한국환경과학회지 제13권(제4호), 413~420, 2004
J. of the Environmental Sciences

랫드 간세포 일차배양에서 Benzo[a]pyrene의 산화 효과

임 태 진
상지대학교 생명자원과학대학 생명공학과
(2004년 2월 17일 접수; 2004년 4월 21일 채택)

The Oxidative Effects of Benzo[a]pyrene in Rat Hepatocyte Primary Culture

Tae-Jin Rhim
Department of Biotechnology, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea
(Manuscript received 17 February, 2004; accepted 21 April, 2004)

The objectives of present study were to investigate the effects of benzo[a]pyrene(BaP) on cytotoxicity, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat hepatocyte primary culture. Primary cultures of rat hepatocytes were incubated for 24 hr, 48 hr or 72 hr in the presence of various concentrations (0, 10, 20, 30, 50 or 100 μ M) of BaP. Cytotoxicity and cell viability were determined by measuring glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) activity, lactate dehydrogenase(LDH) activity and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) value. Lipid peroxidation was evaluated using thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) assay. Effects on antioxidant system were determined by measuring glutathione peroxidase(GPx) activity, glutathione reductase(GR) activity and glutathione concentration. Activities of GOT and LDH, MTT value as well as TBARS concentration were not affected by up to 100 μ M of BaP for 24 hr incubation. However, BaP at the concentration of 50 μ M for 48 hr incubation or at the concentration of 30 μ M for 72 hr incubation began to increase LDH activity and TBARS concentration but decrease MTT value, representing that BaP caused cytotoxicity and decreased cell viability in dose- and time-dependent manners. GPx activity began to be decreased by BaP at the concentration of 50 μ M for 72 hr incubation. Whereas, GR activity began to be decreased by BaP at the concentration of 20 μ M for 72 hr incubation. Glutathione concentration began to be decreased by BaP at the concentration of 20 μ M for 72 hr incubation and was further reduced to 90% by 100 μ M of BaP. These results demonstrate that BaP caused cytoctoxicity and decreased cell viability by increasing lipid peroxidation and decreasing glutathione concentration as well as activities of GPx and GR.

Key Words : Benzo[a]pyrene, Cytotoxicity, Lipid peroxidation, Glutathione, Rat hepatocyte

1. 서 론

대표적인 환경호르몬(내분비 교란물질)으로 알려진 Benzo[a]pyrene(BaP)은 유기화합물 연소 과정에서 생성되는 polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)으로써[1] 체내 대사과정 동안 생성된 대사유도체들에 의해 발암원 또는 돌연변이원으로 작용하며[2~4], 또한 CYP1A1과 CYP1A2 관련 효소, glutathione S-transferase, 세포질 aldehyde dehydrogenase 및 uridine diphosphate glucuronosyltransferase 등의 효소 활성을 유도한다[5,6]. 산화스트레스와 세포손상은 세포내 유해한 oxygen radical의 생성에 의해 초래되며[7,8] reactive oxygen species는 세포의 거대분자를 공격함으로써 세포에 직접적인 손상을 입히거나 또는 유전자를 활성화시켜 세포를 사멸시키게 된다[9,10]. BaP의 독성이 세포에 손상을 초래하는 것은 superoxide anion radical, singlet oxygen 등 reactive oxygen species의 과다 생산에[11,12] 기인하는 것으로 알려져 있다. 지질과산화(lipid perox-

Corresponding Author : Tae-Jin Rhim, Department of Biotechnology, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea
Phone : +82-33-730-0544
E-mail : tjrhim@mail.sangji.ac.kr

idation)는 막지질이나 다른 세포내 소기관을 파괴함으로 유해하며 암, 동맥경화, 고혈압 등의 각종 질병과도 연관이 있다. 이러한 reactive oxygen intermediate와 지질과산화와 같은 산화스트레스로부터 세포를 보호하기 위해 체내에는 항산화 방어기전이 존재한다. 여기에는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR) 등의 효소계 항산화물질들과 비타민 A, 비타민 E, selenium, glutathione 등의 비효소계 항산화물질들로 구성되어 있다. 특히 SOD는 세포내 superoxide anion의 수준을 감소시키며, GPx와 catalase는 hydroxyl radical 형성의 전구물질인 hydrogen peroxide를 물로 변화시키는 반응을 촉매하여 세포내 hydroxyl radical의 수준을 감소시킨다[13~15]. Glutathione은 radical 소거 특성이 있으며, reactive oxygen intermediates가 생체막의 인지질, 핵산 그리고 단백질 등과 같은 주요한 세포 구성성분들과의 상호작용을 방해한다[16~18].

랫드에서 BaP 투여는 혈액이나 조직의 지질과산화를 현저히 증가시킨 반면 SOD와 catalase의 활성을 감소시켰으며[19~21], 이러한 BaP의 지질과산화 촉진 및 항산화효소 억제 효과는 대사산물인 BaP-quinone 형성에 의한 것으로[21] 보고되었다. 반면에, BaP에 의해 유발된 독성 또는 돌연변이는 SOD와 catalase에 의해 억제되었다[22,23]. 이와 같이 BaP의 독성 및 산화에 미치는 효과에 관해 많은 연구들이 수행되어 왔지만, BaP의 처리 농도 및 시간에 따른 간독성, 산화 및 GPx와 GR, glutathione 등의 항산화 방어시스템에 대한 효과는 거의 보고된 바 없다. 간세포 일차배양은 독성물질들에 의해 유발되는 다양한 생물학적 효과들과 항산화 효과 등을 연구하는데 유용한 실험방법이다. 따라서, BaP로 유발되는 독성 및 산화효과를 정확히 이해하기 위해서 본 연구에서는 간세포 일차배양을 통해 BaP에 의한 간세포 독성, 지질과산화 및 항산화효소 활성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

2.1.1. 실험동물

(주)대한바이오링크(충북 음성)로부터 구입한 체중 180~200 g의 Sprague-Dawley 수컷 랫드를 실험동물로 사용하였다. 본 실험실에서 사료와 물은 무제한 공급하였고 1주일의 적응기간을 거친 다음 간세포배양을 실시하였다.

2.1.2. 시약

Fetal bovine serum은 Cambrex사에서 구입하였고, HBSS, WME 및 L-glutamine은 GIBCO사에서 구입하였으며 기타 세포배양에 필요한 시약들, BaP 그리고 생화학적 분석에 필요한 시약들은 Sigma Chemical사에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 간세포 일차배양

간세포 일차배양은 Seglen[24]의 collagenase perfusion 방법을 기초로 하여 다음과 같이 실시하였다. 실험동물에 urethane(1 g/kg BW)을 복강주사하여 마취시킨 뒤 37°C로 가온된 collagenase-free, Ca^{2+} · Mg^{2+}-free HBSS buffer를 이용하여 관류에 의해 혈액을 간으로부터 유출시킨 후 간세포를 분리하였다. 얻어진 간세포는 hemacytometer에 점적하여 세포 생존율과 세포수를 측정한 후 세포수를 5×10^5 cells/ml이 되도록 WME 배양액으로 희석하였다. Cell suspension을 6-well culture plate 또는 100-mm culture dish에 분주한 후 CO_2 incubator에 넣고 37°C에서 4시간 배양하였다. Serum-free WME 배양액으로 2번 세척하여 well에 부착되지 않은 세포들을 제거하고, 처리용액(BaP 첨가 및 무첨가)을 포함한 새로운 WME 배양액을 첨가하여 CO_2 incubator에 넣고 37°C에서 일정시간 배양하였다.

2.2.2. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay

간세포의 생존 및 증식은 MTT assay에 의해 결정하였다. 배양액 채취후 culture plate에 부착되어 있는 세포를 분리시킨 다음 PBS 용액으로 suspension시켜 Mosmann[25]의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 처리군의 MTT값은 대조구를 100%로 기준하여 %MTT 감소로 표시하였다.

2.2.3. Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) assay

지질과산화는 배양액의 TBARS를 측정함으로써 결정하였다. 배양후 배양액을 채취하여 4°C에서 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하였고, 상등액을 취하여 측정시까지 -20°C에서 보관하였다. TBARS 수준은 Uchiyama와 Mihara[26]의 방법을 수정한 Sunderman 등[27]의 방법에 따라 처리군별로 4반복하여 측정하였다. TBARS 농도는 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준용액으로 사용한 malondialdehyde 농도로 표기하였다.

2.2.4. 효소 분석

배양후 배양액을 채취하여 4°C에서 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하였고, 상등액을 취하여 측정시까지 -20°C에서 보관하였다. Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 활성은 Reitman과 Frankel[28]의

방법에 따라 측정하였다. Lactate dehydrogenase (LDH) 활성은 Vassault[29]의 방법에 따라 측정하였다.

GPx과 GR 활성을 측정하기 위해, culture dish에 부착되어 있는 세포를 PBS용액으로 세척한 다음 policeman을 사용하여 분리하였다. 수거한 세포는 얼음 위에서 20 mM MOPS와 300 mM sucrose를 포함한 균질용액으로 균질한 후 원심분리에 의해 세포질 상등액을 채취하여 측정시까지 -85°C에 보관하였다. GPx 활성은 Flohe와 Gunzler[30]의 방법에 따라 측정하였고, 효소활성 1 unit는 분당 산화되는 NADPH μmole로 계산하였으며 mg 단백질당 표기하였다. GR 활성은 Carlberg와 Mannervik[31]의 방법에 따라 측정하였고, 효소활성 1 unit는 분당 산화되는 NADPH μmole로 계산하였으며 mg 단백질당 표기하였다. GOT, LDH, GPx 및 GR 활성은 각각 처리군별로 4반복하여 측정하였다.

2.2.5. Glutathione assay

Glutathione 수준을 측정하기 위해, culture dish에 부착되어 있는 세포를 PBS용액으로 세척하고 policeman을 사용하여 Triton-X100이 포함된 PBS 용액으로 수거한 후 trichloroacetic acid로 변성시켰다. 원심분리를 실시하여 상등액을 채취한 다음 Ulrichova 등[32]의 방법에 따라 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)를 이용하여 측정하였다. Glutathione 수준은 412 nm에서 흡광도를 측정하여 mg 단백질당 표기하였다. Glutathione 수준은 처리군별로 4반복하여 측정하였다.

2.2.6. 단백질 정량

단백질 함량은 BSA를 표준시약으로 사용하여 Bradford 방법[33]에 따라 측정하였다.

2.2.7. 자료분석 및 통계처리

처리군별 %MTT 감소, TBARS 수준, 효소 활성 및 glutathione 수준은 일원 분산분석을 사용하여 조사하였으며, 처리효과가 인정되는 경우 처리군별 평균값의 차이는 Student-Newman-Keuls' test[34]를 사용하여 $p<0.05$에서 유의성을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

간세포를 0, 1, 3, 10, 30 및 100 μM 농도의 BaP로 3시간, 6시간, 12시간 그리고 24시간 배양한 예비실험에서 각각의 배양시간 동안 BaP 처리구 간에 GOT와 LDH 활성의 차이는 발견되지 않았다(data not shown). 따라서, 간세포 독성 및 산화효과에 대한 BaP의 농도 및 시간 의존적 효과를 보다 구체적으로 조사하기 위해, 0, 10, 20, 30, 50 및 100 μM 농도의 BaP로 24시간, 48시간 및 72시간 동안 간세포를 배양하였다.

72시간까지 다양한 농도의 BaP가 간세포의 GOT와 LDH 활성에 미치는 효과는 Table 1과 같았다. 예비실험에서와 같이, 24시간 동안 100 μM BaP는 GOT 활성에 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 50 μM 이상의 BaP 농도로 48시간 처리하였을 경우, GOT 활성은 현저히 증가되어 간손상이 유발되었음을 알 수 있었다. 또한 48시간에 비해 72시간 처리하였을 경우, GOT 활성은 더욱 더 증가하였다. LDH 활성은 세포막 integrity의 지표로 사용되고 있으며, LDH 활성의 증가는 세포 손상(생존율 감소)을 나타낸다. 24시간 동안 100 μM BaP는 LDH 활성에 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 48시간 동안 30 μM 이상의 농도와 72시간 동안 20 μM 이상의 농도에서 BaP는 농도 의존적으로 LDH 활성을 증가시켰다. 또한 48시간에 비해 72시간 처리하였을 경우, LDH 활성은 더욱 더 증가하였다. 따라서, BaP는 시간 및 농도 의존적으로 간세포의 GOT와 LDH 활성을 증가시켰다.

처리시간별 다양한 농도의 BaP가 MTT 감소와 TBARS 농도에 미치는 효과는 Table 2와 같았다. MTT 값은 미토콘드리아 활성의 지표로 사용되고 있으며, MTT 감소의 억제는 세포 손상(생존율 감

Table 1. Effects of BaP on the activities of GOT and LDH in primary cultures of rat hepatocytes

Groups	GOT (U/ℓ)			LDH (nmol NADH consumed per min)		
BaP (μM)	24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr
0	15 ± 0.6^a	17 ± 0.4^a	19 ± 0.5^a	231 ± 7.0^a	252 ± 9.7^a	272 ± 19.6^a
10	15 ± 0.2^a	19 ± 0.5^a	20 ± 0.6^a	225 ± 5.3^a	270 ± 13.0^a	311 ± 16.0^a
20	16 ± 0.7^a	19 ± 0.4^a	21 ± 0.7^a	232 ± 5.9^a	$289\pm15.1^{a,b}$	379 ± 14.7^b
30	16 ± 0.4^a	20 ± 0.7^a	22 ± 0.6^a	229 ± 6.7^a	317 ± 7.0^b	463 ± 18.2^c
50	17 ± 0.3^a	27 ± 0.6^b	38 ± 0.8^b	248 ± 3.9^a	455 ± 10.8^c	691 ± 12.5^d
100	17 ± 0.5^a	44 ± 1.5^c	59 ± 1.7^c	248 ± 5.2^a	768 ± 13.5^d	895 ± 15.5^e

Hepatocytes were cultured for 24 hr, 48 hr or 72 hr in the presence of BaP. Values are presented as the means ± SE derived from four determinations

a,b,c,d,e Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p<0.05$)

Table 2. Effects of BaP on MTT reduction and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes

Groups	% MTT reduction			TBARS (μM)		
BaP (μM)	24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr
0	100±1.7[a]	100±1.7[a]	100±2.9[a]	0.7±0.08[a]	0.8±0.08[a]	0.9±0.12[a]
10	98±1.5[a]	100±1.6[a]	95±2.3[a,b]	0.8±0.06[a]	1.0±0.12[a]	1.2±0.19[a]
20	98±1.3[a]	97±1.5[a,b]	89±2.1[b]	0.8±0.05[a]	0.9±0.08[a]	1.1±0.12[a]
30	97±1.2[a]	96±1.7[a,b]	76±2.9[c]	0.7±0.08[a]	1.1±0.15[a]	2.7±0.11[b]
50	96±0.7[a]	93±0.6[b]	65±1.6[d]	0.8±0.08[a]	2.2±0.11[b]	3.2±0.22[c]
100	94±1.0[a]	50±2.0[c]	27±0.8[e]	0.8±0.11[a]	3.4±0.13[c]	4.7±0.17[d]

Hepatocytes were cultured for 24 hr, 48 hr or 72 hr in the presence of BaP. Cytotoxicity was assessed with the MTT assay and demonstrated by decreases in MTT reduction. Results of MTT assay are expressed as percent of control values. Lipid peroxidation was determined from the production of TBARS. Values are presented as the means±SE derived from four determinations

[a,b,c,d,e]Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p<0.05$)

소)을 나타낸다. 24시간 동안 100 μM BaP는 간세포 MTT 감소에 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 50 μM 이상의 BaP 농도로 48시간 처리하였을 경우 MTT 감소가 억제되었으며, 100 μM BaP는 50% 정도로 억제시켰다. 또한, 72시간 간세포 배양시에는 20 μM BaP 농도로도 MTT 감소를 억제시켰으며, 100 μM BaP는 70%까지 억제시켰다. 배양액의 TBARS 농도는 지질과산화의 지표로 사용되고 있다. 24시간 동안 BaP 처리는 지질과산화에 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 50 μM 이상의 농도로 48시간 처리하였을 경우와 30 μM 이상의 농도로 72시간 처리하였을 경우, BaP는 지질과산화를 증가시켰다. 또한, 48시간에 비해 72시간 처리하였을 경우 각 처리군에서 지질과산화가 더욱더 증가하여, BaP는 시간 및 농도 의존적으로 간세포의 지질과산화를 증가시켰다. 이와 같이 BaP가 지질과산화를 증가시킨다는 본 연구결과는 이전에 발표된 연구결과[19~21]와 일치한다. 또한, 72시간 간세포 배양에서 BaP 처리에 따른 TBARS 농도와 LDH 활성간 및 TBARS 농도와 MTT 감소간의 상관분석을 실시한 결과 각각 지질과산화와 세포 생존율과는 매우 밀접한 상관관계(Pearson 상관계수=0.945 및 -0.942, $p<0.01$)가 있음이 나타났다. 따라서, BaP에 의한 간세포 생존율 저하는 지질과산화의 증가에 따른 것으로 사료된다. BaP의 세포독성으로 인한 세포 생존율 감소효과는 마우스 간세포[35]와 HeLa 세포[36]를 이용한 연구에서도 보고된 바 있다. 또한, 세포 생존율 지표로 사용된 LDH 활성과 MTT 감소간에도 매우 밀접한 음의 상관관계(Pearson 상관계수=-0.965, $p<0.01$)가 관찰되었다. 24시간 동안 100 μM BaP는 간세포 생존율에 영향을 미치지 않은 반면, 48시간 또는 72시간 동안 30 μM 또는 50 μM 이상의 BaP 농도는 간세포 생존율을 현저히 저하시켰다는 본 연구의 결과는 HeLa 세포를 이용한 연구[36]에서도 유사하게 보고된 바 있다. 또한, PAH의 활성을 촉진하고 세포 독성의 지표로 사용되는 ethoxyresorufin-O-deethylase(EROD)의 최대 활성은 BaP 처리 후 12시간 이전 그리고 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) 처리 후 36시간 이전에는 관찰되지 않았다고[37] 보고된 바 있다. 이와 같이 BaP 독성 유발의 시간적 지연은 BaP-quinone과 같은 대사 중간물질 형성 활성화에[3,21] 기인하는 것으로 사료된다.

항산화 방어기전을 수행하는 효소계 항산화물질 중 GPx는 glutathione을 산화시킴으로써 hydrogen peroxide를 물로 환원시켜 세포의 과산화물 수준을 조절한다[15]. 산화형태의 glutathione은 GR에 의해 thiol 형태인 glutathione으로 다시 환원된다[18]. 즉, GPx는 지질과산화로부터 보호하는 중요한 기능을 수행하고[38] 반면에 GR은 산화 스트레스에 대해 항산화물질인 환원 형태의 glutathione을 유지하는 기능을 수행한다[39]. 72시간 동안 다양한 농도의 BaP가 간세포의 GPx와 GR 활성에 미치는 효과는 Table 3과 같다. GPx의 활성은 50 μM 이상의 BaP 농도에 의해 감소되었고 100 μM BaP는 GPx 활성을 약 40% 감소시켰다. 반면에 GR 활성은 20 μM BaP에 의해 감소되었으며, BaP 농도가 증가될수록 GR 활성은 지속적으로 감소되어 100 μM BaP는 GR 활성을 50%까지 감소시켰다. BaP가 SOD와 catalase의 활성에 미치는 영향[19~21]은 많이 연구되었지만, GPx와 GR의 활성에 미치는 효과는 거의 보고된 바가 없다. 그러나 최근에 간독성을 일으키는 ethacrynic acid에 의해 지질과산화가 유발되었고[40] GR 활성이 억제되었다는[41] 연구결과에 비추어 볼 때, 본 연구에서 BaP의 GR 활성 억제도 BaP의 지질과산화 증가와 독성과 매우 밀접한 관계가 있다고 사료된다.

Glutathione은 산화스트레스로부터 세포를 보호하는 항산화 특성이 있다. 간세포배양에서 glutathione

Table 3. Effects of BaP on activities of GPx and GR in primary cultures of rat hepatocytes

Groups BaP (μM)	GPx (nmol NADPH oxidized/min/mg protein)	GR (nmol NADPH oxidized/min/mg protein)
0	87 ± 3.0^{a}	131 ± 6.0^{a}
10	82 ± 1.8^{a}	$119\pm3.3^{a,b}$
20	82 ± 2.6^{a}	$107\pm4.4^{b,c}$
30	79 ± 1.5^{a}	$94\pm2.5^{c,d}$
50	71 ± 3.0^{b}	86 ± 4.3^{d}
100	53 ± 3.0^{c}	69 ± 5.5^{e}

Hepatocytes were cultured for 72 hr in the presence of various concentrations of BaP
Values are presented as the means±SE derived from four determinations
^{a,b,c,d,e}Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p<0.05$)

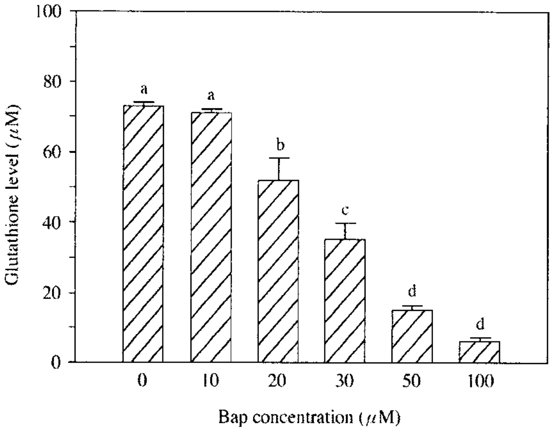

Fig. 1. Effects of BaP on the level of glutathione in primary cultures of rat hepatocytes. Hepatocytes were cultured for 72 hr in the presence of various concentrations of BaP. Each bar represents the means±SE derived from four determinations.
^{a,b,c,d}Values with different letters are significantly different ($p<0.05$).

제거는 DNA 손상, 지질과산화 등의 세포독성을 나타내었다[42,43]. 반면에, 간 microsome에서 glutathione은 지방과산화를 보호하였고[44], 또한 간세포배양에서도 glutathione은 비타민 E와 더불어 지방과산화를 억제시켰다고[45] 보고된 바 있다. 72시간 동안 다양한 농도의 BaP가 간세포의 glutathione 수준에 미치는 효과는 Fig. 1과 같다. 20 μM 이상의 농도에서 BaP는 glutathione의 수준을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 100 μM의 농도에서는 90% 이상의 감소를 나타내었다. 또한, 72시간 동안 배양에서 BaP 처리에 따른 glutathione 수준과 MTT 감소간의 상관분석을 실시한 결과 glutathione 수준과 세포 생존율과는 매우 밀접한 상관관계(Pearson 상관계수 =0.908, $p<0.01$)를 나타내었다.

이상의 연구 결과에 비추어 볼 때, BaP에 의한 독성 증가와 간세포 생존율 감소는 지질과산화 촉진, GPx와 GR 등의 항산화효소 활성 감소 및 glutathione 수준 감소 등의 산화효과에 의한 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 연구의 목적은 랫드 간세포 일차배양에서 BaP에 의해 유발된 세포독성, 지질과산화 및 항산화효소 활성에 미치는 효과를 조사하기 위함이었다. 0, 10, 20, 30, 50 및 100 μM의 다양한 농도의 BaP로 24시간, 48시간 및 72시간 동안 간세포를 일차배양 하였다. 간세포 독성과 생존율은 배양액의 GOT와 LDH 활성 및 MTT 값으로 결정하였고, 지질과산화는 TBARS 방법으로 측정하였다. 항산화에 미치는 효과는 GPx와 GR의 활성과 glutathione 수준으로 결정하였다. 간세포를 BaP로 24시간까지 배양한 결과, 간세포의 GOT와 LDH 활성, MTT 값 뿐 만이 아니라 TBARS 값에 아무런 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 50 μM 이상 농도의 BaP로 48시간 처리하였을 경우와 30 μM 이상 농도의 BaP로 72시간 처리하였을 경우, LDH 활성과 TBARS 값은 모두 현저히 증가하였고 반면에 MTT 값은 현저히 감소하였다. 이러한 연구 결과는 BaP가 시간 및 농도 의존적으로 간독성을 유발시켜 간세포 생존율을 저하시키는 효과를 나타내 보이고 있다. 72시간 동안 다양한 농도의 BaP로 간세포를 처리한 결과 간세포의 GPx 활성은 50 μM 이상의 BaP 농도에서 현저히 감소하였으나, 반면에 GR 활성은 20 μM 이상의 BaP 농도에서 감소하였다. 20 μM 이상의 농도에서 BaP는 간세포의 glutathione 수준을 감소시켰으며, 100 μM 농도에서는 90% 감소를 나타내었다. 이상의 연구 결과는 BaP가 지질과산화를 촉진시키

고 GPx와 GR의 활성과 glutathione 수준을 감소시킴으로써 세포 독성을 유발하고 간세포 생존율을 저하시키는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1) Safe, S., 1990, Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs), Crit. Rev. Toxicol., 21, 51-88.
2) Levin, W., A. W. Wood, P. G. Wislocki, R. L. Chang, J. Kapitulnik, H. D. Mah, H. Yagi, D. M. Jerina and A. H. Conney, 1978, Mutagenicity and carcinogenicity of benzo[a]pyrene derivatives, In: Gelboin, H. V. and P. O. P. Ts'o, (eds), Polycyclic hydrocarbons and cancer: environment, chemistry and metabolism, Vol. 1., Academic Press, 189-202pp.
3) Gelboin, H. V., 1980, Benzo[a]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes, Physiol. Rev., 60, 1107-1166.
4) Pelkonen, O. and D. W. Nebert, 1982, Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis, Pharmacol. Rev., 34, 189-222.
5) Guengerich, F. P., G. A. Dannan, S. T. Wright, M. V. Martin and L. S. Kaminsky, 1982, Purification and characterization of microsomal cytochrome P-450s, Xenobiotica, 12, 701-716.
6) Nebert, D. W., D. D. Peterson and A. J. J. Fornace, 1990, Cellular responses to oxidative stress: the [Ah] gene battery as a paradigm, Environ. Health Perspect., 88, 13-25.
7) Recknagel, R. O., E. A. Glende and R. S. Britton, 1991, Free radical damage and lipid peroxidation, In: Meeks, R. G., S. D. Harrison and R. J. Bull, (eds), Hepatotoxicology, CRC Press, 401-436pp.
8) Kehrer, J. P., 1993, Free radicals as mediators of tissue injury and disease, Crit. Rev. Toxicol., 23, 21-48.
9) Nakazawa, H., C. Genka and M. Fujishima, 1996, Pathological aspects of active oxygen-free radicals, Jpn. J. Physiol., 46, 15-32.
10) Suzuki, Y. J., H. J. Forman and A. Sevanian, 1997, Oxidants as stimulators of signal transduction, Free Radical Biol. Med., 22, 269-285.
11) Kagan, J., R. W. Tuveson and H. H. Gong, 1989, The light-dependent cytotoxicity of benzo[a]pyrene: effect on human erythrocytes, Escherichia coli cells, and Haemophilus influenzae transforming DNA, Mutat. Res., 216, 231-242.
12) Penning, T. M., S. T. Ohnishi, T. Ohnishi and R. G. Harvey, 1996, Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase, Chem. Res. Toxicol., 9, 84-92.
13) McCord, J. M. and E. D. Jr. Day, 1978, Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex, FEBS Lett., 86, 139-142.
14) Harris, E. D., 1992, Regulation of antioxidant enzymes, FASEB. J., 6, 2675-2683.
15) Michiels, C., M. Raes, O. Toussaint and J. Remacle, 1994, Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress, Free Rad. Biol. Med., 17, 235-248.
16) Meister, A. and M. E. Anderson, 1983, Glutathione, Ann. Rev. Biochem., 52, 711-760.
17) Kaplowitz, N., T. K. Aw and M. Ooktens, 1985, The regulation of hepatic glutathione, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 25, 715-744.
18) Guillemette, J., M. Marion, F. Denizeau, M. Fournier and P. Brousseau, 1993, Characterization of the in vitro hepatocyte model for toxicological evaluation: repeated growth stimulation and glutathione response, Biochem. Cell Biol., 71, 7-13.
19) Kim, K. B. and B. M. Lee, 1997, Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene, Cancer Lett., 113, 205-212.
20) Gupta, M. P., K. L. Khanduja and R. R. Sharma, 1998, Effect of cigarette smoke inhalation on antioxidant enzymes and lipid perox-

idation in the rat, Toxicol. Lett., 41, 107-114.
21) Kim, H. S., S. J. Kwack and B. M. Lee, 2000, Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo[a]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[a]pyrene, Chemico-Biol. Inter., 127, 139-150.
22) Chesis, P. L., D. E. Levin, M. T. Smith, L. Ernster and B. N. Ames, 1984, Mutagenicity of quinones: pathways of metabolic activation and detoxification, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1696-1700.
23) Leadon, S. A., M. R. Stampfer and J. Bartley, 1988, Production of oxidative DNA damage during the metabolic activation of benzo-[a]pyrene in human mammary epithelial cells correlates with cell killing, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4365-4368.
24) Seglen, P. O., 1976, Preparation of isolated rat liver cells, Methods Cell Biol., 13, 29-83.
25) Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods, 65, 55-63.
26) Uchiyama, M. and M. Mihara, 1978, Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, Anal. Biochem., 86, 271-278.
27) Sunderman, F. W. Jr., A. Marzouk, S. Hopfer, O. Zaharia and M. C. Reid, 1985, Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats, Ann. Clin. Lab. Sci., 15, 229-236.
28) Reitman, S. and S. Frankel, 1957, A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, Am. J. Clin. Pathol., 28, 56-63.
29) Vassault, A., 1983, Lactate dehydrogenase: UV-method with pyruvate and NADH. In: Bergmeyer, H. U., J. Bergmeyer and M. Grassl, (eds), Methods of Enzymatic Analysis. III. Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases, Verlag-Chemie, 118-126pp.
30) Flohe, L. and W. A. Gunzler, 1984, Assays of glutathione peroxidase, Methods Enzymol., 105, 114-121.
31) Carlberg, I. and B. Mannervik, 1955, Glutathione reductase, Methods Enzymol., 113, 484-490.
32) Ulrichova, J., Z. Dvorak, J. Vicar, J. Lata, J. Smrzova, A. Sedo and V. Silmanek, 2001, Cytotoxicity of natural compounds in hepatocyte cell culture models: the case of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids, Toxicol. Lett., 125, 125-132.
33) Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem., 72, 248-254.
34) Steel, R. G. D. and J. H. Torre, 1980, Principles and Procedures of Statistics, 2nd ed, McGraw-Hill, 186-187pp.
35) Landolph, J. R., J. C. Bartholomew and M. Calvin, 1976, Quantitative studies of the toxicity of benzo(a)pyrene to a mouse liver epithelial cell strain in culture, Cancer Res., 36, 4143-4151.
36) Yu, I. J., C. H. Lim, H. J. Kim, K. H. Chung, K. S. Song, J. H. Han and Y. H. Chung, 2001, Effect of benzo[a]pyrene and mitomycine C on HeLa cell division cycle, Environ. Mutagen. Carcinogens, 21, 82-88.
37) Zhao, W. and K. S. Ramos, 1995, Inhibition of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes by benzo[a]pyrene and related aromatic hydrocarbons: role of Ah receptor-dependent events, Toxicology, 99, 179-189.
38) Simmons, T. W. and I. S. Jamall, 1988, Significance of alterations in hepatic antioxidant enzymes. Primacy of glutathione peroxidase, Biochem. J., 251, 913-917.
39) Rall, T. W. and A. L. Lehninger, 1952, Glutathione reductase of animal tissues, J. Biol. Chem., 194, 119-130.
40) Yamamoto, K., Y. Masubuchi, S. Narimatsu, S. Kobayashi and T. Horie, 2002, Toxicity of ethacrynic acid in isolated rat hepatocytes, Toxicol. In Vitro, 16, 151-158.
41) Hoffman, D. W., P. Wiebkin and L. P. Rybak, 1995, Inhibition of glutathione-related enzymes and cytotoxicity of ethacrynic acid and cyclosporine, Biochem. Pharmacol., 49, 411-415.
42) Domenicotti, C., D. Paola, A. Vitali, M. Nitti, C. d'Abramo, D. Cottalasso, G. Maloberti, F. Biasi, G. Poli, E. Chiarpotto, U. M. Marinari and M. A. Pronzato, 2000, Glutathione depletion induces apoptosis of rat hepatocytes through activation of protein kinase C novel

isoforms and dependent increase in AP-1 nuclear binding, Free Radic. Biol. Med., 29, 1280-1290.
43) Beddowes, E. J., S. P. Faux and J. K. Chipman, 2003, Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress, Toxicology, 187, 101-115.
44) Palamanda, J. R. and J. P. Kehrer, 1992, Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes, Arch. Biochem. Biophys., 293, 103-109.
45) Milchak, L. M. and J. D. Bricker, 2002, The effects of glutathione and vitamin E on iron toxicity in isolated rat hepatocytes, Toxicol. Lett., 126, 169-177.