

Aroclor 1254에 노출된 Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*의 혈액학적 변동

김재원 · 지정훈 · 홍수희 · 강주찬*

부경대학교 수산생명의학과

Hematological Changes of Olive Flounder, *Paralichthys Olivaceus* Exposed to Aroclor 1254

Jae-Won Kim, Jung-Hoon Jee, Su-Hee Hong and Ju-Chan Kang*

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Abstract - Effects of Aroclor 1254, on hematological disturbance were investigated in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Flounders were exposed to waterborne PCB (3.0 µg L⁻¹) for 60 days. Blood samples were taken to determine their hematological disturbances. Plasma calcium concentration was significantly decreased in PCBs exposed flounder compared to the control group, while magnesium and inorganic phosphorus concentrations in PCBs exposed flounders were not significantly influenced during the test period. Although plasma total protein and albumin level were significantly reduced compared to the control group after 40 days, plasma glucose level was found to be significantly increased over the control group. Exposure to waterborne PCBs resulted in significant increase in the various enzyme activities, such as GOT, GPT and ALP in the flounder. The results of the present study led us to conclude that concentration of PCBs 3.0 µg L⁻¹ of the estuarine could markedly affect the hematological distribution of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Key words : Aroclor 1254, Hematological changes, *Paralichthys olivaceus*

서 론

어류를 포함하는 많은 야생동물의 내분비, 생식, 면역 및 신경계 장애를 유발하는 수많은 종의 합성화학물질이 환경 내에 존재하고 있다(Colborn and Clement 1992; Guillette *et al.* 1994; Kime 1995; Rolland *et al.* 1995; Rolland *et al.* 1997; Miller *et al.* 2002). PCBs는 POPs (persistent organic pollutants) 로 분류되어있기 때문에,

먹이 사슬을 통해 여러 먹이 단계로 확대될 수 있다. 따라서 야생동물 뿐만 아니라 인류의 보건의에도 악영향을 유발하는 물질로 알려져 있다(Mimmi 1994; Loomis *et al.* 1997; Hansen 1998; Cheek *et al.* 1999). 이러한 잔류성이 강한 생물축적성 화학물질은 오염지역에서 대기나 수계를 통하여 상당히 폭넓게 확산될 수 있기 때문에 이들 물질에 대한 위험성이 널리 지적되고 있다(Blais *et al.* 1998). 또한, PCBs를 비롯하여 Lindane, 1, 1, 1-trichloro-2, 2'bis (chlorophenyl)ethane (DDT), alkylphenol polyethoxylates (APEs) 및 몇몇 알킬페놀 물질도 POPs에 속하며, 이들 물질의 어류 내의 축적은 에스트

* Corresponding author: Ju-Chan Kang, Tel. 051-620-6146, Fax. 051-628-7430, E-mail. jckang@pknu.ac.kr

로겐 작용(estrogenic actions)을 통하여 생식 및 발생에 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다(McLachlan 1985; Colborn and Clement 1992).

PCBs는 공업용 재료로서 여러 분야에 사용되었으나, 기름에 잘 녹고 분해가 잘 되지 않는 이화학적 특성 때문에 체내에 축적이 잘 되어 만성 장애를 일으키는 것으로 알려지면서 1970년대 초부터 사용이 제한 또는 금지되었지만, 현재에도 수계에 잔류되고 있는 실정이다(Muir *et al.* 1988). 하지만, PCBs를 포함한 수많은 합성 화학물질의 수계오염은 전 세계적으로 날로 가속화되어 가고 있으며, 심지어 극지방에서도 PCBs가 높게 검출되어 매우 우려해야 할 실정이다(AMAP 1998).

현재까지 PCBs에 대한 연구로는 잉어, *Cyprinus carpio*의 해독효소의 유도(Van der Oost *et al.* 1998), 송어의 유전 독성 유발(Belpaeme *et al.* 1996), 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*의 스테로이드 생성 방해(Miranda *et al.* 1992), 어류의 CYP1A의 유도(Dixon *et al.* 2002) 그리고 생식소와 간에 미치는 조직학적 병변(Sivarajah *et al.* 1978) 등이 있다.

생화학 및 생리학적 분석은 수계 독성 및 바이오모니터링에서 매우 유용한 방법으로 사용되고 있다(McDonald and Milligan 1992; Folmar 1993). 간은 척추동물의 주 대사 기관이기 때문에 연안 환경에서 수계 오염물질의 생체 평가에 주요한 기관으로 생각되고 있다(Broeg *et al.* 1999). 이와 함께 오염물질에 대한 진단에 있어 혈액 성분의 분석은 매우 유용한 생태독성학적 방법이라고 생각할 수 있다(Pacheco and Santo 2001). 따라서 본 연구는 저서어류인 넙치, *Paralichthys olivaceus*를 대상으로 PCBs의 만성적 노출에 따른 혈액학적 변동을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험어

넙치, *Paralichthys olivaceus* (평균체중, 37.24 g)는 남해안 소재 육상수조식 양어장에서 구입하여 300 L의 순환여과식 수조에서 2주일 이상 순치시켰다. 먹이는 넙치용 부상사료를 어체중의 3%를 2회에 나누어 공급하였고, 실험에는 외관상 질병의 증세가 나타나지 않고, 섭이율이 양호한 개체를 선택하여 사용하였다.

2. 노출 조건

실험은 PVC수조(70×45×20 cm)를 사용하여 실험해

수는 2일 마다 환수하였고, 희석 해수는 미공여과(공경, 3 µm)시킨 해수를 사용하였으며 광주기는 12시간 간격(light: 12 hour, dark: 12 hour)으로 조절하였다. 실험용액은 PCBs(Aroclor 1254, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany)를 acetone에 1:1로 녹인 후, 2차 희석을 통하여 1 g L⁻¹의 표준용액을 만든 다음, 배출수 허용농도인 3.0(±0.1) ppb로 설정하였으며, 대조구는 Aroclor 1254 희석에 사용한 아세톤과 희석수의 일정량을 첨가한 해수를 사용하였다. 실험에 사용한 해수의 수질 성상은 수온, 염분, pH 및 용존산소가 18.0±0.3°C, 32.7±0.4‰, 8.2±0.5 및 7.5±0.6 mg L⁻¹였다.

3. 실험방법

실험어를 20일 간격으로 60일간 PCBs(Aroclor 1254)에 노출하였으며, 실험 하루전에 절식한 실험어를 대상으로 각 농도구당 10마리씩 ethyl aminobenzoate(Sigma, USA)로 마취시킨 후, 헤파린(25,000 IU, 중외제약) 처리된 1회용 주사기를 사용하여 미부혈관으로부터 채혈하였다. 채혈한 혈액은 4°C에서 2시간동안 방치한 후에 3,000 g에서 5분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 혈장 성분 및 효소활성 측정은 채혈 후 곧바로 실시하거나 냉장상태를 유지하면서 3시간 이내에 측정하였다.

4. 혈장 성분 및 효소활성 분석

혈장 무기성분의 변동은 calcium, magnesium 및 inorganic phosphorus에 대하여 측정하였다. 측정은 calcium은 o-cresolphthalein-complexone법, magnesium은 xylydyl blue법, inorganic phosphorus는 phosphomolybdenate법에 의하여 임상용 kit(Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하여 측정하였다. 혈장 유기성분 변동은 total protein, albumin, glucose에 대하여 측정하였다. 즉, total protein은 Lowry법, albumin은 BCG법, glucose은 glucose-oxidase법으로 시판되고 있는 임상용 kit(Sigma, USA)를 사용하여 측정하였다. 혈장 효소활성의 변동은 GOT(Glutamic oxalate transaminase), GPT(Glutamic pyruvate transaminase), ALP(Alkaline phosphatase)를 측정하였다. GOT와 GPT는 Reitman-frankel법, ALP는 kind-king법으로 임상용 kit(Asan Pharm. Co., Ltd.)로 측정하였다.

5. 유의성 분석

실험결과의 통계적 처리는 SPSS 통계 프로그램(SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA-test를 실시한 후 사후 다중

비교는 최소 유의차 검정 (LSD)으로 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)을 판단하였다.

결과 및 고찰

1. 혈장 무기성분의 변동

PCBs 노출에 따른 혈장 무기성분의 변동을 Fig. 1에 나타내었다. 무기성분 중 calcium은 PCBs 노출 20일째부터 60일까지 모든 노출구에서 감소하는 경향이 보였고, 특히 노출 20일째는 대조구에 비해 18%의 유의적 감소를 보였다 ($P < 0.01$). 하지만, magnesium 및 inorganic phosphorus는 PCBs 노출 전 기간동안 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이와 같이 PCBs 노출에 따른 calcium 농도의 저하는 신장의 세뇨관 상피세포의 재흡수 기능 장애, 아가미 상피세포의 막 투과성 변화 및 장관 흡수기능 장애에 기인된다고 생각된다 (Jiro and Yasuo 1977; Roch and Maly 1979).

2. 혈장 유기성분의 변동

PCBs 노출에 따른 혈장 유기성분의 변동을 Fig. 2에 나타냈다. 유기성분 중 total protein은 PCBs 노출 20일째부터 대조구에 비해 유의한 감소를 보여 ($P < 0.05$), 실험종료시기인 60일까지 이러한 경향이 지속되었다 ($P < 0.01$). Glucose는 노출 40일 이후 대조구에 비해 유의한 증가를 나타냈다 ($P < 0.01$). 어류의 total protein 및 albumin농도의 변화는 최근 환경오염의 지표로 사용되고 있으며 (Ito and Murata 1990; Hodson *et al.* 1992), 일반적으로 오염물질에 의해 감소하며, 그 원인 중의 하나는 장관 손상에 따른 흡수장애를 들 수 있다 (Mayer *et al.* 1985; Yamawaki *et al.* 1986; Khattak and Hafeez 1996; Shen *et al.* 1997). 따라서, PCBs 노출에 의한 넵치의 total protein 및 albumin농도의 감소는 장관의 흡수장애로 인한 영향으로 추정되며, PCBs 노출 20일 이후 이러한 영향이 나타나는 것으로 생각된다. PCBs 노출에 따른 glucose의 변동을 조사한 결과 노출 40일째부터 증가하기 시작하여 노출 60일째에는 대조구에 비해 유의한 증가를 나타냈다 ($P < 0.01$). Glucose의 경우 외인성 화학물질과 같은 독성물질에 대하여 증가하는 경향을 나타내는데, 이것은 아드레날린의 과분비에 의한 과혈당 조건을 유발할 수 있으며 체내 glycogen을 분해하여 혈장 glucose가 증가하게 된다 (Gupta 1974). 따라서 여러 독성물질에 의한 관찰을 통해서 이러한 체내 glycogen 함량의 감소 및 고갈을 보고한 예도 있다 (Ghosh 1987).

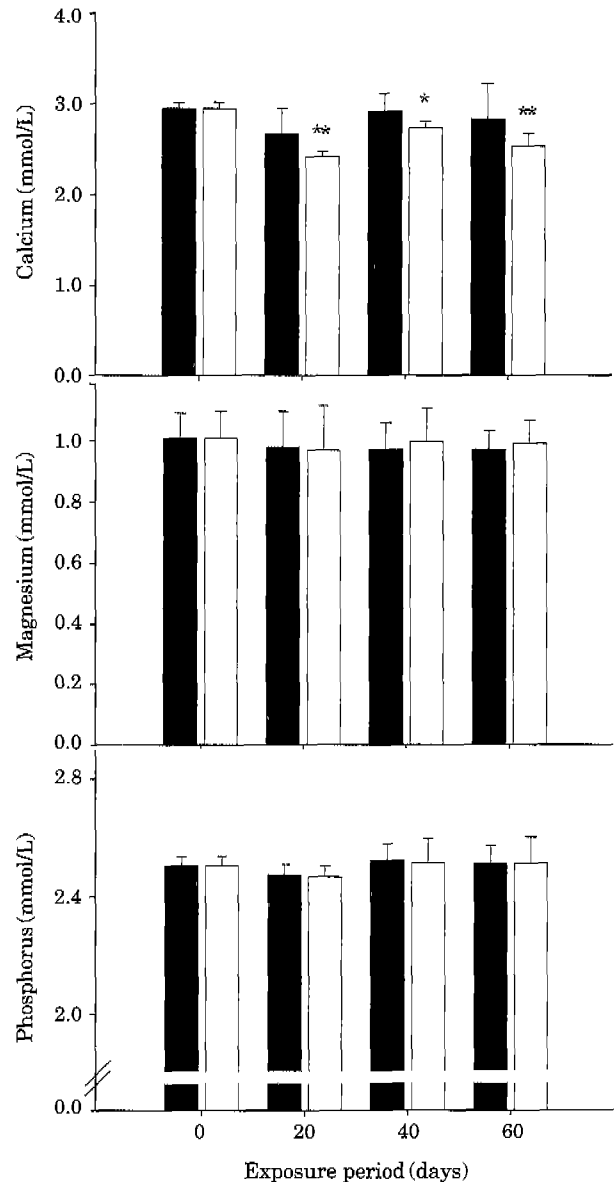


Fig. 1. Changes of inorganic components in plasma of olive flounder, *P. olivaceus* exposed to waterborne PCBs for 60 days. Value are means \pm S.E. ($n = 10$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ relative to initial control value. Black : control group; grey : PCBs group.

이러한 외인성 화학물질에 의한 glucose의 증가는 독성 노출에 따른 스트레스 반응의 일환으로 에너지를 필요로 하는 어류의 생리 반응으로 생각된다.

3. 혈장 효소활성의 변동

PCBs 노출에 따른 혈장 효소활성의 변동을 Fig. 3에 나타냈다. ALP 효소 활성은 노출 20일째부터 유의적으로 증가하여 실험종료까지 지속되었다 ($P < 0.01$). 외인성

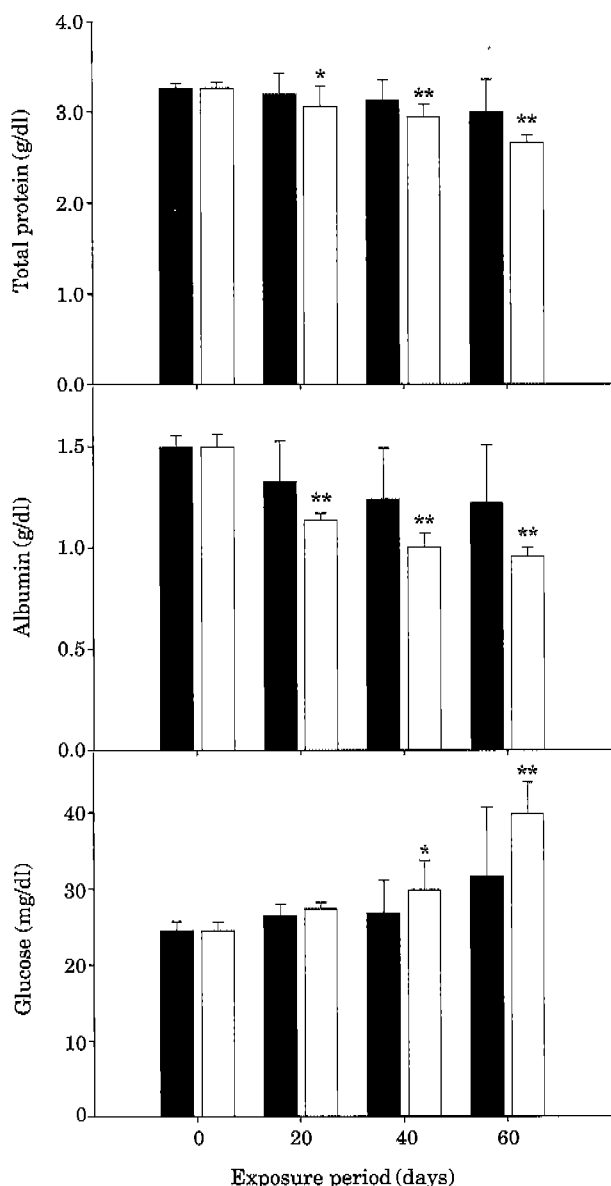


Fig. 2. Changes of organic components in plasma of olive flounder, *P. olivaceus* exposed to waterborne PCBs for 60 days. Value are means \pm S.E. (n = 10); *P < 0.05, **P < 0.01 relative to initial control value. Black : control group; grey : PCBs group.

물질에 대한 독성으로 인한 세포 괴사로 ALP 효소 활성은 증가하는 것으로 알려져 있고 (Gupta and Dhillon 1983; Reddy *et al.* 1992), 이러한 경향은 간 손상 및 간 기능 변동에 그 원인이 있는 것으로 생각된다. PCBs 노출에 의한 넘치 GOT는 노출 40일째부터 유의한 증가가 확인되었고 (P < 0.01), 노출 후 60일째에는 대조구에 비해 60% 증가하였다. GPT의 경우 PCBs 노출에 따라서 GOT에 비해 그 반응이 좀 더 신속히 나타났으며, 노출

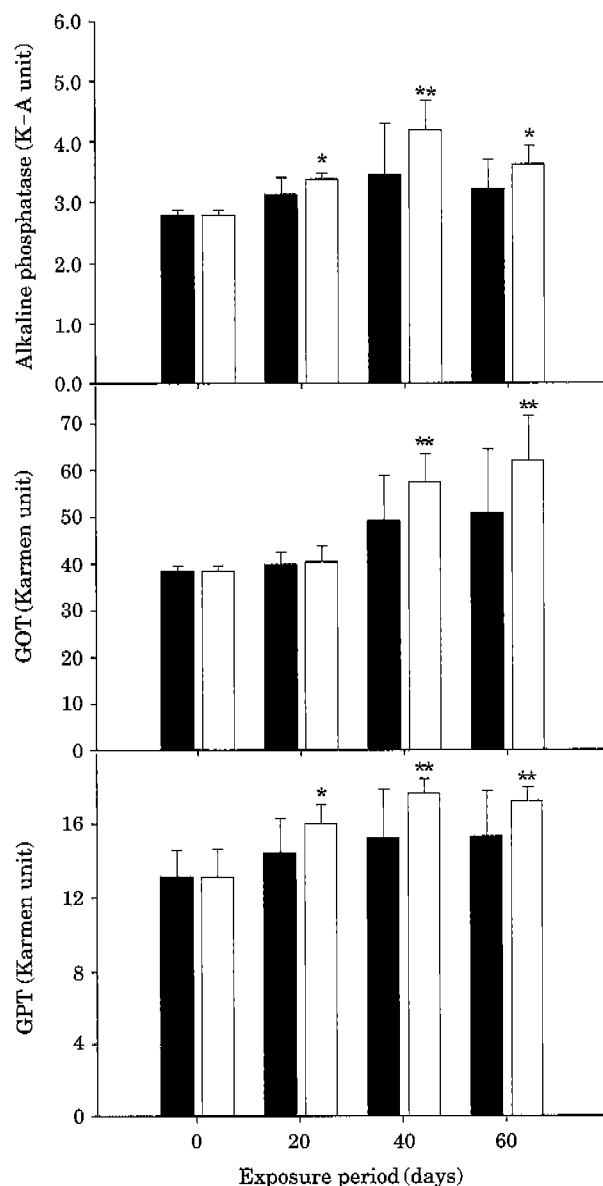


Fig. 3. Changes of enzyme activity in plasma of olive flounder, *P. olivaceus* exposed to waterborne PCBs for 60 days. Value are means \pm S.E. (n = 10); *P < 0.05, **P < 0.01 relative to initial control value. Black : control group; grey : PCBs group.

20일부터 이러한 변동은 실험 종료시까지 나타나 노출 60일째에 대조구에 비해 31% 증가하여 유의한 차이를 나타냈다 (P < 0.01). 따라서 독성물질에 대한 반응 중 ALP 효소의 변동 외에 혈장 전이 효소도 유의한 지표라 생각된다. 혈장 전이 효소인 GOT 및 GPT의 활성은 오염물질에 의한 간, 심장 및 근육 등의 조직 손상의 지표로 사용되기 때문에 어류의 환경성 질병 진단에 이용되고 있으며 (Sakamoto and Yone 1978; Shich 1978;

Smith and Ramos 1980), 일반적으로 오염물질에 의해 증가하는 경향을 나타낸다(Casillas and Ames 1985; Rao *et al.* 1990). 본 연구에서도 혈장 전이효소의 고농도 활성은 PCBs에 의한 조직손상을 간접적으로 나타내는 것으로 생각되며, PCBs 노출에 GOT보다 GPT가 더 민감한 것으로 판단할 수 있었다.

적 요

PCBs 농도 $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$ 노출에 따른 넙치의 혈액학적 변동을 조사하기 위하여 60일간 침지실험을 실시하였다. PCBs에 노출된 넙치의 무기성분 중에 혈장 magnesium과 inorganic phosphorus는 유의적 변동이 없었으나, calcium은 대조구에 비해 유의한 감소를 보였다. 또한 유기성분 중에 total protein과 albumin은 노출 20일째부터 유의한 감소를 보여 실험 종료시까지 이러한 감소는 지속되었고, glucose는 노출 40일 이후 유의한 증가를 나타내었다. 혈장 ALP와 GPT의 활성도는 노출 20일 이후부터 대조구에 비해 유의한 증가를 나타내었고, GOT는 노출 40일 이후 유의한 증가를 나타내었다. 이상의 결과는 해양에 $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 PCBs 농도가 존재할 경우 넙치의 혈액학적 변동을 야기할 수 있음을 의미한다.

참 고 문 헌

- AMAP. 1998. Assessment Report: Arctic Pollution Issues. Arctic Monitoring and Assessment Program, Oslo. 859 pp.
- Belpaeme K, K Delbeke, L Zhu and M Kirsch-Volders. 1996. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 11(5):485-492.
- Blais JM, DM Schindler, DCG Muir, LE Kimpe, DB Donald and B Rosenberg. 1998. Accumulation of persistent organochlorine compounds in mountains of western Canada. *Nature*. 395:585-588.
- Broeg K, S Zander, A Diamant, G Krüner, I Paperna and HV Westernhagen. 1999. The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring. I. North Sea. *Helgolander Marine Res.* 53:171-194.
- Casillas E and W Ames. 1985. Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys vetulus* Girard, from polluted areas of Puget Sound, Washington. *J. Fish Dis.* 8(5):437-449.
- Cheek AO, K Kow, J Chen and JA McLachlan. 1999. Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin. *Environ. Health Perspect.* 107:273-278.
- Colborn T and C Clement (Eds.). 1992. Chemically-induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection, vol. XXI. Princeton Scientific, Princeton, NJ, USA. pp. 403.
- Dixon TJ, JB Taggart and SG George. 2002. Application of Real time PCR determination to assess interanimal variabilities in CYP1A induction in the European flounder (*Platichthys flesus*). *Mar. Env. Res.* 54:267-270.
- Folmar LC. 1993. Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: A bibliography and synopsis of selected effects. *Environ. toxicol. Chem.* 12: 337-375.
- Ghosh TK. 1987. Impact of commercial grade hexagor and sumidon on behaviour and some aspects of carbohydrate metabolism in fish *Cyprinus carpio*. *Uttar Pradesh J. Zool.* 7:48-62.
- Guillette LJ, TS Gross, GR Masson, JM Matter, HF Percival and AR Woodward. 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* 102:680-688.
- Gupta PK. 1974. Malathion induced biochemical changes in rats. *Acta Pharmac. Tox.* 35:191-194.
- Gupta AK and SS Dhillon. 1983. The effects of a few xenobiotics on certain phosphates in the plasma of *Clarias batrachus* and *Cirrhina mrigala*. *Toxicol. Lett.* 15:181-186.
- Hansen LG. 1998. Stepping backward to improve assessment of PCB congeners toxicities. *Environ. Health Perspect.* 106:171-189.
- Hodson PV, M McWhirter, K Ralph, B Gray, D Thivierge, JH Carey, G Van-Der-Kraak, DM Whittle and MC Levesque. 1992. Effects of bleached kraft mill effluent on fish in the St. Maurice River. Quebec. *Environ. Toxicol. Chem.* 11(11):1635-1651.
- 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.
- Jiro K and I Yasuo. 1977. Effects of oral administration of cadmium on fish-I. Analytical results of the blood and bones. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 43(5):523-526.
- Khattak IUD and MA Hafeez. 1996. Effect of malathion on

- blood parameters of the fish, *Cyprinion watsoni*. Pak. J. Zool. 28(1):45-49.
- Kime DE. 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. Rev. Fish. Biol. Fish. 4:52-96.
- Loomis D, SR Browning, AP Schenck, E Gregory and D Savitz. 1997. Cancer mortality among electric utility workers exposed to polychlorinated biphenyls. Occup. Environ. Med. 54:720-728.
- Mayer KS, FL Mayer and A Witt. 1985. Waste transformer oil and PCB toxicity to rainbow trout. Am. fish. Soc. 114:869-886.
- McDonald DG and CL Milligan. 1992. Chemical properties of the blood. pp. 55-133. In Fish Physiology (Hoar WS, DJ Randall and AP Farrell, eds.). Academic Press, San Diego.
- McLachlan JA (Ed.). 1985. Estrogens in the environment II. Elsevier, New York, USA.
- Miller GG, LI Sweet, JV Adams, GM Omann, DR Passino-Reader and PG Meier. 2002. In vitro toxicity and interactions of environmental contaminants (Arochlor 1254 and mercury) and immunomodulatory agents (lipopolysaccharide and cortisol) on thymocytes from lake trout (*Salvelinus namaycush*). Fish Shellfish Immunol. 13(1): 11-26.
- Mimmi AJ. 1994. PCBs, PCDDs and PCDFs. pp. 204-243. In Handbook of ecotoxicology Vol. 2 (Calow P, eds.). Blackwell Scientific, Cambridge.
- Miranda CL, MC Henderson, JL Wang, HA Chang, HD Hendricks and DR Buhler. 1992. Differential effects of 3, 4, 5, 3', 4', 5'-hexachlorobiphenyl (HCB) on interrenal steroidogenesis in male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol. 103C:153-157.
- Muir DCG, RJ Norstrom and M Simon. 1988. Organochlorine Contaminants in arctic food chains: Accumulation of specific polychlorinated biphenyls and chlordane-related compounds. Environ. Sci. Technol. 22:1071-1079.
- Pacheco M and MA Santo. 2001. Tissue distribution and temperature-dependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactate and glucose levels. Environ. Int. 26:149-155.
- Rao PP, KV Joseph and KJ Rao. 1990. Histopathological and biochemical changes in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. J. Nat. Conserv. 2(2):133-137.
- Reddy DC, P Vijayakumari, V Kalarani and W Davis Ronald. 1992. Changes in erythropoietic activity of *Sarotherodon mossambicus* exposed to sublethal concentration of the herbicide diuron. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49:730-737.
- Roch M and EJ Maly. 1979. Relationship of cadmium-induced hypocalcemia with mortality in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the influence of temperature on toxicity. J. Fish. Res. Board Can. 36(11):1279-1303.
- Rolland R, M Gilbertson and T Colborn (eds). 1995. Environmentally induced alterations in development: a focus on wildlife. Environ Health Perspect. 103(Suppl. 4):107.
- Rolland RM, M Gilbertson and RE Peterson (eds). 1997. Chemically-Induced Alterations in Functional Development and Reproduction of Fishes. SETAC Press, Pensacola.
- Sakamoto S and Y Yone. 1978. Requirement of red sea bream for dietary iron. II. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 44(3):223-225.
- 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.
- Shich MS. 1978. Changes of blood enzymes in brook trout induced by infection with *Aeromonas salmonicida*. J. Fish. Biol. 11:13-18.
- Sivarajah K, CS Franklin and WP Williams. 1978. Some histopathological effects of Aroclor 1254 on the liver and gonads of rainbow trout, *Salmo gairdneri* and carp, *Cyprinus carpio*. J. Fish. Biol. 13:411-414.
- Smith AC and F Ramos. 1980. Automated chemical analysis in fish health assessment. J. Fish. Biol. 17:445-450.
- Van der Oost R, SCC Lopes, H Homen, K Satumalay, R Van der Bos, H Heida and NPE Vermeulen. 1998. Assessment of environmental quality and inland water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*): Use of a bioactivation : detoxication ratio as a biotransformation index (BTI). Mar. Environ. Res. 46(1-5):315-319.
- Yamawaki 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.

Manuscript Received: January 29, 2003

Revision Accepted: April 10, 2003

Responsible Editorial Member: Youn Choi
(Kunsan Univ.)