

## $\beta$ -glucan을 접종한 한국산 메기(*Silurus asotus*)의 호중구와 리소자임 활성 증강

박성우 · 김영길 · 최동림\*

군산대학교 해양산업대학 수족병리학과  
\*국립수산진흥원 서해수산연구소 군산분소

한국산 메기(*Silurus asotus*)에  $\beta$ -glucan을 복강내에 접종한 후, 경시적으로 말초혈액중의 호중구의 수와 PAS반응의 변화, 호중구의 탐식능 및 혈청중의 리소자임의 활성변화를 지표로 비특이적방어능력의 증강유무를 조사하였다. 글루칸의 투여후 말초혈액중의 호중구수들 증가시켰으며 투여회수에 따라 2회 접종한 경우 호중구의 증가가 지속되는 기간이 1회 접종어보다 길게 나타났다. 그러나 호중구의 PAS반응에는 변화가 없었다. 또 탐식율도 현저하게 증가하였지만 탐식지수는 변화가 없었다. 리소자임의 활성은 2회 접종시만이 현저히 증가하였으나 1회 접종시에는 활성의 증가가 없었다. 그러므로  $\beta$ -glucan의 투여는 말초혈액중의 호중구수와 탐식능의 증가 및 리소자임 활성의 증가등 비특이적방어인자의 활성을 증가시켜 어체를 방어하는 능력을 증강시키는 것임을 알 수 있다.

Key words : Korean catfish,  $\beta$ -Glucan, Phagocytic activity, Lysozyme activity, Non-specific defence

포유류에 투여시 항암효과는 물론 비특이면역계를 자극하는 것으로 알려진  $\beta$ -glucan은 잉어, 무지개 송어, chinook salmon, catfish, 대서양연어등의 어류에 있어서도 포유류의 경우와 마찬가지로 비특이적방어능력이 증강된다는 보고가 있다(Engstad *et al.*, 1992; Chen and Ainsworth, 1992; Nikl *et al.*, 1993; Jorgensen *et al.*, 1993a). 이러한 비특이적 방어력의 증가는 두신 식세포의 활성화(Yano *et al.*, 1989), 보체의 대체경로의 활성화(Yano *et al.*, 1989, 1991), 탐식능의 증가(Robertsen, 1990; Jeney *et al.*, 1993), 마크로파지의 활성화(Raa *et al.* 1992), 리소조움의 활성화(Engstad *et al.*, 1992; Jorgensen *et al.*, 1993b)에 의한 것으로 밝혀졌다. 또 이러한 비특이적 면역증강제는 비특이적 면역반응뿐만아니

라 특이적 면역반응계를 활성화시켜(Nikl *et al.*, 1993) 세균성 질병의 예방적인 효과면에서 유용한 것으로 생각되고 있다.

저자들은 전보에서  $\beta$ -glucan을 한국산 메기에 복강투여한 결과 *Edwardsiella ictalru*와 *Aeromonas hydrophila*의 인위 감염증에 높은 저항성을 나타내는 것으로 보고하였지만(박 과 김, 1996), 저항성 증가의 요인에 관해서는 조사하지 않았다.

본 연구는  $\beta$ -glucan 투여후의 한국산메기의 세균성질병에 대한 생존율 증가의 요인을 구명하기 위하여  $\beta$ -glucan의 복강 투여후 말초혈액중의 호중구와 리소자임의 활성변화를 경시적으로 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 어류

전북도내의 개인 양어장에서 지수식으로 사육중인 평균 체중 18~25 cm(80~180 g)의 메기를 구입하여, 90×30×45 cm의 유리 수조에 20마리씩 수용하여 순치시킨 다음 사용하였다. 실험 기간중의 수온은 23~25°C였으며, 사료는 순치동안만 투여하였다.

### 2. $\beta$ -glucan의 투여

글루칸(Sigma, G6513)을 멸균생리식염수에 용해시켜 어체중 100 g당 200  $\mu$ g을 복강내에 접종하였다. 또 1회 투여와 2회투여와의 차이를 알아보기 위하여 어체중 100 g당 200  $\mu$ g을 접종한 3일후에 동량을 2차 투여하였다. 대조구로는 멸균생리식염수를 복강주사하였다.

### 3. 호중구의 수와 PAS반응의 변화

글루칸의 최종투여후 1, 3, 5, 7, 14, 28일후에 각 3마리씩의 어류에서 헤파린 처리 플라스틱 주사기를 사용하여 미부혈관에서 채혈한 다음 슬라이드 도말표본을 만들어 May-Grünwald Giemsa염색과 PAS염색을 하였다. 호중구의 수는 박(1995)의 호중구의 형태학적 특징을 기준으로 광학현미경하에서 적혈구 5,000개를 헤아리는 동안에 출현하는 호중구의 수로서 나타내었으며, PAS반응의 정도는 Park and Wakabayashi(1989)의 방법에 따라 양성세포 100개당의 유형별 출현수를 %로 나타냈다. 단 PAS반응의 변화는 1회 접종어에 대하여만 실시하였다.

### 4. 탐식능

미부혈관에서 채혈한 말초혈액의 음소닌화한 *Escherichia coli* 포르말린 사균에 대한 탐식능과 탐식지수를 Yamamoto and Iida(1995)의 방법에 따라

실리콘 코팅 유리시험관에 말초혈액 0.5 ml와 사균액 0.025 ml(20 mg/ml)를 넣고 25°C에서 진탕 배양하였다. 2시간 배양후 슬라이드 도말표본을 만들어 May-Grünwald Giemsa염색을 실시하여 광학현미경하에서 호중구에 의한 탐식율과 탐식지수를 산출하였다.

### 5. 리소자임의 활성

Litwack(1955)의 방법에 따라 0.066M Phosphate buffer(pH 6.2)에 0.02% (W/V)로 현탁부유시킨 *Micrococcus lysodeikticus*(Sigma, M-3770)의 부유액 1.7 ml를 cuvette에 옮긴 다음, 미부혈관에서 채취한 말초혈액을 원심분리하여 채취한 혈청 100  $\mu$ l를 첨가하였다. 이 혼합액을 20°C에서 배양하면서 혼합후 30초와 150초 후에 파장 450 nm의 흡광도( $A_{450}$ )를 측정하여 분당의 흡광도의 감소치를 리소자임의 활성으로 하였다.

### 6. 분석

탐식능과 리소자임의 활성은  $p < 0.05$ 인 범위에서 t검정법에 의해 실시하였다.

## 결과 및 고찰

글루칸을 1회 투여한 메기의 말초혈액중의 호중구수와 PAS반응의 경시적 변화를 Fig. 1과 Fig. 2에 나타냈다. 호중구는 글루칸 접종 1일후에 41.6개로 급격히 증가하기 시작하였다. 접종 3일째에 46.6개로 최대에 달한 다음, 접종 14일후부터는 정상으로 되돌아가기 시작하여 접종 28일후에는 대조군과 차이가 없었다. 한편 생리식염수를 접종한 군에서도 접종 3일후와 5일후에 약간의 증가가 관찰되었지만 시중 안정된 수에 머물러 있었다.

글루칸 접종후의 PAS반응의 변화는 글루칸 접종 1일후부터 1형이 감소하는 대신에 2형의 비율이 증가하여 가장 높은 비율을 차지하였지만, 7일후부터는 다시 1형이 증가하기 시작하여 우점형으로

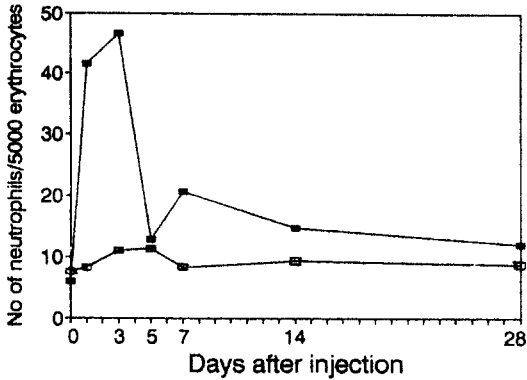


Fig. 1. Changes in the number of peripheral neutrophils of Korean catfish injected intraperitoneally with  $\beta$ -glucan(■) or physiological saline (□). The glucan-injected fish received 200  $\mu$ g/100 g body weight.

되었고 3형의 출현이 접종 1, 3, 5일후에 있었지만 그 비율은 매우 낮았다. 한편 생리식염수 접종어에서는 시종 1형이 대부분이었다.

1회 접종어와 2회접종어간의 말초혈액중의 호중구수의 변화를 Fig. 3에 나타냈다. 2회 접종어의 호중구수의 증가 범위는 1회 접종어와 차이가 없었다. 그러나 증감의 경향에 있어 1회 접종어의 경우 접종 3일후에 최고치에 도달한 다음 감소하는 경향인 반면, 2회 접종어의 경우는 접종후 3일까지는 감소하는 경향이였지만, 그 후부터는 증가하여 1회 접종시 호중구가 감소하기 시작하는 7일후에도 47.7개로 여전히 많은 수가 출현하였으며, 1회 접종어가 정상상태로 회복되는 14일후에도 26.0개로 높은 수치를 나타냈다.

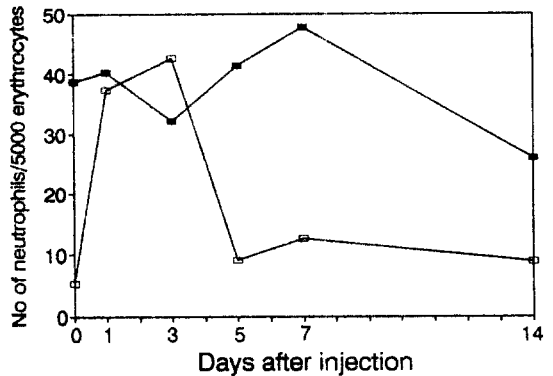


Fig. 3. Changes in the number of peripheral neutrophils of Korean catfish injected intraperitoneally with  $\beta$ -glucan(200  $\mu$ g/100 g body weight) once (□) or twice(■) at an intervals of 3 days.

Fig. 2. Changes in PAS reaction of peripheral neutrophils in Korean catfish injected with  $\beta$ -glucan(a) and physiological saline(b).

말초혈액 호중구의 탐식율과 탐식지수를 Fig. 4에 나타냈다. 정상메기의 *E. coli*포르말린 사균에 대한 탐식율과 탐식지수는 각각 12.0%와 1.7이었다. 글루칸을 1회 접종한 경우, 탐식율은 접종 1일후부터 증가하기 시작하여 접종 5일후까지 현저하게 높았지만( $p < 0.05$ ), 그 이후부터는 감소하여 접종 7일후부터는 정상 수준으로 낮아졌다. 글루칸 2회 접종시에도 1회 접종시와 마찬가지로 탐식율이 증가하였는데, 1회 접종시의 탐식율이 낮아진 접종 7일과

14일후에도 탐식율이 높았다( $p < 0.05$ ). 그러나 생리 식염수를 접종한 대조군에서는 탐식율의 변화는 없었다. 한편 탐식지수는 글루칸의 접종에도 불구하고 대조구와 차이가 없었다.

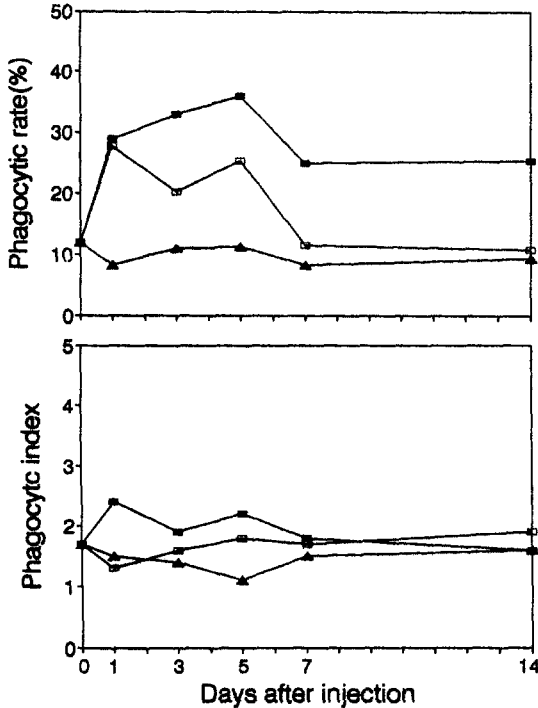


Fig. 4. Phagocytic activity of peripheral neutrophils of Korean catfish injected intraperitoneally with β-glucan(■, □) or physiological saline(▲) to formalin-killed *Escherichia coli*. The glucan-injected fish received β-glucan(200 μg/100 g body weight) once(□) or twice(■) at an intervals of 3 days.

글루칸 처리에 따른 말초혈액 혈청중의 리소조움의 활성을 Fig. 5에 표시한 것처럼 정상메기의 활성은 0.048이었다. 글루칸을 2회 접종하였을 때 만이 접종 1, 3, 5일후에 활성이 증가되었지만( $p < 0.05$ ), 글루칸 1회 및 생리식염수를 접종한 경우에는 활성의 변화가 없었다.

어체에 침입한 세균은 조직중의 마크로파지나

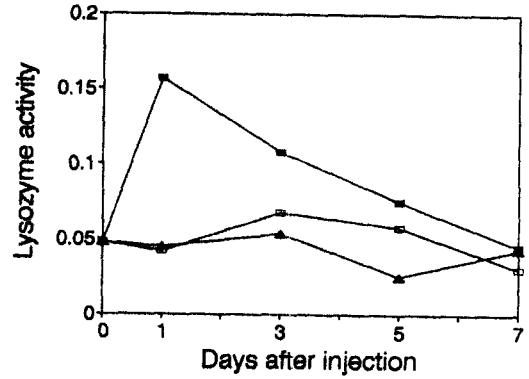


Fig. 5. Lysozyme activity in the blood serum from Korean catfish injected intraperitoneally with β-glucan(■, □) or physiological saline(▲). The glucan-injected fish received β-glucan(200 μg/100 g body weight) once(□) or twice(■) at an intervals of 3 days.

말초혈액중의 단구나 호중구에 의해 비특이적으로 탐식되어 확산이 저지당함으로 이들 식세포가 생체방어의 최일선에서 병원균의 침입을 방어하고 있다고 할 수 있는데, 한국산 메기의 백혈구에는 림프구, 호중구, 단구 및 전구의 4종류가 있으며(小野田, 1934; 深山, 1936; 池田 등, 1986; 박, 1995), 이들 백혈구중에서 호중구와 단구만이 이물에 대한 탐식능이 있는 것으로 보고되었다(박, 1995). 어류에 세균을 비롯한 이물질이 침입하게 되면 말초혈액중의 호중구수가 증가할 뿐만아니라(畑井, 1972; 池田와 見奈美, 1982), 세포질의 PAS양성반응에도 현저한 변화(長村과 若林, 1983; Park and Wakabayashi, 1989)가 일어나, 호중구의 수와 질적변화에 의해 생체를 비특이적으로 방어하는 것으로 보고되었다(Park and Wakabayashi, 1992).

호중구의 강력한 탐식능은 PAS양성반응물질과 밀접한 관계를 가지고 있어(長村과 若林, 1983), 이 양성물질이 호중구가 이물의 탐식시에 에너지로 사용됨으로 양성반응의 강도가 강할수록 탐식능이 강하다고 보고하였다(Park and Wakabayashi, 1992). 그러나 본 실험에 있어서는 글루칸 투여후의

호중구의 숫자는 무지개송어에 글루칸을 주사했을 때(Jeney *et al.*, 1993)와 마찬가지로 현저하게 증가하였지만, 세포질의 PAS양성물질은 2형의 비율이 증가하였을 뿐 과립화는 현저하지 않았다. 또 탐식율은 글루칸 접종어에서 증가한 반면 탐식지수의 변화는 없었다. 이는 글루칸의 접종후에 말초혈액 중의 호중구는 과립상의 글루칸을 이물로서 인식하여 방어기능의 형태로 숫적 증가는 유발하지만, 라텍스나 탄소과립을 접종했을 때의 뱀장어 말초혈액의 호중구(朴, 미발표)와 마찬가지로 탐식시의 에너지원으로 사용되는 PAS양성반응물질의 변화는 미미함으로 글루칸 접종어에서는 세포질에 글리코젠의 축적은 일어나지 않는다는 것을 알 수 있다. 따라서 말초혈액중의 호중구의 숫적증가는 유발시키지만 질적변화는 미약하여 탐식지수의 변화는 초래하지 않는 것으로 생각된다.

또 글루칸을 투여함으로써 리소조움의 활성이 증가되지만(Matsuyama *et al.*, 1992; Engstad *et al.*, 1992; Jorgensen *et al.*, 1993b), 본 실험에서 1회 접종어에서는 활성의 변화가 없고, 2회 접종어에서만 활성이 증가하는 것으로 보아 활성화된 식세포가 1회 접종어보다는 2회 접종어에서 말초혈액에 체류하는 시간이 긴 것 또는 1차 접종시의 식세포의 리소조움 분비자극이 2차 접종에 의해 촉진되었기 때문으로 생각된다. 따라서 글루칸의 투여는 말초혈액중의 호중구의 숫적증가와 탐식율의 증가 및 리소조움의 활성등의 비특이방어인자의 활성화를 초래하지만, 투여회수에 따라 1회 접종한 경우에는 비특이인자의 활성화가 낮지만 2회 접종 시에는 방어인자의 활성이 더욱 증가되어 세균성 질병에 대한 방어능이 현저히 높아진다는 것을 알 수 있다.

### 감사의 말씀

이 연구는 1995년도 한국과학재단의 핵심전문연구과제(과제번호 : 951-0606-01)의 지원연구비로 수행되었습니다.

### 참 고 문 헌

- Chen, D. and Ainsworth, A. J. : Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.*, 15 : 295-304, 1992.
- Engstad, R. E., Robertsen, B. and Frivold, E. : Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish and Shellfish Immunol.*, 2 : 287-297, 1992.
- 畑井 喜司雄 : 魚における血流中接種細菌の動態-II. ウナギ血流中における *Aeromonas* 菌の消長に伴う白血球の變動. *魚病研究*, 7 : 34-43, 1972.
- 深山 一孝 : 多核白血球の「アラニメトリ」に関する研究. その6 脊椎動物多核白血球について. *十全會雜誌*, 41 : 1100-1134, 1936.
- 池田 彌生, 見奈美 輝彦 : フリの連鎖球菌における血液性状. *日水誌*, 48 : 1383-1388, 1982.
- 池田 彌生, 尾崎 久雄, 瀬崎啓次郎 : 魚類血液圖鑑. pp. 196, 279-277. 綠書房, 東京, 1986.
- Jeney, G. and Anderson, D. P. : Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 116 : 315-29, 1993.
- Jorgensen, J. B., Lunde, H. and Robertsen, B. : Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 16 : 313-325, 1993a.
- Jorgensen, J. B., Sharp, G. J. E., Secombs, C. J. and Robertsen, B. : Effect of yeast cell wall glucan on the bacterial activity of rainbow trout macrophages. *Fish and Shellfish Immunol.*, 3 : 267-277, 1993b.
- Litwack, G. : Photometric determination of lysoz-

- yme activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89 : 401-403, 1955.
- Matsuyama, H., Mangindaan, R.E.P. and Yano, T. : Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail(*Seriola quinqueradiata*). Aquaculture, 101 : 197-203, 1992.
- 長村 吉晃, 若林 久嗣 : ウナギ好中球のPAS反應について. 魚病研究, 17 : 269-280, 1983.
- Nikl, L., Evelyn, T. P. T. and Albright, L. J. : Trials with an orally and immersion-administered beta-1,3-glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. aquat. Org., 17 : 191-196, 1993.
- 小野全 外興治 : 白血球の核移動に關する研究補遺. その9 魚類の兩色好性白血球の核型について. 十全會雜誌, 39 : 2427-2440, 1934.
- Park, S.-W. and Wakabayashi, H. : Kinetics of neutrophils in the kidney of eel, *Anguilla japonica*, intraperitoneally injected with formalin-killed *Escherichia coli* as a irritant. Fish Pathol., 24 : 233-239, 1989.
- Park, S.-W. and Wakabayashi, H. : Comparison of pronephric and peripheral blood neutrophils of eel, *Anguilla japonica*, in phagocytic activity. Fish Pathol., 27 : 149-152, 1992.
- 박성우 : 한국산 메기(*Silurus asotus*)의 말초혈액 백혈구의 분류. 한국어병학회지, 8 : 105-112, 1995.
- 박성우, 김영길 : 글루칸 투여에 의한 한국산 메기의 *Edwardsiella ictaluri*와 *Aeromonas hydrophila* 감염증에 대한 저항성의 증가. 한국어병학회지, 9 : 79-85, 1996.
- Raa, J., Roerstad, G., Engstad, R. and Raa, J. : The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infection. Disease in Asian Aquaculture. I. Proceedings of the first symposium on disease in Asian aquaculture. Shariff, M., Subasinghe, R. P., and Arthur, J. R.(Ed.). pp.26-29, 1992.
- Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R. and Raa, J. : Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. J. Fish Dis., 13 : 391-400, 1990.
- Yamamoto, A. and Iida, T. : Non-specific defense activities of triploid rainbow trout. Fish Pathol., 30 : 107-110, 1995.
- Yano, T., Mangindaan, R. E. P. and Matsuyama, H. : Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardseilla tarda* infection, by some beta-1,3-glucans. Nippon Suisan Gakkaishi, 55 : 1815-1819, 1989.
- Yano, T., Matsuyama, H. and Mangindaan, R. E. P. : Polysaccharide-induced protection of carp *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. J. Fish Dis., 14 : 577-582, 1991.

# Increase in phagocytic activity of peripheal neutrophil and lysozyme activity of blood serum in Korea catfish(*Silurus asotus*) intraperitoneally injected with $\beta$ -glucan

Sung-Woo Park, Young-Gill Kim and Dong-Lim Choi\*

*Department of Fish Pathology, College of Ocean Science & Technology,  
Kunsan National University, Kunsan 573-400, Korea*

*\*Kunsan Laboratories, West Sea Fisheries Research Institute, National  
Fisheries Research & Development Agency, Kunsan 573-030, Korea*

To examine the effectiveness of  $\beta$ -glucan in non-specific defence mechanisms of Korean catfish(*Silurus asotus*), the activities of peripheral neutrophils and serum lysozyme were evaluated after once or twice  $\beta$ -glucan injections. The number of peripheral neutrophils increased after the injection. The increased number in neutrophils in twice  $\beta$ -glucan injections maintained longer than in single glucan injecton. But the neutrophils did not showed any remarkable changes in PAS-positive reaction. Peripheral neutrophils from fish injected glucan had enhanced phagocytic activities but there was no significant difference in phagocytic index for the glucan and control groups. An elevation of lysozyme activity was also observed in the fish received twice glucan but neither single glucan or physiological saline injection could not evoked an increase of lysozyme activity. These results suggest that  $\beta$ -glucan can enhance the resistance of Korean catfish against to bacteria infection through the activation of peripheral neutrophils and lysozyme.

---

Key words : Korean catfish,  $\beta$ -Glucan, Phagocytic activity, Lysozyme activity, Non-specific defence