

중금속이 축적된 남극 큰띠조개의 신장에 대한 면역조직학적 및 미세구조적 연구

이용석, 안인영¹, 김완중, 정계현

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부 생물학전공, ¹한국해양연구원 극지연구본부

An Immunohistochemical and Ultrastructural Study of the Heavy Metals accumulated in the Kidney of an Antarctic Clam, *Laternula elliptica*

Yong-Seok Lee, In-Young Ahn¹, Wan-Jong Kim and Kye-Heon Jeong

Department of Biology, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, 336-745, Korea

¹Polar Sciences Laboratory, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan, 425-170, Korea

ABSTRACT

The kidney of bivalve mollusks often contains remarkably high concentrations of both essential and non-essential metals and perform regulating and detoxicating activities. The kidney has also been proposed as a biological indicator for radioactive as well as for stable metals in the sea. The present study of the Antarctic clam, *Laternula elliptica*, concerns the functional morphology of the kidney epithelium, which contains highly accumulated heavy metals.

The immunohistochemical and ultrastructural study was undertaken in order to find out the localization of metallothionein and heavy metals accumulated in the kidney of *Laternula elliptica*. In the immunohistochemical investigation, an intense metallothionein immunostaining reaction was found in the epithelial cells of the kidney of *Laternula elliptica*. Transmission electron microscopy showed that the epithelial cells contained numerous electron-dense inclusion bodies which were considered to be accumulated heavy metals.

Keywords: Antarctic clam, Kidney, Heavy metal, Immunohistochemistry, Metallothionein.

서 론

남극의 저서환경은 기온의 변화가 심하고 건조한 육상 환경과는 달리 연중 수온 (0-2℃) 과 염분의 변화가 거의 없는 (34.6-34.9%) 물리적으로 매우 안정된 환경을 갖추고 있어 종 다양성이 매우 높고 생물량도 풍부하다 (Ahn, 1994). *Laternula elliptica* (남극큰띠조개) 는 연체동물 문 (Mollusca), 부족 강 (Bivalvia), 석공조개 목 (Pholadomyoidea), 띠조개 과 (Laternulidae) 에 속하는 남극 고유종으로써, 남극대륙 및 섬 주변의 모래나 자갈로 구성된 퇴적물로 이루어진 수심 20-30 m 내외의 수심에 많이 서식하고 있으며 우리나라 남극기지인 세종기지 주변에서도 많은 개체수가 발견되고 있다. *Laternula elliptica*는 걸러먹기를 하며 인근해의 탄소순환에 매우 중요한 역할을 하고 있는 것으로 밝혀졌으며 (Ahn, 1993), 주변 환경에 비해 상당히 많은 중금속을 축적하고 있는데, 그 중 신장에 매우 많은 양이 축적되는 것으로 알려져 있는데, 그 중 신장에서의 카드뮴 (Cd) 의 양은 다른 중금속에 비해 20-200 배 더 많이 축적되어 있는 것으로 밝혀졌다 (Ahn et al., 1996).

일반적으로 척추동물의 경우 중금속에 노출되는 경우 대부분 간 및 신장에 축적이 되며, 이때 미세구조적인 변화가 시간이 흐름에 따라 매우 눈에 띄게 변화되는 것으로 알려져 있다 (Dudley et al., 1984). 하지만 연체동물들의 경우는 척추동물의 간에 해당하는 소화선 (digestive gland) 보다 신장에 좀더 많이 축적이 되며, 세포막 부근에서 농축과정을 거치고 과립을 형성하는 해독작용을 하여 자신에게 해를 주지 않는 내성을 지니고 있다. 이러한 결과는 이미 가리비, 삿갓조개 등 여러 종류

Received October 18, 2001; Accepted May 25, 2002

Corresponding author: Lee, Yong-Seok

Tel: (82) 42-860-4471 e-mail: bioysl@mail.kribb.re.kr

1225-3480/18103

© The Malacological Society of Korea

의 조개 등을 통한 많은 실험들에 의해 입증되었으며, 일부 북극류에서도 비슷한 실험이 행해진 바 있다(Stephan *et al.*, 1980). 그래서 연체동물의 신장은 바다의 안정한 금속의 생물학적 지표 (biological indicator) 로 제안되어 지고 있다(Nigro *et al.*, 1992).

어떠한 동물이건 중금속이 체내에 유입되면 미세구조의 변화는 물론, 생리적인 변화도 일어나는데, 가장 뚜렷한 변화는 중금속친화성 단백질인 metallothionein (MT) 의 증가이다. MT는 일종의 stress protein으로 여겨지는데, 최근 biomonitoring의 매우 좋은 도구로 여겨지고 있으며(Viarenco *et al.*, 1999), 이를 면역조직화학연구를 통해 조직에 어떻게 분포하는가를 알아보는 연구들이 많이 수행되고 있다 (Ioachim *et al.*, 2000; Tomita and Matsubara, 2000).

본 연구에서는 *Laternula elliptica* 신장의 조직학적 및 미세구조적 연구를 통하여 체내에 유입되어 있는 중금속의 농축 방식을 알아보고 이에 따른 MT분포의 양상을 면역조직학적 방법을 이용하여 살펴본다 생물학적 지표로 매우 유용한 *Laternula elliptica*에 대한 기초 자료로 활용하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. *Laternula elliptica*의 채집 및 보관

재료로 사용된 남극큰띠조개 (*Laternula elliptica*) 는 우리나라의 남극기지인 세종기지의 앞 Marine Cove 근방에서 채집하였다. 미세구조를 보존하기 위하여 채집 직후 바로 해부하여 신장을 적출한 후 고정액 침투를 용이하게 하기 위하여 여러 조각으로 자른 후 1 M phosphate buffered 2% glutaraldehyde (pH 7.2) 고정액에 넣은 후 4℃를 유지하며 운반하였다.

2. 면역조직학적 연구

운반되어진 시료는 고정액을 만들 때 사용되었던 것과 같은 조성의 1 M phosphate buffer (pH 7.4) 에서 24시간동안 세척 한 후 적당한 크기로 세절한 후 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 2회의 순서로 alcohol을 사용하여 탈수한 후 xylene:alcohol 비율 1:2, 1:1, 2:1 100% xylene의 순서로 투명화 작업을 거친 다음 액화된 paraffin:xylene 비율 1:1, 2:1, 100% paraffin의 순서를 거쳐 paraffin에 포매하여 블록을 제작한 후 상온에서 1일 방치 후 절편제작에 용이하도록 냉동고로 옮겼다. 완전히 굳은 블록은 rotary microtome을 사용하여 6 μm의 두께로 절편을 제작하였다. 제작이 끝난 절편은 metallothionein을 localization 하기 위한 면역조직화학실험을 위해 deparaffin을 하였다.

Deparaffin이 끝난 조직은 Hydrogen peroxide로 처리한 후 비특이적인 면역반응을 제거하기 위해 15 mM sodium azide와 blocking protein이 들어있는 PBS 용액으로 처리한 후 Dako사의 monoclonal mouse metallothionein antibody (Code No. M0639)를 primary antibody (anti-MT) 로 사용하여 10분간 반응시킨 후 secondary antibody에서 10분간 link 시키는 반응을 실온에서 실시하였다. 그 후 streptavidin peroxidase와 substrate-chromogen 용액에 각각 10분간 반응시킨 후 증류수로 조심스럽게 헹구어 낸 후 필요한 경우 hematoxylin 으로 counter staining 하여 Optiphot-II (Nikon) 광학현미경으로 관찰하였다. 이러한 면역조직화학적 실험을 위하여 DAKO's LSAB (Labelled Streptavidin Biotin) kit를 사용하였다.

3. TEM을 이용한 미세구조 관찰

미세구조 관찰을 위하여 전자현미경용 초박절편을 제작하였다. 운반되어진 시료는 광학현미경용 표본에서와 마찬가지로 고정액을 만들 때 사용되었던 것과 같은 조성의 1 M phosphate buffer (pH 7.4)에서 6 시간동안 세척 한 후 1% OsO₄에서 2시간동안 후고정 한 후 다시 동일한 buffer로 5분씩 3회 세척 한 후 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 2회의 순서로 Merck alcohol을 사용하여 탈수한 후 acetone 치환 과정을 거친 후 Epon 812에 포매한 후 37℃에서 12시간, 45℃에서 12시간 60℃에서 48시간 동안 열중합 하여 초박절편용 블록을 제작하였다. 그 후 블록은 ultramicrotome과 diatom을 이용하여 70-80 nm의 두께의 초박절편을 만든 후 200 mesh copper grid에 얹은 후 uranyl acetate에서 20분, lead acetate에서 5분간 이중전자 염색을 한 후 투과전자현미경 (JEM-1010) 을 이용하여 관찰하였다.

결 과

1. 면역조직화학적 연구결과

남극큰띠조개의 신장상피는 일반적인 연체동물들과 마찬가지로 원주세포들로 이루어져 있었으며, 그 세포의 크기는 다양한 편이었지만, 대부분 약 30 μm 정도로 관찰되었다. 상피세포의 기저층 아래에는 근육층이 있었고 그 하부는 소성 결합조직으로 이루어져 있었다. 큰띠조개의 신장상피조직에서 중금속에 의해 유도된 MT의 위치를 확인하기 위하여 DAKO'S LSAB KIT를 이용한 면역조직화학 실험결과 세포들의 상단에서 매우 강한 anti-MT 반응을 보였다 (Fig. 1-4)

2. 미세구조 관찰결과

큰띠조개의 신장상피의 미세구조를 관찰한 결과 모든 세포가 전반적으로 활동성이 강한 편이었으며 이들 세포들은 크게

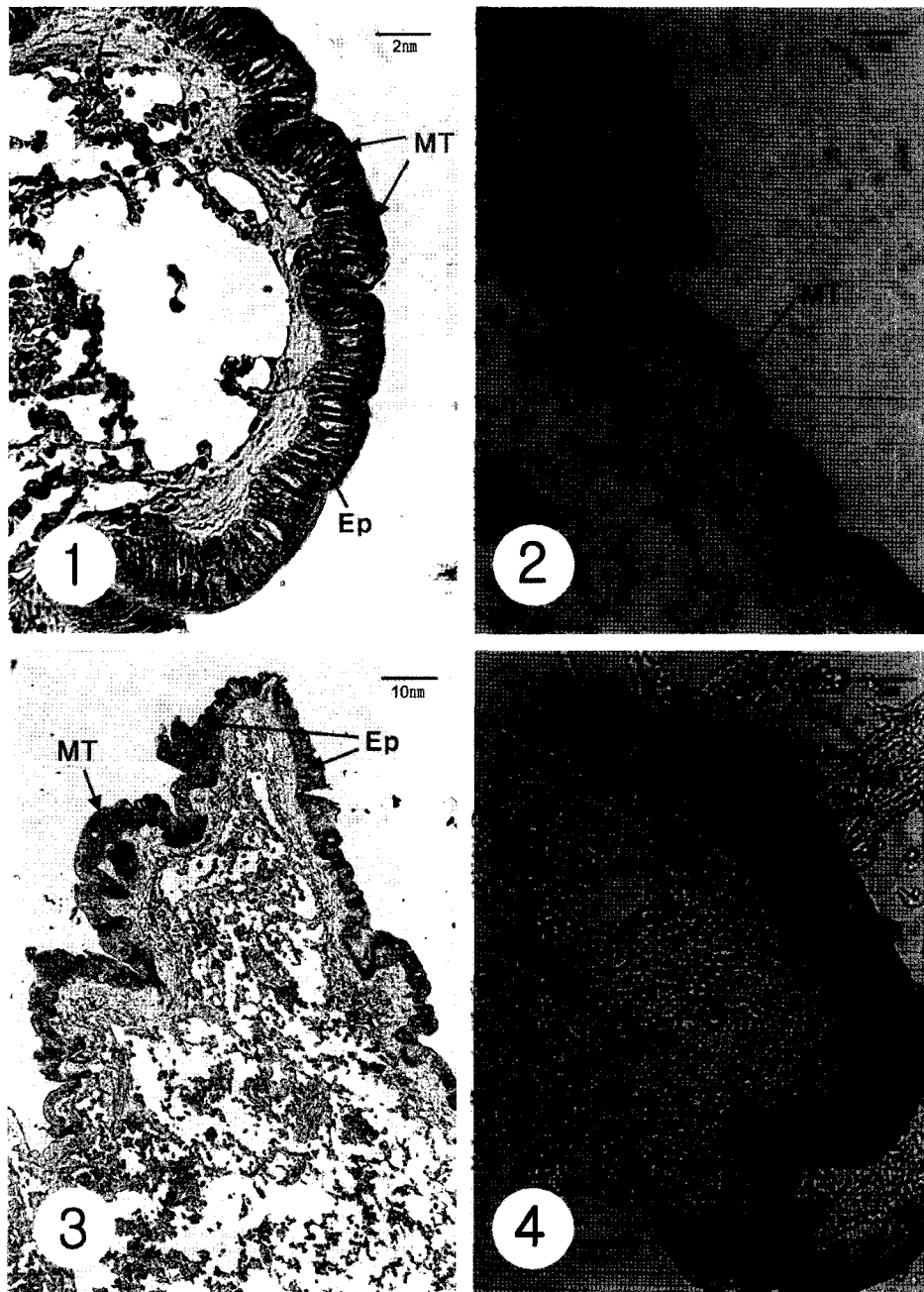


PLATE 1. Light micrographs of renal epithelium of *Laternula elliptica*.

Fig. 1. Counter-staining of hematoxylin after immunostaining. The apical cytoplasm of the renal epithelial cells (Ep) shows strong reaction to the anti-metallothionein immunostain. MT: metallothionein

Figs. 2-4. Metallothionein immunostaining.

2종류의 세포유형으로 분류되었다. 첫 번째 유형 (Type 1) 은 신장상피조직의 대부분을 이루고 있는 세포로서 유리표면에 매

우 많은 microvilli를 가지고 있는 원주세포였다. 이 세포는 잘 발달된 핵을 가지고 있었는데, 핵 내부의 대부분이

euchromatin으로 이루어져 있었으며, 잘 발달된 인도 함유하고 있었다. 세포질은 대체로 전자밀도가 높은 편이었고, 상당수의 mitochondria도 관찰되었다. Microvilli의 길이는 1-1.5 μm 정도였다 (Fig. 5). 특히 세포 상단부 세포질에는 전자밀

도가 매우 높은 과립들을 다수 함유하고 있었다 (Fig. 7). 두 번째 유형 (Type 2) 은 microvilli 와 cilia를 동시에 가지고 있는 세포로서 주로 조직이 주름진 부분에 많이 존재하였으며, cilia의 길이는 약 10 μm 정도였다 (Fig. 5-6). 세포연접부는

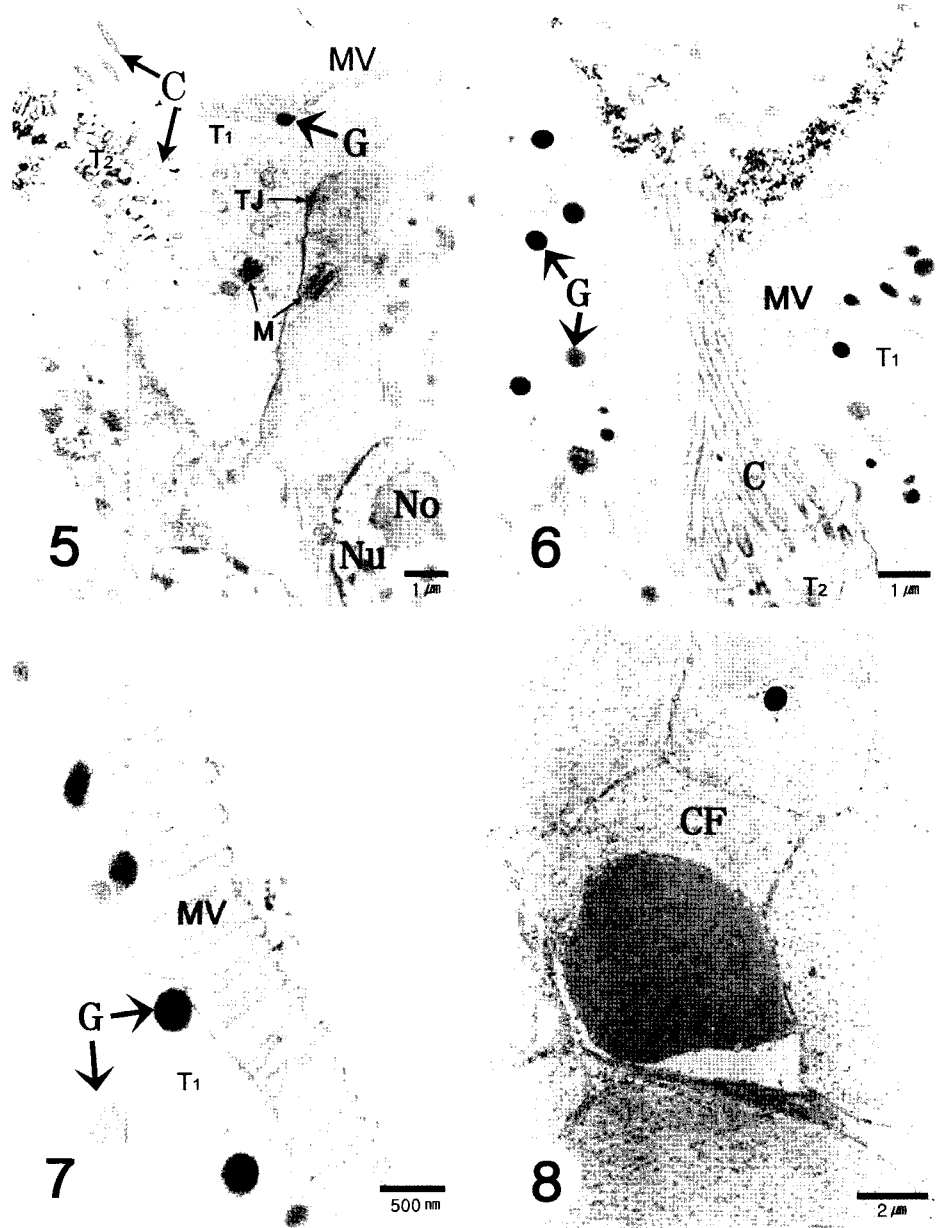


PLATE 2. Electron micrographs of *Laternula elliptica* kidney epithelial cell. (T₁: Type 1 cell, T₂: Type 2 cell)

Fig. 5. It shows numerous microvilli (MV) and cilia (C) on the liminal surface and a few granules (G) in the cytoplasm.

Fig. 6. Numerous cilia (C) and microvilli are prominent.

Fig. 7. Highly magnified microvilli and granule (G).

Fig. 8. Collagen fiber (CF) bundles appeared in the connective tissue.

세포의 상부에 tight junction이 존재하여 결속하고 있었으며, 결합조직 내에는 collagen fiber bundle이 많이 관찰되었다 (Fig. 8).

2가지의 세포유형 중 중금속농축이 관찰된 세포유형은 microvilli만을 가지고 있는 첫 번째 유형의 세포였다. 이 세포에서는 세포상부에 전자밀도가 높은 granule들이 매우 많이 관찰되었다. 이 과립의 종류는 크게 3가지 유형으로 관찰되었

다 (Fig. 9-12).

첫 번째 유형의 과립은 전자밀도가 매우 높은 무정형한 형태를 보였으며, 두 번째 유형의 과립은 다소 전자밀도가 낮으며, 무정형한 상태에서 일반적인 과립형태로 가는 중간과정의 과립형태로 보였다. 마지막 유형의 과립은 완전히 정형화된 과립의 형태를 보였다.

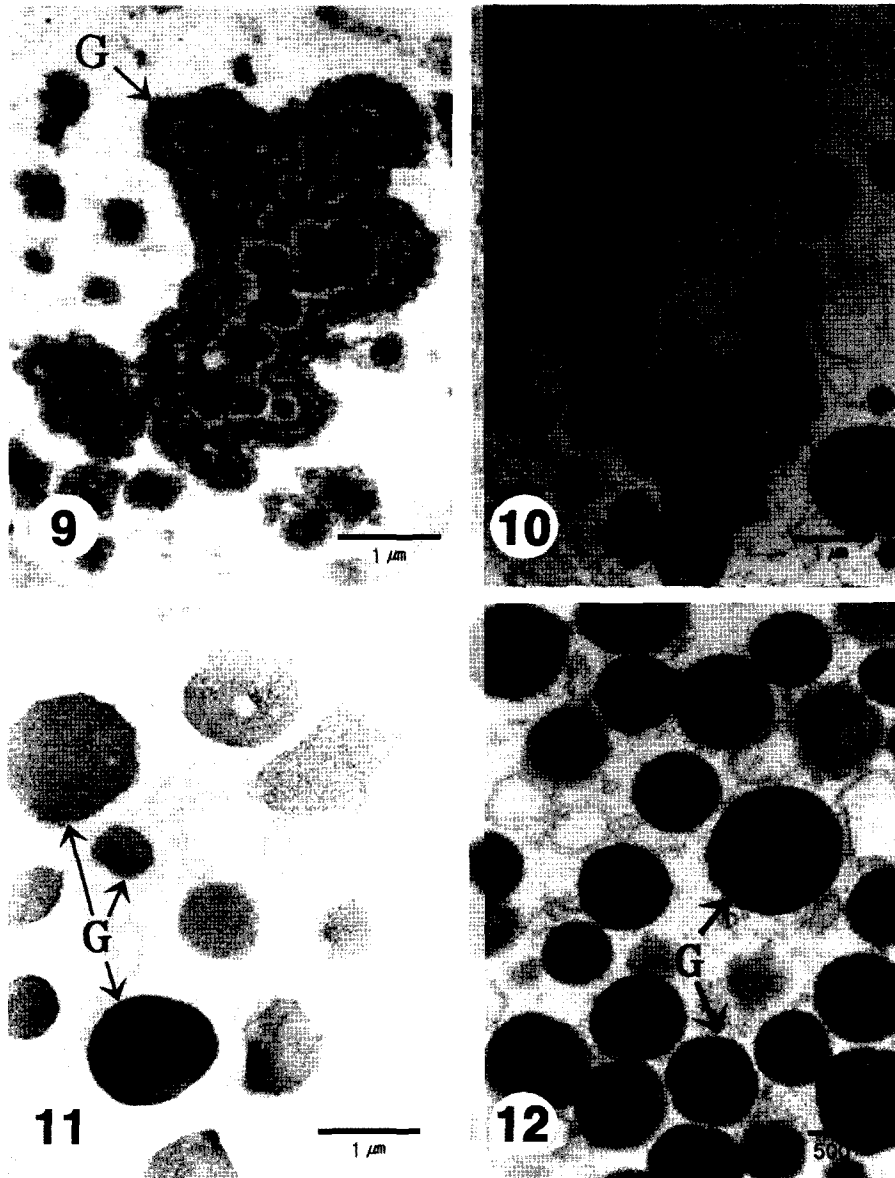


PLATE 3. Electron micrographs showing the heavy metal accumulated in the epithelial cells in the *Laternula elliptica* kidney. The granules in early stage (Figs. 9 and 10), in condensing stage (Fig. 11) and in mature stage (Fig. 12).

고 찰

본 연구에서 면역조직화학적 방법으로 localization 실험의 대상이 되어진 물질인 metallothionein (MT) 은 최초 말의 신장 피질부에서 금속과 결합하고 있는 단백질에 대한 보고에서부터 관심의 대상이 되어온 단백질이다. 주로 2가 양이온들인 카드뮴, 아연 혹은 구리와 결합하고 있는 것으로 잘 알려져 있다. MT 단백질이라고 하는 용어는 중금속 이온과 결합되어 있는 상태를 일컫는 말로, 금속이온을 제외한 순수한 단백질 부분은 thionein으로 이 polypeptide 구성성분으로는 황을 포함하는 아미노산인 cystein이 다량 분포하는 측면에서 붙여진 이름이다. 이들의 특징을 보면, 우선 분자량이 6000 내지 7000 dalton 정도로 저분자량의 단백질로서 주로 세포질 내에 분포하는데, 한 분자의 MT에 7내지 12원자의 금속성분이 포함되어 있다. 아미노산 구성에 있어서는 cystein이 전체의 22-23% 정도를 차지하고 있으며, 방향족 아미노산인 phenylalanine, tryptophane, tyrosine 혹은 histidine이 없다. 또한 MT는 70°C에서 10분 정도까지 변성이 일어나지 않는 내열성단백질이며, thionein과 결합하고 있던 기존의 금속은 이와 더 친화력 (Cd > Zn > Cu의 순서)이 높은 이온이 존재할 경우 대체가 되는 성질을 가지고 있다. 이러한 MT의 생물학적 기능에 대해서는 현재도 활발하게 연구가 되어지고 있는데, 본 연구에서 주목할만한 기능은 중금속에 대한 해독기능을 지니고 있다는 점이다. MT는 여러 요인들에 의해 세포 내에서 합성이 유도되어지는데 금속이온들, 일부 호르몬, cytokines, growth factor, tumor promotor, 기타 화학물질, 외부 스트레스에 의해 합성이 증가된다. 이러한 인자들이 핵 내로 들어가거나 간접적인 방법 (예, cAMP)으로 MT 유전자의 promotor에 영향을 줌으로써 전사과정을 자극하게 되는데 특히 cadmium의 경우에는 거의 모든 조직에서 이러한 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Diane and Richard, 1981). 또한 이러한 현상은 부족류에서도 동일하게 적용되어 진다 (Bebiano and Serafim, 1998). 특히 최근 발표에 따르면 부족류들의 metal 특히 Cd²⁺ detoxification에 있어서 GSH (endogenous glutathione and protein sulfhydryl) 와 MT가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다 (Zaroogian and Jackim, 2000). 때문에 세포 또는 조직 내에 전사를 조절하는 금속이온들의 위치 및 MT의 위치를 파악하기 위한 실험들이 면역조직화학적방법, 면역세포화학적 방법들을 통해 여러 가지 동물들의 여러 가지 기관의 조직을 대상으로 많이 시도되고 있는데 연체동물의 경우엔 신장, 아가미 등이 대상 기관의 조직들이 표적이 되고 있다.

본 연구의 대상기관 역시 가장 많이 시도가 되고 있는 신장이었는데 면역조직화학적 실험결과 *Laternula elliptica*의 신

장 상피세포의 상단부에 MT가 localization 되고 있는 것으로 판단되는데, 이는 본 연구의 미세구조적인 연구결과에서 관찰되어진 세포상부에 전자밀도가 높은 과립들과 많은 관련이 있는 것으로 판단되어진다. 이러한 과립들은 과거에 세포 내 중금속 분포에 관하여 연구되었던 고동류, 전복류, 가리비류 등에서도 찾아볼 수 있었다. 특히 고동류인 *Littorina littorea*에서 관찰되어진 과립들은 본 연구에서 관찰되어진 과립들과 미세구조적으로 농축되어지는 형태가 모두 매우 유사하며 EDX를 이용하여 농축되어지고 있는 금속이온이 sulfur와 cadmium임을 증명하였다 (Marigómez et al., 1990; Hyne et al., 1992; Nigro et al., 1992).

본 연구결과에서 관찰되어진 과립들은 크게 3가지의 종류로 나누어 볼 수 있었다. 이 과립들은 Stephan et al. (1980)에 의해 가리비류인 *Pecten maximus*의 신장에서 관찰되었던 것들과 매우 유사한 형태를 하고 있었다. 이 과립들은 전자밀도의 강해지는 정도에 따라 분류할 수 있었으며, 초기, 농축기, 성숙기로 나누어 중금속이 농축되는 것으로 추정할 수 있었다. 이 세포에서 농축되고 있는 중금속이 어떠한 중금속인지는 아직 알 수 없으나, Ahn et al. (1996)에 따르면 신장에서 cadmium이 가장 많이 농축되어 있는 것으로 나타나고 있어 cadmium이 주로 농축되어지고 있다고 판단된다.

결 론

중금속이 많은 환경에서 서식하는 남극띠조개의 신장에서의 중금속이 농축되는 현상을 규명하기 위하여 미세구조를 살펴본 것으로, 일반적으로 중금속에 노출되었을 경우, 동물체내에서 유도되는 단백질 중의 하나인 metallothionein을 면역조직화적인 방법을 사용하여 localization 함으로써 세포상에서 중금속이 농축되는 위치를 파악하였다. 면역조직화학적 실험방법으로 metallothionein을 추적한 결과 남극띠조개의 신장상피세포의 상단부에서 매우 강한 반응이 나타났다. 이는 중금속에 노출되어진 세포에 metallothionein이 많이 존재함을 말해준다. 미세구조 관찰결과 세포의 상단부에는 중금속이 농축되고 있는 것으로 추정되는 매우 많은 전자밀도가 높은 inclusion body 형태의 과립들이 관찰되었다.

REFERENCES

- Ahn, I.-Y. (1994) Ecology and biology of the Antarctic soft-shelled clam, *Laternula elliptica* (Bivalvia: Laternulidae). *Korean J. Malacology*, **10**(2): 41-46. [in Korean]
- Ahn, I.-Y., Lee, S.-H., Kim, K.-T., Shim, J.-H. and Kim, D.-Y. (1996) Baseline heavy metal concentrations in the Antarctic clam, *Laternula elliptica* in Maxwell Bay, King George Island, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, **32**: 592-598.

- Bebianno, M. J. and Serafim, M. A. (1998) Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve mollusks *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Sci. Total Environ.*, **214**: 123-131.
- Diane, M.D. and Richard, D.P. (1981) Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *The Journal of Biological Chemistry*, **256**: 5712-5716.
- Dudley, R.E., Svoboda D.J. and Klassen, C.D. (1984) Time course of cadmium-induced ultrastructural changes in rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **76**: 150-160.
- Hyne, R.Y., Smith, J.D. and Ellender, E. (1992) Tissue and sub-cellular distribution of Fe, Cu, Zn and ²¹⁰Po in the abalone *Haliotis rubra*. *Marine Biology*, **112**: 75-80.
- Ioachim, E.E., Kitsiou, E., Carassavoglou, C., Stefanaki, S. and Agnantis, N.J. (2000) Immunohistochemical localization of metallothionein in endometrial lesions. *J. Pathol.*, **191**(3): 269-273.
- Marigómez, J.A., Cajaraville, M.P. and Angulo, E. (1990) Cellular cadmium distribution in the common winkle, *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochemistry*, **94**: 191-199.
- Nigro, M., Orlando, E. and Regoli, F. (1992) Ultrastructural localization of metal binding sites in the kidney of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Marine Biology*, **113**: 637-643.
- Stephen, G.G., Brian, J.S.P. and Thomas, L.C. (1980) Isolation and elemental analysis of metal-rich granules from the kidney of the scallop, *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **42**: 143-156.
- Tanimoto, A., Hamada, T., Higashi, K. and Sasaguri, Y. (1999) Distribution of cadmium and metallothionein in CdCl₂-exposed rat kidney: relationship with apoptosis and regeneration. *Pathol. Int.*, **49**(2): 125-132.
- Tomita, T. and Matsubara, O. (2000) Immunocytochemical localization of metallothionein in human pancreatic islets. *Pancreas*, **20**(1): 21-24.
- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A. and Fabbri R. (1999) Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*, **4**(6): 455-466.
- Yonge, C.M. (1971) On functional morphology and adaptive radiation in the bivalve superfamily Saxicavacea (*Hiatella* (= *Saxicava*), *Saxicavella*, *Panomya*, *Panope*, *Cyrtodaria*). *Malacologia*, **11**(1): 1-44.
- Zarogian, G. and Jackim, E. (2000) *In vivo* metallothionein and glutathione status in an acute response to cadmium in *Mercenaria mercenaria* brown cells. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **127**(3): 251-261.
- Zhou, Z. and Kang, Y.J. (2000) Immunocytochemical localization of metallothionein and its relation to doxorubicin toxicity in transgenic mouse heart. *Am. J. Pathol.*, **156**(2): 1653-1662.