대한의생명과학회지: 제6권 제2호 2000
Korean J. Biomed. Lab. Sci.
Vol. 6, No. 2, p.101~107, June, 2000

랫드에 있어서 Bromobenzene의 격일 투여 시, 매일 투여한 경우와 간손상 정도의 비교

계명대학교 공중보건학과†, 영남대학교 생물학과*

이상희 · 윤종국† · 조현국*

국문초록: Bromobenzene의 투여 간격에 따라 간손상이 어떠한 차이를 나타내는지를 검토하기 위하여 흰쥐에 체중 1 kg 당 400 mg의 bromobenzene을 복강으로 2일 및 1일 간격으로 각각 3회 투여한 다음 간손상을 병리조직학적, 간기능적 측면에서 검토한 결과 2일 간격으로 투여한 실험군에서 간손상이 경미하게 나타났다. 그리고 간조직 중 cytochrome P450 함량은 2일 간격으로 투여한 실험군에서는 대조군 보다 증가되는 경향을 보였으나 1일 간격으로 투여한 경우에는 대조군 보다 오히려 유의한 ($p<0.01$) 감소를 보였다. 간조직 중 대조군에 대한 glutathione 감소율과 glutathione S-transferase 활성 증가율은 2일 간격으로 bromobenzene을 투여한 군이 1일 간격으로 투여한 실험군 보다 높게 나타났다. 이상 실험 결과는 동일한 양과 회수로서 bromobenzene을 격일로 투여한 실험동물에 있어서 매일 투여한 경우 보다 간손상이 경미하였으며, 이는 bromobenzene의 대사율이 증가됨으로서 나타난 결과로 생각된다.

서 론

최근 물질문명과 산업의 발전에 따른 산업장의 근무조건 및 생활공간의 다양화에 따라 산업화학물질의 인체 폭로 양상도 달라지고 있다. 이 같은 현상으로 인해 인체에 있어서 산업화학물질의 독성 현상도 달리 나타나리라 생각된다.

일반적으로 체내에서 독성 현상은 독성물질의 흡수 · 분포 · 대사 및 배설과 독성물질의 용량, 폭로의 기간에 영향을 받고 있는 것으로 알려져 있다[18]. 특히 독성물질의 인체에 폭로 간격이 생체 내 독성 반응에 지대한 영향을 받을 것으로 생각된다. 더욱이 산업장에서 근로자들의 독성물질의 간헐적 폭로에 따른 직업병 발병 양상도 달리 나타날 수 있으리라 생각된다.

한편 xenobiotics로서 산업화학물질인 bromobenzene은 간독성 물질로 알려져 있으며[20] 인체에 폭로 시 간세포의 활면소포체에 존재하는 다기능 복합산화기구에 의해서 3,4-epoxide가 생성되며, 이 물질이 간세포, 신장 및 폐와 같은 장기에 괴사성 독성을 일으키는 것으로 알려져 있다[22]. 그리고 친전자성 물질인 bromobenzene 3,4-oxide는 glutathione S-transferase (GST)에 의하여 glutathione (GSH)에 포합되어 무독화되는 것으로 알려져 있다[14,16]. 이러한 bromobenzene의 대사는 이 물질의 투여기간에 따라 간독성이 달리 나타나는 것으로 알려져 있다[1~4,6].

최근 신[3]은 bromobenzene을 반복 투여 시 오히려 이 물질의 대사율이 증가된다고 하였으며, 이 등[5]은 bromobenzene을 실험동물에 급성으로 투여 시 반복 투여함으로서 어느 시기에서는 오히려 간독성이 경미하게 나타남을 관찰하였다. 특히 동일한 xenobiotics를 실험동물에 1일 또는 2일 간격으로 투여한 경우를 몇가지 논문[1~6]을 통해서 귀납해 볼 때 독성 반응이 각각 달리 나타나는 경향을 볼 수 있었다. 그러나 bromobenzene 투여 조건에서 간헐적 투여에 따른 간독성 반응에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구는 실험동물에 bromobenzene을 2일 간격으로 투여하는 경우와 1일 간격으로 투여

*논 문 접 수 : 2000년 4월 29일
수정재접수 : 2000년 6월 21일
†별책 요청 저자: (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000번지, Tel: (053) 580-5230, Fax: (053) 580-5164, E-mail: jky446@kmucc.keimyung.ac.kr

하는 경우 간독성 차이가 어떻게 나타나는지를 검토함과 더불어 이의 기전을 규명하는 일환으로 bromobenzene 대사에 관여하는 효소 활성 및 생리활성물질을 측정하여 상호 비교 · 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 동물의 사육 및 처치

실험동물은 체중이 300 g 내외되는 외견상 건강한 Sprague-Dawley종의 숫 흰쥐를 사용하였다. 성장기간 동안 25℃에서 사육하였으며, 물과 사료 (삼양사 제품)를 제한 없이 공급하였다. 실험군은 bromobenzene을 매일 투여한 군, 격일로 투여한 군 및 대조군의 3군으로 하였으며 각 실험군의 실험동물은 각각 6마리씩 사용하였다. Bromobenzene은 olive oil과 동량 혼합액을 만들어 1일 1회씩 3회 및 2일 1회씩 3회를 체중 kg 당 400 mg을 복강으로 투여한 후 대조군과 함께 24시간 절식시킨 후 처치하였다.

2. 효소원의 조제

실험동물의 처치는 ether로 약하게 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복한 후, 복부대동맥으로부터 혈액을 채취하고, 간장은 생리식염수로 관류시킨 후 적출하여 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 응고시켜 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 그리고 적출한 간장 일부는 1 g 당 4배량으로 0.25 M sucrose 용액을 가하여 빙냉하에 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액 (20% w/v)의 일부는 GSH 함량 측정에 사용하였다. 또한 남은 마쇄균질액은 10,000×g에서 20분간 원심분리한 다음 핵 및 mitochondria를 제거한 후 상층액을 postmitochondria 분획으로 하여 cytochrome P450 및 GST 활성 측정의 효소원으로 사용하였다.

3. 혈청 alanine aminotransferase (ALT) 활성 측정

l -Alanine과 α-ketoglutaric acid를 기질로 하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 생성된 pyruvic acid가 alkali 조건에서, 2,3-dinitrophenyl hydrazine과 반응하여 발색되는 색조를 비색 정량하는 Reitman과 Frankel의 방법[19]에 따라 조제된 kit 시약을 사용하였다. 활성 단위는 혈청 ml 당 Karmen unit[12]로 표시하였다.

4. Cytochrome P450 함량 측정

간조직 중 cytochrome P450 함량 측정은 Omura와 Sato의 방법[17]에 준하여 시험관에 microsome 분획 (4 mg protein/ml)을 넣고 needle을 통해 1분간 CO gas를 통기시킨 후 환원제로 sodium dithionite ($Na_2S_2O_4$) 30 mg을 넣어 잘 혼합한 다음, 1분간 더 CO gas를 통기시켰다. 이상의 조작은 2~4℃에서 행하였다.

CO gas의 통기가 끝난 후 spectorphotometer를 이용하여 400~500 nm에서 microsome 분획에 CO bound microsome간의 difference spectrum을 얻었다. 450~490 nm에서 흡광도의 차이를 cytochrome P450-CO complex에 의한 흡광량으로 하여 cytochrome P450-CO complex의 분자흡광계수 (ε=91mM^{-1}cm^{-1})를 이용하여 cytochrome P450의 양을 계산하였다. Microsome의 cytochrome P450 양은 단백질 1 mg 당 nmole로 표시하였다.

5. GST 활성 측정

GST의 활성 측정은 Habig 등의 방법[9]에 준해 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione을 기질로 하여 25℃에서 10분간 반응시키는 동안 생성된 thioether 양을 340 nm에서 그 흡광도의 변화를 읽고 산정하였다. 효소의 활성 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백 1 mg이 1분 동안 반응하여 생성시킨 conjugate의 nmole로 나타내었다.

이상 효소반응액 중 단백질 측정은 Lowry 등의 방법[15]에 준하였다.

6. GSH 함량 측정

GSH의 함량은 Ellman의 방법[8]에 따라 비단백성 sulfhydryl group을 5',5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)로 발색시켜 412 nm에서 비색 정량하였다. GSH의 함량 단위는 간조직 1 g 당 μmole로 나타내었다.

7. 간의 병리조직검사

간조직 적출 즉시 10% neutral buffered formalin에 고정시킨 다음, 흐르는 물에 수세하여 alcohol의 농도를 순차적으로 증가시키면서 탈수하였다. 탈수된 조직은 파라핀에 포매시킨 후 4 μm 두께로 절편을 만든 다음, hematoxylin과 eosin으로 염색하고 광학현미경 (BH-2, Olympus)으로 관찰하였다.

Table 1. Comparison of liver weight/body weight (LW/BW, %), content of lipid peroxide and serum ALT in the rats exposed to bromobenzene every day (ED) with other exposed every other day (EOD)

Parameters \ Treatment	Control	ED	EOD
LW/BW (%)	2.55 ± 0.16	3.51 ± 0.19**[a)]	3.39 ± 0.62
MDA[1)]	3.16 ± 0.48	5.35 ± 0.44**[a)]*[b)]	3.71 ± 0.28
ALT[2)]	30.58 ± 2.45	415.50 ± 50.25***[a)]***[b)]	41.25 ± 5.25

The assay procedure was described in the experimental methods.
Each value represents the mean ± S.E. of 6 rats.
Unit; [1)] MDA nmoles/g of tissue, [2)] Karmen unit/ml of serum, [a)] Significantly different from the control, [b)] Significantly different from the group treated every other day. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

Table 2. Comparison of liver content of reduced glutathione (GSH) and activity of glutathione S-transferase (GST) in the rats exposed to bromobenzene every day (ED) with other exposed every other day (EOD)

Parameters \ Treatment	Control	ED	EOD
GST[1)]	327.28 ± 17.05	372.48 ± 19.23*[b)]	448.68 ± 22.17*[a)]
GSH[2)]	2.10 ± 0.20	2.32 ± 0.25	1.97 ± 0.57

The assay procedure was described in the experimental methods.
Each value represents the mean ± S.E. of 6 rats.
Unit; [1)] Thioether nmoles/mg protein/min, [2)] μmoles/g of tissue, [a)] Significantly different from the control, [b)] Significantly different from the group treated every other day. (*p<0.05, **p<0.01)

8. 성적검정

실험 결과의 통계처리는 Student's t-test[21)]로 하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결과 및 고찰

1. 체중 당 간무게 (%), 간조직 중 malondialdehyde (MDA) 함량 및 혈청 ALT 활성 변동

일반적으로 일부 이물질들 (xenobiotics)로부터 생체를 보호하는 독성물질의 중독 및 해독 기구는 생체의 생리적 조건에 의하여 영향을 받고 있다[11,13)]. 이러한 생리적 조건은 xenobiotics의 폭로조건에 따라 생체 내 독성 현상이 달리 나타날 수 있다. 특히 xenobiotics의 지속적 및 간헐적 폭로에 따라 생체 독성 현상이 달리 나타날 수 있기 때문에 생활공간 및 산업장에서의 공해물질 폭로조건에 따라 인간의 건강에 다양한 위해 결과가 나타날 수 있으리라 생각된다. 그러나 xenobiotics의 폭로조건에 따라 생체의 중독현상에 대한 기전에 대해서는 불분명하다. 따라서 본 실험에서 xenobiotics의 일종인 bromobenzene을 동일한 양으로 실험동물에 1일 1회 투여한 경우 (ED군)와 2일 간격으로 3회 투여한 경우 (EOD군) 간손상의 기능적 변화를 Table 1에 나타내었다.

대조군에 대한 체중 당 간무게에 있어서 ED군은 약 38%의 유의한 ($p<0.01$) 증가를 보였으며, EOD군은 약 33% 증가되었으나 유의성은 없었다. 간조직 MDA 함량은 ED군에 있어서는 대조군에 비하여 약 65%의 유의한 ($p<0.01$) 증가를 나타냄과 동시에 EOD군에 비해서는 44% 유의한 증가를 보였다. 특히 혈청 ALT 활성은 ED군에서는 대조군에 비하여 약 140%의 현저한 ($p<0.001$) 증가를 보였으나 bromobenzene을 2일 간격으로 투여한 EOD군에서는 대조군에 비하여 약 35% 증가되는 경향을 보였다.

한편 병리조직검사에서 대조군은 간소엽의 구조가 잘 보존되어 있었으나 (Fig. 1A), bromobenzene 2일 간격 투여군의 경우에는 중심정맥 주변부에 매우 제한적으로 내피세포들과 접한 간세포들의 괴사가 관찰되었다 (Fig. 1B). 1일 간격 투여 경우에는 전반적으로 간세포의 크기가 증대되었으며 중심정맥 주변으로 넓은 간세포의 괴사부가 형성되었으며, 괴사부 내에 염증세포의 침윤이 관

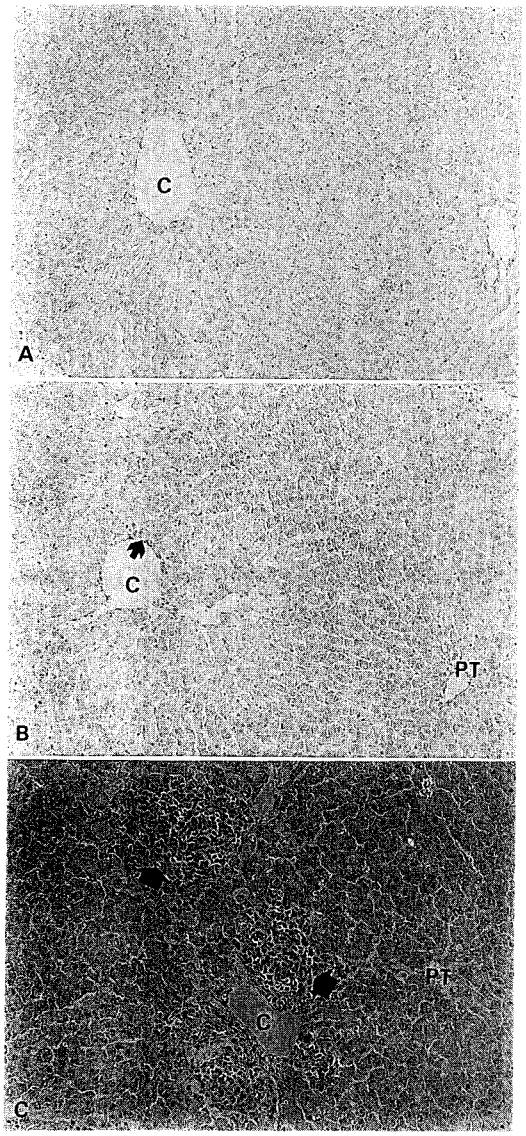

Fig 1. Micrographs of liver tissue in rats, hematoxylin-eosin stain, ×*100*. **A)** Control group; The tissue structure of hepatic lobule was intact, **B)** 3 time-bromobenzene-treated group every other day; A few necrotic hepatocytes (arrow) were limitedly found around the central vein. Some hepatocytes near the central vein had an increased cell volume compared to control group. **C)** 3 time-bromobenzene-treated group everyday; Enlarged hepatocytes and centrilobular necrosis (arrows) were noted. C: central vein, PT: portal triads

찰되었다 (Fig. 1C).

본 실험 결과에서 1일 간격으로 bromobenzene을 3회 투여한 실험동물에 간손상이 심하게 나타난

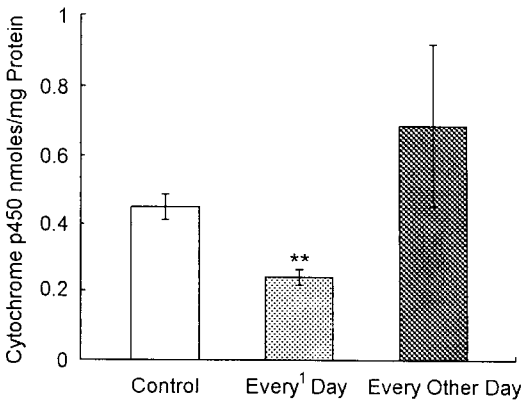

Fig 2. Comparison of liver content of cytochrome P450 in the rats exposed to bromobenzene every day with other exposed every other day. The assay procedure was described in the experimental methods. Each value represents the mean ± S.E. of 6 rats. **Significantly different from the control ($p<0.01$).

결과는 본 연구자들의 전보와 유사하였다[2,5]. 또한 2일 간격으로 bromobenzene을 투여한 전보[1,3,4,6]와 본 실험에서 2일 간격으로 투여한 경우와도 유사한 결과를 보였다. 따라서 본 실험 결과와 전보의 실험 결과를 종합해 볼 때 bromobenzene 투여 간격에 따라 간손상의 차이가 현저하게 나타남을 알 수 있었다. 즉 bromobenzene을 실험동물에 간헐적으로 투여 시에 간손상이 경미하게 나타남을 관찰할 수 있었다.

2. 간조직 중 cytochrome P450 함량 변동

Bromobenzene에 의한 간손상은 생체 내에서 bromobenzene이 다기능 산화기구 (cytochrome P450)에 의하여 bromobenzene-3,4-oxide가 간세포의 macromolecule과 공유결합하므로서 야기되는 것으로 알려져 있다[22]. 그러므로 bromobenzene 투여 간격에 따라 간손상의 차이는 cytochrome P450 함량에 따라 좌우될 것으로 생각되어 본 실험 조건에서 cytochrome P450 함량을 측정한 것이 Fig. 2와 같다.

ED군은 간조직 cytochrome P450 함량이 대조군에 비하여 오히려 43%의 유의한 ($p<0.01$) 감소를 보였으며, EOD는 대조군에 비하여 약 62% 증가되었다. Cytochrome P450은 bromobenzene-3,4-oxide와 같은 free radical에 의하여 불활성화 된다는 보고[7,10]와 본 실험에서 1일 간격으로 투여한 실험군에서 cytochrome P450 함량이 대조군 보다 오히려 저하되어 2일 간격으로 투여한 EOD 실험군에

서는 증가되는 현상을 고려해 볼 때, ED 실험군에 있어서 bromobenzene-3,4-oxide 생성률이 증가됨을 시사해 주고 있다. 따라서 ED 실험군이 EOD 실험군 보다 간손상이 심하게 나타남은 bromobenzene-3,4-oxide 생성률이 증가됨으로 나타난 결과로 생각된다.

3. 간조직 중 glutathione (GSH) 및 이의 포합효소인 GST 활성 변동

Bromobenzene에 의한 간손상은 bromobenzene으로부터 생성된 bromobenzene-3,4-oxide 해독에 관여하는 간 GSH 함량과 포합효소인 GST 활성에 상당한 영향을 받고 있으며[14,16] 이들 phase II계 효소계는 bromobenzene 투여 간격에 따라 달리 나타날 것으로 생각된다. 따라서 본 실험 조건에서 간조직 중 GSH 함량 및 GST 활성을 나타낸 것이 Table 2와 같다.

즉, 간조직 중 GSH 함량은 ED군이 대조군에 비하여 다소 증가되었으나 EOD군은 다소 감소되는 경향을 보였다. 또한 GST 활성은 ED군에 있어서는 약 15% 증가되는 경향을 보였으며, EOD군은 대조군에 비하여 약 37%의 유의한 ($p<0.05$) 증가를 보일 뿐만 아니라 ED군에 비해서는 약 20%의 유의한 ($p<0.05$) 증가를 보였다. 그러므로 bromobenzene으로부터 bromobenzene-3,4-oxide 해독능은 EOD군이 ED군 보다 높게 나타남을 알 수 있다. 따라서 간 glutathione 함량과 GST가 bromobenzene 해독에 관여한다는 사실[14,16]과 본 실험 결과를 고려해 볼 때, bromobenzene을 생체에 투여 시 투여 간격이 bromobenzene 해독에 영향을 미침을 시사해 주고 있다.

이상 실험 결과와 문헌상의 지견을 종합해 볼 때 bromobenzene을 실험동물에 폭로 시 폭로 간격에 따라 간손상의 차이가 나타남은 bromobenzene 대사율과 상당한 관련성이 있음을 시사해 주고 있다.

참 고 문 헌

1) 김광진, 신중규, 윤종국 (1997): 랫드에 있어서 주·야 시차가 Bromobenzene 대사에 미치는 영향. 한국독성학회지, **13(4):** 377-383.
2) 김중우, 신중규, 윤종국 (1995): 흰쥐에 있어서 주정중독이 Bromobenzene 대사에 미치는 영향. 한국독성학회지, **11(2):** 253-259.
3) 신중규, 채순님, 윤종국 (1994): 단백식이 조건을 달리하여 성장시킨 흰쥐에 Bromobenzene 투여가 간손상에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, **23(6):** 894-898.
4) 윤종국 (1996): 저 및 표준단백식이로 성장시킨 흰쥐에 Bromobenzene 투여가 간 및 혈청 Xanthine oxidase 활성에 미치는 영향. 기초과학연구소 연구논집 (계명대학교), **15(2):** 305-311.
5) 이상희, 전태원, 윤종국 (2000): Bromobenzene의 투여 횟수에 따른 간독성의 차이. 대한의생명과학회지, **6(1):** 29-36.
6) 한선일, 윤형원, 윤종국 (1999): 연령이 다른 흰쥐에 Bromobenzene 투여가 간손상에 미치는 영향. 대한의생명과학회지, **5(2):** 201-208.
7) Bambal RB and Hanzlik RP (1995): Bromobenzene 3,4-oxide alkylates histidine and lysine side chains of rat liver proteins in vivo. *Chem Res Toxicol,* **8(5):** 729-735.
8) Ellman GL (1959): Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys,* **82:** 70-77.
9) Habig WH, Pabist MJ and Jakoby WB (1974): Glutathione S-transferase, The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem,* **249:** 7130-7139.
10) Hanzlik RP (1995): Reactive metabolites and drug toxicity. *Crisp Data Nati Insti Health.*
11) Hodgson E (1987): Modification on metabolism. pp. 85-121. Hodgson E and Levi PE (eds), "Modern Toxicology", Elsevier, New York.
12) Karmen A (1955): A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest,* **34:** 131-133.
13) Kato R (1977): Drug metabolism under pathological and abnormal physiological states in animals and man. *Xenobiotica,* **7(1-2):** 25-92.
14) Lee SI, Yoon CG and Huh K (1990): Protective effect of diallyl disulfide on the bromobenzene-induced hepatotoxicity in mice. *Kor J Pharmacol,* **26:** 185-192.
15) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RL (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem,* **193:** 265-275.
16) Monks TJ, Lau SS and Gillette JR (1984): Dif-

fusion of reactive metabolites out of hepatocytes: studies with bromobenzene. *J Pharmacol Exp Ther,* **228(2):** 393-399.

17) 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.

18) Raymond S, Yang H and Anderson ME (1994): Pharmacokinetics. pp. 49-73. Hodgson E and Levi PE (eds), "Introduction to Biochemical Toxicology", Appleton & Lange, London.

19) 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.

20) Ried WD, Christie B, Krishna G, Mitchell JR, Moskowitz J and Brodie BB (1971): Bromobenzene metabolism and hepatic necrosis. *J Pharmacol,* **6:** 41-55.

21) Schefler WC (1980): Statistic for the biological sciences. pp. 84-89. *Addison-Wesley Publishing Co, USA.*

22) Zannoni VG, Marker EK and Lau SS (1982): Hepatic bromobenzene epoxidation and binding: Prevention by ascorbyl palmitate. *Drug Nutr Interact,* **1(3):** 193-204.

=Abstract=

Comparison of Liver Damage in Bromobenzene-Daily Treated Rats with Every Other Day Treated Ones

Sang-Hee Lee, Chong-Guk Yoon† and Hyung-Gug Cho*

†*Department of Public Health, Keimyung University, Taegu, 704-701, Korea*
**Department of Biology, Yeungnam University, Kyongsan, Kyongbuk, 712-749, Korea*

To evaluate the effect of intervals of bromobenzene treatment on the liver damage, the bromobenzene (400 mg/kg, i.p.) was given to rats at either one day or two days interval at three times. All the experimental animals were sacrificed at 24 hours after the last injection. Liver morphological changes were observed under a light microscopic examination and liver functional changes were determined by the measurement of alaine aminotransferase (ALT) activity and hepatic malondialdehyde (MDA) content. The experimental to examine the cause of liver damage were cytochrome P450, glutathione (GSH) content and glutathione S-transferase (GST) activities.

The results are summarized as follows;

Based on the liver morphological and functional findings, the daily bromobenzene-treated rats (ED) showed the more severe liver damage than every other day bromobenzene-treated rats (EOD). The hepatic cytochrome P450 content was higher in EOD group than that in ED group. And the increasing rate of hepatic GST activity and decreasing rate of GSH content to the control were higher in EOD group than that in ED group.

In conclusion, the treatment of bromobenzene intermittently to the rats may lead to more reduced liver injury compared with the continuously treated animals when both cases are treated with the same dose and frequency, and it may be caused by the enhancement of bromobenzene metabolism.

Key Words: Bromobenzene, Dosing interval, Liver damage

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(2): 101-107, June, 2000]

†Corresponding author