

Effect of Cyclohexane and Xylene Mixture Treatment on the Liver Damage in Rats

Joong-Kyu Shin

Faculty of Health Science of Daegu Haany University, Gyeongbuk 712-715, Korea

To investigate the cyclohexane and xylene mixture treatment on the liver damage, the rats were treated by the mixture of cyclohexane and xylene (CH+X) and then, liver damage was demonstrated by liver function findings based on liver weight/body weight, serum level of alanine aminotransferase (ALT), xanthine oxidase (XO) and then compared with cyclohexane treated group (CH group) and xylene-treated group (X).

The CH+X group showed merely severer liver damage than CH or X group. On the other hand, CH+X group showed lower activity of hepatic cytochrome P-450 dependent aniline hydroxylase (CYPdAH) than CH or X group, but no statistical differences were demonstrated among three experimental groups. Especially the hepatic GSH content was merely declined than CH or X group and the activity of hepatic GST was higher in CH+X group than CH or X group.

In conclusion, cyclohexane and xylene mixture treated animals showed merely severer liver damage than cyclohexane or xylene treated group and such a fact may be caused by inhibition of cyclohexane or xylene metabolism and oxygen free radical.

Key Words: Cyclohexan, Xylene, CYPdAH, Rat

서 론

최근 산업발전에 따른 다양한 산업화학물질의 인체 폭포로 인하여 인간의 건강에 심각한 문제를 제기하고 있다. 일반적으로 산업장 및 생활환경에서 화학물질은 여러 가지 종류의 화학물질이 혼합되어 사용되는 경우가 많다. 이때 다른 종류 화학물질의 혼합물이 생체에 흡수될 때 화학물질 상호간에 상승효과, 상승작용 및 길항작용으로 화학물질의 생체 내 독성반응이 다양하게 나타난다¹⁾.

산업화학물질 중 cyclohexane은 산업장에서 n-hexane과 benzene의 대체물질로서 유기용제로 널리 사용되고 있으며, xylene 역시 산업장에서 여러 가지 유기용제로 사용되고 있다. 특히 우리나라 산업장에서 사용되고 있는 세정제와 같은 유기용매 중 이 두 물질이 혼합되어 사용되는 경우가 많은 것으로 보고되고 있다²⁾. 실험동물에 cyclohexane의 급성 투여시에는 간조직에 별다른 병태작용이 나타나지 않은 것으로 보고³⁾되고 있으나 xylene 급성 투여시에는 다소의 간독성

이 나타나는 것으로 알려져 있다¹⁾. 따라서 이 두 물질을 혼합하여 투여시에는 간조직에 독성반응이 이들 물질의 상호 상승작용으로 나타날 가능성이 있을 것으로 생각된다. Cyclohexane은 생체 내에서 표적장기 중 microsomal p-450 dependent monooxygenase^{19,20)}에 의해서 cyclohexanol로 대사되며 일부는 β -glucuronide 형태로 포함된 다음 소변으로 배설⁹⁾되며 나머지는 alcohol dehydrogenase에 의해서 cyclohexanone으로 산화되기도 한다²⁵⁾. 이러한 cyclohexanol 및 cyclohexanone은 생체 내 독작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그리고 xylene 역시 표적장기에서 microsomal p-450 dependent monooxygenase 산화 효소계에 의해서 methylbenzylalcohol로 되며 이는 alcohol dehydrogenase에 의해서 methylbenzaldehyde로 되어 이는 toluic acid^{20,29)}로 되어 glycine과 포함되어 methylhippuric acid로 전환되어 체외로 배설되며 xylene 대사과정 중 methylbenzaldehyde는 조직 세포에 독성을 초래하는 것으로 알려져 있다³⁾. Cyclohexane 및 xylene 대사과정 중 공통적으로 작용하는 효소기구는 cytochrome p-450 dependent monooxygenase와 alcohol dehydrogenase임을 알 수 있다.

그리고 cyclohexane과 xylene의 혼합물을 실험동물에 투여시 이들 화학물질의 대사중간생성물질이 이들 두 물질에 공통적으로 작용하는 효소기구에 작용하여 생체 내 독성작용에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 따라서 cyclohexane과 xylene 혼합액을 실험동물에 투여시에 간기능을 관찰함과 동시

*논문 접수: 2003년 4월 14일

수정재접수: 2003년 6월 3일

†별책 요청 저자: 신중규, (우) 721-240 경상북도 경산시 점촌동 산75, 대구한의대학교 보건과학부

Tel: 053-819-1409, Fax: 053-819-1412

e-mail: jkshin@dhu.ac.kr

에 이에 대한 기전을 구명코저 흰쥐에 cyclohexane과 xylene의 동량 혼합액을 투여한 다음 혈청 중 alanine aminotransferase 및 xanthine oxidase 활성과 체중 당 간무게를 측정함과 더불어 cytochrome p-450 dependent aniline hydroxylase 및 alcohol dehydrogenase 활성을 측정코저 하였다.

재료 및 방법

1. 동물의 사육 및 처치

실험동물은 생후 6주령 된 체중 210 ± 10 g의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 종의 숫 흰쥐를 대한실험동물로부터 구입한 후 사육실 (온도: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도: $50 \pm 5\%$)에서 1주일 동안 적응시켜 실험에 사용하였다. 실험군은 각각 7마리씩 분리 수용하였으며, 실험 기간 동안 물과 사료 (삼양사)의 양은 제한없이 공급하였다. 실험동물은 체중 200g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 종의 숫 흰쥐를 동물사료 (삼양사 제품)로 사육하여 실험에 사용하였다. 실험동물은 각 군을 7마리씩 대조군, cyclohexane 투여군, xylene 투여군 및 cyclohexane과 xylene 혼합 투여군 (이하 혼합 투여군)으로 분리하여 수용하였다. 이때 사육조건은 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 로 하여 실험 기간 동안 물과 사료를 제한없이 공급하였다.

Cyclohexane과 *m*-xylene을 단독 및 혼합하여 복강으로 투여한 실험에서 cyclohexane 투여군은 Bernard 등의 방법⁵⁾에 따라 체중 kg 당 1.56 g, *m*-xylene 투여군은 Pathiratne 등의 방법²²⁾에 따라 체중 1.06 g 그리고 cyclohexane과 *m*-xylene의 혼합 투여군은 체중 kg 당 각각 0.78 g 및 0.53 g을 섞어 복강으로 1일 1회 2일 간격으로 4회 투여하였다. 이때 대조군은 olive oil을 투여하였고 모든 실험군은 마지막 투여 후 24시간 뒤 처치하였다.

동물의 처치는 효소활성의 일중 변동을 고려하여 일정 시간에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였으며, ether 마취하에 복부를 개복한 뒤 복부대동맥으로부터 채혈하여 실험사시켰다. 희생된 동물로부터 간을 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 씻은 후 여지로 압박하여 장기 내에 남아있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻고 alanine aminotransferase 및 xanthine oxidase 활성 측정용 시료로 사용하였다.

2. 효소시료의 조제

적출한 간은 빙냉하에서 절편으로 만들었으며 그 중 일정량에 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 넣고 glass teflon homogenizer를 이용하여 20% (w/v) 마쇄균질액을 만들었다. 이 균질액을 600 g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 상층액을 10,000 g에서 20분간 원심분리하여 다시 상

층액을 얻고 이 상층액을 $105,000 \times g$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획과 microsome 분획을 얻었다.

Homogenate는 reduced glutathione (GSH) 측정에 사용하였고, cytosol 분획은 glutathione-S-transferase (GST) 및 alcohol dehydrogenase (ADH) 활성에 사용하였으며 microsome 분획은 cytochrome p-450 dependent aniline hydroxylase (CYPdAH) 활성에 사용하였다.

3. 효소활성 측정

1) CYPdAH 활성 측정

간 microsomal CYPdAH 활성은 aniline을 기질로 하여 37°C 에서 15분간 반응시켜 유리되는 p-aminophenol을 phenol 시약으로 발색시켜 640 nm에서 흡광도를 측정하는 Bidlack과 Lowery의 방법⁶⁾에 준하여 측정하였다. 활성단위는 효소 반응액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1시간 동안 반응하여 기질로부터 생성된 p-aminophenol의 양을 nmole로 표시하였다.

2) Xanthine oxidase (XO) 활성 측정

XO 활성은 xanthine을 기질로 사용하여 생성된 uric acid에 phosphotungstic acid를 가하여 710 nm에서 측정하는 Yoon의 방법²⁷⁾에 의하였다. 혈청 중 활성단위는 생성된 uric acid의 양을 혈청 1 당 μmole 로 표시하였다.

3) Alcohol dehydrogenase (ADH) 활성 측정

간조직의 cytosol 중 ADH 활성은 Bergmeyer의 방법⁴⁾에 의하였다. 기질인 ethanol과 조효소인 NAD^+ 로부터 37°C 에서 5분간 반응하여 생성되는 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 활성단위는 단백질 1 mg이 1분간 생성한 NADH의 양을 nmole로 표시하였다.

4) Glutathione S-transferase (GST) 활성 측정

기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione을 기질로 하여 25°C 에서 10분간 반응시켜 생성된 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate 양을 340 nm에서 측정하는 Habig 등의 방법¹²⁾에 준하였다. 효소단위는 단백질 1 mg이 1분간 반응하여 생성시킨 conjugate의 양을 nmole로 표시하였다.

5) Reduced glutathione (GSH) 함량 측정

간조직 중 GSH 함량은 Ellman의 방법⁸⁾에 의하여 따라 측정하였다. GSH 함량은 조직 g 당 μmole 로 표시하였다.

4. Alanine aminotransferase (ALT) 활성도 측정

L-alanine과 α -ketoglutaric acid를 기질로 하여 효소시료와 함께 37°C 에서 30분간 반응시킨 후 생성된 pyruvic acid를 alkali 조건에서 2,4-dinitrophenyl hydrazine과 반응시켜 발색되는 색조를 비색 정량하는 Reitman과 Frankel의 방법²³⁾에 따라 조제된 kit 시액을 사용하였다.

활성도 단위는 mL 당 Karmen unit¹³⁾로 표시하였다.

Table 1. Effect of cyclohexane and xylene mixture treatment on the liver weight/body weight (LW/BW, %), serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and xanthine oxidase (XO) activities in rats

Parameters	Control	Cyclohexane	Xylene	Cyclohexane + Xylene
LW/BW (%)	3.89±0.15	5.70±0.22 ^{***a)}	5.44±0.38 ^{**a)}	6.25±0.78 ^{a)}
ALT ¹⁾	31.14±4.15	50.20±5.91 ^{*a)}	62.00±7.15 ^{**a)}	71.25±9.50 ^{**a)}
XO ²⁾	10.84±1.28	15.91±1.41 ^{*a)}	18.79±1.34 ^{**a)}	20.25±3.10 ^{a)}

Each value represents the mean±S.E. of 7 rats. Unit: ¹⁾ Karmen unit/ml of serum, ²⁾ nmoles uric acid/mg protein/min. ^{a)}; Significantly different from the control (*; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001).

Table 2. Effect of cyclohexane and xylene mixture treatment on the activities of hepatic cyclohexane and xylene metabolizing enzymes in rats

Parameters	Control	Cyclohexane	Xylene	Cyclohexane + Xylene
CYPdAH ¹⁾	4.12±0.47	4.66±0.37	4.94±0.42	3.61±0.35 ^{a,b)}
ADH ²⁾	13.69±1.39	17.67±1.82	15.53±1.86	15.91±1.56

Each value represents the mean±S.E. of 7 rats. Unit: ¹⁾ nmoles p-aminophenol/mg protein/hr, ²⁾ nmoles NADH/mg protein/min. ^{a)}; Significantly different from cyclohexane treated group (*; p<0.05), ^{b)}; Significantly different from xylene treated group (*; p<0.05).

Table 3. Effect of cyclohexane and xylene mixture treatment on the hepatic glutathione (GSH) content and the conjugating enzymes, glutathione S-transferase (GST) activities in rats

Parameters	Control	Cyclohexane	Xylene	Cyclohexane + Xylene
GSH ¹⁾	2.79±0.16	3.73±0.31 ^{*a)}	3.94±0.20 ^{***a)}	3.17±0.35
GST ²⁾	350.23±36.39	430.95±40.72	399.31±53.62	480.59±49.66

Each value represents the mean±S.E. of 7 rats. Unit: ¹⁾ μmoles/g of tissue, ²⁾ nmoles 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate/mg protein/min. ^{a)}; Significantly different from the control (*; p<0.05, ***; p<0.001).

5. 단백질 함량 측정

효소액 중 단백질 함량은 Lowry 등의 방법¹⁵⁾에 따라 bovine albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

6. 통계처리

실험 결과의 통계처리는 Student's t-test²⁴⁾로 하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결 과

1. 체중 당 간무게 (%), 혈청 중 ALT 및 XO 활성

Cyclohexane과 xylene의 혼합 투여군에 있어서 cyclohexane 및 xylene 단독 투여군과 간손상 정도 차이를 비교하는 일차적으로 체중 당 간무게, 혈청 중 ALT 및 XO 활성을 나타낸 것이 Table 1과 같다.

Cyclohexane (C군) 및 xylene (X군) 단독 투여군과 cyclohexane 및 xylene의 혼합 투여군 (혼합 투여군)의 체중 당 간무게는 대조군에 비해 각각 46% (p<0.001), 40% (p<0.01) 및

60% (p<0.05)의 유의한 증가를 보였으며 혼합 투여군은 C군 및 X군에 비해서 각각 10%, 14% 정도 증가하는 경향을 보였다.

혈청 중 ALT 활성에 있어서는 C군, X군 및 혼합 투여군은 대조군에 비해서 각각 61% (p<0.05), 93% (p<0.01), 129% (p<0.01)의 유의한 증가를 보였으며, 특히 혼합 투여군은 C군과 X군에 비해 각각 42%, 15% 증가되었다. 그리고 혈청 XO 활성에 있어서는 C군, X군 및 혼합 투여군은 대조군에 비하여 각각 47% (p<0.05), 73% (p<0.01) 및 87% (p<0.05)의 유의한 증가를 보였다. 혼합 투여군은 C군에 비하여 27% 증가되었으며 X군에 비해서 다소 증가되는 경향을 보였다. 따라서 혼합 투여군이 체중 당 간무게, 혈청 중 ALT 및 XO 활성이 C군과 X군에 비하여 높게 나타남을 알 수 있었다.

2. 간조직 중 microsomal CYPdAH 및 cytosolic ADH 활성

Cyclohexane과 xylene 대사과정 중 공통적으로 관여하는 CYPdAH와 ADH의 활성을 나타낸 것이 Table 2와 같다.

C군 및 X군은 대조군에 비하여 CYPdAH 활성이 각각

13%, 및 20% 증가되는 경향을 보였으나, 혼합 투여군은 C 군 및 X군에 비하여 23% ($p<0.05$) 및 27% ($p<0.05$)의 유의한 감소를 보였다. 더욱이 혼합 투여군은 대조군 보다도 12% 감소되는 경향을 보였다.

한편, ADH 활성에 있어서 C군, X군 및 혼합 투여군은 대조군에 비하여 각각 29%, 13% 및 16% 증가되는 경향을 보였으나, 네 군간에는 통계적인 차이를 볼 수 없었다.

3. 간조직 중 GSH 함량 및 GST 활성

본 실험조건에서 혼합 투여군과 C군 및 X군간에 유해산소 해독에 관여하는 간조직 중 GSH 함량 및 GST 활성을 측정코저 하였다.

GSH 함량에 있어서는 C군, X군 및 혼합 투여군은 대조군에 비하여 각각 34% ($p<0.05$), 41% ($p<0.001$) 및 14% 증가되었으며 특히 혼합 투여군 C군 및 X군에 비하여 각각 15% 및 20% 감소되었다 (Table 3).

그리고 GST 활성에 있어서 C군, X군 및 혼합 투여군은 대조군에 비하여 23%, 14% 및 37% 증가되었으며, 특히 혼합 투여군은 C군 및 X군에 비하여 각각 12% 및 20% 증가되는 경향을 보였다 (Table 3).

고 찰

일반적으로 한 가지 물질이 어떤 장기에 다소의 독성을 나타내는 물질과 독성을 나타내지 않는 물질을 첨가시에 독성의 상승작용이 초래하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. 본 실험에서 간에 다소의 독성을 나타내는 xylene과 간에 별다른 독성을 나타내지 않는 cyclohexane²⁾을 혼합하여 흰쥐에 투여한 후 급성 간손상시 증가된다^{23,27)}는 체중 당 간무게, 혈청 중 ALT 및 XO 활성을 측정하였다.

체중 당 간무게는 cyclohexane 및 xylene 단독 투여군 보다 다소 높게 나타났으며, 혈청 중 ALT 및 XO 활성 역시 cyclohexane 및 xylene 단독 투여군 보다 높게 나타났다. 따라서 cyclohexane과 xylene 혼합 투여군이 cyclohexane 및 xylene 단독 투여군 보다 간손상이 높게 나타남을 알 수 있다. 이러한 실험 결과로 보아 간에 비교적 손상을 초래하지 않는 cyclohexane이 다소의 간손상을 초래한다는 xylene의 혼합 투여시 간독성의 상승효과를 나타냄을 시사해 주고 있다.

체내로 흡수된 이물질들 (xenobiotics)은 생체의 여러 가지 반응을 통하여 물질 본래의 고유한 성질 및 독성이 생물학적 변화를 거쳐 체외로 배설되며^{11,18)} 생체반응을 통한 생물학적 변화과정을 대부분 간조직에서 이들 xenobiotics 대사에 관여하는 효소작용에 의해 전환이 이루어진다. 간장에 있어서 생물학적 변화 형태는 먼저 phase I 반응에 의한 변화로서 흡수된 물질이 산화, 환원 및 가수분해 등 일련의 작용을 거쳐

본래의 물질 보다 반응성과 극성을 증가시키는 단계이며^{10,16)} 두번째 phase II 반응으로 phase I의 반응 생성물질과 포함되어 해독화하는 단계이다. 유기용제를 포함하는 대부분의 이물질에 대한 대사 및 배설속도는 phase I 반응단계에서 조절되며⁷⁾, 이와 같은 phase I 반응조절에 따라서 이물질의 중간 대사산물의 체내 유지율에 의한 생체 내 독성작용이 야기될 것으로 생각된다. 본 실험에서 cyclohexane과 xylene의 혼합에 의한 간독성이 단일물질 투여 경우 보다 크게 나타나는 기전을 검토코저 phase I 반응에 관여하는 CYPdAH 활성을 간조직 중에서 측정하였을 때 대조군과 xylene 및 cyclohexane 단독 투여군 보다 낮게 측정되었다.

일반적으로 xenobiotics의 생체 내 대사과정 중 phase I 반응에 관여하는 cytochrome P-450 monooxygenase 활성 증가에 따라 세포독성에 영향을 미치는 xenobiotics의 대사산물 함량의 체내 유지율이 크게 나타날 것으로 생각되나, P-450 monooxygenase 활성이 낮게 나타날 경우⁷⁾ xenobiotics의 체외 배설속도는 오히려 떨어지는 현상이 많이 나타난다. 그러므로 본 실험에서 cyclohexane과 xylene 혼합 투여시 CYPdAH 활성이 낮게 나타남으로써 바로 이들 두 물질의 배설속도가 감소된 것으로 생각된다. 이러한 사실은 CCl_4 를 실험동물에 투여시 간조직 중 cytochrome P-450 함량이 낮게 나타날수록 간손상이 심화된다는 보고가 이를 뒷받침해 주고 있다³⁰⁾. 그리고 xenobiotics가 생체 내에서 대사되어 체외로 배설될 때 phase I 반응과 더불어 phase I 반응 다음 단계에 관여하는 효소활성에도 영향을 미칠 수 있기 때문에 cyclohexane 및 xylene 대사과정 중 cyclohexanone 및 methylbenzaldehyde 생성에 관여하는 ADH 활성을 측정된 결과 cyclohexane 및 xylene 단독 투여군 및 이들 두 물질의 혼합물을 투여한 실험군 모두 대조군 보다 다소 높게 나타났으나, 세 실험군 사이에는 별다른 차이가 없었다. 따라서 cyclohexane 및 xylene 대사에 의한 간손상은 CYPdAH 활성에 상당한 영향을 받고 있음을 시사해 주고 있다.

한편, xenobiotics에 의한 생체 내 독성기전은 xenobiotics의 대사과정 중 생성된 활성산소 종이 세포막 구성성분인 다가 불포화지방산을 과산화시킴으로써 야기되는 것으로 알려져 있다²¹⁾. 본 실험에서 활성산소 중에 의해 생성된 과산화지질을 무독화시키는데 관여하는 간조직 중 glutathione 함량은 cyclohexane 및 xylene 단독 투여군에 비해 cyclohexane과 xylene 혼합 투여군이 낮게 측정되었다. 이러한 결과는 체내 H_2O_2 생성이 증가시에 GSH 소모율이 증가된다는 보고¹⁷⁾를 고려해 볼 때 cyclohexane과 xylene 혼합 투여군에서 간조직 중 GSH 함량 감소는 H_2O_2 생성률이 증가됨을 암시해 주고 있다. 또한 cyclohexane과 xylene 혼합 투여군에서 GST 활성이 높게 나타남은 과량으로 생성된 H_2O_2 에 의하여 본 효소가 유도된 것으로 생각된다. 이상 실험 결과를 종합해 볼 때

cyclohexane과 xylene 혼합 투여가 cyclohexane 및 xylene 단독 투여군 보다 간손상이 심화되었으며 이는 이들 물질의 대사를 저하와 유해산소 종에 기인되어 나타나기 때문인 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 이해자, 이상희, 전태원, 이상일, 윤종국 (2000): 흰쥐 성장 기간에 따른 Xylene의 독성에 관한 연구. 대한의생명과학회지, **6(3)**: 193-199.
- 2) 전태원, 이상일, 윤종국 (2000): Cyclohexane에 의한 흰쥐의 폐독성. 대한의생명과학회, **6(4)**: 245-251.
- 3) Alivisatos SGA and Arora RCA (1975): Formation of aberrant neurotransmitters and its implications for alcohol addiction and intoxication, pp. 255~263. In E Majchrowicz (ed), "Biochemical pharmacology of ethanol", Pleum, New York.
- 4) Bergmeyer HU, Gawehn K and Grassl M (1974): *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 1, *Alcohol dehydrogenase*, Academic Press, New York.
- 5) Bernard AM, de Russis R, Normand JC and Lauwerys RR (1989): Evaluation of the subacute nephrotoxicity of cyclohexane and other industrial solvents in the female Sprague-Dawley rat. *Toxicol Lett*, **45(2-3)**: 271-280.
- 6) Bidlack WR and Lowery GL (1982): Multiple drug metabolism: *p*-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem Pharmacol*, **31(3)**: 311-317.
- 7) Cockerham LG and Shane BS (1994): Basic environmental toxicology, pp. 49~105. CRC press Inc, Boca Raton FL.
- 8) Ellman GL (1959): Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, **82**: 70-77.
- 9) Elliott TH, Parke DV and Williams RT (1959): Studies in detoxication. The metabolism of *cyclo* [¹⁴C] hexane and its derivatives. *Biochem J*, **72**: 193-200.
- 10) Gelboin HV (1989): A microsome-depedent binding of benzo (a) pyrene to DNA. *Cancer Res*, **29**: 1272-1276.
- 11) Guengerich FP, Kim DH and Iwasaki M (1991): Role of human cytochrome P-450IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol*, **4**: 168-179.
- 12) Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB (1974): Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid and formation. *J Biol Chem*, **249(22)**: 7130-7139.
- 13) Karmen A (1955): A note on the spectrophotometer assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest*, **34**: 131-133.
- 14) Klassen CD and Doull J (1980): Evaluation of safety: toxicologic evaluation, pp. 11~27. In Doull J et al (ed), "Casaret and Doull's Toxicology", Macmillan, Toronto.
- 15) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- 16) Miller RE and Guengerich FP (1982): Oxidation of trichloroethylene by liver microsomal cytochrome P-450. Evidence for chlorine migration in a transition state not involving trichloroethylene oxide. *Biochem*, **21**: 1090-1097.
- 17) Morton S and Mitchell MC (1985): Effects of chronic ethanol feeding on glutathione turnover in the rat. *Biochem Pharmacol*, **34**: 1559-1593.
- 18) Nakajima T, Okino T, Okuyama S, Kaneko T, Yonekura I and Sato A (1988): Ethanol induced Enhancement of Trichloroethylene Metabolism and hepatotoxicity: Difference from the Effect of phenobarbital. *Toxicol Appl Pharmacol*, **94**: 227-237.
- 19) Nordblom GD and Coon MJ (1977): Hydrogen peroxide formation and stoichiometry of hydroxylation reactions catalyzed by highly purified liver microsomal cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys*, **180(2)**: 343-347.
- 20) Ogata M, Tomokuni K and Takatsuka Y (1970): Urinary excretion of hippuric acid and *m*- or *p*-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and *m*- or *p*-xylene as a test of exposure. *Br J Ind Med*, **27(1)**: 43-50.
- 21) Ohkawa H, Ohish N and Yaki K (1979): Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, **95**: 351-355.
- 22) Pathiratne A, Puyear RL and Brammer JD (1986): 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(2)**: 272-280.
- 23) Reitman S and Frankel S (1957): A Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol*, **28**: 56-63.
- 24) Scheffler WC (1980): Statistics for the biological sciences. pp. 84~89. Addison-Wesley, London.
- 25) Sakata M, Kikuchi J, Haga M, Ishiyama N, Maeda T, Ise T and Hikita N (1989): Disposition of acetone, methyl ethyl ketone and cyclohexanone in acute poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol*, **27(1-2)**: 67-77.
- 26) Senler TI, Dean WL, Murray LF and Wittliff JL (1985): Quantification of cytochrome P-450-dependent cyclohexane hydroxylase activity in normal and neoplastic reproductive

- tissues. *Biochem J*, **227**: 379-387.
- 27) Yoon CG (1984): A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Res J (Keimyung Junior College)*, **2**: 295-308.
- 28) Yoon CG, Jeon TW, Lee MH, Lee SI, Cha SE and Yu IJ (2000): Survey of actual conditions of material safety data sheet and quantitative risk assessment of toxic substances; substitutes for degreasing agents. *Kor Ind Hyg Assoc J*, **10(2)**: 18-26.
- 29) Van Doorn R, Bos RP, Brouns RM, Leijdekkers CM and Henderson PT (1980): Effect of toluene and xylene on liver glutathione and their urinary excretion as mercaptuic acid in the rat. *Arch Toxicol*, **43(4)**: 293-304.
- 30) Wiscocki PG, Miwa GT and Anthony YH (1980): Reaction catalyzed by the cytochrome P-450 system, pp. 135~139. In Jakoby (ed), "Enzymatic basis of detoxication" vol 1, WB Academic Press, New York.
-