

Article

세포화학적 방법을 이용한 남해안 조간대에 서식하는 참굴(*Crassostrea gigas*) 소화낭 세포 내 리소솜 활동 측정에 관한 연구

정희도<sup>1</sup> · 이지연<sup>1</sup> · 홍현기<sup>1</sup> · 강현실<sup>1</sup> · 김영옥<sup>2</sup> · 최광식<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 해양과학대학 해양의생명과학부  
(690-756) 제주도 제주시 제주대학로 66

<sup>2</sup>한국해양과학기술원 남해연구소  
(656-830) 경상남도 거제시 장목면 장목1길 41

Cytochemical Measurement of Lysosomal Responses in the Digestive Cells of Wild Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* on the South Coast of Korea

Hee-Do Jeung<sup>1</sup>, Jee-Yeon Lee<sup>1</sup>, Hyun-Ki Hong<sup>1</sup>, Hyun-Sil Kang<sup>1</sup>,  
Young-Ok Kim<sup>2</sup>, and Kwang-Sik Choi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Marine Biomedical Science (POST BK21) and Marine and Environmental Research Institute  
Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

<sup>2</sup>South Sea Research Institute, KIOST  
Geoje 656-830, Korea

**Abstract** : Digestive cells of the bivalves have a highly developed lysosomal system and the system is known to be sensitive to changes in environmental qualities. In this study, we measured lysosomal responses of the digestive cells in wild oyster, *Crassostrea gigas* using frozen section. Oysters were collected in June 2010 from intertidal areas in the inner and outer bay of Gwangyang off the south coast of Korea. From the tissue sections, we measured the digestive cell lysosomal membrane stability (LMS), level of neutral lipids (NL), lipofuscin (LF) and the digestive gland atrophy (DGA). The DGA and condition index of oysters from the inner bay were significantly lower ( $P < 0.05$ ). The statistical test indicated that LMS levels of oysters in the inner bay and the outer bay were not significantly different since a shorter activity was displayed by oysters from the inner bay than that of oysters in outer bay. The LF deposition level of the oysters in the inner bay displayed significantly higher levels than the outer bay ( $P < 0.05$ ). In contrast, the NL accumulation measured from oysters in outer bay was significantly higher than the level observed in the inner bay ( $P < 0.05$ ). Different levels of DGA and LF that were observed in the inner and outer bays were thought to be associated to different level of environmental contamination and these two assays are considered to be good biomarkers.

**Key words** : *Crassostrea gigas*, digestive gland atrophy, lysosomal membrane stability, neutral lipid, lipofuscin

## 1. 서 론

해산 이매패류는 어류나 다른 무척추동물에 비해 활동 범위가 제한적인 고착성의 여과 섭식자로 연안 환경 오염에 대한 지표종(sentinel species)으로 널리 사용되고 있다(Krishnakumar et al. 1994; Petrović et al. 2001; Kagley et al. 2003; Moore et al. 2004; Viarengo et al. 2007). 해산 이매패류는 수중으로부터 다양한 생체이물질(xenobiotics)과 독성 화합물을 여과 섭식하여 소화맹낭 혹은 그 주변 조직 세포에 축적하며, 축적된 물질은 패류의 생리학적 기능에 영향을 미친다(O'Connor and Lauenstein 1989; Livingstone 1991; Petrović et al. 2001; Kagley et al. 2003; Moore et al. 2004). 참굴 소화맹낭 상피 세포는 소화 세포(digestive cell or secretory-absorbative cell)와 호염성 세포(basophil cell)로 구성되며, 그 모양은 길고 원통형으로 섬모가 없다(Winstead 1995; Eble and Scro 1996). 소화맹낭은 먹이와 염분에 따라 위축되거나 팽창하기도 한다(Winstead 1995; Kang et al. 2010). 또한 해산 이매패류의 소화맹낭은 먹이의 소화, 흡수뿐만 아니라 오염물질의 해독 및 배출 작용에도 관여한다(Livingstone 1991; Krishnakumar et al. 1994). 이 소화맹낭 기능의 주된 역할은 소화맹낭 상피세포에 존재하는 리소솜(lysosomes)이 수행한다(Moore 1985; Viarengo et al. 1987; Petrović et al. 2001).

리소솜은 세포내 단일막에 둘러싸인 소기관(organelle)으로 약 300개의 산성 가수분해효소(acid hydrolases)를 함유하고 있어 외, 내부의 물질을 소화, 분해시키는 기능을 한다(Moore 1976; Pipe 1993; Chung 2003; Ferreira and Dolder 2003; Viarengo et al. 2007). 리소솜은 효모에서 인간까지 모든 진핵생물 세포에 존재하며, 주로 세포벽 주변에 분포한다(Klionsky and Emr 2000; Moore et al. 2006). 리소솜 가수분해효소는 리소솜 내 pH가 약 5.0 이하가 되는 산성 pH에서 활성을 보이며 단백질, 핵산, 다당체(polysaccharide), 지질 등 세포 내 모든 성분들을 소화할 수 있는 능력을 지니고 있다(Chung 2003). 생체이물질 혹은 환경오염 등의 스트레스를 받은 생물체의 리소솜은 리소솜 막 안정성이 저하되면서 리소솜 내 가수분해효소가 세포질로 확산되거나 Neutral Lipids(NL) 혹은 Lipofuscin(LF)과 같은 물질이 비정상적으로 리소솜 내에 축적된다. 그 결과 병리학적인 자가탐식(autophagy) 혹은 세포 사멸(cell death), 리소솜 저장병(lysosomal storage disease) 등 세포에 해로운 영향을 미친다(Petrović et al. 2001; Chung 2003; Cuervo 2004; Moore et al. 2007).

오염물질 노출로 인한 이매패류 소화맹낭 상피세포에 손상이 일어난 경우, 리소솜의 막 투과정도(membrane permeability) 및 융합(fusion) 현상의 변화, 리소솜 구성물

질의 변화가 일어난다(Hawkins 1980; Moore 1988; Krishnakumar et al. 1994; Moore et al. 2004). 리소솜 막 투과 정도는 리소솜 막 안정성(Lysosomal Membrane Stability, LMS)을 나타내는 지표로서 일반적으로 두 가지 측정 방법이 사용된다. 첫 번째는, 살아있는 세포(e.g. 혈구)를 이용하여 Neutral Red(NR) 염료가 세포에서 빠져나오는 시간(Neutral Red Retention time, NRR time)을 측정하는 방법으로, 스트레스를 받을수록 NRR time이 짧아지게 된다. 이 측정 방법은 해산 이매패류(*Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Pecten maximus*)에 활용된 바 있다(Hauton et al. 2001; Jo et al. 2002; Moore et al. 2004; Cho and Jeong 2005). 두 번째는, 조직(tissue) 동결절편을 이용하여 조직세포 내 리소솜이 화학적인 변화를 일으키는데 걸리는 시간을 측정하는 것이다. 이때, 리소솜의 화학적인 변화는 리소솜 막이 불안정 해져 기질이 리소솜 막을 투과해야 일어난다. 이 기질은 리소솜 내 가수분해효소(e.g. N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase, NAH)에 의해 분해되며, 분해된 기질에 결합하는 diazonium salt(e.g. fast violet B, fast red violet LB)로 염색하여 리소솜의 화학적인 변화를 관찰할 수 있다. 따라서 동결 절편된 조직에 산성 용액(acidic buffer)으로 인위적인 스트레스를 가해 리소솜 막을 불안정화시키고, 리소솜의 화학적인 변화가 일어난데 걸리는 시간(labilization time)을 결정한다. 이때, 이미 스트레스를 받은 세포는 짧은 시간의 산성 용액 처리에도 쉽게 리소솜 막이 불안정화 된다(Moore 1988; Krishnakumar et al. 1994; Petrović et al. 2001; Kagley et al. 2003; Moore et al. 2004). 담치(*Mytilus edulis*)의 경우, 소화맹낭 세포의 LMS는 환경오염물질 노출지역에서 대조지역에 비해 리소솜 막 불안정화 시간(labilization time)이 짧아지며, 인위적으로 오염물질의 농도 구배를 준 경우에도 오염물질의 농도가 높을수록 리소솜 막 불안정화 시간은 짧아진다는 것이 보고된 바 있다(Moore 1988; Krishnakumar et al. 1994; Petrović et al. 2001; Kagley et al. 2003). 이와 같이, 위의 두 가지 방법을 이용한 LMS 평가의 공통점은 환경오염물질 혹은 스트레스에 의해 생물체가 영향을 받으면 LMS가 저하되어 투과력이 증가하는 것이다. 또한 리소솜 막 안정성은 다른 리소솜 작용(e.g. neutral lipid 축적, lipofuscin 축적)과 밀접한 연관성을 가지고 있어 스트레스가 생물체에 끼치는 영향에 대해 좋은 biomarker로써 사용되고 있다(Moore et al. 2006, 2007; Viarengo et al. 2007).

NL은 트리아실글리세리드(triacylglyceride) 혹은 콜레스테롤 에스테르(cholesterol esters)와 같이 물에 녹지 않는 지질로, 세포막의 주된 구성성분이며 에너지 저장에 관여한다(Zweytick et al. 2000; Li et al. 2007). 그러나 NL의 세포 내 과잉 축적은 세포의 사멸(cell death) 혹은 세

포의 기능을 상실하게 한다(Li et al. 2007). 이와 같은 세포 내 NL의 과잉 축적은, 세포화학적 방법을 통한 현장 조사 혹은 실내 수조 실험 등 많은 연구에서, 환경오염물질에 노출된 담치류(*M. edulis* and *M. galloprovincialis*)가 오염물질에 영향을 받을수록 소화낭 내 NL 축적량이 증가된다고 보고된 바 있다. 이는 패류 소화낭 리소솜 막이 불안정해져 리소솜 내 가수분해효소의 활성이 증가하여, 과도한 지방산 대사로 리소솜 내 NL이 축적 되기 때문이며, 이와 같은 NL의 축적은 팽창된 리소솜 염색에 의하여 평가될 수 있다(Moore 1988; Krishnakumar et al. 1994; Dimitriadis et al. 2004; Raftopoulou et al. 2006).

LF는 리소솜 가수분해효소에 의해 분해되지 않고 리소솜에 축적되는 물질이다. LF는 세포분열 시 철의 촉매작용으로 세포 내 구성물질이 산화되어 생성된다. 따라서 세포분열이 많이 일어날수록, 세포 내 LF 축적이 증가하기 때문에 노화색소라고도 불린다(Viengno and Nott 1993; Dimitriadis et al. 2004; Terman and Brunk 2004). 그러나 스트레스의 영향을 받은 세포에서는 비정상적인 리소솜 내 LF 축적이 일어나기도 한다. 이와 같은 리소솜 내 비정상적인 LF의 축적은, 외부 스트레스 인자로 인해 생체 내 활성산소가 증가하게 되면, 이에 대응하는 항산화효소 활성이 증가하고, 이는 지질 과산화 작용을 촉매 하여 그 결과 불용성 LF의 리소솜 내 축적이 일어난다고 보고된 바 있다(Terman and Brunk 2004; Moore et al. 2006). 해산 이매패류에서도, 담치류(*M. edulis* and *M. galloprovincialis*)의 소화낭 리소솜 내 LF 축적이 유류 및 중금속, polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs), polychlorinated biphenyls(PCBs) 등의 농도에 따라 증가 되는 것이 보고된 바 있다(Moore 1988; Krishnakumar et al. 1994; Kagley et al. 2003; Dimitriadis et al. 2004). 또한 항구 주변이나 공업단지 주변에 서식하는 담치의 소화낭에도 LF 축적이 높은 것을 세포화학적 방법을 통해 많은 연구에서 보고된 바 있다(Lowe 1988; Moore 1988; Viengno and Nott 1993; Krishnakumar et al. 1994; Kagley et al. 2003; Moore et al. 2004).

일반적인 조직학적 관찰은 세포의 구조 혹은 고품질의 절편을 제공하는 장점 있다. 그러나 조직관찰을 위한 파라핀 블록 제작은 그 준비 기간이 오래 걸리며, 고정과 포매 과정에서 지질성분 혹은 효소의 활성을 잃어버리는 단점이 있다(Fink 1986). 반면, 동결절편은 생물체의 상태 그대로를 동결하여 세포막의 인지질 성분 및 효소의 활성을 유지하는 장점이 있다. 동결절편을 이용한 세포화학적 평가는 소량의 조직을 이용해 환경오염물질에 대한 생물체의 세포 혹은 조직 반응을 직접적으로 연결해 주는 역할을 하고, 짧은 시간 내에 정량적이고 정성적인 측정을 가능하게 하는 장점이 있다(Fink 1986; Lowe 1988;

Moore 1988; Krishnakumar et al. 1994; Dimitriadis et al. 2004). 이와 같은 이유로, 대부분의 해산 이매패류 소화낭 리소솜 활성의 연구는 동결절편 된 조직에서 세포화학적 방법을 이용하여 이루어지고 있다(Lowe 1988; Moore 1988; Krishnakumar et al. 1994; Petrović et al. 2001; Kagley et al. 2003; Dimitriadis et al. 2004). 또한 동결절편은 세포막의 지질성분을 파괴하지 않기 때문에 전자현미경 및 면역조직화학기법 등 다양한 각도에서 연구가 가능하다(Dimitriadis et al. 2004).

광양만은 남해안의 대표적인 반 폐쇄성 지역으로서, 여수해만 북측에 위치하며 우리나라에서 유일하게 하구언을 축조하지 않은 자연형 하구를 가지고 있는 만이다. 그러나 광양만 주변 육상에는 주요 항만, 산업 공단, 그리고 대도시들이 분포하고 있어 개발에 의한 해안선 변형, 생활하수와 산업 폐기물과 같은 물질들이 연안해역으로 유입되고 있다(Hong et al. 2011). 광양만 내만과 외만 지역의 해수, 저질, 저서생물에 축적되어 있는 PCBs의 양은 내만이 외만에 비해 높은 것으로 보고되었다(Hong et al. 2011). 또한 유기주석화합물인 Tributyltin과 Triphenyltin이 축적된 고동류 대수리(*Thais clavigera*)에서 imposex 현상이 보고된 바 있다(Shim et al. 2000).

이 연구에서는 광양만 해양환경을 평가하는 방법의 일환으로, 광양만 내, 외만 조간대에 분포하는 참굴(*C. gigas*)의 번식학적 특성, 소화낭위축도, NL 및 LF 등을 동결절편제작법에 의하여 분석하였다.

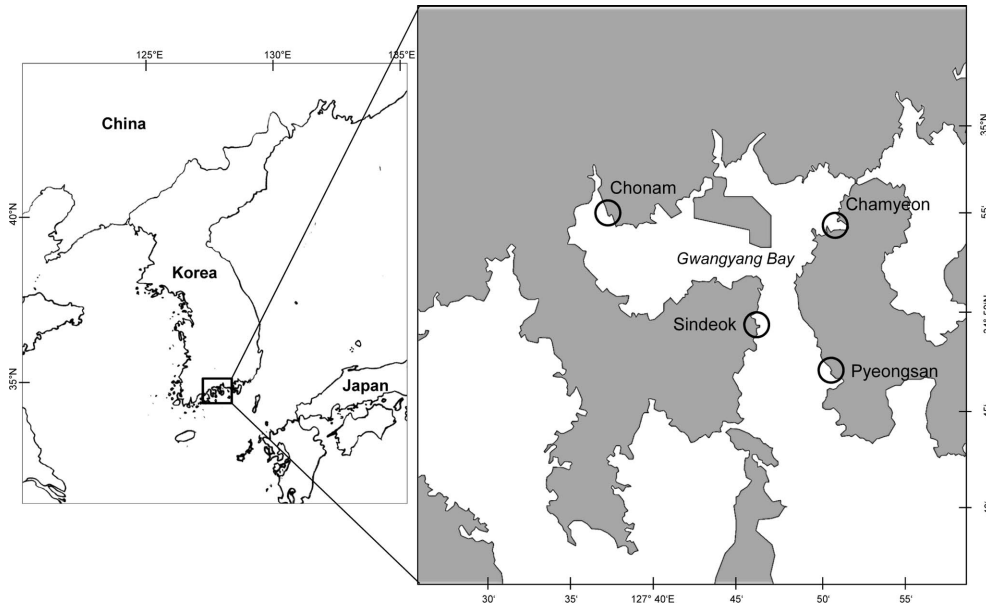
## 2. 재료 및 방법

### 시료 채집

분석에 이용된 시료는 2010년 6월 광양만의 내만 지역인 초남대교와 차면리, 외만 지역인 신덕리와 평산리의 조간대에서 채집되었으며, 조간대 암반에 부착한 자연산 참굴(*C. gigas*)을 채집하였다(Fig. 1). 각 지역에서 채집하는 참굴의 크기가 5 cm 이상인 개체를 채집하였으며, 즉시 실험실로 옮겨와 지역별로 15개체를 선별, 분석하였다.

### 비만도(Condition Index, CI) 측정

채집된 참굴은 각고(shell height, mm)와 총 부피(total volume, ml)를 측정 후, 개각하여 조직과 패각으로 구분해 조직의 습중량(tissue wet weight, g)과 패각 부피(shell volume, ml)를 측정하였다. 참굴의 총 부피와 패각 부피는 메스실린더에 일정량의 해수를 채운 후 참굴 혹은 참굴 패각만을 투입하였을 때 증가하는 해수의 부피를 측정하였으며, 이 때, 총 부피와 패각 부피와의 차이를 패각 내 부피로 정의하였다(internal cavity volume, Kang and



**Fig. 1.** The map shows sampling site. *Crassostrea gigas* collected form four sites (Chamyeon, Chonam, Sindeok and Pyeongsan) of Kwangyang bay, off the south coast of Korea

Choi 1999). 참굴의 비만도(condition index)는 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{비만도(CI)} = \frac{\text{습중량(tissue wet weight)}}{\text{패각 내 부피(internal cavity volume)}}$$

**동결절편제작**

참굴의 조직학적 관찰과 세포화학적 특성을 분석하기 위해 동결절편을 제작하였다. 동결절편의 제작은 Howard and Smith(1983)와 Kang et al. (2010)의 방법에 따라 생식소와 소화맹장이 모두 포함되게 육질 중앙부위를 5 mm 두께로 cross-section하여 O.C.T compound(Tissue-Tek)에 포매 후, 액체질소로 냉각된 butanol 용액에 급속 동결하였다. 이 후, -70°C에 동결 보존된 동결절편 시료는 cryostat(LEICA CM1850)에서 10 μm 두께로 절단하여 조직학적 관찰과 세포화학적 특성 분석에 사용하였다.

**생식소 발달단계(Reproductive Stage, RS) 관찰**

참굴의 생식소 관찰을 위해 동결절편 된 시료는 Baker’s calcium-formol 용액(4% formalin, 1% calcium chloride)으로 4°C에서 10분간 고정하였다. 고정된 시료는 Harrison’s Hematoxylin과 Eosin Y로 염색하여 RS를 관찰하였다. 참굴의 RS는 현미경하에서 임의로 선정된 생식소조직 4개 지점을 0; 미분화기(indifferent stage), 1; 초기발달기(early development stage), 2; 후기발달기(late development), 3; 완숙기(ripe stage), 4; 부분산란기(spawning stage), 5; 소모기(spent stage)의 6 단계로 나누어 판단하였고, 그 평균값을 각 개체의 생식소 지수로 결정하였다(Kang et al. 2010).

**소화맹장 위축도(Digestive Gland Atrophy, DGA)**

생식소 발달 단계에 이용한 슬라이드를 DGA 평가에 이용하였다. DGA는 참굴의 먹이 섭취에 따른 영양상태를

**Table 1.** Semi-quantitative scale for digestive gland atrophy (Kang et al. 2010)

Numerical score	Histological description
0	Normal wall thickness in most tubules (0% atrophy), Lumen nearly occluded, few tubules even slightly atrophied
1	Average wall thickness less than normal, but greater than one-half Normal thickness, most tubules showing some atrophy, some tubule still normal
2	Wall thickness averaging about one-half as thick as normal
3	Wall thickness less than one-half of normal, most tubules walls Significantly atrophied, some walls extremely thin (fully atrophied)
4	Wall extremely thin (100% atrophied), nearly all tubules affected

나타내는 지수로, 소화맹낭 임의의 4개 지역을 선정하여 위축 정도를 0-4단계로 나누어 판단하였으며(Kang et al. 2010), 그 평균값을 각 개체의 DGA 값으로 결정하였다. DGA 단계의 기준은 Table 1과 같으며, 이 기준에 따르면 그 값이 클수록 소화맹낭이 많이 위축되어 있음을 의미한다.

#### 리소솜 막 안정성(Lysosomal Membrane Stability, LMS) 평가

LMS는 인위적으로 리소솜 막을 불안정화하여, 리소솜 내 N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase(NAH)의 효소활성이 최대에 이르는 시간(labilization period, minute)을 측정하여 평가하였다. 염색을 제외한 각 반응단계는 37°C에서 실시하였다(Moore 1988; Krishnakumar et al. 1994). 연속절편된 슬라이드는 0.1 M citrate buffer(pH 4.5, 2.5% NaCl)에 각각 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30분간 반응시켜 리소솜 막을 불안정화 하였다. 리소솜 막이 불안정화 된 조직 슬라이드는 리소솜 막을 투과하는 기질이 포함된 용액에 20분간 반응시켰다. 이 때, 리소솜 투과반응에 쓰인 용액은 20 mg naphthol AS-BI N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide(Sigma)를 2.5 ml 2-methoxy ethanol(Sigma)에 혼합한 후, 조직 용해제인 Polypep low viscosity(Sigma) 3.5 g과 0.1 M citrate buffer를 첨가 하여 총 부피가 50 ml가 되도록 하였다(Moore 1988; Krishnakumar et al. 1994). 반응이 완료된 슬라이드는 3% NaCl 수용액으로 2분간 세척하고, diazonium salts(1 mg/ml fast violet B in 0.15 M phosphate buffer)로 상온에서 염색하였다. 염색된 시료는 차가운 Baker's calcium-formol 용액으로 10분간 고정 한 뒤, NAH 활성을 광학현미경으로 관찰하였다. 염색된 슬라이드는 광학현미경에 연결된 카메라를 이용해 촬영하였고, 임의로 선정한 소화맹낭 3개 영역을 400배 배율의 동일한 조건에서 촬영하여 화상분석 소프트웨어(Image Analyzing

Software)를 이용하여 분석하였다.

#### NL 염색

참굴 소화맹낭 내 NL의 축적은 Moore (1988)와 Krishnakumar et al. (1994)의 Oil Red O 염색법을 이용하여 분석하였다. 4°C Baker's calcium-formol 용액에 고정된 동결절편은 60% triethyl phosphate(Sigma)에 3분간 반응시킨 후, 1% Oil Red O 용액(1% Oil Red O in 60% triethyl phosphate, Sigma)으로 15분 동안 염색하였다. 염색이 완료된 슬라이드는 60% triethyl phosphate에 30초간 세척 후, 증류수로 다시 세척한 뒤, 광학현미경으로 NL의 축적 정도를 관찰하였다. NL의 축적 정도는, 임의로 선정한 소화맹낭 4개 영역을 LMS과 동일한 방법으로 촬영하여 화상 분석에 이용하였다.

#### LF 염색

참굴 소화맹낭 내 LF 축적 정도는 Moore (1988)와 Krishnakumar et al. (1994)의 Schmorl's 염색법에 따라 분석하였다. 이를 위하여, 4°C Baker's calcium-formol 용액에 10분간 고정된 동결절편은 Schmorl's 용액(1% ferric chloride : 1% potassium ferricyanide, 3:1 v/v)에 5분간 반응시켜 염색하였다. 염색이 완료된 슬라이드는 1% acetic acid로 1분간 세척 후, 봉입하여 광학현미경으로 LF 축적 정도를 관찰하였다. LF의 축적 정도는 임의로 선정한 소화맹낭 4개 영역을 LMS과 동일한 방법으로 촬영하여 화상 분석에 이용하였다.

#### 컴퓨터 화상분석방법

참굴 소화맹낭에서 관찰된 LMS 및 NL과 LF의 축적은 Krishnakumar et al. (1994)의 방법에 따라 화상분석 소프트웨어를 이용하여 정량화 하였다. 촬영된 이미지의 면적은 Image J 1.44(NIH) 프로그램으로 측정하였다. 면적의

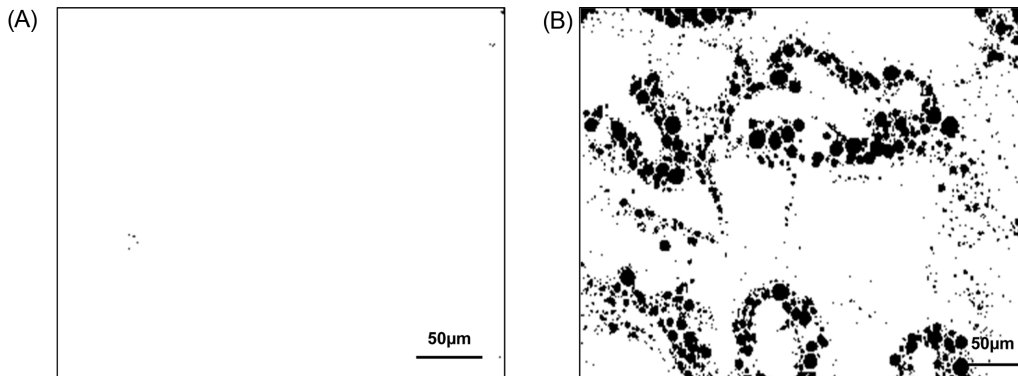


Fig. 2. Threshold pictures of digestive gland tissue sections derived for image analysis by removing the background from original images. (A) normal digestive gland of oyster from Chamyeon, (B) enlarged lysosome by excess accumulation of neutral lipid in digestive gland of oysters from Pyeongsan

측정방법은 촬영된 이미지를 320×240 pixel의 8-bit gray scale로 전환하여 염색이 되지 않은 배경을 제거하고, 배경이 제거된 이미지의 검은색 점의 면적을 pixels로 나타내었다(Fig. 2).

**통계 분석**

측정된 자료는 각 지역의 평균 값과 표준편차(standard deviation)로 표현하였으며, 지역별 차이는 one-way ANOVA test 후, 95%의 신뢰수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

**3. 결 과**

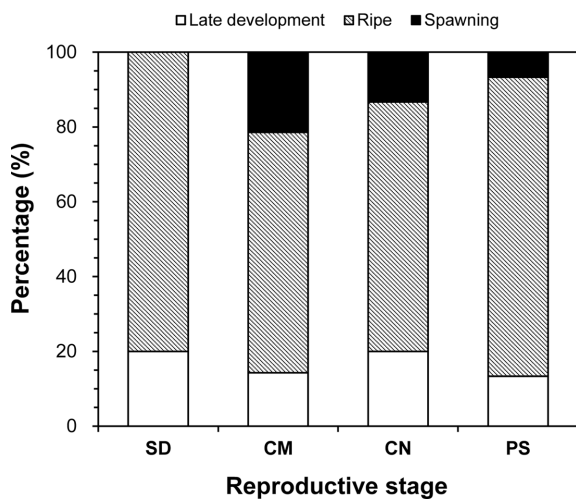
**참굴의 건강도(CI), 생식소 발달단계(RS) 및 소화맹낭위축도(DGA)**

광양만 조간대에 서식하는 참굴의 건강도(CI)는 내만에 위치한 차면리(0.34 ± 0.08)와 초남대교(0.37 ± 0.07)에서 외만에 위치한 신덕리(0.45 ± 0.08)와 평산리(0.45 ± 0.08)

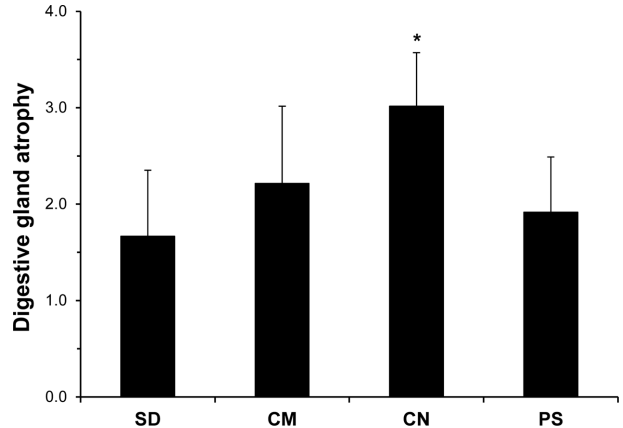
**Table 2. Biometric data of *C. gigas* from four sites and its condition index. SH: shell height, CI: condition index. Data was expressed mean ± standard deviation (SD)**

Site	N	SH (mm)	CI
Sindeok	15	56.58 ± 2.51	0.45 ± 0.08
Chamyeon	15	51.58 ± 4.53*	0.34 ± 0.08**
Chonam	15	55.33 ± 3.53	0.37 ± 0.07**
Pyeongosan	15	56.61 ± 4.26	0.45 ± 0.08

\*Significantly different: P<0.005, \*\*Significantly different: P<0.0001



**Fig. 3. Reproductive stage (RS) of oysters. RS was significantly no difference among 4 sites. SD: Sindeok, CM: Chonam, CN: Chamyeon, PS: Pyeongsan**



**Fig. 4. Digestive gland atrophy (DGA) of oysters. DGA of oysters from Chonam was significantly higher than other sites. \*significantly different (P<0.0001). SD: Sindeok, CM: Chonam, CN: Chamyeon, PS: Pyeongsan**

보다 유의적으로 낮았다(Table 2). 반면, 참굴의 RS는 일부 개체에서 생식세포가 성숙중인 후기 발달기(late development)가 관찰되었으나, 대부분이 성숙한 생식세포를 갖는 완숙기(ripe) 상태로 지역간 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

참굴의 DGA는 내만에 위치한 초남대교의 참굴에서 유의적으로 높게(3.0 ± 0.6) 관찰되었다. 또한 내만에 위치한 차면리에서 채집된 참굴의 DGA는 2.2 ± 0.8로 외만에 위치한 신덕리(1.7 ± 0.7)와 평산리(1.9 ± 0.6) 보다 높았으나 통계적 유의차이는 없었다(Fig. 4).

**리소솜 막 안정성(LMS)**

NAH 효소활성은 Fig. 5에서와 같이 개체 별로 다르게 나타났다. Fig. 5A는 NAH 효소활성이 전혀 일어나지 않은 소화맹낭의 대표적인 예이다. 반면, NAH 효소가 활성화 되면, Fig. 5B와 Fig. 5C에서 보는 바와 같이 리소솜이 diazonium salt로 염색되어 황갈색 반점의 밀도가 높아졌다. 또한 과도한 NAH 효소활성은 Fig. 5D에서 보는 바와 같으며, 소화맹낭 대부분에서 황갈색의 팽창된 리소솜이 관찰되었다.

광양만 4개 정점에서 채집된 참굴의 소화맹낭 LMS는 내만에 위치한 차면리와 초남대교가 각각 12.2 ± 6.4 min, 10.6 ± 7.4 min으로 짧았고, 외만에 위치한 신덕리와 평산리는 각각 18.0 ± 8.6 min, 13.2 ± 9.8 min으로 비교적 그 시간이 길었지만, 지역간 LMS 수치의 통계적인 유의 차는 없었다(Fig. 6).

**Neutral Lipid(NL)**

참굴 소화맹낭 내 NL의 축적 정도는 개체 별로 변이를

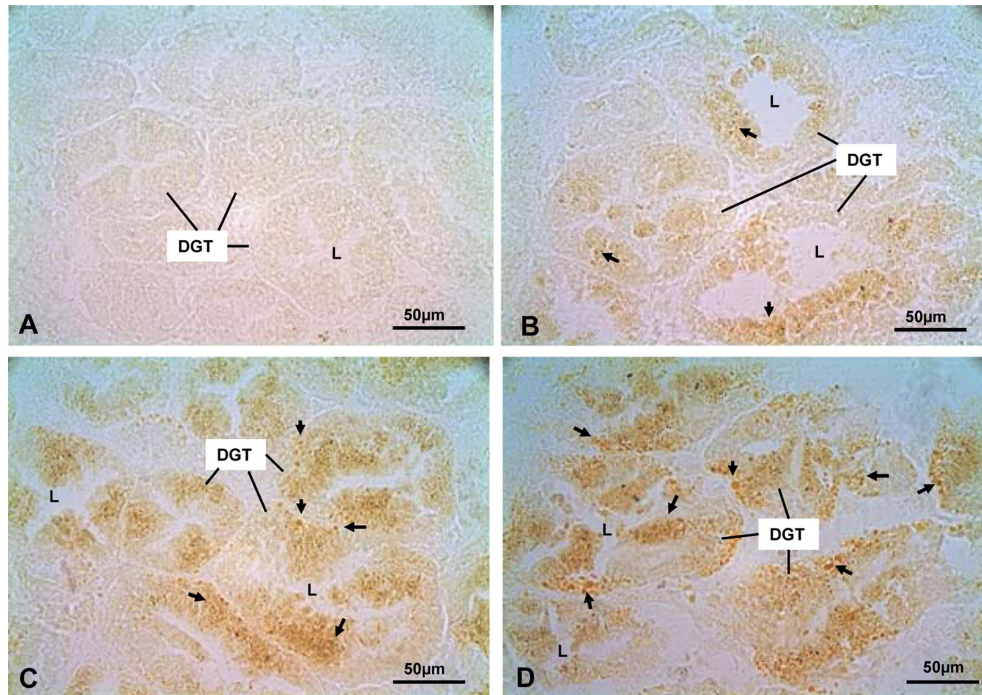


Fig. 5. Some examples of N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase (NAH) activity in digestive gland (DG) of oyster tissue section. (A) no NAH activity (Pyeong-san), (B) lower NAH activity (Chamyeon), (C) higher NAH activity (Chamyeon), (D) enlarged lysosomes showing increased NAH activity (Sindeok). DGT: digestive gland tubules, L: lumen, Arrow: N-acetyl  $\beta$ -hexosaminidase

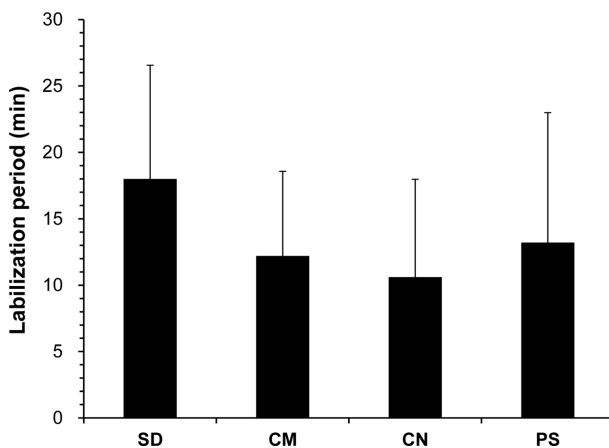


Fig. 6. Labilization period of oysters which was estimated by NAH activity. Statistically no difference was observed within four sites. SD: Sindeok, CM: Chonam, CN: Chamyeon, PS: Pyeongsan

보였으며, 그 결과는 Fig. 7과 같다. Fig. 7A는 NL축적이 일어나지 않은 개체이며, 반면에 Fig. 7B는 소화맹낭 주변 부위에 축적된 NL를 보이고 있다. 또한, NL 축적 정도가 증가하면 Fig. 7C에서 볼 수 있듯이 팽창된 리소솜이 소화맹낭 주변에서 높은 밀도로 출현한다. Fig. 7D는 평산리

에서 채집된 참굴에서 관찰된 NL으로, 소화맹낭 주변에서 매우 높은 밀도의 NL 축적이 관찰되었다.

이미지 분석을 통한 지역별 NL 축적 정도는 외만에 위치한 평산리에서  $10.4 \pm 8.9$  pixels로 다른 지역에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 반면, 외만에 위치한 신덕리 참굴의 소화맹낭 내 NL 축적도는  $6.3 \pm 3.6$  pixels로 내만에 위치한 차면리( $5.9 \pm 3.3$  pixels), 초남대교( $3.6 \pm 1.7$  pixels) 보다 높게 나타났으나, 지역간의 통계적인 유의차는 없었다(Fig. 8).

#### Lipofuscin(LF)

Fig. 9는 남해안 조간대에 분포하는 참굴에서 관찰된 소화맹낭 내 LF의 축적 정도를 보여주고 있다. Fig. 9A는 소화맹낭 내 LF 축적이 거의 일어나지 않은 개체이며, Fig. 9B와 9C는 LF 축적이 진행되는 개체를 나타내고 있다. Fig. 9B와 9C의 경우 Schmorl's 용액에 염색된 LF은 짙은 청색의 반점 형태로, 주로 소화맹낭 주변에서 관찰되었다. Fig. 9D는 LF 축적이 많이 진행된 개체의 소화맹낭으로, 소화맹낭 전체가 Schmorl's 용액에 염색된 LF로 덮여있다.

광양만 참굴의 LF 지역별 축적 정도는 내만에 위치한 차면리의 참굴이  $23.0 \pm 8.2$  pixels로 다른 지역에 비해 유

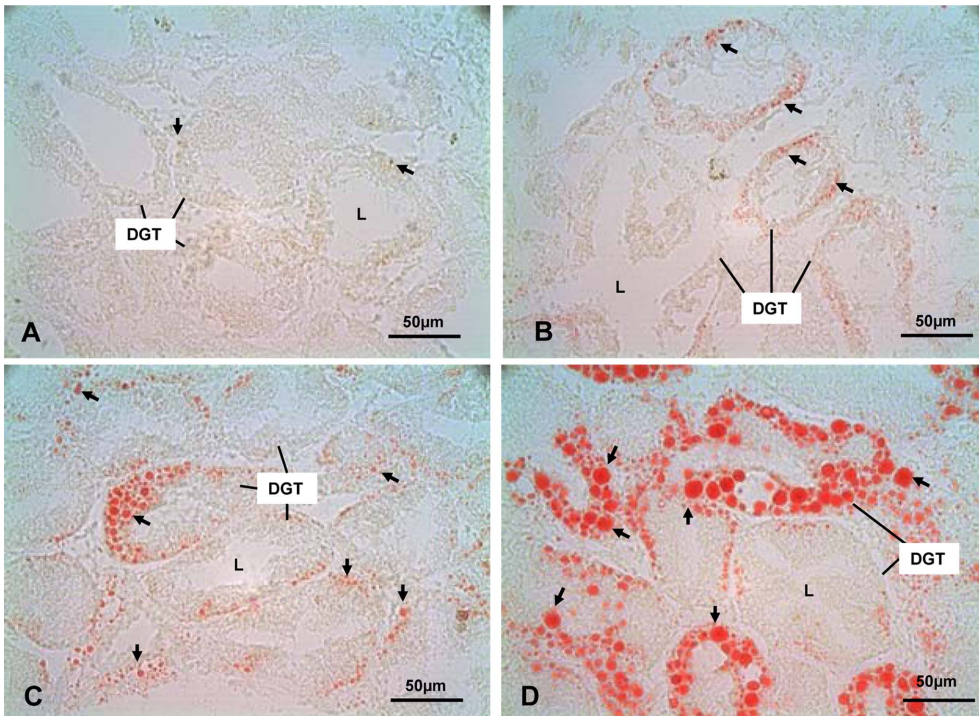


Fig. 7. Some examples of neutral lipids (NL) accumulations in digestive gland (DG) of oyster tissue section. (A) no NL accumulations (Chamyeon), (B) lower accumulation of NL (Sindeok), (C) enlarged NL accumulation (Pyeongsan), (D) pathogenic enlarged NL accumulation (Pyeongsan). DGT: digestive gland tubules. L: lumen Arrow: neutral lipid

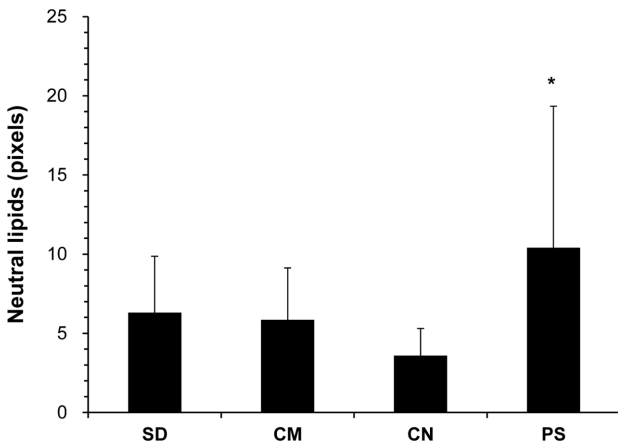


Fig. 8. Neutral lipids (NL) of oysters. NL of oysters from Pyeongsan was significantly higher than other sites. \* significantly different ( $P < 0.01$ ). SD: Sindeok, CM: Chonam, CN: Chamyeon, PS: Pyeongsan

의적으로 높은 LF의 축적량을 보였다. 반면, 외만에 위치한 신덕리와 평산리, 그리고 내만에 위치한 초남대교에서 측정된 LF 축적도는 각각  $15.4 \pm 8.2$  pixels,  $18.4 \pm 6.7$  pixels,  $17.0 \pm 6.5$  pixels로, 지역간의 통계적인 유의차는 관찰되지 않았다(Fig. 10).

#### 4. 고찰

##### 동결절편을 이용한 패류의 조직학적, 세포화학적 관찰

해양환경 모니터링 연구에 있어 이때패류는 오랫동안 지표종으로 이용되어 왔으며, 특히 굴과 홍합의 조직학적, 세포생물학적 특성은 연안의 환경영향 평가 연구에서 바이오 마커로서 널리 쓰여 왔다(Bayne et al. 1984; Huggett et al. 1992; Kramer 1994; Bianchi and Canuel 2011). 과거 환경모니터링 연구에서는 시간이나 공간에 따른 굴, 홍합의 번식생리적 특성 또는 병리학적 특성을 구명, 환경의 변화를 유추하였으며, 이를 위하여 조직학적 방법을 이용하였다. 전통적인 조직학적 절편제작 과정은 알코올 및 유기용매인 자일렌 등을 탈수 및 세정 과정에 이용하며, 이 때 세포가 지닌 생화학적, 세포생물학적 특성을 잃게 된다. 따라서 시료가 지닌 생화학적, 세포생물학적 특성을 유지하게 하는 조직학적 방법으로 동결절편 제작법이 이용되며, 동결절편제작은 형광면역학적 방법이나 다양한 세포생물학적 분석에 이용되어 왔다(Fink 1986; Moore et al. 2004).

이 연구에서는 참굴 소화맹낭 동결절편을 제작하여 소화맹낭 리소솜 활동을 세포화학적인 방법으로 평가하였다. 유럽의 경우, 해양 환경 모니터링에 있어 *M. edulis*나



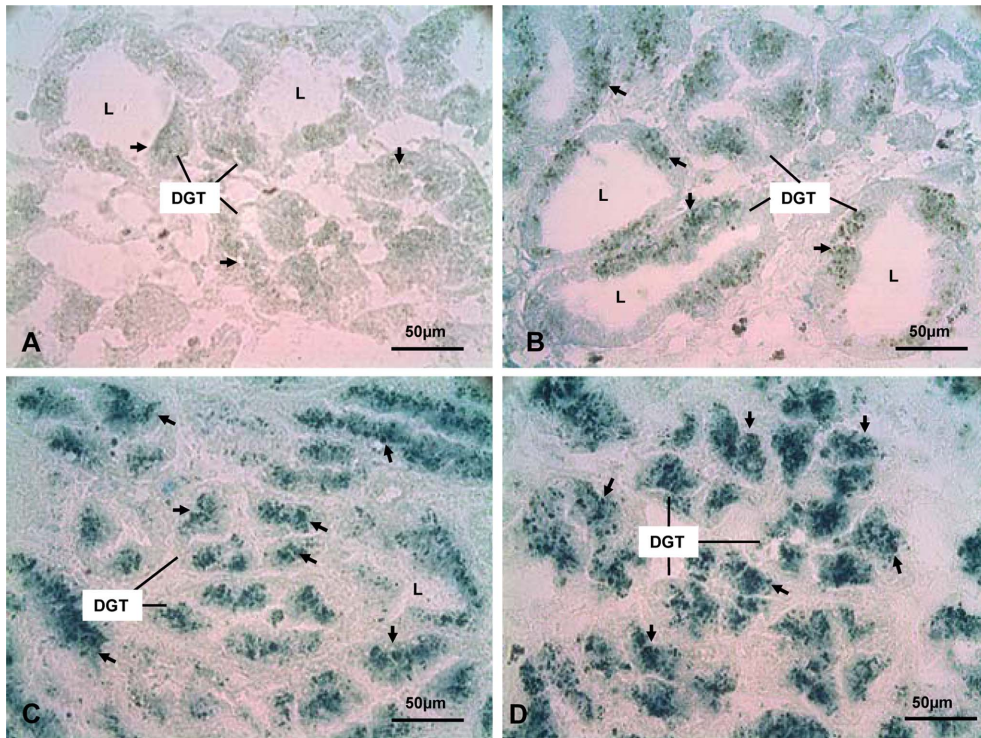


Fig. 9. Some examples of lipofuscin (LF) in digestive gland (DG) of oyster tissue section. (A) lowest LF deposition (Sindeok), (B) Lower LF deposition (Chonam), (C) and (D) higher LF deposition (Chamyeon). DGT: digestive gland tubules, L: lumen, Arrow: lipofuscin

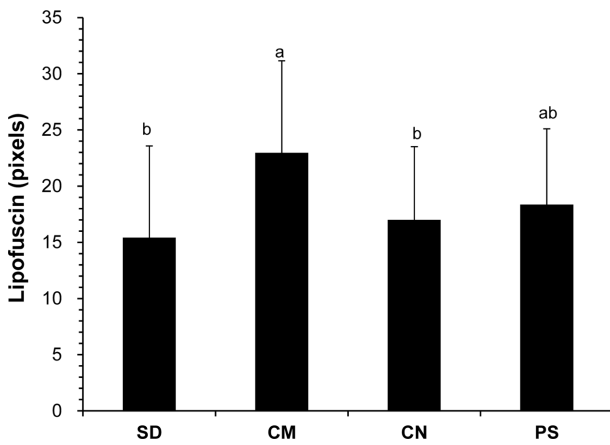


Fig. 10. Lipofuscin (LF) of oysters. LF of oysters from Chamyeon was significantly higher than other sites.  $P=0.0513$  SD: Sindeok, CM: Chonam, CN: Chamyeon, PS: Pyeongsan

*M. galloprovincialis*와 같은 담치류의 소화맹낭을 분석하였는데, 이들 연구에서는 동결절편 제작 및 분석을 위해 미량(일반적으로 5 mm<sup>3</sup>)의 소화맹낭 부위만을 취해 분석에 이용하였다(Moore 1988; Moore et al. 2004; Dimitriadis et al. 2004). 반면 이 연구에서는, 미량의 소화맹낭 세포 대신, Kang et al. (2010)에서 제시한 바와 같이 참굴 조직

중 단면 전체에 관한 동결절편을 제작, 분석하였다. 이에 따라, 이 연구에서 제작된 참굴 동결절편 중 단면은 소화맹낭 세포 내 리소솜 활성도 측정도 뿐만 아니라, 소화맹낭 위축도 및 생식소 발달과 같은 다른 생리학적 특성 분석을 가능케 하였으며, 특히 참굴 소화기관에 포함된 지질(lipid) 및 세포 내에 포함된 효소의 활성 측정도 가능케 하였다.

**해산이매패류의 소화맹낭위축도**

소화맹낭위축도는 해산이매패류의 주요한 영양학적 상태와 생리학적 건강도를 나타내는 지수로 소화맹낭 내벽의 두께와 소화맹낭 공간의 빈정도에 따라 구분된다. 이 지수는 먹이량 변동(Kang et al. 2010), 물리적 환경과 환경오염 물질과 같은 다양한 스트레스 인자들에 영향을 받는다고 알려져 있다(Winsted et al. 1995). 이 연구에서는 광양만 내만인 초남대교에서 채집된 참굴의 소화맹낭 위축도가 다른 지역과 비교하여, 유의하게 높음을 알 수 있었다(Fig. 4). Kang et al. (2010)에 따르면, 참굴의 DGA는 연중생식주기와 연관되어 있으며, 그 변동은 먹이가 부족한 가을이나, 산란 후에 높게 관찰되었다. 또한, 저염분에 노출된 버지니아 굴(*C. virginica*)에서도 DGA가 증가하는 경향을 나타냈다(Winsted 1995). 그러나, 이 연구에

서 채집된 초남대교 참굴은 번식상태가 대부분 완숙기였으며, 한국해양연구원 (2010)의 보고에 따르면 광양만 내만의 클로로필 a의 양이 5월 4.60  $\mu\text{g/l}$ 에서 8월 33.30  $\mu\text{g/l}$ 로 증가하였다. 따라서, 초남대교 참굴의 높은 DGA는 먹이와 염분의 영향이 아닌 다른 환경인자의 영향으로 사료된다. 이매패류의 소화맹낭 위축현상의 원인으로 Lowe et al. (1981)과 Moore et al. (1989)은 원유 또는 PAHs에 노출된 담치(*M. edulis*)에서 소화맹낭 세포 내 리소솜 활동이 자가탐식(autophagy)를 유도하여 세포의 기능상실과 세포 사멸(cell death)에 의한 것으로 보고한 바 있다. 이 연구 지역인 광양만은 여천공단 및 광양제철소, 울촌공단, 컨테이너 부두, 화력발전소 등과 같은 대규모 산업단지가 위치하고 있고, 인구 15만의 광양시, 10만의 순천시, 20만의 여수시가 위치하여, 산업활동으로 인한 부산물이 광양만으로 유입되고 있는 것으로 알려지고 있다. Hong et al. (2011)은 광양만 지역의 퇴적물에 다양한 종류의 유기화합물(PAHs, PCBs와 TBT)이 축적되어 있음을 보고한 바 있다. 그러나, 이 연구에서는 참굴 채집시 서식지역내 환경오염 물질의 오염 정도와 축적량에 관한 분석이 수행되지 않아, 특정 또는 여러 화합물의 노출에 의한 참굴 DGA의 변동에 관한 추가적인 연구가 필요하다.

#### LMS활성에 따른 참굴의 생리학적 특성

이 연구에서 분석된 참굴 소화맹낭의 LMS의 범위는 10-18분으로 광양만 내만이 외만 지역에 비해 짧은 경향을 보였지만, 통계적인 유의차는 없었다(Fig. 6). 해산 이매패류 소화맹낭의 LMS에 관한 다양한 연구에서는 환경오염이 진행된 지역에 서식하는 담치류(*M. edulis*, *M. galloprovincialis*)의 LMS 활성이 대조지역에 비해 리소솜 막 불안정화 시간이 짧음을 보고한 바 있다(Moore 1988; Petrović et al. 2001; Ringwood et al. 2002; Kagley et al. 2003; Moore et al. 2004). Krishnakumar et al. (1994)은 PAHs와 PCBs 수준이 높은 도시 근교의 연안에 분포하는 담치의 LMS 시간이 10분 미만이라고 보고하였다. 또한, Viarengo et al. (2007)은 해산 이매패류의 LMS 시간에 따라 생물체의 생리학적 건강도를 다음과 같이 정의하였다. 생물체의 LMS가 20분 이상인 경우 스트레스에 영향을 받지 않는 건강한 상태이며, 10분 이상 20분 미만일 때는 개체가 스트레스를 받았지만 이를 회복할 수 있는 상태, 10분 미만의 LMS를 보이는 경우는 생물체가 병리학적 증상을 보이는 스트레스 상태라고 설명하였다. 그러나 Moore (1988)는 퇴적물 내 PAHs와 PCBs 농도가 높은 지역에 분포하는 담치(*M. edulis*)의 LMS 분석한 결과, 이 지역 담치의 LMS가 다른 지역에 비해 길게 관찰되는 상반된 결과를 보고한 바 있다. Moore (1988)는 이러한 상반된 현상이 장기적 오염물질 노출에 대한 담치개체군의

내성 증가의 결과로 설명하였다. 이 연구에서 측정된 광양만 참굴 LMS 활성화에 대한 지역적인 유의 차는 관찰되지 않았으며, Viarengo et al. (2007)에 따르면, 광양만 조건대에 분포하는 참굴은 스트레스를 받는 상태이나, 회복이 가능한 상태인 것으로 판단된다.

#### 환경스트레스에 의한 참굴의 NL과 LF 축적

환경스트레스에 대한 해산 이매패류의 반응은 종종 비정상적인 지방산 대사를 초래하여, 리소솜 내부에 NL과 LF의 축적을 유도하는 것으로 알려져 있다(Lüllman-Rauch 1979; Moore 1988; Krishnakumar et al. 1994; Kagley et al. 2003; Moore et al. 2004; Viarengo et al. 2007). 광양만 참굴에 축적된 NL은 3-10 pixels로 외만에 위치한 참굴에서 높은 축적을 보였다(Fig. 8). 반면, LF의 축적은 15-23 pixels로 내만에 위치한 참굴에서 높은 축적을 보였다(Fig. 10). 이와 관련하여 담치(*M. edulis*)를 이용한 다른 연구를 살펴보면, 리소솜 내 NL과 LF의 축적은 환경스트레스 요인이 많은 항구 주변과 내만에 위치 할수록 유의적으로 높은 축적을 보였으며, 리소솜 내 과도한 지질의 축적은 LMS를 저하 시킨다고 보고된 바 있다(Moore 1988; Krishnakumar et al. 1994; Kagley et al. 2003; Moore et al. 2004; Viarengo et al. 2007). 또한 Capuzzo and Leavitt (1988)는 환경오염이 많이 진행된 지역과 그렇지 않은 대조구에서 채집된 담치(*M. edulis*) 소화맹낭의 지방산을 분석한 결과, 비교적 환경오염이 많이 진행된 지역에서 채집된 홍합의 경우, 극성 지방(polar lipid)의 양은 상대적으로 낮고, NL의 양은 높음을 알 수 있었다. 따라서 광양만 내만에 분포하는 참굴에서 관찰된 높은 LF 축적은 환경스트레스에 기인한 것으로 사료된다. 그러나 외만 참굴에서 관찰된 높은 NL 축적은 DGA, LMS, LF 결과 및 다른 연구자들의 연구 결과와 다소 부합하지 않는다. Dimitriadis et al. (2004)은 그리스 에게해에 분포하는 지중해담치(*M. galloprovincialis*) 소화맹낭의 리소솜 LF, NL 및 NAH(N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase) 효소 활성도를 측정한 결과, LF가 높게 나타난 홍합에서 낮은 수준의 NL 및 약한 NAH 효소활성을 보고한 바 있다. 이와 같은 현상은, 과도한 LF 축적이 리소솜 내 NAH 효소 활성을 저하시키고, 리소솜 내 NL을 지질 과산화 작용(lipid peroxidation)을 통하여 LF로 전환하였기 때문이라고 설명하였다. 그러나 리소솜 내 NL이 지질 과산화 작용을 통한 LF로의 전환에 대한 자세한 메커니즘은 아직 명확히 설명되지 않고 있다(Dimitriadis et al. 2004).

## 5. 요약

이매패류의 소화맹낭은 고도로 발달된 리소솜 시스템을

지니고 있어 소화작용과 함께 오염물질의 해독과 배출작용을 담당한다. 따라서 소화맹낭의 리소솜 시스템은 환경변화에 민감하게 반응한다고 알려져 있다. 이 연구에서는 동결절편을 이용한 조직학적 방법으로 조건대에 서식하는 참굴 소화맹낭의 리소솜 활동을 측정하였다. 참굴은 2010년 6월 광양만 내만의 초남대교, 차면리와 외만의 신덕리, 평산리 조건대에 서식하는 굴을 채집하였다. 제작된 동결절편을 이용하여 lysosomal membrane stability(LMS) 및 lipofuscin(LF) 축적, neutral lipid(NL) 축적, 소화맹낭 위축도(digestive gland atrophy, DGA)를 평가하였다. 비만도 및 소화맹낭 위축도는 내만에 서식하는 참굴이 다른 지역에 비해 유의적으로 낮았다( $P<0.05$ ). LMS는 내만이 외만에 비해 짧은 리소솜 막 불안정화 시간을 보였지만 지역별 통계적인 유의차는 없었다. LF 축적은 내만에 서식하는 참굴이 유의적으로 높은 축적을 보였지만( $P<0.05$ ), NL 축적의 경우 외만에 서식하는 참굴이 유의적으로 높은 축적을 보였다( $P<0.05$ ). DGA와 LF의 경우 내만과 외만에서 뚜렷한 차이를 보였고, 이는 환경오염의 수준과 관련 있을 것으로 사료된다. 따라서 이 두 가지 분석항목은 연안환경평가에서 좋은 biomarker로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 사 사

이 연구는 한국해양연구원의 남해 특별관리해역 생태계 건강지수 개발(과제번호 PE98582: Development of Marine Ecosystem Health Index in the special management areas of the South Sea)의 지원에 의하여 수행되었으며, 지원에 깊은 감사를 드립니다.

## 참고문헌

- 한국해양연구원 (2010) 남해 특별관리해역 생태계 건강지수 개발. 한국해양연구원, BSPE98463-2251-3, 381 p
- Bayne BL, Brown DA, Burns K, Dixon DR, Ivanovici A, Livingstone DR, Lowe DM, Moore MN, Stebbing ARD, Widdows J (1984) The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger, New York, 384 p
- Bianchi TS, Canuel EA (2011) Chemicals biomarkers in aquatic ecosystems. Princeton University Press, Princeton, 396 p
- Capuzzo JM, Leavitt DF (1988) Lipid composition of the digestive glands of *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* in response to pollutant gradients. Mar Ecol-Prog Ser **46**:139-145
- Cho SM, Jeong WG (2005) Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture **244**:383-387
- Chung KW (2003) Ultrastructure of chronic liver disease: Lysosomes and lysosomal storage diseases. Korean J Hepatol **9**:344-361
- Cuervo AM (2004) Autophagy: In sickness and in health. Trends Cell Biol **14**:70-77
- Dimitriadis VK, Domouhtsidou GP, Cajaraville MP (2004) Cytochemical and histochemical aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (L.) in relation to function. J Mol Histo **35**:501-509
- Eble AF, Scro R (1996) General anatomy. In: Kennedy VS, Newell RIE (eds) The eastern oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park, pp 19-73
- Ferreira A, Dolder H (2003) Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia, Squamata). Acta Histochem **105**:339-352
- Fink S (1986) A new integrated concept for the improved preparation of sections of fresh or frozen tissue for light microscope histochemistry. Histochemistry **86**:43-52
- Hauton C, Hawkins LE, Hutchinson S (2001) Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L.). Fish Shellfish Immun **11**:143-153
- Hawkins HK (1980) Reactions of lysosomes to cell injury. In: Trump BF, Arstila AV (eds) Pathobiology of cell membranes. Vol 2. Academic Press, New York, pp 252-285
- Hong SH, Kannan N, Yim UH, Choi JW, Shim WJ (2011) Polychlorinated biphenyls (PCBs) in a benthic ecosystem in Gwangyang Bay, South Korea. Mar Pollut Bull **62**: 2863-2868
- Howard D, Smith C (1983) Histological techniques for marine bivalve mollusks. NOAA technical memorandum NMFS-F/NEC-25. Woods Hole, MA, 97 p
- Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM, Bergman HL (1992) Biomarkers. Lewis Publishers, Boca Raton, 347 p
- Jo QT, Choy EJ, Park DW, Jee YJ, Kim SY, Kim Y (2002) Cellular biomarker of membrane stability and hydrolytic enzyme activity in the hemocytes of benzo (a) pyrene-exposed Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J Fish Sci Tech **5**:263-270
- Kagley AN, Snider RG, Krishnakumar PK, Casillas E (2003) Assessment of seasonal variability of cytochemical responses to contaminant exposure in the blue mussel *Mytilus edulis* (Complex). Arch Environ Con Tox **44**:43-52
- Kang DH, Choi KS (1999) Evaluation of methods used in the calculation of condition index using the Mussel, *Mytilus*

- coruscus* (Gould, 1861) collected from Chuja Island, Cheju, Korea. Korean J Malacol **15**:57-62
- Kang DH, Chu FE, Yang HS, Lee CH, Koh HB, Choi KS (2010) Growth, reproductive condition, and digestive tubule atrophy of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Gamakman bay off the southern coast of Korea. J Shellfish Res **29**:839-845
- Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science **290**:1717-1721
- Kramer KJM (1994) Biomonitoring of coastal waters and estuaries. CRC Press, Boca Raton, 327 p
- Krishnakumar PK, Casillas E, Varanasi U (1994) Effect of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington, USA. I. Cytochemical measures of lysosomal responses in the digestive cells using automatic image analysis. Mar Ecol-Prog Ser **106**:249-261
- Li Y, Qin Y, Li H, Wu R, Yan C, Du H (2007) Lysosomal acid lipase over-expression disrupts lamellar body genesis and alveolar structure in the lung. Int J Exp Path **88**:427-436
- Livingstone DR (1991) Organic xenobiotics metabolism in marine invertebrates. In: Giles R (ed) Advances in comparative and environmental physiology. Springer-Verlag, Berlin, pp 45-185
- Lowe DM (1988) Alterations in the cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. Mar Ecol-Prog Ser **46**:91-100
- Lowe DM, Moore MN, Clarke KE (1981) Effect of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. Aquat Toxicol **1**:213-226
- Lüllman-Rauch R (1979) Drug-induced lysosomal storage disorders. In: Dingle JT, Jacques PJ, Shaw IH (eds) Lysosomes in biology and pathology. North-Holland, Amsterdam, pp 49-130
- Moore MN (1976) Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. Cell Tissue Res **175**:279-287
- Moore MN (1985) Cellular responses to pollutants. Mar Pollut Bull **16**:164-169
- Moore MN (1988) Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscs to environmental and experimental exposure to xenobiotics. Mar Ecol-Prog Ser **46**:81-89
- Moore MN, Allen JI, McVeigh A (2006) Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. Mar Environ Res **61**:278-304
- Moore MN, Livingstone DR, Widdows J (1989) Hydrocarbons in marine mollusks: biological effects and ecological consequences. In: Varanasi U (ed) Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. CRC press. Boca Raton, pp 303-310
- Moore MN, Lowe DM, Koehler A (2004) Biological effects of contaminants: Measurements of lysosomal membrane stability. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences (TIMES), Vol 36. ICES, Copenhagen, 31 p
- Moore MN, Viarengo A, Donkin P, Hawkins AJS (2007) Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. Aquat Toxicol **84**:80-91
- O'Connor TP, Lauenstein GG (1989) Ten-year trends in chemical contamination in mussels and oysters. J Shellfish Res **8**:452
- Petrović S, Ozretić B, Krajnović-Ozretić M, Bobinac D (2001) Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as biomarker in a field study. Mar Pollut Bull **42**:1373-1378
- Pipe RK (1993) The generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Dev Comp Immunol **16**:111-122
- Raftopoulou EK, Dailianis S, Dimitriadis VK, Kaloyianni M (2006) Introduction of cAMP and establishment of neutral lipid alterations as pollution biomarkers using the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Correlation with a battery of biomarker. Sci Total Environ **368**:597-614
- Ringwood AH, Hoguet J, Keppler CJ (2002) Seasonal variation in lysosomal destabilization in oyster, *Crassostrea virginica*. Mar Environ Res **58**:793-797
- Shim WJ, Kahng SH, Hong SH, Kim NS, Kim SK, Shim JH (2000) Imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, as evidence of organotin contamination in the marine environment of Korea. Mar Environ Res **49**:435-451
- Terman A, Brunk UT (2004) Molecules in focus lipofuscin. Int J Biochem Cell Biol **36**:1400-1404
- Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A (2007) The use of biomarker in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. Comp Biochem Phys C **146**:281-300
- Viarengo A, Moore MN, Mancinelli G, Mazzucotelli A, Pipe RK, Farrar SV (1987) Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. Mar Biol **94**:251-257
- Viarengo A, Nott J (1993) Mechanisms of heavy metals cation

---

homeostasis in marine invertebrates. *Comp Biochem Phys C* **104**:355-372

lipid particles of eukaryotic cells. *Biochem Biophys Acta* **1469**:101-120

Winstead JT (1995) Digestive tubule atrophy in eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791), exposed to salinity and starvation stress. *J Shellfish Res* **14**:105-111

Zweytick D, Athenstaedt K, Daum G (2000) Intracellular

---

*Received Mar. 28, 2012*

*Revised May. 10, 2012*

*Accepted May. 21, 2012*