

생약제 고삼 뿌리 열수추출물의 넙치 투여시 질병 저항성에 미치는 영향

서정수* · 전은지 · 권문경 · 황지연 · 김진도 · 정승희 · 김나영 · 지보영 · 박명애
(국립수산과학원)

Effect of Disease Resistance on Oral Administration of Lightyellow Sophora Extract in Olive Flounder

Jung-Soo SEO* · Eun-Ji JEON · Mun-Gyeong KWON · Jee-Youn HWANG · Jin-Do KIM ·
Sung-Hee JUNG · Na-Young KIM · Bo-Young JEE · Myoung-Ae PARK

(National Fisheries Research and Development Institute)

Abstract

The effects of lightyellow sophora, *Sophora flavescens* extract were tested on non-specific immune response and a disease resistance of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. For feeding trial, weight gain of fish fed different treated groups were not significant differences. Serum analysis of treated and control group did not demonstrated any differences. Lysozyme activity in the kidney and spleen of the 0.05% treated group on 4th and 8th week showed significant increase, respectively. In addition, phagocytic activity of the 0.05% treated group on 4th and 8th week showed significant increase compared to the control group. Histopathology of the liver and kidney tissue of the administrated group for 4th, 8th and 12th week showed no particular signs of tissue degeneration. The treated group was higher than control group by analyzing the relative percent survival (RPS) of the experimental challenge of *Edwardsiella tarda*. Therefore, the lightyellow sophora showed effective in preventing fish-pathogenic edwardsiellosis for a certain period of time.

Key word : Lightyellow sophora, *Sophora flavescens*, Immunostimulant, Disease resistance, *Paralichthys olivaceus*

I. 서론

넙치(Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)는 한국에서 주요 양식어종으로, 2014년도 전체 양식 어류생산량의 52%를 차지하고(43,413톤), 생산금액은 4,151억원(2015 통계청)으로 전체 53.4%를 차지한다. 하지만, 넙치양식은 육상 수조식 양식 방법에 의한 밀식 등으로 병원체에 의한 감염성 질병이 발생하여 피해를 많이 입고 있다. 양식

넙치의 대표적 감염성 질병 중 세균성 질병인 에드워드병 및 연쇄구균증은 다양한 양식 연령에서 연중 발생하며 심각한 경제적 손실을 일으킨다. 예방 및 치료를 위해 많은 항생제 사용으로 항생제 내성이 높게 나타난다. 따라서 항생제 사용에 의한 사후 치료행위보다 수산용 백신 사용 등의 예방활동이 대단히 중요한 실정이다.

국내 수산용 의약품의 연간 판매량은 24,146백만원 규모이며, 전체 양식경영비 가운데 약품사

* Corresponding author :051-720-2491, jsseosoo@korea.kr

* 이 논문은 국립수산과학원 연구비지원(R2015070)에 의해 연구되었음.

용에 따른 양식어업인의 경제적인 손실이 매우 크다(한국동물약품협회 제공). 그러므로, 양식 어류 질병의 발생률을 감소시킬 수 있는 방안을 마련하여야 하며, 이 중에서 천연 생약제를 이용한 사료첨가제의 개발은 항생제 저감 및 친환경 양식수산물의 생산에 있어 효과적인 방안이 될 수 있다. 최근에 여러 종류의 식물(herbs)추출물을 이용하여 넙치, 틸라피아, 잉어, 조피볼락, 송어등의 어류의 비특이적 면역등의 활성화에 대하여 효과가 있다고 발표되고 있다. 국내 연구는 Kim et al.(1994)이 에센셜 오일의 항균활성을 어병세균에 적용한 이후, Jung et al.(2001)이 지유, 약쭈, 삼지귀엽초 등에서 추출한 물질을 대상으로 다양한 어병세균에 대한 항균 활성 및 어류 면역 활성화에 대한 연구를 수행하였고, 이후 많은 연구자들에 의하여 칠피, 홍삼, 유자, 마늘, 황금, 오배자, 생약제 복합물등의 생약제 추출물의 항균효능, 어류 면역반응등이 보고 되었다(Choi et al., 2004, 2005; Kang et al., 2005; Lee et al., 2010; Jee et al., 2012). 국외 연구는 중국 및 인도 등에서 한련초 추출물의 틸라피아(Christyapita et al., 2007)에 대한 효능, 황기와 인동 복합 추출물의 나일틸라피아(Ardo et al., 2008)에 대한 효능, 황기와 영지버섯 복합 추출물의 잉어에 대한 효능(Yin et al., 2009), 벌꿀 및 음양곽 복합 추출물의 잉어과 중국 앵추이 어류(Zhang et al., 2009)에 대한 효능으로 면역력 증강효과와 세균감염에 대한 저항력 등을 보고하였다. 더불어, 감초, 판람근 등의 어류에 대한 비특이적 효능 및 인도산 님 나무, 홀리 바실 등의 복합 추출물의 어류 투여에 따른 면역 활성화 등이 보고되었다(Galina et al., 2009).

고삼(Lightyellow sophora, *Sophora flavescens*)은 Sophora 중에 속하는 식물의 한 종류로서 전통적인 한약제제의 한 종류이다. 이것의 약리작용은 일반적으로 항균활성, 원충성 질병치료, 바이러스성 간염, 바이러스성 심근염, 위장관 출혈, 암 및 피부질환의 치료에 이용되고 있다(He et al.,

2015; Liu et al., 2015). 고삼의 뿌리는 matrine과 이것의 산화물을 함유하는 quinolizidine alkaloids가 주요 구성 성분이며, 이 성분들은 세포의 TNF-alpha와 IL-6를 방해하여 oxymatrine이 과도한 전염증증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)의 발현을 억제하므로써 활성을 나타낸다고 알려져 있다. 더불어, Matrine은 사람의 피부염증(skin inflammation)에서 substance P와 NK-1R의 발현을 억제한다고 알려져 있다(Liu et al., 2015).

본 실험에서는 세균성 질병에 주로 사용되는 생약제를 대상으로 시험관내(*in vitro*) 어패류 세균에 대한 항균활성을 측정하였으며, 이 중에서 항균활성이 높은 고삼뿌리 추출물을 선택하였다(Lee et al., 2010). 본 연구에서는 고삼 뿌리 열수추출물을 제작 후 사료에 흡습 투여하는 방법으로 넙치의 비특이적 면역 활성화 및 질병저항성에 대한 효능 효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물추출물(Herbal extract)

고삼 생약제제(뿌리)는 국내의 한약재상사(대창생약)를 통하여 2011년 3월에 구입하였으며, 모든 시료는 멸균증류수로 3회 씻은 후 추출에 이용하였다. 열수 추출방법은 고삼 뿌리 중량(200g)의 열배 볼륨(volume)에 해당하는 3차 증류수(2L)를 첨가한 후 고압추출기(90-120°C, 압력 0.2 kgf/cm²)에서 6시간 동안 끓였다. 추출액은 여과 및 진공원심농축기(rotary vacuum evaporator)를 사용하여 농축 후, 최종 농축 잔류물은 100 ml로 맞추어 사료첨가용 원액으로 보관하였다.

2. 시험어류

시험 어류는 국립수산과학원 사료연구센터로부터 분양받아 사용하였으며, 어류는 2.5톤 크기의 FRP 수조(fiber reinforced plastic tanks)에서 적정 수온을 22°C로 유지하면서 해수를 계속 공급

하였다. 각 그룹 당 시험어류는 120마리(평균 무게 68±11 g)를 사용하였다.

3. 사료 제조 및 투여

투여용 넙치 사료는 일반적으로 판매되는 수협 사료를 사용하였으며, 사료 무게(kg)별 원액 추출 물을 각각 0.05%, 0.1%, 1% 되게 습윤시켜 미리 제조하였다. 대조구 사료는 원 사료를 사용하였으며, 모든 사료는 냉동(-20℃)보관하면서 매일 일정량의 사료를 사용 전에 꺼내어 일정한 양을 하루 한번 반복 급여하였다.

4. 실험어의 생체 및 생리변화 측정

시험어의 생체 측정은 이전의 방법(Jee et al., 2012)에 따라 수행하였으며, 각 시기별 0, 4주, 8주 및 12주차에 시험구 및 대조구에서 각각 10마리씩 무작위로 선택 한 후, 어류 무게 및 간중지수 (Hematosomatic index; HSI; 간 무게/체중×100)를 측정하였다. 시험구별 어류의 생화학적 생리변화를 조사하기 위하여 해부시 개체별로 미부정맥에서 채혈 후 원심(15,000 rpm, 10분)분리에 의하여 혈장을 얻어 초저온보관(-80℃)하였다. 혈장 분석은 혈액화학분석기(FUJI DRY CHEM 4000i)를 사용하여 분석하였으며, 조사항목은 포도당 (glucose, mg/dl), 총콜레스테롤(TCHO, mg/dl), 요소질소(BUN, mg/dl), 젖산탈수소효소(LDH, U/L), 글루탐산 옥살로아세트산 트랜스아미나아제(GOT, U/L), 글루탐산 피루빈산 트랜스아미나아제(GPT, U/L), 총단백(TP, g/dl) 및 알칼리성포스파타제 (ALP, U/L) 8개 항목을 측정하였다.

5. Lysozyme 활성 분석

라이소자임 활성은 혈장 및 조직(간, 비장, 신장)으로 나누어서 실시하였다. 혈장 및 조직 lysozyme activity은 이전의 Parry et al.(1965) 방법에 따라 수행하였다.

6. Phagocytic 활성 분석

식세포활성 조사는 이전의 Jee et al.(2012) 방법에 따라 수행하였다. 간단히, 각 시기별, 개체별로 두신을 절취한 후, 항생제 및 L-15 medium(Sigma, USA)가 함유된 소형 페트리디쉬에서 nylon mesh로 세포 현탁액을 준비하였다. 준비된 세포현탁액은 원심분리법에 의하여 백혈구를 분리하였으며, 분리된 백혈구는 세포수를 조정(1×10^6 cells/ml로 조정) 후, 96 well plate에 부착시켰다. 부착된 백혈구는 luminol solution (Sigma)을 넣어 반응 후, 넙치 혈청으로 감작한 zymosan을 첨가하여 phagocytic activity을 luminescence counter (Perkin elmer, USA)를 이용하여 측정하였다.

7. 병리조직학적 분석

병리조직학적 검사는 이전의 Jee et al.(2012) 방법에 따라 수행하였으며, 각 시기별로 간, 비장 및 신장 조직에 대하여 병리학적 관찰을 실시하였다.

8. 인위 감염

어류에 대한 인위감염에 사용되는 균주는 국립수산과학원에서 보관하는 *Edwardsiella tarda* (GY-01) 및 *Streptococcus iniae* (FT5228)를 이용하였다. 각 균주는 BHIA 배지에서 계대 배양하였으며, 어체의 복강 주사 전에 멸균생리식염수를 이용하여 현탁하였다. 어병 세균 *E. tarda*와 *S. iniae*의 어체 당 세균 수는 $0.99 \times 10^5 \sim 2.8 \times 10^5$ CFU 및 $1.15 \times 10^5 \sim 1.17 \times 10^5$ CFU 로 조정하여 사용하였다. 대조구는 생리식염수를 복강에 동량 주사하였으며, 3주 동안 대조구에 대한 상대생존율을 측정하였다.

9. 통계학적 분석

통계학적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다

(P<0.05).

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 넙치의 성장 및 혈액학적 성상

천연물을 이용한 생약제제는 일반적으로 복합 제제로 제형이 불규칙하고, 함량이나 제조법 등이 일반 의약품에 비해 복잡 및 불규칙하므로 생약 성분 추출물의 추출 및 이용에 많은 어려움이 있다. 예비 연구결과를 바탕으로 증탕 및 고압추출기를 이용하여 각각 열수 추출물을 얻은 후, *in vitro* 상의 항균 활성 등에 차이가 있어 고압추출 방법을 본 연구에서 사용하였다(data not shown). 그러므로 본 연구에서는 일반적인 열수 추출방식이 아닌 고압추출법을 사용하여 열수 추출물을 얻었으며, 장기간 넙치 투여에 따른 성장도, 비특이적 면역력 등을 조사하였다.

고삼 추출물의 첨가에 따른 넙치의 체중 및 간중지수를 대조구와의 비교시 약간의 차이는 있었다(<Table 1>). 그러나 전반적으로 다양한 농도의

고삼 추출물 첨가가 넙치의 성장도 개선에는 효과가 없을 것으로 보인다. 국내의 다양한 생약 추출물의 어류 투여에 대한 성장도 조사 결과 어류 체중에는 영향을 미치지 아니한다고 보고하였다(Woo et al., 2010; Lee et al., 2010; Jee et al., 2012). 그러므로 생약 추출물은 어류의 면역력은 증가될 수 있으나 체중의 증가에는 관여하지 않음을 알 수 있었다.

고삼 추출물의 농도별 기간별로 투여한 그룹간의 혈액생화학적 결과는 별다른 차이가 없었다(<Table 1>). 그러므로 고삼 뿌리 추출물을 넙치에 시험 농도로 투여시 넙치의 혈액생화학적 변화에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있으며, 부작용이 없음을 알 수 있었다(Lee et al., 2010; Jee et al., 2012). 다양한 생약 추출물의 어류에 대한 혈액학적 성상은 자운영 및 인동 추출물을 투여한 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)에는 아무런 영향이 없었으며(Ardo et al., 2008), 금붕어에 울금 등의 3종 복합 추출물을 먹였을 경우에도 혈액학적 성상에는 별다른 영향이 없음을 알 수 있었다(Harikrishnan et al., 2010).

<Table 1> Physiological and hematological changes of olive flounders for herbs feeding period

| Duration | Con. | Body weight | HSI* | GLU (mg/dl) | TCHO (mg/dl) | BUN (mg/dl) | LDH (U/l) | GOT (U/l) | GPT (U/l) | TP (g/dl) | ALP (U/l) |
|----------|-------|-------------|---------|-------------|--------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 0 | 0% | 69±11 | 1.1±0.2 | 21±1.7 | 205±37 | 1.6±0.5 | 162±31.1 | 23±2.9 | 1.3±0.3 | 4.2±0.2 | 206±19 |
| 4wks | 0% | 101±18 | 1.2±0.2 | 15±2.1 | 155±9.3 | 1.2±0.2 | 265±64.4 | 21±2.5 | 1.2±0.2 | 4.1±0.4 | 201±28 |
| | 0.05% | 105±18 | 1.1±0.1 | 27±12 | 218±41 | 2.5±0.3 | 201±14.8 | 28±1.2 | 5.3±1.2 | 4.5±0.5 | 199±24 |
| | 0.1% | 105±21 | 1.1±0.1 | 27±4.6 | 154±13 | 0.8±0.1 | 268±86.0 | 23±3.8 | 1.8±0.3 | 3.9±0.2 | 184±24 |
| | 1% | 102±19 | 1.4±0.1 | 20±6.1 | 146±17 | 1.2±0.3 | 145±57.1 | 22±5.9 | 1.2±0.1 | 3.9±0.3 | 238±57 |
| 8wks | 0% | 148±18 | 1.3±0.3 | 17±1.3 | 220±13 | 5.0±0.7 | 121±67.5 | 14±4.2 | 2.9±0.8 | 4.2±0.3 | 230±22 |
| | 0.05% | 151±22 | 1.2±0.2 | 13±0.5 | 235±15 | 3.4±0.5 | 118±33.8 | 8.0±1.1 | 2.0±0.3 | 3.8±0.1 | 203±17 |
| | 0.1% | 145±12 | 1.1±0.1 | 30±6.9 | 204±23 | 1.8±0.7 | 196±20.2 | 19±3.0 | 2.4±0.9 | 4.5±0.3 | 332±26 |
| | 1% | 146±16 | 1.0±0.1 | 40±3.8 | 199±15 | 1.0±0.1 | 192±67.7 | 43±5.3 | 6.9±2.3 | 4.7±0.2 | 453±41 |
| 12wks | 0% | 181±19 | 1.3±0.2 | 23±3.5 | 260±23 | 2.1±0.3 | 212±145 | 23±7.3 | 5.3±0.8 | 4.8±0.1 | 225±52 |
| | 0.05% | 194±12 | 1.5±0.2 | 21±1.9 | 282±16 | 1.7±0.1 | 341±161 | 42±17 | 6.8±1.2 | 5.4±0.2 | 267±43 |
| | 0.1% | 185±19 | 1.0±0.0 | 18±1.8 | 203±27 | 0.4±0.2 | 150±48.4 | 17±1.8 | 2.5±0.6 | 3.8±0.3 | 246±26 |
| | 1% | 188±11 | 1.0±0.1 | 22±1.4 | 183±15 | 0.4±0.3 | 101±33.0 | 15±1.8 | 1.9±0.4 | 4.3±0.2 | 267±19 |

*HSI(Hepatosomatic Index) = (whole liver wight/whole body weight)×100

2. 넙치의 비특이적 면역 활성화

넙치의 비특이적 면역활성을 측정하기 위하여 혈장 및 조직(간, 비장, 신장)내의 lysozyme 활성 및 식세포 활성을 조사하였다. 우선 혈장 lysozyme 활성은 다양한 농도의 고삼 추출물을 흡습시킨 시험 그룹과 대조구의 혈장 lysozyme 활성값을 조사하였다. 고삼 추출물의 4주 투여기간 동안의 모든 그룹의 넙치 혈중 라이소자임 활성의 변화는 차이가 없으며, 8주 투여기간 동안의 고삼 추출물을 흡습시킨 시험구의 넙치 혈장 lysozyme 활성은 대조구에 비하여 혈장 lysozyme 활성이 높으나, 유의적인 차이는 얻지 못하였다(<Table 2>). 틸라피아를 대상으로 하여 고삼 추출물을 농도별로 먹였을시에 일주일부터 한달까지 유의적인 활성증가가 나타나는 것으로 보고되나(Wu et al. 2013), 넙치에서는 혈장 lysozyme 활성의 유의적인 증가는 나타나지 않았다. 조직 lysozyme 활성을 측정하기 위하여 각 기간별, 농도별로 넙치의 간, 비장 및 신장 조직을 채취하여 활성을 측정하였다. 0.05%의 고삼 추출물을 흡습시킨 넙치의 4주 및 8주차의 비장 및 신장 조직의 lysozyme 활성은 통계적으로 유의하게 증가하였다(<Table 2>). 그러나, 장기간(12주) 및 고농도로 고삼 추출물을 먹인 넙치의 조직 lysozyme 활성은 차이가 없었다(<Table 2>). 그러므로, 8주 가량 고삼 추출물을 넙치에 먹일 경우 라이소자임 활성의 증가를 통한 넙치의 비특이적 면역 반응을 증가시켰다는 것을 의미한다.

다양한 농도의 고삼 추출물을 흡습시킨 사료를 투여한 넙치의 식세포 활성을 조사하였다. 0.05% 고삼 추출물을 흡습시킨 넙치 농도 그룹의 4주 및 8주차 그룹에서만 식세포활성이 유의적으로 증가함을 알 수 있었다(Fig. 1)]. 비특이적 면역 활성화에 대한 세포내 면역기작과 관련하여 Robertsen et al.(1994)는 lysozyme 활성도가 식세포 활성 및 두신 백혈구 활성산소 생성과 상응하여 일어난다고 하였다. 따라서, 고삼 추출물을 먹인 넙치 면

역 조직의 lysozyme 활성 및 식세포 활성은 상호 연관관계가 있으며, 이는 백혈구의 활성 산소 및 nitrogen 생성에 의한 비특이적 면역 반응등과 상응하는 것으로 보아진다(Wu et al., 2013).

<Table 2> Lysozyme activity(mean±SD unit/ml) in different tissues of olive flounder for herbs feeding period

| Tissue | Duration (Weeks) | Control (unit/ml) | Diet%(unit/ml) | | |
|-------------|------------------|-------------------|----------------|----------|----------|
| | | | 0.05% | 0.1% | 1% |
| Plasma | 0 | 71±17 | - | - | - |
| | 4 th | 77±12 | 73±11 | 80±13 | 85±8 |
| | 8 th | 78±12 | 96±12 | 85±12 | 99±10 |
| | 12 th | 64±15 | 71±11 | 57±15 | 62±16 |
| Liver | 0 | 7.0±5.1 | - | - | - |
| | 4 th | 7.0±2.2 | 6.4±2.1 | 6.2±5.1 | 8.6±4.3 |
| | 8 th | 5.4±1.6 | 5.9±2.5 | 7.4±4.5 | 6.9±3.8 |
| | 12 th | 8.5±4.5 | 9.4±2.9 | 7.7±5.9 | 4.4±8.9 |
| Spleen | 0 | 7.0±4.6 | - | - | - |
| | 4 th | 6.8±1.5 | 15.9±1.5* | 7.8±4.5 | 8.6±8.6 |
| | 8 th | 6.7±1.8 | 14.9±8.9* | 6.4±4.8 | 8.8±4.9 |
| | 12 th | 12.5±5.9 | 12.6±1.9 | 12.5±8.9 | 17.7±8.3 |
| Body kidney | 0 | 5.5±2.2 | - | - | - |
| | 4 th | 4.1±1.7 | 10.7±3.4* | 6.6±2.7 | 7.4±3.3 |
| | 8 th | 4.3±1.8 | 16.4±2.5* | 8.3±5.9 | 6.3±4.3 |
| | 12 th | 13.2±2.2 | 13.8±2.2 | 13.2±2.1 | 14.6±2.9 |

[Fig. 1] Phagocytic activity in leucocytes of olive flounder after treating the different doses of lightyellow sophora extracts. Values are mean±SEM, n=5 fish per group.

* Significant difference (P<0.05)

3. 조직학적 특성

고삼 추출물을 흡습시킨 사료를 넙치에 투여 후 4주, 8주 및 12주차에 간, 비장 및 신장조직의 병리조직학적 특성을 조사하였다. 실험 기간 동안 어류의 간, 비장 및 신장 조직에 대한 병리조직학적 병변소견은 관찰되지 않았다(dat not shown). 본 결과는 국내 생약성분의 인체 안전성을 확보하기 위하여 식품의약품안전처에서 운영되고 있는 생약종합정보시스템(<http://www.mfds.go.kr/hermed/index.do>)의 고삼 뿌리추출물의 식품 안전성과 일치하며, 식용 어류의 건강도에도 고삼 추출물이 매우 안전하다는 사실을 알 수 있다.

4. 인위 어체 감염에 따른 항 병원성

다양한 고삼 추출물의 농도를 흡습시킨 양식 사료를 먹인 넙치의 어병 세균인 *E. tarda* 및 *S. iniae*에 대한 항병력을 측정하기 위해 각각 4주, 8주 및 12주차에 세균공격실험을 하였다. 모든 기간 동안 연쇄구균 인위공격에 대하여서는 유의적인 효과를 얻지는 못하였으며(data not shown), 8주 및 12주에 질병 예방효과가 다소 있으나 상대생존율의 값인 50% 선을 넘지는 못하므로 의미가 없었다(<Table 3>). 그러나, 고삼 추출물 0.05%로 흡습시킨 넙치 그룹의 4주 및 8주차의 인위적인 에드워드균의 공격에 따른 넙치 누적폐사율은 매우 낮게 나타났다([Fig. 2]). 더불어, 시기별로 대조구와의 상대생존율을 조사하였을 때 66~78%이상의 높은 상대생존율을 나타내었다. 연쇄구균에 대한 넙치의 상대생존율이 높게 나타나지 않은 경우는 아마도 세균의 생리적 차이 및 단일 농도로서의 인위공격의 문제로 이런 결과가 나타나는 것으로 판단된다. 생약 추출물의 병원체 인위 공격에 따른 상대생존율을 조사한 논문은 많이 보고되고 있다. 자운영 및 인동 추출물을 먹인 틸라피아(*O. niloticus*)에서 에로모나스균의 인위 공격실험에 대하여 45% 상대생존율을

나타내며(Ardo et al., 2008), 국화과인 인도초(*Eclipta alba*)의 추출물을 먹였을시에는 에로모나스균에 대하여 57% 상대생존율로 각각 나타났다(Christybapita et al., 2007). 고삼 추출물을 먹인 경우의 틸라피아에 대한 연쇄구균 인위공격실험에 대하여 73% 상대생존율로 나타났다(Wu et al., 2013). 금붕어(*Carassius auratus*)를 대상으로 하여 인도 녹차인 님 잎과 바질 추출물을 먹인 후 에로모나스균의 인위공격실험에 대하여 75% 상대생존율로 나타났다(Harikrishnan et al., 2009; 2010). 넙치를 대상으로 하여 마늘(*Allium sativum*) 추출물을 먹인 후 에드워드균의 인위 공격실험에 대한 상대생존율은 10%~55%(Cho et al., 2010; Lee et al., 2010; Woo et al., 2010)로 다양하게 나타나며, 유자(*Citrus junos*)추출물의 경우는 에드워드균에 대하여 30% 상대생존율(Lee et al., 2010)로 나타났다. 병원체에 대한 상대생존율의 다양한 차이는 아마도 대상어종, 생약 추출 방법, 병원체의 종류 및 병원체 투여 농도등의 차이에 따른 것으로 추정된다.

<Table 3> Relative percent survival (RPS)¹ of experimentally bacteria infected flounders treated lightyellow sophora extracts during the experimental period

| Strain | 4 weeks | | | 8 weeks | | | 12 weeks | | | |
|-------------|-----------------------------|-----|----|---------|-----|----|----------|-----|----|----|
| | 0.05 | 0.1 | 1 | 0.05 | 0.1 | 1 | 0.05 | 0.1 | 1 | |
| R P S | <i>E.tarda</i> ² | 78 | 21 | 0 | 66 | 21 | 0 | 10 | 10 | 0 |
| | <i>S.iniae</i> ³ | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 | 21 | 0 | 10 | 10 |

¹ 1-(mortality of test group (%) / mortality of control group (%))× 100

² *E. tarda* (0.99×10⁶~2.8×10⁶CFU/fish,0.1ml/fish)

³ *S. iniae* (1.15×10⁶~12.7×10⁶CFU/fish,0.1ml/fish)

따라서, 고삼 뿌리를 상기방법에 따라 추출한 시료원액을 시판용 넙치 배합사료에 0.05% 농도로 첨가하여 투여할 경우, 시판용 배합사료만 섭취한 대조구보다 비특이적 면역활성 증가로 병원

체에 대한 항병력이 증강되는 것으로 판단되었다.

면역 및 질병저항성에 대한 효과를 조사하였다. 고삼 추출물의 첨가는 어류 성장에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 혈액화학적 조사 결과에서도 고삼 첨가로 인한 넙치의 생리에는 아무런 영향을 나타내지 않았다. 라이소자임 활성은 0.05%의 고삼 추출물 농도로 흡습시킨 사료 그룹에서 라이소자임 활성이 증가됨을 알 수 있었다. 백혈구의 식세포 활성은 0.05%의 고삼 추출물로 흡습시킨 사료 그룹에서 유의적으로 증가되었다. 병리학적 결과를 통하여 고삼 추출물을 농도별로 넙치에 투여하였을 때 병리조직학적 영향이 없음을 알 수 있었다. 에드워드균의 인위감염에 의한 질병저항성은 0.05%의 고삼 추출물로 흡습시킨 사료 그룹에서만 상대생존율이 높게 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 고삼뿌리 열수 추출물은 넙치에 대한 비특이적 면역력 증강 및 질병 저항성 증강에 효과가 있는 것으로 사료되었다.

[Fig. 2] Cumulative mortality rate (%) of treating the different doses of lightyellow sophora extracts during the experimental period (4th week(A) and 8th week(B)).

IV. 요약

고삼 뿌리 열수 추출물을 농도별로 넙치 사료에 흡습시켜 12주 동안 어류에 급여 후 비특이적

References

- Ardo, L. · Yin, G. · Xu, P. · Varadi, L. · Szigeti, G. · Jeny, Z. & Jeny, G.(2008). Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 275, 26~33.
- Cho, S. H. · Lee, S. M. & Kwon, M. G.(2010). Effect of various concentrations of garlic powder and garlic extract in the diets on growth, serum chemistry and immune response of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Pathology* 23, 409~420.
- Choi, H. S. · Kim, Y. C · Lee, J. S · Jo, M. R. · Seo, C. H. & Park, S. I.(2004). Antibacterial activities of hot-water and ethyl alcohol extracts of medicinal herbs on fish pathogenic bacteria, *Journal of Fish Pathology* 17, 39~55.
- Choi, H. S. · Kim, J. S. · Yu, Y. B. · Kim, Y. C. · Lee, J. S.(2005). Antibacterial activities of *Galla*

- Rhois* extracts against fish pathogenic bacteria, *Journal of Fish Pathology* 18, 239~245.
- Christyapita, D. · Divyagnaneswari, M. & Michael, R. D.(2007). Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 840~852.
- Galina, J. · Yin, G. · Ardo, L. & Jeney, Z.(2009). The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 669~676.
- Haouzi, D. · Lekehal, M. · Moreau, A. · Moulis, C. · Feldmann, G. · Robin, M. A. · Letteron, P. · Fau, D. & Pessayre, D.(2000). Cytochrome P 450-gene-rated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation, and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 32, 303~311, 2000.
- Harikrishnan, R. · Balasundaram, C. · Kim, M. C. · Kim, J. S. · Han, Y. J. & Heo, M. S.(2009). Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. *Fish & Shellfish Immunology* 27, 508~515, 2009.
- Harikrishnan, R. · Balasundaram, C. and Heo, M. S.(2010). Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 354~361.
- He, X. · Fang, J. · Huang, L. · Wang, J. & Huang, X.(2015). *Sophora flavescens* Ait: Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of an important traditional chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 172, 10~29.
- Jee, B. Y. · Seo, J. S. · Jeon, E. J. · Lee, E. H. · Choi, H. J. · Kim, J. D. · Jung, S. H. & Park, M. A.(2012). Effects of various concentrations of Skullcap extracts in the diets on disease resistance of olive flounder *Paralichthy olivaceus*, *Journal of Fish Pathology* 25, 21~30.
- Jung, S. H. · Sohn, Y. C. & Kim, Y. C.(2001). In vitro effect of water extract of medicinal herbs on antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and superoxide production of kidney phagocytes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Journal of Fish Pathology* 14, 3~10.
- Kang So Young(2005). The antimicrobial compound of *Rhus verniciflua* barks against fish pathogenic Gram-negative bacteria, *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*, *Journal of Fish Pathology* 18, 227~238.
- Kim, Y. G. · Rho, B. J. & Lee, K. K.(1994). Antimicrobial activity *Artemisia princeps* var. *orientalis* essential oil against fish pathogenic bacteria, *Journal of Fish Pathology* 7, 113~117.
- Lee, J. H. · Woo, S. H. · Eom, Y. H. · Hwang, B. O. · Kwon, M. G. · Bang, J. D. & Park, S. I.(2010). Effects of garlic *Allium sativum* on the immune responses of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Pathology* 23, 69~83.
- Lee, N. S. · Jeong, S. H. & Jee, B. Y.(2010). Anti-fish Pathogenic Efficacy of hot water extracts obtained from 5 Herbs in-vitro, and efficacy and toxicity in flounder of the one selected herb, Skullcap, *Journal of Fish Pathology* 23, 137~143.
- Liu, Y. · Bi, T. · Dai, W. · Wang, G. · Qian, L. · Gao, Q. & Shen, G.(2015). Effects of oxymatrine on the proliferation and apoptosis of human hepatoma carcinoma cells. *Technology in Cancer Research & Treatment* e1533034615587616.
- Parry, R. M. · Chandau, R. C. & Shahani, R. M.(1965). A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proceedings of Society for Experimental Biology Medicine* 119, 384~386.
- Robertsen, B. · Engstad, R. E. & Jørgensen, J. B.(1994). β -glucans as immunostimulants. In: Stolen, S.J. and Fletcher, T.C. (eds) *Modulators of Fish Immune Response* (vol 1), p83~99 SOS publication, Fair Haven, U.K.
- Taira, Z. · Yabe, K. · Hamaguchi, Y. · Hirayama, K. · Kishimoto, M. · Ishida, S. & Ueda, Y.(2004). Effects of Sho-saiko-to extract and its components, Baicalin, baicalein, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, on pharmacokinetic behavior of salicylamide in carbon tetrachloride intoxicated rats. *Food Chemistry Toxicology* 42, 803~807.
- Woo, S. H. · Lee, J. H. · Lim, Y. K. · Cho, M. Y. · Jung, S. H. · Kim, J. W. & Park, S. I.(2010). Effects of Galic *Allium sativum* extract immersion on the immune response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* prechallenged with pathogenic bacteria, *Journal of Fish Pathology* 23,

- 199~209.
- Wu, Y. R. · Gong, Q. F. · Fang, H. · Liang, W. W. · Chen, M. & He, R. J.(2013). Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. Fish & Shellfish Immunology 34, 220~227.
- Yin, G. · Ardo, L. · Thompson, K. D. · Adams, A. · Jeney, Z. & Jeney, G.(2009). Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology 26, 140~145.
- Zhang, G. · Gong, S. · Yu, D. & Yuan, H.(2009). Propolis and herba epimedii extracts enhance the non-specific immune response and disease resistance of chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. Fish & Shellfish Immunology 26, 467~472.
-
- Received : 23 September 2015
 - Revised : 12 October, 2015
 - Accepted : 16 October, 2015