

흰쥐에 있어서 간손상 정도에 따른 Bromobenzene 대사

신 중 규

경산대학교 자연과학대학 보건과학과

Study on Bromobenzene Metabolism in Rats with Liver Damage

Joong-Kyu Shin

Dept. of Health Science, College of Natural Science, Kyungsan University

(Received November 5, 1997)

(Accepted December 5, 1997)

ABSTRACT : To compare the severe liver damage with the slight one on the bromobenzene metabolism in rats, the animal group described as B7 group was induced the stage of slight liver damage with 7 times bromobenzene injection every other day (400 mg/Kg body wt. i.p.), whereas B40 group was induced that of more severe liver damage with bromobenzene 40 times injection as identified with determination of serum levels of alanine aminotransferase(ALT) activity and the histopathological findings. In the present experimental animal model, the decreasing rate of glutathione(GSH) and the increasing rate of glutathione S-transferase activity to the control group were higher in B7 group than B40 group. Furthermore the single dose of bromobenzene was injected to the two groups and sacrificed at 8hr and the hepatic aniline hydroxylase(AH) activity, GSH content and GST activity were determined. The increasing rate of AH activity to the control was lower in B40 group than B7 group and the decreasing rate of GSH to the control was also lower in B40 than B7 group. Moreover, B7 group showed the increased activity of hepatic GST to the control whereas B40 group showed the decrease activity of the enzyme. And Vmax value in GST was more decreased in B40 group than B7 group.

Key Words : Bromobenzene metabolism, Severe liver damage

I. 서 론

최근 산업현장에서 흔히 취급하는 xenobiotics성 산업 공해물질이 인체에 심각한 건강 문제를 야기시키고 있음은 주지의 사실이다. Xenobiotics의 일종으로 산업공정에서 유기 용제로 사용되고 있는 bromobenzene은 인체에 폭로시 간조직 세포의 다기능 복합산화기구에 의해 친전자성 물질인 bromobenzene 3,4-oxide로 전환되어 간독성을 야기(James, 1985; Zheng과 Hanzlik, 1991)시킨다고하며, glutathione S-transferase(GST)의 작용에 의해 포함인자인 glutathione(GSH)과 포함되어지든가 혹은 epoxide hydrolase에 의해 diol 형태로 무독화되어 체외로 배설되는 것으로 알려져 있다(Boylard와 Chasseud, 1969; Thor, 1978; Lee 등, 1990).

한편 생체는 내외적인 환경, 영양 및 생리적 상태에 따라 생체의 항상성이 영향을 받는 것으로 보고(Kato, 1977; Hodgson, 1987)되고 있으며, 병태 생리적인 조

건인 급만성 간질환시 약물의 대사율이 감소(Zilly 등, 1975; Vessey, 1980)하고, xenobiotics의 혈중 반감기가 연장(Williams와 Benet, 1982)된다고 보고하고 있어 병태 생리적인 조건에 따라 독성물질을 해독하는 해독기구의 활성변동도 생체의 항상성을 유지시키기 위한 생리적 적응현상으로 사료된다. 그러나 Black과 Billing(1969) 및 Motayama(1979)는 급만성 간염시에도 xenobiotics의 대사와 관련된 glucuronide 포함효소의 활성은 정상수준을 유지한다고 보고하고 있어 조직의 손상에 따른 xenobiotics 대사의 변동에 대한 정확한 기전에 대해서는 상당한 논란이 되고 있는 실정이다.

또한 산업현장에서 근로자들이 급만성적으로 독성 물질에 노출된 상태에서, 이와 동일한 기전을 거쳐 조직의 손상을 야기시키는 종류의 독성물질에 노출되는 경우와 이미 노출된 독성물질과는 전혀 무관한 독성기전을 거쳐 조직의 손상을 야기시키는 독성물질에 노출

되는 경우는 그 반응이 현저히 다르게 나타날 것으로 생각된다. 그러나 아직 이에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구에서는 간손상의 정도가 xenobiotics의 대사에 어떠한 영향을 미치는지 검토하는 일환으로 간독소로 유발시킨 간손상 정도차이의 모델에서 동일한 독성기전을 통해 간손상을 유발하는 독성물질의 대사를 확인코자 간독소인 bromobenzene의 투여횟수를 달리하여 경미한 간손상과 심한 간손상의 모델을 유도한 실험동물에서 bromobenzene을 재투여하여 이의 대사에 관여하는 cytochrome P450(CYP)의 기능과 관련된 aniline hydroxylase (Haugen과 Coon, 1976) 활성 및 GSH의 함량과 이의 포합효소인 GST의 활성 변동을 측정하여 상호 비교 검토하므로써 조직손상을 야기시킨 독성물질과 동일한 물질의 대사에 미치는 영향을 관찰코자한다.

II. 재료 및 방법

1. 동물 및 처치

경북의대 사육실에서 구입한 외견상 건강한 200 g 내외의 Sprague-Dawley 종의 수컷 흰쥐를 정상군과 두 실험군으로 나누고 다시 각각을 대조군과 bromobenzene 재투여군으로 구분하여 한 군당 6마리씩 분리하여 Table 1과 같은 식이조건으로 약 1개월간 사

Table 1. Composition of experimental diet (g/kg diet)

Ingredients	Quantity
Casein	200
Corn starch	674.36
Corn oil	54.85
Vitamin A & D mix ¹⁾	10.2
Vitamin E & K mix ²⁾	2
Water sol. vitamin ³⁾	3
Vitamin B12 ⁴⁾	1
Salt mix ⁵⁾	40
α -Cellulose	20
4081 Kcal	

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

²⁾5g of α -tocopherol and 0.2 g of menadion dissolved in 200 ml of corn oil

³⁾contained (mg): choline chloride 2000, 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⁾5 mg of vitamin B₁₂ dissolved in 500 ml of distilled water.

⁵⁾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.

육시켜 실험에 사용하였다. 전처치로서는 두 실험군에 bromobenzene(400 mg/kg of body weight, i.p.)(Lee 등, 1990)을 2일 마다 한번씩 7회(B7) 및 40회(B40) 반복 투여하였고 1일간 절식 후 bromobenzene 재투여군에 bromobenzene을 1회 재투여하여 8시간째 처치하였다.

2. 효소원의 조제

실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복하고 복부대동맥으로 부터 혈액을 채취하여 실험사 시킨 뒤 생리식염수로 간장을 관류한 후 간장을 적출하였다. 적출한 간장 일부는 1g당 4배량의 0.25M sucrose 용액을 가하여 빙냉하에 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액(20% W/V)을 700×g에서 10분간 원심분리한 다음 핵 및 미마쇄부분을 제거하고, 15,000×g에서 30분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 제거시킨 상층액을 다시 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosolic 및 microsomal fraction을 분리하였다.

3. 생화학적 분석

간조직 중 GSH의 함량은 비단백성 sulfhydryl group을 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)로 발색시켜 비색 정량 하는 Ellman(1959)의 방법에 따라 정량하였으며 혈청 alanine aminotransferase(ALT) 활성도 측정은 Reitman과 Frankel(1957)의 방법에 따라 조제된 kit 시액을 사용하였다. Microsomal aniline hydroxylase (AH) 활성도 측정은 Bidlack과 Lowery(1982)의 방법을 이용하였다. 간조직 중 GST의 활성도 측정은 Habig 등(1974)의 방법에 준하였다. 한편 간조직 cytosol(36.0 mg of protein)을 효소시료로 하여 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 일정하게 하고 GSH 기질 농도(pH=6.5)를 달리하여 간조직 중 GST 효소의 kinetics를 측정하고 double reciprocal plots을 이용하여 K_m치와 V_{max}치를 결정하였다. 단백질 함량은 Lowry 등(1951)의 방법에 준하여 측정하였다.

4. 광학현미경적 관찰

간조직의 일반적인 조직학적 변화를 관찰하기 위해 적출한 흰쥐 간 중엽을 즉시 10% neutral formalin액에 고정하고 통상의 방법에 따라 paraffin으로 포매한 후 4~6 μ m의 절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색하여 광학현미경으로 조직학적 검사를 실시하였다.

III. 결 과

1. 체중당 간무게(%), 혈청 ALT 활성 및 병리조직학적 결과

실험동물에 bromobenzene 7회 투여군(B7)과 40회 투여군(B40)의 체중당 간무게는 B7 group에 있어서는 대조군에 비하여 약 1.6배의 유의한 증가를 보였으며, B40군은 약 1.5배 증가되어 두 군간에 별다른 차이를 볼 수 없었다(Table 2). 한편 병리조직검사에서는 정상군은 별다른 이상이 관찰되지 않았으며(Fig. 1), B7군은 간세포의 공포변성(balloning degeneration)을 나타내는 비교적 경미한 간손상을 보였다(Fig. 2). B40군에서는 공포변성 뿐만 아니라 microfatty chang(Fig. 3), 그리고 nodular formation과 bridging necrosis(Fig. 4)가 관찰되었다.

2. 간조직의 microsomal AH 활성변동

실험동물에 bromobenzene을 7회(B7)및 40회(B40)

Table 2. Changes in the liver weight per body weight(%) and levels of serum ALT activity in bromobenzene-pretreated rats

Groups	Normal	B7	B40
Liver wt./ body wt.(%)	3.01±0.06	4.85±0.17*** ^{a)}	4.45±0.68
Serum ALT ^d	25.60±6.47	39.70±7.01	268.00±28.52*** ^{a,b)}

Each value represents the mean ± S.E. of 6 rats.

B7: Intraperitoneal bromobenzene 7 times injection group (one time every 2 day; 400 mg/kg body wt.)

B40: Intraperitoneal bromobenzene 40 times injection group (one time every 2 day; 400 mg/kg body wt.)

^{a)}Karmen unit/ml of serum

^{b)}Significantly different from normal group, ^{c)}Significantly different from B7 group. (***, p<0.001)

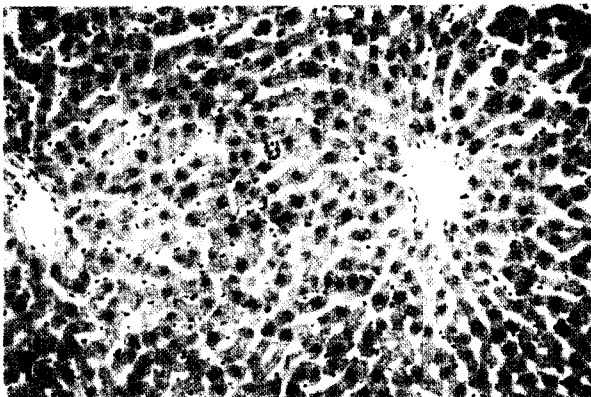


Fig. 1. Normal 10 weeks rat. The hepatic parenchyma is well preserved (H&E, ×100)

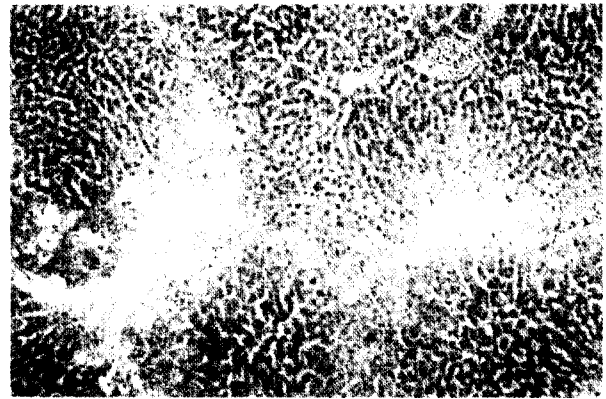


Fig. 2. B7 rat. Balloning degeneration of the hepatocytes are focally seen (H&E, ×40)

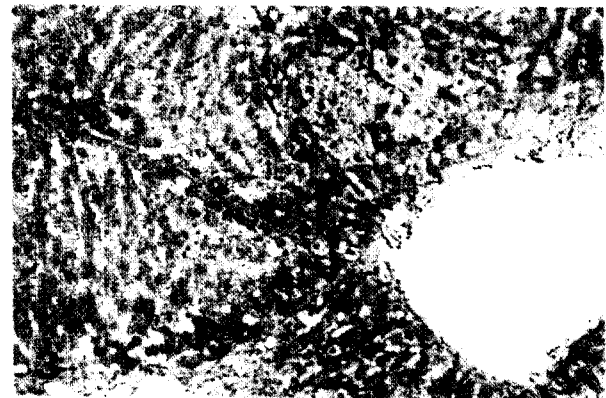


Fig. 3. B40 rat. The hepatocytes show diffuse balloning degeneration and microfatty change (H&E, ×100)

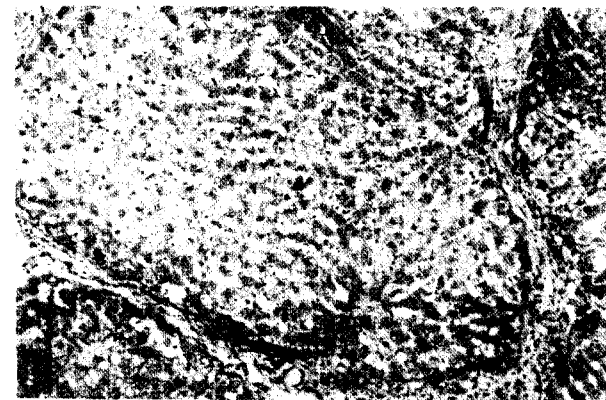


Fig. 4. B40 rat. Nodular formation of the hepatic parenchyma with bridging necrosis is seen. The hepatocytes show microfatty change and balloning degeneration (H&E, ×100)

전처치한 다음 bromobenzene을 재투여 8시간 후 간조직 중 AH 활성을 측정하는 것이 Fig. 5와 같다. 정상군은 bromobenzene을 투여하므로써 본 효소의 활성이 약

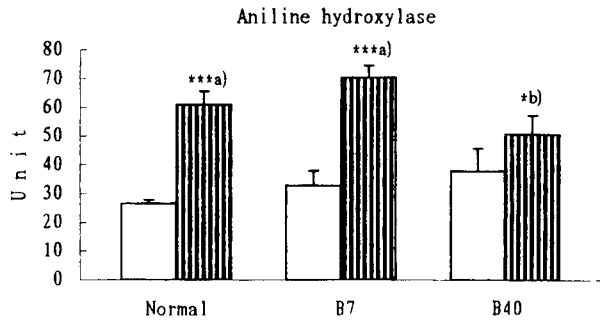


Fig. 5. Effect of bromobenzene retreatment on the hepatic microsomal aniline hydroxylase (AH) activities in bromobenzene-pretreated rats. Each value represents the mean \pm S.E. of 6 rats. Other abbreviations are the same. Fig. 2. a) Significantly different from each control group (***) $p < 0.001$ b) Significantly different from the B7 group (*) $p < 0.05$ Unit; p-aminophenol n moles/min/mg protein □ : Control group, ▨ : bromobenzene retreated group

1.75배의 유의한 증가를 보였으며, B7군은 약 2.6배 유의하게 증가되었다. 그리고 B40군은 대조군에 비하여 약 1.7배 증가되었다.

3. 간조직 중 GSH 및 GST 활성 변동

Fig. 6은 B7군 및 B40군에 bromobenzene 재투여 8시간 후 간조직 중 GSH 함량을 측정하는 것이다. 정상군에서는 GSH치가 대조군에 비하여 약 75% 감소되었으며, B7군에는 약 88%, B40 군에서는 약 66% 감소되었다. 한편 간조직 중 GST 활성은 bromobenzene을 투여하므로써 정상군은 약 18% 증가되는 경향을 보였으며, B7군은 약 15% 증가되었다. 그러나 B40군은 bromobenzene을 투여하므로써 오히려 13% 감소되는 경향을 보였다(Fig. 7).

4. GST의 반응속도

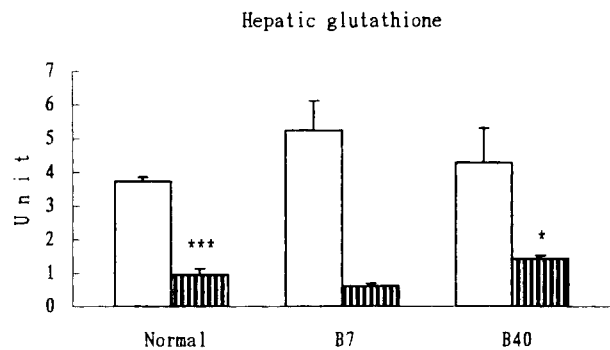


Fig. 6. Effect of bromobenzene retreatment on the hepatic glutathione contents in bromobenzene-pretreated rats. Other abbreviations are the same Fig. 2. Significantly different from each control group (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.001$ Unit; μ moles/g of liver tissue □ : Control group, ▨ : bromobenzene retreated group

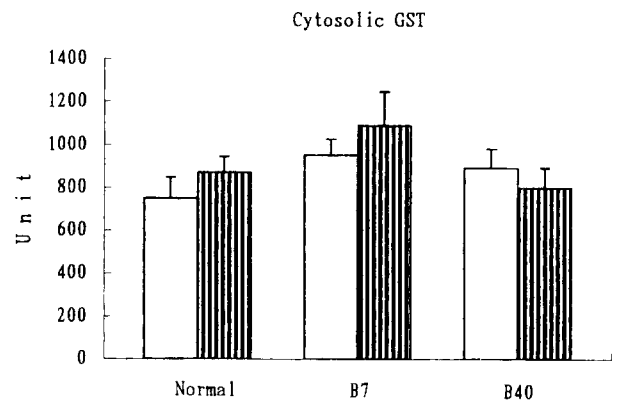


Fig. 7. Effect of bromobenzene retreatment on the hepatic cytosolic GST activities in bromobenzene-pretreated rats. Other abbreviations are the same Fig. 2. Unit; 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate n moles/min/mg protein □ : Control group, ▨ : bromobenzene retreated group

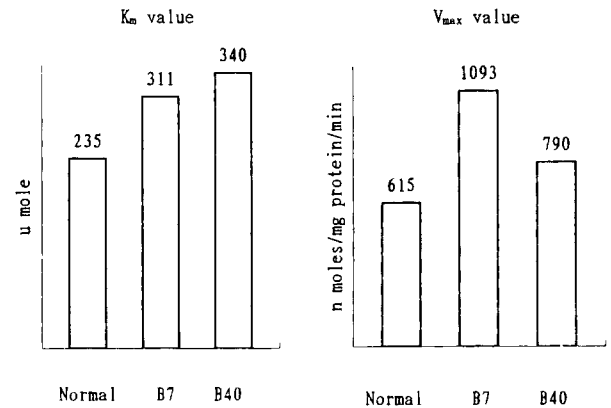


Fig. 8. Effect of bromobenzene retreatment on the K_m and V_{max} value in hepatic GST Each value represents the mean of 5 experiments. Other abbreviations are the same Fig. 2. Each animal (Normal, B7, B40) were sacrificed at 8 hr after bromobenzene retreatment and each enzyme specimen was prepared from the pooled liver in each group.

정상군, B7 및 B40군에 bromobenzene 투여 8시간째의 실험군의 간조직을 효소시료로하여 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 일정히 하고 GSH 농도를 달리하여 GST 활성을 측정하여 double reciprocal plots로 부터의 계산으로 K_m 치와 V_{max} 치를 구한 것이 Fig. 8과 같다. B7군과 B40 군간에 K_m치는 유사하였으나 V_{max}치는 B7군이 B40군 보다 약 38% 증가되었다.

IV. 고 찰

신(1997)은 bromobenzene으로 유도한 급성 간손상시 bromobenzen의 대사율은 정상군 보다 오히려 높게 나타난다고 보고하고 있으나, Zilly 등(1975) 및 Vessey

(1980)는 xenobiotics의 대사가 억제된다고 보고하고 있어 간손상과 xenobiotics 대사의 상호 관련성에 대해서는 관심의 대상이 되고 있으나 정확한 기전에 관한 연구는 미비한 실정이다.

이에 본연구에서는 간손상의 정도에 따라 xenobiotics의 대사에 어떠한 영향을 미치는지 검토코자 간독소인 bromobenzene을 7회 투여한 군(B7)과 40회 투여한 군(B40)에서 체중당 간무게 및 혈청 ALT 활성 변동과 간조직 병리검사를 행하였을 때, B7군은 경미한 간손상이, B40군은 괴사세포가 많이 나타나는 심한 간손상이 나타났다. 이러한 결과는 타 연구자의 보고(Reid 등, 1971)와 차이가 있는 것으로 bromobenzene의 수회 투여로서도 상당한 정도의 간손상이 야기되는 것으로 알려져 있으나, 이는 실험동물의 출처 뿐만 아니라, 성장기간과 성장 조건의 차이에서 기인된 결과로 사료되어진다.

이러한 동물실험 조건하에서 bromobenzene을 재투여한 다음 8시간 경과 후의 aniline hydroxylase의 활성은 각각의 대조군에 비해서는 모든 군에서 증가하였으나, 그 증가율은 경미한 간손상이 유도된 B7군에서 가장 높게 나타났고, 심한 간손상이 야기된 B40군이 가장 낮게 나타났다. 이러한 현상은 bromobenzene의 중간 대사산물인 bromobenzene 3,4-oxide가 CYP를 불활성화시킨다는 보고(Brodie 등, 1971; Sipes 등, 1971)를 고려해 볼 때, 장기간의 bromobenzene을 투여하였을 때, 지속적으로 생성된 bromobenzene 3,4-oxide에 의해 본 효소의 활성이 영향 받음으로써 나타난 결과로 사료된다. 한편, bromobenzene 3,4-oxide의 해독에 관여하는 포함인자인 GSH의 함량은 bromobenzene을 투여하므로써 모든 실험군에서 공히 감소하였으나 그 감소율은 B7군에서 가장 크게 나타났다. 그러나 해독 효소인 GST의 활성은 정상 대조군에 bromobenzene을 투여한 군과 B7군에서는 증가하는 경향을, B40군에서는 이와는 반대로 감소하는 경향을 보였다.

이미 발표한 보고(신, 1997)에서는 bromobenzene의 급성적 투여로 GST의 기질성 물질인 bromobenzene 3,4-oxide가 과잉 생성되므로 이로 인한 기질성 유도작용에 의해 GST의 활성이 증가 되므로써 bromobenzene으로 유도된 경미한 간손상시 오히려 정상 대조군에 비해 GSH의 이용율이 높게 나타난다고 하였다. 그러나 본 실험에서 bromobenzene을 장기간 투여하여 심한 간손상이 유도된 B40군의 경우에는 aniline hydroxylase의 활성 증가율이 B7군에 비해 낮게 나타난 결과를 고려해 볼 때 B40군에서는 bromobenzene 3,4-oxide의 생성량이 B7군 보다 낮을 것으로 사료되어지

며, 이로 인해 B40군에서 GST 효소단백의 합성자극이 감소되어 나타난 결과로 이로 인하여 간조직의 GSH 이용율도 감소되어진 것으로 생각된다. 이를 확인할 목적으로 GST의 Vmax치를 관찰하였을 때, 심한 간손상이 야기된 B40군이 경미한 간손상이 야기된 B7군에 비해 낮게 나타난 것으로 보아 B40군에서 B7군에 비해 GST의 효소단백 합성율이 감소된 것을 뒷받침해주고 있는 것으로 생각된다.

이상의 실험결과와 문헌상의 지견을 종합해 볼 때 bromobenzene에 의해 심한 간손상이 유도되었을 때 경미한 간손상이 유도된 경우에 비해 bromobenzene의 대사율이 낮게 나타난 것은 bromobenzene 대사에 관여하는 효소단백합성의 억제에 기인된 것으로 사료되나 이점에 대해서는 추후 계속적인 연구가 행해져야 할 것이다.

V. 결 론

Bromobenzene에 의한 간손상 정도가 bromobenzene 대사에 어떠한 영향을 미치는 지를 검토하는 일환으로 흰쥐에 bromobenzene을 2일 간격으로 40회(B40) 및 7회(B7) 전처치한 후 체중당 간무게, 혈청 alanine aminotransferase 및 간조직 검사를 통하여 간손상 정도가 B40군은 괴사가 심한 간손상을, B7군은 경미한 간손상의 실험동물로 확인되었다. 이들 실험 동물에 bromobenzene을 재투여한 다음 8시간 후 aniline hydroxylase(AH) 활성과 glutathione(GSH) 함량 및 이의 포함 효소인 glutathione S-transferase(GST) 활성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

간조직 중 AH 활성과 GSH 함량 감소율 및 GST 활성 증가율은 정상군 및 간손상이 경미한 실험군 보다 간손상이 심한 실험군에서 낮게 나타났다. 또한 GST의 Vmax치 역시 간손상이 심한 실험군에서 간손상이 경미한 군 보다 낮게 나타났다.

이상 실험결과를 종합해 볼 때 간손상이 심할 경우 bromobenzene 대사가 억제되며 이는 bromobenzene 대사에 관여하는 효소단백합성억제에 기인된 결과로 생각된다.

참고문헌

- Bidlack, W. R. and Lowery, G. L. (1982): Multiple drug metabolism. : p-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 311-317.
- Black, M. and Billing, B. H. (1969): Hepatic bilirubin

- UDP-glucuronyl transferase activity in liver disease; Gilbert's syndrom. *N. Engl. J. Med.* **280**, 1266.
- Boyland, E. and Chasseud, L. F. (1969): The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.* **32**, 173-219.
- Brodie, B. B., Reid, W. D., Cho, A. K., Sipes, G., Krishna, G. and Gillette, J. R. (1971): Possible mechanism of liver necrosis caused by aromatic organic compounds. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **68**, 160-164.
- Ellman, G. L. (1959): Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
- Habig, W. H., Pabist, M. J. and Jakoby, W. B. (1974): Glutathione S-transferase.: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.
- Haugen, D. A. and Coon, M. J. (1976): Properties of electrophoretically homogenous phenobarbital-inducible and A-naphthoflavone inducible forms of liver microsomal cytochrome-P450. *J. Biol. Chem.* **251**, 7929-7939.
- Hodgson, E. (1987): Modification of metabolism. In "Modern Toxicology." (E. Hodgson and P. E. Kevi eds.), pp. 85-121. Elsevier, New York.
- James, R. C. (1985): Hepatotoxicity: Toxic effects in the liver. In "Industrial toxicology." (Williams, P. L. and Burson, J. L.) 78-105, Van Nostrand Reinhold New York).
- Kato, R. (1977): Drug metabolism under pathological and abnormal physiological states in animals and man. *Xenobiotica*, **7**(1-2), 25-92.
- Lee, S. I., Yoon, C. G. and Huh, k (1990): Protective effect of diallyl disulfide on the bromobenze induced hepatotoxicity in mice. *Korean J. Pharmacol.* **26**, 185-192.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Motayama, Y. (1979): Studies of human liver bilirubin-glycosyl transferase. Bilirubin UDP-xylosyl and UDP-glucuronyl transferase activities in diseased human liver. *Enzyme*. **24**(3), 158-162.
- Reid, W. D., Christie, B., Krishna, G., Mitchell, J. R., Moskowitz, J. and Brodie, B. B. (1971): Bromobenzene metabolism and hepatic necrosis. *Pharmacology*, **6**, 41-55.
- Reitman, S. and Frankel, S. (1957): A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic acid and glutamic pyruvic transaminas. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 58-63.
- Sipes, G., Krishna, G. and Brodie, B. B. (1971): Mechanism of bromobenzene hepatotoxicity. II. Studies in vitro. *Fed. Proc.* **30**, 439.
- Thor, H. (1978): Drug biotransformation and hepatotoxicity studies with bromobenzene in isolated hepatocytes. *Arch. Toxicol. (Suppl.)*, **1**, 107-114.
- Vessey, D. A. (1980): Hepatic metabolism of drugs and toxin. In "Hepatology." (D. Zakim and T. D. Boyer, eds.), W. B. Saunders Co., Philadelphia, p. 197-230.
- Williams, R. L. and Benet, L. Z. (1982): Hepatic function and pharmacokinetics. In "Hepatology" (D. Zakin and T. D. Boyer, eds), W.B. Saunders. Co. Philadelphia, p. 230-246.
- Zheng, J. and Hanzlik, R. P. (1991): Premercapturic acid metabolites of bromobenzene derived via its 2, 3-and 3, 4-oxide metabolites. *Xenobiotica.* **21**(4), 535-546.
- Zilly, W., Richter, E., and Rietbrock, N. (1975): Pharmacokinetics and metabolism of digoxin-and-methyl-digoxin-12 alpha-3H in patients with acute hepatitis. *Clin. Pharmacol. Ther.* **17**, 302-309.
- 신중규 (1997): 흰쥐에 있어서 Bromobenzene 전처치가 간 조직중 Glutathione 및 Glutathione S-transferase 활성에 미치는 영향. *한국환경위생학회지*, **23**(2), 83-88.