



랫드에서 Butylated Hydroxyanisole에 의한 Glutathione S-Transferases 유도 및 Cyclophosphamide로 유발된 기형에 대한 예방효과

강현구 · 이창희 · 이기창 · 이지은 · 김하정 · 최은경 · 윤영원 · 김윤배

충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소

Effects of Butylated Hydroxyanisole on Glutathione S-Transferases Activity and Cyclophosphamide-Induced Teratogenicity in Rats

Hyun-Gu Kang, Chang-Hee Lee, Ki-Chang Lee, Jee-Eun Lee, Ha-Jung Kim,
Young Won Yun and Yun-Bae Kim

College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine,
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Received July 3, 2003; Accepted July 23, 2003

ABSTRACT. Effects of repeated treatment with butylated hydroxyanisole (BHA) on the induction of glutathione S-transferases (GSTs) and teratogenicity of cyclophosphamide were investigated in rats. Pregnant rats were orally treated with BHA (50 mg/kg) for 7 days, from days 6 to 12 of gestation, and intraperitoneally challenged with cyclophosphamide (15 mg/kg) 2 hr after the final treatment. On day 20 of gestation, the maternal and fetal abnormalities were examined. Separately, a part of rats was sacrificed for the assay of hepatic and placental GSTs activities on day 12 of gestation following 7-day treatment with BHA. Cyclophosphamide, administered on day 12 of gestation, induced 43.2% of fetal death and resorption, and 100% of malformations in live fetuses, in contrast to low fetal resorption (8.7%) and malformations (8%) in control group. The malformations include cranial defect and exencephaly (100%), micrognathia and tongue extrusion (100%), limb defects (40%), renal pelvic dilatation (39%), and cleft palate (15%). Interestingly, BHA induced GSTs activities by 62% and 46% over the control in liver and placenta, respectively, and remarkably reduced the fetal resorption (13.9%) and malformations, resulting in 62% of cranial defect and exencephaly, 68% of micrognathia and tongue extrusion, 29% of limb defects, and 14% of renal pelvic dilatation. Taken together, it is suggested that a long-term pretreatment with BHA could substantially prevent fetuses from abortion and malformations following intrauterine exposure to teratogens including cyclophosphamide by inducing phase II antioxidant enzymes such as GSTs.

Keywords: Butylated hydroxyanisole (BHA), Glutathione S-transferases (GSTs), Cyclophosphamide, Teratogenicity

서 론

Cyclophosphamide는 유방암, 폐암, 림프종, 백혈병 등의 치료에 널리 사용되고 있는 항암제이며, 또한 콩팥, 간 및 골수이식 후의 면역억제제로도 사용되고 있다(Wexler,

1998; Zinke와 Woods, 1977). 그러나 cyclophosphamide는 2차적으로 발암, 방광염, 태아기형 등의 독작용을 유발할 수 있는 바, 이러한 독성은 치료용량의 결정에 있어서 가장 큰 제한요인이 되고 있다(Cox, 1979; Gibson과 Becker, 1968; Sieber와 Adamson, 1975; Zemlicki 등, 1993).

Cyclophosphamide가 항암효과 및 변이원성을 나타내기 위해서는 cytochrome P-450(CYP)에 의한 대사적 활성화 과정을 거쳐야 하며 이에 대한 많은 연구가 진행되

Correspondence to: Yun-Bae Kim, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, San 48, Gaeshin-dong, Cheongju 361-763, Korea
E-mail: solar93@chungbuk.ac.kr

어 왔다(Fantel 등, 1979; Slott과 Hales, 1988). Cyclophosphamide는 주로 간의 CYP type 2B1(CYP2B1)에 의해 4-hydroxycyclophosphamide(4-OHCP)로 산화되며, 이 4-OHCP의 일부는 4-ketocyclophosphamide(4-ketoCP)로 대사되기도 하지만 대부분이 aminoaldehyde aldophosphamide(AAAP)로 전환된다(Gomez-Carneiro 등, 2003). AAAP는 2개의 서로 다른 대사과정을 거치는데, 효소에 의해 carboxyphosphamide가 형성되거나 phosphoramidate mustard(PM)과 acrolein으로 자연분해 대사된다. 4-KetoCP나 carboxyphosphamide는 무독성이거나 저독성이며, 뇨로 대부분 배설되어 cyclophosphamide의 해독경로 중의 하나로 생각되지만, PM은 항암성 및 변이원성과 관련된 대사체로, acrolein은 cyclophosphamide의 화학요법치료 부작용의 하나인 기형발생과 관련된 것으로 알려졌지만, 두 물질 모두 기형을 유발하는 것으로 밝혀졌다(Hales, 1989; Marinello 등, 1984; Mirkes, 1985; Mirkes 등, 1981). 따라서 사람에서도 임신 중 cyclophosphamide에 노출될 경우 사지결손(limb reductions) 등의 기형이 유발되며(Wexler, 1998), 랫드에서는 임신 8부터 13일까지의 노출시기 및 용량에 따라 배·태자 사망이나 발육지연(growth retardation)과 더불어 두개골 결손(cranial defect)에 따른 외뇌증(exencephaly), 소악증(micrognathia) 및 혀돌출(tongue extrusion), 구개열(cleft palate), 안검개열(open eyes) 및 안구돌출(exophthalmus), 사지결손 및 꼬리기형(tail defects), 신우확장(renal pelvic dilatation), 부종 및 혈종(edema & hematoma) 등이 다양한 비율로 유발된다(Ashby 등, 1976; Chahoud 등, 2002). 또한 마우스에서는 노출시기에 따라 배·태자 사망 및 발육지연은 물론 구개열과 안검개열 및 안구돌출이 주로 나타나는 기형으로 알려져 있다(Meirow 등, 2001; Neubert와 Barrach, 1977).

화학물질에 의해 발생하는 배·태자독성(embryotoxicity)에 큰 영향을 미치는 요인 중의 하나는 glutathione이다(이은용, 1996). 여러 가지 생식독성 의약품이나 생활 환경 중의 화학물질에 노출되었을 때 세포내 glutathione 농도가 감소하고 embryos의 기형이나 성장저해가 일어나는 것으로 알려지고 있다. 실제로 cyclophosphamide에 의한 기형 발생률이 glutathione을 고갈시켰을 경우 크게 증가하는 반면, glutathione이나 cysteine과 같은 항산화 성분에 의해 효과적으로 방지됨이 보고되었다(Hales, 1981; Han 등, 1995; Slott과 Hales, 1987). 더 나아가 cyclophosphamide나 hydroxyuria와 같은 화학물질 뿐만 아니라 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 역시 기형발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 ROS 생성을 줄여주는 칼로리 제한(protein-and-energy restric-

tion), 활성산소 소거 효소류(scavenging enzymes) 및 vitamin E나 butylated hydroxytoluene(BHT)과 같은 항산화제의 투여로도 기형발생이 효과적으로 예방되는 것으로 밝혀졌다(Chahoud 등, 2002; Eriksson과 Borg, 1991; Yang 등, 1998).

한편, 세포내 glutathione은 glutathione S-transferases(GSTs)에 의해 촉매되어 효율적으로 발암성 친전자체(electrophiles)를 제거하므로, GSTs 유도물질의 항암효과에 대한 연구가 폭넓게 이루어져 왔다(Coles와 Ketterer, 1990; Spornins 등, 1982; Talalay 등, 1995; Zhang 등, 1994). 이러한 유도물질들은 간, 장관, 폐 등을 포함한 다양한 장기에서 GSTs 활성도를 크게 높여 줌으로써 다양한 독성물질 및 ROS를 제거해 주는 것으로 밝혀졌는 바, 그 대표적인 유도물질로는 항산화 식품첨가제인 BHT와 butylated hydroxyanisole(BHA)을 들 수 있다(Cha와 Henry, 1982; McLellan 등, 1992; Sharma 등, 1993). 흥미롭게도 BHA는 GSTs 유도는 물론 glutathione 합성 효소인 γ -glutamylcysteine synthase의 mRNA 발현을 유도함으로써 간조직 내 glutathione 농도를 높여주는 것으로 밝혀졌다(Borroz 등, 1994; Eaton과 Hamel, 1994).

앞서 언급했듯이 cyclophosphamide는 cytochrome P-450 등의 phase I 효소에 의한 대사적 활성화를 통해 독성을 나타내며 GSTs 등의 phase II 효소에 의해 효과적으로 포함, 제거되므로 phase I 효소의 활성화는 기형발생률을 증가시키는 반면, 이 효소 억제제는 기형발생을 낮춘다(Gomez-Carneiro 등, 2003; Han 등, 1995). 따라서 phase II 효소의 유도는 cyclophosphamide를 포함한 다양한 생식독성물질에 의한 기형발현을 효과적으로 차단해 줄 것으로 기대된다. 하지만 BHA와 BHT의 항암 효과에 대해서는 많은 연구보고가 있었으나 이들의 항기형효과는 거의 제시되지 않았으며, 다만 BHT의 투여가 임신 랫드에서 당뇨병에 의한 기형발생률을 낮추어 주는 것으로 밝혀진 바 있다(Eriksson과 Siman, 1996). 따라서 본 연구는 임신 랫드에 BHA를 지속적으로 투여할 경우 GSTs 유도를 통해 cyclophosphamide에 의한 기형발생을 완화시켜 줄 수 있는지를 알아보기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

실험재료

Cyclophosphamide, butylated hydroxyanisole(BHA) 및 reduced glutathione(GSH)은 Sigma Chemical Co.에서, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)은 Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다.

실험동물

생후 8주령의 Sprague-Dawley(SD) 랫드를 (주)샘타코에서 구입하여 약 2주간의 실험실 순화기간을 거쳐 10주령(체중 245±20 g)에 실험에 사용하였다. 모든 동물은 사육 및 실험 전 기간에 걸쳐 온도 23±2°C, 상대습도 55±5%, 12시간 명암이 유지되는 실험실 환경에 수용되었으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

간조직 GSTs 유도

BHA 연속투여에 의한 간 GSTs의 유도 정도를 알아보기 위해 암컷 정상 랫드에 7일간 경구투여하였다. BHA (50, 200, 500 또는 800 mg/kg)를 corn oil에 녹여 1 ml/kg의 투여액량으로 매일 1회 7일간 투여하고 다음날 간조직을 적출하였다. 채취한 간조직에 9배의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5)를 넣고 균질화하여 10%의 homogenate를 만든 다음, 30,000×g에서 60분간 원심분리하여 상등액을 얻었다.

Buffer 2.8 ml에 CDNB(최종농도 1 mM, 30 mM stock in ethanol) 0.1 ml 및 glutathione(최종농도 1 mM, 30 mM stock in buffer) 0.1 ml를 넣은 반응용액에 간조직 효소액(20 µl)을 가하고 혼합한 후 340 nm의 파장에서 흡광도의 변화를 기록하였다(Habig 등, 1974). 시료를 넣지 않았을 때의 자연 흡광도 변화를 모든 측정값에서 빼 주었다.

7일간의 투여기간 동안 가시적인 부작용이나 체중변화에 영향을 미치지 않는 BHA의 용량을 선정하여 cyclophosphamide에 의해 유발되는 기형에 대한 예방효과를 평가하였다.

기형예방 효능평가

10주령의 랫드를 암·수 1:1로 동거시키고, 다음날부터 이른 아침 질도말에 의해 정자가 발견된 날을 임신 0일로 하였다. 임신 중 기관형성기에 cyclophosphamide에 의해 유발되는 기형발생에 대한 BHA의 예방효과를 평가하기 위해 BHA(50 mg/kg)를 corn oil에 녹여 임신 6일째부터 12일까지 7일간 경구투여하고, 마지막 투여 2시간 후 cyclophosphamide(15 mg/kg)를 생리식염수에 녹여 복강내로 주사하였다. 대조군에는 동일 조건으로 용매만을 투여하였다. 일부의 동물을 임신 12일째에 BHA 마지막 투여 2시간 후 제왕절개하여 간과 태반을 적출하여 GSTs 활성도를 측정하였다.

출생 직전인 임신 20일째에 모든 동물을 제왕절개하여 착상수, 태반중량, 흡수 및 사망태자수, 암·수 생존태자수 및 체중을 기록하였다. 또한 생존태자에 대하여는 Bouin's solution으로 고정한 다음 외표 및 내부장기의 형태학적

이상을 관찰하였다(Manson과 Kang, 1989).

모든 실험은 1989년에 미국 Society of Toxicology에서 채택한 'Guide Principles in the Use of Animals in Toxicology'에 따라 수행되었다.

자료의 통계처리

모든 측정값은 형태학적 이상의 발생률을 제외하고는 평균±표준편차로 나타내었다. 평균간 비교로 ANOVA 분석 후 Duncan's multiple-range test를 통하여 $p < 0.05$ 의 수준에서 군간의 유의성을 검정하였다.

결 과

정상 랫드에 BHA를 corn oil에 녹여 50~800 mg/kg의 용량으로 7일간 경구투여한 결과 용량의존성으로 GSTs

Table 1. Induction of hepatic glutathione S-transferases (GSTs) in normal rats treated with butylated hydroxyanisole (BHA) for 7 days

Treatment	Dose (mg/kg)	GSTs activity	
		(ΔOD/min)	% of control
Corn oil	(1 ml/kg)	0.223 ± 0.040	100
BHA	50	0.352 ± 0.036*	158
	200	0.415 ± 0.018*	186
	500	0.539 ± 0.028*	242
	800	0.526 ± 0.035*	236

*Significantly different from vehicle (corn oil) control, $p < 0.05$.

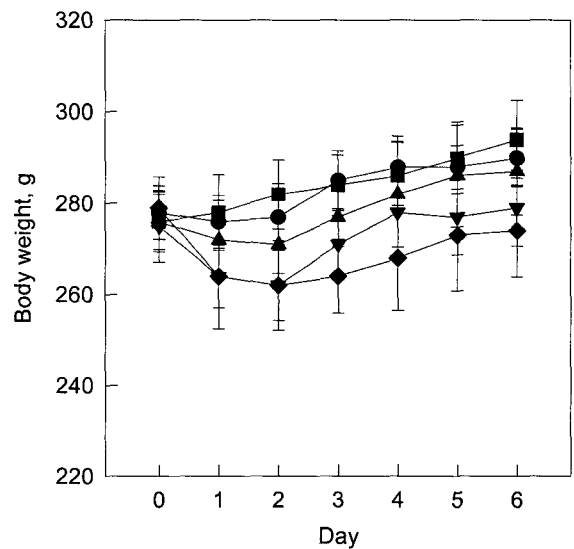


Fig. 1. Change in the mean body weights of normal rats treated with butylated hydroxyanisole (BHA) or its vehicle (corn oil) for 7 days (n=8). ●, corn oil (1 ml/kg); ■, BHA (50 mg/kg); ▲, BHA (200 mg/kg); ▼, BHA (500 mg/kg); ◆, BHA (800 mg/kg).

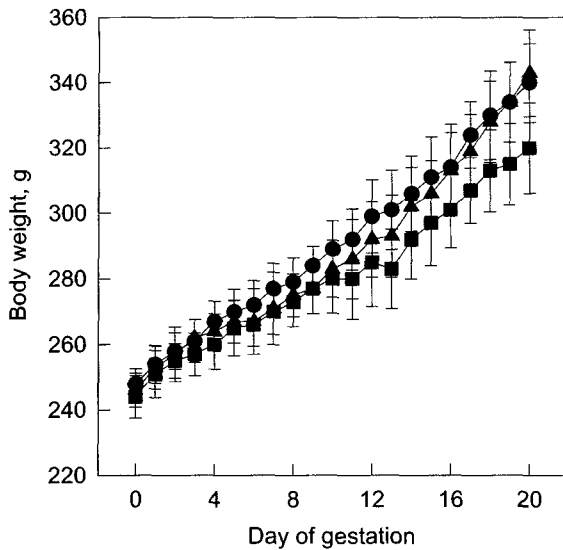


Fig. 2. Change in the mean body weights of pregnant rats treated with butylated hydroxyanisole (BHA) or its vehicle (corn oil) for 7 days, from days 6 to 12 of gestation, and challenged with cyclophosphamide (CP) on day 12 (n=8). ●, control (normal pregnant rats); ■, corn oil (1 ml/kg)+CP (15 mg/kg); ▲, BHA (50 mg/kg)+CP (15 mg/kg).

의 활성도가 증가하였는 바, 50 mg/kg에서는 용매 대조군에 비해 158%로, 200 mg/kg에서는 186%로, 500 mg/kg에서는 242%로 상승하였지만, 800 mg/kg에서는 236%로 더 이상 증가하지 않았다(Table 1). 비록 투여개시 후 유의할 만한 임상증상이 관찰되지는 않았지만 50 mg/kg

Table 2. Induction of hepatic glutathione S-transferases (GSTs) in pregnant rats treated with butylated hydroxyanisole (BHA) or its vehicle (corn oil) for 7 days, from days 6 to 12 of gestation (n=8)

Treatment	Dose (mg/kg)	Relative organ weight (%)	GSTs activity	
			(Δ OD/min)	% of control
Liver				
Corn oil	(1 ml/kg)	3.84 \pm 0.33	0.265 \pm 0.018	100
BHA	50	3.76 \pm 0.24	0.429 \pm 0.027*	162
Placenta				
Corn oil	(1 ml/kg)	1.72 \pm 0.25 (\times 100)	0.013 \pm 0.004	100
BHA	50	1.74 \pm 0.11 (\times 100)	0.019 \pm 0.007*	146

*Significantly different from vehicle control, $p < 0.05$.

을 제외하고는 200~800 mg/kg의 BHA 투여용량에서 일시적인 체중감소 및 체중증가 지연현상이 나타났다(Fig. 1).

이러한 용량설정시험 결과를 바탕으로 50 mg/kg의 BHA 용량을 선정하여 임신 랫드에서 cyclophosphamide에 의한 기형발생에 대한 예방효과를 평가하였다. 임신 6일째부터 1 ml/kg의 corn oil을 매일 투여했을 때는 동물의 체중에 아무런 영향이 나타나지 않았으나, 임신 12일에 cyclophosphamide(15 mg/kg)를 투여했을 경우에는 체중이 일시적으로 감소하였다(Fig. 2). 반면, BHA(50 mg/kg)을 7일간 투여한 경우에는 cyclophosphamide에 의한 충격이 거의 나타나지 않았다.

한편, 7일간 BHA 투여 후 임신 12일째의 GSTs 활성도는 대조군에 비해 간조직에서는 62%, 태반에서는 46% 상승하였으며, 이 때 임상증상 및 간 중량의 변화는 관찰

Table 3. Effect of butylated hydroxyanisole (BHA), administered to pregnant rats from days 6 to 12 of gestation, on reproductive toxicity induced by exposure to cyclophosphamide (CP) on day 12. Maternal and fetal parameters were examined on day 20

Treatment (mg/kg)	Control	Corn oil+CP (15)	BHA (50)+CP (15)
Pregnant dams	8	8	8
Implantation	13.9 \pm 2.4	14.8 \pm 3.6	14.4 \pm 1.9
Live fetuses/litter	12.6 \pm 2.6	8.4 \pm 2.8*	12.4 \pm 2.1 [#]
Resorption & death (%)	10 (8.7%)	51 (43.2%)	16 (13.9%)
Body weights (g) male	3.48 \pm 0.76	2.43 \pm 0.16*	2.98 \pm 0.54*
female	3.09 \pm 0.38	2.41 \pm 0.25*	2.74 \pm 0.42*
Placental weight (g)	0.57 \pm 0.10	0.49 \pm 0.26	0.52 \pm 0.23
No. of fetuses examined	101	67	99
Malformations observed (%)			
cranial defect & exencephaly	0 (0%)	67 (100%)	61 (62%)
micrognathia & tongue extrusion	0 (0%)	67 (100%)	67 (68%)
cleft palate	0 (0%)	10 (15%)	5 (5%)
limb defects	0 (0%)	27 (40%)	29 (29%)
tail defects	0 (0%)	2 (3%)	0 (0%)
renal pelvic dilatation	8 (8%)	26 (39%)	14 (14%)
edema & hematoma	0 (0%)	11 (16%)	2 (2%)
abdominal hemorrhage	0 (0%)	10 (15%)	0 (0%)

*Significantly different from vehicle control, $p < 0.05$.

[#]Significantly different from the group treated with CP alone, $p < 0.05$.

되지 않았다(Table 2).

임신말기 출생 직전인 20일째에 제왕절개에 의한 생식 독성 지표를 검사한 결과 cyclophosphamide 투여에 의해 흡수 및 사망태자의 발생률이 대조군의 8.7%에 비해 43.2%로 크게 증가하였다(Table 3). 이로 인해 한배새끼 (litter) 당 생존 태자수 역시 대조군의 12.6 ± 4.1 마리에 비해 8.4 ± 5.8 마리로 감소하였다. 반면, BHA 투여 후 cyclophosphamide에 노출된 군에서는 흡수 및 사망태자 비율이 13.9%로 크게 낮아져 litter 당 생존 태자수 역시 12.4 ± 2.1 마리로 확실히 회복되었다. 생존태자의 체중에 있어서도 cyclophosphamide에 의해 암·수 모두 대조군의 70~78% 수준으로 감소하였으나, 이러한 발육지연 역시 BHA에 의해 크게 개선되었다. 더 나아가 기형 발생률에 있어서 대조군에서는 관찰태자 101마리 중 8마리(8%)에서 신우확장이 나타난 것 외에는 특별한 기형이 관찰되

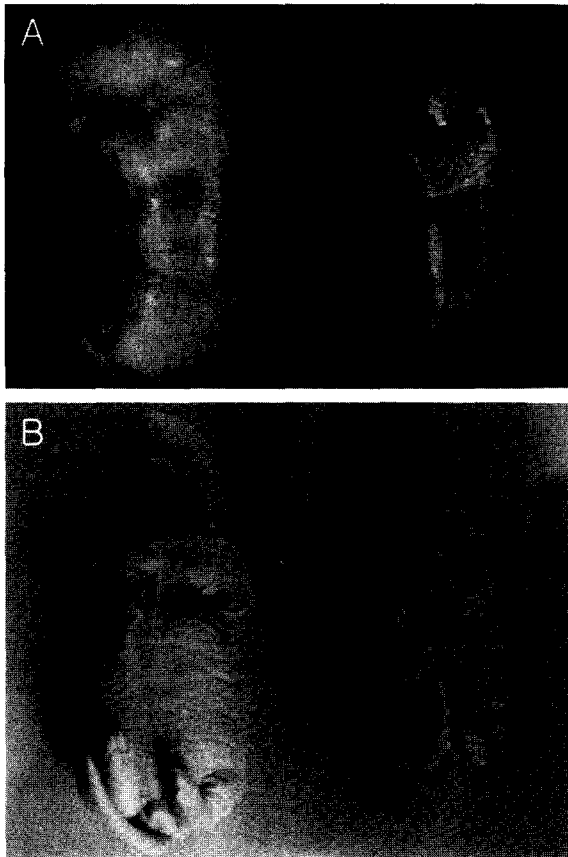


Fig. 3. Representative multiple external deformities induced by intrauterine exposure to cyclophosphamide (15 mg/kg) on day 12 of gestation. In comparison with normal fetuses (left), growth retardation, exencephaly, micrognathia and tongue protrusion, and forelimb defects (dactylyon and ectrodactyly) were observed in fetuses (right) exposed to cyclophosphamide.

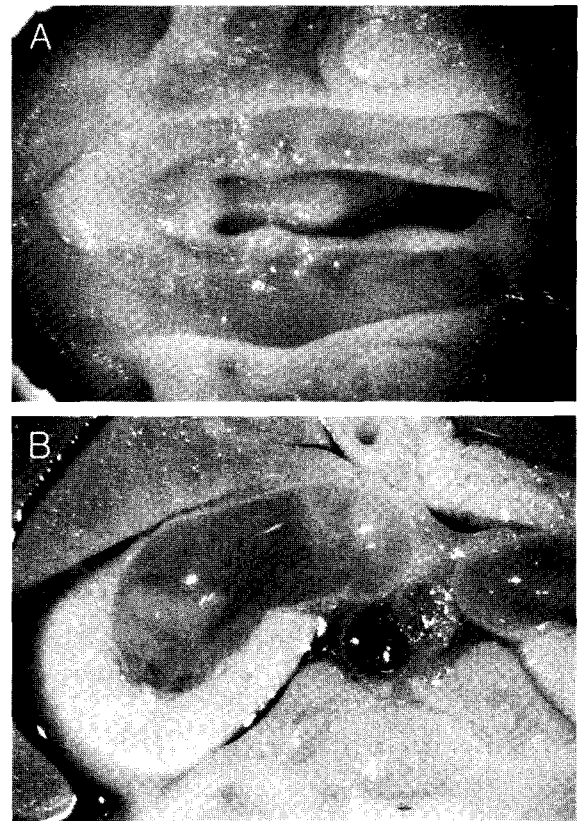


Fig. 4. Representative cleft palate (A) and renal pelvic dilatation (B) induced by intrauterine exposure to cyclophosphamide (15 mg/kg) on day 12 of gestation.

지 않았으나, cyclophosphamide 투여군에서는 관찰태자 67마리 중 67마리(100%) 모두에서 외뇌증 및 소악증이 (Fig. 3), 27마리(40%)에서 사지기형이, 26마리(39%)에서 신우확장이(Fig. 4), 그리고 10마리(15%)에서 구개열이 발견되었다. 흥미롭게도 cyclophosphamide에 의해 유발된 다양한 기형은 BHA에 의해 예방되었는데, 외뇌증 및 소악증은 각각 62%와 68%로 감소하였고, 사지기형은 29%, 신우확장은 14%, 그리고 구개열은 2%로 상당히 감소하였다.

고 찰

환경오염을 급속도로 진행시킨 산업화 사회에 접어들면서 1980년대에 이미 결혼 후 1년 이내에 임신을 하지 못하는 부부가 10~15%에 이르고 임신여성 중 8~28주에 자연유산될 확률이 10~20%에 이르렀으며, 이러한 불임, 유산 및 기형발생률이 점차 증가하고 있는 추세이다(Manson 과 Kang, 1989). 이러한 생식독성의 원인으로서 난포세포(oocytes)에 독성을 나타내는 물질로는 주요 환경오염

물질인 polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs), 다양한 항암제류, antiestrogens 및 prostaglandin synthetase inhibitors 등을 들 수 있는데, 이 중에서도 항암제류는 배·태자의 사망 및 발육지연은 물론 다양한 형태의 기형을 유발한다.

본 연구에서 사용된 cyclophosphamide에 의한 기형은 배·태자 발생과정에서의 internucleosomal DNA fragmentation 즉, 발생조직의 apoptosis에 의한 것으로 밝혀졌다(Chen 등, 1994). Cyclophosphamide에 의한 기형은 매우 다양하여 발육지연, 외뇌증, 소악증, 구개열, 안검개열 및 안구돌출, 사지결손 및 꼬리기형, 신우확장 등을 동반한 복합기형의 형태를 나타내지만 동물에 따라 다소의 차이를 보이는데, 랫드에서는 외뇌증과 소악증이 가장 흔한 반면 마우스에서는 구개열과 안검개열이 상대적으로 높은 비율로 유발된다(Chahoud 등, 2002; Neubert와 Barrach, 1977). 랫드를 이용한 본 연구에서도 임신 12일에 단 1회의 cyclophosphamide(15 mg/kg) 투여만으로도 위에서 언급한 대부분의 기형이 복합적으로 나타났으며, 특히 두개골의 형성부전으로 인한 외뇌증과 턱의 성장지연으로 인한 혀 돌출 현상은 모든 태자에서 관찰되었다. 이러한 기형의 형태와 정도는 임신 중 노출시기에 따라 큰 차이를 보이기는 하지만(Ashby 등, 1976; Chahoud 등, 2002), 마우스와 랫드를 비롯하여 햄스터, 토끼 등 대부분의 동물과 사람에서도 다양하게 나타나는 것으로 잘 알려져 있다(Chahoud 등, 2002; Hales, 1981; Neubert와 Barrach, 1977; Shah 등, 1996; Sieber와 Adams, 1975; Ujhazy 등, 1993; Zemlickis 등, 1993).

BHA는 그 자체로도 강력한 항산화 활성을 가지고 있어 식품첨가 항산화제로 오랜 동안 사용되어 왔는데, GSTs의 유도는 물론 glutathione 농도를 높여 줌으로써 효과적으로 독성물질을 제거해 주는 것으로 여겨지며, 본 연구에서의 기형 예방효과 역시 GSTs 유도, glutathione 농도 증진 및 BHA 자체의 항산화 활성도에 기인하는 것으로 판단된다. 발육중인 배·태자나 신생자는 충분한 GSTs 및 glutathione을 가지고 있지 못하여 다양한 독성물질 및 ROS에 취약한 것으로 알려져 있다. 실제로 출생 5일 전의 태자는 성숙 랫드에 비해 5% 이하의 간 GSTs 활성도를 나타내며 이후 증가하여 생후 30일이 되어야 50% 수준으로 상승한다. Glutathione 역시 출생 전에는 50%에서 출생 후 5일이 지나야 성숙 랫드에 가까운 수준에 이르는 것으로 밝혀졌다(Serafini 등, 1991). 따라서 그 스스로는 기형을 유발하지 않으면서(Hansen과 Meyer, 1978) GSTs 및 glutathione을 유도해 주는 BHA는 diabetes(Eriksson과 Siman, 1996)나 cyclophosphamide에 의한 기형뿐 아니라 다양한 생식독성물질에 대해서도

효과적인 예방제가 될 것으로 기대된다.

본 연구에서는 임신 중 BHA의 지속투여가 cyclophosphamide로 인한 기형발생률을 크게 감소시켜 준다는 사실을 밝힘으로써 GSTs 유도물질들의 임상응용 가능성을 제시하였다. 반면, 고용량(>200 mg/kg)의 BHA를 지속투여할 경우 동물의 체중이 일시적으로 감소하는 현상을 나타내었다. 이러한 부작용은 고용량의 BHT 투여시 간 중량이 다소 증가하였다는 기존의 보고에서 보듯이 BHT나 BHA가 대사과정에서 prooxidant로 대사됨으로써 나타나는 반응으로 여겨지며, 이는 GSTs 등 phase II 효소의 유도기전 중 하나로 여겨진다(Siman과 Eriksson, 1996). 따라서 향후 생체조직에 부담을 덜 주면서 효과적으로 GSTs 등의 phase II 효소를 유도할 수 있는 천연 식품성분의 기형예방효과 검색이 요구된다 하겠다(Sparnins 등, 1982; Zhang 등, 1994).

참고문헌

- Ashby, R., Davis, L., Dewhurst, B.B., Espinal, R., Penn, R.N. and Upshall, D.G. (1976): Aspects of the teratology of cyclophosphamide (NSC-26271). *Cancer Treatm. Rep.*, **60**, 477-482.
- Borroz, K.I., Buetler, T.M. and Eaton, D.L. (1994): Modulation of γ -glutamylcysteine synthetase large subunit mRNA expression by butylated hydroxyanisole. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **126**, 150-155.
- Cha, Y.-N. and Henry, S. (1982): Comparative effects of dietary administration of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole and 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene on several hepatic enzyme activities in mice and rats. *Cancer Res.*, **42**, 2609-2615.
- Chahoud, I., Kuriyama, S.N. and Paumgarten, F.J.R. (2002): Maternal protein-and-energy restriction reduces the developmental toxicity of cyclophosphamide and hydroxyuria in rats. *Toxicology*, **179**, 137-149.
- Chen, B., Cyr, D.G. and Hales, B.F. (1994): Role of apoptosis in mediating phosphoramidate mustard-induced rat embryonic malformations *in vitro*. *Teratology*, **50**, 1-12.
- Coles, B. and Ketterer, B. (1990): The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **25**, 47-70.
- Cox, P.J. (1979): Cyclophosphamide cystitis-identification of acrolein as the causative agent. *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 2045-2049.
- Eaton, D.L. and Hamel, D.M. (1994): Increase in γ -glutamylcysteine synthetase activity as a mechanism for butylated hydroxyanisole-mediated elevation of hepatic glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **126**, 145-149.
- Eriksson, U.J. and Borg, L.A. (1991): Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations *in vitro*. *Diabetologia*, **34**, 325-331.
- Eriksson, U.J. and Siman, C.M. (1996): Pregnant diabetic rats fed the antioxidant butylated hydroxytoluene show de-

- creased occurrence of malformations in offspring. *Diabetes*, **45**, 1497-1502.
- Fantel, G.E., Greenaway, J.C., Juchau, M.R. and Shepard, T.H. (1979): Teratogenic bioactivation of cyclophosphamide *in vitro*. *Life Sci.*, **25**, 67-72.
- Gibson, J.E. and Becker, B.A. (1968): The teratogenicity of cyclophosphamide in mice. *Cancer Res.*, **28**, 475-480.
- Gomes-Carneiro, M.R., De-Oliveira, A.C.A.X., De-Carvalho, R.R., Araujo, I.B., Souza, C.A.M., Kuriyama, S.N. and Paumgarten, F.J.R. (2003): Inhibition of cyclophosphamide-induced teratogenesis by β -ionone. *Toxicol. Lett.*, **138**, 205-213.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974): Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139.
- Hales, B.F. (1981): Modification of the teratogenicity and mutagenicity of cyclophosphamide with thiol compounds. *Teratology*, **23**, 373-381.
- Hales, B.F. (1989): Effects of phosphoramidate mustard and acrolein, cytotoxic metabolites of cyclophosphamide, on mouse limb development *in vitro*. *Teratology*, **40**, 11-20.
- Han, S.-Y., Shin, J.-H., Kwon, S.C., Kang, M.O., Lee, Y.M., Kim, P.G., Yang, M., Park, K.L. and Jang, S.J. (1995): Effects of enzyme inducers and glutathione on the embryotoxicity of cyclophosphamide in cultured rat embryos. *Korean J. Toxicol.*, **11**, 31-36.
- Hansen, E. and Meyer, O. (1978): A study of the teratogenicity of butylated hydroxyanisole on rabbits. *Toxicology*, **10**, 195-201.
- Manson, J.M. and Kang, Y.J. (1989): The methods for assessing female reproductive and developmental toxicology in *Principles and Methods of Toxicology* (A.W. Hayes, Ed.). Raven Press, New York, pp. 311-359.
- Marinello, A.J., Bansal, S.K., Paul, B., Koser, P.L., Love, J., Struck, R.F. and Gurtoo, H.L. (1984): Metabolism and binding of cyclophosphamide and its metabolite acrolein to rat hepatic microsomal cytochrome P-450. *Cancer Res.*, **44**, 4615-4621.
- McLellan, L.I., Harrison, D. and Hayes, J.D. (1992): Modulation of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase by the anticarcinogen butylated hydroxyanisole in murine extrahepatic organs. *Carcinogenesis*, **13**, 2255-2261.
- Meirow, D., Epstein, M., Lewis, H., Nugent, D. and Gosden, R.G. (2001): Administration of cyclophosphamide at different stages of follicular maturation in mice: effects on reproductive performance and fetal malformations. *Human Reprod.*, **16**, 632-637.
- Mirkes, P.E. (1985): Cyclophosphamide teratogenesis: a review. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **5**, 75-88.
- Mirkes, P.E., Fantel, A.G., Greenaway, J.C. and Shepard, T.H. (1981): Teratogenicity of cyclophosphamide metabolites: phosphoramidate mustard, acrolein and 4-ketocyclophosphamide in rat embryos cultured *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **58**, 322-330.
- Neubert, D. and Barrach, H.-J. (1977): Organotropic effects and dose-response relationship in teratology in *Methods in Prenatal Toxicology* (D. Neubert, Ed.). Georg Thieme Publishers, Stuttgart, pp. 405-412.
- Shah, R.M., Izadnegahdar, M.F., Henh, B.M. and Young, A.V. (1996): *In vivo/in vitro* studies on the effects of cyclophosphamide on growth and differentiation of hamster palate. *Anticancer Drugs*, **7**, 204-212.
- Serafini, M.T., Arola, L. and Romeu, A. (1991): Glutathione and related enzyme activity in the 11-day rat embryo, placenta and perinatal rat liver. *Biol. Neonate*, **60**, 236-242.
- Sharma, R., Ahmad, H., Singhal, S.S., Saxena, M., Srivastava, S.K. and Awasthi, Y.C. (1993): Comparative studies on the effect of butylated hydroxyanisole on glutathione and glutathione S-transferases in the tissues of male and female CD-1 mice. *Comp. Biochem. Physiol.*, **105C**, 31-37.
- Sieber, S.M. and Adamson, R.H. (1975): Toxicity of antineoplastic agents in man: chromosome aberrations, antifertility effects, congenital malformations, and carcinogenic potential. *Adv. Cancer Res.*, **22**, 57-155.
- Siman, C.M. and Eriksson, U.J. (1996): Effect of butylated hydroxytoluene on alpha-tocopherol content in liver and adipose tissue of rats. *Toxicol. Lett.*, **87**, 103-108.
- Slott, V.L. and Hales, B.F. (1987): Enhancement of embryotoxicity of acrolein, but not phosphoramidate mustard, by glutathione depletion in rat embryos *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 2019-2025.
- Slott, V.L. and Hales, B.F. (1988): Role of the 4-hydroxy intermediate in the *in vitro* embryotoxicity of cyclophosphamide and dechlorocyclophosphamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **92**, 170-178.
- Spamins, V.L., Venegas, P. and Wattenberg, L.W. (1982): Glutathione S-transferase activity: enhancement by compounds inhibiting chemical carcinogenesis and by dietary constituents. *JNCL*, **68**, 493-496.
- Talalay, P., Fahey, J.W., Holtzclaw, W.D., Prestera, T. and Zhang, Y. (1995): Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol. Lett.*, **82/83**, 173-179.
- Ujhazy, E., Balonova, T., Durisova, M., Gajdosik, A., Jansak, J. and Molnarova, A. (1993): Teratogenicity of cyclophosphamide in New Zealand white rabbits. *Neoplasma*, **40**, 45-49.
- Wexler, P. (1998): *Encyclopedia of Toxicology*, Academic Press, New York, vol. 1, pp. 392-393.
- Yang, X., Borg, L.A.K., Siman, C.M. and Eriksson, U.J. (1998): Maternal antioxidant treatments prevent diabetes-induced alterations of mitochondrial morphology in rat embryos. *Anatom. Rep.*, **251**, 303-315.
- Zemlickis, D., Lishner, M., Erlich, R. and Koren, G. (1993): Teratogenicity and carcinogenicity in a twin exposed in utero to cyclophosphamide. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **13**, 139-143.
- Zhang, Y., Kensler, T.W., Cho, C.-G., Posner, G.H. and Talalay, P. (1994): Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3147-3150.
- Zinke, H. and Woods, J.E. (1977): Donor pretreatment in cadaver renal transplantation. *Surgery Gynec. Obstet.*, **145**, 183-188.
- 이은용 (1996): 발생독성 예방에 있어서의 글루타치온의 역할. *The Korean Society of Toxicology Newsletter*, **10**, 9-10.