

β -naphthoflavone (BNF)에 *in vitro* 노출시킨 해산 어류의 간장 마이크로솜 중 cytochrome P450 (CYP) 유도

전중균* · 이미희 · 이지선 · 심원준¹ · 이수형¹ · 허형택²

강릉대학교 해양생명공학부 · 동해안해양생물자원연구센터 (EMBRC),

¹한국해양연구원 해양환경기후연구본부

²한국해양연구원 해양생물자원연구센터 · 서울해양과학연구소 (SIOS)

In vitro Induction of Hepatic Cytochrome P450 (CYP) with Exposure to β -naphthoflavone in Marine Fishes

Joong-Kyun Jeon*, Mee-Hee Lee, Ji-Seon Lee, Won-Joon Shim¹,
Soo-Hyung Lee¹ and Hyung-Tack Huh²

EMBRC, Kangnung Nat'l University, Gangneung 210-702, Korea

¹Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan 425-170, Korea

²Seoul Institute of Ocean Science, Seoul 137-060, Korea

Abstract - Cytochrome P450 (CYP) induction was determined in microsomes of three aquacultured fish species (*Sebastes schlegeli*, *Paralichthys olivaceus* and *Pagrus major*) and two wild fish species (*Mugil cephalus* and *Stephanolepis cirrhifer*) *in vitro* exposed to β -naphthoflavone (BNF). The microsomes of five fish were exposed to BNF (5 mM or 10 mM) in dimethylsulfoxide at 30°C for 9 hr. The CYP contents in most fish increased according to exposure duration for 3 or 5 hour, and then decreased, while steady increase of CYP was observed in *P. major* for 9 hour. The induction of CYP contents in aquacultured fish species (207~422%) were higher than those in wild fish species (206~207%).

Key words : β -naphthoflavone, cytochrome P450, fish, *in vitro*, olive flounder, rockfish, sea bream, mullet, filefish

서 론

Cytochrome P450 (CYP) monooxygenase 효소계는 mixed function oxygenase (MFO)라고도 하며, 포유동물은 물론이고 어류에서도 지방산이나 호르몬과 같은 내인성 화합물의 대사와 함께 다환방향족 탄화수소류(poly-

nuclear aromatic hydrocarbons, PAHs)나 다염소비페닐류 (polychlorobiphenyls, PCBs)와 같은 외인성오염물질 (xenobiotics)을 대사하는 역할을 한다 (Gibson and Skett 1994). 이들 효소계는 다성분으로 구성되며 그 중에서 가장 대표적인 것이 CYP이다 (Kime 1998). 어류에서 간장은 지질이 가장 많은 부위이고 유기오염물질이 가장 많이 축적되는 조직인데 오염물질이 축적되면 간장은 손상을 입거나 해독효소의 활성이 교란될 위험성이 커진다. 더욱이 이런 변화는 독물질의 생체내 축적이

* Corresponding author: Joong-Kyun Jeon, Tel. 033-640-2412, Fax. 033-647-2410, E-mail. jkjeon@kangnung.ac.kr

나 제거율(clearance)에도 영향을 미치므로, 어떤 오염물질로 인하여 해독시스템이 불활성화 되어 다른 물질의 해독 능력이 떨어진다면 그로 인한 피해는 커지게 된다(Kime 1998).

한편, β -naphthoflavone (BNF)은 비발암성 플라보노이드 화합물로서 포유동물에서 CYP1A를 유발시키는 대표적인 CYP 유도제로 알려져 있고(Kime 1998), 폐류에서도 CYP를 유발한다는 것이 *in vivo*와 *in vitro*로 확인되었다(Michel *et al.* 1993; 전 등 2002). 최근으로 관심이 끌고 있는 내분비계장애물질(또는 환경호르몬) 중에는 체내에서 MFO 효소계를 자극하여 CYP를 유도시키는 것이 있는가 하면 이와는 반대로 저해하는 것도 있어 그 작용은 매우 다양하다. 만일 체내에서 정상적으로 스테로이드 호르몬을 대사해야 하는 CYP를 비롯한 관련효소들이 오염물질의 해독에 이용된다면 호르몬은 그만큼 덜 불활성화 될 것이어서 번식 생리나 내분비 면에서 이상을 일으킬 위험도 있다(Crane *et al.* 2000). 경우에 따라서는 오염물질 때문에 CYP가 저해되어 나타나는 유해효과도 CYP 유도제(inducer)를 처리하면 이를 경감시킬 수도 있으며, 실제로 rat에서는 유기주석화합물의 투여로 인해 일어나는 당뇨증세 등이 CYP 유도제를 병용 또는 사전에 처리함으로써 호전된다는 보고도 있다(Ohhira *et al.* 1999).

본 연구는 각종 외인성 오염물질이 해산어류에 미치는 영향을 조사하는 연구의 일환으로서 강릉지역에서 쉽게 구할 수 있는 자연산 2종 및 양식산 3종의 어류를 대상으로 하여 이들의 간장 마이크로솜을 CYP 유도제로 알려진 BNF와 *in vitro*로 처리하였을 적에 CYP 함량의 경시적인 변화와 어류들간의 유도특성을 살펴본 것이다.

재료 및 방법

1. 시약

CYP 유도제로는 BNF (90~95%, Sigma)를 사용하였으며, 이 밖에 마이크로솜의 제조나 효소 측정에는 모두 Sigma사의 특급시약(AR)을 사용하였다.

2. 실험어류

실험은 2001년 7월에 강릉시 강문의 수산센터에서 입수한 자연산 송어(*Mugil cephalus*; 350~420 g, 23~28 cm), 쥐치(*Stephanolepis cirrhifer*; 350~500 g, 18~25 cm) 및 양식산 넙치(*Paralichthys olivaceus*; 300~370 g, 28~34 cm), 조피볼락(*Sebastes schlegelii*; 450~520 g,

20~25 cm), 참돔(*Pagrus major*; 400~510 g, 20~25 cm)을 대상으로 하였으며, 각 어류마다 3마리를 실험에 사용하였다.

3. 간장 마이크로솜의 제작

MFO 효소계는 어류의 간장 이외에도 아가미, 생식선 및 신장 등에 분포하지만 특히 간장은 모든 척추동물에서 해독에 관여하는 가장 중요한 기관이므로 오염물질이 생물체에 미치는 영향을 파악하는데 중요한 조직으로 이용된다(Gibson and Skett 1994). 따라서 본 실험에서는 간장을 사용하였다. 각 어류를 개체별로 개별하여 간장을 적출하고 빙장한 1.15% KCl 용액에 담구어 혈액을 제거 후 액체질소에 넣어 연구실로 운반하였다. 간장을 얼음 위에서 가위로 약간 세절하고 인산완충액(0.1 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 -20% glycerol, pH 7.4)과 함께 Potter-Elvehjem형의 teflon축-glass homogenizer로 균질화 하고 원심분리(8,000 \times g, 20 min., 4°C)를 하여 상등액을 모은 다음 다시 초원심분리(100,000 \times g, 120 min., 4°C)를 하여 원심관 하부에 가라앉은 pellet을 상기한 인산완충액으로 재현탁하여 마이크로솜을 만들었다. 각 어류의 마이크로솜은 -150°C의 초저온냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

4. In vitro 배양

송어와 쥐치, 참돔의 마이크로솜에는 DMSO (dimethylsulfoxide)로 녹인 BNF를 10 mM가 되도록 첨가하였고, 조피볼락과 넙치의 경우에는 5 mM이 되도록 첨가하여 30°C의 수조에서 9시간까지 배양하였다. 그리고 일정 시간마다 '5. 약물대사효소의 측정'에 기술된 방법으로 관련효소의 농도를 측정하였다. 비교를 위하여 각 어류의 마이크로솜은 2% 농도로 DMSO만을 첨가하여 같은 조건으로 배양하여 대조구로 삼았으며, 배양시간별 CYP 함량은 대조구에 대한 상대비(%)로 나타내었다.

5. 약물대사효소의 측정

CYP 농도의 측정은 Omura and Sato(1964)의 방법을 따랐다. 즉, 일정시간의 배양을 마친 마이크로솜에 환원제로 sodium dithionite를 소량 첨가한 다음 CO 가스를 약 30초간 통기하고 나서 UV/VIS 분광광도계(Shimadzu 1601-PC, Japan)를 사용하여 450과 490 nm의 차이스펙트럼(difference spectrum)을 재었으며, 원자흡광계수 91 $\text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$ 로 정량하였다. 그리고 마이크로솜의 단백질 농도는 Lowry *et al.* (1951)의 방법으로 정량하였다.

결과 및 고찰

실험에 사용한 송어 (*Mugil cephalus*), 쥐치 (*Stephanolepis cirrhifer*) 및 양식산 참돔 (*Pagrus major*), 넙치 (*Paralichthys olivaceus*), 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*)에서 BNF를 첨가하기 전의 마이크로솜 중 CYP 함량은 Table 1과 같다. 이들 5종 어류 중의 CYP 함량 ($0.14 \sim 0.23 \text{ nmol mg}^{-1}$)은 전 등(2003)이 개복치나 청어, 붕장어, 송어, 조피볼락, 참돔에서 조사한 CYP 함량 ($0.20 \sim 0.50 \text{ nmol mg}^{-1}$)이나 Stegeman *et al.* (1997)이 조사한 열대산 어류의 CYP 함량 ($0.1 \sim 0.5 \text{ nmol mg}^{-1}$)과 비슷한 수준이었다.

한편, BNF는 해양생물의 약물대사 효소계에도 유도제로 작용하여 각종 효소계의 수준을 높인다는 것이 알려져 있는데 (Elskus and Stegeman 1989; Stegeman *et al.* 1997; Jaksic *et al.* 1998), 본 실험에서 송어 (*M. cephalus*), 쥐치 (*S. cirrhifer*) 및 참돔 (*P. major*)을 대상으로 하여 간장 마이크로솜을 10 mM BNF와 배양하면서 1, 3, 5, 7 및 9시간 후에 CYP 함량을 조사한 결과는 각각 Figs. 1-3과 같다. 송어의 경우, BNF와의 배양시간이 길어지면서 CYP 함량은 증가하는 경향을 보여 5시간 후에

206%로 정점을 이루다가 이후에는 줄어들어 9시간 후에는 150%가 되었다 (Fig. 1). 그리고 쥐치의 경우에도 BNF와의 배양으로 1시간째부터 급격히 증가하였고 5시간 후에는 처음에 비해 144%까지 증가하였으나 이후 줄어들면서 9시간 후에는 65%로 낮아졌다 (Fig. 2). 참돔의 경우도 배양시간과 더불어 CYP 함량이 늘어나는 경향은 앞서의 다른 어류와 마찬가지로였지만 3시간 후에 179%로 증가하여 송어나 쥐치에 비해 증가폭이 컸고 이후에도 완만하게 증가하여 다른 어류들과 달리 9시간 후에는 207%로 가장 높은 값을 보였다 (Fig. 3).

그리고 양식산 넙치 (*P. olivaceus*)와 조피볼락 (*S. schlegeli*)의 간장 마이크로솜을 5 mM의 농도로 BNF와 배양하였을 적에 CYP 함량의 경시적인 변화는 각각 Fig. 4 및 Fig. 5와 같다. 넙치와 조피볼락은 모두 앞에서 언급한 다른 어류들에 비해 CYP 함량의 증가경향이 뚜렷하였다.

Table 1. Cytochrome P450 (CYP) content of hepatic microsome in marine fishes used in this experiment

Fish species	Cytochrome P450 content* (nmol mg ⁻¹)
Mullet (<i>M. cephalus</i>)	0.18
Filefish (<i>S. cirrhifer</i>)	0.23
Sea bream (<i>P. major</i>)	0.14
Olive flounder (<i>P. olivaceus</i>)	0.18
Rockfish (<i>S. schlegeli</i>)	0.14

* average value (n = 3)

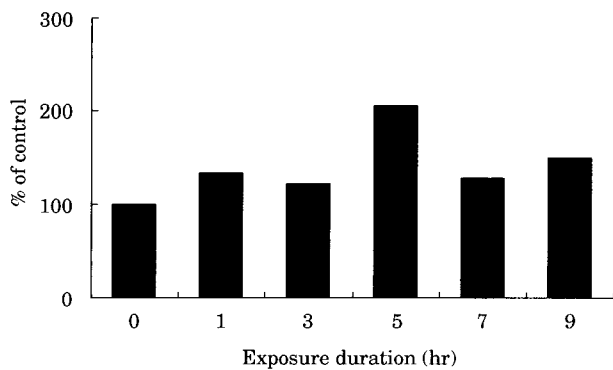


Fig. 1. Time-course *in vitro* induction of CYP content of hepatic microsome in mullet (*Mugil cephalus*) with exposure to 10 mM β -naphthoflavone (BNF). Data expressed as percentage of controls.

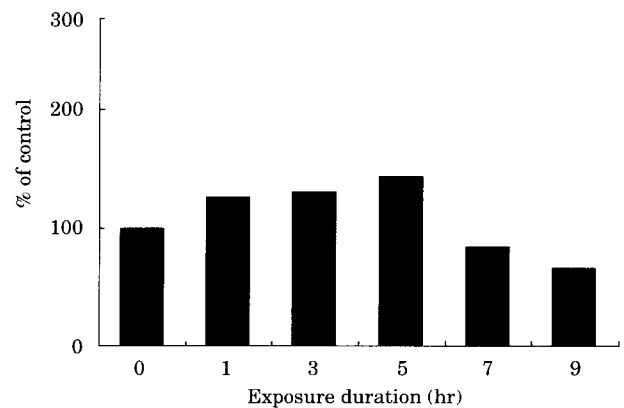


Fig. 2. Time-course *in vitro* induction of CYP content of hepatic microsome in filefish (*Stephanolepis cirrhifer*) with exposure to 10 mM β -naphthoflavone (BNF). Data expressed as percentage of controls.

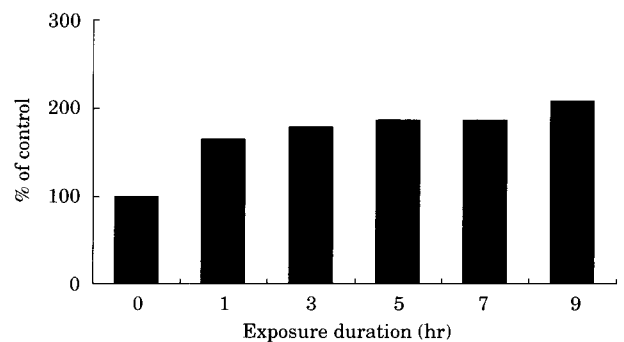


Fig. 3. Time-course *in vitro* induction of CYP content of hepatic microsome in sea bream (*Pagrus major*) with exposure to 10 mM β -naphthoflavone (BNF). Data expressed as percentage of controls.

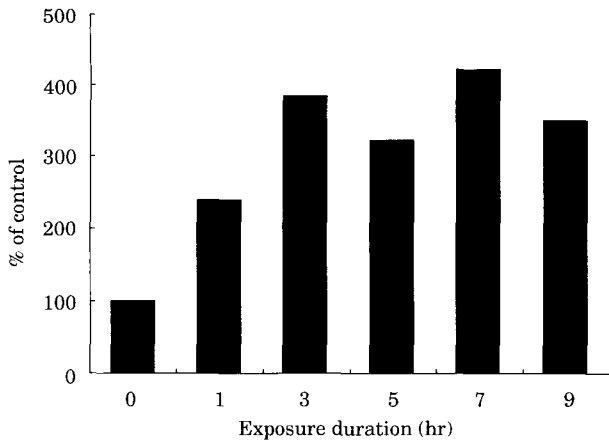


Fig. 4. Time-course *in vitro* induction of CYP content of hepatic microsome in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) with exposure to 10 mM β -naphthoflavone (BNF). Data expressed as percentage of controls.

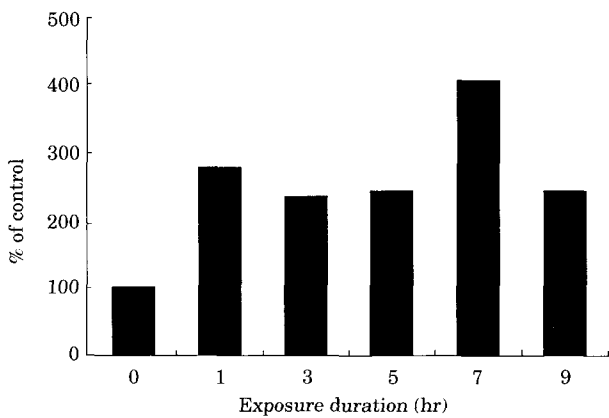


Fig. 5. Time-course *in vitro* induction of CYP content of hepatic microsome in rockfish (*Sebastes schlegeli*) with exposure to 10 mM β -naphthoflavone (BNF). Data expressed as percentage of controls.

즉, 넙치의 경우에는 BNF와의 배양 3시간만에 383%로 증가하였으며 이후 7시간째에는 가장 많아져서 422%나 되었고 이후 감소하여 9시간째에는 350%가 되었지만 여전히 다른 어류들에 비하면 높은 수준이었다. 조피볼락의 경우(Fig. 5)에도 넙치와 비슷한 경향을 보여 배양 3시간만에 236%로 증가하였고 7시간 후에는 최고 407%까지 늘었다가 이후 감소하여 9시간째에는 243%가 되었다.

이들 5종의 어류는 모두 BNF와 배양 시에 CYP 함량이 증가하였으나, 증가경향은 어류에 따라 차이를 보였으며, 이처럼 CYP 유도제에 의한 약물대사 효소계의 유도 정도가 어류에 따라 다르다는 것은 다른 연구자들(Lemaire *et al.* 1996; Stegeman *et al.* 1997)에 의해서도

확인되었다. 그리고 어류간에는 CYP 함량의 증가경향에 특징이 있었고, 가장 두드러진 특징은 자연산 어류와 양식 어류와의 차이로서 대체로 양식 어류는 자연산 어류에 비해 BNF에 의해 다소 늦게 정점에 이르지만 유도 정도는 더욱 컸다. 즉, 양식 어류인 넙치, 조피볼락 및 참돔의 CYP 함량은 BNF의 노출농도(5 mM 또는 10 mM)를 감안하지 않더라도 처음 수준에 비해 207~422%까지 늘었으나 자연산 어류인 송어와 쥐치에서는 206~207% 증가하는데 그쳐 두 그룹간에는 차이가 있었다. 이처럼 양식과 자연산 어류에서 CYP 유도제에 의한 CYP 함량의 증가경향에 차이가 나는 것은 이들의 서식 환경과 연관지을 수 있을 것으로 여겨진다. 양식 어류는 자연산 어류에 비해 제한된 환경의 육상 또는 해상의 시설에서 사육되는 수가 많아 주변 환경이 악화되더라도 이동하여 피할 수가 없어 오염물질에 노출되는 경우가 상대적으로 많을 것이어서 BNF 등의 약물에 의해서도 CYP가 크게 반응하는 듯 하다. 실제로 야외현장의 여러 보고(Bloom *et al.* 1998; Peters *et al.* 1998; Vigano *et al.* 1998)를 보더라도 오염이 덜 된 곳의 생물을 오염된 해역으로 옮기면 약물대사 효소계의 반응이 증대하였다는 것도 이런 추정을 뒷받침해 준다. 그리고 자연산인 송어와 쥐치는 양식 어류에 비해 CYP 반응성이 낮았지만, 이들 간에도 유도경향에는 다소 차이를 보였다. 쥐치는 BNF와의 배양 중 최고 144%까지 증가하였다가 이후에는 65%로까지 급감하여 송어에 비해 감소 정도가 심했다. 일반적으로 쥐치는 바다 속 30 m 이상의 깊은 곳에 살며 갑각류나 유충류, 조개류, 해조류를 주로 먹고살지만, 송어는 담수와 기수, 해수를 이동하는 어종이고 식성도 잡식성이어서 진흙 속의 유기물 등을 먹는다고 알려져 있다(鄭 1996). 강이나 하천 등의 담수에는 육상 기원의 여러 오염물질의 농도가 상대적으로 해양에 비해 높고 특히 저질에는 오염물질이 수중 부유물질과 입자를 이루어 가라앉아 있어 송어는 이것을 섭취할 가능성이 쥐치에 비해 크기 때문에 CYP 반응이 쥐치보다 분명하게 나타나는지도 모르겠다. 이처럼 어류가 서식 환경이나 습성에 따라 외인성 오염물질이나 CYP 유도제 등의 약물에 의해 CYP 반응성이 차이를 보이는지에 관해서는 향후 자세한 검토가 필요할 것이라 여겨진다.

적 요

해산 어류가 cytochrome P450 (CYP) 유도제로 알려진 β -naphthoflavone (BNF)에 의해 어떤 반응을 하는지 살펴보기 위하여, 양식 어류로는 조피볼락(*Sebastes schlegeli*), 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 참돔(*Pagrus*

major)을 그리고 자연산 어류로는 송어 (*Mugil cephalus*)와 쥐치 (*Stephanolepis cirrhifer*)를 대상으로 조사하였다. 송어와 쥐치, 참돔의 마이크로솜은 DMSO (dimethylsulfoxide)로 녹인 BNF를 10 mM이 되도록 첨가하였고, 조피볼락과 넙치의 경우에는 5 mM이 되도록 첨가하여 30°C의 수조에서 9시간까지 배양하면서 CYP 함량의 경시적인 변화를 조사하였고, 각 어류는 2% 농도로 DMSO만을 첨가하여 같은 조건으로 배양한 대조구에 대한 상대비(%)로 나타내었다. 그 결과, 대부분의 어류에서는 배양 3~5시간에 최대값을 보이고 이후 줄어들었으나 참돔은 9시간까지도 계속 증가하는 경향을 보였다. 한편, BNF에 의한 CYP 유도 정도는 양식산 어류가 자연산 어류보다 커서 차이를 보였다. 즉, 양식산 어류인 넙치, 조피볼락 및 참돔의 CYP 함량은 BNF의 노출농도를 감안하지 않더라도 각 어류의 처음 수준에 비해 207~422%까지 늘었던 것에 비해 자연산 어류인 송어와 쥐치에서는 206~207% 증가하는데 불과하였다. 이처럼 양식산과 자연산 어류에서 CYP 유도제에 의한 CYP 유도 정도의 차이는 서식환경의 차이에 따라 생기는 것이라 여겨진다.

감사의 글

연구자들은 이 논문을 2001년도 한국학술진흥재단(KRF-1998-001-H00065)의 지원에 의하여 연구하였으며, 이에 감사 드립니다.

참고 문헌

- 전중균, 이미희, 심원준, 이수형. 2002. Cytochrome P450 유도에 노출시킨 명주조개 (*Coelomactra antiquata*) 약물대사 효소계의 *in vitro* 반응. 한국수산학회지. 35:179-184.
- 전중균, 이미희, 이지선, 심원준, 이수형, 허형택. 2003. 유기주석화합물이 해산 어류의 간장 MFO 효소계에 미치는 영향. 환경생물학회지. 21:18-25.
- 鄭文基. 1998. 韓國魚圖譜. 一志社. 서울.
- Blom S, L Norrgren and L Foerlin. 1998. Sublethal effects in caged rainbow trout during remedial activities in Lake Jaernsjoen. *Ambio*. 27:411-418.
- Crane DA, AA Rooney, EF Orlando and LJ Guillet Jr. 2000. Endocrine-disrupting contaminants and hormone dynamics: lessons from wildlife. pp.1-21. In *Environmental Endocrine Disrupters* (Guillet LJ and DA Crain eds.). Taylor and Francis. New York.
- Elskus AA and JJ Stegeman. 1989. Further consideration of phenobarbital effects on cytochrome P-450 activity in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 92C:223-230.
- Gibson GG and P Skett. 1994. *Introduction to Drug Metabolism*. 2nd edition. Blackie Academic & Professional, London.
- Jaksic Z, N Bihari, WEG Muller, RK Zahn and R Batel. 1998. Modulation of cytochrome P450 1A in sea bass liver by model substances and seawater extracts. *Aquat. Toxicol.* 40:265-273.
- Kime DE. 1998. Disruption of liver function. pp.201-246. In *Endocrine Disruption in Fish* (Kime DE ed.). Kluwer Academic Publishers. Boston.
- Lemaire P, L Forlin and DR Livingstone. 1996. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1A-inducers (3-methylcholanthrene, beta-naphthoflavone) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 36:141-160.
- Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr and RJ Randall. 1951. Protein measurement Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Michel XR, P Suteau, LW Robertson and JF Narbonne. 1993. Effects of benzo(a)pyrene, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aqua. Toxicol.* 27:335-344.
- Ohhira S, H Matsui and K Watanabe. 1999. Effects of pretreatment with cytochrome P450 inducers, especially phenobarbital on triphenyltin metabolism and toxicity in hamsters. *Toxicol.* 137:151-159.
- Omura T and R Sato. 1964. The carbon-monoxide binding pigment of liver micromes. *J. Biol. Chem.* 239:2370-2378.
- Peters LD, C Nasci and DR Livingstone. 1998. Variation in levels of cytochrome P4501A, 2B, 2E, 3A and 4A-immunopositive proteins in digestive gland of indigenous and transplanted mussel *Mytilus galloprovincialis* in Venice Lagoon, Italy. *Mar. Environ. Res.* 46:295-299.
- Stegeman JJ, BR Woodin, H Singh, MF Oleksiak and M Celander. 1997. Cytochromes P450 (CYP) in tropical fishes: Catalytic activities, expression of multiple CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fishes from Bermuda. *Comp. Biochem. Physiol.* 116C:61-75.
- Vigano L, A Arillo, F Melodia, P Arlati and C Monti. 1998. Biomarker responses in cyprinids of the middle stretch of the River Po, Italy. *Environ. Toxicol. Chem.* 17:404-411.

(Received 14 December 2002, accepted 20 February 2003)