

양식 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 아질산 독성에 미치는 aspirin의 투여 효과

김동완 · 구재근* · 박성우†

군산대학교 수산생명의학과, *군산대학교 식품생명공학과

Effects of Aspirin on Nitrite Toxicity in Cultured Eel (*Anguilla japonica*)

Dong-Wan Kim, Jae-Geun Koo* and Sung-Woo Park†

Department of Aquatic life Medicine, Kunsan National University, Kunsan, 573-701, Korea

*Department of Food Science & Biotechnology, Kunsan National University, Kunsan, 573-701, Korea

The effect of aspirin on the recovery of nitrite-induced methemoglobinemia in cultured eels (*Anguilla japonica*) was studied. Methemoglobinemia was induced by exposing eels to nitrite (120 mg NO₂-N/l) for 24 hr. The nitrite exposed eels were bathed in 20 ppm aspirin solution (Aspirin), 0.8 % NaCl solution (NaCl), 20 ppm aspirin plus 0.8% NaCl solution (NaCl + Aspirin) and 50% nitrite free water(control) for 24 hr to recover from nitrite toxicity. Peripheral blood was taken from the arterious bulb from all groups to analyse hematocrit value, hemoglobin concentration, and nitrite concentration of the blood. Histopathological features of gill were also observed. Aspirin and control groups were more effective than NaCl and NaCl + Aspirin groups in recovery of hematocrit value and hemoglobin concentration, methemoglobin rate and nitrite concentration. The histopathological features on the gill of aspirin group were similar to those of normal eels, but other groups showed focal hyperemia in the lamellar capillaries, epithelial hyperplasia. These results suggested that aspirin was very effective to recover from methemoglobinemia in nitrite-induced cultured eels

Key words: Eel, Aspirin bath, Nitrite toxicity

뱀장어는 일반적으로 순환여과방식에 의해 집약적으로 양식되고 있다. 양식 중 뱀장어에서 배출되는 다량의 유독한 암모니아는 생물여과막의 종속 영양 세균에 의하여 질화된다. 그러나 질화과정의 중간산물인 아질산의 농도가 양어지내에 급증하게 되면 뱀장어의 성장과 생존에 위협 요소로 작용하게 된다. 이는 아질산이 헤모글로빈(hemoglobin, Hb)을 산소를 운반하는 능력이 없는 메트헤모글로빈(methemoglobin, Met-Hb)으로 산화시켜 아질산중독증(methemoglo-

binemia)을 유발시키기 때문이다. 아질산 중독증을 유발시키는 아질산의 농도는 어종에 따라 커다란 차이가 나는 것으로 보고되었다(Cameron, 1971; Russo *et al.*, 1974; Smith and Williams, 1974; Westin, 1974; Brown and McLeay, 1975; Konikoff, 1975; Simth and Russo, 1975; Colt and Tchobanoglous, 1976). 아질산은 새변의 소금세포를 통하여 어체의 혈장으로 유입되고 혈장에서의 아질산의 농도는 환경수의 수십 배에 달하게 된다(Eddy *et al.*, 1983). 혈장내의 아질산은 다

†Corresponding Author : Sung-Woo Park, Tel : 063-469-1884
E-mail : psw@kunsan.ac.kr

시 적혈구로 이동하여 Hb의 철 이온 (Fe^{2+})을 Fe^{3+} 로 산화시켜 Met-Hb으로 변화시키므로 혈장의 Met-Hb의 농도가 상승하면 할수록 적혈구의 산소운반 능력은 저하하게 된다(Cameron, 1971). 건강한 뱀장어 혈액의 Met-Hb의 비율은 1% 정도이지만(Kawatu *et al.*, 1987), 아질산 중독증의 Met-Hb의 비율은 4-66%이며(Kubota *et al.*, 1981), 혈액, 아가미 및 간장의 색이 갈색으로 되 색되며, 병리조직학적으로는 적혈구 핵의 농축과 용해를 동반한 변성, 비세포의 적혈구 탐식 및 아가미 혈관내의 혈전 형성, 간장과 비장의 헤모시데린 색소의 침착 등이 생긴다(Kubota *et al.*, 1981). 어류의 아질산의 중독증의 치료는 사람에서 Met-Hb를 감소시키는 것으로 알려진 ascorbic acid의 경구투여(Bancroft *et al.*, 1945; Wise *et al.*, 1988) 또는 송어류의 methylene blue 약용(Wedemeyer and Yasutake, 1978)도 있지만, 가장 효과적인 방법은 아가미를 통한 아질산의 어체 내 유입을 억제하는 것(Perrone and Maede, 1977; Tomasso *et al.*, 1979)으로 알려진 식염을 양어지에 첨가하는 것이다. 그러나 대부분의 양식장에서는 수량부족으로 인해 효율적인 환수가 불가능하므로 부분적으로 환수를 하고 식염을 첨가하고 있는 실정이다.

본 실험에서는 메트헤모글로빈혈증을 유발시킨 뱀장어를 인간의 혈행 개선제로 널리 사용되고 있는 aspirin에 약용시킨 다음 혈액학적 및 병리조직학적인 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

공시어

평균체중 200 g의 뱀장어(*Anguilla japonica*)를 민간 양식업자로부터 구입하여, 자체 순환방식의 콘크리트 사각 수조(12 m × 12 m × 0.8 m)에 수용하여 28°C에서 시판 뱀장어 반죽사료를 투여하면서 3주간 순치시킨 다음 실험에 사용하였다.

아질산 스트레스 및 약용 조건

뱀장어에 아질산 스트레스를 가하기 위해 사육수에 아질산성 질소 농도가 120 mg NO_2-N/l (pH 5.0)이 되도록 $NaNO_2$ 를 첨가한 다음 24시간 수용하여 메트헤모글로빈혈증을 유발시켰다. 약용 조건 설정을 위해서는 메트헤모글로빈혈증 유발 뱀장어를 사육수만 1/2환수한 수조(1/2환수 처리군), 사육수 1/2 환수 후 식염 0.8% 첨가한 수조(식염처리군), 사육수 1/2환수 후 ASA 20ppm 첨가한 수조(ASA처리군), 사육수 1/2환수 후 식염 0.8%와 ASA 20 ppm을 동시에 첨가한 수조(ASA와 식염 혼합처리군)로 나누어 각각 24시간 수용하였다. 실험 중 사육 수온은 28°C로 유지하였고 아질산이 함유된 사육수에 24시간 방치한 것을 대조군으로 하였다.

채혈

뱀장어를 1.5% urethane에 마취한 다음 23G 주사침을 부착한 플라스틱 주사기(3ml)로 미부 정맥 또는 동맥구에서 채혈하여 methemoglobin의 농도를 측정하였다. 일부의 혈액은 혈장을 분리한 다음 아질산의 농도 측정에 사용하였다. 혈구의 형태변화를 관찰하기 위해서 혈액의 도말 표본을 만들어 May-Grunwald Giemsa염색 후 검경하였다.

혈장내의 아질산 농도의 측정

96well microplate를 이용하여 혈장 또는 표준 용액을 희석액으로 단계 희석시킨 다음 시판의 Griess reagent(Promega, USA)를 첨가하여 제조사의 방법에 따라 발색시킨 후 540nm에서 흡광도를 구한 다음 표준곡선으로부터 환산하여 측정하였다.

Methemoglobin (Met-Hb)의 측정

Met-Hb혈증을 유발한 뱀장어의 혈중 Met-Hb는 Kawatsu *et al.*(1987)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 채혈한 혈액에 다량의 멸균 생리식

염수를 첨가하여 2,000 rpm에 2분간 원심하여 여분의 상청액을 제거하고, 멸균생리식염수에 재부유시켜 혈구의 부피가 40%가 되도록 혈구 부유액을 만들었다. 40%혈구 부유액 0.2 ml를 1/60 M 인산완충용액 (KH_2PO_4 5.67g, NaHPO_4 3.55 g, 증류수 1 L의 보존액을 증류수로 4배 희석, pH 6.6) 10 ml에 혼합한 다음 2,000 rpm에 2분간 원심하여 상청액을 회수하였다. 상청액을 각각 2개의 시험관에 3 ml씩 옮긴 다음 그 중 1개의 시험관의 상청액 0.8 ml의 흡광도(A1)를 측정하였다. 측정에 사용한 상청액을 시험관에 되돌린 다음 10% potassium cyanide 40 μl 를 첨가하여 Met-Hb를 cyanmethemoglobin으로 변화시켜 감소된 흡광도(A2)를 측정하였다. 또 다른 한 개의 상청액에 10% potassium ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)액 100 μl 를 첨가, 혼합한 다음 흡광도(A3)를 측정하였다. 흡광도 측정 후 본래의 시험관으로 되돌린 다음 10% potassium cyanide 40 μl 를 첨가해 잘 혼합 후 흡광도(A4)를 측정하였다. 흡광도는 인산완충액을 blank로 하여 630 nm에서 측정하였으며, A2, A3, A4에 각각 1.013, 1.033, 1.047을 곱하여 보정한 흡광도를 각각의 An'로 하여 methemoglobin의 농도(%)는 다음 식으로부터 구하였다.

$$\text{Met-Hb (\%)} = \text{A1-A2}'/\text{A3}'\text{-A4}' \times 100$$

병리조직학적 변화

시료어의 아가미를 절취하여 10% 포르말린에 고정하여 상법에 따라 파라핀에 포매한 다음 5 μm 의 조직절편을 만들어 Mayer's hematoxylin-eosin(HE) 염색 후 광학현미경으로 검정하였다.

결과 및 고찰

아질산 중독을 유발한 뱀장어의 혈액과 아가미 조직학적 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 혈액도 말 표본에서는 세포질의 주변부가 호염기성으로 염색되는 원형의 미숙세포가 증가하였고 핵의 변형 또는 탈핵을 동반한 적혈구의 변성이 관찰되었다. 아가미에서는 2차 세번 기부 상피세포의 증생과 모세혈관의 충혈과 국소적 출혈도 관찰되었다.

아질산 중독된 뱀장어를 앞의 약육 조건에 따라 1/2환수군, 식염처리군, ASA처리군, 식염과 ASA 혼합처리군 및 대조군으로 나누어 약육한 후 각각의 말초혈액에서 채혈하여 측정된 Ht치, methemoglobin 비율 및 아질산 농도를 Fig. 2에 표시하였다. 말초혈액의 Ht치는 ASA처리군, 식염처리군 및 환수처리군의 Ht치는 각각 $38.9 \pm 4.2\%$, $32.5 \pm 2.3\%$, $33.3 \pm 3.0\%$ 로 ASA과 식염의 혼합투여군의 29.6 ± 1.1 과 대조군의 $28.6 \pm 1.9\%$ 보다 현저히 높았으며($P < 0.05$), 그 중에서도

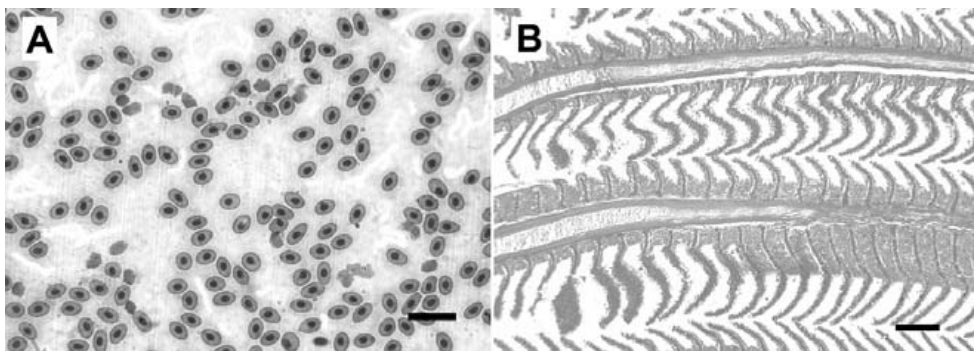


Fig. 1. Micrographs of peripheral blood and gill from eel exposed to 120 mg $\text{NO}_2\text{-N}/\ell$ for 24 hr. Peripheral blood and gill tissue were stained with May-Grunwald Giemsa and HE, respectively. Bars indicate 30 μm in A and 10 μm in B, respectively.

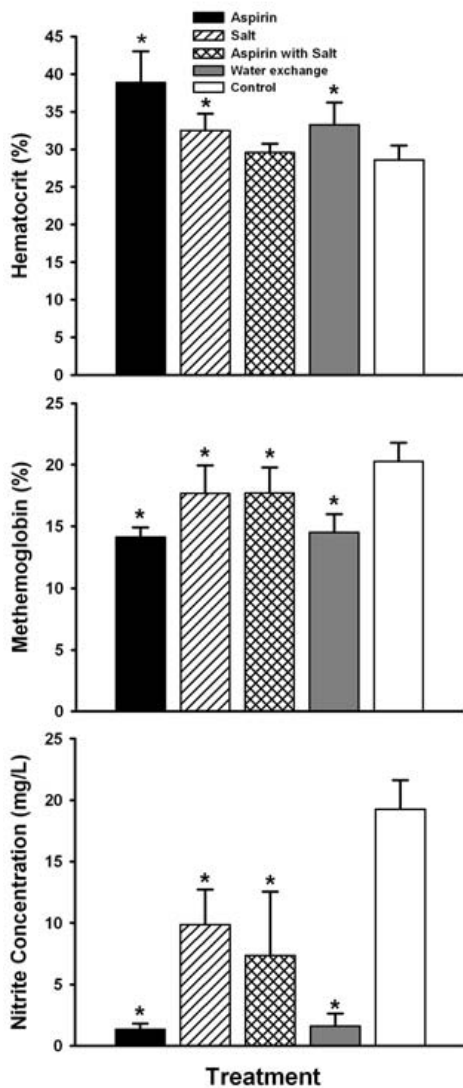


Fig. 2. Changes in hematocrit value, methemoglobin and nitrite in the plasma from eel treated with 20 ppm aspirin, 0.8% sodium chloride, 20 ppm aspirin plus 0.8% sodium chloride and 50% water exchange. The eel were previously exposed to nitrite (120 mg NO₂-N/l) for 24 hr to induce methemoglobinemia (n=4).

ASA 처리군이 가장 높았다. 혈장의 methemoglobin의 비율은 모든 처리군이 대조군의 20.3±1.5%에 비해 현저히 낮았으며(P<0.05), 특히 ASA처리군과 1/2환수군이 각각 14.1±0.8%와 14.5±1.5%로, 식염 처리군과 식염과 ASA 혼합 처리군에 비해 낮았다(P<0.05). 혈장의 아질산의

농도는 모든 처리군이 대조군의 19.3±1.9 mg/l에 비해 현저히 낮았고, ASA처리군과 1/2환수군의 아질산 농도는 각각 1.4±0.5 mg/l와 1.6±1.0 mg/l로 아질산의 독성 예방에 ASA처리와 50% 환수가 효과적이었다.

각 처리군의 말초혈액의 형태적 차이를 Fig. 3에 나타내었다. 모든 처리군의 말초 혈액 염색상에서 변성 적혈구는 현저히 감소한 반면 미숙혈구는 여전히 관찰되었으며 형태학적으로는 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다. ASA처리군에서는 변성적혈구가 거의 발견되지 않은 반면, 식염처리군 및 식염과 ASA의 혼합 처리군에서는 핵 농축을 일으킨 적혈구가 소수 존재하였고, 1/2환수군에서는 원형의 미숙적혈구가 핵농축 또는 핵변형을 일으킨 적혈구의 비율이 높았다.

메트헤모글로빈혈증을 유발시킨 다음 약육 처리한 ASA처리군, 식염처리군, 식염과 ASA 혼합 처리군 및 1/2환수처리군의 아가미의 변화를 Fig. 4에 나타내었다. ASA처리군은 정상상태와 별다른 차이가 없었지만, 식염처리군은 2차 새변의 기부부에 부분적인 상피세포의 증생과 모세혈관의 울혈이 관찰되었다. 또 식염과 ASA 혼합 처리군에서는 2차 새변에 국소적 충혈 부위가 남아 있었으며, 새변에 부분적으로 상피가 박리되기도 하였지만 새변의 유착은 현저하지 않았다. 그러나 1/2환수군에서는 상피의 증생과 충혈 및 새변의 변형이 여전히 남아 있었다.

Kubota *et al.*(1982)은 뱀장어의 메트헤모글로빈혈증은 총 헤모글로빈에 대한 메트헤모글로빈의 비율이 33-70%로, 혈액도말표본에서는 핵 농축, 핵 붕괴 및 탈핵을 동반한 적혈구의 변성과 미숙세포가 증가하며, 병리조직학적으로는 비장세포의 적혈구 탐식, 아가미의 혈전, 비장과 신장의 헤모시데린의 침착이 생긴다고 하였다.

Kawatsu *et al.*(1987)은 정상 뱀장어의 메트화율은 1%미만으로 메트헤모글로빈혈증의 뱀장어를 4°C에 여러 시간 수용하여도 메트헤모글로빈 환원효소가 활성화되지 않기 때문에 메트화율은 변화가 없는 반면, 25°C에 6시간 수용하면

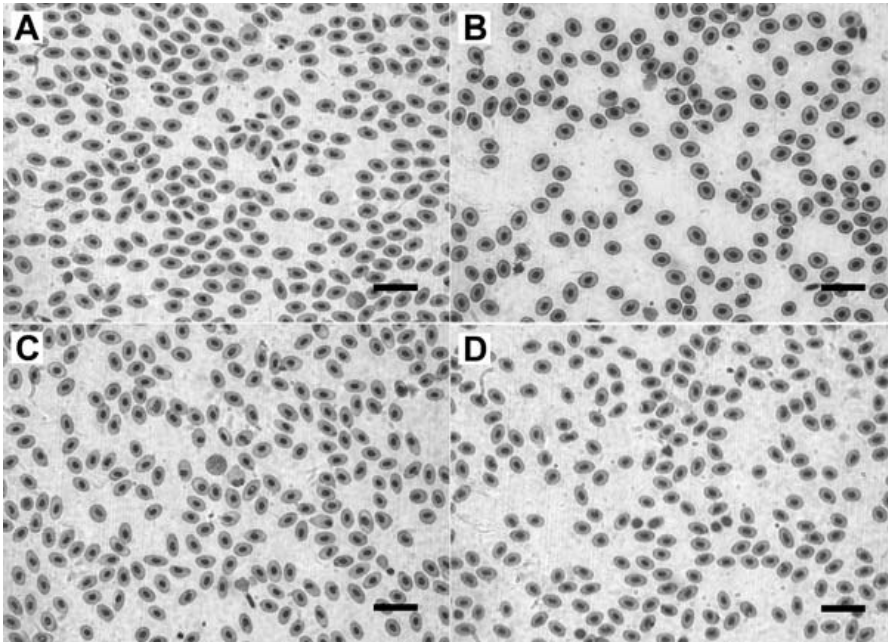


Fig. 3. Micrographs of peripheral blood from eel treated with 20 ppm aspirin (A), 0.8% sodium chloride (B), 20 ppm aspirin plus 0.8% sodium chloride (C) and 50% water exchange (D). The eel were previously exposed to nitrite ($120 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$) for 24 hr to induce methemoglobinemia. May-Grunwald Giemsa. Bars indicate $30 \mu\text{m}$.

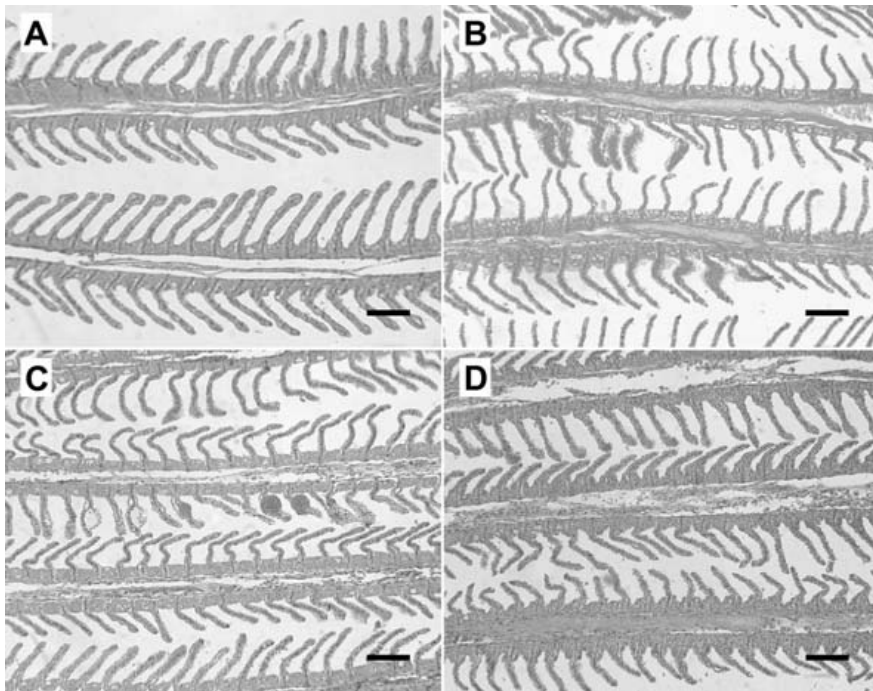


Fig. 4. Micrographs of the gill from the methemoglobinemia-induced eel bathed in 20 ppm aspirin (A), 0.8% sodium chloride (B), 20 ppm aspirin and 0.8% sodium chloride (C), and changed half volume of water with tap water (D) for 24 hr. The eel were kept in aquaria added $120 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$ (pH 5.0) for 24 hr to induce methemoglobinemia. HE stain. Bars indicate $10 \mu\text{m}$.

20-30%가 감소하며, 완전히 환수하면 24 시간 내에 정상의 상태로 회복된다고 하였다. 그러나 Hirayama(1974)는 지수식 뱀장어 양식장에서의 사육수의 아질산의 농도는 대개 10 mg/l 가 검출 되는 것이 일반적이며, 순환여과방식인 경우에는 여과조에서 새로운 아질산이 축적되기 때문에 사육수의 아질산 농도는 더욱 상승한다고 하였다. Perrone *et al.*(1977)은 수중의 아질산은 아가미와 표피를 통하여 체내로 흡수되며, 체액의 삼투압이 환경수의 삼투압보다 낮은 해산어는 표피를 통한 아질산의 흡수가 적기 때문에 체표를 통한 아질산의 침투가 높은 담수어에 비해 아질산의 영향이 적다고 하였다. 뱀장어는 점막과 아가미가 불투과성의 막으로 되어 있어 물을 통과시키지 못하는 역할을 하고 있어(松井, 1972), 해산어처럼 표피를 통한 아질산의 침투가 곤란하기 때문에 담수어 중에서도 아질산에 가장 저항성이 강한 어종(山形 & 丹羽, 1979)이다. 그러나 사육 방식이 고밀도 순환양식 또는 자체 순환방식으로 사육하고 있는 뱀장어 양식에서 수중의 아질산에 의한 피해는 빈번히 발생하고 있는 실정이다. 본 실험에서 120 mg NO₂-N/l 에 24시간 노출시켜 메트헤모글로빈혈증을 유발시킨 결과, 말초혈액의 도말표본상과 아가미의 병리조직상이 사육 중에 발생한 기존의 결과와 일치하였다. 또 뱀장어에 메트헤모글로빈혈증을 유발시킨 다음 사육수를 1/2환수하고 식염과 ASA를 첨가하여 24시간 약육시킨 다음 말초혈액의 Ht치, 헤모글로빈의 메트화율, 혈장의 아질산 농도를 측정된 결과 ASA처리구가 기존의 식염 처리보다 우수하며, 환수와 비슷한 효과를 나타내었다. 이는 ASA처리는 혈장의 아질산 농도를 현저하게 저하시켜, 헤모글로빈의 메트화율을 감소시키며 동시에 혈류의 흐름을 좋게 함으로서 말초혈액의 Ht치와 Hg농도를 상승시킨 것으로 추정된다. 그러므로 뱀장어 양식시설에서 아질산의 독성을 감소시키기 위해서 ASA를 약육하는 것이 혈액흐름을 개선시켜 뱀장어의 생산을 제고에 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

양식 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 사육 중 발생하는 아질산중독에 대한 aspirin(ASA)의 효과를 알아보기 위하여 인위적으로 메트헤모글로빈혈증을 유발시킨 다음 ASA, 식염, 식염과 ASA 및 1/2 환수시키고 24시간 동안 사육하였다. 각 처리군의 뱀장어에서 동맥구에서 말초혈액을 채취하여 헤마토크리트치, 혈구의 형태 변화, 혈장 중의 아질산의 농도 및 메트헤모글로빈의 농도와 아가미의 병리조직학적 변화를 조사하였다.

ASA약육군이 헤마토크리트치가 높고, 혈장중의 아질산 농도와 메트헤모글로빈의 농도가 낮을 뿐만 아니라 적혈구의 형태도 정상어와 유사하였다. 또한 아가미의 병리조직변화도 다른 처리군에서는 상피세포의 증생과 유착 및 모세혈관의 충혈 등이 확인되었지만, ASA처리군에서는 발견할 수 없었다. 이러한 결과로부터 ASA의 약육이 뱀장어의 아질산의 독성저하에 효과적일 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 2006년 해양수산부에서 실시한 해양한국발전프로그램(KSGP) 연구개발사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Bancroft, H., Gibson, Q. H., Harrison, D. C., and McMurray, J.: Familial idopathic methemoglobinemia and its treatment with ascorbic acid. *Clin. Sci.*, 5: 145-157, 1945.
- Brown, D. A. and McLeay, D. J.: Effect of nitrite on methemoglobin and total hemoglobin of juvenile rainbow trout. *Prog. Fish-Cult.*, 37: 36-43, 1975.

- Cameron, J. N.: Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. *Com. Biochem. & Physiol. A*, 40: 743-749, 1971.
- Colt, J. and Tchobanoglous, G.: Evaluation of short-term toxicity of nitrogenous compounds in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 8: 209-224, 1976.
- Eddy, F. B., Kunzlink, P. A., and Bath, R. N.: Uptake and loss of nitrite from the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L, in fresh water. *J. Fish Biol.*, 23: 105-116, 1983.
- Hirayama, K.: Water control by filtration in closed culture systems. *Aquaculture*, 4: 369-385, 1974.
- Kawatsu, H., Nakanishi, Y., and Takeda, H.: Methemoglobin determination in eel blood. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 9-14, 1987.
- Konikoff, M.: Toxicity nitrite to channel catfish. *Prog. Fish-Cult.*, 37: 96-98, 1975.
- Kubota, S. S., Amano, H., Ichioka, M., Miyazaki, T., and Niwa, M.: Methemoglobinemia in Japanese eel. *Bull. Fac. Fish. Mie Univ.*, 8: 149-161, 1981.
- Kubota, S. S., Amano, H., Miyazaki, T., Kamiya, N., and Ichioka, M.: Studies on experimentally occurred methemoglobinemia in Japanese eel-1. *Bull. Fac. Fish. Mie Univ.*, 9: 135-153, 1982.
- Perrone, S. J. and Maeda, T. L.: Protective effect of chloride on nitrite toxicity to coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish Res. Bd. Can.*, 34: 486-492, 1977.
- Russo, R. C., Smith, C. E., and Thurston, R. V.: Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 31: 1653-1655, 1974.
- Smith, C. E. and Russo, R. C.: Nitrite-induced methemoglobinemia in rainbow trout. *Prog. Fish-Cult.*, 37: 150-152, 1975.
- Smith, C. E., and Williams, W. G.: Experimental nitrite toxicity in rainbow trout and chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 103: 89-90, 1974.
- Tomasso, J. R., Simco, B. A. and Davis, K. B.: Chloride inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 36: 1141-1144, 1979.
- Wedemeyer, G. A. and Yasutake, W. T.: Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 35: 822-827, 1978.
- Westin, D. T.: Nitrate and nitrite toxicity to salmonid fishes. *Prog. Fish-Cult.*, 36: 86-89, 1974.
- Wise, D. J. and Tomasso, J. R.: Ascorbic acid inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish. *Prog. Fish-Cult.*, 50: 77-80, 1988.
- 松井 : 鰻學(生物學的研究編). 恒星社 厚生閣. 東京. 215-224. 1972.
- 山形陽一, 丹羽誠: 亞窒酸のウナギに對する毒性について. *水産増殖*, 27: 5-11, 1979.

Manuscript Received : October 5, 2007

Revision Accepted : December 5, 2007

Responsible Editorial Member : Ki-Hong Kim
(Pukyong Univ.)