

## Formalin에 약육시킨 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 스트레스 반응과 간장 약물대사효소의 경시적 반응

이지선, 김병기<sup>1</sup>, 이경선<sup>2</sup>, 전중균\*

강릉대학교 해양생명공학부 · 동해안해양생물자원연구센터  
<sup>1</sup>강원도립대학 해양생물자원개발과, <sup>2</sup>목포해양대학교 해양환경공학전공

## Time-course Responses of Hepatic Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Stress in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Exposed to Formalin

Ji-Seon Lee, Pyong-Kih Kim<sup>1</sup>, Kyoung-Seon Lee<sup>2</sup> and Joong-Kyun Jeon\*

Division of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University/East coastal Marine Bioresources Research Center,  
Gangneung 210-702, Korea

<sup>1</sup>Department of Marine Bio-resources, Gangwon Provincial College, Gangneung 210-804, Korea

<sup>2</sup>Division of Ocean System Engineering, Mokpo National Maritime University, Mokpo, Korea

The effects of formalin on mixed function oxygenase (MFO) system and stress-response were investigated in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Olive flounder was exposed to formalin at the concentration of 300 ppm for 1, 2, 4 and 16 h. Levels of stress-response enzymes together with total protein, glucose and osmolality were quantitatively determined in blood, and the activities of phase I (cytochrome P450, ethoxyresorufin deethylase) and phase II (glutathione S-transferase) hepatic enzymes were also determined. Since the formalin-exposure for 16 h resulted no significant changes in aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase, specific enzymes for liver damage, it was thought that it did not cause hepatic tissue damage at the concentration of 300 ppm. However, hepatic MFO system was induced at 1 to 4 h, and stress response was induced after 16 h of exposure. Moreover, it is considered that the depression of MFO activity after 16 h of exposure may not be adaptation to formalin, but toxic response. These results suggest that low concentration of formalin does not cause hepatic tissue damage of fish, but could induce MFO and stress response.

**Keywords:** Formalin, MFO, Stress, Osmolality, AST, ALT

### 서 론

지난 십여 년간 우리나라의 해산 및 육상 양식 생산량은 급속하게 늘고 있으나 고밀도로 사육하는 경우가 많아 어류 간 강제접촉으로 비늘 박리 등에 따른 피부질환은 물론이고 수질 악화에 의한 수생전염병이 단시간에 확산될 개연성도 크다는 문제점을 안고 있다.

일반적으로 어병 문제를 해결하기 위해 포르말린을 포함한 동물약품의 사용이 늘고 있다. 포르말린은 독성이 강해서 우리나라에서는 극약으로 지정되었지만, 수산 증양식 산업에서는 기생충 방제를 위해 많이 이용되고 있고 외국에서도 흔히 사용하고 있어(Leteux and Meyer, 1972), 일찍부터 어류에 미치는 급

· 만성 독성 조사가 이루어지고 있다(Howe et al., 1995; Hohreiter and Rigg, 2001). 한편, 국내에서도 해산어에 미치는 영향에 관한 연구가 일부 수행되었으나(박 등, 1995; 조와 양, 1996; 양 등, 1997; Jung et al., 2001; 정과 김, 2005), 대부분 노출에 따른 어류 조직의 병리학적 또는 혈액학적 이상 유무를 조사하는 내용이고 생화학적 적응 반응에 관한 연구는 거의 없는 실정이다(Jung et al. 2001; 이 등 2006).

이 등 (2006)은 포르말린이 넙치 간장의 약물대사효소계에 미치는 영향을 조사하여 포르말린에 *in vitro* 및 *in vivo* 노출 시 효소계는 전반적으로 유도되었고, 대사에는 cytochrome P450 (CYP)과 이것에 전자를 전달해 주는 cytochrome P450 reductase (P450R)가 크게 기여한다는 사실을 관찰하였다. 특히 우리나라에서 포르말린 약육 시 1시간 권장농도인 100-300 mg/L보다 낮은 농도 (40 mg/L)에서도 약물대사효소가 유도된다는 것을

\*Corresponding author: jkjeon@kangnung.ac.kr

확인한 바 있다.

일반적으로 약독시간이 짧으면 약독농도를 높이고 시간이 길면 농도를 낮추어 실시하므로, 본 실험에서는 권장 농도 중 최소 수준에 가까운 300 ppm (121 mg/L)에 넙치를 수용한 다음 16시간에 걸쳐 간장 중 약물대사효소계와 스트레스의 반응을 경시적으로 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 대상생물

실험에 사용한 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 강원도 강릉시의 개인양식장에서 부화시켜 사육 중인 개체 중 크기가 비슷한 개체 (평균 체장과 체중은 각각  $24.0 \pm 2.5$  cm 및  $267 \pm 20$  g)를 구입하여 강원도립대학 수조실의 FRP 원형 수조 (500톤 용량)로 옮겨 한 달간 안정시킨 다음 실험에 사용하였다.

### 노출실험

포르말린을 수조에 첨가하여 300 ppm (실제 농도 121 mg/L)으로 조정된 다음 넙치 50 마리를 투입하고 1, 2, 4 및 16시간 후에 10 마리씩을 꺼내어 실험에 사용하였다. 수용 중에는 공기를 충분히 공급한 여과해수(평균염분 30‰, 수온  $20 \pm 1$ )를 유수식으로 공급하였고, 광 조건은 자연 상태로 하였다.

### 혈액의 생화학 분석과 삼투질 농도 분석

우선 해파린으로 처리한 주사기를 사용하여 미부혈관에서 채혈하여 아이스박스에 넣어 실험실로 운반한 다음 원심분리 ( $300 \times g$ , 20분,  $4^\circ C$ )로 혈장을 얻어 생화학 분석과 삼투질 농도 (osmolality, OSM) 분석에 공시하였다. 스트레스 반응을 조사하기 위해서는 총 단백 (total protein, TP), 혈당 (glucose, GLU), 젖산염 (lactate, LAC) 농도를 측정하였으며, 간장의 조직손상 정도를 파악하기 위해서는 지표효소인 AST (aspartate aminotransferase)

와 ALT (alanine aminotransferase)를 혈액분석기 (Johnson & Johnson, USA)로 측정하였으며, OSM은 osmometer (Fisher Co., U.S.A)로 측정하였다.

### 간장 미크로솜과 세포질 조제 및 약물대사효소의 분석

한편 적출한 간장은 액체질소에 담아 실험실로 옮긴 다음 분석에 사용하기까지  $-80^\circ C$  초저온냉동고에 보관하였다. 미크로솜과 세포질은 전 등 (2003)의 방법에 따라 만들었고, 미크로솜으로는 cytochrome P450 (CYP; Omura and Sato, 1964), NADPH-cytochrome P450 reductase (P450R; Phillips and Langdon, 1962), 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD; Burke and Mayer, 1974)을 분석하였으며 세포질로는 2상 효소인 glutathione S-transferase (GST; Habig et al., 1974)를 분석하였다. 미크로솜과 세포질 중의 단백질 농도는 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 정량하였다.

### 통계처리

모든 측정치는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었으며, 대조구와 실험구의 유의성은 SPSS (V. 11.5) program을 사용하여 Duncan's test를 실시하였고, 이때 95% 신뢰구간에서 유의차 검정을 하였다.

## 결과 및 고찰

포르말린에 노출시킨 넙치에서 간장 장애의 지표효소인 AST와 ALT 활성의 경시적인 변화는 Fig. 1과 같다. 두 효소는 모두 16시간의 노출 중에 거의 변하지 않았는데, 이는 포르말린에 독성이 없어서가 아니라 노출 농도가 간장 조직에 손상을 입히지 않는 수준이었기 때문이라 여겨진다.

그리고 혈액 중 스트레스 성분의 경시적인 변화는 Fig. 2와 같다. 일반적으로 어류는 외부로부터 자극 등의 스트레스를 받으면 강도나 지속시간에 따라 혈액과 조직에서 생화학적 양태가 달라지는데, 1 차적으로는 시상하부-뇌하수체-부신축 (HPI)

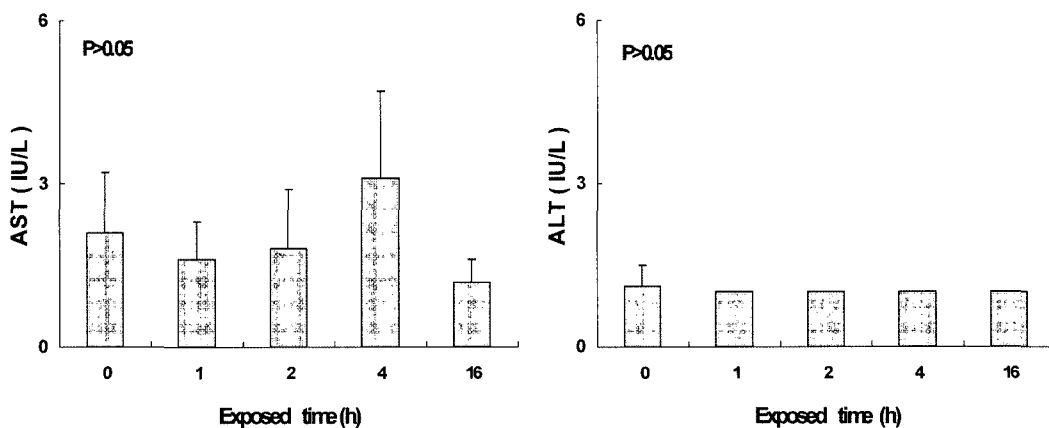


Fig. 1. Time-course changes of AST and ALT activity in olive flounder (*P. olivaceus*) following exposure to formalin for 16 hours. Each value is mean $\pm$ S.D.

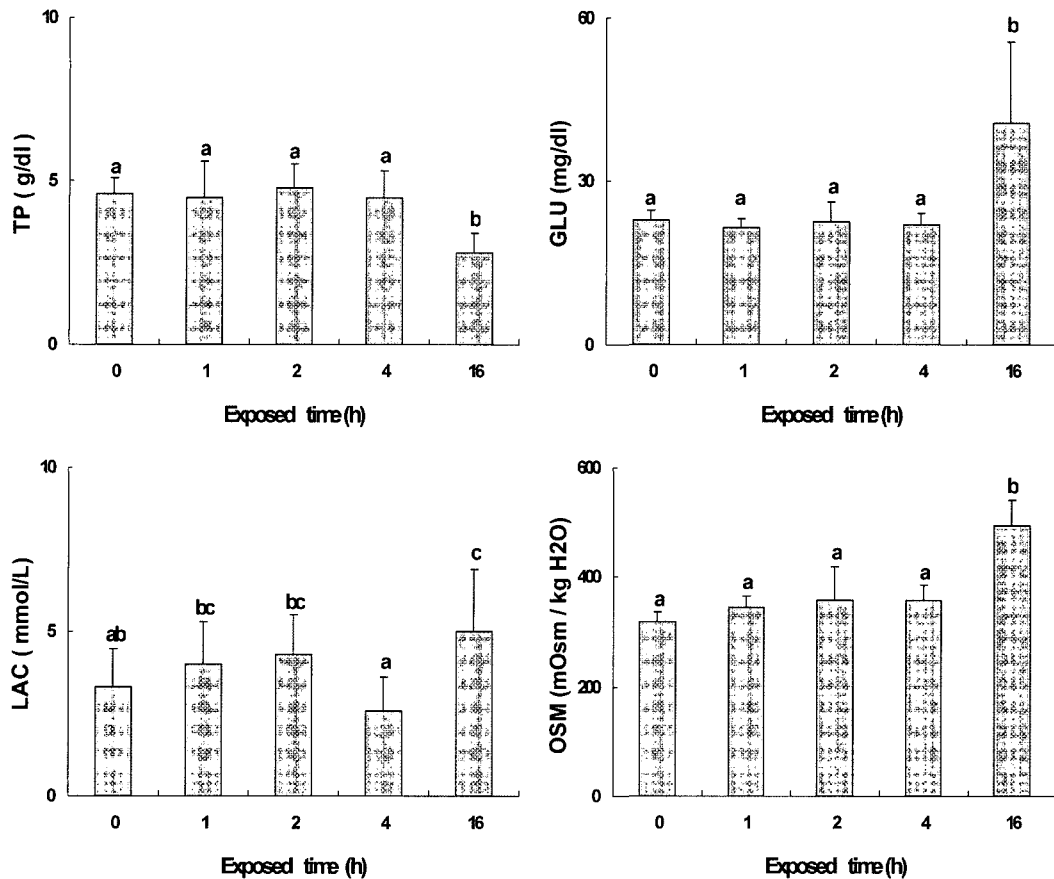


Fig. 2. Time-course changes of plasma TP, GLU, LAC and OSM concentration in olive flounder (*P. olivaceus*) with exposure to formalin for 16 hours. A same superscript in same exposure group is not significantly different ( $P>0.05$ ). Each value is mean $\pm$ S.D.

이 활성화되면서 신경계와 내분비계가 자극을 받아 코티졸 (cortisol)과 카테콜아민 (catecholamine)의 과다분비가 일어나고, 이로 인해 2 차적으로는 삼투압 조절이나 탄수화물 대사의 변화, 순환혈액세포의 population 변화 등이 일어나며 (Mazeud et al., 1977), 또한 스트레스가 만성적으로 작용하면 성장 감소, 질병 감염률 증가, 항상성 (homeostasis) 유지 능력 저하, 다른 스트레스에 대해 저항 능력 감소, 면역력 저하와 같은 부정적인 영향을 미친다고 한다 (Pickering et al., 1991; Olla and Davis, 1992; Vijayan and Moon, 1992; Fevolden and Røed, 1993; Fevolden et al., 1993; Schreck et al., 1993).

본 실험에서 포르말린에 노출시킨 후 4시간까지는 TP, GLU 및 LAC 농도는 노출하기 전과 유의적인 차이를 보이지 않았으나 16시간 후에 TP는 감소, GLU와 LAC은 증가하였다 ( $P<0.05$ ). 즉, TP는 노출하기 전에도 4.6 g/dl 수준이었으며 노출 4시간 후까지 차이를 보이지 않다가 16시간 후에는 2.8 g/dl로 낮아졌고 ( $P<0.05$ ), GLU는 노출 전 22.7 mg/dl 수준에서 노출 4시간 후까지는 21.4-22.6 mg/dl 수준으로 차이가 없다가 16시간 후에는 40.5 mg/dl로 1.8배나 유의적으로 증가하였다 ( $P<0.05$ ). 그리고 LAC도 노출 전의 3.3 mmol/L 수준에서 16시간 후에는 5.0 mmol/L로 유의적으로 증가하였다. 그리고 OSM도 노출

전 319 mOsm/kg H<sub>2</sub>O에서 노출 4 시간 후에도 344-356 mOsm/kg H<sub>2</sub>O 수준으로 별로 변화가 없었으나 16 시간 후에는 494 mOsm/kg H<sub>2</sub>O으로 크게 증가하였다 ( $P<0.05$ ). 이들 성분의 노출 전과 노출 후 16시간째의 농도 변화를 보면 TP는 31% 감소한 반면에 GLU는 80%, LAC은 51%, OSM은 55% 각각 증가하였으며 이것은 포르말린에 노출된 넙치가 탄수화물 대사의 변화와 삼투압조절에 이상을 일으키고 있음을 보여주는 것으로서 전형적인 스트레스 반응이라 여겨진다.

한편, 간장 미크로솜의 약물대사효소계의 경시적인 반응은 Fig. 3과 같다. 어류를 비롯한 동물은 입이나 피부 등을 통하여 몸 안으로 들어온 모든 외인성 화학물을 대사하기 위하여 여러 조직에 약물대사효소계를 갖추고 있으며, 효소계에는 P450R과 CYP로 이루어진 경로 (P450R-CYP 경로) 그리고 b5R과 cytochrome b5 (b5)로 이루어진 경로 (b5R-b5 경로)의 두 가지 전자전달계 경로가 존재한다 (Gibson and Skett, 1994). 그리고 이 중에서 P450R-CYP 경로가 주로 외인성 오염물질을 대사한다고 알려져 있으며 (Fent and Stegeman, 1991; Fent and Bucheli, 1994), 어류에서는 이들 약물대사효소계가 간장 외에도 신장이나 아가미 등에 존재하지만 간장은 지질이 가장 많고 비수용성의 외인성 화학물이 많이 축적되는 조직이며 또한 효소활성도 가장 높

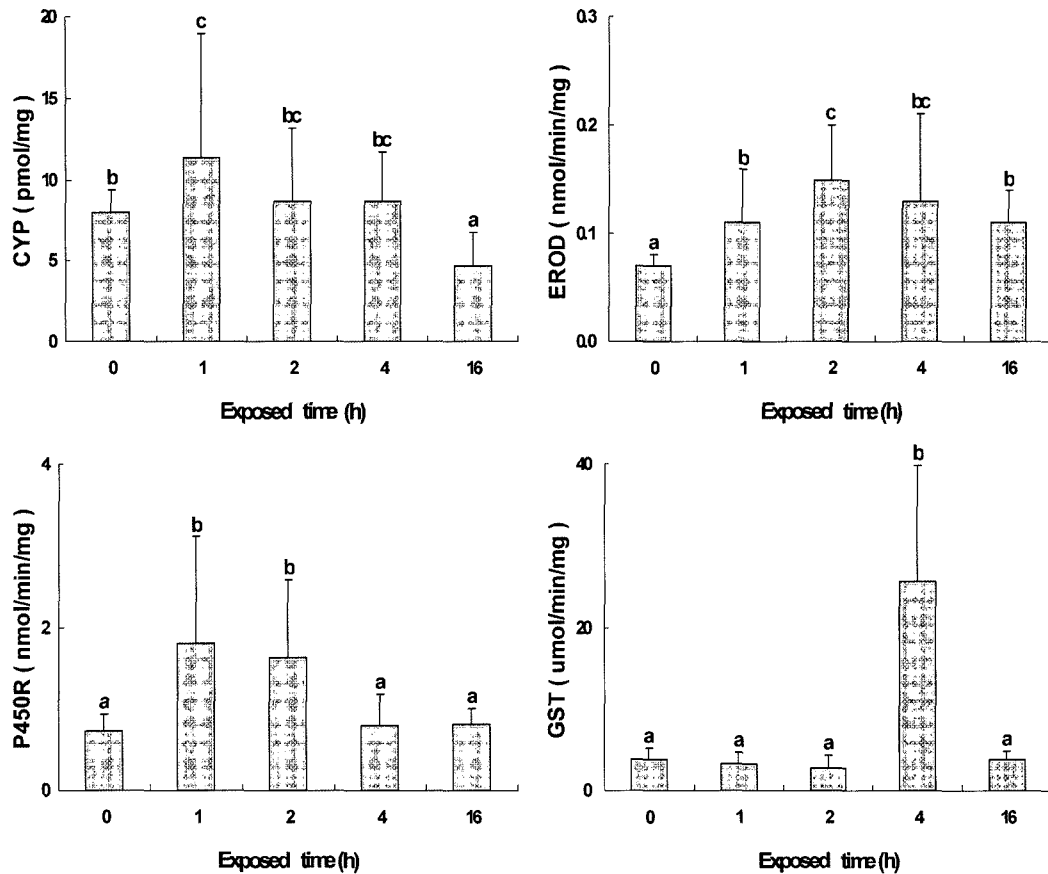


Fig. 3. Time-course response of hepatic CYP, EROD, P450R and GST levels in olive flounder (*P. olivaceus*) with exposure to formalin for 16 hours. A same superscript in same exposure group is not significantly different ( $P>0.05$ ). Each value is mean $\pm$ S.D.

아 효소계를 분석할 적에는 주로 간장을 사용한다 (Kime, 1998).

본 실험에서 간장 미크로솜 중 CYP 농도는 노출한지 1 시간 후에는 노출 전에 비해 41%나 유의적으로 증가하였으나 이후 감소하여 2 시간 후에는 노출하기 전과 비슷하였다가 16 시간 후에는 오히려 41%나 더 낮아지는 경시적인 경향을 보였다 ( $P<0.05$ ). EROD 활성은 노출 직후부터 유의적으로 증가하여 2 시간 후에는 가장 높아 노출 전에 비해 114%나 많았고 16 시간 후에도 여전히 58%나 높은 수준을 보였다. 그리고 P450R 활성은 노출 직후인 1 시간째에 노출 전에 비해 150%나 더 높아 최고 수준에 도달하여 2 시간 후까지는 변함이 없다가 이후에는 노출 전의 수준으로 줄었다. 한편 2상효소인 GST 활성은 노출 2 시간 후까지는 2.7-3.8  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 의 범위로 큰 변함이 없었으나 4 시간 후에는 616%나 증가하여 최고 수준을 이루다가 이후 16 시간째에는 노출 전과 비슷한 수준으로 감소하였다. 이들 각 효소단백질이 최고로 유도되는 시간과 노출하기 전의 수준에 대한 증가정도는 CYP는 1시간-41%, EROD는 2시간-114%, P450R은 1시간-150%, GST는 4시간-616%이었으며, 이후에는 모두 노출하기 전의 수준으로 줄었다.

이상의 결과에서 보듯이, 넙치 기생충병의 치료를 위해 권장하는 포르말린 약욕 농도 범위에서 낮은 수준인 300 ppm (121

mg/L)에 넙치를 16시간 노출시키면서 스트레스 반응과 간장의 약물대사효소계의 반응을 1, 2, 4 및 16시간 후에 경시적으로 조사한 결과, 비록 간장 조직이 포르말린에 의해 직접 손상되지는 않았지만 간장의 약물대사효소계는 1-4시간 이내에 유도되었고, 스트레스 반응은 이보다 늦은 16시간 후에야 나타났다. 그리고 약물대사효소계가 노출 초기에 유도되었다가 16시간 후에는 노출 이전과 비슷한 수준이 감소한 것은 포르말린에 넙치가 적응해서가 아니라 포르말린의 독성 때문에 효소 수준이 낮아진 때문이라 여겨진다. 이와 관련해서, 이 등 (2006)은 본 실험보다 낮은 100 ppm (40 mg/L)에 넙치를 1시간 약욕시킨 후 여과해수로 옮겨 수용하면서 간장의 약물대사효소계의 반응을 살폈더니 3일이 경과하였어도 여전히 유도반응을 보였다고 보고한 바 있다.

이처럼 본 실험에서는 간장 조직을 직접 손상시킬 정도가 아닌 포르말린 농도에 의해서도 약물대사효소계는 영향을 받으며 스트레스도 유발된다는 것을 보여주었다.

## 결론

포르말린을 300 ppm (120 mg/L) 농도로 조절한 수조에 넙치를 수용하여 약욕하면서 1, 2, 4 및 16 시간 후에 어류의 스

트레스 반응과 약물대사효소계의 반응을 경시적으로 조사하였다. 스트레스 반응은 미부혈관에서 채혈한 혈액 중 TP, GLU, LAC 및 OSM을 정량하여 평가하였고, 약물대사효소계 반응은 간장을 사용하여 1상효소인 CYP, P450R, EROD 및 그리고 2상효소인 GST를 분석하여 평가하였다.

그 결과, 간장 손상의 지표효소인 AST와 ALT는 16시간 노출 시켰어도 변함이 없었으므로 간장 조직의 손상은 일어나지 않았다고 여겨지지만, 간장의 약물대사효소계는 대체로 1-4시간 이내에 유도되었고 스트레스 반응은 16시간 후에 나타났다. 그리고 약물대사효소계는 노출 초기에 유도되었다가 16시간 후에는 노출하기 전의 수준으로 줄었는데 이것은 포르말린에 넘치가 적었을 때 때문이기보다는 독성 때문이라 여겨진다. 본 실험에서는 간장 조직을 손상시키지 않을 정도의 포르말린 농도에서도 약물대사효소계와 스트레스 반응이 유발되었음을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 강릉대학교 동해안해양생물연구센터 (EMBRC)로부터 연구비를 지원받아 수행한 것이며, 실험 장소를 제공하여 주신 강원전문대학에게도 감사의 뜻을 전합니다.

## 참고문헌

- Burke, M. D. and R. T. Mayer, 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.*, 2, 583-588.
- Fent, K. and T. D. Bucheli, 1994. Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins in vitro in freshwater fish. *Aquat. Toxicol.*, 28, 107-126.
- Fent, K. and J. J. Stegeman, 1991. Effects of tributyltin chloride in vitro on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops*. *Aquat. Toxicol.*, 20, 159-168.
- Fevolden, S. E., R. Nordmo, T. Refstie and K. H. Røed, 1993. Disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) selected for high or low responses to stress. *Aquaculture*, 109, 215-224.
- Fevolden, S. E. and K. H. Røed, 1993. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low responses to stress. *J. Fish Biol.*, 43, 919-930.
- Gibson G. G. and P. Skett, 1994. Introduction to Drug Metabolism. 2nd ed. Chapman and Hall, London, 256 pp.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby, 1974. Glutathione-S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139.
- Hohreiter, D. W. and D. K. Rigg, 2001. Derivation of ambient water quality criteria for formaldehyde. *Chemosphere*, 45, 471-486.
- Howe, G. E., L. L. Marking, T. D. Bills and T. M. Schreier, 1995. Efficacy and toxicity of formalin solutions containing paraformaldehyde for fish and egg treatments. *Prog. Fish-Cult.*, 57, 147-152.
- Jung, S. H., J. W. Kim, I. G. Jeon and Y. H. Lee, 2001. Formaldehyde residues in formalin-treated olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), black rockfish (*Sebastes schlegelii*), and seawater. *Aquaculture*, 194, 253-262.
- Kime, D. E., 1998. Endocrine Disruption in Fish. Kluwer Academic Publishers, Boston, 396 pp.
- Leteux F. and F. P. Meyer. 1972. Mixture of malachite green and formalin for controlling *Ichthyophthirius* and other protozoan parasites of fish. *Prog. Fish-Cult.*, 34, 21-26.
- Lowry, O. H., N. J. Roseborough, L. A. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mazeaud, M. M., F. Mazeaud and E. M. Donaldson, 1977. Primary and secondary effects of stress in fish : some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 106, 201-212.
- Olla, B. L. and M. W. Davis, 1992. Comparison of predator avoidance capability with corticosteroid levels induced by stress in juvenile coho salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 121, 544-547.
- Omura, T. and R. Sato, 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378.
- Philips, A. H. and R. G. Langdon, 1962. Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization, and kinetic studies. *J. Biol. Chem.*, 237, 2652-2660.
- Pickering, A. D., T. G. Pottinger, J. P. Sumpter, J. F. Carragher and P. Y. Le Bail, 1991. Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 83, 86-93.
- Schreck, C. B., A. G. Maule and S. L. Kaattari, 1993. Stress and disease resistance. (in) J. F. Muir and R. J. Roberts (ed.) *Recent Advances in Aquaculture IV*. Blackwell Sci. Pub., Oxford, pp. 170-175.
- Vijayan, M. M. and T. W. Moon, 1992. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49, 2260-2266.
- 박인석, 김형배, 김민석, 박철원, 1995. 넘치에 대한 포르말린의 급성독성 효과. *한국어병학회지*, 8, 57-67.
- 양한춘, 조재권, 전민남, 1997. 포르말린 및 증성 포르말린 약육넘치의 병리조직학적 반응. *한국어병학회지*, 10, 53-63.
- 이지선, 하진환, 이경선, 전중균, 2006. Formalin에 노출시킨 넘치 (*Paralichthys olivaceus*) 간장 약물대사효소의 in vivo 및 in vitro 반응. *환경생물*, 24, 195-200.
- 전세규, 1992. 海産養殖魚類의 疾病. 韓國水産新報社, 서울, 131 pp.
- 전중균, 이지선, 손영창, 홍경표, 심원준, 김병기, 한창희, 2003. 노닐페놀을 주사한 조피볼락의 신장 MFO (mixed function oxidase)의 반응. *한국수산학회지*, 36, 573-577.
- 정승희, 김진우, 2005. 과망간산칼륨, 안정화이산화염소, 포르말린, 황산동이 넘치 (*Paralichthys olivaceus*) 적혈구에 미치는 시험관내 용혈작용 및 메트헤모글로빈 생성 효과. *한국어병학회지*, 18, 179-185.
- 조재권, 양한춘, 1996. 포르말린과 증성포르말린 약육한 어류의 formaldehyde 잔존량 측정과 병리학적 관찰. *한국어병학회지*, 9, 157-168.