPA는 배아의 생존 및 기형발생에 유의한 영향을 미치지 못하였지만 동일농도의 E2는 체축기형을 유발하여 만곡증을 갖는 유생의 비율이 유의하게 증가하였다. BPA는 비교적 높은 농도인  $25 \mu\text{M}$  처리 시 기형 발생율이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다(Iwamuro *et al.*, 2003). *X. laevis* 배아를 수정 후 3~96시간 동안 다양한 농도의 BPA 및 E2에 노출시켰을 때  $20 \mu\text{M}$  이상의 BPA와 E2는 배아의 사멸 및 기형발생을 유발하는 것으로 확인되었으며, BPA만이 길이성장을 저해하였다. 실험개시시점 기준으로 3~48시간에 걸쳐 BPA를 처리하였을 때 소두증, 만곡증, 부종, 장의 비정상적 꼬임 등을 비롯한 길이성장의 저해가 가장 높은 빈도로 출현하였지만 12~60시간, 24~72시간,

**Table 1.** Summary of the effects of alkylphenols on amphibian embryo development.

Chemicals	Species	Exposure (Conc. <sup>a</sup> / Route/Stage/Duration)	Effects	References
Bisphenol A	<i>X. laevis</i>	0.83, 2.1, 9.5, 23.8, 100, 497 $\mu\text{g L}^{-1}$ /Water/Stage 43/ Stage 45 ~ 66 tadpoles	No effect on survival, growth, developmental stage distributions at exposure days 32 and 62, or mean time to completion of metamorphosis	Pickford <i>et al.</i> , 2003
		25 ~ 30 $\mu\text{M}$ /Water/ Stage 7 embryos/72 h	Malformation of the head region, curved vertebrate, and suppression of organogenesis	Iwamuro <i>et al.</i> , 2003
		20 $\mu\text{M}$ /Water/Stage 6/ Stage 40	Crooked vertebrae and developmental defects of the head and abdomen apoptosis in brain and spinal cord	Oka <i>et al.</i> , 2003
		20 $\mu\text{M}$ /Water/Embryo/4 days	Teratogenic effect, growth inhibition	Sone <i>et al.</i> , 2004
		50 or 100 $\mu\text{M}$ /Water/ Stage 10.5/Stage 28	Decreased expression of Pax6 and ESR1 in a dose-dependent manner in the central nervous system and eyes	Imaoka <i>et al.</i> , 2007
		10 $\mu\text{M}$ /Water/ Stage 10.5/Stage 45	Coliosis, eye dysplasia, and loss of pigments	Baba <i>et al.</i> , 2009
Nonylphenol	<i>X. laevis</i>	0.1 ~ 10 $\mu\text{M}$ /Water/ embryos/48 h	10 $\mu\text{M}$ /dead 1 $\mu\text{M}$ /crooked backs, kinked tails, poorly developed somites and dorsal fins, and "chicken-beaked" cement glands 100 nM ~ 5 $\mu\text{M}$ /significant differences in the numbers and the patterning of neural crest-derived melanocytes in embryos	Bevan <i>et al.</i> , 2003
		20 $\mu\text{M}$ /Water/Embryo/4 days	Teratogenic effect	Sone <i>et al.</i> , 2004
	<i>B. orientalis</i>	5 $\mu\text{M}$ /Primary culture/ neural plate cell/36 h	NGF-induced neurite outgrowth inhibition	Bevan <i>et al.</i> , 2006
		0.1 $\mu\text{M}$ /Water/ 2-cell embryos/24 days	Inhibition of melanocyte expansion in tadpoles	
		0.1 $\mu\text{M}$ /Water/ 2-cell embryos/7 ~ 9 days	Growth inhibition	Park <i>et al.</i> , 2010
		1 $\mu\text{M}$ /Water/ 2-cell embryos/10 days	Decreased survival rate of tadpoles 96 h LC <sub>50</sub> -0.24 mg L <sup>-1</sup>	
Nonylphenol ethoxylate	<i>X. laevis</i>	0.1 ~ 10 mg L <sup>-1</sup> /Water/ Blastula/NF stage 46	96 h LC <sub>50</sub> -3.6 ~ 5.7 mg L <sup>-1</sup> 96 h LC <sub>50</sub> -2.4 ~ 4.7 mg L <sup>-1</sup> MCIG-1.0 ~ 3.0 mg L <sup>-1</sup>	
	<i>L. adalaidensis</i>	0.1 ~ 10 mg L <sup>-1</sup> / Water/Blastula/ Gosner stage 24	140 h LC <sub>50</sub> -9.1 ~ 9.4 mg L <sup>-1</sup> 140 h LC <sub>50</sub> -8.7 ~ 8.9 mg L <sup>-1</sup> MCIG-2.0 ~ 6.0 mg L <sup>-1</sup>	Mann and Bidwell, 2000
	<i>C. insignifera</i>	0.1 ~ 10 mg L <sup>-1</sup> /Water/ Blastula/Gosner stage 24	134 h LC <sub>50</sub> -6.1 ~ 6.6 mg L <sup>-1</sup> 134 h L <sub>50</sub> -4.2 ~ 4.9 mg L <sup>-1</sup> MCIG-4.0 mg L <sup>-1</sup>	
Octylphenol	<i>X. laevis</i>	500 nM/Water/Stage 10.5/ Stage 37	Decreases body length increased percent of embryos with dorsal curvature	Bevan <i>et al.</i> , 2003
		1 $\mu\text{M}$ /Water/Stage 10.5/ Stage 37	Decrease of embryonic survival rate	
	<i>R. pipiens</i>	0.25 $\mu\text{M}$ /Water/Stage 36/ 2 weeks	Decreased survival rate of tadpoles	Hogan <i>et al.</i> , 2006

<sup>a</sup>ConcentrationsPresented data were collected from Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>).

As a key word, (amphibia, frog, urodela, or anura) and (alkylphenol, bisphenol, nonylphenol, or octylphenol) and (toxicity, malformation, estrogenic, survival, development, embryo, or FETAX) were used for survey.

36~84시간, 48~96시간에 걸친 BPA 처리는 앞에서 언급된 기형발생에 영향을 미치지 않았다. 반면, E2는 처리 시간에 상관없이 다양한 기형을 유발하는 것으로 확인되었다(Sone *et al.*, 2004). 이러한 결과로부터 BPA에 의해 유발되는 양서류 배아의 발생기형은 E2 노출과는 그 민감한 시기가 다를 수 있다. 현재로서는 BPA의 양서류 배아 발생기형유발 효과가 에스트로젠의 독성메커니즘과 유사한 것인지 확실하지 않지만 노출에 민감한 시기가 다르므로 E2와는 다른 발생학적 사건에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

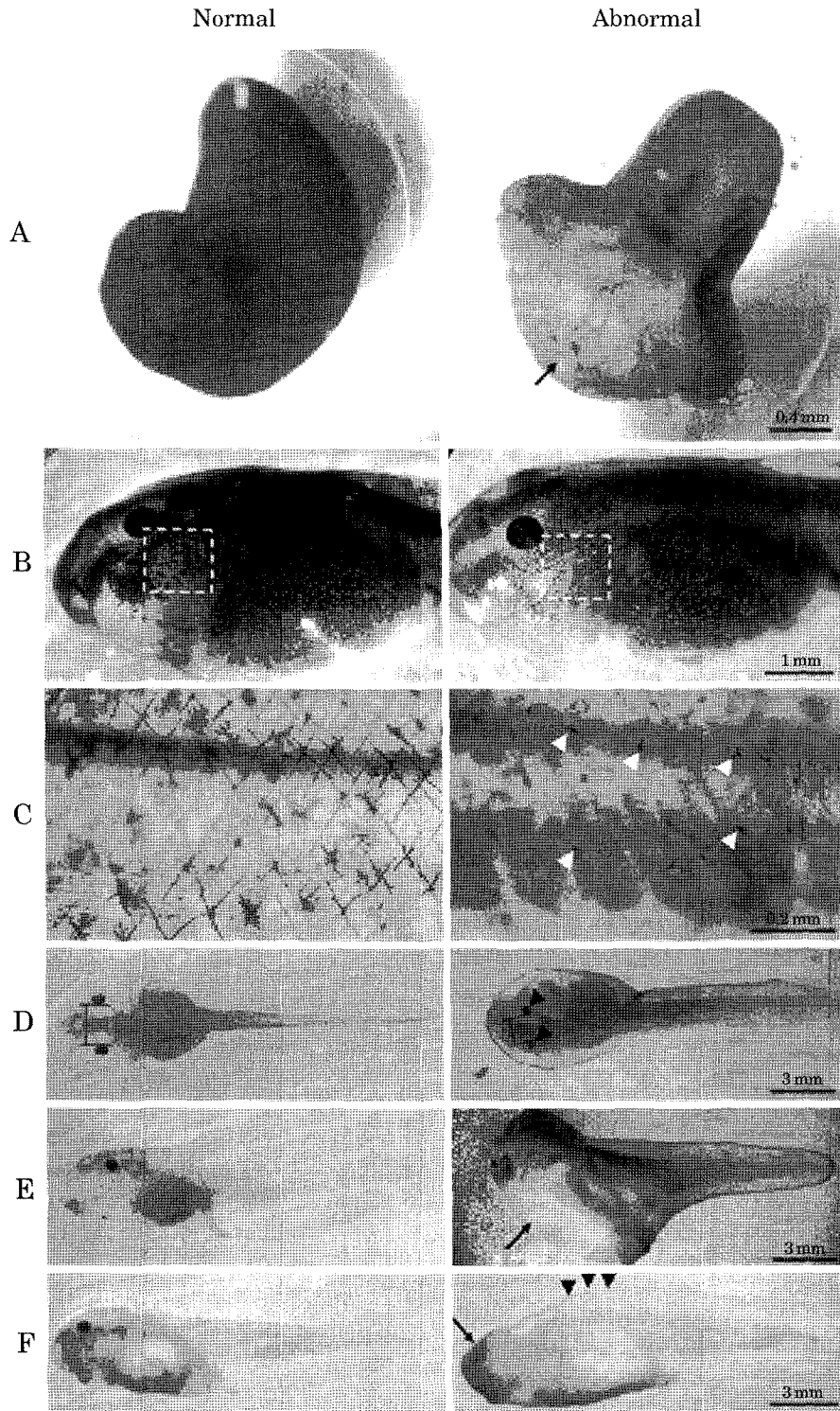
*X. laevis* 수정란에 BPA를 노출시킨 다른 연구에서 40~100  $\mu\text{M}$ 의 BPA는 낭배형성단계 배아를 사멸시키는 것으로 확인되었으며, 20  $\mu\text{M}$ 의 BPA는 배아의 신경관형성장애 및 부화한 유생의 만곡증 및 두부의 형태적 이상을 유발하였다. TUNEL실험을 통해 20  $\mu\text{M}$ 의 BPA가 중추신경세포의 세포사(apoptosis)를 유발하는 것이 확인되었으며, 정상적인 중추신경계 형성이 저해되는 것으로 나타났다. 그러나 E2 처리 시 이러한 현상이 관찰되지 않아 BPA에 의한 중추신경계 손상은 에스트로젠성 효과가 아닌 것으로 추정되었다(Oka *et al.*, 2003).

*X. laevis*에서 BPA 노출에 따른 배아의 기형유발과 관련한 유전자 발현 분석연구 결과 BPA를 50, 100  $\mu\text{M}$ 으로 처리했을 때 눈의 형태발생의 주요 조절인자인 Pax-6와 포유동물의 신경분화 조절에 주요인자인 ESR-1 mRNA의 발현양이 처리된 BPA 농도 의존적으로 감소하였으며, *in situ* 분석에서 BPA처리에 의해 중추신경계와 눈에서 이들 유전자의 발현이 감지되지 않았다(Imaoka *et al.*, 2007). 이와 유사한 연구결과로서 10~20  $\mu\text{M}$ 의 BPA가 *X. laevis* 배아 발생 중 만곡증, 눈 형성 장애, 착색 이상 등을 유발하였다. 특히, 신경배(neurula)단계에 BPA에 노출될 경우 기형발생 빈도가 급격히 증가되는 것으로 관찰되었으며, BPA에 노출된 신경배에서 눈과 두부 형성에 관여하는 pax6, sox2, FoxD3 mRNA 및 Notch 신호에 반응하는 인자인 ESR-1 mRNA의 발현이 감소하였다. 이러한 현상은 BPA가 Notch 수용체-기질 결합 반응 후의 Notch 수용체의 S3 cleavage site의 분할에 관여하는  $\gamma$ -secretase의 활성을 저하시킨 것이 원인으로 밝혀졌다(Baba *et al.*, 2009). Notch 신호전달은 초기배아발생 과정에서 신경배 단계의 신경관과 신경관(neural crest)분화 및 중배엽(mesoderm)형성을 조절하는 것으로 알려져 있어(Kuriyama *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2006),  $\gamma$ -secretase의 활성저하는 신경배의 정상적인 분화를 저해할 수 있다. 또한, BPA(2 phenol group, 2 methly group) 유사물질인 bisphenol E(2 phenol group, 1 methly group),

bisphenol F(2 phenol group, no methly group), dimethyl-bisphenol A (DMBPA; 2 phenol group, 2 methly group)를 처리한 결과 DMBPA만이 BPA와 같이  $\gamma$ -secretase의 활성을 저하시키는 것으로 나타나 BPA의 Notch 신호전달체계 교란으로 인한 양서류 배아의 기형 발생은 폐놀기에 의한 에스트로젠성 효과가 아니라 BPA가 갖는 2개의 메틸기에 의한 현상임이 확인되었다(Baba *et al.*, 2009). BPA의 신경배 형성 및 눈 형성에 대한 억제 효과는 한국산 양서류인 무당개구리(*Bombina orientalis*)를 이용한 연구에서도 확인되어 이러한 효과는 *X. laevis* 뿐만 아니라 다양한 양서류에 공통된 현상으로 사료된다(Fig. 1A, D).

## 2. Nonylphenol

*X. laevis* 배아를 수정 후 3~96시간 동안 다양한 농도의 NP에 노출시켰을 때 10  $\mu\text{M}$  이상의 NP는 배아의 기형발생을 유발하였으며, 20  $\mu\text{M}$  이상의 NP는 배아의 성장을 저해하였고 30  $\mu\text{M}$  이상의 NP는 배아의 사멸을 유발하였다. 또한, 발생기형의 패턴으로서 소두증과 부종을 갖는 기형 개체의 출현빈도는 실험개시시점 기준으로 24~2시간에 걸쳐 NP를 처리하였을 때 가장 높은 빈도로 출현하였으며, 유생의 만곡증 유발 및 길이성장 감소는 실험개시시점 기준으로 48~96시간에 걸쳐 NP를 처리하였을 때 가장 높은 빈도로 출현하였다. 또한 비정상적으로 꼬인 장을 갖는 개체의 출현빈도는 24~84시간에 걸쳐 NP를 처리하였을 때 가장 높게 나타났다(Sone *et al.*, 2004). 이 결과에서 NP는 BPA에 비해 비교적 E2와 유사한 기형 유발 패턴을 나타내는 것으로 사료되며, 특히 유생에서 만곡증을 유발하는 시점은 NP는 E2와 매우 유사한 패턴을 나타낸다는 것을 알 수 있다. NP에 의한 배아의 사멸 및 기형발생을 비롯한 유생의 피부착색 변화에 대한 연구로서 수정 후 11시간이 경과한 NF stage 10.5 *X. laevis* 배아에 NP를 48시간동안 처리 시, 5  $\mu\text{M}$ 의 NP는 배아의 생존율을 유의하게 감소시켰다. 또한, 1  $\mu\text{M}$  NP 처리군에서 성장을 감소가 확인되었으며, 0.1  $\mu\text{M}$  NP 처리시 몸이 휘어지는 형태의 기형과 비정상적인 멜라닌 세포(melanocyte)가 증가하였다. 그러나 ER 길항제인 ICI 182,780를 동시에 처리하였을 때 NP에 의해 유발된 몸이 휘는 기형과 비정상적인 멜라닌세포 출현 빈도가 감소하였다. 따라서 NP의 기형유발 효과는 에스트로젠 유사성에서 기인한 것으로서 설명되었다(Bevan *et al.*, 2003). *X. laevis* 배아의 신경관(neural plate)에서 유래한 세포를 1차 배양하여 신경성장단백질(neurotrophin)



**Fig. 1.** Developmental abnormality in *B. orientalis* embryos and tadpoles following alkylphenol exposure. A. Neural crest deformation at neurula stage by bisphenol A (BPA). Arrow indicates an unfolded neural crest. B. Insufficient development of melanocytes in tadpoles exposed to nonylphenol (NP). Dotted boxes indicate the melanocytes in the skin covering the operculum. C. Deformation of melanocytes in the tail skin following NP exposure. Arrowheads indicate abnormal melanocytes that are defective in melanosome dispersion. D. Abnormal eye development in BPA-treated tadpoles. Arrowheads indicate abnormally shortened distance between eyes. E. Ventral blister in a NP-treated tadpole (arrow). F. Microcephaly (arrow) and curved body (arrowheads) in a NP-exposed tadpole.

인 nerve growth factor (NGF)를 처리하여 신경돌기(neurite)의 성장을 유도하고 5  $\mu\text{M}$  NP를 처리한 경우에 36시간 배양 시 신경돌기의 성장율이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 동일농도의 E2를 처리하였을 때에도 관찰되었으나 ER 길항제인 ICI 182,780 처리로 인한 회복이 관찰되지 않았으며, G protein을 경유하는 신호전달 억제자인 pertussis toxin (PTX) 처리 시 NP에 의한 신경돌기의 성장감소가 회복되어 NP가 기존에 알려진 핵 안에 존재하는 ER 뿐만 아니라 세포막 또는 세포질에 존재하는 ER에도 작용할 가능성이 있음을 보여주었다(Bevan *et al.*, 2006). 국내에 서식하는 양서류를 대상으로 한 연구로서 *B. orientalis*를 이용한 NP의 발생독성평가 결과, 배아에 대한 NP의 96시간  $\text{LC}_{50}$ 은 0.24  $\text{mg L}^{-1}$ 로 확인되었으며, 0.1  $\mu\text{M}$  NP는 유생의 성장 및 멜라닌 세포의 확산을 저해하는 것으로 나타났다(Park *et al.*, 2010) (Fig. 1B, C). 따라서 이러한 효과는 *X. laevis* 뿐만 아니라 다양한 양서류에 공통된 현상으로 사료된다.

FETAX를 이용한 연구에서 NPE의 양서류 배아에 대한  $\text{LC}_{50}$ 은 *X. laevis*에서 3.6~5.7  $\text{mg L}^{-1}$  (96 hr), 호주에 서식하는 양서류인 slender tree frog (*Litoria adelaidensis*)와 sign-bearing froglet (*Crinia insignifera*)에서 각각 9.1~9.4  $\text{mg L}^{-1}$  (140 hr), 6.1~6.6  $\text{mg L}^{-1}$  (134 hr)로 확인되었으며,  $\text{EC}_{50}$ 은 *X. laevis*에서 2.4~4.7  $\text{mg L}^{-1}$  (96 hr), *L. adelaidensis*에서 8.7~8.9  $\text{mg L}^{-1}$  (140 hr), *C. insignifera*에서 4.2~4.9  $\text{mg L}^{-1}$  (134 hr)로 나타났다. 또한, MCIG는 *X. laevis*에서 1.0~3.0  $\text{mg L}^{-1}$ , *L. adelaidensis*에서 2.0~6.0  $\text{mg L}^{-1}$ , *C. insignifera*에서 4.0  $\text{mg L}^{-1}$ 로 나타나 양서류 종에 따른 독성 민감도에 차이가 있음을 보여주었다(Mann and Bidwell, 2000). NPE가 주성분으로 이뤄진 Agral®600 (60% NPE)과 GN8 (100% NPE)로 명명되어 시판되는 농약제품의 양서류 유생에 대한 독성을 시험한 결과 Agral®600의 48시간  $\text{EC}_{50}$ 은 *C. insignifera*, *X. laevis*, cane toad (*Bufo marinus*)에서 각각 2.5~3.0  $\text{mg L}^{-1}$ , 1.0~1.4  $\text{mg L}^{-1}$ , 2.7~3.0  $\text{mg L}^{-1}$ 로 나타났으며, GN8의 48시간  $\text{EC}_{50}$ 은 *C. insignifera*, *X. laevis*, *B. marinus*에서 각각 2.6~2.9  $\text{mg L}^{-1}$ , 0.9~1.2  $\text{mg L}^{-1}$ , 2.0~4.0  $\text{mg L}^{-1}$ 로 나타나 FETAX를 이용한 배아독성 실험과 더불어 유생에 대한 독성분석에서도 NPE에 대한 독성민감도는 *X. laevis*가 비교적 높은 것으로 확인되었다(Mann and Bidwell, 2001).

### 3. Octylphenol

양서류를 이용한 OP의 발생독성에 대한 연구는 다른

알킬페놀류 화합물질에 비해 부족한 편이다. *X. laevis*를 이용한 연구에서 NF stage 10.5 배아에 OP를 처리하여 NF stage 37까지 배양 시 500 nM 이상의 OP는 배아의 길이성장 저해 및 만곡증을 유발하였다. 또한, 1  $\mu\text{M}$  이상의 OP는 배아의 생존율을 유의하게 감소시키는 것으로 관찰되어 OP 역시 NP, BPA와 마찬가지로 배아의 생존 및 정상발생에 대한 독성을 갖는 것으로 확인되었다(Bevan *et al.*, 2003). 다른 무미양서류를 이용한 연구로서 각각 stage 26, 36 (Gosner, 1960)부터 2주간 OP에 노출된 northern leopard frog (*Rana pipiens*) 유생에서  $\text{LC}_{50}$ 은 1.36, 2.8  $\mu\text{M}$ 로 나타났으며, 이는 5.57, >10  $\mu\text{M}$ 의  $\text{LC}_{50}$ 값을 나타낸 E2 처리군보다 강한 급성 독성효과를 보여주었다. 또한, stage 26의 wood frog (*Rana sylvatica*)와 *R. pipiens* 유생을 2주간 OP에 노출시켰을 때 확인된  $\text{LC}_{50}$ 은 각각 0.74, 1.42  $\mu\text{M}$ 로서 *R. sylvatica*가 OP의 급성독성에 더 민감한 것으로 나타났다. 그러나 0.25~1  $\mu\text{M}$  (stage 36 *R. pipiens*), 2.5  $\mu\text{M}$  (stage 26 *R. sylvatica*)의 OP는 유생의 무게를 증가시키는 효과를 나타내었는데 고농도의 E2 처리군에서도 유사한 효과가 있는 것으로 확인되었다(Hogan *et al.*, 2006).

### 4. Estrogen

E2는 체내에서 자체적으로 생성되는 여성호르몬으로 매우 강력한 내분비활성을 갖는다. 이러한 E2는 도시 인근의 육수환경에서 고농도로 검출되고 있다(Ra *et al.*, 2011). 이는 인구밀집지역에서 인체에서 기원한 E2가 정화조를 거쳐 미처 생분해되지 않은 상태에서 육수 내로 유입되었거나, 대규모 축산활동에 따른 가축의 분뇨에서 기원한 E2로 추정되고 있다. 양서류 발생독성에 관련하여 E2는 *X. laevis*의 초기배아의 사멸과 조직학적 이상을 유발하였으며, 에스트로젠 수용체 역시 배아의 다양한 발생학적 결함과 관련된 것으로 나타났다. NF stage 3 배아에 0.1 nM~10  $\mu\text{M}$ 의 E2를 처리 시 10  $\mu\text{M}$  E2 처리군에서 배아 생존율이 NF stage 27 이후에서 유의적으로 감소하였고 NF stage 42와 32에는 모두 사멸했다. 또한, 10  $\mu\text{M}$  E2를 처리한 배아는 NF stage 38에 척추만곡을 포함한 기관발생에 장애가 관찰되었다. 이러한 기형발생과 더불어 에스트로젠 수용체 mRNA 발현 또한 E2 처리에 따라 변화하였다(Nishimura *et al.*, 1997). 이와 유사하게 *X. laevis* 배아를 수정 후 3~96시간 동안 다양한 농도의 E2에 노출시킨 후 초기발생에 미치는 영향을 분석한 결과 10  $\mu\text{M}$  이상의 E2는 배아의 기형발생을 유발하는 것으로 확인되었으나 배아의 생존율 및 유생의 길이 성장에

는 뚜렷한 영향을 미치지 않았다. 또한, 단일 농도의 E2 (20 μM)를 각기 다른 발생단계에 처리하였을 때 유발되는 기형패턴은 처리한 발생단계 및 기간에 따라 그 민감도가 상이하게 나타났다. 소두증, 만곡증, 부종, 장의 비정상적 꼬임은 각각 48~96, 12~60, 3~72, 3~96시간 시간범위에 걸쳐 E2에 노출되었을 때 그 출현 빈도가 가장 높게 나타났다(Sone *et al.*, 2004).

5. 알킬페놀류 화합물의 독성기작 비교

알킬페놀류가 양서류의 배아발생에 미치는 영향 및 물질별 작용경로를 다양한 연구결과들을 기반으로 도식화하였다(Fig. 2). 대표적인 알킬페놀류로서 BPA, NP, OP는 양서류 배아의 초기발생, 기형발생, 성장, 기관분화, 채색발현 등에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. APs와 E2는 공통적으로 배아의 사멸, 몸의 만곡, 두부형성 장애, 부종, 장 형성 장애 등을 유발하는 것으로 확인되었지만, APs 특이적으로 양서류 배아의 성장을 억제하는 것으로 확인되었다. 이는 양서류 배아에 E2를 처리 시 배아의 성장에 영향을 미치지 않은 것과는 대조적이다(Sone *et al.*, 2004). 그러나 *R. sylvatica* 배아에 대한 OP와 E2 처리가 유생의 무게를 증가시키는 것으로 나타나 배아의

성장에 대한 APs 및 E2의 영향에 대한 심도있는 연구가 필요하다(Hogan *et al.*, 2006). 더욱이 OP가 갖는 양서류 배아 발생독성 연구는 비교적 미진하여 이에 대한 메커니즘 규명 연구가 필요할 것으로 사료된다. 현재까지 보고된 다양한 연구결과들로 부터 알킬페놀류가 양서류 초기배아 발생과정 중 에스트로젠과 유사한 성질을 가지는 것으로 사료되며, 양서류의 체내에서 에스트로젠 수용체를 경유하는 것으로 예상되는 다양한 영향을 미치는 것으로 확인되었다(Bevan *et al.*, 2003; Sone *et al.*, 2004, 2006; Hogan *et al.*, 2006). 그러나 최근의 BPA에 대한 연구결과에서 알킬페놀류 화합물의 독성메커니즘이 전적으로 에스트로젠 유사성에 기인하지 않는다는 사실 또한 확인되었다(Oka *et al.*, 2003; Baba *et al.*, 2009). BPA와 NP의 양서류 발생독성 결과를 비교해보면 BPA에 비해 NP의 독성작용 기전이 에스트로젠의 독성작용기전과 유사함을 알 수 있다. 또한, BPA와 NP에 민감한 배아 발생 단계는 차이가 있으며, BPA는 NP보다 초기 발생단계에 영향을 미치는 것을 알 수 있다(Sone *et al.*, 2004). 이는 NP와 BPA 모두 에스트로젠 유사성을 갖기 때문에 초기 발생 후기의 배아 발달에 영향을 미치지만, BPA의 경우에 그 화학구조적 특징으로 인해 에스트로젠의 작용기전과는 독립적으로 E2가 미치는 영향이 비교적 적은 초기

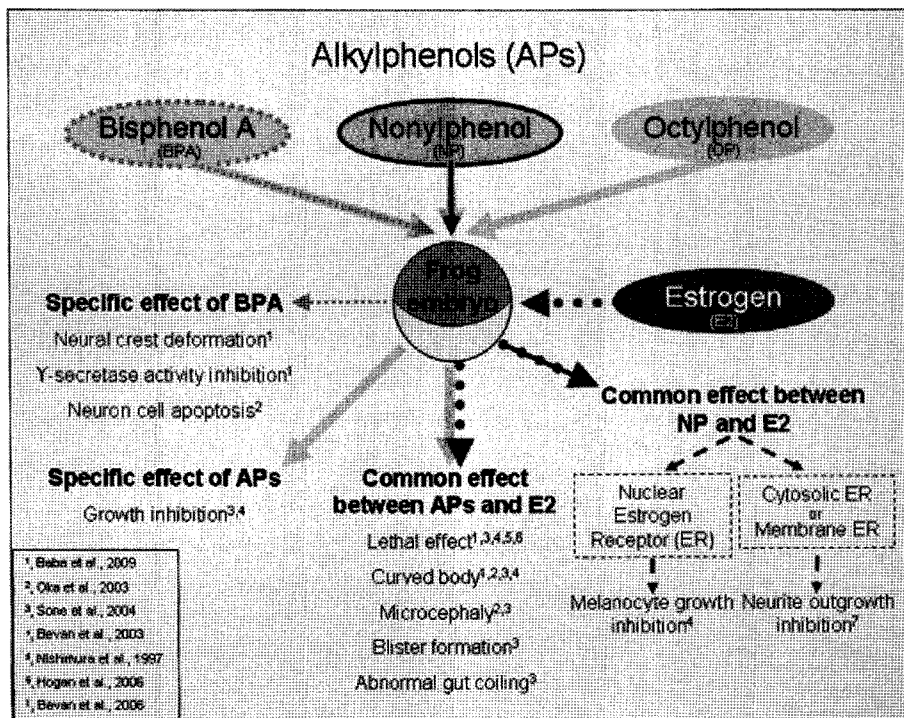


Fig. 2. Summary of developmental toxicity of alkylphenols and estrogen in amphibian embryos.

배아의 신경배 분화를 저해하는 것으로 사료된다.

## 요약 및 제언

양서류 배아에 미치는 알킬페놀류의 영향은 물질자체의 농도에 따른 독성 및 내분비호르몬 교란작용으로 구분될 수 있을 것이다. 현재까지 양서류를 대상으로 분석된 알킬페놀류의 초기배아발생에 대한 영향은 주로 생존, 사멸, 거시적 기형발생 패턴을 위주로 분석되어 왔으며, 이러한 현상들과 E2를 포함한 다양한 호르몬과의 상관관계 및 물질의 작용 메커니즘 규명이 부족하다. 또한, 다양한 연구결과들 중 대부분이 *X. laevis*를 중심으로 정리되어 서식지 분포 특성이나 서식특성이 상이한 타 양서류들 간의 비교분석이 불가능하다. NPE의 독성을 *X. laevis*와 호주산 양서류 2종에서 비교분석한 Mann and Bidwell (2000, 2001)의 연구에서 보여주듯이 단일 화학물질에 대한 민감도는 종에 따라 상이하기 때문에 다양한 종을 이용한 독성 데이터의 축적이 필요하다. 그러나 국내에서는 토종 양서류를 이용한 위해성 평가정보가 매우 부족한 현실이다. 이를 해결하기 위해 독성연구에 적합한 토종 양서류 모델을 선정하고, 이를 활용하기 위한 노력이 요구된다. 무당개구리와 같은 토종양서류 배아 및 유생을 이용한 연구에서 다른 시험모델 양서류에서 나타난 다양한 발생독성 종말점 수준의 독성학적 결과 및 발생기형 유형의 유사성이 확인되었다(Fig. 1). 향후 좀 더 다양한 토착 양서류를 대상으로 객관화되고 체계적인 시험법의 개발 및 적용이 필요한 시점이다. 또한, 실험자 간에 객관적인 독성효과를 비교를 위해 표준시험법의 사용이 필요하며, 독성수치의 비교분석을 위한 LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>, LOEC, NOEC, MCIG 등의 지표가 되는 데이터를 생성하여, 기존의 타 양서류 종에서 도출된 연구결과들과 호환성을 갖는 것이 중요하다. 향후 알킬페놀류가 양서류의 발생에 미치는 영향을 유전자, 단백질 수준에서 연구함으로써 독성 메커니즘을 파악하는 것은 향후 새로운 유사화학물질을 합성하고 활용하기 전에 그 독성 여부를 추측하는데 좋은 수단이 될 것이다. 본 소고에서는 알킬페놀류 화학물질의 양서류 발생에 대해 정리하였다. 그러나 이외의 다양한 제초제, 살충제등의 농약류, 중금속류, 기타화학물질들에 대한 양서류 발생독성정보가 체계적으로 획득, 정리되어야 할 것이다.

현재 국내에서는 물벼룩을 모델로 한 급성노출 독성시험법이 하수처리장 및 산업폐수처리장의 방출수 독성평가에 이용되고 있다. 그러나 하천수 및 처리장 방류수에

잔류하는 저농도 오염물질에 중장기 노출에 따른 독성평가는 도입이 미진한 상태이다. 현재까지 수환경 매체의 중장기 독성평가는 주로 어류를 모델로 이뤄져왔으나 향후 보다 인간에 가깝고 수중, 수변, 육상 환경을 연결하는 생태적 지위를 갖는 양서류를 이용한 생태(생물)독성평가 유용할 것이다. 양서류에서 얻어진 독성정보는 육수환경에서 생태학적인 건강성을 담보하고 나아가 공중보건학적 측면에서 특정 화학물질의 환경잔류량 규제를 위한 기준설정에 중요한 자료가 될 것으로 전망된다.

## 적 요

내분비계장애물질과 같은 유기화합물에 의한 수계의 오염은 지구적인 양서류 감소의 원인으로 의심되고 있다. 양서류는 수정 후 변태에 이르는 생활사를 수중에서 진행하므로 수환경 오염물질에 의한 독성효과를 연구하기에 적합한 모델이다. 또한 양서류는 인간을 비롯한 육상척추동물과 발생학적으로 많은 공통점을 가지므로 공중보건학적 관점에서도 수환경 오염물질의 위해성 평가에 적합한 모델생물이다. 특정 화학물질이나 환경매체의 안전관리 기준을 설정하고 수환경의 독성물질 관리를 위해서는 다양한 독성종말점에서 독성정보가 필요하다. 알킬페놀류 화학물질은 농업, 공업, 가정활동에 사용되고 있으며, 수환경 내에 잔류하여 다양한 수생동물에서 내분비계장애효과를 갖는다. 본 소고에서는 양서류의 배아, 유생을 대상으로 알킬페놀류 화학물질의 종류별, 노출경로 및 농도, 노출 시기에 따른 발생장애와 발생기형 유발효과와 그 기작에 관한 국내외 자료를 정리하였다. 육수환경 잔류 오염물질의 중장기 노출독성 평가모델로서 양서류배아 발생독성평가법의 유용성을 제안하였다.

## 사 사

본 연구는 환경부 차세대핵심환경기술개발사업(091-091-025)지원에 의한 것임.

## 인 용 문 헌

American Society for Testing Materials (ASTM). 1993. Standard guide for conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (Fetax). ASTM Standards on Aquatic



- Toxicology and Hazard Evaluation. ASTM, Philadelphia, PA, USA. pp. 457-467.
- Baba, K., K. Okada, T. Kinoshita and S. Imaoka. 2009. Bisphenol A disrupts Notch signaling by inhibiting gamma-secretase activity and causes eye dysplasia of *Xenopus laevis*. *Toxicological Science* **108**: 344-355.
- Bevan, C.L., D.M. Porter, A. Prasad, M.J. Howard and L.P. Henderson. 2003. Environmental estrogens alter early development in *Xenopus laevis*. *Environmental Health and Perspectives* **111**: 488-496.
- Bevan, C.L., D.M. Porter, C.R. Schumann, E.Y. Bryleva, T.J. Hendershot, H. Liu, M.J. Howard and L.P. Henderson. 2006. The endocrine-disrupting compound, nonylphenol, inhibits neurotrophin-dependent neurite outgrowth. *Endocrinology* **147**: 4192-4204.
- Blaustein, A.R. and D.B. Wake. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American* **272**: 52-57.
- Bögi, C., J. Schwaiger, H. Ferling, U. Mallow, C. Steineck, F. Sinowatz, W. Kalbfus, R.D. Negele, I. Lutz and W. Kloas. 2003. Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*. *Environmental Research* **93**: 195-201.
- Boyer, R. and C.E. Grue. 1995. The need for water quality criteria for frogs. *Environmental Health and Perspectives* **103**: 352-357.
- Carey, C. and C.J. Bryant. 1995. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. *Environmental Health and Perspectives* **103** Suppl. 4: 13-17.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**: 183-190.
- Hogan, N.S., D.R. Lean and V.L. Trudeau. 2006. Exposures to estradiol, ethinylestradiol and octylphenol affect survival and growth of *Rana pipiens* and *Rana sylvatica* tadpoles. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **69**: 1555-1569.
- Houlahan, J.E., C.S. Findlay, B.R. Schmidt, A.H. Meyer and S.L. Kuzmin. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* **404**: 752-755.
- Imaoka, S., T. Mori and T. Kinoshita. 2007. Bisphenol A causes malformation of the head region in embryos of *Xenopus laevis* and decreases the expression of the ESR-1 gene mediated by Notch signaling. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **30**: 371-374.
- Iwamuro, S., M. Sakakibara, M. Terao, A. Ozawa, C. Kurobe, T. Shigeura, M. Kato and S. Kikuyama. 2003. Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *General and Comparative Endocrinology* **133**: 189-198.
- Kloas, W. and I. Lutz. 2006. Amphibians as model to study endocrine disrupters. *Journal of Chromatography A* **1130**: 16-27.
- Kuriyama, S., A. Ueda and T. Kinoshita. 2003. Xerl is a secreted protein required for establishing the neural plate/neural crest boundary in *Xenopus* embryo. *Journal of Experimental Zoology Part A* **296**: 108-116.
- Lahr, J. 1997. Ecotoxicology of organisms adapted to life in temporary freshwater ponds in arid and semi-arid regions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **32**: 50-57.
- Loeffler, I.K., D.L. Stocum, J.F. Fallon and C.U. Meteyer. 2001. Leaping lopsided: a review of the current hypotheses regarding etiologies of limb malformations in frogs. *The Anatomical Record* **265**: 228-245.
- Mann, R.M. and J.R. Bidwell. 2000. Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs. *Aquatic Toxicology* **51**: 19-29.
- Mann, R.M. and J.R. Bidwell. 2001. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. *Environmental Pollution* **114**: 195-205.
- Nieuwkoop, P. and J. Faber. 1967. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Hubrecht Lab., Utrecht; North-Holland Publishing Co., Amsterdam (2nd. edn.).
- Nishimura, N., Y. Fukazawa, H. Uchiyama and T. Iguchi. 1997. Effects of estrogenic hormones on early development of *Xenopus laevis*. *Journal of Experimental Zoology* **278**: 221-233.
- Oka, T., N. Adati, T. Shinkai, K. Sakuma, T. Nishimura and K. Kurose. 2003. Bisphenol A induces apoptosis in central neural cells during early development of *Xenopus laevis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **312**: 877-882.
- Park, C.J., H.S. Kang and M.C. Gye. 2010. Effects of nonylphenol on early embryonic development, pigmentation and 3,5,3'-triiodothyronine-induced metamorphosis in *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura). *Chemosphere* **81**: 1292-1300.
- Pickford, D.B., M.J. Hetheridge, J.E. Caunter, A.T. Hall and T.H. Hutchinson. 2003. Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. *Chemosphere* **53**: 223-235.
- Ra, J.S., S.H. Lee, J. Lee, H.Y. Kim, B.J. Lim, S.H. Kim and S.D. Kim. 2011. Occurrence of estrogenic chemicals

- in South Korean surface waters and municipal waste waters. *Journal of Environmental Monitoring* **13**: 101-109.
- Sone, K., M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe and T. Iguchi. 2004. Effects of 17beta-estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. *General and Comparative Endocrinology* **138**: 228-236.
- Watanabe, Y., H. Kokubo, S. Miyagawa-Tomita, M. Endo, K. Igarashi, K. Aisaki, J. Kanno and Y. Saga. 2006. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse. *Development* **133**: 1625-1634.

(Manuscript received 24 February 2011,  
Revision accepted 5 June 2011)