

흰쥐를 대상으로 벤지딘 노출에 의해 형성된 혈장 단백질 부가체의 생물학적모니터링 적용과 에탄올과 phenobarbital이 미치는 영향

연세대학교 의과대학 산업보건연구소 · 가톨릭대학교 의과대학 예방의학교실¹⁾

김치년 · 이세훈¹⁾ · 노재훈

— Abstract —

The Application of Biological Monitoring and Effects of Ethanol and Phenobarbital on Plasma Protein Adducts Formed in Rats Exposed to Benzidine

Chi-Nyon Kim, Se-Hoon Lee¹⁾, Jaehoon Roh

*Institute for Occupational Health, College of medicine, Yonsei University,
Department of Preventive Medicine, Catholic University¹⁾*

Objectives: The effects of ethanol and phenobarbital, which are known to affect metabolism of xenobiotics, on the formation of benzidine- and its metabolites-plasma protein adducts in rats administered benzidine were evaluated.

Methods: The experimental rats were divided into the control, ethanol and phenobarbital groups. The experimental groups (ethanol and phenobarbital group) were pretreated with ethanol (1g/kg) or phenobarbital (80mg/kg) 24 hours prior to the oral administration of benzidine (0.5mmol/kg). Blood samples were obtained from the vena cava from 5 rats in each group; and at 30 min, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, and 144 h after the administration of benzidine using heparin treated syringes. The plasma protein levels were separated immediately after taking blood samples. The adducts were underwent basic hydrolysis to convert them into aromatic amines. The hydrolyzed benzidine, monoacetylbenzidine, and 4-aminobiphenyl were analyzed by reverse-phased liquid chromatography with an electrochemical detector. The quantitative amount of the metabolites was expressed by the plasma protein binding index(PBI).

Results: Similar to the hemoglobin adducts, the levels of the plasma protein adducts of the ethanol and phenobarbital groups (benzidine-, monoacetylbenzidine-, and 4-aminobiphenyl-PBI) were higher than those of the control group. These results are attributable to the fact that ethanol and phenobarbital induced to the plasma protein adduct formation. The N-acetylation ratio in the control group was highest at 72 h with 2.34. In the ethanol group, it was highest at 72 h with a ratio of 2.46 and was highest in the phenobarbital group at 72 h with a ratio of 2.43. The N-acetylation ratio of the plasma protein adducts was relatively lower than that of the hemoglobin adducts. The level of the plasma protein adduct increased more rapidly than the hemoglobin adducts in all experimental groups regardless of the pretreatment, and decreased rapidly after reaching the maximum level.

Conclusion: The above results indicate that ethanol and phenobarbital increased the level of plasma protein adduct formation. The plasma protein adducts tended to decrease more rapidly than the hemoglobin adducts in the body after benzidine exposure. This results in this study result suggests that the effects of ethanol or phenobarbital need to be considered in the biochemical monitoring, and that the level of the plasma protein adducts be a more proper biomarker than the hemoglobin adducts for assessing the short term exposure to a benzidine and benzidine based dye.

Key Words: Benzidine, Ethanol, Phenobarbital, Plasma protein, Adduct

〈접수일: 2002년 7월 29일, 채택일: 2002년 9월 14일〉

교신저자: 노 재 훈 (Tel: 02-361-5354) E-mail: jhroh@yumc.yonsei.ac.kr

서 론

우리나라는 프랑스, 인도, 폴란드와 함께 벤지딘(benzidine, 이하 BZ) 및 벤지딘계 염료(benzidine based dye)의 주요 생산국으로 알려져 있었다(Meal 등, 1981). 이 중에서 최근에 제조허가 물질인 벤지딘 염산염에 대하여 노동부 산업안전보건법 제37조에 의거 제조·수입·양도·제공 또는 사용을 금지하는 물질로 규정(노동부, 2000)하였으며 미국 산업위생전문가협회(American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH)에서는 노출기준 없이 발암성 물질(A1)로 설정하고 있어(노동부, 1998; ACGIH, 2002) BZ에 대한 유해성은 엄격하게 관리되어지고 있다. 이에 반해 벤지딘계 염료는 기타 분진으로 취급하고 있는 실정이다. 흰쥐의 적출간을 이용하여 벤지딘계 염료인 Direct Black 38을 관류한 결과 BZ와 BZ 대사물질이 검출되었으며(원종욱 등, 1996) 벤지딘계 염료 제조 사업장의 근로자들의 소변에서도 같은 대사물질이 검출되어 건강장해의 위험성을 나타내고 있다(염혜경 등, 1998; Dewan 등, 1988). 또한 BZ와 같이 벤지딘계 직접 아조 염료도 피부로 흡수되어 소변으로 BZ 및 대사물질이 배출되는 것이 확인되었다(Van Duuren, 1980). 따라서 벤지딘계 염료를 제조 및 사용하는 근로자들의 건강장해 평가를 위하여 벤지딘계 염료에 노출후 어느 정도가 BZ로 체내에 흡수되는가를 알아보는 것이 필요하다.

헤모글로빈 부가체는 매우 안정된 상태이기 때문에 혈구세포 수명과 같아(Pereira, 1993) 연속적인 노출에 의하여 누적되는 성질이 있어 1회 노출에 의해 부가체 검출이 어려운 소량의 노출이라도 10일간 연속 노출되면 부가체에 대한 정량분석이 가능하게 된다(Pereira와 Chang, 1981). 이러한 이유로 BZ 및 벤지딘계 염료에 대한 노출평가를 할 때 요중 대사물질을 이용하는 방법(Neumeister, 1991)보다는 헤모글로빈 부가체를 활용하는 것이 유용할 수 있다(Riffelmann 등, 1995; 김치년 등, 2001). 사람의 생체내에서 혈장 단백질이 다른 물질들과 공유결합 한다는 것은 확인되었으며(Sallustio 등, 1997) 혈장 단백질 부가체(plasma protein adduct)를 이용하면 최근 노출에 대한 평가는 가능하다고 알려져

있다(Blondin와 Viau, 1992). 또한 알리지 유발물질인 hexahydrophthalic anhydride의 노출에 의해 형성된 혈장 단백질 부가체가 요중 생물학적 지표의 배설량과 상관성이 높고, benzo(a)pyrene의 노출(Lindh와 Jonsson, 1998)과 trichloroethylene의 노출(Halmes 등, 1997) 그리고 벤젠 노출(Bechtold 등, 1992)의 평가에서 생물학적 지표로 유용하다고 하였다. 그러나 아직까지 BZ 및 벤지딘계 염료의 노출평가 분야에서 헤모글로빈 부가체를 이용한 연구(장규엽 등, 2000; 김치년 등, 2001)는 있었지만 혈장 단백질 부가체와 관련되어 실시한 연구는 없었다.

BZ의 최종 대사물질은 모노아세틸벤지딘(monoacetylbenzidine, 이하 MABZ)과 디아세틸벤지딘(diacetylbenzidine, 이하 DABZ) 그리고 4-아미노비페닐(4-Aminobiphenyl, 이하 4ABP)이다. 이 중 MABZ과 DABZ는 투여량과 상관성이 있게 대사되나 4ABP는 양-반응 관계없이 대사되는 것으로 알려졌다(노재훈 등, 1995; Birner 등, 1990). BZ의 생물학적 주요 대사과정은 N-hydroxylation과 N-acetylation이다. N-hydroxylation은 아민기(amine group)에 수산기(OH)를 부가하는 과정으로 flavin-containing monooxygenase의 역할은 거의 없으며(Windmill 등, 1997), cytochrome P-450이 주요 역할을 담당한다(Stillwell 등, 1997). N-acetylation은 방향족 아민이나 hydroxyamine의 질소와 산소에 아세틸기를 부가하여 수용성을 증가시키는 역할을 한다(Lakshmi 등, 1995). N-hydroxylation에 관여하는 효소는 유전적인 형질 이외에도 체내에 흡수되는 여러 물질들에 의하여 억제되거나(Lakshmi 등, 1997) 유도가 된다(Hsu 등, 1996). 또한 N-acetylation의 경우도 체내에 노출되는 물질에 따라 억제되거나 유도가 된다(Svensson와 Ware, 1993).

혈장 단백질 부가체를 이용한 노출평가를 실용화 하기 위해서는 근로자들이 자주 접하는 약물인 에탄올과 phenobarbital(이하 PB)이 BZ, MABZ 그리고 4ABP와 혈장 단백질에 부가체를 형성하는데 어떠한 영향을 미치는지 평가하는 것이 필요하다. 따라서 본 연구는 혈장 단백질 부가체를 이용한 생물학적 노출평가가 정확하게 이루어지도록 흰쥐를

대상으로 에탄올 또는 PB를 전처치한 경우 BZ 노출에 의해 형성되는 BZ, MABZ, 4ABP의 혈장 단백질 부가체가 어떻게 변하는지 시간 경과에 따라 평가하였다.

연구 방법

1. 실험군 선정 및 혈액시료 채취

생후 7~8주이고, 체중이 230 ± 10 g인 수컷 Sprague-Dawley 계통의 흰쥐들을 에탄올 전처치군(이하 EtOH군), PB 전처치군(이하 PB군) 그리고 전처치가 없는 대조군으로 분류하였다. 에탄올 전처치 용량은 흰쥐의 경구 LD50인 10.81 g/kg body weight의 약 1/10에 해당하는 1 g/kg body weight로 결정하였으며(Verschueren, 1983) PB의 전처치 용량은 80 mg/kg body weight로 하여 증류수 10 ml/kg body weight에 희석하여 경구 투여하였다(이경중 등, 1993). BZ의 투여용량은 헤모글로빈 부가체 형성 결과(김치년 등, 2001)와 비교하기 위하여 같은 1회 경구 투여 용량인 0.5 mmol BZ/kg body weight를 1,2-propanediol(Sigma, St. Louis, Missouri)에 녹여 투여하였다.

에탄올과 PB 그리고 BZ의 경구투여 및 시료채취는 실험동물 연구소(Institute of laboratory animal research, ILAR)의 사용기준에 적합한 수술

실에서 실시하였다(NIH, 1996). 혈액시료 채취는 BZ을 투여하기 전과 투여 후 30분, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 144시간에서 각 군당 5마리의 흰쥐를 대상으로 해파린을 처리한 주사기로 하대정맥에서 채취하였다. 채취한 혈액 시료는 즉시 실험실에서 혈장을 분리하였다.

2. 실험방법

혈액시료에서 혈장 단백질을 분리하고, EtOH를 넣어 혈장 단백질을 응고시켰다. 가수분해는 혈장 단백질 일정량을 취하여 0.05% SDS(sodium dodecylsulfate, Research Organics Inc, Cleveland, Ohio) 용액 10 ml로 녹여 1시간 동안 흔들어서 염기 가수분해한 후 C18 Sep-pak을 통과시켜 농축 및 정제과정을 Sabbioni와 Neumann(1990)의 방법으로 실시하였다. BZ, MABZ 그리고 4ABP의 분석은 분리도 및 감도를 높이기 위하여 lithium chloride를 이동상에 첨가하여 고성능 액체크로마토그래프(Gilson 715 system, GILSON, Villier le Bel, France)-전기화학검출기(ICA-5212, TOA Electronics, Tokyo, Japan)를 이용하였다(Concialini 등, 1983). 표준물질로 사용할 MABZ은 합성을 하였으며(Birner와 Neumann, 1988) BZ와 MABZ은 이동상을 0.2% lithium chloride

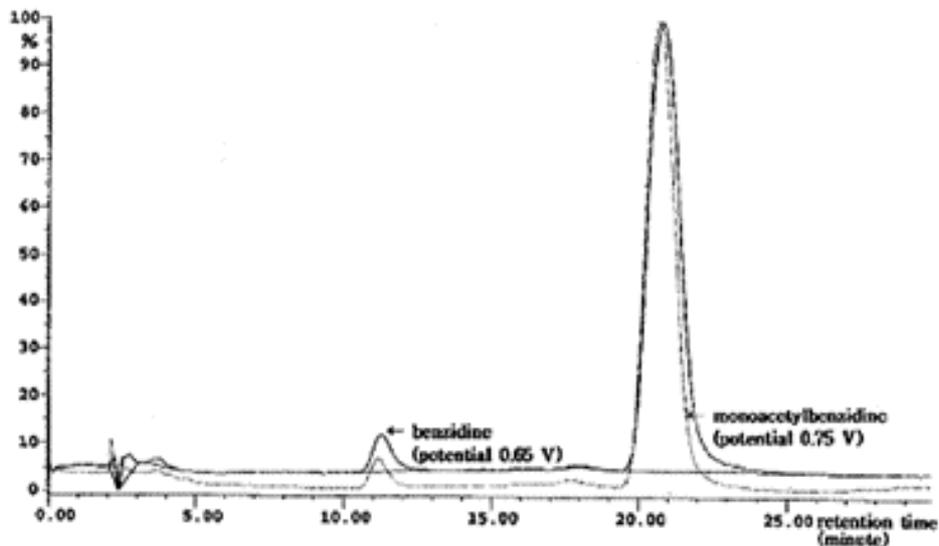


Fig. 1. Chromatogram of benzidine and monoacetylbenzidine by HPLC-ECD(two channel electrode)

와 methanol(70:30)으로 하고 C18 컬럼(HAISIL HL C₁₈, 5 μm, 250×4.6 mm, Higgins Analytical, Mountain View, California)으로 분석하였지만(Fig. 1) 4ABP는 이동상을 0.2% lithium chloride와 methanol(50 : 50)으로 하고 C8 컬럼(HAISIL HL C₁₈, 5 μm, 250×4.6 mm, Higgins Analytical, Mountain View, California)으로 별도의 조건으로 분석하였다(Fig. 2). 따라서 전기화학 검출기의 분석감도를 높이기 위한 voltammogram도 다르게 작성되어 BZ에 적합한 전위값(potential value)은 0.65 V, MABZ은 0.75 V 그리고 4ABP는 0.85 V이었다. 각 분석법의 검출한계는 미국 산업안전보건연구소(national institute for occupational safety and health, NIOSH)에서 제시한 방법에 따라 계산하였으며(NIOSH, 1995) BZ의 검출한계는 1.82 ng/ml, MABZ은 1.54 ng/ml 그리고 4ABP는 0.2 ng/ml이었다.

3. 평가방법

혈장 단백질 부가체 형성을 같은 조건으로 비교하기 위하여 분석결과를 혈장 단백질 결합지수(plasma protein binding index, 이하 PBI)로 표현하였다. PBI는 1 g의 혈장 단백질에 결합된 BZ, MABZ 그리고 4ABP의 nmol 수를 BZ의 투여용량으로 나눈 값으로 간단히 표현하면 다음과 같다.

$$PBI = (\text{nmol cleavage product/g plasma protein}) / (\text{mmol benzidine/kg body weight}).$$

BZ을 경구 투여하여 생성된 혈장 단백질 부가체가 에탄올과 PB에 어떠한 영향을 받았는지 알아보기 위하여 혈장 단백질에 결합된 BZ, MABZ, 4ABP를 대상으로 EtOH군, PB군, 대조군간에 시간대별로 생성된 양이 차이를 Kruskal-Wallis test로 평가하였다. 그러나 Kruskal-Wallis test의 경우 다중비교를 할 수 없기 때문에 어느 군과 차이가 있는지 알아보기 위하여 결과치를 순위 변환한 후 분산분석의 다중비교 방법인 Tukey 방법을 이용하였다. 또한 BZ을 경구 투여한 후 시간에 따라 헤모글로빈 부가체와 혈장 단백질 부가체의 분포를 알아보기 위하여 같은 용량으로 투여한 후 형성된 헤모글로빈 부가체 결과(김치년 등, 2001)와 시간에 따른 변화양상을 비교하였다.

결 과

1. 에탄올과 phenobarbital이 혈장 단백질 부가체 형성에 미치는 영향

BZ을 투여하기 전에 채취한 시료에서는 혈장 단백질 부가체가 검출되지 않았다. 대조군, EtOH군 그리고 PB군의 시간 경과에 따른 혈장 단백질 부가체들의 형성을 BZ-PBI(BZ가 혈장 단백질과 결합한

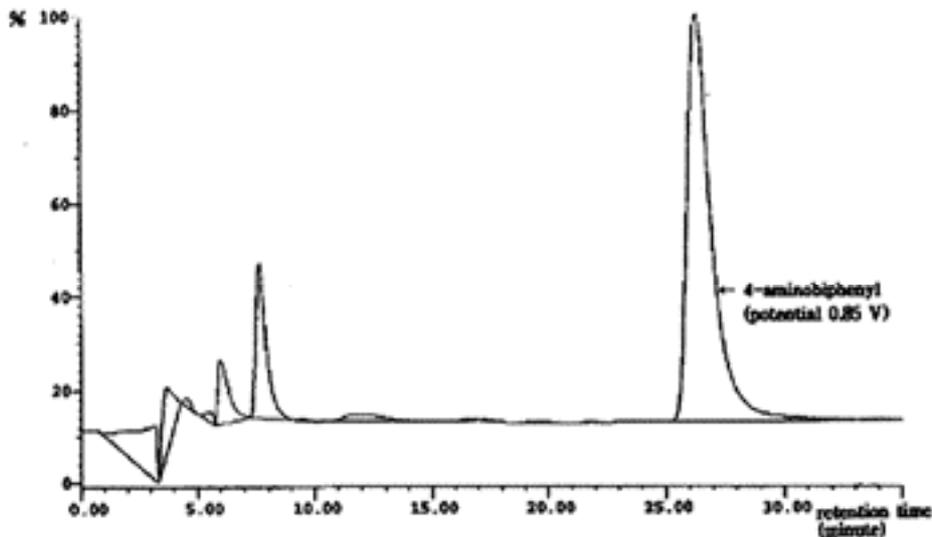


Fig. 2. Chromatogram of 4-aminobiphenyl by HPLC-ECD

지수), MABZ-PBI(MABZ가 혈장 단백질과 결합한 지수), 4ABP-PBI(4ABP가 혈장 단백질과 결합한 지수)를 비교하였다(Table 1).

BZ-PBI의 경우 0.5시간과 144시간에서는 대조군이 EtOH군과 PB군보다 높았다(P<0.05). 그러나 3시간에서 72시간까지는 EtOH군 또는 PB군이 대조군보다 높은 경향이였으며 EtOH군은 6시간, 9시간, 12시간, 24시간, 48시간에서 유의하게 높았고 PB군은 3시간, 9시간, 24시간, 48시간, 72시간에서 높았다(P<0.05).

MABZ-PBI의 경우 3시간까지는 대조군이 EtOH군과 PB군보다 높았으나(P<0.05) 6시간부터 96시간까지는 EtOH군 또는 PB군이 대조군보다 평균 MABZ-PBI가 높은 경향이였다. EtOH군은 24시간 그리고 PB군은 12시간, 24시간, 48시간, 72시간에서 유의하게 높았다(P<0.05).

4ABP-PBI는 3시간까지 대조군이 높았으나(P<0.01) 6시간부터 96시간까지는 EtOH군 또는 PB군이 대조군보다 높은 경향이였다.

2. 에탄올과 phenobarbital이 N-acetylation에 미치는 영향

혈장 단백질 부가체에서 일어나는 N-acetylation이 EtOH와 PB에 의하여 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위하여 시간에 따라 N-acetylation의 비로 평가하였다. N-acetylation 비는 각 군의 MABZ-PBI를 BZ-PBI로 나누어 계산을 하였다(Zwirner-Baier와 Neumann, 1998). 시간에 따른 N-acetylation 비는 대조군, EtOH군, PB군 모두 큰 차이는 없었다(Fig. 3).

대조군은 BZ 투여 후 9시간까지 N-acetylation의 비가 1 이하였으며 72 시간에서 2.34로 가장 높게 나타났다. EtOH군은 12시간까지 N-acetylation의 비가 1 이하였으며 24시간 이후부터 1 이상이었다. 가장 높은 비를 나타낸 것은 72 시간에서 2.46이었다. PB군은 대조군과 동일하게 투여 후 9시간까지 N-acetylation의 비가 1 이하였으며 72 시간에서 2.43으로 가장 높게 나타났다.

3. 혈장 단백질 부가체와 헤모글로빈 부가체형성의 시간별 변화

시간에 따라 헤모글로빈과 혈장 단백질 부가체의

Table 1. Plasma protein binding index of cleavage products by ethanol or phenobarbital pretreatment 24 hr before benzidine administration in rat

| Time (hr) | BZ-PBI [†] | | | MABZ-PBI [‡] | | | 4ABP-PBI [§] | | |
|-----------|-----------------------|-------------------|------------------|-----------------------|--------------|----------------|-----------------------|-------------|---------------|
| | control | EtOH [¶] | PB ^{**} | control | EtOH | PB | control | BZ-EtOH | BZ-PB |
| 0.5 | 9.57±1.482 | 2.476±2.476 | 5.416±0.374** | 4.198±0.776 | 0.459±0.464 | 2.016±0.239** | 0.215±0.078 | ND | ND** |
| 3 | 31.918±2.319 | 7.500±2.419 | 32.762±0.836** | 8.847±2.262 | 5.284±0.968 | 7.854±1.293* | 0.936±0.411 | ND | 0.298±0.096** |
| 6 | 27.769±2.188 | 29.776±2.773 | 24.7508±2.270* | 9.306±2.509 | 10.379±2.417 | 10.541±1.916 | 1.861±0.584 | 2.269±0.699 | 0.746±0.239** |
| 9 | 17.139±1.587 | 26.050±2.506 | 24.226±2.593** | 10.650±2.051 | 13.929±1.236 | 13.925±3.866 | 0.596±0.184 | 3.560±1.022 | 2.999±0.862** |
| 12 | 9.607±0.909 | 19.053±1.716 | 14.132±1.316** | 11.918±1.933 | 14.819±1.109 | 16.175±3.734* | 0.625±0.154 | 0.417±0.378 | 0.669±0.234 |
| 24 | 7.162±1.230 | 12.012±0.730 | 11.551±0.988** | 13.398±1.040 | 16.545±1.051 | 20.582±2.591** | 0.250±0.122 | 0.407±0.131 | 0.524±0.196 |
| 48 | 7.251±1.337 | 9.980±0.549 | 10.485±0.870** | 15.398±1.974 | 15.449±1.232 | 21.619±2.713** | 0.159±0.136 | 0.152±0.250 | 0.274±0.122 |
| 72 | 5.781±1.318 | 4.317±0.680 | 9.679±1.746** | 13.516±2.726 | 10.601±1.540 | 23.534±3.451** | 0.102±0.091 | 0.238±0.228 | 0.322±0.346 |
| 96 | 4.679±0.566 | 4.126±0.588 | 3.847±0.484 | 8.259±4.499 | 7.363±3.143 | 8.492±1.166 | 0.036±0.033 | 0.138±0.111 | |
| 144 | 3.691±0.390 | 2.686±0.442 | 2.461±0.490* | 4.676±1.754 | 2.342±1.150 | 2.155±0.952 | 0.063±0.035 | 0.030±0.053 | ND***, p<0.01 |

[†] BZ-PBI : (mmole benzidine/g plasma protein)/(mmole benzidine/kg body weight)

[‡] MABZ-PBI : (mmole monoacetylbenzidine/g plasma protein)/(mmole benzidine/kg body weight)

[§] 4ABP-PBI : (mmole 4-aminobiphenyl/g plasma protein)/(mmole benzidine/kg body weight)

^{||} control : no pretreatment, administration of 0.5 mmole benzidine/kg body weight only

[¶] EtOH : pretreatment of 1 g EtOH/kg body weight

^{**} PB, pretreatment of 80 mg phenobarbital/kg body weight

* P<0.05 ** P<0.01 by Kruskal-Wallis test of each group; ND: not detected; Mean±SD (N=5)

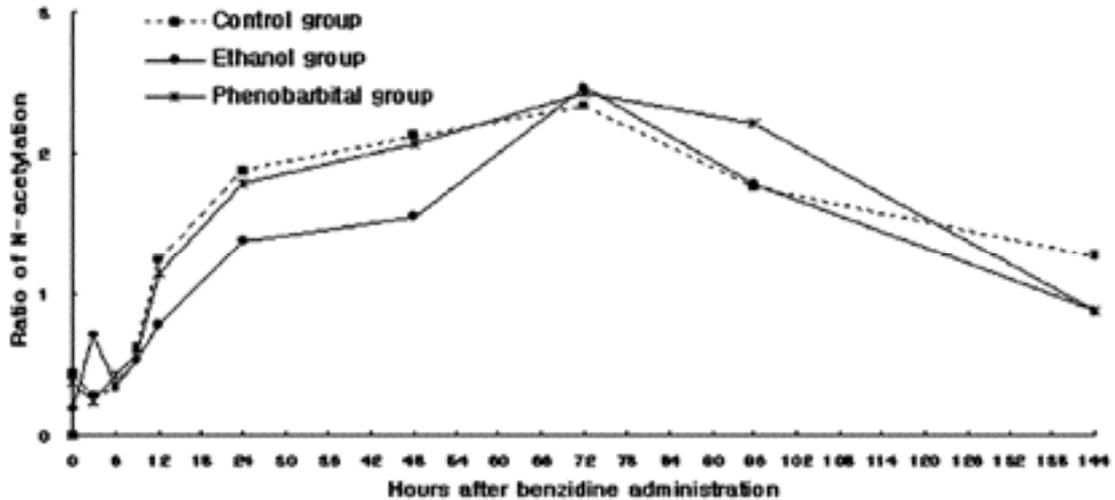


Fig. 3. The ratio of N-acetylation(plasma protein binding index of monoacetylbenzidine / plasma protein binding index of benzidine) by ethanol or phenobarbital pretreatment 24 hr before benzidine administration in rat

분포를 알아보기 위하여 같은 용량으로 BZ을 경구 투여한 후 나타난 헤모글로빈 결합지수(hemoglobin binding index, 이하 HBI)의 결과(김치년 등, 2001)와 본 연구 결과인 PBI를 비교하였다. HBI는 1 mol의 헤모글로빈에 결합된 BZ, MABZ, 4ABP의 mmol 수를 BZ의 투여용량으로 나눈 값이며 PBI는 1 g의 혈장 단백질에 결합된 BZ, MABZ 그리고 4ABP의 nmol 수를 BZ의 투여용량으로 나눈 값이기 때문에 양적으로 직접 비교할 수 없으며 단지 시간에 따른 변화양상만으로 헤모글로빈 부가체와 혈장 단백질 부가체 형성을 비교하였다.

1) 각 군의 BZ-PBI와 BZ-HBI의 비교

대조군의 BZ-PBI는 3시간에서, BZ-HBI는 24시간에 최고 수준이 나타나 PBI가 빠르게 증가하였으며 감소하는 경향도 BZ-HBI보다 BZ-PBI가 빠르게 이루어졌다. EtOH군의 경우도 최고 수준 도달 시간이 BZ-PBI는 6시간, BZ-HBI는 24시간에서 나타나 차이가 있었으며 BZ-PBI가 BZ-HBI보다 빠르게 감소하는 경향이 있었다. PB군도 최고 BZ-PBI는 3시간에서 나타났고 BZ-HBI는 24시간에서 나타나 많은 차이가 있었으며 BZ-PBI가 BZ-HBI보다 빠르게 감소하는 경향이 있었다(Fig. 4).

2) 각 군의 MABZ-PBI와 MABZ-HBI의 비교

대조군의 MABZ-PBI와 MABZ-HBI는 최고 수준 도달 시간이 48시간으로 같았지만 최고 수준 도달 후 MABZ-PBI가 MABZ-HBI보다 빠르게 감소하는 경향이 있었다. EtOH군도 같은 경향이 있었다. PB군의 MABZ-HBI와 MABZ-PBI는 모두 72시간에서 최고수준이 나타났으나 감소는 MABZ-PBI가 MABZ-HBI보다 빠르게 감소하는 경향이 있었다(Fig. 5).

3) 각 군의 4ABP-PBI와 4ABP-HBI의 비교

대조군의 4ABP-PBI는 0.5시간부터 그리고 4ABP-HBI는 3시간부터 검출되었다. 최고 4ABP-PBI는 6시간에서 나타났고 4ABP-HBI는 48시간에서 나타나 최고 수준에 도달하는 시간에 많은 차이가 있었다. 최고 수준 도달 후 4ABP-PBI는 빠르게 감소하는 경향이 있었다. BZ-EtOH군의 4ABP-HBI는 3시간부터 그리고 4ABP-PBI는 6시간부터 검출되었다. EtOH군의 최고 4ABP-PBI는 9시간에서 나타났고 4ABP-HBI는 48시간에서 나타나 최고 수준에 도달하는 시간에 많은 차이가 있었으며 4ABP-PBI가 4ABP-HBI보다 빠르게 감소하는 경향이 있

김치연 등 · 흰쥐를 대상으로 벤지딘 노출에 의해 형성된 혈장 단백질 부가체의 생물학적모니터링 적용과 에탄올과 phenobarbital이 미치는 영향

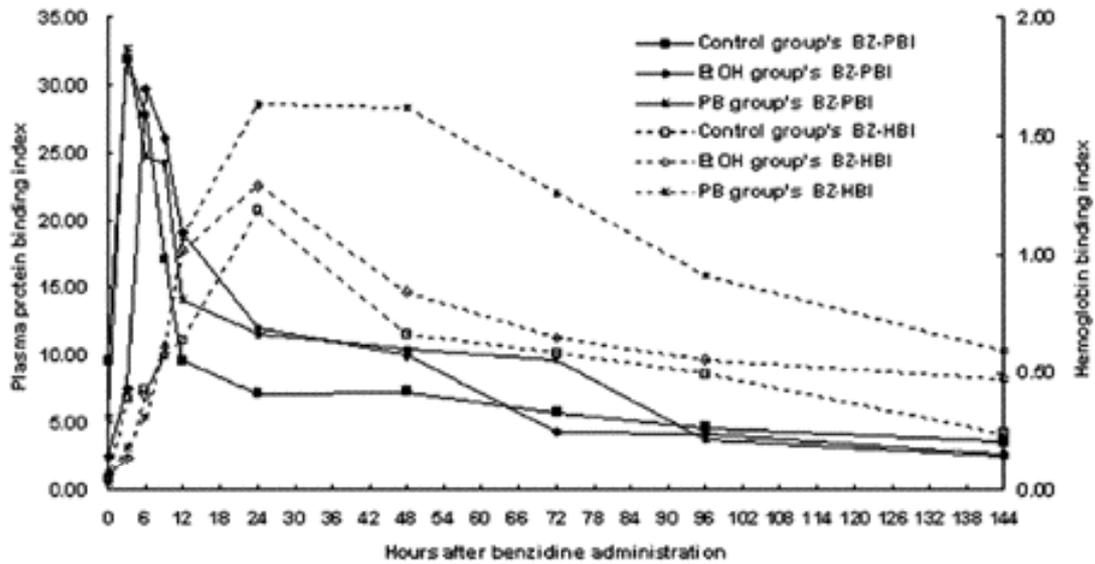


Fig. 4. The comparison of benzidine-plasma protein binding index(BZ-PBI) to benzidine-hemoglobin binding index(BZ-HBI) after benzidine administration in rat

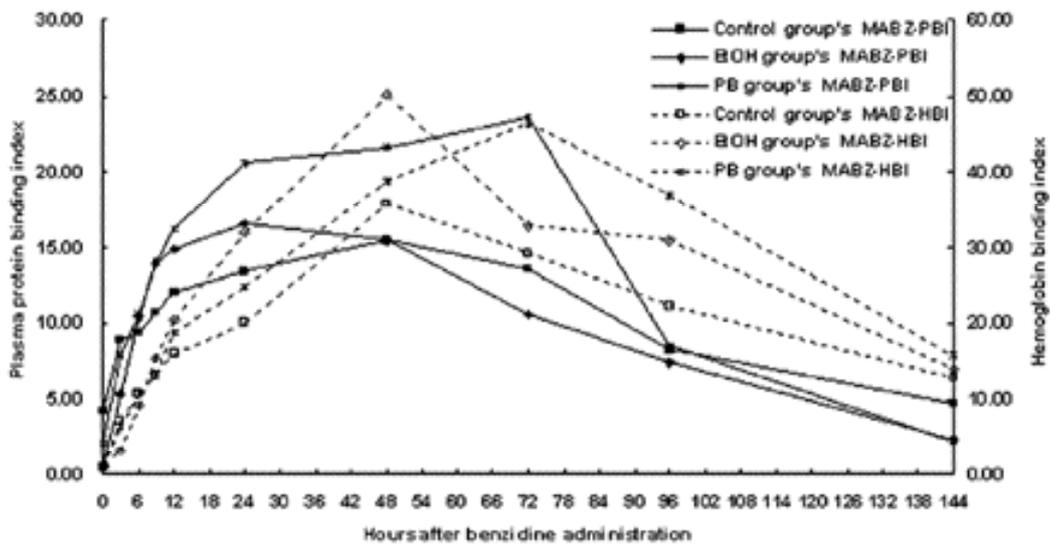


Fig. 5. The comparison of monoacetylbenzidine-plasma protein binding index(MABZ-PBI) to monoacetylbenzidine-hemoglobin binding index(MABZ-HBI) after benzidine administration in rat

었다. PB군의 4ABP-PBI와 4ABP-HBI 모두는 3 시간부터 검출되었으며 PB군의 최고 4ABP-PBI는 9시간에서 나타났고 4ABP-HBI는 48시간에서 나타나 최고 수준에 도달하는 시간에 많은 차이가 있었다. 최고 수준 도달 후 4ABP-PBI는 4ABP-HBI보다 빠르게 감소하는 경향이 있었다(Fig. 6).

고 찰

부가체(adduct)의 정의는 xenobiotics 또는 xenobiotics의 활성화 물질이나 대사물질이 생물학적 거대분자(biomacromolecules)와 공유결합을 하

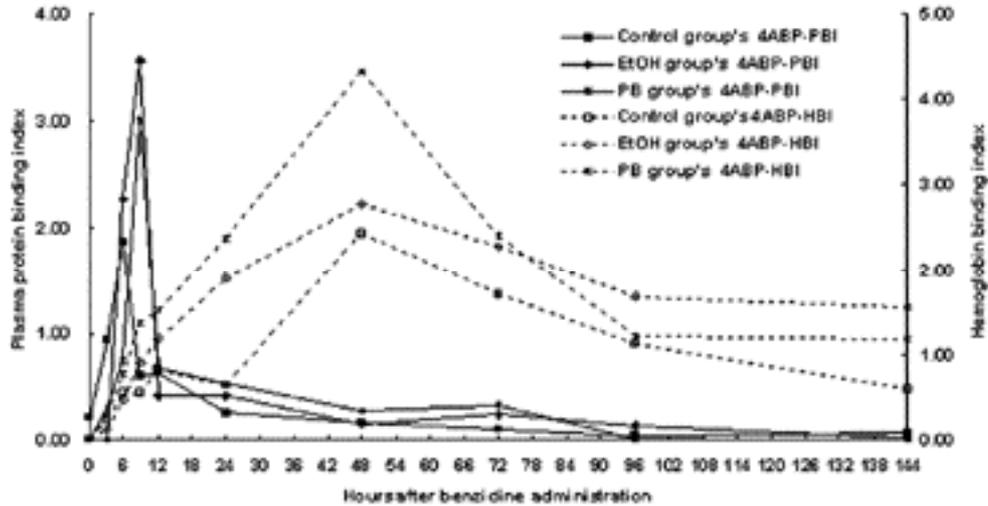


Fig. 6. The comparison of 4-aminobiphenyl-plasma protein binding index(4ABP-PBI) to 4-amino-biphenyl-hemoglobin binding index(4ABP-HBI) after benzidine administration

여 변형된 거대분자를 의미한다(Que Hee, 1993). 정상적인 적혈구 용적은 혈액의 단위 부피당 농축된 적혈구 부피로 남성은 40-50% 그리고 여성 35-45%로 많은 양이 존재하고 있다. 혈장은 그 부피의 10%가 분자량이 크거나 작은 물질로 구성된 수용액이다. 10% 중 혈장 단백질은 7%이며 구성요소는 알부민과 알파, 베타, 감마 글로불린 그리고 섬유소원이다. 이 중 주성분은 알부민이다(Junqueira et al, 1995). 따라서 혈장 단백질의 부가체는 대부분이 알부민과 결합된 형태이다(Podolsky & Isselbacher, 1998).

혈장 단백질 부가체를 일반적인 생물학적 지표로 활용하기 위해서는 혈장 단백질 부가체가 형성될 때 다른 물질들에 의하여 어떠한 영향을 받는지 평가하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 에탄올과 PB가 BZ 노출에 의하여 형성되는 혈장 단백질 부가체 어떠한 영향을 주는지 알아보았다. BZ를 투여하기 전 에탄올을 전처치한 EtOH군 또는 phenobarbital을 전처치한 PB군의 평균 BZ-PBI는 0.5시간, 3시간, 144시간을 제외하고는 대조군보다 전체적으로 높은 경향을 보였다. 평균 MABZ-PBI도 0.5시간, 3시간, 144시간을 제외하고 그리고 평균 4ABP-PBI도 0.5시간, 3시간을 제외하고 EtOH군 또는 PB군이 높은 경향을 보였다. 이러한 양상은 같은 용량의 BZ

를 투여한 후 헤모글로빈과 결합된 BZ-, MABZ-, 4ABP-HBI 결과(김치년 등, 2001)와 유사한 양상이었다. 따라서 에탄올과 PB는 BZ 노출에 의하여 형성되는 헤모글로빈 부가체 뿐만 아니라 혈장 단백질 부가체도 증가시킨다.

혈장 단백질 부가체에서 일어나는 N-acetylation을 상대적으로 평가하기 위하여 각군의 MABZ-PBI를 BZ-PBI로 나누어 N-acetylation 비를 시간에 따라 구하였다. 대조군, EtOH군, PB군 모두 최고의 N-acetylation 비가 BZ 투여 후 72시간에서 나타났으며 시간에 따른 비의 변화도 유사하였다. 그러나 헤모글로빈 부가체의 경우는 전처치에 따라 비의 변화양상이 다르게 나타났다. 또한 헤모글로빈 부가체의 N-acetylation 비는 투여 후 144시간까지 10보다 크게 나타났으나 혈장 단백질 부가체의 경우는 대조군은 12시간 이후부터 EtOH군과 PB군은 24시간 이후부터 1보다 크게 나타났으며 최고수준도 모든 군이 2.5를 넘지 않았다.

본 연구에서는 1회 경구 투여 후에 형성된 평균 HBI와 PBI를 경과 시간에 따라 비교하였다. BZ 만을 투여한 대조군의 BZ-, MABZ-, 4ABP-PBI는 각각의 HBI보다 빠른 시간이나 같은 시간에 최고 수준에 도달하였고 빠르게 감소하였다. EtOH군과 PB군의 모든 PBI도 HBI 보다 최고 수준에 빠르게

도달하였고 감소도 빠르게 이루어졌다. 이러한 결과들을 종합하면 에탄올과 PB의 전처치와 상관없이 일반적으로 혈장 단백질 부가체의 형성이 헤모글로빈 부가체 형성보다 빠르게 감소하는 경향이 있었다. 이것은 BZ이 체내에 흡수되어 혈장 단백질에 먼저 부가체 형성을 하고 헤모글로빈 부가체의 수명이 적혈구 세포 수명과 동일하기 때문에 혈장 단백질 부가체가 빠르게 감소한 것이다. 혈장 단백질 부가체의 경우 MABZ-PBI를 제외하고는 모든 실험군에서 24시간 이전에 감소하기 시작하였다. 이러한 감소 경향은 Birner 등(1990)의 연구결과와 같았다. 이것은 헤모글로빈 부가체는 누적효과가 있지만 (Segerback 등, 1978) 혈장 단백질의 부가체에서는 누적 효과가 적다는 것을 의미한다. 또한 다른 물질과 결합된 혈장 알부민 부가체는 정상 알부민에 비교하면 간이나 신장에서 빨리 제거되기 때문에 안정하지 못하다는 연구도 있었다(Thakore 등, 1994). 따라서 저농도로 장기간 노출되는 발암성물질을 평가하는 경우는 혈장 단백질보다 헤모글로빈 부가체를 이용하는 것이 적합하다. 그러나 단시간 동안의 노출평가가 필요한 경우는 혈장 단백질을 이용하는 것이 유용할 수도 있다.

요 약

목 적 : 에탄올 또는 phenobarbital을 섭취한 근로자들이 벤지딘 및 벤지딘계 염료에 노출되는 경우 혈장 단백질 부가체를 이용한 생물학적 노출평가가 정확하게 이루어지도록 흰쥐를 대상으로 대사에 영향을 주는 물질로 알려진 에탄올과 phenobarbital이 벤지딘 투여시 혈장 단백질 부가체 형성에 미치는 영향을 파악하고 N-acetylation에 미치는 영향도 함께 평가하였다.

방 법 : 실험 대상인 흰쥐를 대조군, 에탄올 전처치군, phenobarbital 전처치군으로 분류하여 벤지딘을 투여하기 24시간 전에 에탄올과 phenobarbital을 전처치하였다. 혈액시료 채취는 투여전과 투여 후 30분, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 144시간에서 각 군을 대상으로 5마리를 대상으로 실시하였다. 채취한 혈액은 즉시 혈장을 분리하고 부가체를 염기 가수분해하여 방향족 아민의 형태로 전환시켰다. 가수분해한 벤지딘, 모노아세틸벤지딘 그리고

4-아미노비페닐을 유도체화 과정 없이 역상 액체크로마토그래프를 이용하여 분리하였으며, 그 물질들은 선택성과 감도가 높은 전기화학검출기로 정량분석하였다. 분석한 대사산물은 혈장 단백질 결합지수와 N-acetylation 비로 표현하였다.

결 과 : 에탄올 또는 phenobarbital 전처치군의 벤지딘-혈장 단백질 결합지수, 모노아세틸벤지딘-혈장 단백질 결합지수, 4-아미노비페닐-혈장 단백질 결합지수가 대조군보다 높아 에탄올 또는 phenobarbital이 혈장 단백질의 부가체 형성을 증가시키는 역할을 하였다.

혈장 단백질 부가체에서 일어나는 N-acetylation은 전처치에 상관없이 모든 군에서 유사하게 나타났으며 헤모글로빈 부가체의 경우와는 다르게 N-acetylation이 적게 이루어졌다. 헤모글로빈 부가체에서는 4-nitroso-4'-N-acetylbiphenyl이 가장 많이 형성되었지만 혈장 단백질에는 다른 양상이었으며 에탄올이 방향족 아민류와 함께 노출이 되면 N-acetylation이 증가한다는 효과도 적었다. 또한 1회 경구 투여 후에 형성된 혈장 단백질 부가체는 전처치헤모글로빈 부가체보다 빠르게 증가하고 감소하는 경향이 있었다.

결 론 : 에탄올과 phenobarbital은 벤지딘 투여에 의해 형성되는 혈장 단백질 부가체를 증가시켰다. 그러나 헤모글로빈 부가체와는 다르게 N-acetylation을 증가하는 경향은 없었다. 혈장단백질 부가체는 벤지딘 노출에 대한 누적효과가 헤모글로빈 부가체보다 상대적으로 적었다. 따라서 벤지딘 노출근로자들을 대상으로 혈장 단백질 부가체를 생물학적 모니터링으로 이용할 때는 에탄올이나 phenobarbital에 대한 영향을 고려하는 것이 필요하며 최근에 대한 노출평가에만 활용되는 것이 바람직하다.

참고문헌

- 김치년, 이세훈, 김현수, 윤영식, 노재훈. 흰쥐에서 에탄올과 phenobarbital이 벤지딘 헤모글로빈 부가체 형성에 미치는 영향. 한국산업위생학회지 200;11(2):118-125.
- 노동부. 유해물질의 허용농도, 서울, 노동부고시 제 97-65호, 1998.
- 노동부. 산업안전보건법. 노동부; 2000.
- 노재훈, 원종욱, 김치년, 김현수, 전미령. 벤지딘 및 벤지딘계 염료(Direct Black 38) 요증 대사물질에 관한 연

- 구. 한국산업위생학회지 1996;6(1):156-164.
- 염혜경, 송재석, 김치년, 원종욱, 노재훈. 벤지딘 염산염 및 염료 제조 근로자들의 피부노출 평가. 대한 산업의학 회지 1998;10(1):83-93.
- 원종욱, 노재훈, 김춘성, 박윤정, 김치년. 흰쥐 적출간 관 류법을 이용한 벤지딘계 염료 Direct Black 38의 대사. 대한산업의학회지 1996;8(1):59-65.
- 이경종, 노재훈, 김치년, 조명화, 문영한. 흰쥐에 있어서 Ethanol과 Phenobarbital이 트리클로로에틸렌 대사에 미치는 영향. 대한산업의학회지 1993;5(1):76-88.
- 장규업, 이경종, 김치년, 윤영식, 노재훈. 헤모글로빈 부가 체를 이용한 염료제조 근로자의 노출평가. 한국산업위생 학회지 2000; 10(2): 124-139.
- ACGIH. Threshold limit values and biological exposure indices for 2002: Cincinnati, ACGIH, 2002.
- Bechtold WE, Willis JK, Sun JD, Griffith WC, Reddy TV. Biological markers of exposure to benzene:S-phenylcysteine in albumin. Carcinogenesis 1992;13(7):1217-1220.
- Birner G, Albrecht W, Neutmann HG. Biomonitoring of aromatic amines III: Hemoglobin binding of benzidine and some benzidine congeners. Arch Toxicol 1990;64:97-102.
- Blondin O, Viau C. Benzo(a)pyrene-blood protein adducts in wild woodchucks used as biological sentinels of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. Arch Environ Contam Toxicol 1992;23(3):310-315.
- Concialini V, Chiavari G, Viyali P. Electrochemical detection in high-performance liquid chromatographic analysis of aromatic amines. J Chromatogr 1983;258:244-251.
- Dewan A, Jani JP, Pater JS, Gandhi DN, Variya MR, Ghodasara NB. Benzidine and its acetylated metabolites in the urine of workers exposed to direct black 38. Arch Environ 1988; 43(4):269-272.
- Elizabeth A, Lane SG, Markku L. Effects on ethanol on drug and metabolite pharmacokinetics. Clin pharmacol 1985;10:228-247.
- Halmes NC, Perkins EJ, McMillan DC, Pumford NR. Detection of trichloroethylene-protein adducts in rat liver and plasma. Toxicol Lett 1997;92(3):187-194.
- Hsu FF, Lakshmi V, Rothman N, Bhatnager VK, Hayes RB, Kashyap R, Parikh DJ, Turk J, Zenser T, Davis B. Determination of benzidine, N-acetylbenzidine, and N,N'-diacetylbenzidine in human urine by capillary gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. Anal Biochem 1996;234:183-189.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic histology. 8th rev. ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1995.
- Lakshmi VM, Zenser TV, Goldman HD, Spencer GG, Gupta RC, Hsu FF, Davis BB. The role of acetylation in benzidine metabolism and DNA adduct formation in dog and rat liver. Chem Res Toxicol 1995;8:711-720.
- Lakshmi VM, Zenser TV, Davis BB. Rat liver cytochrome P450 metabolism of N-acetylbenzidine and N,N'-diacetylbenzidine. Am Soci Pharmacol Experi Thera 1997;25(4):481-488.
- Lindh CH, Jonsson BA. human hemoglobin adducts following exposure to hexahydrophthalic anhydride and methylhexahydrophthalic anhydride. Toxicol Appl Pharmacol 1998;153(2):152-160.
- Meal PF, Cocker H, Wilson HK, Gilmour JM. Search for benzidine and its metabolites in urine of workers weighing benzidine-derived dyes. Brit J Indust Med 1981;38:191-193.
- Neis JM, Brommelstroet BWJ, Gemert PJJ, Roelofs HMJ, Henderson PT. Influence of ethanol induction on the metabolic activation of genotoxic agents by isolated rat hepatocytes. Arch Toxicol 1985;57:217-221.
- Neumeister CE. Analysis of urine to monitor exposures to benzidine, o-dianisidine, o-tolidine, and 4,4'-methylenedianiline. Appl Occup Environ Hyg 1991;6(1):953-958.
- NIOSH. Guidelines for air sampling and analytical method development and evaluation: Cincinnati: Ohio, 1995:65-66.
- NIH. Institute of laboratory animal resource. Guide for the care and use of laboratory animals: 7th ed. National Academy Press, 1996.
- Pereira MA, Chang LW. Binding of chemical carcinogens and mutagens to rat hemoglobin. Chem Biol Interact 1981;33:301-305.
- Pereira MA. Hemoglobin binding as a dose monitor for human exposure to carcinogens and mutagens. In: Que Hee SS, editor. Biological monitoring: An introduction. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993:332-338.
- Que Hee SS, editor. Biological monitoring: An introduction. New York: Van Nostrand

- Reinhold, 1993.
- Podolsky DK, Isselbacher KJ. Derangements of hepatic metabolism. In: Harrison, editor. Harrison's principles of internal medicine. McGraw-Hill. 1998.
- Riffelmann M, Muller G, Schmieding W, Popp W, Norpoth K. Biomonitoring of urinary aromatic amines and arylamine hemoglobin adducts in exposed workers and nonexposed control persons. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 68:36-43.
- Sabbioni G, Neumann HG. Biomonitoring of arylamines: hemoglobin adducts of urea and carbamate pesticides. *Carcinogenesis* 1990;11(1):111-115.
- Sallustio BC, Fairchild BA, Pannall PR. Interaction of human serum albumin with the electrophilic metabolite 1-O-gemfibrozil-beta-D-glucuronide. *Drug Metabol Dispos* 1997;25(1):55-60.
- Segeberback D, Calleman CJ, Ehrenberg L, Lofroth G, Osterman-Golkar S. Evaluation of genetic risks of alkylated amino acids in hemoglobin as a measure of the dose after treatment of mice with methyl methanesulfonate. *Mutat Res* 1978;49:71-82.
- Stillwell WG, Kidd LCR, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Sinha R. Urinary excretion of unmetabolized and phase II conjugates of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in humans: relationship to cytochrome P4501A2 and n-acetyltransferase activity. *Cancer Res* 1997;3457-3464.
- Svensson CK, Ware JA. Effect of solvents on rat liver cytosolic acetyl CoA: arylamine N-acetyltransferase activity in vitro. *Res Com Chem Path Pharmacol* 1993; 79(1): 21-124.
- Thakore KN, Gan JC, Ansari GA. Rapid plasma clearance of albumin-acrolein adduct in rats. *Toxicol Lett* 1994;71(1):27-37.
- Vann Duuren BL. Carcinogenicity of hair dye components. *J Environ Pathol Toxicol* 1980; 3(4):237-251.
- Verschueren K. Handbook of Environmental Data of Organic Chemicals. 2nd ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1983.
- Windmill KF, McKinnon RA, Zhu X, Gaedigk A, Grant DM, McManus ME. The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies. *Mutat Res* 1997;376:153-160.
- Zwirner-Baier I, Neumann HG. Biomonitoring of aromatic amines IV : use of hemoglobin adducts to demonstrate the bioavailability of cleavage products from diarylide azo pigments in vivo. *Arch Toxicol* 1994;68:8-14.