

## 흰쥐에 Toluene과 Alcohol의 병행투여가 Toluene 대사 효소활성에 미치는 영향

윤종국<sup>†</sup> · 전재현 · 신증규\*

계명대학교 공중보건학과

\*경산대학교 보건과학과

### Effect of the Combination of Ethanol with Toluene Treatment for a Short Time Period on the Toluene Metabolizing Enzyme Activity

Chong-Guk Yoon<sup>†</sup>, Jai-Hyun Jeon and Joong-Kyu Shin\*

Dept. of Public Health, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

Dept. of Health Science, Kyung San University, Kyungsan 713-715, Korea

#### Abstract

To elucidate the effect of acute ethanol pretreatment on some toluene metabolizing enzyme activities, rats were divided into 4 groups: control, alcohol-treated, toluene-treated, rat's and toluene-treated rats pretreated with ethanol. The alcohol or toluene-treated rats showed the significantly increased activities of hepatic aniline hydroxylase(AH) and aminopyrine demethylase(AD) compared to the control group. And the toluene-treated rats pretreated with ethanol showed somewhat decreased tendency of these enzyme activities compared to only toluene-treated rats. Liver benzylalcohol or aldehyde dehydrogenase activities were higher in alcohol or toluene-treated rats than those of the control group. The toluene-treated rats showed the decreased tendency of benzylalcohol dehydrogenase activities by the pretreatment of alcohol. Furthermore, toluene treated-rats showed the markedly decreased activity of benzaldehyde dehydrogenase by the ethanol pretreatment. On the other hand, hepatic xanthine oxidase activity in toluene-treated animals pretreated with ethanol was significantly higher than those of the toluene alone-treated rats. These results indicate that the combination of ethanol with toluene treatment for a short period of time possibly results in decreased activity of some toluene metabolizing enzymes in rats.

**Key words:** toluene, ethanol, hepatic aniline hydroxylase, aminopyrine demethylase, benzylalcohol and aldehyde dehydrogenase

#### 서 론

최근 산업발전에 따른 유해공해물질의 폭로와 더불어 식생활의 향상과 다양화에 수반된 주류섭취의 증가가 인간의 건강을 위협하고 있다. 특히 산업장 근로자들에 있어서 산업장 유해물질의 폭로에 stress 증가로 인한 주류섭취의 변수가 작용하여 산업장 근로자 건강 관리에 심각한 문제가 제기될 것으로 생각된다.

산업장 공해물질인 xenobiotics의 복합 폭로시 중독 현상은 이들 xenobiotics의 상호작용에 영향을 받는다

고 하며(1-3), 특히 alcohol과 xenobiotics의 동시 폭로시 alcohol에 의해 xenobiotics의 생전환이 달리 나타난다고 한다(3-5). 이같은 산업장 유해물질 중 xenobiotics의 일종인 toluene은 비교적 안전성이 인정되어 산업장에서 유기용제로 널리 이용되며 생체폭로시 신경계(6,7), 조혈계(8,9) 및 간조직(10)의 중독현상이 나타난다고 보고되고 있다. Toluene은 생체내에서 benzylalcohol, benzaldehyde, benzoic acid를 거쳐 주로 hippuric acid로 변환되며, 일부는 cresol로 전환되어 요중으로 배설된다고 한다(11).

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

한편 alcohol을 실험동물에 장기간 투여시 microsomal enzymes 유도되어 xenobiotics의 대사가 촉진된다(12,13)고 하며 최근 Wang과 Nakajima(14)는 alcohol을 장기간 투여한 다음 toluene 투여시 toluene의 대사가 촉진된다고 하였다. 그러나 alcohol과 toluene을 동시에 투여시 혈액 중 toluene 농도가 감소 또는 증가된다는 보고(14,15)도 있어 alcohol과 toluene의 생체 투여 조건에 따라서 toluene 대사가 달리 나타날 것으로 생각된다.

본 연구에서는 toluene 대사에 대한 alcohol의 영향을 검토할 일환으로 alcohol을 전처치한 다음 toluene을 투여하였을 때 toluene 대사에 관여하는 간조직 microsomal mixed function oxidase인 aniline hydroxylase 및 aminopyrine demethylase 활성도(16)를 측정함과 동시에 alcohol 및 aldehyde dehydrogenase 활성도를 간조직 중에서 측정하여 이들 성적을 상호 비교 검토코자하였다.

### 재료 및 방법

#### 동물 및 처치

동물은 체중 170g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley종의 숫 흰쥐를 시중에서 구입한 동물사료(삼양사료 주식회사 제품)로 1개월간 사육하여 실험에 사용하였다. 사육기간 동안 물과 사료의 양은 제한없이 공급하였다.

각 실험군은 대조군과 alcohol 투여군, toluene 투여군, alcohol 전처치 후 toluene 투여군으로 분리 수용하였다. Alcohol 투여군은 alcohol과 생리식염수의 동량 혼합액을 만들어 Cohen 등의 방법(17)에 준해 체중 100g 당 0.3ml를 1일 1회 4일간 복강내로 주사하였으며, toluene 투여군은 olive oil로 희석한 50%(V/V)용액을 체중 100g 당 0.3ml를 Pathiratne 등의 방법(18)에 준하여 1일 1회 4일간 주사하였다. Alcohol과 toluene의 병행 투여군은 alcohol 투여 2시간 후에 toluene을 두군의 주사방법과 동일하게 주사하였다. 대조군은 saline을 양에 상관없이 복강내로 주사하였으며 4군 모두 마지막 주사 후 24시간 동안 물만 주고 금식시켰다.

동물의 처치는 효소활성의 일중 변동을 고려하여 일정 시간에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였다. 동물은 ether 마취하에 복부정중선을 따라 개복한 후 복부 대동맥으로부터 채혈하고, 4°C 생리식염수로 간을 관류하여 간에 남아있는 혈액을 제거한 다음 적출하였다. 적출한 장기는 생리식염수로 장기 표면에 묻어있는 혈액을 가볍게 씻은 후 여지로 압박하여 장기내에 남아있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음 무게를 칭량하였다.

#### 효소 시료의 조제

간조직을 빙냉하에서 절편으로 만들고 그 중 일정량을 칭량하여 4배 양의 0.25M sucrose용액과 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4)용액을 가하고 glass teflon homogenizer로 마쇄균질액(20% W/V)을 만들었다. 이 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음, 상정액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하였고 다시 그 상정액을 105,000×g에서 1시간 초원심분리하여 cytosol 분획과 microsome 분획을 얻었다. Cytosol 분획은 간 xanthine oxidase, benzylalcohol dehydrogenase 및 benzaldehyde dehydrogenase 활성도 측정의 효소시료로 사용하였고, microsome 분획은 aniline hydroxylase 및 aminopyrine demethylase 활성도 측정에 사용하였다.

#### 효소활성도 측정

Aniline hydroxylase(AH) 및 aminopyrine demethylase(AD) 활성도 측정

간조직 중 AH 활성도 측정은 Kato 등의 방법(19)을 이용하였다. 활성도 단위는 간조직 효소액 중에 함유된 1mg protein이 1시간 동안 반응하여 기질로부터 생성된 p-aminophenol의 양을 nmole로 표시하였다. 한편 AD 활성도 측정은 Nash의 방법(20)을 수정한 Bidlack과 Lowry의 방법(21)에 준하여 측정하였으며 활성도 단위는 간 조직 효소액 중에 함유된 단백 1mg이 1분 동안 반응하여 기질로부터 생성되는 formaldehyde의 양을 nmole로 표시하였다.

Benzylalcohol dehydrogenase(BADH) 활성도 측정  
간조직 중 BADH 활성도 측정은 Bergmeyer 등의 방법(22)에 준하였다. 활성도 단위는 단백질 1mg이 10분 동안 반응하여 생성되는 NADH의 양을 μmole로 표시하였다.

Benzaldehyde dehydrogenase(BALDH) 활성도 측정  
간조직 중 BALDH 활성도 측정은 Stachow 등의 방법(23)에 준하였다. 효소 반응액이 25°C에서 기질인 benzaldehyde와 5분간 반응하여 생성되는 NADH의 양을 1mg protein에 대한 μmole로 표시하였다.

#### Xanthine oxidase(XO) 활성도 측정

간 XO 활성도 측정은 Stirpe와 Della Corte 등의 방법(24) 및 Yoon의 방법(25)에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 간조직에서는 효소 시료가 1분 동안 반응하여 기질로부터 생성된 uric acid 양을 체중 100g당으로 환산하여 nmole 농도로, 혈청에 있어서는 생성된

uric acid 양을 혈청 1당  $\mu\text{mole}$ 로 표시하였다.

### 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등의 방법(26)에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

이상 실험 결과의 통계처리는 student's t-test(27)를 이용하여 상호 비교하였다.

### 결과 및 고찰

#### 간 aniline hydroxylase(AH) 및 aminopyrine demethylase(AD) 활성도 변동

Toluene으로부터 benzylalcohol 생성에는 조직세포의 smooth endoplasmic reticulum(SER)에 존재하는 지용성 약물대사 기구인 혼합산화기능 산화효소인 cytochrome P-450에 의한다(11)고 한다.

본 실험에서 toluene과 alcohol을 병행 투여한 후 toluene으로부터 benzylalcohol 생성에 관여하는 cytochrome P-450에 상응하는 microsomal AH 및 AD 활성도(16)를 측정할 것을 Table 1에 나타내었다. Alcohol 투여군은 대조군에 비해서 AH 및 AD 활성도가 각각 114%( $p < 0.001$ ), 26%( $p < 0.05$ )의 유의한 증가를 보였다. 또한 toluene 투여군에 있어서 AH 및 AD 활성도 역시 대조군에 비해서 각각 약 214%( $p < 0.001$ ), 30%( $p < 0.05$ ) 증가되었다. 그러나 alcohol과 toluene의 병행 투여군은 toluene 투여군 보다 AH 및 AD 활성도 모두 다소 낮게 나타났다. 이러한 결과로 보아 alcohol 및 toluene 투여시에는 microsomal 약물대사효소가 유도됨을 알 수 있다. 또한 alcohol로부터 생성된 acetaldehyde가 cytochrome P-450 효소를 억제시킨다는 Lieber의 보고(28)를 감안해 볼 때, toluene 및 alcohol을 병행투여시에 toluene만 투여한 실험군 보다 본 효소 활성도가 다소 낮게 나타난 것은 toluene 투여 2시간 전에 ethanol

Table 1. Effect of toluene and alcohol treatment on the hepatic aniline hydroxylase(AH) and aminopyrine demethylase(AD) activities in rats

Groups	AH <sup>1)</sup>	AD <sup>2)</sup>
Control	4.62 ± 0.66	34.67 ± 2.31
Alcohol	9.90 ± 0.66***	43.66 ± 2.83*
Toluene	14.52 ± 2.64***	44.94 ± 3.08*
Alc. + Tol.	11.22 ± 0.66***	41.09 ± 3.21

Each value represents the mean ± S.E. of 6 rats  
Significantly different from the control group(\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

Unit; <sup>1)</sup>n moles p-aminophenol/mg protein/min  
<sup>2)</sup>n moles formaldehyde/mg protein/min

을 전처치하므로써 생성된 acetaldehyde가 본 효소 활성도를 억제시키므로써 나타난 결과로 생각된다.

#### 간 조직 중 benzylalcohol dehydrogenase(BADH) 활성도 변동

Toluene으로부터 생성된 benzylalcohol로부터 benzaldehyde 생성에 관여하는 benzylalcohol dehydrogenase 활성도를 측정할 것이 Fig. 1이다. Alcohol 투여군은 대조군에 비해서 BADH 활성도가 약 52%( $p < 0.05$ )의 유의한 증가를 나타내었고 toluene 투여군은 약 45% 증가되었다.

또한 alcohol과 toluene의 병행 투여군은 toluene 투여군 보다 본 효소의 활성도가 다소 낮게 나타나는 경향을 보였다.

Alcohol 투여군이나 toluene 투여군 모두 본 효소 활성도가 대조군 보다 높게 나타난 결과로 보아 본 효소는 지방산 및 방향족 alcohol을 기질로한 비특이적 효소임을 알 수 있다. 또한 acetaldehyde가 간조직 중 효소 단백질 합성을 억제시킨다는 보고(28)와 본 실험에서 alcohol을 전처치한 다음 2시간 후 toluene 투여시 toluene만 투여한 군 보다 본 효소 활성이 다소 낮게 나타난 현상은 acetaldehyde가 본 효소 활성을 억제시키기 때문일 것으로 생각된다.

#### 간조직 중 benzaldehyde dehydrogenase(BALDH) 및 xanthine oxidase(XO) 활성도 변동

Benzaldehyde로부터 benzoic acid로 대사되는데 관여하는 BALDH 활성도를 측정할 것이 Fig. 1이다.

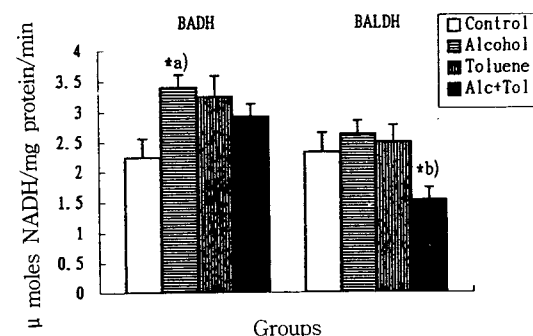


Fig. 1. Effect of toluene and alcohol treatment on the liver benzylalcohol(BADH) or aldehyde(BALDH) dehydrogenase activities in rats.

Other abbreviations are the same as in Table 1.

<sup>a)</sup>Significantly different from the control group.

<sup>b)</sup>Significantly different from the toluene treated group(\* $p < 0.05$ ).

Benzaldehyde를 기질로 하여 효소의 활성을 측정하였을 때 alcohol 투여군과 toluene 투여군은 대조군에 비해서 본 효소의 활성이 다소 높게 나타나는 경향을 보였으나 통계학적 의의는 없었다. 그러나 alcohol과 toluene 병행 투여군은 toluene 투여군 보다 본 효소 활성이 40%의 유의한(p<0.05) 감소를 보였다. 이같이 alcohol과 toluene 병행 투여군이 toluene 투여군 보다 본 효소의 활성이 감소되는 현상은 acetaldehyde와 benzaldehyde가 benzaldehyde dehydrogenase에 대하여 경쟁적으로 작용하는데 기인된 것으로 생각된다.

이같은 실험결과를 검토해 볼 때 toluene과 alcohol의 병행 투여군에 있어서 aldehyde dehydrogenase 활성도가 낮게 나타남으로서 체내 benzaldehyde 유지율이 toluene만 투여한 실험군 보다 높게 나타날 것을 암시해 주고 있다.

한편 benzaldehyde는 xanthine oxidase의 기질성 물질의 일종일 것이라는 보고(29)를 고려해 볼 때 본 실험에서 alcohol과 toluene의 병행 투여군이 toluene 투여군 보다 XO 활성도가 높게 나타날 것으로 생각되어 본 실험 조건에서 간 XO 활성도를 측정하였다(Fig. 2). Alcohol과 toluene 병행 투여군은 toluene 투여군 보다 간 XO 활성도가 약 20%의 유의한(p<0.05) 증가를 보였다. 따라서 toluene과 alcohol을 병행투여시에 benzaldehyde dehydrogenase 활성도가 억제됨으로서 체내 benzaldehyde 유지율이 증가될 것으로 생각되며 이를 보

상하기 위하여 XO 활성도가 증가된 것으로 사료된다.

요 약

흰쥐를 대조군과 체중 100g 당 ethanol 0.3ml를 1일 1회 4일간 복강내로 투여한 실험군, 체중 100g 당 toluene 0.3ml를 1일 1회 4일간 복강내로 투여한 실험군 및 ethanol 투여 2시간 후 toluene을 투여한 군으로 나누어 실험을 행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Alcohol 투여군, toluene 투여군 모두 간 microsomal aniline hydroxylase(AH) 및 aminopyrine demethylase(AD) 활성도가 대조군 보다 유의한 증가를 보였다. Toluene과 ethanol의 병행군은 toluene 투여군 보다 AH 및 AD 활성도가 다소 낮게 나타나는 경향을 보였다. 간조직 중 benzylalcohol dehydrogenase 활성도 역시 alcohol 및 toluene 투여군 모두 대조군에 비하여 높게 나타났으며 toluene과 alcohol의 병행투여군은 toluene 투여군 보다 본 효소 활성도가 다소 낮게 나타나는 경향을 보였다. 한편 간조직 중 benzaldehyde dehydrogenase 활성도는 alcohol 및 toluene 투여군 모두 대조군에 비하여 증가되는 경향을 보였으며 alcohol과 toluene의 병행 투여군은 toluene 투여군 보다 유의한 감소를 보였다. 또한 간조직 중 xanthine oxidase 활성도는 alcohol과 toluene 병행 투여군이 toluene 투여군 보다 유의하게 증가되었다. 이상 실험성적을 종합해 볼 때 alcohol의 전처치는 toluene 대사 효소 활성도를 억제시켜 toluene 대사에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

문 헌

1. Conney, A. H., Pantuck, E. J., Hsiao, K. C., Kuntzman, R., Aluarez, A. P. and Kappas, A. : Regulation of drug metabolism in man by environmental chemicals and diet. *Fed. Proc.*, **36**, 1647(1977)
2. Wilkinason, C. F. : Insecticide interactions. In "Insecticide biochemistry and physiology" Wilkinson, C. F. (ed.), Plenum Press, New York, chapter 15(1976)
3. Corongiu, F. P., Lai, M. and Milia, A. : Carbon tetrachloride, bromotrichloro-methane and ethanol acetate intoxication. *Biochem. J.*, **212**, 625(1983)
4. Kater, R. M. M., Tobon, F. and Iber, F. L. : Increased rate of tolbutamide metabolism in alcoholic patients. *JAMP.*, **207**, 363(1969)
5. Pritchard, J. F. and Schneck, D. W. : Effect of ethanol and phenobarbital on the metabolism of propranolol by 9000g rat liver super natant. *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 2453(1977)
6. Satran, R. and Dodson, V. : Toluene habituation. *N. Engl. J. Med.*, **268**, 719(1963)
7. Rees, D. C., Knisely, J. S. and Jordan, S. : Discrim-

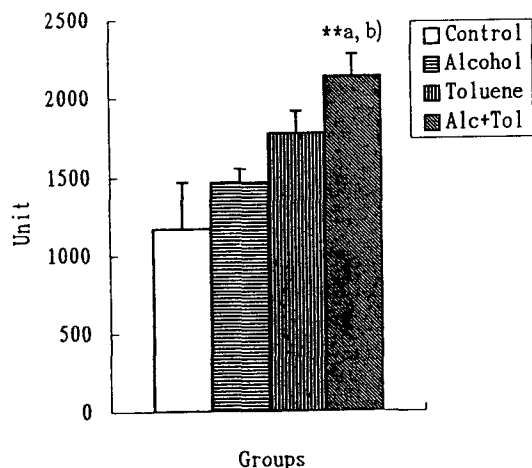


Fig. 2. Effect of toluene and alcohol treatment on the hepatic xanthine oxidase activities in rats. Other abbreviations are the same as in Table 1. a) Significantly different from the control group. b) Significantly different from the alcohol treated group (\*p<0.01). Unit: nmoles uric acid formed/ min/100g body weight.

- inative stimulus properties of toluene in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **88**, 97(1987)
8. Korsak, Z., Sokal, J. A. and Swiercz, R. : The toxic effects of combined exposure to toluene and m-xylene in animals. II. Blood toluene and m-xylene during single and combined exposure in rats. *Pol. J. Occup. Med.*, **4**, 377(1991)
  9. Roh, J., Moon, Y. H. and Kim, K. Y. : The cytogenetic effects of benzene and bone marrow cells in rats. *J. Yonsei. Med.*, **28**, 297(1987)
  10. Morris, R. J. : Toluene and hepatotoxicity. *J. Occup. Med.*, **31**, 1014(1989)
  11. Cohn, K. H. and Stockholm, J. : Toluene : A toxicologic review. Scandinavian Journal of work, *Environ and Health*, **5**, 71(1979)
  12. Nakajima, T., Wang, R. S., Elovaara, E., Park, S. S., Cielboin, H. V. and Rainio, H. : Cytochrome p-450 related differences between rats and mice in the metabolism of benzyene, toluene and trichloroethylene if liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 1079(1993)
  13. Rubin, E. and Lieberm, C. S. : Hepatic microsomal enzymes in man and rats : Induction and inhibition by ethanol. *Science*, **162**, 690(1968)
  14. Wang, R. S. and Nakajima, T. : Effect of ethanol and phenobarbital treatment on the pharmacokinetics of toluene in rats. *Br. J. Ind. Med.*, **49**, 104(1992)
  15. Waldron, H. A., Cherry, N. and Hohnston, J. D. : The effect of ethanol on blood toluene content. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **51**, 365(1983)
  16. Hangen, D. A. and Coon, M. J. : Properties of electrophoretically homogenous phenobarbital-inducible and  $\beta$ -naphthoflavin inducible forms of liver microsomal cytochrome p-450. *J. Biol. Chem.*, **251**, 7929(1976)
  17. Cohen, G., MacNamee, D. and Debiec, D. : Elevation in blood acetaldehyde by pargyline during ethanol administration. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 313(1974)
  18. Pathiratne, A., Puyear, R. L. and Brammer, U. D. : A comparative study of the effects of benzene, toluene and xylene on their *in vitro* metabolism and drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **82**, 272(1986)
  19. Kato, R., Oshima, T. and Tomizawa, S. : Toxicity and metabolism of drug in relation to dietary protein. *Jap. J. Pharmacol.*, **18**, 356(1968)
  20. Nash, T. : The colorimetric estimation of formaldehyde by mensns of the Hantzsch reaction. *J. Biol. Chem.*, **55**, 416(1953)
  21. Bidlack, W. R. and Lowry, G. L. : Multiple drug metabolism : p-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 311(1982)
  22. Bergmeyer, H. U. : *Methods of enzymatic analysis*, ed. 2. New York and London, Academic Press, p.428(1974)
  23. Stachow, C. S., Stevenson, I. L. and Day, D. D. : Purification and properties of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific benzaldehyde dehydrogenase from pseudomonas. *J. Biol. Chem.*, **242**, 5294(1967)
  24. Stirpe, F. and Deslla Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855(1969)
  25. Yoon, C. G. : A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Research Journal(Keimyung Junior College)*, **2**, 295(1984)
  26. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Farr, A. L. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
  27. Scheffler, W. C. : *Statistics for the Biological Sciences*. ed. 2, Menlo Park, Addison-Wesley Publishing Company, USA, p.84(1980)
  28. Lieber, C. S. : Herman award lecture : A personal perspective on alcohol, nutrition, and the liver. *Am. J. Clin. Nutr.*, **58**, 430(1993)
  29. 전태원, 강희양, 윤종국 : 흰쥐에 toluene 투여가 혈청 xanthine oxidase 활성 변동에 미치는 영향. *Korean J. Toxicol.*, **11**, 279(1995)

(1996년 8월 24일 접수)