

Changes of Hepatic Cyclohexane Metabolizing Enzyme Activities and Its Metabolites in Serum and Urine after Cyclohexane Treatment

Ji-Yeon Kim¹, Tae-Won Jeon², SangHee Lee³, Chinkap Chung⁴,
Hyun-Sung Joh⁵, Sang-Il Lee^{6†} and Chong-Guk Yoon¹

¹Department of Public Health, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea.

²College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea.

³Department of Beauty Design, Kyongdo Provincial College, Yeochun 757-807, Korea.

⁴Department of Chemistry, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea.

⁵Department of Oriental Medicine Resources, Asia University, Gyeongsan 712-749, Korea.

⁶Department of Food Nutrition and Cookery, Keimyung College, Daegu 704-703, Korea

This study was conducted to determine the kinetics of cyclohexane metabolites (the biomarker on cyclohexane exposure), the changes of hepatic cyclohexane metabolizing enzyme activities and the metabolites of cyclohexane in urine or serum. The rats were sacrificed at 2, 4, 8, 12 and 24 hr after administration of one dose of cyclohexane (1.56 g/kg body weight, i.p.). The metabolites of cyclohexane in urine were identified as cyclohexanol, cyclohexanone, *trans*-1,2-cyclohexanediol and 1,4-cyclohexanediol with cyclohexane metabolite being 124.00, 0.78, 23.28 and 2.75 (g/g of creatinine, 1×10^{-3}). Most of the cyclohexanol and *trans*-1,2-cyclohexanediol were determined to be in the form of β -glucuronide conjugates, whereas cyclohexanone and 1,4-cyclohexanediol were found as free forms. In toxicokinetics of serum cyclohexane metabolites, cyclohexanol showed a rapid increase, reaching the plateau at 4 hr, after this time rapidly decreased throughout 24 hr. Changes of cyclohexanone also showed the similar pattern with cyclohexanol except somewhat lower concentration. *Trans*-1,2-cyclohexanediol, however, showed a gradual increase until 12 hr with the continued same levels throughout 24 hr. On the other hand, 1,4-cyclohexanediol was detected as trace levels at 4 and 12 hr, respectively. The administration of cyclohexane led to a significant increase of hepatic aniline hydroxylase activity from 2 to 8 hr. The activity of hepatic alcohol dehydrogenase showed a significant increase at 4 hr and then were recovered to the level of the control at 24 hr. On the other hand, there were no differences in liver weight/body weight between the control and cyclohexane-treated animals. However, there were the changes of aniline hydroxylase and alcohol dehydrogenase activities on time-dependent pattern after cyclohexane treatment, which influence on the degree of cyclohexane metabolites both in blood and urine. These results suggest that differential determination of cyclohexane metabolites in urine and serum may be able to be as a biomarker of cyclohexane-exposure in the body. But in this fields further study is needed.

Key Words: Biomarker, Cyclohexane, Cyclohexanol, Cyclohexanone, 1,4-cyclohexanediol, *trans*-1,2-cyclohexanediol

서 론

최근 산업의 발전에 따른 산업 화학물질의 종류와 사용량은 날로 증가되고 있다. 특히 산업장에서 유기용제로 사용되

고 있는 산업 화학물질은 산업재해와 관련하여 인간의 건강에 심각한 영향을 미치고 있어 많은 문제를 야기하고 있다.

Cyclohexane은 비교적 독성이 낮은 물질로 인정되어 benzene (Perbellini and Brugnone, 1980)과 *n*-hexane (Yasugi et al., 1994)의 대체물질로 사용되어 오고 있으며, 우리나라 산업장에서도 널리 이용되는 유기용제이다. 생체 내에 흡수된 cyclohexane은 체내 장기 조직세포 중에 존재하는 microsomal cytochrome P-450 dependent monooxygenase에 의해 cyclohexanol로 대사되며 (Nordblom and Coon, 1977; Senler et al., 1985) 그 중 일부는 glucuronide 형태로 포함된 다음 소변

*논문 접수: 2005년 9월 12일

수정재접수: 2005년 10월 22일

†교신저자: 이상일, (우) 704-703 대구광역시 달서구 신당동 700,

계명문화대학 식품영양조리과

Tel: 053-589-7823, Fax: 053-589-7821

e-mail: lsi125@km-c.ac.kr

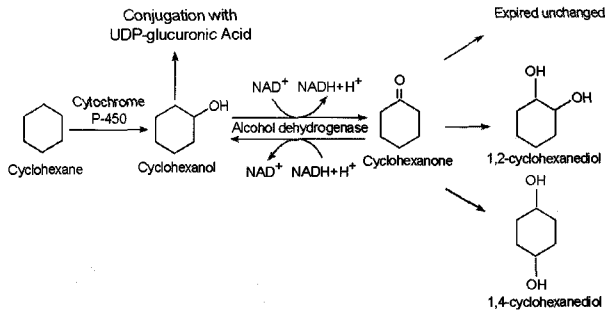


Fig. 1. Biotransformation of cyclohexane.

중으로 배설되고 (Treon et al., 1943; Elliott et al., 1959), 나머지는 alcohol dehydrogenase의 촉매작용에 의해 독성 중간대사산물인 cyclohexanone (Smyth et al., 1969; James and Waring, 1971)으로 산화되는 것으로 알려져 있다. 그리고 cyclohexanone은 그 자체 혹은 1,2-cyclohexanediol 또는 1,4-cyclohexanediol의 형태 (Sakata et al., 1989; Perico et al., 1999)로 소변 중에 배설된다고 한다 (Fig. 1). 또한 cyclohexane이나 cyclohexanol 혹은 cyclohexanone의 인체 폭로 시 cyclohexanol, 1,2-cyclohexanediol 및 1,4-cyclohexanediol이 소변 중에서 검출 (Mráz et al., 1998)되는 것으로 알려져 있다.

한편 cyclohexane이 생체에 폭로되었을 때, 피부 (Longacre, 1987; Iyadomi et al., 1998), 위장 (Longacre, 1987), 신장 (Bernard et al., 1989), 신경계 (Naskali et al., 1994) 및 폐조직 (Jeon et al., 2000)의 손상이 나타나는 것으로 보고되고 있으며, 미국 산업안전보건연구소 (NIOSH, 1985)에서는 cyclohexane을 눈, 호흡기계, 피부 및 중추신경계 손상을 야기할 수 있는 물질로 분류하고 있어 상당한 독성을 가진 물질로 사료된다. 그리고 James와 Waring (1971) 및 Gupta 등 (1979)은 cyclohexanone이 조혈계 및 신경계 독성을 나타낸다고 하였고, Bernard 등 (1989)은 cyclohexanol이 신장 장애를 유발한다고 보고하고 있다. 이 두 물질 모두 cyclohexane의 대사산물이란 점을 고려해 볼 때 cyclohexane의 독성은 중간대사산물의 의해 야기될 것으로 사료되며, cyclohexanol과 cyclohexanone의 생체 내 분포, 대사 및 배설과 같은 parameter들의 동력학적인 변화에 의해 cyclohexane의 체내 독성발현 정도가 상당한 영향을 받을 것으로 생각된다. 그러나 아직까지 cyclohexane의 생체 폭로 시 소변 중에서 일부 대사산물만을 측정하였을 뿐, 시간에 따른 대사산물의 동력학적인 변화와 더불어 cyclohexane의 대사에 직접적인 영향을 미치는 대사 효소 활성 변동에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 cyclohexane을 흰쥐에 투여한 다음 경시별로 처치하여 cyclohexane의 대사산물을 혈액 및 소변 중에서 정량함과 동시에 cyclohexane의 대사에 관여하는 cytochrome P-450에 의한 aniline hydroxylase (AH) 활성 및 alcohol dehydrogenase (ADH) 활성 변동을 상호 비교 검토함으로써 생체의 cyclohexane 노출 정도를 판정할 수 있는 biomarker에 대한 기초 자료를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 동물 및 처치

동물은 6주령된 체중 200 ± 10 g의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 종 수 흰쥐를 대한실험동물센터로부터 구입한 후 사육실 (온도: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도: $50 \pm 5\%$)에서 1주일 동안 적응시켜 실험에 사용하였다. 각 실험군은 대조군 (0시간)과 cyclohexane을 1회 투여한 다음 2, 4, 8, 12 및 24시간 후에 처치하는 군으로 나누었으며 각각 5마리씩 분리 수용하였다. 실험 기간 동안 물과 사료 (삼양사)의 양은 제한 없이 공급하였다. Cyclohexane은 Bernard 등의 방법 (1989)에 따라 체중 kg 당 1.56 g을 1회 복강으로 투여하였다. 대조군과 24시간군의 경우에는 실험동물을 metabolic cage 속에 넣어 24시간 동안 소변을 채취하여 대사산물 측정 시료로 사용하였다. 각 실험군은 처치 24시간 전부터 물만 공급하고 금식시켰다.

동물의 처치는 효소 활성도의 일 중 변동을 고려하여 일정 시간에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였으며 ether 마취 하에 복부를 개복한 후 복부대동맥으로부터 채혈하여 실험 사시켰다. 4°C 생리식염수로 간문맥을 통하여 간을 관류하고 조직 내에 남아 있는 혈액을 제거한 다음 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 씻은 후 여지로 압박하여 장기 내에 남아 있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻고 cyclohexane 대사산물 측정 시료로 사용하였다.

2. 효소 시료의 조제

간조직 일정량을 절취하여 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 넣고 glass teflon homogenizer를 이용하여 20% (w/v) 마쇄균 질액을 만들었다. 이 균질액을 600 \times g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 상층액을 10,000 \times g에서 20분간 원심분리하여 다시 상층액을 얻고 이 상층액을 105,000 \times g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획과 microsome 분획을 얻었다. Cytosol 분획은 ADH 활성도 측정용 시료로 사용하였고 microsome 분획은 일정량의 0.25 M sucrose 용액으로 재현탁하여 AH 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

3. 효소 활성도 측정

간조직 중 AH 활성도는 aniline을 기질로 하여 37°C 에서 반응시키는 동안 유리되는 *p*-aminophenol을 phenol 시약으로

Table 1. Gas chromatography conditions for analysis of cyclohexane metabolites

Items	GC		
Instrument	HP 6890		
GC conditions			
Column	HP-FFAP Capillary 30 m×0.32 mm (ID)		
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 µL		
Detector	FID		

발색시켜 640 nm에서 흡광도를 측정하는 Bidlack과 Lowery의 방법 (1982)에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소 반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1시간 동안 반응하여 기질로부터 생성시킨 *p*-aminophenol의 양을 nmole로 표시하였다. 간조직 중 ADH 활성도는 Bergmeyer의 방법 (1974)에 따라 효소에 의해 기질인 ethanol과 조효소인 NAD⁺로부터 생성된 NADH를 340 nm에서 측정하였다. 활성도 단위는 단백질 1 mg이 1분간 반응하여 생성시킨 NADH의 양을 µmole로 표시하였다. 단백질 정량은 Lowry 등의 방법 (1951)에 따라 bovine albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다.

4. Cyclohexane의 대사산물 측정

Cyclohexane의 대사산물 측정은 Bao 등 (1997)의 방법에 준하여 액체-액체 추출방법으로 분석을 행하였다. 추출용매는 ethyl acetate 및 acetonitrile을 7:3의 비율로 혼합한 용매를 사용하였다. Cyclohexane 대사산물의 측정은 Bao 등 (1997)의 방법에 준하여 소변 및 혈청 시료 0.5 mL을 취해 원심분리용 시험관 (screw cap tube)에 넣고 추출용매 (ethyl acetate : acetonitrile = 7 : 3) 0.5 mL을 가하여 3분간 교반한 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 vial에 옮긴 후 반복 추출한 상층액을 합하였다. 이 상층액 1 µL를 FID (flame ionization detector)가 장착된 gas chromatography (GC)에 주입하고 Table 1의 분석조건에 따라 정량하였다. 그리고 소변 중

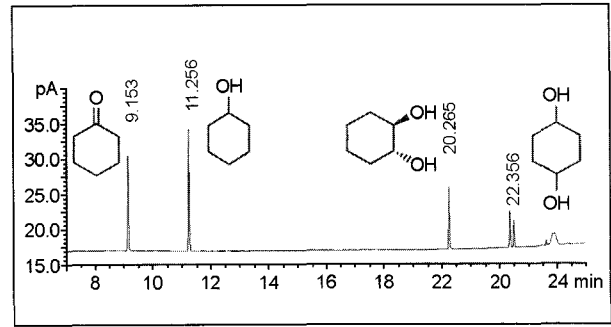


Fig. 2. GC chromatogram of standard compounds.

cyclohexane의 총 대사산물을 측정하기 위해, 소변 1 mL에 β-glucuronidase 2,000 unit를 가하여 37°C에서 1시간 동안 가수분해 시킨 다음 동일한 방법으로 추출하여 정량하였다. 각 대사산물의 정량은 표준물질을 GC에 주입하여 나온 chromatogram의 면적을 이용하여 작성한 표준 검량선에 준해 산출하였다. 소변 시료 중의 creatinine 측정은 Butler 방법 (1976)에 준하였다. Cyclohexane 대사산물의 함량은 혈청 1 mL 당 mg으로, 소변은 creatinine g 당 g으로 나타내었다.

5. 성적 검정

실험 성적의 통계처리는 Student's t-test (Scheffler, 1980)로 하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결 과

1. Cyclohexane 대사산물의 gas chromatogram

Fig. 2는 cyclohexane 대사산물인 cyclohexanol, cyclohexanone, *trans*-1,2-cyclohexanediol 및 1,4-cyclohexanediol의 표준품을 GC에 주입하여 얻은 chromatogram이며, 대조군과 cyclohexane 투여군의 소변 및 혈청 중 cyclohexane 대사산물을 측정한 chromatogram은 Fig. 3 및 4와 같다. Fig. 2에서 각 표준물질의 retention time은 cyclohexanone이 9.15분, cyclohexanol이 11.26분, *trans*-1,2-cyclohexanediol이 20.27분 및 1,4-cyclohexanediol은 22.36분으로 나타났다. 그리고 대조군과 cyclohexane 투여 24시간군의 24시간 소변을 채취하여 분석한 결과, cyclohexane을 투여한 경우 (Fig. 3B) 대사산물의 retention time은 cyclohexanone이 9.15분, cyclohexanol이 11.26분, *trans*-1,2-cyclohexanediol이 20.27분 및 1,4-cyclohexanediol이 22.36분으로 표준물질의 chromatogram (Fig. 2)과 동일한 시간대에 해당하였으며, 또한 대조군 (Fig. 3A)에서 cyclohexane 대사산물의 분석에 영향을 미치는 방해 peak가 없음을 확인할 수 있었다.

대조군과 cyclohexane 투여 4시간군의 혈청을 분석한 결과 cyclohexane을 투여한 경우 (Fig. 4B) 대사산물의 retention

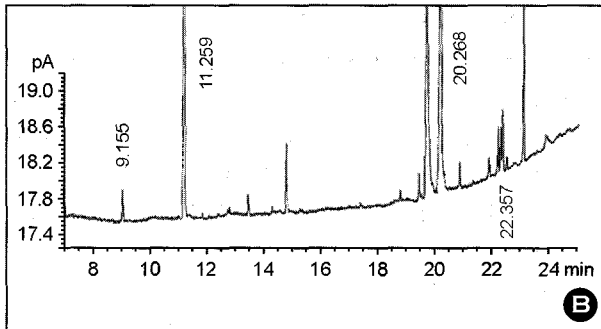
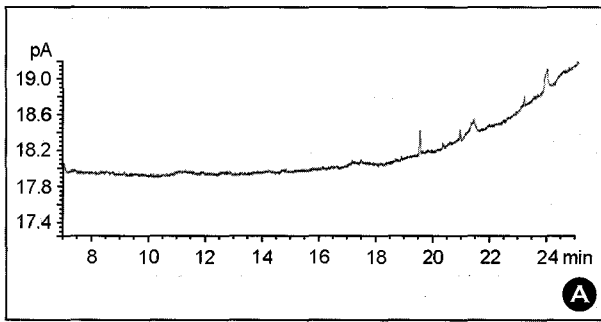


Fig. 3. GC chromatogram of control urine (A) and cyclohexane-treated urine (B).

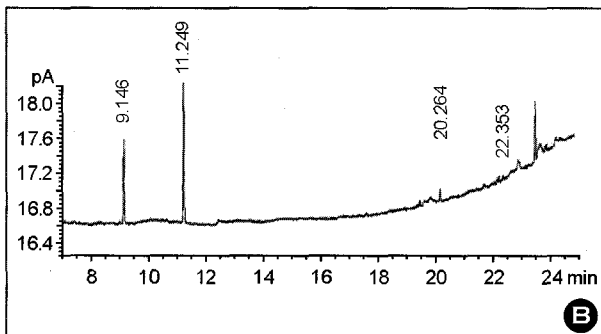
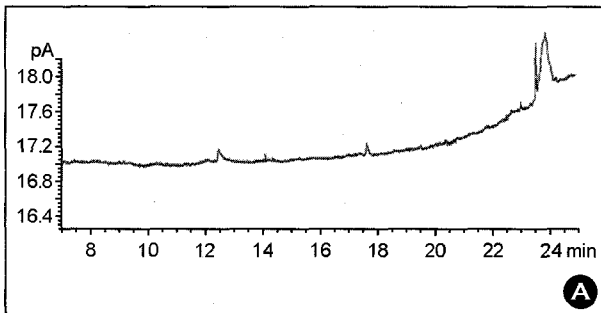


Fig. 4. GC chromatogram of control serum (A) and cyclohexane-treated serum (B).

time은 cyclohexanone이 9.15분, cyclohexanol이 11.25분, *trans*-1,2-cyclohexanediol이 20.26분 및 1,4-cyclohexanediol이 22.35분으로 표준물질의 chromatogram (Fig. 2)과 동일한 시간대이

Table 2. Urinary concentration of cyclohexanol (CH-ol), cyclohexanone (CH-one), *trans*-1,2-cyclohexanediol (CH-1,2-diol) and 1,4-cyclohexanediol (CH-1,4-diol) in the cyclohexane-treated rats

	g/g of creatinine (1×10^{-3})			
	CH-ol	CH-one	CH-1,2-diol	CH-1,4-diol
Total	124.00	0.78	23.28	2.75
Conjugate	123.26	0.06	21.71	0.89
Unconjugate	0.74	0.72	1.57	1.86

Each value represents the mean of 3 experiments

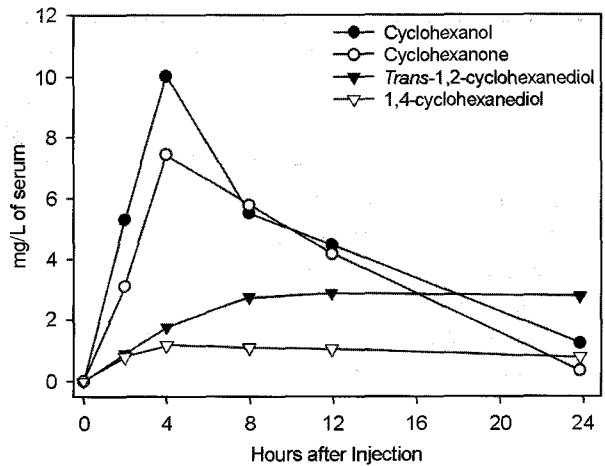


Fig. 5. Changes in serum levels of cyclohexane metabolites in the cyclohexane-treated rats. Each value represents the mean of 3 experiments. -●-, Cyclohexanol; -○-, Cyclohexanone; -▼-, *Trans*-1,2-cyclohexanediol; -▽-, 1,4-cyclohexanediol.

었으며, 대조군 (Fig. 4A)의 혈청에서 cyclohexanone, cyclohexanol, *trans*-1,2-cyclohexanediol 및 1,4-cyclohexanediol의 분석에 영향을 미치는 방해 peak가 없음을 알 수 있었다.

2. 소변 중 cyclohexane 대사산물의 함량

24시간 소변 중 cyclohexane 대사산물을 정량한 결과는 Table 2와 같다. 소변 중에서 cyclohexane 대사산물은 cyclohexanol (82.22%), *trans*-1,2-cyclohexanediol (15.44%), 1,4-cyclohexanediol (1.82%)과 cyclohexanone (0.52%) 순으로 그 함량이 확인되었다. 그리고 cyclohexanol (99.40%)과 *trans*-1,2-cyclohexanediol (93.26%)은 주로 β -glucuronide 형태로 포함, 배설되었고 cyclohexanone (92.31%)과 1,4-cyclohexanediol (67.64%)은 주로 비포함 형태로 배설되었다.

3. 혈청 중 cyclohexane 대사산물의 함량

Cyclohexane 투여 후 24시간 동안 혈청 중 cyclohexane 대사산물의 함량 변동을 경시적으로 관찰한 성적은 Fig. 5와 같다. Cyclohexanol과 cyclohexanone은 cyclohexane 투여 4시

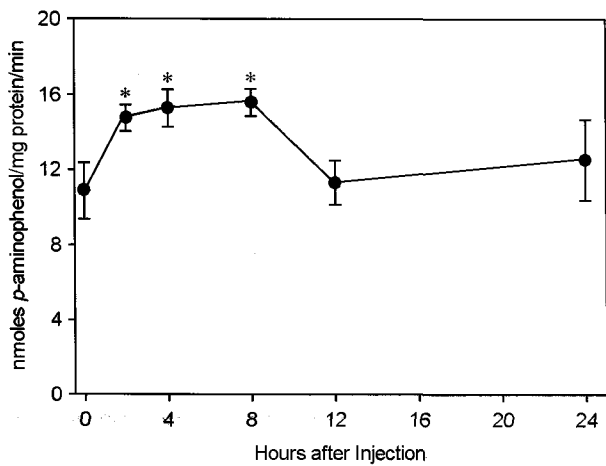


Fig. 6. Changes in hepatic aniline hydroxylase activity during 24 hrs in the cyclohexane-treated rats. The assay procedure was described in experimental methods. Each value represents the mean \pm S.E. of 5 rats. *; Significantly different from 0 hr ($P < 0.05$).

간 경과 시 각각 10.02 및 7.43 mg/L of serum으로 최고치를 나타낸 후 시간의 경과에 따라 급속히 감소하였다. 반면 *trans*-1,2-cyclohexanediol의 경우에는 cyclohexane 투여 12시간 경과 시 2.88 mg/L of serum으로 최고 농도를 보인 후 24시간 경과 후 까지도 계속적으로 유지되었다. 그러나 1,4-cyclohexanediol의 경우에는 cyclohexane 투여 4시간 및 12시간 경과 후에 혈 중에서 측정되었지만 그 이전 혹은 이후 시간에서는 GC chromatogram 상에 거의 나타나지 않았다.

4. 간조직 중 AH 활성 변동

Cyclohexane의 대사에 관여하는 간조직의 microsomal cytochrome P-450에 의해 나타나는 AH 활성 변동을 관찰한 성적은 Fig. 6과 같다. AH 활성은 cyclohexane 투여 2시간군, 4시간군 및 8시간군이 각각 14.75 ± 0.73 , 15.28 ± 1.00 및 15.59 ± 0.76 nmoles *p*-aminophenol/mg protein/min으로 대조군 10.88 ± 1.51 nmoles *p*-aminophenol/mg protein/min에 비해 유의하게 ($P < 0.05$) 증가되었으며, 이후 대조군 수준으로 회복되었다.

5. 간조직 중 ADH 활성 변동

Cyclohexane의 대사산물인 cyclohexanol의 산화에 관여하는 ADH 활성 변동을 나타낸 성적은 Fig. 7과 같다. Cyclohexane 투여 4시간군이 5.52 ± 0.17 μ moles NADH/mg protein/min으로 대조군 4.16 ± 0.10 μ moles NADH/mg protein/min에 비해 유의하게 ($P < 0.001$) 증가하였으며, 이후 대조군 수준으로 회복되었다.

6. 체중 당 간 무게 변동

Cyclohexane 투여에 의한 체중 당 간 무게 변동을 나타낸

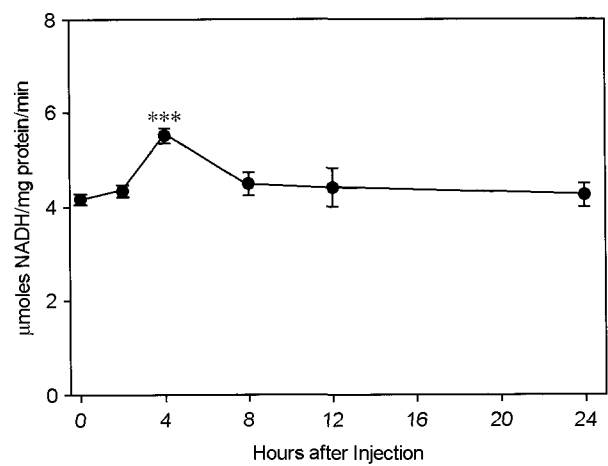


Fig. 7. Changes in hepatic alcohol dehydrogenase activity during 24 hrs in the cyclohexane-treated rats. The assay procedure was described in experimental methods. Each value represents the mean \pm S.E. of 5 rats. ***; Significantly different from 0 hr ($P < 0.001$).

Table 3. Change in liver weight per body weight (LW/BW, %) during 24 hrs in the cyclohexane-treated rats

Times (hr)	Experiments	LW/BW (%)
0		3.10 ± 0.19
2		3.28 ± 0.16
4		3.23 ± 0.15
8		3.37 ± 0.16
12		3.25 ± 0.12
24		3.24 ± 0.12

The assay procedure was described in experimental methods. Each value represents the mean \pm S.E. of 5 rats

성적은 Table 3과 같다. 체중 당 간 무게는 cyclohexane 투여 군과 대조군 사이에 별다른 차이를 나타내지 않았다.

고 찰

흰쥐에 cyclohexane을 투여한 다음 24시간 소변 중 cyclohexane 대사산물을 측정된 결과, cyclohexanol 및 *trans*-1,2-cyclohexanediol이 주된 대사산물로 나타났으며 그 외 1,4-cyclohexanediol과 cyclohexanone이 검출되었다. Elliott 등 (1959)은 cyclohexane의 인체 폭로 시 cyclohexanol의 포함체로 뇨중 배설된다고 하였으며, Mráz 등 (1998)은 소변에서 1,2-cyclohexanediol과 1,4-cyclohexanediol을 측정하여 이를 cyclohexane의 생체 노출과 관련된 biomarker로 이용할 수 있다고 하였다. 그러나 이들 연구자들은 β -glucuronide 포함 형태와 비포함 형태를 분리하여 정량하지 않고 각 대사산물의 총량을 측정된 것으로 cyclohexane에 의한 생체의 노출

정도를 정확히 판정하기에는 미흡한 것으로 생각되며, 포합 및 비포합 형태를 분리 측정함과 동시에 생체 세포의 독성에 관련되는 것으로 알려져 있는 비포합 형태 (Gupta et al., 1979)의 혈청 내 동력학적인 변화를 검토하는 것이 cyclohexane의 생체 내 노출 정도를 관찰할 수 있는 기초 자료로 더욱 유용할 것으로 사료된다. 이에 본 실험에서 실험동물에 cyclohexane을 투여한 후, 24시간 소변 중에서 이의 대사산물을 β -glucuronide 포합 형태와 비포합 형태로 분리하여 측정하였을 때, cyclohexanol과 *trans*-1,2-cyclohexanediol은 주로 β -glucuronide 포합 형태로, 1,4-cyclohexanediol 및 cyclohexanone은 비포합 형태로 배설되었다.

이와 같은 소변 중 cyclohexane 대사산물 중 비포합 형태의 생체 내 동력학적인 변화를 관찰하고자 혈액 중 이들 대사산물의 함량 변동을 측정된 결과, cyclohexanol과 cyclohexanone은 cyclohexane 투여 4시간 경과 시 최고 혈 중 농도를 나타낸 다음 이후 시간 경과에 따라 급속히 감소하였고 *trans*-1,2-cyclohexanediol은 cyclohexane 투여 12시간 경과 시 최고 혈 중 농도를 보인 후 24시간까지도 계속적으로 유지되고 있어, *trans*-1,2-cyclohexanediol이 cyclohexanol 보다 배설속도가 상당히 지연되는 것으로 사료된다.

일반적으로 xenobiotics의 독성발현은 이들 물질의 혈 중 농도 및 배설속도에 따라 좌우되며, 또한 이들 물질의 혈 중 농도와 배설속도는 xenobiotics 대사 효소의 활성에 의존되어 있는 것으로 알려져 있다 (Guidotti, 1994). 그러므로 cyclohexane 투여 후 시간 경과에 따른 cyclohexane 대사산물의 혈 중 변동 양상을 검토하고자 cyclohexane 대사에 관여하는 효소의 활성 변동을 관찰한 결과, cyclohexane의 첫 번째 대사에 관여하는 microsomal cytochrome P-450에 의한 AH 활성 (Haugen and Coon, 1976)은 cyclohexane 투여 2시간 후에서부터 8시간까지 대조군에 비해 유의하게 증가되었으며, 이후 대조군 수준으로 회복되었다. 이는 cyclohexane의 첫 번째 대사산물인 cyclohexanol (Norblom and Coon, 1977; Senler et al., 1985)이 cyclohexane 투여 4시간째에 최고 혈 중 농도를 나타내는 결과를 뒷받침해 주는 것으로 기질성 물질의 증가에 따른 활성 변동으로 생각된다.

한편 cyclohexanol의 산화에 관여하는 ADH 활성은 cyclohexane 투여 4시간째에 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가되었으며, 이후 대조군 수준으로 회복되었다. 이는 cyclohexane 투여 후 ADH에 의해 생성되는 cyclohexanone (Smyth et al., 1969; James and Waring, 1971)이 혈 중에서 4시간째 최고치를 나타낸 결과를 뒷받침해 주고 있다.

Cyclohexane의 독성은 이의 중간대사산물인 cyclohexanol과 cyclohexanone에 의해 나타난다고 한다 (James and Waring, 1971; Gupta et al., 1979; Bernard et al., 1989). Cyclohexane 투여 후 이의 중간대사산물인 cyclohexanol과 cyclohexanone의 혈

중 농도 변동 상태와 조직 손상의 정도를 상호 비교 검토하고자 간조직 손상의 parameter로 알려져 있는 체중 당 간 무게 (Yoon et al., 1994) 변동을 관찰하였을 때, cyclohexanol과 cyclohexanone은 cyclohexane 투여 후 4시간째 최고 혈 중 농도를 나타내고 있어 4시간째부터 조직의 손상이 유도된 것으로 사료되며, 24시간째는 대조군 수준으로 회복되었다. 그러나 체중 당 간 무게는 대조군에 비해 별다른 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과로 미루어 보아 cyclohexane 1회 투여에 의해서는 별다른 조직의 손상이 유도되지 않았지만 연속적인 노출에 의해서는 cyclohexane 노출 후, 조직의 손상을 유도시키는 것으로 알려져 있는 비포합 형태의 cyclohexanol 및 cyclohexanone이 최고로 생성되는 4시간 이후부터 조직의 손상이 초래될 것으로 사료된다.

이상의 모든 실험 결과를 종합해 볼 때, cyclohexane 투여 후 시간 경과에 따라 cyclohexane의 대사에 관여하는 간조직의 AH 및 ADH 활성 변동이 나타나며, 이로 인하여 cyclohexane 대사산물의 혈 중 농도 변화가 초래된 것으로 생각된다. 그러므로 혈액이나 소변 중의 cyclohexane의 대사산물을 분리하여 측정함으로써 cyclohexane의 노출 정도와 더불어 조직의 손상 정도를 판정할 수 있는 biomarker로서 이용이 가능할 것으로 판단된다. 그러나 cyclohexane의 노출 정도와 그에 따른 대사산물의 함량 변동 및 조직 손상의 정도 사이에 어떤 상호 관련성이 있는지에 대한 많은 연구가 행해져야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Bao J, Smith RL, Sauer JM, Pillai U, Sipes IG. Simultaneous determination of cyclohexene oxide and its metabolites in rat plasma and urine by gas chromatography. *J Chromatogr B*. 1997. 696: 59-68.
- Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis*. 1974. Vol. 2, pp 428-429. Academic Press. NY, USA.
- Bernard AM, de Russis R, Normand JC, Lauwerys RR. Evaluation of the subacute nephrotoxicity of cyclohexane and other industrial solvents in the female Sprague-Dawley rat. *Toxicol Lett*. 1989. 45: 271-280.
- Bidlack WR, Lowery GL. Multiple drug metabolism: p-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem Pharmacol*. 1982. 31: 311-317.
- Butler AR. The jaffe reaction identification of the coloured species. *Clin Chem Acta*. 1976. 59: 227-232.
- Elliott TH, Parke DV, Williams RT. Studies in detoxication. The metabolism of cyclo [14 C] hexane and its derivatives. *Biochem J*. 1959. 72: 193-200.

- Guidotti TL. Principles of occupational toxicology in Occupational medicine (Zenz C, Dickerson OB, Horvath EP Jr. Eds). 1994. pp 70-84. Mosby. St. Louis, USA.
- Gupta PK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J. Toxicological aspects of cyclohexanone. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1979. 49: 525-533.
- Haugen DA, Coon MJ. Properties of electrophoretically homogeneous phenobarbital-inducible and β -naphthoflavone-inducible forms of liver microsomal cytochrome P-450. *J Biol Chem*. 1976. 251: 7929-7939.
- Iyadomi M, Higaki Y, Ichiba M, Morimoto M, Tomokuni K. Evaluation of organic solvent-induced inflammation modulated by neuropeptides in the abdominal skin of hairless rats. *Ind Health* 1998. 36: 40-51.
- James SP, Waring RH. The metabolism of alicyclic ketones in the rabbit and rat. *Xenobiotica*. 1971. 1: 573-580.
- Jeon TW, Lee SI, Yoon CG. Effect of cyclohexane on the lung toxicity in rats. *Korean J Biomed Lab Sci*. 2000. 6: 245-251.
- Longacre SL. Cyclohexane in Ehtel Browning's toxicity and metabolism of industrial solvents (Snyder R. Ed). 1987. pp. 225-235. Elsevier. Amsterdam, Netherlands.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951. 193: 265-275.
- Mráz J, Gálová E, Nohová H, Vítková D. 1,2- and 1,4-cyclohexanediol: major urinary metabolites and biomarkers of the exposure to cyclohexane, cyclohexanone and cyclohexanol in humans. *Int Arch Occup Environ Health*. 1998. 71: 560-565.
- Naskali L, Oksanen H, Tähti H. Astrocytes as targets for CNS effects of organic solvents in vitro. *Neurotoxicology* 1994. 15: 609-612.
- NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health). NIOSH pocket guide to chemical hazards. DHHS (NIOSH) Publication No. 85-114. 1985. NIOSH. Cincinnati, USA.
- Nordblom GD, Coon MJ. Hydrogen peroxide formation and stoichiometry of hydroxylation reactions catalyzed by highly purified liver microsomal cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys*. 1977. 180: 343-347.
- Perbellini L, Brugnone F. Lung uptake and metabolism of cyclohexane in shoe factory workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1980. 45: 261-269.
- Perico A, Cassinelli C, Brugnone F, Bavazzano P, Perbellini L. Biological monitoring of occupational exposure to cyclohexane by urinary 1,2- and 1,4-cyclohexanediol determination. *Int Arch Occup Environ Health*. 1999. 72: 115-120.
- Sakata M, Kikuchi J, Haga M, Ishiyama N, Maeda T, Ise T, Hikita N. Disposition of acetone, methyl ethyl ketone and cyclohexanone in acute poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1989. 27: 67-77.
- Scheffler WC. Statistics for the biological sciences. 1980. pp 84-89. Addison-Wesley. London, England.
- Senler TI, Dean WL, Murray LF, Wittliff JL. Quantification of cytochrome P-450-dependent cyclohexane hydroxylase activity in normal and neoplastic reproductive tissues. *Biochem J*. 1985. 227: 379-387.
- Smyth HF Jr, Carpenter CP, Weil CS, Pozzani UC, Striegel JA, Nycum JS. Range-finding toxicity data: List VII. *Am Ind Hyg Assoc J*. 1969. 30: 470-476.
- Treon JF, Crutchfield WE Jr, Kitzmiller KV. The physiological response of animals to cyclohexane, methylcyclohexane and certain derivatives of these compounds. II. Inhalation. *J Ind Hyg Toxicol*. 1943. 25: 323-347.
- Yasugi T, Kawai T, Mizunuma K, Kishi R, Harabuchi I, Yuasa J, Eguchi T, Sugimoto R, Seiji K, Ikeda M. Exposure monitoring and health effect studies of workers occupationally exposed to cyclohexane vapor. *Int Arch Occup Environ Health* 1994. 65: 343-350.
- Yoon CG, Ban JT, Shin JK. Effect of earthworm flour supplemented diet on the liver damage in CCl₄-treated rats. *J East Asian Soc Dietary Life*. 1994. 4: 105-112.