

## Single-cell Gel Electrophoresis Assay에 의한 대합에서의 *In Vivo* 유전독성 평가

김일용<sup>1</sup> · 현창기<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>한동대학교 대학원 생명과학과, <sup>2</sup>생명식품과학부

## Use of the *In Vivo* Single-cell Gel Electrophoresis Assay for Evaluating Genotoxicity in Clam

Il-Yong Kim<sup>1</sup> and Chang-Kee Hyun<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Life Science,

<sup>2</sup>School of Life and Food Sciences, Handong University, Kyungbuk 791-708, Korea

Received July 2, 2004; Accepted August 26, 2004

**ABSTRACT.** The suitability of the single cell gel electrophoresis (SCGE) assay as a test for the monitoring of genotoxicity of aquatic environment was evaluated. The SCGE assay was employed to detect DNA damage induced in clam (*Spisula sachalinensis*) exposed to a direct mutagen, *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) or an indirect mutagen, benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P). The cells of gill and digestive glands were isolated from clam by homogenization, which was the optimized cell dissociation method, and the level of DNA damage was assessed and expressed as mean tail length. In the gill cells, significant dose- and time-dependent increase was observed in the mean tail length at the concentration from 0.01 to 0.5 ppm MNNG for 96 h. The linear correlation between relative damage index (RDI) values was suggested to provide criteria of genotoxicity monitoring for direct acting mutagen. The dose- and time-dependent responses of the digestive glands cells were less sensitive than those of the gill cells. In contrast, the genotoxic response resulting from the exposure of 0.01~1.0 ppm B[*a*]P to clam revealed a higher sensitivity in the digestive glands cells than the gill cells. The comparison between the time profiles of genotoxic responses in clam and carp, the latter had been obtained in our previous study, indicated that the metabolism of genotoxic compounds in the two aquatic organisms were quite different each other. We conclude that the SCGE assay has the potential as a screening test for routine genotoxicity monitoring of aquatic organisms because of its higher sensitivity and simplicity.

**Keywords:** Genotoxicity, SCGE assay, Clam, MNNG, Benzo[*a*]pyrene.

### 서 론

수 환경의 변이원성 물질에 의한 오염으로 인해 수중 생물체가 받는 스트레스 중 일차적인 관심은 염색체 이상 유발성(clastogenicity)이다. 변이원들은 수중 생물체에 DNA 가닥절단(strand breaks) 및 가교형성(crosslinks),

염기 변형 등의 DNA 손상을 일으킴으로써 수중 생태계의 불안정화를 야기하게 된다(Nunn *et al.*, 1996). 이러한 수 환경에서의 유전독성에 대한 위해성 평가를 위해 소핵 검사법(micronucleus test), 자매 염색분체 교환(sister chromatid exchange), 염색체 이상 검사법(chromosome aberration test) 등의 시험방법들이 사용되어 왔다. 그러나 이들 방법들은 원래 포유동물 세포에 대한 유전독성 연구를 기반으로 하여 개발되었기 때문에 수중 생물에서의 염색체 이상 유발성에 대한 시험에는 적합하지 않은 측면이 있다(AI-Sabti and Metcalfe, 1995). 특히 자매

Correspondence to: Chang-Kee Hyun, School of Life and Food Sciences, Handong University, Pohang, Kyungbuk 791-708, Korea  
E-mail: ckhyun@handong.edu

염색분체 교환법과 염색체 이상 검사법 등과 같이 세포 분열 중기(metaphase)에 관찰하는 방법들은 중기의 염색체 이상을 관찰하기 어려운 수중 생물에서는 이용되기 어렵기 때문에(Hoofman and Raat, 1982), 후기(anaphase)의 염색체 이상을 관찰하는 소핵 검사법의 적용을 주로 시도해 왔다(Kirsh-Volders *et al.*, 2003). 최근에는 소핵 검사법처럼 활발하지는 않았지만 단일세포전기영동분석법(single cell gel electrophoresis, SCGE 또는 'comet' assay)을 수중 생물에서의 DNA 손상도 측정에 활용하는 시도가 이루어져왔다(Lee and Steinert, 2003). SCGE assay는 고정화된 염색체 DNA의 전기영동에 의한 이동현상을 관찰함으로써 DNA 가닥절단 및 알칼리에 민감한 부위(alkali labile sites)의 정도를 측정하는 방법으로서(Singh *et al.*, 1988), 시험하고자 하는 조직의 종류에 제한이 없고 여러 형태의 DNA 손상을 측정해낼 수 있으며 단일 세포 수준에서의 결과를 얻을 수 있는 등의 장점을 가지고 있기 때문에(Hartmann *et al.*, 2003) 최근 다양한 유전독성 관련 분야에 응용되고 있다(Rojas *et al.*, 1999). 최근 10여년 동안, 수 환경에서의 유전독성 측정을 위해 다양한 어패류 생물종에 대하여 SCGE assay를 응용하는 연구도 활발하게 진행되어 왔다(Mitchelmore and Chipman, 1998; Lee and Steinert, 2003). 하지만 이 연구들은 특정한 변이원 물질이 어패류 시험동물에서 유전독성을 유발시키는 정도를 확인하거나 특정 오염지역의 어패류에서의 유전독성 상태를 측정하는 내용이 대부분을 차지하고 있다. 다시 말해서 각 연구들은 시험에 사용한 조직, 조직으로부터의 세포분리방법, 측정된 결과의 유전독성 판별 기준 등에 있어 서로 다른 방법을 채용하고 있어서 SCGE assay에 대한 객관적인 평가가 이루어지지 않고 있으며 따라서 그 유용성에 대한 결론이 아직 내려지지 않은 실정이다. 수 환경에서의 유전독성 측정을 위해서는 표준화된 시험방법이 요구되고 있는 상황에서(Dixon *et al.*, 2002), SCGE assay가 공식적인 시험법으로 활용되기 위해서는 시험법으로서의 적합성을 평가하는 작업이 보다 체계적으로 이루어져야 할 필요가 있다. SCGE assay는 다른 유전독성 시험법들과 비교할 때 서로 일치하는 결과들을 보여줄 뿐 아니라 보다 우수한 시험법으로의 응용 가능성도 제시되고 있고(Belpaeme *et al.*, 1996; Hartmann and Speit, 1994; Hartmann *et al.*, 2001, 2003; Klobucar *et al.*, 2003), 신속성과 간편성의 장점을 함께 고려할 때, SCGE assay는 수 환경 유전독성 시험법으로서 보다 널리 활용되어야 할 필요성이 크다 하겠다. 한편 Belpaeme *et al.*(1998)은 어류에서의 SCGE assay의 유용성을 평가하기 위해 가자미류(*Psetta maximus*)를 이용하여 조직의 종류, 세포분리방법, 전기

영동 조건 등을 최적화하고 확립된 최적조건에 의해 얻은 DNA 손상도 결과를 평가함으로써 해수어를 이용한 SCGE assay의 표준화 기준을 제시하였다. 그러나 SCGE assay에 대한 종합적인 적합성 평가를 위해서는 어류가 아닌 조개류를 이용하는 경우에는 별도의 연구가 이루어져야 할 것이다. 유전독성 물질에 의한 DNA 가닥절단 생성의 정도는 세포의 종류, 즉 생물종 또는 조직의 종류에 따라 다르게 나타나는데, 특히 활성화 대사과정이 요구되는 간접 변이원(indirect mutagen)에 대해서 더욱 그러하다(Mitchelmore and Chipman, 1998). 따라서 무척추동물인 조개류에서는 어류를 이용한 SCGE assay의 결과와 다를 가능성이 높기 때문에 조개류를 이용한 SCGE assay의 유용성도 다르게 나타날 수 있는 것이다. 유전독성 물질에 직접 생물체를 노출시킨 후 조직 세포를 분리해내어 DNA 손상도를 측정하는 *in vivo* SCGE assay에 지금까지 이용되어 온 어류는 넙치류(*Pleuronectes americanus*), 가자미류(*Psetta maximus*), 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*), 강송어(*Salmo trutta*), 잉어(*Cyprinus carpio*), zebra fish(*Brachydanio rerio*) 등 다양하며, 무척추동물로는 홍합류(*Mytilus edulis* 또는 *Dreissena polymorpha*), 대합류(*Spisula sachalinensis* 또는 *Mya arenaria*), 다모류 환형동물(polychaetes, *Nereis virens*) 등인데(Lee and Steinert, 2003), 상대적으로 어류보다 무척추동물을 이용한 SCGE assay 연구결과들이 빈약한 실정이다.

본 연구에서는 아직 이루어지지 않고 있는 조개류를 이용한 *in vivo* SCGE assay의 유용성 평가를 실시하였다. 생물종으로는 대합(*Spisula sachalinensis*)을 사용하였는데 이는 홍합류에 비해 실험실적으로 사육 및 유지가 용이하며, 또한 우리나라 동해 연안에서 서식하는 특산 생물종으로서 국내 해수 환경의 유전독성 시험에 활용될 수 있는 가능성을 감안한 것이다. 대합 역시 퇴적물 섭식동물(deposit feeder)이면서 여과 섭식동물(filter feeder)로서 홍합과 함께 연안 수질오염을 측정할 수 있는 시험 생물종으로 적합한 패류이다(Coughlan *et al.*, 2002). 대합에 노출시킨 유전독성 물질로는 알킬화제(alkylating agent)의 일종인 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG)을 직접 변이원의 대표물질로, 다핵 방향족 탄화수소류(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)의 일종인 benzo[*a*]pyrene(B[*a*]P)을 간접 변이원의 대표물질로 사용하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

MNNG, B[*a*]P, dimethyl sulfoxide(DMSO), *N*-*t*butyl-

$\alpha$ -phenylnitron(BPN) 등은 Sigma사(St. Louis, MO)로부터 구입하였으며, phosphate buffered saline(PBS, calcium- and magnesium-free), low melting point agarose(LMA), normal melting point agarose(NMA) 등은 Gibco BRL사(Grand Island, NY), fully frosted slide glass는 ERIE Scientific사(Portsmouth, NH), 형광 염색 시약 YOYO-1은 Molecular Probes사(Eugene, OR)로부터 구입하였다. 기타 일반적인 시약들은 분석시약급(analytical grade)으로서 Merck사(Darmstadt, Germany) 및 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

### 시험 생물(test organism)

포획된 지 1~2일 이내의 대합을 최장 길이  $14.0 \pm 2.8$  cm의 것으로 경북 포항시 소재 죽도 수산시장의 일정한 구입처로부터 구입하여 해수 5 L를 담은 10 L 수조에 넣고 저온고(cold chamber) 내에서  $12 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지해 주면서 2일간 적응시켰다. 해수는 포항시 북구 환여동 인근 바닷가에서 채취된 해수를 공급받아 매 24시간마다 교환시켜주었다.

### 변이원 물질 노출

MNNG와 B[a]P를 0.01~5 ppm 사이의 농도에 대하여 반복 예비 실험을 거쳐 유전독성 결과를 비교할 수 있는 적정 처리농도를 결정하였다. 즉 10마리의 대합에 대한 5일간 생존율이 100%인 한계 농도가 MNNG와 B[a]P에 대해 각각 0.5 및 1 ppm으로 결정됨으로써, MNNG는 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ppm으로, B[a]P는 0.01, 0.25, 0.5, 1 ppm으로 나누어 DMSO에 용해시킨 후 처리하였다. 대합은 각 처리농도별로 무작위로 배치하고 매 24시간마다 3마리씩 샘플링하여 측정에 사용하였다. 또한 매 24시간마다 변이원을 동일 농도가 되도록 용해시킨 새로운 해수 1 L를 교체시키면서 4일 처리하였다. 각 변이원 별로 2회의 독립적인 반복실험을 통해 각 조건에 해당하는 유전독성 결과의 평균치를 유전독성 값으로 결정하였다.

### 조직의 적출 및 세포 현탁액의 제조

대합으로부터 아가미 및 소화샘 조직(digestive glands)을 적출하여 세포를 분리해 내었다. 대합의 껍질을 연 후에 외과용 메스와 핀셋을 이용하여 우선 아가미를 적출해 낸 후 하부의 소화샘 조직을 드러내어 가위로 적출해 내었다. 적출한 조직들은 해수로 세척한 후, 저미기(mincing), 가압여과(filter pressing), 균질화(homogenizing), 200 mM BPN 처리 등 4가지의 서로 다른 세포분리방법을 적용하여 세포 현탁액을 제조하였다. Belpaeme *et al.*(1998)

의 방법을 약간 변형하여, 저미기는 조직을 막자사발에 넣고 100 mM EDTA를 포함하는 동일 부피의 PBS를 가한 후 30초간 저미는 방법, 가압여과는 조직을 1/2 부피의 100 mM EDTA 포함 PBS에 적신 후 100- $\mu\text{m}$  mesh sieve 위에서 물리적으로 눌러 세포 현탁액을 걸러내는 방법, 균질화는 조직을 5-ml Potter-Elvehjem homogenizer에 넣고 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol을 포함하는 동일 부피의 PBS를 가한 후 얼음 수조 위에서 pestle을 10회 왕복하는 방법, BPN 처리는 조직에 200 mM BPN을 포함하는 동일 부피의 PBS를 가하여 실온에서 30분간 반응시키는 방법을 사용하였다. 각 세포 현탁액에서의 세포 생존을 확인을 위해서 trypan blue exclusion test를 실시하고  $2 \times 10^6$  cells/ml이 되도록 희석한 후에 SCGE assay에 이용하였다.

### Alkaline SCGE assay

SCGE assay의 측정순서는 세포의 도말(embedding), 세포 단백질 및 세포막의 용해, DNA의 가닥풀기(unwinding), 전기영동 및 염색과 측정의 순으로 진행하였다. PBS에 녹아 있는 0.5% NMA 용액을  $90^\circ\text{C}$  이상으로 가열한 후, 항온 수조에서  $60^\circ\text{C}$ 로 유지시켰다. Fully frosted slide glass의 서리가 형성되어 있는 면에 NMA 용액 35  $\mu\text{l}$ 를 깔아서 건조시킨 후, 다시 75  $\mu\text{l}$ 를 cover glass ( $24 \times 50$  mm)로 균일하게 깔고 얼음 수조 위에 놓아 응고시켰다. 이와 같이 만들어진 pre-coated agarose gel slide는 습기가 있는 slide 보관함에 넣어 실험 전까지  $4^\circ\text{C}$ 로 보관하였다. 세포의 도말, 용해(lysis) 및 전기영동 등은 Singh *et al.*(1988)의 방법을 따라 실시하였다. 조직으로부터 분리해 낸 세포 현탁액을  $3,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 세포 펠렛(pellet)을 얻은 후 10% Hank's balanced salt solution (HBSS, 10 mM PBS(pH 7.4) + 20 mM HEPES + 0.4%(w/v) KCl + 1%(w/v) glucose)에 재차 현탁시켰다. 이 세포 현탁액 30  $\mu\text{l}$ 를  $3,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 얻은 세포 펠렛을  $45^\circ\text{C}$ 로 유지시킨 0.75% LMA 용액(PBS) 75  $\mu\text{l}$ 에 현탁시킨 후, 신속하게 앞서 제조한 pre-coated agarose gel slide 위로 옮기고, cover glass를 사용하여 그 세포 현탁액이 골고루 분산되게 덮은 뒤, 얼음 수조 위에 놓아 응고시켰다. Cover glass를 제거하고 세포가 깔린 slide gel 위에 다시 0.75% LMA 용액 75  $\mu\text{l}$ 를 도말한 후, covers glass를 덮고, 재차 얼음 수조 위에 놓아 10분간 응고시켰다. 이렇게 준비된 gel slide는 cover glass를 벗겨내고  $4^\circ\text{C}$ 의 alkali lysis buffer(1% sodium sarcosinate, 2.5 M NaCl, 100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10 M Tris HCl, pH 10)에 빛이 차단된 상태에서 1시간 동안 담구어 핵체를 제외한

**Table 1.** Effects of cell dissociation protocol on DNA damages in gill and digestive gland cells of clam<sup>a</sup>

Cell dissociation protocol	Gill	Digestive glands
1. Mincing for 30 s in PBS with 100 mM EDTA	13.74 ± 3.56*	12.61 ± 3.11
2. Homogenizing with 5-ml Potter-Elvehjem homogenizer in PBS with 1 mM mercaptoethanol in ice bath	11.35 ± 3.46	10.32 ± 1.68
3. Filter pressing through 100 mm mesh filter in PBS with 100 mM EDTA on ice bath	12.21 ± 2.79	13.06 ± 4.12*
4. Incubation with BPN for 30 min in PBS with 200 mM BPN	17.45 ± 4.93*	16.86 ± 5.35*

<sup>a</sup>The electrophoretic conditions; 20 min denaturation, 40 min electrophoresis at 0.4 V/cm, 300 mA. Values represent the mean tail length ( $\mu\text{m}$ )  $\pm$  SD of 300 cells isolated from 3 sample organisms (100 cells an organism) per condition. These data are representative of two independent experiments, which showed the same trend.

\*Significantly differ ( $p < 0.05$ ) from the value obtained by the cell dissociation protocol number 2 ('homogenization') for the same tissue.

세포내 모든 성분을 용해시켰다. 세포 용해 과정을 거친 slide들은 수평상 전기영동 장치(Hoefer, San Francisco, CA) 위에 서로 밀착되게 깔고, 전기영동용 완충 용액 (1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH)으로 slide 표면 위 까지 가득 채운 후, DNA의 가닥풀기와 알칼리에 민감한 부위의 표출을 위해 20분간 평형 시간을 주었다. 0.4 V/cm, 300 mA의 조건으로 40분간 전기영동을 실시하였다. 각 slide들을 증류수로 가볍게 세척하고 처리구별 세포의 DNA 손상 정도를 살펴보기 위하여 형광 염색 시약 YOYO-1(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 80  $\mu\text{l}$ 를 가하여 염색하였다. 형광 현미경(배율 250배)으로 관찰된 각각 세포핵의 image는 Comet assay II image analysis system(Perceptive Instruments, Suffolk, U.K.)이 설치된 컴퓨터로 분석하였다. 각 세포 현탁액 시료에서의 유전독성 물질에 의한 DNA 손상도는 slide당 100개 comet image의 tail length를 분석하여 그 평균치(평균 tail length)로 정량화하여 평균 tail length  $\pm$  S.D. (n=100)로 나타내었다. 시료 간 DNA 손상도(평균 tail length) 차이에 대한 유의성 검정을 위하여 Student's t-test를 이용하였으며,  $p < 0.05$ 의 유의수준에서 유의성을 인정하였다.

## 결과 및 고찰

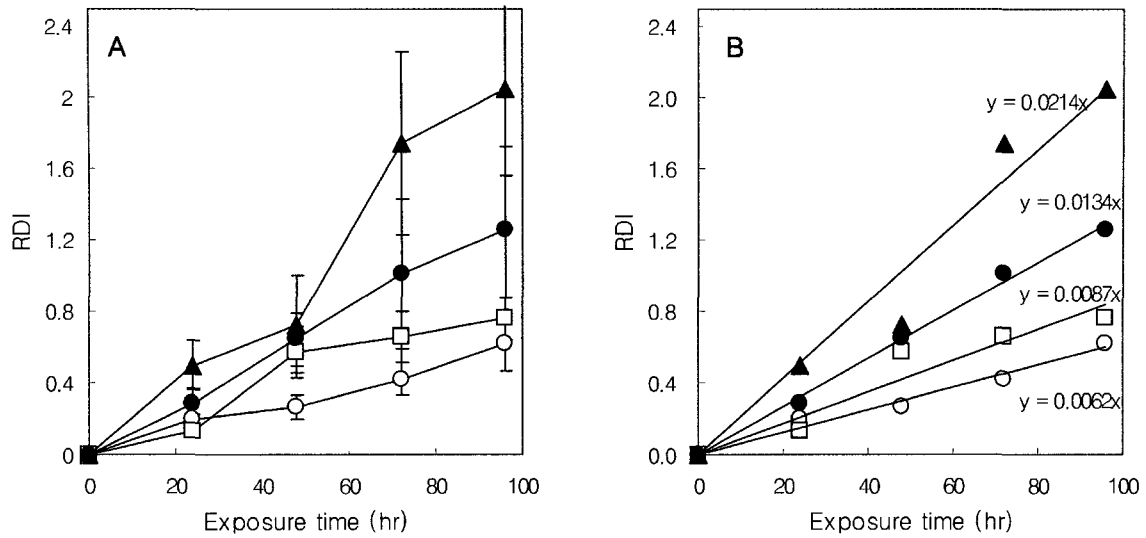
### 세포 분리 방법의 최적 조건 확립

변이원 오염물질에 의한 유전독성을 보다 효율적으로 측정해내기 위해서는 변이원이 처리되지 않은 상태에서의 DNA 손상도가 가능한 한 낮아야 하는데, 이는 조직으로부터 어떤 방법으로 세포를 분리하는가에 매우 의존적이다(Mitchelmore and Chipman, 1998). 대합의 아가미 및 소화샘 조직으로부터 세포를 분리하는 과정에서 가장 DNA 손상을 일으키지 않는 최적조건을 찾기 위해 물리적인 방법으로서 저미기(mincing), 가압여과(filter pressing), 균질화(homogenizing) 등에 대하여 비교하고 BPN에 의한 화학적 분리방법과도 비교하였다. 이와 같은 분리조건

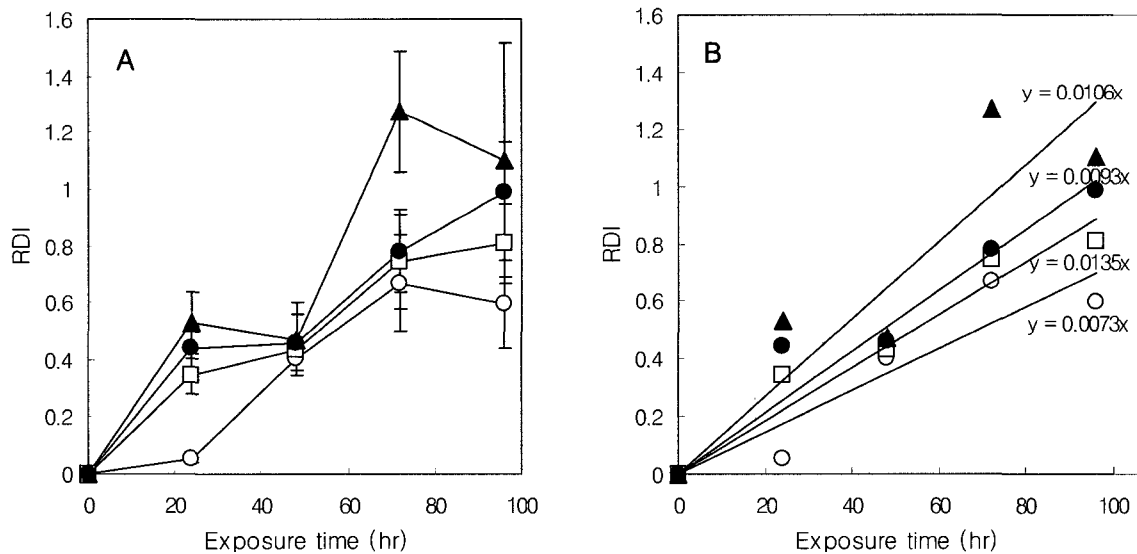
들에 대하여는 가자미류(*P. maximus*)에 대하여 조사된 보고가 있으나(Belpaeme *et al.*, 1998), 어패류의 종과 조직의 종류에 따라 각 방법에 대하여 서로 다른 결과들을 나타내는 것으로 알려져 있기 때문에(Mitchelmore *et al.*, 1998) 본 연구에서는 대합에 대하여 유사한 실험과정을 거쳐 최적조건을 확립하고자 하였다. 사용된 분리방법을 기초로 상호 비교해본 결과, Table 1에 나타난 바와 같이 균질화 방법이 세포를 분리하는 과정에서 가장 낮은 DNA 손상을 일으키는 것을 확인할 수 있었다. 아가미 조직의 경우에는 균질화 방법이 저미기 및 BPN 처리 방법에 비해 유의적으로 낮은 손상도를 나타내었고, 소화샘 조직에서도 균질화 방법이 일으키는 손상도가 가압여과 및 BPN 처리 방법에 비해 유의적으로 낮았다. 따라서 이후의 실험에서는 균질화 방법에 의해 세포 현탁액을 제조하였다.

### 직접 변이원 MNNG의 유전독성 측정

확립된 조건을 적용하여 대합에 대한 직접발암원 MNNG의 유전독성을 측정하였다. MNNG를 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ppm의 농도로 처리하면서 매 24시간마다 3마리씩 대합을 샘플링하여 아가미 세포와 소화샘 조직 세포에 대한 유전독성을 측정한 결과를 Fig. 1과 2에 나타내었다. 그림의 각 data point는 6마리 시료(2회 반복실험)로부터 얻어진 평균 tail length 값들의 평균치를 이용하여 각 시간까지 MNNG를 처리하지 않은 대조구와 비교한 상대적 손상도(relative damage index, RDI)를 나타낸다. MNNG의 처리시간과 처리농도가 증가함에 따라 손상도는 증가하여 시간 및 농도 의존성이 명확하게 나타났고 소화샘 조직 세포보다는 아가미 세포가 상대적으로 안정적인 결과를 보여주었다. 이는 어류 중 잉어(*Cyprinus carpio*)를 이용하여 SCGE assay의 유용성 평가를 실시 하였던 앞선 연구(Jin *et al.*, 2004)에서, 잉어의 아가미 조직이 간 조직에 비해서 아가미 조직이 DNA 손상도 결과의 시간 및 농도 의존성이 뚜렷하게 나타난 것과 일치



**Fig. 1.** Genotoxic effect of MNNG in gill cells of clam with increased treatment time (A) and the correlation between RDI and treatment time with each MNNG concentration (B). Each point represents the average value of mean tail lengths obtained from 6 clam samples of 2 independent experiments (total 606 mean tail length values). The concentrations of MNNG treated were 0.01 (○), 0.05 (□), 0.1 (●) and 0.5 ppm (▲). RDIs were calculated as follows:  $RDI = (\text{mean tail length of MNNG treated clam} - \text{mean tail length of control clam}) / (\text{mean tail length of control clam})$ . MNNG; *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine, RDI; Relative Damage Index.



**Fig. 2.** Genotoxic effect of MNNG in digestive gland cells of clam with increased time of treatment (A) and the correlation between RDI and treatment time with each MNNG concentration (B). Each point represents the average value of mean tail lengths obtained from 6 clam samples of 2 independent experiments (total 606 mean tail length values). The concentrations of MNNG treated were 0.01 (○), 0.05 (□), 0.1 (●) and 0.5 ppm (▲). RDIs were calculated as follows:  $RDI = (\text{mean tail length of MNNG treated clam} - \text{mean tail length of control clam}) / (\text{mean tail length of control clam})$ . MNNG; *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine, RDI; Relative Damage Index.

하는 결과이다. 이는 대합과 잉어의 아가미 조직이 변이 원에의 직접적인 노출이 계속되는 곳이기 때문에 직접 변이원에 대한 민감도가 높게 관찰되는 것으로 판단되었다. 또한 처리시간에 따른 손상도 증가 추이를 살펴볼 때, 처리 96시간까지 지속적으로 손상도가 증가하였는데, 이로

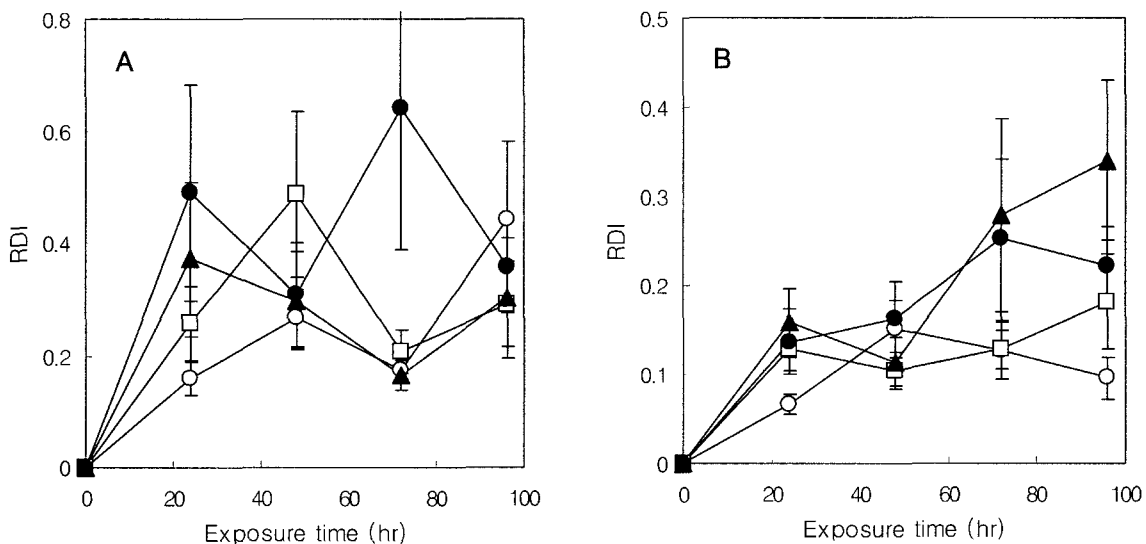
부터 처리시간과 손상도 간의 선형 비례관계가 매우 양호하게 얻어짐을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 한편, 앞선 연구(Jin *et al.*, 2004)에서 잉어의 아가미 조직에서는 48시간까지 손상도가 급속히 증가한 후 72시간 이후부터는 손상도 증가폭이 둔화 또는 정체되는 현상을 보여줌으로써

처리시간과 손상도 간의 선형 비례관계를 나타내는 시간 범위가 상대적으로 좁게 나타났지만, 대합의 경우에는 보다 넓은 시간 범위에 걸쳐 지속적인 손상도의 증가를 나타냄으로써 대합을 이용하면 직접 변이원에 대해 보다 효율적인 유전독성 측정이 가능함을 알 수 있었다. 그러나 고농도의 MNNG 처리 시에는 개체 및 세포 간 데이터 편차가 크게 나타나는 단점이 있었다. 한편 잉어의 간세포에서는 MNNG에 대하여 처리농도와 손상도 간의 상관관계가 명확치 않았으나(Jin *et al.*, 2004), 대합의 소화샘 조직 세포에서는 아가미 세포보다는 명확도가 떨어지지만 비교적 양호한 상관관계를 보여주었다(Fig. 2). 결국 대합에 대한 직접 변이원의 SCGE assay를 이용한 유전독성 평가에서는 DNA 손상의 추세선에 대한 기울기를 평가지수의 하나로 활용할 수 있으며(Fig. 1B 및 2B) 특히 아가미 세포를 이용하는 것이 유리함을 알 수 있었다.

### 간접 변이원 B[a]P의 유전독성 측정

다음으로 간접 변이원인 B[a]P에 대한 *in vivo* 유전독성을 측정하였다. B[a]P를 0.01, 0.25, 0.5, 1 ppm의 농도로 처리하면서 매 24시간마다 3마리씩 대합을 샘플링하여 아가미 세포와 소화샘 조직 세포에서의 DNA 손상도를 측정하였다(Fig. 3). Fig. 3A에서 볼 수 있는 바와 같이 아가미 세포에서의 DNA 손상은 1 ppm이 0.5 ppm보다 낮은 유전독성을 나타내는 등 처리시간 및 농도에 대하여 매우 불규칙한 결과를 보여주었다. 그러나 소화샘

조직 세포에서는 전체적인 손상도는 아가미 세포에 비해 약간 낮았으나, B[a]P 처리농도와 처리시간에 따른 상관관계가 비교적 양호하게 나타났다. 그러나 이는 앞선 연구(Jin *et al.*, 2004)에서의 잉어의 간세포를 이용한 결과와는 매우 다른 경향이다. 즉 잉어의 간세포는 첫 24시간에는 손상이 거의 일어나지 않다가 48시간째부터 급격히 손상이 일어났고 그 이후부터는 점차 손상이 적어지는 현상을 보여줌으로써 간접 변이원 유전독성의 특징으로 이해할 수 있었다. 그러나 대합의 소화샘 조직 세포의 경우는 직접 변이원 MNNG와 간접 변이원 B[a]P에 대해 거의 유사한 경향을 보여줌으로써, 간접 변이원에 의한 유전독성 기작과 해독작용의 기작이 잉어의 간세포와는 매우 다름을 알 수 있었다. 잉어의 간 세포에서 B[a]P에 의한 DNA 손상이 초기에는 낮다가 갑자기 급증하는 소위 유전독성 지연현상이 관찰되는 것은 간세포에 의한 간접 변이원의 대사를 통해 DNA 손상 유발물질이 생산되기 때문일 것이다. B[a]P에 의해 DNA 가닥절단이 발생하는 기작을 보면 cytochrome P4501A(CYP1A)의 작용에 의해 생성되는 diolepoxides(7,8-diol-9,10-epoxide 등) 또는 benzo[a]pyrenequinones(reactive oxygen species로부터 생성) 등이 DNA 상해(lesion)를 유발시키게 되는데 이들에 대한 적절한 회복(repair)이 일어나지 않을 경우 DNA 가닥절단이 발생하게 된다(Canova *et al.*, 1998; Garry *et al.*, 2003). 무지개 송어의 간 세포에서 관찰된 cytochrome P4501A(CYP1A) mRNA 수준 및 ethoxy-



**Fig. 3.** Genotoxic effect of B[a]P in gill (A) and digestive gland (B) cells of clam with increased time of treatment. Each point represents the average value of mean tail lengths obtained from 6 clam samples of 2 independent experiments (total 606 mean tail length values). The concentrations of B[a]P treated were 0.01 (○), 0.25 (□), 0.5 (●) and 1 ppm (▲). RDIs were calculated as follows:  $RDI = (\text{mean tail length of B[a]P treated clam} - \text{mean tail length of control clam}) / (\text{mean tail length of control clam})$ . B[a]P; benzo[a]pyrene, RDI; Relative Damage Index.

resorufin-O-deethylase(EROD) 활성이 B[a]P 처리시간에 따라 급격하게 증가하였다가 점차 감소되는 변화추이를 보여주었는데(Levine and Oris, 1999), 이는 잉어에서 관찰된 DNA 손상도 변화추이와 매우 유사하였다는 사실로부터 잉어에서도 B[a]P의 독성이 CYP1A의 작용에 의한 활성화를 통해 나타나는 것으로 추정할 수 있었다. 그러나 본 연구에서의 대합에 대한 B[a]P의 유전독성 결과를 볼 때 무척추동물인 대합의 경우에는 이러한 독성기작과는 전혀 다르게 DNA 손상 반응이 일어나고 있음을 알 수 있었으며, 이는 조개류에서의 SCGE assay를 이용한 수 환경 유전독성 평가에 있어 반드시 고려해야 할 변수라고 생각된다. 반면 직접 변이원 MNNG의 경우에는 아가미 세포가 유전독성 물질과의 직접적인 접촉을 통해 신속하게 DNA 손상이 일어난 것으로 판단되며, 이러한 직접적인 유전독성 현상은 대사 시스템의 차이와는 무관하므로 잉어와 대합에서 별 차이없이 유발되는 것으로 추측된다.

앞선 연구에서 잉어에 대한 MNNG 및 B[a]P의 유전독성을 측정된 결과(Jin *et al.*, 2004)와 본 연구에서 얻어진 대합에 대한 결과를 종합하여 볼 때 다음과 같은 결론을 내릴 수 있다. 우선 SCGE assay가 변이원 노출 시간과 노출 농도에 따라 DNA 손상도의 증가를 양호한 비례관계로 표현해 낼 수 있었기 때문에 수 환경의 유전독성 시험법으로서 그 유용성과 우수성이 확인되었다. 또한 직접 변이원의 경우에는 잉어 및 대합의 아가미 세포를 이용하고, 간접 변이원의 경우는 잉어의 간 세포 또는 대합의 소화샘 조직 세포를 이용하는 것이 적합하다는 것이다. 실제적인 현장 응용의 측면을 생각해 볼 때, MNNG 또는 B[a]P와 같은 표준물질에 의해 얻어진 표준곡선을 수질오염 수준 측정에 이용할 수 있을 것으로 판단된다. 즉 실제 오염지역에서 채취된 강수 또는 해수 시료를 어패류에 처리하여 SCGE assay의 정량적 측정치를 MNNG 또는 B[a]P에 의한 유전독성 수준을 기준으로 하는 상대적 수치로 나타냄으로써 해당 지역(직접 변이원 또는 간접 변이원 오염이 의심되는 지역)의 직접 변이원 또는 간접 변이원에 의한 수질오염 수준을 정량화할 수 있을 것이다. 또한 이 측정 시스템을 이용하여 다양한 유전독성 물질들에 대한 측정결과들을 축적하게 되면 실제 오염지역에서 채취된 어패류의 유전독성을 직접 판정할 수 있는 *in situ* monitoring도 가능할 것으로 판단된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(과제번호: R01-2001-000-00222-0)지원으로 수행되었습니다.

### 참고문헌

- Al-Sabti, K. and Metcalfe, C.D. (1995): Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.*, **343**, 121-135.
- Belpaeme, K., Delbeke, K., Zhu, L. and Kirsch-Volders, M. (1996): Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, **11**, 485-492.
- Belpaeme, K., Cooreman, K. and Kirsch-Volders, M. (1998): Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine fish. *Mutat. Res.*, **415**, 167-184.
- Canova, S., Degan, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., Voltan, R. and Venier, P. (1998): Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat. Res.*, **399**, 17-30.
- Coughlan, B.M., Hartl, M.G.J., O'Reilly, S.J., Sheehan, D., Morthersill, C., van Pelt, F.N.A.M., O'Halloran, J. and O'Brien, N.M. (2002): Detecting genotoxicity using the Comet assay following chronic exposure of Manila clam *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments. *Mar. Pollution Bull.*, **44**, 1359-1365.
- Garry, S., Nesslany, F., Aliouat, E., Haguenoer, J.-M. and Marzin, D. (2003): Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay. *Mutat. Res.*, **534**, 33-43.
- Hartmann, A. and Speit, G. (1994): Comparative investigation of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ. Mol. Mutagen.*, **23**, 299-305.
- Hartmann, A., Elhajouji, A., Kiskinis, E., Poetter, F., Martus, H.-J., Fjallman, A., Frieauff, W. and Suter, W. (2001): Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 843-858.
- Hartmann, A., Plappert, U., Poetter, F. and Suter, W. (2003): Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat. Res.*, **536**, 27-38.
- Hoofman, R.N. and Raat, W.K. (1982): Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the estern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethylmethanesulfonate. *Mutat. Res.*, **104**, 147-152.
- Jin, H.H., Lee, J.H. and Hyun, C.K. (2004): Detection of DNA damage in carp using single-cell gel electrophoresis assay for genotoxicity monitoring. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 268-275.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2003): Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutat. Res.*, **540**, 153-163.
- Klobucar, G.I.V., Pavlica, M., Erben, R. and Papes, D. (2003): Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat. Toxicol.*

- col.*, **64**, 15-23.
- Lee, R.F. and Steinert, S. (2003): Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.*, **544**, 43-64.
- Levine, S.L. and Oris, J.T. (1999): CYP1A expression in liver and gill of rainbow trout following waterborne exposure: implications for biomarker determination. *Aquat. Toxicol.*, **46**, 279-287.
- Mitchelmore, C.L., Birmelin, C., Livingstone, D.R. and Chipman, J.K. (1998): Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the "Comet" assay. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **41**, 51-58.
- Mitchelmore, C.L. and Chipman, J.K. (1998): DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.*, **399**, 135-147.
- Nunn, J.W., Livingstone, D.R. and Chipman, J.K. (1996): Effect of genetic toxicants in aquatic organisms in *Toxicology and Aquatic Pollution: Physiological, Molecular and Cellular Approaches* (E.W. Taylor, Ed.). Society for Experimental Biology Seminar Series, vol. 57, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 225-251.
- Rojas, E., Lopez, M.C. and Valverde, M. (1999): Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B*, **722**, 225-254.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **175**, 184-191.