

PCBs 노출에 의한 틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 간 cytochrome P450 효소계의 변화

강주찬 · 조규석
부경대학교 수산생명의학과

Changes of Hepatic Microsomal Cytochrome P450 Monooxygenase System in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Exposed to PCBs

Ju-Chan KANG and Kyu-Seok CHO

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University,
Pusan 608-737, Korea

The study was conducted to investigate the changes of hepatic cytochrome P450 monooxygenase system induced by dietary administration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. Tilapia were fed pellet with PCBs (Aroclor 1254) 0.05, 0.25 and 0.50 mg/kg body weight/day for 30 days. The dietary administration of PCBs (0.05 mg/kg) induced a significantly increased the concentration of cytochrome P450 and the activity of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in the hepatopancreas at 30 days, while the augmentation of both responses was found at 20 days with a higher administration of PCBs-diet (0.25 mg/kg). However, hepatic 7-penthoxyresorufin-O-dealkylase (PROD) activity did not show any noticeable changes with the PCBs-diet 0.05~0.5 mg/kg range compared to control group during the experimental periods of 30 days in the tilapia. These results indicate that tilapia fed PCBs at the concentration of more than 0.05 mg/kg for 30 days are affected by PCBs in terms of cytochrome P450 concentration and EROD activity in the hepatopancreas.

Key words: *Oreochromis niloticus*, PCBs, Cytochrome P450, 7-ethoxyresorufin-O-deethylase, 7-penthoxyresorufin-O-dealkylase

서 론

최근 급속한 공업화에 따른 다양한 화학물질이 수계로 유입되어 수질오염을 심화시키고 있다. 특히 인간의 필요에 따라 인위적으로 제조된 유기화학물은 환경 중에서 매우 안정하기 때문에 어류의 체내에 축적되어 여러 가지 반응을 나타낸다 (Kleinow et al., 1987; Stegeman and Kloepper-Sams, 1987). 이들 중에 cytochrome P450 효소계, nitroreductase 및 epoxide hydrolase 등은 지방친화성인 유기오염물질을 산화, 환원 및 가수분해시킴으로서 이를 수용성 물질로 변환시켜 체외로 배출시키는 역할을 한다 (Goksøyr and Förlin, 1992). 이 가운데 cytochrome P450 효소계는 파장 450 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 hemoprotein의 일종으로 산소분자 중 1개의 원자를 기질에 넣는 작용을 촉매하는 역할을 하며, 여러 subfamily로 구성되어 있는데 각각 서로 다른 기질 특이성을 가지고 있다 (Nebert and Gonzalez, 1987). 특히, 오염물질에 민감한 반응을 나타내는 cytochrome P450 1A1은 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)의 기질인 7-ethoxyresorufin을 대사 시키기 때문에 EROD 활성도 측정을 통해서 cytochrome P450 1A1의 농도를 간접적으로 파악할 수 있다. 또한 cytochrome P450 2B1은 phenobarbital, pyridine 및 유기염소계 농약 등에 의해서 활성화되고 7-penthoxyresorufin-O-dealkylase (PROD)의 기질인 7-penthoxyresorufin으로 유도됨에 따라 PROD 활성도 측정은 cytochrome P450 2B1의 농도를 조사하는데 활용되고 있다 (Goksøyr and Förlin, 1992).

Polychlorinated biphenyls (PCBs)은 halogenated aromatic hydrocarbons에 속하는 화합물로서 물리화학적 성질이 우수하여 외국에서는 aroclor, kanechlor 및 clophen 등의 상품으로 생산되었다 (주 등, 1981). 특히 PCBs는 공업용 재료로서 여러 분야에 사용되었으나, 체내 잔류성이 확인되면서 1970년대 초부터 사용이 제한 또는 금지되었지만, 현재에도 수계에 잔류되고 있는 실정이다 (Jensen, 1966; Muir et al., 1988). 따라서, 본 연구는 PCBs 노출에 따른 틸라피아의 간 cytochrome P450 효소계의 변화를 통하여 PCBs 오염에 대한 bioindicator로 활용할 수 있는지를 검토하였다.

재료 및 방법

틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)는 부경대학교 부속양어장에서 분양 받아 실험실로 운반한 후, 400 L 순환여과식 수조에서 2주 이상 순치 시켰다. 이때 수온, pH 및 용존산소는 각각 19.8~21.3°C, 7.0~7.2 및 6.8~7.0 mg/L이었고, 먹이는 시판사료를 공급하였다. 실험에는 체장 15.0~18.6 cm, 체중 133.22~175.88 g인 수컷 틸라피아를 선별하여 외관상 질병 증세가 나타나지 않은 건강한 개체를 사용하였다.

실험은 PVC수조 (52×36×30 cm)를 사용하여 순환식 방법에 의하여 실시하였고, 실험해수의 교환은 2일을 원칙으로 하였으나, 수질측정 결과에 따라 수시로 교환하였다. 실험에 사용한 수질은 Table 1과 같으며, 실험기간 동안의 수질은 1일 1회 측정하였다.

Table 1. Chemical analysis of the freshwater used in bioassays

Item	Value
Temperature (°C)	20.0
pH	7.20
Dissolved oxygen (mg/L)	7.15
NH ₄ ⁺ -N (μg-at N/L)	3.37
NO ₂ ⁻ -N (μg-at N/L)	0.95
NO ₃ ⁻ -N (μg-at N/L)	2.18
PO ₄ ³⁻ -P (μg-at P/L)	0.83
COD (mg/L)	1.02

또한, 모든 실험은 수온±1°C로 조절이 가능한 항온실에서 실시하였으며, 산소발생기에 의해 지속적으로 산소를 공급하였다. PCBs의 노출은 사료를 통하여 투여하였다. PCBs (Aroclor 1254, Dr. Ehrenstorfer GmbH)는 hexane (Junsei Chemical Co.)과 corn oil에 녹여 물과 함께 시판용 분말 사료 (Table 2)에 혼합하여 충분히 섞은 후 압출성형기로 펠릿화 하였다. PCBs가 혼합된 사료는 실험어의 체중을 기준으로 kg당 0.05, 0.25 및 0.50 mg을 매일 2회에 걸쳐 공급하였고, 대조구는 hexane과 corn oil을 첨가한 사료를 공급하였다. 실험은 30일 동안 실시하였고, 10일 간격으로 5마리의 표본에 대하여 측정하였다. 실험구간별로 선택된 실험어는 MS-222로 5분간 마취시켜 복강을 절개한 후, 간을 분리하여 다음 식에 의해 HSI (Hepatosomatic Index)를 계산하였다.

$$RM\ HSI\ (\%) = \frac{\text{Liver wet weight}}{\text{Total body wet weight}} \times 100$$

간 중량 측정이 끝난 시료는 전처리 과정을 걸쳐 간 cytochrome P450, EROD 및 PROD를 분석하였다. 즉, cytochrome P450 농도는 spectrophotometer (DR/4000, Hach Co.)를 이용하여 Omura and Sato (1964)의 방법으로, EROD 및 PROD 활성도는 fluorescence spectrophotometer (BF10001, Packard Instrument Co.)를 이용하여 여기파장 530 nm, 방출파장 590 nm에서 측정하였다 (Burke and Mayer, 1974; Lubet et al., 1985).

Table 2. Composition of the experimental diet

Component	Composition (%)
Protein	48.0
Lipid	5.0
Fiber	4.0
Ash	15.0
Calcium	1.0
Phosphorus	2.7

결 과

PCBs의 경구 투여에 의한 틸라피아의 HSI 변화를 Fig. 1에 나타냈다. 30일 후 대조구의 HSI는 1.68% 이었고, PCBs 0.05, 0.25 및 0.50 mg/kg에서는 각각 1.81, 1.72 및 1.54%로 농도가 증가함에

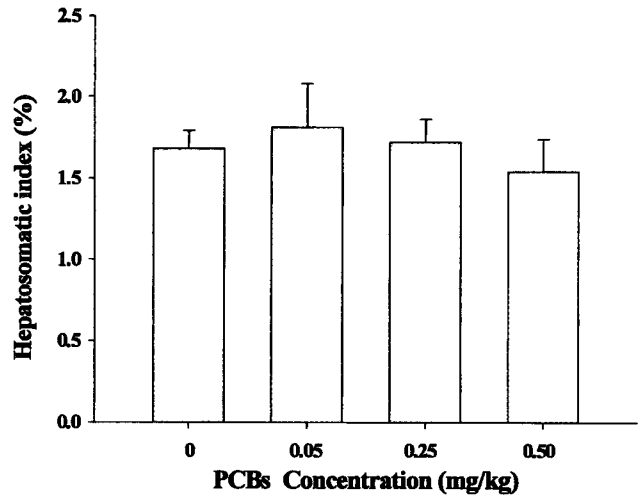


Fig. 1. Changes of the hepatosomatic index (HSI) in the tilapia fed on different PCBs-diet. Vertical bars indicate standard deviations.

따라 조금 감소하는 경향을 보였으나, 대조구에 비해 유의한 차이는 인정되지 않았다. PCBs 경구 투여에 따른 간 cytochrome P450 농도 변화는 Fig. 2와 같다. 대조구는 실험기간동안 뚜렷한 변동이 관찰되지 않았다. 그러나, PCBs 0.05 mg/kg를 투여한 간 cytochrome P450 농도는 실험 30일째 0.49 nmole/mg protein으로 대조구에 비해 약 1.4배 유의한 증가를 나타냈다 (P<0.05). 또한, PCBs 0.25 mg/kg 이상을 투여한 간 cytochrome P450 농도는 실험 20일째 대조구에 비해 약 1.4배 이상의 유의한 증가를 나타냈다 (P<0.05).

PCBs의 경구투여에 의한 틸라피아의 EROD 활성도 변화를 Fig. 3에 나타냈다. EROD 활성도는 실험기간동안 대조구에서

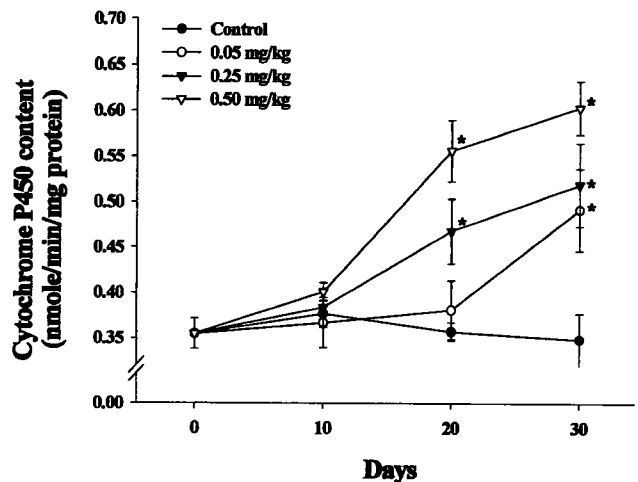


Fig. 2. Changes of the cytochrome P450 concentration in the tilapia fed on different PCBs-diet. Vertical bars indicate standard deviations; *significant difference between control and exposure group (P<0.05).

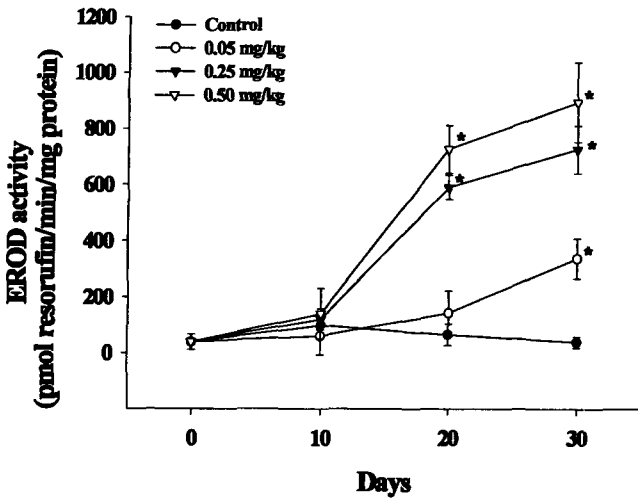


Fig. 3. Changes of the EROD activity in the tilapia fed on different PCBs-diet. Vertical bars indicate standard deviations; *significant difference between control and exposure group ($P < 0.05$).

뚜렷한 변동이 관찰되지 않았으나, PCBs 0.05 mg/kg을 투여한 EROD 활성도는 실험 30일째 대조구에 비해 약 8배의 유의한 증가를 나타냈다 ($P < 0.05$). 또한, PCBs 0.25 mg/kg 이상에서는 실험 20일째부터 유의하게 증가하여 실험 30일째는 대조구에 비해 약 18배 이상의 증가를 보였다 ($P < 0.05$). PCBs에 대한 PROD 활성도의 변화는 Fig. 4에 나타났다. 대조구의 PROD 활성도는 0.75~1.57 pmole/mg protein의 범위에서 측정되었고, 0.05~0.5 mg/kg의 PCBs를 투여한 개체는 0.78~1.93 pmole/mg protein의 범위로 측정되었지만, 대조구 혹은 실험구별 유의한 차이는 인정되지 않았다.

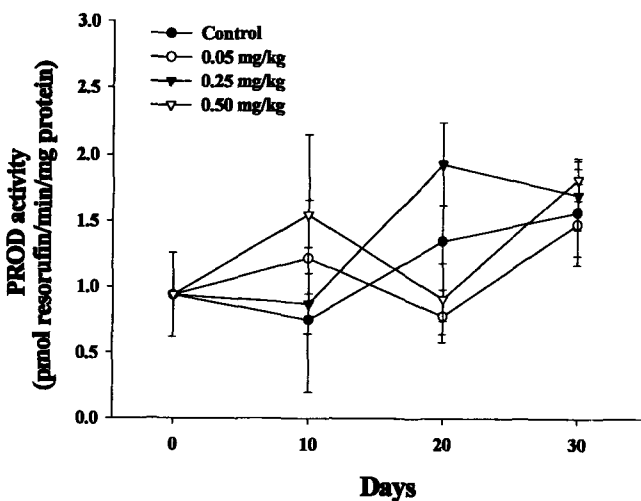


Fig. 4. Changes of the PROD activity in the tilapia fed on different PCBs-diet. Vertical bars indicate standard deviations.

고찰

어류의 cytochrome P450 효소계는 여러 가지 요인에 의해 영향을 받을 수 있으며, 특히 수온, 성별 및 영양상태가 큰 작용을 하는데 (Goksøyr and Förlin, 1992), 이 같은 요인을 배제시키기 위하여 본 실험에서는 수온을 20°C로 유지시켰고, 수컷만을 선별하여 동질의 사료를 동량으로 공급하였다. PCBs에 노출된 틸라피아의 HSI 변화는 관찰되지 않았다. 일반적으로 어류의 간 중량은 수온, 먹이 및 내분비 기능 등에 따라 달라질 수 있으며, 또한 이들과 관련하여 계절적으로 변동될 수 있다 (Slooff et al., 1983). 오염물질에 노출된 어류의 간은 그 역할이 증대됨에 따라 중량이 증가하는 경향을 보이는데 (Poels et al., 1980), 오염이 낮은 지역에 비해 높은 지역에서 중량이 증가되며, 그 원인을 오염물질의 영향으로 추정하고 있다 (Zoeteman et al., 1980). 그러나, 사료를 통한 PCBs 0.05~0.5 mg/kg 범위에 노출된 틸라피아의 HSI 변화는 관찰되지 않아 이 농도범위에서는 HSI를 변화시킬 만큼의 영향을 미치지 않았던 것으로 생각된다.

어류의 간 cytochrome P450 효소계는 기능적으로 독성물질의 해독 및 배설시키는 작용을 하는데, 어류는 포유류에 비해 상대적으로 낮은 유도수준을 나타낸다 (Stegeman, 1981). 정상 상태에서 잉어, *Cyprinus carpio*, 송어, *Salvelinus fontinalis*, 메기, *Ictalurus punctatus* 및 틸라피아, *O. niloticus*의 간 cytochrome P450 농도는 각각 0.107, 0.220, 0.150 및 0.350 nmole/mg protein이 측정된다 (Ankley et al., 1986; Tyle et al., 1991; Ueng et al., 1992). 경구 투여를 통한 대조구의 틸라피아 간 cytochrome P450 농도는 0.35~0.38 nmole/mg protein의 범위였고, PCBs 0.05 mg/kg에서는 실험 30일째, 0.25 mg/kg 이상에서는 실험 20일째부터 유의한 증가를 나타냈다.

Ueng et al. (1992)는 잉어, *C. carpio*와 틸라피아 *Oreochromis mossambicus*의 복강에 Aroclor 1254 30 mg/kg/day를 4일간 주사했을 때, 간 cytochrome P450 농도는 각각 3.4 및 1.5배로 증가했음을 보고하였다. 또한 Sleiderink et al. (1995)은 *Limanda limanda*에 1.0 mg의 Clophen A40을 함유한 gelatin capsule을 2주 단위로 3회 경구투여했을 때, 간 cytochrome P450 농도가 86% 이상으로 증가한다는 것을 지적하였다. 그러나 송어, *S. fontinalis*에 PCBs 1.65 mg/kg을 18일 동안 경구투여했을 때 유의한 변화가 없었으며 (Addison et al., 1978), 메기, *I. punctatus*에 1~100 mg/kg의 PCBs를 복강주사했을 때도 변화는 관찰되지 않았다 (Ankley et al., 1986). 이 같이 상기의 보고들에 의하면, 유기오염물질에 대한 어류의 간 cytochrome P450 농도의 변화는 다양하게 나타나고 있는데, 이는 어류의 특성, 노출방법, 실험 농도, 먹이 상태 및 실험조건 등의 차이에서 기인된 결과라고 생각된다. 한편, PCBs의 경구 투여에 의해 틸라피아의 간 cytochrome P450 농도가 증가한 결과는 자연 수역에 PCBs가 존재할 경우, 먹이 등을 통해 체내에 0.05 mg/kg 및 0.25 mg/kg 이상 유입될 경우에는 각각 30 및 20일째부터 틸라피아의 간 cytochrome P450 농도가 증가됨을 의미한다.

일반적으로 유기오염물질은 간 cytochrome P450 중에 특정

isozyme의 활성에 영향을 미치는데, cytochrome P450 1A1은 ethoxyresorufin에, cytochrome P450 2B1은 penthoxyresorufin에 특이적으로 반응한다 (Burke and Mayer, 1974; Lubet et al., 1985). 따라서, EROD와 PROD 활성도의 측정은 이들의 유도 여부를 증명할 수 있다 (Goksøy and Förlin, 1992). 본 실험에서 PCBs에 대한 EROD 활성도는 0.05 mg/kg에서 30일째, 0.25 mg/kg 이상에서는 20일째부터 유의하게 증가하였고, 특히 실험 30일째 0.05, 0.25 및 0.50 mg/kg 농도에서 각각 8, 18 및 22배로 증가하였다. PCBs는 차넬메기, *I. punctatus*, 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* 및 잉어, *C. carpio*에 1 mg/kg를 복강에 주사했을 때 EROD 활성도가 증가된다 (Ankley et al., 1986; Melancon and Lech, 1983). 이 같은 결과는 틸라피아의 체내에 PCBs가 유입될 경우에도 EROD 활성도가 증가된다는 것을 의미하며, PCBs 0.05 mg/kg에서 30일째부터, 0.25 mg/kg 이상에서 20일째부터 증가할 것으로 예상된다. Baily et al. (1999)에 의하면 현장채집에 의해 틸라피아의 PROD 활성도를 비교한 결과, 정상 수역에 비해 오염수역에서 채집된 어류의 PROD 활성도가 약 5.6배 더 높게 나타났음을 보고했다. 그러나 본 실험에서 틸라피아의 PROD 활성도는 대조구에서 0.75~1.57 pmole/mg protein의 범위로, PCBs 0.05~0.50 mg/kg의 노출구에서 0.78~1.93 pmole/mg protein로 측정되어 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과와 고찰을 종합하면, 자연 수역에 잔류하는 PCBs가 먹이를 통해 틸라피아의 체내에 적어도 0.05 mg/kg 이상이 30일간 이상 계속적으로 유입될 경우에는 간 cytochrome P450 농도 및 EROD 활성도는 증가될 것이며, 이들의 증가정도는 오염감시 수단의 bioindicator로 활용될 가능성이 있다. 그러나 간 cytochrome P450 효소계에 미칠 수 있는 영향은 다양하기 때문에 이들 요소를 최소화할 필요가 있다.

요 약

PCBs의 경구 투여에 의한 틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 간 cytochrome P450 효소계의 변화를 30일간 관찰하였다. 30일 동안 PCBs 0.05, 0.25 및 0.50 mg/kg을 투여했을 때, HSI는 각각 1.81, 1.72 및 1.54% 감소하였으나, 유의한 차이는 인정되지 않았다. PCBs 0.05 mg/kg에 노출된 간 cytochrome P450 농도는 30일째 대조구에 비해 1.4배 유의한 증가를 나타냈고, 0.25 mg/kg 이상에서는 실험 20일 이후부터 유의적으로 증가하였다. EROD 활성도는 PCBs 0.05 mg/kg에서 실험 30일째부터 유의하게 증가하여 약 8배 높게 나타났다. 또한, PCBs 0.25 mg/kg 이상에서는 실험 20일째부터 유의하게 증가하여 30일째부터는 각각 18 및 22배의 증가를 나타냈다. PROD는 PCBs 0.05~0.50 mg/kg에 노출시킨 개체에서 0.78~1.93 pmole/mg protein이 측정되어 대조구에 비해 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과는 자연 수역에서 PCBs의 잔류에 따라 먹이를 통해 틸라피아의 체내에 적어도 0.05 mg/kg 이상이 30일간 이상 계속적으로 유입될 경우에 간 cytochrome P450 농도 및 EROD 활성도는 증가될 것으로 추정된다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 부경대학교 기성회 연구비의 지원에 의해 수행된 결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Addison, R.F., M.E. Zinck and D.E. Willis. 1978. Induction of hepatic mixed-function oxidase (MFO) enzymes in trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding Aroclor 1254 or 3-methylcholanthrene. *Comp. Biochem. Physiol.*, 61C, 323~325.
- Ankley, G.T., V.S. Blazer, R.E. Reinert and M. Agosin. 1986. Effects of Aroclor 1254 on cytochrome P-450-dependent monooxygenase, glutathione-S-transferase and UDP-glucuronosyl transferase activities in channel catfish liver. *Aquat. Toxicol.*, 9, 91~103.
- Baily, A.C.D., B.R. Woodin and J.J. Stegeman. 1999. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir-São Paulo, Brazil. *Aquat. Toxicol.*, 44, 289~305.
- Burke, M.D. and R.T. Mayer. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorometer assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Disp.*, 2, 583~588.
- Goksøy, A. and L. Förlin. 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.*, 22, 287~312.
- Jensen, S. 1966. Report of a new chemical hazard. *New Scientist*, 32, 612.
- Kleinow, K.M., M.J. Melancon and J.J. Lech, 1987. Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environ. Health Perspect.*, 71, 105~119.
- Lubet, R.A., R.T. Mayer, J.W. Cameron, R.W. Nims, M.D. Burke, T. Wolff and F.P. Guengerich. 1985. Dealkylation of pentoxyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome (s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in rat. *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 43~48.
- Melancon, M.J. and J.J. Lech. 1983. Dose-effect relationship for induction of hepatic monooxygenase activity in rainbow trout and carp by Aroclor 1254. *Aquat. Toxicol.*, 4, 51~61.
- Muir, D.C.G., R.J. Norstrom and M. Simon. 1988. Organochlorine contaminants in arctic food chains: Accumulation of specific polychlorinated biphenyls and chlordane-related compounds. *Environ. Sci. Technol.*, 22, 1071~1079.
- Nebert, D.W. and F.J. Gonzalez. 1987. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, 56, 945~993.
- 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.
- Poels, C.L.M., M.A. van der Gaag and J.F.J. van de kerckhoff. 1980. An investigation into the long-term effects of Rhine water on rainbow trout. *Water Res.*, 14, 1029~1035.
- Sleiderink, H.M., M.E. Jan, G. Anders and J.P. Boon. 1995. Hepatic cytochrome P4501A induction in dab (*Limanda limanda*) after oral dosing with the polychlorinated biphenyl mixture clophen A40. *Environ. Toxicol. Chem.*, 4, 679~687.
- Slooff, W., C.V. Van Kreijl and A.J. Baars. 1983. Relative liver weights

- and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquat. Toxicol.*, 4, 1~14.
- Stegeman, J.J. 1981. Polynuclear aromatic hydrocarbons and their metabolism in the marine environment. In *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*, Vol. 3, Gelboin H.V. and P.O.P. Ts'o. eds, Academic Press, New York, pp. 1~60.
- Stegeman, J.J. and P.F. Kloepper-Sams. 1987. Cytochrome P-450 isoenzymes and monooxygenase activity in aquatic animals. *Environ. Health Perspect.*, 71, 87~95.
- Tyle, H., E. Mark and H. Niels. 1991. Mixed-function oxygenase in juvenile rainbow trout exposed to hexachlorobenzene or 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 161~164.
- Ueng, T.H., Y.F. Ueng and S.S. Park. 1992. Comparative induction of cytochrome P-450-dependent monooxygenases in the livers and gills of tilapia and carp. *Aquat. Toxicol.*, 23, 49~64.
- Zoeteman, B.C.J., K. Harmsen, J.B.H.J. Linders, C.F.H. Morra and W. Slooff. 1980. Persistent organic pollutants in river water and ground water of The Netherlands. *Chemosphere*, 9, 231~249.
- 주여정, 구미연, 정종학, 정기호. 1981. 회동 수원지 물고기와 수영강 상류 저니트 중의 Polychlorinated Biphenyls의 분포 상태. *Environ., Anal.*, 1, 75~82.

2001년 2월 28일 접수

2001년 4월 6일 수리