

Effect of Toluene Application to Skin on the Liver Injury in Rats

Soon-Nim Chae[†], Sang-Hee Lee* and Chong-Guk Yoon

[†]Department of Beauty Science, Tongwon College, Kyunggi-do, 464-711, Korea

*Department of Public Health, Keimyung University, 704-701, Korea

To investigate an effect of the topical toluene application to rat skin on the liver injury, toluene (35 mg/cm²) was sequentially applied for 3 or 5 days to rat skin and then the animals were sacrificed.

5 day toluene-treated rats showed the slight increase of liver weight per body weight (%) compared with control. Serum levels of xanthine oxidase and alanine aminotransferase activity were significantly increased both in 3 days and 5 days toluene-treated animals compared with control. In the histopathological findings, cytoplasmic degeneration of hepatocytes around the central vein was noted in the liver of rats applied with toluene to the skin. These results indicate toluene application to rat skin leads to somewhat slight liver injury. On the other hand, the hepatic benzylalcohol or aldehyde dehydrogenase activities were significantly decreased by toluene application to rat skin.

In conclusion, the liver injury was induced by toluene application to rat skin, and it can be hypothesized that accumulation of benzaldehyde in liver cell may be responsible for liver injury.

Key Words: Liver, Skin, Oxygen free radical, Toluene, Rat, Liver injury

서 론

일반적으로 화학물질의 생체 내 흡수는 경구, 경피 및 호흡 기계를 통하여 이루어지고 있으며, 이들 물질의 성상에 따라서 흡수경로는 다양하게 나타난다. 특히 산업장에서 산업화학물질로 많이 이용되는 유기용제는 대부분 휘발성 물질이므로 주로 호흡기계를 통하여 흡수되고 있으나 자극성인 관계로 산업장 근로자가 노출을 기피함과 동시에 유해성에 대한 인식으로 흡기보호구를 착용함으로써 호흡기를 통한 화학물질의 인체폭로의 기회가 적어지고 있는 반면 경피를 통한 흡수기회는 배제할 수 없는 실정이다. 경피흡수의 경우에는 비록 조직의 특징상 피부는 표피에 키틴질로 되어 있어 산업화학물질의 체내 흡수에 장벽역할을 하고 있지만 몸 전체의 약 15%를 차지하고 성인의 체표면적이 약 1.8 m²나 되어 그대로 노출된 부위는 외부 자극에 대하여 침해를 받기 쉬울 뿐 만 아니라 무의식, 부주의로 상당한 양의 산업화학물질이 피부를 통해 체내로 흡수되는 데도 불구하고 소홀히 취급하고 있는 실정이다¹⁾. 더욱이 Wolfe 등²⁾은 위장관, 폐 이외의 피부를 통하여 산업화학물질이 체내 침투로 인하여 전신적 독성을 일으킨다고 하였으며, Ambrose 등³⁾은 간에서 해독되는 화학물질이 피부를 통해서 흡수될 때 보다 더 독성이 클 경우가 있다고 하였다.

산업화학물질 toluene은 비교적 안전성이 인정되어 산업장에서 벤젠 대체 유기용제로 많이 이용되고 있으나 생체 내 폭로 시 신경계⁴⁾, 순환계¹⁷⁾ 및 조혈계^{14,21)}에 독성작용이 야기됨이 보고되고 있으며, 최근 전 등⁵⁾은 toluene을 실험동물에 복강으로 투여시에 간상해가 초래한다고 하였다. 그러나 이와 같은 toluene의 독성은 toluene의 체내 흡수경로가 대체적으로 흡입 및 경구 투여에 따른 검토 결과였으며 피부에 의한 흡수에 따른 간독성에 대한 연구는 미흡하다. 더욱이 toluene의 피부를 통한 체내 흡수율이 간과할 수 없는 정도로 크게 나타남에도 불구하고 산업장에서는 toluene의 biological monitoring이 주로 흡입조건에서 검토되고 있는 실정이다. 따라서 피부를 통한 생체 내 toluene의 독성연구는 산업의학 기초자료제시에 의의가 클 것으로 생각된다.

이에 본 연구는 피부를 통한 toluene의 독성을 검토하는 일환으로 toluene의 일정량을 흰쥐 피부에 5일간 계속해서 도포한 다음 간상해를 검토함과 더불어 이의 기전을 규명코자 toluene 대사에 관여하는 cytochrome P450 함량, benzylalcohol 및 benzaldehyde dehydrogenase 활성을 간조직 중에서 측정하여 이들 실험결과를 상호비교 검토코자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 처치

동물은 체중 200 g 건강한 Sprague-Dawley 종의 수 흰쥐를 시중에서 구입 후 동물사료 (삼양사 제품)와 물을 충분히 공급

*는 문 접수: 2001년 2월 10일

수정재접수: 2001년 3월 7일

[†]별책 요청 저자: 채순님

하면서 사육실에서 1주일 적응시켜 실험에 사용하였다. 각 실험군은 3군으로 하였으며 대조군 및 toluene 도포 3일군 및 5일군으로 각각 7마리씩 분리수용하였으며 실험기간 중 물과 사료의 양은 제한 없이 공급하였고 사육실 온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다.

실험동물의 피부에 toluene 도포는 흰쥐의 등부위에 털을 깎고 피부면적 1 cm^2 당 35 mg씩 3일 또는 5일간 연속 도포하였다. 이때 toluene의 휘발을 방지하기 위하여 Hiroshi 방법⁶⁾에 의하여 O-ring 유리관을 toluene 도포전에 제모(除毛)한 부위에 toluene을 완전히 흡수시킨 후 떼어내었다. 대조군 역시 실험군의 동일한 부위에 털을 깎고 toluene을 도포하지 않고 O-ring 관만 처리하였다.

동물의 처치는 효소 활성의 일 중 변동을 고려하여 일정시간에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였다. 동물은 약한 ether 마취 하에서 복부 정중선을 따라 개복한 후 복부대동맥으로부터 채혈하여 실험사 시킨 후, 4°C 생리식염수로 간문맥을 통하여 간을 관류하여 간 내에 남아 있는 혈액을 제거한 다음 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 씻은 후 여지로 압박하여 간 내에 남아 있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음 무게를 칭량하였다. 그리고 이 간은 효소 활성도 측정 및 병리조직 검사에 사용하였다. 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청을 얻고 alanine aminotransferase (ALT) 및 xanthine oxidase (XO) 활성에 사용하였다.

2. 효소 시료의 조제

적출한 간조직의 일부를 취하여 4배의 0.25 M sucrose용액을 가하여 빙냉하에 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액 (20%w/v)을 $600 \times \text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음, 상청액을 $10,000 \times \text{g}$ 에서 20분간 원심분리한 후, 그 상청액을 $105,000 \times \text{g}$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여 microsome 및 cytosol 분획으로 분리하였다.

Cytosol 분획은 benzylalcohol dehydrogenase (BADH) 및 benzaldehyde dehydrogenase (BALDH) 활성 측정에 사용하였으며 microsome 분획은 cytochrome P450 (CYP) 함량 측정에 사용하였다.

3. 효소 활성도 측정

혈청 중 XO 활성 측정은 일정농도의 xanthine을 기질로 하여 반응시켜 생성된 요산을 phosphotungstate를 가하여 비색정량하는 Yoon의 방법²²⁾에 의하여 측정하였으며 단위는 1분간 생성된 요산의 양을 혈청 l 당 μmole 로 표시하였다.

혈청 ALT 활성은 일정농도의 l -alanine 및 α -ketoglutaric acid를 기질로 하여 생성된 pyruvic acid가 알카리성하에서 2,4-dinitrophenylhydrazine과 반응하여 발색하는 pyruvate-dinitrophenylhydrazone의 색조를 비색정량하는 Reitman과 Frankel 방법¹³⁾에

준해 조제된 kit 시약 (아산제약)을 사용하였으며, 단위는 혈청 ml 당 Karmen unit⁹⁾로 표시하였다.

간세포 cytosol의 BADH 및 BALDH 활성 측정은 Bergmyer의 방법³⁾에 준하였다. 즉 BADH 활성은 일정농도의 benzylalcohol 기질과 조효소인 NAD^+ 로부터 37°C 에서 10분 동안 반응하여 생성된 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소단위는 반응액에 함유된 단백질 1 mg이 1분 동안 생성된 NADH 양을 μmole 로 표시하였다. 그리고 BALDH 활성은 일정농도의 benzaldehyde 기질과 조효소인 NAD^+ 로부터 5분 동안 반응하여 생성된 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소단위는 단백질 1 mg이 1분 동안 생성된 NADH 양을 μmole 로 표시하였다.

4. CYP 함량 측정

간조직의 CYP의 함량 측정은 Omura와 Sato의 방법¹²⁾에 준하여 실시하였다. 즉, 시험관에 microsomal 부유액을 5 ml를 넣고 19 k 주사바늘을 통해서 1분 동안 농황산과 formic acid로부터 생성, 포집한 일산화탄소 (CO) gas를 통기시킨 다음 환원제로 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 30 mg을 넣고 잘 혼합한 다음 또 다시 CO gas를 1분간 통기시켰다. CO gas 통기가 끝난 후 spectrophotometer를 이용하여 파장 400~500 nm에서 흡광도의 차이를 CYP-CO complex에 의한 흡광량으로 하고 CYP-CO complex의 mole 흡광계수 $91\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 이용하여 CYP의 양을 계산하였다. Microsomal의 CYP의 양은 단백질 1 mg 당 nmole로 표시하였다.

5. 간조직 단백질 정량

효소단위 결정에 필요한 단백질 정량은 Lowry 등의 방법¹¹⁾에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

6. 간조직의 병리조직학 실험

간조직의 일반적인 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 대조군, toluene 3일, 5일 도포군으로부터 적출한 흰쥐 간의 중엽을 즉시 10% 중성 formalin액에 고정하고 통상의 방법에 따라 탈수, 청정을 거쳐 paraffin으로 포매한 후 4~6 μm 의 절편으로 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 성적 검정

실험 성적의 통계처리는 Student's t-test¹⁶⁾로 하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결 과

1. 체중당 간무게와 혈청 중 XO 및 ALT 활성

Table 1은 흰쥐 피부에 toluene 도포시 체중당 간무게와 혈

Table 1. Effect of the toluene application to rat skin on the liver weight per body weight (LW/BW, %), serum ALT and XO activities in rats

Group findings	Control	3 day toluene-treated group	5 day toluene-treated group
LW/BW (%)	3.05±0.20	3.06±0.21	3.15±0.25
Serum XO	8.45±0.41	11.83±0.60 ^{***a)**b)}	21.18±2.67 ^{***a)}
Serum ALT	20.04±1.66	32.95±3.51 ^{**a)***b)}	71.94±8.25 ^{***a)}

Each value represents the mean±S.E. of 7 rats, ^{a)} Significantly different from the control.

^{b)} Significantly different from the 5 day toluene-treated rats, (*; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001)

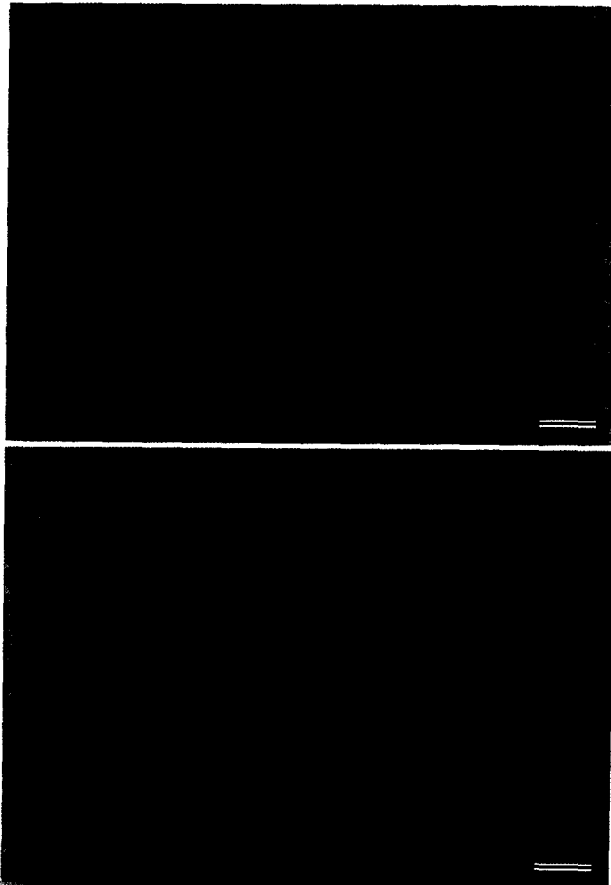


Fig. 1. Light microscopic photographs of liver tissue in rats (H&E stain, scale bar = 100 µm. **a)** Normal group: The tissue structure was intact. C: central vein, P: portal vein. **b)** Toluene-applied group: Vacuolization and cytoplasmic degeneration of hepatocytes around the central vein were noted. C: central vein

청 XO 및 ALT 활성을 나타낸 것이다. 체중당 간무게는 5일 toluene 도포군이 대조군 보다 약간 증가되는 경향을 보였다. 혈청 XO 활성은 3일 toluene 도포군에서는 대조군 보다 약 40%의 유의한 (p<0.001) 증가를 보였으며, 5일 toluene 도포군은 3일 도포군 보다 약 80% 유의하게 (p<0.001) 증가됨과 동시에 대조군 보다 150% (p<0.001)의 현저한 증가를 보였다.

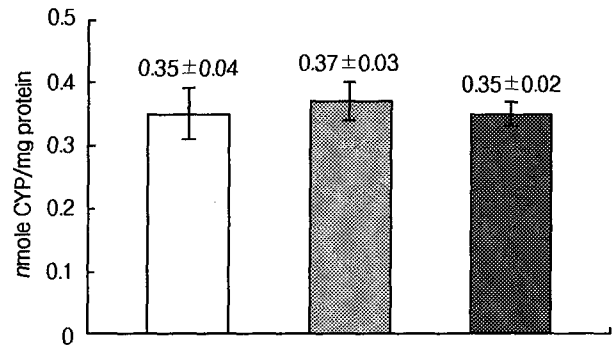


Fig. 2. Effect of the toluene application to rat skin on the hepatic CYP content in rats. Each value represents the mean±S.E. of 7 rats.

□; Control ▨; 3 day toluene-treated group ■; 5 day toluene-treated group

그리고 혈청 ALT 활성은 3일 및 5일 toluene 도포군은 대조군에 비하여 각각 64% (p<0.01), 260% (p<0.001)의 현저한 증가를 보였다.

2. 간조직의 병리학적 변화

흰쥐 피부에 toluene 도포군과 대조군의 간조직검사 소견은 Fig. 1과 같다. 대조군은 별다른 변화를 나타내지 않은 정상적인 소견이었으며 5일 toluene 도포군에서는 중심정맥 주변 간세포의 세포질변성이 관찰되었다.

3. 간조직의 CYP 함량, benzylalcohol 및 benzaldehyde dehydrogenase 활성

실험동물의 피부에 toluene 도포한 경우에 간조직의 CYP 함량은 대조군과 실험군 간에는 별다른 차이를 볼 수 없었으나 (Fig. 2) BADH 활성은 대조군에 비하여 3일 toluene 도포군은 18% 감소되는 경향을 보였으며 5일 toluene 도포군은 대조군에 비하여 약 27%의 유의한 (p<0.01) 감소를 나타내어 toluene 도포기간에 따라 점진적인 감소를 보였다 (Fig. 3). 그리고 BALDH 활성은 5일 toluene 도포군은 대조군 보다 약 50%의 유의한 (p<0.001) 감소를 보였다 (Fig. 4).

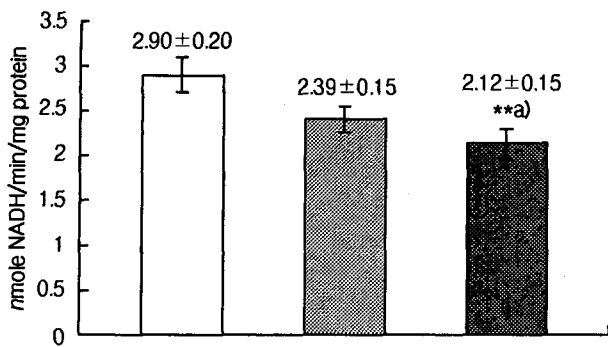


Fig. 3. Effect of the toluene application to rat skin on the hepatic BADH activity in rats. Each value represents the mean ± S.E. of 7 rats.
^{a)}; Significantly different from the control (**; p<0.01)
 □; Control ▨; 3 day toluene-treated group ■; 5 day toluene-treated group

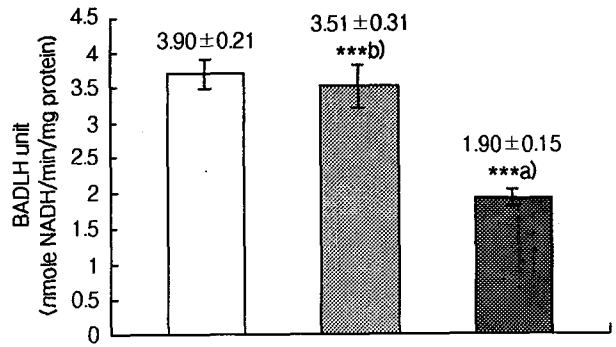


Fig. 4. Effect of the toluene application to rat skin on the hepatic BALDH activity in rats. Each value represents the mean ± S.E. of 7 rats.
^{a)}; Significantly different from the control (***) p<0.001
^{b)}; Significantly different from 5 day-toluene treated group (***) p<0.001
 □; Control ▨; 3 day toluene-treated group ■; 5 day toluene-treated group

고 찰

피부는 동물에 따라서 차이가 있겠지만 사람의 경우에 있어서 피부는 성인의 표면적이 약 1.8 m²이며 체중의 약 10%를 차지하고 있다. 그리고 수용성 물질과 이온은 용이하게 통과할 수는 없지만 여러 가지 지용성 독성물질에 대한 투과성은 크게 나타난다고 한다. 또한 독성물질의 흡수가 대부분 호흡기를 통하여 이루어지겠지만 피부를 통한 흡수도 간과할 수 없다⁷⁾.

피부는 표피, 진피, 결합조직인 피하조직의 세 층으로 구성되어 있으며 외부물질로부터의 확산에 대한 장벽역할을 담당하고 있다. 그리고 지용성 물질은 피부조직으로부터 순환계에 유입하기 전에 일부 대사를 시키는 기능을 갖고 있는데 이는 대부분 표피층에서 이루어지고 있다⁷⁾. 본 실험에서 사용한 toluene은 피부로부터의 흡수속도가 비교적 빠른 것으로 알려져 있다¹⁾. 그리고 전보에서는 실험동물에 복강으로 1일 간격^{8,24,25)}, 또는 2일 간격^{15,23)}으로 급성 투여시에 간상해가 경미하게 나타나는 가역적 상해 정도로 관찰되었으며 이는 간혈적으로 투여된 toluene이 toluene 투여 24시간 전에 이미 모두 대사되어 체외로 배설되기 때문일 것으로 생각된다. 그러나 toluene을 피부에 도포시에는 지속적인 유입상태로 되어, 이 경우에는 세포상해물질로 알려진 benzaldehyde¹⁹⁾가 toluene의 연속적인 대사과정에서 간조직 중에 지속적으로 누적된 상태로 되어 복강으로 경시별 투여 경우 보다 오히려 간상해가 심하게 나타날 수가 있다고 사료된다. 본 논문에는 피부조직에 있어서 data로써 제시하지는 않았지만 toluene 대사에 관여하는 CYP 및 BADH 활성이 간조직에 비하여 비교적 낮지만 의의 있는 활성치를 나타내었다. 그러나 toluene 대사 중 benzaldehyde로부터 benzoic acid로 변화하는데 관여하는 aldehyde dehydrogenase 활성⁹⁾은 극미소치 (trace activity)로 측정되었다. 따라서 toluene을 피부

에 도포하는 경우 toluene의 일부는 흡수되어 피부조직에서 benzaldehyde까지 대사되어 피하조직의 혈관을 따라서 순환계로 분포되며, 나머지 일부는 피부조직에 흡수되어 피부조직에서 대사되지 않은 채 toluene 그대로 순환계에 분포되어 benzaldehyde와 더불어 표적장기인 간조직으로 이동되어 간조직에서 대사되어 최종 hippuric acid로 되어 요로 배설될 것으로 생각된다. 이러한 toluene의 대사과정은 toluene의 피부도포시에는 연속적으로 이행되며 이러한 과정에서 세포상해에 benzaldehyde에 의한 지속적인 상해작용이 이루어 지리라 생각된다. 최근 이 등¹⁰⁾의 연구에 의하면 간독성 물질의 일종인 bromobenzene의 투여 간격이 길수록 간상해가 낮게 나타나는 반면 투여 기간이 짧을수록 간상해가 오히려 크게 나타남을 관찰할 수 있었다. 이러한 실험결과가 이를 뒷받침해 주고 있다.

따라서 toluene을 복강 및 경구 투여 이외 피부에 연속적으로 도포시에 toluene 중간대사산물의 조직 내에 유지율이 증가됨과 더불어 간상해가 오히려 심하게 나타날 것으로 생각되어 이를 확인코자 본 실험에서 toluene을 5일간 연속 피부에 도포한 다음, 간손상을 관찰하였다.

본 실험에서 간손상시에 혈청 중 그 활성이 증가된다는 XO 활성⁸⁾과 ALT의 혈청 중 활성치가 실험동물의 피부에 toluene을 도포시에 3일, 5일째 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였으며 간조직검사 소견에서는 중심정맥 주변에 간세포의 변성이 많이 나타났다. 따라서 본 실험에서 5일간 toluene 피부도포시 간조직의 상해가 초래됨을 알 수 있었다.

본 실험에서 toluene을 피부에 도포를 계속하였을 때 피부조직에서 toluene으로부터 대사되어 생성된 benzaldehyde가 혈류를 통해 간장기에 지속적인 투입형태로 되어 toluene의 복강 투여간격이 짧을수록 간상해가 심하게 나타날 수 있는 근거가

될 수 있다고 생각된다. 이에 피부에 toluene의 연속적인 도포 시에 간상해가 심하게 나타나는 기전을 규명하는 일환으로 간조직 중 toluene 대사기구를 측정할 결과, CYP 함량은 대조군과 실험군 간에 별다른 차이를 볼 수 없었으나 BADH 및 BALDH 활성은 toluene 도포기간 (3일, 5일)에 따라 오히려 억제되었다. 이같이 toluene를 실험동물에 투여시에 간조직의 BADH 및 BALDH 활성이 억제됨은 toluene의 대사중간 생성물질인 benzylalcohol 및 aldehyde가 이들 효소를 억제시켜 나타난 결과로 보고¹⁵⁾된 바 있다. 이때 benzaldehyde가 간세포 내 유지율이 증가될 것으로 생각된다. 이와 같은 현상이 toluene을 피부조직에 지속적인 도포시에 간조직 상해의 요인으로 작용할 것 이라고 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 김현영, 유일재, 정용현 (1996): 유기용제의 피부흡수속도 연구. 산업보건연구원, 한국산업 안전공단.
- 2) Ambrose AM, Christensen HE and Robins DJ (1953): Toxicological and pharmacological studies on chlordance. *Arch Ind Hyg*, **7**: 197-210.
- 3) Bergmeyer HU (1974): *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, Academic Press.
- 4) Boor JW and Hurtig HI (1977): Persistent cerebellar ataxia after exposure to toluene. *Ann Neurol*, **2**: 440-442.
- 5) Cohr KH and Stockholm J (1979): Toluene. A toxicologic review. *Scand J Work Environ Health*, **5**: 71-90.
- 6) Hiroshi T (1982): Percutaneous absorption of organic solvents, *Ind Health*, **20**: 335-345.
- 7) Hodgson E and Levi PE (1987): *A textbook of modern toxicology*. New York: Elsevier.
- 8) Jeon TW, Kang HY and Yoon CG (1995): Effect of toluene administration on the activity of serum xanthine oxidase in rats. *Korean J Toxicol*, **11(2)**: 279-288.
- 9) Karmen A (1955): A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest*, **34**: 13-133.
- 10) Lee SH, Jeon TW and Yoon CG (2000): A study on the effect of injection frequency on the liver damage in rats. *Korean J Biomed Lab Sci*, **6(1)**: 29-36.
- 11) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) Rosin J, Bartosz G and Wronska Nofer T (1988): Studies on the effect of ethanol and/or toluene on rat erythrocytes. *J Appl Toxicol*, **8(5)**: 369-372.
- 15) Ryu JI, Yoon CG and Shin JK (1999): Effect of circadian rhythms on the toluene metabolism in rats. *Korean J Biomed Lab Sci*, **5(1)**: 67-74.
- 16) Scheffler WC (1980): *Statistics for the biological sciences*. pp. 84-89, Addison-Wesley Co., USA.
- 17) Taylor GJ and Harris WS (1970): Glue sniffing causes heart block in mice. *Science*, **170(960)**: 866-868.
- 18) Tucker SB and Key MM (1992): Occupational skin disease. In *Environmental and occupational medicine 2nd ed*, William N, Rom, ed., 551-560.
- 19) Weiner H, Tank AW, Von Wartburg JP and Weber S (1979): Interaction of aldehydes and proteins. Abstr., Int. Symp. Alcohol Aldehyde Metab. Syst., 3rd.
- 20) Wolfe HR, Durham WF and Armstrong JF (1967): Exposure of workers to pesticides. *Arch Environ Health*, **14**: 622-633.
- 21) Yoon CG (2000): Effect of toluene treatment on the MCV in rat erythrocyte. *J Inst Nat Sci*, **19(2)**: 63-67.
- 22) Yoon CG (1984): A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Research Journal (Keimyung Junior College)* **2**: 295-308.
- 23) Weiner H, Tank AW, Von Wartburg JP and Weber S (1979): Interaction of aldehydes and proteins. Abstr., Int. Symp. Alcohol Aldehyde Metab. Syst., 3rd.
- 24) Yoon CG, Kim KS and Jeon TW (1996): Effect of dietary protein content on the toluene metabolism in rat. *Korean J Toxicol*, **12(2)**: 237-241.
- 25) Yoon CG, Yoon SD and Shin JK (1996): Effect of ethanol pretreatment on the toluene metabolism in toluene-treated rats. *Korean J Toxicol*, **12(2)**: 243-250.