

Bromobenzene의 투여 횟수에 따른 간독성의 차이

계명대학교 공중보건학과

이상희 · 전태원 · 윤종국*

국문초록: 실험동물에 있어서 간조직의 손상 정도에 미치는 xenobiotics의 투여기간에 의한 영향을 검토할 목적으로 hepatotoxin의 일종인 bromobenzene의 투여 횟수에 의한 간손상 정도와 이의 기전을 구명한 결과는 다음과 같다.

흰쥐에 1일 간격으로 bromobenzene (400 mg/kg)을 복강으로 1회, 3회 및 6회 투여한 실험군을 대상으로 하여 실시한 실험에서 혈청 alanine aminotransferase (ALT)의 활성 및 체중 당 간 무게는 bromobenzene을 1회 투여한 1일째에는 대조군과 별다른 변동을 볼 수 없었으나 3회 투여한 3일째에는 유의하게 증가되었으며, 이후 6일째 6회 투여한 실험군에서는 체중 당 간 무게 및 혈청 ALT 활성이 3일째 보다 현저히 감소되어 오히려 대조군과 유사하였다. 이와 같이 투여 횟수의 증가에 따른 간손상의 정도가 투여 횟수와 비례하지 않은 것이 어떠한 기전에 의해서 나타나는지를 구명하기 위해 bromobenzene 대사에 관여하는 간조직 중 aniline hydroxylase 및 glutathione S-transferase 활성과 glutathione (GSH) 함량을 측정할 결과, 이들 대사효소 및 GSH 이용률이 bromobenzene 6회 투여군에서 1회 및 3회 투여군 보다 높게 나타났다. 이상 실험 결과를 종합해 볼 때 어떤 독성물질이 생체에 계속 폭로 시 어느 시점에서 중독현상이 경감되는 것은 이 독성물질의 대사율을 증가시켜 해독하려는 생리적응현상이 일어날 수 있다는 가설을 제시할 수 있다.

서 론

최근 산업발전에 따른 산업화학물질의 인체 폭로로 인간의 건강에 심각한 문제가 제기되고 있다. 산업화학물질로부터의 인간의 건강 위하는 주로 이들 물질에 의한 중독성 때문이며, 또한 이러한 산업화학물질의 인체 폭로에 의한 중독현상은 독성물질의 양, 폭로기간 및 간격에 따라 달리 나타난다고 한다¹⁸⁾. 따라서 이러한 산업화학물질에 의한 인체 폭로의 다양성에 세포상해 양상이 달리 나타날 것으로 생각된다.

한편 bromobenzene은 산업화학물질로서 xenobiotics의 일종으로 산업체에 유기용제로 많이 사용되고 있으며, 인체에 폭로 시 주로 간독성 물질

로 알려져 있다^{6,20,23)}. 이 물질이 인체에 폭로 시 주로 간조직 세포의 다기능 복합산화효소기구에 의하여 bromobenzene 3,4-oxide free radical로 전환되며, 이 친전자성 물질이 조직세포의 상해를 유발시킨다고 한다²²⁾. 그리고 이 물질은 친수성 물질인 glutathione S-transferase (GST)에 의하여 glutathione (GSH)과 결합하여 배설이 촉진됨으로써 무독화 되어지는 것으로 알려져 있다^{14,17)}. 이와 같은 bromobenzene의 독성작용은 실험동물의 연령⁴⁾, 투여량, 투여기간, 투여간격¹⁸⁾ 및 투여시차¹⁾에 따라 달라 나타나는 것으로 알려져 있다. 특히 bromobenzene의 투여기간에 따른 단편적인 연구는 되어 있으나 연속적인 투여 시 세포상해와 bromobenzene의 대사 사이의 관련성에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 bromobenzene의 연속적인 투여기간에 따른 독성현상을 검토함으로써 bromobenzene의 독성역학 (toxicokinetics)의 기초자료 제시에 의의가 클 것으로 생각된다.

이에 본 연구는 흰쥐에 bromobenzene을 1일 간격으로 6회 투여하는 급성기간 동안 흰쥐에 간손

* 논문접수 : 2000년 3월 7일

수정재접수 : 2000년 3월 29일

† 별책 요청 저자: 윤종국, 704-701, 대구광역시 달서구 신당동 1000번지, Tel: (053) 580-5230, Fax: (053) 580-5164, E-mail: jky446@kmucc.keimyung.ac.kr

상 정도 차이를 형태학적, 기능적 측면에서 관찰함과 동시에 이의 기전을 구명하고자 간조직 내 cytochrome P-450의 활성인 aniline hydroxylase (AH)¹¹⁾와 GSH 함량 및 이의 포합효소인 GST 활성을 측정하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 동물의 사육 및 처치

실험동물은 생후 6주령된 체중 200 ± 10 g의 외견상 건강한 Sprague-Dawley종의 숫 흰쥐를 사용하였다. 성장기간 동안 25°C에서 사육하였으며 물과 사료(삼양사 제품)를 제한없이 공급하였다. 실험군은 bromobenzene과 olive oil의 동량 혼합액을 1일 1회씩 1일, 3일 및 6일간 체중 kg 당 400 mg을 투여하였으며 대조군과 함께 24시간 절식시킨 후 처치하였다.

2. 효소원의 조제

실험동물은 ether로 마취시킨 다음 복부정중선을 따라 개복한 후, 복부대동맥으로부터 혈액을 채취하여 실험사 시켰으며, 간장은 생리식염수로 관류한 후 적출하여 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 실온에서 응고시켜 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 그리고 적출한 간장 일부는 1 g 당 4배량으로 0.25 M sucrose 용액을 가하여 빙냉 하에서 glass teflon homogenizer

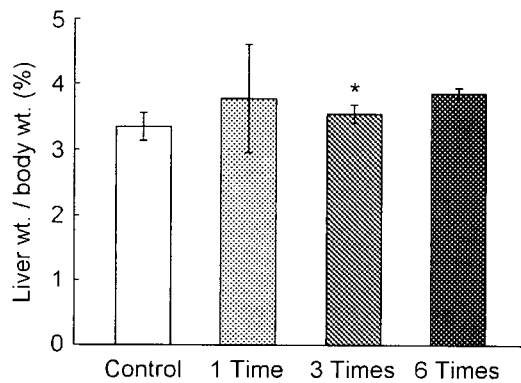


Fig. 1. Liver weight/body weight (%) in the bromobenzene-treated rat. The vertical bars express as mean \pm S.E. with 6 animals in each group. The assay procedure was described in the experimental methods. * Significantly different from the group injected 6 times ($p < 0.05$). □; Control, ▨, ▩ and ▪; Bromobenzene-treated frequency.

로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액 (20%, w/v)의 일부는 GSH 함량 측정에 사용하였다. 또한 남은 마쇄균질액은 10,000×g에서 20분간 원심분리한다 음 핵 및 mitochondria를 제거한 후 상층액을 post-mitochondria 분획으로 하여 AH 및 GST 활성 측정의 효소원으로 사용하였다.

3. 혈청 alanine aminotransferase (ALT) 활성 측정

L-Alanine과 α -ketoglutaric acid를 기질로 하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 pyruvic acid가 alkali 조건에서 2,3-dinitrophenyl hydrazine과 반응하여 발색되는 색조를 비색 정량하는 Reitman과 Frankel의 방법¹⁹⁾에 따라 조제된 kit 시액을 사용하였다. 활성 단위는 혈청 ml 당 Karmen unit¹³⁾로 표시하였다.

4. AH 활성 측정

간조직 중 AH 활성 측정은 Imai 등의 방법¹²⁾을 이용하였다. Aniline을 기질로 하여 37°C에서 15분간 반응시키는 동안 유리된 *p*-aminophenol을 phenol 시액으로 발색시켜 640 nm에서 그 흡광도의 변화를 읽고 산정하였다. 효소의 활성 단위는 간조직 효소액 중에 함유된 단백 1 mg이 1시간 동안 반응하여 기질로부터 생성된 *p*-aminophenol의 양을 nmole로 표시하였다.

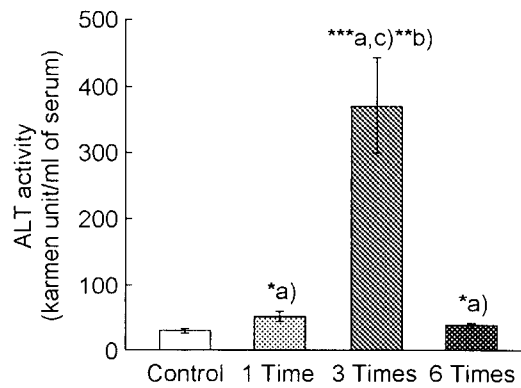


Fig. 2. Serum alanine aminotransferase (ALT) activity in the bromobenzene-treated rat. Other legends are the same as those in Fig. 1. ^{a)} Significantly different from the control, ^{b)} Significantly different from the group injected 1 time, ^{c)} Significantly different from the group injected 6 times. (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$).

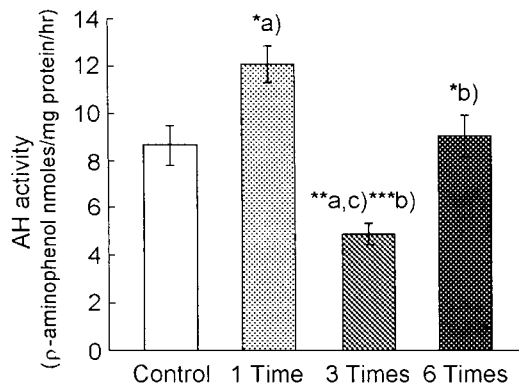


Fig. 3. Hepatic aniline hydroxylase (AH) activity in the bromobenzene-treated rats. Other legends are the same as those in Fig. 1. ^{a)} Significantly different from the control, ^{b)} Significantly different from the group injected 1 time, ^{c)} Significantly different from the group injected 6 times. (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$).

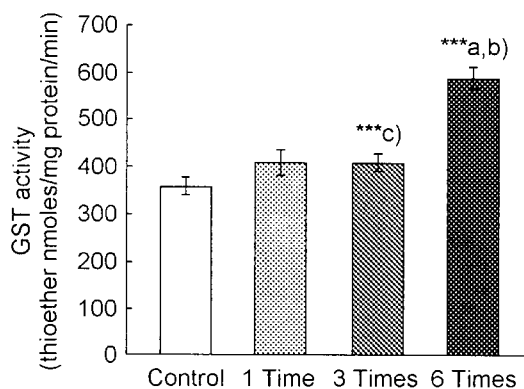


Fig. 4. Hepatic glutathione S-transferase (GST) activity in the bromobenzene-treated rats. Other legends are the same as those in Fig. 1. ^{a)} Significantly different from the control, ^{b)} Significantly different from the group injected 1 time, ^{c)} Significantly different from the group injected 6 times. (**; $p < 0.01$).

5. GST 활성 측정

GST의 활성 측정은 Habig 등의 방법⁹⁾에 준해 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione을 기질로 하여 25°C에서 10분간 반응시키는 동안 생성된 thioether 양을 340 nm에서 그 흡광도의 변화를 읽고 산정하였다. 효소의 활성 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분 동안 반응하여 생성시킨 conjugate의 양을 nmole로 나타내었다.

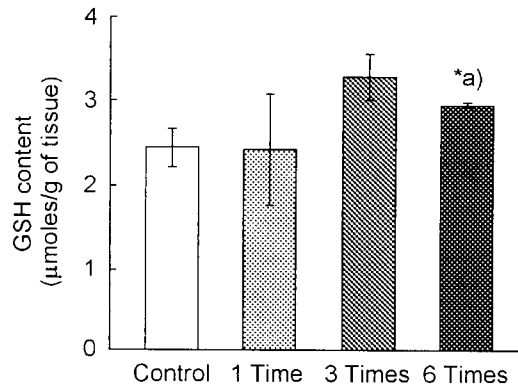


Fig. 5. Hepatic content of reduced glutathione (GSH) in the bromobenzene-treated rats. Other legends are the same as those in Fig. 1. ^{a)} Significantly different from the control (*; $p < 0.05$).

6. GSH 함량 측정

GSH의 함량은 Ellman의 방법⁸⁾에 따라 비단백성 sulfhydryl group을 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)로 발색시켜 412 nm에서 비색 정량하였다. GSH의 함량 단위는 간조직 1 g 당 μmole로 나타내었다.

7. 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등의 방법¹⁶⁾에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

8. 성적검정

실험성적의 통계처리는 Student's t-test²¹⁾로 하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결 과

1. Bromobenzene 투여기간에 따른 간손상 정도의 차이

Bromobenzene을 1일 1회 6일간 투여하는 동안 투여기간에 따른 체중 당 간 무게는 대조군에 비해 투여기간에 관계없이 1일째, 3일째 및 6일째 bromobenzene 투여군에서 각각 12%, 5% 및 14% 정도 증가되었다 (Fig. 1).

한편, 간손상의 지표로 알려져 있는 혈청 ALT 활성에서 1일째 및 6일째 bromobenzene 투여군은 대조군 보다 각각 약 74% ($p < 0.05$) 및 27% ($p < 0.05$)의 유의한 증가를 나타내었으며 3일째 투여군의 경우 약 11배의 현저한 ($p < 0.001$) 증가를 나타내었

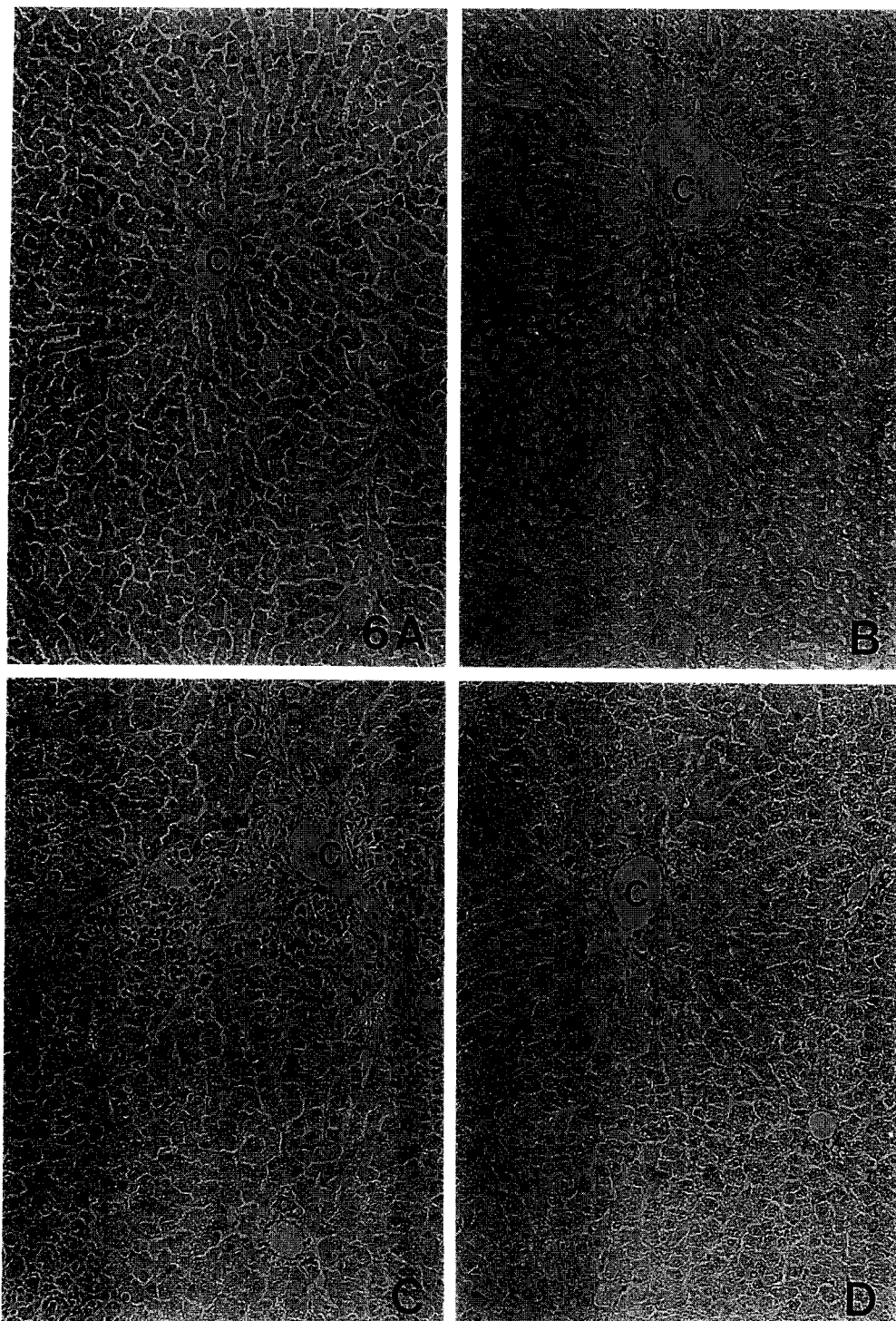


Fig. 6. Photographs of liver tissue in rats (H-E stain, $\times 100$). **A.** Normal group: The tissue structure was intact. **B.** 1 time-bromobenzene-treated group: Hepatocytes around the central vein had cytoplasmic degeneration. **C.** 3 time-bromobenzene-treated group: Tissue hypertrophy and centrilobular necrosis were noted. **D.** 6 time-bromobenzene-treated group: Degeneration of hepatocytes around the central vein was noted. c; Central vein.

다. 그리고 6일째 bromobenzene 투여군은 3일째 투여군 보다 약 90%의 현저한 ($p < 0.001$) 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

2. Bromobenzene 투여기간에 따른 bromobenzene 대사효소 활성 변동

Bromobenzene을 1일 1회 6일간 투여하는 동안 투여기간에 따른 bromobenzene 대사에 관여하는 AH와 GST 활성 및 GSH 함량 변동을 나타낸 것은 Fig. 3, 4 및 5와 같다.

간조직 AH 활성 변동은 1일째 및 6일째 bromobenzene 투여군은 대조군 보다 각각 약 25% ($p < 0.05$) 및 5%의 증가를 나타내었으나, 3일째 투여군은 1일째 투여군 보다 약 59%의 유의한 ($p < 0.001$) 감소를 나타내었다. 또한 6일째 투여군이 3일째 투여군 보다 약 83%의 유의한 ($p < 0.01$) 증가를 나타내었다 (Fig. 3).

간조직 GST 활성은 1일째, 3일째 및 6일째 bromobenzene 투여군은 대조군에 비하여 각각 15%, 14% 및 64% ($p < 0.001$) 정도 증가를 나타내었으며, 1일째와 3일째 bromobenzene 투여군 사이에는 별다른 변동이 나타나지 않았다. 그러나 6일째 bromobenzene 투여군은 3일째 투여군 보다 약 44% ($p < 0.01$)의 유의한 증가를 나타내었다 (Fig. 4).

한편, 간조직 GSH 함량은 1일째 bromobenzene 투여군은 대조군과 별다른 차이를 볼 수 없었으나, 3일째 bromobenzene 투여군은 1일째 및 대조군 보다 각각 약 35% 및 34%의 증가를 나타내었다. 그리고 6일째 bromobenzene 투여군은 3일째 보다 약 10%의 감소를 나타내었다 (Fig. 5).

병리조직학적 검사에서 olive oil을 투여한 대조군은 별다른 소견이 관찰되지 않았으나 (Fig. 6A), 1일째 bromobenzene 투여군에서는 중심정맥에 접한 중심대 간세포의 세포질 변성이 관찰되었다 (Fig. 6B). 또한 3일째 bromobenzene 투여군에서는 전반적으로 간세포들의 크기가 증대되었고 중심대 간세포의 괴사와 괴사부 내에 염증세포의 침윤이 관찰되었으며 (Fig. 6C), 6일째 bromobenzene 투여군에서는 전반적으로 간세포의 체적이 증대된 것 같으나 중심정맥에 접한 세포들의 변성이 외에는 관찰되지 않았다 (Fig. 6D).

고 찰

일반적으로 생체 내에 약물을 계속 투여 시, 일

정 기간에서는 약물의 내성이 초래됨은 잘 알려져 있으며¹⁸⁾, 독성물 역시 계속 투여하는 경우에 어느 시점에서는 오히려 독작용이 경미해지는 생체 내 적응현상이 초래될 것으로 생각된다. 본 실험에서 bromobenzene을 1일 간격으로 6일 동안 복강 투여하면서 체중 당 간 무게, 혈청 ALT 활성 및 병리조직학적 검사를 통하여 간손상 정도를 관찰하였다. Bromobenzene 투여 1일째에 경미한 간손상이 보였다. 3일째에는 심한 간손상이 관찰되었으며 이 결과는 윤과 임의 보고³⁾와 유사하였다. 그러나 bromobenzene 투여 6일째에는 간손상이 오히려 경미하게 나타났다. 이와 같이 bromobenzene의 투여 회수가 많은 6일째에 간손상이 심하게 나타나야 됴도 불구하고 3일째 보다 오히려 간손상이 경미하게 나타남은 이 시점에서 bromobenzene의 독성작용을 경감시키는 생체 내 적응현상이 일어난 것으로 생각된다. 이러한 현상은 바로 bromobenzene의 대사와 관련될 것으로 생각되어 bromobenzene 대사에 관여하는 효소 활성과 생리물질을 관찰하였다. 본 실험에서 bromobenzene 투여 1일째 간조직 중 cytochrome P-450 활성인 AH 활성¹¹⁾이 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 보였으나 3일째에는 1일째 보다 유의하게 ($p < 0.001$) 감소하였다. 이는 bromobenzene 3,4-oxide와 같은 친전자성 물질이 세포구성성분 및 효소와 같은 단백질과 공유결합 한다는 보고^{5,10)}를 고려해볼 때 bromobenzene 3,4-oxide에 의해 AH가 불활성화됨으로서 bromobenzene 투여 3일째에 본 효소 활성이 낮게 나타난 것으로 생각된다. 이는 바로 간세포 내 bromobenzene 3,4-oxide 생성율이 높게 나타남을 암시해 주고 있다. 따라서 체내에서 bromobenzene으로부터 생성된 bromobenzene 3,4-oxide 함량이 조직세포 내에 높게 유지 (retention)됨으로서 이 free radical이 간조직 세포상해를 유발함으로서 bromobenzene 3일째 간손상이 심하게 나타난 것으로 생각된다. 그러나 bromobenzene 투여 6일째에는 AH 활성이 3일째 보다 낮게 나타남은 bromobenzene 3,4-oxide 생성율이 낮게 나타남을 암시해 주고 있으며, 이 때문에 bromobenzene 투여 6일째에 간손상이 경미하게 나타난 것으로 생각된다.

일반적으로 생체 내에서 bromobenzene과 같은 xenobiotics의 중독현상은 free radical 생성계와 해독계 사이의 불균형에 의해 야기되는 것으로 알려져 있다^{7,15)}. 그러므로 bromobenzene에 의한 간

손상은 free radical의 생성체인 cytochrome P-450 활성인 AH¹¹⁾ 뿐만 아니라 해독계에 관여하는 GSH 함량과 GST 활성^{14,17)}에도 상당한 영향을 받는 것으로 생각된다. 본 실험에서 bromobenzene 3,4-oxide의 해독에 관여하는 간조직 GSH 함량 감소 및 GST 활성 증가^{14,17)}은 bromobenzene 투여 6일째에 3일째 보다 높게 나타나는 경향을 보였다. 따라서 bromobenzene 투여 6일째에 3일째 보다 간손상이 경미하게 나타남은 bromobenzene의 해독대사율이 높게 나타나기 때문인 것으로 생각된다.

한편 bromobenzene을 6회 이상 장기간 투여 시에는 간손상이 심하게 나타난다는 보고²⁾를 감안해 볼 때 bromobenzene 투여 회수를 증가시킬 때 간손상이 심하게 나타나는 급성시기를 지나 어느 시기에서는 오히려 간손상이 경미하게 나타나며 이 시점이 가역적 상해로서의 적응현상으로 볼 수 있으며 이후 투여 회수를 증가시킬 때 간손상이 심하게 나타나는 생체 내 중독현상의 사이클 현상이 일어날 것으로 생각된다. 따라서 생체 내 독성물질을 계속 투여 시 중독현상의 sigmoid curve의 생체리듬 모델이 형성될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 김광진, 신중규, 윤종국 (1997): 랫드에 있어서 주·야 시차가 bromobenzene 대사에 미치는 영향. 한국독성학회지, **13(4)**: 377-383.
- 2) 신중규 (1994): Bromobenzene이 흰쥐의 간손상 시 효소 활성에 미치는 영향. 박사학위논문, 효성가톨릭대학교 대학원.
- 3) 윤종국, 임영숙 (1997): Ethanol을 전처치한 흰쥐의 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성에 미치는 bromobenzene의 영향. 동아시아식량학회지, **7(1)**: 21-27.
- 4) 한선일, 윤형원, 윤종국 (1999): 연령이 다른 흰쥐에 bromobenzene 투여가 간 손상에 미치는 영향. 대한의생명과학회지, **5(2)**: 201-207.
- 5) Bambal RB and Hanzlik RP (1995): Bromobenzene 3,4-oxide alkylates histidine and lysine side chains of rat liver proteins *in vivo*. *Chem Res Toxicol*, **8(5)**: 729-735.
- 6) Brodie BB, Reid WD, Cho AK, Sipes G, Krishna G and Gillette JR (1971): Possible mechanism of liver necrosis caused by aromatic organic compounds. *Proce Nati Aca Sci, USA*, **68**: 160-164.
- 7) Chow CK and Tappel AL (1974): Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. *J Nutri*, **104**: 444-451.
- 8) Ellman GL (1959): Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys*, **82**: 70-77.
- 9) Habig WH, Pabist MJ and Jakoby WB (1974): Glutathione S-transferase, The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, **249**: 7130-7139.
- 10) Hanzlik RP (1995): Reactive metabolites and drug toxicity. *Crisp Data Nati Insti Health*.
- 11) Haugen DA and Coon MJ (1976): Properties of electrophoretically homogeneous phenobarbital-inducible and β -naphthoflavono-inducible forms of liver microsomal cytochrome P-450. *J Biol Chem*, **251**: 7929-7939.
- 12) Imai Y, Ito A and Sato R (1966): Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *J Biol Chem, Japan*, **60**: 417.
- 13) Karmen A (1955): A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest*, **34**: 131-133.
- 14) Lee SM, Cho TS and Cha YN (1998): Ethanol prevents from acetaminophen inducible hepatic necrosis by inhibiting its metabolic activation in mice. *Kor J Physiol Pharmacol*, **2**: 261-269.
- 15) Leibovitz BE and Siegel BV (1980): Aspects of free radical reaction in biological system: Aging. *J Geronto*, **35**: 45-56.
- 16) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RL (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- 17) Monks TJ and Lau SS (1984): Activation and detoxification of bromobenzene in extrahepatic tissues. *Life Sci*, **35(5)**: 561-568.
- 18) Raymond S, Yang H and Anderson ME (1994): Pharmacokinetics. pp. 49-73. Hodgson E and Levi PE (eds), "Introduction to Biochemical Toxicology", Appleton & Lange, London.
- 19) Reitman S and Frankel S (1957): A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol*, **28**: 50-63.

- 20) Ried WD, Christie B, Krishna G, Mitchell JR, Moskowitz J and Brodie BB (1971): Bromobenzene metabolism and hepatic necrosis. *Pharmacol*, **6**: 41-55.
- 21) Scheffler WC (1980): Statistic for the biological sciences. pp. 84-89. *Addison-Wesley Publishing Co, USA*.
- 22) Zannoni VG, Marker EK and Lau SS (1982): Hepatic bromobenzene epoxidation and binding: Prevention by ascorbyl palmitate. *Drug Nutr Interact*, **1(3)**: 193-204.
- 23) Zheng J and Hanzlik RP (1991): Premercapturic acid metabolites of bromobenzene derived via its 2,3- and 3,4-oxide metabolites. *Xenobiotica*, **24(4)**: 535-546.

=Abstract=

A Study on the Effect of Injection Frequency on the Liver Damage in Rats

Sang-Hee Lee, Tae-Won Jeon and Chong-Guk Yoon[†]

Department of Public Health, Keimyung University

To investigate the effect of injection frequency of bromobenzene on the liver damage, bromobenzene (400 mg/kg, i.p.) was given daily to rats for six days. All experimental animals were sacrificed at 24 hours after the last injection. Morphological changes of the liver were observed under a light microscopic examination. Functional changes of the liver were evaluated by the measurement of alanine aminotransferase activity. To clarify the cause of discrepancy in liver damage, hepatic glutathione (GSH) content, glutathione S-transferase (GST) and aniline hydroxylase (AH) activities were determined. In the experiments of daily bromobenzene treatments, the sacrificed animals at six day (6 time-injected animals) showed slighter liver damage than those sacrificed at 3 day (3 time-injected ones), based on the liver morphological or functional findings; the decreasing ratio of GSH content and increasing ratio of liver GST and AH activities in the 6 time-injected group were higher than those in the 3 time-injected one.

Key Words: Frequency of bromobenzene treatment, Liver damage, Bromobenzene metabolism, Rats

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(1): 29-36, March, 2000]

[†] Corresponding author