

아질산 노출이 이스라엘잉어 혈장내 아질산 농도 및 간장 약물대사효소에 미치는 영향

박관하*, 최상훈, 김영길, 김용호, 최선남, 김종배

군산대학교 해양과학대학

Effects of Nitrite Exposure on Plasma Nitrite Levels and Hepatic Drug-metabolizing Enzymes in the Carp, *Cyprinus carpio*

Kwan Ha Park*, Sang-Hoon Choi, Young-Gill Kim, Yong-Ho Kim,
Sun-Nam Choe and Jong-Bae Kim

College of Ocean Science & Technology, Kunsan National University,
San-68 Miryong-dong, Kunsan City, Chonbuk, Korea

ABSTRACT

Effects of ambient nitrite, NO_2^- , at 1, 3, 10 and 30 mg/l, on the changes of plasma nitrite/nitrate and on hepatic drug-metabolizing enzyme activity were examined in the juvenile Israeli carp, *Cyprinus carpio*. When the fish were exposed to 1 and 3 mg/l NO_2^- , there was an exposure duration-dependent increase in plasma NO_2^- over the 96-hr period reaching 6~7 fold excess the ambient concentration. In the fish exposed to 10 mg/l, a plateau concentration of less than 2-fold of the environment was attained in 12 hr. With 30 mg/l, however, the maximal plasma NO_2^- was 41.25 mg/l at 12 hr followed by a gradual decline. There was a concentration-dependent increase in methemoglobin (metHb) level in all NO_2^- -exposed groups and a significant decrease in hematocrit value in 30 mg/l group after 96-hr exposure. Apart from the blunted increase in plasma NO_2^- with higher NO_2^- (10 and 30 mg/l) exposure, the ratio of plasma NO_3^- to NO_2^- was significantly higher in these groups compared to 1 and 3 mg/l. The imbalance in the plasma $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ at higher NO_2^- exposure suggests a possible accelerated conversion of NO_2^- to NO_3^- . Nitrite exposure did not affect the hepatic drug-metabolic activities in juvenile Israeli carp. All these data indicate that disposition of NO_2^- differ depending upon exposed concentration and that metHb production may not be the exclusive toxic mechanism in carp

Key words : nitrite, nitrate, israeli carp, drug-metabolizing enzymes

서 론

아질산(NO_2^- , nitrite)은 단백질의 대사결과 생성

※ To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-63-469-1885, E-mail: khpark@kunsan.ac.kr

된 암모니아(NH_3)가 세균 *Nitrosomonas*의 산화작용에 의해 생성되는 물질로서, 또 다른 종류의 세균인 *Nitrobacter*에 의해 질산이온(NO_3^-)으로 신속히 전환되지 않으면 수중 농도가 상승하여 어류에 독성을 미칠 수 있다(Collins *et al.*, 1975). 아질산은 어류의 체내에 축적되어 독성을 유발하는데 그 독

성의 정도는 어종에 따라 차이가 있었으며 특히 공존하는 chloride 이온 (Cl^-) 농도가 낮은 경우에 더 현저하였다(Lewis and Morris, 1986).

아질산은 아가미에서 능동수송체인 Cl^- 이온 운반계를 통해서 체내로 흡수되기 때문에 혈장 및 조직내의 농도가 수중의 농도보다도 높아질 수가 있다(Williams and Eddy, 1986). 혈장내로 들어간 아질산은 적혈구의 hemoglobin을 methemoglobin (metHb)로 산화시키고, 이 metHb는 산소운반력을 상실하여 노출된 어류는 저산소증에 이르게 되는 현상(Eddy and Williams, 1987)이 거의 모든 어류에서의 공통적인 하나의 중요한 독성기전이다. 또한 아질산은 아가미의 Cl^- 이온 흡수기능을 차단·교갈시킴으로써 Cl^- 이온의 흡수가 체액의 균형유지에 절대적인 담수어류에서 체내 전해질의 대사에 불균형을 초래한다(Jenesen *et al.*, 1987).

Cl^- 이 낮은 환경에서 서식하는 담수어류가 아질산에 예민하기 때문에 많은 연구가 주로 담수어류에 대해 연구되었다(Russo and Thurston, 1977; Lewis and Morris, 1986). 아질산노출에 의해 경골어류 *Hoplias malabaricus*의 간장에서 glycogen분해가 촉진되는 반면 백색근에서는 오히려 합성이 촉진되는 현상이 관찰되었다(Moraes *et al.*, 1998). Silver perch의 치어를 25일간 1.43 ppm 이상의 아질산에 노출시키면 성장이 저해되고 고농도에서는 아가미의 손상이 조직학적으로 관찰되었다(Frances *et al.*, 1998). 치사를 거의 일으키지 않는 수준의 비교적 낮은 농도(1.0~2.5 mg/l)의 아질산에 초어(grass carp) 치어를 15일간 노출시키면 현저한 성장저해, 호흡율의 감소 및 유영활동의 감소가 나타났다(Alcaraz and Espina, 1997). 이 때 노출된 어류의 사료섭취량은 변함이 없는 반면 암모니아 배설량은 증가하므로, 아질산은 섭취된 에너지중 상대적으로 많은 비율을 소모성 대사에 활용하는 방향으로 대사균형을 변화시킨다고 볼 수 있다.

차널메기를 1.62 ppm 아질산에 장기간 노출시키면 성장이 저해되며 3.71 ppm 이상에서는 치사율이 현저하게 증가하였다(Colt *et al.*, 1981). Wedemeyer and Yasutake (1978)는 steelhead trout치어를 낮은 아질산 농도인 0.03 ppm에서 6개월간 사육하여도 아무런 성장저해가 나타나지 않음을 관찰하였다. Siberian sturgeon은 아질산에 대해서 비교적 내성이 강하지만 metHb의 생성율은 아질산이 25 mg/l

이상이면 아무런 차이가 없고, 독성이 심각하여 의식불명 상태의 개체에서 보다는 정상으로 보이는 개체에서 metHb의 농도가 오히려 높은 경우도 발견되기 때문에 sturgeon에서는 metHb의 생성만이 아질산의 독성을 유발하는 기전이 아닐 가능성이 제시된 바 있다(Huertas *et al.*, 2002).

잉어는 일반적으로 대부분의 독성물질에 대해서 내성이 강한 것으로 인식되어 있다. 아질산이 잉어에 미치는 독성기전은 위에서 기술한 다른 담수어류에서와 별로 다르지 않은 것으로 생각되고 있지만 독성의 정도는 다른 담수어류와 비교하여 결코 낮지는 않은 것 같다(Jensen *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1997; Williams and Eddy, 1988).

해산어류는 담수어류에 비해 아질산에 대한 독성이 현저하게 낮으며 체내로의 흡수나 독성기전에 대한 연구결과도 거의 없다. 해산어인 유럽산넙치(*Platichthys flesus*)를 아질산에 장기간(11일간) 노출시키더라도 혈장중의 아질산농도는 사육수 농도보다 훨씬 낮고, metHb의 생성정도도 심각하지 않다(Grosell and Jensen, 2000). 담수어류와는 달리 아가미의 능동적 Cl^- 이온 흡수계가 존재하지 않아 해산어에서는 아질산의 흡수가 주로 장을 통해 일어났다(Eddy *et al.*, 1983).

아질산은 어체내에서 적혈구 및 간장에 존재하는 산화효소들에 의해서 무독성의 질산염으로 대사·전환된다(Doblender and Lackner, 1996, 1997). 체내에서 아질산의 대사가 원활하지 못하면 무지개송어, rat이나 토끼 등의 포유동물에서 저산소증을 유발하고 이에 의해 간장의 약물대사 효소활성, 특히 phase I 효소가 저해 받았다(Arillo *et al.*, 1984; Kahl *et al.*, 1978). 이러한 저해작용과는 상반되게 최근의 channel 메기에서의 연구결과에 의하면, 아질산에 노출된 간장내 일부 약물대사효소의 활성이 오히려 증가한다는 흥미로운 보고가 있다(González *et al.*, 2000). 이때 channel 메기에서 아질산에 의해 촉진된 간장약물대사 능력이 아질산의 제거에는 어떤 역할을 하는지는 아직 알려진 것이 없다.

본 연구는 이스라엘 잉어를 다양한 농도의 아질산 노출시킨 후 아질산의 혈장내 농도 및 그 대사산물의 농도를 측정함으로써 아질산 노출농도의 고·저에 따라 어류에서 아질산의 대사능 자체에 변화가 오는지를 검토하였다. 이와 관련하여 간장

내 약물대사효소의 활성을 측정함으로써 일부 어종에서 보고된 간장 약물대사효소 활성에 아질산이 영향을 미치는가도 시험하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

시험에 사용한 이스라엘잉어(*Cyprinus carpio*)는 체중 63.0~89.5 g으로 인근의 치어부화장에서 공급받아 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 사육하였다. 동물을 실험군당 10마리씩 30(W)×80(L)×60(H) cm의 유리수조에 100 liter의 물을 채우고 사육하였다. 산소는 air pump를 사용하여 충분히 폭기하였으며 시험기간 중에는 사료를 공급하지 않았다. 아질산은 NaNO_2 (Sigma) 형태로 사육수에 용해하여 노출하였으며 농도는 NO_2^- 의 농도로 표현하였다.

2. 혈장 아질산 및 질산이온의 측정

혈액을 heparin이 처리된 주사기로 미부정맥에서 일정시간에 소량씩(약 0.5 ml) 채취하여 $3,000 \times g$ 로 20분간 3°C 에서 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 혈장중 아질산이온과 질산이온 농도의 측정은 HPLC system (Waters 501 solvent delivery system, Rheodyne manual injector 50 μl loop, Waters 486 spectrophotometric)을 이용하여 Greiss 반응으로 정량하였다(Green *et al.*, 1982). 즉, 혈장에 함유되어 있는 아질산을 sufanylamine과 반응시키면 diazo compound가 생성되는데 이 물질을 N-1-naphthyl-ethylenediamine-dihydrochloride와 다시 반응시켜서 얻어지는 적색의 azo dye를 spectrophotometer로 파장 540 nm에서 측정하였다. 아질산의 농도의 계산에는 혈장을 직접 Greiss 용액과 반응하여 얻어지는 농도를 사용하였으며, 시료를 Cu로 coating된 cadmium column에 통과시켜서 질산이온을 아질산이온으로 환원시킨 후에 얻어지는 농도는 아질산+질산이온 농도로 사용하였다. 질산이온의 환원에 필요한 cadmium column의 제작을 위해 과립상의 Cd(0.3~0.7 nm)을 10%의 HCl로 씻고 증류수로 다시 세척하여 부유과립을 제거하였다. 깨끗한 과립이 남으면 CuSO_4 (2%) 용액에 넣어서 coating 하였다. Cu coating과정은 Cd이 회색에서

푸른색으로 일단 변하였다가 서서히 흔들어 줌에 따라 콜로이드성의 갈색구리금박이 떨어져 나가면서 푸른색이 서서히 소실되는 것을 육안적으로 확인하였다. CuSO_4 용액에 반복해서 씻어줌에 따라 푸른색이 더 이상 나오지 않는 단계에 이르면 Cd 분말을 stainless steel column (길이 30 mm, 내경 3 mm)에 충전하여 사용하였다.

3. Methemoglobin (Hb) 및 hematocrit (Ht)의 측정

Heparin이 처리된 혈액을 pH 7.3의 phosphate buffer에 넣고 용혈시켰다. 원심분리 ($3,000 \times g$, 20 분, 3°C)하여 상장액의 흡광도를 560 nm, 576 nm 및 630 nm에서 spectrophotometer (Shimadzu UV-2501PC)을 사용하여 측정한 후 Benesch *et al.* (1973)법에 따라 정량하였다. 총 hemoglobin양의 측정을 위해 hemoglobin을 cyanomethemoglobin으로 전환한 뒤 540 nm에서의 millimolar extinction coefficient를 11.0으로 하여 계산하였다. Hemoglobin의 산화지표인 metHb의 수준은 총 hemoglobin에 대한 비율로 표현하였다. Ht는 Hematocrit Centrifuge (Hanil)를 사용하여 microhematocrit법에 따라 측정하였다.

4. Ethoxyresorufin O-deethylas (EROD), Glutathione S-transferase (GST) 및 UDP-glucuronosyltransferase (UDPGT) 활성의 측정

간장을 분리하여 완충액 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, dithiothreitol 0.1 mM, pH 7.4)에 넣고 Ultra Turrax homogenizer (Ika Labortechnik)로 균질화 하였다. 균질액을 $10,000 \times g$ 로 20분간 원심분리 (4°C)하고 상장액을 취해 효소분석용 시료로 사용하였다. 이 시료는 분석시까지 -80°C 에 보관하면서 사용하였다. EROD의 활성은 Burke and Mayer의 방법(1974)으로 분석하였다. 즉 상기 간장 균질액 0.5 ml와 동량의 기질액(최종농도 NADPH 0.25 mM, 7-ethoxyresorfin 3 μM) 혼합액을 30°C 에서 10분간 incubation하였다. 찬 acetone 2.0 ml을 반응액에 가해 반응을 중단시키고 $3,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하였다. 생성된 7-ethoxyresorufin은 spectrofluorometer (Kontron

Table 1. Plasma nitrite concentrations in carp exposed to various ambient nitrite concentrations

Exposed NO ₂ ⁻ concentration (mg/l)	Plasma NO ₂ ⁻ (mg/l)				
	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr	96 hr
0	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02
1	1.62 ± 0.24	2.84 ± 0.30	3.54 ± 0.52	4.95 ± 0.64	6.77 ± 0.77
3	2.58 ± 4.55	5.21 ± 0.72	6.78 ± 0.73	12.0 ± 1.50	16.82 ± 2.33
10	12.26 ± 3.10	17.92 ± 3.21	13.35 ± 3.20	16.3 ± 3.79	19.81 ± 4.21
30	34.82 ± 5.50	41.25 ± 3.47	28.70 ± 4.51	24.77 ± 5.79	23.24 ± 6.21

N = 7-10 in each group

Instruments)를 사용하여 excitation 537 nm/emission 583 nm의 파장에서 측정하였다.

GST의 활성은 Habig *et al.* (1974)의 방법에 따라 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene을 기질로 사용하여 측정하였다. 효소반응은 spectrophotometer cuvette에 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene 1 mM, 환원형 glutathione 1 mM을 포함한 2.8 ml의 100 mM K-phosphate buffer (pH 6.9, 30°C로 유지)에 조직균질액 200 µl를 가해 반응을 개시하였다. Spectrophotometer (Shimadzu)에서 1분간 340 nm에서의 흡광도 증가율을 측정하여 효소활성을 계산하였다.

UDPGT의 활성은 Clarke *et al.* (1992)의 방법에 의해 측정하였다. 즉, 조직균질액 (0.2%의 Triron X-100을 가해 활성화) 200 µl을 0.8 mM의 p-nitrophenol 및 5 mM의 uridine-di-phosphoglucuronic acid가 함유된 100 mM의 K-phosphate buffer 2.8 ml에 가하고 30°C에서 30분간 shaking incubator에서 반응시켰다. 0.2 M의 찬 trichloroacetic acid 0.5 ml를 가해 반응을 중단시키고 0.1 ml의 10N KOH를 가해 반응액을 알칼리화 하였다. 반응하지 않고 남아있는 p-nitrophenol의 양을 405 nm에서 측정하여 반응율을 계산하였다.

이들 효소의 활성을 단백질 단위량에 따라 표현하기 위해 단백질함량을 micro-Lowry method (Sigma kit)에 따라 측정하였다.

6. 통계처리

실험 data를 mean ± SEM으로 표현하고 시험군 간 차이의 유의성은 one-way ANOVA를 사용하여 분석하고 post-hoc test로는 Dunnett's t-test를 사용하였다. 유의성의 기준은 p < 0.05로 하였다.

결 과

1. 아질산의 노출에 따른 잉어의 행동, 치사 및 사육수의 질산염 농도

아질산 1~10 mg/l로 96시간(4일간) 노출하였을 때 유영행동의 이상이나 치사 등 외관상 현저한 변화는 발견되지 않았다. 아질산을 30 mg/l로 노출 시킨 시험군의 잉어 10마리 중 3마리가 노출 3일째에 사망하였으며 사망하지 않은 동물은 시험종료시까지 유영행동이 저하하는 것이 관찰되었다. 아질산을 가하지 않은 사육수의 아질산 및 질산이온 농도는 각각 0.036 mg/l 및 0.041 mg/l의 농도였다.

2. 아질산의 노출에 따른 혈장내 아질산이온 농도 변화

Table 1에서 다양한 농도의 아질산 노출시 나타나는 잉어 혈장 중의 아질산 농도를 보여주고 있다. 전체적으로 노출초기에 해당하는 12시간까지는 노출농도가 높아짐에 따라 혈중농도도 증가하는 경향이 뚜렷하였다. 그러나 노출시간이 더욱 연장됨에 따라 농도별로 약간씩 다른 경향이 나타났다. 즉, 1과 3 mg/l의 농도로 노출시켰을 때 혈장중의 아질산농도는 시간이 흐르면서도 계속하여 증가하는 경향을 보여주었다. 그러나 10 mg/l에서는 12시간에 이르는 동안까지 증가된 수준에서 머무르는 정도에 불과하였으며 30 mg/l에서는 12시간 후에 최고농도인 41.25 mg/l에 도달하였다가 노출시간의 연장에 따라 오히려 감소하는 경향이 나타났다. 전체적으로 농도를 높이더라도 96시간 후에 도달할 수 있는 농도는 24 mg/l 이하의 수준이었다.

3. 혈장중의 아질산/질산 이온의 변화

아질산은 체내에서 대사(산화)과정을 통해 질산으로 전환되며, 다른 요인을 고려하지 않는다면 혈장중의 아질산농도는 이 산화과정을 통해 전환이 일어난 후에 궁극적으로 남아있는 아질산양을 반영한다고도 할 수 있을 것이다. 따라서 이 시험에서는 혈장중의 아질산 농도변화와 그 대사산물인 질산의 농도가 동일한 경향으로 변화하는가를 검토하였다. Fig. 1에서는 96시간 노출 후의 아질산의 농도와 아질산/질산을 합한 농도의 변화를 비교하여 보여주고 있다. 이 결과에서 보는 바와 같이 1과 3 mg/l의 경우에는 (nitrite + nitrate)/nitrite의 비가 2배가 채 되지 않는 정도이지만 10과 30 mg/l에서는 3배 이상의 차이가 나타났다.

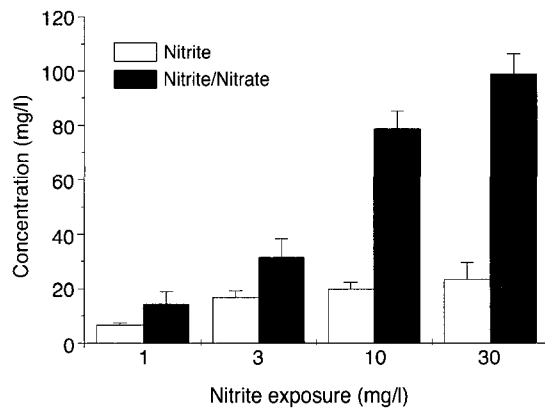


Fig. 1. Plasma levels of nitrite and nitrite+nitrate in carp exposed with nitrite for 96 hr.

4. MetHb, Ht 및 간장대사효소 활성의 변화

이 시험에서는 아질산의 독성으로 알려져 있는 hemoglobin의 산화에 따른 metHb의 생성정도 및 혈구의 손상이 아질산의 농도에 따라 어떻게 달라지는가를 확인하고자 하였다. 또한 앞에서 기술한 바와 같이 96시간 노출에서 노출한 아질산 농도의 고·저에 따라 혈장 중 아질산, 아질산/질산 농도는 상이한 경향을 보여줌을 확인하였기 때문에 아질산을 질산으로 전환하는 능력이 활성화 하는가 하는 점을 간접적으로 검토하고자 하였다. 이 목적으로 96시간 아질산 노출 후 간장중의 약물대사효소 활성을 측정하였다. Table 2에서 보면 metHb의 농도는 노출농도 의존적으로 증가하였다. Ht 농도는 최고 아질산 농도인 30 mg/l 노출군에서만 유의성 있는 감소가 나타났다. 약물대사효소는 대표적인 phase I 효소(EROD)와 phase II 효소(GST, UDPGT)를 측정하였으나 대조군과 비교하여 변화한 시험군이 발견되지 않아서 아질산의 노출과 관련한 변화는 없음이 확인되었다.

고찰

본 연구에서는 이스라엘잉어를 인위적으로 다양한 농도의 아질산에 최장 96시간(4일간)동안 노출시키고 혈장내의 아질산이온 농도의 변화, 질산이온농도의 변화 및 혈액성분과 간장내 약물대사효소의 활성을 검토함으로써 잉어가 아질산에 노출되었을 때 어떠한 생리적 변화를 통해 흡수된 아

Table 2. Biochemical parameters in carp exposed to nitrite for 96 hr

Exposed NO ₂ ⁻ concentration (mg/l)	MetHb (%)	Ht (%)	Hepatic enzyme activity		
			EROD (pmol/min/mg protein)	GST (μmol/min/mg protein)	UDPGT (pmol/min/mg protein)
0	5.9±0.70	29.2±3.3	42.0±6.0	0.82±0.08	224.6±32.3
1	9.7±1.1*	31.3±3.5	51.0±8.3	0.76±0.10	203.8±18.2
3	26.4±5.0*	25.7±4.2	37.6±5.5	0.73±0.07	245.6±32.4
10	63.9±9.9*	22.3±5.2	44.9±6.6	0.80±0.11	221.0±2.5
30	65.6±8.5*	19.2±3.0*	31.7±5.4	0.94±0.10	258.3±21.0

*Significantly different from control (0 mg/l) group (p<0.05).

MetHb: methemoglobin; Ht: hematocrit; EROD: ethoxyresorufin O-deethylase; GST: glutathione S-transferase; UDPGT: UDP-glucuronosyltransferase.

N=7-10 in each group.

질산의 독성에 대처하는가를 규명하고자 하였다. 이 연구에서 발견된 중요한 사실은 노출되는 아질산의 농도에 따라 혈장중에 농축되는 아질산 농도는 다른 pattern으로 나타나는 데, 특히 노출 아질산의 농도가 높을 때의 혈장내 농도는 예상보다 낮음을 확인하였다. 이런 농축억제 현상은 잉어가 아질산을 질산으로 빨리 전환하는 능력을 획득하는 현상과 부분적으로는 관련이 있는 듯 하나, 간장에서 수행하는 일반적인 약물대사 능력이 증진되지는 않는 듯 하다.

양식장이나 오염된 수계에서는 아질산의 농도가 증가하는 경우가 많으며 이 때 수중 아질산은 어체내로 흡수될 것이다. 이 연구에서는 아질산의 농도를 매우 높은 30 mg/l의 수준까지 증가시켰는데, 경우에 따라서는 상당히 높은 수계중의 농도(>18.0 mg/l, Okafor and Ogbonna, 2003)도 보고되고 있어서 본 저자들이 설정한 농도가 환경학적 측면에서 의미가 없을 정도로 높다고 볼 수는 없을 것이다. 혈액으로 들어온 아질산은 적혈구내로 이동되어 hemoglobin을 metHb로 산화시키고 산화된 hemoglobin은 산소운반능력을 상실한다 (Cameron, 1971). 아질산에 장시간 노출된 어류에서의 혈장내 아질산의 농도는 사육수의 농도를 훨씬 능가하는 수준으로 축적됨이 잉어 (Jensen *et al.*, 1987), 무지개송어 (Margiocco *et al.*, 1983) 및 crayfish (Jensen, 1990) 등에서 관찰되었다. 또한 이들 어류에서의 농도는 노출시간이 연장됨에 따라 지속적으로 증가하였다. 본 연구에서도 이런 축적현상을 관찰하였다. 그런데 이 연구에서 발견된 특이한 현상은 혈액중의 아질산의 농도가, 낮은 아질산 노출농도(1 및 3 mg/l)에서는 시간의 경과에 따라 지속적으로 증가하나 높은 노출농도(10 및 30 mg/l)에서는 일정 시간 후에는 오히려 감소하거나 일정한 수준에서 머무르는 현상이다. 다른 연구자들이 지속적인 증가를 보고한 반면, 본 농도에서는 농도에 따라 다른 pattern이 관찰된 원인은 아마도 다른 연구자들이 환경학적으로 의미가 큰 비교적 낮은 농도의 아질산농도에서 실험을 주로 수행한 사실과 무관하지가 않을 것이다.

잉어는 송어류와 비교해서 아질산에 대한 저항성은 다소 강하다 (Williams and Eddy, 1988). 이들 어종이 독성에서 차이가 나타나는 이유는 잉어류에서는 아가미의 음이온 통과 system의 효율이 낮

기 때문인 것으로 해석된다. 아질산에 노출된 어류의 혈장 Cl^- 의 농도는 감소하며 이 감소분이 다른 음이온인 아질산과 젖산이온(lactate⁻)의 증가로 보상될 것이다 (Jensen *et al.*, 1987; Stormer *et al.*, 1996). 추가적으로 흡수된 아질산의 전환으로 생성된 질산이온도 Cl^- 의 감소에 따른 삼투압 변화를 극복하는데 일익을 담당하게 된다 (Doblender and Lackner, 1997). 아질산을 1 mM (약 51 mg/l)의 농도로 잉어에 48시간 동안 노출시키면 hemoglobin의 산화는 현저하게 나타나지만 혈중 젖산이나 HCO_3^- 의 농도는 일시적으로 약간만 변화한다 (Williams *et al.*, 1997). 또 심장박동수, 호흡수, 혈압 등도 단지 일시적으로는 변화하지만 후반 노출기간으로 가게 되면 감소된 산소공급능력을 보상하는 노력을 함으로써 아질산의 독성을 감소시키고자 노력하는 것 같다. 이들의 연구에서 아질산의 혈중농도를 측정하지는 않았지만 본 연구에서 관찰한 고농도 노출시의 적응현상과 일맥상통한다. 한편 Doblender and Lackner (1997)는 아질산에 노출된 무지개 송어 혈장내의 아질산 및 질산염 농도는 노출 후 14일에서는 증가하였지만 28일째는 정상수준으로 회복됨을 관찰하였다. 아질산 농도의 회복에 수반하여 metHb의 농도도 회복됨으로써 무지개 송어가 지속적인 노출 후에는 아질산에 적응하는 능력을 획득할 수 있음을 알 수 있다. 본 연구에서 관찰된 높은 농도의 아질산 노출 후 발견된 혈장내 농도의 점진적 감소는 잉어가 사육수의 높은 아질산 농도에 적응하는 능력을 획득하였음을 시사한다. 또한 적응하는 시간도 무지개 송어의 경우 (Doblender and Lackner, 1997) 보다 상당히 빠른 것을 알 수가 있다.

또한 이 연구에서의 결과를 보면 고농도, 장기간의 아질산 노출시 노출기간이 연장됨에 따라 감소하지만 질산염의 농도는 아질산농도의 감소와 유사한 비율로 감소하지는 않음을 볼 수 있다. 이 결과는 아질산을 질산염으로 전환하는 능력이 증가하는 것이 부분적이기는 하나 최소한 하나의 기전으로 생각된다. 그러나 증가된 질산이온의 농도만으로 전체적인 감소를 모두 설명하기는 부족하며 체내로의 흡수감소와 같은 다른 기전도 관여하는 것으로 보인다. 이 결과는 잉어가 고농도의 아질산에 적응하는 기전이 과연 무엇인가에 대한 의문을 제시한다. 특히 질산염으로의 축진과정에는 어떠한

기전이 관여하는가가 중요한 문제로 떠오를 것이다.

담수어에 축적된 아질산은 대부분 간장세포에서 NO_3^- 로 전환된다(Doblender and Lackner, 1996; Jensen 1996; Stormer *et al.*, 1996). 간장세포내에서 세 종류의 효소, 즉 cytochrome P-450 (Arillo *et al.* 1984), catalase (Takano *et al.*, 1988) 및 cytochrome oxidase (Arillo *et al.*, 1992)가 아질산의 산화에 관여한다. 특히 cytochrome-P450과 아질산의 결합 (Arillo *et al.* 1984) 및 채널메기에서 보고(González *et al.*, 2000)된 아질산에 의한 간장약물대사 효소의 증가현상은 아질산의 제거를 위한 생화학적 반응이 이스라엘잉어 간장에서도 작동되는가에 대한 의문을 제기하게 된다. 즉, 아질산에 노출된 channel 메기의 간장내 약물대사효소 활성을 측정하면 phase I 효소의 하나인 7-ethoxycoumarin O-deethylase (ECOD)의 활성에는 변화가 없지만 phase II 효소계의 일종인 glucuronosyltransferase의 활성이 유의성 있게 증가된다고 보고되어 있다(González *et al.*, 2000). 그러나 이 González *et al.*의 연구에서 sulfatase의 활성에는 변화가 나타나지 않은 것을 보면 phase II 효소계라고 해서 모두 활성화되는 것은 아닌 듯 하다. 본 연구에서는 아질산에 노출된 간장의 약물대사효소 활성의 변화가 나타나는지 보기 위해서 phase I 효소계로서 EROD, phase II 효소계로서 GST 및 UDPGT를 측정하였으나 아무런 변화를 발견하지 못 하였다. 이는 잉어와 channel 메기가 아질산에 대해 동일한 간장내 약물대사 효소계의 반응기전을 보유하지는 않음을 시사한다. 물론 약물대사효소계의 활성은 검정에 사용되는 기질에 따라 달라질 수가 있고, 본 실험과 González *et al.* (2000)에서 사용된 glucuronosyltransferase의 수용기질 (acceptor)은 동일하지 않음을 감안해야 하겠지만 검토된 3종의 효소 모두에서 변화가 발견되지 않은 점을 고려하면 잉어에는 channel 메기에서와 유사한 활성화작용은 없는 것으로 추정된다. 한편 무지개송어의 분리된 간장 microsome의 phase I 약물대사효소 활성이 아질산이온의 존재하에서 감소된다고 하는 보고(Arillo *et al.*, 1984)도 있다. 그들의 *in vitro* 시험계와 본 연구에 사용한 시험계가 동일하지는 않지만 이 연구에서는 최소한 시험한 효소들의 활성감소도 발견되지 않았다.

결론적으로 이 결과에서 발견된 것은 아질산의

노출로 인해 이스라엘잉어에서 metHb의 생성 수준은 노출된 아질산의 농도에 밀접한 관련이 있지만, 혈장 아질산의 농도와 노출된 아질산농도와는 반드시 비례하지 않는다는 사실이다. 이는 이스라엘잉어에서 나타나는 아질산의 독성이 모두 metHb 생성에 의한 것은 아닐 가능성을 제시한다. 또한 높은 농도의 아질산 노출시에는 어류가 아질산을 질산이온으로 전환하는 능력이 증가하지만 간장이 보유한 일반적 약물대사능의 변화는 일어나지 않는 것이 발견된다.

사 사

이 논문은 해양한국발전프로그램의 지원에 의해 연구되었음 (MOMAF-2002-102-F6201).

참 고 문 헌

- Alcaraz G and Espina S. Scope for growth of juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idella* exposed to nitrite, *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; 116C: 85-88.
- Arillo A, Melodia F and Marsano B. Nitrite biotransformation by mitochondria from the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny), *Comp. Biochem. Physiol.* 1992; 102B: 209-211.
- Arillo A, Mensi P and Pirozzi G. Nitrite binding to cytochrome p450 from liver microsome of trout (*Salmo gairdneri* Rich) and effects on two microsomal enzymes, *Toxicol. Lett.* 1984; 21: 369-374.
- Benesch RE, Benesch R and Yung S. Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures, *Anal. Biochem.* 1973; 55: 245-248.
- Burke MD and Mayer RT. Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene, *Drug Metab. Disp.* 1974; 2: 583-588.
- Cameron NN. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout, *Comp. Biochem. Physiol.* 1971; 40A: 743-749.
- Clarke DJ, George SG and Burchell B. Multiplicity of UDP-glucuronosyltransferases in fish. Purification of UDP-glucuronosyltransferase from the liver of a marine teleost, *Pleuronectes platessa*, *Biochem. J.* 1992; 284: 417-423.
- Collins MT, Gratzek JB, Shotts EB Jr, Dawa DL, Campbel LM and Senn DR. Nitrification in an aquatic recircula-

- tion system, J. Fish. Res. Bd. Can. 1975; 32: 2025–2031.
- Colt L, Ludwig R, Tchobanoglous G and Cech J. The effects of nitrite on the short-term growth and survival of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, Aquaculture 1981; 24: 111–122.
- Doblender C and Lackner R. Metabolism and detoxification of nitrite by trout hepatocytes, Biochim. Biophys. Acta 1996; 1289: 270–272.
- Doblender C and Lackner R. Oxidation of nitrite to nitrate in isolated erythrocytes: a possible mechanism for adaptation to environmental nitrite, Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1997; 54: 157–161.
- Eddy FB, Kunzlik PA and Bath RN. Uptake and loss of nitrite from the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L. in fresh water and in dilute seawater, J. Fish Biol. 1983; 23: 105–116.
- Eddy FB and Williams EM. Nitrite and freshwater fish, Chem. Ecol. 1987; 3: 1–38.
- Frances J, Allan GL and Nowak BF. The effects of nitrite on the short-term growth of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). Aquaculture 1998; 163: 63–72.
- González JF, Del Valle PL, Thohan S and Kane AS. Effects of waterborne nitrite on phase I–II biotransformation in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), Mar. Environ. Res. 2000; 50: 29–32.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS and Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids, Anal. Biochem. 1982; 126: 131–138.
- Grossell M and Jensen FB. Uptake and effects of nitrite in the marine teleost fish *Platichthys flesus*, Aquat. Toxicol. 2000; 50: 97–107.
- Habig WH, Pabst MJ and Kacoby WB. Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation, J. Biol. Chem. 1974; 249: 7130–7139.
- Huertas M, Gisbert E, Dodríguez A, Cardona L, Williot P and Castelló-Orvay F. Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) yearlings to nitrite: median-lethal concentration (LC₅₀) determination, hematological changes and nitrite accumulation in selected tissues, Aquat. Toxicol. 2002; 57: 257–266.
- Jensen FB. Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in fresh water crayfish (*Astacus astacus*), Aquat. Toxicol. 1996; 34: 95–104.
- Jensen FB Andersen NA and Heisler N. Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid-base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*), J. Comp. Physiol. 1987; 157: 533–541.
- Jensen FB. Sublethal physiological changes in freshwater crayfish, *Astacus astacus*, exposed to nitrite: haemolymph and muscle tissue electrolyte status, and haemolymph acid-base balance and gas transport, Aquat. Toxicol. 1990; 18: 51–60.
- Kahl R, Wulff U and Netter KJ. Effect of nitrite on microsomal cytochrome P450, Xenobiotica 1978; 8: 359–364.
- Lewis WM and Morris DP. Toxicity of nitrite to fish: a review, Trans. Am. Fish. Soc. 1986; 115: 183–195.
- Magiocco, C, Arillo, A, Mensi, P, Schenone, G. Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich. and hematological consequences. Aquat. Toxicol. 1983; 3: 261–270.
- Moraes G, Cattony EB and Souza RH. Metabolic responses of the teleost *Hoplias malabaricus* to high levels of environmental nitrite, Revista Brasileira de Biologia 1998; 58: 105–113.
- Okafor PN and Ogbonna UI. Nitrite and nitrate contamination of water sources and fruit juices marketed in South-Eastern Nigeria, J. Food Comp. Anal. 2003; 16: 213–218.
- Russo RC and Thurston RV. The acute toxicity of nitrite to fishes. In: Tubbs, RA (ED.), Recent Advances in Fish Toxicology. U.S. Environmental Protection Agency, EPA Ecological Research Service, 1977; EPA-600/3-77-085, Corvallis, OR, pp. 118–131.
- Stormer J, Jensen FB and Rankin JC. Uptake of nitrite, nitrate and bromide in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects on ionic balance, Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1996; 53: 1943–1950.
- Takano T, Miyazaki Y and Nakata K. Interaction of nitrite with catalase in the perfused rat liver, Food Chem. Toxicol. 1988; 26: 837–839.
- Wedemeyer GA and Yasutake WT. Prevention of treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*), J. Fish. Res. Bd. Can. 1978; 35: 822–827.
- Williams EM and Eddy FB. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity, J. Comp. Physiol. 1986; B156: 867–872.
- Williams EM and Eddy FB. Anion transport, chloride cell number and nitrite-induced methemoglobinemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). Aquat. Toxicol. 1988; 13: 29–42.
- Williams EM, Nelson JA and Heisler N. Cardio-respiratory function in carp exposed to environmental nitrite, J. Fish Biol. 1997; 50: 137–149.