

흰쥐에서 N,N-dimethylformamide에 의한 간장의 Microsomal Cytochrome P450의 유도

고상백, 차봉석, 김기웅¹⁾, 강성규¹⁾, 정효석¹⁾

연세대학교 원주의과대학 예방의학교실 및 직업의학연구소, 한국산업안전공단 산업보건연구원¹⁾

Induction of Hepatic Microsomal Cytochrome P450 by N,N-dimethylformamide in Sprague-Dawley Rats

Sang Baek Koh, Bong Suk Cha, Ki Woong Kim¹⁾,
Seung Kyu Kang¹⁾, Hyo Seok Joung¹⁾

Department of Preventive Medicine and Institute of Occupational Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine
Korea Industrial Safety Corporation Industrial Health Research Institute¹⁾

Objectives. In order to gain a better understanding of the mechanism of DMF toxicity, recent studies have focused on hepatic drug metabolizing enzymes. In this study, we investigated the effects of DMF on the induction of P450 and the activities of other related enzymes in rat liver microsomes.

Methods. DMF was administered to male Sprague Dawley rats by intraperitoneal injection at 0(control), 450(D1), 900(D2), 1,800(D3) mg DMF/kg body weight in olive oil once a day for three days. Hepatic P450 was measured by method of Omura and Sato. We evaluated selective assays for the three drug metabolizing cytochrome P450 isoenzymes 1A1, 2B1 and 2E1.

Results. The content of microsomal protein, P450 and b5 were tended to be decreased in DMF treated group, but they were not statistically significant. The activity of NADPH-cytochrome P450 reductase was significantly increased dose dependently($p<0.01$), but the activity of NADH-b5 reductase was decreased in the

treated group($p<0.01$). The activities of PROD and EROD were not significant between control and treated group. The activities of pNPH in the DMF treated groups were higher than that of the control group($p<0.01$). When Western immunoblottings were carried out utilizing three monoclonal antibodies which were specific against P4501A1/1, P4502B1/2 and P4502E1, the strong density band corresponding to P4502E1 was observed with the microsomes obtained from the rats treated with DMF. But there were no significant increased in the P4501A1/2 and P4502B1/2 band densities in immunoblotting.

Conclusions. These result suggested that P4502E1 was inducible by DMF and P4502E1 isozyme might be responsible for the hydroxylation of DMF to HMMF.

Korean J Prev Med 1999;32(1):88-94

Key Words: N,N-dimethylformamide, cytochrome P450, P4502E1

서 론

N,N-dimethylformamide(DMF)는 물과 유기용매에 잘 녹고, 수지나 폴리머를 잘 녹이는 성질이 있어서 보호코팅, 접착제, 필름과 인쇄용 잉크의 보조용제 및 합성피혁제조 등에 널리 이용되는데, 특히 합성피혁제조시 다량 사용되고 있다(IPCS, 1991). DMF는 호흡기와 피부를 통하여 흡수되며(Mraz와 Nohova, 1992), 고농도에 노출시 호흡부전 및 근육의 무긴장증과 같은 일차적인 반응이 일어난다(Horn, 1961; Palmen 등, 1993). 급성으로는 복통, 구토, 어지러움증, 혈압

상승, 빈맥 등의 증상이 동반될 수 있다(IPCS, 1991). 만성적으로 노출될 경우 알코올에 대한 불내성, 혈액학적 변화, 체장질환, 고환암 등 여러 건강장해를 일으킬 수 있으나, 1차 표적장기가 간장으로서는 주로 간독성을 유발한다(Clayton 등, 1963; Ducartman 등, 1986; Redlish 등, 1988; Mraz 등, 1989; Wang 등, 1991; Rojensberg, 1994).

따라서 그 동안 많은 연구자들은 동물과 사람을 대상으로 하여 표적장기인 간장과 관련하여 대사기전 및 독성유발 기전에 대한 많은 연구를 수행하고 있는데(Cai 등, 1992; Kawai 등, 1992; Amato

등, 1996), 그들의 연구 결과에 의하면 DMF 자체의 독성보다는 체내의 이물질 대사효소들의 작용에 의해서 대사변형되면서 형성된 N-methylformamide(NMF)나 N-hydroxy methyl-N-methylformamide(HMMF)와 같은 활성화된 대사 중간체에 의한 독성이 더 크다고 보고하였다(Scailteur 등, 1984; Kennedy, 1986; Gescher, 1993; Bulcke 등, 1994).

DMF의 대사과정은 체내의 이물질(xenobiotics) 대사효소인 cytochrome P-450(P450)에 의해 메틸기가 히드록시화되는 1차 대사변형 과정을 거쳐 HMMF가 생성되고, HMMF는 빠른 속도로 비효소반응(화학적 구조 변형) 또는 효소적 반응에 의해 NMF로 대사변형 된다.

NMF는 다시 P450에 의해 두가지 경로를 따라 대사소실과정(metabolic fate)을 거친다. 하나는 메틸기의 산화반응으로 간독성이 적은 N-hydroxymethyl formamide(HMF)가 되는 과정이고, 다른 하나는 N-formyl group이 산화반응에 의해 반응성이 큰 중간 대사물질인 methylisocyanate(MIC)로 변형되고, MIC는 다시 glutathion과 포합반응(conjugation)을 거쳐 N-acetyl-S- (N-methylcarbamoyl) cysteine(AMCC)으로 대사되는 과정이다(Cooksey 등, 1983; Kestell 등, 1987; Pearson 등, 1991; Mraz와 Nohova, 1992). 이때 DMF 대사에 있어서 대사속도를 조절하는 단계는 P450에 의하여 HMMF가 형성되는 단계이며, 간장독성도 주로 이 과정에서 유발되는 것으로 알려졌다.

Imazu 등(1992)의 보고에 의하면, DMF를 흰쥐의 체중 Kg당 475mg을 1주일 동안 피하주사한 후 간장에 있어서 microsomal p450의 함량을 측정된 결과, microsomal 단백질의 함량 변화는 없었으나 P450의 함량의 변화는 대조군에 비해 약 34% 정도의 감소가 관찰되었다고 보고하였다. Mraz 등(1993)은 DMF가 HMMF로 대사되는 과정에 있어서 특정한 P450 특이항체의 작용에 의해서 대사가 억제된다고 하였으며, Chieli 등(1995)은 P450E1 동위효소를 유도하는 아세톤을 전처리한 후 DMF를 투여한 실험군에서 간 괴사가 현저하였음을 보고하였다.

Amato 등(1996)은 흰쥐의 체중 kg당 50, 200 및 400 mg의 N,N-diethylformamide(DEF)를 4일 동안 연속해서 복강주사한 후 간장의 microsomes에서 ethoxyresorfin-O-deethylase (EROD), pentoxyresorfin-O-deethylase(PROD) 및 aniline hydroxylase(AH)의 활성도를 측정된 결과, 200 및 400 mg 투여군에서 PROD와 AH의 활성도가 통계적으로 유의하게 증가되었다고 보고하였다. 이와 같이 P450은 유도물질의 종류와 농도에 따른 함량의 차이와 기질에 대한 특이성과 중복성을 보이며, 그로 인하여 유도되는 동위효소의 단백질 함량도 많은 차이

를 보인다. 따라서 이 연구에서는 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 이용하여, DMF를 유도물질로 하여 투여농도에 따라 간장의 microsomal P450 의존성 촉매효소의 활성도 변화와 P450 단세포균 항체를 이용하여 어떤 P450 동위효소가 유도되는지를 *in vivo* 실험을 통하여 알아보 고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

Bovine serum albumin(BAS), cytochrome C, EDTA, 7-ethoxyresorufin, glucose 6-phosphate, glucose 6-phosphate dehydrogenase, glycerol, KCl, NaCl, NADPH, NADH, olive oil, sucrose, TEMED 등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였으며, 투여물질인 DMF는 Merck사(New Jersey, USA)에서 구입하여 사용하였다. Western immunoblot kit은 TROPIX사(Bedford, MA, USA)에서 구입하였으며, 그 밖의 일반적인 생화학 시약은 Sigma사와 Aldrich사로부터 구입하여 사용하였다.

본 연구에 사용된 실험동물은 Sprague Dawley계 6주령된 수컷 흰쥐(170±10 g)로서 한국화학연구소 안정성센터로부터 분양받아 실험 1주일 전부터 온도(23±2℃), 습도(55±5%) 및 채광조절(12hr light/dark)된 사육장에서 사료와 음용수를 자유로이 섭취시켰다. 실험군은 olive oil 만을 투여한 군(C, control)과 DMF를 유도물질로 하여 olive oil에 용해시켜 450(D1), 900(D2), 1,800(D3) mg/kg으로 하여 1일 1회씩 3일간 연속하여 복강 주사 하였다. 각각의 실험군은 4마리로 하였다.

2. 실험 방법

1) 간 Microsome 분획의 분리

실험동물을 Sodium-thiopental(40 mg/kg)로 마취시킨 다음, 즉시 간을 절제하여 0.9% sodium chloride solution (saline 용액)으로 혈액을 씻어내고, 응고

된 혈액 및 지방질을 제거한 간을 0.25 M sucrose 용액으로 균질화한 다음, 차등원심분리(12,000 g에서 40분, 105,000 g에서 60분)하여 KCl(0.15 M)로 씻어낸 후 남은 pellet만을 모아서 0.25 M sucrose로 resuspension하여(Park과 Kim, 1984) microsome 분획을 얻었다. 이 microsome 분획은 -70℃에 보관하면서 단백질 정량, P450 의존성 촉매효소의 활성도 및 면역항체 실험을 수행하였다.

2) 단백질, P450 및 b5 정량

Microsomal 단백질의 함량은 BSA를 표준물질로 하여 Lowry등(1951)의 방법에 따라 측정하였으며, P450 함량은 Omura와 Sato방법(1964)에 의해 microsomes에 일산화탄소(CO)를 2분 동안 bubbling 시킨 후 Na₂S₂O₄를 넣어 450 nm와 490 nm에서 흡광도 차이를 측정하여 몰흡광계수 91 mM⁻¹cm⁻¹로부터 함량을 결정하였다. Cytochrome b₅의 농도는 Werringlo와 Estabrook(1975)의 방법에 의하여, 시료 cuvette에 30 mM NADH를 첨가하여 환원 시킨 후 420 nm와 409 nm에서 흡광도 차이를 측정하여 몰흡광계수 185 mM⁻¹cm⁻¹을 이용하여 b₅ 함량을 결정하였다.

3) P450 의존성 전자-전달계 활성도 측정

NADPH-cytochrome C(P450) reductase 활성도는 Master 등(1967)의 방법으로 측정하였다. 반응 혼합물로 microsomes(250 µg/ml)과 0.3 nmol potassium phosphate buffer(pH 7.7), 40 nmol cytochrome C를 혼합한 후 0.1 nmol NADPH를 넣고 550 nm에서 3분 동안 흡광도를 측정하여 몰흡광계수 21 mM⁻¹cm⁻¹를 이용하여 reductase의 활성도를 측정하였다.

NADH cytochrome b₅ reductase의 경우에는 Hultquist(1978) 방법으로 활성도를 측정하였다. 반응 혼합물로 35 nmol cytochrome C, 1.0 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl과 microsomes(25 µg)을 혼합한 후 60 nmol NADH를 넣고 550 nm에서 3분 동안 흡광도를 측정하여 몰흡광계수 21 mM⁻¹cm⁻¹를 이용하여 reductase 활성도

를 측정하였다.

4) P450 의존성 촉매효소의 활성화 측정

기질의 종류에 따라서 P450 동위효소의 활성도가 특이성을 보이는데, P4501A는 ethoxyresorufin O-deethylase (EROD)에 대해서, P4502B는 pentoxyresorufin O-dealkylase (PROD)에 대해서, P4502E1은 p-nitrophenol hydroxylase(pNPH)에 대하여 선택적인 활성을 나타낸다.

따라서 이 연구에서는 EROD와 PROD의 활성도는 Klotz 등(1984)의 방법에 따라 기질의 종류를 달리하여, EROD는 ethoxyresorufin을, PROD는 pentoxyresorufin을 기질로 하여 측정하였다. pNPH의 활성도는 Koop 방법(1986)에 의해서 p-nitrophenol이 간장의 microsomes에 의해서 생성되는 4-nitrocatechol량을 측정하여 상대적인 효소의 활성도를 측정하였다.

5) Western Immunoblot 분석

Microsomal 단백질에 대한 전기영동은 Laemmli(1970) 방법에 의해서 Bio-Rad Protein Ixi Cell apparatus를 사용하여 sodium dodecyl sulfate polycarylamide gel(SDS-PAGE, 8.5%)을 만든 후 각각의 시료를 10 μ씩 gel위에 loading하여 전기영동을 실시한 후, Millipore사 (Bedford, ma, USA)의 Immobilon-P nitrocellulose membrane을 microsomal 단백질이 분리된 gel 위에 올려 놓고 235 mA로 전류를 조절하여 Immobilon-P nitrocellulose membrane으로 이전 시켰다. Western immunoblot 분석은 anti-mouse P4501A1/2(MAb 1-7-1), P4502B1/2(MAb 2-66-3)와 P4501E(MAb 1-98-1) 단일세포성항체를 이용하여 Ko 등(1987)의 방법을 변형하여 TROPIX사 (BEDford, MA, USA)의 Western-Light Plus™ kit을 사용하여 Chemiluminescence 방법으로 실시하였다. 이 방법은 Immobilon-P nitrocellulose membrane 상에 결합된 항체의 작용에 의해서 chemiluminescent 기질이 분해될 때 발생하는 형광을 x-ray film에 폭로시켜 전개된

반응 띠를 관찰하여 유도를 확인하는 방법이다.

3. 자료분석

자료분석은 SPSS/PC를 이용하여 평균 ± 표준편차로 제시하였으며, 각 농도에 따른 각 측정값의 차이는 1요인 분산분석을 이용하여 p값이 0.05이하일 때 유의한 차이의 한계로 삼았다.

결 과

1. 단백질 함량의 변화 및 전자-전달계의 활성도

실험동물로 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 이용하여 유도물질로 DMF를 전처리 한 후, 간장의 microsome에서 단백질, P450 및 b₅의 함량 변화를 측정하였다 (Table 1).

DMF의 투여농도를 달리하여 복강주사한 후 간장의 microsomal 단백질 함량을 측정하고 투여농도에 의존한 함량의 변화는 없었으나 대조군보다 다소 감소된 측정치를 보였다. 또한, 실험대상의 종(species), 유도물질의 종류 및 투여농도에 의존하여 함량의 차이를 보이지 않았으며, cytochrome b₅의 함량도 대조군과 비교시 통계학적인 유의한 차이는 없었다.

체외로부터 흡수된 이물질과 체내 합성

물질의 대사에 관여하는 P450은 이들 물질의 대사과정에 있어서 전자가 요구되는데, 이때 P450에 전자를 전달하는 전자-전달계가 NADPH-P450 reductase와 flavo 단백질인 NADH-b₅ reductase이다.

이번 실험에서 DMF를 투여한 후 microsomes 분획에서 NADPH-P450 reductase 활성도를 측정한 결과, 대조군(0.086 μmol/min/mg)보다 투여군 모두에서 통계학적으로 유의한 활성도의 증가가 관찰되었으며, 450 mg/kg(0.135 μmol/min/mg), 900 mg/kg(0.152 μmol/min/mg) 및 1800 mg/kg(0.159 μmol/min/mg) 투여군에 있어서 투여농도의 증가와 더불어 활성도의 증가를 보였다 (Table 2). 그러나 flavo 단백질인 NADH-b₅ reductase의 활성도는 대조군(0.993 μmol/min/mg)보다 투여군에서 통계적으로 유의한 감소를 보였으며(p < 0.01), 투여용량이 증가함에 따라 활성도는 0.174(450 mg/kg), 0.161(900 mg/kg), 0.126 μmol/min/mg(1,800 mg/kg)으로 감소하여 NADPH-P450 reductase의 활성도 변화와는 상반되는 결과를 보였다 (Table 2).

2. P450 의존성 촉매효소의 활성도 변화

EROD의 활성도는 P4501A1/2 동위효소에 특이적인 선택성을 보이는데, 이 연구에서는 DMF 투여에 따른 활성도의 변화는 관찰되지 않았다 (Table 3). P4502

Table 1. Effect of dimethylformamide on the contents of hepatic protein

Unit: Mean±S.D.

Quantity of protein	Dose of DMF (mg/kg)				p value
	Control	450	900	1800	
Microsomal protein (mg/ml)	44.97±4.73	38.49±1.95	37.46±2.93	39.81±6.42	0.2335
Cytochrome P450 (nmol/mg)	0.758±0.01	0.721±0.05	0.740±0.06	0.703±0.14	0.8687
Cytochrome b5 (nmol/mg)	0.293±0.01	0.271±0.01	0.262±0.02	0.277±0.01	0.2285

Table 2. The content of NADPH P-450 reductase and NADH b₅ reductase in liver microsome from rats treated with dimethylformamide

Unit: Mean±S.D.

Activity of reductase	Dose of DMF (mg/kg)				p value
	Control	450	900	1800	
P450 reductase (μmol/min/mg)	0.086±0.011	0.135±0.008	0.152±0.003	0.159±0.001	0.0001
b ₅ reductase (μmol/min/mg)	0.193±0.012	0.174±0.007	0.161±0.003	0.126±0.006	0.0001

Table 3. Effect of dimethylformamide on the hepatic microsomal P450 dependent catalytic enzyme activities

Enzyme activities (pmole/mg protein/min)	Dose of DMF (mg/kg)				p value
	Control	450	900	1800	
EROD ^a	0.600±0.065	0.551±0.065	0.567±0.051	0.680±0.039	0.0597
PROD ^b	0.950±0.198	1.183±0.384	1.131±0.143	1.328±0.273	0.4265
pNPH ^c	772.4±29.0	1823.7±39.9	1900.6±46.6	2196.9±48.1	0.0001

^a: EROD - ethoxyresorufin O-deethylase
^b: PROD - pentoxyresorufin O-deethylase
^c: pNPH - p-nitrophenol hydroxylase

B1/2 동위효소에 특이적인 선택성을 보이는 PROD 활성도는 대조군 보다 투여군 모두에 있어서 증가되었으며, DMF 투여농도 증가에 따라 활성도도 증가되었으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

또한 ethanol과 acetone 등에 의해서 선택적인 유도가 일어나는 P4502E1 형태의 동위효소는 주로 pNPH와 AH의 활성도에 특이한 변화를 보이는데, 이 연구에서는 pNPH의 활성도를 측정하였다. 그 결과 대조군에서의 pNPH의 활성도는 772.4 pmole/mg protein/min으로 측정되었으며, DMF 투여군에서는 활성도가 대조군의 측정치 보다 증가하였다(Table 3). 뿐만 아니라 DMF 투여 용량이 450, 900, 1800 mg/kg으로 증가함에 따라, pNPH 활성도 역시 1823.7, 1900.6, 2196.9 pmole/mg protein/min으로 각각 유의하게 증가하였다(p<0.01).

3. Western immunoblot 결과

DMF의 투여 농도를 달리하여 3일 동안 복강주사한 후 DMF에 의해서 어떤 형태의 P450 동위효소가 유도되는지를 P450의 특이한 단세포군 항체를 이용하여 관찰한 결과를 Fig 1에 나타내었다. Fig 1에서 보는 바와 같이 DMF 투여한 흰쥐 간장의 microsome에서 P4502E1 단백질의 양이 현저하게 증가하였으며, 투여량의 높은 군에서 유도된 단백질의 양이 더 많음을 immunoblot에서 확인하였다. 그러나 P4501A1/2와 P4502B1/2 단백질 양은 대조군에 비해 큰 차이를 보이지 않았다(Fig 1에는 제시하지 않았음).

고 찰

체내에 흡수된 대부분의 화학물질은 그 자체의 독성보다 체내 이물질 대사효소들의 작용에 의해 극성과 활성이 큰 물질로 변형된 중간체에 의한 독성이 크다고 볼 수 있는데, DMF도 그 자체보다는 NMF나 HMMF와 같은 활성화된 중간체에 의한 간장 독성이 더 크다(Scailteur 등, 1984; Kennedy, 1986; Bulcke 등, 1994). 따라서 DMF에 의한 간독성 기전을 구명하기 위해서는 먼저 대사과정에 관여하는 효소들과 그들의 작용에 대한 이해, 대사과정에서 생성된 중간체와 최종 대사산물의 파악이 필요하다. 따라서 금번 연구에서는 DMF에 의한 간독성 기전을 알아보기 위하여, 대사과정에서 중요한 역할을 하는 P-450과 P450 의존성 촉매효소들의 활성도 변화가 DMF 투여농도에 따라 변화되는 양상을 파악하고, 어떤 형태의 P450 동위효소가 DMF에 의해서 유도되는지를 단세포군 항체를

이용하여 알아보았다.

먼저, DMF 투여농도에 따른 간장의 microsomal 단백질, P450 및 b₅의 함량의 변화를 살펴보았다. Microsomal 단백질 및 P450 함량은 중, 성별에 따른 유전적인 요인과 환경에 의한 영향으로 함량의 차이를 보이는데(Nebert와 Gonzalez, 1987), 금번 연구에서는 DMF 투여로 인한 microsomal 단백질 및 P450의 함량 변화는 보이지 않았다. 그러나 투여군에 있어서 이들 단백질의 함량이 대조군보다 다소 감소하는 경향은 있었다. 투여경로의 차이는 있으나 Imazu 등(1992)에 의하면 1주일 동안 피하(subcutaneous)로 DMF를 투여하였을 때 microsomal 단백질, cytochrome p450 및 b₅ 등이 대조군보다 감소하거나 변화가 없었다고 보고한 연구결과와 우리의 연구결과가 동일하였다. 이러한 결과는 흡수된 이물질의 농도와 관련하여 자기방어체계가 직·간접적인 영향을 받아 항상성 조절 기능의 불균형과 그로 인하여 유발된 조직의 손상에 따라 나타난 결과로 볼 수 있다(김기웅 등, 1994; Nebert와 Gonzalez, 1987). 또한 microsomes에 존재하는 핵단백질(P450)의 전구체나 그들과 결합하고 있는 아포단백질의 합성 억제 및 P450의 손상에 의해 초래된 결과라 할 수도 있다(Imazu 등, 1992).

P450은 redox 반응을 통하여 이물질을 대사시키는데, redox 반응과정에서 전자가 요구되며, 이때 전자를 전달하는 전자 전달계가 NADPH P-450 reductase와

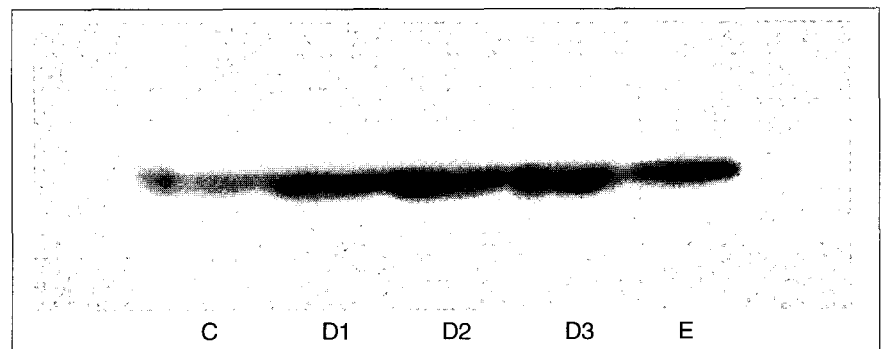


Figure 1. Western immunoblot analysis for microsomes of rats treated with dimethylformamide (DMF) utilizing mouse monoclonal anti-rat P4502E1 antibody. Liver microsomes (10 µg) were loaded for the groups: C, control; D1, DMF 450 mg/kg; D2, 900 mg/kg; D3, 1,800 mg/kg; E, 4 g ethanol/ kg(5 µg loaded)

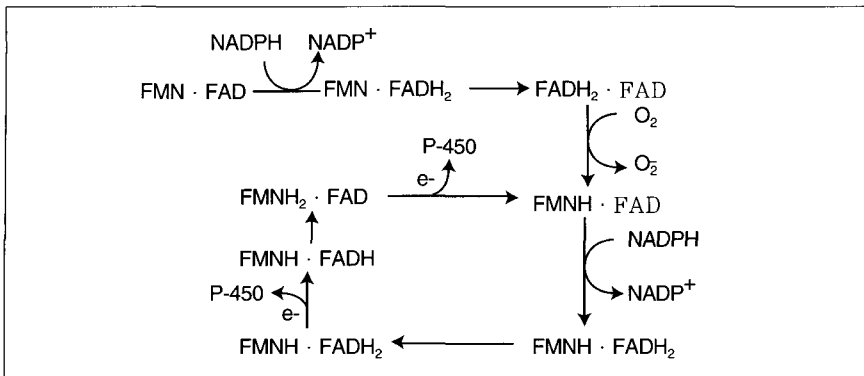


Figure 2. Mechanism of electron transfer in NADPH-cytochrome P450 reductase. Source: Takemori et al, 1993

NADH-b₅ reductase이다. 먼저, NADPH P-450 reductase는 두 단계를 거쳐 촉매 반응에 관여한다(Fig 2). 첫 단계는 NADPH로부터 전자를 받아 한 분자의 flavin만을 환원시키는 것이다(FMN · FADH₂ FMNH₂ · FAD). 두 번째 단계는 전자하나가 산소로 전달되어 활성산소종(reactive oxygen radical)을 형성하는 것이다. 환원된 효소의 나머지 전자 하나(FMNH · FAD)는 P450에 전자를 전달하기 위한 준비단계에 진입하며, 이후 산화환원 반응이 지속적으로 일어나면서 P450에 전자를 전달하게 된다(Vermilion 등, 1981; Takemori 등, 1993; Livertoux 등, 1996). 또한, NADH-b₅ reductase는 NADPH P450 reductase에 의해서 환원된 형태의 복합체(기질과의 복합체)와 체내의 산소분자(O₂)를 받아 산화된 형태의 복합체의 대사과정에 전자를 전달하는 과정을 한다. 금번 연구에 있어서 이들 전자-전달계의 활성도를 측정된 결과, NADPH P450 reductase와 NADH-b₅ reductase의 활성도 변화는 서로 상반되는 결과를 보였다. NADPH P450 reductase 활성도의 경우 대조군에서 보다 DMF 투여군에서 통계적으로 유의한 증가를 보였으며(*p*<0.01), 투여농도의 증가와 더불어 활성도의 증가가 일어난 반면, NADH-b₅ reductase의 활성도는 대조군에서의 활성도보다 투여군에서 통계적으로 유의한 감소를 보였다(*p*<0.01). 김기웅 등(1995)은 벤젠, 톨루엔 및 크실렌의 대사와 관련하여 P450 의존성 radical 전달에 관한 연구에서 NADPH P450

reductase 활성도 변화의 증가와 radical 생성은 양의 상관성이 있다고 하였으며, Ingelman-Sundberg와 Hagbjok(1982)도 NADPH P450 reductase에 의한 radical 생성을 설명하였다. 따라서 금번 연구에 나타난 전자-전달계의 활성도 변화는 DMF의 대사가전 및 간 조직의 손상과 연관하여 생각할 수 있다. 즉, DMF 보다 NMF에 의한 간조직의 손상이 큰데(Bulcke 등, 1994), 이는 DMF를 NMF로 변형시키는 과정에서 NADPH P450 reductase가 주로 작용하는 것으로 생각된다.

P450의 발현은 종, 성별 및 환경으로부터 폭로되는 물질의 영향에 따라서 많은 차이를 보이며(Nebert와 Gonzalez, 1987), 사람, 동물 및 미생물 등에서 현재 까지 밝혀진 P450 superfamily의 종류도 수백종에 이른다(Nelson 등, 1996). 그러나 P450 동위효소와 관련하여 환경으로부터 폭로되는 유기용제에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

다환고리화합물(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)은 P4501A1/2 동위효소를 유도시키며, aryl hydrocarbon hydroxylase(AHH)와 EROD 등에 선택적인 활성을 보인다고 하였으며(Lu와 West, 1980), P4502B1/2 형태의 동위효소는 phenobarbital에 의해서 유도되며 PROD에 특이한 활성을 보인다고 하였다(Ryan 등, 1979). Peng 등(1982)에 의하면 ethanol과 acetone 등은 P4502E1 형태의 동위효소를 유도시키며 pNPH나 AH 등에 활성을 보인다고 하였다. 또한

Guengerich 등(1991)은 할로젠화 유기용제인 trichloroethylene 대사에 있어서 P4502E1 동위효소가 관여한다고 보고하였다. Mraz 등(1993)은 DMF와 관련한 연구에서 P4502E1의 유도물질인 acetone을 전처리한 흰쥐의 간 microsome에서 전처리하지 않은 대조군에 비해 HMMF가 1.7배정도 증가하였으며, phenobarbital을 전처리한 군에서는 이러한 현상이 나타나지 않았다고 보고하였다(Chieli 등, 1995). 따라서 금번 연구에서는 DMF의 농도를 달리하여 복강 투여한 후 P450 의존성 촉매효소 중 EROD, PROD 및 pNPH에 대한 활성도 변화와 DMF에 의해서 어떤 형태의 P450 동위효소가 유도되는지를 파악하고자 하였다. 먼저, P4501A1/2 동위효소에 선택적인 활성을 보이는 EROD와 P4502B1/2 동위효소에 선택성을 보이는 PROD 활성도를 측정된 결과, 대조군과 투여군간에 통계학적인 유의한 차이는 없었으나, PROD의 경우 대조군보다 투여군에 있어서 다소 증가된 활성도를 보였다. P4502E1 동위효소에 선택적인 활성을 보이는 pNPH 활성도는 대조군 보다 투여군에 있어서 현저한 증가를 보였으며(*p*<0.01), 투여농도 증가와 더불어 활성도도 증가하였다. 이러한 결과는 Mraz 등(1993)이 보고한 연구의 결과와 일치하며, DMF가 P4502E1 동위효소를 선택적으로 유도하여 대사에 관여하는 것으로 생각된다. 그러나 이들 P450 의존성 촉매효소들은 기질에 대한 선택성을 가질 뿐만 아니라 기질의 중복성도 가지고 있어 단지 활성도의 변화만을 가지고 어떤 형태의 P450 동위효소가 유도되었다고 단정할 수만은 없다.

그래서 이들 P450 촉매효소에 연관된 P4501A1/2, P4502B1/2 및 P4502E1에 대한 단세포군 항체를 이용하여 면역항체 분석으로 확인하였다. 유도물질로 DMF의 농도를 달리하여 복강 투여한 흰쥐의 microsome을 이용하여 면역항체 분석을 실시한 결과, P4502E1 단백질의 양적인 증가가 뚜렷하였다. 그러나 P4501A1/2 단백질의 유도는 관찰되지

않았으며, P450B1/2 단백질의 유도도 대조군에 비해 현저하지는 않았다. 따라서 DMF에 의해서 P450E1 동위효소가 유도되는 것을 확인하였다. Hyland 등 (1992)은 DMF의 대사 중간체로 알려져 있는 NMF의 대사에 P450E1 동위효소가 관여한다고 보고하였다. 이상에서 나타난 연구결과를 Hyland 등(1992)의 연구와 연관해 보면, DMF가 P450E1 동위효소를 유도하며, 유도된 P450E1 동위효소는 DMF가 NMF로 대사 변형되는 과정과 NMF가 대사되는 과정에 관여하는 것으로 보인다. 그러나 금번 연구에서는 DMF에 의해서 어떤 형태의 P450 동위효소가 유도되는지를 밝혔으므로, 추후에는 DMF에 의해서 유도되는 P450E1 단백질의 유도발현과 분자수준에서의 조절기전 연구를 통하여 DMF의 독성 현상을 보다 더 명확히 파악해야 할 것으로 생각된다.

또한 DMF를 복강내 투여로 시행한 이번 동물모델과는 달리, 사람의 경우 주로 호흡기를 통해 DMF가 흡수되며, 단일폭로에 의한 경우보다 톨루엔이나 메틸에틸케톤 등의 유기용제와 혼합된 형태로 폭로되는 경우가 많다. 따라서 이후 연구에서는 이에 대한 대사 및 독성평가가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

이 연구는 DMF에 의한 간독성 기전을 알아보기 위하여, 대사과정에서 중요한 역할을 하는 이물질 대사효소와 그와 관련된 효소가 어떠한 변화를 보이는가를 알아보았다. 이 연구에 사용된 동물은 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐로 DMF를 체중 kg당 0(Control), 450 (D1), 900 (D2), 1,800 (D3) mg을 1일 1회씩 3일간 연속하여 복강주사하였다. 마지막 투여 후 24시간 후에 실험동물로부터 간장의 microsome을 분리하였고, P450 동위효소의 유도와 P450 의존성 촉매 효소의 활성도 변화를 관찰하였다.

연구결과, DMF를 투여한 실험군이 대조군보다 microsomal 단백질 함량이 통

계학적으로 유의하지는 않았지만 낮은 수치를 보였다. P450과 b5 함량 역시 대조군과 투여군간에 유의한 차이가 없었다. 대사과정에서 어떠한 전자전달계가 주로 관여하는지를 알아보았는데, NADPH-P450 reductase의 경우 대조군보다 투여군이 투여용량이 증가함에 따라 활성도가 유의하게 증가하였다 ($p < 0.01$). NADH-b5 reductase의 활성도의 경우는 대조군보다 투여군이 감소하여 ($p < 0.01$), 전자전달이 주로 NADPH-P450 reductase에 의해 이루어지는 것을 알 수 있었다. 활성도 측정에서는 EROD와 PROD 활성도는 유의한 차이를 보이지 않았으나 pNPH 활성도는 처리군에서 현저한 증가가 관찰되었다 ($p < 0.01$). 또한 P450A1/2, P450B1/2 및 P450E1에 대한 단세포균 항체를 이용한 Western immunoblot 분석에서 P450E1 단백질의 양이 현저하게 증가하였다.

이상의 결과를 보면, DMF에 의해서 P450E1 형태의 동위효소가 유도되며, 유도된 P450E1 동위효소가 DMF의 대사에 관여하는 것으로 보인다.

참고문헌

김기웅, 강성규, 최병순, 이종성, 김종성, 문영한. Trichloroethylene 처리한 흰쥐의 이물질 대사 효소의 활성도에 관한 연구. 대한산업의학 회지 1994;6(2):323-331

김기웅, 강성근, 김양호, 문영한. Cytochrome P-450 의존성 radical 전달에 의한 benzen, toluene, xylene의 대시기전 연구. 한국독성학회지 1995;11(2):205-213

Amato G, Longo V, Mazzaccaro A and Gervasi PG. Microsomal oxidation of N,N-dimethylformamide and its effect on P450-dependent monooxygenase in rat liver. *Chem Res Toxicol* 1996;9:882-890

Bulcke MV, Rosseel MT, Wijnants P, Buylaert W, Belpaire FM: Metabolism and hepatotoxicity of N,N-dimethylformamide, N-hydroxymethyl-N-Methylformamide, and N-methylformamide in the rat. *Arch Toxicol* 1994;68:291-295

Cai SX, Huang MY, Xi LQ, Li YL, Qu JB, Kawai T, Yasugi T, Mizunuma K, Watanabe T, Ikeda M. Health effects of dimethylformamide after occupational exposure at low concentration. *Int Arch Occup Environ*

Health 1992;63:461-468

Chieli E, Saviozzi M, Menicagli S, Branca T, Gervasi PG: Hepatotoxicity and P-450 2E1 dependent metabolic oxidation of N,N-dimethylformamide in rat and mice. *Arch Toxicol* 1995;69(3):165-170

Clayton JW, Barenas JR, Hood DB, Schepers GWH: The inhalation toxicity of dimethylformamide(DMF). *Am Ind Hyg Assoc J* 1963;24:144-154

Cooksey PG, Gate EN, Gescher A, Hickman JA, Langdon SP, Stevens MFG: The formation and metabolism of N-hydroxymethyl compounds. IV. Cytotoxicity and antitumor activity of N-hydroxymethylformamide, a putative metabolite of N-methylformamide. *Biochem Pharmacol* 1983;32:3037-3043

Ducatman AM, Conwill D, Crawl J: Germ cell tumors of the testicle among aircraft repairment. *J Urol* 1986;136:834-835

Gescher A. Metabolism of N,N-dimethylformamide: key to the understanding of its toxicity. *Chem Res Toxicol* 1993;6:245-251

Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. Role of cytochrome IIB1 in the oxydation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol* 1991;4:168-179

Horn HJ: Toxicology of dimethylformamide. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1961;3:12-24

Hultquist DE. Methemoglobinemia reduction system of erythrocyte. *Method in Enzymol* 1978;52:463-473

Hyland R, Gescher A, Thummel K, Shiller C, Jheeta P, Mynett K, Smith AW, Mraz J. Metabolic oxydation and toxification of N-methylformamide catalyzed by the cytochrome p450 isoenzyme CYP2E1. *Mol Phamacol* 1992;41:259-266

Imazu K, Fujjishiro K, Inoue N: Effect of dimethylformamide on hepatic microsomal monooxygenase system and glutathione metabolism in rats. *Toxicology* 1992;72(1):41-50

Ingelman-Sundberg M, Hagjog AL. On the significance of the cytochrome P-450 dependent hydroxy radical-mediated oxygenation mechanism. *Xenobiotica* 1982;12:673-686

IPCS. Environmental Health Criteria 114, Dimethylformamide. *World Health Organization: Geneva*, 1991.

Kawai T, Yasugi T, Mizunuma K, Watanabe T, Cai SX, Huang MY, Xi LQ, Qu JB, Yao BZ, Ikeda M. Occupational dimethylformamide excretion in urine after occupational dimethylformamide exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1992;63:455-460

- Kennedy JR. Biological effects of acetamide, formamide, and their monomethyl and dimethyl derivatives. *CRC crit Rev. Toxicol* 1986;17(2):129-182
- Kestell P, Threadgill MD, Gescher A, Gledhill AP, Shaw AJ, Farmer PB: An investigation of the relationship between the hepatotoxicity and the metabolism of N-alkylformamides. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;240(1):265-270
- Klotz AV, Stegemen JJ, Walch C. An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: A continuous visible spectrophotometric methods for measurement of cytochrome P450 monooxygenase activity. *Anal Biochem* 1984;140:138-145
- Ko IY, Park SS, Song BJ, Patten C, Tan Y, Hah YC, Yang CS, Gelboin HV. Monoclonal antibodies to ethanol induced rat liver cytochrome P450 that metabolizes aniline and nitrosamine. *Cancer Res.* 1987;47:3101-3109
- Koop DR. Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol inducible cytochrome P450 isozymes 3a. *Mol Pharmacol* 1986;29:339-404
- Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head a bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685
- Livertoux ML, Lagrange P, Minn A. The superoxide production mediated by the redox cycling of xenobiotics in rat brain microsomes is dependent on their reduction potential. *Brain Res* 1996;725:207-216
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:401-404
- Lu AYH, West SB. Multiplicity of mammalian microsomal P-450. *Pharmacol Rev* 1980;31:277-295
- Master BSS, Williams CH, Kamin H. The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome C reductase from pig liver. *Method in Enzymol* 1967;10:565-580
- Mraz J, Cross H, Gescher A, Threadgill MD, Flek J: Differences between rodents and humans in the metabolic toxicification of N,N-dimethylformamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989;98(3):507
- Mraz J, Nohova H: Absorption, metabolism and elimination of N,N-dimethylformamide in humans. *Int Arch Occup Environ Health* 1992;64:85-92
- Mraz J, Jheeta P, Gescher A, Hyland R, Thummel K, Threadgill MD: Investigation of the mechanistic basis of N,N-dimethylformamide toxicity. Metabolism of N,N-dimethylformamide and its denaturated isotopomers by cytochrome p-450 2E1. *Chem Res Toxicol* 1993;6(2):197-207
- Nebert DW, Gonzalez FJ. P450 gene: structure, evolution and regulation. *Ann Rev Biochem* 1987;56:945-993
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Watman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC and Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996;6:1-42
- Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964;239:2370-2378
- Palmen NGM, Evelo CTA, Borm PJA, Henderson PTH: Toxicokinetics of dimethylacetamide(DMAC) in rat isolated perfused liver. *Hum Exp Toxicol* 1999;12:27-135
- Park KH, Kim CR. Induction of the different forms cytochrome P450 isoenzymes and comparison of aryl hydrocarbon hydroxylase levels on rat tissues by chemical treatment. *Korean Biochem J* 1984;17(1):10-19
- Pearson PG, Slatter JG, Rashed MS, Han DH, Baillie TA: Carbamylation of peptides and proteins in vitro by S-(N-methylcarbamoyl) glutathion and S-(N-methylcabamoyl)-cysteine, two electrophilic S-linked conjugates of methylisocyanate. *Chem Res Toxicol* 1991;4:436-444
- Peng R, Tu YY, Yang CS. The inhibition and competitive inhibition of a high affinity microsomal nitrosodimethylamine demethylase by ethanol. *Carcinogenesis* 1982;3:1457-1461
- Rayan DE, Thomas PE, Korzeniowski D, Levin W. Separation and characterization of highly purified forms of liver microsomal cytochrome P 450 from rats treated with polychlorinated biphenyl, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene. *J Biol Chem* 1979;254:1365-1374
- Redlich CA, Beckett WS, Sparer J, Barwick KW, Riely CA: Liver disease associated with occupational exposure to the solvent dimethylformamide. *Ann Intern Med* 1988;108: 680-686
- Rojenberg J: Solvent. Ladou J, eds: Occupational Medicine. Connecticut, *Prentice Hall*, 1990, pp 385-386.
- Scailteur V, de Hoffmann E, Buchet JP, Lawerys RR: Study on in vivo and in vitro metabolism of dimethylformamide in male and female rats. *Toxicology* 1984;29(3): 221
- Takemori S, Yamazaki T, Ikushiro SI. Cytochrome p-450 linked electron transport system in monooxygenase reaction. Omura T, Ishimura Y, Fujii-kuriyama Y (Eds). *Cytochrome P-450. Tokyo: Kodansha*, 1993.
- Vermilion JL, Ballou DP, Massey V, Coon MJ. Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome p-450 reductase. *J Biol Chem* 1981; 256:266-277
- Wang JD, Lai MY, Chen JS, LinJM, Chiang JR, Shan SJ, Chang WS: Dimethylformamide induced liver damage among synthetic leather workers. *Arch Environ Health* 1991;46: 161
- Werringloar J, Estabrook NR. Heterogeneity of liver microsomal cytochrome P-450: The spectral characterization of reactants with reduced cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys* 1975;167:270-286