

## 양식산 넙치, *Paralichthys olivaceus* 식세포의 식작용 활성에 미치는 chloramphenicol의 영향

서정수 · 정소정 · 이상환 · 김나영 · 엄혜경 · 허민도 · 정현도 · 정준기<sup>†</sup>  
부경대학교 수산생명의학과

## Effects of Chloramphenicol on Chemiluminescence Response of Leukocytes Isolated from Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Jung Soo Seo, So Jung Jung, Sang Hwan Lee, Na Young Kim, Hye Kyung Eom, Min Do Huh, Hyun Do Jung and Joon Ki Chung<sup>†</sup>

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

This study was performed to investigate the immunological side effects of chloramphenicol (CAP) on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. To investigate immunological effects on olive flounder, we determined the changes of chemiluminescence (CL) response of flounder kidney-derived leucocyte after the treatment of CAP *in vivo* and *in vitro*. The CL activity was significantly decreased in a dose-dependent manner during the treatment of CAP *in vitro*. Similarly, a dose-dependent reduction of CL response, although not significant, were observed during the treatment of CAP *in vivo*. The results suggest that CAP reduced the function of flounder phagocytosis *in vivo* and *in vitro*, indicating the immunosuppressive ability of CAP.

**Key words** : Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, Chloramphenicol, Chemiluminescence activity, Side effects, Immunosuppressive ability.

본 연구는 chloramphenicol (CAP)의 투여에 따른 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 면역학적 변화를 조사하였다. 면역학적 영향을 조사하기 위하여, 넙치에 CAP를 각각 농도 의존적 (150, 300, 500 mg/kg/B.W./day)으로 *in vitro* 및 *in vivo* 상으로 투여한 후, 넙치로부터 분리한 식세포의 chemiluminescence (CL) 반응을 측정함으로써 면역학적 변화를 관찰하였다. *In vitro* 상에서 분리한 넙치 식세포에 대한 면역 능력 검사를 위해 CL 반응을 조사하였을시에, CAP의 농도에 의존적으로 leucocytes의 CL 반응이 유의하게 억제되었다. 이와 유사하게, *in vivo* 실험에서는

분리한 넙치 식세포의 CL 반응이 시간이 지남에 따라 (3주째) 높은 농도에서 억제되는 변화를 관찰하였다. 이러한 결과들을 미루어 볼 때, CAP 투여가 넙치의 면역반응의 억제에 관여하리라 추정되었다.

Chloramphenicol (CAP)은 1947년 *Streptomyces venezuelae*에서 첫 번째로 분리된 항생제로서 70S 리보솜의 50S subunit을 결합하여 세균내의 단백질 합성을 억제시킨다고 알려져 있다 (김, 1997). 이 항생제는 1948년부터 typhus fever 치료제로 사용되어 왔고, salmonellosis와 *Haemophilus influenzae*에 의한 여러 가지 감염,

<sup>†</sup>Corresponding Author : Joon Ki Chung, Tel : 051-620-6142,  
Fax : 051-628-7430, E-mail : jkchung@pknu.ac.kr

특히 뇌막염이나 호흡계 질환, 신경계 질환을 치료하는데 널리 이용되었으며 지금은 주로 귀나 눈 감염 치료제로도 주로 사용되고 있다 (김, 1997). 게다가, 이 약물은 저렴한 가격과 좋은 약동학적 특성을 가지고 있기 때문에 다른 항생제에 비해 많이 사용되어 왔으나, CAP는 혈구 감소증, 혈소판 감소증, 재생 불량성 빈혈 및 백혈병 유발 등과 같은 다양한 부작용을 유발한다고 알려져 있다. (Holt *et al.*, 1993, 1997; Yunis, 1973, 1988; Trevett *et al.*, 1992). 이러한 잠재된 독성에 의한 예상치 못한 부작용으로 국내외에서는 특수한 경우를 제외하고는 식용 가축 및 가축 사료등의 사용을 금지하고 있다. 그럼에도 불구하고 CAP의 그람 음성 · 양성 세균등에 대한 광범위한 항균효과와 저렴한 가격등의 장점 때문에 전 세계적으로 여전히 불법적으로 많이 사용되고 있는 실정이다. 현재, 다양한 항생제들이 육상동물의 면역체계에 대한 영향이 보고되고 있으나 (Briheim and Dahlgren, 1987; Nickerson *et al.*, 1986; Dosogne *et al.*, 1998; Paape and Miller, 1990; Paape *et al.*, 1990), CAP가 유발하는 국내 양식산 어류인 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에 있어서의 면역체계에 대한 연구는 미진한 실정이다. 현재 다양한 동물들에 있어서 면역학적 영향을 측정하기 위하여 대개 식세포의 식활성의 변화를 식세포가 생성하는 reactive oxygen intermediates (ROIs)의 변화를 chemiluminescence (CL) 반응으로 많이 측정하고 있다 (Paape and Miller, 1990; Paape *et al.*, 1990).

따라서, 본 연구에서는 금지 항생제임에도 불구하고 현재 불법적으로 양어장에서 사용되고 있는 CAP가 어류의 면역기관에 부작용을 일으키는지를 알아보기 위하여 다양한 농도의 CAP를 넙치에 투여하였을 때 넙치로부터 분리한 식세포의 식작용 활성을 CL 반응의 변화로서 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어 및 약물 처리

실험어는 동해안 소재 양어장에서 육성 중인 평균 체중 60 g 정도인 넙치를 분양받아 절식하면서 2주 동안 순치시켰다.

Chloramphenicol (CAP; 헤로세친 / 종근당)은 phosphate buffered saline (PBS)에 녹여 보존액을 만들어 희석하여 사용하였다. 양식넙치의 식세포에 대한 *in vitro* 상의 CL 반응에 대한 영향을 측정하기 위하여 2주간 순치시킨 넙치의 두신 (head kidney)을 분리하여 아래와 같은 CL 반응의 영향을 측정하였다. *In vivo* 상태의 양식넙치에 대한 CAP 투여에 따른 CL 반응의 영향을 측정하기 위하여, 넙치 28마리를 MS-222로 마취시켜, 어체 무게 당 150, 300, 500 mg/kg/B.W./day을 4일 동안 매일 하루에 한번 씩 존대를 통하여 경구 투여 (orally administrated)하였으며, 대조구는 동량의 PBS를 경구 투여하였다. CAP 투여 후 실험어는 20°C의 정수식 수조 (크기: 288 L)에 수용하였으며, 수조의 물은 수질의 악변을 방지하기 위하여 미리 20°C로 유지한 여과해수로 매일 전부 또는 반씩 교환하여 주었다. 4회의 CAP 경구 투여 후, 실험어는 사료 투여를 중지하였으며, 3주일 후에 두신을 절취하여 CL 반응을 측정하였다.

### 어류의 leucocyte 분리 및 cell 제작 과정

실험어를 MS-222로 마취 후 두신을 분리하여 heparin (10 U/ml), streptomycin (100 U/ml)과 penicillin G (100 µg/ml)를 첨가한 HBSS (Hanks balanced salt solution × 1) 2 ml을 넣은 다음 steel mesh에 놓고 균질화하였다. 준비한 40% percoll gradient를 3 ml을 넣은 멸균 test tube에 균질화한 두신을 혼합하여 percoll gradient로 상정하였다. 그런 다음 2,000 rpm 4°C에서 30분간 원심 분리하여 leukocytes band를 추출하였다. 추출한 leukocytes는 HBSS를 이용한 원심분리 (3,000 rpm, 4°C, 5 min)로 2번 세척하였다.

이렇게 분리한 세포를 trypan blue로 염색

(1:1) 한 후, 희석하여  $2 \times 10^6$  /ml로 세포수를 맞추었다. 분리한 세포에 대한 CAP의 영향을 조사하기 위해 1.5 g/ml로 stock된 약물을 실험구에 각각 15, 30, 50 mg/test tube이 되도록 세포에 첨가하고, 대조구는 methanol만 넣은 것을 사용하여 28°C 배양기에서 각각 2 시간 배양한 다음 4°C에서 30분간 배양하여 CL 반응을 측정하였다.

### Luminol 및 zymosan 제작

Luminol stock 용액 (100 ml)은 KOH 0.78 g, boric acid 0.618 g, luminol 0.014 g 을 멸균 증류수 10 ml에 녹인 다음 PBS를 첨가하여 만들었다. CL을 측정하기 전에 PBS로 10배 희석하여 사용하였다.

Zymosan은 Scott and Klesius (1981)의 방법에 따라, 멸균된 시험관에 zymosan 50 mg과 PBS 5 ml을 넣어 boiling water bath에서 30분간 녹인 후 600 g 5분간 원심 분리하여 pellet을 만들었다. 이 pellet에 10 ml 넘치 혈청을 넣어 25°C에서 30분간 배양하여 옵소닌 (opsonin) 작용이 일어나도록 유도하였다. 이 현탁액을 원심 분리하여 5

ml의 PBS로 두 번 세척하고 25 ml PBS에 재부유시켜 zymosan 1 mg/ml PBS가 되도록 자극물을 제작하여 CL 측정에 사용하였다.

### Chemiluminescence (CL) 반응 측정

CL 반응 측정을 위해 test cuvette에 zymosan 0.3 ml, luminol 0.7 ml, leukocytes 0.4 ml을 각각 첨가하여 잘 혼합한 후 automatic photoluminometer (Bio-orbit 1251, Sweden)를 사용하여 활성화된 식세포에서 생산되는 reactive oxygen intermediates (ROIs)를 측정하였다.

### 통계학적 분석

결과의 통계적 처리는 Sigma plot을 이용하여 student's t-test 로 실시하였으며,  $p < 0.05$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

### 결과 및 고찰

넘치로부터 분리한 leukocyte 세포 ( $2 \times 10^6$  cell)에 대한 *in vitro* 상의 CAP의 영향은 CAP를 0, 15, 30, 50 mg/test tube 농도별로 현탁하여 28

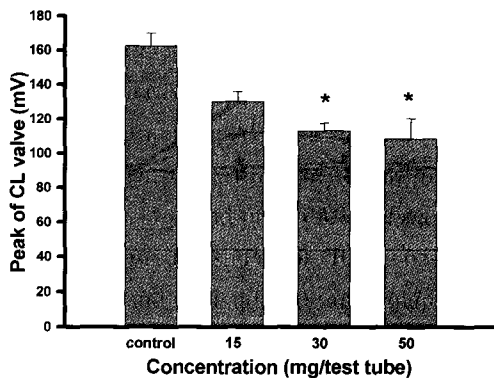


Fig. 1. Effect of respiratory burst activity on different dose with chloramphenicol from head kidney phagocytes of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) *in vitro*. (mean  $\pm$  S.D.; n=4) \* indicates  $p \leq 0.05$ .

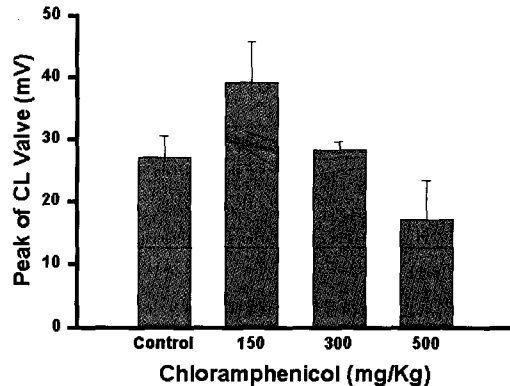


Fig. 2. Respiratory burst activity of head kidney phagocytes from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) orally-administrated with chloramphenicol 150, 300, 500 mg/kg and control (administered with diluted methanol). The respiratory burst activity was measured by chemiluminescence response (CL) and analyzed at 3 weeks post final dosing *in vivo*. (mean  $\pm$  S.D.; n=4)

°C 배양기에 2시간 배양한 후, 다시 4°C에서 30분 배양하여 chemiluminescence (CL) 활성을 측정하였다. 실험구와 대조구간에는 15 mg/test tube의 적정 농도에서는 유의한 차이가 없었으나, 높은 농도인 30, 50 mg/test tube에서는 대조구와 유의하게 낮아졌지만 ( $p < 0.05$ ), 서로 간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 1). 양식 넙치에 있어 *in vivo* 상으로 CAP 투여에 따른 면역세포의 활성의 변화를 측정하기 위하여 CAP를 각각 0, 150, 300, 500 mg/kg/B.W./day로 4일간 강제 투여하였다. 실험 3주 후에 leucocyte를 분리하여 CL 활성을 측정하였을 시에 300, 500 mg/kg/B.W./day로 투여한 실험구에서는 CL 활성도가 낮아지는 경향을 보였으나, 150 mg/kg을 투여한 실험구에서는 CL 활성도가 증가하는 경향이 나타났다 (Fig. 2).

현재 다양한 동물에 있어 항생제 투여가 동물 면역 시스템에 어떠한 영향을 주는지를 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 다양하게 수행하고 있다. 소의 백혈구에 대하여 *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 다양한 항생제 투여시에 *Staphylococcus aureus*에 대한 다핵백혈구 (PMNL)의 식작용이 감소한다고 보고되었다 (Hoeben *et al.*, 1997a, 1997b; Paape and Miller, 1990; Pappé *et al.*, 1990). 게다가, sulphadiazine, CAP, danofloxacin, erythromycin, oxytetracycline, spiramycin, enrofloxacin 등과 분리된 소의 백혈구를 *in vitro* 상에서 함께 배양하였을 때 1,000 µg/ml에서 모든 항생제가 CL 활성을 억제시킨다는 것을 알 수 있었다 (Hoeben *et al.*, 1997b). 또, *in vitro* 상에서 chloramphenicol, tetracycline 그리고 gentamicin 투여시 *Staphylococcus aureus*에 대한 소에서 분리된 다핵백혈구 (PMNL)의 식작용이 감소한다고 조사하였다 (Ziv *et al.*, 1983, Nickerson *et al.*, 1986). 현재 연구의 *in vitro* 상에서 실시한 실험에서는 약물농도가 증가할수록 활성도가 감소하는 경향이 나타났다. 이것은 두신에서 분리된 leucocyte가 항생제와 함께 배양되었을 때 CAP에 의해서 질병 저항에 중요한 역할을 하는 식

세포의 활성감소 뿐만 아니라 병원체 침입에 대한 숙주의 비특이적 면역에도 영향을 미치는 것을 의미한다. 생체내 침입한 세균 치료를 위해 항생제를 투약하는 동안 이 항생제와 숙주 방어 기작 사이에서 중요한 상호 작용이 일어난다. 이러한 항생제와 다핵백혈구 사이의 영향이 많이 연구되어 왔음에도 불구하고 수의학 분야에서는 항생제와 숙주 방어 기작사이의 상호관계에 대해 아직까지 많이 무시되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 넙치에 직접 4일간 CAP를 투여한 후 3주 후에 CL 활성도를 측정하여 보았다. *In vivo* 에서는 3주째에 300, 500 mg/kg 실험구에서 감소하는 경향을 보였다. 넙치의 면역학적 변화를 관찰한 실험에서 사용한 농도인 150 mg/kg 보다 300, 500 mg/kg에서 시간이 지남에 따라 농도 의존적으로 CL 활성도가 감소하는 경향을 나타내었다. 그러므로 CAP와 같은 항생제가 넙치의 생체내에서 식세포가 활성화 되었을시에 나타내는 지표인 reactive oxygen intermediates (ROIs)를 생산하는 비특이적 면역기작을 억제시킨다고 할 수 있다. Hoeben 등 (1997b)은 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 µg/ml 농도의 sulphadiazine, chloramphenicol, danofloxacin, erythromycin, oxytetracycline, spiramycin, enrofloxacin 그리고 oxytetracycline과 분리된 소의 백혈구를 함께 배양하여 본 결과 1000 µg/ml에서 모든 항생제가 CL 활성을 억제시킨다는 것을 알 수 있었다. 그리고 낮은 약물 농도에서는 유의적인 변화를 관찰 할 수 없었지만, enrofloxacin은 이와 반대로 낮은 농도에서 CL 반응을 자극하여 활성이 증가하였다. Enrofloxacin의 CL 자극 효과는 membrane bound NADPH-oxidase 또는 hexose monophosphate shunt activity의 자극에 의한  $O_2^-$ 의 생성 때문에 의한 것이거나 CL 반응은 luminol의 확산에 매우 민감하기 때문에 luminol의 침투성 의한 것으로 설명할 수 있다. 또한 이 항균제는 세포질에 존재하는 free  $Ca^{2+}$ 이 증가함에 따라 phorbol myristate acetate (PMA) 활성을 증가시킬 수 있

기 때문에 이와 같은 자극 효과를 나타내기도 한다 (Hoeben *et al.*, 1997a; 1997b). 이와 같은 자료들은 150 mg/kg 실험구가 3주가 지난 다음에 면역 반응이 증가한 사실을 설명할 수 있다.

전보 (Jung *et al.*, 2004)에 따르면, CAP를 4일 동안 150 mg/kg으로 넘치에 강제 투여했을 때, 간과 신장에서 약물이 잔류하나, 조직학적 관찰 등을 통하여 CAP가 넘치의 간, 신장에는 이 농도하에서는 손상을 입히지 않는다고 보고되었다. 그러나, 전보 (Jung *et al.*, 2004)의 혈액학적 분석시 몇몇 적혈구 수치와 hematocrit 수치가 실험기간 동안 감소하는 것으로 보아 CAP가 혈구 생성에 있어 영향을 미친다고 보고하였다. 본 논문에서는 *in vitro*와 *in vivo*에서 CL 반응 관찰 시 고농도에서 활성이 감소했기 때문에, 넘치에 있어 고농도의 CAP 투여는 숙주의 혈구의 면역 체계에 손상을 미친다고 추정되었다. 본 실험에 사용된 농도를 투약했을 때 실험기간 중 약물에 의한 폐사는 일어나지 않았으나 현재 사용되고 있는 CAP에 대한 약화사고가 현장에서 많이 발생되고 있는 실정이다. 따라서, 본 실험 결과로 미루어볼 때 CAP 자체의 독성 영향이라기보다 이 약물과 다양한 환경 인자들이 함께 작용했을 때 사고가 발생한다고 추정할 수 있었다. Vacha 등 (1981)은 CAP가 자외선과 함께 작용하면 독성이 증가하고 하루 중 자외선을 4시간 보다 6시간 쬐었을 때 2.5배 이상 증가한다는 보고가 있었으므로, 차후에 다양한 환경 인자들과 항생제의 복합이 어류의 생리에 어떠한 영향을 미치는지 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2003년도 해양수산부 KSGP의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구 결과의 일부임을 밝힙니다.

### 참고 문헌

- Briheim, G. and Dahlgren, C.: Influence of antibiotics on formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-induced leukocyte chemiluminescence. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 31:763-767, 1987.
- Dosogne, H., Hoeben, D., Burvenich, C. and Lohuis, J.A.C.M.: Effect of cephapirin and meccillinam on the phagocytic and respiratory burst activity of neutrophil leukocytes isolated from bovine blood. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 21:421-427, 1998.
- Hoeben, D., Burvenich, H. and Heyneman, R.: Influence of antimicrobial agents on bacterial activity of bovine milk polymorphonuclear leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 56:271-282, 1997a.
- Hoeben, D., Dosogne, H., Heyneman, R. and Burvenich, H.: Effect of antibiotics on the phagocytic and respiratory burst activity of bovine granulocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 332:289-297, 1997b.
- Holt, D.E., Harvey, D. and Hurley, R.: Chloramphenicol toxicity. *Adv. Drug. React. Toxicol. Rev.*, 12:83-95, 1993.
- Holt, D.E., Ryder, T.A., Fairbairn, A. and Hurley, R., and Harvey, D.: The myelotoxicity of chloramphenicol: *in vitro* and *in vivo* studies: I. *In vitro* effects on cells in culture. *Hum. Exp. Toxicol.*, 16:570-576, 1997.
- Jung, J.S., Seo, J.S., Eom, H.K., Kim, N.Y., Lee, S.H., Huh, M.D., Jung, H.D. and Chung, J.K.: Tissue level of chloramphenicol and haematological changes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* orally administered chloramphenicol. *J. Fish. Pathol.*, 17:113-121, 2004.
- Nickerson, S.C., Paape, M.J., Harmon, R.J. and Ziv,

- G.: Mammary leukocyte response to drug therapy. *J. Dairy. Sci.*, 69:1733-1742, 1986.
- Paape, M.J. and Miller, R.H.: Effects of Florfenicol, Chloramphenicol, and Thiamphenicol on Phagocytosis, Chemiluminescence, and Morphology of Bovine Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. *J. Dairy. Sci.*, 73: 1734-1744, 1990.
- Paape, M.J., Nickerson, S.C. and Ziv, G.: *In vivo* effects of chloramphenicol, tetracycline, and gentamicin on bovine neutrophil function and morphologic features. *AM. J. Vet. Res.*, 51:1055-1061, 1990.
- Scott, A.L. and Klesius, P.H.: Chemiluminescence: A novel analysis of phagocytosis in fish. *Develop. Biol. Standard.*, 49:243-254, 1981.
- Trevett, A.J., Naraq, S. and Wembri, J.: Typhoid fever complicated by chloramphenicol toxicity, ataxia and psychosis. *Papua New Guinea Med. J.*, 35:205-209, 1992.
- Vacha, J., Pospisil, M. and Velconsky, V.: The toxic effect of chloramphenicol on erythropoiesis in X-irradiated Mice. *Chemotherapy*, 27:131-138, 1981.
- Yunis, A.A.: Chloramphenicol-induced bone marrow suppression. *Semin. Haematol.*, 10:225-234, 1973.
- Yunis, A.A.: Chloramphenicol: relation of structure to activity and toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28:83-100, 1988.
- Ziv, G., Paape, M.J. and Dulin, A.M.: Influence of antibiotics and intramammary antibiotics productson phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes. *American J. vet. Res.* 44:385-388, 1983.
- 김경환. 이우주의 약리학 강의, p 598-600; 의학문회사, 서울, 1997.

---

Manuscript Received : October 04, 2004

Revision Accepted : November 26, 2004

Responsible Editorial Member : Kwan-Ha Park  
(Kunsan Univ.)