

Tin-free 방오제인 Sea-Nine 211을 주사한 북방대합에서 alkoxyresorufin 탈알킬화효소와 글루타치온 포합효소 활성의 변화

이지선 · 전영하¹ · 심원준² · 전중균*

강릉대학교 해양생명공학부 · 동해안해양생물자원연구센터 (EMBRC)

¹강원도 환동해출장소, ²한국해양연구원 남해연구소

Responses of Alkoxyresorufin Dealkylases and Glutathione S-transferase Activities of Surf Clam, *Pseudocardium sachalinensis*, Injected with Sea-Nine 211 Antifoulant

Ji-Seon Lee, Yeong-Ha Jeon¹, Won-Joon Shim² and Joong-Kyun Jeon*

Kangnung National University · EMBRC, Gangneung, Gangwon 210-702, Korea

¹East Sea Branch Office, Government of Gangwon Province, Gangneung 210-800, Korea

²KORDI South Sea Institute, KORDI, Geoje, Gyeongnam 656-830, Korea

Abstract – To evaluate the extent of Sea-Nine 211 (4,5-dichloro-2-n-octyl-3(2H) isothiazolone), one of the alternating organic booster compound used in antifouling paint to replace TBT, on marine benthic bivalve, we injected Sea-Nine 211 to clam, *Pseudocardium sachalinensis*, and then determined some xenobiotics metabolizing enzyme activities, especially EROD (ethoxyresorufin deethylase) and MROD (methoxyresorufin demethylase), in digestive gland during 4 day-exposure period. Moreover, the results were compared with those of TBT exposed clam.

CYP1A1 dependant EROD activity in both the Sea-Nine 211 and the TBTC exposure groups showed no significant differences compared to those of the solvent control group. CYP1A2 dependant MROD activity in Sea-Nine 211 exposure group was significantly induced, but no significant difference was obtained in the TBTC exposure group.

These results indicate that Sea-Nine 211 demonstrated a tendency to induce MROD activity, while TBTC inhibits the activities of this enzyme.

Key words : Sea-Nine 211, TBTC, clam, *Pseudocardium sachalinensis*, EROD, MROD

서 론

유기주석화합물은 방오제 (antifoulant)로서 효과가 뛰

어난 탓에 그동안 주로 쓰이던 산화제1구리(아산화동)을 대신하여 1970년대부터 많이 쓰였다. 즉, 유기주석화합물이 들어있는 방오페인트를 사용하면 보수의 번거로움을 줄일 수 있을 뿐 아니라 도색 비용과 연료비도 절약할 수 있어 유조선이나 화물선 등의 대형선박에 많이 사용되었다. 하지만 1980년대에 들어서면서 유기주석 화

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

합물이 해양생물에게 미치는 심각한 독성이 밝혀지면서 세계 여러 나라는 제한적인 사용 또는 사용 금지를 법적으로 명기하고 있다. TBT는 부작용 생물뿐만 아니라 확산을 통해 근처에 있는 비표적생물(non-targeting organism)에게도 나쁜 영향을 미침으로 생태계에 인위적인 변화를 초래하며(WHO 1990; Alzieu 1991), 실제로 대형 선박의 출입이 빈번한 항구 주변에서는 유기주석 화합물에 의해 참굴(*Crassostrea gigas*)의 패각기형과 개체군 감소가 보고되기도 하였다(Davies *et al.* 1988).

더욱이 유기주석화합물은 사람에게 여성호르몬과 유사한 작용을 하여 생식과 번식에 영향을 미치는 것으로 알려진 환경호르몬 또는 내분비교란물질(endocrine disrupting chemicals)의 일종이기도 하다. 환경호르몬은 생태계 및 인간의 생식기능을 저하시키고 기형이나 성장장애, 암 등의 질병을 유발시켜 모든 생물에게 위협이 될 수 있다는 점에서 심각한 오염물질로 인식되고 있으며, 생체 내에서는 성 호르몬이나 갑상선 호르몬, 부신피질 호르몬도 영향을 받는다고 알려져 있다.

따라서 대부분의 선진국들은 1982년 이후 선박의 방오페인트에 유기주석화합물 사용을 적극 억제하고 있는 추세이며, 주석이 들어있지 않은 새로운 방오제를 개발하려는 연구가 진행되고 있다. 본 실험에 사용한 Sea-Nine 211도 이렇게 개발한 대체제 가운데 하나이며, 영국에서 개발되어 특허를 얻은 화합물(Pesticides Safety Directorate 1998)인데, 본 논문은 전보(이 등 2008)에 이어 Sea-Nine 211이 북방대합(*Pseudocardium sachalinensis*)의 약물대사효소계 특히 alkoxyresorufin 탈알킬화효소와 글루타치온 전이효소에 미치는 영향을 조사한 것이며, 그 효소반응을 유기주석화합물인 tributyltin chloride (TBTC)와 비교하여 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 주사 시약

실험에는 tin-free 방오제인 Sea-Nine 211 (Romm & Haas, England)과 TBTC (tributyltin chloride; 96%, Sigma, USA)를 사용하였으며, 이들 화합물은 DMSO(dimethylsulfoxide, Sigma, USA)에 녹여 북방대합에 주사하였다.

2. 대상 생물과 주사 실험

실험에 사용한 북방대합(*Pseudocardium sachalinensis*)은 강릉지역의 전문판매장에서 구입(150~180 g)하여 실험하기까지 1주일가량을 강원도수산시험장의 사각 콘

크리트 수조(2×10×1 m)에 수용하여 자연 여과해수(염분도 33‰, 수온 17~20°C)를 유수식으로 공급하면서 안정화시켰다. 그리고 주사 실험은 Sea-Nine 211을 각각 5, 25 및 50 mg kg⁻¹의 농도로 16마리의 북방대합에 주사하였고, TBTC는 각각 1, 2 및 5 mg kg⁻¹의 농도로 주사하였으며, sham구에는 용제인 DMSO만을 주사하였다. 화합물의 주입은 1 mL용 주사기로 각 농도별 화합물을 흡인한 다음 북방대합의 인대 부위에 삽입시켜 주사하였고, 주사 후 1, 2 및 4일째에 내장낭 부위를 적출한 다음 불필요한 조직을 가위로 충분히 떼어내고 중장선(digestive gland) 조직의 일부를 사용하여 마이크로즘을 만들어 효소 분석에 사용하였다. 실험 기간에는 클로렐라 등의 먹이생물을 하루 두 차례씩 공급하였다.

3. 마이크로즘 조제와 alkoxyresorufin dealkylase

활성 측정

대합 두 마리의 중장선을 모아 인산완충액(pH 7.4)과 함께 균질화 시켜 원심분리(5,000 rpm, 20분, 4°C)와 초원심분리(100,000×g, 120분, 4°C)를 한 다음 침전물을 상기한 인산완충액으로 현탁시켜 마이크로즘 회분을 만들었다. 그리고 alkoxyresorufin 탈알킬화 효소로는 ethoxyresorufin deethylase (EROD)와 methoxyresorufin demethylase (MROD)의 활성을 Burke and Mayer (1974)의 방법에 따라 마이크로즘 회분을 사용하여 측정하였으며, 마이크로즘의 단백질 정량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법을 따랐다.

4. 통계처리

모든 측정치는 평균±표준편차로 나타내었으며, SPSS (V. 10.0)를 사용하여 one-way ANOVA test를 실시하였고, Duncan' program으로 95% 신뢰구간에서 유의차 검정을 하였다.

결과 및 고찰

지난 30년 이상 방오제로 많이 사용해 왔던 유기주석 화합물이 내분비계 장애물질(endocrine disruptor)로 작용한다는 것이 밝혀지면서 1980년대 후반부터 국제적으로도 그 사용을 규제하고 있기 때문에 이를 대체할 수 있는 새로운 방오화합물이 개발되고 있다. 본 실험에서 사용한 Sea-Nine 211도 영국에서 개발된 방오화합물인데, 이것이 해양생물에 미치는 독성에 대해서는 세균이나 diatom(Willingham and Jacobson 1993, 1996; Callow

and Willingham 1996.), 해조류 (Willingham and Jacobson 1993), 따개비류 (Willingham and Jacobson 1993; Willemssen *et al.* 1998), 홍합이나 굴 유생 (Shade *et al.* 1993; Willingham and Jacobson 1996; Kobayashi and Okamura 2002), 성게 (Kobayashi 1991; Marin *et al.* 2000) 등을 대상으로 하여 조사된 바가 있다.

Sea-Nine 211은 자연 환경에서 반감기가 짧고 (Jacobson and Willingham 2000), 생물이용능이 낮으며 (Jacobson *et al.* 1993), 생체농축계수 (bioconcentration factor, BCF)가 작고, 독성이 약하기 때문에 (Shade *et al.* 1993), 기존에 방오제로 쓰였던 유기주석화합물에 비해서는 독성이 낮다고 알려져 있다. 그러나 이러한 장점을 구비하고 있으면서도 독성 외에 생체 조직에 미치는 영향에 관해서는 잘 알려져 있지 않다. 그래서 본 연구에서는 Sea-Nine 211가 해양생물에 미치는 영향을 조사하기 위한 연구의 일환으로 우선 패류를 대상으로 하여 약물대사효소계의 반응을 조사하였다.

Sea-Nine 211과 TBTC를 주사한 후 마이크로솜 중 cytochrome P450 (CYP)의 isozyme 중 하나인 CYP1A1의 지표효소로 이용되는 EROD의 활성 변화를 경시적으로 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. Sham구를 비롯하여 Sea-Nine 211 주사구들은 시간이 지나면서 효소 활성이 감소하는 경향을 보였지만 주사구간에 유의적인 차이는 없었다 ($p > 0.05$). 즉, sham구에서는 효소 활성이 1일째에 $0.66 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 으로 가장 높았다가 이후에 감소하여 4일째에는 $0.38 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 로 되었으며, Sea-Nine 211 주사구들도 1일째에는 $0.49 \sim 0.59 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 수준에서 4일째에는 $0.35 \sim 0.39 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 으로 감소하였으나 sham구와는 거의 비슷한 수준이었고 유의적인 차이는 없었다 ($p > 0.05$). 그리고 TBTC를 주사한 경우에도 sham구는 주사 4일째까지 $0.16 \sim 0.20 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 의 안정된 수준을 보였고 sham구와도 별다른 차이를 보이지 않았다.

그리고 CYP1A2의 지표효소로 이용되는 MROD의 활성을 경시적으로 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. Sham구와 Sea-Nine 211 주사구는 전반적으로 주사 후 시간이 경과함에 따라 효소 활성이 감소하는 경향을 보였는데 즉, sham구의 효소활성은 1일째에 $0.63 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 이던 것이 4일째에는 $0.18 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 로 감소하였고, Sea-Nine 211 주사구들도 1일째에는 $0.56 \sim 0.65 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 수준이던 것이 4일째에는 $0.23 \sim 0.39 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 의 수준으로 감소하였으나 sham구에 비해서는 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$). 그러나 TBTC를 주사한 경우에는 실험기간 중 주사구는 sham구와 차이를 보이지 않았다. 따라서 본 실험에서는 Sea-Nine 211이 북방

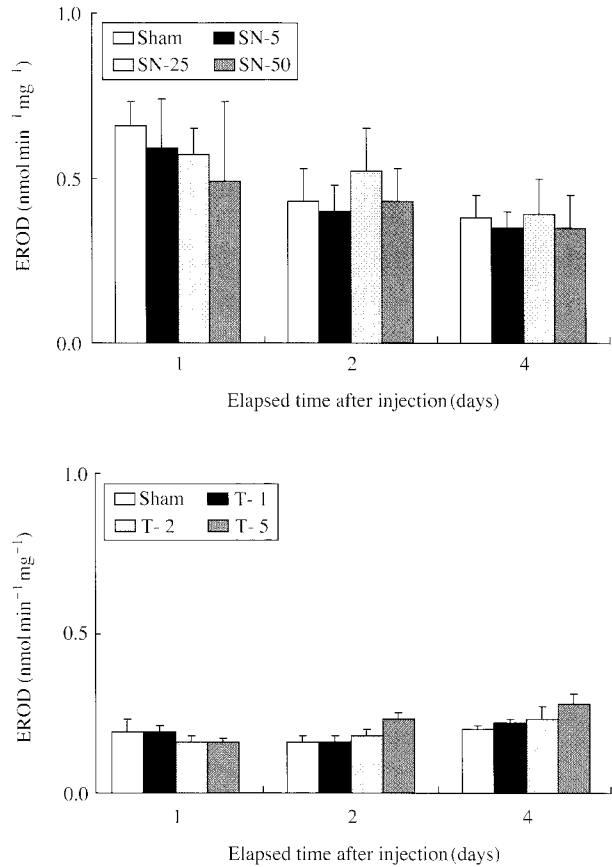


Fig. 1. Changes in EROD activity of surf clam, *P. sachalinensis* injected with Sea-Nine 211 (5, 25 and 50 mg kg⁻¹) and TBTC (1, 2 and 5 mg kg⁻¹).

대합의 약물대사효소계 중 MROD 활성을 유도한다는 것을 알 수 있었다.

이처럼 alkoxyresorufin dealkylase 활성에서도 많은 연구에서 조사되는 EROD가 Sea-Nine 211에 의해서는 별다른 반응을 보이지 않지만 MROD가 유도된다는 것은 매우 흥미롭다. 아직까지는 cytochrome P450의 여러 isozyme 즉, CYP1A, 2B, 2E, 3A, 4A 등이 확인된 패류는 홍합 정도에 불과하지만 (Wootton *et al.* 1995; Peters *et al.* 1998), 본 실험에서 Sea-Nine 211에 의해 MROD가 유도되었다는 것은 북방대합에도 CYP1A2가 존재할 수 있음을 강하게 시사하고 있다.

한편, TBT가 MFO 효소계를 저해하는 것은 앞서 담수산 어류 (Fent and Bucheli 1994), 해산 어류 (Fent and Stegeman 1991, 1993a, b; Morcillo and Porte 1997)를 비롯한 패류 (Morcillo and Porte 1997; Morcillo *et al.* 1998; Solé 2000)에서도 확인된 바 있으며, 전 등 (2002, 2003)도 패류와 어류의 MFO 효소계가 유기주석화합물에 의해 저해된다는 것을 *in vitro* 실험으로 관찰한 바 있다. 즉, 전

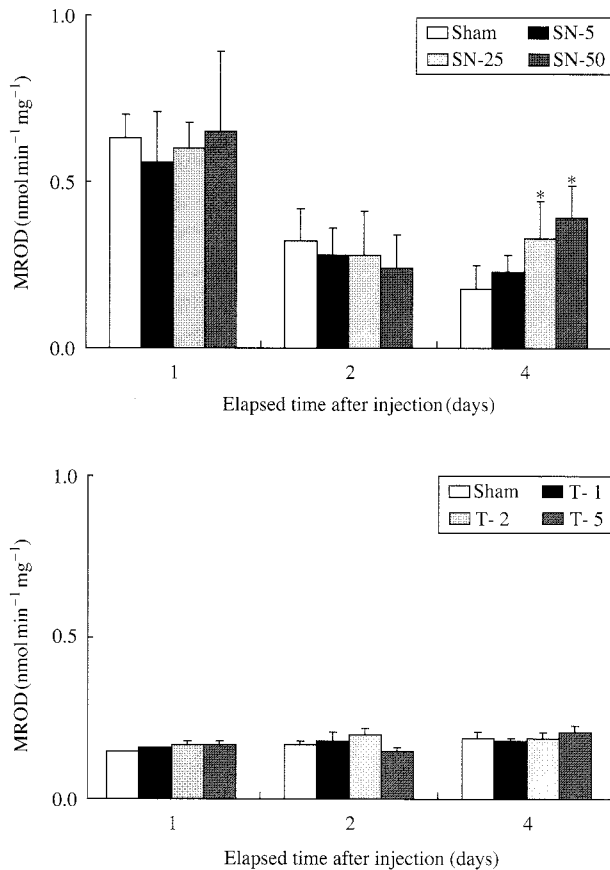


Fig. 2. Changes in MROD activity of surf clam, *P. sachalinensis* injected with Sea-Nine 211 (5, 25 and 50 mg kg⁻¹) and TBTC (1, 2 and 5 mg kg⁻¹). Asterisk symbols denote significant differences from the respective sham group at $p < 0.05$.

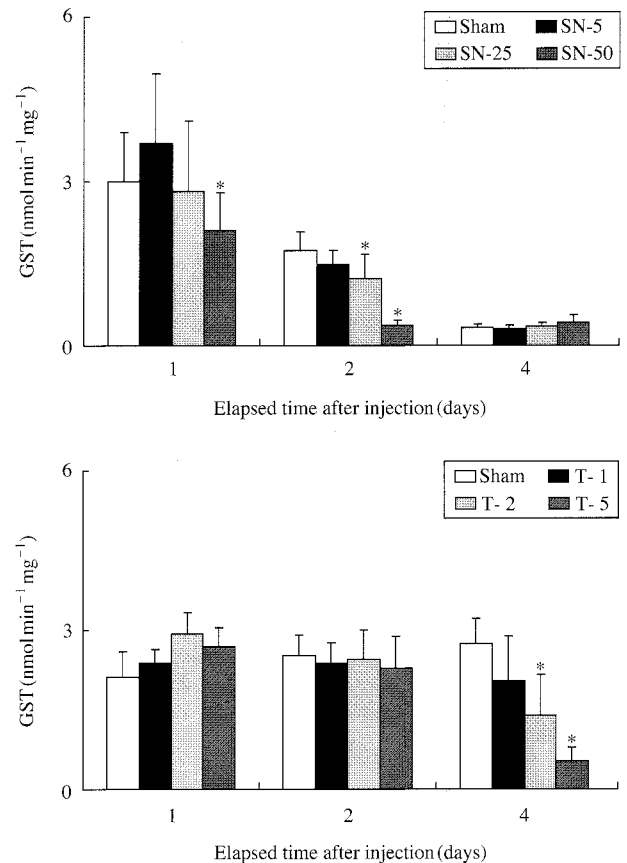


Fig. 3. Changes in cytosol GST activity of surf clam, *P. sachalinensis* injected with Sea-Nine 211 (5, 25 and 50 mg kg⁻¹) and TBTC (1, 2 and 5 mg kg⁻¹). Asterisk symbols denote significant differences from the respective sham group at $p < 0.05$.

등(2002, 2003)은 패류인 명주조개 (*Coelomactra antiquata*) 중장선 마이크로좀과 유기주석화합물인 TBTC, tributyltin oxide (TBTO) 및 triphenyltin chloride (TPTC)를 0.1~0.8 mM의 농도로 첨가하여 배양하면서 EROD 활성을 조사하였더니 이들 효소의 활성이 최대 15%나 저해하였지만 어류에서는 어종에 따라 차이를 보이며 1~65%나 저해하였다고 보고한 바 있으므로, 이 결과를 감안한다면 본 실험에서 TBTC에 의해 북방대합의 EROD 활성이 크게 저해되지 않았던 것은 생물 종에 따른 차이라고 여겨진다.

이처럼 Sea-Nine 211의 일반생물에 미치는 독성은 매우 낮다고 하지만 약물대사효소계에는 적지 않은 영향을 미치는 것이 본 실험에서 확인되었으며, 최근에는 이들 약물대사효소계가 유해물질의 대사뿐 아니라 활성산소종(active oxygen species) 생산이나 산화 스트레스(oxidative stress)와도 관련이 있다는 것(Lemaire *et al.* 1994)이 밝혀지고 있으므로 앞으로는 이로 인한 영향을 조사

하여 독성 자료로 활용할 필요가 있을 것이다.

적 요

방오도료로 많이 쓰이던 유기주석화합물은 일반생물에게 미치는 독성이 매우 강하고 또한 내분비계 장애물질임이 밝혀지면서 이를 대체할 화합물들이 개발되고 있다. 그 가운데 본 연구에서는 Sea-Nine 211(4,5-dichloro-2-n-octyl-3(2H) isothiazolone)을 사용하여 이 화합물이 해양생물 특히 저서생물인 패류에게 얼마나 영향을 미치는지를 살펴보았다. 이를 위해 강원도 북부 해역에 주로 서식하는 북방대합(*Pseudocardium sachalinensis*)에게 Sea-Nine 211을 강제적으로 주사하여 alkoxyresorufin 탈알킬화효소인 EROD와 MROD의 활성 변화를 4 일째까지 조사하였고, 비교를 위해서 tributyltin chloride (TBTC)도 사용하였다.

그 결과, CYP1A1의 지표효소인 EROD 활성은 Sea-Nine 211 및 TBTC 주사구 모두 sham구와 차이가 없었지만, CYP1A2의 지표효소인 MROD 활성은 Sea-Nine 211 주사구가 sham구에 비해 유의적으로 높았으므로 Sea-Nine 211에 의해 유도된 것이라 여겨진다. 이것은 북방대합에도 CYP1A2가 존재할 수 있음을 보여준다.

사 사

본 연구는 해양수산부의 『내분비계장애물질의 해양생태 영향 연구』 프로그램과 산업자원부에서 시행하는 지역혁신센터 사업으로 강릉대학교 해양바이오RIC (동해안해양생물자원연구센터)의 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

- 이지선, 전영하, 심원준, 전중균. 2008. Tin-free 방오제인 Sea-Nine 211에 노출된 북방대합에서 MFO 효소계의 반응. 환경생물. 26:102-108.
- 전중균, 이미희, 김도진, 심원준, 오재룡, 이수형. 2002. 유기주석화합물이 평주조개 (*Coelomactra antiquata*) 약물대사 효소계에 미치는 영향. 한국수산학회지. 35:185-190.
- 전중균, 이미희, 이지선, 심원준, 이수형, 허형택. 2003. 유기주석화합물이 해산 어류의 간장 MFO 효소계에 미치는 영향. 환경생물. 21:18-25.
- Alzieu C. 1991. Environmental problems caused by TBT in France: Assessment, regulations, prospects. Mar. Environ. Res. 32:7-17.
- 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.
- Callow ME and GL Willingham. 1996. Degradation of antifouling biocides. Biofouling 10:239-249.
- Davies IM, J Drinkwater and JC McKie. 1988. Effects of tributyltin compounds from antifoulants on Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in Scottish sea lochs. Aquaculture 74:319-330.
- Fent K and TD Bucheli. 1994. Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins *in vitro* in freshwater fish. Aquat. Toxicol. 28:107-126.
- Fent K and JJ Stegeman. 1991. Effects of tributyltin chloride *in vitro* on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops*. Aquat. Toxicol. 20:159-168.
- Fent K and JJ Stegeman. 1993a. Effects of tributyltin chloride *in vitro* on hepatic microsomal cytochrome P450 and associated enzyme activities in the marine fish *Stenotomus chrysops*. pp. 210-211. In 7th International Symposium on Responses of Marine Organisms to Pollutants (Stegeman JJ, MN Moore and ME Hahn eds.). Elsevier, Göteborg.
- Fent K and JJ Stegeman. 1993b. Effects of tributyltin *in vivo* on hepatic cytochrome P450 forms in marine fish. Aquat. Toxicol. 24:219-240.
- Jacobson A, LS Mazza, LJ Lawrence, B Lawrence, S Jackson and K Kesterson. 1993. Fate of an antifoulant in an aquatic environment. pp. 127-138. In Pesticides in the Urban Environments, Fate and Significance. (Racke KD and AR Leslie eds.). American Chemical Society, Washington.
- Jacobson A and GL Willingham. 2000. Sea-Nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. The Science of The Total Environ. 258:103-110.
- Kobayashi N. 1991. Marine pollution bioassay by using sea urchin eggs in the Tanabe Bay. Mar. Pollut. Bull. 23:709-713.
- Kobayashi N and H Okamura. 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. Mar. Pollut. Bull. 44:748-751.
- Lemaire P, A Matthews, L Forlin and DR Livingstone. 1994. Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26:191-200.
- Lowry OH, NJ Roseborough, LA Farr and RJ Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Marin MG, V Moschio, F Cima and C Celli. 2000. Embryotoxicity of butyltin compounds to the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Mar. Environ. Res. 50:231-235.
- Morcillo Y and C Porte. 1997. Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the western Mediterranean. Aquat. Toxicol. 38:35-46.
- Morcillo Y, MJ Ronis, M Solé and C Porte. 1998. Effects of tributyltin on the cytochrome P450 monooxygenase system and sex steroid metabolism in the clam *Ruditapes decussata*. Mar. Environ. Res. 46:583-586.
- Pesticides Safety Directorate. 1998. Antifouling Products. The Stationary Office, London.
- Peters LD, C Nasci and DR Livingstone. 1998. Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in digestive gland of *Mytilus* sp. Comp. Biochem. Physiol. 121C:361-369.
- Shade WD, SS Hurt, AH Jacobson and KH Reinert. 1993. Ecological risk assessment of a novel marine antifoulant.

- American Society for Testing and Materials (ASTM) Special Technical Publication (STP) 1216:381-407.
- Solé M. 2000. Effects of tributyltin on the MFO system of the clam *Ruditapes decussata*: a laboratory and field approach. *Comp. Biochem. Physiol.* 125C:93-101.
- WHO (World Health Organization). 1990. International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 116 Tributyltin Compounds, Geneva.
- Willemsen PR, K Overbeke and A Suurmond. 1998. Repetitive testing of TBTO, Sea-Nine 211 and farnesol using *Balanus amphitrite* (Darwin) cypris larvae: Variability in larval sensitivity. *Biofouling* 12:133-147.
- Willingham GL and AH Jacobson. 1993. Efficacy and environmental fate of a new isothiazolone antifoulant. pp. 14.1-14.13. In Proceedings of the 3rd Asia-Pacific Conference of the Paint Research Association, Singapore.
- Willingham GL and AH Jacobson. 1996. Designing an environmentally safe marine antifoulant. pp. 224-233. In Designing Safer Chemicals (DeVito SC and RL Garrett eds.). American Chemical Society, Washington.
- Wootton AN, C Herring, JA Spry, A Wiseman, DR Livingstone and PS Goldfarb. 1995. Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression (CYP1A) in the mussel, *Mytilus edulis* sp. *Mar. Environ. Res.* 39:21-26.

Manuscript Received: May 30, 2008

Revision Accepted: June 23, 2008

Responsible Editor: Myung Chan Gye