

넙치, *Paralichthys olivaceus*에서의 Oxytetracycline 처리 농도가 생리·생화학적 반응에 미치는 영향

양정환 · 여인규*

제주대학교 해양과학부, 해양과환경연구소

Effects of Different Levels of Oxytetracycline on Physiological and Biochemical Responses in Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Joung-Hwan Yang and In-Kyu Yeo*

Faculty of Applied Marine Science, Marine & Environmental research institute, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Olive flounder was treated with oxytetracycline (OTC) and changes in blood physiology, antioxidant enzymes and heat shock protein (HSP) were recorded to obtain preliminary data for optimal OTC treatment. Blood parameters were measured 1 and 3 h after the OTC treatments at the concentration of 0 (control), 100, 300 and 500 ppm for 1 h. Hematocrit decreased with time, however the difference was not significant ($P>0.05$). Reduced number of red blood cell was observed with increasing OTC concentration. Serum glucose level increased as the OTC concentration increased. However, glucose level was similar to control after 3 h. Blood total protein decreased immediately after the OTC treatment but increased after 1 and 3 h. However, the increment in blood total protein was low. Activities of superoxide dismutase enzymes in 300 and 500 ppm groups increased by the OTC concentration. Catalase enzyme activity was negatively affected by the OTC concentration. However, the differences were not significant ($P>0.05$). High expression of HSP-70 protein was recorded for groups treated with 100 and 500 ppm compared to that of the control group. However HSP-70 mRNA showed a lower increment which was not significant ($P>0.05$).

Keywords: Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, Oxytetracycline, Superoxid dismutase (SOD), Catalase (CAT), Heat shock protein (HSP)

서론

일반적으로 항생제는 방선균등과 같은 다양한 미생물로부터 생성되는 물질로서, 다른 미생물의 증식을 억제하거나 살균작용을 나타내는 것을 의미하며, 현재까지 알려진 약 4,000여종의 항생제 중, 수산용으로는 약 20여종이 사용되고 있다(Jeong and Chun, 1992). 이러한 항생제들은 크게 β -lactan계 항생제, Tetracycline계 항생제, Aminoglycoside계 항생제, Macrolide계 항생제, Polypeptide계 항생제 및 합성 항생제등으로 나뉘어진다. 어류질병치료에 주로 이용되는 것은 Tetracycline계 항생제로서 tetracycline, chlorotetracycline, oxytetracycline 및 doxycycline 등이 있다. 그중 oxytetracycline (OTC)은 acetate와 malonate가 환을 형성하여 된 4개의 연결된 환을 모핵으로 가지고 있으며, 단백질 합성억제작용에 의한 항균능력이 그람양성균, 그람음성균, rickettsia 및 일부의 protozoa

등에까지 미치는 광범위 항생제로써 수산용 항생제에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다(Rigos et al., 2002). 어류 양식에서의 항생제 사용은 세균성 질병의 예방과 치료를 목적으로 경구 투여 및 약욕에 의해 이루어진다. 항생제에 대한 연구는 항생제의 약동학과 생체내 축적(Uno et al., 1997; Abedini et al., 1998; Namdari et al., 1998, 1999; Haug and Hals, 2000; Meinertz et al., 2001)에 관한 연구가 대부분을 차지하고 있으며, 일부 항생제 사용에 따른 내성(DePaola et al., 1995; Petersen and Dalsgaard, 2003)에 대한 연구도 이루어져있다.

현재까지 알려진 Tetracycline계 항생제의 독성작용으로는 간장독성 및 신장 독성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(이등, 1987). 고농도의 항생제 처리는 오히려 어류의 생리학적 변화를 초래할 가능성이 있으나 이에 대한 연구는 아직까지 이루어진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 넙치, *Paralichthys olivaceus*를 이용하여 OTC 처리농도에 따른 어체내의 영향을 평가하여 어체내에서의 혈액 생리학적 변화, 항산화 효소 및 열충격단

*Corresponding author: ikyeo99@cheju.ac.kr

백질(HSP)등의 변화를 조사함으로써, 항생제의 안정적인 사용에 대한 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험어

실험어는 제주도 남제주군 표선읍에 위치한 육상 수조식 양식장에서 사육된 넙치, *Paralichthys olivaceus*로써 평균 전장이 30.0±1.5 cm, 평균 체중 285.5±25.0 g인 것을 사용하였다. 실험어는 유수식 사육시스템에서 실험 전 2주 동안 예비 사육하여 안정시킨 다음 실험에 사용하였으며, 이때 염분은 32.0±0.5‰, 수온은 18.0±1.0°C이었다. 예비사육 동안 사료는 시판되는 넙치용 pellet 사료를 사용하여 1일 1회 만복 투여하였다. 실험수조는 용량의 3 ton인 FRP 사각수조로 실험 기간 중 수조에는 공기공급을 충분히 하여 용존 산소가 평균 6 ppm 이상 유지되도록 하였다. 또한, OTC (동부한농, 옥탁폰) 약육 처리농도는 제품마다 다르지만 일반적으로 약 50~100 ppm으로 1시간 약육을 실시하므로, 본 실험에서는 0 ppm (대조구), 일반적인 약육 처리 농도인 100 ppm, 고농도인 300 ppm 및 500 ppm으로 각각 설정하였으며, 1시간 약육처리 후 순환시켜 0, 1 및 3시간 후의 혈액성상을 분석하였다.

혈액 성상 분석

혈액은 실험개시전 넙치를 3일간 절식시킨 다음, 실험어의 미부 동맥으로부터 헤파린을 처리하지 않은 주사기를 사용하여 마취 없이 1분 이내에 개체별로 채취하였다. 적혈구 용적(Ht)은 채취한 전혈을 4,000 rpm으로 30분간 원심분리 한 후 적혈구와 혈장부분의 길이에 대한 적혈구 부분의 비율로 구하였다. 적혈구 수(red blood cell count, RBC)는 미부 동맥에서 적혈구용 피펫으로 혈액을 채혈한 후 Hend's diluting solution으로 200 배 희석하여 혈구 계산판으로 적혈구 수를 계수하였다. 전혈에서의 혈당량 측정은 혈당 자동 측정기를 이용하여 측정하였다. 또한, 나머지 혈액은 원심분리용 튜브에 넣어 4°C에서 2시간 방치한 뒤 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 다음 -70°C에서 동결보관 한 후 혈중 총 단백질 분석에 사용하였다. 혈중 총 단백질량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다.

항산화 효소 분석

항산화 효소는 간장을 적출하여 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase (CAT) 효소 활성을 분석하였다. 간장은 적출 후 약 1 g을 0.9% NaCl에 3회 세척 한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화 하였다. 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.

SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund and Marklund (1974)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 8.7 ml에 간장 균질액을 넣은 후 0.3 ml의 3 mM pyrogallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer를 이용 325 nm에서 측정하였다. 그리고 효소활성의 1단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다. CAT 활성도의 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer에 의해 240 nm 파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow (1972)의 방법에 의하여 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다. 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준 단백질로서 BSA (bovine serum albumin)를 사용하여 Spectrophotometer를 이용 540 nm에서 측정하였다.

SDS-PAGE

넙치의 간장조직을 채취하여 분쇄 완충용액 100 mM phosphate buffer에서 Potter-Elvehjem 호모게나이저로 분쇄하여 12,000 G에서 원심분리하였다. 상등액을 동량의 2×Laemmli sample buffer (80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 12% β-mercaptoethanol, 15% glycerol 및 0.012% bromophenol blue)에 용해시켜 100°C에서 3분간 boiling한 후 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE을 실시하였다. 3-20% gradient-polyacrylamide gel을 사용하여 250 V로 4시간 동안 행한 후, 염색액(0.136% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol 및 10% acetic acid)에서 40분간 염색한 후, 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 (45 kD) 및 carbonic anhydrase (31 kD)를 사용하였다.

Western blot

Western blot은 Towbin et al. (1979)의 방법을 변형하여 실시하였다. SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 15 V에서 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 0.1 M Tris buffered saline (TTBS, pH 7.4)을 이용하여 40분 상온에서 약하게 흔들면서 blocking 시켰다. Blocking이 끝난 후 HSP-70 (Sigma, H5147)에 대한 항체를 NC막에 첨가하여 1시간 동안 실온에서 배양한 후, TBS-T (0.05% Tween20 in TBS)로 5분씩 3회 세척하였다. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti- mouse IgG로 1시간 동안 실온에서 배양하고 TBS-T 용액으로 5번 세척한 후, DAB (0.1%)와 0.03% H₂O₂가 함유된 PBS (pH 7.2)로 발색을 유도하였다.

RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

동결된 조직에 Tri-Reagent (Sigma)을 첨가 한 후 homogenizer 를 사용하여 4°C에서 마쇄시켰다. 마쇄조직에 chloroform을 넣어 얼음 위에서 5분간 방치한 뒤 4°C에서 14,000 rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담고 isopropanol을 넣어 RNA를 침전시켰다. RNA 침전물은 DEPC 용액을 넣어 녹이고 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 추출한 RNA 1 ug을 사용하여 14.25 ul 용량으로 역전사를 시행하였으며, RNA 1 ug, RNase inhibitor, oligo(dT) 15 primer, 2.5 mM dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂ 및 reverse transcriptase 를 넣어 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간을 각각 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

cDNA를 증폭시키기 위하여 cDNA 1.0 ul, 10x PCR buffer 9.9 ul, MgCl₂ 7.8 ul, dNTPs 2.0 ul (0.2 mM), primer (sense) 1.0 ul (50 pmole), antisense 1.0 ul (50 pmole), Taq polymerase 1.0 ul 및 Nuclease-Free Water 76.3 ul를 혼합하여 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension 조건으로 30회 증폭하고, 이후 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. HSP-70 mRNA에 대한 oligonucleotide primer는 (주)바이오니아에서 Table 1과 같이 합성주문하였다. 양성 대조로 사용할 oligonucleotide primer는 β-actin mRNA로 사용하였다.

PCR로 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 100 V로 전기영동하여 분리하였으며, 100 bp DNA ladder를 size marker로 사용하여 UV transilluminator하에서 사진 촬영하였다.

통계 처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS-통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결 과

혈액성상 변화

항생제 처리에 따른 넙치에서 혈액 생리학적 변화를 조사한 결과 Ht수치는 약육 후 0시간째 100 ppm과 500 ppm 처리구에서 각각 17.97±1.54 및 19.89±1.00%로 대조구 22.27±1.16%보다 감소되는 경향을 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았

Table 1. Oligonucleotide of primers for heat shock protein-70 mRNA and β-actin

RNA species	Expected size	Primer sequence
β-actin mRNA	520 bp	5-GCCAACAGGGAGAAGATGAC-3
		5-ACGTCGCACTTCATGATGC-3
HSP-70 mRNA	627 bp	5-GVACATTCTCAGACTTGTCWCC-3
		5-CATCAATGAACCAACTGCTGC-3

bp: base pairs

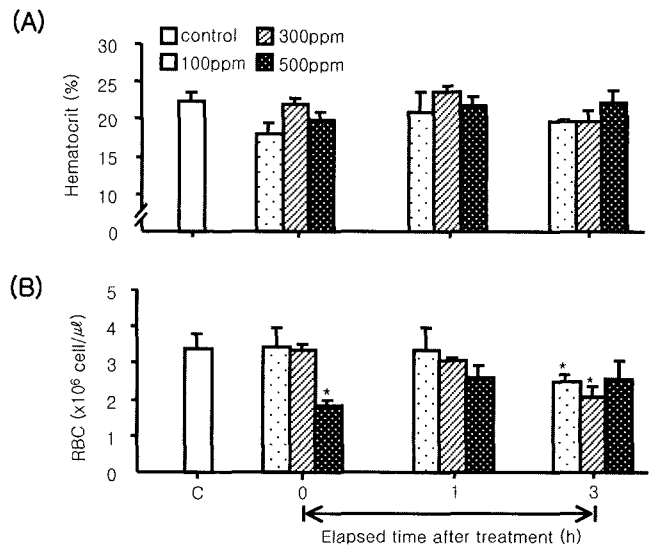


Fig. 1. Changes of Ht (hematocrit) value and RBC (red blood cell) count in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to various oxytetracycline concentrations. Vertical bars indicate standard deviations; *significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

다(Fig. 1A, $P > 0.05$). RBC의 경우에도 100 ppm 및 300 ppm 처리구에서는 처리 이후 0과 1시간째 감소하는 경향은 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. 그러나 3시간 경과 후에는 각각 $2.47 \pm 0.23 \times 10^6$ cell/ul 및 $2.06 \pm 0.29 \times 10^6$ cell/ul로 대조구 $3.38 \pm 0.44 \times 10^6$ cell/ul보다 현저하게 감소되는 경향을 나타내었다(Fig. 1B, $P < 0.05$). 하지만, 500 ppm 처리구인 경우에는 0시간째 $1.81 \pm 0.16 \times 10^6$ cell/ul로 현저하게 감소되었다가 1시간 및 3시간 경과 후에는 회복되는 경향을 보였다. 혈액에서의 글루코오스 함량은 항생제 처리 이후 대조구 34.33 ± 2.40 mg/dl과 비교하여 100 ppm인 경우 전 실험구간에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2A, $P < 0.05$). 그러나 500 ppm 처리구인 경우 약육 처리 이후 0시간 및 1시간째 각각 47.00 ± 1.80 mg/dl 및 52.00 ± 5.30 mg/dl로 시간의 경과함에 따라 현저하게 증가되었으나, 3시간 경과 후에는 이전 대조구 수준으로 회복되는 경향을 나타내었다. 혈청에서의 총 단백질은 대조구 7.65 ± 0.80 mg/ml에 비해 처리 이후 0시간째 전 실험구에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 1시간 후에는 300 ppm 및 500 ppm 처리구에서 각각 6.15 ± 0.10 mg/ml 및 6.99 ± 0.45 mg/ml로 0시간째 보다 증가는 되었지만 처리전의 대조구와 비교하여 유의하게 낮은 값을 나타내었다(Fig. 2B, $P < 0.05$). 처리후 3시간째에는 전 실험구에서 회복되는 경향을 보였으나 300 ppm 처리구에서는 대조구와 비교하여 유의하게 낮은 수치를 유지하였다.

항산화효소 변화

항생제 처리 후 간장내의 SOD 활성은 100 ppm 처리구인 경우 전 시간에서 유의한 차이를 보이지 않았으나, 300 ppm 처리구인 경우에는 항생제 처리 이후 0시간째 31.66 ± 8.00 unit/mg

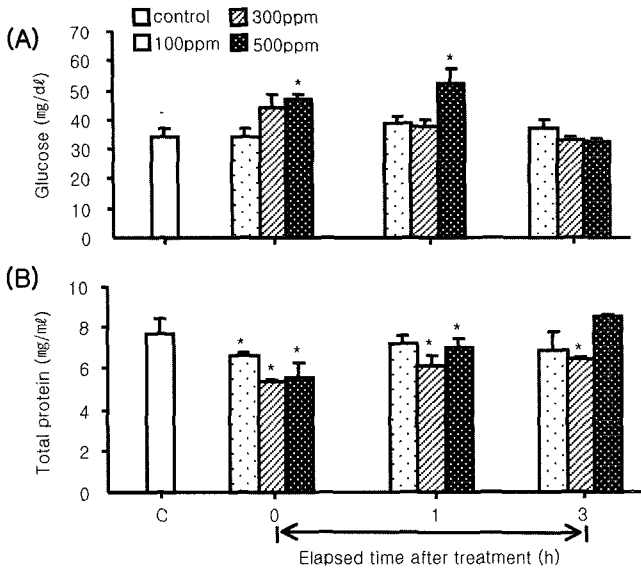


Fig. 2. Changes of glucose concentrations and total protein in olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to various oxytetracycline concentrations. Vertical bars indicate standard deviations; *significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

protein/min으로 효소 활성의 증가되는 경향을 보였고 1시간째 54.75 ± 13.20 unit/mg protein/min으로 최대 값을 나타내었으며, 노출 3시간 후에는 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 대조구에 비교하여 유의하게 높은 값을 나타내었다(Fig. 3A, $P < 0.05$). 또한, 500 ppm 처리구에서도 0 및 3시간째에 각각 46.20 ± 2.60 및 25.23 ± 2.82 unit/mg protein/min으로 현저하게 높은 효소 활성을 나타내었다. 이와는 반대로 CAT효소 활성인 경우에는

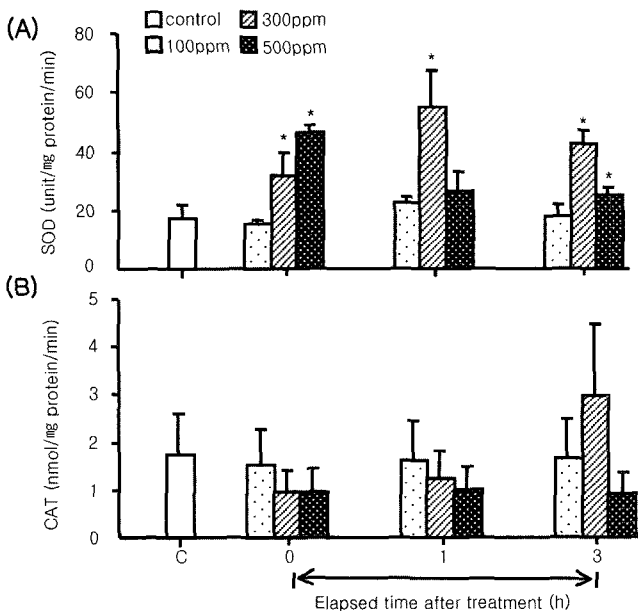


Fig. 3. Changes of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to various oxytetracycline concentrations. Vertical bars indicate standard deviations; *significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

대조구와 비교하여 유의한 차이는 나타나지 않았으나 전 구간에 걸쳐서 감소되는 경향을 보였으며, 약육처리 이후 3시간째 500 ppm 처리구에서 최고 낮은 활성을 보였다(Fig. 3B, $P > 0.05$).

항생제 처리에 따른 HSP-70의 양적 변화 조사

항생제 약육 처리에 따른 HSP-70의 발현 양상을 관찰하기 위하여 항생제 약육 처리 이후 3시간째에 넵치 간장으로부터 단백질을 분리하여 SDS-전기영동 후 Western blot을 실시하였다. 그 결과 대조구와 실험구에서 각각 HSP-70이 유도되는 것이 확인되었다(Fig. 4). 100 ppm과 500 ppm 처리구에서는 대

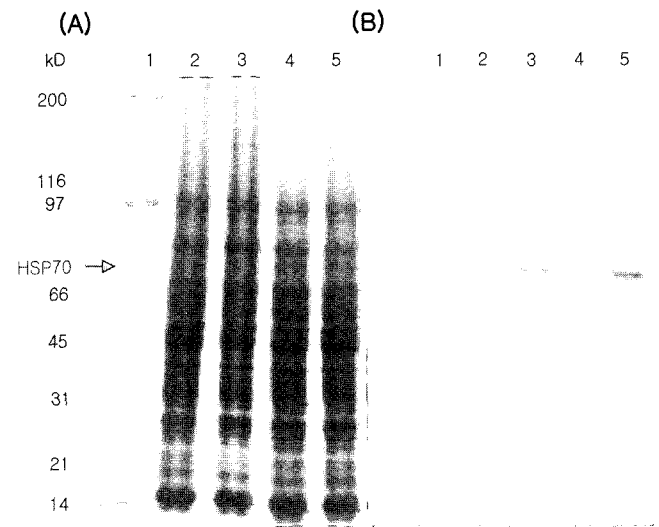


Fig. 4. Immunodetection of heat-shock protein 70 (HSP-70) in liver of olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to various oxytetracycline concentrations. 3-20% SDS polyacrylamide gels (A) and Western blots (B): 1 line, Marker; 2 line, 0 ppm (control); 3 line, 100 ppm; 4 line, 300 ppm; 5 line, 500 ppm.

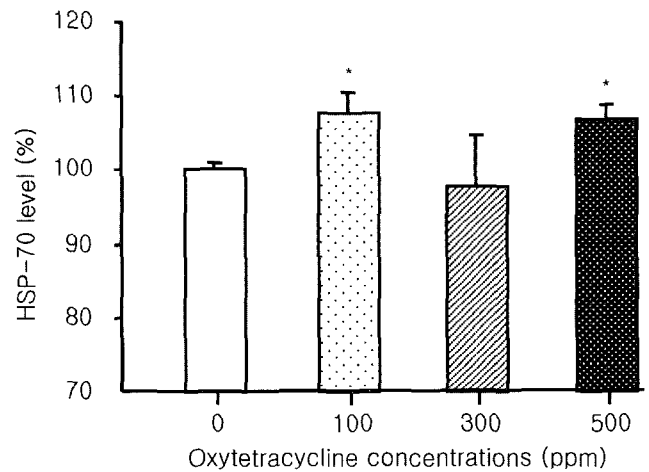


Fig. 5. The amount of HSP-70 expression shown on the western blot was quantitated by densitometry and normalized to the total protein loaded into each lane of the gel. Vertical bars indicate standard deviations; *significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

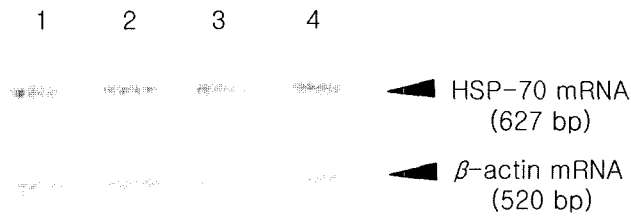


Fig. 6. Expression of HSP-70 mRNA in liver of olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to various oxytetracycline concentrations. 1 line, 0 ppm (control); 2 line, 100 ppm; 3 line, 300 ppm; 4 line, 500 ppm.

조구와 비교하여 HSP-70 발현량의 현저하게 높게 유도되는 것으로 확인되었고, 300 ppm 처리구인 경우에는 대조구와 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 5, $P < 0.05$). 그러나, HSP-70 mRNA 발현은 약육 처리이후 3시간째 대조구와 비교하여 모든 처리구에서 다소 증가하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 6).

고 찰

일반적으로 어류 양식에서의 항생제 사용은 세균성 질병의 예방과 치료를 목적으로 경구투여 및 약욕에 의해 이루어진다. 그러나, 그들 항생제 처리에 따른 어류에 있어서 어체내에서의 독성학적인 생리학적 변화에 대한 연구는 아직까지 이루어진 바가 없다. 따라서, 본 연구에서는 oxytetracycline 약육 처리에 따른 넙치에서의 혈액 생리학적 변화, 항산화효소 활성 및 HSP-70의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다.

오염 물질에 노출된 어류는 일반적으로 Ht 및 RBC 등의 혈액성상의 변동을 일으키며, 신장기능의 장애를 일으켜 조혈기관의 손상을 주는 것으로 알려져 있다(Kang and Jee, 1999; Cho et al., 2002). 현재 저독성 유기인계 살충제인 malathion, formalin, 살충제, 중금속, 카드뮴 및 염소계 화합물에 노출된 어류에서 Ht 및 RBC 등의 혈액인자가 감소되는 것으로 알려지고 있다(Edosa et al., 1994; Khattak and Hafeez, 1996; Kang and Jee, 1999; Zikic et al., 2001; Cho et al., 2002; Costa et al., 2004). 이러한 Ht 및 RBC의 감소는 일반적으로 빈혈을 일으키는 것으로 알려지고 있는데(Edosa et al., 1994; Khattak and Hafeez, 1996), 본 실험에서도 OTC노출에 의한 혈액의 Ht와 RBC가 상기의 결과들과 같이 감소되는 결과를 초래하였다. 이러한 혈액성상에서의 감소는 적혈구 수축, 용혈 및 적혈구 세포의 재생 속도 감소 등에 기인하여 감소되는 것으로 알려지고 있다(Costa et al., 2004). 따라서, 본 연구의 결과에서 나타난 결과는 항생제에 의해 적혈구의 수축 및 재생속도의 영향을 미치는 것으로 추정된다.

한편, 글루코오스는 스트레스에 의해 간에서 포도당의 신생합성(gluconeogenesis)이 촉진되어 그 농도가 증가하는 것으로

알려져 스트레스와 대사의 지표로 사용되고 있다(Vijayan and Moon, 1994). 또한, 혈청 단백질량은 성장, 질병 및 스트레스 등에 차이가 있는 것으로 알려져 있으며(Harbell, 1979; MacFaddin and Brown, 1979; Fasaic and Palackova, 1990), 최근 환경오염 지표로 사용되고 있다(Ito and Murata, 1990). 본 실험에서의 글루코오스 농도 및 혈청 단백질 농도는 글루코오스인 경우에는 300 및 500 ppm 처리구에서 현저하게 증가되는 경향을 보였고, 혈청 단백질 농도인 경우에는 대조구에 비해 약육 1시간 처리 직후 현저하게 감소되는 결과를 초래하였다. 이와 같은 글루코오스 농도의 증가 및 혈청 단백질 농도의 감소는 환경오염 물질인 hexachlorobenzene (HCB), 카드뮴 및 petroleum에 각각 노출된 잉어 및 금붕어에서 혈청 글루코스 농도는 증가되고 단백질 농도는 감소되었다는 이전 연구 결과와 유사하였다(Gluth and Hanke, 1984; Yamawaki et al., 1986; Shen et al., 1997; Zikic et al., 2001). 이러한 결과는 OTC 처리에 의한 간 체장의 손상으로부터의 기능 이상에 기인한 결과라고 추측된다.

호기성 세포에서는 어떤 유해물질 및 약물등에 폭로되었을 때 superoxide radical, hydroxyl radical 및 hydrogen peroxide와 같은 oxygen free radicals이 과다하게 생성되어 지질 과산화반응, 단백질 파괴, 염색체 이상 및 적혈구 파괴등 조직에 손상을 입힐 수 있다(Junqueira et al., 1986). 그러나, 정상적인 조직은 내인성 제거제(endogenous scavengers)를 함유하고 있어 oxygen free radicals 손상으로부터 조직을 보호하는 작용을 하는데, 내인성 제거제인 SOD는 superoxide radical을 환원시켜 H_2O_2 로 바꾸어 주며, 여기서 생성된 H_2O_2 는 다시 catalase의 작용에 의해 H_2O 로 배설됨으로써 산소 독으로부터 생체를 보호한다(Wendel and Feuerstein, 1981). 카드뮴에 노출된 금붕어, 틸라피아 및 황산동에 노출된 어류에서 SOD 및 CAT 효소 활성이 증가되는 것으로 보고되어 있다(Dedrajas et al., 1996; Zikic et al., 2001; Basha and Rani, 2003). 본 실험에서 SOD 효소활성은 대조구에 비해 Oxytetracycline 300 ppm 및 500 ppm 처리구에서 현저하게 증가되는 결과를 나타내었다. 그러나 CAT효소 활성인 경우 1시간 약육 처리 이후 2시간까지 모든 실험구에서 오히려 감소하는 결과를 나타내었다. Ferraris et al., (2002)은 무지개 송어 간세포를 이용한 단시간 in vitro 실험에서 물리적 스트레스에 의해 처음 4시간까지는 CAT 효소활성의 감소하다가 이후 증가되었다고 보고하고 있다. 또한, Zikic et al., (2001)은 카드뮴에 15일 및 30일 동안 노출시킨 금붕어에서 CAT 효소활성이 증가되었다고 보고하고 있다. 따라서 이러한 결과들로 볼 때 단시간의 노출 시에는 SOD가 증가하고 반면 CAT는 감소되는 것으로 추정된다. 그러나 장시간 처리할 경우에는 CAT가 증가할 것으로 기대된다. 또한, OTC 처리는 다른 오염물질 등과 같이 산화적 대사를 유도할 수 있다는 것을 암시하며, 어류 조직 내 산화적 손상을 유발할 것으로 생각되어진다.

HSP-70은 잘 알려져 있는 열충격 단백질로서 정상 세포에서는 chaperone의 기능을 하여 단백질의 폴딩, 올리고머의 해체,

단백질의 운반 및 전위를 돕는다(Landry and Gierasch, 1994; Wynn et al., 1994). 또한, 열충격 등의 스트레스에 유도되어 스트레스로부터 유발될 수 있는 단백질 손상을 방어하는 기능을 한다. 이러한 HSP-70은 최근 들어 독성물질의 노출 또는 스트레스의 지표로 사용되고 있으며, 비소, β -Naphthoflavone (BNF), Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), 포르말린 및 Phenoxyethanol 등의 화학물질에 장기간 노출될 경우 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다(Weber and Janz, 2001; Weber et al., 2002; Zarate and Bradley, 2003). 본 실험에서도 OTC 약육 처리에 의해 HSP-70 발현이 증가되었다. 이러한 결과로 볼 때 OTC 처리는 어류에 있어서 생체내 화학적 스트레스로 작용하는 것으로 생각되어진다. 그러나, 본 연구에서의 HSP-70의 증가함에도 불구하고 HSP-70 mRNA 발현양의 증가되지 않은 결과는 단기간의 노출에 따른 결과라고 여겨지지만, 앞으로 OTC에 의한 HSP-70 mRNA level에 대한 정확한 분석을 위해서는 장기간 노출실험이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 고농도 OTC 노출은 혈액 성상의 변화를 가져와 스트레스로 작용함으로써 이에 대한 방어기작으로 항산화 효소인 SOD 및 CAT 효소 활성이 증가되는 것으로 판단된다. 또한, 2차적으로 HSP-70 단백질을 생성하여 스트레스에 의한 세포 내 단백질의 변성을 억제시켜주는 것으로 생각되어진다. 따라서, 100 ppm 이상의 고농도 OTC 처리는 스트레스 요인으로 작용하여 신진 대사의 변화를 야기시켜 어류의 생리적인 대사에 역효과를 가져다 줄 수 있으므로 적절한 처리농도의 준수가 요구된다. 하지만, 이러한 결과는 장기간이 아닌 단기간의 실험 설정이므로 종합적인 검토를 위해서는 장기간 노출 실험이 수행되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 넙치, *Paralichthys olivaceus*를 이용하여 oxytetracycline (OTC) 처리농도에 따른 체내에서 혈액 생리학적 변화, 항산화 효소 및 열충격단백질(HSP)등의 변화를 조사하여 항생제의 안정적인 사용에 대한 기초 자료를 제공하고 본 실험을 수행하였다. 실험구는 각각 0 (대조구), 100, 300 및 500 ppm으로 설정하였으며, 1시간 약육처리 후 순환시켜 0, 1 및 3시간 후에 혈액성상을 분석하였다. 혈액 중 hematocrit (Ht) 수치는 전 실험구에서 감소하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. Red blood cell (RBC)는 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 또한, 혈청 글루코코스 농도는 농도 의존적으로 증가되는 경향을 나타내었으나, 노출 이후 3시간 경과 후에는 이전 대조구 수준으로 감소되었다. 혈중 단백질량은 0시간째 전 실험구에서 감소되었다가 이후 증가하는 경향을 나타내었으나, 처리전의 대조구와 비교하여 유의하게 낮은 값을 나타내었다. SOD 효소 활성은 노출 직후 300 및 500 ppm에서는 유의하게 높은 값을 나타내었다. CAT 효소활성은

OTC 처리 농도에 비례하여 감소하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. 그리고 HSP-70의 단백질량은 100 ppm 및 500 ppm 처리구에서 대조구에 비해 높게 발현되는 것이 확인되었다. 그러나 HSP-70 mRNA는 다소 증가하는 경향은 보였으나, 모든 실험구에서 유의한 차이는 나타나지 않았다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 제주대학교 두뇌한국21 사업에 의하여 연구되었으며, 연구비를 지원하여 주신데 대하여 깊이 감사드립니다. 그리고 본 연구가 진행되기 까지 많은 협조를 아끼지 않은 제주도 서연수산의 김형식 회장님과 강호정 부회장님께 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

- Abedini, S., R. Namdari and F. C. P. Law, 1998. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in rainbow trout and chinook salmon. *Aquaculture*, **162**: 23-32.
- Basha, P. S. and A. U. Rani, 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **56**: 218-221.
- Cho, K. S., E. Y. Min and J. C. Kang, 2002. Changes of haematological constituents in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to HCB and PCBs. *J. Korean Fish. Soc.*, **35**(2): 110-114.
- Costa, O. T. F., D. J. S. Ferreira, F. L. P. Mendonca and M. N. Fernandes, 2004. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, **232**: 627-636.
- Dedrajas, J. R., J. Lopez-Barea and J. Deinado, 1996. Dieldrin induces peroxisomal enzymes in fish (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol-Toxicol. Endocrinol.*, **115**(2): 125-131.
- DePaola, A., J. T. Peeler and G. E. Rodrick, 1995. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 2335-2340.
- Edosa, O., G. E. Thomas and C. O. Paul, 1994. Chronic effects of formalin on erythrocyte counts and plasma glucose of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Asian Fish. Sci.*, **7**: 1-6.
- Fasaic, K. and J. Palackova, 1990. Total protein and serum fraction values in two-year carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta. Biol. Jugosl. E. Ichthyol.*, **22**: 23-30.
- 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.
- Gluth, G. and W. Hanke, 1984. A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sub-lethal concentration. II. The dependency on the temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, **796**: 39-45.

- Harbell, S. C., 1979. Studies on the pathogenesis of vibriosis in coho salmon *Onchorhynchus kisutch*(Walbaum). J. Fish Dis., **2**: 391-404.
- Haug, T. and P. A. Hals, 2000. Pharmacokinetics of oxytetracycline in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) in freshwater at low temperature. Aquaculture, **186**: 175-191.
- Ito, Y. and T. Murata, 1990. Changes in glucose, protein contents and enzyme activities of serum in carp administered orally with PCB. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **46**(4): 465-468.
- Jeong, H. D. and S. K. Chun, 1992. The utilization of antibiotics and the treatment of bacterial diseases in fish. J. Fish Pathol., **5**(1): 37-48.
- Junqueira, V. B. C., K. Simiz, L. A. Videla and S. B. Barros, 1986. Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver superoxide anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. Toxicology, **41**: 193-204.
- Kang, J. C. and J. H. Jee, 1999. Hemochemical changes in israel carp, *Cyprinus carpio* exposed to cyanide. J. Korean Fish. Soc., **32**(5): 573-581.
- Khattak, I. U. D. and M. A. Hafeez, 1996. Effect of malathion on blood parameters of the fish, *Cyprinion watsoni*. Pak. J. Zool., **28**(1): 45-49.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature., **227**: 680-685.
- Landry, S. J. and L. M. Gierasch, 1994. Polypeptide interactions with molecular chaperones and their relationship to in vivo protein folding. Annu. Rev. Bioph. Biom., **23**: 645-669.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrought, A. L. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. biol. Chem., **193**: 265-275.
- MacFaddin, D. J. and D. A. Brown, 1979. Stress and chronic effects of untreated and treated bleached kraft pulpmill effluent on the biochemistry and stamina of juvenile coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*). J. Fish. Res. Board Can., **36**: 1049-1059.
- 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.
- Meinertz, J. R., M. P. Gaikowski, G. R. Stehly, W. H. Gingerich and J. A. Evered, 2001. Oxytetracycline depletion from skin-on fillet tissue of coho salmon fed oxytetracycline medicated feed in freshwater at temperatures less than 9°C. Aquaculture, **198**: 29-39.
- Namdari, R., S. Abedini, L. Albright and F. C. P. Law, 1998. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in sea pen cultured chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* and Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) following medicated feed treatment. J. Appl. Aquacult., **8**: 39-52.
- Namdari, R., S. Abedini and F. C. P. Law, 1999. A comparative tissue distribution and elimination of oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). Aquacult. Res., **30**: 279-286.
- Nelson, D. P. and L. A. Kiesow, 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C(with molar extinction coefficients of H₂O₂solutions in the UV). Anal Biochem., **49**: 474-478.
- Petersen, A. and A. Dalsgaard, 2003. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas spp.* and *Enterococcus spp.* in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. Aquaculture, **219**: 71-82.
- Rigos, G., M. Alexis, A. Andriopoulou and I. Nengas, 2002. Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, at two water temperatures. Aquaculture, **210**: 59-67.
- Shen, H., Q. Zhang, R. Xu and G. Wang, 1997. Effects of petroleum on the sero-proteins of *Tilapia mossambica*. Mar. Environ. Sci., **16**(1): 1-5.
- Towbin, H., T. Stachelin and J. Gordon, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA., **76**: 4350-4354.
- Uno, K., T. Aoki, R. Ueno and I. Maeda, 1997. Pharmacokinetics of oxytetracycline in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following an intravenous administration. Fish. Sci., **63**: 90-93.
- Vijayan, M. M. and T. W. Moon, 1994. The stress response and plasma disappearance of corticostereoid and glucose in a marine teleost the sea raven. Can. J. Zool., **72**: 379-386.
- Weber, L. P. and D. M. Janz, 2001. Effect of β -naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. Aquat. Toxicol., **54**: 39-50.
- Weber, L. P., S. L. Diamond, S. M. Bandiera and D. M. Janz, 2002. Expression of HSP70 and CYP1A protein in ovary and liver of juvenile rainbow trout exposed to β -naphthoflavone. Comp. Biochem. Physiol., **131**(C): 387-394.
- Wendel, A. and S. Feuerstein, 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice-I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. Biochem. Pharmacol., **30**: 2513-2520.
- Wynn, R. M., J. R. Davie, R. P. Cox and D. T. Chuang, 1994. Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. J. Lab. Clin. Med., **124**: 31-36.
- Yamazaki, K., W. Hashimoto, K. Fujii, J. Koyama, Y. Ikeda and H. Ozaki, 1986. Hemochemical changes in carp exposed to low cadmium concentrations. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **52**(3): 459-466.
- Zarate, J. and T. M. Bradley, 2003. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon, Aquaculture, **223**: 175-187.
- Zicic, R. V., A. S. Stajn, S. Z. Pavlovic, B. I. Ognjanovic and Z. S. Saicic, 2001. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. Physiol. Res., **50**: 105-111.
- 이우주·홍사석·조규철·김원준·홍기환·유경자·차영남·김경환·이향우, 1987. 이우주의 약리학강의. 선일문화사. pp. 530-558.

원고접수 : 2004년 9월 10일

수정본 수리 : 2004년 10월 15일

책임편집위원: 강주찬