

비타민 A 및 피리딘으로 유발된 사염화탄소 유발성 간독성에 대한 2-(알릴티오)피라진의 보호효과: Φ x-174 DNA 손상에 미치는 효과

김상건[†] · 조주연 · 최성희 · 김낙두*
덕성여자대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학
(Received October 15, 1996)

Protective Effects of 2-(Allylthio)pyrazine on Retinoyl Palmitate- and Pyridine-Potentiated Carbon tetrachloride-induced Hepatotoxicity: Effect on Φ x-174 DNA Strand Breakage

Sang Geon Kim[†], Joo Youn Cho, Sung Hee Choi and Nak Doo Kim*
College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea
*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 157-742, Korea

Abstract—2-(Allylthio)pyrazine is effective in selectively suppressing constitutive and inducible expression of cytochrome P450 2E1. The effect of 2-(allylthio)pyrazine against potentiated chemical injury was studied in rats. Vitamin-A pretreatment of rats substantially increased carbon tetrachloride hepatotoxicity, as supported by an ~4-fold increase in serum alanine aminotransferase (ALT) activity. Concomitant pretreatment of rats with 2-(allylthio)pyrazine at the daily dose of 200 mg/kg resulted in a 76% decrease in vitamin-A-potentiated hepatotoxicity, which supported the possibility that 2-(allylthio)pyrazine protects the liver against chemical-induced hepatic injury by the mechanism associated with Kupffer cell inactivation. Pyridine pretreatment caused substantial enhancement in carbon tetrachloride hepatotoxicity. 2-(Allylthio)pyrazine treatment of rats reduced the pyridine-potentiated toxicity in a dose-dependent manner. Animals treated with both pyridine and 2-(allylthio)pyrazine prior to intoxicating dose of CCl₄ resulted in 85% and 47% decreases in pyridine-increased triglycerides and cholesterol levels in the liver. The protective effect of 2-(allylthio)pyrazine on the DNA strand breakage induced by benzenetriol was assessed by measuring the conversion of supercoiled Φ x-174 DNA to the open relaxed form. 2-(Allylthio)pyrazine blocked the benzenetriol-induced conversion of supercoiled DNA to open circular form in a dose-dependent manner. The presence of 2-(allylthio)pyrazine at the doses from 1 to 10 mM in the incubation mixture containing 5 μ M μ benzenetriol completely protected benzenetriol-induced DNA strand breakage with the EC₅₀ for the 2-(allylthio)pyrazine blocking being noted as ~220 μ M, whereas allyl disulfide exerted protecting effect at relatively high concentrations (i.e. ~850 μ M), suggesting that 2-(allylthio)pyrazine effectively scavenges the reactive oxygen species. These results provide evidence that 2-(allylthio)pyrazine blocks vitamin A- or pyridine-potentiated CCl₄ hepatotoxicity and that the agent is active in protecting DNA by scavenging the reactive oxygen species.

Keywords □ 2-(allylthio)pyrazine, hepatoprotective effect, Kupffer cell, hepatotoxicity.

독성물질, 발암물질 및 일부치료제 등 유기 화합물은 cytochrome P450의 대사를 받아 반응성이 강한 중간

체를 형성하고, 조직중의 거대분자인 DNA, 단백질 등과 공유결합을 형성하므로 조직에 손상을 유발시킬 수 있다.^{1,2)} 특히 간독성 및 발암성을 나타내는 여러 소분자 유기 화합물의 대사에 있어서는 cytochrome P450 2E1의 발현이 반응성 대사 중간체의 형성과 높은 관계

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-901-8382 (팩스) 02-901-8386

를 갖는다.^{3,4)} Cytochrome P450 2E1은 활성산소의 생성 및 지질과산화에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이 효소의 활성 및 발현을 억제시킴으로써 화학적 발암 과정의 일부단계가 차단될 수 있다.⁶⁻⁹⁾ 본 연구실에서는 saturated alkyl sulfide에 의하여 CCl₄ 유발성 간독성이 더욱 증가되는 반면, diallyl disulfide와 diallyl sulfide는 cytochrome P450 2E1의 발현 억제 및 cytochrome P450 2E1 대사활성도를 억제하여 간독성을 차단시키는 현상을 보고한 바 있다.¹⁰⁾

사염화탄소 등의 소분자 유기 화합물은 대사를 통하여 Kupffer cell을 활성화시키고, 활성화된 Kupffer cell은 독성이 강한 활성 산소 및 cytokines을 분비하여 간 실질세포의 파괴를 초래할 수 있다.¹¹⁾ 광량의 vitamin-A를 전처치한 후 저용량의 CCl₄를 투여할 경우 CCl₄ 독성이 상승적으로 증가되는 현상이 보고된 바 있다. 이러한 간독성 강화는 vitamin-A가 간의 대식세포인 Kupffer cell을 활성화시켜 활성 산소를 유리하기 때문으로 추정한다.¹²⁻¹⁴⁾ 수종의 간장보호물질은 Kupffer cell 활성을 억제하거나 Kupffer cell 침윤을 억제함으로써 간장보호작용을 나타낸다.

선행된 연구에 근거하여 일련의 유기화합물을 합성하였으며, 합성된 물질중 2-(allylthio)pyrazine은 다양한 독성물질에 대하여 보호작용을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 앞선 연구에서 2-(allylthio)pyrazine이 흰쥐에서 cytochrome P450 2E1 발현을 강력히 억제하는 현상을 발견한 바 있다.¹⁵⁾ 2-(Allylthio)pyrazine에 의한 cytochrome P450 2E1의 발현 억제가 간 보호작용을 나타낸다는 가설에 근거하여, cytochrome P450 2E1 발현억제와 간보호 효과간의 직접적인 상관관계와 그 분자적 기전을 밝히는 일환으로 본 연구를 실시하였다. 본 연구에서는 vitamin-A 또는 pyridine을 간독성을 상승시키는 물질로 동물에 전처치하여 CCl₄ 유발성 간손상에 대한 2-(allylthio)pyrazine의 간장보호효과를 관찰하였다. 한편, 2-(allylthio)pyrazine이 지질과산화를 억제시키는 효과를 나타내므로¹⁵⁾, 연구의 후반에는 2-(allylthio)pyrazine이 활성산소를 scavenging하는지를 $\Phi\alpha$ -174 DNA 모델을 이용하여 관찰하였다.

실험방법

시약 - Vitamin-A (retinoyl palmitate, USP

type 500, 542,000 I.U./g)는 Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland)에서 공급받았다. 2-(Allylthio)pyrazine은 유한양행에서 합성하여 제공하였다. 그밖의 다른 시약들은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다.

동물처치 - 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐(200~250 g)를 대한실험동물센터에서 공급받아 20~23°C의 온도와 50% 습도를 유지하여 사육하였다. 사료(삼양사료)와 물은 충분한량 공급하였다.

Vitamin-A는 250,000 IU/kg/day의 용량으로, pyridine은 50 mg/kg/day의 용량으로 7일간 투여한 후 마지막 날에 CCl₄를 저용량 (0.15 ml/kg, i.p.)으로 투여하여 간손상을 유발시켰다. GdCl₃는 10 mg/kg의 용량으로 CCl₄ 투여전 24시간에 정맥주사하였다. 2-(Allylthio)pyrazine에 의한 간장보호효과를 검증하기 위하여 2-(allylthio)pyrazine (200 mg/kg/day) + vitamin-A 또는 2-(allylthio)pyrazine (30~200 mg/kg/day) + pyridine으로 7일간 전처치하였다. 모든 처치군에 대하여 CCl₄를 투여하고 24시간 후에 치사시켜 심장천공으로 혈액을 채취하였다. 2-(Allylthio)pyrazine과 CCl₄ 투여의 vehicle로는 corn oil을 사용하였다.

혈장 ALT 측정 - 간손상의 지표로서 혈장 ALT 활성도를 상업용 kit (영동제약)를 사용하여 측정하였다. 혈액을 채취하여 EDTA처리하여 혈장을 분리한 후 kit를 사용하여 Reitman-Frankel법에 따라 측정하였다. 이때 측정치가 표준곡선 범위내에 있도록 시료를 희석하여 측정하였다.

Triglycerides와 total cholesterol 함량 측정 - 간조직의 total homogenate (1:10, w/v)를 이용하여 상업용 kit (영동제약)로 triglycerides와 total cholesterol 함량을 측정하였다. Triglycerides 함량은 Trinder법에 의하여 측정하였고, total cholesterol 함량은 cholesterol 유리형에 산화효소를 반응시켜 생성된 H₂O₂에 과산화효소와 4-aminoantipyrine 및 phenol을 동시에 반응시켜 생성되는 quinone을 500 nm에서 비색정량하였다.

$\Phi\alpha$ -174 DNA strand break assay - 2-(Allylthio)pyrazine이 benzenetriol에 의하여 유도되는 DNA strand breakage에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 $\Phi\alpha$ -174 DNA supercoiled form이 open relaxed form으로의 전환을 측정하였다.¹⁶⁾ 2-(Allylthio)py-

Table I—Serum ALT activity in Sprague-Dawley rats treated with retinoyl palmitate and/or 2-(allylthio)pyrazine (2-AP) for 7 days prior to a single injection with a subtoxic dose of CCl₄ (0.15 ml/kg, i.p.)

Pretreatment	Hepatotoxicity (KA Unit/1)		
	Before CCl ₄	After CCl ₄	% Control
Untreated	60±5	433±38	0
Retinoyl palmitate	57±6	1515±259	100
Retinoyl palmitate + GdCl ₃ 10 mg/kg	97±9	221±37**	0
+ 2-AP 200 mg/kg	121±20	688±131**	24

Retinoyl palmitate was administered at the dose of 200,000 unit/kg/day orally to activate Kupffer cells. GdCl₃ was intravenously injected at the dose of 10 mg/kg at 24 h prior to CCl₄ injection. The values are mean±S.E. (n=10). Percent control was calculated using the following formula: (ALT-433)/(1515-433)×100. Data were analyzed with one-way analysis of variance followed by the Newmann-Keuls test for comparisons of multiple group means. Comparison with retinoyl palmitate + CCl₄ treated group (**p<0.01).

razine의 DNA strand breakage 효과에 대한 대조약 물로는 pyrazine과 diallyl sulfide를 사용하였다. 100 mM의 인산칼륨 완충액(pH 7.4)과 5~50 μM benzenetriol을 함유하는 반응혼합액을 37°C에서 60분동안 반응시킨후 stop buffer을 가하고, 1% agarose gel상에서 전기영동하여 Φx-174 DNA의 open relaxed form으로의 전환을 측정하였다.

실험결과

Vitamin-A에 의하여 강화되는 CCl₄ 간독성에 미치는 2-(allylthio)pyrazine의 효과 - Kupffer cell 매개로 강화되는 간독성에 대한 2-(allylthio)pyrazine의 보호효과를 관찰하였다. 준독성용량의 CCl₄를 동물에 1회 주사하였을 때 혈장 ALT의 활성도가 비처치군에 비하여 약 7배 증가하였다. 과량의 vitamin-A를 흰쥐에 7일간 전처치한 후 CCl₄에 의한 간손상을 관찰하였을 때 CCl₄ 단독처치군에 비하여 혈장 ALT 활성도가 4배 증가하여 vitamin A에 의하여 CCl₄의 간독성이 상승적으로 증가하였다(Table I). 그러나 2-(allylthio)pyrazine을 1일 용량 200 mg/kg으로 vitamin-A와 7일간 병용 투여한 후 CCl₄를 투여하였을 때는 vitamin-A로 강화되는 간독성이 76% 감소하였다(Table I). 비교목적으로 vitamin-A를 전처치한 동물에 Kupffer cell in-

Table II—Serum ALT activity in Sprague-Dawley rats treated with pyridine (50 mg/kg, i.p., 7d) and/or 2-(allylthio)pyrazine (2-AP) for 7 days prior to administration with a subtoxic dose of CCl₄ (0.15 ml/kg, i.p.)

Pretreatment	Hepatotoxicity (KA Unit/l)		
	Before CCl ₄	After CCl ₄	% Inhibition
Untreated	56±5	43±38	
Pyridine	108±42	7654±781	0
Pyridine + GdCl ₃ 10 mg/kg	70±6	534±61**	99
+ 2-AP 200 mg/kg	74±34	1992±361**	78
+ 2-AP 100 mg/kg	135±36	2717±720**	68
+ 2-AP 30 mg/kg	177±50	5903±440*	24

Pyridine was administered at the dose of 50 mg/kg daily for 7 days before the injection of carbon tetrachloride. GdCl₃ was intravenously injected at the dose of 10 mg/kg at 24 h prior to CCl₄ injection. The values are mean±S.E. (n=10). Percent control was calculated using the following formula: (1-(ALT-433)/(1515-433))×100. Data were analyzed with one-way analysis of variance followed by the Newmann-Keuls test for comparisons of multiple group means. Comparison with pyridine + CCl₄ treated group (**p<0.01, *p<0.05).

toxicant인 GdCl₃를 10 mg/kg 용량으로 1회 주사하였을 때 vitamin-A에 의하여 증가되는 CCl₄의 상승적인 간독성강화가 완전히 소실되는 것으로 나타났다. Vitamin-A 전처치에 의하여 상승될 수 있는 혈장 ALT 활성도가 2-(allylthio)pyrazine의 병용투여로 감소되는 현상은 2-(allylthio)pyrazine이 Kupffer cell 불활성화를 통하여 간손상을 방어할 수 있는 가능성을 시사한다.

Pyridine에 의하여 강화되는 CCl₄ 간독성에 미치는 2-(allylthio)pyrazine의 효과 - Cytochrome P450 2E1의 강력한 유도제인 pyridine을 동물에 전처치하였을 때 4-nitrophenol hydroxylase 활성도가 증가하고, 면역화학적 분석에 따르면 P450 2E1 단백질이 유도 증가된다.¹⁷⁾ 본 연구에서는 cytochrome P450 2E1의 강력한 유도가 CCl₄에 의한 간독성 강화에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 cytochrome P450 2E1 유도제로서 pyridine을 사용하였고, pyridine으로 강화되는 CCl₄ 간독성에 2-(allylthio)pyrazine이 어떠한 효과를 미치는지 관찰하였다. Pyridine을 50 mg/kg의 용량으로 7일간 전처치하였을 때 CCl₄에 의한 간독성이 현저히 상승하여 CCl₄ 단독군에 비하여 혈장 ALT 활성도가 17배 증가하였다(Table II). 흥미롭

Table III—Hepatic triglycerides and cholesterol contents in Sprague-Dawley rats treated with pyridine (50 mg/kg, i.p., 7d) and/or 2-(allylthio)pyrazine (200 mg/kg/day, i.p., 7d)-(2-AP) prior to administration with a subtoxic dose of CCl₄ (0.15 ml/kg, i.p.)

Treatment	Triglycerides (mg/g tissue)	Cholesterol (mg/g tissue)
CCl ₄ 0.15 ml/kg	9.6±0.96**	4.9±0.20**
PY+CCl ₄	24.9±2.09	12.3±1.09
PY+GdCl ₃ +CCl ₄	4.8±0.23**	3.8±0.16**
PY+2-AP+CCl ₄	11.9±1.15**	8.8±0.58**

Pyridine (PY) was daily administered at the dose of 50 mg/kg for 7 days to induce P450 2E1 prior to the injection of carbon tetrachloride. GdCl₃ was intravenously injected at the dose of 10 mg/kg at 24 h prior to CCl₄ injection. The values are mean±S.E. (n=10). Data were analyzed with one-way analysis of variance followed by the Newmann-Keuls test for comparisons of multiple group means. Comparison with pyridine+CCl₄ treated group (**p<0.01).

제도, pyridine에 의한 CCl₄ 간독성의 상승도 GdCl₃의 1회 병용처치 (10 mg/kg, i.v.)로 완전히 차단되었다. 2-(Allylthio)pyrazine과 pyridine을 병용하여 전처치 할 때에는 pyridine에 의하여 강화되는 간독성이 2-(allylthio)pyrazine 투여용량의존적으로 감소되었다 (Table II). 즉, 2-(allylthio)pyrazine를 1일 용량 200, 100 또는 30 mg/kg으로 pyridine과 함께 병용처치하였을 때 CCl₄에 의하여 강화되는 혈장 ALT의 증가가 각각 78%, 68%, 24%로 감소되었다.

Pyridine을 전처치한 후 CCl₄를 주사하였을 때 간조직중 triglycerides와 cholesterol의 함량이 CCl₄ 투여군에 비하여 2.5배씩 증가하였으나, pyridine을 전처치한 흰쥐에 GdCl₃ (10 mg/kg, i.v.)를 투여한 후 CCl₄를 주사하였을 때는 pyridine에 의하여 상승되는 지방 축적이 감소하였다. Pyridine과 2-(allylthio)pyrazine (200 mg/kg/day)을 병용투여한 후 CCl₄를 주사하였을 때 pyridine+CCl₄ 처치군에 비하여 간조직중 triglycerides와 total cholesterol 함량이 각각 85%, 47%로 감소하였다 (Table III).

Thioacetamide로 유발된 간섬유화에 대한 2-(allylthio)pyrazine의 효과 - Thioacetamide를 만성적으로 투여하여 유발된 간섬유화에 2-(allylthio)pyrazine이 치료효과를 나타내는지를 관찰하였다. 간섬유화가 일어난 동물에 2-(allylthio)pyrazine을 1일 용량 100 mg/kg으로 2주간 투여한 후 간조직중 hy-

Table IV—The effect of 2-(allylthio)pyrazine (2-AP) on the thioacetamide-induced hepatic fibrosis

Treatment	Hydroxyproline (mg/g tissue)	% Change
Untreated	0.086±0.010	100
Thioacetamide	0.134±0.021*	156
Thioacetamide + 2-AP 100 mg/kg	0.159±0.024	185

Female Wistar rats were treated with thioacetamide in drinking water at the concentration of 0.03% for 3 months. After fibrosis formation, rats were daily treated with 2-AP at 100 mg/kg for two weeks or vehicle and liver fibrosis formation was assessed by hydroxyproline levels. The values are mean±S.E. (n=6). Data were analyzed with one-way analysis of variance followed by the Newmann-Keuls test for comparisons of multiple group means. Comparison with untreated group (*p<0.05).

droxyproline의 함량은 감소하지 않았다 (Table IV). 이러한 결과는 2-(allylthio)pyrazine이 xenobiotics의 활성화단계에 관여하여 간장보호효과를 나타내는 간접적인 증거로 볼수 있다.

Benzenetriol에 의한 DNA strand breakage에 대한 2-(allylthio)pyrazine의 보호효과 - 선행된 연구에 따르면 P450 2E1은 활성산소의 생성을 증가시키고 free radical의 증가에 따른 지질과산화물을 향상시킨다. 2-(Allylthio)pyrazine이 대사물에서 기원하는 활성산소를 직접적으로 제거하는 효과를 갖는지를 benzenetriol에 의한 DNA strand breakage에 미치는 효과로 관찰하였다. 5 μM benzenetriol을 함유하는 반응액에 1~10 mM의 2-(allylthio)pyrazine을 가했을 때 2-(allylthio)pyrazine의 농도의존적으로 benzenetriol에 의한 Φx-174 DNA supercoiled form의 open relaxed form으로의 전환이 억제되었다. 이는 2-(allylthio)pyrazine이 benzenetriol에 의한 single DNA strand breakage를 억제하는데 기인한다. 같은 반응조건에서 benzenetriol에 대한 2-(allylthio)pyrazine의 DNA 보호효과 EC50은 ~220 μM로 나타났다 (Figure 1A, 1B).

대조 약물로 사용한 allyl disulfide도 benzenetriol에 의한 DNA strand breakage를 효과적으로 감소시켰으며, EC50은 850 μM로 나타났다. 2-(Allylthio)pyrazine에 의한 DNA strand breakage 억제효과는 benzenetriol의 농도를 25 혹은 50 μM로 증가시킬때 약화되는 것이 EC50의 증가로 확인되었으며, 이는 2-(allylthio)pyrazine이 benzenetriol에 길항하는 것을

시사한다. 2-(Allylthio)pyrazine의 Φ_x -174 DNA strand 보호효과를 시간의 변화에 따라 관찰하였다 (Figure 2A, 2B).

2-(Allylthio)pyrazine 구조중의 일부 moiety인 pyrazine은 benzenetriol에 의하여 유발되는 DNA strand breakage를 효과적으로 감소시키지 못하였다. 한편 0.1 mM 2-(allylthio)pyrazine을 함유하는 반응액에서는 Φ_x -174 DNA의 open circular form으로의 전환이 10분 이내에 완전히 일어났으나, 2-(allylthio)pyrazine의 농도를 0.5, 1, 5 mM로 증가시킴에 따라 전환율이 감소하여 1 또는 5 mM 2-(allylthio)pyrazine의 농도에서는 반응시간 60 분까지 50%의 전환억제가 유지되었다(Figure 3A, 3B). 이러한 결과는 2-(allylthio)pyrazine이 reactive oxygens을 직접적으로 scavenging하므로써 DNA 손상을 방어하는 것을 증명한다.

고 찰

여러 유기황화합물이 cytochrome P450 2E1 활성을 선택적으로 억제시키며 간에서 cytochrome P450 2E1 단백질의 발현을 감소시킨다.^{6,8)} Allyl sulfide와 그 구조유사체는 cytochrome P450 2E1 대사활성도 및 발현을 선택적으로 억제하며^{6,9)}, 이러한 효과는 이 계열 약물의 chemopreventive effects와 관련이 있는 것으로 추정된다. Chemopreventive effects를 갖는 많은 화합물이 화학적 독성물질의 공격으로부터 주요장기를 보호하는 효과가 있는 것으로 보고되었다. 예를들면, allyl disulfide를 동물에 전처치할때 acetaminophen 또는 CCl_4 에 의하여 유발되는 조직손상이 현저히 억제되며, 이는 이들 독성물질 대사에 관여하는 cytochrome P450 2E1의 활성억제와 높은 상관성을 갖는다.

Kupffer cell은 독성이 강한 화학적 매개물질을 간 실질세포로 분비한다. Vitamin-A에 의하여 활성화된 Kupffer cell로부터 분비된 활성산소는 지질과산화물 일으키고, CCl_4 투여시 간손상을 강화시킨다. 따라서 Kupffer cell의 활성화는 간독성과 매우 밀접한 관계가 있으며, 본 실험을 통하여 활성화된 Kupffer cell의 작용이 2-(allylthio)pyrazine에 의하여 억제되고, Kupffer cell을 매개로 하여 일어나는 간독성의 강도가 완전히 제어됨을 실험적으로 증명하였다. 이러한 보호

효과는 혈장 ALT의 변화 및 간조직중의 지질함량변화에서 공통적으로 발견된 현상이었다. 이러한 결과는 Kupffer cell 활성화로 증가된 간손상이 2-(allylthio)pyrazine에 의하여 억제되는 것을 증명한다. 이러한 결과는 2-(allylthio)pyrazine에 의하여 Kupffer cell phagocytosis 및 활성산소분비가 억제되는데 기인하는 것으로 보인다. Kupffer cell 활성화의 변화는 cytochrome P450 2E1의 유도와 밀접한 관련이 있는 것으로 보이니 관련된 분자적인 수준의 기전은 더욱 연구되어야 한다.

앞선 연구에서는 pyrazine에 의하여 유도증가되는 cytochrome P450 2E1 대사활성도가 2-(allylthio)pyrazine을 병용투여할 때 감소되는 것을 보인 바 있다.¹⁵⁾ 본 실험에서는 cytochrome P450 2E1의 유도제인 pyridine (50mg/kg/day, i.p., 7days)을 흰쥐에 처치할 경우 저용량의 CCl_4 에 의해 매우 강력한 간손상이 일어났으며, 2-(allylthio)pyrazine은 pyridine과 CCl_4 를 투여할 때 상승하는 혈장 ALT의 증가를 완전히 낮추는 효과를 갖는다는 것을 증명하였다. 이러한 pyridine에 의한 간손상증가는 cytochrome P450 2E1의 유도발현과 간독성이 밀접한 관계가 있으며, 2-(allylthio)pyrazine은 P4502E1의 활성 억제 및 발현 차단을 통하여 간장보호효과를 갖음을 증명한다.

Cytochrome P450 2E1은 활성산소의 생성과 밀접한 관련을 갖는 효소이다. 활성산소의 제거에 2-(allylthio)pyrazine이 직접적인 효과를 갖는지를 검정하기 위하여 Φ_x -174 DNA를 모델로 사용한 *in vitro* 효과를 검정하였다. Φ_x -174 DNA strand breakage의 분석방법은 자가산화된 지질이나 DNA의 손상을 일으키는 radical species 및 oxygen radical에 의한 DNA 절단을 분석하는 방법으로 흔히 응용된다. DNA strand breakage의 활성도는 peroxide 등의 방출이 최대일 때 가장 커지며, 본 실험에서는 oxygen species를 방출하는 화합물로서 benzenetriol을 이용하였다. Benzenetriol은 cytochrome P450 2E1의 대사에 의하여 benzene에서 생성되는 화합물로서 benzene의 대사물 중에서 가장 oxidative stress를 강하게 일으키는 물질이며, benzene에 의한 발암성 (leukomogenic effect)의 궁극적인 원인물질로 간주된다. 본 연구에서는 일차적으로 모든 supercoiled DNA를 open circular DNA로 전환하는 농도인 5 μ M benzenetriol을 실험에 응용하였으며, 2-

(allylthio)pyrazine은 비교적 저농도에서 benzenetriol의 공격을 방어하는 것으로 나타났다. 2-(Allylthio)pyrazine은 allyl disulfide에 비하여 약 4배의 potency 증가를 나타냈다. Benzenetriol에 의한 DNA 손상에 대한 보호효과를 경시적으로도 관찰할 수 있었으며, 2-(allylthio)pyrazine의 용량에 의존적인 지속적인 oxygen radical scavenging효과를 관찰할 수 있었다. 따라서 2-(allylthio)pyrazine은 allyl disulfide에 비하여 oxygen scavenging효과가 강한 약물이며, 이는 2-(allylthio)pyrazine이 cytochrome P450 2E1의 활성화와 발현을 억제하는 효과이외로 oxidative stress를 일으키는 물질에 직접적으로 길항하는 효과를 갖음을 증명한다.

결 론

종합하면 2-(allylthio)pyrazine은 vitamin-A에 의하여 유도되는 간손상을 감소시켰으며 pyridine에 의해 유도된 간손상을 cytochrome P450 2E1 발현의 억제제를 통하여 차단하였다. 본 2-(allylthio)pyrazine의 연구결과는 cytochrome P450 2E1에 의해 대사되는 반응성이 강한 독성물질로부터 조직을 보호하는 chemoprotective agent의 개발에 도움을 주리라 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품개발연구센터(RCND) 연구지원금으로 수행되었으며 이에 감사를 표합니다. 저자들은 thioacetamide에 의하여 유발되는 liver cirrhosis모델에 미치는 2-(allylthio)pyrazine의 효과를 검정하여주신 남선영씨에게 감사를 표합니다.

문 헌

- 1) Seeff, L. B., Cuccherini, B. A., Zimmerman, H. J., Adler, E. and Benjamin, S. B. : Acetaminophen hepatotoxicity in alcoholics. *Ann. Intern. Med.* **104**, 399 (1986).
- 2) Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. : Benzene metabolism by ethanol-, acetone-, and benzene-inducible cytochrome P-450 (2E1) in rat and rabbit liver microsomes. *Cancer Res.* **48**, 5387 (1988).
- 3) English, J. C. and Anders, M. W. : Evidence for the metabolism of N-nitrosodimethylamine and carbon tetrachloride by a common isozyme of cytochrome P-450. *Drug Metab. Dispos.* **13**, 449 (1985).
- 4) Nelson, S. D., Mitchell, J. R., Timbrell, J. A., Snodgrass, W. R. and Corcoran, G. B. : Isoniazid and iproniazid activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. *Science* **193**, 901 (1976).
- 5) Lewis, J. G., Stewart, W. and Adams, D. O. : Role of oxygen radicals in induction of DNA damage by metabolites of benzene. *Cancer Res.* **48**, 4762 (1988).
- 6) Brady, J. F., Li, D., Ishizaki, H. and Yang, C. S. : Effect of diallyl sulfide on rat liver microsomal nitrosamine metabolism and other monooxygenase activities. *Cancer Res.* **48**, 5937 (1988).
- 7) Hayes, M. A., Rushmore, T. H., and Goldberg, M. T. : Inhibition of hepatocarcinogenic responses to 1,2-dimethylhydrazine by diallyl sulfide, a component of garlic oil. *Carcinogenesis* (Lond.) **8**, 1155 (1987).
- 8) Brady, J. F., Wang, M.-H., Hong, J.-Y., Xiao, F., Li, Y., Yoo, J.-S. H., Ning, S. M., Lee, M.-J., Fukuto, J. M., Gapac, J. M. and Yang, C. S. : Modulation of rat hepatic microsomal monooxygenase enzymes and cytotoxicity by diallyl sulfides. *Toxicol. Appl. pharmacol.* **108**, 342 (1991).
- 9) Kwak, M. K., Kim, S. G., Kwak, J. Y., Novak, R. F. and Kim, N. D. : Inhibition of P450 2E1 expression by organosulfur compounds allylsulfide, allylmercaptan and allylmethylsulfide in rats. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 531 (1994).
- 10) Kim, S. G., Chung, H. J. and Cho, J. Y. : Molecular mechanism for alkyl sulfide-modulated carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: the role of cytochrome P450 2E1, P450 2B and glutathione S-transferase expression. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **277**, 1058 (1996).

- 11) Edwards, M. J., Keller, B. J., Kauffman, F. C. and Thurman, R. G. : The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **119**, 275 (1993).
- 12) ElSisi, A. E. D., Earnest, D. L. and Sipes, I. G. : Vitamin A potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: role of liver macrophages and active oxygen species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **119**, 295 (1993a).
- 13) ElSisi, A. E. D., Earnest, D. L. and Sipes, I. G. : Vitamin A potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: enhanced lipid peroxidation without enhanced biotransformation. **119**, 289 (1993b).
- 14) ElSisi, A. E. D., Pauline, H., Sim, W.-L. W., Earnest, D. L. and Sipes, I. G. : Characterization of Vitamin A potentiation of carbon tetrachloride-induced liver injury **119**, 280 (1993c).
- 15) Kim, N. D., Kwak, M. K. and Kim, S. G. : Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by 2-(allylthio)pyrazine, a potential chemopreventive agent: hepatoprotective effects. *Biochem. Pharmacol.* in press (1997).
- 16) Kim, S. G. and Novak, R. F. : Role of P450IIE1 in the metabolism of 3-hydroxypyridine, a constituent of tobacco smoke: Redox Cycling and DNA strand scission by the metabolite 2,5-dihydroxypyridine. *Cancer Res.* **50**, 5333 (1990).
- 17) Kim, S. G., Williams, D. E., Schuetz, E. G., Guzelian, P. S. and Novak, R. F. : Pyridine induction of cytochrome P-450 in the rat: role of P-450j (alcohol-inducible form) in pyridine N-oxidation. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **246**, 1175 (1988).