

유기주석화합물이 해산 어류의 간장 MFO 효소계에 미치는 영향

전중균* · 이미희 · 이지선 · 심원준¹ · 이수형¹ · 허형택²

강릉대학교 해양생명공학부 · 동해안해양생물자원연구센터 (EMBRC),

¹한국해양연구원 해양환경기후연구본부

²한국해양연구원 해양생물자원연구센터 · 서울해양과학연구소 (SIOS)

Effects of Tributyltin *in vitro* on Hepatic Monooxygenase System in Marine Fishes

Joong-Kyun Jeon*, Mee-Hee Lee, Ji-Seon Lee, Won-Joon Shim¹,
Soo-Hyung Lee¹ and Hyung-Tack Huh²

EMBRC, Kangnung Nat'l University, Gangneung 210-702, Korea

¹Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan 425-170, Korea

²Seoul Institute of Ocean Science, Seoul 137-060, Korea

Abstract - Effects of tributyltin chloride (TBTC) *in vitro* on mixed function oxygenase (MFO) system on liver microsome of eight marine fish species were investigated. To determine the effects on MFO system, cytochrome P450 (CYP) and cytochrome b5 contents, activities of two reductases (NADH-cytochrome b5 reductase and NADPH-cytochrome P450 reductase) and four dealkylation enzymes (EROD, PROD, MROD and ECOD) were measured in fish microsoms exposed to TBTC for 20 min. The CYP content was reduced to 10% of the control group in 6 out of 8 species exposed to TBTC, whereas there was no significant change in the cytochrome b5 content. The response of NAD(P)H dependant reductases depended on fish species. The dealkylation enzyme activities in microsome were also apparently inhibited by TBTC. The degree of inhibition was different among fish species and four enzymes. The EROD activities in eight species were decreased to the range of 1~65% of control group.

Key words : MFO, Cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase, NADH-cytochrome b5 reductase, fish, EROD

서 론

간장은 척추동물에서 해독에 관여하는 가장 중요한 기관으로 오염물질이 생물에 미치는 영향을 파악하는데 중요한 역할을 한다. 어류에서 간장은 지질함량이 가

장 높은 부위로 유기오염물질이 가장 많이 축적되므로 유기오염물질에 의해 손상을 입거나 해독효소의 활성이 교란될 위험성도 가장 크다. 더욱이 이런 변화는 독물질의 생체내 축적이나 제거율(clearance)에도 영향을 미치므로, 오염물질에 의한 해독시스템의 불활성화는 다른 물질의 해독 능력을 떨어뜨려 오염물질에 대한 영향을 크게 할 수 있다(Kime 1998).

외인성 유해물질(xenobiotics)을 해독하는 간장 중의

* Corresponding author: Joong-Kyun Jeon, Tel. 033-640-2412, Fax. 033-647-2410, E-mail. jkjeon@kangnung.ac.kr

효소계는 본래 체내에 존재하면서 여러 화학물질을 합성하거나 불활성(deactivation) 시키는데 이용되는 효소이다(Gibson and Skett 1994). 예를 들어 cytochrome P450(CYP)과 그 관련효소들은 스테로이드 호르몬의 대사에 관여하는 효소로서 이들이 오염물질을 해독하는데 집중적으로 이용되면 호르몬의 대사에 영향을 미쳐 번식 생리나 내분비계에서 이상을 일으킬 수 있다(Crane et al. 2000).

유기주석화합물(organotin compounds, OTC)은 한 개 이상의 주석-탄소결합을 가지며, 분자식은 R_nSnX_{4-n} 로 나타내는 유기금속류로서 R은 탄화수소기, X는 음이온종이며 n은 1~4의 범위를 갖는다. 그 중에서 TBTC(tributyltin chloride)는 독성이 강하여(WHO 1980; Boyer 1989) 농약이나 방오페인트에 살생물제(biocide)로 광범위하게 쓰여왔다. 그래서 대부분의 국가에서는 TBTC의 사용을 1990년대부터 제한하고는 있지만 그 이후에도 수계에서는 여전히 검출되고 있고(Fent 1996), 심지어는 직업성 중독사례마저 보고된 바 있다(Colosio et al. 1991; Lin and Hsueh 1993). 특히 TBT는 해양생물의 MFO 활성화에도 영향을 주는 것으로 보고되고 있으며(Fent and Bucheli 1994), 고동류에서 임포섹스를 유발하여 내분비계장애물질의 일종으로 분류되고 있다(Shim et al. 2000). 이렇듯 세계 여러 나라에서는 생물독성이 강하여 사용이 제한되거나 금지된 유기주석화합물이지만 우리나라에서는 아직 사용제한이 충분하게 이루어지지 않고 있는데다가 해양생물에 미치는 영향에 관한 연구도 미흡한 실정이다(탁과 김 1999, 2001; Shim 2000).

따라서 본 연구에서는 강릉 인근해역에서 어획되는 8종의 어류를 대상으로 하여 OTC에 노출되었을 적의 영향을 조사하고자 각 어류의 간장 마이크로솜을 TBTC와 *in vitro*로 배양하여 MFO 효소계의 반응을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 대상 어류 및 노출 시약

실험에는 강릉시 강문의 수산센터에서 입수한 자연산 개복치(*Mola mola*), 송어(*Mugil cephalus*), 강도다리(*Platichthys stellatus*), 청어(*Clupea pallasii*), 붕장어(*Astroconger myriaster*)와 양식산 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)과 참돔(*Pagrus major*), 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 사용하였다. 노출시약으로는 TBTC(tributyltin chloride; 96%, Aldrich)를 사용하였으며, 마이크로솜 제작에 쓰이는 각종 시약과 효소 측정에는 Sigma사의 특급

시약을 사용하였다.

2. 마이크로솜의 제작

살아있는 어류에서 떼어낸 간장은 바로 빙장한 1.15% KCl 용액에 담구어 혈액을 제거하고 액체질소에 넣어 연구실로 운반하였다. 간장을 얼음 위에서 가위로 약간 세절하고 인산완충액(0.1 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 -20% glycerol, pH 7.4)과 함께 Potter-Elvehjem형의 teflon축-glass homogenizer에 넣어 균질화 하고 원심분리(8,000 × g, 20 min., 4°C)를 하여 상등액을 모아 다시 초원심분리(100,000 × g, 120 min., 4°C)를 하여 원심관 하부에 가라앉은 pellet을 상기한 인산완충액으로 재현탁하여 마이크로솜을 만들었다. 각 어류의 마이크로솜은 여러 개의 microtube에 소량씩 분주하여 -150°C의 초저온냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. TBTC와의 *in vitro* 배양

각 어류의 간장 마이크로솜에 메탄올이나 DMSO(dimethylsulfoxide)로 희석한 2 mM 농도의 TBTC를 첨가한 다음 30°C의 수조에서 20분간 배양하였다. CYP를 비롯하여 cytochrome b5, NAD(P)H-cytochrome c 환원효소의 측정에는 TBTC를 메탄올로 녹여 첨가하였고, 탈알킬화 효소인 EROD(7-ethoxyresorufin-O-deethylase), PROD(7-penthoxyresorufin-O-deethylase), MROD(7-methoxyresorufin-O-deethylase) 및 ECOD(7-ethoxycoumarin-O-deethylase)의 측정에는 반응을 저해하는 메탄올 대신 DMSO에 TBTC를 녹여 첨가하였다. 대조구는 마이크로솜에 용매(2% 메탄올이나 DMSO)만을 넣어 배양하였다.

4. MFO 효소계의 측정

모든 어류의 간장 마이크로솜으로는 CYP와 cytochrome b5의 함량, NAD(P)H-cytochrome c 환원효소와 탈알킬화 효소(EROD, ECOD)의 활성을 측정하였고, 넙치와 강도다리는 이 밖에도 MROD와 PROD 활성을 조사하였다.

CYP 함량은 마이크로솜을 대조 셀과 시료 셀에 각각 분주하고 시료 셀에만 $Na_2S_2O_4$ 을 소량 첨가한 다음 CO 가스를 통기시키고 UV/VIS 분광광도계(Shimadzu 1601-PC, Japan)를 사용하여 450과 490 nm의 차이스펙트럼(difference spectrum)을 재었으며, 분자흡광계수는 $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 으로 정량하였다(Omura and Sato 1964). 그리고 cytochrome b5 함량은 마이크로솜을 대조 셀과 시료

셀에 각각 분주한 다음 시료 셀에만 NADH 용액을 넣어 환원시키고 UV/VIS 분광광도계로 424 nm와 409 nm의 차이스펙트럼(difference spectrum)을 재었으며, 분자흡광계수 $185 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 을 곱하여 정량하였다(Estabrook and Werringlör 1978). 그리고 NAD(P)H-cytochrome P450 환원효소의 활성은 0.5 M 인산완충액(pH 7.6)에 시안화칼륨과 cytochrome c 용액에 시료인 미크로솜을 넣어 교반하고 교반 셀과 시료 셀에 각각 붓는 시료 셀에 NADPH 용액 또는 NADH 용액을 첨가하여 UV/VIS 분광광도계로 550 nm에서의 흡광도 증가를 1분간 측정하고 분자흡광계수로는 $21 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (NADPH의 존성 환원효소)와 $1.02 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (NADH의 존성 환원효소)를 각각 곱하여 활성을 측정하였다.

EROD, PROD 및 MROD의 활성은 어류 간장의 미크로솜에 NADPH 재생계 용액을 첨가한 후 기질인 7-ethoxyresorufin, 7-penthoxyresorufin 및 7-methoxyresorufin을 각각 첨가하여 일정시간을 반응시킨 다음 만들어진 resorufin의 농도를 형광분광계(Shimadzu RF-5301PC, Japan)로 측정(Ex. 550 nm, Em. 585 nm)하여 정량하였고(Burke and Mayer 1974), ECOD(7-ethoxycoumarin-O-deethylase) 활성은 어류 간장의 미크로솜에 NADPH 재생계 용액을 첨가한 후 기질인 7-ethoxycoumarin을 첨가하여 37°C의 수조에서 30분간 반응을 시킨 다음 2 M HCl로 반응을 정지시키고 생성된 7-hydroxycoumarin을 클로로포름으로 추출하여 원심분리를 한 다음에 하부층을 뽑아내어 붕산소다 용액으로 재추출 하고 원심분리를 하여 상층부를 형광분광계로 측정(Ex. 370 nm, Em. 450 nm)함으로써 정량을 하였다(Greenlee and Poland 1978). 그리고 미크로솜의 단백질 농도는 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 정량을 하였다. 그리고 각 효소는 3반복 실시하여 평균값으로 나타내었다.

결 과

자연산의 개복치(*M. mola*), 송어(*M. cephalus*), 강도다리(*P. stellatus*), 청어(*C. pallasii*), 봉장어(*A. myriaster*)를 비롯하여 양식산인 조피볼락(*S. schlegeli*)과 참돔(*P. major*), 넙치(*P. olivaceus*)의 간장 미크로솜을 2 mM TBTC로 20분간 배양 시 CYP 함량의 변화는 Fig. 1과 같다. 8종의 어류 중 CYP 함량은 TBTC와 배양이전(pre-incubation)에는 넙치를 제외하고는 대체로 0.20~0.50 nmol mg⁻¹의 농도였으나, 배양이후(post-incubation)에는 대부분의 어류가 0.01~0.03 nmol mg⁻¹로 감소하였

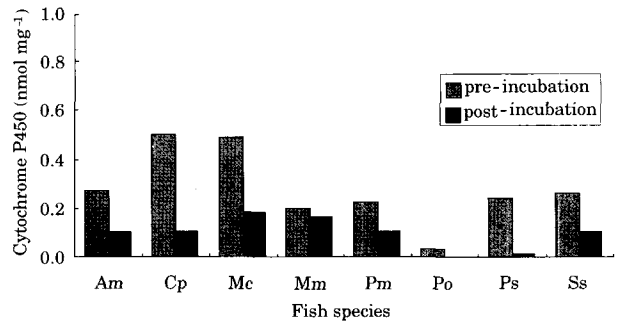


Fig. 1. *In vitro* interaction of 2 mM TBTC with cytochrome P450 of marine fishes after incubation of the microsomal suspension for 20 min at 30°C. Am: common conger *Astroconger myriaster*, Cp: herring *Clupea pallasii*, Mc: mullet *Mugil cephalus*, Mm: ocean sunfish *Mola mola*, Pm: sea bream *Pagrus major*, Po: olive flounder *Paralichthys olivaceus*, Ps: starry flounder *Platichthys stellatus*, Ss: rockfish *Sebastes schlegeli*.

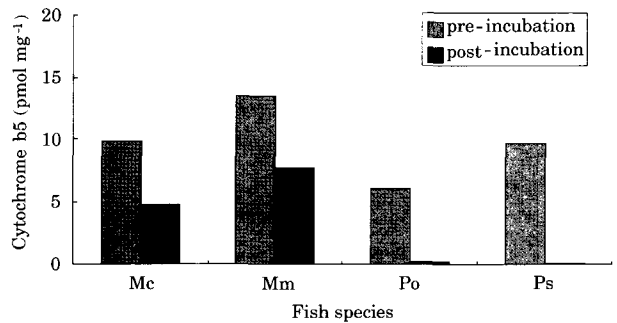


Fig. 2. *In vitro* interaction of 2 mM TBTC with cytochrome b5 of marine fishes after incubation of the microsomal suspension for 20 min at 30°C. Fish species refer to Fig. 1.

고, 개복치($0.16 \text{ nmol mg}^{-1}$)와 송어($0.18 \text{ nmol mg}^{-1}$)는 이보다 다소 높았다. TBTC와의 배양 전후를 비교하면 대부분의 어류는 배양이전의 4~7% 수준으로 줄어들었고, 송어(37%)와 개복치(80%)는 이보다 높았다. 이처럼 조사한 어류 간장의 CYP 함량은 TBTC에 의해서 뚜렷이 저해되었고, 저해 정도는 어류에 따라 차이가 있음을 확인하였다.

그리고 이들 어류의 cytochrome b5 함량은 전반적으로 매우 낮아 개복치 13.4, 송어 9.8, 강도다리 9.6, 넙치 5.9 pmol mg^{-1} 에 불과하였고, 그 밖의 어류에서는 검출한계 이하의 수준이었다. TBTC와의 배양 후에는 그나마 함량이 줄어 개복치와 송어만이 각각 7.6 및 4.8 pmol mg^{-1} 으로 줄었고, 넙치와 강도다리도 검출한계 이하로 되었다. 따라서 이들 어류의 간장 중 cytochrome b5 함

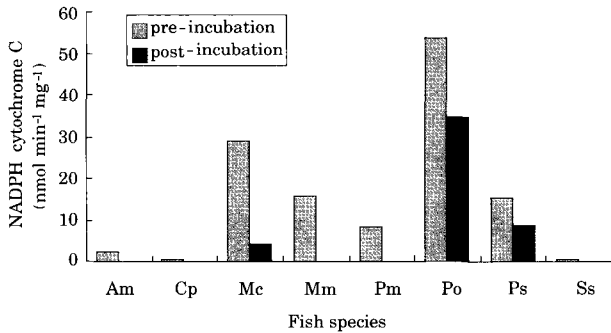


Fig. 3. *In vitro* interaction of 2 mM TBTC with NADPH cytochrome P450 reductase of marine fishes after incubation of the microsomal suspension for 20 min at 30°C. Fish species refer to Fig. 1.

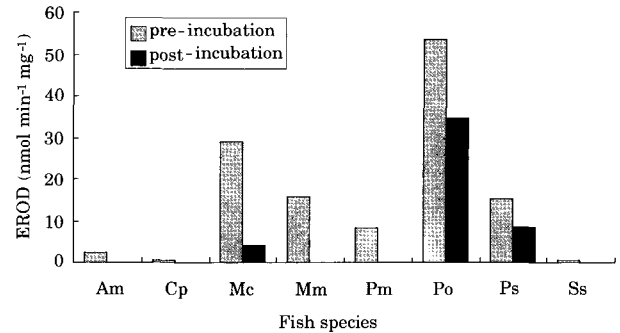


Fig. 5. *In vitro* interaction of 2 mM TBTC with EROD activity of marine fishes after incubation of the microsomal suspension for 20 min at 30°C. Fish species refer to Fig. 1.

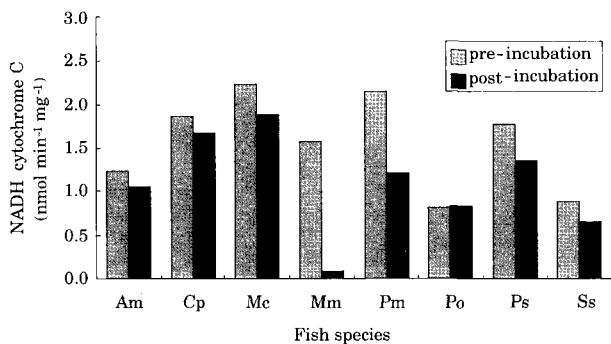


Fig. 4. *In vitro* interaction of 2 mM TBTC with NADH cytochrome b5 reductase of marine fishes after incubation of the microsomal suspension for 20 min at 30°C. Fish species refer to Fig. 1.

량은 다른 약물대사 관련효소나 단백질에 비해 수준이 낮았고 TBTC에 의해서도 크게 영향을 받지 않는 듯 하였다(Fig. 2).

한편, 어류별 NADPH-의존성 환원효소(NADPH-cytochrome P450 reductase)의 활성 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 조사한 어류에서 NADPH-의존성 환원효소의 활성은 0.60~1.71 nmol min⁻¹ mg⁻¹의 수준이었고, 개복치는 2.81 nmol min⁻¹ mg⁻¹로 높은 편이었다. TBTC와의 배양이후에는 0.48(청어)~1.81 nmol min⁻¹ mg⁻¹(개복치)이었다. 따라서 TBTC와의 배양 전후를 비교하면 개복치의 경우가 가장 크게 저해되어 배양이전의 64%로 감소하였으나 그 밖의 어류는 크게 변함이 없어 80~111%로 안정적이었다.

NADH-의존성 환원효소(NADH-cytochrome b5 reductase)의 활성의 변화는 Fig. 4와 같다. 조사한 어류에서 이 환원효소의 활성은 대체로 0.80~2.23 nmol min⁻¹ mg⁻¹의 수준이었고, TBTC와의 배양이후에는 0.64~

1.88 nmol min⁻¹ mg⁻¹으로 TBTC와의 배양 전과 비교하면 개복치만이 6%로 크게 저해되었으나 그 밖의 어류에서는 73~103%로 안정하였다.

한편, CYP1A의 대표적인 지표자(indicator)인 EROD 활성은 어류에 따라 차이가 있어 조피볼락과 청어가 가장 낮아 0.2 nmol min⁻¹ mg⁻¹ 수준이었고, 붕장어와 참돔은 2.4~8.5 nmol min⁻¹ mg⁻¹이었으며, 이어서 개복치와 강도다리(15.4~15.8 nmol min⁻¹ mg⁻¹), 송어(29.2 nmol min⁻¹ mg⁻¹), 넙치(53.8 nmol min⁻¹ mg⁻¹)의 순이었다(Fig. 5). 하지만 TBTC와 배양이후에는 개복치와 참돔, 붕장어, 조피볼락은 1~7%로까지 급감하였고, 송어와 청어는 각각 14%, 29%로 줄었으며 넙치와 강도다리는 56~65% 수준으로 줄었다. 이처럼 EROD 활성도 TBTC에 의해서 상당히 저해를 받았고, 저해 정도는 어류에 따라 차이가 있었다.

ECOD 활성도 어류에 따라 효소활성에 차이가 있으며, 청어나 조피볼락, 넙치, 강도다리는 4.5~9.3 nmol min⁻¹ mg⁻¹ 수준이었으나 붕장어나 개복치, 참돔, 송어에서는 15.2~38.6 nmol min⁻¹ mg⁻¹이었다(Fig. 6). 그러나 TBTC와 배양이후에는 송어(36.7 nmol min⁻¹ mg⁻¹)를 제외하고는 3.6~10.4 nmol min⁻¹ mg⁻¹의 수준으로 낮아졌고, 이것을 배양 전과 비교하면 개복치와 참돔, 붕장어는 36~38%로 낮아졌으며, 다음으로 조피볼락은 63%, 이 밖의 넙치나 청어, 송어, 강도다리는 90% 이상을 유지하였다. 따라서 EROD 활성과 마찬가지로 ECOD 활성도 TBTC에 의해서 저해를 받으며 저해 정도는 어류에 따라 차이가 있었음을 확인하였다.

한편, 가자미목에 속하는 넙치와 강도다리를 대상으로 PROD와 MROD 활성의 변화를 조사하였더니(Fig. 7), 두 어류는 TBTC와 배양이전의 PROD와 MROD 활성이 각각 1.8과 0.6, 9.3과 1.8 nmol min⁻¹ mg⁻¹로서 넙치가

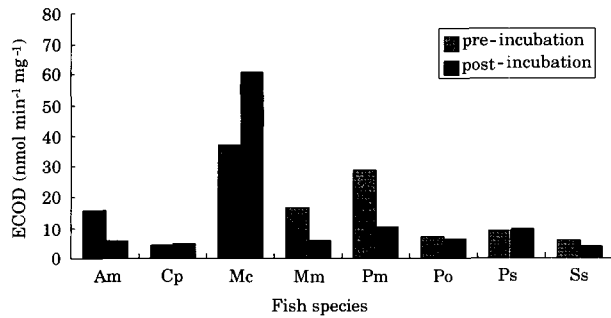


Fig. 6. *In vitro* interaction of 2 mM TBTC with ECOD activity of marine fishes after incubation of the microsomal suspension for 20 min at 30°C. Fish species refer to Fig. 1.

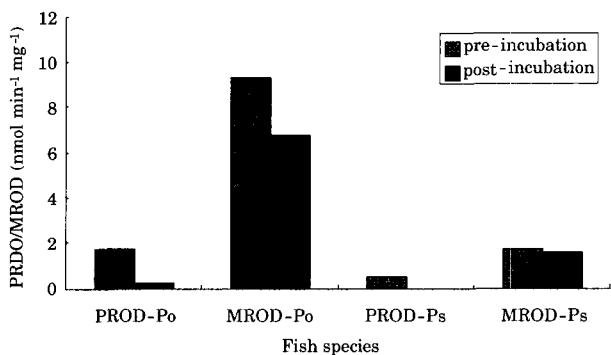


Fig. 7. *In vitro* interaction of 2 mM TBTC with PROD and MROD activities of olive flounder (Po) and harry flounder (Ps) after incubation of the microsomal suspension for 20 min at 30°C.

강도다리에 비해 약간 높았으며, 배양이후에도 0.23과 0.01, 6.8과 1.6 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 로서 넘치가 약간 높았다. 이들 활성의 감소를 비교하면 넘치와 강도다리는 PROD 활성이 각각 배양이전의 13%와 2% 수준으로 낮아졌고, MROD는 73%와 92%를 나타내어 PROD 활성이 MROD 활성에 비해 TBTC에 의해 크게 저해되는 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

간장 마이크로솜에 존재하는 두 가지 전자전달계 즉, NADPH-cytochrome P450 환원효소와 CYP로 이루어진 경로 그리고 NADH-cytochrome b5 환원효소와 cytochrome b5로 이루어진 경로 중에서 앞의 경로가 외인성 오염물질을 대사하는 주요한 경로로 알려져 있다(Fent and Stegeman 1991; Fent and Bucheli 1994). 따라서 본

실험에서는 8종의 어류에 대해서 MFO 효소계의 구성성분 검토와 더불어 OTC의 하나인 TBTC가 이들 구성효소계에 어떻게 영향을 미치는지를 조사·비교하였다.

본 연구에서 조사된 8종 어류의 CYP 함량($0.2 \sim 0.5 \text{ nmol mg}^{-1}$)과 cytochrome b5 함량(0.1 nmol mg^{-1})은 Stegeman *et al.* (1997)이 열대 버뮤다 해역에서 잡아 조사한 해산어류의 함량과 비슷한 수준이었다(CYP: $0.1 \sim 0.5 \text{ nmol mg}^{-1}$, cytochrome b5: $0.025 \sim 0.25 \text{ nmol mg}^{-1}$). 반면 ECOD 활성은 본 실험에서 측정된 값($4.2 \sim 28.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)이 버뮤다의 것($0.23 \sim 2.10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)보다 훨씬 높은 값을 보였다. 이처럼 ECOD 활성에 차이가 나는 것이 서식환경에 의한 것인지 또는 어류 종간의 차이에 의한 것인지는 알 수가 없었다.

한편, 이들 어류의 간장 마이크로솜을 TBTC와 *in vitro*로 배양 시 CYP의 저해율이 개복치(80%)와 송어(37%)를 제외한 나머지 어류들에서는 10% 이하로 상당히 저해되었으나(Fig. 1), cytochrome b5 함량은 워낙 적은 양이었다(Fig. 2). 이처럼 OTC에 의해 CYP는 저해되지만 cytochrome b5는 영향을 받지 않는 것은 무지개송어나 뱀장어, bullhead (*Mullus barbatus*) (Fent and Bucheli 1994) 및 scup (*Stenotomus chrysops*) (Fent and Stegeman 1991)에서도 확인되었다. 그러나 패류인 홍합(*Mytilus galloprovincialis*)은 노출농도에 따라 CYP와 cytochrome b5 함량이 모두 저해되어 어류와는 차이를 보인다(Morcillo and Porte 1997).

그리고 본 연구에서 8종 어류의 NADPH 의존성 환원효소와 NADH 의존성 환원효소의 활성은 각각 $0.60 \sim 2.81 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, $0.80 \sim 2.23 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 의 범위였으나 TBTC에 노출시킨 후에는 각각 $0.48 \sim 1.81 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (64~111%)과 $0.64 \sim 1.88 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (56~103%)로 변화하였는데, 어류에 따라 저해되는 정도가 달랐다(Figs. 3, 4). TBTC는 담수어인 무지개송어, 뱀장어, bullhead에서 NADPH 의존성 환원효소에 영향을 미치지 않고 NADH 의존성 환원효소 활성을 저해하였지만(Fent and Bucheli 1994), scup에서는 NADH 의존성 환원효소 활성을 오히려 증가시켰다는 보고(Fent and Stegeman 1991)도 있어, NADH 의존성 환원효소에 미치는 영향은 어류 종에 따라 차이가 있는 것으로 사료된다.

이처럼 TBTC에 노출된 어류의 MFO 효소계 반응은 대체로 CYP와 NAD(P)H 의존성 환원효소는 영향을 받아 변화하였지만 cytochrome b5는 그다지 영향을 입지 않은 것으로 나타났다. 하지만 이것을 다시 각 구성효소간의 반응의 차이에 따라 다음과 같이 3가지 형태로 구분할 수 있다. 즉, CYP와 두 환원효소가 모두 영향을 받아

저해되는 군(타입 1), CYP 외에 NADH 의존성 환원효소만 저해되는 군(타입 2), CYP는 저해되지만 두 환원효소는 영향을 받지 않거나 또는 유도되는 군(타입 3)으로 구분된다. 조사한 8종 어류 중 타입 1에는 개복치, 조피볼락, 청어, 강도다리, 참돔 등 가장 많은 어류가 포함되며, 타입 2에는 붕장어와 송어, 그리고 타입 3에는 넙치가 해당된다. 이처럼 어류에 따라 TBTC에 의해 MFO 효소계의 구성성분에서 반응이 서로 다르게 나타나는 것은 앞에서 언급한 연구자들의 연구보고와도 일치하지만, 이런 차이가 서식환경 등 생태적인 차이를 반영하는지에 관해서는 향후 상세한 연구를 진행시킬 필요가 있을 것이다. 그리고 본 실험에서도 청어를 제외한 다른 어류는 NADH 의존성 환원효소가 NADPH 의존성 환원효소에 비해 더 크게 저해되는 현상이 관찰되었다.

그리고 TBTC는 어류의 탈알킬화 효소에도 영향을 미쳤다. 8종 어류의 EROD 활성은 $0.15 \sim 53.77 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 범위였던 것이 TBTC에 노출된 후에는 $0.01 \sim 34.86 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 으로 되었으며, 어류에 따라 저해율은 차이가 심했다(Fig. 5). 개복치는 본래 효소활성이 높았지만 TBTC에 의해서 가장 심하게 저해되었으며, 가자미목에 속하는 넙치와 강도다리는 본래 효소활성이 높았으며, 저해 정도가 다른 어류에 비해 심하지 않았다. 한편, TBTC에 의한 ECOD 활성의 저해 경향도 EROD의 경우와 상당히 비슷하였다(Fig. 6). 즉, 개복치나 참돔, 붕장어는 저해가 가장 심해 본래의 36~38% 수준으로 저해되었고, 이어서 조피볼락(63%), 송어, 청어, 넙치 및 강도다리(90%)의 순이었다. 이들 두 효소활성에서 가자미목에 속하는 저서어류인 넙치와 강도다리의 저해율이 다른 어중에 비해 적게 나타났다. 어류에서는 TBT를 비롯한 OTC로는 EROD 활성이 크게 저해된다고 알려져 있는데(Kime 1998), 이번의 조사에서 EROD 활성은 ECOD 활성에 비해 TBTC로 더욱 크게 저해되었으며, EROD 활성의 저해율이 큰 어류는 ECOD 활성의 저해율도 큰 경향을 보였다. Scup의 EROD 활성은 TBTC의 노출농도와 비례하여 줄어들며(Fent and Stegeman 1991), 무지개송어나 뱀장어, bullhead의 EROD 활성도 TBTC에 의해 저해되며, 저해율은 노출농도와 비례하고 무지개송어는 다른 두 어류에 비해 상대적으로 저해정도가 심한 것으로 보고되었는데(Fent and Bucheli 1994), 본 연구결과에서도 어류에 따라 EROD 활성의 저해율에는 차이를 보여 같은 경향을 나타내었다. 한편, 이전 연구에서 0.4 mM TBTC에 노출된 패류의 경우 CYP 함량은 크게 저해되었으나 EROD 활성은 거의 변화를 보이지 않았으나(전 등 2002), 어류의 경우에는 CYP 함량과 EROD 활성이 모두 저해되어, 어류와 패류

간의 TBTC에 의한 MFO 효소계의 반응에 차이가 있음을 보여주고 있다.

한편, 넙치와 강도다리에 대해서는 PROD와 MROD 활성의 영향도 조사하였다(Fig. 7). 넙치와 강도다리의 PROD 활성은 각각 13%와 2%로 낮아져 심하게 저해되었으나, MROD 활성은 각각 73%와 92%로 크게 저해되지 않았다. Rat에서 PROD 활성은 CYP2B에 대응하는 효소이고, MROD는 CYP1A2에 대응하는 특이적인 효소로(Funae and Imaoka 1993), 이것이 어류에도 그대로 적용된다면 TBTC는 어류의 CYP2B에는 작용하지만 CYP1A2에는 작용하지 않는다는 것을 시사한다. 더욱이 CYP2B는 테스토스테론 15 α -hydroxylase의 활성에 깊은 관련이 있는 것으로 알려져 있어(Stegeman *et al.* 1990), TBTC에 의한 PROD 활성의 저하는 스테로이드 대사에도 영향을 미칠 수 있음을 암시한다고 할 수 있다. 이런 결과는 TBT 화합물에 노출된 망둥어에서 성성숙지수(GSI)의 감소, 정자 생성의 저해, 난황축적의 저해 등이 관찰된 것(Shimizu and Kimura 1992)과 일치한다고 할 수 있다.

TBTC가 MFO 효소계에 저해적으로 영향을 미치는 기작에 관해서는 완전하게 밝혀지지는 않았으나, TBT가 CYP의 헴(heme) 성분에 영향을 미치거나 또는 CYP가 들어있는 소수성의 막을 통과하여 효소의 활성 위치에 접근해서 아미노산들과 반응을 함으로서 효소의 구조와 활성을 파손한다는 것으로 해석되고 있다(Fent and Stegeman 1991; Morcillo and Porte 1997). 하지만 고양이 헤모글로빈과 triethyltin과의 상호작용을 연구한 결과에 따르면 이 주석화합물은 CYP의 헴 자체에는 영향을 미치지 못하지만(Taketa *et al.* 1980), TBT의 경우-SH, -OH 및 NH₂ 기와 상호작용하는 것으로 알려져 있어(Tan *et al.* 1978), 효소 단백질의 작용기와 결합하는 쪽이 설득력이 있는 것으로 여겨진다.

이상으로 어류의 마이크로솜을 TBTC와 *in vitro*로 배양시 MFO 효소계의 여러 성분은 상당히 반응한다는 것을 확인할 수 있었다. TBTC에 노출시킴으로서 헴단백질 효소 중에서 CYP는 크게 저해되었지만 cytochrome b5는 별다른 영향을 받지 않았으며, 또한 플라빈 단백질의 두 환원효소도 영향을 받아 넙치를 제외한 나머지 어류에서는 크게 저해되었다. 플라빈 단백질의 환원효소들은 마이크로솜 전자전달계의 주요 성분이며 CYP에 전자를 제공하는 제공자(donor)이므로 이들 제공자에게 변화가 일어난다면 MFO 효소계의 기능에도 영향을 미칠 것이다. 따라서 어떤 오염물질에 의해 MFO 효소계의 어느 한 구성성분이 영향을 받게되면 결국에는 MFO 효소계 전반이 영향을 받게되므로 환경오염물질의 대사는 물론

이고 내인성 화합물의 정상적인 대사도 영향을 받게 되므로 종의 안정성을 위협받게 될 것이다. 그리고, OTC에 의한 생체 내의 약물대사 효소계의 영향을 평가하는데는 저해가 분명하게 나타나는 CYP나 EROD가 좋은 생체지표로 활용할 수 있을 것이라 여겨진다.

적 요

본 연구는 내분비교란물질로 알려진 TBTC가 해양생물에게 미치는 영향을 조사하는 연구의 일환으로, 이 화합물에 노출시킨 어류의 간장 MFO 효소계의 반응을 *in vitro*로 조사하였다. 대상 어류는 개복치 (*Mola mola*), 송어 (*Mugil cephalus*), 강도다리 (*Platichthys stellatus*), 청어 (*Clupea pallasii*), 봉장어 (*Astroconger myriaster*), 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*), 참돔 (*Pagrus major*), 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)이며, 이들의 간장 미크로솜을 2 mM의 TBTC와 *in vitro* (30°C, 20분)로 배양하고 cytochrome P450 (CYP), cytochrome b5, NAD(P)H-cytochrome c 환원효소를 비롯한 탈알킬화 효소들(EROD, PROD, MROD, ECOD)의 변화를 조사하였다. TBTC는 환원효소의 측정 시에는 DMSO에, 그리고 그 밖의 효소 측정 시에는 메탄올에 녹여 2% 농도로 첨가하였다.

어류의 간장 CYP 함량은 TBTC와 배양 후 대부분(6 어류/8 어류)에서 10% 이하로 크게 저해되었으나, cytochrome b5 함량은 변함이 없었다. 하지만 NAD(P)H 의존성 환원효소의 반응은 어류에 따라 달랐고, CYP 외에 두 환원효소도 모두 영향을 받아 저해되는 타입 1(개복치, 조피볼락, 청어, 강도다리, 참돔), CYP 외에 NADH 의존성 환원효소만 저해되는 타입 2(봉장어, 송어) 및 CYP는 저해되지만 두 환원효소는 영향을 받지 않거나 오히려 유도되는 타입 3(넙치)으로 구분되었다. 그리고 대부분(7/8)의 어류에서는 NADH 의존성 환원효소가 NADPH 의존성 환원효소에 비해 더욱 저해되는 경향을 보였다.

TBTC는 어류의 탈알킬화 효소에도 영향을 미쳤고, 어류별 EROD 활성의 저해는 개복치, 참돔, 봉장어, 조피볼락(잔존율 1~7%) > 송어, 청어(14~30%) > 넙치, 강도다리(56~65%)의 순이었으며, ECOD 활성의 저해도 개복치, 참돔, 봉장어(36~38%) > 조피볼락(63%) > 송어, 청어, 넙치, 강도다리(90%)의 순으로 비슷한 경향이였다. 한편, 넙치와 강도다리에서는 PROD가 MROD 보다 더욱 심하게 저해되었다.

이처럼 어류 간장의 약물대사 효소계는 TBTC에 의한 저해 정도가 어류에 따라 심한 차이를 보였다.

사 사

이 논문은 해양수산부 해양한국발전프로그램(MOMAF-2000-101-H6004)의 지원에 의해 연구되었으며, 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- 전중균, 이미희, 김도진, 심원준, 오재룡, 이수형. 2002. 유기주석화합물이 명주조개 (*Coelomactra antiquata*)의 약물대사 효소계에 미치는 영향. 한국수산학회지. 35:185-190.
- 탁건태, 김중균. 1999. 연안어장의 넙치생산성에 영향을 미치는 TBT의 급성독성. 생명과학회지. 9:333-340.
- 탁건태, 김중균. 2001. 넙치 생존과 성장에 미치는 TBT의 독성. 한국수산학회지. 34:103-108.
- Boyer JJ. 1989. Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. Toxicol. 55:253-298.
- Burke MD and RT Mayer. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene. Drug Metab. Disp. 2:583-588.
- Colosio C, M Tomasini, S Cairoli, V Foa, C Minoia, M Marinovich and CL Galli. 1991. Occupational triphenyltin acetate poisoning: a case report. Br. J. Ind. Med. 48:136-139.
- Crane DA, AA Rooney, EF Orlando and LJ Guillette Jr. 2000. Endocrine-disrupting contaminants and hormone dynamics: lessons from wildlife. pp.1-21. In Environmental Endocrine Disrupters (Guillette LJ and DA Crain eds.). Taylor and Francis. New York.
- Estabrook RW and J Werringloer. 1978. The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. pp.212-220. In Methods of Enzymology, Vol. LII. Biomembranes: Part C: Biological Oxidations, Microsomal, Cytochrome P-450, and Other Hemoprotein Systems (Fleischer S and L Packer eds.). Academic Press. New York.
- Fent K. 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. Crit. Rev. Toxicol. 26:1-117.
- Fent K and TD Bucheli. 1994. Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins *in vitro* in freshwater fish. Aquat. Toxicol. 28:107-126.
- Fent K and JJ Stegeman. 1991. Effects of tributyltin chloride *in vitro* on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops*. Aquat. Toxicol. 20:159-168.

- Funae Y and S Imaoka. 1993. Cytochrome P450 in rodents. pp.221-238. In *Cytochrome P450* (Schenkman JB and G Helmut eds.). Springer-Verlag. Berlin.
- Gibson GG and P Skett. 1994. *Introduction to Drug Metabolism*. 2nd edition. Blackie Academic & Professional, London.
- Greenlee WF and A Poland. 1978. An improved assay of 7-ethoxycoumarin *O*-deethylase activity: Induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205:596-605.
- Kime DE. 1998. Disruption of liver function. pp.201-246. In *Endocrine Disruption in Fish* (Kime DE ed.). Kluwer Academic Publishers. Boston.
- Lin JL and S Hsueh. 1993. Acute nephropathy of organotin compounds. *Am. J. Nephrol.* 13:124-128.
- Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr and RJ Randall. 1951. Protein measurement Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Morcillo Y and C Porte. 1997. Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the western Mediterranean. *Aquat. Toxicol.* 38:35-46.
- Omura T and R Sato. 1964. The carbon-monoxide binding pigment of liver micromes. *J. Biol. Chem.* 239:2370-2378.
- Shim WJ, SH Kahng, SH Hong, NS Kim, SK Kim and JH Shim. 2000. Imposed in the rock shell, *Thais clavigera*, as evidence of organotin contamination in the marine environment of Korea. *Mar. Environ. Res.* 49:435-451.
- Shim WJ. 2000. *A Study on the Environmental Chemistry and Toxicology of Organotins in the Marine Environment of Korea*. A Ph.D Thesis. Seoul National University.
- Shimizu A and S Kimura. 1992. Long term effects of bis(n-tributyltin) oxide (TBTO) on salt water goby *Chasmichthys dolichognathus*. *Nissuishi.* 58:1595-1602.
- Stegeman JJ, BR Woodin, H Singh, MF Oleksiak and M Celander. 1997. Cytochromes P450 (*CYP*) in tropical fishes: Catalytic activities, expression of multiple *CYP* proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fishes from Bermuda. *Comp. Biochem. Physiol.* 116C:61-75.
- Stegeman JJ, BR Woodin and RM Smolowitz. 1990. Structure, function and regulation of cytochrome P450 forms in fish. *Biochem. Soc. Trans.* 18:19-21.
- Taketa F, K Siebenlist, J Kasten-Jolly and N Palosaari. 1980. Interaction of triethyltin with cat hemoglobin: identification of binding sites and effects on hemoglobin function. *Arch. Biochem. Biophys.* 203:466-472.
- Tan LP, ML Ng, VG Kumar. 1978. The effect of trialkyltin compounds on tubulin polymerisation. *J. Neurochem.* 31:1035-1041.
- WHO. 1980. Tin and organotin compounds: a preliminary review. pp.69-92. In *Environmental Health Criteria 15* (World Health Organization ed.). Geneva.

(Received 14 December 2002, accepted 20 February 2003)