

## 아연 축적으로 인한 붕어 (*Carassius auratus*) 조직의 변화

신 명 자 · 이 종 은 · 서 을 원\*

(안동대학교 자연과학대학 생명과학과)

Changes of *Carassius auratus* Tissues by Zn Accumulation. Shin, Myung Ja, Jong Eun Lee and Eul Won Seo\* (Department of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea)

Present study aimed to investigate the effect of zinc accumulation on the tissues of *Carassius auratus* with various rearing condition. Heavy metal, Zn, was accumulated in the gill, bone and muscle increased for exposure period of 40 days. Moreover, the accumulated concentration of Zn in the gill showed relatively higher than that in other tissues. Also, activities of antioxidant enzymes in the gill, kidney, liver and muscle tissues after exposure to Zn were increased in the manner of exposure period. Antioxidant enzyme activities were shown higher in the gill and muscle than those in the kidney and liver tissues. The gill of *C. auratus* showed abnormal shapes in its secondary lamellae by long time exposure condition and determined the increased numbers of mucous cells in gill exposed to Zn. In addition, the edema, the exfoliation of epithelial cell was shown in the gill and membrane damages were observed in mitochondria and nucleus. In the kidney, we observed not only the atrophied glomerulus, but the expansion of empty space in Bowman's capsule. Based on the above results, it is considered that the exposure to the high level of Zn for long period possibly involves in the decrease of respiratory and excretory rates, giving rise to secondary lesion of tissues.

**Key words :** *Carassius auratus*, Zn, antioxidant enzyme, tissues

### 서 론

중금속을 비롯한 유해물질은 비록 미량일지라도 수생 생물에 농축, 축적이 가능하며 먹이연쇄를 통해 인간에게 까지 영향을 주기 때문에 중금속에 의한 수서 생물의 오염은 사람의 건강에 직결되는 심각한 문제가 되기도 한다 (Friberg and Vasta, 1972). 또한 중금속은 환경에 유출되어 물에 분해되거나 안정한 화합물로 되지 않고 혼합 상태로 남아 수질과 토양을 오염시키며 먹이사슬을 통한 단계적인 농축으로 생물의 활동에 장애를 주고 생명에 악영

향을 줄 수 있다 (Sorensen, 1991). 따라서 소위 생물증폭에 따른 독성과 피해 사례가 연구, 보고되면서 중금속 오염에 대한 감시의 필요성이 부각되었다 (Watzin and Roscigno, 1997; McGeer *et al.*, 2000).

최근에 다량의 유해 중금속들이 함유되어 있는 산업폐수의 배출로 인하여 자연 환경, 특히 하천의 수질이 심하게 오염되면서 내수면 자원인 담수어가 심각한 병리적 상해를 받거나 폐사, 멸종의 위기에 있다 (Zelikoff *et al.*, 1995). Seo *et al.* (2008)은 안동·임하호 저니토의 토양 성분을 조사한 결과 안동호의 저니토에서 임하호보다 Zn의 함량이 1.5배 정도 높은 것으로 나타나 담 상류 수계

\* Corresponding author: Tel: 054) 820-5462, Fax: 054) 820-7705, E-mail: ewseo@andong.ac.kr

지역으로부터 Zn이 유입되어 저니토에 흡착 및 농축된 것이라 하였다. 이와 더불어 안동호와 임하호에 서식하는 어류의 중금속 함량을 조사한 결과 안동호에 서식하는 어류에서 Zn의 함량이 높은 것으로 나타났다(Kim *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2010a). 어류의 경우 중금속에 의한 독성발현은 일부분이 피부로 침입되고 대부분 아가미를 경유하므로 호흡과 관련된 주요기관이 피해를 받게 되며 어류의 형태적 특성상 아가미와 신장 등 어류의 조직은 수질의 변화에 민감하게 변하게 된다(Kimura *et al.*, 1990; Black and Bauman, 1991). 더불어 Zn은 주로 간장, 신장, 비장, 췌장 등에 축적 되기 때문에 장기간 노출에 따른 임계 농도 이상의 Zn 축적은 Fe과 Cu의 체내 이용률을 저해하거나 생물체에 독성적 영향을 주므로 어류의 생존에 있어 위해 요소로 작용할 수 있다(Magee and Spahr, 1964; Bergman and Soremark, 1968).

이에 따라 최근 수 생태계로 유입된 중금속의 독성적 영향을 평가하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있지만, 수질에 대한 이화학적 분석만으로는 여러 가지 한계가 있다. 그 이유는 다양한 물질이 용존되어 있는 수질의 정확한 분석이 쉬운 일이 아니며 이들 물질의 혼합에 따른 상호작용 측면을 고려해야 하기 때문이다. 또한 어체 내 중금속 축적이나 독성실험에는 수중 생태계의 제반 특성과 어류의 종류에 따라 차이가 있을 수 있다. 더불어 어류에 대한 중금속 축적 연구는 자연 생태계에서의 어류를 채집하여 중금속 농도를 측정할 실험이 대부분이기 때문에 이들이 서식하는 생활환경과 물의 오염상태에 따라 측정치에 차이가 있을 수 있어 사실상 특정 중금속에 어류들이 노출되었을 때 어느 정도 축적되는지, 시간경과에 따른 축적 변화는 어떠한 경향인지를 알아내기가 어렵다(Park *et al.*, 2000). 따라서 본 연구에서는 붕어(*Carassius auratus*)를 아연에 노출시킨 후 노출기간에 따른 붕어의 조직 내 축적된 아연의 양 및 조직의 미세구조와 생리적 변화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료 및 시약

본 실험에 사용한 붕어(*Carassius auratus*, 체장  $6.5 \pm 0.5$  cm, 무게  $3.5 \pm 1.1$  g)는 경북 의성군 비안면에 위치한 약수 양어장에서 사육한 것으로 7일간 순치과정을 거친 후 건강한 개체만을 선별하여 실험에 사용하였다. 또한 본 연구에 사용한 시약 중 glutaraldehyde와 osmium

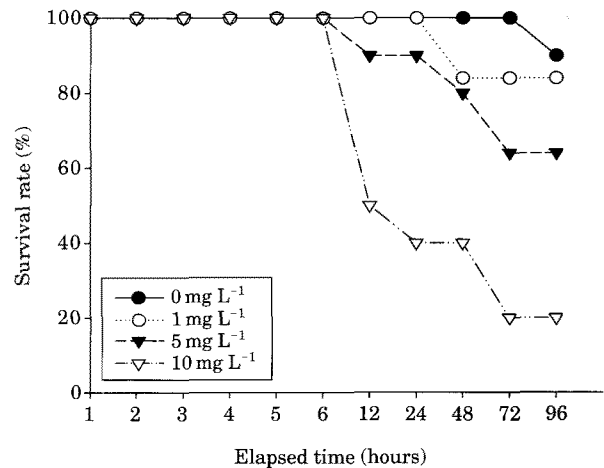


Fig. 1. Effect of Zn concentration on survival of *Carassius auratus*.

tetraoxide은 Ted Pella 사(Reidding, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외에 실험에 사용된 시약은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)의 분석용 특급 시약을 사용하였다.

### 2. 노출 실험

실험은  $30 \times 60 \times 45$  cm 크기의 수조에 각 10마리씩 분배하였고, 각 중금속 농도는  $ZnCl_2$ 를 0, 1, 5, 10 mg L<sup>-1</sup>의 표준액으로 제조한 후 실험에 사용하였다. 또한 수조의 수온은 20~22°C를 유지하여 96시간 동안 실시하였으며, 반수치사농도는 (50% lethal concentration) 96시간에서 APHA(1985)의 probit 값으로 구하였다. Zn의 노출 농도는 Zn에 대한 96 hr-LC<sub>50</sub>의 농도 값이 6.095 mg L<sup>-1</sup>로 나타나 급성실험을 통해 구한 96 hr-LC<sub>50</sub> 농도보다 낮게 설정하여 6.0 mg L<sup>-1</sup>으로 결정하였다(Fig. 1). 또한 노출기간은 5일, 10일, 20일 및 40일 간격으로 설정하였고 각 실험구 당 70마리씩 사용하였다. 대조군은 Zn에 노출 실험 전 0일로 하여 노출기간에 따른 실험군과 비교하였다.

### 3. 조직 내 Zn의 함량 측정

붕어의 아가미, 뼈, 근육 조직의 표면에 부착된 미세입자 및 이물질은 초음파세척기(5210, Branson, USA)를 이용하여 최대한 제거하였다. 미세입자와 이물질을 제거한 조직은 액체 질소로 처리하여 재차 냉동건조기에서 완전히 건조 후, 건조중량을 측정하였다. 각 조직 내 Zn의 함량은 초단파 용해장치(Ethos Plus, Mileston, USA)를 이용하여 전처리 한 후, 유도결합 플라즈마 질량분석기(Elan DRC-e, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 4. 항산화효소 활성 측정

##### 1) 시료 추출

항산화효소 활성 측정을 위한 시료 추출은 노출기간에 따라 붕어의 아가미, 신장, 간, 근육 조직을 적출하였다. 적출된 조직은 100 mM phosphate buffer (pH 7.2)에 혈액 및 기타 이물질 등을 세척한 후 조직의 무게를 측정하였다. 무게를 측정한 시료는 homogenation buffer (5 mM Tris, 38 mM glycine, pH 8.4)에서 완전히 균질화시킨 후, 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 지질층을 제외한 상등액만을 모아 -70°C에 보관하였다.

##### 2) Superoxide dismutase (SOD)

SOD 활성은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 M cytochrome C, 50 mM xanthine, 0.1 mM EDTA 및 효소액이 포함된 용액을 25°C에서 예치한 다음 xanthine oxidase를 첨가하여 반응을 개시하였다 (McCord and Fridovich, 1969). 흡광도 측정은 550 nm에서 측정하였으며, xanthine oxidase 첨가량은 효소액을 함유하지 않은 반응액의 흡광도 흡수가 분당 0.025가 되도록 조절하였다. SOD 활성은 cytochrome C의 환원 속도를 50% 억제하는 양을 1 unit로 하여 unit mg protein<sup>-1</sup>으로 나타냈다.

##### 3) Catalase (CAT)

CAT 활성은 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)와 시료액을 넣은 후 기질로 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 가하여 잘 혼합한 후 240 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다 (Aebi, 1984). 대조실험으로는 기질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 대신에 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)을 가하여 위와 동일한 방법으로 흡광도 변화를 측정하였다. CAT의 활성은 1분 동안에 1 μmol의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

##### 4) Glutathione peroxidase (GPX)

GPX 활성은 1 mM EDTA가 함유된 100 mM phosphate buffer (pH 7.6)에 0.25 mM GSH, 0.12 mM NADPH, 20 mM glutathione reductase 0.72 U가 포함된 반응액을 제조하였다 (Flohe *et al.*, 1984). 이 반응액에 효소 시료액을 혼합한 후 37°C에서 5분간 방치한 다음 4 mM cumene hydroperoxide를 첨가하여 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. GPX의 활성은 1분 동안에 1 μmol의 NADPH를 NADP로 산화하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

#### 5. 조직학적 변화 관찰

##### 1) 광학현미경 관찰

각 노출기간에 따라 적출된 붕어의 아가미와 신장 조직

은 FAA에 24시간 고정하였다. 고정된 조직은 수세와 탈수 과정을 거친 후 일반적인 조직 제작 방법에 따라 조직을 paraffin 포매하였다. 이 후 paraffin block은 두께 4~6 μm로 제작하여 hematoxylin과 eosin에 이중염색 하였다. 완성된 조직 프레파라트는 광학현미경하에서 관찰하였으며, Olympus DP-71을 사용하여 사진 촬영하였다.

##### 2) 투과전자현미경 관찰

각 노출기간에 따라 적출된 붕어의 아가미 조직은 glutaraldehyde에서 전고정 후, osmium tetroxide로 후고정 하였다. 고정된 조직은 ethyl alcohol을 사용하여 계대 탈수과정을 거친 후 propylene oxide로 치환하였다. 치환된 조직은 epon resin에 포매하여 60°C 배양기에서 48시간 중합하여 block을 제작하였다. 제작된 block은 초미세 절편기 (Ultracut UCT, Leica)을 이용하여 80 nm로 박절한 후 uranyl acetate와 lead nitrate로 이중 염색하여 투과전자현미경 (H-7000, Hitachi) 하에서 미세구조를 관찰하였다.

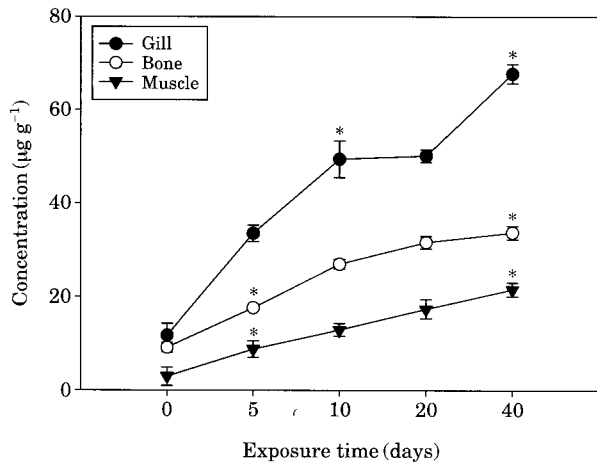
#### 6. 통계처리

각 실험에서 얻어진 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 통계처리는 SPSS 12로 분석한 후 t-검정을 실시하여 분산과 평균의 동일성 여부를 검정하였으며, 분석결과는 일원분산분석 (one way ANOVA)에 의한 Duncan 검정을 실시하였으며, P값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 간주하였다.

## 결 과

#### 1. 조직 내 Zn의 함량

Zn 함량은 아가미, 뼈, 근육 조직에서 노출기간이 길어질수록 증가하였으며, 대조군에 비해 각 조직 내 Zn의 함량은 노출기간에 따라 높은 축적량을 보이며 노출 40일에 가장 높은 축적량을 보였다. 아가미 조직 내 Zn의 함량은 노출기간이 길어질수록 증가하여 노출 40일에 67.76±2.04 μg g<sup>-1</sup>으로 대조군에 비해 5.7배의 높은 함량 증가를 보였다. 또한 뼈 조직은 노출 40일에 33.70±1.45 μg g<sup>-1</sup>으로 대조군에 비해 3.7배의 함량 증가를 보였다. 근육 조직은 노출 40일에 대조군 보다 7.3배 함량이 증가하여 21.55±1.48 μg g<sup>-1</sup>로 높은 축적량을 보였다. 따라서 Zn의 축적량을 대조군과 비교해 보면 가장 높은 축적량을 보인 조직은 근육 조직이며, 뼈 조직이 가장 낮

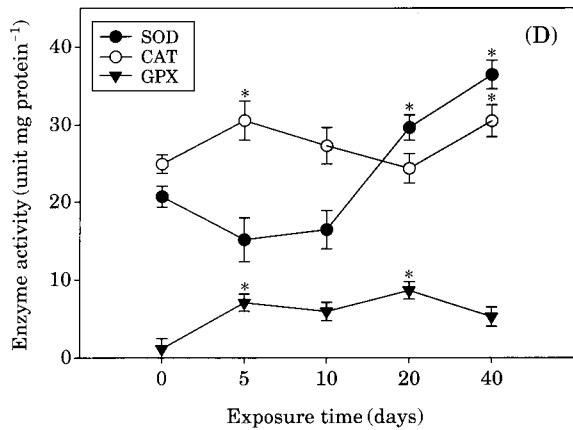
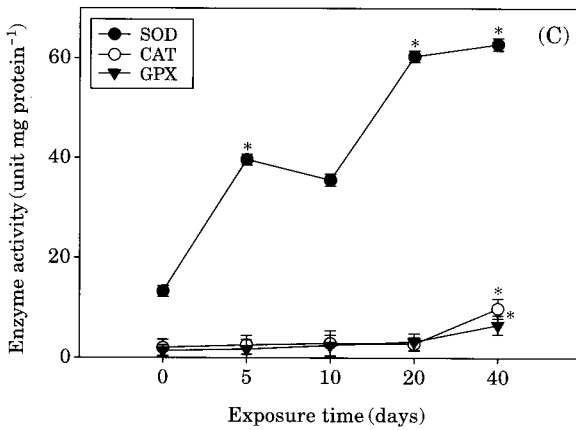
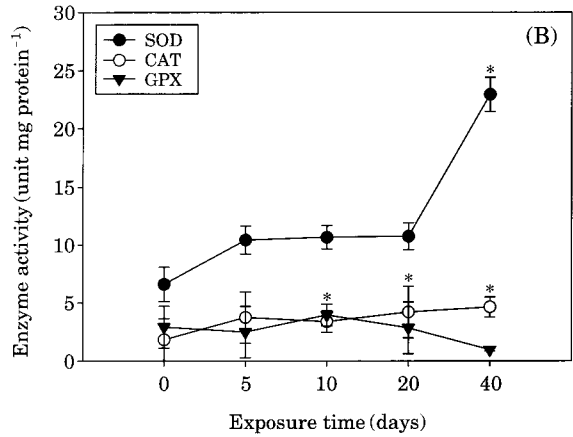
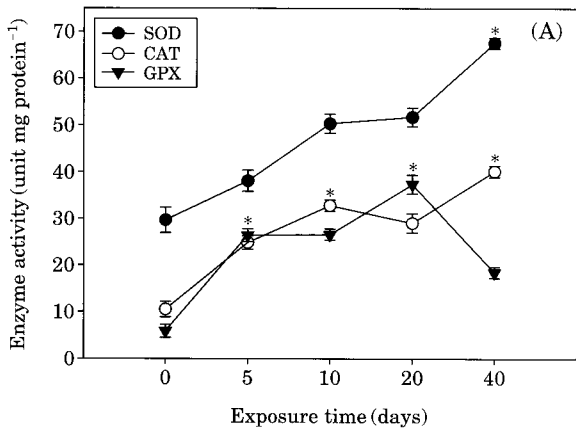


**Fig. 2.** Contents of micro heavy metal of *C. auratus* tissues (gill, bone, muscle) during 40 days exposed to Zn 6.0 mg L<sup>-1</sup> in water. The values are mean ± SD (n=3). \*P < 0.05 indicates significant difference between the control group and Zn exposure group.

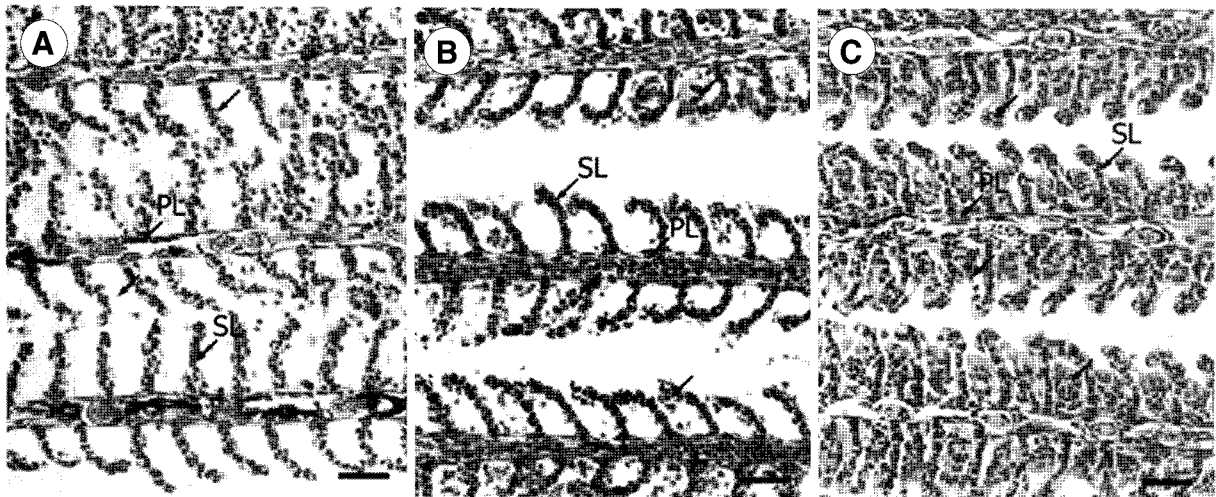
은 축적량을 나타냈다(Fig. 2).

**2. 조직 내 항산화효소의 활성 변화**

항산화효소 활성은 Zn에 40일간 노출시킨 붕어의 각 조직을 노출기간에 따라 측정하였다. 아가미 조직 내 SOD와 CAT 활성은 노출기간이 길어질수록 증가하여 노출 40일에 가장 높은 활성의 증가를 보였다. 또한 SOD 활성은 67.56 ± 1.18 unit mg protein<sup>-1</sup>이며, CAT 활성은 40.16 ± 1.22 unit mg protein<sup>-1</sup>로 노출 40일에 가장 높았다. GPX 활성은 노출 20일에 37.40 ± 2.05 unit mg protein<sup>-1</sup>로 가장 높은 활성을 보인 후 노출 40일에 급격히 감소하였다(Fig. 3A). 신장 조직 내 SOD 활성은 노출 20일까지 미미한 활성의 변화를 보였으나 노출 40일에 급격히 증가하여 22.92 ± 1.48 unit mg protein<sup>-1</sup>로 가장 높은 활성을 보였다. CAT 활성은 노출기간이 길어질수록 증가하였으나 활성의 변화가 미미하였다. 가장 높은 GPX의



**Fig. 3.** Various antioxidant enzyme activities of *C. auratus* tissues during 40 days exposed to Zn 6.0 mg L<sup>-1</sup> in water. A: gill, B: kidney, C: liver, D: muscle. The values are mean ± SD (n=3). \*P < 0.05 indicates significant difference between the control group and Zn exposure group.



**Fig. 4.** Micrographs of *C. auratus* gill during 40 days exposed to Zn 6.0 mg L<sup>-1</sup> in water. A: Exposed to water for 0 day, B: Exposed to Zn 6.0 mg L<sup>-1</sup> in water for 10 days, C: Exposed to Zn 6.0 mg L<sup>-1</sup> in water for 40 days. Scale bars: A, B, C=50 μm. PL: primary lamella, SL: secondary lamella.

활성은 노출 10일로  $3.95 \pm 0.93$  unit mg protein<sup>-1</sup>을 보였으나 노출 20일부터 감소하여 노출 40일에 대조군보다 감소하였다(Fig. 3B). 간 조직 내 SOD 활성은 노출 5일에 급격히 증가하여 노출기간이 길어질수록 증가하였다. 가장 높은 SOD 활성은 노출 40일로  $62.79 \pm 1.24$  unit mg protein<sup>-1</sup>의 활성을 보였다. CAT와 GPX 활성은 노출 20일까지 활성의 변화가 미미하였으나 노출 40일에 증가하였다. CAT 활성은  $9.98 \pm 1.99$  unit mg protein<sup>-1</sup>이며, GPX 활성은  $6.65 \pm 1.90$  unit mg protein<sup>-1</sup>로 노출 40일에 가장 높았다(Fig. 3C). 근육 조직 내 SOD 활성은 노출 5일에 급격히 감소한 후 노출 10일부터 점차 증가하여 노출 40일에  $36.44 \pm 1.83$  unit mg protein<sup>-1</sup>로 가장 높은 활성을 보였다. CAT 활성은 노출 5일에  $30.58 \pm 2.53$  unit mg protein<sup>-1</sup>로 가장 높은 활성을 보인 후 노출 20일까지 감소하였으나 노출 40일에 다시 증가하였다. GPX 활성은 노출기간이 길어질수록 증가하여 노출 20일에  $8.68 \pm 1.11$  unit mg protein<sup>-1</sup>로 가장 높은 후 감소하였다(Fig. 3D).

따라서 항산화효소의 활성은 아가미와 간 조직에서 높았으며, 신장과 근육 조직에서 낮았다. 또한 SOD와 CAT 활성은 노출 40일에 증가하였으나 GPX 활성은 간 조직을 제외하고 노출 40일에 감소하였다.

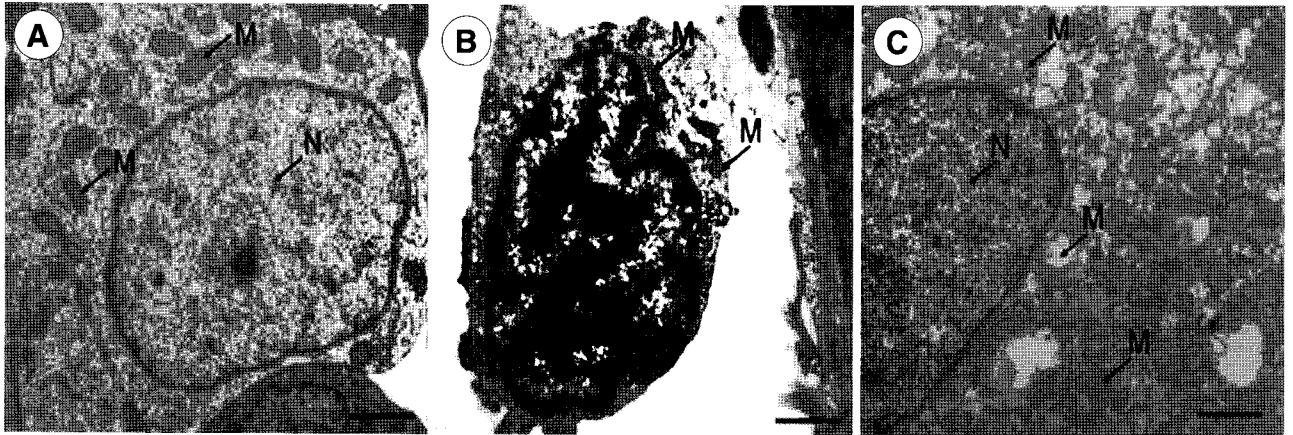
### 3. 아가미와 신장 조직의 변화

아가미 조직은 대조군에서 이차새변 사이의 공간이 비교적 일정하며 새변사이에 점액세포의 수에 증가도 관찰되지 않았다(Fig. 4A). 10일간 Zn에 노출된 아가미 조직

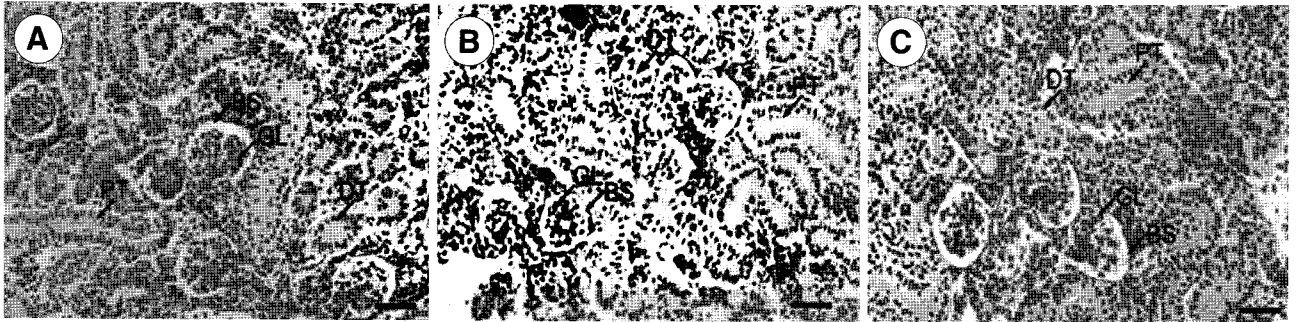
은 이차새변과 새변 사이의 간격이 비교적 일정하였으나, 새변말단부의 이차새변에 끝이 부풀어 오르는 곤봉화 현상이 관찰되었다(Fig. 4B). 또한 노출 40일에는 새변 사이에 점액세포의 수가 많이 증가하였으며, 이차새변에서는 상피세포의 분리와 새변과 새변이 접하여 융합한 형태도 관찰되었다. 또한 이차새변 사이의 공간은 비교적 좁고 불규칙하였으며, 이차새변은 두꺼운 다층의 상피세포로 비대해져 있는 부종 증상이 관찰되었다(Fig. 4C). 따라서 아가미 조직은 대조군에 비하여 Zn에 노출기간이 길어질수록 이차새변에서 뚜렷한 변화로 부종 증상과 곤봉화 현상이 다소 관찰되었으며, 새변 사이에 점액세포의 수가 점점 증가하는 것으로 관찰되었다.

아가미 조직 내 세포소기관은 대조군의 경우 원형의 핵 안에 염색질이 고루 분포되어 있고 핵막은 2중막으로 되어 있으며, 크리스타가 뚜렷한 원형 또는 타원형의 미토콘드리아가 분포되어 관찰되었다(Fig. 5A). 반면 Zn에 10일과 40일에 노출된 아가미 조직은 핵막이 부분적으로 붕괴되어 핵의 형태가 일그러지고 핵 안에 염색질은 널리 산재되어 있다. 또한 미토콘드리아의 크리스타는 구조적으로 붕괴되어서 불분명하게 되어 공포를 형성하기도 하였으며, 대조군에 비해 미토콘드리아는 형태가 손상되거나 크기가 다소 커진 형태도 관찰되었다(Fig. 5B, 5C).

신장 조직은 보우만 주머니 안에 사구체가 가득 차 있으며, 조직 내 피사나 공포가 없는 거의 정상적인 구조로 노출 10일에서 대조군과 유사한 형태로 관찰되었다(Fig. 6A, 6B). 그러나 Zn의 노출기간이 40일로 길어짐에 따라



**Fig. 5.** Transmission electron microscope of *C. auratus* gill during 40 days exposed to Zn 6.0 mg L<sup>-1</sup> in water. A: Exposed to water for 0 day, B: Exposed to Zn 6.0 mg L<sup>-1</sup> in water for 10 days, C: Exposed to Zn 6.0 mg L<sup>-1</sup> in water for 40 days. Scale bars: A, B, C=2 μm. M: Mitochondria, N: Nucleus.



**Fig. 6.** Micrographs of *C. auratus* kidney during 40 days exposed to Zn 6.0 mg L<sup>-1</sup> in water. A: Exposed to water for 0 day, B: Exposed to Zn 6.0 mg L<sup>-1</sup> in water for 10 days, C: Exposed to Zn 6.0 mg L<sup>-1</sup> in water for 40 days. Scale bars: A, B, C=50 μm. BS: Bowman's space, DT: Distal tubule, GL: Glomerulus, PT: Proximal tubule.

사구체가 수축하여 보우만 주머니 안의 공간이 넓은 형태로 관찰되었으며, 사구체 내 혈구세포가 팽창하고 흑색 대식세포들이 관찰되었다(Fig. 6C).

## 고 찰

최근 수질오염에 의한 환경문제가 심각한 가운데 가장 큰 비중을 차지하는 중금속은 생활하수를 비롯하여 폐광산, 농업하수 및 각종 산업 활동을 통하여 발생되고 있다. 이러한 중금속이 토양이나 하천 및 지하수로 유입되면 수중 생태계를 파괴시키고 인간의 건강과 생활환경에 커다란 피해를 주게 된다. 특히 수중 생태계나 인간에 나쁜 영향을 주는 중금속이 우리 몸 속에 유입되면 쉽게 배출이 되지 않고 주로 간, 지방 및 뼈 속에 농축하게 된다. 따라

서 수 생태계로 유입된 중금속의 독성적 영향을 평가하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있지만 수질에 대한 이화학적 분석만으로는 여러 가지 한계가 있다. 이는 다양한 물질이 용존되어 있는 수질의 정확한 분석이 쉬운 일이 아니며 이들 물질의 혼합에 따른 상호작용 측면을 고려해야 하기 때문이다(Lee, 2002).

Zn은 주로 뼈, 피부, 근육 조직에 축적되고(Wicklund *et al.*, 1990), 일부는 metallothionein과 결합한다(Soh *et al.*, 1993). 또한 어류의 부위별 중금속 함량의 경우 Zn 함량은 아가미에서 최고함량을 보이고 골격, 내장, 근육의 순으로 감소함을 보고하였다(Hwang *et al.*, 1989). 본 연구에서도 조직 내 Zn의 축적량은 아가미 조직에서 높고 근육 조직에서 낮은 것으로 나타나 Hwang *et al.* (1989)의 보고와 유사한 결과를 나타냈다. 더불어 송사리(*Oryzias latipes*)의 생체 내 카드뮴 및 미량금속의 축적에 관한 연

구에서 Zn의 농도변화는 Zn을 노출하지 않은 대조군에서 시간 경과에 따른 큰 변화가 없었다. 그러나 Zn을 노출한 군에서는 시간 경과에 따라 점차 증가하는 경향을 보였으며, Zn에 노출하지 않은 군에 비해 그 농도도 유의하게 높았다(Park *et al.*, 2000). 본 연구에서도 노출기간이 길어질수록 Zn의 함량은 증가하였으며, 대조군에 비해 높은 축적량을 보여 Park *et al.* (2000)의 보고와 유사한 결과를 보였다. 또한 이러한 결과로 미루어 보아 비록 중금속의 함량이 미량일지라도 장시간 노출이 되면 어류의 체내에 지속적인 축적이 일어나며, 이는 어류 조직에서 미세구조의 변화와 생리적 병변을 나타낼 것으로 사료된다.

어류는 심한 스트레스를 받게 되면 여러 산화성 물질 중 다량의 활성산소를 발생하게 되며 (Chance *et al.*, 1979), 이러한 활성산소는 생체 내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 친화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시켜 생존에 커다란 영향을 줄 수 있다. 따라서 어류는 이러한 활성산소를 여러 종류의 비효소성 항산화제와 효소성인 항산화효소의 작용을 통해 제거함으로써 세포의 기능손상을 막게 된다(Chance, *et al.*, 1979; Wendel and Feuerstin, 1981). 일반적으로 이러한 항산화효소는 어류 종, 조직 및 계절에 따라 항산화효소 활성이 변화하는 것으로 알려져 있으며(Akanes and Njaa, 1981; Gabryelak *et al.*, 1983), 중금속 이온의 노출에 의해서도 항산화효소 활성이 변화하게 된다(Chen *et al.*, 2000; Zikic *et al.*, 2001). 이처럼 항산화효소의 활성은 생체 내의 스트레스 반응과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 생체내에서 산화·환원 반응을 통해 형성되는 활성산소는 반응성이 매우 큰 산화물 라디칼로서 자발적인 과정에 의해서 일부 분해되거나, 비효소적 반응을 통해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 전환된다. 따라서 SOD와 CAT 등과 같은 항산화효소는 활성산소를 보다 안정된 물질로 환원시키는 데, 이 중 SOD는 superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub>로 전환시키며, CAT는 전환된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 O<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>O로 분해함으로써 생체에 유해한 라디칼을 효소적으로 보다 효율적으로 제거하게 된다(Forman and Fridovich, 1973). 본 연구에서 6 mg L<sup>-1</sup>의 농도에 Zn을 처리한 붕어의 조직 내 SOD와 CAT 활성은 노출기간이 길어질수록 증가하는 유사한 경향을 보였다. 이러한 결과로 보아 Zn의 노출에 따른 환경적 스트레스에 대해 SOD에 의해 항산화 작용이 주로 이루어지며 SOD에 의해 생성된 superoxide radical를 CAT에 의해 분해가 이루어짐으로써 생체에 무해한 분자들로 전환시키는 것으로 사료된다. 더불어 활성산소와 같은 유리 라디칼의 제거에는 SOD나 CAT 외에도 glutathione을 이용하여 GPX와 GST 및

GR 등과 같은 항산화효소가 과산화수소나 수산화 라디칼뿐만 아니라 지질 과산화과정 중에 생성되는 peroxy 라디칼의 제거에 관여하고 있다(Ahmad, 1995). 본 연구에서 조직 내 CAT와 GPX 활성은 유사한 활성의 정도를 보였으나 활성의 패턴은 상반된 경향을 나타낸 것으로 보아 GPX의 경우 과산화수소나 수산화 라디칼의 제거에 관여보다는 지질 과산화과정 중에 생성된 peroxy 라디칼의 제거에 관여하고 있는 것으로 사료된다. 또한 Pb과 Cd의 중금속 노출 실험에서 항산화효소의 활성은 아가미 조직에서 높았으며, 노출 기간이 길어질수록 증가하였다(Kim *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2010b). 본 연구에서도 Zn의 노출된 조직 내 항산화효소의 활성은 아가미 조직에서 높았으며, 노출기간이 길어질수록 높은 활성을 나타내어 Kim *et al.* (2010)과 Shin *et al.* (2010b)의 보고와 유사한 결과를 나타냈다.

일반적으로 어류의 호흡은 피부와 아가미를 통하여 이루어지고 있으나 아가미에서 훨씬 높은 호흡기능을 담당하고 있다. 또한 아가미는 호흡 및 질소노폐물 배설의 중추적인 역할이 이루어지는 기관으로 다른 기관에 비해 그 표면적이 넓기 때문에 환경변화에 가장 민감하게 반응하는 부위로 알려져 있다(Lee *et al.*, 1997). 더불어 아가미는 수중에 독성물질이 함유되거나 탁수와 같은 수환경의 급격한 변화와 같은 환경적 스트레스를 받게 되면 조직학적으로 곤봉화를 나타내거나 새변은 두꺼운 상피층을 이루게 되며, 표면에 다수의 점액세포를 이루어 이차새변의 유합, 새변간 공간 소실, CO<sub>2</sub> 교환을 저하로 인해 호흡능의 악화가 나타날 수 있다(Huh and Jeong, 1993; Shin *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2006). 본 연구에서도 Zn에 노출시킨 붕어의 아가미 조직은 노출기간이 길어질수록 이차새변에서 곤봉화 형태와 점액 세포 수의 증가가 두드러지게 관찰되었으며, 핵과 미토콘드리아에서 막의 손상도 관찰되었다. 이러한 조직의 구조적 변형 등이 일어난 것으로 보아 Zn에 노출됨에 따라 아가미의 미세구조에 변형을 일으킴으로써 아가미 조직의 병리적 영향을 미칠 것으로 생각되며, 이로 인해 호흡면적이 축소되어 호흡기능이 약화될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 미토콘드리아의 변형은 세포 내 에너지 대사와 호흡 활성의 저하를 초래하는 원인(Jeon *et al.*, 1993)으로서 비정상적인 세포 기능을 야기하는 것으로 생각되며, 카드뮴 이온이 조직 내의 단백질과 반응하여 금속성 단백질 화합물을 만들어서 효소의 활성을 저해하여 미토콘드리아의 산화 및 인산화 기능을 저해한다(You *et al.*, 1978). 본 연구에서도 Zn에 노출된 아가미 조직에 미토콘드리아의 손상 및 크기 변화가 관찰된 것으로 보아 Zn이 조직 내의 단백질과 반응하

여 미토콘드리아의 산화 및 인산화 기능을 저해할 수 있을 것으로 사료된다.

어류의 아가미와 더불어 신장도 수질오염과 같은 환경적 스트레스에 의해 사구체 수축의 구조적 변형을 나타내는데 사구체의 표면적이 좁아지는 현상은 포유류의 만성 사구체 신염이나 위축신과 매우 유사한 병변으로 어류의 경우에도 이차 병변의 원인이 될 수 있으며(Fennel and Pardo, 1967), 심할 경우 어류 폐사의 원인이 되기도 한다. 또한 중금속에 노출된 신장 조직은 노출기간이 길어짐에 따라 사구체가 수축하여 보우만 주머니 안의 공간이 넓은 형태로 관찰되었으며, 이러한 구조적 변형은 신장의 기능 손실이나 노폐물 제거에 영향을 줄 수 있음을 보고하였다(Kim *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2010b). 또한 담수어에서는 사구체의 표면적이 좁아지면 삼투압 조절기능 보다는 오히려 노폐물을 걸러주는 효과가 떨어질 수 있다. 본 연구에서도 Zn의 노출 초기에는 사구체의 수축이 두드러지지 않았으나 노출 후기에 사구체의 수축이 두드러지며 보우만 주머니 안의 공간이 넓은 형태로 관찰되었다. 이러한 신장 조직의 구조적 변형이 나타난 것으로 보아 다른 중금속과 마찬가지로 Zn에 노출될 경우에도 신장의 기능 손실이나 노폐물 제거에 영향을 줄 수 있으며, 더 나아가 어류의 2차 병변에도 영향을 줄 것으로 생각된다. 또한 흑색 대식세포군의 출현 및 증가는 자체방어 기작이며, 세뇨관 내강상피의 alcian blue 양성 현상은 세포의 기능적인 이상으로 인한 세뇨관 재흡수 기능의 장애 일 것이라 보고하였다(Lee *et al.*, 2001). 본 연구에서도 흑색 대식세포군을 관찰할 수 있었으며, 이는 Zn 노출로 인해 신장 조직이 영향을 받음으로써 자체방어 기작이 나타난 것으로 사료된다.

## 적 요

본 연구는 Zn의 노출조건에서 Zn의 농도가 어류의 조직과 생리에 미치는 영향을 조사하기 위하여 붕어의 아가미, 신장, 간, 뼈 및 근육 조직을 사용하였다. 아가미, 뼈와 근육 조직에서 Zn의 축적 농도는 노출 40일에 증가하였다. 또한 아가미 조직 내 Zn의 축적량은 다른 조직에 비해 높았으며, 모든 조직에서 노출기간이 길어질수록 증가하였다. Zn에 노출된 아가미, 신장, 간과 근육 조직의 항산화효소의 활성은 노출기간이 길어질수록 증가하였다. 또한 Zn에 노출된 아가미, 신장, 간과 근육 조직의 항산화효소 활성은 아가미와 간 조직에서 높았으며, 신장 조직에서 가장 낮은 활성을 보였다. 농도가 높고 노출기간

이 길어질수록 아가미 조직에서는 이차세변의 간격이 불규칙해지고, 점액 세포 수가 증가하였다. 곤봉화, 부종, 상피세포의 박리가 이차세변에서 관찰되었다. 또한 40일간 Zn에 노출된 아가미 조직 내 미토콘드리아와 핵에서는 막의 손상이 관찰되었다. 신장 조직 내 사구체는 수축되어 보우만 주머니의 공간이 넓게 관찰되었다. 이러한 결과로 보아 고농도의 Zn 노출은 어류의 호흡과 배설 장애 등 심각한 조직, 생리적 장애를 가져 올 수 있을 것으로 사료된다.

## 인 용 문 헌

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro, p. 121-126. *In: Methods in Enzymology* (Packer, L., ed.). Academic Press, New York.
- Ahmad, S. 1995. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. Chapman and Hall, New York.
- Aksnes, A. and L.R. Njaa. 1981. Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* **69B**: 893-896.
- APHA. 1985. Standard methods for the examination of water and wastewater (16th ed.). Port City Press, Maryland.
- Bergman, B. and R. Soremark. 1968. Autoradiographic studies on the distribution of zinc-65 in mice. *Journal of Nutrition* **44**: 6-12.
- Black, J.J. and P.C. Bauman. 1991. Carcinogens and cancers in freshwater fishes. *Environmental Health Perspectives* **90**: 27-33.
- Chance, B., H. Sies and A. Boveris. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* **59**: 527-605.
- 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. *Environmental Contamination and Toxicology* **65**: 357-365.
- Fennel, R.H. and V.M. Pardo. 1967. Experimental glomerulonephritis in rats. *Laboratory Investigation* **17**: 483-488.
- Flohe, L., A. Wolfgang and W.A. Gunzler. 1984. Assay of glutathione peroxidase, p. 105-114. *In: Methods in enzymatic analysis* (Packer, L., ed.). Academic Press, New York.
- Forman, H.J. and I. Fridovich. 1973. Superoxide dismutase: A comparison of rate constant. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **158**: 396-400.
- Friberg, L. and J. Vosta. 1972. Mercury in the Environment. CRS Press, Cleveland.
- Gabrylak, T., M. Piatrowska, W. Leyko and G. Peres. 1983.



- Seasonal variation in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* **75**: 383-385.
- Huh, M.D. and H.D. Jeong. 1993. The histological structure and the pathological lesions of gill in teleosts. *Journal of Fish Pathology* **6**: 65-70.
- Hwang, I.D., S.K. No, S.Y. Gi, J.H. Lee and N.S. Kim. 1989. A study on the heavy metal contents in fish and sediments of the Mankyung River. *Korean Journal of Environmental Health Society* **15**: 33-49.
- Jeon, J.S., J.S. Kim and B.C. Koo. 1993. The effect of cadmium administration in seminiferous epithelium of mouse testes: electron microscopic study. *Korean Journal of Electron Microscopy* **23**: 125-138.
- Kim, J.S., M.J. Shin, J.E. Lee and E.W. Seo. 2009. Heavy metal contents in tissues of *Carassius auratus* in Andong and Imha Reservoirs. *Korean Journal of Life Science* **19**: 1562-1567.
- Kim, J.S., M.J. Shin, J.E. Lee and E.W. Seo. 2010. Morphological and physiological effects of lead (Pb) exposure on tissues of *Carassius auratus*. *Korean Journal of Limnology* **43**: 409-417.
- Kimura, L., M. Yamashita, N. Kinae, H. Kumai and G. Nakamura. 1990. The croaker (*Nibea mitsukurii*) and the sea catfish (*Plotosus anguillaris*): Useful biomarkers of coastal pollution, p. 73-84. In: Biomarkers of Environmental Contamination (Publisher, L., ed.). Academic Press, Florida.
- Lee, C., M.J. Shin, J.E. Lee and E.W. Seo. 2006. Tissues and plasma proteins of *Hemiculter eigenmanni* in muddy water of reservoir. *Korean Journal of Environmental Biology* **24**: 213-220.
- Lee, J.C., J.C. Kang, Y.K. Shin, K.H. Ma and P. Chin. 2001. Histological responses of the flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to copper. *Journal of Fish Pathology* **14**: 81-90.
- Lee, K.H. 2002. A study on adsorption behaviors of activated carbon powder and loess for heavy metal in aqueous solution. *Journal of the Korean Society for Environmental Analysis* **5**: 123-130.
- Lee, Y.C., Y.J. Chang and B.K. Lee. 1997. Osmoregulation capability of juvenile grey mullets (*Mugil cephalus*) with the different salinities. *Journal of the Korean Fisheries Society* **30**: 216-224.
- Magee, A.C. and S. Spahr. 1964. Effects of dietary supplements on young rats fed high levels of zinc. *Journal of Nutrition* **82**: 209-216.
- McCord, J.M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase an enzymic function ferythrocuprotein (Hemocuprotein). *Journal of Biological Chemistry* **244**: 6049-6055.
- McGeer, J.C., C. Szebedinszky, D.F. McDonald and C.M. Wood. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology* **50**: 231-243.
- Park, S.H., I.S. Song and Y.C. Cho. 2000. Experimental study on the accumulation of cadmium and other metals in the fish bodies (*Oryzias latipes*). *Korean Journal of Environmental Health Society* **26**: 25-31.
- Seo, E.W., Y.J. Kim and S.C. Baek. 2008. Soil components and elution characteristics of heavy metals in sediments of Andong and Imha reservoirs. *Journal of the Korean Geotechnical Society* **9**: 47-52.
- Shin, M.J., Y.M. Park, J.E. Lee and E.W. Seo. 2010a. Heavy metal contents in tissues of fishes in Andong and Imha reservoirs. *Korean Journal of Life Science* **20**: 1378-1384.
- Shin, M.J., O.C. Kwon, J.E. Lee and E.W. Seo. 2010b. Effects of cadmium exposure on tissues of *Carassius auratus*. *Korean Journal of Life Science* **20**: 1490-1497.
- Shin, M.Y., D.L. Choi, J.K. Chung and S.K. Chun. 1993. Histopathological changes in fish gills by potassium permanganate and influence of water quality. *Journal of Fish Pathology* **6**: 21-55.
- Soh, C.T., I.S. Yoo, H. Park, S.H. Kim, J.J. Kim and D.Y. Min. 1993. Experimental study on the effect of cadmium containing shellfish by the long term intake. *Korean Journal of Malacology* **9**: 85-93.
- Sorensen, E.M. 1991. Cadmium, p. 175-234. In: Metal Poisoning in Fish., CRC Press, Boston.
- Watzin, M.C. and P.R. Roscigno. 1997. The effects of zinc contamination on the recruitment and early survival of benthic invertebrates in an estuary. *Marine Pollution Bulletin* **34**: 443-455.
- Wendel, A. and S. Feuerstein. 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice-I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selsnium status. *Biochemical Pharmacology* **30**: 2513-2520.
- Wicklund, A., L. Norrgren and P. Runn. 1990. The influence of cadmium and zinc on cadmium turnover in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **3**: 348-353.
- You, K.H., C.K. Choi, R.S. Choe and Y.K. Deung. 1978. Ultrastructural studies on cadmium poisoning in the liver, kidney and gills of *Carassius carassius*. *Korean Journal Electron Microscopy* **8**: 33-48.
- Zelikoff, J.T., D. Bowser, K.S. Squibb and K. Frenkel. 1995. Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish,

- an alternative animal model for immunotoxicological studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **45**: 235-248.
- Zikic, R.V., A.S. Stajin, 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. *Physiological Research* **50**: 105-111.
- (Manuscript received 1 February 2011,  
Revision accepted 4 March 2011)