

이산화염소의 활성산소 발생에 따른 화랑곡나방 심장박동 억제 효과

김철영 · 권혁¹ · 김욱¹ · 김용균*

안동대학교 식물의학과, ¹고려대학교 생명공학부

Inhibitory Effect of Chlorine Dioxide Using Reactive Oxygen Species Against Heart Contraction of the Indianmeal Moth, *Plodia interpunctella*

Chul-young Kim, Hyeok Kwon¹, Wook Kim¹ and Yonggyun Kim*

Department of Plant Medicinals, Andong National University, Andong 36729, Republic of Korea

¹Department of Biosystems and Biotechnology, Korea University, Seoul 02841, Korea

ABSTRACT: Heart contraction is essential for insect hemolymph circulation, in which various physiological changes need control of the heart contraction. Thus, interruption of heartbeats intimidate insect survival. Chlorine dioxide induces release of reactive oxygen species (ROS), which has been regarded as the main insecticidal agent. This study analyzed the effect of chlorine dioxide on heartbeats of the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. The larvae have the dorsal vessel on the medial dorsal region in a form of an extending tube from the first thorax to 10th abdominal segment. Dorsal vessel contraction was noticeable between 3rd and 10th abdominal segments, where five heart chambers were observed. Average heartbeat rate was 118.6 beats per min at 25 °C. However, the heartbeats varied with ambient temperature. Injection of chlorine dioxide to hemocoel suppressed the heartbeats in a dose-dependent manner. The suppressive effect of chlorine dioxide also increased with exposure time to gas form of the chemical at 100 ppm. However, vitamin E (an antioxidant against ROS) treatment significantly rescued the larvae treated with chlorine dioxide in the heart contraction activity. These results suggest that chlorine dioxide negatively influences on the heart contraction of *P. interpunctella* via its production of ROS.

Key words: Chlorine dioxide, Heartbeat, Reactive oxygen species, *Plodia interpunctella*

조 록: 곤충의 혈액순환은 심장 박동에 의해 도움을 받는다. 다양한 생리적 변화는 심장 박동 조절을 수반하게 된다. 심장박동에 대한 교란은 곤충의 생존을 위협하게 된다. 본 연구는 활성산소를 유발하여 살충력을 발휘하는 이산화염소가 혈액순환계에 미치는 영향을 심장박동을 통해 분석하였다. 화랑곡나방(*Plodia interpunctella*) 유충의 등핏줄은 몸의 윗면 중앙에 위치하고 후방으로 복부 10번째 마디에서 시작하여 전방으로 첫 번째 가슴 마디까지 연결된 관 구조를 나타냈다. 등핏줄의 수축과 이완은 주로 복부 3-10번째 마디에 위치한 등핏줄에서 일어났으며 이 부위에 5개의 심실이 관찰되었다. 심장박동빈도는 25°C에서 분당 평균 118.6회의 수축 리듬을 보였다. 그러나 온도에 따라 심장박동빈도는 현격한 변화를 보였다. 혈장에 이산화염소를 다양한 농도로 투여한 경우 심장박동빈도는 약제 농도 증가에 따라 감소하였다. 이산화염소(100 ppm)을 혼중 처리할 경우 노출 시간의 경과에 따라 심장박동리듬이 현격하게 감소하였다. 이러한 이산화염소의 심장박동 억제효과는 활성산소 저해제인 비타민 E와 함께 주입할 경우 회복되는 현상을 나타냈다. 이상의 결과는 이산화염소가 화랑곡나방의 심장박동에 억제효과를 주었으며 이러한 억제효과는 이 물질이 유발하는 활성산소에 기인된 것으로 해석된다.

검색어: 이산화염소, 심장박동, 활성산소, 화랑곡나방

곤충은 개방혈관계를 가지고 있다(Hertel and Pass, 2002). 따라서 혈액은 혈관 속에 갇혀 있지 않고 체강에 노출되어 혈장

과 체액이 합쳐진 혈체강(hemocoel)을 이루게 된다. 또한 혈액은 림프액과 합쳐 혈림프(hemolymph)로 존재하게 된다. 척추동물에서는 혈액이 산소를 운반하기 위해 혈관 속에 갇혀 빠르게 순환되지만, 곤충은 산소운반이 기관지를 통해 이뤄지기에 혈림프 순환을 빠르게 가동시킬 필요가 없다(Tartes et al., 2002). 그러나 몸 전체에 영양분, 호르몬 및 다양한 대사물질을

*Corresponding author: hosanna@anu.ac.kr

Received February 7 2017; Revised March 26 2017

Accepted April 15 2017

전달하기 위한 혈림프 순환이 필요하다. 이를 위해 부분적으로 혈관 구조인 등핏줄(dorsal vessel)을 지니게 된다. 이 등핏줄은 둘로 나뉘어 몸의 뒷부분에 심장(heart) 그리고 앞부분에 대동맥(aorta)으로 구성된다. 심장은 유입심문(incurrent ostia)을 가지고 있어 혈관내로 혈림프의 이동이 가능하며 심장 박동을 통해 관내 이동이 가능해진다. 특히 심장 주변에 존재하는 익상근(alary muscle)의 수축은 이완기 심장을 보다 확장하여 등핏줄 내부의 혈림프 순환을 도와준다(Chiang et al., 1990). 심장에서 전방이동을 통해 대동맥으로 이동한 혈림프는 머리 부분에서 혈체강으로 빠져나가 후방 및 하향으로 흐르게 된다. 이후 신경 주위강(perineural sinus)에 모인 혈림프는 복면격막(ventral diaphragm)과 등면격막(dorsal diaphragm)의 상하운동으로 다시 심장주위강(pericardial sinus)으로 모여 혈림프 순환을 이루게 된다.

심장박동은 심장수축의 자율적 수축활동 주기에서 비롯된 근원성 리듬과 여기에 복면신경색에서 비롯된 심장주변의 신경자극으로 기본 수축 리듬에 변화를 주게 된다(Miller, 1997). 생리적 변화는 내분비계를 통하여 심장근육의 수축리듬을 조절하게 되는데 대표적으로 CAP (cardioacceleratory peptide) 호르몬이 이러한 기능을 담당하게 된다(Tublitz and Truman, 1983). CAP은 심장이 확장되는 때 익상근의 근육 수축을 도와 심장 박동 효율을 촉진시키게 된다. 특별히 탈피 때 분비되는 CCAP (crustacean CAP)는 심장박동을 크게 촉진시켜 혈림프의 순간 이동 속도를 증가시켜 허물벗기를 돕게 되고, 성충의 경우 우화 후에 날개 신장에 도움을 주게 된다(Hamoudi et al., 2016). 따라서 심장박동의 이상은 생리적 교란을 주어 곤충의 생존에 위협을 주게 된다.

이산화염소는 낮은 농도에서 음용수의 소독제로서 이용되는 화학물질이다(Young, 2016). 높은 산화력을 바탕으로 표백제로도 사용된다. 이산화염소를 가스형태로 기체화한 훈증 제형이 개발되었고, 이는 공공시설 및 병원에 서식하는 의학해충(벼룩, 이 등)을 구제하는데 효과적이라고 발표하였다(Gibbs et al., 2012). 이산화염소가 곤충을 치사시키는 기작이 저곡해충인 화랑곡나방(*Plodia interpunctella*)과 거짓쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum*)을 통해 밝혀졌다. 이산화염소 처리에 따라 세포 내 활성산소(ROS; reactive oxygen)가 축적되었고, 이로 말미암아 체내 산화적 피해를 유발하여 대상 곤충을 치사에 이르게 한 것으로 판명되었다(Kumar et al., 2015). 거짓쌀도둑거저리 경우 이러한 ROS는 직접적으로 중추신경계에 작용하여 acetylcholinesterase의 활성을 교란하여 성충의 음성주광성 행동을 교란시켰다(Kim et al., 2015b). 또한 화랑곡나방의 경우 혈장에 존재하는 페놀옥시데이즈 효소 활성을 억제하여

화랑곡나방의 면역작용을 둔화시켰다(Kim et al., 2015a). 활성산소의 작용이 생체 내 다양한 분자 수준에서 이뤄질 수 있기에(Sanz, 2016) 이산화염소가 여러 생리 기관에 교란을 미칠 수 있다고 판단하였다. 이에 본 연구는 이산화염소의 살충기작을 보다 광범위하게 이해하려는 목적으로 이 물질이 곤충의 순환계에 미치는 영향을 알아보기 위해 화랑곡나방의 심장박동을 대상으로 이 물질의 억제 효능을 분석하였다.

재료 및 방법

화랑곡나방 사육

본 연구에서 이용된 공시충의 사육은 Kim et al. (2015a)에 기술된 방법을 따랐다.

이산화염소 제조

Kim et al. (2015a)에 기술된 전기분해방식으로 이산화염소 분리하여 800 ppm의 저장 용액을 대상으로 실험에 이용하였다. 이 저장 용액은 증류수를 분석하려는 농도로 희석하였다. 가스 형태의 이산화염소 처리는 Kumar et al. (2015)의 방법을 따랐다.

심장박동 관찰

화랑곡나방 5령충을 대상으로 심장 박동을 조사하였다. 유충의 복부 등면 부위를 해부현미경(EZ4, Leica, Germany) 하에서 관찰하였다. 심장박동은 복부 두 번째 심실(C2, Fig. 1 참조)을 대상으로 관찰하였다. 심장박동수 측정은 1분간 조사하였으며, 각 개체 당 10회 계수하여 평균값을 대상 개체의 대표치로 측정하였다. 각 처리는 5마리로 반복되었다.

온도에 따른 심장박동 변화 분석

처리 온도는 모두 5가지(15, 20, 25, 30, 35°C)였다. 분석 대상 5령충을 각 온도에 24시간 방치한 후 심장박동수를 상기의 방법으로 측정하였다.

이산화염소 처리에 따른 심장박동 변화 분석

처리 이산화염소 농도는 모두 6종류(0, 8, 80, 200, 400, 800 ppm)로 상기의 방법으로 제조하였다. 각 농도의 이산화염소를

25°C에 방치된 화랑곡나방 5령충에 각각 300 nL를 주입하였다. 주입 후 25°C에서 20분간 방치 후 심장박동수를 상기의 방법으로 측정하였다. 미량주사는 Kumar et al. (2015)의 방법을 따랐다. 기체 형태의 이산화염소는 100 ppm의 농도를 기준으로 차리 시간별(0, 1, 3, 6, 12 h)로 노출시켰다. 노출 직후 심장박동수를 측정하였다.

비타민 E 처리에 따른 이산화염소 처리 효과 분석

비타민 E (α -tocopherol, Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea)는 dimethylsulfoxide에 녹여 0.475 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 준비하였다. 이를 화랑곡나방 5령충 혈강에 1 μL 로 주입하였다. 주입 후 25°C에서 20분간 방치 후 심장박동수를 상기의 방법으로 측정하였다.

통계분석

심장박동 결과는 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 one-way ANOVA 분석을 실시하였고 평균간 비교는 LSD 방법을 이용하였다. 처리 사이에 차이는 제 I 형 오류의 확률 0.05를 기준으로 판별하였다.

결 과

화랑곡나방의 등핏줄 형태

화랑곡나방 5령충의 등핏줄이 관찰되었다(Fig. 1). 유충의 연한 표피층을 통해 복부 4-5마디 사이로 보이는 등핏줄을 관찰하였다(Fig. 1A). 등핏줄의 세부 구조를 관찰하기 위해 복부 절개를 통해 등면 체벽 내부에 붙어있는 등핏줄 전체의 모습을 관찰하였다(Fig. 1B). 등핏줄은 복부 10번째 마디에서 첫 번째 가슴 마디까지 단일관 구조로 뻗어 있었으며, 이 가운데 복부 3번째 마디에서 10번째 마디까지는 등핏줄 주변에 익상근이 발달해서, 이 부위가 심장이라는 것을 확인할 수 있었다. 이 심장 부위에 5개의 심방이 관찰되었다. 따라서 복부 2번째 마디에서 가슴 첫 번째 마디까지 뻗은 등핏줄은 대동맥으로 간주되었다.

온도에 미치는 화랑곡나방 심장박동

화랑곡나방의 주변 온도에 따른 심장박동 변화를 분석하였다(Fig 2). 상온(25°C) 조건에서 5령충은 분당 평균 118.6 \pm 10.7회 박동빈도를 나타냈다. 그러나 온도가 내려가면서 심장박동수는 현저하게($P < 0.05$) 줄어들어 15°C에서는 약 71회의

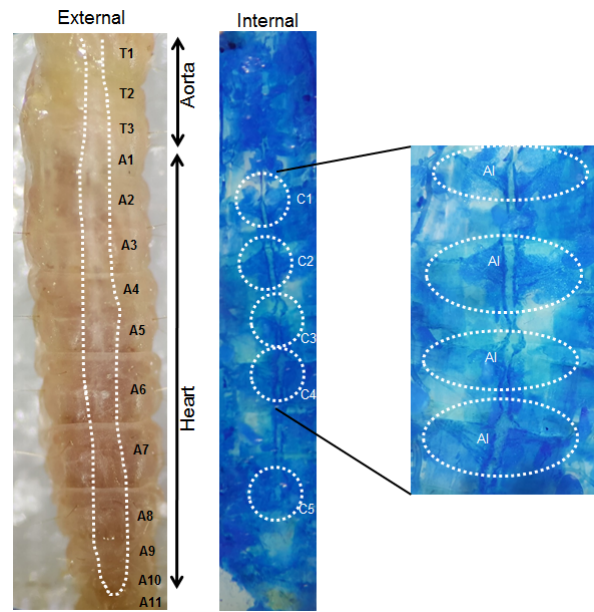


Fig. 1. Structure of dorsal vessel of *P. interpunctella* larvae. External view was taken from dorsal view (50 x magnification), in which three thorax segments (T1-T3) and eleven abdominal segments (A1-A11) are discernable. Dorsal vessel (within dotted line) was visible through transparent cuticle. Internal view was obtained from dissection. To be visible, tissues were stained with 0.05% methylene blue. Five circles indicate five heart chambers (C1-C5, 50 x magnification). These heart chambers are magnified (100 x) and show wing-shaped alary muscles.

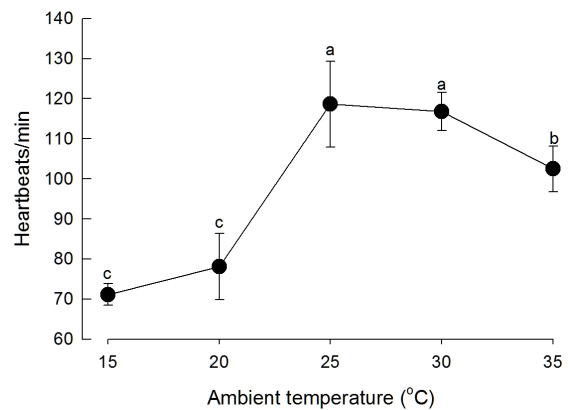


Fig. 2. Influence of ambient temperature on heartbeats of *P. interpunctella* larvae. Five different larvae were assessed in each temperature treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05.

심장박동수를 나타냈다. 또 온도를 증가하면 심장박동이 증가하나 35°C에서는 오히려 현저히($P < 0.05$) 낮은 심장박동수를 기록하였다. 이를 토대로 다른 모든 처리 효과는 25°C 온도 조건에서 분석하였다.

이산화염소 처리에 따른 화랑곡나방 심장박동 억제 효과

이산화염소가 화랑곡나방 심장박동수에 미치는 효과를 분석하기 위해 서로 다른 농도의 이산화염소를 5령 유충에 주입하였다(Fig 3). 주입한 이산화염소 농도가 높아짐에 따라 심장박동수는 감소하였다. 특히 400 ppm 이상의 이산화염소가 주입하게 될 경우 심장박동수는 현저하게 줄어($P < 0.05$) 대조구에 비해 약 80% 감소하였다.

이산화염소 혼중 처리에 따른 화랑곡나방의 심장박동에 미치는 영향이 분석되었다(Fig. 4). 화랑곡나방 5령충을 대상으로 100 ppm의 이산화염소를 처리할 경우 처리 시간이 증가함에 따라 심장박동수가 현저하게($P < 0.05$) 감소하였다.

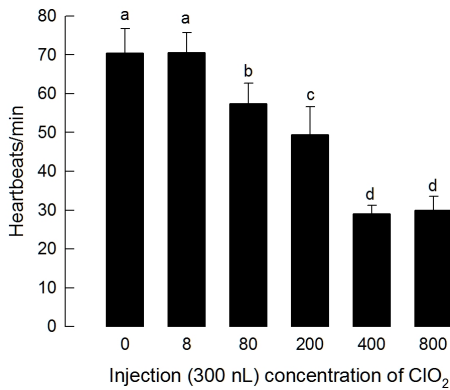


Fig. 3. Inhibitory effect of chlorine dioxide (ClO₂) on heartbeats of *P. interpunctella* larvae. ClO₂ was injected to hemocoel in 300 nL volume. After 20 min, the heartbeats were measured. Five different larvae were assessed in each temperature treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05.

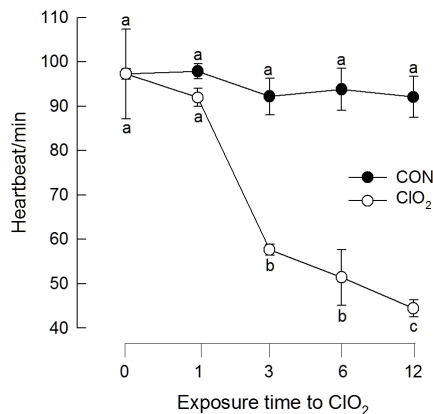


Fig. 4. Exposure to gas form of 100 ppm chlorine dioxide (ClO₂) and its time-dependent influence on heartbeats of *P. interpunctella* larvae. Right after the gas treatment, the heartbeats were measured. Five different larvae were assessed in each temperature treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05.

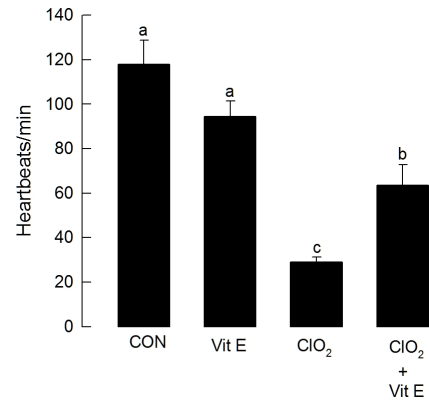


Fig. 5. Rescue effect of vitamin E (475 ng per larva) on *P. interpunctella* larvae treated with chlorine dioxide (ClO₂, 400 ppm). At 20 min after chemical injection, the heartbeats were measured. Five different larvae were assessed in each temperature treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05.

이산화염소 효과에 대한 비타민 E 길항작용

이산화염소 400 ppm을 화랑곡나방에 처리할 경우 심장박동수는 현저하게($P < 0.05$) 감소하였다(Fig. 5). 그러나 여기에 비타민 E를 함께 주입할 경우 심장박동수는 회복되었다.

고찰

본 연구는 화랑곡나방을 대상으로 심장박동수를 측정하여 이산화염소의 독성 작용을 분석하였다. 심장박동을 측정하기에 앞서 이 곤충의 등핏줄 구조를 관찰하였다. 등핏줄은 크게 두 부분으로 심장과 대동맥으로 구분되었다. 심장 주변은 익상근이 분포되어 있어 심장 박동을 도와줄 것으로 추정하였다. 이에 반하여 대동맥은 이들 익상근이 분포하지 않았고, 수축 리듬을 관찰하기 어려웠다. 화랑곡나방 유충의 등핏줄 구조는 얇은 체벽 덕택으로 해부하지 않고 유충 윗면에서 관찰할 수 있었고, 여기에 심장박동 또한 관찰이 가능하였다. Miller (1974)는 곤충 심장박동이 기내(*in vitro*)조건에서 측정되는 것과 생체(*in vivo*)조건에서 약물투여에 따라 반응하는 정도가 상이한 것을 지적하였다. 예로서 미국바퀴벌레(*Periplaneta americana*)의 경우 심장박동촉진호르몬으로서 동정된 [Arg(7)]-corazonin이 기내조건에서 나타나던 박동 촉진 효과가 생체조건에서는 전혀 나타나지 않았다는 점에서 이러한 차이를 이해할 수 있다 (Sláma et al., 2006). 따라서 본 연구에서 심장박동 측정을 생체 조건에서 측정하는 것은 화랑곡나방의 본래 리듬을 대표하였다는 점을 의미할 수 있다.

생체조건에서 화랑곡나방 유충의 심장박동은 분당 약 120 회를 기록하였고, 이러한 심장박동수는 주변 온도의 변화에 따라 변화하였다. 화랑곡나방에 대한 심장박동이 외부기생봉인 *Bracon hebetor*의 기생에 따라 변동되는 지 분석되었는데, 이때 비기생체 화랑곡나방 유충의 경우 약 분당 85회의 리듬을 나타냈고 기생된 유충도 큰 통계적 차이 없이 심장박동리듬을 유지하였다(Shim et al., 2008). 두 연구의 심장박동수 차이는 동시에 병렬실험을 수행하지 않아 판단하기 어렵지만, 두 실험실 대상 곤충의 유전적 차이 또는 환경차이와 더불어 두 연구 모두 관찰자의 시각에 의존되어 실험자의 차이도 있을 수 있다. 또 다른 변이는 상이한 발육시기일 수 있다. 박각시나방류 (*Manduca sexta*)에서는 유충 시기에 분당 약 34.8회의 심장박동이 번데기에서는 21.5회로 줄고 다시 성충시기에는 47.6회로 증가하였다(Smits et al., 2000). 또한 심장박동은 개체의 활동성과도 차이를 보여 *M. sexta* 성충의 경우 빠르게 움직이는 개체와 느리게 움직이는 개체 사이에도 심장박동수는 차이를 보였다. 본 연구에서는 화랑곡나방의 심장박동이 온도에 따라 상이하였다. 낮은 온도에서 느려지고 높은 온도에서 증가하여 이러한 활동성과 관련을 가졌다.

이산화염소의 처리는 화랑곡나방의 심장박동을 크게 둔화시켰다. 처리된 농도는 화랑곡나방에 치명적이지 않았다. 따라서 이산화염소에 의한 심장박동 둔화는 이 약제의 다양한 생리적 교란 가운데 하나로 해석되었다. 본 연구에서 심장박동을 둔화시키는 이산화염소의 작용점은 밝히지 않았다. 이산화염소는 산화제로 자신은 최대 5개의 전자와 결합하여 염소 이온으로 전환될 수 있다. 이러한 높은 산화력에 바탕으로 이산화염소에 대한 기존의 연구는 이산화염소를 처리할 경우 곤충 세포 내에서 다량의 ROS를 발생시켰다(Kim et al., 2015a,b). 따라서 이산화염소가 유기시키는 ROS에 기인되어 심장 박동에 대한 억제작용으로 추정하여 보았다. 이를 증명하기 위해 비타민 E를 혼합하여 처리하였다. 이는 비타민 E가 항산화제로서 ROS 발생을 억제하기 때문에(Brigelius-Flohé and Traber, 1999; Kumar et al., 2015) 이 처리를 고안하였다. 이 혼합 처리 결과 이산화염소의 심장박동 억제효과는 현격하게 줄어들었다. 즉, 이산화염소는 ROS 발생을 유기하여 화랑곡나방의 심장박동을 둔화시킨 것으로 해석되었다.

사 사

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술 평가원의 농생명산업기술개발사업(114063-03)의 지원을 받아 연구되었다.

Literature Cited

- Brigelius-Flohé, R., Traber, M.G., 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 13, 1145-1155.
- Chiang, R.G., Chiang, J.A., Davey, K.G., 1990. Morphology of the dorsal vessel in the abdomen of the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus*. *J. Morphol.* 204, 9-23.
- Gibbs, S.G., Lowe, J.J., Smith, P.A., Hewlett, A.L., 2012. Gaseous chlorine dioxide as an alternative for bedbug control. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 33, 495-499.
- Hamoudi, Z., Lange, A.B., Orchard, I., 2016. Identification and characterization of the corazonin receptor and possible physiological roles of the corazonin-signaling pathway in *Rhodnius prolixus*. *Front. Neurosci.* 10, 357.
- Hertel, W., Pass, G., 2002. An evolutionary treatment of the morphology and physiology of circulatory organs in insects. *Comp. Biochem. Physiol. A* 133, 555-575.
- Kim, Y., Kumar, S., Rahman, M.M., Kwon, H., Chon, Y., Na, J., Kim, W., 2015a. Evasive behavior of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, against chlorine dioxide and its suppression by heat treatment. *Korean J. Appl. Entomol.* 554, 151-158.
- Kim, Y., Park, J., Kumar, S., Kwon, H., Na, J., Chun, Y., Kim, W., 2015b. Insecticidal activity of chlorine dioxide gas by inducing an oxidative stress to the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *J. Stored Prod. Res.* 64, 88-96.
- Kumar, S., Park, J., Kim, E., Na, J., Chun, Y.S., Kwon, H., Kim, W., Kim, Y., 2015. Oxidative stress induced by chlorine dioxide as an insecticidal factor to the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Pesti. Biochem. Physiol.* 124, 48-59.
- Miller, T.A., 1974. Electrophysiology of the insect heart. In: Rockstein, M. (Ed.), *Physiology of the Insecta*, 2nd Edn. Vol. V, pp. 169-200. Academic Press, New York.
- Miller, T.A., 1997. Control of circulation in insects. *Gen. Pharmacol.* 29, 23-38.
- Sanz, A., 2016. Mitochondrial reactive oxygen species: Do they extend or shorten animal lifespan? *Biochim. Biophys. Acta* 1857, 1116-1126.
- SAS Institute, Inc., 1989. SAS/STAT user's guide. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Shim, J.K., Ha, D.M., Nho, S.K., Song, K.S., Lee, K.Y., 2008. Upregulation of heat shock protein genes by envenomation of ectoparasitoid *Bracon hebetor* in larval host of Indian meal moth *Plodia interpunctella*. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 306-309.
- Sláma, K., Sakai, T., Taneda, M., 2006. Effect of corazonin and crustacean cardioactive peptide on heartbeat in the adult American cockroach (*Periplaneta americana*). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 62, 91-103.
- Smits, A.W., Burggren, W.W., Oliveras, D., 2000. Developmental changes in *in vivo* cardiac performance in the moth *Manduca sexta*.

-
- J. Exp. Biol. 203, 369-378.
- Tartes, U., Vanatoa, A., Kuusik, A., 2002. The insect abdomen--a heartbeat manager in insects? Comp. Biochem. Physiol. A 133, 611-623.
- Tublitz, N.J., Truman, J.W., 1983. Insect cardioactive peptides. II. Neurohormonal control of heart activity by two cardioacceleratory peptides in the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. J. Exp. Biol. 114, 381-395.
- Young, R.O., 2016. Chlorine dioxide (ClO₂) as a non-toxic antimicrobial agent for virus, bacteria and yeast (*Candida albicans*). Int. J. Vaccines Vaccin. 2, 00052.