

## Pentachlorophenol 대사물과 세포내 거대분자물의 반응에 관한 연구

정요찬<sup>1</sup> · 윤병수<sup>2</sup> · 이영순<sup>1</sup> · 조명행<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 수의과대학, <sup>2</sup>경기대 이과대학

### Covalent Interactions of Reactive Pentachlorophenol Metabolites with Cellular Macromolecules

Yo-Chan Jeong<sup>1</sup>, Byoung-Su Yoon<sup>2</sup>, Yong-Soon Lee<sup>1</sup>, Myung-Haing Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

<sup>2</sup>Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 440-760, Korea

(Received July 25, 1997)

(Accepted August 30, 1997)

**ABSTRACT** : Pentachlorophenol(PCP) which is widely used in wood preservation, pulp and paper mills, has led to a substantial environmental contamination. To get the reliable data for the effective health risk assessment with PCP, covalent binding potential of PCP to cellular macromolecules and glutathione(GSH) was investigated after intraperitoneal administration of <sup>14</sup>C-PCP to rats. PCP metabolites were able to bind covalently to serum albumin and hepatic protein in a dose- and time-dependent manner. Hepatic protein adducts of PCP metabolites were increased as a function of cytochrome P-450 activities, whereas, albumin adducts significantly decreased. Covalent binding of PCP metabolites with DNA or hemoglobin was not observed. GSH levels in liver tissue decreased over 12hrs, however, the level was recovered after 48hrs. Tetrachloro-1,4-benzoquinone (1,4-TCBQ), one of the most reactive PCP metabolites, conjugated with GSH very rapidly. Base on our results, we could conclude that PCP metabolized to reactive electrophilic metabolites by cytochrome P-450 isoenzymes and conjugated rapidly with neighboring protein or nonprotein sulfhydryl before reacting with DNA or hemoglobin. We propose that albumin adducts and mercapturic acids of PCP metabolites can be used good biomarker of recent PCP exposure.

**Key Words** : Pentachlorophenol, biomarker, albumin adduct, reactive metabolites

## I. 서 론

Pentachlorophenol(PCP)은 원목보존제로 사용되는 광범위살균제로서 전세계적으로 매년 90,000ton의 분량을 사용한다고 한다(WHO, 1987; Seiler, 1991). PCP는 사용장소로부터의 증발이나 토양으로의 유출, 폐기물 처리소에서의 삼출 등에 의해서 환경으로 쉽게 오염되며 인근 하수나 지하수를 통해 쉽게 확산된다. PCP의 사람에게 대한 노출은 오염된 지하수나 음수에 의해서 경구로 흡수되거나 오염물질의 직접적인 피부접촉에 의해 노출될 수 있으며 PCP로 처리한 나무로 지은 건축물 등에서 흡입을 통하여 노출되기도 한다. 사람의 지방조직, 유즙, 혈액 및 요 등에서 탐지되기도 하며 1989년 Hill 등(1989)이 미국 아칸사주의 어린이

197명을 대상으로 조사한 결과 모든 어린이들에게서 PCP가 확인되었으며 14 ppb정도의 수준을 나타내었다. 스페인의 바르셀로나 지방에서 성인 50명을 대상으로 조사한 결과에서도 모두에게서 PCP의 존재가 확인되었으며 평균 25 ppb의 수준을 나타내었다(Gomez-Catalan 등, 1987). PCP는 피부 등 신체의 모든 조직에서 체내로 빠르게 흡수되며 대부분 혈중단백질과 결합하여 신체조직내로는 쉽게 흡수되지 않고 대부분 동물에 따라 6~24시간 내에 노로 배설되며 간장과 신장에 높은 농도로 축적된다(IPCS, 1987). 혈중의 PCP는 간장에서 대사되어 oxidative dechlorination을 통해 tetrachlorohydroquinone (TCHQ) 등의 대사물로 대사된다. 설치류 등 실험 동물의 급성 중독에 따른 증상으로는 고온, 근육 경련 및 강직, 정향반사의 소실 등이 있고 대부분 호흡마비에 의하여 폐사한다(Hoben 등, 1976). PCP의 표적장기는 주로 간장, 신장, 골수이고 간장은

\*To whom correspondence should be addressed.

보통 세포내 막소포체의 증식으로 종창된다 (McConnel, 1980).

PCP의 유전독성에 대해서는 아직 정확한 평가가 내려져 있지 않고 많은 논란이 제기되고 있다. 일례로서 Ames test 결과 Nishimura 등(1982)은 phenobarbital 또는 5,6-benzoflavone으로 유도된 S9 fraction 처치군에서 PCP에 의한 돌연변이를 확인하였다고 보고하였으나, Moriya 등(1983)은 대사적활성화 유무에 관계없이 돌연변이를 유발시키지 않는다고 보고하였다. 또한 PCP는 식물세포에서 염색체 혹은 감수분열의 이상을 초래하지만(Amer와 Ali, 1968, 1969; Sikka와 Sharma, 1976), 미국 NTP의 Chinese hamster ovary cell을 이용한 세포유전실험 결과 PCP에 의한 sister chromatid exchange 및 chromosomal aberration 등은 유발되지 않는다고 평가하였으며(Galloway 등, 1987) 또한 PCP는 Chinese hamster V79 cell에서 *hprt* mutation의 절대수 및 상대수를 감소시키는 것으로 확인되었다(Jansson과 Jansson, 1986). PCP 제조공장 근로자중 PCP에 다량 노출된 사람의 림프구를 조사한 결과 염색체상에서는 어떠한 유전적 변이도 유발하지 않는 것으로 확인되었다(Ziemsen 등, 1987). McConell(1989)이 경구투여에 의한 발암성을 확인한 결과 간장에서 선종 및 암종의 발생빈도를 증가시키고 비장과 간장의 혈관육종 및 부신에서의 갈색세포종의 발생을 유도하는 것으로 확인되었다. 현재 PCP에 대한 발암성 평가는 약한 촉진제로 작용하는 것으로 인식되고 있으며 U.S. EPA에서의 발암성 분류는 2B군의 물질로 분류하고 있다(U.S. EPA, 1994).

본 연구에서는 대표적인 환경독성물질의 하나인 PCP를 모델 물질로 하여 이의 세포내 거대 분자물과의 반응 정도를 여러 경우로 나누어 비교함으로써 PCP에 대한 위해성 평가 제도를 확립하기 위한 기초적인 정보를 얻고자 하였다. 이에 따라  $^{14}\text{C}$ -PCP를 실험동물에 투여한 후 시간별, 용량별로 간장 및 혈액내 각 거대 분자들과의 adduct 형성 여부와 그 수준을 관찰하였으며 이에 미치는 Cyto. P-450의 영향을 조사하였다. 또한 외인성 독성물질의 해독기전에 중요한 역할을 담당하는 GSH의 수준을 측정하여 PCP adduct와 GSH간의 관계를 고찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 시약

실험동물은 3주령의 수컷 S/D 랫드를 서울대학교 실험

동물사육장으로부터 분양받아 서울대학교 수의과대학 동물사육실에서 실험에 필요한 주령까지 사육하여 사용하였다. 사육실 환경은 온도  $22\pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $50\pm 10\%$ , 조도 300lux, 주야 각 12시간이 되도록 조절하여 사육하였다.

시약은 RNase A, RNase T1은 Boeringer Mannheim사(독일)로부터 구입하여 사용하였고 그 외 PCP와  $^{14}\text{C}$ -PCP, GSH, phenol 등 대부분의 시약은 Sigma사(미국)로부터 구입하여 사용하였다.  $^{14}\text{C}$ -PCP는 매 실험 48시간 전에 HPLC(Kontron, 독일)를 이용하여 순도를 측정하였고 liquid scintillation counter(LSC, Walker, 이탈리아)를 이용하여 specific activity를 확인하였다.

### 2. Covalent adduct의 확인

랫드에  $^{14}\text{C}$ -PCP(1.36mCi/mmol)를 투여(20 mg/kg, 8 mg/ml in corn oil, *i.p.*)하고 1, 4, 12, 24, 72시간, 1주, 2주, 4주 후에 실험동물을 희생시켜 protein adduct 및 DNA adduct의 형성을 조사하였으며, 용량 의존성을 확인하기 위하여 각 동물에 5, 10, 20, 30 mg/kg의  $^{14}\text{C}$ -PCP를 투여하고 24시간 후에 희생시켜 역시 각각의 adduct 형성을 조사하였다. Phenobarbital(PB, 80 mg/kg/day, 32 mg/ml in 0.9% saline, *i.p.*, 4 days) 또는 3-methylchloranthrene (3-MC, 45 mg/kg/day, 14 mg/ml in corn oil, *i.p.*, 3 days)을 처치하여 cytochrome P-450을 유도시킨 실험군과 2-diethylaminoethyl-2,2-diphenylvalerate (SKF 525-A, 75 mg/kg/day *i.p.*, 2 hrs prior to PCP)를 전처치하여 cytochrome P-450을 억제시킨 실험군을 대상으로  $^{14}\text{C}$ -PCP를 투여(20 mg/kg, 8 mg/ml in corn oil, *i.p.*)하고 24시간 후에 각 동물을 희생시켜 adduct 형성을 조사하였다. 공유결합의 확인은 간장의 DNA와 protein 및 혈액의 albumin과 hemoglobin을 대상으로 실시하였다.

DNA와 단백질은 Kinoshita와 Gelboin(1972)의 방법을 이용하여 분리하였다. 간략히 기술하면 간장조직에 5배의 6% sodium *p*-aminosalicylate solution을 첨가한 후 glass teflon tissue homogenizer를 이용하여 간장조직을 균질화시키고 간장조직균질액을 phenol을 이용하여 추출하고 수용성 층을 Sevac solution(chloroform: isoamyl alcohol=24:1)으로 한 번 더 추출하였다. 다시 수용액 층을  $-20^\circ\text{C}$  ethoxyethanol로 DNA를 침전시킨 후 DNA를 ethanol과 70% ethanol로 세척하여 1 mM phosphate buffer(pH 7.4)에 녹인 뒤 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase A와 100U/ml RNase T1으로 RNA를 분해시켜 Sevac solution으로 다시 한 번 추출하였다. 다음 단계로  $-20^\circ\text{C}$  ethoxyethanol로 DNA를 침전시키고 DNA를 ethanol과 diethyl ether

로 2회 세척하여 존재할 수 있는 불순물과 DNA와 결합하지 않은 PCP를 제거하고 1 mM phosphate buffer로 용해시킨 뒤 260 nm에서 UV 흡광도를 측정하여 DNA 양을 정량하였다. 이후 DNA 용액 100  $\mu$ l를 LSC로 2분간 방사선량을 측정하여 공유결합을 형성한  $^{14}$ C-PCP의 양을 정량하였다.

Phenol층에서 10배의  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 냉각시킨 methanol로 단백질을 침전시켜 methanol로 1회, diethylether로 2회 세척한 후 1N NaOH용액에 용해시킨 뒤 샘플중의 일부를 대상으로 Bradford(1976)의 방법으로 단백질량을 측정하고 100  $\mu$ l sample을 취하여 LSC로 공유결합 정도를 측정하였다.

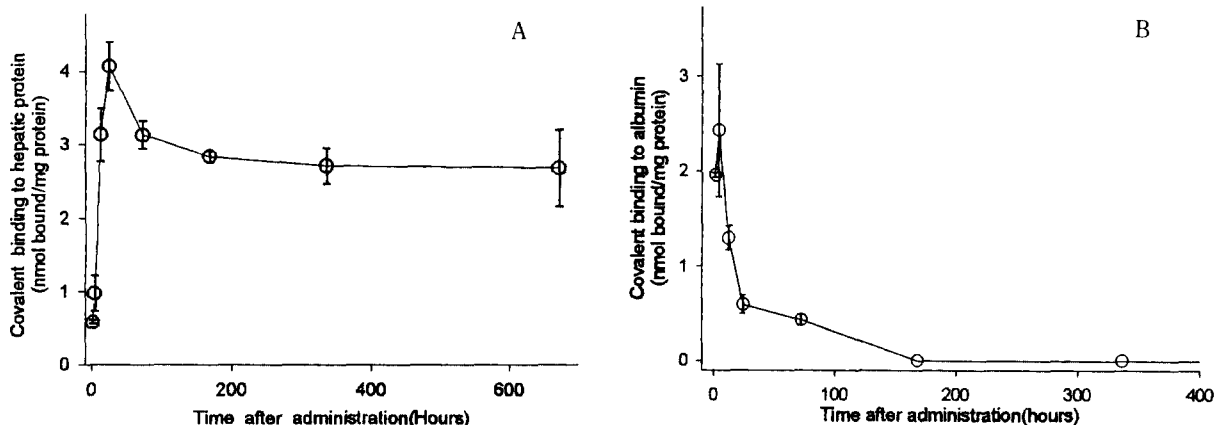
혈액에서는 albumin과 hemoglobin에 대하여 PCP와의 공유결합 정도를 각각 측정하였다. Albumin의 분리는 혈액으로부터 혈장을 분리한 후 동량의 ammonium sulfate 포화용액을 첨가하고 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 1N acetic acid로 pH를 5로 조정하고 원심분리로 albumin만을 침전시켜 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)에 용해시키고 3차 증류수로 24시간 동안 투석을 실시한 후 Doumas 등(1971)의 방법을 이용하여 albumin양을 정량하였다. Hemoglobin은 혈중의 적혈구를 원심 분리한 후 saline으로 2회 세척하고 3차 증류수로 세포막을 파괴시킨 후 50 mM HCl-propanol을 첨가하여 원심분리하고 상층액을 취한 뒤 heme를 제거하고 ethylacetate와 *n*-pentane으로 세척한 후 3차 증류수에 50~100 mg/ml의 농도가 되게 용해시켜 globin만을 분리하였다(Ascoli 등, 1981). 역시 0.5 ml의 sample을 이용하여 cocktail solution과 혼합 후 LSC를 이용하여 2분간 측정하여 공유결합을 형성한  $^{14}$ C-PCP의 양을 정량하였다.

### 3. GSH 정량

Ellman(1959)의 방법에 따라 간장조직의 2배에 해당하는 ice cold 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)로 간장균질액을 만든 후 균질액 1 ml을 4% sulfosalicylic acid 1 ml과 혼합하고 원심 분리하여 다른 단백질을 제거하였다. 상층액 0.5 ml과 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 4.5 ml을 잘 혼합한 후 412nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선과 비교하여 정량하였다.

### 4. 1,4-Tetrachlorobenzoquinone(TCBQ)-GSH adduct의 확인

50 ml의 methanol에 1,4-TCBQ 100 mg을 녹이고 2 ml의 6.24 mg/ml GSH 수용액을 첨가하고 질소존재하에 4시간동안 교반시켰다.  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 vacuum dryer(Uni-Vapo, 미국)를 이용하여 methanol을 제거하고 15 ml의 증류수를 첨가하고 vortex mixer를 이용하여 10분간 혼합하였다. 동량의 ethylacetate로 추출하여 반응하지 않은 1,4-TCBQ를 제거하고 수용성층을 0.45  $\mu$ m PVDF mini filter로 여과한 후 2 ml이 될 때까지 vacuum dryer로 농축시킨 뒤 HPLC로 생성물을 분석하였다. HPLC column은 C18 RP Symmetry column(Waters 0.5  $\mu$ m 4.5  $\times$  250 mm)을 이용하였고 isocratic으로 methanol:50 mM tris-phosphate buffer(pH 2.5)의 비율을 45:55가 되게 하여 1.2 ml/min의 속도로 254 nm에서 U.V. detector를 이용하여 분석을 실시하였다. 각각의 분획을 수집하여 각 분획에 대하여 high resolution mass spectrometer를 이용하여 fast atom bombardment 방법으로 glycerol matrix하에 mass/charge ratio를 분석하였다.



**Fig. 1.** Elimination kinetics of adducts formed with hepatic protein(A) and blood albumin(B) after intraperitoneal administration of  $^{14}\text{C}$ -PCP to rats. Groups of rats were administered PCP(20 mg/kg; 1.33mCi/mmol) and animals were sacrificed at designated times for the determination of radioactivity bound covalently to hepatic proteins. Values represent mean  $\pm$  SE(n=4~5).

### III. 결 과

#### 1. Covalent adduct의 확인

Covalent adduct의 형성 수준을 측정해 본 결과 모든 실험군에서 DNA adduct와 hemoglobin adduct는 확인되지 않았다. Adduct 형성에 대한 시간 의존성 실험에서 단백질 adduct의 수준은 PCP 투여 후 점차 증가되어 24시간에서 최고 수준에 이르렀고 그 후 약간 감소하였으나 4주 이후까지 비교적 높은 수준으로 유지되었다. 반면 혈장 albumin adduct는 PCP 투여 후 급격히 증가하여 4시간에서 최고 수준에 이르렀으며 점차 감

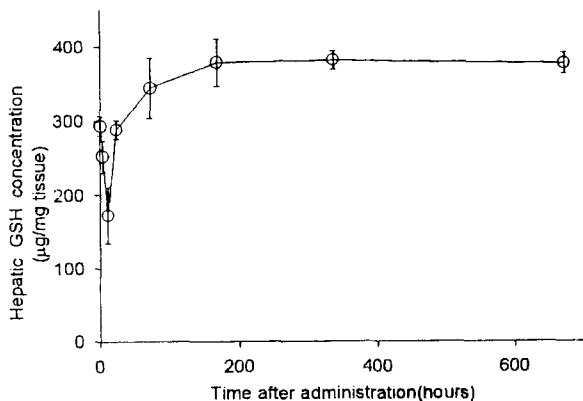


Fig. 2. Time dependent depletion of nonprotein sulfhydryls. The levels of nonprotein sulfhydryls were assessed in 4-5 animals after intraperitoneal administration of <sup>14</sup>C-PCP(20 mg/kg; 1.33mCi/mmol). Values represent mean ± SE.

소하여 1주 이후에는 확인되지 않았다(Fig. 1).

GSH의 수준은 혈장 albumin adduct 수준과 상반되는 양상으로 투여후 그 수준이 급격히 감소되어 12시간에서 최저수준을 나타내었고, 점차 증가되어 48시간 이후 정상수준으로 회복되었다(Fig. 2).

PCP 투여후 용량 의존적 변화를 조사한 결과 각각의 adduct에 대한 용량 의존성이 확인되었고(Fig. 3) GSH 수준도 용량에 따라 감소됨을 관찰할 수 있었다.

각 adduct 형성에 미치는 cytochrome P-450의 영향을 조사한 결과 hepatic protein adduct에서는 inhibitor

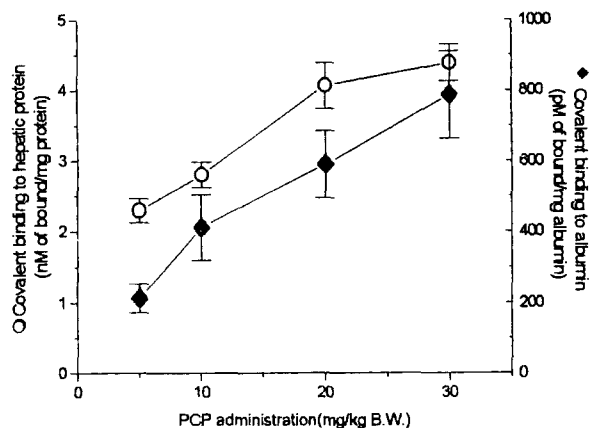


Fig. 3. Dose-dependent formation of hepatic protein adducts(○) and albumin adducts(◆). PCP was administered at the following dose(specific activities in parenthesis) and animals were sacrificed 24 hrs after dosing: 5 mg/kg(1.15mCi/mmol), 10 mg/kg(1.42mCi/mmol), 20 mg/kg(1.33mCi/mmol), and 30 mg/kg(1.41mCi/mmol). Values represent mean ± SE (n=4~5).

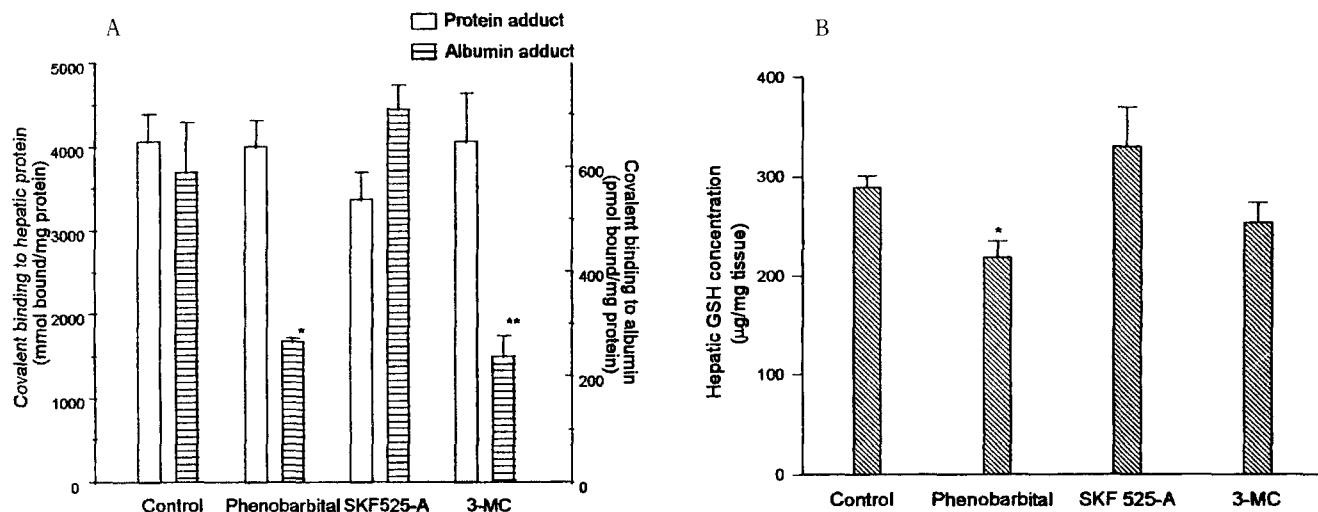


Fig. 4. Effects of cytochrome P-450 inducers(phenobarbital, 3-MC) and inhibitor(SKF 525-A) on the levels of hepatic protein adducts, albumin adducts(A) and hepatic nonprotein sulfhydryls after administration of <sup>14</sup>C-PCP(20 mg/kg; 1.14mCi/mmol). Values represent mean ± SE for determination from 4-5 animals in each group. \*, \*\* denote a significant difference from the PCP only(p < 0.05, p < 0.01, respectively), Student's t-test.

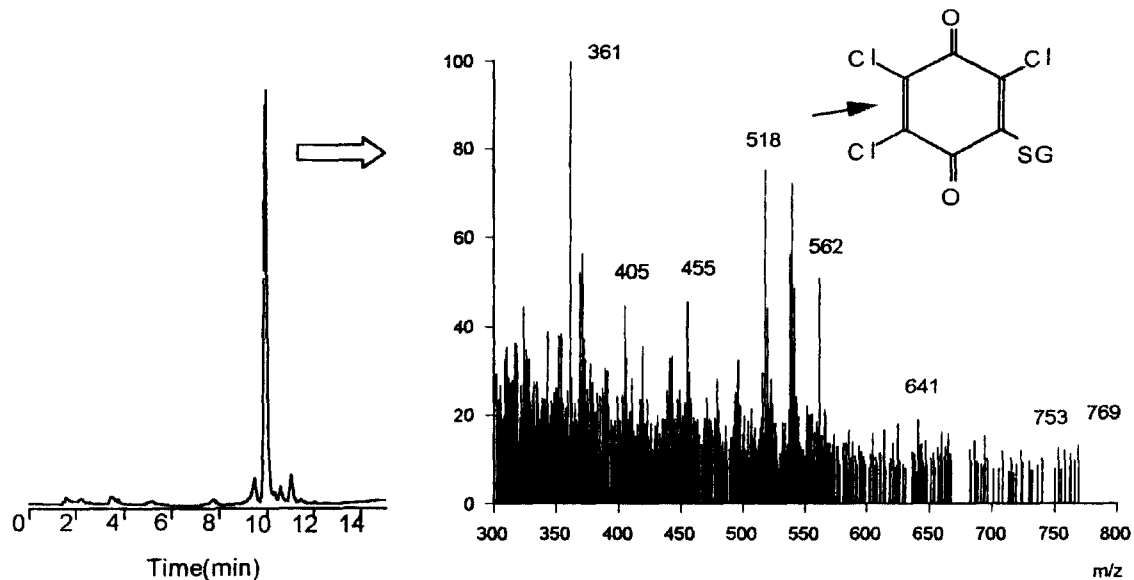


Fig. 5. HPLC chromatogram and FAB mass spectrum of GSH-1,4-TCBQ mixture extract. Presumed GSH-1,4-TCBQ conjugate structure with  $m/z$  518.

인 SKF 525-A 투여군에서 약간 감소하는 양상을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다. 그러나 혈장 albumin adduct는 PB 투여군과 3-MC 투여군에서 adduct의 양이 각각 유의성 및 고도의 유의성 있는 감소를 나타내었고 SKF 525-A 처리군에서는 adduct의 양이 약간 증가하는 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

GSH 수준에 미치는 cytochrome P-450의 영향을 조사한 결과 PB 투여군에서 GSH 수준의 유의성 있는 감소를 확인하였으며 3-MC 처리군에서 감소하는 양상을 확인할 수 있었다. 반면 SKF 525-A 투여군에서는 PB 투여군과는 반대로 GSH의 수준이 대조군에 비해 높게 나타남을 확인하였다(Fig. 4).

## 2. 1,4-TCBQ-GSH covalent adduct의 확인

1,4-TCBQ-GSH mixture를 HPLC를 이용하여 분석한 결과 하나의 주요 분획을 확인할 수 있었으며 분획을 수집하여 vacuum dryer로 건조시킨 후 mass spectrum으로 분석한 결과 Fig. 5에서 확인된 것과 같은  $m/z$  518인 GSH와 1,4-TCBQ의 1:1 conjugate를 확인할 수 있었다.

## IV. 고 찰

환경에 널리 분포되어 있는 환경독성물질인 PCP가 조직중에 가장 높은 농도로 축적되는 간장을 대상으로 단백질 adduct 및 DNA adduct의 형성을 살펴보았다. 먼저 단백질 adduct의 경우 PCP 투여 직후부터 그 형

성이 증가되기 시작하여 투여 후 24시간에서 최고 수준을 나타냈고 그 후 약간 감소하였으나 4주 이후까지 상당히 높은 수준으로 유지되는 것을 확인하였다(Fig. 1). 따라서 PCP에 의한 간장독성은 오랜 기간 간장에 축적되어 장기간의 간장 기능 이상 등을 나타내는 원인이 될 수 있음을 확인하였다. DNA 손상에 대한 지표를 알아보고자 측정된 DNA adduct는 모든 실험군에서 확인되지 않았다. van Ommen 등(1986)은 PCP와 calf thymus DNA에 대한 마이크로솜 배양을 통하여 DNA adduct의 형성을 관찰하고  $12 \pm 3 \text{ pmol/mg DNA/min}$ 이라고 발표하였으나, 본 실험에 의한 결과 *in vivo* 상에서는 관찰하기 어려운 극히 적은 양의 DNA adduct가 형성됨을 알 수 있었다.

간장조직에 대한 adduct 형성에 대한 결과를 토대로 실제적인 PCP 노출에 대한 biomarker의 활용에 대한 조사로서 혈중의 albumin adduct와 hemoglobin adduct의 형성을 살펴보았다. 독성물질이 흔히 작용을 나타내는 간장이나 폐장 등의 표적 장기들은 일반적으로 손쉽게 접근하여 표본을 채취할 수 없으나 혈액에 존재하는 단백질은 용이하게 접근할 수 있으며 이러한 이유로 hemoglobin과 albumin이 지표로 많이 이용되고 있다. 특히 혈중에 존재하는 hemoglobin과 공유 결합한 hemoglobin adduct는 biomarker로 활용되어질 수 있다(Osterman-Golkar 등, 1976). 사람에 있어서 hemoglobin의 수명은 약 120일이기 때문에 지속적이거나 간헐적인 독성물질의 노출 또는 낮은 농도에서의 노출에 유효한 biomarker로 사용될 수 있다. 이러한 특성으로

인해 hemoglobin adduct는 장시간에 걸친 만성적이고 간헐적인 환경독성물질에 대한 biomonitoring에 광범위하게 사용되어 진다. 반면에 혈청중의 albumin의 수명은 약 20~25일로서 first-order kinetic의 형태로 존재하여, 단기간의 그리고 최근의 노출에 대한 biomarker로 사용되고 있다(Skipper와 Tannenbaum, 1990). 또한 albumin의 생합성은 간장에서 이루어지며 따라서 간장에서 발생하는 반응성 대사산물의 화학적 구조를 밝히는데 큰 기여를 하고 있으며 또한 hemoglobin과는 달리 세포막에 의해 보호되지 않기 때문에 반응성 대사산물의 접근이 상대적으로 용이하게 되며, albumin adduct의 생성정도는 단기적으로는 hemoglobin adduct의 생성보다 더 높은 수준으로 형성된다. 본 실험에서 나타난 결과는 hemoglobin adduct는 역시 모든 실험동물에서 확인되지 않았고, albumin adduct는 PCP 투여 후 4시간에서 최고 수준에 이르렀으며 점차 감소하여 1주 이후에는 확인되지 않았다. 이 결과는 Braun 등(1977)에 의해 확인된 혈장내 PCP 농도 변화 및 혈장단백질과의 결합에 대한 연구와 유사한 결과로서 PCP의 대사는 주로 투여 직후로부터 72시간 이내에 first-order kinetic에 의해 대사됨을 추론할 수 있었다. 또한 각 adduct의 형성이 PCP 농도에 의존적으로 증가하는 양상을 확인할 수 있었다. Covalent adduct의 형성에 미치는 cytochrome P-450의 영향을 살펴보기 위한 실험결과에서 Ahlberg(1978)에 의해 PCP metabolic inducer로 확인된 PB와 3-MC로 전처치한 동물에서 albumin adduct와 간장의 GSH 수준은 각각 유의성 있는 감소를 나타내었으나 간장 단백질 adduct의 수준은 변화가 없는 것으로 확인되었다. 이는 PCP metabolic inducer인 PB와 3-MC가 glutathion S-transferase(GST) inducer로 작용하여(van Bladeren과 van Ommen, 1991) 형성이 증가된 PCP 대사산물이 활성이 증가된 GST에 의해 GSH와 보다 빠른 속도로 결합되어 배설됨으로써 간장 단백질 adduct에는 영향을 주지 않지만 GSH 수준을 감소시키고 배설속도 증가에 따른 albumin adduct의 감소를 야기 시키는 것으로 추측할 수 있었다. 반면 cytochrome P-450 inhibitor인 SKF 525-A를 처리한 동물에서는 간장 단백질 adduct는 약간 감소하고 albumin adduct는 증가하는 양상을 나타내었다. 이 결과를 통하여 hepatic protein adduct는 cytochrome P-450에 의하여 대사되어 형성된 PCP 대사산물에 의하여 형성되는 covalent adduct임을 확인할 수 있었다. 또한 albumin adduct는 최근의 PCP 노출에 대한 biomarker로 활용되어 질 수 있음을 확인하였다.

GSH의 PCP에 대한 용량의존성 실험결과를 통하여

본 실험에서 적용한 PCP 수준에서는 GSH에 의한 해독기전의 포화 등은 나타나지 않은 것을 알 수 있었다. 또한 GSH와 PCP의 반응성 대사산물간에 형성된 conjugate의 최종대사산물인 mercapturic acid를 이용하여 PCP 노출에 대한 단기간의 biomarker로 활용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

간장 조직에서의 실험결과를 통하여 확인된 PCP의 반응성 대사산물인 1,4-TCBQ와 GSH간의 conjugate 형성 실험을 실시하였다. 실험에서 얻은 mixture를 HPLC로 분석한 결과 98% 이상에 해당되는 주요한 한 개의 분획을 얻을 수 있었으며 van Ommen 등(1988)이 확인 것과 같은 TCBG-SG conjugate가 확인되었으며 GS-TCBG-SG conjugate는 확인되지 않았다. 본 실험을 통하여 PCP의 대사산물인 1,4-TCBQ는 GSH에 의해 효과적으로 제거될 수 있으며, 이의 구조물에 대한 standard를 확립함으로써 이를 이용하여 뇨중에서 mercapturic acid를 확인하여 단기간의 PCP에 대한 노출을 측정할 수 있는 가능성을 확인하였다. 또한 PCP의 해독작용에 있어 중요한 역할을 하는 GSH가 고갈되어 나타날 수 있는 독작용, 즉 체내에 많은 양의 1,4-TCBQ가 축적되어 세포내 거대분자에 대한 공유결합의 형성을 통한 adduct의 형성을 확인하기 위하여 1,4-TCBQ와 DNA base간의 공유결합 형성여부를 확인하는 실험을 실시하였으나 1,4-TCBQ와 DNA base간의 conjugate는 확인하지 못하였다.

PCP의 대사에 의하여 형성된 대사산물은 반응성이 매우 높은 물질로서 주로 형성 장소로부터 주위의 peptide 또는 protein 등과 같은 친핵성 물질과 신속하게 공유결합을 형성하여 *in vivo* 상에서는 PCP의 반응성 대사산물과 DNA간에 형성된 covalent adduct는 극히 적은 양이 형성되거나 전혀 형성되지 않을 것임을 추측할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구의 일부는 서울대학교 대학발전기금 일반학술연구비(과제번호 95-12-2138)와 한국과학재단(과제번호 94-0402-05-3)의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Ahlberg, U.G. (1978) : Dechlorination of pentachlorophenol *in vivo* and *in vitro*. In Pentachlorophenol, Rao, K.R.(ed.), Plenum Press, Newyork, 115-130  
 Amer, S.H. and Ali, B.M. (1968) : Cytological effects

- of pesticides II. Meitotic effects of some phenols. *Cytologia* **33**, 21-32
- Amer, S.H. and Ali, B.M. (1969): Cytological effects of pesticides IV. Mitotic effects of some phenols. *Cytologia* **34**, 533-540
- Ascoli, F., Fanelli, A.R. and Antonini, E. (1981): Preparation and properties of apohemoglobin and reconstituted hemoglobins. *Methods in Enzymology* **76**, 72-86
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-256
- Braun, W.H., Young, J.D., BLAU, G.E., and Gehring, P.J. (1977): The pharmacokinetics and metabolism of pentachlorophenol in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **41**, 395-406
- Calleman, C.J., Ehrenberg, L., Jansson, B., Osterman-Golkar, S., Segerback, D., Svensson, K., and Wachtmeister, C.A. (1978): Monitoring and risk assessment by means of alkyl group in hemoglobin in persons occupationally exposed to ethylene oxide. *J. Environm. Pathol. Toxicol.* **2**, 427-442
- Doumas, H.T., Watson, W.A., and Biggs, H.G. (1971): Albumin standards and the measurement of Serum Albumin with bromoresol green. *Clinica. Chemica. Acta.* **31**, 87-96
- Ellman, G.L. (1959): Tissue sulfhydryl groups *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77
- Galloway, S.M., Armstrong, M.J, Reuben, C., Colmans, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, B. H., Resnick, M.A., Anderson, B. and Zeiger, E. (1987): Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* **10**, 1-175
- Gomez-Catalan, J. Figueras, J., Planas, J. (1987): Pentachlorophenol and hexachlorobenzene in serum and urine of population of Barcelona Human. *Toxicol.* **6**, 397-400
- Hill R.H., Teresa, T., Holler, J.S., Douglas, M.F., Smith, S.J., Needham, L.L, and Binder, S. (1989): Residues of chlorinated phenols and phenoxy acid herbicides in the urine of Arkansas children. *Arch. of Environ. Contam. Toxicol.* **18**, 469-474
- Hoben, H.J., Ching, S.A., and Cassarett, L.J. (1976): A study of inhalation of pentachlorophenol by rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **15**, 463-465
- International Program on Chemical Safety (1987): Pentachlorophenol. in Environmental health criteria 71, WHO, Geneva. pp1-236
- Jansson, K. and Jansson V. (1986): Inability of chlorophenols to induce 6-thioguanine resistant mutants in V79 Chinese hamster cells. *Mutation. Res.* **171**, 165-168
- Kinoshita N., and Gelboin, H.V. (1972): Aryl hydrocarbon hydroxylase and polycyclic hydrocarbon tumorigenesis: Effect of the enzyme inhibitor 7,8-benzoflavone on tumorigenesis and macromolecular binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 824-828
- McConnel, E.E. (1980): Acute and chronic toxicity, carcinogenesis, reproduction, teratogenesis and mutagenesis in animals in Kimbrough, R.D. Ed. Halogenated biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and related compounds, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam pp51-190
- McConnell, E.E. (1989): NTP Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of pentachlorophenol(Cas No. 87-86-5) in B6C3F1 mice(feed studies). *Natl. Toxicol. Program Technical Report.* **349**, 5-11 and 83-86
- Moriya, M., Ohta, T. Watanabe, K., Miyazawa, T., Kato, K., and Shirasu, Y. (1983): DNA-damaging properties and cytotoxicity in human fibroblasts of tetrachlorohydroquinone, a pentachlorophenol metabolite. *Mutation Res.* **116**, 185-216
- Nishimura, N., Nishimura, H., Oshima, H. (1982): Survey on mutagenicity of pesticides by the salmonella-microsome test. *Aichi Ika Daigaku Igakukai zasshi* **10**, 305-312
- Osterman-Golkar, S., Ehrnberg, D., Segerback, D., and Hallstrom, I. (1976): Evaluation of genetic risks of alkylating agents II. Hemoglobin as a dose monitor. *Mutat. Res.* **34**, 1-12
- Sikka, K., and Sharma, A.K. (1976): The effects of some herbicides on plant chromosomes *Proc. Indian. Natl. Sci. Acad. part B(42)*, 299-307
- Skipper, P.L., and Tannenbaum, S.R. (1990): Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. *Carcinogenesis.* **11**, 507-512
- U.S. EPA (1994): U.S. Environmental Protection Agency's Integrated Risk Information System (IRIS) on Pentachlorophenol (87-86-5) from the National Library of Medicine's TOXNET System, April 1, 1994
- van Bladeren, P.J. and van Ommen, B. (1991): The inhibition of glutathion S-transferase: Mechanism, toxic consequences and therapeutic effects. *Pharmacol. Ther.*, **51**, 35-46
- WHO (1987): Pentachlorophenol. *Environmental health criteria.* **71**, 40-86
- Ziensen, B., Angerer, J. and Lehnert, G. (1987): Sister chromatid exchange and chromosomal breakage in pentachlorophenol(PCP) exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **59**, 413-417.