

## 랫트에 톨루엔 및 에탄올 전처치가 톨루엔 대사에 미치는 영향

안동과학대학 산업안전위생과\*, 계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

차상은\* · 전태원 · 윤종국+

### — Abstract —

#### Effect of Toluene or Ethanol Pretreatment on Toluene Metabolism in Rats

Sang-Eun Cha\*, Tae-Won Jeon and Chong-Guk Yoon+

*Dept. of Industrial Safety and Hygiene, Andong Science College, Andong, Korea\**  
*Dept. of Public Health, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu, Korea*

A study was performed to evaluate an effect of toluene or ethanol pretreatment on the toluene metabolism.

A slight liver damage in rats was induced by administration of 0.2 ml of toluene or 0.2 ml of 50% ethanol per 100 g of body weight intraperitoneally every other day for four weeks except the last day before sacrifice. One day before sacrifice, toluene was administered to rats pretreated ethanol or toluene and the control. Rats were sacrificed at the 1st, the 2nd, the 3rd and the 4th week after the first administration of xenobiotics mentioned above.

Based on the histopathological findings, liver weight per body weight, serum alanine aminotransferase and hepatic glutathione content, toluene- or ethanol-pretreated groups showed the reversible liver injury. By the treatment of one dose of toluene, the contents of hippuric acid in urine was higher in the group pretreated with toluene or ethanol than control.

The contents of cytochrome P-450, benzylalcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase activities were generally more increased in toluene- or ethanol-pretreated rats than control.

$K_m$  values of the benzylalcohol dehydrogenase in pooled liver samples from toluene- and ethanol-pretreated groups were similar each other.  $V_{max}$  values of toluene- or ethanol-pretreated group was higher than control.

In conclusion, the toluene metabolism is accelerated in rats pretreated with toluene or ethanol.

**Key Words :** Toluene- or ethanol-pretreatment, Hippuric acid, Cytochrome P-450, Benzylalcohol and benzaldehyde dehydrogenase

+ To whom all correspondence should be addressed

## I. 서론

최근 첨단 기술의 발달에 힘입어 신물질 제조 산업이 끊임없이 이루어지고 있으며, 인간과 환경에 대한 악영향은 거의 검정되지 않은 상태에서 수 많은 신화학 물질이 산업 공정에서 생산되고 이용되므로 자연 파괴 현상은 날로 심각해져 가고 있다. 더우기 산업장에서는 이들 화학물질이 인체에 폭로되어 인간의 건강을 위태롭게 하고 있다. 이같은 산업현장 유해물질 중 생체이물(xenobiotics)의 일종인 톨루엔은 비교적 그 안정성이 인정되어 생산 공정에서 benzene의 대체용제로 널리 이용되고 있다. 그러나 톨루엔이 인체에 폭로되었을 때는 신경계(Boor와 Hurtig, 1977; Rees 등, 1987), 순환계(Zee-Cheng 등, 1985; Vidrio 등, 1986), 조혈계(Korpela와 Tahti, 1988; Rosin 등, 1988; Lam 등, 1990) 및 간 등에 손상이 초래됨이 보고(Toftgard 등, 1982; Pyykko, 1984; Morris, 1989)되어 있어 이의 유해성의 재평가가 필요한 실정이다.

톨루엔의 대사는 주로 간에서 복합기능산화기구(mixed function oxidation system)에 의해서 benzylalcohol, benzaldehyde, benzoic acid 순으로 산화된 다음 benzoic acid는 glycine과 포함되어 마노산으로 되어 요중에 배설된다.

한편 xenobiotics의 대사는 생체의 내외적인 환경, 즉 영양 및 생리적 상태에 상당한 영향을 받는다고 한다. 최근 신중규(1997)는 실험동물에서 어떤 xenobiotics에 의한 간손상시 동일 xenobiotics의 대사율이 증가된다고 하였으며, 본 연구진은 상이한 xenobiotics를 실험동물에 투여시에 오히려 이들 xenobiotics의 대사율이 저하됨을 관찰할 수 있었다. 특히 윤종국 등(1996)은 에탄올을 장기간 전처치한 다음 톨루엔 투여시 톨루엔 대사가 촉진됨을 보고하였다. 더욱이 최근 생활수준의 향상으로 주류 소비가 증가되고 있으며 더욱이 평소 스트레스에 따른 음주에 산업화학물질의 인체폭로의 변수가 작용할때의 독성현상에 대한 검토는 산업독성학적 측면에서 상당한 의의가 있을 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 흰쥐에게 톨루엔 및 에탄올을 기간별로 투여회수를 달리하여 전처치한 다음 톨루

엔을 1회 투여 후 간 조직을 광학 및 전자현미경을 통하여 관찰하는 한편 체중 당 간 무게와 혈청 alanine aminotransferase 활성도와 간조직 중 glutathione 함량을 측정하였다. 또한 이러한 실험 모델에서 톨루엔 대사를 관찰하는 일환으로서 요 중 마노산의 농도와 톨루엔 대사에 관여하는 cytochrome P450 함량, benzylalcohol dehydrogenase 및 benzaldehyde dehydrogenase 활성도를 간 조직 중에서 측정하였으며, 아울러 톨루엔 대사의 주된 효소(Chapman 등, 1990; Wang과 Nakajima, 1991; Backes 등, 1993)인 benzylalcohol dehydrogenase의  $K_m$ 치와  $V_{max}$ 치도 측정하여 이들 성적을 상호 비교 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 동물의 사육 및 처치

실험 동물은 (주)대한실험동물센터에서 구입한 체중  $100 \pm 10g$  내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 종의 수 흰쥐를 동물사료(삼양사 제품)로 10일간 적응시킨 다음 체중  $150 \pm 10g$  내외의 것을 실험에 사용하였다.

실험군은 각 6마리씩을 대조군, 톨루엔 전처치군 및 에탄올 전처치군으로 나누었으며 톨루엔 전처치군 및 에탄올 전처치군은 다시 1주, 2주, 3주, 4주 경과시키는 군으로 각각 나누었다. 그리고 각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 물과 사료의 양은 제한 없이 공급하였다.

톨루엔의 전처치는 olive oil과 동량 혼합액을 만들어 Pathiratne 등(1986)의 방법에 준하여 체중  $100g$  당  $0.2ml$ 를, 에탄올의 전처치는 에탄올 50%액을 체중  $100g$  당  $0.2ml$ (Maling 등, 1975)씩 1일 1회 2일 간격으로 1, 2, 3 및 4주간 투여하였다. 또한 모든 실험군의 처치를 톨루엔 및 에탄올 4주 전처치군에 맞추기 위하여 전처치 기간에 따라 4, 3, 2 및 1주간 동량의 olive oil을 복강내로 주사하였고, 4주간 olive oil을 주사한 실험동물은 정상대조군으로 하였다. 정상대조군을 제외한 모든 실험군은 마지막 전처치를 한 후 각 실험군의 흰쥐에게 톨루엔을 체중  $100g$  당  $0.2ml$ 씩 복강내에 주사한 다음 24시간 절식시킨 후 희생시켰다. 동물은 ether 마취하에 복부 정중선을 따라 개복하고 복부 대동맥으로부터 채혈하여



실험사 시킨 후, 4 °C 생리 식염수로 간 문맥을 통하여 간을 관류하여 간 내에 남아있던 혈액을 제거한 다음, 간을 적출 하였다. 적출한 간은 생리 식염수로 씻은 후 여지로 압박하여 간 내에 남아있던 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음 무게를 칭량하였다. 그리고 이 간은 효소 활성도 측정 및 병리 조직 검사에 사용하였다. 채취한 혈액은 혈청을 얻고 alanine aminotransferase (ALT) 활성도 측정용 시료로 사용하였다. 한편 metabolic cage를 이용하여 마지막 톨루엔을 주사한 직후 부터 24시간 동안의 요를 채취하여 마노산 함량에 측정에 이용하였다.

## 2. 효소시료의 조제

적출한 간 일부를 취하여 1g 당 4ml의 0.25M sucrose 용액을 가하여 병냉하에 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄 균질액(20% w/v)을 600×g에서 10분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 다음, 상층액을 10,000 × g에서 20분간 원심 분리한 다음 상층액을 얻고 그 상층액을 다시 105,000×g에서 1시간 동안 원심 분리하여 cytosol 분획과 pellet을 얻었으며, 이 pellet을 0.25M sucrose액으로 재현탁시킨 후 105,000 ×g에서 1시간 원심 분리하여 microsome 분획을 분리하였다(Bloom과 Fawcett, 1975). Cytosol 분획은 benzylalcohol dehydrogenase (BAD) 및 benzaldehyde dehydrogenase (BzAD) 활성도 측정용 효소시료로 사용하였으며, microsome 분획은 cytochrome P450 (CYP)함량 측정에 사용하였다.

## 3. 간조직 효소활성 및 CYP와 glutathione의 함량

BAD의 활성도는 Bergmeyer(1974)의 방법, BzAD 활성도는 Stachow 등(1967)의 방법에 준하여 측정하였고, 혈청 ALT 활성도 측정은 Reitman과 Frankel(1957)의 방법에 따라 조제된 kit시액을 사용하여 측정하였다.

한편 CYP의 함량은 Omura와 Sato(1964)의 방법, 환원형 glutathione (GSH)의 함량은 Ellman (1959)의 방법에 따라 측정하였다. 그리고 단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

## 4. 요 중 마노산 정량

요 중 마노산 정량은 high pressure liquid chromatograph를 사용하였으며, Kiyoshi 등 (1988)의 방법에 따라 정량하였으며 이때 마노산의 농도 산출은 standard를 사용하여 작성된 chromatogram의 면적을 사용하여 비례식으로 산출하였으며, 동일 시료 중 creatinine 측정은 Jaffe 반응을 이용한 Butler(1976)의 방법에 준하였다. 단위는 hippuric acid g/ g creatinine으로 나타내었다.

## 5. 광학 및 전자현미경적 관찰

간 조직의 일반적인 조직학적 변화의 관찰은 적출한 중엽을 통상의 방법에 따라 고정, 탈수, paraffin 포매 후 4~6µm의 절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색(Degertekin 등, 1986)하여 광학현미경으로 관찰하였으며 전자현미경적 미세구조의 관찰을 위하여 중엽 조직편을 적출 즉시 전고정, 후고정, 탈수후 Epon 812에 포매(Luft, 1961)하고 60~70 mm의 section을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색(Watson, 1958; Reynolds, 1963)한 후 전자현미경으로 관찰하였다.

한편 얻어진 실험성적은 Student's t-test (Scheffler, 1980)로 유의성 검증을 하였다.

## Ⅲ. 결 과

### 1. 흰쥐의 체중당 간 무게(%), 혈청 ALT 활성 및 간조직 GSH 함량 변동

체중 당 간 무게는 toluene 및 ethanol을 전처리 하므로써 정상대조군에 비해 경시적으로 증가하는 경향이였으며, 혈청 ALT 활성은 실험 전기간을 통하여 별다른 변동이 없었다. 간 조직의 GSH 함량은 톨루엔 전처리군은 대체로 증가하는 경향이였으나, 에탄올 전처리군에서는 3주전처리군에서부터는 감소하는 경향이였다 (Table 1).

### 2. 간의 조직학적 변화

간조직의 광학현미경적 병리조직검사 소견은 요 중 마노산 함량 및 톨루엔 대사효소활성이 비교적 높게 나타나는 4주째를 중심으로 검토하였다. 정상

군의 간 조직은 중심 정맥을 중심으로 간 세포의 배열이 정상적으로 나타났으며 특기할만한 소견은 없었다 (Fig. 1).

톨루엔 전처리군에서는 대조군과 비교하여 큰 변화를 확인할 수가 없었다 (Fig. 2). 에탄올 전처리군에서는 간 세포의 국소적인 변성 소견을 관찰할 수가 있었다 (Fig. 3).

한편 전자현미경적 관찰 역시 요 중 마요산 함량 및 톨루엔 대사효소 활성이 비교적 높게 나타나는 톨루엔 및 에탄올 전처리 3, 4주째를 중심으로 검토하였다. 정상적인 대조군에 대한 소견에 있어서는

핵, mitochondria 및 endoplasmic reticulum 등의 간 세포 소기관이 잘 보존된 정상간 세포의 형태를 보였으며 (Fig. 4), 톨루엔을 1주간 전처리한 군에서는 지방공포를 부분적으로 관찰할 수 있었으며 (Fig. 5), 톨루엔을 4주간 복강내 투여한 군에서는 종창이 되었으며, 세포질내 괴사 영역을 확인 할 수 있었다 (Fig. 6).

3주간 에탄올을 전처리한 군에서는 지방적이 나타났고, mitochondria는 일부 소실되었으며 또한 불규칙한 배열 상태를 나타내었다. 다른 소기관에 팽윤을 확인할 수 있었다 (Fig. 7). 4주간 에탄올을

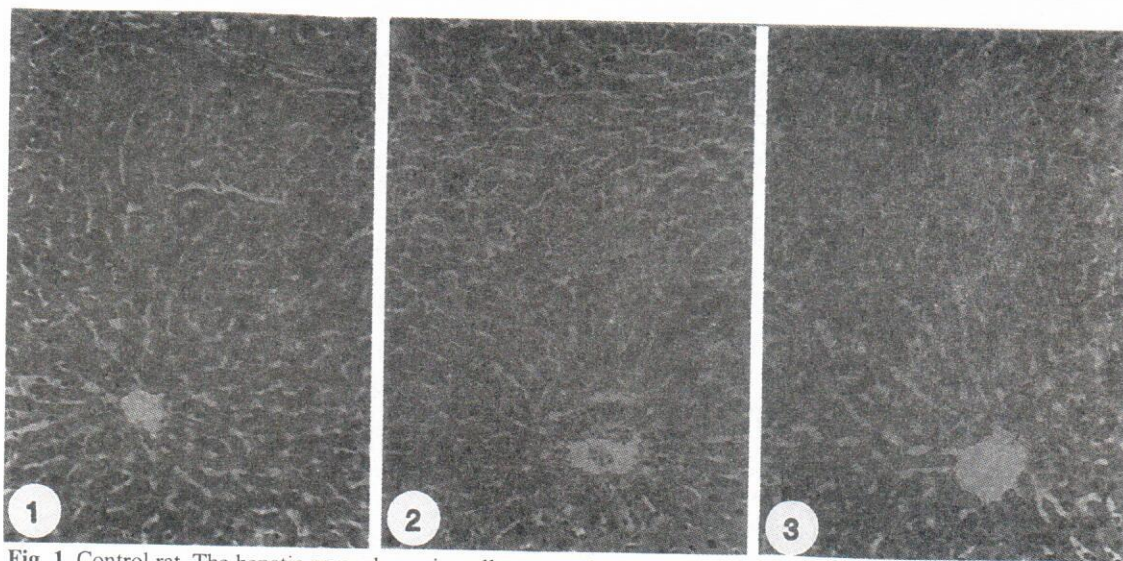
**Table 1.** Changes of liver weight (L.W.) to body weight (B.W.) ratio(%), serum ALT activity and hepatic reduced glutathione(GSH) content in toluene-treated rats after pretreatment with toluene(T) or ethanol(E)

| Pretreatment<br>(Weeks) | L.W./B.W.(%) |           | Serum ALT <sup>2)</sup> |             | GSH <sup>3)</sup> |           |
|-------------------------|--------------|-----------|-------------------------|-------------|-------------------|-----------|
|                         | T            | E         | T                       | E           | T                 | E         |
| NC <sup>1)</sup>        | 2.82±0.25    |           | 31.14±5.27              |             | 3.01±0.22         |           |
| 1                       | 3.14±0.17    | 3.25±0.39 | 26.40± 7.54             | 37.09±10.85 | 3.57±0.39         | 3.19±0.20 |
| 2                       | 3.12±0.10    | 3.28±0.29 | 38.80±29.63             | 37.50±11.68 | 3.56±0.39         | 3.07±0.15 |
| 3                       | 3.35±0.29    | 3.44±0.20 | 24.25± 5.24             | 31.59±12.35 | 3.52±0.22         | 2.77±0.07 |
| 4                       | 3.45±0.34    | 3.36±0.29 | 28.00±12.39             | 24.06± 4.48 | 3.83±0.61         | 2.99±0.15 |

The assay procedure was described in the experimental methods.

Data are expressed as mean±S.E. for 6 rats.

1); Normal control, 2); Karmen unit/ml of serum, 3);  $\mu$ mol/g of tissue



**Fig. 1.** Control rat. The hepatic parenchyma is well preserved.

2. Rat pretreated with toluene. The hepatic parenchyma is well preserved.

3. Rat pretreated with ethanol. The hepatocytes are show mild pyknotic changes (Hematoxylin-eosin stain; magnification  $\times 100$ ).



전처치한 군에서는 mitochondria와 지방적의 공포를 포함한 소기관의 현저한 변성을 관찰할 수가 있었다 (Fig. 8).

### 3. 뇨중 마노산의 함량 변동

요 중 마노산의 함량은 톨루엔만 1회 주사한 톨루엔 대조군에 비해 톨루엔 및 에탄올 전처치군 모두 실험 전기간 동안 증가를 나타내었으며, 4주 톨루엔 및 에탄올 전처치군은 대조군에 비해 약 110% ( $p < 0.05$ ) 및 약 70%의 증가를 보였다 (Table 2).

### 4. 간 조직 CYP 함량 변동

간 조직 중 CYP의 함량 변동을 나타낸 성적은 Table 3과 같다.

CYP 함량은 톨루엔 및 에탄올 전처치군 모두 대조군에 비해 증가하였고 그 경향은 톨루엔 전처치군은 대조군에 비해 경시적으로 증가하는 반면 에탄올 전처치군은 톨루엔 전처치군과 반대로 나타나 4주 실험군에서 대조군의 함량으로 환원되었다.

### 5. 간 조직 중 BAD 및 BzAD 활성도

간 조직 중 BAD 및 BzAD 활성도 변동을 나타

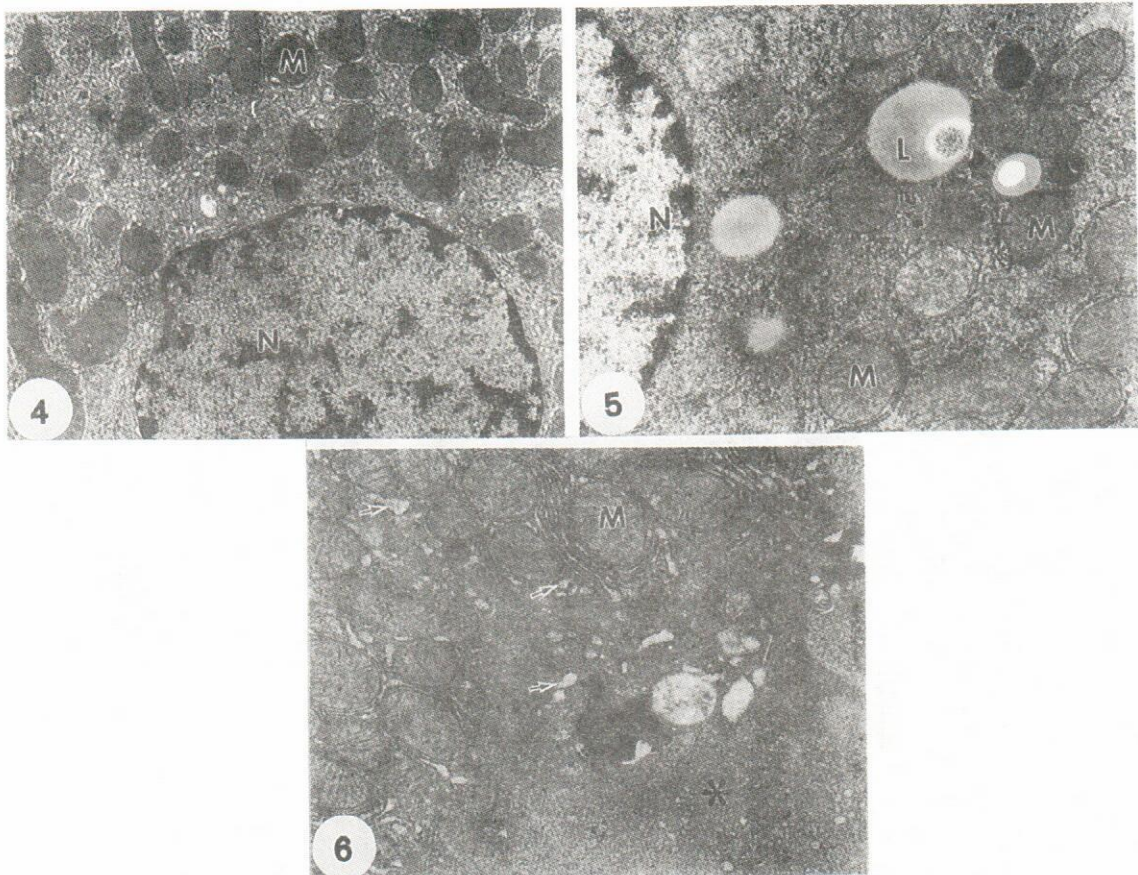


Fig. 4. Control liver of rat. (Uranyl acetate and lead citrate; magnification  $\times 13,600$ ).

5. Intraperitoneal administration of toluene every other day three times for one week. Three lipid vacuoles(L) are present in the relatively preserved hepatocyte. (Uranyl acetate and lead citrate; magnification  $\times 20,400$ ).

6. Administration of toluene every other day for four weeks. Intracytoplasmic necrotic area(asterisk) with some markedly swelling degeneration of RER(arrows). (Uranyl acetate and lead citrate; magnification  $\times 17,000$ ).

N: nucleus, M: mitochondria



낸 성적은 Table 4와 같다.

BAD 활성도는 실험 전기간을 통하여 대조군에 비해 대체로 유의한 증가를 나타내었고 특히 톨루엔 전처치군이 에탄올 전처치군 보다 현저히 높게 나타났다. 그리고 BzAD 활성도 역시 실험 전기간을 통하여 톨루엔 및 에탄올 전처치군 모두 대조군 보다 다소 높게 나타났다.

**Table 2.** Changes of urinary hippuric acid contents in toluene treated rats after pretreatment with toluene(T) or ethanol(E)

| Pretreatment<br>(Weeks) | Urinary Hippuric acid <sup>#</sup> |           |
|-------------------------|------------------------------------|-----------|
|                         | T                                  | E         |
| NC                      |                                    | 0.21±0.06 |
| TC <sup>1)</sup>        |                                    | 3.46±0.96 |
| 1                       | 6.76±2.01                          | 5.47±1.89 |
| 2                       | 5.46±1.84                          | 5.74±1.69 |
| 3                       | 7.84±2.57                          | 5.34±1.96 |
| 4                       | 7.25±1.37*                         | 5.89±1.84 |

The assay procedure was described in the experimental methods.

Data are expressed as mean±S.E. for 6 rats.

Significantly different from the control (\*; p<0.05)

1); Toluene control, #; hippuric acid g/g creatinine

## 6. 간 조직 중 BAD의 K<sub>m</sub>치 및 V<sub>max</sub>치의 변동

본 실험에서 톨루엔 대사효소 중 비교적 그 활성이 높게 나타나는 BAD의 반응속도를 관찰하고자 pooled liver specimen을 사용하여 benzylalcohol의 기질 농도를 변경시키면서 반응속도를 관찰한 후 BAD의 K<sub>m</sub>치 및 V<sub>max</sub>치를 검토한 것이 Table 5이다.

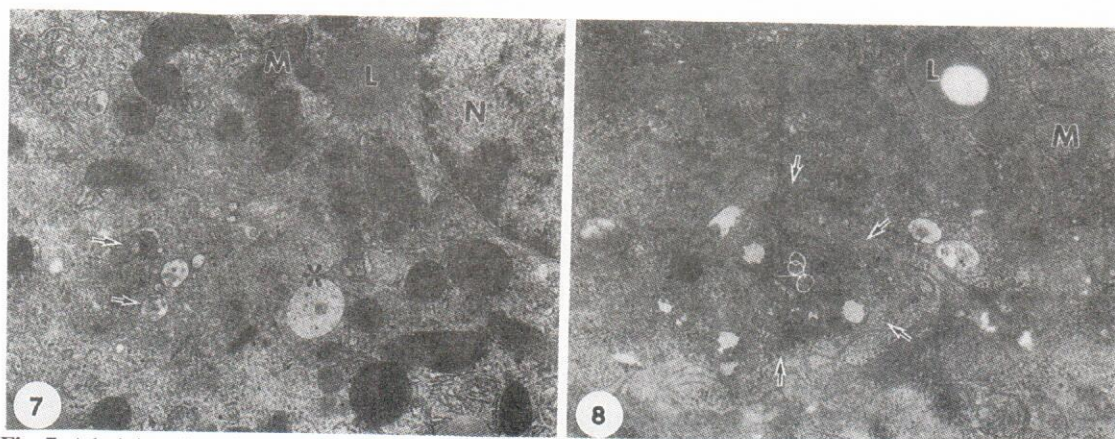
**Table 3.** Changes of cytochrome P450 (CYP) content in toluene treated rats after pretreatment with toluene(T) or ethanol(E)

| Pretreatment<br>(Weeks) | CYP content <sup>#</sup> |            |
|-------------------------|--------------------------|------------|
|                         | T                        | E          |
| C                       |                          | 100.0±19.4 |
| 1                       | 138.9±27.8               | 133.3±25.0 |
| 2                       | 161.1±33.3               | 122.2±22.2 |
| 3                       | 144.4±30.6               | 111.1±19.4 |
| 4                       | 172.2±33.3               | 102.8±16.7 |

The assay procedure was described in the experimental methods.

Data are expressed as mean±S.E. for 6 rats.

#; Each value indicates the relative value to the control (%)



**Fig. 7.** Administration of alcohol every other day for three weeks. The hepatocyte shows some lipid droplets (L), loss of mitochondria (arrows), swelling change of organelle (asterisk), and remainder mitochondria with irregular shape.

**8.** Administration of alcohol every other day for four weeks. The hepatocyte shows marked degeneration of organelle including vacuolar change (arrows) of mitochondria and a lipid droplet (L). N: nucleus, M: mitochondria (Uranyl acetate and lead citrate; magnification × 13,600).

**Table 4.** Changes of benzylalcohol dehydrogenase(BAD) and benzaldehyde dehydrogenase (BzAD) activities in toluene treated rats after pretreatment with toluene(T) or ethanol(E)

| Pretreatment<br>(Weeks) | BAD <sup>#</sup>                   |                                    | BzAD <sup>#</sup> |              |
|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------|--------------|
|                         | T                                  | E                                  | T                 | E            |
| NC                      | 100.00±5.86                        |                                    | 100.00±16.56      |              |
| 1                       | 195.50±66.22                       | 105.86± 2.25                       | 104.29±17.79      | 128.83±28.83 |
| 2                       | 251.35±67.12 <sup>a)</sup>         | 132.88± 6.76 <sup>**a)</sup>       | 143.56±46.63      | 136.20±43.56 |
| 3                       | 295.25±16.67 <sup>***a)</sup>      | 132.88± 4.50 <sup>**a)</sup>       | 134.97± 7.36      | 119.02±30.06 |
| 4                       | 398.25±45.25 <sup>***a), *b)</sup> | 136.49± 6.76 <sup>**a), **b)</sup> | 134.36±57.06      | 117.79±17.79 |

The assay procedure was described in the experimental methods.

Data are expressed as mean±S.E. for 6 rats.

#; Each value indicates the relative value to the control(%).

a) ; Significantly different from the control, b) ; Significantly different from 1 week and 4 weeks. (\* ; p<0.05, \*\* ; p<0.01, \*\*\* ; p<0.001)

**Table 5.** Changes of  $K_m$  and  $V_{max}$  values of benzylalcohol dehydrogenase in toluene treated rats after pretreatment with toluene(T) or ethanol(E)

| Pretreatment<br>(Weeks) | Km Value <sup>1)</sup> |      | Vmax value <sup>2)</sup> |       |
|-------------------------|------------------------|------|--------------------------|-------|
|                         | T                      | E    | T                        | E     |
| C                       | 2.97                   |      | 14.7                     |       |
| 1                       | 3.12                   | 2.95 | 16.45                    | 15.98 |
| 2                       | 2.94                   | 2.94 | 16.58                    | 17.42 |
| 3                       | 2.94                   | 3.10 | 17.83                    | 16.11 |
| 4                       | 3.09                   | 3.02 | 17.51                    | 18.30 |

The assay procedure was described in the experimental methods.

Each value represents the mean of 3 experiments.

1) ;  $10^{-4}$  M, 2) ; nmoles/mg protein/min

$K_m$ 치는 정상대조군, 톨루엔 및 에탄올 전처리군 모두 유사한 값을 나타내었으나  $V_{max}$ 치는 정도의 차이는 있으나 경시별로 증가하는 경향을 나타내었다.

#### IV. 고 찰

본 실험에서 체중당 간 무게 및 간 손상시 증가되던 간조직 중 GSH 함량은 톨루엔 및 에탄올 전처리한 실험군에서 대조군 보다 전실험기간 동안 대체적으로 다소 증가되었으며, 광학현미경을 이용한 병리조직학적 관찰에서 톨루엔 전처리군은 대조군과 별다른 차이를 볼 수 없었으나, 에탄올 전처리군은 간세포의 국소적인 변성 소견과 혼탁종창이 나타났다. 또한 전자현미경적 관찰에서 톨루엔 전처리군은 RER

의 종창이 나타났으며, 세포질 내에서는 괴사영역이 확인되었다. 에탄올 전처리군은 세포질내에 지방소적이 나타났으며 또한 mitochondria의 소실 등 소기관들의 변성이 나타났다. 이상 실험성적을 종합하여 볼 때 톨루엔 및 에탄올 전처리군에 있어서는 간조직은 경미한 가역적 간손상을 나타낸 것으로 사료된다. 이와같이 경미한 간손상을 나타내는 에탄올 및 톨루엔을 전처리한 실험동물 모델에서 톨루엔을 1회 투여하였을 때 요 중 마노산의 함량은 에탄올 및 톨루엔을 전처리하지 않고 톨루엔을 1회 투여한 대조군 보다 전실험기간을 통하여 대체적으로 높게 나타났다.

이와 같이 에탄올의 복강투여로 인한 에탄올 전처리군에 있어서 요중 마노산 증가는 에탄올을 2개월 동안 경구 투여한 윤종국 등(1996)의 실험결과와 유사하였다. 따라서 톨루엔 및 에탄올을 전처리한 경우 요중 마노산 농도가 증가되는 원인을 구명하고자 본 연구진은 톨루엔 대사에 관여하는 효소활성을 측정하여 관찰하였다.

생체내에서 톨루엔은 cytochrome P-450에 의하여 benzylalcohol로, 이것은 benzylalcohol dehydrogenase(BAD)에 의하여 benzaldehyde로, benzaldehyde는 benzaldehyde dehydrogenase(BzAD)에 의하여 benzoic acid로 산화된 다음 glycine과 포합하여 마노산으로 배설되며(Toftgard 등, 1982; Wang과 Nakajima, 1991; Backes 등, 1993) 이때 톨루엔의 대사율은 이의 대사에 관여하는 효소활성 변동에 따라 영향을 받는다(윤종국 등, 1996).



이 실험에서 간조직 중 cytochrome P-450 함량은 톨루엔 전처치군과 에탄올 전처치군 모두 대조군보다 대체적으로 높게 나타났다. 에탄올 전처치군에서 cytochrome P-450 함량이 증가되는 본 실험 결과는 실험동물에 에탄올 투여시 microsomal enzyme이 유도된다는 보고(Pyykko, 1980; Toftgard 등, 1982; Nakajima 등, 1993)가 이를 뒷받침해주고 있다. 그러나 에탄올 전처치군에서는 에탄올을 1주 투여한 군에서 그 증가율이 현저히 나타났으나 에탄올의 전처치 기간이 증가됨에 따라 그 활성도가 감소되어 대조군 치료 회복되는 경향을 보였다. 그러나 에탄올 전처치군에서 2주 이후 대조군 치료 회복된 것은 이 실험만으로는 분명하게 설명하기는 어렵다. 톨루엔 전처치군에서 cytochrome P-450 치가 높게 유지된 것은 톨루엔이 cytochrome P-450의 기질(Chapman 등, 1990)인 점을 고려해 볼 때 톨루엔이 유도자(inducer)가 되어 이의 합성을 증가시킨 것으로 생각된다.

한편 톨루엔 대사에 지대한 영향을 미치는 것으로 알려져있는 BAD의 활성은 에탄올 혹은 톨루엔 전처치군에서는 전실험기간 동안 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였으며, 그 증가율은 톨루엔 전처치군이 에탄올 전처치군 보다 더 높았다. 또한 이 효소의  $V_{max}$ 치 역시 정도의 차이는 있으나 에탄올 전처치군 및 톨루엔 전처치군 모두 전실험기간을 통하여 대조군 보다 높았다. 이러한 실험 결과로 보아 생체내에서 톨루엔이 정상적인 대사과정을 통해 이 효소의 기질인 benzylalcohol을 다량 생산하였을 때는 기질이 유도자가 되어 이 효소의 합성을 증가시키는 것으로 생각된다. 그리고 톨루엔 및 에탄올을 전처치한 군 간에 본 효소의  $V_{max}$ 치의 변동양상이 유사하게 나타난 것은 에탄올 역시 BAD의 기질성 물질임을 암시해 주고 있다. 이 실험에서 BzAD의 활성 역시 톨루엔 전처치군과 에탄올 전처치군은 대조군 보다 다소 높게 나타났다. 그리고 이 실험에서 에탄올 및 톨루엔 전처치군에서 BAD의 활성도 증가율에 비해 BzAD의 활성도 증가율이 낮게 나타난 점은 알콜성 물질의 대사에 의해 생성된 aldehyde 성 물질이 독성이 강하다는 점(Ellenhorn과 Barceloux: 1988)과 aldehyde가 단백질의 SH 및  $NH_2$ 기와 결합한다는 점(Kenney, 1980)을 고려해 볼 때, 투여기간이 길어질수록 다량 생성된 acetal-

dehyde 혹은 benzaldehyde가 BzAD의 활성을 억제시키므로서 이 효소의 활성도 증가율이 비교적 낮게 나타난 것이 아닌가 생각된다.

이상 실험 결과를 종합하여 볼 때 톨루엔 및 에탄올에 의한 가역적 간손상 실험모델에서 톨루엔 대사에 관여하는 효소활성유도에 따라 요 중 마노산 배설량이 증가될 것으로 생각된다.

## V. 요 약

원취에 있어서 toluene 또는 ethanol 전처치가 toluene 대사에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하는 일환으로 원취에 toluene 또는 ethanol을 경시별로 4주간 투여한 다음, 톨루엔을 1회 재투여한 후 처치하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

즉, 간조직의 광학 및 전자현미경을 통한 병리조직학적 소견과 체중당 간 무게, 혈청 alanine aminotransferase 활성 및 간조직 중 glutathione 함량 변동을 관찰한 결과, toluene 및 ethanol 전처치군 모두 가역적 간손상 정도가 관찰되었으며 톨루엔 및 에탄올 전처치군 간에 간손상 정도 차이는 볼 수 없었다.

이러한 실험동물 모델에서 toluene 및 ethanol 전처치군 모두 요 중 마노산 농도가 대조군 보다 높게 나타났으며 toluene 대사에 관여하는 간조직의 cytochrome P-450 함량 및 benzylalcohol(BAD) 또는 benzaldehyde dehydrogenase(BzAD) 활성치가 대조군 보다 높게 나타났다. 그리고 요 중 마노산 농도와 BAD 및 BzAD의 활성치는 톨루엔 전처치군이 에탄올 전처치군 보다 전 실험기간 동안 대체로 다소 높게 나타났다. 또한 간조직의 benzylalcohol dehydrogenase의 반응속도를 관찰한 결과  $V_{max}$ 치는 toluene 및 alcohol 전처치군 모두 대조군 보다 높게 나타났다.

이상 실험결과를 종합해 볼 때 실험동물에 toluene 및 ethanol 전처치가 toluene 대사를 촉진시키며 이는 toluene 대사에 관여하는 효소활성에 영향을 미쳐 나타난 결과로 생각된다.

## REFERENCES

신중규 : 원취에 있어서 간손상 정도에 따른 bromoben-



zene 대사. 한국독성학회지, 1997; 13(4): 371-376.

윤종국, 윤선동, 신중규 : 흰쥐에 있어서 주정중독이 toluene 대사에 미치는 영향. 한국독성학회지, 1996;12(2): 243-250.

Backes, WL, DJ Sequeira, GF Cawley, and CS Eyer : Relationship between hydrocarbon structure and induction of P-450 : Effects on protein levels and enzyme activities. *Xenobiotica*, 1993;23(12):1353-1366.

Bergmeyer, HU : *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 1, Academic Press, New York, 1974:428-429.

Bloom, W and DW Fawcett : *A textbook of histology*, 10th Ed., W. B. Saunders, USA, 1975.

Boor, JW and HI Hurtig : Persistent cerebellar ataxia after exposure to toluene. *Ann Neurol*, 1977;2:440-442.

Butler, AR : The Jaffe reaction identification of the coloured species. *Clin Chim Acta*, 1976;59:277-232.

Chapman, DE, TJ Moore, SR Michener, and G Powis : Metabolism and covalent binding of (14C)toluene by human and rat liver microsomal fractions and liver slices. *Drug Metabol Dispos*, 1990;18(6):929-936.

Degertekin, H, K Akdamar, R Yates, I Chen, A Ertan, and R Vaupel : Light and electron microscopic studies of diet induced hepatic changes in mice. *Acta Anat*, 1986; 125:174-179.

Ellenhorn, MJ and DG Barceloux : *Medical Toxicology*, New York : Elsevier, 1988.

Ellman, GL : Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys*, 1959;82:70-77.

Kenney, WC : Interaction of acetaldehyde with phospholipids. *Gastroenterol*, 1980;79:1030-1033.

Kiyoshi, K, H Yukio, K Keiko, and I Takashi : Determination of benzoic acid and hippuric acid in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J Chromatograph*, 1988;425:67-75.

Korpela, M and H Tahti : The effect of in vitro and in vivo toluene exposure on rat erythrocyte and synaptosome membrane integral enzymes. *Pharmacol Toxicol*, 1988;63(1):30-32.

Lam, CW, TJ Galen, JF Boyd, and DL Pierson : Mechanism of transport and distribution of organic solvents in blood. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990;104(1): 117-129.

Lowry, OH, NJ Rosebrough, AL Farr, and RL Randall : Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951;193:265-275.

Luft, JH : Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophys Biochem Cytol*, 1961;9:409-417.

Maling, HM, B Stripp, IG Sipes, B Highman, and MA Williams : Enhanced hepatotoxicity of carbon tetrachlo-

ride, thioacetamide and dimethylnitrosamine by pretreatment of rats with ethanol and some comparisons with potentiation by isopropanol. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1975;33:291-308.

Morris, RJ : Toluene and hepatotoxicity. *J Occup Environ Med*, 1989;31(12):1014-1015.

Nakajima, T, RS Wang, E Eløvaara, SS Park, HV Gelboin, and H Vainio : Cytochrome P-450 related differences between rats and mice in the metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 1993;45(5):1079-1085.

Omura, T and R Sato : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes : Evidence for its hemo-protein nature. *J Biol Chem*, 1964;239:2370-2378.

Pathiratne, A, RL Puyear, and JD Brammer : A comparative study of the effects of benzene, toluene, and xylenes on their in vitro metabolism and drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1986; 82(2):272-280.

Pyykko, K : Effects of methylbenzenes on microsomal enzymes in rat liver, kidney and lung. *Biochim Biophys Acta*, 1980;633(1):1-9.

Pyykko, K : Effects of pretreatment with toluene, phenobarbital and 3-methylcholantrene on the in vivo metabolism of toluene and on the excretion of hippuric acid in the rat. *Pharmacol Res Commun*, 1984;16(3): 217-225.

Rees, DC, JS Knisely, and S Jordan : Discriminative stimulus properties of toluene in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1987;88:97-104.

Reitman, S and S Frankel : A Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol*, 1957; 28:50-63.

Reynolds, ES : The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, 1963;17:208-212.

Rosin, J, G Bartosz, and T Wronska Nofer : Studies on the effect of ethanol and/or toluene on rat erythrocytes. *J Appl Toxicol*, 1988;8(5):369-372.

Scheffler, WC : *Statistics for the Biological Sciences*, Addison-Wesley Publishing Company, USA, 1980.

Stachow, CS, IL Stevenson, and DD Day : Purification and properties of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate- specific benzaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas*. *J Biol Chem*, 1967;242:5294-5300.

Toftgard, R, OG Nilsen, and JA Gustafsson : Dose dependent induction of rat liver microsomal cytochrome P-450 and microsomal enzymatic activities after inhala-

tion of toluene and dichloromethane. *Acta Pharmacol Toxicol*, 1982;51(2):108-114.

Vidrio, H, GA Magos, and M Lorenzana-Jimenez : Electrocardio-graphic effects of toluene in the anesthetized rat. *Arch Int Pharmacodyn Therap*, 1986;279:121-129.

Wang, RS and T Nakajima : Kinetic studies on toluene metabolism in ethanol- and phenobarbital-induced rat

liver microsomes in vitro. *Arch Toxicol*, 1991; 65(1):39-44.

Watson, ML : Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol*, 1958;6:475-479.

Zee-Cheng, CS, CE Mueller, and HR Gibbs : Toluene sniffing and severe sinus bradycardia. *Ann Intern Med*, 1985;103:482-485.