J. ENVIRON. TOXICOL.
Vol. 18, No. 4, 295~303 (2003)

카드뮴에 대한 녹조류 *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae)의 세포활력도 및 peroxidase 활성도 변화

최은주, 이상구, 이승진, 문성경, 박용석, 이기태※

경희대학교 생물학과

Changes in Cellular Viability and Peroxidase Activities of Green Algae *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae) to Cadmium

Eun-Joo Choi, Sang-Goo Lee, Seung-Jin Lee, Sung-Kyung Moon, Yong-seok Park and Ki-tae Rhie※

Department of Biology, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Physiological cellular activities responses to cadmium (Cd) exposure in green algae with several reductases activities and viability of the cell were examined. The cell division of green algae, *Selenastrum capricornutum* treated with 5ppm was significantly decreased than that of normal algae. The mean cell number of normal algal culture was as twice much as than that of algae at 6 days after Cd treatment. The cellular viability of algae was analysed by flow-cytometry with fluorescent dye after esterase reaction on cell membrane. The 85.35% of cellular viability of normal culture was decreased to 34.35% when algae was treated with 5 ppm of Cd at 6 days after treatment. It was considered that those method of flow-cytometry is useful tool for toxicity test on micro-organisms in the respect of identifying cellular viability. Also, the activities of both glutathione peroxidase (GPX) and ascorbate peroxidase (APX), which are indirectly react against oxidative stress through reduction of glutathione by Cd were significantly increased with 25%. It is considered that both GPX and APX are involved in the metabolic pathway of Cd-detoxification with similar portion in *Selenastrum capricornutum*.

Key words : cadmium toxicity, green algae, cellular vitality, peroxidase activities

서 론

최근 산성비가 오염된 카드뮴의 유용성을 증가시킴으로써 카드뮴 오염문제는 점점 더 심각해지고 있다(Piscator, 1985). 카드뮴 독성을 나타내는 생화학적 기전은 아직까지 확실하게 밝혀지지 않았지만, 카드뮴은 체내 특히 신장이나 간장에 높은 축적률을 보이고 있으며 세포내에 산화적 손상을 야기한다. 카드뮴이 체내 대사과정의 효소활성을 억제하는 기전과 세포막 단백질 중 sulfhydryl (-SH) 기와 결합함으로써 나타나는 세포막투과 및 물질

※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-961-0603, E-mail: rhiekt@khu.ac.kr

이동 방해기전으로 설명되어지고 있다(Waalkes *et al.*, 1984; Jin *et al.*, 1986). 조류를 포함한 식물은 오랜 시간을 통해 중금속에 대처하는 기작을 진화시켜 왔다. 중금속에 의한 세포의 산화적 손상을 피하기 위해 Ascorbate와 glutathione과 같은 항산화제의 활동을 강화하거나 chelation, 중금속의 유입과 유출의 조절, 세포 내 특정지역에 중금속의 저장 등 무독화작용을 시도한다(Tomsett, 1988). 이러한 무독화기작에는 펩타이드 중 하나인 phytochelatin (PC)과 metallothionein (MT)이 식물체 내 중금속 해독작용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Howden, 1992). MTs는 구리, 카드뮴, 아연과 은에 결합할 수가 있으며 chelation에 의해 산화적 손상을 줄여 중금속 해독에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Hamer *et al.*, 1985; Michalska, 1993). PC는 식물계에 광범위하게 분포한다는 사실이 알려진 후 MT와 유사한 유전자와 단백질이 발견되었기 때문에 식물체내에서는 MT와 PC가 모두 존재한다는 것이 밝혀졌다(Rauser, 1999). PC는 중금속 존재 하에서 급속하게 합성이 증가된다. 조류와 효모에 있어서는 PC가 카드뮴, 구리, 납, 아연과 은에 의해 유도된다(Grill, 1986). 그리고 생리적, 생화학적, 유전학적 연구에 의해 glutathione이 PC 합성을 위한 전구체임이 밝혀졌다(Rauser, 1995; Zenk, 1996). PC는 식물세포내에서 카드뮴과 복합체를 이루어 존재한다. 이 복합체는 세포질에서 형성되어 액포에 저장된다. 이 복합체는 pH에 안정성이 있고, 큰 분자량을 가지며, 증가된 카드뮴 결합력을 가진다(Murasugi, 1983). 이때에는 액포막에 존재하는 ATP-binding cassette (ABC) membrane transport에 의해 액포내로 이송되는데 이 transporter는 카드뮴만을 이송시키지는 않으며 액포막에 존재하는 proton-ATPase에 의한 수소농도 구배에 의존하지 않는다(Ortiz, 1995). 식물에서도 거의 모든 카드뮴이 액포로 이송되는 기작이 밝혀졌다(Vogeli-Lange, 1990).

그러나 세포 내에서 일어나는 무독화기작으로 인하여 식물의 종에 따라 에너지대사의 분배 차이에 의한 세포의 형태변화와 활력도(viability)의 변화는 차이가 있다. 중금속독성에 관한 연구는 실제 자연에서 발생되는 생체와 세포의 활성도 변화에 대한 이해를 전제로 하여 확실한 기전을 알 수 있다. 본 연구에서는 녹조류의 일종인 *Selenastrum capricornutum*을 카드뮴에 노출시켰을 때 세포내에서의 반응 즉, 세포생존율의 감소를 포함한 활력도 변화에 대한 분석 방법으로서 Flow-cytometry를 사용하여 그 객관적 해석을 편리하게 하고, 무독화반응에 관여하는 효소들(APX, GST, GPX)의 활성도 변화를 부연함으로써 카드뮴이 녹조류의 세포활성에 대응하는 변화를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

Algal culture

실험재료인 *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae) (NIER-10005, Korea)는 담수에서 서식하는 녹조류의 일종으로 Bold (1949)에 의하여 조성된 Bristol solution을 50%로 희석하여 배양하였다. 삼각 플라스크(5 *l*)에 배양액 2 *l*를 채워 멸균기(AutoClave : KMC-1221, Vison Scientific Co., Korea, 1993)를 이용하여 121°C, 1.1 kg · cm^{-2}조건에서 30분간 멸균시키고, *S. capricornutum*의 초기 접종일 세포수가 2×10^5 cells · ml^{-1}가 되도록 무균대에서 접종하였다. 각 배지는 3개씩 반복구를 조성하여 세포접종 후 4일째에 각 배지에 0 ppm, 5 ppm의 농도로 카드뮴을 투여하였다. 배양조건은 온도 25°C, 광도 45 μM photon · m^{-2} · sec^{-1}로 유지시키며 80 rpm (revolution per minute)의 진탕기(Flask Shake : KMC-1205S, Vision Scientific Co., Korea, 1993)에서 8일간 진탕 배양하였다.

Flow-cytometry

세포의 활력도는 FACS Calibur Flow Cytometer system (Becton Dickinson, Inc.)를 이용하여 측정한 후, 'CellQuest' program version 3.3으로 분석하였다. 살아있는 세포의 활력도와 형광발색을 위하여 세포막의 활성도를 esterase를 이용한 Fluorescein diacetate 세포염색을 활용하였다. 배지내의 세포를 1×10^6 cells · ml^{-1}의 농도로 취하여 멸균한 새 배지로 약하게 세척하였다. Fluorescein diacetate (FDA, Sigma F-7378)는 5 mg/ml의 농도로 아세톤에 용해하여 −20°C에 보관하여 두었다가 사용할 때에는 1/200으로 희석하여 사용하며 얼음에 두어 FDA의 침전이 발생되지 않도록 하였다. 희석한 FDA stock

을 세포마다 1.5 μl씩 처리하여 0°C 이하에서 30분간 방치하였다. FDA만의 형광도를 비교하기 위해서 같은 농도의 세포를 100°C에서 10분간 끓인 것을 대조군으로 하였다. Membrane integrity 측정을 위하여 Propidium iodide (PI, Sigma P-4170)는 100 μg/ml의 농도로 tris buffer나 PBS (phosphate buffer)에 용해하여 4°C에 암보관하였다. PI stock을 세포마다 1.5 μl씩 처리하여 0°C 이하에서 30분간 방치하였다. FDA 염색과 마찬가지로 PI만의 형광도를 비교하기 위해서 같은 농도의 세포를 100°C에서 10분간 끓인 세포를 대조군으로 하였다.

Proteins

조류세포를 원심분리기 (Centrifuge : VS-4000, Vison Scientific Co., Korea, 1994)를 사용하여 모은 후 pellet을 SCE buffer (100 mM sodium citrate, 10 mM EDTA, pH 7)로 2회 이상 세척하였다. Pellet의 부피와 같은 부피만큼의 PK lysis buffer (50 mM Tris [Trizma, Sigma T-1378], 50 mM NaCl, 0.0001 % [v/v] Tween 20, 0.0001% [v/v] Triton X-100, pH 8)를 첨가했다. PK lysis buffer를 첨가하기 전 lysis buffer에 protease inhibitors인 pepstatin, leupeptin, aprotinin 그리고 phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)를 각각 stock solution (pepstatin A [Sigma P-5318] 1 mg · ml^{-1} methanol, leupeptin [Sigma L-8511] 1 mg · ml^{-1} dH_2O, aprotinin [Sigma A-1153] 1 mg · ml^{-1} dH_2O, PMSF [Sigma P-7626] 17.51 mg · ml^{-1} methanol)으로 보관하여 두었다가 1 μl/lysis buffer 1 ml의 농도로 바로 첨가하였다. Pellet과 lysis buffer가 잘 섞이도록 pipetting한 후 단백질의 변성을 방지하기 위하여 4 °C를 유지한 상태로 10초씩 3회 정도 sonication하였다. Lysate는 원심분리기 (Micro 17R, Hanil Science Industrial)로 28,500 × g으로 1 hr 동안 4°C에서 원심분리하였으며 상층액을 단백질로 사용하였다.

Glutathion S-transferase (GST; EC 2.5.1.18)

단백질을 100 μl (1 mg/ml 농도)준비하여 20% Triton X-100을 25 μl첨가한 후 30분간 4°C에서 방치하였다. GST-binding bead를 각각의 micro tube에 50 μl씩 나누어서 담고 차가운 PBS로 5~10회 정도 세척하였다. Incubation이 끝난 단백질을 bead가 들어있는 micro tube에 옮겨담고 pipetting 했다. Bead와 GST가 결합할 수 있도록 4°C에서 2시간 동안 회전방치하였다. Incubation 후 시료는 500 × g에서 10분간 4°C에서 원심분리하여 상층액을 제거하였다. Lysate는 차가운 PBS로 bead의 색깔이 반투명해질 때까지 세척하였다. Pippet을 이용하여 상층액을 제거한 후 PBS를 10 μl를 첨가하여 vortexing하고 95°C에서 3분간 끓여서 SDS-PAGE를 수행하였다.

Glutathione peroxidase (GPX; EC 1.11.1.9)

50 mM KPO_4 buffer, 1 mM Na_2-EDTA, 114 mM NaCl, 1 mM GSH, 0.2 mM NADPH, 0.25 mM H_2O_2, 1 unit (mM · min^{-1}) GSSG-reductase의 혼합액을 시료 수만큼 만들고 50 μg 단백질을 첨가한 후 340 nm에서 흡광도가 증가하는 것을 측정하였다.

Ascorbate peroxidase (APX; EC 1.11.1.11)

Native PAGE

Pellet 부피의 2배가 되도록 grinding buffer (100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 5 mM ascorbate, 1 mM EDTA)를 첨가하였다. Pellet과 grinding buffer가 잘 섞이도록 혼합한 후 액체질소를 이용하여 막자사발에서 갈아 lysates를 11,000 × g으로 10분동안 4°C를 유지하며 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이 상층액을 sample로 사용하였다. Native PAGE gel (5% stacking gel, 10% separating gel)을 이용하여 4°C에서 30분간 pre-running한 후 sample을 loading bufer (3 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% Glycerol, 0.005% Bromophenol Blue)와 섞어 gel에 loading하였다. 200 V, 40 mA 상태에서. 전기 영동 후 gel은 equilibration solution (50 mM sodium phosphate buffer, 2 mM ascorbate)을 이용하여 10분간 반응을 시키고 equilibration solution을 교체하여 3회 반복했다 (Mittler, 1993; Jin, 1995). Equilibration 후 pre-reaction solution (50 mM sodium phosphate buffer, 4 mM ascorbate, 2 mM H_2O_2 pH 7.0)에 20분간 반응시키고 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 1분간 세척하였다. Sample은 reaction solution (50 mM sodium phosphate buffer, 28 mM TEMED, 2.45 mM nitrobezene tetrazolium pH 7.8)으로 10~15분간 반응시키고 dH_2O로 세척하였다.

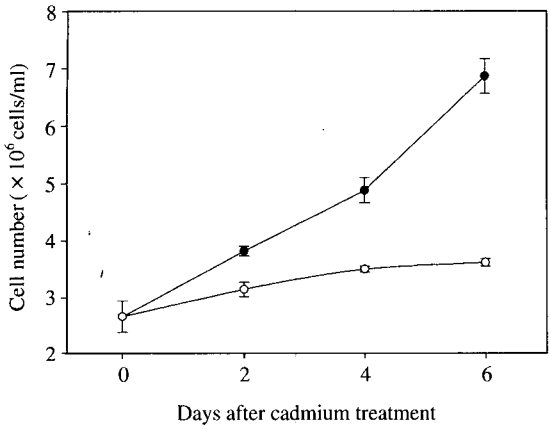

Fig. 1. Changes in cell numbers of *S. capricornutum* during 6 days after cadmium treatment with 5 ppm (○) or 0 ppm (●) (2 days : $t = 7.7$, $p < 0.005$; 4 days : $t = 10.7$, $p < 0.001$; 6 days : $t = 18.1$, $p < 0.001$).

Spectrophotometry

조류세포를 원심분리기 (Centrifuge : VS-4000, Vison Scientific Co., Korea, 1994)를 사용하여 모은 후 pellet을 TAE buffer (50 mM Tris-acetate buffer, 1 mM EDTA)로 세척했다. TAE buffer에 330 mM sorbitol과 50 μM ascorbate를 첨가하여 모은 세포에 적당량을 넣고 sonication 하였다. 30,000 g에서 30분간 4°C를 유지하며 원심분리한 후 상층액을 얻었다. TAE buffer에 3 mM H_2O_2와 2 mM의 ascorbate를 첨가한 후 상층액을 100 μl넣고 290 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

조류의 배지에 5 ppm의 카드뮴을 처리했을 때 카드뮴을 처리하지 않은 배지보다 조류의 세포 수는 현저히 낮아짐을 확인 할 수 있었다(Fig. 1). 이들 두 군간의 카드뮴 처리 후 각 일별 평균세포수 비교에서 t 검정 후 모두 고도로 유의한 차이를 보였는데 (2 days $t = 7.7$, $p < 0.005$; 4 days $t = 10.7$, $p < 0.001$; 6 days $t = 18.1$, $p < 0.001$), 5 ppm의 cadmium 처리 후 6일째 평균 세포 수가 3.59×10^6 cells · ml^{-1}로 cadmium을 처리하지 않은 배지의 세포 수인 6.78×10^6 cells · ml^{-1}에 비교하여 1.9배의 차이

Table 1. Specific Growth Rate (SGR) of algal cell treated with 5 ppm or 0 ppm of cadmium.

Cadmium (ppm)	DAT[1)] 0-2	DAT 2-4	DAT 4-6
0	0.1805±0.048	0.1225±0.012	0.1703±0.005
5	0.0833±0.052	0.0530±0.017	0.0157±0.015
p	ns[2)]	0.005	<0.001

[1)]DAT = Days after cadmium treatment.
[2)]ns = No significant differences after independent t-test at $\alpha = 0.05$.

를 보였다. 또한 새로운 배지에의 적응기간을 두기 위해 접종 후 4일째에 카드뮴을 처리한 바, 처리 후 2일째 되는 날부터 생존율이 감소하기 시작했다. 이와같은 결과는 세포분열에 의한 세포수로 계산한 조류세포의 상대성장율(Specific Growth Rate, SGR) 산정에서도 확인되어, independent t 검정에 의한 두 군의 평균 SGR은 카드뮴처리 후 2일까지의 변화에서만 유의한 차이를 나타내지 않았고 나머지 4일과 6일까지의 비교에서는 모두 고도로 유의한 차이를 확인할 수 있었다(Table 1). 즉, 카드뮴 처리 후 2일에 카드뮴의 처리일의 경과에 따라 카드뮴을 처리하지 않은 배지에서는 0.1805에서 0.1703으로 상대성장율이 유지되는데 반하여 카드뮴을 처리한 배지에서는 0.0833에서 0.0175로 카드뮴에 의한 세포분열 속도가 저해됨을 확인할 수 있었다.

Flow cytometry를 이용한 배지별 세포의 활력도 분석에서 조류세포에 대한 카드뮴의 영향을 확인할 수 있었다(Fig. 2). Propidium iodide (PI)는 non-permeant dye로 건강한 세포 내로는 흡수가 되지 않는다. 따라서 죽은 세포나 죽지는 않았지만 스트레스로 인해 세포막의 기능이 저하된 세포로는 침투하여 핵산사이에 삽입되어 red fluorescence을 나타내게 된다. 따라서 조류세포를 95°C에서 10분간 반응시킴으로써 모두 죽은 세포는 모두 PI 영역인 left area에 분포하게 되는데 점의 분포가 왼쪽으로 치우칠수록 PI의 형광도가 높은 것으로 카드뮴을 처리한 세포에서는 left area의 분포가 카드뮴을 처리하지 않은 세포보다 넓은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2. A). 한편 fluorescein diacetate (FDA)는 permeant dye로 세포내로 들어가게 되면 esterase에 의해 diacetate group이 cleave off 되면서 강한 green fluorescence을 나타내게 된다. 따라서 FDA

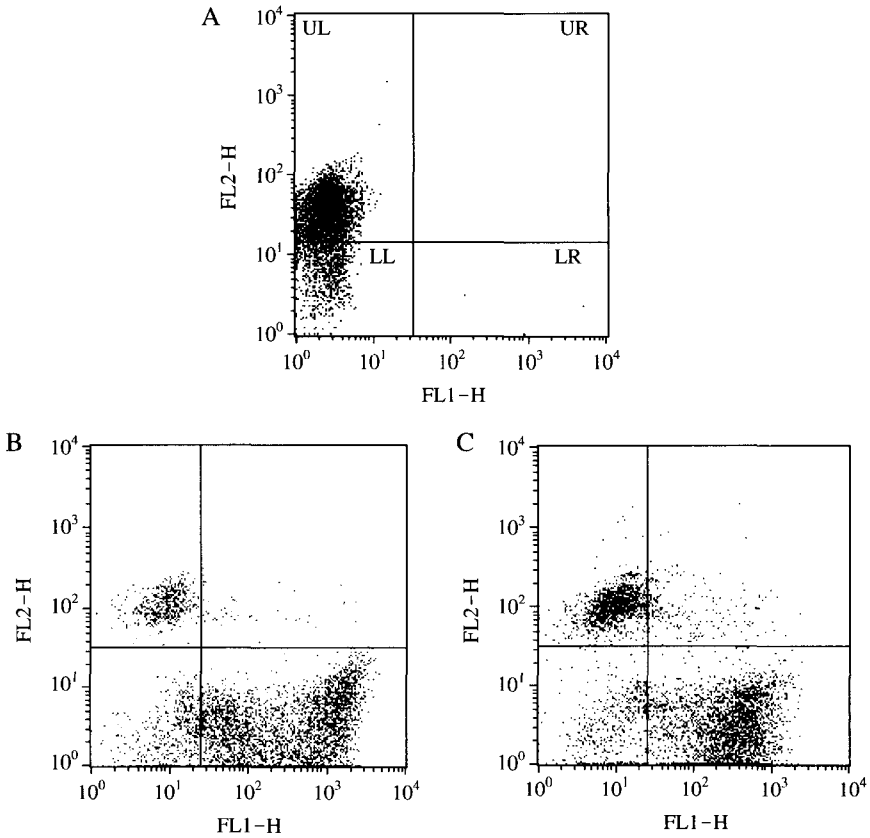

Fig. 2. Comparison of cellular viability by Flow Cytometry with perception of fluorscein emitted after enzymatic reaction with FDA (FL1-H) and PI (FL2-H) (see text for detail). A. regular algal cells boiled with 95°C water. B. regular algal cells-control. C. cadmium treated cells 4 days after treatment

는 살아있는 세포를 관찰할 때 사용할 수 있다. Right area는 FDA의 영역으로 오른쪽으로 치우칠수록 FDA의 형광도가 높은 것으로 95°C로 처리한 죽은 세포에서는 esterase activity를 볼 수 없어 *right area*에 점이 표시되지 않았다. 카드뮴을 처리하지 않은 배지의 세포는 PI의 형광도가 적은 반면 FDA의 형광도는 매우 컸으며 카드뮴을 처리한 배지의 조류 세포는 PI의 형광도가 카드뮴을 처리하지 않은 세포보다 증가하고 FDA의 형광도가 감소하였다. 또한, 카드뮴을 처리한 대부분의 세포가 left area 중에서도 아랫부분에 많은 것을 볼 수 있는데 이것은 esterase의 *activity*는 있지만 점점 PI의 형광을 띠게 되는 left area의 윗부분으로 migration하여, 세포가 완전히 죽지는 않았지만 카드뮴에 의한 스트레스로 인해 membrane integrity가 낮아졌음을 의미할 수 있다.

Esterase의 활성으로 세포에 대한 viability가 높다고 볼 수 있는 right area에 대한 각 조류의 상대적 분포에서 카드뮴을 처리하지 않은 배지에서는 85%의 빈도를 보였으나 카드뮴을 처리한 배지에서는 34%로 낮은 빈도를 보여 카드뮴에 의한 세포활성 저해를 확인 할 수 있었다(Table 2).

한편 이들 세포의 처리군 별 viability를 FDA에 반응한 esterase의 활성 정도에 대한 강도를 서로 비교한 결과 카드뮴을 처리하지 않은 건강한 조류 세포의 형광강도는 mature한 세포군과 정상적으로 분열하여 그 크기와 형광강도가 약한 어린 세포군으로 양분되어 정상적인 세포 성장과정에 따른 양분현상을 보인 반면 대부분은 카드뮴을 처리한 배지에서의 형광흡광은 중앙에 편중되어 카드뮴에

Table 2. Relative cell viability (%) by Flow Cytometry with FDA (right area) and PI (left area) in normal algal cell (control) and cadmium treated cells at 4 days after treatment. The cross border lines in center on the ordinate indicate for complementary effect from fluorscein perception by algal cells, which determines L (left area) and R (right area) (refer fig. 2)

Phase	Regular heat-treated cell	Regular non-treated cell	cadmium-treated cells 4 days after treatment
UL	82	10	26
UR	0	3	3
LL	18	2	35
LR	0	85	35

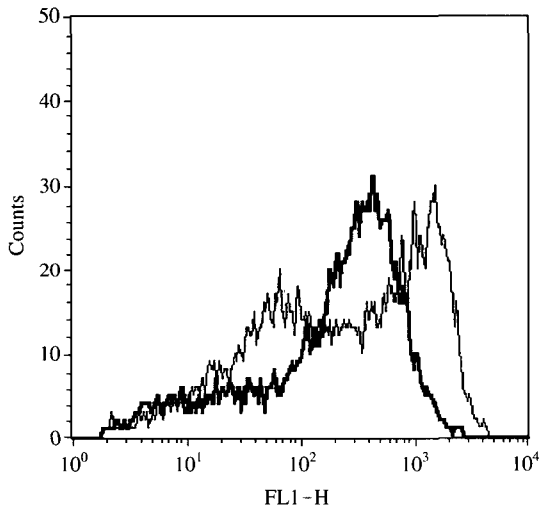

Fig. 3. Ogive overlay showing shift in esterase activity with FDA (FL1-H) of *Selenastrum capricornutum* cells [without cadmium (—); with 5 ppm cadmium (—)] after 4 days exposure.

의한 성장저해효과로 세포의 각 성장주기가 고정되어 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

세포의 생장조건에 필수적이지 않은 카드뮴과 같은 중금속이 세포내로 유입되려고 한다면 세포는 그 중금속의 유입을 막기 위해서 세포벽에 중금속을 흡착시키거나 plasma membrane에서 efflux를 한다. 하지만 이 반응으로는 중금속의 유입을 모두 막을 수는 없다. 카드뮴이 세포내로 들어오게 되면 여러 가지의 ligands에 의해 세포질에서 chela-

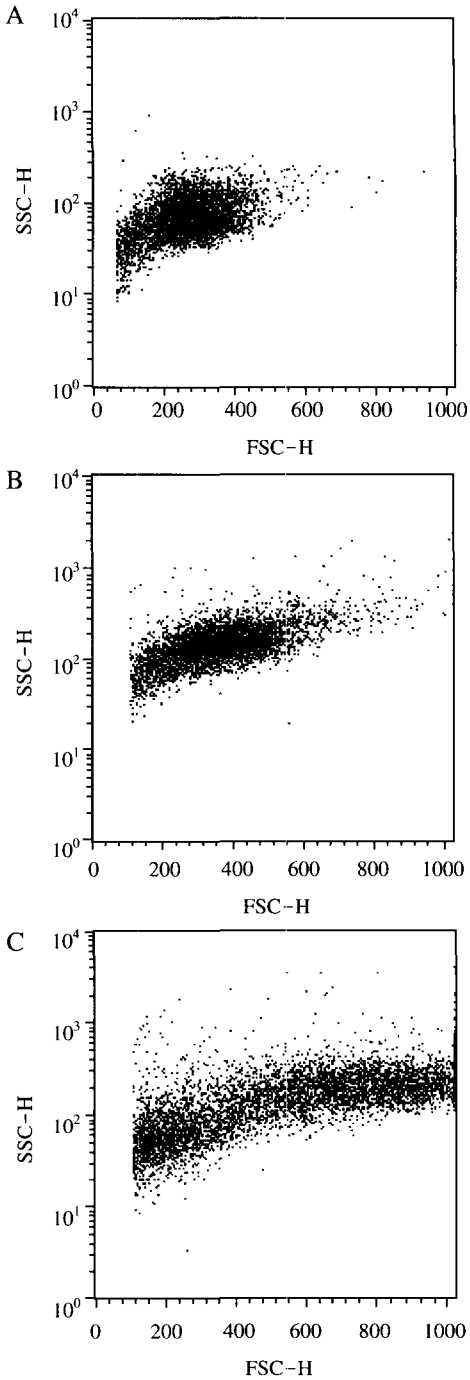

Fig. 4. Comparison of cellular size by Flow-cytometry with perception of size (FSC-H) and density (SSC-H). A. regular algal cells boiled with 95°C water. B. regular algal cells-control. C. algal cells 5ppm cadmium after 4 days exposure.

tion이 되고 phytochelatin과 cadmium의 복합체가 만들어져 액포에 저장이 된다(Marschner, 1995). 이러한 중금속의 무독화 과정에서 생기는 PC-Cd complex와 같은 chelation된 물질들은 세포내에 저장이 되므로 세포전체의 크기가 커지게 된다. Fig. 4에서 보는 것과 같이 95°C에서 10분간 반응시킨 세포(A)나 카드뮴을 처리하지 않은 세포(B)는 세포크기의 변화가 거의 없는 것을 볼 수 있는데, 카드뮴을 처리한 세포는 front scatter (FSC-H)가 약 2배정도 증가한 것을 볼 수 있다(Fig. 4. C). Confocal을 이용하여 세포사진을 촬영한 결과(data are not shown)에서도 카드뮴을 처리하지 않은 세포는 FDA의 형광이 강하고 원래의 세포모양을 간직하고 있는 반면, 카드뮴을 처리한 세포는 세포의 모양이 비정상적이며 PI의 형광이 관찰되었으며, 양쪽 세포 끝이 둥그런 모양으로 부풀어져졌는데, 중금속이 세포 안으로 유입됐을 때 중금속을 무독화하기 위해 chelation된 물질들을 액포 안으로 이동시켜 저장하고 있기 때문이라고 볼 수 있다.

GST는 glutathione에 중금속 등을 congugation 시켜주는 효소이다. GST의 molecular weight이 26 kDa이므로 size marker로도 확인되었다. GST는 친전자적 중심을 가지고 있으며 지방에 친화적인 생체이물과 내부에서 생산된 독성 물질들을 환원된 glutathione과 결합을 형성하게 하는 효소이다(Coles *et al.*, 1990; Mannervik *et al.*, 1985; Pickett *et al.*, 1989). GST는 환원된 형태의 glutathione (GSH)과 친전자적 물질 사이에 phase II conjugation을 형성하도록 촉매하며 이렇게 형성된 conjugate들은 분자량이 커져서 세포의 액포 또는 세포질로 이동하여 불활성이며 수용성이고 독성이 약한 물질을 생성한다. 또한 GST는 세포 내 돌연변이원의 독소와 발암물질, 다른 독성이 있는 물질을 제거한다(Mannervik *et al.*,1985; Pickett *et al.*, 1989). 이같이 카드뮴을 처리한 세포의 단백질에서 GST의 농도가 높은 것은 중금속에 의한 악영향을 감소시키기 위한 하나의 세포적 전략이라고 설명할 수 있다(Fig. 5).

GPX는 세포 내에서 H_2O_2와 GSH로부터 GSSG (oxidized form), alcohol (ROH) 및 물을 생성하는 반응을 촉매하는 효소(Pierce *et al.*, 1978; Chance *et al.*, 1979)로서 산화적 손상을 방지하고 활성산소의 독성을 해독하는 역할을 담당하는 효소이다(Chow *et al.*, 1972; Player *et al.*, 1979; Chance *et al.*, 1979; Wendel, 1980). 두 군 간의 GPX 활성도는 t 검정을 통하여 유의한 차이를 보여 ($t = 3.6$, $p = 0.022$), 카드뮴을 처리한 것에서 모두 높은 활성을 보인 것으로 나타났다(Fig. 6).

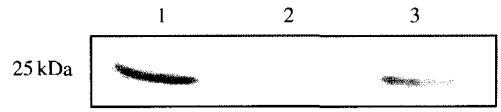

Fig. 5. Comparison of GST induction normal algal cell and cadmium treated cells at 4 days after treatment. SDS-PAGE results done by GST-binding bead pull down method [lane 1. marker (25 kDa, Restriction endonuclease *Bsp* 981 in *E. coli*), lane 2. non-treated cell, lane 3. 5 ppm cadmium-treated cell].

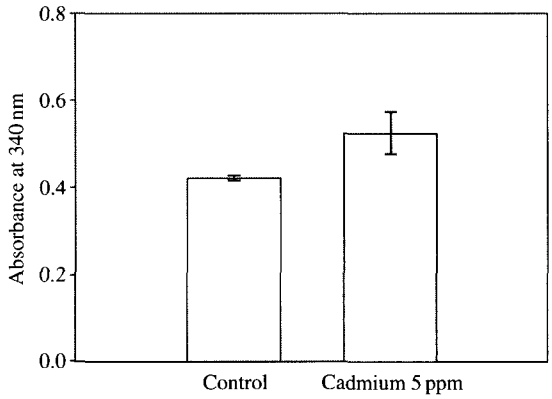

Fig. 6. Activity of GPX in normal algal cell (control) and cadmium treated cells at 4 days after treatment ($t = 3.6$, $p = 0.022$).

APX의 활성도 카드뮴을 처리한 세포에서 높게 측정되었다(independent t-test, $t = 104.8$, $p < 0.001$) (Fig. 7). APX는 native PAGE를 이용해서도 활성도를 보였는데, gel에 내린 결과도 카드뮴을 처리하지 않은 세포에서 보다 눈에 띄게 증가하였다(Fig. 7. A).

결 론

녹조류인 *Selenastrum capricornutum*에 카드뮴을 5 ppm 처리하였을 때 세포에서 일어나는 조류세포의 활력도(viability)와 환원효소의 활성도는 중금

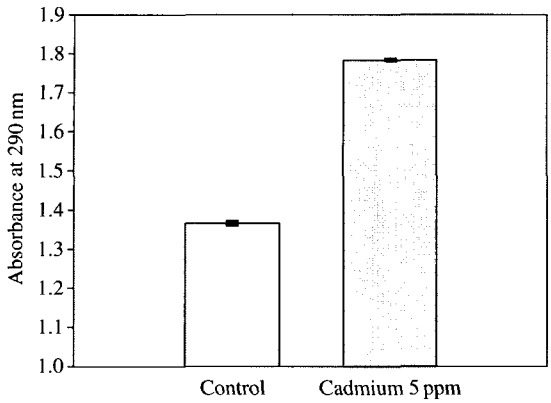

Fig. 7. Activity of APX in control and cadmium treated cells 4 days after treatment. The values are means ± SD of three independent experiments with three replicates ($t = 104.8$, $p < 0.001$).

속 무독화 기작을 이해할 수 있도록 변화하였다. 녹조류에 있어서 카드뮴에 대한 영향으로 나타나는 생장저해는 세포분열의 감소와 Flow-cytometry에 의한 세포의 활력도에 저해로 뚜렷이 나타났다.

또한 중금속에 의해 야기되는 oxidative stress를 해소하기 위한 peroxidation 관련 효소인 APX나 GPX activity가 증가함을 보였고, glutathione을 conjugation시키는 GST의 activity가 높아지므로써 GSH의 이용이 활발해짐을 알 수 있었다. APX의 활성이 높아짐에 따라 ascorbate가 합성을 조절하는 세포벽 구성물질 중에 하나인 chitin의 합성이 조절되지 못해 세포벽 합성이 계속되어 세포팽창과 같은 현상이 관찰되었다. 또 APX로 추정되는 단백질이 카드뮴에 의해 induction되는 것을 확인하였다.

참 고 문 헌

Berglund DL and Eversman S. Flow Cytometric measurements of pollutant stresses on algal cells, Cytometry 1988; 9: 150-155.

Breeuwer P, Drocourt JL, Bunschoten N, Zwietering MH, Romouts FM and Abee T. Characterisation of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product, Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61: 1614-1619.

Dorsey J, Yentsch C, Mayo S and McKenna C. Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae, Cytometry 1989; 10: 622-628.

Franklin NM, Adams MS and Stauber RP. Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassy with marine and freshwater microalgae using flow cytometry, Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2000; 40: 469-480.

Gala WR and Giesy JP. Flow cytometric techniques to assess toxicity to algae, In: Landis WG, van der Schalie WH (eds). Aquatic toxicology and risk assessment, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 1990; 13: 237-246.

Grill E, Loffler S, Winnacker EL and Zenk MH. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plant, are synthesised from glutathione by a specific γ-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986; 86: 6838-42

Hamer DH, Thiele DJ and Lemontt. Function and autoregulation of yeast copperthionein, Science 1985; 228: 685-690.

Howden R and Cobbett CS. Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*, Plant Physiol. 1992; 99: 100-107.

Humphreys MJ, Allman R and Lloyd D. Determination of the viability of *Trichomonas vaginalis* using flow cytometry, Cytometry 1994; 15: 343-348.

Jin CD. Effect of Benzyladenine on Development of Enzymes Related to Ascorbate-Glutathione Pathway in Senescing Wheat Leaves, J. Plant Biol. 1995; 38(1): 47-54.

Kaprelyants AS and Kell DB. Rapid toxicity assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry, JM Appl. Bacteriol. 1992; 72: 410-422.

Mannervik B. The isozymes of glutathione S-transferases, Adv. Enzymol. Relat. Ares. Mol. Biol. 1985; 57: 357-417.

Michalska AE and Choo KHA. Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; 90: 8088-8092.

Mittler R and Zilinskas BA. Detection of Ascorbate Peroxidase Activity in Native Gels by Inhibition of the Ascorbate-Dependent Reduction of Nitroblue Tetrazolium, Anal. Biochem. 1993; 212: 540-546.

Murasugi A, Wada C and Hayashi Y. Occurrence of acid-labile sulfide in cadmium-binding peptide 1 from fission yeast, J. Biochem. JP. 1983; 93: 661-664.

Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF and Ow DW. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC -type vacuolar membrane protein, J. Biol. Chem. 1995; 270: 4721-4728.

Pickett CB and Lu AY. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function, Ann. Rev. Biochem. 1989; 59: 61-86.

Piscator M. Dietary exposure to cadmium and health effects: Impact of environmental changes, Environ. Health. Perspect. 1985; 63: 127-131.

Rauser WE. Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis and function, Plant Physiol. 1995; 109: 1141-1149.

Rauser WE. Structure and function of metal chelators produced by plant; the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins, Cell Biochem. Biophys. 1999; 31: 19-48.

Surasak S, Samuel T, Desh PS, Richard V and Sayre T. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae, Plant Cell 2002; 14: 2837-2847.

Tomsett AB and Thurman DA. Molecular biology of metal tolerances of plants, Plant Cell Environ. 1988; 11: 383-394.

Vilem Z, Oliver S and Arminio B. Growth controled oscillation in activity of histone H1 kinase during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta), J. Phycol. 1997; 33: 673-681.

Vogeli-Lange R and Wagner GJ. Subcellular localisation of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves: implication of a transport function for cadmium -binding peptides, Plant Physiol. 1990; 92: 1086-1093.

Waalkes MP, Hjelle JJ and Klaassen CD. Transient induction of hepatic metallothionein following oral ethanol administration, Toxicol. Appl. Pharmacol. 1984; 74(2): 230-236.

Zenk MH. Heavy metal detoxification in higher plants: a review, Gene 1996; 179: 21-30.