

이염화메탄에 의한 Carboxyhemoglobin 생성에 몇몇 대사활성조절제들이 미치는 영향

강경애 · 김영철*

서울대학교 약학대학, 서울특별시 관악구 신림동 산 56-1

Alterations in Dichloromethane-Induced Carboxyhemoglobin Elevation by Several Metabolic Modulators

Kyoung Ae Kang and Young Chul Kim*

College of Pharmacy, Seoul National University,
San 56-1 Shinrim-Dong Kwanak-Ku, Seoul 151-742, Korea

(Received November 22, 1995)

(Accepted December 4, 1995)

ABSTRACT : Several metabolic modulators on the generation of carbon monoxide (CO) from dichloromethane (DCM) was examined in adult female rats. It has been known that DCM is converted to CO by cytochrome P-450 or to carbon dioxide (CO₂) by glutathione-dependent metabolic reaction. In rats treated with DCM (3 mmol/kg, ip) only, the carboxyhemoglobin (COHb) level reached a peak of approximately 10% 2 or 3 hr following the treatment. Disulfiram (300 mg/kg, ip) or allylsulfide (200 mg/kg, po), both known as a selective inhibitor for cytochrome P-450 2E1, blocked the increase in COHb concentrations almost completely suggesting that the metabolic conversion of DCM to CO is mediated by the activity of this specific type of isozyme. YH439 (125 or 250 mg/kg, po), a potential hepatoprotective agent, decreased the COHb elevation as well indicating that this chemical is a potent inhibitor for 2E1. In rats treated with pyrazine (200 mg/kg, ip) 18 hr prior to DCM the peak COHb concentration was decreased by approximately 3 or 4%. However, pretreatment of rats with pyrazine either 24 or 48 hr before DCM increased the peak COHb concentration significantly compared to the rats treated with DCM only. The results in the present study strongly suggest that the generation of CO from DCM depends on the 2E1 activity and that the pharmacological and/or toxicological action of YH439 or pyrazine in animals or human is associated with its effect on this isozyme.

Key Words : Dichloromethane, Carboxyhemoglobin, Cytochrome P-450 2E1, Disulfiram, Allylsulfide, Pyrazine, YH439

I. 서 론

Dichloromethane(DCM)은 산업용 유기용매로 널리 사용되고 있으며, 간의 microsomal fraction에 의해 매개되는 효소반응에 의해 일산화탄소(CO)로 전환되거나 cytosolic fraction에서 glutathione 의존성 대사반응에 의해 이산화탄소를 생성한다(Kubic *et al.*, 1974; Kubic and Anders, 1975). 따라서 DCM은 CO를 생성하여 carboxyhemoglobin(COHb)의 농도를 증가시켜

hypoxia를 유발하는 것이 주요 독성으로 알려져 있다 (Stewart *et al.*, 1972). 그러나 랫트나 마우스에서 DCM에 의한 COHb 생성은 이 용매의 용량에 무관하게 최고 농도가 10% 내외에서 포화현상을 보이며 (Kurppa and Vainio, 1981), P-450 inducer인 phenobarbital, 3-methylcholanthrene이나 SKF 525-A, CoCl₂ 등의 inhibitor에 의해서도 변화되지 않았다(Kubic and Anders, 1978; Kim and Carlson, 1986). DCM에 의한 COHb 생성이 포화되는 것이나 COHb 농도에 P-450 의존성 대사반응의 inducers/inhibitors 전처리가 영향을 주지 못하는 이유는 아직도 분명하지 않다. 최근 DCM의 대사에 cytochrome P-450 2E1이 중요한 역

이 연구는 신의약품 개발 연구센터(KOSEF-RCNDD)의 연구비에 의해 부분적으로 지원되었음.

*To whom all correspondence should be addressed.

할을 하는 것으로 알려지고(Guengerich *et al.*, 1991), 또한 몇몇 2E1 inducer들은 급성적으로 DCM에 의한 COHb 생성을 증가시키는 것으로 보고되었다(Pankow *et al.*, 1991). 본 연구에서는 잘 알려진 2E1 inhibitor인 disulfiram(Brady *et al.*, 1991) 및 allylsulfide(Kwak, 1993)와 주요 생체내 활성이 2E1 inhibition과 유관한 것으로 추정되는 YH439와 pyrazine이 DCM에 의한 COHb 생성에 주는 영향에 대하여 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

자성 Sprague-Dawley 랫트를 (주)유한양행으로부터 공급받아 실험동물로 사용하였다. 분양받은 동물은 3주 이상 본 대학 사육실에서 적응시킨 후 체중 약 150 g에 도달했을 때 실험에 사용하였다. 사육실은 온도 $22 \pm 5^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ 의 환경을 유지하였으며 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 고품사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

2. 약물투여

Disulfiram(300, 500, 1000 mg/kg, ip)과 YH439(125, 250 mg/kg, po)는 DCM 투여 4시간 전에 주사하였다. Allylsulfide(200 mg/kg, po)를 투여하고 24시간 후에, pyrazine(200 mg/kg, ip)은 18, 24, 48시간 후 DCM을 투여하였다. Disulfiram과 allylsulfide는 corn oil에, pyrazine은 생리식염수에 용해시켰으며 YH439는 sodium carboxy methyl cellulose(CMC-Na)에 현탁시켜 투여하였다.

3. 시약

본 연구실험에 사용한 시약은 disulfiram, tris(hydroxymethyl)aminomethane(이상 Sigma Chemical Co., U.S.A.), sodium dithionite, dichloromethane(이상 Fisher Chemical Co., U.S.A.), sodium chloride(Junsei Chemical Co., Japan), pyrazine(Aldrich Chemical Co., Germany), sodium carboxy methyl cellulose(Shimakyu's Pure Chemicals, Japan), YH439(유한양행 중앙연구소) 등이며 실험에 사용된 모든 시약과 용매는 reagent grade 또는 그 이상의 품질을 사용하였다.

4. Assay

혈중 COHb 농도는 Rodkey 등의 방법(Rodkey *et al.*, 1979)을 이용하여 spectrophotometer로 측정하였다. 랫트의 orbital sinus로부터 채혈한 후 sodium dithionite를 가한 10 mM Tris 용액으로 약 1,500배로 희석하였다. 이 혈액희석액으로 cuvette을 채우고 teflon mixing aids를 넣은 후 캡을 막은 다음 흡광도가 안정해질 때까지 inversion에 의해 mixing하였다. 420 nm 및 432 nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같은 식에 의해 COHb%를 계산하였다.

$$\text{COHb \%} = \frac{A_{432} \times \epsilon[\text{Hb}]_{420} - A_{420} \times \epsilon[\text{Hb}]_{432}}{A_{420}(\epsilon[\text{COHb}]_{432} - \epsilon[\text{Hb}]_{432}) - A_{432}(\epsilon[\text{COHb}]_{420} - \epsilon[\text{Hb}]_{420})} \times 100$$

A_x : x nm에서의 흡광도

$\epsilon[M]_x$: x nm에서의 물질 M의 몰흡광계수(molar extinction coefficient)

5. 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준오차로 표시하였다. 구간간의 차이는 two-tailed Student's *t*-test 또는 one-way ANOVA를 수행한 후 Newman-Keuls multiple range test를 실시하여 유의성을 검정하였다. 따로 기술하지 않은 한 $P < 0.05$ 인 경우 유의성있는 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

DCM은 cytochrome P-450 의존성 효소반응에 의하여 일산화탄소(CO)로 대사되거나 glutathione 의존성 대사반응에 의해 이산화탄소로 전환되는 것으로 알려져 있다(Kubic *et al.*, 1974; Kubic and Anders, 1975). 랫트나 마우스에서 DCM에 의한 COHb 농도 상승은 약 10% 내외에서 포화되어 DCM 투여량을 증가시켜도 상승되지 않는다(Kurppa and Vainio, 1981). 또한 널리 알려져 있는 P-450 효소활성의 inhibitor인 SKF 525-A, CoCl_2 등의 투여에 의해서도 COHb 농도는 변화되지 않는 것으로 보고되었다(Kubic and Anders, 1978; Kim and Carlson, 1986). 본 연구실험에서 DCM을 3 mmol/kg의 용량으로 복강주사하였을 때 약 2시간 경과시 최대 COHb 농도인 10% 부근에 도달하였으며 이 최대 농도는 DCM의 용량을 2배로 증가시켰을 때도 더이상 상승되지 않아 앞의 보고들과 일치하는 결과를 보였다(data not shown).

Disulfiram은 생체내에서 diethyldithiocarbamate와 CS₂로 대사되며 이 두 대사물은 모두 P-450 isozymes 중에서 특이적으로 CYP 2E1 subtype을 억제하는 것으로 알려져 있다(Brady *et al.*, 1991). 본 연구실험에서 DCM 투여 4시간 전에 주사된 disulfiram은 사용된 최소 용량인 300 mg/kg에서 COHb 상승을 거의 완전하게 차단하였다(Fig. 1). 이 결과는 DCM의 CO로의 생체내 전환반응에 CYP 2E1이 중요한 역할을 하고 있음을 시사하고 있다. 한편 allylsulfide는 마늘유의 성분으로 nitrosamine을 활성화 시키는 효소인 CYP 2E1 발현을 억제 시킴으로써 간암 및 대장암을 강력하게 억제함이 최근에 보고된 바 있다(Brady *et al.*, 1988). 본 연구실험에서 24시간 전에 전처리된 allylsulfide(200 mg/kg, po)는 COHb 생성을 현저하게 억제시켜 DCM의 대사전환에 CYP 2E1의 역할을 시사한 위의 실험결과를 강력하게 지지하고 있다(Fig. 2).

YH439(isopropyl 2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methyl thiazol-2-yl) carbamoyl] acetate)는 (주)유한양행에서 간장질환치료제로 개발중인 물질이다. 이 약물은 실험동물에서 화학물질로 유도된 간독성에 억제효과가 있는 것으로 관찰되었으며 그 기전은 이 물질이 가진 CYP 2E1 활성 억제작용과 유관한 것으로 추정되고 있다(Choi, 1994). YH439는 125 mg/kg 또는 250 mg/kg의 용량으로 DCM 주사 4시간 전에 경구투여 되었을 때 COHb 농도상승을 완전하게 차단시켜 강력한

CYP 2E1 활성억제작용이 있음을 보여 주었다(Fig. 3). 본 연구실험에서 YH439가 disulfiram보다 낮은 용량으로 투여되었으며 이 약물의 경구흡수율이 대단히 낮은 것을 고려하면(Yoon, 1996) YH439는 CYP 2E1 활성에 대하여 매우 강력한 억제작용을 갖고 있는 것으로 보인다.

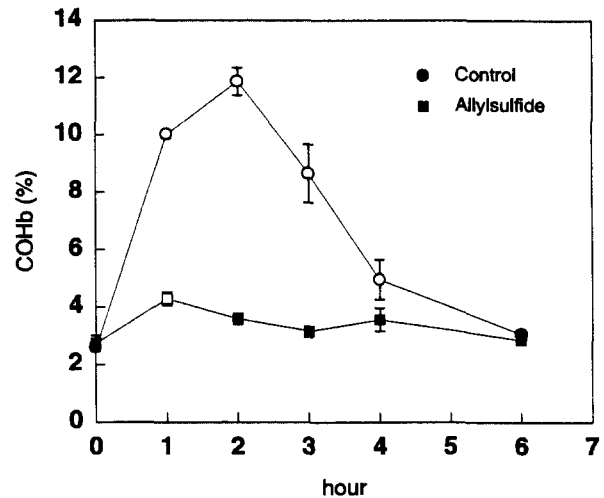


Fig. 2. Effect of allylsulfide on COHb level induced by DCM. Rats were treated with allylsulfide (200 mg/kg, po) 24 hr prior to DCM (3 mmol/kg, ip). Each value represents the mean \pm SE for five rats. The effect of allylsulfide on DCM-induced COHb generation was determined by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test. Significant difference from the COHb concentration determined prior to DCM treatment is expressed by an open symbol such as \circ , \square ($P < 0.05$).

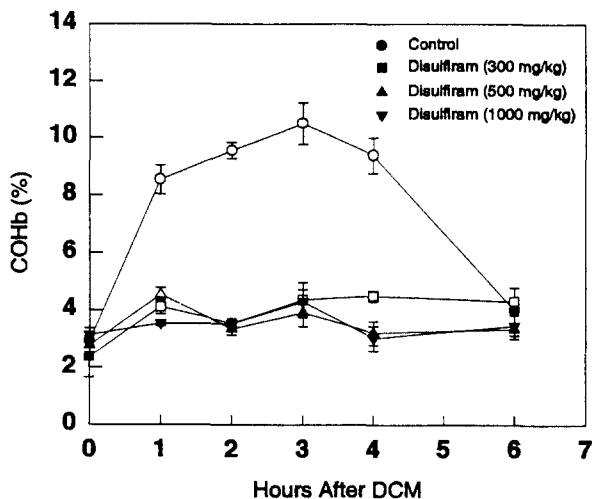


Fig. 1. Effect of disulfiram on COHb level induced by DCM. Rats were treated with disulfiram (300, 500 or 1000 mg/kg, ip) 4 hr prior to DCM (3 mmol/kg, ip). Each value represents the mean \pm SE for four or five rats. The effect of disulfiram on DCM-induced COHb generation was determined by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test. Significant difference from the COHb concentration determined prior to DCM treatment is expressed by an open symbol such as \circ , \square , \triangle , ∇ ($P < 0.05$).

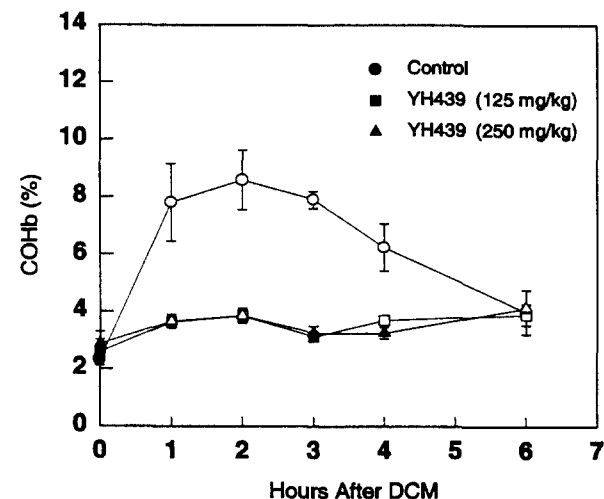


Fig. 3. Effect of YH439 on COHb level induced by DCM. Rats were treated with YH439 (125 or 250 mg/kg, po) 4 hr prior to DCM (3 mmol/kg, ip). Each value represents the mean \pm SE for four or five rats. The effect of YH439 DCM-induced COHb generation was determined by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test. Significant difference from the COHb concentration determined prior to DCM treatment is expressed by an open symbol such as \circ , \square , \triangle ($P < 0.05$).

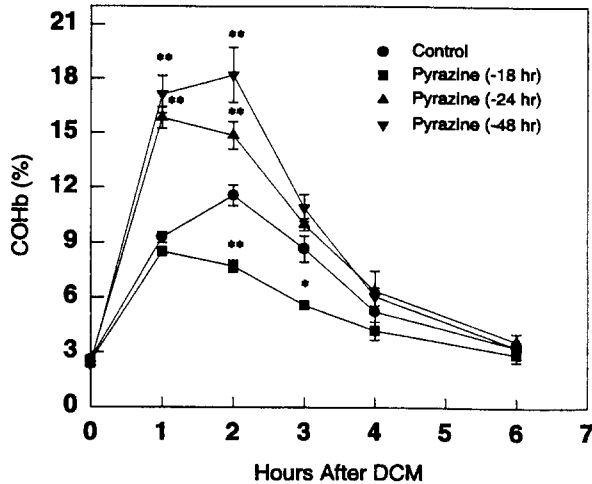


Fig. 4. Effect of pyrazine on COHb level induced by DCM. Rats were treated with pyrazine (200 mg/kg, ip) 18, 24 or 48 hr prior to DCM (3 mmol/kg, ip). Each value represents the mean \pm SE for five to ten rats. Asterisks indicate significant difference from the control rats treated with DCM only (Student's *t*-test, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$).

Pyrazine은 천연물성분이며 의약품의 원료로 사용된다. 이 물질은 CYP 2E1 뿐만 아니라 glutathione S-transferase, microsomal epoxide hydrolase의 활성을 증가시키는 것으로 최근에 보고되었다(Novak *et al.*, 1990). 본 연구실험에서 pyrazine(200 mg/kg, ip)을 전처리하고 18시간 후에 투여된 DCM에 의한 최대 COHb 농도는 대조군에 비하여 3 내지 4% 정도 유의성있게 감소하였다(Fig. 4). 이 결과는 pyrazine이 DCM으로부터 CO로의 전환을 저하시킴으로써 오히려 CYP 2E1 활성을 억제하고 있음을 시사한다. 그러나 pyrazine 주사 후 24시간이 경과하였을 때 투여된 DCM으로부터의 COHb 생성은 현저히 상승되어 pyrazine이 CYP 2E1 활성에 주는 영향은 투여시간에 따라 상반되게 나타남을 보였다. 앞의 실험에서 pyrazine이 DCM으로부터 COHb 생성을 억제시킨 이유는 분명하지 않으나 이 효과가 직접적으로 CYP 2E1 isozyme에 대한 pyrazine의 억제작용에 기인한 것으로 보이지는 않는다. 즉, pyrazine 투여 후 6시간이 더 경과하였을 때 DCM에 의한 COHb 생성은 오히려 증가되었으므로 앞의 실험에서 관찰된 COHb 농도 저하는 아직 체내에 잔류한 pyrazine이 DCM과 더불어 CYP 2E1 isozyme의 활성부위에서 서로 경쟁적으로 반응하기 때문으로 추정된다. 또 DCM 투여 48시간 전에 pyrazine을 전처리하였을 때도 DCM으로부터 COHb이 유의적으로 증가하여 pyrazine의 CYP 2E1에 대한 유도작용은 투여 후 48시간까지 지속됨을 알 수 있다.

종합적으로 본 연구실험결과는 DCM의 체내대사과정에서 CO로의 전환을 매개하는 효소활성은 CYP 2E1에 의존함을 강력하게 시사하고 있으며 간질환치료제로 개발중인 YH439는 혈액내에서 COHb 농도상승에 강력한 억제작용을 나타내어 이 약물의 생리활성이 CYP 2E1에 대한 효과와 연관되어 있음을 암시하고 있다. 또 최근에 xenobiotics의 대사에 관여하는 몇몇 효소의 활성에 영향을 주는 것으로 보고되고 있는 pyrazine은 투여시간대에 따라 CYP 2E1에 의해 매개되는 대사반응에 서로 상반되는 dual action을 나타내며 CYP 2E1 활성을 증가시키는 효과는 pyrazine의 투여에 의해서 48시간 이상 유지됨을 보여주고 있다.

참고문헌

- Brady, J.F., Li, D., Ishzaki, H. and Yang, C.S. (1988): Effect of diallylsulfide on rat microsomal nitrosamine and other monooxygenase activities, *Cancer Res.*, **48**, 5937-5940.
- Brady, J.F., Xiao, F., Wang, M.H., Li, Y., Ning, S.M., Grapac, J.M. and Yang, C.S. (1991): Effects of disulfiram on hepatic P450IIE1, other microsomal enzymes, and hepatotoxicity in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **108**, 366-373.
- Choi, E.Y. (1994): Effects of YH439 on the expression of rat hepatic CYP 2E1, microsomal epoxide hydrolase, glutathione S-transferase, M.S. Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea.
- Guengerich, F.P., Kim, D.H. and Iwasaki, M. (1991): Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects, *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 168-179.
- Kim, Y.C. and Carlson, G.P. (1986): The effect of an unusual workshiff on chemical toxicity I. Studies on the exposure of rats and mice to dichloromethane, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **6**, 162-171.
- Kubic, V.L., Anders, M.W., Engel, R.P. and Barloco, C.H. (1974): Metabolism of dihalomethane to carbon monoxide I. In vivo studies, *Drug Metab. Dispos.*, **2**, 53-57.
- Kubic, V.L. and Anders, M.W. (1975): Metabolism of dihalomethane to carbon monoxide II. In vivo studies, *Drug Metab. Dispos.*, **3**, 104-111.
- Kubic, V.L. and Anders, M.W. (1978): Metabolism of dihalomethane to carbon monoxide III. Studies on the mechanism of reaction, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 2349-2355.
- Kurppa, K. and Vainio, H. (1981): Effects of intermittent dichloromethane inhalation on the blood carboxyhemoglobin concentration and drug metabolizing enzymes in rats, *Res. Com-*

- mum. Chem. Path. Pharmacol.*, **32**, 535-544.
- Kwak, M.K. (1993): Effect of allylsulfides on the expression of cytochrome P4502E1, glutathione S-transferase, microsomal epoxide hydrolase, M.S. Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea.
- Novak, R.F., Kim, S.G., Brooks, S.C., Primito, T., Salinas, F.m and Novak, J.C. (1990): Thiazole, pyridazine and pyrazine induction of glutathione S-transferase in rats, *Toxicologist*, **11**, 48.
- Rodkey, F.L., Hill, T.A. and Robertson, R.F. (1979): Spectrophotometric measurement of COHb and methemoglobin in blood, *Clin. Chem.*, **25**, 1388-1393.
- Pankow, D.P., Matsciner, F. and Weigmann, H.J. (1991): Influence of aromatic hydrocarbons on the metabolism of dichloromethane to carbon monoxide in rats, *Toxicology*, **68**, 89-100.
- Stewart, R.D., Fisher, T.N., Hosko, M.J., Peterson, J. E., Baretta, E.D. and Dodd, H.C. (1972): Carboxyhemoglobin elevation after exposure to methylene chloride, *Science*, **176**, 295-296.
- Yoon, W.H. (1996): Pharmacokinetics of YH439, Ph.D. Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea (Submitted).