Korean J. Toxicol.
Vol. 12, No. 2, pp. 237-241, 1996

식이성 단백질 함량이 Toluene 대사에 미치는 영향

윤종국* · 김경순 · 전태원
계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

Effect of Dietary Protein Content on the Toluene Metabolism in Rats

Chong-Guk Yoon*, Kyoung-Soon Kim, Tae-Won Jeon
Dept. of Public Health, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea
(Received September 16, 1996)
(Accepted October 2, 1996)

ABSTRACT : *To study an effect of toluene administration on the toluene metabolism in rats liver previously fed a low (casein 7%, LP) or standard (casein 20%, SP) protein diet, toluene (50% in olive oil) was given at 0.2 ml per 100 g body weights once daily during 4 days to the male rats. The content of hepatic cytochrome P-450 was higher in rats fed SP than those fed LP. The hepatic benzylalcohol dehydrogenase activity was higher both in toluene-treated rats and its control group fed SP than those fed LP. The hepatic benzaldehyde dehydrogenase activity was somewhat higher in rats fed SP than those fed LP. In the case of toluene treatment, the increasing rate of hippuric acid contents to the control group were higher in rats SP than those fed LP. In conclusion, it is likely that the metabolic rate of toluene would be higher in rats fed SP than those fed LP.*

Key Words : *Low or standard protein diet, Toluene, Cytochrome P-450, Benzylalcohol dehydrogenase, Benzaldehyde dehydrogenase, Hippuric acid*

I. 서 론

최근 산업 발전에 따른 산업장에서의 유해물질의 폭로로 인간의 건강에 위해를 초래하고 있는 실정이다. 이러한 유해 공해 물질에 의한 질병의 예방에 영양관리적 측면의 중요성이 인정되고 있다. 이들 산업 공해 물질중 xenobiotics의 독성과 영양 상태와의 상호관련성에 대해서는 많은 연구자들에 의하여 보고(Drill, 1952; Drill 등, 1947; Campbell 등, 1974; Yoon 등, 1988)되어 왔다. 한편 xenobiotics의 일종인 toluene의 독성에 대한 단백영양의 영향에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

일반적으로 xenobiotics의 독성은 이들 물질의 대사율에 영향을 받으며 단백식이 조건에 따라서 달라진다고(Sachan, 1975; Kato 등, 1968; Anthony, 1973; Miranda 등, 1973) 한다. 따라서 toluene 대사율 역시 단백식이 조건에 따라서 영향을 받을 것으로 사료된다. Toluene은 체내에서 cytochrome P-450에 의하여 benzylalcohol로 다시 benzylalcohol dehydrogenase (BADH)에 의하여 benzaldehyde로 전환된 다음 benzaldehyde dehydrogenase(BALDH)에 의하여 benzoic acid로 되어 최종적으로 glycine과 포합되어 마뇨산으로 뇨중으로 배설된다고(Ellenhorn 등, 1988; Rodwell, 1991) 한다.

본 연구에서는 저 및 표준단백식이로 성장한 흰쥐에 toluene 투여시 요 중 마뇨산 함량을 측정함과 동시에 toluene 대사에 관련된 cytochrome P-450, BADH 및 BALDH 활성도를 측정하여 이들 성적을 상호 비교검토코자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 동물 및 처치

동물은 체중 120 g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley종의 숫 흰쥐를 Table 1의 사료 성분표에 의하여 저단백식이군 (casein 7%, LP)과 표준단백식이군

* To whom all correspondence should be addressed

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

Ingredients	Low protein diet	Standard protein diet
Casein	70	200
Corn starch	804.36	674.36
Corn oil	64.85	64.85
Vitamin A & D mixture (a)	10.2	10.2
Vitamin E & K mixture (b)	2	2
Water soluble vitamin mixture (c)	3	3
Vitamin B_{12} (d)	1	1
Salt mixture (e)	40	40
α-Cellulose	20	50
Total calory(Kcal)	4190.90	4190.90

a) Vitamin A & D mixture: 51,000 unit of A and 5,100 unit of D dissolved in 100 ml of corn oil.
b) Vitamin E & K mixture: 5g of α-tocopherol and 0.2g of menadion dissolved in 200 m*l* of corn oil.
c) Water soluble vitamin mixture: contained (mg); choline chloride 2,000, thiamine hydrochloride 10, riboflavin 20, nicotinic acid 120, pyridoxine 10, Ca-panthothenate 100, biotin 0.05, folic acid 4, inositol 500, p-aminobenzoic acid 100.
d) Vitamin B12: 5 mg of vitamin B_{12} dissolved in 500 m*l* of distilled water.
e) Salt mixture: contained (g); $CaCO_3$ 300, potassium phosphate dibasic 322.5, $MgSO_4$ 102, Ca-phosphate monobasic 75, NaCl 167.5, ferric citrate 27.5, KI 0.8, $ZnCl_2$ 0.25, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.3, $MnSO_4$ 5, molybdic acid 0.2.

(casein 20%, SP)으로 구분하여 약 1개월간 사육하였다. 이때 물과 사료의 양은 제한없이 공급하였다.

LP군 및 SP군의 toluene투여는 olive oil과 동량혼합액을 만들어 Pathiratne 등(1986)의 방법에 준해 체중 100 g당 0.2 m*l*를 1일 1회 4일간 복강내 주사하였고 benzaldehyde 투여는 olive oil과 동량혼합액을 체중 100 g당 0.1 m*l*를 toluene 투여군과 동일한 실험조건에 병행하여 실시하였다. 한편 각 군의 대조군은 동량의 olive oil을 복강내로 주사하였으며, 동물은 처치전 24시간 동안 물만주고 금식시켰다.

동물의 처치는 효소활성의 일중변동을 고려하여 일정시간에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였다. 동물은 ether마취 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 효소시료로 사용하였다.

한편 대조군과 toluene 투여군은 metabolic cage를 이용하여 24시간 뇨를 채취하였으며, 채취직후 냉동보관하여 hippuric acid 측정에 사용하였다.

2. 효소시료의 조제

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×g 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음, 그 상징액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 제거시킨 상징액을 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획과 microsome 분획을 분리하였다. Cytosol 분획은 BADH 및 BALDH 활성도 측정에 사용하였고 microsome 분획은 cytochrome P-450 함량 측정에 사용하였다.

3. 효소활성도 측정

1) Benzylalcohol dehydrogenase(BADH) 활성도 측정

간조직 중 BADH 활성도 측정은 Bergmeyer 등(1974)의 방법에 준하였다. 활성도 단위는 단백 1 mg이 1분 동안 생성된 NADH 양을 μ mole로 표시하였다.

2) Benzaldehyde dehydrogenase(BALDH) 활성도 측정

간조직 중 BALDH 활성도 측정은 Stachow 등(1967)의 방법에 준하였다. 활성도 단위는 단백 1 mg이 1분 동안 생성된 NADH 양을 μ mole로 표시하였다.

4. Cytochrome P-450 함량 측정

Cytochrome P-450 함량 측정은 Omura와 Sato(1964)의 방법에 준하였으며 단위는 mol흡광계수(91 $mM^{-1}cm^{-1}$)를 이용하여 단백 1 mg당 nmole로 표시하였다.

5. 요 중 hippuric acid 함량 측정

요 중 hippuric acid 함량 측정은 Kiyoshi 등(1988)의 방법에 따라 측정하였으며 동일 시료중 creatinine 측정은 Jaffe 반응을 이용한 Butler(1979)의 방법에 준하였다.

6. 단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 등(1951)의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 단백질을 측정하였다.

이상 실험결과의 통계처리는 student's t-test(Schefler, 1980)를 이용하여 상호 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 성장기간동안 체중의 변동

실험동물을 casein으로 단백함량을 달리하여 성장시켰을때 표준단백식이군(casein 20%, SP)은 처음 체중에 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(윤, 1991; 윤, 1992; 윤 등, 1991)와 비슷하였다. 그러므로 본 실험조건이 저단백 및 표준단백식이 조건의 실험 model로 확인되었다.

2. 요 중 hippuric acid 함량 변동

대조군에 대한 toluene 투여군의 요 중 hippuric acid 함량 증가율은 LP군 보다 SP군이 높았다. 그러므로 SP군이 LP군 보다 toluene 대사율이 높게 유지되어짐을 암시하고 있다(Table 2).

Toluene은 생체내에 섭취된 후 세포내 SER에 존재하는 cytochrome P-450에 의하여 benzylalcohol로 전환되며, 다시 benzylalcohol은 BADH에 의하여 benzaldehyde로 대사된 다음 BALDH에 의하여 benzoic acid로 산화되어 glycine과 포합하여 hippuric acid로 되어 뇨 중으로 배설된다고(Ellenhorn 등, 1988; Rodwell, 1991) 한다. 따라서 요 중 마뇨산 함량은 toluene 대사율에 영향을 받으며 이는 toluene 대사에 관여하는 효소활성과 관련될 것으로 생각된다.

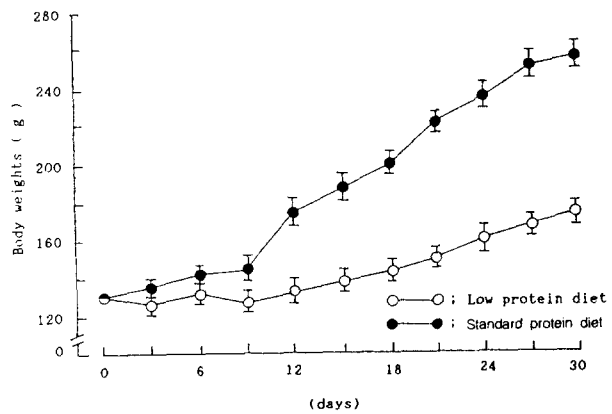

Fig. 1. One month weight gain in rats fed a low or standard protein diet. Each value is the mean±S.E. of 10 rats

Table 2. Effect of toluene treatment on the content of hippuric acid in urine of rats previously fed a low or standard protein diet

Group	Standard protein diet		Low protein diet	
	Control	Toluene	Control	Toluene
Hippuric acid	1.26±0.58	10.28±2.05**	1.04±0.62	7.66±1.67**

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)
Unit ; Hippuric acid g/creatinine g in the urine(24 hrs)

3. Cytochrome P-450 함량 변동

Cytochrome P-450 함량은 SP군이 LP군 보다 56%의 유의한($p<0.05$) 증가를 보였다(Fig. 2). Toluene 투여군에 있어서 SP군이 LP군 보다 cytochrome P-450 함량이 높았다. 그러므로 본 실험조건에서 mixed function oxidation system의 cytochrome P-450에 의한 toluene으로 부터 benzylalcohol로의 전환율이 LP군 보다 SP군이 높게 나타남을 암시해 주고 있다. 한편 생성된 benzylalcohol은 BADH에 의해서 benzaldehyde로 전환되며 다시 BALDH에 의해 대사된다(Ellenhorn 등, 1988; Rodwell, 1991)고 한다.

4. Benzylalcohol(BADH) 및 aldehyde dehydrogenase(BALDH) 활성도 변동

LP군과 SP군에 toluene을 투여한 후 간조직 중 BADH와 BALDH 활성도를 나타낸 성적은 Fig. 3과 같다. BADH 활성도는 대조군 및 toluene 투여군 모두 SP군이 LP군 보다 높게 나타났다. 또한 BALDH 활성도 역시 SP군이 LP군 보다 대조군에서 높게 나타났다. 그러나 toluene 투여군에서는 두군 간에 별다른 차이를

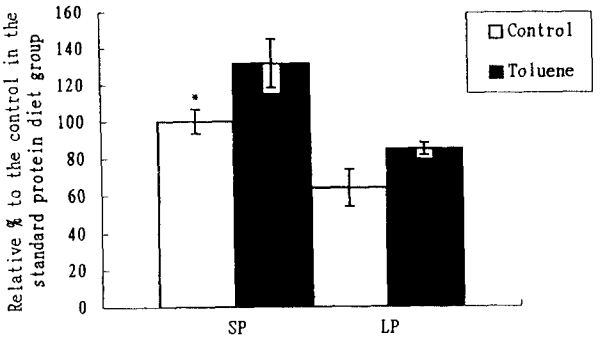

Fig. 2 Effect of toluene treatment on the hepatic cytochrome P-450 contents in rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Each value represents the mean ± S.E. of 5 rats. Each value describes the relative % to the control in the standard protein diet group. Significantly different from control group fed a low protein diet (*; $p<0.05$).

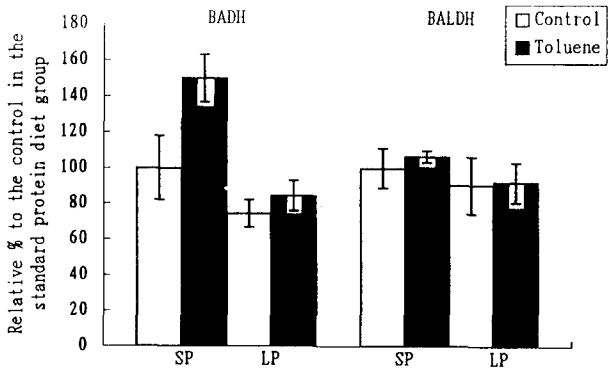

Fig. 3. Effect of toluene treatment on the liver benzylalcohol (BADH) and aldehyde dehydrogenase(BALDH) activities in rats fed a low or standard protein diet. The assay procedure was described in the experimental methods. Each value represents the mean ± S.E. of 5 rats. Each value describes the relative % to the control in the standard protein diet group.

볼 수 없었다.

이상 실험성적을 종합하여 볼 때 단백식이 조건을 달리하여 성장시킨 실험동물에 toluene을 투여하였을 때 SP군이 LP군에 비해 요 중 마뇨산 함량이 증가됨은 SP군이 LP군 보다 toluene 대사율이 높은 것을 시사해 주고 있으며 이는 toluene 대사에 관련된 효소활성의 증가와 관련된 영향으로 사료된다.

IV. 요 약

식이성 단백질 함량이 toluene 대사에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 저단백 식이(casein 7%, LP) 및 표준단백 식이(casein 20%, SP)로 성장시킨 흰 쥐에 toluene 투여 후 요 중 마뇨산 함량, toluene 대사에 관여하는 효소활성을 간조직 중에서 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 요 중 hippuric acid 함량은 대조군 및 toluene 투여군 모두 LP군이 SP군에 비하여 낮게 나타났다. 이때 간 조직 중 cytochrome P-450 함량, benzylalcohol 및 aldehyde dehydrogenase 활성도는 대조군 및 toluene 투여군 모두 LP군이 SP군 보다 대체적으로 낮게 나타났다.

따라서 식이중 단백질 함량을 낮출 때 toluene 대사율이 떨어짐을 알 수 있으며 이는 toluene 대사에 관여하는 효소활성이 식이중 단백질함량에 영향을 미치는 결과로 생각된다.

참고문헌

Anthony, L. E. (1973): Effect of protein-calorie malnutrition on drug metabolism in rat liver microsomes. *J. Nutri.* **103**: 811-820.

Bergmeyer, H. U. (1974): Methods of enzymatic analysis, ed. 2. pp. 428-429, Academic Press, N. Y. and London.

Butler, A. R. (1976): The jaffe reaction identification of the coloured species. *Clin. Chim. Acta.*, **59**: 227-232.

Campbell, T. C. and Hayes, J. R. (1974): Role of nutrition in the drug-metabolizing enzyme system. *Pharmcol. Rev.*, **26**(3): 171-196.

Drill, V. A. (1952): Hepatotoxic agents; Mechanism of action and dietary interrelationship. *Pharmacol. Rev.*, **4**: 1-42.

Drill, V. A., Loomis, T. A. and Belford, J. (1947): Effect of protein carbohydrate intake on liver injury; Produced in dogs by carbon tetrachloride. *J. Industrial Hygiene and Toxicology*, **29**: 180-184.

Ellenhorn, M. J. and Barceloux, D. G. (1988): Toluene in "Medical Toxicology", pp. 959-963, Elsevier Science Pub. Co., Inc., U. S. A.

Kato, R., Oshima, T. and Tomizawa, S. (1968): Toxicity and metabolism of drug in relation to dietary protein. *Jap. J. Pharmacol.*, **18**: 356-366.

Kiyoshi, K., Yukio, H., Keiko, K. and Takashi, I. (1988): Determination of benzoic acid and hippuric acid in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, **425**: 67-75.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.

Miranda, C. L. and Webb, R. E. (1973): Effects of dietary protein quality on drug metabolism in the rat. *J. Nutri.* **103**: 1425-1430.

Omura, T. and Sato, R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**: 2370-2378.

Pathiratne, A., Puyear, R. L. and Brammer, J. D. (1986): 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**(2): 272-280.

Rodwell, V. W. (1991): Conversion of amino acids to specialized products in "Harper's Biochemistry", ed. 22. pp. 307, Appleton & Lange.

Sachan, D. S. (1975): Effect of low and high protein diets on the induction of microsomal drug-metabolizing enzymes in rat liver. *J. Nutr.*, **105**: 1631-1639.

Schefler, W. C. (1980): Statistics for the biological sciences, ed. 2. pp. 84-89, Addison-Wesley Pub-

lishing Company, U. S. A. Menlo Park.

Stachow, C. S., Stevenson, I. L. and Day, D. D. (1967): Purification and properties of nicotinamide adenine dinuclotide phosphate-specific benzaldehyde dehydrogenase from pseudomonas. *J. Biol. Chem.*, **242**: 5294-5300.

윤종국 (1991): 단백식이조건을 달리하여 성장시킨 흰쥐에 사염화탄소 투여가 purine체 대사 효소활성에 미치는 영향. 대한보건협회지, **17**(1): 21-31.

윤종국 (1992): 저단백식이로 성장한 흰쥐에 사염화탄소 투여시 소장과 간 조직중 xanthine oxidase 활성비교. 대한보건협회지, **18**(1): 183-192.

Yoon, C. G., Kang, H. Y. and Lee, S. I. (1988): 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**: 125-135.

윤종국,이상일,신중규 (1991): 식이성단백질 함량에 따른 흰쥐에 CCl_4투여가 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, **20**(6): 527-537.