

흰쥐에 Toluene과 Alcohol의 병행투여가 간 손상에 미치는 영향

전재현 · 임영숙* · 윤종국†

계명대학교 자연과학대학 공중보건학과, *대구공업전문대학 식품영양과

Effect of Acute Pretreatment of Ethanol on the Liver Damage in Toluene Treated Rats

Jai-Hyun Jeon, Young-Suk Lim* and Chong-Guk Yoon

Dept. of Public Health, College of Natural Science, Keimyung Univ. , Taegu 704-701, Korea

*Dept. of Food Science and Nutrition, Taegu Technical Junior College

ABSTRACT

To evaluate an effect of acute ethanol pretreatment on the liver injury in toluene-treated rats, toluene(50% in olive oil)was intraperitoneally given four times at 0.3ml /100g body weight at interval of one day to the ethanol-pretreated rats(0.3ml of 50% /100g body weight).

The increasing rate of liver weight per body weight(%), serum levels of alanine aminotransferase (ALT) activity, liver lipid peroxide content was higher in toluene treated rats pretreated with ethanol than those treated with toluene alone.

Concomitantly the hepatic glucose-6-phosphatase activity was increased whereas glutathione content was decreased by ethanol pretreatment before toluene administration in rats. In case of direct administration of acetaldehyde or benzaldehyde to the rats, the liver weight per body weight(%) and serum levels of ALT activity were almost higher than the control group.

There results indicate that the toluene treated rats showed the reversible injury of liver and intensified, however, by the ethanol treatment.

Key words: Toluene, Alcohol, Alanine aminotransferase, Lipid peroxide, Glucose-6-phosphatase, Glutathione, Acetaldehyde, Benzaldehyde.

I. 서 론

최근 식생활의 향상 및 다양화에 따른 주류섭취의 증가와 더불어 산업발전에 의한 산업공해물질의 폭으로 인간의 건강에 심각한 문제가 야기되고 있는

† To whom all correspondence should be addressed

실정이다. 이들 산업공해물질 중 xenobiotics의 일종인 toluene은 비교적 그 안전성이 인정되어 산업장에서 유기용제로 많이 사용되고 있다. 그러나 toluene이 폭로시 신경계¹¹⁾ 및 순환계^{12,13)}에 독성현상이 초래됨이 알려져 있다. 또한 toluene이 인체에 간독소로 작용한다는 보고^{14,15)}도 있다.

Toluene은 체내에서 benzylalcohol, benzaldehyde, benzoic acid를 거쳐 마뇨산으로 대사되어 요중으로 배설된다¹⁶⁾고 한다.

한편 xenobiotics의 폭로에 alcohol 섭취의 변수가 작용할 때 xenobiotics 중독에 상당한 영향을 미친다는 많은 보고^{11,15)}가 있다. 특히 ethanol에 만성 중독된 실험동물에 xenobiotics의 폭로시 중독현상이 심화된다고 하였다. 그러나 ethanol과 toluene을 병행투여한 경우에 toluene의 중독현상에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구는 실험동물에 ethanol과 toluene을 2일 간격으로 4회 병행투여한 후 간 손상의 parameter로서 체중당 간 무게(%), 간조직의 과산화물질 함량, glucose-6-phosphatase 및 혈청 alanine aminotransferase 활성도를 검토코자 하였다. 또한 이의 기전규명의 일환으로 benzaldehyde 및 acetaldehyde를 실험동물에 직접 투여한 후 간 손상을 관찰코자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물의 사육 및 처치

동물은 체중 170g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley종의 숫 흰쥐(라이프사이언스) 30마리를 시중에서 구입한 동물사료(삼양사료 주식회사 제품)로 1달간 사육하여 실험에 사용하였다. 사육기간 동안 물과 사료의 양은 제한없이 공급하였다.

각 실험군은 30마리 중 상태가 불량한 것을 제외한 24마리를 각 6마리씩 대조군과 alcohol 투여군, toluene 투여군, alcohol 전처리 후 toluene 투여군, acetaldehyde 투여군, benzaldehyde 투여군으로 분리 수용하였다. Alcohol 투여군은 alcohol과 생리식염수의 동량혼합액을 만들어 Cohen등의 방법¹⁷⁾에 준하여 체중 100g당 0.3ml를 1일 1회 4일간 복강내

로 주사하였으며 toluene투여군은 olive oil로 희석한 50%(V/V)용액을 체중 100g당 0.3ml씩 Pathratne 등의 방법¹⁷⁾에 준하여 1일 1회 4일간 주사하였다. Alcohol과 toluene의 병행 투여군은 alcohol을 alcohol 투여군과 동일한 방법으로 투여한 2시간 후에 toluene투여군과 동량의 toluene을 주사하였다. 한편 acetaldehyde 투여군과 benzaldehyde 투여군은 50% 동량혼합액을 만들어 체중 100g당 0.2ml씩 1일 1회 4일간 투여하였다. 대조군은 saline을 양에 상관없이 복강내로 주사하였으며 6군 모두 마지막 주사 후 24시간 동안 물만 주고 금식시켰다.

동물의 처치는 효소활성의 일중 변동을 고려하여 일정 시간에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였다. 동물은 ether 마취하에서 복부 정중선을 따라 개복한 후 복부 대동맥으로부터 채혈하고, 4℃ 생리식염수로 간을 관류하여 간에 남아있는 혈액을 제거한 다음 적출하였다. 적출한 장기는 생리식염수로 장기 표면에 묻어있는 혈액을 가볍게 씻은 후 여지로 압박하여 장기내에 남아있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음 무게를 칭량하였다. 채혈한 혈액은 방치한 다음, 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻고 alanine aminotransferase(ALT) 활성도 측정에 사용하였다.

2. 효소시료의 조제

간조직을 빙냉하에서 절편으로 만들고 그 중 일정량을 칭량하여 4배량의 0.25M sucrose 용액을 가하고 glass teflon homogenizer로 마쇄균질액(20% W/V)을 만들었다. 이 균질액 일부는 lipid peroxide 함량 측정에 사용하였고 나머지 균질액을 고속원심분리기(Hitachi SCRBB)로 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미미체부분을 제거한 다음 상정액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 제거하였다. 다시 그 상정액을 초원심분리기(Hitachi 70P-72)로 105,000×g에서 1시간 초원심분리하여 얻은 microsome 분획은 glucose-6-phosphatase 활성도 측정에 사용하였다.

3. 효소 활성도 측정

1) Glucose-6-phosphatase(G-6-Pase) 활성도

간조직 중 microsome 분획의 G-6-Pase 활성도는 Hasushi 등의 방법¹⁸⁾에 준하였다. 활성도 단위는 1mg protein이 20분간 반응하여 생성되는 phosphorus의 양을 μ mole 농도로 표시하였다.

2) 혈청 ALT 활성도

혈청 ALT 활성도 측정은 Reitman-Frankel의 방법¹⁹⁾에 준해 조제된 kit 시약을 사용하였다. 활성도 단위는 혈청 ml당 Karmen²⁰⁾ unit로 표시하였다.

4. 간조직 과산화 지질(LPO) 함량 측정

간조직 중 지질 과산화물 함량은 Ohkawa 등의 방법²¹⁾에 준하였다. LPO 함량은 조직 1g당 n mole 로 표시하였다.

5. 간조직 reduced glutathione(GSH) 함량 측정

GSH 함량은 Ellman의 방법²²⁾에 따라 측정하였다. 단위는 간조직 1g당 μ mole로 표시하였다.

6. 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등의 방법²³⁾에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

이상 실험 결과의 통계처리는 student's t-test²⁴⁾을 이용하여 상호 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 체중 당 간 무게 및 혈청 alanine aminotransferase(ALT) 활성도 변동

Alcohol과 toluene의 투여 후 체중 당 간 무게 백분율은 toluene만 투여한 군과 alcohol을 전처치한 후 toluene을 투여한 군에서 대조군에 비하여 각각 22%, 38%의 유의한($p < 0.001$) 증가를 보였으며, 대조군에 비하여 간 무게 증가율은 alcohol 전처치군이 toluene 투여군보다 높게 나타났다. 또한 대조군에 대한 혈청 중 ALT 활성도 증가율은 alcohol 전처치한 후 toluene 투여군이 toluene만 투여한 군에 비하여 다소 높게 나타났으나 통계적인 의의는 없었다. 따라서 toluene 투여시 alcohol 전처치하

Table 1. Effect of toluene on the liver weight /body weight(%) and serum ALT activity in alcohol pretreated rats

Groups	Liver wt. /body wt.(%)	ALT activity*
Control	3.21±0.07	24.20±2.01
Alcohol	3.40±0.09	20.50±3.50
Toluene	3.90±0.08*** ^{a)}	28.50±3.89
Alc.+Tol.	4.43±0.16*** ^{a),b)}	38.42±4.80

The assay procedure was described in the experimental methods Each value represents the mean±S.E. of 6 rats

^{a)}: Significantly different from the control group

^{b)}: Significantly different from the alcohol treated group(*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$)

*: Karmen unit /ml of serum

로서 간 무게가 유의하게 증가됨과 더불어 혈청 ALT 활성도가 유의적인 변동을 나타내지 않음은 가역적 간 상해인 swelling을 시사해 주고 있다 (Table 1).

2. 간조직의 lipid peroxide(LPO) 함량 변동

조직의 가역적 간 손상에 swelling이 초래됨은 막의 능동운반에 영향을 받기 때문이며 이는 세포막 손상과 상당한 관련이 있는 것으로 알려져 있다^{21,25)}. 그러므로 본 실험에서 세포막 과산화물을 측정한 결과, Fig. 1과 같이 나타났다.

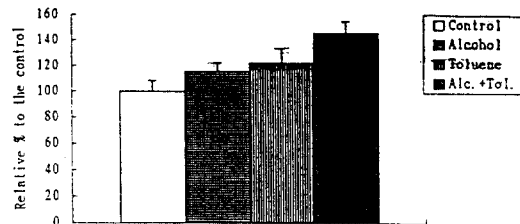


Fig. 1. Effect of toluene treatment to the hepatic lipid peroxide content(LPO) in alcohol pretreated rats.

Each value indicates relative % to the control. Other abbreviations are the same in Table 1. Significantly different from control group(*: $p < 0.05$).

Toluene 투여군은 대조군에 비하여 간 LPO 함량이 약 22% 증가되는 경향을 보였으며 alcohol 전처리 후 toluene을 투여한 경우에는 대조군에 비하여 약 46%의 유의한($p < 0.05$) 증가를 보였다. 또한 막 과산화물질 함량의 증가율이 toluene만 투여한 군보다 다소 높게 나타났다. 따라서 toluene 투여시 alcohol 전처리하므로써 간조직의 부종(swelling)이 심하게 나타났을 toluene만 투여한 군보다 간세포막 손상 정도가 높게 나타난 결과로 생각된다.

3. 간조직 microsomes의 glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) 활성도 및 glutathione(GSH) 함량 변동

일반적으로 간조직의 가역적 상해시에는 free-radical 생성이 유도된다고 하며 또한 endoplasmic reticulum(ER)의 변화가 초래된다고 한다. 그러므로 본 실험에서 free-radical 처리의 생리활성물질인 GSH²⁰⁾와 ER의 marker enzyme인 microsomal glucose-6-phosphatase 활성도²¹⁾를 간조직 중에서 측정된 것이 Fig. 2와 같다.

간 조직중 GSH 함량은 toluene 투여군 및 alcohol과 toluene의 병행 투여군 모두 대조군에 비하여 약간 증가되는 경향을 보였으며, toluene 투여시 alcohol 전처리 하므로써 다소 증가되는 경향을 보였으나 통계적인 의미는 없었다. 그러나 조직세포의 소포체 상해시 그 활성이 감소된다는 microsomal glucose-6-phosphatase 활성도²²⁾는 toluene 투여군이 대조군에 비하여 약 33% 유의한($p < 0.05$) 감소를 보였으며 alcohol과 toluene 병행투여군 역시 대조군에 비하여 약 39% 유의하게($p < 0.001$) 감소되었다. 따라서 alcohol 전처리한 후 toluene을 투여하므로써 본 효소의 활성도 감소율이 toluene 투여군에 비하여 다소 감소되는 경향을 보였다.

이상 실험 결과와 문헌상의 지식을 종합하여 볼 때 toluene 투여군과 더불어 alcohol과 toluene 병행투여군 모두 간조직의 가역적 상해가 초래됨을 알 수 있으며, 이때 alcohol 전처리 하므로써 간 상해가 심하게 나타났을 막 손상과 더불어 ER의 변화에 기인된 결과로 생각된다.

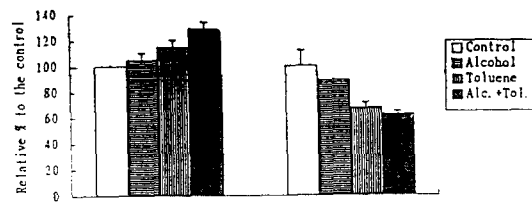


Fig. 2. Effect of toluene treatment on the hepatic GSH content and glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) activity in ethanol pretreated rats.

Each value indicates relative % to the control. Other abbreviations are the same in table 1. ^{a)}: Significantly different from the control group.

^{b)}: Significantly different from the alcohol treated group.

(*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$)

4. Acetaldehyde 및 benzaldehyde 투여가 체중당 간 무게 및 혈청 ALT 활성도에 미치는 영향

Alcohol 및 toluene을 생체내 투여시 이들 물질이 생체내에서 대사과정 중 aldehyde가 생성되며 이들 aldehyde류가 조직손상을 초래한다는 보고²³⁾가 있다. 따라서 본 실험에서 toluene과 alcohol을 병행 투여시 toluene만 투여한 경우보다 간 손상이 심하게 나타나는 원인을 규명하는 일환으로 toluene의

Table 2. Effect of acetaldehyde and benzaldehyde on the liver weight/body weight(%) and serum ALT activity in rats

Groups	Liver wt./body wt.(%)	Serum ALT [#]
Control	3.81 ± 0.09	24.00 ± 1.87
Acetaldehyde	4.20 ± 0.29	33.15 ± 3.10*
Benzaldehyde	4.77 ± 0.10***	44.30 ± 4.00**

The assay procedure was described in the experimental methods.

Each value represents the mean ± S.E. of 6 rats.

Significantly different from the control group(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

[#]: Karmen unit/ml of serum

대사 중간생성물질의 일종인 benzaldehyde와 ethanol 중간대사물질인 acetaldehyde를 실험동물에 직접 투여한 후 간 손상의 parameter로서 간 무게 및 과산화지질 함량을 측정 한 것이 Table 2와 같다.

Acetaldehyde 및 benzaldehyde 투여군이 대조군에 비하여 간 중량이 각각 10%, 25% 증가되었으며 간세포막 과산화지질 함량 역시 각각 23%, 60% 증가되었다. 그러므로 alcohol 및 toluene 투여시 간 손상은 이들 물질의 대사중간 생성물질인 aldehyde류에 기인되므로서 나타난 결과로 생각된다.

IV. 요약 및 결론

흰쥐에 alcohol과 toluene 병행 투여가 간 손상에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 실험군을 4군으로 나누어 alcohol만 투여한 군, alcohol과 toluene을 병행투여한 군(alcohol 전처치 1시간 후 toluene 투여군), toluene만 투여한 군 및 대조군으로 하여 모두 4군으로 분류하였다. Alcohol 및 toluene 투여군 1일 1회 4회 투여한 후 처치하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

대조군에 대한 간 무게, 간세포막 과산화지질 함량 및 혈청 alanine aminotransferase(ALT) 활성도 증가율은 alcohol과 toluene을 병행투여한 군이 toluene만 투여한 군보다 높게 나타났으며, 대조군에 대한 간조직 중 glutathione 증가율과 microsomal glucose-6-phosphatase 활성도 감소율 역시 alcohol과 toluene 병행 투여군이 toluene만 투여한 군보다 높게 나타났다.

한편, toluene 및 alcohol 전처치한 후 toluene만 투여한 경우 간 손상이 야기되는 원인을 검토코자 이들 xenobiotics의 대사중간 생성물질인 acetaldehyde 및 benzaldehyde를 실험동물에 직접 투여한 경우에도 간 무게 및 혈청 ALT 활성도가 대조군보다 높게 나타났다.

이상 실험성적을 종합하여 볼 때 toluene 투여시 간 조직의 가역적 손상이 초래되었으며 이때 alcohol을 전처치하므로서 간 손상이 보다 심화되었다. 이때 간 손상은 acetaldehyde 및 benzaldehyde에 기인된 결과로 생각된다.

V. 참고문헌

1. Satran, R. and Dodson, V. : Toluene habituation, N. Engl. J. Med., 268: 719-721 (1963).
2. Knox, J. W. and Nelson, J. R. : Permanent encephalopathy from toluene inhalation, N. Engl. J. Med., 275: 1494-1496 (1966).
3. Boor, J. W. and Hurtig, H. I. : Persistent cerebellar ataxia after exposure to toluene, Ann. Neurol., 2: 440-442 (1977).
4. Rees, D. C., Knisely, J. S. and Jordan, S. : Discriminative stimulus properties of toluene in the mouse, Toxicol. Appl. Pharmacol., 88: 97-104 (1987).
5. Taylor, G. J. and Harris, W. S. : Glue sniffing causes heart block in mice, Science, 170: 866 (1970).
6. Zee-Cheng, C. S., Mueller, C. E. and Gibbs, H. R. : Toluene sniffing and severe sinus bradycardia, Ann. Inter. Med., 103: 482 (1985).
7. Hayden, J. W., Peterson, R. G. and Bruckner, J. V. : Toxicology of toluene (methyl benzene): Review of current literature, Clin. Toxicol., 11: 549-559 (1977).
8. Morris, R. J. : Toluene and hepatotoxicity, J. Occup. Med., 31(12): 1014-1015 (1989).
9. Toftgard, R. and Gustafsson, J. A. : Biotransformation of organic solvents. A review Scand. J. Work Environ. Health., 6: 1-18 (1980).
10. Ellenhorn, M. J. and Barceloux, D. G. : "Toluene" in Medical Toxicology, Elsevier Science Pub. Co Inc. USA, 1988, pp 953-963.
11. Traiger, G. J. and Plaa, G. L. : Relationship of alcohol metabolism to the potentiation of CCl₄ hepatotoxicity induced by aliphatic alcohols, J. Pharmacol. Exp. Ther., 183: 481-488 (1972).

12. Strubelt, O. : Interactions between ethanol and other hepatotoxic agents. *Biochem. Pharmacol.*, 29: 1445-1449 (1980).
13. 김중우, 신중규, 윤종국: 흰쥐에 있어서 주정중독이 bromobenzene 대사에 미치는 영향. *한국독성학회지*, 11(2): 253-259 (1995).
14. Rubin, E. and Lieber, C. S. : Hepatic microsomal enzymes in man and rats: induction and inhibition by ethanol. *Science.*, 162: 690-691 (1968).
15. Hetu, C., Dumont, A. and Joly, J. G. : Effect of chronic ethanol administration in bromobenzene liver toxicity in the rat: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 67(2): 66-77 (1983).
16. Cohen, G., MacNamee, D. and Debiec, D. : Elevation in blood acetaldehyde by pargyline during ethanol administration. *Biochem. Pharmacol.*, 24: 313-316 (1974).
17. Pathiratne, A., Puyear, R. L. and Brammer, U. D. : A comparative study of the effects of benzene, toluene and xylene on their *in vitro* metabolism and drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 82(2): 272-280 (1986).
18. Hasushi, Y., Teschke, R. and Lieber, C. S. : Increased CCl₄ hepatotoxicity and its metabolism after chronic ethanol consumption. *Gastroenterology*, 66: 415-422 (1974).
19. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, 28: 56-63 (1957).
20. Karmen, A. : A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxalo-acetic transaminase in human blood serum. *J. Clin. Invest.*, 34: 131-133 (1955).
21. Ohkawa, H., Ohish, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95: 351 (1979).
22. Ellman, G. L. : Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77 (1959).
23. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Farr, A. L. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275 (1951).
24. Scheffler, W. C. : *Statistics for the Biological Sciences*, ed. 2., Menlo Park, Addison-Wesley Publishing Company, USA, 1980, pp. 84-89.
25. Cotran, R. S., Kumar, V., Robbins, S. L. and Schoen, F. J. : Cellular injury and cellular death "in Robbins Pathologic basis of disease", Saunders, Philadelphia, 5th ed. 1994. pp. 1-34.
26. Hasushi, Y., Teschke, R. and Lieber, C. S. : Increased CCl₄ hepatotoxicity and its mechanism after chronic ethanol consumption. *Gastroenterology*, 66: 415-422 (1974).
27. Weiner, H. : Aldehyde oxidizing enzymes, in Jakoby, W. B. (ed): *Enzymatic Basis of Detoxication.*, Academic Press, New York, 1980. Vol. 1, pp. 261-280.