

저 및 표준단백식이로 성장시킨 흰쥐에 Toluene 투여가 간 손상에 미치는 영향

윤종국[†] · 김경순 · 임영숙*

계명대학교 공중보건학과

*대구공업전문대학 식품영양과

Effect of the Toluene Administration on the Liver Damage in Rats Fed Low or Standard Protein Diet

Chong-Guk Yoon[†], Kyoung-Soon Kim and Young-Suk Lim*

Dept. of Public Health, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

*Dept. of Food Science and Nutrition, Taegu Technical Junior College, Taegu 704-350, Korea

Abstract

To study the effect of toluene administration on the liver damage, rats were previously fed a low (casein 7%, LP) or standard(casein 20%, SP) protein diet and for four days toluene(50% in olive oil) was given at 0.2ml/100g body weight/day to the male rats, and then the degree of liver damage in toluene-treated animals fed LP were compared with those fed SP. The increasing rate of liver weight/body weight and the serum levels of xanthine oxidase to the control group were higher in rats fed SP than those fed LP. The decreasing rate of protein contents in cytosol, mitochondria and glycogen, glutathione contents of liver to the control group were higher in rats fed SP than those fed LP. In histopathological findings, the swelling of hepatic cell around the central vein was demonstrated in all the two groups toluene-treated rats. But the degree of swelling severity in hepatocytes was somewhat higher in rats fed SP than those fed LP. Therefore it is assumed that the degree of liver damage severity in toluene-treated animals was higher in rats fed SP than those fed LP.

Key words: toluene, low or standard protein diet, serum xanthine oxidase, hepatic glycogen and glutathione, histopathological findings

서 론

최근 산업 발전에 따른 산업 공해 물질의 폭로로 인
간의 건강에 심각한 문제가 야기되고 있는 실정이다.
이러한 유해 공해 물질에 의한 질병의 예방에 영양관
리적 측면의 중요성이 인정되고 있다. 이들 산업 공해
물질 중 xenobiotics의 독성과 단백질영양 상태와의 상호
관련성에 대해서는 많은 연구자들에 의하여 보고(1-4)
되어왔다.

한편 생체이물질(xenobiotics)인 toluene이 인체에
폭로시 신경계(5,6) 및 순환기계(7-9)에 독성이 초래된
이 알려져 있다. 또한 toluene이 간 독소로 작용한다는
보고(10-12)도 있다.

일반적으로 xenobiotics의 증독현상은 단백질이 조
건에 따라서 달라진다고(13-16) 한다. 그러나 toluene
의 증독에 대한 영양조건의 영향에 대한 연구는 미흡

한 실정이다.

Toluene은 체내에서 대사되어 마노산으로 요중에 배
설된다고 한다(6,17). 최근 전 등(12)은 toluene 투여시
간손상은 toluene 대사 중간생성물인 benzaldehyde에
기인된다는 보고와 toluene 대사에 관여하는 cytochrome
P-450 활성치는 단백질이와 관련이 있다는 보고를 고
려해 볼 때 toluene의 증독이 식이성 단백질 함량에 상
당한 영향을 받을 것으로 생각된다. 이에 본 실험에서는
저 및 표준단백 식이조건으로 성장시킨 흰쥐에 toluene
을 투여한 후 체중당 간 무게, 간조직 중 protein, gluta-
thione 및 glycogen 함량과 간손상시 그 활성이 증가된
다는 혈청 xanthine oxidase(이하 XO라 약함)(12) 활
성도를 측정함과 더불어 간조직의 병리조직검사를 실
시하므로써 toluene에 의한 간손상에 미치는 식이성
단백질의 영향을 검토하였다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

동물 및 처치

동물은 체중 120g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley종의 숫 흰쥐를 Table 1의 사료 성분표에 의하여 저단백식이균(casein 7%, LP)과 표준단백식이균(casein 20%, SP)으로 구분하여 1개월간 사육하였다. 이때 물과 사료의 양은 제한없이 공급하였다.

Toluene은 olive oil과 동량혼합액을 만들어 Pathiratne 등(18)의 방법에 준해 체중 100g당 0.2ml를 1일 1회 4일간 복강내 주사하였다. 한편 각 군의 대조군은 동량의 olive oil을 복강내로 주사하였으며, 동물은 처치 전 24시간 동안 물만주고 금식시켰다.

동물의 처치는 효소활성의 일중 변동을 고려하여 일정시간에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였다. 동물은 ether 마취 하에서 복부정중선을 따라 개복한 후 복부대동맥으로부터 채혈하고, 생리식염수로 간장을 관류하여 간장내에 남아있는 혈액을 제거한 다음 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 장기 표면에 묻은 혈액을 가볍게 씻은 후 여지로 압박하여 간장내 남아있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음 무게를 칭량하고 그 일부를 formalin에 고정시켜 조직 병리검사에 사용하였다. 채취한 혈액은 방치한 다음, 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻고 XO 활성 측정용 시료로 사용하였다.

혈청 XO 활성도 측정

혈청 XO 활성도 측정은 Stirpe와 Della Corte의 방

법(19) 및 Yoon의 방법(20)에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 기질인 xanthine으로부터 생성된 뇨산량을 혈청 1L당 μmole 로 표시하였다.

Hepatic glycogen 함량 측정

간조직 glycogen 함량은 Caroll 등의 방법(21)에 준하여 측정하였고 단위는 간조직 1g당 glycogen mg으로 표시하였다.

Hepatic glutathione 함량측정

Glutathione(GSH)의 함량은 Ellman의 방법(22)에 따라 측정하였으며, 단위는 간조직 1g당 μmole 로 나타내었다.

간조직의 병리조직검사

10% formalin에 고정된 조직편을 paraffin에 포매하여 4 μm 의 두께로 박절하고 hematoxylin-eosin염색(23)한 후 광학현미경으로 100 \times 배율에서 관찰하였다.

단백질의 정량

간조직을 빙냉하에서 절편으로 만들고 그 중 일정량을 칭량하여 4배량의 0.25M sucrose액과 함께 glass teflon homogenizer로 마쇄하여 마쇄균질액(20% W/V)을 만들었다. 이 균질액을 600 $\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음, 그 상층액을 10,000 $\times\text{g}$ 에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 얻었다. 한편 mitochondria 분획을 분리시킨 상층액을 105,000 $\times\text{g}$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredients	(g/kg diet)	
	Low protein diet	Standard protein diet
Casein	70	200
Corn starch	804.36	674.36
Corn oil	64.85	64.85
Vitamin A and D mixture ¹⁾	10.2	10.2
Vitamin E and K mixture ²⁾	2	2
Water soluble vitamin mixture ³⁾	3	3
Vitamin B ₁₂ ⁴⁾	1	1
Salt mixture ⁵⁾	40	40
α -Cellulose	20	20
		*4190.90Kcal

¹⁾Vitamin A and D mixture: 51,000 unit of A and 5,100 unit of D dissolved in 100ml of corn oil

²⁾Vitamin E and K mixture: 5g of α -tocopherol and 0.2g of menadion dissolved in 200ml of corn oil

³⁾Water soluble vitamin mixture: contained(mg); choline chloride 2,000, thiamine hydrochloride 10, riboflavin 20, nicotinic acid 120, pyridoxine 10, Ca-pantothenate 100, biotin 0.05, folic acid 4, inositol 500, p-aminobenzoic acid 100

⁴⁾Vitamin B₁₂: 5mg of vitamin B₁₂ dissolved in 500ml of distilled water

⁵⁾Salt mixture: contained(g); CaCO₃ 300, potassium phosphate dibasic 322.5, MgSO₄ 102, Ca-phosphate monobasic 75, NaCl 167.5, ferric citrate 27.5, KI 0.8, ZnCl₂ 0.25, CuSO₄ · 5H₂O 0.3, MnSO₄ 5, molybdic acid 0.2

분획을 분리한 다음 mitochondria 및 cytosol 분획을 시료로 사용하여 Lowry 등(24)의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 단백질을 측정하였다.

이상 실험결과와 통계처리는 student's t-test(25)를 이용하여 상호 비교하였다.

결과 및 고찰

성장기간동안 체중의 변동

실험동물을 casein으로 단백질 함량을 달리하여 성장시켰을 때 표준단백식이군(casein 20%, SP)은 처음 체

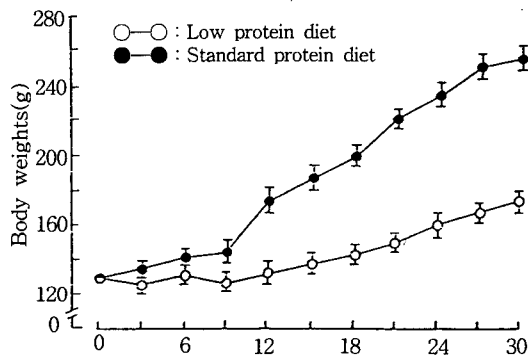


Fig. 1. One month weight gains in rats fed a low or high protein diet. Each value is the mean±S.E. of 10 rats.

중에 비하여 약 76% 증가되었고, 저단백식이군(casein 7%, LP)은 약 17% 증가되어 SP군이 LP군 보다 체중 증가율이 현저히 높았다(Fig. 1). 이는 타 연구자들의 보고(26-28)와 유사하였다. 그러므로 본 실험조건이 저 단백질 및 표준단백식이 조건의 실험 model로 확인되었다. 이러한 실험조건하에 toluene 투여 후 간손상 정도를 두군 간에 상호 비교 관찰하였다.

체중당 간무게, 간조직 중 protein, glycogen, GSH 및 혈청 XO 활성도 변동

Toluene을 투여하였을 때 체중당 간무게 증가율은 SP군에서는 약 28%, LP군에서는 약 17%로 두군 공히 유의한(p<0.01) 증가를 보였으며, SP군이 LP군 보다 toluene 투여로 인한 간무게 증가율이 더 높게 나타났다(Table 2).

한편 간손상시 그 함량이 감소된다는 단백질 함량(29-31)은 cytosol분획의 경우 SP군에서는 약 10% 정도 유의하게(p<0.01) 감소되었으나, LP군에서는 별다를 차이를 볼 수 없었으며, mitochondria 분획은 SP에서는 toluene 투여로 대조군에 비하여 약 20%의 감소를 보였고 LP군은 약 10% 정도 감소를 하는 경향이 관찰되었다. 그리고 급성 간손상시 그 함량이 감소된다는 간 glycogen(32), GSH(33) 함량도 SP군이 LP군 보다 더 많이 감소되었다. 간손상시에 혈청 중 그 활성이

Table 2. Effect of toluene treatment on the weight of liver in rats fed a low or high protein diet

Groups	High protein diet		Low protein diet	
	Control	Toluene	Control	Toluene
Liver wt./body wt.(%)	2.63±0.07	3.36±0.13**	2.46±0.09	2.89±0.03**

The assay procedure was described in the experimental methods
Each value represents the mean±S.E. of 5 rats
Significantly different from control(**p<0.01)

Table 3. Effect of toluene treatment on the liver protein, glutathione(GSH), glycogen contents and serum levels of xanthine oxidase(XO) activity

Parameters	High protein diet		Low protein diet	
	Control	Toluene	Control	Toluene
Protein ¹⁾				
Cytosol	101.23±0.79	91.34±2.26**	97.90±14.10	97.55±2.40
Mitochondria	59.77±6.55	49.58±3.06	58.40± 2.69	62.17±2.60
Glutathione ²⁾	3.47±0.15	2.87±0.31	2.80± 0.16	2.25±0.16*
Glycogen ³⁾	67.00±3.10	60.00±3.91	64.75± 7.36	69.13±3.41
Serum xanthine oxidase ⁴⁾	22.30±1.04	33.97±1.14***	25.27± 0.99	28.74±1.24

The assay procedure was described in the experimental methods
Each value represents the mean±S.E. of 5 rats
*Significantly different from control(p<0.05)
**Significantly different from control(p<0.01)
***Significantly different from control(p<0.001)

Unit: ¹⁾mg/g. wet. liver, ²⁾μmoles/g of tissue, ³⁾mg/g. wet. liver, ⁴⁾μmoles uric acid formed/min/L of serum

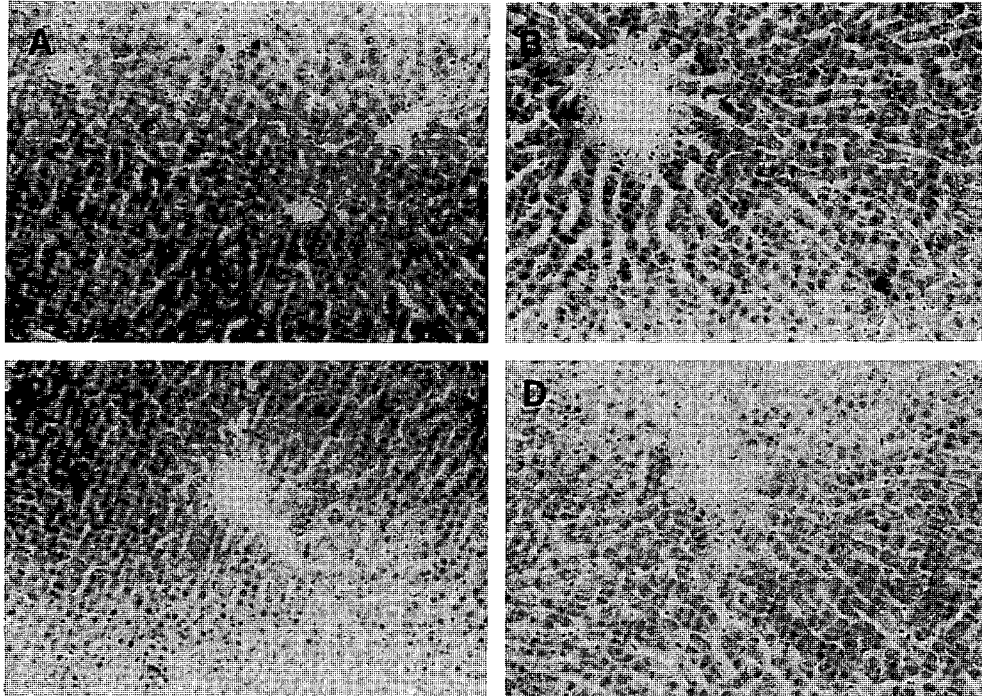


Fig. 2. Light microscopic findings of liver tissue in toluene or oil treated rats fed a low or standard protein diet.

- A: The group fed SP; the lobules and central veins are intact.
 B: The group fed SP and treated with toluene; the swelling of hepatocyte around the central vein was demonstrated.
 C: The group fed LP; the lobules and central vein are intact.
 D: The group fed LP and treated with toluene; the swelling tendency of hepatocyte around the central vein is seen.

증가된다는 XO의 활성(12,34,35)은 toluene 투여로 인하여 SP군에서는 약 35%의 유의한($p < 0.001$) 증가를 나타내었으나, LP군은 약 14% 정도 증가되는 경향을 보였다(Table 3).

간조직 검사

간조직의 병리조직검사에서 SP군, LP군 모두 toluene 투여군에서 중심정맥주위 세포의 팽창(swelling)이 관찰되었으며 그 정도는 SP군에서 높은 경향을 보였다(Fig. 2).

이상 실험성적을 종합하여 볼 때 toluene 투여로 인한 간손상이 초래되었음을 알 수 있으며, 그 손상의 정도는 SP군이 LP군 보다 높게 나타났다. 이와같이 SP군이 LP군 보다 간손상 정도가 높게 나타나는 현상은 benzaldehyde가 간손상에 영향을 미친다는 보고(12)와 toluene으로 부터 benzylalcohol로 대사되는 과정에 관여하는 cytochrome P-450 함량이 식이성 단백질 함량에 비례해서 증가된다는 점(13-16)을 고려해 볼 때 식

이성 단백질 함량에 비례해서 benzaldehyde 생성율이 증가되므로서 나타난 결과로 생각된다.

요 약

식이성 단백질 함량이 toluene에 의한 간 손상에 어떠한 영향을 미치는 지를 검토할 목적으로 흰쥐를 저단백식이(casein 7%, LP) 및 고단백식이(casein 20%, SP)로 성장시킨 후 체중 100g당 toluene과 olive oil의 동량혼액 0.2ml를 1일 1회 4번 투여한 다음 24시간 후 처치하였다. 체중 100g당 간무게는 SP군이 대조군에 비하여 약 28%, LP군은 약 17%의 유의한 증가를 보였으며 혈청 xanthine oxidase(XO)활성은 SP군에서는 약 35%의 유의한 증가를 나타내었으나 LP군에서도 증가되었으나 유의성은 없었다. 한편 toluene 투여로 인한 간 glycogen, glutathione(GSH) 함량 감소율에 있어서는 SP군이 LP군 보다 높게 나타났으며 간세포의 대조군에 대한 cytosol, mitochondria 단백질함량 감소율 역시 SP군이 LP군 보다 증가되는 경향을 보였다. 그리고

병리조직검사 소견에서는 SP군에서 swelling 정도가 LP군에 비하여 심화되어 나타남을 알 수 있었다.

문헌

- Drill, V. A. : Hepatotoxic agents; Mechanism of action and dietary interrelationship. *Pharmacol. Rev.*, **4**, 1 (1952)
- Drill, V. A., Loomis, T. A. and Belford, J. : Effect of protein carbohydrate intake on liver injury; Produced in dogs by carbon tetrachloride. *J. Industrial Hygiene and Toxicology*, **29**, 180(1947)
- Campbell, T. C. and Hayes, J. R. : Role of nutrition in the drug-metabolizing enzyme system. *Pharmacol. Rev.*, **26**, 171(1974)
- Yoon, C. G., Kang, H. Y. and Lee, S. I. : Effect of carbon tetrachloride on the activity of aniline hydroxylase in rats fed on a low protein diet. *J. Institute of Natural Science(Keimyung University)*, **7**, 125(1988)
- Lebel, C. P. and Schatz, R. A. : Effect of toluene on rat synaptosomal phospholipid methylation and membrane fluidity. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 4005(1989)
- Ellenhorn, M. J. and Barceloux, D. G. : Toluene in "Medical toxicology", Elsevier Science Pub. Co., Inc., U.S.A., p.959(1988)
- Taylor, G. J. and Harris, W. S. : Glue sniffing causes heart block in mice. *Science*, **170**, 866(1970)
- Zee-Cheng, C. S., Mueller, C. E. and Gibbs, H. R. : Toluene sniffing and severe sinus bradycardia. *Ann. Intern. Med.*, **103**, 482(1985)
- Vidrio, H., Magos, G. A. and Lorenzana-Jimenez, M. : Electrocardiographic effects of toluene in the anesthetized rat. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **279**, 121(1986)
- Morrison, R. J. : Toluene and hepatotoxicity. *J. Occup. Med.*, **31**, 1014(1989)
- Hayden, J. W., Peterson, R. G. and Bruckner, J. V. : Toxicology of toluene(methylbenzene). *Review of current literature clin Toxicol.*, **11**, 549(1977)
- 전태원, 강희양, 윤종국 : 흰쥐에게 toluene 투여가 혈청 xanthine oxidase 활성 변동에 미치는 영향. *한국독성학회지*, **11**, 279(1995)
- Sachan, D. S. : Effect of low and high protein diets on the induction of microsomal drug-metabolizing enzymes in rat liver. *J. Nutr.*, **105**, 1631(1975)
- Kato, R., Oshima, T. and Tomizawa, S. : Toxicity and metabolism of drug in relation to dietary protein. *Jap. J. Pharmacol.*, **18**, 356(1968)
- Anthony, L. E. : Effect of protein-calorie malnutrition on drug metabolism in rat liver microsomes. *J. Nutr.*, **103**, 811(1973)
- Miranda, C. L. and Webb, R. E. : Effects of dietary protein quality on drug metabolism in the rat. *J. Nutr.*, **103**, 1425(1973)
- Lohr, K. H. and Stockholm, J. : Toluene, a toxicologic review. *Scand. J. of work, Environ and Health*, **5**, 71(1979)
- Pathiratne, A., Puyear, R. L. and Brammer, J. D. : 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.*, **82**, 272(1986)
- Stirpe, F. and Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855(1969)
- Yoon, C. G. : A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Research Journal.(Keimyung Junior College)*, **2**, 295(1984)
- Carroll, N. V., Longley, R. W. and Ree, J. H. : The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone Reagent. *J. Biol. Chem.*, **220**, 583(1956)
- Ellman, G. L. : Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70(1959)
- Degertekin, H., Akdamar, K., Yates, R., Che, I., Ertan, A. and Vaupel, R. : Light and electron microscopic studies of diet-induced hepatic changes in mice. *Acta Anat.*, **125**, 174(1986)
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
- Scheffr, W. C. : Statistics for the biological sciences. ed. 2, Addison-Wesley Publishing Company, U.S.A., Menlo Park, p.84(1980)
- 윤종국 : 저단백식으로 성장한 흰쥐에 사염화탄소 투여 시 소장과 간조직 중 xanthine oxidase 활성비교. *대한보건협회지*, **18**, 183(1992)
- 윤종국 : 단백질이조건을 달리하여 성장시킨 흰쥐에 사염화탄소 투여가 purine체 대사 활성에 미치는 영향. *대한보건협회지*, **17**, 21(1991)
- 윤종국, 이상일, 신중규 : 식이성단백질 함량에 따른 흰쥐에 CCl₄투여가 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향. *한국영양식량학회지*, **20**, 527(1991)
- 정소용, 윤종국 : 흰쥐에 methanethiol투여가 간 기능에 미치는 영향. *과학논집(계명대학교 생활과학 연구소)*, **9**, 119(1990)
- 윤종국, 김석환, 이방자 : 저단백식으로 성장한 흰쥐에 사염화탄소의 투여가 간손상에 미치는 영향. *과학논집(계명대학교 생활과학 연구소)*, **9**, 159(1983)
- 윤종국, 이영순 : 토폴분 첨가식으로 성장한 흰쥐에 사염화탄소투여가 간손상에 미치는 영향. *과학논집(계명대학교 생활과학 연구소)*, **6**, 87(1987)
- Hinson, J. A., Mays, J. B. and Cameron, A. M. : Acetaminophen-induced hepatic glycogen depletion and hyperglycemia in mice. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 1979(1983)
- Thor, H., Moldeus, P., Högberg, J., Hermanson, R., Reed, D. J. and Orrenius, S. : Drug biotransformation and hepatotoxicity studies with bromobenzene in isolated hepatocytes. *Arch. Toxicol., Suppl.*, **1**, 107(1978)
- 윤종국 : 사염화 탄소를 투여한 흰쥐에서의 간장 및 혈청 xanthine oxidase 활성의 변동. *과학논집(계명대학교 생활과학 연구소)*, **6**, 75(1980)
- Al-Khalidi, U. A. S. and Geha, R. S. : The sensitivity of serum xanthine oxidase and serum glutamic pyruvic transaminase in detecting liver damage. *Clin. Chim. Acta*, **14**, 833(1966)

(1996년 9월 2일 접수)