

흰쥐에서 에탄올과 phenobarbital이 벤지딘의 헤모글로빈 부가체 형성에 미치는 영향

김치년 · 이세훈¹⁾ · 김현수 · 윤영식 · 노재훈[‡]

연세대학교 의과대학 산업보건연구소, 가톨릭대학교 의과대학 예방의학교실¹⁾

Effects of ethanol and phenobarbital on hemoglobin adducts formation in rats exposed to benzidine.

Chi Nyon Kim · Se Hoon Lee¹⁾ · Hyun-Soo Kim · Young-Shik Yoon · Jaehoon Roh[‡]

*Institute for Occupational Health, College of medicine, Yonsei University,
Department of Preventive Medicine, Catholic University¹⁾*

Recently, biochemical analysis using hemoglobin adduct is frequently performed to evaluate the exposure to chemical carcinogens. However, data on the effect of co-exposure with other chemicals on hemoglobin adduct formation are seldom provided. The objective of this study is to evaluate the effects of pretreatment of ethanol(EtOH) and phenobarbital(PB), which are known to affect metabolism of xenobiotics, on the formation of hemoglobin adducts in the rats(Sprague-Dawley) administered benzidine(BZ). The experimental rats were divided into control, EtOH, and PB groups. Rats were pretreated with EtOH or PB 24 hours before the oral administration of BZ. Blood sampling was taken before the administration of the chemicals and 0.5, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, and 144 hours after the administration of the BZ in 5 rats each. The blood was separated into hemoglobin and plasma immediately after taking the blood samples, and the adducts were undergone basic hydrolysis to convert them into aromatic amines. Hydrolyzed BZ, monoacetylbenzidine (MABZ), and 4-aminobiphenyl(4ABP) were separated by reversed-phase liquid chromatography without derivatization,

and quantitative analyses of them were performed by a highperformance liquid chromatograph equipped with electrochemical detector. The quantitative amount of the metabolites was expressed by hemoglobin binding index(HBI).

BZ-, MABZ-, and 4ABP-HBI of EtOH and PB groups were increased more than those of control group. These results are attributable to the fact that EtOH and PB induced N-hydroxylation related to the hemoglobin adduct formation. The ratio of N-acetylation (viz, MABZ-HBI/BZ-HBI) showed no significant difference between EtOH group and control group. It means that EtOH increased N-hydroxylation and N-acetylation in a similar degree. The N-acetylation ratio of PB group was relatively lower than control group because the PB increased N-hydroxylation induction. The N-acetylation ratios of all groups were higher than 1 during the entire experimental period. This result suggests that the effects of EtOH or PB need to be considered in the biochemical monitoring for the assessment of intermittent exposure of benzidine.

Key Words: Benzidine, Hemoglobin adduct, Ethanol, Phenobarbital

I. 서 론

벤지딘(benzidine, 이하 BZ)은 방광암을 유발하는 물질로 이미 오래 전부터 알려

져 있으며 최근의 연구에서도 BZ 노출 근로자가 비노출 근로자에 비해 방광암 발생이 높다고 하였다(Bulbulyan et al, 1995). 이러한 BZ의 발암성 때문에 우리나라 노동부와 미국 산업위생협회의(American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH)에서는 노출기준 없

* 본 연구는 2001년도 연세대학교 산업보건연구소의 연구비로 이루어졌음.

접수일: 2001년 7월 9일, 채택일: 2001년 8월 11일

‡ 교신저자: 노재훈(서울 서대문구 신촌동 134번지 연세의대 산업보건연구소

Tel: 02-361-5354, Fax: 02-392-8622, E-mail: jhroh@yumc.yonsei.ac.kr)

이 발암성 물질(A1)로 설정하고 있다(노동부, 1998; ACGIH, 2000).

BZ는 피부흡수 가능물질로 알려져 있으며 흰쥐 피부를 이용한 BZ 흡수에 관한 연구에서도 이러한 내용을 증명하였다(이지현 등, 1997). 이러한 노출경로의 특성 때문에 근로자들의 호흡기 부위에서 측정된 기증 농도만으로 정확한 노출평가를 하기는 어려우며 생물학적 모니터링과 함께 종합적인 평가가 이루어져야 한다.

최근에는 BZ 및 벤지딘계 염료를 주문 생산하고 있어 생산활동이 일정하지 않아 근로자들이 간헐적으로 낮은 농도로 노출되는 경우가 많다. 따라서 배설 반감기가 짧아 체내에서 축적되지 않는 요중 BZ 및 대사물질을 이용하여 노출평가를 하는 것은 많은 어려움이 따른다. 유기물질에 대한 생화학적 노출량 평가에는 일반적으로 많이 이용하는 요중 대사물질의 측정과 발암성 물질의 생체 모니터링으로 주로 이용하는 DNA 부가체(DNA adduct)와 헤모글로빈 부가체(hemoglobin adduct)가 있다(노재훈 등, 1998).

흰쥐의 적출간 관류법을 이용하여 BZ 및 DB38의 대사를 관찰한 결과 모노아세틸벤지딘(monoacetylbenzidine, 이하 MABZ)과 디아세틸벤지딘(diacetylbenzidine, 이하 DABZ)이 대사물질로 확인되었으며(배문주 등, 1996; 원종욱 등, 1996) 벤지딘계 염료 제조 사업장의 근로자들의 소변에서도 같은 대사물질이 검출되었다(노재훈 등, 1996; 염혜경 등, 1998). BZ의 주요 대사과정은 N-hydroxylation과 N-acetylation이며 서로 경쟁적으로 작용을 한다. N-acetylation은 아민류가 대사되어 유전독성을 유발하는 물질인 N-hydroxyamine의 농도를 낮추기 때문에 해독과정의 역할을 한다(Hein, 1988). 이러한 이유로 N-acetylation의 진행속도가 느린 경우는 방광암 발생이 높다는 보고가 있다(Lang, 1997). N-hydroxylation에 관여하는 효소는 유전적인 형질이외에도 체내에 흡수되는 α -naphthoflavone과 ellipticine에 의하여 억제되거나(Lakshmi et al, 1997) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine과 β -naphthoflavone 등에 의하여 유도가 된다(Hsu et al,

1996). 또한 N-acetylation의 경우도 dimethylsulfoxide와 dimethylformamide에 의하여 변화가 된다(Svensson & Ware, 1993). 특히 근로자들이 음주습관으로 자주 접하는 에탄올(이하 EtOH)은 산화과정을 억제하거나 유도하며(Neis et al, 1985) 방향족 아민과 함께 존재하면 N-acetylation을 상승시키는 역할도 한다(Svensson et al, 1993). Phenobarbital(이하 PB)의 경우도 산화과정을 유도한다고 알려져 있다(Corcoss et al, 1998).

이러한 이유로 헤모글로빈 부가체를 이용한 생물학적 모니터링을 실용화하기 위해서는 N-hydroxylation과 N-acetylation에 영향을 주는 물질들에 의하여 부가체 형성이 어떻게 변하는지 평가하는 것이 중요하다. 그러나 BZ에 대한 헤모글로빈 부가체의 연구는 많이 있었지만(Zwirner-Baier & Neumann, 1998) 동시 노출물질에 대한 영향을 평가한 연구는 없었다.

따라서 본 연구에서는 흰쥐를 대상으로 EtOH와 PB가 BZ 투여시 생성되는 헤모글로빈 부가체 형성에 미치는 영향과 N-acetylation의 변화를 시간 경과에 따라 알아보았다.

II. 실험대상 및 방법

1. 실험대상

생후 7~8주이고, 체중이 230 ± 10 g인 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 계통 보존실에서 품질검사를 거친 후에 SPF(Specific Pathogen Free) 동물 실험실(Division of Laboratory Animal Medicine, Medical Research Center, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea)에서 사육 및 실험을 실시하였다.

실험을 실시하였다.

실험동물은 크게 EtOH 전처치군(이하 EtOH군), PB 전처치군(이하 PB군) 그리고 전처치가 없는 대조군으로 분류하였다. 각각의 실험군에 흰쥐는 50마리를 사용하였으며 투여후 시간대별로는 5마리의 흰쥐를 대상으로 하였다. EtOH의 전처치 용량은 흰쥐의 경구 LD₅₀인 10.81 g/kg body weight의 약 1/10에 해당하는 1 g/kg body weight로 결정하였으며(Verschueren, 1983) PB는 80 mg/kg body weight로 하였다(이경중 등, 1993). BZ 투여 용량은 Birner 등(1990)의 1회 경구 투여 용량을 참조하여 0.5 mmol BZ/kg body weight로 하였다(Table 1).

쥐에게 약물을 경구 투여할 때는 비교적 쉽고 안전한 curved ball-tipped gastric inoculation needle을 사용하였다(Baker et al, 1980). EtOH와 PB의 전처치는 BZ을 투여하기 24시간 전에 증류수 10 ml/kg body weight로 희석하여 1회 경구 투여하였으며 대조군은 같은 양의 증류수만을 경구 투여하였다. BZ은 1,2-propanediol(Sigma, St. Louis, Missouri)에 녹여 경구로 투여하였다.

혈액 시료는 BZ을 경구 투여하기 전과 투여 후 30분, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 144시간에 실험군당 5마리씩 해파린으로 처리한 주사기로 하대정맥에서 채취하였다. 채취한 혈액 시료는 즉시 실험실에서 전처리하였다.

2. 실험 방법

표준 물질로 사용할 MABZ의 합성은 Birner와 Neumann(1988)의 합성법을 참조하여 실시하였다. 헤모글로빈 부가체의

Table 1. Experimental groups and doses

| Groups | Reagent & dose |
|------------|--|
| BZ-control | 0.5 mmol benzidine/kg |
| BZ-EtOH | 0.5 mmol benzidine/kg + 1 g ethanol/kg |
| BZ-PB | 0.5 mmol benzidine/kg + 80 mg phenobarbital/kg |

*, ethanol or phenobarbital was pretreated 24 hr before benzidine administration; each reagent was administered orally by curved ball-tipped gastric inoculation needle

전처리하는 Sabbioni과 Neumann(1990)의 방법으로 헤모글로빈을 분리하고 염기 가수분해하여 BZ와 MABZ 그리고 4ABP를 회수하였다. 이들 물질의 정량분석은 유도체화 과정 없이 역상 액체크로마토그래프(Reversed-phase high performance liquid chromatograph, Gilson 715 System, GILSON, Villier le Bel, France)를 이용하여 BZ, MABZ, 4ABP를 분리하였다(김현수 등, 1999). 방향족 아민류의 특성에 적합하고 동시 정량시 분석 감도를 높이기 위하여 2개의 electrode가 각각 다른 전위값(potential value)으로 검출이 가능한 전기화학검출기(Electrochemical detector, ICA-5212, TOA Electronics, Tokyo, Japan)를 사용하였다.

1) 벤지딘 및 모노아세틸벤지딘의 분석

BZ 및 MABZ에 대한 전기화학 검출기의 분석감도를 높이기 위하여 표 2의 분석조건으로 voltammogram을 작성하여 BZ와 MABZ에 적합한 전위값(potential value)으로 각각 0.65 V, 0.75 V를 구하였다. 표 2의 조건으로 분석한 검출한계(NIOSH, 1995)는 BZ는 1.82 ng/ml 이었고 MABZ는 1.54 ng/ml 이었다.

Table 2. Operating condition of high performance liquid chromatograph for benzidine and monoacetylbenzidine

| Description | Condition |
|--------------------|---|
| Column | HAISIL HL C ₁₈ , 5 μ m, 250 \times 4.6 mm (Higgins Analytical, Mountain View, California) |
| Column temperature | 35 $^{\circ}$ C |
| Mobile phase | 0.2% Lithium chloride : Methanol (70 : 30) |
| Flow rate | 1.1 ml/min |
| Detector | Electrochemical detector (potential 0.75V, 0.65 V) |
| Injection Volume | 20 μ l |

2) 4-아미노비페닐 분석

4ABP를 표 2의 조건으로 분석하는 경우 retention time이 너무 길어 정점(peak)이 형성되지 않았다. Retention time을 빠르게 하기 위하여 이동상의 조성을 시간에 따라 변화시키는 경우 전기화학 검출기가 안정이 되지 않아 BZ 및 MABZ와

Table 3. Operating condition of high performance liquid chromatograph for 4-aminobiphenyl

| Description | Condition |
|--------------------|--|
| Column | HAISIL HL C ₈ , 5 μ m, 250 \times 4.6 mm (Higgins Analytical, Mountain View, California) |
| Column temperature | 35 $^{\circ}$ C |
| Mobile phase | 0.2% Lithium chloride : Methanol (50 : 50) |
| Flow rate | 1.1 ml/min |
| Detector | Electrochemical detector (potential 0.85 V) |
| Injection Volume | 20 μ l |

함께 동시에 정량할 수가 없었다. 따라서 표 3의 조건으로 단독 분석하여 4ABP의 voltammogram을 작성하였으며 분석에 적합한 전위값은 0.85 V이었다. 표 3의 조건으로 분석한 4ABP의 검출한계(NIOSH, 1995)는 0.2 ng/ml 이었다.

3) 헤모글로빈 및 혈장 단백질 부가체의 평가

BZ, MABZ, 4ABP의 헤모글로빈 부가체를 같은 조건으로 비교하기 위하여 분석결과를 헤모글로빈 결합지수(hemoglobin binding index, 이하 HBI)로 표현하였다. HBI는 1 mol의 헤모글로빈에 결합된 BZ, MABZ, 4ABP의 mmol 수를 BZ 투여 용량으로 나눈 값이다.

$$HBI = \frac{\text{결합물질/투여량}}{\text{mmol cleavage}}$$

product/mol hemoglobin)/(mmol benzidine or Direct Black 38/kg body weight)

헤모글로빈 부가체에서 일어나는 N-acetylation이 EtOH와 PB에 의하여 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위하여 시간에 따라 N-acetylation의 비로 평가하였다. N-acetylation 비는 MABZ-HBI를 BZ-HBI

로 나눈 값으로 구하였다(Zwimer-Baier & Neumann, 1998).

III. 결 과

1. 에탄올과 phenobarbital이 헤모글로빈 부가체 형성에 미치는 영향

1) 벤지딘-헤모글로빈 결합지수(BZ-HBI)에 대한 영향

BZ를 투여하기 전에 채취한 시료에서는 벤지딘-헤모글로빈 부가체가 검출되지 않았다. BZ 투여후의 대조군, EtOH군 그리고 PB군의 시간 경과에 따른 BZ-HBI는 표 4와 같다. BZ-HBI의 경우 0.5시간을 제외하고는 6시간까지 대조군이 EtOH군과 PB군보다 높은 경향이 있었으며 3시간에는 대조군, 6시간에는 대조군과 EtOH군이 유의하게 높았다($p < 0.05$). 그러나 9시간 이후부터는 EtOH군과 PB군이 대조군보다 평균 BZ-HBI가 높은 경향이 있었으며 EtOH군은 12시간과 144시간 그리고 PB군은 12시간, 48시간, 72시간, 96시간, 144시간에서 유의하게 높았다($p < 0.05$).

2) 모노아세틸벤지딘-헤모글로빈 결합지수(MABZ-HBI)에 대한 영향

BZ를 투여하기 전에 채취한 시료에서는 모노아세틸벤지딘-헤모글로빈 부가체가 검출되지 않았다. BZ 투여후의 대조군, EtOH군 그리고 PB군의 시간 경과에 따른 MABZ-HBI는 표 5와 같다.

MABZ-HBI의 경우 0.5시간을 제외하고는 6시간까지 대조군이 높은 경향이 있었

Table 4. Hemoglobin binding index of benzidine(BZ-HBI) by ethanol or phenobarbital pretreatment 24 hr before benzidine administration in rat

| Time (hr) | BZ-HBI | | |
|-----------|-------------|-------------|---------------|
| | control | EtOH | PB |
| 0.5 | 0.042±0.023 | 0.069±0.006 | 0.032±0.005* |
| 3 | 0.384±0.013 | 0.135±0.044 | 0.181±0.019** |
| 6 | 0.428±0.034 | 0.403±0.023 | 0.309±0.015** |
| 9 | 0.565±0.062 | 0.611±0.085 | 0.609±0.255 |
| 12 | 0.633±0.082 | 1.018±0.189 | 1.070±0.306* |
| 24 | 1.184±0.493 | 1.292±0.415 | 1.632±0.452 |
| 48 | 0.661±0.090 | 0.842±0.128 | 1.621±0.260** |
| 72 | 0.580±0.067 | 0.650±0.022 | 1.257±0.807** |
| 96 | 0.492±0.042 | 0.555±0.067 | 0.913±0.167** |
| 144 | 0.241±0.043 | 0.472±0.030 | 0.592±0.206** |

* P<0.05 ** P<0.01 by Kruskal-Wallis test; ND: not detected; Mean±SD (N=5)

Table 5. Hemoglobin binding index of monoacetylbenzidine(MABZ-HBI) by ethanol or phenobarbital pretreatment 24 hr before benzidine administration in rat

| Time (hr) | MABZ-HBI | | |
|-----------|--------------|--------------|---------------|
| | control | EtOH | PB |
| 0.5 | 0.910±0.184 | 1.205±0.223 | 1.016±0.224 |
| 3 | 7.100±1.716 | 3.095±0.725 | 6.385±1.525** |
| 6 | 10.714±4.974 | 9.091±1.788 | 10.722±1.704 |
| 9 | 12.993±5.066 | 15.325±5.534 | 13.085±1.287 |
| 12 | 15.809±4.019 | 20.399±4.048 | 18.745±4.367 |
| 24 | 20.024±4.586 | 31.945±9.736 | 24.697±7.135 |
| 48 | 35.767±5.502 | 50.013±8.329 | 38.896±5.013* |
| 72 | 29.141±7.419 | 32.688±8.018 | 46.369±5.009* |
| 96 | 22.217±7.221 | 30.896±9.889 | 36.769±9.488 |
| 144 | 12.699±3.924 | 13.882±3.381 | 15.694±2.293 |

* P<0.05 ** P<0.01 by Kruskal-Wallis test; ND: not detected; Mean±SD (N=5)

으며 3시간에서는 유의하게 높았다 ($p<0.01$). 그러나 9시간 이후부터는 EtOH 군과 PB군이 대조군보다 평균 MABZ-HBI가 높은 경향이 있었고 EtOH군은 48시간, PB군은 72시간에서 유의하게 높았다($p<0.05$).

3) 4-아미노비페닐-헤모글로빈 결합지수 (4ABP-HBI)에 대한 영향

BZ를 투여하기 전에 채취한 시료에서는 4-아미노비페닐 헤모글로빈 부가체가 검출되지 않았다. BZ 투여후의 대조군, EtOH군 그리고 PB군의 시간 경과에 따른 4ABP-HBI는 표 6과 같다. 4ABP-HBI의 경우 0.5시간에서 모든 군이 검출되지 않았다. 9시간 이후부터는 EtOH군과 PB군의 평균 4ABP-HBI가 대조군보다 높은 경향이였다. EtOH군은 12시간, 24시간, 72

시간, 96시간, 144시간에서 PB군은 3시간, 6시간, 9시간, 12시간, 24시간에서 다른 군보다 유의하게 높았다($p<0.05$).

2. 에탄올과 phenobarbital이 N-acetylation에 미치는 영향

대조군의 N-acetylation 비는 0.5시간에서 24시간까지 큰 변화 없이 16.92에서 25.02였으나 24시간 이후에는 급격히 증가하여 가장 높은 비가 48시간에서 54.15로 나타났다.

EtOH군도 0.5시간에서 24시간까지는 큰 변화 없이 N-acetylation 비가 17.37에서 25.08이었고 24시간 이후부터는 급격히 증가하여 가장 높은 비가 48시간에서 59.41로 나타났다.

PB군은 0.5시간, 3시간, 6시간에서 대조군과 EtOH군보다 N-acetylation의 비가 높았다. 그러나 24시간 이후에는 반대로 대조군과 EtOH군보다 낮았으며 가장 높은 비는 96시간에서 40.28이었다(그림 1).

IV. 고 찰

최근에는 헤모글로빈 부가체를 이용한 생물학적 모니터링이 ethylene oxide (Tornquist et al, 1986), acrylamide (Bailey et al, 1986), benzo(a)pyrene(Weston et al, 1989) 등에 활용되고 있다. 특히 흡연에 관련된 nitrosoamine과 4-아미노비페닐의 헤모글로빈 부가체에 대한 연구는 매우 활발하게 이루어지고 있다(Bryant et al, 1987). 실제로 적혈구내 헤모글로빈 부가체의 분석은 체내로 흡수된 양도 제시하지만 개인의 대사형태 특성도 평가를 할

Table 6. Hemoglobin binding index of 4-aminobiphenyl(4ABP-HBI) by ethanol or phenobarbital pretreatment 24 hr before benzidine administration in rat

| Time (hr) | 4ABP-HBI | | |
|-----------|-------------|-------------|---------------|
| | BZ-control | BZ-EtOH | BZ-PB |
| 0.5 | ND | ND | ND |
| 3 | 0.233±0.082 | 0.132±0.700 | 0.308±0.079* |
| 6 | 0.548±0.123 | 0.467±0.072 | 0.770±0.133* |
| 9 | 0.539±0.093 | 0.910±0.158 | 1.365±0.177** |
| 12 | 0.818±0.167 | 1.176±0.163 | 1.527±0.287** |
| 24 | 0.641±0.110 | 1.898±0.200 | 2.364±0.412** |
| 48 | 2.424±0.203 | 2.776±0.284 | 4.324±1.243 |
| 72 | 1.707±0.190 | 2.269±0.301 | 2.394±0.995* |
| 96 | 1.125±0.160 | 1.676±0.169 | 1.223±0.170** |
| 144 | 0.587±0.125 | 1.564±0.186 | 1.191±0.165** |

* P<0.05 ** P<0.01 by Kruskal-Wallis test; ND: not detected; Mean±SD (N=5)

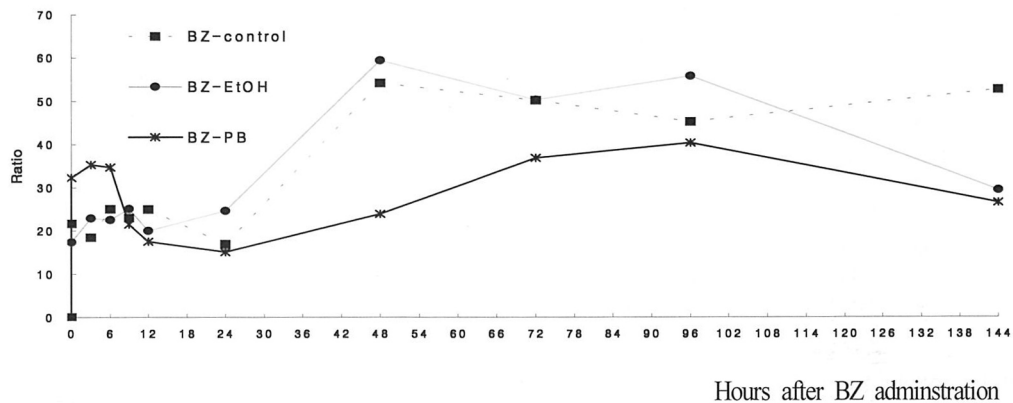


Figure 1. The ratio of N-acetylation(monoacetylbenzidine-hemoglobin binding index / benzidine-hemoglobin binding index) by ethanol or phenobarbital pretreatment 24 hr before benzidine administration in rat

수 있기 때문에 유용성이 매우 높다 (Neumann et al, 1993).

방향족아민이 헤모글로빈과 결합하기 위해서는 N-hydroxylation을 거쳐야한다. N-hydroxylation은 아민기에 OH기를 부가하는 과정으로(Windmill et al, 1997) CYP-450이 주요 역할을 담당한다(Stillwell et al, 1997). BZ의 N-hydroxylation에 깊이 관여하는 효소는 CYP 1A1과 1A2이다. 이들 효소들은 α -naphthoflavone, ellipticine (Lakshmi et al, 1996), furafylline(Lakshmi et al, 1997)에 의하여 억제되고 β -naphthoflavone(Hsu et al, 1996), 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine(Astroff et al, 1988), triethylphosphorothioate(Frukawa et al, 1987)에 의하여 활성화되기도 한다.

본 연구에서는 EtOH군 또는 PB군의 평균 BZ-HBI가 3시간, 6시간을 제외하고는 대조군보다 높은 경향을 보였으며 MABZ-HBI는 3시간을 제외하고 그리고 4ABP-HBI는 전체시간에서 높은 경향을 보였다. 이것은 EtOH(Neis et al, 1985)와 PB(Corcus et al, 1998)가 N-hydroxylation에 관여하는 CYP-450을 유도하여 BZ 투여시 형성된 헤모글로빈 부가체를 증가시킨 결과로 보인다.

N-acetylation은 방향족 아민이나 hydroxylamine의 질소와 산소에 acetate기를 부가하여 수용성을 증가시키는 역할을 한다 (Lakshmi et al, 1995b). 본 연구에서는 헤

모글로빈 부가체에서 일어나는 N-acetylation을 상대적으로 평가하기 위하여 MABZ-HBI를 BZ-HBI로 나누어 N-acetylation 비로 평가하였다. 대조군의 N-acetylation 비는 48시간의 54.15가 최고였고 EtOH군은 48시간의 59.41 그리고 PB군은 96시간의 40.28이었다. EtOH가 방향족 아민류와 함께 노출이 되면 N-acetylation이 증가한다는 연구결과가 있다(Elizabeth et al, 1985; Neis et al, 1985). 본 연구에서는 EtOH군의 MABZ-HBI가 대조군의 MABZ-HBI보다 실제로는 높은 경향을 보였지만 N-acetylation 비에는 큰 차이가 없었다. 이것은 EtOH가 N-hydroxylation과 N-acetylation을 비슷하게 증가시키기 때문에 (Svensson et al, 1993) 대조군의 BZ-HBI보다 EtOH군의 BZ-HBI가 상대적으로 커서 나타난 결과이다. PB군은 N-acetylation 비가 오히려 24시간 이후부터 BZ-대조군의 N-acetylation의 비보다 작은 경향을 보였다. 그러나 PB군의 BZ-HBI가 상대적으로 대조군의 BZ-HBI보다 24시간 이후부터는 컸기 때문에 단순히 BZ-PB군에서 N-acetylation이 적게 일어났다고 할 수는 없다. 대조군, EtOH군 그리고 PB군 모두는 전체시간에서 N-acetylation 비가 1 이상의 값으로 나타나 MABZ-HBI가 BZ-HBI보다 높다는 것을 설명한다. 이러한 결과는 BZ에 노출이 되면 적혈구내에서 4-nitroso-4'-N-acetylbiophenyl이 가장 많이

형성된다는 것을 증명한 것이다. 아닐린이나 4ABP와 같이 아민기가 하나인 방향족 아민류의 경우는 헤모글로빈 부가체를 이용한 노출평가에서 acetylation이 설명되면 더욱 활용도가 높다(Riffelmann et al, 1995). 그 이유는 N-acetylation이 느리게 진행되면 N-hydroxylation이 경쟁적으로 증가하여 방광암 발생의 위험도가 높아지기 때문이다(Birner & Neumann, 1988). 또한 N-acetylation은 방향족 아민이나 hydroxylamine의 질소와 산소에 acetate기를 부가하여 수용성을 증가시켜 빠르게 소변으로 배설시키는 역할을 한다(Lakshmi et al, 1995a). 그러나 BZ와 같이 아민기가 2개 이상인 경우는 헤모글로빈 부가체에서 deacetylation과 N-acetylation이 동시에 일어나기 때문이다(Zwimer-Baier & Neumann, 1998)에 N-acetylation만으로 독성과 수용성을 설명하기는 어렵다.

최근 BZ 및 DB38의 생산 및 취급이 주문에 의해 이루어지고 있어 이 분야에 종사하는 근로자들이 저농도에서 간헐적으로 노출되고 있다. BZ 및 BZ계 아조염료에 노출되면 BZ 및 그 대사산물은 빠르게 소변으로 배설되어(Baselt, 1997) 간헐적인 노출에서는 소변을 이용한 생물학적 노출평가는 정확하지 않을 수 있다. 혈중 헤모글로빈 부가체는 매우 안정된 상태이기 때문에 혈구세포 수명과 같이 일정기간 축적이 가능하다 (Pereira, 1993). 따라

서 장기간에 걸쳐 근로자들이 간헐적으로 BZ 및 DB38에 노출되는 경우 요중 대사 물질을 분석하는 것보다 헤모글로빈 부가체를 이용하는 것이 노출 평가에 적합하다고 할 수 있다.

헤모글로빈 부가체 양은 실제로 체내로 흡수된 양을 제시하고 개인의 대사 특성도 평가를 한다. 또한 많은 문헌에서 노출 평가시 헤모글로빈 부가체를 활용하는 것이 유용하다는 보고가 있다(Riffelmann et al, 1995). 이런 장점 때문에 최근에는 분자역학(molecular epidemiology)분야에서도 헤모글로빈 부가체를 널리 활용하고 있다(Neumann et al, 1993). BZ과 같이 저농도에 간헐적으로 노출되고 피부흡수가 가능한 발암성 물질인 경우는 공기 시료를 이용한 작업환경측정만으로는 노출평가가 불충분하다. 따라서 최근 및 장기간의 노출평가에 적합한 지표를 찾는 것이 매우 필요하다(Sepai et al, 1995). 발암성 또는 돌연변이성 화학물질과 헤모글로빈이 결합된 형태는 노출량 평가의 새로운 지표이다. 과거 25년 동안 이 분야에 대한 정량방법은 많이 발전하였지만(Poirier et al, 2000) 임상분야, 산업보건학 분야 그리고 역학 분야에서 일반적으로 헤모글로빈 부가체를 활용하기에는 아직은 발전 단계이다. 따라서 산업장내에서 근로자들이 실제로 노출되는 양상과 함께 평가하여 타당성을 입증하는 것이 필요하다. 또한 N-acetylation의 진행속도는 인종에 따라서 큰 차이가 있다. 황인종이 가장 빠르게 N-acetylation이 진행되고 다음은 흑인이고 백인은 가장 느리게 진행된다(Riffelmann et al, 1995). 따라서 우리나라의 근로자들을 대상으로 이 분야에 대한 연구가 필요하다고 여겨진다.

V. 결 론

최근에는 발암성 물질 노출평가에 헤모글로빈 부가체를 이용한 생화학적 분석방법을 많이 이용하고 있다. 그러나 다른 물질과 동시 노출되는 경우 부가체 형성이 어떻게 변하는지 평가한 연구는 미흡하

다. 본 연구의 목적은 대사에 영향을 주는 물질로 알려진 EtOH와 PB가 환경에서 BZ 투여시 생성되는 헤모글로빈 부가체에 어떠한 영향을 주는지 평가하는 것이다. 또한 EtOH와 PB가 헤모글로빈 부가체의 N-acetylation에 미치는 영향도 함께 평가하였다.

EtOH군과 PB군의 BZ-, MABZ-, 4ABP-HBI는 대조군보다 전반적으로 증가하는 경향이 있었다. 이러한 증가는 EtOH와 PB가 헤모글로빈 부가체 형성에 관여하는 N-hydroxylation을 유도하였다는 것을 의미한다. EtOH군의 N-acetylation 비(MABZ-HBI/BZ-HBI)는 대조군과 비슷한 경향이였다. 이는 EtOH가 N-hydroxylation과 N-acetylation을 비슷하게 증가시켰기 때문이다. PB군의 N-acetylation 비는 PB가 N-hydroxylation을 유도시켜 BZ-대조군에 비해 낮은 경향이였다. 모든 실험군의 N-acetylation의 비는 모든 시간에서 1보다 높았다. 이상의 결과로 EtOH는 N-hydroxylation을 유도하여 부가체 형성을 증가시킬 뿐 아니라 N-acetylation도 유도하였다. PB도 N-hydroxylation을 유도하여 부가체 형성을 증가시켰다. 따라서 발암성 물질인 BZ에 대하여 생화학적 노출평가를 실시하는 경우 EtOH나 PB의 영향을 고려하여야 하며 헤모글로빈 부가체를 이용하는 것이 간헐적인 노출에 대한 평가에 적합하다고 사료된다.

REFERENCES

김현수, 원종욱, 김치년, 노재훈. 요중 벤지딘 대사물질 분석의 전처리 및 저장방법에 따른 회수율 비교. 한국산업위생학회지 1999; 9(2): 100-110.
노동부. 유해물질의 허용농도, 서울, 노동부고시 제 97-65호, 1998.
노재훈, 원종욱, 김치년, 김현수, 전미령. 벤지딘계 염료(Direct Black 38)의 요중 대사물질에 관한 연구. 한국산업위생학회지 1996; 6(1): 156-164.
노재훈, 이진현, Talaska G. 발암 물질의 생체 모니터링. 서울: 군자출판사,

1998: 1-5.

배문주, 노재훈, 조영봉, 김춘성, 전미령, 김치년. 환경의 적출 간 관류법을 이용한 벤지딘 대사에 관한 연구. 산업위생학회지 1996; 6(1): 28-37.

염혜경, 송재석, 김치년, 원종욱, 노재훈. 벤지딘 염산염 및 염료 제조 근로자들의 피부노출 평가. 대한산업의학회지 1998; 10(1): 83-93.

원종욱, 노재훈, 김춘성, 박윤정, 김치년. 환경 적출간 관류법을 이용한 벤지딘계 염료 Direct Black 38의 대사. 대한산업의학회지 1996; 8(1): 59-65.

이경중, 노재훈, 김치년, 조명화, 문영한. 환경에 있어서 ethanol과 phenobarbital이 트리클로로에틸렌 대사에 미치는 영향. 대한산업의학회지 1993; 5(1): 76-88.

이지현, 염혜경, 김치년, 송재석, 원종욱, 노재훈. 환경 피부를 이용한 벤지딘의 피부투과에 대한 연구. 대한산업의학회지 1997; 9(3): 430-438.

ACGIH. Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices: Cincinnati: ACGIH, 2000.

Bailey E, Farmer PB, Bird I, Lamb JH, Peal JA. Monitoring exposure to acrylamide by the determination of S-(2-carboxy-ethyl) cysteine in hydrolyzed hemoglobin by gas chromatography-mass spectrometry. Anal Biochem 1986; 157: 241-248.

Baker HJ, Lindsey JR, Weibroth SH. The laboratory rat. 1st ed, Orland, Florida: Academic Press Inc 1980, 39-41.

Baselt RC. Biological monitoring methods for industrial chemical. Davis, California: Biomedical Publications 1997, 43-44.

Bryant MS, Skipper PL, Tannenbaum SR, Maclure M. Hemoglobin adducts of 4-aminobiphenyl in smokers and nonsmokers. Cancer Res 1987; 44: 601-608.

Bulbulyan MA, Figgs LW, Zahm SH, Savitskaya T, Goldfarb A, Astashevsky

- G, Zaridze D. Cancer incidence and mortality among beta-naphthylamine and benzidine dye workers in Moscow. *Int J Epidemiol* 1995; 24(2): 266-275.
- Corcos L, Marc N, Wein S, Fautrel A, Guillouzo A, Pineau T. Phenobarbital induces cytochrome P4501A2 hnRNA, mRNA and protein in the liver of C57BL/6J wild type and aryl hydrocarbon receptor knock-out mice. *FEBS Letters* 1998; 425: 293-297.
- Hein DW. Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1988; 948: 37-66.
- Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Kevin Gray, Deitz AC, Yi F, Wen J, Rustan TD, Satran SL, Wilkie TR. Rodent models of human acetylation polymorphism: Comparisons of recombinant acetyltransferases. *Mutat Res* 1997; 376: 101-106.
- Hsu FF, Lakshmi V, Rothman N, Bhatnager VK, Hayes RB, Kashyap R, Parikh DJ, Turk J, Zenser T, Davis B. Determination of benzidine, N-acetylbenzidine, and N,N'-diacetylbenzidine in human urine by capillary gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 1996; 234: 183-189.
- Lakshmi VM, Bell DA, Watson MA, Zenser TV, Davis BB. N-acetylbenzidine and N,N'-diacetylbenzidine formation by rat and human liver slices exposed to benzidine. *Carcinogenesis* 1995a; 16(7): 1565-1571.
- Lakshmi VM, Zenser TV, Goldman HD, Spencer GG, Gupta RC, Hsu FF, Davis BB. The role of acetylation in benzidine metabolism and DNA adduct formation in dog and rat liver. *Chem Res Toxicol* 1995b; 8: 711-720.
- Lakshmi VM, Zenser TV, Davis BB. Rat liver cytochrome P450 metabolism of N-acetylbenzidine and N,N'-diacetylbenzidine. *Am Soci Pharmacol Experi Thera* 1997; 25(4): 481-488.
- Lang NP. Acetylation as an indicator of risk. *Environ Health Persp* 1997 June; 105(4): 763-766.
- Neumann HG, Birner G, Kowallik P, Schutze D, Zwirner-Baier Hemoglobin adducts of N-substituted aryl compounds in exposure control and risk assessment. *Environ Health Persp* 1993; 99: 65-69.
- NIOSH. Guidelines for Air Sampling and Analytical Method Development and Evaluation: Cincinnati: Ohio, 1995; 65-66.
- NIH. Institute of Laboratory Animal Resource. Guide for the care and use of laboratory animals: 7th ed. National Academy Press, 1996.
- Osterman-Golkar S, Hultmark D, Segerback D, Calleman CJ, Gothe R, Ehrenberg L, Wachtmeister CA. Alkylation of DNA and protein in mice exposed to vinyl chloride. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 7: 259-266.
- Osterman-Golkar S, Bailey E, Farmer PB, Gorf SM, Rickard J. Monitoring exposure to propylene oxide through the determination of hemoglobin alkylation. *Scand J Work Environ Health* 1984; 10: 99-102.
- Pereira MA. Hemoglobin binding as a dose monitor for human exposure to carcinogens and mutagens. In: Que Hee SS, editor. *Biological monitoring: An introduction*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993: 332-338.
- Poirier MC, Santella RM, Weston A. Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 353-359.
- Que Hee SS, editor. *Biological monitoring: An introduction*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993.
- Riffelmann M, Muller G, Schmieding W, Popp W, Norporth K. Biomonitoring of urinary aromatic amines and arylamine hemoglobin adducts in exposed workers and nonexposed control persons. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 68: 36-43.
- Sepai O, Henschler D, Sabbioni G. Albumin adducts, hemoglobin adducts and urinary metabolites in workers exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Carcinogenesis* 1995; 16(10): 2583-2587.
- Sorsa M, Peltonen K, Anderson D, Demopoulos NA, Neumann HG, Osterman-Golkar S. Assessment of environmental and occupational exposures to butadiene as a model for risk estimation of petrochemical emissions. *Mutagenesis* 1996; 11(1): 9-17.
- Stillwell WG, Kidd LCR, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Sinha R. Urinary excretion of unmetabolized and phase II conjugates of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline in humans: relationship to cytochrome P4501A2 and n-acetyltransferase activity. *Cancer Res* 1997; 3457-3464.
- Svensson CK, Ware JA. Effect of solvents on rat liver cytosolic acetyl CoA: arylamine N-acetyltransferase activity in vitro. *Res Com Chem Path Pharmacol* 1993; 79(1): 21-124.
- Tornquist M, Osterman-Golkar S, Kautiainen A, Jensen S, Farmer PB, Ehrenberg L. Tissue doses of ethylene oxide in cigarette smokers determination from adduct levels in hemoglobin. *Carcinogenesis* 1986; 7: 1519-1521.
- Van Duuren BL. Carcinogenicity of hair dye components. *J Environ Pathol Toxicol* 1980; 3(4): 237-251.
- Verschuere K. *Handbook of Environmental Data of Organic Chemicals*. 2nd ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1983: 619.
- Weston A, Rowe ML, Manchester DK, Farmer PB, Mann DL, Harris CC.

- Fluorescence and mass spectral evidence for the formation of benzo(a) pyrene anti-diol-epoxide-DNA and hemoglobin adducts in human. *Carcinogenesis* 1989; 10: 251-257.
- Windmill KF, McKimmon RA, Zhu X, Gaedigk A, Grant DM, McManus ME. The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies. *Mutat Res* 1997; 376: 153-160.
- Zwirner-Baier I, Neumann HG. Biomonitoring of aromatic amines V: Acetylation and deacetylation in the metabolic activation of aromatic amines as determined by hemoglobin binding. *Arch Toxicol* 1998; 72: 499-504.