

Polychlorinated biphenyl 전처리한 흰쥐 간장의 S-9 분획에서 Stanozolol의 Hydroxylation 대사체의 생성

권오승[#] · 류재천

한국과학기술연구원 생체대사연구센터 독성연구실
(Received July 17, 2000)

In vitro Metabolism of Stanozolol to 3'-Hydroxystanozolol in the Liver S-9 Fraction of Polychlorinated Biphenyl-treated Rats

Oh-Seung Kwon[#] and Jae-Chun Ryu

Toxicology Lab., Bioanalysis and Biotransformation Research Center,
Korea Institute of Science and Technology

Abstract — Stanozolol (STZ, 17 α -methyl-17 β -hydroxy-5 α -andro-
stano-(3,2-c) pyrazole), an anabolic steroid, is an abused drug by body-builders or athletes, as well as medicine for treatment of aplastic anemia and vascular thrombosis. In human volunteers, the major urinary metabolite of STZ was reported to be 3'-hydroxystanozolol that was identified by gas chromatography-mass selective detector (GC/MSD). The objective of this experiment is to investigate the *in vitro* metabolism of STZ in liver S-9 fraction of polychlorinated biphenyl-induced rats. Reaction mixture including STZ as substrate and the S-9 fraction was extracted with diethyl ether and quantified by the selected ion monitoring mode of GC/MSD. The selected concentration of substrate STZ is 100 nmole and the selected time for incubation in the reaction mixture was determined to 60 min. The amount of 3'-hydroxystanozolol produced was increased by about 6-fold in the reaction medium including the liver S-9 fraction of polychlorinated biphenyl-induced rats, compared to that of untreated rats. Inhibitors of cytochrome P450, SKF-525A and 7,8-benzoflavone, decreased the production of 3'-hydroxystanozolol by about 89~100% and 65~75%, respectively. In conclusion, hydroxylation of STZ into 3'-hydroxystanozolol is confirmed by GC/MSD and is catalyzed by cytochrome P450.

Keywords □ *In vitro*, metabolism, stanozolol, 3'-hydroxystanozolol, gas chromatography-mass selective detector, polychlorinated biphenyl, cytochrome P450.

Stanozolol(STZ, 17 α -methyl-17 β -hydroxy-5 α -andro-
stano-(3,2-c) pyrazole)은 합성 anabolic steroid로 높은 anabolic/androgenic ratio를 가지고 있기 때문에 남성화효과를 최소화하고, 체중의 증가를 유도할 수 있는 약물이다.¹⁾ 또한 STZ은 재생불량성 빈혈이나²⁾ 혈관의 혈전증의 예방^{3,4)}을 위하여 의학적으로 사용되고 있다. 이러한 의학적 용도 뿐만 아니라, 최근에는 체중이나 근육의 형성을 증가시킬 목적으로 운동선수들에

의하여 남용되고 있는 약물 중의 하나이다. 이러한 STZ의 남용은 간이나 생식기관등에 질병을 유발하는 것으로 보고되었다.⁵⁾ 따라서 이 약물은 1974년 이래 국제올림픽 위원회에 의하여 운동선수들에게 사용되는 것을 금지하고 있다.⁶⁾

STZ의 heterocyclic ring은 대부분의 anabolic steroid와는 구조적으로 매우 다르고, gas chromatography에 반응이 우수하지 않아 분석능이 좋지 않을 뿐만 아니라, 뇨로 배설되는 량도 매우 낮아 gas chromatography-mass spectrometry에 관한 분석방법은 그리 많지 않았다.⁷⁻⁸⁾ 그러나 Schanzer⁹⁾ 등에 의

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-958-5184 (팩스) 02-958-5059

한 trimethylsilylating 시약과 heptafluorobutyramide 를 사용한 분석법은 STZ이나 이것의 대사체에 대한 sensitivity를 매우 증가시키는 것으로 보고되었다. 이 방법에 따라 human volunteer에서 뇨시료를 분석하였을 때 주 대사체는 3'-hydroxystanozolol(STZOH)이었다.¹⁰⁾ 따라서 대부분의 hydroxylation은 cytochrome P450에 의하여 촉매되어지기 때문에 STZOH가 in vitro에서 cytochrome P450에 의하여 생성되는지를 연구할 목적으로 이 실험을 하였다.

실험방법

시약 - Stanozolol은 한일약품(Seoul, Korea)에서, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, glucose-6-phosphate, bovine serum albumin 및 trimethylsilyl imidazole은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 3'-Hydroxystanozolol은 Dr. M. Donike 실험실(Cologne, Germany)로부터 제공받아 사용하였다. SKF-525A는 Smith Kline & French Lab.(Philadelphia, PA, USA)에서, polychlorinated biphenyl (octa)과 7,8-benzoflavone은 Wako(Osaka, Japan)에서, calusterone은 Upjohn Co.(Kalamanzoo, MI, USA)에서, N-methyl-N-trimethylsilyl-heptafluorobutyramide 와 N-methyl-bis-heptafluorobutyramide는 Macherey & Nagel(Germany)에서, 그리고 그 외 필요한 시약은 특급 및 일급이상을 사용하였다.

S-9 fraction의 조제 - Ames¹⁶⁾등이 보고한 방법에 따라 polychlorinated biphenyl(octa)을 olive oil에 녹여 500 mg/kg의 용량으로 복강주사한 후 6일째 희생시켜 멸균된 1.15% potassium chloride 용액으로 간을 perfusion 시킨 후, 간 무게의 3배의 비율로 1.15% potassium chloride 용액을 가하고 균질액으로 만든 다음, 9000 g에서 원심분리하여 얻은 상등액을 취하여 S-9 fraction을 제조하였다. S-9 fraction의 단백질량은 Lowry 등의 방법¹²⁾에 따라 정량한 결과 polychlorinated biphenyl 전처리한 rat에서는 24.49 mg protein/ml이고, 전처리하지 않은 정상 rat에서는 12.82 mg protein/ml이었다.

분석기기 및 조건 - Gas chromatography-mass selective detector/electron impact(GC/MSD/EI): Hewlett Packard사의 GC/MSD/EI(5890A/5970B)와 mass spectrometry chemstation(HP 59970C), disc drive

(HP 7946) 및 auto liquid sampler(HP 7673A)를 사용하였다. Cross-linked 5% phenylmethylsilicone fused silica capillary 칼럼(17 m, length \times 0.2 mm, internal diameter \times 0.33 μ m, film thickness)을 사용하였다. GC의 주입구의 온도는 280°C, transfer line의 온도는 300°C이었고 칼럼의 온도는 180°C에서 시작하여 분당 25°C씩 310°C까지 증가시켰다. 이동상 기체로는 helium을 사용하였고 유속은 0.83 ml/min으로 하였다. 주입방식은 splitless로 하였다.

In vitro 대사반응 및 3'-hydroxystanozolol의 추출 - 원심분리 tube를 사용하여 반응혼합액 1 ml 중에는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 2.5 mM β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 10 mM D-glucose 6-phosphate, STZ-ethanol 용액 20 μ l, S-9 fraction 500 μ l로 이루어졌으며, 이 혼합액을 37°C에서 40 분간 배양하였다. 이 반응액에 K₂CO₃ 100 mg을 가하고 혼합하여 반응을 종료시키고, 내부표준물질로 calusterone(20 ppm, 25 μ l)를 가한다. 여기에 diethyl ether 5 ml를 넣어 20 분동안 mechanical shaker(Buchler, Germany)에서 추출하였다. 이 혼합액을 원심분리(2500 rpm, 5 min)하고, -30°C의 freezer(Lauda, Germany)에서 수층을 얼려 층분리를 행하였다. Ether 층을 증발시킨 잔사를 P₂O₅/KOH가 들어있는 desiccator에서 하룻밤 동안 건조시킨 후 N-methyl-N-trimethylsilyl-heptafluorobutyramide/trimethylchlorosilane/trimethylsilylimidazole(100:5:2, v/v/v)의 혼합물 40 μ l를 넣고 80°C에서 5 분동안 가열한 후, N-methyl-bis-heptafluorobutyramide 10 μ l를 넣고 80°C에서 10 분동안 가열하였다. 실온에서 냉각시킨 후, 이 용액 1~2 μ l를 GC/MSD에 주입하여 분석하고 3'-hydroxystanozolol의 검량선에 따라 정량하였다.

GC/MSD/EI에 의한 3'-hydroxystanozolol의 정량 - 3'-Hydroxystanozolol을 분석하기 위하여 GC/MSD의 selected ion monitoring(SIM) 방법을 사용하였다. Stanozolol은 m/z 143(D-ring cleavage), 581(M⁺-15), 596(M⁺)을, 3'-hydroxystanozolol은 m/z 143, 378, 669(M⁺-15), 684(M⁺)를, 내부표준물질인 calusterone은 m/z 315를 선택하여 splitless mode에서 분석하였다. 이 이온들 중에서 3'-hydroxystanozolol은 m/z 669를, 내부표준물질인 calusterone은 m/z 315를 선택하여 3'-hydroxystanozolol의 정량분석을 하였다.¹¹⁾

Protein 농도의 정량 - Lowry 등의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 간의 S-9 fraction 중의 protein 함량을 정량 하였다.¹²⁾

실험결과 및 고찰

Polychlorinated biphenyl을 투여한 rat의 간장으로 부터 제조한 S-9 fraction에 의하여 기질인 STZ이 3'-

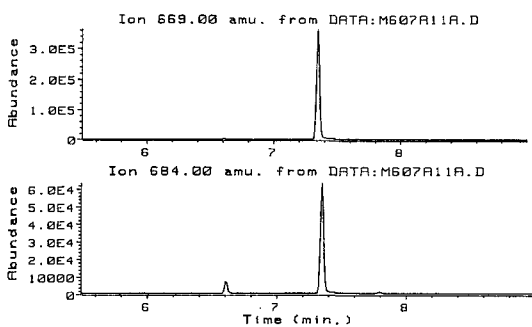


Fig. 1 - Ion chromatograms of authentic 3'-hydroxystanozolol (m/z 669, M⁺+15; m/z 684, M⁺).

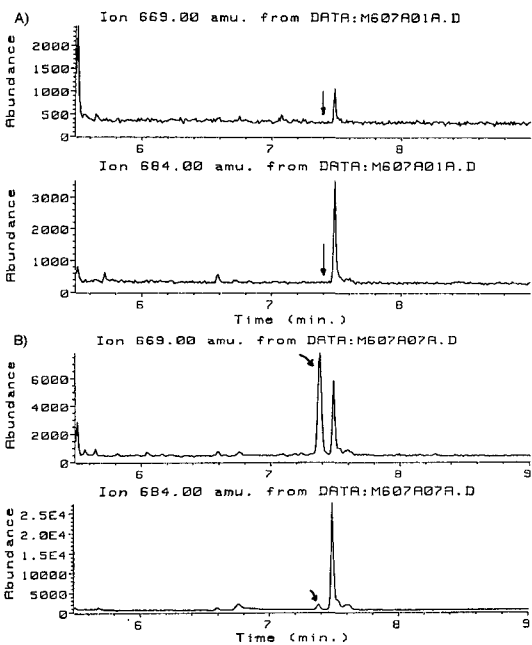


Fig. 2 - Ion chromatograms obtaining from A) reaction mixture not including stanozolol (the same condition as in B) except for stanozolol), and B) reaction mixture including the S-9 fraction of polychlorinated biphenyl-pretreated rats and 100 nmol stanozolol.

hydroxystanozolol(STZOH)로 대사되는 것을 GC/MSD/EI 방법으로 확인하였다. 반응용액에 기질인 STZ을 가하고 37°C에서 60 분동안 배양하고 반응을 종료시킨 후 추출하여 얻은 STZOH의 ion chromatogram(Fig. 2B; m/z 669와 m/z 684)을, 이와 같은 조건에서 STZ을 가하지 않고 반응시킨 대조군의 ion chromatogram(Fig. 2A; m/z 669와 m/z 684)과 비교하였다. STZOH의 retention time은 7.39분으로 Fig. 1에서 보여준 STZOH의 표준물질과 잘 일치하였으며, 이 시간에서 STZOH의 분석을 방해하는 peak은 없었다. 또한 STZOH를 정량하기 위한 검량곡선은 Fig. 3에 나타내었다.

STZOH의 생성에 영향을 미치는 최적의 STZ 농도를 결정하기 위하여 STZ 농도의 변화에 따른 생성된 STZOH의 량을 측정하였다. 이 결과 선택된 기질 농

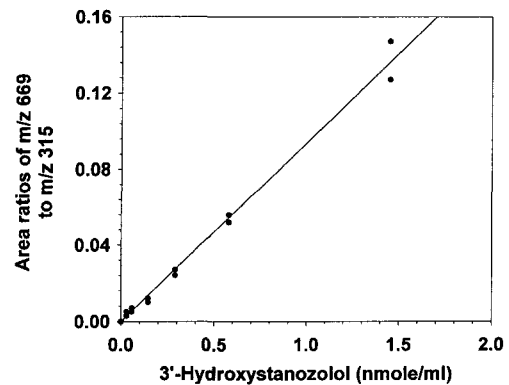


Fig. 3 - Calibration curve of 3'-hydroxystanozolol. The slope of the equation of the calibration plot is 0.135 and the intercept of y-axis is 0.000164 with the relative coefficient of 0.994.

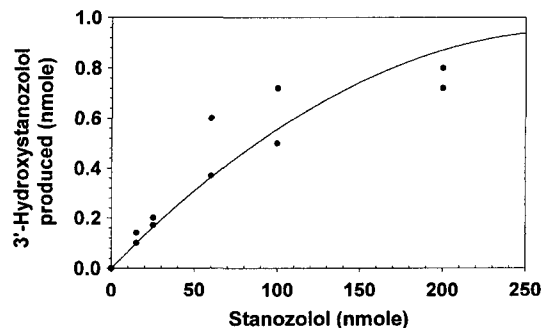


Fig. 4 - Effect of various stanozolol concentrations on the amount of 3'-hydroxystanozolol produced in reaction mixture including the S-9 fraction. The incubation time in reaction mixture is 40 min.

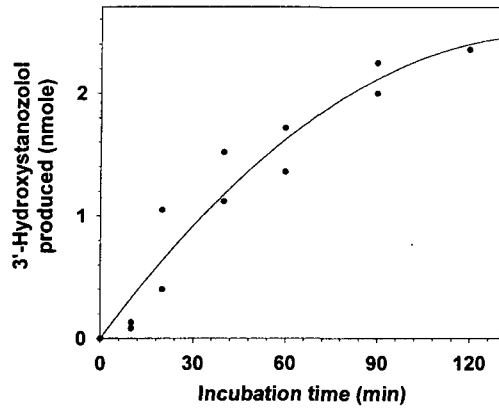


Fig. 5 – Effect of incubation times on the amount of 3'-hydroxystanozolol produced in reaction mixture including the S-9 fraction (100 nmole of stanozolol as substrate was used).

Table I – Effects of S-9 fraction of polychlorinated biphenyl (PCB)-pretreated rats on the metabolism of stanozolol

Pre-treatment	3'-Hydroxystanozolol (pmol produced/mg protein)
Untreated	7.5
	14.6
PCB-pretreated	80.3
	56.9

도는 100 nmol이었다(Fig. 4). 또 배양시간과 생성된 STZOH의 대사체 량의 곡선(Fig. 5)으로부터 이 실험에 사용하기 위하여 선택된 배양시간은 60분으로 정하였다. Table I에 나타난 것처럼, STZ는 polychlorinated biphenyl을 투여한 rat의 간장으로부터 제조한 S-9 fraction에 의하여 STZOH의 생성이 현저하게(평균 약 6배) 증가하였다. 이러한 증가가 polychlorinated biphenyl에 의하여 유도된 rat의 간 S-9의 cytochrome P450의 증가에 기인한 것인지를 규명할 목적으로 cytochrome P450의 inhibitor로 알려져 있는 SKF-525A와 cytochrome 1A2 inhibitor인 7,8-benzoflavone(α -naphthoflavone)을 사용하여 STZOH의 생성을 측정하였다.

이 결과를 Table II에 나타내었다. SKF-525A는 100 μ M 농도에서 약 90%, 500 μ M에서는 100% STZOH의 생성을 억제시켰고, 7,8-benzoflavone은 10 및 50 μ M에서 약 65~75%의 억제를 나타내었다.

Rendic과 Ruf가 보고한 바에 따르면, STZ는

Table II – Effects of cytochrome P450 inhibitors on the metabolism of stanozolol

Inhibitors (μ M)	3'-Hydroxystanozolol (pmol produced/mg protein)	Inhibition (%)
Control		
0	80.3	-
	56.9	
SKF-525A		
100	10.2	88.6
	5.5	
500	ND ^a	100.0
	ND ^a	
7,8-Benzoflavone		
10	10.6	74.0
	25.1	
50	24.0	64.5
	24.7	

^aND, Not detected

cytochrome P450와 상호작용하며 affinity 상수는 1.1 μ M로 cytochrome P450에 높은 친화성을 가지고 있으며, 강력한 cytochrome P450 inhibitor로 작용하는 것으로 알려졌다.¹³⁾ 한편 Thompson등은 STZ를 복강 투여한 rat에서 δ -aminolevulinic acid synthase의 활성을 용량 의존적으로 증가시켰으나 간장의 cytochrome P450의 량에는 변화를 일으키지 않았다.⁵⁾ 이 외에 Boada등의 보고에 의하면 성숙한 웅성 rat에서 단일 용량의 STZ의 투여는 첫 48 hr이내에는 cytochrome P450 및 cytochrome b5의 량을 감소시켰으나, 연속적으로 72 및 96 hr에서는 이들 효소의 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이 반면에 STZ의 반복투여에 의해서는 이 두 효소의 감소를 나타내었다.¹⁴⁾ 또 STZ은 17 α -hydroxylase(K_i =6.31 μ M)와 C_{17,20}-lyase(K_i =1.30 μ M)의 상경적인 inhibitor로 알려져 있다.¹⁵⁾ 따라서 STZ은 cytochrome P450에 친화성이 있으며 cytochrome P450의 량을 증가시키거나 감소시키는 biphasic 효과를 나타내는 것으로 요약해 볼 수 있다. 비록 본 실험에서 purified microsomal fraction을 사용하지는 않았지만, 사용된 S-9 fraction은 P450 inhibitor로 알려져 있는 SKF-525A 또는 7,8-benzoflavone에 대하여 STZOH의 생성이 현저히 억제 되었으므로 STZ의 STZOH로의 대사는 cytochrome P450에 의하여 촉매된다고 시사된다. 결론적으로 종합해 보면, *in vitro*에서 STZ의 대사반응을 위한 최적조

건을 설정하여 이 반응혼합액을 diethyl ether로 추출하고 GC/MSD방법을 사용하여, STZ이 간 S-9 fraction을 포함하는 *in vitro* 반응혼합액에서 STZOH로 대사 된다는 것을 확인하였다.

문 헌

- 1) Little, K. and Munuera, L. : Some mechanisms of action of stanozolol (stromba) and its interaction with cortisone. *Curr. Ther. Res.*, **12**, 291 (1970).
- 2) Gordon-Smith, E. C. : Aplastic anemia and other causes of bone marrow failure. In *Oxford textbook of Medicine*, ed. by Weatherall, D. J., Ledingham, J. G. G., and Warrell, D. A., pp. 141-149. Oxford University Press, London (1983).
- 3) Small, M., McArdle, B. M., Lowe, G. D., Forbes, C. D., and Prentice, C. R. : The effect of intramuscular stanozolol on fibrinolysis and blood lipids. *Thromb. Res.*, **31**, 27 (1982).
- 4) Small, M., McArdle, B. M., Lowe, G. D., Brodie, M. J., Forbes, C. D., and Prentice, C. R. : Oral stanozolol: effects on plasma and saliva fibrinolysis and plasma viscosity in normal males. *Thromb. Res.*, **31**(2), 233 (1983).
- 5) Thompson, G. G., Small, M., Lowe, G. D., Forbes, C. D., Park, B. K., Scobie, G., and Brodie, M. : Effect of stanozolol on δ -aminolevulinic acid synthase and hepatic monooxygenase activity in man and rat. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **26**, 587 (1984).
- 6) IOC Medical Commission, *Games of XXI Olympiad Montreal* (1976).
- 7) Ward, R. J., Shackleton, C. H. L., and Lawson, A. M. : Gas chromatographic-mass spectrometric methods for the detection and identification of anabolic steroid drugs. *Br. J. Sports Med.*, **9**, 93 (1975).
- 8) Bertrand, M. Masse, R., and Dugal, R. : GC-MS approach for the detection and characterization of anabolic steroids and their metabolites in biological fluids at major international sporting events. *Farm. Tijdschr. Belg.*, **55**, 85 (1978).
- 9) Schanzer, W., Opfermann, G., and Donike, M. : Metabolism of stanozolol: identification and synthesis of urinary metabolites. *J. Steroid Biochem.*, **36**(1-2), 153 (1990).
- 10) Choo, H. Y. P., Kwon, O. S., and Park, J. : Quantitative determination of stanozolol and its metabolite in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **14**, 109 (1990).
- 11) Ryu, J. C., Kwon, O. S., Song, Y. S., Yang, J. S., and Park, J. : The effects of probenecid on the excretion kinetics of stanozolol, an anabolic steroid, in rats. *J. Appl. Toxicol.*, **12**(6), 385 (1992).
- 12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 13) Rendic, S. and Ruf, H. : Interaction of stanozolol with cytochrome P450. *Biochemical Pharmacology*, **37**, 766 (1988).
- 14) Boada, L. D., Zumbado, M., Torres, S., Lopez, A., Diaz-Chico, B. N., Cabrera, J. J., and Luzardo, O. P. : Evaluation of acute and chronic hepatotoxic effects exerted by anabolic-androgenic steroid stanozolol in adults male rats. *Arch. Toxicol.*, **73**, 465 (1999).
- 15) Nakajin, S., Takahashi, K., and Shinoda, M. : Inhibitory effect and interaction of stanozolol with pig testicular cytochrome P-450 (17 α -hydroxylase/C17,20-lyase). *Chem. Pharm. Bull(Tokyo)*, **37**, 1855 (1989).
- 16) Ames, B. McCann, J., and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347 (1975).