

해면체에서 추출한 Pectenotoxin 2의 마우스에서의 반복적인 투여에 의한 독성 및 간대사효소계에 주는 영향

윤미영 · 김영철*

서울대학교 약학대학

Toxicity and Changes in Hepatic Metabolizing Enzyme System Induced by Repeated Administration of Pectenotoxin 2 Isolated from Marine Sponges

Mi Young Yoon and Young Chul Kim*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract – Pectenotoxin 2 (PTX2), isolated from marine sponges, was examined for its hepatotoxic potential using male ICR mice. PTX2 (20 or 100 µg/kg/day, ip) was administered to mice repeatedly for one or two week. Histopathological examination revealed an increase in granularity in the liver from the mice treated with PTX2. PTX2 did not alter the parameters for hepatotoxicity and nephrotoxicity such as sorbitol dehydrogenase (SDH), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and blood urea nitrogen (BUN). Cytochrome P-450, cytochrome b₅, or NADPH cytochrome c reductase was not changed by repeated administration of PTX2. Hepatic microsomal activity of *p*-nitroanisole *O*-demethylase, but not aminopyrine *N*-demethylase, was slightly depressed by PTX2 administered repeatedly (100 µg/kg/day, ip) for 2 weeks. The toxicity of PTX2 (200 µg/kg/day, ip) was determined in mice pretreated with a metabolic inducer or inhibitor such as phenobarbital, 3-methylcholanthrene, CoCl₂, or SKF 525-A. Significant alterations in lethality and hepatotoxicity of PTX2 were observed in mice pretreated with a metabolic modulator. The results suggest that liver seems to be the target organ for PTX2 toxicity and also that induction of the PTX2 toxicity may be associated with hepatic drug metabolizing activity.

Key words – Pectenotoxin 2; hepatotoxicity; marine sponge; drug metabolizing activity.

Pectenotoxin 2 (PTX2)는 DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning)를 유발하는 조개류인 *Patinopecten yessoensis*의 소화기에서 처음 분리된 polyether lactone의 구조를 가진 물질로서,¹⁾ 설사를 유발하는 성분과는 관련이 없는 것으로 알려져 있다. 최근 우리나라 근해에 서식하는 해면의 연합체(*Pocillostra* sp.와 *Jaspis* sp.)로부터 PTX2의 분리가

보고되었다.²⁾ 이 물질을 대상으로 실시된 *in vitro* 실험결과 몇 종류의 cancer cell lines에 탁월한 cytotoxicity를 나타냄이 관찰되어 이 물질에 대한 활발한 연구의 필요성이 제시된 바 있다.

본 연구실에서는 PTX2를 동물의 체내에 투여시 발현되는 독성과 그 기전에 대한 연구를 수행해 오고 있다. 이 물질을 급성적으로 일회투여시 LD₅₀은 411 µg/kg이며 조직검사 및 생화학적 검사결과 PTX2 독성의 표적장기는 간으로 확인되었다.³⁾

*교신저자 : Fax 02-872-1795

본 연구에서는 마우스에게 PTX2를 2주간까지 반복적으로 투여하였을 때 이 물질의 표적기관인 간에 주는 영향에 대하여 실험하였다. 한편 이미 수행된 급성독성실험과 예비실험결과에서 PTX2에 의하여 약물대사 효소계의 변화가 관찰되었으므로 간대사 효소활성이 이 물질의 독성발현에 주는 영향을 규명하기 위해 대사조절제를 사용하였다.

재료 및 방법

실험동물 - 전 실험에 걸쳐 서울대학교 실험동물 사육장에서 공급받은 5주령의 ICR 웅성 마우스를 2주 동안 본 대학의 사육실에서 적응시킨 후 사용하였다. 사육실은 온도 $22 \pm 5^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ 의 환경을 유지하였으며 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 고품사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

시약 - PTX2는 우리나라 거문도와 제주도 근해에서 채집한 해면체로부터 분리정제된 순품을 부산대학교 약학대학 정지형교수로부터 공급받아 사용하였다. 실험에 사용된 시약은 NADH, NADPH, 4-dimethylaminoantipyrine, cytochrome c, glutathione reductase, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), glutathione, glucose 6-phosphate (이상 Sigma 시약) 등이며 이 이외에 사용된 시약 및 용매류는 모두 reagent grade 또는 그 이상이였다.

PTX2 및 대사조절제의 투여 - PTX2를 마우스에게 매일 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 또는 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 의 용량으로 2주까지 반복투여하고 독성을 측정하였다. PTX2는 1% tween-60 용액에 현탁하여 $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$ stock 용액으로 만든 후 용시 희석하여 1주 또는 2주일간 연속으로 복강투여하였다. 투여액량은 체중 1 kg 당 10 ml이 되도록 하고 대조군에는 1% tween-60 용액을 같은 부피로 투여하였다.

한편, 별도의 실험에서 PTX2의 독성발현에 약물대사 효소계활성의 역할을 확인하기 위해 대사능력유도제인 phenobarbital, 3-methylcholanthrene(3-MC)과 억제제인 CoCl_2 및 SKF 525-A를 동물에 전처리하고 PTX2의 간독성 및 치사작용에 관해 연구실험하였다. Phenobarbital은 $50 \text{ mg}/\text{kg}$ 용량으로 3일간 복강투여, CoCl_2 는 $60 \text{ mg}/\text{kg}$ 용량으로 2일간 피하주사, 3-MC는 $20 \text{ mg}/\text{kg}$ 용량으로 2일간 복강

투여하고 각각의 약물 최종 투여 24시간 경과후에 PTX2를 투여하였다. SKF 525-A는 $50 \text{ mg}/\text{kg}$ 용량으로 PTX2 투여 1시간 전에 복강투여하였다.

PTX2 반복투여시의 조직병리학적 검사 - 투여된 동물에게서 일반증상, 체중증가 등을 측정하고 투여 기간 종료시 부검하였다. 육안적인 병리검사를 실시하고 간, 폐, 신장조직을 분리한 후 포르말린으로 고정하고 파라핀에 포매하여 검체를 조제하였다. 박절된 조직을 Hematoxylin & Eosin으로 염색후 광학현미경으로 병변을 관찰하였다.

간 및 신장독성의 측정 - 마우스의 심장에서 채혈하여 혈청을 분리한 뒤 간 및 신장독성의 측정에 사용하였다. Alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate aminotransferase (AST)의 활성은 Reitman과 Frankel의 방법⁴⁾을 이용하여 측정하였다. Sorbitol dehydrogenase (SDH) 활성은 Gerlach의 방법⁵⁾에 의하여 측정하였다. 신장독성의 지표로 혈청 중의 urea (Blood Urea Nitrogen: BUN)를 urease로 분해하여 측정하였다.^{6,7)}

간대사활성의 측정 - Omura와 Sato의 방법⁸⁾에 따라 간의 microsomes을 분리하여 cytochrome P-450 및 cytochrome b_5 함량을 측정하였다. NADPH cytochrome P-450 reductase는 artificial electron acceptor인 cytochrome c를 이용하여 NADPH cytochrome c reductase 활성으로서 측정하였다.⁹⁾ Microsomes 단백질량은 Lowry 등의 방법¹⁰⁾을 이용하여 측정하였다.

Aminopyrine *N*-demethylase 활성은 반응생성물인 formaldehyde를 Nash의 방법에 따라 측정하여 구하였다.¹¹⁾ *p*-Nitroanisole *O*-demethylase의 활성은 Shigematsu 등의 방법에 따라 생성물인 *p*-nitrophenol을 4 N의 KOH로 발색시켜 측정하였다.¹²⁾

통계처리 - 실험결과는 각 군의 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며 two tailed Student's *t*-test 및 one-way ANOVA와 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였다. 각 군간의 사망률의 비교는 χ^2 test를 이용하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 반복적으로 투여된 PTX2에 의한

일반적인 독성과 특히 간 및 간대사효소계에 주는 영향에 대해 실험하였다.

PTX2를 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 또는 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 의 용량으로 1주 또는 2주간 매일 투여하면서 대조군과 체중증가율(%)을 비교한 결과 PTX2를 1주까지 반복투여한 경우는 고용량군에서(100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) 체중증가가 다소 둔화되는 경향을 보였다. 그러나 PTX2를 2주까지 반복투여하였을 때는 각 용량군 모두 정상대조군과 비교하여 체중증가율에 유의성있는 차이가 나타나지 않았다(data not shown).

PTX2의 투여종료 후 전 동물을 부검하여 육안으로 관찰하였으나 특별한 이상이 발견되지 않았다. 간, 폐, 신장조직을 포르말린용액으로 고정하여 광학현미경으로($\times 40$ 배율) 관찰한 결과 PTX2를 1회 투여했던 실험에서와 동일하게 간조직에서만 미약한 병변으로 간세포내에 granularity의 증가가 관찰되었다(Fig. 1).

PTX2를 각 용량으로 1주 또는 2주간 반복투여하고 최종투여후 24시간 경과시에 대표적인 간독성의 지표인 혈청중의 ALT, AST, SDH 활성을 측정하였다. 그러나 2주간까지 투여된 PTX2에 의하여 이들 지표의 유의적인 변화는 관찰되지 않았다(Table I). PTX2 반복투여에 의하여 신장독성 지표의 하나인 혈청중의 BUN의 양도 대조군과 유의성있는 차이가 유발되지 못하였다.

PTX2를 일회 투여한 실험에서 이 물질이 간대사 활성을 일부 감소시킴이 보고 되었으므로³⁾ 이 물질

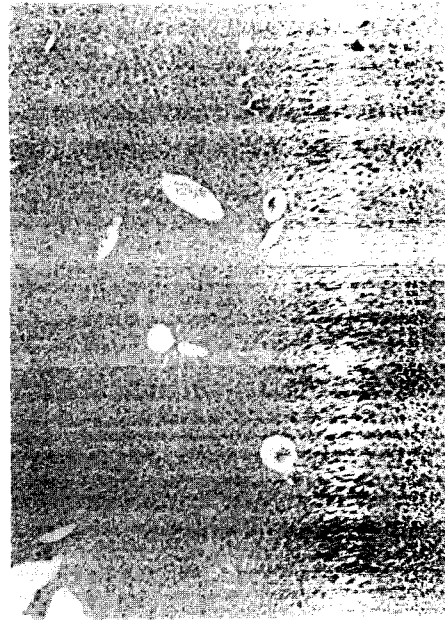


Fig 1. Light micrograph of a liver from a mouse treated with PTX2 for two weeks (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$). Granularity increases in Zone I-II ($\times 40$).

을 반복투여하였을 때 간대사효소계에 주는 영향에 대해 실험하였다. PTX2의 2주간 투여에 의하여 단위체중당 간의 무게는 유의성있는 차이가 유발되지 않았으며 간의 단위무게당 microsomes 단백질 함량도 변화되지 않았다(data not shown). 일회투여시에는 간의 microsomes 단백질 함량의 현저한

Table I. Effect of PTX2 on serum enzyme activities in mice

Treatment Period	Treatment	SDH (units/ml)	ALT (units/ml)	AST (units/ml)	BUN (units/ml)
1 Week	Control	25.00 \pm 13.54	28.29 \pm 9.43	32.06 \pm 10.15	21.31 \pm 5.20
	PTX2 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	22.14 \pm 13.50	28.96 \pm 3.42	36.05 \pm 19.05	23.51 \pm 3.87
	PTX2 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	21.43 \pm 8.52	27.16 \pm 9.63	33.85 \pm 10.83	20.99 \pm 3.71
2 Week	Control	20.00 \pm 7.56	45.95 \pm 7.39	56.84 \pm 21.30	27.27 \pm 3.76
	PTX2 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	13.75 \pm 14.08	42.28 \pm 4.39	41.92 \pm 11.45	27.48 \pm 4.35
	PTX2 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	8.75 \pm 9.9*	31.09 \pm 7.84*	42.01 \pm 7.82	25.79 \pm 5.51

Each value represents the mean \pm S.D. for 7 or 8 mice. *Significantly different from the control group (Student's *t*-test, $p < 0.05$).

Table II. Effect of PTX2 on hepatic microsomal enzyme system and drug metabolizing activities in mice

Treatment	Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	Cytochrome b ₅ (nmol/mg protein)	NADPH-Cytochrome c reductase (nmol reduced/min/mg protein)	Aminopyrine N-Demethylase (nmol HCHO formed/min/mg protein)	p-Nitroanisole O-Demethylase (product nmol/min/mg protein)
Control	0.70±0.06	0.37±0.01	218.6±6.9	4.86±0.64	2.28±0.04
PTX2 (20µg/kg)	0.68±0.03	0.43±0.06	210.1±11.8	5.52±0.63	2.20±0.03
PTX2 (100 µg/kg)	0.56±0.07	0.39±0.04	211.0±18.9	5.18±0.61	1.97±0.09**

Mice were treated with PTX2 (20 or 100 µg/kg/day, ip) repeatedly for 2 weeks. Each value represents the mean±S.D. for 3 pooled samples each made of livers from 2 mice. **Significantly different from the control group (Student's *t*-test, $p < 0.01$).

감소를 관찰한 바 있으나 반복투여 실험결과로 볼 때 PTX2에 의한 단백질의 감소효과는 일시적이며, 또 가역적인 작용에 기인하는 것으로 추정된다. 간의 microsomes에서 cytochrome P-450 함량은 PTX2투여에 의하여 감소하는 경향을 보였으나 대조군과 비교하여 유의성있는 차이가 나타나지는 않았다(Table II). P-450 효소반응의 전자전달에 관여하여 그 반응속도에 영향을 줄 수 있는 cytochrome b₅ 및 NADPH-cytochrome reductase 활성에도 PTX2는 영향을 주지 않았다. 한편 PTX2 투여에 의하여 각 용량에서 모두 간 microsomes의 aminopyrine N-demethylase 활성에는 유의성있는 차이가 나타나지 않았으나 p-nitroanisole O-demethylase 활성은 PTX2 고용량(100 µg/kg) 투여군에서 다소 감소하는 것으로 관찰되었다.

PTX2의 독성이 조직검사를 통해 판단할 때 간에

만 특이적으로 발견되고 또한 이전의 실험결과로부터 이 물질이 간대사효소계에 영향을 주는 것이 관찰되었으므로 잘 알려진 몇가지 간대사효소활성의 inducer와 inhibitor들을 전처리하고 PTX2(200 µg/kg)를 투여하여 간독성 지표들과 치사율의 변화를 측정하였다. 간의 cytochrome P-450의 inducer로는 대표적으로 쓰이는 phenobarbital과 3-methylcholanthrene(3-MC)을 사용하였다. 일회투여된 이 용량의 PTX2에 의해 50%의 동물이 사망하였으나 phenobarbital이 전처리된 동물에서는 사망이 일어나지 않았다(Table III). 반면, phenobarbital-inducible type을 주로 inhibition하는 P-450 inhibitor인 SKF 525-A를 투여한 경우는 약 80%의 동물이 사망하여 phenobarbital 전처리군과 SKF 525-A 전처리군간의 mortality가 유의성있는 차이를 보였다(χ^2 test, $p < 0.05$).

Table III. Effect of microsomal enzyme inducers and inhibitors on serum enzyme activities in mice treated with PTX2 (200 µg/kg)

Treatment	Mortality	SDH (units/ml)	ALT (units/ml)	AST (units/ml)	BUN (units/ml)
Control	0/15	22.33±10.67	37.71±12.19	45.28±20.85	24.29±5.35
PTX2 only	3/6	306.67±219.62	368.55±317.07	180.06±102.99	136.09±165.08
Phenobarbital+PTX2	0/6	218.33±44.01	360.77±43.74	163.99±34.60	154.87±160.97
CoCl ₂ +PTX2	0/6	153.33±59.89	416.93±202.30	203.66±68.39	169.84±93.43
3-MC+PTX2	3/6	64.44±65.77	118.68±73.98	226.55±189.77	121.30±95.42
SKF 525-A+PTX2	5/6	680	828	260	255

Mortality is expressed as the number of dead animals per total animals used in each group. Each value represents the mean±S.D. for surviving mice.

이러한 결과는 phenobarbital에 의하여 induction되는 CYP 2B군이 PTX2의 무독화에 영향을 줄 가능성을 시사하고 있는 것으로 보인다. CoCl_2 역시 P-450의 inhibitor로 사용되나 SKF 525-A와는 일치되지 않는 결과를 보였다. 그러나 CoCl_2 는 P-450에 직접 작용하는 competitive inhibitor 또는 mechanism based inhibitor가 아니고 heme과 apocytochrome의 association을 억제하고 heme degradation을 촉진하기 때문에 P-450 반응을 억제한다고 알려져 있는 물질이므로^{13,14} 본 실험에서 PTX2의 독성과 관련하여 CoCl_2 의 역할을 명확하게 정의하기는 어려울 것으로 보인다. 실제로 CoCl_2 는 간의 무독화 과정에 중요 요소인 glutathione의 함량을 증가시킴이 보고되어있다.¹⁵ 3-MC 전처리 경우는 간독성 지표중 SDH 활성이 PTX2만 투여한 군이나 phenobarbital 전처리 군에 비하여 유의성있는 감소를 보였고(Duncan's multiple range test, $p < 0.05$). 부검시 PTX2 독성의 주요증상으로 나타나는 홍강이나 복강의 물이 관찰되지 않았으므로 PTX2 독성발현이 감소된 것으로 보인다. 그러나 3-MC 전처리는 PTX2에 의한 치사율을 저하시키지 못하였으며, 따라서 보다 확실한 관계를 이해하기 위해서는 앞으로 추가실험이 필요할 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합하면 2주간까지 반복투여된 PTX2에 의한 병변은 간에서만 한정적으로 발생하는 것으로 보이나 간 및 혈청에서 측정된 생화학적인 간독성의 지표에는 변화를 주지 못하였으므로 이미 보고된 PTX2의 일회투여 실험결과와 비교해 보면 이 물질에 의한 간독성은 가역적이거나 또는 축적되지 않는 성질을 가진 것으로 판단된다. 한편 대사조절제를 이용한 실험결과 PTX2의 독성 발현에 일부 약물대사효소계의 활성이 중요한 역할을 하고 있을 가능성이 암시되고 있으나 보다 자세한 것은 추후 계속 실험되어야 할 것이다.

사 사

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 연구비에 의해 지원되었습니다. 저자들은 조직검체를 검경해 주신 서울대학교 수의과대학 이영순 교수께 감사드립니다.

인용문헌

1. Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G. K. and Clardy, J. (1985) Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41: 1019-1025.
2. Jung, J. H., Sim, C. J. and Lee, C. O. (1995) Cytotoxic compounds from a two-sponge association. *J. Nat. Prod.* 58: 1722-1726.
3. Yoon, M. Y. and Kim, Y. C. (1997) Acute toxicity of pectenotoxin 2 and its effects on hepatic metabolizing enzyme system in mice. *Kor. J. Toxicol.* 13: 183-186.
4. Reitman, S. and Frankel, S. K. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Amer. J. Clin. Pathol.* 28: 56-63.
5. Gerlach, U. E. (1965) Sorbitol Dehydrogenase. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods in Enzymatic Analysis*, 761-764. A.E. Harper, New York.
6. Chaney, A. L. and Marbach, E. P. (1962) Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8: 130-132.
7. Kaplan, A. (1965) Urea nitrogen and urinary ammonia. In S. Metes (ed.), *Standard Methods of Clinical Chemistry*, 5: 245-256. Academic Press, New York.
8. Omura, T. and Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378.
9. Guengerich, F. P. (1994) Analysis and Characterization of Enzymes. In Hayes, A.W. (ed.), *Principles and Methods of Toxicology*, 1269-1270. Raven Press, New York.
10. Lowry, O. H., Rosebrough, N. G., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
11. Fowler, B. A., Kleinow, K. M., Squibb, K. S., Lucier, G. W. and Hayes, A. W. (1994) Organelles as tools in Toxicology. In Hayes, A. W. (ed.), *Principles and Methods of Toxicology*, 1217. Raven Press, New York.
12. Shigematsu, H., Yamano, S. and Yoshimura, H. (1976) NADH-dependent O-deethylation of p-nitrophenetole with rabbit liver microsomes. *Arch. biochem. Biophys.* 173: 178-186.
13. Maines, M. D. and Kappas, A. (1975) Cobalt stimulation of heme degradation in the liver.

- J. Biol. Chem.* 250: 4171-4177.
14. Guzelian, P. S. and Bissell, D. M. (1976) Effect of cobalt on synthesis of heme and cytochrome P450 in the liver. *J. Biol. Chem.* 251: 4421-4427.
 15. Roberts, S. A., Price, V. F. and Jollow, D. J. (1986) The mechanisms of cobalt chloride-induced protection against acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* 14: 25-33.

(1997년 11월 5일 접수)