

Cytochrome P450 유도제에 노출시킨 명주조개 (*Coelomactra antiquata*) 약물대사효소계의 *in vitro* 반응

전중균⁺ · 이미희 · 심원준* · 이수형*

강릉대학교 해양생명공학부/동해안해양생물자원연구센터(EMBRC)

*한국해양연구원 해양환경기후연구본부

In vitro Response of the MFO System of the Clam, *Coelomactra antiquata* with Exposure to Cytochrome P450 Inducers

Joong-Kyun JEON⁺, Mee-Hee LEE, Won-Joon SHIM* and Soo-Hyung LEE*

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

*KORDI, Ansan, Gyeonggi-do 425-170, Korea

Induction of cytochrome P450 (CYP) and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in the microsome exposed to 3-methylcholanthrene (MC), β -naphthoflavone (BNF) and phenobarbital-Na (PB) was investigated. Microsome was isolated from digestive gland of clam (*Coelomactra antiquata*) and then exposed to each chemical in concentration range of 0.1 to 1.0 mM for 7 hours. The CYP content and EROD activity in the microsome exposed to each chemical significantly increased compared to the control group. The overall CYP and EROD induction potency was in order of MC>BNF>PB. The induction response of EROD was two times higher than that of CYP level in the microsome exposed to MC, but the induction response of EROD was slightly higher than that of CYP level in BNF and PB exposure groups.

Key words: Phenobarbital, 3-methylcholanthrene, Beta-naphthoflavone, MFO, Cytochrome P450, EROD, Clam, *Coelomactra antiquata*

서 론

생체의 해독효소 (detoxifying enzyme)라고도 하는 약물대사효소계 (drug-metabolizing enzymes)는 본래 스테로이드나 지방산, 담즙산 등과 같은 생체내 물질의 합성 반응을 촉매하거나 생체에 들어온 약물이나 외인성 오염물질 (xenobiotics)을 대사하여 신속히 배설시키는 역할의 효소계이다. 이렇듯 약물대사는 체내의 여러 조직에서 일어나지만 해양생물에서는 간장이나 중장선의 역할이 매우 중요하다. 외인성 오염물질로 간장이 손상을 입으면 간장에 분포하는 해독효소도 교란될 위험성이 크므로 어떤 오염물질 때문에 해독시스템이 불활성화 되어 다른 물질을 해독하는 능력이 떨어지게 되면 오염물질에 의한 영향은 더욱 커질 것이다 (Kime, 1998).

약물대사효소계 중에서 가장 잘 알려진 것이 mixed function oxygenase (MFO)이며, 이 효소계는 여러 효소의 복합체이고 체내에서는 주로 지방산이나 호르몬과 같은 내인성 화합물을 대사하는 중요한 역할을 하며, 또한 다방향족 탄화수소화합물 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)이나 다염소비페닐류 (polychlorinated biphenyls, PCBs)와 같은 외인성 오염물질을 대사하여 빨리 배설되도록 한다. 이들 효소계에서 가장 대표적인 것이 cytochrome P450 (CYP)이며, 포유류나 척추동물은 물론이고 하등동물에서도 그 존재가 확인되었고 (den Besten, 1998; Lee, 1998), 패

류에서는 효소학적으로나 면역학적 및 분자생물학적인 연구를 통해 적어도 21개 이상이 확인되었다 (Livingstone, 1991).

한편, 체내의 CYP는 여러 가지 요인에 의해 유도되기도 하고 또는 저해되기도 하는데, 이들 요인 중에서 가장 효과가 큰 것이 약물이다. 경우에 따라서는 오염물질때문에 CYP가 저해되어 대사능력이 감소되어 나타나는 유해효과도 CYP 유도제 (inducer)의 처리로 이를 극복할 수가 있을 것이며, 또는 이와 반대의 경우도 생각할 수 있을 것이다. 실제로 rat에서는 유기주석화합물에 의해 CYP가 저해되며 당뇨증세 등이 발생하였는데 CYP 유도제를 병용 또는 사전에 처리함으로써 병적 증세를 호전시켰다는 보고 (Ohhira et al., 1999)도 있다.

따라서 본 연구에서는 CYP 유도제로 알려진 여러 약물 중에서 포유동물의 CYP 2B, 2C 및 3A를 유도하는 강력한 약물로 알려진 phenobarbital (PB), 그리고 CYP 1A와 2A를 유발시킨다고 알려진 β -naphthoflavone (BNF) 및 3-methylcholanthrene (MC) (Harada and Omura, 1981)를 패류인 명주조개 (*Coelomactra antiquata*)의 중장선 미크로솜과 *in vitro*로 반응시켜 미크로솜 약물대사 효소계의 이들 유도제에 대한 반응 및 유도제 간의 유도효과를 비교하여 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1) 시 약

CYP 유도제로는 MC (3-methylcholanthrene, 98%, Aldrich),

⁺Corresponding author: jkjeon@kangnung.ac.kr

BNF (β -naphthoflavone, 90~95%, Sigma), PB (phenobarbital-Na, Sigma)를 사용하였다. 그리고 MC와 BNF를 용해하고 희석하는데는 DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma)를, PB를 녹이는데는 생리식염수를 각각 사용하였다. 이 밖에 마이크로솜 제조와 효소 측정에 사용한 시약은 모두 Sigma사의 특급시약 (AR)을 사용하였다.

2) 대상 패류와 마이크로솜 제조

실험에 사용한 명주조개 (*C. antiquata*)는 강릉시 주문진읍 패류시장에서 2001년 8월에 구입하였으며, 살아있는 것을 연구실로 옮겨 여과해수가 담긴 수조에서 충분히 통기하면서 1일간 안정화시켰다. 그리고는 명주조개의 내장낭 부위를 적출한 다음 불필요한 조직을 가위로 충분히 떼어내고 중장선 (digestive gland) 조직의 일부를 사용하여 마이크로솜을 만들었다. 즉, 중장선을 모아 인산완충액 (0.1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -20% glycerol, pH 7.4)으로 균질화 한 다음에 원심분리 (8,000×g, 20 minutes, 4°C)를 하고 상등액을 모아 초원심분리 (100,000×g, 120 minutes, 4°C)하여 원심관 하부에 가라앉은 pellet을 상기한 인산완충액 (pH 7.4)으로 재현탁하였다. 이렇게 만든 마이크로솜을 합쳐 균일하게 하고는 여러 개의 microtube에 소량씩 분주하여 -150°C의 초저온냉동고에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

3) *In vitro* 배양실험

약물배양구와 비교하기 위하여 마이크로솜에 DMSO 또는 생리식염수를 첨가한 sham구를 설정하였으며, 약물배양구는 마이크로솜에 MC, BNF 또는 PB를 각각 0.1~1.0 mM의 농도가 되도록 첨가하여 30°C의 수조에서 1~7시간을 배양하면서 '4) 약물대사효소의 측정'에 기술된 방법에 따라 CYP 함량과 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 활성을 측정하였으며, 각 실험별로 3반복 실시하였다.

4) 약물대사효소의 측정

CYP 농도의 측정은 Omura and Sato (1964)의 방법을 따랐으며, EROD 활성의 측정은 Burke and Mayer (1974)의 방법을 따랐다. 즉, CYP 농도는 마이크로솜에 환원제로 sodium dithionite를 소량 첨가한 다음에 CO 가스를 약 30초간 통기하고 나서 UV/VIS 분광광도계 (Shimadzu 1601-PC, Japan)를 사용하여 450과 490 nm의 차이스펙트럼 (difference spectrum)을 측정하였으며, 분자흡광계수는 $91 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 으로 정량하였다. 한편, EROD 활성의 측정은 마이크로솜에 NADPH 재생계 용액 (0.1 M 인산염완충액/glucose-6-인산염/glucose-6-인산염 탈수소효소/NADP⁺)을 첨가한 다음에 기질인 7-ethoxyresorufin을 넣고 일정시간 반응시켜 생성되는 resorufin의 농도를 형광분광계 (Shimadzu RF-5301PC, Japan)로 측정 (Ex. 550 nm, Em. 585 nm)하여 정량하였다. 그리고 마이크로솜의 단백질 농도는 Lowry et al. (1951)의 방법으로 정량하였다.

결 과

명주조개 (*C. antiquata*)의 중장선 마이크로솜에 CYP 유도제로 알려진 BNF, PB 및 MC를 각각 0.1 mM~1.0 mM의 농도로 첨가하여 30°C에서 0~7시간을 배양하고 CYP 함량의 변화를 조사한 결과는 Figs. 1~3과 같다. 이때 비교를 위한 sham구로는 마이크로솜에 2% 농도의 DMSO (MC, BNF 배양구의 경우)나 생리식염수 (PB 배양구의 경우)만을 첨가하여 배양하였고, 모든 배양구는 유도제나 용매를 첨가하기 전의 CYP 농도를 100%로 하고 유도제로 배양한 후의 CYP 함량을 상대비로 나타내었다.

두 sham구의 CYP 함량은 처음에 $0.54 \text{ nmol mg}^{-1}$ 단백질의 수준이었으나 배양시간이 지나면서 줄어들어 6시간 후에는 $0.49 \text{ nmol mg}^{-1}$ 단백질로서 처음 수준의 91%로 되었다. 한편, BNF와 배양할 경우 (Fig. 1), 0.1 mM의 농도로 배양하면 처음에는 배양시간과 더불어 CYP 함량은 점차 증가하여 4시간 후에는 최고 116%까지 증가하였지만 6시간 후에는 줄어들어 108% 수준이 되었다. 그리고 0.4 mM로 배양한 경우에는 초기부터 급증하여 배양 4시간 후에 최고로 되어 126%나 되었으며 이후 6시간째에는 다소 감소하였으며, 1.0 mM 배양구는 초기에 급증하였으며 4시간 후에는 최고 132%로 증가하였다가 다시 줄어드는 경향을 보였다. 이처럼 모든 BNF 농도구의 CYP 함량은 sham구에 비해 높았으므로 본 약물은

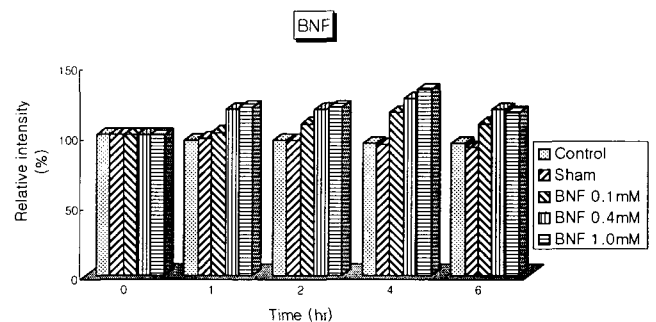


Fig. 1. Time-course *in vitro* changes of cytochrome P450 content of the digestive gland microsomes in the clam, *Coelomactra antiquata*, with exposure to BNF. Data expressed as percentage of 0 min incubation.

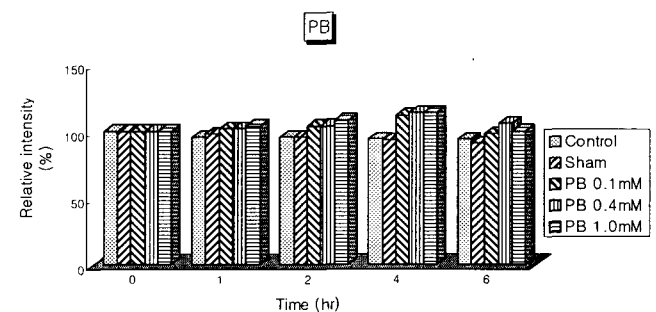


Fig. 2. Time-course *in vitro* changes of cytochrome P450 content of the digestive gland microsomes in the clam, *Coelomactra antiquata*, with exposure to PB. Data expressed as percentage of 0 min incubation.

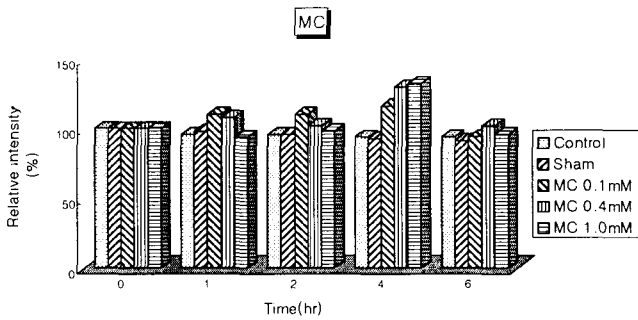


Fig. 3. Time-course *in vitro* changes of cytochrome P450 content of the digestive gland microsome in the clam, *Coelomactra antiquata*, with exposure to MC. Data expressed as percentage of 0 min incubation.

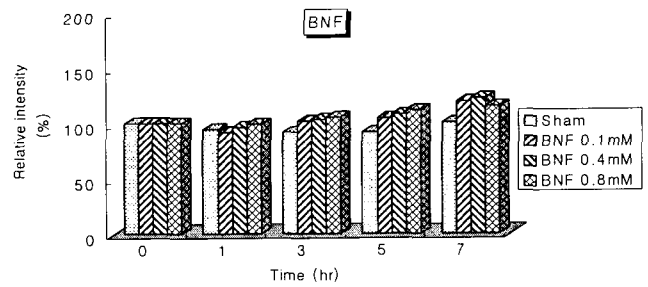


Fig. 4. Time-course *in vitro* changes of EROD activity of the digestive gland microsome in the clam, *Coelomactra antiquata*, with exposure to BNF. Data expressed as percentage of 0 min incubation.

패류 마이크로솜의 CYP 함량을 증가시키는 유도제로 작용한다는 것을 확인할 수 있었다.

PB와 배양할 경우 (Fig. 2), 0.1 mM의 농도에서는 처음 4시간까지는 계속 증가하여 최고 112%까지 되었으나 이후에는 감소하여 6시간 후에는 처음의 수준인 98%로 낮아졌다. 그리고 0.4 mM의 농도에서는 배양 4시간 후에 최고인 114%나 되었다가 6시간째에는 다소 감소하여 106% 수준이었고, 1.0 mM의 농도에서는 0.4 mM의 경우와 비슷한 수준으로 증가하여 4시간 후에 114%까지 증가하였다가 이후 줄어들어 6시간 후에는 낮아져서 처음 수준이 되었다. 이처럼 PB와 배양한 경우에도 CYP 함량은 배양 4시간까지는 증가하다가 이후에는 감소하는 경향을 보였고, 각 배양구의 CYP 함량이 sham구 보다 높았기에 이 약물도 CYP 유도제로 작용하였음을 확인할 수 있었다.

그리고 MC와 배양할 경우 (Fig. 3), 0.1 mM 농도구는 배양 4시간 후에 116%까지 증가하였으며, 0.4 mM에서는 130%, 1.0 mM에서는 132%까지 CYP 함량이 증가하였다가 이후에는 감소하여 처음 수준으로 회복되었다.

이처럼 BNF나 PB, MC는 모두 노출 4시간째에 마이크로솜의 CYP 함량이 최고 수준으로 되었다가 이후 감소하였다. 이들 유도제 중에서 특히 PB는 MC와 BNF에 비해 CYP 유도 효과가 강하지 않아 유도 효과는 MC>BNF>PB의 순이었으며, 대체로 노출 농도가 높을수록 유도 효과 또한 컸다.

한편, EROD 활성의 변화를 살펴본 결과는 Figs. 4~6과 같다. Sham구의 EROD 활성은 처음에 34.5 nmol min⁻¹ mg⁻¹ 단백질의 수준이던 것이 배양시간이 지나면서 약간의 변화는 있었지만 7시간 경과 후에도 처음 수준 (100.8%)을 유지하였다. BNF과 배양할 경우 (Fig. 4), 0.1 mM의 농도에서 7시간 후에는 처음의 120%나 되었고, 0.4 mM 농도구도 증가경향은 0.1 mM 배양구와 비슷하여 7시간 후에는 123%로 증가하였으며, 0.8 mM 농도구는 7시간 후에 115%가 되었다.

PB와 배양하였을 경우 (Fig. 5), 0.1 mM 농도구에서는 배양하지 3시간째에 최고치인 111%까지 증가하였다가 이후에는 감소하였고, 1.0 mM 농도구에서도 3시간째에 136%까지 활성이 증가하였다가 이후에 감소하여 7시간 후에는 처음 수준으로 회복하였다.

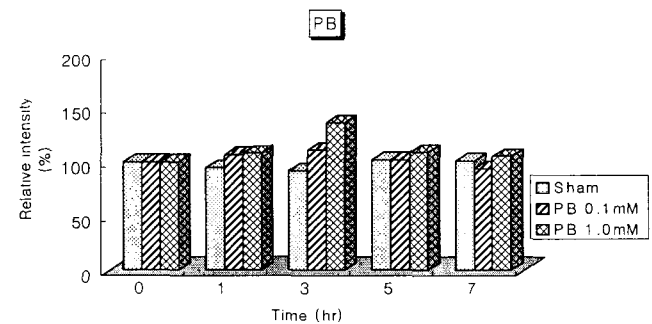


Fig. 5. Time-course *in vitro* changes of EROD activity of the digestive gland microsome in the clam, *Coelomactra antiquata*, with exposure to PB. Data expressed as percentage of 0 min incubation.

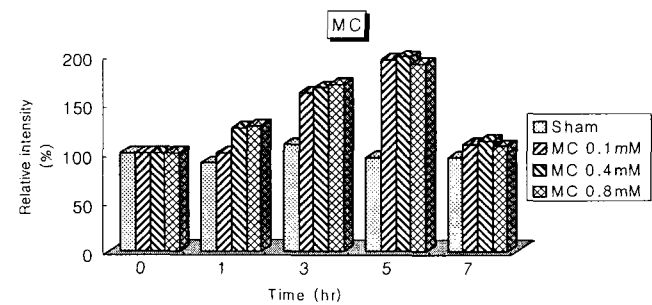


Fig. 6. Time-course *in vitro* changes of EROD activity of the digestive gland microsome in the clam, *Coelomactra antiquata*, with exposure to MC. Data expressed as percentage of 0 min incubation.

그리고 MC와 배양하였을 경우 (Fig. 6), 0.1 mM 농도구는 배양 시간이 늘어나면서 5시간까지는 계속 증가하여 195%까지 증가하였다가 이후에 감소하는 경향을 보였고, 이와 같은 경향은 0.4 mM 농도구도 마찬가지로 5시간 후에 최고 198%까지 증가하였다가 감소하였으며, 0.8 mM에서는 노출 5시간째에 191%까지 증가하였으나 이후에 감소하였다.

이처럼 BNF나 PB, MC와 배양하였을 경우에 마이크로솜의 EROD 활성은 sham구와 비교하여 높았기 때문에 이들 약물은

패류 마이크로솜의 EROD 활성도 유도한다는 것을 확인할 수 있었다. 특히 MC에 의한 EROD 활성의 유도효과는 BNF나 PB에 비해 강하였고, 효과를 비교하면 MC>BNF>PB의 순이었으며 대체로 약물의 농도가 높을수록 유도 효과도 큰 경향을 보였다.

고 찰

동물 간장의 약물대사 효소계를 유도시키는 약물에 관해서는 여러 실험동물을 대상으로 많이 연구되었으며, 1960년대 중반에는 CYP와 그 공역 플라빈단백질 효소인 NADPH-cytochrome P450 환원효소가 PB에 의해 크게 유도된다는 사실이 확인되었다 (Waxman and Azaroff, 1992). 하지만 유도제가 모두 약물대사를 한결같이 증가시키는 것은 아니고 유도제에 따라 어느 약물의 약물대사는 현저하게 촉진시키는 반면에 다른 약물대사에는 거의 영향을 미치지 않거나 오히려 감소시키는 경우도 있어 유도제에 대한 약물대사 반응에는 기질특이성이 있다 (Gibson and Skett, 1994).

이처럼 마이크로솜 CYP의 약물대사가 기질특이성이 큰 것은 한 가지 이상의 CYP 이소자임 (분자종)이 존재하기 때문인데, 실제로 어류 (Buhler et al., 1997; Cao et al., 2000)나 패류 (Wootton et al., 1995; Peters et al., 1998)에서도 여러 이소자임이 존재한다는 것이 최근에 이루어진 여러 연구를 통해 확인되었다. 한편, 생체내 CYP는 약물과 외인성 오염물질 (xenobiotics)을 대사할 뿐만 아니라, 스테로이드나 프로스타그란딘, 지방산, 비타민 D₃와 같은 내인성 물질의 산화도 활발하게 수행하므로 약물이나 환경 유래의 유도물질로 인해 내재성 물질대사에 관여하는 CYP 이소자임에 변화가 생긴다면 CYP가 관여하는 내인성물질의 대사에도 영향을 미칠 것이기에 약물대사 효소계의 유도는 독성학 뿐 아니라 번식 생리적인 면에서도 특히 중요하다.

본 실험에서는 명주조개 (*C. antiquata*)가 BNF, PB 및 MC와 같은 CYP 유도제에 의해 어떻게 반응하는지를 CYP와 EROD 활성을 지표로 삼아 *in vitro*에서 조사하였다. 그 결과, BNF와 PB, MC는 모두 마이크로솜의 CYP 함량과 EROD 활성을 유도하였다. CYP 함량과 EROD 활성을 기준으로 유도제의 효과를 비교해 보면 MC가 가장 강하였고 BNF, PB의 순이었다.

이처럼 MC와 BNF 처리가 CYP1A1과 EROD 활성을 유도시킨다는 것은 어류에서는 *in vivo* (Lemaire et al., 1996) 및 *in vitro* (Scholz and Segner, 1999)로 확인되었으며, 패류에서는 *in vivo*로 관찰되었다 (Michel et al., 1993). 더욱이 유도제의 종류에 따라 유도효과에 차이가 있으며, MC나 BNF가 PB에 비해 CYP 유도 효과가 뛰어나다는 것은 돔류 (*Dicentrarchus labrax*) (Jaksic et al., 1998), 틸라피아와 잉어 (Ueng et al., 1992), 무지개송어 (Ericsson et al., 1992), killifish (*Fundulus heteroclitus*) (Elskus and Stegeman, 1989) 등의 어류에서는 확인되었다. 즉, MC나 BNF에 노출시키면 간장 마이크로솜의 CYP1A 단백질 함량과 EROD 활성 또는 UDP-glucuronosyltransferase (UDPGT) 활성이 유도되었으나 PB에 노출되면 이런 유도 현상은 일어나지 않는 것이 보고되었다. 그리고 포유동물에서는 PB의 CYP 유도효과가 MC나 BNF에 비해 크다고 알려져 있으나 (Gibson and Skett, 1994), 앞서

여러 연구자들의 언급한 어류의 경우는 물론이고 본 실험의 명주조개에서도 MC가 PB보다 높은 유도효과를 보이는 것은 포유동물과 어패류간에서 이들 유도제로 유도되는 CYP 이소자임이 차이가 있음을 시사하는 것으로 여겨진다. Rat에서는 PB와 MC로 유도되는 CYP 분자종이 각각 CYP2B1과 CYP1A1이지만 (Waxman and Azaroff, 1992), 어패류에서는 어느 CYP 이소자임이 유도되는지가 분명하지 않다. Jaksic et al. (1998)은 *D. labrax*를 BNF로 처리하면 간장 마이크로솜의 CYP1A 단백질 함량이 증가하고 EROD 활성도 유도되었으나 PB에 노출시킨 것은 EROD 활성이 유도되지 않았다고 보고 하였으며, Sadar et al. (1996)은 무지개송어의 간장배양세포에 PB를 노출시켰더니 CYP1A1의 유전자 발현이 강하게 유도되었지만 CYP2B와 관련된 7-penthoxyresorufin deethylase (PROD) 활성은 유도되지 않음을 보고하였는데 이것은 CYP2B의 분포가 매우 적음을 시사하는 것으로 여겨진다. 실제로 본 실험에서도 유도제와 배양하기 이전의 명주조개 마이크로솜의 EROD 활성은 $34.5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 단백질 수준이었으나 PROD 활성은 이보다 훨씬 낮았던 점도 이런 추측을 뒷받침한다 (미발표자료). 이와 관련하여 혼합의 CYP 이소자임을 웨스턴블롯 (western blot)과 노던블롯 (northern blot)으로 조사한 결과 CYP1A, 2B, 2E, 3A, 4A 등이 확인되었는데 (Peters et al., 1998; Wootton et al., 1995), 명주조개에도 이소자임의 분포가 비슷하다고 가정하더라도 각 이소자임의 분포 수준에는 차이가 있을 것으로 사료된다.

한편, CYP 유도제에 의해 CYP 함량과 EROD 활성이 유도되는 데는 비교적 시간이 걸려 1시간 이내에서는 별다른 변화를 보이지 않았으며 (미발표자료), 1시간 이후부터 비로소 증가하였다. PB에 의한 유도는 우선 간장에서 CYP2B에 대응하는 리보솜 mRNA의 농도가 증가하고 이에 대응한 cDNA가 합성되어 2~3 시간이 지나면서 CYP2B1의 mRNA가 증가하여 나타나며, PAHs의 일종인 MC와 BNF에 의한 유도는 세포질의 aryl hydrocarbon receptor (AhR)와 결합한 유도제-수용체의 복합체가 핵으로 이동하여 그곳에서 유도에 특이적인 mRNA가 DNA로부터 전사되어 이루어지므로 (Waxman and Azaroff, 1992), 반응시간의 지연은 이런 과정을 거치는 시간을 반영한 결과로 사료된다. 그리고 동일한 유도제를 동일한 농도로 하여 배양한 조개 마이크로솜에서 CYP 함량과 EROD 활성의 증가 수준을 비교하면 EROD 활성이 CYP 함량의 증가보다 약간 컸으며, 특히 MC 배양구에서 그 차이가 컸고 약 2배나 되었다. 그렇지만 어류인 무지개송어에게 MC (20 mg kg^{-1}) 주사 시 EROD 활성이 대조구보다 약 24~30배나 증가하였다는 것 (Lemaire et al., 1996)에 비하면 훨씬 작았다. 이처럼 본 실험에서 여러 유도제 배양구에서 증가폭이 크지 않은 것은 배양농도에 의한 차이거나 또는 *in vivo*와 *in vitro*간의 차이에 기인하는 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 정리하면, 패류의 증장선 마이크로솜에 MC, BNF, PB 등의 CYP 유도제를 처리하였더니 마이크로솜의 CYP 함량과 EROD 활성이 세 종류의 약물에서 모두 증가하였기에 이들 유도제는 패류에서도 마찬가지로 유도 작용이 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 유도 정도는 유도제의 종류에 따라 차이를 보여, rat

등의 포유동물에서 유도효과가 큰 것으로 알려진 PB보다는 MC와 BNF가 패류에서는 오히려 강했으며, 효소간의 비교에서는 EROD 활성이 CYP 농도의 변화보다 증가경향이 컸으므로 좋은 생물지표로 활용될 수 있으리라 여겨진다. 그리고 유도제의 유도효과가 포유동물의 경우와 달랐는데, 이것은 이들 약제로 유도되는 CYP 이소자임의 분포나 유도기작이 포유동물과 차이가 있을 수 있음을 시사하는 것이어서 향후 자세한 연구가 필요할 것이다. 또한 본 실험은 *in vitro*에서 유도제의 효과를 조사한 것이므로 이와 같은 결과가 반드시 *in vivo*의 상태에서도 같은지를 조사하는 것도 바람직할 것이며, 현재 관련 연구를 진행 중에 있다.

요 약

강원 북부 연안에 많은 명주조개 (*Coelomactra antiquata*)의 증장선으로 마이크로솜을 만들고, cytochrome P450 (CYP)의 유도제로 알려진 phenobarbital (PB), 3-methylcholanthrene (MC) 및 β -naphthoflavone (BNF)을 DMSO에 녹여 함께 30°C의 수조 상에서 *in vitro*로 배양하면서 약물대사효소계의 CYP 함량과 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 활성의 변화를 경시적으로 조사하였다. 그리고 비교를 위한 sham구는 마이크로솜에 DMSO만을 첨가하여 같은 조건으로 배양하였다.

그 결과, sham구의 CYP 함량은 배양 6시간이 지나서는 처음 수준의 91%로 줄었으며, 0.1 mM과 0.2 mM, 0.4 mM 및 1.0 mM BNF 배양구는 배양 4~6시간 후에 최대값이 되었는데 각각 처음보다 116%, 114%, 126% 및 132%로 되었다. PB와의 배양에서는 0.1 mM과 0.4 mM 및 1.0 mM 배양구는 배양 4~6시간 후에 최대값이 되었고 각각 처음의 112%, 114% 및 114%로 되었으며, MC와의 배양에서도 0.1 mM과 0.4 mM 및 1.0 mM 배양구는 배양 4시간 후에 최대값이 되어 각각 116%, 130% 및 132%로 증가하였다.

그리고 EROD 활성의 변화도 sham구는 배양 7시간 후에도 변화가 거의 없었으나, BNF의 0.1 mM과 0.4 mM 및 0.8 mM 배양구는 배양 7시간 후에 각각 처음의 120%, 123% 및 115%로 되었고, PB의 0.1 mM과 1.0 mM 배양구는 배양 3시간 후에 최대로 되어 각각 121% 및 136%로 증가하였으며, MC와의 배양에서는 0.1 mM과 0.4 mM 및 0.8 mM 배양구는 배양 5시간 후에 최대값이 되어 각각 204%, 198% 및 191%로 증가하였다.

이처럼 BNF나 PB, MC는 명주조개에서도 마이크로솜의 CYP 함량과 EROD 활성을 증가시키는 유도효과를 나타내었으며, 특히 MC에 의한 유도효과가 가장 강했고 BNF, PB의 순이었고, 대체로 약물의 농도가 높을수록 유도 효과도 큰 경향을 보였다.

감사의 글

이 논문은 강릉대학교와 1998년도 한국학술진흥재단 (KRF-2001-001-H00065)의 지원에 의한 것입니다. 연구비를 지원해 주신 기관과 두 분의 심사자께 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- Buhler, J.-L.W., X. Zhao, Y.-H. Yang, C.L. Miranda and D.R. Buhler. 1997. Expression of a constitutive cytochrome P450 (CYP2K1) in livers of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryo and sac fry. *Aquat. Toxicol.*, 37, 237~251.
- Burke, M.D. and R.T. Mayer. 1974. Ethoxyresorufin: Direct fluorometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Disp.*, 2, 583~588.
- Cao, Z., J. Hong, R.E. Peterson and J.M. Aiken. 2000. Characterization of CYP1A1 and CYP1A3 gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 49, 101~109.
- den Besten, P.J. 1998. Cytochrome P450 monooxygenase system in echinoderms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121C, 139~146.
- Elskus, A.A. and J.J. Stegeman. 1989. Further consideration of phenobarbital effects on cytochrome P-450 activity in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 92C, 223~230.
- Erickson, D.A., F.E. Laib and J.J. Lech. 1992. Biotransformation of rotenone by hepatic microsomes following pretreatment of rainbow trout with inducers of cytochrome P450. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 42, 140~150.
- Gibson, G.G. and P. Skett. 1994. *Introduction to Drug Metabolism*. 2nd ed. Blackie Academic & Professional. London, 296pp.
- Harada, N. and T. Omura. 1981. Selective induction of two different molecular species of cytochrome P-450 by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *J. Biochem.*, 89, 237~248.
- Jaksic, Z., N. Bihari, W.E.G. Muller, R.K. 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, D.E. 1998. Disruption of liver function. In *Endocrine Disruption in Fish*, D.E. Kime, ed. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 201~246.
- Lee, R.F. 1998. Annelid cytochrome P450. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121C, 173~179.
- Lemaire, P., L. Forlin and D.R. 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.
- Livingstone, D.R. 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Vol. 7, R. Gilles, ed. Springer-Verlag, Berlin, pp. 45~185.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275.
- Michel, X.R., P. Suteau, L.W. Robertson and J-F. 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.
- Ohira, S., H. Matsui and K. Watanabe. 1999. Effects of pretreatment with cytochrome P450 inducers, especially phenobarbital on triphenyltin metabolism and toxicity in hamsters. *Toxicology*, 137, 151~159.

- Omura, T. and R. Sato. 1964. The carbon-monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370~2378.
- Peters, L.D., C. Nasci and D.R. 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.
- Sadar, M.D., R. Ash, J. Sundqvist, P-E. Olsson and T.B. Andersson. 1996. Phenobarbital induction of CYP1A1 gene expression in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 271, 17635~17643.
- Scholz, S. and H. Segner. 1999. Induction of CYP1A in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells: Concentration-response relationships of four model substances. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 43, 252~260.
- 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.
- Waxman, D.J. and L. Azaroff, 1992. Review: Phenobarbital induction of cytochrome P450 gene expression. *Biochem. J.*, 281, 577~592.
- Wootton, A.N., C. Herring, J.A. Spry, A. Wiseman, D.R. Livingstone and P.S. 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* spp. *Mar. Environ. Res.*, 39, 21~26.

2002년 1월 5일 접수

2002년 3월 25일 수리