

흰쥐의 피부조직에 있어서 Cyclohexane의 독성

전태원* · 조현국** · 윤종국†

계명대학교 공중보건학과,

*(재)경북테크노파크 경산대학교 한방생명자원특화센터 효능검증원,

**경운대학교 안경광학과

Effect of Cyclohexane Application to Rat Skin on the Skin Toxicity

Tae Won Jeon* · Hyun Gug Cho** · Chong Guk Yoon†

Dept. of Public Health, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

*Efficacy and Safety Research Center for Traditional Oriental Medicines, Kyungsan University,
Kyongbuk Technopark, Daegu 706-060, Korea

**Dept. of Visual Optics, Kyungwoon University, Kyongbuk 716-820, Korea,

ABSTRACT

To evaluate the skin toxicity of topical cyclohexane application ($25\text{mg}/\text{cm}^2$) was sequentially applied to the rat skin for four days. On the histopathological findings in the light micrographs, neutrophils and engulfed neutrophils are seen, and many cytoplasmic processes were appeared in proliferated layer whereas in the dermis area, increased numbers of fibroblast, accumulation of neutrophil and lipid droplets are demonstrated. On the other hand, applying the cyclohexane to the rat skin led to the remarkable rise of cutaneous xanthine oxidase activity and similar activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase and glutathione content and declined activity of glutathione S-transferase compared with control group. Especially the remarkably decreased activity of aniline hydroxylase (AH) was appeared in skin as little as scarcely determined. Furthermore, the applying the cyclohexane to skin led to the significantly increased activity of hepatic AH and alcohol dehydrogenase. These results indicate that oxygen free radical and intermediate metabolite of cyclohexane may be responsible for structural changes in skin by cyclohexane application to rat skin.

Keywords: Cyclohexane, Skin, Oxygen free radical, Rat, Cyclohexane metabolizing enzyme, Morphological changes in skin.

I. 서 론

최근 산업발전에 의한 피부질환이 기계적 찰과상, 물리·화학적 요인들에 의하여 초래되고 있다¹⁾. 이들 피부질환을 야기시키는 유해요인 중 피부노출 정도가 심한 산업장 또는 환경오염이 심한 생활공간 내에서 화학물질에 노출됨으로써

발생되는 직업병 및 공해병 관련 피부질환은 사회적 문제로 제기되고 있는 실정이다. 이들 화학물질에는 산, 알칼리 및 유기용제 등이 있으며²⁾ 이 중 유기용제의 경피흡수는 호흡기 또는 경구흡수와 같이 생체 내 화학물질의 흡수영향을 지각하기 용이하지 않기 때문에 상대적으로 소홀히 취급하고 있다³⁾. 또한 산업장에서 유기용제로 많이 사용되는 지환족 화합물뿐만 아니라 벤젠계 화합물이 피부질환을 야기시키는 것을 간과할 수 없다²⁾.

† Corresponding author : Keimyung University
Tel : 053) 580-5230, fax : 053)580-5164,
Email : jky446@kmu.ac.kr

최근 채 등⁴⁾은 실험동물에 산업장에서 유기용제로 많이 사용되고 있는 toluene을 도포할 때 피부조직의 손상이 야기된다고 보고하였다. 또한 이들 산업화학물질 중 cyclohexane은 n-hexane과 benzene의 대체물질로 라커와 수지 및 페인트의 용매뿐만 아니라 세정제로도 널리 사용되고 있는 지환족이며, 유기합성의 중간 생성물질로서⁵⁻⁷⁾ 인체에 폭로할 때 피부의 염증반응⁸⁾, 위장⁹⁾, 신장¹⁰⁾ 및 신경계¹¹⁾의 장애를 유발시킨다는 보고가 있다. 생체에 흡수된 cyclohexane은 microsomal cytochrome P450 dependent monooxygenase에 의하여 cyclohexanol로 대사되고, 일부는 β -glucuronide 형태로 포함되어 소변 중에 배설되며, 나머지는 alcohol dehydrogenase에 의해서 중간대사산물인 cyclohexanone으로 산화되기도 한다¹⁴⁾. 이와 같이 cyclohexane의 대사과정 중 생성된 cyclohexanol 및 cyclohexanone은 생체 내 독성작용을 유발한다고 한다^{14,15)}. 그리고 유기용제와 같은 xenobiotics가 생체 내 대사될 때, 이들의 대사산물의 연쇄적인 반응에서 생성된 oxygen free radical^{4,16)}과 더불어 xenobiotics의 중간대사산물이 조직세포에서 독성을 유발한다고 한다¹⁷⁾. 따라서 cyclohexane을 피부에 도포한 경우에 cyclohexane 및 이의 대사산물과 oxygen free radical에 의한 피부조직의 병태생리적 반응이 일어날 것으로 생각되며 이에 대한 연구는 산업위생의 기초자료 제시에 의의가 있을 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서는 cyclohexane이 피부조직에 미치는 영향을 검토하기 위하여 cyclohexane의 일정량을 흰쥐 피부에 도포한 다음 피부조직의 손상정도를 광학 및 전자현미경으로 관찰하고 이때 피부조직의 형태학적 변화기전을 규명하고자 피부조직의 cyclohexane 대사 효소 활성을 간조직과 비교 관찰하고 피부조직 중 oxygen free radical 대사에 관여하는 효소 활성을 측정하여 이들 실험결과를 상호비교 검토하였다.

II. 연구방법

1. 동물사육 및 처치

실험동물은 체중 200 ± 10 g되는 건강한 Sprague-Dawley 종의 숫컷 흰쥐를 대한실험동물센터로부터 구입한 후 사육실(온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$)에서 일주일간 적응시켜 실험에 사용하였다. 각 실험군은 대조군, cyclohexane 도포군으로 각각 8마리씩 분리수용하였으며 실험기간 동안 물과 사료(삼양사)의 양은 제한 없이 공급하였다. Cyclohexane 도포군은 동물의 복부털을 제거하여 cyclohexane을 피부 cm^2 당 25 mg을 1일 1회 2일 간격으로 4회 도포하였다. 그리고 cyclohexane의 휘발을 방지하기 위하여 채 등⁴⁾의 방법에 준하여 O-ring 형 유리관(내경 46 mm, 높이 15 mm)을 cyclohexane 도포 전에 부착시킨 후 제모한 부위에 cyclohexane을 완전히 흡수시킨 후 떼 내었다. 대조군은 동일한 부위에 털을 제모하고 cyclohexane을 도포하지 않은 채 O-ring관만 처리하였다.

동물의 처치는 효소활성의 일 중 변동을 고려하여 일정시간(AM 10)에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였다. Ether 마취 하에 개복한 후 복부대동맥으로부터 채혈하고 간문맥을 통해 4°C 생리식염수로 관류하여 조직 내에 남아있는 혈액을 제거한 다음, 간을 적출하였으며 피부조직(표피, 진피 포함)도 적출하였다.

2. 효소시료 조제

적출한 피부 및 간조직의 일부를 취하여 4배량의 0.25M sucrose 용액을 가하여 빙냉하에 biohomogenizer를 이용하여 20% (w/v) 마쇄균질액을 만들었다. 이 마쇄균질액은 $600 \times \text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음, 상정액을 $10,000 \times \text{g}$ 에서 20분간 원심분리한 후 mitochondria 분획을 얻고, 그 상정액 $105,000 \times \text{g}$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여

cytosol 분획과 microsome 분획을 분리하였다. 가용성 분획은 xanthine oxidase (XO), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), alcohol dehydrogenase (ADH) 활성측정에 사용하였으며, mitochondria 분획은 catalase 활성 측정, microsome 분획은 cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase (CYPdAH) 활성 측정에 사용하였다. 한편 마쇄균질액은 glutathione (GSH) 함량 측정용 시료로 사용하였다.

3. 효소활성 측정

피부 및 간조직의 ADH 활성은 기질인 ethanol과 조효소인 NAD가 반응하여 생성되는 NADH를 측정하는 Bergmeyer 방법¹⁸⁾, microsomal CYPdAH 활성은 aniline을 기질로 하여 생성되는 p-aminophenol을 측정하는 Bidlack과 Lowery 방법¹⁹⁾, GPx 활성은 기질인 과산화수소의 제거에 이용된 산화형 glutathione을 환원시키는데 필요한 NADPH의 함량을 측정하는 Paglia와 Valetine의 방법²⁰⁾, GST는 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione의 포함정도를 측정하는 Habig 등의 방법²¹⁾, XO 활성은 기질인 xanthine으로부터 생성되는 요산의 함량을 측정하는 Stripe과 Della Corte의 방법²²⁾에 준하였다. 그리고 SOD 활성은 hematoxylin 자동산화의 억제정도를 측정하는 Martin 등의 방법²³⁾에 준하였다. 효소액 중 단백질 정량은 Lowry 등의 방법²⁴⁾에 의하여 측정하였다.

4. Reduced GSH 함량 측정

피부조직 중 GSH 함량은 조직 마쇄균질액 일정량에 4% sulfosalicylic acid를 넣고 원심분리한 후 상층액 일정량을 0.1mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 함유 0.1M sodium

phosphate buffer (pH 8.0)에 넣고 생성된 p-nitrothiophenol을 측정하는 Ellman의 방법²⁵⁾에 준하였다. GSH 함량은 조직 g당 μ mole로 표시하였다.

5. 광학현미경 관찰

피부조직의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 대조군, cyclohexane 피부도포군에서 적출한 흰쥐의 피부를 즉시 10% neutral buffered formalin액에 고정하고, 고정이 끝난 조직을 흐르는 물에 수세한 후 순차적으로 증가되는 농도 순서에 따라 alcohol로 탈수하여 paraffin에 포매하였다. 포매된 조직을 4 μ m 두께로 절편한 다음, hematoxylin-eosin으로 염색한 후 광학현미경 (Olympus, BH-2)으로 관찰하였다.

6. 전자현미경 관찰

전자현미경적 관찰을 위하여 대조군, cyclohexane 도포군에서 적출한 피부조직을 적출 즉시 1mm³ 크기로 세절하고, 2.5% glutaraldehyde (0.1M phosphate buffer, pH 7.4)로 고정한 다음 전고정이 끝난 조직을 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)로 수세한 후 1% osmium tetroxide (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)로 1시간 동안 후고정하였다. Alcohol-propylene oxide 계열로 순차적으로 증가하는 농도에 따라 탈수한 다음, epoxy resin에 포매하였다. 포매된 조직은 열중합시키고 60~70 nm로 초박절편한 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후 투과전자현미경 (Hitachi, H-600)으로 관찰하였다.

7. 결과의 통계처리

실험결과의 통계처리는 Student's t-test²⁶⁾로 하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 피부조직의 형태학적 변화

산업화학물질의 체내 흡수경로 중 경피흡수의 경우 피부에 직접 손상을 야기시킨다는 보고²⁷⁾가 있으며, 또한 toluene과 같은 유기용제를 피부에 도포시킬 경우 피부조직에 있어서 상피층과 케라틴층에 심한 변화가 야기된다는 보고⁴⁾가 있다. 특히 노동부 고시²⁸⁾ 및 미국 ACGIH²⁹⁾에서 cyclohexane이 허용농도에 첨부하는 피부(skin) 표시를 하는 유해물질인 점을 고려해 볼 때 cyclohexane이 피부에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 우선 cyclohexane을 흰쥐 피부에 도포시킨 후 형태학적인 관찰을 시도해본 바, 광학현미경 관찰에서 대조군(Fig. 1a)은 정상적인 구조를 보였으나 cyclohexane 도포군(Fig. 1b-1, 1b-2)은 상피는 진피층 내의 염증반응으로 탈락되고 염증병소 아래로 새로운 상피층의 증식이 관찰되었다. 그리고 증식된 상피층 아래의 진피층 내에서는 부분적인 출혈부위가 관찰되었다. 또한 광학현미경적 관찰에서 나타난 피부도포 실험군의 변화를 염증으로 인한 상피탈락 부위 그리고 상피증식 부위와 진피 형성부위 세 영역으로 나누어 미세구조의 변화를 관찰하였다. 일부 진피층과 함께 탈락되는 상피층 아래의 염증병소(Fig. 2a)에서는 탐식물을 세포 내에 함유한 호중구, 적혈구 및 삼출물로 형성된 급성 염증 소견을 보였다. 염증병소 아래의 새로운 상피층이 형성되는 부분(Fig. 2b)에서는 세포간질로 많은 돌기를 가진 입방형 또는 편평형의 세포들이 7-8층으로 증식되었고, 세포간의 결합은 desmosome에 의해 정상적인 모습을 보였으나 keratohyaline 과립을 생성하는 과립층과 keratin의 형성은 잘 이루어지지 않았다. 새로운 상피층이 증식된 아래의 진피 내에는(Fig. 2c) 섬유모세포의 수가 증가되었고, 호중구의 침윤이

여러 곳에서 관찰되었으며 부분적으로(Fig. 2d) 섬유모 세포의 주변부에 크고 작은 많은 지방소체들이 관찰되었다.

이상 실험결과를 종합해 볼 때 cyclohexane을 피부조직에 7일간 도포한 경우에 광학현미경 및 전자현미경 하에서 피부조직의 심한 염증반응이 초래됨을 시사해주고 있다.

2. 피부 및 간조직의 cyclohexane 대사 효소 활성 비교

피부조직에서도 xenobiotics의 대사가 미약하나 어느 정도 이루어진다고 한다³⁰⁾. 또한 채등⁴⁾은 toluene을 피부에 도포하는 경우에 toluene 대사물질이 피부조직의 손상에 영향을 미침을 보고하였다. 따라서 cyclohexane을 피부에 도포할 때, 피부조직의 형태학적 변화가 cyclohexane 대사산물에 기인될 것이라는 점을 배제할 수 없기 때문에 피부조직에 있어서 cyclohexane 대사에 관여하는 효소활성을 본 실험조건에서 측정하였다.

Cyclohexane은 체내에 microsomal cytochrome P450에 의해서 cyclohexanol로 변화되며 이는 ADH에 의해서 cyclohexanone으로 변화된다¹²⁻¹⁴⁾. 이때 cyclohexanol 및 cyclohexanone은 조직세포상해를 유발한다고 한다^{14,15)}. 그리고 이들 cyclohexane 대사중간 생성물질의 생성율은 cytochrome P450 및 ADH 활성에 좌우되기 때문에³¹⁾ CYPdAH 활성³²⁾과 ADH 활성을 피부 및 간조직 중에서 측정 한 것이 Fig. 3과 같다.

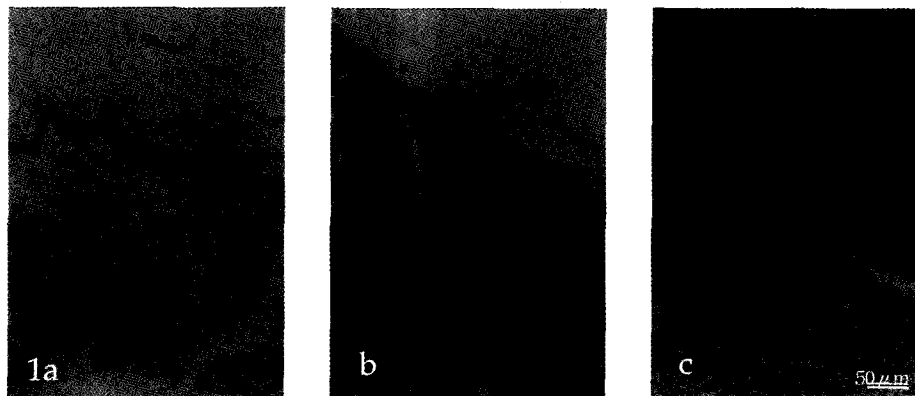


Fig. 1. Photographs of skin tissue in rats, H&E stain. (a) Normal group; The epithelium was composed of stratum basale, stratum granulosum, and stratum corneum. $\times 200$, K: keratin, E: epithelium, D: dermis. (b&c) Cyclohexane application; The skin structure was clearly divided into three zones. Zone A showed infiltration of inflammatory cells (*), epithelium with a few dermal connective tissue is left out, because of inflammation. Under the inflammatory zone, proliferation of new epithelial layers (Zone B) was observed. In the dermal tissue (Zone C), local hemorrhage and inflammatory accumulation were observed. $\times 200$.

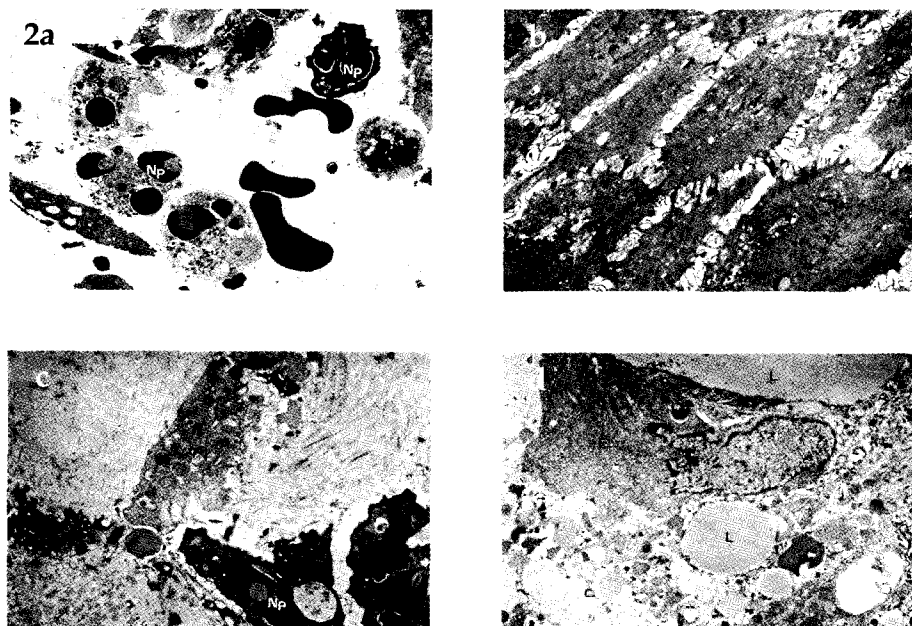


Fig. 2. Electron micrographs of zone A, B, C of figure 1, uranyl acetate and lead citrate stain. (a) Zone A was acute inflammatory area, which showed neutrophils, engulfed neutrophils, other cells and debris. $\times 3,500$, Np: neutrophil. (b) Cuboidal and squamous cells were proliferated to 7~8 layers. Most of cells have many cytoplasmic processes, which adhered with latter layer by desmosomes. $\times 3,500$. (c) and (d) Fibroblast was increased, and showed accumulation of neutrophils and lipid droplets in the dermal tissue. $\times 4,000$, F: fibroblast, Np: neutrophil, L: lipid.

피부조직에 있어서 CYPdAH 활성은 극소량이 측정되었으며, 간조직에 있어서 cyclohexane 도포군이 8.15 ± 0.83 unit로서 대조군 (5.25 ± 0.49)에 비해서 약 55% 유의한 증가를 보였다. 한편 ADH 활성은 피부조직에서는 cyclohexane 도포군이 3.06 ± 0.49 unit로서 대조군 (4.08 ± 0.45)에 비해서 약 25% 감소되는 경향을 보였으나 간조직에서는 cyclohexane 도포군이 22.07 ± 1.45 unit로서 대조군 (20.01 ± 1.75)에 비해서 약 10% 증가하는 경향을 보였다.

최근 김 등³³⁾은 유기용제의 피부흡수속도가 매우 빠르며 피부가 유기용제에 직접 접촉될 경우 신체의 표피인 각질층을 통하여 많은 양이 급속히 체내에 흡수된다고 하였다. 따라서 이러한 보고와 본 실험결과로 보아 cyclohexane을 피부에 도포 시에 간조직으로 cyclohexane이 급속히 분포되어 간조직에서 대사되는 동안 대사중간생성물질이 전신순환계로 분포되어 피부조직으로 재

분포될 가능성이 있을 것으로 생각된다.

전 등³⁴⁾은 복강으로 cyclohexane을 투여할 때 폐조직 손상이 초래되며 이때 폐조직에서 cyclohexane 대사효소활성이 낮게 나타난다고 하였다. 따라서 간조직에서 cyclohexane이 대사되는 동안 cyclohexane의 중간대사산물이 폐조직 뿐만 아니라 이외 타조직인 피부조직에도 영향을 미칠 것임을 배제할 수 없다.

더욱이 본 실험에서 피부조직에 있어서 CYPdAH 활성이 극미소량으로 측정되는 점은 cyclohexane이 대사되기 전에 간조직으로 이행될 것임을 시사해 주고 있다. 또한 피부에 도포할 때 대사전 유기용제에 의해서도 피부손상이 야기된다고 한다³⁵⁾. 따라서 피부에 cyclohexane을 도포할 때 피부조직에 있어서 형태학적 변화는 간조직에서 이행된 cyclohexane의 대사중간생성물질 및 cyclohexane 자체에 기인되어 나타날 것으로 생각된다.

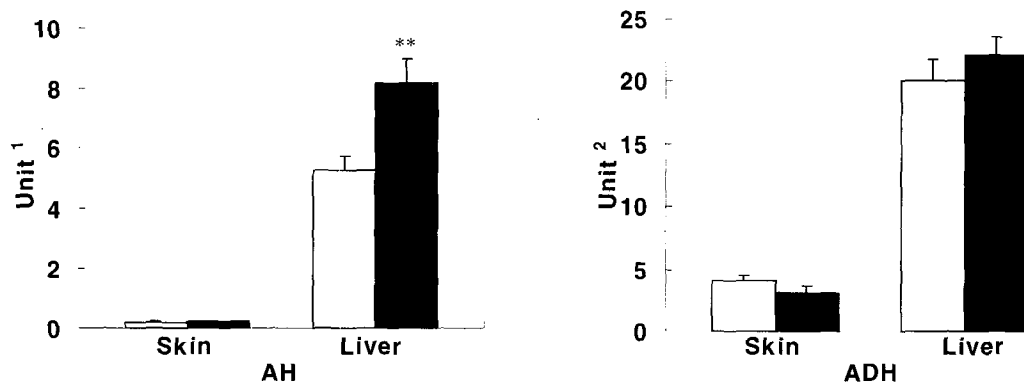


Fig. 3. Comparison of skin to liver in aniline hydroxylase (CYPdAH) and alcohol dehydrogenase (ADH) activities of cyclohexane-treated rats. Each bar represents the mean \pm S.E. of 8 rats. ¹ nmoles *p*-aminophenol/mg protein/hr, ² nmoles NADH/mg protein/min. Significantly different from each control (**; $p < 0.01$). Keys: (□) control and (■) cyclohexane.

Toluene과 같은 유기용제를 실험동물의 피부에 도포할 때에 피부조직의 손상이 oxygen free radical에 의하여 야기된다는 보고⁴⁾가 있다. 따라서 cyclohexane을 실험동물 피부에 도포할 때에 oxygen free radical 대사효소를 측정하는 것이 의의가 있을 것으로 생각되어 본 실험에서 이들 효소활성을 측정하여 대조군에 대한 백분율로 표시한 것이 Fig. 4와 같다.

피부조직 중 유해산소 생성계 효소인 CYPdAH 활성³⁵⁾은 대조군과 별다른 차이를 볼 수 없었으나 XO 활성³⁶⁾은 cyclohexane 도포군이 대조군에 비해서 약 63% 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였다. 일반적으로 조직의 손상은 free radical의 생성계와 해독계의 불균형에 의하여 야기되는 것으로 알려져 있다^{37,38)} 본 실험에서 oxygen free radical 해독에 관여하는 GSH, GPx, SOD, GST 활성을 고려해 볼 때 유해산소 해독계 효소인 GST 활성은 대조군에 비해서 약 31% 유의하게 ($p < 0.05$) 감소되었으나, SOD와 GPx 활성은 대조군에 비해 별다른 변동이 없었다. 그리고 GSH 함량은 cyclohexane 도포군이 대조군에 비해 약 50% 증가되었으나 유의성은 없었다.

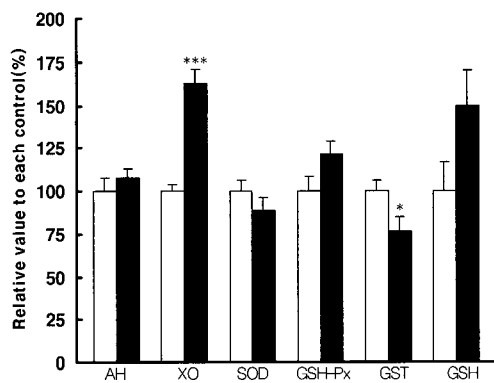


Fig. 4. Effects of cyclohexane application to skin cutaneous oxygen free radical generating and scavenging enzymes activities and reduced glutathione content in rats. Each bar represents the mean \pm S.E. of 8 rats and indicates relative percents to the control. Significantly different from each control (*; $p < 0.05$, ***; $p < 0.001$). Keys: (□) control and (■) cyclohexane.

따라서 본 실험에서 피부조직에 cyclohexane을 도포함으로써 oxygen free radical의 해독효소 활성은 감소 내지 별다른 변화는 없었으나 유해산소 생성효소인 XO 활성이 가장 높게 나타남을 시사해 주고 있다. 그러므로 피부조직에 cyclohexane을 도포함으로써 피부조직의 형태학적 변화를 cyclohexane 및 이의 대사물질과 oxygen free radical에 기인되어 나타난 결과로 생각된다.

IV. 결 론

피부에 cyclohexane 도포가 피부조직에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하기 위하여 흰쥐 피부에 cyclohexane (25mg/cm²)을 1일 1회 4일간 연속 도포한 후 처치하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

병리조직학적 소견은 광학현미경하에서는 상피와 진피층의 탈락현상과 진피 내 출혈반응이 관찰되었으며, 전자현미경하에서는 호중구와 적혈구가 관찰되었다. 피부조직의 cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase (CYPdAH) 활성은 대조군 및 실험군 모두 극미량이 측정되었으며, alcohol dehydrogenase (ADH) 활성은 대조군 및 실험군 모두 극미량이 측정되었으며, alcohol dehydrogenase (ADH) 활성은 대조군 및 cyclohexane 처치군 간에는 별다른 차이를 볼 수 없었다. 그러나 피부에 cyclohexane 도포군은 간조직의 CYPdAH 및 ADH 활성은 대조군보다 유의한 증가를 보였다. 한편 피부조직에 있어서 oxygen free radical 생성효소인 xanthine oxidase 및 CYPdAH 활성과 oxygen free radical 해독효소인 glutathione S-transferase, glutathione peroxidase 및 superoxide dismutase 활성 및 생리활성물질을 측정된 결과, 피부조직에 cyclohexane 도포한 실험군에서 xanthine oxidase 활성이 대조군보다 유의한 증가를 보였으며 본 실험에서 측정한 oxygen free radical 대사효소 활성 중 가장 높게 나타났다.

이상 실험결과는 흰쥐 피부에 cyclohexane 도포한 경우에 피부조직의 염증반응이 초래되었으며 이는 cyclohexane 대사 중간 생성물질 및 oxygen free radical에 기인된 결과로 생각된다.

참고문헌

1. Niland, J.: Industrial hygiene. In Occupational medicine. (Zenz, C., Dickerson, O. B. and Horvath, E. P. Jr., eds.), pp. 1021-1022. *Mosby, St. Louis Baltimore.*
2. Toby Mathias, C.G.: Occupational Dermatoses. In "Occupational medicine" (Zenz, C., Dickerson, O. B. and Horvath, E. P. Jr., eds.), pp. 93-122, *Mosby, St. Louis Baltimore.*
3. Guidotti, T. L.: Principles of occupational toxicology. In "Occupational medicine" (Zenz, C., Dickerson, O. B. and Horvath, E. P. Jr., eds.), pp. 70-84. *Mosby, St. Louis Baltimore.*
4. 채순남, 윤종국, 박원학: 흰쥐에 있어서 피부조직의 Oxygen Free Radical 대사계에 미치는 toluene의 영향. *J. Toxicol. Pub. Health*, 17(1), 33-39, 2001.
5. Perico, A., Cassinelli, C.B., Brugnone, F., Bavazzano, P. and Perbellini, L.: Biological monitoring of occupational exposure to cyclohexane by urinary 1,2- and 1,4-cyclohexanediol determination. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 72, 115-120, 1999.
6. Perbellini, L. and Brugnone, F.: Lung uptake and metabolism of cyclohexane in shoe factory workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 45, 261-269, 1980.
7. Ellenhorn, M.J. and Barceloux, D.G.: Medical toxicology. pp. 968-969. *Elsevier, New York*, 1988.
8. Iyadomi, M., Higaki, Y., Ichiba, M., Morimoto, M. and Tomokuni, K.: Evaluation of organic solvent-induced inflammation modulated by neuropeptides in the abdominal skin of hairless rats. *Ind. Health*, 36(1), 40-51, 1998.
9. Longacre, S.L.: Cyclohexane. In "Ehtel Browning's toxicity and metabolism of industrial solvents" (Snyder, R., ed.), pp. 225-235. *Elsevier, Amsterdam*, 1987.
10. Bernard, A.M., de Russis, R., Normand, J.C. and Lauwerys, R.R.: Evaluation of the subacute nephrotoxicity of cyclohexane and other industrial solvents in the female Sprague-Dawley rat. *Toxicol. Lett.*, 45(2-3), 271-280, 1989.
11. Naskali, L., Oksanen, H. and Tähti, H.: Astrocytes as targets for CNS effects of organic solvents *in vitro*. *Neurotoxicology*, 15(3), 609-612, 1994.
12. Nordblom, G.D. and Coon, M.J.: Hydrogen peroxide formation and stoichiometry of hydroxylation reactions catalyzed by highly purified liver microsomal cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.*, 180(2), 343-347, 1977.
13. Elliott, T.H., Parke, D.U. and Williams, R.T.: Studies in detoxication. The metabolism of cyclo [14C] hexane and its derivatives. *Biochem. J.*, 72, 115-120, 1959.
14. James, S.P. and Waring, R.H.: The metabolism of alicyclic ketones in the rabbit and rat. *Xenobiotica*, 1(6), 573-580, 1971.
15. Smyth, H.F.Jr., Carpenter, C.P., Weil, C.S., Pozzani, U.C., Striegel, J.A. and Nycum, J.S.: Range-finding toxicity data: List VII. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 30(5), 470-476, 1969.

16. 윤종국, 이미경, 이상일: 성장기간이 다른 흰쥐에 사염화탄소 투여가 oxygen free radical 생성계 및 해독계 효소 활성에 미치는 영향. *한국노화학회지*, 8(1), 35-42, 1998.
17. 류종일, 윤종국, 신중규: 흰쥐에 있어서 Toluene 대사에 미치는 주·야 시차의 영향. *대한의생명과학회지*, 5(1), 67-74, 1999.
18. Bergmeyer, H.U.: Method of enzymatic analysis. Academic Press, New York, 2, 428-429, 1974.
19. Bidlack, W. R. and Lowery, G. L.: Multiple drug metabolism: *p*-nitroaniline reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.*, 31(3), 311-317, 1982.
20. Paglia, E. D. and Valentine, W. N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 158-169, 1967.
21. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249(22), 7130-7139, 1974.
22. Stirpe, F. and Della Corte, E.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 244(14), 3855-3863, 1969.
23. Martin, J.P., Dailey, M. and Sugarman, E.: Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 255(2), 329-336, 1987.
24. 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.
25. Ellman, G.L.: Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70-77, 1959.
26. Scheffler, W.C.: Statistics for the biological sciences. pp. 84-89. Addison-Wesley, London, 1980.
27. Brown, H.S., Bishop, D.R. and Rowan, C.A.: The role of skin absorption as a route of exposure for volatile organic compounds (VOCs) in drinking water. *Am. J. Public Health*, 74(5), 479-484, 1984.
28. 노동부: 화학물질 및 물리적 인자의 노출기준. 노동부고시 제97-65호, 노동부, 1998.
29. ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists): 1994-1995 Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. *ACGIH, Cincinnati*.
30. Edmond Riviere, J.: Absorption and Distribution. In "Biochemical pharmacology (Hodgson, E. and Levi, P.E. eds), pp. 23-29, Appleton and Longe, Morwalk, Connecticut., 1994.
31. 이해자, 윤종국: Xylene 대사효소활성에 미치는 주·야 시차의 영향. *한국환경위생학회지*, 27(2), 10-16, 2001.
32. Wislocki, P.G., Mima, G.T. and Anthony, Y.H.Lu.: Reactions catalyzed by the cytochrome P450 system. In "Enzymatic Basis of Detoxication Vol. I" (Jakoby, W.B. eds.), pp. 136-143., Academic Press., New York, 1980.
33. 김현영, 정용현, 정재황, 서길수, 문영환: 유기용제의 피부흡수 연구. *한국산업위생학회지*, 7(2), 279-288, 1997.
34. 전태원, 이상일, 윤종국: Cyclohexane에 의한 흰쥐의 폐독성. *대한의생명과학회지*, 6(4), 245-251, 2000.
35. Freeman, B.A. and Crapo, J.D.: Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47(5), 412-426, 1982.
36. Granger, D.N. and Parks, D.A.: Role of oxygen radical in the pathogenesis of intestinal ischemia. *The Physiologist*, 26, 159-164, 1983.

37. Chow, C.K. and Tappel, A.L.: Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. *J. Nutr.*, 104(4), 444-451, 1974.
38. Leibovitz, B.E. and Siegel, B.V.: Aspects of free radical reactions in biological system:aging. *J. Gerontol.*, 35(1), 45-56, 1980.