

## 흰쥐에 있어서 피부조직의 Oxygen Free Radical 대사계에 미치는 Toluene의 영향

채순님 · 윤종국<sup>1\*</sup> · 박원학<sup>2</sup>

동원대학 피부미용과, <sup>1\*</sup>계명대학교 공중보건학과  
<sup>2</sup>영남대학교 생물학과

### Effect of Toluene Application to the Rat Skin on the Oxygen Free Radical Metabolizing System

Soon-Nim Chae, Chong-Guk Yoon<sup>1\*</sup> and Won-Hark Park<sup>2</sup>

Department of Beauty Science, Tongwon College

<sup>1\*</sup>Department of Public Health, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Biology, Yeungnam University

(Received March 8, 2001)

(Accepted April 6, 2001)

**ABSTRACT :** To evaluate the skin toxicity of topical toluene application, toluene (35 mg/cm<sup>2</sup>) was sequentially applied to the portion rat skin for five days. The topical toluene application resulted in increased xanthine oxidase activity and CYP content, and significantly decreased superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities at five days in rat skin. Especially catalase activity was remarkably decreased in toluene-applied rat skin. And benzylalcohol dehydrogenase activity showed also a significant decrease in toluene-applied skin. On the other hand, histopathological ultrastructural examination revealed disrupted epidermal basement membrane, rared intercellular adhenstions and degenerated keratin layer due to topical toluene application. Increased deposit of cerrous perhydroxide resulted from reaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was observed in toluene-treated animals. These results indicate that oxygen free radical may be responsible for ultrastructural changes in skin tissue by toluene application to rat skin.

**Key Words :** Toluene, Skin, Oxygen free radical, Rats

#### I. 서 론

산업의 발전과 더불어 화학물질의 합성과 사용량은 날로 증가하고 있으며 이러한 물질들에 의한 인체의 폭로로 지금까지 보고된 적이 없었던 여러 가지 질병들이 나타나고 있어 인간의 건강과 관련하여 사회적인 문제로 등장하고 있다.

일반적으로 산업화학물질들의 경우에는 취급 혹은 사용하는 과정에서 경구, 호흡기 및 경피적 접촉을 통해 체내로 흡수되어 여러 가지 독작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 화학물질의 독성에 대한 연구는 피부 부식성과 자극성 등과 같은 직접적인 영향을 미치는 것들 외에는 경구 및 호흡기계를 통한 체내 흡수와 관련된 연구가 대부분을 차지하고 있어 경피적 흡수 독성에 대한 연구는 미흡한 실정에 있다.

산업화학물질의 일종인 톨루엔은 비교적 인체에 안정성이 인정되어 산업장에서 벤젠의 대체 유기용제로 많이 사용되고 있다. 그러나 toluene이 인체 폭로시 신경계(Boor and Hurtig, 1977; Rees *et al.*, 1987), 순환계(Zee-Cheng *et al.*, 1985; Vidrio *et al.*, 1986), 조혈계(Rosin *et al.*, 1988; Lam *et al.*, 1990) 및 간손상(Toftgard *et al.*, 1982; Morris, 1989)을 야기시키는 것으로 알려져 있다. 톨루엔이 생체에 폭로시 benzylalcohol, benzaldehyde, benzoic acid로 산화된 다음 glycin과 포함되어 hippuric acid로 요중으로 배설(Cohr and Stockolm, 1979)되며, 톨루엔에 의한 조직의 손상은 이의 중간대사산물인 benzaldehyde에 의해 야기되는 것으로 보고되고 있다(Ellenhorn and Barceloux, 1988). 한편 Mathias and Morrison(1988)은 toluene이 피부 질환과 관련이 있을 것으로 보고하였고 Langman (1994)은 toluene이 피부에 청색증(cyanosis)을 유발시킨다고 보고하였으며, Grossreu *et al.*(1990)은 피부질환이 oxygen free radical에 기인되어 나타난다고 보고하였다. 그리고 Cha *et*

\*To whom correspondence should be addressed

al.(1998) 및 Jeon *et al.*(1995)은 툴루엔의 대사 중간생성 물질이 조직의 손상에 관여하는 것으로 잘 알려져 있는 oxygen free radical의 대사에 영향을 미친다고 보고하고 있어 툴루엔의 경피적 접촉시 피부에 독성이 나타날 것으로 생각되나 아직까지 별다른 연구는 없는 실정에 있다.

이에 본 연구는 산업 독성학적인 측면에서 툴루엔의 피부독성에 관한 기초자료를 제시하고자 흰쥐 피부에 3일 및 5일간 툴루엔을 도포한 다음 피부 조직의 전자현미경적 관찰을 통해 미세구조의 변화를 관찰함과 동시에 툴루엔의 대사에 관여하는 효소의 활성변동과 조직의 손상과 관련된 oxygen free radical의 생성계 및 해독계의 효소 활성변동, 그리고 oxygen free radical의 피부조직 세포 내 축적 정도를 세포화학적 관찰을 통해 상호비교 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 동물 및 처치

동물은 체중 200 g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 종의 숫 흰쥐를 사용하였다. 각 실험군은 대조군, 툴루엔 3일 도포군, 툴루엔 5일 도포군으로 각각 7마리씩 분리 수용하여 물과 사료를 제한 없이 공급하였다. 툴루엔 도포군은 등부분의 털을 제거하여 24시간 후 피부  $\text{cm}^2$  당 툴루엔 35 mg을 1일 1회 3일간 또는 5일간 도포하였다. 그리고 툴루엔의 휘발을 방지하기 위해서 Hiroshi(1982) 방법에 준하여 O-ring형 유리관(내경 : 46 mm, 높이 : 15 mm)을 툴루엔 도포 전에 제모한 부위에 부착시켜 툴루엔을 완전히 흡수시킨 후 떼어내었다. 대조군은 제모하여 O-ring형 유리관을 부착시킨 후 도포한 실험군의 조건과 동일하게 실시하였다.

동물의 처치는 툴루엔 마지막 도포 24시간 후 ether 마취 하에 복부 정중선을 따라 개복한 다음 복부대동맥으로부터 채혈하여 실험사 시킨 후 피부조직(표피, 진피 포함)을 적출하였다. 한편, 피부조직의 일부는 10% formalin에 고정시켜 병리조직 검사에 사용하였다.

### 2. 효소시료의 조제

적출한 피부 조직의 일부를 취하여 4배 량의 0.25 M sucrose용액을 가하여 빙냉하에 균질기로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액(20% w/v)을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음, 상정액을 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후 mitochondria 분획을 얻고, 그 상정액을 다시 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 가용성 분획과 microsome 분획을 분리하였다. 가용성 분획

은 xanthine oxidase(XO), glutathione peroxidase(GPx), glutathione S-transferase(GST), superoxide dismutase(SOD), benzylalcohol dehydrogenase(BADH) 그리고 benzaldehyde dehydrogenase(BALDH)활성 측정에 사용하였으며 mitochondria 분획은 catalase(CAT) 활성측정, microsome 분획은 cytochrome P450(CYP) 함량측정에 사용하였다.

### 3. 효소 활성 측정

피부조직 중 BADH 활성은 기질인 benzylalcohol과 NAD가 반응하여 생성되는 NADH를 측정하는 Bergmeyer(1974)의 방법, BALDH 활성은 기질인 benzaldehyde와 NAD의 반응에 의해 생성되는 NADH를 측정하는 Stachow 등(1967)의 방법, Catalase 활성은 과산화수소의 분해정도를 측정하는 Aebi(1974)의 방법, GPx 활성은 기질인 과산화수소의 제거에 이용된 산화형 glutathione을 환원시키는데 필요한 NADPH의 함량을 측정하는 Paglia와 Valentine(1967)의 방법, GST는 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione의 포합정도를 측정하는 Habig *et al.*(1974)의 방법, XO 활성은 기질인 xanthine로부터 생성되는 노산의 함량을 측정하는 Stirpe and Della Corte(1969)의 방법에 준하였다. 그리고 SOD 활성은 hematoxylin 자동산화의 억제정도를 측정하는 Martin *et al.*(1987)의 방법에 준하였으며 활성도 단위는 hematoxylin의 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 unit로 나타내었다.

### 4. CYP 함량 측정

CYP의 함량 측정은 Omura and Sato(1964)의 방법에 준하여 450~490 nm에서 흡광도의 차이를 CYP-CO complex에 의한 흡광량으로 하고 CYP-CO complex의 분자흡광계수( $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )를 이용하여 CYP의 양을 계산하였다. Microsome의 CYP 함량은 단백질 1 mg 당 nmole로 표시하였다.

### 5. 피부 조직 GSH 함량 측정

GSH의 함량은 Ellman(1959)의 방법에 따라 비단백성 sulfhydryl group을 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)로 발색시켜 412 nm에서 비색 정량하였다. GSH의 함량 단위는 간 조직 1 g 당  $\mu\text{mole}$ 로 나타내었다.

### 6. 피부 조직 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry *et al.*(1951)의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

7. 미세구조 관찰 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> localization 관찰

피부조직의 미세구조와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 반응양상을 관찰하기 위하여 피부조직을 적출 즉시 1 mm<sup>3</sup> 크기로 세절하고, 세절조직의 일부를 2.5% glutaraldehyde(0.1 M phosphate buffer pH 7.4)와 1% osmium tetroxide(0.1 M phosphate buffer pH 7.4)로 이중고정시켰다. Alcohol-propylene oxide 계열로 순차적으로 증가하는 농도에 따라 탈수한 다음, epoxy resin에 포매하였다. 포매된 조직은 열중합시키고 60~70 nm로 초박절편한 다음(Reichert supernova, Reichert) uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후 투과전자현미경(Hitachi H-600)으로 관찰하였다.

세절조직의 나머지는 세절 즉시 2.0 mM cerium chloride, 10 mM 3-amino-1,2,4-triazole, 0.1 M tris-maleate buffer (pH 7.5), 7% sucrose, 0.0002% triton X-100으로 조제된 기질에 담그고, 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 조직을 0.1 M tris-maleate buffer(pH 7.5)와 0.1 M sodium cacodylate buffer(pH 7.4)로 각각 차례로 수세한 후 1% osmium tetroxide(0.1 M phosphate buffer pH 7.4) 고정한 다음 위와 같은 표본제작법으로 탈수, 포매, 중합, 절편을 만들어 uranyl acetate 단염색하여 투과현미경으로 관찰하였다.

8. 성적 검정

유의성 검정은 Student's t-test(Scheffler, 1980)로 하였으며 유의 수준은 0.05 이하로 하였다.

III. 결 과

1. 피부조직의 oxygen free radical 생성계와 해독계의 활성

흰쥐의 피부에 톨루엔 도포시 oxygen free radical의 생성에 관여하는 CYP의 함량과 XO의 활성변동을 피부 조직에서 관찰한 성적이 Fig. 1이다. CYP 함량은 3일 도포군은 대조군에 비하여 44%의 유의한(p<0.01) 감소를 보였으나 5일째에는 약 13% 증가되는 경향을 보였다. XO 활성은 피부에 톨루엔 도포 후 계속 증가되어 5일째에는 대조군에 비하여 약 26%의 유의한(p<0.05) 증가를 보였다.

한편 흰쥐 피부에 톨루엔 도포시 oxygen free radical의 해독에 관여하는 SOD, CAT, GPx 및 GST 활성변동을 나타낸 것이 Fig. 2이다. 피부조직의 SOD 활성은 톨루엔의 피부도포 3일째에는 26%(p<0.05), 5일째에는 23%(p<0.05)의 유의한 감소를 보였으며, GPx 활성은 톨루엔을 5일간 도포하는 동안 대조군에 비하여 약 28%(p<0.05) 유의하게

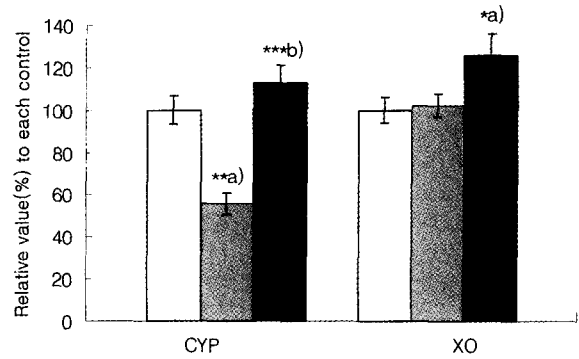


Fig. 1. Effect of the toluene application to rat skin on cutaneous CYP content and XO activity. Each bar represents the mean±SE. of 7 rats and expresses as the relative percentage (%) to the control. <sup>a)</sup>Significantly different from the control (\*p<0.05, \*\*p<0.01). <sup>b)</sup>Significantly different from the 3 days toluene-treated group (\*\*\*)P<0.001). □; Control ▨; 3 days ■; 5 days

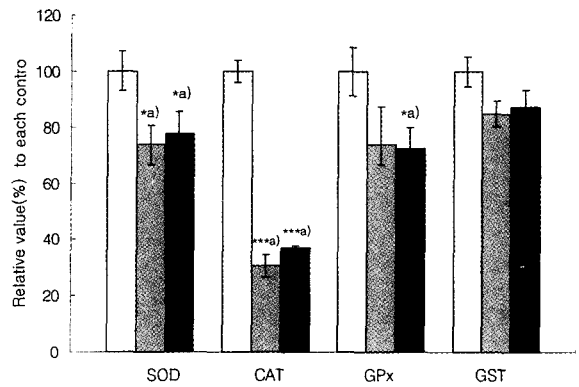
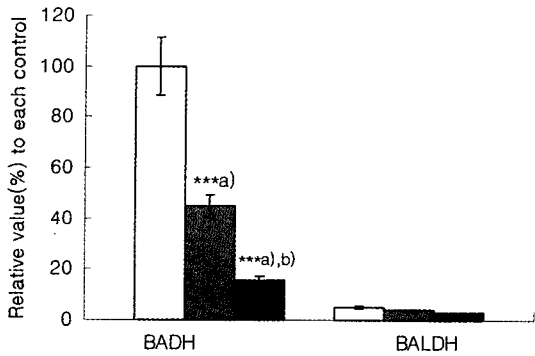


Fig. 2. Effect of the toluene application to rat skin on the cutaneous oxygen free radical scavenging enzyme activities. Other abbreviations are the same as in Fig. 1. <sup>a)</sup>Significantly different from the control (\*p<0.05, \*\*\*p<0.001). □; Control ▨; 3 days ■; 5 days.

감소되었다. 그리고 GST 활성은 톨루엔의 피부도포 3일, 5일째에 대조군에 비하여 각각 15%, 13% 감소되는 경향을 보였다. 특히 CAT 활성은 톨루엔의 피부도포 3, 5일째에 대조군에 비하여 각각 69%(p<0.001), 63%(p<0.001)의 현저한 감소를 보였다.

2. 피부조직의 BADH 및 BALDH 활성

실험동물의 피부에 톨루엔을 도포하는 동안 피부조직의 BADH 및 BALDH의 활성변동을 관찰한 성적이 Fig. 3이다. 대조군에 비하여 톨루엔 3일 도포군은 약 55%(p<0.001), 5일 도포군은 85%(p<0.001)의 급격한 감소를 보였다. 그러나 BALDH 활성은 대조군과 실험군 모두 대단히 낮은 정도(trace)의 활성치만 측정되었다(Fig. 3).



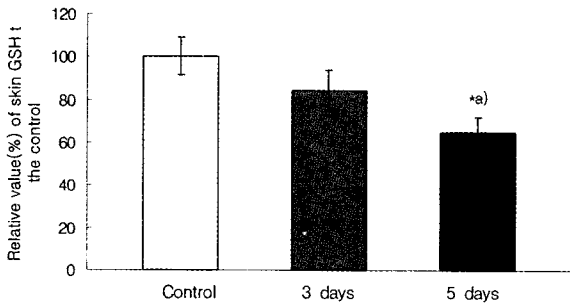
**Fig. 3.** Effect of the toluene application to rat skin on cutaneous BADH and BALDH activities.

Other abbreviations are the same as in Fig. 1.

<sup>a)</sup>Significantly different from the control (\*\*\*) $p < 0.001$ .

<sup>b)</sup>Significantly different from the 3 days toluene-treated group (\*\*\*) $p < 0.001$ .

□; Control ▤; 3 days ■; 5 days.



**Fig. 4.** Effect of toluene application to rat skin on cutaneous GSH content other abbreviations are the same as in Fig. 1.

<sup>a)</sup>Significantly different from the control (\* $p < 0.05$ ).

□; Control ▤; 3 days ■; 5 days.

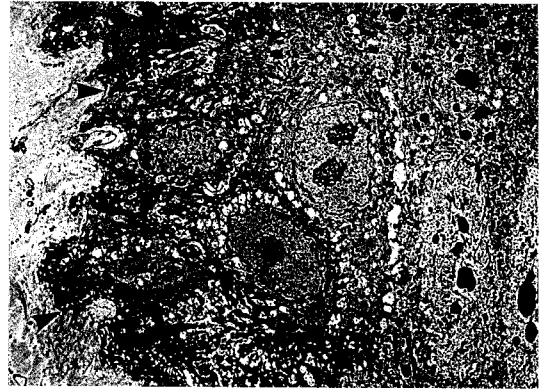
### 3. 피부조직의 GSH 함량

흰쥐에 톨루엔 도포시 피부조직의 GSH 함량 변동을 나타낸 것이 Fig. 4이다. 톨루엔 도포 3일째 GSH의 함량은 대조군에 비하여 약 16% 감소되는 경향을 보였으며, 5일째에는 약 35% ( $p < 0.05$ )의 유의한 감소를 보였다.

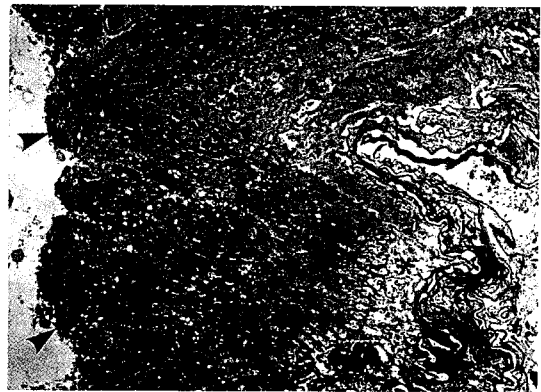
### 4. 흰쥐 피부조직의 미세구조적 변화

대조군과 톨루엔을 도포한 실험군의 피부조직 미세구조 변화를 관찰한 것이 Fig. 5와 6이다.

대조군의 표피층은 3~4층의 세포들로 구성되어 있었으며, 상피세포는 기저막을 경계로 진피층과 잘 결합된 모습이였다. 표피층의 기저세포는 입방형으로 관찰되었고, 과립층 세포들은 편평형으로 관찰되었다. 상피세포의 세포간 연결구조로는 부착반점(desmosome)의 형성이 뚜렷하였는데, 기저막과 접한 기저세포를 제외하고는 모두 돌기구조로 인접세포와 연결을 형성하였고 그 연결부에는 부착반



**Fig. 5.** Normal group (routine electron microscopy, uranyl acetate and lead citrate stain, original mag.  $\times 2,000$ ): The cel structure was intact. Epidermal epithelium consists of 3~4 layers, and basal epithelial cells adhered with adjacent cells by desmosome. arrowheads : basement membrane.



**Fig. 6.** At 5 days group after toluene application (routine electron microscopy, uranyl acetate and lead citrate stain, original mag.  $\times 3,000$ ): Epidermal basement membrane was disrupted (arrowhead), intercellular adhesions were rare, and degeneration of keratin layer was noted (\*). K : keratin.

점이 잘 발달되어 있다(Fig. 5).

톨루엔 도포 5일군은 상피세포층의 기저막 탈락으로 진피층과 결합하지 못한 부분이 여러 부위에서 관찰되었으며, 자유면의 케라틴층은 심한 변동으로 층상구조를 이루지 못하고 심하게 굴곡된 형태를 보였다. 또한 층상구조가 남아 있는 부분이라도 성분의 변성으로 인해 전자밀도가 낮은 포말상으로 관찰되었다. 표피층의 상피세포들은 층의 구분이 불명확하였고, 세포간의 연결형성부전이 관찰되었다(Fig. 6).

### 5. 피부조직의 세포화학적 변화

대조군과 톨루엔을 도포한 실험군의 피부조직 세포화학적 변화를 관찰한 것이 Fig. 7와 8이다.

대조군은  $H_2O_2$  반응산물인 cerrous perhydroxide 과립

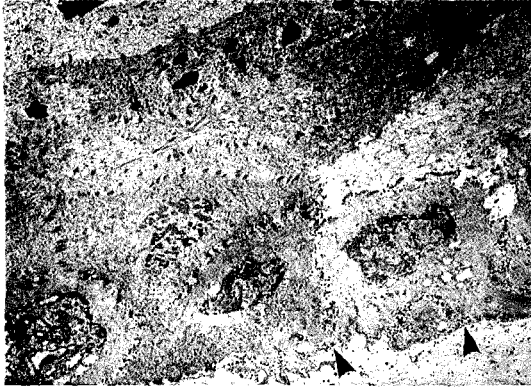


Fig. 7. Normal group (cytochemical electron microscopy, uranyl acetate stain, original mag.  $\times 4,000$ ) : Deposit of cerrous perhydroxide reacted with  $H_2O_2$  was found in the intercellular space of basal cells.

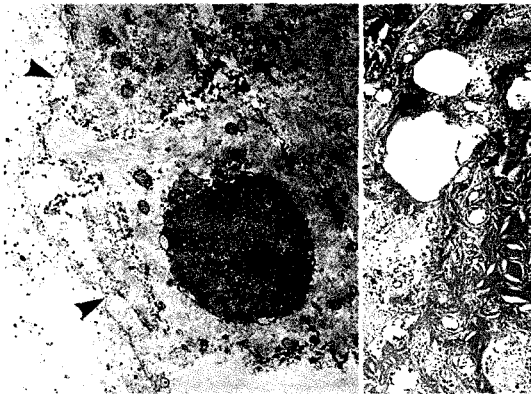


Fig. 8. At 5 days group after toluene application (cytochemical electron microscopy, uranyl acetate stain, original mag. left  $\times 6,000$ , right  $\times 3,500$ ) : Deposit of cerrous perhydroxide was found as a tangled shape in the intercellular space of epithelial cells, in their cytoplasm, and near the basement membrane (left), and in the keratin layer (right). arrowheads : basement membrane, K : keratin.

들이 기저막에 연한 기저세포의 세포간질 부분에 한정적으로 분포되어 있었으나, 반응양상은 약하였다(Fig. 7).

Toluene 도포 5일군은 전체 기저층의 세포간질 부분과 기저막 주변에 매우 많은 반응 과립들이 분포하였고, 케라틴이 변성된 부분에도 강하게 반응되어 나타났다(Fig. 8).

#### IV. 고 찰

내·외인적 요인에 의하여 생성된 친전자성 물질을 포함하는 free radical 들은 체내에서 여러 가지 독작용을 유발하는 것으로 알려져 있으며 해독기구의 작용으로 무독화(Lesko *et al.*, 1980; Venkatasubramian and Joseph, 1977)된다. Xenobiotics가 인체에 폭로시 이들 xenobiotics의 대사산물 뿐만 아니라 대사과정에서 생성되는 oxygen free radical에 의해서도 세포의 손상이 초래된다고 한다

(Halliwell, 1987; Freeman and Crapo, 1982).

한편, oxygen free radical이 피부질환의 유발에도 관여한다는 보고(Barbara and Mark, 1990; Mattia *et al.*, 1991)와 톨루엔을 실험동물에 투여시 간조직에서 oxygen free radical 생성효소 활성이 유도된다는 보고(차 등, 1998; 전 등, 1995)를 종합해 볼 때, 실험동물의 피부에 톨루엔 도포시 oxygen free radical의 대사변동이 초래될 것으로 생각된다. 그리고 피부에 톨루엔을 폭로시 흡수속도가 빠른 것으로 알려져 있으나(김 등, 1996) 5일 동안 매일 1회씩 톨루엔을 도포함으로써 피부조직이 본 유기용제의 조직내 지속적인 유지율이 oxygen free radical에 의한 피부 손상에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 그러므로 실험동물에 톨루엔 도포시 oxygen free radical에 의한 피부조직 상해여부를 관찰코저 이들 효소활성변동을 중심으로 검토하였다. 본 실험에서 실험동물의 피부에 toluene 도포시 oxygen free radical의 일종인 superoxide 생성에 관여하는 XO 활성(Battlei *et al.*, 1973; Granger and Parks, 1983)과 CYP 함량(Freeman and Crapo, 1982; Trush *et al.*, 1982)이 toluene을 5일간 도포한 경우에 톨루엔을 도포하지 않은 대조군에 비하여 모두 증가를 보였다. 이러한 결과는 피부에 톨루엔을 도포함으로써 피부조직 자체에서도 benzylalcohol의 생성이 유도됨을 암시해주고 있다. 한편 톨루엔 도포 실험기간동안 benzylalcohol dehydrogenase 활성은 감소되었으며, benzaldehyde dehydrogenase 활성은 거의 측정할 수 없을 정도의 낮은 활성치를 나타내었다. 류 등(1999)은 흰쥐에 톨루엔 투여시 간조직 중 benzylalcohol 또는 benzaldehyde dehydrogenase의 활성이 오히려 억제되며 이는 benzaldehyde가 효소활성을 직접적으로 억제시켜 나타난 결과로 이들 효소활성의 억제 정도가 benzaldehyde 생성을 증가의 지표가 될 수 있다고 보고하였다. 따라서 본 실험조건에서 피부조직에 superoxide와 더불어 benzaldehyde가 피부조직에 축적될 것임을 시사해 주고 있다.

이러한 실험 조건하에서 과량으로 생성되어진 oxygen free radical은 해독계의 활성 변동에 따라 생체세포 상해를 유발할 것으로 생각되어 oxygen free radical 해독계인 SOD, CAT, GPx, GST의 활성변동을 피부조직에서 측정 한 결과, 톨루엔 도포 5일째에 GST를 제외한 SOD, CAT, GPx 활성이 대조군에 비하여 모두 유의하게 감소되었다. 특히 oxygen free radical 중  $H_2O_2$  해독에 관여하는 CAT의 활성은 톨루엔 도포 전체 실험기간 동안 대조군에 비하여 현저한 감소를 보였고, free radical의 해독에 관여하며  $H_2O_2$  해독의 검색지표로도 이용되는 GSH 함량(Atlas and Nebert, 1976)이 현저히 감소되고 있어 피부조직에 oxygen free radical이 축적되고 있음을 암시해 주고 있다. 그리고 피부조직의 전자현미경적 미세구조 변화와 조직화학적 실험을 통하여 검토한 결과 톨루엔의 피부 도포에 의

해 상피세포 기저막의 탈락, 세포연접의 현성 부전 및 케라틴층의 변성이 관찰되었으며, 조직화학적 관찰에서  $H_2O_2$ 의 반응산물인 cerrous perhydroxide의 분포(Cho *et al.*, 1997)가 기저막 극변부와 상피세포간질 및 케라틴층에서 밀집되고 있어 톨루엔에 의한 피부손상은  $H_2O_2$ 와 benzaldehyde에 의해서 유도된 산화적 손상 때문임을 강력히 시사하고 있다.

이상 실험결과와 문헌상의 지견들을 종합해 볼 때 실험동물의 피부에 톨루엔 도포시 oxygen free radical의 생성 및 해독기구의 불균형으로 야기된 과도한  $H_2O_2$ 에 의해서 피부조직의 미세구조변화가 야기되며 피부조직손상이 초래된 것으로 생각된다.

## V. 요약 및 결론

톨루엔의 피부도포에 의한 피부 독성 여부를 검토하기 위하여 흰쥐 피부에 톨루엔( $35 \text{ mg/cm}^2$ )을 5일간 연속 도포하였으며, 톨루엔 도포 3일 및 5일째 실험동물을 처치한 다음 피부조직을 절취하여 피부조직의 미세구조적변화와 세포화학적 방법으로 조직손상을 관찰하였으며 이와 동시에 oxygen free radical 대사관련효소와 톨루엔 대사 효소의 활성도를 측정하여 상호비교 검토하였다.

피부에 톨루엔 도포 5일째에 피부조직의 xanthine oxidase 활성이 유의하게( $p < 0.05$ ) 증가되었으며, cytochrom p450 함량은 증가되는 경향을 보였으나 superoxide dismutase, glutathine peroxidase 및 catalase의 활성은 유의한( $p < 0.001$ ) 감소를 보였다. 그리고 피부조직의 glutathine 함량 역시 톨루엔 피부 도포시 실험기간에 따라 감소하였으며, 5일째 대조군에 비하여 유의한 감소( $p < 0.05$ )를 나타내었다. 한편, 피부조직의 benzalcohol dehydrogenase 활성은 toluene 도포 3 및 5일째에 현저한 감소( $p < 0.001$ )를 나타내었으며, benzaldehyde dehydrogenase 활성은 대조군 및 toluene 도포군 모두 대단히 낮은 정도의 활성을 보였다. 톨루엔 도포 5일째 피부조직의 기저막이 탈락되었고 케라틴층이 심한 변성을 나타내는 미세구조 변화가 나타났으며, 세포화학적 소견에서는  $H_2O_2$ 의 반응산물인 cerrous perhydroxide 과립이 기저층 부분에서 많이 분포되었다.

이상 실험결과를 종합해 볼 때 실험동물 피부에 톨루엔 도포시 oxygen free radical의 생성 및 해독기구의 불균형으로 야기된 과도한  $H_2O_2$ 에 의하여 피부조직의 미세구조 변화에 따른 피부조직손상이 초래된 것으로 생각된다.

## 참고문헌

Aebi, H. (1974): Catalase in "Methods of Enzymatic Analysis." ed. H.U. Bergmeyer, Vol. 2, pp. 673-684,

- Academic Press, New York.
- Atals, S.A. and Nebert, D.W. (1976): Pharmacogenetics and human disease. In "Drug metabolism from Microbe to Man" (D.V. Parke and R.L. Smith., eds.), 99, 393-430. Taylor and Francis, London.
- Barbara, C.P. and Mark, P.N. (1990): Effect of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase and xanthine oxidase in hairless mice. *J. Invest. Dermatol.*, 95, 213-216.
- Bergmeyer, H.U. (1974): Methods of Enzymatic Analysis. New York, Academic Press.
- Boor, J.W. and Hurtig, H.I. (1977): Persistent cerebellar ataxia after exposure to toluene. *Ann. Neurol.*, 2, 440-442.
- Cha, S.E., Jeon, T.W. and Yoon, C.G. (1998): Effect of toluene or ethanol pretreatment on toluene metabolism in rats. *Korean Ind. Hyg. Assoc. J.*, 8(2), 296-305.
- Cho, H.G., Lee, Y.M. and Park, W.H. (1997): Morphological study of acute lung injury induced by interleukin-1 $\alpha$  intratracheally in young and old rats. *Korean J. Biomed. Lab. Sci.*, 3(2), 139-150.
- Cohr, K.H. and Stockholm, J. (1979): Toluene. A toxicologic review. *Scand. J. Work. Environ. Health.*, b, 71-90.
- Degertekin, H., Akdamar, K., Tates, R., Chen, I., Ertan, A. and Vaupel, R. (1986): Right and electron microscopic studies of diet induced hepatic changes in mice. *Acta. Anat.*, 125, 174-179.
- Ellenhorn, M.J. and Barceloux, D.G. (1988): Medical toxicology. Elsevier Science Publishing Company, USA, pp. 959-963.
- Ellman, G.L. (1959): Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70-77.
- Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1982): Biology of disease : Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47, 412-426.
- Grossrau, R., Frederiks, W.M. and Noorden, C.J. (1990): Histochemistry of reactive oxygen-species (ROS)-generating oxidase in cutaneous and mucous epithelia of laboratory rodents with special reference to xanthine oxidase. *Histochemistry*, 94(5), 539-544.
- Habig, W.H., Pabist, M.J. and Jakoby, W.B. (1974): Glutathione S-transferase : The first enzymatic step in mercapturic and formation. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139.
- Halliwell, B. (1987): Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.*, 1(5), 358-364.
- Han, S.I., Jeon, T.W. and Yoon, C.G. (2000): Effect of occlusion on the activities of dermal xanthine oxidase in rats. *Korean. J. Biomed. Lab. Sci.*, 6(1), 37-43.
- Jeon, T.W., Kang, H.Y. and Yoon, C.G. (1995): Effect of toluene administration on the activity of serum xanthine oxidase in rats. *Korean. J. Toxicol.*, 11(2), 279-

- 288.
- Lam, C.W., Galen, T.J., Boyd, J.F. and Pierson, D.L. (1990): Mechanism of transport and distribution of organic solvents in blood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **104**(1), 117-129.
- Langman, J.M. (1994): Xylene: its toxicity, measurement of exposure levels, absorption, Metabolism and clearance. *Pathology*, **26**(3), 301-309.
- Lesko, S.A., Lorentzem, R.J. and Ts'o, P.O.P (1980): Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission. *Biochemistry*, **19**, 3023-3028.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Martin, J.P., Dailey, M. and Sugarman, E. (1987): Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autooxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **255**, 329-336.
- Mathias, C.G. and Morrison, J.H. (1988): Occupational skin disease, United states Results from the Bureau of Labor Statistics annual survey of occupational injuries and illness. *Arch. Dermatol.*, **124**(10), 1519-1524.
- Mattia, C.J., Adams, J.D. Jr. and Bondy, S.C. (1993): Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem. Pharmacol.*, **46**(1), 103-110.
- Morris, R.J. (1989): Toluene and hepatotoxicity. *J. Occup. Environ. Med.*, **31**(12), 1014-1015.
- 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.
- Paglia, E.D. and Valentine, W.N. (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158-169.
- Rees, D.C., Knisely, J.S. and Jordan, S. (1987): Discriminative stimulus properties of toluene in the mouse. *Toxicol. App. Pharmacol.*, **88**, 97-104.
- 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.
- Ryu, J.H., Yoon, C.G. and Shin, J.K. (1999): Effect of circadian rhythms on the toluene metabolism in rats. *Koreas. J. Biomed. Lab. Sci.* **5**(1), 67-77.
- Scheffler, W.C. (1980): Statistics for the biological sciences. pp. 84-89, Addison-Wesley Co., USA.
- Stachow, C.S., Stevenson, I.L. and Day, D.D. (1967): Purification and properties of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific benzaldehyde dehydrogenase from pseudomonas. *J. Biol. Chem.*, **242**, 5294-530.
- Stirpe, F. and Della Corte, E. (1969): The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855-3863.
- Toftgard, R., Nilsen, O.G. and Gustafsson, J.A. (1982): Dose dependent induction of rat liver microsomal cytochrome P-450 and microsomal enzymatic activities after inhalation of toluene and dichloromethane. *Acta Pharmacol. Toxicol. Copenhagen*, **51**(2), 108-114.
- Venkatasubramian, K. and Joseph, K.T. (1977): Action of singlet oxygen on collagen. *Indian J. Biochem. Biophys.*, **14**, 217-220.
- Vidrio, H., Magos, G.A. and Lorenzana-Jimenez, M. (1986): Electrocardiographic effects of toluene in the anesthetized rat. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **279**(1), 121-129.
- Yoon, C.G., Lee, M.K. and Lee, S.I. (1998): Effect of growth on the enzyme activities of oxygen free radical generating and scavenging system in CCl<sub>4</sub>-treated rats. *Kor. J. Gerontol.*, **8**(1), 35-42.
- 김현영, 유일재, 정용현(1996): 유기용제의 피부 흡수속도 연구. 산업보건연구원, 한국산업안전공단.