진균제 농약 tebuconazole이 *Xenopus laevis*의 초기 배 발생에 미치는 독성 영향

황용기 · 이미주 · 이유화 · 정선우 · 윤춘식*

창원대학교 생물학과

(2010년 4월 30일 접수; 2010년 6월 28일 수정; 2010년 7월 14일 채택)

Toxic Effects of Fungicide Tebuconazole on the Early Development of African Clawed Frog, *Xenopus laevis*

Yong-Gi Hwang, Mi-Ju Lee, You-Hwa Lee, Seon-Woo Cheong, Chun Sik Yoon*

Department of Biology, Changwon National University, Changwon Kyungnam 641-773, Korea

(Manuscript received 30 April, 2010; revised 28 June, 2010; accepted 14 July, 2010)

Abstract

We investigated the toxic effects of tebuconazole on development in the African clawed frog, *Xenopus laevis*. To test the toxic effects, frog embryo teratogenesis assays using *Xenopus* were performed. Embryos were exposed to various concentrations of tebuconazole (0-100 μ M). LC₁₀₀ for tebuconazole was 100 μ M, and the LC₅₀ determined by probit analysis was 82.35 μ M. The exposure to tebuconazole concentrations ≥ 40 μ M resulted in 11 different types of severe external malformations including gut dysplasia. Histological examinations revealed various dysplasia in the eye, heart, liver, intestine, somatic muscle, and in the pronephric ducts. The tissue-specific toxic effects were investigated with an animal cap assay. Blood cells are generally induced at a high frequency by the combination of mSCF and activin A, however, the induction of blood cells was strongly inhibited by the addition of tebuconazole. Electron micrographs of tested embryos showed many of multivesicular bodies and dysplasia of photo-receptive cell, however, the somatic muscle degeneration was not severe. The gene expression of cultivated animal cap explants was investigated by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and revealed that expression of the blood-specific marker, β globin II and muscle-specific marker, muscle actin were more strongly inhibited than the neural-specific marker, XEn2.

Key Words : *Xenopus laevis*, Tebuconazole, Toxic effect

1. 서론

본 연구에서는 농약 중 진균 방제 목적으로 사용되고 있는 Tebuconazole이 양서류인 *Xenopus laevis*의

초기 배 발생에 미치는 독성효과에 대하여 실험하였다. Tebuconazole은 1990년 독일의 Bayer사에서 개발한 triazole계 살균제로 분자량은 307.8, 분자식 C₁₆H₂₂ClN₃O이다. 본 물질은 pH 4, 7, 그리고 9의 완충용액에서(22°C) 1년 이상의 반감기를 가지지만, 토양에서 자연광을 받을 경우 34일 만에 86%가 광분해되고 물에서 광분해시 30일 만에 완전 분해되어, 산과 알칼리 그리고 물 자체에서는 안전하지만 빛에는 약한 특성을 가지고 있다. 국내에서 실바코, 스텔스, 호

*Corresponding author : Chun-Sik Yoon, Department of Biology, Changwon National University, Changwon Kyungnam 641-773, Korea
Phone: +82-55-213-3454
E-mail: biobioy@hanmail.net

리쿠어, 바이칼, 오리우스, 밀리언, 나티모 등의 상품명으로 시판되고 있으며 균사의 ergosterol 생합성을 저해하는 작용을 하여 농작물의 회가루병, 부제병, 지베렐린병, 흑수병, 점무늬병 등에 대한 방제효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Tomlin, 2000). Tebuconazole의 일반적인 독성은 척추동물에 경구투여 하였을 때 rat에서 LD₅₀이 암, 수 각각 1700 mg, 4000 mg/kg, mice에서 300 mg/kg이었고, 경피독성(LD₅₀)은 rat의 암, 수 모두 > 5000 mg/kg이었다. 염소(goat)의 경우 15 mg/kg/day 투여 시 74시간 만에 사망하였고, 암탉(laying hen)은 10 mg/kg/day 투여 시 3일 후 사망하는 것으로 나타났다(FAO, 1994). 임신한 rat에 tebuconazole을 투여 후 태어난 새끼들을 조사한 결과, 암컷 rat는 남성화하고, 수컷 rat는 젖꼭지가 달리는 여성화가 관찰되었으며(Taxvig 등, 2008), 신경 시냅스 결손이 나타난다는 보고가 있다(Moser 등, 2001).

이처럼 tebuconazole의 독성효과는 주로 쥐를 비롯한 포유류에 대하여 일부 연구되어 있으나 그 외의 동물에 대한 충분한 연구결과는 거의 보고된 바 없고, 특히 이러한 농약이 직접 살포되는 농경지에서 서식하는 양서류에 대한 연구 결과는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 tebuconazole이 *Xenopus laevis*의 초기 배 발생에 미치는 독성효과를 *Xenopus* embryo의 독성 실험을 위한 국제 기준인 FETAX방법(ASM, 1998)을 통하여 밝히고, 그 결과를 토대로 생태계 내 양서류의 생존과 개체군에 미치는 영향을 예측해 보고자 한다. 이를 위해서 첫째로 tebuconazole 처리에 따른 기관별 이상과 농도별 생존율을 조사하였다. 둘째, tebuconazole에 의한 조직 내 독성효과를 검증하기 위해 조직병리학적 방법을 통해 대조군과 실험군의 조직 및 기관을 비교하였다. 셋째, 본 연구의 결과 중 관찰된 혈구 생성 저해효과를 증명하기 위하여 benzidine blood stain과 animal cap assay를 수행하였다. 넷째, tebuconazole에 의한 세포내 독성효과를 밝히기 위해 투과전자 현미경을 이용하여 정상조직과 비교하였으며, 마지막으로 tebuconazole이 조직 분화에 미치는 영향을 분자 수준에서 알아보기 위하여 cDNA 합성과 RT-PCR(reverse transcriptional poly chain reaction)을 행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 독성평가

*Xenopus laevis*는 미국에서 수입(Nasco Co. USA)한 것을 실험실 22±2℃ 수조에서 사육·유지하였고, 3년 이상 성적으로 성숙된 암수개체에 HCG(human chorionic gonadotropin, sigma)를 주사하여 수정란을 얻은 후 젤리층을 제거하고 후기 포배기의 배(st. 9)를 실험에 이용하였다(ASM, 1998). 배의 발생단계는 Nieuwkoop과 Faber를 따랐다(Nieuwkoop and Faber, 1956).

배의 선택과 실험법은 FETAX의 표준 지침을 준수하여 수행하였고 각 대조군 및 각 처리군 농도별로 stage 9의 배를 무작위로 25개체씩 선택하여 96시간 동안 24±0.5℃에서 배양하였다(pH 7.2~7.4). 배양액은 매일 교환하였으며, 치사된 배는 매일 제거하였다. 생존한 배는 ethylene glycol monophenyl ether (0.05%)로 마취시켰으며, 실험이 끝난 후 3% 중성포르말린으로 고정하였다(ASM, 1998). 배의 생존율과 기형율은 대조군의 값과 비교하여 백분율로 나타내었다. 또한 기형의 형태와 성장을 저해하는 특정 농도를 관찰하였다. 배의 체장(body length)은 해부현미경과 마이크로미터로 측정하였으며, 외형적 기형 역시 해부현미경(Zeiss)으로 관찰하였다.

2.2. 조직학적 연구

조직학적 관찰을 위하여 FETAX 실험을 마친 배를 대조군과 실험군의 각 농도별로 10개체씩 사용하였다. 표본은 Bouin's solution에서 6시간 동안 실온에서 고정하였다. 이 후 ethanol로 탈수하고, xylene으로 투명화 하였다. Paraffin(Paraplast Plus, Sigma)으로 포매하여 microtome으로 8 µm 두께로 절편 한 후 Xylene으로 paraffin을 제거하고 ethanol로 탈수한 후 hematoxylin-eosin 염색을 행하였다(Shin 등, 2009).

2.3. Benzidine blood stain

Tebuconazole의 독성효과에 의해 혈구의 발생 저해가 일어났는지를 밝히기 위해서 앞의 FETAX 실험법으로 배양한 배의 대조군과 40 그리고 60 µM 농도의 실험군, 동물극 분리편의 대조군과 모든 실험군을 대상으로 benzidine blood stain을 행하였다.

배양과정을 거친 후 고정을 하지 않은 살아있는 배나 조직을 benzidine(Sigma) solution으로 5분간 처리 후 반응이 나타날 때까지 과산화수소수를 첨가해 주고 실온(22℃)에서 10-15분간 유지하면서 발색을 관찰 및 사진촬영 하였다. 촬영 후에 acetic acid로 과산화물을 세척하고 메탄올로 고정하였다(Orkin 등, 1975).

2.4. Animal cap assay

동물극 분리배양법(animal cap assay)은 중배엽 유도 실험 방법과 동일하게 행하였으며(Cooke 등, 1987), 모든 과정은 멸균 상태에서 이루어졌다. Stage 9의 난을 선별하여 난 막을 제거하고 텅스텐 바늘로 동물극을 분리한 후, 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma)이 포함된 Steinberg's 생리식염수로 배양하여 이를 대조군으로 하였다.

혈구의 분화를 유도한 후 tebuconazole의 독성에 의한 발생 저해 효과를 검증하기 위하여 mSCF(Stem Cell Factor from mouse, Sigma) 단독 처리군에서 동물극 분리편은 30 ng/ml mSCF(in Steinberg's solution)에 노출시켰고, activin A(Human Conjugated, Sigma) 단독 처리군에서 동물극 분리편은 0.5 ng/ml activin A(in SS containing 0.1% BSA) 용액에서 배양하였다. Tebuconazole 처리군에서 동물극 분리편은 tebuconazole 60 μ M 농도에 노출시켰다. 또한 동물극 분리편은 activin A와 mSCF의 복합 효과와 activin A와 mSCF, 그리고 tebuconazole의 복합 효과를 실험하였다.

동물극 분리편은 정상배가 stage 43에 도달할 때까지 20℃에서 3일(72시간)간 배양하였다.

2.5. 투과전자현미경적 연구(Transmission Electron Microscopy)

투과전자현미경적 관찰을 위해 대조군과 tebuconazole을 처리, 배양한 배를 0.1M 인산완충액, 2.5% glutaraldehyde 용액, 2% paraformaldehyde 용액과 3차 증류수를 이용하여 2-4시간 전고정하고 0.1M 인산완충액으로 세척하였다. 후고정은 0.1M 인산완충액으로 완충시킨 1% 오스뮴 산으로 4℃에서 1시간 동안 고정하였으며, 고정된 시료는 총괄적으로 0.5% uranyl acetate 용액으로 염색하였다. 이들 시료를

ethanol과 propylene oxide로 탈수한 후, epon-araldite에 포매 하였다. 포매한 시료를 초박절편기(LDK NOVA)에서 다이아몬드 나이프(Diatome)로 0.08 μ m 두께로 절편한 후 2% uranyl acetate 용액과 lead citrate 용액으로 각각 염색하여(Reynold, 1963) 투과 전자현미경(Jeol 1200 EX2)으로 조영하였다. *Xenopus laevis* 배에 대한 전자현미경 관찰 결과의 분석은 Tardin에 따랐다(Tardin, 1972).

2.6. RT-PCR assay

Total RNA는 각 농도 조합별로 배양된 50개씩의 동물극 분리편으로부터 RNase Mini Kit(Qiagen)를 이용해 추출하였으며, EF-1 α , muscle actin, β globin II, XEn-2등의 Primer로(Hemmati-Brivanlou and Melton, 1994) RT-PCR(Perkin-Elmer Gene Amp PCR system 2400)을 실시하여 증폭된 DNA를 전기영동 후 밴드를 확인하였다.

2.7. 통계학적 분석

LC₅₀을 결정하기 위하여 SPSS Software(version 14.0)를 사용하여 probit analysis를 행하였다. 그리고 tebuconazole을 처리한 실험군의 성장이 대조군에 비하여 유의미하게 저해되었는지 평가하기 위하여 SPSS 중 student t-test의 독립표본 검증법을 사용하여 95% 신뢰한계에서 측정하였다.

3. 결 과

3.1. 독성평가

Tebuconazole 농도별로 *Xenopus laevis* 후기포배기의 배(st. 9)를 96시간 배양한 결과 FETAX 배양액에 처리한 대조군과 아세톤(0.1%v/v) 처리군은 모든 개체가 st.46으로 발생하였다. Tebuconazole에 노출된 처리군에서는 수종과 수포를 포함한 다양한 발생학적 기형이 관찰 되었으며, 농도가 증가 할수록 기형 발생률 역시 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 1). Tebuconazole 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 그리고 80 μ M 농도에 노출된 배의 생존률은 각각 99.3%, 99.3%, 82% 그리고 55.3%로 독성물질의 농도가 높아질수록 점차로 낮아지며, 100 μ M 이상의 고농도에서는 처리군의 모든 배가 치사하였다(Fig. 2).

생존한 배의 기형비율은 대조군과 아세톤 처리군에서는 4.7%씩 이었고, 20 μ M, 40 μ M의 tebuconazole 처리군에서 생존한 배의 기형비율은 각각 21.5%, 85.2%로 처리물질의 농도가 높아질수록 증가하였으며, 60 μ M 이상에서는 모든 배에서 기형발생을 보였다(Fig. 2).

반수치사 농도(LC₅₀) 결정을 위한 각 실험군 76 μ M, 78 μ M, 80 μ M, 82 μ M, 84 μ M, 그리고 86 μ M 농도에 노출된 배의 생존율은 각각 80.7%, 74.7%, 67.3%, 49.3%, 42%, 그리고 28%로, LC₅₀은 82 μ M 근사치로 예측할 수 있었으며 이러한 결과를 확인하기 위하여 probit analysis를 행한 결과 LC₅₀은 82.35 μ M로 나타났다.

대조군과 실험군에서 생존한 모든 배의 외형적 기형을 연구한 결과 수종(edema)을 포함하여 11가지의 기형이 나타났다. 수포(blisters)는 지느러미와 수종의 표면에서 비 특이적으로 나타났으며, 정상적인 배에서는 눈이 머리의 측면에 위치하지만 tebuconazole 처리된 배의 눈은 두부의 중앙으로 향하였고, 이러한 두부의 중앙으로 쏠림은 두폭이 좁아지는 개체에서 더 심하게 나타났으며 처리물질의 농도가 증가 할수록 머리 폭의 좁아짐이 빈번하였다. 수종은 눈, 얼굴, 심장 그리고 복부에서 나타났으며, 농도가 증가 할수록 수종의 크기가 증가하였다. St. 46의 정상배의 장은 밀집하고 잘 회전하고 있지만 실험군의 배의 장은 짧고 느슨하며, 형성 장애를 보였으며 고농도에 노출된 배에서는 yolk cell들이 묻쳐있는 경우가 많아 장의 발달이 확인 되지 않았다. 피부의 멜라닌 색소는 대조군에서는 잘 형성되어 색소층이 잘 발달 되어 있었으나 처리군에서 멜라닌 감소로 색소층이 잘 발달되지 못하였다. 대조군의 심장은 활발히 뛰고 혈액이 잘 돌고 있었으나 처리군에서의 심장은 크기가 현저히 줄어들고 심장의 일부만 박동을 하여 심근의 이상을 보이는 개체들이 많았고 이러한 개체들에서 심장 밖으로 혈액이 빠져나와 주변 조직에 퍼지는 출혈현상을 보이는 개체들이 많았다(Fig. 3).

정상배의 체장과 tebuconazole 처리군의 체장 사이에 유의미한 차이를 확인하기 위해 실시한 student t-test의 독립표본 검정 결과 대조군의 평균 길이 $\pm$ SD는 8.38 $\pm$ 0.51 mm이었고 용매 대조군의 평균 길이는

8.33 $\pm$ 0.55 mm(t = 0.85)로 유의미한 변화를 나타내지 않았고, 20 μ M tebuconazole 처리군에서 8.23 $\pm$ 0.61 mm(t = 2.42, p <0.05)로 평균 길이가 감소하며 유의미한 변화를 나타내었다. 그리고 40 μ M, 60 μ M, 그리고 80 μ M으로 농도가 증가함에 따라 각각의 평균 길이도 7.59 $\pm$ 0.65 mm(t = 11.7, p <0.001), 7.07 $\pm$ 0.63 mm(t = 18.6, p <0.001), 그리고 6.68 $\pm$ 0.66 mm(t = 20.29, p <0.001) 등으로 점차 감소하며 대조군과 비교 하였을 때 매우 유의미한 변화를 나타내었다(Fig. 4).

Fig. 1. Tadpoles of *Xenopus laevis* exposed to tebuconazole at the blastula stage. Control tadpole(bottom) and test tadpoles(others). Control and acetone-treated embryos developed into normal tadpoles but tebuconazole-treated embryos exhibited dose-dependent abnormalities. (A) Control embryo, (B) Acetone control embryo, (C-E) Tebuconazole-treated embryos(40 μ M, 60 μ M, 80 μ M). Bar : 1 mm.

Fig. 2. The percentage of survivals and malformations in *Xenopus laevis*. Blastula embryos were exposed to tebuconazole for 96h at 24 $\pm$ 0.5°C. Rates of lethality and malformation increased with increasing the concentration of tebuconazole.

Fig. 3. Various external malformations were observed in tadpoles exposed to 20–80 μ M tebuconazole. Edema, gut displasia, narrow head, centripetal eyes, cardiac, hemorrhage were induced in 40 μ M or higher concentrations of tebuconazole. All malformations were observed very frequently at 60 μ M or higher concentration of tebuconazole.

Fig. 4. Body lengths of control and tebuconazole-treated embryos. The reduction of body length was very significant in 40 μ M or higher concentration of tebuconazole ($P < 0.01$ and error bars show 95.0%).

3.2. 조직학적 연구

Tebuconazole 처리된 실험군에서 눈, 심장, 간, 신장(전신관), 체절, 그리고 소화관 등에서 다양한 조직학적 기형이 관찰되었다(Fig. 5). 정상배의 눈(Fig. 5(A))과 비교해 봤을 때 tebuconazole 처리된 배에서는 눈의 유리체방 결핍에 의한 수정체 헤르니아와 망막 분리가 관찰되었고, 색소상피층이 뇌 쪽으로 함몰된 것이 관찰되었다(Fig. 5(B)). 정상배의 심장은 심방과 심실이 정상적인 형태를 갖추고 심장 내에 다수의 적혈구가 분포하지만(Fig. 5(C)) tebuconazole 처리군의 심장은 크기가 많이 줄어 있고, 심장 근육세포가 비대

Fig. 5. Comparative histology showing malformations in *Xenopus laevis* tadpoles exposed to 40 μ M tebuconazole for 96h : (A-B) tadpoles sectioned at the level of the eye, (A) control, (B) tebuconazole treated; (C-D) tadpoles sectioned at the level of the heart, (C) control, (D) tebuconazole treated; (E-F) tadpoles sectioned at the level of the liver, (E) control, (F) tebuconazole treated; (G-H) tadpoles sectioned at the level of somites, (G) control, (H) tebuconazole treated (a: atrium, b: brain, g: gut, li: liver, ls: lens, nc: notochord, p: pigment epithelium, pn: pronephros, r: retina, s: somatic, si: swollen integument, vc: vitreous chamber, vt: ventricle, y: yolk rich endoderm; bar= 100 μ m).

해져 정상 심장과 큰 차이를 보이며 심장내의 적혈구 분포도 줄어든 것으로 나타났다(Fig. 5(D)). 정상배의 간은 간세포가 일정하게 골고루 잘 분포되어 있고, 간극에 혈구세포들이 차 있었다(Fig. 5(E)). 반면 *tebuconazole* 처리배의 간은 정상 간보다 간세포가 산재되어 있으며 혈구세포의 밀도도 낮았다(Fig. 5(F)). 척색 양쪽에 조밀하고 치밀하게 조직되어 있는 정상배의 체절성 근육(Fig. 5(G))과 비교된 *tebuconazole* 처리배의 근육 조직은 치밀하지 않고 비어있는 곳이 자주 관찰되었다(Fig. 5(H)). 그리고 정상배의 전신관 세포는 단층의 얇고 복잡한 구부러짐을 보이지만(Fig. 5(G)) 처리배의 전신관 세포층은 부풀어 있고 느슨한 구조를 보여주었다(Fig. 5(H)).

3.3. Benzidine blood stain & Animal cap assay

*Tebuconazole*의 독성에 의한 혈구 분화 저해효과를 확인하기 위하여 FETAX 실험법에 따라 배양한 배와, 중배엽 유도 실험방법에 따라 배양한 동물극 분리편을 대상으로 benzidine blood stain을 실시하였고, 동물극 분리편의 경우 조직학적 연구방법을 통해 분석하였다(Fig. 6-8).

*In vivo*에서 FETAX 배양액에서 배양한 대조군의 정상배에서는 심장과 대동맥궁에서 benzidine 반응하여 청색으로 염색된 혈구가 관찰되었다(Fig. 6(A)). 그러나 $40 \mu\text{M}$ 농도로 처리한 실험군의 경우 혈액이 심장부위에서는 거의 관찰되지 않았으며 전신관 부위에서만 관찰되었다(Fig. 6(B)). 그리고 $60 \mu\text{M}$ 농도 실험군에서는 혈액이 심장과 전신관 부근에서는 관찰되지 않

았지만 복부의 후방에서는 출혈로 의심되는 benzidine 반응이 관찰되었다(Fig. 6(C)).

또한 *tebuconazole*에 의한 혈구 분화 저해를 *in vitro*에서 확인하기 위하여 실시한 동물극 분리배양에서 대조군 동물극 분리편은 오직 비정형표피조직만 분화시켰으며 benzidine blood stain에는 반응하지 않았다(Fig. 7(A)). *In vitro*에서 혈구를 유도하는 효과가 있는 것으로 알려진 mSCF를 단독 처리 시 혈구가 유도되는지를 확인하기 위하여 30 ng/ml mSCF를 단독으로 처리하였으며 그 결과 역시 대조군과 유사하게 비정형표피조직만이 분화하였다(Fig. 7(B)). *Tebuconazole*을 $60 \mu\text{M}$ 농도로 단독처리 했을 때에도 외관상 대조군과 비슷하였고 역시 benzidine blood stain에 반응하지 않았다(Fig. 7(C)). Activin A는 $0.1 \sim 0.5 \text{ ng/ml}$ 정도의 저농도에서 동물극 분리편을 배양했을 때 혈구양세포가 주로 유도된다고 알려져 있는데(Ariizumi 등, 1991) 0.5 ng/ml 의 농도로 단독 처리한 결과 benzidine blood stain에 10% 정도만 반응하였다(Fig. 7(D)). Activin A와 mSCF를 복합처리하면 혈구 분화가 효과적으로 일어난다는 연구결과(Miyanaga 등, 1998)에 따라 본 연구에서는 30 ng/ml mSCF, 0.5 ng/ml activin A를 복합 처리하여 배양하였으며, 그 결과 benzidine blood stain에 반응을 보인 분리편은 약 40%로 나타났다(Fig. 7(E)). 최종적으로 activin A와 mSCF의 복합처리에 의한 혈구유도 효과를 *tebuconazole*이 어느 정도 저해할 수 있는지를 *in vitro*에서 확인하기 위하여 30 ng/ml mSCF, 0.5 ng/ml activin A, $60 \mu\text{M}$ *tebuconazole*의 세 가지 물질을 혼합하여 동물극 분리편을 배양하

Fig. 6. Benzidine blood stained tadpoles of *Xenopus laevis* exposed to *tebuconazole* and control. (A) Control tadpole (top) and test tadpoles (others). Control embryos developed into normal tadpoles with intact heart and blood. (B and C) But test embryos exhibits dose-dependent decrease of blood in heart and pronephros. (A) Control embryos showed erythrocytes that stained with hibits dos(bluscolor) in both atrium and ventricle, (B) $40 \mu\text{M}$ *tebuconazole* exposed, (C) $60 \mu\text{M}$ *tebuconazole* exposed(○: heart, →: pronephros).

Fig. 7. Benzidine treated animal cap explants of *Xenopus laevis* (A) Control, (B) single dose of 30 ng/ml of mSCF, (C) single dose of 60 μ M tebuconazole, (D) explant treated with 0.5 ng/ml of activin A swelled but showed benzidine reaction in only one explant, (E) 40% of explants incubated in the mixture of 30 ng/ml of mSCF and 0.5 ng/ml of activin A showed distinct benzidine reaction in their inner space, (F) the addition of 60 μ M tebuconazole to the mixture of 30 ng/ml of mSCF and 0.5 ng/ml of activin A showed strong inhibition of inducing erythrocytes in explants.

였다. 그 결과 activin A의 효과로 분리편이 공처럼 부풀어 오르는 현상이 나타났지만 mSCF와 activin A의 복합 효과인 혈구의 발생 빈도가 10%로 저하되었으며 benzidine에 대한 반응도 약하다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 7(F)). 따라서 이러한 결과를 통해 tebuconazole이 *in vitro*에서 적혈구 유도를 저해한다는 사실을 알 수 있었다.

위와 같은 결과를 재확인하기 위하여 benzidine blood stain을 마친 분리편들을 재고정하여 조직 절편한 결과 대조군에서는 비정형표피조직만이 확인되었다 (Fig. 8(A)). 60 μ M tebuconazole 단독 처리군 역시 비정형표피조직만이 분화되었으나 대조군과는 달리 비정형표피 세포들 사이에 간극이 자주 관찰되고 eosin에 약하게 염색되는 등 대조군과는 차이가 있었

다 (Fig. 8(B)). 30 ng/ml mSCF 단독 처리군에서는 대조군과 유사한 결과를 보여주었으며 비정형표피조직만 분화하였다 (Fig. 8(C)). 0.5 ng/ml activin A 단독 처리군에서는 약간의 중배엽성 간엽조직이 분화하면서 가운데 빈 공간이 형성이 되었으며 여기에 약간의 혈구세포가 나타난 분리편이 있었다 (Fig. 8(D)). 그리고

Fig. 8. The histological verification of the induction or inhibition of erythrocytes in animal cap explants of *Xenopus laevis*. (A) Only atypical epithelium was observed in control explants, (B) explants exposed to 60 μ M of tebuconazole also exhibited only atypical epithelium, (C) explants exposed to 30 ng/ml of mSCF showed only atypical epithelium, (D) mesenchyme and atypical epithelium were induced but blood cell was hardly differentiated by a single dose of 0.5 ng/ml activin A, (E) explants incubated in the mixture of 30 ng/ml of mSCF and 0.5 ng/ml of activin A showed mesenchyme and blood cells, (F) in explants incubated in the mixture of 30 ng/ml of mSCF, 0.5 ng/ml of activin A, and 60 μ M of tebuconazole, erythrocytes were hardly developed (ae: atypical epithelium, bc: blood cell; bar=100 μ m).

30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A 복합 처리군에서도 역시 약간의 중배엽성 간엽조직이 분화하면서 가운데 빈 공간이 형성되었으며 여기에는 mSCF의 작용으로 blood cell이 관찰되었다(Fig. 8(E)). 그러나 30 ng/ml mSCF, 0.5 ng/ml activin A, 60 μ M tebuconazole 복합 처리군에서는 단층의 표피세포로 둘러싸인 분리편에 중배엽성의 간엽조직이 드물게 나타나며 가운데 빈 공간에 blood cell이 관찰되지 않았다(Fig. 8(F)). 이로써 tebuconazole이 혈구분화에 강한 저해제로 작용한다는 것을 알 수 있었다.

3.4. 미세형태학적 연구

대조군과 60 μ M tebuconazole 농도에서 배양된 실험군 배의 미세구조를 투과전자현미경으로 관찰 비교하였다. 대조군의 정상배에서는 근원섬유소들이 규칙적으로 배열되어 있고 Z 라인이 뚜렷하며 치밀한 구성을 보여준다(Fig. 9(A)). 그에 반해 tebuconazole 처리된 절편에서 Z 라인의 부분적 붕괴와 근원섬유소의 결실이 자주 관찰되고 군데군데 비어 있는 것이 특징으로 나타났다(Fig. 9(B)).

대조군의 정상 개체의 눈의 광수용 세포층 외부에는 색소 상피층이 있으며 색소 상피층과 광수용 세포층 사이에는 분화 시 대사 노폐물로서 거대용해소체

(multivesicular body, MV)가 소량 나타났다(Fig. 9(C)). 그러나 처리군의 눈에서는 photoreceptor lamella 층의 발달이 저해되고 세포파괴와 밀접한 관계가 있는 거대용해소체(MV)가 자주 관찰되었는데 이는 시각계의 분화에 치명적인 영향을 받은 것으로 해석할 수 있다(Fig. 9(D)).

3.5. RT-PCR assay에 의한 mRNA 발현량 조사

Activin A와 mSCF에 의한 특정 조직유도와 tebuconazole에 의한 조직 분화 저해효과를 확인하기 위해 유전자 발현량을 각각 비교하였다. EF-1 α 는 유전자 수준에서 변화가 없기 때문에 동일 mRNA 양의 표시자로 사용하였고, 혈액 특이적 유전자인 β globin II와 근육 특이적 유전자인 muscle actin, 그리고 신경 조직 특이적 유전자인 XEn2에 대하여 두 그룹간의 유전자 발현량을 비교하였다(Fig. 10).

대조군, 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A 복합 처리군, 그리고 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A, 60 μ M tebuconazole의 세가지 복합처리군의 mRNA 발현량을 비교해 본 결과 muscle actin과 β globin II

Fig. 9. Electron micrographs of the incubated explants. (A, C) Control animal cap explants, (B, D) test explants exposed to 60 μ M of tebuconazole. The tebuconazole-exposed explants exhibited muscle degeneration and a lot of multivesicular bodies (pg: pigment granule, mv: multivesicular bodies, bar=500 nm).

Fig. 10. Gene expression by RT-PCR of incubated animal cap explants(presumptive ectoderm). Expressions of mRNA were compared. Control showed highly expressed EF-1 α and unexpressed β globin II, XMA and XEn2(lane A). In combined dose of 30 ng/ml mSCF with 0.5 ng/ml activin A, EF-1 α , β globin II and XMA showed strong expression, but XEn2 showed weak expression(lane B). In combined dose of 30 ng/ml mSCF, 0.5 ng/ml activin and 60 μ M tebuconazole, EF-1 α was expressed intensively, but β globin II and XMA were expressed weakly(lane C).

모두 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A 복합처리군에서는 높게 나타났으나 tebuconazole 복합 처리군에서는 낮은 발현량을 보였다. 반면, XEn2 유전자는 대조군에서는 발현되지 않았으나, 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A 복합처리군과 tebuconazole 복합 처리군에서 비슷한 양의 발현을 보였다. 이 결과로 tebuconazole이 혈액과 근육의 분화를 저해하지만 신경조직의 분화에는 거의 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다.

4. 고 찰

양서류는 먹이연쇄의 중위 포식자로서 먹이연쇄를 통해 내분비계 교란물질의 생체 내 축적이 예상되는 표적생물이다. 또한 농경지나 계류 등에서 서식하며 매년 같은 장소에 산란하는 특이한 습성을 가져 농약 등의 환경오염 물질에 의한 영향을 받기 쉬우므로 환경지표생물로서의 역할을 할 수 있다. 최근 세계 각 지역에서는 개구리의 수가 현저히 감소하는 경향을 보이고 있으며 많은 연구들에 의해서 환경에 잔류하며 축적된 농약이 그 원인으로 지적되고 있다. 양서류들의 피부는 화학적 오염물질에 약하며 물질의 투과성이 높아 수중환경에 존재하는 독성 화학물질에 의해 호르몬 조절 기능을 방해받기 쉬운 조건을 갖는다 (Hayes 등, 2006). 또한 양서류는 피부호흡을 하므로 내분비계 장애물질의 흡수가 빠르고, 갑상선호르몬의 작용으로 변태하기 때문에 내분비계 장애물질의 영향을 가장 많이 받는 것으로 알려져 있다 (Burkhart 등, 1998).

본 연구에서는 농약류의 내분비계 장애물질이 생태계 내에서 양서류의 생존과 생활사에 미치게 될 잠재적인 영향을 예측하기 위해, 사용처와 사용빈도 수에 비해 생물체에 대한 연구결과가 미비한 tebuconazole을 이용하여 *Xenopus laevis*의 초기 배 발생에 미치는 독성효과를 실험하였고 그 결과 영향을 받는 다양한 기관과 조직을 확인하였다.

초기 배를 tebuconazole에 노출하였을 때 수종과 수포를 위시한 11개 종류의 외부형태 기형이 발생하였다. 특히 현저히 높은 빈도로 관찰된 수종과 좁아지는 머리 폭, 심장의 비정상적인 발생 등은 이미 보고된

바 있는 fenitrothion (Elliott-Feeley and Armstrong, 1981-1982)과 ZZ-Aphox (Pilar 등, 1993)에 대한 독성 실험 결과와 유사하였다. 또한 소화관의 회전 이상과 피부의 탈색, 눈의 형태적·조직학적 이상, 피부의 수포 등도 관찰되었는데 이러한 영향 역시 이미 보고된 바 있는 베노밀과 그 대사산물인 카벤다짐 및 BIC (n-butyl isocyanate)의 독성 실험결과와 유사한 점이 많았다 (Yoon 등, 2008).

정상배의 체장과 tebuconazole 처리군의 체장 사이의 student t-test의 독립표본 검증결과 대조군과 용매 대조군과는 유의미한 변화는 없었다. 그러나 20 μ M 처리군 농도부터 평균 몸길이가 감소하여 유의미한 변화를 나타내기 시작하였고, 40, 60, 그리고 80 μ M으로 처리물질의 농도가 증가함에 따라 각각의 평균 몸길이가 점차로 감소하여 대조군과 비교하였을 때 매우 유의미한 변화를 나타내었다. 본 실험결과와 유사하게 paraquat (Vismara 등, 2001)와 carbaryl (Bridges, 2000)에서도 평균 체장 감소를 보여주는 연구 결과가 있었는데, 이는 성장저해를 의미하며 모든 독성실험에서 가장 뚜렷한 독성평가가 기준으로 취급되고 있다.

Tebuconazole에 대하여 독성을 나타내는 조직과 기관을 탐색하기 위해 실시한 조직학적 연구에서 대조군에 비해 때 농도 40 μ M 이상 처리군에서 눈, 심장, 간, 전신관, 피부, 그리고 근육(체질) 등에서 다양한 조직학적 기형이 관찰되었다. 특히 심장 내 적혈구 감소와 심장 근육 손상 등은 chlorpyrifos에 의한 독성 효과와 유사하였다 (Colombo 등, 2005). 전체적으로 내배엽 형성부전과 중배엽의 감소가 강하게 나타났으며, 외배엽의 형성은 다른 기관에 비하여 영향을 적게 받은 것으로 관찰되었다. Tebuconazole을 임신한 rat에 투여 후 태어난 태아에게서 신경조직의 결손이 나타난다는 연구 (Moser 등, 2001)가 있었으나 중추신경계의 형성에 대한 저해작용은 본 연구의 조직학적 관찰 수준에서는 확인되지 않았다.

혈구생성 저해효과를 재확인하기 위해 실시한 benzidine blood stain 결과 *in vivo*에서는 대조군 배에서는 심장과 신장, 혈관에서 푸르게 염색된 혈구가 관찰된 것에 반해 tebuconazole 처리군은 그 농도가 증가함에 따라 심장과 신장, 혈관에서 benzidine에 반응하는 혈구 수가 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다. 이

러한 결과를 바탕으로 *in vitro*에서의 *tebuconazole*의 독성에 의한 혈구 분화 저해를 재확인하기 위하여, 혈구를 유도하는 효과가 있는 것으로 알려진 mSCF와 activin A(Ariizumi and Asashima, 1994; Miyanaga 등, 1999)를 이용하여 중배엽 유도 실험 방법에 따라 animal cap assay를 행하였다. 여기에서 사용된 mSCF는 적혈구 분화유도 실험 시 초기 배양에 첨가되는 성장인자(Panzenböck 등, 1998)로 혈구세포의 성장을 돕는 기능이 있는 것으로 밝혀져 있다. Activin A는 0.1~0.5 ng/ml 정도의 저농도에서 혈구양세포가 주로 유도되는 것으로 알려져 있는 물질이다(Ariizumi 등, 1991). 동물극 분리 배양법을 행할 때 배의 분화 시기는 아주 중요하다. 통상 st. 8~10의 배를 선택하는데, 이는 배의 유도능이 이 시기에 최고에 달하기 때문이며 배의 신경 유도가 st. 12에서 시작되기 때문이다(Kelle, 1991).

실험 결과 대조군과 mSCF 단독 처리군 및 *tebuconazole* 단독 처리군에서는 모두 비정형표피조직만 분화 되었고, activin A 처리군에서는 분리편의 대부분에서 비정형표피조직의 분화가 감소하면서 부풀어 오르는 현상을 보였으며 그 중 10%의 분리편만이 benzidine에 약하게 반응하였다. 따라서 mSCF와 activin A는 혈구 유도할 수 있는 물질로 알려져 있지만 *Xenopus* 동물극 분리편에 단독으로 처리 되었을 경우에는 혈구 유도 효율이 낮은 것을 알 수 있었다. 이 두 물질(mSCF와 activin A)을 복합 처리하여 배양한 결과 실험한 분리편 중 40%에서 benzidine에 반응하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 이 두가지 물질의 복합처리에 의해 더욱 효과적인 혈구유도를 할 수 있다는 것을 확인한 것이다. 그리고 혈구의 유도를 확인한 mSCF와 activin A 복합처리군에 *tebuconazole*을 첨가한 결과 benzidine에 반응하는 분리편의 수가 10%로 현저히 감소하였으며 이를 통해 *tebuconazole*이 *Xenopus*의 초기배발생에서 적혈구 분화를 저해한다는 것을 증명할 수 있었다. 동물극 분리편을 절편한 결과, *tebuconazole*은 *Xenopus* 배의 혈구 분화에 매우 강한 저해제로 작용하며, 근육과 신경조직에 대한 영향은 상대적으로 강하지 않다는 것을 알 수 있었다.

*Tebuconazole*이 혈구 분화를 저해한다는 조직학적 결과를 분자생물학적 수준에서 확인하기 위하여 유전

자 발현 결과를 추가적 증거로 제시하였다. 동물극 분리편을 mSCF, activin A, 그리고 *tebuconazole*을 복합 처리한 배양액에서 배양하였으며, 이에 대한 mRNA 발현을 확인한 결과, 혈구 특이적 분자인 β globin II의 발현량의 감소가 관찰되었고, 근육 특이적인 분자인 muscle actin의 발현량도 상당히 감소한 것을 보여주었다. 반면 신경조직 특이적 분자인 XEn2의 발현량은 대조군에 비해 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다. 이는 *tebuconazole*이 혈구의 분화를 저해한다는 조직학적 결과와 동일한 것이다.

전자현미경을 통한 미세형태학적 연구에서 정상적인 근육에 비해서 Z 라인의 부분적 붕괴와 근원 섬유 요소의 결실 등이 나타나는 결과를 볼 때 근육분화 저해가 내부적으로는 상당히 진행 되고 있음을 나타내는 결과로 사료된다. 눈의 망막층에서는 세포의 말단이 photoreceptor lamella의 치밀한 층으로 이루어진 정상조직에 비해 처리군에서는 photoreceptor lamella 층의 발달이 나타나지 않아 시각계의 분화에도 심각한 저해를 일으킨 것으로 보인다.

Xenopus laevis 초기 배에 다른 조직에 비해 혈구의 분화를 심하게 저해하는 *tebuconazole*은 급성 독성 물질은 아니지만, 순환계에 심각한 결함을 유도할 수 있고, 이로 인해 자연환경에서 양서류의 개체수 감소는 불가피 할 것으로 생각된다. 따라서 농업 목적으로 이용한 여러 가지 농약류 내분비계 장애물질은 농장에 근접한 수계 서식지에 서식하는 양서류의 초기 배 발생 동안 직접적인 손상을 야기할 가능성이 높으며, 자연환경에서 양서류의 기형과 농약의 사용 사이의 상호관계에 관한 다양하고 심도 있는 연구가 필요한 것으로 생각된다.

5. 결 론

본 연구에서는 *Xenopus laevis*의 초기 발생에 미치는 *tebuconazole*의 독성 효과를 연구하였다. 독성 효과의 실험은 *Xenopus* 개구리의 배를 이용한 FETAX assay방법에 따라 행하였다. 초기배는 다양한 농도의 *tebuconazole*(0-100 μ M)에 노출시켰으며 그 결과 *tebuconazole*에 대한 LC₁₀₀은 100 μ M이었고, 반수치 사농도인 LC₅₀은 probit analysis를 통해 82.35 μ M로

나타났다. Tebuconazole 40 μ M 이상의 농도에 노출된 *Xenopus* 배에서 소화관 이상을 포함한 11가지의 다양한 종류의 외부형태 기형이 관찰되었다. 조직학적인 연구에서 눈, 심장, 간, 소화관, 체절성 근육 및 전신관의 형성부전이 관찰되었다. 조직 특이적 독성 연구를 위해 동물극 분리배양법을 실시한 결과 mSCF와 activin A의 복합처리에 의해 일반적으로 혈구세포의 분화가 유도되지만 tebuconazole에 의해 강력한 저해를 받는다는 것을 알 수 있었다. 전자현미경을 통한 미세형태학적 관찰에서는 다수의 거대용해소체가 발견되고 광수용세포 형성부전이 나타났으나 체절성 근육 변성은 심하지 않았다. 동물극 분리 배양법을 통한 조직 특이적 독성 연구를 뒷받침하기 위하여 RT-PCR을 행하였다. 혈구 특이 유전자인 β -globin II와 근육 조직 특이 유전자인 muscle actin은 신경조직 특이 유전자인 XEn2보다 더 강하게 저해 되는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 학문후속세대양성사업(KRF-2006-353-C00045)의 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Ariizumi, T., Asashima, M., 1994, *In vitro* control of the embryonic form of *Xenopus laevis* by activin A: Time and dose-dependent inducing properties of activin-treated ectoderm, *Dev. Growth Differ.* 36, 499-507.
- Ariizumi, T., Sawamura, K., Uchiyama, H., Asashima, M., 1991, Dose and time-dependent mesoderm induction and outgrowth formation by activin A in *Xenopus laevis*, *Int. J. Dev. Biol.*, 35(4), 407-414.
- ASTM(American Society for Testing and Materials), 1998, Standard guide for conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX), Philadelphia, ASTM, E1439-1498.
- Bridges, C. M., 2000, Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard Frog(*Rana sphenocephala*), *Arch. Environ. contam. Toxicol.*, 39(1), 90-96.
- Burkhart, J. G., Helgen, J. C., Fort. D. J., Gallagher, K., Bowers, D., Propst, T. L., Gernes, M., Magner, J., Shelby, M. D., Lucier, G., 1998, Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities, *Environ. Health. Perspect.*, 106(12), 841-848.
- Colombo, A., Orsi, F., Bonfanti, P., 2005, Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholin- esterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae, *Chemosphere*, 61(11), 1665-1671.
- Cooke, J., Smith, J. C., Smith, E. J., Yaqoob, M., 1987, The organization of mesodermal pattern in *Xenopus laevis*: experiments using a *Xenopus* mesoderm-inducing factor, *Development*, 101, 893-908.
- Elliott-Feeley, E., Armstrong, J. B., 1981-1982, Effects of fenitrothion and carbaryl on *Xenopus laevis* development, *Toxicology*, 22(4), 319-335.
- FAO, 1994, Pesticide residues in food 1994-Evaluations, 1055-1096.
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V. P., Marjua, Y., Parker, J., Tsui, M., 2006, Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?, *Environ. Health. Perspect.* 114, 40-50.
- Hemmati-Brivanlou, A., Melton, D. A., 1994, Inhibition of activin receptor signaling promoted neurulization in *Xenopus*, *Cell*, 77(2), 273-281.
- Moser, V. C., Barone, S. Jr., Smialowicz, R. J., Harris, M. W., Davis, B. J., Overstreet, D., Mauney, M., Chapin, R. E., 2001, The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats, *Toxicol. Sci.*, 62(2), 339-352.
- Miyanaga, Y., Shiurba, R., Asashima, M., 1999, Blood cell induction in *Xenopus* animal cap explants: effects of fibroblast growth factor, bone morphogenetic proteins, and activin, *Dev. Genes Evol.*, 209(2), 69-76.
- Nieuwkoop, P. D., Faber, J., 1956, Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin), Amsterdam, North-Holland Publishing, p. 243.

- Orkin, S. H., Harosi, F. L., Leder, P., 1975, Differentiation of erythroleukemic cells and their somatic hybrids, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 72(1), 98-102.
- Panzenböck, B., Bartunek, P., Mapara, M. Y., Zenke, M., 1998, Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin- dependent erythroid progenitor cells *in vitro*, *Bolld.*, 92(10), 3658-3668.
- Peng, H. B., editors. *Xenopus laevis*; practical uses in cell and molecular biology, New York, Academic Press, 62-109.
- Pilar, H. M., Paz, H. M., Alvarez, R., 1993, The carbamate insecticide ZZ-Aphox induced structural changes of gills, live, gall-bladder, heart, and notochord of *Rana perezii* tadpoles, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 25(2), 184-191.
- Reynold, E. S., 1963, The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J. Cell Biol.*, 17, 208-212.
- Shin, S. H., Lee, M. J., Lee, Y. H., Cheong, S. W., Yoon, C. S., 2009, The toxic effects of a pesticide carbaryl on the development of african clawed frog, *Xenopus laevis*, *J. Environ. Sci.*, 18(11), 1247-1259.
- Tardin, D., 1972, Ultrastructural features of neural induction in *Xenopus laevis*, *J. Anat.*, 111(1), 1-28.
- Taxvig, C., Vinggaard, A. M., Hass, U., Axelstad, M., Metzdorff, S., Nellemann, C., 2008, Endocrine-disrupting properties *in vivo* of widely used azole fungicides, *Int. J. Androl.* 31(2), 170-177.
- Tomlin, C. D. S., 2000, The pesticide manual, 12th ed., British Crop Protection Council, UK.
- Vismara, C., Bacchetta, R., Cacciatoem B., Vailatim G., Fascio, U., 2001, Paraquat embryotoxicity in the *Xenopus laevis* cleavage phase, *Aquat. Toxicol.*, 55(1-2), 85-93.
- Yoon, C. S., Jin, J. H., Park, J. H., Yeo, C. Y., Kim, S. J., Hwang, Y. G., Hong, S. J., Cheong, S. W., 2008, Toxic effects of carbendazim and n-butyl isocyanate, metabolites of the fungicide benomyl, on early development in the African clawed frog, *Xenopus laevis*, *Environ. Toxicol.*, 23(1), 131-144.