

흰쥐에 있어서 Bromobenzene 전처치가 간조직 중 Glutathione 및 Glutathione S-transferase 활성에 미치는 영향

신 중 규
경산대학교 보건과학과

Effect of Bromobenzene Pretreatment on the Hepatic Glutathione Content and Glutathione S-transferase Activity in Bromobenzene Treated Rats

Joong-Kyu Shin

Dept. of Health Science, Kyungsan University

ABSTRACT

To evaluate the effect of bromobenzene pretreatment on the bromobenzene metabolism, the animal group was induced the stage of slight liver damage with 7 times bromobenzene injection every two days (400 mg/kg body wt. i.p.). In the present experimental animal model, the single dose of bromobenzene(400 mg/kg body wt. i.p.) was injected to the bromobenzene-pretreated rats and the hepatic aniline hydroxylase(AH) activity, glutathione(GSH) content and glutathione S-transferase (GST) activity were determined at the intervals of 2, 4, 8, 24 hours throughout 24 hr. The activities of hepatic AH and GST were generally higher in bromobenzene-pretreated rats than those in normal group throughout the whole course of experiment. Furthermore, the decreasing rate of hepatic GSH content was also higher in bromobenzene pretreated rats than in normal rats. Moreover, the value of V_{max} in hepatic GST was higher in bromobenzene pretreated rats than that in the normal rats. In conclusion, these results indicate that the pretreatment of bromobenzene may rather enhance the bromobenzene metabolism.

Keywords : Bromobenzene, Glutathione, Glutathione S-transferase

I. 서 론

최근 산업의 급속한 발전에 따른 유해 공해물질에 의한 자연파괴 현상은 날로 심각해져 가고 있으며, 더우기 이들 유해물질의 인체 폭로가 인간의 건강을 위태롭게 하고 있는 실정이다. 이들 공해 물질중 xenobiotic성 간독성 물질에 의한 간손상은 오래전부터 많은 관심의 대상이 되어 이에 대한 많은 연구¹⁻⁹⁾가 수행되어왔다.

Xenobiotic성 간독소의 일종인^{7,8)} bromobenzene이 인체에 폭로되었을 때 간조직 세포의 다기능 복합산화효소기구에 의하여 bromobenzene 3,4-oxide로 전환되며 이 친전자성 물질이 주로 간조직 독성을 야기시킨다.⁹⁾ 그리고 이 물질은 glutathio-

ne S-transferase(GST)에 의하여 포합인자인 glutathione(GSH)과 결합하므로써 무독화 되어지며 일부는 epoxide hydrolase에 의하여 bromophenol류의 형태로 무독화 됨이 알려져 있다.^{10,11)}

한편 외부 이물질들로 부터 생체를 보호하는 해독 기구는 생체의 항상성을 유지시키려는 생리적 적응 현상과 관련되어지는 것으로 생체내 병태생리적 조건에 상당한 영향을 받고있음이 알려져 있다.^{12,13)} 특히 동일한 xenobiotic에 폭로될시 또는 서로 다른 xenobiotics의 복합 폭로시 생체내 중독현상은 다양하게 나타난다¹⁴⁾고 하나 이 경우에 xenobiotics의 중독현상에 대한 기작에 대해서 학자들간에 상당한 논란의 대상이 되고 있는 실정이다.

이에 본 연구에서는 동일한 xenobiotics의 전처치

가 xenobiotics의 대사에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하는 일환으로 bromobenzene을 실험동물에 전처치 한후 간손상을 확인한 다음 bromobenzene 대사에 관여하는 간조직 중 cytochrome P-450활성인 aniline hydroxylase 활성¹⁵⁾과 GSH 함량 및 이의 포함효소인 GST활성을 측정하여 정상군과 비교관찰코저 하였다. 또한 실험동물에 bromobenzene을 전처치하므로써 야기된 GST활성변동의 기전을 구명코자 간 GST효소의 반응속도적 측면에서 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물의 사육조건 및 처치

동물은 100 g 내·외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley종의 수컷 흰쥐를 표준식이로(Table 1) 약 1개월간 25°C에서 사육시켜 실험에 사용하였다. 사육기간동안 물과 사료의 양은 제한없이 공급하였다.

전처치로서는 흰쥐를 bromobenzene을 2일마다 7회 반복투여한 다음 1일간 절식시켜 bromobenzene을 1회 재투여하여 2시간, 4시간, 8시간, 24시간에 각각 실험동물을 처치시켜 효소의 활성 변동을 측정하였다.

Bromobenzene의 투여는 bromobenzene을 olive

oil에 용해시켜, 체중 kg당 400 mg씩 격일로 1회씩 총 7번 주사하였다.

2. 효소원의 조제

실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복한 후, 복부대동맥으로 부터 혈액을 채취하고, 생리식염수로 관류시킨후 간장을 적출하였다. 적출한 간장 일부는 1 g당 4배량으로 0.25M sucrose용액을 가하여 빙냉하에 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액 (20% W/V)을 10,000×g에서 20분간 원심분리한 다음 핵 및 mitochondria분획을 제거시킨 상층액을 다시 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosolic fraction과 microsomal fraction을 분리하였다. Cytosolic fraction은 glutathione S-transferase 활성 측정의 효소원으로 사용하였으며, microsomal fraction은 aniline hydroxylase(AH)활성 측정의 효소원으로 사용하였다.

3. Alanine aminotransferase(ALT)활성 측정

L-Alanine과 α -ketoglutaric acid을 기질로하여 37°C에서 30분간 반응 시킨후 생성된 pyruvic acid가 alkali조건에서 2,4-dinitrophenyl hydrazine과 반응하여 발색되는 색조를 비색정량하는 Reitman과 Frankel의 방법¹⁶⁾에 따라 조제된 Kit시액을 사용하였다.

활성단위는 혈청 ml당 Karmen¹⁷⁾ Unit로 표시하였다.

4. Aniline hydroxylase(AH)활성 측정

AH활성 측정은 Bidlack과 Lowery의 방법¹⁸⁾을 이용하였다. Aniline을 기질로 하여 37°C에서 15분간 반응시키는 동안 유리된 p-aminophenol을 phenol 시액으로 발색시켜 640 nm에서 그 흡광도의 변동을 읽고 산정하였다. 효소의 활성단위는 간조직효소액 중에 함유된 단백 1 mg이 1분 동안 반응하여 기질로부터 생성된 p-aminophenol의 양을 n mole로 표시하였다.

5. GST활성 측정

GST의 활성 측정은 Habig 등의 방법¹⁹⁾에 준해 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione을 기질로 하여 25°C에서 10분간 반응시키는 동안 생성된 thioether양을 340 nm에서 그 흡광도의 변화를 읽

Table 1. Composition of Experimental Diet (g/Kg diet)

Ingredients	Standard Protein
Casein	200
Corn starch	674
Corn oil	55
Vitamin A & D mix ¹⁾	10
Vitamin E & K mix ²⁾	2
Water sol. vitamin ³⁾	3
Vitamin B ₁₂ ⁴⁾	1
Salt mix ⁵⁾	40
α -Cellulose	20
	4081 Kcal

¹⁾51,000 unit of A and 5,100 unit of D dissolved in 100 ml of corn oil. ²⁾5g of α -tocopherol and 0.2 g of menadion dissolved in 200 ml of corn oil ³⁾contained (mg) : choline chloride 2000, thiamine hydrochloride 10, riboflavin 20, nicotinic acid 120, pyridoxine 10, Ca-pantothenate 100, biotin 0.05, folic acid 4, inositol 500, P-aminobenzoic acid 100 ⁴⁾5 mg of vitamin B₁₂ dissolved in 500 ml of distilled water. ⁵⁾contained (g) : CaCO₃ 300, K₂HPO₄ 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, molybdc acid 0.2.

고 산정하였다. 효소의 활성단위는 효소반응액중에 함유된 단백 1 mg이 1분동안 반응하여 생성시킨 conjugate의 nmole로 나타내었다.

이상 효소반응액 중 단백질 측정은 Lowry 등의 방법²⁰⁾에 준하였다.

6. GSH 함량 측정

GSH의 함량은 Ellman의 방법²¹⁾에 따라 비단백성 sulfhydryl group을 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)로 발색시켜 412 nm에서 비색 정량 하였다. GSH의 함량단위는 간조직 1 g당 μ mole로 나타내었다.

7. 광학현미경적 관찰

간조직의 일반적인 조직학적 변화를 관찰하기 위해 적출한 흰쥐 간 중엽을 즉시 10% neutral formalin액에 고정하고 통상의 방법에 따라 paraffin으로 포매한후 4~6 μ m의 절편을 만들어 hematoxylin-eosin염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 결 과

1. 흰쥐에 Bromobenzene전처치가 체중당 간무게 및 혈청 ALT활성에 미치는 영향

Bromobenzene전처치군에 있어서 체중당 간무게는 정상군에 비하여 약 1.6배 정도 증가되었으며 혈청 ALT활성치는 정상군보다 약 1.6배 증가되었다 (Table 2).

한편 간조직의 조직학적 소견에 있어서는 간세포의 공포변성(balloning degeneration)을 나타내는 비교적 경미한 간손상을 보였다(Fig. 1).

2. 간조직 중 aniline hydroxylase활성변동

Bromobenzene전처치군과 정상군에 bromoben-

zene을 투여한 후 AH활성을 경시적으로 측정된 결과는 Fig. 2와 같다.

정상군에 있어서 AH 활성은 bromobenzene투여 2시간 후에는 처음 보다 약 1.5배 정도의 유의한 증가를 보였으며, 이후 점진적으로 증가되어 8시간 때에는 처음에 비하여 약 2.3배의 현저한 증가를 나타내었고, 이후 24시간까지는 거의 같은 수준을 유지하였다. 그리고 bromobenzene전처치군에 있어서는 정상군보다 본효소 활성이 약 24%증가되었다. 또한 bromobenzene전처치군에 있어서 bromobenzene재투여 2시간후에는 처음보다 약 1.4배 정도의 유의한 증가를 보였으며, 이후 급격히 증가되어 4~8시간 후에는 처음에 비하여 약 2배 이상 현저하게 증가되었고 24시간까지는 거의 같은 수준을 유지하였다.

3. 간조직 중 GSH 및 GST활성 변동

Bromobenzene전처치 마지막 1일간 절식시킨다음 bromobenzene을 1회 재투여하여 경시별로 GSH와

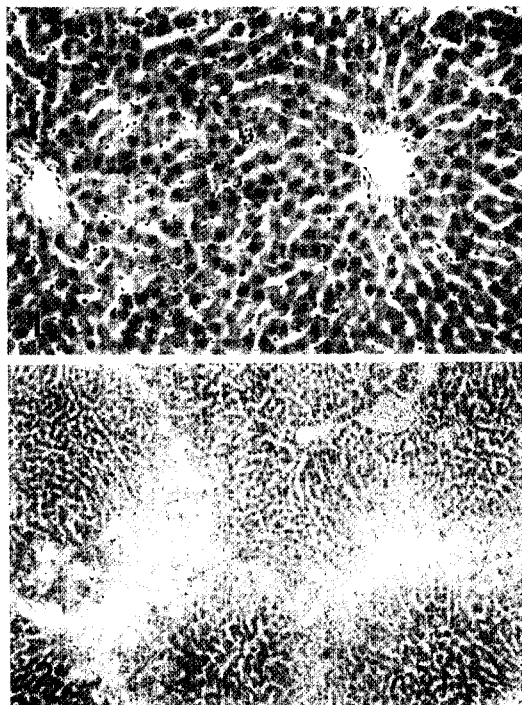


Fig. 1. Light microscopic findings of hepatic tissue in rats. 1. Normal rat. The hepatic parenchyma is well preserved (H & E, $\times 100$). 2. Bromobenzene pretreated rat. Balloning degeneration of the hepatocytes are focally seen (H & E, $\times 40$).

Table 2. Effect of Bromobenzene Pretreatment on Liver Weight per Body Weight(%) and Serum ALT Activity in Rats

Groups	Normal	Bromobenzene pretreatment
Liver wt./ Body wt.(%)	3.01 \pm 0.06	4.85 \pm 0.17***
Serum ALT	25.60 \pm 6.47	39.70 \pm 7.01

Each value represents the mean \pm S.E. of 6 rats. Significantly different from normal group (***, p<0.001)

GST활성변동을 관찰한 것이 Fig 3와 같다. bromobenzene전처치군에 있어서 간조직 중 GSH함량은 정상군보다 약 41% 증가되었으며, 정상군에 있어서 간조직중 GSH함량은 시간경과에 따라 점진적으로

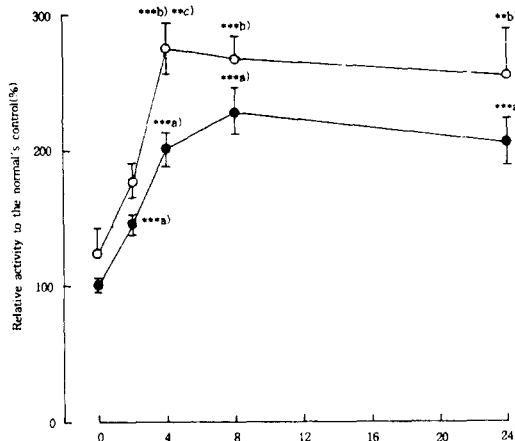


Fig. 2. Changes in hepatic aniline hydroxylase activities in bromobenzene pretreated rats. Other abbreviations are the same as in table 2. a); Significantly different from zero hour at the normal group b); Significantly different from zero hour at the bromobenzene pretreated group c); Significantly different from the normal group at the same time (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$). ●-●; Normal, ○-○; Bromobenzene pretreated

로 감소되어 8시간 째에는 처음에 비하여 약 75%의 현저한 감소를 보였으며 이후 증가되어 24시간 째에는 8시간군보다 약 2배이상 증가 되었다. 그리고 bromobenzene전처치군에 있어서도 bromobenzene투여후 8시간 째에 처음에 비하여 약 88%정도 감소되었으며 이후 증가되었다.

한편 간조직의 GST활성에 있어서는 정상군 및 bromobenzene전처치군 모두 bromobenzene투여후 4시간 및 8시간 째 전실험 기간을 통해 가장 높게 나타났으며 bromobenzene전처치군이 정상군보다 전실험 기간을 통하여 GST활성이 높게 나타났다.

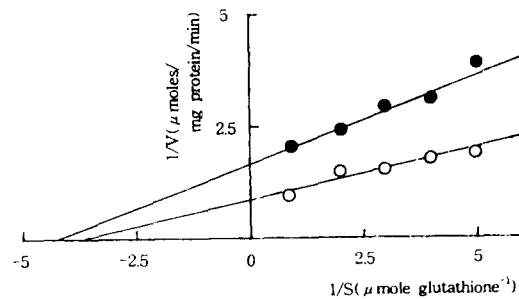


Fig. 4. Double reciprocal plots of hepatic glutathione S-transferase with glutathione as a substrate in control, bromobenzene treated rats. Each value is the mean of 5 experiments. Each enzyme specimen was prepared from the pooled liver in each group. ●-●; Normal, ○-○; Bromobenzene pretreated

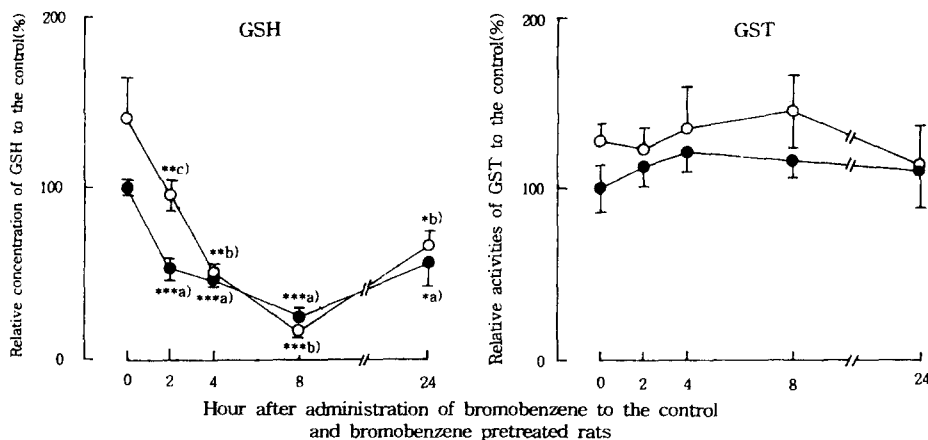


Fig. 3. Changes in hepatic glutathione(GSH) content and glutathione S-transferase (GST) activities in bromobenzene pretreated rats. Other abbreviations are the same as in table 2. a); Significantly different from zero hour at the normal group b); Significantly different from zero hour at the bromobenzene pretreated group c); Significantly different from the normal group at the same time (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$). ●-●; Normal, ○-○; Bromobenzene pretreated

4. GST의 반응속도

Bromobenzene전처치군과 정상군 간에 GST활성과 GSH함량 차이가 가장 심한 bromobenzene투여 8시간 쯤의 실험군의 간조직을 효소시료로하여 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 일정하게 하고 GSH농도를 달리하여 GST활성을 측정하여 K_m 치와 V_{max} 치를 나타낸 것이 Fig. 4와 같다. Bromobenzene전처치군이 정상군에 비하여 V_{max} 치가 약 2배로 증가되었으며 K_m 치는 두군간에 별다른 차이를 볼 수 없었다(Fig. 4).

IV. 고 찰

생체의 병태생리적 조건에 따라서 xenobiotics 대사가 달리 나타난다는 보고¹³⁾가 있으며 더우기 급·만성 간손상시에 xenobiotics의 대사가 억제^{22,23)} 또는 촉진된다는 보고²⁴⁾가 있어 간손상과 xenobiotics의 상호 관련성에 대하여 여러 연구자들 간에 논란의 대상이 되고 있다. 또한 다양한 xenobiotics의 동시 투여시 또는 동일한 xenobiotics의 중복 투여시에 이들 xenobiotics의 대사가 다양하게 나타날 수 있다고 사료된다. 특히 간중독성 xenobiotics의 생체에 폭로시 간손상정도에 따라 이들 xenobiotics의 대사가 달리 나타나리라 생각된다. 본 연구에서는 간독성 물질로 알려진 bromobenzene을 실험동물에 전처치하여 간손상이 경미한 가역성 상해를 유도한 뒤에 bromobenzene대사를 검토코저 하였다.

본실험에서 bromobenzene을 흰쥐에 7회 투여시 간무게, 혈청 ALT 및 조직검사를 통하여 급성 가역성 간손상 정도가 나타남을 확인하였다. 이러한 실험동물모델에 bromobenzene을 1회 재투여한 후 24시간동안 경시별로 간조직의 cytochrome P-450 의존 aniline hydroxylase 활성¹⁵⁾을 관찰 해 볼때 bromobenzene전처치군이 정상군에 비하여 본 효소 활성이 전실험 기간 동안 높게 나타났다. 특히 bromobenzene투여 4시간 까지의 본효소 활성 증가율은 bromobenzene전처치군이 정상군보다 현저히 높았다. 이러한 실험 성적으로 보아 bromobenzene으로 부터 bromobenzene 3,4 oxide 생성율이 정상군보다 bromobenzene전처치군이 높게 나타남을 시사해 주고 있다. Bromobenzene 3,4 oxide의 해독작용은 효소인 GST 촉매에 의하여 glutathione과 포함작용에 기인된 바^{10,11)} 본 실험에서 간조직 중 glu-

tathione과 GST활성을 측정한 결과 정상군 및 bromobenzene전처치군 모두 전 실험기간을 통하여 간조직중 GSH함량이 감소되었다. 더우기 8시간 쯤 두군 모두 GSH함량의 감소율이 가장 크게 나타났으며 bromobenzene전처치군이 정상군보다 GSH감소율이 크게 나타났다. 이때 GST활성 역시 전실험기간 동안 bromobenzene전처치군이 정상군보다 다소 높게 나타났다. 특히 bromobenzene전처치군에 있어서 GST활성과 GSH이용율이 가장 높게 나타나는 bromobenzene투여 8시간 쯤에 GST반응속도를 관찰한 결과 V_{max} 치가 정상치 보다 약 2배 증가되었다. 따라서 실험동물에 bromobenzene전처치로 GSH이용율이 촉진됨은 GST효소단백합성유도에 기인된 결과로 볼 수 있다.

이상 실험 성적을 종합해 볼때 bromobenzene에 의한 간손상이 심하게 나타나지 않은 가역성 간손상시에 오히려 bromobenzene대사가 촉진됨을 시사해 주고 있으며 이는 bromobenzene대사에 관여하는 효소 단백질유도에 기인된 결과로 생각된다.

V. 결 론

생체에 동일한 xenobiotics의 중복 폭로시 그 해독능에 경미한 간손상이 xenobiotics의 대사에 어떠한 영향을 미치는 지를 검토하는 일환으로 흰쥐에 bromobenzene을 2일 간격으로 7회 전처치한 후 체중당 간무게, 혈청 alanine aminotransferase(ALT) 및 간조직 검사를 통하여 간손상정도가 가역적 초기상태임을 확인함과 동시에 bromobenzene의 대사에 관련된 cytochrome P-450 의존 aniline hydroxylase(AH), glutathione(GSH)함량 및 이의 포함효소인 glutathione S-transferase(GST) 활성을 경시별로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Bromobenzene전처치한 실험동물에 있어서 간손상은 경미한 가역적 간손상이 관찰되었으며 이와 같은 실험동물 모델하에 bromobenzene투여시 간조직중 AH활성과 GSH함량 및 GST활성은 정상군에 비하여 높게 나타났다. 또한 GST의 V_{max} 치가 bromobenzene전처치군에서 높게 나타났다.

이상 실험 결과를 종합해 볼 때 bromobenzene에 의한 경미한 간손상시에는 오히려 bromobenzene대사가 촉진되며 이는 bromobenzene대사에 관여하는 효소단백유도에 기인된 결과로 생각된다.

참고문헌

- 1) Himsworth, H.P. : Lectures on the liver and its Diseases. Havard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1947.
- 2) Popper, H., Gerber, M., Schaffner, F and Selikoff, T. : Enviornmental hepatic injury. Progress in Liver Diseases. 6 (H. Popper and F. Schaffner. eds.), Grune and Stratton, New York, 1979.
- 3) Browning, E. : Toxicology and metabolism of industrial solvents. Elsevier, Amsterdam, 1965.
- 4) Klatskin, G. : Toxic and drug-induced hepatitis. Diseases of the Liver. (L. Schiff ed.) 4th ed., 604-710, Lippincott, Philadelphia, 1975.
- 5) James, R.C. : Hepatotoxicity; Toxic effects in the liver. Industrial toxicology. (Williams, P. L. and Burson, J.L.) 78-105, Van Nostrand Reinhold W. New York, 1985.
- 6) Zimmerman, H. J. : Chemical hepatic injury and its detection. Toxicology of the Liver. (G. L. Plaa and W. R. Hewitt eds.), 1-45, Raven Press, New York, 1985.
- 7) Reid, W. D.; Cho, A. K., Krishna, G. and Brodie, B. B. : On the mechanism by which organic compounds product tissue lesions. I. Hepatotoxicity of aromatic hydrocarbons and enhancement by phenobarbital. Pharmacologist, 12, 208, 1970.
- 8) 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, 160-164, 1971.
- 9) Zheng, J. and Hanzlik, R.P. : Premercapturic acid metabolites of bromobenzene derived via its 2,3- and 3,4-oxide metabolites. Xenobiotica. 21(4), 535-546, 1991.
- 10) Boyland, E. and Chasseud, L. F. : The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. Adv. Enzymol. 32, 173-219, 1969.
- 11) Thor, H. : Drug biotransformation and hepatotoxicity studies with bromobenzene in isolated hepatocytes. Arch. Toxicol. (Suppl.) 1, 107-114, 1978.
- 12) Kato, R. : Drug metabolism under pathological and abnormal physiological states in animals and man. Xenobiotica, 7(1-2), 25-92, 1977.
- 13) Hodgson, E. : Modification of metabolism. Modern Toxicology. (E. Hodgson and P. E. Levi eds.), 85-121, Elsevier, New York, 1987.
- 14) Hodgson, E. : Chemical and environmental factors affecting metabolism of xenobiotics. Biochemical Toxicology. (E. Hodgson and P. E. Levi eds.) 153-175, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, 1994.
- 15) Haugen, D. A. and Coon, M. J. : Properties of electrophoretically homogenous phenobarbital-inducible and -naphthoflavone-inducible forms of liver microxomal cytochrome-P 450. J. Biol. Chem. 251, 7929-7939, 1976.
- 16) Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic acid and glutamic pyruvic transaminas. Am. J. Clin. Pathol. 28, 58-63, 1957.
- 17) Karmen, A. : A note on the supectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. J. Clin. Invest. 34, 131-133, 1955.
- 18) Bidlack, W. R. and Lowery, G. L. : Multiple drug metabolism. : p-nitroanisol reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. Biochem. Pharmacol. 31, 311, 1982.
- 19) Habig, W. H., Pabist, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferase. : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249, 7130-7139, 1974.
- 20) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.
- 21) Ellman, G. L. : Tissue sulfhydryl group. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77, 1959.
- 22) Zilly, W., Richter, E., and Rietbrock, N. : Pharmacokinetics and metabolism of digoxin-and -methyl-digoxin-12 alpha-3H in patients with acute hepatitis. Clin. Pharmacol. Ther. 17, 302-309, 1975.
- 23) Vessey, D. A. : Hepatic metabolism of drugs and toxin. Hepatology. (D. Zakim and T. D. Boyer, eds.), 197-230, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1980.
- 24) 윤종국, 윤선동, 신중규 : 흰쥐에 있어서 주정 중독이 toluene 대사에 미치는 영향. 한국독성학회지, 12(2), 243-250, 1996.