

카드뮴에 노출된 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 의 세포성 면역 반응

박경일, 최민순, 박성우, 박관하, 최상훈, 윤종만

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

Cellular Immune Responses of the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, Exposed to Cadmium Chloride

Kyung-Il Park, Min-Soon Choi, Sung-Woo Park, Kwan-Ha Park, Sang-Hoon Choi and Jong-Man Yoon

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

ABSTRACT

The Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, has been considered as a sentinel species due to dominant distribution along the coast of Korea and well developed regulatory system. In order to develop and understand immune responses of the Manila clams, clams were exposed to 50 µg/L of cadmium chloride (Cd) for 8 days and monitored the cellular immune parameters of the hemocytes including blast cell composition, DNA damage, necrosis, apoptosis and hemocyte mortality using a flow cytometer. The results showed that all immune parameters analyzed in the present study increased remarkably compared to the controls and the increases were statistically significant. Apoptosis rate was higher than necrosis rate in the clams exposed to Cd suggesting that apoptosis was preferably induced by the concentration of Cd used in the present study. Our study indicates that the measurement of cellular immune responses of the Manila clam using flow cytometer will be a useful technique for assessment of heavy metal contamination in marine environment.

Key words: *ruditapes philippinarum*, cadmium chloride, flow cytometry, immune parameter, environmental monitoring.

서 론

이매패와 같은 고착성 해양생물은 그 산업적 중요성외에도 최근 들어 해양환경의 건강도를 측정할 수 있는 모니터링 종으로서 그 가치를 인정받고 있다. 이들은 환경모니터링 종으로서 갖추어야 할 여러 특성들, 예를 들어 공간적 제약을 덜 받아 연안 해역에 널리 분포하며, 고착성이고, 척추동물과 유사하게 발달된 생체 조절 능력을 보유하고 있으며, 생물 농축 (bioaccumulation) 과 생리적 반응 등 환경변화에 대하여 민감하게 작용하면서도 생존률이 높다 (O'Conner, 2002; Rittschof and McClellan-Green, 2005). 이에 따라

"Mussel Watch Program"으로 대변되는 미국과 유럽의 대단위 해양환경 모니터링 사업에서 담치류와 굴류는 주요 지표종으로 이용되고 있다 (Goldberg, 1986; Cajaraville *et al.*, 2002).

최근 들어 지표종의 선택에 대한 이해가 높아지면서 환경 모니터링에서 사용되는 굴과 담치류에서 탈피하여 지역 특성에 맞는 종을 선택하기 위한 시도가 진행되고 있다. 특히 굴이나 담치류는 부착 기질이 발달된 일부 지역에 한정되어 분포한다는 단점이 있다. 이러한 관점에서 사니질이 발달한 우리나라 조간대의 경우 바지락 (*R. philippinarum*) 은 환경모니터링에 있어 굴 (*Crassostrea* spp.) 과 담치류 (*Mytilus* spp.) 를 대체할 수 있는 종으로 제시되고 있다. 바지락은 우리나라 전 연안뿐만 아니라 중국, 일본 및 유럽의 조간대와 조하대에 높은 밀도로 서식하므로 채집이 용이하고 (Gouletquer, 1997), 외형적 특성이 타 이매패와 구별이 쉬우며, 중금속의 체내 농축정도가 담치나 굴류와 비교하여 유사한 경향을 보이기 때문에 환경오염 상태를 잘 반영 할 수 있다 (Ji *et al.*, 2006).

Received Jun 12, 2009 ; Accepted Jul 20, 2009
Corresponding author: Kyung-Il Park
Tel: +82 (63) 469-1882 e-mail: kipark@kunsan.ac.kr
1225-3480/25208

고착성 패류를 이용한 해양환경 진단을 위해 다양한 방법이 제시 되었으나 최근 들어 이매패 혈구세포의 각종 면역 기능의 활성도를 측정하는 세포수준 (cellular level) 의 진단법이 환경변화에 대한 반응의 정확성과 측정 방법의 용이성 때문에 주목 받고 있다 (Marigomez *et al.*, 2004). 이매패류의 대표적인 세포성 면역 기작은 식세포 작용이며 (Allam *et al.*, 2002), 세포 사멸도, 활성산소량, apoptosis 비율 및 세포 흡착율 (Auffret and Oubella, 1997) 등이 바이오마커로 개발 되어 이용되고 있다 (Lau and Wong, 2003; Giamberini and Cajaverville, 2005). 특히 유세포 분석기 (flow cytometer)는 신속하고 정확하게 혈구 세포의 형태나 세포내 특정 물질을 정량함으로써 다양한 생리적 변화를 분석할 수 있기 때문에 해산 이매패의 세포성 면역 기작을 측정하는데 매우 유용하다 (Goedken and Guise, 2004). Kang *et al.* (2000) 은 우리나라 바지락 혈구의 형태적 특징과 크기에 따라 과립구, 무과립구, 그리고 노쇠한 세포인 섬유세포 (fibrocyte)로 구분된다고 보고 하였으며, Park *et al.* (2006) 은 유세포 분석기를 이용하여 바지락 혈구의 형태와 기능을 정량화하기 위한 기초 조사와 이를 이용하여 지역간 바지락의 면역력의 차이를 조사한 바 있다.

카드뮴은 국제암연구센터 (the International Agency for Research on Cancer) 의 발암물질 group I에 지정되어 폐, 간, 신장 및 정소에서 암을 유발하는 물질로 알려져 있는 독성 물질이다 (Waalkes, 2000; Waisberg *et al.*, 2003). 이 물질은 우리나라 연안의 해수 중에 널리 분포하며 어류보다는 여과 섭식을 하는 패류의 조직에 보다 고농도로 잔존하고 각종 독성 작용을 한다 (Kim *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007). 해산 패류의 경우 카드뮴 농축으로 면역력의 저하, 섭식률 저하, 성장을 저하, 산소소비량 증가 및 발생률 등이 저하 되는 등 패류의 각종 생리적 변화가 유발하는 것으로 알려져 있다 (Brousseau *et al.*, 1999; Gauthier-Clerc *et al.*, 2006; Ketata *et al.*, 2007). 특히 카드뮴은 타 이매패보다 바지락 아미노산의 생화학적 조절에 관여 하는 transaminase에 잘 반응함으로써 바지락은 카드뮴 모니터링에 특히 유용한 종으로 보고된 바 있다 (Blasco and Puppo, 1999). 따라서 본 연구는 카드뮴 농축에 따른 바지락의 세포성 면역력의 변화를 유세포 분석기를 이용하여 관찰함으로써 바지락의 생리적 방어기작을 이해하고 이를 통하여 환경 모니터링 기법으로서의 유용성을 판단하고자 실시되었다.

재료 및 방법

1. 실험 개요

실험에 이용된 바지락은 지역 어시장에서 구입하였으며, 실험실로 옮겨 20°C, 28 ppt의 수조에서 48시간 동안 적응시켰

다. 이후 시료를 2 개 집단으로 나눠 실험구는 카드뮴 50 µg/L (cadmium chloride, Sigma) 의 해수에 노출시키고, 나머지 집단은 대조구로써 일반 해수에 넣어 각각 8일 동안 사육하였다. 이 기간 동안 각각의 수조에서 카드뮴 노출 전, 노출 후 1일, 2일, 4일, 8일째 되는 날 7 마리씩의 시료를 채취 하여 헴림프액을 후폐각근에서 1 ml 인슐린 주시기를 이용하여 추출하고, 유세포 분석기 (Flow cytometer, Guava EasyCd)를 이용하여 실험구와 대조구의 면역력 차이를 조사 하였다. 유세포 분석을 위해 채혈된 혈구는 현미경하에서 정자 및 기타 오염물의 유무를 확인하고 오염된 경우 배제하였다. 실험 기간 동안 먹이는 공급되지 않았다.

2. blast cell 정량

바지락 혈구중 소형의 미분화 세포만을 정량하기 위하여 헴림프액 100 µl에 100 µl의 6% 중성포르말린과 4 µl의 SYBR green II (Sigma, 1,000x)을 첨가한 후 상온에서 30 분간 고정하였다. 고정된 헴림프액은 유세포 분석기 (Guava ExpressPlus) 의 Guava ExpressPlus 프로그램을 이용하여 FSC-HLin/SSC-HLin dot plot 상에서 5,000 개의 세포 중 과립구 (granulocyte) 와 유리체구 (hyalinocyte) 에 속하지 않는 소형의 세포들을 blast cell로 간주하고 이를 정량하였다.

3. DNA 손상도

바지락 헴림프액 200 µl를 500 µl의 냉각된 70% ethanol 과 섞은 후 4°C 에서 1시간 동안 permeabilization시켰으며, 원심분리 (3,000 rpm, 5 min) 하여 상등액을 제거하고 PBS 로 2회에 걸쳐 세척하였다. 여기에 200 µl의 PBS와 동일 량의 cell cycle reagent (Guava Cell Cycle Reagent) 를 첨가하고 30 분간 반응시킨 후, 유세포 분석기 (Guava EasyCD) 의 GuavaCellCycleBlue program을 이용하여 DNA 손상도를 측정하였다. DNA 손상도는 FSC/PM2 dot plot을 작성하고 이를 바탕으로 PM2/Count histogram을 이용하여 subG0-G1 부분과 그 이외의 부분을 정량함으로써 전체 혈구 중 subG0-G1에 속한 혈구의 비를 계산하였다.

4. Apoptosis와 괴사

바지락 혈구의 apoptosis와 괴사 (necrosis) 는 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) 을 이용하여 정량하였다. 이를 위하여 헴림프액 100 µl를 채혈하고 동일량의 시약과 희석한 후 유세포 분석기의 GuavaCellCycleBlue program을 이용하여 분석하였다. 이때 5,000 개의 세포를 FSC/SSC로 plotting 하고 혈구세포만을 선택 (gating) 하였으며, 이들을 다시 GRN-HLog/Red-HLog plot을 실시하여 FITC와 PI에 2중 염색된 상태에 따

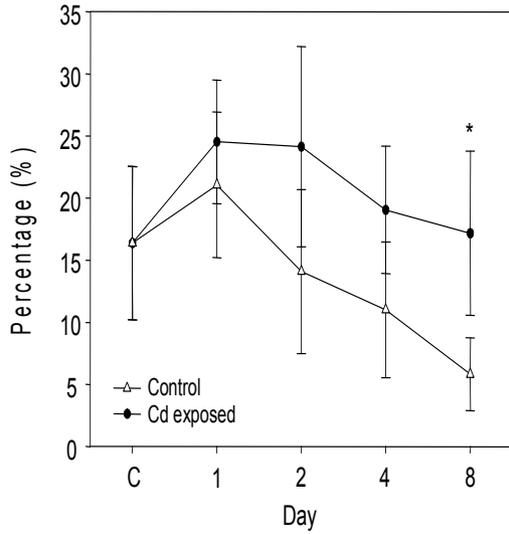


Fig. 1. Variation of DNA damage of *R. philippinarum* exposed to Cd for 8 days. * indicates $p < 0.05$

라 구분된 방형구(quadrant)를 근거로 혈구의 apoptosis와 괴사의 진행 정도와 비율을 정량하였다 (Fig. 1). 즉, 각각의 방형구는 생존 세포 (FITC negative, PI negative), 초기 괴사세포 (PI positive, FITC negative), 초기 apoptosis (FITC positive, PI negative), 사멸 세포 (FITC positive, PI positive) 등으로 구분되었으며, 방형구의 위치에 따라 좌측 하단 (생존 세포), 좌측 상단 (초기 괴사), 우측 하단 (초기 apoptosis), 우측 상단 (사멸 세포)로 구분하였다.

5. 세포사망율

혈구 사망률은 Hégarret *et al.* (2003a)과 Hégarret *et al.* (2003b)의 방법에 따라 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 바지락 혈림프액 100 μ l와 200 μ l의 anti-aggregant solution (AASH, Auffret and Oubella, 1995) 을 섞은 후 100 μ l의 여과 해수 (GF/C filter 여과)를 첨가하였다. 여기에 4 μ l의 SYBR green (1,000x)와 동일량의 propidium iodide (PI, 1 mg/ml)를 첨가한 후

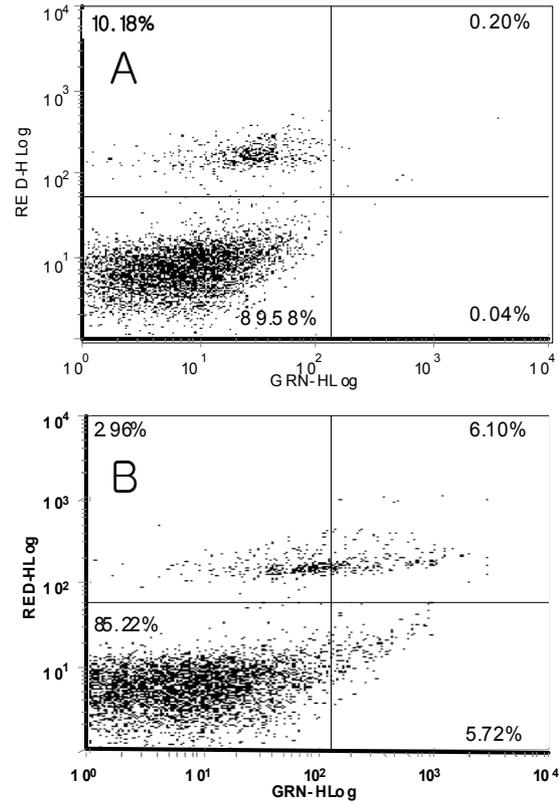


Fig. 2. Double staining of PI and annexin-V for discrimination of apoptosis and necrosis of haemocytes of *R. philippinarum* exposed to normal condition (A) and Cd (B). Lower left, live cell; lower right, early apoptotic cell; upper left, early necrotic cell; upper right, dead cells caused by apoptosis and necrosis.

FSC-HLin/SSC-HLin dot plot을 작성하여 5,000 개의 혈구세포를 선택하였고, 이들로부터 GRN-HLog/SSC-HLin dot plot을 작성하여 혈구 이외의 물질을 배제하였다. 분리된 혈구집단은 마지막으로 RED-HLog/Count histogram을 작성하여 혈구 중 PI에 과다하게 염색된 집단을 선택하여 전체 혈구 중 차지하는 비율을 혈구 사망률로 나타내었다.

Table 1. Shell length, biomass and condition index of *R. philippinarum* exposed to Cd for 8 days

Exposure	day 0		day 1		day 2		day 4		day 8	
	Cd	N								
No. samples	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Shell length (mm)	36.14	35.58	37.33	35.40	37.67	37.72	36.95	37.65	36.16	37.78
Biomass (g)	1.798	1.889	1.844	1.880	1.981	2.063	1.792	2.032	1.448	1.899
CI	0.425	0.464	0.484	0.423	0.476	0.431	0.410	0.447	0.349	0.374

N: not exposed; CI: condition index

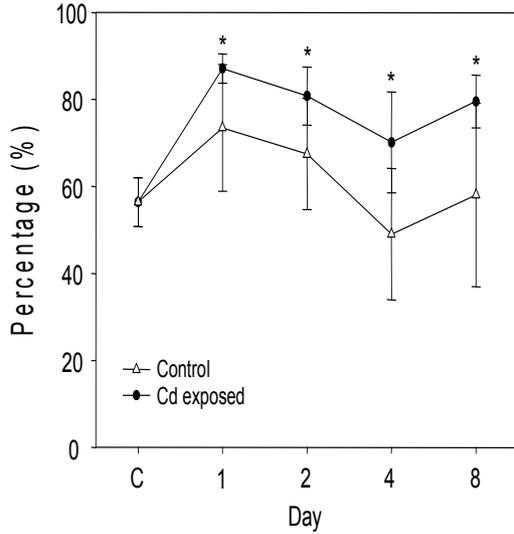


Fig. 3. Variation of the blast cell of *R. philippinarum* exposed to Cd for 8 days. * indicates $p < 0.05$

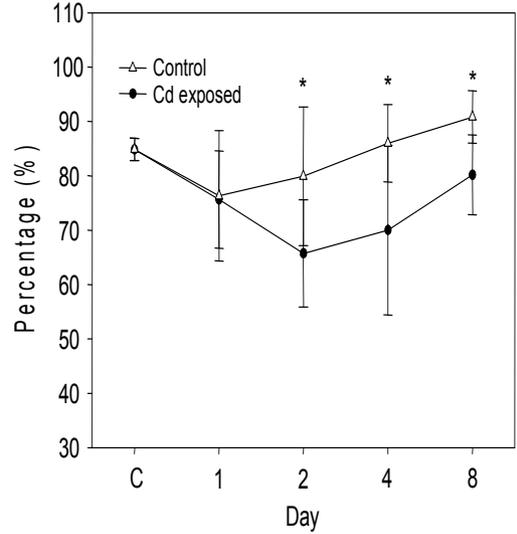


Fig. 4. Variation of the live cells of *R. philippinarum* exposed to Cd for 8 days. * indicates $p < 0.05$

6. 통계분석

카드뮴 노출이 바지락의 면역력에 미치는 영향을 조사하고자 대조구와 실험구의 면역력 차이를 비모수 검정법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 95% 신뢰수준에서 분석하였다.

결 과

1. 각장, 육중량 및 condition index (CI)

본 연구에 사용된 바지락의 각장은 평균 각장은 카드뮴에 노출된 실험구가 36.16-37.67 mm였으며, 대조구의 경우 35.40-37.78 mm였다. 평균 습중량은 실험구가 1.880-2.063 g였고, 대조구는 1.448-1.981 g였다. 평균 CI는 실험구가 0.349였으며, 대조구는 0.374였다 (Table 1). 각 분석 날짜별 실험구와 대조구의 각장, 습중량 및 CI는 통계적 유의성이 없이 유사한 크기의 시료가 이용되었다.

2. 미분화 세포

카드뮴 노출이 있기 전 실험구와 대조구의 미분화 세포 (blast cell) 비율은 약 55% 정도였으나 카드뮴 노출 1일 경과 후부터는 실험구에서 증가하여 전체 혈구 중 약 87%를 차지하였고 이후 감소하여 실험 종료시까지 70%-85%를 나타내었다 (Fig. 1). 반면 대조구의 경우 전 기간 동안 약 20% 정도 blast cell 비율이 낮게 나타났다 ($p < 0.05$).

4. DNA 손상도

카드뮴 노출 바지락과 대조구의 DNA 손상도를 유세포 분석기를 이용하여 측정한 결과 대조구 (A)의 경우 손상된 혈구

의 수가 미미하였으나 카드뮴에 노출된 혈구 (B)의 경우 급격히 증가함이 관찰됨으로써 유세포 분석기를 이용한 바지락 혈구세포의 DNA 손상도 측정이 가능함을 확인하였다 (Fig. 3). 카드뮴 노출 이전 바지락의 DNA 손상도는 개체마다 10-23%로써 그 변이가 심하게 나타나 바지락 혈구의 DNA 손상도는 개체간 차이가 있음을 확인 하였다. 통계적으로 유의하지는 않았지만 카드뮴 노출 1일째부터 평균 DNA 손상도는 대조군과 비교하여 높게 나타났으며 이러한 현상은 관찰 마지막 날인 8일째까지 이어졌다. 노출 1일째 카드뮴 노출 바지락의 경우 평균 DNA 손상도는 25%까지 상승하였으며 이후 점차적으로 감소하여 관찰 마지막 날에는 약 17%정도였다. 반면 대조구는 최대 21%의 DNA 손상도가 관찰 1일째 관측되었고, 이후 감소하여 분석 8일째는 5%에 그쳤다. 그러나 통계적으로 유의한 차이는 관찰 마지막 날에만 관찰되었다.

5. Apoptosis와 괴사

생존 세포의 경우 노출 1일째까지는 두 집단간 유의한 차이가 없었으나 2일째부터 조사 8일째까지 카드뮴 노출 바지락의 생존 세포 비율이 70-80% 내외로 80-90%를 보인 대조군보다 유의하게 낮아짐이 확인되었다 (Fig. 4). 초기 necrotic 세포의 비율은 대조군의 경우 조사 기간 중 평균 3-6%의 비율을 나타냈으나 카드뮴 노출 바지락의 경우 노출이전 약 3%에서 노출 2일째에는 약 9%까지 급등하였고 이후 감소하여 노출 6일째에는 약 4%를 기록하였다 (Fig. 5). 이 같은 결과는 노출 2일째와 6일째 통계적 유의한 차이를 나타냈다. 초기 apoptotic 세포는 노출 이전에는 약 5% 내외였으나 카드뮴 노출 1일째부터 10%로 증가하고 분석 종료시까지 비슷한 비

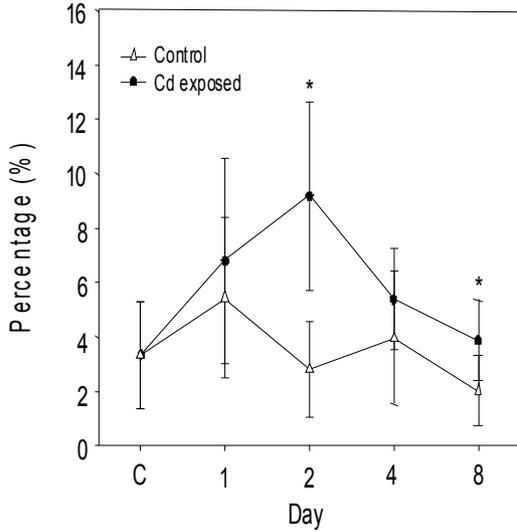


Fig. 5. Variation of the early necrotic cells of *R. philippinarum* exposed to Cd for 8 days. * indicates $p < 0.05$

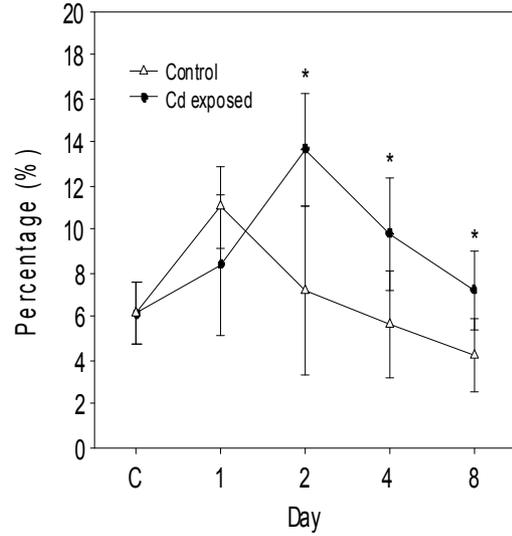


Fig. 7. Variation of the dead cells of *R. philippinarum* caused by necrosis and apoptosis when exposed to Cd for 8 days. * indicates $p < 0.05$

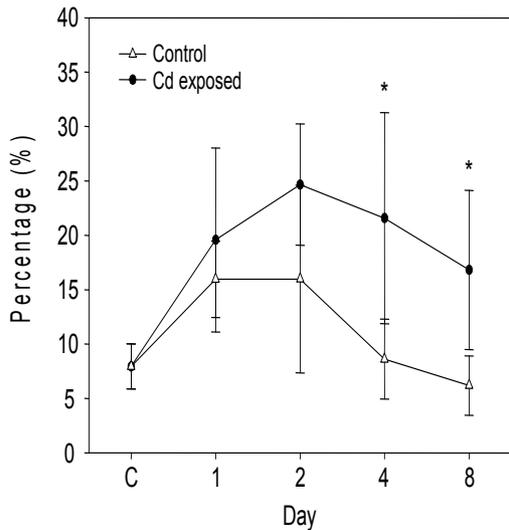


Fig. 6. Variation of the early apoptotic cells of *R. philippinarum* exposed to Cd for 8 days. * indicates $p < 0.05$

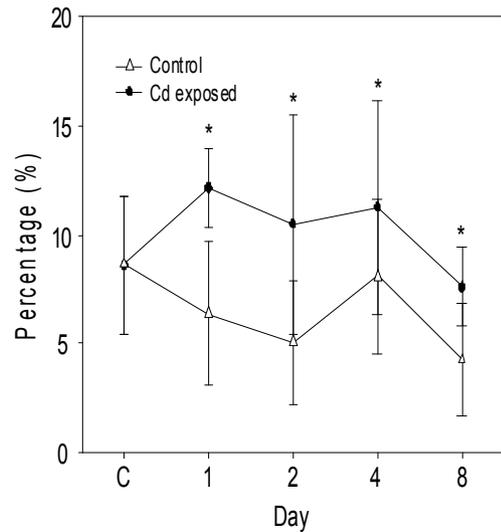


Fig. 8. Variation of the dead cells of *R. philippinarum* exposed to Cd for 8 days. * indicates $p < 0.05$

율을 유지하였다 (Fig. 6). 반면 대조구는 분석 1-2일째에는 약 6%내외였고 이후 감소하여 분석 종료시 평균 2%를 차지하였다. Apoptosis와 괴사에 의해 사망한 세포의 비율은 카드뮴에 노출된 혈구의 경우 분석 2일째 최대값을 보여 약 13%를 차지하였고 이 후 점차 감소하여 7%를 나타내었다 (Fig. 7). 대조구는 분석 1일째 11%까지 증가하였으나 이후 급격히 감소하여 분석 종료 시 약 4%에 불과하였다.

6. 혈구 사망율

카드뮴에 노출된 바지락의 혈구는 대조구에 비하여 혈구 사망률이 현저히 증가한 모습을 확인 할 수 있었다 (Fig. 8). 카드뮴 노출 바지락 혈구의 사망률은 노출 1일째부터 급격히 증가하여 약 10-12%를 나타내었고 노출 8일째에는 감소하여 약 8%의 혈구 사망률을 나타내었다. 그러나 대조구의 경우 전 기간 동안 5-8%의 혈구 사망률을 나타냄으로써 카드뮴 노출이 바지락 혈구의 사망률을 증가시키미 확인 되었다 ($p > 0.05$).

고 찰

산업활동의 증가로 해양은 각종 중금속의 유입으로 오염되고 있으며 이 결과 카드뮴, 납, 수은 등 각종 중금속이 해양생물의 체내에 축적되고 있다. 이러한 중금속의 축적은 미량이라 할지라도 해양생물에 독성으로 작용하여 각종 병리적 작용을 나타내며 궁극적으로 먹이사슬을 통하여 인간에게까지 영향을 미친다. 따라서 해당 지역의 해양 환경을 정확히 묘사할 수 있는 환경모니터링 기법의 개발은 우리나라와 같이 산업이 발달하고 환경 변화가 빈번한 지역에서는 그 중요성이 매우 크다.

바지락과 같이 선천성 면역 기작만을 보유한 해산 이매패의 면역은 세포성 면역과 체액성 면역으로 나뉘며, 혈구는 세포성 면역을 담당하는 가장 중요한 기구로서 비특이적 방어 작용을 수행한다 (Fisher, 1988). 세포성 면역 기능을 측정하기 위한 방법으로 최근 유세포 분석기 (flow cytometer) 중요하게 이용되고 있다. 이 방법은 레이저 빔을 이용하여 개별 세포의 크기 (forward scatter) 와 밀도 (side scatter)를 측정함으로써 세포의 형태적 차이를 구별하고 이러한 특성에 따라 개개의 세포를 집단화 할 수 있다. 이 방법을 이용하여 대서양굴 (*Crassostrea virginica*)과 참굴 (*C. gigas*) 혈구의 형태적 차이에 의한 혈구 집단의 특징이 종에 따라 상이함이 관찰되었다 (Lambert *et al.*, 2003; Hégarret *et al.*, 2003b; Goedken and Guise, 2004). Park *et al.* (2006) 의 연구에서 나타난 바지락 혈구세포의 집단 구조는 가장 큰 크기와 높은 밀도를 가진 과립구 집단이 대부분을 차지하고 있으며, 뒤이어 무과립구 집단과 종류가 명확히 구분되지 않은 소형 무과립구 집단인 미분화 세포 (blast cell) 로 구분되었다.

유세포 분석기의 또 다른 주요 기능은 다양한 파장의 형광 염색 시약을 이용해 세포내 특정 물질을 정량함으로써 환경변화에 따라 반응하는 세포 각각의 특성을 규명하는 기술이다 (Davey and Kell, 1996). Park *et al.* (2006) 은 바지락 혈림프액을 알코올로 고정하고 permeabilization 시킨 후 형광 시약인 SYBR green 첨가하여 세포내 핵과 특이적 반응을 유발시킴으로써 혈림프액 속에서 혈구세포만을 구분하였다. Non-permeabilization 시킨 혈구에는 형광 시약인 PI를 첨가하여 사멸된 세포에서 나타나는 상처를 통하여 세포내로 침투한 PI를 정량함으로써 혈림프액내 사멸세포의 양을 정량하였다. 특히 시약의 형광 파장이 다른 경우 (SYBR green II의 방출파장: 510-530 nm, PI의 방출 파장: 550-590nm) 단일 세포에 대하여 2중 염색한 후 각각의 파장을 검색하고 정량화할 수 있으므로 동시에 두 가지 항목의 면역력을 특정 할 수 있다 (Hégarret *et al.*, 2003b). 또한 본 연구에서 사용된 바와 같이 각각 방출 파장이 다른 형광시약 Annexin V-FITC 와 PI를 2중 염색하여 apoptosis 세포와 염증세포를 정량하

는 방법도 개발되어 이용되고 있다 (Walsh *et al.*, 1998). 이상과 같이 유세포 분석기는 세포내 목적 단백질이나 효소 및 핵산에 특이적으로 반응하는 형광물질을 결합시켜 정량 할 수 있으며, 특히 다량의 세포를 신속하게 검색할 수 있다는 장점이 있어 세포성 면역력을 측정하는데 매우 우수한 기기이다.

본 연구를 통하여 나타난 바와 같이 카드뮴에 노출된 바지락의 미분화 혈구세포가 증가하였다. 그러나 현재까지 미분화 세포의 증감 원인은 정확히 규명되지 못하고 있는 실정이다. Pipe and Coles (1995) 에 의하면 혈구의 증가는 Cd, Cu, fluoranthene, phenol 등에 의해 해산연체동물 혈구의 증식이 촉발된다고 보고되었다. 대서양굴의 경우에도 1 $\mu\text{g/L}$ 의 카드뮴에 노출될 때 혈구의 증가가 관찰되었고 (Cheng, 1988), 특히 0.3 $\mu\text{g/L}$ 의 카드뮴에 노출된 참굴 (*C. gigas*) 혈구의 소집단 (subpopulation) 중 소형 무과립구 (본 연구에서는 미분화 세포로 지칭됨) 의 증식이 보고된 바 있다 (Auffret and Oubella, 1994). 이는 본 연구에서 나타난 결과와 유사하며 이상의 결과를 볼 때 치사량 이하 (sublethal) 의 카드뮴 농도에서는 해산 이매패 미분화 세포의 분열이 증가 되는 것으로 판단된다. 미분화 세포의 증가 원인은 현재까지 명확하게 규명되지 않았으나 외부 자극에 의해 유발 될 수 있음이 보고되고 있다. 바지락의 경우 미생물의 감염이 숙주의 면역 반응을 촉진시킨 결과 혈구세포가 증식되는 것으로 나타났다 (Hégarret *et al.*, 2007). 담치의 경우에도 카드뮴과 비브리오패에 노출될 때 혈구의 수가 증가 하였으며 카드뮴의 농도가 높을수록 혈구 수는 증가하였다 (Pipe and Coles, 1995). 흥미롭게도 Pipe and Coles (1995) 에 따르면 타 중금속 보다는 카드뮴이 특이적으로 혈구 수의 증가를 유발 하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 나타난 바와 같이 카드뮴에 대한 노출은 바지락의 면역 반응에 특이 반응을 유발하여 혈구의 증식을 촉진 하는 것으로 판단된다.

카드뮴이 바지락의 genotoxicity 유발 여부를 측정하기 위하여 바지락 혈구세포의 DNA 손상도를 측정하였다. DNA 손상이 발생하면 DNA사슬에서 염기가 탈락하게 되며 이로 인하여 세포내 총 염기의 양이 감소하게 된다. 이때 유세포 분석기를 이용하여 혈림프액 내 혈구세포의 세포주기를 검사하면 비정상적으로 유리된 염기를 정량 할 수 있다 (Park *et al.*, 2006). 해산 이매패는 과산화수소 (Gielazyn *et al.*, 2003), tri-n-butyltin (TBT) (Micic *et al.*, 2001), 중금속과 polyaromatic hydrocarbons (PAH) 에 노출될 때 DNA 손상이 증가함이 관찰되었다 (Coughlan *et al.*, 2002; Rank *et al.*, 2005). 본 연구에서도 기존 연구 결과와 같이 카드뮴에 노출된 바지락의 혈구에서 DNA 손상도가 상승하였다. 바지락의 경우 카드뮴에 노출이 바지락 혈구의 DNA손상을 초래한다는 보고는 매우 드물며 본 연구로써 그 현상이 확인 되었

다. 바지락 혈구의 DNA 손상에 미치는 카드뮴의 역할은 명확히 규명되지는 않았으나 카드뮴이 송어의 apoptosis를 촉진시키며 (Risso-de Faverney *et al.*, 2001), 활성산소를 발생시키는 것으로 보고되고 있어 (Dailianis, 2009) 이로 인한 DNA 손상이 유발 되는 것으로 판단된다.

세포괴사와 apoptosis는 세포사망을 유발하는 주요 기작으로써 시료의 병리적/생리적 반응을 관찰하는 주요 마커로 이용되고 있다. 본 연구에서는 카드뮴에 노출된 혈구세포에서 세포괴사와 apoptosis가 급격히 증감함이 확인되었다. 카드뮴에 의한 apoptosis는 활성산소의 증가에 의해 나타나는 것으로 알려져 있으며 이러한 활성산소의 증가는 카드뮴의 농도와 관계가 깊은 것으로 알려져 있다 (Watanabe *et al.*, 2003). Apoptosis의 원인과 관련한 최근의 보고에 의하면 apoptosis 유도 인자 (apoptosis inducing factor)가 미토콘드리아에서 핵으로 전좌 (translocation) 되기 때문인 것으로 추정되고 있다 (Kim and Soh, 2009). Tsangaris and Tzortzotou-Stathopoulou (1998) 에 의하면 카드뮴에 의한 apoptosis 유발은 세포 종류에 따라 다름을 보고 하였으며, 따라서 카드뮴 노출에 의해 바지락 혈구에서 apoptosis이 명확하게 관찰되는 것을 고려할 때 바지락 혈구는 카드뮴의 영향을 관찰하는데 적합한 세포로 판단된다. 세포가 어떻게 괴사 또는 apoptosis의 단계로 발전하는지에 대한 정확한 기작은 규명되지 않은 상태이나 apoptosis와 마찬가지로 활성산소의 과생산 (excessive production) 이 세포괴사의 주요 원인이며 특히 apoptosis시보다 과도한 활성산소가 지속적으로 존재할 때 apoptosis 기작을 방해함으로써 세포괴사가 진행되는 것으로 보고되고 있다 (Lee and Shacter, 1999; Galan *et al.*, 2001). 본 연구를 통하여 얻어진 apoptosis와 세포괴사율을 비교해 보면 전 기간 중 초기 apoptosis 비율이 높게 관찰되고 있어 바지락 혈구의 경우 본 연구에서 사용된 카드뮴의 농도는 세포 괴사보다는 apoptosis를 유도하는데 더 효과적인 농도인 것으로 판단되며, 향후 카드뮴의 농도별 apoptosis이나 괴사 유발 정도를 조사한다면 환경모니터링 기법으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구 기간 동안 카드뮴에 노출된 바지락의 면역력 (blast cell, DNA 손상도, 세포괴사율, apoptosis율)은 시간이 지날수록 개선되는 결과를 보여줬으며, 대조구 또한 유사한 경향을 나타내었다. 이는 바지락의 실험실내 적응 기간이 짧아 바지락의 면역력이 기저값으로 떨어지기 이전에 카드뮴 노출이 이루어졌기 때문인 것으로 판단된다. Park *et al.* (군산대학교, 미발표자료) 에 따르면 바지락 서식지에서 측정된 세포성 면역력의 기저값은 DNA 손상도의 경우 0.5% 내외, 초기 혈구괴사율은 0.12%, 초기 혈구 apoptosis 비율은 0.03% 정도였으나 본 연구에 사용된 시료는 이보다 약 10배 이상의 값을 보임으

로써 면역 반응 연구를 수행하는데 충분히 적응되지 못한 것으로 판단된다.

결론적으로, 본 연구에서 카드뮴에 노출된 바지락은 면역반응의 일환으로 blast cell, DNA 손상도, 세포괴사율, apoptosis율 및 세포 사망률 등이 상승하였으며, 이는 바지락이 카드뮴 노출에 적응하기 위한 면역기작을 이해하는데 유용한 정보를 제공 하였다. 또한 이러한 세포성 면역반응은 유세포 분석기를 이용하여 정량이 가능하였으며, 바지락의 세포성 면역반응을 이용한 환경모니터링에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 은 우리나라 조간대에 널리 분포하며 잘 발달된 생체조절 능력을 가지고 있어 환경모니터링 종으로서 가치가 높은 생물이다. 본 연구는 산업활동으로 해양환경에서 그 농도가 높아지고 있으며 생물체에 강한 독성을 가진 카드뮴이 바지락의 세포성 면역에 미치는 영향을 연구함으로써 바지락의 면역 기작을 이해하고 환경 모니터링 기법으로의 적용 가능성을 조사하기 위하여 실시되었다. 실험을 위하여 바지락은 50 µg/l의 카드뮴에 8일간 노출되었으며, 유세포 분석기를 이용하여 혈구의 미분화 세포의 구성비율, DNA 손상도, 혈구괴사율, 혈구 apoptosis 비율 및 혈구 사망율을 측정하였다. 조사 결과 카드뮴에 노출된 바지락은 대조구와 비교하여 미분화세포, DNA 손상도, 세포괴사율, apoptosis 비율 및 세포 사망율이 통계적으로 유의하게 증가하였다. 특히 apoptosis 비율은 세포괴사율보다 높게 증가함에 따라 바지락 혈구의 경우 본 연구에서 사용된 카드뮴의 농도는 세포괴사보다는 apoptosis를 유도하는데 더 효과적인 농도인 것으로 판단된다. 본 연구를 통하여 중금속 오염에 대한 바지락의 세포성 면역반응은 유세포 분석기를 이용하여 정량이 가능하였으며, 세포성 면역반응을 이용한 환경모니터링에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

ACKNOWLEDGEMENTS

본 연구 수행 시 자료 분석을 위해 수고한 군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과 김현중, 송성의 군에게 감사드리며, 본 연구는 해양수산개발원 수산특정과정 (F20814208H 220000110) 의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

Allam, B., Ashton-Alcox, K.A. and Ford, S.E. (2002) Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology*, **13**: 141-158.

- Auffret, M. and Oubella, R. (1994) Cytometric parameters of bivalve molluscs: effect of environmental factors. *In: Modulators of Fish Immune Responses*, Vol. 1 (ed. by Stolen, J.S. and Fletcher, T.C.) pp. 23-32. SOS Publication, Fair Haven, USA.
- Auffret, M. and Oubella, R. (1995) Cytology and cytometric analysis of bivalve mollusc haemocytes. *In: Techniques in Fish Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates* Vol. 4 (ed. by Stolen, J.S.) pp. 55-64. SOS Publications, Fair Haven, USA.
- Auffret, M. and Oubella, R. (1997) Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *in vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **118**: 705-712.
- Blasco, J., Puppo, J. (1999) Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **122**: 253-263.
- Brousseau, P., Pellerin, J. Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H. and Fournier, M. (1999) Flow cytometry as a tool to demonstrate the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicology*, **142**: 145-156.
- Cajaraville, M., Maria, P., Bebianno, J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. and Viarengo, A. (2002) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of The Total Environment*, **247**: 295-311.
- Cheng, T. (1988) *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: Total and differential cell counts. *Journal of Invertebrate Pathology*, **51**: 207-214.
- Coughlan, B.M., Hartl, M.G.J., O'Reilly, S.J., Sheehan, D., Morthersill, C., van Pelt, F.N.A.M., O'Halloran, J. and O'Brien, N.M. (2002) Detecting genotoxicity using the Comet assay following chronic exposure of Manila clam *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, **44**: 1359-1365.
- Dailianis, S. (2009) Production of superoxides and nitric oxide generation in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) after exposure to cadmium: A possible involvement of Na⁺/H⁺ exchanger in the induction of cadmium toxic effects. *Fish & Shellfish Immunology*, **27**: 446-453.
- Davey, H.M. and Kell, D.B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiology Review*, **60**: 641-696.
- Fisher, W.S. (1988) Environmental influence on host response; environmental influence on bivalve hemocyte function. *American Fisheries Society Special Publication*, **18**: 225-237.
- Galan, A., Garcia-Bermejo, L., Troyano, A., Vilaboa, N.E., Fernandez, C., de Blas, E. and Aller, P. (2001) The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducers (cadmium, heat, X-rays). *European Journal of Cell Biology*, **80**: 312-320.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J. and Amiard, J.C. (2006) Estradiol-17 beta and testosterone concentrations in male and female (*Mya arenaria*) (Mollusca Bivalvia) during the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, **145**: 133-139.
- Giamberini, L. and Cajaraville, M.P. (2005) Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. *Environmental Research*, **98**: 210-214.
- Gielazyn, M.L., Ringwood, A.H. Piegorsch, W.W. and Stancyk, S.E. (2003) Detection of oxidative DNA damage in isolated marine bivalve hemocytes using the comet assay and formamidopyrimidine glycosylase (Fpg). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **542**: 15-22.
- Goedken, M. and De Guise, S. (2004) Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish & Shellfish Immunology*, **16**: 539-552.
- Goldberg, E.D. (1986) The mussel watch concept. *Environmental Monitoring and Assessment*, **7**: 91-103.
- Gouletquer, P. (1997) A Biography of the Manila Clam *Tapes philippinarum*. IFREMER, RIDRV-97.02/RA, LaTremblade, France.
- Hégaret, H., da Silva, P.M., Wikfors, G.H., Lambert, C., De Bettignies, T., Shumway, S.E. and Soudant, P. (2007) Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquatic Toxicology*, **84**: 469-479.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H. and Soudant, P. (2003a) Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: I. Haemocyte types and morphology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **293**: 237-248.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H. and Soudant, P. (2003b) Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **293**: 249-265.
- Ji, J., Choi, H.J. and Ahn, I.Y. (2006) Evaluation of Manila clam *Ruditapes philippinarum* as a sentinel species for metal pollution monitoring in estuarine tidal flats of Korea: Effects of size, sex, and spawning on baseline accumulation. *Marine Pollution Bulletin*, **52**: 447-453.
- Kang, S.G., Park, S.W. and Kim, Y.G. (2000) The morphology of the hemocytes of the clam, *Ruditapes*

- philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Fish Pathology*, **13**: 129-136. [in Korean]
- Ketata, I., Smaoui-Damak, W., Guermazi, F., Rebai, T. and Hamza-Chaffai, A. (2007) *In situ* endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of *Ruditapes decussates*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **146**: 415-430.
- Kim, H.Y., Kim, J.C., Kim, S.Y., Lee, J.H., Jang, Y.M., Lee, M.S., Park, J.S. and Lee, K.H. (2007) Monitoring of heavy metals in fishes in Korea -As, Cd, Cu, Pb, Mn, Zn, total Hg. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **39**: 353-359. [in Korean]
- Kim, J. and Soh, J. (2009) Cadmium-induced apoptosis is mediated by the translocation of AIF to the nucleus in rat testes. *Toxicology Letters*, **188**: 45-51.
- Kim, J.H., Im, C.W., Kim, P.J. and Park, J.H. (2003) Heavy metals in shellfishes around the South Coast of Korea. *Journal of Food Hygiene and Safety*, **18**: 125-132. [in Korean]
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C. (2003) Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & Shellfish Immunology*, **15**: 225-240.
- Lau, P.S. and Wong, H.L. (2003) Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, **46**: 1563-1572.
- Lee, Y., and Shacter, E. (1999) Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, **274**: 19792-19798.
- Marigomez, I., Sotoa, M., Orbeaa, A., Cancioa, I. and Cajaravillea, M.P. (2004) Biomonitoring of environmental pollution along the Basque coast, using molecular, cellular and tissue-level biomarkers: an integrative approach. *Elsevier Oceanography Series*, **70**: 335-364.
- Micic, M., Bihari, N., Labura, Z., Muller, W.E.G. and Batel, R. (2001) Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride. *Aquatic Toxicology*, **55**: 61-73.
- O'Connor, T.P. (2002) National distribution of chemical concentration in mussels and oysters in the USA. *Marine Environmental Research*, **53**: 117-143.
- Park, K.I., Park, H.S., Kim, J.M., Park, Y.J., Hong, J.S. and Choi, K.S. (2006) Flow cytometric assesment of immune parameters of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *Journal of Korean Fisheries Society*, **39**: 123-131. [in Korean]
- Pipe, R.K. and Coles, J.A. (1995) Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology*, **5**: 581-595.
- Rank, J., Jensen, K. and Jespersen, P.H. (2005) Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **585**: 33-42.
- Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.P., Bailly, B. and Rahmani, R. (2001) Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species. *Aquatic Toxicology*, **53**: 65-76.
- Rittschof, D. and McClellan-Green, P. (2005) Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Marine Pollution Bulletin*, **50**: 369-373.
- Tsangaris, G.Th. and Tzortzatou-Stathopoulou, F. (1998) Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. *Toxicology*, **128**: 143-150.
- Waalkes, P.M. (2000) Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **79**: 241-244.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. and Beyersmann, D. (2003) Molecular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, **192**: 95-117.
- Walsh, G.M., Dewson, G., Wardlaw, A.J., Levi-Schaffer, F. and Moqbel, R. (1998) A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. *Journal of Immunological Methods*, **217**: 153-163.
- Watanabe, M., Henmi, K., Ogawa, K. and Suzuki, T. (2003) Cadmium-dependent generation of reactive oxygen species and mitochondrial DNA breaks in photosynthetic and non-photosynthetic strains of *Euglena gracilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **134**: 227-234.