

## S-(N,N-Diallyldithiocarbamoyl)-N-acetylcysteine의 합성 및 발암억제와 관련된 생화학적 특성

이 병 훈\*  
원광대학교 약학대학

### S-(N,N-Diallyldithiocarbamoyl)-N-acetylcysteine: Synthesis and Biochemical Properties Associated with Chemoprevention

Byung-Hoon Lee\*

College of Pharmacy, Wonkwang University  
(Received May 12, 1998)  
(Accepted June 2, 1998)

**ABSTRACT** : Dithiocarbamate and mixed disulfide containing allyl functions were designed and synthesized as putative chemopreventive agents, i.e. N,N-diallyldithiocarbamate (DATC) and S-(N,N-diallyldithiocarbamoyl)-N-acetylcysteine (AC-DATC). DATC and AC-DATC were administered and the activities of cytosolic glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) and microsomal N-nitrosodiethylamine (NDEA) deethylase were assayed in order to test the effects of these organosulfur compounds on the detoxification and metabolic activation system of NDEA. The amounts of hepatic glutathione (GSH and GSSG) was also determined. The administration of DATC to rats led to an increase in the activity of GR and to an inhibition of CYP2E1-mediated NDEA deethylation. AC-DATC induced the activity of GR and GST, increased the hepatic GSH content and inhibited the rate of NDEA deethylation. The level of GSSG was decreased as a consequence of the increased activity of GR. These effects may contribute to possible antimutagenic and anticarcinogenic action of the dithiocarbamates investigated.

**Key Words** : S-(N,N-Diallyldithiocarbamoyl)-N-acetylcysteine, Glutathione, Glutathione related enzymes, CYP2E1, Chemoprevention.

#### I. 서 론

최근 발암억제제에 의해 암의 발생을 초기단계에 억제하려는 화학적 암예방(Chemoprevention)에 대한 중요성이 널리 인식되어가고 있으며 많은 동물실험과 역학조사결과들에 의해 효과적인 물질이 발견되고 그 작용기전이 밝혀지고 있다. 발암억제제(Chemopreventive agent)는 천연물질과 합성화합물로 대별할 수 있는데 전자의 경우 많은 부분이 음식물에 존재하는 미량 성분들이 차지하고 있으며 차, 향신료 등 다양한 자원에서부터 특정 성분이 확인되어 이들에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(Wang *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1994; Surh *et al.*, 1995). 마늘 및 양파의 정유성분 또한 발암억제효과가 있다고 보고된바 있으며(Belman 1983) 구조에 allyl기를 함유하는 유기황화합물들이 이

들의 유효성분임이 밝혀졌다. 이중 가장 강력한 효과를 보이는 물질이 diallyl sulfide와 diallyl disulfide이며 이들의 발암억제효과는 CYP2E1 등 발암원의 대사활성화에 관여하는 효소의 억제, glutathione S-transferase 등 발암원의 해독에 관여하는 효소의 활성화 등으로 설명된다(Brady *et al.*, 1991; Hu and Singh, 1997). Spamins 등은(1988) 구조활성연구에서 이들의 allyl기를 포화시켜 propyl기로 치환시킨 유도체들은 발암억제 활성이 없으며, 구조에 allyl기를 한 개 함유한 유도체보다는 두 개 함유한 유도체의 효과가 더 크다는 것을 밝힘으로서 allyl기가 발암억제활성에 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였다. 합성화합물로 발암억제효과가 알려진 물질에는 N,N-diethyldithiocarbamate(DDTC)가 있으며 최근 이들의 구조유사체들이 환경발암원인 benzo[a]pyrene, N-nitrosodiethylamine(NDEA) 등에 의해 유발되는 유전독성을 억제하고, 발암원의 대사활성화를 억제하며 암의 발생을

\*To whom correspondence should be addressed

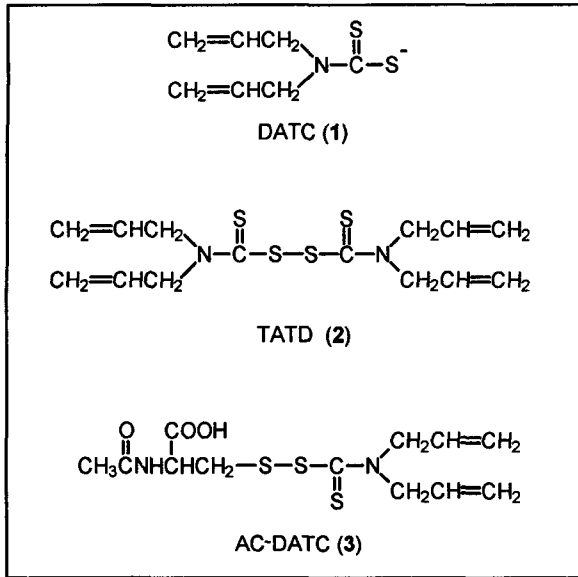


Fig. 1. Structural formulae of DATC (1), TATD (2) and AC-DATC (3).

예방할 수 있는 성질을 갖고있음이 보고되고 있다 (Lee *et al.*, 1994; 1995; 1996; 1997; Hadjiolov *et al.*, 1992).

Allyl기의 발암억제성질과 dithiocarbamate 화합물의 유전독성억제효과를 결합 시킨다면 다양한 작용기전에 의한 발암억제제 후보물질을 개발할 수 있으리라는 기대아래 본 연구에서는 allyl기를 함유하는 dithiocarbamate인 N,N-Diallyldithiocarbamate(DATC)와 이의 유도체인 S-(N,N-Diallyldithiocarbamoyl)-N-acetylcysteine(AC-DATC)을 합성하여(Fig. 1) 이들이 NDEA의 대사활성화와 해독기전에 연관된 생화학적 지표에 미치는 영향을 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

모든 시약은 특급시약을 사용하였으며 주로 Sigma 및 Merck사의 시약을 사용하였고 용매는 필요한 경우 molecular sieve(pore size 0.4 nm)를 이용해 건조한 후 사용하였다.

### 2. 기구

NMR은 Bruker WH-90(90 MHz)을, HPLC는 Latek P400 pump, Shimadzu SPD-6A UV detector, Hewlett-Packard 3390A integrator로 구성된 장치를 사용하였다.

용점은 Büchi사의 용점측정기를 사용하였으며 이는 보정되지 않았다.

### 3. 합성

#### 1) N,N-Diallyldithiocarbamate(DATC) 1

12% NaOH 100 mL에 diallylamine 29.2 g을 녹인 용액을  $-5\sim 0^{\circ}\text{C}$ 로 냉각하고 25.1 g  $\text{CS}_2$ 를 천천히 가한 후 1시간 동안 상온에서 교반하였다. 반응물을 감압농축한 잔류물을 diethylether로 재결정하여 미황색 결정을 얻었다(mp  $72\sim 74^{\circ}\text{C}$ ; 81%).

$^1\text{H-NMR}$  (90 MHz in  $d_6$ -DMSO):  $\delta$ [ppm] = 4.68 (d, 4H, 2N- $\text{CH}_2$ ); 4.93~5.03 (m; br; 4H; 2C= $\text{CH}_2$ ); 5.67~6.09 (m, br, 2H, 2C=CH)

#### 2) N,N,N',N'-Tetraallylthiuramdisulfide(TATD) 2

15 g을 물 200 mL에 녹인 용액을 빙수조에서 냉각시키고 여기에 요드 10 g을 녹인  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  200 mL을 반응액의 색이 적갈색이 될 때까지 교반하며 천천히 가하였다. 반응액을  $\text{CHCl}_3$ 로 추출하고 유기층을 물로 세척하여  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조한 후 감압농축하였다. 황색의 잔류물을 silica gel을 이용하여 column chromatography(n-Hexane/Diethylether = 4/1)로 정제하였다. 이 물질은 공기 중에서 쉽게 산화되므로 질소를 치환한 용매 중에 보관하였으며 일부만 감압농축하여 NMR로 확인하였다 (65%).

TLC: n-Hexane/Diethylether = 2/1;  $R_f$  = 0.58

$^1\text{H-NMR}$  (90 MHz in  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 4.63 (d, 8H, 4N- $\text{CH}_2$ ); 5.20~5.38 (m, br, 8H, 4C= $\text{CH}_2$ ); 5.76~6.18 (m, br, 4H, 4C=CH)

#### 3) S-(N,N-Diallyldithiocarbamoyl)-N-acetylcysteine (AC-DATC) 3

3.3 g N-Acetylcysteine을 100 mL의  $\text{CH}_3\text{OH}$ 에 녹이고 5.5 mL ethyldiisopropylamine과 n-Hexane/Diethylether에 녹아있는 2.92 g을 가하여 질소 하에서 2시간 교반하였다. 감압농축후 100 mL  $\text{CHCl}_3$ 로 추출하고 1N citric acid로 3회 세척하여 유기층을 모아 물로 다시 세척하였다.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조시킨 후 감압농축하여 benzene으로 재결정하였다. 결정에 함유된 benzene을 제거하기 위하여  $\text{CH}_3\text{OH}$ 를 가한 후 감압하에 건조하였다(14%).

TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  = 2/1;  $R_f$  = 0.36

$^1\text{H-NMR}$  (90 MHz in  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 2.15 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 3.08~3.67 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ); 4.42 (s, br, 1H, N-

CH); 4.62~4.82 (m, br, 4H, 2N-CH<sub>2</sub>); 5.16~5.40 (m, 4H, 2C = CH<sub>2</sub>); 5.70~6.13 (m, br, 2H, 2C=CH); 6.32 (s, 1H, COOH); 7.68 (d, 1H, NH)

HPLC: column:  $\mu$ Bondapak C18; 300×4 mm

Solvent: A = 7.9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
+ 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O

B = CH<sub>3</sub>OH

A/B = 70/30

Flow rate: 1 mL/min

Detector: UV 254 nm

Retention time: 14.1 min(95%)

4. 생화학적 지표 검색

모든 실험에는 150~250 g의 웅성 SD 랫드를 사용하였다. 각 군당 5마리의 동물에 DATC 또는 AC-DATC(1.7 mmol/kg; i.p.)를 투여하였고 대조군에는 동량의 생리식염수를 주사하였다. 투여 4시간 혹은 24시간 후에 동물들을 희생시켜 간을 적출한 후 Bertram 등의 방법(1982)에 따라 cytosol과 microsome을 분리하여 단백질을 정량하였다(Lowry 등 1951). 간조직내의 Glutathione(GSH와 GSSG) 함량은 Griffith의 방법(1980)에 따라 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), glutathione reductase, NADPH 등을 함유하는 system에서 2-nitro-5-thiobenzoic acid가 생성되는 속도에 의해 정량하였다. Glutathione S-transferase(GST)의 활성은 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 기질로 사용하여 Habig 등의 방법(1974)에 따라 측정하였고, glutathione reductase(GR)의 활성은 GSSG에 의해 NADPH가 산화되는 속도에 의해 측정하였다(Calberg와 Mannervik 1975). Nitrosamine dealkylase의 활성은 1 mM NDEA를 기질로 하여 생성되는 acetaldehyde를 2,4-dinitrophenylhydrazone으로 유도체화 하여 HPLC로 측정하였다(Janzowski 등 1982).

III. 결과 및 고찰

DATC는 NaOH 알칼리성에서 diallylamine과 CS<sub>2</sub>를 반응시킨 후 diethylether로 재결정하여 정제하였다. 이 물질은 공기 중에서 쉽게 분해되므로 질소를 충전한 'Glove Bag'에서 조작하고 보관하였다. DATC로부터 TATD를 합성할 때 dithiocarbamate를 thiuramdisulfide로 산화할 때 일반적으로 사용하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Adams와 Meuser, 1931), alkali hypochlorite(Bailey, 1931) 혹은 ammonium persulfate(Cramer 1936)를 사용하면 많은

부산물들이 생성되므로 본 실험에서는 Scott의 diallylthiurmadisulfide의 합성법(1930)에 따라 요드를 산화제로 사용하였다. 4개의 allyl기를 갖고있는 TATD 2도 공기 중에서 매우 불안정하여 이를 분리하지 않고 바로 AC-DATC(3)로 반응시켜 NMR로 확인하였으며 이 물질의 순도는 HPLC로 검사하였다.

동물실험을 통해 DATC와 AC-DATC의 발암억제관련 생화학적 지표를 검색한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. DATC는 기존의 N,N-diethyldithiocarbamate (DDTC)와는 달리 GR의 활성을 크게 증가시켰는데 투여 4시간 후에 대조군에 비해 77%, 24시간 후에 47% 증가시켰다. GR의 활성이 증가함에 따라 간에서 GSSG의 함량이 43% 감소하였으며 이는 투여 24시간 후에 정상수준으로 회복되었다. NDEA의 대사활성화에 관여하는 CYP2E1의 활성변화를 시험하기 위해 NDEA deethylation에 의한 acetaldehyde의 생성을 확인한 결과 DATC는 이 효소의 활성을 완전히 억제함을 알 수 있었다. AC-DATC를 투여한 동물에서는 GR 및 GST의 활성이 증가하였고 간 조직 내 GSH의 함량

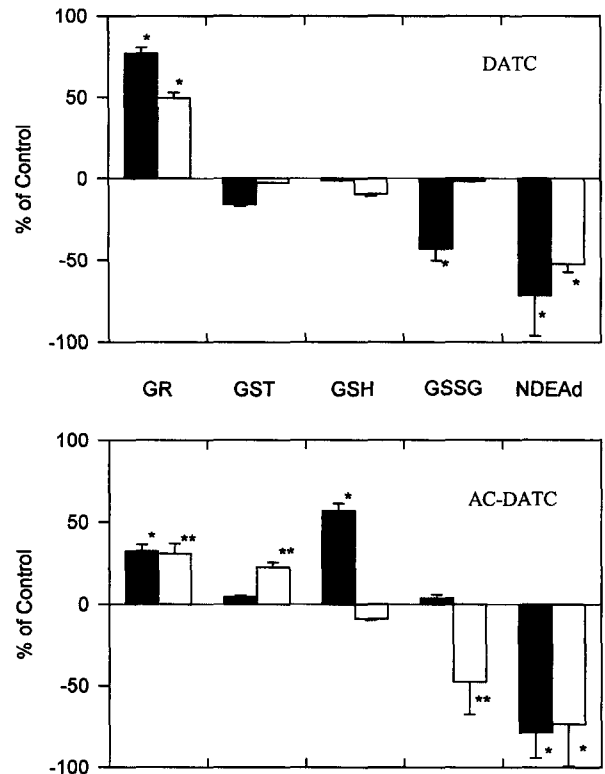


Fig. 2. Percent decrease or increase of glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) activity in cytosol, CYP2E1-mediated NDEA deethylase activity (NDEAd) in microsome and glutathione (GSH and GSSG) content in the liver 4 hrs (■) and 24 hrs (□) after i.p. administration of DATC and AC-DATC to rats (1.7 mmol/kg). Each bar represents the mean±SD of results obtained from five rats. (\*: p<0.01; \*\*: p<0.05).

이 증가하고 GSSG의 수준이 저하되며 NDEA deethylation이 억제되었다. 이상의 결과는 DATC와 AC-DATC가 phase I 대사억제에 의한 발암원의 대사활성화 저해와 phase II 대사 증가에 의한 독성물질의 해독기전 활성화 등 NDEA에 의한 발암억제와 관련하여 매우 긍정적인 결과로 평가된다.

GR은 체내에서 GSH/GSSG의 비율을 일정하게 유지시켜 주어 신체를 환원적 환경으로 만들어 주는 효소로서 phase II 대사과정에서 매우 중요한 효소이며, 이의 활성을 변화시키는 것은 생체의 독성물질에 대한 감수성을 조절하는데 매우 중요하다. Frank 등이(1990) GR의 활성을 조절하기 위하여 시도한 여러 종류의 DDTC 구조유사체들중 어느 것도 이 효소에 영향을 주지 못한 반면 본 실험에서 사용한 DATC와 AC-DATC가 강한 유도효과를 보인 것은 매우 주목할 만한 결과이다. AC-DATC의 투여로 인한 간 조직중 GSH 함량의 증가는 Lee 등(1995)이 발표한 AC-DDTC의 GSH 상승효과와 일치하는 결과를 나타내는 것으로 보아 이들은 모두 구조 중에 함유되어있는 N-acetylcysteine이 GSH 생합성의 전구물질로 작용되기 때문으로 예상된다(Thielemann 등, 1990). GSH가 NDEA의 해독작용에 직접 관여하는가에 대해서는 아직 확실히 밝혀지지 않았으나 N-Nitrosodimethylamine(NDMA)의 대사로 생성된 methylating agent가 N-acetyl-S-methyl cysteine이나 S-methyl cysteine의 형태로 뇨를 통해 배설된다는 연구결과는 이 가능성을 뒷받침 해준다(Hemminki 1982). 이 cysteine 유도체들은 GSH와 NDMA의 친전자성 대사체인 methyl diazonium hydroxide의 반응에 의해 만들어질 것이라 추측되며(Jensen *et al*, 1981) GSH를 고갈시켰을 경우에 N7 methylguanine과 O6 methylguanine의 양이 증가된다는 사실로부터 GSH가 nitroso 화합물의 해독작용에 관여할 것이라고 생각된다(Frank *et al*, 1988).

DATC와 AC-DATC의 투여가 CYP2E1의 활성을 억제하고 GSH의 함량 및 GSH관련효소의 활성을 증가시킨다는 본 연구의 결과는 이 두 물질이 N-nitroso 화합물이나 vinyl carbamate 등과 같이 CYP2E1의 대사활성화를 필요로 하는 발암원에 의한 발암과정을 차단하여 새로운 발암억제제로 개발될 수 있는 가능성을 제시해준다.

### 감사의 글

이 논문은 1998년도 원광대학교 교비지원에 의해서 연구되었으며 이에 감사한다.

### 참고문헌

- Adams, H.S. and Meuser, L. (1931): Herstellung von Tetraalkylthiuramdisulfiden, *Chem. Zentralblatt*, **I**, 852.
- Bailey, G.C. (1931): Herstellung von Thiuramdisulfiden, *Chem. Zentralblatt*, **I**, 3058-3059.
- Belman, S. (1983): Onion and garlic oils inhibit tumor promotion, *Carcinogenesis*, **4**, 1063-1065.
- Bertram, B., Schuhmacher, J., Frei, E., Frank, N. and Wiessler, M. (1982): Effects of disulfiram on mixed function oxidase system and trace element concentration in the liver of rats, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3613-3619.
- Brady, J.F., Ishizaki, H., Fukuto, J.M., Lim, M.C., Fadel, A., Gape, J.M. and Yang, C.S. (1991): Inhibition of cytochrome P4502E1 by diallyl sulfide and its metabolites, *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 642-647.
- Cramer, H.I. (1936): Herstellung von Thiuramdisulfiden, *Chem. Zentralblatt*, **I**, 2227.
- Dragnev, K.H., Nims, R.W. and Lubet, R.A. (1995): The chemopreventive agent diallyl sulfide. A structurally atypical phenobarbital-type inducer, *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 2099-2104.
- Frank, N., Bertram, B., Frei, E., Hadjiolov, D. and Wiessler, M. (1988): Influence of thiocompounds on the metabolism of N-nitrosodiethylamine, *Carcinogenesis*, **9**, 1303-1306.
- Frank, N., Bertram, B., Scherf, H.R. and Wiessler, M. (1990): Influence of dithiocarbamates on the metabolism and toxicity of N-nitrosodiethylamine, *Carcinogenesis*, **9**, 1303-1306.
- Hadjiolov, D., Frank, N., Moog, C. and Spirov, K. (1992): Proline dithiocarbamate inhibits N-nitrosodiethylamine induced liver carcinogenesis, *J. Cancer Clin. Oncol.*, **118**, 401-404.
- Hemminki, K. (1982): Approaches to cancer prevention based on an understanding on N-nitrosamine carcinogenesis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **216**, 181-191.
- Hu, X. and Singh, S.V. (1997): Glutathione S-transferase of female A/J mouse lung and their induction by anticarcinogenic organosulfides from garlic, *Arch. Biochem. Biophys.*, **340**, 279-286.
- Jensen, D.E., Lotlikar, P.D. and Magee, P.N. (1981): The in vitro methylation of DNA by microsomally-activated dimethylnitrosamine and its correlation with formaldehyde production, *Carcinogenesis*, **2**, 349-354.
- Jin, L. and Baillie, T.A. (1997): Metabolism of the chemopreventive agent diallyl sulfide to glu-

- tathione conjugates in rats, *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 318-327.
- Lee, B.H., Bertram, B., Schmezer, P., Frank, N. and Wiessler, M. (1994): Sugar-linked dithiocarbamates as modulators of metabolic and genotoxic properties of N-nitroso compounds, *J. Med. Chem.*, **37**, 3154-3162.
- Lee, B.H., Bertram, B., Raica, A., Frank, N., Schmezer, P. and Wiessler, M. (1995): Inhibitory effects of mixed disulfides from disulfiram on the metabolism and genotoxicity of N-nitrosodiethylamine, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **45(II)**, 1024-1028.
- Lee, B.H., Lee, S., Kim, Y.S., Bertram, B. and Wiessler, M. (1996): Mixed disulfides from disulfiram inhibit the benzo[a]pyrene induced mutagenesis, *Mutat. Res.*, **317**, 215-220.
- Lee, B.H., Lee, S., Kim, Y.S., Bertram, B. and Wiessler, M. (1997): Chemopreventive effects of S-(N,N-diethyldithiocarbamoyl)-N-acetyl-L-cysteine against benzo[a]pyrene, *Mutat. Res.*, **377**, 167-175.
- Scott, W. (1930): Vulkanisationsbeschleuniger, *Chem. Zentralblatt*, **II**, 2585.
- Surh, Y.J., Lee, R.C.J., Park, K.K., Mayne, S.T., Liem, A. and Miller, J.A. (1995): Chemoprotective effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamate and N-nitrosodimethylamine, *Carcinogenesis*, **16**, 2467-2471.
- Thielemann, L.E., Oberhauser, E.W., Rosenblut, G., Videla, L.A. and Valenzuela, A. (1990): Sulfur-containing amino acids that increase renal glutathione protect the kidney against papillary necrosis induced by 2-bromoethylamine, *Cell Biochem. Func.*, **8**, 19-24.
- Wang, I.Y., Cheng, S.J., Zhou, Z.C., Athar, M., Khan, W.A., Bickers, D.R. and Mukhtar, H. (1989): Antimutagenic activity of green tea polyphenols, *Mutat. Res.*, **223**, 273-285.
- Yang, C.S., Wang, Z.Y. and Hong, J.Y. (1994): Inhibition of tumorigenesis by chemicals from garlic and tea. In: *Diet and Cancer: Markers, Prevention and Treatment* (Jacobs, M.M. editor). Plenum Press, New York, pp. 113-122.