

碩士學位論文

^{60}Co 방사선 조사가 전복치패 및 넙치 수정란에
미치는 영향에 관한 연구



濟州大學校 大學院

水產生命醫學科

金 庚 柱

2008 年 2 月

^{60}Co 방사선 조사가 전복치패 및 넙치 수정란에
미치는 영향에 관한 연구

指導教授 呂寅圭

金庚柱

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2008 年 2 月

金庚柱의 理學碩士 學位論文을 認准함

審査委員長 허문수



委員 전유진



委員 여인규



濟州大學校 大學院

2008 年 2 月

Effect of ^{60}Co Gamma-radiation on Juvenile Abalone
and Fertilized Eggs

Kyoung-Ju Kim
(Supervised by professor In-Kyu Yeo)

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Master of Science

Department of Aquatic life medicine
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2008

목 차

목차	i
List of Tables	iv
List of Figures	v
Abstract	vii
I. 서 론	1
II. 저선량 ^{60}Co 방사선 조사에 따른 참전복(<i>Haliotis discus hannai</i>)의 hormesis에 관한 연구	5
1. 서론	5
2. 재료 및 방법	7
1) 실험 재료 및 사육 관리	7
2) 방사선 조사	8
3) 사망률 측정	8
4) 혈림프 수 측정	8
5) 항산화 효소 측정	10
6) RT-PCR 분석	13
7) SDS-PAGE 분석	14
8) Western blot 분석	15
9) 통계처리	16
3. 결과	17
1) 방사선 조사 후 참전복의 초기 생리 변화	17
1-1) 생존율 변화	17
1-2) 혈림프 수 변화	18
1-3) 항산화효소 변화	19
1-4) HSP 70 mRNA 발현량의 변화	20
1-5) 단백질 발현의 변화	21
2) 방사선 조사 후 참전복의 장기 사육에 대한 성장 변화	23
2-1) 사육 환경	23
2-2) 각장 변화	24
2-3) 각폭 변화	26
2-4) 중량 변화	28
2-5) 생존율 변화	30

4. 결과	31
-------------	----

Ⅲ. 고선량 방사선 조사에 따른 까막전복 (*Haliotis discus discus*)의 LD₅₀과

생리적인 영향	36
1. 서론	36
2. 재료 및 방법	38
1) 실험 전복	38
2) 방사선 조사	38
3) 사망률 측정	39
4) 혈림프 수 측정	39
5) 항산화 효소 측정	39
6) RT-PCR 분석	40
7) 통계처리	41
3. 결과	42
1) 생존율 변화	42
2) 각장 변화	43
3) 각폭 변화	44
4) 중량 변화	45
5) 혈림프 수 변화	46
6) 항산화효소 변화	47
7) HSP 70 mRNA 발현량 변화	47
4. 고찰	50

Ⅳ. 저선량 ⁶⁰Co 방사선 조사가 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 수정란

부화에 미치는 영향	53
1. 서론	53
2. 실험 및 방법	55
1) 수정란	55
2) 방사선 조사	55
3) 사망률	55
4) 부화율	56
5) SDS-PAGE 분석	56
6) RT-PCR 분석	57
3 결과	59
1) 난발생 과정 변화	59
2) 부화율 변화	61

3) 사망률 변화	62
4) SDS-PAGE 변화	63
5) mRNA 발현량 변화	63
4. 고찰	67
V. 종합 고찰	70
VI. 요약	74
VII. 참고 문헌	76



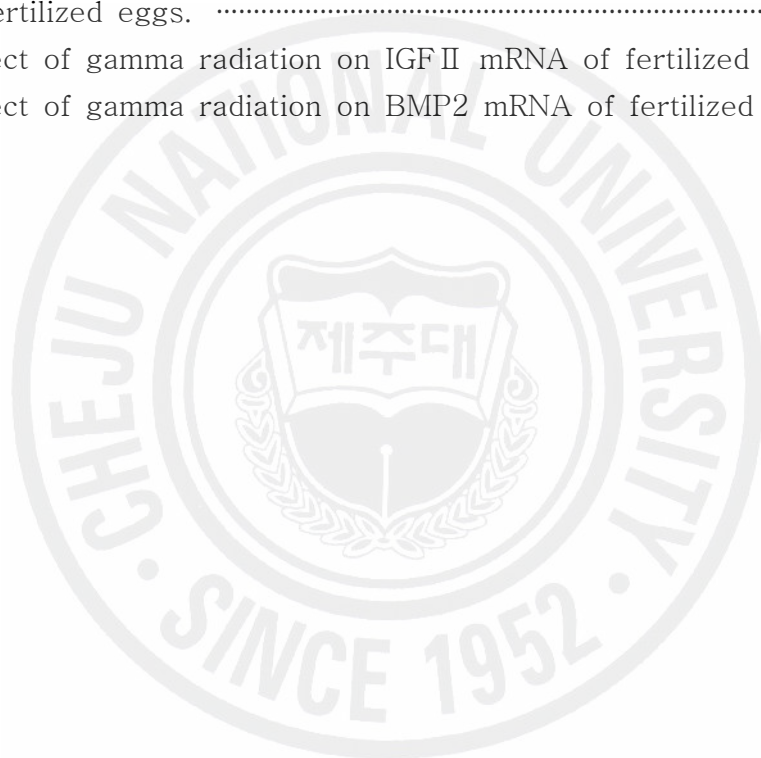
List of Tables

Table 1. Oligonucleotide of primers for RT-PCR	13
Table 2. Compositions of reagents related to SDS gel	14
Table 3. Regents for preparing for SDS-PAGE	15
Table 4. Variations of hemolymph factors of abalone (<i>H. discus hannai</i>) reared with different dose radiation	18
Table 5. The change of temperature, salinity, pH, DO during the experiment	23
Table 6. Variations of shell length (cm) for juvenile abalones reared	25
Table 7. Variations of shell width (cm) for juvenile abalones reared with different dose radiation in the farm	27
Table 8. Variations of total weight (g) for juvenile abalones reared with different dose radiation in the farm	29
Table 9. Variations of shell length (cm) for juvenile abalones reared with different dose radiation in the farm	43
Table 10. Variations of shell width (cm) for juvenile abalones reared with different dose radiation in the farm	44
Table 11. Variations of total weight (g) for juvenile abalones reared with different dose radiation in the farm	45
Table 12. Oligonucleotide of primers for RT-PCR	58

List of Figures

Fig. 1. Juvenile abalones were captured and cultured.	9
Fig. 2. Gamma irradiation to juvenile abalones.	9
Fig. 3. Take a blood sample in abalone.	9
Fig. 4. Extraction of protein.	11
Fig. 5. Procedures for protein assay by Lowery method.	11
Fig. 6. Procedures for measurment of SOD activity.	12
Fig. 7. Procedures for measurment of catalase activity.	12
Fig. 8. Set up of Whatman paper (blotting paper), gel and PVDF between the plate electrodes. Blotting paper and PVDF are used in the same size as the gel.	16
Fig. 9. Survival rate of juvenile abalone (<i>H. discus hannai</i>) after the exposure of gamma radiation.	17
Fig. 10. Change of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in abalone (<i>H. discus hannai</i>) reared with different dose radiation.	19
Fig. 11. Effect of gamma radiation on β -actin mRNA and HSP 70 mRNA of gill in abalone (<i>H. discus discus</i>).	20
Fig. 12. Effect of gamma radiation on HSP 70 mRNA of gill in abalone (<i>H. discus discus</i>).	21
Fig. 13. Protein expression of abalone (<i>H. discus hannai</i>) after the exposure of gamma radiation.	22
Fig. 14. Survival rates of juvenile abalones (<i>H. discus hannai</i>)	30
Fig. 15. Survival rates of juvenile abalones (<i>H. discus discus</i>) after the exposure of gamma radiation.	42
Fig. 16. Variations of hemolymph factors of abalone (<i>H. discus discus</i>) reared with different dose radiation.	46
Fig. 17. Change of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in abalone (<i>H. discus discus</i>) reared with different dose radiation.	48
Fig. 18. Effect of gamma radiation on β -actin mRNA and HSP 70 mRNA of gill in abalone (<i>H. discus discus</i>).	49
Fig. 19. Effect of gamma radiation on HSP 70 mRNA of gill	49
Fig. 20. Gamma-ray irradiation (0~20 Gy) to fertilized eggs.	56

Fig. 21. Extraction of protein.	58
Fig. 22. Embryonic development of fertilized eggs (<i>Paralichthys olivaceus</i>).	60
Fig. 23. Development time of fertilized eggs after the exposure of gamma radiation.	60
Fig. 24. Hatching rate of fertilized eggs after the exposure of gamma radiation.	61
Fig. 25. Death individual of fertilized eggs after the exposure of	62
Fig. 26. Protein expression of fertilized eggs after the exposure of gamma radiation.	64
Fig. 27. Effect of gamma radiation on β -actin, IGF II and BMP2 mRNA of fertilized eggs.	65
Fig. 28. Effect of gamma radiation on IGF II mRNA of fertilized eggs.	66
Fig. 29. Effect of gamma radiation on BMP2 mRNA of fertilized eggs.	66



Abstract

The present study was carried out to identify physiological changes such as blood components or antioxidant enzymes, protein levels, viability, and hatching of egg after radiation exposure on the fertilized egg of *Haliotis discus hannai*, *Haliotis discus discus*, and *Paralichthys olivaceus*.

In order to evaluate the effect of low radiation on the fertilized egg of *H. discus hannai* and *Paralichthys olivaceus*, the radiation exposure was performed at the level of 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 4, 8, 10 and 20 Gy.

The physiological changes of *H. discus hannai* was analyzed at 1, 3, 6, 12, 24, 48, and 72 hours after irradiation, while analysis of the egg of *Paralichthys olivaceus* was performed by development stages.

The experiment of high radiation on *H. discus discus* was tested to determine LD₅₀ and the physiological responses. This exposure was performed at the level of 0, 50, 100, 200, 400, and 800 Gy, the analysis of irradiated groups was accomplished at 0, 1, 2, 3, and 4 weeks after the exposure.

Low level of irradiation on *H. discus hannai* showed that the dropping level of lymphocytes at the early stage after irradiation has recovered to the normal. Distinctive protein was only expressed the control and 0.2 Gy-irradiated group for 21 kDa protein and the 0.2 Gy- and 0.4 Gy-irradiated group for 31 kDa protein.

The level of antioxidant enzymes increased directly after irradiation, the value was reduced gradually until the end of experiment. Similarly, the expression of HSP 70 mRNA was decreased the experiment groups except 10 Gy-exposed group.

As result of a long-term breeding of *H. discus hannai* after irradiation, an increase of growth was not determined. However, the 20 Gy-irradiated group has shown a remarkable delay of growth.

Determination of LD₅₀ and physiological changes for high dose of irradiation on *H. discus discus* was determined that irradiation-induced decline of circulating lymphocytes was linked to death. Antioxidant enzymes has decreased gradually until the death, while the expression of HSP 70 mRNA has increased gradually. Finally, the LD₅₀ of *H. discus discus* was revealed 30 ~40 Gy.

The physiological changes of the fertilized egg of *Paralichthys olivaceus* after low irradiation was determined that LD₅₀ until larvae was about 8 Gy.

Irradiation of 8 ~ 20 Gy has induced a delayed cell cycle arrest. This is going to distinguish a difference of protein expression on the irradiated egg. As a result of the changes irradiation, the eggs was died after all.

The genes related growth was reduced at the early phase after irradiation, levels of genes were rising to larvae stage.

These data has shown that radiation hormesis was not determined in *H. discus hannai*, high dose of radiation was influenced a growth limitation during long-term cultivation. High irradiation on the eggs of *Paralichthys olivaceus* was induced cell cycle arrest and was linked to death.

However, it is necessary to evaluate a hormesis effect of irradiation on the eggs of *Paralichthys olivaceus*.

This study was determined LD₅₀ as an important point in radiation induced mutation breeding of valuable breeding species. High dose of irradiation was changed levels of DNA, RNA, and enzymes on the irradiated individuals, it is linked to difference of protein, cellular function, and individual death finally.

To obtain the practical benefits through radiation applied breeding for marine organism, data for various species, research for radiation hormesis, approach for overall evaluation, determination of generation effects, and long-term observation need to be further evaluated.

I. 서론

생물은 환경으로부터 다양한 형태의 에너지를 받아들이며, 받아들인 에너지는 물질대사를 거치는 동안에 여러 가지 다른 형태의 에너지로 전환시킨다. 광합성을 하는 생물에 의해서 흡수된 빛에너지는 전환되어 화학적 에너지 형태로 저장된다. 이처럼 저장된 에너지는 세포호흡에 의해서 산화 될 때 방출되므로 받아들인 에너지와는 전혀 다른 형태의 에너지로 전환됨을 알 수 있다. 따라서 생물체는 물질과 에너지를 변환시키는 기계로 볼 수 있다.

방사선은 우리가 알고 있는 에너지의 한 가지 형태이며 자연 환경에서 언제나 접할 수 있다. 방사선은 생물의 생활사에 막대한 영향을 미치고 있으며, 생물의 진화에도 지대한 영향을 끼쳐왔다.

방사선 영향은 X-선이 발견된 이래 계속 주목되어 왔으며, 최근 들어 방사선 또는 방사선 물질의 이용이 의료용과 공업용 등 다각적인 용도로 활용하면서 직·간접적으로 방사선에 노출될 기회가 많아졌고(Hall, 2000), 생활방사선 또한 날로 증가함에 따라 환경적인 측면에서도 관심이 높아짐으로써, 방사선 생물학 분야에 대한 올바른 이해가 절실히 요구되어지고 있는 실정이다.

방사선은 입자가 갖는 에너지가 높기 때문에 세포가 조사받으면 세포내 분자는 이온화되거나 들뜬 상태로 되어, 흡수된 방사선 에너지가 소량일지라도 조사량에 따른 화학변화가 일어난다. 이러한 변화는 각 성분에 균일하게 일어나지만, DNA에서 일어나는 변화는 세포의 기능에 중대한 영향을 미치기 때문에 DNA의 작은 변화에도 세포는 죽거나 암세포로 변화는 등, 치명적인 장애를 받는다(Belli et al., 2002; Smith and Fornace, 1995). 생물체를 구성하고 있는 분자가 방사선과의 화학반응으로 핵산, 단백질, 효소 등 생체고분자의 구조 및 기능이 변화하게 되고 나아가 염색체나 기타 세포내 구조의 손상을 초래하게 된다(Kang, 2004). 이런 작용은 방사선에 대한 감수성의 차이로 세포 및 조직의 종류에 따라 다르고, 특히 정원세포와 백혈구 등은 감수성이 높은 반면 근육세포와 신경세포 등은 감수성이 낮은 것으로 알려져 있으며, 실험동물에 따라서도 다양한 감수성의 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다(Lee, 1994).

방사선에 의한 인체의 장애는 크게 체세포 영향(Somatic effect)과 유전적 영향(Genetic effect)으로 나눌 수 있다(Hall, 1994). 체세포 영향은 인체의 체세포가 직접 방사선 피폭을 받아서 일어나는 것으로 100 Gy 이상을 한번에 받았을 때는 신경혈관증으로 24~48 시간내에 사망하게 되고 5~12 Gy의 방사선 피폭을 한번에 받았을 때는 위장관증으로 수주 이내에 사망에 이르게 되며 2.5~5.0 Gy의 피폭을 받게 되면 조혈기관증으로 몇 달 내에 50% 이상이 사망하게 된다(Karas, 1965; Shipman, 1961). 방사선 피폭의 직접적 치사량은 아니라 하더라도 피폭의 정도에 따라 나타나는 체세포 영향은 다양하다. 가장 빨리 나타나는 것으로 백혈병, 림프종 등이 있고 조금 늦게 나타나는 것으로는 피부암, 폐암, 골수암 등이 있으며, 적은 량의 방사선 피폭으로도 원인이 될 수 있다고 하는 것이 갑상선암이나 유방암등을 들 수 있다(Boniver et. al., 1990; Haran-Ghera et al., 1979; Little, 2000, Luebeck and Hazelton, 2002). 유전적 영향(Genetic effect)으로는 생식기에 방사선 피폭이 되었을 때 일어날 수 있는 것으로 피폭 받은 본인보다는 다음세대에서 방사선 피폭으로 인해 고통을 받아야 하기 때문에 더욱 심각한 문제를 야기시킬 수 있다(Russell, 1962).

한편, 저선량 방사선은 고선량 방사선의 조사는 동물의 성장, 발달, 생식 능력 향상, 건강, 수명연장, 방사선 방호, 병원성 감염에 대한 저항력 획득, 면역력의 증강 및 암 발생억제 등을 유발하는 호르메시스(hormesis) 현상을 유발시키는 것으로 보고되고 있다(Luckey, 1982).

Olivieri et al.(1984)은 림프구를 이용한 실험에서 저선량 방사선에 노출된 림프구가 고선량의 방사선에 의해 유도되는 염색체 이상에 저항성을 갖게 된다는 적응 반응(adaptive response)을 보고하고 있다. 방사선 적응반응으로서 세포 수준에서는 염색체 이상, 돌연변이, 세포사 등의 장애가 경감되는 것을 관찰하였으며, 실험동물을 이용한 연구에서도 면역계에 대한 효과, 종양발생과 전이에 대한 효과, 생존에 관한 효과 등이 보고되고 있다. 또한 저선량 방사선에 노출된 작업자의 혈액 림프구에서 염색체 이상이 감소한다는 보고 등에서 알 수 있는 바와 같이 저항성의 유도는 저선량 방사선에 국한하지 않고 p90RSK, Elk, c-Fos와 같은 미량의 각종 DNA 손상물질에 의해서도 유도되어 교차적응의 유발도 관찰되고 있다(Tuschl et al., 1980; Liu et al., 1987; Cai and Liu, 1990; Liu et al., 1992; Wojcik and Streffer, 1994; Cai and Wang, 1995; Flores et al., 1996; Liu et al., 1996;

Cai, 1999).

X선과 γ 선 같은 이온화 방사선은 UV와 달리 DNA손상을 초래하는데, 단일가닥 절단(SSB), 이중가닥 절단(DSB), DNA-DNA cross links, DNA-단백질 cross links들을 유발하는데, 특히 이중가닥 DNA 절단은 방사선에 의해 초래되는 염색체 이상(chromosome aberration), 미소핵 발생, 세포사, 변이(transformation) 등을 유발시키는 주된 요인이다(Belli et al., 2002). 또한 이중가닥 DNA 손상은 DNA 복구기전(DNA repair mechanism), 세포주기의 지연(cell cycle arrest), 세포고사(apoptosis) 등과 같은 신호전달 경로를 자극한다(Smith and Fornace, 1995).

생물에서는 각종 스트레스로부터 생성된 활성산소(superoxide, hydrogen peroxide, peroxy radical, hydroxy radical 등)가 발생하는 것으로 알려져 있다. 활성산소는 생체내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의기능을 손상시킨다(Ferraris et al., 2002). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있으며 (Chance et al., 1979; Wendel and Feuerstein, 1981), 고선량의 방사선은 세포내에 존재하는 물분자 중 산소-수소결합을 분해하여 \cdot OH기를 과다생산하여 세포내에 산화적 스트레스를 유발한다고 알려져 있으며(Dubner et al., 1995), 저선량의 방사선 조사에 의한 작물인 겨자의 호흡 및 catalase(CAT) 활성증가(Garg et al., 1972), 묵은 배추, 참박, 옥수수 및 땅콩(Kim et al., 2000)등 다양한 품종에 항산화효소의 증가에 따른 발아율과 생육의 증가를 관찰하였다는 보고가 있다.

최근의 생화학적 및 분자생물학적 연구에 따르면 외부의 스트레스로부터 개체를 보호하기 위하여 열충격단백질 (Heat Shock Protein, HSP)들을 포함한 여러 가지 스트레스 단백질 발현 및 활성이 상승하는 것으로 밝혀졌다. 계속되는 스트레스의 결과로 나타나게 되는 스트레스 단백질들의 발현은 암, 자가면역, 심혈관 계통의 질병 등의 결과를 궁극적으로 일으킨다고 보고되고 있다. 대표적인 스트레스 단백질에서 열충격단백질 70(HSP70)을 들 수 있다. 이단백질은 molecular chaperone 같은 작용을 주로 하지만 최근 연구에서는 apoptosis의 억제, 암의 발생, 그리고 면역계통에 영향 등 다른 여러 가지 생화학적 기전에 관여하고 있다는 것이 여러 연구진들의 보고되고 있다(Seo, 1997).

방사선 조사에 대한 연구는 현재까지 주로 유용식물을 대상으로 이루어져 왔다. 동물을 대상으로 실시 될 경우에는 생태계에 미치는 영향에 대한 우려로 제한되어진 것이 사실이다. 그러나 방사선 조사를 할 경우 발생속도를 늦추어 발생기전을 연구하거나, 유전적 열성개체를 만들어 바이오 마커의 탐색 및 돌연변이를 통한 우량 개체의 생산을 가능하게 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 제주특별자치도 주요 양식 산업인 전복 2종과 넙치 수정란에 대한 방사선 조사를 실시하여 방사선 조사에 대한 생리학적인 지표를 설정하고자 본 연구를 실시하였고, 이러한 연구를 기초로 고부가가치를 창출하는 양식 산업에 방사선 조사 대한 기초 자료를 제공하고 자 실시하였다.



II. 저선량 ^{60}Co 방사선 조사에 따른 참전복 (*Haliotis discus hannai*)의 hormesis에 관한 연구

1. 서론

인구 증가와 환경오염 등에 의한 식량 자원의 고갈과 증가하는 수요를 대처하기 위해서는 자원의 개발과 종장의 발아력 향상 및 생육 증진을 통한 식량 생산성 향상 방법의 개발이 필수적이다. 이러한 시급한 문제를 해결하기 위해 다양한 연구가 진행되어져 왔으며 최근에는 유해성 물질로 분류된 물질의 적정 처리에 의해 생물 활성의 긍정적 효과를 유도할 수 있다는 hormesis 연구법으로 접근하고 있다(Lee, 2002). 방사선도 물리적 작용물질의 하나로서 저선량 방사선에 의한 hormesis 영향으로는 발아와 증 및 생장과 발육 촉진, 수량구성요소의 증가 등이 여러 작물에서 보고 되었는데(Luckey, 1980; Miller and Miller, 1987), 그 중 농업적 가치가 있는 배추(Kim, 2000)의 경우 종자 저장기간에 따라 그 적정선량은 다르지만 초기 생육과 수량이 증가되었고, 고추(Lee, 1998)와 참박(Kim, 2000)에서도 초기생육이 증가되었다는 보고가 있다. 기내에서도 저선량 방사선 조사시 포도나무의 생장과 감자의 괴경형성, 밀의 약배양 효율 등이 증가되었다고 보고 되었다. 또한 과와 시금치의 발아 종자에서 전분분해와 glutamic acid decarboxylase 활성증가(Kim, 2000), 해바라기에서의 탄수화물 함량증가(Thiede, 1995), 옥수수에서의 광합성 증가(Koepp, 1981) 등이 보고되었다. 이러한 방사선 hormesis 작용은 대상 식물, 종자상태 환경 및 재배조건, 측정하는 생리적 기능, 선량율과 선량에 따라 다르게 나타난다. 그러나 이상에서와 같이 작물을 위주로 다양한 방사선 조사에 따른 연구들이 이루어졌으나 동물 특히 해양생물을 대상으로 한 연구는 거의 이루어지고 있지 않다.

본 실험의 대상종인 전복류는 세계적으로 100여종이 알려져 있고, 이중 어획 대상이 되는 대형종은 20여종으로서 주로 온대수역에서 많이 생산되고 있으며, 우리나라에 서식하는 전복류는 소형종인 오분자기(*Halotis diversicolor supertexta*)를 비롯하여 난류계의 대형종인 말전복(*H. gigantea*), 까막전복(*H. discus*), 씨볼트 전복(*H. sieboldii*), 그리고 한류계인 참전복(*H. discus hannai*)의 5종이 알려져 있다

(Yoon, 2004).

특히 전복류는 산업적으로 중요한 종이기 때문에 오래전부터 많은 연구가 이루어져 왔다. 전복양식은 해조를 공급하여 식물성 단백질로 바꾸는 것이 가능하고 먹이인 해조류의 대량양식을 기대할 수 있다는 이점이 있으며, 시장가치가 아주 높고 많은 수요가 있으나 생산량은 극히 적다. 최근에는 전복 성패를 중국, 일본 등으로 수출하는 경우가 많아지고 있어서 경쟁력과 잠재력이 있는 품종으로 여겨지고 있으며 전복 종묘생산 및 성장에 따른 적절한 사육 방법 및 사료의 연구 진행에 있어서도 상당한 성과를 이루어 놓은 실정이다. 전복의 생리·생태적 변화에 관한 연구로는 참전복 유생발생 및 채묘에 미치는 아연독성(Seo, 1999), 참전복의 폐각피사증(Choe, 1998), 남해안 참전복 치패의 근육위축증후군(Choe, 1999), 참전복 치패의 근육위축증 원인인 스쿠티가섬모충에 대한 Chitosan의 구충효과(Choe, 1998), 참전복 치패의 박리 및 마취회복에 관한 연구(Choe, 1997; 1998) 등, 주로 종묘생산 및 물리적 요인에 따른 생리·생태학적인 연구가 이루어지고 있는 실정이다. 또한 먹이의 제한, 공식, 먹이 구성성분 및 불쾌한 환경 요인들은 전복의 보상 성장 및 성숙에 많은 영향을 초래한다고 보고 된 적이 있다(Jung, 2004).

본 실험에서는 참전복에 저선량 감마선을 조사하였을 때, 참전복의 크기의 변화인 각장, 각고, 무게 변화를 측정하여 방사선에 대한 반응을 관찰하여, 방사선 조사가 해양생물에 미치는 생리적인 영향에 대한 기초자료를 획득하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

1) 실험 재료 및 사육 관리

실험에 사용된 참전복, *Haliotis discus hannai*은 조간대에서 수심 20~30 m에 이르는 바위가 많은 곳에 서식하며, 주로 일본, 우리나라 전 연안에 분포한다(Fig. 1). 방사선 조사 후 전복의 초기 생리변화를 확인하기 위하여 사용된 참전복의 경우 평균 각장 4.12 ± 0.3 cm, 각폭 2.76 ± 0.2 cm, 전중량 7.73 ± 2.3 g인 개체를 사용하였다. 실험 전복은 미리 $18 \pm 0.4^\circ\text{C}$ 에서 1~2주 동안 사육하며 순치시킨 후 순환여과가 가능한 수조를 제작하여 방사선 조사 후 각 선량별로 수조에 라벨을 붙여 사육하였다. 이 때 염분은 $33.4 \pm 0.4\%$ 을 유지하였고 PVC 파이프(\varnothing 20 cm, L 20 cm)를 세로로 절단한 은신처(shelter)를 넣어서 공기를 공급하였다. 예비사육기간에 먹이는 다시마를 충분히 공급하였으며, 실험구는 40마리의 전복을 실험에 사용하였으며, 실험 개시 후 방사선 조사 후를 0 h로 정하여 0, 3, 6, 12, 24, 48 및 72 h 쯤에 각각 5마리의 전복으로부터 혈구와 아가미 조직, 간 부위를 조직 샘플을 채취하여 -70°C 로 보관하며 분석에 사용하였다.

장기간 사육에 사용된 참전복은 제주수산연구소 패류육종센터에서 분양 받은 평균 각장 3.45 ± 0.4 cm, 각폭 2.60 ± 0.6 cm, 중량 5.12 ± 0.17 g인 개체를 사용하였다. 실험 전복은 방사선을 조사 한 후 자연해수를 유수시키는 실내 사육을 하였다. 먹이는 다시마(*Laminaria japonica*)를 2~3일 간격으로 충분량 공급하였다. 사육기간 동안 사육 환경은 측정 당일날 표층에 YSI 556 MPS(Multi-probe system)를 이용하여 수온, 염분, pH, 용존산소량을 측정하였다. 실험구당 30마리의 전복을 실험에 사용하였고, 실험개시 직후, 4주, 8주, 12주, 26주, 48주째까지 방사선 조사량에 따른 크기 변화를 각장과 각고는 Digimatic Cliper (0.01 mm), 중량은 이동식 저울 (0.01 g)로 측정하였다.

2) 방사선 조사

저선량 방사선 조사는 제주대학교 방사선응용과학연구소에서 보유중인 저준위조사 시설(^{60}Co)을 용하여 γ 선 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0, 20.0 Gy 수준으로 직접 제작한 틀에 전복의 발쪽을 선원 쪽으로 고정시킨 후 조사하였다. 조사 선량은 Fricke dosimeter로 측정하였다(Fig. 2).

3) 사망률 측정

전복에 미치는 영향에 대한 실험은 개시 후 0, 3, 6, 12, 24, 48 및 72 h째에 폐사한 개체를 각각 조사하였다. 폐사 개체의 계수는 은신처(shelter)와 수조 벽면에 부착 능력이 없고, 유리봉으로 발과 촉수를 자극하여 반응이 없는 개체를 선택하여 조사하였다.

4) 혈림프(Hemolymph) 수 측정

방사선에 의한 장애를 파악하고 또한 각종 장애 경감물질의 효과를 측정을 위하여 가장 많이 사용되고 기본이 되는 지표는 혈액의 변화이다. 사람에게 있어서도 방사선 치료 시 치료계획의 판단 기준으로 혈액 수치, 특히 림프구의 수치 변화를 사용하고 있으면, 원폭피해자 및 방사선 사고에 의한 피폭자에 대한 연구에서도 조혈기관 장애와 관련된 보고가 주를 이룬다(Kyoizumi et al., 1989; Finch, 1987; Langlois et al., 1987; Gale, 1990; Adams, 1984).

혈림프 수 측정은 실험개시 후 0, 3, 6, 12, 24, 48 및 72 h째에 전복의 심장 옆 혈관으로부터 바늘 규격 26GX 1/2인 1 ml 주사기를 이용하여 혈액을 채취한 후 0.9% 생리식염수로 10배 희석하여 혈구 계산판을 이용하여 살아있는 혈구를 계수하였다(Fig. 3).

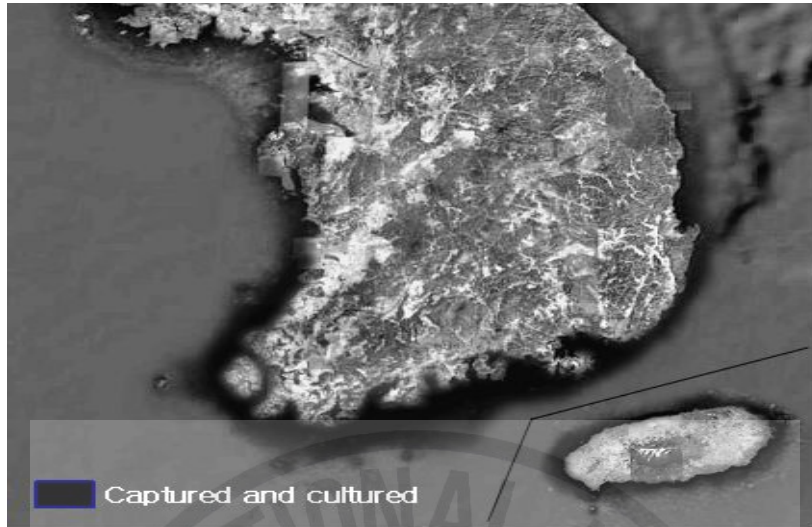


Fig. 1. Juvenile abalones were captured and cultured.



Fig. 2. Gamma irradiation to juvenile abalones.

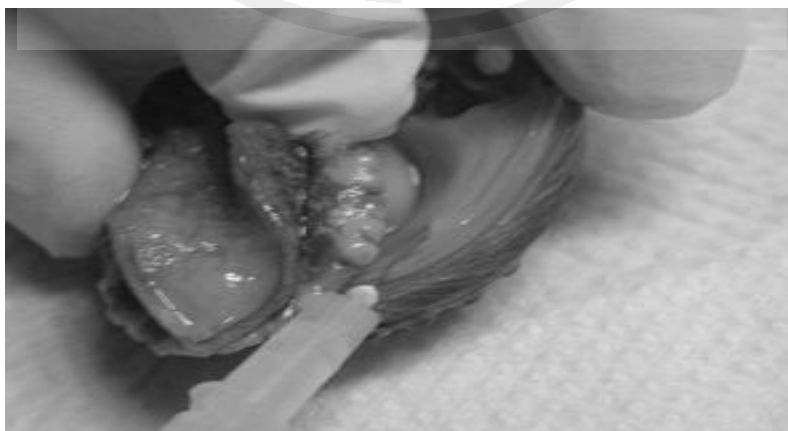


Fig. 3. Take a blood sample in abalone.

5) 항산화 효소 측정

항산화효소는 간부위를 적출하여 SOD 및 CAT를 각각 분석하였다. 간부위를 적출 후 약 0.1 g을 0.9% NaCl에 3회 세척한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화 하였고, 균질화된 시료는 원심분리 (1,000 rpm, 15 min, 4°C)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C)한 후 상등액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다(Fig. 4). 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준 단백질로 소 BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 spectrophotometer를 이용 750 nm에서 측정하였다(Fig. 5). SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund and Marklund (1974)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 1.3 ml에 간장 균질액 25 μ l을 넣은 후 45 μ l의 3mM progallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer를 이용하여 325 nm의 파장에서 측정하였고, 효소활성의 1 단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다(Fig. 6). CAT활성도 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer에 의해 240 nm파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow (1972)의 방법에 의하여 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1분간 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다(Fig. 7).

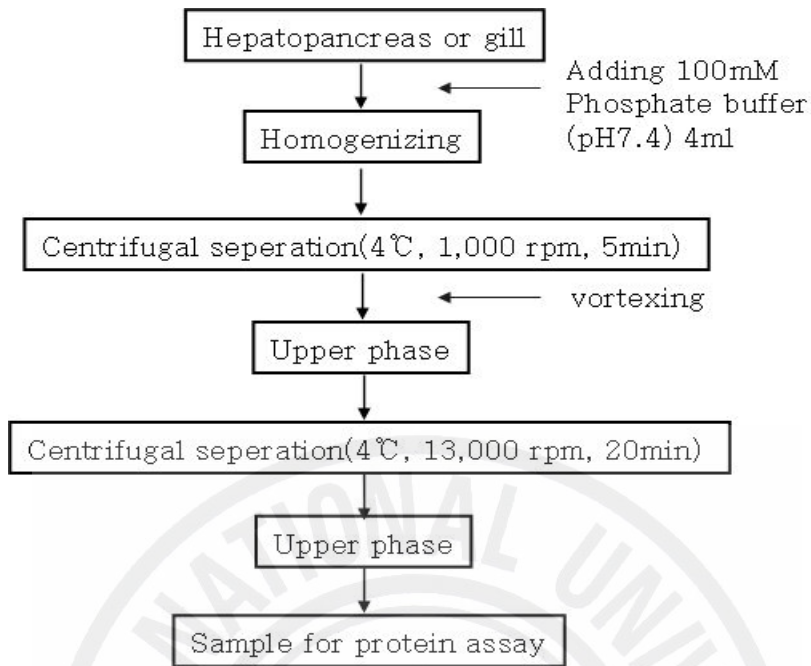


Fig. 4. Extraction of protein.

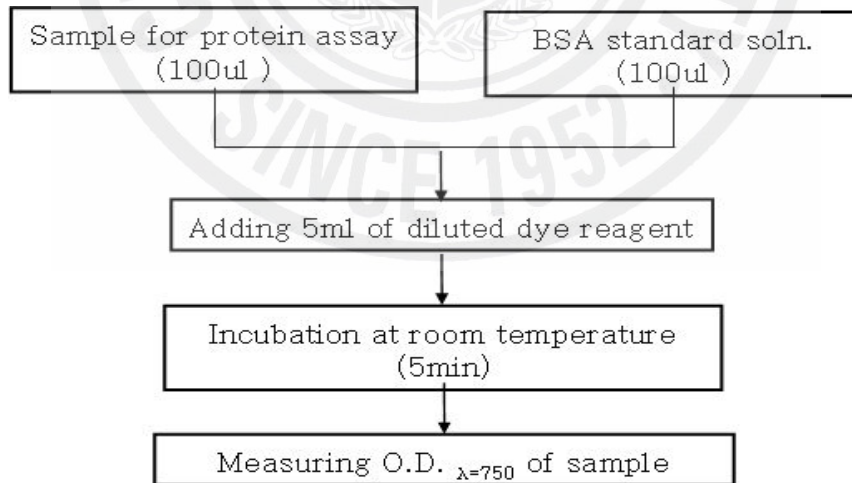


Fig. 5. Procedures for protein assay by Lowery method.

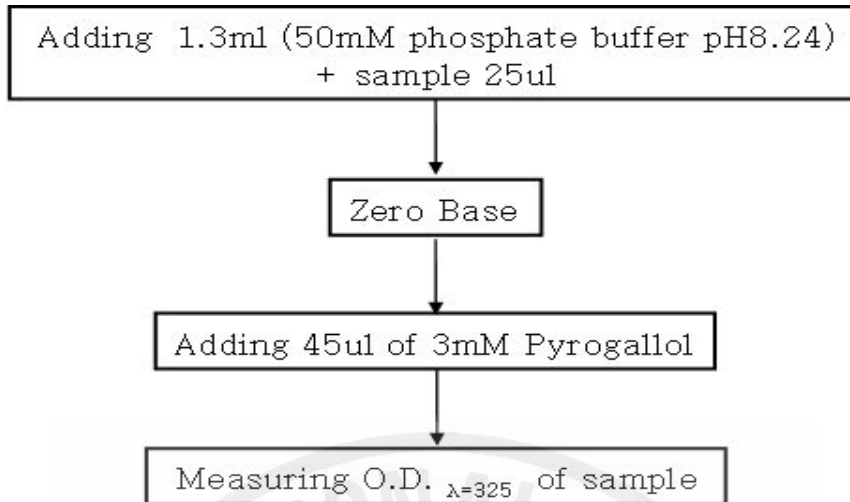


Fig. 6. Procedures for measurement of SOD activity.

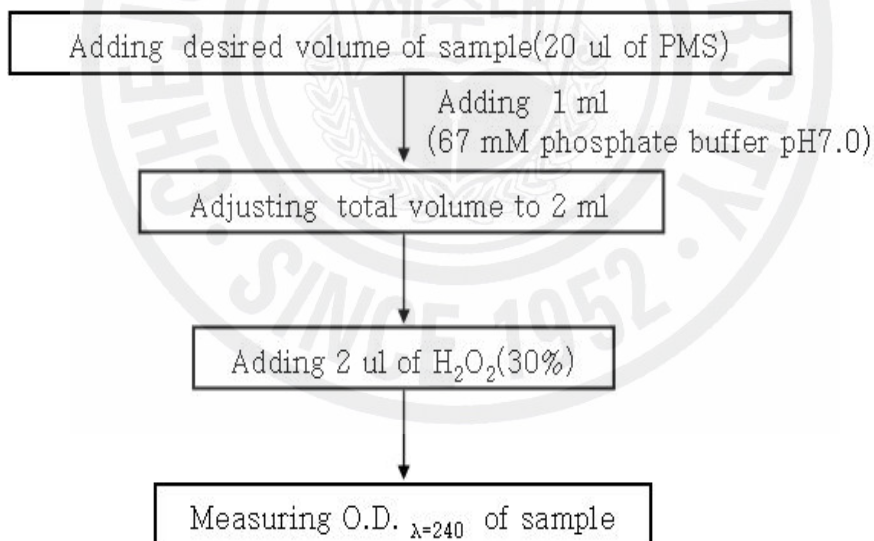


Fig. 7. Procedures for measurement of catalase activity.

6) RT-PCR 분석

동결된 아가미 조직에 Tri-regent 500 μl 를 가한다. 호모젠아이저로 시료를 균질화한 후 상온에서 5분간 방치한다. Chloroform 100 μl 가한 후 혼합하여 상온에서 3분간 방치한다. 원심분리(13,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min) 후 상청액을 다른 tube에 옮겨 동량의 차가운 isopropanol을 넣어서 혼합한다. 10분간 상온에 방치 후 원심분리(13,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min) 한다. 상청액을 제거하고 차가운 75% ethanol을 1 ml 넣어서 혼합 후 원심분리(13,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min)한다. 이를 3회 반복하고 상청액을 제거하고 실온에서 1시간동안 방치하여 ethanol을 증발시킨다. 여기에 DEPC 25 μl 넣어서 total RNA를 놓인다. 추출된 total RNA는 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하여 실험에 사용하였으며, PROMEGA사의 cDNA합성 kit인 ImProm reverse transcriptase kit A3800을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 증폭시키기 위해서 cDNA 2 μl , 10x PCR buffer 5 μl , MgCl 3 μl , dNTP 1 μl , primer (sence) 1 μl (50 pmol), antisence 1 μl , Taq DNA polymerase 0.5 μl 및 Nuclease-Free water 36.5 μl 를 혼합하여 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 predenaturation 시켜준 후 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 denaturation, 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45초간 annealing, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 extension 조건으로 30회 증폭하고, 이 후 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 더 반응시켰다.

HSP 70 mRNA에 대한 oligonucleotide primer를 제작 합성하였고, 양성대조로 사용하기 위해 β -actin mRNA를 제작하였다(Table 1). PCR로 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 100V로 전기영동 하여 분리하였으며, 100 bp DNA ladder를 size marker로 사용하여 UV transilluminator하에서 사진을 촬영하여 이미지 분석 프로그램(Labworks 4.5)을 이용하여 mRNA의 발현량을 정량하였다.

Table 1. Oligonucleotide of primers for RT-PCR

RNA species	Expected size	Primer sequence
β -actin mRNA	520bp	5'-GACHCAGATCATGTTYGARACC-3' 5'-CCTTCTGCATRCGGTCAGC-3'
HSP70 mRNA	400bp	5'-CAGGACTTCTTCAACGGCAAG-3' 5'-GTGCTCTTGTCSACAGCTGA-3'

bp: base pairs

7) SDS-PAGE 분석

전복의 아가미를 채취하여 분쇄 완충용액 100 mM phosphate buffer에서 호모게나이저로 분쇄하여 원심분리(12,000 rpm, 15 min, 4°C) 하였다. 상층액을 2:1 비율로 2 X Laemmli sample buffer (80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 12% β -mercaptoethanol, 15% glycerol 및 0.012% bromphenol blue)에 용해시켜 90°C 이상의 온도에서 3분간 boiling 한 후 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE 을 실시하였다. 7.5~10% polyarylamide gel 을 사용하여 250V, 55mA로 4시간 동안 전기영동을 실시한 후, 염색액 (0.136% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol 및 10% acetic acid)에서 40분간 염색하고 , 7.5% methanol, 7.5% acetic acid에서 탈색하였다(Table 2, 3). 분자량 측정용 표준단백질은 myosin (200 kD), β -galactosidase (116 kD), phospholylase b (97 kD), bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (45kD) 및 carbonic anhydrase (31kD)를 사용하였다.

Table 2. Compositions of reagents related to SDS gel

Solution	Component	
Acrylamide A	Acrylamide Methylene-bis-Acrylamide	22.2 g 0.6 g Adjust to 100 ml
Lower gel buffer (4×concentrated)	18.15g Tris base adjusted to pH 8.8 with 6N HCl	Final volume 100ml Tris 1.5M
Upper gel buffer (4×concentrated)	6g Tris base adjusted to pH 8.8 with 6N HCl	Final volume 100ml Tris 0.5M
10% SDS	SDS(sodium dodecyl sulfate) Distilled water	10 g Adjust to 100 ml
10% APS	Ammonium persulfate(APS) Distilled water	0.1 g 1 ml

Table 3. Regents for preparing for SDS-PAGE

Lower gell	7.5%	10%	Upper gel	3%
Acrylamide A	12.12 ml	16.2 ml	Acrylamide A	2.7 ml
Water	14.16 ml	10.08 ml	Water	12 ml
Lower gel buffer	9 ml	9 ml	Lower gel buffer	5 ml
10% APS	0.36 ml	0.36 ml	10% APS	0.2 ml
10% SDS	0.36 ml	0.36 ml	10% SDS	0.2 ml
TEMED	0.036 ml	0.036 ml	TEMED	0.02 ml
Total volume	36.036ml	36.036ml	Total volume	20.12ml

8) Western blot 분석

Western blot은 Towbin et al. (1979)의 방법을 변형하여 실시하였다(Fig. 8). SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 15V에서 4시간 동안 nitrocellulose (NC)막으로 전사시킨 후 ponceau S 용액 (0.2% ponceaus, 3% trichloroacetic acid 및 3% sulfosalicyclic acid)으로 전사됨을 확인하였다. 그 후 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 3% bovin serum albumin과 0.05% Tween 20이 함유된 0.1M Tris buffered saline (TTBS, pH7.4)을 이용하여 40분 상온에서 약하게 흔들면서 blocking 시켰다. Blocking이 끝난 후 HSP70 (Sigma, H5147)에 대한 항체를 NC 막에 첨가하여 1시간 동안 실온에서 배양한 후, TBS-T (0.05% Tween 20 in TBS)로 5분씩 3회 세척하였다. Alkaline phosphatase-conjugated goat antimonuse IgG로 1시간 동안 실온에서 배양하고 TBS-T 용액으로 5번 세척한 후, DAB(0.1%)와 0.03% H₂O₂가 함유된 PBS (pH7.2)로 발색을 유도하였다.

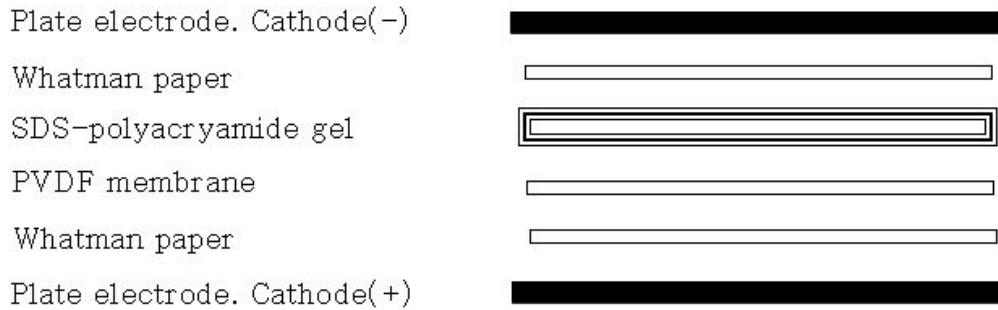


Fig. 8. Set up of Whatman paper (blotting paper), gel and PVDF between the plate electrodes. Blotting paper and PVDF are used in the same size as the gel.

9) 통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS 통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여, P 값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다. 반복 시험의 결과는 평균±표준편차평균으로 나타내었다.

3. 결과

1) 방사선 조사 후 참전복의 초기 생리 변화

1-1) 생존율 변화

저선량 방사선 조사에 대한 참전복의 생존율을 확인하였다. 방사선 조사를 받은 실험구는 대조구(0 Gy)와 동일한 100% 생존율을 실험 종료 시인 72 h까지 확인하였다(Fig. 9).

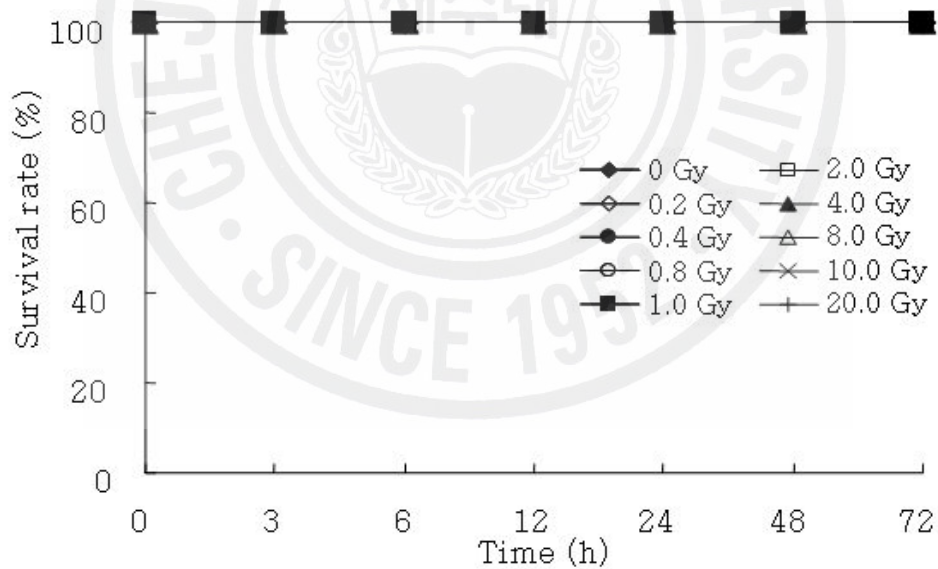


Fig 9. Survival rate of juvenile abalone (*H. discus hannai*) after the exposure of gamma radiation.

1-2) 혈림프 수 변화

저선량 방사선 조사로 인한 참전복의 혈구수 변화는 조사 0h에는 1~20 Gy은 대조구(0 Gy)보다 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 있었다(Table 4, $P < 0.05$). 하지만 3h에서는 10과 20 Gy에서는 대조구(0 Gy)보다 유의적인 감소를 확인하였고, 2 Gy에서는 유의적으로 증가한 것을 확인하였다($P < 0.05$). 10과 20 Gy는 12h까지 대조구(0 Gy)보다 유의적인 감소한 것을 확인하였고($P < 0.05$), 이 후로는 대조구와 유의적인 차이는 확인 되지 않았다. 그리고 6h에서는 3h에서도 확인 할 수 있었던 0.8과 1 Gy에서 대조구(0 Gy)보다 유의적인 증가를 확인 할 수 있었다($P < 0.05$).

Table 4. Variations of hemolymph factors of abalone (*H. discus hannai*) reared with different dose radiation

Dose (Gy)	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
0	1.82±0.32	1.73±0.28	1.70±0.07	1.69±0.06	1.70±0.23	1.63±0.08	1.78±0.23
0.2	1.62±0.09	1.63±0.28	1.63±0.30	1.71±0.24	1.62±0.06	1.62±0.35	1.80±0.16
0.4	1.59±0.34	1.56±0.18	1.58±0.26	1.69±0.04	1.53±0.17	1.58±0.14	1.63±0.19
0.8	1.60±0.20	1.95±0.34	2.03±0.29*	1.88±0.62	1.59±0.49	1.60±0.48	1.73±0.27
1.0	1.63±0.23*	1.61±0.29	1.97±0.22*	1.56±0.42	1.48±0.15	1.26±0.48	1.63±0.23
2.0	1.45±0.16*	2.04±0.28*	1.81±0.31	1.83±0.45	1.49±0.12	1.49±0.20	1.72±0.26
4.0	1.52±0.08*	1.74±0.35	1.82±0.34	1.76±0.21	1.31±0.41	1.35±0.39	1.63±0.09
8.0	1.36±0.22*	1.54±0.29	1.80±0.43	1.56±0.30	1.56±0.22	1.36±0.25	1.60±0.16
10.0	1.43±0.21*	1.47±0.24*	1.45±0.16*	1.53±0.14*	1.45±0.17	1.42±0.30	1.63±0.19
20.0	1.35±0.14*	1.48±0.21*	1.55±0.14*	1.48±0.17*	1.46±0.17	1.33±0.37	1.59±0.13

The values are mean±S.D. (n=3), * $P < 0.05$

1-3) 항산화효소 변화

저선량 방사선 조사에 따른 항산화 효소인 SOD와 CAT 효소를 확인하였다(Fig. 10). 방사선 조사에 따른 SOD효소는 조사 직후부터 0.4와 8 Gy를 제외한 실험구에서 증가하기 시작하였다(Fig. 10-A). 각 실험구마다 일정하지 않은 변화를 72시간 까지 나타나고 있다. 방사선 조사에 따른 CAT효소는 조사 직후에는 대조구(0 Gy)보다 높은 효소 활성을 보였다(Fig. 10-B). 조사 직후부터 감소하기 시작하였고, 실험 종료 72시간에는 4 Gy를 제외한 실험구와 대조구(0 Gy)가 비슷한 수치까지 감소하는 것을 확인하였다.

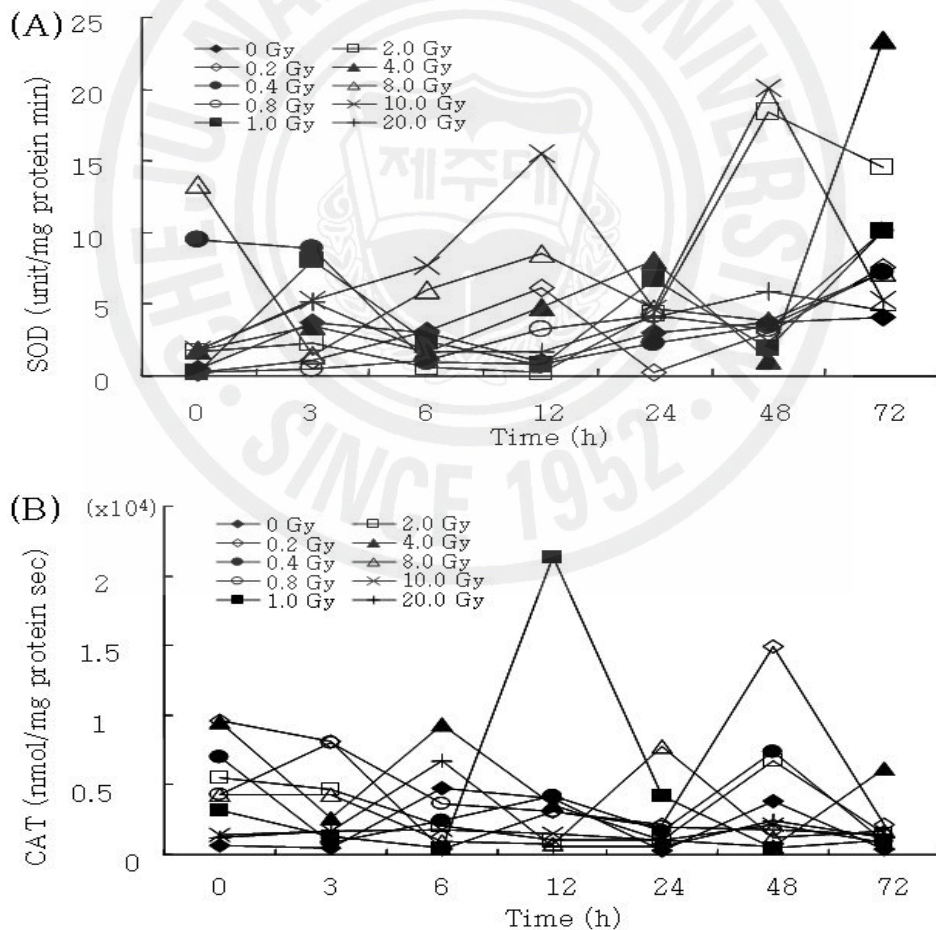


Fig. 10. Change of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in abalone (*H. discus hannai*) reared with different dose radiation.

1-4) HSP 70 mRNA 발현량의 변화

저선량 방사선 조사에 따른 HSP 70의 변화를 관찰하기 위하여 선량과 시간대 별로 아가미 조직에서 샘플을 적출하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 RT-PCR를 통한 HSP 70 mRNA의 발현은 대조구(0 Gy)와 실험구에서 전부 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 11). 그래서 HSP 70 mRNA 발현을 β -actin mRNA를 기준으로 나타낸 결과를 확인하였다(Fig. 12). 방사선 조사 직후 대부분이 HSP 70 mRNA가 증가하였고, 4와 20 Gy에서는 HSP 70 mRNA가 감소하는 것을 확인하였다. 실험구들은 실험 12시간까지 HSP 70 mRNA가 감소와 증가를 확인하였다. 그리고 종료 72시간에는 10 Gy를 제외한 실험구들은 HSP 70 mRNA가 감소하는 것을 확인하였다.

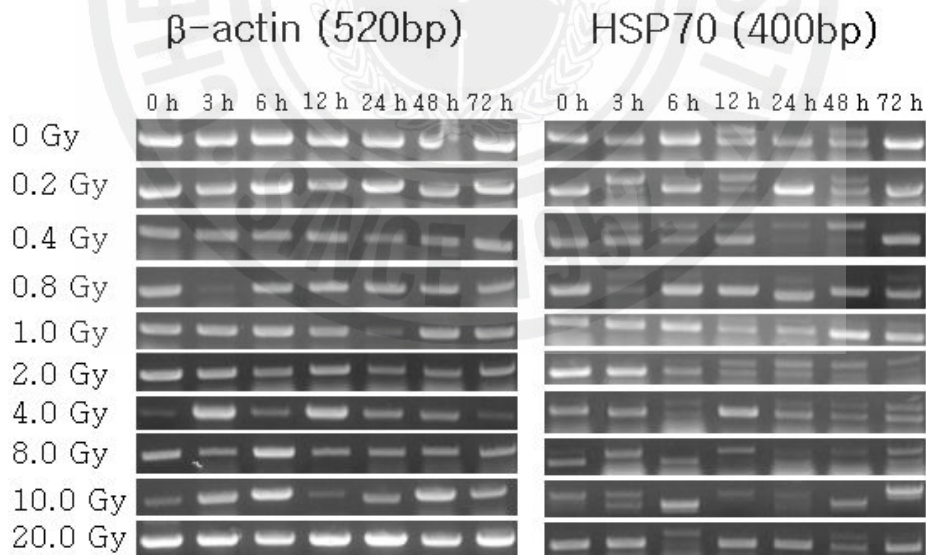


Fig. 11. Effect of gamma radiation on β -actin mRNA and HSP 70 mRNA of gill in abalone (*H. discus discus*).

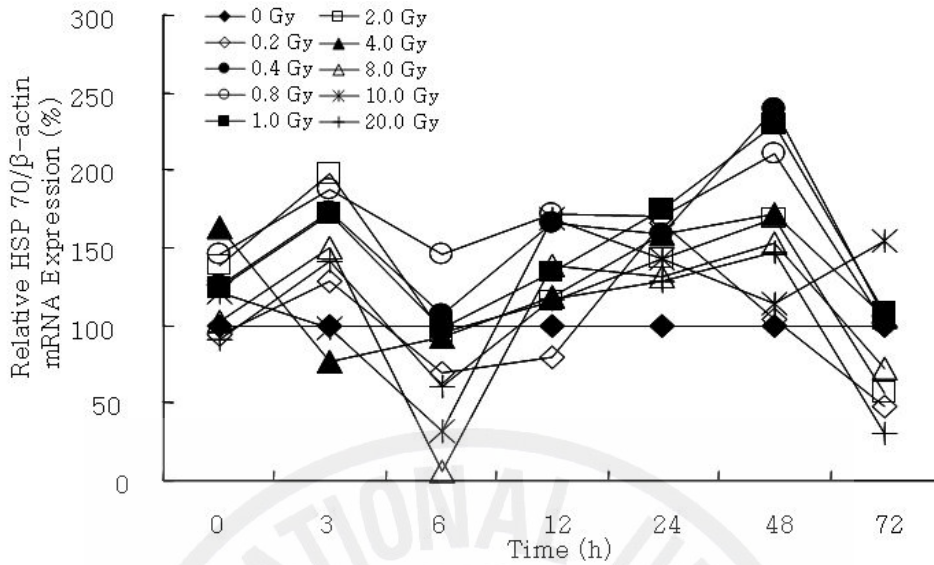


Fig. 12. Effect of gamma radiation on HSP 70 mRNA of gill in abalone (*H. discus discus*).

1-5) 단백질 발현의 변화

방사선 조사량에 따른 단백질 발현의 영향을 알아보기 위하여 전복의 아가미를 적출하여 10 % SDS-PAGE로 분석하였다. 방사선 조사 후 대조구와 0.2 Gy에서는 21 kDa 부근에서 12시간째에 단백질 발현이 뚜렷하게 확인되었지만(Fig 13-A, B), 다른 실험구들에서는 뚜렷하게 확인되지는 않았다. 저선량 방사선 조사 후 0.2와 0.4 Gy에 31 kDa 부근에서 대조구(0 Gy)에서 뚜렷이 나타나지 확인되지 않은 단백질이 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 13-B, C).

저선량 방사선 조사에 따른 HSP 70 단백질 발현을 확인하기 위하여 western blot을 실시하였다. 하지만 방사선 조사량에 대한 HSP 70 단백질은 실험 종료까지 실험구들에서 나타나지 않았다(Date not shown).

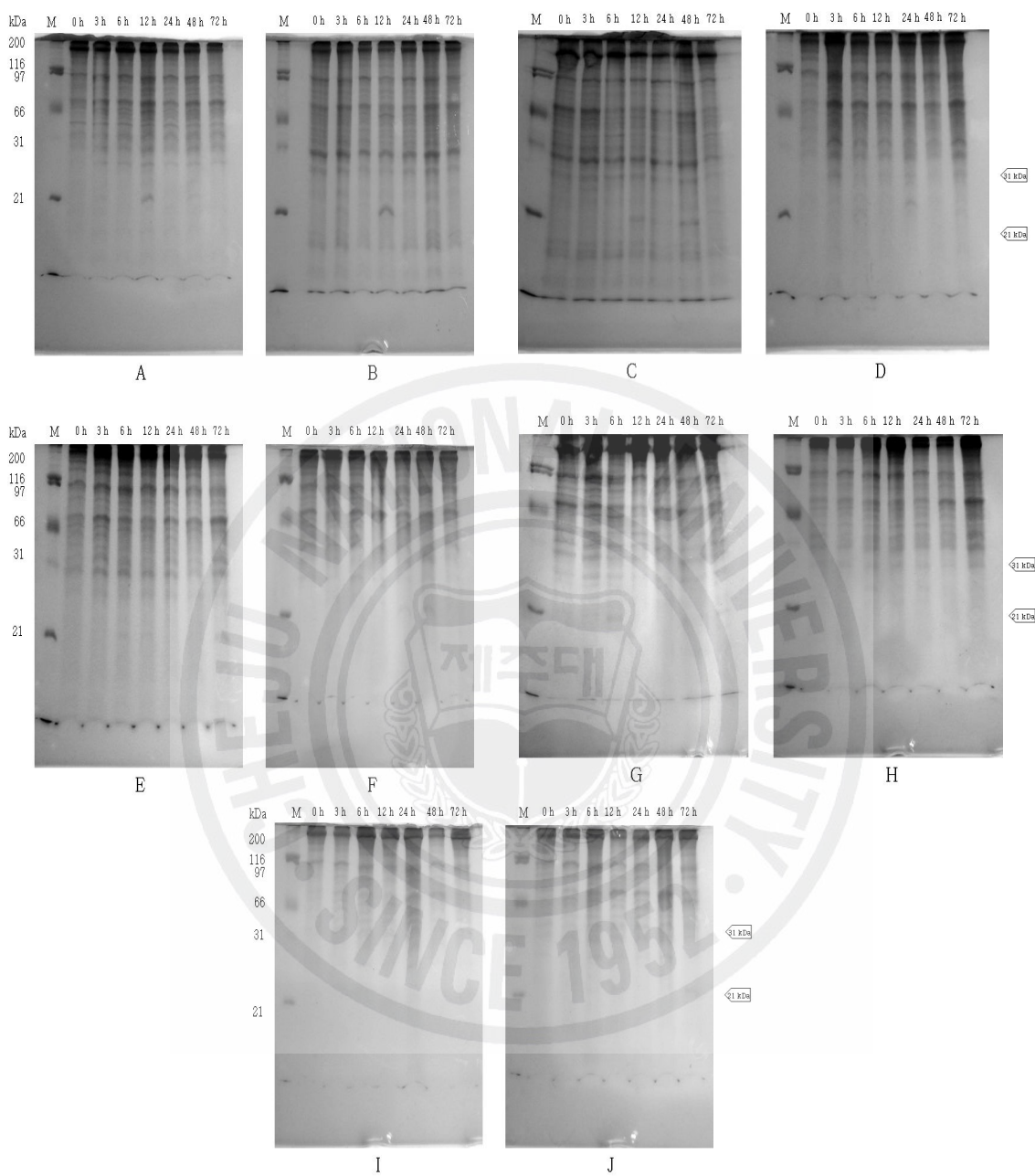


Fig. 13. Protein expression of abalone (*H. discus hannai*) after the exposure of gamma radiation.
 A : 0 Gy, B: 0.2 Gy, C : 0.4 Gy, D : 0.8 Gy, E : 1.0 Gy
 F : 2.0 Gy, G : 4.0 Gy, H : 8.0 Gy, I : 10.0 Gy, J : 20.0 Gy

2) 방사선 조사 후 참전복의 장기 사육에 대한 성장 변화

2-1) 사육 환경

실험기간 동안 사육환경은 Table 5와 같다. 실험 기간 동안 측정된 평균 수온은 16.8 °C 였다. 가장 낮은 수온은 3월 13.1 °C 였고, 높은 수온은 8월 27.4 °C 로 나타났다. 염분은 평균 31.7 ‰ 였고, 가장 낮은 염분은 3월 31.2 ‰, 가장 높은 염분은 4월과 8월 32.2 ‰로 나타났다. pH은 평균 7.85 였고, 측정된 범위는 7.76~7.92로 일정하게 나타났다. 용존산소(DO)는 평균 7.5 mg/L 였고, 측정된 범위는 7.4~7.7 mg/L로 일정하게 나타났다.

Table 5. The change of temperature, salinity, pH, DO during the experiment

Month Date	Temp(°C)	Salinity(‰)	pH	Dissolved oxygen(mg/L)
2004.2.2	14.9	31.7	7.91	7.6
3.7	13.1	31.2	7.84	7.4
4.4	14.5	32.3	7.76	7.6
5.2	16.1	31.8	7.92	7.5
8.8	27.4	32.3	7.79	7.7
2005.1.10	14.7	31.1	7.92	7.4
Mean±S.D.	20.25±10.11	31.65±0.78	7.84±0.11	7.55±0.21

2-2) 각장(shell length) 변화

2004년 2월부터 2005년 1월까지 48주 동안 양식장에서 사육한 각 실험구별 참전복 치패의 각장 성장 결과는 Table 6과 같다.

전복치패의 각장 크기의 변화를 살펴보면, 실험 시작 시 각 실험군의 평균 각장은 $3.37\pm 0.28\sim 3.48\pm 0.25$ cm로 대조군과는 유의적인 각장차이는 없었다. 사육 4주째나 8주째에서도 대조군과 실험군간에 유의적인 성장차이가 없었다. 사육 12주째에는 처리 구간별 각장 성장은 대조군과 비교하였을 때 20 Gy 실험군을 제외한 모든 실험군은 유의적인 성장차이가 없었다. 그러나 방사선 조사량이 가장 높은 20 Gy에서는 대조군과 유의적인 성장 차이를 나타내었다($P<0.05$). 사육 26주째에서도 대조군과 비교하였을 때 20 Gy를 제외한 모든 실험군은 유의적인 성장차이가 없었다. 그러나 방사선 조사량이 가장 높은 20 Gy에서는 12주째와 같이 유의적인 성장 차이가 나타났다($P<0.05$). 실험종료인 48주째에 사육한 결과를 살펴보면 실험 시작 시 대조군인 0 Gy는 3.43 ± 0.15 mm, 0.2 Gy 실험군은 3.47 ± 0.23 mm, 0.4 Gy 실험군은 3.37 ± 0.28 mm, 0.8 Gy 실험군은 3.45 ± 0.14 mm, 1 Gy 실험군은 3.45 ± 0.19 mm, 2 Gy 실험군은 3.48 ± 0.25 mm, 4 Gy 실험군은 3.44 ± 0.14 mm, 8 Gy 실험군은 3.48 ± 0.19 mm, 10 Gy 실험군은 3.43 ± 0.12 mm, 20 Gy 실험군은 3.42 ± 0.12 mm에서 대조군 0 Gy는 5.79 ± 0.45 mm, 0.2 Gy 실험군은 5.33 ± 0.56 mm, 0.4 Gy 실험군은 5.18 ± 0.72 mm, 0.8 Gy 실험군은 5.74 ± 0.60 mm, 1 Gy 실험군은 5.47 ± 0.32 mm, 2 Gy 실험군은 5.54 ± 0.24 mm, 4 Gy 실험군은 5.66 ± 0.33 mm, 8 Gy 실험군은 5.58 ± 0.61 mm, 10 Gy 실험군은 5.17 ± 0.54 mm, 20 Gy 실험군은 4.80 ± 0.47 mm로 성장 하였다. 각 실험군당 성장의 차이를 보면 대조구인 0 Gy는 2.36 ± 0.3 mm, 0.2 Gy는 1.86 ± 0.33 mm, 0.4 Gy는 1.81 ± 0.44 mm, 0.8 Gy는 2.29 ± 0.46 mm, 1 Gy는 2.02 ± 0.13 mm, 2 Gy는 1.81 ± 0.24 mm, 4 Gy는 2.22 ± 0.19 mm, 8 Gy는 2.10 ± 0.42 mm, 10 Gy는 1.74 ± 0.42 mm, 20 Gy는 1.38 ± 0.35 mm 였다. 실험군들에서 방사선 조사량이 높은 20 Gy에서 성장이 느리게 나타났다($P<0.05$).

Table 6. Variations of shell length (cm) for juvenile abalones reared with different dose radiation in the farm

Dose (Gy)	0 week	4 week	8 week	12 week	26 week	48 week
0	3.43±0.15	3.53±0.14	3.83±0.15	4.05±0.19	4.76±0.24	5.79±0.45
0.2	3.47±0.23	3.52±0.24	3.72±0.32	3.89±0.27	4.38±0.62	5.33±0.56
0.4	3.37±0.28	3.43±0.26	3.65±0.32	3.77±0.34	4.28±0.64	5.18±0.72
0.8	3.45±0.14	3.54±0.15	3.81±0.18	4.04±0.24	4.70±0.46	5.74±0.60
1.0	3.45±0.19	3.53±0.21	3.60±0.59	3.98±0.27	4.47±0.56	5.47±0.32
2.0	3.48±0.25	3.62±0.25	3.83±0.21	4.04±0.23	4.74±0.17	5.54±0.24
4.0	3.44±0.14	3.56±0.17	3.80±0.19	4.13±0.35	4.64±0.47	5.66±0.33
8.0	3.48±0.19	3.60±0.20	3.87±0.19	4.03±0.2	4.54±0.50	5.58±0.61
10.0	3.43±0.12	3.47±0.16	3.64±0.22	3.82±0.27	4.47±0.67	5.17±0.54
20.0	3.42±0.12	3.44±0.20	3.62±0.15	3.75±0.14 *	4.14±0.33 *	4.80±0.47 *

The values are mean±S.D. (n=3), * $P < 0.05$

2-3) 각폭(shell width) 변화

전복 치패의 각폭 성장 결과는 Table 7과 같다.

전복 치패의 각폭 크기를 살펴보면, 실험 시작 시 각 실험군의 평균 각폭은 $2.22\pm 0.09\sim 2.46\pm 0.42$ cm로 대조군과는 유의적인 각폭차이는 없었다. 사육 4주째도 대조군과 실험군간에 유의적인 성장차이가 없었다. 사육 8주째에는 처리 구간별 각폭 성장은 대조군과 비교하였을 때 10, 20 Gy를 제외한 모든 실험군은 유의적인 성장차이가 없었다. 그러나 방사선 조사량이 높은 10, 20 Gy에서는 대조군과 유의적인 성장차이를 나타내었다($P<0.05$). 사육 12주째에서도 방사선 조사량이 높은 10, 20 Gy에서는 대조군과 유의적인 성장 차이를 나타내었다($P<0.05$). 사육 26주째에서는 대조군과 비교하였을 때 10 Gy에서는 유의적인 성장차이가 없었지만, 20 Gy에서는 12주째와 같이 유의적인 성장차이를 나타내었다($P<0.05$). 실험종료인 48주째에 사육한 결과를 살펴보면 실험 시작 시 대조군인 0 Gy는 2.29 ± 0.10 mm, 0.2 Gy 실험군은 2.31 ± 0.20 mm, 0.4 Gy 실험군은 2.20 ± 0.17 mm, 0.8 Gy 실험군은 2.46 ± 0.42 mm, 1 Gy 실험군은 2.29 ± 0.12 mm, 2 Gy 실험군은 2.26 ± 0.12 mm, 4 Gy 실험군은 2.22 ± 0.09 mm, 8 Gy 실험군은 2.32 ± 0.11 mm, 10 Gy 실험군은 2.26 ± 0.08 mm, 20 Gy 실험군은 2.23 ± 0.06 mm에서 대조군인 0 Gy는 4.00 ± 0.22 mm, 0.2 Gy 실험군은 3.64 ± 0.41 mm, 0.4 Gy 실험군은 3.53 ± 0.46 mm, 0.8 Gy 실험군은 3.99 ± 0.31 mm, 1 Gy 실험군은 3.76 ± 0.20 mm, 2 Gy 실험군은 3.82 ± 0.11 mm, 4 Gy 실험군은 3.84 ± 0.38 mm, 8 Gy 실험군은 3.80 ± 0.35 mm, 10 Gy 실험군은 3.55 ± 0.27 mm, 20 Gy 실험군은 3.22 ± 0.33 mm로 성장 하였다. 각 실험구당 각폭성장의 차이를 보면 대조군인 0 G는 1.71 ± 0.12 mm, 0.2 Gy 실험군은 1.33 ± 0.21 mm, 0.4 Gy 실험군은 1.33 ± 0.29 mm, 0.8 Gy 실험군은 1.11 ± 0.31 mm, 1 Gy 실험군은 1.47 ± 0.08 mm, 2 Gy 실험군은 1.44 ± 0.11 mm, 4 Gy 실험군은 1.62 ± 0.27 mm, 8 Gy 실험군은 1.48 ± 0.24 mm, 10 Gy 실험군은 1.29 ± 0.19 mm, 20 Gy 실험군은 0.99 ± 0.27 mm 였다. 실험군들에서 방사선 조사량이 높은 10, 20 Gy에서 성장이 느리게 나타났다($P<0.05$).

Table 7. Variations of shell width (cm) for juvenile abalones reared with different dose radiation in the farm

Dose (Gy)	0 week	4 week	8 week	12 week	26 week	48 week
0	2.29± 0.10	2.35±0.09	2.59±0.10	2.75±0.08	3.27±0.13	4.00±0.22
0.2	2.31±0.20	2.35±0.21	2.54±0.26	2.64±0.27	3.04±0.42	3.64±0.41
0.4	2.20±0.17	2.24±0.17	2.40±0.20	2.54±0.27	2.97±0.41	3.53±0.46
0.8	2.46±0.42	2.35±0.11	2.57±0.14	2.73±0.16	3.23±0.29	3.99±0.31
1.0	2.29±0.12	2.36±0.11	2.58±0.12	2.68±0.16	3.05±0.29	3.76±0.20
2.0	2.26±0.12	2.35±0.12	2.54±0.14	2.64±0.14	3.20±0.10	3.82±0.11
4.0	2.22±0.09	2.29±0.13	2.51±0.18	2.68±0.22	3.14±0.29	3.84±0.38
8.0	2.32±0.11	2.38±0.08	2.58±0.14	2.72±0.15	3.10±0.30	3.80±0.35
10.0	2.26±0.08	2.31±0.05	2.45±0.07 *	2.56±0.12 *	3.08±0.38	3.55±0.27 *
20.0	2.23±0.06	2.24±0.08	2.38±0.07 *	2.47±0.07 *	2.81±0.22 *	3.22±0.33 *

The values are mean±S.D. (n=3), *P < 0.05

2-4) 중량(total weight)의 변화

전복 중량의 성장은 Table 8에서 보는 바와 같이 실험 시작 시 실험군의 평균 중량은 $4.75 \pm 0.43 \sim 5.29 \pm 0.96$ g로 대조군과는 유의적인 중량차이는 없었다. 사육 4주째도 대조군과 실험군간에 유의적인 중량차이는 없었다. 사육 8주째에는 처리 구간별 중량 차이는 대조군과 비교하였을 때 20 Gy를 제외한 모든 실험군에서 유의적인 중량차이는 없었다. 그러나 방사선 조사량이 높은 20 Gy에서는 대조군과 유의적인 중량차이를 나타내었다($P < 0.05$). 사육 12주째에서도 방사선 조사량이 높은 20 Gy에서는 대조군과 유의적인 성장 차이를 나타내었다($P < 0.05$). 사육 26주째에서도 12주째와 같이 대조군과 비교하여 20 Gy에서 유의적인 성장차이를 나타내었다($P < 0.05$). 실험종료인 48주째에 사육한 결과를 살펴보면 실험 시작 시 대조군인 0 Gy는 4.93 ± 0.75 g, 0.2 Gy 실험군은 5.19 ± 1.11 g, 0.4 Gy 실험군은 4.90 ± 0.98 g, 0.8 Gy 실험군은 4.75 ± 0.43 g, 1 Gy 실험군은 4.97 ± 0.74 g, 2 Gy 실험군은 4.90 ± 0.94 g, 4 Gy 실험군은 4.83 ± 0.79 g, 8 Gy 실험군은 5.29 ± 0.96 g, 10 Gy 실험군은 4.98 ± 0.67 g, 20 Gy 실험군은 4.92 ± 0.52 g에서 대조군인 0 Gy는 25.82 ± 5.25 g, 0.2 Gy 실험군은 21.28 ± 6.84 g, 0.4 Gy 실험군은 19.72 ± 8.15 g, 0.8 Gy 실험군은 26.09 ± 5.05 g, 1 Gy 실험군은 20.34 ± 4.91 g, 2 Gy 실험군은 23.53 ± 3.11 g, 4 Gy 실험군은 27.29 ± 6.10 g, 8 Gy 실험군은 24.05 ± 7.06 g, 10 Gy 실험군은 18.78 ± 4.15 g, 20 Gy 실험군은 14.73 ± 4.02 g로 성장 하였다. 각 실험군당 중량성장의 차이를 보면 대조군인 0 G는 20.14 ± 5.25 g, 0.2 Gy 실험군은 16.09 ± 5.73 g, 0.4 Gy 실험군은 14.82 ± 7.17 , 0.8 Gy 실험군은 21.34 ± 4.62 g, 1 Gy 실험군은 15.37 ± 4.17 g, 2 Gy 실험군은 18.63 ± 2.17 g, 4 Gy 실험군은 22.46 ± 5.31 g, 8 Gy 실험군은 18.76 ± 6.10 g, 10 Gy 실험군은 13.80 ± 3.48 g, 20 Gy 실험군은 9.81 ± 3.50 g 였다. 실험군들에서 방사선 조사량이 높은 20 Gy에서 성장이 느리게 나타났다($P < 0.05$).

Table 8. Variations of total weight (g) for juvenile abalones reared with different dose radiation in the farm

Dose (Gy)	0 week	4 week	8 week	12 week	26 week	48 week
0	4.93±0.75	6.12±0.83	7.41±1.02	8.50±1.06	12.50±2.06	25.82±5.25
0.2	5.19±1.11	6.05±1.30	7.19±1.70	7.58±2.05	10.37±3.72	21.28±6.84
0.4	4.90±0.98	5.80±1.28	7.08±1.41	7.49±1.82	10.27±4.04	19.72±8.15
0.8	4.75±0.43	6.27±0.78	7.53±1.18	8.68±1.59	12.19±3.15	26.09±5.05
1.0	4.97±0.74	6.05±0.97	7.33±1.28	7.93±1.90	10.60±3.65	20.34±4.91
2.0	4.90±0.94	6.40±1.21	7.26±1.35	8.07±1.21	11.79±1.41	23.53±3.11
4.0	4.83±0.79	6.43±1.6	7.28±1.8	8.22±2.2	12.68±4.6	27.29±6.1
8.0	5.29±0.96	6.46±1.16	7.78±1.62	8.20±1.61	10.83±3.23	24.05±7.06
10.0	4.98±0.67	5.98±0.98	6.64±1.12	7.20±1.57	10.85±4.97	18.78±4.15
20.0	4.92±0.52	5.64±0.83	6.18±0.54 *	6.54±0.64 *	7.97±1.59 *	14.73±4.02 *

The values are mean±S.D. (n=3). *P < 0.05

2-5) 생존율 변화

실험기간 동안 방사선 조사량에 따른 참전복의 생존율에 대한 조사 결과는 Fig. 14와 같다. 사육 후 12주까지는 모든 실험군들에 있어서 생존율이 평균 100 %를 보였으나, 26주째에 20 Gy 실험군은 생존율이 97.78 % 그리고 48주째에 1 Gy, 4 Gy, 10 Gy 실험군들은 폐사를 하여 생존율이 98.89 %, 97.78 %, 98.89 %로 감소하였다. 실험 종료 까지 대조군에 비해 1 Gy, 4 Gy, 10 Gy, 20 Gy 실험군들은 생존율이 감소하였으나, 방사선 조사량에 따른 뚜렷한 생존율 차이를 보이지 않았다.

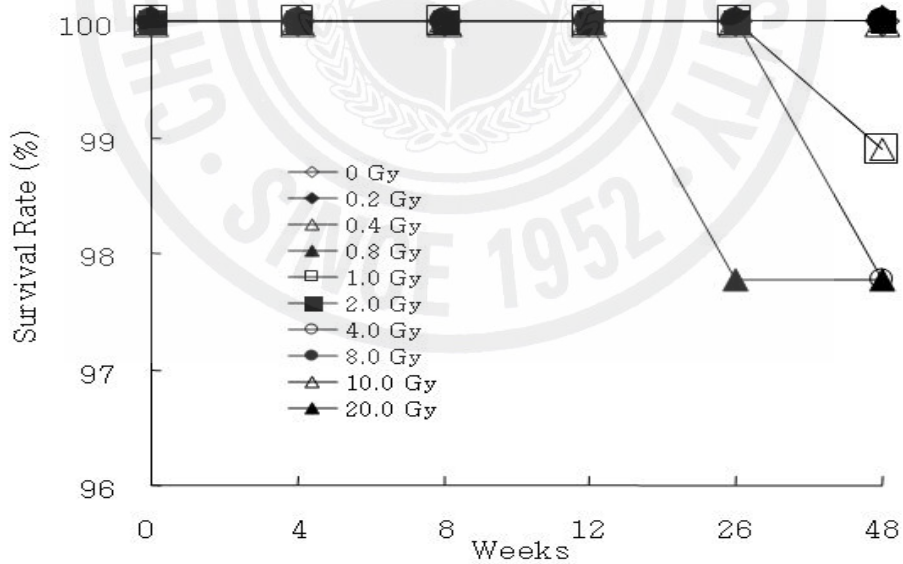


Fig. 14. Survival rates of juvenile abalones (*H. discus hannai*) after the exposure of gamma radiation.

4. 고찰

저선량 감마 방사선이 패류인 참전복에게 미치는 영향을 알아보기 위하여 초기 생리적인 변화와 장기간 사육을 통하여 성장을 관찰하였다. 방사선 0~20 Gy까지의 초기 생리학적인 변화를 알아보기 위한 실험에서는 생존율은 실험 종료 까지 100% 생존율을 확인하였다. 장기간 사육 실험에서는 사육 후 12주째까지는 방사선 조사량에 따른 생존율이 대조군과 실험군들에서 100 %를 보였다. 26주째에서 20 Gy 실험군은 생존율이 평균 97.78 %을 보였으며, 48주째에서도 1 Gy, 10 Gy 실험군들은 98.89 %를 보였으며 4 Gy 실험군은 97.78 %을 보였다. 방사선 조사량에 따른 실험군들과 대조군을 비교 하였을 때, 뚜렷한 생존율에 차이를 보이지 않았다. 전복은 수온이 상승하는 8월경부터 11월중에 섭이부진으로 인한 활력저하 때문에 사망률이 높아진다는 보고가 있다(Yoon, 2004). 폐사 원인은 고수온기로 인한 섭이부진으로 생각되어지며, 대조군과 실험군들 사이에 유의적인 차이가 나타나지 않는 것을 보면 0에서 20 Gy 조사량이 생존율 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 이는 0~20 Gy까지의 방사선 조사가 참전복에 대한 초기 및 장기간 사육 있어서 생존율에 큰 영향이 없다는 것을 확인 할 수 있었다.

방사선에 의한 장애를 파악하고 또한 각종 장애 경감물질의 효과를 측정을 위하여 가장 많이 사용되고 기본이 되는 지표는 혈액이다. 혈액은 혈장과 혈구로 이루어지며 혈구는 적혈구, 백혈구, 그리고 혈소판으로 나누어진다. 방사선 조사되면 림프구수가 급격히 감소하는데 이 현상은 방사선에 피폭된 것을 나타내주는 가장 민감한 지표가 된다. 흰 쥐에 3과 5 Gy의 감마선을 전신 조사하여 혈액세포의 감소 현상과 회복이 된다는 보고가 있다(Seung, et al., 1975). 그리고 생쥐에 4, 7 및 10 Gy의 전리 방사선을 조사하였을 때 백혈구수가 심하게 감소된다는 보고가 있다(Faleeva, 1959). 방사선 조사로 인한 참전복의 초기 혈구수 변화는 조사 0h에는 1~20 Gy은 대조구(0 Gy)보다 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 있었다($P<0.05$). 그러나 3h에서는 10과 20 Gy에서는 대조구(0 Gy)보다 유의적인 감소를 확인하였고($P<0.05$), 2 Gy에서는 유의적으로 증가한 것을 확인하였다($P<0.05$). 10과 20 Gy는 12h까지 대조구(0 Gy)보다 유의적인 감소한 것을 확인하였고($P<0.05$), 이 후로는 대조구와 유의적인 차이는 확인 되지 않았다. 그리고 6h에서

는 3h에서도 확인 할 수 있었던 0.8과 1 Gy에서 대조구(0 Gy)보다 유의적인 증가를 확인 할 수 있었다($P < 0.05$). 포유류인 쥐에서도 나타났던 결과가 패류인 전복에서도 유사한 결과를 얻음으로서 패류인 전복에서도 방사선 조사로 인한 피해를 측정하기에도 혈구를 이용할 수 있다고 사료되어진다.

생물에서는 각종 스트레스로부터 생성된 활성산소(superoxide, hydrogen peroxide, peroxy radical, hydroxy radical 등)가 발생하는 것으로 알려져 있다. 활성산소는 생체내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시킨다(Ferraris et al., 2002). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있으며(Chance et al., 1979; Wendel and Feuerstein, 1981), 고선량의 방사선은 세포내에 존재하는 물 분자 중 산소-수소결합을 분해하여 $\cdot OH$ 기를 과다생산하여 세포내에 산화적 스트레스를 유발한다고 알려져 있다(Dubner et al., 1995). 그리고 급격한 수온 변화에 따른 참전복에서 SOD의 변화가 시간에 따라 급격히 증가한 것을 확인 할 수 있었다(Kim and Yeo, 2005). 모든 생체계에서 있어서 효소활성에 변화를 일으키는 데 소요되는 선량은 유전자 돌연변이나 염색체 손상 또는 세포생장이나 세포분열을 억제하는데 필요한 선량에 비하여 훨씬 크다 그러나 생체에 효소를 변성시킬 수 있는 것보다 적은 선량의 방사선을 조사하여도 효소의 양이나 활성도를 측정해 보면 많은 변화가 나타나게 된다. 식물의 양배추에서는 저선량 방사선 조사로 인하여 양배추의 CAT효소 증가가 보고되고 있다(Kim, 1999). 방사선 조사에 대한 참전복의 SOD와 CAT 효소 변화를 확인하였다. SOD와 CAT 방사선 조사 직후부터 증가한 후 실험 종료까지 감소하는 경향을 보였으나, 일정한 패턴을 확인 할 수 없었다. 방사선이 생체의 효소에 직접 영향을 주었다기보다는 세포의 죽음이나 DNA나 RNA 등의 손상에 의한 효소합성의 저해 등의 의해 나타나는 현상이다. 따라서 효소의 활성이나 양의 변화는 방사선에 의한 다른 종류의 변화에 수반되는 2차적 현상의 특징 될 수 있을지는 모르나 방사선의 중요한 초기 효과라고는 볼 수 없다(Kang et al., 1996). 방사선 조사를 받는 대상의 차이에 있어서 효소의 변화에 대한 차이가 있다고 사료되어진다.

RT-PCR를 통한 HSP 70 mRNA의 발현은 대조구(0 Gy)와 실험군에서 전부 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 11, 12). 방사선 조사 직후 대부분이 HSP 70 mRNA가

증가하였고, 4와 20 Gy에서는 HSP 70 mRNA가 감소하는 것을 확인하였다. 실험구들은 실험 12시간까지 HSP 70 mRNA가 감소와 증가를 확인하였다. 그리고 종료 72시간에는 10 Gy를 제외한 실험구들은 HSP 70 mRNA가 감소하는 것을 확인하였다. 방사선 영향은 방사선량, 선량율, 세포의 특성 등에 따라 다른 양상으로 나타난다(Hall, 2000). 그래서 저선량 방사선 조사에 대한 참전복의 HSP 70 mRNA 발현은 조사 후 증가하였다가 감소되는 현상이 나타나며, 각 각 실험구에 대한 차이에 의해서 감소와 증가가 나타난다고 사료되어진다.

방사선 조사량에 따른 단백질 발현량을 확인하였다. 방사선 조사로 생체내에 고분자 물질에 영향을 미친다. 고분자 물질인 단백질, 지질, 탄수화물 그리고 핵산을 들 수 있다. 이러한 물질에 방사선이 조사되면 분자량이작은 물질로 나누어지는 분해반응(degradation)과 두 물질 사이 또는 한 가지 물질내의 사슬끼리 연결되는 가교형성이 반응이 일반적으로 나타날 수 있다. 방사선 조사로 인하여 단백질의 기능이 상실되는 것은 펩티드 결합이나, 1차구조의 변화에 의한 것이라고 보다는 주로 단백질의 2차, 3차 구조를 유지하는 결사슬의 수소결합이나 이황화결합이 끊어지는데 기인하게 된다. 소의 혈청 알부민에 방사선을 조사하면 침강상수가 증가되지만 분자량의 변화는 나타나지 않았는데 이는 방사선에 의해 단백질의 모양만 변하는 것을 알 수 있다(Kang et al., 1996). 참전복에 방사선 조사 후 대조구와 0.2 Gy에서는 21 kDa 부근에서 12시간째에 단백질 발현이 뚜렷하게 확인되었지만(Fig 13-A, B), 다른 실험구들에서는 뚜렷하게 확인되지는 않았다. 그리고 저선량 방사선 조사 후 0.2와 0.4 Gy에 31 kDa 부근에서 대조구(0 Gy)에서 뚜렷이 나타나지 확인되지 않은 단백질이 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 13-B, C). 이는 방사선 조사로 인하여 참전복의 단백질 발현의 차이가 뚜렷이는 구분되지는 않지만, 방사선 조사 영향으로 단백질의 변형과 새로운 단백질의 생성으로 사료되어진다.

최근의 생화학적 및 분자생물학적 연구에 따르면 외부의 스트레스로부터 개체를 보호하기 위하여 열충격단백질 (Heat Shock Protein, HSP)들을 포함한 여러 가지 스트레스 단백질 발현 및 활성이 상승하는 것으로 밝혀졌다. 계속되는 스트레스의 결과로 나타나게 되는 스트레스 단백질들의 발현은 암, 자가면역, 심혈관 계통의 질병 등의 결과를 궁극적으로 일으킨다고 보고되고 있다. 대표적인 스트레스 단백질에서 열충격단백질 70(HSP 70)을 들 수 있다. 이단백질은 molecular chaperone 같은 작용을 주로 하지만 최근 연구에서는 apoptosis의 억제, 암의 발생, 그리고 면

역 계통에 영향 등 다른 여러 가지 생화학적 기전에 관여하고 있다는 것이 여러 연구진들의 보고되고 있다(Seo, 1997). 방사선 조사량에 따른 참전복의 초기 생리변화를 알아보기 위한 실험에서 HSP 70 단백질 발현을 보았을 때, 참전복은 실험 종료 까지 HSP 70 단백질 발현이 나타나지 않았다. 저선량 방사선 조사가 참전복에게 실험 종료 까지 영향을 미치지 못하였다고 사료되어진다. 이온화 방사선은 DNA 손상에 의한 신호전달계와 독립된 stress response 경로를 활성화하는데, 이 경로를 구성하는 단백질로서 세포고사와 세포주기 지연과 관련되는 JNK1/2와 p39, 세포의 증식, 세포주기의 진행, 손상된 조직의 치유 관련되는 ERK1/2와 같은 MAPKs가 알려져 있다(Shafman et al., 1995; Chen et al., 1996; Abbott and Holt, 1999, Pages et al., 1993; Holbrook et al., 1996; Brunet et al., 1999; Pearson et al., 2001; Chao and Yang, 2001). 이러한 단백질을 조사하여 좀 더 구체적인 단백질의 연구가 필요하다고 사료되어진다.

저선량 방사선 조사가 참전복의 장기간 사육 시 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 감마선을 참전복에 조사하여 우수식 육상양식장에 양식을 통해 관찰하였다. 사육 4주째도 대조군과 실험군들간에 유의적인 성장차이가 없었다. 사육 8주째에는 처리 구간별 각폭 성장은 대조군과 비교하였을 때 10, 20 Gy를 제외한 모든 실험군들은 유의적인 성장차이가 없었다. 그러나 방사선 조사량이 높은 10, 20 Gy 실험군들에서는 대조군과 유의적인 감소 성장차이를 나타냈고($P < 0.05$), 중량 변화는 대조군과 비교하였을 때 20 Gy 실험군에서 유의적인 감소하는 차이를 나타냈다($P < 0.05$). 방사선 조사에 따른 변화는 각장 변화 이전에 각폭 성장과 중량 변화에 영향을 주었다고 사료된다. 사육 12주째에서도 방사선 조사량이 높은 10, 20 Gy 실험군들에서는 대조군과 유의적인 성장 차이를 나타내었으며($P < 0.05$), 각장에 방사선 조사량이 높은 20 Gy에서도 대조군과 유의적인 상장의 차이를 나타냈다($P < 0.05$). 26주와 48주째는 방사선 조사량이 높은 20 Gy 실험군에서 대조군과 유의적인 감소 성장차이를 나타냈다($P < 0.05$).

이상과 같이 방사선 조사량에 따른 대조군과 실험군을 비교하였을 때, 조사선량이 높은 실험군인 20 Gy에서 유의적인 차이를 보였다. 이는 방사선 조사량이 높을수록 성장을 억제하는 작용을 한다고 사료된다.

Lee et al.(1998)은 저선량의 감마선을 고추 작물의 종자에 조사하여 각 선량별로 나타나는 hormesis 효과를 조사한 결과 대조구에 비해 저선량에 감마선 조사구에

서 발아율이 증가되는 것을 관찰하였고. 생육 양상 등에 영향을 미치는 적정선량을 1 Gy에서 20 Gy 사이임을 보고 하였다. Kim et al.(2000b, 2000a, 1999a)도 종자에 저선량 감마선을 조사하여 자란 옥수수, 참박, 배추 등의 생육이나 수량이 증가하는 것을 관찰하였으며, Koeppe and Kramer (1981)는 저선량 감마선이 조사된 옥수수의 발아율이나 생육의 증가는 종자의 종피를 투과한 저선량 방사선이 지베렐린이나 앱시스산 등의 식물 호르몬의 양적평형에 영향을 미쳐 발아율 및 유식물의 성장을 촉진시키고 결국에는 광합성 기구 및 순 광합성량 환경 스트레스에 대한 저항성을 증가 시킨다고 보고하였다. 식물 종자 및 생육에 대한 영향 보고를 통해 감마선의 직접영향을 분석할 때에는 조사환경 및 조사생물의 서식 환경이 중요하게 영향을 줄 수 있을 것으로 사료되며, 전복에 대한 감마선 영향 평가에 있어서도 여러 환경에 대한 고려가 수반되어야 할 것이다.

사육기간 중 실험어장의 수온은 13.1~27.4 °C의 범위로 3월에 가장 낮았고 8월에 가장 높게 나타났다. 보통 7°C이하에서는 전복이 먹이를 거의 먹지 않으며 활동도 둔하게 된다고 보고하였다(Sakai, 1962). 또한 수온에 따라 일간섭식물이 차이를 보여 성장에 영향을 주게 되는데, 참전복의 경우 성장 적수온은 20 °C 전후로 보고하였다(Sakai, 1962; Kim, 2005). 또한 전복의 전중량의 변화는 온도·염분의 변화에 밀접한 관계를 가진다(Kim, 2004; Kim 2005). 본 실험에서는 온도와 염분의 변화가 실험군들과 동일한 환경에서 사육을 하였으나, 전중량에 변화가 있었다는 것은 방사선 선량이 높아질수록 전복의 생리적인 스트레스 요인으로 작용하였음을 보여주고 있다.

. 저선량 방사선 조사로 인하여 초기 생육의 변화는 혈액에서의 변화, 단백질 발현 변화, 항산화 효소의 변화, HSP 70 mRNA의 변화 그리고 장기간 사육을 통하여 알아본 성장과 생존율에 변화를 확인하였다. 저선량 방사선을 참전복에 조사하였을 때에는 저선량 방사선을 이용한 자극 효과인 'hormesis' 치사량 이하의 유해물질은 자극 반응을 일으켜 활성을 가지게 된다 이론을 확인 할 수 없었으며, 장기간 사육을 통하여 20 Gy는 성장에 악영향으로 작용된다는 것을 알 수 있었다. 그러나 감마선 조사에 대한 무척추동물인 참전복의 정확한 영향을 파악하기 위한 면역계의 변화 확인과 정확한 조사영역 결정을 위한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

Ⅲ. 고선량 방사선 조사에 따른 까막전복(*Haliotis discus discus*)의 LD₅₀과 생리적인 영향

1. 서론

전 세계 인구는 1999년 60억명을 돌파하였고, 2030년대에는 100억명이 달할 것으로 추정되는데, 세계의 곡물 증산율은 1950~1980년 초에는 연평균 약 3%로서 인구증가율보다 높았으나 1980년대 중반 이후에는 약 1%로서 인구증가율 1.7%에 크게 미치지 못하고 있어 식량부족이 가중 될 것으로 보여 진다. 전 세계적인 산업화 및 도시화의 가속화 등에 따른 지구 온난화, 오존층 파괴, 기상재해 빈발, 사막화 및 환경 오염 등의 지구환경 변화 및 생물종의 사멸이 점차 심각해져 가고 있어, 이러한 문제 해결을 위한 자원의 이용 및 유전자원의 보존 필요성도 증대하고 있다.

국제 신물신품종보호동맹(UPOV) 가입에 따른 품종 보호권의 강화는 국가간 종자 및 유전자 경쟁시대로 돌입하게되어 국부의 척도가 유전자원의 양과 질에 의하여 결정될 것으로 전망되고 있다. 따라서 선진국에서는 종자 및 바이오산업을 첨단과학 산업으로 육성하고 있으며, 거대한 다국적 기업들이 종자산업관련 바이오산업에 진출을 확대하고 있다.

육종 방법의 하나인 돌연변이 육종은 20세기 중반부터 각국에서 식물을 대상으로 착수하여 꾸준히 성과를 내오고 있는데, FAO-IAEA의 데이터베이스에 등록된 돌연변이 육성 품종만도 2,300여 종에 달한다.

방사선을 이용한 품종개량은 방사선을 사용하여 유전자원을 개량함으로써 현재 재배하고 있는 품종보다 수확량의 증가, 품질의 향상 및 병충해에 강한 품종을 인위적으로 촉진시키는 방법을 가리킨다. 이를 위해서는 육종의 소재가 되는 유전적 변이를 방사선을 이용하여 인위적으로 유발시키고 유발된 변이중에서 우량성이 있는 품종을 선발하여 유지시키는 작업을 수행하게 된다. 종래에는 유전적 변이의 유발을 자연 돌연변이와 인공교잡에 의존하였는데, 이 방법은 변이율이 낮고 신품종을 개발하는데 기간이 오래 걸려 어려운 점이 많았다. 변이의 유발을 위해서는 방

사선의 조사선량이 결정되어야 하나 품종의 종류나 시기에 따라 서로 다르기 때문에 LD₅₀을 미리 조사하여야 한다. 국내에서는 방사선을 이용한 육종은 보리와 콩 같은 작물에서 이루어지고 있는 실정이다.

본 연구에서는 제주특별자치도에서 양식 전복인 까막전복을 이용하여 고선량 방사선을 조사하여 반수치사량인 LD₅₀을 확인하고, 고선량 방사선에 대한 등근전복에게 미치는 영향에 대한 항산화 효소인 SOD 및 CAT의 변화와 HSP 70 mRNA의 발현 등을 측정하여 고선량 방사선 조사에 대한 생리학적인 지표를 설정하고자 본 실험을 실시하였다.



2. 재료 및 방법

1) 실험 전복

실험에 사용된 전복은 제주특별자치도 제주시 부근 양식장에서 까막전복(*Haliotis discus discus*)을 구입하여 사용하였다. 까막전복은 경우 평균 각장 5.06 ± 0.2 cm, 각폭 3.38 ± 0.2 cm, 전중량 14.52 ± 2.9 g인 개체를 사용하였다. 실험 전복은 미리 $18 \pm 0.4^\circ\text{C}$ 에서 1~2주 동안 사육하며 순치시킨 후 순환여과가 가능한 수조를 제작하여 방사선 주사 후 각 선량별로 수조에 라벨을 붙여 사육하였다. 이 때 염분은 $33.4 \pm 0.4\text{‰}$ 을 유지하였고 PVC 파이프(\varnothing 20 cm, L 20 cm)를 세로로 절단한 은신처(shelter)를 넣어서 공기를 공급하였다. 예비사육기간에 먹이는 다시마를 충분히 공급하였으며, 실험구는 40마리의 전복을 실험에 사용하였으며, 실험 개시 후 방사선 조사 후를 0주로 정하여 0, 1, 2, 3 및 4주째에 각각 5마리의 전복으로부터 혈구와 아가미 조직, 간 부위를 조직 샘플을 채취하여 -70°C 로 보관하며 분석에 사용하였다.

2) 방사선 조사

감마선 조사는 제주대학교 방사선 응용과학연구소에서 보유중인 저준위조사시설(^{60}Co)을 이용하여 조사하였다. γ 선에 대한 전복의 반수치량인 LD_{50} 을 확인하기 위하여 까막전복에게 0, 50, 100, 200, 400, 800 Gy 수준으로 각각 직접 제작한 틀에 전복의 발쪽을 선원 쪽으로 고정시킨 후 조사하였다. 조사선량은 Fricke dosimeter로 측정하였다.

3) 사망률 측정

고선량 방사선 조사에 대한 전복의 반수치사량인 LD₅₀을 확인하기 위하여 실험에 사용된 까막전복을 0~4주 동안 매일 확인하였다. 폐사 개체의 계수는 은신처(shelter)와 수조 벽면에 부착 능력이 없고, 유리봉으로 발과 촉수를 자극하여 반응이 없는 개체를 선택하여 조사하였다.

4) 혈림프(Hemolymph) 수 측정

방사선에 의한 장해를 파악하고 또한 각종 장해 경감물질의 효과를 측정을 위하여 가장 많이 사용되고 기본이 되는 지표는 혈액의 변화이다. 사람에게 있어서도 방사선 치료 시 치료계획의 판단 기준으로 혈액 수치, 특히 림프구의 수치 변화를 사용하고 있으면, 원폭피해자 및 방사선 사고에 의한 피폭자에 대한 연구에서도 조혈기관 장애와 관련된 보고가 주를 이룬다(Kyoizumi et al., 1989; Finch, 1987; Langlois et al., 1987; Gale, 1990; Adams, 1984).

혈림프 수 측정은 실험개시 후 0, 3, 6, 12, 24, 48 및 72 h째에 전복의 심장 옆 혈관으로부터 바늘 규격 26GX 1/2인 1 ml 주사기를 이용하여 혈액을 채취한 후 0.9% 생리식염수로 10배 희석하여 혈구 계산판을 이용하여 살아있는 혈구를 계수하였다.

5) 항산화 효소 측정

항산화효소는 간부위를 적출하여 SOD 및 CAT를 각각 분석하였다. 간부위를 적출 후 약 0.1 g을 0.9% NaCl에 3회 세척한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화 하였고, 균질화된 시료는 원심분리(1000 rpm, 15 min, 4℃)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4℃)한 후 상등액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다. 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준 단백질로소 BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 spectrophotometer를 이용 750 nm에서

측정하였다. SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund and Marklund (1974)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 1.3 ml에 간장 균질액 25 μ l을 넣은 후 45 μ l의 3mM progallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer를 이용하여 325 nm의 파장에서 측정하였고, 효소활성의 1 단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다. CAT활성도 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer에 의해 240 nm파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow (1972)의 방법에 의하여 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1분간 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다.

6) RT-PCR 분석

동결된 아가미 조직에 Tri-reagent 500 μ l를 가한다. 호모겐아이저로 시료를 균질화한 후 상온에서 5분간 방치한다. Chloroform 100 μ l 가한 후 혼합하여 상온에서 3분간 방치한다. 원심분리(13,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 min) 후 상청액을 다른 tube에 옮겨 동량의 차가운 isopropanol을 넣어서 혼합한다. 10분간 상온에 방치 후 원심분리(13,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 min) 한다. 상청액을 제거하고 차가운 75% ethanol을 1 ml 넣어서 혼합 후 원심분리(13,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min)한다. 이를 3회 반복하고 상청액을 제거하고 실온에서 1시간동안 방치하여 ethanol을 증발시킨다. 여기에 DEPC 25 μ l 넣어서 total RNA를 놓인다. 추출된 total RNA는 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하여 실험에 사용하였으며, PROMEGA사의 cDNA합성 kit인 ImProm reverse transcriptase kit A3800을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 증폭시키기 위해서 cDNA 2 μ l, 10x PCR buffer 5 μ l, MgCl 3 μ l, dNTP 1 μ l, primer (sence) 1 μ l (50 pmol), antisence 1 μ l, Taq DNA polymerase 0.5 μ l 및 Nuclease-Free water 36.5 μ l를 혼합하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation 시켜준 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 45초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension 조건으로 30회 증폭하고, 이 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 더 반응시켰다.

HSP 70 mRNA에 대한 oligonucleotide primer를 제작 합성하였고, 양성대조로 사용하기 위해 β -actin mRNA를 제작하였다(Table 1). PCR로 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 100V로 전기영동 하여 분리하였으며, 100 bp DNA ladder를

size marker로 사용하여 UV transilluminator하에서 사진을 촬영하여 이미지 분석 프로그램(Labworks 4.5)을 이용하여 mRNA의 발현량을 정량하였다.

7) 통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS 통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여 , P 값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다. 반복 시험의 결과는 평균±표준편차평균으로 나타내었다.



3. 결과

1) 생존율 변화

0~800 Gy 고선량 방사선 조사에 대한 까막전복의 생존율은 대조구(0 Gy)에 비해 800 Gy에서는 방사선 조사 15일째에 사망률이 100%였으며 400 Gy에서는 방사선 조사 18일째에 사망률이 100%였다(Fig. 15). 방사선 조사 100 Gy와 200 Gy에서는 21일째 사망률이 100%였다. 방사선 조사 50 Gy는 30일째 사망률이 100%였다.

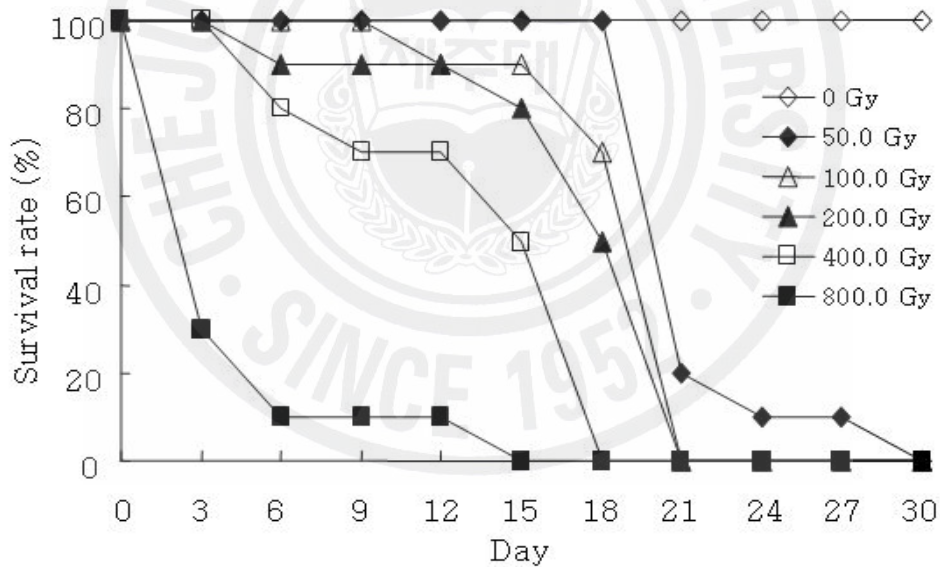


Fig. 15. Survival rates of juvenile abalones (*H. discus discus*) after the exposure of gamma radiation.

2) 각장 변화

고선량 방사선 조사 후 순환 여과 수조에서 사육한 각 실험구별 까막전복 치패의 각장 성장 결과는 Table 9과 같다.

전복치패의 각장 크기의 변화를 살펴보면, 실험 시작 시 각 실험군의 평균 각장은 $4.82 \pm 0.36 \sim 5.17 \pm 0.25$ cm로 대조군과는 유의적인 각장차이는 없었다. 고선량 방사선을 조사한 경우 2~4주 사이에 사망하는 개체들이 발생하였지만 사육 기간 4주 동안 대조군(0 Gy)에서도 유의적인 성장차이가 없었다.

Table 9. Variations of shell length (cm) for juvenile abalones reared with different dose radiation in the farm

Dose (Gy)	0 week	1 week	2 week	3 week	4 week
0	5.17 ± 0.25	5.17 ± 0.24	5.16 ± 0.24	5.17 ± 0.25	5.16 ± 0.24
50.0	4.97 ± 0.19	4.96 ± 0.21	4.97 ± 0.19	4.99 ± 0.20	5.06 ± 0.09
100.0	4.82 ± 0.36	4.81 ± 0.37	4.81 ± 0.37	4.90 ± 0.50	
200.0	5.04 ± 0.57	5.04 ± 0.57	5.04 ± 0.57	5.05 ± 0.74	
400.0	4.84 ± 0.19	4.84 ± 0.17	4.84 ± 0.17		
800.0	4.91 ± 0.16	4.90 ± 0.17	4.88 ± 0.21		

3) 각폭 변화

고선량 방사선 조사 후 순환 여과 수조에서 사육한 각 실험구별 까막전복 치패의 각폭 성장 결과는 Table 10과 같다.

전복치패의 각폭 크기의 변화를 살펴보면, 실험 시작 시 각 실험군의 평균 각장은 $3.32\pm 0.09\sim 3.38\pm 0.14$ cm로 대조군과는 유의적인 각장차이는 없었다. 고선량 방사선을 조사한 경우 2~4주 사이에 사망하는 개체들이 발생하였지만 사육 기간 4주 동안 대조군(0 Gy)에서도 유의적인 성장차이가 없었다.

Table 10. Variations of shell width (cm) for juvenile abalones reared with different dose radiation in the farm

Dose (Gy)	0 week	1 week	2 week	3 week	4 week
0	3.48 ± 0.14	3.45 ± 0.15	3.47 ± 0.13	3.48 ± 0.13	3.47 ± 0.14
50.0	3.33 ± 0.16	3.32 ± 0.16	3.33 ± 0.17	3.44 ± 0.41	3.45 ± 0.02
100.0	3.34 ± 0.21	3.32 ± 0.21	3.32 ± 0.20	3.38 ± 0.29	
200.0	3.47 ± 0.37	3.46 ± 0.38	3.48 ± 0.37	3.48 ± 0.44	
400.0	3.29 ± 0.18	3.29 ± 0.19	3.29 ± 0.17		
800.0	3.32 ± 0.09	3.33 ± 0.10	3.28 ± 0.11		

4) 증량 변화

고선량 방사선 조사 후 순환 여과 수조에서 사육한 각 실험구별 까막전복 치패의 전중량 성장 결과는 Table 11와 같다.

전복치패의 각장 크기의 변화를 살펴보면, 실험 시작 시 각 실험군의 평균 각장은 $13.5 \pm 3.79 \sim 16.6 \pm 6.30$ cm로 대조군과는 유의적인 각장차이는 없었다. 고선량 방사선을 조사한 경우 2~4주 사이에 사망하는 개체들이 발생하였지만 사육 기간 4주 동안 대조군(0 Gy)에서도 유의적인 성장차이가 없었다.

Table 11. Variations of total weight (g) for juvenile abalones reared with different dose radiation in the farm

Dose (Gy)	0 week	1 week	2 week	3 week	4 week
0	15.6 ± 2.44	15.8 ± 2.41	15.8 ± 2.45	16.0 ± 2.30	16.0 ± 2.74
50.0	14.0 ± 2.18	14.8 ± 2.37	14.3 ± 2.76	14.5 ± 2.37	14.5 ± 0.49
100.0	13.7 ± 2.81	13.6 ± 2.72	13.5 ± 2.77	14.6 ± 3.77	
200.0	16.6 ± 6.30	17.0 ± 6.23	16.9 ± 6.52	17.0 ± 7.28	
400.0	13.5 ± 1.79	13.9 ± 1.85	13.6 ± 1.88		
800.0	13.9 ± 1.17	14.2 ± 0.81	14.2 ± 0.99		

5) 혈림프 수 변화

고선량 방사선 조사로 인한 혈구수의 변화는 방사선 조사 0주에서 0~800 Gy은 대조구(0 Gy)보다 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 없었다(Fig. 16). 조사 1주차에서는 대조구(0 Gy)를 제외한 전 실험구인 50, 100, 200, 400 및 800 Gy에서 유의적인 감소를 확인하였다($P < 0.05$). 2주차에서는 400과 800 Gy에서 급격히 감소한 후 사망을 하였으며, 3주차에서도 100과 200 Gy 실험구에서 감소한 후 사망을 확인 할 수 있었다($P < 0.05$). 4주차에서는 50 Gy 실험구도 감소하다 사망을 확인하였다($P < 0.05$). 고선량 방사선을 조사로 인하여 혈구수가 감소하였고 사망에 이루어지는 것을 확인하였다.

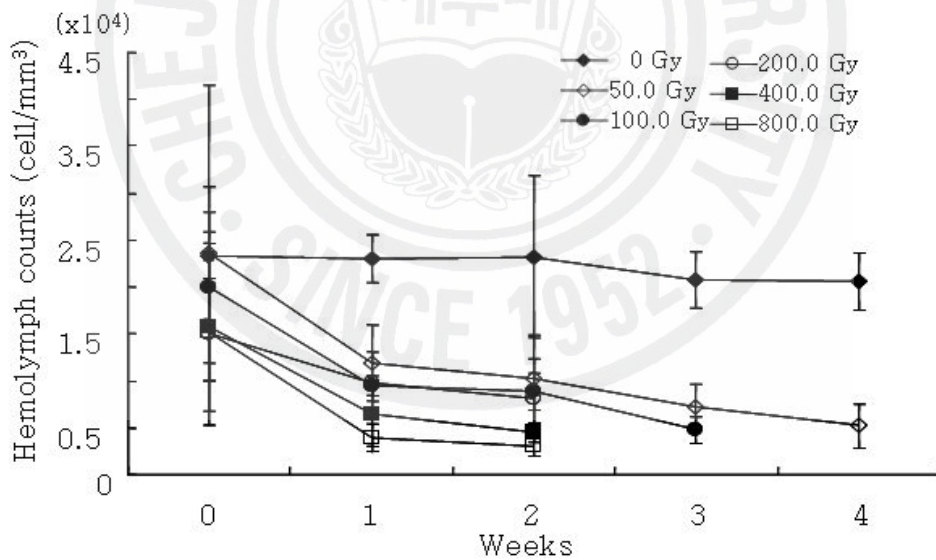


Fig. 16. Variations of hemolymph factors of abalone (*H. discus*) reared with different dose radiation.

6) 항산화 효소 변화

고선량 방사선 조사로 인하여 SOD와 CAT효소를 확인해 본 결과, SOD 효소인 경우 조사 직후 대조군(0 Gy)에 비해 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig 17-A). 2주째에는 대조군(0 Gy)보다 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 있었다($P < 0.05$). 3~4주째에 실험군들은 감소하다 사망하였다.

CAT효소는 조사 직후 대조군(0 Gy)에 비해 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 17-B). 1주째 증가된 효소는 2주차 까지 감소하였다. 대조군은 3주째부터 일정하게 유지되었으며, 실험군은 4주차까지 감소한 후 사망하였다($P < 0.05$).

7) HSP 70 mRNA 발현량 변화

고선량 방사선 조사에 따른 HSP 70의 변화를 관찰하기 위하여 선량과 시간대 별로 아가미 조직에서 샘플을 적출하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 RT-PCR를 통한 HSP 70 mRNA의 발현은 대조군(0 Gy)와 실험구에서 전부 확인되었다(Fig. 18). 그래서 HSP 70 mRNA 발현을 β -actin mRNA를 기준으로 나타낸 결과를 확인하였다(Fig. 19). 대조군(0 Gy)는 지속적인 감소를 확인 할 수 있었고, 실험구에서 HSP 70 mRNA가 감소하다가 증가한 후 사망한 것으로 사료되며, 특히 50 Gy에서는 감소하다가 3주째부터 증가하다가 확인할 수 있었다.

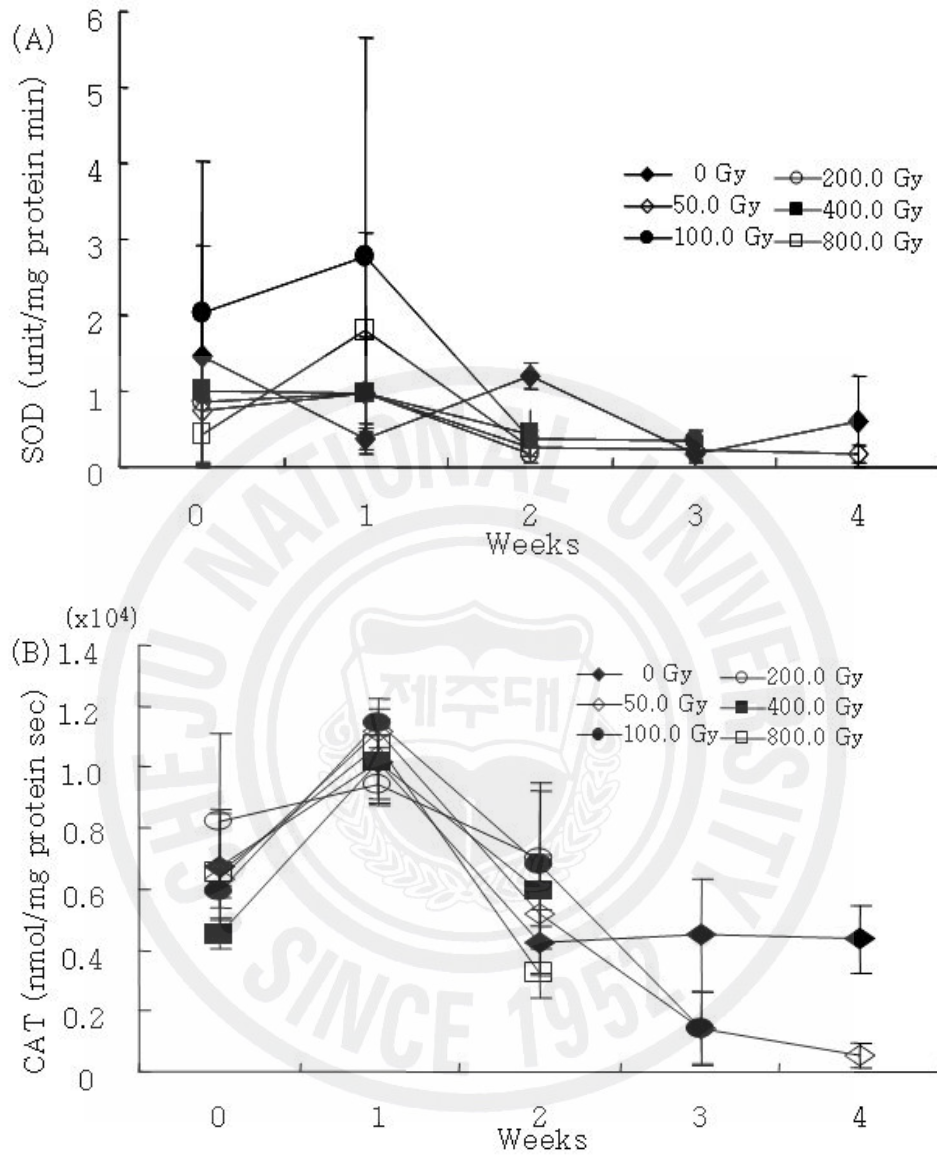


Fig. 17. Change of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.

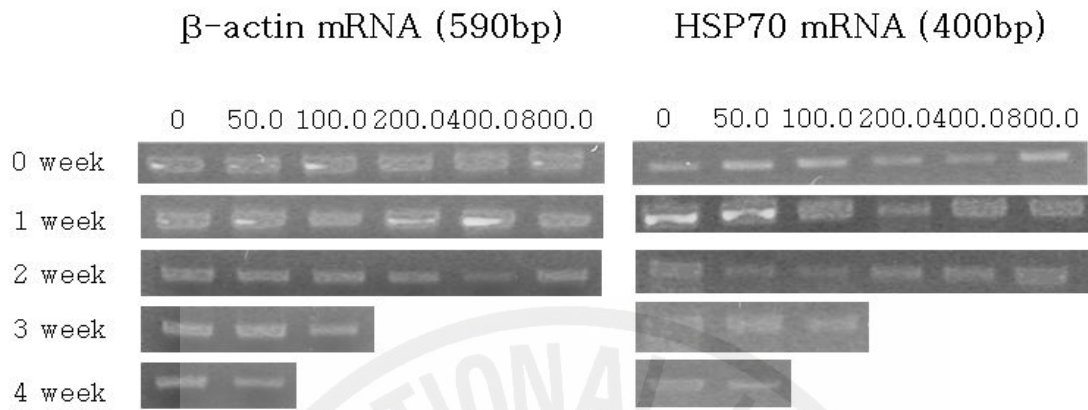


Fig. 18. Effect of gamma radiation on β -actin mRNA and HSP 70 mRNA of gill in abalone (*H. discus discus*).

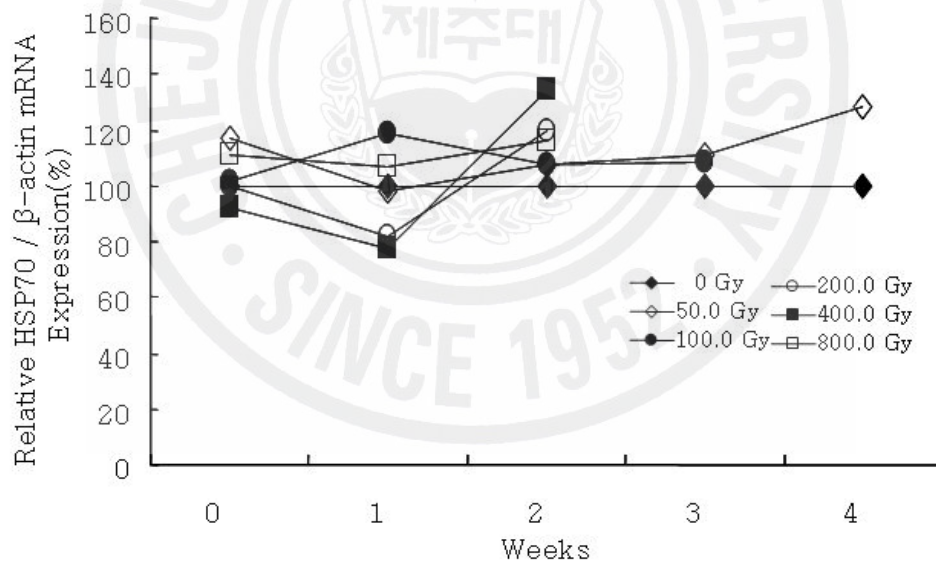


Fig. 19. Effect of gamma radiation on HSP 70 mRNA of gill in abalone (*H. discus discus*).

4. 고찰

방사선 돌연변이 육종을 하기 위하여 필요한 LD₅₀을 확인하기 위하여 제주특별자치도내 양식 패류인 까막전복을 사용하였다. 고선량 방사선 0, 50, 100, 200, 400, 800 Gy 선량을 제주대학교 방사선 응용연구센터에서 조사하여 생리적인 변화를 알아보기 위하여 항산화 효소인 SOD와 CAT, 생체 방어 기작으로 작용하는 HSP 70 mRNA 그리고 방사선 피폭의 지표가 되는 혈구수를 측정 실시 하였다.

고선량 방사선 조사에 따른 생존율은 대조구(0 Gy)에 비해 800 Gy에서는 방사선 조사 15일째에 사망률이 100%였으며 400 Gy에서는 방사선 조사 18일째에 사망률이 100%였다. 방사선 조사 100 Gy와 200 Gy에서는 21일째 사망률이 100%였다. 방사선 조사 50 Gy는 30일째 사망률이 100%였다. 그래서 고선량 방사선 조사에 따른 까막전복의 LD₅₀은 30~40 Gy밑에 존재한다고 사료되어진다. 방사선 조사에 대한 LD₅₀은 사람 2.5~4.5 Gy, 개 3.5 Gy, 원숭이 6 Gy, 토끼 8 Gy, 개구리 7 Gy, 거북이 15 Gy 그리고 금붕어 23 Gy라는 보고가 있다(Kang et al., 1996). 척추동물보다는 높은 LD₅₀을 나타나는 것을 알 수 있었다. 그리고 각장, 각폭, 전중량에 변화는 실험전과 4주후 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

고선량 방사선 조사로 인한 혈구수의 변화는 방사선 조사 0주에서 0~800 Gy은 대조구(0 Gy)보다 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 없었다. 조사 1주차에서는 대조구(0 Gy)를 제외한 전 실험구인 50, 100, 200, 400 및 800 Gy에서 유의적인 감소를 확인하였다($P < 0.05$). 2주차에서는 400과 800 Gy에서 급격히 감소한 후 사망을 하였다($P < 0.05$). 3주차에서도 100과 200 Gy 실험구에서 감소한 후 사망을 확인 할 수 있었다($P < 0.05$). 4주차에서는 50 Gy 실험구도 감소하다 사망을 확인하였다($P < 0.05$). 고선량 방사선을 조사로 인하여 혈구수가 감소하였고 사망에 이루어지는 것을 확인하였다. 이는 방사선 조사로 인하여 혈구수가 급격히 감소하는데 이 현상은 방사선에 피폭된 것을 나타내 주는 가장 민감한 지표가 되는 것을 확인 할 수 있었다(Knag et al., 1996).

효소는 생체내에서 생화학적 반응을 촉매하기 때문에 효소가 방사선에 의해 손상을 입게 되면 이들에 의하여 촉매되는 반응이 일어날 수 없게 된다. 그러나 단백질에 대한 방사선의 영향에서 본 바와 같이, 효소 자체는 방사선에 대한 저항성이 커

서 시험관의 효소를 불활성화 시키기 위해서는 고선량의 방사선이 필요하다. 또한 효소의 종류에 따라 불활성화시키는 데 필요한 선량에도 많은 차이가 있다(Kang et al., 1996). 고선량 방사선 조사로 인하여 SOD와 CAT효소를 확인해 본 결과, SOD 효소인 경우 조사 직후 대조군(0 Gy)에 비해 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 2주째에는 대조군(0 Gy)보다 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 있었다 ($P < 0.05$). 3~4주째에 실험군들은 감소하다 사망하였다. CAT효소는 조사 직후 대조군(0 Gy)에 비해 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 1주째 증가된 효소는 2주차 까지 감소하였다. 대조군은 3주째부터 일정하게 유지되었으며, 실험군은 4주차까지 감소한 후 사망하였다($P < 0.05$). 고선량 방사선 조사로 인하여 초기의 효소의 활성과 불활성을 방사선의 영향으로만 나타나는 것이 아니다. 하지만 시간이 지나면서 효소들의 활성이 감소하였고 이로 인해서 개체가 사망하는 것으로 사료되어진다.

고선량 방사선 조사에 따른 생체 방어 기작으로 작용하는 HSP 70 mRNA의 변화를 관찰하기 위하여 선량과 시간대 별로 아가미 조직에서 샘플을 적출하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 RT-PCR를 통한 HSP 70 mRNA의 발현은 대조구(0 Gy)와 실험군에서 전부 확인되었다. 그래서 HSP 70 mRNA 발현을 β -actin mRNA를 기준으로 나타낸 결과를 확인하였다. 실험군에서 조사 직후 HSP 70 mRNA가 감소하거나 증가한 후 사망한 것으로 사료되며, 특히 50 Gy에서는 감소하다가 3주째부터 증가하다가 확인할 수 있었다. 방사선 영향은 방사선량, 선량율, 세포의 특성 등에 따라 다른 양상으로 나타난다(Hall, 2000). 이는 고선량 방사선 조사로 인하여 HSP 70 mRNA가 초기 방어 작용으로 작용하였다고 설명하기는 어렵다. 하지만 고선량 방사선으로 인한 세포의 치사와 HSP 70 mRNA가 증가한 후 결국 사망하였다고 사료되어진다.

이상의 결과로 고선량 방사선 조사로 까막전복의 돌연변이 육종에 중요한 LD₅₀은 30~40 Gy 이하로 나타났다. 혈구수의 변화를 보았을 때, 선량이 높은 곳에서 조사 후 대조구와 유의차가 없었으나, 그 후에 감소하다가 사망하는 것을 확인하였다. 항산화 효소인 SOD와 CAT는 고선량 방사선에 의한 초기 변화는 확인 할 수 없었지만, 시간이 지나면서 감소하다가 사망하는 것을 확인하였다. HSP 70 mRNA도 실험구에서 고선량 조사 직후 감소하거나 증가하였다가 증가하면서 사망하는 것을 확인하였다. 고선량 방사선 조사 후 생체내에 방어기작이 증가하다가 방사선 조사로 인한 영향으로 세포의 치사가 일어나 사망한다고 사료되어진다. 이러한 고선량

감마선 조사에 대한 정확한 영향을 파악하기 위한 면역계의 변화 확인과 돌연변이 육종 하기위한 LD₅₀을 이용하여 신평종에 대한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.



IV. 저선량 ^{60}Co 방사선 조사가 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 수정란 부화에 미치는 영향

1. 서론

방사선이 인체에 미치는 영향은 X-선이 발견된 이래(Hall, 2000), 계속 주목되어 왔으며, 최근 들어 방사선 또는 방사선 물질의 이용의 의료용과 공업용 등 다각적인 용도로 활용되면서 직·간접적으로 방사선에 노출된 기회가 많아졌고, 생활방사선 또한 날로 증가함에 따라 보건학적인 측면에서도 이들에 대한 관심이 점차 높아짐으로써, 방사선 생물학 분야에 올바른 이해가 절실히 요구되어지고 있는 실정이다.

X선과 γ 선 같은 이온화 방사선은 UV와 달리 DNA손상을 초래하는데, 단일가닥 절단(SSB), 이중가닥 절단(DSB), DNA-DNA cross links, DNA-단백질 cross links들을 유발하는데, 특히 이중가닥 DNA 절단은 방사선에 의해 초래되는 염색체 이상(chromosome aberration), 미소핵 발생, 세포사, 변이(transformation) 등의 생물학적 효과를 초래하는 주된 요인이다(Belli et al., 2002). 또한 이중가닥 DNA 손상은 DNA 복구기전(DNA repair mechanism), 세포주기의 지연(cell cycle arrest), 세포고사(apoptosis) 등과 같은 신호전달 경로를 자극한다(Smith and Fornace, 1995). 그 동안 방사선이 생식에 미치는 영향 대한 평가는 생식세포에서 일어나는 생화학적, 형태학적 생식 능력의 변화에 및 유전적 영향 등이 연구되어져 왔고(Lindop, 1969), 방사선으로 인한 세포고사(apoptosis)와 세포 변형이 발암 작용, 기형형성과 변이 유발(Bentur et al., 1991; Lee et al., 2001)에 대해서도 광범위한 연구가 이루어져왔다.

지금까지의 이들 생식세포에 대한 방사선의 영향에 관한 연구는 대부분 고선량 방사선 조사에 의한 것들로, 흰쥐 난포폐쇄에 미치는 조사선량과 난포 발육 단계에 따른 과립층세포의 방사선 감수성(Kim et al., 2002), 감마선에 조사된 생쥐난포 과립세포의 세포주기 분석(Kim et al., 1999a) 및 감마선에 조사된 미숙한 마우스의

난포에 대한 난포자극호르몬(FSH)의 영향(Kim et al., 1998) 등이 보고되고 있다. 그러나 최근 난포 과립층세포나 난모세포는 발생 단계에 따라, 일부는 방사선에 대해 민감성을 나타내지만 일부 과립층세포들은 방사선 저항성이 있어 다시 회복되는 것이 보고 되어 있다(Song et al., 2004).

넙치는 우리나라 전연안, 일본 및 중국해 연안에 널리 분포하고 있다. 전장이 60 cm까지 성장하는 대형어로서 성장이 빠르며, 맛이 좋아서 우리나라 및 일본에서 고급 어종으로 경제적 가치가 대단히 높다. 그러나 자연에서 어획되는 넙치의 연간 생산량은 1987년도에는 3,150톤, 1992년도에는 2,110톤으로 해마다 감소하고 있는 실정이다. 넙치 양식은 일본에서 1977년부터 시작되어 1980년대에 들어서 본격적으로 확대되었으며, 우리나라에서는 1986년 제주도에서 넙치양식이 시작된 후 1990년대 들어 전국적으로 양식시설이 꾸준히 증가하였다. 특히 제주도는 넙치양식에 최적의 조건을 갖추고 있다. 2005년도인 경우 전국 양식넙치 생산량의 50%를 상회하는 20,370 톤을 생산하였으며, 5,300톤의 활 넙치가 일본으로 수출되어 외국시장에서도 품질을 인정받고 있다.

세포성장인자(growth factor)는 *in vitro*, *in vivo*에 있어서 동물세포의 성장으로 촉진하는 것으로서, 영양물질이 아닌 것으로 정의 된다. 인슐린성장인자(IGF), 상피성성장인자(EGF), 섬유아세포성장인자(FGF), 혈소관유래성장인자(PDGF), 인터류킨(interleukin) 등이 있어 대부분 포유류에서 실시하여 알려지고 있다. IGF는 뇌하수체에서 생산된 성장호르몬(GH)의 하류에 위치하여 GH의 성장촉진작용의 일부를 증대하고 있는 인자이다. IGF는 어류의 성장인자로서는 성장에 직접 관련하는 것으로 보고되고 있다(Jin, 2001). 한편, BMP2(Bone morphogenetic protein 2)는 포유류의 성장판에서 합성, 분비되어 연골세포의 증식 및 성숙조절 및 신경의 재성을 촉진 시켜주는 물질 중의 하나로 태생기의 배엽세포에서 분화와 관련된 유전자이다(Ebara, 2002).

따라서 본 연구에서는 현재 등록된 전복의 IGF II 유전자와 BMP2 유전자를 선택하여 실험하였다. 또한 연구에서는 방사선 조사량에 따른 넙치 수정란의 영향을 알아보기 위하여 수정란의 부화율, 폐사율, 수정란의 세포주기 영향, RT-PCR을 통한 성장 유전자 발현 및 단백질 발현의 변화를 조사하였다.

2. 실험 및 방법

1) 수정란

실험에 사용된 넙치 수정란은 종묘장에서 구입을 하여 사용하였다. 수정란의 경우 평균 0.9 ± 0.02 mm인 개체를 사용하였다. 실험 수정란은 미리 $19 \pm 0.4^\circ\text{C}$ 의 해수를 준비하여서 실험용 용기에 10g씩 넣어서 방사선을 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0 및 20.0 Gy 조사하였다. 조사된 수정란은 실험에 준비된 2L 배양용기로 옮겨놓고 공기를 공급하였다. 실험 도중 해수는 매 12시간 마다 물을 절반씩 교체해주었으며, 수정란에 분화 단계별로 채집을 하여 다세포기인 64세포기, 포배기, 낭배기, 배체형성 초기, 중기, 말기 및 자어기로 구분하여 현미경으로 관찰하여 개체가 90%이상 수정란이 변화하였을 때 30~40 개체를 1.5 ml tube에 넣어서 -70°C 에서 보관하여 실험에 사용하였다.

2) 방사선 조사

감마선 조사는 제주대학교 방사선 응용과학연구소에서 보유중인 저준위조사시설 (^{60}Co)을 이용하여 수정란의 미치는 영향에 대해서 γ 선 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 4, 8, 10 및 20 Gy 수준으로 조사하였으며 각각 배양용 튜브에 넣어서 고정시킨 후 조사하였다. 조사선량은 Fricke dosimeter로 측정하였다(Fig. 20).

3) 사망률

넙치 수정란의 특성을 보면 부화 직후까지는 수면위에 떠 있는데 발생과정 중에 수정란이 흰색으로 변하여 바닥에 가라앉게 되면 이를 사망한 것으로 간주하였다. 이를 유리 피펫을 이용하여 50 ml tube에 옮겨놓고 1 ml을 계수하여 전체 사망개체수를 구하였다. 사망된 개체는 방사선 조사 후 3시간 마다 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 및 45 시간까지 계수하였다.

4) 부화율

넙치 수정란의 부화 소요 시간은 10℃에서는 약 165시간, 20℃에서는 약 48시간이다. 부화 후 90% 이상이 자어기가 판단되었을 경우, 계체를 50ml tube로 옮겨놓고 1 ml을 계수하여 전체 부화율을 구하였고 1.5 ml tube에 넣어서 -70℃ 보관하여 실험에 사용하였다.



Fig. 20. Gamma-ray irradiation (0~20 Gy) to fertilized eggs.

5) SDS-PAGE 분석

넙치의 수정란을 채취하여 분쇄 완충용액 100 mM phosphate buffer에서 호모게나이저로 분쇄하여 원심분리(12,000 rpm, 15 min, 4℃) 하였다(Fig. 21). 상층액을 2:1 비율로 2 X Laemmli sample buffer (80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 12% β -mercaptoethanol, 15% glycerol 및 0.012% bromphenol blue)에 용해시켜 90℃ 이상의 온도에서 3분간 boiling 한 후 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE을 실시하였다. 7.5~10% polyarylamide gel 을 사용하여 250V, 55mA로 4시간 동안 전기영동을 실시한 후, 염색액 (0.136% coomassie brilliant

blue R-250, 45% methanol 및 10% acetic acid)에서 40분간 염색하고 , 7.5% methanol, 7.5% acetic acid에서 탈색하였다. 분자량 측정용 표준단백질은 myosin (200 kD), β -galactosidase (116 kD), phospholylase b (97 kD), bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (45kD) 및 carbonic anhydrase (31kD)를 사용하였다.

6) RT-PCR 분석

동결된 넙치 수정란에 Tri-regent 500 μ l를 가한다. 호모젠아이저로 시료를 균질화한 후 상온에서 5분간 방치한다. Chloroform 100 μ l 가한 후 혼합하여 상온에서 3분간 방치한다. 원심분리(13,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 min) 후 상청액을 다른 tube에 옮겨 동량의 차가운 isopropanol을 넣어서 혼합한다. 10분간 상온에 방치 후 원심분리(13,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 min) 한다. 상청액을 제거하고 차가운 75% ethanol을 1 ml 넣어서 혼합 후 원심분리(13,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min)한다. 이를 3회 반복하고 상청액을 제거하고 실온에서 1시간동안 방치하여 ethanol을 증발시킨다. 여기에 DEPC 25 μ l 넣어서 total RNA를 놓인다. 추출된 total RNA는 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하여 실험에 사용하였으며, PROMEGA사의 cDNA합성 kit인 ImProm reverse transcriptase kit A3800을 이용하여 cDNA 를 합성하였다. 합성된 cDNA를 증폭시키기 위해서 cDNA 2 μ l, 10x PCR buffer 5 μ l , MgCl 3 μ l, dNTP 1 μ l, primer (sence) 1 μ l (50 pmol), antisence 1 μ l, Taq DNA polymerase 0.5 μ l 및 Nuclease-Free water 36.5 μ l를 혼합하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation 시켜준 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 45초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension 조건으로 30회 증폭하고, 이 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 더 반응시켰다.

IGF II와 BMP2 mRNA에 대한 oligonucleotide primer를 제작 합성하였고, 양성 대조로 사용하기 위해 β -actin mRNA를 제작하였다(Table 12). PCR로 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 100V로 전기영동 하여 분리하였으며, 100 bp DNA ladder를 size marker로 사용하여 UV transilluminator하에서 사진을 촬영하여 이미지 분석 프로그램(Labworks 4.5)을 이용하여 mRNA의 발현량을 정량하였다.

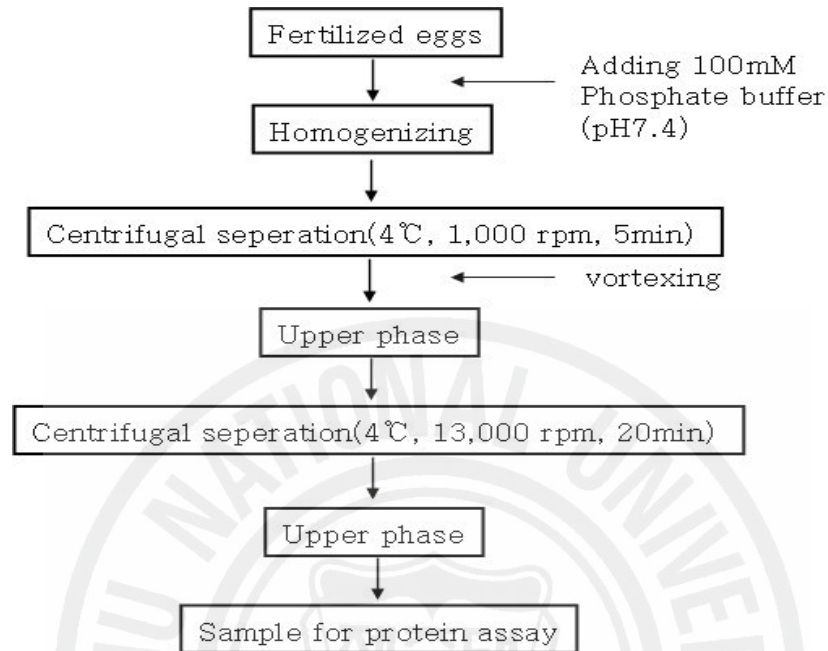


Fig. 21. Extraction of protein.

Table 12. Oligonucleotide of primers for RT-PCR

RNA species	Expected size	Primer sequence
β -actin mRNA	520bp	5'-GCCAACAGGGAGAAGATGAC-3' 5'-ACGTCGCACTTCATGATGC-3'
BMP2 mRNA	422bp	5'-GATCGCTCAGGTGTTGCTGG-3' 5'-GCTCTGCAGAGGTGATTAGCTCC-3'
IGF II mRNA	542bp	5'-CGGACAGCACTCACTTTGC-3' 5'-CCTGCTCCTGTGCTTTGATC-3'

bp: base pairs

3. 결과

1) 난발생 과정 변화

넙치의 수정란은 부상란이고, 사망한 수정란은 흰색을 띄면서 가라앉는다. 수정란은 수정 후 4시간 30분 후 방사선 조사를 받았고, 현미경으로 관찰된 단계는 64세포기로 접어들고 있었다. 수정 후 13시간 만에 포배기가 되고, 18시간 만에 낭배기가 되었다(Fig. 22). 수정 후 26시간 후에 배체형성 초기 단계로 배체는 형태가 뚜렷해지며, 몸의 중앙을 따라 가느다란 형태가 나타난다. 수정 후 30시간 만에 배체형성 중기 단계로 머리가 분화되기 시작하면서 눈이 형태를 갖추게 되고, 배체는 신장되어 꼬리가 머리 가까이에 까지 길어졌다. 수정 후 44시간 만에 배체형성 말기 단계로 꼬리 부근에 막지느러미가 발달하였다. 수정 후 50시간 경과되면 배체가 난막을 뚫고 부화하기 시작하였다.

세포에 방사선을 조사하면 방사선은 세포분열을 지연시키는 효과를 나타낸다. 증식중인 세포에 방사선을 조사하면 우선적으로 분열지수의 감소와 총세포수 증가가 일시적으로 정지된다. 시간이 지나면 분열 세포수는 증가하게 되는데, 분열지수가 방사선 조사전의 값으로 되돌아 가기까지의 시간을 분열지연이라고 한다. 보통 20시간이 이상이 경과하면 다시 분열지수가 감소하고 세포의 죽음이 나타나기 시작한다(Kang, 1996). 분열지연의 정도는 방사선량, 방사선 조사시의 세포주기, 세포의 종류 등 여러 가지 요인들의 영향을 받는다. 세포분열지연효과는 방사선의 양에 비례한다.

수정란에 방사선 조사하였을 때, 8~20 Gy에서는 대조군(0 Gy)에 비해 낭배기가 약 6시간 정도 길어졌다(Fig. 23). 이는 방사선 조사로 인하여 세포분열의 지연된 것으로 사료된다.

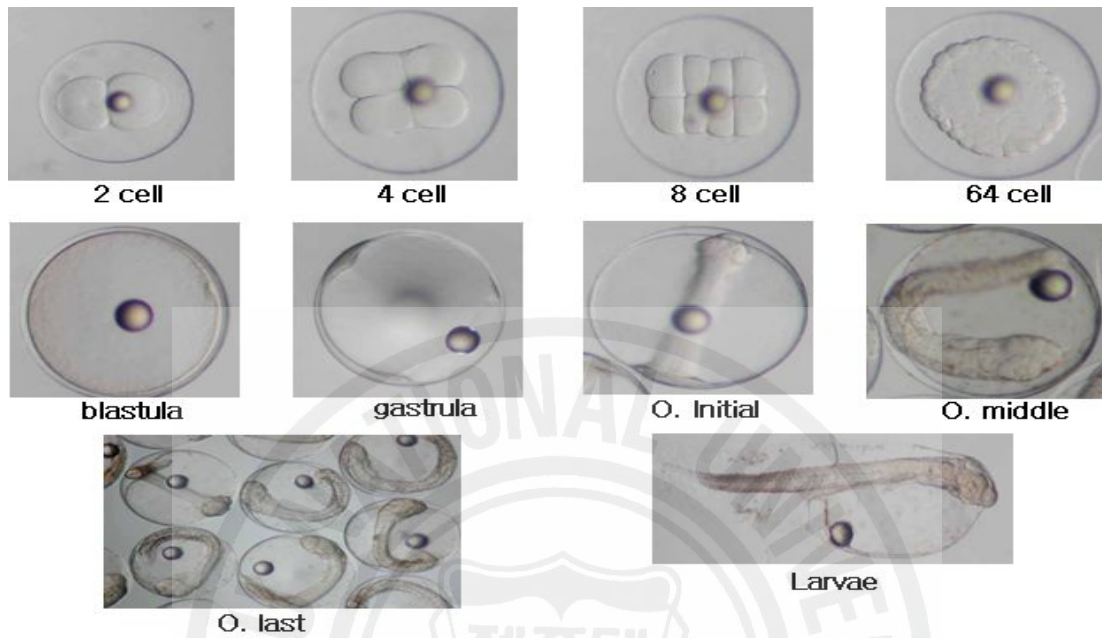


Fig. 22. Embryonic development of fertilized eggs (*Paralichthys olivaceus*).

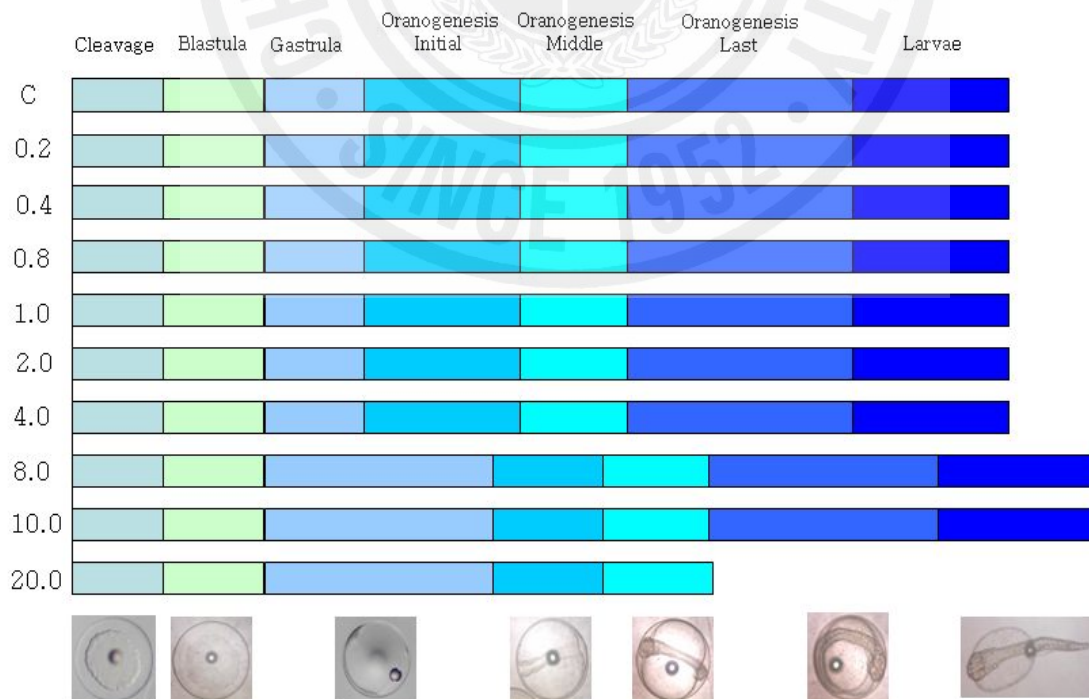


Fig. 23. Development time of fertilized eggs after the exposure of gamma radiation.

2) 부화율 변화

방사선 조사에 따른 넙치 수정란의 부화율을 확인하기 위하여 각 방사선 조사량에 부화 된 개체를 확인하였다(Fig. 24). 부화율은 대조구(0 Gy)에 비해 1과 4 Gy에 서는 부화율이 유의적으로 증가했고($P<0.05$), 0.2 Gy에서도 대조구(0 Gy)에 비해 증가는 하였지만 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 8, 10 그리고 20 Gy에서는 대 조구(0 Gy) 비해 유의적으로 부화율이 감소한 것을 확인되었다($P<0.05$).

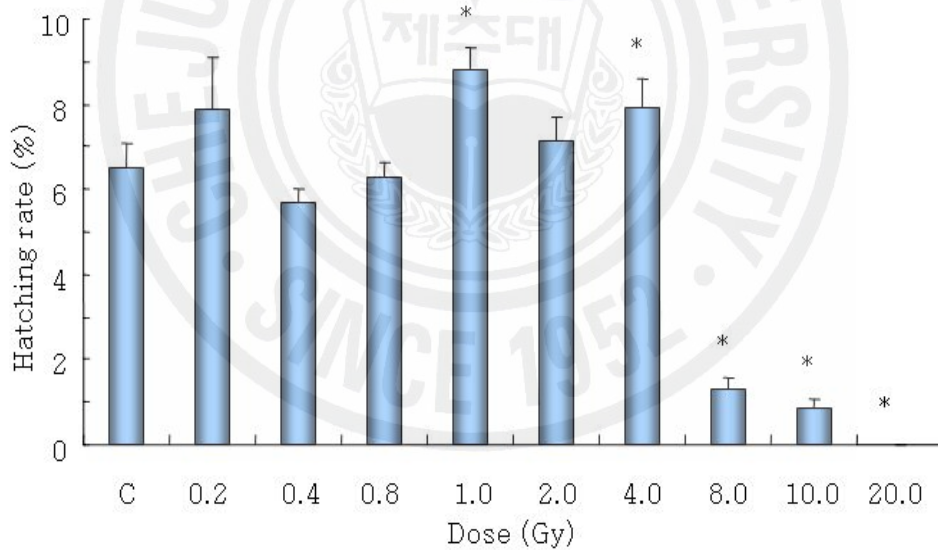


Fig. 24. Hatching rate of fertilized eggs after the exposure of gamma radiation.

3) 사망률 변화

방사선 조사량에 따른 넙치 수정란의 사망률은 12시간 이후부터 8, 10 및 20 Gy에서 증가하기 시작하였다. 20 Gy에서는 24 h 쯤에 높은 사망률이 확인 되었다(Fig. 25). 그 다음은 10과 8 Gy 순으로 높았으며 나머지 실험구에서는 대조구(0 Gy)와 차이가 없었다. 방사선 조사로 인하여 세포분열지연이 나타나고, 시간이 경과할 수 록 분열지수가 감소한다. 그리고 세포는 보통 20시간 이상 경과하면 다시 분열지수가 감소하고 세포의 죽음이 나타나기 시작한다. 이로 인하여 높은 선량을 받아 세포지연이 일어나 8, 10 및 20 Gy에서 사망률이 높아졌다고 사료되어진다. 넙치 수정란에 방사선 조사 반수치량은 부화시기 까지 50~60% 사망률을 나타내고 있는 8 Gy 전후로 판단된다.

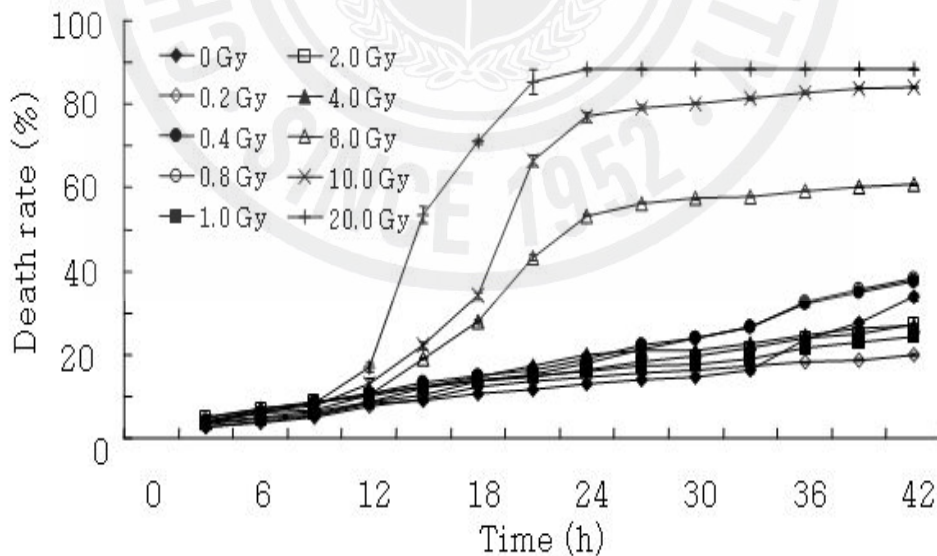


Fig. 25. Death individual of fertilized eggs after the exposure of gamma radiation.

4) SDS-PAGE 분석

방사선 조사량에 따른 각각 분화단계 별 단백질의 발현 패턴을 확인하였다. 64세 포기, 포배기 그리고 낭배기에서는 적은 단백질 발현을 보이는 곳에서는 정확히 단백질 발현의 차이를 확인 할 수 없었지만, 97 kDa 이하의 다른 부분에 비해 높은 단백질 발현을 보이는 부분에서는 차이가 나타나지 않았다(Fig. 26). 조직과 기관이 형성되는 낭배기부터 97 kDa 부근 단백질이 감소하기 시작하였고, 70 kDa 부근에 단백질이 형성되기 시작하였다. 그러나 배체형성 초기 8~20 Gy에서는 세포자연이 일어난 후 약 97과 70 kDa의 단백질 발현량이 다른 실험구에 비해서 적은 발현량이 확인 되었다. 배체형성말기에서는 97 kDa 부근 단백질이 사라지는 것을 확인할 수 있었다. 8~20 Gy의 배체형성초기, 배체형성중기, 말기 및 자어기에서는 다른 실험구들에 비해서 적은 발현량을 보이고 있다.

5) 성장 유전자의 mRNA 변화

방사선 조사로 인하여 넙치 수정란에서의 성장 유전자인 IFG2과 BMP2의mRNA 변화를 발달 시기별로 샘플을 적출하여 RT-PCR을 실시하였다.

IGF II와 BMP2는 포유류에 있어서 성장을 조절하거나, 연골 세포의 증식 및 성숙 조절 및 신경의 재성을 촉진 시켜주는 물질인 유전자이다. 각 유전자들은 배체형성 말기까지 발현하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 27). 그러나 자어기의 대조구(0 Gy)와 0.2 Gy에서는 두 유전자들이 발현되지 않는 것을 확인하였다. 0.2 Gy를 제외한 실험구들은 IGF II와 BMP2가 발현이 되는 것을 확인하였다. IGF II은 발현은 조사 직 후 감소하였다. 이 후 증가와 감소를 나타내고, 자어기에는 대조구(0 Gy)보다 높은 발현을 나타내었다(Fig. 28). BMP2는 조사 직후 1 Gy 이하는 대조구(0 Gy)보다 감소하였지만, 2 Gy이상은 증가하는 것을 나타내었다. 자어기 까지 실험구들은 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 29).

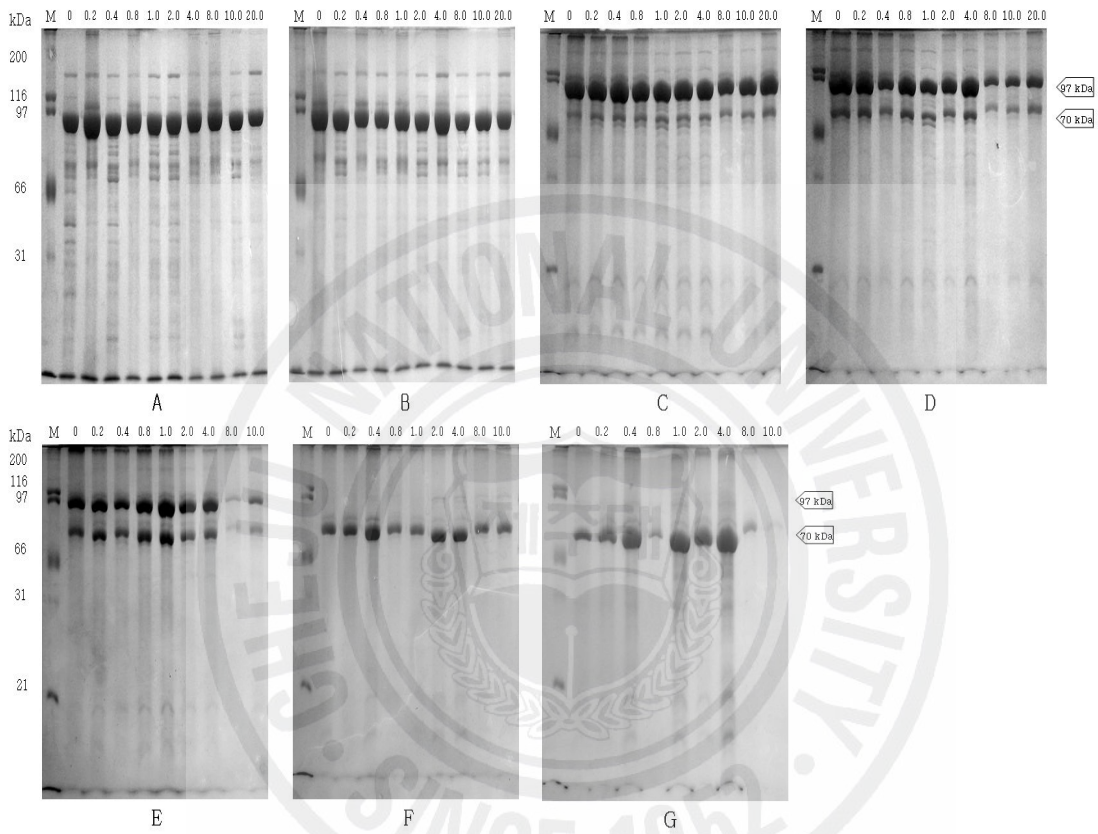


Fig. 26. Protein expression of fertilized eggs after the exposure of gamma radiation.
 A: Cleavage, B: Blastula, C: Gastrula, D: O. initial, E: O. middle, F: O. last, G: Larvae

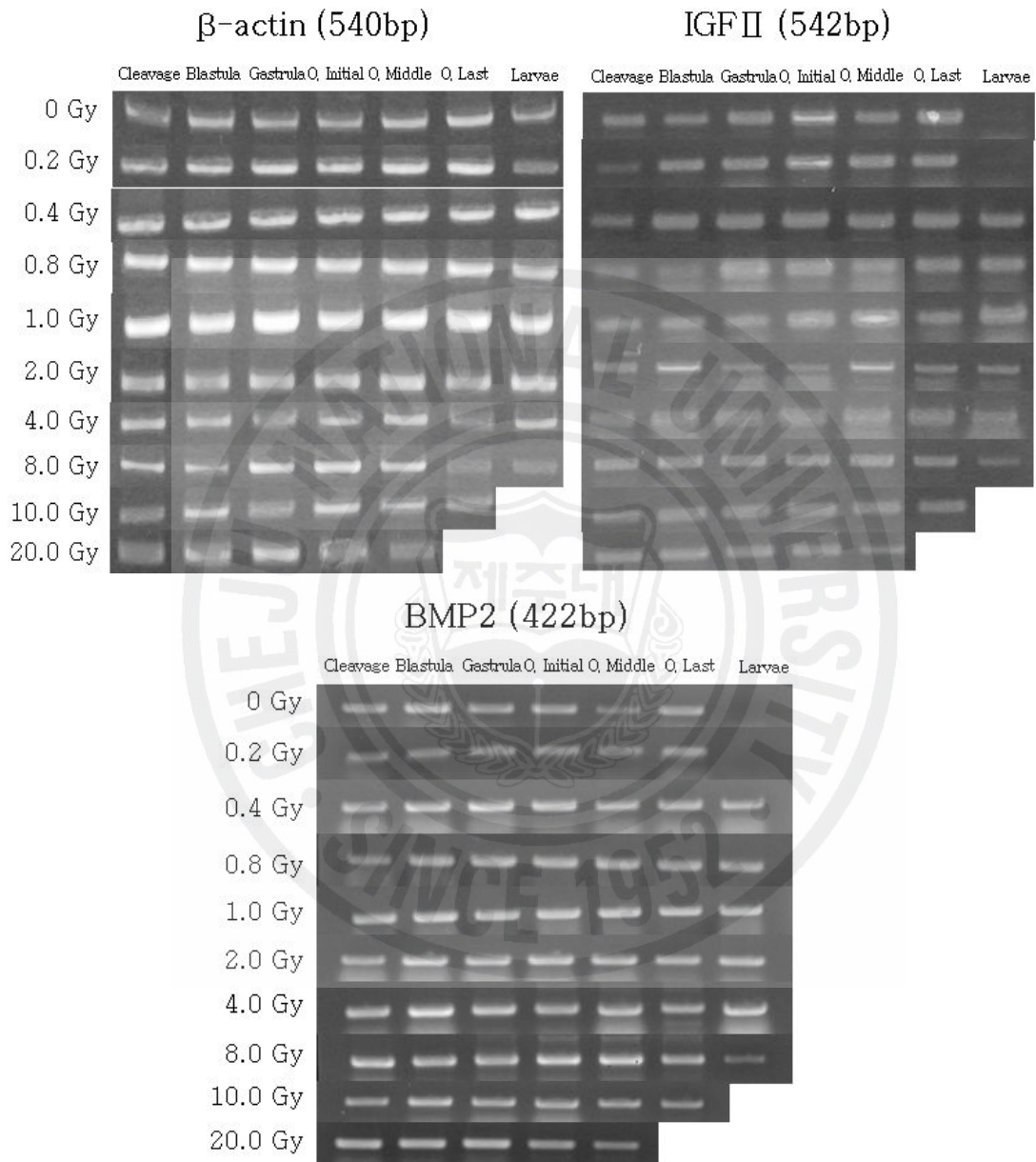


Fig. 27. Effect of gamma radiation on β -actin, IGF II and BMP2 mRNA of fertilized eggs.

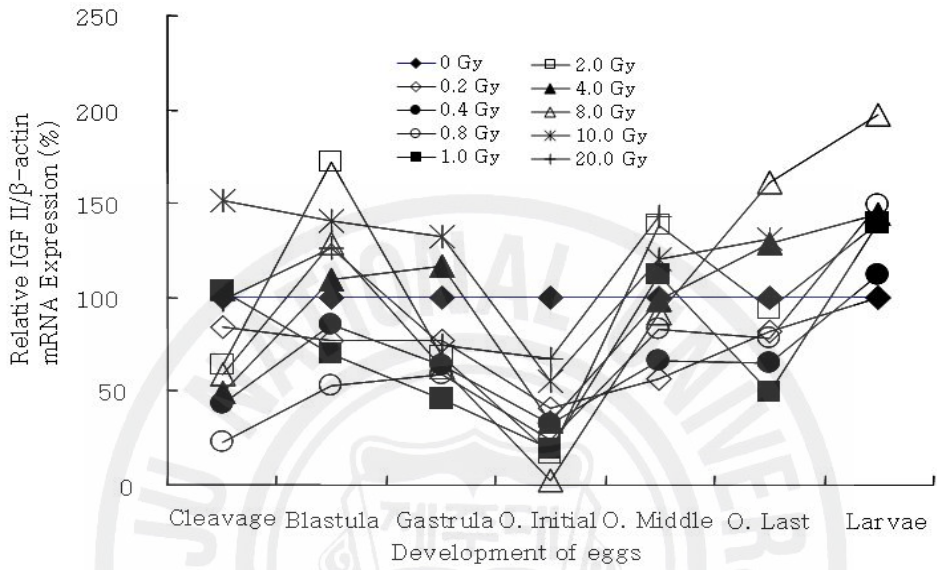


Fig. 28. Effect of gamma radiation on IGF II mRNA of fertilized eggs.

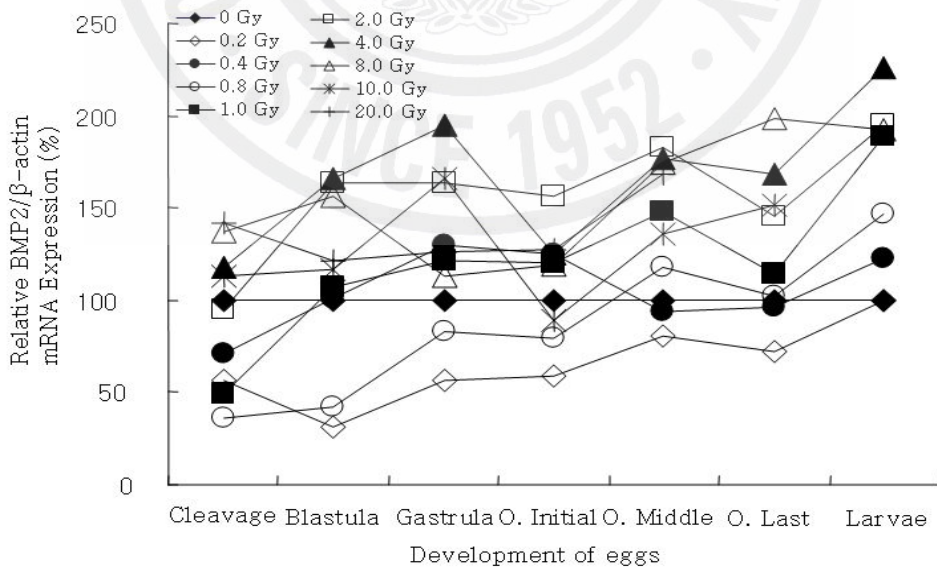


Fig. 29. Effect of gamma radiation on BMP2 mRNA of fertilized eggs.

4. 고 찰

넙치는 우리나라 전연안, 일본 및 중국해 연안에 널리 분포하고 있다. 현재 자연 방사선이 증가함에 있어서 방사선 영향이 넙치 수정란에 미치는 영향에 대해서 알아보았다.

넙치의 수정란은 부상란이고, 사망한 수정란은 흰색을 띄면서 가라앉는다. 수정란은 수정 후 4시간 30분 후 방사선 조사를 받았고, 방사선 조사 후 현미경으로 관찰된 단계는 64세포기로 접어들고 있었다. 수정 후 13시간 만에 포배기가 되고, 18시간 만에 낭배기가 되었다. 수정 후 26시간 후에 배체형성 초기 단계로 배체는 형태가 뚜렷해지며, 몸의 중앙을 따라 가느다란 형태가 나타난다. 수정 후 30시간 만에 배체형성 중기 단계로 머리가 분화되기 시작하면서 눈이 형태를 갖추게 되고, 배체는 신장되어 꼬리가 머리 가까이에 까지 길어졌다. 수정 후 44시간 만에 배체형성 말기 단계로 꼬리 부근에 막지느러미가 발달하였다. 수정 후 50시간 경과되면 배체가 난막을 뚫고 부화하기 시작하였다.

세포에 방사선을 조사하면 방사선은 세포분열을 지연시키는 효과를 나타낸다. 증식중인 세포에 방사선을 조사하면 우선적으로 분열지수의 감소와 총세포수 증가가 일시적으로 정지된다. 시간이 지나면 분열 세포수는 증가하게 되는데, 분열지수가 방사선 조사전의 값으로 되돌아 가기까지의 시간을 분열지연이라고 한다. 보통 20시간이 이상이 경과하면 다시 분열지수가 감소하고 세포의 죽음이 나타나기 시작한다(Kang et al., 1996). 분열지연의 정도는 방사선량, 방사선 조사시의 세포주기, 세포의 종류 등 여러 가지 요인들의 영향을 받는다(Hall, 2000). 세포분열지연효과는 방사선의 양에 비례한다. 수정란에 방사선 조사하였을 때, 8~20 Gy에서는 대조군(0 Gy)에 비해 낭배기가 약 6시간 정도 길어졌다(Fig. 23). 이는 방사선 조사로 인하여 세포분열의 지연된 것으로 사료된다.

방사선 조사에 따른 넙치 수정란의 부화율을 확인하기 위하여 각 방사선 조사량에 부화된 개체를 확인하였다(Fig. 24). 부화율은 대조군(0 Gy)에 비해 1과 4 Gy에서는 부화율이 유의적으로 증가했고($P<0.05$), 0.2 Gy에서도 대조군(0 Gy)에 비해 증가는 하였지만 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 8, 10 그리고 20 Gy에서는 대조군(0 Gy) 비해 유의적으로 부화율이 감소한 것을 확인되었다($P<0.05$).

방사선 조사량에 따른 넵치 수정란의 사망률은 12시간 이후부터 8, 10 및 20 Gy에서 증가하기 시작하였다. 20 Gy에서는 24 h 쯤에 높은 사망률이 확인 되었다. 그 다음은 10과 8 Gy 순으로 높았으며 나머지 실험구에서는 대조구(0 Gy)와 차이가 없었다. 방사선 조사로 인하여 세포분열지연이 나타나고, 시간이 경과할 수록 분열지수가 감소한다. 그리고 세포는 보통 20시간 이상 경과하면 다시 분열지수가 감소하고 세포의 죽음이 나타나기 시작한다. 이로 인하여 높은 선량을 받아 세포지연이 일어나 8, 10 및 20 Gy에서 사망률이 높아졌다고 사료되어진다. 넵치 수정란에 방사선 조사 반수치량은 부화시기 까지 50~60% 사망률을 나타내고 있는 8 Gy 이하라고 사료되어진다.

방사선 조사량에 따른 수정란에서의 단백질 발현 패턴을 확인하기 위하여 10% acrylamide gel을 이용하였다. 8~20 Gy에서는 세포지연이 일어난 뒤인 배체형성 초기부터 약 97 kDa의 단백질 발현량이 다른 실험구에 비해서 적은 발현량이 확인 되었다. 배체형성중기, 말기 및 자어에까지 실험구에 비해서 적은 발현량을 보이고 있다. 분열지연의 기간이 방사선에 의한 손상을 회복하는데 요구되는 시간에 해당 된다. 방사선을 조사받은 세포는 분열에 들어가는 것을 중지하고 손상을 회복한다. 회복이 완료되면 분열재개하며 제대로 회복되지 않으면 분열 도중에 세포가 죽기 쉽다(Kang et al., 1996). 이는 세포지연으로 인하여 세포 분열이 늦어지고 이로 인해 세포의 사망과 연관되면서 단백질 발현에 차이가 생기는 것으로 사료되어진다.

방사능 조사에 따른 유전자들의 발현을 확인하였다. 방사선 조사 직후 IGFⅡ는 감소하고, 그 후 증가하다 감소하다 다시 증가하면서 자어기에는 0.2 Gy를 제외한 실험구들은 대조구보다 높은 발현을 확인하였다. BMP2는 방사선 직후 감소와 증가하고 자어기 까지 증가하고 0.2 Gy를 제외한 실험구들은 IGFⅡ와 동일하게 높은 발현을 확인하였다. 이는 방사선 조사로 인하여 DNA나 RNA가 파괴되었다가 생성하면서 자어기 까지 생성되는 것으로 사료된다.

저선량 방사선 조사에 따른 넵치 수정란이 자어가 되기까지의 반수치사량인 LD₅₀은 약 8 Gy을 확인하였다. 방사선 조사로 세포 지연이 일어나고, 이로 인한 단백질 발현 차이와 사망률에도 영향을 미치는 것을 확인하였다. 방사선 hormesis에 대한 유전자 발현이 증가와 더불어 종합적인 검토를 위해서는 좀 더 장기간에 걸친 연구가 발현 양상에 대한 세부적이 연구가 추가되어야 할 것으로 판단되며, 더 많은 수

정란을 대상으로 하여 실험을 진행함으로써 수정란에서 방사성 조사가 자어기와 성어가 되기까지의 성장과 영향에 대한 생리적인 차이를 알아봐야 할 것이다.



V. 종합 고찰

방사선은 우리가 알고 있는 에너지의 한 가지 형태이며 자연 환경에서 언제나 접할 수 있다. 방사선은 생물의 생활사에 막대한 영향을 미치고 있으며, 생물의 진화에도 지대한 영향을 끼쳐왔다. 이러한 방사선을 이용하여 방사선 hormesis을 확인하기 위하여 패류인 참전복과 넙치 수정란에게는 저선량 방사선을 조사하였고 방사선 돌연변이 육종에 대한 LD₅₀을 확인하위해서 까막전복에게는 고선량 방사선을 조사하였다. 참전복과 까막전복의 계통유전학적 유연관계가 가까운 것으로 나타나 실험에 사용하였다(Kim et al., 200).

방사선에 의한 장해를 파악하고 또한 각종 장해 경감물질의 효과를 측정하기 위하여 가장 많이 사용되고 기본이 되는 지표는 혈액의 변화이다. 사람에게 있어서도 방사선 치료 시 치료계획의 판단 기준으로 혈액 수치, 특히 림프구의 수치 변화를 사용하고 있으면, 원폭피해자 및 방사선 사고에 의한 피폭자에 대한 연구에서도 조혈기관 장애와 관련된 보고가 주를 이룬다(Kyoizumi et al., 1989; Finch, 1987; Langlois et al., 1987; Gale, 1990; Adams, 1984). 저선량 방사선 조사 받은 참전복은 직후 감소하였고, 회복하는 것을 확인하였다. 고선량 방사선 조사 받은 까막전복은 직후 차이가 없는 것처럼 보였으나, 시간이 지날수록 감소하다 사망하였다. 무척추동물인 패류에서도 방사선 조사에 대한 장해물질의 효과를 파악하기 위하여 지표로 혈림프수 변화를 이용 가능하다고 사료된다.

활성산소는 생체내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시킨다(Ferraris et al., 2002). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있으며(Chance et al., 1979; Wendel and Feuerstein, 1981), 고선량의 방사선은 세포내에 존재하는 물분자 중 산소-수소결합을 분해하여 ·OH기를 과다생산하여 세포내에 산화적 스트레스를 유발한다고 알려져 있다(Dubner et al., 1995). 저선량 방사선을 조사한 참전복은 직후 항산화 효소의 증가와 감소를 방사선 조사에 대한 초기작용으로는 작용할 수 없다. 이는 방사선으로 인한 세포의 변화에도 동시 영향을

미치므로 방사선 조사에 대한 효소와의 관계는 명확히 확인할 수는 없다. 하지만 고선량 방사선 조사에서 효소의 초기 변화는 명확히 확인 되지 않았지만, 효소가 감소하다 개체가 사망하는 것을 보면 효소의 감소가 개체 사망에 연관이 있다고 생각되어진다.

RT-PCR을 통하여 방사선 조사에 대한 유전자의 발현을 알아보았다. X선과 γ 선 같은 이온화 방사선은 UV와 달리 DNA손상을 초래하는데, 단일가닥 절단(SSB), 이중가닥 절단(DSB), DNA-DNA cross links, DNA-단백질 cross links들을 유발하는데, 특히 이중가닥 DNA 절단은 방사선에 의해 초래되는 염색체 이상(chromosome aberration), 미소핵 발생, 세포사, 변이(transformation) 등의 생물학적 효과를 초래하는 주된 요인이다(Belli et al., 2002). 방사선 조사에 대한 스트레스 유전자인 HSP 70 mRNA 발현은 참전복인 경우 직후에는 발현의 증가와 감소가 확인되었지만, 시간이 지나면서 대조구(0 Gy)와 비슷하게 발현하였다. 까막전복인 경우는 참전복과 동일하게 직후 발현의 증가와 감소가 확인되었지만, 저선량과는 반대로 발현이 증가하면서 개체가 사망하였다. 이는 방사선 조사 직후에는 스트레스 유전자의 발현과 세포사 및 변이에 의해서 일정한 변화를 확인 할 수 없었고, 이런 유전자에 대한 변이는 저선량에서는 회복, 고선량에서는 사망에 변화가 일어났다고 사료되어진다. 방사선 영향은 방사선량, 선량을, 세포의 특성 등에 따라 다른 양상으로 나타난다(Hall, 2000).

넙치 수정란의 경우 성장유전자를 확인하였는데, 전복류에서 비슷하게 직후에는 감소와 증가가 보였지만, 자어기 까지 증가하는 것을 확인하였다. 이는 방사선 조사로 유전자의 변이를 주었다고 사료되어지며, 이런 증가는 성어에 어떤 영향을 줄 것인가는 대한 연구가 필요하다고 생각되어진다.

생체내에 고분자 물질에 방사선이 조사되면 분자량이작은 물질로 나누어지는 분해반응(degradation)과 두 물질 사이 또는 한 가지 물질내의 사슬끼리 연결되는 가교형성이 반응이 일반적으로 나타날 수 있다. 방사선 조사로 인하여 단백질의 기능이 상실되는 것은 펩티드 결합이나, 1차구조의 변화에 의한 것이라고 보다는 주도 단백질의 2차, 3차 구조를 유지하는 결사슬의 수소결합이나 이황화결합이 끊어지는데 기인하게 된다(Kang et al., 1996). 참전복은 방사선 조사 후 대조구와 0.2 Gy에서는 21 kDa 부근에서 12시간째에 단백질 발현이 뚜렷하게 확인되었지만(Fig 13-A, B), 다른 실험구들에서는 뚜렷하게 확인되지는 않았다. 조사 후 0.2와 0.4

Gy에 31 kDa 부근에서 대조구(0 Gy)에서 뚜렷이 나타나지 확인되지 않은 단백질이 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 13-B, C). 이는 방사선 조사로 인하여 참전복의 단백질 발현의 차이가 뚜렷이는 구분되지는 않지만, 방사선 조사 영향으로 단백질의 변형과 새로운 단백질의 생성으로 사료되어진다.

세포에 방사선을 조사하면 방사선은 세포분열을 지연시키는 효과를 나타낸다. 증식중인 세포에 방사선을 조사하면 우선적으로 분열지수의 감소와 총세포수 증가가 일시적으로 정지된다. 시간이 지나면 분열 세포수는 증가하게 되는데, 분열지수가 방사선 조사전의 값으로 되돌아 가기까지의 시간을 분열지연이라고 한다. 보통 20 시간이 이상이 경과하면 다시 분열지수가 감소하고 세포의 죽음이 나타나기 시작한다(Kang et al., 1996). 넙치 수정란은 높은 선량에서 낭배기가 대조구(0 Gy)보다 시간이 지연되고, 단백질 발현의 차이를 나타내면서 사망률이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 방사선 조사로 인하여 분열지수가 감소하고, 세포 지연이 일어났으며, 단백질 발현의 차이와 세포의 사망으로 연결되어 일어났다고 사료되어진다. 세포지연을 이용하여 세포의 기관을 형성을 지연함으로써, 세포 분열의 관찰을 좀 더 자세히 확인 할 수 있다고 사료되어진다.

저선량 방사선 조사 받은 참전복의 장기간 사육을 통하여 성장에 대한 영향을 확인하였다. Lee et al.(1998)은 저선량의 감마선을 고추 작물의 종자에 조사하여 각 선량별로 나타나는 hormesis 효과를 조사한 결과 대조구에 비해 저선량에 감마선 조사구에서 발아율이 증가되는 것을 관찰하였고, 생육 양상 등에 영향을 미치는 적정선량을 1 Gy에서 20 Gy 사이임을 보고 하였다. Kim et al.(2000b, 2000a, 1999a)도 종자에 저선량 감마선을 조사하여 자란 옥수수, 참박, 배추 등의 생육이나 수량이 증가하는 것을 관찰하였다. 그러나 참전복에서는 이러한 증가인 hormesis는 관찰되지 않았으며, 오히려 고선량인 20 Gy에서는 성장이 악영향 미쳐서 개체가 더디게 성장하는 것을 확인하였다.

본 실험에 결과를 통하여, 방사선 hormesis는 참전복에서 일어나지 않았으며, 높은 선량에서는 장기간 사육에 성장을 저해 했다. 그리고 넙치 수정란에서는 높은 선량에서 세포지연이 일어나 사망에 영향을 미쳤으며, 넙치 수정란의 hormesis 관한 연구가 더 필요하다고 사료되어진다. 까막전복을 이용하여 방사선 돌연변이 육종에서 중요한 LD₅₀을 확인하였으며 고선량 방사선 조사로 인한 세포치사와 유전자 및 효소에 영향을 미쳐 사망했다.

이러한 방사선을 이용하여 육상 생물이 아닌 해양 생물에서도 더 많은 육종 및 방사선 자극 효과인 hormesis에 관한 연구가 필요하고, 다양한 변화에 대한 종합적인 검토를 위해서 좀 더 다양한 실험 분석과 장기간에 걸친 연구가 필요하다고 생각되어진다.



VI. 요약

본 연구에서는 참전복(*Haliotis discus hannai*), 까막전복(*Haliotis discus discus*) 및 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 수정란을 이용하여 방사선 조사량에 따른 생리학적 변화를 하고자 혈액 및 항산화 효소, 단백질 변화, 생존율, 수정란 부화에 미치는 영향에 대해서 조사하여 방사선에 대한 기초 자료를 제공하고자 본 실험에 수행하였다. 참전복과 넙치 수정란의 저선량 방사선 조사량에 따른 hormesis 영향을 알아보기 위하여 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 4, 8, 10 및 20 Gy를 조사하였다. 참전복은 0, 3, 6, 12, 24, 48 및 72h에 넙치 수정란은 발생단계별로 샘플을 취하여 실험에 사용하였다. 고선량 방사선 조사에 따른 까막전복의 LD₅₀과 생리 변화를 알아보기 위하여 0, 50, 100, 200, 400 및 800 Gy를 조사하고, 0, 1주, 2주, 3주 및 4주째에 샘플을 취하여 실험에 사용하였다.

저선량 방사선 조사에 따른 참전복의 초기 생리학적 변화와 장기간 사육에 대한 결과 혈액에서는 초기 혈림프구가 감소하였으나 회복하는 것을 확인하였고, 단백질 발현에서는 21kDa 부근에서 대조구와 0.2 Gy는 뚜렷이 보이는 단백질 밴드가 확인 되었으나, 나머지 실험구에서는 확인되지 않았고, 31 kDa 부근에서 0.2와 0.4 Gy는 밴드가 확인되었으나, 다른 실험구와 대조구에서는 뚜렷한 밴드가 나타나지 않았다. 항산화 효소는 조사 직후 증가하였다가 실험 종료까지 감소하는 경향을 보였다. HSP 70 mRNA는 직후에는 감소와 증가가 보였고, 10 Gy를 제외한 실험구들은 HSP 70 mRNA가 감소하는 것을 확인하였다. 장기간 사육 결과 참전복의 성장이 증가는 확인되지 않았지만, 20 Gy에서는 악영향으로 성장이 더디게 일어났다.

고선량 방사선 조사에 따른 까막전복의 LD₅₀와 생리학적 변화는 방사선 조사에 따라 혈림프 수가 감소하였다가 사망하였다. 항산화 효소는 직후 감소하지는 않았지만, 시간에 따라 감소하면서 사망하였다. HSP 70 mRNA는 직후 감소하거나 증가하였지만, 증가하면서 사망하였다. 까막전복의 LD₅₀은 30~40 Gy 였다.

저선량 방사선 조사에 따른 넙치 수정란의 생리적인 변화는 수정란에서 자어기까지 LD₅₀은 약 8 Gy였다. 방사선 조사로 인하여 8~20 Gy에서는 수정란의 세포지

연이 일어나고, 이로 인하여 단백질 발현의 차이가 생기고 결국에는 사망하는 것을 알았다. 성장 유전자들은 직후 감소하였다가, 자어기까지 갈수록 증가하는 것을 알았다.

본 실험에 결과를 통하여, 방사선 hormesis는 참전복에서 일어나지 않았으며, 높은 선량에서는 장기간 사육에 성장을 저해했다. 그리고 넙치 수정란에서는 높은 선량에서 세포지연이 일어나 사망에 영향을 미쳤으며, 넙치 수정란의 hormesis 관한 연구가 더 필요하다고 사료되어진다. 방사선 돌연변이 육종에서 중요한 LD₅₀을 확인하였으며 고선량 방사선 조사로 인한 세포치사와 유전자에 영향을 미쳐 사망했다. 방사선 조사로 인하여 DNA, RNA 그리고 효소에 영향을 미치면서 세포의 치사와 단백질 발현에 차이를 가져왔고, 고선량 조사는 사망에 이르게 되었다.

이러한 방사선을 이용하여 육상 생물이 아닌 해양 생물에서도 더 많은 돌연변이 육종과 방사선 자극 효과인 hormesis에 관한 연구가 필요하고, 다양한 변화에 대한 종합적인 검토를 위해서 좀 더 다양한 실험 분석과 장기간에 걸친 연구가 필요하다고 생각되어진다.

VII. 참고 문헌

- Abbott D. W. and J. T. Holt. 1999. Mitogen-activated protein kinase kinase2 activation is essential for progression through the G2/M checkpoint arrest in cells exposed to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.*, 274: 2732-2742.
- Adams G. E. 1984. Lethality from acute protracted radiation exposure in man. *Int J Radiat Biol.*, 46: 209-217.
- Alscher R. G. and J. L. Hess. 1993. Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton., p. 1-174.
- Belli M., O. Saporà, and M. A. Tabocchini. 2002. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J Radiat Res.*, 43: 13-19.
- Bentur Y., Horlatch N., Koren G. 1991. Exposure to ionizing radiation during pregnancy: perception of teratogenic risk and outcome. *Teratology*, 43: 109-112.
- Boniver, J., Humblet, C., Rongy, A. M., Delvenne, C., Delvenne, P., Greimers, R., Thiry, A., Courtoy, R. and Defresne, M. P. 1990. Cellular events in radiation-induced lymphomagenesis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 57, 693-698.
- Breslavets I. P., N. M. Berezina G. L. Shchibria, M.L. Romanchikovam, V.A. Lazykova, and Z.F. Milesenko. 1960. Increased yield of radishes and carrots by X or γ -irradiation of seeds before sowing. *Biophysics, (USSR)* 5: 86-89.
- Brunet A., D. Roux, P. Lenormand, S. Dowd, S. Keyse and J. Pouyssegur. 1999. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO. J.*, 18: 664-674.
- Cai L. (1999) Research of the adaptive response induced by low-dose radiation: Where have we been and where should we go? *Hum Exp Toxicol*, 18: 419-425.
- Cai L. and P. Wang. (1995) Induction of a cytogenetic adaptive response in germ cells of irradiated mice with very low-dose rate of chronic gamma-irradiation and its biological difference on radiation induced DNA or chromosomal damage and cell killing in their male offspring. *Mutagenesis*, 10: 95-100.
- Cai L. and S. Z. Liu.(1990) Induction of cytogenetic adaptive response of

somatic and germ cells in vivo and in vitro by low-dose X-irradiation. *Int J Radiat Biol.*, 58: 187-194.

Chance, B., H. Sice and A. Boveris, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59: 527-605.

Chao J. I. and J. L. Yang. 2001. Opposite roles of ERK and p38 mitogen-activated protein kinase in cadmium-induced genotoxicity and mitotic arrest. *Chem Res Toxicol*, 14: 1193-1202.

Chen Y. R., X. Wang, D. Templeton, R. J. Davis and T. H. Tan. 1996. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J. Biol. Chem.*, 271: 31929-31936.

Ebara S., Nakayama K. 2002. Mechanism for the action of bone morphogenic proteins and regulation of their activity. *Spine.*, 16S: S10-S15.

Farag R. S. and K. H. el-Khawas. 1998. Influence of γ -irradiation and microwaves on the antioxidant property of some essential oils. *International J. Foods Soc. Nutr.*, 49: 109-115.

Ferraris, M., S. Radice, P. Catalani, M. Francolini, L. Marabini and E. Chiesara, 2002. Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes; a time course study. *Aquatic Toxicology*, 59: 283-296.

Finch S. C. 1987. Acute radiation syndrome, *JAMA*, 258: 664-667.

Gale R. P., Butturini A. 1990. The role of hematopoietic growth factors in nuclear and radiation accidents, *ExpHematol*, 18: 958-964.

Hall, E. J., 2000. In radiobiology for the Radiologist. 5th ed. USA. Lippincott Williams & Wilkins. 17-123.

Haran-Ghera, N. and Peled, A. 1979. Induction of leukemia in mice by irradiation and radiation leukemia virus variants. *Adv. Cancer Res.*, 30, 45-87.

Holbrook N. J., Y. Liu and A. J. Fornace. 1996. Signaling events controlling the molecular response to genotoxic stress. *EXS.*, 77: 273-288.

Iarilin A. A., Sharova, N. IL, Kuz'menok, O. L., Mitin, A. N., Nikonova, M. F. and Litvna, M. M. 1996. Changes in the immune system of the victims of the action of the factors in the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station. Their manifestations, nature and the possible sequelae. *Radiats. Biol. Radioecol*, 36, 587-600.

Jung H. T., Y. S. Kim and S. D. Choi. 2004. The change of total weight and food consumption of abalone, *Haliotis discus hannai* under a vibration and noise. *J. Environ. Sci.*, 13(6): 581-589.

- Karas J. S., Stanbury J. B. Fatal. 1965. radiation syndrome from an accidental nuclear excursion. N Engl J Med., 272-755
- Kim J. K., Lee C. J., Lee Y. K., Song K. W., Yoon Y. D. 1999a. Cell cycle evaluation of granulosa cells in the γ -radiated mouse ovarian follicles. J. Kor. Radiat Prot., 24(1): 17-22.
- Kim J. S., E. K. Lee, M. H. Back, D. H. Kim and Y. B. Lee. 2000. Influence of low dose γ radiation on the physiology of germinative seed of vegetable crops. Kor. J. Environ. Agric., 19: 58-61.
- Kim J. S., Y. K. Lee, H. S. Park, M. H. Back and K. H. Chung. 2000. Effects of low dose gamma radiation on the early growth and physiological activity of gourd (*Lagenaria leucantha* L.). Kor. J. Environ. Agri., 19: 142-146.
- Kim, J. S., H. S. Song, J. K. Kim, Y. K. Lee, and Y. B. Lee. 1998. Stimulation effect of early growth in crops by low dose radiation. Kor. J. Env. Agri., 17: 156-159.
- Kim, S. K., Y. H. Jung, S. H. Han, Y. S. Oh, M. H. Ko and M. Y. Oh. 2000. Phylogenetic relationship among *Haliotis* spp. distributed in Korea by the RAPD Analysis. Korea J. Genetics, 22(1): 43-49.
- Kim, T.H., K. J. Kim, M. G. Choe, and I. K. Yeo. 2006. Physiological changes of juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute water-temperature stress. Kor. J. of aquaculture, Vol. 19, 77~83.
- Kim, T.H., M. H. Yang, M. G. Choe, S. J. Han and I. K. Yeo. 2005. Physiological studies on acute water-temperature stress of abalone (*Haliotis discus hannai*). Kor. J. of aquaculture, Vol. 18, 7~12.
- Koepf R and M Kramer. 1981. Photosynthetic activity and distribution of photoassimilated ^{14}C in seedlings of Zeamays grown from gamma-irradiated seeds. Photosynthetica, 15: 484-493.
- Kyoizumi S, Nakamura N, Hakoda M, et al.1989. Detection of somatic mutations at the glycophorin A locus in erythrocytes of atomic bomb survivors using a single beam flow sorter. Cancer Res., 49: 209-217.
- Langlois R. G., Bigbee WL, Kyoizumi S, et al. 1987. Evidence for increased somatic cell mutations at the glycophorin A locus in atomic bomb survivors. Science, 236: 445-448.
- Lee E. K., J. S. Kim, Y. K. Lee and Y. B. Lee. 1998. Effect of low dose γ -ray irradiation on the germination and growth in redpepper (*Capsicum annuum* L.). J. Kor. Soc. Hort. Sci., 39: 670-675.
- Lee H. Y., J. S. Kim, M. H. Baek, Y. K. Lee and D. S. Im. 2002. Effect of

low dose γ -radiation on growth, activities of Enzymes and photosynthetic activities of gourd (*Lagenaria siceraria*). Korean J. Environ. Biol., 20(3): 197-204.

Lee, D. M. 1994., Histological study on the injury of the seminiferous tubules of the pheasant (*Phasianus colchicus*) following ^{60}Co γ -irradiation. Korean J. Vet. Res., 34 : 665-678.

Lee, E. K., J. S. Kim, Y. K. Lee, and Y. B. Lee. 1998. Effects of low dose γ -ray irradiation on the germination and growth in red pepper. J. Kor. Soc. Hort. Sci., 39: 670-675.

Lindop P. J. 1969. The effects of radiation on rodent and human ovaries. Proc. Soc. Med., 62: 144-148.

Little J. B. 2000. Radiation carcinogenesis. Carcinogenesis., 21, 397-404.

Liu S. Z., W. H. Liu, and J. B. Sun. (1987) Radiation hormesis: its expression in the immune system. Health phys., 52: 579-583.

Liu S. Z., Y. C. Zhang, Y. Mu, S. Xu, and J. X. Liu. 1996. Thymocyte apoptosis in response to low-dose radiation. Mutat Res., 358: 185-191.

Lowry O. H., N. J. Rosengbrought., A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

Luckey T. D. 1980. Hormesis with ionizing radiation. CRC press. Inc. Boca Raton. Fla.

Luckey T.D. 1982. Physiological benefits from low levels of ionizing radiation. Health Phys., 43: 771-789.

Luebeck E. G. and Hazelton, W. D. 2002. Multistage carcinogenesis and radiation. J. Radiol. Prot. 22, 43-49.

Marklund S. and G. Marklund, 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem., 47: 469-474.

Miller M. W. and W. M. 1987. Radiation hormesis in plants. Health physics. 52(5): 607.

Nelson D. P. and L. A. Kiesow, 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H_2O_2 solutions in the UV). Anal Biochem, 49: 474-478.

Olivieri G., J. Bodycote, and S. Wolff. .1984. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. Science, 233: 594-597.

- Pages G., P. Lenormand, G. L'Allemain, J. C. Chambard, S. Meloche and J. Pouyssegur. 1993. Mitogen-activated protein kinase p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 90: 8319-8323.
- Pearson G., F. Robinson, T. B. Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway: regulation and physiological function. *Endoc Rev.*, 22: 127-134.
- Russell W. L. 1962. Studies in mammalian radiation genetics. *Nucleonics*, 123: 53-56
- Seo J. S. 1997. Cloning and Characterization of Hsp70-binding protein. 기초 의학연구보고서.
- Shafman T. D., A. Saleem, J. Kyriakis, R. Weichselbaum, S. Kharbanda and D. W. Kufe. 1995. Defective induction of stress-activated protein kinase activity in ataxia-telangiectasia cells exposed to ionizing radiation. *Cancer Res.*, 55: 3242-3245.
- Shipman T. L., Lushbaugh C. C. 1961. Acute radiation death resulting from an accidental nuclear critical excursion. *J Occup Med.*, 3(suppl.): 145-192
- Smith M. L. and A. J. Fornace. 1995. Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncol*, 7: 69-75
- Stan S. and A. Croitoru. 1970. Effect of low, moderate and high levels of gamma radiations(⁶⁰Co) on soybean plants. I. Analysis of growth and yield. *Stim. Newsl.*, 1: 23-25
- Thiede M. E., O. Link, R. J. Fellow and P. A. Beedlow. 1995. Effects of gamma radiation on stem diameter growth, carbon gain and biomass partition in *Helianthus annuus*. *Environ. Exp. Bot.*, 35: 33-41.
- Tuschl H., H. Altmann, R. Kovac, A. Topaloglou, D. Egg, and R. Gunther. 1980. Effects of low-dose radiation on repair processes in human lymphocytes. *Radiat Res.*, 81: 1-9.
- Ulich R. L. and Store, J. B. 1978. Influence of dose, dose rate and radiation quality on radiation carcinogenesis and life shortening in RFM mice and BALB/c mice. *IAEA-SM-224/204*, 95-113.
- Wendel, A. and S. Feuerstein, 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice-1. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem Pharmacol*, 30: 2513-2520.
- Yoo J. S. 1991. Korean shells in color, Ilji Press, Seoul, Korea, pp. 110. (in Korean)

- 강만식, 김종봉, 정규희, 정해원. 1996. 방사선생물학.
- 김수일, 허대영, 이영호, 조문준, 김무강, 김원식. 2002. 방사선조사에 의한 흰쥐 난포의 퇴축과 난포세포의 방사선 감수성. *충남의대잡지*, 29(1): 1-17.
- 김재성, 김진규, 이은경, 이영복. 1997. 전리방사선에 의한 배추와 무의 생육촉진 효과. *한국환경농학회지*, 16 :390-393.
- 김재성, 백명화, 김동희, 이영근, 이영복. 2001. 저선량 방사선이 고추의 초기생육과 후속고선량 내성에 미치는 영향. *환경생물*, 19: 71-77.
- 김재성, 이영근, 백명화, 이영복, 박영선, 1999. 묵은 배추종자의 발아와 생육에 미치는 저선량 γ 선 효과. *환경생물*, 17: 11-15.
- 서대철·최상덕·라성주·양한훈·서해립, 1999, 참전복, *Haliotis discus hannai* 유생발생 및 채묘에 미치는 아연독성, *한국양식학회지*, 12(3): 229~236.
- 송근일, 노홍태, 이윤이, 손성경, 김원식, 김수일. 2004. 방사선에 의한 난포 퇴축과 난포 대식세포에 관한 형태학적 연구. *대한산부회지*, 47: 1940-1948.
- 이원정, 한승로, 정옥, 김수일, 조문준, 김원식. 2001. 방사선 조사로 유도된 흰쥐 태자의 선천성 기형 분석. *대한체질인류학회지*, 14: 159-168.
- 이해연, 김재성, 백명화, 이영근, 임돈순. 2002. 저선량 γ 선 조사가 참박의 초기 성장과 효소활성 및 광합성 등에 미치는 영향. *한국환경학회*, 20: 197-204.
- 최상덕·김호진·서해립·서로영·양문호·황성일, 1998, 양식산 참전복 (*Haliotis discus hannai*)에 대한 리도카인 및 MS-222의 박리효과, *한국어병학회지*, 11(1): 35~41.
- 최상덕·윤장택·조용철, 1998, 남조류, *Mastigocoleus sp.* 에 의한 한국산 참전복의 패각 괴사증, *한국양식학회지*, 11(4): 365~474.
- 최상덕·이원교, 1998, 참전복(*Haliotis discus hannai*) 치패의 근육위축증 원인인 스쿠티가섬모충에 대한 Chitosan의 구충효과, *여수대학교 논문집*, 13(2): 997~1008.
- 최상덕·정성채·김호진·공요근·백재민·최규정, 1997, 온도구간별 파라아미노안식향산에틸과 담수에 의한 참전복(*Haliotis discus hannai*) 치패의 박리 및 마취 회복에 관한 연구, *한국양식학회지*, 10(3): 281~228.

감사의 글

대학과 대학원 생활 동안 세심한 관심과 격려 그리고 많은 깨달음을 주시고 이 논문이 완성되도록 지도해 주신 여인규 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 바쁘신 가운데에도 저의 논문을 심사해주시고, 귀중한 조언과 따뜻한 격려를 아끼지 않으셨던 허문수 교수님과 전유진 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 늘 관심과 조원으로 격려해주신 이제희 교수님과 최미경 박사님께도 진심으로 감사드립니다.

실험실 생활을 하며 저의 가족보다 더 많은 시간을 같이 보내고 항상 제 2의 가족처럼 같이 생활하며 많은 도움을 준 실험실 식구인 민석, 수아, 졸업하셨지만 항상 찾아와주셔서 따뜻한 격려해주신 문휴형, 정환형, 태형형에게도 감사드리고, 저희 어류분자생리학 실험실을 거쳐서 졸업한 이들에게도 감사드립니다. 아울러 항상 우리 실험실과 가까이 있어 많은 일을 공유하며 도움을 주었던 해양 병원 미생물 실험실 식구들 병규형, 철영형, 영건형, 만철형, 현식, 윤범, 봉근, 민웅, 용재, 동민에게도 감사드립니다. 분자유전육종 실험실에 맹진형과 분자유전학 실험실에 철홍형, 영득외 실험실 식구들에게도 감사드립니다. 해양생물자원이용공학 실험실 수진형, 길남형, 선희, 긴내, 석천, 성명의 실험실 식구들에게도 감사드립니다. 항상 주말이면 함께 운동을 하는 해남회 식들과 조교인 민주에게도 감사드립니다.

짧은 기간 동안 같이 일을 하면서 많은 것을 말씀해주신 제주도립수산자원 연구소 강봉조 연구사님과 창식형에게도 감사드립니다.

또한, 대학원 생활동안 항상 믿고 의자하며 많은 시간을 함께 하고, 모든 것을 함께 나누던 대학원 동기인 주상, 태원, 승홍, 송헌, 혜영에게도 고맙고 수고했다는 말을 하고 싶습니다.

여기에 이름을 올리지는 못했지만 부족한 저에게 항상 관심을 보여주고, 항상 격려 말을 해주신 많은 분들과 항상 곁에서 힘을 실어주고, 얼굴만 봐도 기분이 좋아지는 주란에게도 감사하고 고맙다는 말을 드리고 싶습니다.

길고 긴 대학 생활과 대학원 생활동안 많은 뒷마라지 해주셨던 부모님과 서울에 있으면서 많은 힘과 용기 주신 형과 누나, 매형에게도 감사드리고, 항상 친구처럼

같이 있어준 동생에게도 감사드리고, 앞으로 더욱더 낯아지는 모습 보여 드리겠습니다

이분들이 계시기에 이렇게 무사히 졸업을 할 수 있는 것이라 생각하고 다시 한번 모든 분들에게 감사드립니다.

