

연구자료
센터96

방향족 유기용제의 상호작용 및
대사에 관한 연구
(Benzene, Toluene, Xylene)

1 9 9 6

한국산업안전공단
산업보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 연구 결과를 1996년도 산업보건연구원의 연구사업중 “방향족 유기 용제의 상호작용 및 대사에 관한 연구”에 대한 최종 결과 보고서로 제출합니다.

이 연구보고서에 수록된 내용은 연구자 개인의 의견
이며 본 연구원의 공식견해가 아님을 밝혀 드립니다.

1996년 12월 31일

제출자 : 산업보건연구원장 문 영 한

연구책임자 : 책임연구원 김 기 응

공동연구자 : 원 장 문 영 한

위촉연구원 박 상 신

연구원 김 태 균

연구원 손 남 석

정 효 석

목 차

- Abstract -	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 재료	6
2. 실험군	6
3. 간 Microsomes 분획의 분리	7
4. 간장의 microsomal 단백질 및 P-450 정량	8
5. P-450 dependent monooxygenase 활성도 측정	8
6. Western Blot 분석	9
7. 요중 대사산물의 배설량 측정	10
8. 자료처리	10
III. 결 과	11
1. Microsomal P-450 함량 변화	11
2. P-450 의존성 reductase의 활성도	13
3. Cytochrome P-450 의존성 monooxygenase 활성도 변화	15
4. 단일세포성 항체를 이용한 면역생화학적 분석	19
5. Benzene, toluene, xylene의 상호작용에 의한 뇨중 대사산물의 배설량	22
IV. 고 찰	26
V. 요약 및 결론	32
VI. 참고문헌	34

A study on the metabolism of aromatic organic solvents and their interaction

(Benzene, Toluene and Xylene)

Ki-Woong Kim, Young Hahn Moon and Sang Shin Park

Occupational Disease Diagnosis and Research Center

Industrial Health Research Institute

Korea Industrial Safety Corporation

34-6, Kusan-Dong, Pupyong-Ku

Incheon 403-120, Korea

- Abstract -

We studied the effects of a single, combined and mixed exposure of benzene, toluene and xylene on P-450-mediated metabolizing capacity, and the activities, other related enzymes and the excretion of their metabolites.

1. The contents of cytochrome P-450 and b_5 in liver microsomes derived from treated groups were slightly higher than those from the control group: The increases of P-450 contents were prominent in B3, TX and mixed groups (M)($p<0.05$) and that of b_5 contents were also prominent B1, X3, TX and M groups ($p<0.05$).

2. The activities of NADPH-P-450 reductase in liver microsomes derived from treated groups were increased: The activity of TX group was prominent.

The activity of NADH b_5 reductase showed same tendency as NADPH-P-450 reductase: The activities of B1, T2, BT and TX groups were prominent ($p<0.05$).

3. The prominent increase of EROD activity was observed with single treatment of B, T, X ($p < 0.05$), but not the with combined and mixed treatment. Also the prominent increase of PROD activities were observed with the treatments except BT and TX groups ($p < 0.05$).

4. Western blotting with monoclonal antibodies against P4502B1/2 isozymes showed the presence of cytochrome P4502B1 in liver microsomes from rats treated with xylene and T3, and color densities of bands were correlated with the injected xylene amounts. The color density against P4502E1 were slightly increased in benzene, T1 and T2 groups compared with xylene treated groups.

5. The amounts of urinary metabolites of the organic solvents by single treatments were significantly higher than those by combined and mixed treatment ($p < 0.01$).

These results suggested that P4502E1 isozyme might be responsible for the metabolism of benzene and toluene, and P4502B1 isozyme is for xylene. We also found that P-4502B1 was inducible by xylene. When we compared the results of single treatments with those of combinatory and mixture treatments for the activities of P-450 dependent monooxygenase, the activities were reduced in the groups of combined and mixed treatments. Therefore, there must be some interactions of the organic solvents in inductions of P4502E1 and P4502B1 and in their action in the metabolism.

Key Words: Benzene, Toluene, Xylene, CYP2B1/2, CYP2E1/2, CYP1A1/2, Cytochrome P-450 dependent monooxygenase, Metabolites

Abbreviation: B, benzene; T, toluene; X, xylene; BT, benzene+toluene; BX, benzene+xylene; TX, toluene+xylene; M, benzene+toluene+xylene

I. 서 론

하나의 고리를 가진 방향족탄화수소 (monocyclic aromatic hydrocarbons, MAH)계 유기용제는 지방질 및 수지류에 대한 뛰어난 용해성을 가지고 있어서 이들 물질은 페인트, 플라스틱, 고무제조, 세정제 및 희석제 등으로 산업체 전반에 걸쳐서 널리 사용되고 있다 (Arlie-Soborg, 1992). 따라서 이들 물질에 대한 대사, 독성현상 및 용량-반응에 관련한 대사산물 분석등에 대한 많은 연구가 사람과 동물을 대상으로 수행되고 있으나 (Rosa 등, 1987; Sabourin 등, 1989; Moretto와 Lotti, 1990; Baelum 등, 1993) 대부분의 연구는 MAH계 유기용제의 단일물질 폭로에 대한 연구들이다.

그러므로 본 연구는 MAH계 유기용제의 대표적인 물질인 benzene, toluene 과 xylene 을 대상으로 Sprague Dawley계 흰쥐를 이용하여 단일, 병합 및 혼합된 형태로 폭로시킨 후, 간장에서 이들 유기용제를 해독대사 시키는 효소의 활성도와 효중으로 배설되는 대사산물의 배설량등을 분석하여 폭로형태에 따르는 영향 및 상호작용을 단일세포 항체 (monoclonal antibodies)를 이용하여 생화학 및 분자생물학적인 측면에서의 규명을 시도하였다.

Benzene (Parke와 Williams, 1953), toluene (Cohr와 Stockholm, 1979) 및 xylene (Ogata 등, 1970) 등의 대사가전이 밝혀지면서, 이들 MAH계 유기용제의 대사에 있어서 cytochrome P-450 (P-450)이 대사과정의 맨 처음 단계에 관여하여 benzene은 benzene epoxid, toluene과 xylene은 benzene ring에 붙어있는 methyl기를 수산화반응을 통해 수용성으로 변형을 시키고, 이들 변형된 중간체는 phase II 효소에 의하여 배설되는 것으로 알려졌다 (Parke와 Williams, 1953; Cohr와 Stockholm, 1979).

이들 유기용제의 전반적인 대사과정에서 대사의 특이성을 결정하는 단계는 phase II 효소와 conjugation되는 단계에서 보다 phase I 효소에 의해서 1차 생물학적인 변형이 이루어지는 단계이다. 또한 P-450은 MAH계 유기용제 뿐만 아니라 약물, 환경오염물질 등 이물질 (xenobiotics)의 대사에 관여하여 흡수된 본래의 물질 보다 극성과 활성이

큰 물질로 대사변형시켜 해독대사 시키는 반면, 일부는 활성화되어 독성을 유발하기도 한다. P-450은 함량에 따른 정도의 차이는 있으나 체내의 전반적인 기관에 분포하고 있으며, 특히 세포질 망상조직의 망상체 (microsomes)에 cytochrome b₅ 및 reductase와 함께 single polypeptide의 heme 단백질로 존재하는 독특한 단백질이다 (박기현, 1986). 또한 P-450은 exogeneous substances 뿐만 아니라 생체내 구성물질인 지방산, 스테로이드 및 prostaglandine과 같은 endogeneous substances 등에도 작용을 한다 (Cockerham 과 Shane, 1994).

그러므로 많은 연구자들이 P-450에 의한 유기용제 (김 등, 1994; Lewis, 1995; Osawa 등, 1995) 및 특정화학물질 (Sabzevari 등, 1995; Lewis 등, 1995; Mannering과 Shoeman, 1996)의 대사기전과 관련하여 발암유발기전 (Uematsu 등, 1994; Tefre 등, 1994; Yue 등, 1994; Rajasenan 등, 1995; Stroop 등, 1996)을 밝히고 있다.

Arinc 등 (1991)은 P-450과 관련하여 토끼를 이용하여 benzene에 대한 급성독성 실험을 연구 하였는데, 3일 동안 연속하여 benzene 880 mg/kg을 피하주사한 후 간장과 신장에 있어서 P-450의 함량을 측정한 결과, benzene의 투여로 인하여 간장과 신장에 있어서 P-450의 함량 변화를 관찰할 수 없었다고 보고하였다. 그러나 Pyykko (1983)는 toluene 2,000 ppm을 흰쥐에 폭로시킨 후 간장에서 P-450의 함량이 증가 되었다고 보고하였으며, Toftgard와 Nilsen (1982)은 xylene과 xylene 혼합물 (o-, m-, p-xylene), ethylbenzene을 각각 2,000 ppm 농도로 3일 동안 폭로시킨 흰쥐의 간장에 있어서 P-450의 함량이 증가되는 것을 관찰하였다고 보고 하였다.

Pathiratne 등 (1986)도 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐에 benzene, toluene, xylene을 3일 동안 연속해서 투여하면 간장에 있어서 microsomal cytochrome P-450의 함량이 증가하였으나 benzene 투여군에서는 통계학적인 유의한 증가가 없었으며, benzene < toluene < xylene 순으로 P-450의 함량이 증가하였다고 보고하였다. Nakajima 등 (1992)은 Male Wistar 흰쥐를 이용하여 P-450 monoclonal antibodies에 의한 inhibition 연구를 한 결과, benzene의 대사에 있어서 P450IIIc 형태의 isozyme이 관여한다고 보고 하였다. 어떤 특정한 물질에 대한 대사기전 및 독성평가는 실험동물을 이용하여 단일

물질에 대한 용량-반응 및 pharmacokinetic 연구를 수행하여 전반적인 평가가 이루어지고, 그 결과를 바탕으로 하여 사람에 대하여 역학조사, 폭로농도 측정 및 대사산물의 농도등에 대한 연구를 통하여 인체의 유해정도를 평가하게 된다. 그러나 생명체를 대상으로한 연구는 매우 복잡하여 특정한 부분에 국한된 일반적인 독성 연구결과를 가지고 평가하여 결론을 내리는 것은 대단히 어려운 일이다. 또한 사람이 환경으로 부터 폭로되는 유기용제, 특정화학물질 및 환경오염물질은 단일물질에 의한 폭로 보다는 대부분 혼합된 형태로 폭로되고 있다. 따라서 많은 연구자들은 혼합된 형태의 폭로에 따른 대사기전 및 독성발현 등에 관한 연구를 수행하고 있는데 일부 특정한 물질들에 대한 연구가 대부분이다 (Ikeda, 1974; Sato와 Nakajima, 1979; Okino 등, 1991). 또한 benzene, toluene, xylene 대사에 있어서 대사의 특이성을 결정하는 것은 phase I enzyme인 P-450이 관여한다는 연구보고는 있으나 이들 유기용제의 대사에 어떠한 형태의 P-450 isozymes이 관여 하는지에 대해서는 아직까지 확실히 밝혀지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 이들 유기용제를 단일, 병합 및 혼합된 형태로 폭로시킨 후 어떤 형태의 P-450 isozymes이 유도 (induction) 되는지를 확인하기 위하여 P4501A1/2, P4502B1/2 및 P4502E1/2에 대한 단일항체를 이용하여 확인하고자 하였다. 이들 isozymes의 유도가 폭로물질에 따라서 어떠한 유도의 차이를 거저오며 대사산물의 배설량에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하였다. 따라서 본 연구의 목적은 동물실험 결과를 통하여 이들 유기용제에 의하여 유도되는 특정한 isozymes의 형태를 파악한 후 이들 유기용제에 폭로되는 근로자들의 혈액세포에서도 이들 cytochrome P-450의 isozymes이 유도되는지를 확인하고, 이와같은 특정한 효소의 발현을 이용하여 유기용제 폭로에 따르는 사람에 있어서의 생물학적인 영향의 평가에 있어서 새로운 Bio-marker로서 활용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

Bovine serum albumin (BSA), 7-ethoxyresorufin, pentoxyresorufin, cytochrome C, NADH, NADPH, sucrose, NaCl, glycerol, BCIP/NBT solution, TEMED, $MgCl_2$, KCl, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase 등은 Sigma 사 (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였으며, 투여물질인 benzene, toluene, xylene은 Aldrich 사 (Milwaukee, WI, USA)로 부터 구입하여 사용하였다. 그 밖의 일반적인 생화학 시약도 Aldrich사와 Sigma사로 부터 구입하여 사용하였다. 실험동물은 한국화학연구소 안전성센터로 부터 분양받은 Sprague Dawley계 6 주령된 수컷흰쥐 (180 ± 10 g)를 사용하였으며, 실험 2 주일전 부터 온도 ($23 \pm 2^\circ C$), 습도 ($55 \pm 5\%$) 및 채광조절 (12 hrs light/dark)된 사육장에서 사료와 음용수를 자유로이 섭취시켰다.

2. 실험군

실험군은 크게 대조군과 투여군으로 분류하였다 (Table 1).

투여군은 폭로형태에 따라서 단일, 병합 및 혼합 투여군으로 분류하였다. 단일 투여군의 경우는 benzene (B), toluene (T)과 xylene (X) 투여군으로 세분하여 각각 0.5, 1.0, 1.5 mole/kg으로 투여하였고 (9개군), 병합 투여군은 B+T (BT), B+X (BX), T+X (TX)군 3개군과 B+T+X (M)를 혼합 투여한 군 (1 개군)으로 하여 총 14군으로 하였다. 병합 및 혼합 투여군은 1.0 mole/kg 등몰 (equimolar)로 혼합하여 투여하였다. 각각의 유기용제는 olive oil에 용해시켜 1일 1회씩 3일간 연속하여 복강주사 하였으며, 각각의 실험군은 4마리로 하였다.

3. 간 Microsomes 분획의 분리

실험동물은 chamber 내에서 CO₂ gas로 혼절시킨 다음 즉시 간을 절제하여 0.9% sodium chloride 용액으로 혈액을 씻어내고, 응고된 혈액 및 지방질을 제거한 간을 0.25 M sucrose 용액으로 균질화한 다음, 차등원심분리 (12,000 xg에서 40분, 105,000 xg에서 60분) 하여 0.15 M KCl로 씻어낸 후 침전물을 0.25 M sucrose로 resuspension 하여 (Park과 Kim, 1984) 단백질 정량과 cytochrome P-450 dependent monooxygenase 활성도 및 Western blot등 각종 실험에 사용하였다. 모든 실험은 0-4℃에서 수행하였고 분리된 microsomal 단백질의 변성을 방지하기 위하여 - 80℃에서 보관하였다.

Table 1. Classification of experimental groups and doses of aromatic organic solvents administered

Groups	Animals (n)	Doses (mole/kg)	Remark
Control (C)	4		
Benzene (B1)	4	0.5 mole/kg	Single treatment
Benzene (B2)	4	1.0 mole/kg	
Benzene (B3)	4	1.5 mole/kg	
Toluene (T1)	4	0.5 mole/kg	
Toluene (T2)	4	1.0 mole/kg	
Toluene (T3)	4	1.5 mole/kg	
Xylene (X1)	4	0.5 mole/kg	
Xylene (X2)	4	1.0 mole/kg	
Xylene (X3)	4	1.5 mole/kg	
B2+T2 (BT)	4	1.0 mole/kg (equimolar)	Combined treatment
B2+X2 (BX)	4	1.0 mole/kg (equimolar)	
T2+X2 (TX)	4	1.0 mole/kg (equimolar)	
B2+T2+X2 (M)	4	1.0 mole/kg (equimolar)	Mixed treatment

4. 간장의 microsomal 단백질 및 P-450 정량

Microsomal 단백질의 농도는 BSA를 표준물질로 하여 Lowry 등 (1951)의 방법으로 정량하였다. P-450의 함량은 Omura와 Sato 방법 (1964)에 따라서 일산화탄소를 microsomes에 bubbling 시킨 후 450nm와 490 nm에서 흡광도 차이를 측정하여 몰흡광계수 $91 \text{ mM}^{-1}\text{Cm}^{-1}$ 로 부터 함량을 결정하였다.

5. P-450 dependent monooxygenase 활성도 측정

1) NADPH-cytochrome C (P-450) reductase와 NADH-cytochrome b_5 reductase 측정

NADPH-P-450 reductase의 활성도는 Master 등 (1967)의 방법으로 측정하였다. 반응 혼합물로 microsomes (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 0.3 nmol potassium phosphate buffer (pH 7.7), 40 nmol cytochrome C를 혼합한 후 0.1 nmol NADPH를 넣고 550 nm 에서 3 분 동안 흡광도를 측정하여 몰 흡광계수 $21 \text{ mM}^{-1}\text{Cm}^{-1}$ 를 이용하여 reductase 활성도를 측정하였다.

Cytochrome C를 전자수용체로 하는 NADH-cytochrome b_5 reductase의 활성도는 Hultquist (1978) 방법에 의해서 측정하였다. 반응 혼합물로 35 nmole cytochrome C, 1.0 M EDTA, 100 μmol Tris-HCl과 microsomes 25 μg 를 혼합한 후 60 nmol NADH를 넣고 550 nm에서 3 분동안 흡광도를 측정하여 몰 흡광계수 $21 \text{ mM}^{-1}\text{Cm}^{-1}$ 를 이용하여 reductase 활성도를 측정하였다.

2) Catalytic Enzymes 활성도 측정

기질의 종류에 따라서 P-450 동위효소의 활성도가 특이성을 보이는데, P4501A는 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)에 대해서, P4502B는 pentoxyresorufin-O-deethylase (PROD)와 P4502E는 p-nitrophenol hydroxylase (PNPH)에 대하여 선택적인 활성을 나타낸다.

(1) EROD와 PROD의 활성화 측정

EROD와 PROD의 활성화도는 Klotz 등의 방법 (1984)에 따라서 기질의 종류를 달리하여, EROD는 ethoxyresorufin을 PROD는 pentoxyresorufin을 각각 기질로 사용하여 측정하였다. 반응 혼합물은 microsomes (3 mg/ml) 100 μ l와 0.1 M tris-HCl (pH 7.4) 705 μ l, 100 μ M ethoxyresorufin 20 μ l (PROD의 경우는 2 mM pentoxyresorufin 20 μ l), 100 mM $MgCl_2$, 2.0 M KCl, G-6-PD (40 U/ml), 60 mM G-6-P 및 NADP를 각각 25 μ l 씩 혼합하고 10 mM NADPH 50 μ l를 첨가하여 최종부피를 1 ml로 하여 진탕 혼합 하였다. 그리고 37°C에서 10 분간 항온반응 시키고 나서 2.5 ml 메탄올을 첨가하고 700 xg에서 5 분간 원심분리 하였다. 상층액을 취하여 575 nm에서 흡광도를 측정하여 몰 흡광계수 40 mM⁻¹Cm⁻¹를 이용하여 정량화 하였다.

(2) PNP의 활성화도

PNPH의 활성화도는 Koop (1986) 방법에 의해서 p-nitrophenol이 간장의 microsomes에 의해서 생성되는 4-nitrocatechol 양을 측정하여 상대적인 효소의 활성도를 측정 하였다. 반응 혼합물은 microsomes (3 mg/ml) 50 μ l와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 850 μ l, 1 mM NADPH, 100 μ M p-nitrophenol 100 μ l를 혼합하여 37°C에서 30 분간 항온반응한 후 0.6 N perchloric acid 0.5 ml 를 첨가하여 진탕혼합하고 원심분리 (3,000 rpm에서 10 분동안) 하였다. 상층액을 취하여 10 N NaOH 100 μ l를 넣고 실온에서 10 분간 반응시킨 후 512 nm에서 흡광도를 측정하여 몰 흡광계수를 이용하여 효소의 활성도를 측정하였다.

6. Western Blot 분석

Ko 등 (1987)의 방법에 따라서 Western Blot 분석을 하였다.

Microsomal 단백질에 대한 전기영동은 Laemmli (1970) 방법에 의해서 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE, 8.5%)을 이용하여 실시한 후, Millipore사 (Bedford, MA, USA)의 Immobilon-P nitrocellulose membrane을

microsomal 단백질이 분리된 gel 위에 올려 놓고 235 mA로 전류를 조절하여 Immobilon-P nitrocellulose membrane 으로 이전 시켰다. Immobilon-P nitrocellulose membrane에 단백질이 이전되지 않은 부분은 skim milk로 2 시간 동안 실온에서 반응 시켰으며, 이어서 그 membrane을 10 mM PBS buffer로 씻고, P4501A1/2, P4502B1/2, P4502E1/2 동위효소에 대한 단일항체를 10mM PBS buffer로 500 µg/ml로 희석시켜 (Park 등,1982; Park 등,1983; Ko 등, 1987) 실온에서 12 시간 반응 시킨 후 10 mM PBS와 0.05% Tween으로 세척하였다. 제2차 항체의 반응은 alkaline phosphatase가 conjugation된 goat antimouse antibody를 5% goat serum으로 희석한 (1:1,000) 다음, 용액으로 실온에서 1 시간 동안 반응시키고 10 mM PBS와 0.05% Tween 그리고 PBS buffer로 세척한 다음 BCIP/NBT 용액으로 발색시켜 전개된 반응띠를 확인 하였다.

7. 요중 대사산물의 배설량 측정

Benzene의 요중 대사산물인 phenol 량은 Baselt 방법 (1980)으로 배설량을 측정하였고, toluene과 xylene의 대사산물인 마뇨산 (hippuric acid) 과 메틸마뇨산 (methyl hippuric acid)은 Ogata 등 (1977)의 방법에 따라서 측정하였다.

8. 자료처리

실험 결과에 대한 자료는 개인용 컴퓨터를 이용하여 입력한 후 SAS 통계 프로그램을 이용하여 t-test, ANOVA등의 방법으로 자료를 분석 하였다.

III. 결 과

1. Microsomal P-450 함량 변화

실험 대상으로 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 이용하여 이물질로 benzene, toluene, xylene을 단일, 병합 및 혼합 처리한 후 간장의 microsomes에 있어서 P-450과 b₅의 함량 변화에 대한 측정결과는 Table 2에 표시한 바와 같다.

Benzen, toluene, xylene을 투여한 후 간장의 microsomal P-450의 총함량을 측정하여 대조군의 측정치 (0.524 nmole/mg) 와 비교시 단일 투여군과 병합 투여군에 있어서 B2, T3, X1 및 BT군에서만 비슷하거나 다소 감소된 함량의 측정치를 보였으며, 기타의 투여군에서는 증가를 보였다. 그러나 B3군 (0.638 nmole/mg), TX군 (0.723 nmole/mg)과 혼합 투여군 (0.825 nmole/mg) 에서만 통계학적으로 유의한 증가를 보였으며 ($p<0.05$), 투여물질의 종류 및 투여 농도량에 따른 P-450의 총함량 변화는 병합 투여군인 TX군과 혼합 투여군 (M)에서 단일 투여한 군 보다 총함량이 증가된 것을 관찰할 수 있었을 뿐 기타의 투여군에서는 변화가 나타나지 않았다.

Cytochrome b₅ 함량의 측정 결과 (Table 2)는 P-450의 총함량과 비슷한 경향을 보였다. 대조군의 경우는 0.144 nmole/mg 으로 측정 되었으며, BX 군 (0.135 nmole/mg) 을 제외한 모든 투여군에서 b₅의 총함량이 증가된 측정치를 보였으나 B1 (0.177 nmole/mg), X3 (0.212 nmole/mg), TX (0.340 nmole/mg) 및 혼합 투여군 (M) (0.295 nmole/mg) 에서 통계학적으로 유의한 증가를 나타냈다 ($p<0.05$). 투여형태에 따른 b₅의 총함량을 보면 단일 투여군에서 보다 병합 및 혼합 투여군에 있어서의 총함량 증가를 관찰할 수 있었다.

Table 2. Effect of benzene, toluene and xylene on the contents of hepatic proteins

Groups	Quantities of Protein	
	Cytochrome P-450 (nmole/mg of protein)	Cytochrome b ₅ (nmole/mg of protein)
Control	0.524 ±0.0170	0.144 ±0.0064
B1	0.694 ±0.0770	0.177* ±0.0085
B2	0.508 ±0.0212	0.146 ±0.0276
B3	0.638* ±0.0183	0.161 ±0.0424
T1	0.565 ±0.0127	0.171 ±0.0354
T2	0.677 ±0.0502	0.179 ±0.0106
T3	0.500 ±0.0171	0.141 ±0.0170
X1	0.518 ±0.0948	0.178 ±0.0191
X2	0.619 ±0.0643	0.179 ±0.0488
X3	0.601 ±0.0350	0.212* ±0.0085
BT	0.512 ±0.0368	0.188 ±0.0226
BX	0.567 ±0.0042	0.135 ±0.0085
TX	0.723* ±0.0060	0.340* ±0.0262
M	0.825* ±0.0297	0.295* ±0.0021

Values are expressed as mean±S.D from four animals.

*: Significantly different from control (p<0.05).

2. P-450 의존성 reductase의 활성도

P-450에 의해서 이물질들을 대사시키는 과정에 전자가 요구되는데 이때 전자를 전달하는 전자-전달계에 NADPH-P-450 reductase와 NADH b₅ reductase도 참여한다.

금번 실험에서 benzene, toluene, xylene을 투여한 후 NADPH-P-450 reductase의 활성도를 측정한 결과, 대조군에서는 0.0213 nmole/min/mg 으로 측정되었으며 단일, 병합 및 혼합 투여군에서의 활성도는 전부 대조군 보다 증가된 측정치를 보였다. 그러나 병합 투여군인 TX 군에서만 통계학적으로 유의한 증가를 나타냈다 (Fig. 1)($p < 0.05$).

Fig. 1. The effects of benzene, toluene and xylene treatment on the activity of hepatic microsomal NADPH-P-450 reductase. The bar represents the mean values of four rats. *: Significantly different from control ($p < 0.05$).

또한, NADH b₅ reductase의 활성도도 NADPH-P-450 reductase의 경우와 마찬가지로 대조군의 활성도 측정치 (0.442 nmole/min/mg) 보다 단일, 병합 및 혼합 투여군 모두에 있어서 증가된 활성도를 보였다. 그러나 통계학적으로 유의한 증가를 보인 실험군은 B1, T2, BT, TX 및 혼합 투여군이였다 (Fig. 2)(p<0.05).

Fig. 2. The effects of benzene, toluene and xylene treatment on the activity of hepatic microsomal NADH b₅ reductase. The bar represents the mean values of four rats. *: Significantly different from control (p<0.05).

3. Cytochrome P-450 의존성 monooxygenase 활성도 변화

1) EROD 활성도

Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) 처리에 의한 선택적인 유도는 P-450A1/2 형태의 동위효소의 유도로서 EROD의 활성도에 특이한 변화를 가져온다, 금번 연구에서 나타난 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3. Effect of benzene, toluene and xylene treatment on the activity of EROD.

The bar represents the mean values of four rats.

Upper letters (a,b,c,d,e,f,g): The same letters are not significantly different ($p < 0.05$).

대조군에 대한 EROD의 활성도는 0.175 pmol ethoxyresorufin/min/mg of microsomal protein 으로 측정이 되었으며, 유도물질로 benzene, toluene, xylene을 단일, 병합 및 혼합 투여한 군에 있어서의 EROD의 활성도는 대조군 보다 전부 증가된 측정치를 보였다. 그러나 병합 및 혼합투여한 실험군을 제외한 단일 투여군에서만 통계학적으로 유의한 증가를 보였고 ($p < 0.05$), 유도물질의 종류나 농도변화에 따른 차이는 관찰되지 않았다.

2) PROD의 활성도

PROD 활성도는 P-450B1/2 동위효소에 특이적인 선택성을 보이는데, 측정 결과는 Fig. 4에 나타내었다.

병합 투여군인 BT, BX, TX 군에서의 PROD 활성도는 0.339, 0.306, 0.369 pmol pentoxyresorufin/min/mg of microsomal protein 으로, 혼합 투여군(M)에서는 0.313 pmol/min/mg 으로 대조군인 0.405 pmol/min/mg 보다 감소된 측정치를 보였으나, BT와 M 군에서만 통계학적으로 유의한 감소를 보였으며 기타의 단일 투여군에서는 대조군 보다 측정치 전부 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.05$). 실험군 중 xylene 단일 투여군의 경우, 투여 농도의 증가에 따라서 비례적인 활성도의 증가가 뚜렷하였으며, toluene 투여군에서도 xylene 투여군과 비슷한 경향의 활성도의 증가를 볼 수 있었다.

3) PNPB 활성도

Ethanol과 acetone등에 의해서 선택적인 유도가 일어나는 P-450 2E1/2 형태의 동위효소는 주로 PNPB와 aniline p-hydroxylase (AH)의 활성도에 특이한 변화를 보이는데, 금번 연구에서는 PNPB의 활성도를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 5와 같다.

대조군에서는 PNPB의 활성도가 246.17 pmol 4-nitrocatechol/min/mg of protein 으

로 측정되었으며 기타의 단일, 병합 및 혼합 투여군에서의 PNPH 활성도는 대조군 보다 통계학적으로 유의한 증가를 보였다 ($p<0.05$).

Fig. 4. Effect of benzene, toluene and xylene treatment on the activity of PROD.

The bar represents the mean values of four rats.

Upper letters (a,b,c,d,e,f,g): The same letters are not significantly different ($p < 0.05$).

Fig. 5. Effect of benzene, toluene and xylene treatment on the activity of PNPH.

The bar represents the mean values of four rats.

Upper letters (a,b,c,d,e,f,g): The same letters are not significantly different ($p < 0.05$).

4. 단일세포성 항체를 이용한 면역생화학적 분석

1) 단일 투여군의 면역생화학적 분석

Benzene, toluene, xylene 등의 투여 농도를 0.5, 1.0 1.5 mole/kg 체중 으로 하여 3일 동안 연속하여 복강 주사한 간장의 microsomes을 이용하여 P4501A1/2, P4502B1/2 및 P4502E1/2의 유도를 monoclonal antibodies를 이용하여 분석하였다.

Fig. 6.에서 볼 수 있는 바와같이 xylene을 투여한 후 분리한 간장의 microsomes에 있어서는 P4502B1 단백질의 양이 현저히 증가하였으며, 투여량의 증가에 따라 유도된 단백질의 양도 비례하여 증가되는 것을 immunoblot에서 확인할 수 있었다. 또한 toluene을 1.5 mole/kg 체중 투여한 군에서도 P4502B1 형태의 동위효소가 유도되는 것을 확인할 수 있었다. Benzene과 toluene 0.5, 1.0 mole/kg 투여군에서는 P4502E1/2 단백질량이 기타의 투여군 보다 다소 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 7). 그러나 benzene, toluene, xylene의 단일, 병합 및 혼합 투여군 모두에 있어서 P4501A1/2 단백질을 확인할 수 없었다.

2) 병합 및 혼합 투여군의 면역생화학적 분석

Benzene, toluene, xylene을 단일 투여하여 P-450의 특정한 동위효소의 유도를 단일 세포성항체를 이용하여 확인한 후 그 실험결과를 바탕으로 하여 병합 및 혼합된 형태

의 투여군에서 어떤 변화가 있는지를 관찰 하였다. 먼저, P4502B1 동위효소는 대조군 보다 BX, TX 및 혼합 투여군 (M)에서 단백질의 양이 증가된 것을 관찰하였으며, 특히 혼합 투여군에서는 기타의 실험군 보다 유도가 현저히 증가된 것을 확인하였다 (Fig.6).

P4502E1 동위효소는 BX 군과 M 군에서 단백질의 양이 증가된 것을 확인 하였다 (Fig.7).

a)

MW C B1 B2 B3 T1 T2 T3 X1 X2 X3 PB MW TX BT

b)

MW C BT BX TX M PB

Fig. 6. Western immunoblot analysis for microsomes of rats treated with benzene, toluene and xylene utilizing mouse monoclonal anti-rat P4502B1/2 antibodies. Liver microsomes (100 µg) were loaded for the groups: control, benzene, toluene and xylene treatment (injected intraperitoneally once a day for three days, killed 24 hrs after the last injection). C, Control; B1, benzene 0.5 M/kg; B2, benzene 1.0 M/ kg; B3, benzene 1.5 M/kg; T1, toluene 0.5 M/kg; T2, toluene 1.0 M/kg; T3, toluene 1.5 M/kg; X1, xylene 0.5 M/kg; X2, xylene 1.0 M/kg; X3, xylene 1.5 M/kg; BT, B2+T2; BX, B2+X2; M, B2+T2+X2. a) Single treatment, b) Combinatory treatment.

a)

C B1 B2 B3 T1 T2 T3 X1 X2 X3 BT TX E

b)

MW C BT BX TX M E

Fig. 7. Western immunoblot analysis for microsomes of rats treated with benzene, toluene and xylene utilizing mouse monoclonal anti-rat P450III_E1/2 antibodies. Liver microsomes (100 µg) were loaded for the groups: control, benzene, toluene and xylene treatment (injected intraperitoneally once a day for three days, killed 24 hrs after the last injection). C, Control; B1, benzene 0.5 M/kg; B2, benzene 1.0 M/kg; B3, benzene 1.5 M/kg; T1, toluene 0.5 M/kg; T2, toluene 1.0 M/kg; T3, toluene 1.5 M/kg; X1, xylene 0.5 M/kg; X2, xylene 1.0 M/kg; X3, xylene 1.5 M/kg; BT, B2+T2; BX, B2+X2; M, B2+T2+X2. a) Single treatment, b) Combinatory treatment.

5. Benzene, toluene, xylene의 상호작용에 의한 뇨중 대사산물의 배설량

이물질이 체내에 흡입되면 대부분의 경우 이물질 대사효소의 작용에 의해서 연속적인 대사과정을 거쳐서 변형된 형태의 물질로 체외로 배설되지만 일부는 본래의 물질 그대로 배설되기도 한다. Benzene은 phenol로, toluene은 마노산, xylene은 메틸마노산으로 변형되어 뇨중으로 배설된다.

Fig. 8. Concentration of urinary phenol after benzene administration.

The bar represents the mean values of four rats (C, control; B, benzene; BT, benzene+toluene; BX, benzene+xylene; M, benzene+toluene+xylene).

** : Significantly different from B ($p < 0.01$)

Benzene을 단일, 병합 및 혼합된 형태로 투여한 후 대사산물인 phenol의 뇨중 배설량을 비교한 결과, benzene을 투여하지 않은 대조군의 뇨중 phenol량은 7.93 g/g creatinine이었으나 benzene 단일 투여군에서는 32.51 g/g creatinine, 병합 투여군인 BT, BX 군에서는 25.42 및 28.71 g/g creatinine으로 단일 투여군 보다 각각 22%와 12%가 감소된 측정치를 보였다. 혼합 투여군에서는 뇨중 phenol의 배설량이 18.95 g/g creatinine으로 약 42% 정도가 감소된 측정치를 보였다 (Fig. 9).

Toluene 투여군의 경우, toluene을 단일 투여한 군의 뇨중 hippuric acid의 배설량은 3.26 g/g creatinine이었으나 병합 투여군인 BT, TX 투여군에서는 각각 2.56 및 2.95 g/g creatinine 으로 약 11% 정도가 감소된 측정치를 보였으며, 혼합 투여군에서는 50% 정도가 감소된 배설량 (1.51 g/g creatinine)을 보였으며, BT 군과 M 군에서의 대사산물의 배설량은 toluene 단일 투여군 보다 통계학적으로 유의하게 감소된 배설량을 보였다 (Fig. 10)($p < 0.01$).

Xylene을 단일, 병합 및 혼합 투여한 후 뇨중 대사산물인 methyl hippuric acid의 배

설량을 단일, 병합 및 혼합 투여군에서 측정한 결과, xylene을 투여하지 않은 군에서는 뇨중 methyl hippuric acid가 측정되지 않았다 (Fig. 11). Xylene을 단일 투여한 군에서의 methyl hippuric acid의 배설량은 1.62 g/g creatinine이었고 병합 투여군인 BX, TX 투여군에서는 0.95 및 0.93 g/g creatinine, 혼합 투여군에서는 0.76 g/g creatinine이었다. 이들 배설량의 감소는 통계학적으로 유의하였으며 ($p < 0.05$), 대체적으로 약 40-53% 정도의 methyl hippuric acid가 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

Fig. 9. Concentration of urinary hippuric acid after the treated with toluene.

The bar represents the mean values for the four rats (C, control; T, toluene; BT, benzene+toluene; TX, toluene+xylene; M, benzene+toluene+xylene).

** : Significantly different from T ($p < 0.01$)

Fig. 10. Concentration of urinary methyl hippuric acid after xylene administration.
The bar represents the mean values for the four rats (C, control; X, xylene; BX, benzene+xylene; TX, toluene+xylene; M, benzene+toluene+xylene).

** : Significantly different from X ($p < 0.01$)

IV. 고 찰

P-450은 hydroxylation, N-oxidation, sulfoxidation, peroxidation, deamination, dehalogenation 및 N-, O-, S-dealkylation 등의 다양한 반응을 촉매하여 alcohol, aliphatic, halogenated hydrocarbon, cyclic 화합물 및 keton체 등 많은 유기용제, 약물 및 환경오염물질등의 대사 (Powis,1975; Sato 등,1981; Koop 등,1985; Patten 등,1986; Ciaccio와 Halpert,1989; Sherson 등,1992; Hanioka 등,1995) 뿐만 아니라 생체내 구성 물질인 지방산, 스테로이드 및 prostaglandine 등의 대사에도 작용한다 (Lu 와 West, 1980). P-450의 발현은 종 (specise), 성별 (sex) 및 환경으로 부터 폭로되는 물질등의

영향에 따라서도 차이를 보여 사람, 동물 및 미생물등에 있어서 현재까지 밝혀진 P-450 superfamily의 종류는 수백종에 이른다 (Nelson 등, 1996). 그러나 많은 연구자들에 의해서 생체내 구성물질과 이물질 대사에 P-450이 관여한다는 것은 밝혀지고 있으나, 어떤 종류의 P-450 동위효소가 관여하는지에 대한 연구는 아직 미흡한 상태이며, 특히 환경으로 부터 폭로되는 유기용제에 대한 연구는 더욱 미흡하다 (Peng 등,1982; Patten 등,1986; Ko 등,1987; Guengerich 등,1991; Nakajima 등,1992; Hanioka 등,1995).

그러므로 본 연구에서는 산업체 및 실험실등에서 널리 사용되고 있는 benzene, toluene, xylene을 연구대상 유기용제로 하였다. 이들 유기용제의 대사시 P-450이 관여한다는 것은 이미 여러 연구자들에 의해서 보고 되었으나 (Park과 Williams,1953; Cohr와 Stockholm,1979; Ogata 등,1970) 어떤 형태의 P-450 동위효소가 관여하는지에 대해서는 아직까지 불명확하다. 따라서 본 연구에서는 P4501A1/2, P4502B1/2 및 P4502E1/2에 대한 monoclonal antibodies를 이용하여 이들 유기용제의 폭로에 따라서 어떤 형태의 동위효소가 유도되며, 병합 및 혼합된 형태로 폭로될 경우에는 이들 동위효소의 유도가 어떠한 변화를 보이는지와 폭로 형태에 따라서 요중으로 배설되는 대사산물의 배설량과 연관하여 이들 유기용제의 상호작용을 연구 하였다.

먼저, 유도물질 (inducer)로 benzen, toluene, xylene을 투여한 후 간장의 microsomal P-450의 총 함량을 대조군의 측정치와 비교한 결과, 단일 투여군과 병합 투여군인 B2, T3, X1 및 BT군에서만 비슷하거나 다소 감소된 함량의 측정치를 보였으며, 기타의 B1, B3, T1, T2, X2, X3, BX, TX 및 M 투여군에서는 증가를 보였다. 특히 TX 군과 혼합 투여군(M)에서는 P-450의 증가가 현저하였다 ($p<0.05$). 또한 cytochrome b₅에 대한 총함량 변화도 P-450의 총 함량과 비슷한 경향으로 측정 되었는데, B1 (0.177 nmole/mg), X3 (0.212 nmole/mg) TX (0.340 nmole/mg) 및 혼합 투여군 (0.295 nmole/mg) 에서의 증가는 현저하였다. 투여물질의 종류 및 투여 농도량에 따른 P-450과 b₅의 총 함량 변화는 TX군과 혼합 투여군 (M)을 제외한 다른 투여군에서는 나타나지 않았다. 본 실험과 다른 연구자의 연구결과와 비교시 투여 농도의 차이는 있으나

2,000 ppm의 toluene을 3일 동안 투여한 후 흰쥐 간장의 microsomes에 있어서 P-450의 총 함량 변화를 보고한 Pyykko 등 (1983)의 연구결과와 benzene, toluene, xylene을 연속하여 3일 동안 투여하고 간장의 microsomal P-450의 총 함량 변화를 관찰하여 보고한 Pathiratne 등 (1986)의 연구결과와 비슷한 현상을 보였다. 또한 본 결과와 김 등 (1995)이 이전에 보고한 연구결과와 비슷하였다. 이러한 결과는 P-450의 함량이 종(species), 폭로농도 및 체외로 부터 흡수되는 물질에 따라서 함량의 차이를 나타내기 때문에 보인다 (Nebert와 Gonzalez, 1987).

또한, NADPH-P-450 reductase의 활성도 변화를 보면, 대조군의 활성도 (0.0213 nmole/min/mg) 보다 유기용제 투여군 모두에 있어서 활성도의 증가가 관찰 되었으며, NADH b₅ reductase의 경우에도 NADPH-P-450 reductase와 비슷한 경향의 활성도 변화가 나타났다. 따라서 이물질이 체내로 흡수되면 이들을 대사시키기 위해서는 P-450에 의해서 1 차적인 산화-환원 작용이 일어나야 되며 그러기 위해서는 이들 두 종류의 reductase 참여가 필요한 것으로 생각된다.

이물질에 대한 해독대사 과정에서 P-450의 중요한 역할은 비극성 물질을 극성 물질로 전환 시켜 phase II 효소를 포함한 체내의 구성물질과 결합을 용이하게 하는 것이다. P4501A1/2 동위효소가 선택적인 특성을 갖는 기질은 여러개의 고리를 가진 방향족탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)계 물질로서 aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)와 EROD의 활성을 보이며 (Guengerich,1978; Lu와 West, 1980), P4502B1/2 형태의 동위효소는 PROD에 활성을 보인다 (Ryan 등,1979; Guengerich 등,1982). Ethanol과 acetone 등은 P4502E1/2 형태의 동위효소를 선택적으로 유도 시키며 이 동위효소에 특이적인 반응은 PNP와 AH 등에 활성을 나타낸다 (Peng 등,1982; Patten 등,1986; Ko 등,1987; Umeno 등,1988). 따라서 금번 연구에서는 단일고리 방향족 탄화수소계 (monocyclic hydrocarbon hydroxylase, MAH) 유기용제중 널리 사용되는 물질인 benzene, toluene, xylene을 단일, 병합 및 혼합 투여한 후 간장의 microsomes P-450 의존성 촉매효소중 EROD, PROD 및 PNP에 대한 활성도의 변화를 측정하였다.

먼저, EROD의 활성도 변화를 보면, benzene, toluene, xylene 투여군 모두에 있어서 투여하지 않은 대조군의 활성도 보다 증가된 것을 볼 수 있었다. 특히 단일 투여군에서의 증가는 현저하였다 ($p < 0.05$).

대조군과 투여군에 있어서 PROD의 활성도를 비교해 보면 병합 투여군인 BT와 TX 군을 제외한 모든 투여군에 있어서 PROD의 증가를 볼 수 있었다 ($p < 0.05$). 특히 xylene과 toluene 투여군에서의 활성도 증가가 현저하였으며, xylene의 경우는 투여농도에 따라서 비례적인 활성도의 증가를 나타냈다.

PNPH의 활성도 변화를 보면, 대조군의 활성도 (246.17 pmole/min/mg)와 투여군의 활성도를 비교할 때 모든 투여군에서 PNPH의 활성도 증가가 현저하였으며 ($p < 0.05$), benzene과 toluene 투여군에서의 증가가 xylene, 병합 및 혼합 투여군에서의 증가 보다 다소 증가되었음을 볼 수 있었다.

이상의 결과에서 보여 주었듯이 투여물질의 종류와 투여 방법에 따라서 P-450 의존성 촉매효소들의 활성도가 차이를 보였으며, benzene과 toluene은 주로 PNPH의 활성도에 영향을, xylene은 PROD의 활성도를 현저히 증가시키는 것을 보아 benzene과 toluene은 P4502E1/2 형태의 동위효소에 의해서 이들 유기용제의 대사에 관여 하는 것으로 보이며, xylene은 P4502B1/2 형태의 동위효소를 선택적으로 유도하여 대사에 관여하는 것으로 생각된다. 그러나 이들 P-450 의존성 촉매효소는 기질에 따라서 선택성을 가지고 있으나 기질의 중복성도 내포하고 있어서 단지 활성도 변화만을 가지고 이들 유기용제에 의해서 P4502B1/2 및 P4502E1/2 형태의 동위효소가 유도된다고 단정할 수 만은 없다. 그래서 P4501A1/2, P4502B1/2 및 P4502E1/2에 대한 monoclonal antibodies를 이용하여 Western immunoblot를 통하여 확인 하였다. 유도물질로 benzene, toluene, xylene을 단일, 병합 및 혼합 투여한 간장의 microsomes을 사용하여 얻은 결과에서는 benzene과 toluene 단일 투여군에서 P4502E1 단백질의 양적인 증가가 나타나는 것을 관찰 하였으며, 병합 및 혼합 투여군에서는 BX 군에서의 단백질이 다른 투여군 보다 양적으로 약간의 증가를 보였으나 뚜렷하지는 않았다. P4502B1/2 단일세포성향체를 이용한 Western immunoblot에서도 T3군과 xylene 단일 투여군인 X1, X2,

X3 군에서 P4502B1 단백질의 양적인 증가가 현저한 것을 관찰하였다. 또한 xylene 투여농도의 증가에 따라서 유도되는 P4502B1 단백질의 량도 비례적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 병합 및 혼합 투여군에서는 TX 및 혼합 투여군 (M)에서 P4502B1 단백질이 단일 투여군과 기타의 병합 투여군 보다 양적으로 현저히 증가된 것을 관찰할 수 있었다. Toluene과 같이 benzene 고리에 methyl기가 결사슬로 붙은 물질이 대사되기 위해서는 P-450에 의해서 methyl기가 수산화 (hydroxylation) 된 후 연쇄적인 반응을 거쳐서 대사가 이루어지는데, 이때 methyl기를 hydroxylation을 시키는데 P4502C11/6 와 P4502B1/2가 촉매작용을 하는 것으로 보고 되었다 (Nakajima 등, 1991). Toluene과 xylene은 benzene의 유도체로서 toluene은 benzene ring에 methyl기가 하나, xylene은 methyl기가 두개 결사슬로 붙어있어 두 물질간의 분자구조가 매우 유사하며, 물리.화학적 성질도 비슷하다. 따라서 금번 연구에 있어서 단일물질 투여군 보다 TX군과 혼합 투여군에서 P4502B1 단백질의 유도가 현저한 것은 toluene과 xylene의 수산화작용을 촉매하는 P4502B1 동위효소가 두 물질에 대하여 상호보완적인 작용으로 인하여 유도를 증가시킨 것으로 생각된다. 그러나 P4501A1/2 형태의 동위효소는 단일, 병합 및 혼합 투여군에서 관찰되지 않았다. Nakajima 등 (1992)도 Male Wistar계 흰쥐를 이용한 연구에서 benzene의 대사에 P4502E1 형태의 동위효소가 관여하며 toluene으로 부터 p-cresol 형성에 P4502B1/2가 관여한다고 보고 하였다. 따라서 단일세포성향체를 이용한 면역생화학적인 연구결과를 종합해 보면, benzene과 toluene을 처리한 동물에서는 P4502E1 동위효소가 검출되었으며, xylene을 처리한 흰쥐에서는 P4502B1 단백질이 대조군 보다 다량으로 검출 되었으므로 xylene이 이 동위효소를 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

흡수된 이물질에 대한 대사기전과 독성현상을 연구하기 위해서는 흡수물질에 대한 흡수, 분포, 대사 및 배설등에 관한 pharmacokinetic 연구와 더불어서 역학적인 연구가 병행되어야 한다 (Sato와 Nakajima,1979; Sabourin 등,1989; Moretto와 Lotti,1990; Chen 등,1991; 김 등,1994). 그러나 많은 연구자들에 의해서 수행되는 pharmacokinetic 연구는 단일물질에 대한 연구가 대부분이고 복합물질의 흡수에 대한 연구는 그다지 많

지 않으며 더우기, 복합물질의 흡수에 따른 체내 독성발현에 대한 연구는 폭로농도, 폭로방법 및 종에 따라서 연구자간에 이견을 보이고 있다 (Sato와 Nakajima,1979; Sabolainen,1980; Tunek 등,1981; Iregren 등,1986; Nakajima 등,1988; Okino 등,1991).

Ikeda 등 (1972)은 toluene이 benzene의 대사를 억제하여 benzene의 독성작용을 상승시킬 수 있다고 보고 하였으며, Sato와 Nakaima (1979)는 Wistar계 female rats를 이용하여 benzene과 toluene의 농도를 달리하여 복강주사한 후 혈액에서 투여물질의 농도 변화와 뇨중에서 대사산물의 배설량을 측정한 결과, benzene과 toluene을 단일 투여하였을때 보다 병합투여시에 대사가 지연된다고 보고 하였다. Riihimaki (1979)는 toluene과 xylene의 대사시 1차 변형된 후 형성되는 benzoic acid와 methyl benzoic acid가 병합투여시 감소되는 현상을 보고 하였으며, Iregren 등 (1986)은 toluene과 alcohol을 복합투여한 연구에서 alcohol에 의한 영향은 관찰되지 않았다고 보고 하였다.

금번 우리의 연구에 있어서 benzene, toluene, xylene을 단일, 병합 및 혼합 투여한 후 뇨중에서 대사산물의 배설량을 측정한 결과, 단일 투여군 보다 병합 및 혼합 투여군에서 배설량이 감소되는 것을 관찰하였다. Benzene의 대사산물인 phenol의 배설량은 단일 투여군과 비교시 혼합 투여군 (M) 에서만 통계학적으로 유의한 감소를 보였으며 감소는 $B > BX > BT > M$ 군 순으로 나타났고 ($p < 0.01$), Toluene의 경우도 단일 투여군 보다 병합 및 혼합 투여군에 있어서 뇨중 대사산물인 hippuric acid의 배설량이 $T > TX > BT > M$ 군 순으로 감소를 보였으나, BT와 M 군에서만 통계학적으로 유의한 감소를 보였다 ($p < 0.01$). Xylene을 투여한 경우에서도 단일 투여군 보다 병합 및 혼합 투여군에서 methyl hippuric acid의 배설량 감소가 통계학적으로 유의 하였다 ($p < 0.01$).

이와같이 유기용제 투여군 모두에 있어서 단일물질 투여군에서 보다 병합 및 혼합 투여군에서 대사산물의 배설량이 현저히 감소된 것은 대사작용의 억제로 인한 결과라 보여진다. 병합 투여군에 있어서 이들 유기용제의 상호작용을 보면, benzene의 대사에 xylene 보다는 toluene에 의한 억제작용이, toluene의 대사에는 xylene 보다 benzene에 의한 억제작용이 다소 큰 것으로 나타났으며, xylene의 대사에는 benzene과 toluene의 억제현상이 비슷한 것으로 관찰되었다.

이상의 결과에 있어서 대사산물의 배설량, P-450 의존성 촉매효소의 활성화도 및 단일 세포성향체 실험결과를 연관하여 보면, 단일세포성향체를 이용한 면역생화학실험 결과로 단일물질 투여군에서 보다 병합 및 혼합 투여군에서 P-450 동위효소의 유도가 증가된 반면, P-450 의존성 촉매효소의 활성화도와 뇨중 대사산물의 배설량은 오히려 감소되었다. 이러한 현상은 이물질의 흡수에 따른 생체내의 방어기전으로 이물질 대사에 관여하는 특정한 효소의 합성은 증가되나 흡수된 유기용제들의 상호작용에 의한 경쟁적인 효소작용의 억제로 인하여 대사산물의 배설량이 감소된 것으로 생각된다. 따라서 이들 물질에 대하여 병합 및 혼합된 형태의 폭로가 단일물질에 의한 폭로 보다 대사가 억제되므로, 체내의 독성현상도 병합 및 혼합된 형태의 폭로시에 클 것으로 생각된다.

그러므로 금번 연구에 있어서 이들 유기용제의 폭로로 인하여 어떤 형태의 P-450 동위효소가 유도 되는지를 밝혔으므로, 추후에는 이들 유기용제에 의하여 유도되는 P450 2E1/2와 P4502B1/2 단백질의 유도발현과 분자수준에서의 조절기전 연구를 통하여 이들 유기용제들의 상호작용기전 및 독성현상을 보다 더 명확히 파악해야 할 것으로 생각된다. 또한 이러한 동물실험의 결과를 이용하여 이들 유기용제를 취급하는 근로자들의 혈액 및 소변과 같은 체액에 있어서 민감도가 뛰어난 항체를 이용한 면역생화학적 연구를 통하여 새로운 Bio-marker를 개발해야 할것으로 생각된다.

V. 요약 및 결론

본 연구에서는 수컷 흰쥐를 이용하여 benzene, toluene, xylene을 단일, 복합 및 병합된 형태로 투여한 후 간장의 microsomes에 있어서 어떤 형태의 Cytochrome P-450 동위효소가 유도되는지를 P4501A1/2, P4502B1/2 및 P4502E1/2에 대한 단일세포성향체를 이용하여 확인하고자 하였다. 또한, 이들 동위효소의 유도가 폭로물질에 따라서 어떠한 유도의 차이를 가져오며 대사산물의 배설량에 어떠한 영향을 미치는지를 연구 하였다.

1. Cytochrome P-450과 b_5 함량은 대조군에서 보다 투여군에 있어서 다소 증가한 것을 관찰하였다. 그러나 P-450의 함량은 B3, TX, 혼합 투여군 (M)에서, b_5 함량은 B1, X3, TX 그리고 혼합 투여군에서 현저한 증가를 보였다 ($p<0.05$).

2. NADPH-P-450 reductase의 활성도는 대조군 보다 투여군에 있어서 증가되었으나, TX 투여군에서 통계학적으로 유의한 증가를 볼 수 있었다 ($p<0.05$). NADH b_5 reductase의 활성도도 대조군 보다 투여군 모두에 있어서 증가되었으나 B1, T2와 TX 군에서의 증가가 통계학적으로 유의하였다 ($p<0.05$).

3. EROD 활성도는 대조군 보다 투여군에 있어서 전부 증가되었으나, benzene, toluene 및 xylene 단일 투여군에서만 통계학적으로 유의한 증가를 보였다 ($p<0.05$).

PROD 활성도는 대조군 보다 단일 투여군에서 유의한 증가를 보였고 ($p<0.05$), 병합 및 혼합투여군에는 단일 투여군에서 보다 감소되었으며, 그 감소는 BX와 M 군에서 현저하였다 ($p<0.05$). 또한 PNPH 활성도는 대조군 보다 투여군 모두에 있어서 현저한 증가를 보인 반면 ($p<0.05$), BX와 M 군에서는 감소를 보였다 ($p<0.05$).

4. 단일세포성항체를 이용한 Western immunoblot 실험에서 benzene (B1, B2, B3)과 T1 (0.5 mole/kg), T2 (1.0 mole/kg) 군에서는 P4502E1 단백질의 양이 기타의 투여군 보다 다소 증가되었으며, T3 (1.5 mole/kg) 군과 xylene (X1, X2, X3) 투여군에서는 P4502B1 단백질의 양이 현저한 증가를 보였다. 병합 및 혼합 투여군에서는 P4502E1 단백질이 BX 군에서, P4502B1 단백질은 TX와 M 군에서 증가를 보였다.

5. 투여형태에 따라서 benzene, toluene 및 xylene의 뇨중 대사산물을 측정 한 결과, 단일 투여군 보다 병합 및 혼합 투여군에서 대사산물의 배설량이 감소되었다. Benzene의 경우는 M군, toluene의 경우는 BT와 M군 그리고 xylene의 경우에는 병합 및 혼합 투여군에서 통계학적으로 유의한 감소를 관찰하였다 ($p<0.05$).

이상의 결과를 보면, 이물질의 흡수에 따른 생체내의 방어기전으로 이물질 대사에 관여하는 cytochrome P-450의 단백질 합성은 증가되나 흡수된 유기용제들의 상호작용에 의한 경쟁적인 효소작용의 억제로 인하여 대사산물의 배설량이 감소된 것으로 생각된

다. 따라서 이들 유기용제에 대하여 병합 및 혼합된 형태의 폭로가 단일물질에 의한 폭로 보다 대사가 억제되므로, 체내의 독성현상도 단일 물질에 의한 폭로 보다 병합 및 혼합된 형태의 폭로시에 클 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

- 김기웅, 강성규, 최병순, 이종성, 김종성, 문영한. Trichloroethylene 처리한 흰쥐의 이물질 대사효소의 활성도에 관한 연구. 대한산업의학회 1994;6:323-331
- 김기웅, 장성근, 김양호, 문영한. Cytochrome P-450 의존성 radical 전달에 의한 benzene, toluene, xylene의 대사가전 연구. 한국독성학회지 1995;11:205-213
- 박기현. Microsomal Cytochrome P-450s의 특이성. 생화학총설집, 한국생화학회 1986;1:309-334
- Arinc E, Adali O, Iscan M, Guray T. Stimulatory effects of benzene on rabbit liver and kidney microsomal cytochrome P-450 dependent drug metabolizing

- enzymes. Arch Toxicol 1991;65:186-190
- Arlie-Soborg P. Solvent neurotoxicity. CRC Press Inc., Florida, 1992, 61-127
- Baelum J, Mølhave L, Hasen SH, Døssing M. Hepatic metabolism of toluene after gastrointestinal uptake in humans. Scand J Work Environ Health 1993;19:55-62
- Baselt RC. Biological monitoring methods for industrial chemicals. Biomedical Publication, California, 1980;41-42
- Chen JD, Wang JD, Jang JP, Chen YY. Exposure to mixtures of solvents among paint workers and biochemical alteration of liver function. J Ind Med 1991; 48:696-701
- Ciaccio PJ and Halpert JR. Characterization of a phenobarbital-inducible dog liver cytochrome P450 structurally related to rat and human enzymes of the P450III_A (Steroid-inducible) gene subfamily. Arch Biochem Biophys 1989;271:284-299
- Cockerham LG, Shane BS. Basic environmental toxicology, CRC press Inc., Boca Raton, FL, 1994, 49-105
- Cohr KH, Stokholm J. Toluene. a toxicology review. Scand J Work Environ Health 1979;5:71-90
- Guengerich FP. Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P-450. 1978;253:7931-7939
- Guengerich FP, Dannan GA, Wright ST, Martin MV, and Kaminsky LS. Purification and characterization of liver microsomal cytochrome P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or β -naphthoflavone. Biochemistry 1982;21:6019-6030
- Guengerich FP, Kim DH and Iwasaki M. Role of human cytochrome P-450III_{E1} in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. Chem Res Toxicol 1991;4:168-179

- Hanioka H, Hamamura M, Kakino K, Ogata H, Jinno H, Takahashi A, Nishimura T and Ando M. Dog liver microsomal P450 enzyme-mediated toluene biotransformation. *Xenobiotica* 1995;25:1207-1217
- Hultquist DE. Methemoglobin reduction system of erythrocytes. *Methods in Enzymol* 1978;52:463-473
- Ikeda M. Reciprocal metabolic inhibition of toluene and trichloroethylene *in vivo* and *in vitro*. *Int Arch Arbeitsmed* 1974;33:125-130
- Ikeda M, Ohtsuji H, Imamura T. In vivo suppression of benzene and styrene oxidation by co-administrated toluene in rats and effects of phenobarbital. *Xenobiotica* 1972;2:101-106
- Iregren A, Akerstedt T, Olson BA, and Gamberale F. Experimental exposure to toluene in combination with ethanol intake. *Scand J Work Environ Health* 1986; 12:128-136
- Klotz AV, Stegeman JJ, Walsh C. An alternative 7-ethoxyresolufin O-deethylase activity assay: A continuous visible spectrophotometric methods for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. *Anal Biochem* 1984;140:138-145
- Ko I-Y, Park SS, Song BJ, Patten C, Tan Y, Hah YC, Yang CS, and Gelboin HV. Monoclonal Antibodies to Ethanol-Induced Rat Liver Cytochrome P-450 That Metabolizes Aniline and Nitrosamines. *Cancer Research* 1987;47:3101-3109
- Koop DR. Hydroxylation of p-Nitrophenol by rabbit ethanol inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Mol Pharmacol* 1986;29:339-404
- Koop DR, Crump BL, Nordblom GD, and Coon MJ. Immunochemical evidence for induction of the alcohol-oxidizing cytochrome P-450 of rabbit liver microsomes by diverse agents: Ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole, and isoniazid. *Proc Natl Acad USA* 1985;82:4065-4069
- Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head a

- bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685
- Lewis DFV. Three-dimensional models of human and other mammalian microsomal P450s constructed from an alignment with P450₁₀₂ (P450_{bm3}). *Xenobiotica* 1995; 25:333-366
- Lewis DFV, Lake BG and Parke DV. Molecular orbital-generated QSARs in a homologous series of alkoxyresolufins and studies of their interactive docking with P450s. *Xenobiotica* 1995;25:1355-1369
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurment with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:401-404
- Lu AYH, and West SB. Multiplicity of mammalian microsomes P-450. *Pharmacol Rev* 1980;31:277-295
- Mannering GJ and Shoeman JA. Murine cytochrome P450_{3A} is induced by 2-methyl-3-buten-2-ol, 3-methyl-1-pentyn-3-ol (meparfynol), and tert-amyl alcohol. *Xenobiotica* 1996;487-493
- Master BSS, Williams CHJr, Kamin H. The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome C reductase from pig liver. *Methods in Enzymol* 1967;10:565-580
- Moretto A and Lotti M. Exposure to toluene increases the urinary excretion of D-glucaric acid. *Br J Ind Med* 1990;47:58-61
- Nakajima T, Okino T, Okuyama S, Kaneko T, Yonekura I, and Sato A. Ethanol-induced enhancement of trichloroethylene metabolism and hepatotoxicity: Difference from the effect of phenobarbital. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 94:227-237
- Nakajima T, Wang R-S, Elovaara E, Park SS, Gelboin HV, Hietanen E, and Vainio H. Monoclonal antibody-directed characterization of cytochrome P450 isozymes responsible for toluene metabolism in rat liver. *Biochem Pharmacol* 1991;41:

- Nakajima T, Wang R-S, Elovaara E, Park SS, Gelboin HV and Vainio H. A comparative study on the contribution of cytochrome P450 isozymes to metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in rat liver. *Biochem Pharmacol* 1992;43:251-257
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC and Nebert DW. P450 superfamily: updata on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996;6:1-42
- Ogata M, Sugihara R, Kira S. Quantitative determination of urinary HA and m- or p-xylene exposure by HPLC. *Int Arch Occup Environ Health* 1977;39:199-206
- Okino T, Nakajima T, Nakano M. Morphological and biochemical analyses of trichloroethylene hepatotoxicity: Differences in ethanol-, and phenobarbital-pretreated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;108:379-389
- Omura T and Sato R. The carbon monooxide binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964;239:2370-2378
- Osawa Y, Davila JC, Nakatsuka M, Meyer CA and Darbyshire JF. Inhibition of P450 cytochromes by reactive intermediates. *Drug Meta Rew* 1995;27:61-72
- Park KH and Kim CR. Induction of the different forms cytochrome P-450 isozymes and comparison of aryl hydrocarbon hydroxylase levels on rat tissues by chemical treatment. *Korean Biochem J* 1984;17:10-19
- Park SS, Fujino T, West D, Guengerich FP, and Gelboin HV. Monoclonal antibodies inhibiting enzyme activities of cytochrome P-450 from 3-methylcholanthrene-treated rats. *Cancer Res* 1982;42:1798-1808
- Park SS, Fujino T, Miller H, Guengerich FP, and Gelboin HV. Monoclonal antibodies to phenobarbital induced rat liver cytochrome P-450. *Biochem*

Pharmacol 1983;33:2071-2081

Parke DV, Williams RT. Studies in detoxication. The metabolism of benzene containing ^{14}C -benzene. Biochem J 1953;54:231-238

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

Patten CJ, Ning SM, Lu AYH, and Yang CS. Acetone-inducible cytochrome P-450: Purification, catalytic activity, and interaction with cytochrome b5. Arch Biochem Biophys 1986;251:629-638

Peng R, Tu YY, and Yang CS. The inhibition and competitive inhibition of a high affinity microsomal nitrosodimethylamine demethylase by ethanol. Carcinogenesis 1982;3:1457-1461

Powis G. Effect of a single oral dose of methanol, ethanol and propan-2-ol on the hepatic microsomal metabolism of foreign compounds in the rat. Biochem J 1975;148:269-277

Pyykko K. Time course of effects of toluene on microsomal enzymes in rat liver, kidney and lung during and after inhalation exposure. Chem Biol Interact 1983;44:299-310

Rajaseenan R, Riley RJ, and Leeder JS. Expression and Inducibility of Antigens in Severe Combined Immunodeficient Mice Recognized by Human Anti-P450 Antibodies. Toxicol Appl Pharmacol 1995;135:89-99

Riihimäki V. Conjugation and urinary excretion of toluene and m-xylene metabolites in a man. Scand J Work Environ Health 1979;5:135-142

Ryan DE, Thomas PE, Korzeniowski D, and Levin W. Separation and characterization of highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyl, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene. J

Biol Chem 1979;254:1365-1374

Rosa ED, Bartollucci GB, Sigon M, Callegaro R, Perbellini L, Brugnone F. Hippuric acid and ortho-cresol as biological indicators of occupational exposure to toluene. Am J Ind Med 1987;11:529-537

Sabolainen K. Combined effects of xylene and alcohol on the central nervous system. Acta Pharmacol Toxicol 1980;46:366-372

Sabourin PJ, Bechtold WE, Griffith WC, Birnbaum LS, Lucier G, Henderson RF. Effect of exposure concentrations, exposure rats, and route of administration on metabolism of benzene by F 344 rats and B6C3F1 mice. Toxicol Appl Pharmacol 1989;99:421-444

Sabzevari O, Hatcher M, O'Sullivan M, Kentish P and Gibson G. Comparative induction of cytochrome P4504A in rat hepatocyte culture by the peroxisome proliferators, bifonazole and clofibrate. Xenobiotica 1995;25:395-403

Sato A and Nakajima T. Dose-dependent metabolic interaction between benzene and toluene *in vivo* and *in vitro*. Toxicol Appl Pharmacol 1979;48:249-256

Sato A, Nakajima T, and Koyama Y. Dose-related effects of a single dose of ethanol on the metabolism in rat liver of some aromatic and chlorinated hydrocarbons. Toxicol Appl Pharmacol 1981;60:8-15

Sherson D, Sigsgaard T, Loft EOS, Poulsen HE, Jongeneelen FJ. Interaction of smoking, uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons, and cytochrome P450IA2 activity among foundry workers. Br J Ind Med 1992;49:197-202

Stroop CJM, Paul Dutmer AAH, and Horbach GJ. Changes in Chromatin Structure and Nuclear Matrix Association of the Rat Cytochrome P450 2B1/2 (CYP2B1/2) Gene Following Induction with Phenobarbital. J Biochem Toxicol 1996;11:59-65

Tefre T, Daly AK, Armstrong M, Leathart JBS, Idle JR, Brøgger A and Børresen A-L. Genotyping of the CYP2D6 gene in Norwegian lung cancer patients and

- controls. *Pharmacogenetics* 1994;4:47-57
- Toftgard R and Nilsen OG. Effects of xylene and xylene isomers on cytochrome P-450 and *in vitro* enzymatic activities in rat liver, kidney and lung. *Toxicology* 1982;23:197-212
- Tunek A, Olofsson T, Berlin M. Toxic effects of benzene and benzene metabolites on granulopoietic stem cells and bone marrow cellularity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981;59:149-156
- Uematsu F, Ikawa S, Kikuchi H, Sagami I, Kanamaru R, Abe T, Satoh K, Motomiya M and Watanabe M. Restriction fragment length polymorphism of the human CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. *Pharmacogenetics* 1994; 4:58-63
- Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, and Gonzalez FJ. Human ethanol-inducible P450IIE1: Complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry* 1988;27:9006-9013
- Yue Q-Y, Tomson T and Sawe J. Carbamazepine and cigarette smoking induce differentially the metabolism of codeine in man. *Pharmacogenetics* 1994; 4:193-198

