

카드뮴 노출에 따른 북방전복, *Haliotis discus hannai* (Ino, 1953) 의 hemolymph 및 hepatopancreas의 효소활성의 변화

민은영, 이정식¹, 곽인실², 김재원³, 강주찬

부경대학교 수산생명의학과, ¹전남대학교 수산생명의학과, ²전남대학교 해양기술학부, ³강원도립대학 해양생명과학부

Changes of enzyme activity in the hemolymph and hepatopancreas of the abalone, *Haliotis discus hannai* (Ino, 1953) exposed to cadmium

Eun-Young Min, Jung Sick Lee¹, In-Sil Kwak², Jae Won Kim³ and Ju-Chan Kang

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

²Faculty of Marine Technology, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

³Department of Marine Life-Science, Gangwon Provincial College, Gangneung 210-804, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of cadmium (Cd) exposure on biochemical factors in the hemolymph and hepatopancreas of the abalone, *Haliotis discus hannai*. The abalone were exposed to 0, 5, 10, 20 and 40 µg/L Cd for 4 weeks. The phenoloxidase (PO) activity was decreased in hemolymph of abalone exposed to 40 Cd µg/L for 4 weeks compared to the control ($P < 0.05$). The hemolymph enzymes, alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities were markedly elevated in 40 Cd µg/L after 4 weeks. The hemolymph calcium concentrations were significantly decreased in 20 and 40 Cd µg/L for 4 weeks. Hepatopancreas superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were significantly increased by Cd. SOD was increased in both 20 and 40 Cd µg/L and CAT, in 40 Cd µg/L after 2 weeks ($P < 0.05$). These results suggested that the abalone SOD and CAT including PO may serve as a protective mechanism against oxidative stress by Cd. We conclude that a Cd concentration, 40 µg/L in water may curtail hemolymph homeostasis and anti-oxidative reactions in abalone hepatopancreas. From these results, these biochemical factors may represent a convenient method of monitoring heavy metal pollution in coastal areas.

Key words: abalone, Cd, hemolymph, hepatopancreas, PO, SOD, CAT

서론

최근 수산 산업은 수산 자원의 급격한 감소로 빠르게 양식

산업으로 전환되고 있으며, 그 중 북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 은 우리나라의 전복 양식생산량의 대부분을 차지한다 (Kim *et al.*, 2006). 2010년, 양식산 전복 6,228톤을 생산한 우리나라는 세계 2위의 전복 생산국으로 주목을 받고 있다 (KNSO, 2011). 이러한 급격한 생산량의 향상은 해상가두리 육성법을 이용한 대량생산체제가 구축되었기 때문이나, 이는 최근 급변하는 해양 환경조건에 그대로 노출된다는 단점이 있다 (Park *et al.*, 2011). 우리나라는 산업발전에 따라 각종 생활오수, 산업폐수 등에 의하여 연안 해역의 오염이 가속화되고 있는 가운데, 해수 중으로 유입된 중금속으로 인해 연안생물의 중금속 오염의 우려를 안고 있다. 특히, 우리나라 연안 무척추

Received: March 10, 2014; Revised: March 20, 2014;
Accepted: March 27, 2014

Corresponding author : Ju-Chan Kang

Tel: +82 (51) 629-5944 e-mail: jckang@pknu.ac.kr
1225-3480/24513

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

카드뮴 노출에 따른 북방전복, *Haliotis discus hannai* (Ino, 1953) 의 hemolymph 및 hepatopancreas의 효소활성의 변화

동물의 카드뮴 (Cd) 함량을 조사한 연구에서, 복족류는 0.154 $\mu\text{g/g}$, 이매패류는 0.423 $\mu\text{g/g}$ 함유되어 있음이 조사된 바 있다 (Mok *et al.*, 2010). 복족류 (gastropods) 에 관한 카드뮴 연구는 100-220 Cd $\mu\text{g/L}$ 이상에서 성장이 감소하였다 (Wo *et al.*, 1999; Forbes and Depledge, 1992) 는 보고가 있다. 전복 (*Haliotis* sp.)에 대한 카드뮴 연구는, 500 Cd $\mu\text{g/L}$ 로 7주간 노출 시킨 결과, 성장의 감소 (Huang *et al.*, 2010) 와 먹이를 통한 체내 카드뮴 축적 (Haung *et al.*, 2008) 에 관한 보고로 희소한 편이다.

카드뮴을 비롯한 크롬 (Cr) 및 구리 (Cu) 와 같은 2가 양이온 금속은 활성산소 (ROS, reactive oxygen species) 인 superoxide, hydrogen peroxide, peroxy radical, hydroxyl radical을 발생시키는 것으로 알려져 있다 (Stohs *et al.*, 2000; Firat *et al.*, 2009). 활성산소 (ROS) 는 생체 내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상 시킨다 (Ferraris *et al.*, 2002). 수계생물은 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) 등과 같은 항산화 효소를 이용하여 ROS에 대한 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있다 (Lopes *et al.*, 2001). 만약 독성물질이 이와 같이 생체 내 생화학적 변환을 통하여 무독화 혹은 배설되지 못하면 DNA, RNA 및 단백질을 손상시켜 세포에 심각한 독성을 발휘한다 (Liu *et al.*, 2005). SOD는 두 가지의 이성질 효소 (Isoenzyme) 를 가지는 항산화효소로서 free radical을 H_2O_2 와 O_2 로 아세틸화시켜 free radical의 직접적인 독성을 방지한다. 또한 다른 항산화효소와 함께 radical이 금속이온과 상호작용하여 유독성인 hydroxy radical의 발생 증가를 억제하며 이러한 과정에서 체내의 SOD 농도가 증가될 수 있다 (Winston and Di Guilio, 1991; Parihar *et al.*, 1997). CAT는 $2\text{H}_2\text{O}_2$ 를 $2\text{H}_2\text{O}$ 와 O_2 로 환원하는 효소로서 세포막의 손상 및 효소활성 억제를 제한하는 역할을 한다 (Wendel and

Feuerstein, 1981). 이와 같이 체내 유입된 이물질에 대한 생체 방어기작을 하는 다른 기관으로는 순환계가 있으며, 복족류는 개방혈관계로 hemolymph 내 혈구세포 (hemocytes) 가 그 기능을 담당한다. Hemolymph는 모든 조직 사이를 순환하면서 상처 치유, 패각 재생, 영양분 소화 및 분비물 배설 등 다양한 기능을 수행 한다 (Cheng, 1981). 또한, hemocytes는 병원체 가수분해 및 phagocytosis 등, 다양한 형태의 면역 기능을 하며 체내에 흡수된 중금속에 의해서 이들 기능의 변화가 초래된다 (Wang *et al.*, 2009).

본 연구는 최근 고부가가치 양식산업종으로 부각되고 있는 북방전복 (*H. discus hannai*) 을 대상으로, 카드뮴 노출에 의한 hemolymph 내의 무기, 유기 및 효소 활성과 hepatopancreas의 항산화 효소의 변화를 검토하여 카드뮴 오염의 모니터링 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험생물

본 실험에 사용한 북방전복, *Haliotis discus hannai* 는 완도 소재의 양식장으로부터 분양받아 PVC (52 × 36 × 30 cm) 수조에서 2주간 순치하였고, 시험에는 외관상 건강한 개체 (각 장 48.3 ± 2.4 mm, 전중 13.8 ± 2.2 g) 를 사용하였다.

2. 실험조건

모든 실험은 항온실 (20 ± 1°C) 에서 실시하였으며, 실험에 사용한 해수의 수질은 Table 1과 같다. 실험용액은 카드뮴 표준용액 (1,000 mg/L) 을 이용하였고, 실험 농도는 예비실험을 바탕으로 5, 10, 20, 및 40 Cd $\mu\text{g/L}$ 로 설정하였다. 실험은 환수식 방법으로 실시하였고, 먹이는 매일 미역 (*Undaria pinnatifida*) 을 충분한 양으로 공급 하였다. 실험은 4주 동안 실시하였으며, 노출 후 2주와 4주째에 hemolymph와 hepatopancreas를 채취하여 생화학적 분석에 이용하였다. Hemolymph는 hemocyte의 엉김을 방지하기 위해 EDTA

Table 1. The chemical components of seawater used in this experiments

Item	Value
Temperature (°C)	19.8 ± 0.7
pH	8.2 ± 0.1
Salinity (‰)	33.2 ± 0.2
Dissolved oxygen (mg/L)	7.0 ± 0.3
Chemical oxygen demand (mg/L)	1.3 ± 0.3
Ammonia ($\mu\text{g/L}$)	8.7 ± 0.8
Nitrite ($\mu\text{g/L}$)	5.9 ± 0.2
Nitrate ($\mu\text{g/L}$)	15.2 ± 0.7
Cd ($\mu\text{g/L}$)	N.D.

(50 mM EDTA in PBS, pH 7.6) 를 처리한 주사기로 심장 옆의 혈관에서 채취 한 뒤, 1,200 rpm, 4°C, 10 min. 조건으로 원심분리 (Mikro 22R, Hettich zentrifugen Ltd, Germany) 하여 상등액을 - 70°C에 보관하였다. Hepatopancreas는 적출 한 후 약 0.1 g을 절단하여 washing buffer (0.9% NaCl) 에 3회 세척한 후, - 70°C에 보관하였다.

3. Hemolymph 효소 분석

Hemolymph 효소 활성은 phenoloxidase (PO), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine aminotransferase (ALT) 를 분석하였다. PO의 활성은 Ashida and Soderhall (1984) 의 방법을 이용하였다. 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.1) 에 hemolymph와 10% sodium dodecyl sulfate를 넣고 잘 혼합한 뒤, 15 mM L-DOPA (10 mM CaCl₂ in 9.5 M HCl) 를 넣은 뒤 즉시 파장 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 28°C 배양기에서 20분간 반응시킨 후, 차가운 증류수를 넣어 반응을 정지시키고 흡광도를 측정하였다. 효소 활성의 계산은 흡광도 측정치가 0.001/ml 감소한 값을 1 unit로 하였다. ALP는 Kind-king법으로, AST와 ALT는 Retiman-Frankel법을 이용하여 측정하였다.

Hemolymph의 무기성분은 마그네슘 (Mg) 과 칼슘 (Ca) 을 측정하였다. Mg의 정량은 Xylidyl blue 법으로, Ca는 OCPC (o-cresolphthalein-complexon) 법으로 비색 정량하였다. 유기성분은 총 단백질 (total protein, TP) 과 glucose를 측정하였다. TP는 Biuret법, glucose는 GOD법으로 측정하였다.

4. Hepatopancreas 효소 분석

전복 hepatopancreas를 적출하여 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase (CAT) 활성 및 단백질 함량을 분석하였다. 적출한 hepatopancreas 약 0.1 g을 washing buffer (0.9% NaCl) 에 3회 세척한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) 를 첨가하여 teflon-glass homogenizer (099C K4424, Glas-Col) 로 균질화 하였다. 균질화한 시료는 1,000 rpm, 4°C, 15 min.의 조건에서 원심분리하여 (Mikro 22R, Hettich zentrifugen Ltd, Germany), 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시 13,000 rpm, 4°C, 20 min.의 조건에서 원심분리 한 후 상등액을 - 70°C에 보관하여 항산화 효소 측정 시료로 사용하였다.

SOD는 SOD Assay Kit (Dojindo Tech. Inc.) 를 이용하였다. 시료를 단계 희석하여 450 nm에서 inhibition curve를 작성하고, inhibition curve에서 활성이 50% 억제되는 농도

를 찾아 계산하였다.

CAT 활성 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 240 nm 파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로 계산하였고, 효소 활성 단위는 1분간 단백질 1 mg이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다.

단백질 함량은 Bradford 법을 바탕으로 한 Kit (Biorad. Co. Ltd.) 를 이용 했으며, 표준 단백질로서 BSA (bovine serum albumin) 를 사용하였다.

5. 유의성 검정

실험 결과의 통계 처리는 SPSS 통계프로그램 (version 12.0) 을 이용하여 ANOVA test를 실시하고, 사후검정으로 Duncan's multiple range test를 통해 P < 0.05일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. Hemolymph의 효소활성

Cd에 노출된 전복의 hemolymph 효소로, alkaline phosphatase (ALP) 및 phenoloxidase (PO), aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine aminotransferase (ALT) 활성을 분석하였다 (Fig. 1, 2). ALP 활성은 4주째에 20과 40 Cd μ g/L농도 구간에서 유의하게 증가하였고, PO는 20 Cd μ g/L 구간은 4주째에, 40 Cd μ g/L 구간은 2와 4주째에 증가하였다 (Fig. 1). AST와 ALT 효소 활성 모두 노출 후 4주째에 40 Cd μ g/L 구간에서 유의한 증가를 보였다 (Fig. 2).

Cd에 노출된 전복의 hemolymph의 무기성분인 마그네슘 (Mg) 과 칼슘 (Ca) 의 변화는 Fig. 3에 나타났다. Mg은 전 실험기간 중에 노출농도 및 노출기간에 따라 유의한 차이를 나타내지 않았다 (P > 0.05). 전복 hemolymph Ca은 2주 및 4주째에 20 Cd μ g/L 이상의 농도에서 유의적인 감소를 보였다 (Fig. 3). Hemolymph의 유기성분인 TP와 glucose의 변화는 Fig. 4에 나타났다. Cd에 2주 동안 노출된 전복의 TP와 glucose 농도는 유의한 변동을 보이지 않았으나, 노출 4주째에는 두 구성 성분 모두 유의한 감소를 보였다. Hemolymph TP는 40 Cd μ g/L 구간에서, glucose는 20과 40 Cd μ g/L 구간에서 유의한 감소를 보였다 (Fig. 4).

2. Hepatopancreas의 산화효소 활성

Cd에 노출된 전복의 hepatopancreas의 효소활성은 superoxide dismutase (SOD) 활성과 catalase (CAT) 를 분석하여 Fig. 5에 나타났다. SOD 활성은 Cd 농도에 따라 증가하는 경향을 보였으나, 20과 40 Cd μ g/L 구간에서 유의성이 인정되었다 (P < 0.05). 노출 4주째 40 Cd μ g/L 구간에서

카드뮴 노출에 따른 북방전복, *Haliotis discus hannai* (Ino, 1953) 의 hemolymph 및 hepatopancreas의 효소활성의 변화

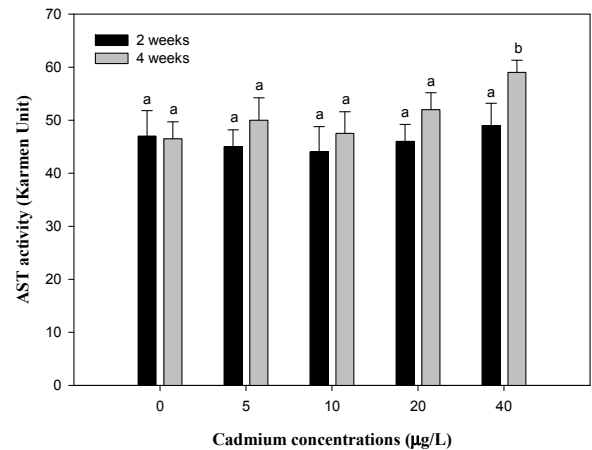
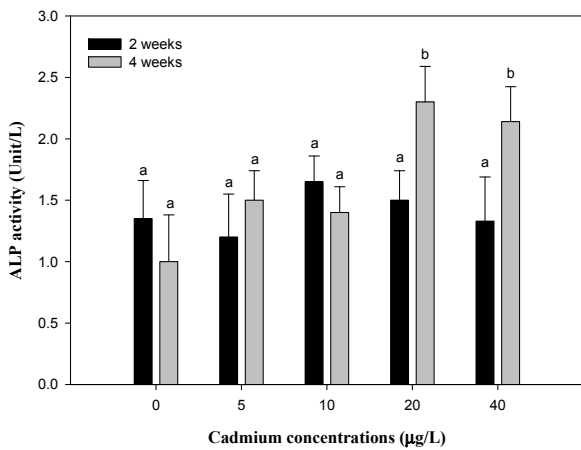
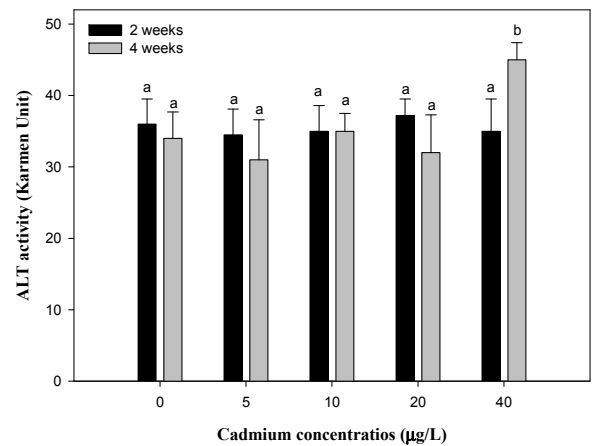
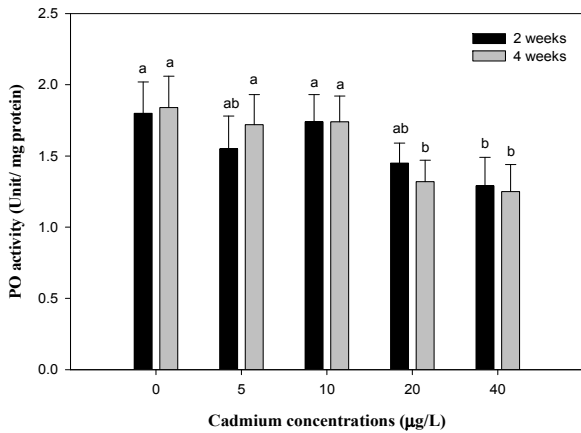


Fig. 1. Changes of PO and ALP enzymes activity in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to various Cd concentrations for a four-week time period. Each point represents a mean value \pm S.D. of two replicates (n = 7). Values with different superscript are significantly different (P < 0.05) from control according to Duncan's multiple range test.

Fig. 2. Changes of AST and ALT enzymes activity in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to various Cd concentrations for a four-week time period. Each point represents a mean value \pm S.D. of two replicates (n = 7). Values with different superscript are significantly different (P < 0.05) from control according to Duncan's multiple range test.

가장 높은 SOD 활성을 보였으나, 노출 기간에 따른 유의한 차이는 보이지 않았다. CAT 활성도 노출 기간과는 무관하게 40 Cd µg/L 구간에서만 유의한 증가가 확인되었다 (P < 0.05).

고찰

수산 생물은 외부환경의 변화에 따라 어느 수준까지는 스트레스를 견딜 수 있는 능력을 가지고 있으나, 임계 수준을 넘어 서면 스트레스로 인해 생물의 생리활성이 떨어짐으로 인해 건강을 악화시킬 수 있다 (Barton, 1991). 특히 연안 환경에서 가두리 양식을 하고 있는 전복의 경우, 양식 환경의 변화로 겪는 다양한 환경 스트레스로 인해 발생하는 생리적 장애 등에

관한 연구가 요구되어진다. 국내에서 전복에 대한 환경스트레스로 발생하는 생리적 변화에 관한 연구는 주로 수온 및 염분 변화에 따른 연구로, 삼투질, 호흡률, 조직학적 변화, heat shock protein 발현과 항산화 효소인 SOD 및 CAT 등에 대한 보고가 있다 (Kim *et al.*, 2005, 2006; Park *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2011). 본 연구에서는 고부가가치 양식생물로 주목받고 있는 북방전복 (*H. discus hannai*) 을 대상으로 Cd 노출에 따른 생리적 반응의 변화를 조사하였다.

Cd는 지각 도처에 함유되어 있으며, 아연이나 납 채광 및 체련 시 중간산물로, 인산비료 생산 시 부산물로 많이 발생된다 (Courtois *et al.*, 2003). 수산 생물의 Cd 노출은 직접적인

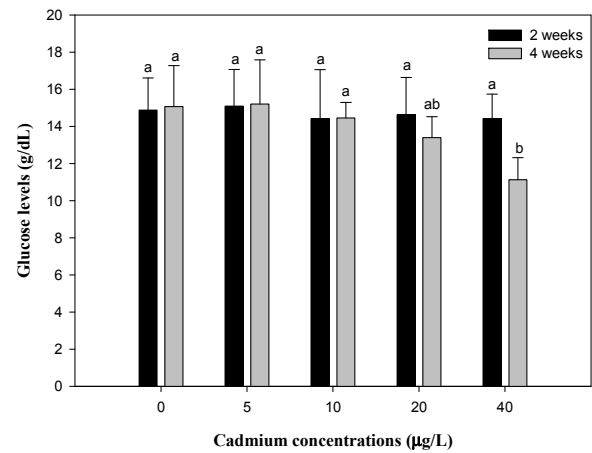
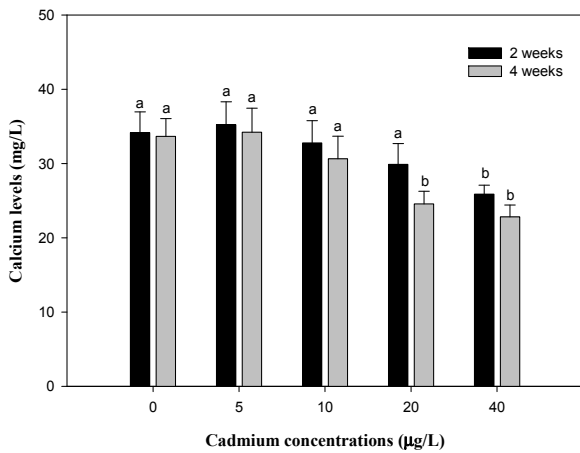
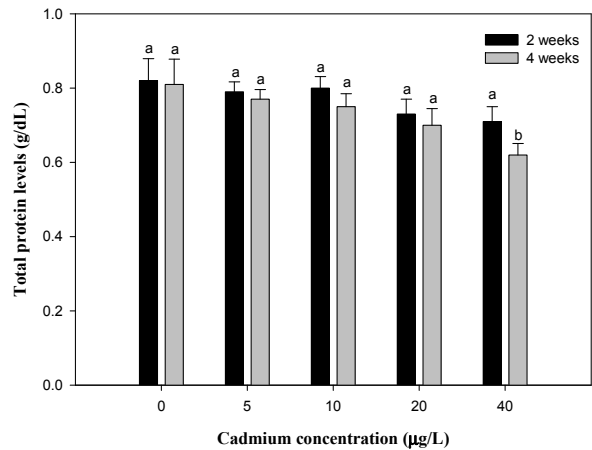
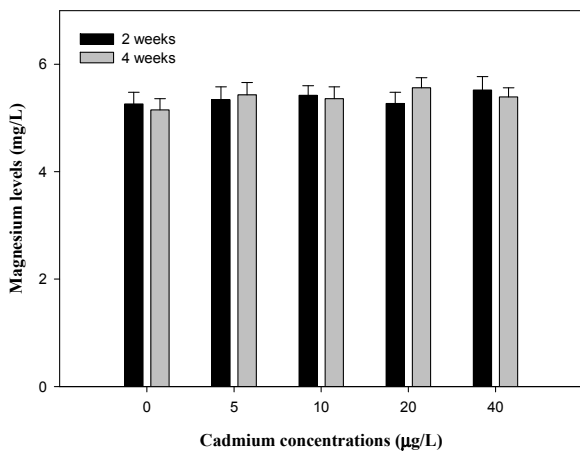


Fig. 3. Changes of inorganic components in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to various Cd concentrations for a four-week time period. Each point represents a mean value \pm S.D. of two replicates (n = 7). Values with different superscript are significantly different (P < 0.05) from control according to Duncan's multiple range test.

Fig. 4. Changes of organic components in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to various Cd concentrations for a four-week time period. Each point represents a mean value \pm S.D. of two replicates (n = 7). Values with different superscript are significantly different (P < 0.05) from control according to Duncan's multiple range test.

체표 막을 통해서나 소화관 내의 먹이 흡수에 의한 간접적인 경로를 통해 일어나고, 이런 기작은 생물에 따라 다양하게 나타난다 (Abel and Bärlocher, 1984).

어류에 있어 혈액 및 혈청학적 지표들은 다양한 스트레스에 따라 다르게 반응하여, 유해화학물질 노출에 의한 대사 장애의 수준을 판단할 수 있는 주요한 지표로 사용된다 (Shen *et al.*, 1997; Jee *et al.*, 2004). 어류의 혈액과 같은 무척추동물의 hemocyte 및 hemolymph는 개방혈관계로 선천성 면역체계의 주요 기능을 한다. 특히 pro-phenoloxidase를 매개로 하는 멜라닌 자극계가 방어 기능을 하며, 주로 hemolymph 내에서 합성되는 pro-phenoloxidase는 체내의

세균 및 기생충이나 기타 이물질에 의해서 phenoloxidase (PO) 로 활성화된다. PO는 산화효소 중 하나로 병원성 미생물 및 이물질 유입 시 방어에 필요한 멜라닌의 합성 및 상처 치유 역할을 하며 (Jonhson *et al.*, 2003), 또한 체내 활성산소 (reactive oxygen species, ROS) 를 제거하고 체외로 배설하기 위해 생체 변환을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Halliwell and Gutteridge, 1995). 무척추동물의 비특이적 면역에서 핵심적 요소인 PO는 sulpher기를 함유한 금속이나 유기용매에 의해 감소된다고 알려져 있다 (Cong *et al.*, 2005). 특히, 구리, 아연 및 칼슘과 같은 2가 양이온 금속이 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 내의 sulpher기와 결합하

카드뮴 노출에 따른 북방전복, *Haliotis discus hannai* (Ino, 1953) 의 hemolymph 및 hepatopancreas의 효소활성의 변화

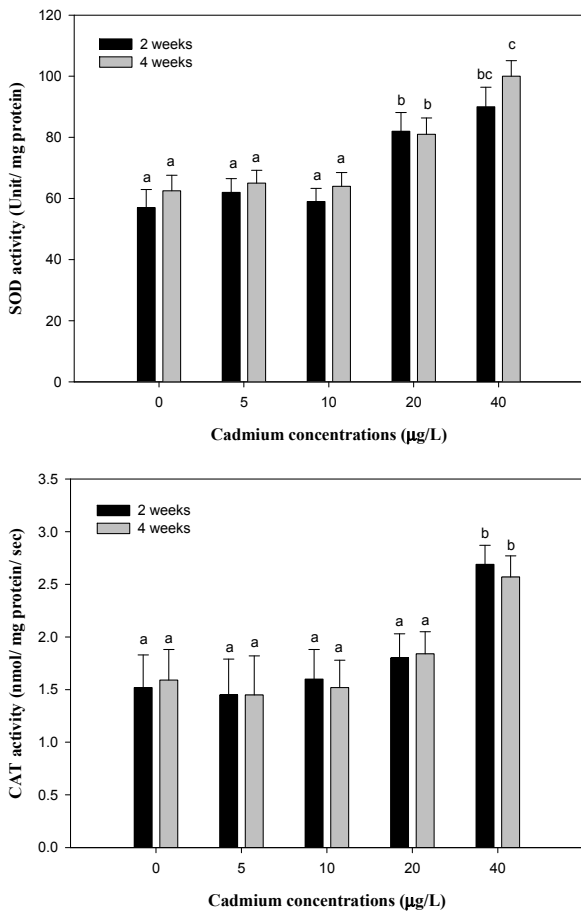


Fig. 5. Changes of antioxidant enzymes activity in hepatopancreas of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to various Cd concentrations for a four-week time period. Each point represents a mean value \pm S.D. of two replicates ($n = 7$). Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) from control according to Duncan's multiple range test.

여 PO 활성을 저해시킨다는 보고가 있다 (Cong *et al.*, 2005). Park and Kang (2012) 은 구리에 노출된 북방전복 (*H. discus hannai*) 의 PO 활성이 감소하는 경향을 보였다고 보고하였듯이, 본 연구에서는 40 µg/L Cd에 노출된 전복의 PO 활성이 유의하게 감소되어 Cd가 hemolymph PO 활성을 억제함을 확인하였다. ALP는 금속이온에 민감하게 반응하여 중금속 중독의 척도로 이용되고 있는 효소로 척추동물에서는 간이나 뼈에 주로 존재하여, 여러 간 질환에서도 증가한다 (Bogé *et al.*, 1988). 본 연구에서는 Cd 20 µg/L 이상의 농도에서 4주째에 유의한 증가가 확인되어 PO와 마찬가지로 Cd의 노출에 대한 생체 방어 기작에 따른 보인다.

어류의 혈청 효소 성분인 ALT와 AST는 일반적으로 독성물

질에 의한 간, 심장 및 근육 등의 조직 손상을 나타내는 지표로 사용된다 (Hwang *et al.*, 2013). 본 연구에서 전복의 AST와 ALT는 (Fig. 2), 바지락, *R. philippinarum*에 대해서 보고된 바와 유사하게 노출 4주째에 Cd 40 µg/L의 농도에서 유의하게 증가하였다 (Blasco and Puppo, 1999).

북방전복 (*H. discus hannai*) 의 Mg은 모든 실험구간에서 유의한 변화가 관찰되지 않았으나, Ca은 Cd 20 µg/L의 이상에서 유의한 감소를 보였다. 혈청 내 무기성분인 Mg와 Ca는 혈청 삼투압 변화에 따라서 증가하거나 감소하며 (Hur *et al.*, 2001), 특히, Cd에 노출된 어류에서는 상피세포의 막 투과성 변화 및 장관의 흡수 장애로 인해 Ca 농도가 감소한다 (Koyama and Itazawa, 1977). 따라서 본 연구에서도 어류의 혈장과 마찬가지로 hemolymph의 Ca 농도가 금속이온의 섭취 과정 중 Ca와 Cd의 상호 또는 경쟁 작용에 의해 Ca 흡수가 저해된 것으로 판단된다.

어류에서 혈청 glucose는 일반적으로 Cd 노출과 같은 스트레스를 받으면 탄수화물 대사의 증가에 따라 증가한다 (Hontela *et al.*, 1996). 수은과 납에 노출된 진주담치 (*Mytilus edulis*) hemolymph에서도 TP 및 glucose의 증가가 관찰되었다 (Abdel-Moati, 1992). 본 연구에서는 북방전복 (*H. discus hannai*) 의 TP와 glucose가 Cd 40 µg/L 농도에서 감소하였는데, 이는 Cd 노출에 따른 탄수화물의 과도한 이용에 의한 결과로 보인다 (Bhattacharyya *et al.*, 1988).

척추동물의 간과 같은 기능을 하는 무척추동물의 간체장 (hepatopancreas) 은 다양한 효소작용의 근원이 된다 (Fried and Levin, 1973). 스트레스에 의해 발생하는 활성산소 (ROS) 는 체내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시키고, 조직의 생리적 반응을 저해하기도 한다 (Moody and Hassan, 1982; Ferraris *et al.*, 2002). ROS에 대항하여 체내에서는 항산화 효소인 SOD 및 CAT를 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있다 (Wendel and Feuerstein, 1981). 이러한 항산화 효소는 Cd를 포함한 중금속 노출에 의해서 효소 활성이 증가된다고 한다 (Sugiyama, 1994). 중금속 속의 의해 발생된 ROS는 SOD에 의해 과산화수소로 변환되어 해독화가 진행되고, 전환된 과산화수소는 다시 CAT에 의해서 산소와 물로 전환된다 (Nebot *et al.*, 1993). 본 연구에서 북방전복 (*H. discus hannai*) 의 hepatopancreas SOD와 CAT가 함께 증가하는 경향을 보이는 것은 SOD에서 CAT로 이어지는 단계적인 산화스트레스에 대한 저항으로 볼 수 있다 (Fig. 5). 또한 10 mg/L Cd에 노출된 *Procambarus clarkii*의 hepatopancreas와 gill tissue에서 SOD와 CAT 활성이 증가된 바 있으며 (Hu *et al.*, 2009), 구리에 노출된 담치 (*M. edulis*) 와 전복에서 SOD의 증가가 보고된 바 있다

(Pipe *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2012). 특히 씨볼트 전복 (*Haliotis sieboldii*) 에서는 수온 자극에 의해서도 SOD의 급격한 활성 증가를 보인다고 한다 (Kim *et al.*, 2005).

이상의 결과는 20 $\mu\text{g/L}$ 이상의 Cd는 북방전복 (*H. discus hannai*) 의 스트레스 요인으로 작용하여 hemolymph 내의 생리적 변동 유발 및 hepatopancreas의 항산화 효소의 활성을 촉진하며, 이는 연안 중금속 오염에 대한 모니터링의 수단으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청 Golden Seed 프로젝트 사업에 의해 이루어진 것임

요 약

본 연구는 카드뮴 노출에 따른 북방전복, *Haliotis discus hannai*의 hemolymph 및 hepatopancreas의 효소활성에 대한 변화를 관찰하였다. 북방전복은 카드뮴 0, 5, 10, 20 및 40 $\mu\text{g/L}$ 의 농도에서 4 주간 노출시킨 결과, hemolymph의 phenoloxidase (PO) 활성은 40 $\mu\text{g/L}$ 농도에서 4주 후에 유의하게 감소하였으나, alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine aminotransferase (ALT) 활성은 40 $\mu\text{g/L}$ 농도에서 4주 후에 유의한 증가를 나타냈다. 또한 hemolymph의 칼슘 (Ca) 농도는 20 및 40 $\mu\text{g/L}$ 의 농도에서 4주 후에 유의한 감소를 나타냈다. 한편 hepatopancreas의 superoxide dismutase (SOD) 활성은 20 및 40 $\mu\text{g/L}$ 농도에서, catalase (CAT) 활성은 40 $\mu\text{g/L}$ 농도에서 2주 후에 유의한 증가를 나타냈다. 따라서 카드뮴에 노출된 북방전복 hemolymph와 hepatopancreas의 효소활성은 적어도 카드뮴 농도 40 $\mu\text{g/L}$ 에서 변동이 있을 것으로 예상되며, 이들 효소활성은 연안의 중금속 오염 모니터링의 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

Abdel-Moati, M.A.R. (1992) Biochemical and physiological responses of *Mytilus edulis* to Hg and Pb in the coastal waters of Alexandria region. Proceeding of the FAD-UNEP-IOC workshop on biological effects of pollutants in marine organisms. Athens, Greece, **69**: 61-72.

Abel, T.H. and Bärlocher, F. (1984) Effect of cadmium on aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, **48**: 245-251.

Barton, B.A. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis in the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish*

diseases, **1**: 3-26.

Bhattacharyya, M.H., Whelton, B.D., Stern, P.H. and Peterson, D.P. (1988) Cadmium accelerates bone loss in ovariectomized mice and fetal rat limb bones in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**: 8761-8765.

Blasco, J. and Puppo, J. (1999) Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Comparative biochemistry and physiology Part C: Pharmacology, toxicology & endocrinology*, **122**: 253-263.

Bogé, G., Bussiere, D. and Pérès, G. (1988) Effets du chrome hexavalent sur les fonctions de la bordure en brosse de l'intestin de la truite arc en ciel (*Salmo gairdneri* R.). *Water Research*, **22**: 441-447.

Cheng, T.C. (1981) Bivalves. In: *Invertebrate blood cell* (ed. by Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F.), London Academic Press, London. pp. 233-299.

Cong, R., Sun, W., Liu, G., Fan, T., Meng, X., Yang, L. and Zhu, L. (2005) Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, **18**: 61-70.

Courtois, E., Marques, M., Barrientos, A., Casado, S. and López-Farré, A. (2003) Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Journal of the American Society of Nephrology*, **14**: 1464-1470.

Ferraris, M., Radice, S., Catalani, P., Francolini, M., Marabini, L. and Chiesara, E. (2002) Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. *Aquatic Toxicology*, **59**: 283-296.

Firat, Ö., Çogun, H.Y., Aslanyavrusu, S. and Kargin, F. (2009) Antioxidant responses and metal accumulation in tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under Zn, Cd and Zn + Cd exposure. *Journal of Applied Toxicology*, **29**: 295-301.

Forbes, V.E. and Depledge, M.H. (1992) Cadmium effects on the carbon and energy balance of mudsnails. *Marine Biology*, **113**: 263-269.

Fried, G.H. and Levin, N.L. (1973) Enzymatic activity in hepatopancreas of *Nassarius obsoletus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **45**: 153-157.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1995) The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, **18**: 125-126.

Hontela, A., Daniel, C. and Ricard, A.C. (1996) Effects of acute and subacute exposures to cadmium on the interrenal and thyroid function in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, **35**: 171-182.

Hu, G.F., Li, Z., Liang, H.W., Wang, C.Z., Wu, Q.C., Luo, X.Z. and Zou, G.W. (2009) Effects of cadmium on SOD and CAT in hepatopancreas, antennary

카드뮴 노출에 따른 북방전복, *Haliotis discus hannai* (Ino, 1953) 의 hemolymph 및 hepatopancreas의 효소활성의 변화

- gland and gill of *Procambarus clarkii*. *Journal of Agro-Environment Science*, **28**: 1806-1811.
- Huang, X., Ke, C. and Wang, W.X. (2008) Bioaccumulation of silver, cadmium and mercury in the abalone *Haliotis diversicolor* from water and food source. *Aquaculture*, **283**: 194-202.
- Huang, X., Guo, F., Ke, C. and Wang, W.X. (2010) Response of abalone *Haliotis diversicolor* to sublethal exposure of waterborne and dietary silver and cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**: 1130-1137.
- Hur, J.W., Chang, Y.J., Lim, H.K. and Lee, B.K. (2001) Stress responses of cultured fishes elicited by water level reduction in rearing tank and fish transference during selection process. *Bulletin of the Korean Fisheries Society*, **34**: 465-472.
- Hwang, U.G., Kim, J.H. and Kang, J.C. (2013) Changes of growth and hematological constituents in the rock bream *Oplegnathus fasciatus* exposed to TBT. *Journal Fish Pathology*, **26**: 219-229.
- Jee, J.H., Kim, S.G. and Kang, J.C. (2004) Effects of phenanthrene on growth and basic physiological functions of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **304**: 123-136.
- Johnson, J.K., Rocheleau, T.A., Hillyer, J.F., Chen, C.C., Li, J. and Christensen, B.M. (2003) A potential role for phenylalanine hydroxylase in mosquito immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **33**: 345-354.
- Kim, T.H., Yang, M.H., Choe, M.K., Han, S.J. and Yeu, I.K. (2005) Physiological studies on acute water-temperature stress of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*. *Journal of Aquaculture*, **18**: 7-12.
- Kim, T.H., Kim, K.J., Choe, M.K. and Yeo, I.K. (2006) Physiological changes of juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute water temperature stress. *Journal of Aquaculture*, **19**: 77-83.
- KNSO (2011) Korea National Statistical office. Fishery production survey DB, Daejeon, Korea.
- Koyama, J. and Itazawa, Y. (1977) Effects of oral administration of cadmium on fish: I. Analytical results of the blood and bones. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **43**: 523-526.
- Liu, H., Zhang, J.F., Shen, H., Wang, X.R. and Wang, W.M. (2005) Impact of copper and its EDTA complex on the glutathione-dependent antioxidant system in freshwater fish (*Carassius auratus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **74**: 1111-1117.
- Lopes, P.A., Pinheiro, T., Santos, M.C., da Luz Mathias, M., Collares-Pereira, M.J. and Viegas-Crespo, A.M. (2001) Response of antioxidant enzymes in freshwater fish population (*Leuciscus alburnoides complex*) to inorganic pollutants exposure. *Science of the Total Environment*, **280**: 153-163.
- Mok, J.S., Lee, K.J., Shim, K.B., Lee, T.S., Song, K.C. and Kim, J.H. (2010) Contents of heavy metals in marine invertebrates from the Korean coast. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **39**: 894-901.
- Moody, C.S. and Hassan, H.M. (1982) Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proceedings of the National Academy Sciences*, **79**: 2855-2859.
- Nebot, C., Moutet, M., Huet, P., Xu, J.Z., Yadan, J.C. and Chaudiere, J. (1993) Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Analytical Biochemistry*, **214**: 442-451.
- Parihar, M.S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A.K. and Parkash, P. (1997) Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *Journal of Thermal Biology*, **22**: 151-156.
- Park, C.J., Min, B.H., Kim, K.S., Lee, J.W., Lee, J.H., Noh, J.K., Kim, H.C., Park, J.W. and Myeong, J.I. (2011) Physiological responses on low water temperature stress of Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Korean Journal of Malacology*, **27**: 317-322.
- Park, H.J. and Kang, J.C. (2012) Biochemical changes in the hemolymph and hepatopancreas of abalone *Haliotis discus hannai* exposed to copper. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **45**: 154-160.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Carissan, F.M.M. and Ramanathan, K. (1999) Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, **46**: 43-54.
- Shen, H., Zhang, Q., Xu, R. and Wang, G. (1997) Effects of petroleum on the sero-proteins of *Tilapia mossambica*. *Marine Environmental Science*, **16**: 1-5.
- Shin, Y.K., Jun, J.C., Im, J.H., Kim, D.W., Son, M.H. and Kim, E.O. (2011) Physiological response in abalone *Haliotis discus hannai* with different salinity. *Korean Journal of Malacology*, **27**: 283-289.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E. and Bagchi, M. (2000) Oxidative mechanism in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of environmental Pathology Toxicology and Oncology*, **19**: 201-213.
- Sugiyama, M. (1994) Role of cellular antioxidant in metal-induced damage. *Cell Biology and Toxicology*, **10**: 1-22.
- Wang, W., Mai, K., Zhang, W., Ai, Q., Yao, C., Li, H. and Liufu, Z. (2009) Effects of dietary copper on survival, growth and immune response of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture*, **297**: 122-127.
- Wendel, A. and Feuerstein, S. (1981) Drug-induced lipid peroxidation in mice—I Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochemical Pharmacology*, **30**: 2513-2520.
- Winston, G.W. and Di Giulio, R.T. (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms.

- Aquatic Toxicology*, **19**: 137-161.
- Wo, K.T., Lam, P.K.S. and Wu, R.S.S. (1999) A comparison of growth biomarkers for assessing sublethal effects of cadmium on a marine gastropod, *Nassarius festivus*. *Marine Pollution Bulletin*, **39**: 165-173.