

# 유세포 분석기를 이용한 바지락(*Ruditapes philippinarum*)의 면역력 측정

박경일<sup>1</sup> · 박흥식<sup>2</sup> · 김종만<sup>2</sup> · 박영제<sup>3</sup> · 홍재상<sup>4</sup> · 최광식<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 해양과학부, <sup>2</sup>한국해양연구원, <sup>3</sup>국립수산과학원 서해수산연구소, <sup>4</sup>인하대학교 해양학과

## Flow Cytometric Assessment of Immune Parameters of the Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*)

Kyung-Il PARK<sup>1</sup>, Heung-Sik PARK<sup>2</sup>, Jong-Man KIM<sup>2</sup>, Young-Je PARK<sup>3</sup>, Jae-Sang HONG<sup>4</sup> and Kwang-Sik CHOI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

<sup>2</sup>Korea Ocean Research and Development Institute (KORDI)

Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea

<sup>3</sup>National Fisheries Development and Research Institute (NFRDI), Incheon 400-420, Korea

<sup>4</sup>Department of Oceanography, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Immune parameters of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* collected from four tidal flats, Nudong, Gonam, Hwangdo and Bangpo on Anmyeon-do, Korea were optimized and evaluated at the single cell level using flow-cytometry. Hemocytes were withdrawn from the sinus of each clam, and total hemocyte counts (THC), phagocytosis rate, hemocyte mortality (HM) and DNA damage of hemocyte were analyzed. The highest hemocyte counts was recorded from the clams collected from Gonam, followed by Hwangdo, Nudong and Bangpo (P<0.001). Phagocytosis rate and hemocyte mortality of Gonam and Nudong clams were significantly higher than those of clams from Hwangdo and Bangpo (P<0.001). DNA damage in the clams from Nudong was higher twice than that of clams from Gonam (P<0.05). We suggest that the flow-cytometry has a high potential for evaluation of immunity of marine bivalves.

Key words: *Ruditapes philippinarum*, Flow cytometry, Immune parameter, Phagocytosis, Hemocyte, DNA damage

### 서 론

생물체는 외부로부터 전달되는 스트레스에 대하여 이를 극복하고 생리적 안정상태(homeostasis)를 유지하기 위한 다양한 생물·생리학적 변화를 나타낸다(Lacoste et al., 2002). 최근 들어 이 같은 외부 스트레스에 대한 생물의 반응을 측정하기 위한 다양한 기술이 개발되었으며, 그 결과는 해양환경과 생물의 건강 정도를 측정하는 지표로 이용되고 있다(Peakall, 1992; Gagne et al., 2006). 특히 고착생활을 하며, 연안에 분포하는 해산 이매패류는 그 수산업적 가치 이외에도 장·단기적인 환경변화 연구에 있어 지표 생물로 널리 이용되고 있다(Viarengo and Canesi, 1991; Cima et al., 1999). 해산 이매패의 경우 건강도를 측정하기 위하여 가장 보편적으로 이용되는 건강도 지수(Condition Index, CI)는 패각의 부피 또는 무게에 대한 육질의 무게 비율로 표현되고 있으며(Mann and Glomb, 1978), 이 밖에도 체조직의 생화학적 구성(Marin et al., 2003), 질병 감염도(Ellis et al., 1998), 각종 유해물질의 체내 축적 정도(Roméo et al., 2005) 등 역시 해양환경의 장·단기적 변화를 측정하는데 널리 이용되고 있다.

최근 들어 고착성 패류를 이용한 해양환경 감시에서는 분자

수준(molecular level)의 DNA 손상도(Mitchelmore and Chipman, 1998), 세포수준(cellular level)의 혈구 손상 및 식세포 활동 정도 등 (Allam et al., 2002)을 해양환경 변화를 조기에 진단하는 바이오마커로 이용하고 있으며, 그 효율성이나 중요성이 점차 높게 인식되고 있다(Lau and Wong, 2003; Giamberini and Cajaraville, 2005). 특히 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용한 방법은 신속하고 정확하게 세포 각각의 형태나 기능을 정량적으로 분석할 수 있기 때문에 해산 이매패의 세포성 면역 기작을 측정하는데 매우 유용할 것으로 기대되고 있다(Goedken and Guise, 2004). 현재까지 이 기법을 이용함으로써 해산 이매패의 식세포작용(Fournier et al., 2001), 혈구수의 변화(Soudant et al., 2004), 활성 산소(Lambert et al., 2003), 혈구 사망율(Hégaret and Wikfors, 2005) 등의 면역 기작이 측정된 바 있다.

바지락(*Ruditapes philippinarum*)은 황해를 중심으로 베트남과 필리핀 북부 연안부터 사할린까지 분포하며, 연안의 조하대와 조간대에 널리 서식 한다(Ponurovsky and Yakovlev, 1992). 이 종은 특히 연안환경에 잘 적응하여 성장하기 때문에 굴과 더불어 그 산업적 가치가 매우 높은 이매패류로서 FAO 통계에 의하면 전 세계 바지락 생산량은 2002년 기준으로 연간 240 만 톤에 달하고 있고, 중국과 우리나라 일본

\*Corresponding author: email:skchoi@cheju.ac.kr

등은 주요 바지락 생산국이다. 천해양식에 의한 우리나라의 바지락 생산량은 1990년 6만 톤을 정점으로 1993년 1만 여 톤으로 급감한 이래 현재까지 매년 2만여 톤을 생산하는데 그치고 있는 실정이다. 이 같은 바지락 생산량 감소의 직접적인 원인에 대하여는 서식지 환경요인의 변화, 세균 또는 기생충 감염 등으로 인한 바지락 대량 폐사가 제시되고 있으나, 폐사 원인규명에 관한 다수의 연구가 수행되었음에도 불구하고, 그 정확한 원인은 아직 밝혀지지 않고 있다(Park et al., 1999).

안면도 일대 조간대의 잘 발달된 갯벌은 바지락 치패의 주요 생산지로 잘 알려진 지역이며, 2004년부터 해양수산부의 바다목장화 사업지역으로 선정된바 있다. 본 연구는 안면도 일대 주요 바지락 생산지인 고남, 누동, 황도, 방포 지역에서 채집된 바지락 혈구세포의 형태학적 특징에 따른 집단구조와 식세포율, 혈구 사망률, 혈구 수, 그리고 혈구의 DNA 손상도 등을 측정하기 위한 방법을 최적화 하였으며, 이를 바탕으로 지역간 바지락의 면역력을 비교하였다. 이와 같은 시도는 향후 바지락의 세포성 면역력 측정을 통한 건강도 판정에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 시료채집

본 연구에 이용된 바지락은 2004년 10월 충청남도 태안군 안면읍의 방포리와 황도리, 고남면의 고남리와 누동리 등 총 4개 지역에서 30개체씩 채집되었다(Fig. 1). 실험실로 당일 옮겨진 바지락은 실온의 해수에서 24시간 동안 적응시킨 다음 분석에 이용하였다.

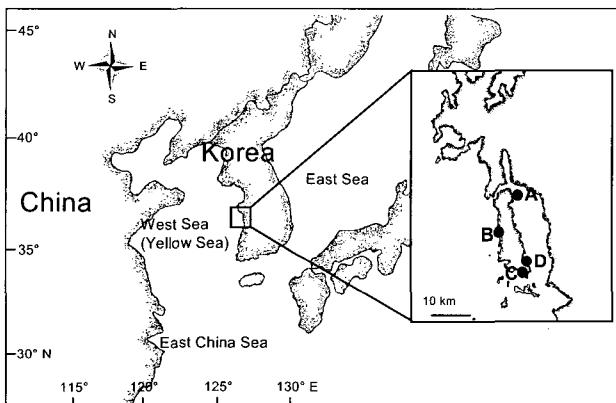


Fig. 1. Locations on Anmyeon-do in the west coast (Yellow Sea) of Korea. A, Hwange-do; B, Bangpo; C, Gonam; D, Nudong.

### 바지락 과립세포의 미세구조

바지락 혈구세포의 미세구조를 관찰하기 위하여 심장에서부터 혈림프액을 추출한 후 2% EM grade glutaraldehyde에 전고정하였으며, 2% OsO<sub>4</sub>에 후고정하였다. 시료를 에탄올을

이용하여 탈수한 후 100% isoamyl acetate로 치환하였다. 이후 혈구를 동결건조하였으며, Pt-Pd를 이용하여 2분 동안 코팅하고 장방출주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope, JSM-6700F)을 이용하여 4.0 kV에서 혈구세포의 미세 구조를 촬영하였다.

### 바지락 혈구의 집단 구조 특성

바지락 혈림프액 100  $\mu$ L을 심장에서부터 채혈하여 동일량의 6% 중성 포르말린과 희석하여 상온에서 30분간 고정시킨다. 이를 유세포 분석기의 FS (forward scatter)와 SSC (side scatter)를 이용하여 30초간 density plot을 측정하였다. Data 분석은 WinMDI v2.8을 이용하여 측정하였다.

### 총 혈구 수(total hemocyte count)와 혈구사망률(Hemocyte mortality, %)

총 혈구 수와 혈구 사망률은 Hégarret et al. (2003a)과 Hégarret et al. (2003b)의 방법에 따라 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다 (Fig. 2). 이를 위해 바지락 혈림프액 100  $\mu$ L과 200  $\mu$ L의 anti-aggregant solution (Auffret and Oubella, 1995)을 섞은 후 100  $\mu$ L의 여과 해수를 첨가하였다. 여기에 4  $\mu$ L의 SYBR green (5,000x)와 propidium iodide (1 mg/mL) 4  $\mu$ L를 첨가한 후 FL-1/SSC, FL-1/FL-3 dot plot과 histogram을 이용하여 optical signal을 60초간 분석 하였다. 바지락 총 혈구 수와 혈구의 사망률은 WinMDI v2.8을 이용하여 측정하였다. 그림 2A의 R1은 바지락 혈구와 형태적으로 유사한 집단을 나타내며 이들 중 핵을 갖고 있는 혈구만 선택되었다(Fig. 2B). 혈구의 사망률은 혈구 중 PI에 과다하게 염색된 집단(Fig. 2C, M1)을 선택하여 전체 혈구 중 차지하는 비율로써 나타내었다. 혈림프액 1 mL당 총 혈구 수(Y)를 계산한 식은 아래와 같다.

$$Y = X / 85 \times 4 \times 1,000$$

여기서 X는 유세포 분석기를 이용하여 측정된 혈구 수이며, 85( $\mu$ L)는 1분당 유세포 분석기의 유속, 4는 희석배수, 1,000은  $\mu$ L를 mL로 환산하기 위한 상수이다.

### 혈구의 식세포율(phagocytosis rate, %)

바지락 혈림프액 150  $\mu$ L에 30  $\mu$ L의 희석된 형광 bead (Fluoresbrite plain YG 2.0 microspheres, diameter 2.0  $\mu$ m, Polyscience)를 첨가하고, 18°C에서 120분간 식세포 작용을 유도하였으며, 최종적으로 유세포 분석기를 이용하여 식세포율을 측정하였다(Fig. 3). 식세포 작용은 FS Log/SS Log dot plot에서 phagocytic cell population을 선택하고(R1) FL1 Log/Events histogram에서 bead를 하나 이상 식작용한 혈구를 선택하였다(M1). 식세포율은 전체 혈구중 bead를 식작용한 혈구의 비로 나타내었다.

### 혈구의 DNA 손상도

바지락 혈림프액 200  $\mu$ L를 냉각된 99.9% ethanol 1,000  $\mu$ L과 섞은 후 -20°C에서 20분간 permeabilization 시켰으며 원심분리하여 1,000  $\mu$ L의 PBS로 교환하고 5  $\mu$ L의 RNase (10 mg/

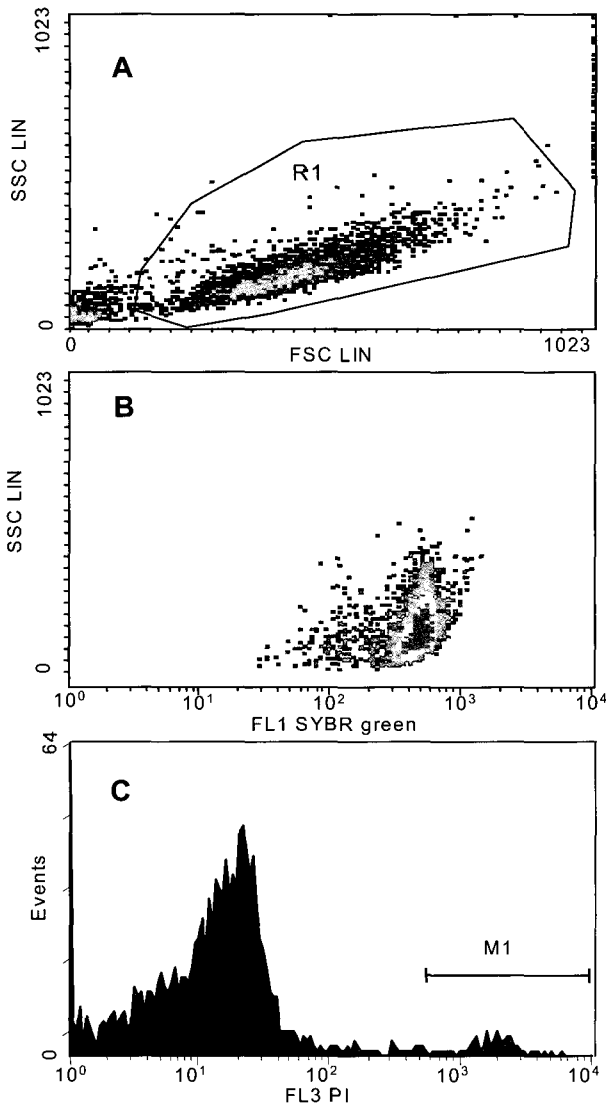


Fig. 2. Flow cytometric measurements of hemocyte counts and hemocyte mortality of the Manila clam. A, FSC/SSC density plot in which hemocytes were distinguished from unknown particles by gating R1; B, hemocytes were confirmed by staining with SYBR green which can stain nucleus specifically; C, hemocytes stained with propidium iodide, in which over stained cells were regarded as dead cells (M1).

mL)와 25  $\mu$ L의 propidium iodide (2 mg/mL)를 첨가하였다. 30분간 반응 후, DNA 손상도는 유세포 분석기의 SS Lin/FS Lin (A) dot plot에서 혈구만을 선택하고 FL-3/Aux (FL-3 peak) dot plot (B)에서 singlet 혈구만을 선택(R2)한 다음 최종 FL-3/counts histogram (C)을 이용하여 손상 혈구(M1)를 정량하고 정상 혈구와의 비로 나타내었다(Fig. 4).

통계분석

조사 항목에 대한 지역간 차이를 조사하기 위하여 One way ANOVA test 후, 95% 신뢰수준에서 Duncan의 사후분석을 실시하였다. 또한 각 항목간 상관관계는 Pearson's correlation

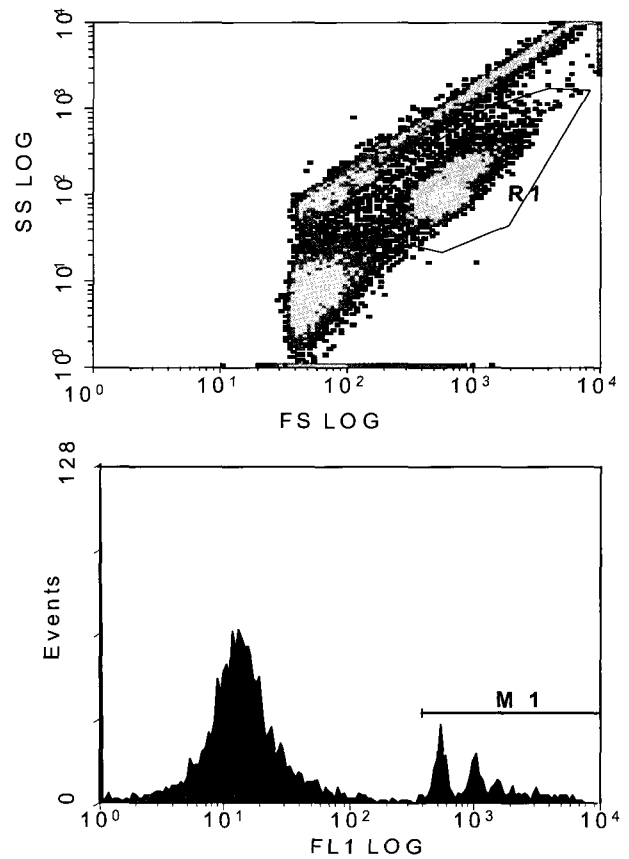


Fig. 3. Phagocytosis of fluorescent beads by hemocytes of the Manila clam measured by flow cytometer. Phagocytic ability was defined as the percentage of cells with one or more ingested fluorescent beads (M1) within the phagocytic cell population (R1).

coefficient를 분석하여 확인하였으며, 이때 P<0.1인 경우 유의성 있는 관계로 간주하였다.

결 과

바지락의 평균 각장은 각각 35.38 mm  $\pm$  3.17 (누동), 35.26 mm  $\pm$  2.49 (고남), 36.34 mm  $\pm$  2.35 (황도), 37.91 mm  $\pm$  2.96 (방포)였으며, 습중량은 2.167 g  $\pm$  0.707 (누동), 2.386 g  $\pm$  0.621 (고남), 2.337 g  $\pm$  0.489 (황도), 2.918 g  $\pm$  0.926 (방포) 으로서 지역간 유사한 크기의 시료가 분석에 이용되었다(Table 1).

주사방출현미경을 이용하여 바지락의 혈구과립세포를 촬영한 결과 과립세포는 직경이 약 5  $\mu$ m 정도였으며 세포질과 위족(pseudopodia)이 관찰되었다(Fig. 5). 바지락 혈구의 집단 특성은 혈구세포 각각의 크기(size)와 밀도(granularity 또는 complexity)에 따라 과립구(R1), 무과립구(R2), 소형 무과립구 (small agranulocyte, R3)로 구분되었다(Fig. 6).

유세포 분석기를 이용하여 측정된 각 지역별 면역력의 차이를 보면(Fig. 7), 바지락 혈구의 평균 사망률은 누동 바지락이 17.32%를 나타냈으며, 고남 바지락은 13.87%를 나타냈다. 이

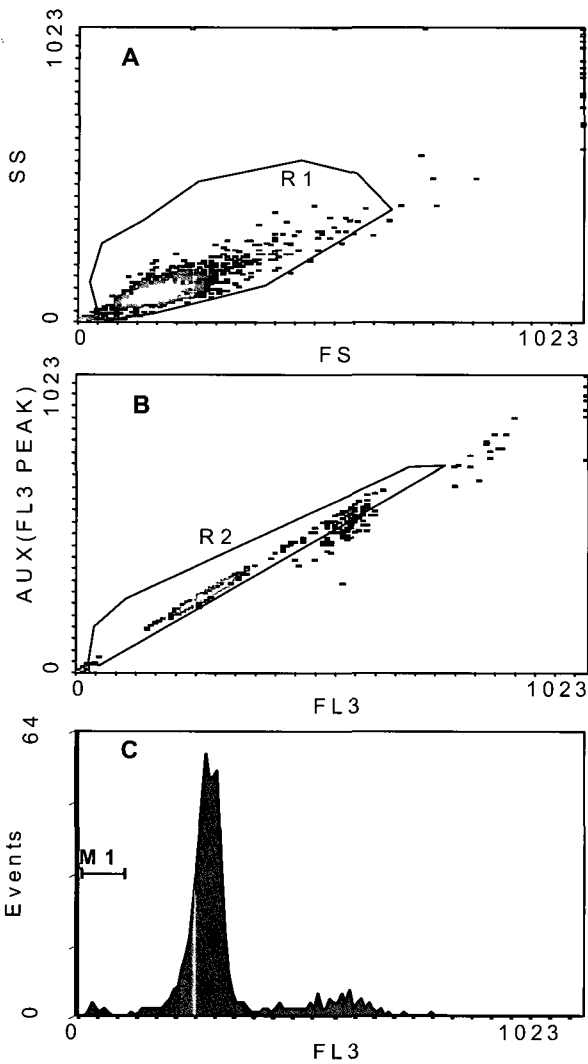


Fig. 4. Measurements of DNA damage by flow cytometry. The cell cycle distribution and quantification of DNA fragmentation (M1) were determined by the fluorescence of individual cells; 10,000 events per sample were analyzed, and the percentage of cells in individual cell cycle phases was determined in SS Log/FS Log and FL-3/Aux (FL-3 peak) dot plots, and FL-3/counts histogram.

Table 1. Shell length and tissue wet weight of the Manila clam collected from Gonam, Nudong, Hwangdo and Bangpo on Anmyeon-do, Korea. SD, standard deviation

Location	N	Shell length (mm) ± SD	Tissue wet weight (g) ± SD
Nudong	30	35.38±3.17	2.137±0.707
Gonam	30	35.26±2.49	2.386±0.621
Hwangdo	30	36.34±2.35	2.337±0.489
Bangpo	30	37.91±2.96	2.918±0.926

는 5.62%와 5.51%의 혈구 사망율을 보인 황도와 방포 바지락에 비해 약 3배 이상의 차이를 나타낸 것이다 (P<0.001). 바지락 혈구의 평균 식세포율도 고남과 누동의 바지락이 각각 33.18%와 36.53%를 나타냈으나 황도와 방포 바지락의 경우

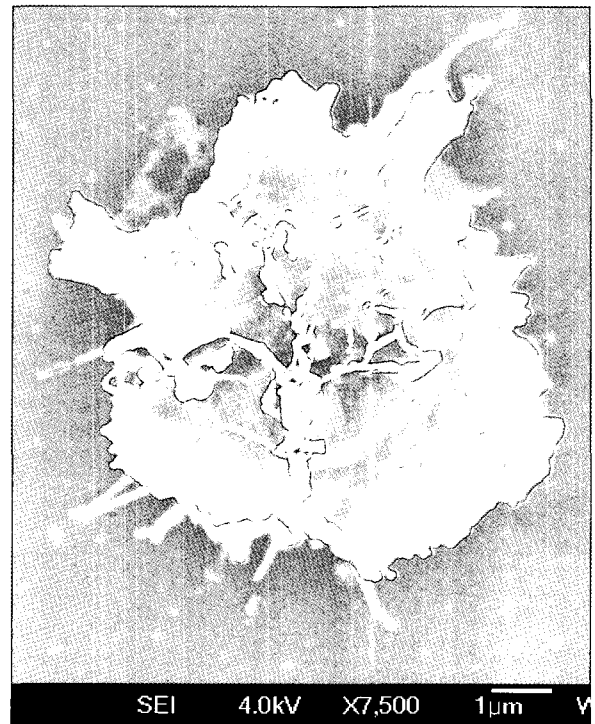


Fig. 5. SEM image of a granulocyte of the Manila clam. C, cytoplasm; arrows, pseudopodia.

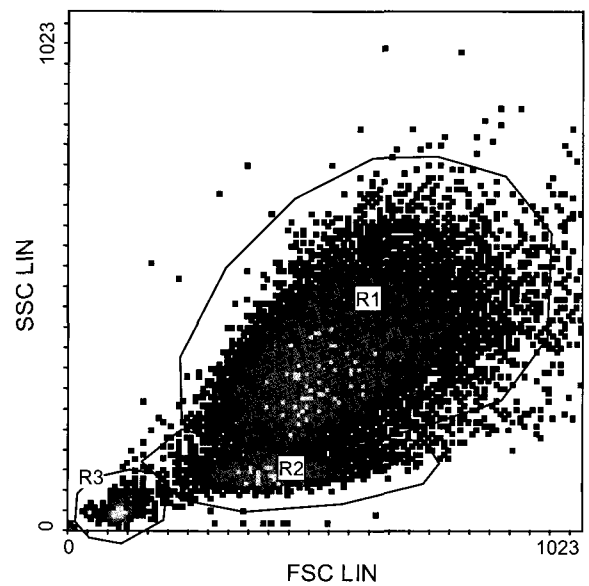


Fig. 6. Typical flow cytometer density plot of the Manila clam hemocytes, Forward scatter (Linear scale) vs. side scatter (Linear scale). Three distinct population of hemocytes are apparent. R1, granulocytes, R2, hyalinocytes and R3, small agranular cells.

16.98%와 19.37%를 나타냈다(P<0.001). 그러나 평균 총 혈구 수는 고남 바지락이 약 120 만개/mL로 가장 높게 조사 되었고, 뒤이어 황도 바지락(70 만/mL), 누동 바지락(55 만/mL), 방포

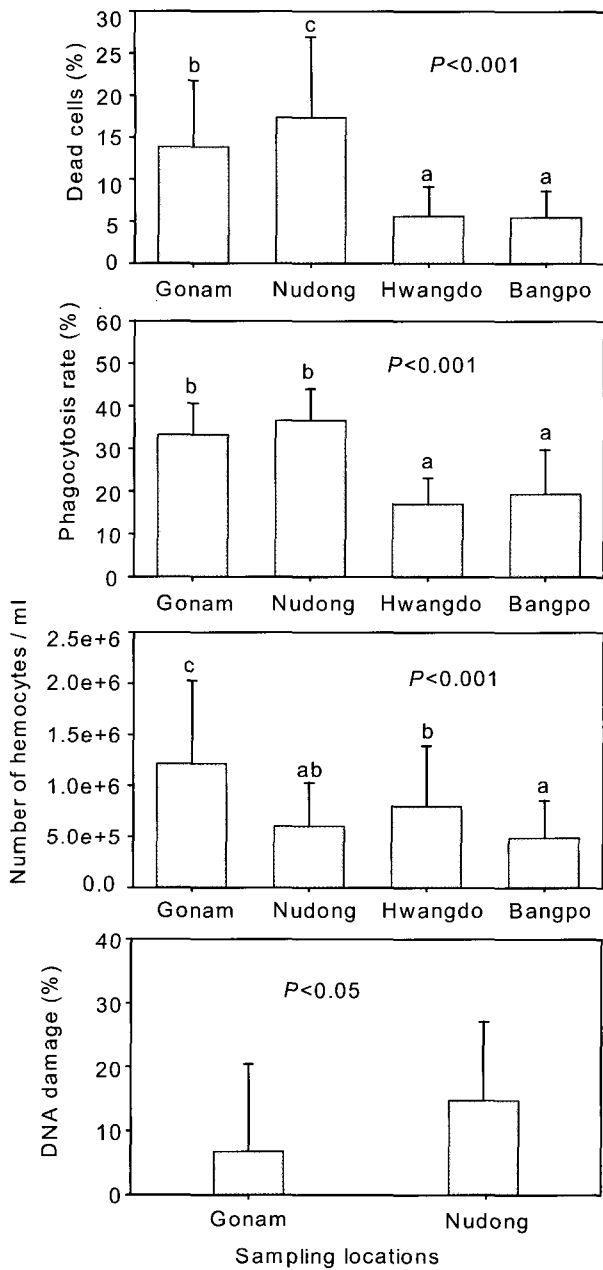


Fig. 7. Comparison of immune parameters of the Manila clam collected from Gonam, Nudong, Hwangdo and Bangpo, Anmyeon-do, Korea.

바지락(50 만/mL)의 순 이었다( $P < 0.001$ ). 평균 DNA 손상도는 누동 바지락에서 14.76%의 손상도를 보인 반면 고남 바지락은 단지 6.80% 손상도만을 보여 누동 바지락의 DNA 손상도가 2배 이상 높음이 관찰되었다( $P < 0.05$ ). 이상을 종합하면 고남 바지락은 평균 혈구 수와 식세포율이 높고 DNA 손상도는 낮은 것으로 나타나 전반적으로 타지역 바지락 보다 면역 기능이 활성화 되어 있는 것으로 판단된다.

지역별 각 면역 기작 항목간의 상관관계를 나타내고 있는 Table 2에 따르면 바지락 혈구 수와 혈구 사망률과는 음(-)의

관계가 고남과, 황도, 방포 지역 바지락에서 관찰되었으며, 혈구 수와 식세포 작용 역시 음(-)의 관계가 고남, 누동, 방포 바지락에서 조사되었다. 혈구 사망률과 식세포율은 방포 바지락에서만 양(+)의 관계가 관찰되었고 타 지역에서는 유의한 관계가 나타나지 않았다. DNA 손상도와 혈구 사망률은 고남 바지락에서 양(+)의 관계가 나타났고, 혈구 수와의 관계는 고남과 누동에서 음(-)과 양(+)의 상반된 결과가 조사되었다.

### 고찰

선천성 면역 기작만을 보유한 해산 이매패의 면역은 세포성 면역와 체액성 면역으로 나뉘며 혈구는 세포성 면역의 가장 중요한 기능을 담당 한다(Fisher, 1988). 혈구의 분류는 연구자에 따라 다소 차이가 있으나 Cheng (1981)은 해산 이매패의 혈구를 형태-기능적 특성(morphofunctional aspect)에 따라 기본적으로 과립구와 무과립구로 구분하였으며, 이후 과립구는 위족(pseudopodia)을 형성하고 있고 응집반응과 식세포작용을 하며 가수분해 효소를 분비함이 밝혀졌다(Cima et al., 2000). 또한 염색 특성에 따라 호중구, 호산성과립구, 호염성 과립구 등으로 세분화되기도 한다. 무과립구는 일반적으로 과립구보다 크기가 작으며 세포질이 적은 특징이 있다. 바지락 역시 위와 유사한 혈구의 구성 특성을 가지며, 과립구와 무과립구가 전체 혈구의 80% 이상을 차지하는 것으로 알려져 있다(Cima et al., 2000). 강 등(2000)은 우리나라 바지락 혈구의 형태적 특징과 크기에 따라 과립구, 무과립구, 그리고 노쇠한 세포인 섬유세포(fibrocyte)로 구분된다고 보고하였다.

세포성 면역 기능을 측정하기 위한 방법으로 최근 유세포 분석기(Flow cytometer)가 빈번히 이용되고 있다. 이 방법은 개별 세포의 크기(forward scatter)와 밀도(side scatter)를 측정하여 세포의 형태적 차이에 따른 sub-population을 구분한다. 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; Hégaré et al., 2003b; Goedken and Guise, 2004). 즉, 이매패는 종에 따라 과립세포, 무과립구 등 주요 혈구 세포의 크기와 그 밀도가 다를 수 있으며 이는 각 종의 특성이 될 수 있음을 의미 한다. 또한 이와 같이 혈구세포의 형태적 차이에 따른 분류 및 정량화는 어류의 경우 백혈구나 B-cell 등 면역세포 종류의 정량적 변화를 측정 할 수 있으며 이는 각종 면역 기능을 이해하는데 중요하게 이용되고 있다(Rønneseth et al., 2005). 본 연구에서 나타난 바지락 혈구세포의 집단 구조는 가장 큰 크기와 높은 밀도를 가진 과립구 집단이 대부분을 차지하고 있었으며, 뒤이어 무과립구 집단과 종류가 명확히 구분되지 않은 소형 무과립구 집단으로 구분되었다. 이 같은 혈구 집단 구조는 기존에 알려진 대서양굴(*C. virginica*)과는 다소 차이가 있는 것으로써 향후 다양한 이매패 혈구의 집단 구조 분석을 통하여 중간 또는 종내 면역 기능을 이해하는데

Table 2. Correlation coefficients between immune parameters of the Manila clam from 4 locations.  $P < 0.1$  was regarded as significant correlation

Location	Parameter	Hemocyte counts		Dead cells		Phagocytosis	
		coefficients	P	coefficients	P	coefficients	P
Gonam	Dead cell (%)	-0.408	0.025	-	-	-	-
	Phagocytosis (%)	-0.408	0.007	0.008	0.965	-	-
	DNA damage (%)	-0.327	0.078	0.608	0.000	0.093	0.627
Nudong	Dead cell (%)	-0.152	0.422	-	-	-	-
	Phagocytosis (%)	-0.707	0.000	-0.153	0.419	-	-
	DNA damage (%)	0.325	0.091	-0.244	0.210	0.069	0.726
Hwangdo	Dead cell (%)	-0.447	0.013	-	-	-	-
	Phagocytosis (%)	0.044	0.822	-0.138	0.475	-	-
Bangpo	Dead cell (%)	-0.415	0.022	-	-	-	-
	Phagocytosis (%)	-0.318	0.087	0.181	0.022	-	-

중요하게 이용될 수 있을 것이다(Fournier et al., 2001).

유세포 분석기의 추가적인 주요 기능은 다양한 파장의 형광 염색 시약을 이용해 목적하는 세포를 인지함으로써 세포 각각의 특성을 규명하는 기술이다(Davey and Kell, 1996). 본 연구에서 측정된 혈구 수와 사망 세포의 진단은 세포의 핵(nucleus)만을 특이적으로 인식하는 형광 시약인 SYBR green을 이용하여 혈구만을 인지하여 혈구수를 측정하였으며, 동시에 세포 사망률은 세포막 투과성이 없는 propidium iodide가 혈구와 반응할 때 사망한 혈구의 경우 손상된 세포막을 통해 세포핵을 염색함으로써 형광량이 증가되는 원리를 이용하여 전체 혈구 중 형광량이 증가된 세포만을 측정하는 이중 염색 방법을 이용하였다(Hégaret et al., 2003b). 본 연구에서는 FS vs. SS plotting을 통하여 과립구와 무과립구 만을 혈구 계수 및 사망 세포율 측정에 이용하였다. 이때 폐의 혈구 수는 질병 감염, 화학약품 등이 의해 증가된다는 보고가 있으며(Santarem et al., 1994), 반대로 흔들림 스트레스에 노출될 경우 감소하는 경우가 보고 된 바 있다(Ballarin et al., 2003). 한편, 당단백질인 렉틴(lectin)은 척추동물 혈구세포의 증식을 가져온다는 연구가 있지만 무척추동물인 바지락의 경우 현재까지 이에 대해 보고된 바 없다(Yao et al., 2001; Regis et al., 2002). Soudant et al. (2004)은 바지락의 혈구 수가 봄-여름 시기가 가을-겨울보다 많음을 관찰하였으며, Kang et al. (2000) 역시 유사한 결과를 보고한 바 있다. 이상의 연구내용을 살펴볼 때 바지락 혈구수의 변화는 스트레스나 계절적 환경 변화에 기인하는 것으로 판단된다. 본 연구결과 지역별 총 혈구 수는 고남 지역 바지락이 가장 많았으며 뒤이어 황도, 누동, 방포 순이었다. 이들 지역에서 혈구 수와 기타 요인들과의 상관관계를 살펴보면 혈구 수가 많을수록 혈구사망률과 식세포율이 낮았으며, DNA 손상도는 혈구가 많았던 고남지역 바지락에서 낮게 조사되었고 혈구 수가 상대적으로 적었던 누동 바지락에서 높게 조사되었다. 따라서 이 같은 지역별 바지락 혈구 수의 차이는 바지락이 채집된 4개 지역의 서식환경이 상이함을 나타내는 것으로 추정할 수 있다.

혈구 사망률은 수온 상승이나 오염물질에 노출된 시료의 면역력의 변화를 나타내는 마커로 이용되어 왔다(Gagnaire et al., 2004; Hégaret and Wikfors, 2005). 본 조사에서는 누동과 고남 바지락의 혈구세포 사망률이 높았으며 상대적으로 황도와 방포 바지락의 혈구 사망률이 낮은 것으로 조사되었다. Soudant et al. (2004)은 바지락이 가장 높은 혈구 사망률을 보인 경우는 가장 적은 수의 혈구를 갖고 있을 때였음을 보고한 바 있어 본 연구에서 나타난 혈구 사망률이 혈구 수와 음(-)의 상관관계를 나타낸 것과 매우 유사한 결과이다. Paillard et al. (1996)은 바지락의 혈구 사망률이 바지락 폐사 발생시 시료의 생리적 상태를 나타내는 좋은 지시자(indicator)임을 언급하였다. 우리나라의 경우 최근 바지락 폐사 현상이 발생하고 있으며 주로 가을철에 집중되고 있다(박 등, 1999). 그러나 안면도의 경우 채집 당시인 2004년 10월경에는 바지락 폐사 현상이 없었으나 2005년 2-4월 고남과 황도 등 안면도 일대 전 지역에서 대량 폐사현상이 언론에 보고된 적이 있어 향후 안면도 지역의 바지락 폐사 현상을 이해하는데 바지락 혈구 사망률 조사 기법은 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

본 연구에서 조사된 지역별 식세포율은 고남과 누동 바지락이 30% 이상이었으나 황도와 방포 바지락은 15% 이내의 식세포율을 보였다. 황도를 제외한 모든 지역에서 식세포율은 혈구 수가 많을수록 낮았으며, 방포 바지락의 경우 식세포율이 높을수록 혈구사망률이 높아지는 경향이 관찰되었다. 식세포 작용은 해산 이매패의 가장 일반적인 세포성 면역 기작으로써 혈구는 다양한 종류의 박테리아, 조류, 효모, latex sphere 등을 포식할 수 있다(Wootton et al., 2003). 해산 이매패의 식세포율을 측정하기 위하여 최근까지 yeast의 일종인 zymosan을 혈구와 반응시켜 식세포된 현상을 현미경을 이용하여 정량하는 방법이 전통적으로 이용되어 왔으나, 최근 유세포 분석기를 이용하여 식세포작용을 측정하려는 시도가 많아지고 있다. 이 방법은 zymosan 대신 형광 bead를 이용하며, 혈구가 식작용한 형광 bead의 수를 유세포 분석기를 이용하여 측정함으로써 혈구 하나당 식작용한 bead의 수를 측정하는 것이 가능하다.

현재까지 알려진 해산 이매패의 식세포율을 변화시키는 요인으로는 수온 상승(Hégaret et al., 2004), 중금속(Fournier et al., 2001), 공기노출(Pampanin et al., 2002) 등이 식세포작용의 변화를 유발하는 것으로 보고 되고 있다.

한편 본 연구는 분자수준의 면역력 측정 방법으로써 바지락 혈구세포의 DNA손상도가 측정하였다. DNA 손상이란 주로 DNA strand break을 의미하며 활성산소, 자외선, excision repair enzyme 등 genotoxic chemical에 의해 유발되고 apoptosis나 necrosis로 발전한다(Mitchelmore and Chipman, 1998). DNA 손상이 발생하면 DNA사슬에서 염기가 탈락하게 되고 따라서 세포내 총 염기의 양이 감소하게 되는데 이를 정량화 하는 comet assay나 flow cytometry가 보편적인 진단 방법이다. 해산 이매패는 과산화수소(Gielazyn et al., 2003), tri-n-butyltin (TBT) (Micic et al., 2001), 중금속과 polyaromatic hydrocarbons (PAH) (Coughlan et al., 2002)에 노출될 때 DNA 손상이 증가함이 관찰되었다. 본 연구에서는 고남과 누동 바지락 혈구의 DNA 손상도가 측정 되었다. 그 결과 누동 바지락의 DNA 손상도가 고남 바지락의 그것보다 약 2배 이상 높은 것으로 측정되었다. 따라서 고남 보다는 누동 지역의 genotoxicity가 높은 것으로 판단된다.

해산 이매패의 면역력 측정의 주된 목적은 해양환경을 모니터링 할 수 있는 바이오마커로써 이용하기 위함이다. 이와 같은 목적을 충족시키기 위해서는 다양한 진단 항목을 신속하게 조사할 수 있는 기술의 개발이 매우 중요하다. 이런 관점에서 유세포 분석기의 이용은 이미 의료분야에서 검증된 바와 같이 목적하는 세포의 다양한 특성을 민감하고 신속한 진단을 가능케 하기 때문에 해양 생물의 면역력 측정을 통한 해양환경 모니터링에 유세포 분석기를 이용한 측정법이 매우 유용할 것으로 기대된다. 본 연구를 통하여 유세포 분석기를 이용한 우리나라 바지락의 세포성 면역 기작을 측정하기 위한 방법이 최적화 되었으며, 이를 이용함으로써 안면도 일대 4개 지역 바지락의 면역력이 측정되었다. 조사 결과 면역력의 지역별 차이와 각 면역 인자간 다양한 상관관계가 확인되었다. 그러나 이 같은 결과를 유발하는 원인에 대해서는 보다 심도 있는 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다. 왜냐하면, 현재까지 진행된 해산 이매패의 면역력 측정 실험의 경우 대부분 실험실내 제한된 환경하에서 단기간에 걸쳐 일어난 면역력의 변화를 측정할 결과이기 때문에(Fisher et al., 2003; Nicholson and Lam, 2005), 본 연구와 같이 오염원이나 질병의 감염도가 명확히 밝혀지지 않은 장소에서 수년간 성장한 시료의 면역력 변화를 이해하기 위해서는 면역 반응과 이를 유발하는 다양한 인자들 간의 상호기작에 대한 충분한 기초 조사가 선행되어야 할 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 해양수산부 주관 2005년도 바다목장 개발사업의 일환인 동서제주 바다목장화 사업의 지원으로 이루어졌

습니다.

참 고 문 헌

Auffret M. and R. Oubella. 1995. Cytology and cytometric analysis of bivalve mollusc haemocytes. In: Techniques in Fish Immunology Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates Vol. 4. Stolen J.S. et al., eds. SOS Publications, Fair Haven, UK, 55-64.

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

Ballarin, L., D.M. Pampanin and M.G. Marin. 2003. Mechanical disturbance affects haemocyte functionality in the Venus clam *Chamelea gallina*. Comp. Biochem. Phys. A, 136, 631-640.

Cheng, T. 1981. Bivalves. In: Invertebrate Blood Cells. Ratcliffe, N.A. and A.F. Rowley eds. Academic Press. London, 233-300.

Cima, F., M.G. Marin, V. Matozzo, L. Da Ros and L. Ballarin. 1999. Biomarkers for TBT immunotoxicity studies on the cultivated clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). Mar. Poll. Bull., 39, 112-115.

Cima, F., V. Matozzo, M.G. Marin and L. Ballarin. 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. Fish Shellfish Immunol., 10, 677-693.

Davey, H.M. and D.B. Kell. 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. Microbiol. Rev., 60, 641-696.

Ellis, M.S., R.D. Barber, R.E. Hillman, Y. Kim and E.N. Powell. 1998. Histopathology analysis. In: Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project: 1993-1996 Update. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 130, Maryland, 198-215.

Fisher, W.S. 1988. Environmental influence on host response; environmental influence on bivalve hemocyte function. Am. Fish. Soc. Spec. Publ., 18, 225-237.

Fisher, W.S., L.M. Oliver, J.T. Winstead and A.K. Volety. 2003. Stimulation of defense factors for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. Aquat. Toxicol., 64, 375-391.

Fournier, M., J. Pellerin, Y. Clermont, Y. Morin and P. Brousseau. 2001. Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. Toxicology, 161,

- 201-211.
- Gagnaire, B., H. Thomas-Guyon and T. Renault. 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. Fish Shellfish Immunol., 16, 501-512.
- Gagne, F., C. Blaise, J. Pellerin, E. Pelletier and J. Strand. 2006. Health status of *Mya arenaria* bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive period. Ecotox. Environ. Safe (In press).
- Giamberini, L. and M.P. Cajaraville. 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. Environ. Res., 98, 210-214.
- Gielazyn, M.L., A.H. Ringwood, W.W. Piegorsch and S.E. Stancyk. 2003. Detection of oxidative DNA damage in isolated marine bivalve hemocytes using the comet assay and formamidopyrimidine glycosylase (Fpg). Mutat. Res-Gen. Tox. En., 542, 15-22.
- Goedken, M. and S. De Guise. 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. Fish Shellfish Immunol., 16, 539-552.
- Hégaret, H., and G.H. Wikfors. 2005. Time-dependent changes in hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, and northern bay scallops, *Argopecten irradians irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. Harm. Algae, 4, 187-199.
- Hégaret, H., G.H. Wikfors and P. Soudant. 2003a. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: I. Haemocyte types and morphology. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 293, 237-248.
- Hégaret, H., G.H. Wikfors and P. Soudant. 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. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 293, 249-265.
- Hégaret, H., G.H. Wikfors, P. Soudant, M. Delaporte, J.H. Alix, B.C. Smith, M. S. Dixon, C. Quere, J.R. Le Coz, C. Paillard and J.F. Samain. 2004. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. Aquaculture, 234, 541-560.
- Kang, S.G., S.W. Park and Y.G. Kim. 2000. The morphology of the hemocytes of the clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). J. Fish Pathol., 13, 129-136.
- Lacoste, A., S.K. Malham, F. Gelebart, A. Cueff and S.A. Poulet. 2002. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. Dev. Comp. Immunol., 26, 1-9.
- Lambert, C.P. Soudant, G. Choquet and C. Paillard. 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. Fish Shellfish Immunol., 15, 225-240.
- Lau, P.S. and H.L. Wong. 2003. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. Mar. Pollut. Bull., 46, 1563-1572.
- Mann, R. and S.J. Glomb. 1978. The effect of temperature on growth and gametogenesis in the manila clam *Tapes japonica*. Estuar. Coast. Mar. Sci., 6, 335-339.
- Marin, M.G., V. Moschino, M. Deppieri and L. Lucchetta. 2003. Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of *T. philippinarum* from the Lagoon of Venice. Aquaculture, 219, 859-871.
- Micic, M., N. Bihari, Z. Labura, W.E.G. Muller and R. Batel. Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride. Aquat. Toxicol., 55, 61-73.
- Mitchellmore, C.L. and J.K. Chipman. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mut. Res., 399, 135-147.
- Nicholson, S. and P.K.S. Lam. 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). Environ. Int., 31, 121-132.
- Paillard, C., K. Alcox and S.E. Ford. 1996. Changes in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the American oyster, *Crassostrea virginica* affected by the Juvenile oyster disease. Aquat. Living Resour., 92, 145-158.
- Pampanin, D.M., L. Ballarin, L. Carotenuto and M.G. Marin. 2002. Air exposure and functionality of *Chamelea gallina* haemocytes: effects on haematocrit, adhesion, phagocytosis and enzyme contents. Comp. Biochem. Phys. A, 131, 605-614.
- Park, K.I., K.S. Choi and J.W. Choi. 1999. Epizootiology of *Perkinsus* sp. found in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Komsoe Bay, Korea. J. Kor. Fish. Soc., 32, 303-309.
- Peakall, D. 1992. Animal Biomarkers as Pollution



- Indicators. Chapman and Hall, New York, 1-291.
- Ponurovsky, S.K. and Y.M. Yakovlev. 1992. The reproductive biology of the Japanese littleneck, *Tapes philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) (Bivalvia: Veneridae). J. Shellfish Res., 11, 265-277.
- Regis, L., M. Ribeiro, V. Vale, B. Paule, I. Nascimento, R. Schaer, R. Meyer and S. Freire. 2002. Effect of different lectins on the proliferation of goat peripheral blood mononuclear cells. Small Ruminant Res., 46, 71-73.
- Rønneseth, A., E.F. Pettersen and H.I. Wergeland. 2005. Leucocytes of anadromous and landlocked strains of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the smolting period. Fish Shellfish Immunol., 19, 229-239.
- Santarem, M.M., J.A.F. Robledo and A. Figueras. 1994. Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. Dis. Aquat. Org., 18, 217-222.
- Soudant, P., C. Paillard, G. Choquet, C. Lambert, H.I. Reid, A. Marhic, L. Donaghy and T.H. Birkbeck. 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (= *Tapes*, = *Ruditapes*) *philippinarum*. Aquaculture, 229, 401-418.
- Viarengo, A. and L. Canesi, 1991. Mussels as biological indicators of pollution. Aquaculture, 94, 225-243.
- Wootton, E.C. and P.K. Pipe. 2003. Structural and functional characterization of the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana*. Fish Shellfish Immunol., 15, 249-262.
- Yao, L.J., L.J. Fraher, R.A.W. Veldhuizen, S. Samuelson, P. Borron, J. Malloy, L. McCaig and J.F. Lewis. 2001. Effects of alveolar surfactant aggregates on T-lymphocyte proliferation. BBA-Mol. Basis Dis., 1535, 266-274.

---

2005년 9월 5일 접수

2006년 5월 23일 수리