Korean J. Toxicol.
Vol. 11, No. 2, pp. 205-213, 1995

Cytochrome P-450 의존성 radical 전달에 의한 Benzene, Toluene, Xylene의 대사기전 연구

김기웅 · 장성근* · 김양호 · 문영한
한국산업안전공단 산업보건연구원, 순천향대학교 자연대학 화학과*

A Study on the metabolism mechanism of Benzene, Toluene and Xylene by Cytochrome P-450 dependent radical-mediated

Ki-Woong Kim, Sung-Keun Chang*, Yangho Kim, Young Hahn Moon
Industrial Health Research Institute, 34-6 Kusan-dong, Pupyeong-ku, Incheon 403-120, Korea
**Dept. Chemistry, College of Natural Science, Soonchunhyang University, ChugNam, Korea*

(Received November 13, 1995)
(Accepted November 24, 1995)

ABSTRACT : *This study was undertaken to investigate the effects of organic solvents on xenobiotic metabolizing enzyme system in vivo by means of experimental conditions i.e. (1) single group which was treated by benzene (B), toluene (T) and xylene (X), respectively, (2) combination group which was treated by mixture of benzene+toluene (BT), benzene+xylene (BX), and toluene+xylene (TX), respectively, (3) mixture group which was treated by benzene+ toluene+xylene mixture (M), and to interpreat the interaction between the organic solvents metabolizing enzymes.*

1. The contents of cytochrome P-450 in liver microsomes were increased ($p < 0.01$) in organic solvents treated groups, and the contents of cytochrome P-450 were increased by following order of B < T < M < BT=BX < X < TX.

2. The activity of cytochrome P-450 dependent AHHase was significantly higher in organic solvents treated groups than in control group ($p < 0.01$), and the activity of AHHase was increased by following order of B < T < BT=BX=TX=xylene < M.

3. The activity of NADPH P-450 reductase was significantly higher in organic solvents treated groups than in control group ($p < 0.01$), and the order of M < combinated group < X < T <B, however, the activity of NADH b5 reductase was the reverse order of NADPH P-450 reductase activity.

4. The activity of superoxide dismutase (SOD), and generation of hydroxyl radical and lipid peroxide were significantly higher in organic solvents treated groups than in control group ($p < 0.01$), and the order of M < T=X=combinated group (BT=BX=TX) < B.

These results suggested that the first step of biotransformation pathway of organic solvents(benzene, toluene and xylene) may be proceeded by a different metabolic reaction. Because benzene was metabolized by radical reaction through cytochrome P-450 dependent radical intermediates, meanwhile toluene and xylene were hydroxylated by cytochrome P-450 dependent AHHase.

Key Words : *Benzene, Toluene, Xylene, Cytochrome P-450 Monooxygenase, Hydroxyl radical, Lipid peroxide, Superoxide dismutase*

I. 서 론

환경오염물질 및 화학물질과 같은 이물질(xenobiotic)들은 물질을 구성하고 있는 구성 분자들의 화학식, 작용기의 형태 및 결합구조 등이 달라서 물질이 가지는 고유의 물리 · 화학적인 성질의 차이를 보이게 되며, 그러한 이유에 의해서 체내 흡수시 분포, 대사, 배설 등의 기전 차이를 보이게 되고 표적기관 및 독성발현 등이 다르게 나타난다(Dean, 1978; Nakajima 등, 1988; Sabourin 등, 1989; Okino 등, 1991).

체내로 흡입된 이물질들은 생체의 여러가지 반응을 통하여 물질 본래의 고유한 성질 및 특성이 생물학적

변화(biotransformation)를 거쳐 체외로 배설되며 (Nakajima 등, 1990; Guengerich 등, 1991; 김 등, 1995) 생체 반응을 통한 생물학적 변화 과정은 대부분 효소 작용에 의해 전환이 이루어진다. 이물질에 대한 생물학적 변화 과정은 기질(substrate) 특이성과 분포속도(distribution rate), 반감기 등에 의해서 흡입된 물질에 따라 많은 차이를 나타나며, 주로 간장에서 이루어진다(Lu와 West, 1980).

간장에 있어서 생물학적 변화 형태는 먼저, phase I 반응에 의한 변화로서 흡수된 어떤 물질이 산화, 환원, 가수분해 등 일련의 작용을 거쳐 본래의 물질보다 반응성과 극성을 증가시키는 단계이다(Gelboin, 1969; Reynold와 Molslen, 1977; Miller와 Guengerich, 1982).

두번째는 phase II 반응으로 phase I 반응 생성물과 conjugation을 일으켜 해독화시키는 단계이며, 또 다른 단계는 제거효소(scavenger enzymes)에 의해서 대사과정에서 생성된 활성화된 중간체를 제거하는 단계이다. 그러나 흡수된 물질의 성질에 따라서 각각의 생물학적 변화 단계에 작용하는 효소가 다르며, 그로 인하여 대사기전 및 배설속도 등이 차이를 보인다.

유기용제를 포함한 대부분의 이물질에 대한 대사 및 배설속도는 phase I 반응 단계에서 조절되며, phase I components중에서도 cytochrome P-450에 의한 작용이 매우 중요하다(Cockham과 Shane, 1994).

Cytochrome P-450은 함량에 따른 정도의 차이는 있으나 체내의 전반적인 기관에 분포하고 있으며,주로 세포질 망상조직의 microsome에 cytochrome b_5와 함께 single polypeptide의 heme 단백질로 존재하는 독특한 단백질이다(박기현, 1986).

이 단백질은 exogeneous substance 뿐만 아니라 생체 구성물질인 지방산, 스테로이드 및 prostaglandine 등에도 작용하여 지방족 및 방향족 물질의 수산화반응의 촉매, N-oxidation, sulfoxidation, peroxidation, deamination 및 N-, O-, S- dealkylation 등 다양한 반응을 촉매하므로 mixed function oxidase(MFO)라고도 한다 (Cockerham과 Shane, 1994).

이와 같이 cytochrome P-450은 기질에 대한 다양한 반응성을 가지고 있어 환경오염물질 및 화학물질, 약물 등의 대사와 관련하여 사람과 동물을 대상으로한 많은 연구가 수행되고 있는데(김 등, 1994; Villaverde 등, 1995; Lewis, 1995; Osawa 등, 1995) 특히, 산업의 발달로 인하여 작업자가 폭로되는 유기용제 및 화학물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Rosa 등, 1987; Moretto와 Lotti, 1990; Nakajima 등, 1992).

대부분의 유기용제는 세정제, 희석제, 페인트 및 고무제조시 원료로 산업체의 여러 분야에서 널리 사용되고 있는데, 하나의 고리를 가지는 방향족탄화수소(monocyclic aromatic hydrocarbon; MAH)계 유기용제인 benzene, toluene, xylene은 페인트, 접착제, 인쇄용제 등 여러가지 물질에 포함되어 있어서 작업자의 폭로가 크다고 볼 수 있다(Arlien-Soborg, 1992). 그러나 같은 MAH계 유기용제라도 benzene ring에 붙어있는 곁사슬의 차이에 의해서 대사기전 및 표적기관, 독성발현 등이 서로 다를 것으로 예상된다. 그러므로 본 연구는 MAH계 유기용제인 benzene, toluene 및 xylene 등의 대사에 관여하는 효소인 cytochrome P-450과 관련하여 대사기전을 파악하고자 시도하였다.

II. 재료 및 방법

Cytochrome C, NADPH, NADH, sucrose, bovine serum albumin(BSA), benzo(a)pyrene, superoxide dismutase(SOD), deoxyribose, xanthine oxidase 등은 Sigma(St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하였으며, 투여물질인 benzene, toluene, xylene 등은 Aldrich (Milwaukee, WI, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 그 밖의 일반적인 생화학 시약도 Aldrich사 또는 Sigma사의 것을 사용하였다.

실험동물은 국립보건안전연구원으로부터 분양받은 Sprague Dawley계 6주령된 웅성 흰쥐(170±10 g)를 사용하였으며, 실험 1주일전부터 온도(23±2°C), 습도(55±5%) 및 채광조절(12 h light/dark)된 사육장에서 사료와 음용수를 자유로이 섭취시켰다. 실험군은 대조군, benzene(B), toluene(T), xylene(X) 단독투여군(3개군)과 B+T, B+X, T+X의 병합투여군(3개군), B+T+X의 혼합투여군(1개군)으로하여 총 8개군으로 분류하여 corn oil에 용해시켜 1일 1회씩 2일간 연속하여 복강주사 하였으며, 각 실험군은 5마리로 하였다.

1. 간 Microsomes 분획의 분리

실험동물을 경부탈골에 의한 방법으로 희생시킨 후 즉시 간을 절제하여 0.9% sodium chloride용액으로 혈액을 씻어내고, 응고된 혈액 및 지방질을 제거한 간을 0.25 M sucrose로 균질화한 다음, 차등원심분리(12.000×g에서 40분, 105.000×g에서 60분)하여 0.15 M KCl로 씻어낸 후 침전물을 0.25 M sucrose로 resuspension한 후(Park과 Kim, 1984) 단백질 정량과 cytochrome P-450 의존성 monooxygenase 활성도 및 각종 실험에 사용하였다. 모든 실험과정들은 0-4°C에서 수행

하였으며 microsomal 단백질의 변성을 방지하기 위하여 -70°C에서 보관하였다.

2. 단백질과 Cytochrome P-450 정량

BSA을 표준물질로 하여 Lowry 등(1951)의 방법에 의해서 단백질 농도를 결정하였다. Cytochrome P-450의 함량은 Omura와 Sato 등(1964)의 방법에 따라서 일산화탄소를 bubling 시킨 후 450 nm와 490 nm에서 흡광도 차이를 측정하여 몰흡광계수 91 $Cm^{-1}mM^{-1}$로부터 함량을 결정하였다.

3. Cytochrome P-450 의존성 monooxygenase 활성도 측정

Benzo(a)pyrene(B(a)P)을 기질로 사용하여 hepatic microsomes에 의해서 생성된 3-OH-B(a)P를 형광광도계를 이용하여 excitation 392 nm, emission 514 nm에서 형광광도를 측정하여 정량화 하였으며(Nebert와 Gelboin, 1968), cytochrome C를 전자수용체로 이용하는 NADH-cytochrome b_5 reductase 활성도는 Hultquist(1978) 방법에 의해서 측정하였고, NADPH-cytochrome C(P-450) reductase 활성도는 Master 등(1967)의 방법으로 몰 흡광계수 21 $Cm^{-1}mM^{-1}$을 이용하여 측정하였다.

4. Hydroxy radical과 과산화지질 생성량 및 superoxide dismutase(SOD) 활성도

Hydroxy radical의 생성량은 1.2% thiobarbituric acid(TBA)를 사용하여 최 등(1993)의 방법을 다소 변형하여 측정하였으며, 과산화지질의 생성량은 Yagi방법(1987)에 의해서 TBA법으로 측정하였다. SOD의 활성도 측정은 Oyanagui(1984)의 방법에 따라 표준물질을 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 정량화 하였다.

5. 자료분석 방법

자료분석을 위해 PC/SAS 프로그램을 사용하여 평균값과 표준오차를 살펴보고 자료의 특성에 따라 각 군별 비교를 위한 t-test, 분산분석(ANOVA)을 실시하였다.

III. 연구결과

1. Cytochrome P-450 함량 및 Aryl hydrocarbon hydroxylase(AHHase) 활성도

Table 1. Effects of benzene, toluene and xylene on liver microsomal cytochrome P-450 and related AHHase activity

Organic solvents (1 mol/kg)	Cytochrome P-450 (nmol/mg)	AHHase (arbitrary unit)
Control	$0.744^{d} \pm 0.025$	$3.318^{d} \pm 0.0597$
B	$0.784^{d} \pm 0.032$	$3.659^{cd} \pm 0.0870$
T	$0.855^{c} \pm 0.022$	$4.329^{bc} \pm 0.2950$
X	$0.922^{ab} \pm 0.038$	$4.703^{ab} \pm 0.2048$
BT	$0.898^{abc} \pm 0.064$	$4.967^{ab} \pm 0.2274$
BX	$0.905^{ab} \pm 0.034$	$4.580^{ab} \pm 0.1757$
TX	$0.981^{a} \pm 0.039$	$4.865^{ab} \pm 0.5124$
M	$0.870^{abc} \pm 0.020$	$5.228^{a} \pm 0.2015$
F-value	4.31**	6.62**

**$p < 0.01$
Values represent mean ± S.D for five rats.
Upper letters (a, b, c, d): The same letter are not significantly different.
AHHase: aryl hydrocarbon hydroxylase.

Sprague Dawley계 웅성 흰쥐를 이용하여 benzene, toluene, xylene을 처리물질로하여 단독, 병합 및 혼합투여한 후 간장의 microsomes에 있어서 cytochrome P-450의 함량 변화를 측정한 결과 Table 1을 얻었다.

Cytochrome P-450의 함량은 처리물질 및 기간, 종(species)에 따라서 많은 차이를 보이는데 금번 실험에 있어서는 benzene 단독투여군을 제외한 모든 투여군이 대조군에 있어서의 측정치보다 통계학적인 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$).

단독투여군의 경우 benzene < toluene < xylene 순으로 증가되었으며, 병합투여군 및 혼합투여군은 M < BT < BX < TX 순으로 측정성적을 보였다.

또한, benzene 고리와 benzene에 붙어있는 곁사슬을 수산화(hydroxylation) 시키는데 관여하는 AHHase의 활성도를 측정한 결과, benzene을 제외한 기타의 투여군 모두에 있어서 대조군보다 통계학적인 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$).

투여군간의 AHHase 활성도를 비교해 보면, M군이 가장 높은 측정치를 보였으며 병합투여군과 xylene(X) 단독투여군은 비슷한 결과를 나타냈다. Cytochrome P-450의 함량과 AHHase의 활성도를 비교해보면 다소의 차이는 보이나 비슷한 경향을 나타내고 있다.

2. NADPH-C(P-450) reductase와 NADH-b_5 reductase의 활성도 변화

체내로 흡입된 이물질을 대사시키기 위해서는 산화-환원작용에 의한 이화학적인 변화가 이루어져야 하는

Table 2. Activities of reductase in liver microsomes from rats treated with organic solvents

Organic solvents (1 mol/kg)	NADPH P-450 (μmol/min/mg)	NADH b_5 (μmol/mim/mg)
Control	72.47^{d} ±5.091	98.29^{d} ± 6.928
B	130.86^{a} ±5.099	156.04^{c} ± 8.419
T	101.28^{b} ±6.359	195.09^{b} ± 5.152
X	97.78^{b} ±7.115	219.65^{ab} ± 6.627
BT	90.18^{bc} ±6.334	235.11^{a} ± 9.416
BX	83.65^{bcd} ±3.955	228.82^{a} ± 8.251
TX	96.94^{b} ±4.872	245.66^{a} ±10.608
M	74.41^{cd} ±5.355	222.98^{ab} ± 5.005
F-Value	10.92**	25.70**

**p < 0.01.
Values represent mean ± S.D for rats.
Upper letters (a, b, c, d): The same letter are not significantly different.
NADPH P-450: NADPH cytochrome C(P-450) reductase.
NADH b_5: NADH b_5 reductase.

데 이때 산화-환원작용에 필요한 전자를 전달하는 전자-전달계가 NADPH-C(P-450) reductase와 NADH-b_5 reductase이다.

본 실험에 있어 benzene, toluene, xylene을 기질로하여 단독, 병합 및 혼합투여한 후 reductase 활성도 변화를 측정한 결과 Table 2를 얻었다.

NADPH-C(P-450) reductase의 활성도는 대조군과 비교시 투여군 모두에 있어서 증가된 활성도의측정치를 보였으나 BX, M군에서는 통계학적인 유의성은 나타나지 않았다($p > 0.01$). 활성도의 증가는 B > T > X > TX > BT > BX > M군 순으로서 단독투여군에서보다 병합 및 혼합투여군에서 감소되는 측정치를 보였다.

NADH-b_5 reductase 활성도의 경우는 대조군보다 투여군 모두에 있어서 통계학적인 유의한 증가를 보였으나($p < 0.01$) 활성도의 증가는 NADPH-C(P-450) reductase의 활성도 증가와 상반되는 현상을 보였다.

3. Hydroxy radical과 과산화지질 생성량 및 superoxide dismutase(SOD) 활성도

1) Hydroxy radical(HR)과 과산화지질 생성량

Benzene, toluene, xylene을 단독, 병합 및 혼합투여한 후 간장의 microsomes에 있어서 hydroxy radical과 과산화지질의 생성량을 측정한 결과 Table 3과 같다.

강력한 활성산소종으로 알려져 있는 HR의 생성량은 대조군과 투여군간의 비교시 투여군 모두 증가된 결과를 보였으나 M군을 제외한 기타의 투여군에서만 통계학적인 유의한 차이를 보였다($p < 0.01$). benzene, toluene, xylene 단독투여군은 45.77, 39.03, 40.35 nmol/mg으로 측정되었으며,병합투여군인 BT, BX, TX군에서는 41.40, 41.29, 41.42 nmol/mg으로 측정되었고 혼합투여군(M)에서는 36.50 nmol/mg 측정되었다. 실험군간의 HR의 생성량을 보면 benzene 단독투여군 > T, X 및 병합투여군 > 혼합투여군 순으로 나타났다.

Table 3. Generation contents of hydroxy radical and lipid peroxide in liver microsomes from rats treated with organic solvents

Organic solvents (1 mol/kg)	HR (nmol/mg)	LPO (nmol/mg)
Control	32.94^{d} ±3.211	16.51^{c} ±1.436
B	45.77^{a} ±1.926	29.15^{a} ±3.295
T	39.03^{bc} ±2.220	21.97^{b} ±2.596
X	40.35^{b} ±3.217	24.58^{b} ±3.034
BT	41.40^{b} ±2.319	22.73^{b} ±2.752
BX	41.29^{b} ±2.453	23.91^{b} ±3.500
TX	41.41^{b} ±2.404	24.40^{b} ±3.192
M	36.50^{cd} ±3.952	21.85^{b} ±2.917
F-Value	9.38**	7.42**

**p < 0.01.
Values represent mean ± S.D for five rats.
Upper letters (a, b, c, d): The same letter are not significantly different.
HR; Hydroxy radical, LPO; Lipid peroxide.

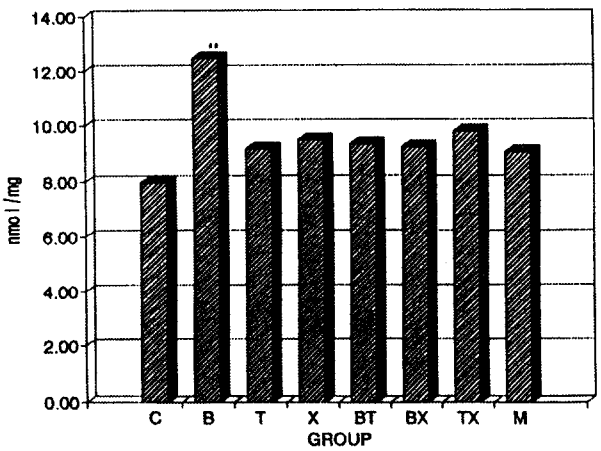

Fig. 1. Acivities of SOD in liver microsomes from rats treated with organic solvents. **Significantly different from treated groups ($p < 0.01$).

활성산소종의 작용에 의해서 생성되는 과산화지질의 함량을 대조군과 투여군간에 있어서 비교해 보면 투여군 모두에 있어서 통계학적인 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$). Benzene 단독투여군은 29.15 nmol/mg, toluene과 xylene은 21.97, 24.58 nmol/mg으로 각각 측정이 되었으며, 투여군간의 측정치를 비교해보면 benzene 단독투여군을 제외한 기타의 투여군에 있어서 군간의 측정치 차이를 보이지 않았다.

2) Superoxide dismutase(SOD) 활성도

활성산소종을 제거하는 효소의 하나인 SOD의 활성도를 측정하여 Fig. 1의 결과를 얻었다.

단독, 병합 및 혼합투여군에 있어서 SOD의 활성도는 대조군보다 통계학적인 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$). 단독투여군인 benzene, toluene, xylene군의 활성도는 12.47, 9.16 및 9.48 nmol/mg으로 측정되었으며 병합투여군인 BT, BX, TX군에서는 9.33, 9.23, 9.79 nmol/mg으로 각각 측정되었으며, 혼합투여군의 경우에는 9.07 nmol/mg의 측정치를 보였다. 또한 투여군간의 차이를 비교해 보면 단독투여군인 B군에서만 차이를 나타냈다($p < 0.01$).

IV. 고 찰

Benzene(Parke와 Williams, 1953), toluene(Cohr와 Stokholm, 1979), xylene(Ogata 등, 1970)의 대사기전이 밝혀지면서, 이들 유기용제의 대사에 있어서 cytochrome P-450 monooxygenase가 관여하여 benzene은 benzene epoxide, toluene과 xylene은 benzene ring에 붙어있는 methyl기의 수산화반응을 통하여 전반적인 대사가 이루어지는 것으로 알려졌다.

Cytochrome P-450은 MAH계 유기용제 뿐만 아니라 약물, 환경오염물질 등 이물질 대사에 깊은 관여를 하여 해독화 및 독성을 유발하는 이중적인 작용을 한다. 즉 흡수된 이물질의 대사과정시 cytochrome P-450에 의해서 1차 대사변형된 중간체들의 대부분은 여러 단계의 대사과정을 거쳐서 체외로 배설되는 반면, cytochrome P-450의 대사작용에 의해 형성된 활성화된 중간체들은 체내의 합성물질과 반응에 의해 독성현상을 유발시킨다.

Cytochrome P-450의 함량은 종(specise), 성별등에 따른 유전적인 요인은 물론, 체외로부터 흡수되는 물질에 의한 유도(induce)에 따라서도 많은 차이를 보인다(Nebert와 Gonzalez, 1987).

그러므로 이물질 대사에 있어서 cytochrome P-450의 함량 및 유도된 동위효소의 형태는 흡입된 물질의 대사에 매우 중요하다. 본 실험에 있어서 benzene, toluene, xylene을 처리물질로하여 단독 및 병합, 혼합투여한 후 간장의 microsome에 있어서 cytochrome P-450의 함량을 측정한 결과, 투여군 모두에 있어서 대조군에서 측정된 함량치(0.744 nmol/mg of protein)보다 증가된 측정치를 보였으나, benzene 단독 투여군(0.784 nmol/mg of protein)을 제외한 투여군에서만 통계학적인 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$).

Arinc 등(1991)은 토끼를 이용한 연구에서 체중 kg당 benzene 880 mg을 3일 동안 연속해서 피하주사한 후 간장과 신장에 있어서 cytochrome P-450 함량을 측정한 결과, benzene 투여로 인하여 간장과 신장에 있어서 cytochrome P-450 함량의 변화는 나타나지 않았다고 보고하였다.

Pyykko 등(1983)은 2,000 ppm의 toluene에 폭로시킨 흰쥐 간장에 있어서 cytochrome P-450의 함량이 증가되었다고 보고하였으며, Toftgard와 Nilsen(1982)은 2,000 ppm xylene과 xylene 혼합물(o-, m-, p-xylene), ethylbenzene에 3일 동안 폭로시킨 후, 간장에 있어서 cytochrome P-450의 함량 증가를 보고하였다. 또한, Pathiratne 등(1986)은 Sprague-Dawley(Sp-D) 웅성 흰쥐에 3일 동안 연속해서 benzene, toluene, xylene을 투여한 후 간장의 microsomes에 있어서 cytochrome P-450의 함량을 측정한 결과, benzene 투여군을 제외한 toluene, xylene 투여군에서 통계학적인 유의한 증가를 보였으며 ($p < 0.05$), 함량의 증가는 benzene < toluene < xylene순으로 증가 되었다고 보고하여, 금번 연구결과와 일치하는 현상을 보였다.

이와 같이 benzene, toluene, xylene을 투여시 간장의 microsomes에 있어서 cytochrome P-450의 함량 차이를 보이는 것은 benzene ring에 붙어 있는 곁사슬에 의한 유기용제 자체의 물리 · 화학적인 성질의 차이로 인하여 함량의 차이를 보이는 것으로 생각되며, 단독투여군과 병합, 혼합 투여군간의 cytochrome P-450의 함량 차이는 이들 유기용제에 의해서 유도되는 cytochrome P-450 동위효소(Nebert와 Gonzalez, 1987; Yuan 등, 1995)와 이물질 흡입으로 인한 생체내의 자기방어 기전의 작용이 상승된 결과라 보여진다.

AHHase는 비극성 물질을 극성물질로 전환시키는 작용을 하는 효소로서 비극성인 방향족화합물을 수산화(hydroxylation)시키는데 중요한 작용을 한다. 또한 이 효소는 발암성 물질을 포함한 환경오염물질, 특히 polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)계 화합물의 대사에 관여하여 세포독성을 나타내며(Gelboin, 1969), cytochrome P-450 IA 형태의 동위효소에 선택적 활성을 보이는 효소이다(Nebert와 Gonzalez, 1987).

Parke과 Williams(1953)는 benzene 대사에 있어서 처음 단계에 AHHase가 작용하여 benzene epoxide를 형성시킨 후, 기타의 특정 효소에 의해서 대사가 이루어진다고 하였으며, toluene과 xylene의 대사에 있어서도 처음단계에 작용하여 benzene ring에 붙어있는 곁사슬인 methyl기를 수산화시키는데 작용하는 것으로 알려졌다(Ogata 등, 1970: Cohr와 Stokholm, 1979).

금번 실험에 있어서 benzene, toluene, xylene을 단독, 병합 및 혼합투여한 후, 간장의 micromes에 있어서 AHHase의 활성도를 측정한 결과, 대조군과 비교시 투

여군 모두에 있어서 통계학적인 유의한 증가를 보였으며($p < 0.01$), benzene < toluene < xylene < 병합 및 혼합투여군 순으로 활성도의 증가를 보였다. Benzene 단독 투여군에서의 AHHase 활성도가 toluene, xylene 단독투여군에서보다 감소된 활성도를 보였는데, 이는 MAH계 유기용제의 구조와 반응성의 차이로 인하여 나타난 현상으로 보이며, 그러한 이유로 말미암아 benzene, toluene, xylene의 대사기전이 다를 것으로 생각된다.

이물질이 체내에 흡수되면 체내 항상성 조절인자, 즉 효소들에 의해서 선택적인 대사작용을 통하여 체외로 배설되는데, 효소작용에 의해서 이물질을 대사시키기 위해서는 redox 작용이 수행되어야하고 그러기 위해서는 전자-전달계에 의한 전자가 전달되어야 한다. 이때 전자를 전달하는 전자-전달계가 NADPH-cytochrome P-450 reductase와 NADH-cytochrome b_5 reductase 이다(박기현, 1986).

Pathiratne 등(1986)은 benzene, toluene, xylene을 투여하였을 경우 NADPH-cytochrome P-450 reductase 활성도는 대조군에서보다 투여군 모두에 있어서 통계학적인 유의한 증가를 보였으며, 활성도 증가는 benzene < toluene < xylene 순으로 측정 되었다고 보고하였다. 그러나 금번 연구의 결과, 대조군과 투여군간의 비교시 투여군 모두에 있어서 활성도의 증가 경향을 보였으나 benzene+xylene(BX) 병합투여군과 혼합투여군(M)을 제외한 나머지 투여군에서 통계학적인 유의한 증가를 보였으며($p < 0.01$), 활성도 증가는 benzene(B) > toluene (T) > xylene(X) > 병합 및 혼합투여군 순으로 감소되어 Pathiratne 등(1986)과 상반되는 결과를 얻었다.

이러한 현상은 microsome에서 cytochrome P-450 의존성 전자-전달계의 작용으로 생성되는 free radical과 lipid peroxide를 연관지어 생각할 수 있다(Ingelman-Sundberg와 Hagbjork, 1982). 즉, 기질-O_2-P-450 complex가 NADPH-cytochrome P-450 reductase의 작용으로 free radical을 성시킬때 benzene, toluene, xylene 등이 차이를 보이게 되는 결과라고 생각된다.

반면, flavo protein인 NADH-b_5 reductase의 활성도는 투여군 모두에 있어서 통계학적인 유의한 증가를 보였는데($p < 0.01$), NADPH-cytochrome P-450 reductase 활성도 측정 성적과 상반되는 결과를 보였다. 이와 같이 NADPH-cytochrome C(P-450) deductase와 NADH-b_5 reductase의 활성도가 차이를 보이는 것은 Kamataki 등(1983)이 polychlorinated biphenyl을 처리한 흰쥐의 간장에 있어서 NADPH-cytochrome P-450 reductase와 NADH-b_5 reductase는 재구성계에서 양론적으로 상호보완적인 관계를 유지한다는 보고와 일치하는 것으로 본다.

화학물질, 중금속 등 이물질에 의해서 초래되는 발암기전은 여러가지의 경로에 의해서 발생될수 있는데, 그중의 한 경로는 흡수된 이물질에 의해서 직·간접적인 영향으로 생성된 활성산소종에 의해서 체내의 거대분자와의 결합과 세포손상 등의 원인에 의해서 유발된다(Ames, 1989; Halliwell와 Gutteridge, 1985; Oleinick 등, 1987; Kasprzak, 1991).

Ingelman-Sundberg와 Hagbjork(1982)에 의하면 토끼 간장으로부터 분리한 microsome을 이용하여 benzene과 ethanol에 의해서 형성되는 cytochrome P-450 dependent radical을 측정한 결과, hydroxyl radical의 생성이 증가 되었다고 보고하였다. 금번 연구에 있어서 MAH계 유기용제인 benzene, toluene, xylene을 투여한 후, 강력한 활성산소종인 hydroxyl radical의 생성량을 측정한 결과, 대조군보다 투여군 모두에 있어서 생성량이 증가되었으며, 혼합투여군(M)을 제외한 기타의 투여군에서 통계학적인 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$).

측정된 hydroxyl radical의 생성량은 benzene > 병합투여군 > xylene > toluene > 혼합투여군(M) 순으로 나타났다. 또한 생성된 활성산소종과 지방질 성분등과 연쇄반응(chain reaction)에 의해서 생성되는 lipid peroxide는 혈액과 연관된 질병을 유발하는 것으로 알려져 있는데(Demopoulos 등, 1982), 금번 실험에 있어서 측정된 lipid peroxide의 생성량은 대조군과 비교시 투여군 모두 통계학적인 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$). Lipid peroxide 생성량은 benzene 투여군에서 가장 높은 수준이었으며, 병합 및 혼합투여군에서는 다소의 차이를 보이나 비슷한 수준으로 측정되었다.

화학물질 및 중금속 등에 의해서 분자상의 산소가 전자를 받아 환원되어 superoxide radical(O_2^-)이 생성되고, 다시 전자와 수소를 받아 과산화수소(hydrogen peroxide: H_2O_2)를 생성시킨다.

$$2H^+ + 2O_2^- \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} O_2 + 2H_2O$$

이때 superoxide radical을 제거하는 효소(scavenger enzyme)가 superoxide dismutase(SOD)로서 금번 실험에 있어서 유기용제를 투여한 후, SOD의 활성도를 측정한 결과 투여군 모두에서 대조군보다 통계학적인 유의한 증가를 보였으며($p < 0.01$), SOD 활성도의 크기는 benzene > 병합투여군 > 혼합투여군 순으로 측정되

었다.

이러한 현상은 hydroxyl radical과 lipid peroxide, SOD 활성도 변화를 전자-전달계인 NADPH-Cytochrome C(P-450) reductase의 활성도 변화와 연관하여 생각해 보면, Ingelman-Sundberg와 Hagbjork(1982)의 연구보고에 의한 cytochrome P-450 의존성 free radical이 benzene에 전달되는 기전에 대한 연구결과와 일치하는 현상으로 생각된다.

Parke과 Williams(1953)는 benzene 대사기전의 처음 단계에 AHHase가 작용하여 benzene이 benzene epoxide로 1차 변형된 후 효소 또는 비효소 작용에 의해서 phenol로 변형된다고 하였다. 그러나 금번 연구에서 나타난 cytochrome P-450 함량과 AHHase 및 NADPH cytochrome P-450 reductase 활성도와 hydroxyl radical 생성량 등을 benzene, toluene, xylene의 대사와 연관하여 보면 benzene의 경우, cytochrome P-450 의존성 AHHase에 의해서 benzene epoxide로 된 후 phenol이 생성되는 기전 보다는 cytochrome P-450 의존성 radical이 benzene에 전달되어 hydroxyl radical이 benzene과 직접적인 radical 반응에 의해서 phenol이 생성되는 기전이 주된 대사기전으로 생각된다.

또한, cytochrome P-450 dependent monooxygenase의 활성도와 hydroxyl radical, lipid peroxide의 생성량을 연관하여 toluene과 xylene의 대사기전을 살펴보면 cytochrome P-450 dependent AHHase에 의해서 benzene ring에 붙어 있는 methyl가 hydroxylation되면서 대사되는 것으로 생각된다.

그러므로 금번 연구결과를 가지고 benzene과 toluene, xylene의 대사기전을 살펴보면 benzene은 radical 반응에 의한, toluene과 xylene은 cytochrome P-450 의존성 AHHase에 의해서 hydroxylation에 의한 1차 변형 후 효소작용에 의해서 대사가 이루어지는 것으로 보인다.

V. 결 론

본 연구는 benzene(B)과 toluene(T), xylene(X)을 단독(B, T, X), 병합(B+T, B+X, T+X), 혼합(B+T+X; M) 투여한 후 이들 유기용제가 체내의 이물질 대사 효소계에 미치는 영향과 상호작용을 보기 위하여 시도하였다.

1. 흰쥐 간장의 microsome에 있어서 cytochrome P-450의 함량은 유기용제 투여군에서 함량의 증가를 보였으며($p < 0.01$), 함량의 증가는 benzene < toluene < 혼합투여군 < 병합투여군(BT=BX) < xylene < 병합투여군(TX) 순으로 측정되었다.

2. Cytochrome P-450 의존성 AHHase의 활성도는 대조군보다 투여군에 있어서의 활성도가 통계학적으로 유의한 증가를 보였으며($P < 0.01$), AHHase의 활성도는 benzene < toluene < 병합투여군(BT=BX=TX) = xylene < 혼합투여군 순으로 측정되었다.

3. NADPH P-450 reductase의 활성도는 대조군에서보다 투여군에 있어서 통계학적인 유의한 증가를 보였으며($p < 0.01$), 혼합투여군 < 병합투여군 < xylene < toluene < benzene 순으로 활성도의 증가를 보였다. 그러나 NADH b_5 reductase 활성도는 NADPH P-450 reductase의 활성도와 상반되는 결과를 보였다.

4. Superoxide dismutase 활성도와 hydroxyl radical, 과산화지질의 함량은 대조군에서보다 투여군에 있어서 통계학적인 유의한 증가를 보였으며($p < 0.01$), 증가는 혼합투여군 < toluene=xylene=병합투여군(BT=BX=TX) < benzene 투여군 순으로 측정되었다.

이상의 결과를 보면, benzene, toluene, xylene의 1차 대사변형 단계에 있어서 다른 대사반응이 진행되는 것으로 생각된다. Benzene은 cytochrome P-450 의존성 radical을 통한 radical 반응에 의한 대사가 이루어지는 반면 toluene과 xylene은 cytochrome P-450 의존성 AHHase에 의해 수산화된 후 대사가 이루어지는 것으로 보인다.

참고문헌

김기웅, 강성규, 최병순, 조영숙, 이세휘, 문영한, 박상신 (1995): Ethanol이 trichloroethylene 대사효소의 활성도와 유도성에 미치는 영향, 예방의학회지, **21**, 141-152.

김기웅, 강성규, 최병순, 이종성, 김종성, 문영한 (1994): Trichloroethylene 처리한 흰쥐의 이물질 대사효소의 활성도에 관한 연구, 대한산업의학회, **6**, 323-331.

박기현 (1986): 생화학총설집. 한국생화학회, **1**, 309-334.

최진호, 김재일, 김동우, 오두환 (1993): 알킨산 첨가 요구르트가 흰쥐의 비만억제와 생리작용에 미치는 영향, 한국노화학회지, **3**, 123-128.

Allemand, H., Pessayer, D., Descatoire, V., Degott, C., Fildmann, G. and Benhamou, J.P. (1987): Metabolic activation of trichloroethylene into a chemically reactive metabolite toxic to the liver. J. Pharmacology. Ther., **204**, 714-723.

Ames, B.N. (1989): Mutagenesis and carcinogenesis. *Environ. Mol. Mutagen.*, **14**, 66-77.

Arinc, E., Adali, O., Iscan, M., Guray, T. (1991): Stimulatory effects of benzene on rabbit liver and kidney microsomal cytochrome P-450 dependent drug metabolizing enzymes. Arch. Toxicol., **65**, 186-190.

Arlien-Soborg, P. (1992): Solvent neurotoxicty. CRC Press Inc., Florida, 61-127.

Clement, B., Jung, F. (1995): N-hydroxylation and N-dealkylation by P4502C3 of N-methyl- benzamidin. N-oxygenation and N-oxydative dealkylation of one functional group. Xenobiotica, **25**, 443-455.

Cockerham, L.G., Shane, B.S. (1994): Basic environmental toxicology, CRC press Inc., Boca Raton, FL, 49-105.

Cohr, K.H., Stokholm, J. (1979): Toluene. a toxicology review. *Scand. J. Work. Environ. Health.*, **5**, 71-90.

Dean, B.J. (1978): Genetic toxicology of benzene, toluene, xylene and phenol. *Mutation. Res.*, **47**, 75-97.

Dean, B.J. (1985): Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylene and phenols. *Mutation. Res.*, **154**, 153-181.

Demopoulos, H.B., Flamm, E., Seligman, M., Pietronigro, D.D. (1982): Oxygen free radicals in central nervous ischemia and trauma. In Autor AP (ed) pathology of oxygen. Academic Press Inc., New York, 127-155.

Gelboin, H.V. (1989): A microsome-dependent binding of benzo(a)pyrene to DNA. *Cancer. Res.*, **29**, 1272-1276.

Guengerich, F.P., Kim, D.H., 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.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1985): The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects. Med.*, **8**, 189-193.

Hultquist, D.E. (1978): Methemoglobin reduction system of erythrocytes. Methods in Enzymol., **52**, 463-473.

Ingelman-Sundberg, M., Hagbjork, A.L. (1982): On the significance of the cytochrome P-450 dependent hydroxy radical-mediated oxygenation mechanism. *Xenobiotica*, **12**, 673-686.

Kamataki, T., Maeda, K., Ishil, K., Yamazoe, Y., Kato, R. (1983): A high spin form of cytochrome P-448 highly purified from PCB-treated rats II. Characteristic requirement of cytochrome b5 for maximum activity. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 2479-2483.

Kasprzak, K.S. (1991): The role of oxidative damage in metal carcinogenicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 604-615.

Lewis, D.F.V. (1995): Three-dimensional models of human and other mammalian microsomal P450s constructed from an alignment with P450102 (P 450_{bm3}). *Xenobiotica*, **25**, 333-366.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 401-404.

Lu, A.Y.H., West, S.B. (1980): Multiplicity of mammalian microsomal cytochromes P-450. *Pharmacol. Rew.*, **31**, 277-295.

Master, B.S.S., Williams, C.H.Jr., Kamin, H. (1987): The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome C reductase from pig liver. *Methods in Enzymol.*, **10**, 565-580.

Miller, R.E., Guengerich, F.P. (1982): Oxidation of trichloroethylene by liver microsomal cytochrome P-450. Evidence for chlorine migration in a transition state not involving trichloroethylene oxide. *Biochemistry*, **21**, 1090-1097.

Moretto, A., Lotti, M. (1990): Exposure to toluene increses the uninary excretion of D-glucaric acid. *Br. J. Ind. Med.*, **47**, 58-61.

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.

Nakajima, T., Wang, R.S., Elovara, E., Park, S.S., Gelboin, H.V., Varinio, H. (1992): A comparative study on the contribution of cytochrome P-450 isozymes to metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 251-257.

Nakajima, T., Wang, R.S., Murayama, N., Sato, A. (1990): Three forms of trichloroethylene metabolizing enzymes in rat liver induced by ethanol, phenobarbital, and 3-methyl- cholanthrene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **102**, 546-552.

Nebert, D.W., Gelboin, H.V. (1988): Substrate inducible microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of the induced enzymes. *J. Biol. Chem.*, **234**, 6242-6249.

Nebert, D.W., Gonzalez, F.J. (1987): P450 Gene. Structure, evoluation and regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 945-993.

Ogata, M., Tomokuni, K., 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**, 43-51.

Okino, T., Nakajima, T., Nakano, M. (1991): Morphological and biochemical analyses of trichloroethylene hepatotoxicy. Differences in ethanol-, and phenobarbital-pretreated rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **108**, 379-389.

Oleinick, N.L., Chiu, S., Ramakrishnan, N., Xue, L.

(1987): The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br. J. Cancer.*, **55**, 135-140.

Omura, T., Sato, R. (1984): The carbon monooxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprtein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.

Osawa, Y., Davila, J.C., Nakatsuka, M., Meyer, C.A. and Darbyshire, J.F. (1995): Inhibition of P450 cytochromes by reactive intermediates. *Drug. Meta. Rew.*, **27**, 61-72.

Oyanagui, Y. (1984): Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.*, **42**, 290-296.

Park, D.V., Williams, R.T. (1953): Studies in detoxication. The metabolism of benzene containing 14C-benzene. *Biochem. J.*, **54**, 231-238.

Park, K.H., Kim, C.R. (1984): Induction of the differenct forms cytochrome P-450 isozymes and comparison of aryl hydrocarbon hydroxylase levels on rat tissues by chemical treatment. *Korean Biochem. J.*, **17**, 10-19.

Pathiratne, A., Puyear, R.L., Brammer, J.D. (1988): A comparative study of the effects of benzene, toluene, and xylenes on their *in vivo* metabolism and drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **82**, 272-280.

Pyykko, K. (1983): Time course of effects of toluene on microsomal enzymes in rat liver, kidney and lung during and after inhalation exposure. *Chem. Biol. Interact.*, **44**, 299-310.

Reynold, E.S., Moslen, M.T. (1977): Damage to hepatic cellular membranes by chlorinated olefins with emphasis on synergism and antagonism. *Environ. Health. Perspect.*, **21**, 137-147.

Rosa, E.D., Bartolucci, G.B., Sigon, M., Callegaro, R., Perbellini, L., Brugnone, F. (1987): Hippuric acid and ortho-cresol as biological indicators of occupational exposure to toluene. *Am J Ind Med.*, **11**, 529-537.

Sabourin, P.J., Bechtold, W.E., Griffith, W.C., Birnbaum, L.S., Lucier, G., Henderson, R.F. (1989): Effect of exposure concentrations, exposure rats, and route of administration on metabolism of benzene by F 344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99**, 421-444.

Toftgard, R., Nilsen, O.G. (1982): Effects of xylene and xylene isomers on cytochrome P-450 and *in vitro* enzymatic activities in rat liver, kidney and lung. *Toxicology*, **23**, 197-212.

Villaverde, C., Alvarez, A.L., Redondo, P., Voces, J., Del Estal, J.L. and Prieto, J.G. (1995): Small intestinal sulphoxidation of Albendazole. *Xenobiotica*, **25**, 433-441.

Yagi, K. (1987): Lipid peroxide and human diseases. *Chem. Physics. Lipids.*, **45**, 337-351.

Yuan, W., White, T.B., White, J.W., Strobel, H.W., Backes, W.L. (1995): Relationship between hydrocarbon structure and induction of P450 effect on RNA levels. *Xenobiotica*, **25**, 9-16.