

톨루엔 흡입 현쥐의 선조체에서 미세투석법을 이용한 세포외성 흥분성 아미노산 신경전달물질의 측정

백승경[#] · 김해규 · 김철민

*국립과학수사연구소, 부산대학교 의과대학

(Received August 1, 1997)

Measurements of Extracellular Excitatory Amino Acid Neurotransmitter Levels in Corpus Striatum of Toluene Inhaled Rat by Microdialysis

Seung-kyung Baeck[#], Hae-Kyu Kim and Cheol-Min Kim

*National Institute of Scientific Investigation, Seoul, 158-097, Korea
College of Medicine, Pusan National University, Pusan 132-020, Korea

Abstract—Male Sprague-Dawley rats were exposed to the toluene at $3,000 \pm 200$ ppm via inhalation for two hours (single inhalation group), three weeks by two hours per day, six days per week (repeated inhalation group). We examined the level of excitatory amino acids of the extracellular neurotransmitter within the corpus striatum of rats by using *in vivo* microdialysis. Aspartate (Asp) and glutamate (Glu) of excitatory amino acid neurotransmitters were generally decreased in the inhalation groups compared with the control group, and more significantly decreased in the repeated inhalation group than in the single inhalation group except that Asp was increased from 60 min after the beginning of the inhalation to 30 min after the termination.

Keywords □ Toluene, inhalation, aspartate, glutamate, neurotransmitter.

톨루엔은 약리학적으로 중추신경 억제제로 분류되고, 뇌혈관막을 쉽게 통과하여 간뇌에 있는 상향성 망상활성계를 억제하며, 지질친화성으로 인하여 세포막의 투과성에 영향을 미쳐 신경전달을 억제하여, 습관성, 중독성 및 내성을 가지므로 남용가능성이 대단히 높은 물질이다.¹⁻²⁾

톨루엔의 뇌신경 전달물질에 대한 영향에 관한 보고로는 시상하부에서 norepinephrine(NE), dopamine(DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC), homovanillic acid(HVA), 5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA) 등의 증가, 선조체에서 DA, 5-hydroxytryptamine(serotonin: 5-HT), 5-HIAA의 증가, 소뇌에서 NE의 증가, 중뇌에서 NE, DA, 5-HT의 증가,

전뇌에서 NE, DA의 증가 등 주로 카테콜아민계 중추신경전달물질에 관해 보고되어 있고,³⁻⁷⁾ 톨루엔과 n-hexane을 단기투여시 acetylcholine(Ach)의 대사변화⁸⁾ 및 glutamine(Gln)의 증가에 대한 연구가 있으며,⁹⁾ 톨루엔에 의하여 혈장에서 tyrosine(Tyr)과 tryptophan(Trp)의 농도가 감소되었다는 보고가 있으나,¹⁰⁾ 이외 아미노산의 영향에 대한 보고는 별로 많지 않다.¹¹⁻¹²⁾

1994년 Stengard 등¹³⁾은 생체내의 신경전달에 있어서 신경화학적변화 및 행동변화등의 연구에 유용성을 인정받고 있는 미세투석법¹⁴⁾을 이용한 톨루엔의 세포외성 카테콜아민류에 미치는 영향에 대한 보고에서 1,000 ppm 및 2,000 ppm의 농도로 톨루엔을 2시간 동안 흡입노출시 선조체에서 세포외성 DA level이 증가하였으나, HVA는 영향을 받지 않았다고 하였으며, 특히 세포외성 아미노산 신경전달물질에 대하여는 톨루엔 급성투여시 소뇌에서 세포외성 gamma-amino-

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-600-2302~4 (팩스) 02-600-2333

butyric acid(GABA)의 증가에 대한 보고¹²⁾는 나와 있지만, 흥분성 아미노산에 대하여는 보고되어 있지 않다.

따라서, 본 실험에서는 흰쥐를 대상으로하여 톨루엔을 3,000±200 ppm의 농도로 각각 1회 및 3주간 반복 흡입 투여후, 최근 대단히 각광을 받고있는 정위적 미세투석법을 이용하여 흰쥐의 선조체에서 흥분성 아미노산으로 알려져있는 aspartate(Asp)와 glutamate(Glu)의 세포외성 농도변화를 측정함으로써 톨루엔 흡입이 흰쥐의 뇌선조체에서 세포외성 아미노산 신경전달물질에 미치는 영향을 연구하고자 본 실험을 실시하였다.

실험방법

시약 및 기기

Aspartate(Asp), glutamate(Glu), toluene analytical standard는 Sigma사 제품을 사용하였으며, Mock's artificial cerebrospinal fluid(CSF: 147 mM NaCl, 2.3 mM CaCl₂, 0.9 mM MgCl₂, 4.0 mM KCl; pH 7.4)은 조제하여 사용하였고, halothane 및 pancuronium은 국내 제약회사 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 시판 1급 또는 특급을 사용하였다.

기기로는 high performance liquid chromatograph(BAS; HPLC), toluene vaporizer(FLUOTEC MK III; serial No. 316353, Cyprane Ltd., Keighly, England), stereotaxic instrument(Stoelting # 51400, U.S.A.), microdialysis pump(BAS), ventilator(Harvard rodent ventilator model 683) 등을 사용하였고, 기구로는 catheter(polyethylene tubing 10), microdialysis probe(microprobe: CMA 10, CMA microdialysis, Stockholm, Sweden) 등을 사용하였다.

실험동물 및 실험군

평균체중 280~300 g의 건강한 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 일주일 이상 사육실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 일반공기와 산소를 흡입투여한 군을 대조군(CO군)으로 하였고, 3,000 ppm의 톨루엔과 산소(톨루엔 증기)를 2시간 동안 흡입투여한 군을 1회흡입군(A1군)으로, 톨루엔 증기를 1일 2시간, 1주 6일간씩 3주동안 반복흡입투여한 군을 반복흡입군(C

3군)으로 하였다.

톨루엔 기화기

Fluotec MK III를 사용하였다.

흡입방법 및 흡입챔버내 톨루엔 농도의 모니터링

Baek¹⁵⁾ 등과 같은 방법으로 모니터링하였다.

미세투석법을 이용한 세포외액의 채취

미세투석법은 Stengard 등¹²⁻¹³⁾ 및 Lawrence 등¹⁶⁾의 방법을 수정하여 사용하였다. 미세투석 실험방법은 99% 산소가 혼합된 4% 할로탄으로 흰쥐를 마취유도한 후 기관내삽관을 하고, 인공호흡기에 연결하여 조절호흡을 실시하였으며, 이후 흡입마취제의 농도를 1.5%로 낮추어 마취를 유지 하였다. 실험동물을 양와위로 한 상태에서 우측 서혜부의 피부를 절개한후 대퇴동맥과 정맥을 찾아 카테터를 삽관하여 동맥로는 계속적으로 혈압을 감시하기위한 경로로, 정맥로는 각종 약물투여와 수액주입로로 이용하였다. 근이완은 pancuronium을 0.1 mg/kg를 반복 정맥주사하여 유지하였다. 준비가 된 흰쥐를 복와위로 하고 정위적 입체주성장치를 이용하여 두부를 편평하게 고정시킨후 피부를 절개하여, 두개를 노출시키고 Paxinos Atlas¹⁷⁾를 참조하여 전정에서 앞으로 1 mm, 외측 3 mm의 위치에 미세투석관을 삽입하기 위하여 직경 2 mm의 천공을 만들었다. 미세투석관은 삽관하기전에 미세투석관의 회수율을 측정하여 20% 이상의 회수율을 가진것 만을 사용하였다. 미세투석관을 입체주성장치에 부착하여 앞서 만들어 놓은 천공을 통하여 선조체면과 평행하게 삽입하여 대뇌 표면에서 4 mm의 깊이에 위치 시키고 미세투석관을 통하여 인공뇌척수액을 2 µl/min의 속도로 주입하였다. 이때 흰쥐의 직장온도는 37°C를 유지하도록 하였으며, 미세투석관 삽관에 따른 출혈등의 뇌 조직 손상에 의한 뇌 환경의 변화가 정상화되도록 1시간 동안 기다린 후 기저상태의 신경전달물질의 농도를 구하기 위하여 30분간 미세투석관에서 나오는 세포외액을 시료로 채취하였다. 그 후 2시간 동안 톨루엔을 흡입시키면서 매 30분 간격으로 세포외액을 채취한 다음, 계속해서 톨루엔 흡입중단이후 3시간 동안 매 30분 간격으로 세포외액을 채취하여 흰쥐 한 개체당 각각 11개씩의 시료를 얻었다(Fig. 1). 채취한 시료는 즉시 영하 70°C의 deep freezer에 옮겨서 보관하였으며, HPLC로 측정

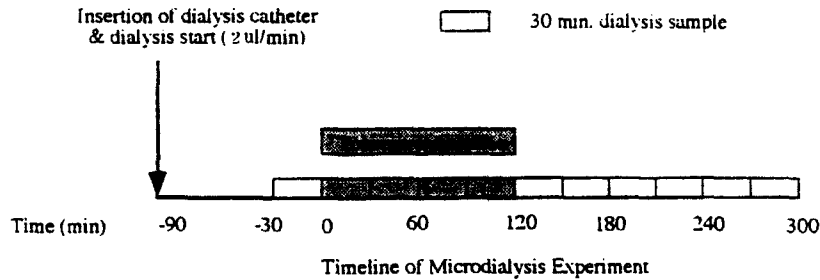


Fig. 1 — Time-schedule of CSF collection.

하였다. 시료의 채취가 끝난 이후에는 10% formalin이 포함된 생리식염수를 동맥으로 주입하여 뇌를 고정시킨 후, 뇌를 분리하여 brain mold를 이용하여 일정한 두께로 절단하고, 선조체에 완전하게 미세투석관이 삽입이 되었는지를 현미경 또는 육안으로 관찰하여, 완전하게 삽입된 것에 한해서만 시료로 사용하였다.

세포외성 아미노산 신경전달물질의 HPLC 측정

Kashiwagi 등¹⁸⁾ 및 Ferrarese 등¹⁹⁾의 방법을 수정하여 실시하였다.

9, 90, 900 pmol 농도의 Asp 및 Glu의 아미노산 표준품을 단계별로 희석하여 표준용액을 만들고, o-phthalaldehyde 및 ethylmercaptan으로 유도체화시킨 후 reverse phase precolumn(4.6×150 mm)가 장착된 HPLC에 주입하여 얻어진 chromatogram으로 표준품의 유지시간을 확인하였으며, 각 chromatogram의 면적비로 검량선을 작성하였고, 작성된 검량선에 의하여 시료에서 세포외성 아미노산 신경전달물질의 농도를 계산하였다. 아미노산 신경전달물질의 측정에 사용한 HPLC column은 4.6 mm(φ)×150 mm reverse phase precolumn(Eicompak, MA 50DS, EICOM, Kyoto, Japan)이었고, detector는 electrochemical detector ECD-100: EICOM, Kyoto, Japan)를 사용하였으며, mobile phase는 0.1 mol phosphate buffer(pH 6.0)과 30% methanol을 gradient로 사용하였다.

통계처리

모든 수치는 산술평균±표준오차로 표시하였고, 통계처리는 Fisher's PLSD 및 ANOVA test를 이용하여 분석하였으며, 전 항목에 대하여 5%(p<0.05)의 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

톨루엔의 흡입투여시 흰쥐의 선조체에서 흥분성 아미노산 신경전달물질의 변화를 보고저 흰쥐의 뇌 선조체를 적출하지 않은 상태에서 미세투석법을 이용하여 Asp 및 Glu의 농도변화를 동일 흰쥐의 생체내에서 연속적으로 측정하여 관찰할 수 있었으며, 전 실험시간 동안의 Asp 및 Glu의 농도변화를 기저농도에 대한 % 변화로 하여 Fig. 2 및 Fig. 3에 나타내었다.

Aspartate 의 농도변화

톨루엔의 흡입초기에는 1회 및 반복흡입군에서 모두 감소하였으나, 흡입 60분부터 흡입중단후 30분 사이에

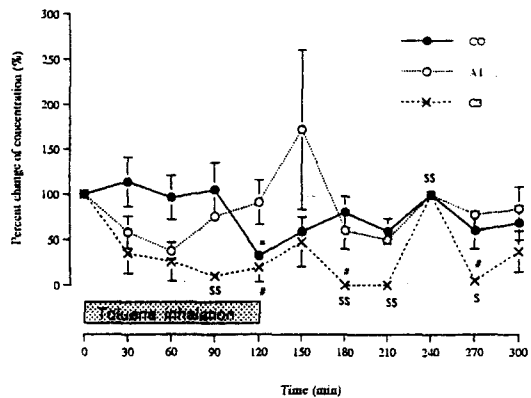


Fig. 2 — The percent change of the extracellular aspartate concentration in the corpus striatum of rats brain. Vertical lines indicate S.E. (n=10) *P<0.05 A1 vs. CO, #P<0.05 C3 vs. CO, *P<0.05 C3 vs. A1, **P<0.01 C3 vs. CO. CO: Control group, A1: Toluene (3,000 ppm) single inhalation group (for 2 hrs), C3: Toluene (3,000 ppm) repeated inhalation group (2 hrs/day, 6 days/week×3 weeks).

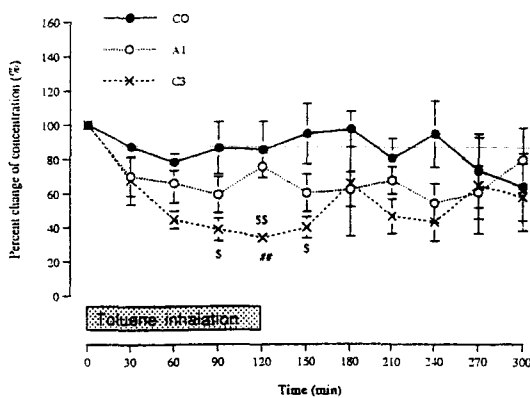


Fig. 3— The percent change of the extracellular glutamate concentration in the corpus striatum of rats brain.

Vertical lines indicate S.E. (n=10)

^SP<0.05 C3 vs. CO, [#]P<0.01 C3 vs. AI, ^{SS}P<0.01 C3 vs. CO.

CO: Control group, AI: Toluene (3,000 ppm) single inhalation group (for 2 hrs), C3: toluene (3,000 ppm) repeated inhalation group (2 hrs/day, 6 days/week × 3 weeks).

서 1회 흡입군이 약간 증가된 반면, 반복흡입군은 $9.87 \pm 6.53\%$ 까지 감소하는 현상을 보였으며, 흡입 90분, 흡입 중단후 60, 90 및 150분에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고, 1회 흡입군에 비하여도 비슷한 시간대에 유의하게 감소하였다(Fig. 2). 그러나, 미세투석후 2시간에 대조군의 extracellular aspartate 농도가 50% 이하로 감소하였는데, 이 현상은 2시간 동안 대조공기를 흡입시킨 다음 제거함에 따른 원인에 의한 것인지 실험오차에 의한 것인지는 정확하게 판단할 수 없었다.

Glutamate의 농도변화

톨루엔의 흡입초기에는 1회 및 반복흡입군에서 모두 감소하였으나, 1회 흡입군은 흡입직후부터 감소하기 시작해서 흡입 30분 이후 계속해서 약 50~60%의 감소상태를 지속적으로 유지하였고, 반복흡입군은 흡입과정중에 1회 흡입군에 비하여 보다 급격히 감소되었으며, 전반적으로 좀 더 낮은 농도상태를 유지하였다(Fig. 3).

Lee 등¹¹⁾은 톨루엔을 흰쥐에 대하여 1,700과 5,000 ppm의 농도에서 1회 및 반복흡입 투여한 결과 선조체에서 모두 Asp 및 Glu의 농도가 대조군보다 증가하였다는 상반된 보고를 하였으나 이 경우는 톨루엔 흡입투여후 단두치사하여 뇌 부위를 분리하였고 더우기 아미노산의 전달, 작용부위에서의 효과 등이 이미 진행된 상

태에서 선조체를 적출하였으므로 본 실험에서 미세투석법에 의하여 세포외성 아미노산 신경전달물질을 연속적으로 측정하여 얻은 실험결과와는 상호비교 및 연관성을 맺기가 곤란하였다. 그러나, Asp 및 Glu 농도의 전반적인 경향을 보면 특히 흡입 60분 이후부터 흡입중단후 90분 사이에서 대조군에 비하여 심한 변화양상을 나타내었으며, $3,000 \pm 200$ ppm의 농도로 톨루엔을 1회 및 반복흡입투여시 선조체에서 세포외성 아미노산 신경전달물질의 변화는 흡입 60분부터 흡입 중단후 90분 사이에서 유의성있는 변화들을 관찰할 수 있었다.

톨루엔 흡입투여에 의한 신경화학적변화에 대하여 Mutti²⁰⁾는 1,000 ppm 농도의 톨루엔을 8시간 동안 1회 투여시 DA, NE, 5-HT 등이 증가되었다고 하였고, Honma⁸⁾는 1,000~8,000 ppm의 농도로 8시간 투여한 결과 저용량에서는 Ach의 양이 증가하나 고용량에서는 감소하였다고 주장한 바 있다.

톨루엔 흡입투여에 따른 뇌중 아미노산 신경전달물질에 대하여는 4,000 ppm의 농도로 8시간 투여시 중뇌에서 Gln의 양이 증가하였다는 보고가 있으며,⁹⁾ 기타 보고들에서도 반복흡입투여의 경우는 보고마다 투여량과 투여기간이 모두 다르기 때문에 결과들이 상이하게 보고되어 있고,²¹⁻²²⁾ 세포외성 아미노산 신경전달물질을 동일 개체내에서 연속적으로 측정된 결과가 아니므로 그 결과들과의 상호비교 및 톨루엔으로 인한 독성효과와의 연관성을 맺기가 곤란하였다.

한편, 톨루엔 흡입투여에 있어서 미세투석법을 사용한 아미노산 신경전달물질의 측정에 대한 예로서 1993년 Stengard 등¹²⁾은 2,000 ppm의 농도로 톨루엔 흡입투여시 선조체에서는 GABA가 증가한 반면, 담창구에서는 오히려 감소하였다고 하였으며, 본 실험 결과에서도 측정하였던 세포외성 아미노산 신경전달물질이 대조군에서는 대단히 안정적인 변화를 보인 반면, 흡입군에서는 전반적으로 대조군에 비하여 낮은농도를 보인것과 특히 흡입 60분부터 흡입중단후 90분 사이에서 Asp의 증가와 Glu의 감소등의 변화를 보인 것으로 보아 톨루엔에 의한 영향인 것으로 사료된다. 그러나 본 실험에서 측정된 뇌선조체에서 두가지의 세포외성 흥분성 아미노산의 변화만으로는 톨루엔의 중독작용기전을 설명하는 것은 어려움이 많으며, 이외 억제성 아미노산류의 변화 및 아민류등 다른 신경전달물질들의 변화, 또한 기타 뇌 부위에서의 신경전달물질들의 변화 등 종합적인 비교연구가 되어져야 할 것으로 생각된다. 그러

나 톨루엔의 흡입노출에 따른 아미노산류의 변화에 대한 연구 보고가 극히 적을 뿐만아니라 특히 미세투석법에 의한 세포외성 아미노산류에 대한 실험보고는 거의 없는 실정이라서 다른 연구 보고와의 비교 고찰이 어려움이 많으므로 추후로 이 분야에 대한 보다 더 구체적인 연구가 계속적으로 진행 되어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

3,000±200 ppm의 농도로 톨루엔을 1회 및 반복흡입 투여한 환쥐에서 미세투석법에 의한 선조체에서의 흥분성 아미노산 신경전달물질의 농도변화에 대하여 실험한 결과는 다음과 같다.

1) 미세투석법에 의한 동일 환쥐의 선조체에서 세포외성 아미노산 신경전달물질을 연속적으로 측정된 결과 흥분성 아미노산 신경전달물질인 aspartate(Asp) 및 glutamate(Glu)는 톨루엔 흡입군이 대조군에 비하여 전반적으로 감소되었으나, 1회 흡입군에서 Asp는 흡입 초기에 약간 감소하였고, 대조군과 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았다.

2) 선조체에서 세포외성 aspartate(Asp) 및 glutamate(Glu)의 변화는 반복흡입군이 1회 흡입군보다 더욱 심한 감소현상을 나타내었다.

3) 실험기간중 특히, 톨루엔 흡입 60분부터 흡입중단 후 90분 사이에서 세포외성 aspartate(Asp) 및 glutamate(Glu)가 유의성있는 변화를 나타내었다.

문 헌

1) Kyrklund, T. : Brain lipid changes in rats exposed to xylene and toluene. *Toxicology* **45(2)**, 123 (1987).
 2) Konietzko, H., Keilbatk, J. and Drysch, K. : Cumulative effects of daily toluene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **46**, 53 (1980).
 3) Kiriu, T., Ameno, K., Fuke, C. and Ameno, S. : The distribution of toluene in the brain and its effects on the brain catecholamines in acute toluene poisoning. *日法醫誌* **44(1)**, 25 (1990).
 4) Romanelli, A. : Effect of some monocyclic aromatic solvents and their metabolites on brain dopamine in rabbits. *J. Appl. toxicol.* **6(6)**, 431 (1986).

5) Arito, H., Tsuruta, H. and Nakagaki, K. : Acute effects of toluene on circadian rhythms of sleep-wakefulness and brain monoamine metabolism in rats. *Toxicology* **33(3-4)**, 291 (1984).
 6) Castilla, S. L. : Effects of acute and chronic toluene inhalation on behavior, monoamine metabolism and specific binding (3H-serotonin and 3H-norepinephrine) of rat brain. *Arch. Med. Res.* **24(2)**, 169 (1993).
 7) Rea, T. M., Nash, J. F., Zabik, J. E., Born, G. S. and Kessler, W. V. : Effects of toluene inhalation on brain biogenic amines in the rat. *Toxicology* **31**, 143 (1984).
 8) Honma, T. : Changes in acetylcholine metabolism in rat brain after a short-term exposure to toluene and n-hexane. *Toxicol. Lett.* **16**, 17 (1983).
 9) Honma, T., Miyagawa, M., Sato, M. and Hasegawa, H. : Increase in glutamine content of rat midbrain induced by short-term exposure to toluene and hexane. *Ind. Health* **20**, 109 (1982).
 10) Voog, L. and Erikson, T. : Toluene induced decrease in rat plasma concentrations of tyrosine and tryptophan. *Acta. Pharmacol. Toxicol. Copenh.* **54(2)**, 151 (1984).
 11) Lee, S. H., Shin, D. S., Rhie, D. J., Lee, J. K., Kim, D. B., Kim, P. Y., Hong, Y. T. and Shin, S. C. : Studies on the effects of toluene in the nervous system(II)-changes of amino acid neurotransmitter contents in rat brain by toluene inhalation-. *The Report of Nat'1 Inst. Safty Res.* **5**, 70 (1992).
 12) Stengard, K., Tham, R., O'Connor, W. T., Hoglund, K. and Ungerstedt, U. : Acute toluene exposure increase extracellular GABA in cerebellum of Rat : A microdialysis study. *Pharmacol. Toxicol.* **73**, 315 (1993).
 13) Stengard, K., Hoglund, K. and Ungerstedt, U. : Extracellular dopamine levels within the striatum increase during inhalation exposure to toluene : a microdialysis study in awake, freely moving rats. *Toxicol. Lett.* **71(3)**, 245 (1994).
 14) Benveniste, H. and Huttesier, P. C. : Microdialysis-theory and application. *Neurobiol.* **35**, 195 (1990).

- 15) Baeck, S. K. and Ro, I. H. : The Effect of Toluene Inhalation on Blood Toluene Concentration in Time Sequence and Behavioral Change in Rats. *Yakhak Hoeji* **40(5)**, 545 (1996).
- 16) Lawrence, A. J. and Jarrott, B. : L-glutamate as a neurotransmitter at baroreceptor afferents : Evidence from in vivo microdialysis. *Neuroscience* **58(3)**, 585 (1994).
- 17) Paxinos, G. and Watson, C. : *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed., Academic Press Inc., San Diego, p. 8 (plate 14 & fig. 14) (1986).
- 18) Kashiwagi, S., Fugisawa, H., Yamashita, T., Ito, H., Maekawa, T., Kuroda, Y. and Tateishi, A. : Excitatory amino acid neurotransmitters are increased in human cerebrospinal fluid after subarachnoid haemorrhage. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **57(11)**, 1142 (1994).
- 19) Ferrarese, C., Pecora, N. and Frigo, M. : Assessment of reliability and biological significance of glutamate levels in cerebrospinal fluid. *Ann. Neurol.* **33**, 316 (1993).
- 20) Mutti, A. : Brain dopamine as a target for solvent toxicity : effect of some monocyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology* **49(1)**, 77 (1988).
- 21) Andersson, K., Fuxe, K., Toftgard, R., Nelson, O., Eneroth, P. and Gustoafsson, J. : Toluene induced activation of certain hypothalamic and median eminence catecholamine nerve terminal systems of the rat and its effect on anterior pituitary hormone secretion. *Toxicol. Lett.* **5(6)**, 393 (1980).
- 22) Von, E. G. : Effect of acute haloperidol treatment on reisonal catecholamine levels and utilization in rats exposed to toluene. *Acta. Physiol. Scand.* **132(2)**, 199 (1988).