



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

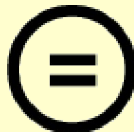
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

급이를 통한 납(Pb) 노출에 따른
강도다리, *Platichthys stellatus*의
생체축적 및 생리·생화학적 변화

2016년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

황 인 기



이 학 석 사 학 위 논 문

금이를 통한 납(Pb) 노출에 따른
강도다리, *Platichthys stellatus*의
생체축적 및 생리·생화학적 변화

지도교수 강 주 찬

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함.

2016년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

황 인 기

황인기의 이학석사 학위논문을 인준함.

2016년 2월 26일

위 원 장 이학박사 김 기 홍 (인)

위 원 이학박사 김 도 형 (인)

위 원 이학박사 강 주 찬 (인)

목차

목차	i
Abstract	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	8
1. 실험어 및 실험환경	8
2. Bioaccumulation	11
3. 전혈	12
4. 혈청	13
5. 항산화효소 분석	14
5-1. Superoxide dismutase (SOD)	14
5-2. Glutathione S-transferase (GST)	15
5-3. Glutathione (GSH)	15
6. Acetylcholinesterase activity	16
7. Lysozyme activity	17
8. 유의성 검정	18
III. 결과	19
1. Bioaccumulation 분석.....	19
2. 혈액 성분 분석.....	28
3. 혈청 성분 분석.....	30
4. 항산화효소 분석	35
4-1. Superoxide dismutase (SOD)	35

4-2. Glutathione (GSH)	39
4-3. Glutathione S-transferase (GST)	43
5. Acetylcholinesterase activity	47
6. Lysozyme activity	55
IV. 고찰	57
V. 요약	67
VI. 참고문헌	69



Bioaccumulation and physiological-biochemistry changes exposed to
dietary lead(II) in starry flounder, *Platichthys stellatus*

In Ki Hwang

Department of Fish Pathology, Graduate School
Pukyong National University

Abstract

Lead(Pb) is not required for normal physiology in plants or animals and is potentially toxic. It is common heavy metal pollutants of the environment. In aquatic environment, the prevalent heavy metals have been usually accumulated through the foodchain, and the accumulation in the tissues maybe toxic for fish. Therefore, the aim of present study were to investigate the effect of the dietary Pb toxicity, accumulation and elimination on starry flounder with the concentrations at 0, 30, 60, 120 and 240 mg/kg.

Pb accumulation in the tissues increased with exposure periods and concentrations for the 4weeks of dietary lead exposure. The highest Pb accumulation was observed in the intestine tissue by the dietary lead exposure. Pb elimination in tissues of starry flounder decreased during the 2weeks of depuration. Gill showed the fastest elimination rates of Pb at all concentrations compared with other tissues.

In hemotological parameters, RBC count and Hematocrit was significantly

decreased in 2 and 4 weeks compared to control. In hemolymph, calcium and magnesium was decreased. And glucose, total protein was too. Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvate transaminase (GPT) was increased but Alkaline phosphatase (ALP) was not significantly changed. Superoxide dismutase(SOD), Glutathione S-transferase(GST) and Glutathione(GSH) of antioxidant enzyme were significantly increased in liver, kidney and gill in high concentration. Acetylcholine activity was significantly decreased at high concentration in brain and muscle. But liver and spleen were not significantly changed. Lysozyme activity was significantly increased in 2, 4 weeks.



I. 서 론

인간에 의해 생산되는 각종 화학물질은 환경에 쉽게 노출되며 그 양 또한 지속적으로 증가하고 있다. 과거 수년 동안 중금속 사용의 방대하게 늘어나면서 수계환경에 금속성분 또한 늘어나게 됐다(Yang and Rose, 2003). 특히 독성 금속의 경우 생체축적으로 인하여 먹이사슬의 최상위층에 속하는 인간에게 지속적으로 피해를 끼칠 수 있기에 사회적 문제로도 꼽히고 있다. 따라서 이 문제점을 인지하여야 하며 충분한 연구가 필요하다.

중금속은 대표적으로 생체축적을 일으키는 물질로 알려져 있으며 이 중 생체에 미량으로 요구되는 아연, 철, 구리 등은 인체의 구성성분, 생리기능 유지, 물질대사에 관여하고 있다(Geret and Bebianno, 2004). 하지만 수은, 납, 카드뮴 등은 환경공해물질로써 생체내로 흡수되면 생체 내 단백질과 결합하여 배설되지 않고 축적되며 광범위한 장기에 다양한 형태의 독성을 나타내고 항상성 유지를 담당하는 호르몬 생산, 방출, 수송, 대사, 결합 등을 방해하는 내분비 교란물질로 작용한다. 그리고 세포 내에서 수많은 화학 반응의 촉매 역할을 하며, 병원균에 대한 항체를 만드는 단백질과 결합하여 그 구조를 깨뜨리면서 기능을 잃게 만든다(Moron et al., 1979). 중금속의 축적은 노출되는 기간과 그 농도와 관계하며 생태학적 요구와 크기, 성을 비롯하여 pH, 온도, 염도, 경도 등의 환경적 요소와도 관계한다(Kalay et al., 1999).

납은 중금속 중에 지구상에 가장 풍부한 금속으로 산업적으로 널리 쓰이고 있다. 오늘날 납 사용의 대부분은 배터리이며 주로 자동차, 오토바이

등의 배터리 뿐만 아니라 공장의 기계까지 사용된다. 페인트와 가연 가솔린에 사용되었지만 납의 영구적인 독성 때문에 사용을 금하거나 제제하게 되었다. 이러한 사용 제재에도 불구하고 납은 인위적인 활동으로 인해 자연으로 계속 수계에 유입이 되면서 지속적으로 오염되고 있다(Monteiro, 2011). 납은 흔한 독성물질 중 하나이며 전 세계적으로 동물의 건강에 위협한 물질이라 제기되어진다. 또한 산업에서 공통적으로 많이 사용되며 자연환경에서 영구적으로 존재하기 때문에 위험한 독성물질로 간주된다(Oliveira Ribeiro et al., 2006). 아직까지는 생체 내에서 납의 역할이 잘 알려져 있지는 않지만(Khan et al., 2014), 낮은 농도의 납에 노출되면 행동적으로 이상이 생기며, 학습, 인식, 청각에 장애가 나타나게 된다. 또한 납은 생체 내 비필수적이며 조직 내 축적시 신경독성, 혈액독성이 나타나며 생식계 또한 장애가 생기게 된다. 높은 농도에 노출되면 대부분의 장기와 중추신경계, 혈액이 비가역적 손상을 입게 되고(Palaniappan, 2008), 어류의 행동, 성장, 생식에 있어서 아치사적 변화나 폐사의 원인이 된다. 또한 납은 어류에게 근육위축, 척추측만, 마비, 꼬리지느러미의 흑화, 변성, 활동항진증, 불규칙한 유영, 평형유실 등을 나타나게 하는데(Burden et al., 1998), 꼬리지느러미 흑화 증상은 납의 신경독성에 의한 것이며 증상이 악화되면 척추측만 증상이 나타나게 되고 주위 근육의 위축이 발생하며 유영이 어려워지고 폐사에 이르게 된다(Hodson et al., 1978).

스트레스는 일반적으로 항상성을 교란시키면서 비특이적 면역반응을 나타나게 한다. 어류에게 영향을 미치는 스트레스의 원인은 비 생물적 환경요소(수온, pH, 용존산소, 오염물질 등), 생물적 요소(포식자, 기생충, 세균, 경쟁상대 등), 인위적인 요소(오염물질 배출, 소음발생, 어업 등) 등이 있다. 이런 원인들에 의해 어류는 스트레스를 받게 되며 이때 발생하는 스트

레스의 조절은 신경 및 호르몬이 담당하며 교감신경계의 활성화, 두신에서 스트레스 호르몬(에피네프린, 코티솔 등)을 분비 등의 방법으로 나타난다(Bonga, 1997). 스트레스에 대한 반응은 혈액 성분의 변화와 면역 기작의 변화를 포함하여 다양한 생리적 변화로 나타난다. 어류의 삼투압에 변화가 생기며 포도당이나 지방산 등의 에너지원의 농도가 변하고 각종 효소들의 활성이 증가하거나 감소하며 stress protein이 많아지며 체액성 면역 요소가 감소하게 된다(Witeska and Malgorzata, 2005). 스트레스는 적혈구의 수와 활성을 변화시키며 헤마토크릿과 RBC count, 헤모글로빈 등을 증감시킨다(Houston et al., 1996). 스트레스로 인한 삼투압 변화와 함께 세포안으로 전해질과 물의 유입이 많아져 세포질은 알칼리화 되며 혈청은 산성화가 되어 erythrocyte가 팽윤된다(Nikinmaa and Huestis, 1984). 중금속에 노출이 되면 앞서서와 같은 스트레스 반응이 유사하게 나타나며, 특히 혈액에서는 빈혈이 빈번히 나타난다. 백혈구 역시 그 수가 감소되며 특히 비특이적 면역을 담당하는 림프구와 대식세포의 감소가 나타나 면역 시스템을 상당히 손상시킨다(Witeska and Kosciuk, 2003).

납은 생물학적으로 비필수 요소이며 세포의 고분자와 상호작용하여 비가역적인 변화를 일으키며 병리학적, 생화학적, 행동학적으로 넓은 범위에 기능장애 독성을 유발한다(Oliveira Ribeiro et al., 2006). 혈액학적 시스템은 납이 독성을 일으키는 표적 중 하나이다. 납은 적혈구의 구성요소를 변화시키며, 헤모글로빈의 합성을 억제한다(Gurer et al., 1998). 또한 먹이 내 납 농도가 높아질수록 RBC count, 헤모글로빈, 헤마토크릿이 감소된다(Iavicoli et al, 2003). 이는 납이 헤모글로빈의 산소와의 친밀성을 감소시키며 erythrocyte를 불안정하게 만들고 세포의 투과성을 높여 세포의 팽윤을 일으켜 손상을 주기 때문이다(Witeska and Kosciuk, 2003). 중금속에

노출이 되면 어류 내 코티졸의 농도가 증가하게 되며 이는 WBC가 증가하게 되는 원인이 된다. 헤마토크릿, 헤모글로빈, RBC count, WBC count 등의 혈액학적 실험은 생물 전신의 병리생리학적 지표로 관련되며 독성에 노출된 어류의 구조적, 기능적 지표로서 아주 중요하며(Adhikari et al., 2004), 성의 지표로 수계동물의 독성과 환경검사로 이용된다(Sancho et al., 2000).

오염물질들은 산화스트레스를 일으켜 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)를 발생시켜 독성을 나타낸다. 산소는 세포에 있어서 아주 중요한 요소이긴 하지만 ROS가 세포의 호흡과정에 발생하여 산화스트레스로 작용, cytotoxic problem을 증가시킨다(Fuente and Victor, 2000). 과도한 양의 ROS는 세포를 공격하며 세포막의 지질, 단백질, 탄수화물, 핵산 등을 산화시켜 세포가 파괴되게 한다. 산화스트레스는 패혈성 쇼크 같은 병리학적 원인이나(Galley et al, 1997), 노화, 항산화제의 감소 등의 원인이 된다(Meydani et al, 1998). 어류에서는 조직 내 중금속이 축적되면 ROS를 발생시키는 산화 환원 반응이 일어난다(Zhang et al., 2007). 납에 중독이 되면서 발생한 ROS가 DNA에 영향을 주며 세포의 방어기작에 쇠퇴를 일으킨다는 보고도 있었다(Farmand et al., 2005). 하지만 생물들은 세포 내에서 발생하는 ROS를 제거하여 몸을 보호할 수 있는 항산화 기작을 가지고 있으며 다양한 항산화 효소들이 작용하게 된다(Mourente et al., 2002). 항산화효소로는 catalase(CAT), Glutathione peroxidase(GPX), glutathione S-transferase(GST), glutathione reductase(GR) 그리고 superoxide dismutase(SOD)등이 있으며 이들은 활성산소가 발생하게 되면 몸을 보호하는 중요한 역할들을 한다. 초기 항산화 효소로 SOD는 superoxide radical(O_2^-)를 과산화수소(H_2O_2)로 바꾸는 과정을 촉매하며 과산화수소를

CAT가 물과 산소로 바뀌 제거한다. GSH와 GPX 또한 이 과정에서 과산화수소를 제거하는 역할을 한다. 그리고 GR은 GSH의 작용 이후 전환된 GSSG를 GSH로 다시 전환시킨다. GST는 강한 수산기(OH-)같은 전자친화성 기질을 glutathione에 결합시키는 반응을 촉매하여 독성을 제거한다 (Atli and Canli, 2010). 항산화기작은 산화스트레스와 관련하며 환경독성학적으로 매우 관심이 높다. 따라서 항산화효소는 수질, 저질, 먹이 등의 독성을 나타내는 중요한 지표이자 어류에게 발생하는 위해요소의 생체지표이다(Geoffroy et al., 2004).

Acetylcholine(Ach)은 감각계와 신경계에서 주된 신경전달물질이며 감각계와 신경계의 활성화는 일반적인 움직임이나 근육의 기능에서 필수적이다. Acetylcholinesterase(AChE)은 어류에서 콜린성 신경계의 주요 구성 요소이며 Ach를 분해함으로써 콜린성 시냅스의 신경 자극 전달을 억제할 수 있다. AChE activity는 일반적으로 뇌와 근육에서 측정하며 이는 어류의 신경근계가 주로 콜린성으로 이루어져 있고, AChE는 근육의 행동과 기능에 필수적이기 때문이다. AChE는 어류에서 근육보다 뇌에 훨씬 더 많이 존재하며(Ferrari et al., 2007), 뇌는 독성물질이 신경독성 효과를 나타낼 수 있는 주된 대상이 된다. AChE 효소의 억제는 ACh의 생산을 높이며 신경과 근섬유에 지속적이거나 광대한 자극이 주어지면서 근육경직과 마비 등이 발생하며 최종적으로는 죽음에 이르게 된다(Kirby et al, 2000). AChE activity는 어류가 유기화합물, 중금속, 기타 화학물질 등에 의한 신경독성에 영향을 받을 때 변하게 되며 중요한 생물지표 중 하나이다 (Modesto and Martinez, 2010).

면역은 생물에게 중요한 방어기작으로 감염을 막고 체내의 항상성을 유지시켜준다. 중금속은 수계환경 속의 생물들에게 면역체계를 교란시키는

핵심적인 물질이다. 면역의 핵심 기능은 신체구성성분과는 다른 위험한 성분들(바이러스, 세균, 기생충)로부터 몸을 보호하기 위해 면역세포를 분화시키거나 증식시킨다. 하지만 중금속 같은 독성 물질에 중독되면 면역 시스템의 성분들이 교란되며 이로 인해 면역 기능이 피해를 입어 자가면역질환이나 면역억제가 발생 한다(Sanchez Dardon et al, 1999). 면역체계는 체내에 들어오는 모든 이물에 대해 항상 일정한 유형으로 반응하는 비특이적 면역과 특정 항원에 대한 특정 항체를 생산해내는 특이적 면역으로 나뉘는데, 어류는 대부분 비특이적 면역에 의존한다. 비특이적 면역은 생물 내 가장 처음으로 반응하는 면역으로 작용하는 효소 중 lysozyme이 있다. Lysozyme은 어류 내 백혈구에서 생산되며 그람음성세균의 세포벽에 존재하는 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine과의 결합을 가수분해시킴으로 세포벽을 파괴하고 식작용을 도와주는 역할을 한다(Saurabh and Sahoo., 2008). Lysozyme은 비특이적 면역의 중요한 항목이자 수계 스트레스에 의한 면역반응의 지표로 사용되어진다(Tapia-Paniagua et al., 2011).

우리나라 해산어류 양식생산량 중 성장이 빠르고 고밀도 사육이 가능한 넙치, *Paralichthys olivaceus*가 51.1%를 차지한다. 이러한 양식 생산 구조는 매년 초과생산을 초래하게 되어 가격이 하락하고 소비되지 않는 어류는 싼값에 어분생산 공장에 팔려가는 실정이라 양식어가는 경제적 어려움을 피할 수 없게 되었다. 따라서 넙치를 대체할 새로운 양식품종 개발에 관심이 집중되며 최근 강도다리, *Platichthys stellatus*가 양식어종으로 대두되고 있다.

어류가 생체의 구성성분들을 흡수하는 경로는 먹이와 아가미이다. 이 두 가지 경로를 통해 축적물질을 흡수하게 되며 그 밀도와 농도에 따라 축적 정도가 달라진다(Ciardullo Silvia et al, 2008). 수계 환경에서는 중금속이

주로 먹이연쇄를 통해 생체축적이 발생한다(Dural et al., 2007). 따라서 본 실험은 아직 연구가 많이 되지 않은 어류인 강도다리에게 납을 먹이에 노출시켜 납의 축적과 제거, 항산화효소, 혈액학적 성분 및 면역 반응에 대한 독성을 확인하고 강도다리의 민감성을 판단하기 위해 실시하였다.



II. 재료 및 실험방법

1. 실험어 및 실험환경

본 실험에 사용한 실험어는 기장 동백리에서 구입한 강도다리, *Platichthys stellatus*로 1주간 순치시킨 후 제조된 사료로 보름간 입불힘을 하였다. 체중 160.15 ± 15 g, 전장 20 ± 2 cm의 외관상 건강한 개체를 사용하였다. 선별된 개체는 250L 원형수조에 입식하여 시간당 250L의 환수율로 사육하였고 12시간 간격으로 광주기를 조절하였으며 하루 2회 체중의 1%만큼 급이 하였다. 실험에 사용된 해수의 수질은 Table. 1과 같다.

실험을 위해 만든 사료 성분은 Table. 2와 같다. Pb노출을 위한 lead premix는 Lead (II) nitrate(Sigma chemical Co., LTD) 1g과 셀룰로오스 99g을 혼합하였다. 사료성분과 lead premix를 철저하게 배합하여 낱의 농도가 0, 30, 60, 120, 240 mg/kg 되도록 하였다. 이를 물과 혼합하여 반죽을 하고 기계로 정형하여 실온에 24시간 말렸으며 -20°C 에서 보관하였다. 사료의 납 함유량을 확인하기 위해 ELAN 6600DRC ICP-MS 장비를 이용하였고, standard curve는 ICP multi-element standard solution VI를 이용하였다.

총 사육기간은 6주이며 4주까지 납이 함유된 사료를 급이 하였으며 4주부터 6주까지는 납이 함유되지 않은 Control사료를 급이 하였다.

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

Item	Value
Temperature (°C)	13.0 ± 0.8
pH	8.1 ± 0.4
Salinity (‰)	32.2 ± 0.8
Dissolved Oxygen (mg/L)	7.1 ± 0.3
Chemical Oxygen Demand (µg/L)	1.24 ± 0.2
Ammonia(mg/L)	11.9 ± 0.9
Nitrite (mg/L)	1.3 ± 0.2
Nitrate (mg/L)	11.31 ± 1.0

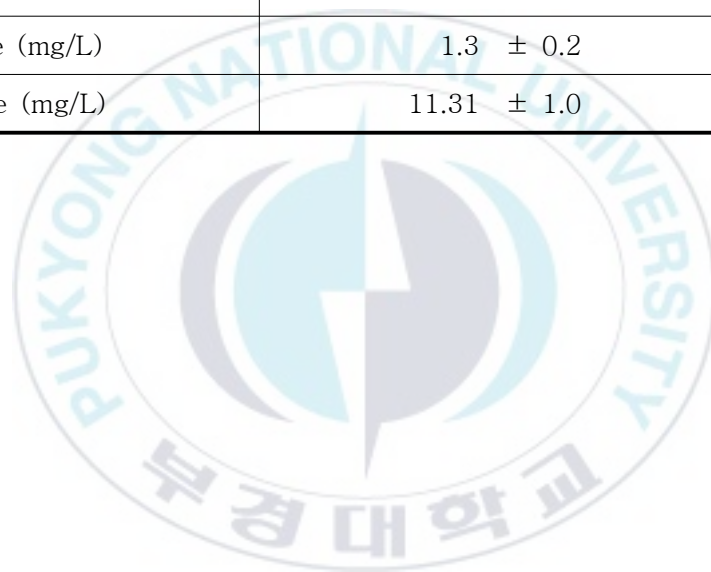


Table. 2) Formulation of the experimental diet (% dry matter).

Ingredient (%)	Lead concentration (mg/kg)				
	0	30	60	120	240
Casein ¹	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
Fish meal ²	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0
Wheat flour ³	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Fish oil ⁴	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cellulose ¹	5.0	4.7	4.4	3.8	2.6
Corn starch ³	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Vitamin premix ⁵	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Mineral premix ⁶	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Lead premix ⁷	0.0	0.3	0.6	1.2	2.4
Actual lead concentration	1.8	31.4	62.1	118.8	244.5

1.United States Biochemical (Cleveland, OH).

2.Suhyup Feed Co., Ltd., Gyeong Nam Province, Korea.

3.Young Nam Flour Mills Co., Pusan, Korea.

4.Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

5.Vitamin premix(mg/kg diet): ascorbicacid, 240; dl-calciumpanthothenate, 400; cholinechloride, 200; inositol, 20; menadione, 2; nicotinamide, 60; pyridoxine • HCl, 44; riboflavin, 36; thiamine mononitrate, 120; dl-a-tocopherolacetate, 60; retinyl acetate, 20,000IU; biotin, 0.04; folicacid, 6; vitaminB12, 0.04; and cholecalcifero, 4000IU.

6.Mineral premix(mg/kg diet): Al, 1.2; Ca, 5000; Cl, 100; Cu, 5.1; Co, 9.9; Na, 1280; Mg, 520; P, 5000; K, 4300; Zn, 27; Fe, 40; I, 4.6; Se, 0.2; and Mn, 9.1.

7.Lead premix(mg/kg diet): 10,000mg Pb/kg diet.

2. Bioaccumulation

모든 장기들은 동결건조를 한 후 건조중량(Dry weight)을 측정하였다. 시료분해는 wet digestion method를 이용하여 각 시료들을 65%(v/v) HNO_3 에 용해시킨 후, 120°C 로 가온하여 재건조하였다. 이 과정을 유기물이 완전히 분해되도록 반복하였다. 유기물이 완전히 분해된 후 건조된 시료에 2%(v/v) HNO_3 를 넣어 용해시켰다. 이 시료들을 membrane filter (Advantec mfs, Ins. $0.2\mu\text{m}$)를 이용하여 필터링한 후 분석을 하였다.

시료 내 납 함유량을 측정하기 위해 ELAN 6600DRC ICP-MS(Perkin Elmer) 장비를 이용하였고, standard curve는 ICP multi-element standard solution VI를 이용하였다. 장기 내 납 함유량은 $\mu\text{g/g}$ dry wt로 표시하였다.

3. 전혈

실험어의 혈액이 응고됨을 방지하기 위해 heparin-Na (5,000 I.U., 중외제약)을 처리한 1회용 주사기를 사용하여 미부정맥에서 채취하였다. 채취한 혈액으로 RBC(Red Blood Cell) count, WBC(Whithe blood cell) count, hemoglobin (Hb) 농도 및 hematocrit (Ht)을 즉시 분석하였다. RBC count와 WBC count는 Hendrick's diluting soluton으로 혈액을 400배 희석 후, hemo-cytometer (Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학현미경으로 계수 후 다시 희석 배수를 곱하여 계산하였다. Ht는 Ht 모세관 내로 혈액을 넣어, microhematocrit centrifuge(Model; 01501, HAWKSLEY AND SONS Ltd., England)에서 12,000rpm, 5분간 원심분리 후 관독판(Micro-Haematocrit reader, HAWKSLEY AND SONS Ltd., England)으로 측정하였다. Hb 농도는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하여 Cyan-methemoglobin법으로 측정하였다.

4. 혈청

채취한 혈액은 4°C, 3000g로 5분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청으로 무기성분, 유기성분, 효소활성의 변화를 보았다.

무기성분으로는 칼슘 (Calcium), 마그네슘 (Magnesium)을 측정하였다. 칼슘은 OCPC법, 마그네슘은 Xylidyl blue- I 법에 의해 시판되고 있는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하였다.

유기성분으로는 혈당 (Glucose), 총단백질 (Total protein) 을 측정하였다. 혈당은 GOD/POD법, 총단백질은 Biuret법에 의하여 임상용 kit(Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하였다.

혈청 내 효소활성으로는 GOT (Glutamic oxalate transminase), GPT (Glutamic pyruvate transminase), ALP (Alkaline phosphatase)를 측정하였다. GOT와 GPT는 Reitman-Frankel법, ALP는 Kind-king법에 의하여 임상용 kit(Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하였다.

5. 항산화효소 분석

조직의 효소활성을 측정하기 위해 homogenizing buffer (0.1M PBS, pH 7.4)로 세척 후, homogenizing buffer (0.1M PBS, pH 7.4)로 teflon-glass homogenizer (099CK4424, Glass-Col, Germany)를 이용하여 균질화하였다. 이것을 4°C, 10000g로 60분간 원심분리하여 상등액을 실험에 사용하였다. 모든 상등액은 실험전까지 -75°C (MDF-U53V, SANYO Electric Co. Ltd., Japan)에 보관하였다.

5-1. Superoxide dismutase (SOD)

SOD 활성은 WST-1의 환원에 대한 50% inhibitor rate로 측정하는 SOD Assay kit - WST (Dojindo Co., Japan)를 이용하였다. 예비 실험으로 sample을 0.1M PBS에 5배수 씩 희석한 다음 50% inhibitor rate가 위치하는 농도를 확인한 후 25, 125, 625 배수 씩 희석한 농도를 실험에 사용하였으며 효소의 반응 시간을 고려해 두 구간씩 실험하였다. 실험에 사용한 solution은 WST working solution, Enzyme working solution, Sample solution이며 증류수와 Dilution buffer를 사용하였으며 분광광도계를 이용하여 450nm에서 측정하였다.

50% inhibitor rate(SOD activity)

$$= \frac{[(\text{blank1} - \text{blank3}) - (\text{sample} - \text{blank2})]}{(\text{blank1} - \text{blank3})} \times 100$$

위 식으로 50% 억제 농도를 구하여 unit/ mg protein으로 표시하였다.

5-2. Glutathione s-transferase (GST)

GST 활성은 Habig (1974)의 방법을 변형하여 측정하였다.

사용한 시약은 0.2M PBS buffer pH6.5, 10mM GSH, 10mM CDNB 을 사용하였다.

희석 배수는 가장 변화량이 높았던 5배 희석한 농도를 사용하였고, 실온에서 분광광도계를 이용해 흡광도 450nm로 30초 간격으로 5분간 반응을 측정하여 변화가 가장 많은 구간을 사용, nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

5-3. Glutathione (GSH)

Reduced glutathione 함량은 Beutler 등 (1963)의 방법을 이용하였다.

사용된 시약은

DTNB solution (DTNB 40mg + 1% sodium citrate 100ml),

Phosphate solution (0.3M Na₂HPO₄ solution, 4.26g/100ml),

Precipitation solution (metaphosphoric acid 0.835g + Na₂EDTA 0.1g + sodium chloride 15g + 0.1M PBS buffer 50ml)

이며, sample과 혼합 후 암소에서 15분간 발색시켜 분광광도계를 이용하여 412nm에서 측정하였다.

GSH 함량은 L-Glutathione reduced, Minimum 98% (Sigma aldrich Co., Korea)로 reduced glutathione standard curve를 그려 이를 이용하여 측정하였고, nmol GSH/mg protein으로 표시하였다.

6. Acetylcholinesterase activity

AChE activity는 Ellman 등 (1961)의 실험방법을 따랐다. AChE activity를 확인하기 위해 모든 장기를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)와 1:10의 비율로 균질화 하여 4℃에서 10,000 g로 20분간 원심분리를 실시 후 상층액을 추출하여 실험에 사용하였다. AChE activity는 acetylthiocholine iodide (ACSCH, 0.88mM)이 sample에 의해 가수분해 되는 정도로 확인하며 분광광도계로 412nm에서 5분 동안 1분 간격으로 이를 측정하였고 nmol/min/mg protein으로 표시하였다. 모든 protein농도는 Bradford 등 (1976)의 방법을 따랐으며 bovine serum albumin (Sigma, USA)을 standard로 사용하였다.



7. Lysozyme activity

Turbidimetric method (Ellis, 1990)를 이용하여 lysozyme 활성을 확인하여 혈청 내 lysozyme 농도를 측정하였다. *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma)와 0.05 M phosphate buffer (pH6.2)를 혼합하여 혈청과의 반응을 30초, 4분 30초 간격으로 분광광도계에서 530nm로 확인하였다. Lyophilized hen egg white lysozyme (Sigma)를 이용하여 standard curve를 만들었으며 결과는 hen egg white lysozyme activity와 동등하게 $\mu\text{g/ml}$ 로 표시하였다.



8. 유의성 검정

실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램 (IBM SPSS Statistics 20)을 이용, ANOVA test를 실시하여 DUncan's multiple range test를 통해 $P < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.



Ⅲ. 결 과

1. Bioaccumulation 분석

납에 노출된 강도다리의 뇌와 근육, 간, 비장, 신장, 장, 아가미의 납의 축적은 Fig. 1-7에 나타내었다.

뇌에서는 2주차와 4주차의 240 mg/kg 농도에서 유의적인 변화가 있었으며 회복기간(depuration period)이후에는 유의적인 변화가 없었다.

근육에서는 2주차에서 유의적인 변화가 없었고 4주차에서 240 mg/kg 농도에서 유의적인 변화가 있었으며 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 없었다.

간에서는 2주차, 4주차 모두 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었으며 회복기간 이후에도 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었다.

비장에서는 2주차의 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었고 4주차에서는 30 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었으며 회복기간 이후에는 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었다.

신장에서는 2주차의 60 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었고 4주차에서는 30 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었으며 회복기간 이후에는 30 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었다.

장에서는 2주차의 60 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었고 4주차에서는 30 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었으며 회복기간 이

후에는 60 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었다.

아가미에서는 2주차의 60 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었고 4주차에서는 30 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었으며 회복기간 이후에는 60 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화가 있었다.



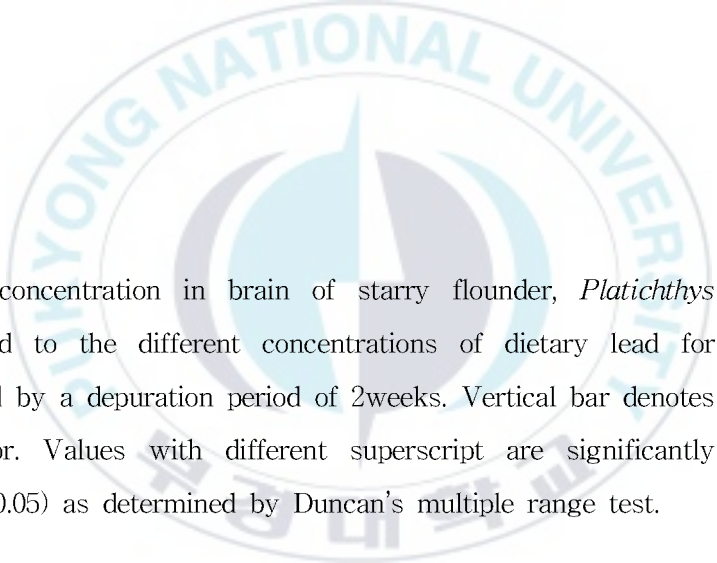


Figure. 1 Pb concentration in brain of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

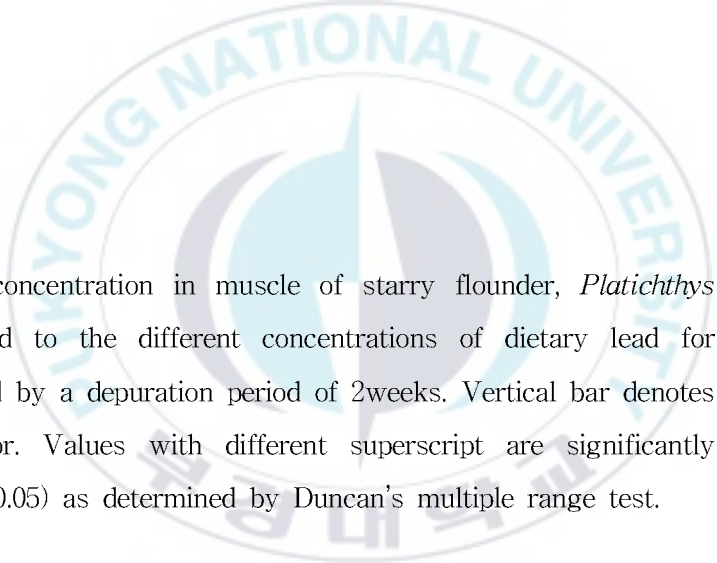


Figure. 2 Pb concentration in muscle of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

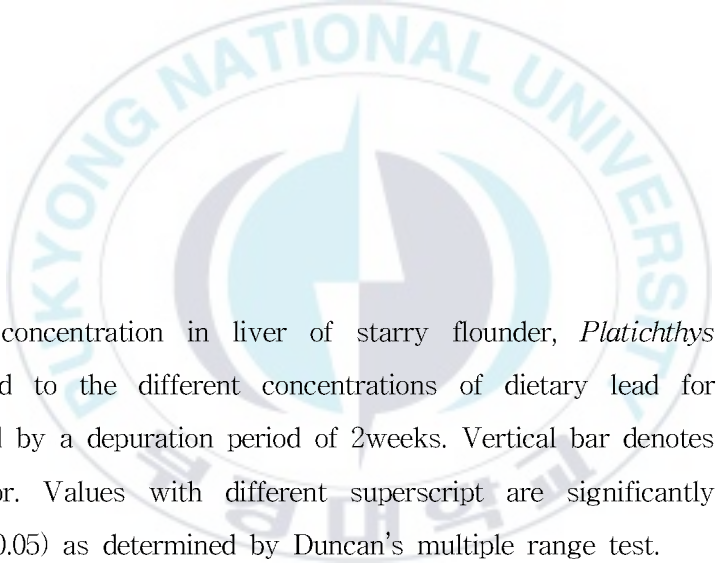


Figure. 3 Pb concentration in liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

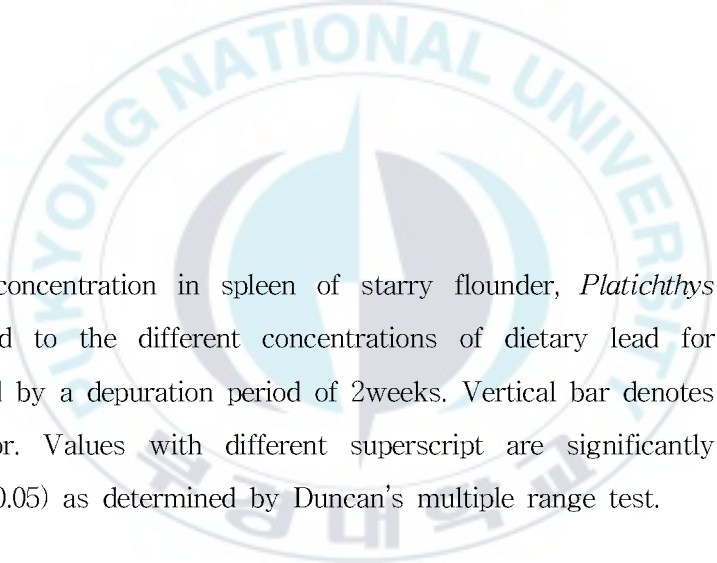


Figure. 4 Pb concentration in spleen of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

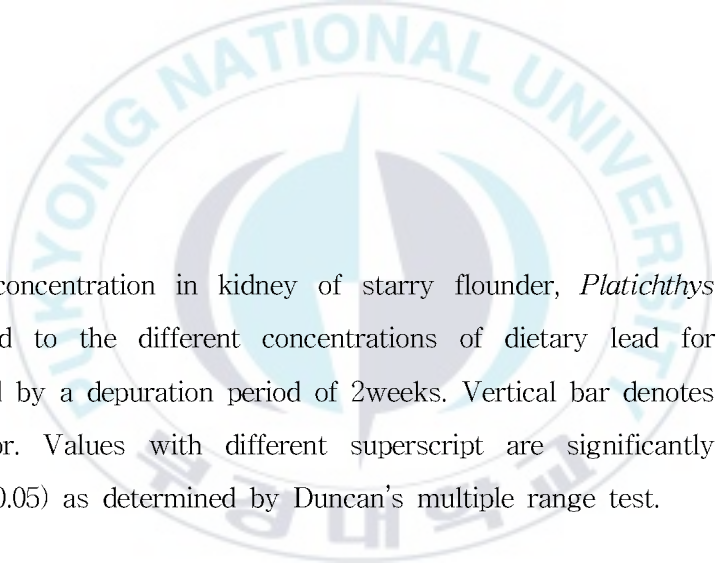


Figure. 5 Pb concentration in kidney of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

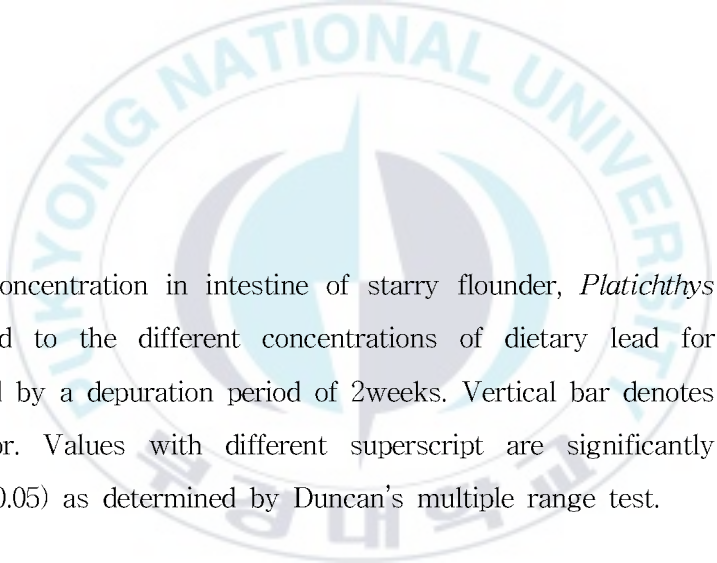


Figure. 6 Pb concentration in intestine of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

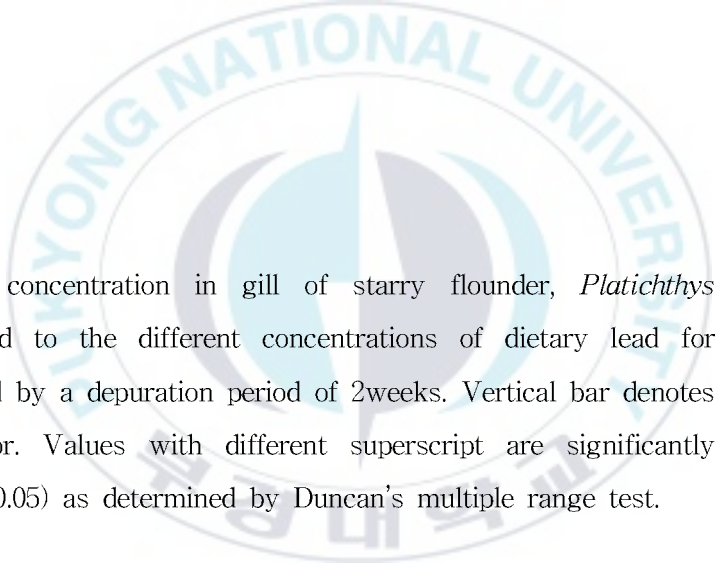


Figure. 7 Pb concentration in gill of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

2. 혈액 성분 분석

납에 노출된 강도다리의 혈액 성분 변화는 Table. 3에 나타내었다.

RBC count실험 결과 2주차에서는 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났으며 4주차에서는 240 mg/kg에서 유의적인 감소가 나타났고 회복기간 이후에는 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났다.

Hematocrit실험 결과 2주차와 4주차에서 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났으며 회복기간 이후에도 240 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났다.

Hemoglobin실험 결과 2주차와 4주차에서 240 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났으며 회복기간 이후에는 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났다

Table. 1 Changes of RBC count, Hematocrit and Hemoglobin in starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks.

Parameters	Period (weeks)	Lead concentration (mg / kg)				
		0	30	60	120	240
RBC count ($\times 10^4 \text{mm}^3$)	2	263.3 $\pm$ 10.46 ^a	262.7 $\pm$ 10.90 ^{ab}	242.4 $\pm$ 10.02 ^{bc}	230.7 $\pm$ 10.13 ^c	194.0 $\pm$ 15.10 ^c
	4	266.5 $\pm$ 5.98 ^a	256.0 $\pm$ 12.54 ^a	235.0 $\pm$ 15.54 ^{ab}	204.5 $\pm$ 9.98 ^{bc}	190.0 $\pm$ 17.44 ^c
	6(Depuration)	263.3 $\pm$ 8.77 ^a	253.3 $\pm$ 14.69 ^a	255.3 $\pm$ 10.03 ^a	208.0 $\pm$ 11.78 ^b	198.0 $\pm$ 12.97 ^b
Hematocrit (%)	2	30.50 $\pm$ 1.73 ^a	29.25 $\pm$ 2.36 ^a	29.00 $\pm$ 4.58 ^a	22.67 $\pm$ 4.73 ^{ab}	19.01 $\pm$ 3.46 ^b
	4	30.66 $\pm$ 4.16 ^a	24.67 $\pm$ 3.79 ^{ab}	25.33 $\pm$ 3.06 ^{bc}	22.67 $\pm$ 3.31 ^{bc}	19.33 $\pm$ 2.59 ^c
	6(Depuration)	27.33 $\pm$ 5.52 ^a	30.33 $\pm$ 5.00 ^a	25.00 $\pm$ 3.12 ^{bc}	24.33 $\pm$ 2.58 ^{bc}	20.32 $\pm$ 2.52 ^c
Hemoglobin (g/dL)	2	6.09 $\pm$ 0.23 ^a	5.85 $\pm$ 0.32 ^{ab}	5.72 $\pm$ 0.50 ^{ab}	5.55 $\pm$ 0.57 ^{ab}	5.36 $\pm$ 0.30 ^b
	4	5.95 $\pm$ 0.14 ^a	6.08 $\pm$ 0.28 ^a	5.60 $\pm$ 0.32 ^{ab}	5.29 $\pm$ 0.32 ^{bc}	4.83 $\pm$ 0.23 ^c
	6(Depuration)	5.82 $\pm$ 0.05 ^a	5.87 $\pm$ 0.27 ^a	5.64 $\pm$ 0.11 ^a	5.23 $\pm$ 0.25 ^b	5.02 $\pm$ 0.24 ^b

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

3. 혈청 성분 분석

납에 노출된 강도다리의 혈청 성분 변화는 Table. 4-6에 나타내었다.

혈청 내 무기 성분으로는 칼슘과 마그네슘을 분석하였다.

칼슘 분석 결과 2주차에서는 120 mg/kg농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났으며 4주차에서는 60 mg/kg농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났고, 회복기간 이후에는 240 mg/kg농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났다.

마그네슘 분석 결과 2주차에서는 120 mg/kg농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났으며 4주차에서는 60 mg/kg농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났고, 회복기간 이후에는 240 mg/kg농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났다.

혈청 내 유기 성분으로는 글루코즈와 총단백질을 분석하였다.

글루코즈 분석 결과 2주차와 4주차 모두 60 mg/kg농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났고, 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

총단백질 분석 결과 2주차에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았으며 4주차에서는 120 mg/kg농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났고, 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

혈청 내 효소활성의 변화는 GOT, GPT, ALP를 분석하였다.

GOT 분석 결과 2주차에서는 240 mg/kg농도에서 유의적인 증가가 나타났으며 4주차에서는 120 mg/kg농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났고, 회복기간 이후에는 240 mg/kg농도에서 유의적인 증가가 나타났다.

GPT 분석 결과 2주차에서는 240 mg/kg농도에서 유의적인 증가가 나타났으며 4주차에서는 120 mg/kg농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났고, 회복기간 이후에는 240 mg/kg농도에서 유의적인 증가가 나타났다.

ALP 분석 결과 2주차와 4주차에서는 240 mg/kg농도에서 유의적인 증가가 나

타났으며 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.



Table. 2 Changes of serum calcium and magnesium in starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks.

Parameters	Period (weeks)	Lead concentration (mg / kg)				
		0	30	60	120	240
Calcium (mg/dL)	2	8.82±0.76 ^a	8.73±0.20 ^a	8.23±0.32 ^a	7.45±0.21 ^b	5.56±0.18 ^c
	4	9.44±0.67 ^a	8.63±0.20 ^a	6.03±0.35 ^b	4.44±0.21 ^c	3.69±0.48 ^c
	6(Depuration)	9.58±0.40 ^{aa}	9.60±0.42 ^a	9.21±0.91 ^a	9.06±0.29 ^a	8.39±0.17 ^b
Magnesium (mg/dL)	2	3.94±0.23 ^a	3.86±0.28 ^{ab}	3.61±0.18 ^{bc}	3.49±0.21 ^c	3.38±0.15 ^c
	4	3.82±0.21 ^a	3.80±0.02 ^a	3.52±0.02 ^b	3.38±0.12 ^c	2.89±0.21 ^d
	6(Depuration)	3.72±0.02 ^a	3.76±0.06 ^a	3.65±0.06 ^a	3.62±0.03 ^a	3.43±0.08 ^b

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

Table. 3 Changes of serum glucose, albumin, cholesterol, and total protein in starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks.

Parameters	Period (weeks)	Lead concentration (mg / kg)				
		0	30	60	120	240
Glucose (mg/dL)	2	96.11±3.92 ^a	96.85±5.63 ^a	104.38±4.70 ^b	107.63±4.10 ^b	110.16±4.99 ^b
	4	96.32±4.48 ^a	95.92±4.46 ^a	108.16±5.38 ^b	119.92±5.69 ^c	123.70±4.68 ^c
	6(Depuration)	97.05±4.44 ^a	97.42±4.46 ^a	99.16±5.38 ^a	98.92±5.69 ^a	100.50±4.68 ^a
Total protein (g/dL)	2	2.81±0.18 ^a	3.08±0.17 ^a	2.80±0.10 ^a	2.85±0.16 ^a	2.89±0.11 ^a
	4	2.96±0.21 ^a	3.08±0.18 ^a	3.00±0.12 ^a	2.54±0.13 ^b	2.05±0.11 ^c
	6(Depuration)	2.71±0.19 ^a	2.72±0.10 ^a	2.80±0.14 ^a	2.69±0.15 ^a	2.75±0.14 ^a

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

Table. 4 Changes of serum GOT, GPT and ALP in starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks.

Parameters	Period (weeks)	Lead concentration (mg / kg)				
		0	30	60	120	240
GOT (karmen unit)	2	22.33±5.46 ^a	25.07±2.75 ^{ab}	26.25±2.76 ^{ab}	28.45±3.74 ^{ab}	30.92±4.66 ^b
	4	21.70±2.03 ^a	24.00±1.18 ^a	25.58±2.57 ^{ab}	29.20±0.81 ^b	32.85±3.01 ^c
	6(Depuration)	22.48±2.64 ^a	23.78±3.69 ^a	22.27±1.84 ^a	24.75±4.58 ^a	29.57±4.87 ^b
GPT (karmen unit)	2	15.23±1.74 ^a	14.09±0.52 ^{ab}	16.69±2.39 ^{ab}	17.28±2.42 ^{ab}	21.96±1.77 ^b
	4	14.58±1.64 ^a	20.23±2.27 ^{ab}	19.60±1.67 ^{ab}	22.69±1.47 ^b	23.91±2.40 ^b
	6(Depuration)	15.35±1.42 ^a	17.72±3.44 ^a	16.01±1.82 ^a	16.07±1.80 ^a	23.88±2.60 ^b
ALP (K-A)	2	4.32±0.11 ^a	4.58±0.19 ^{ab}	4.79±0.18 ^{bc}	4.74±0.12 ^{bc}	4.99±0.28 ^c
	4	4.14±0.15 ^a	4.31±0.22 ^{ab}	4.30±0.10 ^{ab}	4.59±0.25 ^{bc}	4.69±0.14 ^c
	6(Depuration)	4.24±0.11 ^a	4.18±0.19 ^a	4.26±0.18 ^a	4.26±0.19 ^a	4.18±0.20 ^a

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

4. 항산화효소 분석

4-1. Superoxide dismutase(SOD) activity

납에 노출된 강도다리의 간과 아가미, 신장 내 SOD 활성 결과를 Fig. 8-10 에 나타내었다.

간에서는 2주차에서 120 mg/kg, 4주차에서 60 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났으며 회복기간 이후에도 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났다.

신장에서는 2주차와 4주차 모두 240 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났으며 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

아가미에서는 2주차와 4주차 모두 240 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났으며 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

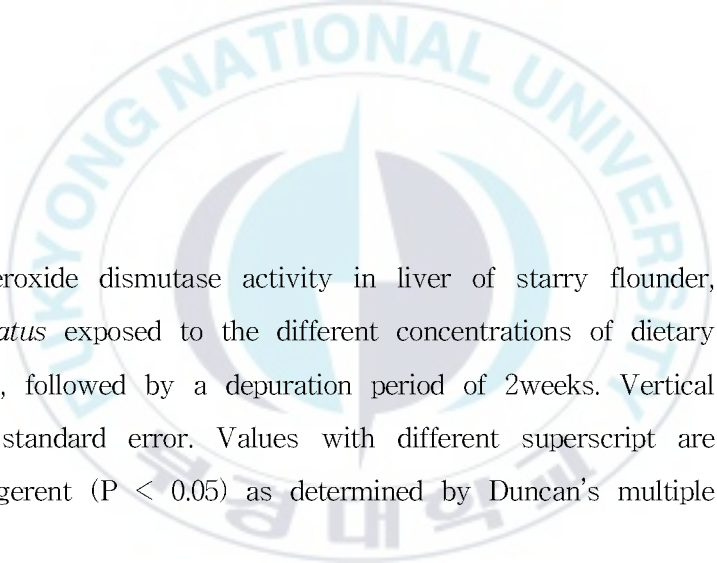


Figure. 8 Superoxide dismutase activity in liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

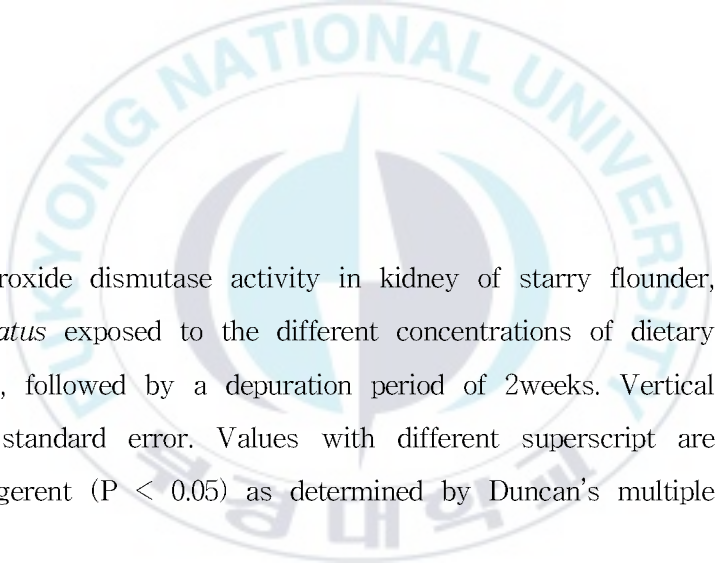


Figure. 9 Superoxide dismutase activity in kidney of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

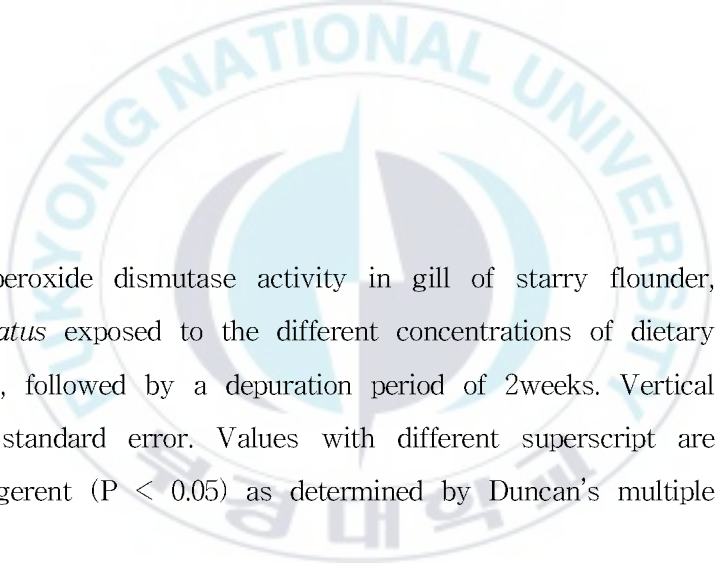


Figure. 10 Superoxide dismutase activity in gill of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

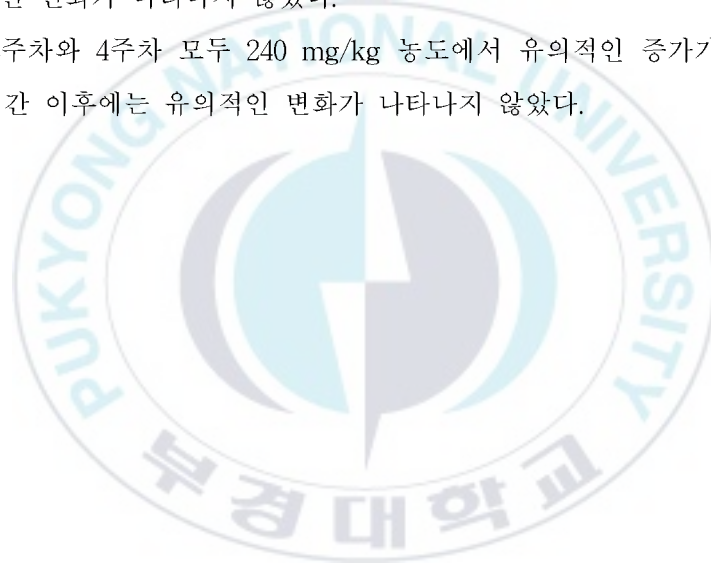
4-2. Glutathione(GSH) level

납에 노출된 강도다리의 간과 아가미, 신장 내 Glutathione 함량은 Fig. 11-13에 나타내었다. 증가가 나타났다.

간에서는 2주차에서 240 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났으며 4주차에서 60 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났고, 회복기간 이후에는 240 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났다.

신장에서는 2주차에서 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났으며 4주차에서 240 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났고, 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

아가미에서는 2주차와 4주차 모두 240 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났고, 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.



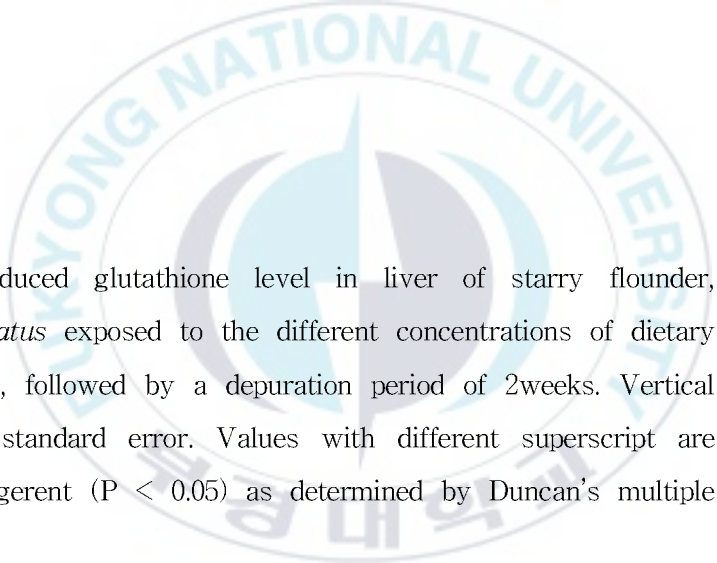


Figure. 11 Reduced glutathione level in liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

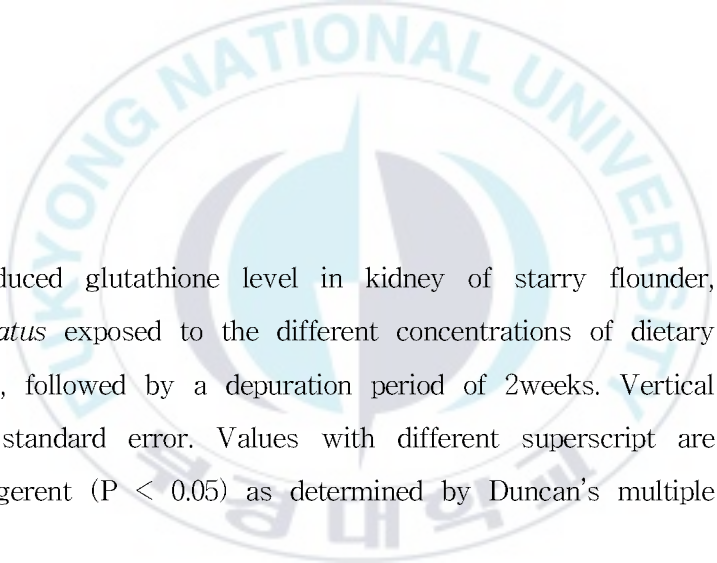


Figure. 12 Reduced glutathione level in kidney of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

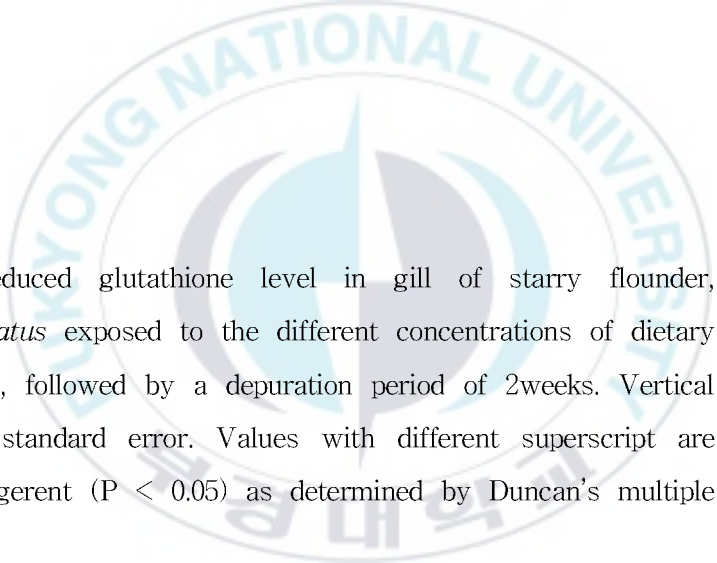


Figure. 13 Reduced glutathione level in gill of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

4-3. Glutathione S-transferase(GST) activity

납에 노출된 강도다리의 간과 아가미, 신장 내 GST 활성 변화는 Fig. 14-16에 나타내었다.

간에서는 2주차에서 60 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났으며 4주차에서 240 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났고, 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

신장에서는 2주차와 4주차 모두 60 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났고, 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

아가미에서는 2주차에서 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났으며 4주차에서 60 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났고, 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.



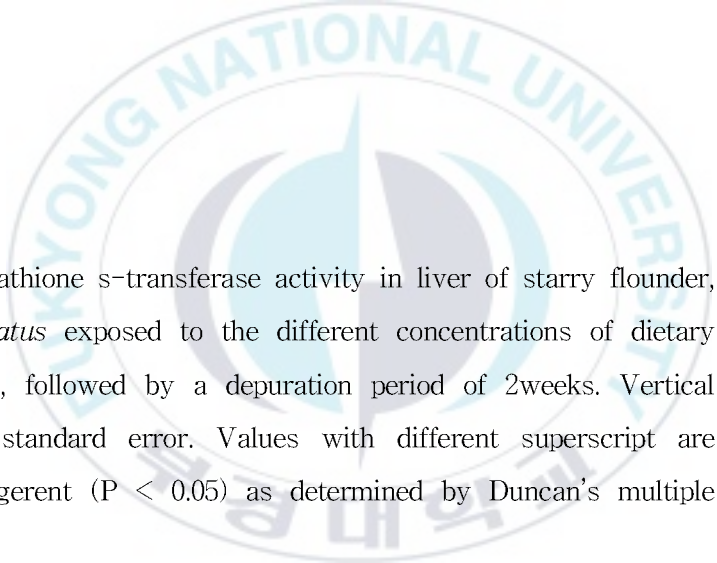


Figure. 14 Glutathione s-transferase activity in liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

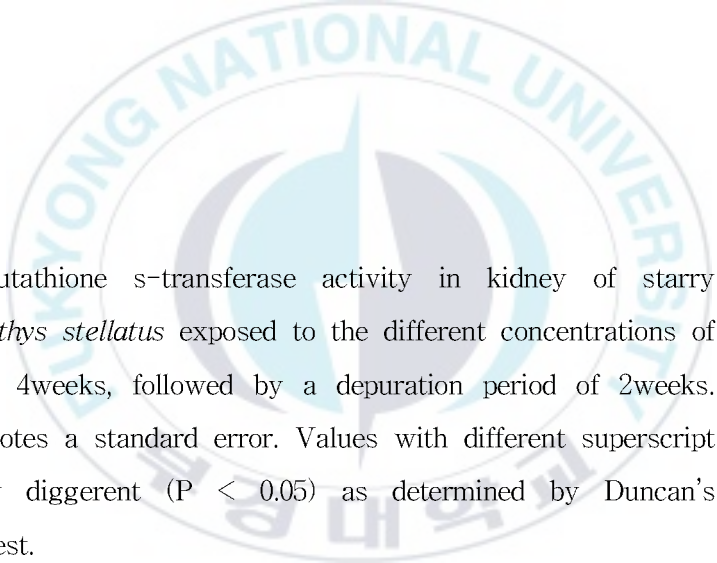


Figure. 15 Glutathione s-transferase activity in kidney of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

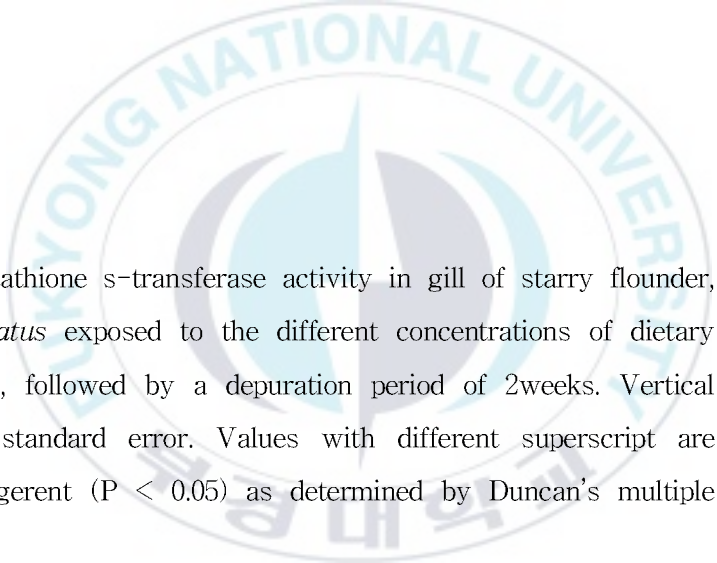


Figure. 16 Glutathione s-transferase activity in gill of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

5. Acetylcholinesterase activity

납에 노출된 강도다리의 뇌와 근육, 간, 비장, 신장, 장, 아가미의 acetylcholinesterase activity는 Fig. 17-23에 나타내었다.

뇌에서는 2주차에서 120 mg/kg, 4주차에서 30 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났으며 회복기간 이후에는 60 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났다.

근육에서는 2주차에서 240 mg/kg, 4주차에서 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났으며 회복기간 이후에는 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났다.

간에서는 2주차와 4주차, 회복기간 이후 모두 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

비장에서는 2주차와 4주차, 회복기간 이후 모두 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

신장에서는 2주차에서 유의적인 변화가 나타나지 않았으며 4주차에서 240 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났고, 회복기간 이후에는 240 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났다.

장에서는 2주차에서 240 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났으며 4주차에서 120 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났고, 회복기간 이후에는 240 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났다.

아가미에서는 2주차에서 유의적인 변화가 나타나지 않았으며 4주차에서 240 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났고, 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

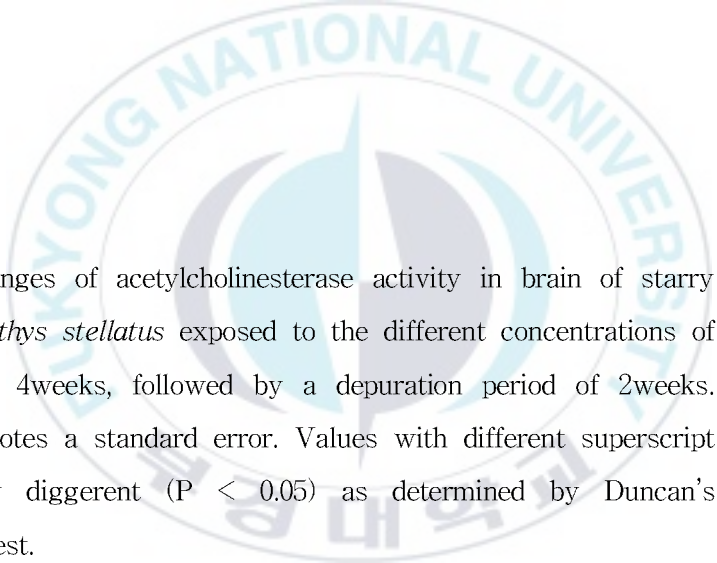


Figure. 17 Changes of acetylcholinesterase activity in brain of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

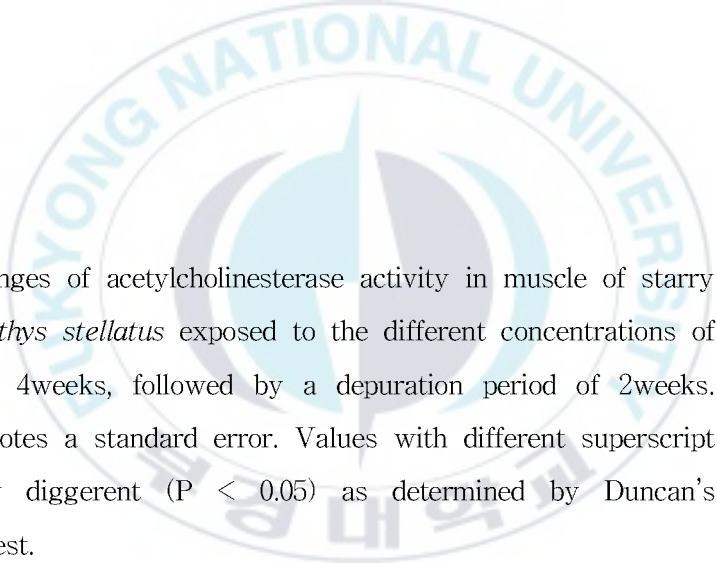


Figure. 18 Changes of acetylcholinesterase activity in muscle of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

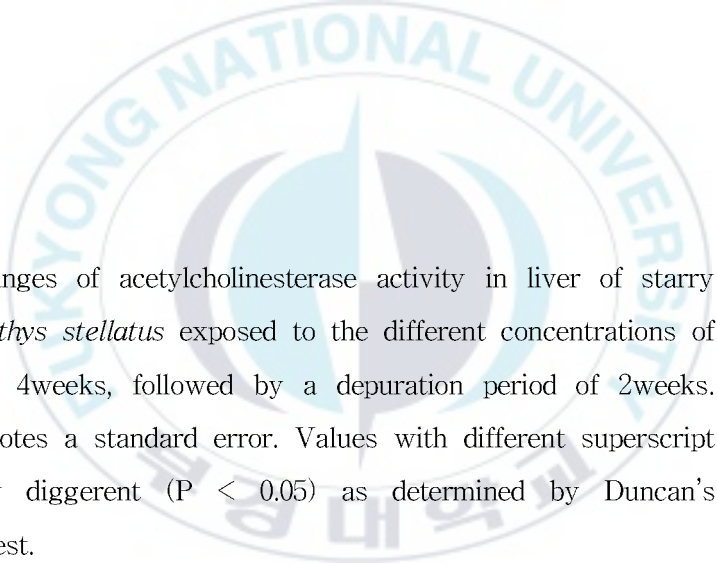


Figure. 19 Changes of acetylcholinesterase activity in liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

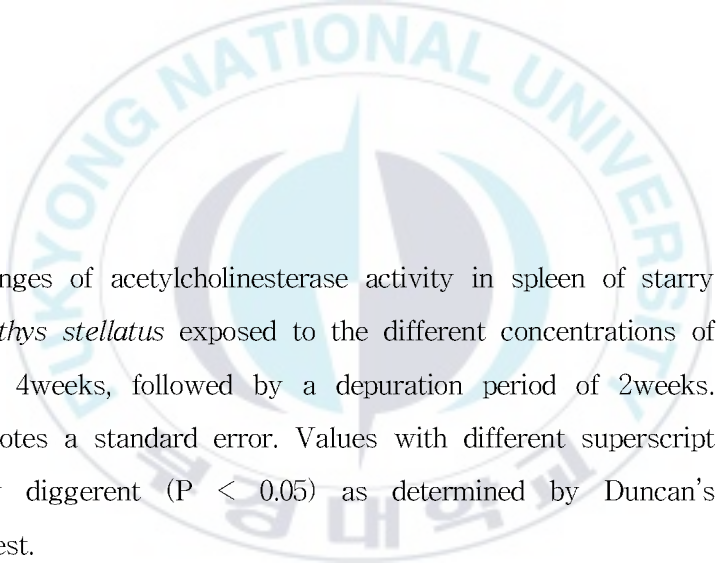


Figure. 20 Changes of acetylcholinesterase activity in spleen of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

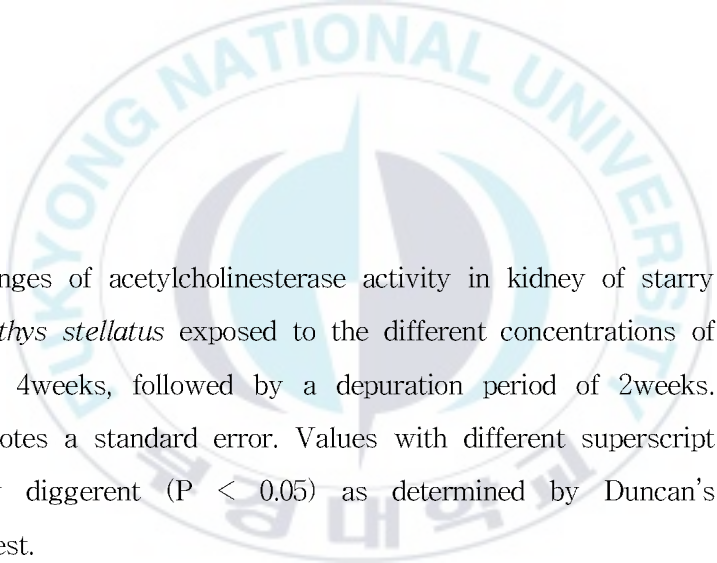


Figure. 21 Changes of acetylcholinesterase activity in kidney of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

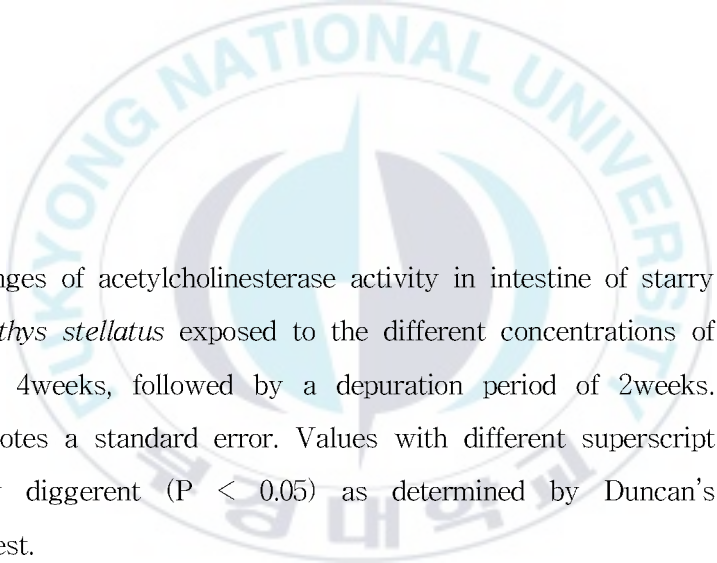


Figure. 22 Changes of acetylcholinesterase activity in intestine of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

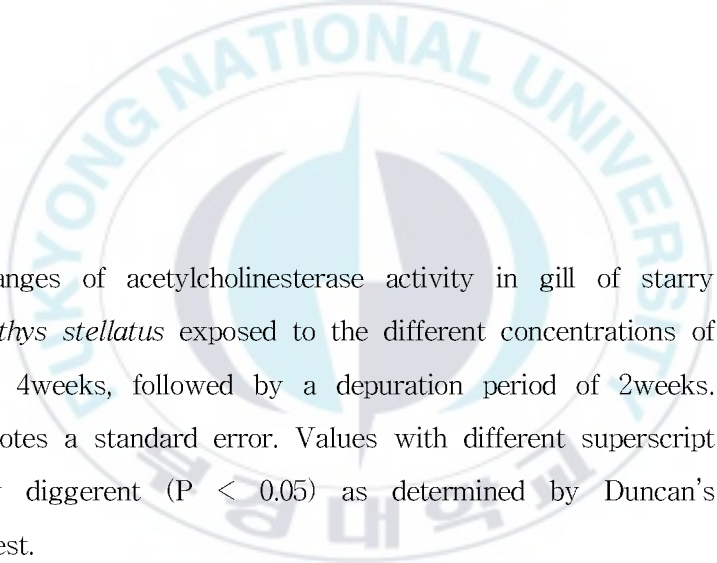


Figure. 23 Changes of acetylcholinesterase activity in gill of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

6. Lysozyme activity

납에 노출된 강도다리의 혈청 내 lysozyme activity는 Fig. 24에 나타내었다.

혈청 내에서는 2주차와 4주차 모두 60 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났으며 회복기간 이후에는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.



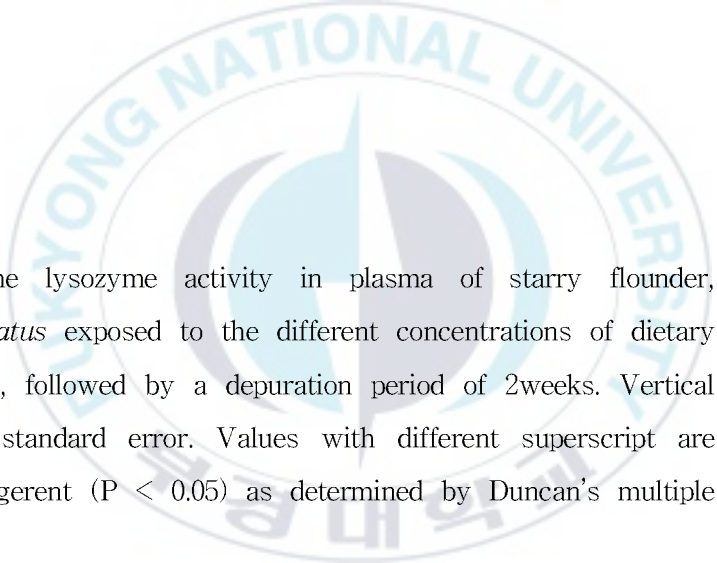


Figure. 24 The lysozyme activity in plasma of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentrations of dietary lead for 4weeks, followed by a depuration period of 2weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly diggerent ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

IV. 고 찰

어류가 중금속 성분을 먹이를 통해 섭취하면 장기간에 걸쳐 독성을 일으키며 어류의 먹이 내 금속 물질의 영양적, 독성적 영향에 대한 연구도 진행되었었다(Handy, 1996). 어류 내 금속 축적은 노출되는 농도와 시간 이외에 온도, 나이, 체내 생화학적 작용 등 여러 요인과 관계하며, 조직 내 흡수율과 제거율에 관계한다(Heath, 1996). 본 연구 결과 강도다리의 뇌와 근육, 간, 비장, 신장, 장, 아가미에서 납의 축적은 노출된 기간과 농도에 비례하여 증가하였다. 장기의 축적 농도 순은 장>신장>간>아가미>비장>근육>뇌 순이었으며, 뇌는 blood brain barrier의 역할로 높은 농도를 제외하고는 유의적인 변화가 없었으며 많은 축적이 발생하지 않았다.

어류가 생체의 구성성분들을 흡수하는 경로는 먹이와 아가미이다. 이 두 가지 경로를 통해 축적물질을 흡수하게 되며(Ciardullo Silvia et al, 2008), 주로 자연적인 어류 내 금속 축적은 먹이 섭취를 통해 이루어진다(Dural et al., 2007). 본 연구에서 장에서 가장 높은 축적농도가 나타났다. Alves et al(2006)의 연구에서도 납이 함유된 먹이를 먹은 무지개송어에서 장의 축적이 가장 높았다고 보고했으며 어류가 납이 함유된 먹이를 먹으면 장에 높은 축적이 일어나는 경향이 많은데 이는 수중에 납을 노출시키는 연구에서 아가미에서 축적이 가장 높은 것처럼 먹이 내 납이 독성을 일으키는 주요 기관이 장이라는 것으로 유추할 수 있다고 보고했다. Kim et al(2006)의 연구에서도 카드뮴이 함유된 먹이를 먹은 조피볼락의 장에서 가장 높은 축적농도를 보였다. 납이 함유된 먹이가 가장 먼저 도달하는 장기이며 장내의 보호역할로 점액을 장벽에 분비하여 둘러싸 먹이 내 독성물질을 걸러내

기에 장벽을 통과하지 못한 금속물질이 축적된다는 보고도 있었다(Glover and Hogstrand, 2002).

기본적으로 대사활성이 높은 장기에는 많은 양의 금속이 축적되는데, 주로 간과 신장, 비장 등이 있다. 메탈로티오네인은 중금속에 노출되면 이 단백질이 중금속과 결합하면서 배출되어 해독하는 역할을 하는데(Roesijadi and Robinson, 1994), 대사활성이 높은 기관에서 메탈로티오네인과 같은 금속결합단백질을 통해 금속성분을 배출하여 해독하는 역할을 담당하기 때문이다. 본 연구 결과 강도다리의 신장에서 농도에 비례하여 유의적으로 축적이 증가하였다. 간에서도 비슷한 경향이 나타났지만 신장의 축적 농도가 조금 더 높게 나타났다. Luszczek-Trojnar Ewa(2013)의 연구에서도 납에 노출된 붕어의 신장이 간보다 더 높은 수치의 축적을 나타냈다. 하지만 Heidi Amlund et al(2006)의 연구 결과 비소에 노출된 먹이를 먹은 대서양 연어에게는 간에서 더 높은 축적이 발생되었으며 높은 축적이 일어나는 장기가 해당 종의 해당 물질을 제거하는 주요 기관이자 독성의 주요 타겟 조직이라고 제시했다. 따라서 축적되는 장기는 종이나 노출되는 물질에 따른 영향이 강한 것으로 생각된다(Kraal et al, 1995). 비장 역시 혈구와 혈액속의 단백질과 결합한 항원이나 기타 입자들을 제거하는 기관이다. 본 연구 결과 비장에서도 농도와 시간에 비례하여 축적이 증가하였다.

경골어류의 아가미는 이온조절, 기체교환, pH조절, 질소화합물 배출 등의 중요한 역할을 담당한다. 아가미 상피세포에서 능동적, 수동적 교환이 끊임없이 일어나기 때문에 중금속의 배출이 일어날 수 있는 장소가 될 수 있다(Ay et al., 1999). 본 연구 결과 먹이의 납 농도에 비례하여 축적이 증가하였다. 납이 함유된 먹이는 장에서 혈액으로 흡수된 뒤 혈류를 따라 아가미의 상피세포막 측면으로 들어가면서 축적이 이루어진다(Szebedinszky

et al., 2001). 이 과정에서 아가미에 납이 축적되며 무지개송어에서도 납이 함유된 먹이를 노출 시켰을 때 같은 결과가 보고되었다(Alves and Wood, 2006).

어류의 근육은 주로 사람이 섭취하는 부위이기 때문에 근육의 중금속 축적은 사람의 건강에 있어서 아주 중요하다(Cinier et al., 1999). 본 연구 결과 강도다리의 근육에서 납의 축적이 4주차 240 mg/kg 농도를 제외하고는 유의적인 증가가 나타나지 않았다. Luszczek-Trojnar Ewa(2013)의 연구에서도 납에 노출된 먹이를 먹은 붕어의 근육 역시 다른 장기와 같이 노출 기간에 따라 납의 축적이 증가한다고 제시했다. Cinier et al(1999)은 어류가 카드뮴에 노출된 후 근육 내 카드뮴의 축적 양이 극히 적은 이유는 대부분의 간과 신장에 축적되기 때문이라고 제시했다. 본 연구에서 강도다리가 납이 든 먹이를 섭취하여 근육 내 납 농도가 증가했으므로 충분히 생물학적 모니터로써 만성적 납 노출에 대해 중요하다고 볼 수 있다.

어류의 체내로 들어온 금속을 제거하는 경로는 일반적으로 담즙, 뇨, 아가미, 점액 등이 있다(Usha and Markey, 1978). 본 연구 결과 회복기간 동안 납의 제거율은 아가미>간>신장>비장>장 순이며 근육과 뇌는 축적이 잘 일어나지 않은 만큼 회복기간 이후 모두 배출되는 경향이 보였다. 납에 노출된 먹이를 먹은 틸라피아에서도 약 2주간의 회복기간 동안 아가미와 간에 축적된 납의 양의 반 정도가 감소하였으며(Canlı, 2000), 중금속 같은 비 필수 금속은 체내에서 제거되는 기간이 길고 비 필수 금속 성분과 어류 종의 특이성에 따른 금속결합단백질의 기능이 달라 금속이 효율적으로 제거되는 장기 및 기간이 다를 수 있다고 제시했다. 본 연구에서는 아가미에서 가장 빠른 납의 반감기가 나타났다. 일반적으로 아가미에서 순환시스템에 의해 상피 내 축적된 금속이 빠르게 밖으로 배출되거나 다른 기관으로

운송 되어진다. 하지만 Luszczyk-Trojnar Ewa(2013)의 연구에서는 붕어의 장에서 낱이 회복기간 동안 가장 빠르게 제거 되었고 Hou et al(2011)의 연구에서는 칠갑상어의 근육에서 낱이 빠르게 제거되었다. 따라서 제거율이 높은 장기는 종에 따라 많은 차이를 나타낸다고 보여진다. 간과 신장은 주요 해독 장기로 금속의 배출 또한 담당하는 기관이며 본 연구에서도 아가미 다음으로 빠른 반감기가 간에서 나타났다. 간은 담즙을 통해 빠르게 금속성분을 장으로 배출한다. 강도다리에서 신장 역시 주요 배출기관임에도 불구하고 아가미나 간에 비해 그 배출 능력이 낮은 이유는 해수경골어류는 기본적으로 사구체가 거의 없어 뇨의 배출이 적기 때문에 신장의 금속성분 배출능력이 담수어류 보다 부족하기 때문이다(Kim , 2006). 본 연구 결과 강도다리에서는 비장, 장에 비해 상대적으로 아가미와 간이 낱을 제거하는 주요 장기라고 보여진다.

혈액학적 성상은 생물 전신의 병리생리학적 지표로 관련되며 독성에 노출된 어류의 구조적, 기능적 지표로서 아주 중요하다(Adhikari et al., 2004). 낱에 노출되면 아가미의 조직학적 구조의 변형이 일어나 물과 혈액 간의 거리가 멀어지면서 가스교환의 효율이 감소하고(Mallat, 1985) 혈액학적 성상의 수치가 감소하고 빈혈상태가 증가한다고 보고되어있다(Lohner et al., 2001). 낱에 노출된 다른 어류 역시 RBC count, 헤마토크릿, 헤모글로빈 수치가 감소한다고 알려져 있다(Gurer et al., 1998; Iavicoli et al, 2003). 본 연구 결과 RBC count, 헤마토크릿, 헤모글로빈 수치가 낱에 노출되는 기간 동안 농도에 비례하여 유의적인 감소가 나타났다. 그리고 회복기간 이후에도 농도에 비례하여 수치가 감소하였다. 카드뮴, 니켈, 납과 같은 중금속들은 적혈구 공격하여 투과성을 높이고 약하게 만들어 산소와 결합하는 것을 방해한다. 이는 적혈구에 부종이 발생하거나 심각한 피해를

입은 결과이며(Witeska and Kosciuk, 2003), 중금속이 조혈기관의 활성을 낮추기 때문에(Vinodhini and Narayanan, 2009a) 금이를 통한 납 노출에 따른 회복기간 이후의 유의적 감소도 축적된 납이 지속적인 피해를 일으키거나 피해를 입은 조혈기관이 그 기능을 완전히 회복하지 못한 결과라고 보여진다.

일반적으로 환경 내 독성물질은 생체 내에서 세포와 분자 단위로 독성을 일으켜 생화학적 반응을 유의적으로 변화시키기 때문에 혈청 생화학적 실험은 중요한 지표이다(Vutukuru, 2003). 본 연구에서 무기성분으로 칼슘과 마그네슘을 측정하였다. 납은 아가미의 칼슘과 마그네슘 이온교환 시스템에서 경쟁적으로 작용하며 납 노출 시 칼슘과 마그네슘 이온이 감소하게 된다(MacDonald et al., 2002). 본 연구 결과도 납의 농도와 노출된 시간에 비례하여 칼슘과 마그네슘의 농도가 감소하였으며 회복기간 이후 240 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타난 것은 아직 신체 내 납이 완전히 제거되지 못한 결과라고 보여진다. 본 연구에서 유기 성분으로 글루코즈와 총단백질을 측정하였다. 혈청 내 글루코즈는 어류의 스트레스에 대한 민감한 지표로 이용된다(Nemcsok and Boross, 1981). 본 연구 결과 글루코즈 수치가 시간과 농도에 비례하여 유의적으로 증가하였다. 납은 생체 내 대사율을 증가시켜 글루코오신생합성과정을 촉진시켜 글루코즈 농도가 증가하게 되며(saravanan et al., 2011), 스트레스로 자극으로 부신에서 글루코코르티코이드와 카테콜아민의 분비를 촉진시키고 스트레스 호르몬인 코티졸의 상승이 동반된다(Aly et al., 2003). 혈청 내 총단백질 또한 오염물질에 노출되었을 때 생물학적 대사 기작의 지표에 중요하다. 본 연구 결과 총단백질 또한 4주차의 높은 농도에서 유의적인 감소가 나타났으며 회복기간 이후에는 정상으로 회복되었다. Martinez et al(2004)의 연구에서도 노

출된 납의 농도와 시간에 비례하여 총단백질 수치가 감소하였고, 납은 단백질 합성에 독성을 나타낸다고 제시했다. 혈청 내 효소 성분으로 GOT와 GPT, ALP를 측정하였다. GOT와 GPT, ALP 모두 농도와 시간에 비례하여 유의적으로 증가하는 경향이 나타났고 다른 연구에서도 납에 노출되었을 때 비슷한 결과가 나타났다(Gill et al., 1991; Aly et al., 2003; Zaki et al., 2009). 일반적으로 GOT와 GPT, ALP는 간의 효소로 잘 알려져 있으며 독성 성분에 노출되거나 기타 스트레스에 의해 간에 독성이 나타나면 배설이 빨라지면서 혈액 내 농도가 증가하게 되는데, 이는 병리조직학적으로 간세포의 변성이나 괴사를 일으키면 세포막이 변형, 세포 내 효소성분을 배설이 증가하게 되고(Zaki et al., 2009), 더 강한 독성이 나타나게 되면 운송시스템의 붕괴로 효소가 감소하게 된다(Humtsoe et al., 2007). 또한 회복기간 이후의 지속적인 활성 감소로 보아 축적된 납에 의해 간이 계속해서 피해를 입은 것으로 보여진다.

수계환경에서 ROS를 발생시키는 독성물질은 수계동물에게 피해를 입히며, 어류는 이 독성물질을 저질이나 물, 먹이를 통해 섭취한다. 일반적으로 분자량이 높은 중금속의 경우 생물학적으로 산화반응을 촉진하며(Atli and Canli, 2010), xenobiotics로 작용하지만 항산화효소의 작용으로 해독될 수 없다면 조직의 산화적 손상이 발생하게 된다. 납 또한 ROS를 일으키는 금속이라고 보고되어 있다(Maiti et al., 2010). 본 연구에서는 항산화효소로 간, 신장, 아가미의 SOD, GST, GSH를 측정하였다. 간과 신장, 아가미 모두 SOD의 활성이 납의 농도와 시간에 비례하여 증가하였다. SOD는 superoxide radical(O_2^-)를 과산화수소(H_2O_2)로 바꾸는 과정을 촉매하는 효소로 다른 연구에서도 납의 농도와 시간에 비례하여 효소가 증가하는 경향이 보고되었다(Vinodhini and Narayanan, 2009b; Zhang et al., 2007). 간

에서는 회복기간 이후에도 유의적인 증가가 나타났으며 이는 축적된 납에 의한 영향으로 보인다. GSH는 SOD에 의해 생성된 과산화수소를 제거하는 역할을 한다. 본 연구 결과 간과 신장, 아가미의 GSH level이 납의 농도와 노출된 시간에 비례하여 유의적인 증가가 나타났다. Atli and Canli(2008)의 연구에서도 납에 노출된 나일틸라피아의 간과 아가미의 GSH level이 대조군에 비해 유의적인 증가가 나타났고 GSH level이 증가한 것은 산화스트레스에 대하여 생체를 보호하기 위한 주요 방어시스템이기 때문이라고 보고했다. Lima et al(2006)에 따르면 오염물질에 어류가 만성적 노출이 된다면 이에 적응하기 위해 GSH level이 증가한다고 보고했다. 회복기간 이후의 GSH level은 약간의 증가가 보이기는 했지만 간의 240 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났고 간과 아가미에서는 유의적인 변화는 나타나지 않고 회복되었다. 이는 간에 축적된 납에 의해 지속적인 활성산소의 발생으로 SOD의 역할로 발생된 과산화수소를 해독하기 위하여 증가한 것으로 보여진다. GST는 활성산소 중에 가장 독성이 강한 하이드록시 라디칼(OH) 같은 전자친화성 기질을 glutathione에 결합시키는 반응을 촉매하여 glutathione peroxidase(GPx)로 하여금 활성산소를 제거하게 도와주는 효소이다. 본 연구 결과 GST는 간과 신장, 아가미 모두 활성이 유의적으로 증가하는 경향이 나타났다. Özkan-Yilmaz et al(2014)의 연구에서도 납에 노출된 비단잉어의 GST활성이 증가했다고 보고되었다. GST의 활성이 증가한 것은 간과 신장, 아가미에서 납과 같은 xenobiotics의 해독, 제거를 위한 것이며 Marí and arthur(2001)은 산화스트레스가 GST의 활성을 증가시킬 수 있으며 세포의 피해를 막기 위한 방어기작 이라고 보고했다. 본 연구 결과 GST의 활성은 회복기간 이후에 모두 정상적으로 회복되었고 축적된 납은 GST의 활성을 증가시키기 위한 활성산소나 기타 전자친화성

기질을 생성시키지 않는 것으로 보여진다.

Acetylcholinesterase(AChE) activity는 중금속오염에 대한 중추신경계 독성의 생체지표로 이용되는데, 이는 중금속이 anticholinesterase로 작용하기 때문이며 해양 무척추, 척추동물 모두에게 그 영향을 나타내기 때문이다(Costa et al., 2007). 본 연구 결과 장기 중 AChE는 뇌와 근육에 가장 함량이 많았으며 노출된 농도와 시간에 비례하여 활성이 유의적으로 감소하였다. 그리고 회복기간 이후 근육은 활성이 어느 정도 회복되었으나 높은 농도에서 유의적인 감소가 나타났으며 뇌에서는 활성이 회복되지 못하고 더욱 감소하는 경향이 나타났다. Devi and Fingerman(1995)의 연구에서도 납에 의해 AChE의 활성이 감소하는 경향을 나타냈다. 중금속이 신경독성을 나타내는 정확한 기전은 아직 보고되어있지 않지만 Guilhermino et al(1998)의 가설에 따르면 cholinesterase의 음이온 부위에 결합하여 효소로 작용하지 못하여 분해되지 않는다고 하였다. 따라서 각 장기에 축적되는 납 이온이 ChE와 복합체를 형성하면서 그 능력을 상실하여 AChE의 수치가 감소한 것으로 보인다. 뇌와 근육을 제외한 장기에서는 AChE의 양이 상대적으로 적었다. 특히 간과 비장이 가장 적었으며 유의적인 변화 또한 나타나지 않았다. 아가미에서는 4주차의 240 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났으며 회복기간 이후에는 완전히 회복되었다. 신장과 장에서는 노출된 농도와 시간에 비례하여 유의적으로 감소하였으며 상대적으로 많은 축적이 나타난 장에서 많은 감소가 나타났으며 회복기간 이후에도 완전히 회복하지 못하고 유의적인 감소가 나타났다. 뇌와 근육을 제외한 장기에서는 낮은 AChE activity를 나타냈기 때문에 결과로 나타난 감소는 반드시 유의적이라고 볼 수는 없지만 노출된 납은 충분히 다른 장기에 신경독성을 나타낼 수 있다는 것을 알 수 있었다. 본 연구 결과 납은 충분히 강도다리

에게 신경독성을 나타내고 특히 뇌와 근육의 피해가 컸으며 뇌는 축적된 납이 모두 제거되었음에도 불구하고 회복기간 이후에 활성이 더욱 감소하는 것으로 보아 강도다리의 뇌에 강한 신경독성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

어류의 혈청 내 lysozyme은 환경독성물질이 어류의 비특이적 면역에 끼치는 영향을 모니터링 할 수 있는 면역물질이다(Saurabh and Sahoo., 2008). Lysozyme은 어류의 몸 전체에 분포하지만 혈청 내에서 가장 많이 측정되어진다. Paul et al(2014)는 낮은 농도의 납에 노출된 어류는 비특이적 면역이 피해를 입는다고 보고하였다. Adeyemi et al(2014)의 연구에서는 납에 노출된 아프리카 메기에서 lysozyme의 수치가 감소하였고, Kaya et al(2013)의 연구에서도 납에 노출된 틸라피아에서 lysozyme의 수치가 감소하였다. Sanchez Dardon et al(1999)의 연구에서는 수은, 카드뮴, 아연에 노출된 무지개송어의 lysozyme 수치가 증가했지만 Fletcher(1986)의 연구에서는 수은에 노출된 어류의 lysozyme 수치가 감소하였다. 반면에 Low and Sin(1998)의 연구에서는 수은에 노출된 구라미에서는 변화가 나타나지 않았다. Lysozyme의 활성은 노출되는 금속의 농도와 종, 기타 요인에 따라 많은 증감을 나타낸다. 본 연구에서는 납의 농도와 노출기간에 비례하여 lysozyme activity의 수치가 유의적으로 증가하였다. 따라서 먹이에 함유된 납은 강도다리의 비특이적 면역반응을 일으키는 자극을 주었다고 보여진다.

현재 각종 레저산업이 활성화 되면서 해안가 주변에는 버려지는 낚들에 의해 높은 농도의 납 노출이 발생되고 있다. 해저 무척추동물에서 0-797 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 농도로 납이 분포하며 이는 잠재적으로 척추동물의 먹이로 이용된다(Dai et al., 2012). 해안가 주변이 아닌 해저에서 최대 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 농도로

분포한다면 해안가 주변의 오염 농도는 상당히 높을 것이며 이 납들은 먹이 연쇄로 어류를 통해 사람에게 노출 될 수 있다. 따라서 납 오염이 수계 생물에게 지속적이기 때문에 납을 함유한 먹이에 대한 수계생물의 노출실험은 필수적이다. 본 연구는 납을 먹이에 함유시켜 강도다리에게 공급하였으며 그 결과 납의 농도와 시간에 비례하여 생체축적 뿐만 아니라 생리대사와 면역까지 독성을 나타냈다. 환경적으로 납의 농도는 지역적으로 그 분포가 다르며 농도가 현저히 높은 지역에서는 강도다리에게 충분히 비가역적 독성 영향을 나타낼 수 있다고 보여지며 강도다리는 납에 대해 민감한 반응을 보이기 때문에 다른 독성연구에서도 충분히 사용될 수 있다고 판단된다.



V. 요약

납은 중금속 중에 지구상에 가장 풍부한 금속으로 산업적으로 널리 쓰이고 있다. 오늘날 납 사용의 대부분은 배터리이며 주로 자동차, 오토바이 등의 배터리뿐만 아니라 방사능 보호재료로서 사용된다. 납의 영구적인 독성 때문에 사용을 금하거나 제재에도 불구하고 납은 인위적인 활동으로 인해 자연으로 계속 수계에 유입이 되면서 지속적으로 오염이 발생되고 있다.

우리나라 해산어류 양식생산량 중 넙치가 51.1%를 차지한다. 이러한 양식 생산 구조는 매년 초과생산을 초래하게 넙치를 대체할 새로운 양식품종 개발에 관심이 집중되며 최근 강도다리, *Platichthys stellatus*가 양식어종으로 각광받고 있으며 또한 강한 내병성의 고급 어종으로 양식되고 있다.

따라서 본 연구는 수계 환경에서는 중금속이 먹이연쇄를 통해 어류의 몸속에 축적이 되는 특성에 맞게 강도다리에게 납을 0, 30, 60, 120, 240 mg/kg의 농도로 함유한 먹이를 4주간 급여 이후 2주간 회복기간을 거쳐 축적과 제거, 혈액학적 성상, 항산화효소의 활성, 신경독성, 비특이적 면역의 변화를 측정하였다.

본 연구 결과 납은 농도에 비례하여 강도다리의 장기에 유의적으로 축적하였으며 축적률이 높은 장기는 장>신장>간>비장≥아가미>근육>뇌 순이었으며 제거율은 아가미>간>신장≥비장≈장 순이며 근육과 뇌는 축적률이 낮아 모두 제거되었다. 혈액학적 성상은 농도에 비례하여 RBC count, Ht, Hb의 유의적인 감소가 나타났으며 무기성분인 칼슘과 마그네슘은 유의적 감소를, 유기성분인 글루코즈는 유의적인 증가를, 총단백질은 유의적

인 감소를 나타냈다. 혈청 내 효소성분은 유의적인 증가를 나타냈다. 항산화 효소는 간과 신장, 아가미에서 측정하였으며 SOD, GSH, GST 모두 농도에 비례한 활성의 유의적인 증가가 나타났다. Acetylcholinesterase activity는 뇌와 근육, 간, 비장, 신장, 장, 아가미에서 측정하였으며 간과 비장에서는 유의적인 변화는 없었으며 뇌, 근육에서 활성이 높았고 농도에 비례하여 활성이 감소하였다. 장과 신장, 아가미에서는 높은 농도에서 유의적인 감소가 나타났다. Lysozyme activity는 농도에 비례하여 유의적인 활성의 증가가 나타났다.



VI. 참고문헌

- Adeyemi et al. "Mortality, oxidative stress and hepatotoxicity in Juvenile African Catfish, *clarias gariepinus burchell*, exposed to lead and cypermethrin." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 92.5 (2014): 529-533.
- Adhikari et al. "Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton)." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58.2 (2004): 220-226.
- Alves and Wood. "The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets." *Aquatic toxicology* 78.3 (2006): 217-232.
- Alves et al. "Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Archives of environmental contamination and toxicology* 51.4 (2006): 615-625.
- Aly et al. "Pathological, biochemical, haematological and hormonal changes in catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to lead pollution." *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association* 63.1 (2003): 331-342.
- Atli and Canli. "Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures." *Ecotoxicology and environmental safety* 73.8 (2010):

1884-1889.

Atli and Canli. "Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 25.1 (2008): 33-38.

Ay et al. "Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na, K-ATPase activity." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 62.2 (1999): 160-168.

Bonga. "The stress response in fish." *Physiological reviews* 77.3 (1997): 591-625.

Burden et al. "Effects of lead on the growth and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." *Environmental pollution* 101.2 (1998): 285-289.

Canli. "Elimination of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) metals from tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii*." *Turk J Zool* 24 (2000): 429-36.

Ciardullo Silvia et al. "Bioaccumulation potential of dietary arsenic, cadmium, lead, mercury, and selenium in organs and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a function of fish growth." *Journal of agricultural and food chemistry* 56.7 (2008): 2442-2451.

Cinier et al. "Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 122.3 (1999): 345-352.

- Costa et al. "Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67.1 (2007): 82-88.
- Dai et al. "Lead (Pb) accumulation, oxidative stress and DNA damage induced by dietary Pb in tilapia (*Oreochromis niloticus*)." *Aquaculture Research* 43.2 (2012): 208-214.
- Devi and Fingerman. "Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, by mercury, cadmium, and lead." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 55.5 (1995): 746-750.
- Dural et al. "Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon." *Food Chemistry* 102.1 (2007): 415-421.
- Farmand et al. "Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase." *Environmental Research* 98.1 (2005): 33-39.
- Ferrari et al. "Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146.3 (2007): 308-313.
- Fletcher. "Modulation of nonspecific host defenses in fish." *Veterinary immunology and immunopathology* 12.1 (1986): 59-67.
- Fuente and Victor. "Anti-oxidants as modulators of immune function." *Immunology and cell biology* 78.1 (2000): 49-54.

- Galley et al. "The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock." *Free Radical Biology and Medicine* 23.5 (1997): 768-774.
- Geoffroy et al. "Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin." *Environmental Pollution* 131.2 (2004): 233-241.
- Geret and Bebianno. 2004. does zinc produce reactive oxygen species on *Rudotapes decussatus* *Ecotoxicol. Environ. Sate.* 57:339-409
- Gill et al. "In vivo tissue enzyme activities in the rosy barb (*Barbus conchoni* Hamilton) experimentally exposed to lead." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 47.6 (1991): 939-946.
- Glover and Hogstrand. "In vivo characterisation of intestinal zinc uptake in freshwater rainbow trout." *Journal of Experimental Biology* 205.1 (2002): 141-150.
- Guilhermino et al. "SHORT COMMUNICATION Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned." *Biomarkers* 3.2 (1998): 157-163.
- Gürer et al. "Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats." *Toxicology* 128.3 (1998): 181-189
- Handy. "Dietary exposure to toxic metals in fish." *SEMINAR SERIES-SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY*. Vol. 57. Cambridge University Press, 1996.
- Heath. *Water pollution and fish physiology*. Boca Raton: CRC press, pp

(1995). 141 – 170.

Heidi Amlund et al. "Accumulation and elimination of dietary arsenobetaine in two species of fish, Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)." *Environmental toxicology and chemistry* 25.7 (2006): 1787-1794.

Hodson et al. "Chronic toxicity of water-borne and dietary lead to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Lake Ontario water." *Water Research* 12.10 (1978): 869-878.

Hou et al. "Morphological deformities and recovery, accumulation and elimination of lead in body tissues of Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, early life stages: a laboratory study." *Journal of Applied Ichthyology* 27.2 (2011): 514-519.

Houston et al. "The nature of hematological response in fish." *Fish physiology and biochemistry* 15.4 (1996): 339-347.

Humtsoe et al. "Effect of arsenic on the enzymes of the Rohu carp, *Labeo rohita* (Hamilton 1822)." *Raffles Bull. Zool* 14 (2007): 17-19.

Iavicoli et al. "Effects of low doses of dietary lead on red blood cell production in male and female mice." *Toxicology letters* 137.3 (2003): 193-199.

Kalay et al. "Heavy metal concentrations in fish tissues from the Northeast Mediterranean Sea." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63.5 (1999): 673-681.

Kaya et al. "Impacts of sublethal lead exposure on the hemato-immunological parameters in tilapia (*Oreochromis*

- mossambicus)."Toxicological & Environmental Chemistry 95.9 (2013): 1554-1564.
- Khan et al. "Impact of acute toxicity of lead acetate on the level of essential trace metals and histopathological changes in crucian carp.(*Carassius auratus gibelio*). " JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences 24.5 (2014): 1405-1414.
- Kim et al. "Kinetics of Cd accumulation and elimination in tissues of juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*) exposed to dietary Cd." Marine environmental research 62.5 (2006): 327-340.
- Kirby et al. "The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries." Marine Pollution Bulletin 40.9 (2000): 780-791.
- Kraal et al. "Uptake and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by carp (*Cyprinus carpio*)." Ecotoxicology and Environmental Safety 31.2 (1995): 179-183.
- Lima et al. "Time-course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry." Archives of Environmental contamination and Toxicology 50.1 (2006): 23-30.
- Lohner et al. "Assessment of tolerant Sunfish populations (*Lepomis* sp.) inhabiting selenium-laden coal ash effluents: 1. Hematological and population level assessment." Ecotoxicology and Environmental Safety 50.3 (2001): 203-216.
- Low and Sin. "Effects of mercuric chloride and sodium selenite on some

- immune responses of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus)." *Science of the total environment* 214.1 (1998): 153-164.
- Luszczek-Trojan Ewa. "Lead accumulation and elimination in tissues of Prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch, 1782), after long-term dietary exposure, and depuration periods." *Environmental Science and Pollution Research* 20.5 (2013): 3122-3132.
- Macdonald et al. "A lead-gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133.1 (2002): 227-242.
- Maiti et al. "Effect of lead on oxidative stress, Na⁺ K⁺ ATPase activity and mitochondrial electron transport chain activity of the brain of *Clarias batrachus* L." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 84.6 (2010): 672-676.
- Mallatt. "Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42.4 (1985): 630-648.
- Marí and Arthur. Cederbaum. "Induction of catalase, alpha, and microsomal glutathione S transferase in CYP2E1 overexpressing HepG2 cells and protection against short term oxidative stress." *Hepatology* 33.3 (2001): 652-661.
- Martinez et al. "Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*." *Brazilian Journal of Biology* 64.4 (2004): 797-807.

- Meydani et al. "Antioxidant modulation of cytokines and their biologic function in the aged." *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft* 37 (1997): 35-42.
- Modesto and Martinez. "Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*." *Chemosphere* 78.3 (2010): 294-299.
- Monteiro et al. "In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*." *Aquatic toxicology* 104.3 (2011): 291-298.
- Moron et al. "Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver." *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects* 582.1 (1979): 67-78.
- Mourente et al. "Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E." *Aquaculture* 214.1 (2002): 343-361.
- Nemcsok and Boross. "Comparative studies on the sensitivity of different fish species to metal pollution." *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 33.1 (1981): 23-27.
- Nikinmaa and HUESTIS. "Adrenergic swelling of nucleated erythrocytes: cellular mechanisms in a bird, domestic goose, and two teleosts, striped bass and rainbow trout." *Journal of experimental biology* 113.1 (1984): 215-224.
- Oliveira et al. "Hematological findings in neotropical fish *Hoplias*

- malabaricus exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride." *Environmental research* 101.1 (2006): 74-80.
- Özkan-Yilmaz et al. "Effects of dietary selenium of organic form against lead toxicity on the antioxidant system in *Cyprinus carpio*." *Fish physiology and biochemistry* 40.2 (2014): 355-363.
- Palaniappan et al. "Morphological changes due to Lead exposure and the influence of DMSA on the gill tissues of the freshwater fish, *Catla catla*." *Food and chemical toxicology* 46.7 (2008): 2440-2444.
- Paul et al. "Lead toxicity on non-specific immune mechanisms of freshwater fish *Channa punctatus*." *Aquatic Toxicology* 152 (2014): 105-112.
- Roesijadi and Robinson. "Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release." *Aquatic toxicology* 102 (1994): 125-133.
- Sanchez Dardon et al. "Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vivo." *Environmental toxicology and chemistry* 18.7 (1999): 1492-1497.
- Sancho et al. "Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*." *Ecotoxicology and environmental safety* 46.1 (2000): 81-86.
- Saravanan et al. "Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes)

- during acute and chronic sublethal exposure to lindane." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100.3 (2011): 206-211.
- Saurabh and Sahoo. "Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system." *Aquaculture Research* 39.3 (2008): 223-239.
- Szebedinszky et al. "Effects of chronic Cd exposure via the diet or water on internal organ specific distribution and subsequent gill Cd uptake kinetics in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)."
Environmental toxicology and chemistry 20.3 (2001): 597-607.
- Tapia-Paniagua et al. "Impact of the intestinal microbiota species of Senegalese sole larvae and fries fed with *Shewanella putrefaciens* Pdp11 probiotic bioencapsulated in *Artemia*, effect of one or two intervals of application." CD: Abstracts Aquaculture Europe2011. Rhodes, Greece (2011): 622-623.
- Usha and Markey. "Uptake and release of lead and cadmium in skin and mucus of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)."
Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology 60.2 (1978): 187-191.
- Vinodhini and Narayanan. "The Impact of Toxic Heavy Metals on the Hematological Parameters in Common Carp (*Cyprinus Carpio* L.)."
(2009)a.
- Vinodhini and Narayanan. "Biochemical changes of antioxidant enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after heavy metal exposure."
blood 3 (2009)b: 4.
- Vutukuru. "Chromium induced alterations in some biochemical profiles

- of the Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton)." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 70.1 (2003): 0118-0123.
- Witeska and Kościuk. "The changes in common carp blood after short-term zinc exposure." *Environmental Science and Pollution Research* 10.5 (2003): 284-286.
- Witeska and Małgorzata. "Stress in fish – hematological and immunological effects of heavy metals." *Electronic journal of ichthyology* 1 (2005): 35-41.
- Yang and Rose. "Distribution of mercury in six lake sediment cores across the UK." *Science of the Total Environment* 304.1 (2003): 391-404.
- Zaki et al. "Biochemical and Immunological studies in *Tilapia Zilli* exposed to lead pollution and climate change." *Nat. Sci* 7.12 (2009): 90-93.
- Zhang et al. "Long-term toxicity effects of cadmium and lead on *Bufo raddei* tadpoles." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 79.2 (2007): 178-183.