



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

**A THESIS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE**

**Flow cytometric characterization of hemocyte of the mussel  
*Mytilisepta virgata* (Wiegmann, 1837) and effect of heat  
wave stress on hemocyte parameters**

**Chang-Wan Kim**

**Department of Marine Life Science**

**GRADUATE SCHOOL**

**JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

**August, 2019**

# Flow cytometric characterization of hemocyte of the mussel

*Mytilisepta virgata* (Wiegmann, 1837) and effect of heat

wave stress on hemocyte parameters

**Chang-Wan Kim**

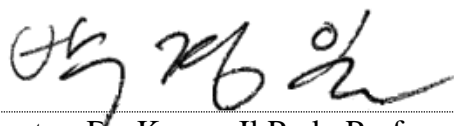
(Advised by Professor Kwang-Sik Choi)

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement for the  
degree of

**Master of Science**

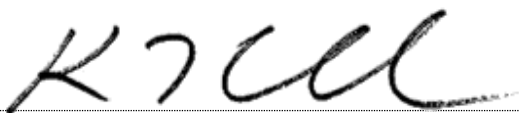
June 2019

This dissertation has been examined and approved by



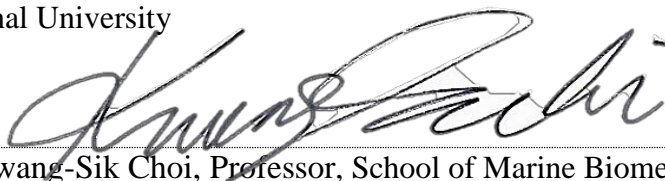
---

Thesis director, Dr. Kyung-Il Park, Professor, Department of Aquatic Life  
Medicine, College of Ocean Science and Engineering, Kunsan National  
University



---

Dr. Kyeong-Jun Lee, Professor, School of Marine Biomedical Science, Jeju  
National University



---

Dr. Kwang-Sik Choi, Professor, School of Marine Biomedical Science, Jeju  
National University

June 2019

Date

**Department of Marine Life Science  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

# 목 차

ABSTRACTS .....	iii
LIST OF FIGURES .....	v
LIST OF TABLES.....	vi
1. 서론 .....	1
2. 재료 및 방법.....	5
2.1. 시료 채집.....	5
2.2. 혈림프액 (hemolymph) 채집.....	7
2.3. 광학현미경을 이용한 혈구 특성 파악.....	7
2.4. 유세포분석기를 이용한 혈구 특성 파악 .....	8
2.4.1 혈구 종류 (Hemocyte type)와 혈구 수 (Hemocyte count).....	8
2.4.2 혈구 사멸률 (Hemocyte mortality).....	9
2.4.3. 혈구의 식세포 능력 (Phagocytosis capacity) 측정.....	9
2.4.4. Reactive oxygen species (ROS) 발생량 측정 .....	10
2.4.5 세포 내 lysosome 함량 측정 .....	10
2.5. 폭염 스트레스에 노출된 담치의 혈구 반응.....	11
2.5.1. 실험 디자인 .....	11
2.5.2. 유세포분석기를 이용한 혈구 반응 변화 측정 .....	12
3. 결과 .....	13
3.1. 혈구 종류와 혈구 수.....	13
3.2. 혈구 종류별 형태적 특징 .....	15
3.3. 혈구 종류별 기능적 특징 .....	17
3.3.1 식세포 능력 .....	17
3.3.2. ROS 발생량.....	18
3.3.3 세포질 내 lysosome 함량.....	19
3.4. 폭염환경에서의 혈구 변화 .....	20
3.4.1. 누적 사망률 .....	20
3.4.2. 총 혈구 수.....	21

3.4.3. 혈구 사멸률 .....	22
3.4.4. DNA 손상도 .....	23
3.4.5. 혈구 식세포 능력 .....	24
3.4.6. 혈구 ROS 발생량 .....	25
4. 고찰 .....	27
4.1. 굽은줄격판담치 혈구의 형태 및 기능적 특성 .....	27
4.2. 폭염환경에서의 혈구 변화 .....	30
5. 결론 .....	33
6. 참고문헌 .....	35

## ABSTRACTS

굽은줄격판담치 (*Mytilisepta virgata* Wiegmann, 1837)는 조간대 중상부 암반에 고착하여 서식하는 소형 담치류로, 우리나라 전 연안의 암반 조간대에 군집을 이루어 분포한다. 이 연구에서는 유세포분석기와 광학현미경을 이용하여 굽은줄격판담치의 혈구의 형태와 기능을 최초로 구명하였다. 굽은줄격판담치의 혈구는 형태와 기능에 따라

granulocytes, hyalinocytes, blast-like cells의 세 종류로 나뉘었다. Granulocytes는 세포질 내 수 많은 과립 (granules)들이 있는 반면, hyalinocytes는 세포질 내 과립이 없었다. 유세포분석기를 이용한 면역 기능 분석 결과, granulocytes가 hyalinocytes보다 식세포 (phagocytosis) 능력과 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 발생 능력이 높으며 세포질 내 lysosome 함량이 많아 granulocytes가 주된 면역 세포인 것으로 확인되었다. Blast-like cells은 세포질이 매우 얇아 세포의 크기가 매우 작은 구형 세포로 식세포 능력과 ROS 발생 능력이 거의 없는 미분화 세포였다. 폭염 환경에서의 굶은줄격판담치의 적응 능력을 파악하기 위하여 40 °C의 기온에 노출시켰다. 폭염에 노출된 담치는 66 시간 후 폐사가 발생하였으며 126 시간 후에는 모든 개체가 폐사하였다. 폐사가 발생하기 시작한 66시간 후에는 담치의 혈구 사멸률과 혈구 DNA 손상도가 대조구 개체들에 비해 유의적으로 ( $P<0.05$ ) 증가하였다. 노출 90시간 이후에는 담치의 혈구 식세포율이 대조구에 비해 유의적으로 ( $P<0.05$ ) 감소하였다. 혈구 세포 내 ROS 발생량은 노출 초기에 증가하여 산화 스트레스가 발생하였으나, 노출 90시간 이후에는 ROS 발생 능력이 감소하였다. 이번 연구를 통해 굶은줄격판담치가 폭염 환경에 66시간 이상 지속적으로 노출시 반치사 (sub-lethal) 뿐만 아니라 치사 (lethal) 수준에서의 영향이 있을 수 있음이 확인되었다.

## List of Figures

<b>Fig. 1.</b> Location of sampling site .....	6
<b>Fig. 2.</b> Three hemocyte types from <i>Mytilisepta virgata</i> were determined using a combination of flow cytometry and light microscopy .....	14
<b>Fig. 3.</b> Phagocytosis capacity of the granulocytes and hyalinocytes of <i>Mytilisepta virgata</i> .....	17
<b>Fig. 4.</b> Reactive oxygen species (ROS) production of the granulocytes and hyalinocytes of <i>Mytilisepta virgata</i> .....	19
<b>Fig. 5.</b> Lysosome contents of the granulocytes and hyalinocytes of <i>Mytilisepta virgata</i> .....	20

<b>Fig. 6.</b> Cumulative mortality of <i>Mytilisepta virgata</i> exposed to heat wave stresses	21
<b>Fig. 7.</b> Total hemocyte count (THC) of <i>Mytilisepta virgate</i> exposed to heat wave stresses	22
<b>Fig. 8.</b> Hemocyte mortality (%) of <i>Mytilisepta virgata</i> exposed to heat wave stresses	23
<b>Fig. 9.</b> DNA damage (%) in hemocytes of <i>Mytilisepta virgata</i> exposed to heat wave stresses	24
<b>Fig. 10.</b> Phagocytosis capacity (%) of <i>Mytilisepta virgata</i> exposed to heat wave stresses	25
<b>Fig. 11.</b> Reactive oxygen species (ROS) production of hemocytes of <i>Mytilisepta virgata</i> exposed to heat wave stresses	26



## List of Tables

**Table1.** Total hemocyte count (THC) and percentage of each hemocyte types ..... 15

**Table2.** Cell and nucleus diameters and nucleus/cell (N/C) ratio ..... 16

# 1. 서론

이매패류는 혈구 (hemocytes)와 체액성 인자들 (humoral factors)로 구성된 선천 면역 시스템 (innate immune system)을 보유하고 있으며, 혈구는 혈림프액 (hemolymph) 안에서 모든 조직세포 사이를 자유롭게 순환하며 내부 면역 외에도 영양분의 소화와 이동, 손상된 폐각과 조직의 수선, 대사물질 분비, 삼투압 조절, 가스 교환 등에 관여를 하며 생리적 안정상태 (homeostasis)를 유지하기 위해 다양한 변화를 나타낸다 (Cheng 1981; Donaghy et al. 2009b).

다양한 환경 변화뿐만 아니라 질병과 같은 생물학적 스트레스에 대한 이매패류의 세포성 면역 반응을 이해하기 위해서는 혈구의 종류와 기능을 파악하는 것이 우선이다. 이매패류의 혈구는 연구자에 따라 분석 방법에 따라 다양하게 분류가 되지만, 일반적으로 세포질 내 과립 (granules)의 유무에 따라 과립이 많은 granulocytes와 과립이 거의 없는 hyalinocytes의 2 가지 주요 세포 종류로 나뉜다 (Cheng 1981; Hine 1999). Granulocytes와 hyalinocytes는 모두 위족 (pseudopodia)을 형성하고 있어 외부로부터 침입한 물질들로 이동하여 식작용 (phagocytosis) 또는 피포화 (encapsulation)를 하고 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)와 다양한 가수분해 효소들을 분비하여 제거하는 방어 작용을 한다 (Cheng 1981; Hine 1999). 두 세포 중에서도 granulocytes가 hyalinocytes 보다 이러한 면역 기능들이 활발하여 granulocytes가 이매패류의 주된 면역 세포로 알려져 있다 (Cheng 1981; Hine 1999; Donaghy et al. 2009b). 그리고 세포질이 매우 얇아 세포의 크기가 상당히 작으며 면역학적 기능들이 없는 미분화된 세포들도 다양한 이매패류들에서 분류가

되고 있다 (Cima et al. 2000; Aladaileh et al. 2007; Travers et al. 2008; Donaghy et al. 2009b, 2010; Hong et al. 2013, 2014).

담치류는 조간대 암반에 부착하여 생활하는 고착성 저서생물로 해수 내 부유물을 여과 섭취하여 오염물질들을 체내에 농축하는 정도가 높으며 다양한 환경변화에 대해 생리적 안정상태를 유지하기 위한 다양한 생리학적 변화를 나타내기 때문에 해양환경의 장·단기적 변화를 파악하기 위한 지표종 (bioindicator species)로 활용할 수 있다. 그러나 담치류의 혈구 특성 및 기능 연구는 *Mytilus edulis* (Le Foll et al. 2010; Renwranz et al. 2013), *M. galloprovincialis* (Cajaraville and Pal 1995; Carballal et al. 1997, 1998), *M. coruscus* (Yang et al. 2015), *Perna perna* (Barracco et al. 1999) and *P. viridis* (Donaghy and Volety 2011; Wang et al. 2012) 등의 Mytilinae 아과 (subfamily)에서만 보고되고 있다.

굵은줄격판담치 (*Mytilisepta virgata*)는 Septiferinae 아과에 속하는 종으로 인도-서태평양 지역의 조간대 중상부 암반에 군집을 이루어 분포한다 (Morton 2019). 이 종은 두꺼운 폐각과 강한 족사 (byssal)의 부착 능력이 있어 조간대 중상부에서의 강한 유속과 파도에 잘 견딜 수 있다 (Gerdol et al. 2017). Huq (1997)에 의하면 굵은줄격판담치는 동일한 지역의 조간대 하부에 서식하는 *M. edulis* 보다 높은 온도와 공기 노출에 저항력이 강하여 조간대 중상부에 우점종으로 분포할 수 있다. 우리나라에서는 전 연안의 조간대 중상부 암반에 널리 분포하는 종이지만 이들의 세포성 면역 시스템에 대한 연구는 전무하다.

폭염은 평소보다 더운 날씨가 수일 이상 지속되는 현상으로 지역별 기후와 주민의 더위에 대한 적응도를 반영하여 폭염에 대한 기준을 정의한다. 우리나라

라 기상청의 의하면 일 최고기온이 33°C 이상이 2일 지속될 경우를 폭염주의보라 하며 35°C 이상이 2일 이상 지속될 경우를 폭염경보라 한다. 2018년 전국 평균 폭염일수는 31.4일로 관측 이래 역대 최장 기록이었으며, 강원도 홍천은 일 최고 기온이 41°C로 최고치를 경신하는 등 극한의 기온변화를 보이고 있다. 제주도의 경우 2016년 8월에 7일동안 폭염특보가 유지된 적이 있었다 (기상청 2018). 최근 10년 동안 기후변화에 의해 여름철 기온이 상승하고 있으며 폭염의 빈도와 강도가 증가하고 있다. 조간대 증상부에 서식하는 고착성 저서생물들은 이동성이 없기 때문에 간조 시 폭염 환경에 쉽게 노출이 된다. 대부분의 고착성 저서생물들은 높은 기온이나 공기 노출 등에 견딜 수 있는 능력이 있으나, 폭염과 같은 극한 환경에 지속적으로 노출된다면 이들이 생물학적으로 허용할 수 있는 범위를 초과할 수 있다 (Mislán et al. 2015).

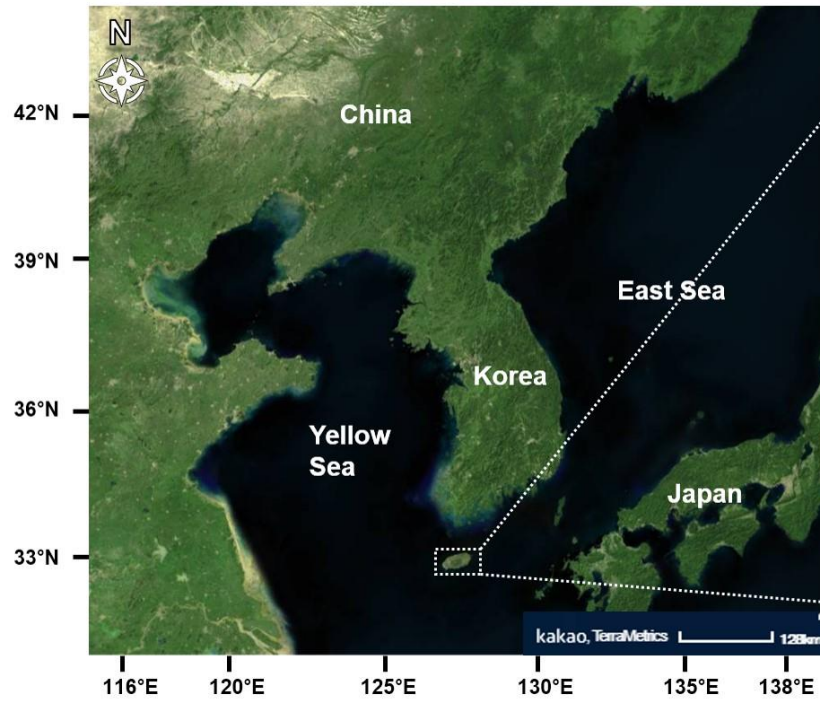
이번 연구에서는 광학현미경과 유세포분석기를 이용하여 굽은줄격판담치 혈구의 형태와 기능 파악을 통해 혈구 종류를 최초로 구명하였다. 그리고 폭염 환경에서의 굽은줄격판담치의 스트레스 반응을 이해하기 위하여, 인위적인 폭염 환경에 노출시킨 후 유세포분석기를 이용하여 담치의 총 혈구 수, 혈구 사멸률, 혈구 DNA 손상도, 식세포 능력 및 활성산소 발생량 등의 면역 능력을 측정하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시료 채집

실험에 사용된 굵은줄격판담치는 2019년 3월 8일, 4월 17일 2회에 걸쳐 제주도 서귀포시 화순금모래해수욕장 (위도 33° 14' 25" N, 경도 126° 19' 53" E)에서 채집되었다 (Fig. 1). ). 채집 지역의 조간대 암반에 부착되어 있는 담치 중 크기가 큰 개체들을 대상으로 채집하였다. 채집된 담치는 즉시 실험실로 옮겨와 채집 지역에서 가져온 해수에 48시간 동안 순치하여 채집과 운송 중에 발생할 수 있는 스트레스를 최소화하였다. 1차 채집된 개체들은 혈구의 특성 규명에 사용하였고, 2차 채집된 개체는 폭염환경에서의 혈구 변화 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 담치의 크기는 각장 (shell length) 32.1-43.7 mm (평균 37.5 mm), 각고 (shell height) 14.7-21.1 mm (평균 18.0 mm), 각폭 (shell width) 12.9-19.0 mm (평균 15.7), 총 중량 (total weight) 0.74-1.66 g (1.16 g) 이었다.





**Fig. 1.** Location of sampling site: 33°14'25"N; 126°19'53"E

## 2.2. 혈림프액 (hemolymph) 채집

담치의 각장 (shell length)을 측정 후 후폐각근 (posterior adductor muscle) 으로부터 22G 1/4”의 주사바늘이 장착된 1 ml 주사기를 이용하여 약 600  $\mu$ l의 혈림프액을 채집하였다. 채집된 혈림프액은 혈구세포들의 응집을 방지하기 위하여 얼음에 보관된 1.5 ml tube로 즉시 옮겼다. 모든 분석은 개체별로 실시하였으며, 총 20 개체의 혈림프액을 이용하여 혈구의 종류와 기능 파악에 사용하였다.

## 2.3. 광학현미경을 이용한 혈구 특성 파악

100  $\mu$ l 혈림프액을 poly-L-lysine으로 코팅된 유리슬라이드에 도말한 후 실온의 습윤 챔버에서 30분간 부착시켰다. 혈구가 부착된 유리슬라이드는 100% 메탄올에 5분간 고정시킨 후 Hemacolor reagent (Merck, Darmstadt, Germany)로 세포 염색을 하였다. 염색이 끝난 슬라이드는 커버슬라이드로 봉입 후 디지털카메라가 장착된 광학현미경으로 혈구의 형태를 관찰하고 사진을 촬영하였다. 촬영된 세포들은 화상분석 프로그램 (Image J 1.43u)을 이용하여 세포와 핵 크기를 측정하였다.

## 2.4. 유세포분석기를 이용한 혈구 특성 파악

담치의 혈구 종류, 총 혈구 수, 혈구 사멸률을 파악하고, 혈구 식세포 능력, 활성산소 발생량, 세포 내 lysosome 함량 등의 면역 기능을 파악하기 위하여



유세포분석기 (CytoFLEX flow cytometer, Beckman Coulter Life Sciences, USA)를 이용하였다.

#### 2.4.1. 혈구 종류 (Hemocyte type)와 혈구 수 (Hemocyte count)

혈림프액 중 혈구 형태별 세포를 분류하기 위하여 DNA 이중가닥에 부착하는 형광색소인 SYBR green I (Thermo Fisher Scientific, USA)을 이용하였다. 100  $\mu$ l의 혈림프액을 동일량의 3% 포르말린에 고정시킨 후, 2  $\mu$ l의 1000x SYBR green I (final dilution=10x)을 첨가하여 실온의 암실에서 30분간 반응시켰다. 유세포분석기의 green fluorescence detector를 이용하여 SYBR green I에 염색된 세포들만을 선택한 후, Forward Scatter (FSC)와 Side Scatter (SSC)를 이용하여 세포의 크기와 밀도에 따라 혈구 종류를 분류하고 각 종류 별 구성 비율을 측정하였다. 총 혈구 수는 혈림프액 내 혈구의 수(cells/ml)로 계산하였다.

#### 2.4.2. 혈구 사멸률 (Hemocyte mortality)

혈구 사멸률은 DNA 이중가닥에 부착하지만 세포막은 통과 하지 못하는 Propidium Iodide (PI; Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 분석하였다. PI는 세포막이 불안정화되거나 세포막이 파괴되어 사멸된 세포들만을 특이적으로 염색할 수 있다. 100  $\mu$ l의 혈림프액을 동일량의 항응고제 (anti-aggregant solution; 2.5% NaCl and 1.5% EDTA in 1.0M phosphate buffer, pH 7.4)를 혼합 한 후 2  $\mu$ l의 PI (2 mg/ml; final concentration = 20  $\mu$ g/ml)를 첨가하여 실온의 암실에서 10분간 반응시켰다. 유세포

분석기의 red fluorescence detector를 이용하여 PI에 과하게 염색된 혈구만을 선택한 후 전체 혈구에 대한 비율을 계산하여 혈구 사멸률 (%)로 나타내었다.

### 2.4.3. 혈구의 식세포 능력 (Phagocytosis capacity) 측정

혈구의 식세포율을 측정하기 위해 2.0  $\mu\text{m}$  직경의 형광 bead (fluorescent bead; Polyscience Inc., USA)를 이용하였다. 형광 bead는 멸균 해수에 2%로 희석하여 사용하였다. 100  $\mu\text{l}$ 의 혈림프액에 동일량의 멸균 해수에 희석한 후 20  $\mu\text{l}$ 의 2% 형광 bead를 첨가하여 실온의 암실에서 180분간 식세포 작용을 유도하였다. 유세포 분석기의 green fluorescence detector를 이용하여 형광 bead를 식작용한 혈구들을 선택한 후 전체 혈구 수에 대한 비율을 계산하여 phagocytosis capacity로 나타내었다. 반응 후 10, 30, 60, 90, 120, 180분마다 측정하여 시간 별 식세포율의 변화를 조사하였다.

### 2.4.4. Reactive oxygen species (ROS) 측정

세포 내에서 발생하는 활성산소종의 발생량을 측정하기 위해 2',7'-dichlorofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ; Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하였다.  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ 는 활성산소종과 반응하면 형광을 띄는 dichlorofluorescein(DCF)로 변한다. 100  $\mu\text{l}$ 의 혈림프액을 동일량의 멸균해수에 희석 후, 2  $\mu\text{l}$ 의 DCFH-DA (final concentration = 10  $\mu\text{M}$ )를 첨가하여 실온의 암실에서 180분간 반응 시켰다. 유세포 분석기의 green fluorescence detector를 이용하여 혈구 내 활성산소종들에 의해 발

생하는 DCF의 형광정도를 측정하여 arbitrary units (A.U.)으로 나타내었다. 반응 후 10, 30, 60, 90, 120, 180분 마다 측정하여 혈구 세포의 ROS 발생량 변화를 조사하였다.

#### 2.4.5. 세포 내 lysosome 함량 측정

혈구 내 lysosome의 함량을 확인하기 위하여 세포막을 투과하여 lysosome에 축적이 되어 형광을 띄는 LysoTracker Red (Invitrogen, USA)를 사용하였다. 100  $\mu$ l의 혈림프액을 일량의 멸균해수에 희석 후 2  $\mu$ l의 LysoTracker Red (final concentration = 1  $\mu$ M) 첨가하여 실온의 암실에서 60분간 반응시켰다. 유세포분석기의 red fluorescence detector를 이용하여 혈구 내 lysosome 함량에 따라 발생하는 형광 강도를 측정하여 arbitrary units (A.U.)으로 나타내었다.

### 2.5. 폭염 스트레스에 노출된 담치의 혈구 반응

#### 2.5.1. 실험 디자인

실험구는 폭염 환경을 조성하기 위하여 인큐베이터의 온도를 40 °C로 설정하였으며 대조구는 실온의 환경에서 실시하였다. 6.5 L 크기의 플라스틱 수조에 채집 지역의 해수를 6 L 채운 후 100 개체의 담치를 넣어 에어스톤을 이용하여 해수 내 충분한 산소를 공급하였다. 일반적인 간조와 만조의 주기는 6시간으로 조건대 암반에 서식하는 담치의 경우 간조시 6시간 동안 공기중에 노출됨을 가

정하여, 6시간 동안은 공기에 노출시키고 6시간 동안은 다시 해수를 채워 넣는 과정을 반복하였다. 노출 후 6, 18, 30, 42, 54, 66, 78, 90, 102, 114, 126 시간마다 패각이 열려있는 개체들을 확인하여 누적 폐사율을 계산하였다. 그리고 각 시간마다 생존한 개체들 중에서 5개체씩 무작위로 선택하여 혈구 반응을 측정하였으며, 측정이 끝난 개체들은 실험 수조에서 제거하였다.

### 2.5.2. 유세포분석기를 이용한 혈구 반응 변화 측정

유세포 분석기를 이용하여 담치의 총 혈구 수, 식세포율, 활성산소 발생량 및 혈구 DNA 손상도를 측정하였다. 혈림프액 채집 방법과 총 혈구 수, 식세포율, 활성산소 발생량 측정은 혈구 특성 조사에서 사용한 동일한 방법을 이용하였다.

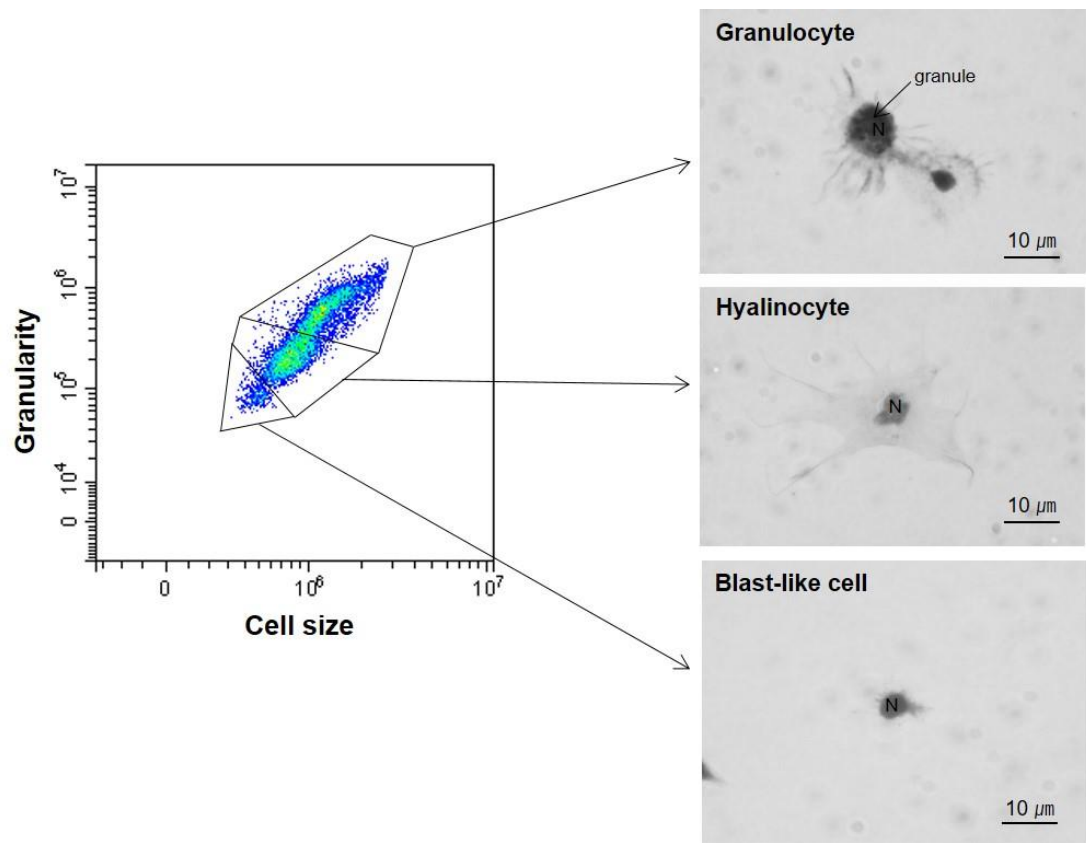
혈구의 DNA 손상도 측정을 위하여 100  $\mu$ l의 혈림프액을 냉동실에 보관되었던 900  $\mu$ l absolute ethanol과 혼합하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간동안 permeabilization시켰다. 14,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상등액을 제거하고 1x PBS로 2회에 걸쳐 세척하였다. 세척이 끝난 후 300  $\mu$ l PBS를 넣어 균질화한 후 5  $\mu$ l RNase (10 mg/ml)을 첨가하여 30분 동안 RNA를 제거하고 10  $\mu$ l의 PI (2 mg/ml)을 첨가하여 실온의 암실에서 30분간 DNA 염색을 하였다. 유세포 분석기를 이용하여 단일 세포 형태의 혈구만을 선택한 후 Red fluorescence/Count histogram 에서 cell cycle을 작성하였다. DNA가 손상되어 절편된 sub G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>에 해당되는 부분을 선택하여 전체 혈구에 대한 비율로 계산하였다.

### 3. 결과

#### 3.1. 혈구 종류와 혈구 수

광학현미경과 유세포분석기 분석 결과 굵은줄격판담치의 혈구는 형태적인 특징에 따라 granulocytes, hyalinocytes, blast-like cells의 3가지 종류로 구분이 되었다. Granulocytes는 세포질 내에 수많은 과립 (granules)들이 있으며 세포 표면에 긴 위족 (pseudopodia)들을 형성하고 있었다 (Fig. 2). Hyalinocytes도 세포 표면에 긴 위족들이 있지만 세포질 내 과립들이 없는 것이 특징이었다 (Fig. 2). Blast-like cells은 구형으로 세포질이 상당히 얇아 세포의 크기가 매우 작았다 (Fig. 2).

유세포분석기를 이용한 분석에서도 혈구 크기와 내부 밀도에 따라 granulocytes, hyalinocytes, blast-like cells의 3 종류로 구분이 되었다 (Fig. 2). 혈림프액 내 총 혈구 수는 최소  $3.5 \times 10^5$  cells/ml, 최대  $2.7 \times 10^6$  cells/ml의 범위로 평균  $1.3 \times 10^6$  cells/ml 였다. 혈구 사멸률은 최소 0.2%, 최대 4.5%의 범위로 평균 0.9%로 조사되었다. 혈구 종류 중 granulocytes가 평균 56.5 %로 가장 많았으며, hyalinocytes와 blast-like cells은 각각 평균 29.3%와 12.6%로 구성되어 있었다 (Table 2).



**Fig. 2.** Three hemocyte types from *Mytilisepta virgate* were determined using a combination of flow cytometry and light microscopy. N, nucleus.

**Table 2.** Total hemocyte count (THC) and percentage of each hemocyte types

	N	Mean ± SE	Min	Max
THC (cells/ml)	20	$1.3 \times 10^6 \pm 1.5 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$2.7 \times 10^6$
Mortality (%)	20	$0.9 \pm 0.2$	0.2	4.5
Granulocytes (%)	20	$56.5 \pm 1.8$	44.2	79.0
Hyalinocytes (%)	20	$29.3 \pm 1.9$	11.6	45.5
Blast-like cells (%)	20	$12.6 \pm 1.5$	4.4	35.6

### 3.2. 혈구 종류별 형태적 특징

광학현미경을 이용하여 측정한 혈구 종류 별 세포 (C)와 핵 (N)의 크기, 세포 크기에 대한 핵 크기의 비율 (N/C ratio)을 측정한 결과 혈구 별 세포의 크기는 hyalinocytes가 평균  $12.96 \mu\text{m}$ 로 가장 컸으며, granulocytes는  $8.93 \mu\text{m}$ , Blast-like cells은  $5.62 \mu\text{m}$ 였다 (Table 2). 핵의 평균 크기는 hyalinocytes가  $3.96 \mu\text{m}$ , granulocytes가  $3.50 \mu\text{m}$ , blast-like cells이  $3.98 \mu\text{m}$ 로 비슷하였다 (Table 2). N/C ratios는 blast-like cells이 평균 0.71로 가장 높았으며, granulocytes와 hyalinocytes가 각각 0.39와 0.31으로 비슷하였다 (Table 3).

**Table 3.** Cell and nucleus diameters and nucleus/cell (N/C) ratio. Different letter (a-c) represent significant (one way ANOVA,  $P < 0.05$ ) difference

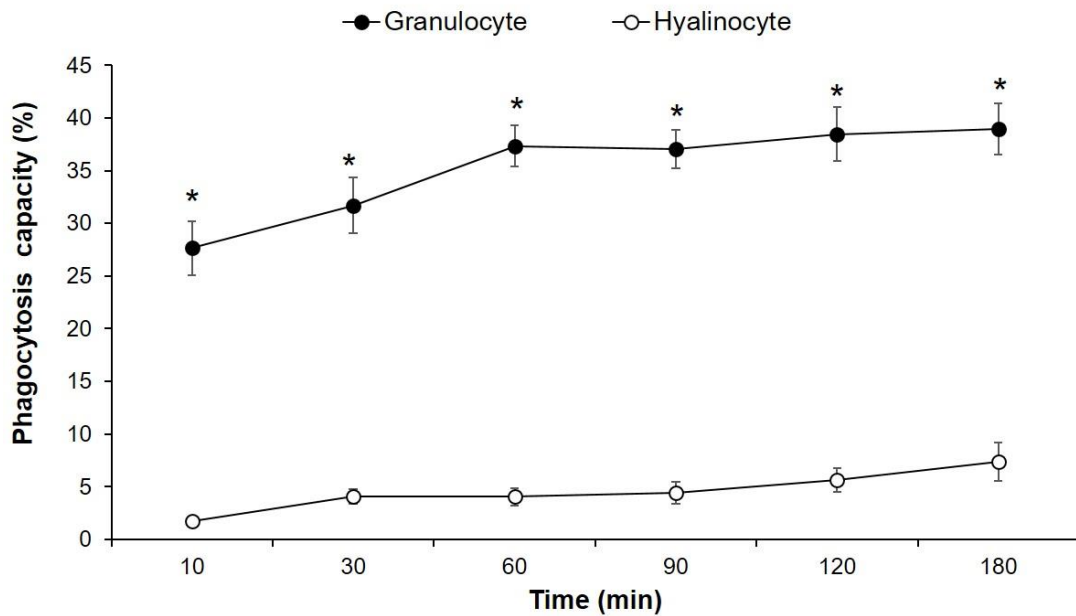
	N	Cell ( $\mu\text{m}$ )			Nucleus ( $\mu\text{m}$ )			N/C ratio		
		Mean $\pm$ SE	Min	Max	Mean $\pm$ SE	Min	Max	Mean $\pm$ SE	Min	Max
Granulocytes	20	8.93 <sup>b</sup> $\pm$ 0.31	6.50	11.80	3.56 <sup>b</sup> $\pm$ 0.15	3.09	5.98	0.40 <sup>b</sup> $\pm$ 0.02	0.30	0.62
Hyalinocytes	20	12.96 <sup>a</sup> $\pm$ 0.43	9.83	15.75	4.36 <sup>a</sup> $\pm$ 0.15	3.59	5.90	0.34 <sup>c</sup> $\pm$ 0.01	0.24	0.46
Blast-like cells	10	5.62 <sup>c</sup> $\pm$ 0.18	4.55	6.22	3.98 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.14	3.55	4.81	0.71 <sup>a</sup> $\pm$ 0.02	0.61	0.80



### 3.3. 혈구 종류별 기능적 특징

#### 3.3.1. 식세포 능력

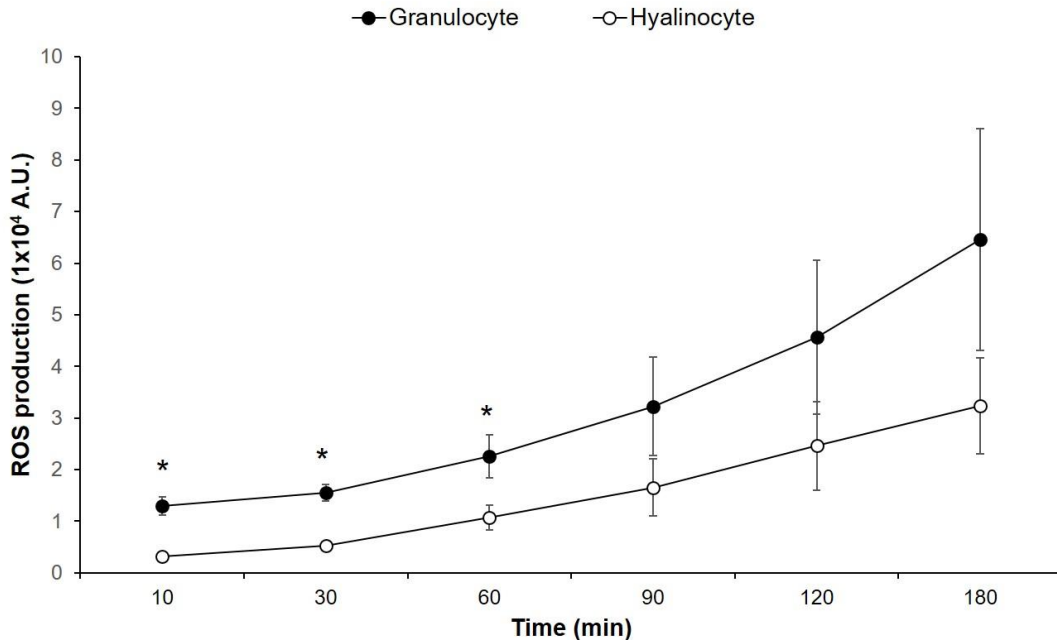
Granulocytes와 hyalinocytes는 형광 bead를 식작용하는 반면, blast-like cells은 식작용하지 못하였다. 반응 초반부터 granulocytes는 hyalinocytes 보다 식세포율이 월등하게 높았다 (Fig. 3). Granulocytes의 식세포율은 반응 10분 후 27.6%였으며 시간이 경과함에 따라 지속적으로 증가하여 반응 180분 후에는 39%에 이르렀다 (Fig. 3). Hyalinocytes의 식세포율은 반응 10분 후 1.7%였으며 시간이 경과함에 따라 증가하여 반응 180분 후에는 7.4%였다 (Fig. 3).



**Fig. 3.** Phagocytosis capacity of the granulocytes and hyalinocytes of *Mytilisepta virgate*. Values are presented as mean  $\pm$  SE. n=20. Asterisk (\*) represent significant (t-test,  $P < 0.05$ ) difference between granulocytes and hyalinocytes.

### 3.3.2. Reactive oxygen species (ROS) 발생량

Blast-like cells은 ROS 발생량이 상당히 적었기 때문에 ROS 발생량 결과 그래프에서 제외하였다. Granulocytes의 ROS 발생량은 반응 시간 내내 hyalinocytes의 ROS 발생량보다 높았지만, 반응 90분 후부터는 두 세포 간의 ROS 발생량의 유의적인 차이는 없었다 (Fig. 4). Granulocytes의 ROS 발생량은 반응 10분 후  $1.3 \times 10^4$  A.U.였으며 시간이 경과함에 따라 지속적으로 증가하여 반응 180분 후에는  $6.5 \times 10^4$  A.U.에 이르렀다 (Fig. 4). Hyalinocytes의 ROS 발생량은 반응 10분 후  $0.3 \times 10^4$  A.U.였으며 시간이 경과함에 따라 증가하여 반응 180분 후에는  $3.2 \times 10^4$  A.U.였다 (Fig. 4).

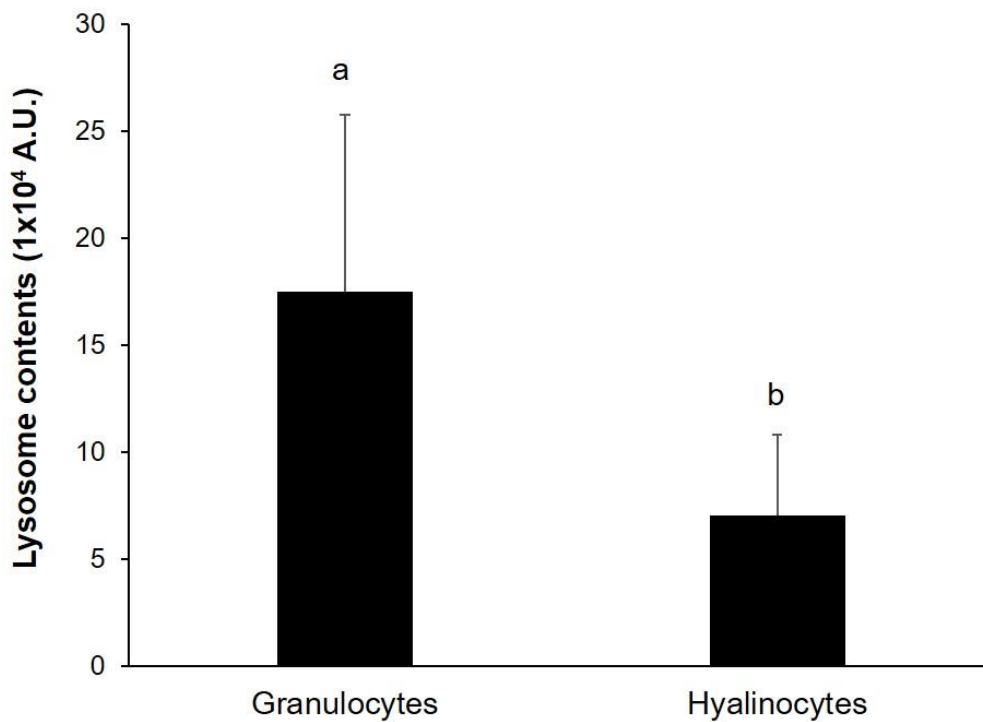


**Fig. 4.** ROS production of the granulocytes and hyalinocytes of *Mytilisepta virgate*. Values are presented as mean  $\pm$  SE. n=20. Asterisk (\*) represent significant (t-test,  $P < 0.05$ )

difference between granulocytes and hyalinocytes.

### 3.3.3. 세포질 내 lysosome 함량

Granulocytes의 lysosome 함량은  $1.8 \times 10^5$  A.U.  $\pm$   $0.8 \times 10^5$  A.U. 였으며 hyalinocytes의 lysosome 함량은  $0.7 \times 10^5$  A.U.  $\pm$   $0.4 \times 10^5$  A.U.으로, granulocytes가 hyalinocytes에 비해 유의적으로 ( $P < 0.05$ ) 많은 lysosome을 함유하고 있었다 (Fig. 5).



**Fig. 5.** Lysosome contents of the granulocytes and hyalinocytes of *Mytilisepta virgate*. Values are presented as mean  $\pm$  SE. n=20. Different letter (a, b) represent significant (t-test,  $P < 0.05$ ) difference between granulocytes and hyalinocytes.

### 3.4. 폭염환경에서의 혈구 변화

#### 3.4.1. 누적 사망률

실온의 환경에 놓인 대조구 굽은줄격판담치는 실험 기간동안 폐사가 발생하지 않았다. 폭염 환경에 노출된 굽은줄격판담치는 노출 54시간까지는 폐사가 없었으나 노출 66시간부터 폐사가 발생하였다 (Fig. 6). 노출 66시간 후의 담치 폐사율은 7.1%였으며 시간이 경과함에 따라 폐사율이 급격히 증가하여 노출 126시간 후에는 모든 개체가 폐사하였다 (Fig. 6).

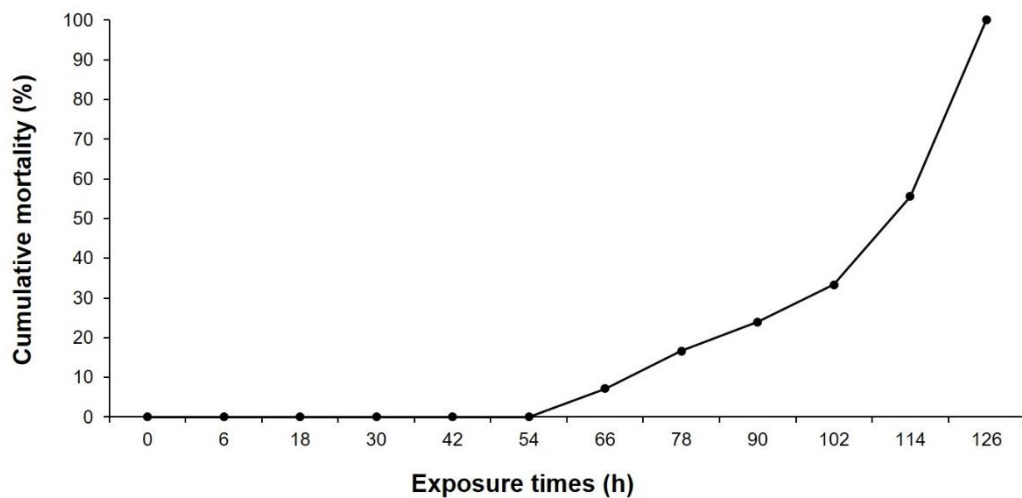
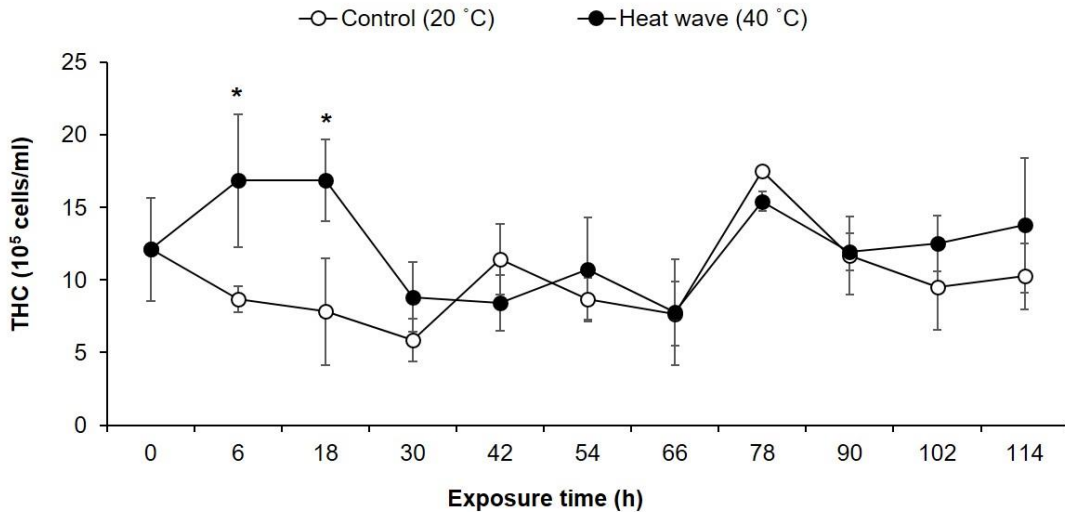


Fig. 6. Cumulative mortality of *Mytilisepta virgate*.exposed to heat wave stresses.

#### 3.4.2. 총 혈구 수

실험 시작 전에 측정된 담치의 총 혈구 수는 평균  $1.2 \times 10^6$  cells/ml 이었

다 (Fig. 7). 대조구 담치의 총 혈구수는 노출 후 30시간 후에 최소  $0.7 \times 10^6$  cells/ml 에서 노출 78시간 후에 최대  $1.7 \times 10^6$  cells/ml 의 범위를 보였다 (Fig. 7). 폭염 환경에 노출된 담치의 총 혈구 수는 노출 전  $1.2 \times 10^6$  cells/ml 에서 노출 6시간 후에  $1.7 \times 10^6$  cells/ml로 증가하여 노출 18시간까지 대조구에 비해 유의적으로 ( $P < 0.05$ ) 높았으나, 노출 30시간 후에  $0.8 \times 10^6$  cells/ml로 감소하여 실험 종료 시간까지 대조구와 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 7).

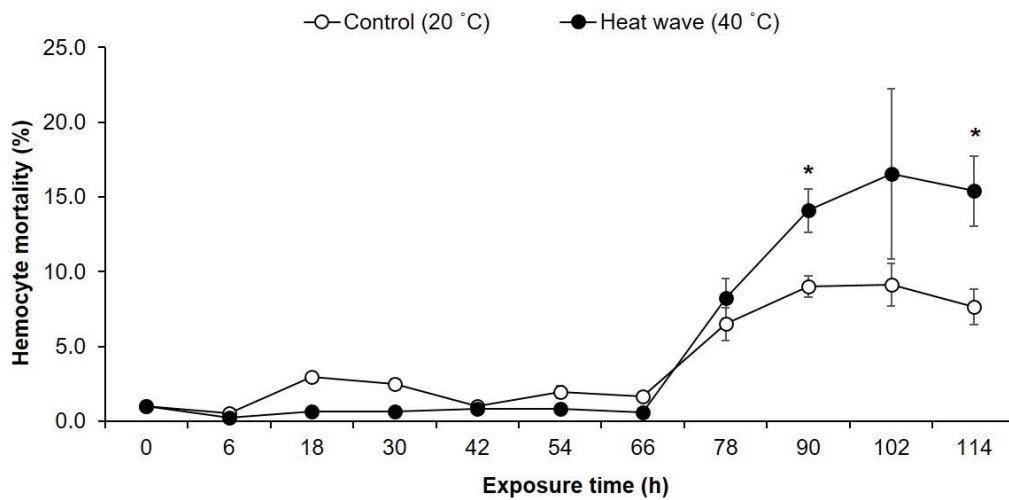


**Fig. 7.** Total hemocyte count (THC) of *Mytilisepta virgate*. For each time and each treatment,  $n = 5$  mussels. Asterisk (\*) represent significant (t-test,  $P < 0.05$ ) difference between control and treatment group.

### 3.4.3. 혈구 사멸률

노출 전 담치의 혈구 사멸률은 1.0 %였다 (Fig. 8). 대조구 담치의 혈구 사멸률은 노출 66시간까지 0.6-3.0 %으로 일정하게 유지되다가 노출 78시간 후에

6.5 %로 증가한 후 노출 102시간 후에 9.1 %의 최대값을 기록하였다 (Fig. 8). 폭염에 노출된 담치의 혈구 사멸률도 대조구와 같이 노출 66시간까지 0.2-0.8 %로 낮은값을 유지하다가 노출 78시간 후에 8.2%로 증가한 후 노출 102시간 후에 16.6%의 최대값에 이르렀다 (Fig. 8). 폭염에 노출된 담치의 혈구 사멸률은 노출 90시간 이후부터는 대조구에 비해 유의적으로 ( $P<0.05$ ) 높은 값을 보였다 (Fig. 8).

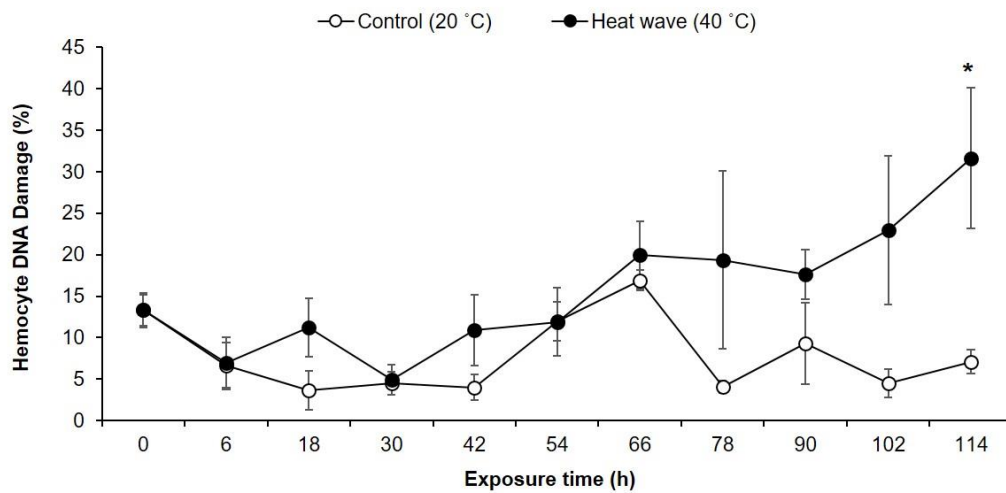


**Fig. 8.** Hemocyte mortality (%) of *Mytilisepta virgate*. For each time and each treatment, n = 5 mussels. Asterisk (\*) represent significant (t-test,  $P<0.05$ ) difference between control and treatment group.

#### 3.4.4. 혈구 DNA 손상도

노출 전 담치의 혈구 DNA 손상도는 13.3% 였다 (Fig. 9). 대조구 담치의 혈구 DNA 손상도는 노출 42시간 후 4.0 %의 최저값을, 노출 66시간 후 16.9%의 최대값을 보였다 (Fig. 9). 폭염에 노출된 담치의 혈구 DNA fragmentation 정도는

노출 66시간까지는 대조구와 차이가 없었으나, 폐사가 발생한 노출 78시간 후부터 DNA 손상도가 증가하여 노출 114시간 후에는 최대 31.6%에 이르러 대조구와 유의적인 ( $P<0.05$ ) 차이를 보였다 (Fig. 9).

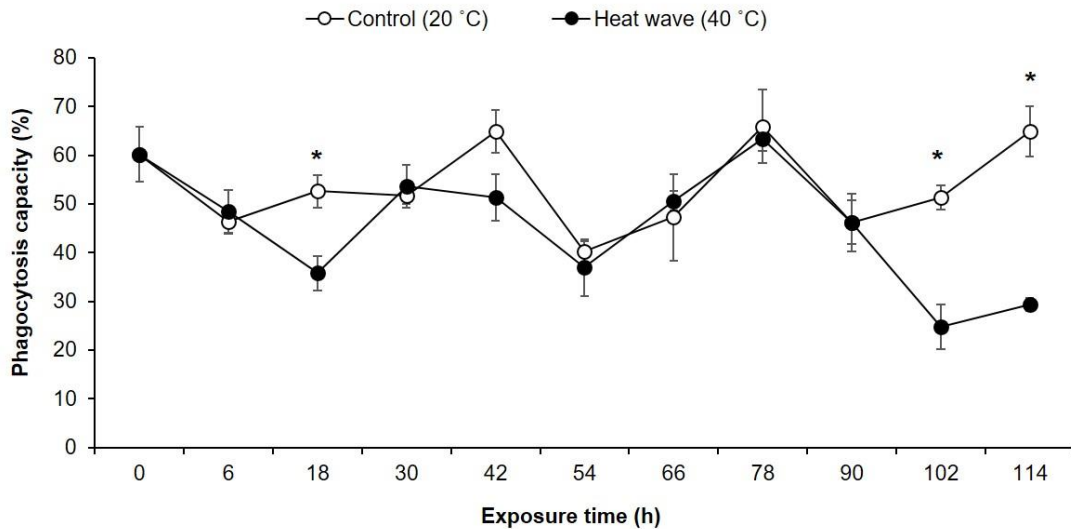


**Fig. 9.** DNA damage (%) in hemocytes of *Mytilisepta virgate*. For each time and each treatment,  $n = 5$  mussels. Asterisk (\*) represent significant (t-test,  $P<0.05$ ) difference between control and treatment group.

### 3.4.5. 혈구 식세포 능력

실험 시작 전 담치의 혈구 식세포율은 60.2 % 였다 (Fig. 10). 대조구 담치는 실험 기간 동안 최저 46.2%, 최대 64.9%의 범위의 식세포율을 보였다 (Fig. 10). 폭염 환경에 노출된 담치의 혈구 식세포율은 노출 18시간 후에 35.8%로 감소하여 대조구에 비해 유의적인 ( $P<0.05$ ) 차이를 보였으나, 이후부터 노출 90시간 후까지 대조구와 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 10). 그러나 노출 102시간 후에는

혈구 식세포율이 급격히 감소하여 24.8%에 이르렀으며 노출 114시간까지 대조구에 비해 유의적으로 낮은 식세포율을 보였다 (Fig. 10).



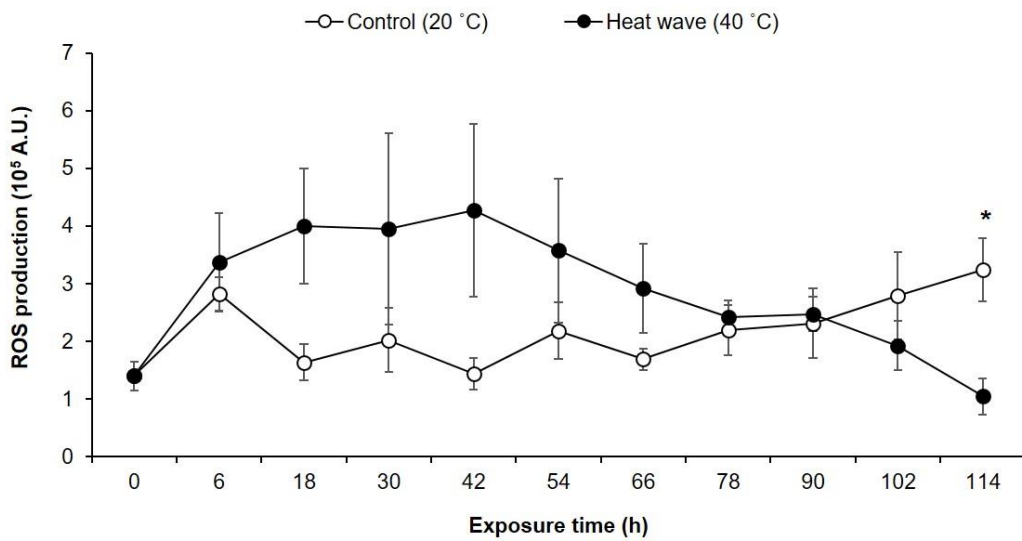
**Fig. 10.** Phagocytosis capacity (%) of *Mytilisepta virgate*. For each time and each treatment, n = 5 mussels. Asterisk (\*) represent significant (t-test,  $P < 0.05$ ) difference between control and treatment group.

### 3.4.6. 혈구 Reactive oxygen species (ROS) 발생량

노출 전 혈구의 ROS 발생량은  $1.4 \times 10^5$  A.U. 였다 (Fig. 11). 대조구 담치의 혈구 세포 내 ROS 발생량은  $1.6 \times 10^5$  A.U. 에서  $3.2 \times 10^5$  A.U.의 범위로 실험 기간 동안 일정하게 유지되었다 (Fig. 11). 폭염에 노출된 담치는 대조구와 유의적인 차이는 없었지만 노출 초반인 18시간 후에 ROS 발생량이  $4.0 \times 10^5$  A.U.으로 증가하여 42시간까지 대조구에 비해 상대적으로 높은 값을 보였다 (Fig. 11). 그러



나 노출이 지속될수록 혈구 세포 내 ROS 발생량이 지속적으로 감소하여 노출 114시간 후에는  $1.0 \times 10^5$  A.U.으로 대조구에 비해 유의적으로 낮은 값을 보였다 (Fig. 11).



**Fig. 11.** Reactive oxygen species (ROS) production of hemocytes of *Mytilisepta virgate*. For each time and each treatment, n = 5 mussels. Asterisk (\*) represent significant (t-test,  $P < 0.05$ ) difference between control and treatment group.

## 4. 고찰

### 4.1. 굽은줄격판담치의 형구의 형태 및 기능적 특성

이 연구에서는 굽은줄격판담치의 혈구 종류를 분류하기 위하여 광학현미경과 유세포분석기를 동시에 활용하였다. 두 가지 방법에 의해 굽은줄격판담치의

혈구는 granulocytes와 hyalinocytes가 주된 세포인 것으로 확인되었다. Granulocytes는 세포질 내 수많은 과립들이 있는 반면, hyalinocytes는 과립이 거의 없거나 존재하지 않았다. Granulocytes와 hyalinocytes가 주된 혈구 세포인 것은 *M. edulis* (Le Foll et al. 2010; Renwranz et al. 2013), *M. galloprovincialis* (Cajaraville and Pal 1995; Carballal et al. 1997, 1998), *M. coruscus* (Yang et al. 2015), *Perna perna* (Barracco et al. 1999), *P. viridis* (Donaghy and Volety 2011; Wang et al. 2012) 등의 해산 담치류들 뿐만 아니라 *Cristaria plicata* (Xie et al. 2011), *Quadrula* sp. (Burkhard et al. 2009) 등의 담수 담치류들에서 보고되었다. 이외에도 *Crassostrea gigas* (Chang et al. 2005), *C. virginica* (Hégaret et al. 2003a), *C. ariakensis* (Donaghy et al. 2009b), *C. nippona* (Hong et al. 2014), *Ostrea edulis* (Xue et al. 2001), *O. circumpicta* (Hong et al. 2013), *Saccostre glomerata* (Aladaileh et al. 2007), *S. kegaki* (Hong et al. 2013), *Hyotissa hyotis* (Hong et al. 2013) 등의 굴류 (oysters), *Ruditapes decussatus* (Donaghy et al. 2009a), *R. philippinarum* (Cima et al. 2000; Donaghy et al. 2009a), *Meretrix lusoria* (Chang et al. 2005) 등의 clams 및 *Chlamys farreri* (Monari et al. 2007)의 가리비류 (scallops)의 이매패류들에서도 granulocytes와 hyalinocytes가 주요 혈구 세포인 것으로 알려져 있다.

이매패류의 혈림프액 내 혈구 수와 혈구 종류별 비율은 수온과 염분 (Hégaret et al. 2003a; Soudant et al. 2004; Flye-Sainte-Marie et al. 2009; Donaghy and Volety 2011), 오염물질 (Fisher et al. 2000; Matozzo et al. 2001; Parry and Pipe 2004; Gagné et al. 2008; Donaghy et al. 2010), 병원체 감염 (Labreuche et al. 2006; Flye-Sainte-Marie et al. 2009), 및 번식활동 (Pipe 1990; Soudant et al. 2004; Chang et al. 2005; Lambert et al. 2007; Hong et al. 2014) 등에 의해 다양하게 변화할 수 있다. 이 연구에서는 유세포분석기를 이용하여 굵은줄격판담치의 혈림프액 내 총 혈구 수와 혈구 세포 종류별 구성 비율의 기본값 (base level)을 측정하였다. 굵은줄격판담치

의 혈림프액 내 총 혈구 수는 최소  $3.5 \times 10^5$  cells/ml, 최대  $2.7 \times 10^6$  cells/ml 범위로 평균  $1.3 \times 10^6$  cells/ml 이었다. 이는 *M. edulis* ( $8 \times 10^6$  cells/ml in Coles et al. 1995;  $4.2 \times 10^6$  cells/ml in Renwranz et al. 2013), *M. galloprovincialis* ( $1-5 \times 10^6$  cells/ml in Carballal et al. 1998), *P. viridis* ( $1.3 \times 10^6$  cells/ml in Donaghy and Volety 2011;  $5.5 \times 10^6$  cells/ml in Wang et al. 2012) 등의 다른 담치 종들의 총 혈구 수와 비슷하였다. 혈구 종류 중에서는 granulocytes가 평균 56.5%로 가장 많았으며, hyalinocytes와 blast-like cells이 각각 29.3%과 12.6%의 구성 비율을 보였다. Granulocytes가 가장 많은 혈구 세포인 점은 *M. edulis* (Le Foll et al. 2010; Renwranz et al. 2013), *M. galloprovincialis* (Cajaraville and Pal 1995; Carballal et al. 1997, 1998), *P. viridis* (Donaghy and Volety 2011; Wang et al. 2012), *C. plicata* (Xie et al. 2011), and *Quadrula* sp. (Burkhard et al. 2009)의 담치류에서도 보고되었다.

Granulocytes와 hyalinocytes 외에도 매우 얇은 세포질 (N/C ration = 0.72)과 크기가 매우 작은 (직경  $0.52 \mu\text{m}$ ) blast-like cells이 분류가 되었다. 이 작은 세포들은 식세포 능력이 없고 활성산소 발생능력이 상당히 낮아 미분화된 세포의 특징을 보였다. 이러한 미분화된 세포들은 다양한 이매패류들에서 분류가 되어 haemoblast-like cells (Cima et al. 2000; Aladaileh et al. 2007) 또는 blast-like cells (Donaghy et al 2009b; Hong et al. 2014)로 명명되었다. Blast-like cells은 위족이 형성되어 있지 않아 유리슬라이드에 부착하지 못하여 광학현미경 상에서 쉽게 관찰이 되지 않는다. 반면에 유세포분석기는 혈림프액 상태로 분석을 하기 때문에 작은 blast-like cells을 쉽게 분류할 수 있다. 예를 들면, *M. coruscus*의 동일한 종이더라도 광학현미경을 이용할 경우 blast-like cells이 관찰이 안되었지만 (Feng et al. 1977), 유세포분석기를 이용한 경우에는 이 세포가 쉽게 분류가 되었다 (Yang et

al. 2015).

해산 이매패류에서 세포성 면역은 침입한 외부물질을 인지하고 혈구 세포들이 이동하여 식작용 (phagocytosis)를 하거나 피포화 (encapsulation) 하는 과정에서 시작한다 (Chu 2000). 그리고 세포 lysosome 내 많은 가수분해 효소들과 함께 활성산소종 (ROS)들이 분비되어 침입한 외부물질을 파괴한다 (Carballal et al. 1997; Donaghy et al. 2009). 이 연구에서 굽은줄격판담치에서 granulocytes가 식세포 능력과 ROS 발생 능력이 가장 높으며 세포질 내 lysosome 함량이 가장 많아 granulocytes가 주된 면역 세포인 것으로 확인되었다. 굽은줄격판담치 granulocytes의 식세포 능력은 hyalinocytes 보다 5배 이상 높았으며, ROS 발생량도 hyalinocytes보다 3배 이상 많았다. 수많은 가수분해 효소가 있어 해독 (detoxification)과 방어 (defense) 작용을 하는 lysosome 함량도 granulocytes가 hyalinocytes 보다 2배 이상 높았다. Granulocytes가 면역 기능 능력이 가장 높은 것은 담치류 (muessels) *M. galloprovincialis* (Cajaraville and Pal 1995), *P. viridis* (Donaghy and Volety 2011; Wang et al. 2012), *Bathymodiolus azoricus* (Bettencourt et al. 2009), 굴류 (oysters) *C. gigas* (Delaporte et al. 2007), *C. virginica* (Hégaret et al. 2003b; Goedken and De Duise 2004), *C. ariakensis* (Donaghy et al. 2009a), *O. circumpicta* (Hong et al. 2013), *S. glomerata* (Aladaileh et al. 2007), *S. kegaki* (Hong et al. 2013), *H. hyotis* (Hong et al. 2013), 그리고 clams *R. philippinarum* (Donaghy et al. 2009b), *R. decussatus* (Lopez et al. 1997), and *Mercenaria mercenaria* (Tripp 1992)의 많은 이매패류에서도 밝혀진 바 있다.

## 4.2. 폭염환경에서의 혈구 변화

40°C의 폭염 환경에 노출된 굽은줄격판담치는 노출 66시간 후부터 폐사가 발생한 후 그 비율이 급속히 증가하여 126시간 후에는 모든 개체들이 폐사하였다. 폭염 환경에서 살아있는 개체들은 노출 초반에는 ROS 발생량이 증가하여 산화 스트레스가 발생하였으며, 폐사가 발생하기 시작한 노출 66시간 이후부터는 혈구 DNA 손상도와 사멸률이 증가하였고 면역 기능인 식세포 능력과 ROS 발생 능력이 저하되는 반치사 (sub-lethal) 수준의 영향이 있음이 확인되었다.

이때패류의 혈구 수의 변화는 혈구의 증식이나 혈림프액과 조직 사이에서의 이동에 따라 조절된다 (Donaghy et al. 2009a). 고수온에 노출된 *Chamelea gallina* (Monari et al. 2007), 고염분에 노출된 *M. galloprovincialis* (Malagoli et al. 2007), 저산소 환경에 노출된 *M. galloprovincialis* (Malagoli et al. 2007)은 총 혈구 수가 증가하는 반면, 저산소 환경에 노출된 *C. gallina* (Pampanin et al. 2002; Matozzo et al. 2005), *Macrta veneriformis* (Yu et al. 2010)는 총 혈구 수가 감소하였다. 또한 오염물질의 유입에 따라 혈구 수가 증가하거나 감소한다. 구리 (Cu)에 노출된 *M. edulis* (Pipe Coles 1995)와 *C. virginica* (Fisher et al. 2000), 카드뮴 (Cd)에 노출된 *M. edulis* (Coles et al. 1995)에서 총 혈구 수가 증가한 반면, PCBs에 노출된 *Chlamys farreri* (Liu et al. 2009), 망간 (Mn)에 노출된 *M. edulis* (Owson and Hernroth 2009)에서는 총 혈구 수가 감소하였다. 그러나 이 연구에서는 폭염 환경에 노출된 굽은줄격판담치의 혈림프액 중 혈구 수가 대조구와 차이가 없었다. 이러한 연구 결과들과 같이 환경변화에 대한 혈구 수가 서로 다르게 변화하는 것을 이해하기 위해서는 혈구의 증식과 이동에 대한 구체적인 연구가 필요하다.

폭염 환경에 노출된 담치의 혈구 사멸률은 노출 66 시간까지는 1% 미만으로 낮은 값을 유지하다가 노출 78시간 후에 8.2%로 급증한 후 102시간 후에는

16.6%의 최대값에 이르렀다. 이와 비슷하게 혈구 DNA 손상도도 노출 78시간 이후부터 증가하기 시작하여 노출 114시간 후에는 31.4%에 도달하였다. 급격한 환경 변화에 대해 혈구는 초기 산화 스트레스 반응으로 ROS의 발생량을 증가시킨다. 이러한 과도한 ROS 발생 등에 의해 세포의 DNA 염기사슬에서 염기가 탈락하는 경우가 발생할 수 있다 (Nikitaki et al. 2015; Hong et al. 2019). 기존 연구에서도 급격한 수온 변화에 노출된 담치류인 *M. galloprovincialis*와 *M. californianus*의 혈구 DNA 손상도가 증가함이 보고되었다. 이외에도 공기 중에 노출된 바지락 *R. philippinarum* (Park et al. 2012)과 오분자기 *Haliotis diversicolor* (Hong et al. 2019)에서도 혈구 DNA의 손상도가 증가하였다. 이 연구에서도 폭염 환경에 노출된 굽은줄격판담치 혈구의 ROS 발생량이 노출 초반에 증가함이 관찰되었으며, 이러한 산화 스트레스에 의해 혈구의 DNA 손상도와 사멸률이 증가한 것으로 사료된다.

이때패류의 혈구 식세포 능력과 ROS 발생 능력은 다양한 스트레스에 대해 대상종의 세포성 면역 능력을 평가하는데 가장 좋은 지표로 사용된다 (Donaghy et al. 2009; Hégaret et al. 2011). 담치류인 경우 고온의 공기중에 노출된 *M. galloprovincialis* (Mosca et al. 2013)의 혈구 식세포율이 감소 했으며, 낮은 산소 포화도와 산성화에 노출된 *M. coruscus* (Sui et al. 2016)의 혈구 식세포율이 감소했다. 그리고 고온에 노출된 *M. coruscus* (Wu et al. 2016)와 *M. edulis* (Mackenzie et al. 2014)의 혈구 ROS 발생량이 증가하였다. 이 연구에서도 폭염 환경에 노출된 굽은줄격판담치의 혈구 식세포율이 저하됨이 확인되었다. 그러나 혈구 ROS 발생량은 노출 초반에는 증가하였다가, 노출 42시간 이후부터 지속적으로 감소하여 노출 114시간 이후에는 대조구보다 3배 이상 감소하였다. 이는 담치가 40°C의 극한 환경에 지속적으로 노출됨에 따라 혈구의 DNA 손상 등에 의해 면역 기능이 손

실되어 ROS 발생 능력이 저하되는 것으로 사료된다.

## 5. 결론

이번 연구에서는 유세포분석기와 광학현미경을 이용하여 굵은줄격판담치의 혈구를 형태적 특징과 기능에 따라 granulocytes, hyalinocytes, blast-like cells의 세가지 종류로 분류하였다. Granulocytes는 세포질 내 많은 과립들을 함유하고 있었으며, 식세포 능력과 ROS 발생 능력이 가장 높으며 세포질 내 lysosome 함량이 가장 많아 세포성 면역을 담당하는 주요 면역 세포인 것으로 확인이 되었다. 40°C의 폭염 환경에 노출된 담치는 노출 66시간 이후 폐사가 발생하여 126시간 후에 모든 개체가 폐사하였다. 폭염 환경에서 살아남은 담치들은 노출 초반에 ROS 발생량이 증가하여 산화 스트레스가 발생하였으며, 노출 66시간 후에 혈구 DNA 손상도와 사멸률이 증가하였다. 그리고 노출 90시간 후 세포성 면역 기능인 혈구 식세포 능력과 ROS 발생 능력이 저하되었다. 이 연구 결과를 통해 폭염 환경에 66시간 이상 지속적으로 노출될 경우 굵은줄격판담치는 반치사 (sub-lethal) 수준뿐만 아니라 치사 (lethal) 수준의 영향이 있을 수 있음을 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

- Aladaileh, S., Nair, S.V., Birch, D., Raftos, D.A., 2007. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocyte: Morphology and function. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 48-63.
- Barracco, M.A., Medeiros, I.D., Moreira, F.M., 1999. Some haemato-immunological parameters in the mussel *perna perna*. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 387-404.
- Bettencourt, R., Dando, P., Collins, P., Costa, V., Allam, B., Santos, R.S., 2009. Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Comp. Biochem. Phys A.* 152, 278-289.
- Burkhard, M.J., Leavell, S., Weiss, R.B., Kuehnl, K., Valentine, H., Watters G.T., Wolfe, B.A., 2009. Analysis and cytologic characterization of hemocytes from freshwater mussels (*Quadrula* sp.). *Vet Clin Path.* 38, 246-436.
- Cajaraville, M.P., Pal, S.G., 1995. Morphofunctional Study of the Haemocytes of the Bivalve Mollusc *Mytilus galloprovincialis* with Emphasis on the Endolysosomal Compartment. *Cell. Struct. Funct.* 20, 355-367.
- Carballal, M.J., Villalba, A., López, C., 1998. Seasonal Variation and Effects of Age, Food Availability, Size, Gonadal Development, and Parasitism on the Hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 304-312.



- Chang, S.J., Tseng S.M., Chou, H.Y., 2005. Morphological Characterization via Light and Electron Microscopy of the Hemocytes of Two Cultured Bivalvers: A Comparison Study between the Hard Clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Zool. Stud.* 44, 144-153
- Chang, T.C., 1981. Bivalves. In: Ritcliffe, N.A., Rowly, A.G. (Eds.), *Invertebrate Blood Cell*. Academic Press, London, PP. 233-300.
- Chu, F.L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerma NNR (ed) *Recent advances in marine biotechnology. Immunobiology and pathology*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, pp, 1-42
- Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G., Ballarin, L., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterization. *Fish Shellfish Immunol.* 10. 667-693.
- Coles, J.A., Farley, S.R., Pipe, R.K., 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquat. Organ.* 22, 59-65.
- Delaporte, M., Chu, F.L., Langdon, C., Moal, J., Lambert, C., Samain, J.F., Soudant, P., 2007. Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid. *J Exp Mar. Biol. Ecol.* 343, 361-275.
- Donaghy, L., Hong, H.K., Lambert, C., Park, H.S., Sim, W.J., Choi, K.S., 2010. First characterization of the population and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 87-97.
- Donaghy, L., Lamvert, C., Choi, K.C., Soudant, P., 2009a. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussates*) and the Manila Clam (*ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects. *Aquaculture.* 297, 10-24.
- Donaghy, L., Kim, B.K., Hong, H.K., Park, H.S., Choi, K.S., 2009b. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 296-301

- Donaghy, L., Volety, A.K., 2011. Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: *in vitro* impacts of temperature. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 808-814.
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of interal defense measurements with contaminant burdes. *Aqua Toxicol.* 51, 115-138.
- Feng, S.Y., Feng J.S., Wamasu, T., 1997. Roles of *Mytilus coruscus* and *Crassostrea gigas* blood cells in defense and nutrutuin. In: Bulla Jr LA, Cheng, T.C., eds, *Comparative Pathobiology. Volum 3 : Invertebrate Immune Responses.* Springer Science Business, Media New Tork, USA, pp 31-67.
- Flye-Sainte-Marie, J., Soudant, P., Lambert, C., Le Goic, N., Goncalvez, M., Travers, M.A., Paillard, C., Jean, F., 2009. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 377, 1-11.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Fournier, M., Durend, M.J., Talbot, A., 2008. Relationships between intertidal clam population and health status of the soft-shell clam *Mya arenaria* in the St. Lawrence Estuary and Saguenay Fjord (Québec, Canada). *Environ Int.* 34, 30-43.
- Goedken, M., De Guise, S., 2004. Flow cytometry as a toll to quantify oyster defence mechaniss. *Fish Chellfish Immunol.* 16, 539-552.
- Gerdol, M., Fujii, Y., Hasan, I., Koike, T., Shimojo, S., Spazzali, F., Yamamoto, K., Ozeki, Y., Pallavicini, A., Fujita, H., 2017. The purplish bifurcate mussel *Mytilisepta virgata* gene expression atlas reveals a remarkable tissue functional specialization. *BMC genomics*, 18, 590-614.
- He'garet, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003a Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oyster, *Crassostrea virginica*, subjected to sudden temperature elevation I. Haemocyte type and morphology. *J Exp Mar. Biol. Ecol.* 293, 237-248.
- He'garet, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003b Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oyster, *Crassostrea virginica*, subjected to sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J Exp Mar. Biol. Ecol.* 293, 249-265.

- Hine, P.M., 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 9, 367-385
- Hong, H.K., Donaghy, L., Choi, K.S., 2014. Flow cytometric studies on the morphology and immunological functions of hemocytes in the Iwagaki oyster *Crassostrea nippona*. *Fish. Sci.* 80, 969-976.
- Hong, H.K., Donaghy, L., Choi, K.S., 2019. Flow cytometric characterization of hemocytes of the abalone *Haliotis diversicolor* (Reeve, 1846) and effects of air exposure stresses on hemocyte parameters. *Aquaculture*. 506, 401-409.
- Hong, H.K., Kang H.S., Kim, Y.O., Choi, K.S., 2012. Assessment of Immune Parameters of the Wild Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) using a Flow Cytometry and Neutral Red Retention Assay. *Ocean Polar*. 32, 137-149.
- Hong, H.K., Kang, H.S., Le, T.C., Choi, K.S., 2013. Comparative study on the hemocytes of subtropical oysters *Saccostrea kegaki* (Torigoe & Inaba, 1981), *Ostrea circumpicta* (Pilsbry, 1904), and *Hytotissa hyotis* (Linnaeus, 1758) in Jeju Island, Korea: Morphology and functional. *Fish Shellfish Immunol*. 35, 2020-2025.
- Jauzein, C., Donaghy, L., Volety, A.K., 2013. Flow cytometric characterization of hemocytes of the sunray venus clam *Macrocallista nimbosa* and influence of salinity variation. *Fish Shellfish Immunol*. 35, 716-724.
- KMA., 2018. [설명자료] 폭염 현황과 전망 및 2018 장마 특성.  
[http://www.kma.go.kr/notify/press/kma\\_list.jsp?bid=press&mode=view&num=1193567](http://www.kma.go.kr/notify/press/kma_list.jsp?bid=press&mode=view&num=1193567).
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boule, V., Huvet, A., Nicolas, J.L., 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect.* 8, 2715-2724.

- Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J., Samain, J.F., 2007. In vitro modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. *Aquaculture*. 270, 413-421.
- Le Foll, F., Rioult, D., Boussa, S., Pasquier, J., Dagher, Z., Le Boulenger., 2010. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol*. 28, 372-386.
- Li, J., Zang, Y., Mao, F., Lin, Y., Xiao, S., Xiang, Z., Ma, H., Zhang, Y., Yu, Z., 2018. The first morphologic functional characterization of hemocytes in Hong Kong oyster, *Crassostrea hongkongensis*. *Fish Shellfish Immunol*. 81, 423-429.
- Lopez, C., Carballal, M.J., Azevedo, C., Villaba, A., 1997. Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carp shell clam *Ruditapes decussates* (Mollusca: Bivalvia). *Dis. Aquat. Organ*. 30, 209-215.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol*. 101, 13-30.
- Mackenzie, C.L., Lynch, S.A., Culloty, S.C., Malham, S.K., 2014. Future Oceanic Warming and Acidification Alter Immune Response and Disease Status in a Commercial Shellfish Species, *Mytilus edulis* L. *Plos one*. 13, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099712>
- Mateo, D.R., Spurmanis, A., Siah, A., Araya, M.T., Kulka, M., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R., Greenwood, S.J., 2009. Changes induced by two strains of *Vibrio splendidus* in haemocyte subpopulations of *Mya arenaria*, detected by flow cytometry with LysoTracker. *Dis. Aquat. Organ*. 86, 253-262.
- Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Serrazatti, G.P., Cattani, O., Marin, M.G., 2007. Effects of salinity on the clam *Chamelea Gallina*. Part I : alterations in immune responses. *Mar. Biol*. 151, 1051-1058.
- Mislan, K.A.S., Wethey, D.S., 2015. A biophysical basis for patchy mortality during heat waves. *Ecol*. 96(4), 902-901.

- Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Cattani, O., Serrazanetti, G.P., Marin, M.G., 2007. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the *Chamelea gallina*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 98-114.
- Morton., 2019. The biology and functional morphology of *Septifer bilocularis* and *Mytilisepta virgata* (Bivalvia: Mytiloidea) from corals and the exposed rocky shores, respectively, of Hong Kong. *Regional Stud Mar Scien.* 25, 100454
- Mosca, F., Narcisi, V., Calzetta, A., Gioia, L., Finoia, M.G., Latini, M., Tiscar, P.G., 2013. Effects of high temperature and exposure to air on mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk 1819) Hemocyte phagocytosis: Modulation of spreading and oxidative response. *Tissue Cell.* 45, 198-203.
- Nikitaki, Z., Hellweg, C.E., Georgakilas, A.G., Ravanat, J.L., 2015. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and Limitation. *Front. chem.* 3, 35.
- Parisi, M.G., Li, H., Jouvét, L.B.P., Dyrzynda, E.A., Parrinello, N., Cammarata, M., Roch, P., 2008. Differential involvement of mussel heocyte sub-population in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 834-840.
- Park, K.I., Donaghy, L., Kang, H.S., Hong, H.K., Kim, Y.O., Choi, K.S., 2012. Assessment of Immune Parameters of Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in Different Physiological Conditions usinf Flow Cytometry. *Ocean Sci. J.* 47, 19-26.
- Parry, H.E., Pipe, R.K., 2004. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat Toxicol.* 69, 311-325.
- Patetsini, E., Dimitriadis, V.K., Kaloyianni., 2013. Biomarkers in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and penoxsulam. *Aquat. Toxicol.* 126, 338-345.
- Pipe, R.K., 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem J.* 22, 595-603..

- Renwranz, L., Siegmund, E., Woldmann, M., 2013. Variations in hemocyte count in mussel, *Mytilus edulis*: Similar reacton patterns occur in disappearance and return of mulluscan hemocytes and vertebrate leukocytes. *Comp. Biochem. Phys A.* 164, 629-637.
- Soudant, P., Paillard, C., Choquet, G., Lambert, C., Reid, Hi.I., Marhic, A., Donaghy, L., Birkbeck T.H., 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis (=Tapes, =Ruditapes) Philppinarum*. *Aquaculture.* 229, 401-418.
- Sui, Y., Kong, H., Shang, Y., Huang, X., Wu, F., Hu, M., Lin, D., Lu, W., Wang, Y., Effects of short-term hypoxia and seawater acidification on hemocyte responses of the mussel *Mytilus coruscus*. *Mar. Pollut. Bull.* 108, 46-52.
- Travers, M.A., Silva, P.M., Gor̄c, N.L., Marie, D.M., Donval, A., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008. Morphologic, cytometric and functional characterization of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish shellfish Immunol.* 24, 400-411.
- Tripp, M.R., 1992. Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J Comp. Phys B.* 127, 281-298.
- Wang, Y., Hu, M., Chiang, M.W.L., Shin, P.K.S., Cheung, S.G., 2012. Characterization of subpopulations and immune-related parameters of hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 381-390.
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A., Ratcliffe, N.A., 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish Shellfish Immunol.* 15, 195-210.
- Yang, H.S., Hong, H.K., Donaghy, L., Noh, C.H., Park, H.S., Kim, D.S., Choi, K.S., 2015. Morphology and Immune-related Activities of Hemocytes of the Mussel *Mytilus coruscus* (Gould, 1861) from East Sea of Korea. *Ocean.Sci.J.*50(1), 1-9.

- Wu, F., Lu, W., Shang, Y., Kong, H., Li, L., Sui, Y., Menghong, H., Wang, Y., 2016. Combined effects of seawater acidification and high temperature on hemocyte parameters in the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Fish Shellfish Immunol.* 56, 554-562.
- Xie, Y., Hu, B., Wen, C., Mu, S., 2011. Morphology and phagocytic ability of hemocytes from *Cristaria plicata*. *Aquaculture.* 310, 245-251.
- Yao, C.L., Somero, G.N., 2012. The impact of acute temperature stress on hemocytes of invasive and native mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*): DNA damage, membrane integrity, apoptosis and signaling pathways. *J. Exp. Biol.* 215, 4267-4277.
- Zhang, W., Wu, X., Sun, J., Li D., 2005. Morphological and functional characterization of the hemocytes of the scallop, *Chlamys farreri*. *J. Shellfish. Res.* 24, 931-936.
- Zhang, W., Wu, X., Wang, M., 2006. Morphological, structural, and functional characterization of the haemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*. *Aquaculture.* 251, 19-32.