

# 구리에 노출된 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)의 항산화 효소 및 acetylcholinesterase 활성의 변화

민은영 · 강주찬<sup>1\*</sup>

부경대학교 수산과학연구소, <sup>1</sup>부경대학교 수산생명의학과

## Chronic Effects of Copper on Antioxidant Enzymes and Acetylcholinesterase Activities in Rock bream *Oplegnathus fasciatus*

EunYoung Min and Ju-Chan Kang<sup>1\*</sup>

*Institute of Fisheries science, PuKyong National University, Busan 608-737, Korea*

*<sup>1</sup>Department of Aquatic life medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

A laboratory experiment was conducted to determine chronic effects of waterborne copper exposure on rock bream *Oplegnathus fasciatus* using a panel of enzymes. The activities of the following biochemical biomarkers were determined at different concentrations of CuSO<sub>4</sub> for 10 and 20 days: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and lactate dehydrogenase (LDH) in plasma; antioxidant enzymes including glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) in liver and gills; and acetylcholinesterase (AChE) in brain and muscle. After exposure to two CuSO<sub>4</sub> concentrations (200 and 400 µg/L), the activities of plasma ALT in the fish showed a tendency to increase with AST and LDH, depending on CuSO<sub>4</sub> concentration. Additionally, GSH levels and SOD activities significantly increased, depending on CuSO<sub>4</sub> concentrations in liver and gills. This involved the inactivation of reactive molecules formed during oxidative stress, which could provide protection against oxidative damage induced by CuSO<sub>4</sub>. However, GPx and AChE activities significantly decreased with CuSO<sub>4</sub> in liver and gills. In conclusion, these enzymes may represent convenient biomarkers for monitoring heavy metal pollution in coastal areas. Such chronic exposure studies are necessary for improving our understanding of complementary or deleterious effects of pollutants, and for developing metal toxicity biomarkers.

Key words: Copper, GSH, Anti-oxidant enzymes, AChE, *Oplegnathus fasciatus*

### 서 론

최근에 구리(Copper)는 양식어망의 부착생물 억제 및 항균활성 능력으로 그 용도가 부각되었지만(Xiuling et al., 2012), 이 전부터 오랫동안 선체 도료, 목제 보존제와 양어장의 살충제 및 살조제로 광범위하게 사용되어 연근해 유입이 지속되어 왔다(Tucker, 1985; Clark, 1996). 국내 진해만 해수 중의 구리 농도는 0.31-0.9 µg/L, 퇴적물에서는 25.3-92.3 µg/g으로 조사되었고, 참굴(*Crassostrea gigas*)에서의 구리 생물농축계수(BCF)는 카드뮴보다도 2배 높은 280861로 조사되었다(Lee and Kim, 2000). 구리는 척추동물의 다양한 생물학적 반응을 수반하는데

필수적인 미량금속으로 이온수송과 산화효소반응 및 헤모글로빈 합성에 관여하며, 세포 내 물질대사 효소의 보조인자로서 정상적인 생리기능 유지에 필요하다(Sanchez et al., 2005). 하지만, 구리는 적정 농도를 넘어서면 어류를 포함한 해양생물에 상당한 독성을 발휘하는 것으로 알려져 있으며, 필요 이상의 농도에 노출될 경우 시간과 농도에 비례하여 어류 및 갑각류의 폐사를 일으키고, 성장, 항상성 유지 및 생리활동에 부정적인 영향을 미친다(Carvalho and Fernandes, 2005; Park et al., 2009; Shin et al., 2013). 따라서, 비교적 저 농도의 구리에 만성적으로 노출되었을 때, 어류의 생리 활성변화를 알아볼 수 있는 biomarker에 관한 연구가 필요하다(Vieira et al., 2009).

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0874>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Kor J Fish Aquat Sci 47(6) 874-881, December 2014

Received 21 August 2014; Revised 14 November 2014; Accepted 24 November 2014

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5944 Fax: +82. 51. 629. 5938

E-mail address: jckang@pknu.ac.kr

과도한 구리 노출에 의한 생물독성 기전에는 여러 가지 모델이 제시되는데, 그 중 하나는 superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ) 및 peroxy ( $ROO^{\cdot}$ )과 같은 활성산소류(ROS, reactive oxygen species)를 과도하게 발생시켜 세포 독성을 유발한다는 것이다 (Linde et al., 2005). 세포 내 glutathione (GSH)와 결합하려는 구리의 성질은 세포 내 GSH 고갈 유도도 인한 구리 독성의 또 다른 기전이며 (Maracine and Segner, 1998), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR)과 같은 GSH-independent antioxidant 활성 및 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)와 같은 antioxidant enzymes의 조절 능력 또한 구리 독성 기전과 연관되어 있다 (Gaetke and Chow, 2003).

GSH는 세포에서 ROS와 직접적으로 반응하여 독성물질의 대사 및 수송 과정에 관여하는 물질로, ROS뿐만 아니라 이들의 대사 산물과도 반응하여 세포의 방어 기작에 다방면으로 작용한다 (Dringen et al., 2000). 세포 내에 ROS 발생시, GSH는 주로 GPx에 의해서 glutathione disulfide (GSSG)로 산화되고, GSSG는 GR에 의해서 다시 GSH로 환원되는 redox cycle을 통해 유해물질 포합(conjugation) 과정에 관여하고, glutathione S-transferase (GST)와 같은 효소의 도움을 받아 생체 외로 배설 시킨다. 이러한 생체변환(biotransformation) 과정을 통하여 무독화 혹은 배설되지 못한 ROS는 DNA, RNA 및 단백질을 손상시켜 세포에 심각한 독성을 발휘한다 (Liu et al., 2005).

Acetylcholinesterase (AChE)는 척추동물의 신경자극 전달 물질로 체내에 흡수된 오염물질에 의해서도 유도되는 효소이기 때문에 해양오염에 대한 조기경보지표로 사용되어 왔다 (Kramer, 1994). 특히 유기염소계와 카바마이트계 농약에 의해 활성이 저해되는 것으로 알려져 있으나, 중금속에 오염된 지역의 해양 생물에서도 cholinesterase의 저해가 보고된 바 있다 (Devi and Fingerman, 1995; Guilhermino et al., 1998; Diamantino et al., 2003). 또한, 구리는 어류의 AChE 활성에 영향을 미쳐 운동신경 및 부교감신경을 자극하여 이상행동을 초래했다는 보고와 함께 AChE는 구리 노출에 따라 유의한 활성 변화를 보여 유용한 biomarker로 활용 가치가 있다는 보고가 있다 (Shin et al., 2003; Gioda et al., 2013).

따라서 본 연구는 국내 주요 양식종인 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)에 대한 구리의 만성적 영향을 알아보기 위해서 혈액, 간, 아가미, 뇌 및 근육에서 구리 독성과 관련 있는 일련의 효소들의 활성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)은 경남소재 양식장으로부터 분양 받아 실험실 조건에서 4주 이상 순치 시킨 후, 외관상 질병증세가 없는 건강한 개체(전장,  $12.14 \pm 1.03$  cm; 체중,  $33.78 \pm 1.74$  g)를 선별하여 실험구별 12마리씩 수용하여 실험

하였다.

### 실험조건

실험은 항온실( $20 \pm 1^\circ C$ )에서 유리수조( $50 \times 28 \times 31$  cm)를 사용하여 1일마다 실험용액을 교환하는 환수식으로 실시하였고, 실험조건은 Table 1과 같다. 실험 용액은 Copper (II) sulfate minimum 99% ( $CuSO_4$ , Sigma-Aldrich Co. LLC)를 증류수에 용해시켜 stock solution을 만든 후, 여과해수로 희석하여 노출농도가 각각 0, 200 및 400  $\mu g/L$ 이 되도록 설정하였다. 돌돔은 각 농도에 10일 및 20일간 노출시킨 후, heparin-Na (5,000 I.U., 중외제약)를 처리한 주사기를 이용하여 미부 정맥에서 채혈한 후, 간, 아가미, 뇌 및 근육을 적출하였다. 모든 실험은 2회 반복 실시하였다.

### 혈액 효소 활성

채혈한 혈액은 1시간 동안 실온에 방치한 후,  $4^\circ C$ 에서 6,000 rpm으로 5분간 원심 분리 (MICRO 22R, Hettich, Germany) 하여 혈청을 분리하였다. 효소활성 검토를 위해 ALT 및 AST는 Reitma-Frankel법으로, LDH는 LDH 젯산 기질법에 의하여 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하여 분석하였다.

### 항산화효소 및 AChE 활성

간과 아가미에서는 항산화 효소(GSH, GPx, SOD)를, 뇌와 근육에서 AChE의 활성을 검토하기 위하여 다음과 같이 진행하였다. 적출한 각 기관은 washing buffer (0.1 M KCl, pH 7.4)로 세척 후, homogenizing buffer (0.1 M  $K_2HPO_4$ , 0.15 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7.8)를 이용하여 Teflon-glass homogenizer (099CK4224, Glass-Col, Germany)로 균질화하였다. 조직 균질액을  $4^\circ C$ 에서 12,000 g로 25분간 원심 분리하여 상등액을 효소 분석 전까지  $-75^\circ C$ 에서 보관하였다.

GSH 함량은 Richardson and Murphy (1975)의 방법에 의하여 측정하였다. 일정량의 시료에 working solution (0.01 M 5,

Table 1. The chemical components of seawater and experimental condition used in the experiments

Test parameters	Value
Culture type	Renewal 24h toxicity test
Temperature ( $^\circ C$ )	$20.0 \pm 1$
pH	$8.1 \pm 0.5$
Salinity (‰)	$33.5 \pm 0.6$
Dissolved oxygen (mg/L)	$7.1 \pm 0.3$
Chemical oxygen demand (mg/L)	$1.13 \pm 0.1$
Ammonia (mg/L)	$12.5 \pm 0.7$
Nitrite (mg/L)	$1.3 \pm 0.3$
Nitrate (mg/L)	$11.48 \pm 1.0$

5'-dithiobis, 2-nitrobenzoic acid (DTNB), 0.1 M PBS buffer, pH 8.0)을 첨가하여 분광광도계 (Zenyth 200, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)를 사용하여 412 nm에서 측정하였다. GSH 함량 계산은 10 nM reduced glutathione standard solution을 사용한 검량선을 이용하였다.

GPx 효소 활성은 Bell et al. (1985)의 변형된 방법으로 측정하였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 기질로, sodium azide를 catalase 억제제로 사용하였다. 시료에 1 mM GSH, 0.1 M NADPH, 0.5 U glutathione reductase, 1 mM EDTA, 2 mM sodium azide 및 50 mM 인산완충용액(pH 7.4)이 포함된 혼합용액을 가하고 5분간 20°C에서 안정시킨 후, 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가함과 동시에 반응이 시작되었다. NADPH가 산화되는 비율을 340 nm에서 4분 동안 20초 단위로 측정하였고, 단위는 nmol/min/mg protein이다.

SOD 활성은 시료를 0.1M PBS buffer로 희석하여 시판되는 SOD assay kit (WST, Dojindo Labs. Co. Japan)로 450 nm에서 측정하였다. SOD 1 unit은 WST (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-terazolium, monosodium salt)의 붕괴율을 50% 억제하는 Cu, Zn-SOD의 양이다.

AChE 활성은 Ellman (1961)의 방법을 기초로 하여 변형된 방법으로 측정하였다. 시료를 효소 측정 범위 내로 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 적절히 희석한 후, 1.875 mM DTNB를 혼합하여 기질로 8.25 mM Acetylcholinesterase iodide을 넣은 뒤 즉시 파장 412 nm에서 5분간 측정하였다.

## Protein

조직의 단백질 함량의 측정은 Bradford (1976) 방법으로 측정하였고, Bovine gamma globulin (Sigma, USA)을 이용하여 표준 검량선을 작성하였다.

## 유의성 검정

실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램(SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시하고, 사후검정으로 Duncan's multiple range test를 통해  $P < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

본 연구에서는 돌돔(*O. fasciatus*)에서 구리의 만성적 노출에 따른 어류의 생리 활성 변화를 파악할 수 있는 biomarker 조사를 위해 혈청 효소 및 간과 아가미에서의 항산화 효소와 뇌와 근육에서의 AChE의 활성을 측정하였다. 이전 연구에 따르면 구리에 대한 돌돔의 24시간 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)는 1.73 mg/L, 방어(*Oplegnathus fasciatus*)는 1.03 mg/L, 담수어인 three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.)은 2.78 mg/L였다(Park and Kim, 1979; Svecovicus and Vosyliene, 1996). 본 연구에서는 기존 연구자료와 예비실험을 바탕으로 만성적 구리 노출을 위하여 농도를 200과 400 µg/L로 설정하여 실험하였다.

혈액학적 지표들은 중금속 노출 시 빠르게 반응하는데, 이런 변화는 중금속에 노출된 어류의 신장과 간 기능 장애 및 조혈기 손상을 의미하기 때문에 어류에서 혈액학적 연구는 환경의 오염 수준을 감시하는 유용한 수단으로 이용되고 있다(Witters et al., 1990). 본 연구에서, 구리에 노출된 돌돔 혈청의 효소활성 변동은 Table 2에 나타내었다. ALT (KU) 활성은 노출 20일째, 200 µg/L 실험구를 제외하고는 모든 실험구에서 노출 기간과 농도에 의존적으로 대조구에 비하여 유의하게 높은 활성을 보였다( $P < 0.05$ ). AST (KU)도 ALT와 유사하게 구리에 노출된 모든 실험구에서 대조구에 비하여 유의하게 높은 값을 보였다( $P < 0.05$ ), 노출 기간 및 농도에 따른 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 그러나, 돌돔의 혈청 LDH (IU/L) 활성은 단지 노출 20일째에 400 µg/L 실험구에서만 대조구에 비하여 유의하게 높은 값을 보였다(Table 2). 혈청 내 효소성분인 ALT와 AST는 해당 효소를 이루는 필수아미노산과 탄수화물 대사에 중요한 역할을 하며, 정상 조건에서는 혈중에 미량으로 존재하나, 간, 심장 및 근육의 조직학적 손상이나 이상 발생시 혈중 농도가 높아지는 것으로 알려져 있어, 어류에 있어 독성물질에 대한 모니터링 지표로 사용되고 있다(Blasco and Puppo, 1999). 본 연구에서 보인 혈중 ALT와 AST 증가도 이와 같이 구리의 만성적 노출에 의한 여러 장기의 조직학적 손상이 원인이라고 판단된다. LDH는 젖산을 분해하고 재합성하는 효소로, 스트레스를 받았

Table 2. Changes of plasma enzymes parameter of rock bream *Oplegnathus fasciatus* exposed to Cu for 10 and 20 days.

Parameters	Exposure time (days)	Copper concentrations (µg/L)		
		Control	200	400
ALT (KU)	10	56.04±8.32 <sup>a</sup>	60.34±7.19 <sup>a</sup>	88.29±8.64 <sup>bc</sup>
	20	55.78±4.48 <sup>a</sup>	78.88±2.32 <sup>b</sup>	92.14±5.75 <sup>c</sup>
AST (KU)	10	32.31±2.88 <sup>a</sup>	39.98±2.58 <sup>b</sup>	44.21±4.32 <sup>b</sup>
	20	31.50±1.49 <sup>a</sup>	38.77±3.75 <sup>b</sup>	45.59±4.12 <sup>b</sup>
LDH (IU/L)	10	105.43±7.4 <sup>a</sup>	117.79±12.9 <sup>ab</sup>	125.99±11.1 <sup>ab</sup>
	20	107.75±5.2 <sup>a</sup>	128.37±14.0 <sup>ab</sup>	132.65±9.3 <sup>b</sup>

Values are mean±S.E. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test (n=12).



을 때 생성된 젖산으로 인한 혈액의 산성화를 제어하는 기능을 하며, 유해물질에 의해 에너지 생산 경로에 이상이 발생할 경우 그 활성이 변한다(Vieira et al., 2009). 본 연구 결과와 유사하게, 같은 해산 어종인 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)에서도 구리(100 및 200  $\mu\text{g/L}$ ) 노출에 의해서 LDH 활성이 유의하게 증가하였다(Baeck et al., 2014). 또한, 기수어인 망둥어(*Pomatoschistus microps*)에서는 근육의 LDH (U/mg protein)가 구리(200 및 400  $\mu\text{g/L}$ ) 및 수은(25 및 50  $\mu\text{g/L}$ )에 의해서 유의하게 증가하였다. 이는 구리 노출에 의한 스트레스 상황에서 에너지 생산과정 중 혐기적 경로 사용의 증가를 의미한다고 한다고 한다(Vieira et al., 2009). 그러나, 이들 어종에 대한 구리의 노출기간은 단지 4일이었으나, 본 연구에서는 노출 기간이 10일과 20일로 길었음에도 불구하고 LDH 활성의 증가 현상이 지속적으로 나타난 점을 주목해 볼 때, 만성적 구리 오염에 대한 specific biomarker로서의 가능성을 제시할 수 있을 것이다.

구리 노출에 의한 독성은 oxidative stress를 유발하는 pro-oxidant와 antioxidant 항상성의 불균형과 연관이 있다(Liu et al., 2005). 어류에서, 구리에 의한 oxidative stress는 무지개 송어와 잉어에서 보고된 바 있다(Niyogi et al., 2006; Gert et al., 2002). 구리에 의한 oxidative stress는 dietary, waterborne 혹은 injection과 같이 노출 경로를 달리 해도 유도됨이 밝혀졌다(Lushchak, 2011). 이와 같이 중금속에 의한 free radical과 oxidative stress 반응은 redox cycling을 중심으로 GSH 및 SOD와 같은 antioxidant defense system에서 대해서 많이 연구되어 왔다(Valavanidis et al., 2006). 본 연구에서는 구리의 산화적 스트레스에 대한 표적 장기로 간과 아가미를 선택하였으며, 그 결과, 아가미의 GSH, SOD 및 GPx, 모두 간에서 보다는 낮은 활성을 보였지만, 구리 노출에 따른 활성 반응양상은 간에서와 유사하였다(Fig. 1-3). 또한, 본 연구에서 항산화 효소 활성의 변화기간에서는 노출 20일차에 유의하게 나타난 것 비해 아가미에서는 노출 10일차에 좀 더 빨리 나타난 것은, waterborne 노출 시, 구리의 주요 축적 장기는 간과 아가미이지만, 주요 흡수 경로가 아가미일뿐만 아니라, 구리로 인한 아가미 점막 손상 때문인 것으로 사료된다(Campbell et al., 1999; Tao et al., 2000; Handy, 2003). 더욱이 Bopp et al. (2008)은 무지개 송어(*O. mykiss*)의 아가미 세포에서 구리에 의한 산화적 스트레스의 결과로 ROS 발생과 lipid peroxidation 및 DNA 손상을 보고한 바 있다.

GSH는 생체 내 free radical scavenger이자 항산화제로 중금속 노출 시 해독능력을 나타내는 중요한 지표로서, redox reaction을 유지하고, ROS와 외인성 물질에 대해 방어하는 중요한 역할을 한다(White et al., 2003). 본 연구에서는 노출 20일째, 200  $\mu\text{g/L}$  실험구를 제외하고, 구리에 노출된 모든 실험구의 돌돔의 간과 아가미에서 GSH의 구리 농도에 따른 유의한 증가가 관찰되었다(Fig. 1). 이는 다른 어종인 조피볼락(*S. schlegeli*)과 붕어(*Carassius auratus*)에서와 유사한 결과로(Baeck, 2012; Liu et al., 2005), 돌돔에서도 구리에 의하여 발생된 ROS를 제

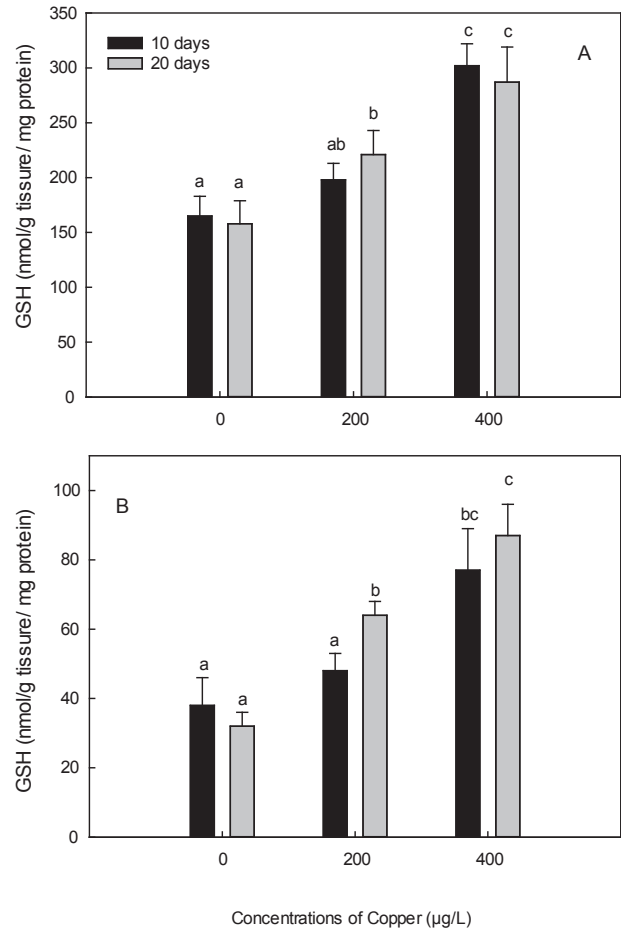


Fig. 1. Glutathione (GSH) levels in liver (A) and gill (B) of Rock bream *Oplegnathus fasciatus* exposed to copper for 10 and 20 days. Vertical bar denotes one standard deviation of the mean. Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between the groups ( $n=12$ ).

거하기 위하여 GSH 생성이 촉진 된 것으로 사료된다. 어류의 간에서 중금속에 의한 GSH의 증가는 간의 amino-acid substrates 흡수를 증가와 생합성 효소들의 활성 증가에 의한 것으로, 특히, 과산화 과정이 활성화 될 때 GSH가 더욱 필요하기 때문이라고 알려져 있다(Gallagher et al., 1992; Maracine and Segner, 1998). 또한, Zhang et al. (2005)도 구리(5-250  $\mu\text{g/L}$ )에 노출된 붕어(*C. auratus*)에서 GSH 합성 증가를 통해 경미한 산화 스트레스에 적응하기 위한 메커니즘으로 GSH 함량이 증가할 수 있다고 보고하였다.

구리는, 정확한 메커니즘이 밝혀진 것은 아니나, GSH와 결합하여 보다 안정적인 형태인 GS-Cu(I) 복합체를 형성하는 것으로 알려져 있으며, 높은 농도의 구리 노출 초기에는 GSH가 빠르게 감소한다고 보고된 바 있다(Connors and Ringwood, 2000). 이전 연구에서, 이러한 GSH의 감소는 GSH regenerat-

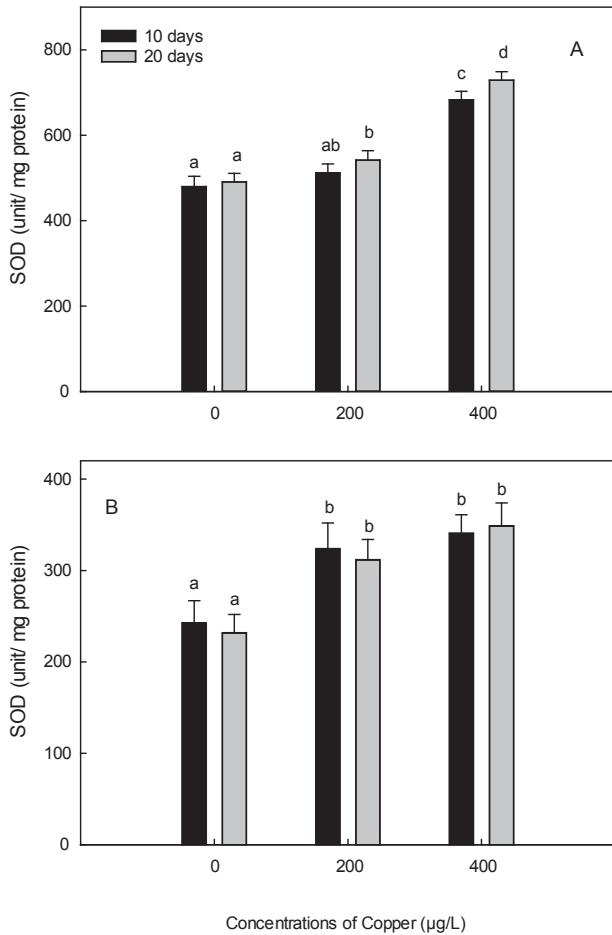


Fig. 2. Superoxide dismutase (SOD) activities in liver (A) and gill (B) of Rock bream, *Oplegnathus fasciatus* exposed to copper for 10 and 20 days. Vertical bar denotes one standard deviation of the mean. Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between the groups ( $n=12$ ).

ing system (GSH reductase, GSH synthetase)이 영향을 입었을 가능성을 제시하며, 노출 농도에 따른 변화에 주목하였다(Canesi et al., 1999; Sanchez et al., 2005). 한편, 구리와 GSH의 복합체인 GS-Cu(I)에 의해서는 ROS가 생성되며, 이는 또 SOD 및 cytochrome oxidase와 같은 또 다른 metalloenzymes의 합성을 촉진시킨다고 한다(Freedman et al., 1989).

본 연구에서 보인 구리 노출에 따른 돌돔의 간과 아가미에서의 SOD의 증가도 이와 같은 맥락에서 해석될 수 있을 것이다. 구리에 노출된 돌돔의 간에서는 구리 농도 및 노출 기간에 따른 SOD의 증가가 관찰되었고, 아가미에서는 농도 및 노출기간과는 상관없이 구리에 노출된 모든 실험구에서 유의한 증가를 보였다(Fig. 2). SOD는 CAT, GPx 및 GSH를 포함하여 중금속에 의해 발생된 ROS에 대한 첫 번째 방어선으로서, superoxide와 hydrogen peroxide를 제거하는 역할을 담당한다(Hayes and

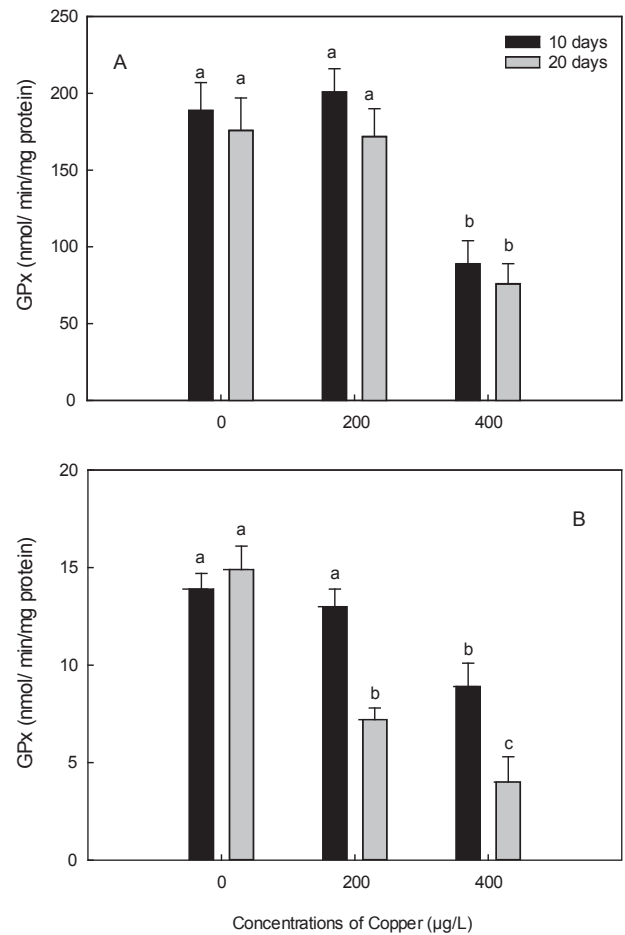


Fig. 3. Glutathione peroxidase (GPx) activities in liver (A) and gill (B) of Rock bream, *Oplegnathus fasciatus* exposed to copper for 10 and 20 days. Vertical bar denotes one standard deviation of the mean. Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between the groups ( $n=12$ ).

McLellan, 1999). Hansen et al. (2006)도 brown trout (*Salmo trutta*) 간과 아가미에서 구리 노출 시, 먼저 SOD와 CAT 활성이 증가되며, 이후에 GR과 metallothionein이 유도된다고 보고하였다. 또한, 무지개송어(*O. niloticus*)에서도 구리에 급성(48시간)과 만성(20일) 노출 모두에서 SOD 활성이 증가하였다(Atli and Canli, 2010).

GPx는  $H_2O_2$ 를 분해하여  $H_2O$ 와  $O_2$ 로 만드는 효소로, GPx가 활성을 발휘하기 위해서는 GSH를 필요로 하며,  $H_2O_2$ 를 분해하는 과정인 redox-cycle에서 antioxidant enzymes으로서의 그 기능을 한다(Winston and Giulio, 1991). 본 연구에서 구리에 노출된 돌돔의 간 및 아가미에서 GPx는 감소하였다(Fig. 3). 이러한 감소는 노출 농도 및 노출 기간에 따라 더욱 가속화되었는데, 이는 포유류 및 다른 어종에서도 유사한 결과이다(Ossola et al., 1997; Zhang et al., 2000; Ahmad and Santos, 2004; Baeck,

2012). GPx는 GR과 함께 GSH의 산화, 환원 과정에 필요한 항산화 효소로, 구리 노출에 의한 GR의 감소는 oxidized GSH인 GSSG의 축적을 유도한다(Zhang et al., 2005). 본 연구에서, GSH가 증가한 것으로 보아 GR과 마찬가지로 GPx의 감소 또한 GSH의 산화를 감소시켜 환원된(reduced) GSH의 축적을 유도하여 돌돔의 정상적인 redox cycling을 방해하였을 것으로 사료된다.

콜린성 섬유 및 혈액 세포에 풍부하게 존재하는 AChE는 중앙 및 말초 신경계에서 중요한 신경전달물질로, 최근 어류에서는 독성물질에 노출되었을 경우 그 활성이 감소되는 것으로 알려져, 신경독성에 대한 biomarker로써 제안된 바 있다(Shin et al., 2003; Modesto and Martinez, 2010). 본 연구에서, 돌돔의 AChE의 활성은 뇌에서는  $40 \pm 5.2$ 로, 근육의  $25 \pm 1.2$  nmol/min/mg protein보다 약 1.6배 정도 높았다(Fig. 4). 이 활성 수

치는 돌돔과 같은 농어목인 참돔(*Pagrus major*)의 뇌와 근육에서 조사된 바와도 유사하였다(Kim, 2013). 본 연구에서, 구리에 노출된 돌돔의 AChE 활성을 조사한 결과, 뇌에서는 노출 10일째부터 유의한 감소가 관찰되었고, 근육에서는 20일째에 유의한 감소가 관찰되었다(Fig. 4). 이와 유사하게 cadmium에 노출된 갯바어(*Seriola dumerili*)와 제조제에 노출된 은메기(*Rhanda quelen*)에서도 AChE의 활성이 유의하게 감소됨이 보고되었다(Jebali, 2006; Miron et al., 2005). 또한, 송사리(*Oryzias latipes*)에서 구리 노출에 의해서도 유의성은 인정되지 않았지만, 몸통에서 효소 활성이 감소되는 경향과 함께 비정상적인 행동이 보고된 바도 있다(Shin et al., 2003). 이와 같은 AChE 억제에 따른 acetylcholine의 증가는 어류의 섭식 및 행동에 이상을 유발하여 어류 생존까지 위협할 수 있다(Bretaud, 2000). 그러나, gilthead seabream (*Sparus auratus*)에서는 500 µg/L 구리에 20일간 노출 후, AChE의 활성이 뇌와 근육에서 2배 이상의 증가를 보였고, 저자는 두 기관에서 구리의 유의적인 축적은 관찰되지 않았으나, AChE의 활성만 증가한 것으로 보아 효소-기질 친화성(affinity) 증가에 2가 양이온인 구리의 관련성을 제안하였다(Romani et al., 2003). 하지만, 구리를 포함하여 중금속 노출에 따른 AChE에 관한 연구는 미비하기 때문에 AChE 저해제로 알려진 tetrodotoxin (Shin et al., 2003) 등을 이용하여 보다 명백한 규명을 위한 연구가 필요할 것이다.

이상의 논의로부터 만성적 구리 노출에 대한 돌돔의 혈청 효소와 항산화 효소 및 신경전달물질 활성의 변동은 연안 구리 오염에 대한 모니터링의 수단으로 이용될 수 있을 것으로 사료되며, 항산화 효소에 있어서는 돌돔의 간뿐만 아니라 아가미도 해양 모니터링의 재료로써 가치가 있을 것으로 판단된다.

## 사 사

본 연구는 부경대학교 자율창의학술연구 ‘돌돔의 acetylcholinesterase 및 산화효소에 미치는 독성물질의 영향 (Project Number C-D-2013-0351)’의 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

- Ahmad IMP and Santos MA. 2004. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaption to phagocytic-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicol Environ Safe* 2, 290-302.
- Antognelli C, Romani R, Baldracchini F, De Santis A, Andreani G and Talesa A. 2003. Different activity of glycolase enzymes in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chem Biol Interact* 142, 297-305.
- Atli G and Canli M. 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposure. *Ecotoxicol Environ Safe* 73, 1884-1889.

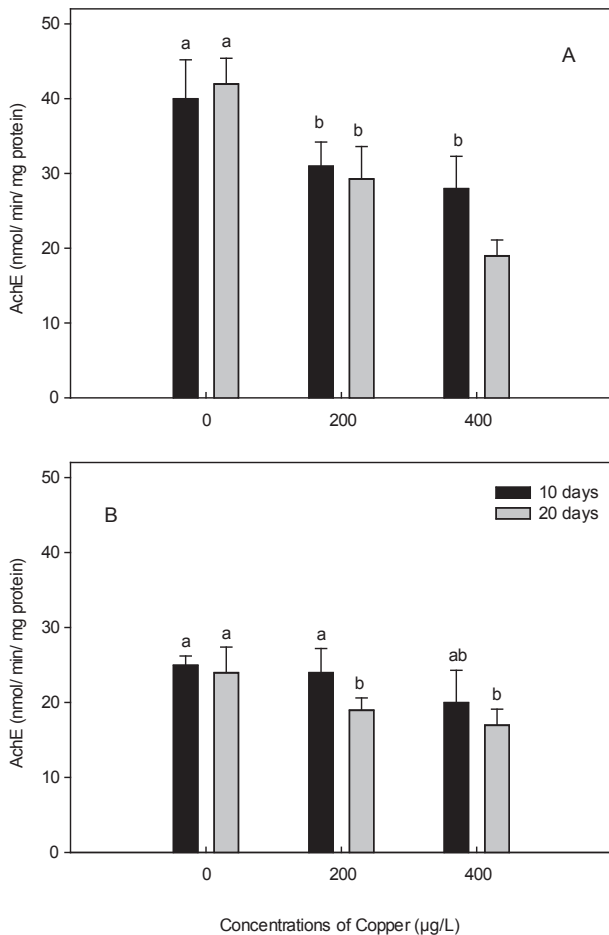


Fig. 4. Acetylcholinesterase (AChE) activities in brain (A) and muscle (B) of Rock bream, *Oplegnathus fasciatus* exposed to copper for 10 and 20 days. Vertical bar denotes one standard deviation of the mean. Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between the groups ( $n=12$ ).

- Baeck SK. 2012. Combined effect of Cu and temperature on physiological and biochemical change of rock fish, *Sebastes schlegeli*. Master, Thesis, Pukyong National University, Pusan, Korea.
- Bell JG, Cowey CB, Adron JW and Shanks AM. 1985. Some effects of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br J Nutr* 53, 149-157.
- Blasco J and Puppo J. 1999. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pu) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Comp Biochem Physiol Part C: Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 253-263.
- Bopp SK, Abicht HK and Knauer K. 2008. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquat Toxicol* 86, 197-204.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brethead S, Toutant JP and Saglio P. 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ Safe* 47, 117-124.
- Campbell HA, Handy RD and Nimmo M. 1999. Copper uptake kinetics across the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) measured using an improved isolated perfused head technique. *Aquat Toxicol* 46, 177-190.
- Canesi L, Viarengo A, Leonzio C, Filippelli M and Gallo G. 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat Toxicol* 46, 67-76.
- Carvalho CS and Fernandes MN. 2005. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture* 251, 109-117.
- Clark RB. 1996. Metals. *In: Marine pollution*. Oxford University Press, Oxford, New York, USA, 74-77.
- Connors DE and Ringwood AH. 2000. Effects of glutathione depletion on copper cytotoxicity in oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquat Toxicol* 50, 341-349.
- Dautrmepuits C, Betoulle S, Vernet G. 2002. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochim Biophys Acta* 4-8.
- Devi M and Fingerman M. 1995. Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the Red swamp crayfish, *Procambarus clarkia* by mercury, cadmium and lead. *Bull Environ Contam Toxicol* 55, 746-750.
- Diamantino L, Almeida E, Soares AMVM and Guilhermino L. 2003. Characterization of cholinesterase from *Daphnia magna* status and their inhibition by zinc. *Bull Environ Contam Toxicol* 71, 219-225.
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. 2000. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267, 4912-4916.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V and RM Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7, 88-95.
- Freedman JH, Ciriolo MR and Peisach J. 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J Biol Chem* 264, 5598-5605.
- Gaetke LM and Chow CK. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147-163.
- Galgani F, Bocquene G and Cadiou Y. 1992. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 91, 77-82.
- Gallagher EP, Canada AT and Di Giulio RT. 1992. The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquat Toxicol* 23, 155-168.
- Gert F, Stouthart XJHX, Spanings FAT, Lock RAC, Fenwick JC and Bonga SEW. 2002. Stress response to waterborne Cu during early life stages of carp, *Cyprinus carpio*. *Aquat Toxicol* 56, 167-176.
- Gioda CR, Loro VL, Pretto A, Salbeg J, Dressler V and Flores EMM. 2013. Sublethal Zinc and Copper exposure affect acetylcholinesterase activity and accumulation in different tissues of *Leporinus obtusidens*. *Bull Environ Contam Toxicol* 90, 12-16.
- Guilhermino L, Barros P, Silva MC and Soares AMVM. 1998. Should the use of cholinesterase as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarker* 3, 157-163.
- Handy RD. 2003. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process?. *Comp Biochem Physiol* 135A, 25-38.
- Hansen BH, Rømme S, Garmo ØA, Olsvik PA and Andersen RA. 2006. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metals levels. *Comp Biochem Physiol C* 143, 263-274.
- Hayes JD and McLellan LI. 1999. Glutathione and Glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defense against oxidative stress. *Free Rad Res* 31, 273-300.
- Jebali J, Banni M, Guerbei H, Almeida EA, Bannaoui A and Boussetta H. 2006. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. *Fish Physiol Biochem* 32, 93-98.
- Kim JH. 2013. Effects of selenium on the responses of antioxidant enzymes, acetylcholinesterase activity, non-specific immune, and bioaccumulation in red seabream, *Pagrus major*. Master, Thesis, Pukyong National University, Pusan, Korea.
- Kramer KJM. 1994. Bio-monitoring of coastal waters and estuaries. CRC press, London. 325-329.
- Lee IS and Kim EJ. 2000. Distribution of Heavy Metals in Sediments, Seawater and Oysters (*Crassostrea gigas*) in the Jin-



- hae Bay. *J Ecol Environ* 23, 59-64.
- Linde AR, Klein D and Summer H. 2005. Phenomenon of hepatic overload of copper in *Mugil cephalus*: Role of metallothionein and patterns of copper cellular distribution. *Bas Clin Pharm Toxicol* 97, 230-235.
- Liu H, Zhang JF, Shen H, Wang XR and Wang WM. 2005. Impact of Copper and Its EDTA Complex on the Glutathione-Dependent Antioxidant System in Freshwater Fish (*Carassius auratus*). *Bull Environ Contam Toxicol* 74, 1111-1117.
- Lushchak VI. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals (Review). *Aquat Toxicol* 101, 13-30.
- Maracine M and Segner H. 1998. Cytotoxicity on metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status. *Comp Biochem Physiol* 120, 83-88.
- Miron dos SD, Crestani M, Shetinger RM, Morsch MV, Baldisserotto B, Tierno AM, Moraes G and Vieira VL. 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ Saf* 61, 398-403.
- Modesto KA and Martinez CBR. 2010. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294-299.
- Niyogi S, Kamunde CN and Wood CM. 2006. Food selection, growth and physiology in relation to dietary sodium chloride content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under chronic waterborne Cu exposure. *Aquat Toxicol* 77, 210-221.
- Ossola JO, Groppa MD and Tomaro ML. 1997. Relationship between oxidative stress and heme oxygenase induction by copper sulfate. *Arch Biochem Biophys* 33, 332-337.
- Park KY, Lee DJ, Won DH, Lee WH and Kwak IS. 2009. Studies on endpoints of toxicological evaluation of heavy metals in *Brachinella kugenumaensis*. *J Environ Toxicol* 24, 241-249.
- Park JS and Kim HG. 1979. Bioassays on marine organisms III. Acute toxicity test of mercury, copper and cadmium to yellowtail, *Seriola quinqueradiata* and rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. *Bull Korean Fish Soc* 12, 119-123, 1979.
- Richardson RJ and Murphy SD. 1975. Effect of glutathione depletion on tissue deposition of methylmercury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 31, 505-519.
- Romani R, Antognelli C, Baldracchini F, De Santis A, Isani G, Giovannini E and Rosi G. 2003. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chem Biol Inter* 145, 321-329.
- Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Procher JM and Aïssa SA. 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ Toxicol Pharmacol* 19, 177-183.
- Shin SW, Cho HD, Chon TS, Kim JS, Lee SK and Koh SC. 2003. Neurobiochemical analysis of abnormal fish behavior caused by copper toxicity. *J Environ Toxicol* 18, 145-153.
- Shin YK, Park JJ, Lim HS and Lee JS. 2013. Copper toxicity of survival, respiration and organ structure of *Mactra veneriformis* (Bivalvia: Mactridae). *K J Malacol* 29, 129-237.
- Svecevicus G and Vosyliene MZ. 1996. Acute toxicity of copper to common freshwater fishes of Lithuania. *Ekologija* 2, 17-21.
- Tao S, Long A, Liu C and Dawson R. 2000. The influence of mucus of copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 47, 59-64.
- Tucker CS. 1985. Water quality. In: Channel catfish culture. Ed, Tucker CS. Elsevier, Amsterdam, 135-227.
- Valavanidis AT, Dassenakis M and Scudllo N. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environment pollutants. *Ecotoxicol. Environ Saf* 64, 178-189.
- Vieira LR, Gravato C, Soares AMVM, Morgado F and Guilhermino L. 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behavior. *Chemosphere* 76, 1416-1427.
- White CC, Viernes H, Krejsa CM, Botta D and Kavanagh TJ. 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal Biochem* 318, 175-180.
- Winston GW and Giulio RT. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 19, 137-161.
- Witters HE, Van Puymbroeck S, Van Den Sande I and Vanderborght OLJ. 1990. Hematological disturbances and osmotic shifts in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under acid and aluminum exposure. *J Comp Physiol* 160B, 563-571.
- Winston GW and Giulio RT. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 19, 137-161.
- Zhang SSZ, Noordn MM, Rahman SOA and Haron MJ. 2000. Effects of copper overload on hepatic lipid peroxidation and antioxidant defense in rats. *Vet Hum Toxicol* 42, 261-264.
- Zhang FS, Nriagu JO and Itoh H. 2005. Mercury removal from water using activated carbons derived from organic sewage sludge. *Water Res* 39, 389-395.
- Xiuling JI, Qunhui S, Fang L, Jing M, Gang X, Yuanlong W and Minghongm W. 2012. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China. *J Hazard Mat* 235-236, 178-185.