

Arsenic에 노출된 틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 항산화 효소반응에 미치는 수온의 영향

민은영·정지원*·강주찬**†

부경대학교 수산과학연구소, *국립수산물품질관리원, **부경대학교 수산생명의학과

Thermal effects on antioxidant enzymes response in Tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed Arsenic

EunYoung Min, Ji Won Jeong* and Ju-Chan Kang**†

Institute of Fisheries science, PuKyong National University, Busan 619-911

**National Fishery Products Quality Management Service, Busan 600-016*

***Department of Aquatic life medicine, Pukyong National University, Busan 608-737*

The effects of waterborne arsenic (As) exposure on antioxidant defense were studied in liver and gills of tilapia, *Oreochromis niloticus* under thermal stress. Tilapia were exposed to different As concentrations (0, 200 and 400 µg/L) at three water-temperatures (WT; 20, 25 and 30°C) for 10 days. In antioxidant response, glutathione (GSH) levels, glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST) activities were significantly decreased depend on WT in the gills after As exposure. Also, the range of fluctuation in these enzymes activities was most significantly increased at 30°C in the liver of tilapia exposed to As. The present findings suggest that a simultaneous stress by temperature change and As exposure could accelerate the alteration in antioxidant enzymes activities of tilapia.

Key words: Arsenic, Temperature, Antioxidant enzymes, *Oreochromis niloticus*

우리나라 평균 기온의 상승폭은 세계 평균 (년간 0.3~0.6°C)의 약 2배에 달하는 등 온난화의 진행속도가 세계 평균을 상회하고 있다. 따라서 비교적 빠른 생태계 변화가 예상되기 때문에 기후변화에 대한 지속적인 모니터링 및 관리가 필요한 실정이다 (Ha et al., 2004; Ahn et al., 2013). 이렇듯 기후 변화에 따른 수온 상승은 수중 생물의 성장, 번식 및 분포에 영향을 미친다. 특히, 어류는 미미

한 수온변화에도 민감하여 대사, 삼투압 조절 및 면역 등의 생명활동에 큰 영향을 받아 생존까지 위협을 받는다 (Logue et al., 1995). 최근 한국 연근해 수온의 장기변동에 관한 연구에서도, 우리나라 동, 서 및 남해역의 표층 수온의 지속적인 상승이 보고되었다 (Seong et al., 2010). 이에 따라, 국내외 연구에서 수온의 급변이 어류의 생리적 변화 및 스트레스 요인으로 작용하여, 생체 내 대사 및 혈액성상 등의 변화를 초래하였다는 보고가 있다 (Ryan, 1995; Park et al., 1999; Chang et al., 2001).

비소 (Arsenic)는 금속과 유사한 성질을 갖는 준금속 원소로서 특히, 광산 인근의 호수나 강에서

†Corresponding author: Ju-Chan Kang
Tel: +82-51-629-5944, Fax: +82-51-629-5938
E-mail: jckang@pknu.ac.kr

검출되며, 납, 수은, 카드뮴 등과 같이 현재 EPA에서 내분비장애 추정물질로 분류하고 있다 (Lawson et al., 2001). 비소의 수계 내 유입은 주로 강우, 공장폐수, 제초제 및 살충제의 남용에 의해 일어나는데, 박테리아에 의해 독성이 보다 강한 메틸- 또는 디메틸화된 비소 화합물로 전환되며, 친지질성으로 생체내의 지방조직에 축적된다 (Nam et al., 2001). 비소 화합물 중 3가 비소 (아비산 이온)인 arsenic trioxide (As_2O_3)가 독성이 가장 강한 것으로 알려져 있으며, sodium arsenite ($NaAsO_3$)는 해양 조류 증식 억제제로, As_2O_3 는 살충제 제조성분으로 사용되어 육상생물보다는 수서 생물에 농축이 심한 것으로 알려져 있다 (Bachleitner-Hofmann et al., 2001). 3가 비소 (As_2O_3)의 경우 블루길, 송어 및 금붕어에서 24~96시간 반수치사농도, 15~60 mg/L인 반면, 5가 비소 (비산 이온)은 상대적으로 독성이 2~10배 정도 낮다 (Sorensen, 1976). 또한, 비소의 독성은 이와 같이 화합물의 형태뿐만 아니라, 수온, 경도 및 pH 등의 수질 환경요인에 따라서도 다르게 나타난다 (Elsie, 1976; Sorensen, 1991).

비소의 독성 기전에는 여러 가지 모델이 제시되는데, 그 중 하나는 superoxide ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl (OH^{\cdot}) 및 peroxy (ROO^{\cdot})와 같은 활성산소 (ROS, reactive oxygen species)를 과도하게 발생시켜 세포 독성을 유발한다는 것이다 (Hughes, 2002). 특히, 세포 내 glutathione (GSH)와 같은 nonprotein thiols 및 thiol groups의 protein과 결합하려는 비소의 성질은 비소 독성의 또 다른 기전이며 (Chouchane and Snow, 2001), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR)과 같은 antioxidant enzymes 활성 및 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)와 같은 GSH-independent antioxidant의 조절 능력 또한 비소 독성 기전과 연관되어 있다 (Shi et al., 2004). GSH는 세포에서 ROS와 직접적으로 반응하여 독성물질의 대사 및 수송 과정에 관여하는 물질로, ROS뿐만 아니라 이들의 대사 산물과도 반응하여 세포의 방어 기작에 다방면으로 작용한다 (Dringen et al., 2000). 세포 내에 ROS 발생시, 주로 GSH는 GPx에 의해서 glutathione disulfide (GSSG)로 산화되고, GSSG는 GR

에 의해서 다시 GSH로 환원되는 redox cycle을 통해 유해물질 포합 (conjugation) 과정에 관여하고, glutathione S-transferase (GST)와 같은 효소의 도움을 받아 생체 외로 배설 시킨다. 이러한 생체변환 (biotransformation) 과정을 통하여 무독화 혹은 배설되지 못한 ROS는 DNA, RNA 및 단백질을 손상시켜 세포에 심각한 독성을 발휘한다 (Liu et al., 2005). 어류에 있어, 비소 독성에 관한 연구는 주로 어류 기관 내 비소 축적과 배출에 관한 연구가 주를 이루고 있다 (Takatsu et al., 1999; Jezierska et al., 2006; Culioli et al., 2009; Shah et al., 2009). 최근에는 틸라피아, *Oreochromis mossambicus*에서 성장률과 비소 축적률과의 상관관계를 평가한 비소 독성연구가 이루어졌으며 (Tsai et al., 2012), 틸라피아, *O. mossambicus*의 아가미와 간 조직에서 비소에 의한 조직병리학적 변화도 연구된바 있다 (Ahmed et al., 2013). 그러나, 어류에서 비소의 독성 기전을 밝히기 위한 산화 스트레스 및 이에 대한 항산화 반응에 관한 연구는 Zebrafish, *Danio rerio* 연구 (Ventura-Lima et al., 2009) 외에는 찾아보기 어려우며, 특히 수온 변화와 같은 복합적 요인에 의한 비소의 영향에 관한 연구는 거의 찾아볼 수 없다.

따라서 본 연구는 틸라피아, *O. niloticus*가 자연 생태계에서 처할 수 있는 비소로 인한 수질 오염과 수온 상승으로 인한 복합적인 영향을 평가하기 위하여 항산화 효소 즉, GSH 및 관련 효소들인 GR, GPx 및 GST 활성을 틸라피아의 간과 아가미에서 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

틸라피아, *O. niloticus*는 부경대학교 양어장에서 분양 받아 실험실 조건 (Table 1)에서 4주 이상 순치 시킨 후, 외관상 질병증세가 없는 건강한 개체 (전장, 14.98 ± 1.78 cm; 체중, 56.35 ± 8.77 g)를 선별하여 구간별 10마리씩 입식 하여 실험하였다.

실험과정

실험은 항온실에서 유리수조 ($50 \times 28 \times 31$ cm)를

Table 1. The chemical components of seawater and experimental condition used in the experiments

Test parameters	Value
Culture type	Renewal 24h toxicity test
Temperature (°C)	18.0±0.5
pH	8.1±0.5
Salinity (‰)	33.5±0.6
Dissolved oxygen (mg/L)	7.1±0.3
Chemical oxygen demand (µg/L)	1.13±0.1
Ammonia (mg/L)	12.5±0.7
Nitrite (mg/L)	1.3±0.3
Nitrate (mg/L)	11.48±1.0

사용하여 1일마다 실험용액을 교환하는 환수식으로 실시하였고, 실험조건은 Table 1과 같다. 실험 온도 유지는 히터기 (Electronic thermostat, MS701-H, Mink, Korea)를 사용하여 각각 20°C, 25°C 및 30°C로 유지하였다. 비소 실험용액은 sodium arsenite (NaAsO₂, Sigma-Aldrich Co.)를 증류수에 용해시켜 stock solution을 만든 후, 급성독성실험을 바탕으로 노출농도가 각각 0, 200 및 400 µg/L이 되도록 설정하였다. 10마리의 틸라피아를 각 농도 및 실험온도에 10일간 노출시킨 후, 간과 아가미를 적출하였고, 모든 실험은 2회 반복 실시하였고, 조직 내 GSH 및 관련 효소들 (GR, GPx와 GST)의 활성 검토를 위하여 아래와 같이 진행하였다.

적출한 간과 아가미는 washing buffer (0.1 M KCl, pH 7.4)로 세척 후, homogenizing buffer (0.1 M K₂HPO₄, 0.15 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA 및 1 mM PMSF)를 이용하여 Teflon-glass homogenizer (099CK4224, Glass-Col, Germany)로 균질화하였다. 조직 균질액을 4°C에서 12,000 ×g로 25분간 원심 분리하여 상층액을 효소 분석 전까지 -75°C에서 보관하였다.

Glutathione (GSH)

GSH 함량은 Richardson and Murphy (1975)의 방법에 의하여 측정하였다. 일정량의 시료에 working solution (0.01 M 5, 5'-dithiobis, 2-nitrobenzoic acid (DTNB), 0.1 M PBS buffer, pH 8.0)을 첨가하여 분광광도계 (Zenyth 2000, Anthos Labtec Instru-

ments GmbH, Austria)를 사용하여 412 nm에서 측정하였다. GSH 함량 계산은 10 nM reduced glutathione standard solution을 사용한 검량선을 이용하였다.

Glutathione reductase (GR)

GR 효소 활성은 Beutler (1984)의 방법으로 측정하였다. 시료에 1 mM EDTA가 포함된 potassium phosphate (pH 7.5), 2 mM oxidized glutathione (GSSG) 및 3 mM DTNB를 첨가한 후, 당일 조제한 NADPH 첨가 시 반응이 시작된다. NADPH가 oxidized glutathione (GSSG)를 reduced glutathione (GSH)로 환원시킨 후, DTNB에 의하여 반응이 일어난 용액을 412 nm에서 30초 간격으로 4분 동안 측정하였다.

Glutathione peroxidase (GPx)

GPx 효소 활성은 Bell et al. (1985)의 변형된 방법으로 측정하였고, H₂O₂를 기질로, sodium azide를 catalase 억제제로 사용하였다. 시료에 1 mM GSH, 0.1 M NADPH, 0.5 U glutathione reductase, 1 mM EDTA, 2 mM sodium azide 및 50 mM PBS (pH 7.4)이 포함된 혼합용액을 가하고 5분간 20°C에서 안정시킨 후, 2.5 mM H₂O₂를 첨가함과 동시에 반응이 시작된다. NADPH가 산화되는 비율을 340 nm에서 4분 동안 20초 단위로 측정하였다.

Glutathione S-transferase (GST)

GST 효소 활성은 Habig et al. (1975)의 변형된 방법에 의하여 측정하였다. 일정량의 시료에 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)와 증류수를 넣어 혼합하고, 10 mM GSH와 10 mM CDNB를 첨가한다. 실온에서 1분간 반응시킨 뒤 340 nm에서 5분간 30초 간격으로 증가하는 값을 측정하였다.

Protein

조직의 단백질 함량의 측정은 Bradford assay kit (Bio-Rad, California, USA) 방법으로 측정하였고, Bovine gamma globulin (Sigma, USA)을 이용하여 표준 검량선을 작성하였다.

유의성 검정

실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램 (SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시하고, 사후검정으로 Duncan's multiple range test를 통해 $P < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

Glutathione (GSH)

비소 (NaAsO_2)에 10일간 노출된 틸라피아, *O. niloticus*의 수온변화에 따른 GSH 함량의 변화는 Fig. 1에 나타내었다. 20°C일 때, 대조구에서, 간에

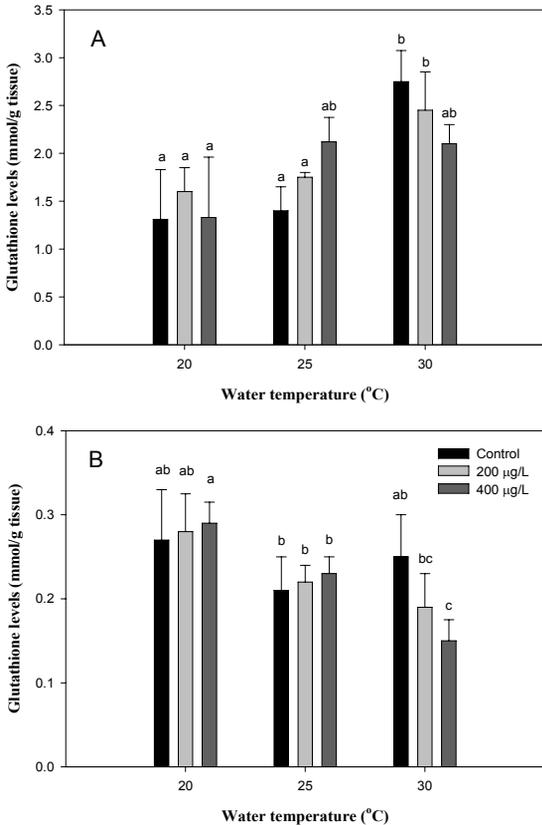


Fig. 1. Reduced glutathione (GSH) level in liver (A) and gill (B) tissues tilapia, *O. niloticus* exposed to various arsenic concentrations at 20, 25 and 30°C for ten-days. Each point represents the mean value \pm S.E of three replicates. Vertical bar denotes the standard error (n=10). Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

서의 GSH 함량은 1.31 ± 0.52 nmol/g tissue로 아가미, 0.27 ± 0.06 nmol/g tissue에 비해 높은 값을 보였다. 수온 변화에 따른 틸라피아 간에서의 GSH 함량은 대조구와 200 µg/L 농도구간에서 18°C일 때와 비교하여 수온이 25°C 일 때는 유의한 차이가 없었으나 ($P > 0.05$), 30°C에서는 대조구와 200 µg/L 농도구간에서 각각, 2.75 ± 0.33 및 2.45 ± 0.5 nmol/g tissue로 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$). 그러나, 각각의 온도 (20, 25 및 30°C)에서 비소 노출에 따라서는, 모든 구간 (200 및 400 µg/L)의 틸라피아의 간에서 대조구에 비하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 1A).

아가미에서는 대조구에서는 수온 변화에 따른 유의한 GSH 함량 변화가 관찰되지 않았으나, 400 µg/L에 노출된 경우는 30°C로 수온이 증가할수록 GSH 함량이 0.15 ± 0.02 nmol/g tissue로 대조구, 0.25 ± 0.05 nmol/g tissue에 비하여 유의하게 감소하였다 (Fig. 1B).

Glutathione reductase (GR)

비소 (NaAsO_2)에 10일간 노출된 틸라피아, *O. niloticus*의 수온변화에 따른 GR 활성의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 대조구의 간에서 20°C와 25°C에 노출되었을 때는 GR 활성이 각각, 180 ± 10 및 160 ± 9.8 nmol/min/mg protein 이었으나, 수온이 30°C일 때는 유의하게 증가하여 230 ± 24 nmol/min/mg protein이었다 (Fig. 2A). 또한 간에서, 200 µg/L 농도구에 노출된 경우에는 20°C에서는 유의하게 증가하였으나, 25°C와 30°C에서는 유의한 감소를 보였고, 400 µg/L 농도구에서는 모든 실험온도에서 유의한 감소를 보였다 ($P < 0.05$).

아가미에서의 GR 활성은 대조구에서 96~120 nmol/min/mg protein으로 온도 변화에 따른 유의한 변화가 관찰되지 않았다 ($P > 0.05$). 비소에 노출된 경우에는, 200 µg/L 농도에서는 20°C일 때는 대조구의 GR 활성, 113 ± 18 nmol/min/mg protein에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았으나, 25°C와 30°C에서는 각각, 53 ± 9.7 및 50 ± 7.9 nmol/min/mg protein으로 유의하게 감소하였다. 그러나, 400 µg/L 농도에 노출된 경우에는 모든 실험온도에서 유의하게 낮은 GR 활성 값을 보였다 (Fig. 2B).

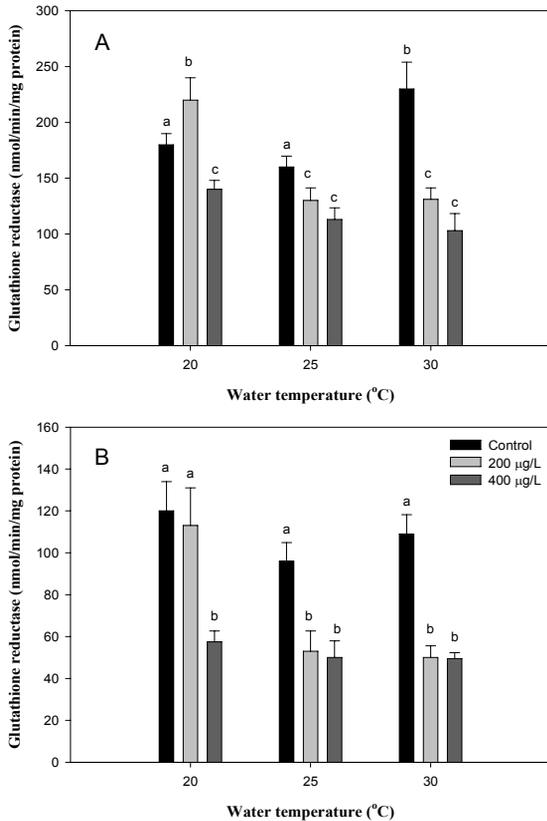


Fig. 2. Glutathione reductase (GR) activities in liver (A) and gill (B) tissues tilapia, *O. niloticus* exposed to various arsenic concentrations at 20, 25 and 30°C for ten-days. Each point represents the mean value \pm S.E of three replicates. Vertical bar denotes the standard error (n=10). Values with different superscript are significantly different ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

Glutathione peroxidase (GPx)

비소 (NaAsO_2)에 10일간 노출된 틸라피아, *O. niloticus*의 수온변화에 따른 GPx 활성은 Fig. 3에 나타내었다. 대조구의 간과 아가미에서, 수온 증가에 따른 GPx의 활성변화는 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3). 비소에 노출되었을 때는 간과 아가미에서 GPx의 현저한 감소가 관찰되었다 ($P<0.05$). 특히, 간에서 20°C일 때, 42 ± 7.2 nmol/min/mg protein인 것에 비해 400 µg/L 구간에서, 25°C에서는 23 ± 3.3 nmol/min/mg protein으로, 30°C에서는 8.2 ± 4.6 nmol/min/mg protein으로, 온도가 증가할수록 GPx 활성이 유의하게 감소하였다 ($P<0.05$).

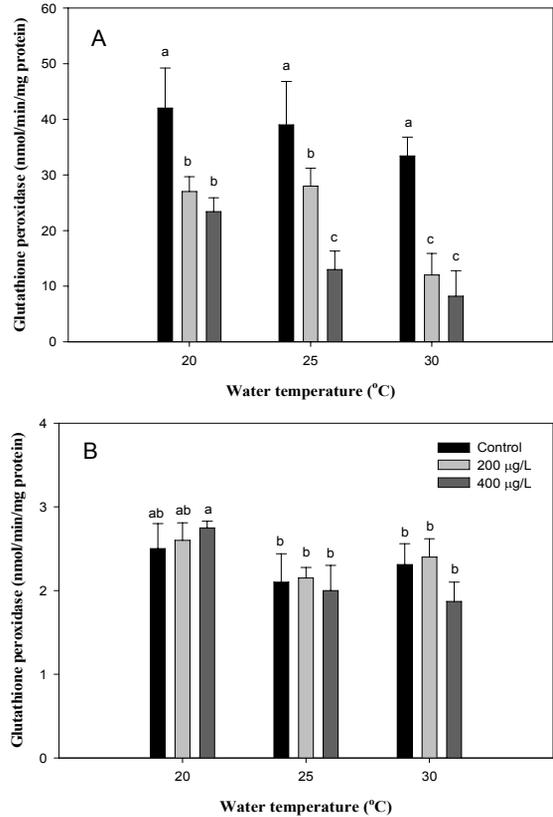


Fig. 3. Glutathione peroxidase (GPx) activities in liver (A) and gill (B) tissues tilapia, *O. niloticus* exposed to various arsenic concentrations at 20, 25 and 30°C for ten-days. Each point represents the mean value \pm S.E of three replicates. Vertical bar denotes the standard error (n=10). Values with different superscript are significantly different ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

아가미에서는 대조구에서 수온 변화에 따른 틸라피아의 GPx 활성 변화는 관찰되지 않았고 ($P>0.05$), 비소에 노출된 경우에는 간의 경우와 마찬가지로 20°C일 때와 비교하여 25°C와 30°C일 때, 400 µg/L 구간에서 유의한 GPx 활성의 감소를 보였다 (Fig. 3B).

Glutathione S-transferase (GST)

비소 (NaAsO_2)에 10일간 노출된 틸라피아, *O. niloticus*의 수온변화에 따른 GST 활성은 Fig. 4에 나타내었다. 비소에 노출되지 않은 대조구에서 GST의 활성은 간과 아가미에서 각각, 1.2 ± 0.1 및

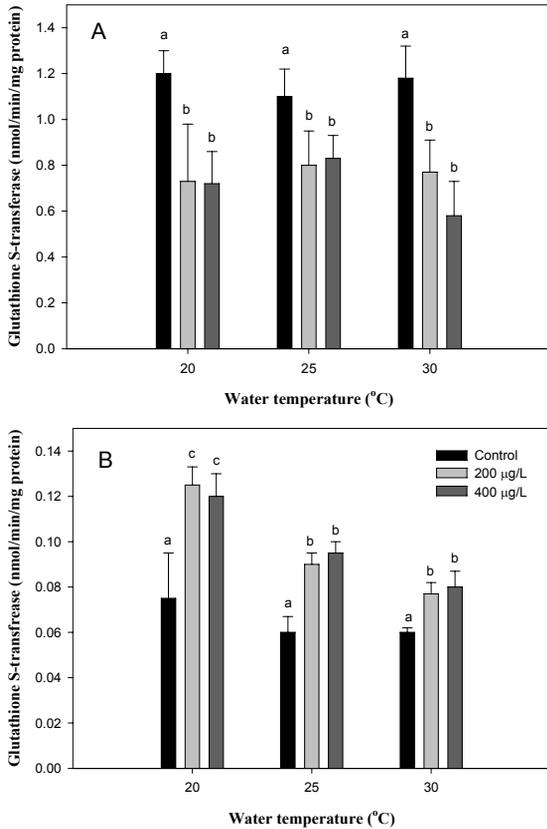


Fig. 4. Glutathione S-transferase (GST) activities in liver (A) and gill (B) tissues tilapia, *O. niloticus* exposed to various arsenic concentrations at 20, 25 and 30°C for ten-days. Each point represents the mean value \pm S.E. of three replicates. Vertical bar denotes the standard error ($n=10$). Values with different superscript are significantly different ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

0.07 \pm 0.02 nmol/min/mg protein으로 수온에 따른 유의한 차이가 없었다 ($P>0.05$). 비소에 노출된 경우에는 수온 변화와는 무관하게, 간에서 200 및 400 $\mu\text{g/L}$ 구간 모두에서 유의한 감소를 보였으나, 아가미에서는 유의한 GST 활성의 증가를 보였다 ($P<0.05$).

고 찰

비소는 호흡기 또는 소화기계를 통해 체내로 들어오며 주로 간에서 methylation 과정을 통해 대

사된다 (Csanaky et al., 2003). 수계환경에서 비소의 독성 및 축적은 비소 화합물의 형태, 어체 크기 뿐만 아니라, 수온, 경도 및 pH 등의 환경요인에 따라 다르게 나타난다 (McGeachy and Dixon, 1989; Kotsanis and Iliopoulou, 1999). 따라서, 본 연구에서는 틸라피아, *O. niloticus*를 20°C, 25°C 및 30°C, 각각의 수온에서 200 및 400 $\mu\text{g/L}$ 비소에 노출시킨 후, 이에 따른 GST 관련효소 변화를 조사하였다.

중금속에 의해 발생하는 free radical에 의한 산화 스트레스 또는 산화적 손상을 시험하기 위해서 antioxidant defense system 효소들이 biomarkers로 이용되는데, GR, GPx 및 비효소적 산화제인 GSH가 이에 속한다 (Hayes and McLellan, 1999). 비소 노출에 의한 독성은 일반적으로 ROS 발생에 의한 free radical이 유해작용의 주요 매개체라는 연구들이 보고되었다 (Shi et al., 2004; Valko et al., 2006). 세포 내에서 중금속에 의해 발생하는 ROS는 세포 손상 및 파괴의 원인물질로 작용하며, 특히 hydroxyl radical은 DNA를 직접 공격하여 세포사멸을 초래하는 것으로 알려져 있다 (Kitchin et al., 2003; Shi et al., 2004; Valko et al., 2006). 또한, 비소는 생체분자의 -SH기와 결합하는데, 특히, GSH의 -SH기와 결합하여 세포의 항산화 능력을 감소 시킴으로써 결과적으로 세포 내 ROS의 농도를 상승시키는 것으로 알려져 있다 (Jason et al., 2006).

수온 변화에 따른 항산화 효소 활성에 관한 연구는 고온 노출에 의해 항산화 효소의 활성 변화를 초래했다는 연구 (Cui et al., 2011; Cherkasov et al., 2007; Bagnyukova et al., 2007; Kaur et al., 2005), 혹은 저온 노출에 의해서는 이들 효소의 변화가 없었다 (Grim et al., 2010; 2013)는 연구 결과를 제시한다. 어류에서 수온 상승에 따른 항산화 효소의 활성 변화는 ROS의 증가로 인한 결과로 여겨지고 있으며 (Heise et al., 2003), 변화 양상은 다양하게 나타난다. 예를 들어, Bagnyukova et al. (2007)은 goldfish, *Carassius auratus*의 사육수온을 증가시켰을 경우, GSH, GST 및 GPx의 활성 증가를 보고하였으나, Kaur et al. (2005)의 연구에서는 수온 증가 시, spotted snakehead, *Channa punctata*의 간과 아가미에서 GSH, GST, GR 및 CAT 활성

의 감소를 보였다고 보고하였다. 이에 대해, Bagnyukova et al. (2007)는 수온변화에 적응하기 위한 일시적인 반응이라고 고찰하였으며, Kaur et al. (2005)는 lipid peroxidation에 의한 산화 스트레스가 원인이라고 하였다.

본 연구에서 틸라피아의 간과 아가미에서, 수온 증가에 따라서는 GSH 함량 및 GR 활성은 유의하게 증가하였으나, GPx 및 GST의 효소활성 변화는 관찰되지 않았다. 30°C 수온에 노출된 경우, 간에서의 GSH 함량 증가는 위에서 언급한 바와 같이 수온 증가에 의한 ROS 발생이 GSH 생성을 촉진한 것으로 사료된다. 이 결과는 담수 어류인 spotted snakehead, *Channa punctata* Bloch에서 heat stress 이 후, 간의 GSH 증가와도 같은 결과이다. 물론 이 연구에서, 우리 결과와 달리 아가미에서도 heat stress에 의해 GSH가 증가하였으나, 그 증가 폭이 간에 비해 1/3 이하 정도로 낮은 수치였다 (Kaur et al., 2005). 이렇게 어류의 간에서 GSH가 증가하는 것은 간의 amino acid substrates 흡수율이 증가하고, 생합성 효소들의 활성 증가로 인한 것으로, 특히, 과산화 (peroxidative) 과정이 활성화될 때 GSH를 더욱 필요로 하기 때문이다 (Gallagher et al., 1992; Kaur et al., 2005). GSH는 생체 내 free radical scavenger이자 항산화제로 redox reaction을 유지하고, ROS와 외인성 물질을 방어하는 중요한 역할을 할 뿐 아니라, 비소의 methylation 과정에서 5가 비소의 3가로의 환원에 관여하는 필수적인 보조요소 (co-factor)로 비소 배출에도 관여한다 (Mandal and Suzuki, 2002).

본 연구에서, 수온이 20°C와 25°C일 때, GSH 함량은 비소 노출에 따라 유의한 차이가 관찰되지 않았으나, 수온이 30°C일 때는 200 µg/L 구간에서 유의한 증가가 관찰되었다. 그러나, 아가미에서는 20°C와 25°C일 때는 간과 마찬가지로 비소 노출 이후, 유의한 차이가 없었으나, 수온이 30°C일 때는 유의한 감소가 관찰되었다 (Fig. 1). 본 연구에서 보여진 수온 증가 및 비소 노출에 따른 GSH 감소는 보통 척추동물의 간에서 일어나는 독성기전에 의해 설명될 수 있다. 비소가 조직 내의 'sulfhydryl (SH)기'가 풍부한 GSH와 직접적인 반응을 한 결과와 비소에 의해 생성·유도된 ROS에

의한 GSH 소실로 인한 것이다 (Tripathi and Flora, 1998). 이는 비소 (NaAsO₂)에 노출된 rat와 mouse의 조직 내 GSH 감소와도 일치하는 결과이다 (Choi et al., 2003). 또한, 본 연구에서 비소 노출 이후, 틸라피아 간에서 비록 낮은 농도 (200 및 400 µg/L)이긴 하나 GSH 함량의 유의한 차이가 나타나지 않은 것은 간이 비소의 치명적인 표적 장기 (target organ)는 아니기 때문이라고 사료된다 (Choi et al., 2003). 하지만, 비소에 의한 독성이 비소의 노출량과 노출기간 등에 따라 표적 장기가 다를 수 있기 때문에 (Liu et al., 2002; Choi et al., 2003), 향후 비소의 독성 연구를 수행함에 있어서는 이를 고려해야 할 것으로 사료된다.

세포 내 GSH의 변화는 산화불균형을 유도하여 세포의 항상성에 영향을 미칠 수 있다. 비소에 의해 유도된 GSH 변화는 GR, GPx 및 GST의 활성에도 연관되어 있으며, 이들은 산화 스트레스로부터 생물체를 보호하는데 중요한 효소이면서 동시에 수계 생물 오염 감시의 유용한 indicator이다 (Winston and Giulio, 1991).

GR은 스트레스를 받는 환경에서 세포 내 GSH/GSSG 항상성을 유지하기 위하여 GSSG를 환원시키는 중요한 역할을 하며, GSH의 합성에도 관여한다 (Atli and Canli, 2010). 본 연구에서는 비소 노출에 따른 GSH의 함량은 30°C에 노출된 아가미를 제외하고, 유의한 변화는 관찰되지 않았으나, GR의 활성은 비소 농도뿐만 아니라 수온의 증가에 따라서도 유의하게 감소하였다 (Fig. 2). 중금속 노출에 의해 pro-oxidative 영향의 결과로 GR의 활성이 감소되면 GSH의 고갈을 초래할 수 있고, 이로 인해 redox cycle을 정상적으로 유지할 수 없게 된다 (Elia et al., 2003).

GPx는 H₂O₂를 분해하여 H₂O와 O₂로 만드는 효소로, GPx가 활성을 발휘하기 위해서는 GSH를 필요로 하며, H₂O₂를 분해하는 과정인 redox-cycle에서 antioxidant enzymes으로서의 그 기능을 한다 (Winston and Giulio, 1991). 본 연구에서 비소에 노출된 틸라피아의 간 및 아가미에서 GPx는 감소하였다 (Fig. 3). 이러한 감소는 간에서 수온 및 비소 농도가 높을수록 더욱 가속화 되었는데, 이는 다른 어종에서 카드류 및 구리에 노출되었을 때와

유사한 결과이다 (Ahmad and Santos, 2004; Baeck, 2012). 또한, Elia et al. (2000)는 높은 농도의 수온에 노출된 catfish, *Ictalurus melas*에서 GSH의 증가가 GPx의 감소를 유도하였다고 보고하였다.

GST는 잘 알려진 항산화 효소로 세포 내 수송 및 방어 역할을 하며, GST의 기질은 대부분이 외인성 물질이나 oxidative stress의 생성물인 전자 친화체 (electrophiles)로 GSH 사이에 thioether bond를 형성하여 이물질을 해독화하는 기능을 한다 (John et al., 1995). 본 연구에서 수온 증가에 따라서는 유의한 GST 활성변화는 관찰되지 않았고, 비소 노출에 따라 틸라피아의 간에서는 유의한 감소를 보였으나, 아가미에서는 유의하게 증가하였다 (Fig. 4). Maiti and Chatterjee (2001) 보고에 따르면 비소는 GR, GPx 및 GST 활성의 감소를 초래하며, 이는 비소 노출의 농도 및 기간 그리고 조직에 따라 다르게 나타난다고 한다. 비소에 노출된 common carp, *Cyprinus carpio*에서도 조직간의 다른 항산화 활성을 보였는데, 이는 비소 독성으로부터 세포를 보호하기 위한 각 산화 효소의 특이적 전략에 인한 것으로 보인다고 하였다 (Ventura et al., 2009). Profenofos에 노출된 틸라피아, *O. mossambicus*의 아가미에서도 본 연구 결과와 마찬가지로 GSH의 감소와 GST 효소 활성의 증가를 보였다 (Kavitha and Venkateswara, 2009). 일반적으로 GST는 많은 어종에서 외인성 화합물에 노출되었을 때 증가하며, 이는 화학적 스트레스에 대한 적응반응으로 볼 수 있다 (Hayes and Pulford, 1995). 반대로 GST 활성의 감소는 세포 내 ROS 증가의 결과로 볼 수 있으며, 산화 스트레스 정도가 심하지 않은 경우에는 방어작용을 위한 보상기전으로 인하여 GST 효소 증가를 유도하지만, 노출 기간 연장과 같은 심각한 산화 스트레스는 산화 손상 및 보상 반응의 손상으로 인해 효소의 활성이 오히려 억제된다 (Livingstone, 2001; Sun et al., 2006).

이와 같이 GSH 함량 및 GR 활성의 증가와 GPx 및 GST 활성 감소와 같은 항산화 반응의 변동은 독성물질 노출 시, 보상관련 효소들의 유도가 일어나지 않아 산화 스트레스로부터 어체를 보호할 수 없는 상황, 즉, 어체 내 항상성 기능의 소실을

의미한다. 특히, 본 연구에서 30°C에서의 그 변동폭이 큰 것은 수온 증가로 인한 호흡 빈도수의 증가와 비소 배출기능을 하는 GSH 및 관련 효소들의 기능 감소로 인한 비소 흡수의 가속화가 원인 일 것이다.

결론적으로 본 연구는 틸라피아의 간과 아가미에서 GSH 및 항산화 효소인 GR, GPx 및 GST에 미치는 비소의 영향은 수온과 상당히 관련이 있음을 보여준다. 즉, 단순히 비소만을 노출 했을 때보다 수온 상승이 동반되었을 때, 어류의 산화 스트레스에 대한 방어 기작의 감소를 촉진시키며, 이로 인해 비소 독성이 증가됨을 의미한다.

요 약

본 연구에서는 수온변화에 따른 비소 (As) 노출의 영향을 틸라피아 *Oreochromis niloticus*의 간과 아가미에서 항산화 방어기작 (antioxidant defense system)을 통해 알아보려 한다. 틸라피아를 수온이 각각, 20, 25 및 30°C 일때, 비소 농도 0, 200 및 400 µg/L에서 10일간 노출시킨 후, glutathione (GSH) levels, glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST) 효소 활성을 측정하였다. 비소 노출 이후, 틸라피아의 간과 아가미에서 이들 항산화 효소는 수온 변화에 따라 유의하게 변화하였다. 특히, 다른 온도구간에 비하여 수온이 30°C 일 때, 비소에 노출된 틸라피아의 간에서 이들 효소의 변동폭은 가장 유의하게 증가하였다. 즉, 본 연구는 틸라피아의 간과 아가미에서 GSH 및 항산화 효소인 GR, GPx 및 GST에 미치는 비소의 영향은 수온 상승이 동반되었을 때, 어류의 산화 스트레스에 대한 방어 기작의 감소를 촉진시켰음을 보여준다.

References

- An, J.H. and Lee, K.H.: Correlation and hysteresis analysis of air-water temperature in four rivers: Preliminary study for water temperature prediction. Kor. Environ. Pol. Res. 12(2): 17-32, 2013.
- Ahmad, I.M.P. and Santos, M.A.: Enzymatic and non-enzymatic antioxidants as an adaption to phag-

- ocytic-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 2: 290-302, 2004.
- Ahmed, M.K., Mamun, Md.H.A., Parvin, E., Akter, M.S. and Khan, M.S.: Arsenic induced toxicity and histopathological changes in gill and liver tissue of freshwater fish, tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Exp. Toxicol. Pathol.*, 65: 903-909, 2013.
- APHA 1992: Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th edition. American Public Health Association, Washington, D.C., 1992.
- Atli, G. and Canli, M.: Response of antioxidant system of freshwater fish, *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 73: 1884-1889, 2010.
- Bachleitner-Hofmann, T., Gisslinger, B., Grumbeck, E. and Gisslinger, H.: Arsenic trioxide and ascorbic acid: synergy with potential implication for the treatment of acute of myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 112(3): 783-786, 2001.
- Baeck, S.K.: Combined effect of Cu and temperature on physiological and biochemical change of rock fish, *Sebastes schlegeli*. PuKyong National University, Master's Thesis, 2012
- Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, K.B. and Lushchak, V.I.: Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. *J. Thermal Biol.* 32: 227-234, 2007.
- Bell, J.G., Cowey, C.B. Adron, J.W. and Shanks, A.M.: Some effects of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* 53: 149-157, 1985.
- Beutler, E. Red cell metabolism: Manual of biochemical methods (3rd ed.). Grune Stratton, Inc., Orlando, FL 32887, London, 1984.
- Chang, Y.J., Hur, J.W., Kim, H.K. and Lee, J.K.: Stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and fat cod (*Hexagrammos otakii*) by the sudden drop and rise of water temperature. *J. Korean Fish. Soc.*, 34 (2): 34(2):91-97, 2001.
- Cherkasov, A.A., Overton, R.A., Sokolov, Jr. E.P. and Sokolova, I.M.: Temperature-dependent effects of cadmium and purine nucleotides on mitochondrial aconitase from a marine ectotherm, *Crassostrea virginica*: a role of temperature in oxidative stress and allosteric enzyme regulation. *J. Exp. Biol.* 210: 46-55, 2007.
- Choi, B.S., Kang, D.W., Lee, J.Y., Park, E.S., Hong, Y.P., Yang, J.S., Lee, H.M. and Park, J.D.: Acute toxicity of arsenic in Rats and Mice. *K. J. Occup. Environ. Med.* 15(4): 323-334, 2003.
- Chouchane, S. and Snow, E.T.: In Vitro Effect of Arsenical Compounds on Glutathione-Related Enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 14(5): 517-522, 2001.
- Csanaky, I. Nemeti, B. and Gregus, Z.: Dose-dependent biotransformation of arsenite in rats- not. S-adenosylmethionine depletion impairs arsenic methylation at high dose. *Toxicol.* 183: 77-91, 2003.
- Cui, Y., Du, Y., Lu, M. and Qiang, C.: Antioxidant responses of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae exposed to thermal stress. *J. Thermal Biol.* 36: 292-297, 2011.
- Culioli, J.L., Calendini, S., Mori, C. and Orsini, A.: Arsenic accumulation in a freshwater fish living in a contaminated river of Corsica, France. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 72: 1440-1445, 2009.
- Dringen, R., Gutterer, J.M. and Hirrlinger, J.: Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* 267: 4912-4916, 2000.
- Elia, A.C., Dörr, A.J.M., Mantilacci, L., Taticchi, M.I. and Galarini, R.: Effects of mercury on glutathione and glutathione-dependent enzymes in catfish (*Ictalurus melas* R.). In: Markert B, Friese K (Eds.), Trace Elements- Their distribution and effects in the environment: Trace metals in the environment. Vol. 4, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 411-421, 2000.
- Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Martin Dorr, A.J. and Mantilacci, L.: Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 55: 162-167, 2003.
- Elsie, M.B.S.: Thermal effects on the accumulation of arsenic in green sunfish, *Lepomis cyanellus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 4(1): 8-17, 1976.
- Gallagher, E.P., Canada, A.T. and Di Giulio, R.T.: The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquat. Toxicol.* 23: 155-168, 1992.
- Grim, J.M., Miles, D.R.B. and Crockett, E.L.: Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or suscepti-

- bility to lipid peroxidation in fish muscle. *J. Exp. Biol.* 213: 445-452, 2010.
- Grim, J.M., Simonik, E.A., Semones, M.C., Kuhn, D.E. and Crockett, E.L.: The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 164(A): 383-390, 2013.
- Ha, K.J., Ha, E.H., Yoo, C.S. and Jeon, E.H.: Temperature trends and extreme climate since 1909 at big four cities of Korea. *AP. J. Atmos. Sci.* 40(1): 1-16, 2004.
- Habig, W., Pabst, J. and Jakoby, W.B.: Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139, 1974.
- Hayes, J.D. and Pulford, D.J.: The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 445-600, 1995.
- Hayes, J.D. and McLellan, L.I.: Glutathione and Glutathione-dependent enzymes represent a Co-ordinately regulated defense against oxidative stress. *Free Rad. Res.* 31: 273-300, 1999.
- Heise, K., Puntarulo, S., Portner, H.O., Abele, D.: Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 134(C): 79-90, 2003.
- Hughes, M.F.: Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133: 1-16, 2002.
- Jason, M.H. Hong, Z. and Dean, P.J.: Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 138-145, 2006.
- Jeziarska, B. and Witeska, M.: The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation, NATO Science Series*, 69: 107-114, 2006.
- John, D.H. and David, J.P.: The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isozymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical reviews in Biochem. Molecul. Biol.* 30(6): 445-600, 1995.
- Kavitha, P. and Venkateswara, R. J.: Sub-lethal effects of profenofos on tissue-specific antioxidative responses in a Euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1727-1733, 2009.
- Kaur, M., Atif, F., Ali, M., Rehman, H. and Raisuddin, S.: Heat stress-induced alterations of antioxidants in the freshwater fish *Channa punctate* Bloch. *J. Fish Biol.* 67: 1653-1665, 2005.
- Kitchin, K.T. and Ahmad, S.: Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 137: 3-3, 2003.
- Kotsanis, N. and Ilipoulou, G.J.: Arsenic induced liver hyperplasia and kidney fibrosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by microinjection technique: A sensitive animal bioassay for environmental metal-toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62 (2): 169-178, 1999.
- Lawson, N.M. and Mason, R.P.: Concentrations of mercury, methylmercury, cadmium, lead, arsenic and selenium in the Rain and Stream water of two contrasting watersheds in Western Maryland. *Water Res.* 35(17): 4039-4052, 2001.
- Liu, J., Liu, Y., Powell, D.A., Walkes, M.P. and Klassen, C.D.: Multidrug-resistance mdr 1a/1b double knockout mice are more sensitive than wild type mice to acute arsenic toxicity, with higher arsenic accumulation in tissues. *Toxicol.* 170: 55-62, 2002.
- Liu, H., Zhang, J.F., Shen, H., Wang, X.R. and Wang, W.M.: Impact of Copper and Its EDTA Complex on the Glutathione-Dependent Antioxidant System in Freshwater Fish (*Carassius auratus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74: 1111-1117, 2005.
- Livingstone, D.R.: Contaminant-stimulated reaction oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 656-666, 2001.
- Logue, J.P.T. and Cossins, A.R.: Heat injury and resistance adaptation in fish. *J. Ther. Biol.* 20: 191-197, 1995.
- Maiti, S. and Chatterjee, A.K.: Effects on levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency. *Arch. Toxicol.* 75: 531-537, 2001.
- Mandal, B.K. and Suzuki, K.T.: Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58: 201-235, 2002.
- McGeachy, S.M. and Dixon, D.G.: The impact of temperature on the acute toxicity of arsenate and arsenite

- ite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17(1): 86-93, 1989.
- Nam, S.S., Lee, C.W., Ryn, J.R., Park, E.R., Nam, K.C., Rhu, H.I., Jeon, S.H., Na, J.G., Choi, D.I. and Park, K.S.: Effects of Arsenic on the gonadal development in Crucian carp. *Kor. J. Environ. Toxicol.* 16(2): 51-56, 2001.
- Park, M.Y., Chang, Y.J. and Kang, D.Y.: Physiological response of the cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to the sharp changes of water temperature. *J. Aquaculture*, 12(3): 221-228, 1999.
- Richardson, R.J. and Murphy, S.D.: Effect of glutathione depletion on tissue deposition of methylmercury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31: 505-519, 1975.
- Ryan, S.N.: The effect of chronic heat stress on cortisol levels in the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. *Experimentia*, 51: 768-774, 1995.
- Seong, K.T., Hwang, J.D., Han, I.S., Go, W.J., Suh, Y.S. and Lee, J.Y.: Characteristic for long-term trends of temperature in the Koreans waters. *J. K. Soc. Mar. Environ.*, 16(4): 353-360, 2010.
- Shah, A.Q., Kazi, T.G., Arain, M.B., Jamali, M.K., Afridi, H.I., Jamil, N.J., Baig, J.A. and Kandhro, G.A.: Accumulation of arsenic in different fresh water fish species – potential contribution to high arsenic intakes. *Food Chem.* 112: 520-524, 2009.
- Shi, H., Hudson, L.G. and Liu, K.J.: Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 37: 852-593, 2004.
- Sorensen, E.M.B.: Toxicity and accumulation of arsenic in green sunfish, *Lepomis cyanellus*, exposed to arsenate in water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 15: 756-764, 1976.
- Sorensen, E.M.B.: Arsenic. In: Sorensen, E.M.B. (Ed.), *Metal poisoning in Fish*. CRC Press, pp. 61-99, 1991.
- Sun, Y., Zhang, H., Yu, J., Shen, Y., Yin, H., Liu, H. and Wang, X.: Bioaccumulation and antioxidant responses in goldfish *Carassius auratus* under HC Orange No 1 exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 63: 430-437, 2006.
- Takatsu, A., Kuroiwa, T. and Uchiumi, A.: Arsenic accumulation in organs of the fresh water fish *Tribolodon hakonensis*. *J. Trace Elements Med. Biol.* 13: 176-179, 1999.
- Tripathi, N. and Flora, S.J.S.: Effect of some thiol chelators on enzymatic activities in blood, liver and kidneys of acute arsenic (III) exposed mice. *Biomed. Environ. Sci.* 11: 38-45, 1998.
- Tsai, J.W., Huang, Y.H., Chen, W.Y. and Liao, C.M.: Detoxification and bioregulation are critical for long-term waterborne arsenic exposure risk assessment for tilapia. *Environ. Monit. Assess.* 184: 561-572, 2012.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M.: Free-radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1-40, 2006.
- Ventura-Lima, J., de Castro, M.R., Acosta, D., Fattorini, D., Regoli, F., de Carvalho, L.M., Bohrer, D., Geracitano, L.A., Barros, D.M., Marins, L.F., da Silva, R.S., Bonan, C.D., Bogo, M.R. and Monserrat, J.M.: Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 149(4C): 538-43, 2009.
- Winston, G.W. and Giulio, R.T.: Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19: 137-161, 1991.

Manuscript Received : July 10, 2014

Revised : July 29, 2014

Accepted : August 04, 2014