

Xylene에 의한 CYP2B1/2의 유도과 대사에 있어서 toluene의 영향

김기웅[†] · 허경화

한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원

The effects of toluene on its metabolism and induction of cytochrome P-450(CYP)2B1/2 by xylene

Ki-Woong Kim[†] · Kyung-Hwa Heo

Occupational Safety and Health Research Institute, KOSHA

This study was undertaken to investigate the effects of single and combined exposure of toluene (T) and xylene (X) on the cytochrome-450(CYP)-mediated metabolizing capacity, induction of CYP isozymes and the excretion of their metabolites in urine. Animal were adults male Sprague-Dawley (SD) rats and divided into 4 groups such as control, T (treated with 63.7 mg/body kg), X (treated with 65.9 mg/body kg) and TX(T=X). Organic solvents was administrated by intraperitoneal injection for 3 days. The contents of protein and CYP in liver microsomes of control group were 16.48 ± 0.56 mg/ml and 0.744 ± 0.025 nmol/mg protein, respectively, and they contents were significantly lower than in derived from treated groups ($p < 0.01$). The activities of PROD and ρ NPH were significantly higher in single treated groups than in control and combined group (TX). When Western immunoblotting were carried out with two monoclonal antibodies (MAb 1-98-1 and MAb 2-66-3) which were specific against CYP2B1/2 and CYP2E1, respectively, a strong signal corresponding to CYP2B1/2 was observed in microsomes obtained from rats treated with X and TX. The color density against CYP2E1 was slightly increased in T and TX groups compared with C and X

groups.

The amounts of urinary hippuric acid in T single treated group was 3.29 ± 1.97 g/g creatinine and TX combined group was 2.91 ± 1.76 g/g creatinine, but was not significant. However, amount of urinary methy hippuric acid in X single treated group (1.62 ± 0.72 g/g creatinine) was significantly higher than TX combined group (0.93 ± 0.63 g/g creatinine)($p < 0.01$).

These results suggested that CYP2E1 isozyme might be responsible for the metabolism of T, and CYP2B1/2 isozyme is for X. And also, difference of metabolites level between single and combined group may be speculated that the intermediates of T and X interacted each other in the process of their metabolite formation reaction.

Key Words: Toluene, Xylene, CYP2B1/2, CYP2E1, CYP dependent monooxygenase, metabolites

접수일: 2008년 12월 16일, 채택일: 2009년 3월 17일

[†] 교신저자: 김기웅(403-711 인천광역시 부평구 구산동 기능대학길25(구산동 34-4),
Tel: 032)5100-821, Fax: 032)502-7197, e-mail: k0810@kosha.net)

I. 서론

Xylene(CAS Number, 1330-20-7)은 하나의 벤젠 고리를 가진 방향족 탄화수소계(monocyclic aromatic hydrocarbons, MAHs) 유기용제로서 methyl기의 결합위치에 따라 ortho-, meta-, para-xylene 등 3가지 형태의 이성체(isomers)로 구성되어 있다.

MAHs계 유기용제의 대표적인 물리·화학적 특성 중의 하나가 지방질과 수지류에 대한 뛰어난 용해성이며, 이러한 성질로 인하여 페인트, 잉크, 플라스틱, 고무제조, 세정제 및 희석제 등의 원료 및 부원료로 산업체 전반에 걸쳐 널리 사용되고 있다(Arlie-Soborg, 1992). 제조업 사업장에서 사용되는 MAHs계 유기용제는 대부분 단일물질이 아닌 혼합된 형태로 사용되고 있다. 흔히 화학물질처럼 불리는 thinner(희석제)의 경우에 제조회사에 따라 구성성분과 농도의 차이는 있으나 보통 MAHs계, 케톤류, 알코올 및 아세테이트류 등의 화합물로 구성되어 있다. 우리나라에서 제조 또는 수입 판매되는 thinner는 약 220 여종으로 알려져 있으며, 이들 thinner에는 MAHs계 화합물인 toluene과 xylene이 주성분이며 이 밖에도 ethyl benzene 등 87종 이상의 물질이 함유되어 있는 것으로 보고되었다(김현영 등, 2008). 또한 자동차 제조업에서 사용되는 70 여종의 thinner에도 방향족 및 지방족탄화수소, 케톤, 에테르 화합물질 등이 함유되어 있다고 보고하였다(이권섭 등, 2002). 이러한 연구는 근로자들이 작업 중 노출되는 화학물질이 단일물질이 아닌 혼합물질을 단적으로 보여 주는 결과로서 단일물질 노출에 의한 체내 독성평가도 중요하지만 혼합형태의 노출에 대한 약물역동학적(pharmacokinetic) 연구의 수행이 시급함을 보여준 결과이기도 하다. 많은 연구자들은 체내의 이물질 대사와 관련하여 흡수된 물질의 상호작용과 그에 따른 대사산물의 변화에 대한 연구를 수행하였다(Tardif 등, 1993; Uaki 등, 1995; 김기웅 등, 1996; Tassaneeyakul 등, 1996; Dennison 등, 2003; Dennison 등, 2005). 그러나 산업보건 분야에 있어서 혼합된 형태의 유기용제 대사와 이물질 대사효소의 유도(induction) 및 활성도에 관한 단백질 수준의 연구는 매우 미흡한 실정이다.

따라서 이 연구의 목적은 제조업 사업장에서 단일 또는 혼합된 형태로 널리 사용되고 있는 toluene과 xylene을 대상물질로 하여, Sprague Dawley(SD)계 수컷 흰쥐에 단일 및 혼합된 형태로 노출시킨 다음, 이들 물질의 대사에 관여하는 cytochrome P-450(CYP) 동위효소의 유도를 CYP 의존성 촉매효소의 활성도 변화를 통하여 어떤 형태의 동위효소가 유도되는지를 파악하고, 그에 따라 CYP 번역항체를 이용하여 유도된 CYP 동위효소를 확인하고자 하였다. 또한, 동위효소의 유도(induction) 및 활성도 변화와 각각의 물질에 대한 대사산물의 배설량이 노출 형태에 따라 어떠한 변화를 보이는지를

밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 실험군

연구에 사용된 bovine serum albumin(BSA), cytochrome C, NADH, NADPH, NaCl, MgCl₂, glucose-6-phosphate와 glucose-6-phosphate dehydrogenase, pentoxeresorufin, toluene, xylene 등 기타의 일반적인 생화학 시약은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 실험동물은 SD계 6 주령된 수컷 흰쥐(180 ± 10 g)를 사용하여 실험 2주전부터 온도(23 ± 2°C), 습도(55 ± 5%) 및 채광조절(12 hrs light/dark)된 사육장에서 사료와 음용수를 자유로이 섭취시켰다. 투여용량은 노 등(1988)의 방법에 따라 우리나라 노동부(2008)에서 권고하는 단시간 노출 기준을 근거로 하여 흰쥐의 체중 kg당 toluene (T)은 63.7 mg (150 ppm), xylene(X)은 65.9 mg(150 ppm) 및 혼합 투여군(TX)은 T(63.7 mg)과 X(65.9 mg)을 혼합한 다음, olive oil에 용해시켜 1일 1회씩 3일간 연속하여 복강 주사하였다. 각각의 실험군은 5마리로 하였으며 대사산물의 배설량을 측정하기 위하여 소변 채취가 가능한 metabolism cage에 1 마리씩 투여 1일 전에 넣어 소변을 채취하였다.

2. 방법

(1) 간장의 Microsomes 분획 분리

실험동물을 chamber 내에서 CO₂ gas로 혼절시킨 후, 즉시 간장을 절제하여 0.9% sodium chloride 용액으로 혈액을 씻어내고, 응고된 혈액 및 지방질을 0.25 M sucrose 용액으로 균질화하였다. 이 용액으로부터 차등원심분리(12,000 xg에서 40분, 105,000 xg에서 60분)하여 얻은 침전물을 0.15 KCl로 씻어낸 다음, 0.25 M sucrose로 resuspension하여(Park과 Kim, 1984) 단백질과 CYP 정량, CYP 의존성 monooxygenase 활성도, Western blot 분석 등의 실험에 사용하였다.

(2) 단백질 및 CYP 정량

Microsomes 단백질은 BSA를 표준물질로 하여 Lowery 등(1951)의 방법에 따라 농도를 결정하였다. CYP의 함량은 Omura와 Sato 등(1964)의 방법에 따라 일산화탄소를 microsomes에 bubbling 시킨 후, 450과 490 nm에서 흡광도 차이를 측정하여 몰흡광계수 91 Cm²mM⁻¹를 이용하여 함량을 산출하였다.

(3) CYP 의존성 촉매효소의 활성도

Pentoxeresorufin-O-deethylase(PROD)의 활성도는 Klotz 등의

방법(1984)에 따라 2 mM pentoxyresorufin을 기질로 하여, microsomes(3 mg/ml) 100 μ l, 0.1 M Tris-HCl(pH 7.4) 705 μ l, 100 mM MgCl₂, 2.0 M KCl, 60 mM G-6-P 25 μ l 와 G-6-PD(40 U/ml), NADP와 10 mM NADPH를 각각 25 μ l와 50 μ l를 첨가하여 시료의 총 부피를 1 ml로 한 후, 진탕·혼합하였다. 시료를 37 °C에서 10분간 항온반응 시키고 나서 2.5 ml methanol을 첨가한 다음, 700 xg에서 5분 동안 원심분리하여 얻은 상층액을 575 nm에서 흡광도를 측정하여 몰흡광계수 40 Cm²mM⁻¹를 이용하여 활성도를 산출하였다. ρ -Nitrophenol hydroxylase(ρ NPH)의 활성도는 Koop(1986) 방법에 따라 microsomes(3 mg/ml) 50 μ l, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 850 μ l, 1 mM NADPH, 0.1 M ρ -nitrophenol 100 μ l를 혼합하여 37°C에서 30분간 항온반응 시킨 후, 0.6 N perchloric acid 0.5 ml를 첨가하여 진탕·혼합시킨 다음, 원심분리(3,000 rpm에서 10분간)하여 얻은 상층액에 10 N NaOH 850 μ l를 넣고 실온에서 10분간 반응시키고 나서 512 nm에서 흡광도를 측정하고, 몰흡광계수 9.53 Cm²mM⁻¹를 이용하여 효소의 활성도를 산출하였다.

(4) Western Immunoblot

간장의 microsomal 단백질에 대한 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel(SDS-PAGE, 8.5%) 전기영동은 Bio-Rad Protein II Cell apparatus를 사용하여 Laemmli(1970) 방법에 따라 실시하였다. CYP 동위효소의 immunoblotting은 CYP2B1/2(MAb 2-66-3)와 CYP2E1(MAb 1-98¹) 단일세포성항체를 사용하여 Kim 등(1999)의 방법에 따라 실시하였다. 간장의 microsomal 단백질은 8.5% SDS-PAGE로 분리시킨 다음, gel 위에 Millipore 사(Bedford, MA, USA)의 Immobilon-P nitrocellulose membrane을 올려놓고 gel 상의 분리된 단백질을 전기적인 힘(235 mA)으로 membrane으로 이전시켜 skim milk와 반응시킨 다음, CYP 단일세포성항체(ascite, 500 μ g/ml)와 10시간 동안 반응시켰다. 다시 biotinylated goat anti-mouse IgG(TROPIX)와 1시간 동안 반응시키고 나서 Nitro-

Block(1:20)이 포함된 chemiluminescence 기질과 반응시킨 다음, x-ray 필름에 조사시켜 전개된 반응 띠를 확인하였다.

(5) Toluene과 xylene의 뇨중 대사산물 측정

T과 X의 대사산물인 마뇨산(hippuric acid, HA)과 메틸마뇨산(methyl hippuric acid, mHA)은 Ogata 등(1977)의 방법에 따라서 측정하였다.

(6) 자료분석

실험결과에 대한 자료는 Version 12.0 SPSS 통계프로그램(SPSS Inc., USA)을 이용하여 t-test와 ANOVA test를 실시하였다.

III. 결 과

SD계 수컷 흰쥐에 T와 X를 단일 및 혼합하여 3일 동안 복강투여한 후, 간장의 microsomal에서 단백질과 CYP의 함량을 측정하여 표 1에 나타내었다.

대조군의 총 단백질 함량은 16.48 \pm 0.56 mg/ml로 단일 및 혼합투여군보다 유의하게 낮았으나(p<0.01), 단일 및 혼합투여군간 단백질 함량의 차이는 없었다.

CYP의 함량은 투여군 모두에서 대조군(0.744 \pm 0.025 nmol/mg protein)보다 높은 측정치를 보였으나, T 단일 투여군을 제외하고 X(0.922 \pm 0.038 nmol/mg protein)군과 TX군(0.981 \pm 0.039 nmol/mg protein)에서 유의한 증가를 보였다(p<0.01). CYP의존성 PROD의 활성도를 투여군별로 비교한 결과에서는 대조군보다 투여군 모두에서 통계적으로 유의한 증가를 보였으나 T와 X 단일 투여군보다 TX 혼합 투여군에서 낮은 활성도를 보였다.

ρ NPH 활성도 변화도 PROD의 경우처럼 대조군보다 투여군에서 높은 활성도를 보였으며, 단일 투여군에서 보다 TX 혼합 투여군에서 통계적으로 유의하게 낮은 활성도를 보였

Table 1. The contents of hepatic proteins in rats after 3 days exposure to toluene, xylene and combination with toluene and xylene

Treatment (mg/kg)	Protein (mg/ml)	CYP (nmol/mg protein)
Control	16.48 \pm 0.56 ^a	0.744 \pm 0.025 ^a
T	19.24 \pm 1.10 ^b	0.855 \pm 0.022 ^a
X	20.68 \pm 1.40 ^b	0.922 \pm 0.038 ^b
TX	20.36 \pm 0.47 ^b	0.981 \pm 0.039 ^b
F-values	4.19**	4.31**

**p<0.01. CYP, cytochrome P-450; T, toluene; X, xylene; TX, T+X.

Values represent mean \pm S.D. Upper letters(a,b): The same letter are not significantly different.

다. PROD와 ρNPH 활성도가 대조군보다 T와 X 단일 투여군에서 증가된 결과를 보임에 따라(Table 2) 이들 CYP 의존성 촉매효소에 특이적 선택성을 보이는 CYP2B1/2와 CYP2E1/2 동위효소에 대한 단일세포성면역항체를 이용하여 Western immunoblotting 분석을 실시하여 fig. 1에 나타내었다. CYP2B1/2 단백질의 유도는 대조군<T<X<TX 투여군 순으로 증가되었고, CYP2E1/2은 대조군<T=X<TX 순으로 나타났다. T와 X 단일 투여군과 TX 혼합 투여군에서 이들 물질의 대사 산물을 측정된 결과, T의 대사산물인 HA의 배설량은 T 단일 투여군에서 3.29±1.97 g/g creatinine, TX 혼합 투여군에서는 2.91±1.76 g/g creatinine으로 두 군간에 유의한 차이를 보이지 않았으나 대조군과는 유의한 차이를 보였다. X의 대사산물인 mHA의 뇨중 배설량은 X 단일 투여군에서 1.62±0.72 g/g creatinine, TX 혼합 투여군에서는 0.93±0.63 g/g creatinine으로 두 군간 통계적으로 유의한 차이를 보였으나, 대조군에서는 측정되지 않았다(Fig. 2).

IV. 고찰

CYP는 hydroxylation, N-oxidation, sulfoxidation, peroxidation, deamination, dehalogenation 및 N-, O-, S-dealkylation 등의 다양한 반응을 촉매하여 알코올, 케톤, 방향족 및 지방족탄화수소 등 많은 유기용제, 약물 및 환경오염물질 뿐만 아니라 생체내 구성 물질인 지방산, 스테로이드 및 prostaglandine 등의 대사에 작용한다(Lu 와 West, 1980; Omura 등, 1993). CYP의 발현은 종(species), 성별 및 환경으로부터 노출되는 물질 등의 영향에 의해 차이를 보이기 때문에 사람, 동물 및 미생물 등에 있어서 현재까지 밝혀진 CYP superfamily의 종류는 수백종에 이른다(Nelson 등, 2004). 그러나 많은 연구자들에 의해 생체내 구성물질과 이물질 대사에 CYP가 관여한다는 것은 밝혀지고 있으나(Gonzlaez, 2005), 어떤 종류의 CYP 동위효소가 관여하는지는 분명하지 않으며, 특히 환경으로부터

Table 2. The activities of PROD and ρNPH in liver microsomes from rats exposed to toluene, xylene and combination with toluene and xylene for 3 days

Treatment (mg/kg)	PROD	ρNPH
	(pmol/min/mg protein)	
Control	0.406±0.005 ^a	247.3±10.5 ^a
T	0.609±0.011 ^b	533.7±20.9 ^b
X	0.885±0.010 ^c	502.1±21.8 ^b
TX	0.535±0.015 ^d	399.3±30.5 ^c
F-values	2172.057**	136.457**

**p<0.01. PROD, Pentoxyresorufin-O-deethylase; ρNPH, ρ-Nitrophenol hydroxylase; T, toluene; X, xylene, TX, T+X. Values represent mean±S.D. Upper letters(a,b,c,d): The same letter are not significantly different(p<0.01).

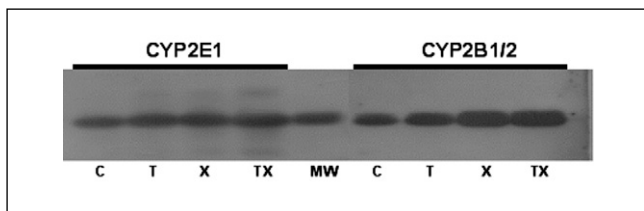


Fig.1. Western immunoblot analysis for liver microsomes of rats treated with toluene and xylene utilizing mouse monoclonal anti-rat CYP2B1/2 and CYP2E1 antibodies. Liver microsomes(100 μg) were loaded for the groups: C, control; T, toluene 63.7 mg/kg; X, xylene 65.9 mg/kg; TX, T+X; MW, molecular weight.

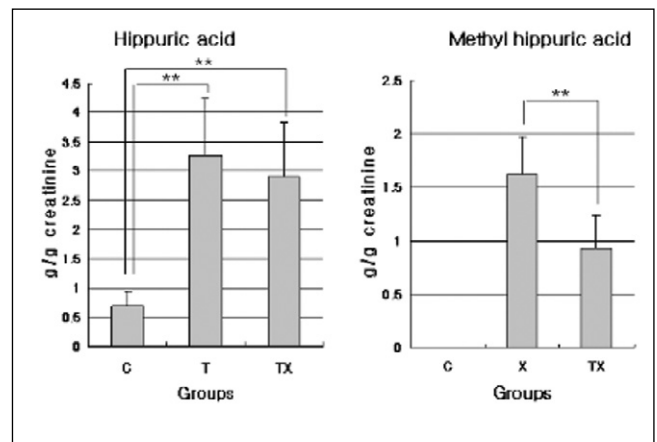


Fig. 2. Concentration of urinary metabolites after the administration of toluene and xylene. **p<0.01. C, control; T, treated with toluene 63.7 mg/kg; X, treated with xylene 65.9 mg/kg; TX, T+X.

노출되는 유기용제에 대한 연구는 미흡한 상태이다. MAH계 물질의 대사에 CYP가 관여한다는 것은 이미 여러 연구자들에 의해서 보고되었으나(Park과 Williams, 1953; Ogata 등, 1977; Cohr와 Stockholm, 1979), 혼합 노출에 대한 CYP 동위효소의 유도와 촉매작용에 관한 연구는 거의 이루어지고 있지 않다. 혼합노출에 대한 연구에서 Ikeda 등(1972)은 toluene이 benzene의 대사를 억제시켜 benzene의 독성작용을 상승시킬 수 있다고 보고하였으며, Wetmore 등(2008)은 toluene과 benzene의 단일물질 노출보다 혼합 노출시 CYP2E1에 선택적인 활성을 보이는 ρ NPH의 활성도가 높았다고 보고하였다. 김기웅 등(1996)의 SD계 흰쥐를 이용한 연구에서는 대조군보다 toluene과 xylene 단일 및 혼합 투여군에서 CYP1A1/2에 선택적인 활성을 보이는 aryl hydrocarbon hydroxylase의 활성도가 통계적으로 유의하게 높았으나, 단일과 혼합 노출군간에는 차이를 보이지 않았다고 하였다. 이 연구에서 측정된 microsomal 단백질의 농도는 대조군이 16.48 ± 0.56 mg/ml, T군과 X군은 각각 19.24 ± 1.10 과 20.68 ± 1.40 mg/ml이었으며 TX 혼합 투여군에서는 20.36 ± 0.47 mg/ml로 투여군 모두에서 대조군보다 유의하게 높은 결과를 보였으나, 투여군간 차이는 보이지 않았다. CYP의 함량도 대조군(0.744 ± 0.025 nmol/mg protein)에 비해 투여군 모두에서 통계적으로 유의하게 높은 결과를 보였다. 또한, CYP2B1/2과 CYP2E1/2에 선택적인 활성을 보이는 PROD와 ρ NPH의 활성도는 대조군에 비해 단일 물질 노출군에서 유의하게 높았으나, 혼합물질 노출군에서는 단일물질 노출군의 활성도보다 낮았다. T와 X의 투여에 의해서 microsomal 단백질과 CYP의 함량이 증가된 결과는 이들 물질을 제거하기 위한 방어시스템이 작동하여 대사에 관여하는 특이 효소의 발현을 증가시켜 나타난 결과로 보인다(Nerbert와 Gonzalez, 1987). 투여군에서 PROD와 ρ NPH 활성도의 증가는 benzene, toluene 및 xylene과 같은 저분자량을 가진 물질의 대사에 CYP2E1/2(Lu와 Cederbaum, 2008)과 CYP2B1/2 동위효소(Foy와 Schatz, 2004)가 관여하기 때문에 이들 동위효소에 선택적인 활성을 보이는 PROD(Lubet 등, 1985)와 ρ NPH(Koop, 1986)의 활성도가 증가된 결과라 생각된다. 또한, 단일 노출군보다 혼합 노출군에서 PROD와 ρ NPH의 활성도가 감소된 것은 각각의 물질을 대사시키기 위한 효소의 경쟁 반응에 의한 결과로 해석할 수 있으며, 위에서 언급하였듯이 T와 X의 노출이 PROD와 ρ NPH의 활성도를 증가시킨 것은 이들 물질이 CYP2B1/2와 CYP2E1/2 동위효소를 유도시킨 결과에 의한 것으로 볼 수 있다. 그러나 PROD와 ρ NPH와 같은 CYP-의존성 촉매효소들은 노출물질에 따라 선택성을 가지고 있으며 중복성도 함께 내포되어 있어서 단지 활성도 변화만을 가지고 CYP2B1/2와 CYP2E1/2 동위효소가 유도되었다고 단정하기는 어렵다. 따라서 CYP2B1/2와 CYP2E1/2에 대

한 단일세포성면역항체를 이용하여 Western immunoblot을 실시한 결과, T와 X는 CYP2B1/2와 CYP2E1/2 동위효소를 유도하며 단일 물질보다는 혼합물질 노출시 유도가 증가되는 것을 확인하였다. T와 X에 대한 대사기전이 밝혀진(Cohr와 Stockholm, 1979; Ogata 등, 1977) 이후에 이들 물질에 대한 생물학적 모니터링은 소변으로 배설되는 마노산(hippuric acid)과 메틸마노산(methyl hippuric acid)을 측정하여 평가하고 있다(ACGIH, 2002). 이 연구에서 노중 HA는 대조군보다 T 단일 투여군과 TX 혼합 투여군에서 배설량의 증가를 보였으나 단일과 혼합 투여군간에는 유의한 차이를 보이지 않았다. mHA는 대조군에서는 검출되지 않았으며 X 단일 투여군보다 TX 혼합 투여군에서 통계적으로 유의한 감소를 보였다. 이러한 결과는 노출물질과 그에 따른 대사산물간 특이성을 들어서 설명할 수 있다. 즉, T의 경우는 T의 대사산물인 HA가 X의 대사산물인 mHA보다 특이성이 낮아 X 투여군과는 달리 단일과 혼합 투여군간 차이를 보이지 않은 것으로 생각되는데, 그러한 이유 중의 하나가 T를 투여하지 않은 대조군에서도 HA가 검출되었다는 것을 들 수 있다.

Ikeda 등(1972)은 benzene과 toluene을 단일 투여한 흰쥐의 소변에서 benzene의 대사산물인 phenol을 측정된 결과, 혼합 투여군에서 감소된 배설량을 보였으며, Sato와 Nakajima(1979)의 연구에서 투여물질의 농도 증가와 더불어 phenol의 배설량이 감소된다는 보고처럼 우리의 연구에서도 단일보다 혼합 투여군에서 배설량의 감소를 보인 것은 CYP 의존성 촉매효소와 CYP 동위효소의 유도와 관련하여 생각할 수 있다. T와 X에 의해서 CYP의 함량과 동위효소의 유도는 증가되었으나, 이들 물질의 대사과정에서 유기용제간의 상호작용과 대사에 관여하는 효소의 경쟁적 반응으로 각각의 노출물질에 대한 대사에 영향을 주어 혼합 노출군에서 대사산물의 배설량이 감소된 것으로 생각된다.

이러한 결과를 통하여 혼합 유기용제에 노출되는 근로자의 소변으로 배설되는 대사산물의 농도를 측정하여 생물학적 모니터링을 실시할 경우 실제보다 과소평가될 수도 있다는 사실을 염두에 두어야 할 것이다.

V. 결 론

이 연구는 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 이용하여 산업체에서 널리 사용되고 있는 toluene과 xylene을 단일 및 혼합된 형태로 노출시킨 다음, 간장의 microsomes에서 어떤 형태의 CYP 동위효소가 유도되는지를 CYP2B1/2와 CYP2E1/2에 대한 단일세포성항체를 이용하여 확인하고자 하였다. 또한, 이들 동위효소의 유도와 활성도가 노출물질과 노출 형태에 따

라 어떠한 변화를 보이며 대사산물의 배설량에는 어떤 영향을 미치는지를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Microsomal 단백질의 농도는 대조군이 16.48 ± 0.56 mg/ml, T와 X는 각각 19.24 ± 1.10 과 20.68 ± 1.40 mg/ml이었으며, TX 혼합 투여군에서는 20.36 ± 0.47 mg/ml로 투여군 모두에서 대조군에 비해 유의하게 높은 결과를 보였으나 투여군간 차이는 보이지 않았다.

2. 대조군의 CYP 함량은 0.744 ± 0.025 nmol/mg protein으로 T 단일 투여군을 제외하고 X(0.922 ± 0.038 nmol/mg protein)과 TX 혼합 투여군(0.981 ± 0.039 nmol/mg protein)에서 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$).

3. CYP2B1/2에 선택성을 보이는 PROD의 활성도는 대조군에서 0.406 ± 0.005 pmol/min/mg protein, T과 X 단일 투여군에서는 각각 0.609 ± 0.011 과 0.885 ± 0.010 pmol/min/mg protein이었으며, TX 혼합 투여군에서는 0.535 ± 0.015 pmol/min/mg protein으로 투여군 모두에서 대조군에 비해 유의하게 높은 활성도를 보였으며 단일 투여군보다 혼합투여군에서 낮은 활성도를 보였다.

4. CYP2E1/2 동위효소에 선택적 특이성을 보이는 ρ NPH의 활성도도 대조군에서 247.3 ± 10.5 pmol/min/mg protein으로 단일(T, 533.7 ± 20.9 ; xylene, 502.1 ± 21.8 pmol/min/mg protein) 및 TX 혼합 투여군(399.3 ± 30.5 pmol/min/mg protein)보다 통계적으로 유의하게 낮았으며, 단일보다는 혼합 투여군에서 유의한 활성도의 감소를 보였다.

5. 단일세포성항체를 이용한 Western immunoblot 실험에서 T는 CYP2E1/2, X는 CYP2B1/2의 유도를 증가시키는 것으로 확인되었으며, 각각의 단일물질보다 혼합 노출의 경우에 단백질의 유도가 증가되었다.

6. 노출형태에 따라 노출 대사산물의 배설량을 측정된 결과, HA은 T 단일 노출군에서 3.29 ± 1.97 g/g creatinine, TX 혼합 투여군에서는 2.91 ± 1.76 g/g creatinine으로 두 군간에 유의한 차이를 보이지 않았으나, 대조군과는 유의한 차이를 보였다. X의 대사산물인 mHA의 노출 배설량은 X 단일 투여군에서 1.62 ± 0.72 g/g creatinine, TX 혼합투여군에서는 0.93 ± 0.63 g/g creatinine으로 두 군간 통계적으로 유의한 차이를 보였으나, 대조군에서는 측정되지 않았다.

이상의 결과를 보면, T과 X이 이물질 대사효소인 CYP의 단백질 합성은 증가시켰으나 흡수된 T과 X의 상호작용에 의한 효소의 경쟁반응으로 인하여 효소의 촉매작용이 억제되어 대사산물의 배설량이 감소된 것으로 생각된다. 따라서 혼합 유기용제에 노출되는 근로자에 대하여 소변으로 배설되는 대사산물의 농도를 측정하여 생물학적 모니터링을 실시할 경우에 실제보다 과소평가 될 수도 있다는 사실을 염두에 두어야 할 것이며, 향후 연구에서는 흡수된 물질간의 상호작

용과 대사효소의 작용에 관한 기전(mechanism) 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 김기웅, 박상신, 김태균, 문영한, 장성근. 흰쥐 간의 microsomal enzymes의 유도에 있어서 benzene, toluene과 xylene의 복합적인 영향과 그들의 대사산물. 한국독성학회지 1996;12(1):9-15
- 김현영, 이성배, 한정희, 김태균, 이정석, 강민구, 이채관. 시너(thinner)의 물리화학적 특성과 랫트의 생식기에 미치는 영향 연구. 한국산업위생학회지 2008;18(3):224-238
- 노동부. 화학물질 및 물리적 인자의 노출기준(노동부고시 2008-26호). 노동부, 2008
- 노재훈, 신동천, 박정균, 문영한, 정호근. 단시간 허용농도의 toluene이 benzene 대사에 미치는 영향. 예방의학회지 1988;21(1):152-162
- 이권섭, 이용목, 유일재, 권현우. 도료희석제의 MSDS 신뢰성 조사 연구. 한국산업안전공단 산업안전보건연구원, 2002
- ACGIH. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. Cincinnati, Ohio, ACGIH, 2002
- Arlie-Soborg P. Solvent neurotoxicity. CRC Press Inc., Florida, 1992, 107-124
- Cohr KH, Stokholm J. Toluene. a toxicology review. Scand J Work Environ Health 1979;5:71-90
- Dennison JE, Andersen ME, Yang RS. Characterization of the pharmacokinetics of gasoline using PBPK modeling with a complex mixtures chemical lumping approach. Inhal Toxicol 2003;15(10):961-86
- Dennison JE, Bigelow PL, Mumtaz MM, Andersen ME, Dobrev ID, Yang RS. Evaluation of potential toxicity from co-exposure to three CNS depressants(toluene, ethylbenzene, and xylene) under resting and working conditions using PBPK modeling. J Occup Environ Hyg 2005;2(3):127-35
- Foy JW, Schatz RA. Inhibition of rat respiratory-tract cytochrome P-450 activity after acute low-level m-xylene inhalation: role in 1-nitro-naphthalene toxicity. Inhal Toxicol 2004;16(3):125-132
- Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. Mutat Res 2005;569:101-110
- Ikeda M, Ohtsuji H, Imamura T. In vivo suppression of benzene and styreneoxidation by co-administrated toluene in rats and effects

- of phenobarbital. *Xenobiotica* 1972;2:101-106
- Kim KW, Kim HY, Park SS, Jeong HS, Park SH, Lee JY, Jeong JH, Moon YH. Gender differences in activity and induction of hepatic microsomal cytochrome P-450 by 1-bromopropane in Sprague-Dawley rats. *J Biochem Mol Biol* 1999;32(3): 232-23
- Klotz AV, Stegeman JJ, Walsh C. An alternative 7-ethoxyresolufin O-deethylase activity assay: A continuous visible spectrophotometric methods for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity *Anal Biochem* 1984;140:138-145
- Koop DR. Hydroxylation of p-Nitrophenol by rabbit ethanol inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Mol Pharmacol* 1986;29:339-404
- Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head a bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:401-404
- Lu AYH, and West SB. Multiplicity of mammalian microsomes P-450. *Pharmacol Rev* 1980;31:277-295
- Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biology & Medicine* 2008;44:723-738
- Lubet RA, Nims RW, Mayer RT, Cameron JW, Schechtman LM. Measurement of cytochrome P-450 dependent dealkylation of alkoxyphenoxazones in hepatic S9s and hepatocyte homogenates: Effects of dicumarol. *Mutation Research* 1985;142:127-131.
- Nebert DW, Gonzalez FJ. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annual Review of Biochemistry* 1987;45:945-993.
- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 2004;14(1):1-18
- Ogata M, Sugihara R, Kira S. Quantitative determination of urinary HA and m- or p-xylene exposure by HPLC. *Int Arch Occup Environ Health* 1977;39:199-206
- Ommura T, Ishimura Y, Fujii-Kuriyama Y. Cytochrome P-450. 2nd ad., Kodansha Ltd, Tokyo, 1993
- Omura T and Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964;239:2370-2378
- Park KH and Kim CR. Induction of the different forms cytochrome P-450 isozymes and comparison of aryl hydrocarbon hydroxylase levels on rat tissues by chemical treatment. *Korean Biochem J* 1984;17:10-19
- Park DV, Williams RT. Studies in detoxication. The metabolism of benzene containing 14C-benzene. *Biochem J* 1953;54:231-238
- Sato A and Nakajima T. Dose-dependent metabolic interaction between benzene and toluene in vivo and in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979;48:249-256
- Tassaneeyakul W, Birkett DJ, Edwards JW, Veronese ME, Tassaneeyakul W, Tukey RH, Miners JO. Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-, m- and p-xylene. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;276(1):101-8
- Tradif R, Rapare S, Krishnan K and Brodeur J. A descriptive and mechanistic study of the interaction between toluene and xylene in humans. *International Archives Occupational and Environmental Health* 1993;65:135-137
- Uaki H, Kawai T, Mizunuma K, Moon CS, Zhang ZW, Inui S, Takada S, Ikeda M. Dose-dependent suppression of toluene metabolism by isopropyl alcohol and methyl ethyl ketone after experimental exposure of rats. *Toxicol Letter* 1995;81:229-234
- Wetmore BA, Struve MF, Gao P, Sharma S, Allison N, Roberts KC, Letinski DJ, Nicolich MJ, Bird MG, Dorman DC. genotoxicity of intermittent co-exposure to benzene and toluene in male CD-1 mice. *Chemico-Biological Interactions* 2008;173:166-178