

효소유도제 및 glutathione이 전배자배양된 랫드태자에서 cyclophosphamide의 독성에 미치는 영향

한순영¹ · 신재호 · 권석철 · 강명옥 · 이유미 · 김관기 · 양미라* · 박귀례 · 장성재

국립보건안전연구원 독성부, *단국대학교 의과대학

Effects of Enzyme Inducers and Glutathione on the Embryotoxicity of Cyclophosphamide in Cultured Rat Embryos

Soon-Young Han¹, Jae-Ho Shin, Seok Cheol Kwon, Myong Ok Kang,
You Mie Lee, Pan Gyi Kim, Mierha Yang*, Kui Lea Park and Seung Jae Jang

Department of Toxicology, National Institute of Safety Research, Seoul 122-020, Korea

*College of Medicine, Dan Kook University, Cheonan, Choongnam 314-714, Korea

(Received February 11, 1995)

(Accepted March 10, 1995)

ABSTRACT : Cyclophosphamide (CP) must be enzymatically activated by cytochrome P450(CYP)-linked mixed-function oxidation pathway to be either mutagenic or teratogenic. Influences of alterations in hepatic mixed-function oxidase activity and glutathione (GSH) content on the embryotoxicity of CP were studied in rat whole embryo culture system. The embryotoxicity of CP was compared using rat S-9 fraction (S-9) pretreated with chemicals inducing different CYP isozymes, acetone (ACE), Aroclor 1254 (ARO), β -naphthoflavone (NAF) and phenobarbital (PHE). When 10.5 day embryos were cultured in the immediately centrifuged rat serum for 48 hrs using general gas changing schedule, CP (40 μ g/ml) with S-9 induced by either NAF or PHE increased the incidence of malformations and significantly decreased embryonic growth compared with the non-induced S-9 group. ACE or ARO induced S-9 group showed no significant difference in embryonic growth. These data suggest that PB and/or NAF inducible CYP isoenzymes are mainly involved in the activation of CP. To examine the effect of GSH on the embryotoxicity of CP, 10.5 day embryos were exposed to CP and S-9 after preincubation with 10 mM of GSH for 3 hrs. In the GSH pretreated group the growth of embryos increased significantly compared with that of the untreated group, suggesting that GSH may protect embryos in culture from some toxic effects of CP.

Key Words : Whole embryo culture, Cyclophosphamide, Glutathione, Enzyme inducers, S-9

I. 서 론

Cyclophosphamide(CP)는 유방암, 폐암, 임파종 및 백혈병의 치료에 널리 사용되고 있는 항암제이며, 또한 신장 또는 골수이식의 면역억제제로 사용되고 있다(Livingston 및 Carter, 1970; Zinke 및 Woods, 1977). CP가 항암효과 및 변이원성을 나타내기 위해서는 cytochrome P 450(CYP)에 의한 대사활성화과정을 거쳐야 하며 이에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다(Fantel 등,

1979; Greenaway 등 1982; Slott 및 Hales, 1988). CP는 CYP에 의해 4-hydroxycyclophosphamide(4-OHCP)로 산화되며 이 4-OHCP는 이어 4-ketocyclophosphamide(4-ketoCP)로 대사되기도 하지만 대부분이 개환되어 aminoaldehyde aldophosphamide(AP)가 되어 4-OHCP와 평형상태를 이룬다. AP는 2개의 서로 다른 대사과정을 거치는데 효소에 의해 carboxyphosphamide가 형성되거나 phosphoramidate mustard(PM)와 acrolein으로 spontaneous하게 분리된다. 4-ketoCP나 carboxyphosphamide는 무독성이거나 저독성이며 또한 요로 대부분 배설되어 CP의 해독경로 중의 하나로 생각되나(Marinello 등, 1984;

¹To whom correspondence should be addressed

Mirkes, 1985) PM은 항암성 및 변이원성과 관련된 대사체로, acrolein은 CP의 화학요법 치료의 부작용의 하나인 최기형성과 관련된 것으로 알려지고 있다(Mirkes, 1985).

CP를 임신 10일부터 14일령까지의 Wistar 및 Sprague-Dawley(SD) 랫드 모체에 복강주사한 결과 10일령의 랫드에서는 발생의 중단과 함께 배자사망이 유발되었고 11일령의 랫드에 주사한 경우에는 뇌헤르니아, 소뇌중(microcephaly), 다리 및 꼬리기형이 유발되었으며(von Kreybig, 1965) Chaube 등(1967)은 임신 11일, 12일에 CP를 투여하여 특징적인 뇌기형을 동반한 구개열(cleft palate), 구순열(cleft lips), 다리기형등을 관찰하여 CP의 최기형성을 확인하였다. 또 Fantel 등(1979)이 *in vitro* 실험에서 microsome을 배지에 넣어 배양할 때 CP가 기형을 유발하였으며, Sanyal 등(1980)은 이러한 최기형작용은 CP의 대사체에 의해 유발된다고 하였다. Kitchin(1981)은 CP의 생활성화유도를 위해 간장의 microsome 분획을 사용하였는데 microsomal oxygenase system이 주로 관여한다고 하였고 Greenaway 등(1982)은 CYP monooxygenase의 억제제를 사용하였을 때 CP의 생활성화가 억제된다고 하였다.

Glutathione(GSH)은 tripeptide로서 세포 및 기관의 독성 방어기전에 관여하는 thiol 중의 주요물질로 잘 알려져 있으나 그 기능과 적정농도에 대해서는 잘 알려지지 않았다(Meister와 Anderson, 1983). Hales(1982)는 임신 랫드에 GSH를 전투여할 경우 CP의 최기형성이 감소된다고 보고하였으며, Slott와 Hales(1987)는 배양된 랫드배지에서 GSH를 인위적으로 감소시킬 때 배자독성의 증가를 관찰하였다.

본 실험에서는 배자의 기관형성기에 대한 최기형유발 물질을 예견하고 그 작용기전을 규명하기 위해 많이 이용되고 있는 전배자배양법(New, 1978)을 이용하여 각기 다른 효소유도제에 의해 유도된 S-9에 의한 microsomal metabolism이 CP의 배자독성 및 최기형성에 미치는 영향을 알아보고 GSH가 CP의 독성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용동물

국립보건안전연구원의 barrier 시설내에서 사육된 특정 병원체 부재(SPF) Sprague Dawley(SD) 암수 랫드를 사용하여 교배일 오후 4시에서 6시 사이에 암컷과 수컷을 2:1로 교배시켰다. 다음날 아침 질진(vaginal plug)을 확인할 수 있거나 질도말법으로 정자가 발견된 것을 임신

동물로 하고 이날의 새벽 0시를 임신 0일로 간주하였다. 임신 랫드는 실험동물용 나무깔집을 사용한 polycarbonate사육상자에서 cage당 3마리씩 수용하였으며 실험동물용 고품사료[(주)신촌사료] 및 수도물을 자유롭게 섭취시켰다. 사육온도는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $55\pm 5\%$ 인 상태로 유지하였고 명암은 1일 12시간(오전6시~오후6시)씩 교대하였다.

2. 효소유도 및 S-9 분획(S-9)의 제조

간의 효소를 유도시키기 위해 체중 약 200 g 정도의 SD 수컷 랫드에 acetone(ACE)의 경우는 30%의 용액을 5 ml/kg의 용량으로 3일간 1일 1회 복강투여하였고, Aroclor 1254(ARO)는 S-9 제조 부검 5일 전에 corn oil에 녹여 500 mg/kg 용량으로 1회 복강투여하였으며, β -naphthoflavone(NAF)은 corn oil에 녹여 80 mg/kg 용량으로 3일간 1일 1회 복강투여하였고, phenobarbital sodium(PB)은 생리식염수에 녹여 80 mg/kg 용량으로 3일간 1일 1회 복강투여하였다. 효소유도를 위한 어떠한 화학물질도 투여하지 않은 랫드의 간장을 S-9 대조군(NID)으로 이용하였다.

S-9 제조 전날 절식시킨 랫드를 경추탈구한 다음 복부를 70% 에탄올로 닦고 개복하여 얻은 간장을 4°C 의 멸균된 0.15 M의 KCl용액으로 혈액이 제거될 때까지 충분히 세척하고 미리 무게를 단 비이커에 옮겨 3배 용량의 같은 용액을 넣어 잘게 절단한 다음 teflon pestle로 균질화하였다. 균질화된 간을 멸균된 원심시험관에 옮긴 후 $0-2^{\circ}\text{C}$ 에서 9000 g로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 취하여 S-9으로 하고 70°C 의 deep freezer에서 사용전까지 보관하였다.

3. 전배자배양

임신 9.5일 또는 10.5일째 되는 날 오후 1시~3시 사이에 경추탈구시켜 도살한 다음 70% 에탄올로 복부를 닦고 개복하여 오염되지 않도록 주의하면서 자궁을 모체로부터 적출하였다. 적출된 자궁을 0.05% glucose와 0.03% sodium bicarbonate가 함유된 멸균 Hank's 용액이 담긴 petri dish로 옮겨 clean bench내에서 미세가위를 이용하여 자궁체로부터 수태산물을 제거한 다음 forceps를 이용하여 자궁벽을 절개하여 배자가 들어있는 탈락막(decidua)을 노출시켰다. 입체현미경하에서 미세한 Watchmaker's forceps를 이용하여 탈락막을 조심스럽게 제거하여 배자를 분리시킨 후, 난황낭, 양막, 그리고 ectoplacental cone을 건드리지 않도록 주의하면서

Reichert's membrane을 조심스럽게 제거하였다. 이와 같이 적출된 배자들을 배양배지 3 ml가 담겨있는 배양병에 2마리씩 넣어 전배자 배양시스템(Ikemoto Co., Japan)에서 48시간 동안 배양하였다. 배양배지는 랫드의 전혈로부터 얻은 IC(immediately centrifuged)혈청을 이용하였으며 배양기내 온도는 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로, 기계의 회전장치(drum)의 회전속도는 1분당 35회전으로 유지시켰다. 가스는 혼합제조된 가스[(주)동진가스]를 습윤하게 한 후 0.22 μm 의 filter를 150 ml/min의 속도로 통과시켜 멸균하여 공급했으며, 가스 교환시간 및 농도는 통상의 조건을 이용하였다(Park 등, 1993). CP는 Hank's 용액에 녹여 stock 용액(10 mg/ml)을 만들어 사용하였으며, 배양배지에 S-9을 넣을 경우 각 배양병당 30 μl 와 조효소로 glucose-6-phosphate 및 NADPH을 배양병당 최종 농도가 각각 5 mM, 1.5 mM가 되게 첨가하였다. CP는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 가스공급 직전에 넣어 48시간 배양하였으며, GSH의 영향을 알아보기 위한 실험에서는 GSH를 10 mM의 농도로 첨가한 배지에서 먼저 3시간 동안 배양한 후 CP 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 PHE로 유도한 S-9을 가하여 나머지 기간동안 노출시켰다. 배양후 모든 배자의 심박과 난황혈액순환을 관찰하였으며, 난황이경(yolk sac diameter), 두전장(crown-rump length), 뇌장(head length), 체절수(somite number)를 측정하였다. 또한 각 배자의 성장 및 분화상태의 평가는 Maelle-Fabry 등(1990)의 배자 점수 평가방법(embryo scoring system)에 의한 점수총계를 이용하였다.

4. 통계방법

본 실험에서 얻은 측정치, 난황이경, 두전장, 뇌장, 체절수 및 점수총계는 CP투여군과 대조군과의 비교 및 GSH가 CP의 최기형성에 미치는 영향비교시 t-test를 실시하여 유의성을 검정하였고, 각기 다른 효소유도제에 의해 유도된 S-9에 대한 영향은 일원분산분석을 실시하여 유의성을 검정하였으며, 유의차가 있는 항목은 Scheffe의 방법에 의해 $P < 0.05$ 수준내에서 각 투여군과 대조군과의 유의성 검정을 실시하였다.

III. 결 과

10.5일령의 랫드 배자를 각각 ACE, ARO, NAF 및 PHE로 유도한 S-9과 배양하여 CP의 배자독성을 비교하였다. 10.5일령 배자를 CP 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 노출시켰을 때, S-9 분획을 사용하지 않은 경우 기형이 유발되지 않았고 성장 상태도 정상이었으나, S-9 분획을 사용한 경우 기형이

유발되었는데 주로 안면기형, 꼬리의 수포형성 및 곡미, 두부의 성장이상(hammer head)이 관찰되었다(Fig. 1). 기형의 발생분포는 효소유도제에 따라 다르게 나타났는데(Table 1), NAF 및 PHE에 의해 유도된 S-9 분획을 이용한 경우 두부 및 꼬리의 이상이 다수 나타났으며 효소유도제로 유도되지 않은 S-9 분획이나 ARO에 의해 유도된 S-9 분획을 이용한 경우보다 기형발생이 많았다. PHE로 유도된 S-9을 사용한 경우에는 신경공개존(neural tube open)도 3예 관찰되었다.

CP의 독성발현에 미치는 여러 효소유도제의 영향을 Table 2에 나타내었다. 난황이경은 모든 군에서 CP 및 S-9투여에 의해 영향을 받지 않았으나 두전장, 뇌장 및 체절수는 모든 CP 및 S-9투여군에서 감소되었다. 점수총계는, ARO군을 제외한 모든 S-9군에서 유의성있게 감소하

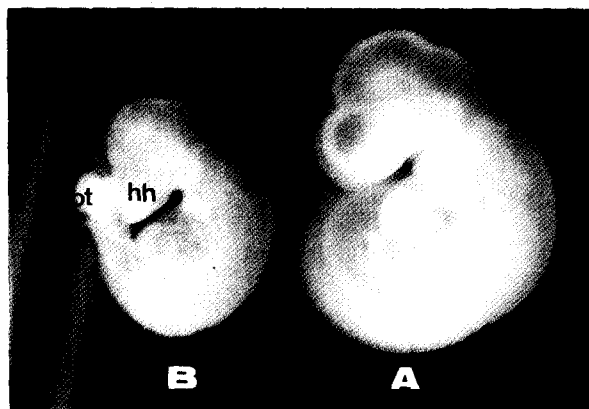


Fig. 1. Embryos grown for 48 hrs from GD 10.5 in the presence of 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cyclophosphamide. (A) A control embryo grown in culture without S-9. (B) An embryo grown in culture including S-9 with cofactors for monooxygenase systems. Note the growth retardation of the embryo, particularly with the hypoplasia of the prosencephalon resulting in a ventrolateral protrusion(hh: hammer head) and a bleb in tail(bt).

Table 1. Quantification of individual embryo defects produced by exposure of cyclophosphamide (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) with S-9 induced by different chemicals

	NID	ACE	ARO	NAF	PHE
	4/10*	6/11	5/10	8/12	10/13
Hammer Head	3	5	2	6	8
Hydrocephalus		1	1	1	
Exencephalus			1		
Hydropericardium	2	1		1	1
Cranial facial abnormality	1	1		2	1
Tail (blistered or twisted)	1		2	4	6
Neural tube open		1		1	3

*: No. of malformed embryos/No. of observed embryos

Table 2. Effects of CP (40 µg/ml) with S-9 induced by different chemicals on the growth of 10.5 day rat embryos cultured in vitro for 48 hr

	NID	ACE	ARO	NAF	PHE
Yolk-sac diameter (mm)					
Control	5.50±0.34	5.54±0.50	5.50±0.12	5.54±0.34	5.65±0.13
CP	5.55±0.33	5.50±0.22	5.47±0.24	5.48±0.20	5.45±0.29
Crown-rump length (mm)					
Control	3.80±0.14	4.08±0.49	3.90±0.22	4.00±0.39	3.82±0.14
CP	3.25±0.34*	3.21±0.51*	3.30±0.30*	3.29±0.10*	3.02±0.25*
Head length (mm)					
Control	2.46±0.13	2.48±0.24	2.42±0.25	2.45±0.19	2.42±0.29
CP	1.80±0.25*	1.82±0.28*	1.78±0.35*	1.78±0.56*	1.74±0.20*
Number of somites					
Control	29.5±3.78	29.1±1.07	29.2±2.68	30.7±2.42	29.4±2.70
CP	23.3±1.38*	21.2±2.31*	22.0±0.82*	18.2±1.72** ^a	19.6±3.14** ^a
Total score					
Control	60.6±4.13	60.4±1.67	59.7±4.15	61.8±3.86	59.8±4.96
CP	55.2±4.79*	52.3±3.98*	54.9±5.38	50.7±3.73*	49.7±3.27** ^{a,b}

*Significantly different from the control, non-treated with CP, group (P<0.05).

^aSignificantly different from the non-induced S9 (NID) group (P<0.05).

^bSignificantly different from the Aroclor 1254 induced S9 (ARO) group (P<0.05).

IV. 고 찰

Table 3. Effects of GSH (10 mM) pretreatment for 3 hrs on the embryotoxicity of CP (40 µg/ml) with S-9 induced by PHE

	GSH	CP	GSH+CP
Yolk-sac diameter (mm)	5.78±0.11	5.45±0.29*	5.28±0.17** ^a
Crown-rump length (mm)	4.23±0.21	3.02±0.25*	3.78±0.25** ^a
Head length (mm)	2.28±0.08	1.74±0.20*	2.14±0.02** ^a
Number of somites	28.7±1.83	19.6±3.14*	24.3±1.80** ^a
Total score	60.3±1.25	49.7±3.27*	56.4±2.74** ^a

*Significantly different from the group treated with GSH alone (P<0.05).

^aSignificantly different from the group treated with CP and S9 (P<0.05).

었다. 또한 체질수는 NAF 및 PHE에 유도된 S-9을 사용한 경우 효소유도제로 유도되지 않은 S-9을 사용한 경우보다 유의성있게 감소하였으며, PHE에 유도된 S-9군에서 효소유도제로 유도되지 않은 S-9군 또는 ARO로 유도된 군보다 점수 총계가 유의성있게 감소하였다. 그러나, ACE에 의해 유도된 S-9을 이용한 경우, CP에 의해 체질수 및 점수총계가 감소하였으나, 유도되지 않은 S-9에 대한 유의성은 관찰되지 않았다.

CP의 초기형성에 대한 GSH의 방어효과를 알아보기 위한 실험에서는 S-9 및 조효소와 GSH를 10 mM의 농도로 첨가한 배지에서 48시간 배양한 경우 대조군에 비해 배자의 성장 및 발생에 영향이 없었으나 GSH를 10 mM의 농도로 첨가한 배지에서 먼저 3시간동안 배양한 후 CP 40 µg/ml를 나머지 기간동안 노출시켰을 때에는 CP 40 µg/ml를 전기간동안 노출시킨 군보다 두전장, 뇌장, 체질수 및 점수총계가 유의성있게 증가하였으나, GSH 대조군 수준에는 이르지 못하는 못하였다(Table 3).

CP 40 µg/ml를 랫드 전배자에 노출시켜 S-9 및 조효소와 같이 배양했을 때 10.5일령 배자에서 기형이 유발되어 안면기형, 꼬리의 수포형성 및 곡미, 신경공개존과 특징적인 두부이상(2)이 관찰되었는데 특히 전뇌의 형성부전과 더불어 후에 발달되어 종뇌(telencephalon)가 되는 부분에 복측외측의 돌출(ventrolateral protrusion)이 생기는 CP의 대표적 기형인 hammer head가 본 실험에서도 모든 효소유도제군에서 관찰되었다. 이것은 CP노출시 조직학적으로 심장계에는 영향을 미치지 않고 neural epithelium을 포함한 전반적인 간엽(mesenchyme)에 영향을 미치고 있는데, 이것은 발생시간(generation time)과 분화 단계(stage)에 따라 초기형물질에 대한 저항성이 다르기 때문에 생긴 것으로 생각된다. Von Kreybig(1965)는 CP를 Wistar 및 SD 랫드에 *in vivo* 투여할 때 10일령 배자에서는 배자사망을 11일령 배자에서는 기형을 유발하였으나 높은 농도에서도 몇몇 배자는 분만때 까지 생존한다고 보고하였다. 또한, Chaube 등(1967)은 CP를 임신 2일부터 12일까지 복강투여한 경우 임신 11일, 12일령에서만 기형이 나타나고 10일령의 경우는 52마리의 배자 중 51마리가 사망하였다고 보고하였다. Ashby 등(1976)은 CP투여가 9.5일 및 10.5일령에서는 배자사망을 유발하고, 7.5일, 8.5일 및 11.5일령에서는 기형을 유발한다고 보고하였다. 대체적으로, CP는 임신 10일째 또는 10일 이전에 투여한 경우, 효과가 없거나 배자사망을 보이나, 적절한 용량으로 임신 10-16일중에 투여한 경우 기형을 나타내는 것으로 보고되었다. 본실험에서는 9.5일령 배자

및 CP 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여까지는 정상성장 상태를 보였으나 (data not shown), 10.5일 배자에서 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 대부분의 배자에서 기형이 발생되어 여러 저자의 *in vivo* 실험과 유사한 결과를 나타내었다. 그러나, 기형발생시기 및 CP노출 용량이 다른 보고와 다소 차이가 나타나는데, 이것은 실험에 이용한 동물의 종, S-9의 종류 및 효율, 실험조건등의 *in vitro* 실험의 특이성과 관련이 있는 것으로 생각된다.

본 실험에서, CP를 S-9과 같이 노출시켰을 때 최기형성을 나타냈을 뿐만 아니라 성장상태에서 있어서도 난황이경을 제외한 두전장, 뇌장, 체질수 및 점수총계가 S-9을 첨가하지 않은 군보다 유의적으로 감소하여 CP는 간 microsome에 의해 대사되어 배자에 대한 독성을 나타낸다는 것을 재확인할 수 있었으며 전배자배양방법이 대사활성화를 거쳐 작용하는 약물에 대한 *in vitro* 실험에서도 효과적으로 이용될 수 있음을 보여주고 있다. PHE와 NAF에 의해 유도된 S-9이 효소유도체로 유도되지 않은 S-9을 사용한 경우보다 높은 기형유발의 경향을 보이며 체질수의 유의성있는 감소와 특히 PHE군의 경우는 점수총계도 유도되지 않은 군 및 ARO군에 비하여 유의성있게 감소하여 성장의 지연을 나타내는 등 배자독성이 더 크게 나타난 것으로 보아 두 물질에 의해 유도된 CYP의 isoenzyme이 CP의 대사활성화에 주로 관여하였을 것으로 생각된다. NAF는 CYP의 subfamily 중 1A1, 1A2 및 2A1을 유도하고 PHE는 2A1과 2B1, 2B2, 2B4 및 2C5, 2C6 그리고 3A2, 3A4를 유도하는 것으로 ARO는 1A1, 1A2 및 2B1을 ACE는 2E1을 유도하며(Murray 및 Reidy, 1990), CP는 isofamide와 함께 CYP 2B1에 의해 활성화되는 물질로 보고된 바 있으며(Oesch-Bartlomowicz 등, 1990), Greenaway 등(1982)도 PHE로 유도된 랫드의 S-9을 이용한 경우 CP에 의한 기형발생이 증가되고 3-methylcholanthrene(3MC)으로 유도된 경우 기형이 발생하지 않고 또한 CYP monooxygenase의 억제제로 알려진 metyrapone이나 일산화탄소에 의해 활성이 억제된다고 보고한 바 있다. 따라서 본 실험결과와 종합하여 볼때 CP는 3MC에 의해 유도되는 CYP의 subfamily인 1A1, 1A2와 ACE에 의해 유도되는 2E1에 의해 서라기 보다 NAF 및 PHE에 의해 유도된 S-9에 풍부한 2A1 및 2B1에 의해 대사활성화가 많이 이루어져 최기형성과 성장의 지연 등 배자독성이 증가되었다고 생각된다.

GSH의 CP에 대한 영향을 알아보기 위한 실험에서는 S-9과 조효소 및 GSH를 10 mM의 농도로 첨가한 배지에서 48시간 배양한 경우, 다른 대조군 배양군에 비해 배자의 성장 및 발생에 영향을 미치지 않았다. GSH를 먼저 3시간동안 배양한 후 CP 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 노출시켰을 때, CP

40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 전기간 동안 노출시킨 군보다 두전장 및 뇌장과 체질수 및 점수총계가 유의성있게 증가하였으나, GSH 대조군 수준에 이르지지는 못하였다. GSH는 세포내 thiol로서 세포내 대사에서 많은 중요한 기능을 한다고 알려져 있는데, 그중의 하나가 GSH가 환원제로 작용하거나 활성 중간대사체로 부터 세포 고분자를 방어한다고 알려져 있다(Köberle와 Speit, 1990). 4-OHCP의 hydroxyl group이 치환되어 thiol유도체가 되는 것도 하나의 기전이라고 생각되나, 이 합성물은 곧 가수분해되므로 그 작용효과는 의심스럽다. 그러나, PM과 acrolein은 CP의 oxazaphosphorine ring이 열려 생긴 최종 독성 대사산물로서 PM의 chloroethyl기의 chloride가 저분자량의 thiol로 치환된다고 하였고 특히 acrolein은 sulfhydryl group과 반응하고, *in vivo*와 *in vitro*에서 세포내 thiol인 GSH와 결합하여 GSH conjugates를 형성한다고 알려져 있는데(Slott 등, 1987; Peters 등, 1990), CP의 독성과 관련하여 이것에 의한 acrolein의 해독과 관련이 있는 것 같다. Peters 등(1990)은 K-562세포에서 GSH esters를 넣어 줄 경우, GSH의 수준이 증가했으며 4-hydroperoxy CP의 세포독성을 감소시켰다고 하였으나, GSH가 CP의 세포독성을 방어하는 실질적인 기전은 아직 잘 알려지지 않았다. 본 실험에서는 GSH에 의해 CP의 대사체들이 직접적인 conjugation이나 불활성화가 일어날 수 있으며, 이것에 의해 본실험에서 관찰된 CP의 detoxification을 설명할 수도 있을 것 같다.

본 실험을 통해, CP는 전배자배양법에서 *in vivo* 상황과 유사한 결과를 나타내므로써 기관형성기 중의 일부만 관찰할 수 있다는 단점에도 불구하고 prenatal toxicology의 screening단계 및 기전연구에 이용할 수 있는 한 방법으로 생각되었으며, Cytochrome P450의 isozyme중 2A1 및 2B1이 CP의 대사활성화에 주로 관여하므로써 배자에 대한 독성을 유발하고 GSH는 이로 인한 CP의 독성에 방어적인 효과가 있음을 관찰하였으며, 이에 관한 계속적인 실험의 수행이 필요하다고 생각되었다.

V. 결 론

전배자배양법을 이용하여 여러가지 효소유도체에 의해 유도된 S-9 분획이 알킬화제인 CP의 독성에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험한 결과, 임신 10.5일의 배자에 CP를 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 48시간 노출시킬 때 S-9 분획을 사용하지 않은 경우에는 기형이 유발되지 않았고 성장상태도 정상이었으나, S-9 분획을 사용한 경우 기형이 유발되었으며 주로 안면기형, 꼬리의 수포형성, 곡미 및 두부의 성장이상(hammer head)이 관찰되었다. NAF 또는

PHE로 유도된 S-9 분획을 사용한 경우 화학물질로 유도되지 않은 S-9 분획 또는 ARO로 유도된 S-9 분획을 사용하였을 때보다 기형의 발생율이 높은 경향을 보였으며 전반적인 성장상태도 유의성있게 부진하였다. ACE로 유도된 S-9군도 성장상태가 부진하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 따라서 NAF 또는 PHE로 유도된 Cytochrome P450의 isoenzyme인 2A1 및 2B1가 CP의 대사 활성화에 주로 관여하였을 것으로 생각된다. 한편, GSH가 CP의 독성에 미치는 영향을 알아보기 위해 배양배지에 GSH를 10 mM의 농도로 넣고 3시간 동안 배양한 후 나머지 기간 동안 40 µg/ml의 CP를 노출시켰을 때 배자의 전반적인 성장이 GSH를 전투여하지 않고 CP만을 노출시켰을 때보다 유의적으로 증가하여 GSH가 CP의 독성을 경감시키는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

- Ashby, R., Dans, L., Dewhurst, B.B., Espinal, R., Penn, R.N. and Upshell, D.G. (1976): Aspects of teratology of cyclophosphamide, *Cancer Treat Rep.*, **60**, 477-489.
- Chaube, S., Kury, G. and Murphy, M.L. (1967): Teratogenic effects of cyclophosphamide in the rat, *Cancer Chemother. Rep.*, **51**, 363-376.
- Fantel, A.G., Greenaway, J.C., Juchau, M.R. and Shepard, T.H. (1979): Teratogenic bioactivation of cyclophosphamide *in vitro*, *Life Sci.*, **25**, 67-72.
- Greenaway, J.C., Fantel, A.G., Shepard, T.H. and Juchau, M.R. (1982): The *in vitro* teratogenicity of cyclophosphamide in rat embryos, *Teratology*, **25**, 335-343.
- Hales, B. (1982): Comparison of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and its metabolites, 4-hydroxycyclophosphamide, phosphoramidate mustard, and acrolein, *Cancer Res.*, **42**, 3018-3021.
- Kitchin, K.T., Schmid, B.P. and Sanyal, M.K. (1981): Teratogenicity of cyclophosphamide on a coupled microsomal activating/embryo culture system, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 59-64.
- Köberle, B. and Speit, G. (1990): The effect of glutathione depletion on sister-chromatid exchange induction by cytostatic drugs, *Mut. Res.*, **243**, 225-231.
- Livingston, R.B. and Carter, S.K. (1970): Cyclophosphamide in *Single agent in cancer therapy* (Plenum, New York), p. 25-80.
- Maele-Fabry, G.V., Delhaise, F. and Picard, J.J. (1990): Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos, *Toxic. in vitro*, **4**, 149-156.
- Marinello, A.J., Bansal, S.K., Paul, B., Koser, P.L., Love, J., Struck, R.F. and Gurtoo, H.L. (1984): Metabolism and binding of cyclophosphamide and its metabolite acrolein to rat hepatic microsomal cytochrome P-450, *Can. Res.*, **44**, 4615-4621.
- Murray, M. and Reidy, G.F. (1990): Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P-450 by chemical agents, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **42**(2), 85-101.
- Meister, A. and Anderson, M. (1983): Glutathione, *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 711-760.
- Mirkes, P.E. (1985): Cyclophosphamide teratogenesis: A review, *Terato. Carcino. Mutagen.*, **5**, 75-88.
- New, D.A.T. (1978): Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis, *J. Reprod. Fert.*, **53**, 81-122.
- Oesch-Bartlomowicz B., Vogel, S., Arens, H. and Oesch, F. (1990): Modulation of the control of mutagenic metabolites derived from cyclophosphamide and isofamide by stimulation of protein kinase A, *Mut. Res.*, **232**, 305-312.
- Park, K.L., Shin, J.-H., Kang, C.-M., Han, S.Y., Kim, P. G., Lee, S.-Y., Kim, K. and Jang, S.J. (1993): In situ hybridization studies on the localization of retinoic acid receptor- transcripts in rat embryo, *Kor. J. Gen.*, **15**, 325-336.
- Peters, R.H., Ballard, K., Oatis, J.E., Jollow, D.J. and Stuart, R.K. (1990): Cellular glutathione as a protective agent against 4-hydroperoxycyclophosphamide cytotoxicity in K-562 cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **26**, 397-402.
- Sanyal, M.K., Kitchin, K.T. and Dixon, R.L. (1981): Rat conceptus development *in vitro* : Comparative effects of alkylating agents, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **57**, 14-19.
- Slott, V.L. and Hales, B.F. (1987): Enhancement of the embryotoxicity of acrolein, but not phosphoramidate mustard, by glutathione depletion in rat embryos *in vitro*, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 2019-2025.
- Slott, V.L. and Hales, B.F. (1988): Role of the 4-hydroxy intermediate in the *in vitro* embryotoxicity of cyclophosphamide and dechlorocyclophosphamide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **92**, 170-178.
- Von Kreybig T. (1965): Die teratogene wirkung cyclophosphamid während der embryonalen entwicklungsphase bei der ratte, *Naunyn-Schniedeb Arch. Exp. Pathol. Phamakol.*, **252**, 173-195.
- Zinke, H. and Woods, J.E. (1977): Donor pretreatment in cadaver renal transplantation, *Surgery Gynec. Obstet.*, **145**, 183-188.