

## 살균제 carbendazim이 랫드 간 해독체계에 미치는 영향

이제봉\* · 신진섭 · 정미혜 · 박연기 · 강규영<sup>1</sup>

농촌진흥청 농업과학기술원 농약안전성과, 경상대학교 환경생명화학과의

**요약** : Carbendazim의 랫드 간 해독체계에 대한 영향을 검색하기 위하여 간장독성의 지표 효소인 혈장 ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 활성, 간에 대한 독성, 해독 및 대사에 대한 영향을 구명하기 위하여 간 GSH(glutathione), GST(glutathione-S-transferase), cytochrome P450 및 cytochrome P450 reductase 활성을 375, 750, 1,500 mg/kg 약량에서 측정된 결과 혈장 ALT 및 AST 활성이 120분 후에 약간의 증가가 있었으나 특이한 독성증상은 관찰되지 않았다. GSH는 고농도와 중농도 120분에서 20%의 함량증가가 있었고, GST는 120분까지 36~50% 정도의 활성저해가 있었으나 240분에는 활성이 회복되었다. Cytochrome P450함량은 60분까지 25~50%까지 함량이 저하되었으나 120분에 70%이상 회복되었고, 240분 저농도에서는 거의 회복되었으며, cytochrome P450 reductase도 120분까지 25~50% 활성저해가 있었으나, 240분에는 무처리 군의 활성과 유사하게 회복되어 대사관련 효소에 대한 손상은 크지 않을 것으로 판단되었다. 이상의 결과에서 benzimidazole 계 살균제인 carbendazim은 생체내 해독 및 대사관련 체계에 영향이 적은 농약으로 급성적인 중독은 일으키지 않을 것으로 판단되었다. (2005년 11월 14일 접수, 2005년 12월 20일 수리)

**Key Word** : 간 해독체계, 가벤다짐, 혈장효소.

### 서 론

식물 병원균 중 자낭균류, 담자균류, 불안전균류에 방제효과가 탁월한 침투성 살균제인 benzimidazole계 농약은 nitrogen heterocyclic fungicide로서 benomyl이 1967년 E. L. DuPont de Nemours & Co에 의해 개발되어 채소, 과일, 잔디 및 기타 작물에 등록되면서부터 사용이 일반화 되어왔다(Hayers, 1982 ; Tomlin, 1997). Benzimidazole계 농약에는 benomyl, carbendazim, thiophanate-methyl 및 thiabendazole이 있으며, 국내에는 이 4성분이 등록되어 사용되고 있으나 미국에서는 간독성, 기형독성, 발암성 등에 대한 논란이 끊임없이 제기되고 있으며, 아급성발생신경독성 시험 등을 추가로 요구하자 제조회사인 Dupont은 2001년 4월에 자진 취하하였다(US/EPA, 2001c)

생체내에서 대부분이 carbendazim으로 대사되는(Sherman 등, 1975) benzimidazole계 살균제의 독성기전은 세포수준에서 microtubule과 결합하여 진행 세포내 물질전달이나 spindle 형성을 억제하므로 세포분열의 기능을 저해한다. 이와 같은 독성기전을 이용하여 구충제나 항암제로도 사용되어왔다. 곰팡이 병원균에

대한 살균력도 tubulin과의 결합력에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다(Davidse와 Flach, 1977). 그러나 농약 등 외인성 화합물이 체내로 유입되면 1차적으로 간에서 해독을 위하여 분해 대사된다. 분해대사 과정에서 간세포에 손상을 일으키기도 하고 해독기전에 의해 무독화 되기도 한다.

Alanine aminotransferase(ALT) 는 주로 세포질내에 존재하는 효소로서 간세포의 손상이나 질병 등에 의해 증가되므로 간의 독성을 가늠하고, aspartate aminotransferase(AST)는 세포질 및 mitochondria내에 존재하며 급성간염이나 일반적인 손상에 의해 증가하므로 간에 미치는 영향을 평가하는 지표로 이용되고 있다.

Glutathione(GSH)은 포유동물 세포에서 외인성 화합물 및 세포내 산화적 손상을 일으키는 산화물질을 제거하는 가장 중요한 물질중 하나이다. 포유동물 간중의 GSH함량 분포범위는 0.5~10 mM정도이나, 일반적으로는 4~8 mM이 존재하는 것으로 알려져 있고, 산화형태는 전체 GSH의 5% 이하로 존재한다. 간에서만 합성되는 것으로 알려져 있는 GSH는 외인성물질의 대사과정에서 감소되고, 회복되지 않으면 세포가 손상을 입게된다. 외인성물질의 대사과정에서 간독성 유무를 조기에 관찰하기 위해 GSH의 함량변화를 조

\*연락저자

사하는 것은 유용한 방법으로 알려져 있다(Donald, 1994).

Glutathione S-transferase(GST)는 생체내의 많은 조직에 분포하며 electrophilic compound와 GSH와의 conjugation을 형성하여 대사에 관여한다. 오줌으로 배설하는 mercapturic acid 생합성의 초기 반응을 주도하며, 지방조직의 손상을 일으키는 물질의 해독에 중요한 역할을 한다. 또한 항생제, 농약 등 외인성 화합물에 대한 저항성을 유발시키며, 해독, 외인성물질 제거, 독성물질의 활성저지 등 중요한 역할을 한다(Dauterman, 1994 ; Oruc과 Uner, 2000). 물질의 대사과정 중 가장먼저 반응하는 cytochrome P450은 외부에서 투입된 물질의 대사에서 phase I 반응을 주도하며, 한분자의 산소와 함께 물질을 산화시키므로 극성을 높여 배설이나 수용성물질과 결합이 용이하게 하는 기능을 가지고 있다. Cytochrome P450은 포유동물의 대부분의 장기에 존재하지만 간에 가장 많이 존재하며, 외인성물질의 독성유무를 판단하는데 좋은 지표효소로 알려져 있다(Hodgson과 Levi, 1994).

Cytochrome P450 reductase를 포함한 cytochrome P450계의 효소들은 외인성 화합물을 대사하는 과정에서 생체내 활성산소를 생성한다(Can-Eke 등, 1998). 생체내에 생성된 radical이 산소분자와 반응하여 활성산소 및 hydroxy기를 생성하고, 이로 인한 세포막지질의 과산화를 일으키므로 세포막손상, 단백질의 불활성화, DNA손상 및 지방산 생합성저해 등을 일으킬 수 있다고 알려져 있다(Choi와 kim, 1998). Carbendazim의 급성경구독성 LD<sub>50</sub>은 15,000 mg/kg으로 급성독성이 매우 낮은 물질이나, 선진국 및 국제기구에서는 기형독성, 발암위해성 등 만성독성을 제기하고 있고, 국내에서도 위해성 문제를 제기하여왔으나, 아직까지 확실한 증거는 알려져 있지 않은 상태이다. 특히 간 독성에 대하여도 위해성을 제기하고 있으므로, 본 연구에서는 carbendazim의 생체내 해독 및 분해대사에 관여하는 물질 및 효소체계에 미치는 영향을 구명하기 위하여 간 손상 지표효소인 혈중 ALT 및 AST 수준을 조사하였고, 또한 외인성 화합물로부터 세포를 보호하는 GSH 함량, 해독 및 대사에 관여하는 Cytochrome P450, Cytochrome P450 reductase 와 GST 활성 영향을 탐색하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시험농약 및 시약

시험농약으로 carbendazim 90%는 농약회사로부터 분양받았으며, glutathione등은 Sigma(USA)로부터 구입하였고, 기타시약은 Ciba Corning 및 시중에서 구입하여 사용하였다.

### 시험동물 및 농약투여

농업과학기술원 실험동물실에서 사육한 200~300g의 Sprague Dawley(S.D.)계 랫드를 사용하였으며, 시험동물은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수 13~18/hr, 조명시간 12시간(오전6시-오후6시) 및 조도 200~300 Lux로 설정된 실험동물실에서 사육하였다. 시험기간 중 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주))를, 음용수는 수돗물을 여과 멸균하여 자유 급식시켰다.

군당 5마리의 랫드 숫컷에 carbendazim 375, 750 및 1,500 mg/kg 체중을 랫드용 존대로 경구투여 하였으며, 투여 용량은 급성독성반응은 낮으나 생체내 효소계에는 영향이 있을 것으로 추정되는 농도인 LD<sub>50</sub>의 10%를 최고 농도로 공비 2를 두어 설정하였다.

### 혈장 ALT 및 AST 활성 측정

Carbendazim 투여 후 0, 10, 20, 30, 60 및 120분에 각각 ethyl ether로 마취시키고 심장에서부터 혈액을 채취하였다. 혈장은 혈액으로부터 20분간 3000 rpm에서 원심분리하여 획득하였으며, 분리된 혈장을 ALT 및 AST reagent와 automatic analyzer(Gilford System 103, CIBA CORNING, USA)를 이용하여 혈장효소활성을 측정하였다.

### 간 GSH 함량

Carbendazim 투여 후 0, 10, 20, 30, 60 및 120분에 간장을 적출하고, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)를 간 조직 1.0 g당 6 mL을 처리하여 homogenizer(Ika, Germany)로 간 균질물을 조제하고 30℃ 3,500 rpm으로 원심분리하여 상청(上淸)액 0.5 mL에 DTNB(5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid, 10mM) 4.5 mL을 30초 간격으로 첨가하여 15분 이내에 spectrophotometer (Shimadzu UV-2201, Japan) 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. GSH 함량은 GSH 표준곡선으로부터 mg/g tissue로 산출하였다(Ellman, 1959).

### 간 microsome 및 cytosol 분리

Carbendazim을 랫드용 존대로 경구투여 한 다음, 0, 60, 120, 240 및 360분에 간장을 적출하고, 0.15M

KCl로 세척하여 hemoglobin을 제거한 후 3배의 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4, 1mM EDTA, 0.1 mM PMSF (Phenylmethanesulfonyl Fluoride))로 간조직을 homogenizer(Ika T-25, Germany)로 균질화하여 9000 g에서 20 분간 원심분리하고, 상청액을 회수하여 105,000 g에서 60분간 원심분리하여 microsome과 cytosol을 분리한 후 -70°C에 보관하여 효소활성검정에 사용하였다.

#### 단백질정량

Bradford법에 의해 microsome 및 cytosol 0.8 mL에 0.2mL의 dye reagent (protein assay kit, Bio-rad)를 첨가하여 단백질량을 spectrophotometer (Shimadzu UV-2201, Japan)로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 표준곡선으로부터 단백질량을 측정하였다.

#### GST 활성측정

0.25 M phosphate buffer(pH 6.5) 0.2mL, 2% triton X-100 0.05 mL, 증류수 0.15 mL, microsome(약 10 mg protein/mL) 0.1mL을 잘 섞어 시험물질반응액을 만들었다. 0.25M phosphate buffer(pH 6.5) 0.8 mL, 증류수 0.9 mL, 시험물질반응액 0.1 mL, 20 mM CDNB (chlorodinitrobenzene) 용액 0.1 mL을 시험관(10 mL)에 넣고 교반한 후 spectrophotometer(Shimadzu UV-2201, Japan)로 340 nm에서 1분간에 변화된 효소활성을 측정하였다.

흡광도로부터 GST활성은 CDNB와 glutathione복합체의 분자흡광계수( $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )을 이용하여 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{GST}(\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}) = \frac{\Delta\text{OD}(\text{probe-blank})}{9.6} \times \frac{1}{0.1} \times \frac{\text{희석 배수}}{\text{단백질량}}$$

#### Cytochrome P450 함량 측정

Omura와 Sato(1964) 등의 방법에 준하여 분석하였으며, 400~500 nm까지  $\lambda$ -scanning 하여 cytochrom P450함량을 산출하였으며, 시험방법은 1.0 mL 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4, 1mM EDTA, 20% glycerol, 0.5% sodium cholate, 0.4% triton 101)에 microsome 1.0 mL을 가하여 CO gas 30~40 방울로 환원시킨 후 1~2 mg sodium dithionate를 가하여 교반한 다음 450 및 490 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 의해 cytochrome P450 함량을 산출하였다.

$$\text{nmol P450} = \frac{[(A450-A490)\text{observed}-(A450-490)\text{baseline}]}{0.091} \times \frac{\text{희석 배수}}{\text{배수}}$$

#### Cytochrome P450 reductase 활성 측정

0.5 mM cytochrome C 0.08 mL, microsome(3 mg protein/mL) 0.1 mL, 0.3 M phosphate buffer(pH 7.7) 0.99 mL을 혼합하고 30°C에서 3분간 반응시켰다. 반응액을 흡광도 550 nm에서 측정하고 30°C를 유지하면서 0.01mL 10 mM NADPH를 첨가하여 3분동안 높아진 흡광도를 아래 식에 의해 효소활성을 산출하였다.

$$\text{nmol cytochrome P450 reductase} = \frac{\Delta 550/\text{min}/\text{mg protein}}{0.021}$$

## 결과 및 고찰

#### 혈장효소ALT 및 AST 활성변화

Carbendazim의 간장에 대한 영향을 검색하기 위해서 간장독성의 지표효소인 alanine aminotransferase (ALT) 및 aspartate aminotransferase(AST)활성을 혈장에서 조사한 결과 표 1과 표 2에서 보는 바와 같다. ALT는 375, 750 및 1,500 mg/kg 수준으로 투여하였을 때 60분까지는 음성대조군과 유사한 36.0~54.0 u/L수준으로 독성이 인정되지 않았으나, 120분에서는 1,500 mg/kg 수준에서 60.6 u/L, 750 mg/kg 수준에서 60.6 u/L, 375 mg/kg 수준에서 59.9 u/L로 음성대조군에 비해 20% 정도로 유의성( $p < 0.01$ )있게 증가되었다.

AST는 375, 750 및 1,500 mg/kg 수준으로 투여하였을 때 30분까지는 통계적인 유의성은 없었으나 투여군에서 약간의 활성증가가 있었으며, 투여 60분에서는 대조군 82.1 u/L에 비해 375 및 1,500 mg/kg 수준에서 99.6과 100.6로 유의성있게 증가하였으며, 120분에는 1,500 mg/kg 113.9 u/L, 750 mg/kg 123.3 u/L, 375 mg/kg 수준에서 98.7 u/L로 음성대조군 87.0 u/L에 비해 13~41% 정도의 유의성( $p < 0.01$ )있는 증가가 관찰되었다.

이상의 결과에서 급성독성 LD<sub>50</sub>이 15,000 mg/kg 체중 이상인 carbendazim은 급성독성이 낮으므로 간 독성은 강하지 않았으며, 이와 같은 결과는 ChR-CD랫드에 32 및 64 mg/kg/day로 90일간 투여한 시험과 (Janardhan 등, 1970) 2,500 및 5000 ppm 104주간 투여한 시험(Sherman 등, 1972)에서 혈장 ALT의 활성이 증가하였다는 결과와 유사하였고, Wistar 랫드를 이용한 만성독성시험에서 10,000 ppm투여하였을 때 AST의 활성은 감소하였으나, ALT의 활성은 증가하였다는 보고(Til 등, 1976a, 1976b)에서 ALT에 대한 결과는 유사하였으나, AST활성은 본시험의 결과와 달리 감소했다.

Table 1. Changes of serum alanine aminotransferase(ALT) activity in SD rats administered with different doses of carbendazim

Administration dose(mg/kg)	ALT activity <sup>a)</sup> (U/L) after given times of administration				
	10	20	30	60	120min
0	36.0±4.99	47.5±7.28	42.7±6.22	39.3±1.70	49.7±6.61
375	54.0±10.7	42.7±7.88	43.9±10.1	47.1±4.36	59.9±1.13**
750	42.1±9.08	40.4±6.09	47.3±10.6	43.4±4.09	60.6±4.55**
1,500	44.1±4.94	50.1±10.5	51.2±12.6	52.7±8.45	60.6±2.61**

<sup>a)</sup>Serum ALT activity was measured with automatic analyzer(Gilford system 103, Ciba Corning, USA). Each value represents mean±SE.

\*\* Statistically significant difference with respect to the control value. Student's *t*-test, *p*<0.01

Table 2. Changes of serum aspartate aminotransferase(AST) activity in SD rats administered with different doses of carbendazim

Administration dose(mg/kg)	AST activity <sup>a)</sup> (U/L) after given times of administration				
	10	20	30	60	120min
0	88.3±7.4	112.6±4.0	108.3±17.3	82.1±1.6	87.0±2.08
375	115.2±17.2	93.3±11.8	91.8±11.2	99.6±6.6*	98.7±9.46**
750	126.1±22.3	88.7±10.4	89.3±10.8	86.5±5.0	123.3±8.37**
1,500	105.9±6.6	112.8±14.8	131.4±20.3	100.6±7.1*	113.9±16.3**

<sup>a)</sup>Serum AST activity was measured with automatic analyzer(Gilford system 103, Ciba Corning, USA). Each value represents mean±SE.

\*, \*\* Statistically significant difference with respect to the control value. Student's *t*-test, *p*< 0.05, *p*<0.01 respectively.

독성물질이 간에 투입되면 이 효소의 활성은 증가하는 것이 일반적인 현상이나, 높은 농도에서 감소했다는 결과에 대한 원인은 밝혀지지 않았다(Til 등, 1976a, 1976b). 개에 대한 만성독성시험의 500 ppm 투여군에서 ALT의 증가가 있었으나, AST에는 영향이 없었다(Sherman 등, 1972).

그 외의 시험에서는 carbendazim 1,000 mg/kg/day 이내의 투여농도에서는 영향이 없는 것으로 보고된 것도 있었다(Til 등 1976b). Benzimidazole계 살균제의 혈중 최저 저해 농도(MIC : minimum inhibitory concentration) 산출을 위한 연구결과 5~25 µg/mL의 혈중농도에서 영향이 있었으며, 고농도에서 AST 및 ALT활성 증가가 관찰되었고(Durmaz 등, 1998), benzimidazole 유도체 1,000 mg/kg/day 이내의 투여농도에서는 이들 효소에 대한 영향은 없었다(Saitoh 등, 1999 ; Harada 등, 2000). ALT 및 AST의 생체내 정상범위는 동물 및 운동량 등에 따라 차이가 있으나 ALT는 개, 고양이 및 소에 대하여 평균 72.7~76.0 U/L였으며, AST는 개, 고양이 및 소에 대하여 78.7~178.2 U/L(한 등, 1982)로 본시험의 결과로는 정상범위에 있다고 판단되었다.

#### 간 해독물질 Glutathione(GSH) 함량변화

Carbendazim이 간의 대사에 미치는 영향을 조사하기 위해 간 대사의 중요한 물질인 GSH의 함량변화를 375, 750 및 1,500 mg/kg 체중으로 투여하여 10분, 20분, 30분, 60분 및 120분에 조사한 결과 표 3에서 보는 바와 같이 60분까지는 GSH함량에 변화가 없었으나, 120분에는 750 및 1,500 mg/kg 체중에서 약 21%의 증가가 관찰되었다. 배양세포(Rat 유래 Fa 32, 및 human hepatoma cell)에서 세포내 GSH 함량에 따른 benomyl, carbendazim, carbaryl 및 quinalphos에 대한 세포독성시험에서 GSH 합성을 저해하는 buthionine-S,R-sulfoximine (BSO)(Griffith, 1982)와 함께 처리하였을 때 세포독성이 benomyl 및 carbendazim의 단독처리에 비해 2배 이상 강하게 나타나 세포내의 GSH함량이 세포독성에 민감한 영향을 준다고 보고하였다(Dierickx, 1999). Benomyl 200 mg/kg/day로 7일간 투여한 SD계 랫드에서 대조군에 비해 25%정도 감소하여 간장에 독성을 일으키는 것으로 알려졌다(Banks와 Soliman, 1997). 그러나 본 연구에서는 120분에 약간의 활성이 증가하였으나, 60분까지는 영향이 없었으므로 SD계 랫드에 본시험에서 투여된 농도로는 GSH 합성

Table 3. Changes of hepatic glutathione(GSH) amount in SD rats administered with different doses of carbendazim

Administration dose(mg/kg)	GSH amount <sup>a)</sup> (mg/g liver)after given times of administration				
	10	20	30	60	120min
0	2.4±0.26	2.1±0.17	3.0±0.54	2.6±0.05	2.8±0.19
375	2.5±0.37	2.0±0.33	3.2±0.31	2.5±0.05	2.7±0.37
750	2.5±0.56	2.6±0.45	3.5±0.42	3.1±0.33	3.4±0.09*
1,500	2.3±0.22	2.0±0.24	3.2±0.10	3.4±0.41	3.4±0.12*

<sup>a)</sup>Liver GSH amount was measured by Ellam method using spectrophotometer (Shimduz UV-2201, Japan) by monitoring the change in absorbance at 412nm. Each value represents mean±SE.

\*Statistically significant difference with respect to the control value. Student's *t*-test, *p* < 0.05.

을 저해하지 않았고, 대사에도 영향이 크지 않음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 급성독성이 낮고 대사가 용이한 carbendazim은 랫드 간에서 해독에 관여하는 물질인 GSH 함량에 영향을 크게 미치지 않음을 알 수 있었다.

### GST 활성

Carbendazim이 랫드 간 해독기능에 미치는 영향을 검색하기 위해 외인성물질의 간 대사에 중요한 효소인 GST 활성을 조사하였다. Carbendazim을 375 mg/kg, 750 mg/kg 및 1,500 mg/kg 체중으로 투여한 후 60분, 120분, 240분 및 360분에 GST 활성을 조사한 결과 표 4에서 보는 바와 같이 투여후 60분에 375 mg/kg, 750 mg/kg 및 1,500 mg/kg 체중 투여군에서 GST활성이 각각 대조군에 비해 48.1%, 58.3% 및 69.4% 감소하였으며, 120분에 375 mg/kg, 750 mg/kg 및 1,500 mg/kg 체중 투여농도에서 각각 대조군에 비해 67.4%, 72.5% 및 51.1% 감소하였으나 240분에는 101.4~109.5%로 거의 활성을 회복하였으며, 360분에는 375, 750 및 1,500 mg/kg 체중 투여농도에서 각각 대조군에 비해 151.2, 95.4 및 95.4%로 활성이 회복되었다.

외인성 화합물의 초기 대사에서 GSH 함량이 감소될 수 있으나 간의 GSH 합성능력이 2~3  $\mu\text{mol/hr/g liver}$  로 빠르기 때문에 다소 GST활성이 증가하여도 크게 변화가 없을 것으로 추정되며, GST활성이 감소하여도 GSH함량에는 큰 변화가 없을 것으로 사료된다(Dauterman, 1994).

Dimethoate와 malathion 0.03 mg/kg 체중 및 0.13 mg/kg 체중으로 투여한 랫드 적혈구에서 활성이 현저하게 감소되었다(John 등, 2001)고 보고하였고, 또한 cypermethrin 단회 170 mg/kg 체중과 5일간 75 mg/kg 체중 수준으로 반복투여 하였을 때 대조군과 차이가 없었다(Giray 등 2001)는 연구결과도 있다. 100 mg/kg

체중으로 thiazole계 화합물을 랫드에 투여한 시험에서 48시간까지 간 GST mRNA가 4~24배 증가하였고(Kim과 Cho, 1996), 터키산 물고기(*Oreochromis niloticus*)에 대한 2,4-D 27ppm과 azinphosmethyl 0.03 ppm을 혼합처리 하였을 때 GST의 농약에 대한 영향은 없었다(Oruc와 Uner, 2000)는 보고 등과 같이, 본시험의 결과에서도 carbendazim이 생체내에서 해독기전 이 정상적으로 작동하기 전에는 GST활성을 저해하지만 대사가 진행되면서 회복되는 것을 알 수 있어 간 GST 활성에는 큰 영향이 없는 물질로 판단되었다.

### Cytochrome P450 함량변화

Carbendazim이 랫드 간 해독기능에 미치는 영향을 검색하기 위해 외인성물질의 간대사 중 phase I 반응에 관여하는 효소복합체인 cytochrome P450 함량을 조사하였다.

Carbendazim을 375 mg/kg, 750 mg/kg 및 1,500 mg/kg 체중을 투여한 후 60분, 120분, 240분 및 360분에 cytochrome P450 함량을 조사한 결과 표 5에서 보는 바와 같이 투여후 60분에 375 mg/kg, 750 mg/kg 및 1,500 mg/kg 체중 투여군에서 cytochrome P450 함량이 각각 대조군에 비해 77.3%, 61.7% 및 52.6% 감소하였고, 120분에는 71.9%, 77.7% 및 73.2% 감소하였으나 240분에는 거의 활성을 회복하였으며, 360분에는 113.9%, 111.8% 및 112.3%로 활성이 회복되었다.

Thiophanate-methyl 285 mg/kg 체중 및 570 mg/kg 체중으로 SD계 랫드에 단회 및 3일간 반복투여 하여 성간의 cytochrome P450계열의 효소활성을 조사한 시험에서 마지막 투여 후 24시간에 일반적으로 효소 활성이 증가하였다는 보고(Paolini 등, 1999)와 투여 후 120분까지는 부분적인 활성저해를 보였으나 240분 이후에는 약간의 활성증가가 관찰된 본시험의 결과와 유사한 경향을 보였고, 랫드 간 배양세포에 benomyl 10  $\mu\text{g/mL}$  및 25  $\mu\text{g/mL}$ 을 24시간 처리한 시험에서

Table 4. Changes of hepatic glutathione S-transferase(GST) activity in SD rats administered with different doses of carbendazim

Administration dose(mg/kg)	GST activity <sup>a)</sup> ( $\mu$ mol/mg protein)after given times of administration			
	60	120	240	360min
0	0.48 $\pm$ 0.06 (100) <sup>b)</sup>	0.31 $\pm$ 0.01 (100)	0.28 $\pm$ 0.02 (100)	0.22 $\pm$ 0.01 (100)
375	0.23 $\pm$ 0.02 (48.1)	0.21 $\pm$ 0.01 (67.4)	0.29 $\pm$ 0.01 (101.4)	0.33 $\pm$ 0.07 (151.2)
750	0.28 $\pm$ 0.01 (58.3)	0.23 $\pm$ 0.01 (72.5)	0.30 $\pm$ 0.01 (105.3)	0.21 $\pm$ 0.01 (95.4)
1,500	0.33 $\pm$ 0.01 (69.4)	0.16 $\pm$ 0.01 (51.1)	0.31 $\pm$ 0.01 (109.5)	0.21 $\pm$ 0.02 (95.4)

<sup>a)</sup>Hepatic GST activity was measured by modified Habig method using spectrophotometer(Shimduz UV-2201, Japan) by monitoring the change in absorbance at 340nm and 30°C. Each value represents mean $\pm$ SE. Each value represents mean $\pm$ SE.

$$\text{GST } (\mu\text{mol/mg/min}) = \frac{\Delta\text{OD}(\text{probe-blank})}{9.6} \times \frac{1}{0.1} \times \text{Dilution fold} \times \frac{1}{\text{Protein con.}}$$

<sup>b)</sup>% to the control value

cytochrome P450함량의 미세한 감소가 관찰되었으며 (Radice 등, 1995), 인체배양 세포인 HEP2에 benomyl을 처리하였을 때 미세한 감소가 있었으나, carbendazim처리 군에서는 약간의 증가가 있었고, benomyl과 carbendazim을 혼합 처리하였을 때는 증가되었다 (Radice 등, 1996)는 것과도 유사한 경향이였다. Benomyl처리 군에서 활성이 감소한 것은 대사물질인 butylisocyanate의 영향으로 판단했다(Radice 등, 1997). 토끼 간세포를 이용한 thiabendazole 및 그 밖의 benzimidazole계 유도체가 cytochrome P450 및 mRNA 함량을 증가시켜 benzimidazole계 화합물이 cytochrome P450의 생합성 유발물질로 판단하였다(Rey-Grobellet

등, 1996)는 보고도 있다.

이상의 결과로 carbendazim 고농도 투여군에서 구토 등 일반적인 중독증상으로 인해 투여초기에는 동물체 내의 cytochrome P450함량을 일시적으로 감소시키나 투여 4시간 후에는 cytochrome P450활성이 회복되는 것을 알 수 있었다.

#### Cytochrome P450 reductase 활성

Cytochrome P450 reductase에 대한 carbendazim의 효소활성 저해와 간세포에 대한 산화적 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위해 carbendazim을 375 mg/kg, 750 mg/kg 및 1,500 mg/kg 체중을 투여한 후 60분, 120분,

Table 5. Changes of hepatic cytochrome P450(Cyt P450) amounts in SD rats administered with different doses of carbendazim

Administration dose(mg/kg)	Cyt P450 <sup>a)</sup> amount(nmol/mg protein) after given times of administration			
	60	120	240	360min
0	0.88 $\pm$ 0.03 (100) <sup>b)</sup>	0.56 $\pm$ 0.03 (100)	0.76 $\pm$ 0.03 (100)	0.38 $\pm$ 0.06 (100)
375	0.68 $\pm$ 0.06 (77.3)	0.40 $\pm$ 0.03 (71.9)	0.74 $\pm$ 0.05 (97.9)	0.43 $\pm$ 0.02 (113.9)
750	0.54 $\pm$ 0.06 (61.7)	0.43 $\pm$ 0.03 (77.7)	0.45 $\pm$ 0.05 (59.1)	0.43 $\pm$ 0.04 (111.8)
1,500	0.46 $\pm$ 0.06 (52.6)	0.41 $\pm$ 0.05 (73.2)	0.64 $\pm$ 0.09 (84.9)	0.43 $\pm$ 0.05 (112.3)

<sup>a)</sup>Hepatic cytochrome P450 amount was measured by Omura and Sato method<sup>114)</sup> using spectrophotometer(Shimduz UV-2201, Japan) by monitoring the change in absorbance at 450nm. Each value represents mean $\pm$ SE.

$$\text{nmol cytochrome P450} = [(A_{450-490})_{\text{observed}} - (A_{450-490})_{\text{baseline}}] / 0.091 \times \text{Dilution fold}$$

<sup>b)</sup>% to the control value.

Table 6. Changes of hepatic cytochrome P450(Cyt P450) reductase activity in SD rats administered with different concentrations of carbendazim

Administration dose(mg/kg)	Cyt P450 <sup>a)</sup> reductase(nmol/mg protein) after given times of administration			
	60	120	240	360min
0	1.93±0.07 (100) <sup>b)</sup>	1.54±0.05 (100)	1.61±0.07 (100)	1.28±0.05 (100)
375	1.48±0.07 (76.4)	1.15±0.02 (74.7)	1.89±0.15 (117.2)	1.51±0.03 (117.8)
750	1.41±0.02 (73.1)	1.22±0.08 (89.0)	1.29±0.05 (80.3)	1.45±0.06 (113.3)
1,500	1.11±0.08 (57.5)	1.19±0.04 (76.9)	1.51±0.02 (93.5)	1.30±0.05 (101.8)

<sup>a)</sup>Hepatic cytochrome P450 reductase was measured by Crankshaw method using spectrophotometer(Shimduz UV-2201, Japan) by monitoring the change in absorbance at 550nm and 30°C. Each value represents mean±SE.

$$\text{nmol cytochrome P450 reductase activity} = \frac{\Delta A_{550}/\text{min/mg}}{0.021}$$

<sup>b)</sup>% to the control value.

240분 및 360분에 cytochrome P450 reductase 활성을 조사한 결과 표 6에서 보는 바와 같다. 투여후 60분에 375 mg/kg, 750 mg/kg 및 1,500 mg/kg 체중 투여군에서 cytochrome P450 reductase 활성이 각각 대조군에 비해 76.4%, 73.1% 및 57.5% 감소하였으며, 120분에는 74.7%, 89.0% 및 76.9% 감소하였으나 240분에는 80.3~117%로 거의 활성을 회복하였으며, 360분에는 117.8%, 113.3% 및 101.8%로 활성이 회복되었다.

Benzimidazole계 화합물의 지방산화 방지 효과시험에서 cytochrome P450 reductase 활성은 크게 변하지 않아(Can-Eke 등, 1998) 본시험의 결과와 유사하였고, carbendazim은 cytochrome P450 reductase 활성을 투여 초기에 저해하였으나 360분에는 정상적인 활성을 회복되었을 뿐 크게 증가하지는 않아 carbendazim의 대사과정에서 생성된 활성산소의 수준으로는 세포막에 영향이 크지 않을 것으로 판단되었으나, Suwalsky 등(2000)은 benomyl을 개구리 신경상피세포에 노출시켰을 때 0.01~1.0 mM의 농도에서 영향이 있었다고 보고하여 시험종이나 시험계에 따른 차이가 있을 것으로 판단되었다.

이상의 결과에서 대표적인 benzimidazole계 농약인 carbendazim의 단기투여에 의한 간 해독체계에 미치는 영향은 적을 것으로 추정되며, 고농도로 2시간 이상 노출되면 혈중 간세포 손상의 지표 효소인 ALT 및 AST 활성이 다소 증가하여 간세포에 손상을 일으킬 가능성이 있었으나, 랫드 간 해독체계에는 영향을 미칠 수준은 아닌 것으로 판단되었다.

## 인용문헌

- Banks, D. and M. R. I. Soliman (1997) Protective effects of antioxidants against benomyl-induced lipid peroxidation and glutathione depletion in rats. *Toxicology* 116:177~181.
- Choi, B.-K and Y.-C. Kim (1998) Scavenging effect of Ginkgo biloba Extracts on Paraquat Induced Toxicity. *Kor. J. Environ. Toxicol.* 13:105~115.
- Can-Eke, B., M. O. Puskullu, E. Puskullu and M. Iscan (1998) A study on the antioxidant capacities of some benzimidazoles in rat tissues. *Chemico Biological Interactions* 113:65~77.
- Crankshaw, D. L., K. Hetnarsky and C. F. Wilkinson (1978) Purification and characterization of NADPH-cytochrome C reductase from the midgut of the southern armyworm(*Spodoptera eridania*). *Insect. Biochem.* 43:43~48.
- Dauterman, W. C. (1994) Metabolism of toxicants : phase II reactions. pp.113~132, In *Introduction to Biochemical Toxicology*(ed. Hodgson, E. and Levi, P. E.), Appleton & Norwak, Connecticut.
- Davidse, L. C. and W. Flach (1977) Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* 72:174~193.
- Dierickx, P. J. (1999) CYP1/2 Activation and

- Glutathione-dependent Cytotoxicity of Four Pesticides in Hep G2 and Fa32 Cells, *Toxicology in Vitro*. 13:779~783.
- Donald, J. R. (1994) Mechanism of chemically induced injury and cellular protection mechanisms. pp.265~294, .In *Introduction to Biochemical Toxicology* (ed. Hodgson, E. and Levi, P. E.), Appleton & Norwak, Connecticut.
- Durmaz, R., M. Koroglu, H. Kucukbay, I. Temel, M. K. Ozer, M. Refiq, E. Cetinkaya, B. Cetinkaya and S. Yologlu (1998) Investigation of serum minimal inhibitory concentrations of some benzimidazole, imidazole and benzothiazole derivatives and their effects on liver and renal functions. *Araneimittel-Forschung/Drug Research* 48(12):1179~1184.
- Ellman, G. L. (1959) Measurement of GSH by Spectrophotometry. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82:70~77
- Giray, B., A. Gurbay and F. Hincal (2001) Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by Vitamin E or allopurinol. *Toxicology Letters* 118:139~146.
- Griffith, O. W. (1982) Mechanisms of action, metabolism, and toxicity of buthonine sulfoxamine and its higher homologs, potent inhibitors of gultathion synthesis . *J. of Biochemical chemistry* 257:13704~13712.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974) Glutathione-S-transferase. the first step in mercapturic acid formation. *J. Bio. Chem.* 249:7130~7139.
- Han H. Y., J. G. Lee, and C. W. Lee (1982) Outline of Veterinary Clinical Pathology, Kijeonyoungusa, Suwon, 251~274
- Harada, T., I. Koyama, K. Sato and T. Komoda (2000) Induction of rat alkaline phosphatase isozymes bearing a glycan-phosphatidylinositol anchor modified by in vivo treatment with a benzimidazole derivative linked to ethylbenzene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*: 127:193~202.
- Hayers, W. J. (1982) Pesticides studied in man. *Williams & Wilkins, Baltimore/London*, 610~615.
- Hodgson, E. and P. E. Levi (1994) Metabolism of toxicants : phase I reactions. pp.75~111, In *Introduction to Biochemical Toxicology*(ed. Hodgson, E. and Levi, P. E.), Appleton & Norwak, Connecticut.
- Janardhan, A., A. B. Rao, and P. Sisodia (1987) Sub-chronic toxicity of methyl benzimidazole carbamate in rats. *Bull Environ Contam Toxicol*. 38(5):890~898.
- John, S., M. Kale, N. Rathore and D. Bhatnagar (2001) Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J.of Nutr. Biochem.* 12:500~504.
- Kim, S. G. and M. K. Cho (1996) Expression of Glutathione S-transferases Ya, Yb1, Yb2, Yc1 and Yc2 and Microsomal Epoxide Hydrolase Genes by Thiazole, Benzothiazole and Benzothiadiazole. *Biochem. Pharmacology* 52(12):1831~1841.
- Omura, T. and R. Sato (1964) The carbonmonoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239:2370~2378.
- Oruc E. O. and N. Uner (2000) Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Phisology Part C* 127:291~296.
- Paolini, M., L. Pozzetti, P. Perocco, M. Mazzullo and G. Cantelli-Forti (1999) Molecular non-genetic biomarkers of effect related to methyl thiophanate cocarcinogenesis: organ- and sex-specific cytochrome P450 induction in the rat. *Cancer Letters* 135:203~213.
- Radice, S., B. Cipelletti, E. Chiesara and L. Marabini (1995) Effect of benomyl on cytochrome P450 in primary cultured rat hepatocytes. *Eurotox* 95:6.
- Radice, S., L. Marabini and E. Chiesara (1996) Benomyl action on the monooxygenase system of HepG2 cell line is mediated by its metabolites, *Toxicology Lett.* 88:30~31
- Radice, S., L. Marabini, M. Gervasoni, M. Ferraris, E. Chiesara (1997) Carbendazim and n-butylisocyanate: metabolites responsible for benomyl double action on cytochrome P450 in HepG2 cells. *Toxicology* 123(1~2):135~142.
- Rey-Grobelle, X., N. Ferre, C. Eeckhoutte, G. Larrieu, T. Pineau and P. Galtier (1996) Structural requirement for the induction of cytochrome P450 by benzimidazole anthelmintic derivatives in incultured rabbit



- hepatocytes. *Biochemical & Biophysical Res. Com.* 220(3):789~794.
- Saitoh, M., T. Umemura, T. Kawasaki, J. Momma, Y. Matsushima, K. Sakemi, K. Isama, S. Kitajima, Y. Ogawa and R. Hasegawa (1999) Toxicity Study of a Rubber Antioxidant, Mixture of 2-Mercaptomethylbenzimidazoles, by Repeated Oral Administration to Rats. *Food and Chemical Toxicology* 37:777~787
- Sherman, H. (1972) Long-term feeding studies in rats and dogs with 2-benzimidazolecarbamic acid, methyl ester (INE-965) (50% and 70% MBC wettable powder formulations): Parts I and II. Newark, Delaware.
- Sherman, H., R. Culik and R. A. Jackson (1975) Reproduction, teratogenic, and mutagenic studies with benomyl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 32:305~315.
- Suwalsky, M., M. Benites, B. Norris, P. Sotomayor (2000) Toxic effects of the fungicide benomyl on cell membranes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 125:111~119.
- Til, H.P., C. Koellen and C. A. van der Heijden (1976a) Combined chronic toxicity and carcinogenicity study with carbendazim in rats. The Hague, Central Institute for Nutrition and Food Research (TNO) (Unpublished report prepared for BASF AG, Ludwigshafen and Hoechst AG, Frankfurt).
- Til, H.P., C. Koellen and C. A. van der Heijden (1976b) Multigeneration study with carbendazim in rats. The Hague, Central Institute for Nutrition and Food Research (TNO) (Unpublished report No. R-5024, prepared for Hoechst AG, Frankfurt).
- Tomlin, C. D. S. (1997) *The pesticide manual*, 11th edition. British crop protection council.

---

#### The Effect of Fungicide Carbendazim on Hepatic detoxication systems of rat

Je Bong Lee<sup>\*</sup> · Jin Sup Shin · Mi-Hye Jeong · Yeon-Ki Park · Kyu Young Kang<sup>2</sup>(*National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, Korea*, <sup>1</sup>*Dept. of Environ. Biotechnology, Gyeong Sang National University, Jinju, Korea*)

**Abstract :** Serum alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase (AST), hepatic glutathione, glutathione S-transferase(GST), cytochrome P450 and cytochrome P450 reductase activity were measured to investigate the effects of hepatic detoxication system and metabolic activities of carbendazim in Sprague Dawley(S.D.) male rat at dose levels of 375, 750 or 1,500 mg/kg body weight. Serum alanine aminotransferase(ALT) and aspartate aminotransferase(AST) activities were slightly increased in all test groups after 120 minutes of administration. Glutathione was increased about 20% at high and medium dose level within 120 minutes after administration, while activity of glutathione S-transferase was decreased 36~50%. However, the enzyme activity was recovered from all test groups after 240 minutes of administration. Cytochrome P450 and activity of cytochrome P450 reductase were decreased 25~50% until 120 minutes after administration, but recovered after 240 minutes.

**Key Word :** carbendazim, serum enzymes, hepatic detoxication system

---

<sup>\*</sup>Corresponding author(Fax : +82-31-290-0508, E-mail : jblee@rda.go.kr)