

## Effects of the Acute Exposure Oxytetracycline on the Behavior and Endocrine Response in Adult Zebrafish

Eun Seong Ko and Seungheon Lee\*

Department of Marine Life Sciences, School of Marine Biomedical Sciences, College of Ocean Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Received November 18, 2014 / Revised January 13, 2015 / Accepted January 26, 2015

Zebrafish (*Danio rerio*) has been more widely used to study pharmacology. Oxytetracycline (OTC) is a broad-spectrum antibiotic and works by interfering with the ability to produce essential proteins of bacteria. The aim of this study was to identify the effects of exposure to OTC on behavioral changes or endocrine response in zebrafish. The behavioral effects of exposure to OTC (50, 100 or 200 mg/l) were characterized in several novelty-based paradigms such as the novel tank or open field test in zebrafish. Moreover, to investigate effects of exposure to OTC on endocrine response, we measured whole-body cortisol level using cortisol ELISA kit. As results of novel tank test, duration in top and immobile duration were significantly increased by the exposure to OTC in a concentration-dependent manner ( $p < 0.05$ ). In addition, moving distance, highly mobile, velocity and zone transition were significantly decreased by the exposure to OTC in a concentration-dependent manner ( $p < 0.05$ ). As results of open field test, the exposure to OTC increased immobile duration significantly ( $p < 0.05$ ). However, moving distance, mobile duration and velocity were significantly decreased by the exposure to OTC in a concentration-dependent manner ( $p < 0.05$ ). Besides, the exposure to OTC elevated whole-body cortisol levels in zebrafish. These results suggest that the exposure to OTC may induce chemical stress in zebrafish.

**Key words** : Behavioral test, chemical stress, cortisol, oxytetracycline, zebrafish

### 서론

Oxytetracycline (OTC)는 tetracycline계 항생제로서 항균 스펙트럼이 넓어서 다양한 세균에 사용되며, 특히 그람 양성균, 랩토스피라, 리켓치아, 클라미디아, 마이코플라즈마 및 원충 등에 의한 감염증을 치료에 사용되는 항생제이고[2], 세균의 30S ribosome에 작용하여 단백질 합성을 억제하여 정균 작용을 나타낸다. OTC의 투여량은 일반적으로 75 mg/kg/day이며, 종에 따라 2~10일 동안 투여할 수 있다[16]. OTC의 대표적인 부작용은 위장 장애, 광각 알레르기 반응과 치아와 뼈를 손상시킬 수 있으며[8], 어류에서는 면역 억제, 신장 독성, 성장저하, 내성 균주 발생 등과 같은 부작용이 보고된 바 있다[4]. 또한 OTC는 특히 한국과 영국에서 많은 양을 사용하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 남용으로 인하여 내성균주의 출현이나 오염과 같은 환경 문제를 야기하는 것으로 밝혀졌다[2].

제브라피쉬(*Danio rerio*)는 유전학, 생물학 등에서 널리 사용되고 있는 실험 동물 중 하나로, 최근 많은 행동약리학 연구에서도 다양하게 사용되고 있다. 이는 제브라피쉬가 포유류와 유사한 생리학적 반응을 가지고 있기 때문이며, 포유류의 cortisol 분비과정의 경우 시상하부-뇌하수체-부신 축의 순이며, 제브라피쉬는 시상하부-뇌하수체-간신샘 축의 신호에 따라 cortisol을 분비한다[12, 15]. 즉, 제브라피쉬의 내분비계는 말초 신경계에서 보낸 신호가 시상하부를 자극하고, 이렇게 받은 신호는 corticotropin-releasing hormone (CRH)의 분비를 유도하게 된다. CRH의 작용에 의해 뇌하수체에서 혈류로 adrenocorticotrophic hormone (ACTH)를 분비하고, 분비된 ACTH는 제브라피쉬의 간신샘에 도달하여 cortisol을 분비시킨다. 분비된 Cortisol은 생리적으로 간의 gluconeogenesis의 수용력을 증가시키고, 말초 저장부에서 gluconeogenesis의 선도체 역할을 하는 것으로 포유류 연구를 통하여 밝혀졌다[7]. Cortisol의 증가는 어체의 지방분해를 활성화 하며, 간에서 글리세롤 kinase와 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase의 활성을 증가시킨다[1]. 그리고 급성 스트레스는 초기에는 선천면역을 활성화시키고, 백혈구 운동성 증가 및 Th1 세포의 반응성 증가를 유도하는 것으로 밝혀졌다[5, 17]. 그러나 만성 스트레스에 노출되면 선천 면역을 억제하고 백혈구의 분포 및 분화를 억제하고 Th2의 반응성 증가를 유도하여 장기적인 면역 억제를 일으키는 것으로 알려져 있다[6, 18].

#### \*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3476, Fax : +82-64-756-3493

E-mail : slee76@jeju.ac.kr

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.

제브라피쉬를 이용하여 OTC에 대한 노출이 어체의 스트레스 반응이 미치는 영향에 대해서는 아직 보고 된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 OTC에 노출을 시켰을 때 나타나는 행동약리학적 변화와 cortisol 농도를 측정하여 수산양식에 사용되고 있는 대표적인 항생제인 OTC가 화학적 스트레스 요인으로써 미치는 영향에 대한 기초 자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 연구에서 사용된 OTC HCl는 Sigma-aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 하였으며, whole-body cortisol 정량을 위하여 cortisol assay kit (R&D system, USA)를 사용하였다. 그 외의 시약은 시중에 유통되는 최고 등급의 것을 구입하여 사용하였다.

### 실험동물

본 연구에 사용된 제브라피쉬는 총 116마리의 'wild-type'의 성체 제브라피쉬를 사용하였으며, 제주시에 위치한 관상어매장(월드피쉬, Korea)에서 분양을 받았다. 실험 어체를 2주 동안 실험실 환경에 적응시켰다. 실험 어체는 60 l 탱크에 30-40마리, 여과 시스템을 통하여 사육되었다. Zebrafish care standard에 따라 사육수의 온도는 26-28°C로 하였고, 명암주기는 16-8시간 주기(on:09:00-off:18:00)로 하였다[20]. 제브라피쉬는 사료로 TetraMin (Tetra, Germany)를 하루에 두 번 투여하였으며 1달간 실험실 환경에 적응한 후 사용되었다.

### 약물 투여

실험에 사용된 OTC의 농도와 시간은 pilot study를 통하여 결정되었다. Novel tank test 및 open field test, whole-body cortisol 측정 실험 진행할 때, 500 ml의 증류수에 50-200 mg/l의 농도로 각각 제조한 뒤 6분간 약용시켰다.

### Novel tank test

OTC 노출이 불안행동에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Robinson 등의 실험방법에 따라 novel tank test (NTT)를 실시하였다[10]. 행동실험은 10시부터 17시 사이에, 실험 환경의 온도를 일정하게 유지한 뒤에 진행되었다. 실험에 사용된 제브라피쉬는 총 48마리(group당 n=12)로, OTC가 녹아 있는 1 l 비커에 6분간 약용시켰다. Tank (15 cm height × 28 cm top × 23 cm bottom × 7 cm width)는 1.5 l의 사다리꼴 모양의 tank를 top half과 bottom half으로 나누어 물을 가득 채운 뒤 사용 하였다. Tank 정면에 camera를 설치하여 6분간 관찰을 하였으며, Ethovision XT 8.5 (Noldus, Wageningen, The Netherlands) 프로그램을 사용하여 분석하였다.

### Open field test

OTC 노출이 행동 변화 및 자발 운동량에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Cachat 등의 방법을 이용하여 open field test(OFT)를 실시하였다[3]. 원통형 모양의 백색 plastic cylinder (24 cm Height × 21 cm diameter)에 12 cm의 물을 채워 진행하였으며, 원통형 상단에 camera를 설치하여 Ethovision XT 8.5(Noldus, Wageningen, The Netherlands)을 이용하여 6분간 행동변화를 측정하였다.

### Whole-body cortisol 측정

Whole-body cortisol 측정은 Grossman 등의 실험방법에 따라 진행하였다[9]. 제브라피쉬를 6분간 50-200 mg/l 농도의 OTC 용액에 약용 시킨 후 150 mg/l 농도의 tricaine (Sigma-Aldrich, Mo)로 안락사시켰다. 안락사 후 제브라피쉬는 물기를 제거한 뒤 액체 질소에 급속 냉동 시키고 준비해 놓은 cryo tube에 2 ml 1× Phosphate buffer saline (PBS)넣고 물고기를 분쇄하였다. 분쇄한 혼합물에 5 ml diethyl ether (Sigma-Aldrich, MO)를 넣은 후 1분간 vortexing을 하였다. 이후 3,000g에 10분 동안 원심 분리(Hanil, Korea) 후 액체 질소에 30초간 급속냉동 시킨 뒤 상층액을 test tube에 옮겨 담았다. 이 후 진공 원심 농축기(CVE-2000, Eyela, Japan)를 이용하여 ether을 증발시켰다. Ether를 증발시킨 test tube에 1 ml 1× PBS을 넣고 1.7 ml tube에 옮긴 후 cortisol 측정 시까지 -20°C에서 보관하였다. Cortisol 농도는 cortisol assay kit (R&D system, USA)를 이용하여 측정하였다. ELISA plate를 분석하기 위해서 versa max microplate reader (molecular devices, USA)기를 사용하였고, 이렇게 얻은 흡광도 값은 4-parameter sigmoid minus curve를 기초하여 cortisol 농도값으로 환산되었다. Whole-body cortisol level은 각 어체 무게에 대한 농도의 비로 표현되었다.

### 통계처리

본 연구에서 데이터를 mean ± S.E.M.으로 표현하였으며, 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 한 후  $p < 0.05$  수준에서 student-Newman-Keuls test를 이용하여 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### OTC가 novel tank test에 미치는 영향

NTT는 제브라피쉬의 불안 또는 스트레스를 측정하는 실험 방법으로 zebrafish의 tank의 상층부에 머무는 시간, 총 이동거리, 유영속도 등을 통하여 불안 정도를 확인하는 실험 방법이다. OTC를 50, 100 그리고 200 mg/l의 농도로 6분 동안 약용 후 NTT를 실시한 결과, control 그룹의 총 이동거리는 2124.5±191.6 cm였으며, OTC를 투여한 그룹에서는 50 mg/l

농도에서  $1543.5 \pm 82.5$  cm, 100 mg/l 농도에서  $1168.5 \pm 136.1$  cm, 200 mg/l 농도에서  $1098.9 \pm 109.9$  cm로 control 그룹과 비교하여 통계적으로 유의성이 있는 농도의존적 감소가 확인되었다( $p < 0.05$ , Fig. 1A). 부동 시간 측정 결과, control 그룹에서  $203.1 \pm 13.5$ 초로 나왔으며, 약물을 처리하였을 때 50 mg/l 농도에서는  $279.6 \pm 9.0$ 초, 100 mg/l 농도에서는  $306.5 \pm 7.6$ 초 그리고 200 mg/l 농도에서는  $327.9 \pm 5.9$ 초의 결과값으로 농도의존적으로 통계적인 유의성 있는 증가 현상이 확인되었다( $p < 0.05$ , Fig. 1D). 과행동 운동시간의 경우 control 은  $5.6 \pm 1.1$  초 결과값이 관찰되었고 약물을 처리한 그룹에서 50 mg/l 농도에서는  $3.0 \pm 0.4$  초, 100 mg/l 농도에서는  $1.7 \pm 0.4$ 초, 200 mg/l 농도에서는  $1.9 \pm 0.4$  초의 값을 얻었다. 이는 control 그룹과 비교하였을 때 통계적 유의성이 있는 감소 현상이 확인되었다( $p < 0.05$ , Fig. 1E). 평균속도는 control 값이  $6.4 \pm 0.3$  cm/s 였으며 50 mg/l, 100 mg/l 그리고 200 mg/l를 처리하였을 때  $4.1 \pm 0.2$  cm/s,  $3.4 \pm 0.3$  cm/s 그리고  $2.9 \pm 0.3$  cm/s로 농도의존적으로 유의성 있는 감소 현상이 확인되었다( $p < 0.05$ , Fig. 1F). 또한 상하 변위 결과, control의 경우  $13.5 \pm 2.7$ 회로 확인이 되었다. 50 mg/l 농도에서는  $14.1 \pm 2.0$ 회, 100 mg/l 농도에서는  $9.1 \pm 1.8$  회 200 mg/l 농도에서는  $5.6 \pm 1.4$ 회로 확인되었다. Control과 비교하였을 때 200 mg/l에서 통계적으로 유의성이 있는 감소 현상이 관찰 되었다( $p < 0.05$ , Fig. 1G). 제브라피쉬는 NTT에서 불안이나 스트레스 상태에서 최초로 상층부에 들어간 시간이 지연되거나 상층부의 머무는 시간이 감소하게 되는데[21], 본 연구에서 최초로 상층부에 들어간 시간과 상층부의 머무는 시간의 경우, 농도 의존적으로 증가하는 경향이 관찰되었으나, 통계적인 유의성은 확인되지 않았다(Fig. 1B 및 1C).

#### OTC가 open field test에 미치는 영향

OFT에서는 제브라피쉬의 유영 pattern과 유영 속도를 통하여 실험 모델이 불안 정도를 측정하는 실험 방법이며, 이는 설치류의 실험 방법과 동일한 원리로 데이터를 분석할 있다. OFT에서의 총 이동 거리는 control 그룹에서  $3,050.2 \pm 466.2$  cm 였고, 100 mg/l 농도의 OTC처리그룹에서  $1,510 \pm 251.6$  cm, 200 mg/l 농도의 OTC 처리그룹에서는  $1,362.4 \pm 137.6$  cm로 control 그룹과 비교하여 통계적으로 유의성이 있는 감소현상이 확인되었다( $p < 0.05$ , Fig. 2A.). 그러나 가운데 구간과 바깥구간에서 머무는 시간은 통계적인 유의성이 확인되지 않았다. 부동 시간에서는 control group의 결과 값은  $167.9 \pm 36.5$ 초로 확인되었다. 200 mg/l 농도에서는  $270.1 \pm 15.4$ 초로 통계적으로 유의성 있는 증가 현상이 확인되었다( $p < 0.05$ , Fig. 2D). 동적 시간에서는 control 그룹에서는  $197.3 \pm 32.6$ 초로 확인되었다. OTC약물 투여 그룹에서는 50 mg/l 농도에서는  $156.5 \pm 17.5$ 초, 100 mg/l  $112.4 \pm 22.3$ 초 그리고 200 mg/l  $87.5 \pm 15.1$ 초로 100 mg/l와 200 mg/l에서 통계적으로 유의성 있는 감소현상이 확인되었다( $p < 0.05$ , Fig. 2E). 평균속도에서는 control 그룹에

서는  $8.5 \pm 1.2$  cm/s과 비교하였을 때 50 mg/l 농도에서는  $5.6 \pm 0.7$  cm/s, 100 mg/l 농도에서는  $4.1 \pm 0.6$  cm/s 그리고 200 mg/l 농도에서는  $3.7 \pm 0.3$  cm/s로 농도 의존적으로 통계적으로 유의성 있는 감소 현상이 확인되었다( $p < 0.05$ , Fig. 2F). 그러나 나선 유영과 회전각에서는 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 2G 및 2H).

#### OTC가 whole-body cortisol level에 미치는 영향

Whole-body cortisol test 결과 control- $152.6 \pm 70.8$  ng/g, 50 mg/l- $178.6 \pm 42.5$  ng/g, 100 mg/l- $230.6 \pm 100$  ng/g, 200 mg/l- $526.4 \pm 105.2$  ng/g 수치가 확인이 되었다. Control group과 OTC 투여 그룹을 비교하였을 때, 200 mg/l 농도에서는  $526.4 \pm 105.2$  ng/g로 통계적으로 유의성 있는 증가 현상이 확인되었다( $p < 0.05$ , Fig. 3).

## 고 찰

어류에게 스트레스는 행동변화 및 생존과 밀접한 연관성이 있다. 적당한 수준의 스트레스는 어류의 생존을 위해서 반드시 필요하지만, 장기간의 스트레스 노출은 어체에 부정적인 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다. 그 변화 중 하나는 면역계에서의 변화이며 급성 스트레스의 경우 선천면역을 활성화시키고, 백혈구 운동성 증가 및  $Th_1$  세포의 반응성 증가를 유도하지만[5, 17], 만성 스트레스에 노출될 경우 오히려 선천면역을 억제하고 백혈구의 분포 및 분화를 억제하고  $Th_2$ 의 반응성 증가를 유도하여 면역계 전반에 억제 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다[6, 19]. 또한 lysergic acid diethylamide 또는 microcystins과 같은 화학물질에 노출될 경우, 이들 물질이 화학적 스트레스 요인으로 작용하여 이동거리 감소 또는 유영속도 감소, 부동 시간의 증가 등과 같은 행동 변화 연구결과가 관찰 되었고 cortisol 수치가 증가하는 현상이 확인 되었다[9, 11].

본 연구에서는 OTC를 제브라피쉬에게 노출시켰을 때 나타나는 스트레스 반응을 NTT 및 OFT, whole-body cortisol 농도를 통하여 관찰하였다. NTT와 OFT는 스트레스와 불안 정도를 측정하기 위해 많이 사용되는 행동 실험의 하나이다[10, 13, 14].

NTT를 실시한 결과, 총 이동거리 및 과행동 지속시간, 평균속도, 상하 변위에서 통계적으로 유의성 있는 감소 현상이 관찰되었고, 부동시간에서 통계적으로 유의성 있는 증가 현상이 나타났다(Fig. 1). 이러한 현상은 Luiza 등은 제브라피쉬를 100  $\mu$ g/l 농도의 microcystins에 노출 시켰을 때, NTT에서 총 이동거리가 감소하고, 부동시간이 증가하는데, 이는 microcystins가 제브라피쉬에게 화학적 스트레스 요인으로 작용하여 제브라피쉬의 행동에 영향을 미친다고 보고한 바 있다[11]. 제브라피쉬의 불안 행동 중 하나인 부동 시간은 OTC에 6분간 노출시

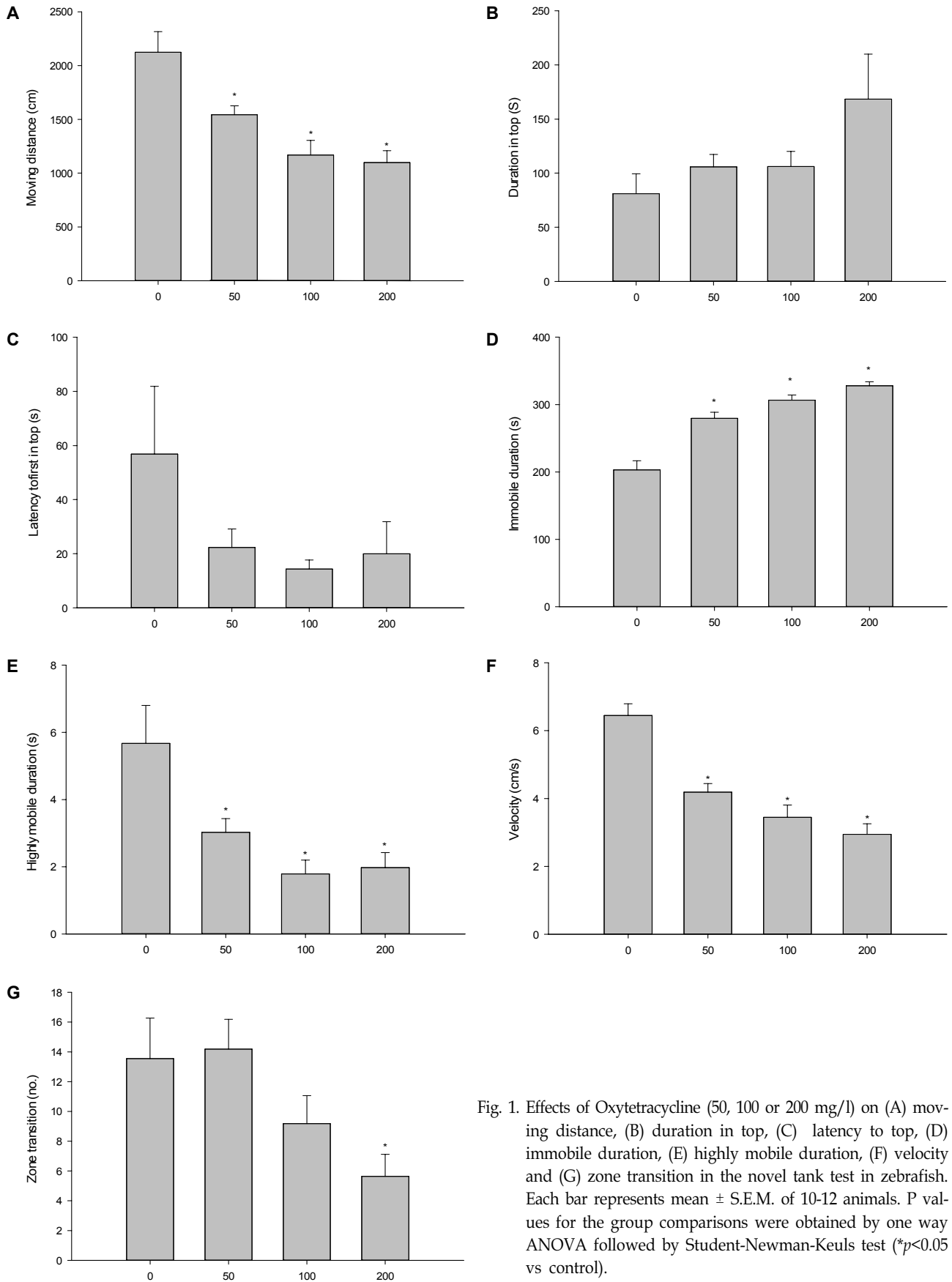


Fig. 1. Effects of Oxytetracycline (50, 100 or 200 mg/l) on (A) moving distance, (B) duration in top, (C) latency to top, (D) immobile duration, (E) highly mobile duration, (F) velocity and (G) zone transition in the novel tank test in zebrafish. Each bar represents mean  $\pm$  S.E.M. of 10-12 animals. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (\* $p$ <0.05 vs control).

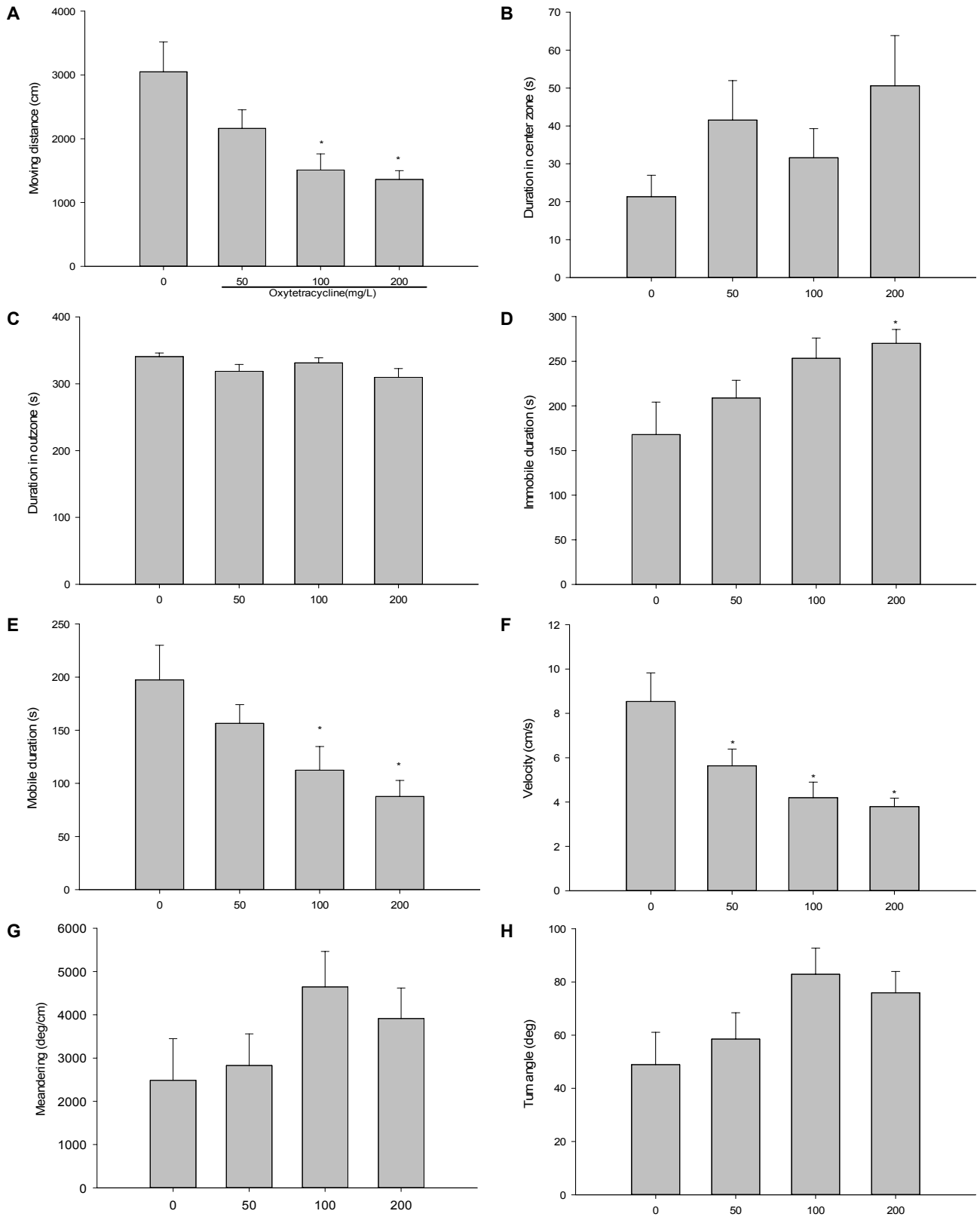


Fig. 2. Effects of Oxytetracycline (50, 100 or 200 mg/l) on (A) moving distance, (B) duration in center zone, (C) duration in out zone, (D) immobile duration, (E) mobile duration, (F) velocity, (G) turn angle on the open field test in zebrafish. Each bar represents mean ± S.E.M. of 10-12 animals. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (\* $p < 0.05$  vs control).

켰을 때, 100 및 200 mg/l의 농도에서 통계적으로 유의성 있는 증가하는 현상이 관찰되었다. 이러한 결과는 microcystins를 처리 하였을 때 부동시간이 증가 하는 것과 유사 현상이며 사료되며 OTC 또한 화학적 스트레스로 작용을 하여 불안과 유사한 행동을 유발한 것으로 사료된다. 제브라피쉬를 OTC에 6분 간 노출 하였을 때 평균속도에서는 농도 의존적으로 감소 현상이 확인되었고 이는 OTC가 화학적 스트레스로 작용을 한 것으로 추정된다. 본 연구에서도 OTC를 농도 별로 노출시켰을 때 이전 연구와 유사하게 제브라피쉬의 총 이동거리가 농도 의존적으로 감소하는 현상이 관찰되었고 과행동 시간과 평균속도 그리고 상하 변위에서 통계적으로 유의성 있는 감소 현상이 확인되었다. 위의 결과로 비추어 볼 때 OTC가 제브라피쉬에게 화학적 스트레스로 작용하였고 이로 인해 불안과 유사한 행동을 유발하는 것으로 사료된다.

OFT 결과 총 이동거리와 움직이는 시간 그리고 유영속도에서 통계적으로 유의성 있는 감소 현상이 확인 되었고(Fig. 2A, 2E, 2F) 움직이지 않는 시간에서 통계적으로 유의성 있는 증가 현상이 관찰되었다(Fig. 2D). OFT에서는 총 이동거리 결과와 유영속도는 이전 lysergic acid diethylamide를 250 µg/l 농도로 20분간 투여 하였을 때 총 이동거리와 움직이는 시간 그리고 유영속도가 감소하는 경향이 확인되었고, 본 실험에서는 총 이동거리는 100과 200 mg/l의 농도에서 통계적으로 유의성 있는 감소 현상이 확인되었고 움직이는 시간은 100과 200 mg/l의 농도에서 통계적으로 유의성 있는 감소현상이 관찰되었고 유영속도는 농도의존적으로 통계적으로 유의성 있는 감소 현상이 확인되었다[9]. 위의 실험결과로 비추어 볼 때 OTC는 제브라피쉬에게 화학적 스트레스로 작용을 하여 이동거리 감소 및 유영속도, 움직이는 시간 등에 영향을 준 것으로 사료된다.

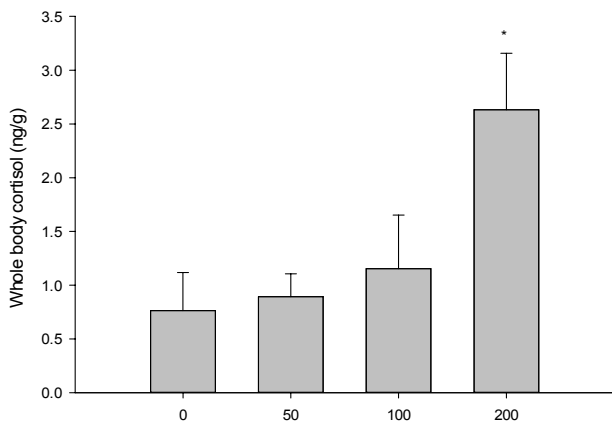


Fig. 3. Whole-body cortisol level after exposure to oxytetracycline (50, 100 or 200 mg/l) for 6 min in zebrafish. Each bar represents mean ± S.E.M. of 4 animals. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (\* $p < 0.05$  vs control).

스트레스를 받게 된 어류는 어체에서 1차적 반응과 2차적 반응이 나타난다. 1차 반응에서는 corticosteroid와 catecholamine hormones이 증가 하게 되고 2차 반응에서는 glucose나 lactate가 증가하고, 조직에서 glycogen이 감소하는 현상, 삼투압 장애, lysozyme의 활성화, 항체의 생성 등과 같은 면역기능의 변화 등 대사의 변화가 일어나게 된다[1]. 스트레스의 지표로 알려져 있는 whole-body cortisol을 측정한 결과, 200 mg/l의 농도에서 OTC를 약용하였을 때 cortisol 수치가 증가하는 현상으로 비추어 볼 때 zebrafish에게 화학적 스트레스로 작용한 것으로 사료된다.

항생제 사용은 병원성 질병으로부터 어류를 보호하고 상품의 가치를 증가시키며 경제적으로 손해를 줄일 수 있는 방법으로 수산 양식 환경에서 중요한 수단이다. 하지만 항생제의 과도한 사용은 어체에게 스트레스 인자로 작용할 수 있음을 본 연구를 통해 확인할 수 있었다. 본 연구는 양식 산업에서 어류의 복지와 항생제 사용으로 인한 어류의 스트레스 반응에 대해서 학문적으로 기여할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업업(NRF-2012R1A1A1010218).

### References

- Aluru, N. and Vijayan, M. M. 2009. Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. *Gen. Comp. Endocrinol.* **164**, 142-150.
- Ambili, T. R., Saravanan, M., Ramesh, M., Abhijith, D. B. and Poopal, R. K. 2013. Toxicological effects of the antibiotic oxytetracycline to an Indian major carp Labeo rohita. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **64**, 494-503.
- Cachat, J., Kyzar, E. J., Collins, C., Gaikwad, S., Green, J., Roth, A., El-Ounsi, M., Davis, A., Pham, M., Landsman, S., Stewart, A. M. and Kalueff, A. V. 2013. Unique and potent effects of acute ibogaine on zebrafish: the developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research. *Behav. Brain Res.* **236**, 258-269.
- Chern, C. J. and Beutler, E. 1976. Biochemical and electrophoretic studies of erythrocyte pyridoxine kinase in white and black Americans. *Am. J. Hum. Genet.* **28**, 9-17.
- Demers, N. E. and Bayne, C. J. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 363-373.
- Engelsma, M. Y., Huising, M. O., van Muiswinkel, W. B., Flik, G., Kwang, J., Savelkoul, H. F. and Verburg-van Kemenade, B. M. 2002. Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **87**, 467-479.
- Fujiwara, T., Cherrington, A. D., Neal, D. N. and

- McGuinness, O. P. 1996. Role of cortisol in the metabolic response to stress hormone infusion in the conscious dog. *Metabolism* **45**, 571-578.
8. Gozubuyuk, A., Ozpolat, B., Cicek, A. F., Caylak, H., Yucel, O., Kavakli, K., Gurkok, S. and Genc, O. 2010. Comparison of side effects of oxytetracycline and talc pleurodesis: an experimental study. *J. Cardiothorac. Surg.* **5**, 128.
9. Grossman, L., Utterback, E., Stewart, A., Gaikwad, S., Chung, K. M., Suci, C., Wong, K., Elegante, M., Elkhayat, S., Tan, J., Gilder, T., Wu, N., Dileo, J., Cachat, J. and Kalueff, A. V. 2010. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav. Brain Res.* **214**, 277-284.
10. Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., Craddock, C., Kyzar, E. J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman, C. P., Pittman, J., Rosemberg, D. B., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhaus, S. C., Weng, W., Bally-Cuif, L. and Schneider, H. 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish* **10**, 70-86.
11. Kist, L. W., Piato, A. L., da Rosa, J. G., Koakoski, G., Barcellos, L. J., Yunes, J. S., Bonan, C. D. and Bogo, M. R. 2011. Acute exposure to microcystin-producing cyanobacterium microcystis aeruginosa alters adult zebrafish (*Danio rerio*) swimming performance parameters. *J. Toxicol.* **2011**, 280304.
12. Korelitz, B. I. and Sommers, S. C. 1976. Responses to drug therapy in ulcerative colitis. Evaluation by rectal biopsy and mucosal cell counts. *Am. J. Dig. Dis.* **21**, 441-447.
13. Kyzar, E., Stewart, A. M., Landsman, S., Collins, C., Gebhardt, M., Robinson, K. and Kalueff, A. V. 2013. Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish. *Brain Res.* **1527**, 108-116.
14. Nguyen, M., Yang, E., Neelkantan, N., Mikhaylova, A., Arnold, R., Poudel, M. K., Stewart, A. M. and Kalueff, A. V. 2013. Developing 'integrative' zebrafish models of behavioral and metabolic disorders. *Behav. Brain Res.* **256**, 172-187.
15. Parry, W. H., Martorano, F. and Cotton, E. K. 1976. Management of life-threatening asthma with intravenous isoproterenol infusions. *Am. J. Dis. Child.* **130**, 39-42.
16. Petrenko, I. U., Titov, V. and Vladimirov Iu, A. 1995. Generation of active forms of oxygen by antibiotics of the tetracycline series during tetracycline catalysis of oxidation of ferrous iron. *Antibiot. Khimioter.* **40**, 3-8.
17. Sunyer, J. O. and Tort, L. 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **45**, 333-345.
18. Tort, L. 2011. Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 1366-1375.
19. Tort, L. Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 1366-1375.
20. Westerfield, M. 2007. *Journal.* p.^pp. Fourth Edition ed., Eugene, USA.
21. Williams, L. R., Wong, K., Stewart, A., Suci, C., Gaikwad, S., Wu, N., Dileo, J., Grossman, L., Cachat, J., Hart, P. and Kalueff, A. V. 2012. Behavioral and physiological effects of RDX on adult zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **155**, 33-38.

## 초록 : Oxytetracycline의 단기 노출이 제브라피쉬의 행동 및 내분비 반응에 미치는 영향

고은성 · 이승현\*

(제주대학교 해양생명과학과)

Zebrafish는 약리학 연구에 널리 사용되는 실험 동물 중 하나이다. Oxytetracycline은 넓은 항균 범위를 가지는 항생제로써 단백질 합성을 억제하여 정균 작용을 가진 항생제이다. 본 연구의 목적은 OTC에 노출이 되었을 때 zebrafish에게서 나타나는 행동변화와 내분비계의 변화를 관찰하였다. OTC (50, 100 or 200 mg/l)에 노출된 zebrafish의 행동변화를 확인하기 위해 novel tank test와 open field test를 진행하였다. 또한 내분비계의 변화를 확인하기 위하여 whole-body cortisol의 수치를 cortisol kit를 이용하여 측정하였다. Novel tank test 결과 상층부에서 머문 시간과 부동 시간에서 OTC를 약육하였을 때 통계적으로 유의성이 있는 증가현상이 확인되었다. 반면에, 총 이동거리, 과행동 시간, 유영 속도 그리고 상하 변위에서 OTC를 약육하였을 때 통계적으로 유의성 있는 감소 현상이 확인되었다. Open field test 결과 부동시간에서 OTC를 약육 하였을 때 통계적으로 유의성 있는 증가 현상이 확인 되었다. 그러나 OTC를 약육 하였을 때 총 이동거리, 움직임 시간, 유영 속도에서 통계적으로 유의성이 있는 감소 현상이 확인 되었다. Whole-body cortisol에서는 zebrafish에게 약육을 하였을 때 증가하는 경향이 관찰되었다. 이러한 결과를 통하여 OTC가 zebrafish에게 화학적 스트레스로 작용한 것으로 사료된다.