

넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서의 과산화수소 (H₂O₂) 처리 농도가 생리·생화학적 반응에 미치는 영향

최미경·여인규*†

국립수산과학원 육종연구센터

*제주대학교 해양과학부

Effects of the different hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment level on physiological and biochemical responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Mi-Kyung Choe and In-Kyu Yeo*†

Genetics & Breeding Research Center, National Fisheries Research & Development Institute

*Faculty of Applied Marine Science, Cheju national University, Jeju 690-756, Korea

This study was conducted to investigate the change of antioxidant enzyme activity (catalase and superoxide dismutase) and variation of blood physiology in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment. Blood parameters were measured 1, 3 and 5 hours after H₂O₂ treatment with 0 (control), 100, 300 and 500 ppm for 1 hr. The value of hematocrit was decreased significantly dependently on treatment concentrate and elapsed time in the treatment of H₂O₂. Hemoglobin concentration in the test groups were lower than that of the control group. Red blood cell value in the test groups were significantly lower compared to that of the control group, but recovered to the level of the control group after 5 hr. Protein concentration was significantly lower compared to that of the control group at 0 and 1 hr, but recovered after 3 hr in 500 ppm treatment group. The superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activities were observed to be increased. Heat-shock protein 70 (HSP70) was significantly increased compared to that of control group in all of the test groups. HSP70 mRNA groups was highly expressed in 500 ppm treatment.

Key words: Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), Hydrogen peroxide (H₂O₂), Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Heat-shock protein (HSP)

현재 산업적 육상 고밀도 사육시설에서 어병의 예방 및 처리방법의 하나로 살균제, 살충제 및 항균제 등을 일정량 용해시켜 대상어종을 침지시키고 있다. 이러한 약제 침지 방법은 대상 어류의 체표나 아가미 등 표면에서 발생하는 질병에 치유효과가 크나 고농도 처리 시에는 어체 내 스트레스로 작용할 것으로 판단된다. 이러한

환경변화에서 발생하는 화학적 스트레스는 사육시 성장, 번식, 대사, 삼투압조절 등 어류의 생리적 변화를 유발시켜 양식 생산성에 큰 영향을 미친다(Cho and Yang, 1996, Varanka et al, 2001).

해산어류 종묘생산과 양성과정에서 각종 질병이 빈발함에 따라 사육수중의 병원체 살균을 위하여 어병의 예방 및 처리방법의 하나로 포

†Corresponding Author : In-Kyu Yeo, Tel : 064-754-3474
Fax : 064-756-3493, E-mail : ikyeo99@cheju.ac.kr

르말린, 말라카이트그린, NaOCl 및 ClO₂ 등 여러 가지 약제를 일정량 용해 시켜 대상어종을 침치시킴으로써 병원균으로부터 구제하고 있다 (Raphael et al., 1981; Leteux and Meyer, 1972; Fox et al., 1985; Speare et al., 1996). 하지만, 현재까지 가장 보편적으로 사용되었던 포르말린 및 말라카이트그린 독성이 널리 알려지면서 일부의 약제에 있어서 사용 규제됨으로 인해 그 대체 약품으로 과산화수소를 대부분 사용하고 있는 실정이다. 과산화수소는 무색 투명한 점조 액체이며, 산화 환원 작용이 있고 비교적 안정하며 약산성을 나타낸다. 이러한 과산화수소에 대한 독성학적 연구는 일부 이루어져 있으나, 어체내에서의 스트레스 지표가 되는 항산화 효소의 변화 및 열충격 단백질 (HSP) 등의 변화를 파악한 논문은 전무하다고 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 이용하여 살충제에 대한 화학적 스트레스에 따른 혈액 성분, 항산화 효소 (catalase 및 superoxide dismutase) 변화 및 열충격 단백질 (Heat-shock protein) 등의 변화를 조사하여 다양한 스트레스에 대한 어체내 생리·생화학적 반응에 대한 지표 자료를 제공하고자 본 연구를 실행하였다.

재료 및 방법

실험어

본 실험에 사용한 어류는 육상 수조식 양식장에서 사육된 넙치(*Paralichthys olivaceus*)로서 전장 27.5~31.5 cm, 체중 246.5~285.5 g인 것을 사용하였으며, 외관상 질병의 증세가 나타나지 않은 건강한 개체를 사용하였다. 또한, 어류를 실험조건에 적응시키기 위하여 실험 전 2주 동안 예비 사육하여 안정시킨 다음 실험에 사용하였으며, 이때 염분 농도는 29.5~31.5 ‰, 수온은 18.0~20.5°C로 유지하였다. 예비사육 동안 사료는 시판되는 넙치용 pellet 사료를 사용하여 1일

1회 반복 투여하였으며, 실험 기간 중 사육수에는 공기공급을 충분히 하여 용존 산소가 평균 6 ppm 이상 유지되도록 하였다.

과산화수소 (H₂O₂, 동양 Chem.)는 시판되고 있는 약품을 구매하여 사용하였다. H₂O₂ 약용 처리농도는 제품마다 차이를 두고 있으나, 일반적으로 약 50~100 ppm으로 1시간 약용을 실시하므로, 본 실험에서는 0 ppm(대조구), 일반적인 약용처리 농도인 100 ppm, 고농도인 300 ppm 및 500 ppm으로 각각 설정하였으며, 1시간 약용 처리 후 순환시켜 0, 1, 3시간 및 5시간 후의 혈액 성상을 분석하였다.

혈액 성분 분석

혈액은 실험개시 전 넙치를 2일간 절식시킨 다음, 실험어의 미부 동맥으로부터 헤파린을 처리하지 않은 주사기를 사용하여 마취 없이 1분 이내에 개체별로 채취하였다. 적혈구 용적(hematocrit, Ht)은 채취한 전혈을 1,670 g로 30분간 원심분리 한 후 적혈구와 혈장부분의 길이에 대한 적혈구 부분의 비율로 구하였다. 적혈구 수(red blood cell count, RBC)는 미부 동맥에서 혈액을 채혈한 후 Hayem씨액(Ishisu)으로 200배 희석하여 혈구 계산판으로 적혈구 수를 계수하였다. 전혈에서의 혈당량 측정은 혈당 자동 측정기를 이용하여 측정하였다. 또한, 나머지 혈액은 원심분리용 튜브에 넣어 4°C에서 2시간 방치한 뒤 955 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 다음 -70°C에서 동결보관 한 후 혈중 총 단백질 분석에 사용하였다. 혈중 총 단백질량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다.

항산화 효소 분석

항산화 효소는 간장과 신장을 적출하여 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase (CAT) 효소 활성을 분석하였다. 간장은 적출 후 약 1g을 0.9% NaCl에 3회 세척 한 다음 KCl (1.17%)을 함유

한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화 하였다. 균질화된 시료는 원심분리 (106 g, 15 min, 4°C)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시 원심분리 (16,060 g, 20 min, 4°C)한 후 상등액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다. SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund and Marklund (1974)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 8.7 ml에 간장 균질액을 넣은 후 0.3 ml의 3 mM pyrogallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer (OPRON-3000, Hanson Tec.) 를 이용 325 nm에서 측정하였다. 그리고 효소활성의 1단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50 % 억제하는 효소의 양으로 정하였다. CAT 활성도의 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer에 의해 240 nm 파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow (1972)의 방법에 의하여 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다. 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준 단백질로서 BSA (bovine serum albumin)를 사용하여 Spectrophotometer로서 540 nm에서 측정하였다.

SDS-PAGE

넙치의 간장조직을 채취하여 분쇄 완충용액 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)에서 Potter-Elvehjem 호모게나이저로 분쇄하여 12,000 g에서 원심분리하였다. 상층액을 동량의 2 x Laemmli sample buffer (80 mM Tris-HCl, pH 6.8), 2 % SDS, 12 % β -mercaptoethanol, 15 % glycerol 및 0.012 % bromophenol blue)에 용해시켜 100°C에서 3분간 boiling한 후 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE를 실시하였다. 3-20 % gradient-polyacrylamide gel을 사용하여 250 V로 4시간 동안 행한 후, 염색액 (0.136 % Coomassie brilliant blue R-250, 45 % methanol 및 10 % acetic acid)에서 40분간 염색한 후, 7.5 % methanol, 7.5

% acetic acid에서 탈색하였다. 분자량 측정용 표준단백질은 myosin (200 kD), β -galactosidase (116 kD), phosphorylase b (97 kD), bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (45 kD) 및 carbonic anhydrase (31 kD)를 사용하였다.

Western blot

Western blot은 Towbin et al. (1979)의 방법을 변형하여 실시하였다. SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 15 V에서 4시간 동안 nitrocellulose (NC) 막으로 전사시킨 후 Ponceau S 용액 (0.2 % Ponceaus, 3 % trichloroacetic acid 및 3 % sulfosalicylic acid)으로 전사됨을 확인하였다. 그 후 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 3 % bovin serum albumin과 0.05 % Tween 20이 함유된 0.1 M Tris buffered saline (TTBS, pH 7.4)을 이용하여 40분 상온에서 약하게 흔들면서 blocking 시켰다. Blocking이 끝난 후 HSP-70 (Sigma, H5147)에 대한 항체를 NC막에 첨가하여 1시간 동안 실온에서 배양한 후, TBS-T (0.05 % Tween20 in TBS)로 5분씩 3회 세척하였다. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti- mouse IgG로 1시간 동안 실온에서 배양하고 TBS-T 용액으로 5번 세척한 후, diaminobenzidine (DAB, 0.1 %)와 0.03 % H₂O₂가 함유된 100 mM PBS (pH 7.2)로 발색을 유도하였다.

RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

동결된 조직에 Tri-Reagent (Sigma)을 첨가 한 후 homogenizer를 사용하여 4°C에서 마쇄시켰다. 마쇄조직에 chloroform을 넣어 얼음 위에서 5분간 방치한 뒤 4°C에서 14,000 rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담고 isopropanol을 넣어 RNA를 침전시켰다. RNA 침전물은 diethylpyrocarbonate (DEPC) 용액을 넣어 녹이고 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 추출한 RNA 1 μ g을 사용하여 14.25 μ l 용량으로 역전사를 시행하였으며, RNA 1 μ g,

RNase inhibitor, oligo-(dT) 15 primer, 2.5 mM dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂ 및 reverse transcriptase를 넣어 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간을 각각 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

cDNA를 증폭시키기 위하여 cDNA 1.0 µl, 10x PCR buffer 9.9 µl, MgCl₂ 7.8 µl, dNTPs 2.0 µl (0.2 mM), primer (sense) 1.0 µl (50 pmole), antisense 1.0 µl (50 pmole), Taq polymerase 1.0 µl 및 Nuclease-Free Water 76.3 µl를 혼합하여 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension 조건으로 30회 증폭하고, 이후 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. HSP-70 mRNA에 대한 oligonucleotide primer는 (주)바이오니아에서 다음과 같이 합성주문하였다 (Table. 1). 양성 대조로 사용할 oligonucleotide primer는 β-actin mRNA로 사용하였다.

PCR로 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 100 V로 전기영동하여 분리하였으며, 100 bp DNA ladder를 size marker로 사용하여 UV transilluminator하에서 사진 촬영하였다.

통계 처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS-통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여 Duncan's multiple range test로 검정하였으며, $P < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

혈액성상 변화

H₂O₂ 처리에 따른 넙치에서 혈액 생리학적 변화를 조사한 결과 Ht수치는 약육 후 0시간째 100 ppm을 제외한 300 ppm 및 500 ppm 처리구에서 각각 25.83 ± 1.30 및 22.67 ± 0.28 %로 대조구 33.89 ± 0.70 %보다 현저하게 감소되는 경향을 나타내었고 1시간 경과 이후에는 모든 그룹에서 낮은 값을 나타내었다(Fig 1, $P < 0.05$). 또한, 5시간째에는 500 ppm 처리 그룹에서 18.67 ± 0.50 %로 최고 낮은 값을 나타내었다. Hb인 경우에는 100 ppm 및 300 ppm 처리구에서 처리 이후 1과 3시간째 각각 5.17 ± 0.48 와 5.08 ± 0.36 g/dl로 현저하게 감소하는 경향을 보였으나 그 외의 다른 그룹에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig 1). RBC 수치는 실험전 대조구보다 3시간까지 전반적으로 감소하는 경향을 보였으나, 5시간 경과 후에는 고농도인 500 ppm 처리구에서 대조구 보다 증가하는 경향을 나타내었다(Fig 2, $P < 0.05$). 혈청에서의 총 단백질 농도는 대조구 7.15 ± 0.11 mg/ml에 비해 처리 이후 0시간째 500 ppm 처리구에서 5.88 ± 0.37 mg/ml로 현저하게 감소하는 결과를 나타내었으며, 이후 5시간째까지 지속적으로 증가하는 결과를 나타내었으나 대조구와 비교하여 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig 2). 하지만, 100 ppm 처리구인 경우에는 이와 반대로 0시간째 일시적으로 증가

Table 1. Oligonucleotide of primers for heat-shock protein 70 mRNA and β-actin

RNA species	Expected size	Primer sequence
β-actin mRNA	520 bp	5-GCCAACAGGGAGAAGATGAC-3
		5-ACGTCGCACTTCATGATGC-3
HSP-70 mRNA	627 bp	5-GVACATTCTCAGACTTGTCWCC-3
		5-CATCAATGAACCAACTGCTGC-3

bp : base pairs

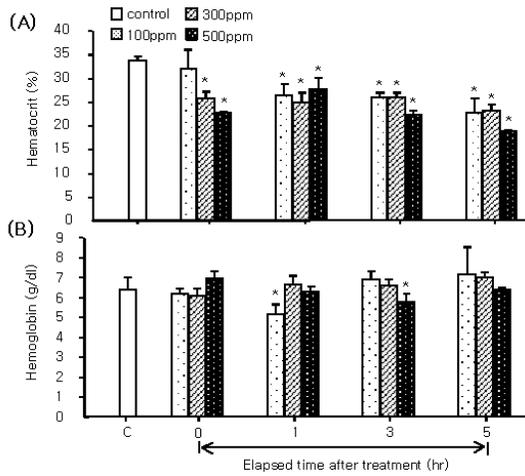


Fig. 1. Changes of hematocrit (Ht) value and hemoglobin (Hb) count in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard deviations; *significant difference between control and exposure group ($P<0.05$).

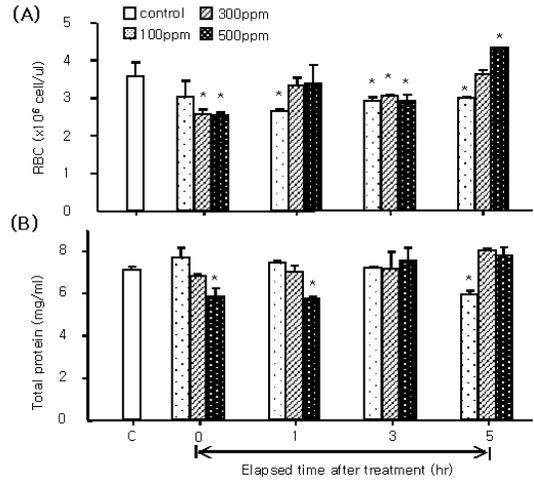


Fig. 2. Changes of RBC (red blood cell) count and total protein in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard deviations; *significant difference between control and exposure group ($P<0.05$).

하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. 하지만, 1시간 경과 이후 지속적으로 낮아지다가 5시간째에는 5.96 ± 0.20 mg/ml로 현저하게 낮은 값을 나타내었다.

항산화효소 변화

H₂O₂ 1시간 약육 처리 이후 어류 간장에서의 SOD 활성은 100 ppm 처리구인 경우 전 시간에서 유의한 차이를 보이지 않았으나, 300 ppm 및 500 ppm 처리구인 경우에는 대조구 8.24 ± 3.60 unit/mg protein/min에 비해 H₂O₂ 처리 이후 0시간째 각각 20.62 ± 3.50 및 15.51 ± 1.00 unit/mg protein/min로 효소 활성의 현저하게 증가하는 경향을 보였고 3시간째 각각 7.24 ± 5.00 및 12.06 ± 1.50 unit/mg protein/min으로 낮아지는 경향을 보였으나, 대조구와 비교하여 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig 3). 하지만, 5시간 후에는 300 ppm 처리구에서 대조구와 비교하여 현저하게 증가되는 결과를 나타내었다(Fig 3A). CAT효소 활성인 경우에는 대조구 $1.62 \pm 0.24 \times$

10^6 nmol/mg protein/min과 비교하여 100 및 500 ppm 처리구에서 실험 전 구간에 걸쳐 현저하게 증가되는 경향을 보였으며, 약육처리 이후 3시간째 500 ppm 처리구에서 $5.08 \pm 0.63 \times 10^6$ nmol/mg protein/min로 최고 높은 효소 활성을 보였다(Fig 3). 하지만, 300ppm 처리구인 경우에는 0시간째에는 증가하는 경향을 보였으나, 이후 1시간째 급속히 감소되는 결과를 나타내었고 이후 5시간째까지 점진적으로 증가되는 결과를 나타내었다.

H₂O₂ 처리에 따른 HSP70의 양적 변화 조사

H₂O₂ 약육 처리에 따른 HSP70의 발현 양상을 관찰하기 위하여 약육 처리 이후 3시간째에 넙치 간장으로부터 단백질을 분리하여 SDS-전기영동 후 Western blot을 실시하였다. 그 결과 대조구와 실험구에서 각각 HSP70이 유도되는 것이 확인되었다(Fig. 4B). 대조구와 비교하여 모든 실험구에서 현저하게 높게 유도되었으며, 그중 100ppm 처리구에서 HSP70 단백질 발현량

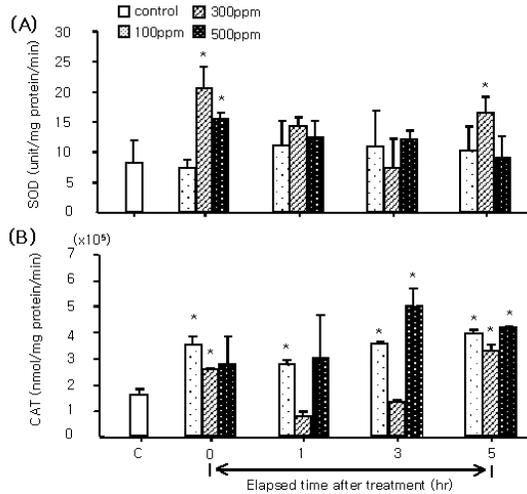


Fig. 3. Changes of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard deviations; *significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

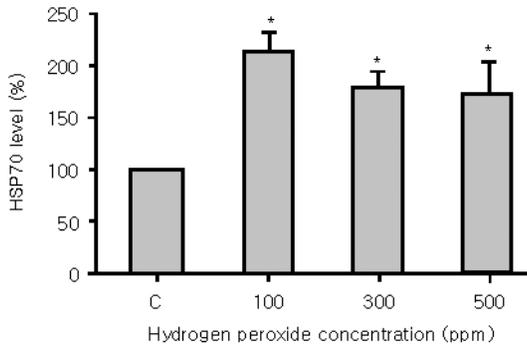


Fig. 5. The amount of HSP70 expression shown on the western blot was quantitated by densitometry and normalized to the total protein loaded into each lane of the gel. Vertical bars indicate standard deviations; *significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

의 가장 높게 유도되었으며, 300 및 500 ppm 처리구에서도 대조구에 비해 높은 수치를 나타내었다(Fig. 5). 그러나 HSP70 mRNA 발현은 약육 처리이후 대조구와 비교하여 100 및 300 ppm에서는 유의한 차이를 나타내지 않았으나, 500 ppm에서는 유의하게 높은 수치를 나타내었다(Fig. 6 and 7).

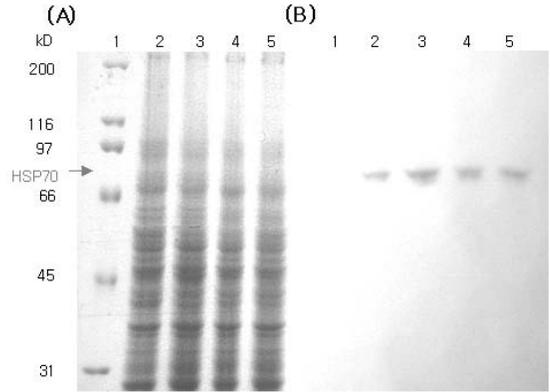


Fig. 4. Immunodetection of heat-shock protein 70 (HSP70) in liver of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various hydrogen peroxide concentrations. 3-20% SDS polyacrylamide gels (A) and Westerns blots (B): 1 line, Marker; 2 line, 0 ppm (control); 3 line, 100 ppm; 4 line, 300 ppm; 5 line, 500 ppm.

고찰

일반적으로 어류 양식에서 사육중인 어체가 주로 받는 스트레스로는 크게 화학적 요인과 물리적 요인 등으로 나눌 수 있는데, 이들 중 화학적 요인으로는 어류의 기생충 구제제로 사용되는 포르말린(Cho and Yang, 1996) 및 황산동(Varanka et al, 2001)과 같은 소독약제 투여 등이 있다. 이러한 환경변화에서 발생하는 화학적 스트레스는 어체에게 생화학적 작용을 가함으로써 건강도에 영향을 미칠 수 있고, catecholamine이나 코티졸을 과다 분비하는 내분비 반응을 유도함으로써 비축된 에너지원의 빠른 소비를 유발하여 양식 생산성에 큰 영향을 미친다. 따라서 본 연구에서는 넘치(*Paralichthys olivaceus*)를 이용하여 H₂O₂에 의한 화학적 스트레스에 따른 혈액 성분, 항산화 효소 (CAT 및 SOD) 변화 및 열충격 단백질 (HSP) 등의 변화를 조사하였다.

오염 물질에 노출된 어류는 일반적으로 Ht 및 RBC 등의 혈액성상의 변동을 일으키며, 신장기

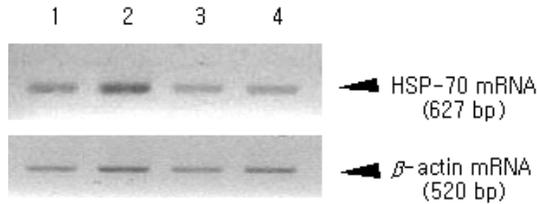


Fig. 6. Expression of HSP70 mRNA in liver of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various hydrogen peroxide concentrations. 1 line, 0 ppm (control); 2 line, 100 ppm; 3 line, 300 ppm; 4 line, 500 ppm.

능의 장애를 일으켜 조혈기관의 손상을 주는 것으로 알려져 있다(Kang and Jee, 1999; Cho et al, 2002). 이전의 연구에서 malathion, formalin, 살충제, 중금속, 카드뮴 및 염소계 화합물에 노출된 어류에서 Ht 및 RBC 등의 혈액인자가 감소되는 것으로 알려지고 있다(Edosa et al., 1994; Khattak and Hafeez, 1996; Kang and Jee, 1999; Zikic et al, 2001; Cho et al, 2002; Costa et al, 2004). 이러한 Ht 및 RBC의 감소는 일반적으로 빈혈을 일으키는 것으로 알려지고 있는데(Edosa et al, 1994; Khattak et al, 1996), 본 실험에서도 H₂O₂ 노출에 의한 혈액의 Ht와 RBC 수가 상기의 결과들과 같이 감소되는 결과를 초래하였다. 이러한 혈액성상에서의 감소는 적혈구 수축, 용혈 및 적혈구 세포의 재생속도 감소 등에 기인하여 감소되는 것으로 알려지고 있다(Costa et al, 2004). 따라서 본 연구의 결과에서 나타난 결과는 과도한 살충제의 사용에 의해 적혈구의 수축 및 재생속도의 영향을 미치는 것으로 추정된다.

스트레스에 의한 생체내 호르몬 분비는 대부분 시상하부-뇌하수체-부신피질계의 조절기전에 의존하여 이루어지는데(Choi and Kim, 1990), 이 기전의 말초 호르몬인 코티졸 함량은 어체가 받는 스트레스 반응의 지표로 널리 이용되며(Donaldson, 1981), 글루코오스는 스트레스 반응에 의해 생성된 코티졸이 에너지 대사에 작용하

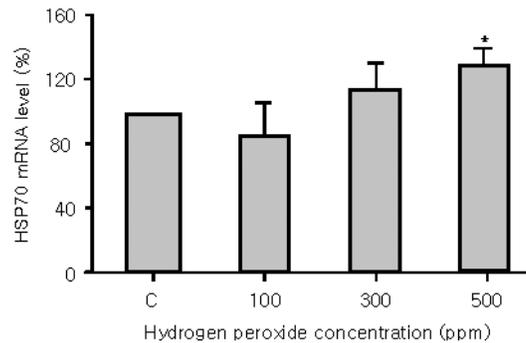


Fig. 7. The amount of HSP70 mRNA expression was quantiated by densitometry and normalized to the β -actin loaded into each lane of the gel. Vertical bars indicate standard deviations; *significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

여 단백질의 파괴로부터 방출된 아미노산으로부터 포도당 신생합성 (gluconeogenesis)이 촉진되어 그 농도가 증가하는 것으로 알려져 스트레스와 대사의 지표로 사용되고 있다(Vijayan and Moon, 1994). 또한, 혈청 단백질량은 성장, 질병 및 스트레스 등에 차이가 있는 것으로 알려져 있으며(Harbell, 1979; MacFaddin and Brown, 1979; Fasaic and Palackova, 1990), 최근 환경오염 지표로 사용되고 있다(Ito and Murata, 1990). 본 연구에서는 H₂O₂ 500ppm 처리구에서 글루코오스의 증가 및 혈청 단백질 농도의 감소를 나타내는 결과를 나타내었다. 글루코오스 농도의 증가 및 혈청 단백질 농도의 감소는 환경오염 물질인 hexachlorobenzene (HCB), 카드뮴 및 petroleum에 각각 노출된 잉어 및 금붕어에서 혈청 글루코스 농도는 증가되고 단백질 농도는 감소되었다는 이전 연구 결과와 유사하였다(Gluth and Hanke, 1984; Yamazaki et al, 1986; Shen et al, 1997; Zikic et al, 2001). 따라서 이러한 결과들은 급성 스트레스에 따른 젖산이 생성됨으로 인하여 혈액이 산성화되어 생체내 산소수급에 문제가 발생하기 때문에, 호기성 대사에서 필요한 양의 에너지를 얻을 수 없었을 것으로 생각된다. 따라서 고농도의 코티졸이 글루코스 신생합성 과정을 활성화시킴에 따라, 다량으로 생성된 글루코스가 혐기적 대사를 촉진시켜 에너지 수

급에 대처한 결과라고 생각되어진다.

한편, 스트레스에 의해 발생하는 활성산소는 내인성 제거제인 SOD와 CAT가 생체에 무해한 분자들로 전환시킨다(Forman and Fridovich, 1973; Wendel and Feuerstein, 1981). 이러한 항산화 효소는 어류 중, 조직 및 계절에 따라 항산화 효소 활성이 변화하는 것으로 알려져 있다(Aksnes and Njaa, 1981; Wdzieczak et al. 1981; Gabryelak et al. 1983). 카드뮴에 노출된 금붕어, 틸라피아 및 황산동에 노출된 어류에서 SOD 및 CAT 효소 활성이 증가되는 것으로 보고되어 있다(Dedrajas et al, 1996; Zikic et al, 2001; Basha and Rani, 2003). 본 실험에서도 H₂O₂ 처리시 SOD, 및 CAT 효소활성이 현저하게 증가되는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 H₂O₂ 처리는 다른 오염물질 등과 같이 산화적 대사를 유도할 수 있다는 것을 암시하며, 어류 조직 내 산화적 손상을 유발할 것으로 생각되어진다.

HSP70은 잘 알려져 있는 열충격 단백질로서 정상 세포에서는 chaperone의 기능을 하여 단백질의 폴딩, 올리고머의 해체, 단백질의 운반 및 전위를 돕는다(Landry and Gierasch, 1994; Wynn et al. 1994). 또한, 열충격 등의 스트레스에 유도되어 스트레스로부터 유발될 수 있는 단백질 손상을 방어하는 기능을 한다. 이러한 HSP-70은 최근 들어 독성물질의 노출 또는 스트레스의 지표로 사용되고 있으며, 비소, β -naphthoflavone (BNF), dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), 포르말린 및 phenoxyethanol 등의 화학물질에 장기간 노출될 경우 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다(Weber and Janz, 2001; Weber et al. 2002; Zarate and Bradley, 2003). 본 실험에서도 H₂O₂의 약육 처리에 의해 HSP70 발현이 증가되었다. 이러한 결과로 볼 때 H₂O₂ 처리는 어류에 있어서 생체 내 화학적 스트레스로 작용하는 것으로 생각되어진다. 또한 HSP70 mRNA 발현양에 있어서도 증가되는 경향을 나타내어, H₂O₂에 의해 HSP 70의 발현이 증가되어 생체내 방어기작의 일환

으로 작용한다고 판단된다. 그러나 mRNA의 증가는 HSP70 단백질의 증가보다 둔감하여, 낮은 H₂O₂의 농도에서는 translation의 증대만으로 증가된 HSP70의 수요를 충족하지만, 그 이상의 요구량이 증가하게 되면 transcription의 단계를 촉진하여 mRNA의 발현을 증가시킬 가능성이 있는 것으로 판단된다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 화학적 스트레스로 작용할 수 있는 과도한 양의 과산화수소 처리는 혈액 성상의 변화를 가져와 스트레스로 작용함으로써 이에 대한 방어기작으로 항산화 효소인 SOD 및 CAT 효소 활성이 증가되는 것으로 판단된다. 또한, 2차적으로 HSP-70 단백질을 생성하여 스트레스에 의한 세포 내 단백질의 변성을 억제시켜주는 것으로 생각되어진다.

요 약

본 연구에서는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 이용하여 과산화수소(H₂O₂)처리농도에 따른 체내에서의 혈액생리학적 변화, 항산화효소 및 열충격단백질(HSP)등의 변화를 조사하여 화학적 스트레스에 대한 기초자료를 제공하고자 본 실험을 수행하였다. H₂O₂의 실험구는 각각 0(대조구), 100, 300 및 500 ppm으로 설정하였으며, 1시간 약육처리 후 순환시켜 1, 3 및 5시간 후에 혈액성상을 분석하였다. 그 결과, H₂O₂ 처리에 의한 혈액성상에서의 헤마토크리트 수치인 경우에는 농도 및 시간에 의존하여 유의하게 감소되는 경향을 나타내었다. 헤모글로빈의 농도에 있어서도 대조구에 비하여 낮은 수치를 나타내었다. 또한, 적혈구 수에서도 대조구와 비교하여 3시간까지 유의하게 낮은 수치를 나타내었으나, 5시간 경과 후에는 이전 대조구 수준으로 회복되는 경향을 나타내었다. 단백질 농도는 500 ppm 처리구에서 0시간 및 1시간째 대조구와 비교하여 유의하게 낮은 수치를 나타내었으나, 3시간 경과 이후 회복되는 경향을 나타내었다.

SOD 및 CAT 효소활성은 유의하게 증가되는 결과를 나타내었다. 또한, HSP70 단백질량이 대조구에 비해 전 실험구에서 유의하게 증가되었으며, HSP70 mRNA량은 500 ppm 처리구에서 유의하게 높게 발현되는 경향을 나타내었다.

사 사

이 논문은 2006년도 제주대학교 발전기금 국외과건 연구지원계획 및 국립수산물과학원(어류육종프로그램 개발(넙치), RP-2007-AQ-054)의 지원에 의하여 연구되었습니다.

참 고 문 헌

- Aksnes, A. and L. R. Njaa : Catalase, Glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B: 893~896, 1981.
- Basha, P. S. and A. U. Rani : Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56: 218~221, 2003.
- Cho, J. K. and H. C. Yang : Determination of formaldehyde residue and histopathological observation in formalin and neutral-formalin treated Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). *J. Fish Pathol.*, 9(2): 157~168, 1996.
- Cho, K. S., E. Y. Min and J. C. Kang : Changes of haematological constituents in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to HCB and PCBs. *J. Korean Fish. Soc.*, 35(2): 110~114, 2002.
- Choi, J. H. and H. R. Kim : The effects of tryptophan and tyrosine-enriched diet on the serum cortisol, glucose and free fatty acid levels of stressed rats. *Korean J Nutrition.*, 23(4): 229~236, 1990.
- Costa, O. T. F., D. J. S. Ferreira, F. L. P. Mendonca and M. N. Fernandes : Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, 232: 627~636, 2004.
- Dedrajas, J. R., J. Lopez-Barea and J. Deinado : Dieldrin induces peroxisomal enzymes in fish (sparusaurata). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol-Toxicol. Endocrinol.*, 115(2): 125~131, 1996.
- Donaldson, E. M. : The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. : In *Stress and Fish*, A. D. Pickering (ed.), Academic Press, London, 11~48, 1981.
- Edosa, O., G. E. Thomas and C. O. Paul : Chronic effects of formalin on erythrocyte counts and plasma glucose of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Asian Fish. Sci.*, 7: 1~6, 1994.
- Fasaic, K. and j. Palackova : Total protein and serum fraction values in two-year carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta. Bio. Iugosl. E. Ichthyol.*, 22: 23~30, 1990.
- Forman, H. J. and I. Fridovich : Superoxide dismutase : A comparison of rate constant. *Arch. Biochem. Biophys.*, 158: 396, 1973.
- Fox, C. H., F. B. Johnson, J. Whiting and P. P. Roller : Formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.*, 33: 845~853, 1985.
- Gabryelak T., M. Piatrowska, W. Leyko and G. Peres : Seasonal variation in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75C: 383~385, 1983.
- Gluth, G. and W. Hanke : A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sub-lethal concentration. II. The dependency on the temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 796: 39~45, 1984.

- Harbell, S. C. : Studies on the pathogenesis of vibriosis in coho salmon *Onchorhynchus kisutch* (Walbaum). J. Fish Dis., 2: 391~404, 1979.
- Ito, Y. and T. Murata : 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, 1990.
- Kang, J. C. and J. H. Jee : Hemochemical changes in israel carp, *Cyprinus carpio* exposed to cyanide. J. Korean Fish. Soc., 32(5): 573~581, 1999.
- Khattak, I. U. D. and M. A. Hafeez : Effect of malathion on blood parameters of the fish, *Cyprinion watsoni*. Pak. J. Zool., 28(1): 45~49, 1996.
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature., 227: 680~685, 1970.
- Landry, S. j. and L. M. Gierasch : Polypeptide interactions with molecular chaperones and their relationship to invivo protein folding. Annu. Rev. Bioph. Biom., 23: 645~669, 1994.
- Letux, F. and F.P. Meyer : Mixture of malachite green and formaline for controlling *Ichthyophthirius* and other protozoan parasites of fish. Prog. Fish Cult., 34: 21~26, 1972.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrought, A. L. Farr and R. J. Randall : Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265~275, 1951.
- MacFaddin, D. J. and D. A. Brown : Stress and chronic effects of untreated and treated bleached kraft pulpmill effluent on the biochemistry and stamina of juvenile coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*). J. Fish. Res. Board Can., 36: 1049~1059, 1979.
- Marklund, S. and G. Marklund : Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem., 47: 469~474, 1974.
- Nelson, D. P. and L. A. Kiesow : Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). Anal Biochem., 49: 474~478, 1972.
- Raphael, D., T. A. Wong, R. Hoodnik and B. G. Borden : The effect of temperature on the bactericidal efficiency of sodium hypochlorite. J. Endod., 7: 330~334, 1981.
- Shen, H., Q. Zhang, R. Xu and G. Wang : Effects of petroleum on the sero-proteins of *Tilapia mossambica*. Mar. Environ. Sci., 16(1): 1~5, 1997.
- Speare, D. J., G. Goff, P. MacIsaac, J. Wechrkiwsky and N. MacNair : Effects of formalin and chloramine-T treatments on oxygen consumption of juvenile salmonids. J. Aquatic Anim. Health., 8: 285~291, 1996.
- Towbin, H., T. Stachelin and J. Gordon : Electrophoretic transfer of proteins from polyacryamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA., 76: 4350~4354, 1979.
- Varanka, Z., I. Rojik, I. Varanka, J. Nemcsok and M. Abraham : Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. Comp. Biochem. Physiol., 128C: 467~478, 2001.
- Vijayan, M. M. and T. W. Moon : The stress response and plasma disappearance of corticostreiod and glucose in a marine teleost the sea raven. Can. J. Zool., 72: 379~386, 1994.
- Wdzieczak, J., G. Zalesna., A. Bartowiak, H. Witas

- and W. Leyko : Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase level in erythrocytes of different fish species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B: 357~358, 1981.
- Weber, L. P. and D. M. Janz : Effect of β -naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. *Aquat. Toxicol.*, 54: 39~50, 2001.
- Weber, L. P., S. L. Diamond, S. M. Bandiera and D. M. Janz : Expression of HSP70 and CYP1A protein in ovary and liver of juvenile rainbow trout exposed to β -naphthoflavone. *Comp. Biochem. Physiol.*, 131(C): 387~394, 2002.
- Wendel, A, and S. Feuerstein : Drug-induced lipid peroxidation in mice-1. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem. Pharmacol.*, 30: 2513~2520, 1981.
- Wynn, R. M., J. R. Davie, R. P. Cox and D. T. Chuang : Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. *J. Lab. Clin. Med.*, 124: 31~36, 1994.
- Yamazaki, K., W. Hashimoto, K. Fujii, J. Koyama, Y. Ikeda and H. Ozaki : Hemochemical changes in carp exposed to low cadmium concentrations. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52(3): 459~466, 1986.
- Zarate, J. and T. M. Bradley : Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon, *Aquaculture*, 223: 175~187, 2003.
- Zikic, R. V., A. S. Stajn, S. Z. Pavlovic, B. I. Ognjanovic and Z. S. Saicic : Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiol. Res.*, 50: 105~111, 2001.

Manuscript Received : October 11, 2007

Revision Accepted : December 5, 2007

Responsible Editorial Member : Ju-Chan Kang
(Pukyong Univ.)