

방사선과 옥틸페놀의 복합작용이 자주달개비
미세핵 생성물에 미치는 영향

Synergistic Interaction of Radiation and Octylphenol
Evaluated by *Tradescantia*-Micronucleus Assay

신해식, 이진홍
충남대학교
대전시 유성구 공동 220

이병현, 김진규
한국원자력연구소
대전시 유성구 덕진동 150

요 약

다양한 용도로 이용되고 있는 합성화학물질의 일부는 내분비계 교란물질로 분류되고 있으나 이러한 잠재적 위해물질의 생물학적 영향을 정량적으로 평가할 수 있는 실험기법은 확립되어 있지 않은 실정이다. 분열중인 자주달개비 화분모세포는 외부의 유해자극에 매우 민감하여 감마선은 물론 비스페놀 에이에 대해 뚜렷한 선량-반응 및 농도-반응 관계를 나타내는 것이 밝혀졌다. 본 연구는 자주달개비 화분모세포를 생물말단점으로 이용하여 옥틸페놀과 감마선의 복합작용에 의한 영향을 분석하고자 수행되었다. 옥틸페놀을 1, 5, 10 μM 로 처리한 후 30 cGy의 일정한 방사선을 조사하였다. 옥틸페놀만을 처리하였을 때의 각각의 농도에 대한 미세핵 생성률은 4.20, 7.27, 4.93 MCN/100 tetrads로서 농도-반응 관계가 뚜렷하지 않았으나 옥틸페놀의 농도별 처리 후 30 cGy의 감마선을 조사하였을 때는 각각 10.13 ± 0.50 , 19.27 ± 1.51 , 24.47 ± 0.89 MCN/ 100 tetrads로서 뚜렷한 반응 관계를 나타내었다. 감마선에 의한 미세핵 생성률이 8.00 MCN/ 100 tetrads인 점을 감안하였을 때, 옥틸페놀과 감마선의 상승작용이 뚜렷하게 나타났음을 확인할 수 있었다. 따라서 자주달개비 화분모세포에 화학물질과 방사선이 복합적으로 작용하였을 때 나타나는 상승작용을 이용하여 저농도 유해화학물질의 영향을 정량화할 수 있다고 판단된다.

Abstract

Many kinds of synthetic chemicals have been being used for various purposes. Some of them are called 'Endocrine Disruptors' because they can

disturb the endocrine system of organisms. Presently no technique is established for the quantitative assessment of biological risk of the environmental hormones. The pollen mother cells (PMC) of *Tradescantia* are very sensitive to chemical toxicants or ionizing radiation, and thus can be used as a biological end-point for assessing their effects. Micronucleus frequencies in PMC showed a good dose- and concentration-response relationship for radiation and bisphenol A. The MCN frequencies in the pollen mother cells treated with octylphenol were 4.20, 7.27, 4.93 MCN/100 tetrads for 1, 5 and 10 μM , respectively. On the other hand, the frequencies were 10.13, 19.27, 24.47 MCN/100 tetrads for the octylphenol treatments (1, 5, and 10 μM) combined with 30 cGy irradiation. The MCN frequency of 30 cGy control was 8.00 MCN/100 tetrads. It is known from the result that the Trad-MCN assay can be an excellent tool for the detection of biologically harmful effects of environmental toxicants or synthetic chemicals.

서 론

일부 합성화학물질들은 생태계 및 인간의 생식기능저하, 기형, 성장장애, 암 등을 유발하는 것으로 추정하고 있으며, 이러한 합성화학물질을 내분비계 장애물질이라고 부른다. 이러한 내분비계 장애물질은 생태계 및 인간의 호르몬계를 저해 또는 교란하여 생물종에 위협이 될 수 있다는 우려를 낳고 있어 오존층파괴, 지구온난화 문제와 함께 중요한 환경문제로 대두되고 있다. 합성화학물질 중 옥틸페놀(octylphenol)은 고순도 페놀과 디이소부탄(diisobutene)을 반응시켜 만들어지며, 백색의 플레이크 상태로 유용성 페놀수지, 계면활성제, 합성고무용 접착부여제 등에 사용된다. 이들은 플라스틱용 화학물질로서 유해화학물질관리법에 의하여 관찰물질로 규정되어 있다. 합성화학물질들은 화학적으로 안정되어 있으므로 생분해성이 낮아 난분해성 물질로 구분되고 있다. 이들 난분해성 물질은 생물독성이나 생물농축성이 높아 저농도라고 할지라도 생태계에 미치는 영향이 매우 크다는 특징을 지니고 있다. 내분비계에 영향을 주는 물질의 검색방법을 개발하고 이용하는 것은 어떤 물질이 내분비계 장애물질이며, 이들의 독성학적 의미를 정량적으로 파악하고, 어느 정도의 농도에서 어떠한 영향을 나타내는가를 파악하는데 있어 상당히 중요하다. 내분비계 장애물질에 의하여 생태계 내에서 일어날 수 있는 부정적인 영향을 얼마나 잘 예측할 수 있는 지는 매우 중요하다. 또한 합리적인 위해성 평가와 규제를 위한 원인과 결과 및 농도-반응 관계가 구체적으로 밝히기 위한 방법이 개발되고 검증되어야만 한다. 이를 위해서는 환경에서 생물이 그 화학물질에 노출이 되는지 여부에 대한 연구, 특히 민감한 종 또는 개체에 대한 연구, 즉 지표생물에 대한 연구와 환경에서 영향을 예측하는 연구가 필요하다. 생물체의 생식기관은 방사선에 매우 민감한 세포들로 구성되어 있기 때문에 이온화방사선에 의한 손상이 쉽게 나타난다. 자주달개비의 화분모세포(PMC; pollen mother cell)는 감수분열을 통하여 4개의 꽃가루를 형성하는 응성 생식세포로서 방사선 또는 돌연변이원에 매우 민감

하다 [1-4]. 특히 감수분열중인 화분모세포의 염색체는 동일개체의 분열중인 체세포 염색체보다도 훨씬 방사선에 민감하다는 사실이 잘 알려져 있다 [4,5].

Trad-MCN assay와 같은 생물학적인 분석은 1,2-dibromoethane의 염색체변이 유발영향을 연구하기 위하여 처음으로 사용하였다 [6,12]. X-ray의 선량-반응곡선과 다른 민감도의 관계로서 좀더 명확해졌다 [12]. EMS, sodium azide, hydrazoic acid, cyclohexylamine과 maleic hydrazide와 같은 잘 알려진 돌연변이원을 가지고 확인하였다 [7,13]. 이 실험의 다양성과 효율성 때문에, 오염지역의 연속적인 현장감시를 수행하였고 화학물질을 검사함으로써 신뢰할 만한 결과를 얻었다. 이러한 시스템으로 maleic hydrazide의 돌연변이 유발력과 염색체변이 시스템을 인간혈구와 비교연구한 결과, 인간세포의 것과 식물세포의 유전적인 손상이 어느 정도의 범위까지는 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌다 [8,14]. 자주달개비의 미세핵분석법은 신속하고, 간단하며 환경유해물질 중 염색체변이의 영향이나 돌연변이 영향을 결정하는데 유효적절한 시스템이다.

본 연구는 Müller and Streffer (1991) [7,9]에 의하여 제시된 방사선에 대한 생물지표로서의 조건들을 상당 부분 충족시키며, 환경독성물질 및 저선량 방사선에 민감하게 반응하는 것으로 밝혀진 자주달개비를 대상생물로 이용하였다. 화분모세포 미세핵 생성률이 환경독성물질 중 내분비계 장애물질로 추정되는 옥틸페놀(octylphenol)의 농도에 따른 생물학적 변화를 확인하기 위하여, 방사선에 의한 화분모세포의 미세핵 생성률을 확인한 다음, 옥틸페놀을 처리한 후 방사선을 조사하여 옥틸페놀의 농도별 생물학적 반응을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료 : 실험용 식물체는 방사선에 민감하게 반응하면서도 자발돌연변이율이 비교적 낮은 *Tradescantia* 4430 클론을 사용하였다. 온실에서 건전하게 생육된 화서를 절취하여 실험군별로 20개 이상 (>200 화기)을 생장상 (growth chamber)에서 24시간 순치시킨 다음 실험에 사용하였다.

방사선 조사 : 방사선원은 ^{60}Co (선원강도 150 TBq, Panoramic Irradiator, AECL)을 이용하였고, 절취화서 (cuttings)가 시드는 것을 방지하기 위해 줄기가 양액에 침지된 상태로 공기중에서 0~50 cGy를 조사하였다.

옥틸페놀을 처리한 실험군에 대해서는 30 cGy의 한 선량만을 조사하였다. 방사선 조사가 끝난 화서는 새로운 Hougland's solution No.2 6배 희석액에 침지하여 생육상대에 두고 폭기를 실시하였다.

Octylphenol : 옥틸페놀 (1,1,3,3-tetramethyl-1-(4-hydroxyphenyl)-butane, FW:206.3, Sigma Co.)은 DMSO에 녹여 1, 5, 10 μM 의 농도로 희석하여 사용하였다 (DMSO 최종농도 0.6%). 순치된 화서를 각각의 농도별로 옥틸페놀의 처리액에 침지한 다음 폭기를 실시하면서 24시간 동안 처리한 후 방사선을 조사하였다.

미세핵 분석 : 화분모세포에 생성된 미세핵을 분석하기 위해서는 화서의 고정, 저

장 및 염색과정을 거쳐야 한다. 일련의 처리과정은 기 보고된 절차를 따랐다 [10,11]. 전처리가 끝난 후 실험군별로 10개의 프레파라트를 제작하고 광학현미경 하에서 미세핵을 계수하였다. 하나의 프레파라트에서 300개 이상의 4분자 염색체를 검경하여 100 사분자당 미세핵 수로서 각 실험조건별 미세핵 생성률을 산정하였다.

결과 및 고찰

방사선량-반응 관계 : 자주달개비 화서 내에는 다양한 발육상태의 화아들이 공존하고 있으며, 특히 이들 중 일부 화아 내에는 감수분열 중인 화분모세포가 포함되어 있다. 감수분열 중인 화분모세포는 방사선에 매우 민감하기 때문에 방사선을 받게 되면 염색체의 일부가 절단되어 미세핵을 형성하게 된다. 미세핵의 생성률은 방사선량의 증가에 따라 점차 증가하는 양상을 나타냈으나, 50 cGy 이상의 다소 높은 선량영역에서는 MCN 생성률의 변이가 매우 크게 나타나서 선량-반응 관계를 규정짓기는 곤란한 것으로 밝혀졌다. 그러나 0~50 cGy 선량범위에서 평균값보다는 최대 MCN 생성률이 갖는 선량-반응 관계가 뚜렷하다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1).

옥틸페놀에 의한 영향 : 옥틸페놀의 농도는 1, 5와 10 μM 을 처리하였다. 옥틸페놀의 용매로 사용된 0.6% DMSO 처리군의 화분모세포 미세핵생성률은 자발빈도인 $3.27 \pm 0.48 / 100$ tetrads를 나타내어 DMSO에 의한 영향은 없는 것으로 확인되었다. 옥틸페놀 1, 5, 10 μM 의 처리군에서의 미세핵생성률은 각각 4.20 ± 0.43 , 7.27 ± 0.32 , 4.93 ± 0.69 MCN / 100 tetrads로 농도에 따른 반응 관계가 명확하지 않았다. DMSO를 처리한 대조군과 비교하여 볼 때 미세핵 생성률의 유의성 있는 증가가 나타났지만 뚜렷한 농도-반응 관계를 규정하기는 곤란하였다. 이와 같이 화학물질의 처리와 관련된 생물학적 반응을 확인하기가 곤란하기 때문에 기존에 방사선을 이용한 자주달개비 미세핵 생성률의 선량-반응 관계를 이용하여 일정한 선량을 조사함으로써 화학물질에 대한 생물학적 반응을 명확하게 판단 확인할 수 있었다.

방사선과 화학물질의 상승작용 : 옥틸페놀을 24시간 동안 처리한 후 방사선을 조사한 실험군에서는 1, 5, 10 μM 의 농도에서 각각 10.13 ± 0.50 ($p < 0.001$), 19.27 ± 1.51 ($p < 0.001$), 24.47 ± 0.89 ($p < 0.001$) MCN / 100 tetrads로서 농도에 따라 미세핵 생성률이 뚜렷하게 증가하는 양상을 나타내었다 (Fig. 2). 옥틸페놀을 전처리후 방사선을 조사하였을 때 유발되는 자주달개비의 미세핵 생성률은 옥틸페놀의 농도보다는 방사선량에 크게 의존하는 양상을 나타내었고 더욱이 옥틸페놀의 5 μM 이상의 농도범위에서 방사선량에 의해 미세핵 생성률의 변화가 농도-선량에 따른 반응성이 뚜렷한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 본 실험의 경우 두 가지 요인이 복합적으로 작용하여 미세핵 생성률을 더욱 큰 폭으로 증가시키는 상승작용 (synergistic interaction)을 확인할 수 있었다. 두 가지 요인이 복합적으로 생물체에 영향을 미치는 경우 처리간의 시간간격은 물론 옥틸페놀의 농도와 방사선량이 모두 영향요인으로 작용하기 때문에 각 요인의 영향을 개별적으로 확인하는 것은 매우 어렵다. 그러나 두 가지 요인이 복합적으로 작용하는 경우 각각의 요인에 의한 영

향의 합보다 더 큰 영향이 유발될 가능성이 상존하기 때문에 복합적 영향을 해석하기 위해서는 상승작용 또는 길항작용의 여부를 반드시 고려해야 할 것이다.

결 론

산업이 고도화됨에 따라 합성화학물질과 일상생활 및 산업활동은 불가분의 관계를 유지하게 될 것이다. 합성화학물질이 가져다주었던 사고 및 부작용에도 불구하고 화학물질은 일상생활에서 편리성과 유연성으로 인하여 사용이 계속적으로 증가하게 될 것이다. 합성화학물질이 초래하는 부작용을 최소화하기 위한 방도로서 화학물질의 위해성 평가에 근거한 관리가 필요할 것으로 생각된다. 내분비계 장애물질의 영향은 연령, 농도 등과 같은 다양한 요인에 의하여 영향이 증가하는 경향을 가진 일반적인 화학물질과 다른 농도-반응 곡선을 나타낼 수 있기 때문에 이러한 합성화학물질의 위해성평가를 위해서는 새로운 접근법이 필요하다. 각각의 물질에 따른 영향의 민감도를 파악하여 우선 순위를 결정하며, 방사선에 의한 돌연변이 유발을 통하여 내분비계 장애물질이 영향을 나타내는 용량-반응에 대한 평가와 현재 상태의 오염 수준이 미치는 영향에 대한 평가를 위한 모델 및 위해성 평가 기법을 개발하는 것이 다른 무엇보다 절실히 필요하다.

본 연구에서는 방사선, 옥틸페놀이 자주달개비 화분모세포에 유발하는 미세핵 빈도의 선량·농도-반응 관계를 통하여 생물학적 영향을 확인하였다. 그 결과를 통하여 볼 때 Trad-MCN 분석법은 내분비계 장애물질 등 다양한 환경유해물질의 생물학적 영향을 검색하는데 유용한 생물학적 모델로 활용될 수 있다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부에서 시행하는 특정연구사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. T. H. Ma, "The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China", *Mut. Res.* 426, 103-106 (1999).
2. Z. Xu, and T. H. Ma, "Clastogenicity of formaldehyde fumes and X-rays evaluated by the *Tradescantia*-micronucleus assay", *Environ. Exp. Bot.* 39, 169-175 (1998).
3. T. H. Ma, "Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia* - A promising mutagen test system", *Mut. Res.* 64, 307-313 (1979).

4. T. H. Ma, G. J. Kentos, Jr. and V. A. Anderson, "Stage sensitivity and dose response of meiotic chromosomes of pollen mother cells of *Tradescantia* to X-rays", *Environ. Exp. Bot.* 20, 169-174 (1980).
5. K. Sax, "Chromosome aberrations induced by X-rays", *Genetics* 23, 494-516 (1938)
6. J. H. Taylor, "The duration of differentiation in excise anthers". *Am. J. Bot.* 37, 137-140 (1950).
7. W. F. Grant, "Higher plant bioassays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations--a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals", *Mut. Res.* 426, 107-112 (1999).
8. J. R. K. Savage, and D. G. Papworth, "An investigation of LET 'finger-prints' in *Tradescantia*", *Mut. Res.* 422, 313-322 (1998).
9. D. Steffensen, "Induction of chromosome breakage at meiosis by a magnesium deficiency in *Tradescantia*", *Proc. Nat. Acad. Sci.* 39, 613-620 (1953).
10. D. Steffensen, "Breakage of chromosomes in *Tradescantia* with a calcium deficiency", *Proc. Nat. Acad. Sci.* 41, 155-160 (1955).
11. J. A. Heddle, "A rapid *in vivo* test for chromosome damage", *Mut. Res.* 18, 187-190 (1973).
12. Ma, T. H., A. H. Sparrow, A. H. Sparrow, L. A. Schairer, and A. F. Anderson, "Effect of 1, 2-dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*". *Mut. Res.* 58, 251-258 (1978).
13. Ma, T. H, and V. A. Anderson, "Micronuclei induced by ultraviolet light and chemical mutagens in pollen mother cells of *Tradescantia*", *Environ. Mut.*, 1(2): 123-124 (1978).
14. Ahmed, I, and T. H. Ma, "Chromosome breakage induced by maleic hydrazide in cultured human lymphocytes and *Tradescantia* pollen mother cells", Proc. 11th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society. Abstract, (1980).

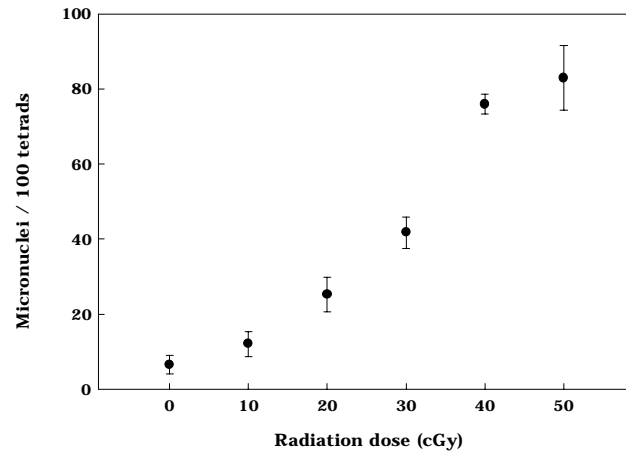


Figure 1. Micronucleus frequencies induced by radiation in the pollen mother cells of T-4430.

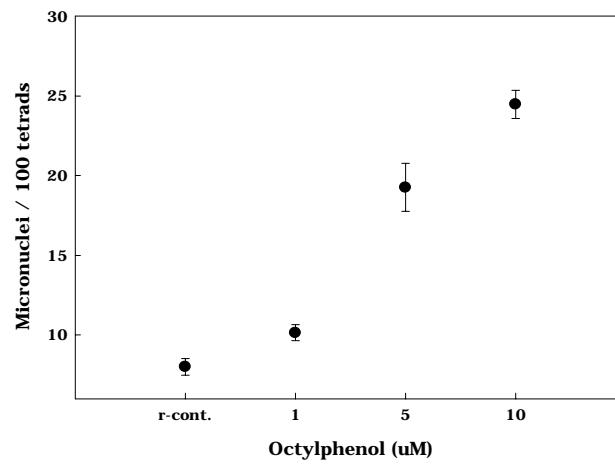


Figure 2. Micronucleus frequencies induced by radiation in the pollen mother cells of T-4430 pretreated with octylphenol.