



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

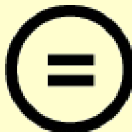
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



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

Trichlorfon 노출에 따른
뱀장어 (*Anguilla japonica*)의 체내
잔류량 및 독성 연구 수행



2021년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

조 현 호

이 학 석 사 학 위 논 문

Trichlorfon 노출에 따른
뱀장어 (*Anguilla japonica*)의 체내
잔류량 및 독성 연구 수행

지도교수 정 준 기

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2021년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

조 현 호

조현호의 이학석사 학위논문을 인준함

2021년 2월 19일

위 원 장 이학박사 강 주 찬 (인)

위 원 약학박사 정 준 기 (인)

위 원 농학박사 허 민 도 (인)

목 차

Abstract	iv
제 1장. Trichlorfon 노출에 따른 뱀장어의 체내 잔류량 및 약물 동태학 연구	
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	5
2.1. 실험 어류 및 대상 물질	5
2.2. 시약 및 기기	5
2.3. TCF 표준 용액 및 시약 조제	6
2.4. 항생제 투여 및 시료 채취	6
2.5. 시료 전처리	6
2.6. 기기 분석	9
2.7. 분석법 검증	11
2.8. 약동학적 해석	13
3. 결과	13
3.1. 직선성	13

3.2. 검출 한계 (Limit of detection, LOD) 및 정량 한계 (Limit of quantification) 및 회수율.....	15
3.3. Trichlorfon 약물에 대한 잔류 양상.....	18
3.4. 약동학적 해석.....	23
4. 고찰.....	30
제 2장. Trichlorfon이 뱀장어의 약물 대사 및 생리적 기능에 미치는 영향.....	36
1. 서론.....	36
2. 재료 및 방법.....	38
2.1. 실험 어류.....	38
2.2. RNA isolation and first-strand cDNA synthesis.....	39
2.3. Cloning of <i>Anguilla japonica</i> CYP1A, CYP1B, CYP1C1.....	39
2.4. AjCYP1 isoform의 염기서열 분석.....	44
2.5. Exposures, sampling and 전처리 과정.....	44
2.6. 항산화 효소 활성.....	45
2.7. AChE activity.....	47
2.8. Stress indicator (Cortisol).....	47

3. 결과	48
3.1. 약물대사효소 유전자 서열 정보 확보 및 CYP1 family에서 조직 별 발현 양상	48
3.2. 항산화 효소 활성	51
3.3. AChE 활성	55
3.4. Stress indicator (Cortisol)	57
4. 고찰	59
요약	63
감사의 글	65
참고문헌	67



Studies on residual amounts and toxicity in the eel (*Anguilla japonica*)
following exposure to trichlorfon

Hyun Ho Jo

*Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan
48513, Korea*

Abstract

In this study, pharmacokinetic analysis was performed according to trichlorfon (TCF) exposure to obtain the data necessary for the establishment of maximum residue level (MRL) for eels, and the effect of TCF on drug metabolism and physiological function of eels was also investigated.

First, pharmacokinetic parameters of TCF were obtained in muscle, liver, and blood using the PK Solver program based on the results of measuring the drug residual concentration in the body according to the bath

administration of TCF. In blood, muscle and liver, $C_{\max}$ is 25.8698–357.421, 129.905–1043.73, 40.4662–375.198, $T_{\max}$ is 0.1278–1.31581h, 1.18943–3.338h, 0.1361–5.39822h, and half-life($t_{1/2}$) is 2.12919–3.92153h, 5.29793–10.3544h, and 0.65284–13.8079h, respectively.

Second, the expression of the drug metabolism enzyme CYP450 gene was analyzed. TCF mainly expressed CYP 1 family genes in each tissue. *AjCYP1A* gene was mainly expressed in the heart and liver, *AjCYP1B* gene was mainly expressed in the brain, eye, and heart. On the other hand, *AjCYP1C1* gene was expressed without differences between tissues.

Third, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE) and Cortisol activities were measured. The activities of antioxidant enzymes (GST, SOD and CAT) were maintained at a steady state without significant change, and AChE activity in the brain was significantly inhibited and recovered again. plasma cortisol levels, a stress index, increased as time elapsed after TCF administration, showing the highest levels between 30 minutes and 1 hour. After that, it began to decrease and returned to its original state.

Taken together, the results of this study indicate that TCF not only affects the drug metabolism process in eel, but also inhibits AChE activity,

resulting in neurotoxicity.



1장. Trichlorfon 노출에 따른 뱀장어의 체내 잔류량 및 약물동태학 연구

1. 서론

항생제의 정의는 미생물에 의해 생성된 물질로 다른 미생물의 성장을 억제시켜서 체내에 침입한 미생물의 성장을 억제시켜서 감염을 치료하는 물질입니다(Choe and Lee, 2004). 해양생물들을 대상으로 하는 수산용 항생제는 위의 정의에 따르면 해양생물의 체내 또는 체외에 침투하여 기생하는 생물들의 발육을 저지해 기생생물에 의해 발생하는 질병을 치료한다. 항생제는 대상 기생생물에 대해 특이적으로 반응하는 효과를 가지는데 기생생물에 대해 어떻게 반응하는가에 대해 분류할 수 있다(Chung et al., 2007).

기생생물의 성장과 번식을 억제하며 숙주의 면역 반응과 함께 작용하는 정균성 항생제가 있으며 직접적으로 기생생물을

죽이지만 활동하지 않으면 죽이지 못하는 살균성 항생제로 분류 할 수 있다. 항생제를 사용하면 감염성 질병을 치료 할 수 있는 장점이 있지만 항생제를 오남용 하면 기생 생물이 항생제에 대해 적응해 내성을 가지게 될 수도 있다. 뿐만 아니라 수산용 항생제는 우리의 밥상에 올라오는 해양생물을 대상으로 사용하게 되는 경우가 대부분이라서 전문적인 처방을 받지 않고 사용하게 된다면 수산물에 잔류하는 항생제가 우리의 밥상에 올라와서 안 좋은 영향을 끼칠 수 있으므로 수산용 항생제는 반드시 전문가에 의한 처방을 받고 사용해야한다(Lee et al., 2008).

현재 우리나라 수산용 동물용 의약품 중 잔류허용기준이 설정 되어 있지 않은 의약품은 항생 및 항균 제제 중 Trichlorfon(TCF)이 있다(Kim et al., 2014). TCF은 흡충, 조충, 선충, 구두충 등 기생충성 질병치료에 가장 빈번하게 사용 되고 있는 유기인계 구충제이다. TCF은 주로 골격근의 시냅스 및 신경 근육 접합에서 아세틸콜린에스테라제 활동을 억제하여 유기체의 항산화 방어 시스템을 변화 시킨다(Guimarães et al., 2007). 현재까지 양식 어류를 대상으로 하여 사육환경 및 투약

방법에 따른 TCF의 효과는 잉어, 틸라피아, 베스, 연어, 유럽산
뱀장어의 다양한 어류 질병 치료에 효과가 있는 것으로 보고되
었다(Yonar et al., 2015; Ferrando et al., 1991). 하지만 일부
양식장에서 다량의 트리클로폰을 사용하여 치료를 하고 있기
때문에 TCF는 고농도로 잔류할 수 있으며 이는 다시 인간의
건강에 손상을 일으킬 수 있다.

인간에 대한 위험 때문에 국제연합식량농업기구(FAO)나 세계
보건기구(WHO)에 의해 위해 관리를 위한 위해 평가를 수행한
다. 이는 식품첨가물의 일일 섭취허용량(ADI)을 권고하면서 식
품에 함유된 식품첨가물의 섭취로 인한 인체내 위해 평가를 담
당하고 있으며 육 가공품 및 육류에 잔류하는 수의 약품의 최
대잔류한계(MRL)와 산업 및 환경오염물질에 대한 허용한계
(Tolerable limit)을 설정한다. 2017년 식품의 동물용의약품 잔
류허용기준에서 소의 근육, 간 지방 및 신장의 트리클로폰의 최
대 잔류량 한계(MRL)은 0.05mg/kg이어야 한다고 권고 하였
으며 돼지 및 양에서도 근육, 간 지방 및 신장의 트리클로폰의
최대 잔류량 한계(MRL)은 0.1mg/kg으로 권고하였다. 하지만
TCF는 수산용 의약품 중 잔류허용기준이 아직 미 설정 되어있

으며 현재 국내 제조 및 수입사에서 제조 판매되고 있는 상황이다. 그렇기 때문에 검사 시 불검출이 될 수 있고, 섭취 시 인간에게 안 좋은 영향을 미칠 수 있다.

뱀장어는 우리나라를 포함해 중국, 일본 및 대만에 주로 분포하는 강하성 어류(Tsukamoto et al., 2003)로 2005년도의 우리나라 뱀장어 생산량은 5,775톤이며, 2006년도에는 7,966톤이고, 2007년도에는 10,557톤으로 2007년의 생산량은 2005년 생산량에 비해 1.8배가 넘는 것으로 나타났다. 이는 전체 담수양식 생산량의 약 26.5%를 차지하는 중요한 양식 대상 품종이다(Kim et al., 2010).

다른 어종에서 TCF의 약물동태학적 비교는 있지만, 뱀장어에서의 TCF의 약물동태학적 연구는 빈약하다. 따라서 본 연구에서는 뱀장어를 대상으로 하여 TCF 노출에 따른 체내 잔류량 및 약물동태학적 분석으로 잔류허용기준 설정을 위한 기초 데이터를 확보하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 어류 및 대상 물질

본 연구에서 사용된 전장 약 50cm(약 180g)의 건강한 뱀장어(그룹별 66 마리)를 고창의 한 양식장에서 구입하여 300L 수조에 7일간 순치 시켰다. 대상 물질은 Trichlorfon(metrifon, (DAESUNG MICROBIOLOGICAL LABS.CO.,LTD, korea)를 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

Trichlorfon 표준물질은 Trichlorfon 99%, (Sigma chemical co)을 구입하여 사용하였다. HPLC grade의 메탄올(Methanol), n-헥산(N-Hexane), 아세토니트릴(Acetonitrile), 물(Water)을 사용하였고 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하여 분석하였다.

2.3. TCF 표준 용액 및 시약 조제

TCF을 메탄올에 녹여 100ug/ml의 농도로 표준 원액을 만들었다. 이 후 표준 원액을 메탄올로 정밀히 희석하여 각각 2.5, 5, 10, 20 그리고 50 μ g/ml 농도로 만들어 분석하였다.

2.4. 항생제 투여 및 시료 채취

시험구는 적정 수온(30℃)과 비교 수온(20℃)을 설정하여 진행하였으며, 농도는 30℃, 20℃ 둘 다 어체중 kg 당 30 및 150 mg 이 되도록 하여 수조에 각 10 마리씩 30 분 간 침지 투여한 뒤 각각 깨끗한 여과 해수 수조에 수용하였다. 약욕이 종료된 직후를 기준으로 0, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 168, 336 시간마다 MS-222 로 마취시켜 각 실험구에서 10 마리씩 혈액, 근육, 간을 채취하였다. 혈액을 채취해 원심분리(4℃, 6000rpm, 15 분)하여 혈장 분리한 후 -80℃에서 보관하였으며, 실험 기간 동안 폐사한 실험 어는 없었다.

2.5. 시료 전처리

(1) 혈장

먼저 혈액 내 TCF 를 추출하기 위해 TCF 을 침지 투여한 샘플의 혈장 200ul 을 Eppendorf tube 에 취하여 1 ml의 Acetonitrile 를 첨가한다. 이 후 5 분동안 Sonication 을 한 후, 원심분리(6000rpm, 10 분)하고 상등액을 취하여 Syringe filter(0.2 μ m)로 여과한 다음 기기에 주입하여 분석하였다.

(2) 근육 시료

TCF 을 침지 투여한 근육 시료 2g 을 50 ml 원심분리관에 취하여 Acetonitrile 20 ml을 첨가 후 10 분간 진탕 혼합하고, 4℃, 13000rpm 에서 10 분동안 원심분리하여 상층 액을 취한다. 상층 액을 농축플라스크로 옮겨 40℃이하에서 감압 농축을 실시했으며 잔류물을 아세토니트릴 포화 헥산 10 ml로 재 용해하여 새로운 튜브에 옮긴다. 다시 농축플라스크에 포화 헥산 ACN 10 ml로 재 용해하고 앞의 용액과 합쳐서 10 분간 진탕 혼합한다.

분리가 될 때까지 정치하고, 헥산 층을 제거하고 40℃이하의 수욕 상에서 감압농축한다. 이후 잔류물은 50% 메탄올 1 ml로 재 해하고 4℃, 13000rpm 에서 10 분동안 원심분리 후 0.2 μ m membrane filter 로 여과하여 시험용액으로 한다.

(3)간 시료

TCF 를 침지 투여한 샘플의 간 시료 1g 을 50 ml 원심분리관에 취하여 ACN 10 ml을 가한 뒤 10 분간 진탕 혼합 후, 4℃, 13000rpm 에서 10 분동안 원심분리하여 상층 액을 취한다. 상층 액을 추출 액으로 하고, 메탄올 5 ml과 물 5 ml로 활성화 시킨 HLB cartridge 에 총 시료추출액을 흡착시켜 용출 액을 만들어 15 ml Corning tube 에 담아 40℃이하의 수욕 상에서 질소 가스로 감압농축하고, 잔류물을 아세토니트릴 포화 헥산 10 ml로 재 용해한 후 10 분간 진탕 혼합한다. 분리가 될 때까지 정치시킨 후, 헥산 층을 제거하고 40℃ 이하의 수욕 상에서 질소 가스로 감압 농축 한다. 잔류물은 50% 메탄올 0.5 ml로 재

용해하고 4℃, 13000rpm에서 10분동안 원심분리 후 0.2 μ m
멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

2.6. 기기 분석

TCF을 분석을 확인하기 위해 액체크로마토그래피/ 질량 분석기(LC-MS/MS)를 사용하였다. 분석용 칼럼은 Eclipse Plus C18 column(2.1 x 100mm, 1.8 μ m, Agilent Technologies), 컬럼 온도는 40℃, 이동상으로는 용매 A는 Water with 0.1% Formic Acid, 용매 B는 ACN with 0.1% Formic Acid을 이용해 Table. 1의 기울기 용매 조건으로 분석하였으며, 유속은 0.3 ml/min 속도로 유지시켰고, 주입량은 10 μ L로 하였다. 질량 분석기 조건을 설정하기 위해 각각의 분석 물질은 표준 물질을 사용하여 column을 통과시키지 않고 직접 텐덤 질량분석기로 분석하였다. 전기 분무 이온화 (ESI)방법으로 양이온(+, positive) mode에서 모 분자 (precursor ion)를 선택하고 최적화된 충돌 에너지(Collision energy)를 알아내어 딸 분자(product ion)를 생성 후 정성 및 정량 이온을 결정하는 MRM mode로 조건을 설정하여 분석하였다.

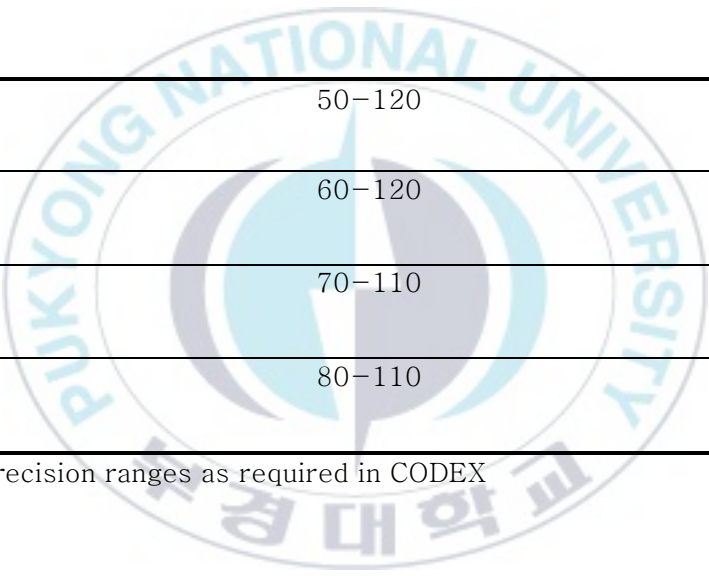
HPLC	Agilent 1290 infinity		
Column	Eclipse Plus C18 (2.1 mm x 100 mm, 1.8 μ m particle size)		
Mobile phase	(A) Water + 0.1% formic acid (B) Acetonitrile + 0.1% formic acid		
Flow rate	0.3 mL/min		
Oven temperature	40°C		
Injection volume	10.0 μ L		
MS	Agilent 6430 Triple Quad LC/MS		
Ionization	Electrospray ionization (ESI)		
Acquisition mode	Multiple reaction monitoring (MRM), positive ion mode		
Ionspray voltage	4 kV	Collision gas	Nitrogen
Ion source temp.	350°C	Nebulizer	40 psi
Gas Flow	11 l/min		

[Gradient program]		
min	%A	%B
0	90	10
1	90	10
7	20	80
8.5	20	80
11	90	10
17	90	10

Table 1. LC–MS/MS parameters for the analysis of TCF

2.7. 분석법 검증

TCF 분석법 검증은 CODEX 에서 제안하는 “식품 중 동물용 의약품 잔류시험법에 대한 Variation 가이드 라인”에 준하여 특이성, 직선성, 회수율, 정량 한계(LOQ, limit of quantification) 등으로 시험법의 신뢰성 및 적합성 여부를 검토하였다(Codex alimentarius commission, 2000). CODEX 에서 검량 곡선을 위해 0 을 포함하여 6 개의 농도, 상관계수 0.95% 이상을 요구하며, 각 농도에 대해 회수율 및 분석 오차(coefficient of variation)에 대한 범위를 정하여 정확도 및 정밀도에 대해 적정여부를 판단한다(Table. 2). 분석 오차는 표준편차를 평균으로 나눈 값을 백분율로 나타내는 값이다.



Concentration (mg/kg)	Acceptable recovery (%)	Relative standard deviation (CV,%)
≤ 0.001	50–120	≤ 35
0.001–0.01	60–120	≤ 30
0.0–0.01	70–110	≤ 20
> 0.1	80–110	≤ 15

Table 1. Accuracy and precision ranges as required in CODEX

2.8. 약동학적 해석

TCF를 투여한 뱀장어 장기 조직 별 약물 농도 측정결과를 바탕으로 비 구획 (Non-Compartmental) model에 따라 PKSolver (Zhang et al., 2010)을 적용하여 최고 농도 (C_{max}), 최고농도도달시간 (T_{max}), 배설 반감기 ($T_{1/2}$)등의 중요한 pharmacokinetic parameter를 계산하였다.

3. 결과

3.1. 직선성

TCF의 표준 곡선 작성을 하기 위해 메탄올로 희석하여 각각 2.5, 5, 10, 20 그리고 $50\mu\text{g/ml}$ 농도로 만들어 LC-MS/MS로 분석하여 각 농도에 대한 peak 면적을 이용해 표준 곡선을 작성하였다. TCF의 회귀계수(R^2)는 0.999로 우수한 직선성을 보였다. 이는 CODEX guideline 에서 제시하는 기준을 충족하였다(Fig. 1).

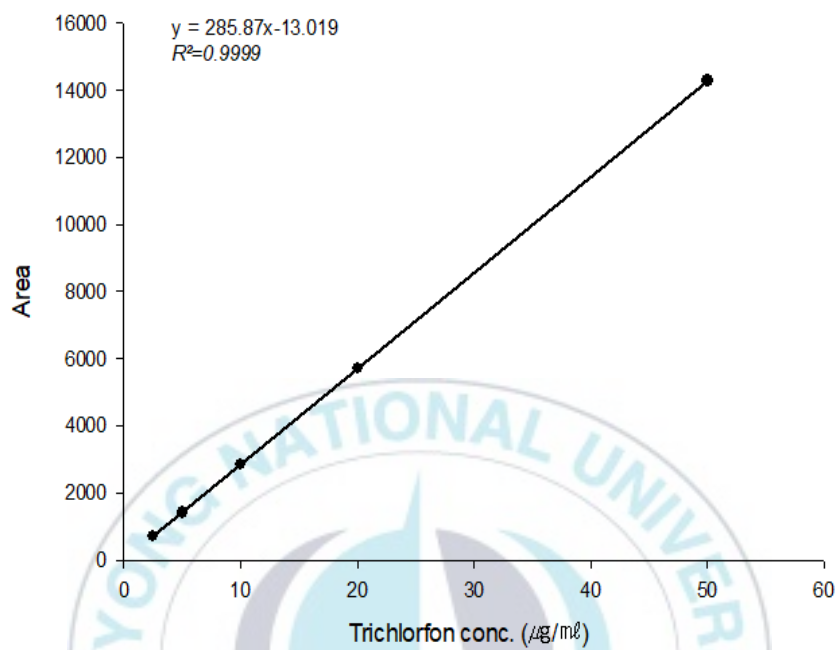


Fig. 1 Calibration curve for the assay of TCF

3.2. 검출 한계(Limit of detection, LOD) 및 정량 한계 (Limit of quantification) 및 회수율

(가) 검출 한계 및 정량 한계

TCF의 검출 한계(LOD)는 크로마토그램에서 각각 신호 대 잡음비(S/L ratio)를 3.3 이상을 하였으며, 정량 한계는(LOQ)는 각각 신호 대 잡음비 10 이상으로 계산하였다. 그 결과 TCF의 각 물질의 검출 한계는 *Anguilla japonica*의 혈청에서 $0.15 \mu\text{g/kg}$, 근육에서 $0.18 \mu\text{g/kg}$ 그리고 간에서 $0.11 \mu\text{g/kg}$ 으로 분석되었다(Table 3).

(나) 회수율

Anguilla japonica 의 시료 별 TCF 평균 회수율은 혈청 86 ~ 102%, 근육 108 ~ 111%, 간장 56 ~ 67% 였으며 변이 계수는 각 시료 별 모두 15% 이내로 국제기준을 충족하였다(Table 4).

(unit: μ g/kg)

Compound	Serum		Muscle		Liver	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Trichlorfon	0.15	0.46	0.18	0.55	0.11	0.07

Table 3. LOD and LOQ of TCF in spiked *Anguilla japonica* samples, LOD (Limit of detection) = $3.3 * \sigma / S$, LOD(Limit of quantification) = $10 * \sigma / S$ (σ : SD of the response, S : slope of the calibration curve)

Substance	Species	Matrix	Matrix curve(r^2)	Spiked Conc (μ g/kg)	Recovery rate(%)	CV(%)
Trichlorfon	<i>Anguilla japonica</i>	Serum	>0.999	5	86 $\pm$ 4.8	5.2
				10	93 $\pm$ 2.4	4.1
				100	102 $\pm$ 3.6	3.8
		Muscle	>0.999	5	110 $\pm$ 1.2	1.3
				10	108 $\pm$ 2.3	2.3
				100	111 $\pm$ 1.9	1.9
		Liver	>0.999	5	56 $\pm$ 4.2	4.3
				10	67 $\pm$ 3.4	3.5
				100	58 $\pm$ 2.6	2.7

Table 4. Recovery rate and coefficient of TCF in spiked *Anguilla japonica* samples

질량분석법은 대상 물질의 분자에서 생성한 이온의 질량전하비 (m/z ratio)로 나타낸다. 분석 모두 (+)mode에서 ESI를 선택했으며, full scan mode 내에서 질량스펙트럼을 확인한 후 precursor ion 과 product ion을 생성한 다음 특정 이온을 선택해 MRM조건을 확립하였다. TCF은 precursor ion인 m/z 259에 collision energy 11eV를 가해서 정량 이온 m/z 109를 얻었고 collision energy 9eV, 5eV를 가해서 확인 이온 m/z 79, m/z 221를 얻었다. 분자구조로 살펴보면 TCF은 McLafferty rearrangement 또는 m/z 127에서 물분자가 소실되어 m/z 109에서 최적의 감도를 확인할 수 있었다 (KFDA,2014). 따라서 MRM mode에서 최적화 된 각각의 fragment ion을 분석하였다.

3.3. Trichlorfon 약물에 대한 잔류 양상

뱀장어에 적정 수온(30℃) 하에 30mg/kg의 TCF을 침지 투여한 후 뱀장어 혈장, 근육, 간 내 TCF을 분석한 결과, 혈청에는 침지 투여 후 48시간 이후 검출 한계 이하로

나타났다. 근육과 간은 약물투여 336시간 이후 검출 한계 이하로 나타났다.

뱀장어에 비교 수온(20℃) 하에 30mg/kg의 Trichlorfon을 침지 투여 한 후 뱀장어 혈청, 근육, 간 내 TCF를 분석한 결과, 혈청에는 약물투여 96시간 이후 검출 한계 이하로 나타났다. 근육은 336시간 이후 검출 한계 이하로 나타났고 간은 약물투여 96시간 이후 검출 한계 이하로 나타났다(Fig. 2).



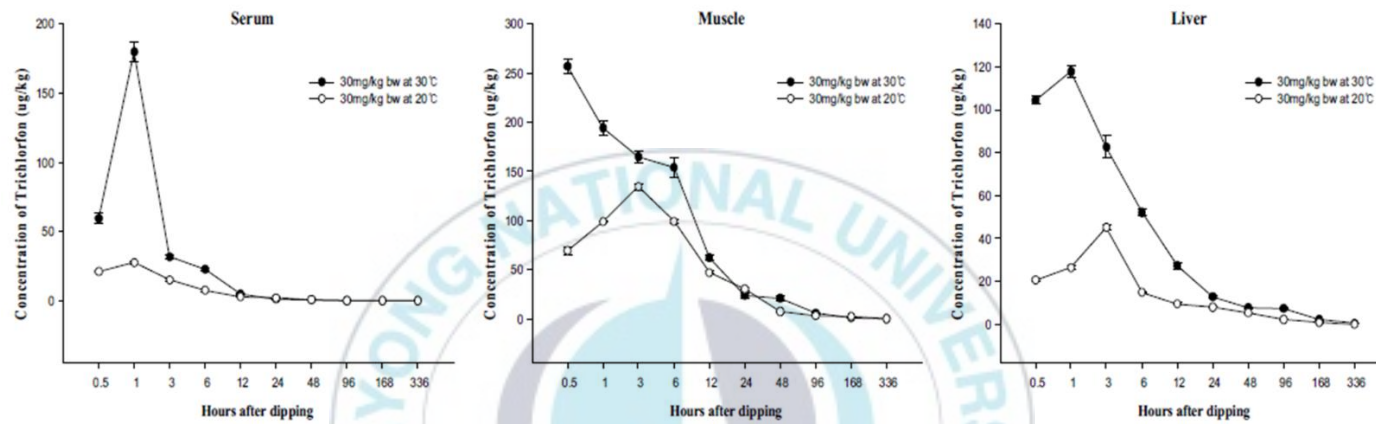


Fig. 2 Tissue concentration of TCF in *Anguilla japonica* after dipping treatment with different temperature

뱀장어에 적정 수온(30℃) 하에 150mg/kg의 TCF을 침지 투여한 후 뱀장어 혈청, 근육, 간 내 TCF을 분석한 결과, 혈청에는 약물 침지 후 48시간 이후 검출 한계 이하로 나타났다. 근육은 약물투여 336시간 이후 검출 한계 이하로 나타났고 간은 약물투여 후 168시간 이후 검출 한계 이하로 나타났다. 이후 검출 한계 이하로 나타났다. 뱀장어에 비교 수온(20℃) 하에 150mg/kg의 TCF을 침지 투여 한 후 뱀장어 혈청, 근육, 간 내 TCF을 분석한 결과, 혈청에는 약물투여 168시간 이후 검출 한계 이하로 나타났다. 근육은 약물투여 후 672시간 이후 검출한 계이하로 나타났고 간은 약물투여 168시간 이후 검출 한계 이하로 나타났다(Fig. 3).

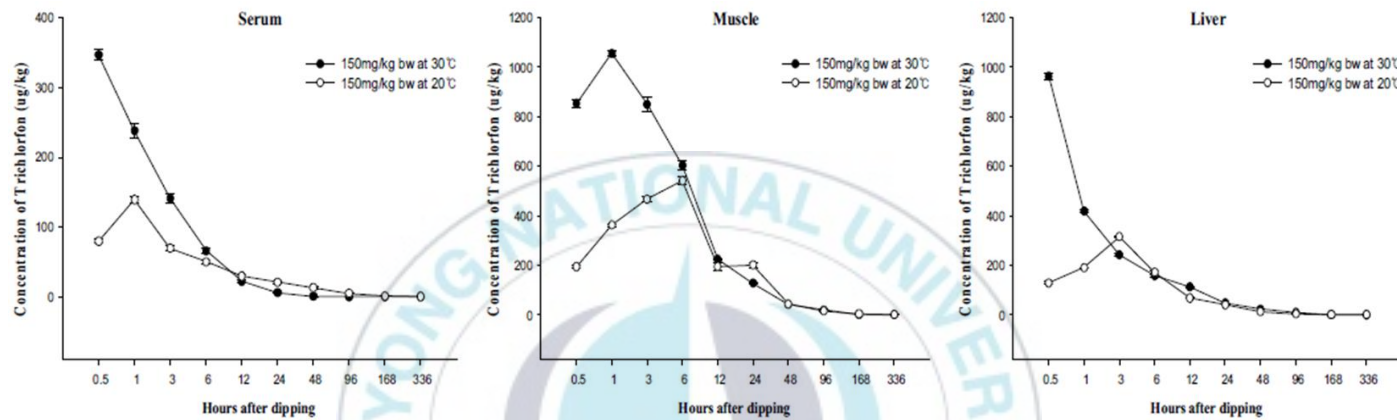


Fig. 3 Tissue concentration of TCF in *Anguilla japonica* after dipping treatment with different temperature

3.4. 약동학적 해석

TCF를 침지 투여한 후 뱀장어의 조직 별 잔류 약물 농도 결과를 바탕으로 약물 동태의 수학적 분석을 noncompartmental model에 따라 pharmacokinetic parameters를 계산한 결과를 온도와 용량에 따라 각각 Table 5, 6, 7 and 8에 나타내었다. 적수온인 30℃에서 30, 150 mg/kg으로 약육한 뱀장어 근육 내 TCF의 농도-시간곡선하 면적 ($AUC_{0-\infty}$)은 각각 2405.929, 9320.75 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$ 로 나타났다. 근육 내 최고 농도 도달시간 ($T_{\max}$) 및 최고 농도 ($C_{\max}$)는 각각 1.167749, 1.18943시간에서 237.5085, 1043.725 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 나타났다. 배설 반감기 ($t_{1/2}$)는 각각 6.90, 5.29시간으로 나타났고 평균체류시간 ($MRT_{0-\infty}$)은 각각 9.98, 8.0시간으로 나타났다. 비교 수온인 20℃에서는 30, 150 mg/kg으로 약육한 뱀장어 근육 내 TCF의 농도-시간곡선하 면적 ($AUC_{0-\infty}$)은 각각 1702.306, 9432.503 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$ 로 나타났다. 근육 내 최고 농도 도달시간 ($T_{\max}$) 및 최고 농도 ($C_{\max}$)는 2.45, 3.33시간에서 각각 129.9052, 504.9886 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 나타났다. 그 외 배설 반감기 ($t_{1/2}$)는 각각 7.16, 10.3시간으로 나타났고 평균체류시간

(MRT_{0-∞})은 각각 11.26, 16.16시간으로 나타났다.

적수온인 30℃에서 30, 150 mg/kg으로 약육한 뱀장어 혈청 내 TCF의 농도-시간곡선하 면적 (AUC_{0-∞})은 각각 372.5024, 1144.55 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$ 로 나타났다. 근육 내 최고 농도 도달시간 (T_{max}) 및 최고 농도 (C_{max})는 각각 1.02, 0.127시간에서 131.4142, 357.4207 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 나타났다. 배설 반감기 ($t_{1/2}$)는 각각 2.739, 2.12시간으로 나타났고 평균체류시간 (MRT_{0-∞})은 각각 2.085, 3.098시간으로 나타났다. 비교 수온인 20℃에서는 30, 150 mg/kg으로 약육한 뱀장어 근육 내 TCF의 농도-시간곡선하 면적 (AUC_{0-∞})은 각각 120.6328, 788.559 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$ 로 나타났다. 근육 내 최고 농도 도달시간 (T_{max}) 및 최고 농도 (C_{max})는 1.315, 1.146시간에서 각각 25.86978, 113.8059 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 나타났다. 그 외 배설 반감기 ($t_{1/2}$)는 각각 2.414691, 3.921533시간으로 나타났고 평균체류시간 (MRT_{0-∞})은 각각 3.907, 6.06시간으로 나타났다.

적수온인 30℃에서 30, 150 mg/kg으로 약육한 뱀장어 간 내 TCF의 농도-시간곡선하 면적 (AUC_{0-∞})은 각각 897.693,

1387.75 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$ 로 나타났다. 근육 내 최고 농도 도달시간 ($T_{\max}$) 및 최고 농도 ($C_{\max}$)는 각각 0.855, 0.13시간에서 112.9852, 375.198 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 나타났다. 배설 반감기 ($t_{1/2}$)는 각각 4.876, 0.65시간으로 나타났고 평균체류시간 ($\text{MRT}_{0-\infty}$)은 각각 7.281, 0.983시간으로 나타났다. 비교 수온인 20℃에서는 30, 150 mg/kg 으로 약육한 뱀장어 간 내 TCF의 농도-시간곡선하 면적 ($\text{AUC}_{0-\infty}$)은 각각 260.5681, 1747.146 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$ 로 나타났다. 근육 내 최고 농도 도달시간 ($T_{\max}$) 및 최고 농도 ($C_{\max}$)는 2.295, 5.398시간에서 각각 40.466, 66.8866 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 나타났다. 그 외 배설 반감기 ($t_{1/2}$)는 각각 8.067, 13.807시간으로 나타났고 평균체류시간 ($\text{MRT}_{0-\infty}$)은 각각 4.7867, 22.09시간으로 나타났다.

Parameter	Unit	Serum	Muscle	Liver
C _{max}	μ g/ml	25.8698	129.905	40.4662
T _{max}	h	1.31581	2.45422	2.29536
t _{1/2}	h	2.41469	7.16303	8.06754
AUC _{0-t}	μ g/ml*h	120.633	1702.31	260.568
AUC _{0-∞}	μ g/ml*h	120.633	1702.31	260.568
MRT _{0-∞}	h	3.90708	11.2604	4.78672

Table 2. Pharmacokinetic parameters of TCF in serum, muscle liver from *Anguilla japonica* after dipping concentration of 30 mg/kg bw at 20℃

Parameter	Unit	Serum	Muscle	Liver
$C_{\max}$	$\mu\text{g/ml}$	131.414	237.509	112.985
$T_{\max}$	h	1.0225	1.16775	0.85555
$t_{1/2}$	h	2.73945	6.90423	4.87662
AUC_{0-t}	$\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$	372.502	2405.93	897.693
$AUC_{0-\infty}$	$\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$	372.502	2405.93	897.693
$MRT_{0-\infty}$	h	2.08574	9.98927	7.28176

Table 3. Pharmacokinetic parameters of TCF in serum, muscle liver from *Anguilla japonica* after dipping concentration of 30 mg/kg bw at 30°C

Parameter	Unit	Serum	Muscle	Liver
C _{max}	μ g/ml	113.806	504.989	66.8867
T _{max}	h	1.14689	3.338	5.39822
t _{1/2}	h	3.92153	10.3544	13.8079
AUC _{0-t}	μ g/ml*h	788.559	9432.5	1747.15
AUC _{0-∞}	μ g/ml*h	788.559	9432.5	1747.15
MRT _{0-∞}	h	6.06087	16.1636	22.09

Table 4. Pharmacokinetic parameters of TCF in serum, muscle liver from *Anguilla japonica* after dipping concentration of 150 mg/kg bw at 20°C

Parameter	Unit	Serum	Muscle	Liver
C _{max}	μg/ml	357.421	1043.73	375.198
T _{max}	h	0.1278	1.18943	0.1361
t _{1/2}	h	2.12919	5.29793	0.65284
AUC _{0-t}	μg/ml*h	1144.56	9320.75	1387.76
AUC _{0-∞}	μg/ml*h	1144.56	9320.75	1387.76
MRT _{0-∞}	h	3.09846	8.01857	0.98358

Table 5. Pharmacokinetic parameters of TCF in serum, muscle liver from *Anguilla japonica* after dipping concentration of 150 mg/kg bw at 30°C

4. 고찰

본 연구는 뱀장어에서 TCF의 약동학적 잔류 시험을 통해 혈액, 근육, 간을 LC-MS/MS로 분석하였다. 체내 약물동태연구를 위해 PK Solver program (Zhang *et al.*, 2010)을 적용하여 비구획 (non-compartmental) model로서 최고 농도 (C_{max}), 최고농도도달시간 (T_{max}), 배설 반감기 ($t_{1/2}$) 등의 중요한 pharmacokinetic parameter를 계산하였다. (woo *et al.*, 2016)에서는 넙치에서의 TCF 노출에 따른 약물동태학적 연구는 넙치에 1mg/kg과 5mg/kg의 농도에서 약육한 결과 혈장에서 최고 농도(C_{max})는 각각 $3.1 \pm 0.5\text{ng/mL}$ 과 $31.8 \pm 3.7\text{ng/mL}$, 최고농도도달시간 (T_{max})은 6시간 그리고 배설 반감기 ($t_{1/2}$)는 $19.6 \pm 4.1\text{시간}$ 과 $14.4 \pm 2.8\text{시간}$ 으로 다소 긴 반감기를 가졌다. 이 뿐만 아니라 (Woo and Chung, 2019)에서 조피볼락에서의 TCF 약육시 혈장에서 약물동태학적 결과 15°C 의 30ppm과 150ppm에서 최고 농도(C_{max})는 $98.76\mu\text{g/mL}$, $253.42\mu\text{g/mL}$, 최고농도도달시간 (T_{max})은 둘다 1시간, 배설 반감기 ($t_{1/2}$)는 각각 6.10h,

7.34h이며 25° C의 30ppm과 150ppm에서 최고 농도(C_{max})는 479.63 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 301.49 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 최고농도도달시간 (T_{max})은 0.5, 1시간, 배설 반감기 ($t_{1/2}$)는 각각 6.86h, 4.54h의 결과를 얻었다. 이는 본 연구 결과와 다소 비슷하게 최고 농도까지 도달하는 시간은 적수온인 30도가 비교 수온인 20도 보다 더 빠르게 흡수가 되며 반감기 또한 빠르게 나타나는 것을 볼 수 있다. 즉 투여 농도가 동일 시 고수온이 약물의 잔류 시간이 짧아지는 것으로 약물이 체내에 머무르는 시간은 투여 농도 보다는 수온에서 영향을 더 크게 받는 것으로 나타났다. 어체 내에서 약물 동태는 약물 투여 농도, 배설, 배사, 분포 등과 같은 여러 인자에 의해 달라진다고 알려져 있다(Treves-Brown, 2000). 뿐만 아니라 어류에서 수온은 생리적 대사과정에 직접적인 영향을 주는 조절인자로서 항생제와 같은 약물이 체내 분포 및 배설에 수온이 큰 영향을 준다고 하였으며(Son et al., 2011), 잔류 기간은 낮은 수온 보다 고수온에서 더 짧다고 보고되었다(Zhang and Li, 2007).

또한 양식 어류의 TCF 휴약 기간에 대한 첫번째 연구는 (Brandal and Egidius., 1979)에 의해 보고 되어있다. 이는

연어류 근육에서 TCF가 소실된 것을 연구했지만 약물투여 12일 후 조직에서는 잔류물이 분석되지 않았다. TCF를 투여하는 동안 21일의 휴약기간을 권고하였다. 본 연구에서는 적수온인 30도와 비교 수온 20도로 나누었고, 각 온도에는 트리클로폰을 30, 150mg/kg bw이 되도록 하여 투여했다. 투여 21일 후 혈장, 근육, 간에서 TCF는 검출 되지 않았다.

뱀장어에서 TCF 소실에 대한 연구는 수행되지 않았다. TCF의 분포, 배설, 대사와 같은 생리적 과정은 어종, 크기, 실험 조건, 약물 농도 그리고 기간에 따라 달라지므로 연구 데이터를 비교하기 어렵다.

TCF은 국내외에서 각 식품에 대하여 잔류허용기준(MRL)이 설정되어져 있다. 국내에서는 Table 9 에서 보는 바와 같이 소, 돼지 및 양 등에 대하여 세부적으로 설정되어져 있으며 대개 0.05~0.1 mg/kg이다. 일본은 수산 생물에 대하여 8가지 분류 체계에 따라 MRL을 설정하고 있으며, 0.004~0.01 mg/Kg이다. 일본에서 TCF의 수산용의약품 허가는 한국과 같게 뱀장어, 잉어에 사용이 가능하도록 허가가 나 있는 실정이다(Table 10). 유럽에서는 0.01 mg/Kg으로 나타나지만, 어류에서의 개별적

MRL 수치는 나오지 않고 있다.

이상의 결과들을 종합하여 보면 본 연구의 결과들은 trichlorfon을 어류 양식에서 보다 안전하게 사용하기 위해 잔류 허용기준을 설정하는데 필요한 기초자료로 활용 될 것으로 기대한다.



식품명	MRL (ppm)	식품명	MRL (ppm)	식품명	MRL (ppm)
돼지 간 (Pig Liver)	0.1	소간 (Cattle Liver)	0.05	양간 (Sheep Liver)	0.1
돼지 근육 (Pig Muscle)	0.1	소 근육 (Cattle Muscle)	0.05	양 근육 (Sheep Muscle)	0.1
돼지 신장 (Pig Kidney)	0.1	소 신장 (Cattle Kidney)	0.05	양 신장 (Sheep Kidney)	0.1
돼지 지방 (Pig Fat)	0.1	소 지방 (Cattle Fat)	0.05	양 지방 (Sheep Fat)	0.1
유 (Milk)	0.0				

Table 9. maximum residue limit for TCF in Korea

식품분류	MRL(ppm)
Salmoniformes (such as salmon and trout)	0.004
Anguilliformes (such as eel)	0.01
Perciformes (such as bonito, horse mackerel, mackerel, sea bass, sea bream and tuna)	0.004
Other fish	0.01
Shelled molluscs	0.004
Except Shelled molluscs	-
Crustaceans	0.004
Other aquatic animals	0.004

Table 10. maximum residue limit for TCF in Japanese food

제 2 장 Trichlorfon이 뱀장어의 약물 대사 및 생리적기능에 미치는 영향

1. 서론

현재 양식 산업과 수산물 소비증가와 함께 수산물 안전성 문제도 커지고 있다. 현재 우리나라 양식 산업은 밀식, 수질악화, 과식과 같은 여러 요인들로 인해 질병 발생이 증가 하고 있다. 이런 질병 발생을 예방하거나 치료하기 위한 방법 중 하나로 수산용의약품을 사용한다. 그러나 약물을 정확한 용법, 용량에 맞추어 사용 하지 않으면 저항성 균주 발생, 약효 감소, 사람이 섭취 시 인체에 부작용으로 이어질 수 있다. 따라서 어류로 흡수된 약물의 독성, 축적성, 약물배출시간과 같은 자료를 검토해 약물을 모니터링하고 잔류허용기준(MRL)을 설정하는 것이 중요하다.

Trichlorofon(TCF)은 수산용의약품으로써 기생충인 *Dactylogyrus* sp. *Gyrodactylus* sp. 와 기생성 갑각류인

Lernaea cyprinacea, *Argulus japonicus*, *Caligus spinosus* 등의 구제를 위해 사용되고 있다. 그러나, 과도한 TCF사용은 생물체에 스트레스를 유발하며 이로 인하여 생물체는 병원체의 감염에 대하여 면역기능이 저하되어 쉽게 질병에 감염되게는 원인이 되기도 한다. TCF는 생물체내에서 DNA손상, 지질 과산화(LPO), 산화 스트레스를 유발하는 과산화수소(H₂O₂)와 같은 ROS의 생성을 유도한다고 알려져 있고 (Xu et al., 2012), 또한 TCF는 내인성 화합물, 환경 오염 물질, 약물 등의 생체 내 변환에 관여하며, 잠재적인 독소로부터 유기체를 보호하는데 중요한 역할을 하는 cytochrome P450(CYP)효소에 대하여서도 영향을 미친다고 알려져 있다(Kim et al., 2013). 또한, TCF의 사용은 수중 환경을 오염시켜 많은 문제를 야기시킨다고 알려져 있다. TCF는 짧은 반감기(약 57시간)를 나타내지만, 반복적이고 과도한 사용은 종종 대상 어류에 대한 독성 및 비표적 어종(생선, 게, 새우 등)에 대한 환경오염 등의 심각한 문제를 나타낸다고 알려져 있다(Baldissera., 2019). 또한 TCF는 유영 능력의 장애(Yonar et al., 2015), 혈액학적 파라미터(Venturini et al., 2015;Yonar et al., 2015), 면역 체계 및 대

사물(2015) 등에 부정적 영향을 미친다고 보고되었다. 또한 silver catfish(*Rhamdia quelen*)와 nile tilapia (*Orychromis niloticus*)에서도 TCF가 산화적 스트레스를 유발한다고 보고되었다(Thomaz et al., 2009; Baldissera et al., 2019.) 이와 같은 많은 보고서들은 TCF가 어류에 대하여 다양한 생리적 부작용을 야기한다는 것을 보여주고 있다.

따라서 본 연구에서는 뱀장어에 대한 TCF의 약물 안전성을 평가하기 위하여 뱀장어의 약물 대사 및 생리적기능에 미치는 TCF의 영향을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 어류

본 연구에서 사용된 총 50 마의 건강한 뱀장어 (70 ± 5 g)를 고창의 한 양식장에서 구입하여 300L 수조(수온 15℃, pH 6.5~7.0)에 5마리 씩 7일 동안 순치 시켰다.

2.2. RNA isolation and first-strand cDNA synthesis

뇌(Brain), 눈(Eye), 아가미(Gill), 심장(Heart), 위(Stomach), 간(Liver), 비장(Spleen), 신장(Kidney), 장(Intestin), 근육(Muscle), 생식소(Testis)는 무작위로 선택된 건강한 물고기 한 마리에서 해부 되었다. Total mRNA는 Trizol™(Invitrogen, USA)을 사용하여 매뉴얼에 따라 추출하였다. 추출된 RNA는 Nanodrop(Thermo Scientific™, NanoDrop™ Lite Spectrophotometer)를 사용하여 260/280 nm의 OD를 기준으로 정량화되었다. 모든 검체의 흡광도 비율은 1.8부터 2.1까지로 RNA 검체의 만족스러운 순도를 나타낸다. cDNA는 cDNAsynthesis kit(EnzoLife Science Inc, USA)를 사용하여 총 RNA의 1 µg에서 합성되었다. 합성된 cDNA는 사용할 때까지 -80℃에서 저장되었다.

2.3. Cloning of *Anguilla japonica* CYP1A, CYP1B, CYP1C1

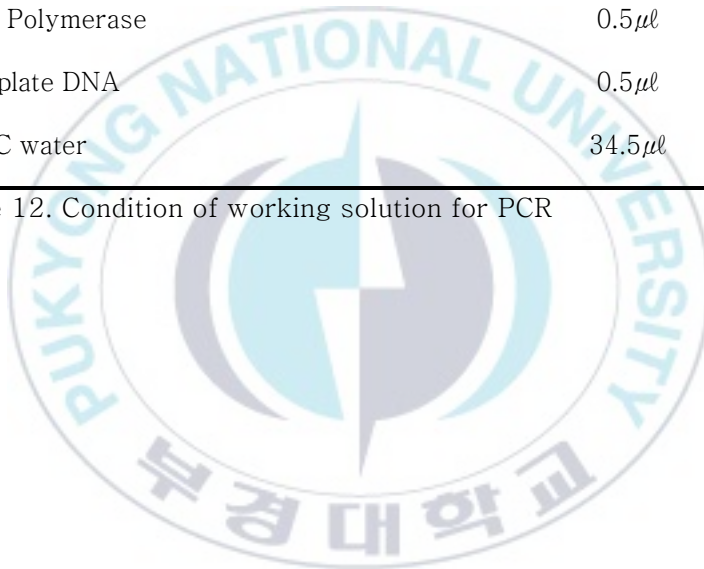
뱀장어로부터 CYP1 gene의 클로닝을 하기 위해 유전체 (genomic), 전사체(transcriptomic) 자료로써 차세대 염기서열 분석(NGS) 기술을 이용하여 간 조직을 분석하였다. 본 실험에 서 사용된 primer는 Table 11에 나타내었다. *Anguilla japonica* CYP1A, CYP1B, CYP1C1 cDNA는 ExTaq™ DNA polymerase (Takara, Japan)를 이용하여 (Table 12) PCR을 실시하였다(Table 13). 증폭된 PCR product는 1.2% agarose gel을 사용하여 PCR 여부를 확인하였고, FaverPrep™ GEL/PCR Purification Mini kit (FAVORGEN, Seoul, South Korea)를 이용해 추출하고 pGEM®-T Easy Vector(Promega)를 이용하여 ligation을 진행하였고, E. coli DH5 α competent cells을 이용하여 형질전환 하여 37℃에서 overnight하여 배양하였다. White colony를 선별하여 colony PCR을 진행하였고 Gel Doc image analysis system (Bio Rad, USA)를 통해 확인하였다. Target sample을 선별해 ALB 배지에 배양액 100 μ l를 넣어 37℃에서 160 rpm으로 overnight하였다. 이후 DNA 염기서열을 추출하여 MACROGEN Co, Ltd.,(DNA Sequencing Service, Seoul, Korea)에서 분석하였다.

Primer name	5' -3' sequence	Product size (bp)
AjCYP1A-F	ATGGCACTGATGATTCTACCCTTGG	1,603
AjCYP1A-R	CTTAAACTGAATGTGCGCGCACAAAC	
AjCYP1B-F	ATGGACATTCAGGAGGTGATGGA	1,619
AjCYP1B-R	TTAGTTCTGTTCTGAGGATGTGCTTT	
AjCYP1C1-F	ATGGCACTGTGGGACTCAGAGTTT	1,580
AjCYP1C1-R	TCATGCTGGTGAAACCAAGCCTAGA	

Table 11. Primers sequence sets used to amplify CYP gene for PCR

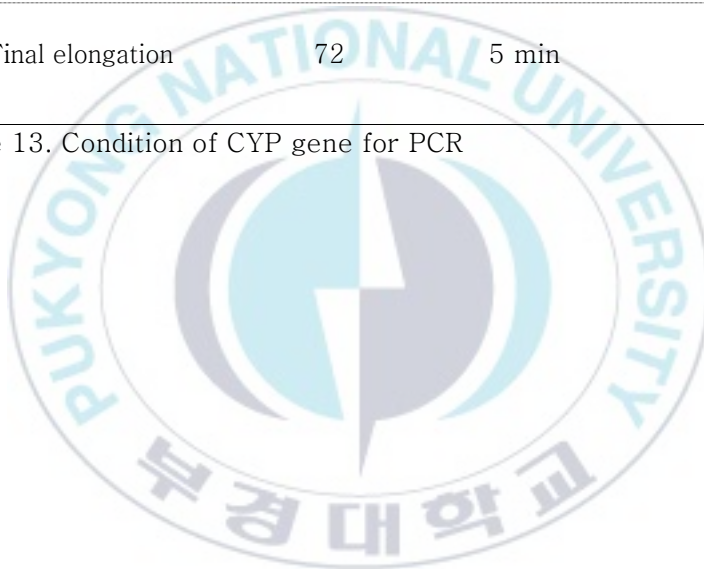
Components of PCR	Volume
10X reaction buffer	5 μ l
dNTP mixture	5 μ l
GC solution	2.5 μ l
F (10pmole/ μ l)	1 μ l
R (10pmole/ μ l)	1 μ l
DNA Polymerase	0.5 μ l
Template DNA	0.5 μ l
DEPC water	34.5 μ l

Table 12. Condition of working solution for PCR



Step	Temp (°C)	Time	Cycle
Initial denaturation	94	2 min	
Denaturation	95	30sec	30
Annealing	55	30sec	
Extension	72	30sec	
Final elongation	72	5 min	

Table 13. Condition of CYP gene for PCR



2.4. AjCYP1 isoform 의 염기서열 분석

염기서열 비교는 National Center for Biotechnology Information(NCBI)에 등록된 염기서열을 이용하였다. 염기서열 정렬은 Bio Edit Sequence Alignment Editor 와 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)을 이용하였으며, ClustalW multiple alignment(Bioedit)를 이용하여 확인하였다. ClustalW multiple alignment 를 사용하여 유전자 서열을 분석하였다(Hall, 1999).

2.5. Exposures, sampling and 전처리 과정

본 연구에서 사용된 총 50 마리의 건강한 뱀장어(약 150g)를 고창의 한 양식장에서 구입하여 300L 수조(20℃, pH 6.5~7.0)에 7 일 동안 순치 시켰다. 대상 물질은 Trichlorfon(metrifon, (DAESUNG MICROBIOLOGICAL LABS.CO.,LTD, korea)를 사용하였다.

서로 다른 온도(20℃, 30℃)를 만들기 위해 30℃ 그룹 탱크는 쿨러를 사용하여 온도를 유지시켜주었고 다른 그룹의 탱크는

하루에 1℃씩 온도를 올려주었다. 그리고 TCF 와 온도 사이의 포커스를 맞추기 위해 실험 기간 약 3 주동안 먹이를 먹이지않았다. 그리고 매일 환수를 해주었다.

두개의 그룹으로 나누었고, 각 그룹은 또 2 개의 노출에 대해서 서브그룹으로 나누었다. 첫번째 두번째 서브 그룹은 30 mg kg bw at 20℃ and 30℃으로 30분간 침지 하였다. 3,4 번째 그룹은 TCF concentration of 150 mg kg bw at 20℃ and 30℃으로 30 분간 침지 하였다. 이 후 투여한 뒤 깨끗한 수조에 수용하였다. 약육 종료 후 0시간을 기준으로 0, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 168, 336 시간마다 각 실험구에서 10 마리씩 혈액, 근육, 간, 아가미, 뇌 등을 채취하였다. 혈액은 6,000rpm 에 4℃에서 15 분동안 원심 후 혈장을 채취하여 실험하였고, 나머지 각 시료 0.1g 을 PBS 1 ㎖를 첨가한 뒤 얼음 위에서 마쇄하였다. 이후 13,000 G, 4℃에서 30 분간 원심 분리한 뒤 상층 액을 채취 후 희석하여 분석에 사용하였다.

2.6. 항산화 효소 활성

먼저 Superoxide dismutase(SOD) 활성은 상업용 kit(SOD

Assay Kit-WST, Dojindo Molecular Technologies, Inc)를 사용하였다. 96 well에 아가미 및 간 시료 20 μl , 200 μl WST working solution, 20 μl Dilution buffer, 20 μl Enzyme working solution을 분주하여 37℃에 20분동안 배양한 후 450 nm에서 측정하였다.

Catalase (CAT) 분석은 상업용 kit (Catalase colorimetric Activity Kit, ARBOR ASSAYS, USA)를 사용하였다. 96well plate에 시료 25 μl , 25 μl Supplied Hydrogen Peroxide Reagent 분주 후 RT에서 30분간 방치 후 25 μl Supplied Substrate, 25 μl HRP Reagent 분주 후 RT에서 15분간 방치 후 560nm에서 측정하였다.

Glutathione S-transferases (GST) 활성은 상업용 kit (Glutathione S-transferases (GST) Assay Kit, Sigma)를 사용하였다. 먼저 Dulbecco' s Phosphate Buffered Saline 9.8 ml, 200 mM L-Glutathione reduced 0.1 ml, 100 mM CDNB 0.1 ml를 만들어 Substrate solution을 만든 후 2 μl GST + 18 μl Sample Buffer와 Substrate solution 180 μl 를 분주 후 340nm에서 6분동안 매분 측정한다.

2.7. AChE activity

Acetylcholine esterase(AChE)는 Ellman (1961)의 방법을 변형하여 측정하였다. 50mM TrisHClbuffer (pH 7.5)로 희석한 후, 1.875 mM DTNB를 혼합하고 기질로 8.25mM Acetylcholinesterase iodide을 넣고, 파장 412 nm에서 5분간 측정하였다.

2.8. Stress indicator(Cortisol)

혈장 Cortisol 농도는 Cortisol ELISA kit(Enzo Life Sciences, USA)의 protocol에 따라 측정하였다.

3. 결과

3.1. 약물대사효소 유전자 서열 정보 확보 및 CYP1 family에서 조직 별 발현 양상

약물대사효소인 CYP 450을 이용해 수산 동물의 체내 약물 대사 능력과 생체 이물질 제거 평가하기 위해 CYP 450에 대한 실험을 진행하였다. 뱀장어의 CYP 450 gene 서열을 확보 하였다(Fig. 4). 이후 조직(뇌, 아가미, 심장, 위, 유문수, 간, 신장, 비장, 장, 근육, 생식소)에서의 약물대사효소 유전자 발현 분포 양상을 알아보았다. CYP450 gene의 종류에 따라서 간 뿐만 아니라 다른 조직에서 발현의 차이를 보였다(Fig. 5).

(a)

```

1 ATGGACATGATGATCTACCGTCTGCTGGGCTCTGCTGGGCTCTGAGAGAGCTCTGTGGGCT 60
MALMILPLVGPVSVSESLLA
61 ATGGACAGATATGATAGTACTACTGATGGGCTCTGGCTCTGATATTCAGAG 120
NATVGLVYLLMLIRSDIE
121 GGAGTGGAGGCTTTGGGAGGAGCTTAAGGAGCTGGCATATATGAAATGTGGTGGAGTGG 180
GLDRLPGPKPLPIQNVLEV
181 GGAGGAGGAGCTTGGCTTGGCTGGGAGTGGAGTGGTGGGAGGCTTGGGAGGCTTGGGAG 240
GANPHLSLTSAMSENFQGVYQ
241 ATGAGATGGGATGGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCT 300
IOLGMRPPLVNLGSETIRQA
301 CTGATGAGAGAGGAGAGGCTGGGAGGAGGAGGCTGGGAGGAGGCTGGGAGGAGGCTGGGAG 360
LIRGGEFAARPDLYSFQFI
361 AAGATGGGAGGCTTGGCTTGGGAGGAGGAGGCTGGGAGGCTGGGAGGAGGCTGGGAGGAG 420
NNGRLAFLFSSDQAGVWRIRH
421 AAGCTGGGAGGCTTGGCTTGGGAGGAGGAGGCTGGGAGGAGGCTGGGAGGAGGCTGGGAG 480
KLA MNALIRSFSTIKGSDILG
481 TGGCTGGCTTGGGAGGAGGAGGCTGGGAGGAGGCTGGGAGGAGGCTGGGAGGAGGCTGGGAG 540
SCVLEEHVYCKEGRGELVVKQLS
541 AAGCTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 600
NVTEASGSGFDPFRHIVVSV
601 AAGCTGATCTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 660
NVLGGMCFGRVYHDDLELL
661 AGCTTGGTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 720
SFVNLSDIEFGQVAGSGNPA
721 TTGATGGCTTGGTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTT 780
PPLRFLPSRMTKTFMDIN
781 GCTGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 840
ARENVFVQKIVTEHYRTFDK
841 AATATATCTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 900
NRLHDI DSLIDHCEDRKLD
901 GAGAGCTGATCTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 960
ENSGNVQVSEKIVGIVNDLF
961 GGAGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGG 1020
GAGFDITSLALSNAVYVLYA
1021 TGGCTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCT 1080
YYPDEKLIHQEMKDSVGLER
1081 AGCTGATCTTGGTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGG 1140
TPLLSDKAPLLEAFLEL
1141 TTGGGAGGCTTGGTGGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 1200
FHLSSFTF
1201 CTGATGATGATCTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGG 1260
LNGVFPKDTCTVFNQGVN
1261 CATGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 1320
HDPALWKKDPSFSFPERFLNJA
1321 GAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 1380
GVTVYNNKMDAEKVMVFMGR
1381 GAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 1440
RRCGLSEAGRTLEVYRA
1441 GTGAGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 1500
VOKLRPHLELPHPDITPEY
1501 GGAGGCTTGGGAGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 1560
GLTMKHKRRCQLRASLRVGG

```

(b)

```

1 ATGGACATGAGAGGATGATGAGAGGATGATGAGAGGATGATGAGAGGATGATGAGAGGATGATGAG 60
MDIQEVMEEMSRPSPRSLL
61 GGTGAGTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 120
ASVSLLVAVHLLWLWIORGRN
121 GGTGAGTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 180
ADGPPPGFPFNPVYDRAAGLG
181 AGGAGGAGGATCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 240
SAPHULFSPNMAQRNDEYD
241 AAGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCT 300
KLGSRNANVYVLLNGDADEHLL
301 AANAGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGG 360
KRGADFAGRPDFTSTDFVSN
361 GGTGAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 420
GKSMAFGNYSDDWWKAQRKIA
421 GAGACTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCT 480
GTTVTRFTSTCNVHTKRVLEN
481 GAGTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 540
HVLFGDRELHLLHVFMRNBER
541 AATATTTGGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGG 600
KVFQGPLIVITLGLACATCTACAGAGAGATTAAGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 660
TGGTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGG 720
GAGGATTTAGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCT 780
TATTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGG 840
YFPNPFKTIFFGNFRKRLNHEIF
781 TGGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 900
YVVLGQVVAEHRNLIQDSEHIV
841 AGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 960
NDFMTDFAFLALDGLSLIIG
901 GGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 960
VYLDKKEYVPPPTIVSDIEFASQ
961 GATGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 1020
GATGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 1080
GATGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 1140
GATGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 1200
AGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGG 1260
GATGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 1320
RIPKDTIVFVNDVSNHSP
1321 AAGTGGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 1380
KNNVRPEVFPNRRFLDKSGAL
1381 GAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 1440
GATGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 1500
EGLDLMMDLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLLHLL
1441 TTGAGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGG 1500
PKANRMAEPLSLDLYLFBLLH
1501 GGTGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 1560
PKAFSFAVEIHNSMALDIA
1561 GGTGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 1620
VQGHAKAEADGESTSEON

```

(c)

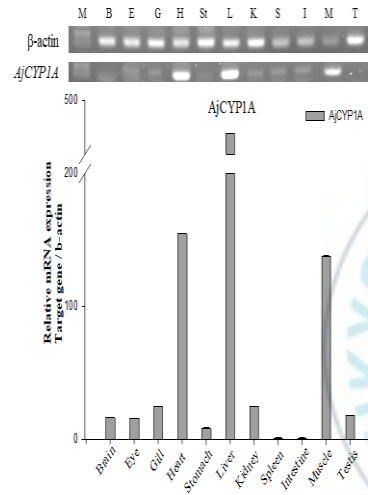
```

1 ATGGACATGAGAGGATGATGAGAGGATGATGAGAGGATGATGAGAGGATGATGAGAGGATGATGAG 60
MALWDOSEFGVKGSSIIREWS
61 GGTGAGTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 120
GQVDPALVASFIFLCLEAC
121 GTTGGGAGTGGAGAGGCTTGGGAGGAGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 180
LWVYDRLPHVAFIQLPWPY
181 GTGGTAAITGGGAGGCTTGGGAGGAGGAGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGG 240
VGNAMQLGQMPHITFSKLSK
241 AAGTATGAAAGGCTTGGGAGGAGGAGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAG 300
KLGNGVYDRLHLCNDIVVLRN
301 GATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 360
DTAIRGALLIQLHSTAFAGRPN
361 TTGCTGCTTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 420
FLSFQMISGGKSMFTFSNYS
421 GATGAGGAGGCTTGGGAGGAGGAGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAGGCTTGGGAGGAG 480
QWKMHRLHQLHIVSEALDVG
481 AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 540
SDIKKRAELQHVSEALDVG
541 GTTGTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 600
VYLRNSADGRVFNPSHELV
601 GGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 660
AAANVICALCFGRVGHEDL
661 GATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 720
EFTKLLSRVDFKFGETVAGGS
721 TTGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 780
LVQVMPWLQSFNPVRSIYQ
781 AACTTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 840
NFKELNNEELAFVVKQKVIQH
841 AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 900
REFTYNPVEVTRDMSDALISV
901 GATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 960
ENHGRNGLIKDFVEGIVIDL
961 ATTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1020
IGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
1021 AATATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1080
KYPHHLQGLDGLDVKVGRD
1081 HGGCTTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1140
XELPFTMSFVPTIPHSTISDV
1141 AGCTTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1200
TMRFTSFVPTIPHSTISDV
1201 ACCTTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1260
TEGVHPIPHVFNINQSV
1261 AATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1320
NHOPGKMKQPHVFNPSRFLD
1321 GATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1380
ENGLDKDLTSSVMIFSIGK
1381 AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1440
RRCGLDGLAKVSEVSLDGSY
1441 CTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1500
LWDFGSESNPSQELSLDGSY
1501 GGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1560
GLTLKPLNHSISAKLRGRFL
1561 GCTTGGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1620
GLVSPA

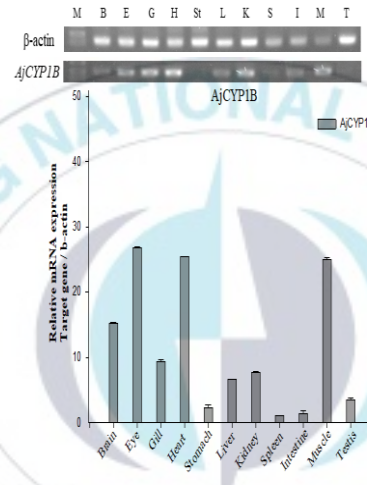
```

Fig. 4 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Anguilla japonica* CYP1A (*AjCYP1A*) (a), CYP1B (*AjCYP1B*) (b), and CYP1C1 (*AjCYP1C1*).

(a)



(b)



(c)

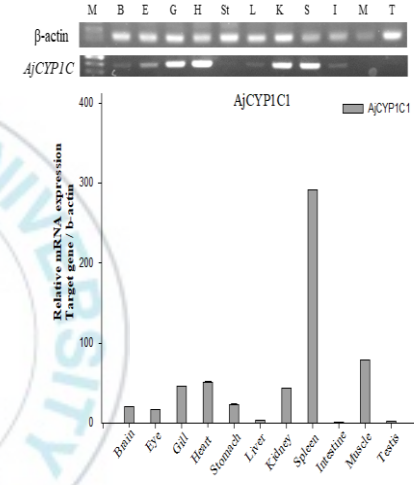


Fig. 5 RT-PCR and relative expression levels of *AjCYP1A*(a), *AjCYP1B*(b), and *AjCYP1C1*(c) in various tissue of *Anguilla japonica*. The β -actin gene was used as a reference housekeeping gene.

* 뇌(B; Brain), 눈 (E; eye), 아가미(G; Gill), 심장(H; Heart), 위(St; Stomach), 간(L; Liver), 신장(K; Kidney), 비장(S; Spleen), 장(I; Intestine), 근육(M; Muscle), 생식소(T; Testis)

3.2. 항산화 효소 활성

TCF를 약육한 후 뱀장어의 간을 바탕으로 항산화 효소인 SOD, CAT, GST를 분석한 결과를 아래의 그림으로 나타내었다. 스트레스에 의해 발생하는 활성산소 (ROS) 는 체내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포의 기능을 손상시키고, 조직의 생리적 반응을 저해한다. ROS에 대하여 체내에서는 항산화 효소인 SOD 및 CAT를 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있다. 하지만 Fig. 6, 7 and 8의 그래프와 같이 온도 및 농도 비교에서도 큰 차이를 보이지 않았다.

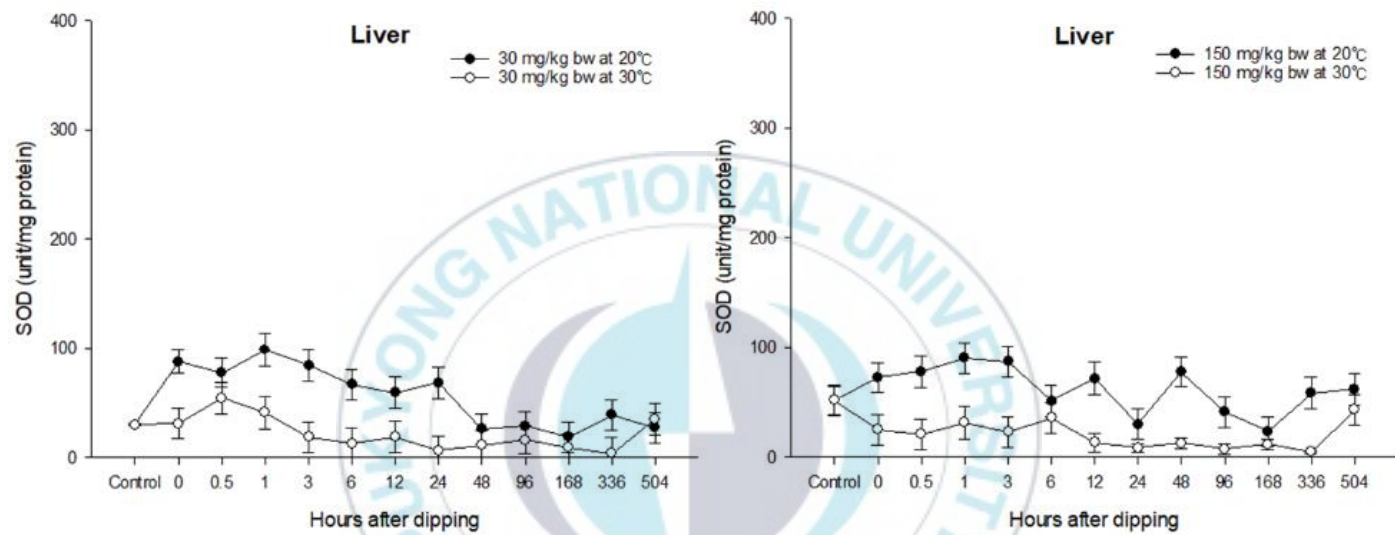


Fig. 6 SOD activity in liver of *Anguilla japonica* exposed to TCF (30 and 150 mg/kg bw) at different temperatures. Each value represents a mean value $\pm$ SD of three replicates (n = 10).

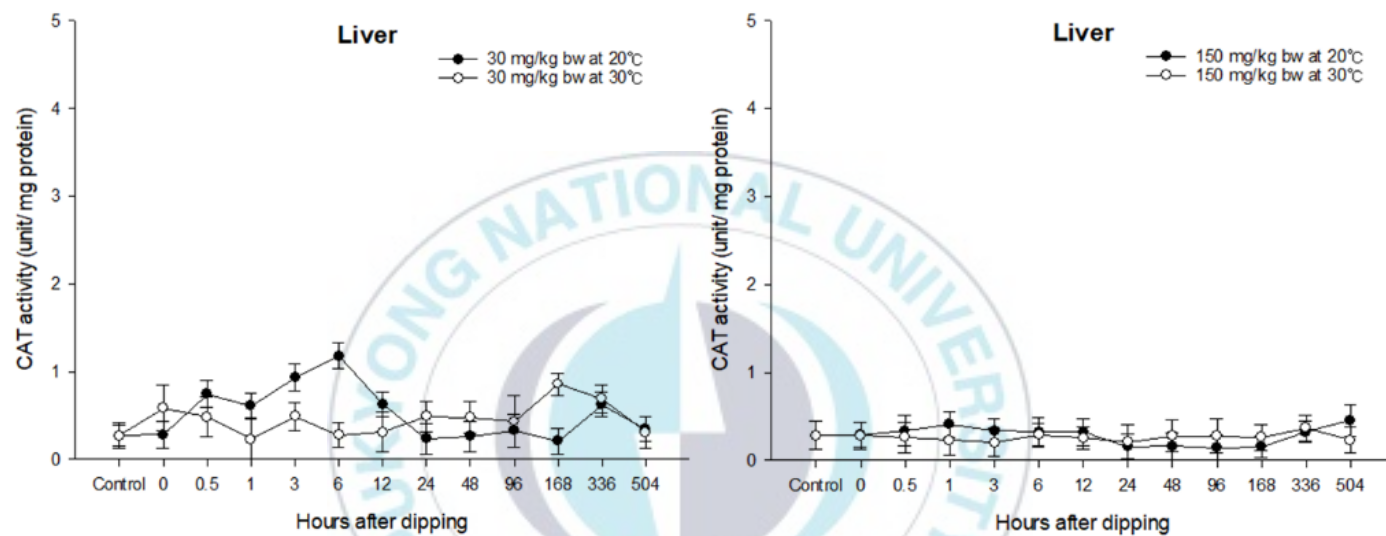


Fig. 7 CAT activity in liver of *Anguilla japonica* exposed to TCF (30 and 150 mg/kg bw) at different temperatures. Each value represents a mean value $\pm$ SD of three replicates (n = 10).

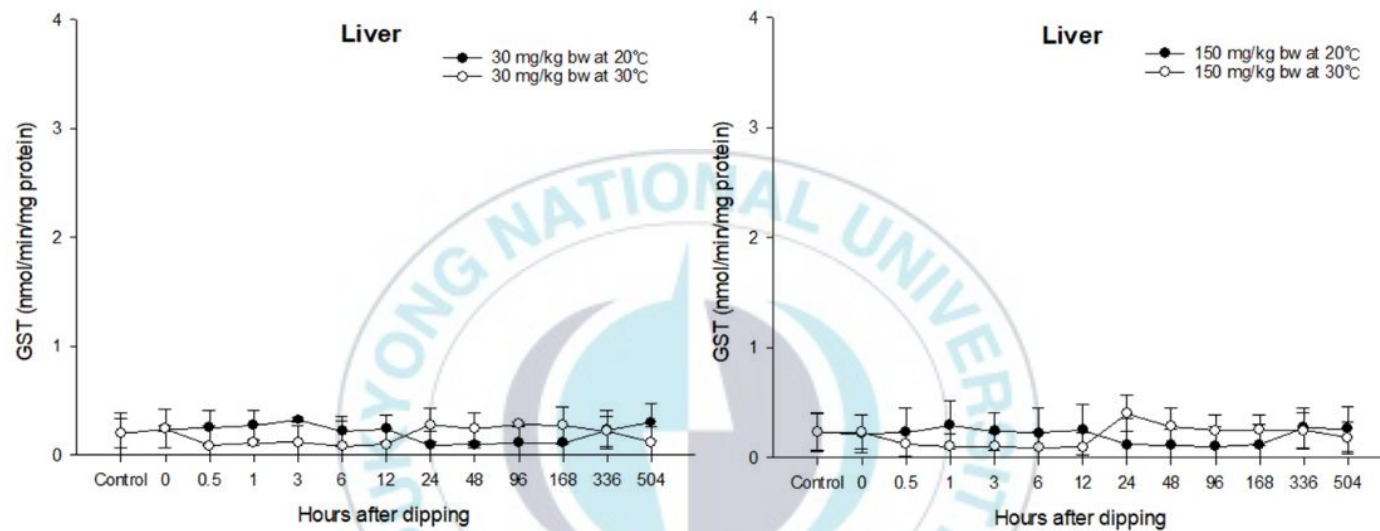


Fig. 8 GST activity in liver of *Anguilla japonica* exposed to TCF (30 and 150 mg/kg bw) at different temperatures. Each value represents a mean value $\pm$ SD of three replicates (n = 10).

3.3. AChE 활성

뇌에서 AChE 활성은 트리클로폰을 노출 직후부터 1시간까지 억제되었다가 다시 회복하는 양상을 보였음을 알 수 있다. Acetylcholinesterase 효소 활성이 감소되면 신경말단에서 아세틸콜린이 많아지게 되며, 이것은 몸의 조직과 기관 내에서 신경에 과도한 자극을 일으킬 수 있다(Fig. 9).



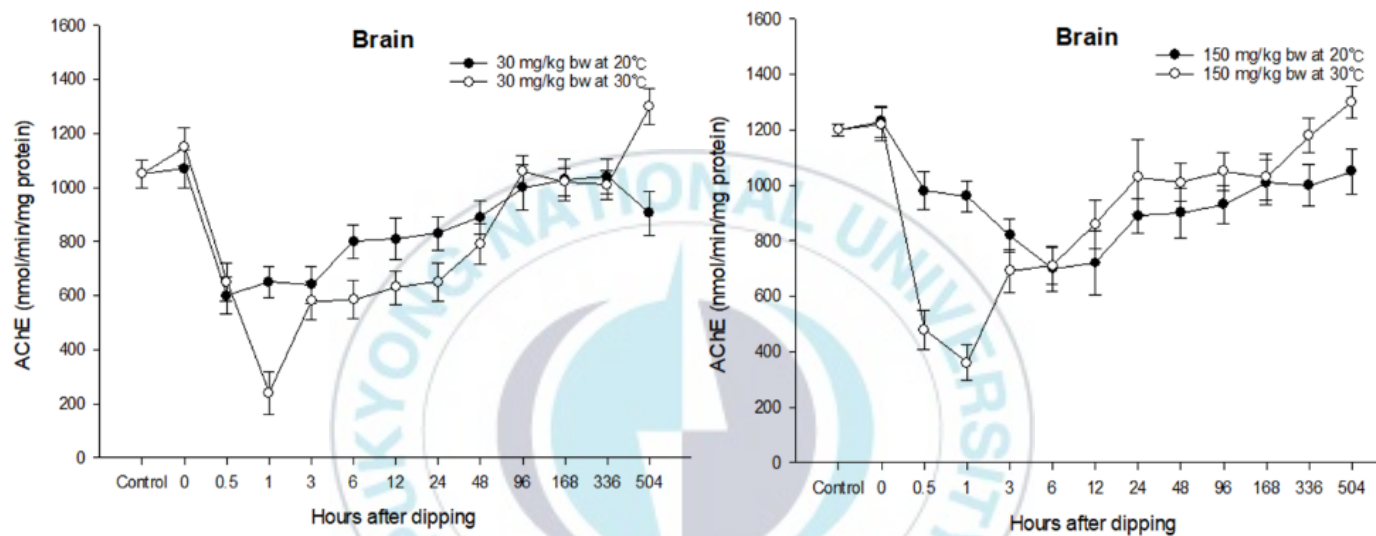


Fig. 9 AChE activity in brain of *Anguilla japonica* exposed to TCF (30 and 150 mg/kg bw) at different temperatures. Each value represents a mean value $\pm$ SD of three replicates (n = 10).

3.4. Stress indicator (Cortisol)

혈장 cortisol의 수치는 트리클로폰 투여 후 30분~1시간 사이에 가장 높은 수치를 보이며 이 후 감소하기 시작해 원래 상태로 회복되었다.

스트레스 호르몬인 cortisol 또한 신경 독성과 관련되어 있어 Acetylcholinesterase에 의해 발생하는 자극에 의해 cortisol 수치가 올라간것으로 생각된다(Fig. 10).



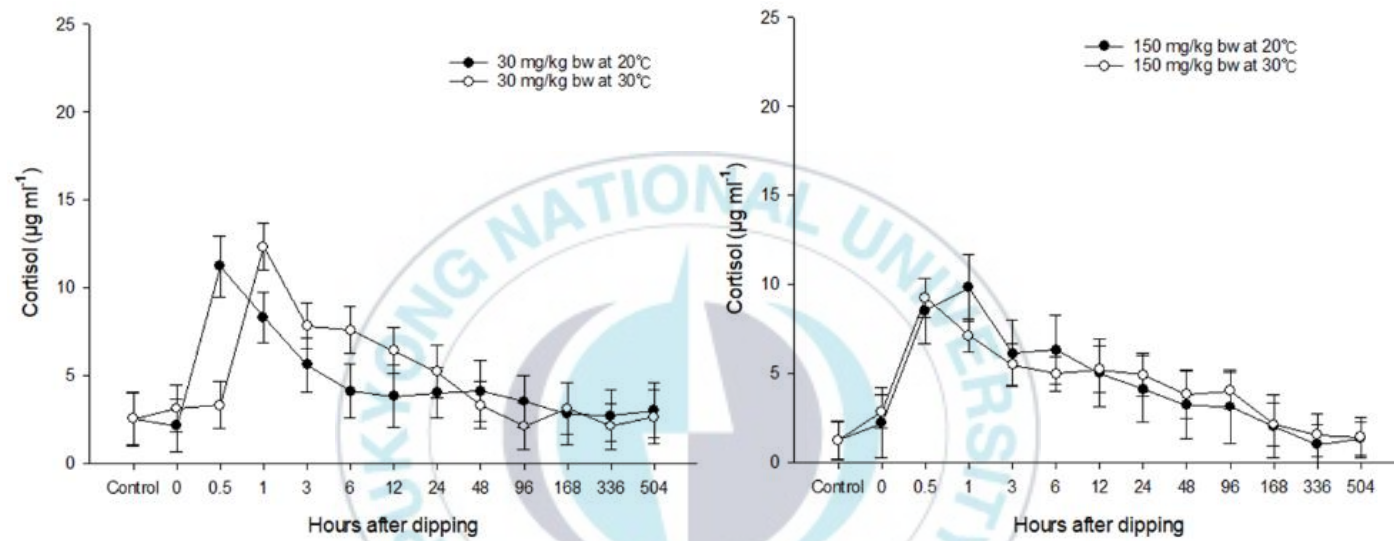


Fig. 10 Cortisol in plasma of *Anguilla japonica* exposed to TCF (30 and 150 mg/kg bw) at different temperatures. Each value represents a mean value $\pm$ SD of three replicates (n = 10).

4. 고찰

CYP450은 보조 인자로 heme을 갖는 효소로써 여러 종류의 기질들을 대사 반응 시킨다. monooxygenase 반응은 CYP450에 의해 촉매 되는 가장 대표적인 반응이며, 내인성 대사 산물이나 약물같은 잠재적인 독성물질이 이러한 작용에 의해 대사된다(Lee and Ahn, 2020). 본 연구에서 조직 별 유전자 서열 정보를 분석하였다. 보았다. T7/SP6 Primer를 통하여 분석한 DNA 염기서열이 AjCYP1A, AjCYP1B 및 AjCYP1C1임을 확인하였으며 그리고 AjCYP1A, AjCYP1B 및 AjCYP1C1의 Full-length cDNA을 얻었고, 520, 540, 527 크기의 단백질을 인코딩하는 1,560 bp, 1,620 bp 및 1,581bp ORF가 포함되어 있다. 그리고 조직 별 약물대사효소 gene family (*AjCYP1A*, *AjCYP1B*, *AjCYP1C1*) 발현 양상을 보았다. *AjCYP1A*에서는 간에서 발현량이 가장 높았고, *AjCYP1B*는 눈에서, *AjCYP1C1*은 비장에서 높은 발현 양상을 보였다.

본 연구에서는 뱀장어에 TCF 30, 150 mg/kg bw를 30분약 약 후 나타나는 독성을 평가하였다. 결과를 종합하여 평가하면

30, 150 mg/kg bw 항산화 효소 활성에서는 뚜렷한 변화를 알 수 없었지만 신경독성 평가인 AChE 활성에서 대조군과 비교해서 AChE 활성이 현저하게 감소했다. 이는 농도와 온도에는 영향을 받지 않았지만 기간에 영향을 받았다. 이 결과와 달리 (Callaghan et al., 2002)에서 AChE 억제제는 특히 OP에 의해 발생하며 온도 변화에 상대적으로 둔감하다는 것을 연구하였다. 그리고 *Calichthys calichthys*의 AChE 활성은 메틸 파라티온 500mg/L 투여 후 4일까지 억제되었으며 35일 되는 날에 조금씩 회복되었다(Silva et al., 1993). 본 연구에서도 AChE의 억제 양상과 유사하게 초기에 억제된 후 시간이 지남에 따라 다시 회복하였다. AChE는 아세틸콜린을 분해하여 신경자극을 전달에 관여하며, 신경 말단을 건너 신호를 전달하는 물질이다. AChE의 효소 활성이 감소되면 신경말단에 아세틸콜린이 많아지게 되고 결과적으로 조직과 기관 내에서 신경에 강한 자극을 일으킬 수 있다.

약물 노출 이후 스트레스를 유발하여 1차 반응인 cortisol이 분비된다. 스트레스는 어류의 catecholamine과 cortisol을 과다 분비하는 내분비 반응을 유도하여 비축된 에너지원의 빠른 소

비를 유발하여, 어체의 건강에 영향을 미칠 수 있다 (Pickering, 1993). 이상적인 어류의 cortisol 농도는 5 ng/mL 이하로 알려져 있다 (Pickering and Pottinger, 1989). 뿐만 아니라 (Chang et al., 2014)에서 수온이 높을 수록 cortisol의 수치가 증가하는 경향을 보였지만 본 연구에서 cortisol을 평가 결과 수온과 농도에 상관없이 TCF 노출 30분부터 급격히 올라간 후 시간이 지남에 따라 서서히 회복하는 양상을 보였다. 이는 강한 cortisol 농도의 상승을 보였지만, 시간이 지나면서 다시 회복된다고 알려져 있다 (Barton et al., 1980; Park et al., 1999)에서 수온 변화와 상관없이 넙치의 cortisol 농도는 다른 어종에 비해 넙치가 수온에 대한 강한 저항력을 가진 것으로 판단하였으며, 이는 스트레스 조건이나 종 특이성의 차이 및 실험 시 어류의 상태 등 여러요인이 작용한 것이라고 보고하였다.

SOD와 CAT는 항산화 효소로서 SOD는 O_2^- 를 H_2O_2 로 치환시키고 CAT는 H_2O_2 를 산소와 물로 환원시키는 역할을 한다. 그리고 GST는 많은 외인성물질을 해독화시키는 효소 중 하나로 산화스트레스에 대하여 방어 작용을 담당한다(Fournier et al., 1992). 어류 세포가 오염물질과 만나게 되면, 오염물질은

GSH와 직접적으로 포함 하거나 GST에 의해서 포함 하여 제거하게 동자개 항산화 효소 활성의 변동 된다(Zhang et al., 2004). 본 연구에서 SOD 활성은 30, 150 mg/kg bw 농도에서 유의한 차이를 보이지않았으며 CAT와 GST또한 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이는 TCF 30, 150 mg/kg bw 농도에서는 SOD 활성을 변화시킬 정도의 영향을 주지 않는다고 생각한다.



요약

본 연구에서는 뱀장어를 대상으로 하여 trichlorfon(TCF) 노출에 따른 체내 잔류량 및 약물동태학적 분석을 실시하여 잔류허용기준 설정에 필요한 자료들을 확보하였으며, 또한 TCF가 뱀장어의 약물 대사 및 생리적 기능에 미치는 영향을 조사하였다.

첫번째로 TCF 약독에 따른 뱀장어의 체내 약물 잔류 농도를 측정 한 결과를 바탕으로 PK Solver 프로그램을 이용하여 근육, 간 및 혈액에서 20℃와 30℃에서 30mg/kg과 150mg/kg에서 약동학적 파라미터(parameter)를 얻었다. 혈액, 근육 및 간에서 각각 Cmax는 25.8698–357.421, 129.905–1043.73, 40.4662–375.198이며 Tmax는 0.1278–1.31581h, 1.18943–3.338h, 0.1361–5.39822h 그리고 반감기($t_{1/2}$)는 2.12919–3.92153h, 5.29793–10.3544h, 0.65284–13.8079h의 값을 얻게 되었다.

두번째는 약물대사효소인 CYP450 유전자 발현을 분석하였다. TCF는 각 조직에서 CYP 1 family 유전자를 주로 발현시켰으며, *Ajcyp1A* 유전자는 심장과 간에서 주로 발현되었으며,

Ajcyp1B 유전자는 뇌, 눈, 심장에서 주로 발현되었다. 반면에 *Ajcyp1C1* 유전자는 조직간의 차이가 없이 발현되었다.

세번째는 Superoxide dismutase(SOD), Catalase(CAT), Glutathione-S-Transferase(GST), acetylcholinesterase(AChE) 및 Cortisol 활성을 측정하였다. 항산화 효소인 GST, SOD 및 CAT 활성은 큰 변화 없이 정상 상태로 유지 되었으며, AChE 활성은 뇌에서는 유의하게 억제되었다가 다시 회복하는 양상을 보였다. 또한 혈 스트레스 지표인 혈장 cortisol의 수치는 TCF 투여 후 시간이 경과함에 따라 컨트롤에 비해 증가하여 30분에서 1시간 사이에 가장 높은 수치를 보였으며 그 이후부터는 감소하기 시작해 원래 상태로 회복되었다.

본 연구결과들을 결과를 종합하여 보면, 뱀장어에서는 TCF가 약물대사과정에 영향을 미칠 뿐만 아니라 AChE의 활성을 저해하여 신경독성을 나타냄을 알 수 있다.

감사의 글

약리학 실험실에 들어온 지 벌써 2년이 넘었습니다. 캡스톤 디자인을 하면서 실험에 흥미를 가지게 되었고 주안이 형, 승현이와 같이 힘을 모아 약리방을 다시 일으켰습니다. 약리방에 들어오자마자 방장을 하게 되었고 석사 졸업까지 했지만 아직 너무 부족하고 철들지 못해서 애들한테 미안한 생각이 듭니다. 그래도 짧다면 짧은 석사 생활을 마무리 짓게 되었습니다. 아직 많이 부족하지만 많은 사람들의 도움으로 석사 생활을 끝냈습니다. 지금까지 도움을 주신 모든 분들께 감사하고 있습니다.

먼저 처음부터 졸업까지 항상 부족한 저에게 용기를 주시고 끝까지 도와주신 정준기 교수님께 감사의 인사를 드립니다. 앞으로의 조교 생활과 그 이후에 더 나은 모습으로 꼭 보답하겠습니다.

그리고 제게 진심 어린 조언과 격려를 해주신 강주찬 교수님, 김기홍 교수님, 김도형 교수님, 허민도 교수님께도 감사의 인사를 드립니다.

그리고 석사 생활을 하면서 알게 된 준규 햄, 모르는 거 있으면 잘 알려주셔서 감사하고 재미있었습니다. 그리고 병리방에 효은이, 다혜, 노을이, 준용이 형 실험도 도와주고 같이 놀기도 하고 덕분에 심심하지 않은 대학원 생활을 보내서 행복했습니다.

그리고 약리방 선배님들 감사드립니다. 특히 영림이 형 시간 나

실 때마다 약리방에 오셔서 맛있는 거 사주시고 인생선배로서
조언도 해주시고 정말 감사하게 생각하고 있습니다. 그리고 수
지 누나 캡스톤디자인때부터 아껴주시고 많은 도움을 주셔서
늘 감사한 마음을 가지고 있습니다.

그리고 대학원 간다고 했을 때 제 의견 존중해주시고 항상 뒤
에서 지켜봐 주시면서 기다려 주셔서 감사합니다.

마지막으로 내 여자친구 지원이에게 긴 시간은 아니지만 지금
까지 내 옆에서 도와주고 사랑해줘서 고마워. 자기가 내 옆에
없었다면 석사 졸업하고 남는게 많이 없었을 거야!! 진심으로
고맙고 나도 항상 옆에서 의지할 수 있는 남자로 더 성장해 나
갈게 더 지켜 봐줘!!

끝으로 다시 한번 저를 도와주신 모든 분들께 감사의 마음을
전합니다. 많은 도움을 받은 만큼 저도 다른 사람들에게 도움이
되도록 하겠습니다. 감사합니다.

-2021.01.20-

참고 문헌

- Ahn, Tae-Young, Dal Sang Jeong, Jun-Hwan Kim, and Ju-Chan Kang. "Changes of Hematological Constituents in the Mullet, *Mugil Cephalus* Exposed to Chromium." *Journal of fish pathology* 26, no. 2 (2013): 89-97.
- Baldissera, Matheus D, Carine F Souza, Sharine N Descovi, Renato Zanella, Osmar D Prestes, Antonio FIM de Matos, Aleksandro S da Silva, Bernardo Baldisserotto, Anderson Gris, and Ricardo E Mendes. "Disturbance of Energetic Homeostasis and Oxidative Damage Provoked by Trichlorfon as Relevant Toxicological Mechanisms Using Silver Catfish as Experimental Model." *Chemico-biological interactions* 299 (2019): 94-100.
- Barton, BA, CB Schreck, RD Ewing, AR Hemmingsen, and R Patino. "Changes in Plasma Cortisol During Stress and Smoltification in Coho Salmon, *Oncorhynchus Kisutch*." *General and comparative endocrinology* 59, no. 3 (1985): 468-71.

Barton, Bruce A, Carl B Schreck, and Lesley D Barton.

"Effects of Chronic Cortisol Administration and Daily Acute Stress on Growth, Physiological Conditions, and Stress Responses in Juvenile Rainbow Trout." *Diseases of aquatic organisms* 2, no. 3 (1987): 173–85.

Brandal, PO, and E Egidius. "Treatment of Salmon Lice (Lepeophtheirus Salmonis Krøyer, 1838) with Neguvon®—Description of Method and Equipment." *Aquaculture* 18, no. 2 (1979): 183–88.

Callaghan, Amanda, Thomas C Fisher, Albania Grosso, Graham J Holloway, and Mark Crane. "Effect of Temperature and Pirimiphos Methyl on Biochemical Biomarkers in Chironomus Riparius Meigen." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52, no. 2 (2002): 128–33.

Chandrasekara, LWHU, and A Pathiratne. "Body Size–Related Differences in the Inhibition of Brain

Acetylcholinesterase Activity in Juvenile Nile Tilapia (Oreochromis Niloticus) by Chlorpyrifos and Carbosulfan." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, no. 1 (2007): 109–19.

Cukurcam, Suna, Fengyun Sun, Ilse Betzendahl, Ilse–Dore Adler, and Ursula Eichenlaub–Ritter. "Trichlorfon Predisposes to Aneuploidy and Interferes with Spindle Formation in in Vitro Maturing Mouse Oocytes." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 564, no. 2 (2004): 165–78.

da Silva, Helena Cristina, Heitor Segundo Guilherme Medina, Edith Fanta, and Metry Bacila. "Sub–Lethal Effects of the Organophosphate Folidol 600 (Methyl Parathion) on Callichthys Callichthys (Pisces: Teleostei)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 105, no. 2 (1993): 197–201.

Fournier, Dominique, Jean–Marc Bride, F Hoffmann, and François Karch. "Acetylcholinesterase. Two Types of

Modifications Confer Resistance to Insecticide." *Journal of Biological Chemistry* 267, no. 20 (1992): 14270–74.

Heo, Gang Joon, and Geewook Shin. "Efficacy of Benzocaine as an Anaesthetic for Crucian Carp (*Carassius Carassius*).*" Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 37, no. 2 (2010): 132–35.

Kim, Jin Woo, Mi Young Cho, Bo–Young Jee, Myoung Park, and Na Young Kim. "Administration and Use of Aquaculture Drugs in Korea." *Journal of fish pathology* 27, no. 1 (2014): 67–75.

Lee, Jinseok, and Sung–Hoon Ahn. "Recent Trends in Drug Interaction Studies Based on Drug Metabolism." *Yakhak Hoeji* 64, no. 1 (2020): 8–20.

Li, Bo, Yu Ma, and Yu H Zhang. "Oxidative Stress and Hepatotoxicity in the Frog, *Rana Chensinensis*, When Exposed to Low Doses of Trichlorfon." *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 52, no. 7 (2017): 476–82.

Li, Zhi-Hua, Josef Velisek, Roman Grabic, Ping Li, Jitka Kolarova, and Tomas Randak. "Use of Hematological and Plasma Biochemical Parameters to Assess the Chronic Effects of a Fungicide Propiconazole on a Freshwater Teleost." *Chemosphere* 83, no. 4 (2011): 572–78.

Park, MR, YJ Chang, and DY Kang. "Physiological Response of the Cultured Olive Flounder (*Paralichthys Olivaceus*) to the Sharp Changes of Water Temperature." *J Aquac* 12 (1999): 221–28.

Pickering, AD. "Endocrine-Induced Pathology in Stressed Salmonid Fish." *Fisheries Research* 17, no. 1–2 (1993): 35–50.

Pickering, AD, and Tom G Pottinger. "Stress Responses and Disease Resistance in Salmonid Fish: Effects of Chronic Elevation of Plasma Cortisol." *Fish physiology and biochemistry* 7, no. 1–6 (1989): 253–58.

Regoli, Francesco, and Maria Elisa Giuliani. "Oxidative

Pathways of Chemical Toxicity and Oxidative Stress Biomarkers in Marine Organisms." *Marine Environmental Research* 93 (2014): 106–17.

Smulders, Chantal JGM, Tjerk JH Bueters, Regina GDM Van Kleef, and Henk PM Vijverberg. "Selective Effects of Carbamate Pesticides on Rat Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors and Rat Brain Acetylcholinesterase." *Toxicology and applied pharmacology* 193, no. 2 (2003): 139–46.

Thomaz, Juliana Montovani, Nathan Dias Martins, Diana Amaral Monteiro, Francisco Tadeu Rantin, and Ana Lúcia Kalinin. "Cardio–Respiratory Function and Oxidative Stress Biomarkers in Nile Tilapia Exposed to the Organophosphate Insecticide Trichlorfon (Neguvon®)." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, no. 5 (2009): 1413–24.

Venturini, Francine P, Fernanda D Moraes, Lucas RX Cortella, Priscila A Rossi, Claudinei Cruz, and Gilberto Moraes. "Metabolic Effects of Trichlorfon (Masoten®) on the

Neotropical Freshwater Fish Pacu (*Piaractus Mesopotamicus*).\" *Fish physiology and biochemistry* 41, no. 1 (2015): 299–309.

Woo, Soo Ji, and Joon Ki Chung. "Cytochrome P450 1 Enzymes in Black Rockfish, *Sebastes Schlegelii*: Molecular Characterization and Expression Patterns after Exposure to Benzo [a] Pyrene.\" *Aquatic Toxicology* 226 (2020): 105566.

Xu, Wei-Na, Wen-Bin Liu, and Zhao-Pu Liu. "Trichlorfon-Induced Apoptosis in Hepatocyte Primary Cultures of *Carassius Auratus Gibelio*.\" *Chemosphere* 77, no. 7 (2009): 895–901.

Xu, WeiNa, WenBin Liu, XianPing Shao, GuangZhen Jiang, and XianngFei Li. "Effect of Trichlorfon on Hepatic Lipid Accumulation in Crucian Carp *Carassius Auratus Gibelio*.\" *Journal of aquatic animal health* 24, no. 3 (2012): 185–94.

Yonar, M Enis, Serpil Mişe Yonar, Ayşegül Pala, Sibel Silici,

and Naim Saglam. "Trichlorfon-Induced Haematological and Biochemical Changes in Cyprinus Carpio: Ameliorative Effect of Propolis." *Diseases of aquatic organisms* 114, no. 3 (2015): 209–16.

Zhang, JF, XR Wang, HY Guo, JC Wu, and YQ Xue. "Effects of Water-Soluble Fractions of Diesel Oil on the Antioxidant Defenses of the Goldfish, Carassius Auratus." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58, no. 1 (2004): 110–16.

Zhang, Linbao, Lihua Qiu, Huifeng Wu, Xiaoli Liu, Liping You, Dong Pei, Leilei Chen, Qing Wang, and Jianmin Zhao. "Expression Profiles of Seven Glutathione S-Transferase (Gst) Genes from Venerupis Philippinarum Exposed to Heavy Metals and Benzo [a] Pyrene." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 155, no. 3 (2012): 517–27.

Zhang, Yong, Meirong Huo, Jianping Zhou, and Shaofei Xie. "Pk solver: An Add-in Program for Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis in Microsoft

Excel." *Computer methods and programs in biomedicine* 99, no. 3 (2010): 306–14.

김지수, 이지훈, 이수진, and 박관하. "Amoxicillin 의 근육투여에 따른 수온별 넙치 체내 약동학적 특성." *한국어병학회지* 제 28, no. 1 (2015).

노혜지, 조향현, and 김희경. "Sialic Acid 를 지표성분으로 하는 유청가수분해단백분말의 기능성식품 개발연구-I. 효소분리로 7% Sialic Acid 가 표준적으로 함유된 유청가수분해단백분말 (7%) 의 랫드를 이용한 90 일 반복경구투여 독성시험 평가 연구." *Journal of Milk Science and Biotechnology* 34, no. 2 (2016): 99–116.

백수경, 민은영, and 강주찬. "조피볼락, *Sebastes Schlegeli* 의 혈액학적 성분변화에 미치는 구리 및 온도의 복합적 영향." *한국어병학회지* 제 27, no. 1 (2014).

이진석, and 안성훈. "대사 기반 약물상호작용 연구의 최신 경향." *약학회지* 64, no. 1 (2020): 8–20.