

노닐페놀을 주사한 조피볼락의 간장 cytochrome P450과 EROD의 반응

전중균* · 이지선 · 손영창 · 심원준¹ · 정지현² · 홍경표¹ · 김병기³ · 한창희²

강릉대학교 해양생명공학부/동해안해양생물자원연구센터,

¹한국해양연구원, ²동의대학교 생물학과,

³강원도립대학 해양생물자원개발과

Responses of Cytochrome P450 and EROD Activity in Rockfish (*Sebastes schlegeli*) Administered Intraperitoneal Injection of 4-nonylphenol

Joong-Kyun Jeon*, Ji-Seon Lee, Young-Chang Sohn, Won Joon Shim¹,
Jee-Hyun Jeung², Gyong-Pyo Hong¹, Pyong-Kih Kim³ and Chang-Hee Han²

Kangnung Nat'l Univ. / EMBRC, Gangneung 210-702, Korea

¹Korea Ocean Res. & Develp. Inst., Ansan 425-170, Korea

²Dong-Eui Univ., Busan 614-714, Korea

³Gangwon Provincial Univ., Gangneung 210-804, Korea

Abstract - Nonylphenol (NP) used actively as non-ionic surfactant is classified as one of most potent endocrine disrupting chemicals. Effects of NP on mixed function oxygenase (MFO) system in rockfish (*Sebastes schlegeli*) were investigated for seven days after intraperitoneal injection (10 and 25 mg kg⁻¹). Hepatosomatic index (HSI) of fishes exposed to NP of 25 mg kg⁻¹ was significantly reduced compared to those in control group. NP exposure enhanced cytochrome P450 levels in the fish liver, while 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity was inhibited. NP exposure levels in this study were much higher than those found in the coastal environment of Korea. Effects on HSI and liver MFO system, which is involved in steroid hormone metabolism, imply that NP may influence on reproduction of fish by not only hormone receptor mediated response but also through effects on the MFO system.

Key words : 4-nonylphenol, rockfish, *Sebastes schlegeli*, cytochrome P450, EROD, hepatosomatic index

서 론

최근 수십 년 간 인류의 복지향상을 위해 인위적으로

만든 수많은 화학물질들이 본래의 의도와는 달리 생태계를 오염시키고 더 나아가 사람이나 야생동물의 내분비계에 작용하여 동물의 생식에 장애효과를 나타낼 가능성이 있다는 보고(Colborn *et al.* 1993)가 있는 이후, 환경 중으로 배출된 각종 화학물질들이 동물의 성장이나 발달, 생식, 면역 등에 미치는 영향에 대해 세계적으로 관심이 모

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

아지고 있다. 우리나라에서도 환경부를 중심으로 오염물질에 대한 국내의 오염실태 조사와 위해성 평가를 위한 화학물질의 선정에 관한 연구가 시작되어, 1998년에는 내분비계 장애물질로 캐나다의 세계야생동물재단(WWF)이 선정한 67종의 화학물질을 우선 연구대상물질로 정하였으나, 알킬페놀류는 규제대상에서 제외되었다.

산업체에서 널리 사용하는 알콕시페놀 세정제는 생분해되면서 알킬페놀류가 만들어지는데 이 화합물은 에스트로겐 활성을 갖는다는 사실이 밝혀졌다(Sumpter and Jobling 1993; Jobling and Sumpter 1994; Purdom *et al.* 1994). 노닐페놀(4-nonylphenol, NP)은 산업용이나 가정용 세제의 비이온성 계면활성제로 많이 쓰이는 알킬페놀 폴리옥시에틸렌의 분해산물인데, 화학적으로 안정하므로 생활하수나 산업배수가 많이 유입되는 하천 등에서는 상당히 높은 농도로 검출된다. 게다가 이들 화합물은 최종적으로는 바다로 유입되는데, 완전히 분해되지 않은 분해산물에 의해 해양에서 서식하는 여러 생물들은 영향을 받을 수 있다. 비록 NP의 독성이 다른 오염물질에 비해 상대적으로 낮다고 알려져 있으나(McLeese *et al.* 1981), NP가 해양생물에 어떻게 영향을 미치는지에 관해서는 조사된 것이 많지 않다.

국립환경연구원(2002)의 조사를 통해 우리나라의 담수 어류에서는 $9.8 \mu\text{g NP kg}^{-1}$ 이 검출된 바 있고, 공단지역인 경기도 시화호 주변의 하천수에서는 최고 $41 \mu\text{g L}^{-1}$ 이 측정되었으며, 서해의 퇴적물에서도 최고 $41.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ dry wt.이 검출되었다(해양수산부 2002). 그리고 부산의 낙동강 하구를 비롯하여 부산항과 울산항의 퇴적물에서는 각각 845, 1,956 및 $2,162 \mu\text{g kg}^{-1}$ dry wt.의 높은 농도가 검출되었는데 이것은 해양 퇴적물이 NP의 간접적인 노출원으로 작용할 수 있음을 보여주는 것이어서 해양에서의 영향도 무시할 수 없을 것이라 여겨진다(해양수산부 2002).

NP가 생물에게 미치는 연구로는 먹이사슬의 하부에 위치하는 각종 동식물성 플랑크톤에 미치는 독성, 예를 들어 *Daphnia magna*에게 미치는 급성·만성독성(Comber *et al.* 1993)과 번식 이상(Baldwin *et al.* 1997, 1998), 무지개송어(Meldahl *et al.* 1996; Tremblay and van der Kraak 1998; Arukwe *et al.* 2001; Madigou *et al.* 2001)와 송사리(Gray and Metcalf 1997; Lee *et al.* 2002) 등 담수에 서식하는 종에 미치는 독성 등에 관해서는 조사된 바가 있지만, 해양생물 특히 어류에 대해서는 대서양연어(*Salmo salar*) (Arukwe *et al.* 2000a, b)나 넙치(*Platichthys flesus*) (Christensen *et al.* 1999) 등에 불과하다. 그나마 성호르몬이나 난황단백질인 vitellogenin의 발현 여부에 관해서만 관심이 모아지고 있는 편이다. 하지만

성호르몬의 대사에는 약물대사에 관여하는 효소로 알려져 있는 cytochrome P450 등도 관여를 하지만, 이들에게 미치는 영향에 관한 연구는 많지 않다.

따라서 본 연구에서는 NP가 해산어류에게 미치는 영향을 조사하고자 우리나라 연안에 많이 서식하며 또한 주요 양식종이기도 한 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)을 대상으로 하여 NP 노출시 외인성화학물질(xenobiotics)의 해독에 관여하며 또한 스테로이드 호르몬의 대사에 관여하는 MFO(mixed function oxidase) 효소계에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 어 류

우리나라에서 많이 양식하는 조피볼락(평균 체중 247 g)을 실험어류로 하였고, 강원도 삼척의 개인양식장에서 부화시켜 사육 중인 것을 강원도립대학 수조실의 원형수조(500 l 용량)로 옮겨 약 2주간 안정화시킨 다음 사용하였다. 사육조건은 자연광 하에서 여과해수(평균 30%)를 지속적으로 공급하였고, 수온은 20°C 전후였으며, 폭기하여 공기를 충분히 공급하였다. 실험기간 중 먹이는 배합 사료를 공급하였다.

2. 주사실험과 시료조제

NP(Aldrich Chem., technical grade)를 DMSO(dimethylsulfoxide; Sigma Chem.)에 녹여 어체중(kg) 당 10 mg(이하 저농도구라 함)과 25 mg(이하 고농도구라 함)을 암수 구별 없이 농도 당 60마리씩 복강주사를 하였고, DMSO만을 주사한 sham구도 대조구로 설정하였다. NP를 주사한 조피볼락은 12, 24, 48, 72 및 168시간 후에 실험구에서 9마리씩 꺼내어 간장을 적출한 다음 중량을 재고, 이어서 간장의 마이크로솜과 세포질을 제조하였다. 마이크로솜과 세포질은 전 등(2003)의 방법을 따라 만들었다.

3. 약물대사효소의 분석과 통계처리

마이크로솜으로는 cytochrome P450(CYP) 농도(Omura and Sato 1964), EROD(7-ethoxyresorufin-O-deethylase)의 활성(Burke and Mayer 1974)을, 그리고 세포질로는 glutathione S-transferase(GST) 활성(Habig *et al.* 1974)을 각각 정량하였고, 마이크로솜과 세포질의 단백질 농도는 Lowry *et al.* (1951)의 방법으로 정량하였다. 그리고 모든 측정치는 평균±표준편차로 나타내었으며,

SPSS (V. 10.0)를 사용하여 one-way ANOVA test를 실시하였고, Duncan test로 95% 신뢰구간에서 유의차 검정을 하였다.

결 과

1. 간장중량지수 (hepatosomatic index, HSI)의 변화

조피볼락에게 NP를 주사한 다음 HSI의 변화를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 대조인 sham구를 비롯하여 저농도구에서는 HSI가 주사 후 시간이 지남에 따라 변화하지 않았으나, 고농도구에서는 72시간 이후에 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

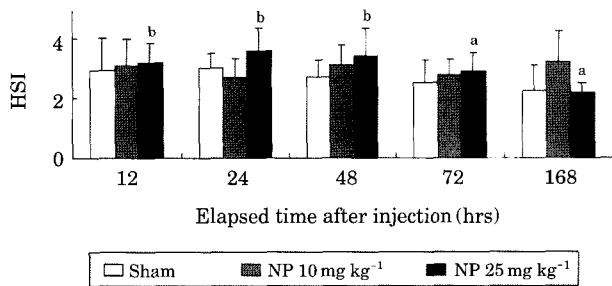


Fig. 1. Time course of changes in hepatosomatic index (HSI) in rockfish (*Sebastes schlegeli*), with exposure to NP (10 and 25 mg kg⁻¹ bw). A same superscript in same exposure group are not significantly different ($p > 0.05$). Each value is the mean for nine animals \pm S.D.

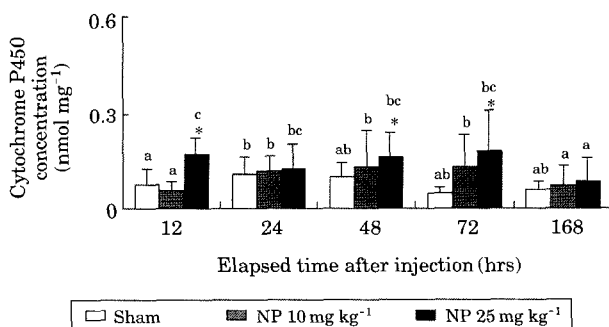


Fig. 2. Time course of changes in CYP level of the hepatic cytosol in rockfish (*Sebastes schlegeli*), with exposure to NP (10 and 25 mg kg⁻¹ bw). A same superscript in same exposure group are not significantly different ($p > 0.05$), and * $P < 0.05$ compared with the rockfish treated with DMSO (sham). Each value is the mean for nine animals \pm S.D.

2. 약물대사효소의 경시적 반응

NP 주사구의 CYP 농도 및 EROD 활성의 경시적인 변화는 각각 Fig. 2 및 Fig. 3과 같다. Sham구와 저농도구에서 CYP 농도는 24시간째에 일시 증가하였으나, 고농도구는 이보다 빠른 12시간만에 최고 수준을 보였다($p < 0.05$) (Fig. 2). 고농도구의 CYP 농도는 저농도구에 비해 전반적으로 높았고 12, 48 및 72시간째에는 대조를 위해 DMSO만 주사한 sham구와 유의적인 차이 ($p < 0.05$)를 보였다. 한편, NP 주사구의 EROD 활성은 72시간 이후부터 뚜렷하게 증가하였지만 sham구에 비하면 유의적으로 낮은 수준이었다 (Fig. 3).

GST 활성의 경시적인 변화 (Fig. 4)에서는 주사 후 매

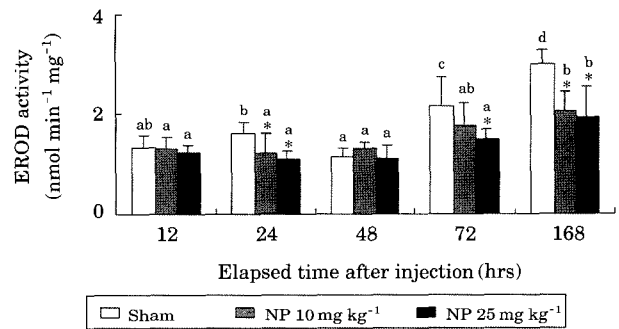


Fig. 3. Time course of changes in EROD level of the hepatic cytosol in rockfish (*Sebastes schlegeli*), with exposure to NP (10 and 25 mg kg⁻¹ bw). A same superscript in same exposure group are not significantly different ($p > 0.05$), and * $P < 0.05$ compared with the rockfish treated with DMSO (sham). Each value is the mean for nine animals \pm S.D.

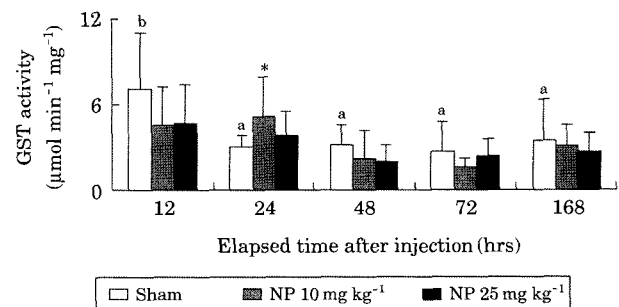


Fig. 4. Time course of changes in GST activity of the hepatic cytosol in rockfish (*Sebastes schlegeli*), with exposure to NP (10 and 25 mg kg⁻¹ bw). A same superscript in same exposure group are not significantly different ($p > 0.05$), and * $P < 0.05$ compared with the rockfish treated with DMSO (sham). Each value is the mean for nine animals \pm S.D.

경과시간에서 주사구 간의 차이가 24시간째에 NP 저농도 주사구에서 GST 활성이 특이하게 증가한 것을 제외하고는 나머지 주사구에서는 sham구와 유의적인 차이를 보이지 않았다($p>0.05$). 그리고 각 주사구의 경시적인 활성 변화를 보면, sham구는 주사 12시간에 가장 높은 활성을 보이다가 이후 감소하였고, NP 주사구도 시간 경과에 따라 다소간의 감소 경향은 있었지만 두 주사구 간에 유의적인 차이는 없었다($p>0.05$).

고 찰

간장은 모든 척추동물에서 해독에 관여하는 가장 중요한 기관이어서 특정 오염물질이 생물에 미치는 영향을 파악하는데 중요한 역할을 한다. 어류에서 간장은 지질이 가장 많은 부위이고 유기오염물질이 가장 잘 축적되는 조직이므로, 오염물질로 인해서 조직이 손상을 입고 또한 간장에 들어있는 해독효소의 활성이 교란될 위험성도 다른 조직에 비해 크다(Kime 1998). 최근 내분비계 장애물질로 알려지면서 관심을 모이고 있는 NP나 옥틸페놀(octylphenol) 등의 알킬페놀류는 지난 40년 이상 사용되던 것이며 지금도 세계적으로는 매년 36만톤이나 만들어진다고 한다. 세제나 플라스틱의 원료로 쓰이고 유화제나 보습성 소재 등으로 가정용품이나 농약, 공업용품에 쓰이는데 그 중 60%는 물에 씻겨진다(Nimrod and Benson 1996). 그래서 NP의 독성에 관한 연구가 담수산 생물에 게 집중되었다. 그러나 이들은 수생생물에게 쉽게 축적되므로 해산어류에 미치는 영향도 적지 않을 것이다.

본 연구에서는 조피볼락에게 NP를 복강주사 하고 물질대사의 1차 기관인 간장에 미치는 영향을 살펴보고자 간장 중량의 변화(HSI)와 약물대사효소의 변화를 조사하였다. 그 결과, 10 mg NP kg⁻¹ bw의 처리로는 HSI가 영향을 받지 않았고, 25 mg NP kg⁻¹ bw에서는 HSI가 감소하였다(Fig. 1). 일반적으로 간장 크기가 변한다는 것은 간장 독성이 있기 때문이라 여겨진다. 그리고 약물대사효소인 CYP와 EROD도 NP에 의해 영향을 받았는데 즉, NP를 주사한 두 주사구의 CYP 농도는 DMSO만을 주사한 sham구에 비해 전반적으로 유도되었으며, 최고 수준을 보이는 때는 주사 후 12시간(고농도구)~24시간(저농도구)으로 주사 농도에 따라 차이를 보였다(Fig. 2). 그러나 EROD 활성은 sham구를 비롯하여 NP 주사구 모두 주사 후에 시간이 지남에 따라 증가하기는 하였어도 sham구에 비해 NP 주사구의 증가 정도가 작은 것으로 보아 NP는 EROD 활성을 유도하지 않는 것으로 보인다(Fig. 3). NP가 EROD 활성을 유도하지 않는다는 것은 해

산어류인 대서양연어(*Salmo salar*) (Arukwe et al. 1997)나 육생동물인 마우스의 hepatoma Hepa-1c1c7 세포(Jeong et al. 2001)에서도 마찬가지로 관찰된 바 있다. 한편 GST는 약물대사의 II상에 관여하는 포합효소이다. I상 반응(phase I)에서 산화, 환원, 가수분해로 극성기 도입되면 II상 반응(phase II)에서는 이들 극성기를 가진 화합물을 내재성 생체 성분인 글루쿠론산이나 황산, 글루타치온 등과 포함시켜 몸밖으로 배설하기 쉽게 만든다. NP 주사 후 초기에 GST 활성이 높았다가 이후 점차 낮아지는 패턴을 보이는 것은 초기에 체내에 주입된 NP를 포집하여 배설하려는 활성이 커졌다가, 이후 체내의 NP 농도가 줄어들면서 GST 활성도 낮아지는 것이라 여겨진다.

이상의 결과를 정리하면, NP는 조피볼락에게 간장 독성을 보였고, 간장의 약물대사효소에도 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다. 간장의 조직 또는 해독효소가 영향을 받으면 공존하는 유독물질의 생체축적과 청소율(clearance)도 영향을 받을 수 밖에 없으므로 유해작용은 증폭될 것이다. 또한 약물대사효소는 스테로이드나 지방산과 같은 내인성 화합물의 합성 등에도 관여를 하기 때문에, 이들 효소의 유도 또는 저해는 간접적으로 내인성 화합물의 대사에도 영향을 미칠 수 있을 것이다. 특히 NP는 내분비계 장애물질로 알려져 있으므로 성호르몬에도 영향을 미친다는 것이 관찰되었는데 이에 관해서도 보고할 예정이다.

적 요

비이온성 계면활성제로 많이 쓰이는 알킬페놀류의 하나인 노닐페놀(nonylphenol)이 해산어류에게 미치는 영향을 조사하려고 주요 양식어종인 조피볼락에게 복강주사로 10 및 25 mg kg⁻¹을 1회 투여하였다. 한편 용제인 DMSO만을 주사한 sham구를 설정하여 비교하였다. 주사 후 7일간 간중량지수(hepatosomatic index)의 변화를 조사하였고, 또한 간장 마이크로솜 중 대표적인 약물대사효소인 cytochrome P450 (CYP) 농도와 ethoxyresorufin deethylase (EROD) 활성의 변화도 측정하였다.

그 결과, 고농도(25 mg kg⁻¹) 주사구에서는 HSI가 감소하였는데, 이것은 NP가 간장에 독성이 있다는 것을 보여준다. 한편, 약물대사효소 중 CYP 농도는 유도되었지만 EROD 활성은 저해되는 경향을 보였다. 이번에 주사한 농도는 우리나라 연근해 해수 중의 NP 농도에 비해 매우 높은 수준이지만, 본 실험에서는 NP가 조피볼락에게 간장 독성을 보였고, 간장의 약물대사효소에도 영향을 미

친다는 것을 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구는 해양수산부 연구사업비의 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- 국립환경연구원. 2002. 내분비계장애물질 측정분석방법. 327 pp.
- 전중균, 이미희, 이지선, 심원준, 이수형, 허형택. 2003. 유기주석 화합물이 해산 어류의 간장 MFO 효소계에 미치는 영향. 환경생물. 21:18-25.
- 해양수산부. 2002. 내분비계장애물질의 해양생태계 영향과 거동연구(I). 내분비계장애물질의 해양 내 유입경로 특성연구. 171pp.
- Arukwe A, T Celius, BT Walther and A. Goksøyr. 2000a. Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquat. Toxicol. 49:159-170.
- Arukwe A, L Förlin and A Goksøyr. 1997. Xenobiotic and steroid transformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. Environ. Toxicol. Chem. 16: 2576-2583.
- Arukwe A, SW Kullman and DE Hinton. 2001. Differential biomarker gene and protein expressions in nonylphenol and estradiol-17 β treated juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol. 129C: 1-10.
- Arukwe A, R Thibaut, K Ingebrigtsen, T Celius, A Goksøyr and JP Cravedi. 2000b. *In vivo* and *in vitro* metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquat. Toxicol. 49:289-304.
- Baldwin WS, SE Graham, D Shea and GA LeBlanc. 1997. Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. Environ. Toxicol. Chem. 16:1905-1911.
- Baldwin WS, SE Graham, D Shea and GA LeBlanc. 1998. Altered metabolic elimination of testosterone and associated toxicity following exposure of *Daphnia magna* to nonylphenol polyethoxylate. Ecotoxicol. Environ. Safe. 39:104-111.
- Burke MD and RT Mayer. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. Drug Metab. Dispos. 2:583-588.
- Christensen LJ, B Korsgaard and P Bjerregaard. 1999. The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. Aquat. Toxicol. 46: 211-219.
- Colborn T, FS vom Saal and AM Sato. 1993. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ. Health Persp. 101:378-384.
- Comber MHI, TD Williams and KM Stewart. 1993. The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. Water Res. 27:273-276.
- Gray MA and Metcalf CD. 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. Environ. Toxicol. Chem. 16:1082-1086.
- Habig WH, MJ Pabst and WB Jakoby. 1974. Glutathione-S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249:7130-7139.
- Jeong HW, JY Kim, CY Choi, HJ You and KS Hahm. 2001. Suppression of CYP1A1 expression by 4-nonylphenol in murine Hepa-1c1c7 cells. Cancer Lett. 165:95-101.
- Jobling S and JP Sumpter. 1994. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Aquat. Toxicol. 27:361-372.
- Kime, D.E. 1998. Endocrine disruption in fish. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Lee C, JG Na, KC Lee and K Park. 2002. Choriogenin mRNA induction in male medaka, *Oryzias latipes* as a biomarker of endocrine disruption. Aquat. Toxicol. 61:233-241.
- Lowry OH, NJ Roseborough, LA Farr and RJ Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Madigou T, P Le Goff, G Salbert, JP Cravedi, H Segner, F Pakdel and Y Valotaire. 2001. Effects of nonylphenol on estrogen receptor conformation, transcriptional activity and sexual reversion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 53:173-186.
- McLeese DW, V Zitko, DB Sergeant, L Burrige and CD Metcalfe. 1981. Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. Chemosphere 10:723-730.
- Meldahl AC, K Nithipatikom and JJ Lech. 1996. Metabolism of several ¹⁴C-nonylphenol isomers by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): *In vivo* and *in vitro* microsomal metabolites. Xenobiotica 26:1167-1180.
- Nimrod AC and WH Benson. 1996. Estrogenic responses to xenobiotics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Mar. Environ. Res. 42:155-160.
- Omura T and R Sato. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. J. Biol. Chem. 239:2370-

2378.

Purdom CE, PA Hardiman, VJ Bye, NC Eno, CR Tyler and JP Sumpter. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8:275-285.

Sumpter JP and S Jobling. 1993. Male sexual development in a 'sea of oestrogen'. *Lancet*, 342:124-125.

Tremblay L and G van der Kraak. 1998. Use of a series of

homologous *in vitro* and *in vivo* assays to evaluate the endocrine modulating actions of β -sitosterol in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 43:149-162.

Manuscript Received: November 30, 2003

Revision Accepted: January 29, 2004

Responsible Editorial Member: Saywa Kim
(Yongin Univ.)