

Direct Black 38 염료를 흰쥐에 투여 시 형성되는 헤모글로빈 부가체에 에탄올과 Phenobarbital이 미치는 영향

김치년, 이세훈¹⁾, 노재훈

연세대학교 의과대학 산업보건연구소, 가톨릭대학교 의과대학 예방의학교실²⁾

Effects of Ethanol and Phenobarbital on Hemoglobin Adducts Formation in Rats Exposed to Direct Black 38

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

Institute for Occupational Health, College of Medicine, Yonsei University;
Department of Preventive Medicine, Catholic University²⁾

Objectives : To evaluate the effects on the formation of benzidine-hemoglobin, and benzidine metabolite-hemoglobin adducts, caused by pretreatment with the known xenobiotic metabolism effectors, ethanol and phenobarbital, in rats administered Direct Black 38 dye.

Methods : The experimental rats were divided into three groups: a control group, an ethanol group and a phenobarbital group. Rats were pretreated with ethanol (1g/kg) or phenobarbital (80mg/kg) 24 hours prior to the oral administration of Direct Black 38 (0.5mmol/kg), with the control group being administered the same amount of distilled water. Blood samples were obtained from the vena cava of 5 rats from each group prior to, and at 30 min, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, and 144 h following the oral administration of Direct Black 38. Directly after sampling the blood was separated into hemoglobin and plasma, with the adducts being converted into aromatic amines by basic hydrolysis. Hydrolyzed benzidine, monoacetylbenzidine and 4-aminobiphenyl were analyzed by reverse-phase liquid chromatography with an electrochemical detector. The quantitative amount of the metabolites was expressed by the hemoglobin binding index (HBI).

Results : In the ethanol group, benzidine-, monoacetylbenzidine-, and 4-aminobiphenyl-HBI were increased to a greater extent than those in the control group. These results were attributed to the ethanol inducing N-hydroxylation, which is related

to the formation of the hemoglobin adduct. In the phenobarbital group, all the HBIs, with the exception of the benzidine-HBI, were increased to a greater extent than those of the control group. These results were attributed to the phenobarbital inducing N-hydroxylation related to the formation of the hemoglobin adduct. The N-acetylation ratio was only increased with the phenobarbital pretreatment due to the lower benzidine-HBI of the phenobarbital group compared to those of the control and ethanol groups. The N-acetylation ratios for all groups were higher than 1 for the duration of the experimental period. Although the azo reduction was unaffected by the ethanol, it was inhibited by the phenobarbital. The ratio of the benzidine-HBI in the phenobarbital group was lower than those of the ethanol the control groups for the entire experiment.

Conclusion : Our results indicate that both ethanol and phenobarbital increase the formation of adducts by the induction of N-hydroxylation, but also induced N-acetylation. Phenobarbital decreased the formation of benzidine-HBI due to the decrease of the azo reduction. These results suggest that the effects of ethanol and phenobarbital need to be considered in the biochemical monitoring of Direct Black 38.

Korean J Prev Med 2002;35(3):229-235

Key Words: Direct Black 38, Benzidine, Ethanol, Phenobarbital, Hemoglobin

서론

방향족 아민류로 합성한 아조염료는 전세계적으로 매년 70만 톤이 생산되고 있으며 이중에서 벤지딘계 직접 아조염

료(benzidine based azo dye)는 약 200여종이 넘게 유통되고 있다 [1].

Direct Black 38(DB38)은 벤지딘염산염을 기초로하여 1차 커플링으로 H-acid를 아조결합시키고 2차, 3차 커플링

반응으로 aniline과 m-phenyl diamine을 결합시킨 후 염색, 여과, 건조 과정을 거쳐 생산되어 색종이, 직물, 가죽, 고무, 플라스틱, 모피 등의 염색에 널리 사용되고 있다 [2]. 벤지딘계 염료의 주원료인 benzidine(BZ)은 발암성 때문에 우리나라 노동부와 미국 산업위생협회의 (ACGIH)에서는 노출기준 없이 발암성

물질로 설정하고 있다 [3,4]. 최근에는 제조허가 물질이었던 벤지딘 염산염을 노동부 산업안전보건법 제37조에 의거 제조·수입·양도·제공 또는 사용하여서는 안된다고 새로이 규정하고 있다 [5]. 벤지딘계 아조염료는 실온에서는 비휘발성이고 분해가 안되는 안정된 형태로 존재하지만 생체내 효소 [6]나 열 [7]에 의해서는 염료의 발색단인 디아조 결합이 끊어진다. 흰쥐의 적출간 관류법으로 DB38을 관류한 결과 BZ 및 BZ 대사물질인 monoacetylbenzidine(MABZ)과 diacetylbenzidine(DABZ)이 검출되었으며 [8] 벤지딘계 염료 제조 사업장의 근로자들의 소변에서도 같은 대사물질이 검출되었다 [9-11]. 그러나 우리나라에서는 벤지딘계 염료를 단순히 기타 분진으로 규정하고 있어 이에 따른 작업환경관리의 미흡으로 생산 및 사용 근로자들에게 건강장해를 유발할 가능성이 있다. 따라서 독성학적으로 적합한 노출기준 및 관리기준의 설정이 매우 시급한 실정이다 [12].

직접 아조염료(Direct azo dye)인 Direct Blue 6과 DB38은 동물실험에서 피부로 흡수되어 BZ 및 대사물질이 소변으로 배설되는 것을 확인하였다 [13]. 이러한 노출경로의 특성 때문에 기중 농도만으로 정확한 노출평가를 하기는 어려우며 생물학적 모니터링과 함께 종합적인 평가가 이루어져야 한다. 그러나 염료 제조 및 염색가공은 소량 다품종으로 주문생산하고 있어 근로자들이 간헐적으로 낮은 농도로 노출되는 경우가 많다. 따라서 배설 반감기가 짧은 요중 BZ 및 대사물질을 이용한 노출평가는 시료 채취시기에 따라 측정값의 변동이 심하여 대표성이 결여될 수 있다. 최근에는 적혈구 세포가 체내에서 생존하는 기간동안 안정성이 유지되는 헤모글로빈 부가체를 이용한 생물학적 모니터링이 발암성물질 평가에 많이 활용되고 있다 [14,15]. 실제로 적혈구내 헤모글로빈 부가체의 분석은 일정기간 동안 체내로 흡수된 양도 제시하지만 개인의 대사형태 특성도 평가를 할 수 있다 [16]. 헤모글로빈은 발암성

Table 1. Operating condition of high performance liquid chromatograph for benzidine, monoacetylbenzidine, 4-aminobiphenyl

Description	Condition
Column for BZ, MABZ	HAISIL HL C ₁₈ , 5 μ m, 250 \times 4.6 mm (Higgins Analytical, Mountain View, California)
Column for 4ABP	HAISIL HL C _s , 5 μ m, 250 \times 4.6 mm (Higgins Analytical, Mountain View, California)
Column temperature	35 $^{\circ}$ C
Mobile phase for BZ, MABZ	0.2% Lithium chloride : Methanol (70 : 30)
Mobile phase for 4ABP	0.2% Lithium chloride : Methanol (50 : 50)
Flow rate	1.1 ml/min
Detection for BZ, MABZ	Electrochemical detector (potential 0.75V, 0.65 V)
Detection for 4ABP	Electrochemical detector (potential 0.85 V)
Injection Volume	20 μ l

이 없는 물질과는 결합하지 않으며 chloroform이나 carbon tetrachloride와 같이 유전독성이 없고 DNA와 결합하지 않는 발암성 물질과도 결합을 하여 유용성이 매우 높다.

방향족 아민류의 주요 대사과정은 N-hydroxylation과 N-acetylation이다. N-acetylation이 느리게 진행되면 N-hydroxylation이 증가하여 유전독성을 유발하는 물질인 N-hydroxyamine에 의하여 방광암 발생의 위험도가 높아진다 [17,18]. 따라서 N-acetylation은 유전독성을 유발하는 물질인 N-hydroxyamine의 농도를 낮추는 역할을 하기 때문에 해독과정이라고 할 수 있다. 이러한 이유로 N-acetylation의 진행속도가 느린 경우는 방광암 발생이 높다는 보고가 있다 [19]. 벤지딘계 아조염료의 경우는 BZ의 대사과정과는 다르게 체내에 흡수되면 우선 아조 환원반응에 의하여 벤지딘으로 분해된 후 N-hydroxylation과 N-acetylation을 거친다. 이러한 대사과정들은 근로자들이 흡주습관으로 자주 접하는 에탄올(EtOH)에 의하여 산화과정이 억제되거나 또는 유도되며 [20] 방향족 아민류와 함께 노출되는 경우는 N-acetylation을 상승시키는 역할도 한다 [21].

Phenobarbital(PB)의 경우 산화과정은 유도하지만 아조 환원효소의 활성은 억제한다고 알려져 있다 [22]. 따라서 대사과정에 영향을 주는 물질로 알려진 EtOH와 PB가 헤모글로빈 부가체 형성에 어떠한 영향을 주는지 관찰하는 것이

중요하다. 그러나 제조금지물질인 벤지딘에 의해 형성되는 헤모글로빈 부가체에 대한 EtOH와 PB의 영향 평가 [23]는 있었지만 발암성물질이면서도 현재 기타분진으로 취급되고 있는 DB38에 관한 연구는 없었다. 따라서 헤모글로빈 부가체를 이용한 벤지딘계 염료의 생물학적 노출평가를 실용화하기 위해서는 N-hydroxylation과 N-acetylation 그리고 아조환원 반응에 영향을 주는 물질들에 의하여 부가체 형성이 어떻게 변하는지 관찰하는 것이 필요하다.

본 연구의 목적은 흰쥐를 대상으로 DB38을 투여시 형성되는 헤모글로빈 부가체에 EtOH와 PB가 어떠한 작용을 하는지 알아보기 위하여 시간 경과에 따라 헤모글로빈 부가체의 형성, N-acetylation에 미치는 영향 그리고 DB38의 아조환원에 미치는 영향을 평가하였다.

대상 및 방법

1. 실험대상 선정 및 투여용량 설정

생후 7~8주이고, 체중이 230 ± 10 g인 수컷 Sprague-Dawley 계통의 흰쥐를 EtOH 전처치군(EtOH군), PB 전처치군(PB군) 그리고 전처치가 없는 대조군으로 분류하였다. EtOH의 전처치 용량은 흰쥐의 경구 LD₅₀인 10.81 g/kg body weight의 약 1/10에 해당하는 1 g/kg body weight로 [24] PB는 80 mg/kg body weight로 [25] 하여 DB38을 투여하기 24시간 전에 증류수 10 ml/kg

body weight로 희석하여 1회 경구 투여 하였다. 대조군은 같은 양의 증류수만을 경구 투여하였다.

DB38의 투여는 벤지딘에 의한 헤모글로빈 부가체 형성 결과 [23]와 비교하기 위하여 벤지딘의 1회 경구 투여 용량을 참조하여 0.5 mmol DB38/kg body weight를 1,2-propanediol(Sigma, St. Louis, Missouri)에 녹여 경구로 투여하였다.

혈액 시료는 DB38을 경구 투여하기 전과 투여 후 30분, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 144시간에서 각각의 실험군당 5마리씩 헤파린으로 처리한 주사기로 하대정맥에서 채취하였다. 채취한 혈액 시료는 즉시 실험실에서 혈구를 분리하였다.

2. 실험 방법

채취한 혈액을 1,000 g로 5분간 원심 분리하여 혈구 세포를 분리하고 0.9% NaCl 용액으로 세척한 후 pH 7.5, 10⁻⁴M ethylenediamine tetraacetate (EDTA, Sigma, St. Louis, Missouri)를 혈구 부피의 4배정도 첨가하여 충분히 흔들어 준 후 4,000 g로 5분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에 EtOH를 넣어 헤모글로빈을 응고시켜 회수하였다. 헤모글로빈 부가체의 가수분해는 헤모글로빈

일정량을 취하여 0.05% SDS(sodium dodecylsulfate, Research Organics Inc, Cleveland, Ohio) 용액 10 ml로 녹여 1 시간 동안 흔들어서 염기 가수분해한 후 분석시료를 회수하였다 [26]. 전처리가 끝난 BZ와 BZ의 대사물질인 MABZ 그리고 4-aminobiphenyl(4ABP)은 역상 액체크로마토그래프(Gilson 715 System, GILSON, Villier le Bel, France)를 이용하여 분리하였다.

검출은 쉽게 산화되는 방향족 아민류의 특성에 적합한 전기화학검출기(Electrochemical detector, ICA-5212, TOA Electronics, Tokyo, Japan)를 이용하였으며 동시 정량시 감도를 높이기 위하여 2개의 electrode가 각각 다른 전위값으로 검출이 가능한 것을 사용하였다. 검출한계는 BZ는 1.82 ng/ml, MABZ는 1.54 ng/ml 그리고 4ABP의 경우는 0.2 ng/ml 이었다. 4ABP는 BZ 및 MABZ의 이동상 조건으로 동시 분석하는 경우 retention time이 너무 길어 정점(peak)이 형성되지 않아 단독으로 분석하였다. 전기화학검출기의 Voltamogram을 평가한 결과 최적의 전위값이 BZ는 0.65V, MABZ는 0.75V 그리고 4ABP는 0.85V 이었으며 분석조건은 Table 1과 같다. 시판이 안되는 표준 물질 MABZ은 합성하여 사용하였다 [27].

헤모글로빈에 결합된 BZ, MABZ, 4ABP를 대상으로 EtOH군, PB군, 대조군간에 시간대별로 생성된 양이 차이가 있는지 알아보기 위하여 Kruskal-Wallis test를 실시하였다. 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.

결 과

1. 에탄올과 phenobarbital이 DB38에 의해 형성된 헤모글로빈 부가체에 미치는 영향

BZ, MABZ, 4ABP의 헤모글로빈 부가체를 같은 조건으로 비교하기 위하여 분석결과를 헤모글로빈 결합지수(hemoglobin binding index, HBI)로 표현하였다. HBI는 헤모글로빈 결합물질(hemoglobin adduct)을 투여량으로 나눈 값이다. 결합물질은 일정량의 헤모글로빈에 결합된 BZ, MABZ, 4ABP를 가수분해하여 분석한 값(mmmole cleavage product)을 1mole의 헤모글로빈에 결합된 양으로 환산하여 "mmmole cleavage product/mole hemoglobin"로 계산한다. 투여량은 흰쥐 무게 kg당 DB38 투여

Table 2. Hemoglobin binding index of cleavage product by ethanol or phenobarbital pretreatment 24 hr before Direct Black 38 administration in rat

Time (hr)	BZ-HBI [†]			MABZ-HBI [‡]			4ABP-HBI [§]		
	control [¶]	EtOH [¶]	PB ^{**}	control	EtOH	PB	control	EtOH	PB
0.5	ND	ND	ND	0.043 0.040	0.036 0.034	0.038 0.039	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	0.035 0.038	0.057 0.067	0.061 0.056	ND	0.132 0.154	ND**
6	ND	ND	ND	0.035 0.052	0.071 0.093	0.053 0.054	0.013 0.012	0.140 0.016	ND**
9	ND	0.004 0.005	ND	0.094 0.123	0.149 0.149	0.100 0.107	0.032 0.021	0.133 0.022	0.001 0.001**
12	0.192 0.132	0.163 0.030	0.113 0.038	0.866 0.348	1.101 0.506	0.900 1.590	2.412 0.469	8.893 1.310	2.766 0.425**
24	0.427 0.344	0.578 0.093	0.118 0.050	1.683 0.146	6.679 4.305	3.310 1.869	2.784 0.209	13.103 1.531	6.273 0.903**
48	0.084 0.053	0.207 0.145	0.103 0.053	0.524 0.279	0.947 0.219	1.002 0.159*	1.978 0.415	11.483 1.456	2.378 0.428**
72	0.047 0.039	0.202 0.149	0.068 0.064	0.486 0.149	0.515 0.211	0.841 0.064*	1.130 0.201	1.550 0.308	1.965 0.389**
96	0.032 0.047	0.104 0.075	0.024 0.008	0.262 0.075	0.564 0.120	0.636 0.130**	0.138 0.033	1.054 0.176	0.835 0.168**
144	0.029 0.044	0.041 0.061	0.005 0.036	0.120 0.113	0.156 0.141	0.138 0.164	0.096 0.061	0.667 0.126	0.013 0.012**

[†] BZ-HBI: hemoglobin binding index=(mmole benzidine/mole hemoglobin)/(mmole DB38/kg body weight)
[‡] MABZ-HBI: hemoglobin binding index=(mmole monoacetylbenzidine/mole hemoglobin)/(mmole DB38/kg body weight)
[§] 4ABP-HBI: hemoglobin binding index=(mmole 4-aminobiphenyl/mole hemoglobin)/(mmole DB38/kg body weight)
[¶] control: no pretreatment, administration of 0.5 mmole Direct Black 38/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 groups ND: not detected; Mean SD (N=5)

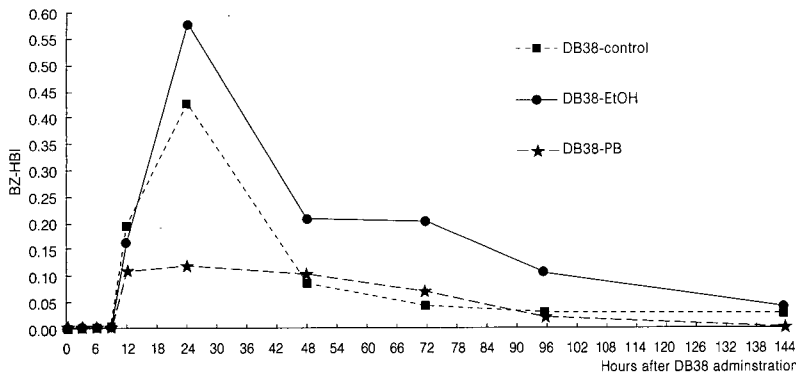


Figure 1. Benzidine-HBI by ethanol or phenobarbital pretreatment 24 hr before Direct Black 38 administration in rat.

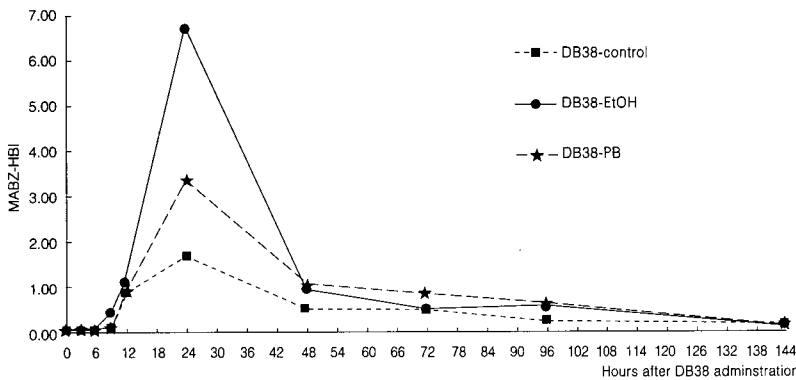


Figure 2. Monoacetylbenzidine-HBI by ethanol or phenobarbital pretreatment 24 hr before Direct Black 38 administration in rat.

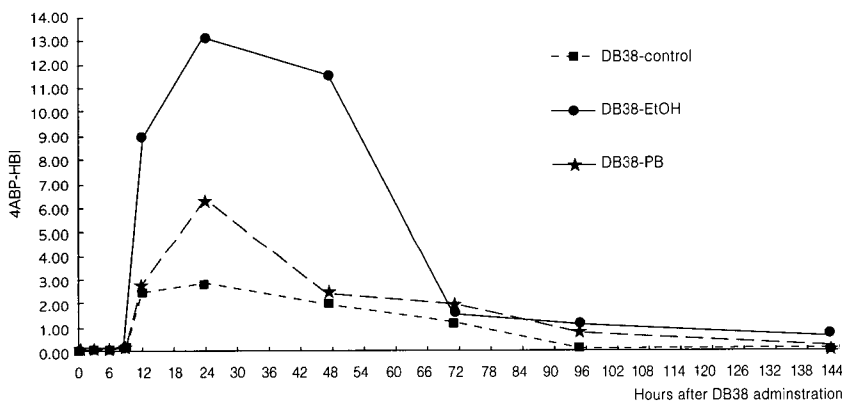


Figure 3. 4-Aminobiphenyl-HBI by ethanol or phenobarbital pretreatment 24 hr before Direct Black 38 administration in rat.

mmole로 “mmole Direct Black 38/kg body weight”로 표현한다. 결국 HBI는 “결합물질/투여량=(mmole cleavage product/mole hemoglobin)/(mmole

Direct Black 38/kg body weight)”이다. DB38을 투여하기 전에 채취한 모든 군의 시료에서는 헤모글로빈 부가체가 검출되지 않았으며 대조군, EtOH군 그

리고 PB군의 시간 경과에 따른 BZ-HBI, MABZ-HBI, 4ABP-HBI의 변화는 Table 2와 같다.

BZ-HBI의 경우 대조군과 PB군은 9시간 그리고 EtOH군은 6시간까지 검출되지 않았다. 대조군은 12시간에서만 높은 경향이 있었고 그 외 모든 시간은 EtOH군의 평균 BZ-HBI가 높은 경향이 있었다 (Figure 1). MABZ-HBI는 0.5시간을 제외하고 EtOH군 또는 PB군이 전체 시간에서 대조군보다 높은 경향이 있었고 EtOH군은 48시간, 96시간에서 그리고 PB군은 48시간, 72시간, 96시간에서 유의하게 높았다 (Figure 2). 4ABP-HBI의 경우 대조군은 3시간, EtOH군은 0.5시간 그리고 PB군은 6시간까지 검출되지 않았다. EtOH군 또는 PB군의 평균 4ABP-HBI는 72시간을 제외한 모든 시간에서 대조군보다 높은 경향이 있었으며 EtOH군은 3시간, 6시간, 9시간, 12시간, 24시간, 48시간, 96시간, 144시간에서 높았고 PB군은 24시간, 72시간, 96시간에서 유의하게 높았다 (Figure 3).

2. 에탄올과 phenobarbital이 N-acetylation과 아조환원에 미치는 영향에 미치는 영향

1) N-acetylation에 미치는 영향

헤모글로빈 부가체에서 일어나는 N-acetylation이 EtOH와 PB에 의하여 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위하여 시간에 따라 N-acetylation의 비로 평가하였다. N-acetylation 비는 MABZ-HBI를 BZ-HBI로 나눈 값으로 구하였다 [26]. 대조군에서는 N-acetylation 비가 72시간에서 10.30으로 최고 높았으며 EtOH군은 24시간에서 11.56, PB군은 24시간에서 28.03으로 제일 높았다 (Figure 4).

2) 아조환원에 미치는 영향

DB38이 흡수된 후 BZ과 동일한 대사 과정을 거치기 위해서는 아조환원반응을 반드시 거쳐야 한다. EtOH와 PB가 DB38의 아조환원에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 같은 용량으로 BZ을 투여한 연구결과 [21]와 비교하였다.

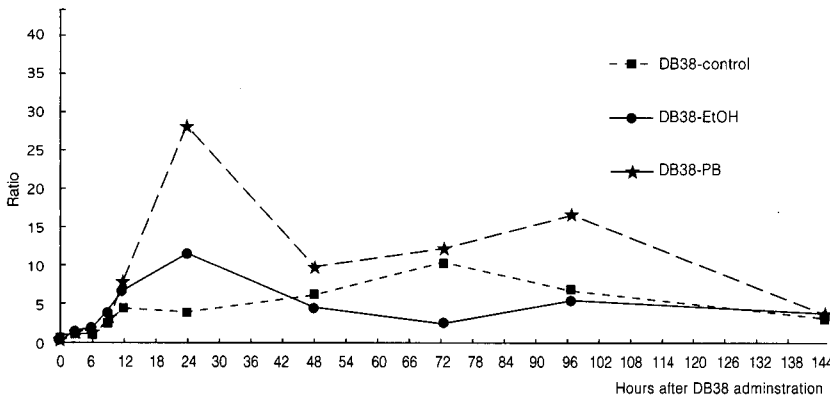


Figure 4. The ratio of N-acetylation(monoacetylbenzidine-hemoglobin binding index / benzidine-hemoglobin binding index) by ethanol or phenobarbital pretreatment 24 hr before Direct Black 38 administration in rat.

DB38이 아조환원된 정도는 DB38 투여군의 HBI를 BZ 투여군의 HBI로 나누어 비로 평가하였다. DB38을 투여한 후 헤모글로빈 부가체가 검출되지 않은 시간의 결과는 비교할 수 없어 Table 3에서 표현하지 않았다. DB38 투여군의 BZ-HBI와 MABZ-HBI를 BZ 투여군의 BZ-HBI, MABZ-HBI로 나눈 비가 대조군, EtOH군, PB군 모두 전체 관찰시간에서 1보다 낮게 평가되었다. 이러한 결과는 BZ를 투여한 경우보다 DB38을 투여한 경우가 전처치에 관계없이 헤모글로빈 부가체가 적게 형성되었다는 것을 의미한다. 특히 BZ-HBI 비보다 MABZ-HBI 비가 상대적으로 더 낮은

경향이 있었다. 그러나 4ABP-HBI의 경우는 DB38-대조군의 12시간, 24시간에서, DB38-EtOH군은 3시간, 12시간, 24시간, 48시간에서 그리고 DB38-PB군은 12시간 24시간에서 BZ 투여군 보다 많이 형성되었다 (Table 3).

고찰

벤지딘계 직접 아조염료의 대표적인 형태인 DB38은 아조기(-N=N-)에 의하여 색이 나타나며 아조성분(azo compound)과 커플링(coupling)하는 방법으로 합성을 한다. 이러한 염료는 작업 환경 내에서는 분해가 안되는 안정된 형

태이지만 [29] 흰쥐에 DB38을 경구 투여한 본 연구 결과에서는 벤지딘 및 벤지딘 대사물의 헤모글로빈 부가체가 검출되었다. 이것은 DB38이 아조환원되어 벤지딘과 같은 대사경로를 거쳐 헤모글로빈과 결합한다는 것을 나타낸 것이다.

DB38 투여에 의하여 형성된 평균 BZ-HBI는 EtOH군이 12시간을 제외한 9시간 이후의 전 시간대에서 높은 경향을 보였다. 그러나 PB군은 대조군보다 오히려 12시간, 24시간, 144시간에서 평균 BZ-HBI가 낮았다. 이것은 PB가 N-hydroxylation을 활성화시키는 역할도 하지만 [30] N-acetylation의 속도도 빠르게 진행시켜 MABZ-HBI가 상대적으로 증가하여 나타난 결과로 생각된다. EtOH군 또는 PB군의 평균 MABZ-HBI의 경우는 0.5시간을 제외하고 대조군보다 높은 경향이였으며 평균 4ABP-HBI도 전체 시간에서 대조군보다 높은 경향이였다. 이것은 EtOH와 PB가 DB38이 투여된 후 아조환원을 거쳐 형성되는 헤모글로빈 부가체를 증가시켜 나타난 결과이다.

EtOH와 PB의 전처치 없이 DB38만을 투여한 대조군의 N-acetylation 비는 72시간에서 10.30이 최고였으며 EtOH군은 24시간에서 11.56 그리고 PB군은 24시간에서 28.03이었다. 본 연구에서 투여한 DB38과 같은 몰수로 BZ를 투여

Table 3. The ratio of Direct Black 38 group's HBI to benzidine group's HBI by ethanol or phenobarbital pretreatment 24 hr before benzidine or DB38 administration in rat

Time (hr)	Control*			EtOH			PB†		
	BZ‡	MABZ§	4ABP¶	BZ	MABZ	4ABP	BZ	MABZ	4ABP
0.5	-	0.0471	-	-	0.0295	-	-	0.0375	-
3	-	0.0050	-	-	0.0184	1.0026	-	0.0095	-
6	-	0.0033	0.0236	-	0.0078	0.2979	-	0.0049	-
9	-	0.0072	0.0597	0.0058	0.0097	0.1457	-	0.0076	0.0005
12	0.3035	0.0548	2.9604	0.1567	0.0540	7.5592	0.1058	0.0480	1.8118
24	0.3605	0.0841	4.3448	0.4474	0.2091	6.9051	0.0724	0.1340	2.6533
48	0.1271	0.0146	0.8158	0.2453	0.0189	4.1363	0.0632	0.0259	0.5499
72	0.0813	0.0167	0.6619	0.3111	0.0158	0.6830	0.0541	0.0181	0.8210
96	0.0643	0.0118	0.1224	0.1869	0.0183	0.6290	0.0263	0.0173	0.6825
144	0.1218	0.0094	0.1637	0.0865	0.0112	0.4262	0.0088	0.0088	0.0110

* Control: no pretreatment

† EtOH: pretreatment of 1g EtOH/kg body weight

‡ PB: pretreatment of 80 mg phenobarbital/kg body weight

§ BZ: the ratio of Direct Black 38 group,s benzidine-HBI to benzidine group,s benzidine-HBI

¶ MABZ: the ratio of Direct Black 38 group,s monoacetylbenzidine-HBI to benzidine group,s monoacetylbenzidine-HBI

‡ 4ABP: the ratio of Direct Black 38 group,s 4-aminobiphenyl-HBI to benzidine group,s 4-aminobiphenyl-HBI

한 연구 결과 [23]와 N-acetylation 비를 비교한 결과 DB38을 투여한 대조군, EtOH군, PB군 모두가 BZ 투여한 대조군, EtOH군, PB군의 N-acetylation 비보다 전반적으로 작았다. PB군의 N-acetylation 비는 대조군과 EtOH군보다 높은 경향이였다. 이것은 PB에 의해 DB38의 아조환원이 억제되어 [30] PB군의 BZ-HBI가 대조군과 EtOH군의 BZ-HBI보다 상대적으로 작아서 나타난 것이다. 대조군, EtOH군 그리고 PB군 모두는 전체시간에서 N-acetylation 비가 1 이상의 값으로 나타나 MABZ-HBI가 BZ-HBI보다 높은 것으로 나타났다.

이러한 결과는 BZ를 경구 투여 후 나타난 결과 [23]와 유사하게 나타나 벤지딘계 염료인 DB38에 노출되면 BZ에 노출된 경우와 마찬가지로 적혈구내에서 4-nitroso-4'-N-acetylbiphenyl이 가장 많이 형성된다는 것을 의미하는 것이다.

본 연구와 같은 투여용량으로 BZ를 투여한 결과 [23]를 비교하면 전처치에 관계없이 DB38을 투여한 경우의 헤모글로빈 부가체가 적게 형성되어 DB38이 체내에 흡수되어 BZ 대사과정의 일부만 거친다는 것을 입증하였다. DB38과 유사한 아조계 염료인 Direct Red 46을 흰쥐에 투여한 결과에서도 BZ가 매우 낮은 농도로 헤모글로빈 부가체를 형성하여 [31] 본 연구 결과와 같은 양상을 보였다. 그러나 4ABP-HBI의 경우는 벤지딘계 아조염료인 Direct Black 29를 대상으로 한 연구 [27]와 유사하게 DB38을 투여한 경우가 BZ를 투여한 경우보다 높게 나타났다. 이러한 원인은 BZ의 대사물로 4ABP가 생성되는 기전이 아직 밝혀지지 않아 [32] 확실하게 설명할 수 없어 앞으로 이분야에 대한 연구가 필요하다고 사료된다. 사람과 암발생 기전이 비슷한 개를 대상으로 BZ 투여용량과 같게 벤지딘계 아조염료를 종류별로 투여한 경우, Direct Black 4와 Direct Red 28 투여군의 요중 BZ 배설량이 BZ 투여군보다 적었으며 Direct Green 1과 Direct Orange 8은 비슷하게 배설되었다 [33]. Direct Brown의 경우는 BZ군보다 요중으로 배

설되는 BZ 양이 더 많았다 [34]. 따라서 DB38에 노출되어 생성되는 헤모글로빈 부가체가 BZ 노출에서 생성되는 헤모글로빈 부가체의 양보다 적다는 연구결과를 모든 벤지딘계 염료에 적용하기는 어렵다고 생각한다.

결론

벤지딘계 염료인 DB38을 흰쥐에 투여 시 아조환원을 거친 후 벤지딘 및 벤지딘 대사물질이 헤모글로빈과 결합할 때 EtOH와 PB가 부가체 형성에 어떠한 영향을 주는지 평가하였다. 또한 EtOH와 PB가 헤모글로빈 부가체의 N-acetylation과 아조환원에 미치는 영향도 함께 평가하였다.

PB군의 BZ-HBI를 제외하고는 EtOH군과 PB군의 BZ-, MABZ-, 4ABP-HBI가 전반적으로 증가하는 경향이 있었다. 이러한 증가는 EtOH와 PB가 헤모글로빈 부가체 형성에 관여하는 N-hydroxylation을 유도하였다는 것을 의미한다. N-acetylation의 비는 PB를 전처치한 경우가 높게 나타났다. 이것은 PB가 DB38이 BZ으로 전환되는 아조환원 반응을 억제하여 BZ-HBI가 다른 군보다 상대적으로 낮았기 때문에 나타난 결과이다. N-acetylation의 비는 모든 시간에서 1보다 높아 적혈구와 4-nitroso-4'-N-acetylbiphenyl이 가장 많이 결합된다는 것을 확인하였다. EtOH와 PB가 DB38의 아조환원에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 BZ를 투여한 연구와 비교한 결과 4ABP-HBI를 제외하고는 전처치에 관계없이 전체시간에서 BZ를 투여한 경우보다 BZ-, MABZ-HBI가 적어 DB38의 아조환원이 매우 적게 이루어졌다는 것을 의미한다.

이상의 결과로 EtOH는 N-hydroxylation을 유도하여 부가체 형성을 증가시킬 뿐 아니라 N-acetylation도 유도하였다. PB는 아조환원은 억제하여 DB38군에서는 부가체 형성을 감소시키는 경향도 있었다. 따라서 발암성 물질인 DB38에 대하여 헤모글로빈부가체를 이용한 생화학

적 노출평가를 실시하는 경우 EtOH나 PB의 영향을 고려하여야 한다.

참고 문헌

1. Keck A, Klein J, Kudlich M, Stolz A, Knackmuss, Mattes R. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of sphingomonas sp. strain BN6. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3684-3689
2. Clayson DB. Benzidine and 2-naphthylamine - Voluntary substitution or technological alternatives. *Ann NY Acad Sci* 1976; 271: 170-175
3. 노동부. 유해물질의 허용농도 노동부고시 제 97-65호. 노동부; 1998
4. ACGIH. Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices: Cincinnati: ACGIH; 2002
5. 노동부. 산업안전보건법. 노동부; 2000
6. Shinka T, Ogura H, Morita T, Nishikawa T, Fujinaga T, Ohkawa T. Relationship between glutathione S-transferase M1 deficiency and urothelial cancer in dye workers exposed to aromatic amines. *J Urol* 1998; 159: 380-383
7. Kristin EA, George JH, Fred FK, John DP, Keith RK, Kenneth FI, Rodney FM, Candee HT, Hsien-Chang C, Martha VM, Peter G, Gary WB, Nicholas PL, Lisa AP. Metabolic activation of aromatic amines by human pancreas. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1083-1092
8. Won JW, Roh JH, Kim CS, Park YJ, Kim CH. The metabolism of benzidine-based dye, Direct Black 38 in the isolated perfused rat liver. *Korean J Occup Environ Med* 1996; 8(1): 59-65 (Korean)
9. 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 Health* 1988; 43(4): 269-272
10. Roh JH, Ahn YS, Kim KS, Kim CH, Kim HS. Benzidine exposure among benzidine-based dye manufacturing workers. *Korean J Occup Environ Med* 1995; 7(2): 103-109 (Korean)
11. Yeom HK, Song JS, Kim CH, Won JU, Roh JH. Evaluation of dermal measurement for workers in benzidine dihydrochloride and benzidine based dye manufacturing factory. *Korean J Occup Environ Med* 1998; 10(1): 83-93 (Korean)
12. 노재훈, 원종욱, 김치년, 송재석, 김승기, 임남규, 황철, 정재훈, 장정환. 노출기준 설정에 관한 연구: 나무분진, 염료분진, 염화비닐, 2,6-톨루엔디

- 이소시아네이트. 서울: 한국산업안전공단(연구 자료 위생 98), 1998
13. Van Duuren BL. Carcinogenicity of hair dye components. *J Environ Pathol Toxicol* 1980; 3(4): 237-251
 14. Skipper PL, Naylor S, Gan LS, Day BW, Pastorelli R, Tannenbaum SR. Origin of tetrahydrotetraols derived from human hemoglobin adducts of benzo[a]pyrene. *Chem Res Toxicol* 1989; 2: 280-281
 15. Weston A, Rowe ML, Manchester DK, Farmer PB, Mann DL, Harris CC. Fluorescence and mass spectral evidence for the formation of benzo(a)pyrene anti-diol-epoxide-DNA and hemoglobin adducts in human. *Carcinogenesis* 1989; 10: 251-257
 16. Neumann HG, Birner G, Kowallik P, Schutze D, Zwirner-Baier I. Hemoglobin adducts of N-substituted aryl compounds in exposure control and risk assessment. *Environ Health Persp* 1993; 99: 65-69
 17. Evans DAP, Eze LC, Whibley EJ. The association of the slow acetylator phenotype with bladder cancer. *J Med Genetics* 1983; 20: 330-333
 18. Birner G, Neumann HG. Biomonitoring of aromatic amines II: Hemoglobin binding of monocyclic aromatic amines. *Arch Toxicol* 1988; 62: 110-115
 19. Lang NP. Acetylation as an indicator of risk. *Environ Health Persp* 1997 June; 105(4): 763-766
 20. Neis JM, Brommelstroet BW, Van Gemert PJ, Roelofs HM, Henderson PT. Influence of ethanol induction on the metabolic activation of genotoxic agents by isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 1985; 57: 217-221
 21. 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
 22. Corcos L, Marc N, Wein S, Fautrel A, Guillouzo A, Pineau T. Phenobarbital induces cytochrome P4501A2 hnRNA, mRNA and protein in the liver of C57BL/6J wild type and aryl hydrocarbon receptor knock-out mice. *FEBS Letters* 1998; 425: 293-297
 23. Kim CH, Lee SH, Kim HS, Yoon YS, Roh JH. Effects of ethanol and phenobarbital on hemoglobin adducts formation in rats exposed to benzidine. *J Korean Soc Occup Environ Hyg* 2001; 11(2): 118-125(Korean)
 24. Verschuere K. Handbook of Environmental Data of Organic Chemicals. 2nd ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1983: 619
 25. Lee KJ, Roh JH, Kim CH, Cho MH, Moon YH. Effects of ethanol and phenobarbital on metabolism of trichloroethylene in rats. *Korean J Occup Environ Med* 1993; 5(1): 76-88 (Korean)
 26. Sabbioni G, Neumann HG. Biomonitoring of arylamines: hemoglobin adducts of urea and carbamate pesticides. *Carcinogenesis* 1990; 11(1): 111-115
 27. Birner G, Albrecht W, Neumann HG. Biomonitoring of aromatic amines III: hemoglobin binding of benzidine and some benzidine congeners. *Arch Toxicol* 1990; 64: 97-102
 28. Zwirner-Baier I, Neumann HG. Biomonitoring of aromatic amines V: Acetylation and deacetylation in the metabolic activation of aromatic amines as determined by hemoglobin binding. *Arch Toxicol* 1998; 72: 499-504
 29. Gerber SM. Substitutes for Benzidine- New structure, presented before the Southeastern Regional Meeting. *Am Chem Soc* 1978; 9: 17
 30. Zbaida S, Stoddart AM, Levine WG. Studies on the mechanism of reduction of azo dye carcinogens by rat liver microsomal cytochrome P-450. *Chem Biol Interactions* 1998; 69: 61-71
 31. 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
 32. Cerniglia CE, Zhou Z, Manning BW, Federle TW, Heflich RH. Mutagenic activation of the benzidine-based dye direct black 38 by human intestinal microflora. *Mutat Res* 1986; 175: 11-16
 33. Lynn RK, Donielson DW, Ilias AM, Kennish JM, Wong K, Matthews HB. Metabolism of bisazobiphenyl dyes derived from benzidine, 3,3'-dimethylbenzidine or 3,3'-dimethoxybenzidine to carcinogenic aromatic amines in the dog and rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 56: 248-258
 34. Haley FJ. A review of the literature and problems associated with the use of benzidine and its congeners. *Clin Toxicol* 1975; 8: 13-42