

이학석사 학위논문

Dibutyl phthalate와 di-ethylhexyl
phthalate의 노출에 의한 동자개
(*Pseudobagrus fulvidraco*)의 생화학적 반응



2005년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

금 유 화

금유화의 이학석사 학위논문을 인준함

2005년 2월 25일

주 심 농학박사 허 민 도 

위 원 이학박사 정 준 기 

위 원 이학박사 강 주 찬 

목 차

목차	i
Abstract	iv
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 실험어	6
2. 실험환경	6
3. 실험 사료 제조 및 투여	6
4. 시료 채취	7
4-1. 전혈	7
4-2. 혈장	8
4-3. 조직	9
5. 조직의 효소 활성	9
5-1. Acetylcholinesterase (AChE)	9
5-2. Glutathione peroxidase (GPx)	10
5-3. Glutathione reductase (GR)	10
5-4. Glutathione-S-transferase (GST)	11
6. Glutathione (GSH) 함량	11
7. protein	11
8. 통계	12
III. 결 과	13
1. 혈액	13

1-1. 혈액성상	13
1-1-1. DBP	13
1-1-2. DEHP	13
1-2. 혈장유기성분	17
1-2-1. DBP	17
1-2-2. DEHP	17
1-3. 혈장무기성분	21
1-3-1. DBP	21
1-3-2. DEHP	21
1-4. 혈장효소	24
1-4-1. DBP	24
1-4-2. DEHP	24
2. Acetylcholinesterase(AChE)의 활성	27
2-1. DBP	27
2-2. DEHP	28
3. 글루타치온 관련효소	31
3-1. Glutathione S-trasnferase	31
3-1-1. DBP	31
3-1-2. DEHP	31
3-2. Glutathione peroxidase	35
3-2-1. DBP	35
3-2-2. DEHP	35
3-3. Glutathione reductase	38

3-3-1. DBP	38
3-3-2. DEHP	38
4. 글루타치온 함량	41
4-1. DBP	41
4-2. DEHP	41
IV. 고 찰	44
1. 혈액성상 및 혈액화학	44
2. Acetylcholinesterase	46
3. 글루타치온 함량 및 글루타치온 관련 효소	48
V. 요약	53
VI. 감사의 글	55
참고문헌	56

**Effects of dibutyl phthalate and di-ethylhexyl phthalate on
biochemical response in bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco***

Yoo-Hwa Keum

*Department of Fish Pathology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Organisms of wild life are exposed to many chemicals in their environment. Especially, phthalate esters have attracted the public attention due to their potential health hazards in recent years. Phthalate esters are plasticizers used in food handling and storages. Some of them are considered to be ubiquitous but present slight endocrine-disrupting properties. In order to evaluate the impact of dibutyl phthalate (DBP) and di-ethyl hexyl phthalate (DEHP) in aquatic organism, its effects on haematological parameters, neurotoxicity and antioxidant response in bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco* were studied. Fish were fed with diets containing 100, 500 and 1,000 mg phthalate ester/kg diet ad libitum for 4 weeks or 8 weeks, and controls were fed without phthalate ester.

In haematological factors, red blood cell count, hemoglobin concentration, hematocrit levels in bagrid catfish administrated with DBP and DEHP containing diet

(1,000 mg/kg diet) were decreased. DBP fed fish showed decreasing level of total protein, albumin, total cholesterol and triglyceride after 4 and 8 weeks administration, however, effect of DEHP was shown after 8 weeks exposure. Plasma glucose and magnesium level were significantly increased in the experimental group, meanwhile plasma chloride, calcium and phosphate levels were not affected by DBP and DEHP exposure. Plasma alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphates and lactate dehydrogenase enzyme activities in fish administrated with DBP and DEHP showed increasing tendency.

Remarkable reduction in acetylcholinesterase activity which is an indicator of neurotoxicity was recorded in most of the tissues in exposed fish to DBP and DEHP. Moreover, the most profound enzyme inhibition was observed in brain and muscle acetylcholinesterase activity was observed in the DBP and DEHP exposed groups of fish.

The DBP treatment group showed higher concentration of hepatic and gill glutathione compared with those in the control group. However, consumption of the DEHP diet increased the glutathione contents only in liver of exposed fish. Highest concentration of DBP (1000 mg/kg diet) induced a significant increase in the activity of glutathione peroxidase in all organs at time intervals of 4 and 8 weeks. Liver and gill glutathione reductase activity in fish when compared to control at 8 weeks. Liver and gill glutathione reductase activity in fish showed a significant increase in its activity in the all DBP exposed fish when compared to control at 8th weeks. However, renal glutathione reductase activity was significantly increased in fish fed 1000 mg DBP/kg diet. Liver glutathione reductase activity in fish fed DEHP were investigated same pattern like DBP, whereas gill and kidney glutathione reductase activities showed significant increase in highest concentration of DEHP after 8 weeks exposure.

I. 서론

지구상의 생물들은 서식 환경에 존재하는 많은 화학물질에 노출되어 있고, 건강에 영향을 주는 여러 화학물질들은 자연적으로 생긴 것도 있지만 주로 내분비교란물질, 농약, PAHs (polyaromatic hydrocarbons), 중금속 및 phthalic acid esters (PAEs)와 같은 인위적인 오염물질이다 (Watanuki *et al.*, 2003). 이 중, 최근 몇 년동안 PAEs의 노출과 관련된 위험에 대하여 관심이 증가되고 있다 (Casajuana and Lacorte, 2004).

PAEs는 1930년대 이후로 주로 고분자 물질의 유연성을 제공하기 위한 플라스틱 가소제로 사용되고 있다. 이 중, DEHP (di-ethyl hexyl phthalate)는 전체 가소제의 25%를 차지할 정도로 가장 광범위하게 사용되었다 (Karle *et al.*, 1997). 하지만 IARC (International Agency for Research on Cancer)에서 인간에게 발암을 일으킬 수 있는 그룹으로 분류하였고 (Chilvers *et al.*, 1984), 유럽 대부분의 나라에서는 이 물질 사용을 금지하였으며 우리나라에서도 식품 포장 시 사용을 금지하였다 (홍 등, 2002). 또한, 그 이성질체인 DBP (di-butyl phthalate)도 종이 코팅, 니스, 라커, 매니큐어, 치과용품 및 음식 포장제 등에 사용되고 있다 (Salazar *et al.*, 2004).

DEHP와 DBP는 제조 과정 및 후에 고분자 물질에서 쉽게 휘발되거나 떨어져 나와 환경에 광범위하게 존재한다 (Jobling *et al.*, 1995). 특히, phthalate가 수계로 들어가는 주요 경로는 플라스틱 제조 공장에서 배출되는 폐수 인 것으로 알려져 있고, 플라스틱 제품과 폐기물에서 용출되기도 한다. 또한 플라스틱 제조 공정에서 대기로 배출되는 phthalate esters가 빗물에 의해 수환경으로 유입되는

것도 알려져 있다 (Daniel and Bratt, 1978; Thomas, 1973). 실제로, 수질과 저질의 phthalate esters의 분포 조사결과 독일의 강과 호수 등에서 DEHP의 농도는 0.33~97.8 $\mu\text{g}/\text{L}$, 저질에서 0.21~8.44 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 조사되었으며 (Hermann *et al.*, 2002), 영국, 스웨덴, 미국 및 네덜란드의 강의 DEHP 농도는 0.31~0.6 $\mu\text{g}/\text{L}$ 범위였다 (Fatoki and Vernon, 1990). 가까운 일본의 경우, DEHP는 가장 많이 검출되는 phthalate로 N.D.~0.39 $\mu\text{g}/\text{L}$ 의 농도가 조사되었다 (日本 環境廳, 1998). 우리나라의 경우, 섬진강 및 낙동강 수계에서의 DEHP 농도는 N.D.~6.920 $\mu\text{g}/\text{L}$, DBP는 N.D.~10.28 $\mu\text{g}/\text{L}$ 로 나타났으며 저질에서 DEHP와 DBP의 농도는 각각 N.D.~2044.96, N.D.~32.46 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 조사되었다 (홍 등, 2002; 김 등, 2004). 또한 어류에 축적되어진 농도는 DEHP가 N.D.~227.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이고, DBP는 N.D.~19.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 나타났다. 이러한 수계에 유입된 DEHP와 DBP는 octanol/water 분배 계수 (K_{ow})가 높아 그 결과로 저질의 유기탄소와 불 사이에 평형은 저질에 강하게 부착하는 특징을 가진다. 또한, 헨리 상수가 각각 0.004와 0.27 $\text{Pa} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ 로 낮고 이것은 오직 물 표면에서 천천히 휘발 될 것이라는 것을 가르킨다. 즉, DEHP와 DBP의 거의 대부분이 수층에서 평형상태로 남아있을 수 있기 때문에 수생생물에 지속적인 영향을 줄 수 있다.

PAEs는 체내 과산화물질을 증식시키는 원인물질 (Reddy and Lalwani, 1983) 및 내분비교란물질 (김 등, 2002) 이라고 알려져 있다. DEHP는 높은 농도에서 설치류의 간암을 유발시키기도 하고, 과산화증식 및 항산화 효소에 영향을 끼친다 (Brock *et al.*, 2002; Reddy, 1990). 또한, 부고환내 정자수의 감소, 효소 활성의 변화 (Mattison *et al.*, 1990) 및 정소내의 아연결핍 (Thomas *et al.*, 1982) 이 일어나는 등 용성생식기관에 강한 독성작용을 일으킨다 (Mattson *et al.*, 1990).

DBP의 경우 간비대와 과산화 증식을 일으키고 (NTP, 1995), 유방암 cell line에 estrogenic을 나타내며 (Jobling *et al.*, 1995), 생식률을 저하시킨다는 연구 보고가 있다 (Foster *et al.*, 2000). 한편, 지금까지 알려진 어류에 대한 DEHP와 DBP의 독성에 대한 연구에는 Japanese medaka (*Oryzias latipes*) 에 DEHP 노출과 (Kim *et al.*, 2002) zebrafish와 rainbow trout에 DBP 노출과 (Van den Belt *et al.*, 2003) 관련하여 antiestrogenic함을 증명하였고, Sabourault *et al.* (1999)과 Cravedi and Elisabeth (2002)는 lauric acid hydroxylation (LAH)이 이들 원인 물질에 대한 생물학적 지표로써 가치에 대하여 논의하였으며, Watanuki *et al.* (2003)은 common carp (*Cyprinus carpio* L.)을 대상으로 면역학적인 관점에서 연구하였다. 하지만, 아직까지 phthalate에 노출에 따른 어류의 영향에 관한 연구는 많이 조사되어있지 않고 설치류에 비하여 생식과 관련있는 연구에 편중되어 있다 (Kim *et al.*, 2002). 따라서, 어류에 DEHP와 DBP의 노출 시 야기될 수 있는 다면적인 독성 연구가 필요한 실정이다.

일반적으로 혈액은 환경오염을 감시하는 수단으로 사용되고 있다 (Chandraseker, 1990). 혈액화학 및 혈액성상은 어류의 영양, 질병 및 수질 변화에 따른 스트레스 해석 차원의 연구가 많이 이루어지고 있다. 예를 들어 당, 지질 및 단백질 대사에 관계하는 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)는 어류가 질병에 걸렸거나 간과 신장 같은 기관에 염증이 생기면 장기가 파괴되어 혈중으로 유출되어 혈중 농도가 높아지고 (Kusuda *et al.*, 1976), 혈장내 총단백질은 독성물질에 노출 후 감소하는 경향을 보인다 (Hodson *et al.*, 1992).

Acetylcholinesterase (AChE)의 활성은 해양오염에 대한 조기오염경보지표 중

의 하나이다(Kramer, 1994). AChE는 신경전달에 중요한 효소로, acetylcholine을 가수분해하는 역할을 한다. carbamate계나 유기인계농약은 설치류나 어류의 AChE 활성을 저해하는 대표적인 물질로 알려져 있고 (Weiss *et al.*, 1964; Dutta and Arends, 2003), phthalate의 한 물질인 Di-ethyl-phthalate (DEP)가 잉어과 어류인 *Cirrhina mrigala*의 뇌의 AChE에 대한 유의적인 감소를 나타낸다는 보고가 있지만 (Niveditia *et al.*, 2002), 아직까지 어류에 DEHP와 DBP로 인한 AChE의 활성에 관한 보고는 없다.

글루타치온과 글루타치온과 관련된 효소는 환경오염으로 인한 산화스트레스에 대한 생물학적 방어체계로 매우 중요하다 (Rodriguez-Ariza *et al.*, 2000; Livingstone, 1998). 글루타치온은 비효소적 방어체계로 외인성물질이 어체내로 들어가면 산화스트레스를 받게 되는데 제 일선에서 방어를 한다 (Fang, 1975). 또한 글루타치온과 관련된 효소에는 glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) 및 Glutathione S-transferase (GST)가 있다. 이것은 외인성물질의 노출에 의한 생화학적 지표로써 해양 오염 지표로 사용되어져왔다 (Livingstone, 1998; Payne *et al.*, 1987; Rodriguez-Ariza *et al.*, 1991). 살충제나 유기 외인성물질에 대한 글루타치온과 관련된 효소는 증가한다는 보고가 있는 반면 (Radi *et al.*, 1985), 설치류에서 DEHP나 clofibrate와 같은 과산화물 증식 물질의 노출로 인하여 감소한다는 보고도 있다 (Reddy *et al.*, 1980; Reddy, 1990; Seo *et al.*, 2003). 하지만 어류에서 DBP와 DEHP에 대한 연구 보고는 없다.

본 연구에서 사용된 실험어는 한국 특산종인 동자개 (*Pseudobagrus fulvidraco*)이다. 동자개는 인도차이나반도에서 기원하여 우리나라에서는 황해와 남해로 유입되는 하천과 북한, 중국, 일본, 대만 및 시베리아에 분포한다 (정, 1986). 사니

질이 많은 곳의 바닥에 서식하고 알을 낳을 때 진흙을 파서 산란하며 어린 불고기, 알, 갑각류 및 실지렁이 같은 것을 먹는 육식어류이다. 따라서 저질에 잘 부착하는 특성을 가지는 DBP와 DEHP에 수생생물이 노출될 가능성은 매우 크다 (한 등, 2001). 이러한 습성과 관련하여 본 실험은 8주동안 DEHP와 DBP에 장기간 사료로 노출하여 동자개의 혈액학적 변동, 신경독성 및 항산화 반응을 조사 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

동자개는 충북 내수면 연구소에서 분양받아 부경대학교 수권환경학 연구실로 수송하여 3주 이상 순치시킨 후 외관상 질병이 없는 건강한 개체를 사용하였다. 평균체장 : 170.92 ± 2.14 mm, 평균 체중 : 54.25 ± 1.69 g의 동자개 (*Pseudobagrus fulvidraco*)를 사용하였다.

2. 실험환경

동자개의 적정 수온으로 알려진 $22^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$ 를 유지하기 위하여 항온실 ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$)에서 실험을 실시하였다. 시험 수조는 $340 \times 240 \times 300$ mm (50L)을 사용하여 한 수조당 실험어 8마리씩 수용하였다. 실험에 사용한 수질 성상은 2~3일 간격으로 해양오염공정시험법(해양수산부, 2002)에 따라 측정하였으며 결과는 Table 1과 같다.

3. 실험 사료 제조 및 투여

실험사료는 di-2-ethylhexyl phthalate ($\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$, CAS registry number; 117-81-3)와 di-butyl phthalate ($\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$, CAS registry number; 84-74-2)를 오징어 간유 (squid liver oil)에 녹여 각각의 phthalate ester 농도가 0, 100, 500 및 1000 mg/kg인 사료를 조제하여 펠렛 제조기로 압출·성형하였으며, sieve로 사료를 고르게 친 후 이를 24시간 건조시킨 뒤 -20°C 에서 냉동 보관하였다 (SAC 1600, 삼아냉장). 조제된 사료로 4주 및 8주 동안 매일 어체중의 1%를 공

급하였다. 사료의 조성은 조단백질 48%, 조지방 5%, 조섬유 4%, 조회분 15%, 칼슘 1% 및 인 2.7% 가 포함되었다.

Table 1. Water quality of tap water used in this experiment

Parameters	Value (mean±S.E)
Temperature(°C)	22.3±0.8°C
pH	7.2±0.5
Dissolved oxygen (mg L ⁻¹)	6.7±0.5
Ammonia (µg-at N L ⁻¹)	8.5±0.6
Nitrite (µg-at N L ⁻¹)	1.5±0.2
Nitrate (µg-at N L ⁻¹)	7.5±0.7
Phosphate (µg-at P L ⁻¹)	4.6±0.4
Hardness (mg L ⁻¹)	231.7±5.7

4. 시료 채취

4-1. 전혈

시료 채취는 실험 사료 투여 개시일로부터 4주째와 8주째에 이루어졌으며 혈액을 채취하기 전 24시간동안 절식시켰다. 실험어를 3-aminobenzonic acid ethyl ester (Sigma chemical, St. Louis, MO)로 마취 후, 혈액응고를 막기 위해 heparin-Na (25,000 I.U., 신풍제약)을 처리한 주사기로 미부정맥 (caudal vein) 으로부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 수치의 변동을 막기 위해 적혈구 (Red Blood Cell; RBC)수, 혈색소 (hemoglobin; Hb)농도 및 헤마토크리트 (hematocrit; Ht)를 즉시 분석하였다. 적혈구수는 Hesser (1960)의 방법을 사용하여 0.1% trypan-blue가 첨가된 phosphate Buffer (pH 7.4)로 1:200배 희석하여

광학현미경 (CX40RF200, OLYMPUS, Japan)으로 계수하였다. 혈중 혈색소 농도는 cyan-methemoglobin법을 사용하여 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)에 혈액을 넣은 후 흡광도 540nm에서 측정하였다. 헤마토크리트는 capillary tube에 혈액을 넣고 12000rpm, 5분간 원심분리 (01501, HAWKSLEY AND SONS Ltd., England) 후, Hawksley reader로 측정하였다. 이를 바탕으로 평균 적혈구 용적 (mean corpuscular volume, MCV), 평균 적혈구 혈색소 량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH) 및 평균 적혈구 혈색소 농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)를 아래의 계산식을 이용하여 산출하였다.

$$MCV(\mu\text{m}^3) = \text{Ht}(\%) / \text{RBC}(\text{cells mm}^{-3}) \times 10$$

$$\text{MCH}(\text{pg}) = \text{Hb}(\text{g } 100\text{mL}^{-1}) / \text{RBC}(\text{cells mm}^{-3}) \times 10$$

$$\text{MCHC}(\%) = \text{Hb}(\text{g } 100\text{mL}^{-1}) / \text{Ht}(\%) \times 100$$

4-2. 혈장

채취한 혈액은 4℃, 6000rpm, 5분간 원심분리하여 (MIKRO 22R, Hettich, Germany) 혈장을 분리하였다. 혈장의 유기성분은 총단백질량 (total protein), 알부민 (albumin), 총콜레스테롤 (total cholesterol), 글루코즈 (glucose) 및 중성지방 (triglyceride)을 각각 Biuret법, BCG법, 효소법, GOD/POD법 및 효소법을 사용하는 임상용 키트 (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하여 측정하였다. 혈장의 무기성분은 칼슘 (calcium), 염소(chloride), 마그네슘 (magnesium) 및 인산염 (phosphate)을 측정하였다. 칼슘은 Arsenazo III법(Asan Pharm. Co., Ltd.), 마그네슘은 xylidyl blue-I법 (Asan Pharm. Co., Ltd.), 염소는 colorimetric 법

(Sigma Diagnostic Kit461) 그리고 인은 ultraviolet 법(Sigma Diagnostic Kit360)으로 측정하였다. 혈장 효소활성 조사로는 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), LDH (lactase dehydrogenase) 및 ALP (alkaline phosphatase)를 측정하였다. AST와 ALT는 Reitman-Frankel법, LDH는 Kinetic법, ALP는 kind-king법으로 측정하였다 (Asan Pharm. Co., Ltd.). 또한 혈장 삼투압은 micro-osmometer (Model 3300, Advanced Instruments, Inc., USA)로 혈장분리 후 측정하였다.

4-3. 조직

간, 아가미, 신장, 안구, 심장, 뇌 및 근육 등의 효소 활성 등을 측정하기 위해 먼저 각각의 조직은 washing buffer (0.1M KCl, pH, 7.4)로 세척하였다. 세척 후, 각 조직은 homogenizing buffer (0.1M K_2HPO_4 , 0.15M KCl, 1mM Na_2EDTA , 1mM DTT, 20% glycerol)를 이용하여 teflon-glass homogenizer (099C K4424, Glas-Col, USA)로 균질화하였다. 이것을 4℃에서 12,000g로 25분간 원심분리하여 상등액을 얻은 후 실험전까지 -70℃ (SW-UF-120, 삼원엔지니어링)에 보관하였다.

5. 조직의 효소 활성

5-1. Acetylcholinesterase (AChE)

AChE 효소 활성은 Ellman (1961)의 방법을 기초로 측정하였다. AThCh (acetylthiocholine)을 기질로 하여 적정량의 희석 시료, 0.1M의 phosphate buffer 및 0.01-M DTNB를 혼합한 후, 즉시 5분간 15초 간격으로 412nm에서 흡

광도를 측정하였다 (Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments Gmbh, Austria). 측정 범위를 벗어난 시료는 buffer로 적절하게 희석한 후 시험하였다. 단위는 μ mol/min/mg protein 로 표시하였다.

5-2. Glutathione peroxidase (GPx)

GPx 효소는 Bell 등 (1985)의 방법을 수정한 것으로 H_2O_2 를 기질로, sodium azide를 catalase 억제제로 사용하였다. 시료에 1mM GSH, 0.1mM NADPH, 0.5U GSH-reductase, 1mM EDTA, 2mM sodium azide 및 50mM 인산완충용액 (pH, 7.4)이 포함된 혼합용액을 가한 후 6분동안 $20^\circ C$ 에서 배양하였다. 반응은 2.5mM H_2O_2 를 넣는 동시에 시작되었다. NADPH가 산화되는 비율을 340nm에서 3분동안 20초 단위로 분광광도계 (Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments Gmbh, Austria)로 측정하였고, 단위는 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

5-3. Glutathione reductase (GR)

GR 효소는 Beutler (1984)의 방법을 통하여 측정하였다. 시료에 1mM EDTA가 포함된 potassium phosphate (pH, 7.5), 2mM oxidized glutathione (GSSG) 및 3mM DTNB를 첨가한다. 반응은 당일 조제한 NADPH의 첨가로 시작한다. NADPH가 산화형 글루타치온(GSSG)을 환원형 글루타치온(GSH)으로 환원시킨 후, DTNB에 의하여 발색된 용액을 분광흡광도 412nm에서 30초 단위로 3분동안 측정 측정하였고 (Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments Gmbh, Austria), 단위는 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

5-4. Glutathione-S-transferase (GST)

GST 효소 활성은 Habig (1974)의 방법을 응용하여 측정하였다. 일정량의 시료에 0.2M potassium phosphate (pH, 6.5)와 증류수를 넣어 혼합시킨 뒤 10mM GSH와 10mM CDNB를 첨가한다. 실온에서 1분정도 반응시킨 뒤에 분광광도계 (Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments Gmbh, Austria)를 사용하여 파장 340nm에서 4분동안 30초단위로 증가하는 값을 측정하여 활성을 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

6. Glutathione (GSH_T) level

총 글루타치온 (GSH_T) 함량은 Baker 등 (1990)의 방법에 의하여 측정되어졌다. 측정을 위한 시료는 GSH의 측정시 방해되는 protein을 제거하기 위하여 5% 5-sulfosalicyclic acid (SSA)로 희석하여 사용하였다. 일정 시료에 혼합시액 (100mM NaH₂PO₄, 1mM EDTA, 0.15mM DTNB, 0.2mM NADPH 및 1U/mL GR, pH 7.5)을 첨가하여 파장 405nm에서 2분 이상 측정하였다(Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments Gmbh, Austria). GSH 함량 계산은 GSSG를 사용한 검량선을 바탕으로 계산하여 단위는 $\mu\text{M/g tissue}$ 로 나타내었다.

7. protein

조직의 단백질 양은 Bradford (1976) 방법으로 측정하였다. Bovine serum albumin (sigma, USA)을 사용하여 표준검량선을 작성하였다.

8. 통계

모든 자료에 대하여 $p < 0.05$ 를 유의차가 있는 것으로 간주하고 통계 프로그램 패키지 (SPSS Inc, ver 10.01)를 이용하였다. 처리구 간의 비교는 ANOVA test를 실시하였고 사후검정은 Duncan's multiple range test로 각 처리구 사이에 유의적인 차이를 통계처리하였다. 결과는 평균값 \pm 표준오차로 나타내었다.

III. 결과

1. 혈액

1-1 혈액성상

1-1-1. DBP

DBP에 노출된 동자개의 혈액성상의 조사는 Table 2 에 나타내었다. 혈액성상 조사에서 red blood cell (RBC) 수는 4주째에 1000 mg/kg diet 구에서 대조구에 비하여 20% 감소하였고, 8주후의 500 및 1000 mg/kg diet 농도의 사료 투여 구에서는 대조구에 비하여 각각 17%와 25% 감소하였다. 4주와 8주 후, 진혈에서 hemoglobin (Hb) 함량은 가장 높은 농도구인 1000 mg/kg diet 구에서만 유의적인 변동이 조사되었고 ($P<0.05$), hematocrit (Ht)는 4주 후에 500과 1000 mg/kg diet 구에서 유의한 감소가 나타났으나 ($P<0.05$), 8주 후에는 500 mg/kg diet 구는 대조구와 유의한 차이가 인정되지 않았다 ($P>0.05$). mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) 및 mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) 조사에서 모든 항목은 노출 기간과 농도에 따른 유의적인 변화가 관찰되지 않았다($P>0.05$).

1-1-2. DEHP

DEHP를 경구투여한 실험어의 혈액성상은 Table 3 에 나타내었다. RBC는 노출 4주째에서 500 mg/kg diet구에서 189.92 ± 10.57 의 값으로 대조구에 비하여 유의적으로 감소하였고($P<0.05$), 1000 mg/kg diet에서 177.75 ± 6.78 의 값으로 대조구와 100 mg/kg diet 구에 비하여 유의적으로 감소하였다 ($P<0.05$). 8주째

RBC수의 변동은 농도가 높은 두 구에서(500과 1000 mg/kg diet) 내조구에 비하여 감소하였으나 높은 두 구 사이에서 농도에 따른 유의성은 없었다 ($P>0.05$). 경구투여 4주제와 8주제의 Hb는 1,000 mg/kg diet 구에서 감소가 조사되었고, Ht도 Hb와 비슷한 경향을 나타내었다. MCH, MCHC 및 MCV의 조사 시 DEHP의 노출 4주 후 500 mg/kg diet 투여 구에서 내조구에 비하여 유의적인 값을 나타냈을 뿐 가장 높은 구에서는 유의성이 나타나지 않았고, 다른 항목에서도 유의한 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$).

Table 2. Changes of hematological parameters in whole blood in bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DBP for 8 weeks

Parameters	Exposure period	DBP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1,000
RBC (10 ⁶ cell/mm ³)	4 week	226.6±4.0 ^d	218.3±11.5 ^a	205.1±5.2 ^a	180.9±8.1 ^b
	8 week	229.3±4.7 ^a	209.8±14.5 ^{ab}	191.3±16.3 ^b	173.1±5.5 ^b
Hb (g/dL)	4 week	6.98±0.21 ^a	6.36±0.33 ^{ab}	5.97±0.41 ^{ab}	5.61±0.30 ^b
	8 week	7.25±0.26 ^a	6.77±0.18 ^{ab}	6.56±0.43 ^{ab}	5.91±0.28 ^b
Ht (%)	4 week	32.60±1.86 ^a	29.50±1.73 ^{ab}	27.00±0.82 ^b	26.50±1.18 ^b
	8 week	31.60±0.68 ^a	30.67±1.26 ^{ab}	30.83±2.18 ^{ab}	26.50±0.89 ^b
MCH (pg)	4 week	30.78±0.76	29.17±0.59	28.99±1.59	31.22±1.79
	8 week	31.67±1.35	32.94±2.07	34.79±1.58	34.13±0.96
MCHC (%)	4 week	21.58±0.97	21.66±0.82	22.00±1.05	21.23±0.89
	8 week	23.01±1.13	22.23±0.95	21.36±0.48	22.29±0.60
MCV (µm ³)	4 week	143.5±5.7	135.4±4.5	131.7±2.3	147.1±6.3
	8 week	137.8±1.6 ^a	149.0±9.7 ^{ab}	162.7±5.3 ^b	153.2±2.0 ^{ab}

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test. RBC : red blood cell, Hb : hemoglobin, Ht : hematocrit, MCH : mean corpuscular hemoglobin, MCHC : mean corpuscular hemoglobin concentration, MCV : mean corpuscular volume.

Table 3. Changes of hematological parameters in whole blood in bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DEHP for 8 weeks

parameters	Exposure period	DEHP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1,000
RBC (10^6 cell/mm ³)	4 week	226.6±4.0 ^d	211.1±8.6 ^{ab}	189.9±10.6 ^{bc}	177.8±6.8 ^c
	8 week	229.3±4.7 ^a	214.7±6.9 ^{ab}	204.6±7.6 ^b	194.7±6.1 ^b
Hb (g/dL)	4 week	6.98±0.21 ^d	6.69±0.17 ^a	6.18±0.29 ^{ab}	5.53±0.35 ^b
	8 week	7.25±0.26 ^a	6.84±0.33 ^{ab}	6.80±0.49 ^{ab}	5.96±0.30 ^b
Ht (%)	4 week	32.60±1.86 ^a	30.67±1.54 ^{ab}	27.67±1.67 ^{ab}	26.33±1.33 ^b
	8 week	31.60±0.68	31.00±0.73	31.83±1.60	29.50±1.23
MCH (pg)	4 week	30.78±0.76	31.88±1.19	32.66±0.94	30.94±0.91
	8 week	31.67±1.35	31.82±0.90	33.04±1.17	30.54±0.74
MCHC (%)	4 week	21.58±0.97	22.12±1.39	22.55±1.07	20.92±0.42
	8 week	23.01±1.13	22.02±0.75	21.61±1.82	20.22±0.66
MCV (μm^3)	4 week	143.5±5.7	146.6±9.6	146.7±8.8	147.9±2.8
	8 week	137.8±1.6 ^a	144.7±1.8 ^{ab}	156.5±8.9 ^b	151.4±3.4 ^{ab}

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test. RBC : red blood cell, Hb : hemoglobin, Ht : hematocrit, MCH : mean corpuscular hemoglobin, MCHC : mean corpuscular hemoglobin concentration, MCV : mean corpuscular volume.

1-2. 혈장유기성분

1-2-1. DBP

DBP를 경구투여 한 후 혈장유기성분 조사는 총 단백질, 알부민, 글루코즈, 콜레스테롤 및 중성지방을 조사하였다 (Table 4). 총단백질량 (Total protein)은 노출 4주째에 1000 mg/kg diet의 농도구에서만 유의적인 감소가 나타났으나, 8주째에는 모든 노출 농도 구에서 대조구에 비하여 유의적으로 감소하였다 ($P<0.05$). 혈장 알부민 (Albumin)도 총단백질량과 비슷한 경향을 나타내어, 노출 4주째에는 농도별 변동이 없었으나, 8주째에서는 대조구에 비하여 모든 구에서 유의적인 감소 ($P<0.05$)가 조사되었다. 글루코즈 (glucose)는 4주째에 모든 구에서 각각 유의적인 증가가 나타났지만 8주에는 1000 mg/kg diet에서만 155.87 ± 26.96 으로 조사되어 유의적인 증가를 보였다 ($P<0.05$). DBP 노출에 따른 실험어의 혈장 총 콜레스테롤 (Total cholesterol)의 변동은 4주째에서 500 mg/kg diet와 1000 mg/kg diet에서 각각 303.02 ± 30.81 과 262.36 ± 9.10 으로 조사되어 유의적인 감소가 나타났고, 8주에서는 모든 구에서 농도별 감소가 조사되었다. 중성지방은 4주째에는 구별 차이는 없었으나, 8주째에 500 mg/kg diet 농도 구에서 20%, 1000 mg/kg diet에서 31%의 감소를 나타냈다.

1-2-2. DEHP

4주와 8주동안 DEHP에 노출된 동차개의 혈장 유기성분 중 총 단백질량 (total protein)은 8주째의 1000 mg/kg diet 구를 제외한 모든 구에서 유의적인 변동이 없었다 (Table 4). 알부민은 4주째에는 노출구에서 대조구와 비슷한 양상을 보였으나, 8주째에서는 모든 노출구에서 유의적인 감소가 조사되었다

($p < 0.05$). 글루코즈는 4주와 8주째에서 각각 가장 높은 구인 1,000 mg/kg diet 농도의 구에서 유의적인 증가를 나타냈고 ($p < 0.05$), 총 콜레스테롤은 노출기간 동안 대조구에 비하여 유의적인 변동이 나타나지 않았다 ($p > 0.05$). 중성지방은 4주째에서는 변화가 없었으나, 8주째에서 100 mg/kg diet 와 500 mg/kg diet 농도 구에서 대조구에 비하여 감소하는 경향을 나타내었으나, 농도에 따른 유의적 변화는 나타나지 않았고 1,000 mg/kg diet 구에서는 대조구뿐만 아니라 100 및 500 mg/kg diet 구의 값과도 유의적인 차이가 인정되었다 ($P < 0.05$).

Table 4. Changes of plasma total protein, albumin, glucose total cholesterol and triglyceride in bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DBP for 8 weeks

parameters	Exposure period	DBP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1,000
Total protein (g/dL)	4 week	5.69±0.24 ^a	5.33±0.22 ^{ab}	5.31±0.35 ^{ab}	4.56±0.21 ^b
	8 week	5.60±0.18 ^a	4.45±0.55 ^b	3.94±0.38 ^b	4.02±0.26 ^b
Albumin (g/dL)	4 week	1.15±0.03 ^a	1.18±0.04 ^a	1.11±0.07 ^a	0.96±0.06 ^b
	8 week	1.11±0.02 ^a	1.14±0.04 ^a	1.06±0.06 ^a	0.89±0.06 ^b
Glucose (mg/dL)	4 week	53.3±8.7 ^a	90.2±11.8 ^b	94.5±14.8 ^b	92.0±12.0 ^b
	8 week	68.48±6.41 ^a	97.49±12.10 ^{ab}	106.1±16.8 ^{ab}	155.9±27.0 ^b
Total Cholesterol (mg/dL)	4 week	381.6±8.9 ^a	381.0±28.8 ^a	303.0±30.8 ^b	262.4±9.1 ^b
	8 week	359.4±8.4 ^a	316.4±25.4 ^b	313.3±19.7 ^b	244.4±9.6 ^b
Triglyceride (mg/dL)	4 week	626.7±34.0	655.0±71.4	537.2±41.0	562.6±43.2
	8 week	646.4±20.9 ^a	574.7±46.8 ^{ab}	513.3±28.0 ^{bc}	444.4±30.3 ^c

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

Table 5. Changes of plasma total protein, albumin, glucose total cholesterol and triglyceride in bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DEHP for 8 weeks

parameters	Exposure period	DEHP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1,000
Total protein (mg/dL)	4 week	5.69±0.24	5.07±0.20	4.87±0.34	5.04±0.24
	8 week	5.60±0.18 ^a	5.67±0.17 ^a	5.95±0.17 ^a	4.71±0.32 ^b
Albumin (mg/dL)	4 week	1.15±0.03 ^a	1.11±0.05 ^{ab}	1.09±0.06 ^{ab}	0.94±0.08 ^b
	8 week	1.11±0.02 ^a	1.15±0.03 ^a	1.04±0.09 ^a	0.84±0.08 ^b
Glucose (mg/dL)	4 week	53.3±8.7 ^a	77.9±7.4 ^{ab}	71.1±10.1 ^{ab}	94.4±9.9 ^b
	8 week	68.5±6.4 ^a	95.6±13.6 ^{ab}	109.1±14.5 ^{ab}	125.5±16.1 ^b
Total Cholesterol (mg/dL)	4 week	381.6± 8.9	363.5±26.8	365.8±26.6	302.8±28.2
	8 week	359.4± 8.4	339.6±14.1	317.0±19.9	314.2±18.0
Triglyceride (mg/dL)	4 week	626.7±34.0	636.7±40.0	565.8±58.0	522.7±32.6
	8 week	646.4±20.9 ^a	549.7±23.5 ^b	530.0±38.4 ^b	427.8±35.2 ^c

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

1-3. 혈장무기성분

1-3-1. DBP

DBP에 노출된 실험어의 혈장무기 성분의 변화는 Table 6 에 나타내었다. 혈장 내 칼슘 (calcium) 농도는 DBP 경구 투여 4주 후, 모든 노출 구에 영향을 미치지 않았지만, 8주째에서는 500 과 1,000 mg/kg diet 농도 구에서 각각 8.64 ± 0.29 와 9.10 ± 0.32 의 값으로 대조구에 비하여 유의적인 증가를 나타냈다. 혈장 내 염소 (chloride)와 마그네슘 (magnesium) 농도는 DBP가 포함된 사료 투여 기간동안 아무런 영향을 미치지 않았다. 혈장 인산농도는 4주 후에 가장 높은 1,000 mg/kg diet 구에서만 유의적 감소가 나타났고 ($P < 0.05$), 8주째에서는 500 mg/kg diet 농도 구에서 유의적 감소가 조사되었다 ($P < 0.05$). DBP에 노출된 동자개의 혈액 삼투압은 500과 1000 mg/kg diet 농도 구에서 각각 대조구에 비하여 유의적인 감소가 조사되었다.

1-3-2. DEHP

다양한 농도의 DEHP를 포함한 사료를 경구투여한 동자개의 혈장내 칼슘 농도는 노출 후 4주째와 8주째에서 1000 mg/kg diet 농도구에서 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 나타냈다 (Table 7). 하지만, 혈장 내 염소, 마그네슘 및 인산 농도는 노출 후 기간별 및 구별 유의적 차이가 나타나지 않았다 ($P < 0.05$). 동자개 혈액 내 삼투압은 4주와 8주 동안 DEHP를 포함한 사료를 섭취한 구에서 유의적인 감소가 나타났다 (Table 7).

Table 6. Changes of plasma calcium, chloride, magnesium and phosphate in bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DBP for 8 weeks

Parameter	Exposure period	DBP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1,000
Calcium (mg/dL)	4 week	7.96±0.14	8.37±0.18	8.61±0.22	8.69±0.38
	8 week	8.06±0.11 ^a	8.84±0.21 ^{ab}	8.64±0.29 ^b	9.10±0.32 ^b
Chloride (mmol)	4 week	103.6±1.5	102.2±1.6	98.1±4.7	100.9±1.6
	8 week	103.6±1.8	103.4±1.7	95.9±4.1	101.0±1.5
Magnesium (mg/dL)	4 week	3.82±0.21	4.29±0.37	3.96±0.19	3.72±0.35
	8 week	3.75±0.23	3.65±0.23	3.84±0.34	3.85±0.23
Phosphate (mg/dL)	4 week	10.15±.23 ^{ab}	10.63±0.12 ^d	10.21±0.31 ^{ab}	9.75±0.22 ^b
	8 week	9.94±0.16 ^d	9.42±0.32 ^{ab}	8.90±0.33 ^b	9.42±0.18 ^{ab}
Osmolarity (mOsm)	4 week	307.2±2.1 ^a	299.3±7.3 ^{ab}	287.3±2.9 ^b	273.7±4.1 ^c
	8 week	308.5±3.7 ^a	300.5±5.3 ^a	283.0±4.2 ^b	267.5±8.0 ^b

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test

Table 7. Changes of plasma calcium, chloride, magnesium and phosphate in bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DEHP for 8 weeks

parameters	Exposure period	DEHP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1,000
Calcium (mg/dL)	4 week	7.96±0.14 ^a	8.23±0.22 ^a	8.04±0.19 ^a	8.92±0.33 ^b
	8 week	8.06±0.11 ^a	8.02±0.16 ^a	8.43±0.19 ^a	9.45±0.28 ^b
Chloride (mmol)	4 week	103.6±1.5	102.2±1.6	98.1±4.7	100.9±1.6
	8 week	103.6±1.8	103.4±1.7	95.9±4.1	101.0±1.5
Magnesium (mg/dL)	4 week	3.82±0.21	3.97±0.32	3.88±0.14	3.86±0.25
	8 week	3.75±0.23	3.72±0.18	4.09±0.28	3.62±0.20
Phosphate (mg/dL)	4 week	10.15±0.23	9.42±0.35	9.39±0.43	9.75±0.22
	8 week	9.94±0.16	9.65±0.41	9.12±0.34	9.25±0.37
Osmolarity (mOsm)	4 week	307.2±2.1 ^a	285.7±6.2 ^b	285.2±3.4 ^b	272.7±4.7 ^b
	8 week	307.8±3.3 ^a	285.3±4.1 ^b	266.0±7.9 ^c	269.5±6.1 ^{bc}

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

1-4. 혈장효소

1-4-1. DBP

다양한 농도의 DBP를 포함한 사료를 4주와 8주동안 경구 투여 후 혈장 내 효소활성 변화를 조사한 결과는 Table 8과 같다. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) 및 lactate dehydrogenase (LDH)는 DBP 경구투여 후 4주와 8주에서 1,000 mg/kg diet 구에서만 대조구에 비하여 유의적인 증가가 조사되었다($P < 0.05$). AST는 4주 후와 8주 후의 1,000 mg/kg diet 구에서 대조구에 비하여 각각 2.4, 1.8배 증가하였고, ALT 활성도 각각 84%, 83% 증가를 나타내었다. ALP와 LDH도 1,000 mg/kg diet 구에서 경구투여 4주와 8주 모두 1.3배와 1.4배의 유의적인 증가가 관찰되었다 ($P < 0.05$).

1-4-2. DEHP

DEHP에 노출된 동자개의 AST와 ALP는 4주 후 가장 높은 구 (1,000 mg/kg diet) 에서 51.52 ± 8.63 의 값으로 유의적인 증가가 조사되었고, 8주 후에는 500과 1,000 mg/kg diet 농도 구에서 각각 44.10 ± 3.72 와 54.84 ± 6.10 의 값으로 대조구에 비하여 유의적인 증가가 나타났다 (Table 9). ALT는 4주 후 조사에서는 가장 높은 농도의 구에서만 유의적인 증가가 나타났으나 8주 후에는 500 mg/kg diet 농도 구에서도 유의적인 증가를 나타내는 비슷한 경향이 조사되었다 (Table 9). ALP는 DEHP 노출에 의한 변동이 나타나지 않았다. LDH는 4주째에 농도가 높은 두 구에서 유의적인 증가를 나타냈지만 농도에 따른 증가를 나타나지 않았고 8주째에는 모든 농도 구에서 대조구와 유사한 값이 조사되었다 (Table 9).

Table 8. Changes of plasma aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase activity of bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DBP for 8 weeks

parameters	Exposure period	DBP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1,000
AST (Karmen Unit)	4 week	25.83± 1.62 ^a	41.77±6.14 ^a	40.93±4.54 ^a	61.86±8.92 ^b
	8 week	27.65± 3.90 ^{ab}	23.73±4.62 ^{ab}	37.43±9.47 ^{ab}	48.55±9.65 ^b
ALT (Karmen Unit)	4 week	17.05±0.96 ^a	19.25±5.23 ^a	28.70±3.82 ^{ab}	31.38±3.97 ^b
	8 week	19.71±1.50 ^a	26.02±2.10 ^a	23.32±3.44 ^a	36.05±2.61 ^b
ALP (K-A unit)*	4 week	3.26±0.29 ^a	3.05±0.17 ^a	3.53±0.36 ^{ab}	4.16±0.29 ^b
	8 week	3.22±0.20 ^a	3.55±0.28 ^{ab}	3.64±0.39 ^{ab}	4.14±0.21 ^b
LDH (W unit)**	4 week	2.68±0.17 ^a	3.39±0.13 ^{ab}	3.12±0.20 ^{ab}	3.87±0.41 ^b
	8 week	2.98±0.23 ^a	3.48±0.21 ^{ab}	3.41±0.36 ^{ab}	4.22±0.42 ^b

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test. AST : aspartate aminotransferase, ALT : alanine aminotransferase, LDH : lactate dehydrogenase, ALP : Alkaline phosphatase.

*K-A unit ; King-Amstrong unit, **W unit ; Wroblewski unit.

Table 9. Changes of plasma aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase activity of bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DEHP for 8 weeks

parameters	Exposure period	DEHP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1,000
AST (Karmen Unit)	4 week	25.83±1.62 ^d	28.18±10.11 ^{ab}	47.33±8.77 ^{ab}	51.52±8.63 ^b
	8 week	27.65±3.90 ^d	21.11±5.60 ^d	44.10±3.72 ^b	54.84±6.10 ^b
ALT (Karmen Unit)	4 week	17.05±0.96 ^d	15.67±1.74 ^d	18.99±2.93 ^{ab}	25.84±3.95 ^b
	8 week	19.71±1.50 ^d	21.11±2.63 ^{ab}	26.84±2.28 ^b	27.04±2.14 ^b
ALP (K-A unit)*	4 week	3.26±0.29	3.42±0.26	3.33±0.26	4.13±0.78
	8 week	3.22±0.20	3.32±0.24	3.31±0.10	3.56±0.34
LDH (W unit)**	4 week	2.68±0.17 ^d	3.50±0.35 ^{ab}	4.34±0.37 ^b	4.22±0.18 ^b
	8 week	2.98±0.23	3.55±0.28	3.25±0.21	3.27±0.22

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

AST : aspartate aminotransferase, ALT : alanine aminotransferase, LDH : lactate dehydrogenase, ALP : Alkaline phosphatase.

* K-A unit ; King-Amstrong unit, **W unit ; Wroblewski unit.

2. Acetylcholinesterase(AChE)의 효소활성

2-1. DBP

DBP의 경구투여로 인한 AChE의 효소활성은 Table 10 에 나타내었다. 간의 AChE의 활성은 4주째에서는 1000 mg/kg diet 구에서만 유의적인 감소가 나타났지만, 8주째에는 500과 1000 mg/kg diet 농도구에서 유의적인 차이가 나타났다 ($P<0.05$). 하지만, 아가미에서 AChE의 활성은 사료 섭취 4주동안은 대조구와 실험구 사이의 차이가 조사되지 않았으나 8주째의 가장 높은 농도의 노출 구 (1,000 mg/kg diet)에서 대조구에 비하여 낮은 활성을 나타내었다. 신장에서도 아가미에서 나타난 활성과 비슷한 양상을 띠는데, 경구투여 4주 동안 AChE 활성에 영향이 없었고 8주째의 500 과 1,000 mg/kg diet 구에서 대조구와 비교하여 유의적인 활성 감소를 나타내지만, 두 구사이의 농도에 따른 유의성은 없었다. 4주간 DBP에 노출된 동자개의 심장의 AChE의 활성은 사료내 DBP의 농도가 높은 두 노출 구에서, 8주간 노출된 동자개에서는 가장 높은 농도의 구에서 활성감소가 나타났다. 오염 물질 노출에 따른 AChE의 활성을 조사할 때 일반적으로 가장 많이 조사하는 장기인 뇌는 경구투여 4주후에 100 mg/kg diet 구를 제외한 노출구에서 유의적인 감소값을 가지고 ($P<0.05$), 8주 후에는 대조구에 비하여 모든 DBP 투여구에서 유의적인 활성 감소값을 나타내었다. 근육에서는 4주째에 대조구와 모든 노출구 사이에 유의적인 차이가 인정되나 8주째에는 농도가 높은 두 농도구 (500 및 1000 mg/kg diet) 유의적 차이가 나타났다. 안구에서 조사된 AChE의 활성치는 28.43~35.49 nmol/min/mg protein의 값으로 기간과 농도에 따른 차이가 인정되지 않았다 ($P>0.05$).

2-2. DEHP

DEHP를 0, 100, 500 및 1,000 mg/kg diet 농도로 사료에 첨가하여 경구투여한 동자개의 각 장기별 AChE의 활성은 Table 11 에 나타내었다. 4주간 DEHP에 노출된 동자개의 AChE 활성 조사중 간, 아가미 및 신장은 대조구와 실험구의 유의적인 변동이 나타나지 않았으나 8주간 사료를 섭취한 동자개의 간과 아가미는 500 과 1,000 mg/kg diet 농도 구가 대조구에 비하여 유의적인 감소치가 조사되었고 신장은 노출 전구에서 감소하였다. 특히 간과 신장의 경우 가장 높은 농도에서는 대조구뿐만 아니라 노출구 중 가장 낮은 농도인 100 mg/kg diet 구에 대해서도 유의적인 감소치가 조사되었다. 심장의 AChE 활성은 4주와 8주 실험에서 1000 mg/kg diet 구에서만 유의적인 감소값이 인정되었다. 뇌에서는 노출기간동안 모든 노출구가 대조구에 비하여 유의적으로 감소된 값을 보였는데, 경구투여 4주 후 AChE의 활성은 최대 39% 감소하였고 8주 후의 AChE의 활성은 최대 46% 억제되었다. 근육에서도 4주째 100 mg/kg diet 구를 제외한 나머지 DEHP 노출 구에서 감소치가 조사되었다. DEHP에 의한 안구의 AChE의 활성은 4주에는 500 과 1000 mg/kg diet 구에서 각각 25.73 ± 1.87 과 21.35 ± 2.25 의 값을, 8주에는 1000 mg/kg diet에서 27.00 ± 1.75 의 값을 나타내어 유의차가 인정되었다 ($P < 0.05$).

Table 10. Changes of acetylcholinesterase activity (U/min/mg protein) in tissue of bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DBP for 8 weeks

Tissue	Exposure period	DBP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1,000
Liver	4 week	9.18±0.41	7.75±0.62 ^{ab}	7.50±0.77 ^{ab}	7.37±0.70 ^b
	8 week	9.17±0.23 ^a	8.39±0.54 ^a	7.08±0.53 ^{bc}	6.59±0.36 ^c
Gill	4 week	14.27±1.52	14.70± 1.21	13.78±0.87	12.59±0.78
	8 week	13.52±1.25 ^a	12.16± 1.40 ^{ab}	12.13±0.74 ^{ab}	9.13±1.08 ^b
Kidney	4 week	36.02±1.40	32.81± 5.64	30.85±2.06	28.40±2.15
	8 week	30.63±0.92 ^a	26.35± 1.37 ^a	21.69±2.12 ^b	17.87±1.22 ^b
Heart	4 week	58.73±4.45 ^a	54.82± 3.05 ^{ab}	48.76±2.21 ^b	46.06±2.40 ^b
	8 week	56.50±3.47 ^a	60.38± 4.94 ^a	55.38±4.26 ^{ab}	43.75±3.01 ^b
Brain	4 week	379.90±38.76 ^a	322.47±27.30 ^{ab}	271.11±19.05 ^b	231.82±34.71 ^b
	8 week	359.83±40.05 ^a	206.01±23.64 ^b	175.20±16.37 ^b	179.32±10.03 ^b
Muscle	4 week	99.39 ±7.03 ^a	71.46±5.36 ^b	68.73±4.26 ^b	66.44±4.23 ^b
	8 week	95.88±6.19 ^a	73.31±8.61 ^{ab}	60.71±8.60 ^b	53.60±7.10 ^b
Eye	4 week	34.71±2.23	35.22±1.93	33.75±2.54	28.75±2.46
	8 week	34.96±2.06	35.49±2.85	33.40±1.17	28.43±2.95

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

Table 11. Changes of acetylcholinesterase activity(U/min/mg protein) in tissue of bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DEHP for 8 weeks

Tissue	Exposure period	DEHP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1000
Liver	4 week	9.18±0.41	8.34±0.61	7.66±0.54	6.82±0.83
	8 week	9.17±0.23 ^a	8.19±0.46 ^{ab}	6.91±0.26 ^{bc}	6.42±0.44 ^c
Gill	4 week	14.27±1.52	14.22±0.95	13.55±0.53	11.70±0.81
	8 week	13.52±1.25 ^a	11.16±0.63 ^{ab}	9.67±0.47 ^b	9.53±0.92 ^b
Kidney	4 week	36.02±1.40	30.84±1.48	30.63±4.56	29.68±2.90
	8 week	30.63±0.92 ^a	25.87±1.51 ^b	23.67±1.88 ^{bc}	20.25±1.31 ^c
Heart	4 week	58.73±4.45 ^a	53.07±3.43 ^{ab}	47.42±5.91 ^{ab}	41.68±1.87 ^b
	8 week	56.50±3.47 ^a	56.47±3.15 ^a	49.13±2.02 ^{ab}	45.42±3.58 ^b
Brain	4 week	379.90±38.76 ^a	274.75±22.19 ^b	232.48±19.55 ^b	234.21±33.35 ^b
	8 week	359.83±40.05 ^a	214.83±9.43 ^b	197.69±28.63 ^b	194.12±19.02 ^b
Muscle	4 week	99.39±7.03 ^a	83.85±8.02 ^a	62.19±5.72 ^b	58.02±3.89 ^b
	8 week	95.88±6.19 ^a	73.19±10.97 ^b	61.00±4.25 ^b	52.90±5.42 ^b
Eye	4 week	34.71±2.23 ^a	35.35±3.04 ^a	25.73±1.87 ^b	21.35±2.25 ^b
	8 week	34.96±2.06 ^a	32.92±2.99 ^{ab}	28.68±1.88 ^{ab}	27.00± 1.75 ^b

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

3. 글루타치온 관련 효소

3-1. Glutathione S-transferase (GST)

3-1-1. DBP

실험어 간의 GST 활성은 4주와 8주째 실험에서 500 mg/kg diet 농도구에서부터 영향을 받는 것으로 조사되었다 (Table 12). 4주째 실험에서 500 과 1000 mg/kg diet 농도구 사이의 유의적인 차이가 인정되지 않았으나 8주째 실험에서는 두 구 사이에서도 유의적인 증가가 인정되었다 ($P<0.05$). DBP 노출 4주 후와 8주 후의 아가미에서 GST 활성은 비슷한 경향을 나타낸다. 가장 낮은 농도인 100 mg/kg diet 농도구에서부터 DBP에 영향을 받은 것으로 조사되었고 가장 높은 농도인 1000 mg/kg 구에서는 대조구뿐만 아니라 100과 500 mg/kg diet 구에 대해서도 유의적인 증가값이 조사되었다(Table 12). 4주와 8주동안 1,000 mg/kg diet 농도를 포함한 사료를 경구투여한 동자개 신장의 GST 활성은 각각 1.5배, 1.8배 증가하였다 (Table 12).

3-1-2. DEHP

DEHP의 노출로 인한 GST 활성의 변화는 Table 13에 나타내었다. 간의 경우 노출 4주 후에는 가장 높은 구인 1000 mg/kg diet 에서만 (339.42 ± 45.10) 대조구에 (150.05 ± 8.06) 비하여 유의적인 증가가 인정되었고 ($P<0.05$), 8주 후에는 그보다 낮은 농도인 500 mg/kg diet 구에서부터 대조구에비하여 유의적인 활성 증가가 조사되었지만 ($P<0.05$) 500 mg/kg diet (292.34 ± 18.31)과 1000 mg/kg diet (297.62 ± 21.86) 사이의 유의성은 인정되지 않았다 ($P>0.05$). 아가미에서는 4

주와 8주동안 노출된 DBP의 영향으로 최고 농도 노출구인 1,000 mg/kg diet 구에서 대조구에 비하여 유의적인 증가가 조사되었고 ($P<0.05$), 신장의 경우 8 주 짜에 1000 mg/kg diet 농도구에서만 대조구에 대하여 68% 활성증가를 나타내었다 ($P<0.05$).

Table 12. Changes of glutathione S-transferase activity (nmol/min/mg protein) in liver, gill and kidney of bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DBP for 8 weeks

Tissue	Exposure period	DBP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1000
Liver	4 week	150.1±8.1 ^a	206.5±29.5 ^{ab}	233.2±22.4 ^b	257.0±20.0 ^b
	8 week	162.3±9.6 ^a	292.5±16.4 ^a	281.6±24.6 ^b	460.8±32.8 ^c
Gill	4 week	91.67±1.81 ^a	111.75±8.18 ^b	122.95±5.36 ^b	148.68±6.12 ^c
	8 week	82.27±4.19 ^a	107.03±4.11 ^b	115.99±10.25 ^b c	137.32±7.93 ^c
Kidney	4 week	35.80±2.07 ^a	41.41±2.21 ^a	45.60±1.71 ^{ab}	54.40±5.66 ^b
	8 week	39.52±3.63 ^a	52.40±6.05 ^a	53.55±3.80 ^a	71.30±4.17 ^b

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

Table 13. Changes of glutathione S-transferase aicity (nmol/min/mg protein) in liver, gill and kidney of bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DEHP for 8 weeks

Tissue	Exposure period	DEHP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1000
Liver	4 week	150.1±8.1 ^a	250.8±31.3 ^{ab}	188.0±28.4 ^a	339.4±45.1 ^b
	8 week	162.3±9.6 ^a	220.8±25.9 ^a	292.34±18.3 ^b	297.62±21.9 ^b
Gill	4 week	91.67±1.81 ^a	106.59±6.54 ^a	105.72±4.18 ^a	136.50±8.05 ^b
	8 week	82.27±4.19 ^a	88.73±5.17 ^a	112.73±10.25 ^b	128.09±7.67 ^b
Kidney	4 week	35.80±2.07	47.18±8.48	44.60±8.20	53.76±6.92
	8 week	39.52±3.63 ^a	53.64±3.90 ^{ab}	50.85±4.96 ^{ab}	65.58±5.94 ^b

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

3-2. Glutathione peroxidase(GPx)

3-2-1. DBP

사료를 통한 DBP의 노출로 인하여 GPx 활성의 변화는 Table 14 과 같다. 투여 4주 및 8주 후 1000 mg/kg diet 농도구의 동자개 간, 아가미 및 신장에서 GPx 가 증가하는 경향을 나타내었다. 4주동안 노출 후 간과 아가미의 GPx의 활성은 500 과 1000 mg/kg diet 농도구에서 유의적인 효소 활성 증가를 나타냈고 ($P<0.05$), 8주 후에는 1000 mg/kg diet 농도구에서만 유의적인 활성 증가가 조사되었다. 신장에서는 경구투여 4, 8주 후 가장 높은 농도구 (1000 mg/kg diet) 에서만 유의적 증가가 나타났다 ($P<0.05$).

3-2-1. DEHP

DEHP에 노출된 동자개 간의 GPx 활성은 4주째 실험에서 가장 높은 구에서만 유의적 변동이 조사되었으나 8주째 실험에서는 500mg/kg diet 농도구부터 유의적 변동이 조사되었다 (Table 15). 4주와 8주동안 DEHP에 영향을 받은 어류 아가미에서의 활성은 증가하는 것으로 보이나 유의성은 나타나지 않았다. 4주동안 DEHP 투여 후, 신장의 GPx 활성 변화는 조사되지 않았고, 8주 후 가장 높은 농도의 구에서 대조구 (118.57 ± 10.88) 값에 비하여 유의적으로 높은 활성 (196.75 ± 17.81)을 나타내었다 ($P<0.05$).

Table 14. Changes of glutathione peroxidase activity in liver, gill and kidney of bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DBP for 8 weeks

Tissue	Exposure period	DBP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1000
Liver	4 week	239.7±11.7 ^a	245.8±14.0 ^a	345.8±15.4 ^b	324.6±28.9 ^b
	8 week	256.3±2.7 ^a	299.3±10.1 ^a	302.2±19.2 ^a	451.6±31.3 ^b
Gill	4 week	242.3±11.7 ^a	328.8±29.1 ^{ab}	303.8±17.3 ^{bc}	405.3±39.3 ^c
	8 week	258.7±8.9 ^a	247.5±16.2 ^a	351.0±47.5 ^{ab}	435.3±47.6 ^b
Kidney	4 week	107.4±6.2 ^a	132.8±9.9 ^{ab}	138.4±8.5 ^{ab}	163.2±17.0 ^b
	8 week	118.6±10.9 ^a	157.2±18.2 ^a	160.6±11.4 ^a	213.9±12.5 ^b

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

Table 15. Changes of glutathione peroxidase activity in liver, gill and kidney of bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DEHP for 8 weeks

Tissue	Exposure period	DEHP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1000
Liver	4 week	239.6±11.7 ^a	248.5±9.6 ^a	289.5±24.4 ^a	369.8±18.6 ^b
	8 week	256.3±2.7 ^a	271.7±22.2 ^a	368.9±31.6 ^b	414.7±39.4 ^b
Gill	4 week	242.3±11.7	262.1±23.2	246.4±11.5	293.0±27.7
	8 week	258.7±8.9	273.5±31.1	280.7±9.5	303.8±53.7
Kidney	4 week	107.4±6.2	141.5±25.4	133.8±24.6	161.3±20.8
	8 week	118.6±10.9 ^a	160.9±11.7 ^{ab}	152.5±14.9 ^{ab}	196.8±17.8 ^b

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

3-3. Glutathione Reductase (GR)

3-3-1. DBP

DBP로 인한 간의 GR 효소활성은 4주와 8주째 실험에서 가장 낮은 노출구부터 대조구에 비하여 유의적인 증가가 나타나고 가장 높은 농도구에서는 대조구와 노출구 중 가장 낮은 농도에 대해서도 유의적인 증가가 나타나는 것으로 조사되었다 (Table 16). DBP의 경구 투여 후 동자개 아가미의 GR의 활성은 4주동안 1000 mg/kg diet의 농도에서만 영향을 받았으나, 8주 후에는 모든 노출구에서 대조구에 비하여 각각 38%, 88% 및 105% 증가가 나타났다 (Table 16). DBP 투여 4주 후, 신장의 GR 활성은 1000 mg/kg diet 농도구에서 대조구에 비하여 52% 증가하였으나, 8주 후에는 같은 농도구에서 80% 증가하였다 (Table 16).

3-3-1. DEHP

4주와 8주동안 DEHP의 경구투여 후 동자개의 간, 아가미 및 신장의 GR 활성변화는 Table 17와 같다. 간의 GR 효소 활성 변화는 4주 후와 8주 후의 결과 값이 비슷한 양상을 나타낸다. DEHP에 대한 영향은 100 mg/kg diet 농도구에서부터 나타나기 시작하고 1000 mg/kg diet 농도구는 대조구뿐만 아니라 100과 500 mg/kg diet 농도구에 비해서도 유의적으로 높은 활성을 나타냈다 ($P<0.05$). 아가미에서 GR의 효소 활성은 사료 섭취 4주동안 변동이 나타나지 않았고 8주 후에는 가장 높은 농도 구인 1000 mg/kg diet 농도구에서 유의적인 증가가 조사되었다 ($P<0.05$). 신장에서는 노출 4주동안 GR 활성의 변화가 조사되지 않았고 8주 후에 대조구에 대하여 66% 증가가 조사되었다.

Table 16. Changes of glutathione reductase activity (nmol/min/mg protein) in liver, gill and kidney of bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DBP for 8 weeks

Tissue	Exposure period	DBP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1000
Liver	4 week	57.04±3.66 ^d	86.72±6.16 ^b	108.47±7.45 ^c	114.43±5.97 ^c
	8 week	59.62±2.71 ^d	92.81±7.15 ^b	85.05±4.44 ^b	121.74±9.63 ^c
Gill	4 week	58.43±3.88 ^d	72.10±5.71 ^a	70.26±5.53 ^a	108.39±5.87 ^b
	8 week	47.66±3.33 ^a	65.88±6.16 ^b	89.55±5.08 ^c	97.56±2.74 ^c
Kidney	4 week	35.80±2.07 ^a	39.82±2.84 ^a	43.88±2.43 ^{ab}	54.40±5.66 ^b
	8 week	39.52±3.63 ^a	52.40±6.05 ^a	53.55±3.80 ^a	71.30±4.17 ^b

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

Table 17. Changes of glutathione reductase activity (nmol/min/mg protein) in liver, gill and kidney of bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DEHP for 8 weeks

Tissue	Exposure period	DEHP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1000
Liver	4 week	57.04±3.66 ^a	81.74±3.93 ^b	79.72±5.03 ^b	141.51±11.99 ^c
	8 week	59.62±2.71 ^a	83.52±7.44 ^b	103.75±6.37 ^b	137.68±9.51 ^c
Gill	4 week	58.43±3.88	62.91±5.04	68.69±5.19	67.60±4.24
	8 week	47.66±3.33 ^a	57.78±4.22 ^a	57.11±2.12 ^a	86.06±5.40 ^b
Kidney	4 week	35.80±2.07	47.18±8.48	44.60±8.20	53.76±6.92
	8 week	39.52±3.63 ^a	53.64±3.90 ^{ab}	50.85±4.96 ^{ab}	65.58±5.94 ^b

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

4. 총 글루타치온(GSH_T) 함량

4-1. DBP

DBP가 포함된 사료를 섭취한 동자개의 간, 아가미 및 신장의 비효소적 항산화 물질인 GSH의 함량은 대조구에 비하여 증가한 것으로 조사되었다 (Table 18). 500 및 1,000 mg/kg diet 구에서 간의 총 GSH의 함량은 대조구와 100mg/kg diet 농도구에 비하여 유의적인 증가를 나타내었고, 경구투여 8주후에는 500mg/kg diet 농도구에 대해서도 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 4주동안 노출된 어류의 아가미 내의 글루타치온 함량은 500 및 1000 mg/kg diet 농도구에서 대조구에 대하여 각각 42%, 82% 증가하였고, 8주째에서는 각 농도별로 28%, 57% 및 81% 증가하였다. 신장내의 글루타치온의 함량은 노출 8주째에서 가장 높은 농도에서만 유의적인 증가가 조사되었다 ($P < 0.05$).

4-2. DEHP

Table 19은 4주와 8주간 DEHP 노출시 간, 아가미 및 신장의 글루타치온 함량 변화를 나타내었다. DEHP에 노출된 동자개의 간의 글루타치온 농도는 DBP보다 낮은 농도인 모든 노출구에서부터 대조구에 비하여 유의적인 증가가 나타났으나 농도에 의존적 경향은 나타나지 않았다. 아가미의 글루타치온 함량은 4주째 1,000 mg/kg diet의 농도를 섭취한 동자개에서 대조구와 다른 노출구에 비하여 유의적인 변동이 조사되었다($P < 0.05$). 신장의 경우 8주 후 DEHP의 농도가 가장 높은 농도 투여구인 1,000 mg/kg diet 구에서 유의적인 증가가 나타났다 ($P < 0.05$).

Table 18. Changes of glutathione level (nmol/g tissue) in liver, gill and kidney of bagrid catfish administrated with diet containing various concentrations of DBP for 8 weeks

Tissue	Exposure period	DBP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1000
Liver	4 week	237.6±9.8 ^a	227.9±12.1 ^a	294.9±22.4 ^b	335.3±17.1 ^b
	8 week	229.4±11.3 ^a	219.5±8.3 ^a	308.6±26.6 ^b	387.1±25.2 ^c
Gill	4 week	50.30±2.06 ^a	55.55±5.55 ^a	71.33±5.02 ^b	91.46±3.99 ^c
	8 week	50.72±2.77 ^a	64.92±5.42 ^b	79.51±5.04 ^c	91.60±4.48 ^c
Kidney	4 week	75.63±4.18	68.02±2.08	74.80±5.31	72.73±5.87
	8 week	68.23±5.88 ^a	74.74±4.85 ^{ab}	71.70±3.78 ^a	86.64±3.88 ^b

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

Table 19. Changes of glutathione level (nmol/g tissue) in liver, gill and kidney of bagrid catfish administrated with diet containing various concentration of DEHP for 8 weeks

Tissue	Exposure period	DEHP concentration (mg/kg diet)			
		0	100	500	1000
Liver	4 week	237.7±9.8 ^a	359.6±26.8 ^b	339.1±25.6 ^b	495.4±44.4 ^c
	8 week	229.4±11.3 ^d	413.3±41.8 ^b	398.1±44.0 ^b	442.3±52.6 ^b
Gill	4 week	50.30±2.06 ^d	59.43±3.72 ^d	60.38±3.21 ^d	73.46±4.64 ^b
	8 week	50.72±2.77	46.22±5.23	64.09±4.76	61.10±5.15
Kidney	4 week	75.63±4.18	68.70±4.63	73.27±4.13	75.96±3.18
	8 week	68.23±5.88 ^a	65.41±4.02 ^d	66.72±3.18 ^a	90.27±2.83 ^b

Values are means±S.E. (n=6). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

IV. 고찰

1. 혈액성상 및 혈액화학

혈액학적인 검사는 오염물질에 대하여 민감하게 반응하기 때문에 오랫동안 해양오염지표로 다루어졌다 (Chandraseker, 1990). 적혈구는 영양소나 산소, 노폐물과 탄산가스의 운반 및 배설하는 기능을 담당하므로 빈혈 및 조혈기능을 파악하는데 중요하다(Chandraseker, 1990). 본 연구에서 DBP와 DEHP의 1000 mg/kg diet 농도구에서 RBC수, Hb 및 Ht 감소하는 혈액학적 스트레스 반응을 나타냈다. 이것은 DBP와 DEHP에 의해서 RBC의 지질과산화가 증가하게되어 혈구가 용해되어 나타난 결과라 판단되어진다. 이 결과는 Arun 등의 *in vitro* 실험과 Deepa Devi 등(1998)에 의한 실험에서 산화손상은 적혈구 세포막에 영향을 끼쳐 RBC를 용해시킨다고 보고와 같다. 따라서, 본 연구의 결과는 DEHP가 혈구의 혈구용해를 일으킨다는 것을 증명하였다. Hb의 감소는 Hb가 파괴율이 증가하거나 Hb의 합성이 감소되었기 때문이다.

본연구에서 혈장의 유기성분은 총단백질, 알부민, 글루코즈, 콜레스테롤 및 중성지방을 조사하였다. 단백질은 에너지원으로 중요하고 알부민은 영양단백의 보급원이기도 하지만 교질 삼투압을 유지하는데 필수 성분이다 (Avella *et al.*, 1990). 글루코즈는 탄수화물 대사에서 중요하고 에너지 원으로 사용된다. 콜레스테롤은 세포막의 유동성에 중요한 역할을 하며 중성지방은 대표적인 에너지 대사에 관계되는 지질로 콜레스테롤 합성의 원료이자 고지혈증의 원인이된다. 척추동물에 DEHP 노출 후, DEHP의 제거를 위해 에너지 많은 에너지를 소모하기 때문에 혈장의 유기성분이 감소한다는 보고가 있다 (Ranjisigh and Badejo,

1996; Sonde *et al.*, 2000). 본 연구에서 8주동안 DBP와 DEHP를 경구투여한 동자개 혈장의 총단백질, 알부민, 중성지방 및 콜레스테롤의 수치가 억제되었다. 이것은 독성물질로 야기된 해로운 상태를 회복하기 위하여 에너지 요구량이 증가되기 때문이라 생각되어진다. 글루코즈는 대조구에 비하여 1000 mg/kg diet 농도구에서 증가하는 양상을 보이는데 이것은 glucocorticoids에 의한 gluco-genesis 때문이라 알려져 있다 (Robertsom *et al.*, 1987). 또한, DBP와 DEHP로 인한 유기성분의 변화를 비교하면 DBP와는 달리 DEHP는 4주째에 글루코즈를 제외하고 대조구에 비하여 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 따라서 DEHP보다 DBP가 동자개 혈장의 유기성분에 더 민감하게 반응하는 것으로 생각되어진다.

혈장의 무기염류 조사에서 칼슘과 삼투압이 대조구와 노출구사이에 유의한 차이가 조사되었다. 독성물질에 급성으로 노출시 다양한 어종에서 아가미의 상피세포 및 점액세포의 변화를 원인으로 지적하고 있다 (Tardner, 1975; Hawker, 1977). 지질화합물은 세포막에 축적되고, 이것은 세포막 투과성에 영향을 미치며 세포막에서의 수송 대사에 문제가 생긴다(Payne *et al.*, 1978). 따라서, DEHP와 DBP로 인한 삼투압의 감소는 아가미의 삼투조절의 문제성과 알부민의 감소로 생각되어진다.

혈장의 전이 효소인 AST와 ALT는 간 손상을 감지할 수 있는 지표로 사용되어오고 있다. 어체가 정상적인 상태에서는 세포내에서 발견되지만, 손상을 입었을 시, 혈액으로 빠져나오게된다 (Smith and Ramos, 1980). Seth (1982)는 DEHP가 rat의 간에 과산화물을 일으키고 급성노출시 조직학적 변화가 조사되었다고 보고하였다. 또한 Seo *et al.* (2003)은 DEHP와 DBP가 과산화물을 증식시키

는 물질로서, 간의 해독효소에 영향을 끼친다고 보고하였다. 본 연구의 결과 DBP와 DEHP를 1000 mg/kg diet 경구투여한 구에서 AST와 ALT가 증가하는 것이 관찰되었다. 이것은 rat에서의 실험과 같이 DEHP와 DBP가 간의 세포를 파괴시키는 등의 손상으로 AST와 ALT가 혈중으로 방출된 것으로 사료된다. 알칼라인 포스파타제는 주로 간 및 뼈에 존재하는 효소로서 간염, 간경변을 포함한 여러 간질환에서 증가한다 (Matsuzawa *et al.*, 1993). 본 연구결과는 DBP와 DEHP에 의해서 가장 높은 농도 구인 1000 mg/kg diet 농도구에서 증가가 나타났다. 앞서 언급한 것과 같이 간 손상으로 인하여 알칼라인포스파타제의 활성이 증가한 것으로 보인다. LDH는 거의 어느 조직이나 분포되어 있는 일종의 효소로서 pyruvic acid 와 latic acid 간의 가역적 전환에 관여하여 촉매작용을 한다. LDH를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액 중으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승하며 간질환 중추신경 계통등의 진단에 도움이 된다. 본연구에서는 4주와 8주 동안 DBP와 DEHP를 경구투여 후, 가장 높은 노출 농도 구 (1000 mg/kg diet)에서만 대조구에 비하여 증가하였는데 간의 손상에서 비롯된 것이라 판단되어진다.

2. Acetylcholinesterase (AChE)

신경세포에 결합한 아세틸콜린은 다음의 자극이 올 때까지 AChE (EC 3.1.1.7)에 의해 분해된다 (Ceron *et al.*, 1996). AChE의 활성은 항콜린에스테라제 물질에 의해서 억제될 수 있는데, 이러한 물질들은 콜린성 수용체에 결합하지 않고 축적되어 무스카린성과 니코틴성의 콜린성 수용체에 과도한 자극을 준다.

항콜린에스테라제에 속하는 물질에는 잔존율이 높은 유기인계와 카바마이트계 살충제가 잘 알려져 있다 (Hernandez *et al.*, 1998). 비록 이런 살충제보다 잔존율은 높지 않지만, 어류를 죽일수 있는 독성을 가지고 있는 물질이 있다 (Zinkle *et al.*, 1991). 예를 들어 다른 종류의 살충제 (Davies and Cook, 1993; Gill *et al.*, 1990a)와 구리, 수은, 납, 철 및 니켈과 같은 중금속 (Gill *et al.*, 1990b), phenanthrene 같은 PAHs 물질 (Jee and Kang, 2003) 및 phthalate계 물질인 DEP (diethyl phthalate) 가 담수어류와 해산어류에 아세틸콜린의 활성을 저하시키는 물질 (Ghorpade *et al.*, 2001; Jee, *et al.*, 2004)로 보고되었다. 하지만, DBP와 DEHP에 의한 AChE의 활성 변동에 대한 보고는 전무하다. 본 연구에서 DBP를 경구투여한 동자개의 각 조직별 AChE의 활성을 조사한 결과 안구 조직을 제외하고 노출구 대부분의 장기에서 대조구에 비하여 억제되는 것으로 조사되었다. AChE의 활성이 낮은 것으로 알려져 있는 간, 아가미 및 신장에서도 8주동안 노출 후 1,000 mg/kg diet 구에서 유의적인 억제가 나타났고 AChE의 활성을 조사시 대표적으로 사용되는 조직인 뇌와 근육에서는 가장 낮은 농도였던 100 mg/kg diet에서도 유의한 효소활성 억제가 나타났다. 이런 결과는 DBP가 동자개의 신경계에 민감하게 반응한다고 결론지을 수 있다.

DEHP의 경구투여로 인한 동자개의 간, 아가미 및 신장의 AChE의 활성은 투여 4주째에는 유의한 변동이 나타나지 않았으나 8주째에 500 mg/kg diet 이상의 농도구에서 유의한 억제가 나타났다($p < 0.05$). 심장과 눈은 투여 후 4주와 8주째에 1,000 mg/kg diet 구에서만 효소활성이 억제되었으며, 뇌와 근육은 가장 낮은 농도구인 100 mg/kg diet 구에서부터 억제가 나타났다. DEHP도 DBP와 같이 각 장기의 AChE의 활성에 영향을 미치는 것으로 판단되어지고 간, 아

가미 및 신장의 AChE의 활성은 다른 장기에 비하여 DEHP에 대한 반응이 느리다고 생각되어진다. 본 연구의 결과에서 DBP와 DEHP에 의한 간, 아가미 및 신장은 DBP를 경구투여한, 4주째 실험을 제외하고 4주후 AChE의 활성에는 변화가 없다가 8주 후 억제가 나타난 것으로보아 다른 조직에 비하여 AChE에 대한 반응이 느린 것으로 판단되어진다. 반면 뇌와 근육은 다른 조직에 비하여 조직내 AChE의 활성도가 높고, DBP와 DEHP 모두 가장 낮은 농도에서부터 억제가 나타났기 때문에 DBP 및 DEHP로 유발되는 신경계독성의 연구에 적합한 조직이라 생각되어진다. 반면, 안구에서의 활성은 DBP에 의한 변동은 없었으나 DEHP에 의해서는 억제되는 경향이 나타나 동자개의 안구에는 DBP보다는 DEHP에 의한 독성이 보다 강한 것으로 생각되어진다.

3. 글루타치온 함량 및 글루타치온 관련 효소

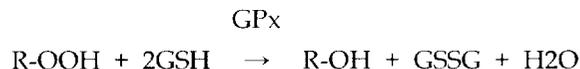
GSH는 -SH기를 가지는 비단백질성 항산화물질로 (Siegers, 1989) 일반적으로 대사 수송 기능을 담당한다 (Kosower and Kosower, 1978). 특히, 해양생물에서는 외인성 물질의 해독과 배설 등의 중요한 기능을 담당하고, 이런 물질로 인해 유발되는 산화스트레스 독성반응에 대하여 세포를 보호하는 방어 기작에서 제일 처음으로 관여하는 것으로 알려져 있다 (Hasspielar *et al.*, 1994; Otto and Moon, 1995). 가벼운 산화스트레스 반응에는 GSH가 증가되기도 하지만 심한 산화스트레스 반응에 의해서는 적절한 대사를 잃고 GSH가 산화형인 GSSG로의 산화되기 때문에 GSH의 함량이 감소되어질 수 있다 (Zhang *et al.*, 2004). 오염물질에 대한 GSH 함량의 변동에 대한 연구에서 paraquat와 meandione을

Rainbow trout에 복강주사 하거나 (Stephenses *et al.*, 2002) deltamethrin의 노출에 의해 GSH 함량이 증가한다고 보고가 있다 (Sayeed *et al.*, 2003). 또한 오염된 저질에 노출된 catfish에서도 유사한 결과가 조사되었다 (DiGiulio *et al.*, 1993). 이와는 반대로, 표백제 회사 방출물에 노출된 catfish (Mather-Mihaich and Di Giulio, 1986)와 3,4-Dichloroanilin에 노출된 crucian carp (Li *et al.*, 2003)에서 GSH의 함량이 감소한다고 보고하였다. 본 연구에서는 4주와 8주동안 DBP를 경구투여한 동자개 간과 아가미의 GSH함량은 가장 낮은 농도의 노출구를 제외하고 대조구에 비하여 유의적인 증가가 조사되었으나 신장에서는 8주째 가장 높은 농도구를 제외하고는 유의한 변동이 없었다. DEHP의 경우 간에서 모든 농도의 노출구의 GSH 함량이 증가하였으나 아가미와 신장에서는 간과 같은 뚜렷한 경향이 나타나지 않았다.

글루타치온과 관련된 효소는 산화스트레스를 생성하는 외인성물질을 해독화시키는 효소로 (Fournier *et al.*, 1992; Stegeman *et al.*, 1992; Radi *et al.*, 1985) 환경적 영향을 나타낸다고 보고되어왔다 (Rodriguez-Ariza *et al.*, 2000; Livingstone, 1998). 이와 관련된 효소에는 Glutathione-S-transferase (GST), Glutathione peroxidase (GPx) 및 Glutathione Reductase (GR)이 있다. GST는 많은 외인성물질을 해독화시키는 효소 중 하나로 산화스트레스에 대하여 방어 작용을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Fournier *et al.*, 1992). 랫드에 DBP와 DEHP를 경구투여 시 GST활성의 억제를 나타내었고 (Seo *et al.*, 2004), 이 연구에서뿐만 아니라 DEHP와 DBP가 과산화물을 증식시키는 물질로 이 물질을 제거하기 위하여 효소가 증가하면 그 산물로 H₂O₂가 증가하게 된다. 하지만 H₂O₂를 제거하는 효소는 조금 증가하거나 감소 혹은 변동이 없어서 H₂O₂가 축적되게 되고 이로써 산

화 스트레스 손상으로 인한 간손상이 발생된다 (Badr, 1992, Reddy *et al.*, 1980). 하지만 본연구에서는 DBP와 DEHP 노출 후 간과 아가미의 GST효소활성이 8주까지 대조구에 비하여 높게 나타났으나 신장에서 DBP에 노출된 어류에서만 높은 효소 활성을 나타냈다. 어류 세포가 오염물질과 만나게 되면, GSH와 직접적으로 포함하거나 GST에 의해서 포함하여 제거하게 된다 (Zhang, *et al.*, 2004). 따라서, GST 효소 활성이 증가했다는 것은 DBP와 DEHP에 대한 체내 보고 작용의 반응으로 생각되어지고, 랫드에서의 보고처럼 (Seo *et al.*, 2002) GST 활성이 고농도의 phthalate 노출에 따른 억제제가 나타나지 않는 것은 동자개에 경구투여된 DBP와 DEHP의 농도가 약한 산화스트레스를 유도하는 낮은 농도이기 때문이라 생각된다. 또한, 신장에서만 DBP에 의한 GST의 활성이 증가하는데 이것은 신장조직이 DEHP보다 DBP에 더 영향을 받는 것으로 생각되어진다.

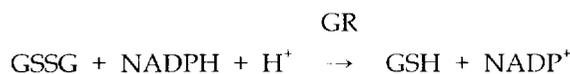
GPx는 살아있는 세포에서 과산화물을 해독하는 메카니즘을 가지고 있다. 이 반응은 프리 라디칼에 의한 손상을 방어하는데 중요한 역할을 하고, 과산화물을 분해한다. 세포의 지질 화합물은 프리 라디칼과 민감하게 반응하는데, 그 결과 지질과산화물이 일어날 수 있으며, 이때 GPx는글루타치온을 사용하여 과산화수소를 알콜로 환원시키기 때문에 프리 라디칼의 생성을 막는다. GPx는 과산화수소의 환원을 촉매하고 환원제로 세포의 글루타치온을 사용하여 유기 과산화물을 안정된 알콜과 물로 바꾼다(Mannervik, 1985).



GPx는 환경오염물질에 노출시 간에서 유도된다는 보고가 있다 (Radi *et al.*, 1985). 산화손상에 민감한 어류는 일반적으로 높은 GPx 활성을 가지고 있고, GPx가 고갈된

무지개송어의 간에서는 GSSG의 형태가 나타나지 않을 수도 있다 (Bell *et al.*, 1986). 본 연구에서 DBP와 DEHP의 영향으로 간에서 가장 높은 농도의 노출구에서 GPx의 활성이 증가하였고, 이것은 아마도 산소 라디칼로부터 유래된 H₂O₂의 생산 증가와 효소를 유도하였기 때문이라 생각되어지고 아가미와 신장에서 DBP의 영향은 나타났지만 DEHP에 의한 영향은 조사되지 않았다.

GR은 산화형 글루타치온을 (GSSG) 환원형 글루타치온으로 (GSH) 환원시키는 효소로 GSH와 GSSG의 균형을 유지하는데 중요하다 (Winston and Di Giulio, 1991). GR은 NADPH를 NADP⁺로 산화시킴으로써, 산화형 글루타치온을 (GSSG) 환원형 글루타치온으로 (GSH) 환원시킨다 (Worthington and Rosemeyer, 1974). 이것은 펜토스 인산 경로에 의해서 반복된다. 그렇지만, 만약 GSSG의 생성이 GR에 의해서 GSH로 환원되는 것 보다 높으면, GSSG는 축적되고 NADPH의 고갈을 막기 위해서 특이 수송에 의해서 세포 밖으로 이동하게 된다 (Kaplowitz *et al.*, 1996; Keppler *et al.*, 1997). 그 결과, GSH의 고갈을 일으키고, 항산화반응에 문제를 야기시킨다.



GR의 활성은 PCBs, PAHs, DDE 및 HCB를 포함한 사료를 경구투여한 어류에서 관찰되었고 현장실험에서도 Atlantic salmon과 shorthorn sculpin 등에서 조사되었다. GR 활성의 명확한 감소는 PCBs를 노출시킨 red mullet (Rudneva-Titova and Zherko, 1994)과 오염된 지역에 서식하는 Nile tilapia (Bainy *et al.*, 1996)의 연구에서 보고되었다. 반면, Otto 와 Moon (1995)의 보고에서는 PCB를 rainbow trout에 노출시킨 후, 대조구에 비하여 500%이상의 GR 활성이 증가하였다고 보고하였다. 본 연구

에서 DBP를 경구투하여 동자개의 간, 아가미 및 신장에서의 활성은 증가하는 경향이 나타났고 특히 간에서는 가장 낮은 농도구에서부터 유의적 활성 증가가 조사되었다. 이것은 GSH를 DBP와 DEHP를 제거하기 위하여 사용되었고 GPx의 활성이 증가함으로써 체내에 GSH가 부족하게 된다. 따라서 체내 GSH의 농도를 유지하기 위하여 GR의 활성이 증가하는 것으로 보인다.

V. 요약

Dibutyl phthalate (DBP)와 di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)는 플라스틱 가소제로 널리 사용되어왔고 체내 과산화물을 증가시키는 물질로 알려져 있으며 특히, DEHP는 내분비교란물질로도 분류되어있다. 최근까지 DBP와 DEHP에 대한 독성연구는 포유류에 집중되어 있고, 수서생물에 대한 연구는 아직까지 미비하다. phthalate ester는 저질에 매우 쉽게 흡착되어 저층에 서식하는 수산생물에 큰 영향을 줄 것으로 예상된다. 따라서, 본 연구에서는 저층에 서식하는 우리나라 고유종인 어류인 동자개를 대상으로 혈액학적 변동, 신경독성 및 항산화반응을 조사하였다.

DBP와 DEHP를 0, 100, 500 및 1000 mg/kg diet 농도의 사료를 제조하여 8주간 경구투여하였다. 혈액성상 조사시, 1000 mg/kg diet 구에서 RBC수, Hb농도 및 Ht수치가 감소하는 경향을 나타내었고 혈장 내 유기성분 중, 총 단백질, 알부민, 총 콜레스테롤 및 중성지방이 DBP에 의하여 투여 후 4주 및 8주째에 감소하였으나 DEHP에 의한 영향은 8주째에서 나타났다. 반면 DBP와 DEHP에 의하여 글루코즈 농도는 증가하였다. 한편, 혈장 내 무기성분을 조사한 결과 칼슘만 phthalate 투여 최고 농도인 1000 mg/kg diet 구에서 증가하였다. 혈장의 효소 활성 조사시 DBP 및 DEHP에 의해서 AST, ALT, ALP 및 LDH가 증가하는 경향을 나타내었다.

신경독성을 나타내는 AChE의 효소 활성은 대부분의 조직에서 대조구에비하여 감소하는 경향이 조사되었다. 특히 DBP 및 DEHP는 뇌와 근육의 AChE 효소 활성은 강력하게 억제하였고, 노출 8주째에 모든 노출구에서 대조구에 비해

유의한 활성 감소가 나타났다.

DBP와 DEHP에 의한 항산화방어 조사는 간, 아가미 및 신장에서의 GPx, GR, GST 활성 및 GSH의 함량을 조사하였다. 4주와 8주 동안 DBP를 포함한 사료를 경구투여한 동자개의 간과 아가미의 글루타치온 함량은 500 mg/kg diet 구에서 대조구에 비하여 유의적으로 증가하였으나, DEHP를 투여한 동자개에서는 간에서만 유의한 증가가 조사되었다. Glutathione S-transferase의 활성은 Glutathione 함량과 비슷한 양상이 조사되었다. Glutathione peroxidase의 활성은 1000 mg/kg diet 농도의DBP에 영향을 받은 동자개 간, 아가미 및 신장에서 유의적인 증가가 나타났으나, DEHP에 의한 Glutathione peroxidase의 활성은 오직 간에서만 유의적인 증가가 조사되었다. DBP와 DEHP가 포함된 사료를 통한 Glutathione reductase의 활성은 간의 모든 노출구에서 유의적인 증가가 관찰되었고, DBP에 의한 아가미와 신장의 Glutathione reductase의 활성은 가장 높은 농도구에서만 증가하였으나, DEHP에 의한 Glutathione reductase의 활성은 변동이 없었다.

VI. 감사의 글

석사 과정 2년동안 제가 흐트러지지 않고 졸업이라는 문까지 도달할 수 있게 이끌어주신 강주찬 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 부족한 저의 논문을 심사해 주신 허민도, 정준기 교수님, 학업에 많은 가르침을 주신 박수일, 정현도, 김기홍 선생님께 감사드립니다.

학부 3학년때부터 4년동안 수권환경학 연구실은 저에게 편안한 안식과 버팀목이된 공간이었습니다. 공부와 실험을 많이 가르쳐주신 정훈선배님, 까만 얼굴 때문에 외국인 같은 석우선배님, 실험실 말언니 은영언니, 실험실 잔일을 마다하지 않는 승엽선배, 착한 나의 동기 희주와 봉환이, 실험을 도와주고 실험실의 활력소가 되는 옥현이와 막내 미영이에게 감사합니다. 졸업하셨지만 큰 힘이 되어준 구자근선배님, 동자개를 구해주신 규석선배님, 진흥원에서 살빼고 계시는 성길선배님, 일본에서 박사과정 하고 계시는 상규선배님께 감사드리고 지금은 각자의 길을 가고 있는 이영주, 강병욱 선배님,채영, 민경, 마옥, 선미와 제주도 에 있는 용석이에게도 감사한다는 말을 전하고 싶습니다. 비록 다른 실험실에 있었지만 늘 저를 아껴주신 이쁜 대심언니에게도 감사합니다.

잠시나마 수산과학원에 있을 때 많은 도움을 주셨던 김귀영 연구관님과 박영태 연구사님께 감사드리고 같이 일했던 호섭오빠, 선기언니에게도 감사의 뜻을 전하고 싶습니다.

고등학교때부터 늘 저의 편이 되어준 혜경이와 영란이, 대학교 들어와서 정말 소중한 친구가 되어버린 차사랑 동기들 경환, 계웅, 진영, 진향, 민수, 희은, 문선, 규순, 유근, 존석이에게 고마운 마음을 전합니다.

마지막으로 하나뿐인 우리 동생 영균이와 지금까지 저의 뒷바라지 하시느라고 고생하신 아버지와 어머니께 이 논문을 바칩니다.

참고문헌

- Arun, P., K.G. Padmakumaran Nair, V. Manojkumar, K.V. Deepadevi, L.R. Lakshmi and P.A. Kurup. 1999. Decreased hemolysis and lipid peroxidation in blood during storage in the presence of nicotinic acid. *Vox Sang.*, 76, 220-225.
- Badr, M.Z. 1992. Induction of peroxisomal enzyme activities by di(ethylhexyl) phthalate in thyroidectomized rats with parathyroid replants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 263, 1105-1110.
- Bainy, A.C.D., E. Saito, P.S.M. Carvalho and B.V.C. Junqueira. 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.*, 34, 151-162.
- Baker, M.A., G.J. Cerniglia and A. Zaman. 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal. Biochem.*, 190, 360-365.
- Bell, J.G., C.B. Cowey, J.W. Andron and A.M. Shanks, A.M. 1985. Some effects of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.*, 53, 149-157.
- Bell, J.G., J.W. Andron and C.B. Cowey. 1986. Effect of selenium deficiency on hydroperoxide-stimulated release of glutathione from isolated perfused liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.*, 56, 421-428.
- Beutler, E. 1984. Red Cell Metabolism. *Manual of Biochemical Methods*. 3rd ed. Grune Stratton, Inc. Orlando, FL 32887, London.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of

- microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. biochem.*, 72, 248-254.
- Ceron, J.J., M.D. Ferrando, E. Sancho, C. Gutierrez-Panzio and E. Andreu-Moliner. 1996. Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of European eel (*Anguilla anguilla*). *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 35, 222-225.
- Chandrasekar, S. and N. Jaybalan. 1993. Hematological responses of the common carp, *Cyprinus carpio* L. exposed to the pesticide endosulfan. *Asian. Fish. Sci.*, 6, 331-340.
- Chilvers, C., Pike, M.C., Forman, D., Fogelman, K and Wadsworth. 1984. Apparent doubling of frequency of undescended testis in England and Wales in 1961-81. *M.J., Lancet*, II, pp. 330-332.
- Cravedi, J.P. and E. Perdu-Durand. 2002. The phthalate diesters DEHP and DBP do not induce lauric acid hydroxylase activity in rainbow trout. *Mar. Environ. Res.*, 54, 787 - 791.
- Davies, P.E. and L.S.J. Cook. 1993. Catastrophic macroinvertebrate drift and sublethal effects on brown trout, *Salmo trutta*, caused by cypermethrin spraying on a Tasmanian stream. *Aquat. Toxicol.*, 27, 201-224.
- Deepa Devi, K. V., V. Manoj Kumar, P. Arun, A. Santhosh, K.G. Padmakumaran Nair, L. R. Lakshmi and P.A. Kurup. 1998. Increased lipid peroxidation of erythrocytes in blood stored in polyvinyl chloride blood storage bags plasticized with di-[2-ethyl hexyl] phthalate and effect of antioxidants. *Vox Sang.*, 75, 198-204.

- DiGiulio, R.T., C. Habig and E.P. Gallagher. 1993. Effects of black river harbour sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol.*, 26, 1-22.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple-range and multiple F tests. *Biometrics*, 11, 1-42.
- Dutta, H.M. and D.A. Arends. 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environmental Research*. 91, 157-162
- Foster, P.M.D., R.C. Cattley and E. Mylchreest. 2000. Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: implications for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol.*, 38, S97-S99.
- Fournier, D., J.M. Bride, M. Poirie, J.B. Berge and F.W. Plapp. 1992. Insect glutathione S-transferases: biochemical characteristics of the major forms of houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.*, 267, 1840-1845.
- Gardner, G.R. 1975. Chemically induced lesions in estuarine or marine teleost. P. 657-693. In ; *The pathology of fishes* (Ribelin, W.E. and G. Migaki, eds). University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin.
- Ghorpade, N., V. Mehta, M. Khare, P. Sinkar, S. Krishnan and C.V. Rao. 2002. Toxicity study of diethyl phthalate on freshwater fish *Cirrhina mrigala*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 53, 255-8.
- Gill, T.S., H. Tewari and J. Pande. 1990b. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. *Comp. Biochem.*

- Physiol. C, 97, 287-292.
- Gill, T.S., J. Pande and H. Tewari. 1990a. Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon, and endosulfan pesticides in fish tissues. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 97, 244-287.
- Habig, W.H., M.J. Pabst and W.B. Jakoby. 1974. Glutathione S-Transferase. *J. Bio. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hasspieler, B.M., J.V. Behar and R.T. Di Giulio. 1994. Glutathionedependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 28, 82-90.
- Hawker, J.W. 1977. The Effects of petroleum hydrocarbon exposure in the structure of fish tissues. *P. carbons in marine organism and ecosystems* (D.A., Wolfe, ed.). Pergamon Press, New York.
- Hernandez, F., R. Serrano, E. Pitarch and F.J. Lopez. 1998. Automated sample clean-up procedure for organophosphorus pesticides in several aquatic organisms using normal phase liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 374, 215-229.
- Hodson, P.V., M. McWhirter, K. Ralph, B. Gay, D. Thivierge, J.H. Carey, G. Van-Der-Kraak, D.M. Whittle and M.C. Levesque. 1992. Effects of bleached kraft mill effluent on fish in the St. Maurice River, Quebec. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11, 1635-1651.
- Jee, J.H., Y.H. Keum and J.C. Kang. 2004. Effects of Diethyl phthalate on Acetylcholinesterase activity in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Following

- short-term exposure. *J. Fish. sci. tec.*, 7, 171-173.
- Jobling, S., T. Reynolds, R. White, M.G. Parker and J.P. Sumpeter. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.*, 103, 582-587.
- Kaplowitz, N., J.C. Fernandez-Checa, R. Kannan, C. Garcia-Ruiz, M. Ookhtens and J.R. Yi. 1996. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler*, 377, 267-273.
- Karle, V.A., B.L. Short, G.R. Martin, D.I. Bulas, P.R. Getson, N.L.C. Luban, A.N. O'Brien and R.J. Rubin. 1997. Extracorporeal membrane oxygenation exposes infants to the plasticizer, di (2-ethylhexyl)phthalate. *Crit. Care. Med.*, 25, 696-703.
- Keppler, D., I. Leier and G. Jedlitschky. 1997. Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Biol. Chem.*, 378, 787-791.
- Kim, E.J., J.W. Kim and S.K. Lee. 2002. Inhibition of oocyte development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to di-2-ethylhexyl phthalate. *Environ. Int.*, 28, 359-365.
- Kosower, N.S. and E.N. Kosower. 1978. The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.*, 54, 109-159.
- Kramer, K.J.M. 1994. Biomonitoring of coastal waters and estuaries. CRC Press London, 325-329.
- Li, W.M., D.Q. Yin, Y. Zhou, S.Q. Hu, and L.S. Wang. 2003.

- 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*) *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56, 251 -255.
- Livingstone, D.R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 120, 43 - 49.
- Mannervik, B. 1985. *Methods in Enzymol.*, 113, 490-495.
- Mather-Mihaich, E., and R.T. Di Giulio. 1991. Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached kraft mill effluent. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20, 391-397.
- Mattison, D.T., D.R. Plowchalk, M.J. Meadows, A.Z. Al-Juburi, J. Gandy and A. Malek. 1990. Reproductive toxicity : Male and female reproductive systems as targets for chemical injury. *Med. Clin. Nor. Am.* 72, 391-441.
- Otto, D.M.E. and T.W. Moon. 1995. 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout. *Parmaicol. Toxicol.*, 77, 281-287.
- Payne, J.F., J.W. Kiceniuk, W.R. Squires and G.L. Fletcher. 1978. Pathological changes in a marine fish after a six month exposure to petroleum. *J. fish. Res. Board Can.*, 35, 665-667.
- Radi, A.A.R., D.Q. Hai, B. Matkovics and T. Gabrielak. 1985. Comparative antioxidant enzyme study in fresh water fish with different types of feeding behavior. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 81, 395 - 399.
- Ranjitsingh, A.J.A. and M.A. Badejo. 1996. Effect of organo-phosphate pesticide

- (phosphamidon) on aquatic snail *Indoplanorbis exustus*. J. Ecotoxicol. Environ. Monitoring, 6, 127-130.
- Reddy, J.K. 1990. Carcinogenicity of peroxisomal proliferators: evaluation and mechanisms. Biochem. Soc. Trans., 18, 92-94.
- Reddy, J.K. and N.D. Lalwani. 1983. Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferations : evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to human. CRC Crit. Rev. Toxicol., 12, 1-58.
- Robertson, L., P. Thomas, C.R. Arnold and J.M. Traut. 1987. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density and a disease outbreak. Prog. Fish Cult., 49, 1-123.
- Rodriguez-Ariza, A., J. Peinado, C. Pueyo and J. Lopez-Barea. 1993. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 50, 2568-2573.
- Rudneva-Titova, I.I. and N.V. Zherko. 1994. Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. J. Biol. Chem., 265, 14648-14653.
- Sabourault, C., G. de Sousa, M. Amichot, A. Cuany, R. Rahmani, J.P. Salau'n, J.B. Berge, J.P. Girard and M. Lafaurie. 1999. Tissue-specific induction and inactivation of cytochrome P450 catalysing lauric acid hydroxylation in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Comp. Biochem. Physiol. B, 122, 253-260.
- Salazar, V., C. Castillo, C. Ariznavarreta, R. Campon and J.A. Tresguerres. . 2004. Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring.

- Toxicology, 205, 131-137.
- Sayeed, I., S. Parvez, S. Pandey, B. Bin-Hafeez, R. Haque and S. Raisuddin. 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 56, 295-301.
- Seoa, K.W., K.B. Kim, Y.J. Kim, J.Y. Choi, K.T. Lee and K.S. Choi. 2004. Comparison of oxidative stress and changes of xenobiotic metabolizing enzymes induced by phthalates in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 42, 107-114.
- Seth, P.K. 1982. Hepatic effects of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.*, 45, 27-34.
- Siegers, C.P. 1989. Glutathione and glutathione dependent enzymes. *Progr. Pharmacol. Clin. Pharmacol.*, 7, 171-180.
- Smith, A.C. and F. Ramos. 1980. Automated chemical analysis in fish health assessment. *J. Fish Biol.*, 17, 445-450.
- Sonde, V., A. D'souza, R. Tarapore, L. Pereira, M.P. Khare, P. Sinkar, S. Krishnan and C.V. Rao. 2000. Simultaneous administration of diethylphthalate and ethyl alcohol and its toxicity in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 147, 23-31.
- Stegeman, J.J., Marius Brouwer, Di. and R.T. Giulio. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein synthesis as indicators of chemical exposure and effects. In: Huggett, R.A., P.M. Kimerle, P.M. Mehrle Jr. and H.L. Bergman (Eds.), *Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 235-335.

- Stephensen, E., J. Sturve and L. Forlin. 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133, 435-442.
- Tomas, J.A., K.A. Curto and M.J. Thomas. 1982. MEHP/DEHP : Gonadal toxicity and effects on rodent accessory sex organs. *Environ. Health. Perspect.* 45, 85-88.
- Van den Belt, K., R. Verheyen and H. Wittersa. 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56, 271 - 281.
- Watanuki, H., Y. Gushiken and M. Sakai. 2003. In vitro modulation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) phagocytic cell by Di-n-butyl phthalate and Di-2-ethylhexyl phthalate. *Aquatic Toxicology*, 63, 119-126.
- Watanuki, H., Y. Gushiken and M. Sakai. 2003. In vitro modulation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) phagocytic cells by Di-n-butyl phthalate and Di-2-ethylhexyl phthalate. *Aquat. Toxicol.*, 63, 119-126.
- Weiss, C.M. and J.H. Gakstatter. 1964. Detection of pesticides in water by biochemical assay. *J. WPCF.*, 36, 240-252.
- Winston, G.W. and R.T. Di Giulio. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19, 137-161.
- Worthington, D. J. and M.A. Rosemeyer. 1974. Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, 48, 167-177.

- Zhang, J.F., X.R. Wang, H.Y. Guo, J.C. Wu, and Y.Q. Xue. 2004. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus* *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 58, 110-116.
- Zinkl, J.G., W.L. Lockhart, S.A. Kenny and F.J. Ward. 1991. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. In: Mineau, P. (Ed.), *Cholinesterase Inhibiting Insecticides*. Elsevier, Amsterdam, pp. 233-254.
- 김민선, 이동호, 심원준, 오재룡. 2004. 광양만 및 섬진강 하구에서의 프탈레이트 화합물의 분포 특성. *Korean. J. Environ. Biol.* 22, 47-53.
- 日本 環境廳. 1998. 外因性 内分泌 攪亂 化學物質 調査 鑑定 マニコアル. 日本 環境廳 東京, 29-104.
- 정문기. 1986. 한국어도보. 223-224, 2판, 일지사.
- 한경남, 남기봉, 정충훈. 2001. 동자개의 형태발달과 성장특성. *Korean. J. Ichthyol.*, 13, 74-84.
- 해양수산부. 2002. 해양환경공정시험방법
- 홍성희, 한개희, 이찬형, 이순화. 2002. 낙동강 중류수계의 Phthalate Esters 분포. *J. Kor. Soc. Water Quality*, 18, 527-534.