

## 레바미졸이 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의 자연살해세포 활성화에 미치는 영향

박관하 · 윤종만 · 최상훈\*

군산대학교 수산생명의학과

### Effect of Levamisole on Enhancing Natural Cytotoxic Cell Activity in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*

Kwan-Ha Park, Jong-Man Yoon and Sanghoon Choi\*

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

The study examined the effect of levamisole on the natural cytotoxic cell (NCC) activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) head kidney (HK) leukocytes. *In vitro*, HK leukocytes were incubated with  $10^{-4}$  to  $10^4$  ng of levamisole/ml for 5, 20 or 40 h and then their NCC activity against target cells was assayed. The NCC activity appeared to increase after a 20 h of incubation. *In vivo*, tilapia were fed commercial diet containing 0, 50, 100 or 300 mg of levamisole/kg for 12 consecutive days. Then, the fish were fed a commercial normal diet and samples harvested weekly 0 to 8 weeks after levamisole administration. The NCC activity was augmented uniformly at all times examined until the end of the experiment. In conclusion, levamisole effectively enhanced and maintained tilapia NCC activity.

Key words: Nile tilapia, Levamisole, Natural Cytotoxic cell

## 서 론

면역증강물질은 특이적 및 비 특이적 면역반응을 활성화 시킬 수 있는 천연 또는 합성물질이다(Anderson, 1992). 양어를 위해 사용되는 천연면역증강 물질의 사용은 항생제 오남용으로 인한 부작용 및 제한적 이용에 국한된 백신사용의 대체물질로서 각광을 받아왔다. 양식농가에 사용되는 합성물질 또는 약제의 수는 사실 매우 적으며 오히려 천연물질로 대체되고 있는 실정이다. 그러나 레바미졸과 같은 합성물질은 의학 및 수의학 분야에서 항기생충 제재로 널리 사용되어 왔으며(Sakai, 1999) 또한 아주 효과적인 면역증강물질로 작용한다는 연구결과가 보고 되었다(Cheng and Po, 2011). 비록 레바미졸이 유럽공동체와 미국 USDA에 허가 및 등록되어 있다 하더라도 그 대사 기능의 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 상태이다. 또한 레바미졸의 독성 및 조직잔류에 대한 연구결과가 일부 실험

동물을 통해 발표(Babish et al., 1990)되었으나 어류에는 아직 보고된 예가 없다. 동물들에 특히 양식어류에 레바미졸이 좋은 면역증강물질로 작용할 수 있는 지 알아보기 위해 레바미졸의 적정사용량 및 가장 알맞은 투여시기 등에 관한 정확한 정보가 필요하다.

레바미졸은 단독으로 투여하거나 또는 백신과 더불어 투여했을 경우 비특이적 또는 특이적 면역반응이 유발된다는 사실이 몇 종류의 어종에서 확인되었다(Anderson, 1992). 어류의 백혈구를 레바미졸과 함께 *in vitro* 상에서 배양했을 시 대식기능과 호흡폭발, 면역세포증식 및 항체생산세포 등이 증가되었다(Siwicki and Cossarini-Dunier, 1990; Siwicki et al., 1990). 게다가 생체실험을 통해 침지 또는 사료 급이를 통해서 또한 백신과 함께 또는 단독으로 투여했을 시 혈청 라이소자임과 보체의 활성, 특이항체의 수준 및 대식세포의 활성, 또는 잉어

#### Article history;

Received 13 September 2012; Revised 13 December 2012; Accepted 20 December 2012

\*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469. 1886 Fax: +82. 63. 469. 1886

E-mail address: shchoi@kunsan.ac.kr

Kor J Fish Aquat Sci 45(6) 675-678, December 2012

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0675>

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

© The Korean Society of Fishereis and Aquatic Science. All rights reserved

와 무지개송어 및 연어의 자연살해세포의 활성이 증가된다는 보고가 있었다(Olivier et al., 1985; Siwicki, 1987, 1989; Anderson et al., 1989; Kajita et al., 1990; Anderson and Jeney, 1992; Baba et al., 1993; Jeney and Anderson, 1993; Siwicki et al., 1994). 어류 또한 레바미졸을 투여한 후 인위적으로 감염 시킨 병원균에 상당한 저항성을 나타내는 것으로 보아 특이 면역체계에도 효과가 있음을 암시해 준다 (Siwicki, 1987, 1989; Baba et al., 1993; Kajita et al., 1990; Olivier et al., 1985; Mulero et al., 1998a,b). Mulero et al. (1998b)은 레바미졸의 사료를 통한 급이가 gilthead seabream (보체활성, 대식기능, 호흡폭발 및 대식세포 활성인자 생산)의 면역반응을 촉진시키며 비브리오팀에 대한 저항성을 향상시켜준다고 보고하였다. 그러나 *in vitro*에서 head-kidney (HK) 백혈구에 레바미졸을 투여하였을 시 그러한 반응이 전혀 관찰되지 않았다(Mulero et al., 1998b). Renoux (1980)는 레바미졸을 어류에 처리하였을 시 표적세포가 면역세포 중 원충류, 암세포 및 바이러스에 감염된 세포에 대한 저항성을 나타내는 살해세포라는 사실을 제안하였다. 그러나 레바미졸의 활성에 대한 자세한 정보가 미흡한 실정이므로 본 연구에서는 어류모델로 틸라피아를 선정하여 두신 백혈구 내에 존재하는 자연살해세포 (natural cytotoxic cell, NCC)의 활성에 미치는 레바미졸의 효과에 대해 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

약  $90 \pm 8$  g 크기의 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) 140 미를 군산대학교 해양과학대학 양어장에서 분양 받아 450 liter의 대형 수조에 넣고 지하수를 공급하여 약 25 °C를 유지하였다. 사료 급이는 일 일당 어 체중의 1%의 비율로 시판되는 펠릿 사료(CJ 제일제당)를 먹였다.

### 시료채취

실험에 사용된 틸라피아는 100 mg/L 농도의 MS222 (Sigma)를 이용하여 마취시켰다. 혈액을 피부에서 채취하고 두신 백혈구는 50% Percoll density gradient (Pharmacia)를 이용하여 분리하였으며 세척과정을 거친 후 마지막으로 5%의 fetal bovine serum (FBS) (Gibco)이 첨가된 MEM (Gibco) 배양배지에 현탁하여 실험에 사용하였다. 세포의 생존율은 98% 이상으로 확인되었다.

### 레바미졸과 백혈구와의 *in vitro* 반응

두신 백혈구 내의 NCC에 미치는 레바미졸의 *in vitro* 영향을 알아보기 위해 48-well plate (Corning) well 당  $3 \times 10^6$  의 세포수와 함께 레바미졸을 음성대조군에는 0, 실험군에는  $10^4$  부

터  $10^4$  ng/mL 범위의 농도로 분주한 후 NCC의 활성을 측정하기 전 5시간, 20시간 또는 40시간 동안 22 °C에서 배양하였다. 세포를 배양한 후 백혈구의 생존율은 flow cytometry로 관찰하였다.

### 사료를 통한 레바미졸의 *in vivo* 효과

레바미졸의 *in vivo* 효과를 알아보기 위하여 140미를 무작위로 4 그룹으로 나누고 각 그룹은 레바미졸이 첨가되지 않은 시판되는 펠릿사료를 나머지 3 그룹은 사료 kg 당 50, 100 또는 500 mg의 레바미졸을 각각 첨가한 사료를 급이 하였다. 사료는 연속되는 12일 동안 지속적으로 하루에 틸라피아 생 체중 1 kg 대비 1% 되는 양으로 급이 하였다. 그 이후 레바미졸이 없는 일반사료로 대체했으며 시료채취는 레바미졸 사료를 투여한 후 0부터 8주까지 매주에 각각 채취하였다.

### 표적세포

살해세포활성 분석방법에 마우스 lymphoma 세포주 (L-1210, ATCC CCL-219)를 표적세포로 사용하였다. 표적세포는 10%의 FBS, 100 IU/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin (Gibco)과 2 mM glutamine (Gibco)이 첨가된 RPMI 1640 배양배지를 이용하여 37 °C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포를 표지 하기 위해 빛이 차단된 환경에서 3시간 동안 10 µg/ml의 3,3-dioctadecylozocarbocyanine perchlorate (DiO, Sigma)이 첨가된 배양배지에서 배양하였다. 표지 후 잉여의 DiO는 PBS로 세척하였으며 세포의 표지 정도는 flow cytometry로 최종 확인 하였다.

### 살해세포 활성

틸라피아의 두신백혈구의 자연살해활성을 *in vitro* 또는 레바미졸이 첨가된 사료를 급이한 후 이중 형광표지(Cuesta et al., 1999)를 기초로 한 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 각 세포살해 활성 분석은 duplicate로 수행하였다. 즉, 두신 백혈구들을 5 mL tube (Falcon, Becton Dickinson)에 넣은 후 50 의 DiO가 표지된 표적세포를  $10^6$ /mL의 수로 분주하여 최종 50:1의 effector:target 비율이 되게 조정하였다. 샘플들을 500 g에서 2분간 원심분리 하였으며 24 °C에서 3시간 동안 배양하였다. 대조군으로서 최초의 표적세포 생존율을 결정하기 위해 0시간 쯤 샘플분석을 하였다. 배양배지로 24 °C에서 배양된 표적세포의 생존율을 3시간 동안 분석하였다. 배양시간이 종료된 후 FACScan (Becton Dickinson)을 수행하기 전 30 µL의 propidium iodide (400 µg/mL, Sigma)를 각 샘플에 넣어 가볍게 흔들어 섞어 주었다. 분석 중 DiO가 표지된 표적세포에 일치되는 FL1영역만을 선택하여 수행하였다. 각 세포독성 분석 과정에 DiO가 표지된 또는 두신 백혈구의 표준샘플을 포함시켜 진행하였다. Green과 red 형광색으로 발현되는 사멸된

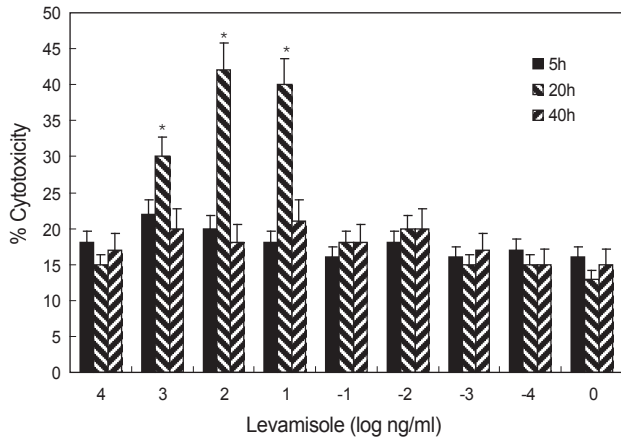


Fig. 1. NCC activity of tilapia *Oreochromis niloticus* HK leukocytes after incubation with levamisole-supplemented RPMI-1640 culture medium for 5, 20 or 40 h. Bars represent mean+S.E. (n = 5). Asterisks denote statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between control leukocytes and levamisole-treated leukocytes.

표적세포의 생존율은 틸라피아 백혈구의 세포살해활성과 연관되었다. 세포살해활성은 다음과 같은 방법으로 측정되었다. Cytotoxic activity (%) =  $(\% \text{sample} - \% \text{control}) / (100 - \% \text{control}) \times 100$ .

### 통계분석

Flow cytometry 결과에 대한 정량분석은 Lysis Software Package (Becton Dickinson)의 통계적 option을 사용하였다. 제시된 결과들은 means  $\pm$  S.E. 형태로 표시되었으며 ANOVA (one way analysis of variance)로 분석하였다. ANOVA 테스트 결과 그룹 간 통계적 유의성( $P < 0.05$ )을 나타냈을 때 평균치의 비교를 적용하였다.

### 결과 및 고찰

어류양식이 전세계적으로 중요한 산업으로 자리매김 하면서 항생제, 백신 및 면역증강제 등이 어류질병을 예방하거나 치료하기 위해 널리 사용되었으며(Anderson, 1992) 그 중 면역증강제에 대한 중요성은 지난 20년 동안 강조되어 왔다. 면역증강제 중 레바미졸은 carp (Siwicki, 1987, 1989; Baba et al., 1993), rainbow trout (Kajita et al., 1990), coho salmon (Olivier et al., 1985) 및 gilthead seabream (Mulero et al., 1998a,b)의 면역반응 및 질병에 대한 저항성을 증진시킨다는 연구결과가 보고되었다. 또한 레바미졸은 sheep (Cabaj et al., 1995)과 fish (Mulero et al., 1998a; Siwicki and Korwing-Kossakowski, 1998)에 있어서 성장촉진인자로도 효능이 있다고 알려졌다. 비록 레바미졸이 면역체계에 미치는 긍정적인 효과가 입증되

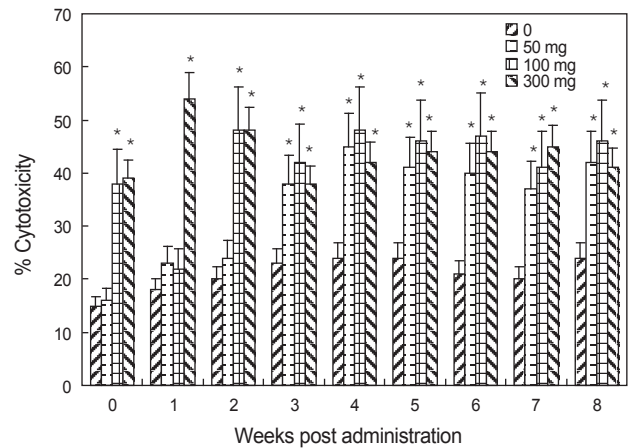


Fig. 2. NCC activity of HK leukocytes from tilapia *Oreochromis niloticus* fed levamisole-supplemented diet. Bars represent mean+S.E. (n = 5). Asterisks denote statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between leukocytes from control fish and those from fish fed levamisole-supplemented diet.

었다 하더라도 경우에 따라서는 부정적 또는 면역억제효과 있다는 주장도 제기되었다(Siwicki et al., 1990). 어류의 대식세포활성에 미치는 레바미졸의 영향에 관련된 제한된 정보가 있기는 하지만 어류의 세포살해활성에 관한 유일한 연구는 주 표적세포로서 T 림프구와 자연살해세포가 대상이 될 수 있다는 내용에 국한된다(Renoux, 1980). 어류의 NCC 활성화와 원생생물, 종양세포 및 바이러스에 감염된 세포에 대항하는 생체방어 메커니즘에 관련된 연구정보가 미진하여 본 연구를 수행하게 되었다.

우선 첫 번째로 어류모델로서 틸라피아를 선정하여 틸라피아의 두신 백혈구에 존재하는 NCC활성에 미치는 레바미졸의 *in vitro* 효과를 조사하였다. 그 결과 레바미졸을  $10^1$ 에서  $10^3$  ng/mL의 농도로 20시간 배양했을 시 살해세포의 활성이 유의성 있게 증가되었다(Fig. 1). 반면에 레바미졸을 고농도( $10^4$  ng/mL)로 처리한 실험군과 전혀 처리하지 않은 대조군의 어떠한 그룹도 NCC의 활성을 증가시키지는 못하였다. 그러나 추가로 20시간이 지난 후부터는 약간의 증가되는 경향이 있었으나 유의성 있는 증가는 관찰되지 않았다(Fig. 1). 또한 고농도의 레바미졸은 그 자체로 면역세포에 독성으로 작용하여 활성을 억제하는 것으로 추정된다. 살해세포 활성 분석실험에서 effector 세포와 주표적 세포를 함께 넣은 후 배양하지 않은 자체로 살해활성을 측정할 결과 10% 내외의 수치를 나타냈다(자료 미제시). 레바미졸을 *in vitro*로 처리하였을 시 다른 종류의 어류 면역반응이 나타난다는 보고가 있다. 예를 들면 carp에 있어서 림프구증식(Siwicki and Cossarini-Dunier, 1990)이 관찰되었고 무지개송어의 경우 레바미졸을 비장세포와 배양한 후 대식세포의 활성, 호흡폭발 및 항체생성 세포수가 증가되었다

(Siwicki et al., 1990). 그러나 상대적으로 높은 레바미졸의 농도(25 또는 50  $\mu\text{g/mL}$ )는 면역반응을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

본 연구의 *in vivo* 실험에서 틸라피아에 레바미졸이 첨가된 사료를 급여 시킨 후 NCC의 활성이 급격히 증가되는 것이 관찰되었다(Fig. 2). 레바미졸을 12일 동안 급여한 후 바로 샘플링 한 그룹에서도 사료 kg 당 100 또는 300 mg의 레바미졸을 투여한 경우에 있어서 통계적으로 유의성 있는 NCC의 활성이 관찰되었다. 더욱이 레바미졸의 투여를 끝낸 후 8주까지의 실험기간까지도 그러한 높은 활성이 유지되었다. 최고치의 NCC 활성은 사료 kg 당 300 mg의 레바미졸을 급여한 후 일주일 만에 관찰되었으며 대조군의 활성보다 약 3배까지 상승하는 것으로 관찰되었다. Kajita et al. (1990)은 NCC 또는 NK 세포활성이 레바미졸을 주사한 무지개송어에서 증가된다고 보고하였다. 그러나 활성증강 정도나 유지되는 효과의 기간은 본 연구에서 측정된 NCC의 활성에 훨씬 못 미친 수준이다.

결론적으로 요약하자면 틸라피아의 두신 백혈구의 NCC활성은 *in vitro* 또는 레바미졸의 사료를 통한 투여에 의해 증가되었다. *In vitro*의 경우 레바미졸과의 배양시간이 NCC활성에 미치는 매우 중요한 조건으로 나타났다. *In vivo*의 경우 레바미졸을 급여한 틸라피아의 NCC활성이 실험초기부터 증가하기 시작하여 8주 후까지도 유지되는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통하여 레바미졸이 일정한 시간 동안만 유지되었다 소멸되는 다른 면역증강물질의 효과와는 상당한 차이가 있음을 알 수 있다.

## 사 사

이 논문은 2012년 군산대학교 수산과학연구소 학술연구비 지원으로 연구되었음

## 참고문헌

- Anderson DP. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Ann Rev Fish Dis* 2, 281-307.
- Baba T, Watase Y and Yoshinaga Y. 1993. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 301-307.
- Cabaj W, Stankiewicz M, Jomas WE and Moore LG. 1995. Levamisole and its influence on the immune response of lambs. *Vet Res Commun* 19, 17-26.
- Cheng YC and Po HL. 2011. Leukoencephalopathy after levamisole for the treatment of verrucae. *Acta Neurol Taiwan* 4, 262-266.
- Cuesta A, Esteban MA and Meseguer J. 1999. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L) leucocytes. Assessment by flow cytometry and microscopy. *Vet Immunol Immunopathol* 71, 161-171.
- Kajita Y, Sakai M, Atsuta S and Kobayashi M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mikiss*. *Fish Pathol* 25, 93-98.
- Mulero V, Esteban MA and Meseguer J. 1998b. In vitro levamisole fails to increase seabream (*Sparus aurata* L) phagocyte functions. *Fish Shellfish Immunol* 8, 315-318.
- Mulero V, Esteban MA, Munoz J and Meseguer J. 1998a. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L) *Fish Shellfish Immunol* 8, 49-62.
- Olivier G, Evelyn TPT and Lallier R. 1985. Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. *Dev Comp Immunol* 9, 419-432.
- Renoux G. 1980. The general immunopharmacology of levamisole. *Drugs* 19, 89-99.
- Sakai M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-92.
- Siwicki AK. 1987. Immunomodulating activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio*. *J Fish Biol* 31, 245-246.
- Siwicki AK. 1989. Immunomodulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Dev Comp Immunol* 13, 87-91.
- Siwicki AK, Anderson DP and Dixon OW. 1990. *In vitro* immunostimulation on rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) spleen cells with levamisole. *Dev Comp Immunol* 14, 231-237.
- Siwicki AK and Cossarini-Dunier M. 1990. Effect of levamisole on the lymphocyte and macrophage activity in carp (*Cyprinus carpio*). *Ann Rech Vet* 21, 95-100.