2007-1-11

Korean Journal of Malacology, Vol. 22(2): 157-165, December 30, 2006

바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 의 중금속 축적에 관한 연구

이용석, 조용훈[1], 변인선[2], 강세원, 조은미[3], 한연수[1], 최상행[2], 박홍석[2], 고원규, 안인영[4], 정계헌[3]

인제대학교 의과대학 기생충학교실 및 백인제기념연구소 말라리아연구부,
[1]전남대학교 농업생명과학대학 농생물학과, [2]한국생명공학연구원 유전체연구센터,
[3]순천향대학교 자연과학대학 생명과학과, [4]한국해양연구원 부설 극지연구소

Bioaccumulation of Heavy Metals in *Ruditapes philippinarum*

Yong Seok Lee, Yong Hun Jo[1], In Sun Byun[2], Se Won Kang, Eun Mi Cho[3], Yeon Soo Han[1], Sang-Haeng Choi[2], Hong-Seog Park[2], Weon-Gyu Kho, In-Young Ahn[4], and Kye-Heon Jeong[3]

Department of Parasitology, Inje University College of Medicine and Department of Malariology, PICR, Busan 614-735, Korea
[1]Department of Agricultural Biology, Chonnam National University, Gwanju 500-757, Korea
[2]Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea
[3]Department of Biology, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam, 336-745 Korea
[4]Korea Polar Research Institute, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan, 426-744, Korea

ABSTRACT

The present study was conducted to confirm that a bivalve *Ruditapes philippinarum* can be used as a biomarker for the monitoring of the heavy metal pollution in the silt of the marine environment. The clams were collected from the silt of Cheonsu-bay, Buheung-ri, and Tan-island of the West Sea, Korea. To observe the normal structures of the target organs (hepatopancreas and gill), they were dissected out for the immunohistochemical study and the electron microscopy with TEM, SEM, and SEM-EDS. The immunohistochemical study showed that the interdiverticular connective tissues of the hepatopancreas, and the outer epithelium of the gill lamellae was strongly reacted to anti-metallothionein (MT), indicating the presence of MT, a metal-binding protein, involved in metal detoxifying process. According to the examinations under the TEM, the epithelial cells of the hepatopancreas of the clams collected from polluted area (Tan-island) showed certain changes such as swollen rER, swollen nuclear envelope and inclusion bodies in the nulcei. In the SEM-EDS analysis, tissue of the hepatopancreas showed relatively higher concentration of S, Zn, and Cd. These elements are supposed to be concerning with the MT-reaction in the hepatopancreas. Considering that the coastal bivalve *R. philippinarum* showed immediate subcellular responses to heavy metal pollution in the overall experiments conducted, this species might act as one of efficient biomarkers for the heavy metal contamination in the marine environment.

Keywords: *Ruditapes philippinarum,* TEM, Heavy metals, Biomarker.

Received October 5, 2006; Accepted December 8, 2006
Corresponding author: Jeong, Kye-Heon
Tel: +82 (41) 530-1249 e-mail: jngkh@sch.ac.kr
1225-3480/22208
© The Malacological Society of Korea

서 론

갯벌을 포함한 연안생태계는 광범위한 지역을 포괄하는 용어로서 인간의 활동이 가장 활발한 지역이다. 그 결과 여러 종류의 오염물질에 의해 많은 영향을 받는 지역이라 할 수 있다. 특히 갯벌은 매우 중요한 어업의 장을 제공하며, 최근에는 수

많은 생물들이 살아가는 서식처이자 주변 연안 해역을 깨끗하게 지켜 주는 정화조로서 그 중요성이 더욱 부각되고 있다. 그러나 1980년대 후반에 들어서면서 이른바 '서해안 개발'이라는 명분 아래 갯벌을 매립하는 등 무분별한 개발 행위가 이루어졌고 그로 인해 갯벌 생물들의 서식처가 파괴되고 오염되어 한반도 주변 연안 생태계 중에서 인위적 간섭을 가장 많이 받는 곳이 되어 버린 지 오래이다. 또한 도시의 하수구로 전락한 하천으로부터 생활하수나 공장 폐수 등이 유입되어 주변생물들이 대량으로 폐사하는 사태가 벌어지고 있다. 이에 갯벌환경에서의 환경오염에 대한 모니터링은 매우 중요하다 할 수 있다 (Hong, 1998).

전 세계적으로 연안환경에서의 환경오염을 모니터링 하는 데에는 Mussel Watch Program을 중심으로 담치류와 굴, 총알고둥 등이 지표종 (indicator species) 으로 널리 사용되어 왔다 (O'Connor *et al.*, 1994). 그러나 이러한 지표종이 서식하고 있지 않은 지역에서는 이에 상응하는 다른 유용한 생물지표종을 사용할 수 있다. 예를 들어 남극과 같은 경우 담치, 굴, 총알고둥이 서식하고 있지 않아 남극큰띠조개 (*Laternulla elliptica*), 남극가리비 (*Adamussium colbecki*), 남극삿갓조개 (*Nacella concinna*) 와 같은 종들이 이러한 생물지표종들로 사용되고 있다 (Lee, 2002). 하지만 이러한 연안환경을 모니터링 하는데 사용되어지는 종들의 서식환경은 대부분 조간대의 암석에 부착되어 살아감으로, 실재로 인간의 활동과 가장 밀접한 갯벌환경의 환경오염에 대한 모니터링을 하는데 있어서는 지표종으로써 충분한 역할을 할 수 없다. 이에 갯벌생태계를 모니터링 하는 새로운 지표종의 개발이 매우 시급하게 요구되어진다고 할 수 있다.

갯벌생태계에서 살아가는 여러 가지 생물 중 현탁물 섭식 (suspension-feeding) 을 하며 살아가는 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 의 경우엔 국내 전역에 서식하고 있으며 (Min *et al.*, 2004), 중금속에 민감한 반응을 보이는 연체동물의 특징을 가지고 있고 (Bebianno *et al.*, 2003), 매우 많은 양의 물을 걸러내고 있는데 한 연구에 의하면 21-24℃에서 각장 36-38 mm인 개체들이 0.6-1.5 liter/hr의 여과량을 보이고 있어 갯벌의 자정작용에 매우 중요한 종으로 최근 부각되고 있으며 (Kohata *et al.*, 2003), 특히 근연종인 지중해바지락 (*Ruditapes decussatus*) 의 경우에서는 Cd 및 Cu 등의 중금속을 임의적으로 노출시켜 그 반응 양상을 확인하여 중금속에 의한 환경오염에 대한 biomarker로 가능 여부를 확인하고자 하는 많은 연구가 이미 진행되어 왔다.

일반적으로 척추동물의 경우엔 중금속이 주로 축적되는 장기는 간장 (liver) 과 신장 (kidney) 이며, 이때 노출시간에 따라 현저한 미세구조적인 변화가 관찰되어지는 것으로 알려져 있다. 또한 유입된 중금속을 해독 또는 농축하기 위해 금속결합 단백질인 metallothionein (MT) 및 GSH (endogenous sulfhydryl glutathione) 의 분비가 촉진되어지는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 중금속의 노출에 따른 세포의 미세구조적 및 생리적 반응 현상은 연체동물에서도 같은 양상을 보인다고 이 등이 보고한 바 있다 (Lee *et al.*, 2000).

특히 이번 실험대상 단백질인 MT는 척추동물, 무척추동물, 식물과 미생물을 포함하는 갖가지 진핵 및 원핵 동물에서 발견되어지고 있는 cytosolic protein이며, Cys-Xaa-Cys의 아미노산 서열을 갖고 있는 독특한 형태를 갖는다 (Hammer, 1986; Kagi and Kojima, 1987). MT는 단지 몇몇 아미노산의 위치와 등전점 (isoelectric points) 그리고 소수성 등에 의한 다양한 이형 (isoform) 이 존재한다 (Kagi, 1993; Dabrio *et al.*, 2002). 또한 Cu와 Zn와 같은 필수 금속의 조절과 필수비필수 금속의 해독에 깊이 관련하고 있다. 하지만 MT의 더 중요한 기능은 oxidative stress에 대한 세포 보호 작용에서 세포 내 자유래디컬 (free radicals) 을 제거하는 역할을 하며, Zn을 매개로 하는 유전자 조절작용 (zinc-mediated gene regulation) 과 같은 기능을 한다 (Zeng *et al.*, 1991a, b). 그러므로 d10 metal ions (Zn^{2+}, Cd^{2+}, and Cu^{+}) 과 같은 독극물로 개체를 노출시키면 서로 다른 조직에서 MT의 발현이 일어난다. 그러므로 MT는 노출실험에 있어서 환경오염 지표물질로 사용할 수 있다고 말 할 수 있다 (Simes *et al.*, 2003). 또한 Bebianno and Serafim (1998) 은 MT가 Cd 노출에 의한 초기 경고 신호로 이용될 수 있으며, 생물군집의 독성학적 위치를 평가할 수 있는 매우 유용한 biomarker임을 확인하였고 (Bebianno and Serafim, 2003), Lecoeur *et al.* (2004) 은 수중생태계에서 중금속 오염의 biomarker로서 MT의 사용을 제안했다.

본 연구에서는 이러한 이론들을 바탕으로 하여 지역의 오염도에 따른 바지락을 이용하여 면역조직화학적 및 미세구조적 변화의 관찰을 통하여 자연 상태에서 체내에 유입되는 중금속의 농축 방식과 이에 따른 MT 분포의 양상을 관찰하고, EDS를 이용하여 중금속의 농축 패턴을 확인하여 연안의 갯벌에서의 환경오염 모니터링 지표종으로서의 가능성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

재료로 사용된 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 은 연체동물 문 (Mollusca), 이매패 강 (Bivalvia), 백합 목 (Veneroida), 백합 과 (Veneridae) 에 속하는 종으로 갯벌지역이 존재하는 우리나라 전역에 분포하는 종이다. 실험에 사용된 시료들은 오염정도가 서로 다른 지역에 서식하는 개체들 간의 미세구조 및 조직화학적 반응 등의 비교를 위해서는 2003

년 5-6월 사이 천수만, 대부도 부흥리 및 탄도에서 채집하였다. 각 지역별 바지락을 실험실로 옮긴 후 Olympus B-601 해부현미경하에서 간췌장 (hepatopancreas) 과 아가미 (gill) 를 각각 적출하여 Karnovsky's fixative solution에 고정하였다.

2. Immuno-histochemical Study

1) 광학현미경용 표본 제작

면역조직화학적 실험을 위하여 일반적인 광학현미경 표본 제작과정을 실행하였다. 고정된 시료를 흐르는 물에 24시간 수세를 하였다. 적당한 크기로 세절한 후 ethanol 농도 상승 순으로 탈수를 하였고, xylen 농도 상승 순으로 투명화를 시켰다. paraffin:xylen 비율을 1:2, 1:1, 2:1, paraffin 순으로 치환을 한 후 paraffin에 포매하여 블록을 제작하였다. 상온에서 1일 놓아 둔 후 절편 제작에 용이하도록 냉동고 (-20℃) 에서 보관하였다. 약 7 μm 두께로 절편을 만들어 슬라이드 글라스 위에 올렸다.

2) Immuno-histochemical Study

Xylen을 이용하여 파라핀을 제거한 후, ethanol 농도 하강 순으로 수화에 들어갔다. 수화된 조직을 hydrogen peroxide로 처리하였고, 비특이적 면역반응을 제거하기 위해 blocking 단계를 거쳤다. Monoclonal mouse MT antibody (DAKO, Code No. M0639) 를 primary antibody (anti-MT) 로 사용하여 반응을 시킨 후 secondary antibody와 상온에서 반응시켰다. 그 후 streptavidin peroxide와 AEC substrate-chromo- gen solution에 각각 반응시켰으며, 필요한 경우 헤마톡실린 (Mayer's hematoxylin) 으로 대조 염색하여 Optiphot-II (Nikon) 광학현미경으로 관찰하였다. 이러한 면역조직화학적 실험의 과정은 DAKO's LSAB (labelled streptavidin biotin) kit를 사용하였다.

3. 투과전자현미경용 표본 제작

미세구조 관찰을 위하여 투과전자현미경용 초박절편을 제작하였다. 고정된 시료를 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)에 10분간 3회 수세를 하였다. 적당한 크기로 세절한 후 2% OsO_4에 1시간 동안 후 고정하고 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 에 각각 10분간 3회 수세하였다. 에탄올 농도 상승 순으로 탈수를 하였고, 아세톤 농도 상승 순으로 투명화를 시켰다. Spurr:acetone 비율을 1:2, 1:1, 2:1, Spurr 순으로 치환을 한 후 Spurr에 포매하여 블록을 제작하였다. 60℃에서 3일간 열 중합반응을 시켜 블록을 굳힌 후 완전히 굳은 블록을 ultramicrotome을 이용하여 초박절편을 얻었다. 초박절편을 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색 하여 투과전자현미경 (JEM-100CX II) 으로 관찰하였다.

4. 주사전자현미경과 SEM-EDS 표본 제작

SEM-EDS (energy dispersive spectrometry) 표본을 만

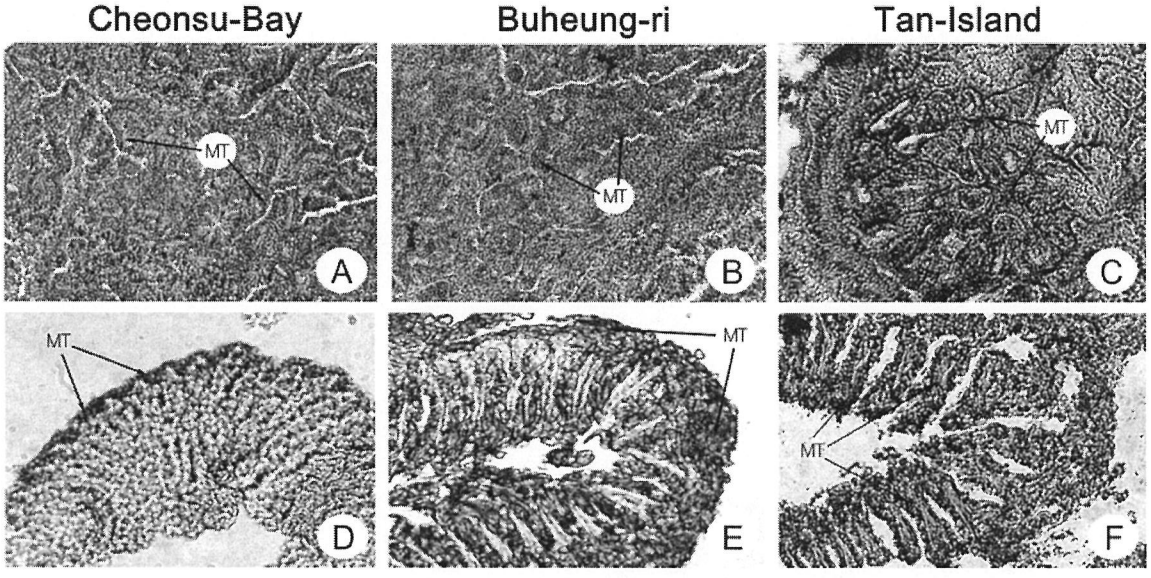

Fig. 1. Light micrographs of immuno-reactivity against monoclonal mouse MT antibody in *Ruditapes philippinarum*. **A-C**, Epithelial cells of the hepatopancreas. The interdiverticula, custer of hepatopancreas show strong reaction to the anti-metallothionein immunostain; **D-F**, Epithelial cells of the gill. The apical cytoplasm of the lamella cells shows strong reaction to the anti-metallothionien immunostain.

들기 위하여 일반적인 주사전자현미경용 표본 제작과정을 시행하였다. 고정된 시료를 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)에 10분간 3 회 수세한 후 적당한 크기로 세절하였다. 그 후 ethanol 농도 상승 순으로 탈수한 후 IAA (isoamyl acetate):ethanol 비율 1:2, 1:1, 2:1 100% IAA 의 순서로 치환작업을 거친 다음 critical point dryer에서 완전히 건조시켰다. 완전히 건조된 표본을 spy ion sputter를 이용하여 200 nm 두께로 gold coating 한 후 EDS (Kevex) 가 장착된 H-2500C (Hitachi) 으로 관찰하였다.

결 과

1. 면역조직화학적 실험 결과

바지락의 간췌장은 원주형 상피세포의 덩어리 (cluster) 로 구성되어진 diverticula의 연속구조로 이루어져 있었다. 우선 지역별로 채집한 바지락의 MT의 위치를 면역조직학적인 방법을 이용하여 확인한 결과, diverticula의 외연부에서 비교적 강한 anti-MT 반응을 보였다. 이러한 반응은 천수만, 부흥리, 탄도 등에서 채집한 모든 샘플에서 관찰 할 수 있었다. 천수만 및 부흥리 샘플의 경우에는 반응의 정도가 거의 유사하게 관찰되었으나, 탄도에서 채집한 샘플의 경우에는 diverticula내 cluster의 분리현상이 관찰되었다. 천수만에서 채집한 바지락을 이용한 Cd 노출실험에서도 지역별로 채집한 바지락을 이용한 실험과 마찬가지로 diverticular 외연부에서 비교적 강한 anti-MT 반응을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1A-C).

바지락의 아가미는 일반적인 부족류의 아가미와 마찬가지로 두 층의 라멜라 (lamella) 로 이루어진 demibranch의 연속적인 구조로 되어있었다. 우선 지역별로 채집한 바지락의 아가미에서 면역조직화학적 방법으로 MT의 분포를 확인한 결과 lamella의 외측 상피 및 내부에서 비교적 강한 anti-MT 반응을 확인할 수 있었다. 천수만 샘플의 경우 아가미를 이루는 lamella의 외측 상피의 유리면에서 주로 반응을 보였고, 부흥리 및 탄도의 샘플은 상피의 내부구조에서도 동일한 반응을 보였다. 관찰결과 반응의 정도는 천수만 샘플보다 부흥리 샘플이 부흥리 샘플보다 탄도의 샘플에서 더 강한 반응을 보였다. Cd 노출실험의 결과 역시 지역별 바지락 실험과 비슷한 양상을 보였다 (Fig. 1D-F).

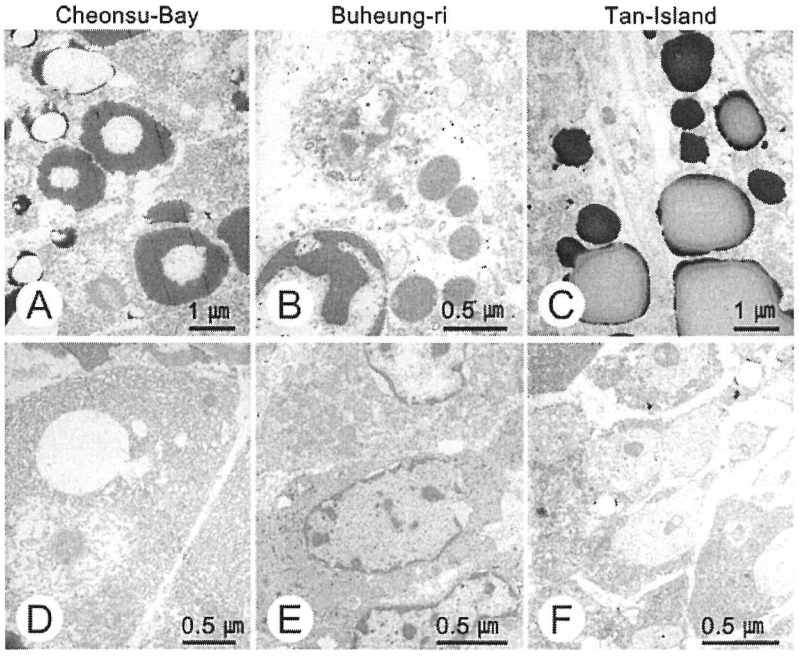

Fig. 2. Transmission electron Micrographs of the hepatopancreas of *Ruditapes philippinarum*. **A** and **D**, Cheonsu-bay sample. The cells show the swollen nuclear membranes, an inclusion body and a vacuole; **B** and **E**, Buheung-ri sample. The cells show the swollen nuclear membranes, an inclusion body and a vacuole; **C** and **F**, Tan-island sample. The cells show the swollen nuclear membranes, an inclusion body, a vacuole and granules in mature stage.

노출 시간별로 본 anti-MT 반응이 전반적으로 확산되는 현상을 관찰할 수 있었다.

2. Transmission Electron Microscopy

지역별로 채집한 바지락을 이용하여 간췌장과 아가미의 미세구조를 관찰 한 결과 지역의 오염정도에 따라 다르기는 하지만 세포질에서 중금속으로 추정되는 과립들을 다수 관찰할 수 있었고, 핵막이 swelling 되는 현상을 관찰할 수 있었다. 간췌장에서는 핵 내에서는 봉입체 (inclusion body) 를 관찰 할 수 있었으나 아가미에서는 관찰 할 수 없었다. 특히 탄도에서 채집한 시료의 경우 간췌장에서는 mature stage의 농축된 중금속을, 아가미에서는 early stage의 농축된 중금속을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 2, 3).

3. Scanning Electron Microscopy and SEM-EDS

지역별로 채집한 바지락의 간췌장과 아가미를 주사전자현미경으로 관찰한 결과 오염도에 따른 구조적 변화는 관찰할 수 없었다 (Fig. 4).

SEM-EDS를 이용하여 지역별로 채집한 바지락의 간췌장, 소화관, 그리고 아가미의 원소를 정량 하였으며, Cd에 노출된 시료의 간췌장과 아가미의 원소를 정량분석 하였다.

간췌장의 결과를 살펴보면, 탄도와 천수만 샘플에서는 Zn이 주로 많은 량을 차지하고 있었지만, 부흥리 샘플의 경우 Cu > Zn > Fe의 순서대로 검출되었으며, Cd는 검출되지 않았다 (Fig. 5A).

아가미 (gill) 의 결과를 살펴보면, 전반적으로 Zn이 가장 많이 나타나는 중금속으로 나타났다. 이러한 경향은 천수만과 탄도의 샘플에서 더욱 찾아볼 수 있었으며, 부흥리 샘플의 경우에는 Cu 및 Fe가 차지하는 비율이 더 컸다 (Fig. 5B, C).

모든 조직에서 S와 Zn의 수치가 비교적 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

연체동물은 중금속 농축의 조절에 대한 능력이 부족하기 때문에 Cd와 Cu에 매우 민감한 반응을 보인다. 조직 내에 존재하는 metal lignads는 전반적인 중금속의 증감을 조절하며, 각각의 종마다 중금속 축적을 하는 양상이 다르다고 알려져 있다. 중금속 해독에 관여하는 ligands는 중금속 축적을 방해하는 결정적인 역할을 수행한다고 보고한바 있다 (Bebianno *et al.,* 2003).

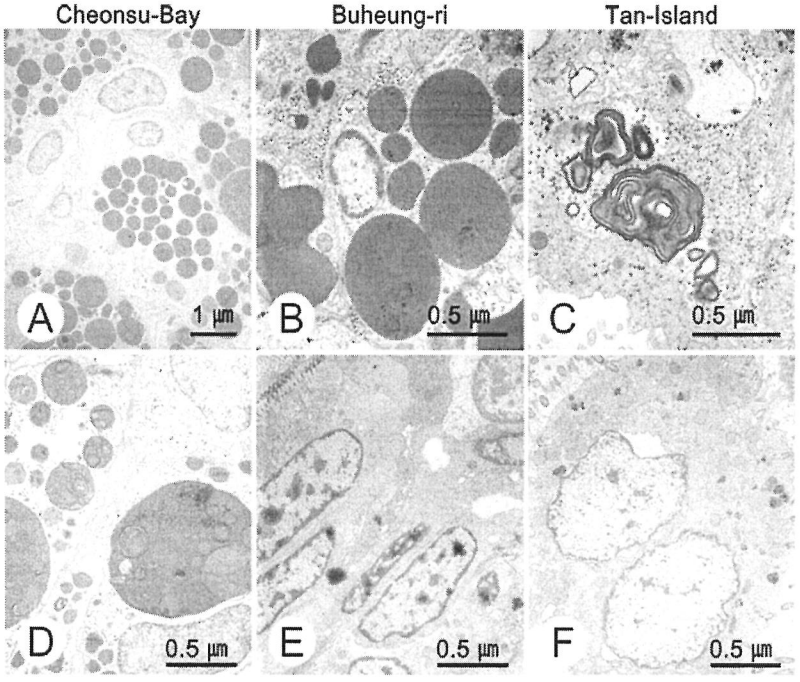

Fig. 3. Transmission electron micrographs of the gill of *Ruditapes philippinarum*. **A** and **D**, Cheonsu-bay sample. The cells show the swellen nuclear membranes and a vacuole; **B** and **E**,Buheung-ri sample. The cells show the swollen nuclear membranes and a vacuole; **C** and **F**, Tan-island sample. The cells show the swollen nuclear membranes, a vacuole and granules in early stage.

최근 연구에 의하면, MT가 척추동물뿐만 아니라 해양 무척추동물의 세포의 세포질과 핵에서 나타나며, 2가 양이온과 결합하는 강한 친화력을 갖는다는 것이 밝혀졌다.

MT는 여러 요인들에 의해 세포 내에서 합성이 유도되어지는데 금속이온들, 일부 호르몬, cytokine, 성장인자 (growth factor), tumor promoter, 기타 화학물질, 외부 스트레스 등에 의한 자극으로 인해 합성이 증가된다 (Jayasurya *et al.,* 2000; Kurasaki *et al.,* 2000; Nguyen *et al.,* 2000; Hidalogo and Carrasco, 1998; Richard, 1998). 이러한 인자들이 핵 내로 들어가거나 cAMP를 통한 간접적인 방법 등으로 MT 유전자의 promotor에 영향을 줌으로서 전사과정을 자극하게 되는데 특히 Cd의 경우에는 거의 모든 조직에서 이러한 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Diane and Richard, 1981). 이러한 현상은 부족류에서도 동일하게 나타난다 (Bebianno and Serafim, 1998). 그러한 이유로 MT는 최근 환경오염에 대한 생물학적 감시망 구축에 매우 좋은 표적물질로 여겨지고 있으며 (Viarengo *et al.,* 1999), 이를 면역조직화학적 연구를 통해 조직에 어떻게 분포하는가를 알아보는 연구들이 많이 수행되고 있다 (Lee *et al.*, 2002; Ioachim *et al.,* 2000; Tomita and Matsubara, 2000). 또한 면역세포화학적 방법을 통해 세포 수준에서도 그 분포를 알아보고자 하는 연구도 수행되어지고 있다 (Zhou and Kang, 2000).

특히 최근 발표에 따르면 이매패류에서는 금속이온 특히 Cd의 해독작용에 있어서 GSH와 MT가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다 (Zaroogian and Jackim, 2000; Tanimoto *et al.,* 1999). 이를 근거로 최근 세포 또는 조직 내에 전사를 조절하는 금속이온들의 위치 및 MT의 위치를 파악하기 위한 실험들이 면역조직화학적방법, 면역세포화학적 방법들을 통해 많이 시도되고 있는 바, 연체동물의 경우엔 주로 중금속을 축적하는 경향이 있는 기관인 신장, 소화선, 아가미 등이 대상 기관의 조직들이 표적이 되어 연구되고 있다 (Ahn *et al.,* 2001).

본 연구에서는 지역별 (천수만, 부흥리, 탄도) 로 채집한 바지락의 간췌장과 아가미를 적출하여 각 지역에 따른 바지락의 체내 중금속 축적 양상을 확인하고 미세구조를 관찰하였으며, SEM-EDS를 이용한 원소정량 등의 방법을 이용하여 MT의

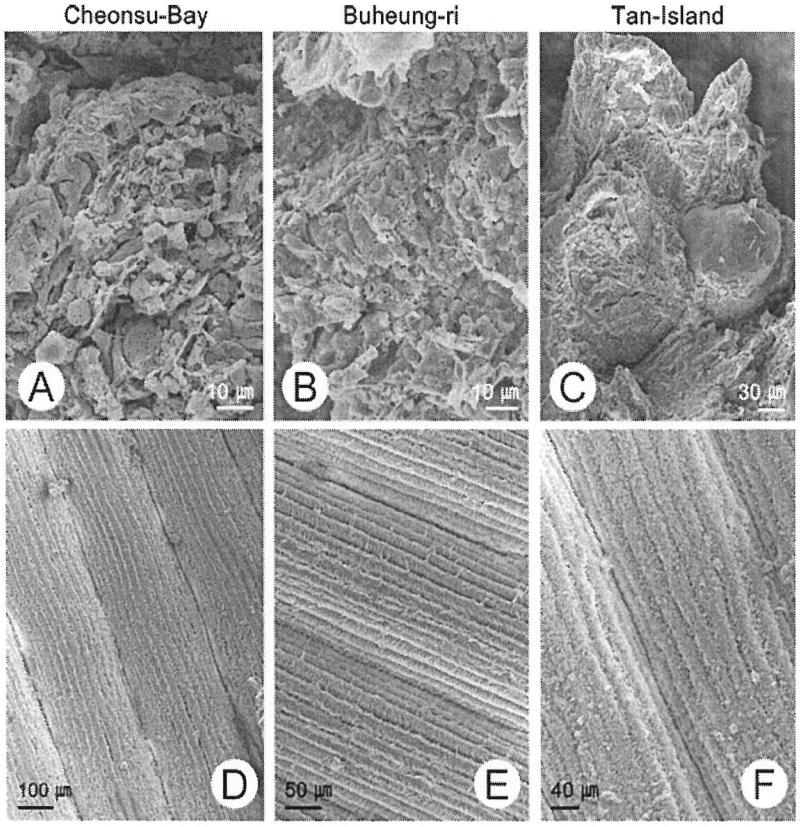

Fig. 4. Scanning electron micrographs of the hepatopancreas (A-C) and the gill (D-F) of *Ruditapes philippinarum*.

분포 양상을 확인하였다.

이 실험은 남극큰띠조개 (*Laternula elliptica*) (Lee *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003) 와 남극삿갓조개 (*Nacella concinna*) (Lee *et al.*, 2006) 를 이용한 조직화학적 및 미세구조적 연구를 통하여 체내에 유입되는 중금속의 농축 방식을 알아보고 이에 따른 MT의 분포양상을 면역조직화학적 방법을 이용하여 살펴본 연구와 밀접하게 연관이 되어진다.

바지락의 간췌장에서 면역조직화학적 연구결과를 살펴보면, MT의 분포가 diverticular 전반에 걸쳐 확산되는 현상을 관찰할 수 있었으며, 주사전자현미경으로 관찰한 결과에서는 그리 많은 변화를 관찰 할 수 없었다. 하지만 지역별로 채집한 바지락을 투과전자현미경을 이용한 미세구조 관찰 결과 지역의 오염도가 높아질수록 세포질 내에 중금속으로 추정되는 과립들을, 핵 내에서는 봉입체 (inclusion body) 를 관찰할 수 있었다. 핵막은 swelling되는 현상을 관찰 할 수 있었다. 이로서 미세구조 관찰에서는 지역별로 채집한 바지락을 이용한 실험이 지역의 오염 정도에 따라 변화기 있음을 확인할 수 있었고, 이는 같은 부족류인 남극큰띠조개를 이용한 실험 (Lee, 2002) 과 비슷한 양상을 확인할 수 있었다.

아가미에서의 면역조직화학적 연구결과를 보면, lamella의 외측 상피에서 비교적 강한 anti-MT반응을 확인할 수 있었으며, 오염도가 높아질수록 lamella 내부까지 MT의 분포가 확산됨을 확인할 수 있었다. 주사전자현미경으로 관찰한 결과는 간췌장과 비슷하게 큰 변화를 확인할 수 없었다. 투과전자현미경을 이용한 미세구조 관찰에서는 세포질과 핵 내에서 봉입체와 중금속으로 추정되는 다수의 과립들을 관찰할 수 있었다.

Lee *et al.* (2000, 2002) 에 의하면 위와 같은 결과들이 과잉의 중금속 노출에 대한 세포 내 반응으로 보이고, 유리 상태의 카드뮴 농도를 감소시켜 세포를 중금속으로부터 보호하기 위한 기작의 하나로 보았다..

SEM-EDS를 이용하여 중금속의 분포를 확인한 결과 천수만에서 채집한 시료의 경우에서는 간췌장, 아가미의 결과가 아주 평이한 것으로 보아 중금속 (Cd) 의 농도가 아주 낮은 지역으로 판명된다. 하지만, 부흥리의 경우를 보면, 중금속 (Cd) 의 농도가 어느 정도 있으면서 S (MT) 의 양이 비교적 높아 중금속에 대한 오염지역으로 판명되었다. 또한 lumen에 인접한 면과 소화관의 바깥쪽 조직층에서 Fe의 농도가 높게 나타나는데 이는 MT에 더 강한 친화력을 갖고 있는 Cd가 MT와 결합하는 과정에서 Fe 등의 다른 원소가 방출된 결과로 해석하였다 (Lee, 2002). 탄도의 경우 LSAB에 의한 면역반응실험에 따르면 중금속에 대한 면역반응이 다른 지역보다 높게 나타난 것으로 나타났으나, SEM-EDS를 이용한 중금속의 분포를 확인한 결과는 Cd의 양이 오히려 부흥리의 것에 비해 낮은 것으로 나타났다. Ahn et al. (2006) 은 Cd가 식물플랑크톤이 인산염을 흡수할 때 부수적으로 축적이 되며, 이를 먹이로 하는 바지락의 체내로 농축이 되어진다고 추정하였다. 따라서 영양상태가 좋을수록 식물플랑크톤 섭취가 많을 것이고, 결과적으로 Cd 농축도 이에 비례할 것으로 여겨진다고 설명하였다.

본 연구의 결과를 종합해보면 자연상태에서의 오염의 정도에 따라 비교적 빠르고, 상이한 세포반응을 보이는 바지락의 특징은 연안 생태계의 갯벌지역에서의 중금속 오염에 대한 환경 모니터링을 하기 위한 지표종으로서 충분히 가치가 있는 것으로 사료된다.

요 약

바지락의 중금속의 농축 방식 및 해독기작을 연구하기 위해 소화선, 소화관 및 아가미등 세 기관을 선택하여 면역조직화학적 방법, 미세구조적 연구 그리고 SEM-EDS를 사용한 MT와 중금속의 분포 양상을 지역별로 채집한 샘플과 Cd-Cu에 시간별로 노출시킨 샘플에서 각각 살펴보았다.

중금속에 의해 유도된 MT 단백질이 면역조직화학적인 방법에 의해 붉은 색으로 표지되었다. 노출시간이 길어질수록 간췌

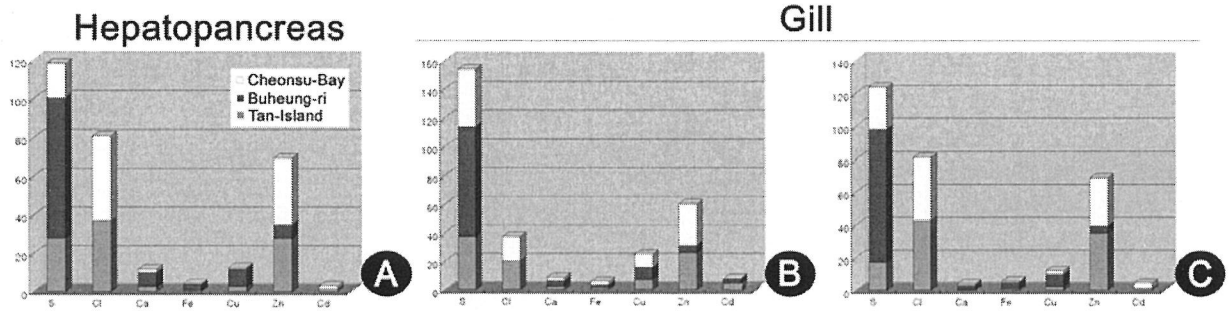

Fig. 5. Fluctuation of the element level of *Ruditapes philippinarum* by time courses. **A**, hepatopancreas; **B**, concaved surface between the demibranches of the gill; **C**, convex surface of the demibranch of the gill.

장에서는 diverticula의 외곽으로 강한 반응을 보였으며, 아가미에서는 중금속의 노출시간이 길어질수록 노출되지 않은 조직에 비해 전반적으로 더 넓은 지역에서 강하게 반응을 보였다.

간췌장과 아가미를 투과전자현미경으로 관찰한 결과 중금속(Cd) 에 더 오래 노출될수록 세포질에서 inclusion body와 중금속으로 추정되는 과립들을 다수 관찰할 수 있었으며, 핵막이 swelling 되는 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 발달된 조면소포체와 미토콘드리아가 관찰되었다.

SEM-EDS 결과 중금속의 분포 양상이 지역별로 상당히 상이한 결과를 나타났는데, 이는 지역별로 중금속의 오염정도와 오염원이 되는 중금속의 종류가 다르기 때문으로 추측된다. 그리고 지역별로 채집한 바지락을 이용한 실험과 S와 Zn의 수치가 높게 나타나는 것으로 보아 MT가 관여하고 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다.

ACKNOWLEDGEMENT

이 연구과제는 한국과학재단 특정기초연구사업 (R01-2002-000-00345-0) 및 2000년도 인제대학교 학술연구조성연구사업의 일환으로 수행되었습니다.

REFERENCES

Ahn, I.Y., Kang, J.K. and Kim, K.W. (2001) The effect of body size on metal accumulations in the bivalve *Laternula elliptica*. *Antarctic Science*, **13**: 355-362.

Ahn, I.-Y., Ji, J., Choi, H.J., Pyo, S.-H., Park, H. and Choi, J.-W. (2006) Spatial variations of heavy metal accumulation in Manila clam *Ruditapes philippinarum* from some selected intertidal flats of Korea. *Ocean and Polar Research*, **28**(3): 215-224.

Bebianno, M.J. and Serafim, M. A. (1998) Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Science of the Total Environment,* **214**: 123-131.

Bebianno, M.J. and Serafim, M.A. (2003) Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **44**: 53-66.

Choi, H.J., Ahn, I.-Y., Lee, Y.-S., Kim, K.-W. and Jeong, K.-H. (2003) Histological responses of the antarctic bivalve *Leternula elliptica* to a short-term sublethal-level Cd exposure. *Ocean and Polar Research,* **25**(2): 147-154.

Durnam, D.M. and Palmiter, R.D. (1981) Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *Journal of Biological Chemistry*, **256**: 5712-5716.

Hammer, J.S. (1986) Children and savings in less developed countries. *Journal of Development Economics*, **23**: 107-118.

Hidalgo, J. and Carrasco, J. (1998) Regulation of the synthesis of brain metallothioneins. *Neurotoxicology,* **19**: 661-666.

Hong, J.S. (1998) The Foreshore of Korea. 144 p. Daewonsa, Seoul. [in Korean]

Ioachim, E.E., Kitsiou, E., Carassavoglou, C., Stefanaki, S. and Agnantis, N.J. (2000) Immunohistochemical localization of metallothionein in endometrial lesions. *Journal of Pathology,* **191**: 269-273.

Jayasurya, A., Bay, B.H., Yap, W.M. and Tan, N.G. (2000) Correlation of metallothionein expression with apoptosis in nasopharyngeal carcinoma. *British Journal of Cancer,* **82**: 1198-1203.

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.

Jo, Y.H. (2002) Bioaccumulation of Heavy Metals in *Ruditapes philippinarum*. 42 p. Master's Thesis in Soonchunhyang University. [in Korean]

Kagi, J. H. R. (1993) Evolution, structure and chemical reactivity of class I metallothioneins: an overview. *In*: Metallothionein III: Biological Roles and Medical Implications. (ed. by Suzuki, K.T., Imura, N. and Kimura, M.) pp. 25-61. Birkhauser Verlog, Basel.

Kagi, J.H. and Kojima, Y. (1987) Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia, Supplement,* **52**: 25-61.

Kurasaki, M., Okabe, M., Saito, S., Yamanoshita, O., Hosokawa, T. and Saito, T. (2000) Histochemical characterization of silver-induced metallothionein in rat kidney. *Journal of Inorganic Biochemistry,* **78**: 275-281.

Lecoeur, S., Videmann, B. and Berny, P. (2004) Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environmental Research,* **94**: 184-191.

Lee, Y.S. (2002) Bioaccumulation of Heavy Metals in *Laternula elliptica*. 89 p. Dissertation in Soonchunhyang University. [in Korean]

Lee, Y.S., Ahn, I.Y., Kim, W.J. and Jeong, K.H. (2002) An immunohistochemical and ultrastructural study of the heavy metals accumulated in the kidney of an antarctic clam, *Laternula elliptica*. *The Korean Journal of Malacology*, **18**(1): 15-21. [in Korean]

Lee, Y.-S., Jo, Y.-H., Han, Y.-S., Kho, W.-G., Ahn, I.-Y., and Jeong, K.-H. (2006) Bioaccumulation of heavy metals in intestine of *Nacella concinna*. *The Korean Journal of Malacology,* **22**(1): 87-95. [in Korean]

Nguyen, A., Jing, Z., Mahoney, P.S., Davis, R., Sikka, S.C., Agrawal, K.C. and Abdel-Mageed, A.B. (2000) *In vivo* gene expression profile analysis of metallothionein in renal cell carcinoma. *Cancer Letters,* **160**: 133-140.

O'Connor, T.P., Cantillo, A.Y. and Lauenstein, G.G. (1994) Monitoring of Temporal trends in chemical

contamination by the NOAA National Status and Trends Mussel Watch Project. *In*: Biomonitoring of Costal Waters and Estuaries. (ed. by Kramer, K.J.M.) pp. 29-50. CRC Press, Boca Raton.

Richard, D.P. (1998) The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 8428-8430.

Simes, D.C., Bebianno, M.J. and Moura, J.J. (2003) Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Toxicology*, **63**: 307-318.

Tanimoto, A., Hamada, T., Higashi, K. and Sasaguri, Y. (1999) Distribution of cadmium and metallothionein in $CdCl_2$-exposed rat kidney: relationship with apoptosis and regeneration. *Pathology International*, **49**: 125-132.

Tomita, T. and Matsubara, O. (2000) Immunocytochemical localization of metallothionein in human pancreatic islets. *Pancreas*, **20**: 21-24.

Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A. and Fabbri, R. (1999) Metallothionein as a tool in biomonitoring programes. *Biomarkers*, **4**: 455-466.

Zaroogian, G. and Jackim, E. (2000) *In vivo* metallothionein and glutathione status in an acute response to cadmium in *Mercenaria mercenaria* brown cells. *Comparative Biochemistry and Physiology. C. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **127**: 251-261.

Zeng, J., Heuchel, R., Schaffner, W. and Kagi, J.H. (1991) Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. *FEBS Letters*, **279**: 310-312.

Zeng, J., Vallee, B.L. and Kagi, J.H. (1991) Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**: 9984-9988.

Zhou, Z. and Kang, Y.J. (2000) Immunocytochemical localization of metallothionein and its relation to doxorubicin toxicity in transgenic mouse heart. *American Journal of Pathology*, **156**: 1653-1662.

Min, D.K., Lee, J.S., Ko, D.B. and Je, J.G. (2004) Mollusks in Korea. 566 p. Hanguel Graphics. Busan.