

## 살충제 Carbofuran과 Phenobarbital Sodium 및 3-Methylcholanthrene이 이스라엘 잉어의 효소활성에 미치는 영향

한성수\* · 임요섭 · 정재훈

원광대학교

**초록 :** 이스라엘 잉어에 있어서 carbamate계 살충제 carbofuran의 독성에 미치는 phenobarbital sodium(PB) 또는 3-methylcholanthrene (3-MC)의 영향과 작용기작을 효소적 측면에서 구명할 목적으로 carbofuran과 PB나 3-MC를 이스라엘 잉어에 각 조합으로 처리하여 독성경감 효과를 조사하였고, 공시한 농약과 PB나 3-MC가 acetylcholinesterase(AChE), glutathione S-transferase(GST), UDP-glucuronosyltransferase(UDPGT) 및 cytochrome P-450-dependent monooxygenase(monooxygenase)의 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 carbofuran과 PB나 3-MC를 각각 조합으로 처리한 후 경시적으로 이스라엘 잉어의 각 효소들의 상대활성도를 조사하였다. PB와 3-MC만 투여한 실험군에서 이스라엘 잉어의 생존수는 무처리군과 동일하였고 살충제만 처리한 실험군의 이스라엘 잉어 생존수는 처리농도가 증가하면서 감소되었으나, PB나 3-MC와 살충제를 조합처리한 실험군에서는 살충제만 처리한 실험군에 비하여 매우 높은 생존율을 나타낸 것으로 보아 해독효과가 인정되었다. 효소활성(*in vivo*)은 AChE의 경우 carbofuran 0.95 ppm만을 처리한 실험군에서는 24시간내내 각 조사시기마다 무처리군에 비해 40% 이상의 활성저해를 보였으나 carbofuran과 PB 및 3-MC를 조합처리한 실험군에서는 효소활성이 초기에 감소하다가 서서히 증가하여 24시간후에는 무처리군과 비슷한 수준을 나타냈고, GST의 경우 carbofuran만을 처리한 실험군에서는 초기에 약 20% 이상의 활성저해를 보였으나 carbofuran과 PB나 3-MC를 조합처리한 실험군에서는 약제처리 1시간 후 부터 무처리군에 비해 효소활성이 20% 이상 증가하였다. UDPGT와 monooxygenase의 효소활성은 carbofuran과 PB나 3-MC를 조합처리한 실험에서 처리 6~12시간 후에는 carbofuran 처리군에 비해 효소활성이 4~8배 이상 급격히 높아졌다. 이상의 결과에서 PB 및 3-MC처리가 이들 효소의 활성을 유도함으로써 carbofuran의 독성으로 부터 이스라엘 잉어를 보호하는데 관여한 것으로 보인다(1995년 10월 23일 접수, 1996년 1월 19일 수리).

### 서 론

현재 우리 나라에서 사용되고 있는 많은 살충제는 곤충의 생명유지에 기본적 역할을 하는 신경계나 에너지 생성계의 촉매인 효소에 작용하여 치사시키게 된다. 물론 모든 생명체는 외부 물질에 대한 방어 기작을 가지고 있어 외부 이물질에 대사시키거나 배설시켜 스스로를 보호하고 있지만<sup>1)</sup> 농산물 생산의 수량증대 및 품질향상을 위해 불가피하게 사용되어지는 농약은 다소간의 독성이 있을 수 있다. 우리 나라의 경우 총 농약사용량의 50% 이상이 논·밭의 병해충과 잡초방제에 사용될 뿐만 아니라 사용된 많은 농약이 수도작 재배시기에 집중되어 있어 이로 인한 수계로의 유입 가능성이 높은 실정인데, 이러한 수계의 오염은 어류의 성장과 생존에 불리한 영향을 미친다고 알려져 있다.<sup>2)</sup> 더우기 환경공해 지표수에 따르면 농약이 중금속과 산업폐수 보다도 3~4배 높다고 하였고<sup>3)</sup> 유기인계나 carbamate 농약이 비록 잔류성은 짧지만 다량사용으로 토양 및 농산물의 오염가능성이 높다<sup>4)</sup> 하였다. 이러한 일련의 과정들이 자연의

순환기능을 교란시킬 수 있고, food chain 과정을 통하여 인축으로 그 해악이 돌아갈 수도 있다. 외국의 경우 농약의 독성경감을 목적으로 효소유도제를 이용하여 효소 및 대사측면에서 접근하는 연구 등<sup>5-7)</sup>을 오래전 부터 해 왔으나 우리나라에서는 농약이 급성독성 및 효소 활성에 미치는 영향에 관한 연구 등<sup>8-10)</sup>이 있을 뿐 농약독성의 경감에 끼치는 약제에 대한 연구는 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 효소유도제가 농약의 독성 경감에 미치는 효과를 검토하기 위해 담수어인 이스라엘 잉어에 carbamate계 살충제 carbofuran과 phenobarbital sodium(PB) 또는 3-methylcholanthrene(3-MC)을 각 조합으로 처리하여 carbofuran의 독성에 미치는 PB또는 3-MC의 영향을 조사하였고, 이에 대한 작용기작 구명을 효소측면에서 검토하기 위하여 공시농약과 PB 또는 3-MC의 조합처리가 이스라엘 잉어의 acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase(GST), UDP-glucuronosyltransferase (UDPGT) 및 cytochrome P-450-dependent monooxygenase(monooxygenase)의 활성에 미치는 영향을 경시적으로 조사하였다.

찾는말 : Phenobarbital sodium, 3-methylcholanthrene, acetylcholinesterase, glutathione S-transferase, UDP-glucuronosyltransferase, cytochrome P-450-dependent monooxygenase

\*연락처자

## 재료 및 방법

### 공시어종 및 사육용수

본 실험에 사용한 어종은 이스라엘 잉어로 전라남도 내수면 개발시험장에서 운반용 비닐봉지에 약 30 L의 물을 넣고 여기에 이스라엘 잉어를 넣은 후 산소를 채워 운반하여 직경 90 cm, 높이 42 cm의 원통형 플라스틱 통에 200~300마리씩 넣어 2주간 순화시킨 후 체중  $2.58 \pm 0.64$  g 및 총체장  $5.52 \pm 0.42$  cm인 이스라엘 잉어를 실험에 공시하였다. 순화기간 중 잉어사육용 사료(대한제당 무치개사료 잉어치어용 3)를 체중당 2~4%로 나누어 충분히 공급하였고<sup>10)</sup> 실험실 조건은 온도  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 광은 12시간/일이었으며, 공시어는 실험 시작 24시간전에 절식시켜 PB와 3-MC를 먹이에 혼합하여 투여한 후 이를 섭식한 물고기를 공시약제를 각 농도별로 처리한 수조에 넣어 실험을 수행하였다. 실험용 수조는 60 cm(L) × 30 cm(W) × 40 cm(H)로 實遊泳 면적은 20 L이었다. 모든 실험은 정치상태로 하였으며 수조당 10마리씩 3반복으로 한 처리군당 30마리로 하였다. 순화중이거나 절식중인 공시어에는 계속 산소발생기로 공기를 공급하여 주었으나 실험기간 중에는 공기와 먹이를 공급하지 않았다.<sup>11)</sup> 치사어는 부패에 의한 영향을 막기 위해 수시로 아가미 호흡이 중지된 것이나 유리막대로 자극을 주어 반응이 없는 것을 치사어로 간주하여 수조에서 곧바로 제거하였다. 실험에 사용한 잉어사육 용수는 원광대학교내 지하수를 24시간 정치하여 실험온도와 동일조건으로 한 후 사용하였으며, 수질특성은 전기전도도: 0.14 mMho/cm, 총 알칼리도: 18.29mg/l as CaCO<sub>3</sub>, 총 경도: 22 mg/l as CaCO<sub>3</sub>, total NH<sub>3</sub>-N: 0.062 mg/l, Cl: -, 온도:  $12 \pm 1.5^\circ\text{C}$ , 용존산소량: 7.09 mg/l, pH: 7.3이었다.

### 공시약제 및 시약

본 실험에 사용된 공시약제인 carbamate계 살충제 carbofuran(2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol methyl carbamate, 순도: 99.9%)은 농촌진흥청 농업과학기술원 작물보호부에서 분양받았으며 phenobarbital sodium[5-ethyl-5-phenyl-2,4,6-(1H,3H,5H)-pyrimidinetrione monosodium salt, 순도: 97.5%]과 3-methylcholanthrene(2-dihydro-3-methyl-ben[j]aceanthrylene, 순도: 99%)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo, U.S.A)에서 구입하여 실험을 수행하였다. 시약은 bovine serum albumin(BSA), acetylthiocholine iodide(AThCh), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), glutathione reduced, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB), ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), glucose-6-phosphate(G-6-P), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), glycogen, glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-P-DG), uridine diphosphoglucuronic acid(UDPGA), trichloroacetic acid(TCA)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo, U.S.A)에서 K<sub>2</sub>EDTA, p-nitrophenol, coomassie brilliant blue G-250은 Fluka Chemika AG. (Buchs, Switzerland)에서 p-nitroanisole은 Aldrich Ch-

mical Co.(Milwaukee, U.S.A)에서 각각 구입하여 사용하였다.

### Carbofuran의 독성에 미치는 PB 또는 3-MC의 영향

공시어인 이스라엘 잉어에 carbamate계 살충제 carbofuran[0, 0.8(LC<sub>10</sub>), 0.95(LC<sub>25</sub>), 1.13(LC<sub>50</sub>), 1.76 ppm(LC<sub>95</sub>)]과 phenobarbital sodium(PB) 혹은 3-methylcholanthrene(3-MC) 20, 40, 60, 80, 100 mg/kg을 각각 조합으로 처리하였다. 먹이조제시 PB는 saline에 3-MC는 corn oil에 녹여 stock solution을 만들어 각각 먹이 1개당 전술한 량이 되게 사육용 사료와 혼합하여 조제하여 48시간 실내조건에서 건조시킨 후 투여하였고, 섭식한 잉어를 임과 한<sup>10)</sup>의 방법에 따라 상기 carbofuran의 농도별로 조제하여 처리된 수조에 넣어 96시간동안 경시적으로 치사어수를 조사하여 생존율로 환산하였다.

### 효소활성에 미치는 carbofuran과 PB 및 3-MC의 영향

Carbofuran과 PB 및 3-MC가 acetylcholinesterase(AChE), glutathione S-transferase(GST), UDP-glucuronosyltransferase(UDPGT), monooxygenase의 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 이스라엘 잉어에 carbofuran 0.95 ppm과 PB 및 3-MC 20 mg/kg을 각 조합으로 처리한 후 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24시간마다 생존어를 시료 채취하여(3~4°C cold room을 사용) 다음과 같이 각각의 효소활성을 측정하였다. 단백질 정량은 BSA를 사용한 Bradford<sup>12)</sup>의 방법으로 분석하였다.

### Acetylcholinesterase(AChE) 활성

AChE의 활성측정은 Ellman 등<sup>13)</sup>의 방법에 준하여 수행하였다. 이스라엘 잉어 5마리의 뇌를 적출하여 4°C의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.0) 8 ml를 가한 후 glass homogenizer로 1분간 완전히 마쇄하여 균질화시킨 homogenate를 2중가제로 여과하여 4,500 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상침액을 효소원으로 사용하였다. 활성측정은 효소액 0.2 ml에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.0) 2.8 ml를 시험관에 넣고 항온수조에서 (25°C) 3분간 반응시킨 후 0.01 M DTNB 용액 100 μl를 가하여 cuvette에 옮기고 spectrophotometer에서 영점(零點)을 맞추었다. 기질로써 3차 증류수에 녹인 0.075 M AThCh 20 μl를 가하여 cuvette 뚜껑을 막아 10초간 흔들어 준 후 412 nm에서 6분간 흡광도 변화를 측정하여 효소활성을 계산(消光係數는  $1.36 \times 10^4 \text{M/cm}$ )한 후 대조군의 효소활성에 대한 처리군의 상대활성(%)을 구하였다.

### Glutathione S-transferase(GST) 활성

GST 활성 측정은 Habig 등<sup>14)</sup>의 방법에 준하여 수행하였다. 공시어 5마리를 해부한 후 간을 취하여 4°C의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.2) 8 ml를 넣어 glass homogenizer로 1분간 마쇄하여 균질화시켰다. 균

질액을 이중 가제로 여과하여 10,000×g에서 20분간 원심분리한 다음 상정액을 다시 초고속원심분리기에서 105,000×g로 60분간 원심분리한 상정액을 효소원으로 사용하였다. 효소액 0.5 ml, glutathione 15 mM 1 ml와 상기 완충용액 1.5 ml를 시험관에 넣고 수조(20°C)에서 1분간 반응시킨 후 여기에 150 mM CDNB 0.02 ml를 가하여 cuvette 뚜껑을 막아 10초간 흔들어진 후 흡광도의 변화를 파장 344 nm에서 5분동안 30초 간격으로 측정하여 효소활성을 계산(消光係數는 9.6 mM/cm)한 후 대조군의 활성에 대한 처리군의 상대활성(%)을 구하였다.

**Microsome의 조제**

Microsome은 UDPGT와 monooxygenase의 활성측정을 위해 Anderson 등<sup>15)</sup>의 방법을 변형하여 조제하였다. 공시어 5마리의 간을 cold room(3~4°C)에서 채취한 후 1 mM EDTA가 함유된 1.15% KCl용액 8 ml를 넣어 glass homogenizer로 완전히 균질화시켰다. 균질액은 이중 가제로 여과하여 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상정액을 다시 105,000×g에서 1시간 동안 원심분리하여 microsomal pellet을 얻었다. 여기에 1 mM EDTA와 20% glycerol이 함유된 0.1 M 인산 완충용액(pH 7.4)을 넣어 glass homogenizer로 균질화시킨 microsome을 단백질 함량이 2.0 mg/ml가 되게 희석하여 실험에 사용하였다.

**UDP-glucuronosyltransferase(UDPGT) 활성**

UDPGT 활성측정은 Koivusaari<sup>16)</sup>방법에 준하여 수행하였다. 시험관에 microsomal fraction 0.2 ml, 20 mM K<sub>2</sub> EDTA가 함유된 4.5 mM UDPGA 0.2 ml, 0.5 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 0.5 ml, 0.45 mM p-nitrophenol 0.5 ml를 넣고 진탕 항온수조에서(25°C) 20분간 반응시킨 후, 3% TCA 0.5 ml로 반응을 중지시키고 여기에 5 N NaOH 1 ml를 가한 후 400 nm에서 흡광도를 측정하였으며 효소활성을 계산(消光係數는 9.15×10<sup>6</sup>M/cm<sup>2</sup>)한 다음 대조군의 활성에 대한 처리군의 상대활성(%)을 구하였다.

**Monooxygenase 활성**

Monooxygenase 활성측정은 Shang 등<sup>17)</sup>의 방법에 준하여 수행하였다. 시험관에 microsomal fraction 0.2 ml, NADPH generating system 0.2 ml, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 1.0 ml와 0.45 mM p-nitroanisole 0.5 ml를 가한 후 진탕 항온수조에서(25°C) 20분간 반응시킨 후 여기에 chloroform 3 ml를 가하여 격렬히 진탕한 다음 1분간 정치시킨 후 분리한 chloroform층에 5 N NaOH 3 ml를 가하여 생성된 p-nitrophenol을 400 nm에서 측정, 효소활성을 계산(消光係數는 2.008×10<sup>4</sup>M/cm)한 다음 대조군의 활성에 대한 처리군의 상대활성(%)을 구하였다. NADPH generating system은 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 10 ml에 G-6-P와 NADP를 각각 20 mM이 되도록 넣었고 G-6-P-DG는 1.8 unit를 넣어 조

제한 것을 사용하였다.

**Glycogen의 정량**

Glycogen은 Murty 등<sup>18)</sup>의 방법을 변형하여 수행하였다. 시험관에 공시어의 간 0.1 g과 20% KOH 용액 1 ml를 넣고 끓는 수조에서 20분간 용해시켜, 12,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상정액을 버리고 침전물을 얻어 0.6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml로 재용해한 후 0.5 N NaOH로 pH 7.0이 되게 적정하였다. 적정된 액은 증류수로 최종 5 ml가 되도록 정용하였으며 여기에 10 ml의 anthrone시약(anthrone 0.2 g을 24 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 l에 녹인 용액)을 가한 직후 vortexing한 다음 끓는 수조에 옮겨 10분간 반응시킨 후 곧바로 급냉시켜 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**Carbofuran의 독성에 미치는 PB 또는 3-MC의 영향**

Carbofuran과 phenobarbital sodium(PB)의 조합처리에 따른 상호작용에서 이스라엘 잉어의 생존율은 Table 1에 나타낸 바와 같다. PB만 처리한 실험군에서의 생존율은 무처리군과 동일하였고, carbofuran만을 처리한 실험군에서의 생존율은 carbofuran의 농도가 높을 수록 생존율이 현저히 감소하였다. 그러나 carbofuran과 PB를 조합처리한 실험군에서의 생존율은 carbofuran만을 처리한 실험군에서보다 높은 것으로 보아 PB가 해독작용에 관여하였음을 알 수 있었다. 특히 LC<sub>95</sub>值인 1.76 ppm처리구에서는 carbofuran만을 처리한 실험군의 생존율이 전무한 데 비해 carbofuran과 PB를 조합으로 처리한

Table 1. Effect of phenobarbital sodium on the toxicity of carbofuran in israeli carps.

Carbofuran concentration (ppm)	Dosage of phenobarbital sodium (mg/kg)					
	0	20	40	60	80	100
	Survival (%)					
0	100	100	100	100	100	100
0.8	80.0	83.3	83.3	83.3	86.7	96.7
0.95	73.3	76.7	73.3	76.7	76.7	76.7
1.13	43.3	66.7	66.3	73.3	76.7	76.7
1.76	0	43.3	53.3	56.7	66.7	66.3

Table 2. Effect of 3-methylcholanthrene on the toxicity of carbofuran in israeli carps.

Carbofuran concentration (ppm)	Dosage of 3-methylcholanthrene (mg/kg)					
	0	20	40	60	80	100
	Survival (%)					
0	100	100	100	100	100	100
0.8	83.3	100	100	96.7	96.7	100
0.95	76.7	100	100	96.7	76.7	76.7
1.13	43.3	100	93.3	93.3	76.7	76.7
1.76	0	100	66.7	46.7	46.7	46.7

Table 3. Enzyme activities of AChE, GST, UDPGT and Monooxygenase in israeli carps untreated.

Enzymes	Specific activity* (nmol/mg protein/min)
Acetylcholinesterase (AChE)	93.64 ± 3.36
Glutathione S-transferase (GST)	52.30 ± 2.78
UDP-Glucuronosyl transferase (UDPGT)	0.126 ± 0.032
Cytochrome-P-450-dependent monooxygenase	0.038 ± 0.004

\* Mean of triplicate ± S.E.

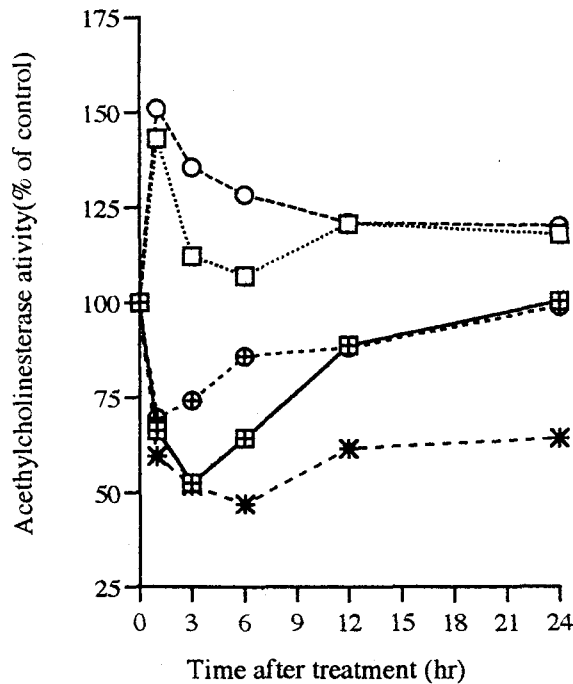


Fig. 1. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium (PB) and 3-methylcholanthrene (3-MC) on activity of acetylcholinesterase in israeli carp. 田-田, Carbofuran 0.95 ppm+PB 20 mg/kg; □-□, PB 20 mg/kg; ⊕-⊕, Carbofuran 0.95 ppm+3-MC 20 mg/kg; ○-○, 3-MC 20 mg/kg; \*-\* , Carbofuran 0.95 ppm.

실험군에서는 약 43~66%의 높은 생존율을 보인 결과로 보아 PB가 해독효과에 영향을 주었음을 알 수 있었다.

한편, carbofuran과 3-MC와의 조합처리에 따른 이스라엘 잉어의 생존율은 Table 2에서 보는 바와 같이 PB에서와 비슷한 경향을 보였으나 3-MC량이 적을 수록 (20, 40 mg/kg) 생존율이 높게 나타났으며, 특히 3-MC 20 mg/kg과 carbofuran 조합 처리구에서의 생존율은 carbofuran의 농도가 증가하여도 대조군과 유사하게 나타난 것으로 보아 3-MC의 해독효과는 현저하고, PB보다도 크다는 것을 알 수 있었다. 여기에서 3-MC 투여량이 많은 실험군에서보다 적은 실험군에서 생존율이 증가 되었는데 이는 약제와 실험동물이 다르기는 하지만 PAM을 쥐에 투여하여 해독효과를 조사한 실험<sup>19)</sup>에서 적정투여량 초과시 오히려 해독효과가 낮아질 수도 있다는 결과와 비교해 볼때 유사한 경향인 것으로 생각

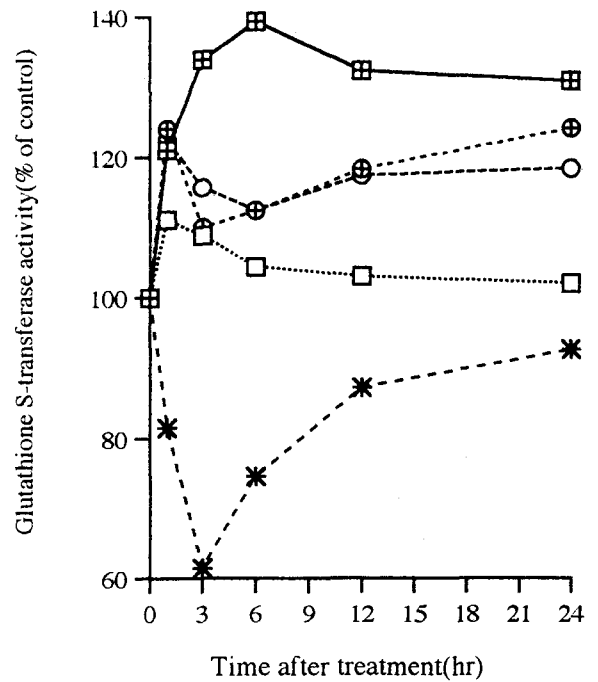


Fig. 2. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium (PB) and 3-methylcholanthrene (3-MC) on activity of glutathione S-transferase in israeli carp. 田-田, Carbofuran 0.95 ppm+PB 20 mg/kg; □-□, PB 20 mg/kg; ⊕-⊕, Carbofuran 0.95 ppm+3-MC 20 mg/kg; ○-○, 3-MC 20 mg/kg; \*-\* , Carbofuran 0.95 ppm.

된다.

### 효소활성에 미치는 carbofuran과 PB 및 3-MC의 영향

#### 대조군에서 이스라엘 잉어의 효소활성

Carbofuran이나 PB 및 3-MC 무처리군에서 이스라엘 잉어의 효소활성은 Table 3에서 보는 바와 같이 AChE 93.64 ± 3.36, GST 52.30 ± 2.78, UDPGT 0.126 ± 0.032과 monooxygenase 0.038 ± 0.004로 이중 AChE와 GST는 임과 한<sup>10)</sup>의 이스라엘 잉어에서의 실험결과인 AChE 97.54 ± 2.972, GST 52.08 ± 1.486과 양 등<sup>9)</sup>의 잉어에서의 실험결과인 GST 49.90 ± 1.46과 비슷한 수준이었다. 또한 UDPGT와 monooxygenase는 각각 Sivarajah 등<sup>20)</sup>의 잉어에서의 실험결과인 UDPGT 0.121 ± 0.021과 monooxygenase 0.04 ± 0.01으로 비슷한 수준이었다.

#### AChE 활성

Carbofuran과 PB 및 3-MC의 조합처리에 따른 AChE의 경시적 변화는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. PB나 3-MC만 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 효소활성이 크게 증가 되었으나 carbofuran만을 처리한 실험군에서의 효소활성은 초기부터 저해를 시작하여 6시간에는 약 60%의 AChE 효소활성을 저해시킨 후에도 24시간 내내 평균 40% 이상의 저해를 나타냈으며 carbofuran+3-MC 처리군은 처리 1시간 그리고 carbofuran+PB 처리군은 처리 3시간까지 활성이 감소되다가 이후부터 빠른 속

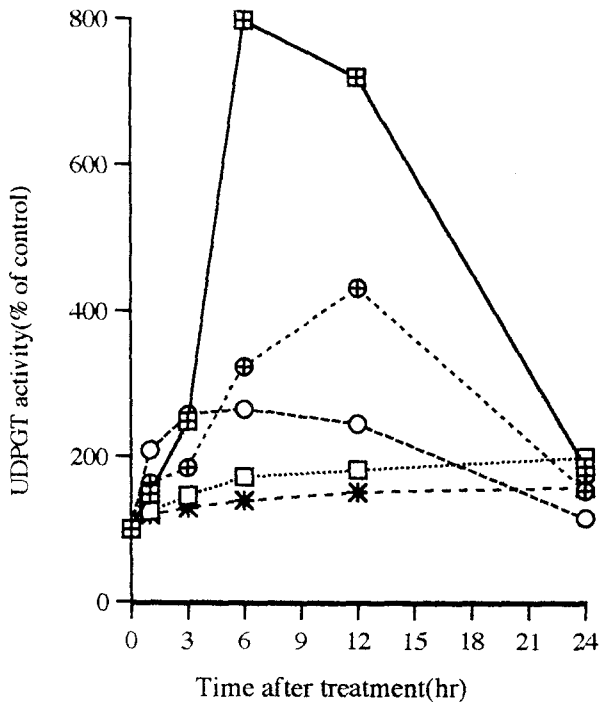


Fig. 3. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium (PB) and 3-methylcholanthrene (3-MC) on activity of UDP-glucuronosyltransferase in israeli carp. ■-■, Carbofuran 0.95 ppm+PB 20 mg/kg; □-□, PB 20 mg/kg; ⊕-⊕, Carbofuran 0.95 ppm+3-MC 20 mg/kg; ○-○, 3-MC 20 mg/kg; \*-\*, Carbofuran 0.95 ppm.

도로 활성이 증대되어 처리 24시간 후에는 무처리군과 비슷한 효소활성을 나타냈다. 이상의 결과 PB 및 3-MC만 처리시의 효소활성은 대조군에 비해 현저히 높고 carbofuran과 PB 및 3-MC 조합처리시 carbofuran만 처리한 실험군에 비해 효소활성이 높고 회복속도도 빠른 것으로 보아 PB와 3-MC가 AChE 효소활성을 회복시키는 데 큰 영향을 끼친 것으로 생각된다.

**GST 활성**

Carbofuran과 PB 및 3-MC의 조합처리에 따른 GST의 경시적 변화는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 PB 및 3-MC만 처리한 실험군에서 GST활성은 대조군에 비해 증가되었으나 carbofuran만을 처리한 실험군에서는 약제처리 후 1시간부터 6시간까지 40~60%가 저해되었으며 활성의 회복속도가 아주 느린데 비해 carbofuran과 PB 및 3-MC를 조합처리한 실험군에서의 GST활성은 처리 1시간 후 부터 급격히 증가되어 24시간 내내 대조군보다 높은 활성을 유지하였다. 이와 같이 carbofuran과 PB 및 3-MC를 조합처리한 실험군에서는 빠른 속도로 효소활성을 유도한 것으로 보아 PB 및 3-MC가 GST활성에 영향을 끼친 것으로 생각된다.

**UDPGT 활성**

Carbofuran과 PB 및 3-MC의 조합처리에 따른 UDPGT의 경시적 변화는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 carbo-

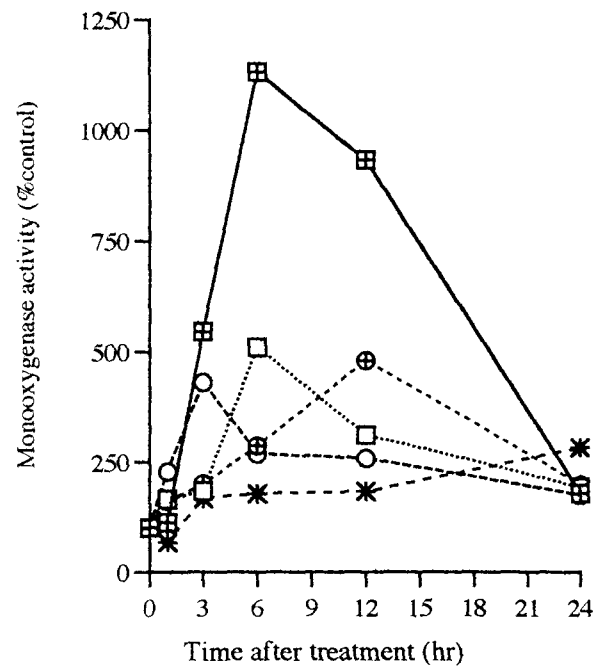


Fig. 4. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium (PB) and 3-methylcholanthrene (3-MC) on activity of cytochrome P-450-dependent monooxygenase in israeli carp. ■-■, Carbofuran 0.95 ppm+PB 20 mg/kg; □-□, PB 20 mg/kg; ⊕-⊕, Carbofuran 0.95 ppm+3-MC 20 mg/kg; ○-○, 3-MC 20 mg/kg; \*-\*, Carbofuran 0.95 ppm.

furan만을 처리한 실험군에서의 UDPGT활성은 20~30%의 증가를 보이고 있으나 carbofuran과 PB 및 3-MC를 조합처리한 실험군에서의 UDPGT활성은 PB의 경우 carbofuran만 처리한 실험군에 비해 3시간 후에는 약 2배, 6시간 후에는 6배 이상, 12시간 후에는 5배 정도의 활성 증가를 보이다가 서서히 낮아지는 양상을 나타냈으며, 3-MC의 경우 처리 6시간 후에 3배 이상의 효소활성을 나타낸 것으로 보아 PB 및 3-MC가 UDPGT의 활성유도에 큰 영향을 끼친 것으로 생각된다.

**Monooxygenase 활성**

Carbofuran과 PB 및 3-MC의 조합처리에 따른 monooxygenase의 경시적 변화는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 carbofuran만을 처리한 실험군에서는 약제처리후 부터 활성증가를 보여 3시간 후부터 무처리군에 비하여 2배 이상의 활성을 나타냈으나 carbofuran과 PB 및 3-MC의 조합처리군의 효소활성은 PB의 경우 대조군에 비해 처리 3시간 후에는 4배, 6시간 후에는 6배 이상의 높은 효소활성을 보이다가 서서히 낮아지는 경향이었고, 3-MC의 경우 처리 3시간 후에는 약 2배의 활성을 나타낸 것으로 보아 PB 및 3-MC가 효소활성 유도에 크게 영향을 끼친 것으로 생각된다.

**Glycogen 함량**

Carbofuran과 해독제 PB 및 3-MC의 조합처리에 따른 glycogen의 경시적 변화는 Fig. 5에서 보는 바와 같이

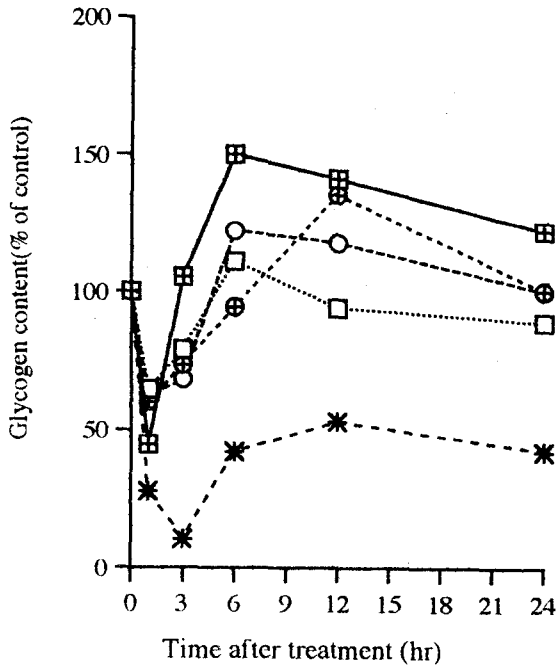


Fig. 5. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium (PB) and 3-methylcholanthrene (3-MC) on glycogen content in israeli carp.  $\blacksquare$ - $\blacksquare$ , Carbofuran 0.95 ppm+PB 20 mg/kg;  $\square$ - $\square$ , PB 20 mg/kg;  $\oplus$ - $\oplus$ , Carbofuran 0.95 ppm+3-MC 20 mg/kg;  $\circ$ - $\circ$ , 3-MC 20 mg/kg;  $*$ - $*$ , Carbofuran 0.95 ppm.

carbofuran만을 처리한 실험군에서는 무처리 대조군에 비해 3시간까지 급격한 소모 및 분해로 약 90%까지 감소하였는 바 이 결과는 glycogen이 stress나 외부물질의 도입에 의해 소모되거나 분해되는 것으로 알려져 있고 IBP등의 농약을 처리했을 때 어류의 간에서 glycogen의 합성이 저해되거나 파괴가 유도된다는 양 등<sup>9)</sup>의 결과와 일치함을 알 수 있었다. 한편, carbofuran과 PB나 3-MC를 조합처리한 실험군에서는 PB의 경우 처리후 1시간까지는 약 56% 정도의 감소를 보이다가 회복을 시작하여 처리 3시간 후에는 오히려 glycogen함량이 약 40% 이상 증대되었고, 3-MC의 경우 처리후 1시간까지는 약 40%의 감소를 보였으나 서서히 회복되어 처리 6시간 후에는 무처리 대조군과 유사한 glycogen함량을 나타냈으며 12시간 후에는 40% 정도 증대된 것으로 나타났다. 따라서 carbofuran과 PB나 3-MC의 조합처리는 glycogen의 함량을 증대시켰으므로 PB 및 3-MC가 glycogen의 생성에 관여하지 않았나 추정된다.

상기결과를 종합 분석해 보면 carbofuran은 AChE를 target enzyme으로 하여 신경계의 자극전달 작용에 필수적인 acetylcholine의 가수분해에 관여하는 이 효소의 활성을 저해함으로써 치사에 이르게 하며<sup>21)</sup> GST는 glutathione과 촉매적 conjugation을 이루어 비극성 이물질들을 친수성으로 하기 때문에 모든 생물에서 이물질의 대사적 해독에 중요한 해독효소로 알려져 있다.<sup>22)</sup> 또한 UDP-GT는 UDP-glucuronide의 6번 탄소를 절단시켜 mucopolysaccharide가 주요구성성분인 glucuronic acid를 생

성하는데, 이는 alcoholic과 phenolic 화합물의 해독기능을 가지고 있고,<sup>23)</sup> cytochrome P-450효소계는 독성물질의 해독에 가장 중요한 역할을 하는 해독효소인 monooxygenase반응을 촉매하는 효소군으로써 흡수된 외부물질의 대사에 관여하는 microsome 전자전달계의 최종산화 효소로 친유성 생리물질의 기질을 산화시켜 외부물질을 불활성화 물질로 대사시켜 무독화 시킨다.<sup>24)</sup> 따라서 이와같은 효소활성저해나 해독효소로 알려진 이들 효소들의 활성에 미치는 carbofuran과 PB나 3-MC의 상호작용을 구명한다는 것은 의미있는 일이기 때문에 본 실험을 수행한 결과 이스라엘잉어에 carbofuran과 PB 또는 3-MC를 조합처리했을 때 생존율이 carbofuran만을 처리한 실험구보다 높게 나타나 PB 및 3-MC의 해독작용 효과가 인정되었고, 효소에 따라 정도의 차이는 있으나 이들의 조합처리로 효소 활성은 크게 증대되었다. Lichtenstein 등<sup>25)</sup>에 의하면 carbofuran의 경우 초기 대사산물의 conjugation은 잘 일어나나 그 결합 endo-con간에는 차이를 나타내어 주로 glucuronide나 sulfate 결합 형태일 것으로 추정된다는 보고에 비추어 볼 때 carbofuran은 cytochrome p-450효소계가 방향족 수산화작용을 유발시켜 carbofuran의 3번 탄소부분에 OH기를 생성시키고(I相 효소반응 : 3-hydroxy carbofuran), carbofuran의 작용기 중 N부분을 UDPGT가 관여 II相 효소반응인 N-glucuronides화 하여  $N \cdot C_6H_5O_6$ 로 변환시킴으로써 3-hydroxy carbofuran phenol 또는 carbofuran phenol로 무독화시켜 가는 과정에 이들 효소(GST, UDPGT, monooxygenase)가 관여하는 것으로 추정된다. 또한 간의 microsome(UDPGT, monooxygenase)이나 cytosol(GST)의 효소들에 의해 분해되는 과정은 대부분 microsome의 monooxygenase에 의해 먼저 산화되어 분해된 대사물질이 UDPGT 또는 GST등의 효소에 의해 분해되는 일련의 대사과정을 거쳐 무독화되는데<sup>15)</sup> 여기에 PB 및 3-MC가 관여하여 효소활성을 촉진시킴으로써 carbofuran 1차 대사물질을 더욱 빠른 속도로 대사시키기 때문에 이스라엘잉어의 생존율을 높이는 결과를 가져온 것이라 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 1995학년도 원광대학교 교내연구비(일반과제) 지원에 의하여 수행되었으며, 연구비를 지원해 준 학교당국에 감사를 표합니다.

## 참고 문헌

1. Ware, G. W. (1983) 'Pesticides: Theory and Application', p. 44-48, Freeman, New York.
2. Holden, A. V. and D. W. Johnson (1973) 'Environmental Pollution by Pesticides: Pesticide residues in fish' (C. A. Wilkinson. ED), p. 182-253, Plenum, London/New York.
3. 환경농학 편집위원회 (1991) 환경농학, p. 267, 한국환경농학회, 한림저널사.

4. 金澤 純 (1971) 北日本 病蟲年譜 **13**, 83.
5. Cueto, C. Jr. and W. J. Hayes, Jr. (1967) Effect of repeated administration of phenobarbital on the metabolism of dieldrin. *Ind. Med. Surg.* **36**, 546-551.
6. Lidman, U., L. Forlin, O. Molander and G. Axelson (1976) Induction of the drug metabolizing system in rainbow trout (*salmo gairdneri*) liver by polychlorinated biphenyls(PCB). *Acta Pharmacol. Toxicol.* **39**, 262-272.
7. Hayaoka, T. and W. C. Dauterman (1983) The effect of phenobarbital induction on glutathione conjugation of diazinon in susceptible and resistant house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.* **19**, 344-349.
8. 이성규, 박철원, 노정구 (1984) 농약의 급성어독성과 처리 방법에 따른 毒性的 변화. *한국환경농학회지* **3**, 45-51.
9. 양광록, 심재한, 서용택 (1992) 농약상호간의 협력작용에 의한 잉어의 독성과 해독효소 활성 비교. *한국농화학회지* **35**, 367-374.
10. 임요섭, 한성수 (1995) 농약에 의한 참잉어 및 이스라엘 잉어의 급성독성 비교. *한국환경농학회지* **14**, 163-170.
11. 橋本康 (1981) '農藥實驗法-6:水生動物實驗法', 環境化學分び析編, p. 186-200, ソフトサイ エンス社發行, Japan.
12. Bradford, M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
13. Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres, Jr. and R. M. Featherstone (1961) A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
14. Habig W. H., M. J. Pabst and W. B. Jokoby (1974) Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.
15. Anderson T., M. Pesonen and C. Johanson (1985) Differential induction of cytochrome p-450-dependent monooxygenase, epoxide hydrolase, glutathione transferase and glucuronosyltransferase activities in the liver of the rainbow trout by  $\beta$ -naphthoflavone or clophen A50. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 3309-3314.
16. Koivusaari U. (1983) Thermal acclimatization of hepatic polysubstrate monooxygenase and UDP-glucuronosyltransferase of Mature rainbow trout(*salmo gairdneri*). *J. Exp. Zool.* **227**, 35-42.
17. Shang, C. C. and D. M. Soderlund (1984) Monooxygenase activity of tobacco budworm (*Heliothis virescens* F.) larvae: tissue distribution and optimal assay conditions for the gut activity. *Comp. Biochem. Physiol.* **79B**, 407-411.
18. Murty, A. S. and A. P. Devi (1982) The effect of endosulfan and its isomers on tissue protein, glycogen, and lipids in the fish *Channa punctata*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **17**, 280-286.
19. Loomis, T. A. (1956) The effect of an aldoxime on acute sarin poisoning. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **118**, 23-128.
20. Sivarajah, K., C. S. Franklin and W. P. Williams (1978) The effect of polychlorinated biphenyls on plasma steroid levels and hepatic microsomal enzymes in fish. *J. Fish Biol.* **13**, 401-409.
21. Reiner, E. and W. N. Aldridge (1967) Effect of pH on inhibition and spontaneous reactivation of acetylcholinesterase treated with series of phosphoric acids and of carbamic acids. *J. Biochem.* **105**, 171-179.
22. Boyland, E. and L. F. Chasseaud (1970) The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advan. Enzymol.* **32**, 172-192.
23. Isselbacher, K. J. (1965) Enzymatic Mechanism of hormone metabolism, II. Mechanism of hormonal glucuronide formation. *Recent Prog. Horm. Res.* **12**, 134-146.
24. Black, S. D. and M. J. Coon (1986) Cytochrome P-450; P. Ortize de Montellano Ed., p. 161-213, Plenum, New York.
25. Lichtenstein, E. P., J. L. Kunstman, T. W. Fuhremann and T. T. Liang (1979) Effects of atrazine on the toxicity: penetration and metabolism of carbofuran in the housefly. *J. Econ. Entomol.* **72**, 780-788.

#### Effect of Insecticide Carbofuran and Phenobarbital Sodium and 3-Methylcholanthrene on Activity of Enzyme in Israeli Carp(*Cyprinus israeli carpio* L.)

Seong-Soo Han\*, Yo-Sup Rim and Jea-Hun Jeong (Department of Agricultural Chemistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea)

**Abstract**: Effects of insecticide carbofuran and phenobarbital sodium(PB) or 3-methylcholanthrene(3-MC) on activities of several enzymes in israeli carps were investigated. Survival number of israeli carp was the same as that of control when PB and 3-MC only was treated, individually and that was low compared to control when carbofuran only was treated. But survival rate of israeli carp was high compared to individual treatment of carbofuran when combination treatment of carbofuran and PB or 3-MC was carried out. These results indicate that PB and 3-MC can intervene to detoxify carbofuran exposed to israeli carp. In *in vivo* test for the effect of this chemicals on activity of enzyme in israeli carp, activities of acetylcholinesterase(AChE) and glutathione S-transferase(GST) were inhibited in carbofuran treatment, but did not in combination treatment of carbofuran and PB or 3-MC. Activities of UDP-glucuronosyltransferase (UDPGT) and cytochrome P-450-dependent monooxygenase increased in individual or combined treatments of carbofuran and PB or 3-MC. These results suggest that a simultaneous application of carbofuran and PB or 3-MC is critical for the enhancement of activity of AChE, GST, UDPGT and monooxygenase and the protection of israeli carp from carbofuran toxicity.

\*Corresponding author