

## 마우스에서 Pectenotoxin 2의 급성독성 및 간대사 효소계에 주는 영향

윤미영 · 김영철\*  
서울대학교 약학대학

### Acute Toxicity of Pectenotoxin 2 and Its Effects on Hepatic Metabolizing Enzyme System in Mice

Mi Young Yoon and Young Chul Kim\*

College of Pharmacy, Seoul National University  
San 56-1 Shinrim-Dong, Kwanak-Ku, Seoul 151-742, Korea  
(Received May 27, 1997)  
(Accepted July 30, 1997)

**ABSTRACT** : Acute toxicity of pectenotoxin 2 (PTX2) was examined in mice. Treatment of mice with a toxic dose of PTX2 resulted in clinical signs such as ataxia, cyanosis and an abrupt decrease in body temperature. Histopathological studies revealed that the liver is the major target organ for PTX2. Activities of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and sorbitol dehydrogenase (SDH) were significantly elevated by PTX2 administration. Glucose-6-phosphatase activities were not changed by the treatment. The PTX2 treatment decreased relative liver weight without changing the body weight. The effect of PTX2 on hepatic drug metabolizing enzyme system was determined. An ip dose of PTX2 (200 µg/kg) induced a significant decrease in the hepatic microsomal protein content. Cytochrome P-450 content, cytochrome b<sub>5</sub> content, NADPH cytochrome c reductase, aminopyrine N-demethylase activities, or hepatic glutathione content were not altered by PTX2 treatment.

**Key Words** : Pectenotoxin 2, Hepatotoxicity, Marine sponge, Diarrhetic shellfish poisoning, Drug metabolizing activity

## I. 서 론

Pectenotoxin 2(PTX2)는 polyether lactone 골격을 가진 물질로 DSP(Diarrhetic Shellfish Poisoning)를 유발하는 조개류(*Patinopecten yessoensis*)의 소화기에서 처음 분리되었으며(Yasumoto 등, 1985), 현재까지 7개의 유사체가 발견되었다(Jung 등, 1995). 이 toxin은 조개에서 직접 생성되는 것이 아니고 *Dinophysis fortii*와 *D. acuminata*가 생성하여 조개로 전파한다고 알려져 있다(Lee 등, 1989). 7개의 유사체중 PTX2 만이 *Dinophysis fortii*에서 발견되므로 나머지는 조개의 hepatopancreas 에서의 산화반응에 의한 대사체라고 생각되고 있다. 최근 우리나라 근해에서 채집된 두 종류의 해면의 연합체 (*Poecillastra* sp.와 *Jaspis* sp.)으로부터 PTX2가 분리되었다(Jung 등, 1995). 이 물질을 대상으

로 미국 국립암연구소에서 실시된 *in vitro* 실험결과 PTX2는 human lung (A-549), colon (HT-29), breast (MCF-7)의 cancer cell lines에 탁월한 cytotoxicity를 나타내어 이 물질에 대한 활발한 연구의 필요성이 제기되고 있다.

PTX2는 true DSP toxins과는 달리 diarrhea를 유발하지는 않으나 다른 DSP toxin과 독성발현을 비교하기 위하여 행해진 조직병리학적인 연구를 통하여 PTX2의 표적장기는 간으로 추정되었다(Terao 등, 1993). 이때 PTX2를 각각 경구와 복강으로 투여시 복강 투여의 경우에만 간병변을 관찰하였다.

본 실험실에서는 PTX2를 마우스에게 일회투여시의 급성독성을 측정하고 이 물질의 약리작용 또는 독성작용의 생체내 기전을 확인하고자 표적장기에서의 독성 발현에 대하여 연구실험하였다. 급성독성의 지표로 LD<sub>50</sub> 치, 병리조직학적 검사, 임상증상을 관찰하고, PTX2의 cytotoxicity 의 기전을 밝히는 연구실험의 첫

\*To whom correspondence should be addressed.

단계로서 표적장기로 확인된 간에서의 독성과 간대사 효소계에 주는 변화를 측정하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

전 실험에 걸쳐 서울대학교 실험동물 사육장에서 공급받은 5주령의 ICR 웅성 마우스를 2주 동안 본 대학의 사육실에서 적응시킨 후 사용하였다. 사육실은 온도  $22 \pm 5^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$ 의 환경을 유지하였으며 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 고형사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

### 2. 시약

PTX2는 우리나라 거문도 근해에서 채집된 해면체로부터 분리정제된 순품을 사용하였다. 실험에 사용된 시약은 NADH, NADPH, 4-dimethylaminoantipyrine, cytochrome c, glutathione reductase, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), glutathione, glucose 6-phosphate (이상 Sigma 시약) 등이며 이 이외의 시약 및 용매류는 모두 reagent grade 또는 그 이상이었다.

### 3. PTX2 투여

PTX2를 1% tween-60 용액에 현탁하여 0.1 ml/stock 용액으로 만든 후 각 용량으로 희석하여 복강투여하였다. 투여액량은 체중 1 kg 당 10 ml이 되도록 하였다. 대조군에는 1% tween-60 용액을 같은 부피로 투여하였다.

### 4. PTX2의 급성독성

PTX2를 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 용량으로 각군당 10마리의 동물에 복강투여하고 11일 동안 사망률 및 중독증상을 관찰하였다.

병리조직검사에서 PTX2를 1000, 400, 200, 또는 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  으로 투여하고 각각 1시간, 2시간, 4시간, 24시간 후에 부검을 실시하여 전 동물의 뇌, 폐장, 심장, 간장, 신장, 정소, 소장, 대장, 위장을 육안적으로 관찰한 후 각 조직을 포르말린으로 고정하고 파라핀에 포매하였다. 박절된 조직은 Hematoxylin & Eosin 염색 후 검경하였다.

PTX2 투여직전에 실험동물의 체중을 측정하였고 투여 후 11일이 경과하였을 때 생존 동물의 체중을 측정하였다. 체중의 변화는 투여일의 평균체중에 대한 11일 경과 후의 평균체중변화의 %로 나타내었다.

### 5. 간독성의 측정

Alanine aminotransferase(ALT)와 Aspartate aminotransferase(AST)의 활성은 Reitman과 Frankel의 방법(1957)을 이용하여 측정하였다. Sorbitol dehydrogenase (SDH) 활성은 Gerlach의 방법(1965)에 의하여 측정하였다. Glucose-6-phosphatase 활성은 Traiger와 Plaa의 방법(1971)을 수정하여 측정하였다.

### 6. 간대사활성의 측정

Omura와 Sato(1964)의 방법에 의거하여 Cytochrome P-450 및 Cytochrome b<sub>5</sub> 함량을 측정하였다. NADPH cytochrome P-450 reductase는 artificial electron acceptor인 cytochrome c를 이용하여 NADPH cytochrome c reductase 활성으로서 측정하였다(Guengerich, 1994).

Aminopyrine N-demethylase 활성은 반응 생성물인 formaldehyde를 Nash의 방법에 따라 측정하여 구하였다(Fowler 등, 1994). Microsomes 단백질량은 Lowry 등(1951)의 방법을 이용하여 측정하였다.

간조직내의 glutathione 총량은 enzymatic recycling method를 이용하여 측정하였다(Akerboom and Sies, 1981; Griffith, 1980).

### 7. 통계처리

실험결과는 각 군의 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며 two tailed Student's *t*-test로 유의성을 검정하였다. PTX2의 LD<sub>50</sub>값은 Litchfield와 Wilcoxon의 방법(Tallarida and Rodney, 1987)을 이용하여 산출하였다.

## III. 결과 및 고찰

PTX2의 투여에 의해 사망한 동물의 수는 용량의존적으로 증가하였으며 동물의 사망은 모두 PTX2 투여 후 24시간 이내에 발생하였다(Table 1). PTX2의 복강투여시의 LD<sub>50</sub>는 411  $\mu\text{g}/\text{kg}$  으로 산출되었다. PTX2의 투여후 중독증상으로는 운동실조증과 현격한 체온저하 및 청색증이 관찰되었다. 다만 그 증상의 발현 시기와 정도는 용량이 높을수록 빠르고 현격하였다. PTX

**Table 1.** Mortality and mean body weight changes in mice treated with an intraperitoneal dose of PTX2.

Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Mortality	Increase in Mean Body Weight (%)
0	0/10	10
100	0/10	10
200	0/10	11
300	0/10	-
400	5/10	16
500	7/10	21
600	8/10	20
700	9/10	10
1000	10/10	-

Each group consisted of 10 mice. Body weight increases were determined 11 days following the PTX2 treatment in surviving animals. The  $\text{LD}_{50}$  was calculated to be  $411 \mu\text{g}/\text{kg}$  using the method of Litchfield & Wilcoxon (Tallarida and Rodney, 1987).

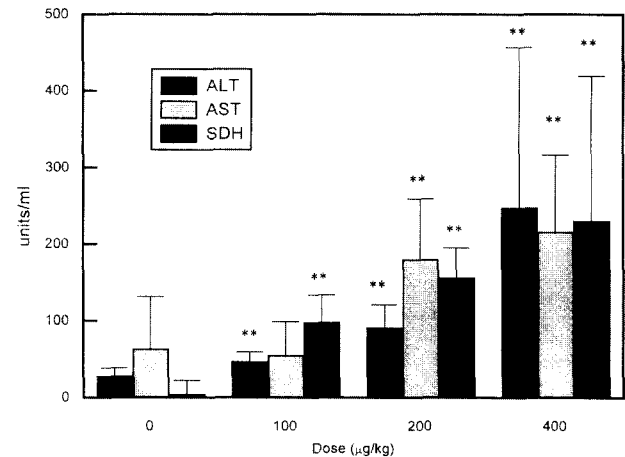
2의 투여 당일이 경과한 후에는 11일간의 관찰기간이 종료될 때까지 전 용량군에서 특이한 증상은 보이지 않았다. 또 관찰기간 중의 체중변화량에도 큰 차이가 없는 것으로 관찰되었다.

PTX2를 1000, 400, 200, 또는  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 복강투여하고 각각 1, 2, 4, 24시간 후에 동물을 도살하여 전 조직에 대한 병리조직학적 병변을 측정하였다. 동물을 부검시에 육안으로 간의 울혈이 관찰되었으며 복강 및 흉강에 fluid가 증가되어 있었다. 마우스의 전 주요장기를 광학 현미경으로 검사한 결과 간에서만 유의적인 변화가 관찰되었다(Fig. 1). PTX2를  $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 투여한 고용량군에서 간조직내의 granularity의 증가가 관찰되었으며 이는 체온저하에 따른 glycogen 분해 감소와 연관된 현상으로 추정되나, 보다 확실한 것은 추후 실험되어야 할 것이다.

PTX2 투여후 24 시간 경과시에 측정된 혈청중의 ALT, AST, SDH 활성은 용량의존적으로 증가하여



**Fig. 1.** Granularity increases in zone I, II in liver of a mouse treated with PTX2 ( $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ , ip).



**Fig. 2.** Effect of PTX2 on serum enzyme activities in mice. Each value represents the mean  $\pm$  SD for 10 mice except for the group of the animals treated with  $400 \mu\text{g}/\text{kg}$  of PTX2 (3 to 6 mice). \*\*Significantly different from the control group ( $p < 0.01$ , Student's *t*-test).

(Fig. 2) 이 물질의 생체내 표적기관은 간임을 시사한 조직검사와 일치하는 결과를 나타내었다.

PTX2의 cytotoxicity 및 생리활성 기전을 밝히기 위한 첫단계로서 이 물질의 표적기관인 간에서의 대사효소계에 주는 영향에 대하여 실험하였다(Table 2). 조직병리학적 실험결과와 간독성 실험결과를 고려하여 현저한 생리활성 및 간독성을 유발하면서 사망은 유발하지 않는 용량을  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 판단하여 사용하였다. PTX2 투여후 24 시간 경과시 체중의 변화는 관찰되지 않았으나 단위체중당 간의 무게가 감소함을 관찰하였다. 이때 간 microsomes 단백질의 양 또한 대조군에 비해 유의성있게 감소하였다. Cytochrome P-450 함량이나 간대사활성정도를 반영하는 aminopyrine N-demethylase 활성을 측정시 대조군과 PTX2 투여군 사이에 유의적인 차이를 관찰하지 못하였다. Cytochrome P-450 효소계 대사반응에서 전자의 전달에 관여하는 cytochrome b나 NADPH-cytochrome c reductase 활성도 유의적인 차이가 없었다. 다만 간 microsomes 단백질 함량이 감소하였음을 고려하면 단위 간 무게당 aminopyrine N-demethylase 활성은 감소한 것으로 보이며 PTX2 투여에 의해 상대간무게가 유의적으로 감소한 결과와 종합하면 PTX2는 한 개체내에서 전체적인 간대사활성 정도는 현저하게 저하시킬 수 있음을 시사한다.

한편 PTX2 투여후 24시간 경과시 여러가지 electrophilic toxicants에 대한 무독화반응의 필수요소이며 대표적인 세포내 항산화제 역할을 하는 간의 glutathione 함량은 대조군과 비교하여 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 또한 간 glucose-6-phosphatase 활성도 유의적으로 감소되지 않았다. 따라서 지질과산화에 의

**Table 2.** Effect PTX2 on some hepatic parameters in mice.

Parameters	Control	PTX2(200 µg/kg, ip)
Relative Liver Weight (%)	6.5 ± 0.4	6.1 ± 0.5*
Microsomal protein (mg/g liver)	10.06 ± 0.69	7.97 ± 0.85**
Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	0.96 ± 0.21	0.92 ± 0.10
Cytochrome b <sub>5</sub> (nmol/mg protein)	0.52 ± 0.07	0.46 ± 0.03
NADPH-Cytochrome c Reductase (nmol cytochrome c reduced/min/mg protein)	400.8 ± 22.3	422.2 ± 35.2
Aminopyrine N-Demethylase (nmol HCHO formed/min/mg protein)	11.46 ± 1.89	9.93 ± 2.91
Total Glutathione (µmol/g liver)	7.21 ± 1.31	7.31 ± 1.49
Glucose-6-Phosphatase (µmol PO <sub>4</sub> /g liver/min)	12.77 ± 0.83	12.42 ± 1.09

Each value represents the mean ± SD for 5 to 12 mice except for the microsomal enzyme system parameters which are the mean ± SD for 6 pooled samples each made of livers from 2 mice. An asterisk indicates a significant difference from the control group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Student's *t*-test).

한 endoplasmic reticulum 의 손상이 PTX2의 독성유발에 큰 역할을 하지 않는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 우리나라 근해에서 채집된 해면체의 유독성분 PTX2의 급성독성을 측정하고 중요한 표적기관이 간임을 확인하였다. PTX2에 의한 간독성 및 cytotoxicity의 발현기전은 앞으로 더 연구가 필요하나 본 연구에서 관찰된 간대사활성의 저하현상과 부분적으로 유관한 것으로 추정된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 연구비에 의해 지원되었습니다. 저자들은 조직검체를 검경해 주신 서울대학교 수의과대학 박재학 교수께 감사드립니다.

### 참고문헌

Akerboom, T.P.M and Sies, H. (1981): Assay of glutathione and glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples in *Methods in Enzymology* (Packer, L. and Fleischer, S. Eds.), (Academic Press, N.Y.), vol. **77**, p. 373-382.

Fowler, B.A., Kleinow, K.M., Squibb, K.S., Lucier, G.W. and Hayes, A.W. (1994): Organelles as tools in Toxicology in *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes, A.W. Ed.), (Raven Press, New York), p. 1217.

Gerlach, U.E. (1965): Sorbitol Dehydrogenase in *Methods in Enzymatic Analysis* (H.U. Bergmeyer Ed.), (A.E. Harper, New York), p. 761-764.

Griffith, O.W. (1980): Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl pyridine, *Anal. Biochem.*, **106**, 207-212.

Guengerich, F.P. (1994): Analysis and Characterization of Enzymes in *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes, A.W. Ed.), (Raven Press, New York), p. 1269.

Jung, J.H., Sim, C.J., Lee, C.O. (1995): Cytotoxic compounds from a two-sponge association, *J. Nat. Prod.*, **58**, 1722-1726.

Lee, J.S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P. and Yasumoto, T. (1989): Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species, *J. Appl. Phycol.*, **1**, 147-152.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.G., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with Folin-phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

Omura, T. and Sato, R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.

Reitman, S. and Frankel, S.K. (1957): A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase, *Amer. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56-63.

Tallarida, R.J. and Rodney, B.M. (1987): Manual of Pharmacological Calculations with Computer Programs, (Springer-Verlag, New York), p. 153.

Terao, K., Ito, E., Ohkusu, M. and Yasumoto, T. (1993): A comparative study of the effects of DSP-toxins on mice and rats in *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea* (T.J. Smayda and Y. Shimizu, Eds), (Elsevier), p. 581-586.

Traiger, G.J.L. and Plaa, G.L. (1971): Differences in the potentiation of carbon tetrachloride in rats by ethanol and isopropanol pretreatment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **20**, 105-112.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K. and Clardy, J. (1985): Diarrhetic shellfish toxins, *Tetrahedron*, **41**, 1019-1025.