

1-Bromopropane의 간독성에 미치는 N-Acetyl Cysteine과 Silymarin의 영향

이상규 · 강미정 · 전태원* · 정태천#

영남대학교 약학대학, *(주)바이오독스텍

(Received July 13, 2009; December 3, 2009; Accepted December 3, 2009)

Effects of N-Acetyl Cysteine and Silymarin on 1-Bromopropane-induced Hepatotoxicity in Mice

Sang Kyu Lee, Mi Jeong Kang, Tae Won Jeon* and Tae Cheon Jeong#

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

*Biotoxtech Co., Ltd., Ochang 363-883, Korea

Abstract — Recently, it was found that the formation of reactive metabolites by cytochrome P450s as well as the depletion of glutathione would play important roles in hepatotoxicity induced by 1-bromopropane. In the present study, possible roles of anti-oxidants in 1-bromopropane-induced hepatotoxicity were investigated in male ICR mice. The hepatotoxicity induced by 1-bromopropane was significantly protected by the co-treatment with either N-acetyl cysteine or silymarin. 1-Bromopropane-induced decrease in hepatic glutathione level was significantly protected by the pretreatment with N-acetyl cysteine. Taken together, the present results indicated that the reduction of hepatic glutathione level caused by 1-bromopropane treatment might be associated in 1-bromopropane-induced hepatotoxicity in mice.

Keywords □ 1-bromopropane, hepatotoxicity, N-acetyl cysteine, silymarin, lipid peroxidation, *in vivo*

단쇄 알칸 형태의 할로젠 화합물은 공업적으로 그 용도가 매우 다양하여 유기합성 중간체, 추출용매 및 고분자 화합물의 합성 시에 사용되어 왔으며, 농약제조 시에도 이용되어 왔다. 특히 1-bromopropane은 오존층 파괴로 문제가 되어 있는 chloro-fluorocarbon의 대체물질로써 최근 사용량이 늘어난 물질이다. 1-Bromopropane은 낮은 오존층 파괴능, 고휘발성 및 난연성 등의 물성 때문에 작업장에서 세척제나 접착제로도 사용이 되어 왔다.^{1,2)} 할로프로판류의 사용량은 지속적인 증가 추세에 있는데, 1-bromopropane의 경우 2000년에 미국 내 상업적 사용량이 약 2000톤에 달할 정도이었다.

1-Bromopropane은 중추신경계 및 생식계에 독성작용이 있음이 보고된 바 있으며,^{3,4)} 간독성과 면역독성에 있어서는 glutathione 포합체 생성으로 인하여 체내 glutathione 함량이 감소하는 것과 밀접한 관계가 있음이 보고된 바 있다.⁵⁾ 1-Bromopropane은 그 밖에 cytochrome P450(CYP)에 의한 대사

도 보고된 바 있어, 1-bromopropane의 독성은 제1상 대사체에 의한 독성과 2상 대사로 인한 glutathione 감소의 결과로 독성이 발생하는 것으로 판단되고 있다.^{6,7)} 실제, 1-bromopropane은 CYP 2E1에 의해 대사를 받는 것으로 알려져 있어, 추가적인 연구가 요구되긴 하지만 1상 대사로 인한 독성작용의 가능성도 있다고 예측되고 있다.^{8,9)}

본 연구에서는 1-bromopropane에 의한 간독성 유발 시 산화적 스트레스의 영향을 살펴보기 위하여 대표적인 항산화제인 N-acetyl cysteine과 silymarin의 영향을 시험하였다.

실험방법

시험재료

1-Bromopropane(순도, >99%)은 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, 미국)에서 구입하여 시험물질로 사용하였으며, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), N-acetyl cysteine 및 silymarin은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, 미국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. ALT 및 AST 측정용 시약은 아산제약(화성, 한국) 제품을 사용하였으며, 기타 시약도 시판 특급

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-810-2819 (팩스) 053-810-4654
(E-mail) taecheon@yumail.ac.kr

시약을 사용하였다. 모든 시약은 별도의 정제과정 없이 입수한 상태로 실험에 사용하였다.

실험동물

특정병원체 부재 ICR 마우스 수컷(28 to 33 g)을 (주)오리엔트에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 4주령을 구입하여 최소한 2주간 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 사용하였다. 동물은 입수 직후 폴리카보네이트 케이지에 5 마리씩 분리 수용하였다. 동물실은 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 및 상대습도 $50\pm 10\%$ 를 유지하였으며, 12시간 간격으로 명암주기를 조절하였다. 모든 동물실험은 미국독성학회에서 권고한 가이드라인에 준하여 수행하였고, 본 연구는 영남대학교 약학대학 실험동물윤리위원회의 승인을 받아 실시되었다.

동물의 처치

1-Bromopropane을 corn oil에 혼합하여 경구투여하였으며, 대조군 동물은 매체를 10 ml/kg의 용량으로 경구투여하였다. 부검 시 복대정맥으로부터 채혈한 다음, 간을 적출하여 중량 측정 후 4배 량의 냉 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 넣어 균질화하였다. 간 균질액과 분리한 혈청은 사용 시까지 -80°C 에서 보관하였다.

1-Bromopropane 유발 간독성에 미치는 N-acetyl cysteine의 영향

N-Acetyl cysteine 500 mg/kg을 단회 복강투여한 다음 2시간 후에 500 및 1000 mg/kg의 1-bromopropane(10 ml 옥수수기름/kg)을 단회 경구투여하였다.¹⁰⁻¹²⁾ 투여 6시간 및 24시간 후에 각 실험동물을 부검하여 시료를 제조하였다.

1-Bromopropane 유발 간독성에 미치는 silymarin의 영향

Silymarin 500 mg/kg을 실험동물에 단회 복강투여하고, 2시간 후에 500 및 1000 mg/kg의 1-bromopropane(10 ml 옥수수기름/kg)을 단회 경구투여하였다.¹³⁾ 투여 24시간 후에 각 실험동물을

부검하여 시료를 제조하였다.

간독성 지표의 측정

ALT 및 AST의 측정을 위하여 혈액을 2,500×g에서 15분간 4°C 에서 원심하여 혈청시료를 분리하였으며, 각 효소의 활성은 제조사에서 제공한 시험방법에 준하여 측정하였다. 간의 glutathione 함량은 문헌을 참조하여 측정하였으며, 간 균질액의 단백질 정량은 소의 혈청 알부민을 표준품으로 사용하여 측정하였다.^{14,15)}

통계처리

평균값±표준오차(S.E.)를 각 시험군에 대하여 산출하였고, Dunnett's t-test를 활용하여 $P<0.05$ 수준에서 시험군의 통계학적 유의성을 검정하였다.

실험결과

1-Bromopropane에 의한 간독성에 간 glutathione의 소모가 관련되어 있다는 이전 보고에 착안하여,⁹⁾ 본 연구에서는 N-acetyl cysteine의 투여가 1-bromopropane의 간독성에 미치는 영향을 평가하였다. N-Acetyl cysteine 500 mg/kg을 실험동물에 단회 복강투여하고 2시간 후에 500 및 1000 mg/kg의 1-bromopropane을 경구투여하였다.¹⁰⁻¹²⁾ 1000 mg/kg의 1-bromopropane을 투여한 시험군의 혈청 ALT 및 AST 활성은 대조군 활성의 22.4배와 2.0배까지 각각 증가하여 간독성이 뚜렷하게 나타났지만, N-acetyl cysteine 병용투여군에서는 이러한 간독성이 현저히 감소되었다(Table I). 또한, N-acetyl cysteine 병용투여군에서는 1000 mg/kg의 1-bromopropane 단독투여군에 비하여 지질과산화물의 생성도 현저히 감소된 결과를 보여주었다(Table I).

한편, N-acetyl cysteine에 의한 1-bromopropane의 독성 경감 작용과 glutathione 간의 관계를 살펴보기 위하여 N-acetyl cysteine과 500 또는 1000 mg/kg의 1-bromopropane을 단회투여한 다음 6시간 후에 간의 glutathione 함량을 측정하였다. 그 결

Table I – Effects of N-acetyl cysteine (NAC) on the hepatotoxicity induced by 1-bromopropane (1-BP) in male ICR mice

Dose (mg/kg)		Hepatotoxic parameters		
1-BP	NAC	Malondialdehyde (nmole/mg protein)	ALT (Karmen unit/ml)	AST (Karmen unit/ml)
-	-	1.49 ± 0.21^a	49.0 ± 11.2^a	29.9 ± 1.2^a
-	500	1.43 ± 0.19^a	50.1 ± 17.5^a	25.1 ± 2.3^a
500	-	1.20 ± 0.19^a	43.3 ± 14.7^a	22.2 ± 1.3^a
1000	-	2.19 ± 0.43^b	1097.1 ± 771.4^b	60.3 ± 16.8^b
500	500	1.46 ± 0.30^a	38.3 ± 10.4^a	23.0 ± 2.2^a
1000	500	1.58 ± 0.22^a	41.3 ± 11.6^a	29.0 ± 1.4^a

Animals were treated intraperitoneally with NAC at 500 mg/kg once. Two hr after the NAC treatment, 500 and 1000 mg/kg of 1-BP in corn oil were treated orally once. Animals were subjected to necropsy 24 hr after the 1-BP treatment. Each value represents the mean±S.E. of five animals. Mean levels with different alphabets are significantly different at $P<0.05$.

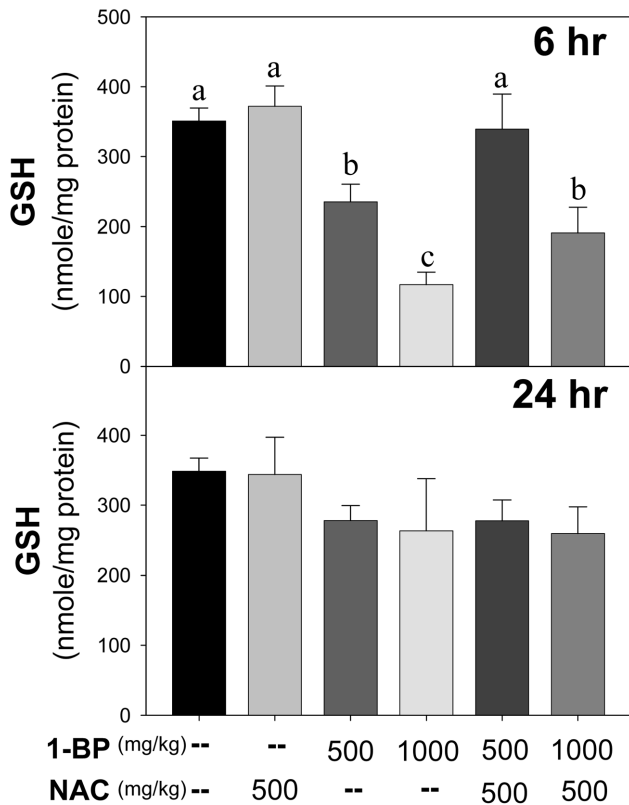


Fig. 1 – Effects of *N*-acetyl cysteine (NAC) on 1-bromopropane (1-BP)-induced reduction of hepatic glutathione. Experimental designs were similar with Table I, except that hepatic samples were prepared either 6 h or 24 h after treatment with 1-BP. Each bar represents mean±S.E. of 5~10 animals. Mean levels with different alphabets are significantly different at $P < 0.05$.

과, 1-bromopropane 투여에 의한 간 glutathione 함량의 감소가 *N*-acetyl cysteine의 투여에 의해 어느 정도 보호됨을 확인할 수 있었다. 이는 *N*-acetyl cysteine에 의한 1-bromopropane의 독성 보호에 glutathione의 역할이 중요함을 시사하는 결과로 판단되었다(Fig. 1). 한편, *N*-acetyl cysteine과 1-bromopropane의 병용 투여 24시간 후에는 glutathione level이 모든 시험군에서 정상

으로 회복되는 결과로 보아 glutathione level의 조절이 매우 빠르게 일어나고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

N-Acetyl cysteine의 투여에 의해 1-bromopropane과 glutathione 간의 S-propyl glutathione 포함체 생성에 미치는 영향을 시험한 결과, 포함체 생성에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2).

다음에는 1-bromopropane에 의한 간독성에 있어서 항산화제의 역할을 시험하기 위하여 마우스에 silymarin을 500 mg/kg의 용량으로 단회 복강투여하고 1000 mg/kg의 1-bromopropane으로 간독성을 유도하였다.¹³⁾ 그 결과, 1-bromopropane은 단독 투여시 혈청 ALT 및 AST 활성을 대조군에 비하여 유의성있게 증가시켰으며, silymarin 병용 투여 시 1-bromopropane에 의한 간독성을 유의성있게 보호하였다(Table II). 또한, silymarin 병용 투여는 1-bromopropane에 의한 지질과산화물의 생성을 유의성있게 감소시켰다(Table II). 하지만 1-bromopropane에 의한 간독성을 보호하는 silymarin의 용량에서 1-bromopropane에 의한 glutathione의 감소에 대해서는 회복능을 보여주지 않아 silymarin에 의한 간독성 보호작용은 glutathione과는 관계없이 항산화 작용에 의한 것으로 판단되었다(Fig. 3).

고찰

1-Bromopropane은 의약품, 농약, 4급 암모늄 화합물 등의 합성시 원료로 사용되거나 지방, 왁스, 수지 등에 대한 용매로 사용되는 등 매우 다양한 산업적 용도로 사용되고 있으나, 최근 중추신경계 및 생식계에 대한 독성 영향이 보고되면서 건강영향에 대한 관심이 고조되고 있는 물질이다.^{3,4,16-18)} 1-Bromopropane의 대사 및 glutathione 포함에 대한 연구 결과, *n*-propylmercapturic acid, 2-hydroxypropylmercapturic acid 및 *n*-propylmercapturic acid sulfoxide 등의 3가지 대사체가 오래 전에 보고된 바 있다.¹⁹⁾ 또한, 이후 1-bromopropane을 투여한 랫드의 뇨로부터 3-bromopropionic acid, 3-hydroxypropyl mercapturic acid 및 2-carboxyethylmercapturic acid 등의 대사체가 추가로 보고되었다.⁷⁾ 따라서, 1-bromopropane의 주요 대사경로는 CYP에 의한 C2 또

Table II – Effects of silymarin on the hepatotoxicity induced by 1-bromopropane (1-BP) in male ICR mice

Dose (mg/kg)		Hepatotoxic parameters		
1-BP	Silymarin	Malondialdehyde (nmole/mg protein)	ALT (Karmen unit/ml)	AST (Karmen unit/ml)
-	-	1.22±0.08 ^a	29.9±11.9 ^a	73.2±12.5 ^a
-	500	1.16±0.15 ^a	14.2±2.3 ^a	58.6±2.3 ^a
500	-	1.12±0.05 ^a	107.9±41.6 ^a	121.0±23.9 ^{ab}
1000	-	1.91±0.29 ^b	1306.3±598.8 ^b	173.2±76.9 ^b
500	500	1.09±0.03 ^a	10.6±1.2 ^a	51.1±3.2 ^a
1000	500	1.41±0.25 ^{ab}	14.3±4.9 ^a	50.2±12.9 ^a

Animals were treated intraperitoneally with silymarin at 500 mg/kg once. Two hr after the silymarin treatment, 500 and 1000 mg/kg of 1-BP in corn oil were treated orally once. Animals were subjected to necropsy 24 h after the treatment. Each value represents the mean±S.E. of five animals. Mean levels with different alphabets are significantly different at $P < 0.05$.

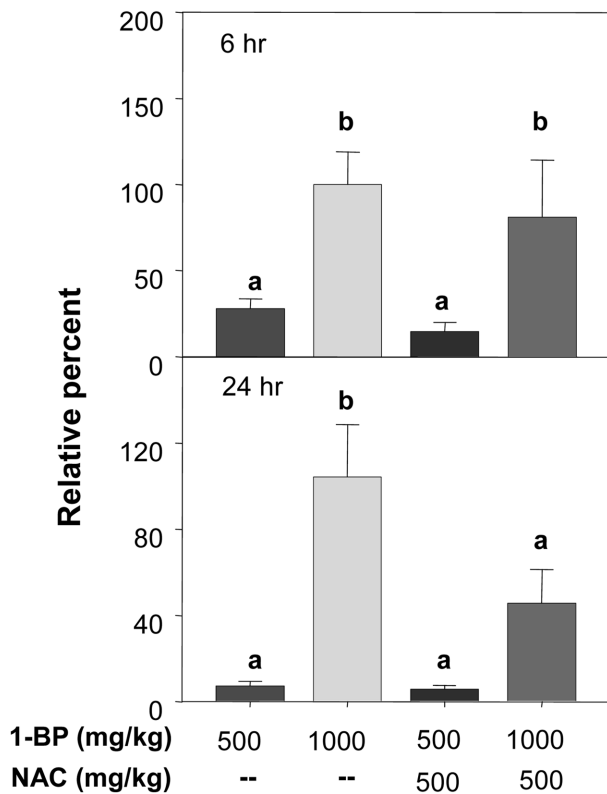


Fig. 2 - Effects of *N*-acetylcysteine (NAC) on the production of *S*-propyl glutathione in liver. Each bar represents mean percent of 1000 mg/kg of 1-BP-treated group \pm S.E. of 5~10 animals. Mean levels with different alphabets are significantly different at $P < 0.05$.

는 C3의 산화와 glutathione S-transferase에 의한 포합체 형성의 두 가지로 구분되는 것으로 알려져 있다.⁶⁾ 본 연구자들의 최근 연구를 통하여 1-bromopropane에 의한 간독성에는 glutathione 포합체 형성을 통한 간 glutathione 고갈이 세포 내에 산화적인 손상을 유발하여 간독성을 유발한다는 결과를 얻은 바 있다.^{2,5)} 특히, 이러한 연구를 통하여 *S*-propyl GSH와 같은 포합체의 구조와 그 생성 특성도 동시에 밝힐 수 있었다.^{5,9)}

Glutathione의 고갈은 화학물질에 의한 간독성 유발 시 매우 중요한 역할을 담당하기 때문에 본 연구에서는 1-bromopropane에 의한 간독성 기작을 확인하기 위하여 glutathione level을 보충할 수 있는 *N*-acetyl cysteine의 작용을 살펴 보았다. 1-Bromopropane은 glutathione 포합체 생성을 통하여 세포 내 glutathione level을 감소시키기 때문에 이러한 glutathione level의 감소가 간독성과 밀접한 연관이 있다면 *N*-acetyl cysteine의 보충에 의하여 간독성이 회복 또는 보호될 수 있을 것으로 판단되었기 때문이었다.

1-Bromopropane에 의한 간독성이 *N*-acetyl cysteine이나 silymarin의 병용 투여에 의하여 보호되는 결과로 보아(Table I 및 Table II), 예측한 바와 마찬가지로 glutathione의 고갈과 산

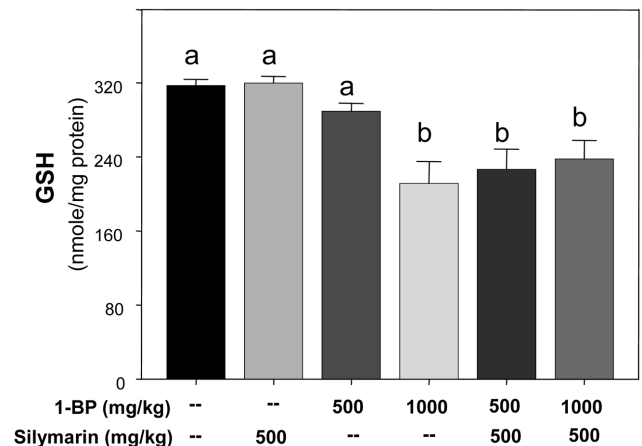


Fig. 3 - Effects of 1-bromopropane (1-BP) and silymarin on the level of hepatic glutathione. The experimental designs were the same as Table II. Each bar represents mean \pm S.E. of 5~10 animals. Mean levels with different alphabets are significantly different at $P < 0.05$.

화적 손상이 1-bromopropane의 간독성에 관련이 있음을 확인할 수 있었다. 특히, *N*-acetyl cysteine에 의한 보호작용은 감소된 glutathione level의 부분적인 복구를 수반하는 것으로 보아 glutathione의 세포 내 농도가 산화적 손상의 조절에 중요함을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 한편, *N*-acetyl cysteine의 투여는 1-bromopropane에 의한 간의 glutathione 감소를 보호하는 결과를 나타내었으나, glutathione 포합체의 생성에는 영향을 주지 않은 것으로 나타났다(Fig. 2). 따라서, glutathione 포합체 자체가 간독성을 유발하기 보다는 1-bromopropane에 의해 감소된 glutathione level로 인하여 2차적으로 세포 내에 산화적인 손상을 유발하여 독성이 나타나는 것으로 예측할 수 있었다.

한편, silymarin에 의한 간독성 보호 시에는 간의 glutathione level에 영향을 주지 않은 결과를 얻었는데(Fig. 3), 이는 silymarin에 의한 간독성 보호작용은 glutathione과 1-bromopropane 간의 포합체 생성으로 기인하는 glutathione level의 변화에 직접적으로 영향을 주기 보다는 silymarin의 항산화 작용에 의한 결과로 사료되었고, *N*-acetyl cysteine과는 다른 기작을 통하여 보호작용이 나타나는 것으로 판단되었다.

본 연구의 결과는 1-bromopropane에 의해 유발되는 간독성이 glutathione 포합에 의한 간세포 내 glutathione의 고갈과 그 후의 지질과산화 유발의 두 과정으로 구분될 수 있음을 의미하며, 두 과정 모두 1상 대사의 역할에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 보인다. 따라서, 현재 1-bromopropane에 의한 간독성에 있어서 1상 대사의 역할을 규명하기 위한 연구를 진행 중에 있는데, 특히 1-bromopropane의 대사에 CYP가 관여할 가능성이 크기 때문에 CYP의 억제제와 유도제를 활용한 *in vivo* 연구를 통하여 1상 대사작용의 역할 규명이 가능할 것으로 판단된다.

감사의 말씀

이 논문은 2008년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2008-521-E00183).

참고문헌

- 1) Låg, M., Söderlund, E. J., Omichinski, J. G., Brunborg, G., Holme, J. A., Dahl, J. E., Nelson, S. D. and Dybing, E. : Effect of bromine and chlorine positioning in the induction of renal and testicular toxicity by halogenated propanes. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 528 (1991).
- 2) Lee, S. K., Jin, C. H., Hyun, S. H., Lee, D. W., Kim, G. H., Jeon, T. W., Lee, J., Kim, D. H., Jeong, H. G., Lee, E. S. and Jeong, T. C. : Identification of glutathione conjugates of 1,2-dibromopropane in female BALB/c mice by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Xenobiotica* **35**, 97 (2005).
- 3) Yu, X., Ichihara, G., Kitoh, J., Xie, Z., Shibata, E. and Kamijima, M. : Preliminary report on the neurotoxicity of 1-bromopropane, an alternative solvent for chlorofluorocarbons. *J. Occup. Health* **40**, 234 (1998).
- 4) Ichihara, G., Kitoh, J., Yu, X., Asaeda, N., Iwai, H. and Kumazawa, T. : 1-Bromopropane, an alternative to ozone layer-depleting solvents, is dose-dependently neurotoxic to rats in long-term inhalation exposure. *Toxicol. Sci.* **55**, 116 (2000).
- 5) Lee, S. K., Jeon, T. W., Kim, Y. B., Lee, E. S., Jeong, H. G. and Jeong, T. C. : Role of glutathione conjugates in the hepatotoxicity and immunotoxicity induced by 1-bromopropane in female BALB/c mice. *J. Appl. Toxicol.* **27**, 358 (2007).
- 6) B'Hymer, C. and Cheever, K. L. : Development of a gas chromatographic test for the quantification of the biomarker 3-bromopropionic acid in human urine. *J. Chromatogr. B* **802**, 361 (2004).
- 7) Jones, A. R. and Walsh, D. A. : The oxidative metabolism of 1-bromopropane in the rat. *Xenobiotica* **9**, 763 (1979).
- 8) Ghanayem, B. I. and Hoffler, U. : Investigation of xenobiotics metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity using Cyp2e1 (-/-) mice. *Curr. Drug Metab.* **8**, 728 (2007).
- 9) Lee, S. K., Jo, S. W., Jeon, T. W., Jun, I. H., Jin, C. H., Kim, G. H., Lee, D. J., Kim, T. O., Lee, E. S. and Jeong, T. C. : Hepatotoxic effect of 1-bromopropane and its conjugation with glutathione in male ICR mice. *Arch. Pharm. Res.* **28**, 1177 (2005).
- 10) Al-Mustafa, Z. H., Al-Ai, A. K., Qaw, F. S. and Abdul-Cader, Z. : Cimetidine enhances the hepatoprotective action of N-acetylcysteine in mice treated with toxic doses of paracetamol. *Toxicology* **121**, 223 (1997).
- 11) Letteron, P., Descatoire, V., Larrey, D., DeGott, C., Tinel, M., Geneve, J. and Pessayre, D. : Pre- or post-treatment with methoxsalen prevents the hepatotoxicity of acetaminophen in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **239**, 559 (1986).
- 12) Whitehouse, L. W., Wong, L. T., Paul, C. J., Pakuts, A. and Solomonraj, G. : Postabsorption antidotal effects of N-acetylcysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **63**, 431 (1985).
- 13) Letteron, P., Labbe, G., Degott, C., Berson, A., Fromenty, B., Delaforge, M., Larrey, D. and Pessayre, D. : Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. Evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 2027 (1990).
- 14) Ellman, G. L. : Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70 (1959).
- 15) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 16) Boekelheide, K., Darney, S. P., Daston, G. P., David, R. M., Luderer, U., Olshan, A. F., Sanderson, W. T., Willhite, C. C. and Woskie, S. : NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of 1-bromopropane. *Reprod. Toxicol.* **18**, 157 (2004).
- 17) Wang, H., Ichihara, G., Ito, H., Kato, K., Kitoh, J., Yamada, T., Yu, X., Tsuboi, S., Moriyama, Y., Sakatani, R., Shibata, E., Kamijima, M., Itohara, S. and Takeuchi, Y. : Biochemical changes in the central nervous system of rats exposed to 1-bromopropane for seven days. *Toxicol. Sci.* **67**, 114 (2002).
- 18) Wang, H., Ichihara, G., Ito, H., Kato, K., Kitoh, J., Yamada, T., Yu, X., Tsuboi, S., Moriyama, Y. and Takeuchi, Y. : Dose-dependent biochemical changes in rat central nervous system after 12-week exposure to 1-bromopropane. *Neurotoxicology* **24**, 199 (2003).
- 19) Barnsley, E. A., Grenby, T. H. and Young, L. : Biochemical studies of toxic agents: the metabolism of 1- and 2-bromopropane in rats. *Biochem. J.* **100**, 282 (1966).