

## Phenytoin의 태아 구개열 유발과 모체 혈청 Corticosterone 증가에 대한 Dimethyl Sulfoxide 억제 작용

이재권 · 이창업 · 이문한 · 류관동 · 이영재 · 성하정

서울대학교 수의과대학

## INHIBITORY EFFECT OF DIMETHYL SULFOXIDE ON PHENYTOIN-INDUCED FETAL CLEFT PALATE AND MATERNAL CORTICOSTERONE LEVEL

Jae-Kwon Lee, Chang-Eop Lee, Mun-Han Lee, Pan-Dong Ryu,  
Young-Jae Lee and Ha-Jung Sung

Department of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744

(Received November 18, 1992)

(Accepted December 15, 1992)

**ABSTRACT:** It is well known that phenytoin (PHT), a commonly prescribed anticonvulsant, has teratogenicity in experimental animals and human. The major malformation induced by PHT in mouse is cleft palate. The mechanisms of the embryotoxic effects of PHT are unknown. However, PHT and synthetic glucocorticoids share several features with respect to their teratogenicity, and it was known that PHT increased maternal corticosterone level. Therefore PHT-induced cleft palate may be mediated indirectly by elevated maternal corticosterone. Recently it was reported that secalonic acid D induced cleft palate and elevated endogenous corticosterone level, and that such effects were antagonized by DMSO. The purpose of this work was to investigate whether the elevated maternal corticosterone is associated with the teratogenicity of PHT in the ICR mouse fetuses by treatment with PHT or PHT plus DMSO. PHT (74 mg/kg, BW) was daily administered intraperitoneally on day 10~12 of gestation with and without DMSO (2 ml/kg, BW), and the fetal malformation was observed on day 18. Maternal serum corticosterone and fetal PHT levels were determined by HPLC. The results are summarized as follows. 1) The percentage of cleft palate incidence in fetuses following treatment with PHT on day 10~12 of gestation was 51.7%. 2) There was a significant decrement in the cleft palate incidence in fetuses to 30.8% in the group

*treated with PHT plus DMSO compared with 51.7% in that with PHT alone. 3) Maternal serum corticosterone levels following treatment with PHT on day 10~12 of gestation increased by 116~343% compared with that of vehicle control. Such effect was antagonized by DMSO. 4) PHT concentration in the fetuses was not affected by DMSO. These results suggest that PHT-induced cleft-palate in fetuses seems to be closely associated with the elevation of maternal corticosterone level.*

**Key Words:** Phenytoin, Teratogenicity, Cleft Palate, Maternal Corticosterone, Dimethyl Sulfoxide, ICR mouse.

## 서 론

Phenytoin(PHT: diphenylhydantoin: dilantin)은 항경련제로서 비교적 독성이 적고 효과가 우수하기 때문에 널리 쓰이고 있다. 그러나 마우스, 랫트, 토끼에서 임신 특정 시기에 모체에 투여시 태아에 기형이 유발됨이 알려져 있으며(Massey, 1966; Harbison과 Becker, 1974; McC-lain과 Langhoff, 1980), 사람에서도 여러 사례들이 보고되고 있다(Hanson과 Smith, 1975; Hanson, 1976; Kelly, 1984). PHT에 의한 기형 유발에는 실험동물 중 마우스가 가장 민감한 종이며, 주된 기형이 구개열로 실험적 구개열 유발 물질로 흔히 쓰이고 있는 glucocorticoids에 의한 것과 여러 측면에서 유사성을 가지고 있어 두 물질이 같은 기전으로 구개부의 정상적 발생 및 형성을 방해하는 것이 아닌가 추측되고 있다(McDevitt 등, 1981; Fritz, 1976; Goldman, 1984). 또한 Hansen 등(1988)은 기형을 유발하는 용량의 PHT를 투여할 때 기형 유발에 민감한 A/J 마우스에서는 모체혈장 corticosterone이 고농도로 지속적으로 증가하나 저항성이 있는 계통의 마우스와 비교적 낮은 용량을 투여하였을 때는 모체 혈장 corticosterone 농도의 증가 정도와 지속 시간이 짧았다고 보고하였다. PHT 이외에도 caffeine, diazepam, orciprenaline sulfate 등의 투여에 의해서도 모체의 혈장 corticosterone의 증가와 구개열을 포함한 기형이 나타나며(Elmazar 등, 1981; Barlow 등, 1980; Iida 등, 1988), corticosterone 증가를 유발하는 또 다른 인자인 절수, 절식 등의 스트레스에 의해서도 구개열이 나타난다(Barlow 등, 1975; Hemm 등, 1977).

PHT의 구개열 유발 기전은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. Hansen 등(1988)은 PHT 투여에 의해서 corticosterone의 모체 혈중 농도가 증가함을 관찰하여 이것이 PHT에 의한 기형을 매개할 수 있다고 하였다. 한편 Reddy 등(1981)은 임신 특정 시기에 투여할 때 모체에서 corticosterone을 증가시키며 아울러 태아에서 구개열을 일으키는 물질의 하나인 secalonic acid D(SAD)의 독성 실험 중 용매로 사용한 dimethyl sulfoxide(DMSO)가 SAD의 기형 유발을 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다. 이 때 DMSO는 SAD에 의하여 모체에서 증가된 corticosterone의 농도를 저하시키는 작용이 있는 것으로 보아 SAD에 의한 기형이 corticosterone에 의하여 매개된다고 하였다(Eldeib와 Reddy, 1990).

DMSO는 산업용 및 실험실에서 용매, 조직 동결 보존시의 보호제 등으로 널리 쓰이고 있다. 또한 항염증 작용이 있기 때문에(Rosenbaum 등, 1965) 사람과 가축에서 방광염 등의 염증 치료에 사용되고 있으며(Booth와 McDonald, 1988), 항취기형 및 항변이원성 효과(Bariljak 등, 1978)가 보고되어 있다. DMSO는 steroid의 중요한 기질인 cholesterol의 생합성을 억제함이 보고되어 있어(Yachnin 등, 1984; Cooper 등, 1981) 부신 피질에서 corticosterone의 합성을

방해할 수 있으며, Allen과 Allen(1975)에 의하면 DMSO가 랫트에서 시상하부-뇌하수체-부신의 기능에 영향을 미친다고 하였다. 또한 DMSO는 구개 형성에 직접 영향을 줄 수 있는데 Wee 등 (1980)은 *in vivo* 실험에서 정상적인 구개부의 형성 과정 중 구개판이 수직 방향에서 수평 방향으로 이동하는 것을 촉진한다고 보고하였다. 마우스에서 DMSO의 LD<sub>50</sub>은 정맥주사할 때 5.75 g/kg BW, 경구투여 시는 21.4 g/kg BW으로 저독성이며(Willson 등, 1965), 다른 약물과의 직접적 상호작용이 없는 것으로 알려져 있다(Dixon, 1965).

본 실험에서는 PHT에 의한 구개열 유발 및 모체에서의 corticosterone 변동을 확인하고, 또한 DMSO를 동시에 투여한 후 기형 유발 정도와 corticosterone 변동 및 모체와 태아에서 경시별 PHT 농도를 PHT 단독 투여시와 비교함으로써 PHT에 의한 기형 유발에서 DMSO의 항최기형 작용과 corticosterone의 연관성 여부, 그리고 DMSO가 PHT의 흡수 및 분포에 영향을 주는지를 조사하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

생후 6주령 된 ICR 마우스를 서울대학교 실험동물사육장에서 분양받아 8~12 주령까지 사육 조건에 적응시키면서 성숙시켜 실험에 사용하였다. 사육 및 실험 기간 동안의 환경은 온도 20±2℃, 습도 65±10% 범위였고 명암주기는 12시간으로 (점등: 오전 7시, 소등: 오후 7시) 자연조명과 인공조명을 함께 사용하였으며, 사료(실험동물용, 삼양사) 및 물(수도물)은 자유 급식시켰다. 사육상자에는 일반적인 깔집을 사용하였다. 임신은 수컷 1마리와 암컷 2마리를 오후 7시에 합사시킨 후 다음 날 아침 질전을 검출하여 확인하였으며, 이 때를 임신 0일로 하였다.

### 실험 동물의 배치 및 약물 투여

실험동물은 용매 대조군, PHT의 구개열 유발 정도 및 모체 혈청 corticosterone의 변동을 보기 위하여 임신 10~12일 PHT(Sigma) 투여군, DMSO의 PHT에 의한 기형 유발과 corticosterone에 대한 작용을 보기 위하여 DMSO(Yakuri)와 PHT를 임신 10~12일에 동시에 투여한 군, DMSO의 PHT에 대한 직접 작용을 조사하기 위하여 임신 14일 PHT 단독 투여군 및 PHT과 DMSO를 동시에 투여한 군 등 모두 5개 군으로 나누었다. PHT은 증류수에 현탁시킨 후 1 N NaOH 용액으로 pH를 11로 조정하여 가장 민감한 계통의 마우스에서 거의 100%의 태자에 기형을 유발하는 용량인 체중 kg당 75 mg(10 ml)을 오전 9시에 복강내로 주사하였으며, 용매 투여군에 대하여는 pH를 11로 조정한 증류수를 같은 용량 비율로 주사하였다. PHT과 DMS를 동시에 투여하는 실험군에 대하여는 증류수로 20%(v/v) DMSO 용액을 만든 후 PHT를 현탁시켜 1 N NaOH 용액으로 pH를 11로 조정하여 주사하였다. 이 때 DMSO의 용량은 체중 kg당 2 ml였다.

### 기형 검사

PHT 투여에 의한 태자의 구개열 발생을 조사하기 위하여 용매 대조군, 임신 10~12일 PHT 투여군과 임신 10~12일에 PHT과 DMSO 동시 투여군에 대하여 임신 18일에 경추탈골로 모체를 희생시키고 제왕절개로 태아를 적출하여 Bouin's solution에 2주간 고정된 후 구개부 이상 유무를 관찰하였다.

### 모체 혈청 corticosterone 측정

모체 혈청에서의 corticosterone 농도는 high-performance liquid chromatography(HPLC)를 이용한 Yamada와 Aizawa(1984)의 방법을 변용하여 측정하였다. 구체적인 방법은 아래와 같다.

### 1) 혈청 채취

용매 대조군, 임신 10~12일에 PHT(75 mg/kg, BW) 단독 투여군 및 PHT과 DMSO(2 ml/kg, BW)를 동시에 투여한 군에서 임신 10일 투여 후 2시간, 6시간 및 24시간과 11일과 12일 투여 후 각각 6시간 및 24시간에 복대정맥에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다가 corticosterone 측정에 사용하였다. 이때 채혈 자극에 의한 corticosterone 변동을 최소한으로 줄이기 위하여 10초 이내에 경추 탈골로 동물을 희생시켰다.

### 2) 추출

혈청 0.2 ml를 internal standard인 prednisolone(Sigma) 200 ng이 들어 있는 유리 시험관에 취한 다음 0.5 ml ligroin(Aldrich)으로 씻어내고 2 ml dichlormethane으로 2번 추출하였다. 추출물은 0.1 N NaOH 용액과 증류수 각 2 ml로 연속적으로 세척한 후 dichlormethane층을 질소 가스로 증발 건조시키고 잔유물을 40  $\mu\text{l}$ 의 ethanol에 재용해시켜 이것 20  $\mu\text{l}$ 를 HPLC에 주입하였다. 측정된 peak area에 의하여 다음에 기술한 방법에 따라서 작성한 표준선에서 모체 혈청 corticosterone 농도를 구한 다음 회수율을 보정하여 정량하였다.

### 3) 표준선 작성

Corticosterone 표준품(Sigma)을 1 mg/ml 되도록 ethanol에 용해시킨 후 단계 희석하여 20  $\mu\text{l}$ 에 10, 25, 50, 100, 200 ng이 되도록 한 후 농도별로 HPLC에 주입하였으며 4 반복하여 얻어진 평균 peak area를 컴퓨터 프로그램(PHARM/PCS)을 이용하여 linear regression하여 표준선의 식을 얻었다.

### 4) 회수율 측정

Corticosterone 100 ng과 200 ng을 각각 혈청 0.2 ml에 넣어 추출하여 HPLC에 주입하였다. 네번 반복하였으며 혈청자체의 corticosterone 양을 제외시키고 표준품 해당 농도와 비교하여 회수율을 측정하였다. 두 농도에서의 회수율 평균을 전체 회수율로 하였다.

### 5) 분석 조건

HPLC system(Waters)은 solvent delivery system(Model 6000A), data module(Model 720), variable wavelength UV detector(Model 450) 및  $\mu\text{Porasil}$  column(Waters)을 이용하였다. 이동상은 hexane: chloroform: methanol 혼합액(7:1:1, v/v)을 microfilter(Millipore)로 여과하여 사용하였으며 flow rate를 1.8 ml/min으로하여 245 nm에서 측정하였다.

## Phenytoin의 농도 측정

PHT에 대한 DMSO의 직접 작용을 보기 위하여 모체의 혈청 및 뇌 그리고 태아조직에서의 경시별 PHT 농도 변동을 Stout와 DeVane(1984)의 방법을 변용하여 HPLC로 측정하였다.

### 1) 시료 채취

임신 14일에 PHT(75 mg/kg, BW)을 단독 투여하거나 DMSO(2 ml/kg, BW)를 동시 투여한 후 2시간, 8시간, 16시간 및 32시간에 경추탈골로 모체를 희생시켜 복대정맥에서 채혈하여 혈청을 분리하였으며 뇌조직과 태아를 적출하였다.

### 2) 추출

**혈청 :** 혈청 0.2 ml를 시험관에 취하여 0.4 ml의 인산 완충액(pH 11)을 가한 후 vortex-type mixer로 격렬하게 혼합하였다. 이 혼합액에 1.5 ml의 ethyl acetate를 넣어 10분간 진탕하여 추출한 후 220 g에서 10분간 원심분리하여 1 ml의 ethyl acetate를 취하였다. 이 추출액을 질소 가스로 증발 건조시키고 잔유물을 0.1 ml의 ethanol에 재용해시켜 이것 20  $\mu\text{l}$ 를 HPLC에 주입하였다.

**모체 뇌조직 및 태아 :** 0.34 M perchloric acid 10 ml에 뇌 조직 또는 태아를 1.6 g의 비율로 넣어 균질화한 후 균질액 1 ml를 취하여 2 ml의 인산 완충액(pH 11.4)과 혼합하고 혈청에서와 동일한 방법으로 추출하여 HPLC에 주입하였다. 얻어진 peak area는 회수율을 보정한 후 표

준선의 식을 통하여 정량하였다.

### 3) 표준선 작성

PHT 표준품을 1 mg/ml 되도록 methanol에 용해시키고 단계 희석하여 20  $\mu$ 에 0.2, 0.5, 1.0, 2.0  $\mu$ g이 되도록 하여 각 농도별로 HPLC에 주입하였다. 네번 반복하여 얻어진 peak area의 평균을 linear regression하여 표준선의 식을 얻었다.

### 4) 회수율 측정

PHT를 처리하지 않은 마우스 혈청 0.2 ml, 뇌조직 또는 태아 균질액 1 ml에 5 $\mu$ g의 PHT를 넣은 후 추출하여 HPLC에 주입하였다. 네번 반복하여 얻어진 peak area의 평균을 표준품 해당량과 비교하여 회수율을 구하였다.

### 5) 분석 조건

HPLC system(Waters)은 solvent delivery system(Model 6000A), data module(model 720), variable wavelength UV detector(Model 450) 및 RADIAL-PAK™ cartridge (8MBC<sup>18</sup> 10 $\mu$ , Waters)를 사용하였다. 이동상은 acetonitrile: phosphate buffer(pH 5) 혼합액(32 : 68, v/v)을 microfilter로 여과하여 사용하였으며 flow rate를 1.5 ml/min으로 하여 254 nm에서 측정하였다.

## 통계 처리

평균과 표준오차로 얻어진 값들은 student t-test, 백분율로 얻어진 자료들은 chi-square test의 컴퓨터 프로그램(PHARM/PCS)을 이용하여 p<0.05 수준에서의 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### Phenytoin의 태아 구개열 유발 및 DMSO의 영향

주된 기형으로 알려진 구개열은 임신 10~12일 PHT(75 mg/kg BW) 투여군에서 51%의 태아에서 나타났으며 DMSO의 동시 투여에 의하여 30%로 유의성 있게 감소되었다 (Table 1, p<0.05).

### 모체의 혈청 corticosterone 변동

#### 1) 표준선

Corticosterone을 농도별로 HPLC에 주입하여 얻은 peak area를 linear regression하였을 때  $y=0.147854x+1.242271$  ( $r=1$ )였으며 이 식을 원점을 지나도록 변형하면  $y=0.149185x$ 가 되었다.

#### 2) 회수율

100 ng 또는 200 ng을 혈청에 넣어 추출하여 회수율을 측정하였을 때 각각 93% 및 87%로 평균 90%의 높은 회수율을 보였다.

**Table 1.** Cleft palate of ICR mouse fetuses from dams dosed intraperitoneally with PHT (75 mg/kg, BW), with or without DMSO (2 ml/kg, BW) on day 10~12 of gestation.

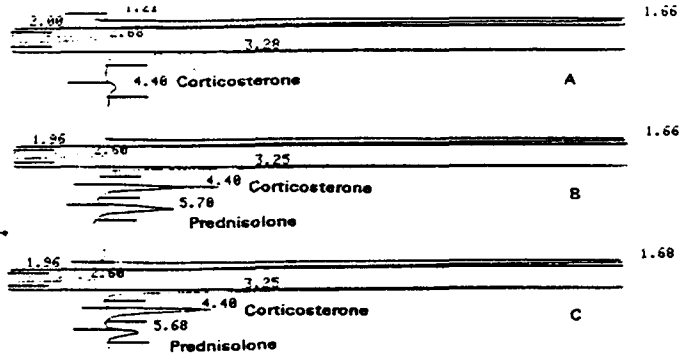
	Gestation day 10~12		
	Vehicle	PHT 75 mg/kg	PHT 75 mg/kg + DMSO 2 ml/kg
No. of fetuses	105	118	91
Cleft palate (%)	0	61* (51)	28** (30)

\*Significantly different from vehicle control at p<0.05.

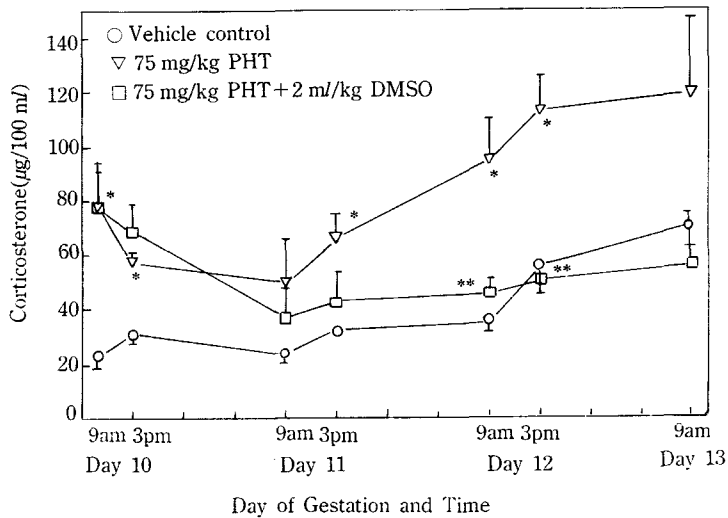
\*\*Significantly different from PHT (75 mg/kg, BW) in gestation day 10~12 at p<0.05.

3) corticosterone의 변동

Corticosterone의 HPLC chromatogram은 Fig. 1과 같다. Corticosterone은 4.40분, prednisolone은 5.70분 전후에서 검출되었으며 10 ng까지 검출이 가능하였다. 일반적으로 용매 대조군에서의 corticosterone의 수준은 오전에 감소하고 오후에 증가하는 경향과 임신 기간이 경과하면서 증가하는 경향이 나타났다(Fig. 2). Fig. 2에서와 같이 PHT의 투여는 모든 측정 기간에서 용매 대조군과 비교하여 모체 혈청 corticosterone의 농도를 169.16%에서 343%까지 증가시켰으며, 임신 10일 투여 후 24시간과 임신 12일 투여 후 24시간을 제외하면 모두 유의성이

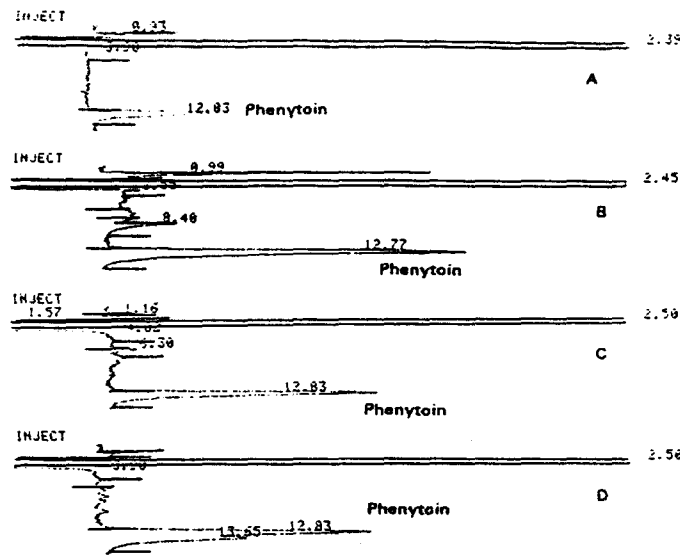


**Figure 1.** High-performance liquid chromatograms of corticosterone. A: Chromatogram of corticosterone standard (10 ng). B: Chromatogram of corticosterone and prednisolone standard (each of 100 ng). C: Chromatogram of serum corticosterone. Phenyton 75 mg/kg was injected intraperitoneally into the 10-day-pregnant ICR mouse and the serum was sampled 2 hours after injection.



**Figure 2.** The effect of phenytoin on maternal serum corticosterone level. PHT was intraperitoneally injected with or without 2 ml/kg DMSO on days 10, 11 and 12 of gestation. Each point represents the mean of four mice and bars represent SE.

\*Significantly different from vehicle control ( $p < 0.05$ ).  
 \*\*Significantly different from 75 mg/kg PHT ( $p < 0.05$ ).



**Figure 3.** High-performance liquid chromatograms of phenytoin.

A: Chromatogram of phenytoin standard (0.5  $\mu$ g). B: Chromatogram of maternal brain phenytoin. Phenytoin (75 mg/kg) was injected intraperitoneally into the 14-day-pregnant ICR mouse and the brain was sampled 8 hours after injection. C: Chromatogram of whole fetus phenytoin. Phenytoin (75 mg/kg) was injected intraperitoneally into the 14-day-pregnant ICR mouse and the fetuses were collected 16 hours after injection. D: Chromatogram of maternal serum phenytoin. Phenytoin (75 mg/kg) was injected intraperitoneally into the 14-day-pregnant ICR mouse and the serum was sampled 16 hours after injection.

있었다( $p < 0.05$ ). PHT와 DMSO를 동시 투여했을 경우의 모체 혈청 corticosterone의 농도는 임신 10일 투여 후 6시간을 제외하면 모든 PHT 단독 투여시보다 감소되어 용매 대조군과 유사한 수준을 나타냈으며 임신 11일 투여 후 24시간과 임신 12일 투여 후 6시간에서 유의성이 있었다 (Fig. 2,  $p < 0.05$ ).

### DMSO에 의한 phenytoin의 경시별 농도 변화

#### 1) 표준선

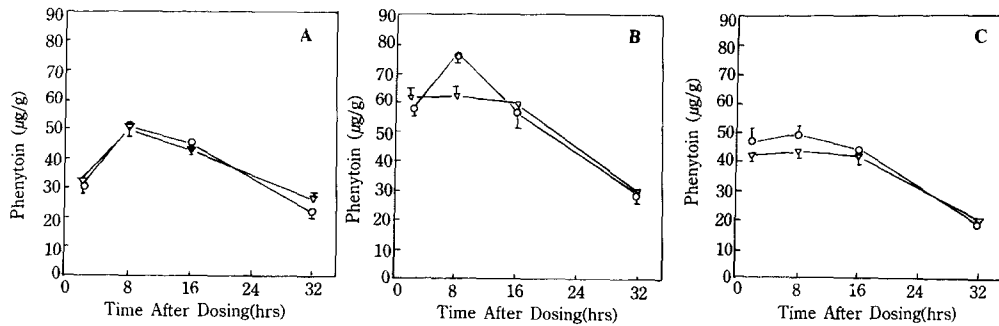
PHT을 농도별로 HPLC에 주입하여 얻은 peak area를 linear regression 하였을 때  $y' = 8.070679 \times 10^{-4}x - 0.1085805$  ( $r = 0.995$ ) 였으며 이 식을 원점을 지나도록 변형하면  $y = 7.478834 \times 10^{-4}x$ 가 되었다.

#### 2) 회수율

PHT 표준품 5  $\mu$ g을 혈청 0.2 ml, 뇌 조직 또는 태아 균질액 1 ml에 넣어 추출하였을 때 혈청에서는 72.57%, 뇌 조직에서는 95.85%, 태아 균질액에서는 89.87%의 높은 회수율을 얻었다.

#### 3) PHT의 경시별 농도 변동

모체의 혈청과 뇌 조직 그리고 태아에서 PHT을 추출한 후 HPLC에 주입하여 Fig. 3의 B, C 및 D와 같은 chromatogram을 얻었다. PHT은 12.83분 전후에서 검출되었다. 모체 혈청과 태아에서의 PHT 농도는 투여 후 8시간에 최고 수준을 보였으며 DMSO를 동시 투여했을 때 모든 측정 시간에서 PHT 단독 투여시와 거의 동일하게 나타나 (Fig. 4 A 및 C) DMSO의 PHT에 대한 직접적 작용은 관찰되지 않았다. 뇌 조직에서는 DMSO의 동시 투여에 의해 투여 후 8



**Figure 4.** Effects of DMSO on phenytoin levels in maternal serum (A), maternal brain (B) and whole fetus (C). Phenytoin (75 mg/kg) was intraperitoneally injected with (triangles) or without (circles) 2 ml/kg dimethyl sulfoxide on day 14 of gestation. Each point represents the mean of four mice and bar represent SE. Asterisk indicates statistical significance at the  $p < 0.05$  level.

시간에서 유의성 있게 감소되었으나 ( $p < 0.05$ ) 2시간, 16시간 및 32시간에서는 거의 동일한 농도를 나타냈다(Fig. 4B).

## 고 찰

구개열은 사람의 태아에서 가장 흔하게 관찰되는 기형의 하나로서 (Greene과 Kochhar, 1975) 다양한 물질과 환경 요인을 실험 동물에 적용하여 구개열 유발을 확인하고 기전을 밝히기 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 구개열의 발생 기전은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않으나 Walker와 Fraser(1957)에 의하여 처음으로 cortisone을 이용한 연구가 시작된 이래 대부분이 glucocorticoid 호르몬을 대상으로 수행되었으며, 구개열 유발에서 glucocorticoids와 유사성과 연관성을 가진 항염제인 PHT에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 본 실험에서는 PHT에 의한 구개열 유발에서 모체에서 증가되는 corticosterone의 연관성을 구명하고자 항최기형 작용이 있을 것으로 추측되는 DMSO를 PHT와 함께 투여한 후 구개열 유발 정도와 모체의 corticosterone 변동을 조사하였다.

PHT을 DMSO와 함께 투여한 후 태아의 구개열 유발 정도를 PHT 단독 투여시와 비교하였던 바 PHT(75 mg/kg, BW)을 단독으로 임신 10~12일에 ICR 마우스의 복강내로 주사하였을 때 51.7%의 태아에서 구개열이 나타났으나 체중 kg당 2 ml의 DMSO를 함께 투여했을 때는 30.8%로 감소되어 DMSO는 PHT에 의한 구개열 유발에 억제 작용이 있음을 확인할 수 있었다. Corticosterone은 마우스 혈중 glucocorticoid의 대부분을 차지하며(Badr와 Spickett, 1965; Wilson 등, 1958), 임신 기간에 따른 변동이 보고되어 있는데(Barlow 등, 1974; Salomon 등, 1979) Salomon 등(1979)에 의하면 계통별로 차이가 있으나 교미가 확인된 때를 임신 0일로 했을 때 임신 9일 전후에 증가가 시작되어 임신 15일째에 최고 수준에 달하고 분만 후 정상으로 회복된다. 본 실험에서는 용매 대조군의 경우 임신 10일부터 혈청내 corticosterone을 측정해본 바 임신 일이 경과되면서 증가하는 경향을 보였으며, 그 수준이 Barlow 등(1974)의 보고와 유사하였다. 또한 생체내에서의 corticosterone 수준은 일주기에 따라 변동을 보이는 것으로 되어 있는데 마우스에서 조사된 바는 없으나 같은 야행성 동물인 랫트의 경우 정오에 가장 낮은 수준을 보이다가 증가되어 오후 8시에 가장 높은 수준에 이른 후 점점 감소되며 오전 9시와 오후 3시를 비교했을 때 오후 3시가 높은 수준을 보이는 것으로 나타났다(Critchlow 등, 1963; Krieger, 1973). 본 실험에서 사용한 ICR 마우스에서도 같은 결과가 관찰되었다. PHT을 투여한 후의 모체 혈청 corticosterone 수준은 실험 기간 동안 용매 대조군에 비하여 116~343% 증가되었



으며, 그 증가 정도는 투여 후 24시간까지는 Hansen 등(1988)이 보고한 A/J 마우스의 경우와 유사하였으며, PHT에 의한 구개열 유발에 저항성 있는 계통인 B6 마우스에서 보다 높은 수준으로 유지되었다. Barlow 등(1980)은 diazepam 투여에 의한 구개열 유발에서 투여 후 6시간에 모체 corticosterone 수준이 대조군과 유사할 때는 구개열이 나타나지 않으나 대조군의 140% 및 250% 정도에서는 구개열이 유발된다고 보고하였다. 또한 Rosenweing과 Blausteine(1970)은 운동 제한 스트레스에 의한 구개열 유발 실험에서 모체 혈액 중의 corticosterone이 고농도로 2시간 정도 지속될 때는 구개열이 나타나지 않으나 48시간 정도 지속되면 36%의 태아에서 구개열이 일어난다고 보고한 바 있어 corticosterone의 증가 정도 뿐만 아니라 그 지속 시간도 중요한 것으로 판단된다. 본 실험에서는 3회의 PHT 투여로 인하여 혈청 중 corticosterone이 116~343% 증가되어 72시간 이상 지속됨으로써 구개열 유발에 충분한 기간으로 여겨진다. DMSO를 PHT와 함께 투여했을 경우의 corticosterone 농도는 임신 10일 투여 후 24시간 이후에는 모든 측정 시간에서 PHT 단독 투여시 보다 낮은 수준으로 유지되었으며 2번째 투여(임신 11일) 후 24시간과 3번째 투여(임신 12일) 후 6시간에서는 유의성이 있게 감소되어 DMSO가 PHT에 의한 corticosterone 증가를 억제하였다. 이와 같이 DMSO는 PHT 투여에 의한 모체 혈청 중 corticosterone의 증가를 억제함으로써 PHT에 의한 구개열 유발을 감소시킨 것으로 사료된다.

PHT 투여에 의하여 유발된 태아의 구개열과 모체의 corticosterone 증가에 대한 DMSO의 억제 작용 기전은 다음의 몇 가지로 추정되고 있다. DMSO는 직접적으로 steroid의 기질인 cholesterol의 합성을 억제시키는 작용(Yachnin 등, 1984; Cooper 등, 1981)과 cholesterol의 조직 uptake를 감소시키는 작용(Herzmann, 1969)이 있어 부신 피질에서의 corticosterone의 생합성을 감소시킬 수 있다. 또한 Pfiffner와 North(1940)는 소의 부신으로부터 호르몬을 추출하는 과정에서 DMSO의 생체내 대사 산물인 dimethyl sulfone이 발견되었다고 보고한 바 있으며, 이 물질의 생체내에서의 역할은 아직 밝혀져 있지 않으나 외부에서 투여된 DMSO가 대사되어(Williams 등, 1965) 부신에서 dimethyl sulfone의 농도를 증가시킴으로써 이것이 corticosterone 합성에 영향을 줄 수 있을 것으로 추측된다.

DMSO는 이와 같이 corticosterone 농도에 영향을 미칠 뿐 아니라 구개부 형성에 대한 직접적 작용들이 있는 것으로 보고되어 있다. 구개열 형성 과정 중 구개판이 수직방향에서 수평방향으로 재정위되는 시기에 구개판을 구성하는 세포내 3',5'-cyclic adenosine mononucleotide(cAMP)의 일시적 증가가 일어나는데(Greene과 Pratt, 1979; Greene과 Garbarino, 1984) 구개열을 일으키는 물질인 glucocorticoid(Pratt와 Martin, 1980; Greene 등, 1981), caffeine(Schreiner 등, 1986), SAD(Eldeib와 Reddy, 1988) 등이 cAMP 농도를 변화시키며 이것이 기형 유발과 관련되어 있음이 보고되어 있다. PHT이 cAMP의 농도에 변화를 주는지 여부는 아직 밝혀져 있지 않으나 PHT에 의하여 모체에서 증가된 corticosterone이 cAMP 농도를 변화시킬 수 있으며, DMSO는 phosphodiesterase의 활성을 억제시키는 작용이 있어(Nakagawa와 Willner, 1986) cAMP의 농도를 증가시킴으로써 PHT에 의한 기형을 감소시킬 수 있을 것으로 추정된다. 또한 DMSO는 *in vitro*에서 구개판의 재정위를 촉진시키는 것이 관찰되어(Wee 등, 1980) PHT에 의하여 일어나는 구개판의 재정위 지연이 DMSO에 의하여 직접적으로 영향을 받을 수 있다.

한편 DMSO는 많은 화학 물질의 흡수와 막 투과성을 증가시키는 작용이 보고되어 있으며(Jacob, 1971), Levine(1975)은 생체내에서 화학물질의 분포를 변화시킨다고 하였다. PHT이 태반을 통과하여 태아로 이동한다는 것은 사람 및 실험 동물에서 보고되어 있으며(Mirkin, 1971; Stevens와 Harbison, 1974), 본 실험에서는 DMSO에 의하여 PHT의 복강내에서의 흡수와 모체 뇌 조직 및 태아로의 이동이 영향을 받는지 여부를 조사하고자 임신 14일에 1회 PHT을 단독 투여하거나 DMSO와 함께 투여하여 PHT의 경시별 농도를 측정하였다. PHT은 투여 후 32시간까지 태아 g당 20~50  $\mu\text{g}$ 의 높은 농도로 분포하였으며, 모체의 혈청 및 태아에서의 PHT

농도는 투여 후 32시간까지 DMSO 동시 투여에 의한 영향이 나타나지 않았다. 이와 같이 DMSO를 함께 투여할 때 태아에서의 PHT 농도는 감소되지 않고 구개열이 감소됨으로써 PHT이 태아에 직접 작용하여 구개열을 일으키는 것이 아님을 추측할 수 있다.

이상에서 나타난 바와 같이 DMSO는 PHT에 의한 태아 구개열 유발과 모체 corticosterone 증가에 억제 효과를 나타냈으며, DMSO는 태아로 이동하는 PHT의 양을 감소시키지 않고 PHT에 의한 구개열 유발은 PHT 투여에 의하여 모체에서 증가된 corticosterone과 밀접하게 관여되어 있을 것으로 추정된다. 이와 같은 DMSO의 항최기형 작용에 대하여 정확한 기전이 연구된다면 항경련제인 PHT을 저독성으로 사용할 방법을 모색할 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Allen, J.P. and Allen, C.F. (1975): The effect of dimethylsulfoxide on hypothalamic-pituitary-adrenal functions in the rat, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **243**, 325-336.
- Badr, F.M. and Spickett, S.G. (1965): Genetic variation in the biosynthesis of corticosteroids in *Mus musculus*, *Nature*, **205**, 1088-1090.
- Bariljak, I.R., Nummer Zhitskaja, L.V. and Turkevich, A.N. (1978): Studies on the anti-mutagenic characteristics of dimethylsulfoxide (DMSO), *Tistol. I. Genit.*, **12**, 50-56.
- Barlow, S.M., Morrison, P.J. and Sullivan, F.M. (1974): Plasma corticosterone levels during pregnancy in the mouse: The relative contributions of the adrenal glands and foeto-placental units, *J. Endocr.*, **60**, 473-483.
- Barlow, S.M., Knight, A.F. and Sullivan, F.M. (1980): Diazepam-induced cleft palate in the mouse: The role of endogenous maternal corticosterone, *Teratology*, **21**, 149-155.
- Barlow, S.M., Morrison, P.J. and Sullivan, F.M. (1975): Effects of acute and chronic stress on plasma corticosterone levels in the pregnant and non-pregnant mouse, *J. Endocr.*, **66**, 93-99.
- Booth, N.H. and McDonald, L.E. (1988): *Veterinary pharmacology and therapeutics* (Iowa State University Press, Ames) p. 727-729.
- Cooper, R.A., Ip, S.H., Cassileth, P.A. and Kuo, A.L. (1981): Inhibition of sterol and phospholipid synthesis in LH-6 promyelolytic leukemia cells by inducers of myeloid differentiation, *Cancer Res.*, **41**, 1847-1852.
- Critchlow, V., Liebelt, R.A., Bar-Sela, M., Mountcastle, W. and Lipscomb, H.S. (1963): Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat, *Am. J. Physiol.*, **205**, 807-815.
- Dixon, R.L., Adamson, R.H., Man Ben and Rall, D.P. (1965): Apparent lack of interaction between dimethyl sulfoxide(DMSO) and a variety of drugs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **188**, 756-759.
- Eldeib, M.M.R. and Reddy, C.S. (1990): Role of maternal plasma corticosterone elevation in the teratogenicity of secalonic acid D in mice, *Teratology*, **41**, 137-146.
- Eldeib, M.M.R. and Reddy, C.S. (1988): Secalonic acid D-induced change in palatal cyclic AMP and cyclic GMP in developing mice, *Teratology*, **37**, 343-352.
- Elmazar, M.M.A. McElhatton, P.R. and Sullivan, F.M. (1981): Acute studies to investigate the mechanism of action of caffeine as a teratogen in mice, *Hum. Toxicol.*, **1**, 52-63.

- Fritz, H. (1976): The effect of cortisone on the teratogenic action of acetylsalicylic acid and diphenylhydantoin in the mouse, *Experientia*, **32**, 721-722.
- Goldman, A.S. (1984): Biochemical mechanism of glucocorticoid- and phenytoin-induced cleft palate, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **19**, 217-239.
- Greene, R.M. and Kochhar, D.M. (1975): Some aspects of corticosteroid-induced cleft palate: A review, *Teratology*, **11**, 47-56.
- Greene, R.M. and Garbarino, M.P. (1984): Role of cyclic AMP, prostalands, and catecholamines during normal palate development in *Current Topics in Developmental Biology* (Moscona, A.A. and Monroy, A (eds), (Academic, New York), Vol. 19, p. 65-79.
- Greene, R.M. and Pratt, R.M. (1979): Correlation between cyclic-AMP levels and cytochemical localization of adenylate cyclase during development of secondary palates, *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 924-931.
- Greene, R.M. Goldman, A.S., Lloyd, M., Baker, M., Brown, K.S., Shanfeld, J.L. and Davidovitch, Z. (1981): Glucocorticoid inhibition of cAMP in the developing secondary palate, *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, **1**, 31-42.
- Hansen, D.K., Holson, R.R., Sullivan, P.A. and Grafton, T.F. (1988): Alterations in maternal plasma corticosterone levels following treatment with phenytoin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **96**, 24-32.
- Hanson, J.W. (1976): Fetal hydantoin syndrome, *Teratology*, **13**, 24-32.
- Hanson, J.W. and Smith, D.W. (1975): The fetal hydantoin syndrome, *J. Pediatr.*, **87**, 285-290.
- Harbison, R.D. and Becker, B.A. (1974): Diphenylhydantoin teratogenicity in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **22**, 193-200.
- Hemm, R.D., Alanoglou, L. and Pollock, J.J. (1977): Cleft palate following prenatal food restriction in mice; Association with elevated maternal corticosteroids, *Teratology*, **15**, 243-248.
- Herzmann, E. (1968): Studies of the effect of dimethyl sulfoxide on experimental hypercholestermia in young cocks, *Acta Biol. Ger.*, **20**, 483-487.
- Iida, H., Kast, A., Tsunenari, Y. and Asakura, M. (1988): Corticosterone induction of cleft palate in mice dosed with orciprenaline sulfate, *Teratology*, **38**, 15-27.
- Jacob, S.W. (1971): Pharmacology of DMSO in *Dimethyl sulfoxide* (Jacob, S.W., Rosenbaum, E.E. and Woods, D.D(eds), (Marcel Dekker, New York), Vol. 1, p. 99-112.
- Kelly, T.E. (1984): Teratogenicity of anticonvulsant drugs. 1: Review of the literature, *Am. J. Med. Genet.*, **19**, 413-434.
- Krieger, D.T. (1973): Effect of ocular enucleation and altered lighting regimens at various ages on the circadian periodicity of plasma corticosteroid levels in the rat, *Endocrinology*, **93**, 1077-1091.
- Levine, W.G. (1975): Effect of dimethylsulfoxide on the hepatic disposition of chemical carcinogens, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **243**, 185-193.
- Massey, K.M. (1966): Teratogenic effects of diphenylhydantoin sodium, *J. Oral Ther. Pharmacol.*, **2**, 380-385.
- McClain, R.M. and Langhoff, L. (1980): Teratogenicity of diphenyl-hydantoin in the New Zealand white rabbit, *Teratology*, **21**, 371-379.
- McDevitt, J.M., Gaqutieri, R.F. and Hann, D.E. (1981): Comparative teratogenicity of cortisone and phenytoin in mice, *J. Pharm. Sci.*, **90**, 156-160.

- Mirkin, B.L. (1971): Diphenylhydantoin: Placental transport, fetal localization, neonatal metabolism, and possible teratogenic effects, *J. Pediat.*, **78**, 329-337.
- Nakagawa, M. and Willner, J.H. (1986): Adenylate cyclase in sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Distribution, orientation, and regulation, *J. Cyclic Nucleotide and Protein Phosphor. Res.*, **11**, 237-251.
- Pfiffner, J.J. and North, H.B. (1940): Dimethyl sulfoxide: A constituent of the adrenal gland, *J. Biol. Chem.*, **134**, 781-782.
- Pratt, R.M. and Martin, G.R. (1974): Epithelial cell death and cyclic AMP increase during palatal development, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 874-877.
- Reddy, C.S., Reddy, R.V. and Hayes, A.W. (1981): Teratogenicity of secalonic acid D in mice, *J. Toxicol. Environ. Health*, **7**, 445-455.
- Rosenbaum, E.E., Merschler, R.J. and Jacob, S.W. (1965): Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders, *J. A. M. A.*, **192**, 309-313.
- Rosenzweig, S. and Blaustein, F.M. (1970): Cleft palate in A/J mice resulting from restraint and deprivation of food and water, *Teratology*, **3**, 47-52.
- Salomonm, D.S., Gift, V.D. and Pratt, R.M. (1979): Corticosterone levels during mid-gestation in the maternal plasma and fetus of cleft palate-sensitive and resistant mice, *Endocrinology*, **104**, 154-156.
- Schreiner, C.S., Zimmerman, E.F., Wee, E.L. and Scott, W. (1986): Caffeine effects on cyclic AMP levels in the mouse embryonic limb and palate in vitro. *Teratology*, **34**, 21-27.
- Stevens, M.W. and Herbison, R.D. (1974): Placental transfer of diphenylhydantoin: Effects of species, gestational age, and route of administration, *Teratology*, **9**, 317-326.
- Stout, S.A. and DeVane, C.L. (1984): Tissue assay of phenobarbital, phenytoin and p-hydroxyphenytoin by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **285**, 500-508.
- Walker, B.E. and Fraser, F.C. (1957): The embryology of cortisone induced cleft palate, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **5**, 201.
- Wee, E.L., Phillips, N.J. Bakiarz, B.S. and Zimmerman, E.F. (1980): Palatal morphogenesis: V. Effects of cholinergic agonists and antagonists on rotation in embryo culture, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **55**, 177-193.
- Williams, K.I.H., Whittemore, K.S., Mellin, T.N. and Layne, D.S. (1965): Oxidation of dimethyl sulfoxide to dimethyl sulfone in the rabbit, *Science*, **149**, 203-204.
- Willson, J.E., Brown, D.E. and Timmens, E.K. (1965): A toxicologic study of dimethyl sulfoxide, *Toxicology and applied pharmacol.*, **7**, 104-112.
- Wilson, H., Borris, J.J. and Bahn, R.C. (1958): Steroids in the blood and urine of female mice bearing an ACTH-producing pituitary tumour, *Endocrinology*, **62**, 135-149.
- Yachnin, S., Toub, D.B. and Mannickarottie, V. (1984): Divergence in cholesterol biosynthetic rate and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity as a consequence of granulocyte versus monocytes-macrophage differentiation in HL-60 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 894-897.
- Yamada, K. and Aizawa, Y. (1984): A simple and convenient method for quantitation of corticosterone by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *J. Pharmacol. Method.* **11**. 291-297.