

<단보>

# 넙치 *Paralichthys olivaceus* 기아시 간세포 및 장상피세포의 조직학적 변화

박인석\*

한국해양대학교 해양과학기술대학 해양환경생명과학부

## Histological Changes of Hepatocyte and Intestinal Epithelium during Starvation in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

In-Seok PARK\*

Division of Marine Environment and Bioscience, College of Ocean Science and Technology, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

The effects of starvation on histological changes in hepatocytes and the intestinal epithelium in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* were examined. The starved group was not fed for 12 weeks, whereas the fed group was given food. Food deprivation resulted in a significant decrease in hepatocyte nucleus size and nuclear height in the intestinal epithelium ( $P<0.05$ ). In the starved group, pronounced degenerative changes were seen in the histology of hepatocytes and the intestinal epithelium; the tissue morphology was irregular and the nuclei were stained basophilic, shrunk irregularly, and very compact. These results suggest that histological changes in hepatocytes and the intestinal epithelium can be used as an indicator of starvation in the olive flounder. In addition, the data are interpreted in detail and some biologically important relationships are discussed.

Key words: Hepatocyte, Histology, Intestinal epithelium, Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, Starvation

어류들은 계절적인 월동(wintering), 산란이동 혹은 지역적인 먹이 감소로 인해 자연 기아(starvation)시기를 거치게 된다. 이와 같은 기아시 어류는 생화학적 방법, 생리학적 방법 그리고 행동학적 방법으로 기아를 극복하고 견딜 수 있으며, 체내 조직내 축적된 에너지를 소모하게 된다(Mustafa and Mittal, 1982; Weatherley and Gill, 1987; Lee et al., 1999; Woo, 2005).

어류 중장상피(midgut epithelium)세포의 높이 조사는 어류 영양 상태의 파악에 유용하며(Ehrlich et al., 1976), 간세포 핵(hepatocyte nucleus) 크기 조사 또한 영양 상태와 기아 정도의 진단에 유용하여 pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Strüssmann and Takashima, 1989), 붉바리, *Epinephelus akaara* 자어(Lee et al., 1998) 및 점농어, *Leteolabrax* sp. 자어와 조피볼락, *Sebastes schegeli* 자어(Park et al., 1998)에서 기아시 이들 조사항목에 대한 파악이 이루어진 바 있다.

넙치, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel)는 타원형의 체형으로 주로 저서생활을 하고 수심 10-20 m의 연안에 서식하며 우리나라 전 연안, 쿠릴 열도, 일본 및 남중국해에 분포하는 해산어종으로서(Choi et al., 2002), 이러한 넙치는 현재 우리나라 해산어류 양식산업을 주도하는 대표적인 양식 대상 어종이다(MOMAF, 2004). 이러한 넙치에 관한 기아 연구로는 Hur et al. (2006a, 2006b)에 의해, 기아시 신장 melano-

macrophage centre 변화와 기아가 간세포 미세구조에 미치는 영향에 관해 연구된 바 있다. 본 연구는 넙치의 양식생산에서 상품성을 좌우할 수 있는 섭식(feeding)과 절식시의 효과를 파악하기 위하여, 조직학적인 방법으로 넙치의 기아에 따른 간과 장상피세포에서의 세포 핵크기 변화 양상을 조사하였다.

2004년 8월에 넙치 종묘배양장에서 한국해양대학교 수산 유전육종학연구실의 입해양식장으로 넙치를 운반하여 순화시킨 후 사육하였다. 기아 및 포식 실험은 2004년 10월 4일에 실시하였으며, 실험 시작시 넙치의 평균 체장과 평균 체중을 digital calipers (CD-20CP, Japan)와 전자저울(JW-1, Korea)을 사용하여, 0.01 cm 단위, 0.01 g 단위로 각각 측정하였다.

실험 시작시의 표본과 더불어 실험군인 기아군(starved group)과 포식군(fed group)을 설정하였다. 본 실험 시작전 까지 넙치 포식량의 70% 만을 매일 먹이 공급하였으며, 이들 중 일부를 2번에 걸쳐 10마리씩 실험 시작시 표본하였다. 각 1,093 L 용량의 순환여과식 FRP 원형수조( $\phi$  118 cm<sup>2</sup>×H 100 cm)에 넙치 30마리씩을 수용하여 기아군과 포식군을 설정하여 각 실험군별로 2반복 실험을 실시하였다. 수조 밖으로 넙치가 튀어 나오는 것을 방지하기 위하여 기아군과 포식군의 각 원형수조 상면을 2×2 cm 망목의 그물로 완전히 덮었다. 일주일에 한번씩 순환여과 해수 2/3에 해당하는 사육 수량을 자연 해수로 환수하였고, 수온은 실험 기간 중 19.4-22.4℃의 범위였다. 실험 기간 중의 사육 해수는 다음과 같이 유지하였

\*Corresponding author: ispark@hhu.ac.kr

다: 염분농도, 34.0-37.0‰; 용존산소, 5.7-8.0 ppm; pH, 6.5-7.8; T-N, 1.9-4.1 mg/L; TKN, 1.0-1.2 mg/L;  $\text{NH}_4^+$ -N, 0.9-1.1 mg/L;  $\text{NO}_3^-$ -N, 0.9-2.9 mg/L; T-P, 0.02-0.78 mg/L;  $\text{PO}_4^{3-}$ -P, 0.004-0.351 mg/L;  $\text{COD}_{\text{Mn}}$ , 2.0-11.1 mg/L.

포식군의 먹이 공급에 배합사료(Ewha Oil & Fat Ind. Co., Korea; crude protein, 50.0%; crude fat, 8.0%; crude fiber, 4.0%; crude ash, 15.0%; calcium 1.5%; phosphorus, 1.7%; nutrition and mineral, 3.0%)를 사용하였다. 포식군은 하루 3번(오전 9시, 오후 3시 및 오후 9시)에 걸쳐 만복 시켰으며, 포식군의 먹이 공급 후 2시간 이내에 사육 수조 바닥에 가라앉은 넙치 배설물을 사이펀을 사용하여 제거 하였다. 기아군은 절식하였으며, 본 실험의 종료는 실험 후의 기아군에서의 절식으로 인하여 활력이 급격히 저하되는 시기로 정하였다. 본 실험 종료시 기아군과 포식군에서의 누적생존율을 조사하였다.

본 실험 시작시 표본된 10마리, 그리고 실험후 4주부터 본 실험 종료시까지 4주 간격으로 매 회 채취된 기아군과 포식군의 각 10마리를 대상으로 간세포 핵 면적 및 장세포 핵 크기 조사를 실시하였다. 실험은 2반복으로 실시하였으며 표본 채취 1일전에 대상 어류를 절식하였다. 실험 시작시 및 기아군과 포식군의 간세포 핵 면적과 장세포 핵 크기를 조사하였다. 조직학적 조사를 위하여 22°C 수온 조건의 400 ppm 염산리도 카인/1,000 ppm  $\text{NaHCO}_3$ 로 과도하게 노출시켜서 개체들을 죽였다. 표본된 개체들로부터 간(liver) 및 장(intestine)을 적출하였으며, 적출된 간과 장조직을 냉장 상태의 10% 해수 중성 포르말린용액(100 mL formalin, 6.5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 4.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 900 mL sea water)에 1일간 고정 후 다시 10% 담수 중성 포르말린용액에 고정, 보관하였다. 충분히 고정된 각군의 간과 장 조직을 Bouin용액에 24시간 재고정 하였으며, 이후 통상의 파라핀 조직절편법으로 slide 표본을 작성하여 검경하였다. 아울러 각 조직상을 생물현미경(Axioskop, Zeiss, Germany)으로 사진 촬영하였다.

각 조직 slide를 대상으로 각 개체당 10-40개의 간세포 핵 및 장상피세포 핵을 1,000× 배율의 생물현미경 하에서 관찰하였으며, 간세포 핵은 장경(a), 단경(b)을, 장상피세포 핵은 높이를 각각 0.1 mm 단위로 측정하였다. 간세포 핵의 표면적(S)은  $S=ab\pi/4$  (Park et al., 1998; Lee et al., 1998)로 계산하였다. 아울러 본 실험 시작시의 간세포와 장세포, 그리고 실험 종료시의 기아군과 포식군으로 부터의 간세포와 장세포를 대상으

로 1,000× 배율의 생물현미경 하에서 각각 사진 촬영하였다. 대조군과 기아 경과에 따른 포식군과 기아군에서의 간세포 핵 크기 및 장상피세포 핵 크기를 서로 비교하기 위하여 one-way analysis of variance (ANOVA)를 적용한 후 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

넙치를 대상으로한 본 실험 시작시를 포함한 실험군인 기아군 및 포식군의 평균 체장 및 평균 체중은 공통적으로 각각  $22.9 \pm 0.88$  cm,  $100.7 \pm 11.67$  g이었다. 본 실험 시작 후 12주에 기아군의 활력이 급격히 저하되어 실험을 종료하였다. 실험 종료후 평균 누적생존율은 포식군이 90.0%인 반면, 기아군은 77.5%로 나타났다.

본 기아실험 시작시를 포함한 기아군 및 포식군의 간세포 핵 평균 면적은  $7.9 \pm 0.90 \mu\text{m}^2$ 으로서 51%의 최다 빈도를 보였다(Table 1, Fig. 1a). 12주간의 기아실험 기간 중 첫 번째 조사 시기인 기아후 1주에서의 기아군의 간세포 핵 평균 면적은  $6.3 \pm 0.54 \mu\text{m}^2$ 으로 감소하여 동일 시기의 포식군 간세포 핵 평균 면적은  $9.2 \pm 0.89 \mu\text{m}^2$ 에 비하여 유의하게 낮은 간세포 핵 면적 크기를 보였다( $P < 0.05$ )(Table 1). 기아에 따른 간세포 핵 평균 면적의 점진적인 감소는 본 기아실험 종료시기인 기아후 12주까지 나타나, 기아후 12주의 기아군 간세포 핵 평균 면적은  $4.6 \pm 0.50 \mu\text{m}^2$  (58%의 최다 빈도)로 기아군 자체 내에서도 1.7배의 간세포 핵 면적 감소를 보인 반면, 포식군의 간세포 핵 평균 면적은  $11.0 \pm 1.00 \mu\text{m}^2$  (44%의 최다 빈도)로 기아후 12주의 기아군의 간세포 핵 평균 면적에 비해 2.4배 크게 나타났다( $P < 0.05$ ) (Table 1, Fig. 1a).

Fig. 2의 a, b, c는 각각 기아실험 시작시 및 기아실험 12주의 기아군 및 포식군의 간세포 조직상으로 기아군은 시작시와 포식군에 비하여 간세포 핵 크기가 축소 하였으며, 분포 밀도가 높았고, 각각의 형태가 불규칙적 이었다(Fig. 2b). 반면, 포식군은 시작시에 비하여 간세포 핵의 분포가 겹쳐짐이 없이 희박하고, 간세포 핵 크기가 증가하였으며 각 간세포 핵은 호염기성으로 진하게 염색되어 형태가 일정하였다(Fig. 2c). 본 연구 결과와 유사하게, 미성숙 무지개송어, *Salmo gairdneri*를 13°C 수온 조건으로 3개월간 기아시 간조직에서 퇴행적인 변화가 일어난 바 있다(Robertson et al., 1963). 이와 더불어, 간세포 핵 크기 조사는 영양 상태와 기아 정도의 진단에 유용하여 pejerrey 및 점농어 와 조피볼락에서 기아시 체내 축적 에너지의 소모가 이루어짐이 확인된 바 있다(Strüssman and

Table 1. The change of hepatocyte nuclear and nuclear height of midgut epithelium in fed group and starved group in olive flounder

	Group	Experiment period (weeks)			
		0	4	8	12
Hepatocyte nuclear area ( $\mu\text{m}^2$ )	Fed	$7.9 \pm 0.90^a$	$9.2 \pm 0.89^a$	$10.4 \pm 0.99^a$	$11.0 \pm 1.00^a$
	Starved	$7.9 \pm 0.90^a$	$6.3 \pm 0.54^b$	$5.2 \pm 0.51^b$	$4.6 \pm 0.50^b$
Nuclear height of midgut epithelium ( $\mu\text{m}$ )	Fed	$7.1 \pm 0.13^a$	$7.4 \pm 0.20^a$	$7.5 \pm 0.22^a$	$7.7 \pm 0.13^a$
	Starved	$7.1 \pm 0.13^a$	$6.0 \pm 0.20^b$	$5.5 \pm 0.25^b$	$4.3 \pm 0.21^b$

The value are means $\pm$ SD of duplicated groups. Means in columns having same superscript letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

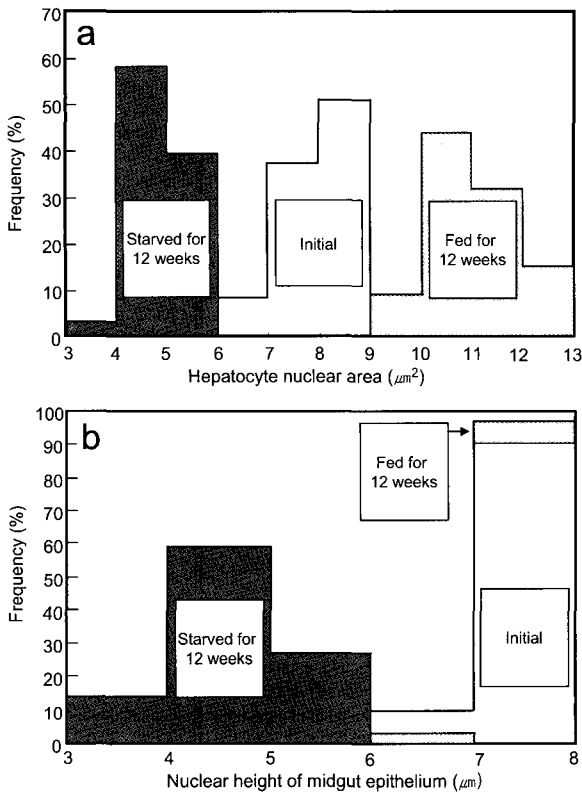


Fig. 1. Frequency distribution of (a) hepatocyte nuclear areas and (b) middle intestine epithelium heights from the same individuals depicted in histological appearance of hepatocyte and middle intestinal epithelium. Nuclear areas and middle intestine epithelium heights from two replicate photographs of each individual were pooled and grouped in 1- $\mu\text{m}^2$  area classes and 1- $\mu\text{m}$  length class, respectively.

Takashima, 1989; Park et al., 1998).

어류의 장은 jack mackerel, *Trachurus symmetricus* 기아시 우선적으로 영향을 받는 조직으로서(Theilacker, 1978), 기아시 어체 운동능력 감소를 동반한 위조직의 위축이 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있다(Elliott, 1972; Jobling, 1980). 본 기아실험 시작시 및 기아군, 포식군의 장상피세포 핵 평균 길이는  $7.1 \pm 0.13 \mu\text{m}$ 으로 90%의 최다 빈도를 보였다(Table 1, Fig. 1b). 12주간의 기아실험 기간 중 첫 번째 조사 시기인 기아후 1주에서의 기아군 장상피세포 핵 평균 길이는  $6.0 \pm 0.20 \mu\text{m}$ 으로 감소하여, 동일 시기의 포식군 장상피세포 핵 평균 길이  $7.4 \pm 0.20 \mu\text{m}$ 에 비하여 유의하게 낮은 장상피세포 핵 평균 길이를 보였다( $P < 0.05$ ) (Table 1). 이러한 기아에 따른 장상피세포 핵 평균 길이 감소는 본 기아실험 종료 시기인 기아후 12주까지 나타났으며, 기아후 12주의 기아군 장상피세포 핵 평균 길이는  $4.3 \pm 0.21 \mu\text{m}$  (59%의 최다 빈도)인 반면, 포식군의 장상피세포 핵 평균 길이는  $7.7 \pm 0.13 \mu\text{m}$  (97%의 최다 빈도)로 포식군의 장상피세포 핵 길이에 비해 유의하게 컸으며 본 기아실험 시작시의 장상피세포 핵 평균 길이와 유사하였다( $P < 0.05$ ) (Table 1, Fig. 1b). 미성숙 무지개송어인

경우 13°C 수온 조건에서 3개월간 기아시, 본 연구 결과와 유사하게 위 상피세포 조직에서 퇴행적인 변화가 일어난 바 있다(Robertson et al., 1963).

Fig. 2의 d, e, f는 각각 기아실험 시작시 및 기아실험 12주의 기아군 및 포식군의 장상피세포 조직상으로 기아시 간세포 핵 조직상과 마찬가지로 기아군은 기아실험 시작시에 비하여 장상피세포 핵 길이가 축소하고, 분포 밀도가 높았으며, 장상피세포 핵의 형태가 불규칙적이었다(Fig. 2e). 이와같이 기아시 조직학적 변화가 증장상피세포, 포피 및 근육섬유에서 나타난 바 있어, 기아시 killfish, *Fundulus heterneletus*의 장과 직장에서 상피세포 및 핵의 밀도와 분포 변화가 본 연구 결과와 같이 나타난 바 있고 아울러 고밀도의 공포가 관찰된 바 있다(Pickford, 1953). 반면 넙치 포식군은 기아실험 시작시와 유사한 조직상을 보였으며, 기아군에 비하여 장상피세포 핵의 분포가 희박하고 간세포 핵 길이가 크게 나타났으며 그 형태가 일정하였다(Fig. 3의 a, c).

본 연구에서의 간세포 핵 크기와 장상피세포 핵 길이 변화는 기아에 따른 각 조직의 축적에너지 소모에 기인된 조직학적 변화로, Park et al. (1995a, b)은 미꾸라지, *Misgurnus mizolepis*와 쟁뿔어, *Boleophthalmus pectinirostris*의 동면 시기별 근육성분 분포 및 조직학적 조사 결과, 동면 직후에는 근육성분을 구성하고 있는 영양성분이 동면 전보다 낮게 나타났고, 조직의 구성 역시 동면 직후에는 동면 전보다 근육의 지방질 염색 반응이 다소 약하게 나타나는 것으로 보아 동면 시기 즉, 기아시기에 이들 어류들도 근육 조직 내에 축적된 지방을 에너지원으로 사용하고 있는 것으로 보고한 바 있다.

기아중 어체의 기본적 대사는 축적에너지 소모에 의한 내생적으로 유지되는 것으로, 이때 체조직의 연속적인 고갈과 소모에 의한 성장감소 현상까지도 야기된다(Love, 1980; Weatherley and Gill, 1987; Lee et al., 1998; Park et al., 1998, 2001). 어류에서의 기아시 이러한 체조직 에너지는 다양한 조직에서 다양한 가동율로 소모될 수 있다(Weatherley and Gill, 1987; Lee et al., 1999; Hur et al., 2006a, 2006b). 본 연구 결과, 넙치를 대상으로한 12주간의 기아시 파악된 간세포와 장상피세포에서의 뚜렷한 퇴행적 조직상은 Hur et al. (2006a)에 의해 언급되었듯이, 넙치에서의 먹이 공급 없는 상태의 축양시나 본 종의 양식시 불가피하게 기아가 요구되는 상황에서의 영양상태 확인의 한 지표로 유용할 것이며, 자연산 넙치 어획시 영양상태와 연관된 서식지의 환경 및 어획된 넙치의 성장 상태 평가의 한 방편이 될 수 있을 것이다.

## 사 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 “2004년도 한국해양대학교 해양과학기술연구소 중점연구소 지원사업(KRF-2004-005-F00003)” 연구비 지원에 의해 수행된 연구 결과로, 본 연구 수행시 도움을 주신 관련 연구진들께 감사드립니다.

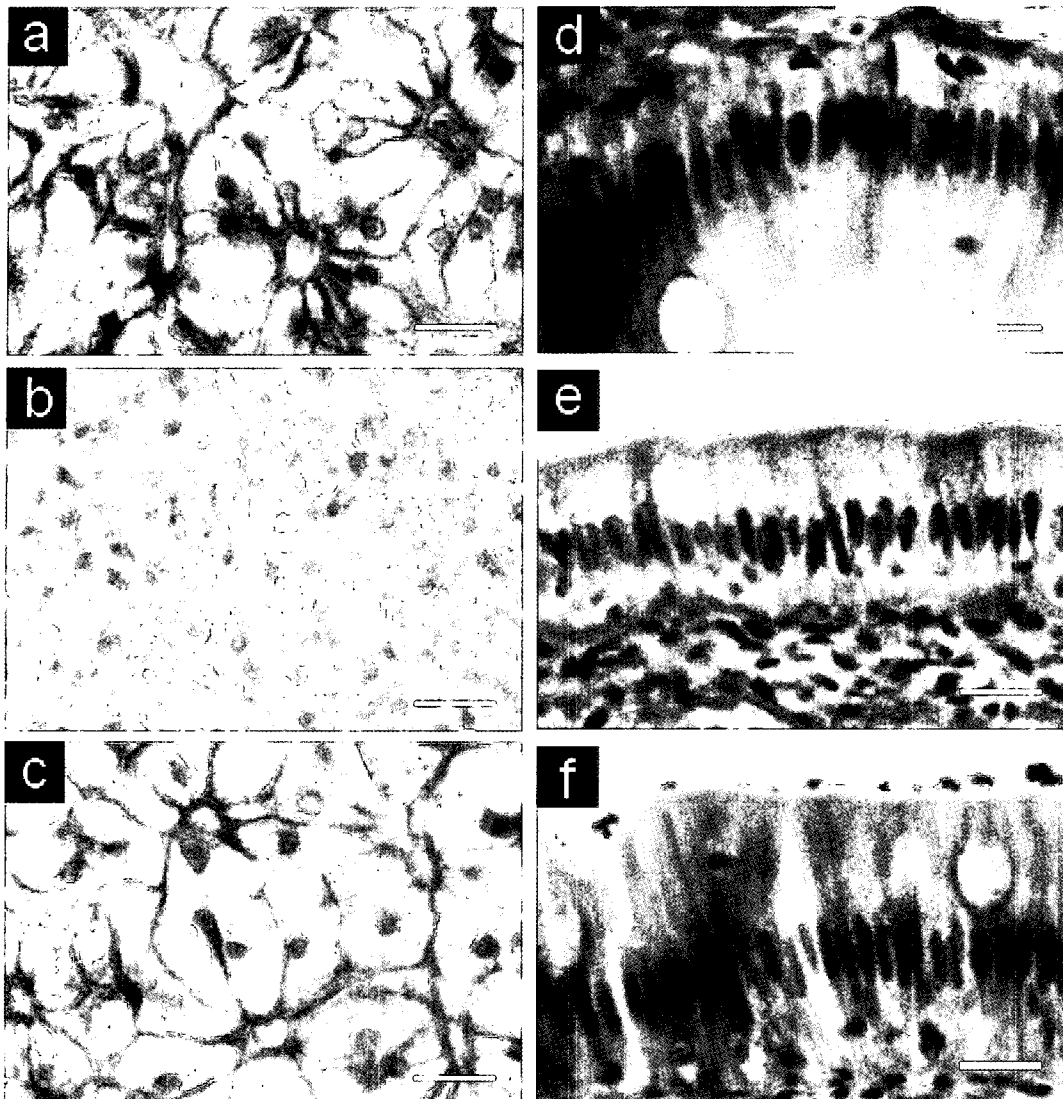


Fig 2. Histological appearance of hepatocytes of (a) initial, (b) fish starved for 12 weeks, and (c) fish fed for 12 weeks, and middle intestinal epithelium of (d) initial fish, (e) fish starved for 12 weeks, and (f) fish fed for 12 weeks in olive flounder. Note the reduction in hepatocyte nuclear size and height of middle intestinal epithelium in the starved group. a, b and c: Bar=50  $\mu$ m; d, e and f: Bar=10  $\mu$ m.

### 참 고 문 헌

- Choi, Y., J.H. Kim and J.Y. Park. 2002. Marine Fishes of Korea. Kyo-Hak Publ. Co., Ltd., Seoul, Korea, 1-645.
- Ehrlich, K.F., J.H.S. Blaxter and R. Pemberton. 1976. Morphological and histological changes during the growth and starvation of herring and plaice larvae. *Mar. Biol.*, 35, 105-118.
- Elliott, J.M. 1972. Rates of gastric evacuation in brown trout, *Salmo trutta* L. *Freshwat. Biol.*, 2, 1-18.
- Hur, J.W., J.H. Jo and I.S. Park. 2006a. Effects of long-term starvation on hepatocyte ultrastructure of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Ichthyol. Res.*, 53.
- Hur, J.W., S.R. Woo, J.H. Jo and I.S. Park. 2006b. Effects of starvation of kidney melano-macrophage centre in olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). *Aquacult. Res.*, 37, 821-825.
- Jobling, M. 1980. Effects of starvation on proximate chemical composition and energy utilization of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Biol.*, 17, 325-334.
- Lee, C.K., I.S. Park and S.B. Hur. 1998. Influence of starvation on the variations of hepatocyte nucleus in larvae of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *J. Aquacult.*, 11, 11-17.

- Lee, K.K., Y.H. Kim and I.S. Park. 1999. Effect of starvation on some nutritional parameters in *Rhynchocypris oxycephalus*. 1. Characteristics of the histological and biochemical changes. Kor. J. Ichthyol., 11, 33-41.
- Love, R.M. 1980. The Chemical Biology of Fishes. Vol. 2, Academic Press, London and New York, pp. 50-75.
- MOMAF. 2004. 2004 Statistics, Ministry of Maritime Affairs & Fisheries, [http://www.momaf.go.kr/info/stat/d\\_stat/d\\_stat\\_01.asp](http://www.momaf.go.kr/info/stat/d_stat/d_stat_01.asp)
- Mustafa, S. and A. Mittal. 1982. Protein, RNA and DNA levels in liver and brain of starved catfish, *Clarias batrachus*. J. Ichthyol., 28, 396-400.
- Park, I.S., C.K. Lee, J.H. Im, J.H. Kim and S.U. Kim. 1998. Effect of starvation on the growth and hepatocyte nuclear size of larval rockfish *Sebastes schlegeli* and larval spotted sea bass *Lateolabrax* sp. J. Aquacult., 11, 345-352.
- Park, I.S., J.H. Im, D.K. Ryu, Y.K. Nam and D.S. Kim. 2001. Effect of starvation on morphometric changes in *Rhynchocypris oxycephalus* (Sauvage and Dabry). J. Appl. Ichthyol., 17, 277-281.
- Park, I.W., J.S. Hong, K.K. Lee, J.B. Kim, K.H. Kang and H.O. Kim. 1995a. Histological observation on the seasonal changes of distribution of muscle components in hibernant fish. 2. Distributional changes of carbohydrate, protein and lipid components in the muscle tissues of mudskipper, *Boleophthalmus pectinirostris*. Kor. J. Ichthyol., 7, 195-202.
- Park, I.W., J.S. Hong, K.K. Lee, M.K. Kim, J.B. Kim and K.H. Kang. 1995b. Histological observation on the seasonal changes of distribution of muscle components in hibernant fish. 1. Distributional changes of carbohydrate, protein and lipid components in the muscle tissues of loach, *Misgurnus mizolepis*. Kor. J. Ichthyol., 7, 187-194.
- Pickford, C.E. 1953. A study of the hypophysectomized male killfish, *Fundulus heteroclitus* (Linn.). Bull. Blingham Oceanogr. Coll., 14, 5-41.
- Robertson, O.H., S. Hane, B.C. Wexler and A.P. Rinfret. 1963. The effect of hydrocortisone on immature rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Gen. Comp. Endocrinol., 3, 422-436.
- Strüssmann, C.A. and F. Takashima. 1989. Effects of temperature upon survival and histological changes of starved pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Nippon Suisan Gakkaishi, 55, 247-254.
- Theilacker, G.H. 1978. Effect of starvation on the histological and morphological characteristics of jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, larvae. Fish. Bull., 76, 403-414.
- Weatherley, A.H. and H.S. Gill. 1987. The Biology of Fish Growth. 4. Protein, Lipid and Caloric Contents. Academic Press, London, 139-146.
- Woo, S.R. 2005. Effect of starvation on parameters in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). MS Thesis, Korea Maritime University, Busan, 1-77.

---

2005년 8월 12일 접수  
2006년 6월 20일 수리