

용해된 시멘트 분말이 붕어에 미치는 영향

신 명 자 · 이 중 은 · 서 을 원*

안동대학교 자연과학대학 생명과학과

The Effect of Dissolved Cement Powder on *Carassius auratus*

Myung-Ja Shin, Jong-Eun Lee and Eul-Won Seo*

Department of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea

Abstract - In this study, we studied the effect of dissolved cement powder on *Carassius auratus* by analysis of the morphophysiological changes. The gill exposed to dissolved cement powder showed the thickened primary lamellae and the activity of chloride cells and mucous cells was also significantly increased and the proliferation, separation and clubbing of gill filament was observed in the secondary lamellae. In the kidney tissue, the space in Bowman's capsule was widen and the arrangement of dermis was irregular due to the thinned epidermis in the integument tissue. The activities of antioxidant enzymes and LDH tended to increase with the duration of cement exposure. It was confirmed that the up-regulated proteins were identified as involved in glycolysis and energy metabolism and down-regulated proteins were myofibrillar proteins which were involved in muscle contraction by the cement exposure to the integument. With these results, dissolved cement powder was thought to be a big threat to the survival of the fish because it causes the morphological changes and weakens the physiological activity in *C. auratus* tissues.

Key words : *Carassius auratus*, cement powder, antioxidant enzyme, LDH

서 론

물속에서 생활하는 어류는 수온, 삼투압, 저산소, 수압 및 오염물질 등의 환경조건에 의하여 대사, 발생, 성장, 성숙 등의 생리현상이 강하게 영향을 받는다. 이런 여러 가지 환경요인에 응답하기 위하여 어류는 특유의 생리 기능을 획득하고 있지만 수 환경의 급격한 물리화학적 변화에 대해서는 항상 심각한 스트레스를 받게 되며 결국 다양한 수준에서 복합적인 생리적 변화를 초래하게 된다 (Hosoya *et al.* 2007). 일반적으로 변화된 환경은 심

각한 스트레스로 작용하며 이러한 환경에서 서식하는 생물의 생리적 건강에 심각한 영향을 미치게 된다. 어류는 수환경에 서식하는 동물 중 환경의 작은 변화에도 가장 예민하게 반응하며 (Jee *et al.* 2005), 일단 스트레스를 받게 되면 여러 단계의 생리적 반응을 거친 적응을 통해 항상성을 유지하게 된다 (Chrousos 1998). 그러나 스트레스의 강도가 매우 강하거나 장기간 지속되는 경우에는 생리적 반응을 통한 적응은 이루어지지 않고 오히려 면역기능이 악화되어 건강에 해를 끼치게 된다 (Barton and Iwama 1991). 이러한 스트레스에 대한 어류의 초기 반응은 스트레스로 인한 변화된 상황을 인지하는 제1차 반응과 cortisol과 같은 스트레스 호르몬을 분비하게 되는 제 2차 내분비 반응으로 나누어지는데 (Mommsen *et al.* 1999), 스트레스가 반복되면 어류는 이에 대해 무감각하

* Corresponding author: Eul-Won Seo, Tel. 054-820-5462, Fax. 054-820-7705, E-mail. ewseo@andong.ac.kr

게 되고, 내분비물질의 분비가 감소되며 대사반응이 저하되기도 한다 (Reid *et al.* 1998). 더불어 어류에 미치는 지속적인 스트레스는 세포 또는 조직 내 효소활성, 일반 대사 및 호흡 등에 변화를 줄 뿐만 아니라 세포막 성분의 구조 및 기능 변화 등을 일으킬 수 있게 된다. 결국 이러한 스트레스성 생리적 변화는 어류의 성장을 저해하고 병원균에 대한 저항력 및 면역력의 감소를 초래하게 되어 생존에 치명적인 영향을 주기도 한다.

수환경의 유해성을 나타내는 바이오마커는 대사관련 효소, 산화적 스트레스 요인, 스트레스 단백질, 중금속 노출 인자, 혈액학적 요인, 생식 및 내분비계 요인, 신경학적 요인, 유전독성학적 요인, 생리 및 형태적 요인 등 매우 다양하다. 이러한 바이오마커는 수 환경 유해인자의 독성영향 기전에 대한 정보를 제공하고 잠재적인 생태계 영향을 제시하고 있다 (Kim *et al.* 2010). 수환경에 영향을 미치는 여러 유해 환경 요인 중 시멘트는 이미 고대 시대로부터 각종 토목 및 건축공사에 사용되었으며, 현재에도 토목 및 건축자재로 폭넓게 사용되고 있으며, 주성분은 규산 (SiO_2), 산화알루미늄 (Al_2O_3), 산화철 (Fe_2O_3) 및 산화칼슘 (CaO)으로 구성되어 있다. 토목 공사의 일부로 수변 환경에 사용하게 되는 시멘트는 물과 접촉하게 되고, 이로 인해 시멘트의 주요 성분들이 느린 속도로 수중에 유리하게 되어 수질 악화뿐만 아니라 수중 생태계에 나쁜 영향을 미치게 된다 (Lee and Hur 2005). 특히 시멘트가 갖고 있는 독성은 주로 처리수에 높은 알칼리성을 띠게 하는 것으로, 일반적으로 환경수의 pH가 9 이상 되게 되면 어류의 성장은 늦어지게 되고, pH 11 이상이 되게 되면 급성 치사를 일으키게 된다고 보고되어 있다 (Boyd 1998). 이와 같이 건설 현장에 사용되고 있는 시멘트는 그 유해성이 보고되고 있으나 실제 이의 형태 생리적 영향에 대한 평가는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 시멘트 노출에 따른 어류 조직의 형태 생리적 변화를 분석하여 용해된 시멘트 분말 노출이 어류에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험어 및 시멘트 노출

본 실험에 사용한 실험어는 경북 안동시 와룡면에 위치한 양어장에서 분양받은 붕어 (*Carassius auratus*, 체장 6.0 ± 0.7 cm, 무게 2.5 ± 1.1 g)로 7일간 순치과정을 거친 후 건강한 개체만을 선별하여 실험에 사용하였다.

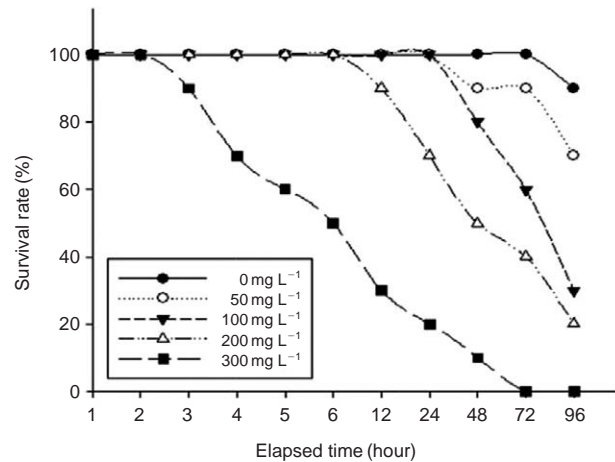


Fig. 1. Effect of cement concentration on survival of *C. auratus*. The 96 hr-LC₅₀ was estimated to 92.08 mg L⁻¹.

우선 용해된 시멘트 분말의 반수치사 농도를 구하기 위하여 1종 보통 포틀랜드 시멘트 분말을 50, 100, 200 및 300 mg L⁻¹로 표준액을 제조하였다. 이 표준액이 들어 있는 수조 (30 × 60 × 45 cm)에 붕어 10마리씩을 넣어 96시간 동안 측정된 APHA (1985)의 probit 값으로 시멘트 분말의 반수치사 농도를 구하였다. 용해된 시멘트 분말에 대한 96 hr-LC₅₀은 92.08 mg L⁻¹로 측정되었으며 (Fig. 1), 이에 따라 본 실험에서는 시멘트 농도를 반수치사 농도보다 낮은 90 mg L⁻¹로 설정하여 용해된 시멘트 분말이 붕어에 미치는 영향을 평가하였다. 시멘트에 노출시킨 기간은 각 실험군 당 20마리의 붕어를 사용하여 2일, 4일 및 6일 간격으로 설정하였고 시멘트 노출 직전의 붕어를 대조군으로 설정하였다. 모든 동물실험 과정은 안동대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 취한 후 실시하였다 (2014-3-1111-11-01).

2. 조직 관찰

각 실험 종료시점에 용해된 시멘트 분말이 붕어의 조직에 미치는 조직학적 영향을 조사하기 위하여 아가미, 신장 및 표피를 절취하여 FAA (formaline acetic acid)에 24시간 고정한 후 일반적인 조직 제작 방법에 따라 paraffin 포매하였다. Paraffin block은 두께 4~6 μm로 절편하였으며, hematoxylin과 eosin에 이중염색하여 관찰하였고 Olympus DP-71을 사용하여 사진 촬영을 하였다. 세포의 크기와 조직의 두께는 IMT I-Solution Lite 프로그램 (IMT I-solution InC., Korea)을 이용하여 1/1000 mm 단위까지 측정하였다. 조직학적 변화에 대한 평가는 각 실험

험군 당 각 5개체씩 샘플링하여, 개체 당 20회 이상 관찰한 후 통계적으로 비교 분석하였다.

아가미의 초미세구조를 관찰하기 위하여 절취한 아가미를 2.5% glutaraldehyde에서 전고정한 후, 1% osmium tetraoxide (O_8O_4)로 후고정 하였다. 고정된 조직은 탈수 과정을 거친 후 완전히 동결 건조시켰으며 시료 표면에 금 코팅을 한 후 주사전자현미경(S-2500C, Hitachi) 하에서 아가미의 표면의 미세구조를 관찰하였다. 아가미 표면의 미세구조 변화에 대한 평가는 각 실험군당 각 5개체씩 선별하여 개체 당 10회 이상 관찰한 후 비교 분석하였다.

3. 항산화효소와 LDH 활성 및 LDH isozyme 패턴 분석

항산화효소 활성 측정을 위하여 노출기간에 따라 적출한 붕어의 아가미, 눈, 뇌, 포피 조직을 homogenation buffer (5 mM Tris, 38 mM glycine, pH 8.4)에서 완전히 균질화시킨 후, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 지질층을 제외한 상등액을 항산화효소 시료로 사용하였다.

SOD의 활성은 McCord와 Fridovich (1969)의 방법에 따라 측정하였다. 우선 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 M cytochrome C, 50 mM xanthine, 0.1 mM EDTA 및 효소 시료를 25°C에서 예치한 다음 xanthine oxidase를 첨가하여 반응을 개시하였으며 반응은 550 nm에서 10초 단위로 150초간 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 첨가량은 효소액을 함유하지 않은 반응액의 흡광도 흡수가 분당 0.025가 되도록 조절하고 SOD 활성은 cytochrome C의 환원 속도를 50% 억제하는 양을 1 unit로 측정하여 $unit\ mg\ protein^{-1}\ min^{-1}$ 으로 정의하였다. CAT 활성은 Aebi (1984)의 방법에 따라 측정하였다. 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 15 mM H_2O_2 용액에 1 mg protein 효소 시료를 첨가한 후 240 nm에서 3분간 변화되는 흡광도를 측정하여 직선으로 나타나는 최초 60초 동안의 H_2O_2 감소량을 활성으로 나타내었다. CAT의 활성은 1 mg의 단백질이 1분 동안에 1 μM 의 H_2O_2 를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다. GPX 활성은 Flohe 등 (1984)의 방법에 따라 측정하였다. 1 mM EDTA를 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 3 mM GSH, 0.45 mM NADPH, 20 mM glutathione reductase 0.72 U와 1 mg protein 효소 시료를 넣고 37°C에서 5분간 방치한 다음 4 mM cumene hydroperoxide를 첨가한 후 반응을 개시하여 340 nm에서 3분 동안 변화되는 흡광도를 측정하였다. GPX의 활성은 1분 동안에 1 μmol 의 NADPH를

NADP로 산화하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

붕어 세포기질 내 LDH 활성은 Schnaitman 등 (1967)의 방법을 이용하여 측정하였다. 아가미, 눈, 뇌 및 포피에서 세포기질을 추출하기 위하여 각 조직에 0.25 M sucrose, 5 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)를 4배 (v/w) 또는 8배 가하여 균질화하였다. 이 시료는 1,000 $\times g$ 에서 15분간씩 2회 원심분리 하였으며, 상등액을 다시 10,000 $\times g$ 에서 원심분리 하여 상등액을 얻었다. 이후 분리한 상등액은 추가로 20,000 $\times g$ 에서 30분간 원심분리한 후 LDH에 대한 시료로 사용하였다. LDH 활성은 1.5 mM 피루브산과 0.14 mM NADH가 포함된 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85) 3 mL에 50 μL 의 시료를 넣은 후 NADH로부터 NAD^+ 로 산화되는 정도를 340 nm에서 측정하였다. LDH의 활성은 1분간 기질 1 $\mu mole$ 을 생성물로 전환시키는 데 필요한 효소의 양을 1 unit으로 하였다. LDH isozyme의 발현 패턴은 Davis (1964)의 방법에 따라 전기영동을 실시한 후 Whitt (1970)의 방법에 따라 6.7 mM NAD^+ , 194.6 mM DL-lactate, 3.1 mM NBT, 0.25 mM PMS 혼합용액에서 반응시킨 후 분석하였다.

4. 단백질체 분석

추출된 포피 단백질은 1차적으로 Ettan IPGphor II IEF System (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용하여 분리하였으며 분리된 IPG strip은 2차적으로 10% SDS-PAGE 상에서 분리하여 coomassie brilliant blue 염색을 통해 분리된 spot을 확인하였다. 대조군과 실험군에서 가장 두드러지게 정량 정성적 변화를 나타내는 spot을 확인하여 각각 번호를 부여한 후 추출하였으며 각각의 spot은 MALDI-TOF (microflex LRF20, Bruker Daltonics)를 통해 분석한 후 실시한 후 지문감식법 (PMF, peptide mass fingerprinting)을 실시하였다. PMF를 통해 분석된 spot은 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 사이트를 통해 단백질의 종류를 확인하였다.

5. 통계처리

각 실험에서 얻어진 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 통계처리는 SPSS 12로 분석한 후 t-검정을 실시하여 분산과 평균의 동일성 여부를 검정하였다. 분석결과는 일원분산분석 (one way ANOVA)에 의한 Duncan 검정을 실시하여 P값이 0.05미만일 때 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 아가미, 신장 및 표피 세포의 조직학적 변화

용해된 시멘트 분말이 붕어에 미치는 조직학적 변화를 노출 시간에 따라 관찰하였다. 전자현미경을 통해 아가미 표면의 초미세구조를 살펴보면 시멘트에 노출되지 않은 대조군의 아가미는 일차새변과 이차새변의 표면이 깨끗하며 일차새변의 두께도 일정하였다. 이차새변은 새변과 새변 사이의 간격이 규칙적이며, 상피세포의 증식이 관찰되지 않았으며 (Fig. 2A), 조직학적으로도 이차새

변의 간격은 일정하였고, 염세포와 점액세포의 활성이 관찰되지 않았으며, 새엽 상피세포의 증식도 관찰되지 않았다 (Fig. 3A). 그러나 용해된 시멘트 분말에 2일간 노출된 아가미 일차새변의 두께는 두꺼워지며 이차새변에서는 새엽 상피세포의 증식이 관찰되었고 새변 사이의 간격이 불규칙해졌다 (Fig. 2B). 장시간 시멘트에 노출된 아가미는 일차새변과 이차새변에 이물질이 부착되어 있으며, 새변의 표면도 매끄럽지 못했으며, 이차새변은 새엽 상피세포의 증식으로 인해 새엽이 융합되어 있는 형태로 관찰되었다 (Fig. 2C, D). 시멘트 노출 초기의 아가미 조직은 간헐적으로 새엽 상피세포의 증식과 박리가

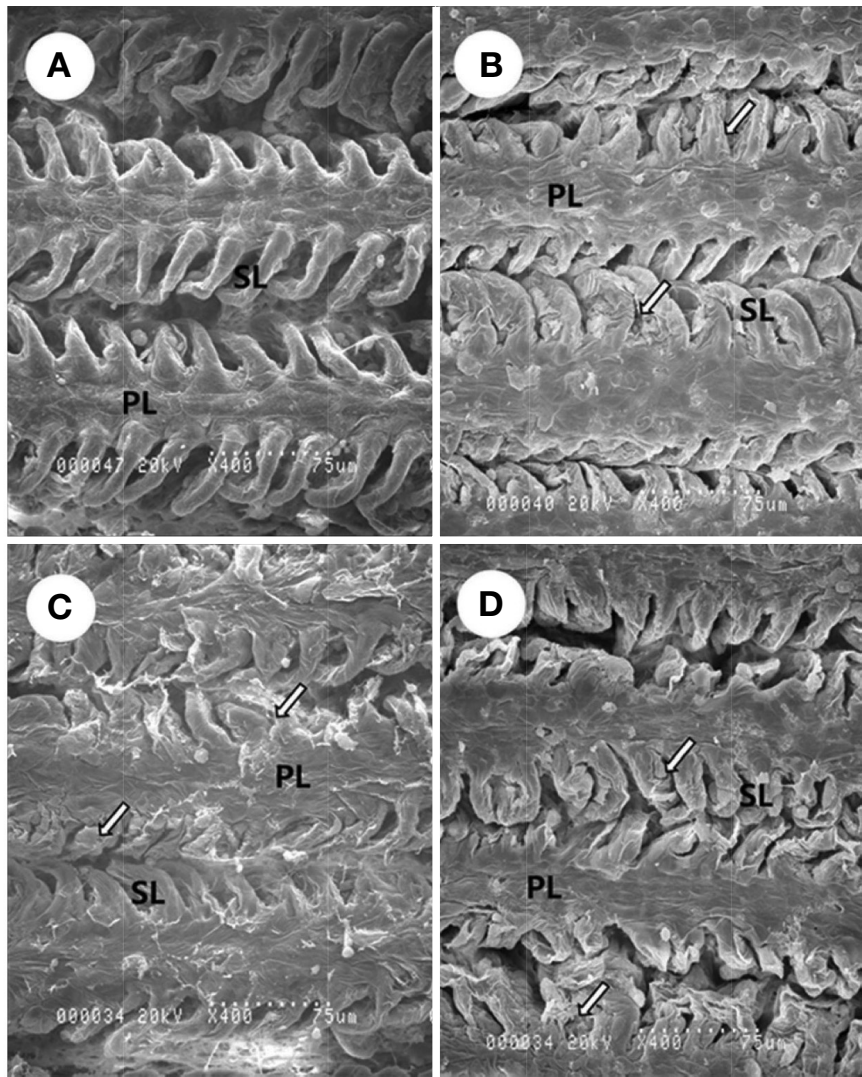


Fig. 2. Ultrastructural changes of *C. auratus* gill. A: normal gill, B: gill exposed for 2 day in dissolved cement powder, C: gill exposed for 4 day in dissolved cement powder, D: gill exposed for 6 day in dissolved cement powder. The gills exposed to dissolved cement powder showed thickened primary lamellae and irregular space between lamellae, and it was observed the epithelial cell proliferation in secondary lamellae (arrows). Scale bars: A-D=75 μ m. PL: primary lamella, SL: secondary lamella.

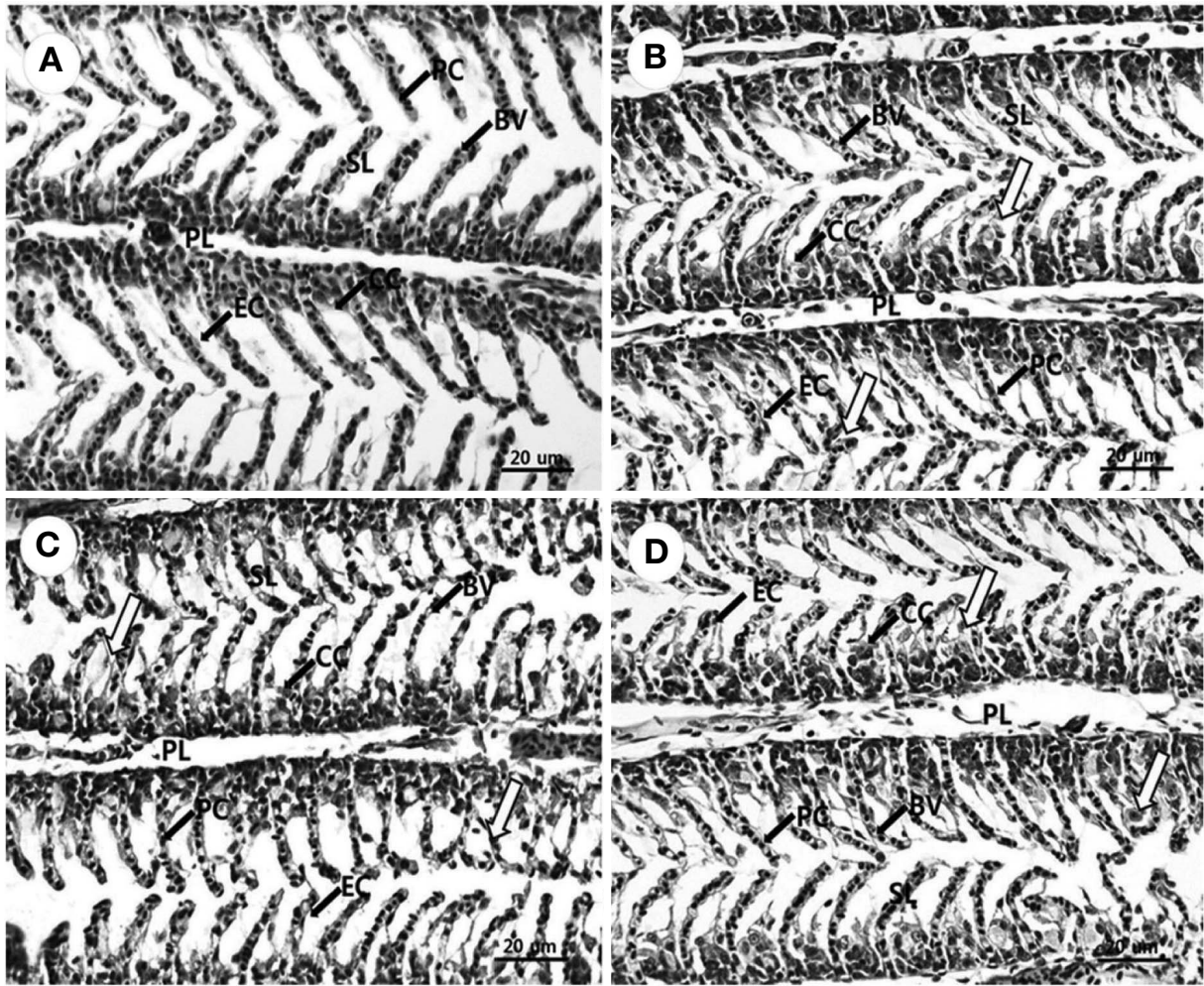


Fig. 3. Histological changes of *C. auratus* gill tissue. A: normal gill, B: gill exposed for 2 day in dissolved cement powder, C: gill exposed for 4 day in dissolved cement powder, D: gill exposed for 6 day in dissolved cement powder. The activities of chloride cells and mucous cells were increased in the gills exposed to dissolved cement powder, and the proliferation, separation and clubbing of gill filament were observed in the secondary lamellae (arrows). Scale bars: A-D =20 μ m. PL: primary lamella, SL: secondary lamella, BV: blood vessel, EC: epithelial cell, PC: pillar cell, CC: chloride cell.

나타났으며 (Fig. 3B), 장기간 시멘트에 노출된 아가미에서는 일차새변의 두께가 두꺼워지며, 염세포와 점액세포의 활성이 두드러지게 증가되고 있으며, 이차새변의 새엽에서는 곤봉화 현상까지 나타나는 것으로 관찰되었다 (Fig. 3C, D).

용해된 시멘트 분말 노출이 신장에 미치는 변화를 살펴보면 대조군에서는 보우만주머니에 사구체의 내피세포와 적혈구 등이 가득차 있으며, 조혈조직이 조밀한 형태를 하고 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 4A). 그러나 시멘트에 노출된 신장은 노출기간이 길어질수록 보우만주머니내 사구체의 내피세포와 적혈구 등이 감소하고 있으며, 사구체의 수축도 관찰되며 이로 인해 보우만주머

니내 공간이 점차 넓어지는 형태로 관찰되었고 조혈조직은 대조군에 비해 엉성한 형태로 배열되어 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 4B-D). 보우만주머니 공간의 지름은 대조군에서는 $2.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 를 보였으나 노출기간 2일에는 $5.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$, 4일에는 $6.9 \pm 1.6 \mu\text{m}$, 6일에는 $6.6 \pm 1.1 \mu\text{m}$ 를 보여 노출기간이 길어질수록 넓어지는 형태로 조사되었다 (Fig. 4A-D).

시멘트 노출이 표피에 미치는 변화를 살펴보면 대조군의 표피는 표피층이 두껍고 진피층의 배열도 조밀하고 규칙적이며, 기저막은 뚜렷한 경계를 나타내는 것으로 관찰되었다 (Fig. 5A). 그러나 시멘트에 노출된 실험군의 표피는 노출기간이 길어질수록 표피층의 두께가 감

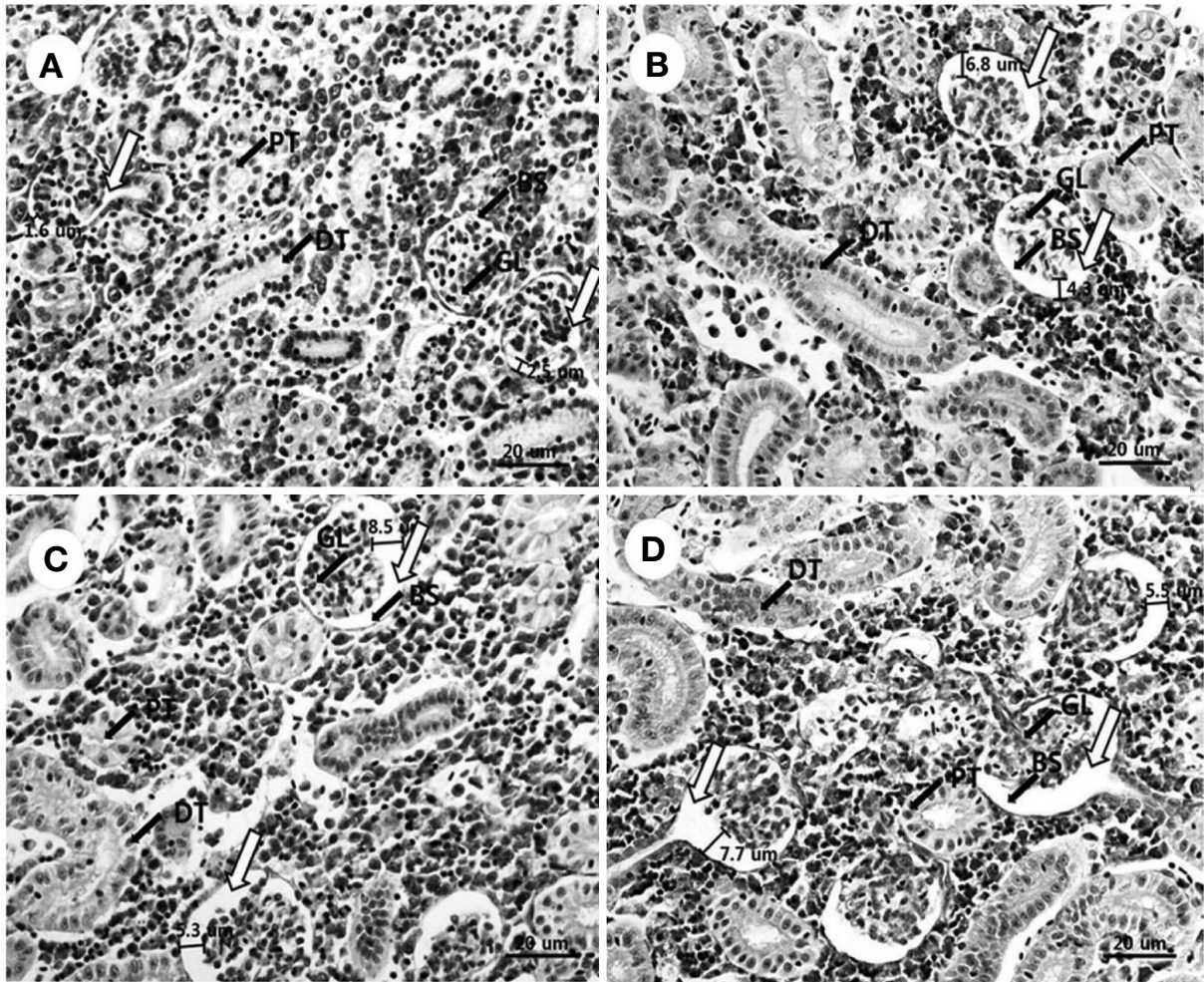


Fig. 4. Histological changes of *C. auratus* kidney. A: normal kidney, B: kidney exposed for 2 day in dissolved cement powder, C: kidney exposed for 4 day in dissolved cement powder, D: kidney exposed for 6 day in dissolved cement powder. In the kidney tissue, the number of glomerular endothelial cells and red blood cells in Bowman's capsule reduced by longer exposure to dissolved cement powder, and Bowman's spaces expanded widely due to the glomerular contraction (arrows). Scale bars: A-D=20 μ m. BS: space, GL: Glomerulus, DT: Distal tubule, PT: Proximal tubule.

소하였고, 진피층은 불규칙한 배열을 보이며, 조밀하지 않은 형태로 관찰되었다. 또한 기저막의 경계가 뚜렷하지 않았으며, 표피층은 배열이 조밀하지 않고 공포도 나타나는 것으로 관찰되었다 (Fig. 5B-D). 표피층의 두께는 대조군에서 $27.5 \pm 1.5 \mu\text{m}$ 로 관찰되었으나 노출기간 2일에는 $20.5 \pm 4.3 \mu\text{m}$, 4일에는 $18.9 \pm 1.4 \mu\text{m}$, 6일에는 $12.8 \pm 1.0 \mu\text{m}$ 로 노출기간이 길어질수록 두께가 감소하는 경향을 보여주고 있다 (Fig. 5A-D).

2. 항산화효소 활성과 LDH의 활성

시멘트 노출에 따른 붕어 조직의 항산화효소 활성을 조사하였다. 우선 SOD 활성은 시멘트에 노출되는 기간

이 길어짐에 따라 눈과 아가미에서 활성이 증가하고 있으나 노출 6일에는 감소하는 경향을 나타냈다. 뇌와 표피 조직에서 시멘트 노출에 따라 지속적으로 SOD 활성이 증가하는 경향을 나타내고 있다 (Fig. 6A). CAT 활성은 시멘트 노출 초기에는 모든 조직에서 활성이 증가되나 장기간 시멘트에 노출되면 활성이 감소하는 경향을 나타내고 있다 (Fig. 6B). 그러나 GPX 활성은 뇌와 표피에서 시멘트 노출 2일에 가장 높은 활성을 보인 뒤 점차 감소하는 경향을 나타냈으나 눈에서는 지속적으로 활성이 증가하는 경향을 보이고 있으며 아가미에서는 유의적인 활성의 변화를 보이지 않았다 (Fig. 6C). 시멘트 노출에 따른 붕어 조직 내 LDH 활성은 시멘트 노출 후에 증가되는 경향을 나타내었다. 아가미와 뇌 조직에서

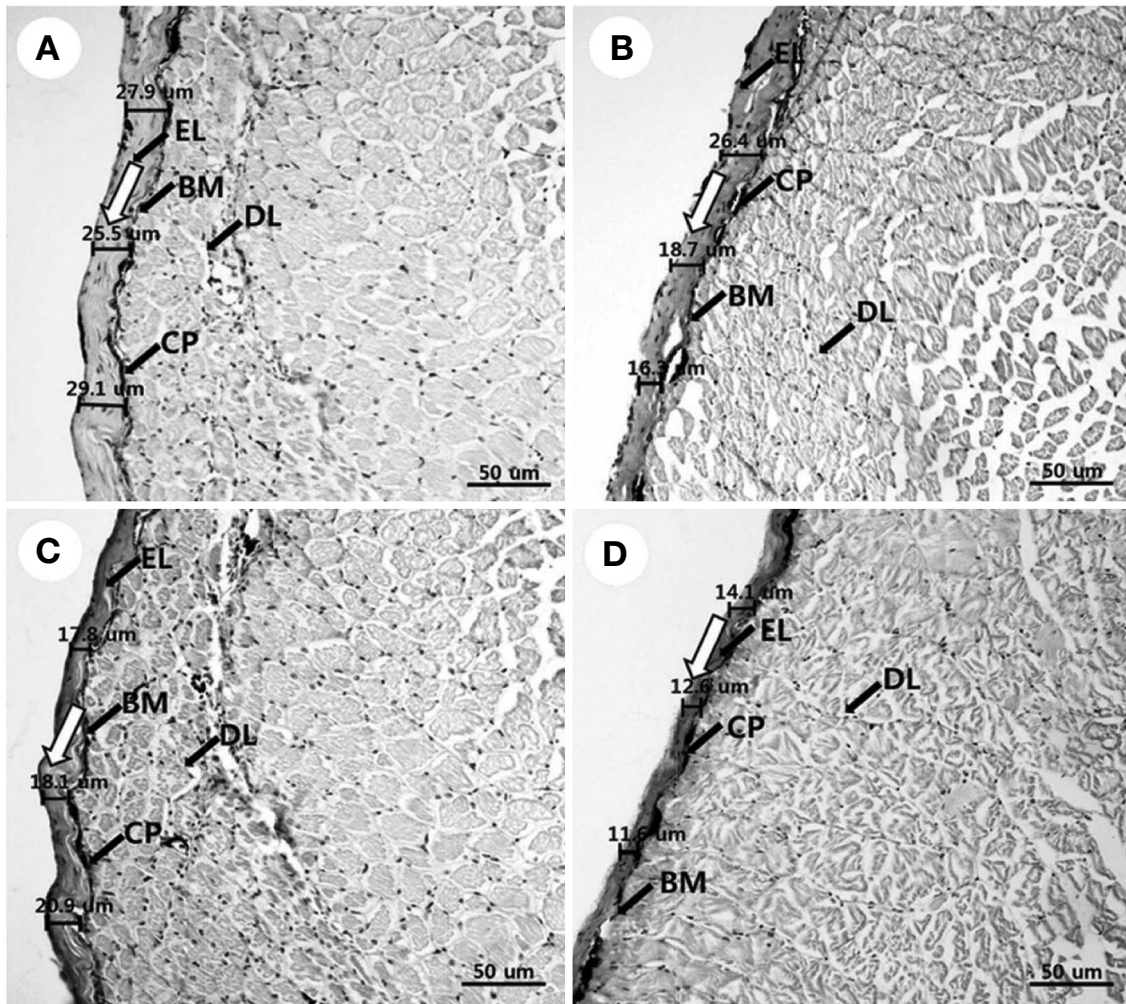


Fig. 5. Histological changes of *C. auratus* integument. A: normal integument, B: integument exposed for 2 day in dissolved cement powder, C: integument exposed for 4 day in dissolved cement powder, D: integument exposed for 6 day in dissolved cement powder. The epidermis of integument thinned due to longer dissolved cement powder exposure, and arrangement of dermis was irregular and the boundary of basement membrane was unclear (arrows). Scale bars: A-D=50 μm . EL: Epidermal layer, DL: Dermal layer, BM: Basement membrane, CP: Chromatophore.

LDH의 활성은 시멘트 노출기간이 길어짐에 따라 활성이 증가하여 시멘트 노출 4일에 가장 높은 활성을 보인 반면 눈과 표피 조직에서는 시멘트 노출 2일에 가장 높은 활성을 보인 뒤 점차 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 6D).

3. LDH isozyme 패턴 분석

시멘트 노출에 따른 붕어 조직 내 LDH isozyme의 발현 패턴을 살펴보면 아가미, 눈, 뇌 및 표피 조직에서는 공통적으로 LDH-1이 확인되었으나, 표피 조직에서는 LDH-2와 LDH-3가 추가로 발현되는 것으로 확인되었고

특히 눈 조직에서는 시멘트 노출 기간과 상관 없이 LDH isozyme 활성이 높게 나타났으며, 뇌 조직에서는 시멘트 노출 초기에 높은 활성을 나타내었으며, 아가미와 표피 조직은 시멘트 노출기간이 길어질수록 증가하는 경향을 보여주고 있다 (Fig. 7).

4. 스트레스 단백질의 단백질체 분석

시멘트 노출에 따라 반응하는 단백질의 종류를 단백질체 분석법으로 확인하였다. 본 실험에 사용한 조직 중 변화가 가장 많이 나타난 표피 조직의 단백질을 통해 용해된 시멘트 분말 노출에 반응하는 단백질을 분석해 보

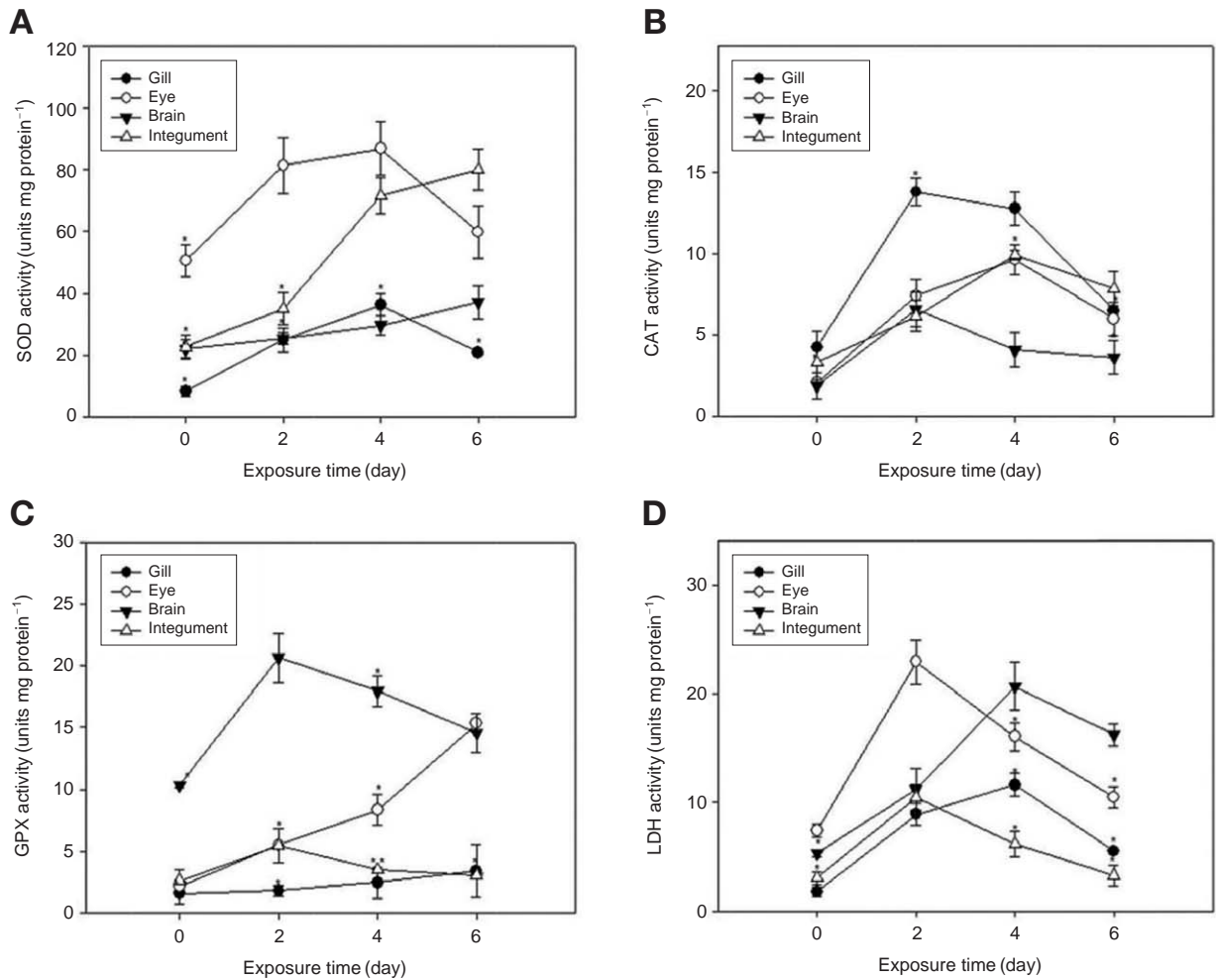


Fig. 6. Activities of anti-oxidant enzymes (A, SOD; B, CAT; C, GPX) and LDH (D) in *C. auratus* tissues exposed to dissolved cement powder. The values are mean \pm SD (n=5). * $P < 0.05$ indicates significant difference between the control group and the cement exposed groups.

Table 1. Up-regulated (spot 1,2,5) and down-regulated (spot 3,4,6) protein list identified by the reference map.

Spot no.	Protein identified	NCBI nr	pI	MW (D)	Cov (%)	Score	E-value
1	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 [Danio rerio]	NP001003488	6.88	58887	35	118	7.7e-07
2	Beta-enolase [Danio rerio]	NP999888	6.25	47841	42	174	1.9e-12
3	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 7-like [Neolamprologus brichardi]	XP006805682	8.94	40164	28	79	0.0063
4	Tropomyosin alpha-1 chain [Danio rerio]	NP571180	4.70	32760	32	87	0.00095
5	Adenylate kinase isoenzyme 1 [Cyprinus carpio]	P12115	6.64	21532	61	208	7.7e-16
6	Troponin C, skeletal muscle-like [Takifugu rubripes]	XP003978215	3.91	18216	27	91	0.00037

면 1, 2, 5번 spot은 발현이 증가되는 것으로 확인되었고 3, 4, 6번 spot은 발현이 감소되는 것으로 확인되었다. 이에 따라 대조군과 실험군에서 정성 정량적 차이를 보이는 6개의 spot을 추출하였다 (Fig. 8). 이를 MALDI-TOF과 지문감식법 과정을 거쳐 분석한 후 Mascot ([\[www.matrixscience.com\]\(http://www.matrixscience.com\)\) 사이트를 통해 단백질의 종류를 확인하였다. 용해된 시멘트 분말 노출에 따라 발현이 증가된 단백질은 pyruvate kinase isozymes M1/M2, beta-enolase, adenylate kinase isoenzyme 1으로 확인되었고, 발현이 감소된 단백질은 ectonucleotide pyrophosphatase/](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

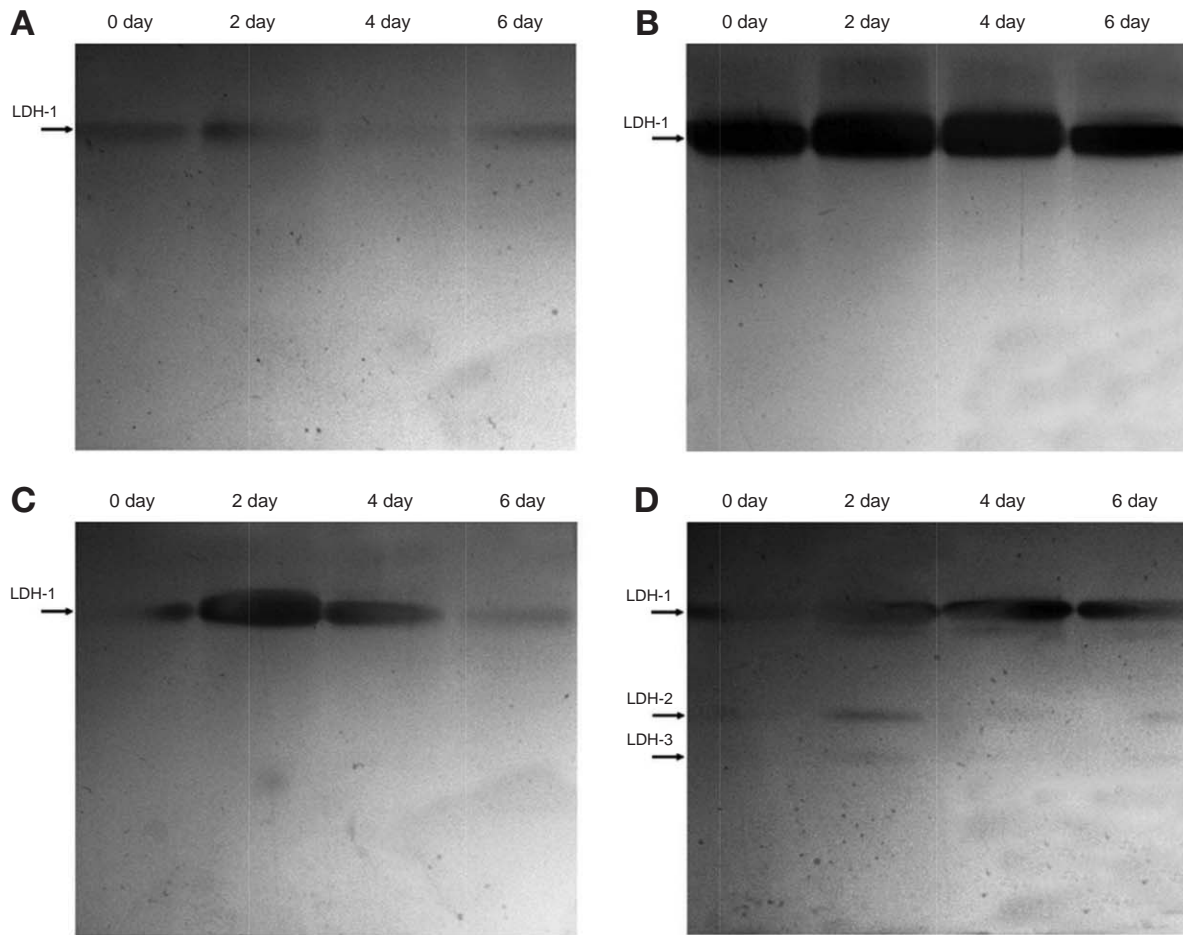


Fig. 7. Zymograms of LDH isozyme in *C. auratus* tissues. A: gill, B: eye, C: brain, D: integument. LDH-1 was commonly detected in the tissues of gill, eye, brain and integument, and LDH-2 and LDH-3 were additionally expressed in integument.

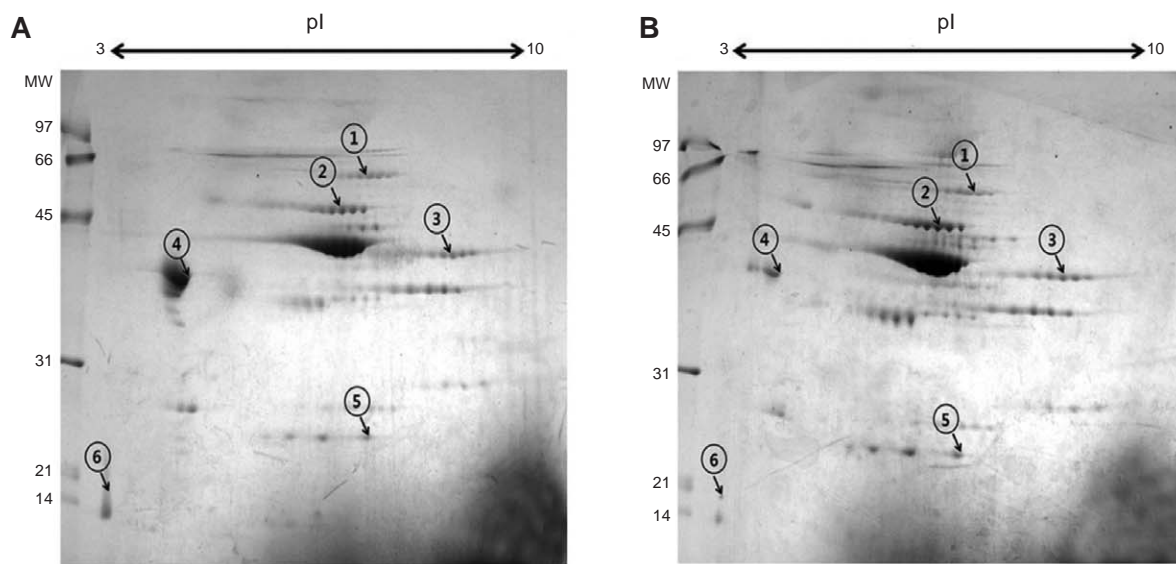


Fig. 8. 2-D gel images of the integument tissue. A: Control integument, B: Integument exposed to dissolved cement powder for 6 day.

phosphodiesterase family member 7-like, tropomyosin alpha-1 chain, troponin C, skeletal muscle-like인 것으로 확인되었다(Table 1).

고 찰

하천 및 호소 등의 개발에 많이 사용되고 있는 시멘트는 항시 직·간접적으로 수 환경에 맞닿게 된다. 여러 수 환경에 노출되어 있는 시멘트는 수많은 수 생물에 해를 끼칠 수 있는 유해성분을 함유하고 있고 이러한 물질들은 장기간 수 환경에 노출됨에 따라 서서히 수 환경 속으로 녹아 들어가게 된다. 시멘트에서 흘러나오는 유해성분의 농도가 미약할 경우 하천이나 호소의 자정 능력으로 인해 수중생물에 거의 영향을 미치지 않는다. 그러나 하천이나 호소가 심하게 오염되어 자정능력을 상실하게 될 경우 및 유출되는 시멘트 성분의 농도가 큰 경우 수중생물은 지대한 악영향을 받게 된다. 빙어의 경우 500 ppm의 시멘트 농도에서 4시간 이내에 전량 폐사되었으며, 시멘트 농도가 높아지면 수환경의 pH는 알칼리화 되어 아가미를 통한 삼투압 조절이 이루어지지 않게 되어 결국 폐사에 이르게 된다고 보고되어 있다(Lee and Hur 2005). 본 연구에서도 300 ppm의 시멘트 농도에서 사육한 붕어는 72시간 이내에 모두 폐사하는 것으로 나타나 고농도의 시멘트는 어류에 형태 생리학적으로 악영향을 미쳐 수생물의 생존을 위협하는 요인으로 작용할 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

어류의 아가미는 가스교환, 이온조절, 산·염기 조절 및 배설 등을 담당하는 기관으로(Evans 1987), 수환경이 오염되면 아가미 상피세포는 괴사, 박리, 이상증식 및 비대화 등이 일어나며 새판이 융합되기도 하며 점액세포가 이상 증식하기도 한다(Mallatt 1985). 또한 수질이 오염되어 알칼리화 되면 아가미 새엽 기부에 있는 점액세포가 이상 비대해지고 상피세포가 붕괴하여 호흡 곤란으로 폐사를 일으키기도 한다(Boyd 1998). 본 연구에서도 붕어가 시멘트에 노출되기 시작하면 아가미 상피세포의 괴사와 박리가 관찰되었으며, 노출기간이 길어지면 새엽이 융합되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과로 보아 시멘트는 붕어의 생존을 위협하는 심각한 수준의 스트레스로 작용하며, 결국 아가미의 구조적 변형을 초래하여 삼투 조절 실패에 따른 호흡장애를 가져올 수 있을 것으로 추측된다.

어류의 신장은 다양한 수질오염으로 인한 환경적 스트레스에 의해 세뇨관 괴사, 세뇨관 상피층의 퇴행성 병변,

사구체 위축 및 팽창이 나타날 수 있으며, 심할 경우 어류 폐사의 원인이 되기도 한다(Gill *et al.* 1989; Schwaiger *et al.* 2000). 또한 보우만 공간은 모세혈관 벽과 내벽을 통해 여과된 액체를 받아들이는 역할을 하고 있다. 본 연구에서 붕어의 신장은 시멘트의 노출기간이 길어짐에 따라 사구체가 수축되어 보우만 주머니의 공간이 넓어지는 형태로 관찰되었다. 즉 시멘트는 이러한 형태적 변화를 초래하여 신장의 기능을 저하시키는 유발 요인이 되며 궁극적으로 어류의 생존을 위협하는 한 요인으로 작용할 것으로 생각된다.

어류의 표피는 물리, 화학, 생물학적인 외부의 스트레스로부터 개체를 보호하는 기관이지만 외부 오염원에 의해 다양한 변화를 나타내기도 한다. Asiatic knifefish (*Notopterus notopterus*)가 아연에 노출되면 피부표면은 다량의 점액물질로 뒤덮이게 되고 상피층의 두께가 감소하며 점액세포가 다량 증식하고 비대해진다고 보고된 바 있다(Roy *et al.* 1993). 본 연구에서도 시멘트에 노출된 붕어의 표피층은 두께가 감소하고 있으며, 진피층 세포는 조밀하지 않고 불규칙적으로 배열하는 것으로 관찰되었다. 따라서 붕어는 시멘트 노출로 인한 수환경의 변화로 인해 물리적인 스트레스를 받게 되어 세포간 결합력의 약화를 초래하게 되며 피부조직의 손상으로 인하여 다양한 이물질들의 침입경로가 되며 결국 2차 감염의 요인이 될 수 있을 것으로 사료된다.

호기성 생물에서 필연적으로 생성되는 활성산소는 노화, 발암 및 면역억제작용을 유발시키는 원인물질로 작용하고 있다. 따라서 호기성 생물은 항산화 물질의 제거를 위해 항산화 효소의 활성을 증대시키거나 항산화제의 생성을 촉진하여 세포 내에 생성된 활성산소를 제거하여 스스로를 보호하게 된다(Alscher and Hess 1993; Dalton *et al.* 1993). 또한 LDH는 에너지대사에서 중요한 위치를 차지한다(Buono and Robyn 1999). Cu를 처리한 붕어의 경우 LDH 활성은 아가미에서 가장 낮은 활성을 보였고 근육에서 가장 높은 활성을 보였다(Lee and Choo 1973). 또한 메기(*Clarias batrachus*)의 경우 LDH 활성은 유기인산 살충제인 rogor에 24~192시간 단계별로 노출시킨 경우 48시간 동안 최고점에 이르렀다가 96~192시간 후에 감소되고 저산소 조건에서 해당과정에 의해 젖산을 축적하는 것으로 관찰되었다(Begum and Vijayraghavan 1999). 본 연구에서도 시멘트 노출에 따른 항산화효소와 LDH의 활성은 조직 및 노출 기간에 따라 활성에 차이가 있는 것으로 나타났으며, LDH isozyme의 활성도 눈 조직에서는 LDH isozyme 활성이 높게 나타났으나, 뇌 조직에서는 시멘트 노출 초기에 높은 활성을

나타내며, 아가미와 포피 조직은 시멘트 노출기간이 길어질수록 증가하는 패턴을 나타내고 있다. 이러한 결과로 보아 용해된 시멘트 분말은 생존을 위해 생체 내 항산화효소와 대사 관련 효소의 활성을 촉진시키게 되나 시멘트에 장기간 노출되면 더 이상 방어 체계를 유지할 수 없게 되고 결국 어류의 병변을 초래할 가능성을 시사해 주고 있다.

용해된 시멘트 분말은 생체에 심각한 스트레스를 초래하게 되고 이에 따라 생물은 이에 저항하기 위하여 새로운 방어 체계를 가동시키게 된다. 이때 유전자는 활성이 증진되거나 저하되며 이는 결과적으로 단백질의 정성 정량적 변화로 나타나게 된다. 따라서 단백질체 분석을 통해 환경적 변화에 대응하여 생성되는 개체 내 모든 종류의 단백질의 양적 질적 변화를 추정할 수 있게 해 주며 유전정보만으로 확인이 불가능한 단백질의 발현량 및 번역 후 수식 정도 분석할 수 있게 해주고 있다(Naaby-Hansen *et al.* 2001). 본 연구에서 포피 단백질을 분석한 결과 발현이 증가된 단백질은 해당과정과 에너지 대사과정에 관여하는 pyruvate kinase isozymes M1/M2, beta enolase, adenylate kinase isoenzyme 1 등으로 확인되었으며, 발현이 저하된 단백질들은 tropomyosin alpha-1 chain과 troponin C로 근수축에 관여하는 근섬유 구성 단백질과 ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 7-like으로 세포 내 pyrophosphate 농도를 높여주는 데 관여하는 효소로 확인되었다. 이러한 결과로 보아 시멘트 독성 스트레스는 근형질 내 에너지 생성에 관여하는 단백질과 근육의 구조에 영향을 주는 단백질에 양적 질적 변화를 줄 수 있을 것으로 추정된다.

이러한 결과에 비추어 보아 용해된 시멘트 분말은 붕어 조직의 형태적 변형과 생리적 기능의 약화를 초래하여 어류의 생존에 커다란 위협이 될 요인으로 작용할 수 있을 것으로 추정된다.

적 요

본 연구는 시멘트 노출에 따른 어류 조직의 형태 생리적 변화를 분석하여 용해된 시멘트 분말이 어류에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 용해된 시멘트 분말에 노출된 아가미는 일차새변의 두께가 두꺼워지고, 염세포와 점액세포도 두드러지게 활성이 증가되고 있으며, 이차새변의 새엽에서는 상피세포의 증식과 박리 및 곤봉화 현상도 관찰되었다. 신장 조직에서는 보우만 주머니

공간이 넓게 관찰되었고, 포피 조직은 포피층의 두께가 감소하며 진피층의 배열이 불규칙해지는 것으로 관찰되었다. 항산화효소와 LDH의 활성은 조직 및 노출 기간에 따라 활성에 차이가 있는 것으로 나타났다. 포피 조직에서 용해된 시멘트 분말에 의해 발현이 증가되는 단백질은 해당과정과 에너지 대사과정에 관여하는 단백질로 확인되었고 발현이 저하된 단백질들은 근수축에 관여하는 근섬유 구성 단백질로 조사되었다. 이러한 결과로 보아 용해된 시멘트 분말은 붕어 조직의 형태적 변형과 생리적 기능의 약화를 초래하여 어류의 생존에 커다란 위협이 될 요인으로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. pp.121-126. In Methods in Enzymology. Academic Press. New York.
- Alscher RG and JL Hess. 1993. Antioxidants in higher plants. pp. 31-58, CRC Press. Boca Raton, FL.
- APHA, AWWA, WPCF. 1985. Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA. Washington DC.
- Barton BA and GK Iwama. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the responses and effects of corticosteroids. Ann. Rev. Fish Dis. 1:3-26.
- Begum G and S Vijayraghavan. 1999. Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). Environ. Res. Sec. 80A:80-83.
- Boyd CE. 1998. Water quality for pond aquaculture. Research and development series No. 43. International center for aquaculture and aquatic environments. Alabama Agricultural Experiment Station. Auburn University. Alabama.
- Buono RJ and KL Robyn. 1999. Hypoxic repression of lactate dehydrogenase-B in retina. Exp. Eye Res. 69:685-693.
- Chrousos GP. 1998. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. Ann. N.Y. Acad. Sci. 851:311-335.
- Dalton DA, L Langeberg and NC Treneman. 1993. Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. Physiol. Plant. 87:365-370.
- Davis BJ. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 404-427.
- Evans DH. 1987. The fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. Environ. Health Perspect. 71:47-58.

- Flohe L, A Wolfgang and WA Gunzler. 1984. Assay of glutathione peroxidase. pp.114-130. In *Methods in enzymatic analysis*. Academic Press. New York.
- Gill TS, JC Pant and H Tewari. 1989. Cadmium nephropathy in a freshwater fish, *Puntius conchoni* Hamilton. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 18:165-172.
- Hosoya S, SC Johnson, GK Iwama, AK Gamperl and LOB Afonso. 2007. Changes in free and total plasma cortisol levels in juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) exposed to long-term handling stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 146A:78-86.
- Jee JH, F Masroor and JC Kang. 2005. Responses of cypermethrin-induced stress in haematological parameters of Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquacul. Res.* 36:898-905.
- Kim JK, YN Park, WK Kim, JW Kim, SK Lee and KG Choi. 2010. Molecular/ biochemical biomarkers for exposure to hazardous chemicals in the water environment and their application to freshwater fish. *J. Env. Hlth. Sci.* 36:418-434.
- Lee CK and IY Choo. 1973. Studies on the effects of copper on the lactate dehydrogenase and esterase isozymes in various tissues of *Carassius carassius*. *Korean J. Zool.* 2:79-96.
- Lee JY and JW Hur. 2005. Acute toxicity of cement on mortality of pond smelt (*Hypomesus olidus*). *Korean J. Environ. Biol.* 23:89-92.
- Mallatt J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish Aqu. Sci.* 42:630-648.
- McCord JM and I Fridovich. 1969. Superoxide dismutase an enzymic function erythrocyte protein (Hemocuprotein). *J. Biol. Chem.* 244:6649-6055.
- Mommsen TP, MM Vijayan and TW Moon. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Revi. Fish Biol. Fish.* 9:211-268.
- Naaby-Hansen S, MD Waterfield and R Cramer. 2001. Proteomics-post-genomic cartography to understand gene function. *Trends Pharmacol. Sci.* 22:376-384.
- Reid SG, NJ Bernier and SF Perry. 1998. The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol.* 120C:1-27.
- Roy RN, LN Roy, KM Vogel, C Porter-Moore, T Pearson, CE Good, FJ Millero and DM Campbell. 1993. The dissociation constants of carbonic acid in seawater at salinities 5 to 45 and temperatures 0 to 45°C. *Mar. Chem.* 44:249-267.
- Schnaitman C, VG Erwin and JW Greenawalt. 1967. The sub-mitochondrial localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* 32:719-735.
- Schwaiger J, OH Spieser, C Bauer, H Ferling, U Mallow, W Kalbfus and RD Negele. 2000. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquat. Toxicol.* 51:69-78.
- Whitt GS. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* 175:1-35.

Received: 28 November 2014

Revised: 13 January 2015

Revision accepted: 19 January 2015