

碩士學位論文

넙치에서의 물리·화학적 스트레스에 관한
생리학적 연구



濟州大學校大學院

海洋生物工學科

梁楨桓

2004年 12月

碩士學位論文

Physiological Studies on the Physical and
Chemical Stress of Olive Flounder
(*Paralichthys olivaceus*)



梁楨桓

2004年 12月

Physiological Studies on the Physical and
Chemical Stress of Olive Flounder
(*Paralichthys olivaceus*)

指導教授 呂寅圭

梁楨桓

이 論文을 理學碩士 論文으로 提出함



梁楨桓의 理學碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 전 유 진 (인)

委 員 이 경 준 (인)

委 員 여 인 규 (인)

濟州大學校 大學院

2004年 12月

Physiological Studies on the Physical and
Chemical Stress of Olive Flounder
(*Paralichthys olivaceus*)

Joung-Hwan Yang
(Supervised by Professor In-Kyu Yeo)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER
OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2004. 12.

목 차

Abstract	i
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	
1. 실험어	4
2. 실험 조건	4
3. 혈액성상 분석	5
4. 항산화 효소 분석	6
5. SDS-PAGE	6
6. Western blot	7
7. RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)	8
8. 통계 처리	9
III. 결 과	
1. 수온변화에 따른 스트레스	10
1) 평균 호흡수	10
2) 혈액성상 변화	10
3) 항산화효소 변화	11
4) 수온변화 스트레스에 따른 HSP-70의 양적 변화	12

2. Oxytetracycline치리에 따른 스트레스	20
1) 혈액성상 변화	20
2) 항산화효소 변화	21
3) 항생제 처리에 따른 HSP-70의 양적 변화	21
3. 과산화수소 처리에 따른 스트레스	29
1) 혈액성상 변화	29
2) 항산화 효소 변화	30
3) 과산화수소 처리에 따른 HSP-70의 양적 변화	30
IV. 고 찰	39
V. 요 약	45
VI. 참 고 문 헌	47
감사의 글	56



Abstract

This study was conducted to investigate the change of antioxidant enzyme activity (Catalase and Superoxide dismutase) and variation of blood physiology in olive flounder (*Paralyticus olivaceus*) by acute water temperature, oxytetracycline (OTC) and hydrogen peroxide (H_2O_2) treatment. Physical stress was determined on the variation of blood component at 10, 15, 20, 25 and 30°C for 1, 2, 4, 6 and 8 hr, respectively, while chemical stress on the blood was determined for 0, 1 and 3 hr after chemical treatment with 0, 100, 300 and 500 ppm for 1 hr.

In the physical stress experiment, hematocrit, the hemoglobin and red blood cell concentrations tended to be increased as water temperature rises. The cortisol concentration in the plasma was decreased at 15°C compared to the control group and recovered to the initial level after increment at 10 and 30°C. The cortisol concentration was highly maintained for longer period at 25°C. The superoxide dismutase activity in the liver was increased at high water temperature conditions (25°C) while it decreased at low water temperature conditions (10 and 15°C). Increased catalase activity in liver was observed in all the groups except at 10°C.

In OTC treatment experiment, hematocrit decreased by time, however, the difference was not significant ($P>0.05$). Reduced number of red blood cell was observed as OTC concentration increased. Serum glucose level increased as the OTC concentration increased. However, glucose level was similar to the control groups after 3 hr. Blood total protein decreased immediately after the OTC treatment, however, recovered to the level of the control group after 1 hr. Activities of superoxide dismutase enzyme in 300 and 500 ppm groups was

increased by increased OTC concentration. Catalase enzyme activity was negatively affected by the OTC concentration. However, the differences were not significant ($P>0.05$). Higher expression of HSP-70 protein was recorded for groups treated with 100 and 500 ppm compared to that of the control group. However HSP-70 mRNA showed a lower increase in 300 ppm treatment group although the difference was not significant ($P>0.05$). The hematocrit value was decreased significantly by concentration and elapsed time in the treatment of hydrogen peroxide. Hemoglobin concentration in the test groups were lower than that of the control group. Red blood cell value in the test groups were significantly lower compared to that of the control group, but recovered to the level of the control group after 5 hr. Protein concentration was significantly lower compared to that of the control group at 0 and 3 hr, but recovered after 3 hr in 500 ppm treatment group. The SOD and CAT enzyme activities were observed to be increased. HSP-70 protein was significantly increased compared to that of control group in all of the test groups. The amount of HSP-70 mRNA in 500 ppm treatment groups was highly expressed.

I. 서론

어류 양식에서 사육중인 어체가 주로 받는 스트레스로는 크게 화학적 요인과 물리적 요인 등으로 나눌 수 있는데, 이들 중 물리적 요인으로는 염분(Singley and Chavin, 1971), 사육밀도(Wedemeyer and Mcleay, 1981), 수온(Fryer, 1975) 등이 있으며, 화학적 요인으로는 어류의 기생충 구제제로 사용되는 포르말린(Cho and Yang, 1996) 및 황산동(Varanka et al, 2001)과 같은 소독약제 투여 등이 있다. 이러한 환경변화에서 발생하는 물리적 스트레스 및 화학적 스트레스는 사육시 성장, 번식, 대사, 삼투압조절 등 어류의 생리적 변화를 유발시켜 양식 생산성에 큰 영향을 미친다.

최근, 수온의 변화는 연안해역의 대규모 산업 시설인 발전소, 제철공장, LNG 저장기 지로부터 냉·온배수의 연안해역 방류에 의해서도 수산생물상의 변화 및 수산 자원량에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으며(Kim and Kim, 2001), 이러한 수온 변화에 의해서 해양생물들은 대사율이 변하고 동시에 산소 소모량도 변화하는 것으로 알려져 있다(정과 옥, 1996). 그 중 성장촉진을 위하여 고수온에 순치된 어류는 저수온에 약한 경향을 나타내는 것으로 알려져 있다(Horning and Pearson, 1973). 또한 고수온에서는 항체 형성시간이 빠르며 항체가도 높게 나타나는 반면, 저수온에서는 항체 형성이 늦어지고 항체가도 낮아진다고 보고되고 있다(Avtalion et al, 1976; Salati et al, 1988; 방과 박, 1994). 이처럼 수온은 어체의 면역 및 기초 생리학적인 변화를 초래하는 주요한 인자로 여겨지고 있다.

특히, 급격한 수온 변화는 어류에게 있어 스트레스로 작용하여 어류의 건강도를 저하시켜 질병을 유발시키는 요인으로 작용한다(Wedemeyer and Mcleay, 1981). 또한 여름철 우리 나라 동해안에서 발생하는 냉수대로 인한 급격한 저수온 변화는 어류의 성장을 느리게 하고 질병을 발생시키는 요인으로 알려져 있다(Park, 1978; Schreck, 1981).

현재 산업적 육상 고밀도 사육시설에서 어병의 예방 및 처리방법의 하나로 약제 즉

살균제, 살충제 및 항균제 등을 일정량 용해시켜 대상어종을 침지시키고 있다. 이러한 약제 침지 방법은 대상어류의 체표나 아가미 등 표면에서 발생하는 질병에 치유효과가 크나 고농도 처리 시에는 어체내 스트레스로 작용한다.

한편, 화학적 스트레스 중 일반적으로 사용되는 항생제는 방선균등과 같은 다양한 미생물로부터 생성되는 물질로서, 다른 미생물의 증식을 억제하거나 살균작용을 나타내는 것을 의미하며, 현재까지 알려진 약 4,000여종의 항생제 중, 수산용으로는 약 20여종이 사용되고 있다(Jeong and Chun, 1992). 이러한 항생제들은 크게 β -lactam계 항생제, Tetracycline계 항생제, Aminoglycoside계 항생제, Macrolide계 항생제, Polypeptide계 항생제 및 합성 항생제등으로 나뉘어 진다. 어류질병치료에 주로 이용되는 것은 Tetracycline계 항생제로서 tetracycline, chlorotetracycline, oxytetracycline 및 doxycycline 등이 있다. 그중 oxytetracycline (OTC)은 acetate와 malonate가 환을 형성하여 된 4개의 연결된 환을 모핵으로 가지고 있으며, 단백질 합성억제작용에 의한 항균능력이 그람양성균, 그람음성균, rickettsia 및 일부의 protozoa등에까지 미치는 광범위 항생제로써 수산용 항생제에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다(Rigos et al, 2002). 어류 양식에서의 항생제 사용은 세균성 질병의 예방과 치료를 목적으로 경구투여 및 약욕에 의해 이루어진다. 하지만, 항생제 사용에 대한 연구는 항생제의 약동학과 생체내 축적(Uno et al., 1997; Abedini et al., 1998; Namdari et al., 1998, 1999; Haug and Hals, 2000; Meinertz et al., 2001)에 관한 연구가 대부분을 차지하고 있으며, 일부 항생제 사용에 따른 내성(DePaola et al, 1995; Petersen and Dalsgaard, 2003)에 대한 연구가 전부이다. 또한, 현재까지 알려진 Tetracycline계 항생제의 독성작용으로는 간장독성 및 신장 독성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(이 등, 1987).

한편, 해산어류 종묘생산과 양성과정에 각종 질병이 빈발함에 따라 사육수중의 병원체 살균을 위하여 어병의 예방 및 처리방법의 하나로 포르말린, 말라카이트그린, NaOCl 및 ClO₂등 여러 가지 약제를 일정량 용해 시켜 대상어종을 침지 시킴으로써 병원균으로부터 구제하고 있다(Raphael et al., 1981; Leteux and Meyer, 1972; Fox et

al., 1985; Speare et al., 1996). 하지만, 현재까지 가장 보편적으로 사용되었던 포르말린 및 말라카이트그린 독성이 널리 알려지면서 현재 사용 규제됨으로 인해 그 대체 약품으로 과산화수소를 대부분 사용하고 있는 실정이다. 과산화 수소는 무색 투명한 점조 액체이며, 산화 환원 작용이 있고 비교적 안정하며 약산성을 타나낸다. 하지만, 아직까지 이러한 과산화 수소 사용에 따른 어체내 영향에 대한 연구는 전무하다고 할 수 있다.

일반적으로 스트레스를 받게되면 생체 내에 활성산소(superoxide, hydrogen peroxide, peroxy radical, hydroxy radical 등)가 발생하는 것으로 알려져 있다. 활성산소는 생체 내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 친화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시킨다(Ferraris et al, 2002). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase (CAT)등을 생성하여 세포기능손상을 막는 것으로 알려져 있다(Chance et al, 1979; Wendel and Feuerstein, 1981). 이러한 항산화 효소는 온도 변화에 의해 효소활성이 증가하는 것으로 보고되어 있으며 (Parihar et al, 1996; 1997), 중금속 이온의 노출에 의해서도 항산화 효소 활성이 변화한다고 알려져 있다(Livingstone et al, 1992; Chen et al, 2000; Zikic et al, 2001). 이처럼 항산화 효소의 활성은 생체내의 스트레스 반응과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 이용하여 수온, 항생제 및 살충제에 대한 물리·화학적 스트레스에 따른 혈액 성분, 항산화 효소 (CAT 및 SOD) 변화 및 열충격 단백질 (HSP)등의 변화를 조사하여 다양한 스트레스에 대한 어체내 생리·생화학적 반응에 대한 지표 자료를 제공함과 동시에 화학적 스트레스의 유해성에 대한 자료를 제공하고자 본 연구를 실행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

본 실험에 사용한 어류는 제주도 남제주군 표선읍에 위치한 육상 수조식 양식장에서 사육된 넙치(*Paralichthys olivaceus*)로써 전장의 27.5~31.5 cm, 체중 246.5~285.5 g인 것을 사용하였으며, 외관상 질병의 증세가 나타나지 않은 건강한 개체를 사용하였다. 또한, 어류를 실험조건에 적응시키기 위하여 실험 전 2주 동안 예비 사육하여 안정시킨 다음 실험에 사용하였으며, 이때 염분 농도는 29.5~31.5‰, 수온은 18.0~20.5℃로 유지하였다. 예비사육 동안 사료는 시판되는 넙치용 pellet 사료를 사용하여 1일 1회 반복 투여하였으며, 실험 기간 중 사육수에는 공기공급을 충분히 하여 용존 산소가 평균 6 ppm 이상 유지되도록 하였다.



2. 실험 조건

수온 스트레스 실험인 경우 수온 조절이 가능한 순환 여과식 사육시스템을 사용하였다. 실험수조는 용량의 1 ton인 FRP 사각수조로 사용 해수는 1차 모래 여과한 다음, 수온조절 제어시스템에 의해 시간당 10℃씩 하강 또는 상승되도록 하였다. 실험구는 각각 10, 15, 20(대조구), 25 및 30℃로 설정하였으며, 0, 1, 2, 4, 6 및 8시간 후 혈액성상을 분석하였다. 이때, 실험에 사용된 어류는 그룹당 20마리씩 사육하였다.

물리적 스트레스 실험인 경우에는 유수식 사육시스템을 사용하였으며, 실험수조는 용량의 3 ton인 FRP 사각수조였다. 물리적 스트레스를 유발하기 위하여 사용된 약품으로는 최근 일반적으로 많이 사용되는 oxytetracycline (OTC) 및 과산화수소 (H₂O₂)를 사

용하였다. OTC 및 H₂O₂ 약육 처리농도는 제품마다 차이를 가지지만 일반적으로 약 50~100 ppm으로 1시간 약육을 실시하므로, 본 실험에서는 0 ppm(대조구), 일반적인 약육처리 농도인 100 ppm, 고농도인 300 ppm 및 500 ppm으로 각각 설정하였으며, 1시간 약육처리 후 순환시켜 0, 1, 3 및 5시간 후의 혈액성상을 분석하였다.

3. 혈액 성상 분석

혈액은 실험개시전 넙치를 3일간 절식시킨 다음, 미부 동맥으로부터 헤파린을 처리하지 않은 주사기를 사용하여 마취 없이 1분 이내에 개체별로 채취하였다. 채취된 혈액은 원심분리용 튜브에 넣어 4℃에서 2시간 방치한 뒤 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리 한 다음 -70℃에서 동결보관 한 후 혈중 총 단백질 분석에 사용하였다. 또한 헤파린을 처리한 주사기를 사용하여 개체별로 채취한 혈액은 즉시 헤파린 처리된 튜브에 분주하여 상온에서 20분간 방치한 후, 원심 분리하여 혈장을 분리하였으며, 추출한 혈장은 -70℃에서 동결보관 한 후 코티졸(cortisol)량을 측정하였다. 적혈구 용적(Ht)은 혈액을 채취한 후 4,000 rpm으로 30분간 원심분리 한 후 적혈구와 혈장부분의 길이에 대한 적혈구 부분의 비율로 구하였다. 혈색소농도(Hb)는 cyanmethemoglobin법을 이용하여 540 nm에서 측정하였으며, 적혈구수(red blood cell count, RBC)는 헤파린 처리한 전혈을 Hayem씨액(Ishisu)으로 희석시켜 Thoma 혈구 계산판과 red cell pipet을 사용하여 측정하였다. 전혈에서의 혈당량 측정은 혈당 자동 측정기를 이용하여 측정하였다. 코티졸 측정은 cortisol RIA kit (DSL, USA)를 사용하여 항원·항체반응을 유도한 다음, Wizard 1470 counter (Hewlett Packard, USA)를 사용하여 radioimmunoassay (RIA)로 분석하였다. 혈중 총 단백질량은 Lowry et al.(1951)의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다.

4. 항산화 효소 분석

항산화 효소는 간장을 적출하여 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase (CAT) 효소 활성을 분석하였다. 간장은 적출 후 약 1 g을 0.9% NaCl에 3회 세척 한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화 하였다. 균질화된 시료는 원심분리 (1,000 rpm, 15 min, 4°C)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시 원심분리 (13,000 rpm, 20 min, 4°C)한 후 상등액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다. SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund and Marklund (1974)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 8.7 ml에 간장 균질액을 넣은 후 0.3 ml의 3 mM pyrogallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer를 이용 325 nm에서 측정하였다. 그리고 효소활성의 1단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다. CAT 활성도의 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer에 의해 240 nm 파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow (1972)의 방법에 의하여 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다. 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준 단백질로서 BSA (bovine serum albumin)를 사용하여 Spectrophotometer를 이용 540 nm에서 측정하였다.

5. SDS-PAGE

넙치의 간장조직을 채취하여 분쇄 완충용액 100 mM phosphate buffer에서 Potter-Elvehjem 호모게나이저로 분쇄하여 12,000 G에서 원심분리하였다. 상등액을 동량의 2 x Laemmli sample buffer (80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 12% β

-mercaptoethanol, 15% glycerol 및 0.012% bromophenol blue)에 용해시켜 100℃에서 3분간 boiling한 후 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE을 실시하였다. 3~20% gradient-polyacrylamide gel을 사용하여 250 V로 4시간 동안 행한 후, 염색액 (0.136% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol 및 10% acetic acid)에서 40분간 염색한 후, 7.5% methanol, 7.5% acetic acid에서 탈색하였다. 분자량 측정용 표준단백질은 myosin (200 kD), β -galactosidase (116 kD), phospholylase b (97 kD), bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (45 kD) 및 carbonic anhydrase (31 kD)를 사용하였다.

6. Western blot

Western blot은 Towbin et al. (1979)의 방법을 변형하여 실시하였다. SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 15 V에서 4시간 동안 nitrocellulose (NC) 막으로 전사시킨 후 ponceau S 용액 (0.2% ponceaus, 3% trichloroacetic acid 및 3% sulfosalicyclic acid)으로 전사됨을 확인하였다. 그 후 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 3% bovin serum albumin과 0.05% Tween 20이 함유된 0.1 M Tris buffered saline (TTBS, pH 7.4)을 이용하여 40분 상온에서 약하게 흔들면서 blocking 시켰다. Blocking이 끝난 후 HSP-70 (Sigma, H5147)에 대한 항체를 NC막에 첨가하여 1시간 동안 실온에서 배양한 후, TBS-T (0.05% Tween20 in TBS)로 5분씩 3회 세척하였다. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti- mouse IgG로 1시간 동안 실온에서 배양하고 TBS-T 용액으로 5번 세척한 후, DAB(0.1%)와 0.03% H₂O₂가 함유된 PBS (pH 7.2)로 발색을 유도하였다.

7. RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

동결된 조직에 Tri-Reagent (Sigma)을 첨가 한 후 homogenizer를 사용하여 4°C에서 마쇄시켰다. 마쇄조직에 chloroform을 넣어 얼음 위에서 5분간 방치한 뒤 4°C에서 14,000 rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담고 isopropanol을 넣어 RNA를 침전시켰다. RNA 침전물은 DEPC 용액을 넣어 녹이고 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 추출한 RNA 1 µg을 사용하여 14.25 µl 용량으로 역전사를 시행하였으며, RNA 1 µg, RNase inhibitor, oligo-(dT) 15 primer, 2.5 mM dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂ 및 reverse transcriptase를 넣어 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간을 각각 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

cDNA를 증폭시키기 위하여 cDNA 1.0 µl, 10x PCR buffer 9.9 µl, MgCl₂ 7.8 µl, dNTPs 2.0 µl (0.2 mM), primer (sense) 1.0 µl (50 pmole), antisense 1.0 µl (50 pmole), Taq polymerase 1.0 µl 및 Nuclease-Free Water 76.3 µl를 혼합하여 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension 조건으로 30회 증폭하고, 이 후 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. HSP-70 mRNA에 대한 oligonucleotide primer는 (주)바이오니아에서 Table. 1과 같이 합성주문하였다. 양성 대조로 사용할 oligonucleotide primer는 β-actin mRNA로 사용하였다.

Table. 1. Oligonucleotide of primers for heat shock protein-70 mRNA and β-actin

RNA species	Expected size	Primer sequence
β-actin mRNA	520 bp	5-GCCAACAGGGAGAAGATGAC-3
		5-ACGTCGCACTTCATGATGC-3
HSP-70 mRNA	627 bp	5-GVACATTCTCAGACTTGTCWCC-3
		5-CATCAATGAACCAACTGCTGC-3

bp : base pairs

PCR로 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 100 V로 전기영동하여 분리하였으며, 100 bp DNA ladder를 size marker로 사용하여 UV transilluminator하에서 사진 촬영하였다.

8. 통계 처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS-통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여 Duncan's multiple range test로 검정하였다.



Ⅲ. 결과

1. 수온 변화에 따른 스트레스

1) 평균 호흡수

온도에 따른 넙치의 평균 아가미 운동횟수는 대조구 31.7 ± 1.3 회/min에 비해 30 및 25℃에서 유의한 증가를 나타내었고, 저온인 15℃에서는 1시간째 39.3 ± 2.8 회/min을 제외한 2, 4, 6, 8시간에는 급속히 낮아졌다(Fig. 1, $P < 0.05$). 또한 10℃에서는 대조구와 비교하여 1시간째 41.7 ± 3.1 회/min으로 일시적으로 증가하는 경향을 보였으나 이후 대조구와 비슷한 수치를 유지하였다.



2) 혈액성상 변화

Ht수치는 대조구 $28.02 \pm 2.24\%$ 에 비하여 30℃에서는 전반적으로 높은 수치를 나타내었으며, 6시간째에 $40.12 \pm 3.13\%$ 로 최대 값을 나타내었다(Table. 2, $P < 0.05$). 25℃에서는 실험개시 후 4시간까지 전반적으로 높은 값을 나타내었으나 6시간 후에는 $24.01 \pm 1.60\%$ 로 낮은 값을 나타내었다. 그러나 저수온인 15℃ 및 10℃에서는 대조구에 비해 유의하게 낮은 값을 나타내었다.

RBC는 실험개시 후 2시간까지는 대조구 $3.4 \pm 0.3 \times 10^6$ cell/ μ l에 비하여 30, 25 및 10℃에서 유의하게 높은 값을 나타내었다(Table. 2, $P < 0.05$). 그러나 실험개시 후 4시간째 모든 구에서 일시적으로 낮아지는 현상을 보였다. 반면, 저수온인 15℃ 처리 구에서는

1시간 3.06 ± 0.47 , 2시간 3.13 ± 0.42 , 4시간 1.71 ± 0.41 , 6시간 2.37 ± 0.54 및 8시간째 $2.71 \pm 0.38 \times 10^6$ cell/ μ l로 전 구간에서 대조구 보다 낮은 수치를 나타내었다. Hb농도에 있어서도 Ht 및 RBC와 유사한 경향을 나타내었다(Table. 2, $P < 0.05$).

수온의 변화에 의해 발생하는 혈장 코티졸의 농도는 15°C에서는 20°C (대조구) 4.92 ± 2.46 ng/ml 보다 전반적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 10 및 30°C 극심한 온도 스트레스에서는 1시간 후 12.08 ± 0.70 및 13.04 ± 4.30 ng/ml 증가하였다가 회복되는 경향을 나타내었다(Fig. 2, $P < 0.05$). 그러나 25°C 사육조건에서는 실험개시 후 6시간까지 지속적으로 상승하여 8시간째에 회복되는 경향을 나타내어, 코티졸의 농도를 가장 장시간 높게 유지하는 결과를 나타내었다.

3) 항산화효소 변화

간장에서의 SOD는 25°C, 1시간째 가장 높은 87.3 ± 15.27 unit/mg protein/min을 나타내었고, 실험 종료시까지 유의하게 높게 나타났다(Fig. 3, $P < 0.05$). 하지만, 30°C에서는 1시간째 52.3 ± 7.07 unit/mg protein/min로 감소하였다가 이후 4시간째 74.77 ± 3.02 unit/mg protein/min로 증가하는 경향을 보였다. 그러나 그 외의 실험구에서는 대조구에 비해 감소하는 경향을 나타내었으며, 10°C의 실험구에서 가장 낮은 수치를 나타내었다.

한편, 간장에서의 CAT의 활성은 10°C의 실험구를 제외한 실험구에서 유의하게 높은 수치를 나타내었으며, 10°C에서는 전반적으로 대조구와 유사한 수치를 나타내었다(Fig. 4, $P < 0.05$).

4) 수온 변화 스트레스에 따른 HSP-70의 양적 변화 조사

급격한 수온 변화에 따른 HSP-70 단백질의 발현 양상을 관찰하기 위해 넙치 간장으로부터 단백질을 분리하여 SDS-전기영동 후 Western blot을 실시하였는데 대조구를 포함한 모든 실험 그룹에서 각각 HSP-70 단백질이 유도되는 것으로 확인되었다(Fig 5). 그 결과 대조구와 비교하여 모든 실험그룹에서 HSP-70 단백질량이 유의하게 증가하는 경향을 보였으나, 그중 10℃에서 HSP-70 발현량의 가장 높게 유도되는 것으로 확인되었다(Fig 6, $P<0.05$).



Table. 2. Variations of hematological factors of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to exposure of acute water temperature

	Time (h)	Experimental group			
		10 °C	15 °C	25 °C	30 °C
Ht (%)	0 (control)	28.02 ± 2.24	28.02 ± 2.24	28.02 ± 2.24	28.02 ± 2.24
	1	29.46 ± 0.18	21.78 ± 2.69*	31.40 ± 1.50*	34.88 ± 1.47*
	2	24.23 ± 1.01*	25.89 ± 4.97	30.02 ± 1.05	36.79 ± 0.12*
	4	24.44 ± 1.40	23.69 ± 2.52	28.61 ± 2.25	32.55 ± 1.30*
	6	25.83 ± 0.80	21.91 ± 1.40*	24.01 ± 1.60*	40.12 ± 3.13*
	8	20.28 ± 0.55*	16.74 ± 2.02*	31.80 ± 2.25*	30.47 ± 1.09
	RBC (× 10 ⁶ cell/ μℓ)	0 (control)	3.40 ± 0.31	3.40 ± 0.31	3.40 ± 0.31
1		3.85 ± 0.87	3.06 ± 0.47	4.10 ± 0.59	5.64 ± 0.89*
2		4.17 ± 1.02	3.13 ± 0.42	4.77 ± 0.17*	5.19 ± 0.56*
4		2.63 ± 0.28*	1.71 ± 0.41*	4.20 ± 0.20*	4.25 ± 0.37*
6		3.75 ± 0.67	2.37 ± 0.54*	4.85 ± 0.23*	5.19 ± 0.39*
8		5.00 ± 0.23*	2.71 ± 0.38	4.54 ± 0.19*	5.02 ± 0.29*
Hb (g/ dℓ)		0 (control)	4.67 ± 0.39	4.67 ± 0.39	4.67 ± 0.39
	1	5.94 ± 0.09	4.45 ± 0.28	5.01 ± 0.55	4.96 ± 0.74
	2	4.33 ± 0.55	4.66 ± 0.18	5.29 ± 0.28*	5.74 ± 0.37*
	4	4.23 ± 0.22	4.25 ± 0.21	4.29 ± 0.55	5.02 ± 0.61
	6	5.23 ± 0.26*	5.56 ± 0.60	5.05 ± 0.40	6.80 ± 0.26*
	8	4.29 ± 0.34	4.61 ± 0.10	4.77 ± 0.46	5.54 ± 0.11*

* Asterisks indicate significant difference from the control ($P < 0.05$)

The control temperature was set at 20°C. Ht: hematocrit, RBC: red blood cell, Hb: hemoglobin

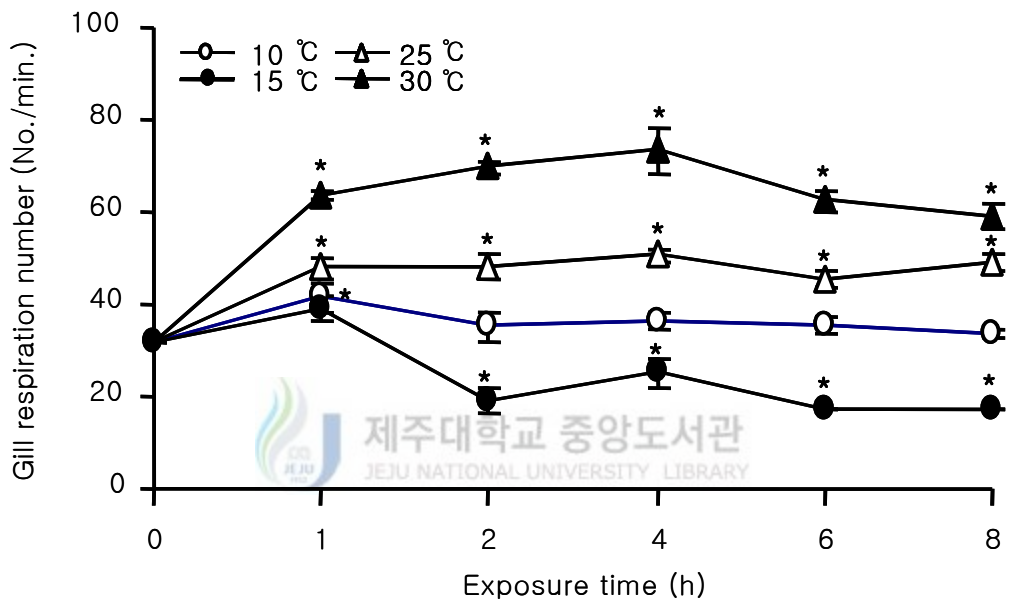


Fig. 1. Variations of gill respiration number (No./min.) of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) during exposure to temperature range from 10 to 30°C at various times. Values represent mean \pm SD (n=4). * $P < 0.05$ as compared to control (20°C).

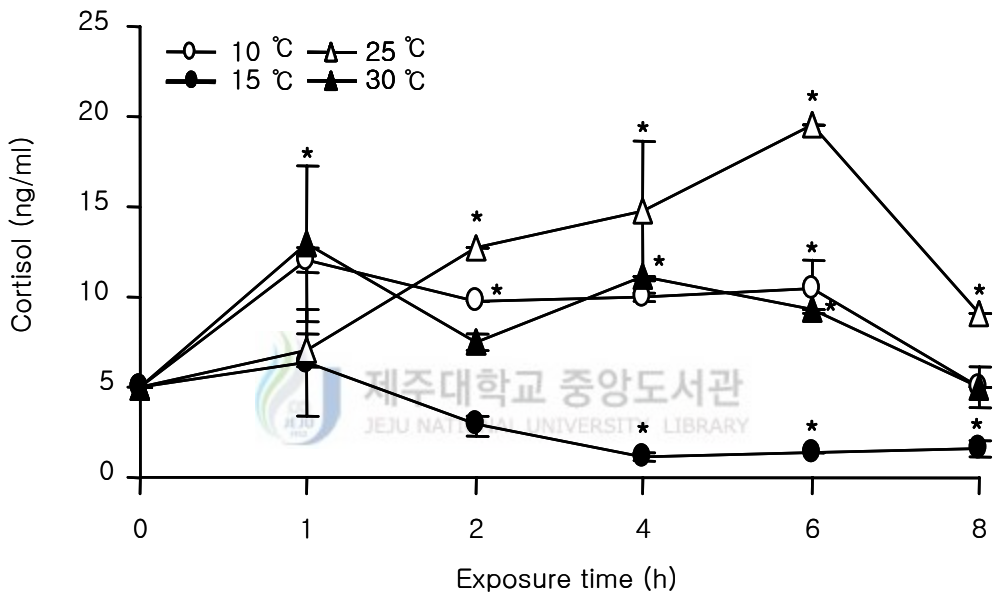


Fig. 2. Variations of cortisol concentration of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) during exposure to temperature range from 10 to 30°C at various times. Values represent mean \pm SD (n=4). * $P < 0.05$ as compared to control (20°C).

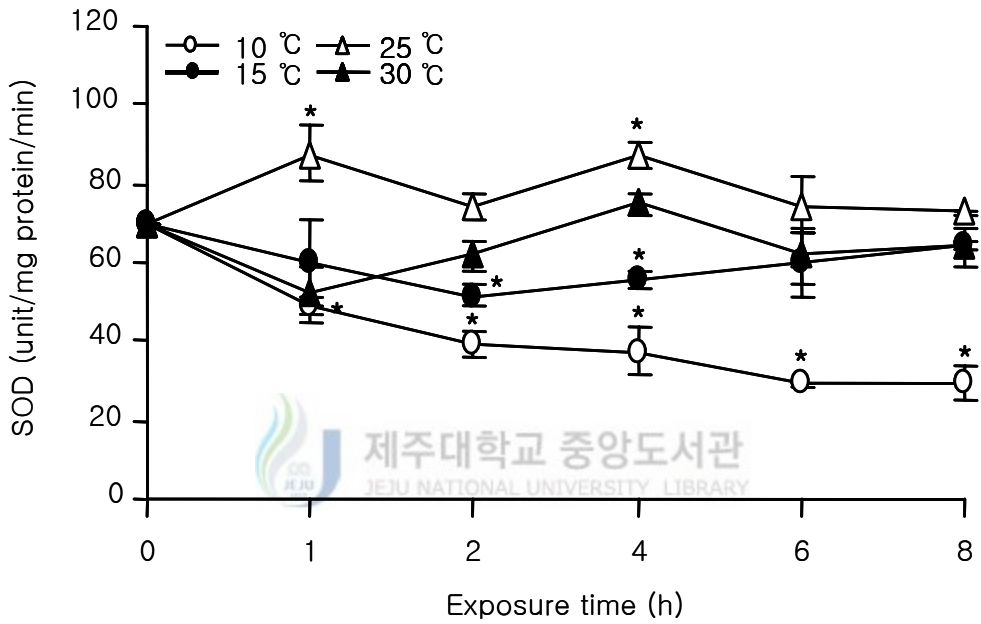


Fig. 3. Variations of superoxide dismutase (SOD) activity in kidney of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) during exposure to temperature range from 10 to 30°C at various times. Values represent mean \pm SD (n=4). * $P < 0.05$ as compared to control (20°C).

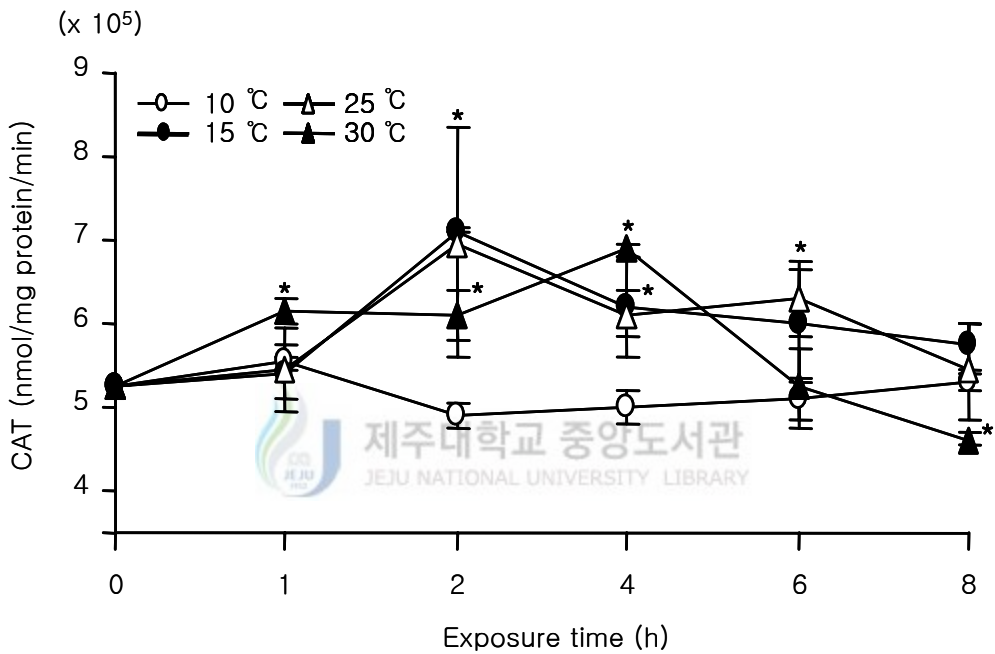


Fig. 4. Variations of catalase (CAT) activity in liver of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) during exposure to temperature range from 10 to 30°C at various times. Values represent mean \pm SD (n=4). * $P < 0.05$ as compared to control (20°C).

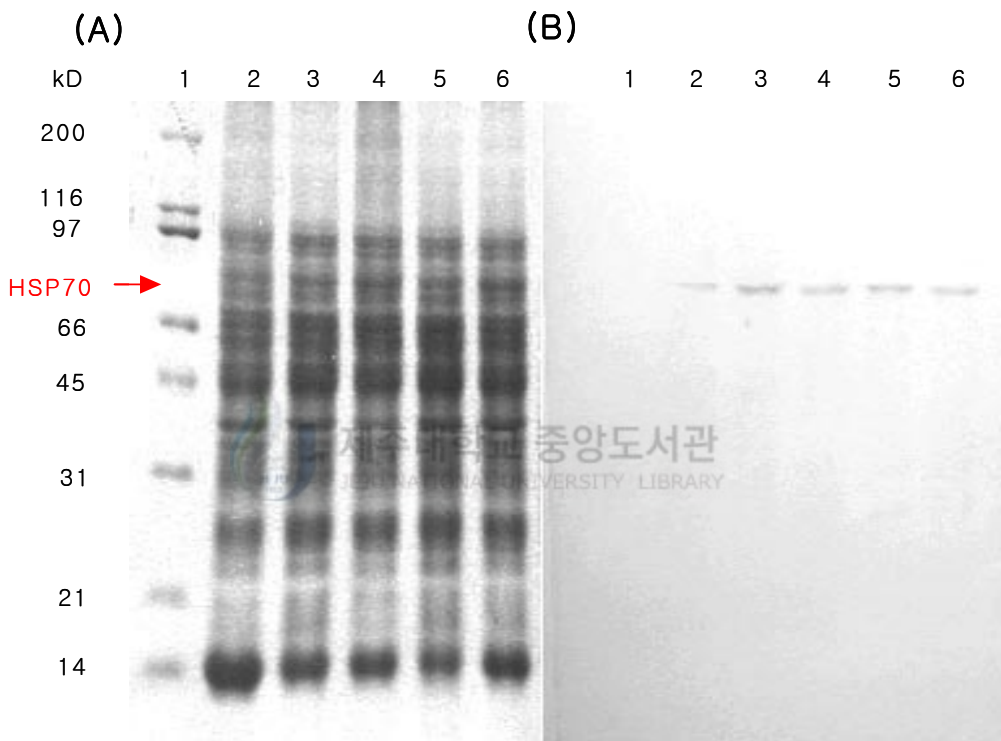


Fig. 5. Immunodetection of heat-shock protein 70 (HSP-70) in liver of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to temperature range from 10 to 30°C. 3-20% SDS polyacrylamide gels (A) and Westerns blots (B): 1 line, Marker; 2 line, 20°C (control); 3 line, 10°C; 4 line, 15°C; 5 line, 25°C; 6 line, 30°C.

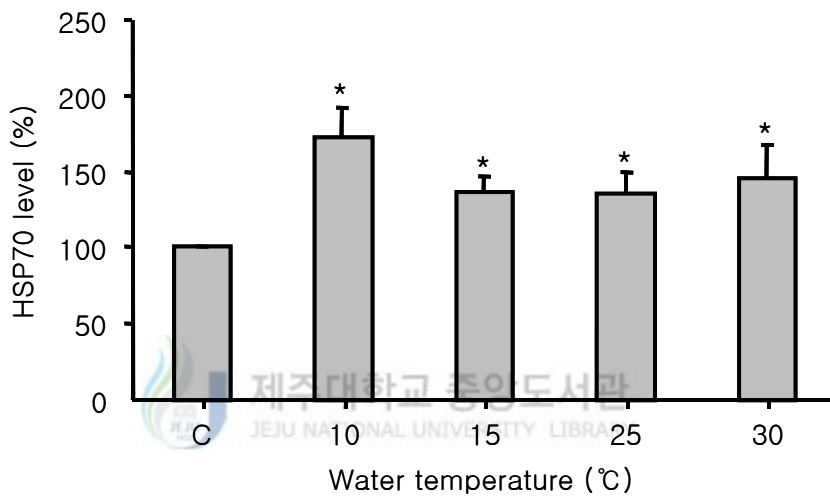


Fig. 6. The amount of HSP-70 expression shown on the western blot was quantitated by densitometry and normalized to the total protein loaded into each lane of the gel. Vertical bars indicate standard deviations; * significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

2. Oxytetracycline치리에 따른 스트레스

1) 혈액성상 변화

항생제 처리에 따른 넙치에서 혈액 생리학적 변화를 조사한 결과 Ht수치는 약욕 후 0시간째 100 ppm과 500 ppm 처리구에서 각각 17.97 ± 1.54 및 $19.89 \pm 1.00\%$ 로 대조구 $22.27 \pm 1.16\%$ 보다 감소되는 경향을 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig 7A, $P > 0.05$). RBC인 경우에도 100 ppm 및 300ppm 처리구에서는 처리 이후 0과 1시간째 감소하는 경향은 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. 그러나 3시간 경과 후에는 각각 $2.47 \pm 0.23 \times 10^6$ cell/ μ l 및 $2.06 \pm 0.29 \times 10^6$ cell/ μ l로 대조구 $3.38 \pm 0.44 \times 10^6$ cell/ μ l보다 유의하게 감소되는 경향을 나타내었다(Fig 7B, $P < 0.05$). 하지만, 500 ppm 처리구인 경우에는 0시간째 $1.81 \pm 0.16 \times 10^6$ cell/ μ l로 유의하게 감소되었다가 1시간 및 3시간 경과 후에는 회복되는 경향을 보였다. 혈액에서의 글루코오스 함량은 항생제 처리 이후 대조구 34.33 ± 2.40 mg/dl와 비교하여 100 ppm인 경우 전 실험구간에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig 8A, $P < 0.05$). 그러나 500 ppm 처리구인 경우 약욕 처리 이후 0시간 및 1시간째 각각 47.00 ± 1.80 mg/dl 및 52.00 ± 5.30 mg/dl로 시간의 경과함에 따라 유의하게 증가되었으나, 3시간 경과 후에는 이전 대조구 수준으로 회복되는 경향을 나타내었다. 혈청에서의 총 단백질은 대조구 7.65 ± 0.80 mg/ml에 비해 처리 이후 0시간째 전 실험구에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 1시간 후에는 300 ppm 및 500 ppm 처리구에서 각각 6.15 ± 0.10 mg/ml 및 6.99 ± 0.45 mg/ml로 0시간째 보다 증가는 되었지만 처리전의 대조구와 비교하여 유의하게 낮은 값을 나타내었다(Fig 8B, $P < 0.05$). 처리후 3시간째에는 전 실험구에서 회복되는 경향을 보였으나 300 ppm 처리구에서는 대조구와 비교하여 유의하게 낮은 수치를 유지하였다.

2) 항산화효소 변화

항생제 처리 후 간장내의 SOD 활성은 100 ppm 처리구인 경우 전 시간에서 유의한 차이를 보이지 않았으나, 300 ppm 처리구인 경우에는 항생제 처리 이후 0시간째 31.66±8.00 unit/mg protein/min으로 효소 활성의 증가되는 경향을 보였고 1시간째 54.75±13.20 unit/mg protein/min으로 최대 값을 나타내었으며, 노출 3시간 후에는 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 대조구에 비교하여 유의하게 높은 값을 나타내었다(Fig 9A, $P<0.05$). 또한, 500 ppm 처리구에서도 0시간 및 3시간째에 각각 46.20±2.60 및 25.23±2.82 unit/mg protein/min으로 유의하게 높은 효소 활성을 나타내었다. 이와는 반대로 CAT효소 활성인 경우에는 대조구와 비교하여 유의한 차이는 나타나지 않았으나 전 구간에 걸쳐서 감소되는 경향을 보였으며, 약육처리 이후 3시간째 500 ppm 처리구에서 최고 낮은 효소활성을 보였다(Fig 9B, $P>0.05$).



3) 항생제 처리에 따른 HSP-70의 양적 변화 조사

항생제 약육 처리에 따른 HSP-70의 발현 양상을 관찰하기 위하여 항생제 약육 처리 이후 3시간째에 넙치 간장으로부터 단백질을 분리하여 SDS-전기영동 후 Western blot 을 실시하였다. 그 결과 대조구와 실험구에서 각각 HSP-70이 유도되는 것이 확인되었다(Fig 10). 100 ppm과 500 ppm 처리구에서는 대조구와 비교하여 HSP-70 발현량의 유의하게 높게 유도되는 것으로 확인되었고, 300 ppm 처리구인 경우에는 대조구와 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig 11, $P<0.05$). 그러나, HSP-70 mRNA 발현은 약육 처리이후 3시간째 대조구와 비교하여 모든 처리구에서 다소 증가하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig 13).

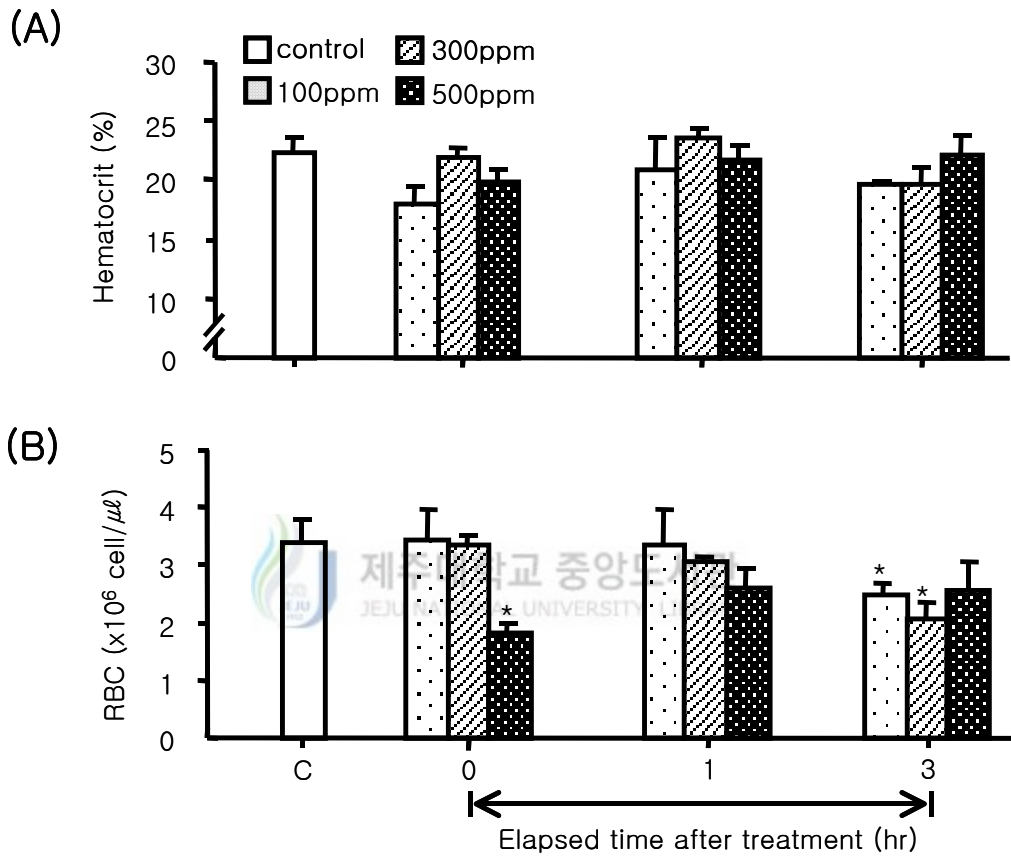


Fig. 7. Changes of Ht (hematocrit) value and RBC (red blood cell) count in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various oxytetracycline concentrations. Vertical bars indicate standard deviations; * significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

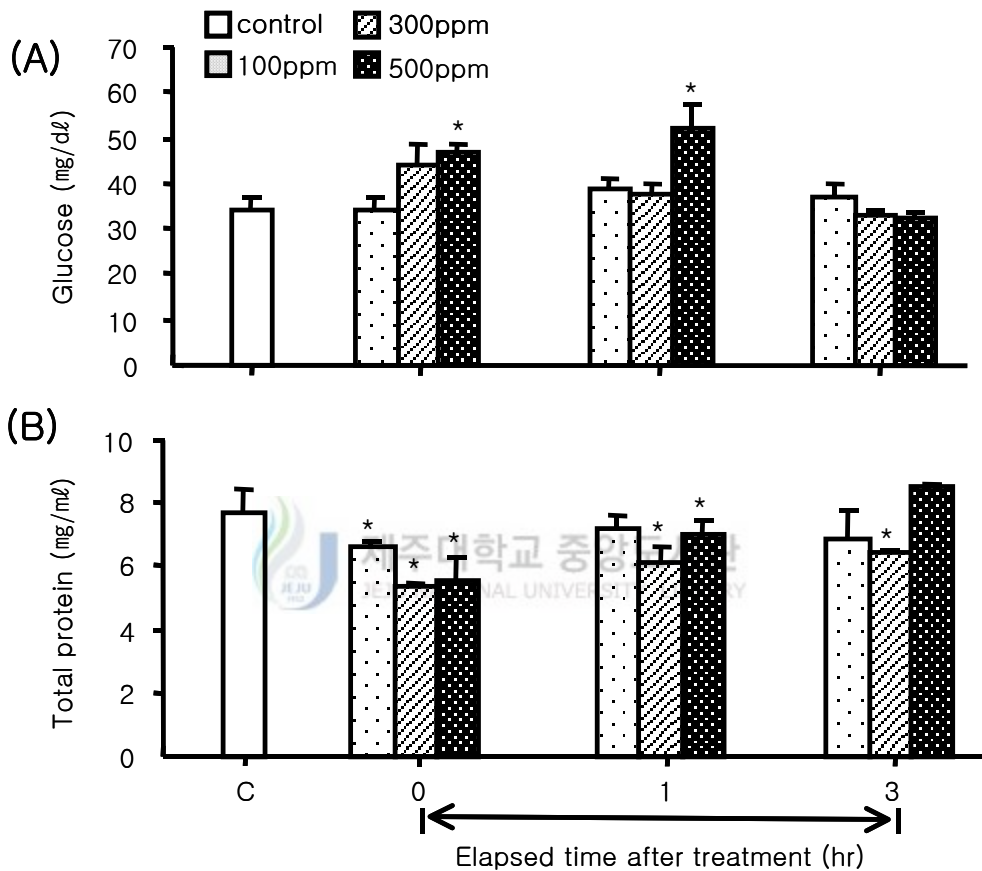


Fig. 8. Changes of glucose concentrations and total protein in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various oxytetracycline concentrations. Vertical bars indicate standard deviations; * significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

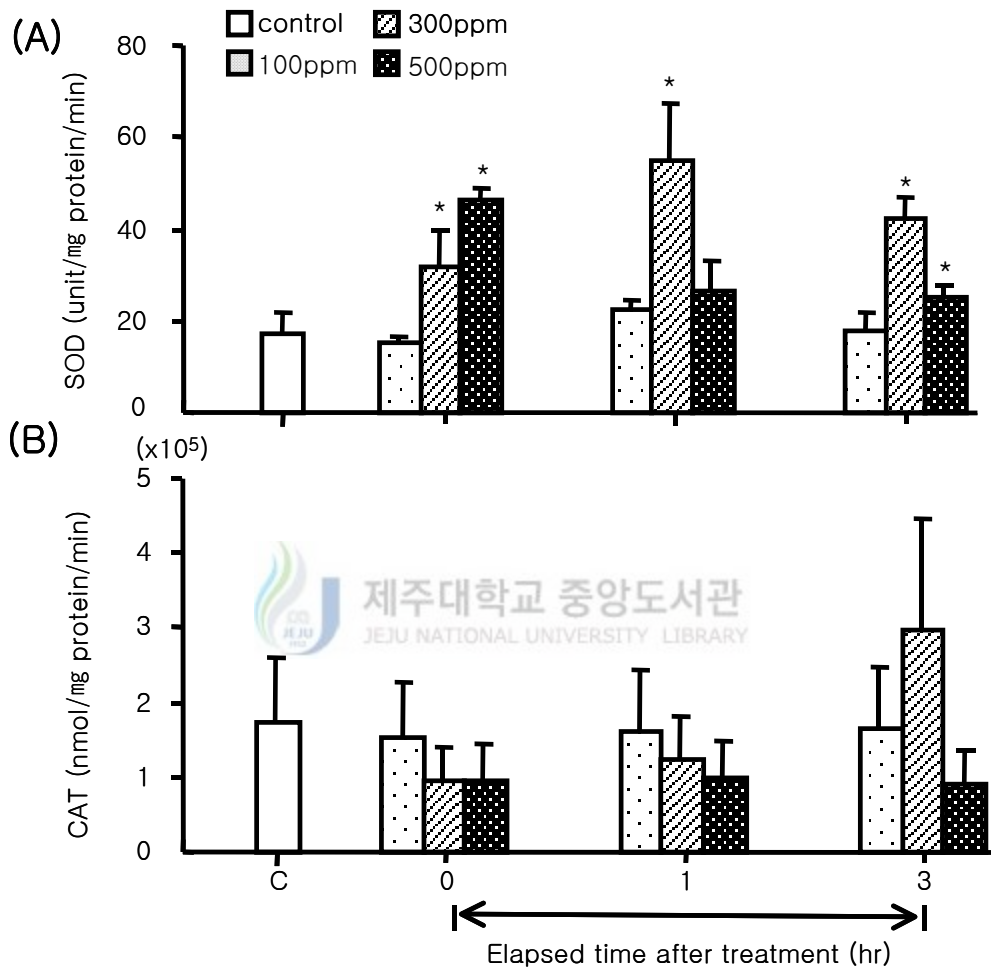


Fig. 9. Changes of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various oxytetracycline concentrations. Vertical bars indicate standard deviations; * significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

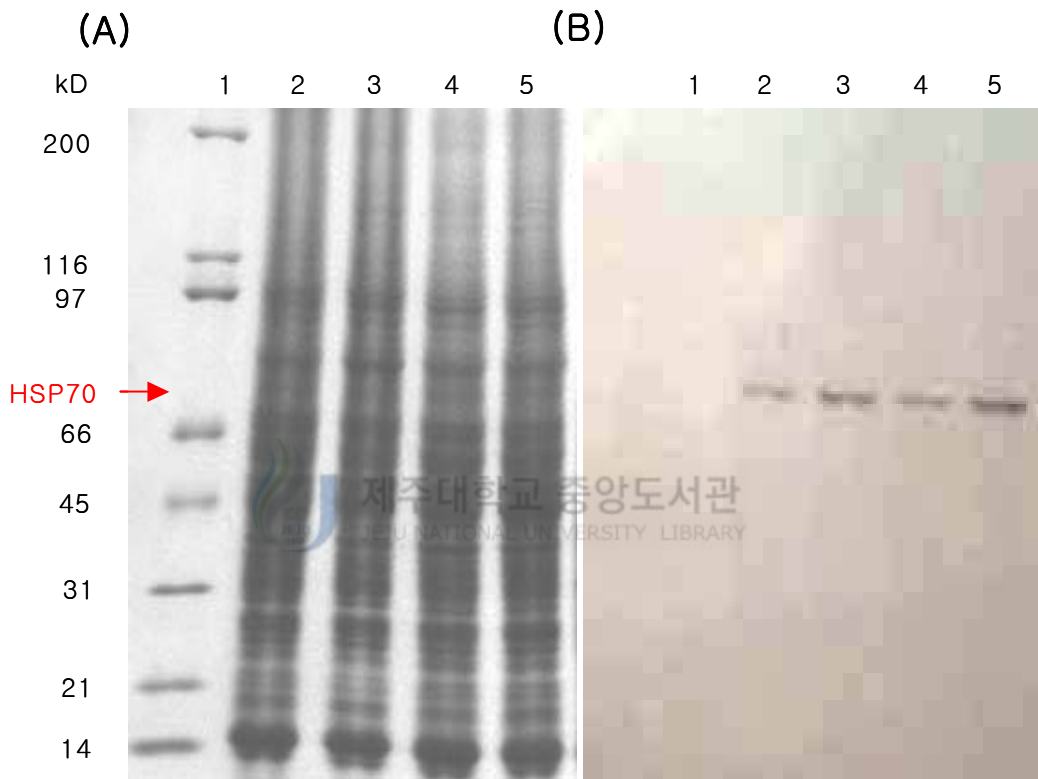


Fig. 10. Immunodetection of heat-shock protein 70 (HSP-70) in liver of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various oxytetracycline concentrations. 3-20% SDS polyacrylamide gels (A) and Westerns blots (B): 1 line, Marker; 2 line, 0 ppm (control); 3 line, 100 ppm; 4 line, 300 ppm; 5 line, 500 ppm.

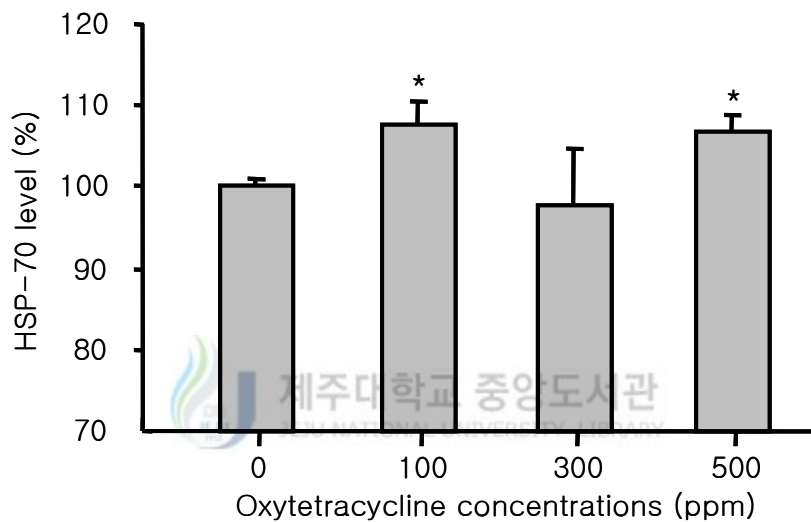


Fig. 11. The amount of HSP-70 expression shown on the western blot was quantitated by densitometry and normalized to the total protein loaded into each lane of the gel. Vertical bars indicate standard deviations; * significant difference between control and exposure group ($P<0.05$).

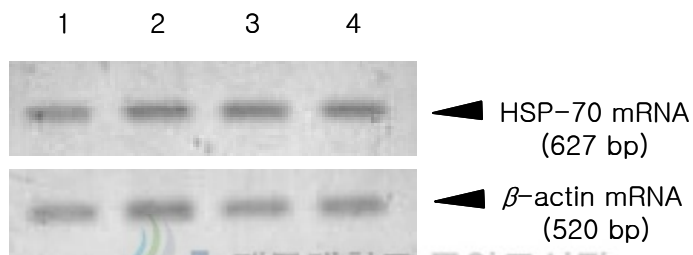


Fig. 12. Expression of HSP-70 mRNA in liver of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various oxytetracycline concentrations. 1 line, 0 ppm (control); 2 line, 100 ppm; 3 line, 300 ppm; 4 line, 500 ppm.

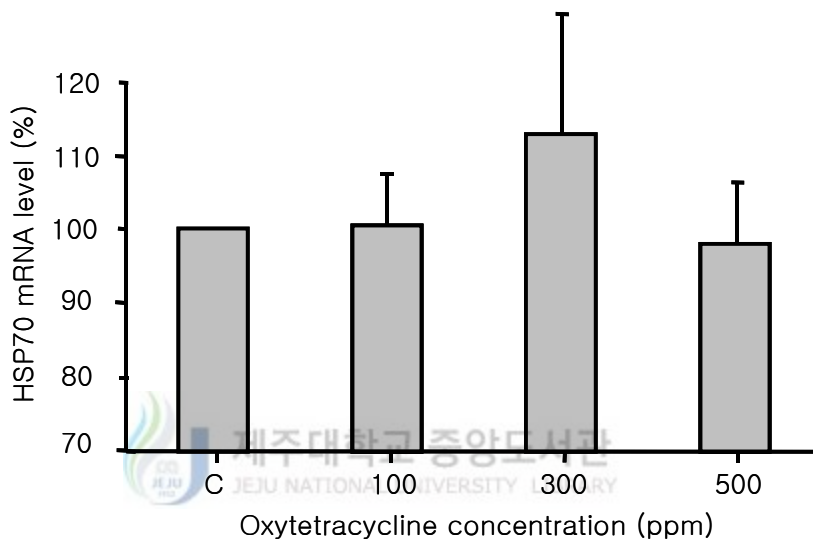


Fig. 13. The amount of HSP-70 mRNA expression was quantitated by densitometry and normalized to the β -actin loaded into each lane of the gel. Vertical bars indicate standard deviations; * significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

3. 과산화수소 처리에 따른 스트레스

1) 혈액성상 변화

과산화수소 처리에 따른 넙치에서 혈액 생리학적 변화를 조사한 결과 Ht수치는 약육 후 0시간째 100 ppm을 제외한 300 ppm 및 500 ppm 처리구에서 각각 25.83 ± 1.30 및 22.67 ± 0.2 %로 대조구 $33.89 \pm 0.70\%$ 보다 유의하게 감소되는 경향을 나타내었고 1시간 경과 이후에는 모든 그룹에서 낮은 값을 나타내었다(Fig 14A, $P < 0.05$). 또한, 5시간째에는 500 ppm 처리 그룹에서 $18.67 \pm 0.50\%$ 로 최고 낮은 값을 나타내었다. Hb인 경우에는 100 ppm 및 300 ppm 처리구에서 처리 이후 1과 3시간째 각각 5.17 ± 0.48 와 5.08 ± 0.36 g/dl로 유의하게 감소하는 경향을 보였으나 그 외의 다른 그룹에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig 14B, $P < 0.05$). RBC 수치는 실험전 대조구보다 3시간까지 전반적으로 감소하는 경향을 보였으나, 5시간 경과 후에는 고농도인 300 ppm 및 500 ppm 처리구에서 대조구 보다 증가하는 경향을 나타내었다(Fig 15A, $P < 0.05$). 혈청에서의 총 단백질 농도는 대조구 7.15 ± 0.11 mg/ml에 비해 처리 이후 0시간째 500 ppm 처리구에서 5.88 ± 0.37 mg/ml로 유의하게 감소하는 결과를 나타내었으며, 이후 5시간째까지 지속적으로 증가하는 결과를 나타내었으나 대조구와 비교하여 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig 15B, $P < 0.05$). 하지만, 100 ppm 처리구인 경우에는 이와 반대로 0시간째 일시적으로 증가하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. 하지만, 1시간 경과 이후 지속적으로 낮아지다가 5시간째에는 5.96 ± 0.20 mg/ml로 유의하게 낮은 값을 나타내었다.

2) 항산화효소 변화

과산화 수소 1시간 약육 처리 이후 어류 간장에서의 SOD 활성은 100 ppm 처리구인 경우 전 시간에서 유의한 차이를 보이지 않았으나, 300 ppm 및 500 ppm 처리구인 경우에는 대조구 8.24 ± 3.60 unit/mg protein/min에 비해 항생제 처리 이후 0시간째 각각 20.62 ± 3.50 및 15.51 ± 1.00 unit/mg protein/min로 효소 활성의 유의하게 증가하는 경향을 보였고 3시간째 각각 7.24 ± 5.00 및 12.06 ± 1.50 unit/mg protein/min으로 낮아지는 경향을 보였으나 대조구와 비교하여 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig 15, $P < 0.05$). 하지만, 5시간 후에는 300 ppm 처리구에서 대조구와 비교하여 현저하게 증가되는 결과를 나타내었다(Fig 16A, $P < 0.05$). CAT효소 활성인 경우에는 대조구 $1.62 \pm 0.24 \times 10^6$ nmol/mg protein/min과 비교하여 100 및 500 ppm 처리구에서 실험 전 구간에 걸쳐 유의하게 증가되는 경향을 보였으며, 약육처리 이후 3시간째 500 ppm 처리구에서 $5.08 \pm 0.63 \times 10^6$ nmol/mg protein/min로 최고 높은 효소 활성을 보였다(Fig 16B, $P > 0.05$). 하지만, 300 ppm 처리구인 경우에는 0시간째에는 증가하는 경향을 보였으나, 이후 1시간째 급속히 감소되는 결과를 나타내었고 이후 5시간째까지 점진적으로 증가되는 결과를 나타내었다.

3) 과산화 수소 처리에 따른 HSP-70의 양적 변화

항생제 약육 처리에 따른 HSP-70의 발현 양상을 관찰하기 위하여 항생제 약육 처리 이후 3시간째에 넙치 간장으로부터 단백질을 분리하여 SDS-전기영동 후 Western blot을 실시하였다. 그 결과 대조구와 실험구에서 각각 HSP-70이 유도되는 것이 확인되었다(Fig 17). 대조구와 비교하여 모든 실험구에서 유의하게 높게 유도되었으며, 그중 100 ppm 처리구에서 HSP-70 단백질 발현량의 가장 높게 유도되는 것으로 확인되었다

(Fig 18, $P < 0.05$). 그러나, HSP-70 mRNA 발현은 약육 처리이후 대조구와 비교하여 모든 처리구에서 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig 20).



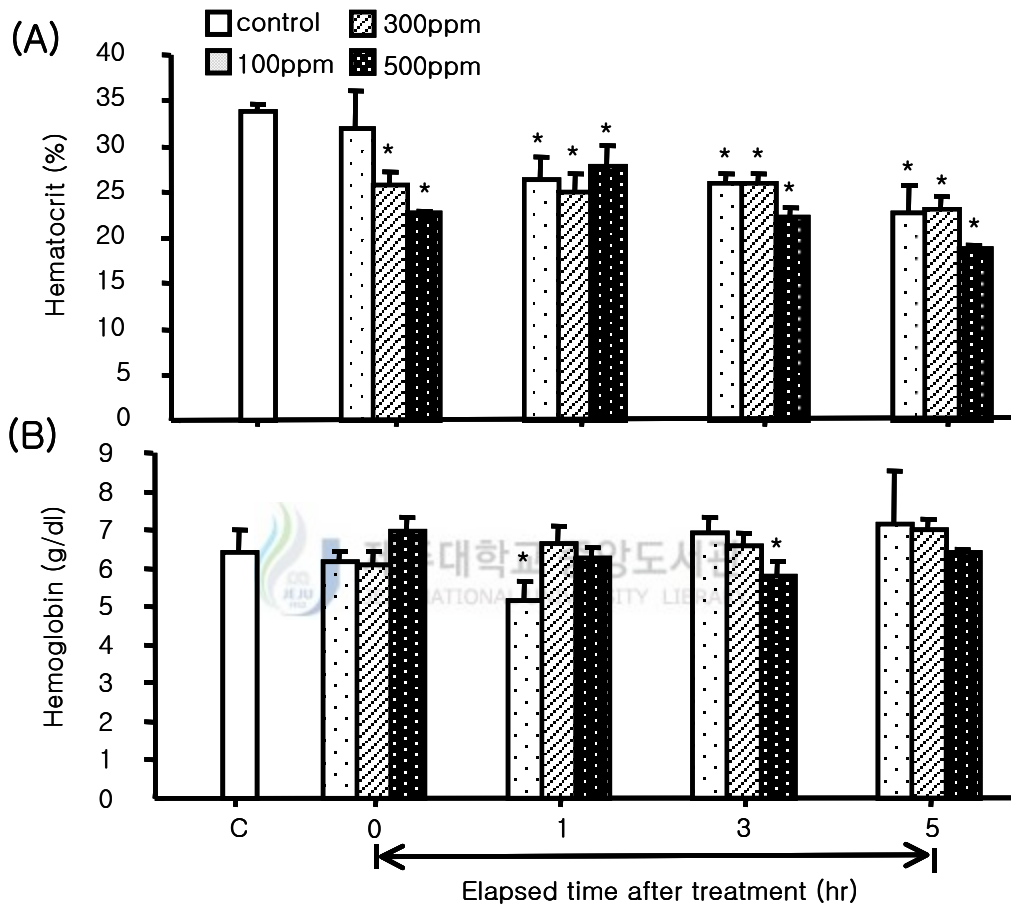


Fig. 14. Changes of Ht (hematocrit) value and Hb (hemoglobin) count in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard deviations; * significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

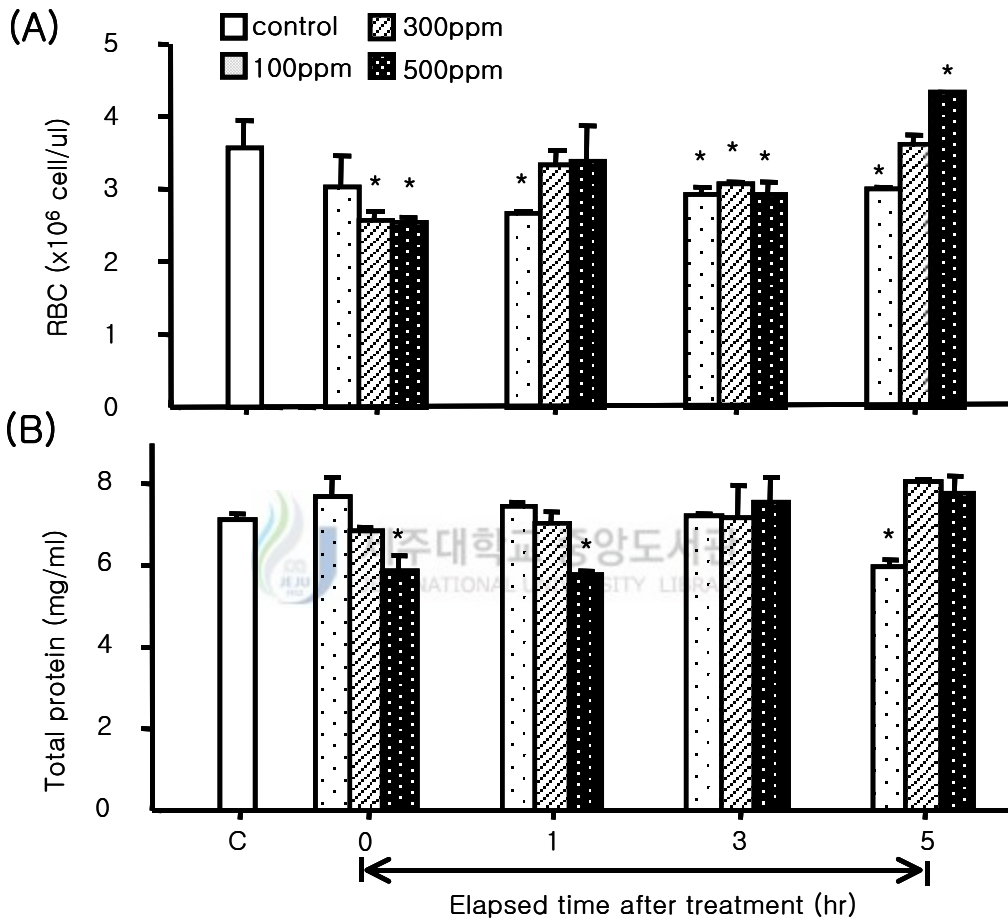


Fig. 15. Changes of RBC (red blood cell) count and total protein in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard deviations; * significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

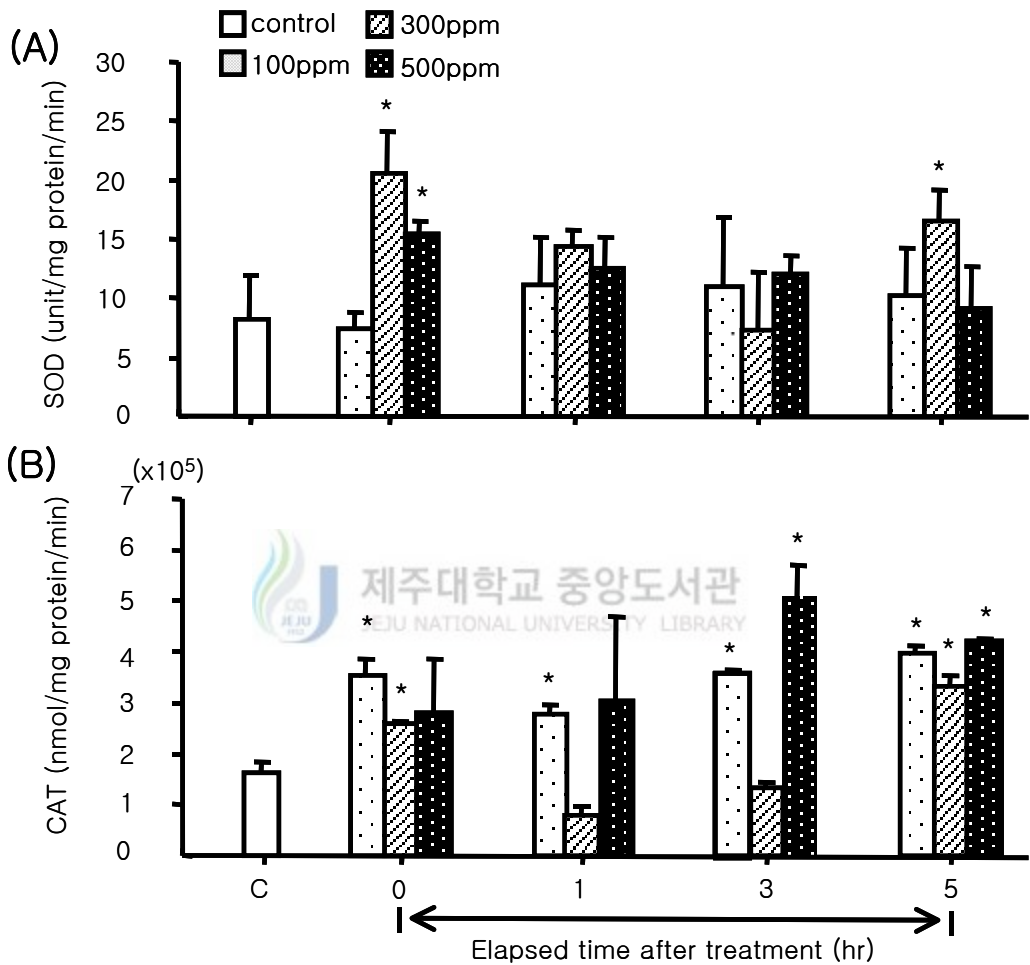


Fig. 16. Changes of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard deviations; * significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

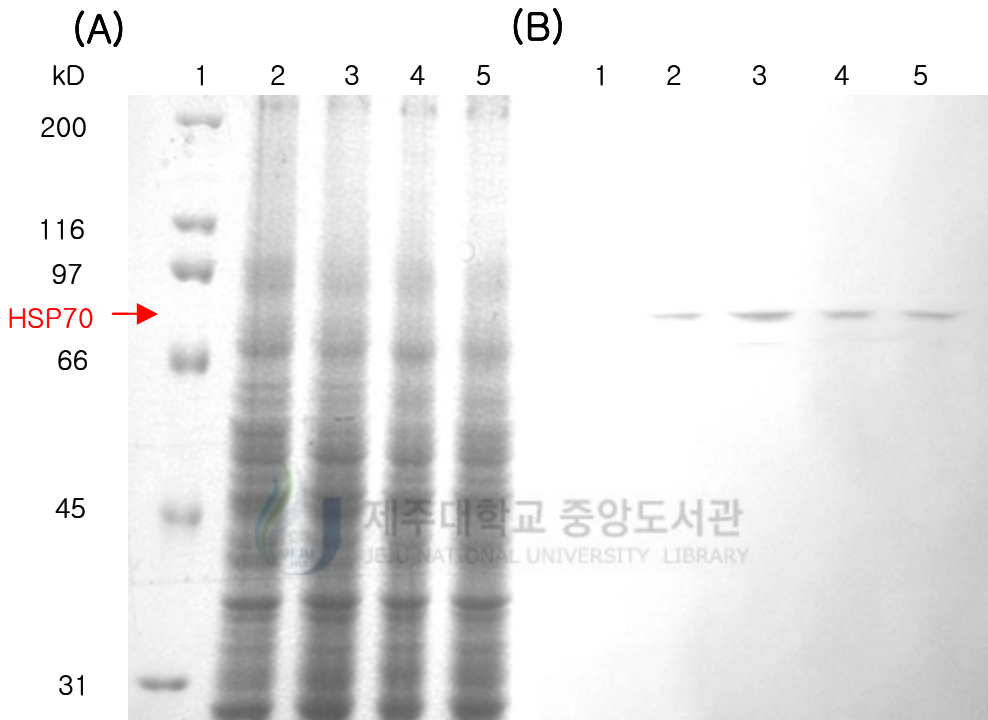


Fig. 17. Immunodetection of heat-shock protein 70 (HSP-70) in liver of Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to various hydrogen peroxide concentrations. 3-20% SDS polyacrylamide gels (A) and Westerns blots (B): 1 line, Marker; 2 line, 0 ppm (control); 3 line, 100 ppm; 4 line, 300 ppm; 5 line, 500 ppm.

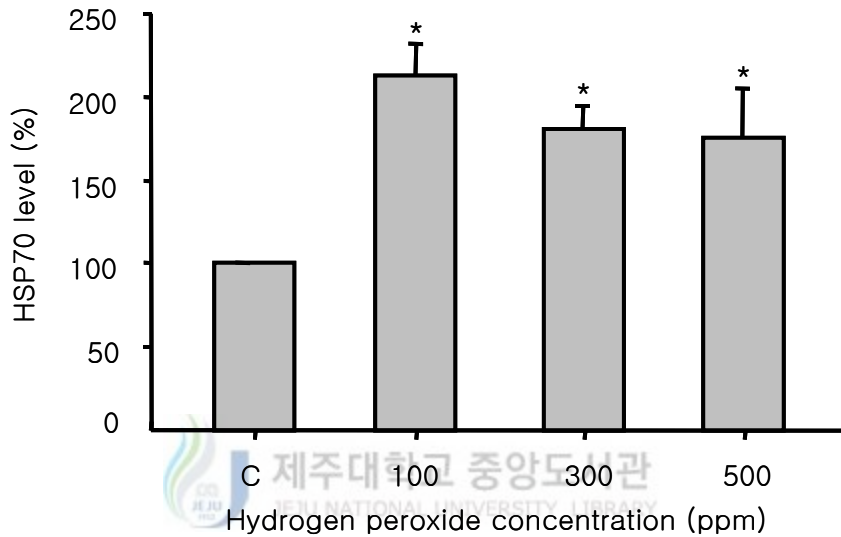


Fig. 18. The amount of HSP-70 expression shown on the western blot was quantitated by densitometry and normalized to the total protein loaded into each lane of the gel. Vertical bars indicate standard deviations; * significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

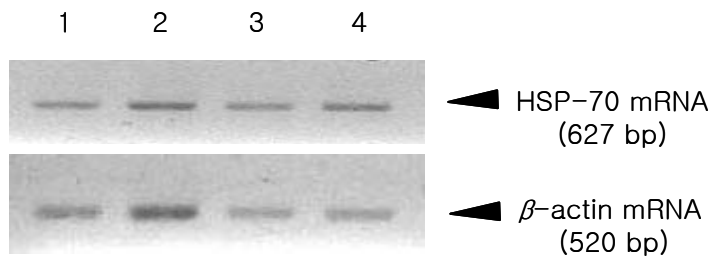


Fig. 19. The amount of HSP-70 mRNA expression shown on the RT-PCR was quantitated by densitometry and normalized to the β -actin loaded into each lane of the gel. Vertical bars indicate standard deviations; * significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

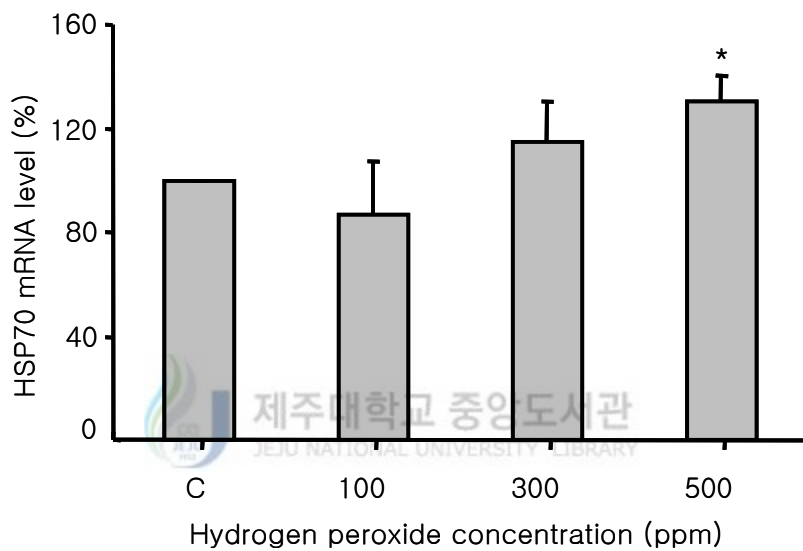


Fig. 20. The amount of HSP-70 mRNA expression was quantitated by densitometry and normalized to the β -actin loaded into each lane of the gel. Vertical bars indicate standard deviations; * significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

IV. 고찰

일반적으로 어류 양식에서 사육중인 어체가 주로 받는 스트레스로는 크게 화학적 요인과 물리적 요인 등으로 나눌 수 있는데, 이들 중 물리적 요인으로는 수온 및 염분 등이 있으며, 화학적 요인으로는 어류의 기생충 구제제로 사용되는 포르말린(Cho and Yang, 1996) 및 황산동(Varanka et al, 2001)과 같은 소독약제 투여 등이 있다. 이러한 환경변화에서 발생하는 물리적 스트레스 및 화학적 스트레스는 어체에게 생화학적인 작용을 가함으로써 건강도에 영향을 미칠 수 있고, catecholamine이나 코티졸을 과다 분비하는 내분비 반응을 유도함으로써 비축된 에너지원의 빠른 소비를 유발하여 양식 생산성에 큰 영향을 미친다. 따라서 본 연구에서는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 이용하여 물리·화학적 스트레스에 따른 혈액 성분, 항산화 효소 (CAT 및 SOD) 변화 및 열충격 단백질 (HSP) 등의 변화를 조사하였다.

일반적으로, 혈액성상에 있어서 Ht, RBC 및 Hb 등은 생체의 산소운반능력을 나타낸다(Chang et al, 1999). 해산어류에 있어 수온상승 자극은 Ht, RBC 및 Hb는 증가시키고, 수온하강 자극은 이와 반대의 경향을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Davis et al, 1990; Ishioka, 1980; Chang et al, 1999, 2001). 또한 어체는 스트레스의 작용으로 혈액 산성화 현상(acidosis)에 의해 적혈구의 산소운반능력이 떨어지는 것으로 알려져 있다(Perry and Reid; 1993). 이상의 연구 결과에서와 같이 본 연구에서도 Ht, RBC 및 Hb 농도가 수온상승 시에는 증가되고 수온하강 시에는 감소되는 경향을 나타내었다. 이러한 경향들은 온도가 높아질수록 사육수의 용존산소포화도가 낮아져 이에 따른 산소 부족으로 어류의 적혈구 수 및 Ht수치가 증가하고 활발한 아가미운동을 통하여 혈액으로의 산소운반을 능동적으로 취하고 있음을 나타내는 것으로 추정된다.

한편, 오염 물질에 노출된 어류는 일반적으로 Ht 및 RBC 등의 혈액성상의 변동을 일으키며, 신장기능의 장애를 일으켜 조혈기관의 손상을 주는 것으로 알려져 있다(Kang

and Jee, 1999; Cho et al, 2002). 현재 저독성 유기인계 살충제인 malathion, formalin, 살충제, 중금속, 카드뮴 및 염소계 화합물에 노출된 어류에서 Ht 및 RBC 등의 혈액인자가 감소되는 것으로 알려지고 있다(Edosa et al., 1994; Khattak and Hafeez, 1996; Kang and Jee, 1999; Zikic et al, 2001; Cho et al, 2002; Costa et al, 2004). 이러한 Ht 및 RBC의 감소는 일반적으로 빈혈을 일으키는 것으로 알려지고 있는데(Edosa et al, 1994; Khattak et al, 1996), 본 실험에서도 OTC 및 H₂O₂ 노출에 의한 혈액의 Ht와 RBC 수가 상기의 결과들과 같이 감소되는 결과를 초래하였다. 이러한 혈액성상에서의 감소는 적혈구 수축, 용혈 및 적혈구 세포의 재생속도 감소 등에 기인하여 감소되는 것으로 알려지고 있다(Costa et al, 2004). 따라서, 본 연구의 결과에서 나타난 결과는 항생제에 의해 적혈구의 수축 및 재생속도의 영향을 미치는 것으로 추정된다.

스트레스에 의한 생체내 호르몬 분비는 대부분 시상하부-뇌하수체-부신피질계의 조절 기전에 의존하여 이루어지는데(Choi and Kim, 1990), 이 기전의 말초 호르몬인 코티졸 함량은 어체가 받는 스트레스 반응의 지표로 널리 이용되며(Donaldson, 1981), 글루코오스는 스트레스 반응에 의해 생성된 코티졸이 에너지 대사에 작용하여 단백질의 파괴로부터 방출된 아미노산으로부터 포도당 신생합성 (gluconeogenesis)이 촉진되어 그 농도가 증가하는 것으로 알려져 스트레스와 대사의 지표로 사용되고 있다(Vijayan and Moon, 1994). 또한, 혈청 단백질량은 성장, 질병 및 스트레스 등에 차이가 있는 것으로 알려져 있으며(Harbell, 1979; MacFaddin and Brown, 1979; Fasaic and Palackova, 1990), 최근 환경오염 지표로 사용되고 있다(Ito and Murata, 1990). 본 연구에서의 온도 급변에 따른 코티졸 농도는 20℃ 보다 15℃에서 낮은 농도를 나타내었으며, 10℃에서는 높아지는 결과를 초래하였다. 그리고 25℃ 및 30℃에서도 10℃와 같은 현상을 보였다. OTC 노출에 의한 글루코오스 농도 및 혈청 단백질 농도는 글루코오스인 경우에는 300 및 500 ppm 처리구에서 현저하게 증가되는 경향을 보였고, 혈청 단백질 농도인 경우에는 대조구에 비해 약육 1시간 처리 직후 현저하게 감소되는 결과를 초래하였다. 또한, H₂O₂ 500ppm 처리구에서도 OTC와 같이 혈청 단백질 농도가 감소되는 결

과를 초래하였다. 이러한 수온 상승에 의한 코티졸 농도의 증가는 수온상승에 따른 어체 내로의 불충분한 산소 공급에 기인하는 것으로 보고되고 있다(Chang et al, 2001). 또한, 글루코오스 농도의 증가 및 혈청 단백질 농도의 감소는 환경오염 물질인 hexachlorobenzene (HCB), 카드뮴 및 petroleum에 각각 노출된 잉어 및 금붕어에서 혈청 글루코스 농도는 증가되고 단백질 농도는 감소되었다는 이전 연구 결과와 유사하였다(Gluth and Hanke, 1984; Yamawaki et al, 1986; Shen et al. 1997; Zikic et al, 2001). 따라서 이러한 결과들은 급성 스트레스에 따른 젓산이 생성됨으로 인하여 혈액이 산성화되어 생체내 산소수급에 문제가 발생하기 때문에, 호기성 대사에서 필요한 양의 에너지를 얻을 수 없었을 것으로 생각된다. 따라서 고농도의 코티졸이 글루코스 신생합성 과정을 활성화시킴에 따라, 다량으로 생성된 글루코스가 혐기적 대사를 촉진시켜 에너지 수급에 대처한 결과라고 생각되어진다.

한편, 스트레스에 의해 발생하는 활성산소는 어떤 유해물질이나 약물 등에 폭로되었을 때 superoxide radical, hydroxyl radical 및 hydrogen peroxide와 같은 oxygen free radicals이 과다하게 생성되어 지질 과산화반응, 단백질 파괴, 염색체 이상 및 적혈구 파괴등 조직에 손상을 입힐 수 있다(Goldberg and Stern, 1977; Simon et al, 1981; Moody and Hassan, 1982; Junqueira et al, 1986). 그러나, 정상적인 조직은 내인성 제거제(endogenous scavengers)를 함유하고 있어 oxygen free radicals 손상으로부터 조직을 보호하는 작용을 하는데, 내인성 제거제인 SOD는 superoxide radical (O_2^-)을 H_2O_2 와 O_2 ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)로 전환시키며, 이 전환된 H_2O_2 를 CAT가 O_2 와 H_2O ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$)로 분해하여 활성산소를 형성하기 전에 생체에 무해한 분자들로 전환시킨다(Forman and Fridovich, 1973; Wendel and Feuerstein, 1981).

일반적으로 이러한 항산화 효소는 어류 종, 조직 및 계절에 따라 항산화 효소 활성이 변화하는 것으로 알려져 있다(Aksnes and Njaa, 1981; Wdzieczak et al. 1981; Gabryelak et al. 1983). 또한, Parihar et al (1996; 1997)는 온도 증가에 의한 스트레스로 실험 후 4시간까지 SOD 효소활성 등이 증가한다는 연구 보고가 있다. 본 실험에서

도 상기의 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었는데, 수온 상승시 2시간 또는 4시간 이후까지 항산화 효소인 SOD 및 CAT가 증가하였다가 이후 실험 종료시까지 낮아지는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 급격한 수온상승과 수온하강 스트레스에 기인하여 발생하는 활성산소에 대한 어체의 생리학적 방어 기작으로 인해 SOD 및 CAT가 증가한 결과라고 생각되어지며, 그 후 감소되는 것은 어체내 생리학적 방어기작의 한계에 도달함으로써 어체내 기초 생리학적인 변화를 초래한 결과에 기인하여 항산화 효소 활성이 감소한 것으로 여겨진다. 또한, 카드뮴에 노출된 금붕어, 틸라피아 및 황산동에 노출된 어류에서 SOD 및 CAT 효소 활성이 증가되는 것으로 보고되어 있다(Dedrajas et al, 1996; Zikic et al, 2001; Basha and Rani, 2003). 본 실험에서도 OTC와 H₂O₂ 처리시 SOD 효소활성이 현저하게 증가되는 결과를 나타내었다. 그러나 OTC 처리할 경우 CAT효소 활성은 약육 처리 이후 2시간까지 모든 실험구에서 오히려 감소하는 결과를 나타내었다. Ferraris et al. (2002)은 무지개 송어 간세포를 이용한 단시간 in vitro 실험에서 물리적 스트레스에 의해 처음 4시간까지는 CAT 효소활성의 감소하다가 이후 증가되었다고 보고하고 있다. 또한, Zikic et al. (2001)은 카드뮴에 15일 및 30일 동안 노출시킨 금붕어에서 CAT 효소활성이 증가되었다고 보고하고 있다. 따라서 이러한 결과들로 볼 때 OTC 처리 단시간의 노출 시에는 SOD가 증가하고 반면 CAT는 감소되는 것으로 추정된다. 그러나 장시간 처리할 경우에는 CAT가 증가할 것으로 기대된다. 따라서 OTC 및 H₂O₂ 처리는 다른 오염물질 등과 같이 산화적 대사를 유도할 수 있다는 것을 암시하며, 어류 조직 내 산화적 손상을 유발할 것으로 생각되어진다.

HSP-70은 잘 알려져 있는 열충격 단백질로서 정상 세포에서는 chaperone의 기능을 하여 단백질의 폴딩, 올리고머의 해체, 단백질의 운반 및 전위를 돕는다(Landry and Gierasch, 1994; Wynn et al. 1994). 또한, 열충격 등의 스트레스에 유도되어 스트레스로부터 유발될 수 있는 단백질 손상을 방어하는 기능을 한다. 이러한 HSP-70은 최근 들어 독성물질의 노출 또는 스트레스의 지표로 사용되고 있으며, 비소, β -Naphthoflavone (BNF), Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), 포르말린 및

Phenoxyethanol 등의 화학물질에 장기간 노출될 경우 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다(Weber and Janz, 2001; Weber et al. 2002; Zarate and Bradley, 2003). 본 실험에서도 OTC 약육 처리에 의해 HSP-70 발현이 증가되었다. 이러한 결과로 볼 때 OTC 처리는 어류에 있어서 생체내 화학적 스트레스로 작용하는 것으로 생각되어진다. 그러나, 본 연구에서의 HSP-70의 증가함에도 불구하고 HSP-70 mRNA 발현양의 증가되지 않은 결과는 단기간의 노출에 따른 결과라고 여겨지지만, 앞으로 OTC에 의한 HSP-70 mRNA level에 대한 정확한 분석을 위해서는 장기간 노출실험이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

일반적인 수온 스트레스 조건에서는 수온 상승과 함께 비례적으로 코티졸 및 항산화 효소 활성의 상승한다고 알려져 있다(Davis et al. 1990; Parihar et al, 1996; 1997). 그러나, 본 실험에서는 10 및 30℃에서는 코티졸 및 항산화 효소가 상승한 후 단시간 내에 회복되는 경향을 나타내었으나, 25℃에서 가장 지속적으로 높은 농도가 유지되는 결과를 나타내었다. 이상의 결과에서와 같이, 적정수온 이상의 과도한 수온 변화보다 오히려 적은 수온 변화에 있어서의 스트레스 관련 혈액성상의 변화가 크게 나타나, 생체내의 방어 기작이 적은 수온 변화에 있어서 그 작용능력이 낮아지게 되고 이에 따른 회복력이 비교적 낮아져 지속적인 스트레스로 작용하는 것으로 판단된다. 또한, 고농도 OTC 및 H₂O₂ 처리는 혈액 성상의 변화를 가져와 스트레스로 작용함으로써 이에 대한 방어기작으로 항산화 효소인 SOD 및 CAT 효소 활성이 증가되는 것으로 판단된다. 또한, 2차적으로 HSP-70 단백질을 생성하여 스트레스에 의한 세포 내 단백질의 변성을 억제시켜주는 것으로 생각되어진다. 따라서, 고농도 OTC 처리는 스트레스 요인으로 작용하여 신진 대사의 변화를 야기시켜 어류의 생리적인 대사에 역효과를 가져올 수 있을 것으로 판단된다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 물리적 스트레스인 급격한 수온 스트레스보다는 화학적 스트레스인 OTC와 과산화수소 처리가 직접적으로 어체내 방어기작을 억제시킴으로 인하여 물리적 스트레스인 급격한 수온변화 스트레스보다는 화학적 스트레스가 어

체내에서 더 큰 악 영향을 미칠 수 있으므로 적절한 농도의 항생제 및 살균제 처리가 요구된다.



V. 요약

본 연구에서는 넙치(*paralichthys olivaceus*)를 이용하여 급격한 수온 변화 스트레스, Oxytetracycline (OTC) 및 과산화 수소(H_2O_2) 처리농도에 따른 체내에서 혈액 생리학적 변화, 항산화 효소 및 열충격단백질 (HSP)등의 변화를 조사하여 물리·화학적 스트레스에 대한 기초 자료를 제공하고자 본 실험을 수행하였다. 물리적 스트레스인 경우 실험구는 각각 10, 15, 20(대조구), 25 및 30℃로 설정하였으며, 측정 시간은 1, 2, 4, 6 및 8시간 후에 측정하였다. 또한, 화학적 스트레스인 경우에는 실험구를 각각 0 (대조구), 100, 300 및 500 ppm으로 설정하였으며, 1시간 약욕처리 후 순환시켜 0, 1, 3 및 5시간 후에 혈액성상을 분석하였다.

그 결과, 물리적 스트레스인 경우 혈액 중 Hematocrit (Ht), Hemoglobin (Hb) 및 Red blood cell (RBC) 농도는 수온상승 시 증가하였다. 또한, 혈장에서의 코티졸 농도는 20℃와 비교하여 15℃에서는 감소하였고, 10 및 30℃에서는 상승 후 일정시간이 경과함에 따라 회복되었으나, 25℃에서는 장시간 코티졸 농도가 높게 유지되었다. 신장에서의 SOD 활성은 25℃에서 높게 나타났으며, 10 및 15℃에서는 그 활성이 감소하였다. 간장에서의 CAT 활성은 10℃를 제외한 실험구에서 유의하게 높은 수치를 나타내었다. HSP-70 단백질 발현량에서는 대조구와 비교하여 실험 전 그룹에서 유의하게 증가되는 경향을 나타내었다.

또한, 화학적 스트레스 중 OTC 처리인 경우 혈액에서의 Hematocrit (Ht) 수치는 전 실험구에서 감소하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. Red blood cell (RBC)는 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 또한, 혈청 글루코오스 농도는 농도 의존적으로 증가되는 경향을 나타내었으나, 노출 이후 3시간 경과 후에는 이전 대조구 수준으로 감소되었다. 혈중 단백질량은 0시간째 전 실험구에서 감소되었다가 이후 회복되는 경향을 나타내었다. SOD 효소 활성은 노출 직후 300 및 500 ppm에서

는 유의하게 높은 값을 나타내었다. CAT 효소활성은 OTC 처리 농도에 비례하여 감소하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 나타내지 않았다. 그리고 HSP-70의 단백질량은 100 ppm 및 500 ppm 처리구에서 대조구에 비해 높게 발현되는 것이 확인되었다. 그러나 HSP-70 mRNA는 300 ppm 처리구에서 다소 증가하는 경향은 보였으나, 모든 실험구에서 유의한 차이는 나타나지 않았다. 과산화수소 처리에 의한 혈액성상에서의 헤마토크리트 수치인 경우에는 농도 및 시간에 의존하여 유의하게 감소되는 경향을 나타내었다. 헤모글로빈 농도에 있어서도 대조구와 비교하여 낮은 수치를 나타내었다. 또한, 적혈구 수에서도 대조구와 비교하여 3시간까지 유의하게 낮은 수치를 나타내었으나 5시간 경과 후에는 이전 대조구 수준으로 회복되는 경향을 나타내었다. 단백질 농도는 500 ppm 처리구에서 0시간 및 1시간째 대조구와 비교하여 유의하게 낮은 값을 나타내었으나 3시간경과 이후 회복되는 경향을 나타내었다. SOD 및 CAT 효소 활성은 유의하게 증가되는 결과를 나타내었다. 또한, 과산화수소 처리에 의해서도 HSP-70 단백질량이 대조구에 비해 전 실험구에서 유의하게 증가되었으며, HSP-70 mRNA량은 500 ppm 처리구에서 유의하게 높게 발현되는 경향을 나타내었다.

VI. 참고문헌

- Abedini, S., R. Namdari and F. C. P. Law, 1998. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in rainbow trout and chinook salmon. *Aquaculture*, 162: 23~32.
- Aksnes, A. and L. R. Njaa, 1981. Catalase, Glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B: 893~896.
- Avtalion, R. R., E. Weiss and T. Moalem, 1976. Regulatory effects of temperature upon immunity in ectothermic veterbrate. In comparative immunology. Marchalonis, J., Blachwell Scientific Publication, Oxford, pp. 227~238.
- Basha, P. S. and A. U. Rani, 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56: 218~221.
- Chance, B., H. Siec and A. Boveris, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol, Rev.*, 59: 527~605.
- Chang, Y. J., J. W. Hur, H. K. Lim and J. K. Lee, 2001. Stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and fat cod (*Hexagrammos otakii*) by the sudden drop and rise of water temperature. *J. Korean Fish. Soc.*, 34: 91~97 (in Korean).
- Chang, Y. J., M. R. Park, D. Y. Kang and B. K. Lee, 1999. Physiological responses of cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) on series of lowering seawater temperature sharply and continuously. *J. Korean Fish.*

- Soc., 32(5): 601~606 (in Korean).
- Chen, Y., X. D. Cao, Y. Lu and X. R. Wang, 2000. Effects of rare earth metal ions and their EDTA complexes on antioxidant enzymes of fish liver. Environ. Contam. Toxicol., 65: 357~365.
- Cho, J. K. and H. C. Yang, 1996. Determination of formaldehyde residue and histopathological observation in formalin and neutral-formalin treated Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). J. Fish Pathol., 9(2): 157~168.
- Cho, K. S., E. Y. Min and J. C. Kang, 2002. Changes of haematological constituents in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to HCB and PCBs. J. Korean Fish. Soc., 35(2): 110~114.
- Choi, J. H. and H. R. Kim, 1990. The effects of tryptophan and tyrosine-enriched diet on the serum cortisol, glucose and free fatty acid levels of stressed rats. Korean J Nutrition., 23(4): 229~236.
- Costa, O. T. F., D. J. S. Ferreira, F. L. P. Mendonca and M. N. Fernandes, 2004. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. Aquaculture, 232: 627~636.
- Davis, K. B., P. Torrance and N. C. Parker, 1990. Physiological stress in striped bass : effect of acclimation temperature. Aquaculture, 91: 349~358.
- Dedrajas, J. R., J. Lopez-Barea and J. Deinado, 1996. Dieldrin induces peroxisomal enzymes in fish (*Sparus aurata*). Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol-Toxicol. Endocrinol., 115(2): 125~131.
- DePaola, A., J. T. Peeler and G. E. Rodrick, 1995. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. Appl. Environ. Microbiol., 61: 2335~2340.

- Donaldson, E. M., 1981. In Stress in Fish A. D. Pickering (ed.), Academic Press, London, 11 pp.
- Edosa, O., G. E. Thomas and C. O. Paul, 1994. Chronic effects of formalin on erythrocyte counts and plasma glucose of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Asian Fish. Sci., 7: 1~6.
- Fasaic, K. and j. Palackova, 1990. Total protein and serum fraction values in two-year carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta. Bio. Iugosl. E. Ichthyol., 22: 23~30.
- Ferraris, M., S. Radice, P. Catalani, M. Francolini, L. Marabini and E. Chiesara, 2002. Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. Aquatic Toxicology., 59: 283~296.
- Forman, H. J. and I. Fridovich, 1973. Superoxide dismutase : A comparison of rate constant. Arch. Biochem. Biophys., 158: 396.
- Fox, C. H., F. B. Johnson, J. Whiting and P. P. Roller, 1985. Formaldehyde fixation. J. Histochem. Cytochem., 33: 845~853.
- Fryer, J. N., 1975. Stress and adrenocorticosteroid dynamics in the goldfish, *Carassius auratus*. Can. J. Zool., 53: 1011~1020.
- Gabryelak T., M. Piatrowska, W. Leyko and G. Peres, 1983. Seasonal variation in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. Comp. Biochem. Physiol., 75C: 383~385.
- Gluth, G. and W. Hanke, 1984. A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sub-lethal concentration. II. The dependency on the temperature. Comp. Biochem. Physiol., 796: 39~45.
- Goldberg, B. and A. Stern, 1977. The role of the superoxide anion as a toxic

- species in the erythrocyte. Arch. Biochem. Biophys., 178: 218~225.
- Harbell, S. C., 1979. Studies on the pathogenesis of vibriosis in coho salmon *Onchorhynchus kisutch*(Walbaum). J. Fish Dis., 2: 391~404.
- Haug, T. and P. A. Hals, 2000. Pharmacokinetics of oxytetracycline in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) in freshwater at low temperature. Aquaculture, 186: 175~191.
- Horning, W. B. I. and R. E. Pearson, 1973. Growth temperature requirement And lower lethal temperature for juvenile smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). J. Fish. Res. Bd. Can., 30: 1226~1230.
- Ishioka, H., 1980. Stress reactions in the marine fish-I Stress reactions induced by temperature change. Bull Jpn Soc. Sci. Fish., 46: 523~532 (in Japanese).
- Ito, Y. and T. Murata, 1990. Changes in glucose, protein contents and enzyme activities of serum in carp administered orally with PCB. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 46(4): 465~468.
- Jeong, H. D. and S. K. Chun, 1992. The utilization of antibiotics and the treatment of bacterial diseases in fish. J. Fish Pathol., 5(1): 37~48.
- Junqueira, V. B. C., K. Simiz, L. A. Videla and S. B. Barros, 1986. Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver superoxide anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. Toxicology, 41: 193~204.
- Kang, J. C. and J. H. Jee, 1999. Hemochemical changes in israel carp, *Cyprinus carpio* exposed to cyanide. J. Korean Fish. Soc., 32(5): 573~581.
- Khattak, I. U. D. and M. A. Hafeez, 1996. Effect of malathion on blood parameters of the fish, *Cyprinion watsoni*. Pak. J. Zool., 28(1): 45~49.
- Kim, J. K. and J. H. Kim, 2001. Diffusion modelling of cold discharge on

- coastal waters. Jour. Fish. Mar. Sci. Edu., 13(2): 132~145 (in Korean).
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature., 227: 680~685.
- Landry, S. j. and L. M. Gierasch, 1994. Polypeptide interactions with molecular chaperones and their relationship to invivo protein folding. Annu. Rev. Bioph. Biom., 23: 645~669.
- Leteux, F. and F. P. Meyer, 1972. Mixture of malachite green and formaline for controlling *Ichthyophthirius* and other protozoan parasites of fish. Prog. Fish Cult., 34: 21~26.
- Livingstone, D. R., S. Archibald, J. K. Chipman and J. W. Marsh, 1992. Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser., 91: 97~104.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrought, A. L. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. biol. Chem., 193: 265~275.
- MacFaddin, D. J. and D. A. Brown, 1979. Stress and chronic effects of untreated and treated bleached kraft pulpmill effluent on the biochemistry and stamina of juvenile coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*). J. Fish. Res. Board Can., 36: 1049~1059.
- Marklund, S. and G. Marklund, 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem., 47: 469~474.
- Meinertz, J. R., M. P. Gaikowski, G. R. Stehly, W. H. Gingerich and J. A. Evered, 2001. Oxytetracycline depletion from skin-on fillet tissue of coho salmon fed oxytetracycline medicated feed in freshwater at temperatures less than 9°C. Aquaculture, 198: 29~39.

- Moody, C. S. and H. M. Hassan, 1982. Mutagenicity of oxygen free radicals. Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 2855~2859.
- Namdari, R., S. Abedini, L. Albright and F. C. P. Law, 1998. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in sea pen cultured chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* and Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) following medicated feed treatment. J. Appl. Aquacult., 8: 39~52.
- Namdari, R., S. Abedini and F. C. P. Law, 1999. A comparative tissue distribution and elimination of oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). Aquacult. Res., 30: 279~286.
- Nelson, D. P. and L. A. Kiesow, 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). Anal Biochem., 49: 474~478.
- Parihar, M. S., A. K. Dubey, T. Javeri and P. Prakash, 1996. Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. J. Therm. Biol., 21(5/6): 323~330.
- Parihar, M. S., T. Javeri, T. Hemnani, A. K. Dubey and P. Prakash, 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. J. Therm. Biol., 22: 151~156.
- Park, C. K., 1978. Chemical oceanographic aspect of the cold water mass in offshore of the east coast of Korea. Korean Fish. Soc., 11(2): 49~54 (in Korean).

- Perry, S. F and S. D. Reid, 1993. β -adrenergic signal transduction in fish interactive effects of catecholamines and cortisol. *Fish. Physiol. Biochem.*, 11: 195~203.
- Petersen, A. and A. Dalsgaard, 2003. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas spp.* and *Enterococcus spp.* in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. *Aquaculture*, 219: 71~82.
- Raphael, D., T. A. Wong, R. Hoodnik and B. G. Borden, 1981. The effect of temperature on the bactericidal efficiency of sodium hypochlorite. *J. Endod.*, 7: 330~334.
- Rigos, G., M. Alexis, A. Andriopoulou and I. Nengas, 2002. Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, at two water temperatures. *Aquaculture*, 210: 59~67.
- Salati, F., K. Kawai and R. Kusuda, 1988. Immune response of ayu against *Vibro anguillarum* lipopolysaccharide. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, 55(1): 45~49.
- Schreck, C. B., 1981. Stress and compensation in teleostean fishes : responses to social and physical factors. In *Stress in fish*, A. S. Pickering. Ed. Academic Press, London., 295~321 pp.
- Shen, H., Q. Zhang, R. Xu and G. Wang, 1997. Effects of petroleum on the sero-proteins of *Tilapia mossambica*. *Mar. Environ. Sci.*, 16(1): 1~5.
- Simon, R. H., C. H. Scoggin and D. Patterson, 1981. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, 256: 7181~7186.
- Singley, J. A. and W. chavin, 1971. Cortisol levels of normal goldfish, *Carassius auratus* L., and response to osmotic change. *Am. Zool.*, 11: 653.

- Speare, D. J., G. Goff, P. MacIsaac, J. Wecherkiwsky and N. MacNair, 1996. Effects of formalin and chloramine-T treatments on oxygen consumption of juvenile salmonids. *J. Aquatic Anim. Health.*, 8: 285~291.
- Towbin, H., T. Stachelin and J. Gordon, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacryamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 76: 4350~4354.
- Uno, K., T. Aoki, R. Ueno and I. Maeda, 1997. Pharmacokinetics of oxytetracycline in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following an intravenous administration. *Fish. Sci.*, 63: 90~93.
- Varanka, Z., I. Rojik. I. Varanka, J. Nemcsok and M. Abraham, 2001. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comp. Biochem. Physiol.*, 128C: 467~478.
- Vijayan, M. M. and T. W. Moon, 1994. The stress response and plasma disappearance of corticostereoid and glucose in a marine teleost the sea raven. *Can. J. Zool.*, 72: 379~386.
- Wdzieczak, J., G. Zalesna, A. Bartowiak, H. Witas and W. Leyko, 1981. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase level in erythrocytes of different fish species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B: 357~358.
- Weber, L. P. and D. M. Janz, 2001. Effect of β -naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. *Aquat. Toxicol.*, 54: 39~50.
- Weber, L. P., S. L. Diamond, S. M. Bandiera and D. M. Janz, 2002. Expression of HSP70 and CYP1A protein in ovary and liver of juvenile rainbow trout

- exposed to β -naphthoflavone. *Comp. Biochem. Physiol.*, 131(C): 387~394.
- Wedemeyer, G. A. and D. J. Mcleay, 1981. Methods for determining The tolerance of fishes to environmental stressors. In *Stress and Fish* A.D. Pickering (ed.), Academic Press, London, pp. 247~275.
- Wendel, A, and S. Feuerstein, 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice-1. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem. Pharmacol.*, 30: 2513~2520.
- Wynn, R. M., J. R. Davie, R. P. Cox and D. T. Chuang, 1994. Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. *J. Lab. Clin. Med.*, 124: 31~36.
- Yamazaki, K., W. Hashimoto, K. Fujii, J. Koyama, Y. Ikeda and H. Ozaki, 1986. Hemochemical changes in carp exposed to low cadmium concentrations. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52(3): 459~466.
- Zarate, J. and T. M. Bradley, 2003. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon, *Aquaculture*, 223: 175~187.
- Zikic, R. V., A. S. Stajn, S. Z. Pavlovic, B. I. Ognjanovic and Z. S. Saicic, 2001. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiol. Res.*, 50: 105~111.
- 방종득 · 박수일, 1994. 넙치의 면역반응에 수온이 미치는 영향. *한국어병학회*. 7(2): 119~126.
- 이우주 · 홍사석 · 조규철 · 김원준 · 홍기환 · 유경자 · 차영남 · 김경환 · 이향우, 1987. 이우주의 약리학강의. 선일문화사. pp 530~558.

감사의 글

대학에 들어와 부족함이 많은 저를 학문의 길로 이끌어 주시고, 이 논문이 완성되기까지 부족한 저에게 항상 따뜻한 가르침과 격려를 아끼지 않으시고 지도하여주신 여인규 교수님께 진심으로 감사드리며, 바쁘신 중에도 부족한 논문을 심사해 주시고 정성껏 다듬어 주신 전유진 교수님, 이경준 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 늘 관심과 조언으로 격려를 아끼지 않으신 송춘복 교수님, 허문수 교수님, 이제희 교수님, 박근태 교수님 그리고 임윤규 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

이 논문이 완성되기까지 관련실험에 필요한 실험장소 및 어류를 제공하여 주시고 실험시 자기 일처럼 돌보아 주신 서연수산 및 유라수산 강호정 부회장님을 비롯한 직원 여러분께 고마운 마음을 전합니다. 또한, 어류분자생리학 실험실 식구들이 있었기에 본 논문이 완성된 것이라 생각합니다. 이 논문이 완성되기까지 참으로 많은 시간동안 형제간처럼 동고동락하며 성심 성의껏 실험시 애써 준 어류 분자생리학 실험실 식구들인 김태형, 이기정, 김경주, 김혜영, 김지연에게 진심으로 감사의 말씀드리며, 실험을 하는 동안 항상 옆에서 버팀목이 되어주었던 문휴, 영진, 철홍, 수진, 맹진이 형 그리고 친동생들 같은 만철, 상규, 길남에게도 감사드립니다. 아울러 늘 옆에서 많은 조언을 해주신 양병규 선배님을 비롯한 철영이 형, 용욱이 형에게도 감사의 말씀을 드리며, 다시 한번 지금까지 격려해주신 주위의 모든 분들에게 진심 어린 감사의 말씀을 드립니다.

끝으로 오늘이 있기까지 어려운 여건에서도 항상 사랑과 희생으로 뒷바라지하시느라고 애써 사랑하시는 어머니님과 아버지님, 형님가족, 하나밖에 없는 동생 그리고 항상 곁에서 힘을 실어준 김수미에게 이 논문을 바칩니다.