

단백식이 조건을 달리하여 성장시킨 흰쥐에 Bromobenzene 투여가 간손상에 미치는 영향

신중규 · 채순님* · 윤종국*†

경산대학교 보건과학과

*개명대학교 공중보건학과

An Effect of Bromobenzene Treatment on the Liver Damage of Rats Previously Fed Low or High Protein Diet

Joong-Kyu Shin, Soon-Nim Chae* and Chong-Guk Yoon*†

Dept. of Health Science, Kyung San University, Kyungsan 713-715, Korea

*Dept. of Public Health, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

Abstract

To evaluate an effect of dietary protein on the liver damage, the bromobenzene was intraperitoneally injected to the rats fed a low or high protein diet and then the liver weight per body weight and serum levels of alanine aminotransferase (ALT) activities were determined to demonstrate the differences in liver damage between the groups fed low or high protein diet. Hepatic aniline hydroxylase (AH), glutathione (GSH) content and glutathione S-transferase (GST) activity were also determined to clarify causes of liver damage between the two groups. Increases of liver weight per body weight and serum ALT activities were higher in bromobenzene treated rats fed low protein diet than those fed high protein diet. The increasing rate of hepatic AH activity was higher in bromobenzene-treated rats fed low protein diet than that in those fed high protein diet. Furthermore, hepatic glutathione contents and GST activities in bromobenzene-treated rats were higher in rats fed high protein diet than those fed low protein diet. In case of control group, the hepatic glutathione content and GST activity were also higher in rats fed high protein diet than those fed low protein diet.

Key words : high protein diet, low protein diet, bromobenzene

서 론

최근 산업발전에 따른 산업공해물질에 대한 독성 예방대책의 일환으로 영양 관리적 측면을 배제할 수 없다고 생각된다. 이들 유해 산업공해물질 중 bromobenzene은 xenobiotic성 간독소의 일종^{1,2)}으로 인체에 폭로되었을 때 간세포의 다기능 복합산화효소기구에 의하여 bromobenzene 3,4-oxide로 전환되며 이 친전자성 물질이 간독성을 야기한다고 한다³⁾. 한편 xenobiotics와 생체의 단백질 영양상태와의 상호작용은 오래 전부터 연구의 대상이 되어왔다⁴⁻⁶⁾. 그러나 xenobiotics성 bromobenzene과 단백영양조건과의 상호작용에 관한 보

고는 접할 수가 없었다. 특히 bromobenzene의 생체내 대사는 bromobenzene이 친수성물질로 전환되는 phase I 대사와 친수성물질을 포함하는 phase II 대사가 뚜렷 하기 때문에^{7,8)} xenobiotic의 대사에 단백영양조건을 검토하는 모델실험으로 적절하다고 생각된다.

이에 본 연구에서는 bromobenzene의 대사에 단백질 영양조건의 영향을 검토코자 실험동물에 bromobenzene을 투여한 다음, 체중당 간무게, 혈청 alanine aminotransferase (ALT)를 측정하여 식이성 단백질에 따른 간손상 정도를 관찰하는 한편 이에 대한 기전을 구명하는 일환으로 해독에 관여하는 간 glutathione 함량과 이에 포함효소인 glutathione S-transferase (GST) 활성^{7,8)}을 측정하여 이들 결과를 비교 관찰하였다.

* To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

실험동물 및 처치

실험동물은 체중이 100g 내외되는 외견상 건강한 Sprague-Dawley계 숫 흰쥐를 Table 1에 표시된 사료성 분묘의 식이로 저(LP; 7% casein) 및 고(HP; 20% casein)단백식이군으로 구분하여 약 1개월간 사육하였다. 고단백식이와 저단백식이로 약 1개월간 사육하였으나, 고단백식이와 저단백식이로 약 1개월간 사육하였다. 고단백식이와 저단백식이로 약 1개월간 사육하였다. 고단백식이와 저단백식이로 약 1개월간 사육하였다. 고단백식이와 저단백식이로 약 1개월간 사육하였다.

간조직 효소액의 조제

조직은 4°C하에서 절편으로 만들고 그 중 일정량을 침투하여 4배량의 빙냉 0.25M sucrose를 첨가하여 teflon glass homogenizer로 마쇄하여 간균질액(20% w/v)을 만들었다. 이 간 균질액을 4°C하에서 700×g로 10분간 원침시켜 해 및 미마쇄분을 제거한 다음 그 상층액을 15,000×g에서 20분간 원침하여 상층액을 효소액으로 만들었다.

Table 1. Composition of experimental diet (g/kg diet)

Ingredients	Low protein diet	High protein diet
Casein	70	200
Corn starch	804.36	674.36
Corn oil	54.8	54.8
Vitamin A and D mixture ^a	10.2	10.2
Vitamin E and K mixture ^b	2	2
Water soluble vitamin mixture ^c	3	3
Vitamin B ₁₂ ^d	1	1
Salt mixture ^e	40	40
α-Cellulose	20	20
	4190.90.Kcal	

^a Vitamin A and D mixture : 51,000unit of A and 51,000unit of D dissolved in 100ml of corn oil

^b Vitamin E and K mixture : 5g of α-tocopherol and 0.2g of menadion dissolved in 200ml of corn oil

^c Water soluble vitamin mixture : contained (mg) : choline chloride 2,000, thiamine hydrochloride 10, riboflavin 20, nicotinic acid 120, pyridine 10, Ca-panthothenate 100, biotin 0.05, folic acid 4, inositol 500, p-aminobenzoic acid 100

^d Vitamine B₁₂ : 5mg of vitamin B₁₂ dissolved in 500ml of distilled water salt mixture : contained(g) : CaCO₃ 300, potassium phosphate dibasic 322.5, MgSO₄ 102, Ca-phosphate monobasic 75, NaCl 167.5, ferric citrate 27.5, KI 0.8, ZnCl₂ 0.25, CuSO₄ · 5H₂O 0.3, MnSO₄ 5, molybdic acid 0.2

활성 및 단백질정량에 사용하였다.

혈청 ALT 활성측정

혈청 ALT 활성측정은 Reitman과 Frankel의 방법⁹에 의해 측정하였으며, 효소활성단위는 혈청 1ml당 Karman unit¹⁰로 표시하였다.

간조직의 aniline hydroxylase 활성측정

효소 활성측정은 aniline을 기질로 하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 유리되는 p-aminophenol을 phenol 시약으로 발색시켜 640nm에서 흡광도를 측정하는 Bidlack과 Lowry의 방법¹¹에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 간조직 효소액 중에 함유된 단백질 1mg이 1시간 동안 반응하여 기질로 부터 생성된 p-aminophenol의 양을 nmole로 표시하였다.

간조직의 glutathione 함량측정

간조직 일정량을 생리식염수 4배량을 가하고 glass teflon homogenizer로 마쇄하여 간균질액 20% w/v을 만든 다음 이것을 glutathione 함량측정에 사용하였다. Glutathione의 함량은 Ellman의 방법¹²에 준하여 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)로 발색시켜 파장 412nm에서 측정하였다.

간조직 glutathione S-transferase의 활성측정

Glutathione S-transferase의 활성측정은 Habig 등의 방법¹³에 준해 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 1 mM, glutathione 1mM 및 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.5)에 일정량의 효소액을 함유시킨 반응액을 25°C에서 10분간 반응시켜 생성된 glutathione-2,4-dinitrobenzene conjugate를 파장 340nm에서 1분 동안에 생성된 conjugate의 양을 nmole로 나타내었다.

간조직의 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등의 방법¹⁴에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

얻어진 각종 성적들의 평균치 중 상호비교가 필요한 경우에는 student t-검정법에 의하여 검정하였다.

결과 및 고찰

성장기간중 체중의 변동

실험동물을 casein으로 단백함량을 달리하여 성장시켰을 때 HP군의 성장율이 LP군 보다 약 70% 증가되

었다. 이는 본 연구진의 이전 보고^{5,6}와 유사하였다 (Fig. 1). 따라서 본 실험조건이 저 및 고단백식이 조건의 실험동물 모델로 확인되었다.

체중당 간중량 및 혈청 ALT 활성변동

체중당 간무게에 있어서 HP군은 bromobenzene 투여군이 대조군 보다 약 61% 유의한 증가를 보였으며, LP군은 bromobenzene을 투여하므로써 약 64% 증가하였다. 간손상시 그 활성이 증가된다는 혈청 ALT 활성^{15,16)}은 LP군에서 bromobenzene 투여군이 대조군에 비하여 약 130%의 유의한 증가를 보였으며, HP군에서는 bromobenzene 투여군이 대조군에 비하여 약 61% 증가되었던 (Table 2). 따라서 bromobenzene 투여로 인한 간무게 및 혈청 ALT 활성 증가율이 HP군 보다 LP군이 높게 나타남을 알 수 있었다. 그러므로 bromobenzene에 의한 간손상 정도가 LP군이 HP군 보다 높게 나타남을 시사

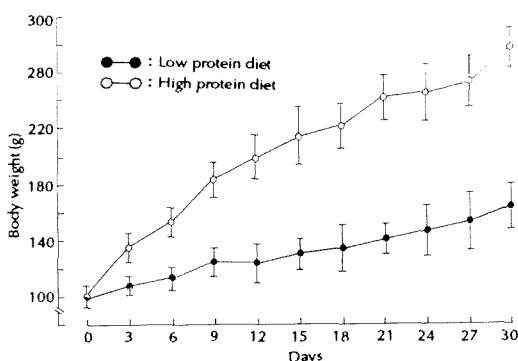


Fig. 1. One month weight gains in rats fed a low or high protein diet.

Each value is the mean \pm S.E. of 12 rats.

해 주고 있다.

간조직 중 aniline hydroxylase 활성변동

Bromobenzene에 의한 간손상은 생체내에서 bromobenzene 중간 대사산물의 free radical인 bromobenzene 3,4-oxide에 기인된다고 한다⁷. 또한 bromobenzene으로부터 bromobenzene 3,4-oxide 생성은 cytochrome P-450에 상응하는 aniline hydroxylase 효소활성¹⁷에 좌우된다고 하며, 본 효소의 활성은 식이성 단백질 함량에 상당한 영향을 받는다^{5,18)}고 한다. 따라서 식이성 단백질 함량에 따른 bromobenzene에 의한 간손상은 간 aniline hydroxylase 활성에 영향을 받을 것으로 생각된다.

Bromobenzene 투여시 간 aniline hydroxylase 활성을 LP 및 HP군에서 모두 증가되었으며, 그 증가율은 LP이 HP군 보다 높게 나타났다 (Table 3). 그러므로 간손상을 야기시키는 bromobenzene-3,4-oxide 생성율이 HP군 보다 LP군이 높게 나타남을 암시해주고 있다. 이는 bromobenzene에 의한 간손상의 정도가 HP군 보다 LP군에서 더 크게 나타남을 뒷받침 해주고 있다.

Bromobenzene에 의한 간손상은 bromobenzene으로부터 생성된 bromobenzene-3,4-oxide 해독에 관여하는 간 glutathione 함량과 포함효소인 GST 활성에 상당한 영향을 받고 있으며^{7,8)} 이들 phase II계 효소群은 단백식이 조건에 따라 달리 나타난다고 한다⁴⁻⁶⁾. 따라서 실험동물의 식이성 단백 함량의 차이에 의한 bromobenzene 해독에 차이가 나타날 것으로 생각된다.

간조직 중 glutathione 함량 및 GST 활성변동

Bromobenzene 투여로 인한 간 glutathione 함량 및

Table 2. Effect of dietary protein on the liver weight per body weight (%), and serum ALT activity in bromobenzene treated rats

Groups	Low protein diet		High protein diet	
	Control	Bromobenzene	Control	Bromobenzene
Liver/body wt.	3.35 \pm 0.12	5.49 \pm 0.26*** ^a	3.01 \pm 0.06	4.85 \pm 0.17*** ^a
Serum ALT*	19.22 \pm 4.73** ^b	44.51 \pm 6.90	25.60 \pm 6.47	39.70 \pm 7.01

Each value represents the mean \pm S.E. of 6 rats

* Significantly different from the control group (*p < 0.05, ***p < 0.001), **Karmen unit/ml of serum

Table 3. Effect of dietary protein on the hepatic aniline hydroxylase (AH) activity in bromobenzene

Groups	Low protein diet		High protein diet	
	Control	Bromobenzene	Control	Bromobenzene
Liver AH activities	19.80 \pm 5.12	40.56 \pm 3.19** ^a	26.50 \pm 1.32	32.86 \pm 5.01

Other abbreviations are the same as in table 2, Aniline hydroxylase activities unit : μ -aminophenol nmoles/min/mg protein

**Significantly different from the control group (p < 0.01)

Table 4. Effect of dietary protein on the hepatic glutathione (GSH) content and glutathione S-transferase (GST) activities in bromobenzene treated rats

Groups	Low protein diet		High protein diet	
	Control	Bromobenzene	Control	Bromobenzene
GSH(μmoles/g wt. liver)	2.80± 0.16	3.05± 0.24	3.73± 0.14*	5.25± 0.87
GST(nmoles/mg protein/min)	615.98±173.69	622.20±284.23	750.01±97.90	952.51±72.61

Other abbreviations are the same as in table 2, *: Significantly different from the control in low protein diet group

GST 활성을 나타낸 것이 Table 4와 같다. HP군에 있어 서 간 glutathione 함량이 LP군 보다 약 33%의 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 보였으며 bromobenzene 투여로 인한 간 glutathione 함량 증가율 역시 HP군 LP군 보다 높게 나타났다. 한편 간 GST 활성 역시 bromobenzene 투여군 및 대조군 모두 LP군 보다 HP군이 각각 22%, 53% 높게 나타났다.

그러므로 bromobenzene으로부터 bromobenzene 3,4-oxide 해독능은 HP군이 LP군 보다 높게 나타남을 알 수 있다. 따라서 간 glutathione 함량과 GST 효소가 bromobenzene 해독에 관여한다는 사실^[1,2,7]과 본 실험 성적을 종합하여 볼 때 식이 단백질 함량이 bromobenzene 해독에 영향을 미침을 시사해 주고 있다.

요 약

식이성 단백질이 bromobenzene에 의한 간손상에 어떠한 영향을 미치는지를 검토코자 흰쥐를 저(LP : casein 7%) 및 고(HP : casein 20%) 단백식이로 1개월간 성장시킨 뒤 bromobenzene을 투여한 다음, 간무게, 혈청 alanineaminotransferase (ALT) 활성을 측정하여 간손상 정도를 두 군간에 비교하였다. 아울러 이에 대한 기전을 구명하는 일환으로 간조직 중 aniline hydroxylase (AH) 활성과 glutathione (GSH) 함량 및 이의 포합효소인 glutathione S-transferase (GST) 활성을 측정하였다. Bromobenzene 투여로 인한 대조군에 대한 간중량 및 혈청 ALT 활성 증가율은 LP군이 HP군 보다 높았다. 이 때 간 AH 활성 증가율은 HP군 보다 LP군이 높았으나, 간 GSH 및 GST 활성은 LP군 보다 HP군이 높게 나타났다. 이상 실험결과를 종합하여 볼 때 bromobenzene에 의한 간독성을 식이 중 단백질 함량 감소에 영향을 받으며, 이는 LP군이 HP군 보다 bromobenzene 투여로 인한 간 AH 활성을 증가되나 bromobenzene 해독에 관여하는 간 glutathione 함량과 GSH 활성의 감소에 기인되기 때문인 것으로 생각된다.

문 헌

- Reid, W. D., Cho, A. K., Krishna, G. and Brodie, B. B. : On the mechanism by which organic compound product tissue lesions. I. Hepatotoxicity of aromatic hydrocarbons and enhancement by phenobarbital. *Pharmacologist*, **12**, 208 (1970)
- Brodie, B. B., Reid, W. D., Cho, A. K., Sipes, G., Krishna, G. and Gillette, J. R. : Possible mechanism of liver necrosis caused by aromatic organic compounds. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**, 160 (1971)
- Zheng, J. and Hanzlik, R. P. : Premercaptopuric acid metabolites of bromobenzene derived via its 2,3- and 3,4-oxide metabolites. *Xenobiotica*, **21**, 535 (1991)
- Drill, V. A. : Hepatotoxic agents. Mechanism of action and dietary interrelationship. *Pharmacol. Rev.*, **4**, 1 (1952)
- 윤종국, 이상일, 신중규 : 식이성 단백질 함량에 따른 흰쥐에 사염화탄소 투여가 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향. *한국영양식량학회지*, **20**, 527 (1991)
- 윤종국, 정소웅, 차상운 : 단백 식이조건을 달리하여 성장한 흰쥐에 methanethiol 투여가 간기능에 미치는 영향. *한국영양식량학회지*, **22**, 15 (1993)
- Boyland, E. and Chasseud, L. F. : The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.*, **32**, 173 (1969)
- Thor, H. : Drug biotransformation and hepatotoxicity studies with bromobenzene in isolated hepatocytes. *Arch. Toxicol.(suppl.)*, **1**, 107 (1978)
- Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56 (1957)
- Karmen, A. and Worblewski, G. L. : Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.*, **34**, 126 (1955)
- Bidlack, W. R. and Lowry, G. L. : Multiple drug metabolism. *p*-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 311 (1982)
- Ellaman, G. L. : Tissue sulphhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959)
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130 (1974)
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin

- phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
15. Wróblewski, F. and La Due, J. S. : Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **91**, 569 (1956)
 16. Takeda, Y., Ichihara, A., Tanioka, H. and Inove, H. : The biochemistry of animal cells, the effect of corticosteroids on leakage of enzyme from dispersed rat liver cell. *J. Biol. Chem.*, **239**, 3590 (1964)
 17. Hanzen, D. A. and Coon, M. J. : Properties of electrop-
- oretically homogenous phenobarbital-inducible and β -naphthoflavon inducible forms of liver microsomal cytochrom P-450. *J. Biol. Chem.*, **251**, 7929 (1976)
18. 윤종국, 이상일, 강희양 : 저단백식으로 성장한 흑쥐에 사염화탄소 투여가 aniline hydroxylase 활성에 미치는 영향. 계명대학교 기초과학연구소 연구논집, 7, 125 (1988)

(1994년 8월 10일 접수)