

알코올 섭취 유무에 따른 cyclohexane의 폐 독성

김 병 렬¹, 이 상 희², 조 현 국*

¹대구시 보건환경연구원 보건연구부,

²경도대학 뷰티디자인과, 경운대학교 안경광학과

Alcohol Ingestion Increases Lung Injury Induced by Cyclohexane

Byung Ryul Kim¹, Sang Hee Lee² and Hyun Gug Cho*

¹Health Research Department, Health & Environmental Institute of Daegu, Daegu, 706-732 Korea

²Department of Beauty Design, Gyongdo College, Kyungbuk, 757-807 Korea

Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Kyungbuk, 730-852 Korea

(Received June 8, 2005; Accepted June 24, 2005)

ABSTRACT

To evaluate the effects of ingestion of alcoholic drinks on the toxicities of industrial compounds, cyclohexane (CH) was intraperitoneally administrated to rats (1.56 g/kg body weight), which had been ingested 15% ethanol for up to 6 weeks, 4 times by once a day and every other day. Following the last treatment of ethanol or CH, blood and lung tissues were collected during 24 hours prior to sacrifice of animals.

Comparing with the control group, the lung weight per body weight (%) and the protein content in bronchoalveolar lavage fluid were increased in the ethanol pretreated group, and the glucose 6 phosphatase activity in lung tissues was decreased in the CH treated group. In a morphological observations, pulmonary embolus were found in the CH treated group, whereas a partial pulmonary atelectasis and a much increase in pulmonary embolus were shown in the CH treated group after pretreated with ethanol for 6 weeks.

In conclusion, these results indicate that ethanol pretreatment could enhance CH metabolism and that CH treatment with ethanol pretreatment could induce lung injury due to the increased CH metabolism.

Key words : Alcohol, Cyclohexane, Lung Injury

서 론

인체가 산업화학물질에 폭로될 경우 체 내 생리적 상태에 따라 그 중독현상은 상이하게 나타나는 것으로 알려져 있다. 더욱이 주류의 섭취는 화학물질에 의

한 독성작용에 상당한 영향을 미치게 되는데, 습관성 음주에 따른 xenobiotic의 인체 폭로는 그 중독현상이 심화되는 것으로 알려져 있으나 (Stott et al., 1982; Liira et al., 1990), 적당한 알코올의 섭취는 오히려 대사를 촉진시키기도 한다고 (Smith et al., 1980; Hetu et al., 1983) 하였다. 따라서 알코올의 섭취를 병행할 때

* Correspondence should be addressed to Dr. Hyun Gug Cho, Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Gumi, Kyungbuk, 730-852 Korea. Ph.: (054)479-1333, FAX: (054)479-1333, E-mail: hgcho@ikw.ac.kr

이들 물질이 인체에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하는 것은 근로자들의 건강관리 측면에서 매우 의의가 있다고 사료된다.

알코올의 대사는 주로 alcohol dehydrogenase (ADH)에 의해 간에서 진행되며, 20% 정도는 microsomal cytochrome p450계와 catalase에 의해 대사되어 acetaldehyde로 변환된 다음, aldehyde dehydrogenase에 의해 acetic acid로 산화되어 신장과 폐를 통해 배설된다 (Lieber, 1991). 이 때 생성된 aldehyde는 알코올에 비해 반응성이 높고 독성이 강하여 알코올 섭취 시 생성된 oxygen free radical과 더불어 알코올성 간 상해의 원인물질로 작용한다 (Nordmann et al., 1992; Lieber, 1997).

Cyclohexane (CH)은 그 안정성이 인정되어 *n*-hexane과 benzene의 대체물질로 널리 이용되고 있으며 (Perbellini & Brugnone, 1980), 라커와 수지, 페인트의 용매로 사용될 뿐만 아니라 식물성 오일의 추출제와 대체 세정제로도 널리 사용되고 있다. 이러한 CH는 체 내에 흡수된 후 간 조직을 거쳐 노 중으로 배설되고, 독성 중간대사산물인 CH-one은 그 자체로 혹은 CH-ol로 재환원되어 폐를 통해 외기로 직접 배출되기도 한다 (Mutti et al., 1981). 그러나 CH 자체의 안전성 평가에 대한 연구는 Yasugi et al. (1994)이 있을 뿐 미흡한 실정이며, 더욱이 혼합용제의 구성성분으로 이용되고 있어서 제한적인 연구만 이루어져 왔다 (Seedorf & Olsen, 1990).

따라서 본 연구에서는 알코올의 섭취가 xenobiotics 대사에 영향을 미친다는 점을 고려해, 에탄올을 섭취시킨 실험동물에 CH를 복강 투여한 다음 폐 내 CH 대사효소 변화에 따른 폐 조직의 손상도와 형태학적 변화를 관찰하여 이들 결과를 상호 비교·검토하고자 하였다.

재료 및 방법

동물은 200±10g의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 중 수컷 흰쥐를 대한실험동물센터 (Korea)로부터 구입 후 사육실에서 1주일간 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 실험군은 대조군과 에탄올 6주 섭취군 및 CH 단독투여군, 그리고 에탄올 6주 섭취 후 CH 투여군으

로 나누었으며, 각각 6마리씩 분리 수용하였다.

에탄올의 섭취는 15% (v/v) 에탄올을 실험기간 동안 섭취시켰으며, CH는 Bernard et al. (1989)의 방법에 따라 체중 kg당 1.56g을 1일 1회, 2일 간격으로 4회 복강투여하였고, 대조군은 동량의 olive oil을 복강으로 투여하였다. 동물의 처치는 모든 실험군에서 마지막 투여 후 24시간 뒤에 실시하였고, ether 마취 하에 배대동맥으로부터 채혈하여 실험사시켰다. 폐는 폐동맥을 통해 생리식염수로 관류한 다음 적출하여 장기 내에 남아 있는 수분을 가능한 제거시키고 그 무게를 측정하였다.

1. 폐 세척액 (bronchoalveolar lavage; BAL) 내 단백질 함량의 측정

기관지를 통해 8.0 mL의 생리식염수로 폐 세척을 실시하여 6.0 mL의 폐 세척액을 얻은 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하여, 세포성분을 제거한 상층액을 이용하여 단백질의 함량을 측정하였다.

2. Alcohol dehydrogenase (ADH) 활성도 측정

조직 중 ADH의 활성도는 Bergmeyer et al. (1974)의 방법에 따라 측정하였다. 기질인 에탄올과 조효소인 NAD⁺로부터 37°C에서 5분간 반응하여 생성되는 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 활성도 단위는 단백질 1 mg이 1분간 생성한 NADH의 양을 nmole로 표시하였다.

3. Cytochrome p450 dependent aniline hydroxylase (CYPdAH) 활성도 측정

조직 중 CYPdAH의 활성도는 aniline을 기질로 하여 37°C에서 15분간 반응시켜 유리되는 *p*-aminophenol을 phenol 시약으로 발색시켜, 640 nm에서 흡광도를 측정하는 Bidlack & Lowery (1982)의 방법에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1시간 동안 반응하여 기질로부터 생성된 *p*-aminophenol의 양을 nmole로 표시하였다.

4. Glucose-6-phosphatase (G6P) 활성도 측정

조직 중 G6P의 활성도는 Hasumura et al. (1974)의

방법에 따라 측정하였다. G6P를 기질로 하여 30°C에서 20분간 반응시켜 유리되는 inorganic phosphorus를 Fiske & Subbarow (1925)의 방법에 따라 발색시킨 다음, 680 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성도 단위는 단백질 1 mg이 20분간 반응하여 생성되는 phosphorus의 양을 nmole로 표시하였다.

5. 폐 조직의 관찰

폐 조직을 적출하여 조직 내 공기를 제거하고 10% neutral buffered formalin에 고정시킨 후, 흐르는 물에 수세하고 알코올을 이용하여 탈수시켰다. 탈수가 끝난 조직을 파라핀에 포매하여 박절기 (Lipshaw model-45)를 이용하여 4 μm의 절편을 만든 다음, hematoxylin과 eosin으로 염색하고 광학현미경 (Olympus BH-2)으로 관찰하였다.

6. 폐 조직의 미세구조 관찰

폐 조직을 적출하여 조직 내 공기를 제거하고 2.5% glutaraldehyde로 전고정, 1% osmium tetroxide로 후고정시킨 다음, 알코올로 탈수시키고 epoxy resin에 포매하여 열중합시켰다. 제작된 블록은 초박절기 (Reichert Supernova)를 이용하여 60~70 nm 두께의 절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 다음, 전자현미경 (Hitachi H-600)으로 관찰하였다.

결 과

1. 폐 손상 지표

폐 손상의 정도를 알아보기 위해 실시한 체중 당 폐 무게, 폐 세척액 내 단백질 함량, 폐 조직 내 G6P 활성도 측정결과는 Table 1과 같다.

체중 당 폐 무게는 에탄올 투여군과 CH 투여군에서 대조군과 비교하여 증가되는 경향이었고, 에탄올 섭취 후 CH 투여군은 대조군과 비교하여 유의하게 증가되었다. 폐 세척액 내 단백질 함량은 CH 투여군과 에탄올 섭취 후 CH 투여군에서 대조군과 비교하여 각각 약 4.0배, 3.0배 증가되었고, 에탄올 섭취 후 CH 투여군에서 나타난 단백질 함량은 에탄올 섭취군과 비교

Table 1. Effects of cyclohexane treatment on the lung weight/body weight (LW/BW, %), protein contents of bronchoalveolar lavage (BAL) and glucose-6-phosphate (G6P) activity in ethanol pretreated rats

Groups	LW/BW (%)	BAL protein ¹⁾	G6P ²⁾
Control	0.855 ± 0.042 ^{ab}	27.26 ± 2.45 ^a	2.434 ± 0.161 ^{ab}
6EH	0.907 ± 0.071 ^{abc}	32.27 ± 5.46 ^a	3.067 ± 0.376 ^{bc}
CH	1.079 ± 0.120 ^{bc}	109.89 ± 25.45 ^c	1.704 ± 0.302 ^a
6ECH	1.116 ± 0.055 ^c	82.38 ± 13.55 ^{bc}	1.511 ± 0.194 ^a

Each value represents the mean ± S.E. of 6 rats and 3 experiments. Value with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. EH: ethanol treated, CH: cyclohexane treated, ECH: ethanol and cyclohexane treated, Unit: ¹⁾mg/two lungs, ²⁾nmoles Pi formed/min/mg protein

하여 약 2.6배 유의하게 증가되었다. 그리고 G6P의 활성도는 CH 투여군과 에탄올 섭취 후 CH 투여군이 대조군과 비교하여 각각 30% 및 38% 감소되었으며, 에탄올 섭취 후 CH 투여군은 에탄올 투여군과 비교하여 51% 유의하게 감소되었다.

2. 폐의 형태학적 변화

에탄올 6주 섭취군은 대조군과 비교하여 특이한 병리적 손상소견은 발견되지 않았으나 (Fig. 1b), CH 투여군은 세기관지 주변의 부종현상과 혈관 내 색전으로 보여지는 지방소적이 축적된 형태가 관찰되었다 (Fig. 1c). 에탄올 섭취 후 CH 투여군은 부분적인 무기폐현상이 관찰되었으며, CH 투여군과 비교하여 혈관 내 지방소적의 축적이 증가된 모습이었다 (Fig. 1d). 그리고 CH 투여에 의한 미세구조의 변화를 관찰한 결과, 폐포 혈관 내 지방색전과 단핵구의 축적현상이 관찰되었으며 (Fig. 2), 제2형 폐포상피의 손상과 호중구의 침윤, 그리고 폐포강 내 불활성 lamellar body 등이 유출된 형태로 관찰되었다 (Fig. 3).

3. 폐 조직 중 cyclohexane 대사효소의 활성도 변동

에탄올을 섭취시킨 실험동물에 CH 복강투여 후 폐 조직 중 CH 대사에 관여하는 CYPdAH와 ADH의 활성도 변동을 나타낸 결과는 Table 2와 같다.

CYPdAH의 활성도는 에탄올 6주 섭취군의 경우 대조군과 비교하여 약 1.7배 유의하게 증가되었고, ADH

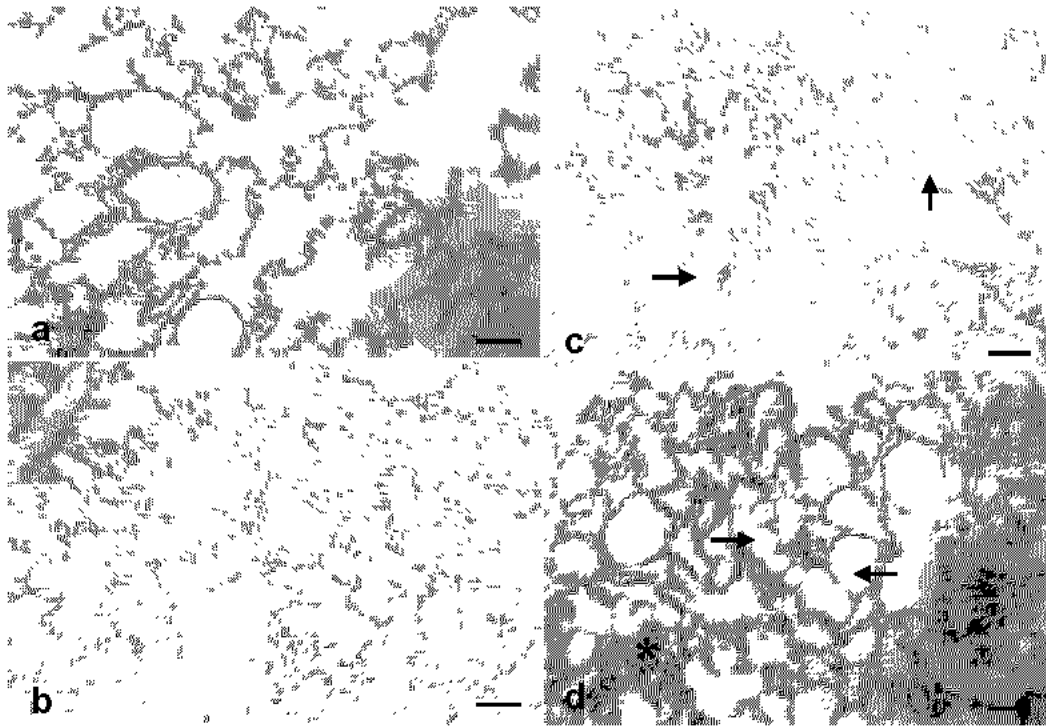


Fig. 1. Micrographs of lung tissue treated with alcohol, cyclohexane, or both of them, H&E, scale = 100 μ m. a) Control, b) 6EH : The tissue structure is intact, c) CH : Vascular lumens filled with lipid droplets are expanded to round or oval shape (arrow), d) 6ECH : Atelectasis (*) and luminal expansion of capillary (arrow) are found.

Table 2. Effects of cyclohexane treatment on the lung activities of cyclohexane metabolizing enzymes, cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase (CYPdAH) and alcohol dehydrogenase (ADH), in ethanol-pretreated rats

Groups	CYPdAH ¹⁾	ADH ²⁾
Control	0.555 \pm 0.088 ^b	2.248 \pm 0.309 ^{ab}
6EH	0.945 \pm 0.083 ^{cd}	5.193 \pm 0.566 ^c
CH	0.707 \pm 0.107 ^{bc}	3.559 \pm 0.757 ^b
6ECH	0.271 \pm 0.026 ^a	2.146 \pm 0.435 ^a

Each value represents the mean \pm S.E. of 6 rats and 3 experiments. Value with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. EH: ethanol treated, CH: cyclohexane treated, ECH: ethanol and cyclohexane treated, Unit: ¹⁾nmoles *p*-aminophenol formed/min/mg protein, ²⁾nmoles NADH formed/min/mg protein

의 활성도 역시 2.3배 유의하게 증가되었다. 그리고 에탄올 섭취 후 CH 투여군은 대조군과 비교하여

CYPdAH 활성도는 51% 유의하게 감소되었고, ADH의 활성도 역시 감소되는 경향이였다.

고찰

주류의 섭취가 산업화학물질의 생체 내 독성유발에 어떠한 영향을 미치는지 검토하기 위하여, 에탄올을 6주간 섭취시킨 실험동물에 CH를 2일 간격으로 4회 복강으로 투여하였다. 일반적으로 xenobiotics는 간 조직에서 대사되어 뇨와 분변을 통해 배설되며 (Rozman, 1985), 특히 CH는 뇨 뿐만 아니라 폐를 통해서도 배설된다 (Mutti et al., 1981). 그러므로 CH의 대사는 간 조직 뿐만 아니라 폐 조직에서도 이루어지는 것으로 생각되어, 정상군의 폐 조직에서 CH 대사효소인 CYPdAH (Nordblom and Coon, 1977) 및 ADH (Sakata et

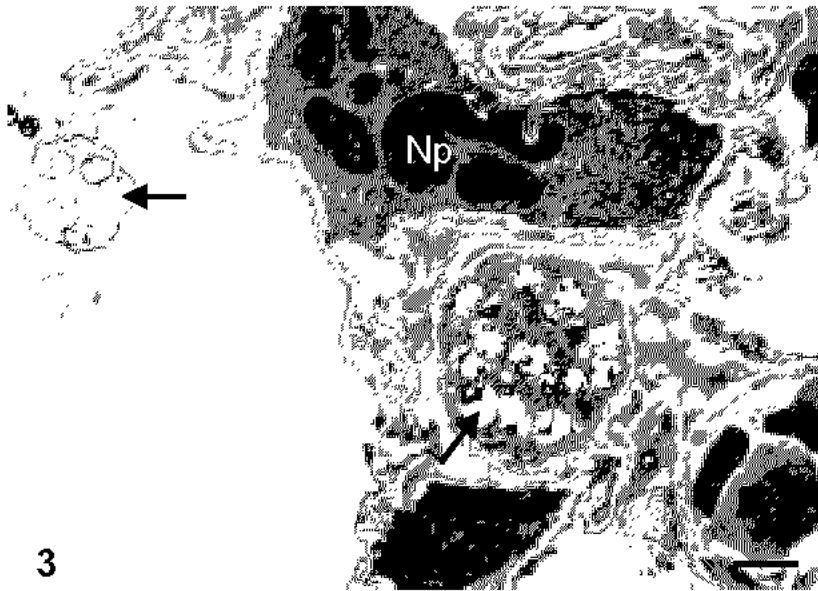
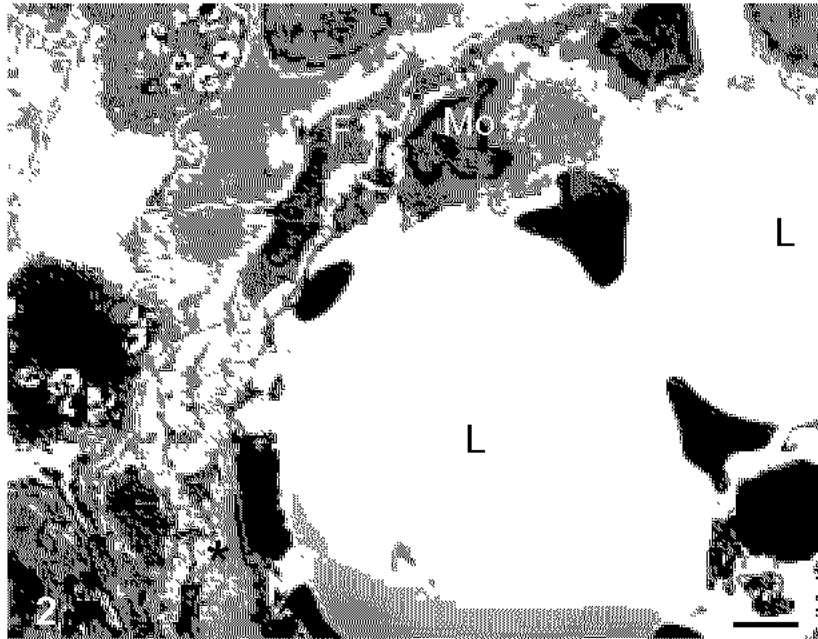


Fig. 2. Ultrastructure of alveolar tissue treated with cyclohexane, uranyl acetate and lead citrate, scale = 4.0 μm . Fat embolus (L) and monocytes (Mo) are accumulated in vascular lumen, activation of fibroblasts (F) and edema (*) are shown in interstitium.
Fig. 3. Ultrastructure of alveolar tissue treated with cyclohexane, uranyl acetate and lead citrate, scale = 3.3 μm . Neutrophils (Np) are infiltrated into the interstitium and abnormal lamellar bodies (arrows) are found in type II cell and in alveolar lumen.

al., 1993)의 활성변화를 측정하였다. 두 효소의 활성은 알코올 섭취군과 CH 투여군에서 정상군과 비교하여

모두 증가된 것은 CH의 대사가 활성화되었음을 의미하며, CH에 의한 폐 조직 손상은 간 조직 중 에탄올

전처치로 인해 과잉으로 생성된 CH 독성 중간대사산물의 일부가 무독화되지 못하고 혈액을 통해 폐에 분포되었기 때문으로 생각된다 (James and Waring, 1971; Gupta et al., 1979). 한편 폐 조직 손상의 정도를 관찰하였을 때, 폐 손상시 증가된다는 체중 당 폐 무게와 폐 세척액 내 단백질 함량은 CH 투여군과 에탄올 섭취 후 CH 투여군에서 증가되었으며, 세포 상해 시 활성이 감소되는 것으로 알려져 있는 G6P의 활성은 CH를 투여함으로써 감소되었다 (Hasumura et al., 1974; Jeon et al., 2000). 이는 CH 투여시 에탄올을 전처치함으로써 폐 조직에 손상이 초래됨을 암시해 주고 있다. 특히 폐 조직의 형태적 변화를 관찰해 본 결과 CH 투여군은 세기관지 주변의 부종현상과 혈관 내 색전으로 생각되는 지방조직이 관찰되었고, 에탄올 섭취 후 CH 투여군에서는 무기폐현상과 함께 혈관 내 지방조직 축적빈도는 CH만 투여한 군보다 증가되었다. 더욱이 호흡상피세포와 혈관내피세포가 손상된 것으로 보아, 혈관투과성 장벽의 붕괴로 인해 폐세척액 내 단백질 함량이 증가되고 폐 조직 내 G6P의 활성이 감소된 것으로 생각되었다. 그리고 폐 조직 중 CYPdAH와 ADH의 활성변동을 관찰한 결과, 에탄올 섭취군은 대조군과 비교하여 그 값이 증가되었으나 에탄올 섭취 후 CH 투여군은 다소 감소되었다. 이러한 결과는 CYPdAH와 ADH에 의해 생성되어진 CH-이과 CH-one에 의해 효소활성이 억제되어 나타난 결과로 사료되어진다.

이상의 실험결과들을 토대로 볼 때, 실험동물에 CH를 투여할 경우 폐 조직은 상피세포의 손상과 아울러 혈관 내 지방색전을 유도하며, 에탄올의 전처치는 간 조직의 CH 대사를 촉진시킴으로 인해 간 조직으로부터 과잉 생산된 CH의 독성 중간대사물이 혈액을 통해 폐 조직으로 분포되어 손상을 심화시키는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Bergmeyer HU, Gawehn K, Grassle M: Methods of enzymatic analysis. Alcohol dehydrogenase. N.Y., Academic Press. Vol. 1, 1974.
- 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 Letters* 45 : 271-280, 1989.
- Bidlack WR, Lowely GL: Multiple drug metabolism: p-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem Pharmacol* 31(3) : 311-317, 1982.
- Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Bio Chem* 66 : 375-400, 1925.
- Gupta PK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J: Toxicological aspects of cyclohexanone. *Toxicol Appl Pharmacol* 49 : 525-533, 1979.
- Hasumura Y, Tescke R, Lieber CS: Increased carbon tetrachloride hepatotoxicity and its metabolism after chronic ethanol consumption. *Gastroenterol* 66(3) : 415-422, 1974.
- Hetu C, Dumont A, Joly JG: Effect of chronic ethanol administration in bromobenzene liver toxicity in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 67(2) : 66-77, 1983.
- James SP, Waring RH: The metabolism of alicyclic ketones in the rabbit and rat. *Xenobiotica* 1(6) : 573-580, 1971.
- Jeon TW, Lee SI, Yoon JG: Effect of cyclohexane on the lung toxicity in rats. *Korean J Biomed Lab Sci* 6(4) : 245-252, 2000. (Korean)
- Lieber CS: Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clinica Chemica Acta* 257(1) : 59-84, 1997.
- Lieber CS: Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcoholism Clin Exp Res* 15 : 573-592, 1991.
- Liira J, Riihimaki V, Engstrom K: Effects of ethanol on the kinetics of methyl ethyl ketone in man. *British J Industrial Med* 47(5) : 325-330, 1990.
- Mutti A, Falzoi M, Lucertini S, Cavatorta A, Franchini I, Pedroni C: Absorption and alveolar excretion of cyclohexane in workers in a shoe factory. *J Appl Toxicol* 1(4) : 220-223, 1981.
- Nordblom G, Coon MJ: Hydrogen peroxide formation and stoichiometry of hydroxylation reactions catalyzed by highly purified liver microsomal cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophysics* 180 : 343-347, 1977.
- Nordmann R, Ribiere C, Rouach H: Implication of free radical mechanisms in ethanol induced cellular injury. *Free Radical Biol Med* 12 : 219-240, 1992.
- Perbellini L, Brugnone F: Lung uptake and metabolism of cyclohexane in shoe factory workers. *Int Arch Occup Environ Health* 45 : 261-269, 1980.
- Rozman K: Intestinal excretion of toxic substances. *Arch*

- Toxicol Suppl 8 : 87-93, 1985.
- Sakata M, Take J, Watanabe T, Sakata K, Wada K, Haga M: Metabolic interaction of ethanol and cyclohexanone in rabbits. *J Toxicol Environ Health* 38 : 33-42, 1993.
- Seedorf L, Olsen E: Exposure to organic solvents I. A survey on the use of solvents. *The Annuals of Occupational Hygiene* 34(4) : 371-378, 1990.
- Smith AC, Freeman RW, Harbison RD: Ethanol enhancement of cocaine induced hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol* 30 : 453-458, 1980.
- Stott WT, Quast JF, Watanabe PG: The pharmacokinetics and macromolecular interactions of trichloroethylene in mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 62 : 137-152, 1982.
- 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* 65 : 343-350, 1994.

<국문초록>

주류의 섭취가 산업화학물질의 생체 내 독성유발에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하기 위해 흰쥐를 이용하여 15% 에탄올을 6주간 섭취시킨 후, cyclohexane (CH)을 2일 간격으로 4회 복강 투여하고 24시간 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

체중 당 폐 무게와 폐 세척액 내 단백질 함량은 에탄올 전처치군이 대조군과 비교하여 증가되었고, 폐 조직 중 glucose 6 phosphatase의 활성은 감소되었다. 형태학적 변화에서도 CH만 투여한 군과 비교하여 에탄올 6주 섭취 후 CH를 투여한 군에서 부분적인 무기폐현상과 색전현상이 심화되어 나타났다.

따라서 CH 투여 시 에탄올을 전처치함으로써 간 조직 중 CH 효소의 활성이 증가되어, 과잉의 대사부산물들이 폐에 분포됨으로 인해 폐 조직의 손상이 심화되는 것으로 나타났다.