

살충제 Carbofuran과 Phenobarbital Sodium 및 3-Methylcholanthrene이 쥐의 효소활성에 미치는 영향

임요섭* · 한성수¹

순천대학교 농과대학 농화학과, ¹원광대학교 생명자원과학대학 농화학과

요약 : 쥐에 있어서 carbamate계 살충제 carbofuran의 독성에 미치는 phenobarbital sodium(PB) 또는 3-methylcholanthrene(3-MC)의 영향과 작용기작을 효소적 측면에서 구명할 목적으로 이들을 단독 또는 조합으로 경구투여 하여 *in vivo* 효소활성을 조사하였다. Acetylcholinesterase(AChE)와 butyrylcholinesterase(BuChE)의 효소활성은 carbofuran 3.8 mg/kg을 투여하였을 때 48시간까지 20~70%범위의 저해를 보였고, carbofuran과 PB 또는 3-MC를 조합 투여하였을 때 효소활성은 초기에 감소하다가 24시간 후에는 대조군과 비슷한 수준을 나타냈다. Glutathione S-transferase(GST)의 경우 carbofuran만을 투여하였을 때 초기(0.5~6 hr)에 15~35%의 저해를 보였으나, carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여시 초기에는 약간 저해를 보이다가 3시간 후에는 대조군과 유사한 효소활성을 보였고, 6시간 후에는 대조군에 비해 활성이 20%이상 증가하였다. UDP-glucuronosyltransferase(UDPGT) 및 cytochrome P-450 효소계의 효소활성은 carbofuran과 PB 또는 3-MC를 조합 투여하였을 때 투여 후 6시간까지는 carbofuran만의 투여에 비해 효소활성이 2.6~2.8배 이상 높았다. 이상의 결과에서 PB 및 3-MC의 투여가 이들 효소활성을 유도하므로써 carbofuran의 독성으로부터 쥐를 보호한 것으로 판단된다.(1999년 8월 30일 접수, 1999년 9월 30일 수리)

Key words : carbofuran, phenobarbital sodium, 3-methylcholanthrene, detoxification, enzyme activity.

서론

농약은 농작물의 유해생물 방제에 필수 불가결한 농업 자재이나 자연환경에 노출되어 축적될 경우 식품연쇄를 통해 생태계에 위해 문제를 야기할 수도 있고, 오용과 남용 등에 의한 피해나 비닐하우스 등의 밀폐된 공간 내에서의 작업으로 인한 흡입중독, 그리고 자살목적으로 음용한 경우에 있어서의 중독 등 인축에 대한 급성적 위해 유발가능성이 높은 실정이다.

그러나, 많은 연구들은 농약의 독성과 대사(Abou-Donia 등, 1979; Lichtenstein 등, 1979)에 관한 것으로써 농약의 부작용으로부터 인축을 보호하기 위한 연구는 매우 적으며, 농약의 해독(Taylor 등, 1965), 효소유도제 phenobarbital sodium(PB)과 3-methylcholanthrene(3-MC)이 섬유모세포(한과 임, 1997)와 세포조직의 형태(임과 한, 1997)에 미치는 영향 등에 관한 연구가 인축이 농약에 중독되었을 경우 독성을 경감시킬 수 있는 해독제 개발에 관한 연구의 일부일 뿐이다.

포유동물의 해독효소들은 간의 cytosol과 microsome에 많이 있는데, 특히 glutathione S-transferase, UDP-glucuronosyltransferase, cytochrome P-450 효소계 등이 이물질(異物質)의 해독에 주로 관여하는 효소들이라고 하

였다(Anderson 등, 1985). 한과 임(1998)은 PB 또는 3-MC가 살충제 carbofuran의 쥐에 대한 독성과 이의 독성경감에 끼치는 영향을 조사하기 위하여 이들을 단독 또는 조합으로 경구투여한 후 조사한 쥐의 생존율은 carbofuran 단독처리 시 0%이었으나, carbofuran 과 PB 또는 3-MC 조합투여 시 100% 생존한다고 하여 PB 또는 3-MC가 carbofuran의 독성을 크게 경감시키는 효과가 있음을 지적하였다.

따라서 본 연구에서는 PB 또는 3-MC가 어떻게 carbofuran의 쥐에 대한 독성을 경감시키는 효과가 있는지를 효소학적 측면에서 구명하기 위하여 이들을 단독 또는 조합으로 경구투여한 후 쥐의 몇 가지 효소활성에 미치는 영향과 glycogen 함량변화를 조사하였다.

재료 및 방법

시험 동물

본 실험에 사용된 시험동물은 대한실험동물센터(충북 음성)에서 번식 사육한 80~100 g의 SPF Albino Rat(웅성 Sprague Dawley계)를 구입하여 2주간 순화시킨 뒤 190±10 g의 체중을 가진 쥐만을 선별하여 실험을 수행하였다. 순화 시 사육온도는 23±1°C, 습도는 55~60%, 광도는 인공조명으로 명암을 각각 12시간으로 유지시켜 주었으며 먹이와 물은 삼양식품 rat용 사료(제3224호)와 1차 증류수

*연락저자

를 일정량씩 공급하여 자유로이 섭식할 수 있도록 하였고 깔집은 3일을 주기로 교체하여 분비물로 인한 스트레스를 방지하였다.

시약 및 기기

시험 농약인 살충제 carbofuran(순도: 99.9%)은 국립보건원에서 분양 받았으며, 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 구입하였다.

Bovine serum albumin(BSA), acetylthiocholine iodide (AThCh), butyrylthiocholine iodide (BuThCh), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid):DTNB, glutathione reduced, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB), ethylenediamine tetra-acetic acid(EDTA), glucose-6-phosphate(G-6-P), nicotinamide adenine dinucleotide reduced form(NADH), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), cytochrome C, glycogen, glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-P-DG), flavin adenine dinucleotide (FAD), uridine diphosphoglucuronic acid(UDPGA), sodium deoxycholate, trichloroacetic acid(TCA) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo, U.S.A.)에서, K₂EDTA, p-nitrophenol 및 coomassie brilliant blue G-250 등은 Fluka Chemika AG.(Buchs, Switzerland)에서 p-nitroanisole은 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, U.S.A.)에서, sodium hydrosulfite와 potassium ferrocyanide는 Junsei Chemical Co.(Tokyo, Japan)에서, CO gas(grade : ultra high purity)는 Air Products and Chemicals, INC.(Allentown, PA 18195, U.S.A.)에서, bis-MSB {p-Bis-(2-methylstyryl)benzene}는 Beckman(U.S.A.)에서, 그리고 기타 시약은 상기 회사들의 특급을 각각 구입하여 사용하였다. 기기는 pH meter(Fisher Accumet®, U.S.A.), homogenizer(IKA ultra turrax T-25, Japan), centrifuge(Du Pont sorvall RC-5C, U.S.A.), ultracentrifuge(Hitachi 70P-70, Japan), UV/Vis spectrophotometer(Varian DMS-200, Australia), shaking water bath(Dongyang 2650, Korea), rat cage(Daejong DJ-102, Korea), operating table(Daejong DJ-2412, Korea)을 사용하였다.

In vivo 효소활성에 미치는 carbofuran과 PB 및 3-MC의 영향

Carbofuran[0, 3.8 mg/kg(LD₂₅)]을 경구투여하고 30분 후 여기에 PB 또는 3-MC(0, 60 mg/kg)를 각각 경구투여한 다음 3 마리씩의 쥐를 시간별(0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 96

시간)로 취하여 저온실(3~4°C)내에 설치한 마취상자에서 chloroform으로 마취시킨 후 쥐의 머리와 복벽을 절개하여 뇌, 혈액, 간을 적출하였고, 각 기관별 효소를 추출하여 효소활성을 측정하였다. 단백질 정량은 Bradford법(1976)에 준하여 수행하였다.

Acetylcholinesterase(AChE) 활성 : AChE의 활성측정은 Ellman 등(1961)의 방법에 준하여 수행하였다. 쥐의 뇌 1g에 4°C의 0.1M 인산나트륨 완충용액(pH 7.4) 10 ml를 가하여 glass homogenizer로 30초간 마쇄·균질화시켜 2중 가제로 여과한 homogenate를 15,000 rpm에서 20분간 원심분리한 상정액을 효소원으로 사용하였다. 활성측정은 0.1 M 인산나트륨 완충용액(pH 7.4) 2.5 ml를 효소액 0.5 ml와 함께 시험관에 넣고 수조에서(37°C) 3분간 반응시킨 후 0.01M DTNB 용액 100 μ l와 0.4M MgCl₂ 용액 100 μ l를 가하여 cuvette에 옮기고 spectrophotometer에서 영점을 맞추었다. 기질로써 3차 증류수에 녹인 0.075M AThCh 용액 20 μ l를 미량주사기로 가하여 cuvette 뚜껑을 막아 20초간 흔들어 준 후 412 nm에서 6분간 흡광도 변화를 측정하였으며, 효소활성의 저해율은 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

(A : 대조구의 효소활성, B : 약제투여구의 효소활성)

Butyrylcholinesterase(BuChE) 활성 : BuChE 활성측정은 Abou-Donia 등(1979)의 방법에 준하여 수행하였다. Heparin으로 처리된 시험관에 혈액을 채취, 3~4°C에서 15분간 정치시킨 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리한 상정액인 혈장을 분리하여 4°C의 냉장고에 보존하면서 활성측정시험에 사용하였다. 활성측정은 4 mM tris buffer(pH 7.4) 2.5 ml를 효소액 0.5 ml와 함께 시험관에 넣고 수조에서(37°C) 3분간 반응시킨 후 0.01M DTNB 용액 100 μ l와 0.4M MgCl₂ 용액 100 μ l를 cuvette에 가하고 spectrophotometer의 영점을 조정하였다. 기질로서 0.02M BuThCh 용액 20 μ l를 미량 주사기로 가하여 cuvette 뚜껑을 막아 20초간 흔들어 준 후 412 nm에서 6분간 흡광도 변화를 측정하였다.

Glutathione S-transferase(GST) 활성 : 쥐의 간 1g을 0.1 M 인산완충액(pH 7.4)로 씻은 후 4°C로 냉각된 전술한 완충용액 10 ml를 넣어 glass homogenizer로 30초간 마쇄·균질화시킨 homogenate를 2중 가제로 여과하여 10,000×g에서 20분간 원심분리한 상정액을 다시 105,000×g로 60분간 원심분리하여 상정액을 효소원으로 aryltransferase 활성을 측정하였다. Aryltransferase(CDNB

conjugation) 활성측정은 Habig 등(1974)의 방법에 준하여 15 mM glutathione 1 ml, 0.1M 인산나트륨 완충용액(pH 7.4) 1.5 ml, 효소액 0.5 ml를 시험관에 넣고 수조(37°C)에서 1분간 반응시킨 후 150 mM CDNB 용액 20 μ l를 가하고, cuvette 뚜껑을 막아 10초간 흔들여 준 다음 344 nm에서 5분간 30초 간격으로 흡광도 변화를 측정하였다.

Microsome의 조제 : 저온실(3~4°C)에서 쥐의 간 2 g을 채취하여 Donald 등(1989)의 방법을 변형하여 조제하였다. 즉, 간을 1 mM EDTA가 함유된 1.15% KCl 용액으로 세척한 다음 이 용액 20 ml를 넣어 glass homogenizer로 균질화시켰다. 이 균질액은 이중 가제를 이용하여 여과한 후 10,000×g에서 10분간 원심분리한 상정액을 다시 105,000×g에서 1시간 동안 원심분리하여 microsomal pellet을 얻었다. Microsomal pellet은 1 mM EDTA와 20% glycerol이 함유된 0.1M 인산 완충용액(pH 7.4) 10 ml를 이용하여 glass homogenizer로 균질화시켜 효소액으로 사용하였다.

UDP-glucuronosyltransferase(UDPGT) 활성 : UDPGT 활성측정은 Koivusaari((1983)의 방법에 준하여 수행하였다. 시험관에 microsomal fraction 0.5 ml(1.0 mg/ml), 20 mM K₂EDTA가 함유된 4.5 mM UDPGA 0.5 ml, 0.5M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 1 ml, 10 mM MgCl₂ 0.5 ml와 0.45 mM p-nitrophenol 0.5 ml를 넣고 20분간 진탕항온수조(37°C)에서 반응시킨 후, 3% TCA 용액 0.5 ml로 반응을 중지시키고 여기에 5N NaOH 1 ml를 가한 후 400 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

Cytochrome P-450 효소계의 활성 : 쥐 간의 cytochrome P-450 효소계에 미치는 영향을 조사하기 위해 Omura와 Sato(1964)의 방법에 준하여 cytochrome P-450의 함량, cytochrome b₅의 함량, NADPH cytochrome P-450 reductase의 활성 및 total heme 함량의 변화를 조사하였다. Cytochrome P-450의 함량 측정은 단백질 함량이 0.5 mg/ml가 되게 0.1 M 인산 완충용액(pH 7.4)으로 microsome을 현탁시킨 후 현탁액 3 ml를 cuvette에 넣고 10 mg의 sodium hydrosulfite를 가하여 분광광도계의 흡광도를 영점조정하였다. 그 후 시료 cuvette에 CO gas를 20초간 40방울을 불어 넣어 포화시킨 다음 450 nm와 490 nm에서 흡광도를 측정한 후 그 차이를 구하여 함량을 계산하였다. Cytochrome b₅의 함량 측정은 0.1M 인산 완충용액(pH 7.4)에 현탁시킨 microsomal 현탁액 3 ml(0.5 mg/ml)를 cuvette에 넣고 분광광도계를 영점조정한 다음 시료 cuvette에 최종 농도가 0.2 mM이 되도록 NADH 결정을 넣어 잘 섞은 다음 1분 후에 424 nm와 409 nm에서 측정된 흡광도 차이를 구해 함량을 계산하였다. NADPH cytochrome P-450 reductase 활성 측정은 0.1M 인산 완충용액(pH 7.4)에 녹인 0.125 mM cytochrome C 용액 1 ml와 15 mM KCN 용액 0.2 ml, microsomal 현탁액 0.1 ml(5

mg/ml)를 분광광도계 cuvette에 넣고 시료와 기준 cuvette의 총 부피가 각각 2.4 ml와 2.5 ml가 되게 완충용액을 가한 다음 parafilm으로 밀봉하여 37°C의 항온기에서 3분간 반응시켰다. 그 후 시료 cuvette에 동일한 완충용액에 녹인 10 mM NADPH 용액 0.1 ml를 가하여 550 nm에서 30초 간격으로 5분 동안 흡광도를 측정하였다. Total heme 단백질 함량은 0.1M 인산 완충용액(pH 7.4)에 현탁된 3 ml의 microsomal 현탁액(0.5 mg/ml)의 단백질을 1% sodium deoxycholate로 용해시켜 이 용액 1 ml를 시료와 기준 cuvette에 넣고, 각 cuvette에 0.5N NaOH 용액 0.1 ml, 25 % pyridine 용액 0.5 ml를 가하여 분광광도계의 영점조정 1분 후 시료 cuvette에는 10 mg sodium hydrosulfite를 그리고 기준 cuvette에는 12.5 mM potassium ferrocyanide 용액 10 μ l를 각각 넣어 잘 섞은 다음 557 nm와 575 nm에서 측정된 흡광도 차이를 구해 함량을 계산하였다.

Glycogen의 정량 : Glycogen은 Murty와 Devi(1982)의 방법에 준하여 쥐의 간 100 mg을 30% KOH 용액 1 ml에 넣고 끓는 수조에서 20분간 용해시킨 다음 12,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상정액을 버리고 침전물을 0.6N H₂SO₄ 1 ml로 재용해한 후 0.5N NaOH 수용액을 이용 pH 7.0이 되게 조정하였다. 조정된 액은 증류수로 최종 5 ml가 되도록 정용하였으며 여기에 anthrone 시약(anthrone 0.2 g을 24N H₂SO₄ 1 l에 녹인 용액)을 가하여 vortexing시킨 다음 수조에 옮기고 10분간 반응시킨 직후 얼음 수조에 넣어 급냉시켜 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

In vivo 효소활성에 미치는 carbofuran, PB 및 3-MC의 영향

무투여군의 효소활성 : 표 1에서 보는 바와 같이 AChE 100.46±6.47, BuChE 55.14±2.51, GST 96.67±6.25, UDPGT 0.79±0.08, cytochrome P-450 0.82±0.09, cytochrome b₅ 0.62±0.07, NADPH cytochrome P-450 reductase 0.94±0.06, total heme 0.44±0.11(nmol/mgprotein/min)이었다. 이들 효소의 활성치는 Wang과 Murphy(1982)의 AChE 95.2, Habig 등(1974)의 GST 83.01, Rao 등(1984)의 UDPGT 0.83±0.48과 Alvares 등(1973)의 cytochrome P-450 0.73±0.02(nmol/mgprotein/min)와는 비슷한 수준이었다.

AChE 활성 : Carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여에 따른 AChE 상대활성의 경시적 변화는 그림 1에 나타난 바와 같다. PB 나 3-MC만 투여한 실험군에서는 대조

Table 1. Enzyme activities of AChE, BuChE, GST, UDPGT and cytochrome P-450 in rats untreated

Enzymes	Specific activity* (nmol/mg protein/min)
AChE	100.46±6.47
BuChE	55.14±2.51
GST	96.67±6.25
UDPGT	0.79±0.08
Cytochrome P-450	0.82±0.09
Cytochrome b ₅	0.62±0.07
NADPH Cytochrome P-450 reductase	0.94±0.06
Total heme	0.44±0.11

* Mean of triplicate ± S.E.

군에 비해 효소활성이 크게 증가되었으나 carbofuran만을 투여한 실험군에서의 효소활성은 초기에 급격히 감소하여 3시간 후에는 약 70% 까지 저해되었으며, 이후 서서히 회복되었으나 48시간 까지도 20% 이상 저해받은 것으로 나타났다. Carbofuran과 PB 조합투여군은 투여 30분 후 약 65%까지 활성이 감소되었으나 이후부터는 빠른 속도로 활성이 회복되어 투여 24시간 후에는 무투여군과 비슷한 효소활성을 나타냈다. 그리고 carbofuran + 3-MC 투여군은 투여 30분 후에 약 63%의 저해를 보이다가 빠른 속

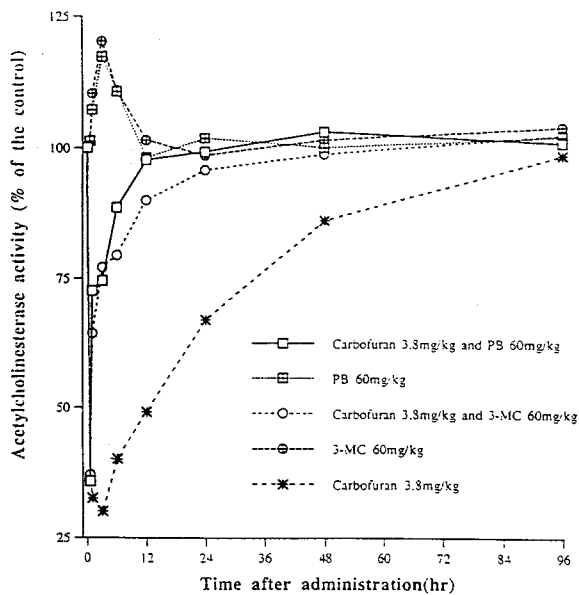


Fig. 1. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium(PB) and 3-methylchlanthrene(3-MC) on activity of acetylcholinesterase in rat.

도로 활성을 회복하여 12시간 후에는 대조군의 활성과 유사하였고 그 회복속도가 PB 투여군보다 빨랐다. 이러한 결과는 카바메이트계 살충제도 유기인계와 같이 AChE의 활성을 저해하여 acetylcholine이 축적되게 함으로써 치사시킨다는 보고(Chattopadhyay 등, 1986)와 유사하였고, carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여구에서는 carbofuran만의 단독처리구에서 나타난 AChE 저해현상이 나타나지 않았다. 이상의 결과 PB 및 3-MC를 쥐에 투여했을 때 AChE의 활성이 대조군에 비해 현저히 증가했고 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여시 carbofuran만 투여한 실험군에 비해 효소활성이 높고 회복속도도 빠른 것으로 보아 PB 와 3-MC의 처리가 carbofuran 처리시 나타나는 AChE 효소활성 저해현상을 막아 정상에 가까운 효소활성이 계속되지 않았나 생각된다.

BuChE 활성 : Carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여에 따른 BuChE 상대활성의 경시적 변화를 살펴보면 Carbofuran 투여 후 PB 나 3-MC를 쥐에 투여한 실험군에서는 무투여 대조군에 비해 효소활성이 크게 증가되었으나 carbofuran만을 투여한 실험군에서는 초기부터 급격히 감소하여 1시간 후에는 약 60%까지의 저해를 받았으며 이후 서서히 회복하였지만 48시간까지도 완전히 회복되지 않았다. Carbofuran+PB와 carbofuran+3-MC 투여군의 경우에는 모두 투여 30분 후에 약 50%의 저해를 보였지만 매우 빠른 속도로 활성을 회복하여 6시간 후에는 대조군의 효소활성과 유사하였다. Carbofuran 단독투여군에서

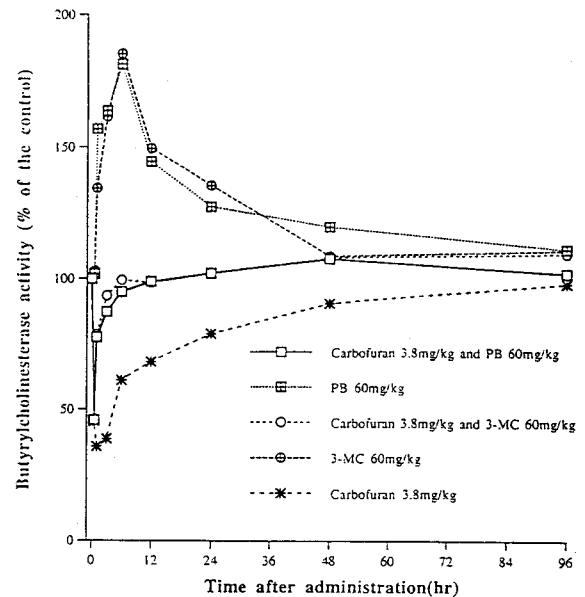


Fig. 2. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium(PB) and 3-methylchlanthrene(3-MC) on activity of butyrylcholinesterase in rat.

BuChE의 경우 AChE 보다 효소활성 저해정도가 약하였고 회복시간도 빨랐는데, 이는 carbofuran의 독성은 BuChE 보다 AChE에 더 민감하다는 Loewenstein 등(1993)의 보고와 일치함을 보여 주었다.

GST 활성 : Carbofuran과 PB 또는 3-MC가 쥐의 GST 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 그림 2와 같다. PB 및 3-MC만 투여한 실험군에서 GST활성은 대조군에 비해 크게 증가되었으나 carbofuran만을 투여한 실험군에서는 활성이 급속히 떨어져 1시간 후 35%의 저해를 받았으며, 이후 활성회복이 느리게 진행되었다. 그러나 carbofuran투여 후 PB 또는 3-MC를 조합투여한 실험군에서의 GST활성은 30분 경부터 활성이 급격히 증가되어 6시간 후에는 대조군보다 높은 활성을 유지하였다. 이러한 결과는 PB 또는 3-MC를 쥐에 투여했을 때 glutathione reductase에는 영향을 미치지 않지만 GST활성과 glutathione의 함량증가를 유도하여 이물질의 분해에 관여 한다는 Moron 등(1979)의 시험결과와 일치하고 있었다. 따라서 carbofuran 단독투여군에 비하여 PB 또는 3-MC를 조합투여한 실험군에서 효소활성 증가는 물론 회복속도가 빠른 것으로 보아 GST활성에도 PB 및 3-MC의 영향이 있다고 생각된다.

UDPGT 활성 : Carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여에 따른 UDPGT 활성의 경시적 변화는 그림 3에서 보는 바와 같다. PB와 3-MC만을 투여한 실험군에서의 UDPGT 활성은 급속히 증가되어 3시간 후 최고에 도달하

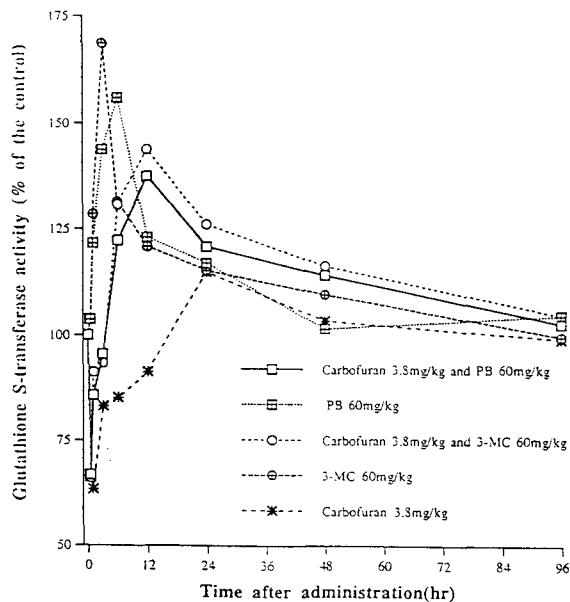


Fig. 3. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium(PB) and 3-methylchlanthrene(3-MC) on activity of glutathione S-transferase in rat.

여 대조군의 1.8~2배이었고, carbofuran만을 투여한 실험군에서의 UDPGT 활성은 서서히 증가하여 12시간 후 최고에 도달하여 대조군의 1.8배이었다. 한편, carbofuran과 PB 또는 3-MC를 조합투여한 실험군에서는 carbofuran을 단독투여 했을 때보다 UDPGT 활성이 더욱 증가하여 투여 6시간 후 2.6~2.8배에 달하였고 특히 해독효과가 가장 크게 나타나는 초기에 급속히 증가하였다가 서서히 원상으로 복귀하는 양상을 보였다. 이와 같은 결과는 한 등(1996)이 어류에 대하여 시험한 carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여가 UDPGT 활성을 유도하였다는 결과와 유사하였고, Bock 등(1984)이 쥐에 처리한 PB나 3-MC가 UDPGT의 활성을 유도시키고, 유도된 UDPGT가 이물질과 반응하여 다양한 형태의 isomer들을 생산, 이물질과 결합하여 분해시킨다는 결과와 일치하고 있었다.

Cytochrome P-450 효소계의 활성 : Carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여에 따른 cytochrome P-450효소계의 경시적 활성변화는 그림 4, 5, 6 및 7에 나타난 바와 같다. PB 및 3-MC 단독투여군의 경우 cytochrome P-450(그림 4), cytochrome b₅(그림 5), NADPH cytochrome P-450 reductase(그림 6), total heme(그림 7) 모두 30분부터 6시간까지 함량 및 활성증가를 보이다가 이 후 서서히 감소하였는데, 이는 PB(70 mg/kg) 및 3-MC(25 mg/kg)를 쥐에 피하주사 했을 때 cytochrome P-450효소계의 활성이 증가하였다는 Alvares 등(1973)에 의한 시험결과와 유사하였다.

Carbofuran만을 투여한 실험군에서는 약제투여후 cyto

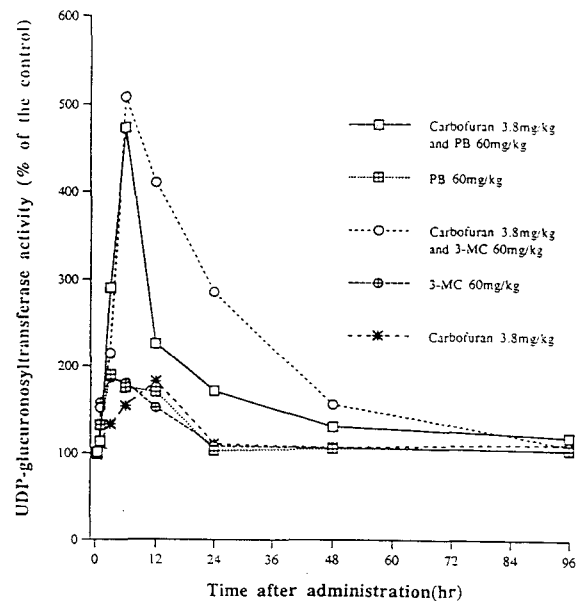


Fig. 4. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium(PB) and 3-methylchlanthrene(3-MC) on activity of UDP-glucuronosyltransferase in rat.

chrome P-450 함량이 서서히 증가하기 시작하여 3시간대에 무투여군에 비하여 1.1배, 12시간대에 1.6배의 증가를 보이다가 그 후 활성이 떨어지는 현상을 나타내었고(그림 4), cytochrome b₅ 함량은 초기에 미미한 증가를 보이다가 6시간대에 1.5배의 증가를 보인 후 서서히 낮아졌다(그림 5).

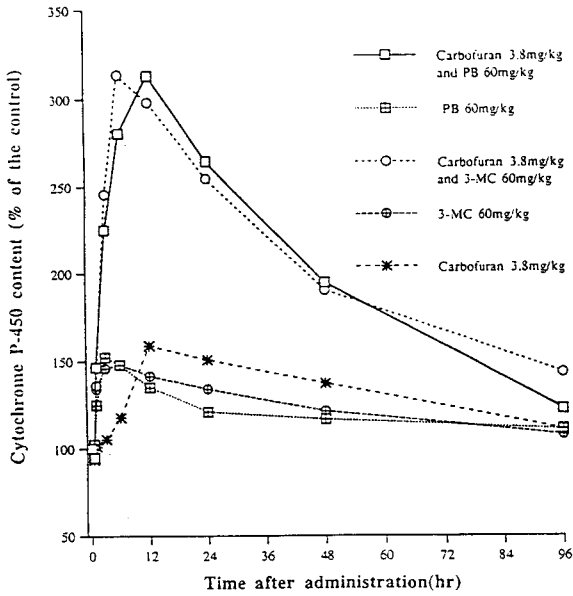


Fig. 5. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium(PB) and 3-methylchlanthrene(3-MC) on cytochrome P-450 content in rat.

NADPH cytochrome P-450 reductase의 경우에는 약제 투여 30분 후부터 급격한 증가를 보여 6시간까지 1.2~2.5 배의 활성증가를 나타낸 이후 감소하기 시작하여 24시간 후에는 무투여군보다 약간 높은 활성을 유지하였다(그림 6). Total heme 함량의 경우 약제투여후 1시간까지는 10~15%의 감소를 보이다가 3시간부터 증가하기 시작하여 6시간부터 12시간 사이에 110~150%의 함량증가를 나타낸 이후 서서히 낮아지는 경향을 나타내었다(그림 7).

이상의 결과에서 carbofuran은 NADPH cytochrome P-450 reductase의 활성을 크게 증가시키는 등 cytochrome P-450 효소계의 효소활성을 유도시킴을 관찰할 수 있었는데 이를 Omura 등(1983)의 연구보고와 비교해 보면 여러 가지 형태의 cytochrome P-450 효소계로 구성되어 있는 microsomal monooxygenase system에서 NADPH나 NADH로부터 전자를 전이시켜 NADPH cytochrome P-450 reductase의 활성을 촉진시켰다는 결과와 일치함을 알 수 있었다.

Carbofuran만을 투여한 실험군에서 나타난 cytochrome P-450 효소계의 변화를 경시적으로 관찰해 보면 약제투여

후 30분부터 증가되기 시작하여 6시간~12시간대에 1.5~2.5배의 최대증가를 보인 후 점점 낮아지고 있는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 이물질인 carbofuran의 해독을 위해 자체 해독능력을 지닌 cytochrome P-450 효소계가 작

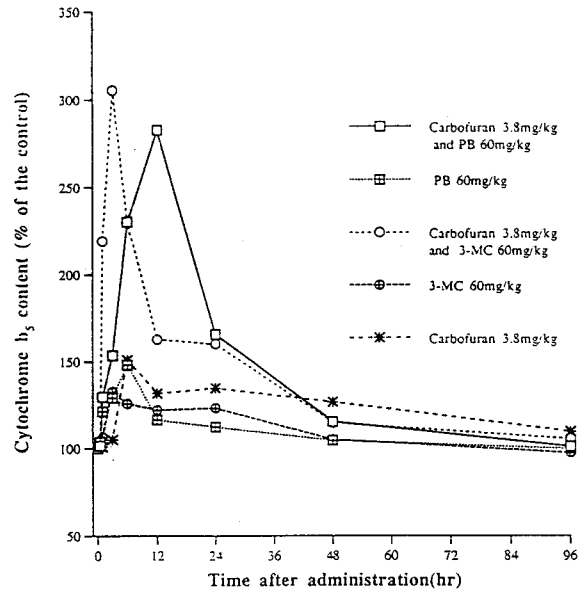


Fig. 6. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium(PB) and 3-methylchlanthrene(3-MC) on cytochrome b₅ content in rat.

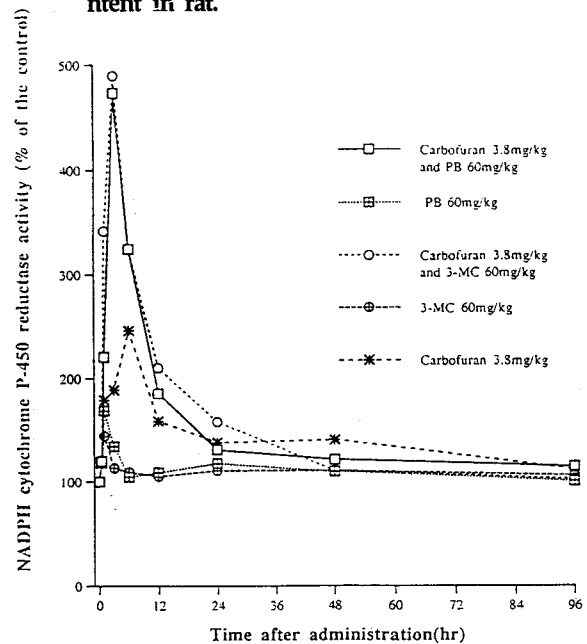


Fig. 7. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium(PB) and 3-methylchlanthrene(3-MC) on activity of NADPH cytochrome P-450 reductase in rat.

용하여 활성증가를 통해 독성을 감소시키고 있었으나 주요 치사시간대(50분~6시간)내의 활성이 낮아 carbofuran의 독성을 해독시키지 못해 독성의 누적으로 인한 치사로 사료된다.

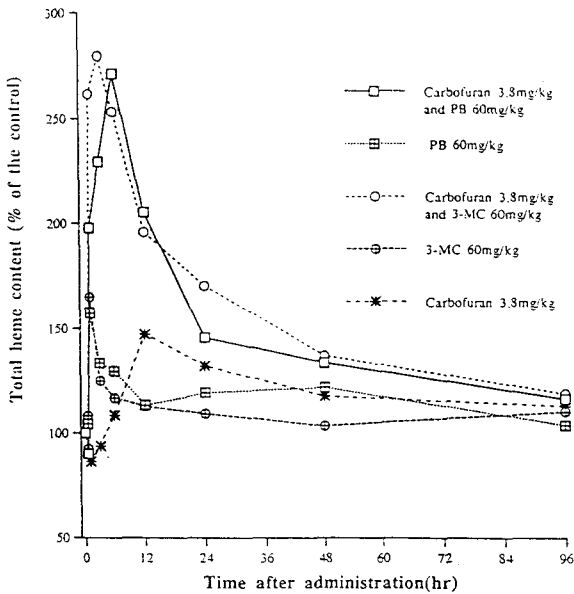


Fig. 8. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium(PB) and 3-methylchlanthrene(3-MC) on total heme content in rat.

Carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여에 따른 효소활성은 carbofuran과 PB 투여후 cytochrome P450 함량(그림 4)과 cytochrome b₅ 함량(그림 5)이 30분부터 급격히 증가하여 6~12시간대에는 carbofuran투여군에 비해 약 2배의 증가를 보였고, NADPH cytochrome P450 reductase(그림 6)와 total heme 함량(그림 7)은 3~6시간대에 약 2~2.5배 이상의 증가를 나타내었다.

Carbofuran과 3-MC의 경우에는 PB의 영향보다 조금 빠른 시간대인 30분부터 3시간대에 PB보다 더 높은 증가를 나타내었다.

이러한 결과로 보아 PB 및 3-MC 투여가 최초의 치사시간대인 50분 이전부터 cytochrome P-450 효소계의 활성을 촉진시켜 carbofuran의 대사를 더욱 빠르게 진행시킴으로써 carbofuran보다 독성이 낮은 대사물질로 분해시켜 쥐의 생존이 가능하게 하는 것으로 추정된다.

그리고 carbofuran과 3-MC의 조합투여가 carbofuran과 PB의 조합투여보다 cytochrome P-450 효소계의 효소활성이 빠르고, 높게 나타난 결과로 보아 3-MC가 PB보다 빠르게 cytochrome P-450 효소계에 영향을 주어 carbofuran과 3-MC의 조합투여군의 생존율이 carbofuran과 PB의 조합투여군의 생존율보다 높게 나타났다고 볼 수 있었다.

Glycogen의 함량 : Carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여에 따른 glycogen 함량의 경시적 변화를 살펴보면 Carbofuran만을 투여한 실험군에서는 glycogen 함량이 급격히 소비되어 30분 후 대조군의 35% 수준까지 떨어졌으며 이후 원상으로 회복하는데 12시간 이상이 걸렸다. 체내의 에너지원인 glycogen은 간, 콩팥 및 조직에 다량 존재하면서 stress나 외부물질의 도입에 의해 소모되거나 분해되는 것으로 알려져 있다(Murty와 Devi, 1982). 따라서 상기의 결과는 carbofuran과 iprobenphos 등의 농약을 투여했을 때 어류의 간에서 glycogen의 함량이 저해되거나 파괴가 유도된다는 한 등(1996)의 보고와도 유사한 결과였다. 한편, carbofuran 투여후 PB 또는 3-MC를 조합투여한 실험군에서는 glycogen의 함량이 급속히 증가하여 6시간째에는 carbofuran만을 투여한 실험군보다 최고 3~3.5배 수준까지 높아졌으며 이후 서서히 감소하여 48시간 경과 후 원상으로 회복되었다. 이는 PB 및 MC가 glycogen의 생성에 관여하고 carbofuran과 조합으로 투여했을 때는 glycogen의 생성을 촉진시키는 것으로 보인다.

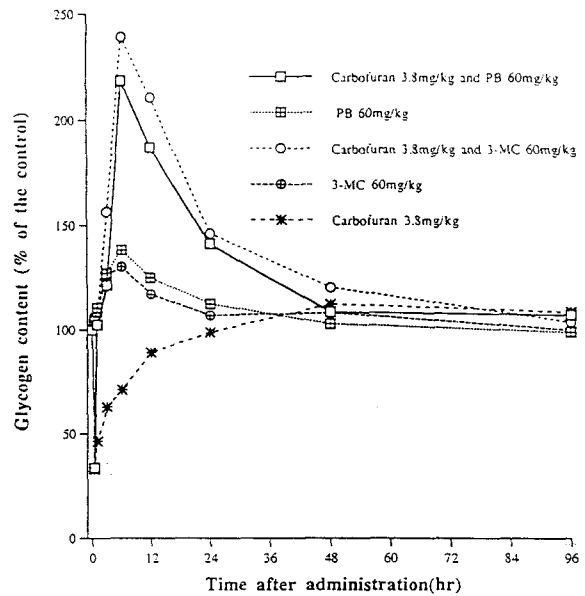


Fig. 9. Effect of combination treatment of insecticide carbofuran, phenobarbital sodium(PB) and 3-methylchlanthrene(3-MC) on glycogen content in rat.

Carbofuran의 효소활성에 미치는 기존의 연구결과들을 살펴보면 carbofuran은 신경조직과 혈장에 있는 AChE를 target enzyme으로 하여 신경계의 자극전달 작용에 필수적인 acetylcholine이나 butyrylcholine의 가수분해에 관여하는 이들 효소의 활성을 저해함으로써 치사에 이르게 하며(Chattopadhyay 등, 1986), 간의 cytosol에 주로 존재하고 있는 GST는 glutathione과 촉매적 conjugation을 이루

어 비극성 이물질을 친수성으로 하기 때문에 모든 생물에서 이물질의 대사적 해독에 중요한 효소로 알려져 있다(Habig 등, 1974).

또한 *microsome*의 *membrane*에서 활성을 나타내는 UDPGT는 *alcoholic* 과 *phenolic* 화합물의 해독기능을 가지고 있고(Koivusaari, 1983), 주로 *microsome*에 존재하는 cytochrome P-450 효소계는 독성물질의 해독에 가장 중요한 역할을 하는 해독효소인 *monooxygenase* 반응을 촉매하는 효소군으로써 흡수, 침투된 외부물질을 불활성화 물질로 대사시켜 무독화 시킨다(Donald 등, 1989).

한편 *glycogen*은 효소계에 속하지 않지만 체내에서 에너지의 공급 및 보존작용에 관여하는 것으로 알려져 있다(Murty와 Devi, 1982).

따라서 이러한 많은 연구결과들과 본 실험의 이들 효소 활성에 미치는 *carbofuran*과 PB나 3-MC의 상호작용을 구명한 결과로 볼 때 쥐에 *carbofuran*과 PB 또는 3-MC의 조합처리시 생존율이 *carbofuran*만을 처리한 실험구보다 높게 나타났고(한과 임, 1998) 해독작용에 관여하는 효소의 종류에 따라 정도의 차이는 있으나 이들의 조합처리로 효소 활성은 크게 증대되었으므로 PB 및 3-MC의 해독작용 효과가 인정된다.

Lichtenstein 등(1979)에 의하면 *carbofuran*의 경우 3-hydroxycarbofuran, 3-ketocarbofuran으로 대사된 뒤 이들 대사산물과 conjugation은 잘 일어나 그 결합 *endocon*간에는 차이를 나타내어 2차 대사는 주로 *glucuronide*나 *sulfate* 결합 형태일 것으로 추정된다는 보고에 비추어 *carbofuran*은 cytochrome P-450 효소계가 방향족 수산화작용을 유발시켜 *carbofuran*의 3번 탄소부분에 OH기를 생성시키고(I相 효소반응 : 3-hydroxycarbofuran), *carbofuran*의 작용기 중 N부분을 UDPGT가 관여 II相 효소반응인 N-glucuronides화 하여 $N-C_6H_5O_6$ 로 변환시킴으로써 3-hydroxycarbofuran phenol 또는 *carbofuran phenol* 등 phenol 화합물로 전환시키면서 무독화시켜 가는 과정에 이들 효소(GST, UDPGT, *monooxygenase*)가 관여한다는 한 등(1996)의 어류에서의 실험결과와 일치함을 의미하였다.

또한 간의 *microsome*(UDPGT, *monooxygenase*)이나 *cytosol*(GST)의 효소들에 의해 분해되는 과정은 대부분 *microsome*의 cytochrome P-450 dependent *monooxygenase*에 의해 먼저 산화되어 분해된 대사물질이 UDPGT 또는 GST 등의 효소에 의해 분해되는 일련의 대사과정을 거쳐 무독화 되는데(Anderson 등, 1985) 여기에 PB 및 3-MC가 관여하여 이들 효소의 활성을 촉진시킴으로써 독성이 높은 *carbofuran* 및 *carbofuran*의 1차 대사물질을 더욱 빠른 속도로 대사시키기 때문에 쥐의 생존율을 높이는 결과를 가져온 것이라 생각된다.

인용문헌

- Abou-Donia, M. B., D. G. Graham, K. M. Abdo and A. A. Komeil (1979) Delayed neurotoxic, late acute and cholinergic effects of *s,s,s*-tributylphosphorotrithioate (DEF) ; subchronic(90days) administration in hen. *Toxicol.* 14:229~243.
- Alvares, A. P., D. R. Bickers and K. Attallah (1973) Polychlorinated biphenyls ; A new type of inducer of cytochrome P-448 in the liver. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70(5):1321~1325.
- 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 β -naphthoflavone or clophen A50. *Biochem. Pharmacol.* 34:3309~3314.
- Bock, K. W., W. Lilienblum, D. Ullrich and G. Fischer (1984) Differential induction of UDP-glucuronosyltransferases and their permanent induction in preneoplastic rat liver. *Biochem. Soc. Trans.* 12:55~58.
- 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.
- Chattopadhyay, D. P., S. K. Dihge, A. B. Nashikkar and D. K. Dube (1986) Species difference in the in vitro inhibition of brain acetylcholinesterase and carboxylesterase by Mipafox, Paraoxon and Soman. *Pesti. Biochem. Physiol.* 26:202~208.
- Donald, E. M., P. N. William and E. L. Patricia (1989) Selective inhibition of cytochrome P-450 isozymes by the herbicide synergist tridiphane. *Pestic. Biochem. Physiol.* 35:42~49.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Jr. Andres and R. M. Featherstone (1961) A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88~95.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974) Glutathione S-transferase ; The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130~7139.
- Koivusaari, U. (1983) Thermal acclimatization of hepatic polysubstrate *monooxygenase* and UDP-glucuronosyltransferase of mature rainbow trout(*Salmogairdneri*). *J. Exp. Zool.* 227:35~42.

- 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.
- Loewenstein, Y., M. Denarie, H. Zakut and H. Soreq (1993) Molecular dissection of cholinesterase domains responsible for carbamate toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 87:209~216.
- Moron, M. S., J. W. Depierre and B. Mannervik (1979) Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 582:67~78.
- 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*. *Pesti. Biochem. Physiol.* 17:280~286.
- Omura, T., N. Harada and H. Yoshioka (1983) Comparative Biochemistry of Animal, Plant and Microorganism Oxidases. *Pesticide Chemistry; Human Welfare and the Environment* vol. 3., Mode of action, metabolism and toxicology. IUPAC Pergamon Press. U.S.A.:255~262.
- Omura, T., and R. Sato (1964) The carbon-monoxide binding pigment of liver microsomes ; I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239:2370~2378.
- Rao, K. S. P., C. S. Chetty and D. Desai (1984) *In vitro* effects of pyrethroids on rat brain and liver ATPase activities. *J. Toxicol. Environ. Health* 14:257~265.
- Taylor, W. J. R., E. L. Thomas and E. A. Sellers (1965) Effect of a combination of atropine, metaraminol and pyridine aldoxime methansulfonate(AMP therapy) on normal human subjects. *Canad. Med. Ass. J.* 93: 957~961.
- Wang, C. and S. D. Murphy (1982) Kinetic analysis of species difference in acetylcholinesterase sensitivity to organophosphate insecticides. *Toxicol. App. Pharmacol.* 66:409~419.
- 임요섭, 한성수 (1997) Carbofuran이 쥐의 조직에 미치는 형태적 변화와 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene에 의한 억제효과. *한국환경농학회지* 16(1): 61~66.
- 한성수, 임요섭, 정재훈 (1996) 살충제 carbofuran과 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene이 이스라엘잉어의 효소활성에 미치는 영향. *한국농화학회지* 39(1): 77~83.
- 한성수, 임요섭 (1997) 살충제 carbofuran이 쥐의 NIH3T3 섬유모세포에 끼치는 세포 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene의 수복효과. *한국환경농학회지* 16(2):149~155.
- 한성수, 임요섭, 정재훈 (1996) 살충제 carbofuran과 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene이 이스라엘잉어의 효소활성에 미치는 영향. *한국농화학회지* 39(1):78~83.
- 한성수, 임요섭 (1998) 쥐에서 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene이 ¹⁴C-carbofuran의 독성과 *in vitro* 대사에 미치는 영향. *한국농약과학회지* 2(2):29~38.

Effect of Insecticide Carbofuran and Phenobarbital Sodium and 3-Methylcholanthrene on Activity of Enzyme in Rat

Yo-Sup Rim* and Seong-Soo Han¹(Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Suncheon National University, Chonnam 540-070, Korea, ¹Department of Agricultural Chemistry, College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea)

Abstract : Effect of insecticide carbofuran and phenobarbital sodium(PB) or 3-methylcholanthrene(3-MC), they were orally administered by the chemicals, alone or in combination, on activities of several enzymes in rats were investigated. In *in vivo* test for the effect of this chemicals on activity of enzyme in rat, activities of acetylcholinesterase(AChE) and butyrylcholinesterase(BuChE) were inhibited by 20~70% for 48 hrs after the oral administration of carbofuran alone of 3.8mg/kg, whereas those were lowered at the beginning, but recovered to the control level after 24 hrs, in case of the mixed administration of carbofuran+PB or carbofuran+3-MC. The activity of glutathione S-transferase(GST) was inhibited by more than 15 to 35% for an early period of 0.5 to 6 hrs, in the case of the administration of carbofuran alone, whereas that was slightly inhibited at the beginning, recovered almost to the control level after 3 hrs, and raised by more than 20% above the control after 6 hrs, in case of the mixed administration of carbofuran+PB or carbofuran+3-MC. When carbofuran was administered along with PB or 3-MC, the activities of UDP-glucuronosyltransferase (UDPGT) and cytochrome P-450 were more than 2.6 to 2.8 times higher than that in the case of the administration of carbofuran alone for 6 hrs. These results suggest that a simultaneous application of carbofuran and PB or 3-MC is critical for the enhancement of activity of GST, UDPGT and cytochrome P-450 and the protection of rat from carbofuran toxicity.

*Corresponding author (FAX : +82-661-752-8011, E-mail : ysrin@suncheon.ac.kr)