



CCl₄ 전처치한 흰쥐에 Cyclohexane 투여가 간손상에 미치는 영향

윤종국 · 김현희
계명대학교 공중보건학과

Effect of Cyclohexane Treatment on the Liver Damage in CCl₄-Pretreated Rats

Chong-Guk Yoon and Hyun-Hee Kim

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

Received April 13, 2003; Accepted May 26, 2003

ABSTRACT. To evaluate an effect of cyclohexane treatment on the degree of liver damage, rats were induced liver damage with 10 or 17 times CCl₄ injection (0.1 ml/100 g body wt., 50% CCl₄ dissolved in olive oil) at intervals of every other day. Cyclohexane (1.56 g/kg body wt., i.p.) was administered to the animals at 48 hours after the last pretreatment of CCl₄. Rats were sacrificed at 4 hours after injection of cyclohexane. On the basis of histopathological findings, liver weight/body weight (LW/BW, %), activities of serum alanine aminotransferase (ALT), xanthine oxidase (XO) and alkaline phosphatase (ALP), and contents of liver protein and malondialdehyde (MDA), CCl₄-pretreatment induced liver damage. And CCl₄ 17 times treated group showed more severe liver damage than CCl₄ 10 times treated group. Administration of one dose of cyclohexane to CCl₄ 10 times treated animals resulted in the enhanced liver damage; liver necrosis with proliferation of fibroblast and bile duct abnormality, and increase in hepatic MDA content and the activities of serum ALP and ALT. But the enhanced liver damage was not found in CCl₄ 17 times treated animals. Serum cyclohexanone concentrations at 4 or 8 hours after injection of cyclohexane were higher in all liver damaged groups than normal group and were somewhat higher in CCl₄ 17 times treated animals than CCl₄ 10 times treated ones. Among the oxygen free radical metabolizing enzymes, hepatic cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase (CYPdAH) activity in cyclohexane metabolizing enzyme system was meaningfully increased by the injection of cyclohexane to the liver damaged rats, with increased V_{max} and high affinity to aniline. LW/BW (%) and activities of serum XO and ALT were more significantly increased in liver damaged groups than normal group by administration of cyclohexanone. In conclusion, it is assumed that an enhancement of liver damage by injection of one dose of cyclohexane to liver damaged animals might be caused by oxygen free radicals and cyclohexanone.

Keywords: Cyclohexane, CCl₄, Oxygen free radical, Rats.

서 론

Cyclohexane은 비교적 독성이 낮은 물질로 인정되어 산업현장에서 benzene(Perbellini와 Brugnone, 1980) 및 n-hexane(Perico 등, 1999) 등의 대체물질로 널리 사용되고 있는 물질이다. 그러나 생체가 cyclohexane에 폭로

시 피부염증반응(Iyadomi 등, 1998), 위장장애(Longacre 1987), 신장(Bernard 등, 1989) 및 신경계(Naskali 등, 1994)뿐만 아니라 폐(전 등, 2000)를 포함한 호흡계(NIOSH, 1985)의 손상이 유발되는 것으로 보고되고 있다. 생체 내에서 cyclohexane은 microsomal cytochrome P450 dependent monooxygenase에 의해 cyclohexanol로 대사되어(Nordblom와 Coon, 1997; Senler 등, 1985) 일부는 β-glucuronide 형태로 포함된 다음, 소변 중에 배설되며(Treon 등, 1943; Elliott 등, 1959), 나머지는 alcohol dehydrogenase의 촉매작용에 의해 중간대사산물

Correspondence to: Chong-Guk Yoon, Department of Public Health, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea
E-mail: jky446@kmu.ac.kr

인 cyclohexanone(Smyth 등, 1969; James와 Waring 1971)으로 산화되기도 한다(Sakata 등, 1989). 한편 cyclohexane의 중간대사산물인 cyclohexanone은 생체 내 독성작용을 유발(James와 Waring, 1971)하는 것으로 알려져 있어, cyclohexane의 생체 내 대사율에 따라 cyclohexane에 의한 조직손상의 정도가 다르게 나타날 것으로 사료된다.

일반적으로 xenobiotics의 인체 폭로 시 생체의 내·외적인 환경인 연령, 성별, 영양상태 및 병태·생리적 조건 등에 따라 xenobiotics에 대한 감수성이 다르게 나타난다고 한다(Vessey, 1996). 특히 병태·생리적 조건인 급·만성 간질환 시에 xenobiotics의 대사가 상당한 영향을 받는다(이 등, 1999; Howden 등, 1989)는 보고와 간질환 시 간손상 정도에 따라 이물질에 대한 생체 내 대사가 달리 나타난다는 보고(이 등, 1999)뿐만 아니라 간손상 시 간조직에 별다른 독성을 유발시키지 않는 것으로 알려져 있는 xenobiotics의 폭로에 의해서도 간손상이 심화된다는 보고(윤 등, 1999)도 있어 간손상의 정도에 따라 xenobiotics 독성에 대한 감수성의 차이가 나타날 것으로 생각된다.

또한 xenobiotics에 의한 간손상은 xenobiotics 대사 중간생성물질과 더불어 xenobiotics 대사과정 중 연쇄적으로 생성되는 free radical에 기인되어 나타나는 것으로 알려져 있다(Freeman와 Crapo, 1982).

이에 본 연구에서는 간손상 시 산업화학물질의 노출이 간손상의 정도에 어떠한 영향을 미치는지 검토할 목적으로 CCl_4 를 투여하여 간손상을 유도시킨 실험동물에 cyclohexane을 투여하여 cyclohexane의 대사와 oxygen free radical 대사계의 활성변동을 상호 비교 검토하였다.

재료 및 방법

동물 및 처치

동물은 체중 250 ± 10 g의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 종 웅성 흰쥐를 대한실험동물센터(Korea)로부터 구입 후, 사육실(온도 $25 \pm 1^\circ C$, 상대습도 $50 \pm 5\%$)에서 1주일 동안 적응시켜 실험에 사용하였다. 각 실험군은 정상대조군, cyclohexane 1회 투여군, CCl_4 10회 투여군, CCl_4 10회 투여 후 cyclohexane 1회 투여군(이하 CCl_4 10회 전처치군이라 약함), CCl_4 17회 투여군 및 CCl_4 17회 투여 후 cyclohexane 1회 투여군(이하 CCl_4 17회 전처치군으로 약함)으로 나누었으며 각각 6마리씩 분리 수용하였다. 그리고 cyclohexanone 실험군은 대조군, cyclohexanone 투여군, CCl_4 10회 투여군 및 CCl_4 10회 투여 후 cyclohexanone 투여군으로 나누었으며, 각각 5

마리씩 분리 수용하였다. 실험기간 동안 물과 사료(삼양사, Korea)의 양은 제한없이 공급하였다. CCl_4 는 Rubin, Hutterer, Popper(1963)의 방법에 준해 olive oil과 동량 혼합액을 만들어 체중 100 g당 0.1 ml씩 2일 간격으로 각각 10회 및 17회 복강으로 투여하였으며, 마지막 주사 후 48시간 뒤에 처치하였다. Cyclohexane 및 cyclohexanone은 Bernard 등(1989)의 방법에 따라 olive oil과의 동량 혼합액을 체중 100 g당 0.4 ml (kg당 1.56 g)을 1회 복강 투여한 후 4시간 뒤에 처치하였다. 모든 실험군은 처치 24시간 전부터 물만 공급하고 금식시켰다.

동물의 처치는 효소 활성도의 일 중 변동을 고려하여 일정시간에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였으며 ether 마취 하에 개복한 후 복부대동맥으로부터 채혈하여 실험사 시켰다. $4^\circ C$ 생리식염수로 간문맥을 통하여 간을 관류하고 조직 내에 남아있는 혈액을 제거한 다음 적출 하였다. 적출한 간은 생리식염수로 씻은 후 여지로 압박하여 장기 내에 남아있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻고 alanine aminotransferase, xanthine oxidase 및 alkaline phosphatase 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

효소시료의 조제

간조직 중 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 넣고 glass teflon homogenizer를 이용하여 20% (w/v) 마쇄균질액을 만들었다. 이 균질액을 $600 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 상층액을 $10,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 얻고 다시 이 상층액은 $105,000 \times g$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획과 microsome 분획을 얻었다.

Mitochondria 분획은 catalase 활성도 측정, cytosol 분획은 xanthine oxidase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 glutathione S-transferase 활성도 측정용 시료로 사용하였고, microsome 분획은 일정량의 0.25 M sucrose 용액으로 재현탁한 뒤 $105,000 \times g$ 에서 1시간 동안 다시 초원심분리한 후 침전물을 sucrose 용액으로 재현탁시킨 용액을 cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

효소 활성도 측정

혈청 중 간손상 marker 효소 활성 측정: 혈청 중 alanine aminotransferase(ALT) 활성도 측정은 Reitman,

Frankel(1957)의 방법에 따라 조제된 kit 시약(아산제약)을 사용하였으며, 활성도 단위는 ml 당 Karmen unit(1955)로 표시하였다. 혈청 중 alkaline phosphatase(ALP) 활성도는 Bessey, Lowry(1946)의 방법에 준하여 측정하였으며, 단위는 Bessey-Lowry unit을 사용하였다.

Oxygen free radical 생성 효소 활성: 간조직 및 혈청 중 xanthine oxidase(XO) 활성도는 Yoon(1984)의 방법에 준하여 측정하였으며, 간조직 중 Cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase(CYPdAH) 활성도는 Bidlack, Lowery(1982)의 방법에 준하여 측정하였다. 한편 효소 시료의 일정량을 함유한 50 mM tris buffer(pH 7.4)-150 mM KCl-10 mM MgCl₂ 효소 반응액에서 기질인 aniline 농도를 변동시키면서 CYPdAH 활성도를 측정하였다. 이때 이들 결과로부터 반응속도의 역수치(1/V)를, 그리고 기질농도로부터 기질농도의 역수치(1/[S])를 계산하여 이중역수도(double-reciprocal plot)를 작도한 다음 이것으로부터 V_{max}와 K_m을 산출하였다.

Oxygen free radical 해독 효소 활성: 간조직 중 superoxide dismutase(SOD) 활성도는 Martin 등(1987)의 방법, catalase(CAT) 활성도는 Aebi(1974)의 방법, glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성도는 Paglia와 Valentine(1967)의 방법에 따라 측정되었으며, glutathione S-transferase(GST)의 활성도는 Habig 등(1974)의 방법에 준하였다.

Reduced glutathione(GSH) 함량 측정

간조직 중 GSH 함량은 Ellman(1959)의 방법에 따라 측정하였다. 조직 마쇄균질액 일정량에 4% sulfosalicylic acid 0.5 ml를 넣고 원심분리한 후, 상층액 일정량을 0.1 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 함유 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 8.0)에 넣고 반응시켜 생성된 p-nitrophenol을 측정하였다. GSH 함량은 조직 g당 μ mole로 표시하였다.

Malondialdehyde(MDA) 함량 측정

간조직 중 MDA 함량은 Ohkawa 등(1979)의 방법에 따라 측정하였다. 효소 시료 속의 과산화지질을 산성조건 하에서 2-thiobarbituric acid 용액과 가열 반응시켜 생긴 MDA의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다. MDA 함량은 조직 g당 nmole로 표시하였다.

단백질 함량 측정

간조직 중 단백질 함량은 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다.

Table 1. GC conditions for the analysis of cyclohexanone

Item	GC condition
Column	HP-FFAP Capillary 30 mx0.32 mm (I.D)
Temperature	Column initial temp. 50°C initial time 3 min rate 7°C/min final temp. 200°C final time 5 min
	Injector 200°C
Detector	250°C
Carrier gas	He 1.3 ml/min
Air	450 ml/min
Hydrogen	40 ml/min
Type of injection	Splitless
Injection volume	1 ml
Detector	FID

Cyclohexane의 대사산물 측정

Cyclohexanone의 대사산물의 일종인 cyclohexane의 혈청 중 측정은 Bao 등(1997)의 방법에 준하여 액체-액체 추출방법으로 분석을 행하였다. 추출용매는 ethyl acetate 및 acetonitrile을 7 : 3의 비율로 혼합한 용매를 사용하였다. 대사산물의 정량은 표준물질을 GC(HP 6890)에 주입하여 나온 chromatogram의 면적을 이용하여 작성한 표준 검량선에 준해 산출하였다. cyclohexanone 양은 혈청 l 당 mg으로 나타내었다.

GC의 분석조건은 Table 1과 같다.

광학현미경 관찰

조직의 광학현미경적 변화를 관찰하기 위해 적출 즉시 장기의 일부분을 10% neutral buffered formalin 액에 고정하고, 고정이 끝난 조직을 흐르는 물에 수세한 후 순차적으로 증가되는 농도 순서에 따라 alcohol로 탈수하여 paraffin에 포매하였다. 포매된 조직을 4 μ m 두께로 절편한(Lipshaw, model 45) 다음, hematoxylin-eosin 염색하고 광학현미경(Olympus, BH-2)으로 관찰하였다.

성적 검정

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

결 과

간조직 및 혈청 중 간손상 지표

간손상의 지표 중 몇가지 data를 나타낸 결과는 Table 2와 같다. 체중당 간 무게 및 간조직 중 MDA 함량은 정상

Table 2. Effect of cyclohexane treatment on the liver weight/body weight (LW/BW, %), contents of hepatic protein and MDA, and serum activities of ALT, XO and ALP in CCl₄-pretreated rats

Group		Normal		Frequency of CCl ₄ injection			
		Control	Cyclohexane	10 times		17 times	
				Control	Cyclohexane	Control	Cyclohexane
Liver	LW/BW (%)	2.70±0.25	2.88±0.29	3.71±0.30 ^{a*}	4.05±0.20 ^{**b}	5.07±0.45 ^{†a,c}	4.66±0.23 ^{†b}
	Protein ¹	120.00±9.17	111.19±10.21	107.55±6.30	95.43±4.45	83.54±3.56 ^{†a,c}	101.26±9.79
	MDA ²	3.41±0.24	4.09±0.39	5.88±0.43 ^{†a}	7.74±0.50 ^{†b,e}	7.56±0.82 ^{†a}	6.78±0.54 ^{**b}
	ALT ³	19.12±2.67	58.10±13.50 ^{*e}	292.5±36.7 ^{†a}	442.7±50.10 ^{†b,e}	1023.3±153.8 ^{†a,c}	787.9±179.3 ^{**b}
Serum	XO ⁴	25.80±2.11	31.68±3.30	44.38±2.09 ^{†a}	55.02±5.15 ^{**b}	85.63±5.67 ^{†a,c}	58.38±8.91 ^{†b,e}
	ALP ⁵	3.70±0.18	4.11±0.30	7.78±0.68 ^{†a}	9.89±1.70 ^{**b}	15.85±2.19 ^{†a,c}	22.19±3.06 ^{†b,d}

Each value represents the mean±S.E. of 6 rats.

Unit : ¹mg/g of liver, ²nmoles/g of liver, ³Karmen unit/ml of serum, ⁴μmoles uric acid formed/l of serum, ⁵Bessey-Lowry unit/ml of serum.

^aSignificantly different from normal control, ^bSignificantly different from normal cyclohexane, ^cSignificantly different from 10 times control group, ^dSignificantly different from 10 times cyclohexane group, ^eSignificantly different from each control (*; p<0.05, **; P<0.01, †; p<0.001).

대조군에 비하여 CCl₄ 10회 투여군에서는 각각 약 37% (p<0.05) 및 72%(p<0.001) 유의하게 증가하였고, CCl₄ 17회 투여군에서는 각각 1.9배 및 2.2배 정도 모두 유의하게(p<0.001) 증가하였다. 또한 간조직 중 단백질 함량은 정상대조군에 비해 CCl₄ 10회 투여군에서는 10% 정도 감소하는 경향을 보였으며 CCl₄ 17회 투여군에서는 30% 정도 유의하게(p<0.01) 감소되었다. 혈청 중 ALT, XO 및 ALP 활성의 경우, CCl₄ 10회 투여군에서는 대조군에 비해 각각 약 15.3배, 1.7배 및 2.1배의 유의한 (p<0.001) 증가를 보였으며, CCl₄ 17회 투여군은 각각 53.5배, 3.3배 및 4.3배 정도 현저하게(p<0.001) 증가하였다.

Cyclohexane 투여군 및 CCl₄ 10회 전처치군은 각각의 대조군에 비해 체중당 간무게가 다소 증가하였으나, CCl₄ 17회 전처치군은 오히려 감소하는 경향을 보였다. 간조직 중 MDA 함량은 cyclohexane 투여군과 CCl₄ 10회 전처

치군에서는 각각의 대조군에 비해 약 20% 및 32% 증가되었으며, CCl₄ 17회 전처치군에서는 약 10% 감소되었다. 또한 간조직 중 단백질 함량은 cyclohexane 투여군과 CCl₄ 10회 전처치군에서는 각각의 대조군에 비해 각각 약 7% 및 11% 감소하였으나, CCl₄ 17회 전처치군에서는 오히려 21% 정도 증가되었다. 혈청 중 ALT 및 XO 활성의 경우, cyclohexane 투여군에서는 대조군에 비해 각각 약 3배(p<0.05) 및 1.2배 증가하였으며, CCl₄ 10회 전처치군 역시 1.5배(p<0.05) 및 1.2배 정도 증가하였으나, CCl₄ 17회 전처치군에서는 각각 약 1.3배 및 1.5배 (p<0.05) 감소하였다. 한편, 혈청 중 ALP 활성은 cyclohexane을 투여한 모든 실험군에서 각각의 대조군에 비해 약 11%, 27% 및 40% 증가되었다.

병리·조직학적 관찰

CCl₄ 전처치 후 cyclohexane 투여로 인한 간손상의 정

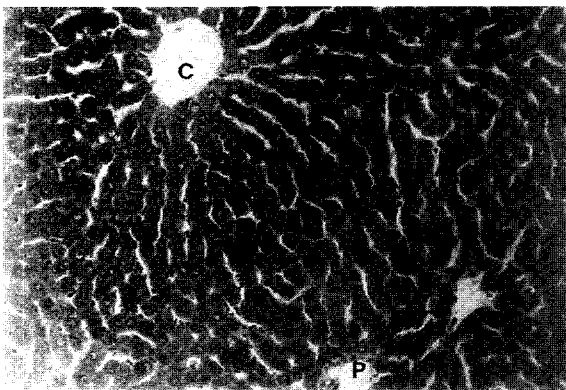


Fig. 1. Micrograph of liver tissue in normal rats, H&E, x200. The tissue structure was intact. C : central vein, P : portal vein.

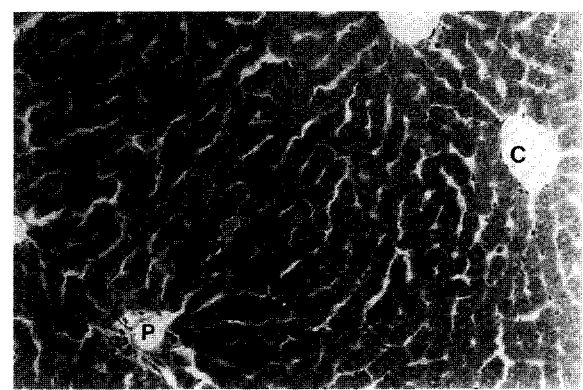


Fig. 2. Micrograph of liver tissue in rats with one time injection of cyclohexane, H&E, x200. The tissue structure was similar to normal. C : central vein, P : portal vein.

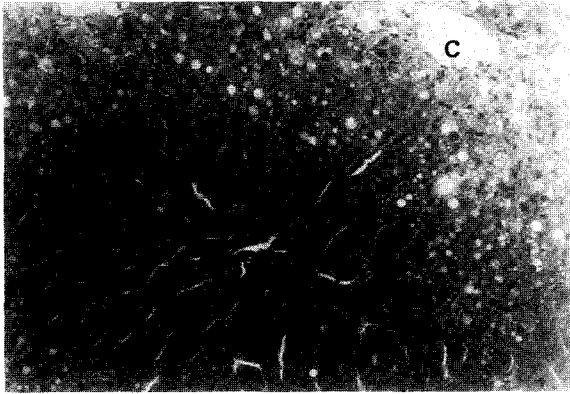


Fig. 3. Micrograph of liver tissue in rats with 10 times injection of CCl₄, H&E, x200. Fatty degeneration was shown in the central and mid zones of classical lobules. C : central vein, P : portal vein.

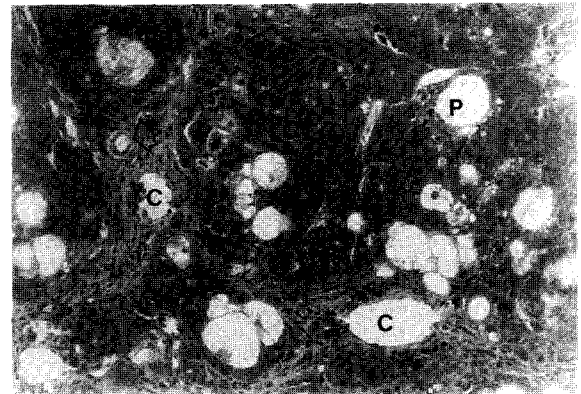


Fig. 5. Micrograph of liver tissue in rats with 17 times injection of CCl₄, H&E, x200. Central fibrosis with bridging was shown through the margin of portal lobules. Duct formation (arrow) in the fibrotic zone and necrosis of hepatocytes were shown, and the shape of hepatic cell cords was changed like glanular acinus. C : central vein, P : portal vein.

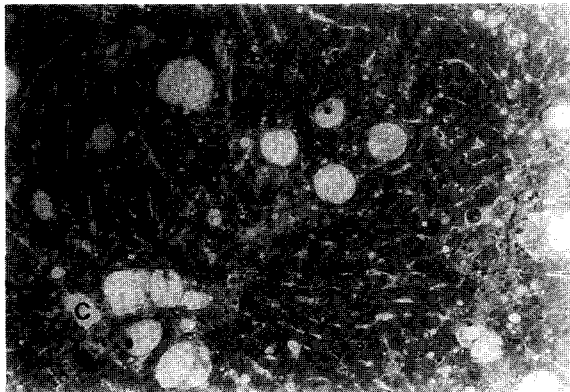


Fig. 4. Micrograph of liver tissue in rats with one time injection of cyclohexane after 10 times injection of CCl₄, H&E, x200. Proliferation of fibroblasts in the central zone and necrosis of hepatocytes were shown. C : central vein.



Fig. 6. Micrograph of liver tissue in rats with one time injection of cyclohexane after 17 times injection of CCl₄, H&E, x200. Central fibrosis with bridging and necrosis of hepatocytes were shown. Nuclear volume of hepatocytes was increased in comparison with that of normal hepatocytes. C : central vein, P : portal vein.

도를 확인하기 위해 간의 병리·조직학적 변화를 광학현미경으로 관찰하였다(Fig. 1-6).

정상대조군(Fig. 1)과 cyclohexane 투여군(Fig. 2)에서는 병리적 손상조건이 관찰되지 않았다. CCl₄ 10회 투여로 고유 간소엽(classical lobule)의 중심대와 중간대에 지방변성이 관찰되었고(Fig. 3), CCl₄ 10회 투여 후 cyclohexane 투여로 인해서 간세포의 괴사와 섬유모세포의 증식이 관찰되었다(Fig. 4). 또한 CCl₄ 17회 투여군은 간세포의 괴사와 중심정맥들을 잇는 문맥 간소엽(portal lobule)의 가장자리로 섬유화(central fibrosis with bridging)가 관찰되었으며, 이런 섬유화된 부분에 담도증식 현상이 관찰되었다(Fig. 5). CCl₄ 17회 투여 후 cyclohexane 투여군은 CCl₄ 17회 투여군과는 별다른 차이를 보이지 않았으나 특징적으로 간세포 내 핵의 체적이 증가된 모습을 보였다(Fig. 6).

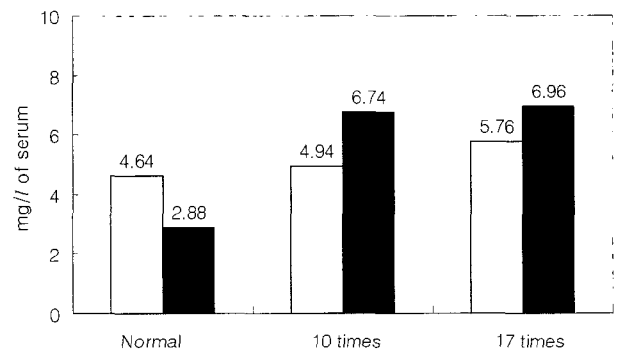


Fig. 7. Effect of cyclohexane treatment on the serum levels of cyclohexanone in CCl₄-pretreated rats. □ : 4 hours ■ : 8 hours.

Table 3. Effect of cyclohexanone on the LW/BW (%) and serum activities of ALT and XO in 10 times CCl₄-treated rats

Group	Normal		10 times	
	Control	CH-none	Control	CH-none
LW/BW (%)	2.74±0.15	2.57±0.16	4.13±0.47 ^{ab}	5.53±0.76 ^{ab}
XO ¹	12.54±1.14	12.13±0.53	25.59±4.04 ^{ab}	34.73±3.90 ^{tb}
ALT ²	20.25±2.10	35.15±3.35 ^{abc}	315.10±4.30 ^{ta}	466.20±49.60 ^{tb,ac}

Each value represents the mean±S.E. of 5 rats.

Unit: ¹μmoles uric acid formed/l of serum, ²Karmen unit/ml of serum.

^aSignificantly different from normal control, ^bSignificantly different from normal cyclohexane, ^cSignificantly different from each control (*; p<0.05, **; p<0.01, †; p<0.001).

Cyclohexanone의 혈중 농도

CCl₄를 10회 및 17회 전처치한 후 cyclohexane 1회 투여 시 혈청 중 cyclohexanone의 함량을 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. CCl₄를 10회 및 17회 투여 시, 4시간 및 8시간대의 혈청 중 cyclohexanone의 함량은 정상대조군에 비해 약 7% 및 24% 증가되었으며, cyclohexane 투여로 인해 시간경과에 따라 정상대조군은 약 38% 감소하였으나, CCl₄ 10회 및 17회 전처치군에서는 각각의 대조군에 비해 약 36% 및 21% 증가를 보였다.

Cyclohexanone에 의한 간손상

Cyclohexanone을 CCl₄ 10회 투여한 간손상모델 실험 동물에 직접 투여한 다음 간손상 정도를 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 체중당 간 무게 및 혈청 중 XO 활성은 정상대조군과 cyclohexanone 투여군 간에는 별다른 차이를 보이지 않았으나, CCl₄ 10회 투여 후 cyclohexanone 투여군에서는 CCl₄ 10회 투여군에 비해 각각 약 34% 및 36% 증가되었다. 또한 혈청 중 ALT 활성은 cyclohexanone 투여군과 CCl₄ 10회 투여 후 cyclohexanone 투여군 모두 각각의 대조군에 비해 약 1.7배(p<0.01) 및 1.5배(p<0.05) 유의하게 증가되었다.

간조직 중 Oxygen Free Radical 생성계 효소 활성변동

간조직 중 oxygen free radical 생성계 효소 활성도 변동을 나타낸 결과는 Table 4와 같다. XO 활성은 CCl₄ 투여횟수에 비례하여 증가되었고, 정상군은 cyclohexane

투여로 약 35% 감소하였으나, CCl₄ 10회 및 17회 투여군은 cyclohexane 투여로 인해 각각 약 25% 및 13% 증가하였다. CYPdAH 활성의 경우, CCl₄ 투여로 인해 감소되는 경향을 보였으나, cyclohexane 투여로 각각의 대조군에 비해 cyclohexane 투여군은 약 2.1배(p<0.001), CCl₄ 10회 전처치군은 약 2.8배(p<0.05), CCl₄ 17회 전처치군은 약 2.7배(p<0.01)의 현저한 증가를 보였다.

간조직 중 Oxygen Free Radical 해독계 효소 활성변동

간조직 중 oxygen free radical 해독계 효소 활성도 변동을 나타낸 결과는 Table 5와 같다. SOD 활성은 CCl₄를 투여하였을 때 약간 증가되는 경향을 보였으나, cyclohexane을 투여함으로써 각각의 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였으며 그 증가율은 CCl₄ 17회 투여군에서 약 54%(p<0.01)로 가장 크게 나타났다. CAT 활성은 정상군과 CCl₄ 10회 투여군에서 별다른 차이를 보이지 않았으며, CCl₄ 17회 투여군에서는 약 36%의 증가를 보였으나 통계적인 의의는 없었다. GSH-Px 활성은 CCl₄ 투여기간에 따라 증가되었으며, cyclohexane을 투여함으로써 정상군과 CCl₄ 10회 투여군에서는 각각의 대조군에 비해 약 13% 및 22% 증가를 보였으나, CCl₄ 17회 투여군은 cyclohexane 투여로 인해 약 14% 오히려 감소하였다.

한편 GST 활성의 경우에는 정상군과 CCl₄ 10회 투여군에서 별다른 차이를 보이지 않았으나, CCl₄ 17회 투여군에서는 약 13% 증가하였다. 간조직 중 GSH 함량은 CCl₄를 투여하였을 때 정상대조군에 비해 모두 증가하였

Table 4. Effect of cyclohexane treatment on the hepatic activities of free radical generating enzymes in CCl₄-pretreated rats

Group	Normal		Frequency of CCl ₄ injection			
	Control	Cyclohexane	10 times		17 times	
	Control	Cyclohexane	Control	Cyclohexane	Control	Cyclohexane
XO ¹	0.49±0.09	0.32±0.10	0.55±0.10	0.69±0.05 ^{ab}	0.69±0.15	0.78±0.08 ^{ab}
CYPdAH ²	3.80±0.36	8.07±0.89 ^{ab}	2.97±1.17	8.30±1.25 ^{ab}	2.40±1.10	6.51±0.97 ^{ab}

Each value represent the mean±S.E. of 6 rats.

Unit : ¹nmol uric acid formed/min/mg protein, ²nmol p-aminophenol formed/hr/mg protein.

^aSignificantly different from normal cyclohexane, ^bSignificantly different from each control (*; p<0.05, **; p<0.01).

Table 5. Effect of cyclohexane treatment on the hepatic activities of free radical scavenging enzymes and reduced glutathione content in CCl₄-pretreated rats

Group	Normal		Frequency of CCl ₄ injection			
			10 times		17 times	
	Control	Cyclohexane	Control	Cyclohexane	Control	Cyclohexane
SOD ¹	50.06±4.80	66.92±7.51	55.62±0.89	76.76±4.17 ^{†d}	52.72±4.16	81.11±4.82 ^{***d}
CAT ²	38.41±2.97	38.46±3.98	35.62±2.95	37.99±4.26	27.27±3.02 ^{***a}	37.06±4.14
GSJ-Px ³	8.42±0.51	9.49±0.62	10.88±1.24	13.27±0.49 ^{tb}	12.83±1.36 ^{***a}	11.09±0.72 ^{***c}
GST ⁴	379.79±16.29	374.02±9.32	330.70±4.83 ^{***a}	320.67±17.40 ^{***b}	296.17±21.83 ^{***a}	334.51±27.70
GSH ⁵	2.42±0.21	1.92±0.20	3.64±0.21 ^{***a}	3.35±0.36 ^{***b}	4.12±0.46 ^{***a}	3.41±0.28 ^{***b}

Each value represents the mean±S.E. of 6 rats.

Unit : ¹Unit/mg protein (50% inhibition of autooxidation of hematoxylin), ²Reduced H₂O nmoles/min/mg protein, ³NADPH oxidized nmoles/min/mg protein, ⁴nmoles 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate/min/mg protein, ⁵μmoles/g of liver.

^aSignificantly different from normal control, ^bSignificantly different from normal cyclohexane, ^cSignificantly different from 10 times cyclohexane group, ^dSignificantly different from each control (*; p<0.05, **; p<0.01, †; p<0.001).

Table 6. V_{max} and K_m values of cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase in cyclohexane-treated rats pretreated with CCl₄

Group	Normal		Frequency of CCl ₄ injection			
			10 times		17 times	
	Control	Cyclohexane	Control	Cyclohexane	Control	Cyclohexane
V _{max} ¹	11.39	16.23	6.24	13.27	6.84	12.83
K _m ²	8.97	9.84	4.58	3.92	5.81	2.60

Each value is the mean of 3 experiments.

Unit : ¹nmoles/min/mg protein, ²1×10⁻⁵ M.

으며, cyclohexane 투여로 인해 각각의 대조군에 비해 각각 약 21%, 8% 및 17% 감소를 보였으나 통계적인 의의는 없었다.

CYPdAH 활성변동의 반응속도론적 관찰

Table 6은 CCl₄ 10회 및 17회 투여 후 cyclohexane에 의한 CYPdAH의 활성변동기전을 검토코자 반응속도론적인 면에서 관찰한 결과이다. CCl₄를 10회 및 17회 투여 하였을 때 K_m 치는 정상대조군에 비해 각각 약 49% 및 35% 정도 감소하였으며, V_{max} 치는 또한 각각 약 45% 및 40% 정도 감소하였다.

한편 정상대조군에 cyclohexane을 1회 투여하였을 때 K_m 치는 별다른 변동이 없었으나 V_{max} 치는 cyclohexane 투여군에서 약 1.4배의 유의한 증가를 보였다. CCl₄ 10회 투여군 역시 cyclohexane 1회 투여에 의해 K_m 치는 별다른 변동이 없었으나 V_{max} 치는 약 2.1배의 현저한 증가를 보였다. 그러나 CCl₄를 17회 투여군의 경우 정상군 및 CCl₄ 10회 투여군과는 달리 cyclohexane 투여로 인해 K_m 치와 V_{max} 치 모두 각각 약 2.2배, 1.9배의 변동을 보였다.

고 찰

일반적으로 xenobiotics의 체내 대사 및 독성발현은 생

체의 병태·생리적 조건에 따라 달리 나타나는 것으로 알려져 있으며, 특히 간손상에 따라 현저한 차이가 나타난다고 한다(Vessey, 1996).

본 실험에서 간손상의 정도에 따른 cyclohexane에 의한 간중독 현상을 검토하고자 CCl₄를 10회 및 17회 투여한 다음 간손상 시 증가된다는 체중당 간무게, 간조직 MDA 함량, 혈청 ALT(윤 등, 1998) 및 XO 활성(윤 등, 1988)과 ALP 활성(윤, 1985)을 관찰하였을 때, 정상대조군에 비해 CCl₄ 투여횟수에 비례하여 모두 현저히 증가되었으며 그 증가율은 CCl₄ 10회 투여군 보다 CCl₄ 17회 투여군에서 높게 나타났다. 또한 간조직 중 단백질 함량은 CCl₄ 투여로 정상대조군에 비하여 유의한 감소를 보였으며, CCl₄ 17회 투여군에서 CCl₄ 10회 투여군에 비해 감소의 정도가 크게 나타났다. 한편 CCl₄ 투여군의 간조직은 CCl₄ 10회 투여로 인해 지방변성과 경미한 괴사가 관찰되었고, 17회 투여군에서는 심한 괴사와 더불어 섬유화가 관찰되었다. 또한 손상의 정도는 CCl₄ 17회 투여군에서 CCl₄ 10회 투여군에 비해서 크게 나타남을 알 수 있었다. 이와 같이 간손상의 정도를 달리 유발시킨 실험동물에 cyclohexane을 1회 투여하였을 때 정상군과 CCl₄ 10회 투여군에서는 체중당 간무게, 간조직 MDA 함량은 각각의 대조군에 비해 증가하였으나, CCl₄ 17회 투여군에서는 오히려 감소하였다. 그리고 간조직의 단백질 함량은

대조군과 CCl_4 10회 투여군에서는 cyclohexane 투여로 인하여 감소하였으나 CCl_4 17회 투여군은 오히려 증가하였다. 혈청 중 급성 간손상의 지표인 ALT 및 XO 활성(윤, 1988)은 정상군과 CCl_4 10회 전처치군에서는 모두 각각의 대조군에 비해 유의하게 증가되었으나, CCl_4 17회 전처치군에서는 오히려 감소하였으며, 섬유화가 수반되는 간담도성 질환 시 혈청 중 활성이 증가된다는 혈청 ALP 활성(Kaplan, 1972; Righetti와 Kaplan, 1972)은 cyclohexane을 투여함으로써 CCl_4 투여기간에 비례하여 모두 증가되었다. 한편 간손상 정도의 변화를 병리·조직학적인 면에서 관찰하였을 때, CCl_4 10회 투여 후 cyclohexane을 투여함으로써 간세포의 괴사와 섬유모세포의 증식이 관찰되었고, CCl_4 17회 투여 후 cyclohexane을 투여하였을 때는 CCl_4 를 17회 투여한 군과는 별다른 차이를 보이지 않았으나 간세포 내 핵의 체적이 증가된 모습을 관찰할 수 있었다.

이상의 간기능 및 형태학적 검사결과를 종합해 볼 때 지방변성과 일부 간세포의 괴사가 수반된 간손상 시에 cyclohexane을 1회만 투여하더라도 괴사세포의 증가와 더불어 섬유화 징후와 같이 간손상의 정도가 더욱 심화되는 것으로 보아 아급성 간손상 시 cyclohexane과 같은 xenobiotics를 1회만 투여하더라도 간손상의 반응이 진행되어 급성 간손상이 유도됨을 시사해 주고 있다. 그리고 심한 괴사와 섬유화가 유발된 경우 cyclohexane 투여로 인하여 급성 간손상 시에 현저히 증가된다는 혈청 XO 및 ALT 활성은 감소되고 혈청 ALP 활성이 오히려 증가되는 것은 cyclohexane 1회 투여가 만성형 간손상을 유도시킴을 암시해 주고 있다. 이러한 결과는 급성 간손상 시에 혈청 중 XO 및 ALT 활성이 현저히 증가되거나 간조직에 있어서 담도형성과 심한 섬유화가 나타나는 초기 간경변 시 혈청 ALP 활성이 증가된다는 보고(윤, 1985)가 뒷받침해 주고 있다.

한편 간손상 실험동물에 cyclohexane을 투여하였을 때 간손상의 정도가 심화된 것이 cyclohexane의 독성 중간대사산물인 cyclohexanone (Deneke와 Fanburg 1980; Simon 등, 1981)에 기인된 것인지를 검토할 목적으로 cyclohexane을 투여한 다음 cyclohexanone의 혈중 농도를 측정된 결과 4시간 및 8시간 대의 혈중 cyclohexanone의 함량은 정상군에서는 시간경과에 따라 감소되었으나 CCl_4 투여로 간손상이 야기된 군에서는 대조군과 달리 모두 증가하였다. 또한 본 실험조건과 같이 CCl_4 를 10회 투여한 간손상모델 실험동물에 cyclohexanone을 직접 투여한 다음 간손상 정도를 관찰한 결과, 간손상 시 증가된다는 체중당 간 무게와 혈청 중 XO 및 ALT 활성(윤 등, 1999)이 모두 증가되었다. 이러한 결과로 보아

CCl_4 에 의한 간손상 실험동물에 cyclohexane 투여로 간손상의 심화 현상의 한 요인인 cyclohexanone에 기인될 것으로 생각된다. 그리고 본 실험조건에서 cyclohexane 투여 시 CCl_4 17회 투여군에서 CCl_4 10회 투여군 보다 혈청 중 chclohexanone 함량이 다소 높게 나타나는 것은 CCl_4 17회 투여군에서 CCl_4 10회 투여군 보다 간손상의 정도가 심하게 나타났기 때문인 것으로 사료된다.

일반적으로 xenobiotics에 의한 생체조직의 손상은 xenobiotics의 반응성 중간대사산물뿐만 아니라 xenobiotics의 대사과정 중 연쇄적으로 생성되는 oxygen free radical에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다(Freeman와 Crapo, 1982). 또한 oxygen free radical에 의한 조직의 손상은 이의 생성계와 해독계의 불균형에 의해 야기되는 것으로 보고(Leibovitz와 Siegel, 1980)되고 있다. 그러므로 본 실험조건에서 cyclohexane 투여에 의한 간손상이 심화된 것이 oxygen free radical에 의해 야기된 것인지를 검토하였을 때, CCl_4 투여 후 cyclohexane 투여 시 CCl_4 투여횟수에 따라 정도의 차이는 있으나 간조직 oxygen free radical 생성계인 XO 및 CYPdAH의 활성증가율이 oxygen free radical 해독계의 활성증가율에 비해 높게 나타나고 있다. 이러한 실험결과로 보아 CCl_4 투여 후 cyclohexane 투여 시 간손상이 심화되는 현상은 cyclohexane의 독성 중간대사산물인 cyclohexanone 뿐만 아니라 CYPdAH 등과 같은 oxygen free radical 생성계의 활성증가에 의해 과잉으로 생성된 oxygen free radical이 빠른 속도로 제거되지 못하고 체내에 오랫동안 유지됨으로써 간손상의 정도가 더욱 심화된 것으로 사료된다.

Cyclohexane 투여에 따른 CYPdAH의 활성이 증가되는 원인을 검토하고자 기질농도변화에 따른 본 효소의 반응속도를 관찰하였을 때, 정상대조군과 CCl_4 10회 투여군에 cyclohexane을 투여한 경우 K_m 치는 별다른 변동이 없었으나 V_{max} 치는 증가하되는 것으로 보아 정상 및 지방변성과 경한 괴사가 수반된 아급성 간손상 시에 cyclohexane 투여로 CYPdAH의 합성이 증가되어 나타난 것으로 사료된다. 그리고 CCl_4 17회 투여 후 cyclohexane을 투여한 경우에는 K_m 치와 V_{max} 치 모두 변동을 나타내고 있어 CYPdAH의 합성뿐만 아니라 효소 단백질의 성상에도 변화가 초래되어 나타난 결과로 사료된다.

이상의 모든 실험결과와 문헌상의 지견들을 종합해 볼 때 간손상을 유발시킨 실험동물에 xenobiotics의 일종이며 비교적 독성이 경미한 물질로 알려져 있는 cyclohexane을 1회만 투여하여도 간손상의 정도가 심화될 것으로 생각되며, 이러한 결과는 cyclohexane의 독성 중간대사산물뿐만 아니라 oxygen free radical 생성증가에 기

인되어 나타날 것으로 생각된다.

요약 및 결론

간손상 시 산업화학물질의 노출이 간손상의 정도에 어떠한 영향을 미치는지 검토할 목적으로 CCl₄를 투여하여 간손상 정도를 관찰함과 더불어 혈청 중 cyclohexanone 농도와 oxygen free radical 대사계의 활성변동을 상호 비교 검토하여 다음과 같은 결과를 얻는다.

CCl₄ 10회 및 17회 투여하여 간손상을 유도한 다음 cyclohexane을 1회 투여하였을 때 체중당 간 무게, MDA 함량 및 혈청 ALT와 XO의 활성이 CCl₄ 10회 투여군에서는 증가하였으나, CCl₄ 17회 투여군에서는 오히려 감소하였다. 그러나 cyclohexane 투여로 혈청 ALP의 활성은 간손상의 정도에 따라 비례하여 증가하였다. 한편 광학현미경 관찰에서는 CCl₄ 10회 전처치군은 간세포의 괴사와 섬유모세포의 증식이 관찰되었고, CCl₄ 17회 전처치군은 CCl₄ 17회 투여군과는 별다른 차이를 보이지 않았으나, 간세포 내 핵의 체적이 증가된 모습을 보였다. Cyclohexane 투여 후 cyclohexanone의 혈중 농도는 간손상 정도에 따라 정상군에 비해 4시간 및 8시간대에서 모두 증가하였다. Oxygen free radical 생성체인 XO 활성은 간손상의 정도에 비례하여 증가하였으며, cyclohexane을 투여하였을 때도 간손상의 정도에 비례하였다. 이와는 반대로 CYPdAH의 활성은 간손상 정도에 반비례하여 감소하였으나, cyclohexane을 투여함으로써 정도의 차이는 있으나 모든 실험군에서 증가하였다. 한편, oxygen free radical 해독체인 SOD의 활성은 cyclohexane을 투여함으로써 간손상 정도에 비례하여 증가하였고, CAT와 GST의 활성은 간손상 정도에 반비례하여 감소하였으나, cyclohexane을 투여함으로써 모든 실험군에서 유사하게 나타났다. GSH-Px의 활성과 GSH의 함량은 간손상 정도에 비례하여 증가하였으나, cyclohexane을 투여함으로써 GSH-Px 활성은 대조군과 CCl₄ 10회 투여군에서는 오히려 감소하였다. GSH의 함량은 cyclohexane 투여로 인하여 각각의 대조군에 비하여 감소하였다. 그리고 CCl₄ 투여에 의한 간손상 실험동물과 cyclohexane을 투여한 실험동물에서 있어서 CYPdAH의 활성변동을 동력학적인 측면에서 관찰하였을 때 CCl₄ 투여 실험군 모두에서 대조군에 비해 K_m 및 V_{max} 가 정도의 차이는 있으나 대조군에 비해 감소하였다. 그리고 cyclohexane을 투여함으로써 정상대조군과 CCl₄ 10회 투여군에서는 V_{max} 치만 증가하였으나, CCl₄ 17회 투여군에서는 K_m 치는 감소한 반면 V_{max} 치는 증가하였다.

이상의 실험결과를 종합해 볼 때 간손상 실험동물에

cyclohexane 1회 투여 시에도 간손상이 심화되었으며, 이는 cyclohexane의 독성 대사산물인 cyclohexanone과 이의 대사과정 중에 생성되는 oxygen free radical에 기인되어 나타난 것으로 생각된다.

참고문헌

- Aebi, H. (1974): *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 2, Catalase. Academic Press, New York.
- Bao, J., Smith, R.L., Sauer, J.M., Pillai, U. and Sipes, I.G. (1997): Simultaneous determination of cyclohexene oxide and its metabolites in rat plasma and urine by gas chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **696**, 59-68.
- Bernard, A.M., de Russis, R., Normand, J.C. and Lauwerys, R.R. (1989): Evaluation of the subacute nephrotoxicity of cyclohexane and other industrial solvents in the female Sprague-Dawley rat. *Toxicol. Lett.*, **45**, 271-280.
- Bessey, O.A. and Lowry, O.H. (1946): A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, **164**, 321-337.
- Bidlack, W.R. and Lowery, G.L. (1982): Multiple drug metabolism: p-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 311-317.
- Deneke, S.M. and Fanburg, B.L. (1980): Normobaric oxygen toxicity of the lung. *New Engl. J. Med.*, **303**, 76-86.
- Elliott, T.H., Parke, D.V. and Williams, R.T. (1959): Studies in detoxication. The metabolism of cyclo [14C] hexane and its derivatives. *Biochem. J.*, **72**, 193-200.
- 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.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974): Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid and formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139.
- Howden, C.W., Birnie, G.G. and Brodie, M.J. (1989): Drug metabolism in liver disease. *Pharmacol. Ther.*, **40**, 439-474.
- Iyadomi, M., Higaki, Y., Ichiba, M., Morimoto, M. and Tomokuni, K. (1998): Evaluation of organic solvent-induced inflammation modulated by neuropeptides in the abdominal skin of hairless rats. *Ind. Health*, **36**, 40-51.
- James, S.P. and Waring, R.H. (1971): The metabolism of allicyclic ketones in the rabbit and rat. *Xenobiotica*, **1**, 573-580.
- Kaplan, M.M. (1972): Alkaline phosphatase. *Gastroenterol.*, **62**, 452-468.
- Karmen, A. (1955): A note on the spectrophotometer assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 131-133.
- Leibovitz, B.E. and Siegel, B.V. (1980): Aspects of free radical reaction in biological systems: aging. *J. Gerontol.*, **35**, 45-56.
- Longacre, S.L. (1987): Cyclohexane. In *Ehtel Browning's toxicity and metabolism of industrial solvents*, edited by R.

- Snyder. Amsterdam: Elsevier Press.
- 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. Jr., Dailey, M. and Sugarman, E. (1987): Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **255**, 329-336.
- Naskali, L., Oksanen, H. and Tahti, H. (1994): Astrocytes as targets for CNS effects of organic solvents *in vitro*. *Neurotoxicol.*, **15**, 609-612.
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). (1985): *NIOSH pocket guide to chemical hazards*. Cincinnati.
- Nordblom, G.D. and Coon, M.J. (1997): Hydrogen peroxide formation and stoichiometry of hydroxylation reactions catalyzed by highly purified liver microsomal cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 343-347.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ana. Biochem.*, **95**, 351-358.
- Paglia, D.E. and Valentine, W.N. (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158-169.
- Perbellini, L. and Brugnone, F. (1980): Lung uptake and metabolism of cyclohexane in shoe factory workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **45**, 261-269.
- Perico, A., Cassinelli, C., Brugnone, F., Bavazzano, P. and Perbellini, L. (1999): Biological monitoring of occupational exposure to cyclohexane by urinary 1,2- and 1,4-cyclohexanediol determination. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **72**, 115-120.
- Righetti, A. and Kaplan, M.M. (1972): Disparate responses of serum and hepatic alkaline phosphatase and 5' nucleotidase to bile duct obstruction in the rat. *Gastroenterol.*, **62**, 1034-1039.
- 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**, 56-63.
- Rubin, E., Hutterer, F. and Popper, H. (1963): Cell proliferation and fiber formation in chronic carbon tetrachloride intoxication, a morphologic and chemical study. *Am. J. Pathol.*, **42**, 715.
- Sakata, M., Kikuchi, J., Haga, M., Ishiyama, N., Maeda, T., Ise, T. and Hikita, N. (1989): Disposition of acetone, methyl ethyl ketone and cyclohexanone in acute poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **27**, 67-77.
- Scheffler, W.C. (1980): *Statistics for the biological sciences*. USA : Addison-Wesley Co.
- Senler, T.I., Dean, W.L., Murray, L.F. and Wittliff, J.L. (1985): Quantification of cytochrome P-450-dependent cyclohexane hydroxylase activity in normal and neoplastic reproductive tissues. *Biochem. J.*, **227**, 379-387.
- Simon, R.H., Scoggin, C.H. and Patterson, D. (1981): Hydrogen peroxide causes the fetal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, **256**, 7181-7186.
- Smyth, H.F. Jr., Carpenter, C.P., Weil, C.S., Pozzani, U.C., Striegel, J.A. and Nycum, J.S. (1961): Range-finding toxicity data: List VII. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **30**, 470-476.
- Treon, J.F., Jr. Crutchfield, W.E. and Kitzmiller, K.V. (1943): The physiological response of animals to cyclohexane, methylcyclohexane and certain derivatives of these compounds. II. *Inhalation. J. Ind. Hyg. Toxicol.*, **25**, 323-347.
- Vessey, D.A. (1996): Metabolism of xenobiotics by the human liver. In *Hepatology*, edited by D. Zakim, and T. D. Boyer. Philadelphia: W. B. Saunders Co.
- Yoon, C.G. (1984): A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Res. J. (Keimyung Junior College)*, **2**, 295-308.
- 이혜자, 윤종국, 박원학 (1999): CCl₄에 의한 간손상 정도 차이에 따른 Xylene 대사 변동. *한국독성학회지*, **15**, 345-352.
- 이혜자, 조현국, 윤종국 (1999): 흰쥐에 있어서 사염화탄소에 의한 간손상이 Xylene 대사에 미치는 영향. *한국환경위생학회지*, **25**, 102-108.
- 윤종국 (1985): 흰쥐에 사염화탄소 투여시 Xanthine Oxidase 활성 변동에 관한 연구. *박사학위논문*, 영남대학교.
- 윤종국 (1988): 흰쥐에 사염화탄소에 의한 간 손상시 Actinomycin 및 Prednisolone이 혈청 Xanthine Oxidase 활성에 미치는 영향. *계명대학교 기초과학연구논집*, **7**, 113-123.
- 윤종국, 이미경, 이상일 (1998): 성장기간이 다른 흰쥐에 사염화탄소 투여가 Oxygen Free Radical 생성계 및 해독계 효소 활성에 미치는 영향. *한국노화학회지*, **8**, 35-42.
- 윤종국, 전태원, 이혜자 (1999): 간손상 실험동물 모델에서 Xylene 투여가 혈청 Xanthine Oxidase 활성에 미치는 영향. *계명대학교 기초과학연구논집*, **18**, 103-108.
- 전태원, 이상일, 윤종국 (2000): Cyclohexane에 의한 흰쥐의 폐독성. *대한의생명과학회지*, **6**, 245-251.