

Effect of Toluene Application to Skin on the Enhancement of Liver Injury in CCl₄-Pretreated Rats

Soon-Nim Chae[†], Chong-Guk Yoon* and Hyun-Gug Cho**

[†]Department of Beauty Science, Tongwon College, Kyunggi-do, 464-711, Korea

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

**Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Kyungbuk, 716-820, Korea

To evaluate an effect of toluene application to skin on the enhancement of liver damage in CCl₄-pretreated rats, toluene (35 mg/cm²) was sequentially applied for 5 days to the skin of liver damaged rats with CCl₄ (6 times every other day: 0.1 ml/100 g body weight-50% CCl₄ in olive oil).

On the basis of the functional and morphological findings in rat liver, applying toluene to the skin in liver damaged animals led to the more enhanced liver damage. In addition, by applying toluene to skin of liver damaged rats, the hepatic cytochrome P450 content was somewhat more increased, but the hepatic benzylalcohol dehydrogenase activity was significantly decreased ($P < 0.001$), whereas benzaldehyde dehydrogenase activity was not statistically changed.

In conclusion, the toluene application to skin in liver-damaged rat led to enhancement of liver injury that may be due to the accumulation of toluene metabolite in liver.

Key Words: Liver damaged rats, Toluene application, Skin

서 론

최근 산업발전에 따른 생활 환경공간 및 산업장에서의 유해한 공해물질은 인체에 폭로 시 인간의 건강에 문제를 발생시키고 있다. 특히 건강인에 비해 노인층과 질환을 앓고 있는 환자들에게 공해물질에 의한 질병의 악화현상은 심각한 사회문제를 초래할 수 있다. 이들 유해 공해물질 중 산업 화학물질인 toluene은 산업체에서 비교적 안전성이 인정되어 벤젠의 대체물질로 많이 이용되는 유기용제로서 신경계^{1,2)}, 순환계¹⁸⁾, 조혈계^{16,21)}에 독성이 야기됨이 보고되고 있으며, 생체에 폭로 시 간상해도 유발된다고 알려져 있다¹⁰⁾. 최근 윤 등⁹⁾에 의하여 실험동물에 toluene을 복강 투여 및 피부 도포 시에 간상해가 초래된다고 하였다. 특히 차 등⁴⁾은 실험동물에서 CCl₄에 의해 간손상 시에 toluene의 대사가 억제됨을 관찰한 바, 이와 같은 toluene의 생체 내 독성현상은 생체 내 병태생리적 조건에 따라 달리 나타날 수 있음을 시사해 주고 있다. 따라서 CCl₄에 의한 간상해가 유도된 경우 toluene의 폭로로 간상해 정도가 심화될 수 있다고 생각된다. 일반적으로 화학물질의 생체 내 흡수 경로는 경구, 경피 및 호흡기계이며, 통상적

인 생활공간에서의 유기용제 흡수는 호흡기계 및 경피를 통하여 이루어지고 있다^{8,19)}. 더욱이 피부노출이 심한 여름철에는 피부를 통한 경피흡수의 가능성이 높다. 따라서 간질환과 같은 질병 시에 피부로의 toluene 폭로 시 간독성의 심화현상이 나타날 것인가에 대한 검토는 예방의학적 측면에서 의의가 있을 것으로 생각된다.

이에 본 연구는 흰쥐에 CCl₄를 투여하여 간손상을 유도한 다음 피부에 toluene을 5일간 도포시킨 후 처치하여 간기능 및 형태학적 검사를 통하여 간손상 정도를 확인하고 이의 원인을 규명코자 toluene 대사효소활성을 간조직 중에서 측정하였다.

재료 및 방법

1. 동물 및 처치

실험동물은 체중 200 g 되는 외견상 건강한 Sprague-Dawley 계의 숫흰쥐를 시중으로부터 구입 후 동물사료와 물을 충분히 공급하면서 사육실에서 1주일 적응시켜 실험에 사용하였다. 각 실험군은 대조군, CCl₄ 투여군, CCl₄ 전처치 후 toluene 피부도포군 (이하 CCl₄ 전처치군으로 약함)의 3군으로서 각각 7마리씩 분리 수용하였으며, 실험기간 중 물과 사료의 양은 제한없이 공급하였고, 사육실 온도는 25±1°C를 유지하였다. CCl₄ 투여군은 CCl₄를 olive oil과 혼합액을 만들어 체중

*논문 접수: 2001년 4월 13일
수정재접수: 2001년 6월 25일

[†]별책 요청 저자: 채순임

Table 1. Effect of the toluene application to rat skin on the liver weight per body weight (LW/BW, %), serum ALT and XO activities in liver damaged rats induced with CCl₄

Group parameters	Control	CCl ₄ -treated group	Toluene-applied group pretreated with CCl ₄
LW/BW (%)	3.25±0.03	4.95±0.48	5.36±0.45***a)
Serum XO	9.70±0.50	25.15±3.85**a)	44.33±6.35***a)*b)
Serum ALT	30.51±0.45	150.15±17.25***a)	436.12±64.30***a)***b)

Each value represents the mean±S.E. of 7 rats. a); Significantly different from the control. b); Significantly different from the CCl₄-treated rats. (*; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001)

100 g 당 0.1 ml를 실험군 각 7마리에 2일 간격으로 6회 복강으로 주사하였으며 CCl₄ 전처치군은 CCl₄를 상기와 같이 6회 투여한 다음 등 부위에 제모하고 피부면적 cm² 당 35 mg을 5일간 연속 도포하였다. 이때 toluene의 휘발을 방지하기 위하여 Hiroshi 방법⁷⁾에 의하여 O-ring 유리관을 toluene 도포 전에 부착시킨 후 제모한 부위에 toluene을 완전히 흡수시킨 후 떼내었다. 대조군 및 CCl₄ 투여군 모두 동일한 부위에 털을 제모하고 toluene을 도포하지 않은 채 O-ring관만 처리하였다.

동물의 처치는 일정시간 (AM 10시 전후)에 실시하였으며 약한 ether 마취 하에서 복부 정중선을 따라 개복한 후 복부 대동맥으로부터 채혈한 다음 4°C 생리식염수로 간문맥을 통하여 간을 관류하여 간 내에 남아있는 혈액을 제거한 다음 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 씻은 후 여지로 압박하여 간 내에 남아있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음 무게를 측정하였다. 그리고 적출한 간의 일정량은 효소 활성도 측정 및 병리조직 검사에 사용하였다. 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청을 얻고 alanine aminotransferase (ALT) 및 xanthine oxidase (XO) 활성에 사용하였다.

2. 간조직 세포의 fractionation

적출한 간조직의 일부를 취하여 4배의 0.25 M sucrose 용액을 가하여 빙냉 하에 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액 (20% w/v)을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 다음, 상층액을 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후, 그 상층액을 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 microsome 및 cytosol 분획으로 분리하였다.

Cytosol 분획은 benzylalcohol dehydrogenase (BADH) 및 benzaldehyde dehydrogenase (BALDH) 활성 측정에 사용하였으며 microsome 분획은 cytochrome P450 (CYP) 함량 측정에 사용하였다.

3. 효소 활성 측정

혈청 중 XO 활성 측정은 일정농도의 xanthine을 기질로 하여 반응시켜 생성된 요산을 phosphotungstate를 가하여 비색정량하는 Yoon의 방법²²⁾에 의하여 측정하였으며 단위는 1분간

생성된 요산의 양을 혈청 1 당 μmole로 표시하였다.

혈청 ALT 활성은 일정농도의 l-alanine 및 α-ketoglutaric acid를 기질로 하여 생성된 pyruvic acid가 알칼리성 하에서 2,4-dinitrophenylhydrazine과 반응하여 발색하는 hydrazine의 색조를 비색정량하는 Reitman과 Frankel 방법¹⁵⁾에 준해 조제된 kit 시약 (아산제약)을 사용하였으며, 단위는 혈청 ml 당 Karmen unit¹¹⁾로 표시하였다.

간세포 cytosol의 BADH 및 BALDH 활성 측정은 Bergmyer의 방법⁹⁾에 준하였다. 즉 BADH 일정농도의 benzylalcohol 기질과 조효소인 NAD⁺로부터 37°C에서 10분 동안 반응하여 생성된 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소 단위는 반응액에 함유된 단백질 1 mg이 1분 동안 생성된 NADH 양을 μmole로 표시하였다. 그리고 BALDH 활성은 일정농도의 benzaldehyde 기질과 조효소인 NAD⁺로부터 5분 동안 반응하여 생성된 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소 단위는 단백질 1 mg이 1분 동안 생성한 NADH 양을 μmole로 표시하였다.

4. CYP 함량 측정

간조직의 CYP의 함량 측정은 Omura와 Sato의 방법¹⁴⁾에 준하여 실시하였다. 즉, 시험관에 microsome 부유액 5 ml를 넣고 19 k 주사바늘을 통해서 1분 동안 농황산과 formic acid로부터 생성, 포집한 일산화탄소 (CO) gas를 통기시킨 다음 환원제로 Na₂S₂O₄ 30 mg을 넣고 잘 혼합한 후 또 다시 CO gas를 1분간 통기시켰다. CO gas 통기가 끝난 후 spectrophotometer를 이용하여 파장 400~500 nm에서 흡광도의 차이를 CYP-CO complex에 의한 흡광량으로 하고 CYP-CO complex의 mole 흡광계수 91 mM⁻¹cm⁻¹을 이용하여 CYP의 양을 계산하였다. Microsome의 CYP의 양은 단백질 1 mg 당 nmole로 표시하였다.

5. 간조직 단백질 정량

효소 단위 결정에 필요한 단백질 정량은 Lowry 등의 방법¹²⁾에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

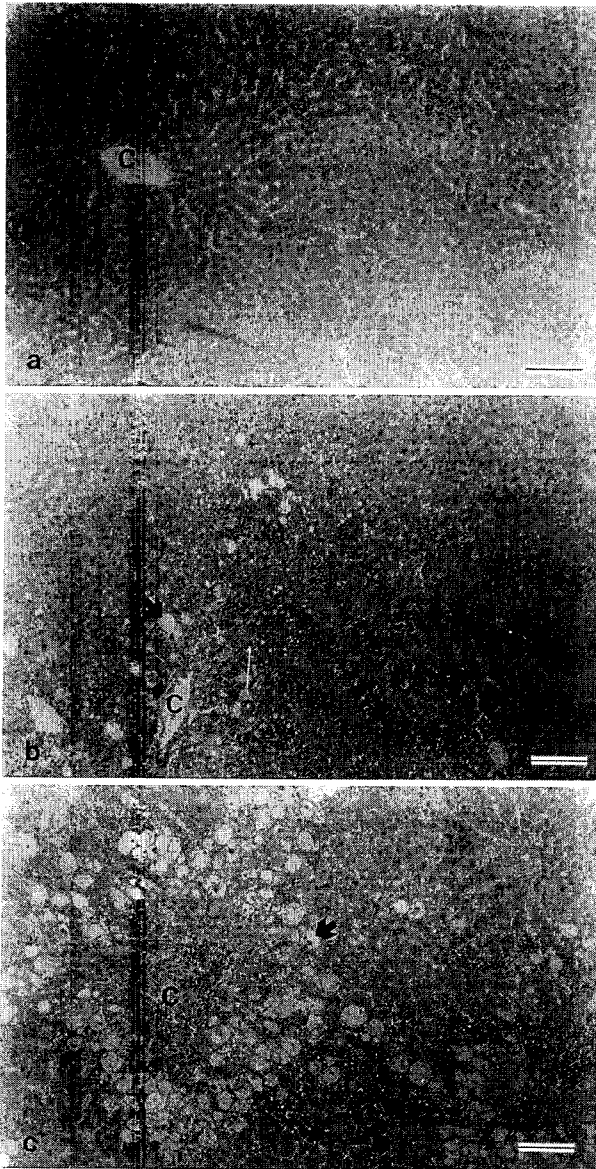


Fig. 1. Micrographs of liver tissue in rats, H&E stain. *a)* control group; The tissue structure was intact. C: central vein, scale bar=100 μ m. *b)* CCl_4 -treated group; Necrotic cells (arrow) were found in the central zone and intracellular vacuolization of hepatocytes was shown in the central zone to the mid zone. C: central vein, scale bar=100 μ m. *c)* Toluene-applied group pretreated with CCl_4 ; Formation of centrilobular necrotic (arrow) zone was shown with infiltration of inflammatory cells and congestion. C: central vein, scale bar=100 μ m.

6. 간조직의 병리조직학 검사

간조직의 일반적인 병리조직학적 변화를 관찰하기 위하여 대조군, CCl_4 투여군 그리고 toluene 5일 도포군으로부터 적출한 흰쥐 간의 중엽을 즉시 10% 중성 formalin액에 고정시키고 통상의 방법에 따라 탈수, 청정을 거쳐 paraffin으로 포매

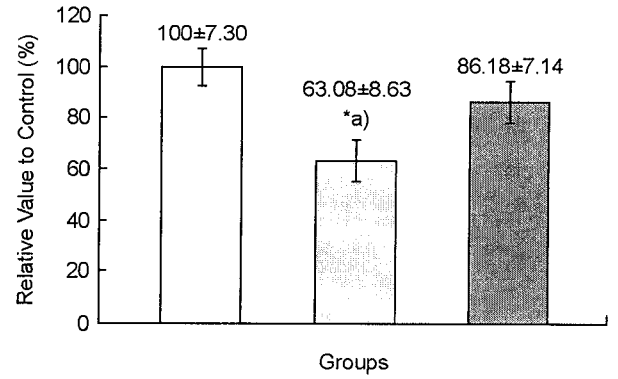


Fig. 2. Effect of the toluene application to rat skin on the hepatic cytochrome P450 content in CCl_4 -pretreated rats. ^{a)} Significantly different from the control (*; $P < 0.05$). □; Control. ▤; CCl_4 -treated group. ■; Toluene-applied group pretreated with CCl_4 .

한 다음 4 μ m의 질편으로 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 하여 광학현미경 (BH-2, olympus)으로 관찰하였다.

7. 통계 분석

실험 성적의 통계처리는 Student's t-test¹⁷⁾로 하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결 과

1. 체중 당 간무게 (%), 혈청 ALT 및 XO 활성

흰쥐를 전처치한 다음 피부에 toluene 도포 시 체중 당 간무게, 혈청 ALT 및 XO 활성을 나타낸 것이 Table 1과 같다. 체중 당 간무게는 대조군 보다 CCl_4 전처치군에서 약 1.6배의 유의한 증가 ($P < 0.001$)를 보였으며, CCl_4 투여군에서는 다소 높게 나타나는 경향을 보였다.

혈청 XO와 ALT 활성은 CCl_4 전처치군이 대조군 보다 각각 약 4.6배 ($P < 0.001$), 14.5배 ($P < 0.001$)의 현저한 증가를 보였으며, CCl_4 투여군에 비해서도 각각 1.8배 ($P < 0.05$), 2.9배 ($P < 0.001$)의 유의한 증가를 나타내었다.

2. 병리조직학적 검사소견

Olive oil만 투여한 정상군은 중심정맥으로부터 문맥아를 잇는 주변대까지 간세포삭 (hepatic cell cords)과 동양혈관이 방사형 구조로 관찰되었다 (Fig. 1a). CCl_4 투여군은 중심정맥 주변부의 중심대 일부세포 괴사와 더불어 괴사부에는 염증세포가 다수 관찰되었으며, 중간대에 걸쳐 간세포의 공포화 현상이 관찰되었다 (Fig. 1b). CCl_4 를 전처치한 다음 toluene 도포군 (CCl_4 전처치군)에서는 간세포의 비대와 함께 괴사대 영역이 중간대까지 관찰되며 중심정맥 주변의 중심대에는 울혈현상과 염증세포의 침윤이 관찰되었다 (Fig. 1c).

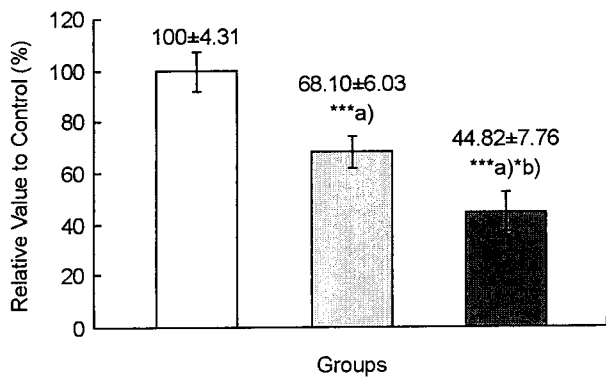


Fig. 3. Effect of the toluene application to rat skin on the hepatic benzylalcohol dehydrogenase activity in CCl₄-pretreated rats. ^{a)} ; Significantly different from the control. ^{b)} ; Significantly different from the CCl₄-treated rats (*; *P*<0.05, ***; *P*<0.001). □; Control. ▤; CCl₄-treated group. ■; Toluene-applied group pretreated with CCl₄

3. 간조직 중 CYP, BADH 및 BALDH 활성

CYP 함량은 CCl₄ 투여군이 대조군에 비하여 약 37% 유의하게 (*P*<0.001) 감소되었다. 그리고 CCl₄ 전처치군은 대조군에 비하여 약 14% 감소되는 경향을 보였으며, CCl₄ 투여군에 비해서는 약 36%의 유의한 (*P*<0.05) 증가를 보였다 (Fig. 2).

한편, BADH 활성은 CCl₄ 투여군이 대조군에 비해서 약 32%의 유의한 (*P*<0.001) 감소를 보였다. CCl₄ 전처치군은 대조군에 비해서 약 55%의 현저한 (*P*<0.001) 감소를 보였으며, CCl₄ 투여군에 비해서도 약 33% 유의하게 (*P*<0.05) 감소되었다 (Fig. 3).

BALDH 활성에 있어서는 CCl₄ 투여군은 대조군에 비하여 약 68% (*P*<0.001)의 유의한 감소를 보였다. CCl₄ 전처치군 역시 대조군에 비하여 BALDH 활성이 약 72%의 현저한 (*P*<0.001) 감소를 보였으며, CCl₄ 투여군에 비해서도 약 13% 감소되는 경향을 나타내었다 (Fig. 4).

고 찰

산업장에서 toluene은 일반적으로 benzene에 비하여 안전성이 인정되어 유기용매로 많이 사용되고, 이는 toluene의 급성 투여 시 간손상이 심하게 나타나지 않으며, 가역적 경미한 간세포 상해가 야기된다는 사실^{5,7)}과 관련지을 수 있다. 그러나 이미 간질환을 앓고 있는 경우 toluene의 폭로로 인한 간손상이 심화될 것으로 착안하여 본 실험에서는 CCl₄로 급성 간손상을 유발시킨 실험동물에 toluene을 5일간 연속 피부에 도포한 뒤 간손상 정도를 확인코저 하였다. 본 실험에서 CCl₄를 복강으로 6회 투여한 후 간손상을 확인하기 위해서 간손상 시 증가된다는 혈청 XO 활성^{5,10)}과 ALT 활성이 대조군 보다 현

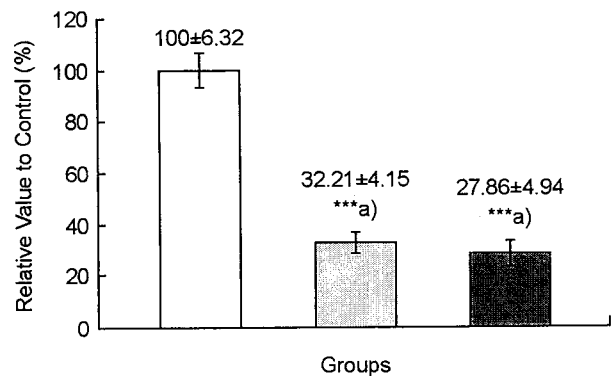


Fig. 4. Effect of the toluene application to rat skin on the hepatic benzaldehyde dehydrogenase activity in CCl₄-pretreated rats. ^{a)} ; Significantly different from the control (***) ; *P*<0.001). □; Control. ▤; CCl₄-treated group. ■; Toluene-applied group pretreated with CCl₄

저히 증가되었으며, 간조직의 병리조직학적 소견에서도 간세포의 괴사가 심하게 나타났다. 따라서 본 실험의 CCl₄를 전처치한 흰쥐가 간손상 모델 실험동물임이 확인되었다. 이와 같은 실험동물의 피부에 toluene을 도포함으로써 혈청 XO 활성과 ALT 활성은 CCl₄를 전처치한 군 보다 상당히 높게 나타났다. 간조직 세포의 괴사의 정도도 심하게 나타났다. 그러므로 간손상 실험동물의 피부에 toluene을 도포함으로써 간손상이 심화됨을 알 수 있었다.

Toluene을 실험동물에 투여하면 toluene은 환원소포체에 존재하는 다기능산화효소인 CYP에 의하여 benzylalcohol로 변환된 다음, BADH에 의하여 benzaldehyde로, BALDH에 의해 benzoic acid로 변화된 후 glycine과 포함되어 마노산이 된 다음 요 중으로 배설된다고 한다⁹⁾. 이때 toluene의 중간대사산물인 benzaldehyde은 세포상해를 유발하는 것으로 알려져 있으며, toluene에 의한 조직손상은 benzaldehyde에 의해 기인된다고 한다²⁰⁾. 채 등⁵⁾은 toluene을 피부에 도포 시 toluene이 간조직에 분포되어 대사된 benzaldehyde에 의해서 경미한 가역적 간상해가 유발된다고 보고하였다. 그리고 일반적으로 간손상 시 간조직에서 약물대사속도가 지연된다는 것은 잘 알려진 사실이다¹⁾. 그러므로 CCl₄ 전처치 후 toluene을 피부에 도포함으로써 간조직에 toluene의 대사장애가 초래되어 benzaldehyde의 유지율이 증가되므로써 간손상이 심화된 것으로 생각된다. 이를 확인하기 위해서 본 실험조건에서 toluene 대사효소활성을 측정된 결과, CCl₄ 투여군은 대조군에 비해 CYP 함량이 감소되었으며 이는 CCl₄로부터 대사된 trichloromethyl free radical (CCl₃·)이 생리활성물질을 불활성화 및 합성을 억제시키기 때문이라는 보고^{9,13)}가 이를 뒷받침해 주고 있다. 그러나 본 실험조건에서 CCl₄ 전처치 후 toluene 투여군은 CCl₄ 투여군 보다 CYP 함량의 억제 정도가 낮게 나타났으며, 이는 CCl₄ 전처치군이 CCl₄ 투여군 보다 benzylalcohol 생성

율이 높게 나타난 것임을 시사해 주고 있다. 따라서 이 실험 결과를 보아 CCl₄ 전처리 후 toluene 피부 도포 시 CYP 함량, BADH 및 BALDH 활성이 낮게 나타남으로써 세포상해에 관련된 benzylalcohol 및 benzaldehyde²⁰⁾가 간조직에 다량 축적되어 간손상이 심화될 것으로 생각된다. 그리고 toluene 피부 도포 시 toluene의 체내 흡수가 비교적 잘 이루어진다는 보고⁹⁾를 고려해 볼 때 체내 흡수된 toluene은 표적장기인 간조직으로 분포되어 대사 시 toluene의 중간대사산물이 간세포의 상해에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 또한 본 실험에서 CCl₄ 전처리하여 간손상을 유도한 다음, 피부에 toluene을 5일간 도포함으로써 계속적인 간조직으로의 분포로 인해 toluene의 계속적인 대사가 이루어져 이로 인하여 toluene의 중간대사생성물질이 지속적으로 생성되어 간조직에 심한 상해를 유발할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 이해자, 윤중국, 박원학 (1999): CCl₄에 의한 간손상 정도 차이에 따른 Xylene 대사 변동. *J Toxicol Pub Health*, **15** (3): 345-352.
- 2) Boor JW and Hurtig HI (1977): Persistent cerebellar ataxia after exposure to toluene. *Ann Neurol*, **2**: 440-442.
- 3) Bergmeyer HU (1974): *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, Academic Press.
- 4) Cha SE, Yoon CG and Lee SI (1998): Effect of hepatic damage on the toluene metabolism in carbon tetrachloride pre-treated rats. *J Toxicol Pub Health*, **14**(3): 321-328.
- 5) Chae SN, Lee SH and Yoon CG (2001): Effect of toluene application to rat skin on the liver injury in rats. *Kor J Biomed Lab Sci*, **7**(1): 45-51.
- 6) Cohr KH and Stockholm J (1979): Toluene. A toxicologic review. *Scand J Work Environ Health*, **5**: 71-90.
- 7) Hiroshi T (1982): Percutaneous absorption of organic solvents. *Ind Health*, **20**: 335-345.
- 8) Hodgson E and Levi PE (1987): *A textbook of modern toxicology*. New York: Elsevier.
- 9) Johnson EF (1979): Multiple forms of cytochrome P-450; Criteria and signification. *Rev Biochem Toxicol*, **1**: 1-26.
- 10) Jeon TW, Kang HY and Yoon CG (1995): Effect of toluene administration on the activity of serum xanthine oxidase in rats. *J Kor Toxicol*, **11**(2): 279-288.
- 11) Karmen A (1955): A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest*, **34**: 13-133.
- 12) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- 13) Noguchi T, Fong KL and Lai EK (1982): Selective early loss of polypeptides in liver microsomes of CCl₄-treated rats. *Biochem Pharmacol*, 609-614.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) Rosin J, Bartosz G and Wronska Nofer T (1988): Studies on the effect of ethanol and/or toluene on rat erythrocytes. *J Appl Toxicol*, **8**(5): 369-372.
- 17) Scheffler WC (1980): *Statistics for the biological sciences*. Addison-Wesley Co, USA, 84-89.
- 18) Taylor GJ and Harris WS (1970): Glue sniffing causes heart block in mice. *Science*, **170**(960): 866-868.
- 19) Tucker SB and Key MM (1992): Occupational skin disease. In *Environmental and occupational medicine* (2nd ed, William N, Rom, ed.), 551-560.
- 20) Weiner H, Tank AW, Von Wartburg JP and Weber S (1979): Interaction of aldehydes and proteins. *Abstr Int Symp. Alcohol Aldehyde Metab Syst*, 3rd.
- 21) Yoon CG (2000): Effect of toluene treatment on the MCV in rat erythrocyte. *J Inst Nat Sci*, **19**(2): 63-67.
- 22) Yoon CG (1984): A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *J Keimyung Res*, **2**: 295-308.