Article

유세포 분석기와 Neutral Red Retention Assay를 이용한
자연산 참굴(*Crassostrea gigas*)의 면역력 측정

홍현기¹ · 강현실¹ · 김영옥² · 최광식^{1*}

¹제주대학교 해양과학대학 해양의생명과학부
(690-756) 제주도 제주시 제주대학로 66

²한국해양과학기술원 남해연구소
(656-830) 경상남도 거제시 장목면 장목1길 41

Assessment of Immune Parameters of the Wild Pacific Oyster
(*Crassostrea gigas*) using a Flow Cytometry and
Neutral Red Retention Assay

Hyun-Ki Hong¹, Hyun-Sil Kang¹, Young-Ok Kim², and Kwang-Sik Choi^{1*}

¹School of Marine Biomedical Science (POST BK21) and Marine and Environmental Research Institute,
Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²South Sea Research Institute, KIOST
Geoje 656-830, Korea

Abstract : Hemocyte parameters of the wild Pacific oyster *Crassostrea gigas* inhabiting intertidal zones in small bays (Gwangyang and Jinhae Bay) on the southern coast of Korea were evaluated using flow cytometry and neutral red retention (NRR) assay. Morphological features, cell count, mortality, DNA damage, phagocytosis, and lysosomal membrane stability of hemocytes were analyzed. Three types of hemocytes were identified in the oyster hemolymph: granulocytes, hyalinocytes, and blast-like cells. Immune related functions of hemocyte including phagocytosis and lysosomal membrane stability were significantly different among the study areas ($P < 0.05$), while cell count, mortality, and DNA damage of hemocytes were not significantly different. In Gwangyang Bay, phagocytosis of granulocytes and lysosomal membrane stability of oyster hemocytes inhabiting inside bay were significantly lower than those of oyster hemocytes in outside bay ($P < 0.05$), indicating that oysters in inside bay of Gwangyang were relatively suppressed the immunological function in hemocytes. Contrary to Gwangyang Bay, immune parameters of oyster hemocytes in Jinhae Bay not showed the difference between sampling sites. In conclusion, flow cytometry and NRR assay using oyster hemocyte has a powerful tool to investigate the cell level in a short time due to no-preprocessing of material.

Key words : *Crassostrea gigas*, flow cytometry, neutral red retention assay, hemocyte, DNA damage, phagocytosis, lysosomal membrane stability

*Corresponding author. E-mail : skchoi@jejunu.ac.kr

1. 서 론

자연산 굴류는 조간대의 암반에 부착하여 생활하는 고착성 동물로서 해수 내 부유물을 여과 섭취하여 오염물질들을 체내에 농축하는 정도가 높으며 환경변화에 대해 생리적 안정상태(homeostasis)를 유지하기 위한 다양한 생물·생리학적 변화를 나타낸다. 그러므로 자연산 굴류의 건강도를 측정하여 해양환경의 장·단기적 변화를 파악하고, 환경 오염이 심각할 시 이들을 통해 간접적인 피해까지 유추해 볼 수 있다. 그 예로, 미국 국립 해양 대기청(National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA)은 1986년부터 굴과 담치류를 지표종으로 이용하여 “Mussel Watch Program”이라는 대규모 해양환경 모니터링을 실시하고 있다.

해산 이매패류의 건강도를 평가하는 방법으로는 비만도(condition index) 조사(Pampanin et al. 2005; Uddin et al. 2007; Park et al. 2008; Chávez-Villalba et al. 2010), 조직병리학적(histopathology) 관찰(Ngo et al. 2003, 2004; Gorinstein et al. 2008; Park et al. 2008; Yang et al. 2010), 소화맹낭위축도(digestive gland atrophy) 조사(Winstead et al. 1995; Kang et al. 2010), 체조성분(biochemical composition) 분석(Dridi et al. 2007; Kang et al. 2007, 2011; Li et al. 2010), 혈구 면역력 측정(Soudant et al. 2004; Park et al. 2006; Novas et al. 2007; da Silva et al. 2008; Flye-Sainte-Marie et al. 2009; Hégaret et al. 2009, Li et al. 2010) 등의 다양한 방법이 이용되고 있다.

해산 이매패류는 체액성 인자(humoral effectors)들과 혈구(hemocyte)로 구성된 선천 면역 시스템(innate immune system)을 보유하고 있으며, 혈구는 모든 조직세포 사이를 자유롭게 순환하며 내부 면역 외에도 영양분의 소화와 이동, 폐각과 조직의 수선, 분비 등에 관여를 하며 생리적 안정상태를 유지하기 위해 다양한 변화를 나타낸다(Cheng 2000; Chu 2000). 특히, 오염 물질의 유입이 해산 이매패류의 혈구의 기능을 저하시킨다는 결과가 여러 연구들에서 보고되고 있다. 예를 들어, 구리(Pipe and Coles 1995; Matozzo et al. 2001), 카드뮴(Auffret et al. 2002), Xenobiotics(Brousseau et al. 2000; Sauvé et al. 2002), Polychlorinated biphenyl(PCBs; Liu et al. 2009) 및 Tributyltin(TBTs; Fisher et al. 1990)에 노출된 해산 이매패류 혈구의 주요 면역 작용인 식세포능(phagocytosis)이 저하되었다. 또한 중금속 외에도 해상에 원유 유출 사고로 인해 해산 이매패류의 혈구 기능들이 저하된 연구들도 있다. 1996년 영국 Wales 해안에서 발생한 Sea Empress 유류 유출로 인해 진주담치(*Mytilus edulis*)는 혈구의 식세포 능력과 과산화 이온(superoxide anion) 생산력이 줄어들었

으며(Dyrynda et al. 2000), 2002년 스페인에서 발생한 Prestige 유류 유출 사고로 지중해담치(*M. galloprovincialis*)의 혈구 내 일산화질소(nitric oxide) 생산이 감소되었다(Novas et al. 2007). 이러한 연구 결과들을 바탕으로 해산 이매패류 혈구의 구조적 특징과 기능들의 변화 조사는 해양환경의 변화를 조기에 진단하고 모니터링할 수 있는 유용한 분석 바이오마커(biomarker)임을 시사한다.

광양만은 섬진강, 동천, 주교천 등에서 담수가 유입되는 하구형 지역으로 대규모의 석유화학단지, 산업단지, 제철소 등이 조성됨에 따라 산업폐수를 포함한 다양한 육상 오염물질들이 유입된다. Hong et al. (2011)은 광양만의 해수, 퇴적물 및 저서동물 내의 PCBs 농도를 측정하고, 육상과 인접한 내만(inner bay) 지역이 외만(outer bay) 지역보다 PCBs의 농도가 높음을 보고하였다. 진해만은 내만형 지역으로 마산, 진해, 부산 등지에서 주거오수가 유입되는 지역이다. Hong et al. (2009)는 진해만(마산만)과 프랑스 Thau lagoon의 퇴적물과 지중해담치(*M. galloprovincialis*) 내의 다이옥신류인 polychlorinated dibenzo-p-dioxins(PCDDs)와 polychlorinated dibenzofurans(PCDFs), 브롬계 난연제(flame retardant)의 일종인 polybrominated diphenyl ethers(PBDEs), 그리고 nonylphenol류 물질들을 조사 비교한 결과, 진해만이 Thau lagoon보다 그 오염도가 높은 것으로 확인되었다. 다양한 외래 오염 물질 유입에 의한 광양만과 진해만의 해양생태계 변화를 진단, 평가하는 기술을 개발하여 해양생태계 정보를 공급하기 위한 기초연구로, 이 연구에서는 광양만과 진해만에 서식하는 자연산 참굴의 세포성 면역을 담당하는 혈구의 기능들을 신속, 정확하게 측정할 수 있는 방법을 최적화하여 해산이매패류 건강성 평가를 위한 분석법으로 제시하고자 한다. 광양만과 진해만의 안쪽과 바깥쪽에 서식하는 자연산 참굴의 혈구를 유세포 분석기를 이용하여 형태학적 특성에 따라 종류를 분류하고, 혈구 종류별 수, 사멸률, DNA 손상도, 식세포 작용 능력을 측정하였다. 또한, Neutral Red Retention(NRR) assay를 이용하여 혈구의 lysosomal membrane stability를 측정하였다.

2. 재료 및 방법

시료 채집

실험에 사용된 참굴은 2011년 6월 남해 광양만의 섬진대교(내만)와 평산리(외만), 진해만의 광도면(내만)과 덕곡리(외만)의 총 4 지역에서 채집되었다(Fig. 1). 채집 지역의 조간대 암반에 부착되어 있는 참굴 중 크기가 큰 개체들을 대상으로 채집을 하였다. 채집한 굴은 즉시 실험실로 옮겨와 채집 지역과 동일한 수온과 염분의 해수에 24시간 동안 순치하여 채집과 운송 도중에 발생할 수 있는 스트

Fig. 1. Location of sampling sites. SJ, Seomjin bridge; PS, Pyeongsan-ri; GD, Gwangdo-myeon; DK, Deokgok-ri

레스를 최소화하였다.

비만도(Condition Index, CI) 측정

지역 별로 30개의 개체를 무작위로 선별한 후, 각장(shell length)을 측정하고 총 부피(total volume)를 측정하였다. 굴을 개각 후 조직과 패각을 분리하고 조직의 습중량(tissue wet weight)과 패각의 부피(shell volume)를 측정하였다. 참굴의 전반적인 생리상태를 조사하기 위하여 다음과 같이 비만도를 계산하였다.

$$\text{비만도} = \text{조직 습중량} / \text{패각 내 부피} (\text{총 부피} - \text{패각 부피})$$

혈림프액(hemolymph) 채집

비만도 측정이 끝난 굴을 개각 후 즉시 패각근으로부터 22G" 1/2의 주사바늘을 이용하여 혈림프액을 채집한 후 응집을 방지하기 위하여 얼음에 보관된 1.5 ml 튜브로 옮겼다. 혈림프액은 지역별로 30개의 개체를 분석에 사용하였으며, 분석에 필요한 700 μ l의 혈림프액을 취하기 위해 2-3개체의 혈림프액을 혼합하여 사용하였다.

혈구 종류(Hemocyte type) 분류와 혈구 수(Hemocyte count)

혈림프액 중 혈구 형태별 세포를 분류하기 위하여 DNA의 이중가닥에 부착할 수 있는 형광색소인 SYBR Green I(Sigma-Aldrich, USA)을 이용하였다. 150 μ l의 혈림프액을 동일량의 3% 포르말린에 고정시킨 후, 1,000 $\times$ SYBR green I(final dilution=10 $\times$)을 첨가하여 실온의 암실에서 90분간 반응시켰다. 유세포 분석기(FACS Calibur flow cytometer, Becton-Dickinson, USA)의 FL-1 detector를 이용하여 SYBR green I에 염색된 세포들만을 선택하

였다. 선택된 혈구들은 유세포 분석기의 Forward Scatter (FSC)와 Side Scatter(SCC)를 이용하여 세포의 크기와 내부 밀도에 따라 혈구의 종류를 분류하고 각 종류 별 구성 비율을 측정하였다.

혈림프액 중의 총 혈구의 수를 측정하기 위하여 총 10,000개의 세포를 계수한 시간을 기록하였다. 혈림프액 1 ml 당 혈구의 수를 계산한 식은 다음과 같다.

$$\text{총 혈구 수} = 10,000 / (A \times B) \times 2$$

여기에서 A는 10,000개의 혈구세포를 측정한 시간이며, B는 1분당 유세포 분석기의 유속, 2는 회석배수이다. 총 혈구 수에 대한 혈구 종류별 구성 비율을 계산하여 혈림프액 중 혈구 종류별 수를 계산하였다.

혈구 사멸률(Hemocyte mortality)

혈구 사멸률 측정은 DNA 이중가닥에 부착은 하지만 세포막을 통과하지 못하여 세포막이 불안정화된 세포들에만 염색되는 Propidium Iodide(PI; Sigma-Aldrich, USA)를 이용하였다. 150 μ l의 혈림프액을 동일량의 항응고제(Anti-aggregant solution, containing 2.5% NaCl and 1.5% EDTA in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)와 3 μ l의 PI(1 mg/ml; final concentration=20 μ g/ml)를 혼합한 후 4°C의 암실에서 10분간 반응을 시켰다. 유세포 분석기의 FL-3 detector를 이용하여 PI에 과하게 염색된 혈구만을 선택한 후 전체 혈구에 대한 비율을 계산하여 혈구 사멸률로 나타내었다.

혈구 DNA 손상도(Hemocyte DNA damage)

150 μ l의 혈림프액에 차가운 900 μ l의 absolute ethanol과 혼합 후 -20°C에서 24시간 동안 permeabilization을 시

켰다. 다음날 반응액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 제거하고 PBS로 2회에 걸쳐 세척하였다. 세척이 끝난 후 1 ml의 PBS와 5 μ l의 RNase(10 mg/ml)를 첨가하여 30분 동안 RNA를 제거하고 PI(final concentration=50 μ g/ml)와 실온의 암실에서 30분간 반응시켰다. 유세포 분석기의 FSC/SSC dot plot에서 혈구 세포만을 선택한 후 FL-3/Count histogram에서 cell cycle을 작성하였다. DNA가 손상되어 절편된 sub G0-G1 부분에 해당되는 혈구를 선택하여 전체 혈구에 대한 비율로 계산하였다.

혈구 식세포율(Phagocytosis rate)

혈구 식세포율을 측정하기 위하여 형광 bead(fluorescent bead; 2.0 μ m diameter, Polyscience Inc.)를 이용하였다. 150 μ l의 혈림프액을 동일량의 멸균된 해수와 희석한 후, 30 μ l의 희석된 2% 형광 bead를 첨가하여 실온의 암실에서 120분간 식세포 작용을 유도하였다. FSC/FL-1 dot plot에서 형광 bead를 식작용한 혈구들만을 선택하여 FL-1/Count histogram에서 형광 bead를 3개 이상 식작용한 혈구들을 선택한 후, 전체 혈구 수에 대한 비율을 계산하여 phagocytosis index로 나타내었다.

혈구의 lysosomal membrane stability

혈구의 lysosomal membrane stability를 측정하기 위하여 lysosome을 특이적으로 염색할 수 있는 Neutral Red (Sigma-Aldrich, USA)를 이용하였다. 100 μ l의 혈림프액을 100 μ l의 항응고제와 100 μ l의 neutral red solution (200 μ g/ml)과 혼합하여 실온의 암실에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 15분마다 현미경 하에서 시료당 25개의 혈구를 무작위로 관찰하고, 그 중에서 50% 이상의 혈구의 lysosome membrane이 불안정화되어 neutral red가 빠져나가기 시작하는 시간을 측정하였다.

생식소 발달 단계(Gonad developing stage)

참굴의 생식소 발달 단계에 따른 혈구 기능들에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈구 채집이 끝난 참굴 조직을 약 3 mm 두께로 cross-section한 후 Davidson's solution에 48시간 동안 고정시켰다. 고정이 끝난 시료는 에탄올을 이용하여 탈수한 다음 파라핀으로 포매하였다. 포매된 조직 시료는 마이크로톰을 이용하여 6 μ m 두께로 박절하여 Harris' Haematoxyline과 Eosin Y로 염색하였다. Ngo et al. (2003)의 방법에 따라 광학현미경 하에서 참굴의 생식소 발달단계를 Stage 0(미분화기, indifferent stage), Stage 1(발달기, developing stage), Stage 2(완숙기, ripe stage), Stage 3(산란기, spawning stage), Stage 4(산란후기, spent stage)의 5단계로 구분하였다. 혈구 분석에 암, 수의 구분 없이 혈림프액을 혼합하여 사용하였기 때문에 생식소 지

수(Gonadal Index, GI)는 암, 수를 합쳐서 나타내었다.

통계 처리

모든 조사항목에 대한 지역간 차이를 조사하기 위하여 one-way ANOVA test 후, 95%의 신뢰수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 또한 각 항목간 상관관계는 Pearson's correlation coefficient를 분석하여 $P < 0.05$ 인 경우 유의성 있는 관계로 간주하였다.

3. 결 과

참굴의 각장과 비만도

이 연구에 사용한 참굴의 각장과 비만도의 평균값과 표준편차(standard deviation, SD)는 Table 1과 같다. 참굴의 각장은 덕곡리가 80.9 ± 9.8 mm으로 가장 컸으며 광도면(66.5 ± 8.5 mm), 평산리(55.8 ± 7.4 mm), 섬진대교(46.7 ± 5.4 mm)의 순으로 네 지역 간에 유의적인 차이가 있었다($P < 0.05$). 참굴의 비만도는 광도면이 0.650 ± 0.208 으로 가장 높았으며 평산리가 0.539 ± 0.106 , 덕곡리가 0.381 ± 0.085 , 섬진대교가 0.289 ± 0.114 순으로 네 지역 간에 유의적인 차이가 있었다($P < 0.05$).

혈구 집단 별 구조적 특징

유세포 분석기를 이용한 참굴 혈구내 세포 형태, 크기 및 내부 밀도에 따라 granulocytes, hyalinocytes, blast-like cells의 3가지 종류로 구분되었다(Fig. 2A). 이렇게 분류된 혈구 집단내 세포 종류의 구성비는 hyalinocytes의 비율이 평균 67% 이상으로 가장 많았으며, granulocytes가 평균 16%이며 blast-like cells은 평균 6.4%로 가장 적었다. 지역 별 혈구의 수를 비교해본 결과 모든 혈구 집단에서 유의적인 차이가 없었다(Fig. 2B). Granulocytes는 섬진대교, 평산리, 광도면, 덕곡리에서 측정된 세포수(평균값 $\pm$

Table 1. Shell length (SL) and Condition index (CI) of the wild *Crassostrea gigas* collected from Seomjin bridge (SJ), Pyeongsan-ri (PS), Gwangdo-myeon (GD), and Deokgok-ri (DG). N, number of sample. SD, standard deviation. Different letters (a-d) in the mean values columns represent significant differences among sampling sites (ANOVA, $P < 0.05$)

Location	N	SL (mm) $\pm$ SD	CI $\pm$ SD
SJ	30	$46.7^d \pm 5.4$	$0.289^d \pm 0.114$
PS	30	$55.8^c \pm 7.4$	$0.539^b \pm 0.106$
GD	30	$66.5^b \pm 8.5$	$0.650^a \pm 0.208$
DG	30	$80.9^a \pm 9.8$	$0.381^c \pm 0.085$

Fig. 2. Hemocyte type (A) and counts (B) of the wild *Crassostrea gigas*. Three populations of hemocytes were distinguished: granulocytes, hyalinocytes and blast-like cells. Number of hemocytes populations were not significantly different among sampling sites. SJ, Seomjin bridge; PS, Pyeongsan-ri; GD, Gwangdo-myeon; DG, Deokgok-ri

표준편차)는 각각 $306,547 \pm 436,639$ cells/ml, $154,772 \pm 104,760$ cells/ml, $166,012 \pm 88,367$ cells/ml, $137,833 \pm 21,947$ cells/ml였다. Hyalinocytes의 세포수는 섬진대교, 평산리, 광도면, 덕곡리에서 각각 $1,141,795 \pm 1,610,196$ cells/ml, $748,424 \pm 581,030$ cells/ml, $1,163,151 \pm 243,497$ cells/ml, $445,166 \pm 178,929$ cells/ml였다. 세포의 크기가 가장 작은 blast-like cells의 세포수는 섬진대교, 평산리, 광도면, 덕곡리에서 각각 $81,816 \pm 47,927$ cells/ml, $59,397 \pm 44,596$ cells/ml, $83,915 \pm 62,146$ cells/ml, $49,553 \pm 25,925$ cells/ml였다.

혈구 사멸률과 DNA 손상도

혈구 사멸률과 DNA 손상도는 지역 간의 유의적 차이가 없었다(Fig. 3). 혈구 사멸률(평균값 $\pm$ 표준편차)은 섬진대교, 평산리, 광도면, 덕곡리에서 각각 $4.4 \pm 1.9\%$, $6.2 \pm 3.0\%$, $4.8 \pm 3.2\%$, $5.1 \pm 1.9\%$ 였다. 혈구 DNA 손상도(평균

값 $\pm$ 표준편차)는 섬진대교, 평산리, 광도면, 덕곡리에서 각각 $14.5 \pm 8.2\%$, $10.9 \pm 9.5\%$, $10.8 \pm 6.6\%$, $18.5 \pm 11.3\%$ 였다.

혈구 식세포율

혈구 집단 별 형광 bead를 식작용 할 수 있는지 조사한 결과, granulocytes와 hyalinocytes는 식작용을 하는 반면 blast-like cells는 식작용을 하지 못했다(Fig. 4A, B). Granulocytes는 hyalinocytes 보다 평균적으로 2-3배 높은 활발한 식작용 활성을 보였다(Fig. 4C). 지역 간 혈구 식작용 활성의 차이를 조사한 결과, granulocytes의 식작용은 평산리의 참굴 혈구가 $64.8 \pm 12.6\%$ (평균값 $\pm$ 표준편차)로 유의적으로 가장 높았으며($P < 0.05$), 광도면이 $63.2 \pm 10.5\%$, 덕곡리가 $53.4 \pm 10.6\%$, 섬진대교가 $52.5 \pm 12.7\%$ 로 조사되었다. Hyalinocytes의 식작용 능력은 섬진대교, 평산리, 광도면, 덕곡리에서 $20.5 \pm 4.1\%$, $19.0 \pm 4.9\%$, $20.1 \pm 4.7\%$, $21.2 \pm 3.4\%$ 로 지역 간의 유의적 차이가 없었다.

Fig. 3. Hemocyte mortality (A) and DNA damage (B) of the wild *Crassostrea gigas*. Mortality and DNA damage of hemocytes were not significantly different among sampling sites. SJ, Seomjin bridge; PS, Pyeongsan-ri; GD, Gwangdo-myeon; DG, Deokgok-ri

Fig. 4. Flow cytometry determination of the wild *Crassostrea gigas* hemocytes phagocytosis capacities. (A) Size against internal complexity dot plot of hemocytes associated (black smear) or not (grey smear) with fluorescent microbeads. (B) Fluorescence intensity against internal complexity density plot allowed determination of phagocytosis index (M1) for each hemocyte population. (C) Phagocytosis index of *C. gigas* hemocytes populations. Different letters (a,b) in the mean values columns represent significant differences among sampling sites (ANOVA, P<0.05). SJ, Seomjin bridge; PS, Pyeongsan-ri; GD, Gwangdo-myeon; DG, Deokgok-ri

Fig. 5. Neutral red retention time of the wild *Crassostrea gigas*. Different letters (a,b) in the mean values columns represent significant differences among sampling sites (ANOVA, P<0.05). SJ, Seomjin bridge; PS, Pyeongsan-ri; GD, Gwangdo-myeon; DG, Deokgok-ri

혈구의 lysosomal membrane stability

혈구의 lysosome membrane이 불안정화 되어 neutral red가 lysosome membrane으로부터 빠져 나오는 시간을 조사한 결과는 Fig. 5와 같으며, retention time이 짧을수록 혈구의 lysosomal membrane이 상대적으로 불안정 함을 의미한다. 조사결과, 섬진대교의 참굴 혈구의 유지 시간이 53.3 ± 17.2 분(평균값 $\pm$ 표준편차)으로 가장 짧았으며 광도면에서 76.0 ± 15.8 분으로 가장 길었다(ANOVA, P<0.05). 평산리와 광도면에서는 각각 70.0 ± 15.1 분과 76.0 ± 15.8 분으로 조사되었다.

혈구 parameter들 간의 상관관계

이 연구에서 조사한 참굴의 각장, 총 습중량 및 혈구 parameter들 간의 상관관계를 분석하여 Table 2에 나타냈다. 참굴의 각장과 총 습중량은 서로 양(+)의 상관관계가 있었으나, 혈구 parameter들과의 상관관계는 보이지 않았다. 세 종류의 혈구 집단들의 총 수는 각자 서로 양(+)의 상관관계를 보였으며, 다른 항목들과는 상관관계가

Table 2. Correlation coefficients among the hemocyte parameters of the *Crassostrea gigas* collected in this study. P<0.05 was regarded as significant correlation. Gr_Count, granulocytes count; Hy_Count, hyalinocytes count; BL_Count, blast-like cells count; MOT, mortality; DDM, DNA damage; Gr_PHG, granulocytes phagocytosis; Hy_PHG, hyalinocytes phagocytosis; NRR, neutral red retention time

Parameters	Gr_Count		Hy_Count		BL_Count		MOT		DDM		Gr_PHG		Hy_PHG	
	Coefficient	P	Coefficient	P	Coefficient	P	Coefficient	P	Coefficient	P	Coefficient	P	Coefficient	P
Hy_Count	0.895	<.0001	-	-										
BL_Count	0.638	<.0001	0.701	<.0001	-	-								
MOT	-0.161	0.348	-0.120	0.487	0.251	0.139	-	-						
DDM	-0.213	0.234	-0.267	0.133	-0.018	0.920	0.376	0.031	-	-				
Gr_PHG	-0.171	0.312	-0.005	0.978	0.086	0.611	-0.055	0.748	-0.457	0.007	-	-		
Hy_PHG	-0.010	0.951	0.028	0.870	-0.058	0.732	-0.387	0.020	-0.226	0.198	0.379	0.016	-	-
NRR	-0.280	0.134	-0.144	0.447	-0.236	0.210	-0.211	0.271	-0.093	0.633	0.456	0.009	-0.103	0.576

Fig. 6. Gonadal Index (GI) of the wild *Crassostrea gigas*. 0, indifferent stage; 1, developing stage; 2, ripe stage; 3, spawning stage; 4, spent stage. GI were not significantly different among sampling sites. SJ, Seomjin bridge; PS, Pyeongsan-ri; GD, Gwangdo-myeon; DG, Deokgok-ri

없었다. 혈구 사멸률은 DNA 손상도와 양(+)의 관계, hyalinocytes의 식세포율과는 음(-)의 관계가 관찰되었다. DNA 손상도는 granulocytes의 식세포율과 음(-)의 상관관계가 있었다. Granulocytes의 식세포율은 hyalinocytes의 식세포율과 lysosomal membrane stability에 양(+)의 상관관계가 있었다.

생식소 지수

참굴의 생식소 지수(GI)는 Fig. 6과 같으며 네 지역 간의 생식소 지수는 유의적인 차이는 없었다. 덕곡리에서는 모든 개체에서 생식세포가 완숙한 시기로 GI는 2.0이었다. 섬진대교는 완숙기의 25개체와 발달기의 5개체가 관찰되어 GI는 1.8 ± 0.4 (평균값 $\pm$ 표준편차)였다. 평산리는 완숙기의 29개체와 발달기의 1개체로 GI는 2.0 ± 0.2 였다. 덕곡리는 완숙기의 26개체와 발달기의 4개체로 GI는 1.9 ± 0.4 였다.

4. 고 찰

유세포 분석기를 이용한 해산 이매패류 혈구 집단의 세포학적 특성 관찰

유세포 분석기는 유액 상태의 입자나 세포가 일정 감지 지역(sensing point)을 통과할 때 각각의 입자나 세포를 신속하게 측정하여 한 세포가 갖는 여러 특징(세포의 크기, 세포 내부 밀도, 세포 기능 등)을 동시에 측정할 수 있는 장비이다. 레이저 광원의 직진하는 빛을 통해 세포의 크기를 산란하는 빛의 정도에 따라 세포의 내부 밀도를 파악

한다. 또한, 일정 파장을 띄는 형광이 표시된 항체나 형광 염색소로 표시된 세포의 다양한 기능을 레이저 광원을 통해 측정할 수 있다. 이러한 특징들로 인하여 의학(Riley et al. 1998a; Givan 2001)과 수의학(MacKenzie and Pinder 1987; Raidal et al. 1998a, 1998b) 분야에서는 오래 전부터 유세포 분석기를 사용하고 있다. 해산 이매패류 분야에서도 1990년도 이후부터 유세포 분석기를 이용한 연구가 활발히 시작되어, Soudant et al. (2004)과 Fly-Sainte-Marie et al. (2009)는 바지락(*Ruditapes philippinarum*)의 혈구 기능의 연중 변화를 모니터링 하였다.

이 연구에서는 유세포 분석기를 이용하여 참굴의 혈구 집단을 분류하고, 이들의 면역 관련 기능들을 정량적으로 측정하여 참굴을 비롯한 해산이매패류 혈구의 세포성 면역기작 측정에 매우 유용한 tool임을 확인하였다. 특히, 이매패류는 종에 따라 혈구세포내 분포하는 혈구 집단이 다를 수 있어, 각 종의 고유한 면역학적 특성으로 설명될 수 있다. 해산 이매패류의 혈구 집단의 분류는 연구자에 따라 다소 차이가 있으나, 기본적으로 세포질 내 수많은 과립을 함유한 과립구(granulocytes)와 세포질 내 과립구가 없는 무과립구(agrulocytes 또는 hyalinocytes)로 나뉜다(Cheng 1984; Hine 1999). 과립구의 세부 분류는 균질한(homogeneous) 반면, 무과립구는 종에 따라 다양하게 나뉘어진다. 예를 들면, 대서양굴(*C. virginica*)과 유럽굴(*Ostrea edulis*)에서는 hyalinocytes의 크기에 따라 small hyalinocyte와 large hyalinocyte로 나뉘었으며(Ashton-Alcox and Ford 1998; Xue et al. 2001; Hégaret et al. 2003), 대서양굴(*C. virginica*)에서 intermediate cells(Goedken and DeGuise 2004), 참굴(*C. gigas*)에서 small hyalinocytes(Lambert et al. 2007; Labreuche et al. 2006), 바지락(*Tapes philippinarum*), Sydney rock oyster(*Saccostrea glomerata*)와 강굴(*C. ariakensis*)에서 blast-like cells이(Cima et al. 2000; Aladaileh et al. 2007; Donaghy et al. 2009a) 분류되었다. 이번 연구에서 유세포 분석기를 이용하여 분석된 자연산 참굴 혈구 내 혈구 세포의 구성은 세포의 크기와 내부 밀도에 따라 granulocytes, hyalinocytes와 blast-like cells의 세 가지 형태로 분류하였다(Fig. 2A). 분류된 세 종류의 혈구 집단내 구성 비율은 조사 지역 간에 차이는 있었지만 hyalinocytes가 평균 63.1-75.9% 이상으로 가장 높은 비율을 차지하였고, granulocytes가 평균 10.8-19.2%, blast-like cells이 5.5-8.2%로 혈구 내 가장 낮은 구성 비율을 나타냈다. 이 결과를 Delaport et al. (2001)이 조사한 참굴 혈구 집단의 구성 비율(granulocytes: 14-23%, hyalinocytes: 63-74%)과 비교시 자연산 참굴 혈구의 hyalinocytes의 비율은 비슷한 범위를 나타냈지만, granulocytes의 구성 비율은 다소 낮았다. 이와 달리, Donaghy et al. (2010)은 2007년 한국의 서해안

에 Hebei spirit호 유류 유출 사고 2년이 지난 후, 유출 지역인 태안 신두리와 대조구 지역인 인천 중현의 양식산 참굴의 혈구 집단별 구성 비율을 조사하여 hyalinocytes > blast-like cells > granulocytes의 분포도를 갖고 있다고 설명하였다. 이러한 혈구내 집단 구성 비율의 차이는 조건대 암반에 부착하여 서식하는 자연산 참굴과 수하식으로 양식(suspended culture)되는 참굴간의 양식에 따른 성장과 크기의 차이, 자연산 참굴 채집 시기가 여름철인 반면, 양식산 참굴의 채집 시기는 겨울철로 계절별 영향에 의한 차이일 수도 있으므로 정확한 원인을 파악하기 위해서는 자연산과 양식산 참굴의 계절별 혈구 집단 구성의 변동에 관한 추가적인 연구가 필요하다.

혈림프액 안에 존재하는 혈구의 수를 파악하기 위해서는 일반적으로 광학현미경 하에서 혈구 계수기(hemocytometer)를 이용하여 세포수를 계수한다. 그러나 세포의 DNA 이중 가닥에 결합하는 형광염색 시약인 SYBR green I를 처리하면, 유세포 분석기로 시약에 염색된 혈구 세포만을 선택하여 혈림프액 내 혈구의 수를 측정할 수 있다(Choquet et al. 2003). 이 연구에서는 유세포 분석기를 이용하여 총 혈구 수를 측정하고 혈구 집단의 구성 비율에 따라 계산한 결과, 참굴의 혈림프액내 실제로 존재하는 혈구 집단 별 수는 지역 간에 유의적 차이가 없었다(Fig. 2B). 세 혈구 집단의 수를 합한 총 혈구 수는 Donaghy et al. (2010)이 2009년 1월에 태안과 인천에서 채집한 양식산 참굴의 총 혈구 수(태안: 평균 345,233 cells/ml, 인천: 평균 401,201 cells/ml)보다 적게는 2배에서 많게는 4배 가량 많았다. 바지락(*R. philippinarum*)의 경우에는 총 혈구 수가 봄과 여름철에는 증가하다가 가을과 겨울철이 되면 감소하는 경향을 보였다(Soudant et al. 2004; Flye-Saint-Marie et al. 2009). Donaghy et al. (2009b)는 가을과 겨울철에 바지락의 총 혈구 수가 줄어드는 이유를 두 가지의 가설을 이용하여 설명하였다. 첫 번째는, 가을과 겨울철에 먹이 부족으로 인하여 세포 분열에 필요한 충분한 에너지가 제공되지 못하게 됨으로써, 새로운 혈구의 생산이 줄어들게 되어 혈구의 수가 감소한다는 것이다. 두 번째는, 저수온과 먹이부족으로 인하여 혈구가 영양분의 운반과 소화와 같은 영양학적 활동(nutritional activities)이 감소하게 됨으로써 혈구의 수가 감소한다는 것이다. 그러므로 겨울철인 1월에 채집을 한 Donaghy et al. (2010) 연구에서의 참굴 혈구 수는 여름철인 6월에 채집을 한 이번 연구의 참굴 혈구 수보다 적은 것으로 사료된다. 또한 해산 이매패류의 혈구의 수는 오염 물질의 유입에 따라 증가하거나 감소한다. 구리(Cu)에 노출된 *M. edulis*(Pipe and Coles 1995; Pipe et al. 1999)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*(Oweson and Hernroth 2009)에서는 총 혈구 수가 감소하였다. 또한, 비오염 지역에 서식하던 *M. edulis*를 오염지역으로 이식하였을 때에도 총 혈구 수가 감소한다고 보고하였다(Mayrand et al. 2005). 이러한 연구 결과들과 같이 환경오염에 대한 혈구의 수가 서로 다르게 변동하는 것을 이해하기 위해서는 혈구의 증식과 이동에 대한 구체적인 연구가 필요하다.

환경스트레스에 의한 참굴 혈구의 면역학적 특성 변화

다양한 genotoxic chemical 등에 의하여 핵내 DNA 사슬의 염기가 탈락하는 손상이 발생한다(Lee and Steinert 2003). 이러한 DNA가 손상되는 정도를 측정하는 방법으로는 comet assay와 유세포 분석기가 일반적으로 사용되고 있다. Comet assay인 경우는 민감도가 높긴 하지만 유세포 분석기를 이용한 방법에 비해 시간과 비용이 많이 든다. 반면, 단일 세포의 핵내 DNA 이중 가닥에 부착할 수 있는 형광염색소 propidium iodide로 염색하여, 염색된 세포를 유세포 분석기로 측정하면 단시간에 세포내 핵산의 양과 DNA 손상도를 측정할 수 있다(Darzynkiewicz et al. 2004; da Silva et al. 2005; Grigoryan et al. 2007). Park et al. (2009)은 카드뮴에 노출시킨 바지락의 DNA 손상도를 유세포 분석기를 이용하여 측정한 결과, 대조구에 비해 노출된 바지락 혈구의 DNA 손상도가 증가함을 확인하였다. 이 연구에서는 참굴 혈구의 DNA 손상도가 지역 간의 유의적인 차이는 없었지만, 광양만의 내만인 섬진대교, 진해만의 외만인 덕곡리가 평균적으로 약 1.5배 높은 것으로 측정되었다. 그러므로 섬진대교와 덕곡리 지역의 genotoxicity가 평산리와 광도면보다 높은 것으로 판단된다. 혈구 DNA의 손상이 유발되면 apoptosis나 necrosis로 발전하게 되고 결국 혈구가 사망하게 된다(Lee and Steinert 2003). 이 연구에서도 참굴 혈구내 면역 인자들의 상관관계 비교시, 혈구의 사멸률과 DNA 손상도가 양(+)의 상관관계를 보여(Table 2), 오염 물질을 포함한 해양 환경 변화에 따른 참굴 혈구내 두 면역 인자들의 관계가 면역 기능에 중요한 요소임을 알려주고 있다.

이 연구에서는 세 종류의 혈구 집단 중 granulocytes와 hyalinocytes만이 식세포 작용을 하는 것으로 확인되었다. 그 중에서도 granulocytes가 hyalinocytes에 비해 약 3배 정도 활발한 식세포 작용을 하는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 *Mercenaria mercenaria*(Tripp 1992), *R. decussatus*(López et al. 1997), *C. virginica*(Goedken and De Guise 2004), *Bathymodiolus azoricus*(Bettencourt et al. 2009), *C. ariakensis*(Donaghy et al. 2009a)에서 조사된 이매패류들의 혈구세포 식세포 결과와 일치한다. 네 지역 간의 혈구의 식세포율은 hyalinocytes의 경우에는 유의적 차이가

없지만, granulocytes는 평산리가 유의적으로 가장 높았으며, 섬진대교와 덕곡리는 유의적으로 낮았다. 이외에도 해산 이매패류의 혈구 식세포율은 구리(Pipe and Coles 1995; Matozzo et al. 2001), 카드뮴(Auffret et al. 2002), xenobiotics(Brousseau et al. 2000; Sauvé et al. 2002), PCBs(Liu et al. 2009) 및 TBT(Fisher et al. 1990)에 노출 시 그 기능이 저하됨이 알려져 있다. 이 연구에서 조사지역 간의 중금속과 같은 오염물질의 농도 측정을 실시하지 않아 실질적인 오염정도를 확인할 수 없으나, 섬진대교와 덕곡리 지역 참굴의 낮은 식세포율은 환경적 스트레스로 인한 세포성 면역기능이 저하된 것으로 사료된다.

리소좀(lysosome)은 세포질 내에 존재하며 다양한 가수분해 효소를 함유하고 있어 불필요한 물질들을 소화하고 분해하는 기관이다(Luzio et al. 2007). 해양 생물에서 lysosome은 해독(detoxification)과 방어(defense) 작용에 중요한 역할을 한다(Moore 1980; Lowe et al. 1995a, 1995b). 이러한 기능들은 lysosome membrane stability에 따라 달라지므로, 세포막의 안정도를 측정하여 lysosome의 기능을 평가할 수 있다(Zhao et al. 2011). Neutral red는 친유기성(lipophilic) 화학물질로 세포의 세포막에 쉽게 침투할 수 있다(Lowe et al. 1992). Neutral red가 lysosome 내에 보존(retention)될 수 있는 효율은 lysosome 내의 pH에 의해 좌우되며, lysosome을 산성 상태로 유지시켜 주는 양성자 펌프(proton pump)에 의해 보존이 유지된다(Zhao et al. 2011). 그러므로 스트레스를 받지 않은 세포들은 오랜 시간 동안 neutral red를 가지고 있게 되지만, lysosome의 세포막이나 H^+ 이온 펌프가 불안정화되면 neutral red가 유출되게 된다. 이러한 원리를 이용하여 lysosome이 neutral red를 보유하고 있는 시간을 측정하는 neutral red retention(NRR) assay는 굴과 담치류에 다양한 스트레스가 미치는 영향을 조사하는 바이오 마커로 사용되고 있다(Lowe et al. 1995a, 1995b; Hauton et al. 1998, 2001; Cho and Jeong 2005; Zhang and Li 2006; Guidi et al. 2010). 이 연구에서는 네 지역간의 NRR 시간이 유의적인 차이가 있었으며, lysosomal membrane stability는 광도면의 참굴이 가장 높고, 섬진대교의 참굴이 가장 낮은 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 혈구 식세포율 조사 결과와 유사한 경향을 보였다.

참굴의 건강도, 생식소 발달 단계에 따른 혈구 면역 parameter들과의 상관관계

Flye-Saint-Marie et al. (2009)는 바지락(*R. philinarum*)의 크기는 식세포율과 혈구 사멸률에 음(-)의 상관 관계가 있다고 설명하였다. 이 연구에서는 채집 지역에 서식하는 참굴들 중 크기가 큰 개체들만 채집을 하였지만, 네 지역 간 참굴의 각장은 유의적인 차이가 있었다(Table 1). 그러

므로 시료의 크기나 나이에 따라 혈구 면역력의 차이가 발생할 수 있으므로, 혈구 분석 시 개체별 크기와 나이도 고려해야 할 것이다. 참굴의 비만도는 패각내 부피 중에 조직이 차지하는 정도를 나타냄으로써 참굴의 전반적인 생리상태를 유추할 수 있다. 이 연구에서 2-3개체의 혈림프액을 혼합하여 사용하였기 때문에 개체별 비만도와 혈구 측정값들과 비교를 할 수는 없었다. 그러나 지역 간의 차이를 조사하였을 때, 평산리와 광도면의 참굴보다 상대적으로 비만도가 낮은 섬진대교와 덕곡리의 참굴은 혈구의 식세포율과 lysosomal membrane stability가 낮았으며, DNA 손상도도 상대적으로 높았다. 그러므로 참굴의 비만도와 혈구 면역 기능들은 참굴의 생리상태를 평가하는데 중요하게 이용될 수 있을 것이다.

참굴을 비롯한 해산 이매패류는 생식세포가 발달한 후 산란을 하는 번식주기를 가진다. 특히, 산란활동은 상당한 에너지가 소요되는 활동으로(Gosling 2003), 산란 이후의 참굴은 혈구 식세포율, 항균력(antibacterial activity), lysosomal membrane stability가 감소한다(Cho and Jeong 2005; Li et al. 2010). 그러나, 이 연구에서 관찰된 참굴의 생식소 발달 단계는 대부분의 개체가 산란 전의 완숙기 상태로 일부 개체에서 생식세포 발달이 관찰되었지만, 생식소 지수는 지역간에 유의적 차이가 없었다. Gagnaire et al. (2006)의 연구에서는 생식세포를 형성하는 이배체(diploid) 참굴의 식세포능이 생식능력이 없는 삼배체(triploid) 참굴보다 낮았으며, 식세포능의 차이는 완숙기때 가장 컸음을 확인하였다. 또한, 이배체 굴은 생식세포를 형성하고 발달시키는 활동에 에너지를 소모하기 때문에 식세포 작용과 같은 혈구 기능에 필요한 에너지가 삼배체 굴에 비해 상대적으로 낮기 때문이라고 설명하였다. 따라서 참굴의 생식소 발달과 산란 활동이 참굴 혈구의 기능에 영향을 미칠 수 있으므로, 참굴의 혈구 기능 측정 시에는 개체별 번식상태를 고려해야 할 것이다.

5. 요 약

남해의 광양만과 진해만에 서식하는 자연산 참굴의 건강성 평가를 위해 세포성 면역을 담당하는 혈구의 기능들을 유세포 분석기와 Neutral Red Retention(NRR) assay를 이용하여 신속, 정확하게 측정하였다. 광양만과 진해만의 안쪽과 바깥쪽에 서식하는 자연산 참굴의 혈구를 유세포 분석기를 이용하여 형태학적 특성에 따라 혈구의 종류를 분류하고, 혈구 종류별 수, 사멸률, DNA 손상도, 식세포능을 측정하였다. 또한 NRR assay를 이용하여 혈구의 lysosomal membrane stability를 측정하였다. 참굴의 혈구는 granulocytes, hyalinocytes, blast-like cells의 세 가지 종류로 분류되었다. 조사 지역 간의 혈구의 수, 사멸률,

DNA 손상도는 유의적 차이가 없었지만, 식세포율과 lysosomal membrane stability와 같은 면역 관련 기능들은 유의적 차이가 있었다. 진해만은 내만과 외만 지역에 서식하는 참굴의 혈구 면역인자들 간에는 유의적 차이가 관찰되지 않았다. 이에 반해, 광양만에 서식하는 참굴은 내만 지역의 섬진대교가 외만 지역의 평산리 지역에 서식하는 참굴보다 낮은 식세포율과 낮은 lysosomal membrane stability를 보여 면역력이 저하되어 있는 것으로 추정된다. 하지만, 해양환경 변화와 시료의 면역력과의 상관관계를 이해하기 위해서는 조사지역의 환경적 특성이나 오염정도, 그리고 시료 내의 오염물질 축적량 등의 객관적인 분석 결과와의 종합적인 고찰이 필요할 것이다. 유세포 분석기와 NRR assay를 이용한 참굴 혈구 집단의 형태 변화 및 면역능 측정 기술은 시료의 전처리 없이 빠른 시간 내에 세포의 특성을 분석할 수 있는 유용한 분석 tool로 활용될 수 있음을 확인하였다.

사 사

이 연구는 한국해양연구원의 남해 특별관리해역 생태계 건강지수 개발(과제번호 PE98582: Development of Marine Ecosystem Health Index in the special management areas of the South Sea)의 지원에 의하여 수행되었으며, 지원에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

- Aladaileh S, Nair SV, Birch D, Raftos DA (2007) Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function. *J Invertebr Pathol* **96**:48-63
- Ashton-Alcox KA, Ford SE (1998) Variability in molluscan hemocytes: A flow cytometric study. *Tissue Cell* **30**:195-204
- Auffret M, Mujdzic N, Corporeau C, Moraga D (2002) Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Mar Environ Res* **54**:585-589
- Bettencourt R, Dando P, Collins P, Costa V, Allam B, Serrão Santos R (2009) Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Comp Biochem Phys B* **152**(2):278-289
- Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Fournier M (2000) Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology* **142**:145-156
- Chávez-Villalba J, Arreloa-Lizárraga A, Burrola-Sánchez S, Hoyos-Chairez F (2010) Growth, condition, and survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated within and outside a subtropical lagoon. *Aquaculture* **300**:128-136
- Cheng TC (1981) Bivalves. In: Ratcliffe NA, Rowly AF (eds) *Invertebrate blood cells*. Academic Press, London, pp 233-300
- Cheng TC (2000) Cellular defense mechanisms in oysters. In: Fingerman N, Nagabhushanam (eds) *Recent advances in marine biotechnology: Immunobiology and Pathology*. Science Publishers, Enfield, NH, pp 43-83
- Cho SM, Jeong WG (2005) Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **244**:383-387
- Choquet G, Soudant P, Lambert C, Nicolas JL, Paillard C (2003) Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Organ* **57**:109-116
- Chu FLE (2000) Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman N, Nagabhushanam R (eds) *Recent advances in marine biotechnology: Immunobiology and Pathology*. Science Publishers, Enfield, NH, pp 1-42
- Cima F, Marin MG, Matozzo V, Da Ros L, Ballarin, K (2000) Biomarkers for TBT immunotoxicity studies on the cultivated clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): Morphofunctional characterization. *Fish Shellfish Immun* **10**:677-693
- Coles JA, Farley SR, Pipe RK (1995) Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis Aquat Organ* **22**:59-65
- da Silva PM, Hégaret H, Lambert C, Wikfors GH, Le Goïc N, Shumway SE, Soudant P (2008) Immunological responses of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long-term exposure to the harmful algae, *Karenia selliformis*, and possible interactions. *Toxicon* **51**:563-573
- da Silva PM, Soudant P, Carballal MJ, Lambert C, Villalba A (2005) Flow cytometric DNA content analysis of neoplastic cells in haemolymph of the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis Aquat Organ* **67**:133-139
- Darzynkiewicz Z, Crissman H, Jacobberger JW (2004) Cytometry of the cell cycle: Cycling through history. *Cytom A* **58**:21-32
- Delaporte M (2001) Effet de la qualité lipidique du régime nutritif sur la composition des membranes des hémocytes de *C. gigas*. Impact sur les capacités de défense. Mémoire de fin d'études. Diplôme d'études approfondies Biologie et Productions Animales, Option: Biologie Aquacole (Ms dissertation) Université Rennes I—Ecole

- Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, 36 p
- Donaghy L, Hong HK, Lee HJ, Jun JC, Park YJ, Choi KS (2010) Hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* a year after the Hebei Spirit oil spill off the west coast of Korea. *Helgoland Mar Res* **64**(4): 349-355
- Donaghy L, Kim BK, Hong HK, Park HS, Choi KS (2009a) Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Sumino oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Fish Shellfish Immun* **27**:296-301
- Donaghy L, Lambert C, Choi KS, Soudant P (2009b) Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquaculture* **297**:10-24
- Dridi S, Romdhane MS, Elcafsi M (2007) Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture* **263**:238-248
- Dyrynda EA, Law RJ, Dyrynda PEJ, Kelly CA, Pipe RK, Ratcliffe NA (2000) Changes in immune parameters of natural mussel *Mytilus edulis* populations following a major oil spill ('Sea Empress', Wales, UK). *Mar Ecol- Prog Ser* **206**:155-170
- Fisher WS, Oliver LM, Winstead JT, Long ER (2000) A survey of oyster *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: Association of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat Toxicol* **51**:115-138
- Fisher WS, Wishkovsky A, Chu FLE (1990) Effects of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes. *Arch Environ Con Tox* **19**:354-360
- Flye-Sainte-Marie J, Soudant P, Lambert C, Le Goïc N, Goncalvez M, Travers MA, 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
- Gagnaire B, Soletchnik P, Madec P, Geairon P, Le Moine O, Renault T (2006) Diploid and triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunber) at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture* **254**:606-616
- Givan AL (2001) *Flow Cytometry: First Principles*, 2nd ed. Wiley-Liss, Somerset, 273 p
- Goedken M, De Guise S (2004) Flow cytometry as a tool to quantify the oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immun* **16**:539-552
- Gorinstein S, Leontowicz M, Leontowicz H, Namiesnik J, Jastrzebski Z, Drzewiecki J, Park YS, Ham KS, Heo BG, Trakhtenberg S (2008) Influence of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from polluted and non-polluted area on some atherosclerosis indices in rats fed cholesterol. *Food Chem* **111**:381-386
- Gosling E (2003) Reproduction, settlement and recruitment In: Elizabeth G (ed) *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. Blackwell Science, UK, pp 131-168
- Grigoryan RS, Yang B, Keshelava N, Barnhart JR, Reynolds CP (2007) Flow cytometry analysis of single-strand DNA damage in neuroblastoma cell lines using the F7-26 monoclonal antibody. *Cytom Part A* **71**:951-960
- Guidi P, Frenzilli G, Benedetti M, Bernardeschi M, Falleni A, Fattorini D, Regoli F, Scarcelli V, Nigro M (2010) Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. *Aquat Toxicol* **100**:75-83
- Hauton C, Hawkins LE, Hutchinson S (1998) The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L). *Comp Biochem Phys B* **119**:619-623
- Hauton C, Hawkins LE, Hutchinson S (2001) Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L). *Fish Shellfish Immun* **11**:143-153
- Hégaret H, da Silva P, Sunila I, Shumway SE, Dixon MS, Alix J, Wikfors GH, Soudant P (2009) Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *J Exp Mar Biol Ecol* **371**:112-120
- Hégaret H, Wikfors GH, Soudant P (2003) Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oyster, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation I. Hemocyte type and morphology. *J Exp Mar Biol Ecol* **293**:237-248
- Hégaret H, Wikfors GH, Soudant P, Delaporte M, Alix JH, Smith BC, Dixon MS, Quéré C, Le Coz JR, Paillard C, Moal J, Samain JF (2004) Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed microalgal diets experimentally varied in both quantity and quality, before and after a sudden temperature elevation. *Aquaculture* **234**:541-560
- Hine PM (1999) The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immun* **9**:367-385
- Hong SH, Kannan N, Yim UH, Choi JW, Shim WJ (2011) Polychlorinated biphenyls (PCBs) in a benthic ecosystem in Gwangyang Bay, South Korea. *Mar Pollut Bull* **62**: 2863-2868

- Hong SH, Munschy C, Kannan N, Tixier C, Tronczynski J, Héas-Moisán K, Shim WJ (2009) PCDD/F, PBDE, and nonylphenol contamination in a semi-enclosed bay (Masan Bay, South Korea) and a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Chemosphere* **77**:854-862
- Kang CK, Kang YS, Choy EJ, Kim DS, Shim BT, Lee PY (2007) Condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of the Manila clam, *Tapes philippinarum* in natural and newly created sandy habitats of the southern coast of Korea. *J Shellfish Res* **26**:401-412
- Kang DH, Chu FL, Yang HS, Lee CH, Koh HB, Choi KS (2010) Growth, reproductive condition, and digestive tubule atrophy of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Gamakman Bay off the southern coast of Korea. *J Shellfish Res* **29**(4):839-845
- Kang CK, Choy EJ, Lee WC, Kim NJ, Park HJ, Choi KS (2011) Physiological energetics and gross biochemical composition of the ascidian *Styela clava* cultured in suspension in a temperate bay of Korea. *Aquaculture* **319**:168-177
- Labreuche Y, Lambert C, Soudant P, Boulo V, Huvet A, Nicolas JL (2006) Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microb Infect* **8**:271-2724
- Lambert C, Soudant P, Dégremont L, Delaporte M, Moal J, Boudry P, Jean F, Huvet A, Samain JF (2007) Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture* **270**:276-288
- Lee RF, Steinert S (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res-Rev Mutat* **544**:43-64
- Li Y, Qin JG, Li X, Benkendorff K (2010) Assessment of metabolic and immune changes in postspawning Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Identification of a critical period of vulnerability after spawning. *Aquac Res* **1**:1-11
- Liu J, Pan LQ, Zhang L, Miao J, Wang J (2009) Immune responses, ROS generation and the hemocyte damage of scallop *Chlamys farreri* exposed to Aroclor 1254. *Fish Shellfish Immun* **26**:422-428
- López C, Carballal MJ, Azevedo C, Villalba A (1997) Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *J Invertebr Pathol* **69**:51-57
- Lowe DM, Fossato VU, Depledge MH (1995a) Contaminant induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from Venice Lagoon: An *in vitro* study. *Mar Ecol-Prog Ser* **129**:189-196
- Lowe DM, Moore MN, Evans BM (1992) Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Mar Ecol-Prog Ser* **91**:135-140
- Lowe DM, Soverchia C, Moore MN (1995b) Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquat Toxicol* **33**:105-112
- Luzio JP, Pryor PR, Bright NA (2007) Lysosomes: Fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(8):622-632
- MacKenzie NM, Pinder AC (1987) Flow cytometry and its applications to veterinary medicine. *Res Vet Sci* **42**:131-139
- Matozzo V, Ballarin L, Pampanin DM, Marin MG (2001) Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Arch Environ Con Tox* **41**(2):163-170
- Mayrand E, St-Jean SD, Courtenay SC (2005) Haemocytes responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: Can the immune system recuperate? *Aquacult Res* **36**:962-971
- Moore MN (1980) Cytochemical determination of cellular responses to environmental stressors in marine organisms. *Rap Proces* **170**:7-15
- Ngo TTT, Berthe FCJ, Choi KS (2003) Prevalence and infection intensity of the ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* during an annual reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Organ* **56**:259-267
- Ngo TTT, Choi KS (2004) Seasonal changes of *Perkinsus* and *Cercaria* infections in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* from Jeju, Korea. *Aquaculture* **239**:57-68
- Novas A, Barcia R, Ramos-Martínez JI (2007) After the Prestige oil spill modifications in NO production and other parameters related to the immune response were detected in hemocytes of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* **85**:285-290
- Oweson C, Hernroth B (2009) A comparative study on the influence of manganese on the bactericidal response of marine invertebrates. *Fish Shellfish Immun* **27**:500-507
- Pampanin DM, Volpato E, Marangon I, Nasci C (2005) Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. Survival in air and condition index. *Comp Biochem Phys A* **140**:41-52
- Park KI, Choi MS, Park SW, Park KH, Choi SH, Yoon JM (2009) Cellular immune responses of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, exposed to cadmium chloride. *Korean J Malacol* **25**:135-143

- Park KI, Park HS, Kim JM, Park YJ, Hong JS, Choi KS (2006) Flow cytometric assessment of immune parameters of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). J Korean Fish Soc **39**:123-131
- Park KI, Tsutsumi H, Hong JS, Choi KS (2008) Pathology survey of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* occurring on sandy tidal flats along the coast of Ariake Bay, Kyushu, Japan. J Invertebr Pathol **99**:212-219
- Pipe RK, Coles JA (1995) Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalves molluscs. Fish Shellfish Immun **5**:581-595
- Pipe RK, Coles JA, Carissan FMM, Ramanathan K (1999) Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. Aquat Toxicol **46**:43-54
- Raidal SL, Bailey GD, Love DN (1998a) The flow cytometric evaluation of phagocytosis by equine peripheral blood neutrophils and pulmonary alveolar macrophages. Vet J **156**:107-116
- Raidal SL, Bailey GD, Love DN (1998b) Flow cytometric determination of oxidative burst activity of equine peripheral blood bronchoalveolar lavage derived leucocytes. Vet J **156**:117-126
- Riley RS, Mahin EJ, Ross W (1993) Clinical Applications of Flow Cytometry. Igaku-Shoin Press, New York, 914 p
- Sauvé S, Brousseau P, Pellerin J, Pmorin Y, Sénécal L, Goudreau P, Fournier M (2002) Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). Aquat Toxicol **58**:189-200
- Soudant P, Paillard C, Choquet G, Lambert C, Reid HI, Marhic A, Donaghy L, Birkbeck TH (2004) Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (=Tapes, =*Ruditapes*) *philippinarum*. Aquaculture **229**:401-418
- Tripp MR (1992) Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. J Invertebr Pathol **59**:222-227
- Uddin MJ, Park KI, Kang DH, Park YJ, Choi KS (2007) Comparative reproductive biology of Yezo scallop, *Patinopecten yessoensis*, under two different culture systems on the east coast of Korea. Aquaculture **265**:139-147
- Winstead JT (1995) Digestive tubule atrophy in eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), exposed to salinity and starvation stress. J Shellfish Res **14**:105-111
- Xue QG, Renault T, Chilmonczyk S (2001) Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. Fish Shellfish Immun **11**:557-567
- Yang HS, Park KJ, Choi KS (2010) Pathologic survey on the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve 1850) from Haeju off the western coastal Yellow Sea. Ocean Sci J **45**(2):93-100
- Zhang Z, Li X (2006) Evaluation of the effects of grading and starvation on the lysosomal membrane stability in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) by using neutral red retention assay. Aquaculture **256**:537-541
- Zhao C, Li X, Luo S, Chang Y (2011) Assessments of lysosomal membrane responses to stresses with neutral red retention assay and its potential application in the improvement of bivalve aquaculture. Afr J Biotechnol **10**:13968-13973

Received Mar. 28, 2012

Revised May. 10, 2012

Accepted May. 21, 2012