

Conjugation of Cyclohexane Metabolite in Liver Damaged Rats

Hyun-Sung Joh¹ and Chong-Guk Yoon^{2†}

¹Department of Oriental Medicine Resources, Asia University, Gyeongsan 712-220, Korea.

²Department of Public Health, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

To evaluate an effect of pathological liver damage on the conjugation of cyclohexane metabolites, rats were pretreated with 50% CCl₄ dissolved in olive oil (0.1 ml/100 g body weight) 10 or 17 times intraperitoneally at intervals of every other day. On the basis of liver function, the animals pretreated with CCl₄ 10 times were identified as acutely liver damaged ones and the animals pretreated with CCl₄ 17 times were identified as severely liver damaged ones. To these liver damaged animals, cyclohexane (a single dose of 1.56 g/kg body weight, i.p.) was administered at 48 hr after the last injection of CCl₄. The rats were sacrificed at 4 or 8 hr after injection of cyclohexane. The cyclohexane metabolites, cyclohexanol (CH-ol), cyclohexane-1,2-diol (CH-1,2-diol), cyclohexane-1,4-diol (CH-1,4-diol), and their glucuronyl conjugates and cyclohexanone were detected in the urine of cyclohexane treated rats. The urinary concentration of cyclohexane metabolites was generally more increased in liver damaged animals than normal ones, and the increasing rate was higher in CCl₄ 17 times injected rats than 10 times injected ones. And liver damaged rats, especially CCl₄ 17 times treated ones, had an enhanced ability of glucuronyl conjugation to CH-ol analogues compared with normal group. Furthermore, CH-1,2 and 1,4-diol were all conjugated with glucuronic acid in CCl₄ 17 times injected animals. On the other hand, the increasing rate of activities of hepatic cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase, alcohol dehydrogenase and urine diphosphate glucuronyl transferase was higher in 17 times CCl₄-treated rats compared with normal and CCl₄ 10 times injected animals. Taken all together, it is assumed that an increased urinary excretion amount of cyclohexane metabolites in liver damaged rats might be caused by an increase in the activities of cyclohexane metabolizing enzymes. And enhanced conjugating ability of CH-ol in liver damaged animals and novel finding of conjugating form of CH-1,2 and 1,4-diol might be caused by increase in the activity of hepatic diphosphouridine glucuronyltransferase.

Key Words: Cyclohexane metabolism, CCl₄

서 론

외부 이물질로부터 생체를 보호하려는 독성물질의 해독기는 생체의 항상성 (homeostasis)을 유지하려는 생리적 적응 현상과 관련되며, 생체의 내부 환경인 연령, 성별, 생리적 조건 등에 상당한 영향을 받고 있는 것으로 알려져 있다 (Hodgson, 1987). 생체에 있어서 외부 환경 변화에 내부 환경이 이에 최대한 적응하여 생명을 유지 보존하려는 생리현상이 일어나고 있으며, 이때 외부 환경에 의한 내부 환경의 항상성이 파괴될 경우 질병이 야기된다고 생각된다.

현대인에 있어서 문명발달에 따른 다양한 화학물질 폭로

와 약물의 오·남용, 비만증, 주류섭취 등으로 간질환이 증가되고 있으며 이에 독성물질의 변수가 작용함과 더불어 간장이 독성물질대사와 해독의 주된 장기라는 점을 감안해 볼 때, 간장의 병태·생리적 조건이 독성물질의 해독에 심각한 영향을 미칠 것으로 생각된다. 특히 간장의 병태·생리적 조건인 급·만성 간조직 손상과 관련된 간 실질세포 질환 (parenchymal liver disease) 시에는 약물의 반감기가 지연된다는 보고 (Howden et al., 1989)와 심한 간 경변 시에는 약물 대사의 첫 단계에 관여하는 cytochrome P450 (CYP) 함량이 감소된다는 보고 (Brodie et al., 1971; Schoene et al., 1972) 및 비활동성인 간경변증과 중증도의 간염 시에는 CYP 함량의 변동이 없었으나, 심한 간손상 시에는 epoxide hydroxylase (Guengerich and Turvy, 1991)와 FAD-monoxygenase 활성화와 CYP dependent aminopyrine demethylase (Schoene et al., 1972; Gold and Ziegler, 1973) 및 AHH 활성이 감소된다는 보고 (Farrell et al., 1979; Brodie et al., 1981)들이 있다. 그리고 심한

*논문 접수: 2006년 10월 12일

수정재접수: 2006년 12월 4일

†교신저자: 윤종국, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 100, 계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

Tel: 053-791-2949, e-mail: gukyoon@hanmail.net

간질환 시에도 모든 CYP의 isozyme들의 활성이 모두 감소되지는 않는다는 보고 (Farrell et al., 1979)도 있다. 즉 ethylmorphine demethylase 활성은 정상을 나타내었으며, 더욱이 CYP 중 2C종은 간질환 시에 오히려 증가됨을 관찰하였다 (Hasumura et al., 1974; Guengerich and Turvy, 1991). 또한 NADPH-CYP reductase 활성이 심한 간질환 시에도 정상을 나타냄이 Schoene 등 (1972)에 의하여 관찰되었다. 담도폐쇄성 간질환 시에도 간조직에서 CYP 함량이 감소되었다 (McPherson et al., 1982). 그리고 CYP 치와 어떤 약물대사효소 활성저하는 약물의 대사의 감소와 간의 약물 청소율을 감소시킴을 의미하지만, CYP 함량이 약물의 반감기와 반드시 일치하지는 않는다고 하였다 (Farrell et al., 1979). 또한 간손상 정도에 따른 약물의 반감기가 약물대사효소 활성과는 반드시 일치하지는 않는다고 한다 (Davies et al., 1973). 이러한 사실은 간질환 환자로부터 절취한 일부의 생검 (biopsy) 시료가 간 전체의 활성을 반영하지는 않는다 (Farrell et al., 1979)는 것을 의미한다. 이와 같은 약물대사효소와 약물의 청소율 간에 관련성이 나타나지 않은 것은 또 다른 요인 때문일 것으로 생각되며 담즙유체성 간질환의 경우를 들 수 있다 (Kawata et al., 1987). 약물이 여러 가지의 CYP 종을 유도할 수 있는 능력은 간질환에 영향을 받는다고 한다 (Farrell et al., 1979). 특히 중증도의 간질환과 비활동성 간경변증에 있어서는 약물에 의한 CYP의 정상적인 유도현상이 관찰되지만 심한 간질환 내지 간경변증에서는 약물에 의한 유도가 일어나지 않는다고 한다. 그리고 각종 독성물질 및 약물의 해독작용은 phase I의 oxygenation 뿐만 아니라 phase II의 포함반응에 상당한 영향을 받는다. Oxazepam 및 lorazepam과 같은 xenobiotics의 배설 전 단계인 glucuronide 포함반응은 급·만성 간질환에 영향을 받지 않는다고 한다 (Shull et al., 1976; Kraus et al., 1978). 이와 같은 사실은 bilirubin 포함반응이 간염 및 간경변증에 그다지 영향을 받지 않는다는 보고 (Black and Billing, 1969; Motoyama, 1979)에 의해 뒷받침된다. 그러나 심한 간경변증 환자에 있어서 glucuronide 포함반응이 이루어지지 않는다는 보고 (Hoyumpa and Schenker, 1991)도 있다. 이상 문헌들을 종합해 볼 때, 간손상 조건에 따라 생체 이물질의 해독에 관여하는 효소활성변동이 다양하게 나타남을 알 수 있다.

한편 cyclohexane (CH)은 유기용매로서 뿐만 아니라 세정제로도 널리 사용되고 있는 지환족의 화학물질이며 유기합성의 중간생성물질 (Ellenhorn and Barceloux, 1988)로도 알려져 있다. CH가 생체에 폭로 시 위장 (Longacre, 1987), 신장 (Bernard et al., 1989) 및 신경계 (Naskali et al., 1994)의 장애와 더불어 피부의 염증반응 (Longacre, 1987, Iyadomi et al., 1998) 및 폐손상을 유발시킨다고 보고 (Jeon et al., 2000)하였다.

생체 내로 흡수된 CH은 주로 간조직에서 microsomal CYP dependent monooxygenase에 의해 cyclohexanol (CH-ol)로 대사 (Nordblom and Coon, 1977; Senler et al., 1985)되며 일부는 β -glucuronide 형태로 포함되어 소변 중에 배설 (Treon et al., 1943; Elliott et al., 1959)되고, 나머지는 alcohol dehydrogenase (ADH)의 촉매작용에 의해서 독성 중간대사산물인 cyclohexanone (CH-one)으로 산화되기도 한다 (Smyth et al., 1969; James and Waring, 1971; Sakata et al., 1989). 또한 CH-one의 일부는 CH-ol로 재환원되어 폐를 통해 외기로 직접 배출되거나 1,2-cyclohexanediol (CH-1,2-diol) 혹은 1,4-cyclohexanediol (CH-1,4-diol)의 형태로 소변 중에 배설된다 (Skakata et al., 1989; Perico et al., 1999). 그리고 CH의 대사과정 중 생성된 CH-ol 및 CH-one에 의해 생체 내 독성작용이 유발된다고 한다. 이같이 CH의 생체 내 독성작용은 CH 및 이의 대사중간생성물질이며, 이의 해독작용은 CH의 포함작용에 영향을 받는다.

이상 여러 연구자들의 보고를 종합해 볼 때, 간손상 정도의 차이 그리고 독성물질 및 약물의 종류에 따라 xenobiotics의 대사가 다양하게 나타날 뿐만 아니라 이와 같이 간질환과 xenobiotics 대사간의 관련성에 대해서 여러 연구자들 간에 상당한 논란의 대상이 되고 있는 실정이다. 특히 주된 CH 대사산물인 CH-ol은 체외로 배설은 glucuronide 포함반응과 상당한 관련성이 있으며, 또한 CH-ol의 포함반응은 간손상에 상당한 영향을 받을 것으로 생각된다. 이에 본 연구는 CCL₄로 간손상을 유도한 흰쥐에 CH를 투여한 다음, CH의 대사산물 및 포함율과 간조직 중 CH의 대사효소를 측정하여 손상된 간조직의 CH 대사 기전을 구명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 동물 및 처치

동물실험의 조건은 전보 (Joh, 2006)와 동일하게 실시하였다. 즉 실험동물은 Sprague-Dawley 계 외견상 건강한 체중 250 ± 10 g의 웅성 흰쥐를 대한동물실험센터 (Korea)로부터 구입한 후 사육실 (온도: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도: $50 \pm 5\%$ 에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험군은 각각 6마리씩 분리 수용하였으며, 실험기간 동안 물과 사료 (삼양사, Korea)의 양은 제한 없이 공급하였다.

각 실험군은 각 6마리씩 총 9군으로 하였다. 즉 정상군, 정상군에 CH 투여 4시간 후 처치군, 정상군에 CH 투여 8시간 후 처치군, CCL₄ 10회 투여군, CCL₄ 10회 투여한 다음 CH 투여 4시간 후 처치군, CCL₄ 10회 투여한 다음 CH 투여 8시간 후 처치군, CCL₄ 17회 투여군, CCL₄ 17회 투여한 다음 CH 투여 4시간 후 처치군, CCL₄ 17회 투여한 다음 CH 투여 8시간 후 처치군으로 하였다.

간손상 유도는 CCl₄와 olive oil과의 동량혼합액 (1:1)을 실험동물에 복강으로 체중 100 g당 0.1 ml을 2일 간격으로 10회 및 17회 투여하였다. CH 투여는 체중 kg당 1.56 g 해당되는 olive oil과의 혼합액을 Bernard 등 (1989)의 방법에 따라 실험동물의 처치 4시간 및 8시간 전에 복강으로 투여하였다. 각 군의 대조군은 olive oil만 투여하였다. 각 실험군은 처치 24시간 전부터 물만 공급하고 금식시켰으며, 대조군과 각 실험군은 metabolic cage에 넣어 CH를 투여한 후 4시간과 8시간 동안의 소변을 채취해서 CH 대사산물 측정 시료로 사용하였다.

실험동물의 처치는 효소 활성도의 일 중 변동을 고려하여 일정시간 동안 실시할 수 있도록 시간을 조절하였으며 ether 마취 하에서 복부 정중선을 따라 개복한 다음 복부 대동맥으로부터 채혈하여 실험사 시킨 후, 4°C 생리식염수로 간문맥을 통하여 간을 관류하여 간 내에 남아있는 혈액을 제거한 다음, 간을 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 표면에 묻은 혈액을 가볍게 씻은 후 여지로 압박하여 간조직 내에 남아 있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음 무게를 칭량하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 혈청을 얻어 alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), bilirubin, creatinine 측정 시료로 사용하였다.

2. 효소 시료의 조제

적출한 간조직은 4°C에서 절편으로 만들고 그 중 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 가해 4°C에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하여 균질액 (20%, w/v)을 만들었다. 이 마쇄균질액을 600 ×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 다음, 이 상층액을 10,000 ×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 105,000 ×g에서 1시간 원침시킨 후 상층액은 ADH, 침사인 microsomal 분획은 CYP dependent aniline hydroxylase (CYPdAH), uridine diphosphate glucuronyltransferase (UDPGT) 활성도 측정 시료로 사용하였다.

3. 효소 활성도 측정

ALT 측정은 Reitman과 Frankel (1957)의 방법에 따라 조제된 kit 시액을 사용하였다. 활성도 단위는 ml 당 Karmen (1955) unit로 표시하였으며, ALP 활성은 Bessey와 Lowry (1946)의 방법에 준하여 측정하였으며, 단위는 Bessey-Lowry unit을 사용하였다.

간조직 중 CYPdAH 활성 측정은 aniline을 기질로 하여 37°C에서 15분간 반응시킨 뒤 유리되는 *p*-aminophenol을 phenol 시약으로 발색시켜 640 nm에서 흡광도를 측정하는 Bidlack과 Lowery (1982)의 방법에 준하여 측정하였다. 활성

도 단위는 간조직 효소 반응액 중에서 함유된 단백 1 mg이 1시간 반응하여 기질로부터 생성된 *p*-aminophenol의 양을 nmole로 표시하였다. 간조직 중 ADH 활성 측정은 Bergmeyer (1974)의 방법에 따라 기질인 ethanol과 조효소인 NAD⁺로부터 생성된 NADH의 흡광도를 340 nm에서 측정하였다. 활성도 단위는 단백질 1 mg이 1분간 반응하여 생성시킨 NADH의 양을 nmol로 표시하였다.

UDPGT 활성 측정은 Dutton과 Storey (1962)의 방법에 따라 *p*-nitrophenol과 UDP-glucuronic acid가 UDPGT의 촉매로 반응하여 형성된 *p*-nitrophenol β-D-glucuronide를 413 nm 파장에서 비색하여 측정하였다.

4. 생화학적 검사

혈청 중 bilirubin은 diazo 반응을 이용한 Kingsley 등 (1953)의 방법에 준하여 측정하였다.

소변 및 혈청 중 creatinine 측정은 Jaffe 반응을 이용한 Butler (1975)의 방법에 따라 측정하였다.

5. Malondialdehyde (MDA) 함량 측정

간조직 중 MDA 함량은 Ohkawa 등 (1979)의 방법에 준하여 측정하였으며, 마쇄균질액의 MDA를 산성조건하에 2-thiobarbituric acid와 가열 반응시켜 생성된 물질을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 함량은 간조직 g당 nmole로 표시하였다.

6. 단백질 함량 측정

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

7. 소변 중 CH의 대사산물 측정

CH의 대사산물 측정은 Bao 등 (1997)의 방법에 준하여 액체-액체 추출방법으로 분석을 행하였다. 추출용매는 ethyl acetate 및 acetonitrile을 7:3의 비율로 혼합한 용매를 사용하였다. CH 대사산물의 측정은 소변 및 혈청 시료 0.5 ml을 취해 원심분리용 시험관 (screw cap tube)에 넣고 추출용매 0.5 ml을 가하여 3분간 교반한 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 깨끗한 vial에 옮긴 후 반복 추출한 상층액을 합하였다. 이 상층액 1 μl를 GC에 주입하여 분석하였다. 그리고 소변 중 CH의 총 대사산물을 측정하기 위해, 소변 1 ml에 β-glucuronidase 2,000 unit를 가하여 37°C에서 1시간 동안 incubation한 다음, 동일한 방법으로 추출하였다. 각 대사산물의 정량은 표준물질을 GC (Table 1)에 주입하여 나온 chromatogram의 면적을 이용하여 작성한 표준 검량선에 준해 산출하였다 (Fig. 1). 소변 시료 중의 creatinine 측정은 Jaffe 반응을 이용한 Butler (1975)의 방법에 준하였다. CH 대

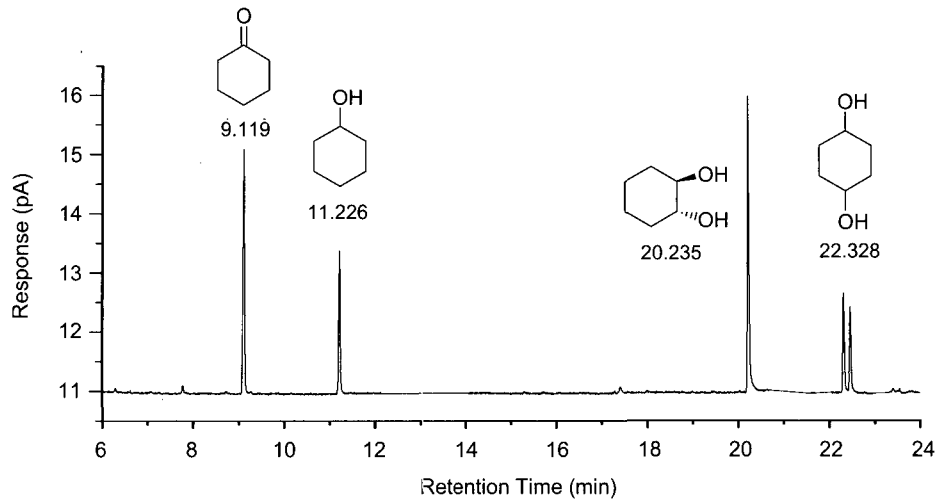


Fig. 1. GC-FID chromatogram of standard solution.

사산물의 양은 혈청은 혈청 1 당 mg으로, 소변은 creatinine g당 g으로 나타내었다. GC의 분석조건은 Table 1과 같다.

8. 결과의 통계

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

결 과

1. CCl₄에 의한 간손상 모델 실험동물 유도

흰쥐에 CCl₄를 10회 및 17회 투여한 다음 간손상 정도를 확인한 성적은 Table 2와 같다. CCl₄를 10회 및 17회 투여함으로써 정상군에 비해 체중당 간무게는 각각 약 37% ($P < 0.05$) 및 88% ($P < 0.001$), 혈청 ALT 활성은 각각 14배 ($P < 0.001$) 및 53배 ($P < 0.001$), 간조직 MDA 함량은 각각 약 72% ($P < 0.001$) 및 122% ($P < 0.001$) 그리고 혈청 bilirubin은 각각 64% 및 291% ($P < 0.001$) 유의한 증가를 나타내었다. 간조직 중 단백질 함량의 경우 10회 투여군은 정상군에 비해 감소하는 경향만 보였으나 CCl₄ 17회 투여군에서는 약 30%의 유의한 ($P < 0.05$) 감소를 나타내었다. 또한 CCl₄ 투여 횟수에 따른 간손상 지표들 비교해 볼 때, 간조직 MDA 함량을 제외한 모든 간손상 지표에서 CCl₄ 17회 투여군이 10회 투여군 보다 통계적으로 유의한 증감을 나타내었다.

2. 소변 중 CH 대사산물

CH을 투여한 후 생성된 CH의 대사산물을 소변 중에서 정량한 결과는 Table 3과 같다. 본 실험조건에서 CH-ol, CH-one, CH-1,2 및 1,4-diol의 4가지 CH 대사산물의 포합형과 비포합형 모두가 확인되었다. CH의 주된 대사산물인 포합형으로 배설된 물질은 CH-ol이 97% 포합형으로 배설되었으며

Table 1. Gas chromatography conditions for the 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		
Detecto	FID		

CH-1,2-diol은 2.7%, CH-1,4-diol은 0.3%의 포합형이 배설되었다. 한편 비포합형으로 CH-ol은 33.1%가 배설되었으며 CH-one은 23.9%, CH-1,2-diol은 16.4% 그리고 CH-1,4-diol은 26.6%의 비포합형이 나타났다.

3. 소변 중 CH 대사산물의 농도변동

Table 4와 Fig. 2는 4시간 및 8시간째의 CH-ol, CH-one, CH-1,2 및 1,4-diol의 소변 중 농도변화의 결과를 나타낸 것이다. 정상군과 실험동물군 모두에서 CH 투여 시 CH의 주

Table 2. Liver damaged animal model induced with CCl₄

Parameters	Normal	Frequency of CCl ₄ injection	
		10 times	17 times
Liver weight/body weight (%)	2.70±0.25	3.71±0.30 ^{a)}	5.07±0.26 ^{***a,**b)}
Homogenate protein ¹⁾	159±12.3	143±8.32	112±9.79 ^{a,b)}
Serum ALT ²⁾	19.1±2.67	293±36.7 ^{***a)}	1023±154 ^{***a,b)}
Hepatic MDA content ³⁾	3.41±0.24	5.88±0.43 ^{***a)}	7.56±0.82 ^{***a)}
Serum ALP ⁴⁾	3.70±0.18	7.78±0.68 ^{***a)}	15.9±2.19 ^{***a,**b)}
Serum bilirubin ⁵⁾	0.11±0.01	0.18±0.03	0.43±0.05 ^{***a,**b)}

Each value represents the mean ± S.E. of 6 rats. ALT, alanine aminotransferase; MDA, malondialdehyde; ALP, alkaline phosphatase. ^{a)}Significantly different from the normal group. ^{b)}Significantly different from the rats 10 times pretreated with CCl₄. (*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$, ***; $P < 0.001$). Units: ¹⁾mg/g wet. liver, ²⁾Karmen unit/ml of serum, ³⁾nmoles/g of tissue, ⁴⁾Bessey-Lowry unit/ml, ⁵⁾mg/dl of serum

Table 3. Urinary concentration of CH-ol, CH-one, CH-1,2-diol and CH-1,4-diol during 8 hr in cyclohexane-treated rats

Metabolites	g/g of creatinine (1×10^{-3})			
	CH-ol	CH-one	CH-1,2-diol	CH-1,4-diol
Total	69.2 (96.3%)	2.50 (0.3%)	25.8 (2.9%)	5.00 (0.5%)
Conjugate	866 (97.0%)	ND	24.1 (2.7%)	2.22 (0.3%)
Unconjugate	3.46 (33.1%)	2.50 (23.9%)	1.72 (16.4%)	2.78 (26.6%)

Each value indicates the concentration of cyclohexane metabolites in pooled urine of each group. ND: not detected

Table 4. Effect of cyclohexane treatment on the urinary concentration of CH-ol, CH-one, CH-1,2-diol and CH-1,4-diol in CCl₄-pretreated rats

Hours		Normal		Frequency CCl ₄ of injection			
				10 times		17 times	
		4	8	4	8	4	8
Total	CH-ol	279.00	869.22	374.21	872.73	881.53	978.15
	CH-one	1.69	2.50	2.63	3.05	5.07	6.45
	CH-1,2-diol	3.36	25.84	6.06	22.16	25.70	28.44
	CH-1,4-diol	N.D	5.0	N.D	2.99	N.D	4.88
Conjugate	CH-ol	277.33	865.76	372.68	871.07	879.74	975.52
	CH-1,2-diol	3.36	24.12	6.06	20.79	25.70	28.44
	CH-1,4-diol	N.D	2.2	N.D	1.47	N.D	4.88
Unconjugate	CH-ol	1.67	3.46	1.53	1.66	1.79	2.63
	CH-one	1.69	2.50	2.63	3.05	5.07	6.45
	CH-1,2-diol	N.D	1.72	N.D	1.37	N.D	N.D
	CH-1,4-diol	N.D	2.78	N.D	1.52	N.D	N.D

Each value indicates the concentration of cyclohexane metabolites in pooled urine of each group. Unit: g/g of creatinine, ND: not detected

된 대사산물이며 거의 대부분이 포함되는 것으로 알려져 있는 CH-ol은 거의 포함형으로 배설됨을 알 수 있었다. 그리고 4시간 소변에 있어서 CCl₄ 10회 및 17회 투여군은 정상군 보다 각각 1.3배 및 3.2배 정도의 증가를 하였다. 또한 8시간 소변에서는 CCl₄ 10회 투여군과 정상군 간에는 별다른 차이가 없었으나 CCl₄ 17회 투여군은 정상군 및 CCl₄ 10회 투여군 보다 각각 약 12% 및 13% 높게 나타나는 경향을 보였다. 따라서 심한 간손상 시 실험동물에 CH을 투여함으로써 CH의 주된 대사산물인 포함형의 CH-ol 농도가 높게 나타났으

나 배설율은 저하됨을 알 수 있었다. CH-one의 경우, 정상군의 4시간 소변은 10회 및 17회 투여기간에 따라 각각 약 56% 및 200% 증가하였으며 그 증가율은 CCl₄ 17회 투여군이 CCl₄ 10회 및 정상군 보다 높게 나타났다. 또한 8시간 소변에서 CH-one는 CCl₄ 17회 투여군이 CCl₄ 10회 및 정상군 보다 높게 나타났으며 정상군에 비해 158% 정도 현저히 증가하였다. CH 투여 시 CH-1,2-diol의 정상군 및 CCl₄ 10회 및 CCl₄ 17회 투여군은 모두가 포함되었으며 4시간의 경우, CCl₄ 17회 투여군은 정상군 및 10회 투여군 보다 각각 7.6배

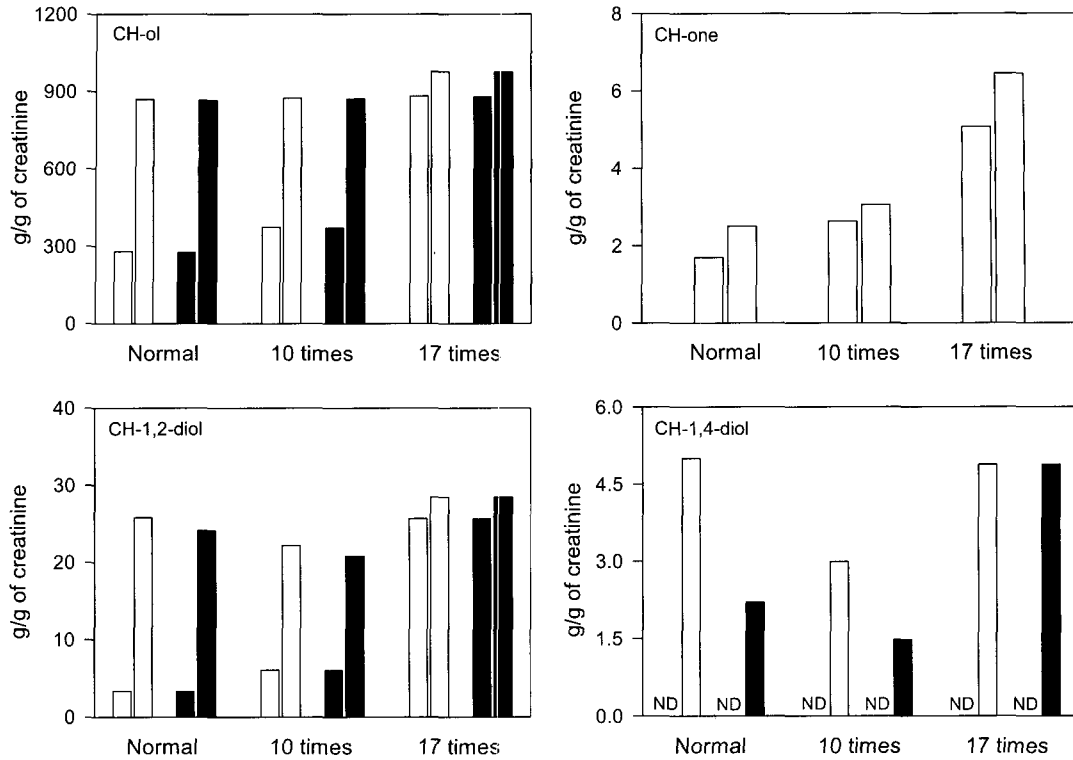


Fig. 2. Effect of cyclohexane treatment on the urinary total its conjugates concentration in CCl₄-pretreated rats. Forward column; 4 hr after injection of cyclohexane, Backward column; 8 hr after injection of cyclohexane. ND, not detected; □, total form; ■, conjugated form.

및 4.2배 정도 높게 나타났으며 8시간의 경우 CCl₄ 17회 투여군은 정상군 및 CCl₄ 10회 투여군 보다 각각 10% 및 28% 정도 높게 포함되었으며, CCl₄ 17회 투여군이 정상군 및 10회 투여군 보다 현저히 높게 포함되었다. CH-1,4-diol의 경우, 소변 중 배설량은 CH 투여 4시간 소변에는 검출되지 않았으며, 8시간 소변에서는 CCl₄ 10회 투여군이 정상군 및 CCl₄ 10회 17회 투여군에 비해 소변 중 배설량이 감소되었다.

4. 간손상 실험동물에 CH 투여 시 소변 중 CH 대사산물의 비포함 free form의 농도변동

CH 투여 시 소변 중에서 CH-ol, CH-one, CH-1,2 및 1,4-diol free form의 소변 중 배설량은 Table 4 및 Fig. 3과 같다. CH 투여 시 CH-ol의 비포함형인 free form의 소변 중 배설량에 있어서는 4시간 소변에서는 정상군이나 간손상 실험군 모두에서 비슷한 정도로 나타났으며, 8시간 소변에서는 CCl₄ 투여군 모두에서 정도의 차이는 있으나 정상군에 비해 낮게 나타났다. 특히 4시간 소변에 대한 8시간 소변의 CH-ol의 free form 증가율은 CCl₄ 투여군이 정상군 보다 낮게 나타났다.

CH-1,2 및 1,4-diol 모두 투여 4시간 소변에서는 측정되지 않았으나 8시간 소변에서는 정상군과 CCl₄ 10회 투여군 모두에서 CH-1,2 및 1,4-diol의 free form이 나타났으며 정상군

에 비해 CCl₄ 투여군에서 낮게 나타났다. 그러나 CCl₄ 17회 투여군에서는 4시간 및 8시간 소변 모두에서 검출되지 않았다. 이러한 실험결과는 간손상이 심한 CCl₄ 17회 투여군에서 CH-1,2 및 1,4-diol 모두 포함되어 나타남을 알 수 있다.

Table 4의 결과에서 CH 대사산물의 free form과 포함형을 근거로 하여 포함율로 환산한 것이 Table 5와 같다. CH-ol과 CH-1,2-diol의 경우 모든 실험군에서의 포함율은 유사하게 나타났다. 그러나 CH-1,4-diol의 경우 정상군과 CCl₄ 10회 투여군에서는 포함비율이 50% 정도였으나 CCl₄ 17회 투여군에서는 100% 포함되었다.

5. 간손상 실험동물에 CH 투여 시 간조직 내 CH 대사 효소 활성변동

본 실험조건에서 CH의 대사에 관여하는 CYPdAH, ADH 및 UDPGT 활성변동을 간조직 중에서 측정된 것이 Fig. 4와 같다.

CYPdAH 활성의 경우, 정상 대조군에 대한 CCl₄ 10회 및 17회 투여군의 대조군을 비교해 볼 때, 투여 횟수에 비례해서 각각 23% 및 38% ($P < 0.05$) 감소하였으나, CH을 투여함으로써 각 실험군의 대조군에 비해 정상군, 10회 및 17회 투여군의 4시간군에서 각각 2.1배 ($P < 0.01$), 2.8배 ($P < 0.01$) 및 3.5배 ($P < 0.001$) 정도 현저히 증가하였다. 그 증가의 정도는

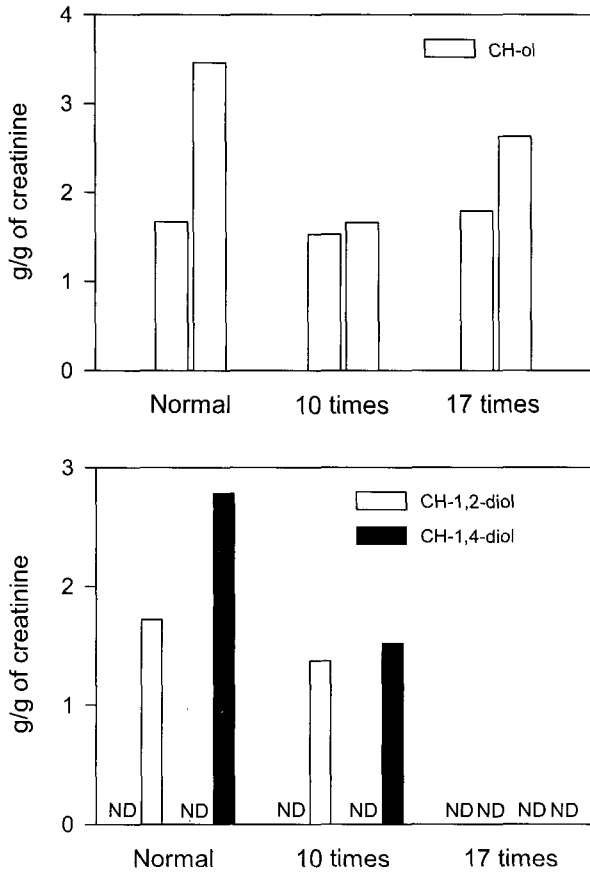


Fig. 3. Effect of cyclohexane treatment on the urinary concentration of CH-ol, CH-1,2-diol and CH-1,4-diol free form in CCl₄-pretreated rats. Forward column; 4 hr after injection of cyclohexane, Backward column; 8 hr after injection of cyclohexane. ND, not detected.

CCl₄ 17회 투여군이 정상군 및 10회 투여군 보다 높게 나타났다. 8시간군에서는 각 실험군의 대조군에 비해 정상군, 10회 및 17회 투여군에서 각각 2.4배 ($P < 0.001$), 2.6배 ($P < 0.01$) 및 4.7배 ($P < 0.01$) 정도 현저히 증가하였다. 그리고 각 실험군의 4시간군과 비교해 볼 때, 8시간 경과 후 정상군과 CCl₄ 17회 투여군에서는 높게 나타나는 경향을 보였으나 CCl₄ 10회 투여군에서는 오히려 감소하였다.

CH으로부터 가역적으로 CH-one으로 변화 반응하는 ADH 활성변동을 관찰한 결과, 정상 대조군에 대한 CCl₄ 10회 및 17회 투여군의 대조군을 비교해 볼 때, 투여 횟수에 비례해서 각각 약 21% 및 42% 증가하였으나 통계적 의의는 없었다. CH을 투여함으로써 정상군 및 17회 투여군에서는 각각의 대조군과 4시간 및 8시간군 간에 별다른 변동이 없었으나 10회 투여군에서는 4시간 및 8시간군이 대조군에 비해 각각 12% 및 18% 정도 증가하는 경향을 나타내었다.

CH의 대사산물의 소변 중 배설에 직접적으로 관여하는 UDPGT의 활성변동을 관찰한 결과, 정상 대조군에 비해

Table 5. Effect of CCl₄-pretreatment on the conjugation of urinary CH-ol, CH-1,2-diol and CH-1,4-diol with glucuronic acid during 8 hr in cyclohexane-treated rats

	Frequency of CCl ₄ injection		
	Normal	10 times	17 times
CH-ol	99.6%	99.8%	99.7%
CH-1,2-diol	93.3%	94%	100%
CH-1,4-diol	44%	49%	100%

Each value indicates the percentage determined with pooled urine of each group. Each value is the mean of 3 experiments

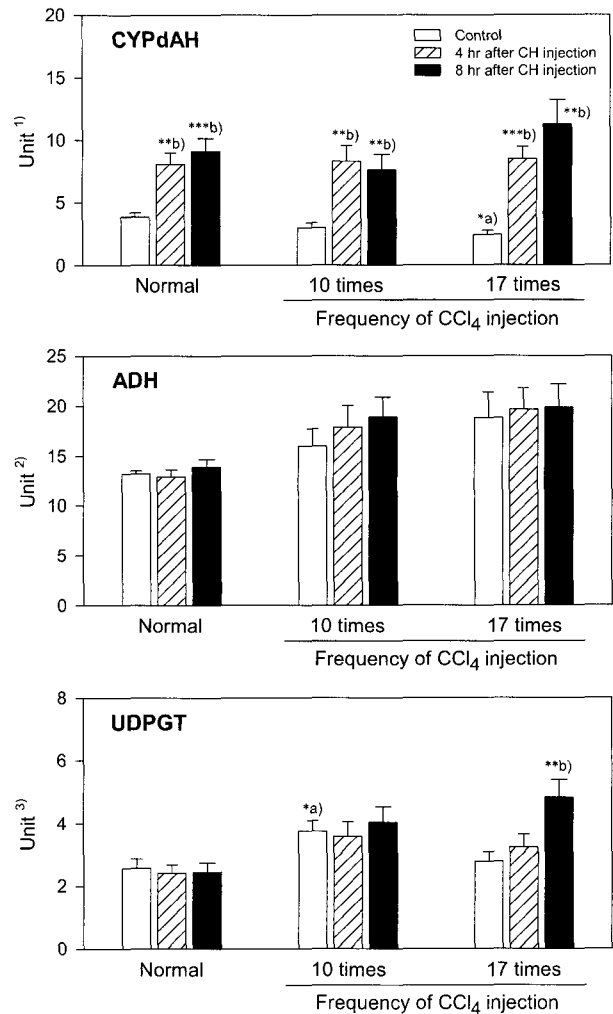


Fig. 4. Effect of CH treatment on the activities of hepatic cytochrome P450 dependent aniline hydroxylase (CYPdAH), alcohol dehydrogenase (ADH) and UDP-glucuronyl transferase (UDPGT) in CCl₄-pretreated rats. Each value represents the mean \pm S.E. of 6 rats. ^a) Significantly different from the control in normal group, ^b) Significantly different from each control. (*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$, ***; $P < 0.001$). Units: ¹) nmole *p*-aminophenol formed/hr/mg protein, ²) pmole/min/mg protein, ³) nmole conjugates/min/mg protein.

CCl₄ 10회 투여군의 대조군은 약 46%의 유의한 ($P < 0.05$) 증가를 나타내었으나 17회 투여군의 대조군 간에는 별다른 변

동이 없었다. CH을 투여함으로써 17회 투여군의 경우, CH 투여에 따라 경시적으로 증가하였다. 즉, 대조군에 비해 4시간 및 8시간군이 각각 16% 및 73% ($P<0.01$) 정도 증가하였고 4시간군에 비해 8시간군에서 약 49%의 유의한 ($P<0.05$) 증가를 나타내었다. 그러나 정상군 및 10회 투여군의 경우 CH 투여에 따른 활성변동은 관찰되지 않았다.

고 찰

본 실험에서 간손상을 유도하기 위하여 CCl_4 를 2일 간격으로 10회 및 17회 투여한 다음 간조직과 혈청 중 간손상의 지표로 이용되는 체중당 간 무게 및 간조직 중 MDA 함량과 혈청 ALT 활성을 측정된 결과, CCl_4 를 10회 및 17회 투여한 군 모두 대조군에 비해서 유의한 증가를 보였으며 그 증가 정도는 CCl_4 17회 투여군이 CCl_4 10회 투여군 보다 높게 나타났다. 또한 간조직의 섬유화 및 담도성 질환과 같은 심한 간질환 시에 증가된다고 알려져 있는 혈청 ALP 활성과 bilirubin 함량 (Crawford, 1999)은 CCl_4 투여군 모두에서 증가되었으며, 그 증가 정도는 CCl_4 17회 투여군에서 현저히 높았다.

본 실험에서 어떤 종류의 CH 대사산물이 나타나는지를 검토한 결과, 정상군에 CH 투여 시 소변 중 CH-ol, CH-one, CH-1,2 및 1,4-diol의 4가지 물질과 CH-ol의 glucuronyl conjugate가 확인되었으며 이 결과는 타 연구자들의 보고 (Treon et al., 1943; Elliott et al., 1959; Smyth et al., 1969; James and Waring, 1971; Nordblom and Coon, 1977; Senler et al., 1985; Sakata et al., 1989)와 일치되었다. 그러나 지금까지 CH-1,2 및 1,4-diol의 포함형에 대해서는 보고가 되지 않았지만 본 실험에서는 CH-ol의 포함체 이외 CH-1,2 및 1,4-diol의 포함형도 새로이 확인할 수 있었다.

간질환 시에 약물의 반감기가 지연된다는 보고 (Howden et al., 1989)와 간손상 시에 약물대사효소 활성이 억제됨으로서 약물대사에 상당한 영향을 미친다는 보고 (Vessey, 1996)가 있는 반면 간손상 정도에 따른 약물의 반감기가 약물대사효소 활성과는 반드시 일치하지 않는다고 보고하고 있어 간손상 시 xenobiotics의 대사에 대해서는 많은 학자들 사이에 논란이 되어 왔다.

특히 본 실험에서 CH-ol의 비포합형인 free form의 소변 중 배설율이 CCl_4 10회 투여한 간손상 실험군에서 정상군 보다 낮게 나타났다. 더욱이 간손상이 심한 CCl_4 17회 투여군에서는 CH-1,2 및 1,4-diol의 비포합형이 4시간 및 8시간 소변에서 나타나지 않았으며 오히려 포함형 형태로 나타났다. 이와 같이 간손상이 심한 CCl_4 17회 투여군에서 CH-ol 뿐만 아니라 CH-1,2 및 1,4 diol이 모두 포함형으로 나타난 현상은 간조직의 관류장애에 대한 생리적 대처작용으로써, 배설이

비교적 용이하게 이루어질 수 있게 하려는 생체 내 적응현상으로 사료된다.

일반적으로 xenobiotics 대사율은 대사효소 활성에 영향을 받는 것으로 보고 (Lee et al., 1999)되고 있어 본 실험조건에서 이들 효소 활성을 간조직 중에서 측정하였다. CH에 의해 유도되는 것으로 알려져 있고 (윤 등, 2000), CH 대사의 첫 단계에 관여하며, CCl_4 투여 시 간조직에서 그 활성이 감소된다 (Lee et al., 1999)는 CYPdAH 활성은 정상군에 비해서 CCl_4 에 의한 간손상 정도에 따라서 감소되었다. 그러나 CH을 투여함으로써 모든 실험군에서 4시간 경과 후에는 현저히 증가되었으며 그 증가 정도는 간손상이 심하게 나타나는 CCl_4 17회 투여군에서 가장 높게 나타났다. 그리고 8시간 경과 후에는 정상군과 CCl_4 17회 투여군 모두에서 각각의 4시간째에 비해서 높게 나타났다. 그리고 CH-ol로부터 CH-one으로의 가역적인 산화반응에 관여하는 ADH 활성 (Smyth et al., 1969; James and Waring, 1971)은 CCl_4 투여에 의한 간손상 정도에 따라 증가되는 경향을 보였으나 CH 투여 시에는 모든 실험군에서 각각의 대조군에 비해 유의한 변동을 나타내지 않았다. 특히 CH 대사산물의 소변 중 배설에 관여하는 포함효소인 UDPGT 활성 (Treon et al., 1943; Elliott et al., 1959)은 CH를 투여함으로써 정상군 및 CCl_4 10회 투여군에서는 각각의 대조군에 비해서 유의한 변동을 나타내지 않았다. 그러나 CCl_4 17회 투여군에서는 CH 투여 경시별에 따라서 증가되었다. 이러한 결과는 앞에서 언급한 바와 같이 CCl_4 17회 투여군에서 정상군 및 CCl_4 10회 투여군에 비해서 CH의 모든 대사산물이 모두 포함형으로 나타난 것을 뒷받침해 주고 있다. 그리고 본 실험에서 CH 대사의 유도자이며 key enzyme인 CYPdAH 활성 (Nordblom and Coon, 1977; Senler et al., 1985)이 CH 투여 시에 간손상이 심한 실험동물에서 대조군에 대한 증가율이 높게 나타난 것은 간손상이 심한 실험동물에 있어서 폐 및 신장기능이 저하된다는 보고 (Joh HS, 2006)에 근거하여 CH의 배설이 억제됨으로써 CH의 체내보유율 증가에 기인된 결과로 생각된다. 그러나 간손상이 초래된 실험동물에서 CH 대사효소 활성이 대체적으로 간손상이 심한 CCl_4 17회 투여군에서 유도된 점은 손상된 간조직의 피사세포와 공존하고 있는 정상세포에서 생리적 적응현상에 기인된 결과로 생각된다.

이상의 실험결과를 종합해 볼 때 간손상 실험동물에 CH 투여 시 소변 중 CH 대사물질이 오히려 증가된 것은 CH 대사에 관여하는 효소 활성증가에 기인된 결과로 사료된다. 특히 간손상 실험동물에 있어서 CH-ol 이외의 CH-1,2 및 1,4-diol의 포함반응 증가현상은 간조직의 UDGPt 활성증가에 기인된 결과로 생각된다. 그리고 CCl_4 에 의한 간손상 실험동물의 간조직에 있어서 피사세포와 공존하고 있는 정상세포에 있어서 CH 대사율 증가에 대한 생리적 적응현상이

이루어질 것으로 생각되며 이에 대해서 추후 연구검토 할 과제로 남아 있다.

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*. Vol. 2, pp. 428-429. 1974. 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.
- Bessey OA, Lowry OH. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem*. 1946. 164: 321-337.
- Bidlack WR, Lowery GL. Multiple drug metabolism: p-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem Pharmacol*. 1982. 31: 311-317.
- Black M, Billing BH. Hepatic bilirubin UDP-glucuronyl transferase activity in liver disease and gilbert's syndrome. *N Engl J Med*. 1969. 280: 1266-1271.
- Brodie BB, Reid WD, Cho AK, Sipes G, Krishna G, Gillette JR. Possible mechanism of liver necrosis caused by aromatic organic compounds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971. 68: 160-164.
- Brodie MJ, Boobis AR, Bulpitt CJ, Davies DS. Influence of liver disease and environmental factors on hepatic monooxygenase activity in vitro. *Eur J Clin Pharmacol*. 1981. 20: 39-46.
- Butler AR. The jaffe reaction. Identification of the coloured species. *Clin Chem Acta*. 1975. 59: 227-232.
- Crawford JM. The liver and the biliary tract in Robbins pathologic basis of disease (Cotran et al. Eds). pp. 845-901. 1999. W. B. Saunders Co. London, UK.
- Davies DS, Thorgeirsson SS, Breckenridge A, Orme M. Interindividual differences in rates of drug oxidation in man. *Drug Metab Dispos*. 1973. 1: 411-417.
- Dutton GJ, Storey IDE. Glucuronide-forming enzymes in *Methods in enzymology* (Colowick SP, Kaplan NO. Eds). Vol. 5, pp. 159-164. 1962. Academic Press, NY, USA.
- Ellenhorn MJ, Barceloux DG. *Medical toxicology*. 1988. Elsevier. NY, USA.
- Elliott TH, Parke DV, Williams RT. *Studies in detoxication. The metabolism of cyclo [14C] hexane and its derivatives*. *Biochem J*. 1959. 72: 193-200.
- Farrell GC, Cooksley WG, Powell LW. Drug metabolism in liver disease: activity of hepatic microsomal metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther*. 1979. 26: 483-492.
- Gold MS, Ziegler DM. Dimethylaniline N-oxidase and aminopyrine N-demethylase activities of human liver tissue. *Xenobiotica* 1973. 3: 179-189.
- Guengerich FP, Turvy CG. Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991. 256: 1189-1194.
- Hasumura Y, Teschke R, Lieber CS. Increased carbon tetrachloride hepatotoxicity, and its mechanism, after chronic ethanol consumption. *Gastroenterology* 1974. 66: 415-422.
- Hodgson E. *Modification of metabolism in Modern toxicology* (Hodgson E, Levi PE. Eds). 1987. Elsevier, NY, USA.
- Howden CW, Birnie GG, Brodie MJ. Drug metabolism in liver disease. *Pharmacol Therapeutic*. 1989. 40: 439-474.
- Hoyumpa AM, Schenker S. Is glucuronidation truly preserved in patients with liver disease? *Hepatology* 1991. 13: 786-795.
- 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.
- Joh HS. The serum or urinary levels of cyclohexane metabolites in liver damaged rats. *Korean J Biomed Lab Sci*. 2006. Submitted
- Karmen A. A note on the spectrophotometer assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest*. 1955. 34: 131-133.
- Kawata S, Imai Y, Inada M, Tamura S, Miyoshi S, Nishikawa M, Minami Y, Tarui S. Selective reduction of hepatic cytochrome P450 content in patients with intrahepatic cholestasis. A mechanism for impairment of microsomal drug oxidation. *Gastroenterology* 1987. 92: 299-303.
- Kingsley GR, Getchell G, Schaffert RR. *Standard methods of clinical chemistry* (Reiner M. Ed). Vol. 1. 1953. Academic Press, NY, USA.
- Kraus JW, Desmond PV, Marshall JP, Johnson RF, Schenker S,

- Wilkinson GR. Effects of aging and liver disease on disposition of lorazepam. *Clin Pharmacol Ther.* 1978. 24: 411-419.
- Lee HJ, Yoon CG, Park WH. Changes in xylene metabolism in rats induced various degree of liver damage with CCl₄. *J Toxicol Pub Health* 1999. 15: 345-352.
- 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.
- McPherson GA, Benjamin IS, Boobis AR, Brodie MJ, Hampden C, Blumgart LH. Antipyrine elimination as a dynamic test of hepatic functional integrity in obstructive jaundice. *Gut* 1982 23: 734-738.
- Motoyama Y. Studies of human liver bilirubin-glycosyl transferase. Bilirubin UDP-xylosyl and UDP-glucuronyl transferase activities in diseased human livers. *Enzyme* 1979. 24: 158-162.
- Naskali L, Oksanen H, Tähti H. Astrocytes as targets for CNS effects of organic solvents in vitro. *Neurotoxicology* 1994. 15: 609-612.
- 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.
- Ohkawa H, Ohish N, Yaki K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979. 95: 351-355.
- 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.
- Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol.* 1957. 28: 56-63.
- 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.
- Schoene B, Fleischmann RA, Remmer H, von Oldershausen HF. Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsies of human liver. *Eur J Clin Pharmacol.* 1972. 4: 65-73.
- 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.
- Shull HJ, Wilkinson GR, Johnson R, Schenker S. Normal disposition of oxazepam in acute viral hepatitis and cirrhosis. *Ann Intern Med.* 1976. 84: 420-425.
- 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.
- Vessey DA. *Hepatology.* 1996. W. B. Saunders. Co. Philadelphia, USA.
- Yoon CG, Kim HH, Jeon TW. Effect of cyclohexane on the kinetics of hepatic microsomal aniline hydroxylase in mice. *J Inst Nat Sci (Keimyung University).* 2001. 20: 83-87.