*Korean J. Toxicol.*
Vol. 7, No. 2, pp. 165-171, 1991



# 육체운동이 사염화탄소의 간독성에 미치는 영향

김민경 · 김영칠*

서울대학교 약학대학
서울특별시 관악구 신림동 산 56-1
*(Received November 12, 1991)*
*(Accepted November 25, 1991)*

# EFFECTS OF FORCED PHYSICAL EXERCISE ON CARBON TETRACHLORIDE HEPATOTOXICITY

Min Kyung Kim and Young Chul Kim*

*College of Pharmacy, Seoul National University*
*San 56-1 Shinrim-Dong, Kwanak-ku, Seoul 151-742, Korea*
*(Received November 12, 1991)*
*(Accepted November 25, 1991)*

***ABSTRACT:*** *Effects of forced physical exercise on the $CCl_4$ hepatotoxicity were examined in adult female rats. Rats were treated with $CCl_4$ (2 mmol/kg, ip) and introduced into a cylindrical cage rotating at 9 rpm for 20 min/hr for 6 hr. Eighteen hr following the termination of exercise serum sorbitol dehydrogenase (SDH), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) activities and glucose-6-phosphatase activity were determined as parameters for hepatotoxicity. Physical exercise inhibited the $CCl_4$-induced increases in SDH, GOT, GPT activity, and glucose-6-phosphatase activity was decreased less. Distribution of [$^{14}CCl_4$] and the metabolites in major organs and tissues was determined immediately following the exercise period. Significantly less radioactivity remained in the body fat of the exercise group compared to that of the sedentary rats. The total radioactivity in the carcass was also lower indicating that $CCl_4$ was eliminated more rapidly in the exercise group. The results suggest that acute physical exercise decreased the $CCl_4$ hepatotoxicity by altering distribution and enhancing disposition of this solvent in the body.*

***Key words:*** *Physical exercise, Carbon tetrachloride, Distribution and disposition of $CCl_4$, Hepatotoxicity.*

*To whom correspondence should be addressed

## 서 론

간의 약물대사능력은 각 개체가 가지는 유전적, 환경적 요소의 복잡한 상호작용에 의존하는 것으로 알려져 있다. 최근에 들어와 육체운동이 위의 요소들 중의 하나로 추가되고 있다.

Døssing (1985) 은 중등이상의 육체운동을 수시간 부과했을때 indocyanine green clearance를 지표로 측정한 간혈류량이 저하되고 이에 따라 lidocaine과 같이 flow-limited metabolism을 보이는 약물의 배설은 감소하며 antipyrine과 같이 capacity-limited metabolism을 나타내는 약물은 영향을 받지 않음을 보고하였다. 또한 Somani와 Babu (1990) 는 육체운동이 각 조직으로의 혈류량을 변화시킴으로써 physostigmine 또는 그 대사물의 체내분포 및 배설이 변화함을 관찰하였다. 이 결과들은 육체운동은 대사 또는 활성 부위로의 약물 전달량에 영향을 주어 생체내의 반응을 변화시킬 수 있음을 지적하고 있다.

실제로 Stokinger 등(1956)은 랫트에게 시간 당 15분 씩 6 시간동안 가벼운 운동을 부과한 결과 sedentary group 에서는 독성을 나타내지 않는 농도인 1 ppm의 ozone이 치명적인 독성을 보이는 것을 관찰하였다. 또 DiVincenzo와 Kaplan (1981)은 인체에 100 ppm의 이염화메탄을 흡입시킬때 운동군의 carboxyhemoglobin (COHb) 농도가 대조군에 비하여 약 두 배 증가함을 관찰하였다. 그러나 Carlson과 Kim (1986)은 위의 결과와는 상반되는 육체운동효과를 보고한 바 있다. 즉 랫트를 사용한 실험에서 1000 ppm의 이염화메탄을 8 시간동안 흡입시킬 때 혈중 이염화메탄 및 COHb 농도가 오히려 분당 11 회전하는 원통형의 케이지 내에서 시간 당 15분 씩 운동을 부여한 동물군에서 현저히 낮음을 보고하였다.

본 연구에서는 산업현장에서 널리 사용되는 유기용매인 사염화탄소의 간독성에 육체운동이 미치는 영향과 그 기전을 규명하고자 하였다. 사염화탄소는 mixed-function oxidase (MFO) enzyme system에 의해 trichloromethyl free radical ($\cdot CCl_3$) 로 활성화 되어 간독성을 유발하므로 사염화탄소 간독성에 육체운동이 미치는 영향 및 그 기전을 연구하는 것은 육체운동이 약물대사 능력에 미치는 영향을 밝히는 데 있어 매우 의미있는 정보를 줄 수 있을 것으로 기대하였다.

## 재료 및 방법

### Animals

전 실험에 걸쳐 체중 150-250g의 자성 Sprague-Dawley rats를 사용하였다. 실험동물은 분양받은 후 3 주 이상 사육실에서 적응시키고 실험에 사용하였다. 사육실은 온도 22±5℃, 습도 55±5%의 환경을 유지하고 사료와 물은 제한없이 공급하였다.

### Chemicals

시험에는 glucose-6-phosphate disodium salt, NADPH, semicarbazide HCl, NADH, bovine serum albumin, 2,4-dinitrophenylhydrazine (이상 미국 Sigma Chemical 사), nicotinamide (미국 Aldrich Chemical 사), carbon tetrachloride (일본 Junsei Chemical 사), potassium tartrate (미국 Merck Chemical 사), [$^{14}$C]$CCl_4$ (미국 New England Chemical 사), GOT 및 GPT kit (영동제약, Seoul) 등을 사용하였다. 그외 사용된 모든 시약 및 용매류는 reagent grade 또는 그 이상이었다.

### Treatment

사염화탄소는 corn oil에 용해 시킨 뒤 2 mmol/kg 용량을 복강 주사하고 투여 즉시 운동군과 대조군의 두 group으로 분리 하였다. 운동군은 9 rpm (7 m/min) 의 속도로 회전하는 케이지에 넣어 시간 당 20 분씩 6 시간동안 육체운동을 부과하였다. 사용된 회전케이지는 직경 20 cm, 길이 50 cm의 목재 및 철재를 사용한 원통을 모터에 연결한 것으로 (Fig. 1), 분당 9 회전의 속도에서 랫트는 케이지의 회전에 순응하여 지속적인 운동을 실시하였다. 운동시간 동안 대조군은 회전케이지와 같은 모양의 케이지에 넣어 회전없이 방치하였다. 사염화탄소 분포 실험에서는 [$^{14}$C] $CCl_4$이 혼합된 사염화탄소를 투여하고 6 시간동안 운동시킨 후 각 조직의 잔류 radioactivity를 측정하였다.

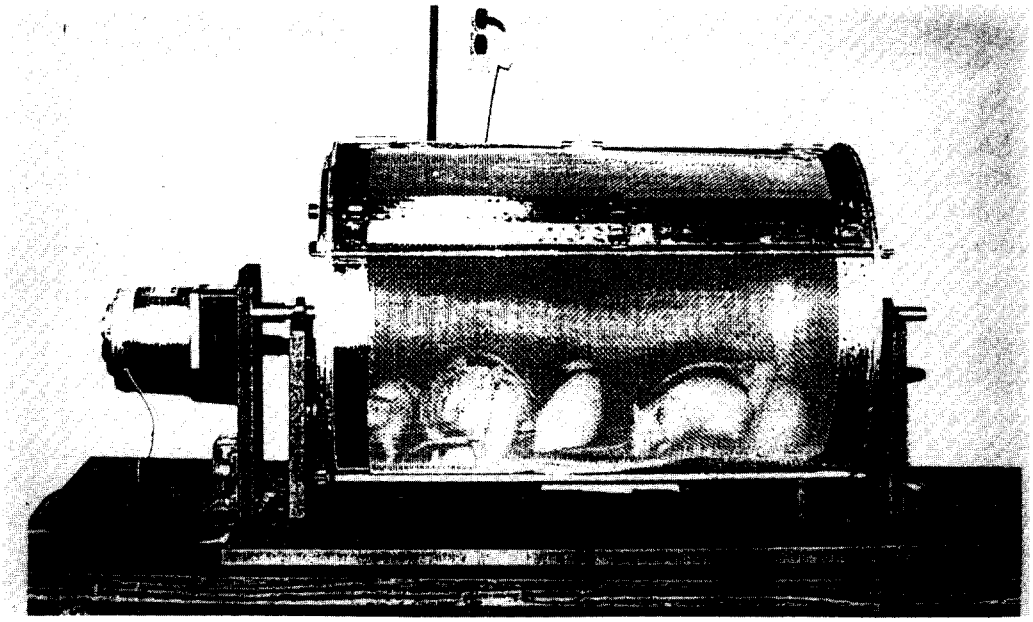

**Fig. 1.** Rotating cage used to force the animal to exercise

**Assays**

SDH (sorbitol dehydrogenase) 활성은 Gerlach (1965)의 방법을 수정하여 측정하였다. 0.2 M triethanolamine 완충액 (pH 7.4) 2.4 m*l*과 혈청 0.2 m*l*, NADH (12 mM) 0.1 m*l*에 72% fructose 용액 0.3 m*l*을 가하고 366 nm에서 1 분간 흡광도의 변화를 측정하여 SDH 활성을 구하였다.

GOT 및 GPT 활성 측정은 Reitman과 Frankel (1957)의 방법을 사용하여 측정하였다. GOT와 GPT 기질액을 1 m*l*씩 취하고 혈청 0.2 m*l*을 가하여 37℃에서 GOT는 60 분간, GPT는 30 분간 incubation 하였다. Incubation 종료시 2,4-DNPH 1 m*l*과 0.4 N NaOH 10 m*l*을 가하고 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Glucose-6-phosphatase 활성은 Traiger와 Plaa (1971)의 방법을 수정하여 측정하였다. 적출된 간을 0.1 M maleate 완충액 (pH 6.25) 내에서 polytron으로 분쇄하여 homogenate 1 m*l* 당 간 50 mg이 함유되게 하였다. 0.2 M glucose-6-phosphate 0.5 m*l*, maleate 완충액 1.8 m*l*와 간 homogenate 0.2 m*l*을 incubation하고 10% trichloroacetic acid로 incubation을 종료시켰다. 2500 rpm로 원심분리한 상등액 1 m*l*과 $2\times10^{-3}$ M molybdate 용액 5 m*l*을 섞은 후 reducing agent ($4.2\times10^{-2}$M 1-amino-2-naphthol-4-sulphonic acid) 1 m*l*을 가하였다. 30 분 동안 방치한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사염화탄소의 체내 분포 측정은 Kim과 Matthews (1987)의 방법을 참고하였다. [$^{14}$C]$CCl_4$ ($2\times10^7$ dpm/2 mmol)를 rat에 2 mmol/kg으로 복강주사한 후 6 시간동안 운동을 부과하였다. 운동직후 단두치사시키고 혈액 1 m*l*을 심장에서 취해 건조지에 100 $\mu l$ 씩 적하하여 건조시켰다. 동물을 완전히 dissection하여 간, 폐, 뇌, 신장, 비장은 전 조직을 취하고 피부, 근육, 지방조직은 일정량 취하였다. 각 조직을 100 mg씩 칭량하여 Packard TriCarb Sample Oxidizer (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL, U.S.A.) 내에서 완전히 연소시켜 Carbo-sorb과 Permafluor의 1:2 혼합액에 $^{14}CO_2$로 포집하고 radioactivity를 측정하였다. 피부, 지방, 근육의 체중당 비율은 각각 11, 8, 50%로 추정하였다 (Kim and Matthews, 1987). 모든 sample은 triplicate하여 평균값을 구했다.

**Statistics**

모든 실험결과를 평균 ± 표준편차로 표시하고 two-tailed Student's *t*-test를 사용하여 유의성을 검정

하였다. 따로 기술하지 않은 한 p 값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

동물실험의 결과를 인체에 extrapolation하는 데 있어 인체가 대상물질에 노출시의 환경적 요소를 도입하는 시도는 매우 의미있는 연구방법이 될 수 있는 것으로 받아 들여지고 있다. 최근의 연구는 육체운동의 강도와 기간에 따른 생체 적응이 화학물질의 체내대사 및 분포에 영향을 주어 개체간의 화학물질에 대한 반응성의 차이를 유발할 수 있음을 지적하고 있다 (Stokinger *et al.*, 1956; DiVincenzo *et al.*, 1981; Boel *et al.*, 1984; Døssing, 1985; Carlson and Kim, 1986; Ardies *et al.*, 1989; Somani and Babu, 1990). 본 연구에서는 산업현장에서는 널리 사용되고 있는 용매인 사염화탄소의 독성에 육체운동이 미치는 영향을 측정하고 그 기전을 규명하고자 하였다.

사염화탄소는 mixed function oxidase (MFO) enzyme system의 활성에 의해 trichloromethyl free radical ( $\cdot CCl_3$) 을 형성하는 것이 간독성 유발의 전제조건으로 널리 받아들여지고 있다. 생성된 이 free radical은 인근 지질막을 공격하여 지질의 과산화를 일으키거나 (Recknagel, 1967; Recknagel and Glende, 1973; Recknagel *et al.*, 1982), free radical이 세포내의 단백질이나 지질 등의 macromolecules와 결합하여 (Villarruel *et al.*, 1974) 그 결과 간의 괴사, fatty infiltration, microsomal enzyme 활성 저하 등의 간독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 한편 최근에는 사염화탄소 또는 그 대사물이 endoplasmic reticulum의 Ca pump를 억제하여 세포내 calcium homeostasis를 저해하는 것이 간조직 괴사의 기전으로 제시되고 있다 (Glende *et al.*, 1986; Long and Moore, 1986).

급성 육체운동이 사염화탄소의 간독성에 미치는 영향을 측정하기 위해 사염화탄소가 전처리된 동물에게 운동을 부과하고 사염화탄소 투여 후 24시간 경과시 간독성의 지표로서 SDH, GOT, GPT 및 glucose-6-phosphotase 활성을 측정하였다. 혈청 enzyme 중 화학물질에 의한 간독성에 가장 민감한 지표로 알려져 있는 SDH의 활성 및 GOT, GPT 활성은 운동군이 비운동군에 비해 현저히 낮아 급성적인 운동이 사염화탄소의 간독성을 저하시킴을 보였다 (Table 1). 한편 MFO enzyme system이 존재하는 endoplasmic reticulum의 integrity가 활성유지를 위해 필수적인 glucose-6-phosphatase 활성은 운동군이 현저히 높아 육체운동이 사염화탄소의 간독성을 저하시킴을 보인 위 실험결과를 지지하고 있다. 본 실험에서 적용된 운동량 자체로는 사용된 간독성의 지표와 aminopyrine을 기질로 한 *in vitro* N-demethylase 활성에 아무런 변화를 주지 않았다 (data not shown). 따라서 위 실험에서 보인 육체운동의 사염화탄소 간독성 감소효과는 간대사활성의 저하에 기인한 것으로는 보이지 않는다.

본 실험에서는 육체운동에 의한 사염화탄소 간독성 감소 기전을 확인하기 위해 [$^{14}$C]$CCl_4$를 동물에게 투여하고 운동을 6시간동안 부과한 후 각 조직에서의 radioactivity를 측정하였다 (Table 2). 비운동군의 경우 총 radioactivity 투여량의 28%가, 운동군의 경우는 18%가 체지방에 잔류되어 있었으며 피부조직에는

**Table 1.** Effect of physical exercise on $CCl_4$ hepatotoxicity[a]

| Group | SDH (units/ml) | GOT (units/ml) | GPT (units/ml) | Glucose-6-phosphatase (μmol phosphate/g liver/min) |
|---|---|---|---|---|
| Sedentary | 865±157 | 165±24 | 219±80 | 12.07±1.17 |
| Exercise | 548±162[b] | 123±31[c] | 127±50[c] | 15.51±2.48[d] |

[a] Rats were treated with $CCl_4$ (2 mmol/kg, ip) and introduced into either a rotating cage or a stationary cage. The rotating cage rotated at a speed of 9 rpm for 20 min of each hour for six hours. Twenty four hrs following the treatment, the rats were sacrificed for the assay. Each value represents the mean±SD for at least 6 rats.

[b] Significantly different from the sedentary group (Student's *t*-test, $p<0.001$).

[c] Significantly different from the sedentary group (Student's *t*-test, $p<0.01$).

[d] Significantly different from the sedentary group (Student's *t*-test, $p<0.05$).

**Table 2.** Tissue distribution of [$^{14}$C]$CCl_4$ radioactivity following physical exercise[a]

| Tissue | Sedentary | | Exercise | |
|---|---|---|---|---|
| | dpm/mg | % ingested dose | dpm/mg | % ingested dose |
| Blood | – | – | – | – |
| Liver | 1.74±0.26 | 0.12±0.07 | 1.46±0.35 | 0.09±0.04 |
| Kidney | 1.27±0.17 | 0.05±0.02 | 0.93±0.13 | 0.04±0.01 |
| Skin[b] | 4.68±0.21 | 3.77±1.03 | 7.43±0.63 | 7.20±0.69[c] |
| Fat[b] | 58.85±12.18 | 28.14±3.77 | 35.48±6.26 | 17.61±4.19[d] |
| Brain | 0.52±0.22 | 0.04±0.01 | 0.39±0.10 | 0.02±0.01 |
| Spleen | 0.33±0.03 | 0.01±0.00 | 0.42±0.22 | 0.01±0.01 |
| Muscle[b] | – | – | – | – |
| Lung | – | – | – | – |
| total | | 32.12±4.91 | | 24.97±4.95 |

[a] Rats were treated with [$^{14}$C]$CCl_4$ (2 mmol/kg, *ip*) and introduced into either a rotating cage or a stationary cage. The rotating cage rotated at a speed of 9 rpm for 20 min of each hour for six hours. Immediately following the exercise, the rats were sacrificed for the assay. Each value represents the mean±S.D. for 3 rats.

[b] The total weight of muscle, skin, and fat was estimated 50, 16, and 11% of body weight, respectively.

[c] Significantly differnt from the sedentary group (Student's *t*-test, $p<0.01$).

[d] Significantly differnt from the sedentary group (Student's *t*-test, $p<0.05$).

비운동군의 경우 4%가, 운동군의 경우 7%가 잔류하여 체지방과는 대조적인 결과를 보였다. 그 외의 모든 조직 및 혈액에서는 두 군간에 radioactivity 잔류량의 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 전체적인 잔류 radioactivity는 두 군간에 통계적으로 유의성있는 차이를 보이지는 않았으나 운동군의 잔류량이 다소 낮은 양상을 나타내었다. 이 결과는 육체운동에 의해 사염화탄소의 전체적인 disposition량이 증가함을 시사하고 있다.

본 실험에서 관찰된 급성적인 육체운동에 의한 사염화탄소 간독성의 저하는 육체운동시 병행되는 생리적인 변화와 유관한 것으로 보인다. 즉, 운동에 의한 근육으로의 혈류량 증가 및 상대적인 내부장기로의 혈류량 감소에 의해 사염화탄소의 표적기관인 간을 포함하여 신장, 지방조직으로의 delivery되는 양이 감소되며 또한 운동량 증가에 의한 호흡심도와 호흡수의 상승에 의해 휘발성인 사염화탄소의 체외로의 배설이 증가하여 체내의 사염화탄소 body burden이 감소하는 것으로 추정된다. 이 관점은 운동 직후 사염화탄소의 체내 조직분포를 측정한 실험결과에 의해 지지되고 있다. 운동군에서 관찰된 피부조직 내의 사염화탄소 잔류량이 상대적인 증가는 근육운동 및 발한에 의한 피부조직으로의 혈류량 증가에 기인된 것으로 보인다.

동물실험 수행의 궁극적인 목표는 어떤 화합물의 인체에서의 반응성을 유추하기 위한 자료를 확보하는데 있다고 볼 수 있다. 그러나 동물실험결과의 extrapolation을 용이하지 않게 하는 요인의 하나로는 설치류와 인간의 behavioral difference를 들 수 있다. 야행성인 설치류를 대상으로 실시된 실험결과를 이용하여 육체운동이 왕성한 주간중의 인체에 적용하기 위한 extrapolation은 육체운동효과를 고려할 때에 보다 정확한 작업이 수행될 수 있을 것이다. 본 실험결과는 어떤 xenobiotic의 체내 대사 및 반응성을 정확하게 예측하기 위해서는 인체의 운동량을 고려해야 하며 이때 그 물질의 물리화학적 성질, 독성기전, 표적기관 등을 종합적으로 검토해야 함을 시사하고 있다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1989년도 교육부 학술연구조성비에 의해 지원되었으며 이에 감사드린다.

## 참고문헌


Ardies, C.M., Morris, G.S., Erickson C.K. and Farrar, R.P. (1989): Both acute and chronic exercise enhance *in vivo* ethanol clearance in rats, *J. Appl. Physiol.*, **66**, 555-560.

Boel, J., Anderson, L.B., Rasmussen, B., Hansen, S.H. and Døssing, M. (1984): Hepatic drug metabolism and physical fitness, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **36**, 121-126.

Carlson, G.P. and Kim, Y.C. (1986): Effect of forced exercise on dichloromethane blood levels and metabolism to carbon monoxide in rats, *IRCS Med. Sci.*, **14**, 795.

DiVincenzo, G.D. and Kaplan, C.J. (1981): Effect of exercise or smoking on the uptake, metabolism and excretion of methylene chloride vapor, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 141-148.

Døssing, M. (1985): Effect of acute and chronic exercise on hepatic drug metabolism, *Clinical Pharmacokinetics*, **10**, 426-431.

Gerlach, U. (1965): Sorbitol Dehydrogenase *in Method of Enzymatic Analysis*, 761 (Bergmyer, H. U. Ed., A.E. Harper).

Glende, E.A. Jr. and Pushpendran, C.K. (1986): Activation of phospholipase $A_2$ by carbon tetrachloride in isolated rat hepatocytes, *Biochem. Pharmcol.*, **35**, 3301-3307.

Kim, Y.C. and Matthews, H.B. (1987): Comparative metabolism and excretion of resorcinol in male and female F344 rats, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **9**, 409-414.

Long, R.M. and Moore, L. (1986b): Inhibition of liver endoplasmic reticulum calcium pump by carbon tetrachloride and release of sequstered calcium pool, *Biochem. Pharnacol.*, **35**(23), 4131-4137.

Recknagel, R.O. (1967): Carbon tetrachloride hepatotoxicity, *Pharmacol. Rev.*, **19**, 145-208.

Recknagel, R.O. and Glende, E.A. Jr., (1973): Carbon tetrachloride: An example of lethal cleavage, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **2**, 263-297.

Recknagel, R.O., Glende, E.A. Jr., Waller, R.L. and Lowrey, K. (1982): Lipid peroxidation: biochemistry, measurement and significance in liver cell injury *in Toxicology of the Liver.* (G.L. Plaa and W.R. Hewitt (Eds.), Raven Press, p. 213-241.

Reitman, S. and Frankel, S.K.: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase, *Amer. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56-63.

Somani, S.M. and Babu, S.R. (1990): Effect of trained exercise on time course of distribution of radioactivity in tissues of rat after $^{3}$H-physostigmine administration, *Toxicologist*, **10**, 241.

Stokinger, H.E. Wagner, W.D. and Wright, P.G. (1956): Studies of ozone toxicity. 1. Potentiating effects of exercise and tolerance development, *Am. Med. Assoc. Arch. Environ. Health*, **14**, 158-162.

Traiger, G.J. and Plaa, G.L. (1971): Differences in the potentiation of carbon tetrachloride in rats by ethanol and isopropanol pretreatment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **20**, 105-112.

Villarruel, M.C., Diaz Gomez, M.I. and Castro, J.A. (1975): The nature of the *in vitro* irreversible binding of carbon tetrachloride to microsomal lipids, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **33**, 106-114