

총알고둥에서 카드뮴과 아연의 축적과 제거

한수정 · 이인숙

이화여자대학교 생물과학과

적 요: 카드뮴과 아연에 각각 그리고 동시에 노출한 총알고둥(*Littorina brevicula*)에서 중금속의 생체내 축적, 제거 및 세포내 분포 양상을 조사하였다. 총알고둥을 카드뮴 400 $\mu\text{g/L}$ 또는 아연 3000 $\mu\text{g/L}$ 에 각각 90일간 노출하였을 경우, 각 중금속의 축적량은 노출기간에 따라 증가하였으며, 70일 이후에는 더 이상 축적량이 증가하지 않았다. 카드뮴과 아연을 동시에 노출하였을 경우에는 각각의 중금속에 노출하였을 경우에 비해 아연의 축적량은 증가하였으나, 카드뮴의 축적량은 감소하였다. 노출실험에 이어 수행한 42일간의 청장실험 결과, 카드뮴은 체외로 제거되지 않았으나, 아연은 제거되었다. 특히 카드뮴과 아연에 동시 노출한 총알고둥의 경우에 아연은 더 신속히 제거되었다. 총알고둥을 카드뮴과 아연에 각각 70일 동안 노출한 후, 체내로 흡수된 카드뮴의 약 60%가 soluble fraction에 분포하고 있었으며, 아연의 75%는 insoluble fraction에 분포하고 있었다. 이러한 경향은 카드뮴과 아연의 동시 노출시에도 유사하게 나타났다. 카드뮴과 아연은 soluble part내의 리간드(ligand)와의 결합 양상에서도 차이를 나타냈는데, 카드뮴은 90% 이상이 약 6.5 kDa크기의 MBP-1(Metal-Binding Protein-1)과 결합하고 있었으나, 아연은 HMW(High molecular weight fraction, >60 kDa), MBP-1, MBP-2, LMW(Low molecular weight fraction, <1 kDa)에 고루 분포하는 것으로 나타났다.

검색어: 아연, 제거, 총알고둥, 축적, 카드뮴

서론

일반적으로 해양오염을 모니터링하는 방법에는 해수를 분석하는 방법과 해저퇴적물을 분석하는 방법, 그리고 해양생물을 분석하는 방법이 있다. 해수를 분석하는 방법과 해저퇴적물을 분석하는 방법은 절대적인 오염수치를 파악하기 위해서 매우 중요하다. 그러나 최근 들어서는 해양생물을 분석하는 방법에 더 큰 관심이 모아지고 있다. 생물체를 분석하는 방법은 단순한 오염수치 뿐 아니라 생물유효성(bioavailability)까지 반영되기 때문이다(Rainbow 1995). 즉, 오염물질이 그 환경 내에 존재하는 생물체에 미치는 영향을 파악하는 것은 생태계 전체를 고려할 때 더욱 중요하다고 볼 수 있는데, 그 이유는 저차영양단계 생물에서 생물농축(bioaccumulation)된 오염물질은 고차영양단계의 생물로 생물확대(biomagnification)되고 결국은 인간에게 까지 영향을 미치게 되기 때문이다(이 1994).

해양오염 감시의 목적으로 이용하기 위한 생물종은 정착성 생물이고, 시료채취가 용이하며, 환경내의 오염물질의 농도를 잘 반영하여야 한다(이 1994, Brown and Luoma 1995). 또한 내성이 강하여 다른 생물이 폐사된 지역에서도 살아남아 오염에 대한 정보를 제공해줄 수 있어야 하며, 지역간, 국가간의 오염 정도를 비교할 수 있는 척도로 이용하기 위해서는 세계적으로 널리 분포하고 있어야 한다(Phillips and Rainbow 1988). 이때패류와 같은 연체동물들은 일생을 통해 활동범위가 거의 한 지역에 국한되면서도 중금속이나 유기 독성 화합물, 또는 방사성 물질 등을 생물농축시키므로 오염감시 목적으로 사용하기에 적

합한 것으로 알려져 있다(이 1994). 따라서 세계적으로 중금속 오염 감시를 위한 지표생물로 진주담치와 굴을 이용한 통합감시 프로그램(International Mussel Watch)이 널리 수행되고 있으며(NAS 1980, IMWC 1992), 우리나라에서도 진주담치(*Mytilus edulis*), 참굴(*Crassostrea gigas*) 및 총알고둥(*Littorina brevicula*) 등을 오염 감시에 이용하기 위한 연구가 수행되어 왔다(한국해양연구소 1982, 1989, 조 등 1988, Choi et al. 1992, 김 1996, 송 등 1997, 백과 이 1998).

그러나 중금속 오염감시목적으로 생물체를 이용하기 위한 현재까지의 연구들은 한 종류의 중금속만을 대상으로 한 연구가 주를 이루어 왔다(백과 이 1998, 박 2000, Mason 1988, Baudrimont et al. 1997). 그런데 이러한 이때패류를 중금속 혼합물에 노출하였을 경우, 중금속간에 간섭효과가 일어나 어느 특정 중금속이 그 체내로 흡수되는 다른 중금속의 유입을 저해하거나 혹은 증가시킨다는 보고들이 나오고 있다(Elliott et al. 1986, Engel 1999, Martinez et al. 1999). 해안중금속오염의 경우, 산업 폐수나 생활하수와 같은 오염물질의 혼합 상태로 중금속이 방출되며, 실제로 오염된 해수나 해저퇴적물에서도 여러 가지 중금속의 농도가 높게 나타나므로(조 등 1988, 백과 이 1998, 송 등 1997, Kang et al. 1999), 중금속 혼합물에 대한 노출실험은 한 가지 중금속에 대한 노출실험보다 실제적인 오염상황을 반영한다고 할 수 있을 것이다.

최근에는 중금속에 의해 특이적으로 유도되는 단백질인 metallothionein(MT)을 생화학적 지표로 사용하기 위한 연구에 관심이 집중되고 있다(Berger et al. 1995, Baudrimont et al.

1997, Paek *et al.* 1999, 박 2000). MT는 1957년에 처음으로 말의 피질(horse kidney cortex)에서 카드뮴결합단백질(cadmium-binding protein)로 발견되었다 (Margoshes and Vallee 1957). 이러한 metal-binding protein (MBP)은 체내의 중금속 농도 증가와 유의적인 상관관계가 있고, 중금속 노출 정도에 비례하여 MBP의 양도 증가하며, 생물체의 MBP수준이 아치사 혹은 치사 효과를 나타내기 전에 환경 오염에 대한 지표가 될 수 있다는 점 때문에 관심을 모으고 있다 (백과 이 1998, Pavicic *et al.* 1987, Paek *et al.* 1999).

그러나 이 단백질은 중금속에 따라 유도되는 정도가 다르다고 알려져 있으며 (Baudrimont *et al.* 1997), 실제로 구리와 카드뮴에 노출시킨 계의 hepatopancreas에서 분리된 CdMT-1은 각각 한 종류의 금속에 노출시켰을 때 유도되는 양이 복합 노출시킨 경우의 1/3 수준이라고 보고된 바 있다 (Brouwer *et al.* 1992). 또한 포유류에서는 중금속 결합자리에 대한 각 중금속들의 affinity가 달라 구리, 은 > 카드뮴 > 납 > 아연의 순으로 높은 친화력을 나타낸다고 알려져 있으며 (Vašák 1991), 이러한 metal-binding protein의 결합자리에 이미 결합하고 있던 금속이 다른 금속에 의해 대체되는 경우도 보고되고 있다 (Dutton *et al.* 1993, Engel 1999). 그러므로 MBP를 생화학적 지표로 이용하기 위해서는 두 가지 이상의 중금속이 존재하는 조건하에서의 MBP와 중금속의 관계에 대한 연구들이 반드시 필요하다고 하겠다.

카드뮴은 1817년에 탄산아연 속에서 발견되었으며, 전기도금, 은땀, 전선, 건전지, 사진 등에 쓰이는 청백색의 금속으로 자연에서 단독으로 존재하지 않고, 아연, 납, 구리 등에 불순물로 섞여 있다. 특히 아연 제련시 부산물로 카드뮴이 생성되며, 아연광산, 아연-납 광산, 아연-구리 광산에서 채취된다. 약 50년 전에 일본에서 발생한 '이타이 이타이'병은 납과 아연 제련 공장에서 방출된 폐수 속에 포함되어 있던 고농도의 카드뮴으로 인해 발생하였다. 이처럼 카드뮴과 아연은 밀접한 관계를 지니고 있다. 최근의 해수, 해저퇴적물 혹은 생물체 분석을 통한 보고들에 의하면, 우리나라 남해안의 진해만이나 동해안의 온산만 등 공단이나 항만지역에서 중금속 오염도가 점점 증가하고 있다 (김 1996, 백과 이 1998, 조 등 1988). 이중 카드뮴과 아연의 오염도가 크게 증가하는 경향을 보이고 있다 (백 1998).

총알고둥은 우리나라의 삼면에 고루 분포하고, 채집이 용이하며, 체내에 중금속을 고농도로 축적하면서도 생존률이 높아 중금속 오염 감시를 위한 지표생물로서 최근 관심이 집중되고 있다 (송 등 1997, 고 등 1997, 고 등 1999, Paek *et al.* 1999). 본 연구에서는 총알고둥을 카드뮴과 아연에 동시에 노출시킨 후, 카드뮴과 아연의 생체내 축적(accumulation)과 제거(elimination) 및 세포내 분포(subcellular distribution) 양상의 차이를 관찰함으로써 단독노출과 동시노출 경우의 중금속의 생물농축 전략의 차이를 파악해 보고자 하였다.

재료 및 방법

노출실험 (Exposure)

1999년 12월에 안면도(Lee *et al.* 1998)에서 채집한 총알고둥 (*Littorina brevicula*)을 중금속에 노출하였다. 대조군으로는 중금속을 첨가하지 않은 청정해수에 노출한 총알고둥을 이용하였으며, 실험군으로는 카드뮴(CdCl_2 400 $\mu\text{g/L}$), 아연(ZnSO_4 3000 $\mu\text{g/L}$)에 각각 노출한 총알고둥과 카드뮴과 아연이 모두 포함된 해수에 노출한 총알고둥을 설정하였다. 총알고둥 약 100개체를 4L의 해수에 노출하였고, 해수는 일주일에 한번씩 교체하였으며, 교체시 해수내 중금속의 농도를 일정하게 재조정해 주었다. 중금속 노출실험은 90일간 실시하였다.

청장실험 (Depuration)

청장 실험은 중금속을 첨가하지 않은 청정해수에 42일간 총알고둥을 유지시키는 조건에서 실시하였다. 청장실험시에도 해수는 일주일에 한번씩 교체하였다.

중금속 축적량 분석을 위한 시료 준비

총알고둥을 중금속에 노출한 지 0, 7, 21, 35, 70일 및 90일, 그리고 청장실험을 시작한지 42일째에 대조군 및 실험군에서 총알고둥을 20마리씩 수거하였다. 각각의 개체들을 5 mM 2-mercaptoethanol이 포함된 20 mM Tris-acetate buffer(pH 8.1)로 2회 이상 행구고, 패각을 제거한 후, 육질부를 다시 동일한 buffer를 이용하여 3회 씻어주었다. 아가미덮개를 제외한 육질부를 5 mM 2-mercaptoethanol과 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)가 포함된 20 mM Tris-acetate buffer(pH 8.1)로 균질화(homogenization)하여 중금속 함량 분석을 위해 acid digestion을 수행하였다. 노출 0, 7, 35, 70일째 시료의 경우에는 gel-filtration chromatography를 하기 위해서 homogenate의 일부를 4°C에서 100,000×g의 속도로 90분간 원심분리하였다. 원심분리후 얻어진 상등액(supernatant)을 soluble fraction이라고 명하고, 침전물(pellet)은 insoluble fraction이라 명하였다. Soluble fraction 일부와 insoluble fraction은 중금속 함량을 분석하기 위해 acid digestion을 수행하였고 soluble fraction의 나머지 일부는 gel-filtration chromatography에 사용하였다.

Gel-filtration chromatography

Gel-filtration chromatography는 Sephacryl S-100 HR column (3 × 33 cm, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)을 사용하여 실시하였다. Elution buffer는 5 mM 2-Mercaptoethanol이 포함된 20 mM Tris-acetate buffer(pH 8.1)를 사용하였으며, flow rate는 0.8 ml/min으로 조정하였다. 각 fraction은 3 mL씩 모아서 acid digestion과정 없이 직접 AAS로 중금속 함량을 측정하였고, 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. Calibration standard로는 bovine serum albumin (66 kDa), α -chymotrypsin (25 kDa), horse kidney

MT (metallothionein, 6.5 kDa), vitamin B₁₂ (1.35 kDa)를 사용하였다.

중금속 분석

총알고등의 homogenate, soluble fraction, insoluble fraction 시료를 각각 microwave용 digestion vessel에 넣고, 65% 질산 5 mL을 넣은 후, 1시간 이상 실온에서 방치하여 이산화탄소를 날려 보내고 microwave digestion system (MDS-2000, CEM, U.S.A.)을 이용하여 분해하였다 (Maccarthy and Ellis 1991). 분해된 시료를 3차증류수로 희석하여 Atomic Absorption Spectroscopy (AAS, Perkin Elmer Analyst 100, U.S.A.)로 카드뮴, 아연의 농도를 측정하였다. 중금속 축적량은 t-test를 통해 유의성을 확인하였다.

Gel-filtration chromatography로부터 얻은 각 fraction은 분해 과정 없이 직접 분석하였다. 카드뮴은 graphite furnace AAS로 분석하였고, 아연은 flame AAS로 분석하였다. 분석방법의 신뢰도는 미국 NIST(National Institute of Standard and Technology)에서 공인된 표준물질인 Standard Reference Material 1566a (oyster tissue)의 분석을 통해 확인하였다.

결과 및 고찰

카드뮴과 아연의 축적(Accumulation)과 제거(Elimination)

총알고등을 카드뮴 400 µg/L, 아연 3000 µg/L농도에 각각 단독으로 노출하였을 때, 각 중금속의 축적량은 노출기간에 따라 점차적으로 증가하여 70일 후 각각 72 µg Cd/g wet weight, 245 µg Zn/g wet weight 까지 증가하였으며, 90일이 지나도 더 이상 증가하지 않았다 (Fig. 1, 2).

카드뮴과 아연의 동시노출 실험의 경우에는 총알고등의 카드뮴 축적량은 35일이 지난 후부터 카드뮴에만 노출한 총알고

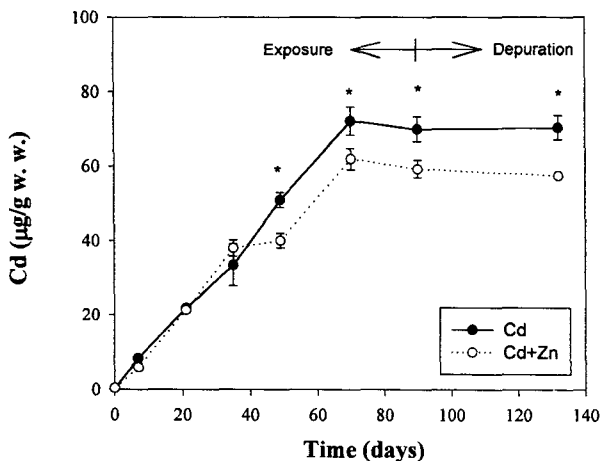


Fig. 1. Accumulation and elimination of Cd in the whole soft parts of *L. brevicula* exposed to Cd only and to the mixture of Cd and Zn. *statistically significant.

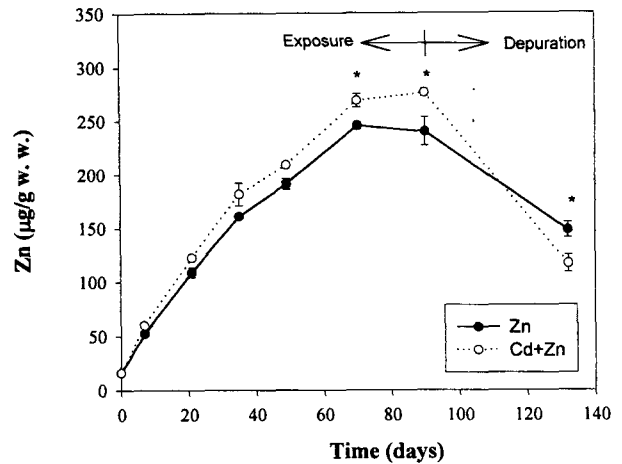


Fig. 2. Accumulation and elimination of Zn in the whole soft parts of *L. brevicula* exposed to Zn only and to the mixture of Cd and Zn. *statistically significant.

등보다 그 축적량이 감소하기 시작하였으며, 카드뮴 단독 노출 시와 마찬가지로 70일이 지나자 더 이상 증가하지 않았다. 이때의 카드뮴 축적량은 카드뮴에 단독으로 노출시켰을 경우보다 약 15% 정도 낮게 나타났다.

반면 카드뮴과 아연의 동시노출 실험에서 노출 70일 후의 아연의 축적량은 아연에만 노출한 경우보다 약 10% 정도 증가하였다. 그리고 70일이 지나자 아연 축적량이 더 이상 증가하지 않는 경향을 나타냈는데, 이러한 경향은 카드뮴 노출의 경우에서와 같았다. 즉 동시노출 결과, 카드뮴은 아연의 축적량을 증가시키고, 아연은 카드뮴 축적량을 감소시키는 것으로 나타났다. 이때패류인 *Mytilus edulis*를 카드뮴과 아연에 동시 노출한 실험(Elliott et al. 1986)에서 중금속 축적경향은 본 실험과 같은 결과가 보고된 바 있다. 쥐의 간세포, 그리고 돼지의 신장에서 분리한 LLC-PK₁ 세포 등에서 카드뮴의 세포 내로의 흡수는 carrier-mediated transport에 의해서 이루어진다고 알려졌으며 (Stacey and Klaassen 1980, Endo et al. 1995), 필수금속인 아연도 carrier-mediated transport에 의해 세포 내로 흡수된다고 알려져 있다 (Tacnet et al. 1990, Bobilya et al. 1992). 또한 Tacnet 등 (1990)과 Bobilya 등(1992)은 아연과 카드뮴은 transport site에 대해서 비슷한 affinity를 가진다고 보고하였다. 또 Endo 등(1996)도 돼지의 신장으로부터 분리된 LLC-PK₁ 세포를 카드뮴과 아연에 동시 노출한 결과 카드뮴 축적량이 감소하였다고 보고하였으며, kinetic analysis를 통해서 카드뮴과 아연은 경쟁적 저해 관계에 있다고 제안한 바 있다. 총알고등에서도 아연은 카드뮴의 축적량을 감소시키는 것으로 나타났으므로, transport system 상에서 카드뮴과 아연이 경쟁하여 아연이 카드뮴의 흡수를 감소시키는 기작을 추정해 볼 수 있다.

노출실험에 이어 청장(depuration)실험을 수행한 결과, 총알고등의 체내에 축적된 카드뮴은 42일 동안에는 체외로 제거되

지 않았다. 동시노출한 경우에도 42일 동안에는 체내의 카드뮴은 제거되지 않았다. 그러나 아연에 대해서도 같은 기간 동안 청장실험을 한 결과, 단독노출과 동시노출 실험에서 아연은 체외로 제거되었으며, 특히 카드뮴과 동시노출한 경우에 더 빠른 속도로 제거되었다. 즉 아연은 카드뮴의 제거에 별다른 영향을 미치지 않지만, 카드뮴은 아연을 더 빠른 속도로 제거되도록 하는 것으로 나타났다.

청장실험을 통해서 일단 총알고둥의 체내로 흡수된 카드뮴은 체외로 쉽게 제거되지 않는 것을 알 수 있었다. Engel(1999)의 *Crassostrea virginica* 실험에서도 본 실험과 같은 결과가 보고되었으며, *M. edulis*의 경우에도 체내에 축적된 카드뮴의 제거속도는 축적속도에 비해서 18배나 느리다고 보고된 바 있다 (George and Coombs 1977). 또한 Suzuki 등(1990)은 쥐의 간세포를 카드뮴에 노출한 이후 아연의 함량이 감소하였다고 하였으며, 비필수금속인 카드뮴의 influx나 efflux에 대한 조절기작은 나타나지 않았으나, 필수금속인 아연의 efflux가 조절되는 양상을 보였다고 보고하였다. 총알고둥을 카드뮴과 아연에 노출한 본 실험에서도 체내로 흡수된 카드뮴은 체외로 제거되지 않고, 아연만이 제거되었으므로 총알고둥의 체내에서도 아연의 efflux만이 조절되는 이와 유사한 기작이 일어나고 있는 것으로 추정된다. 또한 한번 총알고둥의 체내로 흡수된 카드뮴이 체외로 제거되지 않는 특징은 과거 카드뮴 오염의 역사를 알려줄 수 있는 지표로서의 역할도 할 수 있을 것으로 기대된다.

카드뮴과 아연의 세포내 분포 (cytosolic partitioning)

총알고둥을 카드뮴과 아연에 노출하였을 때, 카드뮴과 아연의 세포내 분포는 서로 반대되는 경향을 나타냈다. 총알고둥을 카드뮴과 아연에 각각 70일 동안 노출한 후, 체내로 흡수된 카드뮴은 soluble fraction과 insoluble fraction에 약 60%와 40%의 비율로 분포하였으며, 아연은 약 25%와 75%의 비율로 분포하였다 (Fig. 3).

카드뮴에 노출한 총알고둥에서는 노출기간이 길어짐에 따라 70일 이후에는 흡수된 카드뮴의 약 60% 정도가 soluble fraction으로 분포하였으며, 이러한 경향은 카드뮴과 아연의 동시노출 시에도 비슷하게 나타났다. 노출실험을 거치는 동안에 총알고둥은 카드뮴은 체내에 축적하면서도 치사한 개체는 없었고, 또 체내에 축적된 카드뮴 중 더 많은 양이 soluble fraction으로 partitioning되었으므로, 카드뮴의 무독화기작(detoxification mechanism)에서 soluble fraction이 더 큰 역할을 담당할 것으로 사료된다.

카드뮴의 세포 내 분포 양상은 *Littorina littorea*에서도 이와 유사하게 보고되었다 (Langston and Zhou 1987, Bebianno and Langston 1998). 카드뮴과 같은 비필수금속은 세포 내로 흡수된 이후 필수금속 대신 효소와 결합하여 효소 활성을 억제하거나 세포막의 리간드(ligand) 등과 결합하여 독성효과를 나타내므로 (Simkiss et al. 1982), 척추동물을 비롯한 무척추동물에서 무독화 기작이 발달되어 있다고 알려져 있다. 그 중 대표적인 기작

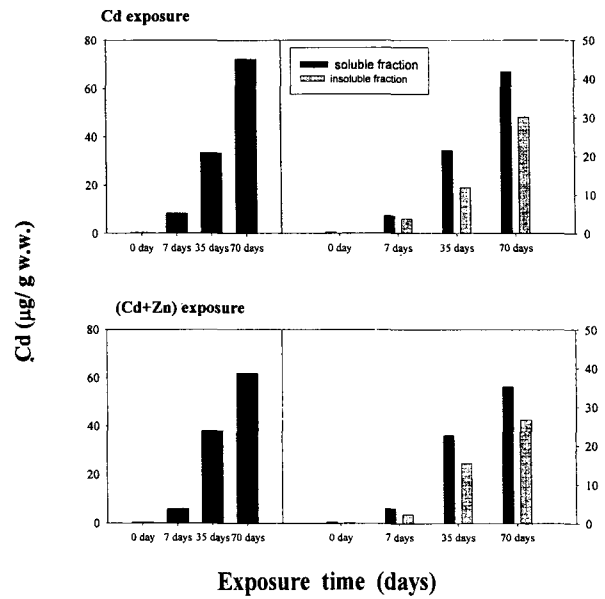


Fig. 3. Distribution of Cd in soluble fraction and insoluble fraction of *L. brevicula* exposed to Cd only and to the mixture of Cd and Zn.

은 세포질 내에 존재하거나 혹은 중금속에 의해 유도된 단백질이 세포 내로 들어온 카드뮴과 결합하여 무독화시키는 기작이다. 이 단백질은 metallothionein이라는 분자량이 작은(6.5 kDa) 금속 결합 단백질(metal-binding protein)로, 말의 신장에서 처음 발견되었고 (Margoshes and Vallee 1957), 척추동물을 비롯한 무척추동물에서도 발견되며 (Roesijadi and Klerks 1989, Bebianno and Langston 1991, Berger et al. 1995), 효모, 식물 등에서도 유사한 기능을 수행하는 리간드(ligand)가 보고된 바 있다 (Grill et al. 1985, Sanita di Toppi and Gabrielli 1999, Hayashi et al. 1986). 이 단백질은 카드뮴, 수은, 은과 같은 금속에 대해 큰 결합력을 지니기 때문에 (Dutton et al. 1993), 세포 내로 이러한 비필수금속들이 유입될 경우, 세포내의 다른 구조물과 결합하여 나타날 수 있는 기능장애를 방지한다고 알려져 있다 (Hammer 1986).

아연에 노출한 경우에는 노출기간이 길어짐에 따라 70일 이후에 흡수된 아연의 약 75%가 insoluble fraction에 분포하였으며, 동시노출한 경우에도 이와 유사했다 (77%). 세포 내로 흡수된 아연은 주로 insoluble fraction과 결합하는 것으로 나타났는데, 이매패류인 *Ruditapes decussatus*에서도 이러한 경향이 보고된 바 있다 (Roméo and Gnassia-Barelli 1995). 아연 단독노출 70일째, 동시노출 35일째, 동시노출 70일째의 soluble fraction 내의 아연 함량은 거의 유사하게 나타났다. 즉, soluble fraction내의 아연 결합 pool은 단독노출한 경우에는 70일째에, 동시노출한 경우에는 35일째에 포화된 것으로 보인다. Insoluble fraction의 경우를 살펴보면, 단독노출과 동시노출 실험 35일째부터 아연의 함량이 급격하게 증가하기 시작하므로, 아연은 soluble fra-

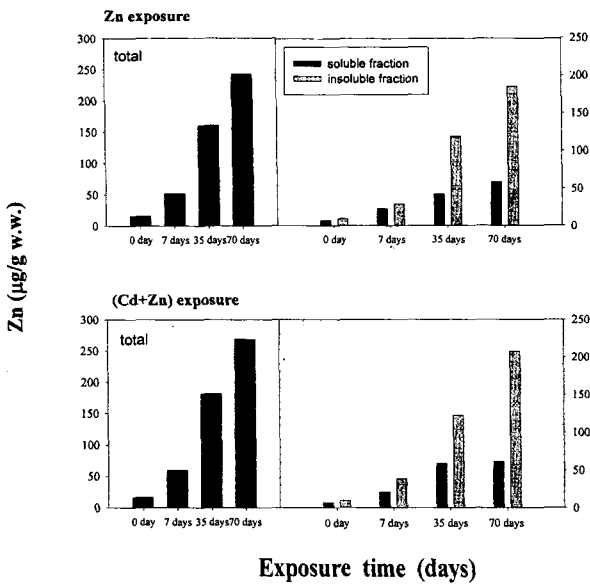


Fig. 4. Distribution of Zn in soluble fraction and insoluble fraction of *L. brevicula* exposed to Zn only and to the mixture of Cd and Zn.

ction 내의 아연 결합 pool이 먼저 포화되고, 그 후에 insoluble fraction 내의 아연 결합 pool에서의 아연 함량이 증가하는 것으로 생각된다. 아연은 체내에 축적된 아연의 대부분이 insoluble fraction으로 partitioning되었으므로, 이 경우에는 과량의 아연에 대한 무독화기작(detoxification mechanism)이 주로 insoluble fraction과 관련되어 있을 것으로 추정된다.

Gel-filtration chromatography

각 중금속과 결합한 리간드(ligand)의 분포양상을 파악하기 위해서 Gel-filtration chromatography (Sephacryl S-100)수행한 결과는 Fig. 5, 6과 같다. 카드뮴과 아연의 리간드와의 결합 양상은 다르게 나타났는데, 카드뮴의 대부분은 약 6.5 kDa크기의 MBP-1(Metal-Binding Protein-1)과 결합하고 있었으며, 아연은 HMW(High molecular weight fraction, >60 kDa), MBP-1, MBP-2, LMW(Low molecular weight fraction, <1 kDa)에 고루 분포하는 것으로 나타났다.

카드뮴에 노출한 후 7, 35, 70일째에 gel-filtration chromatography를 통해 각 fraction의 중금속 함량을 분석한 결과, 두 개의 카드뮴 peak가 나타났다. 대조구의 chromatogram에서는 나타나지 않았던 peak, MBP-1과 MBP-2, 가 나타난 것은 세포 내로 흡수된 카드뮴이 새로운 리간드의 합성을 유도하였거나 혹은 존재하고 있는 리간드와 결합하였기 때문인 것으로 생각된다. 그 중에서 MBP-1은 horse kidney MT(metallothionein)와 유사한 분자량을 갖는 약 6.5 kDa크기의 리간드이며, MBP-2는 약 5 kDa 크기의 리간드였다. 그러나 이중에서도 90% 이상의 카드뮴이 MBP-1과 결합하고 있었다. 그러므로 soluble fraction으로

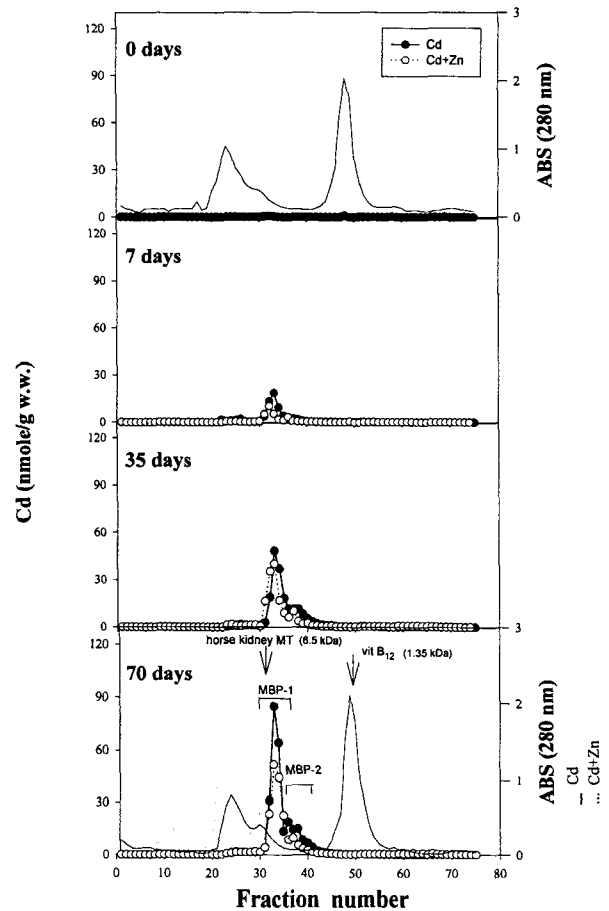


Fig. 5. Elution profiles of Sephacryl S-100 gel filtration chromatography of soluble fraction of *L. brevicula* exposed to Cd only and to the mixture of Cd and Zn.

partitioning 된 카드뮴의 무독화기작에서 MBP-1이 큰 역할을 할 것으로 기대된다.

그런데 동시노출 실험 결과, 이 MBP-1과 결합하는 카드뮴의 몰수가 감소하였다. 이것은 MBP-1이 카드뮴과 아연에 모두 affinity를 가지기 때문에, soluble fraction 내로 partitioning된 아연과의 경쟁에 의해 감소한 것으로 추정해 볼 수 있다. 동시노출시의 아연의 chromatogram과 비교해 보면, 35일째에 MBP-1과 결합한 아연의 몰수는 아연 단독 노출시보다 증가하는 것을 볼 수 있다.

또한 아연에 노출한 후에는 아연과 결합하는 4개의 리간드가 나타나는데, HMW (>60 kDa), MBP-1 (6.5 kDa), MBP-2 (5 kDa) 과 LMW (<1 kDa), 아연은 이들 4개의 리간드에 고루 분포하는 경향을 나타냈다. 각 리간드가 아연과 결합하는 비율을 살펴보면, 노출 0일째에는 soluble fraction 내의 아연은 HMW, MBP-1 과 결합하고 있지만, 노출기간이 길어짐에 따라 점점 LMW과 MBP-2와 결합하는 아연양이 증가하는 경향을 관찰할

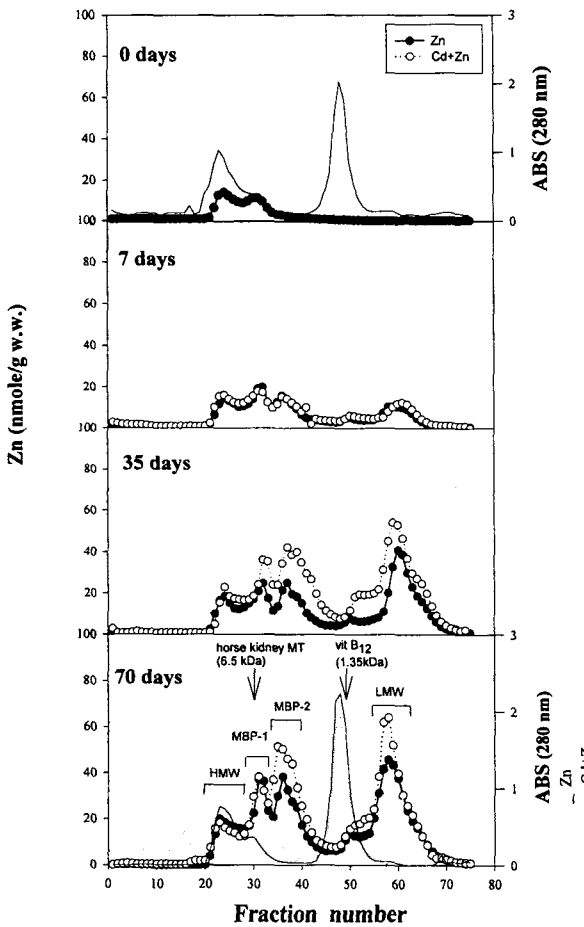


Fig. 6. Elution profiles of Sephacryl S-100 gel filtration chromatography of soluble fraction of *L. brevicula* exposed to Zn only and to the mixture of Cd and Zn.

수 있다. 이러한 경향은 아연에 단독노출한 경우와 카드뮴과 동시노출한 경우에 공통적으로 나타났다.

HMW와 MBP-1은 노출하지 않은 상태, 즉 0일째의 chromatogram에서도 나타나는 것으로 보아 항상성 조절을 위한 기작과 관련된 리간드일 것으로 추정된다. 특히 HMW는 장기간의 노출을 하더라도 아연의 함량이 거의 증가하지 않았고, 동시노출시에도 단독노출한 경우와 거의 차이가 없었으므로, 일정 수준의 아연만을 포함하도록 하는 조절기작을 지니는 리간드로 추정된다. MBP-1은 아연 노출기간이 길어짐에 따라 아연 함량이 증가하기는 하지만, 동시노출 35일째와 단독노출 70일째, 동시노출 70일째에 이 리간드와 결합한 아연의 몰수가 거의 같기 때문에, 카드뮴과 아연에 동시노출된 경우에는 35일째에, 그리고 아연에 단독노출된 경우에는 70일째에 아연 결합 pool이 포화되는 것으로 생각된다. 즉, MBP-1의 아연 결합 pool은 아연 단독노출시보다는 카드뮴과 아연 동시노출시 더 빨리 포화되는 것으로 나타났다.

총알고등을 아연에 노출하였을 때, Gel-filtration chromatogram 상에 새로이 나타나는 MBP-2는 체내로 흡수된 아연에 의해 새로이 유도된 리간드이거나, 혹은 이미 존재하고있는 리간드이면서 과량으로 존재하는 아연에 대해 scavenger 역할을 하는 리간드일 것으로 추정된다. 노출기간이 길어짐에 따라 MBP-2가 포함하는 아연의 몰수는 증가하고 있으며, 동시노출한 경우에 더 크게 증가하는 것을 볼 수 있다. 이는 동시노출시 아연 축적량이 증가함에 따라 soluble fraction내에 증가한 아연을 MBP-2가 수용하는 것으로 생각된다. MBP-1과는 달리 MBP-2에서는 계속적으로 노출 70일째까지 아연의 함량이 증가하고 있다. 또한 MBP-2는 아연에 노출된 후에 peak이 나타나며, 노출기간이 지남에 따라 MBP-2와 결합하는 아연의 양이 증가하는 경향을 나타내었으므로 아연에 대한 생화학적 지표로서의 가능성이 기대되며, 그러한 가능성을 확인하기 위해서는 농도구배에 따른 단백질 유도 수준에 대해 더 깊은 연구가 필요하다 하겠다.

LMW는 크기가 1 kDa 이하인 것으로 보아 중금속과 결합력이 있는 glutathione이나 작은 펩티드일 것으로 생각된다. 이전 연구들에 의하면 무척추동물에서 아연은 high molecular weight ligand 혹은 1 kDa 이하이거나 1~3 kDa 정도의 low molecular weight ligand에 결합하는 것으로 알려졌다. Lobel(1989)에 의해 mussel (*M. edulis*)은 아연에 노출되었을 때 molecular weight 700 이상의 Zn-binding ligand를 유도하는 것으로 밝혀졌으며, Dallinger 등(1993)에 의해 (snail *Helix pomatia*)을 아연에 노출하였을 때 hepatopancreas에서 3 kDa 정도의 Zn-binding ligand가 유도되는 것으로 보고되었다.

총알고등의 MBP-1은 노출기간이 지남에 따라 카드뮴 함량이 증가하였고, 또 이전의 연구에 의하면 카드뮴의 농도에 비례하여 MBP가 증가한다는 사실이 밝혀졌기 때문에 (백 1998), 카드뮴에 대한 생화학적 지표로서의 가능성이 높다 하겠다. 다른 연체동물에서도 카드뮴에 의해 유도되는 MBP가 다수 보고되었는데, *L. littorea* (Langston and Zhou 1986), *M. edulis* (Bebiano and Langston 1991), *C. virginica* (Roesijadi and Klerks 1989)에서도 metallothionein과 유사한 특징과 분자량을 갖는 카드뮴 결합 리간드가 보고되었으며 카드뮴 오염에 대한 생화학적 지표로서의 가능성이 있다고 확인되었다. 또한 MBP-2는 카드뮴 보다 아연과 큰 결합능력을 지니는 것으로 확인되었다. MBP-2는 카드뮴과 아연 동시노출시에 아연을 더 높은 농도로 수용하였다. 그리고 장기간의 아연 노출실험과 카드뮴과의 동시노출실험에서도 노출기간이 길어짐에 따라 MBP-2와 결합하는 아연의 양이 증가하는 경향을 나타내어 아연 오염에 대한 생화학적 지표로서의 가능성이 기대되며, 그러한 가능성을 확인하기 위한 더 깊은 연구가 필요하다고 하겠다.

인용문헌

고철환, 강성길, 오인숙, 정경수. 1999. 총알고등(*Littorina brevi-*

- cula*) 체내 중금속 농도에 따른 온산만 중금속 오염평가. 서울대학교 "연안 저서환경 건강평가 기술"에서. 환경부. 서울. pp. 328-349.
- 고철환, 강성길, 최만식. 1997. 총알고둥(*Littorina brevicula*)을 이용한 전국 연안역 중금속 오염의 평가. 서울대학교 "연안 저서환경 건강평가 기술". 환경부. 서울. pp. 238-264.
- 김은정. 1996. Contamination assessment and bioavailability of heavy metals in the Chinhae Bay System, Korea. 이화여자대학교 대학원 석사학위논문.
- 박진성. 2000. 아시아산 고둥인 총알고둥(*Littorina brevicula*)에서의 Metallothionein의 분리와 정제. 이화여자대학교 대학원 석사학위논문.
- 백수민. 1998. 온산연안에 서식하는 패류의 중금속 생물농축에 관한 연구. 이화여자대학교 대학원 석사학위논문.
- 백수민, 이인숙. 1998. 온산연안에 서식하는 진주담치(*Mytilus edulis*)의 중금속 생물농축에 관한 연구. 한국생태학회지 21: 217-224.
- 송미연, 최병래, 박경숙, 이인숙. 1997. 온산만의 퇴적물과 총알고둥(*Littorina brevicula*)내 중금속의 분포. 한국생태학회지 20: 51-60.
- 이수형. 1994. 이매패류를 지표종으로 이용한 해양환경오염연구. 한국패류학회지 10: 24-40.
- 조현서, 박청길, 변종률. 1988. 온산연안해역의 중금속 오염에 관한 연구. 수질보전학회지 4: 31-40.
- 한국해양연구소. 1982. 생태계내에 있어서 오염물질의 이동체계에 대한 연구. BSPE 00032-60-4. 77 p.
- 한국해양연구소. 1989. 연안환경보전기술개발연구. BSPG 000 83-242-4.
- Baudrimont, M., J. Metivaud, R. Maury-Brachet, F. Ribeyre and A. Boudou. 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. Environmental Toxicology and Chemistry 16: 2096-2105.
- Bebiano, M.J. and W.J. Langston. 1991. Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. Marine Biology 108: 91-96.
- Bebiano, M.J. and W.J. Langston. 1998. Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*. Talanta 46: 301-313.
- Berger, B., R. Dallinger and A. Thomaser. 1995. Quantification of metallothionein as a biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropod. Environmental Toxicology and Chemistry 14: 781-791.
- Bobilya, D., M. Briske-Anderson and P.G. Reeves. 1992. Zinc transport into endothelial cells is a facilitated process. Journal of Cellular Physiology 151: 1-7.
- Brouwer, M., D. Schlenk, H.A. Ringwood and T. Brouwer-Hoexum. 1992. Metal-specific induction of metallothionein isoforms in the blue crab *Callinectes sapidus* in response to single- and mixed metal exposure. Archives of Biochemistry and Biophysics 294: 461-468.
- Brown C.L. and S.N. Luoma. 1995. Use of the euryhaline bivalve *Potamocorbula amurensis* as a biosentinel species to assess trace metal concentration in San Francisco Bay. Marine Ecology Progress Series 12: 129-142.
- Choi, H.G., J.S. Park and P.Y. Lee. 1992. Studies on the heavy metal concentration in mussel and oyster from the Korean coastal water. Bull. Korean Fish. Soc. 25: 485-494.
- Dallinger, R., B. Berger, P.E. Hunziker, N. Bircler, C.R. Hauer and J.H.R. Kagi. 1993. Purification and primary structure of snail metallothionein. European Journal of Biochemistry 216: 739-746.
- Dutton, M.D., M. Stephenson and J.F. Klaverkamp. 1993. A mercury saturation assay for measuring metallothionein in fish. Environmental Toxicology and Chemistry 12: 1193-1202.
- Elliott, N.G., R. Swain and D.A. Rits. 1986. Metal interaction during accumulation by the mussel *Mytilus edulis planulatus*. Marine Biology 93: 395-399.
- Endo, T., O. Kimura, M. Sasaya, M. Takada and M. Sakata. 1995. Na⁺ and energy-dependent transport of cadmium into LLC-PK₁ cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin 18: 1689-1693.
- Engel, D.W. 1999. Accumulation and cytosolic partitioning of metals in the American oyster *Crassostrea virginica*. Marine Environmental Research 47: 89-102.
- George, S.G. and T.L. Coomb. 1977. The effect of chelating agents on the uptake and accumulation of cadmium *Mytilus edulis*. Marine Biology 39: 261-268.
- Grill, E., E.-L. Winnacker and M.H. Zenk. 1985. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. Science 230: 674-676.
- Hammer, D.H. 1986. Metallothionein. Annual Review of Biochemistry 55: 913-951.
- Hayashi, Y., C.W. Nakagawa and A. Murasugi. 1986. Unique properties of Cd-binding peptides induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. Environmental Health Perspectives 65: 13-19.
- IMWC. 1992. The international mussel watch. The International Mussel Watch Committee. 122 p.
- Kang, S.G., M.S. Choi, I.S. Oh, D.A. Wright and C.H. Koh. 1999. Assessment of metal pollution in Onsan Bay, Korea using Asian periwinkle *Littorina brevicula* as a biomonitor. The

- Science of Total Environment 234: 127-137.
- Langston, W.J. and M. Zhou. 1986. Evaluation of the significance of metal-binding proteins in the gastropod *Littorina littorea*. Marine Biology 92: 505-515.
- Langston, W.J. and M. Zhou. 1987. Cadmium accumulation, distribution and metabolism in the gastropod *Littorina littorea*: The role of metal-binding proteins. Journal of Marine Biological Association of U.K. 67: 585-601.
- Lee, K.W., H.S. Kang and S.H. Lee. 1998. Trace elements in the Korean coastal environment. The Science of the Total Environment 214: 11-19.
- Lobel, P.B. 1989. The effect of dithiothreitol on the subcellular distribution of zinc in the cytosol of mussel kidney (*Mytilus edulis*): Isolation of metallothionein and a unique low molecular weight zinc-binding ligand. Comparative Biochemistry and Physiology 92C: 189-192.
- Maccarty, H.T. and P.C. Ellis. 1991. Comparison of microwave digestion for analysis of Pb, Cd, Cr, Co and Zn in the shellfish by flame AAS. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 74: 566-569.
- Margoshes, M. and B.L. Vallee. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. Journal of American Chemical Society 79: 4813-4818.
- Martinez, M., J.D. Ramo, A. Torreblanca and J. Diaz-Mayans. 1999. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. Aquaculture 172: 315-325.
- Mason, A.Z. 1988. The kinetics of zinc accumulation by the marine prosobranch gastropod *Littorina littorea*. Marine Environmental Research 24: 135-139.
- NAS. 1980. The international mussel watch. National Academy of Science. Washington D.C. 248 p.
- Paek, S.M., S. Chung and I.S. Lee. 1999. Level of heavy metals in the Onsan Bay in Korea and involvement of metal binding protein in the accumulation of cadmium in *Littorina brevicula*. Korean J. Ecol. 22: 95-100.
- Pavicic, J., M. Skreblin, B. Raspor and M. Branica. 1987. Metal pollution assessment of the marine environment by determination of metal-binding proteins in *Mytilus* sp. Marine Chemistry 22: 235-248.
- Phillips, D.J.H. and P.S. Rainbow. 1988. Barnacles and mussels as biomonitors of trace elements : A comparative study. Marine Ecology Progress Series 49: 83-93.
- Rainbow, P.S. 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. Marine Pollution Bulletin 31: 183-192.
- Roesijadi, G. and P.L. Klerks. 1989. Kinetic analysis of cadmium binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. The Journal of Experimental Zoology 251: 1-12.
- Romeo, M. and M. Gnassia-Barelli. 1995. Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper or zinc. Comparative Biochemistry and Physiology 111C: 457-463.
- Sanita di Toppi, L. and R. Gabbrielli. 1999. Review: Response to cadmium in higher plant. Environmental and Experimental Botany 41: 105-130.
- Simkiss, K., M. Taylor and A.Z. Mason. 1982. Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. Marine Biology Letters 3: 187-201.
- Stacey, N.H. and C.D. Klaassen. 1980. Cadmium uptake by isolated rat hepatocyte. Toxicology and Applied Pharmacology 55: 448-455.
- Suzuki, K.T., S. Kawahara, H. Sunaga and N. Shimojo. 1990. Efflux of endogenous zinc liberated from metallothionein and alcohol dehydrogenase in the liver by replacement with cadmium. Toxicology and Applied Pharmacology 105: 413-421.
- Tacnet, F., D.W. Watkins and P. Ripoche. 1990. Studies of zinc transport into brush-border membrane vesicles isolated from pig small intestine. Biochimica et Biophysica Acta 1024: 323-330.
- Vašák, M. 1991. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. In J.F. Riordan and B.L. Vallee (eds.). Methods in Enzymology vol. 205. Metallobiochemistry, Part B. Academic Press, Inc. San Diego. pp. 452-458.

(2000년 8월 29일 접수; 2000년 11월 29일 채택)

Accumulation and Elimination of Cadmium and Zinc in *Littorina brevicula*

Han, Soo-Jeong and In-Sook Lee

Department of Biological Science, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

ABSTRACT: Accumulation, elimination and subcellular distribution of heavy metals in *Littorina brevicula* exposed to cadmium and zinc separately and concurrently were investigated. When the winkles had been exposed to 400 μ g/L CdCl₂ and 3000 μ g/L ZnSO₄ separately for 90 days, each of the metal body burden in the whole soft parts increased in proportion to time of exposure until 70 days. But it didn't increase after 70 days. But when the winkles had been exposed to cadmium and zinc simultaneously, cadmium body burden decreased but zinc body burden increased as compared to the winkles exposed to each of the metal. We also found that cadmium accumulated in the winkles was not depurated for 42 days, but zinc accumulated in them was depurated. Especially, zinc was depurated faster when they had been exposed to mixture of cadmium and zinc. After the winkles had been exposed to cadmium and zinc separately for 70 days, about 60% cadmium of the total body burden was associated with the soluble fraction, while about 75% zinc of the total body burden was associated with insoluble fraction. And these trends of metal partitioning did not alter when the winkles had been exposed to metal mixture. After the soluble fraction applied to gel-filtration chromatography column, the distribution patterns of cadmium and zinc associated with proteins or ligands were different each other. Most of cadmium (>90%) in the soluble fraction was bound to MBP-1 (Metal-binding protein-1, about 6.5 kDa), while zinc was distributed evenly to HMW (High molecular weight fraction, >60 kDa), MBP-1, MBP-2 (about 5 kDa), LMW (Low molecular weight fraction, <1 kDa).

Key words; Accumulation, Cadmium, Elimination, *Littorina brevicula*, Zinc
