



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

CaO를 이용한 환경수 및 Ca^{2+}
섭취량 변화 유도에 따른 어류의
생리학적 변화에 대한 연구



濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

文 惠 擎

2015 年 2 月

CaO를 이용한 환경수 및 Ca^{2+} 섭취량 변화 유도에 따른 어류의 생리학적 변화에 대한 연구

指導教授 呂寅圭

文惠拏

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



2015 年 2 月

文惠拏의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 이영돈

委 員 이승현

委 員 여인규



濟州大學校 大學院

2015 年 2 月

The physiological change by Ca^{2+} control of
rearing water and a diet feeding with CaO
in the fish.

Hye-Na Moon
(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 Life Sciences
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2015

목 차

목 차	i
List of Tables	iv
List of Figures	iv
I. 종합 서론	1
II. 사육수 내의 CaO농도 변화에 따른 cichlid의 생리적 변화에 관한 연구	
1. 서론	4
2. 재료 및 방법	6
2-1. 사육수 제작	6
2-2. 실험동물 및 사육관리	7
2-3. 어체 내 총 칼슘 함량 측정	8
2-3-1. ICP-MS 분석의 전 처리	8
2-3-2. ICP-MS 계량 및 실험 조건	8
2-4. 혈액 생리학적 분석	9
2-4-1. 혈액 내 칼슘 농도의 변화	9
2-4-2. Cortisol hormone 변화 분석	10
2-4-3. Lysozyme activity 변화 분석	11
2-5. 통계처리	12
3. 결과	13
3-1. 어체 내 총 칼슘량의 변화	13
3-2. 혈액 내 칼슘 농도의 변화	14
3-3. Cortisol의 변화	15
3-4. Lysozyme activity 변화	16
4. 고찰	17

Ⅲ. 사육수 내의 CaO농도 변화에 따른 zebrafish의 유전자 활성의 변화	
1. 서론	19
2. 재료 및 방법	21
2-1. 사육수 제작	21
2-2. 실험동물 및 사육관리	22
2-3. 어체 내 총 칼슘 함량 측정	23
2-3-1. ICP-MS 분석의 전 처리 및 실험조건	23
2-4. RT-PCR	24
2-4-1. RNA 추출	24
2-4-2. cDNA 합성 및 RT-PCR	25
2-5. 통계처리	26
3. 결과	27
3-1. 어체 내 총 칼슘량의 변화	27
3-2. 성장 관련 유전자 GHRA의 유전자 발현량	28
3-3. 면역 관련 유전자 lysozyme의 유전자 발현량	29
3-4. 면역 관련 유전자 MPO의 유전자 발현량	30
4. 고찰	31
Ⅳ. CaO가 첨가된 사료 공급이 해산어인 넙치에 미치는 생리적 변화에 관한 연구	
1. 서론	33
2. 재료 및 방법	34
2-1. 실험동물 및 사육관리	34
2-2. 사료 제작	35
2-3. 혈액 성분 분석	36
2-4. Lysozyme activity 변화 분석	37
2-5. 간 및 혈중 단백질 함량 측정	38
2-6. 비늘 외형 변화 관찰	39
2-7. 간 외형 및 조직 관찰	40

2-8. 병원균 공격 실험	41
2-9. 통계처리	42
3. 결과	43
3-1. 혈액 성분 변화	43
3-2. Lysozyme activity 변화	46
3-3. 간 및 혈중 단백질 함량	48
3-4. 비늘 외형 변화 관찰 결과	50
3-5. 간 외형 및 조직 관찰 결과	51
3-6. 병원균 공격 실험 결과	52
4. 고찰	54
V. 종합 고찰	56
VI. 요약	59
VII. 참고 문헌	61
VIII. 감사의 글	68



List of Tables

Table. 1-1. Ion concentration in artificial fresh water for acclimation experiments in cichlid fish, <i>Metriaclima lombardoi</i>	6
Table. 2-1. Ion concentration in artificial fresh water for acclimation experiments in zebrafish, <i>Danio rerio</i>	21
Table. 2-2. Oligonucleotide of primers for RT-PCR (bp: base pair)	25

List of Figures

Fig. 1-1. Analysis of calcium concentration in serum of cichlid fish, <i>Metriaclima lombardoi</i> acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM and 8 mM *Significant difference by the one way ANOVA test between control group and CaO group respectively($P<0.05$)	13
Fig. 1-2. Total calcium amount of whole body in cichlid fish, <i>Metriaclima lombardoi</i> , acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM by inductively coupled plasma mass spectrometry(ICP-MS) *Significant difference by the one way ANOVA test between control group and CaO group respectively($P<0.05$)	14
Fig. 1-3. Cortisol concentration in cichlid fish, <i>Metriaclima lombardoi</i> , acclimated to artificial fresh water with Control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM by inductively coupled plasma mass spectrometry(ICP-MS) *Significant difference by the <i>t</i> -test between control group and CaO group respectively($P<0.05$)	15
Fig. 1-4. Lysozyme activity in serum of cichlid fish, <i>Metriaclima lombardoi</i> , acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM *Significant difference by the <i>t</i> -test between control group and CaO group respectively($P<0.05$)	16

- Fig. 2-1. Total calcium amount (\pm S.D.) of whole body in zebra fish, *Danio rerio* acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM by inductively coupled plasma mass spectrometry(ICP-MS) *Significant difference by the one way ANOVA test between control group and CaO group respectively($P<0.05$) 27
- Fig. 2-2. Relative GHRA/beta actin mRNA expression (\pm S.D.) in liver of zebra fish, *Danio rerio* acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM by RT-PCR *Significant difference by the one way ANOVA test between control group and CaO group respectively($P<0.05$) 28
- Fig. 2-3. Relative lysozyme/beta actin mRNA expression (\pm S.D.) in gill of zebra fish, *Danio rerio* acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM by RT-PCR *Significant difference by the one way ANOVA test between control group and CaO group respectively($P<0.05$) 29
- Fig. 2-4. Relative MPO/beta actin mRNA expression (\pm S.D.) in kidney of zebra fish, *Danio rerio* acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM by RT-PCR *Significant difference by the one way ANOVA test and student's *t*-test between control group and CaO group respectively($P<0.05$) 30
- Fig. 3-1. Analysis of calcium concentration in serum of olive flounder *Paralichthys olivaceus*, (A), mature stage; (B), immature stage. *Significant difference between control group and CaO diet group based on the student's *t*-test ($P<0.05$). 44
- Fig. 3-2. Analysis of AST (A) and ALT (B) in serum of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Significant difference between control

	group and CaO diet group based on the <i>t</i> -test ($P<0.05$).	45
Fig. 3-3.	Lysozyme activity in serum (A) of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> . *Significant difference between control group and CaO diet group based on the <i>t</i> -test ($P<0.05$).	46
Fig. 3-4.	Lysozyme activity skin (B) and gill (C) of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> . *Significant difference between control group and CaO diet group based on the <i>t</i> -test ($P<0.05$).	47
Fig. 3-5.	Protein level of liver (A) and serum (B) in olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> . *Significant difference between control group and CaO diet group based on the <i>t</i> -test ($P<0.05$).	49
Fig. 3-6.	Staining results of scales in olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> (A, control in immature stage; B, control in mature stage; C, calcium diet in immature stage; D, calcium diet in mature stage)	50
Fig. 3-7.	Liver appearance and histological analysis of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> (A, C, control; B, D, calcium diet).	51
Fig. 3-8.	Mortality late of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> treated of phosphate buffered saline (A)	52
Fig. 3-9.	Mortality late of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> treated of <i>Vibrio anguillarum</i> (B), <i>Edwardsiella tarda</i> (C).	53

I. 종합 서론

칼슘은 척추동물 내에서 뼈 및 치아의 형성, 신경전달 활성근육의 수축 및 이완, 혈액 응고, 체액의 산, 알칼리성 평형, 호르몬과 여러 효소들의 활성 및 세포분열 등에 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있다(Paterson, 1978; NRC, 1993).

어류는 지속적인 성장을 위해 살아가는 동안 계속해서 체내에 칼슘을 축적하고, 수중에 녹아있는 칼슘을 아가미를 통하여 직접적으로 흡수한다. 아가미는 어류와 물 사이의 접촉점이 되는 가장 중요한 부위이며, 수중 칼슘을 흡수하는데 있어 가장 중요한 기관이다(Flik and Verbost, 1993a; Herrmann-Erlee and Flik, 1989; Parry, 1966).

칼슘 배설은 주로 소변을 통해 이루어지는데 (Flik et al., 1993), 해산어류는 상당한 양의 칼슘(약 10 mmol l^{-1})이 용해되어 있는 해수를 마시기 때문에 고농도의 요를 배출하여 수분이 유출되는 것을 방지하고 동시에 현저한 칼슘을 축적하므로, 장 상피세포의 칼슘 투과유량이 담수어류에 비해 낮은 편이다(Flik et al., 1996). 반면 담수어류는 주변 이온농도 보다 체내 삼투압이 높아 몸 안으로 물이 계속 유입되기 때문에 이것에 대응하기 위해 묽은 요를 생산하며, 칼슘 손실은 칼슘의 재흡수 활동을 통해 최소화시킨다(Hickman 1968; Schmidet-nielsen et al., 1975; Renfro et al., 1982).

한편 어류는 번식시기에 달하면 평소보다 더 많은 칼슘을 필요로 하며 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 경우, 성숙 시기별 혈중 칼슘 수치를 비교한 결과 미성숙 시기보다 성숙시기에 혈중 칼슘 농도가 더욱 높아지는 것으로 나타났다(Yeo and Mugiya, 1998). 또한, 대서양 대구(*Gadus morhua*)에서도 생식소를 발달시키기 위해 산란 전에 장내의 칼슘 흡수량이 급격히 증가하는 것으로 보고되었다(Sundell and Björnsson, 1988). 이처럼 어류에 있어서 성숙시기나 빠른 성장이 요구되는 치어 성장기에서는 외부로부터의 칼슘흡수가 매우 중요한 역할을 할 것이라고 여겨진다(Flik et al., 1993).

그러나 수중에서는 일반적으로 충분한 양의 칼슘이 녹아있는 것으로 알려져 있지만, 앞에서 언급한 것과 같이 특정 시기에 칼슘 수요가 더욱 높아지게 되어

사육수를 통한 칼슘 공급만으로는 충분히 칼슘을 흡수 할 수 없다. 따라서 칼슘 수요가 높아지는 기간에는 뼈와 비늘에서 칼슘을 재흡수하여 필요한 칼슘을 보충하게 된다(Mugiya and Watabe, 1977). 그러나 비늘로서의 칼슘 동원이 지속적으로 이루어지게 되면 체표에서의 면역력이 약화되며, 칼슘이 부족할 경우 성장률이 저조하고 뼈의 무기화가 지연되는 것으로 보고되어졌다(Hossain and Furichi, 2014).

이에 칼슘을 충분히 공급하여 어류의 생리적 활성을 높이고자 하는 연구가 다수 이루어졌으나, 어류의 칼슘 공급에 이용되는 tricalcium phosphate(TCP)의 경우는 그 흡수율이 낮은 것으로 알려졌으며, 특히 넙치 사료 내 TCP를 첨가하여 급이 후 증체율을 관찰한 결과 저농도의 TCP첨가 사료급이군의 경우 어류의 증체율이 증가되는 것을 확인할 수 있었던 반면 고농도의 TCP첨가 사료급이군의 경우 TCP를 급이하지 않은 대조군보다 낮은 증체율을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Hossain and Furuichi, 2000b). 이것은 TCP가 체내에 쉽게 소화될 수 없는 형태로 존재하기 때문에 이러한 결과가 나온 것으로 판단된다.

이에 본 연구에서는 이온화된 형태인 CaO를 사용하여 어체내로의 CaO흡수를 용이하게 하고자 연구를 실시하였다.

CaO는 이온화 되어 있는 형태로 식품첨가물, 칼슘이온음료, 동물사료 및 양식어류사료 등에 적용 시에 흡수율이 높고 그에 따라 칼슘의 효능이 극대화되는 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

따라서 CaO를 인공적으로 사육수 및 사료 내에 첨가하여 어류에 미치는 생리적 변화를 관찰함으로써 칼슘이 어류에 미치는 영향 및 칼슘의 동원 메커니즘을 파악하고자 본 연구를 실시하였다.

우선 실험실 내에서 쉽게 기를 수 있는 열대 담수어종인 시클리드(*Pseudotropheus lombardoi*)를 이용하여 사육수의 칼슘 농도를 인위적으로 조절하였을 때 나타나는 생리적 변화를 연구하였으며, 이후 이러한 연구들을 바탕으로 칼슘의 변화에 따른 성장 및 면역 관련 유전자에 대해 많이 밝혀져 있는 제브라피쉬(*Danio rerio*)를 이용하여 유전적 분석을 실시하였다.

또한 해산어에서 칼슘공급에 따른 변화를 조사하기 위하여 주요 양식 대상종

인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 이용하여 사료 내 CaO를 첨가하여 실험을 실시하였다. 담수에서와 다르게 해수에는 이미 수중 내 칼슘이 고농도로 존재하기 때문에 사육수를 통한 인위적인 조절 대신 사료 내에 칼슘을 첨가하여 현장 실험으로 진행하였으며, 칼슘 급이에 따라 성숙기와 미성숙기 넙치에 미치는 생리적 변화에 대하여 분석을 실시하였다.



II. 사육수 내의 CaO농도 변화에 따른 cichlid의 생리적 변화에 관한 연구

1. 서론

일반적으로 담수어는 외부의 광범위한 칼슘 농도로부터 혈중 칼슘량을 매우 좁은 범위인 2~4 mmol로 유지하며, 음식이나 주변 매개체로부터 칼슘을 획득한다. 이와 같은 환경으로부터 담수어의 칼슘 흡수 시에 가장 많이 사용되어지는 것은 아가미이며 특히 아가미의 염류세포는 세포 내 칼슘수송을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Payan et al., 1981; Perry and Flik 1988; Perry et al., 1992). 그러나 번식기와 성장기와 같이 칼슘 요구량이 급격히 증가하는 시기에는 체내로 흡수되는 혈중 칼슘 양이 한정되어 있기 때문에 주로 체내의 골조직과 비늘에서 칼슘을 재흡수 하여 필요한 칼슘을 보충하는 것으로 보고되어졌으며, 실제로 경골어류의 칼슘은 약 95%가 뼈와 비늘에 포함되어 있다(Flik et al., 1986). 담수어의 경우 금붕어(*Carassius auratus*), 송사리(*Fundulus heteroclitus*), 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*) 및 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)에서 산란기와 같은 특정시기에 비늘에서 칼슘이 재흡수 되는 것으로 보고되어졌다(Carragher and Sumpter, 1991; Mugiya and Watabe, 1977; Persson et al., 1994; 1995; 1997). 그러나 이처럼 뼈와 비늘에서 칼슘 동원이 이루어지게 되면, 면역력이 약화 되어 질병에 걸릴 확률이 높아진다.

그러나 자연 상태에 존재하며 어류의 칼슘첨가제로서 주로 사용되는 칼슘인 CaCO_3 는 석회암 등에 포함된 탄산칼슘으로부터 유래되는 칼슘이온으로 지하수 속에 오랜 세월 동안 풍부하게 유지하기 위해 물속에 쉽게 용출되지 않는 단단한 암석질의 형태로 존재하기 때문에 어류에게 흡수되기 어려운 형태로 존재한다.

반면에 본 연구에서 사용한 칼슘인 CaO는 폐각류를 가열 및 소성시켜 폐각류에 포함된 유기물 및 잔류 독성을 제거하여 산화칼슘을 제조하는 방법을 사용하여 제조하였기 때문에 수용성으로 흡수율이 매우 높으며, 현재 식품 첨가물 등 인체에도 사용되고 있는 물질로 알려져 있다.

시클리드(cichlid, *Pseudotropheus lombardoi*)는 우리나라의 하천에서 번식하는 나일 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)와 같은 척삭동물문(chordata) 조기아강(actinopterygian)에 속하는 종이다. 아프리카 말라위호가 원산지인 시클리드(*Pseudotropheus lombardoi*)는 국내에서는 블루 시클리드 또는 블루 제브라 시클리드로 불리며 국외에서는 주로 케니 시클리드라고 불린다. 열대어 종으로 최대 15cm 까지 자라는 난생어종으로서 마우스 브리딩 하는 잡식어종이다. 관상 열대어로서 많이 사용되는 시클리드는 육안으로 암수가 구별가능하며 구입이 쉽고 사육이 간편한 장점이 있어 본 실험에 사용하였다.

따라서 본 연구에서는 이온화된 칼슘인 CaO를 인공적으로 실험어류에 첨가하였을 때 어류에 미치는 생리적 변화를 관찰하기 위하여 실험실 내에서 쉽게 사육이 가능한 열대 담수어종인 시클리드를 이용하여 사육수에 칼슘 농도를 인위적으로 조절하였을 때 나타나는 생리적 변화를 연구하였다.



2. 재료 및 방법

2-1. 사육수 제작

CaO 농도가 다른 환경수에서 사육한 실험동물의 생리적 변화를 관찰하기 위하여 인공적으로 사육수를 제조하여 실험에 사용하였다. 사육수는 1차 증류수에 $MgSO_4$, NaCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , CaO를 첨가하여 제조하였으며, CaO가 첨가된 실험군은 총 3그룹으로 22 L의 사육수 안에 CaO를 2 mM, 4 mM, 8 mM의 농도로 첨가하여 실험에 사용하였다. 모든 그룹의 Mg^{2+} , K^+ , Na^+ 은 동일한 양으로 첨가하였으며, control군은 CaO를 첨가하지 않았다.



Table. 1-1. Ion concentration in artificial fresh water for acclimation experiments in cichlid fish, *Metriaclima lombardoi*

Mg^{2+}	Na^+	Ka^+	Ca^{2+}
0.1 mM	0.5 mM	0.02 mM	0 mM
			2 mM
			4 mM
			8 mM

2-2. 실험동물 및 사육관리

본 연구에 사용된 실험어는 대만에서 종묘 생산된 4-6개월령 시클리드 (*Pseudotropheus lombardoi*)치어를 사용하였으며 실험실로 수송 후 3일 간 적응시간을 가진 뒤 실험에 사용하였다. 이후 실험을 위하여 control군과 CaO첨가 농도에 따른 2 mM군, 4 mM군 및 8 mM군으로 나누어 28×28×28cm³의 수조에 한 군당 30마리씩 이송하였다. CaO처리 후 순치는 14일간 진행되었으며 사육 기간 동안 에어레이션과 여과를 지속적으로 시켜 주었고, 실험 기간 동안 사육수의 수온은 26~28℃, 그리고 광주기는 12h:12h(light:dark)로 유지하였다. 사료 급이 시 사용된 사료는 시중에 일반적으로 판매되고 있는 열대어 전용 사료(tetra bits, tetra)를 사용하였으며 1일 2회 급이 하였다. 실험어의 평균 체장은 2.94±0.06 cm 이며, 평균 체폭은 0.88±0.1 cm, 평균 무게는 0.57±0.04 g이었다.



2-3. 어체 내 총 칼슘함량 측정

2-3-1. ICP-MS분석의 전 처리

어체 내 총 칼슘 함량 측정을 위하여 실험종료 후 실험어의 두부 신경을 빠르게 절단한 뒤, -80°C 에 바로 동결하였다. 이후 동결 건조기(PVTFD 10A)를 이용하여 건조 후 분말 형태로 분쇄하였다. 이후 분쇄된 샘플 각각 0.2 g을 질산 10 mL과 과산화수소(electronic grade) 1 mL을 사용하여 PTFE digestion vessel에 옮긴 뒤, $100-180^{\circ}\text{C}$ 에서 가수분해 시켰다. Blank solutions으로는 10 mL 질산과 1mL 과산화수소를 혼합하여 사용하였다.

2-3-2. ICP-MS 계량 및 실험 조건

칼슘분석을 위하여 Agilent 7700s ICP-MS (Agilent, USA)를 사용하여 측정하였다. 무선주파수는 1500 W으로 설정하였으며, 아르곤 가스의 속도는 0.5 L min^{-1} 로 조정하였다. 2-3-1의 전처리 과정을 거친 산 가수분해 샘플은 연동펌프와 자동 견본기를 사용하여 ICP-MS 장비 안으로 넣었다. 칼슘원소의 데이터 수집은 Agilent mass hunter software for ICP-MS (Version A.01.02)을 사용하여 실시하였으며, 수소 모드를 사용하여 측정하였다. ICP-MS분석의 교정을 위하여 Multi-element calibration standards 1, 2A, 3, 및 4를 사용하였다.

2-4. 혈액 생리학적 분석

2-4-1. 혈액 내 칼슘량 측정

사육 실험 종료 후, 실험어를 2-Phenoxy-Ethanol 200 μ L에 3분동안 순치하여 마취 후, heparine을 처리한 인슐린 주사기를 이용하여 미부 정맥에서 혈액을 채혈하였다. 이후 3000 g에서 3분간 원심분리 후, 상층액을 분리하여 실험에 사용하였다.

칼슘 분석은 칼슘 시료 내의 칼슘량이 15 mg/dL의 범위내로 들어오도록 10배 희석한 뒤 자동 분석기용 Ca^{2+} 측정용 시약(아산제약)을 사용하여 생화학 분석기(CH 100 PLUS)로 측정하였다.



2-4-2. Cortisol의 변화 분석

스트레스 호르몬인 cortisol의 분석을 위하여, 앞에 기술한 내용과 마찬가지로 실험종료 후 실험어를 2-phenoxy-ethanol 200 μ L에 3분 동안 순치하여 마취 후, heparine을 처리한 1 mL 주사기를 이용하여 미부 정맥에서 혈액을 채혈하였다. 이후 3000 g에서 3분간 원심분리 후, 상층액을 분리하여 실험에 사용하였다.

Cortisol 호르몬 분석은 cortisol 전용 well plate를 사용하여 실시되었다. 우선 RD5-43을 이용하여 혈액샘플을 400배 희석 시킨 뒤, conjugation 시약을 50 μ L 첨가한 후, antibody를 50 μ L 분주하여 2시간 동안 상온에서 shaking(300 rpm)하며 반응 시켰다. 이후 plate를 wash한 후, 발색 시약인 color reagent를 200 μ L씩 각 샘플에 첨가하여 빛을 차단 한 상태에서 30분간 반응 시켰다. 이후 반응을 멈춰주는 stop solution을 50 μ L첨가한 뒤 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader를 이용하여 450 nm에서 측정하였으며, Soft max pro 프로그램을 이용하여 분석하였다. 모든 분석은 R&D systems에서 나온 cortisol kit에 포함된 시약들을 사용하여 제조사의 분석 방법에 따라 진행되었다.

2-4-3. Lysozyme activity 변화 분석

앞에 기술한 내용과 마찬가지로 실험어의 혈청을 분리하여 얻은 상층액을 사용하여 각각 혈청 15 μL 을 96 well plate에 분주한 후 150 μL *micrococcus lysodeikticus* solution (0.1 M phosphate buffer saline, pH 6.8)을 넣은 뒤 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분간 반응 후 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 다시 5분 간 반응 시켰다. 이후 동일한 파장에서 흡광도를 측정하여 lysis 전 후의 흡광도 차를 비교하여 측정하는 방법을 통해 lysozyme activity 변화를 분석하였으며, Lysozyme의 활성 단위(U)는 흡광도 0.001/min의 감소치를 1 unit으로 정의하였다.



2-4-4. 통계처리

SigmaPlot(ver.12.0) 프로그램을 이용하여 통계적 분석을 실시하였다. 어체 및 혈액 내 총 칼슘함량 분석은 one-way ANOVA로 분석하였으며, 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test($P < 0.05$)로 유의성을 판단하였다. Lysozyme activity 및 cortisol 변화 분석은 student's *t*-test로 통계 분석하였으며, $P < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였으며, 모든 데이터는 평균값±표준편차 (mean ± SD)로 나타내었다.



3. 결과

3-1. 어체 내 총 칼슘량의 변화

ICP-MS 분석법을 이용하여 어체 내 총 칼슘량의 변화를 측정하였다. 그 결과 control군에서는 50.71 ± 8 mg/L 였으나, 2 mM군에서 46.52 ± 12.2 mg/L, 4 mM군에서 52.5 ± 9 mg/L이였으며, 8 mM군에서는 가장 높은 53.92 ± 11 mg/L 으로 각 그룹간에 유의적인 차이는 없었으나 2 mM, 4 mM 및 8 mM CaO군에서 농도 의존적으로 칼슘량이 증가하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 1-1).

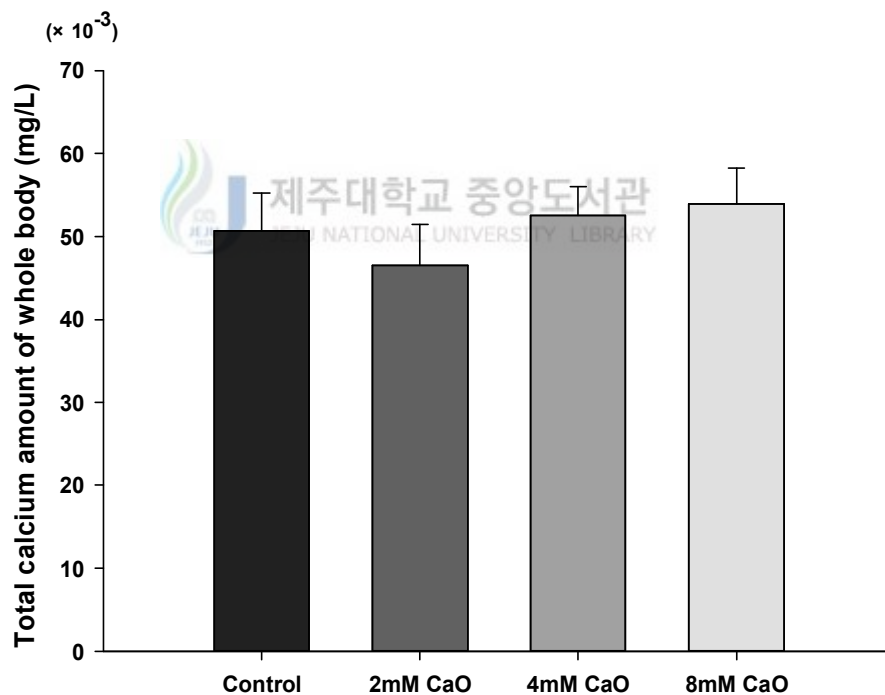


Fig. 1-1. Total calcium amount (\pm S.D.) of whole body in cichlid fish, *Metriaclima lombardoi* acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM by inductively coupled plasma mass spectrometry(ICP-MS) *Significant difference by the one-way ANOVA between control group and CaO group respectively($P < 0.05$)

3-2. 혈액 내 칼슘 농도의 변화

시클리드의 혈액 내 칼슘 변화량 결과 control군에서는 150.50 ± 1 mg/L 였으나, 2 mM군에서 170.28 ± 8 mg/L, 4 mM군에서 175.0 ± 7 mg/L이었으며, 8 mM군에서는 가장 높은 175.05 ± 7 mg/L 으로 control군에 비교하여 모든 CaO군에서 유의적인 차이를 나타내었다. 또한 앞에서 언급한 ICP-MS 분석을 이용한 어체 내 총 칼슘량 측정 결과와 마찬가지로 control군에 비해서 2 mM, 4 mM 및 8 mM CaO군에서 농도 의존적으로 칼슘량이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1-2).

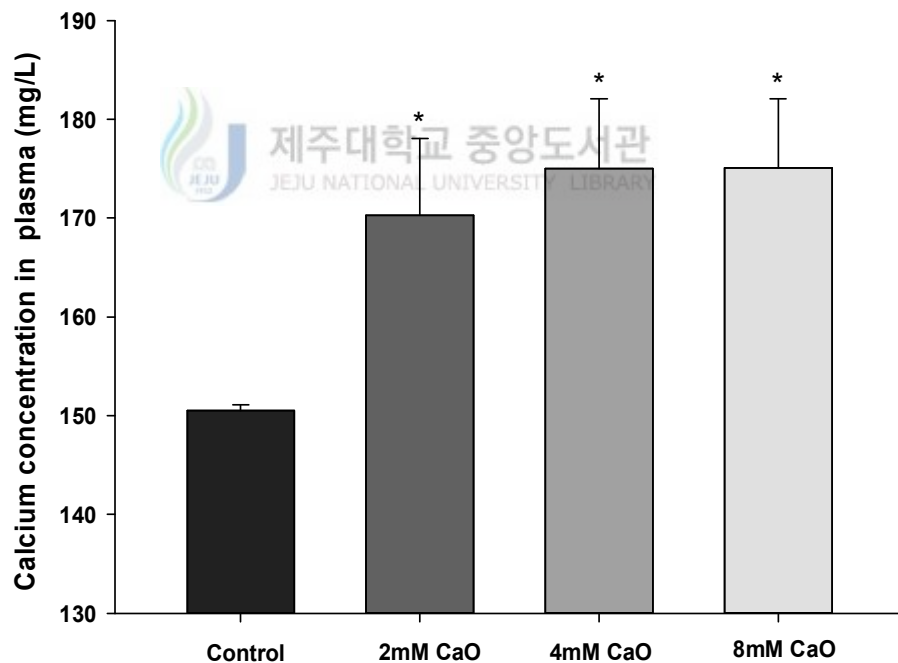


Fig. 1-2. Analysis of calcium concentration (\pm S.D.) in serum of cichlid fish, *Metriaclima lombardoi* acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM and 8 mM *Significant difference by the one-way ANOVA between control group and CaO group respectively($P < 0.05$)

3-3. Cortisol의 변화

스트레스 관련 호르몬인 cortisol의 측정 결과, control군의 경우 $227.14 \pm 19 \mu\text{g/dL}$, 2 mM CaO군은 $182.66 \pm 44 \mu\text{g/dL}$, 4 mM CaO군은 $182.00 \pm 49 \mu\text{g/dL}$ 이었으며, 8 mM CaO군은 $166.54 \pm 30 \mu\text{g/dL}$ 으로 control군과 비교하여 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다($P < 0.05$, Fig. 1-3).

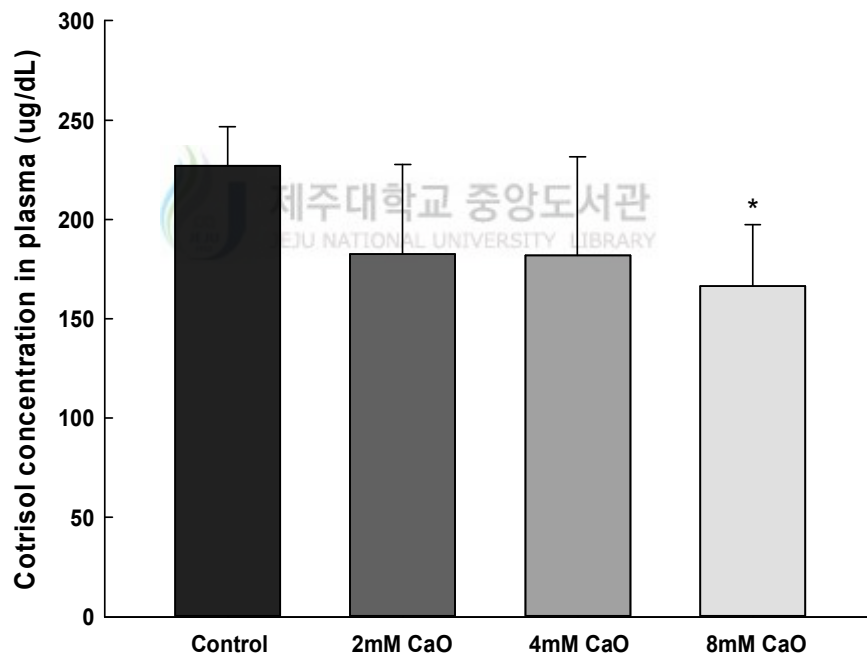


Fig. 1-3. Cortisol concentration (\pm S.D.) in cichlid fish, *Metriaclima lombardoi* acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM by inductively coupled plasma mass spectrometry(ICP-MS) *Significant difference by the *t*-test between control group and CaO group respectively($P < 0.05$)

3-4. Lysozyme activity

안정화된 상태에서의 lysozyme activity 측정 결과, control군은 9.33 ± 3 U/mL, 2 mM군은 7.73 ± 2 U/mL, 4 mM군은 7.7 ± 4 U/mL 및 8 mM군은 4.4 ± 1 U/mL 로서 control군에 비해 8 mM군의 칼슘 처리군에서 lysozyme activity가 유의적으로 낮았다($P < 0.05$, Fig. 1-4).

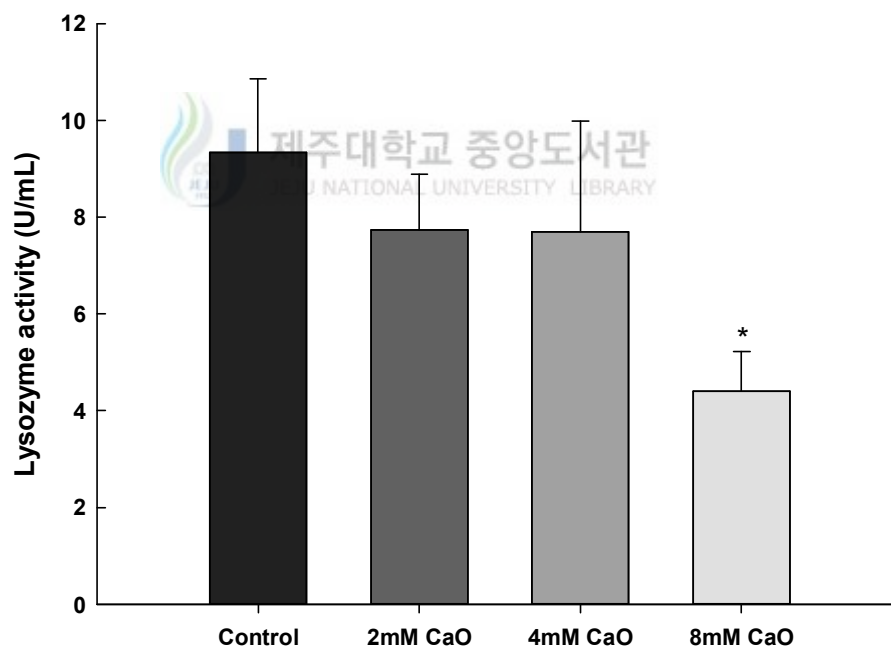


Fig. 1-4. Lysozyme activity in serum (\pm S.D.) of cichlid fish, *Metriaclima lombardoi* acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM *Significant difference by the *t*-test between control group and CaO group respectively($P < 0.05$)

4. 고찰

어류는 다양하고 광범위한 수중 환경에서 서식하며, 어류의 칼슘 흡수 및 조절은 서식지의 환경 요인 등에 의하여 영향을 받는다(Chen et al., 2003). 일반적인 수중 환경에 존재하는 칼슘의 형태는 CaCO_3 로 체내에 흡수되기 어려운 형태로 존재하기 때문에 본 연구에서는 수용성 칼슘인 CaO를 이용하여 사육수 내에 인공적으로 칼슘 농도를 조절하였을 때 나타나는 변화를 생리적으로 분석하였다. 그 결과 어체 내 칼슘 흡수량의 경우 각 그룹간의 유의적인 차이는 없었으나, 혈액 내 칼슘 흡수량의 경우 control군과 비교하여 모든 CaO 처리군에서 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었으며($P < 0.05$), CaO 처리 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 칼슘량이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 이온화된 형태의 CaO가 증가함에 따라 체내에 보다 쉽게 흡수되어 어체 내 칼슘 축적량이 증가된 결과로 판단된다.

이에 반해 스트레스 관련 호르몬인 혈액 내 cortisol 함량 분석 결과 control군과 비교하여 8 mM CaO군에서 유의적으로 낮은 값을 나타내었다. 일반적으로 칼슘은 생체내의 안정화를 가져오는 물질로 알려져 있으며, 어류는 화학적 또는 물리적인 요인 등에 의하여 스트레스를 받게 되면 cortisol과 같은 스트레스 관련 호르몬의 분비가 증가되어 신진대사와 면역기관에 변화를 준다(Pickering, 1998). 본 실험에서의 cortisol 함량 분석 결과 또한 CaO가 고농도로 처리된 8 mM CaO군에서 코르티솔 체내 생산량이 유의적으로 낮았음을 확인할 수 있었으며($P < 0.05$), 따라서 사육수 내 칼슘 농도 증가가 어체를 안정화 시키는 것으로 판단된다.

또한 안정화된 상태에서의 lysozyme activity 측정 결과, 앞선 cortisol 분석 결과와 마찬가지로 control군과 비교하여 8 mM CaO군에서 유의적으로 낮은 결과를 나타내었으며($P < 0.05$), 마찬가지로 CaO군 처리가 어체의 안정화에 기여를 하여, 외부 환경에 대한 저항성이 control군에 비해 높아져 이러한 결과가 나온 것으로 사료되나 추후 스트레스 및 면역과 연관 지어 실험이 더 진행되어야 할 것으로 판단된다.

이상의 결과들을 미루어보아 수중 환경에서의 CaO가 체내로의 칼슘 흡수에

유의적인 영향을 미치지 않지만 스트레스 및 면역 활성화에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 CaO의 첨가 후 본 실험보다 장기간으로 순치하였을 경우 나타나는 체내의 생리적 변화 및 갈숨 흡수 조절능력 등에 관한 연구가 추후 진행되어야 할 것으로 판단되며, 8mM CaO 처리의 경우 비교적 단기간임에도 불구하고 체내를 안정화시키는 영향을 나타내었기 때문에 이후 어류 이송 또는 어류가 물리적 또는 화학적 스트레스를 받을 시에 고농도의 CaO가 처리된 환경에서 순치시킬 경우 어체의 안정화를 더욱 신속하게 유도할 수 있을 것으로 판단되어진다.



Ⅲ. 사육수 내의 CaO농도 변화에 따른 제브라 피쉬의 유전자 활성의 변화

1. 서론

제브라 피쉬(*Danio rerio*)는 세대가 짧고, 유전자 종류가 인간과 매우 유사한 척추동물로서 사육과 번식이 간편 및 용이하여 다양한 분야의 연구 모델 열대 담수어종이다.

성장호르몬(Growth hormone)은 시상하부에서 분비되는 GHRH에 의해 자극되어 뇌하수체에서 분비되는 호르몬으로서, 주로 뇌하수체의 somatotrophs에 의해 조절되며 Growth hormone receptor(GHR)와 같은 수용체와의 상호작용을 통해 표적 장기에 주로 작용한다. 특히 어류에 있어 성장호르몬은 어류의 칼슘 균형에 관여하는 것으로 알려져 있으며, GHR의 합성은 생물학적 및 환경적 요인에 따른 성장호르몬의 감수성을 조절한다. (Flik et al., 1993b; Flores-Morales et al., 2006). 체내에 칼슘이 부족할 경우 성장률이 저조하게 되어 어류 성장에 있어 문제가 되는 것으로 보고되어져 있어 체내의 칼슘 동원과 성장관련 유전자의 발현은 매우 밀접한 관련성을 가지는 것으로 추정되고 있다(Hossain and Furichi, 2014).

한편, 비특이적 면역활성을 하는 것으로 알려진 lysozyme은 세균 침입시에 초기 방어 역할을 하며, 병원균의 감염 및 스트레스에 의해 활성이 다양하게 나타는 것으로 보고되어졌다(Saurabh and Sahoo, 2007). 일반적으로 어류에 존재하는 lysozyme은 c-type과 g-type으로 존재한다고 알려진 바 있으며, 그 중 c-type은 칼슘과 결합하는 특징이 있으며, calcium-binding lysozyme 이라고도 한다(Hikima, 2000; Wang, 2008). 이처럼 면역 활성을 하는 것으로 알려진 lysozyme은 어류에서 병원균 감염 및 내부 항상성 유지에 있어 중요한 생리적 메커니즘으로 작용하며, 선천면역으로 알려져 있다(Saurabh and Sahoo, 2007).

이와 마찬가지로 면역 활성을 하는 것으로 알려진 myeloid-specific peroxidase(MPO)는 호중구와 같은 골수세포의 세포질 내에서 특정적으로 발현되는 과산화 효소로서, 일차적으로 아주르친화성 호중성과립(azurophilic

neutrophil granules)으로부터 방출되며, 미생물 감염에 반응하는 호스트로서 중요한 역할을 한다(Kettle, 1993). MPO는 할로젠과 과산화수소(H_2O_2)를 사용할 수 있으며, 효율적으로 세균과 바이러스를 포함한 생물체를 파괴하는 작용을 하는 차아염소산($HOCl$)의 호흡 폭발로 인해 형성되는 물질로 알려져 있다(Podok et al., 2014).

따라서 제브라 피쉬의 면역 활성화 능력에 대한 평가 지표로서 lysozyme 및 MPO 유전자를 사용하여 유전적 분석을 실시하였으며, 본 II장에서는 체내의 칼슘 변화와 성장유전자의 수용체인 GHR과 면역 관련 유전자인 lysozyme 및 myeloid-specific peroxidase를 통해 체내의 칼슘 농도에 따른 칼슘 동원이 제브라 피쉬의 GHR, lysozyme 및 myeloid-specific peroxidase의 mRNA의 발현과 어떤 상관관계를 가지는지에 대하여 연구를 진행하였으며, 이를 통하여 사육수의 칼슘농도의 변화가 어체 내의 성장 및 면역 활성화에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 파악하고자 하였다.



2. 재료 및 방법

2-1. 사육수 제작

CaO 농도가 다른 환경수에서 사육한 실험동물의 생리적 변화를 관찰하기 위하여 앞선 사육 실험과 같은 조건으로 인공 사육수를 제조하여 실험에 사용하였다. $MgSO_4$, $NaCl$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , CaO 를 1차 증류수에 첨가하여 사육수를 제조하였으며, CaO 가 첨가되지 않은 control군을 제외한 CaO 첨가 실험군은 총 3그룹으로 설정하여, CaO 를 2 mM, 4 mM, 8 mM의 농도로 22 L의 사육수에 첨가하여 사육 후 실험에 사용하였다. CaO 를 첨가하지 않은 control군을 포함한 모든 그룹의 Mg^{2+} , K^+ , Na^+ 농도는 동일하게 설정하였다(Table. 2-1).



Table. 2-1. Ion concentration in artificial fresh water for acclimation experiments in zebrafish, *Danio rerio*

Mg^{2+}	Na^+	Ka^+	Ca^{2+}
			0 mM
			2 mM
0.1 mM	0.5 mM	0.02 mM	4 mM
			8 mM

2-2. 실험동물 및 사육관리

본 연구에 사용된 실험어는 대만에서 종묘 생산된 6개월령 제브라 피쉬 (*Danio rerio*) 치어를 사용하였으며 3일 간의 적응시간을 가진 후에 본 실험에 사용하였다. 이후 실험군을 control군, 2 mM군, 4 mM군 및 8 mM군으로 나누어 28x28x28cm³의 수조에 한 군당 각각 20마리씩 이송하였다. 이송 후 CaO가 첨가된 사육수에서 10일간 순치 후 실험에 사용하였으며 사육 기간 동안 에어레이션과 여과를 지속적으로 시켜주었으며, 실험 기간 동안 사육수의 수온은 28℃ 광주기는 12h:12h(light:dark)로 유지하였다. 사료는 1일 2회 급이 하였으며, 사료는 시중에 일반적으로 판매되고 있는 열대어 전용 사료(tetra bits, tetra)를 사용하였다. 실험어의 평균 체장은 3.14±0.07 cm 이며, 평균 체폭은 0.77±0.05 cm, 평균 무게는 0.55±0.05 g이었다.



2-3. 어체 내 총 칼슘 함량 측정

2-3-1. ICP-MS분석의 전 처리 및 실험조건

어체 내 총 칼슘함량의 측정은 II장의 2-3의 방법과 동일한 방법을 이용하여 측정하였다. 제브라 피쉬의 사육 실험종료 후 실험어의 두부 신경을 빠르게 절단한 뒤 동결 후, 동결 건조기(PVTFD 10A)를 이용하여 건조된 샘플을 분말 형태로 분쇄하였다. 이후 분쇄된 샘플을 앞에서 기술한 방법과 동일하게 전 처리 하여 분석에 이용하였으며, 전처리 과정 후 어체 내 총 칼슘함량 분석을 위하여 Agilent 7700s ICP-MS (Agilent, USA)를 사용하여 II장에서 기술한 시클리드의 어체 내 총 칼슘 함량 측정법과 동일하게 실시하였다.



2-4. RT-PCR

2-4-1. RNA 추출

Control군, 2 mM, 4 mM, 8 mM CaO 첨가군으로부터 각각 17마리의 아가미, 신장 및 간 조직 0.1 g을 튜브에 취하여, lysis/binding buffer 400 μ L을 넣어 조직을 분쇄하였다. 이후 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액 200 μ L를 분리 후 분자용 에탄올 200 μ L를 첨가하여 RNA추출용 필터 튜브로 옮긴 뒤 다시 14,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 이후 DNase incubation buffer 90 μ L와 DNase incubation buffer 10 μ L를 혼합한 뒤, 10 μ L를 덜어 각 샘플에 첨가하여 상온에서 15분 반응시켰다. 이후 wash buffer를 사용하여 원심분리를 거쳐 충분히 세척 한 뒤, 완전히 건조시켜 elution Buffer 80 μ L를 넣고 8000 g에서 2분간 원심분리 하여 RNA를 추출하였으며, 추출된 RNA는 -80°C 에 보관하여 실험에 사용하였다. 모든 RNA추출은 Roche에서 생산된 high pure RNA isolation kit에 포함된 시약들을 사용하였다.



2-4-2. cDNA 합성 및 RT-PCR

각 샘플 RNA 2 μ L와 kanamycin positive control RNA 2 μ L를 각각 튜브에 분주한 뒤, 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. cDNA합성은 PROMEGA사의 cDNA 합성 kit인 reverse transcription system을 이용하였으며 master mix를 제작하여 cDNA합성을 하였다. master mix제작은 MgCl₂ 25mM 4 μ L, Reverse transcription 10 \times buffer 2 μ L, dNTP mixture 10mM 2 μ L, Rnasin RNasin Ribonuclease Inhibitor 0.5 μ L, AMV reverse transcriptase 2 μ L, Oligo(dT) primer 1 μ L, Nucleas-free water 7.5 μ L 및 RNA 샘플을 혼합하여 제작하였다.

이후 합성된 cDNA를 증폭시키기 위하여 Roche사의 kit를 이용하여 RT-PCR을 진행하였다. cDNA 2 μ L, 10x PCR buffer 5 μ L, MgCl 3 μ L, dNTP 1 μ L, primer (sence) 1 μ L (50 pmol), antisence 1 μ L, Taq DNA polymerase 0.5 μ L 및 Nuclease-Free water 36.5 μ L를 혼합하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation 시켜준 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 45초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension 조건으로 35회 증폭하고, 이 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 더 반응시켰다.

Table. 2-2. Oligonucleotide of primers for RT-PCR (bp: base pair)

RNA species	Expected size	Primer sequence
β -actin mRNA	165 bp	5'-ctcttcagccttccttct-3' 5'-cttctgcatacggtcagcaa-3'
GHRA mRNA	237 bp	5'-ccagaaatccagatcctga-3' 5'-cagttgtccaggtgagagca-3'
Lysozyme mRNA	242 bp	5'-tgatacggggaaggactacg-3' 5'-gctgctcacagccttttacc-3'
myeloid-specific peroxidase mRNA	243 bp	5'-gagaggctgtttgccttcac-3' 5'-aggctcagcaacacctccta-3'

2-5. 통계처리

SigmaPlot(ver.12.0) 프로그램을 이용하여 RT-PCR 발현량 결과를 통계적으로 분석을 실시하였다. one-way ANOVA 및 student's *t*-test로 통계 분석하였으며, $P < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다. 모든 데이터의 결과 값은 평균값 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었다.



3. 결과

3-1. 어체 내 총 칼슘함량 변화

ICP-MS 분석법을 통한 어체 내 총 칼슘함량 변화 분석 결과, control군의 경우 42.22 ± 0.79 mg/L, 2mM CaO군은 54.48 ± 0.73 mg/L, 4 mM CaO군은 33.98 ± 0.74 mg/L 및 8mM CaO군은 54.41 ± 1.07 mg/L로 모든 CaO그룹에서 control과 유의적인 차이를 나타내었다($P < 0.05$, Fig. 2-1).

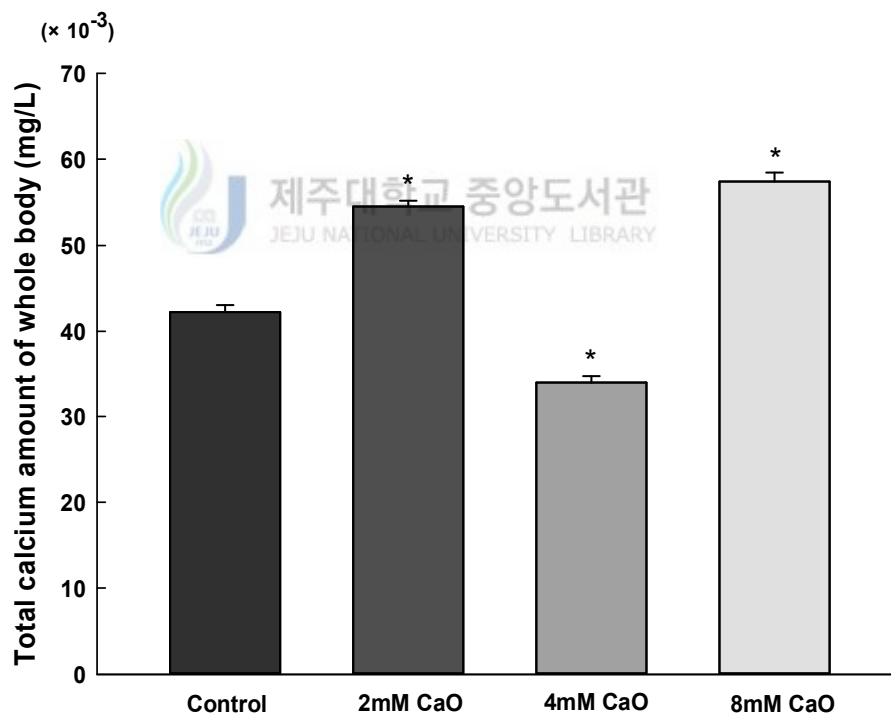


Fig. 2-1. Total calcium amount (\pm S.D.) of whole body in zebra fish, *Danio rerio* acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM by inductively coupled plasma mass spectrometry(ICP-MS) *Significant difference by the one way ANOVA test between control group and CaO group respectively($P < 0.05$)

3-2. 성장 관련 유전자 GHRA의 유전자 발현량

성장 호르몬 수용체인 growth hormone receptor A(GHRA)의 mRNA 발현량을 RT-PCR로 측정해본 결과, control군과 각 CaO군과의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 control군에 비하여 2 mM, 4 mM 및 8 mM CaO군에서 농도 의존적으로 발현량이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 2-2).

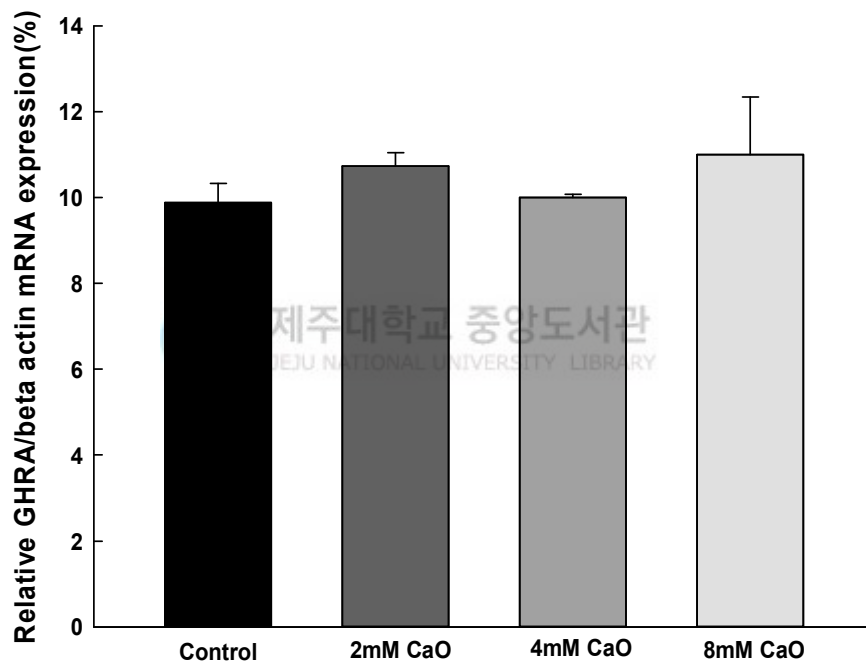


Fig. 2-2. Relative GHRA/beta actin mRNA expression (\pm S.D.) in liver of zebra fish, *Danio rerio* acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM by RT-PCR *Significant difference by the one way ANOVA test between control group and CaO group respectively($P < 0.05$)

3-3. 면역 관련 유전자 Lysozyme의 유전자 발현량

제브라 피쉬의 lysozyme 유전자의 발현량을 RT-PCR을 통하여 측정한 결과 control군과 2 mM군의 경우 lysozyme 발현이 거의 일어나지 않은 것을 확인할 수 있었다. 반면에 4 mM과 8 mM CaO군의 경우 control군에 비하여 유의적으로 높은 발현량을 나타내었다($P < 0.05$, Fig. 2-3).

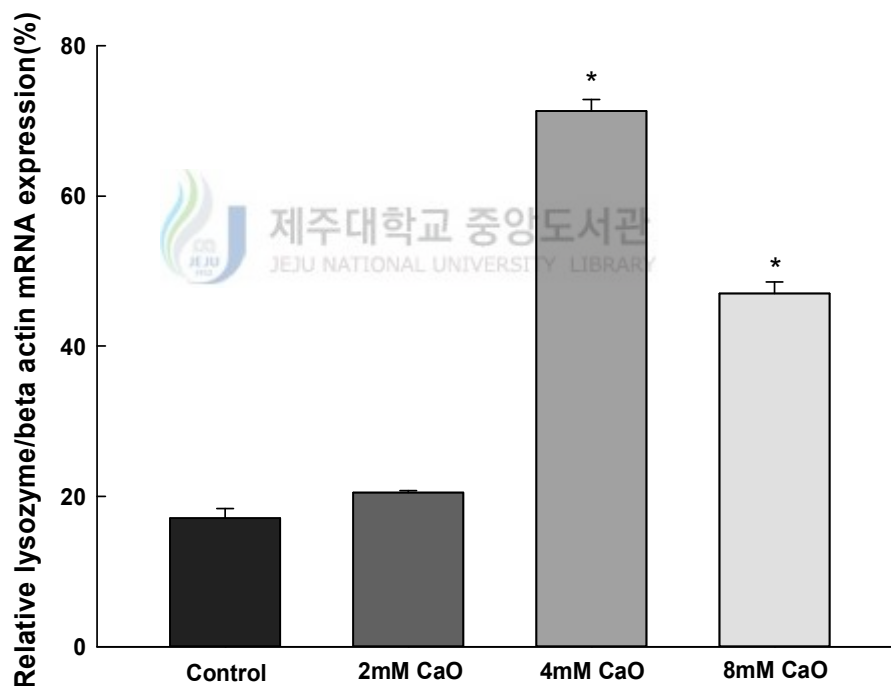


Fig. 2-3. Relative lysozyme/beta actin mRNA expression (\pm S.D.) in gill of zebra fish, *Danio rerio* acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM by RT-PCR *Significant difference by the one way ANOVA test between control group and CaO group respectively($P < 0.05$)

3-4. 면역 관련 유전자 MPO의 유전자 발현량

제브라 피쉬의 Myeloid-specific peroxidase(MPO) mRNA 발현량을 RT-PCR로 분석해본 결과 control군과 비교하여 각 그룹에서 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 농도 의존적으로 control군에 비하여 2 mM, 4 mM, 8 mM군에서 낮아지는 결과를 확인할 수 있었다.

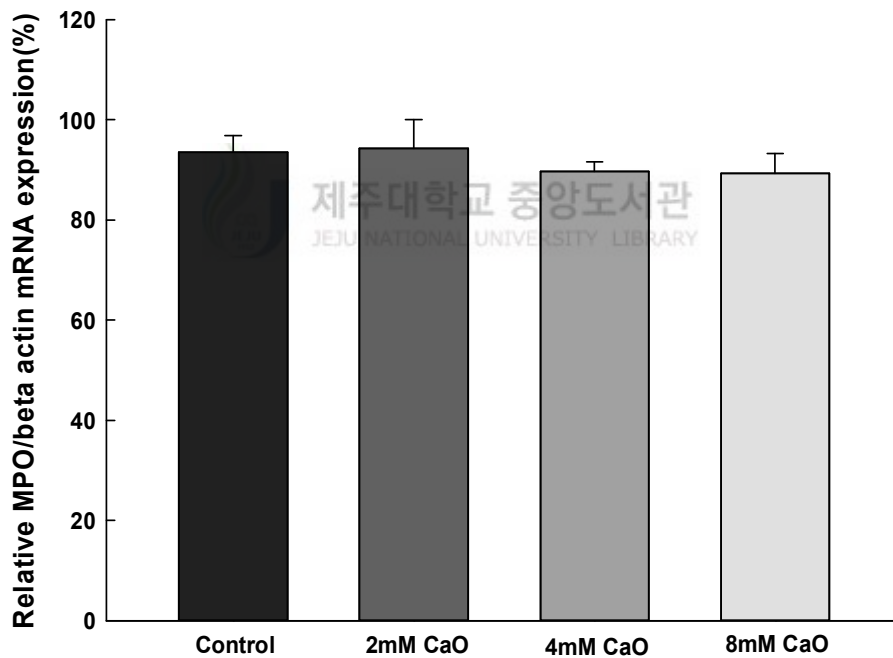


Fig. 2-4. Relative MPO/beta actin mRNA expression (\pm S.D.) in kidney of zebra fish, *Danio rerio* acclimated to artificial fresh water with control(0 mM), 2 mM, 4 mM, and 8 mM by RT-PCR *Significant difference by the one way ANOVA test between control group and CaO group respectively($P<0.05$)

4. 고찰

칼슘이온은 다양한 생리학적 시스템의 중요한 구성요소이며, 생명체의 기능과 생존을 위해 매우 중요한 역할을 담당한다(Herberger and Loretz, 2013). 제브라 피쉬에서의 GHRA의 결과, control군과 각 CaO군과의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 어체 내 총 칼슘 함량 분석 결과와 유사한 결과가 나왔다. 어체 내 총 칼슘 함량을 분석하기 위하여 ICP-MS 분석법으로 도출한 결과를 살펴보면 control과 비교하여 2 mM CaO군과 8 mM CaO군의 유의적으로 증가된 칼슘량을 확인할 수 있었는데, 이와 비슷하게 GHRA 발현량 역시 control군에 비하여 2 mM CaO군과 8 mM CaO군에서 농도의 존적으로 증가하는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 3-2). 이에 반해 어체 내 총 칼슘량이 control군에 비하여 4 mM CaO군이 유의적으로 낮은 값을 나타내는 것을 확인할 수 있었으나($P < 0.05$) GHRA의 경우 유의적인 차이는 없었지만 ICP-MS와 대조되는 결과를 나타내었다. 본 연구는 앞서 시행되었던 I의 시클리드(*Metriaclima lombardoi*)에서 진행한 연구보다 짧은 기간의 순치를 통해 진행되었음에도 불구하고, ICP-MS를 통한 어체 내 총 칼슘량을 측정했을 시에 유의적 차이가 나타나지 않은 시클리드에 반해 제브라 피쉬의 경우 control군과 유의적인 차이가 나타났음을 확인할 수 있었다. 이것은 같은 열대 담수어종일지라도 칼슘을 체내로 받아들이는 것이 종마다 특이적으로 작용하기 때문에 이와 같은 결과가 나온 것으로 추정된다.

또한 제브라 피쉬에서의 lysozyme 발현량 측정 결과 control군과 2 mM CaO군에서는 lysozyme이 거의 발현되지 않은 반면에 4 mM과 8 mM CaO군에서는 control군에 비하여 유의적으로 높게 발현하는 것을 확인할 수 있었다($P < 0.05$). 이러한 결과는 앞선 시클리드 결과와 대조되는 결과로 정확한 메커니즘은 알 수 없으나, 제브라 피쉬에서의 면역활성이 4 mM과 8 mM CaO군에서 적극적으로 일어나 체내의 면역력을 향상시킨 것으로 생각된다(Fig. 3-3).

더불어 면역에 관계되는 Myeloid-specific peroxidase(MPO)의 mRNA 발현량 분석 결과 각 그룹간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 control군에

비하여 2 mM, 4 mM 및 8 mM CaO군에서 농도 의존적으로 낮아지는 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 3-4). Podok et al.(2014)의 연구에 따르면 건강한 어류에서는 MPO의 발현이 거의 일어나지 않으나 병에 감염된 병어에서는 MPO발현이 증가되는 결과를 확인할 수 있었다. 본 연구에서 사용된 제브라 피쉬 역시 건강한 어류이기 때문에 MPO의 유전자 발현이 각 그룹간에 유의적으로 차이가 나지 않은 것으로 판단되며, 이후 CaO에 사육된 제브라 피쉬를 사용해 챌린지 테스트를 진행하여 건강한 어류와 병어에서의 면역 유전자를 이용하여 CaO농도에 따른 면역력을 정밀하게 평가하여야 할 것이라고 판단된다.



IV. CaO가 첨가된 사료 공급이 해산어인 넙치에 미치는 생리적 변화에 관한 연구

1. 서론

어류는 일반적으로 사육수로부터의 칼슘 흡수에 의존하는 것으로 알려져 있으나, 사료를 통해 칼슘을 추가적으로 공급했을 때 아메리칸 시클리드 (*Cichlasoma urophthalmus*)(Chavez-Sanchez et al., 2000) 등의 어종에서 성장에 좋은 영향을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 또한, 자주복(*Takifugu rubripes*), 큰 민어(*Nibea japonica*) 및 가숭어(*Chelon haematocheilus*)와 같은 일부 어류들에서는 성장 및 성숙에 필요한 체내의 칼슘 요구량을 사육수로부터 충분히 공급을 받지 못하는 것으로 보고되어졌다(Furuichi et al., 1997; Hossain and Furuichi, 1999 ; 2000a). 한편, 해산어류 중 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*) 및 참돔(*Pagrus major*)은 해수에서 칼슘을 충분히 이용할 수 있으나, 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 및 숭어(*Mugil cephalus*) 등은 해수로부터 충분한 칼슘이 흡수되지 않기 때문에 적절한 칼슘 보충제를 이용하여 칼슘을 공급하여야 한다고 보고되고 있다(Hossain and Furuichi, 2000a; 2000b; 2009). 이처럼 칼슘의 농도가 높은 해수에 서식하는 어종에 있어서도 칼슘의 흡수 기작의 차이를 나타내며, 특히 성 성숙시기, 어린 성장시기 및 외부로부터 많은 스트레스를 받는 사육환경 하에서는 외부로부터의 칼슘 공급이 추가적으로 필요한 것으로 여겨지고 있다.

따라서 본 연구에서는 해산어의 생리활성 및 면역력 증대에 미치는 효과를 조사하기 위하여 양식넙치를 활용하여 진행하였다. 실험은 성어기 넙치와 치어기 넙치를 사용하여 진도의 양식장에서 사육 후 생리적 분석을 실시하였으며, 이후 제주도 내 양식장에서 사육한 치어기 넙치를 통한 공격실험을 실시하여 어류 병원성에 대한 질병 저항성에 관해 조사하였다.

본 실험을 위하여 패류의 패각을 고온, 고전압으로 소성하여 생산된 고농도 산화칼슘(CaO)용액을 습사료(MP)에 첨가하였으며, 현장실험을 통한 해수어 넙치의 CaO흡수 변화를 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험동물 및 사육관리

어체 내의 칼슘흡수율과 체내활성을 살펴보기 위하여 진도의 양식장에서 사육 중인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 약 1개월간, 각 실험군당 10×10 m의 수조에서 약 2,500마리씩 사육하였다. 사육기간 동안의 수온은 $20.43 \pm 1.8^\circ\text{C}$ 로 자연수온에 의존하였으며 환수는 1일 약 30회 실시되었다.

실험어는 성숙기의 평균 전장 34.1 ± 1.3 cm 및 평균 체중 410.5 ± 50 g의 넙치 성어와 평균 전장 18.83 ± 0.29 cm 및 평균 체중 70 ± 10 g의 넙치 치어를 각각 사용하였다.



2-2. 사료 제작

CaO의 제작은 폐각류를 고온(1,500-5,000℃)에서 극도로 높은 전압으로 고온소성 통전하는 방법으로 제작된 제주에코바이오텍의 제품을 사용하였다.

사료에 첨가된 CaO의 농도는 미성숙시기의 넙치를 이용한 예비 실험을 통하여 CaO를 공급시 넙치의 혈중 칼슘 농도가 50% 전후 상승하는 농도를 기준으로 설정하였으며, 칼슘섭이균에는 사료에 1,500 mg/ton의 농도가 되도록 CaO를 첨가하여 실험을 실시하였다.

본 실험에 사용된 실험어의 사육은 각각 3개의 수조로 구분하여 진행되었다.



2-3. 혈액 성분 분석

혈액분석을 실시하기 위하여 실험넙치를 0.01%의 2-phenoxy-ethanol로 마취한 뒤, 항응고제 처리를 하지 않은 3 mL 주사기를 사용하여 피부 정맥에서 혈액을 채혈하였다. 채취된 혈액은 상온에서 2시간 보관 후에, 원심분리기를 이용하여 12,000 rpm에서 10분간 혈청을 분리하였다. 이후 분리된 혈청을 사용하여 aspartate amino transferase (AST), alanine amino transferase (ALT) 및 혈액 내 칼슘 양을 측정하였다. 칼슘분석은 자동 분석기용 Ca^{2+} 측정용 시약(아산제약)을 사용하였으며, AST 와 ALT는 stanbio laboratory 에서 제조된 키트를 사용하였다. 모든 혈액성상분석은 혈액 자동 분석기(CH 100 PLUS)로 측정하였다.



2-4. Lysozyme activity 변화 분석

넙치에서 분리한 혈청, 아가미 점액 및 체표 점액을 이용하여 lysozyme activity 분석을 실시하였다. 분석방법은 II장 및 III장에서 기술한 방법과 동일한 방법으로 *micrococcus lysodeikticus* solution (0.1 M phosphate buffer saline, pH 6.8)를 이용한 흡광도 측정법으로 실시하였다.



2-5. 간 및 혈중 단백질 함량 측정

간의 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin (BSA)을 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈중 단백질 함량은 stanbio laboratory에서 제조된 키트를 사용하여 혈액 자동 분석기(CH 100 PLUS)로 측정하였다.



2-6. 비늘 외형 관찰

CaO 급이 후의 성숙시기와 성장시기 녁치의 비늘의 외형 상태를 파악하기 위하여 Zu (2004)의 실험 방법을 이용하여 채취 및 염색을 실시하였다. 채취는 핀셋으로 비늘이 상하지 않게 비늘 안쪽을 잡아 채취하였으며, 비늘 염색은 조직 염색 시에 사용되는 eosin에 약 5초간 담가두어 색을 침적시키고, 95% ethanol에서 잔여물을 제거한 뒤 슬라이드에 염색된 비늘을 올려놓고, 광학현미경을 사용하여 관찰하였다.



2-7. 간 외형 및 조직 관찰

간의 외형 평가는 Tanaka et al. (2013)의 연구에서 사용된 간의 출혈 정도를 육안으로 판단하는 실험방법에 따라 대조군과 칼슘섭이균 넘치의 간 외관 조건을 비교하기 위하여 해부를 통해 육안으로 간의 상태를 확인하였다. 조직 관찰은 어체로부터 간을 절개하여, bouin's solution에 24시간 고정한 후 수세와 탈수과정을 거쳐 파라핀에 포매 후, 박절기로 5 μ m 절편을 제작하여 hematoxylin-Eosin (H&E) 염색하였다.



2-8. 공격 실험

넙치의 면역력에 미치는 CaO의 영향을 조사하기 위해 제주도내의 양식넙치 치어를 대상으로 사료 내 CaO가 2,000 mg/ton 이 되도록 첨가하여 1개월간 사육한 후 병원균의 공격실험을 3반복 실시하였다. 사육기간 동안의 수온은 $24.68 \pm 1.3^\circ\text{C}$ 였고, 실험어의 평균 전장은 19.6 ± 1.7 cm 및 평균 체중 69 ± 17 g이었으며 각 수조당 20마리씩 수용하여 대조군, PBS (phosphate buffered saline) 투여군, *Vibrio anguillarum* (KCTC-2711) 투여군 및 *Edwardsiella tarda* (KCTC-3657) 투여군을 설정하여 CaO 공급에 따른 면역력의 차이를 관찰하였다.

실험은 일반사료만 급여한 대조군과 CaO 2,000 mg/ton의 농도로 첨가한 사료를 한달 간 급여한 칼슘섭이균 넙치를 사용하였으며, 각 그룹당 20마리로 나누어 3반복 실험을 실시하였다.

공격실험은 PBS (phosphate buffered saline)와 병원균 *V. anguillarum* (KCTC-2711) 및 *E. tarda* (KCTC-3657)를 사용하여 진행하였으며, PBS를 제외한 병원균들은 1% NaCl 첨가 tryptic soy Agar (TSA, Difco) 배지에서 25°C , 24시간 배양한 후 시험에 사용하였다. *V. anguillarum*는 1×10^3 cfu/mL, *E. tarda*는 1×10^5 cfu/mL 로 현탁하여 복강주사를 통해 공격실험을 실시하였다. 각 실험군당 20마리로 수온은 $23-25^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며 복강주사 후 14일간 살펴보며 폐사율을 측정하였다.

2-9. 통계처리

모든 분석 결과는 SPSS (Ver.21) 통계분석 프로그램을 활용하여 student's *t*-test로 분석하였으며, $P < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다. 모든 데이터 값은 평균값±표준편차(mean ± SD)로 나타내었다.



3. 결과

3-1. 혈액 성분 변화

성숙기와 미성숙기 넙치의 혈액 내 칼슘 분석 결과, 성숙기 대조군의 혈중 칼슘량은 165.9 ± 5 mg/L, 성숙기 칼슘섭이군의 혈중 칼슘량은 195.27 ± 9 mg/L 으로 대조군에 비하여 칼슘섭이군의 혈중 칼슘량이 높다($P < 0.05$, Fig. 3-1A), 미성숙기 대조군의 혈중 칼슘량은 105 ± 7 mg/L이며 미성숙기 칼슘섭이군의 혈중 칼슘량은 162.73 ± 4 mg/L으로 칼슘섭이군의 혈중칼슘량이 성숙기와 같이 높았다($P < 0.05$, Fig. 3-1B).

ALT/AST 측정은 성숙기 성어만을 대상으로 측정하였다. AST 측정결과 대조군 26.38 ± 4 U/L, 칼슘섭이군 10.88 ± 2 U/L으로 대조군보다 칼슘섭이군에서 유의적으로 낮았으며($P < 0.05$), ALT 측정결과 역시 대조군 5.63 ± 1 U/L, 칼슘섭이군 5.13 ± 1 U/L로 대조군보다 칼슘섭이군에서 더 낮게 나타났으나 유의적이 차이는 없었다(Fig. 3-2).



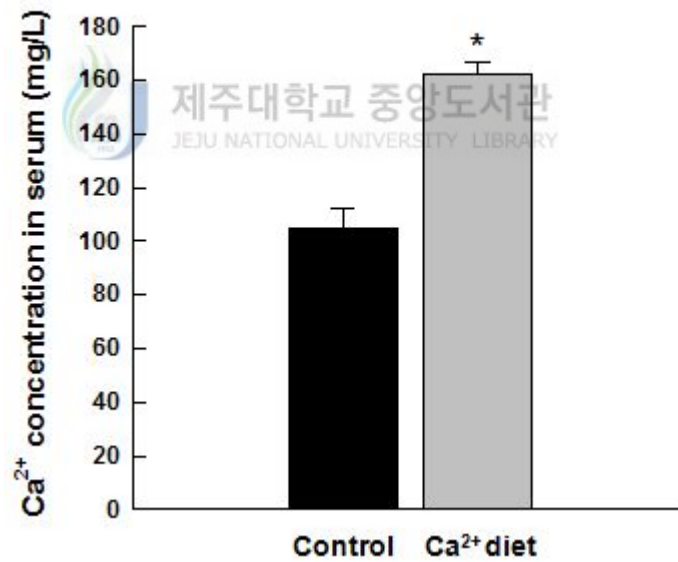
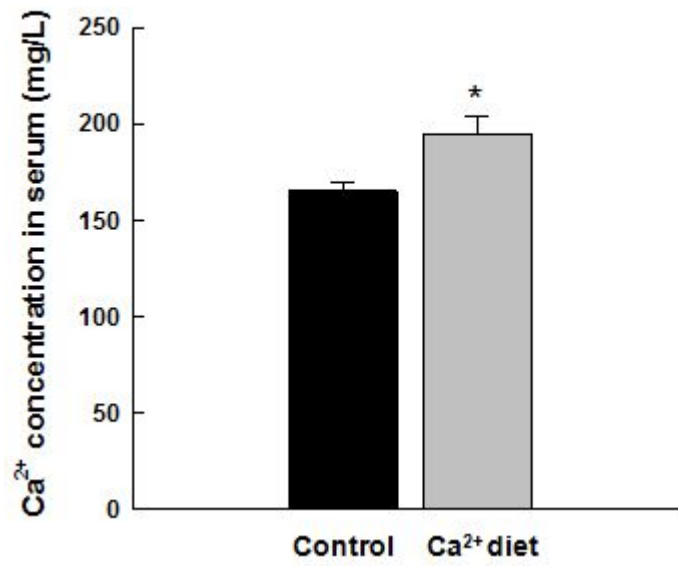


Fig. 3-1. Analysis of calcium concentration in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, (A) mature stage; (B) immature stage. *Significant difference between control group and CaO diet group based on the student's *t*-test ($P < 0.05$)

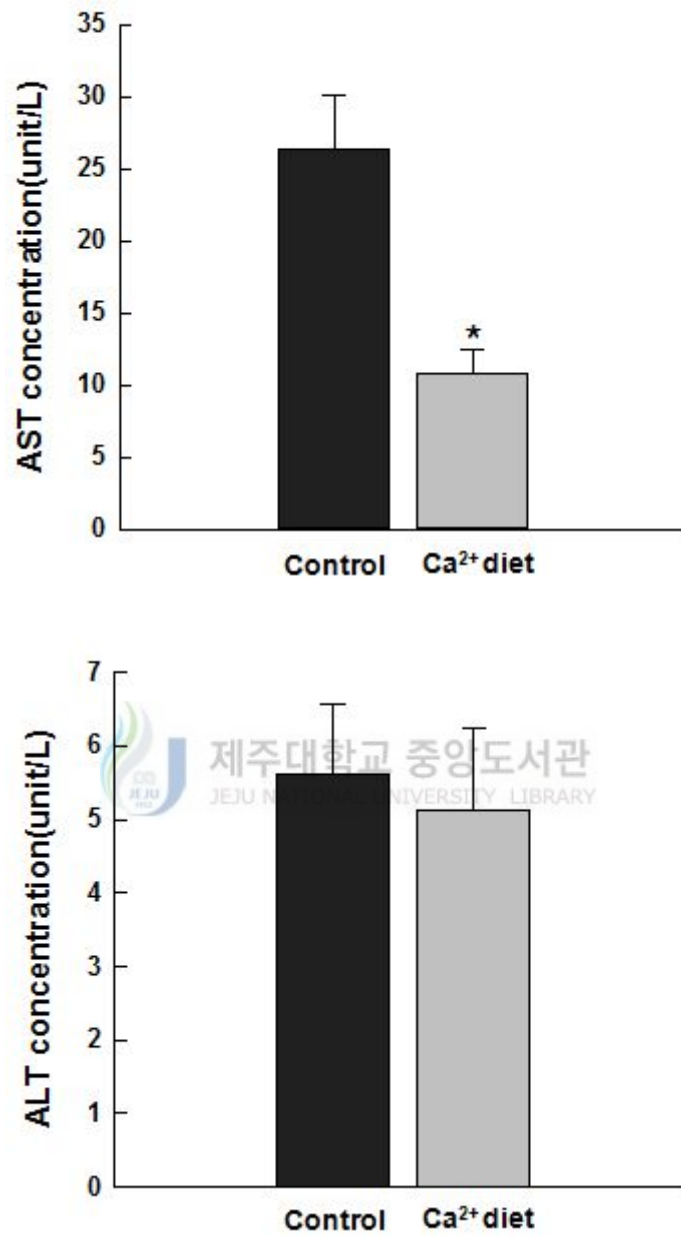


Fig. 3-2. Analysis of AST (A) and ALT (B) in serum of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Significant difference between control group and CaO diet group based on the *t*-test ($P < 0.05$)

3-2. Lysozyme activity 변화

비특이적 면역활성 중 하나인 lysozyme 활성 측정 결과 혈청의 lysozyme 활성은 대조군 10 ± 0.1 U/mL, 칼슘섭이군 50 ± 0.5 U/mL으로 높고($P < 0.05$), 체표점액 lysozyme 활성 역시 대조군 32.5 ± 2.5 U/mL, 칼슘섭이군 83 ± 2.5 U/mL로 더 높다($P < 0.05$). 또한 아가미 점액의 lysozyme 활성이 대조군 7.5 ± 0.3 U/mL, 칼슘섭이군 25 ± 0.2 U/mL 로 칼슘섭이군이 높은 활성을 가졌다($P < 0.05$)(Fig. 3-3,4).

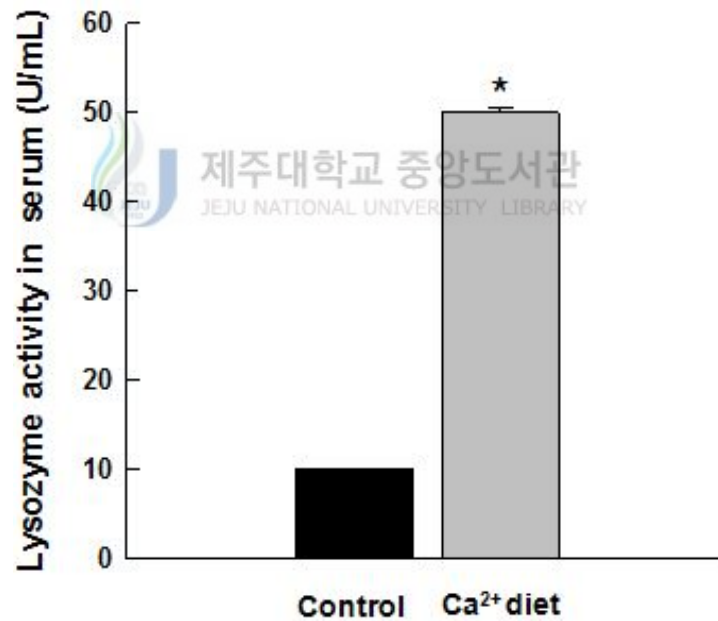


Fig. 3-3. Lysozyme activity in serum (A) of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Significant difference between control group and CaO diet group based on the *t*-test ($P < 0.05$)

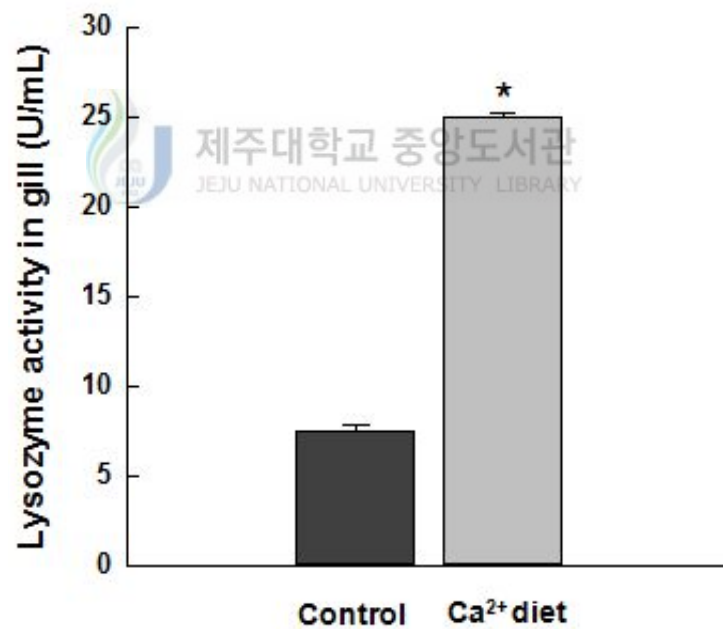
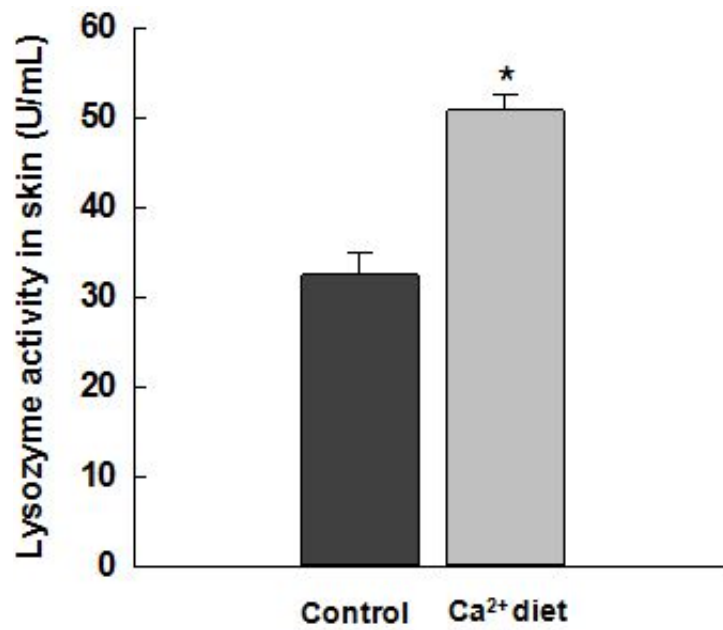


Fig. 3-4. Lysozyme activity skin (B) and gill (C) of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Significant difference between control group and CaO diet group based on the *t*-test ($P < 0.05$)

3-3. 간 및 혈중 단백질 함량

간의 단백질 함량은 대조군의 경우 41.6 ± 1 mg/mL 였고 칼슘섭이군은 45.9 ± 3 mg/mL으로 칼슘섭이구의 간 단백질 함량이 높았다($P < 0.05$).

혈액의 단백질 함량은 대조군의 경우 51.3 ± 1 mg/mL였고 칼슘섭이군은 51.8 ± 1 mg/mL으로 대조군과 칼슘섭이군이 유사하였다(Fig. 3-5).



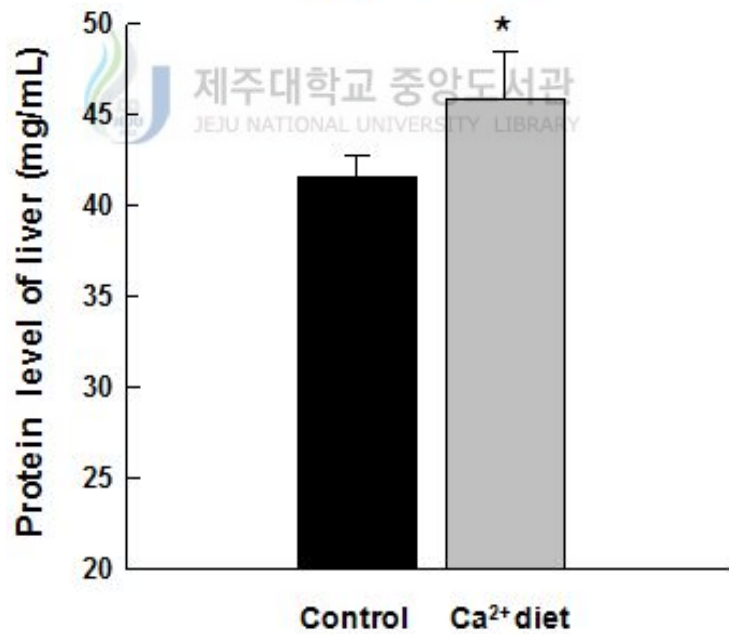
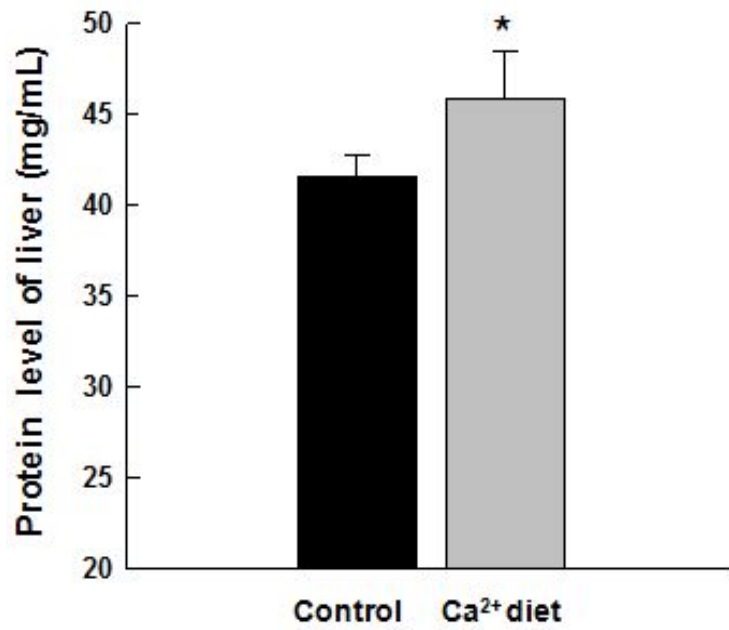


Fig. 3-5. Protein level of liver (A) and serum (B) in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Significant difference between control group and CaO diet group based on the *t*-test ($P < 0.05$)

3-4. 비늘 외형 변화 관찰 결과

미성숙기의 대조군과 칼슘섭이균 낚치의 비늘을 채취하여 염색한 결과 대조군의 비늘 끝은 요철모양으로 비늘 사이의 틈이 갈라져 있는 형태였으나(Fig. 3-6A), 칼슘섭이균의 비늘은 갈라짐 없는 일정한 형태를 나타내었다(Fig. 3-6C). 이후 성숙기의 대조군과 칼슘섭이균 낚치의 비늘 염색 결과 또한 대조군의 비늘 끝이 심하게 불균형 한 것에 비해(Fig. 3-6B) 칼슘섭이균의 비늘 끝은 일정한 형태를 나타내었다(Fig. 3-6D).

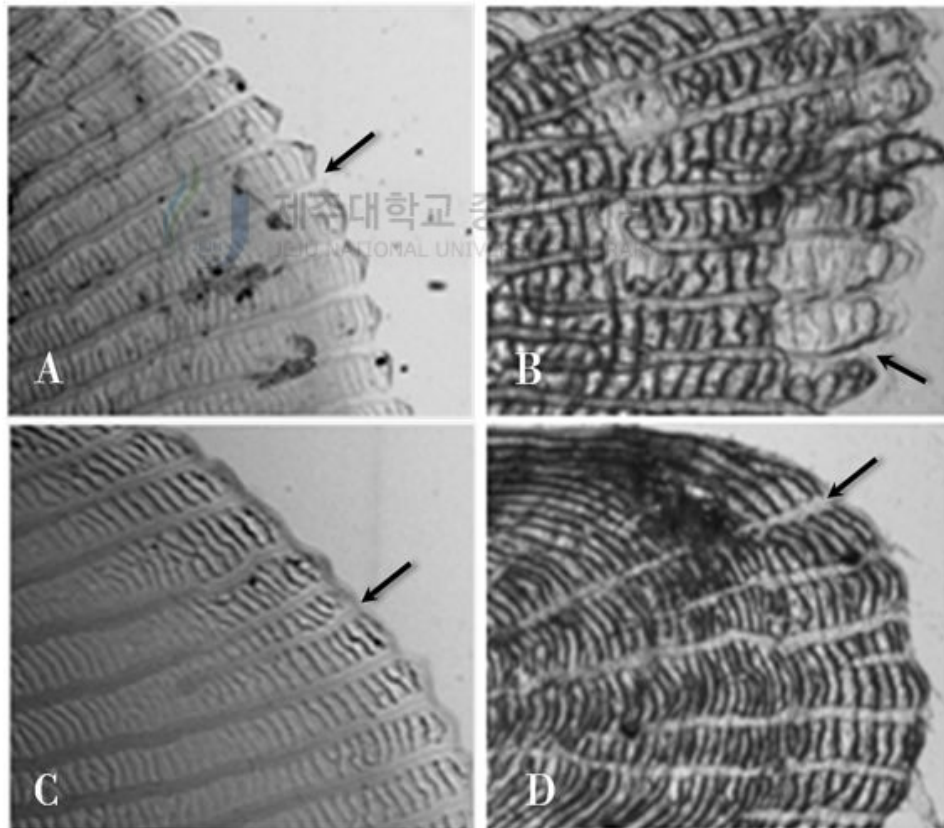


Fig. 3-6. Staining results of scales in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (A, control in immature stage; B, control in mature stage; C, calcium diet in immature stage; D, calcium diet in mature stage)

3-5. 간 외형 및 조직 관찰 결과

대조군과 칼슘섭이군 넙치의 간을 해부하여 육안으로 확인해본 결과 대조군 (Fig. 3-6A)의 간은 출혈이 일어나서 붉게 된 반면에 칼슘섭이군에서는 출혈이 관찰되지 않았다(Fig. 3-7B).

또한 조직학적 방법으로 간 조직을 확인해본 결과 칼슘섭이군의 간세포간의 조밀도가 대조군에 비해 조밀한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-7C, 3-7D).

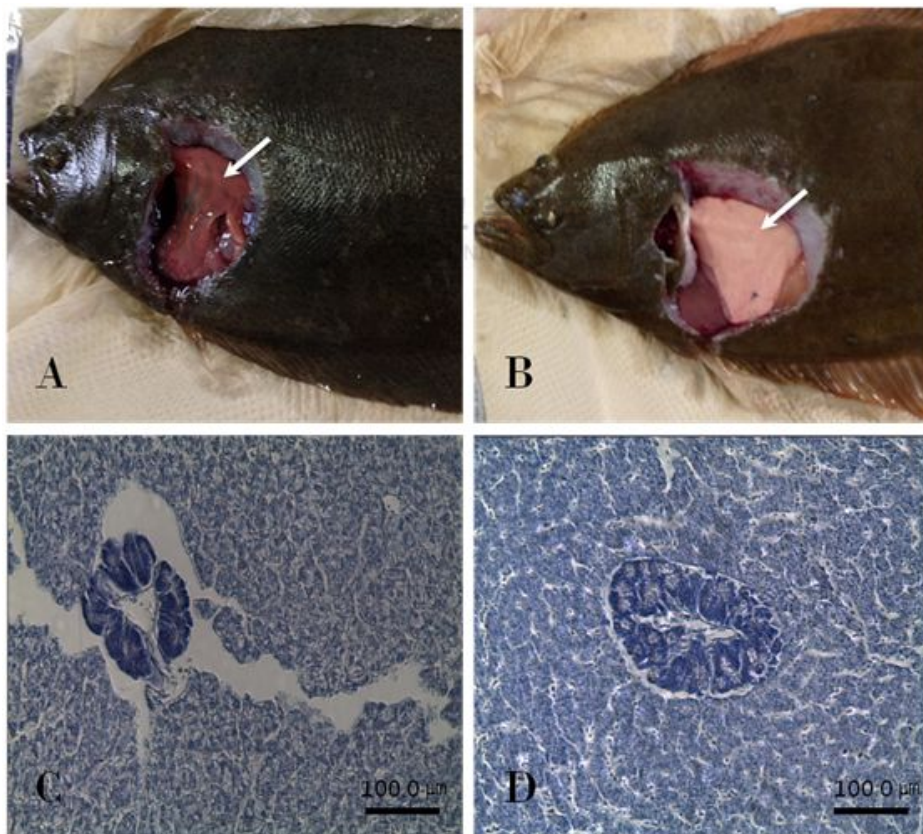


Fig. 3-7. Liver appearance and histological analysis of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (A, C, control; B, D, calcium diet)

3-6. 공격 실험 결과

PBS군의 환경변화 및 절식에 따른 폐사율을 관찰한 결과 칼슘섭이군이 대조군에 비해 폐사율이 낮았다(Fig. 3-8, A).

V. anguillarum 을 복강 주사하여 인위감염을 시킨 후 폐사율을 관찰한 결과 대조군에서는 10일째 100% 폐사하였으나 칼슘섭이군은 약 70%의 폐사에 그쳐 대조군에 비해 높은 질병 내성을 보였다(Fig. 3-9, B).

E. tarda 를 복강주사하여 인위 감염시킨 결과 대조군에서는 9일째 100% 폐사하였으나, 칼슘섭이군에서는 실험종료시점인 12일째까지도 약 50%의 생존율을 나타내어 질병에 대한 내성이 강하게 나타났다(Fig. 3-9, C).

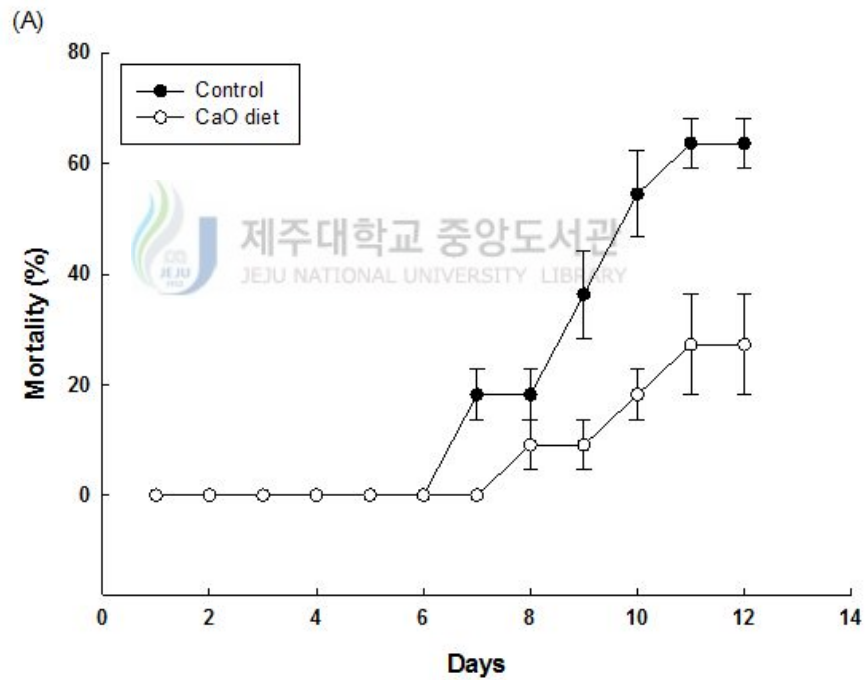


Fig. 3-8. Mortality late of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* treated of phosphate buffered saline (A). The experiments was repeated three times respectively.

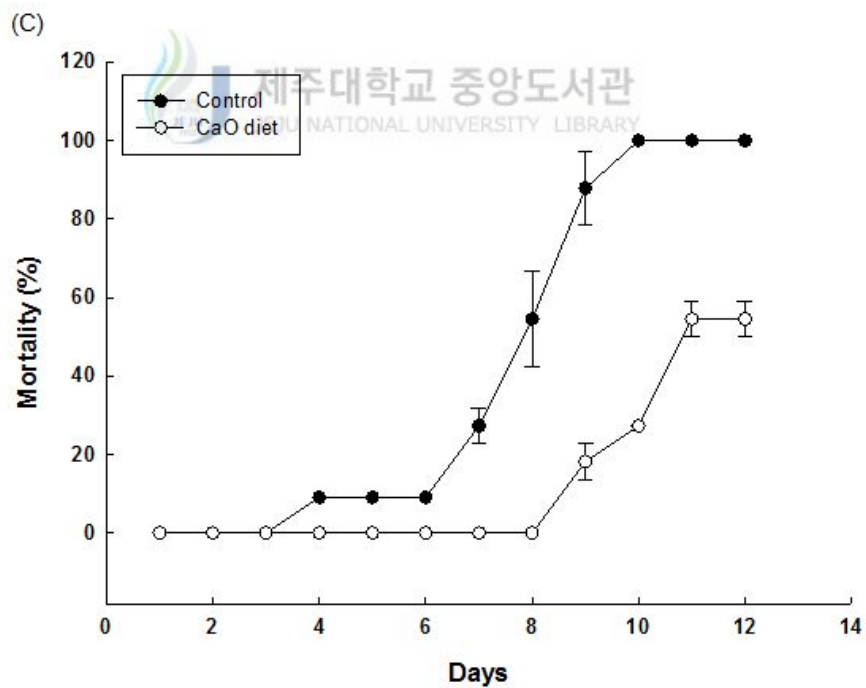
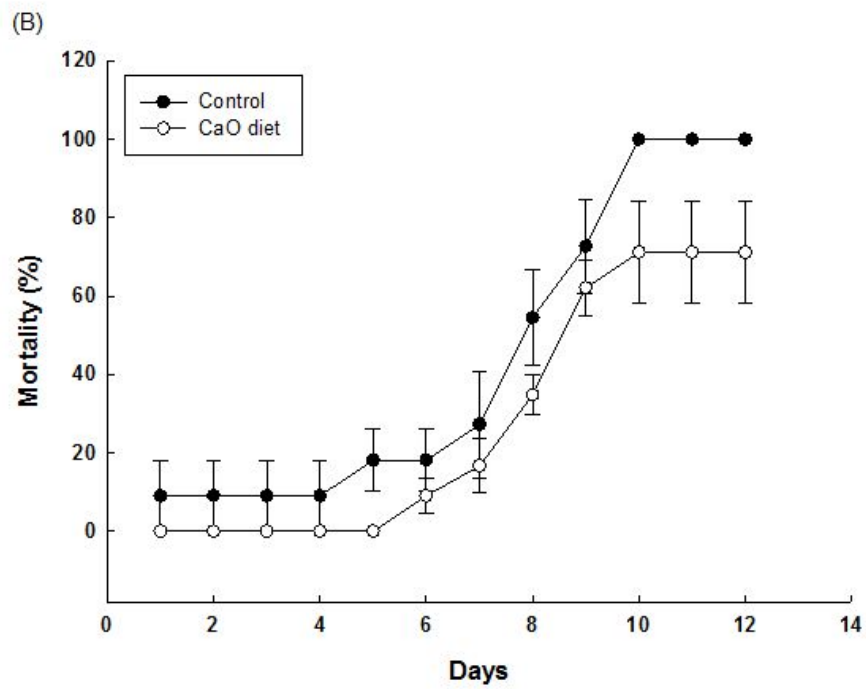


Fig. 3-9. Mortality late of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* treated of *Vibrio anguillarum* (B), *Edwardsiella tarda* (C). The experiments was repeated three times respectively.

4. 고찰

어류의 혈액은 생리상태의 변화를 파악할 수 있는 요인이며, 성숙 시기에는 혈중 칼슘 요구량이 급격히 증가하는 것으로 알려져 있다(Yeo and Mugiya, 1998; Chen et al., 2004). 본 연구에서 CaO 공급이 넙치의 혈액 내 칼슘 흡수량에 미치는 영향을 확인하기 위하여 미성숙기와 성숙기 넙치의 혈중 칼슘 농도를 측정된 결과 대조군에 비하여 칼슘섭이군의 혈중 칼슘량이 유의적으로 높았음을 확인할 수 있었으며($P<0.05$), 앞에서 언급되었던 Hossain and Furuichi (2009)의 연구결과와 유사한 결과를 나타내고 있다. 이는 넙치와 같이 해수 내에서 칼슘을 충분히 흡수하지 못하는 어종의 경우 사료 내 칼슘첨가가 어류 체내의 칼슘을 보충해 줄 수 있다는 것을 시사한다.

AST와 ALT는 간을 비롯한 체내의 장기에 존재하는 아미노산 합성 효소로서, 간과 특정 장기가 손상을 입을 시에 수치가 상승하는 것으로 알려져 있으며, 간 기능 검사시에 주로 사용되고 있다. 특히 어체의 생리상태가 좋지 않을 경우 간의 장애가 일어나 AST와 ALT의 활성이 높아져 혈중 농도가 증가하는 것으로 알려져 있다(Casilas and Ames, 1985; Gordon, 1968; Rao et al., 1990). 본 연구에서의 대조군과 칼슘섭이군의 AST, 측정 결과 대조군보다 칼슘섭이군에서 유의적으로 낮게 나타났으며($P<0.05$), ALT는 두 실험구간 유의적인 차이는 없었지만 칼슘섭이군이 낮아지는 결과를 나타내어 칼슘 섭취가 AST, ALT를 감소시켜 간 기능 개선에 효과가 있는 것으로 여겨진다.

또한 넙치의 혈청, 아가미 점액, 체표 점액의 lysozyme 측정 결과 모두 대조군에 비해 칼슘섭이군의 lysozyme 활성이 유의하게 증가했음을 확인할 수 있었다. 이는 CaO가 lysozyme을 비롯한 면역 기능 활성을 증가시켰기 때문으로 여겨지며 따라서 CaO의 급이가 넙치의 체내면역을 증가시키는 효과가 있는 것으로 판단된다.

간 외형 평가는 일반적으로 포유동물과 사람의 컨디션을 확인하기 위하여 이루어지며, 대상이 간 주변에 외상을 당하거나 질병성 또는 스트레스성 징후를 보였을 때 간 출혈이 일어나는 것으로 알려져 있다(Tanaka et al., 2013). 본 실험의 결과, 칼슘섭이군의 간 출혈이 대조구에 비해 거의 일어나지 않았

을 뿐만 아니라 간 조직 또한 조밀한 형태를 가지는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 어류가 CaO를 충분히 흡수 하였을 경우 외부스트레스에 대한 저항성을 강화시켜 스트레스성 간 출혈을 저하시켰기 때문으로 사료되며, 간 조밀도가 대조군에 비해 높게 나온 것은 면역력이 증가함에 따라 외부자극에 대한 저항성이 강해졌기 때문으로 판단된다. 간이 손상을 입을 시에 수치가 상승하는 것으로 알려진 AST와 ALT 결과 또한 본 실험에서 대조군에 비해 칼슘섭이균에서 활성이 낮게 나타나 CaO가 외부스트레스 저항성을 높여주는 것으로 판단된다.

Mugiya and Watabe (1977)는 칼슘 요구량이 높아지는 시기의 비늘에서 칼슘 방출이 이루어져 체내로 칼슘이 동원되는 것으로 보고하고 있으며, 본 실험 결과에서도 양식넙치의 사육 중 비늘로부터 칼슘의 재흡수가 이루어지는 것으로 나타났다. 이에 본 실험에서와 같이 CaO의 섭취를 인위적으로 유도할 경우 장관으로부터 충분한 칼슘이 넙치의 체내로 흡수 되어 비늘에서의 칼슘 재흡수가 이루어지지 않고 비늘의 모습이 일정한 형태를 유지하는 것으로 판단된다.

또한 CaO의 첨가에 따른 넙치의 면역활성기능을 조사하기 위하여 어류 병원성 세균인 *V. anguillarum* 과 *E. tarda*를 인위 감염시킨 실험에서 대조군의 경우 높은 폐사율을 보였지만 칼슘섭이균에서는 폐사율이 낮은 결과를 보임으로써 칼슘이 넙치의 비특이적 면역계 중 체액성 면역계를 담당하는 lysozyme과 보체의 활성에 영향을 미쳐 외부 스트레스와 병원균 저항력이 향상에도 도움을 주는 것으로 여겨진다.

V. 종합 고찰

칼슘은 어류의 면역력과 성장에 중요한 역할을 하는 물질로서 사람과 어류뿐만 아니라 식물 등 다방면에서 중요성이 대두되고 있다.

어류는 수중환경에 서식 하고 있으므로 물로부터 지속적으로 칼슘을 공급받으며 살아간다. 그러나 수중환경이라는 것은 매우 다양하기 때문에 환경에 따라 크게 담수어종 및 해수어종의 칼슘 흡수가 다양한 방법을 통해 이루어진다(Flik, 1993).

해수어의 경우 매우 고농도의 칼슘이 함유된 수중환경에 서식하고 있는 반면, 담수어는 해수어에 비하여 낮은 칼슘이 함유된 환경에 서식하고 있기 때문에 체내로 흡수할 수 있는 칼슘의 양이 해수어에 비해 좁은 범위로 한정되어 있다(Flik, 1993). 따라서 본 실험에서는 수용성 칼슘인 CaO를 이용하여 담수어의 사육수 내 칼슘 농도에 따라 체내로 흡수되는 칼슘량과 그에 따른 생리적 변화를 관찰하기 위하여 열대 담수어종인 시클리드와 제브라 피쉬를 사용하여 인공적으로 칼슘 농도를 조절하여 실험을 진행하였다. 사육수 내 칼슘 첨가 농도는 control(0 mM), 2 mM, 4 mM 및 8 mM로 진행을 하였다. 2 mM과 4 mM은 일반적으로 담수에 존재하는 칼슘 이온농도와 근접한 농도로 일반적으로 담수에 포함되어 있는 칼슘의 형태가 아닌 CaO를 사용하였기 때문에 일반적인 환경과 비교하기 위해 이와 같이 설정하였으며, 8 mM은 해수에 존재하는 칼슘농도와 근접한 농도로 담수 환경에 서식하는 어종이 해수어와 같이 고농도의 칼슘이 존재하는 환경에서 서식할 경우에 어류에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 이와 같이 설정하였다.

각각 다른 CaO농도에서 사육한 시클리드의 체내 총 칼슘량을 측정한 결과 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, 혈액 내 칼슘량 측정 결과 CaO가 첨가된 환경에서 사육된 2 mM, 4 mM, 8 mM CaO군에서 control군과 비교하여 유의적인 차이를 나타내었다($P < 0.05$). 또한 제브라 피쉬의 체내 총 칼슘량 측정결과, 모두 control군에 비하여 유의적인 차이를 나타냈으며, 특히 2 mM군과 8 mM군에서 유의적으로 증가하는 결과를 확인할 수 있었다($P < 0.05$). 4 mM군의 경우 control군 보다 유의적으로 낮아지는 결과를 나타내었는데, 이러한 결과는 시클리드

리드의 경우와는 대조되지만 본 실험의 제브라 피쉬를 이용한 예비실험과 동일한 결과로 예비실험 역시 4 mM군에서 급격하게 낮아졌다가 8 mM군에서 다시 올라가는 결과가 나타났으며 이에 따른 정확한 메커니즘은 알 수 없으나 칼슘 흡수에 있어서도 종간의 차이가 발생하는 것으로 사료된다. 또한 본 실험에서 사용한 시클리드와 같은 과에 속하는 어종인 틸라피아(*Oreochromis mossambicus*)의 경우에도 장을 통한 칼슘 흡수에 있어서 종간의 차이가 있는 것으로 알려졌다(Schoenmakers et al., 1993).

반면 해수어의 경우 매우 고농도의 칼슘이 함유된 수중환경에 서식하고 있으므로 주로 물에서 아가미를 통하여 칼슘을 흡수하며, 장을 통한 흡수에 관한 연구는 거의 진행되지 않았으나 대서양 대구(*Gadus morhua*)의 경우 체내 전체 칼슘 흡수량의 약 30%가 장을 통해 흡수되어지며, 남부에 서식하는 넙치(*Paralichthys lethostigma*)의 경우 장을 통한 흡수량이 약 70%가 되는 것으로 알려져 있다(Björnsson and Nilsson, 1985; Sundell and Björnsson, 1988). 따라서 해수어 넙치를 이용하여 CaO가 첨가된 사료 급이가 어체 내에 미치는 생리적 변화를 관찰하기 위하여 진행되었다. 그 결과 성숙기 및 치어기의 넙치 모두 control군에 비하여 칼슘섭이군의 혈중 칼슘량의 농도가 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다($P < 0.05$). 어류는 성성숙기와 같은 특정 조건에서 장을 통한 칼슘 흡수가 활성화된다고 알려졌다(Berg, 1968; Ichii and Mugiya, 1983). 본 연구에서 칼슘 요구량이 증가하는 성성숙기의 어류와 치어기 넙치의 사료 내 칼슘첨가가 혈액 내의 칼슘농도를 증가시키고, CaO군의 비늘에서의 칼슘 재흡수가 일어나지 않은 결과들을 보아 사료 내의 CaO 첨가가 넙치의 체내 칼슘 흡수에 용이하게 작용하였기 때문에 이와 같은 결과가 나온 것으로 판단된다.

비특이적 면역활성 중 하나인 lysozyme은 자연계에 넓게 분포하는 효소로서, peptidoglycan이 주성분인 세균의 세포벽 성분을 분해하는 작용을 가지고 있으며, 이외에도 보체의 옵소닌화, 항바이러스, 항암작용 등에도 관여를 하는 것으로 보고 되었다(Jolles and Jolles, 1984). Lysozyme은 어류의 점액, 림프조직, 혈장 및 기타 체액에 존재하는데(Hikima, 2001), 어류의 피부 표면과 아가미에 주로 존재하는 점액 lysozyme은 세균 침입에 대한 초기방어역할을 수행한다고 알

려져 있으며, 성별, 수온, pH, 독성물질 노출, 감염 및 스트레스 정도에 따라 lysozyme 활성이 다양하게 나타난다(Saurabh and Sahoo, 2007).

동물에서 lysozyme은 c-type (chicken or conventional type), g-type (goose-type) 그리고 i-type (invertebrate type)으로 세 종류의 lysozyme이 존재하는데, 그 중 어류에는 c-type과 g-type의 lysozyme이 존재한다(Hikima, 2000). 이 c-type과 g-type lysozyme은 그람 양성균 및 음성균에 항균효과가 있는 것으로 알려졌으며(Itami et al., 1992; Yousif et al., 1994; Hikima et al., 2001; Minagawa et al., 2001; Zheng et al., 2007), 특히 c-type lysozyme은 calcium-binding lysozyme으로 불리며 칼슘과 결합하는 특징이 있다(Wang, 2008). 따라서 칼슘이 선천면역인 lysozyme 활성화에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 판단되어 본 실험에서 lysozyme 활성 측정을 통한 면역력을 평가하였다. 그 결과 담수어 시클리드와 제브라 피쉬 및 해수어 넙치의 라이소자임 활성 모두 control군에 비하여 유의적인 차이를 나타내었으며($P < 0.05$), 담수어 시클리드의 경우 스트레스 관련 호르몬인 cortisol의 변화와 해수어 넙치의 경우 병원균을 이용한 공격실험과 같은 모든 상기의 결과를 미루어보아 산란기나 초기성장기 같이 많은 양의 칼슘을 필요로 하는 시기에 CaO 형태의 칼슘을 사료나 사육수의 형태로 공급 및 적용한다면 어류가 필요로 하는 정도의 칼슘을 충분히 보충할 수 있고 이로 인해 면역력을 적절하게 유지 또는 상승시켜줌으로써 외부 스트레스나 병원균 저항성을 높여줄 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 요약

본 연구에서는 어류에게 CaO를 공급 시 나타나는 생리적 변화를 확인하기 위하여 담수어와 해수어로 구분하여 실험을 진행하였다.

먼저 담수어인 시클리드를 이용하여 사육수 내에 CaO첨가 농도를 control(0 mM), 2 mM, 4 mM, 8 mM로 나누어 각각 사육 한 뒤, 체내 총 칼슘량 및 혈액 내 칼슘량을 각각 측정한 결과 어체 내 총 칼슘량에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 control군에 비하여 농도 의존적으로 증가하는 결과를 확인할 수 있었으며, 혈액 내 칼슘량 결과에서는 control군에 비해 모든 CaO처리군에서 유의적으로 칼슘 농도가 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해 혈액 내 코르티솔 함량 측정 결과 8 mM군에서 control군과 유의적으로 낮은 수치를 나타내었으며, 혈액 내 라이소자임 활성 측정 결과 역시 8 mM군에서 control군과 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다.

이후 시클리드와 동일한 방법으로 사육한 담수어인 제브라 피쉬를 이용하여 유전적 분석을 실시하였다. ICP-MS 분석법을 통한 어체 내 총 칼슘량 측정 결과 control군과 비교하여 모든 그룹에서 유의적 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 이후 성장 호르몬 수용체인 GHRA mRNA 발현량 결과 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 CaO군에서 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 면역 관련 유전자인 lysozyme 분석 결과에서는 4 mM군과 8 mM CaO군에서 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, MPO의 결과에서는 각 그룹 간에 유의적인 차이가 발견되지 않았다.

해수어를 이용한 실험은 제주도 내에서 가장 양식이 많이 이루어지는 어종 중 하나인 넙치를 사용하여 현장실험으로 진행하였다. 그러나 해수 수중에는 이미 고농도로 칼슘이 존재하기 때문에 사육수를 통한 인위적인 조절 대신 사료 내에 칼슘을 첨가하여 급이하는 방법으로 실험을 진행하였다. 그 결과 혈액 내 칼슘량이 control군에 비하여 칼슘섭이군에서 유의적으로 증가하였으며, AST 측정 결과 control군보다 칼슘섭이군에서 유의적으로 낮게 나타났으며, ALT는 두 실험구간 유의적인 차이는 없었다. 넙치의 혈청, 아가미 점액, 체표 점액의 lysozyme 측정 결과 모두 control군에 비해 칼슘섭이군의 lysozyme 활성이 유

의하게 증가했음을 확인할 수 있었다. 또한 칼슘섭이균의 간 출혈이 control군에 비해 거의 일어나지 않았으며, 간 조직 또한 조밀한 것으로 관찰되었다. 또한 성장기 및 성숙기 넙치의 비늘을 염색하여 관찰한 결과 control군에서 비해 칼슘섭이균에서의 비늘이 일정한 형태를 유지하는 것을 관찰할 수 있었다. 이후 어류 병원성 세균인 *V. anguillarum* 과 *E. tarda*를 인위 감염시킨 챌린지 테스트 결과 칼슘섭이균에 비해 control군에서 높은 폐사율을 나타내었다.

따라서 CaO를 사료 또는 환경수에 공급 시 양식어류의 면역향상을 기대해볼 수 있으며, 성숙기 또는 성장기의 어류의 추가적인 CaO의 공급은 체내의 부족한 칼슘을 보충해줄 수 있을 것이라고 사료되며 이후 본 연구를 바탕으로 CaO를 적용했을 시에 칼슘의 조절과 생리적 반응에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.



VII. 참고 문헌

Berg A. 1968. Studies on the metabolism of calcium and strontium in freshwater fish. Relative contribution of direct and intestinal absorption. Mem. Ist. Ital. Idrobiol. Dotto Marco de Marchii 23, 161-169.

Casillas E and Ames W. 1985. Serum chemistry of diseased English sole *Parophrys vetulus* Girard, from polluted areas of Puget Sound, Washington. J Fish Dis 8, 437-449.

Carragher JF and Sumpter JP. 1991. The mobilization of calcium from calcified tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced to synthesize vitellogenin. Comp Biochem Physiol A Physiol 99, 169-172.

Cleveland P and Hickman Jr. 1968. Glomerular filtration and urine flow in the euryhaline outhern flounder *Paralichthys lethostigma*, in seawater. Can J Zool 46, 427-437.

Chavez-Sanchez C, Martinez-Palacios CA, Martinez-Perez G and Ross LG. 2000. Phosphorus and calcium requirements in the diet of the American cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther). Aquac Nutr 6, 1-9.

Chen CY, Wooster GA and Bowser PR. 2004. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *streptococcus iniae* or exposed to carbontetra chloride, gentamicin, or coppersulfate. Aquaculture 239, 421-443.

Flik G, Fenwick JC, Kolar Z, Mayer-Gostan N and Wendelaar Bonga SE. 1986. Effects of low ambient calcium levels on Ca²⁺ flux rates and

internal calcium pools in the freshwater cichlid teleost *Oreochromis mossambicus*. J Exp Biol 120, 249-264.

Flik G and Verbost PM. 1993a. Calcium transport in fish gills and intestine. J Exp Biol 184, 17-29.

Flik, G, Velden JAV, Dechering KJ, Verbost PM, Schoenmakers TJM, Kolar ZI and Wendelaar Bonga SE. 1993b. Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: a review. J. Exp. Zool. 265, 356-365.

Flik G, Klaren PH, Schoenmakers T.J, Bijvelds MJ, Verbost PM. Wendelaar Bonga S.E. 1996. Cellular calcium transport in fish: unique and universal mechanisms. Physiol Zool 69, 403-417.

Furuichi M, Furusho Y, Hossain MA, Matsui S and Azuma R. 1997. Essentiality of Ca supplement to white fish meal diet for tiger puffer. J Fac Agr Kyushu Univ 42, 69-76.

Gordon RB. 1968. Distribution of transaminases (*Aminotransferases*) in the tissue of the Pacific salmon (*Oncorhynchus*) with emphasis on the properties and diagnostic use of glutamic oxaloacetic transaminase. J Fish Res Bd Can 25, 1247-1268.

Herberger AL and Loretz CA. 2013. Morpholino oligonucleotide knockdown of the extracellular calcium-sensing receptor impairs early skeletal development in zebrafish. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 166, 470-481.

Herrmann-Erlee MPM and Flik G. 1989. Bone: Comparative studies on endocrine involvement in bone metabolism. In: Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications. Academic Press, New York, U.S.A., 211-243.

Hickman CP, JR. 1968. Ingestion, intestinal absorption and elimination of seawater and salts in the southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. Can. J. Zool. 46, 457-466

Hikima J, Hirono I and Aoki T. 2000. Molecular cloning and novel repeated sequences of a c-type lysozyme gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Marine Biotechnology 2, 241-247.

Hikima J, Minagawa S, Hirono I and Aoki T. 2001. Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein. Biochim Biophys Acta 1520, 35-44.

Hossain MA and Furuichi M. 1999. Dietary Calcium Requirement of Giant Croaker *Nibea japonica*. J Fac Agr Kyushu Univ 44, 99-104.

Hossain MA and Furuichi M. 2000a. Essentiality of dietary calcium supplement in redlip mullet *Liza haematocheila*. Aquac Nutr 6, 33-38.

Hossain MA and Furuichi M. 2000b. Necessity of calcium supplement to the diet of Japanese flounder. Fish Sci 66, 660-664.

Hossain MA and Furuichi M. 2009. Absorption of calcium from seawater by marine fishes in relation to dietary calcium. J Asiatic Soc

Bangladesh Sci 35, 9-18.

Hossain MA and Yoshimatsu T. 2014. Dietary calcium requirement in fishes. Aquac Nutr 20, 1-11.

Tanaka H, Shibano K, Monji Y, Kuwayama T and Iwata H. 2013. Liver Condition Affects Bovine Oocyte Qualities by Changing the Characteristics of Follicular Fluid and Plasma. Reprod Dom Anim. 48, 619-626.

Ichii T and Mugiya Y. 1983. Effects of a dietary deficiency in calcium on growth and calcium uptake from the aquatic environment in the goldfish, *Carassius auratus*. Comp. Biochem. Physiol. 74A, 259-262.

Itami T, Takehara A, Nagano Y, Suetsuna K, Mitsutani A, Takesue K and Takahashi Y. 1992. Purification and characterization from Ayu skin mucus. Nippon Suisan Gakkaishi. 58, 1937-1944.

John FC and John PS. 1991. The mobilization of calcium from calcified tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced to synthesize vitellogenin. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 99, 169-172.

Jolles P and Jolles J. 1984. What's new in lysozyme research?. Mol Cell Biochem 63, 165-189.

Kettle AJ, Gedye CA, Winterbourn and CC. 1993. Superoxide is an antagonist of anti-inflammatory drugs that inhibit hypochlorous acid production by myeloperoxidase. Biochem Pharmacol. 45, 2003e10.


Lowry OH, Rosenbrought NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J Biol Chem 193, 265-275.

Minagawa S, Hikima J, Hirono I, Aoki T and Mori H. 2001. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells. *Dev Comp Immunol* 25, 439-445.

Mugiya Y and Watabe N. 1977. Studies on fish scale formation and resorption—II. Effect of estradiol on calcium homeostasis and skeletal tissue resorption in the goldfish, *Carassius auratus* and the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 57, 197-202.

Parry G. 1966. Osmotic adaptation in fishes. *Biol. Rev* 41, 392-440.

Paterson CR. 1978. Calcium requirements in man: a critical review. *Postgrad Med J* 54, 244-248.

 제주대학교 중앙도서관
Persson P, Sundell K and Björnsson BT. 1994. Estradiol-17induced calcium uptake and resorption in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem* 13, 379-386.

Persson P, Takagi Y and Björnsson BT. 1995. Tartrate resistant acid phosphatase as a marker for scale resorption in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effects of estradiol-17treatment and refeeding. *Fish Physiol Biochem* 14, 329-339.

Persson P, Johannsson SH, Takagi Y and Björnsson BT. 1997. Estradiol-17and nutritional status affect calcium balance, scale and bone resorption, and bone formation in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Comp Physiol B* 167, 468-473.

Pickering AD. 1998. Stress responses of farmed fish. In: Black KD, Pickering AD. editors. Biology of farmed fish. Sheffield: Sheffield Academic Press, 222-243.

Podok P, Wang H, Xu L and Lu. 2014. Characterization of myeloid-specific peroxidase, keratin 8, and dual specificity phosphatase 1 as innate immune genes involved in the resistance of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) to Cyprinid herpesvirus 2 infection. Fish Shellfish Immunol. 41, 531-540.

Rao PP, Joseph KV and Rao KJ. 1990. Histopathological and biochemical change in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. J Nat Conserv 2, 33-137.

Renfro JL, Dickman KG and Miller DS. 1982. Effect of Na⁺ and ATP on peritubular Ca transport by the marine teleost renal tubule. Am J physiol. 243, 34-41.

Saurabh S and Sahoo PK. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquac Res 39, 223-239.

Schmidt-Nielsen B and Renfro JL. 1975. Kidney function of the American eel *Anguilla rostrata*. AM J physiol 228, 420-431.

Schoenmakers TH J M, Verbost PM, Flik G and Wendelaar bonga, SE. 1993. Transcellular intestinal calcium transport in freshwater and seawater fish and its dependence on sodium/calcium exchange. J. exp. Biol. 176, 195-206

Subcommittee on Fish Nutrition, National Research Council. 1993. Nutrient

Requirements of Fish. Academy Press, Washington, D.C., U.S.A.

Sundell K and Björnsson BT. 1988. Kinetics of calcium fluxes across the intestinal mucosa of the marine teleost, *Gadus morhua*, measured using an in vitro perfusion method. J Exp Biol 140, 171-186.

Yeo IK and Mugiya Y. 1998. Effects of calcium agonists on vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Sci. 64, 443-447.

Yousif AN, Albright LJ and Evelyn TPT. 1994. In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. Dis Aquat Org. 19, 15-19.

Zheng W, Tian C and Chen X. 2007. Molecular characterization of goose-type lysozyme homologue of large yellow croaker and its involvement in immune response induced by trivalent bacterial vaccine as an acute-phase protein. Immunol Lett 113, 107-116.

Zu MJ. 2004. Comparison of Morphological and Nutrient Composition of Scale Between Cultured and Wild and Released Black Sea Bream, *Acanthopagrus schlegeli*. Yosu National University, Yosu, Korea.

VIII. 감사의 글

즐겁고 기쁜 일도 많고 우여곡절도 많았던 저의 석사 생활을 비로소 마치며 지나온 시간들을 되돌아봅니다. 가장 먼저 늘 제가 용기를 잃지 않도록 격려해 주시고 응원해주시는 저희 여인규 교수님께 큰 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 짧다 하면 짧을 수 있고, 길다 하면 길 수 있는 2년이라는 시간동안 교수님께 정말 많은 가르침을 받았고 덕분에 무사히 석사 학위를 마칠 수 있게 되었습니다. 정말 감사합니다. 교수님의 애정 어린 지도 덕에 저는 연구자의 자세 뿐 아니라 삶의 자세에 대한 깊은 깨우침과 방향을 알 수 있었습니다. 교수님께 감사의 말씀을 드리자면 정말 끝도 없을 것 같습니다. 앞으로도 더욱 열심히 하는 모습으로 교수님의 은혜에 보답하도록 하겠습니다. 더불어 저의 논문 심사를 정성껏 도와주신 이영돈 교수님과 이승헌 교수님께도 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 교수님들의 진심어린 조언과 격려가 너무나도 큰 힘이 되었습니다. 그리고 저에게 많은 가르침을 주신 해양생명과학과의 모든 교수님들께도 감사드립니다. 이외에도 누구보다 나와 많은 시간을 함께 보내는 우리 진이 언니, 항상 열심히 도와주고 응원해줘서 너무 고맙고 앞으로도 열심히 하며 서로 더욱 발전해 나갔으면 좋겠습니다. 그리고 지금은 미국에서 공부중이지만 늘 열심히 도와주던 고마운 우리 형재, 힘 하면 절대 빼놓을 수 없고 사소한 것까지 세심하게 잘 챙겨주는 든든한 우리 천만이, 들어온 지는 얼마 안됐지만 누구보다 열심히 하고 부지런한 우리 착한 혜림이, 가재에 대한 사랑이 각별하고 알면 알수록 너무 재미있는 우리 가재아빠 현석이 모두 늦은 시간 마다하지 않고 언제나 열심히 도와줘서 너무나도 감사드립니다. 그리고 이번에 저와 함께 졸업하는 박사 민석이 오빠, 그 동안 너무 수고 많으셨고 박사 학위 취득을 진심으로 축하드립니다. 또 우리 해양동물생리학 실험실 졸업 선배님들, 늘 좋은 말씀 많이 해주시고 응원해주셔서 정말 감사드립니다. 이외에도 나와 함께 졸업하는 우리 동기들 원보오빠, 은성오빠, 현수오빠, 서영이, 경미, 민선이, 지운이 졸업 축하하고 다함께 졸업할 수 있게 되어서 너무 기쁩니다. 더불어 연구에 많은 도움을 주신 해양생명과학과의 모든 실험실 선배님들과 후배님들에게 깊은 감사의 말씀을 올립니다. 마지막으로 언제나 날 믿어주고 응원해주

는 제가 너무 사랑하는 우리 가족들 아빠, 엄마, 성혁이, 찡이. 정말 너무 고맙고 사랑합니다. 그리고 제가 사랑하는 우리 외할머니, 외할아버지와 지금은 하늘에 계시는 사랑하는 우리 할머니와 할아버지께도 감사의 말씀을 올리고 싶습니다. 모두가 있어 제가 이 자리에 서게 된 것 같아 정말 너무 기쁘고 감사드립니다. 앞으로도 더욱 열심히 하는 제가 되겠습니다. 사랑합니다.

