

## Comet assay를 이용한 갯지렁이 (*Perinereis aibuhitensis*)의 혈구세포에 대한 유전독성 평가

서진영, 성찬경, 최진우<sup>1</sup>, 이창훈<sup>1</sup>, 류태권<sup>1</sup>, 한기명<sup>1</sup>, 김기범<sup>\*</sup>

경상대학교 해양환경공학과 해양산업연구소, <sup>1</sup>한국해양연구원 남해연구소

## Evaluation of Genotoxicity in Blood Cells of a Polychaetous Worm (*Perinereis aibuhitensis*), Using Comet Assay

Jin-Young Seo, Chan-Gyoung Sung, Jin-Woo Choi<sup>1</sup>, Chang-Hoon Lee<sup>1</sup>,  
Tae-Kwon Ryu<sup>1</sup>, Gi-Myung Han<sup>1</sup> and Gi Beum Kim<sup>\*</sup>

Department of Marine Environmental Engineering, Marine Industry Institute,  
Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

<sup>1</sup>South Sea Institute, KORDI, Geoje 656-830, Korea

### ABSTRACT

In order to know whether polychaetes could be used as an appropriate organism for the detection of genotoxicity, DNA strand breaks were evaluated in blood cells of a nereidae worm (*Perinereis aibuhitensis*) exposed to various aquatic chemical pollutants (e.g. Cd, Pb, Pyrene, Benzo[a]pyrene). Hydrogen peroxide increased DNA strand breaks up to the highest concentration (10  $\mu$ M). Higher concentration than 0.1  $\mu$ M showed a significantly more DNA damage than control. Cadmium and lead also showed higher DNA damage than control, over 1.0 and 1  $\mu$ g/L, respectively. In case of pyrene, DNA damage was detected even at 0.001  $\mu$ g/L. However, DNA damage decreased due to apoptosis at the highest concentration of pyrene and Pb. This study suggested that the polychaetous blood cells could be used effectively for screening genotoxic contaminants in the environment.

**Key words** : comet assay, polychaetous blood cell, bioassay, metal, PAH

### 서 론

생물검정 (bioassay)이란 어떤 물질이 살아있는 생물에 어떠한 영향을 나타내는지를 알아보기 위한 실험을 의미한다. 특히 생물의 유전독성을 알아보기 위해 다양한 생물검정법이 개발되었으며, 그 중 comet assay는 다양한 동물의 DNA 가닥절단을

측정하는데 있어 간단하고, 빠르며, 민감도가 뛰어난 장점이 있어 최근 많이 사용되어지는 방법이다 (Singh *et al.*, 1988).

이러한 장점으로 인해 comet assay는 해면동물에 서부터 극피동물의 성체에 이르기까지 다양한 해양무척추동물들에 대해서도 적용되어졌다 (Mitchellmore and Hyatt, 2004; Taban *et al.*, 2004). 육상지렁이의 경우, X-ray와 mitomycin C (Verchaeve and Gilis, 1995), 살충제 (Zang *et al.*, 2000), 니켈 (Reinecke and Reinecke, 2004), 그리고 benzo[a]pyrene

<sup>\*</sup> Corresponding author.

Tel: +82-55-640-3164, E-mail: kgb@gsnu.ac.kr

와 lindane에 오염된 토양(Martin *et al.*, 2005)에 의한 유전독성평가 등 비교적 다양한 연구가 진행되어 왔다. 그러나 갯지렁이에 대한 연구는 배아의 발생과정 중 독성물질에 대한 영향(Hagger *et al.*, 2002)과 PAHs에 대한 *Capitella* sp.의 내성에 대한 연구(Bach *et al.*, 2005) 등 매우 제한적으로 연구되어왔다. 본 연구에서 사용되어진 두토막눈썹참갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*)는 해양 퇴적물에서 서식하며 퇴적물을 섭식하는 종이기 때문에 퇴적물의 오염지시생물종으로 알려져 있고, 한국과 중국 연안의 조간대 상부에서 발견되어진다. 다른 해양생물에 비해 손쉽게 채집할 수 있으며, 또한 배양이 용이하고, 저렴하며, 성체의 크기가 10 cm 이상으로 혈구세포를 추출하기에도 용이하여 본 연구에서 실험생물로 사용되었다.

1990년대부터 comet assay를 이용한 DNA 손상에 대한 연구에서 DNA 손상을 일으키는 물질은 금속에서 유기오염물질에 이르기까지 아주 다양한 것으로 밝혀졌다. 본 연구에서는 갯지렁이 혈구세포에 DNA 손상을 유도하기 위해 과산화수소(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 금속 중 카드뮴과 납, 유기오염물질인 pyrene과 benzo[a]pyrene을 선택하였다. 과산화수소는 DNA 손상을 측정할 때, 양성대조구(positive control)로 주로 사용되는 물질로서(Singh *et al.*, 1988; Mitchelmore and Chipman, 1998) DNA strand breaks의 형성에 대사작용이 필요하지 않고 직접적인 손상을 일으킨다(Mitchelmore and Hyatt, 2004). 카드뮴은 독성이 강한 금속들 중에 하나이며, 해양 먹이 사슬에 많이 축적이 되어 있는 것으로 알려져 있다(Romeo *et al.*, 1995; Devi *et al.*, 1996). 이러한 카드뮴은 DNA strand breaks를 유도하여 직접적인 손상을 주거나(Hassoun and Stohs, 1996), 자유라디칼의 생성(Zhong *et al.*, 1990), DNA 회복효소의 생성 저해(Hartwig, 1998), 자유라디칼 스캐빈저의 감소(Shimizu *et al.*, 1997)와 같은 간접적인 기작으로 독성을 일으키는 것으로 알려져 있다. 쉽게 휘발되어 퍼지며 지속성이 강한 독물이어서 해양생물 뿐만 아니라 인간의 건강에도 많은 해를 입히는 것으로 알려진 납 또한 DNA에 손상을 일으킨다고 밝혀져 있다(Devi *et al.*, 2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) 역시 DNA 이중가닥을 파괴하는 역할을 한다(Akcha *et al.*, 2004). 이러한 물질은 퇴적물과 수괴,

모두에 존재하며 수생동물에 흡수되어 직접적 혹은 ROS (Reactive Oxygen Species) 생성에 의한 간접적인 방법으로 DNA 손상을 일으킨다(Akcha *et al.*, 2004). ROS 생성은 산화력에 의한 DNA 손상을 야기하고 DNA 가닥을 파괴하며(Akcha *et al.*, 2000; Livingstone, 2000) 이러한 DNA 가닥파괴는 유기오염물질에 의해 형성된 DNA adduct의 회복을 방해하기도 한다(Rybicki *et al.*, 2004).

그러므로 본 연구에서는 갯지렁이의 혈구세포에 유전독성을 가지고 있다고 알려진 중금속(Cd, Pb), 유기오염물질(Pyrene, Benzo[a]pyrene)를 노출시킨 후, comet assay를 실시하여 갯지렁이의 혈구세포가 유전독성실험에 유용한 재료가 될 수 있는지에 대해 조사해 보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상생물의 배양

두토막눈썹참갯지렁이(*P. aibuhitensis*)는 거제도 장목의 낚시점에서 구입하여 2주 이상 10°C의 수조에서 순치시켰다. 배양에 필요한 기질은 배타적 경제수역(EEZ)에서 채집한 펄과 거제도 흥남해수욕장의 모래를 사용하였다. 먹이는 우렁 먹이용 사료를 사용하였다. 위의 모든 배양 조건은 과학기술처(1990)에서 수행한 '해산 갯지렁이 자원조사 및 사육기법 개발'에 의거하여 수행하였다.

### 2. 혈구세포추출

두토막눈썹참갯지렁이(*P. aibuhitensis*)의 혈구세포를 얻기 위해 해부현미경 아래에서 혈관의 위치를 파악한 후, 수술용 가위로 혈관이 있는 머리부분을 잘라 인산완충용액이 들어있는 원심분리관에 넣었다. 1~2분 후, 원심분리관에는 혈구와 체액 등 기타 이물질이 함께 모아지는데 이를 균질하게 혼합하고 1~2분간 다시 가라앉혔다. 혈구에 비해 무거운 체액과 기타 이물질들은 가라앉게 되므로 상등액만을 다시 모아 실험에 사용하였다. 이렇게 모아진 혈액 중 일부를 슬라이드에 놓고 trypan blue 용액을 떨어뜨려 광학현미경(×100)으로 세포의 생사여부를 판단하였다.

### 3. 노출실험조건

*In vitro* test를 위한 각 화학물질의 농도 범위는 다음과 같다. 과산화수소는 4개의 농도로 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ 를 준비하였고, 카드뮴은 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{g/L}$ , 납은 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$ 의 5개 농도를 준비하였다. Pyrene은 0.001, 0.01, 0.1, 1 그리고 10  $\mu\text{g/L}$ 를 준비하였고, benzo[a]pyrene (B[a]P)은 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1  $\mu\text{g/L}$  그리고 1  $\mu\text{g/L}$ 를 준비하였다. 농도별로 준비된 독성물질의 적당량을 well plate에 넣은 후, PBS로 희석된 갯지렁이의 혈구세포를 100  $\mu\text{L}$ 씩 넣었다. 준비된 well plate를 4°C 암실에서 1시간 동안 노출시켰다. 모든 실험에서 인산완충용액만으로 대조구를 만들어 함께 수행하였다. 본 실험에서 노출한 각 물질의 농도 범위는 예비실험을 통해 결정을 하였다.

### 4. Comet assay 실험절차

Comet assay 실험은 Singh *et al.* (1988)의 실험법을 일부 수정하여 실시하였다. 구체적인 실험 절차는 다음과 같다 (Fig. 1). 노출 후, 마이크로 원심분리관으로 옮겨 5,000 rpm, 3분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상등액을 제거하고, 0.65% Low melting agarose (LMA) 50  $\mu\text{L}$ 로 재부유시켜 1% normal melting agarose (NMA)로 미리 코팅된 슬라이드에 25  $\mu\text{L}$ 를 취해 슬라이드 윗부분에 놓고 커버글라스를 덮었다. 나머지 25  $\mu\text{L}$ 에 다시 LMA 500  $\mu\text{L}$ 를 넣고 재부유시켜 25  $\mu\text{L}$ 를 취해 슬라이드의 아랫부분에 놓고 커버글라스로 덮었다. 약 3분간 얼음위에서 응고시킨 후, 다시 한 번 0.65% LMA 25  $\mu\text{L}$ 로 코팅시켜 얼음위에서 다시 3분간 응고시켰다. 커버글라스를 제거하고 lysis buffer solution (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.01 M Tris-HCl, 10% dimethyl sulfoxide, 1% Triton X-100)이 담긴 coplin jar에 넣고 2시간 이상 4°C에서 보관하여 주었다. 그 후, 4°C 증류수에 슬라이드를 3회 2분 간격으로 넣어주었다. 그런 다음, 슬라이드는 unwinding buffer solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13, 4°C)이 든 coplin jar로 옮겨 15분간 4°C에서 보관하였다. 15분간 unwinding buffer에 보관 후, 전기영동기에 슬라이드를 넣고 unwinding buffer solution으로 채워, 25 V, 300 mA, 25분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 슬라이드는 0.4 M

Tris-HCl solution (pH 7.5)에 3회 2분 간격으로 세척하여 주었다. 그리고 4°C 에탄올에 5분간 담궜 후 실온에서 건조시켰다. 건조된 슬라이드는 20  $\mu\text{L}$  ethidium bromide 용액으로 염색하여 형광현미

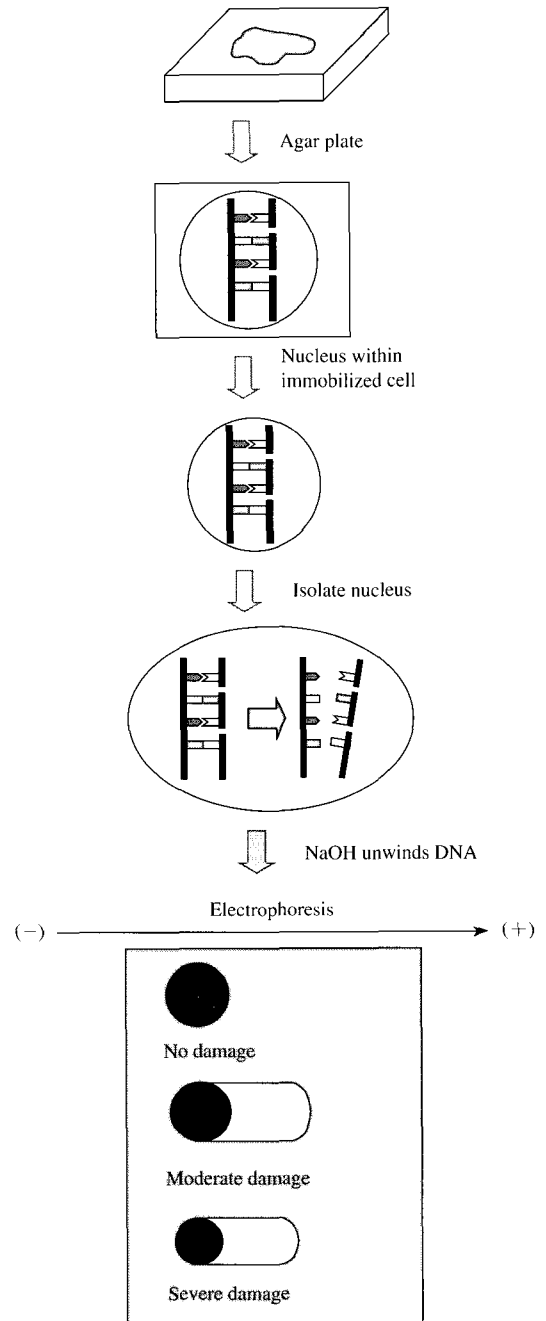


Fig. 1. A schematic diagram for a comet assay.

경 (Nikon Eclipse E200)으로 400배 배율에서 관찰하였다.

## 5. 분석 및 통계처리

각각의 슬라이드에서 50개의 핵을 분석하여 이미지 분석 프로그램 (Komet version 5, Kinet Imagine Ltd)을 이용하여 DNA Tail moment (부서진 DNA 꼬리의 길이 ( $\mu\text{m}$ )  $\times$  꼬리부분에 있는 DNA (%))를 계산하였다. 통계처리는 TOXSTAT (Gulley and WEST, Ind., 1996) 프로그램의 trimmed Spearman-Kärber method (Hamilton *et al.*, 1977)를 이용하여 계산하였다 ( $\alpha=0.05$ ).

## 결과 및 토의

### 1. 과산화수소

갯지렁이의 혈구세포를 과산화수소 0.01~10  $\mu\text{M}$ 의 농도에 노출한 결과, 대조구보다 통계적으로 유의하게 높은 DNA 손상을 보인 농도는 0.1, 1  $\mu\text{M}$  그리고 10  $\mu\text{M}$ 였고 ( $p<0.05$ ), 가장 높은 DNA 손상을 보인 농도는 10  $\mu\text{M}$ 이며, 이때 DNA 손상정도 (tail moment)가 8.4에 이르렀다 (Fig. 2).

과산화수소는 직접적인 DNA 손상을 주는 물질로, 어류 및 이매패류의 DNA 손상을 알아보는 실험이나 (Nacci *et al.*, 1996; Mitchelmore and Hyatt, 2004), 세포의 민감도를 알아보기 위한 예비실험으로 많이 이용되었다 (Mitchelmore and Chipman, 1998). 따라서 해양무척추동물에 대해서도 과산화수소를 이용하여 많은 연구들이 선행되었다 (Pruski and Dixon, 2002; Kim and Pae, 2003, Mitchelmore and Hyatt, 2004; Hook and Lee, 2004a). 기존의 실험 결과들을 본 연구 결과와 비교해 본 결과, 새우의 유생은 8.8  $\mu\text{M}$ , 굴의 아가미 조직은 10  $\mu\text{M}$ , 담치의 아가미 조직은 100  $\mu\text{M}$  그리고 말미잘은 200  $\mu\text{M}$ 에서부터 대조구와 통계적으로 유의한 차이 ( $p<0.05$ )를 보이기 시작하였다 (Table 1). 본 연구의 갯지렁이 혈구세포에서 대조구와 통계적으로 유의한 차이를 보이기 시작한 농도는 0.1  $\mu\text{M}$ 로, 이는 갯지렁이의 혈구세포가 다른 해양무척추동물의 조직에 비해 과산화수소에 대해 더 높은 민감도를 보여주는 것으로 판단되었다.

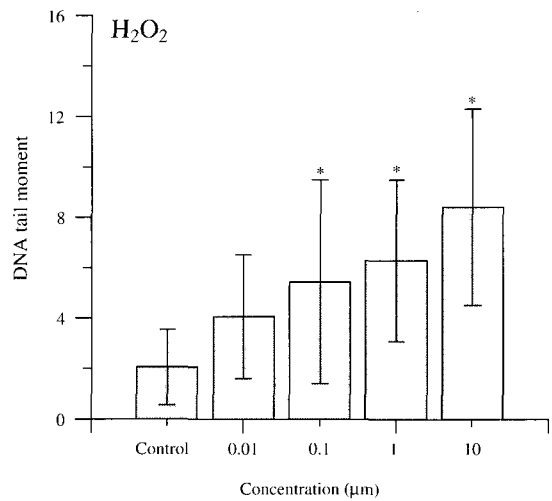


Fig. 2. Effect of genotoxicity of hydrogen peroxide on polychaetous blood cells. Error bars show standard deviation ( $n=50$ ) and '\*' means  $p<0.05$ .

Table 1. Comparison in the sensitivity of different marine invertebrates exposed to hydrogen peroxide in the comet assay (*in vitro* test)

| Species                                       | Cell type  | Concentration (* $p<0.05$ ) | Reference                   |
|---|------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Polychaeta ( <i>Perinereis aibuhitensis</i> ) | Blood cell | 0.01                        | Present study               |
|   |            | 0.1*                        |                             |
|   |            | 1*                          |                             |
|   |            | 10*                         |                             |
| Mussel ( <i>Mytilus edulis</i> )              | Gill       | 10                          | Pruski and Dixon, 2002      |
|   |            | 100*                        |                             |
| Oyster ( <i>Crassostrea gigas</i> )           | Gill       | 10*                         | Kim and Pae, 2003           |
|   |            | 100*                        |                             |
|   |            | 1000*                       |                             |
| Cnidaria ( <i>Anthopleura elegantissima</i> ) | Tissue     | 50                          | Mitchelmore and Hyatt, 2004 |
|   |            | 100                         |                             |
|   |            | 200*                        |                             |
| Grass shrimp ( <i>Palaemonetes pugio</i> )    | Embryo     | 8.8 (*)                     | Hook and Lee (b), 2004      |
|   |            | -Stage 4 17.7 (*)           |                             |
|   |            | -(Stage 7) 44.2 (*)         |                             |

### 2. 중금속

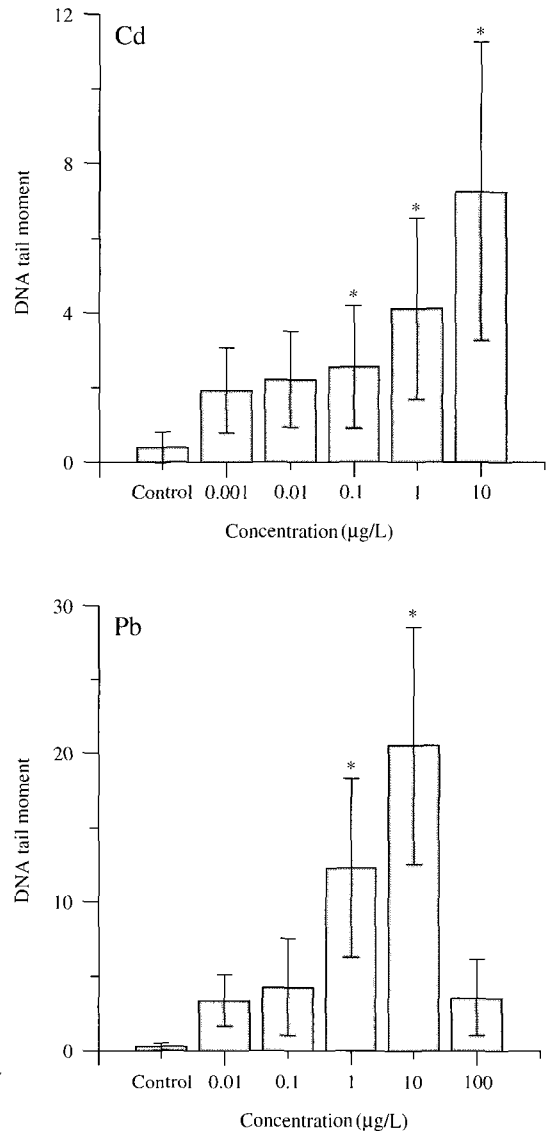
일반적으로 동물은 유전독성물질에 노출되어 DNA에 손상이 발생하였을 경우, 이것을 제거하거나 회복하려는 기작을 가진다 (Hook and Lee,

2004b). 카드뮴은 DNA 손상을 일으키기도 하는데, 직접적으로 반응하지 않고 Fenton 반응을 통해 ROS (reactive oxygen species)를 생성하여 DNA 손상을 유발한다(Potts *et al.*, 2001). 한편 카드뮴은 손상된 DNA의 회복을 방해하는 것으로도 알려져 있다(Hook and Lee, 2004a). 본 연구에서 카드뮴을 0.001~10 µg/L의 농도로 노출하였다. 처리구 중 10 µg/L에서 가장 높은 DNA 손상을 보였고, 대조구와 통계적으로 유의한 수준의 손상을 보인 농도는 0.1, 1 그리고 10 µg/L였다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3).

납은 인체의 신경조직, 내분비계, 신장조직 그리고 생식계에 영향을 미친다(Liu *et al.*, 2000; Danadevi *et al.*, 2003). 이러한 인체독성으로 인해 납에 대한 기존의 연구는 인간의 혈액을 대상으로 하였고 해양생물에 대한 연구는 극히 드물었다(Fracasso *et al.*, 2002; Danadevi *et al.*, 2003). 본 연구에서는 납을 0.01~100 µg/L의 농도에서 노출하였다. 가장 높은 DNA 손상을 보인 처리구는 10 µg/L였고, 대조구보다 통계적으로 유의하게 높은 DNA 손상을 보인 농도는 1 µg/L과 10 µg/L였다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3). 실험구 중 가장 높은 농도인 100 µg/L에서는 현미경 하에서 세포사(apoptosis, programmed cell dead)가 많이 관찰되었다. 이러한 세포사는 낮은 tail moment 값을 보였다. 따라서 본 연구에서는 세포사상태는 현미경으로 관찰할 때 제외를 하였고, 그 결과 100 µg/L에서는 tail moment가 3.6으로 10 µg/L 노출에 비해 낮은 값의 DNA 손상이 나타났다(Fig. 3). 다른 연구에서도 고농도의 유전독성물질에서 높은 DNA 손상과 세포사가 유도된다는 보고가 있었다. 또한 이러한 형태의 DNA 손상은 세포독성과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다(Steinert, 1996). 본 연구에서도 납 100 µg/L에서는 DNA 손상 뿐 아니라 세포독성을 일으켜 세포 스스로 사멸하게 되는 기작을 발현시키는 것으로 판단되었다.

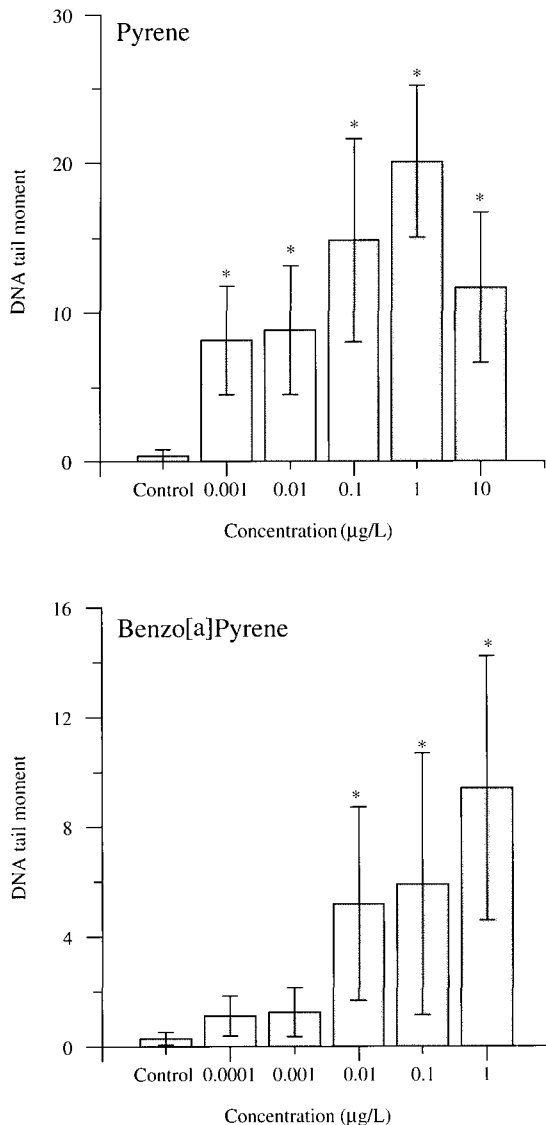
### 3. PAHs

PAHs와 같은 발암물질에 노출되면, DNA 손상이 야기된다. 이러한 DNA 손상은 라디칼에 의한 산화로 형성된 것이다(Farmer *et al.*, 2003). 산화에 의한 DNA 손상은 환경오염물질에 의해 유발되는 발암성 평가와 유전독성 평가에 대한 생물지시자로 사용이 되어 왔다(Park *et al.*, 2005). PAHs에 노출되



**Fig. 3.** Effects of genotoxicity of cadmium and lead on polychaetous blood cells. Error bars show standard deviation ( $n = 50$ ) and ‘\*’ means  $p < 0.05$ .

면 PAH-DNA adduct가 형성되어 DNA 회복을 방해한다(Ovrebø *et al.*, 1995; Rybicki *et al.*, 2004). Benzo[a]pyrene의 adduct 생성과정은 다음과 같다. B[a]P은 산화과정에서 P450을 유도하고 이 효소에 의해 B[a]P-7, 8-epoxide가 형성된다(Shimada *et al.*, 1998). Epoxide 형성 후, mEH (microsomal epoxide hydrolase)에 의해 dihydrodiol (B[a]P-7, 8-



**Fig. 4.** Effect of genotoxicity of PAHs on polychaetous blood cells. Error bars show standard deviation (n=50) and “\*” means  $p < 0.05$ .

dihydrodiol, BPD)로 변화되고, BPD는 AKRIC에 의해 ortho-quinone (B[a]P-7, 8-dione, BPQ)로 변환된다 (Burczynski and Penning, 2000). BPQ는 DNA에 결합하여 직접적으로 작용을 하거나, ROS를 형성하여 간접적으로 DNA에 손상을 일으킨다 (Flowers *et al.*, 1996).

이러한 PAHs에 의한 유전독성 평가에 갯지렁이

**Table 2.** Comparison of tail moments at the same concentration (\*:  $p < 0.05$ )

| Concentration (µg/L) | Pb               | Cd       | Pyrene           | B[a]P    |
|----------------------|------------------|----------|------------------|----------|
| Control              | 0.3±0.2          | 0.4±0.4  | 0.4±0.4          | 0.3±0.2  |
| <b>0.01</b>          | 3.4±1.7          | 2.2±1.3  | <b>8.8±4.3*</b>  | 5.2±3.5* |
| <b>0.1</b>           | 4.3±3.2          | 2.6±1.6  | <b>14.8±6.8*</b> | 5.9±4.8* |
| <b>1</b>             | 12.3±6.0*        | 4.1±2.4* | <b>20.1±5.1*</b> | 9.4±4.8* |
| <b>10</b>            | <b>20.6±8.0*</b> | 7.3±3.4* | 11.7±5.1*        | -        |

혈구세포가 얼마나 유용한지를 알아보기 위해, 본 연구에서는 pyrene과 B[a]P를 사용하여 실험하였다. Pyrene은 0.001~10 µg/L의 농도에서, B[a]P은 0.0001~1 µg/L의 농도에서 실험을 실시하였다. 그 결과 pyrene은 모든 실험 농도에서 대조구와 유의한 차이를 보였고 ( $p < 0.05$ ), B[a]P은 0.01~1 µg/L의 농도에서 대조구와 유의한 차이를 보였다 (Fig. 4). 납에서와 같이 pyrene에서도 가장 높은 농도인 10 µg/L에서는 세포사가 나타났으며 1 µg/L에 비해 낮은 DNA 손상이 나타났다. 위의 결과들을 종합하여 동일 노출 농도에서 각각의 화학물질의 DNA 손상정도를 비교해 보았다 (Table 2). 그 결과, 동일한 노출 농도인 1 µg/L에서 가장 높은 DNA 손상을 보인 물질은 pyrene으로 tail moment는 20.1이었다. 다음으로 높은 tail moment를 나타낸 물질은 납(12.3)이었고, B[a]P은 9.4의 tail moment 값을 보였으며, 카드뮴이 가장 낮은 손상(4.1)을 보였다. 이로부터 pyrene이 실험에 사용된 오염물질 중 가장 DNA 손상을 잘 일으키는 것으로 나타났다.

이와 같이 PAHs의 경우 직접적으로 DNA에 손상을 주기도 하지만 대부분이 ROS를 형성하거나 (Flowers *et al.*, 1996; Rybicki *et al.*, 2004), DNA adduct를 형성하여 간접적으로 손상을 준다 (Ovrebø *et al.*, 1995; Rybicki *et al.*, 2004). DNA adduct는 alkali-labile abasic site로 변환 후, DNA 가닥을 절단하기도 한다 (Phillips, 1983). 그러므로 기존의 연구들은 단기간에 실시하는 *in vitro* test보다는 *in vivo* test를 주로 실시하여 PAHs에 대한 DNA의 손상과 회복까지 동시에 관찰하였다 (Siu *et al.*, 2004; Hook and Lee, 2004a). 향후 본 실험실에서도 DNA 손상과 함께 회복에 이르는 시간에 대한 연구를 더 수행하고자 한다. 또한 실제 해양환경의 유전독성평가에도 갯지렁이 혈구세포가 적용가능

한지에 대해서도 연구하고자 한다.

## 결 론

직접적으로 DNA에 손상을 주는 과산화수소와 대표적인 유전독성물질로 DNA 회복(repair)을 방해하는 것으로 알려진 카드뮴과 신경독성물질인 납, 그리고 유기오염물질 중 대표적 유전독성물질인 pyrene과 benzo[a]pyrene에 갯지렁이 혈구세포를 노출시킨 후, comet assay로 DNA 손상정도를 측정하였다. 그 결과 과산화수소는 10 µM, 카드뮴과 납은 10 µg/L에서 가장 높은 DNA 손상이 나타났다. Pyrene과 benzo[a]pyrene은 1 µg/L에서 가장 높은 손상을 보였다. Pyrene은 4개의 독성물질 중 동일 농도에서 가장 높은 DNA 손상을 보여, 갯지렁이 혈구세포는 pyrene에 가장 민감한 것을 알 수 있었다. 반면 동일 농도에서 가장 낮은 DNA 손상을 보인 물질은 카드뮴이었다. 납과 pyrene은 가장 높은 농도에서 비교적 낮은 DNA 손상이 나타났는데 이는 현미경 관찰에서 제외된 세포사(apoptosis)에 의한 것으로 판단되어진다. 위와 같이 모든 처리구에서 DNA 손상이 관찰되었으며, 민감도에 있어서도 다른 해양무척추동물에 비해 높게 나타났다.

지금까지 지렁이를 이용한 생물검정은 주로 육상지렁이를 이용하였으며, 갯지렁이는 오염된 퇴적물에 노출시켜 사망률을 알아보는 정도였다. 그러나 본 연구를 통해 처음으로 갯지렁이가 해양생태계 모니터링에서 저농도의 오염물질을 탐색할 수 있는 새로운 생물종으로 사용할 수 있음을 처음으로 보여주었다.

## 감사의 글

본 연구는 “남해안 특별관리해역의 해양환경위해성평가연구: 마산만 연안 중심 (PE 91800)”의 지원으로 수행되었으며, 본 연구에 도움을 주신 해양연구원 이택견 박사님과 김소정 연구원에게 감사를 전합니다.

## 참 고 문 헌

- 과학기술부, 해산 갯지렁이 자원조사 및 사육기법 개발. 1990, BSPG 00098-307-3, pp 83~91.
- Akcha F, Burgeot T, Pfohl-Leszkowicz A, Budzinski H and Narbonne JF. Induction and elimination of bulky B[a]P-related DNA adducts and 8-oxodGue in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed *in vitro* to B[a]P-contaminated feed, Mar Ecol Prog Ser 2000; 205: 195-206.
- Akcha F, Leday G and Pfohl-Leszkowicz A. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage, Mut Res 2004; 552: 197-207.
- Bach L, Palmqvist A, Rasmussen LJ and Forbes VE. Differences in PAH tolerance between *Capitella* species: Underlying biochemical mechanisms, Aqu Toxicol 2005; 74: 307-319.
- Burczynski ME and Penning TM. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor, Can Res 2000; 60: 908-915.
- Danadevi K, Rozati R, Banu BS, Rao PH and Grover P. DNA damage in workers exposed to lead using comet assay, Toxicol 2003; 187: 183-193.
- Devi KD, Banu BS, Grover P and Jamil K. Genotoxic effect of lead nitrate on mice using SCGE (comet assay), Toxicol 2000; 145: 195-201.
- Devi M, Thomas DA, Barber JT and Fingerman M. Accumulation and Physiology and biochemical effects of cadmium in a simple aquatic food chain, Eco Env Saf 1996; 33(1): 38-43.
- Farmer PB, Singh R, Kaur B, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Garte S, Taioli E, Gabelova A and Wasilewska AC. Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage, Mut Res 2003; 554: 397-402.
- Flowers L, Bleczynski WF, Burczynski ME, Harvey RG and Penning TM. Disposition and biological activity of benzo[a]pyrene-7, 8-dione. A genotoxic metabolite generated by dihydrodiol dehydrogenase, Biochem 1996; 35: 13664-13672.
- Fracasso ME, Perbellini L, Solda S, Talamini G and Francesc-

- hetti P. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C, *Mut Res* 2002; 515: 159–169.
- Gulley DD, West, Inc. TOXSTAT 3.5. West, Inc., Cheyenne, WY, 1996.
- Hagger JA, Fisher AS, Hill SJ, Depledge MH and Jha AN. Genotoxic, cytotoxic and ontotoxic effects of tri-*n*-butyltin on the marine worm, *Platynereis dumerilii* (Polychaeta: Nereidae), *Aqu Tox* 2002; 57: 243–255.
- Hamilton MA, Russo AC and Thurston RV. Trimmed Spearman–Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays, *Env Sci Tec* 1977; 11: 714–719.
- Hassoun EA and Stohs SJ. Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell culture, *Toxicol* 1996; 112: 219–226.
- Hartwig A. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition, *Toxicol Lett* 1998; 102–103: 235–239.
- Hook SE and Lee RF. Interactive effects of UV, benzo[a]pyrene, and cadmium on DNA damage and repair in embryos of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*, *Mar Env Res* 2004a; 58: 735–739.
- Hook SE and Lee RF. Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stages of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* embryo as measure by the comet assay, *Aqua Toxicol* 2004b; 66: 1–14.
- Kim GB and Pae SJ. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and gill of oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to pyrene and benzo(a)pyrene, *J Aquacul* 2003; 16(3): 196–201.
- Liu MY, Hsieh WC and Yang BC. *In vitro* aberrant gene expression as the indicator of lead-induced neurotoxicity in U-373MG cells, *Toxicol* 2000; 147: 59–64.
- Livingstone DR. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms, *Mar Poll Bull* 2000; 42: 656–666.
- Martin FL, Pearce TG, Hewer A, Phillips DH and Semple KT. A biomarker model of sublethal genotoxicity (DNA single-strand breaks and adducts) using the sentinel organism *Aporrectodea longa* in spiked soil, *Env Pol* 2005; 138: 307–315.
- Mitchelmore CL and Chipman JK. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay, *Aqua Toxicol* 1998; 41: 161–182.
- Mitchelmore CL and Hyatt S. Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay, *Mar Env Res* 2004; 58: 707–711.
- Nacci DE, Cayula S and Jackim E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organism using the single cell gel assay, *Aqu Tox* 1996; 35: 197–210.
- Ovrebø S, Haugen A, Hemminki K, Szyfter K, Drablos PA and Skogland M. Studies of biomarkers in aluminum workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Can Det Pre* 1995; 19: 259–267.
- Park SY, Lee KH, Kang D, Ha EH and Hong YC. Effects of genetic polymorphisms of MnSOD and MPO on the relationship between PAH exposure and oxidative DNA damage, *Mut Res* 2005 (in pressed).
- Pillipps DH. Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature* 1983; 303: 468–472.
- Potts RJ, Bespalov IA, Wallace SS, Melamede RJ and Hart BA. Inhibition of oxidative DNA repair in cadmium-adapted alveolar epithelial cells and potential involvement of metallothionein, *Toxicol* 2001; 161: 25–38.
- Pruski AM and Dixon DR. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L, *Aqua Toxicol* 2002; 57: 127–137.
- Reinecke SA and Reinecke AJ. The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms, *Arc Env Con Toxicol* 2004; 46: 208–415.
- Romeo M, Gnassia-Barelli M and Lafauria M. Heavy metals pollution in marine food chains, *J Eur Hydrol* 1995; 26(2): 227–238.
- Rybicki BA, Rundle A, Saveria AT, Sankey SS and Tang D. Polycyclic aromatic hydrocarbon–DNA adduct in prostate cancer, *Can Res* 2004; 64: 8854–8859.
- Shimada T, Yamazaki H, Foroosh M, Hopkins NE, Alworth WL and Guengerich FP. Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1, *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 1048–1056.
- Shimizu M, Hochadel JF and Waalkes MP. Effects of glutathione depletion on cadmium-induced metallothionein synthesis, cytotoxicity, and proto-oncogene expression in cultured rat myoblasts, *J Tox Env Health* 1997; 51: 609–621.
- Singh NP, McCoy MT and Tice RR. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell, *Exp Cell Res* 1988; 175: 184–191.
- Siu WHL, Cao L, Jack RW, Wu RSS, Richardson BJ, Xu L and Lam PKS. Application of the comet and micronucleus assay to the detection of B[a]P genotoxicity in hemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*), *Aqu Toxicol* 2004; 66: 381–392.
- Steinert SA. Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells, *Mar Env Res* 1996; 42: 253–



259.

Taban IC, Bechmann RK, Torgrimesn S, Baussant T and Sanni S. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay, *Mar Env Res* 2004; 58: 701–705.

Verschaeve L and Gilles J. Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils, *Bull Env Con Toxicol* 1995; 54:

112–119.

Zang Y, Zhong Y, Luo Y and Kong ZM. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*, *Env Pol* 2000; 108: 271–278.

Zhong Z, Troll W and Frenkel KL. Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by human polymorphonuclear leukocytes, *Cancer Res* 1990; 50: 7564–7570.