

14. Benzopyrene에 노출된 광어(*Conger myriaster*) 혈액 cells과 개조개(*Saxidomus purpurata*) 조직 cells을 이용한 *in vivo* DNA single strand breakage

김소정, 오로라, 하병혁, 최은석, 장만, 이택건
한국해양연구원 남해 연구소

요 약

유해 화학 물질류에 의해 오염된 해양 환경 시료의 환경독성 수준을 평가하기 위하여 다양한 화학 물질에 대해 민감성이 우수한 생물학적 독성평가기법을 개발 하고자하였다. 지속성 유기오염 물질 중 다환 방향족 탄화수소(PAHs)를 처리한 광어(*Conger myriaster*)와 개조개(*Saxidomus purpurata*)의 DNA 손상정도를 single cell gel electrophoresis assay(comet assay)를 통해 분석하였다. PAHs 중 광양탄에서 높은 농도로 검출되는 benzo(a)pyrene을 농도별(0, 10, 50, 100 ppb)로 처리한 후 2일과 4일에 광어의 혈액세포와 개조개의 근육세포를 채취해 comet assay를 실시하였다. benzo(a)pyrene에 대한 DNA 손상정도를 처리된 농도와 생물종에 따라 다르게 나타났는데 광어의 혈액세포는 2일에 가장 DNA 손상정도가 높았고, 4일에는 회복되는 경향을 나타냈다. 개조개의 근육세포는 시간이 지나면서 DNA 손상정도가 증가하는 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 comet assay 기법이 유해 화학물질로 오염된 해양생물 종의 환경독성을 검색하는 유용한 수단이 될 수 있음을 보여준다.

서 론

산업기술의 발달로 인하여 자연계에 존재하지 않았던 많은 새로운 독성물질이 자연계로 유입되어 심각한 환경문제가 야기되며, 각종 오염원이 매우 심각한 환경오염을 유발하고 있다. 최근 수질의 오염문제가 심각해지면서 수질오염을 일으키는 물질들이 수중생물에 미치는 영향에 대하여 많은 연구가 이루어 졌다(Lopes, *et al.*, 1994). 유해독성물질들은 물질의 농도가 낮아도 물질자체가 고 독성이거나 2차 대사산물의 독성이 원래 물질보다 더 강할 수 있으며, 더욱이 생체 축적성이 큰 경우에는 생물체가 독성물질에 노출된 시점으로부터 장시간이 경과되어야만 물질의 독성이 발현되는 것으로 알려져 있다. 그러나 화학물질에 의한 수질오염은 수많은 물질들이 함께 존재하는 경우가 대부분이기 때문에, 단지 이화학적 분석방법만으로는 수중생물의 서식환경을 좌우하는 수질을 파악하기는 어렵다. 따라서 환경조건변화에 민감하게 반응하는 생물의 특성을 이용하여, 수 환경의 건강성을 평가할 수 있는 생물검정기법(biological assay)의 개발이 요구된다(황인영, 1997). 생물학적 지사자(biomarkers)를 이용한 생물학적 검정법에는 어느 특정 화학 물질 군에 대하여 특히 예민한 반응을 나타내는 수가 있다(Keddy, *et al.*, 1995). 수 환경은 많은 화학물질들에 의해 오염되어 있는 경우가 많으므로, 생물검정법을 사용하여 환경오염수준을 평가하기 위해서는 단일 생물 종보다 다양한 생물 종들을 이용하는 것이

바람직하다. 생물검정기법에 이용하고자 하는 생물로는 사육, 관리 등의 취급이 용이하여 시험비용이 비교적 적게 들고 인위적인 방법에 의하여 연중 생활환을 유지, 지속시킬 수 있는 생물 종의 선택이라야 한다(정금희, 1997).

오늘날 생물학적 기법에 의한 환경독성 평가하는 다양하게 연구되어지고 있는데, 특히 세포 내 DNA에 대한 독성물질의 영향은 많은 생물체를 대상으로 연구되어 왔다(Tice, *et al.*, 2000 ; Mitchelmore, *et al.*, 1998). 이들 중 가장 많이 적용되고 있는 기법은 DNA adduct, chromosomal aberrations, comet assay 및 micronuclei 측정 등을 들 수 있다. 그 중에서 comet assay는 DNA 손상을 알아보는 대표적인 방법이며, single cell gel electrophoresis라고도 하는데, Ostling and Johanson(1984)에 의해 처음 소개되었다. 이 기법을 이용하여 최근 연구가 많이 이루어지고 있는데 예를 들면, Scotland UK의 Loch Leven 해안에 살고있는 담치류(*Mytilus edulis*)의 오염정도를 알아보기 위하여 실험실내에서 benzo(a)pyrene(BaP)을 이용하여 *in vivo* 실험을 실시한 결과 농도가 높을수록 DNA의 손상정도가 크게 나타났으며(Large and Shaw, 2002), 오염 유출로 인해 해양의 피해정도를 알아보기 위하여 Newfoundland를 중심으로 여러 가지 실험을 실시하였는데, 현장 시료와 비교해 보기 위한 비교실험으로 실험실 내에서 arabian crude oil(ACO)에 노출시켜 DNA 손상 정도를 알아본 결과 DNA migration이 나타났다(Hamoutene, *et al.*, 2002). Petroleum hydrocarbon은 방향족 탄화수소(PAHs)가 주류를 이루고 있으며, 저농도 PAHs는 개체수준 이하의 세포에 강력한 DNA 손상을 준다(Monteiro, *et al.*, 2002). 특히, 과거에는 *in vitro* 실험이 대부분이었으나 최근에는 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo* 연구도 다양한 분야에서 시도되고 있다(Tice, *et al.*, 2000).

본 연구에서는 독성평가를 하기 위한 생체 지표로서 세포수준에서 DNA 손상을 확인하는 comet assay를 실시하였다. Comet assay는 DNA를 denature시킨 후 세포내의 single strand DNA fragment를 전기적인 영향아래 세포 밖으로 이동시켜 원래구조에서 변화된 tail의 형태를 보이게 됨으로써 DNA 손상여부를 알아볼 수 있는 방법이다(Singh, *et al.*, 1998 and Shaw, *et al.*, 2000). comet assay는 세포질 유전에 관한 assay 중 세포수준에서 결과를 얻을 수 있는 고유한 방법으로 최근 널리 사용되고 있는 방법이다(Diane, *et al.*, 1996). 이 기법은 실험과정이 간편하며, 단일 세포에서 정량이 용이하며, 적은 시료를 이용하여도 실험이 가능하며, 현미경 상으로 직접 눈으로 확인할 수 있고, 정량까지 단시간 내에 마칠 수 있는 장점을 가지고 있어 수 환경의 건강성을 평가 관리하는데 적절한 지표로 평가되고 있다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서는 양식장 등에서 손쉽게 구입가능하고 해양에 널리 서식하고 있는 생물 종으로 광어(*Conger myriaster*)와 개조개(*Saxidomus purpurata*)를 실험 종으로 선택하여 구입 후 3~4일 정도 순치 시킨 후 실험을 실시하였다. 먹이는 2차 오염을 막기 위하여 실험을 실시하는 동안 공급하지 않았으며, 선정된 대상 생물체의 크기는 광어는 150~200 g, 개조개는 50~70 g 정도의 크기를 가지고 실험을 하였다.

노출 방법

PAHs 중 광양만에서 검출되는 대표적인 오염물질인 Benzopyrene을 시험대상물질로 선정하였다. 노출 농도는 1, 10, 50, 100 ppb로 희석하여 사용하였고, 각각이 수조 당 어류는 5마리 패류는 4마리를 기준으로 하여 노출기간까지 표시되도록 하였다. 노출기간은 4일이며, 각 번호표가 부착된 5마리 광어를 0, 2, 4 day 채혈하였고, 패류는 농도별로 1마리씩 처리하여 실험을 실시하였고 위의 실험은 동일 조건으로 두 번 반복실험을 실시하였다. (-)대조구로는 DMSO를 (+)대조구로는 hydrogen peroxide (100 uM)을 10, 20, 40, 80 ul씩 처리하여 사용하였다 (4 °C 2 hr). 노출방법은 정체식으로 가로×세로×높이 (50×30×30 cm)인 간이 수조를 이용하여 농도별로 25 l로 맞추어 실험을 실시하였다. 시험수 교환은 2일에 한번 교체하였고, 수온은 18~20 °C가 유지되도록 항온 항습기를 설치하여 온도를 일정하게 유지시켜 주었으며, aeration은 계속 유지시켜 노출 실험을 실시하였다.

시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 Sigma사(St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였고, 전기영동 기기는 Pharmacia사(Amersham Pharmacia Biotech. USA) 그리고 원심분리기는 Hanil Microspin Centrifuge(Hanil Co., Korean)를 이용하였다. DNA 손상정도를 알아보기 위한 기기로서 형광 현미경은 Lecia microsystem(Lecia. German)을 이용하였고 KOMET IMAGE ANALYSIS SYSTEM(Kinetic Imaging Ltd.)의 software를 이용하여 정량 분석하였다.

시료의 전처리

광어의 꼬리 부분에서 1 ml syringe를 이용하여 1~0.5 ml 정도 혈액을 뽑아 굳지 않은 상태의 혈액을 phosphate buffered saline(PBS) 1 ml에 현탁시켜 원심 분리(5000 rpm. 10 min)하여 상등액을 버리고 pellet부분을 PBS 1 ml에 다시 현탁시켜 사용하였고, 개조개 근육조직을 일정한 크기로 절단하여 5 ml hanks balanced salt(HBS)을 넣고 homogenizer를 이용하여 분쇄시킨 다음 40, 20 μm

mess로 여과 후 원심 분리(5000 rpm. 10 min)하여 pellet을 0.3 ml의 HBS의 재부유 시킨 후 실험에 사용하였다(Birmelin, 1998).

Comet assay 방법

1 % LMAgarose가 얇게 입혀진 slide에 시료 10 μ l을 0.65 % LMAgarose 100 μ l 현탁시켜 slide에 올리고 cover glass을 덮고 굳혔다. 다시 0.65 % LMAgarose 100 μ l입혀 굳힌 후 슬라이드 제거시키고 냉장고에 보관된 lysis buffer (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.01M Tris-HCl)에 담구어 4 $^{\circ}$ C에서 최소 2 시간 방치시켰다. Lysis buffer에 보관된 slide을 꺼내어 증류수에 담구어 염을 제거한 다음 1X electrophoresis/unwinding buffer (10 N NaOH 54 ml, 0.2 M EDTA 9 ml, 증류수 1737 ml.)을 15분 정도 정치시킨 다음 염을 제거한 slide을 buffer에 담군 후 25 V 300 mA에서 20분간 전기영동 시켰다. 전기영동 후 조심스럽게 slide을 건져내고 4 $^{\circ}$ C 0.4 M Tris pH 7.5 담긴 coplin jars에 옮겨 5분 정도 담구어서 중화시켰다. 다시 4 $^{\circ}$ C ethanol에 5분간 담군 다음 R.T.에서나 37 $^{\circ}$ C에서 슬라이드를 dry 시킨다. 적당한 슬라이드 보관용기에 넣어서 저장 후 counting 실시하는데, 60 μ l working stock EtBr(2 μ g/ml) 슬라이드에 떨어뜨린 후 slide cover을 덮고, \times 400배율로 한 slide당 50개 썩 counting을 하는데 DNA 파괴로 인하여 발생한 Comet 형태를 각각의 밝기와 tail의 길이로 비교 정량화 분석하였다. 사용된 기기는 KOMET IMAGE ANALYSIS SYSTEM으로 분석하였다 (Tice, 1998).

결과 및 고찰

광어의 혈액 세포와 개조개의 근육 세포에 hydrogen peroxide(H_2O_2 100 μ M)을 최저 10 μ l, 최고 80 μ l를 노출하여 *in vitro* test을 하였다. Figure. 1.에서와 같이 H_2O_2 의 농도가 높아질수록 전형적인 DNA strand breakage 일어나 tail movement가 일어났다(Devaux *et al.*, 1997). 생물체 종이 다르지만 핵의 크기나 형태는 거의 동일하였고, Figure. 2, 3에서도 보는 바와 같이 정량(tail length, head DNA)되는 값도 큰 차이를 나타나지 않았다. H_2O_2 처리농도가 높아질수록 Tail length가 길어지고 반면에 head DNA 점점 작아지는 결과가 나타났다. 생물체 종이 다를수록 약간 다른 경향을 나타냈으며, 광어의 혈액 세포가 개조개의 근육 세포에 비해 민감하게 나타났다(Fig. 2A~D).

어류는 개체별로 생리 변화를 알아보기 위하여 각각 개체별로 label을 실시하여 0, 2, 4 day 동안 sampling을 하여 DNA 손상을 관찰하였고, 패류는 농도별로 1마리씩 처리하여 실험을 실시하였다. Figure. 3A와B에서 보는 바와 같이 혈액세포는 대조군에 비해 benzo(a)pyrene의 농도가 높아질수록 tail length가 길어지며 노출기간이 4 day보다 2 day가 더 민감한 반응을 나타내었다. 이에 반해 패류의 근

육조직 핵은 benzo(a)pyrene의 농도가 높아질수록 tail length가 길어지며 노출기간이 길어질수록 DNA 손상을 더 많이 받는 것으로 나타내었다(Fig. 3 C and D).

본 연구에서 얻어진 결과로서 다음과 같은 결론을 내릴 수 있다.

1. 유해화학물질로 오염된 수 환경독성을 평가하기 위한 시험 생물 종으로 광어(*Conger myriaster*)와 개조개(*Saxidomus purpurata*)를 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다. 그 이유로는 해양에 널리 서식하고 있고 실험실이나 현장에서 사육관리가 용이하고, 어류의 경우는 노출실험 전후 채혈이 가능하기 때문이다.

2. 유해 화학물질로 오염된 생물체의 환경독성을 검색하는 수단으로서 comet assay 기법이 유용함을 의미하고 있다. 이는 실험실 내에서 benzopyrene을 이용하여 *in vivo* DNA single strand breakage 실험을 실시한 결과 노출 농도에 따라 큰 차이를 나타냈으므로 환경독성 상태를 진단할 수 있는 양호한 biomarker 라고 판단된다.

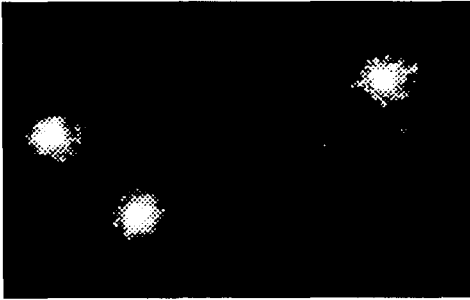
3. Single cell gel electrophoresis assay(comet assay) 기법은 다양한 육, 해상 오염원으로 인해 오염되었을 가능성이 높은 광양만의 해양 환경 현황을 환경독성학적 기법으로 평가하기 위한 생물검정기법(biological assay)이라고 사료된다. 향후 지속적인 biomarker 개발과 현장시료를 이용한 실험을 병행할 필요가 있다고 사료되어진다.

참 고 문 헌

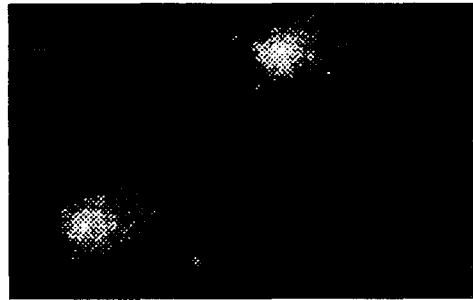
- 정금희. 1997. 산업폐수의 환경독성 평가기법 인체 환경연구소 제6회 심포지움 논문집. 19-36
- 황인영. 1997. 생물학적 지사자에 의한 수질 오염평가. 인체 환경연구소 제6회 심포지움 논문집. 37-50
- Birmelin C., Mitchelmore C. L., *et al.*, 1998. Characterisation of biotransformation enzyme activity and DNA integrity in isolated cells of the digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 120:51-56
- Devaux A., Pesonen M., Monod G., 1997. Alkaline Comet Assay in Rainbow Trout Hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 11:71-79
- Diane E. Nacci, Stephanie Cayula, Eugene Jakim, 1996. Detection for DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aqu. toxic.*, 35:197-210
- Hamoutene D., Payne J. F., *et al.*, 2002. Use of the Comet assay assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and calms exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Mar. Envir. Res.*, 11:71-79

- Keddy C. J., Greene J. C., *et al.*, 1995. Review of whole-organism bioassays : soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotox. Environ. Safe.*, 30:221-251
- Large A. T., Shaw J. P., L. D., *et al.*, 2002. Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Envir. Res.*, 49:453-467
- Lopes Celeste M., Donato Ana M., 1994. Comparative study between the toxicity of 3,4-dichloroaniline and sodium bromide with 21 days chronic test and using lactate dehydrogenase activity of *Daphnia Magna* straus. *Chemosphere.*, 28:2021-2027
- Mirjana Pavlica, Klobucar, Goran I. V., Nina Mojas, 2001. Detection of damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mut. Res.*, 490:209-214
- Mitchelmore C. L., Chipman J. K., 1998. DNA and breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mut. Res.*, 399:135-147
- Monteiro P. R. R., Reis-Henriques, M. A., Coimbra J., 2000. Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Envir. Res.*, 49:453-467
- Raymond Tice, PhD and Marie Vazquez B. S., 1998. Protocol for application of the pH > 13 alkaline single cell gel assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. *Integrated Laboratory Systems*
- Shaw J. P., Large A. T., Chipman J. K., 2000. Seasonal variation in mussel *Mytilus edulis* digestive gland cytochrome P450IA- and 2E-immunoidentified protein levels and DNA strand breaks (comet assay). *Mar. Environ. Res.*, 50: 405-409
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., and Schneider E. L., 1988. A simple technique for quantitative of low levels of DNA damage individual cell. *Exper. Cell Res.*, 175:184-191
- Tice R. R., Agurell E., Anderson D., *et al.*, 2000. Single cell gel / comet assay : Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Envir. Mol. Mutagen.*, 35:206-221

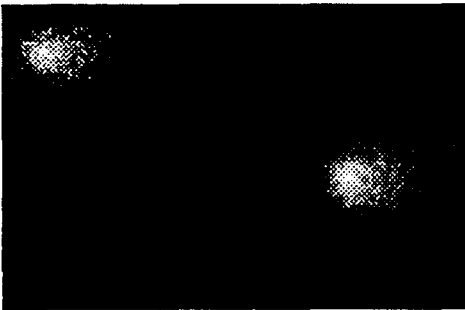
A.



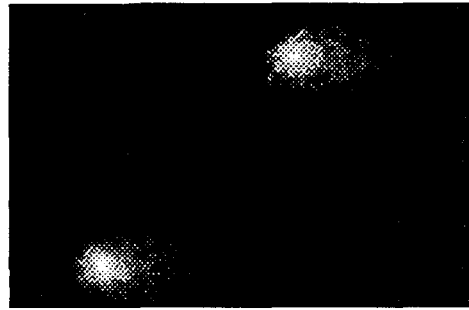
B.



C.



D.



E.



- | | |
|----|--|
| A. | CONTROL |
| B. | 100mM H ₂ O ₂ 10ul |
| C. | 100mM H ₂ O ₂ 20ul |
| D. | 100mM H ₂ O ₂ 40ul |
| E. | 100mM H ₂ O ₂ 80ul |

Fig. 1. Fluorescence microscopy images of flounder blood cell ($\times 400$). (A) Nuclei from control blood cell consist of a head with no or minimal DNA migrating into the tail region. (B~E) Nuclei from blood cell exposed to 100 mM H₂O₂ (10, 20, 40, 80 ul) consist of a head with DNA migrating into the tail region as a result of strand breakage.

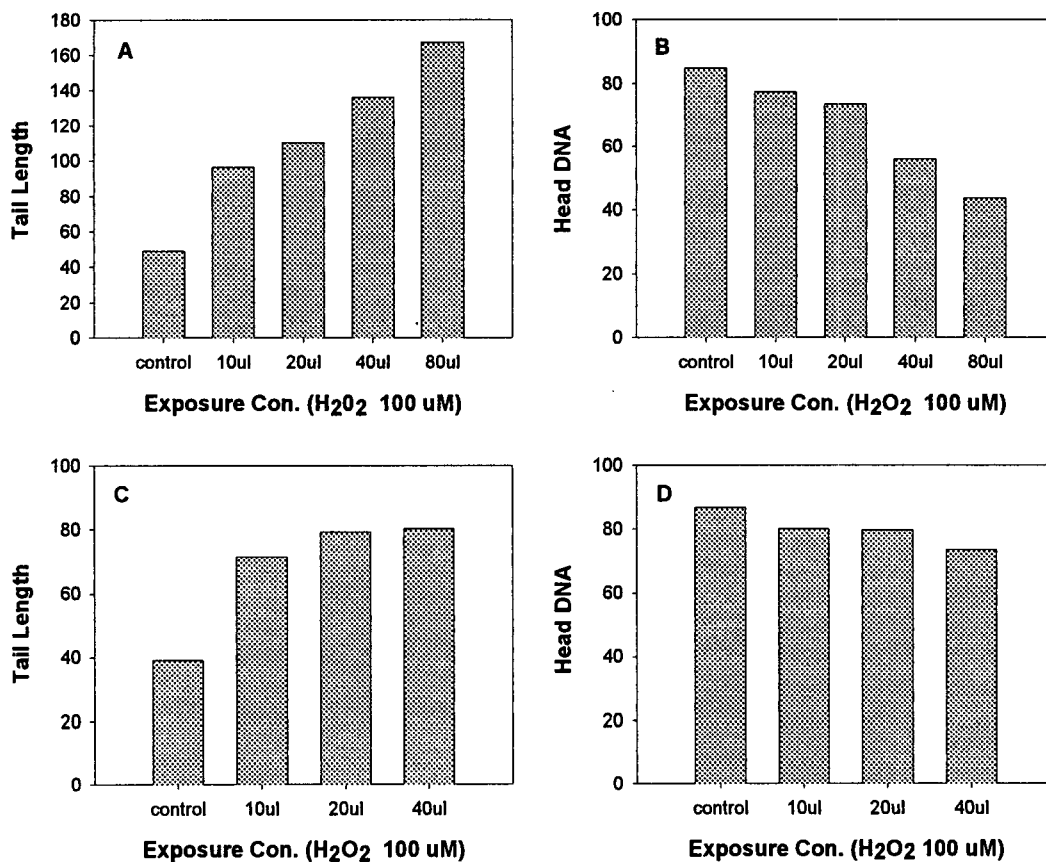


Fig. 2. Levels of DNA damage in flounder blood cells (A and B) and clam tissue cells (C and D) exposed in vitro for 2hr (4 °C) to different concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂ 100 uM). Three slide were prepared per assay and 50 nuclei were counted per slide.

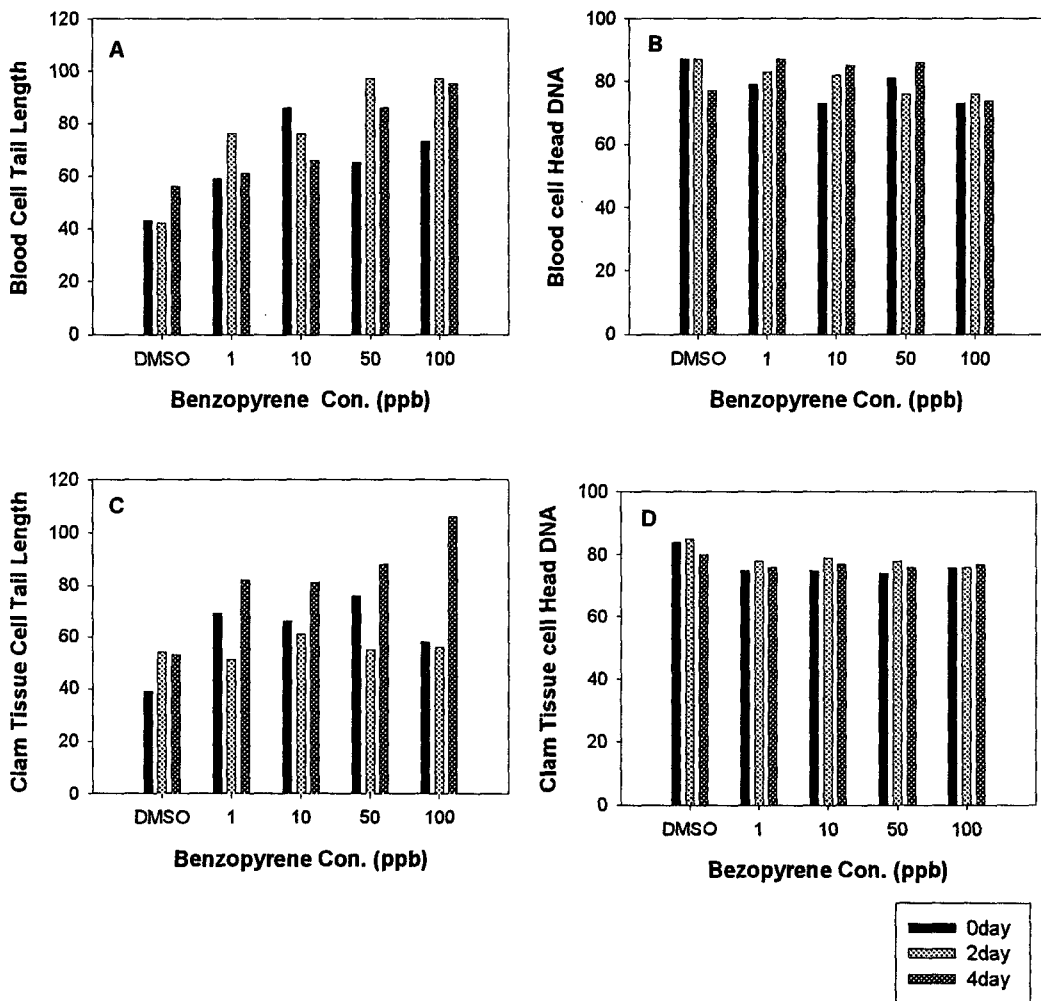


Fig. 3. Effect of exposure to benzopyrene for different concentration and period on the DNA damaged in flounder blood cells (A and B) and clam tissue cells (C and D). Three slide were prepared per assay and 50 nuclei were counted per slide.