

## Glucose-diethyldithiocarbamate가 흰쥐의 약물 대사 효소에 미치는 영향 연구

최병기 · 신혜주

동덕 여자대학교 약학대학 생화학교실

## Effect of Glucose-diethyldithiocarbamate on Drug Metabolizing Enzymes in Rats

Byung-Ki Choi and Hye-Joo Shin

Dept. of Pharmacology, Colloge of Pharmacy, DOUNG-DUK WOMENS UNIVERSITY, SEOUL, 136-714, KOREA.

(Received October 18, 2000; accepted December 1, 2000)

**Abstract** – The modulation of cytochrome P450(P450) activities and glutathione S-transferase (GST) was investigated after i.p. administration of glucose-diethyldithiocarbamate (Glu-DDTC) to rats. P450 1A2 and 2E1 activities were inhibited by 60% 4 hr after the administration of 200 mg Glu-DDTC/kg and those activities were recovered to original levels 24 hr after dosing. In contrast, GST activities were enhanced up to 24 hr after dosing. These results seem to be due to the bifunctional activity of Glu-DDTC. Glu-DDTC acts as an inhibitor of P450 enzymes as well as inducer of GST enzyme. Glu-DDTC inhibited PNP hydroxylation (P450 2E1) and ethoxycoumarin O-deethylation (P450 1A2) in a dose-dependent manner up to 200 mg/kg whereas it did not affect testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation (P450 3A) and pentoxifyresorufin O-dealkylation (P450 2B) activities. Induction of GST activity toward 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and 1,2-dichloro-4-nitrobenzenen (DCNB) was dependent on the dose of Glu-DDTC and no species difference in the GST induction was seen between rat and mouse. Amongst GST subunits, Ya, Yb1 and partially Yb2 were induced by Glu-DDTC as conjugated by western blotting. The levels Yp, Yk and Yc subunits were not affected by Glu-DDTC treatment. Therefore the enhanced activity of GST toward CDNB and DCNB might be due to the induction of Ya, Yb1 and partially Yb2 subunits. In conclusion, Glu-DDTC selectively inhibited P450 1A2 and P450 2E1 activities whereas it enhanced Ya, Yb1 subunits and partially Yb2 subunits of GST and the antimutagenic activity of this compound might be attributed from the modulation of these enzyme activities in animals.

**Key words** □ Glu-DDTC, P450

이물질(xenobiotics)로부터 신체가 항상성을 유지하기 위해 일반적인 간세포에서의 생체 내 대사 과정은 보통 phase I과 phase II의 과정을 통해 일어난다. Phase I에서는 체내로 흡수된 약물 또는 환경 독성 물질이 산화(oxidation), 환원(reduction) 또는 가수 분해(hydrolysis) 등의 작용을 받아 수산화기를 가지게 되거나 epoxide를 형성하여 독성이 강한 대사 산물을 형성한다. Phase II 포함 반응에서는 세포 내의 UDP-glucuronosyl transferase(UDPGT), sulfotransferase 및 glutathione S-transferase(GST)등의 효소에 의하여 phase I의 산화 과정을 통해서 생성된 중간 대사 산물과 포합체를 형성하여 체외로 배설되며, 또는 epoxide를 형성한 대사 산물은 주로 glutathion(GSH) 포합체를 형성하거나

epoxide hydrolase에 의하여 수용성이 큰 대사물로 전환되어 glucuronide 또는 sulfate 포합체를 형성한 후 체외로 배설됨으로써 무독화 대사 작용(detoxification)을 하게 된다. 오늘날 밝혀진 발암 물질을 포함한 유독 물질은 포합 반응에 관여하는 효소의 이상으로 인하여 phase II 포함 반응이 원활하지 못하여 친핵성 물질(nucleophile)이 phase I의 산화 과정에서 형성된 친전자성 물질(electrophile)과 공유 결합하여 세포 기능에 장애를 주어 독성을 유발한다(Smith and Orrenius, 1984). 특히 간세포에는 다른 세포에 비하여 포합 작용에 관여하는 보조 인자인 GSH를 비교적 많이 함유하고 있는데 유독한 이물질이 GSH와 conjugation을 형성하는 것이 일반적인 친전자체 독성 물질이 무독화되는 대표적인 대사 과정이다. GSH는 DNA의 친핵체 결합 위치와 경쟁적으로 작용하여 유전 독성을 가지는 친전자체 대사 산

\*To whom correspondence should be addressed.

물에 방어적인 작용을 할 수 있다는 것을 최초로 Boyland와 Chasseaud에 의하여 밝혀 졌으며(Boyland and Chasseaud, 1969), 이러한 반응이 GST의 작용에 의해 반응이 촉매되고(Ketter, 1988; Boothe 등, 1964), GST의 광범위한 기질 특이성을 가진 많은 동위 효소가 있으며, 이 효소는 이량체 효소(dimeric enzyme)로 존재하며, 여러 동위 효소는 1-chloro-2,4-dinitro-benzene(CDNB), 1,2-dichloro-4-nitrobenzen(DCNB) 및 trans-4-phenyl-3-butene-2-one 등과 같은 여러 기질에 대해 활성도를 보인다(Ketter, 1986). 또 이 효소는 모든 조직에 고루 분포하며 특히 간 조직에 많이 분포되어 있고 또한 동위 효소의 분포도 각 조직마다 다르게 나타나며 어떤 조직에서는 하나의 subunits가 우세하게 존재하는 것을 볼 수 있다(Hayes and Mantle, 1986).

Disulfiram은 aldehyde dehydrogenase를 억제하기 때문에 만성 알콜 중독 치료제로 사용되는데 화학적 발암 물질인 nitrosamine에 대한 항암성 효과가 있다고 밝혀진 이후 활발히 연구되었다. 이는 nitrosamine의 대사 활성화시키는 대표적인 phase I의 효소인 cytochrome P450(P450)을 억제함과 동시에 GST같은 nonoxidative detoxifying enzyme를 활성화시켜 독성이나 발암성물질에 대하여 방어 작용을 하는데 이때 주요 대사 산물인 N,N-diethyl dithio-carbamate(DDTC)는 발암성 친전자체와 반응함으로써 안정한 중간 대사 산물을 형성하여 효과를 나타낸다. 이러한 diethyldithiocarbamate의 항암성 효과를 기대함으로써 현재 많은 연구에서 여러 유도체를 합성하게 되었고 diethyl-dithiocarbamate의 유도체에 sugar를 연결시킨 glucose-diethyldithiocarbamate(Glu-DDTC) 및 lactose-diethyldithio-carbamate 같은 sugar-linked dithiocarbamate를 합성하게 되었다. 이는 brain으로 transport를 증가(Namane 등, 1992) 시켰고 수용성이 증가함은 물론이고 체내 안정성 및 세포 투과성이 향상된다고 확인되었다(Lee 등, 1994).

본 연구에서는 Glu-DDTC의 microsomal monooxygenase 억제 여부 및 cytosolic GST 유도 가능성을 알아보려고 하였다. Phase I 과정에서 microsomal monooxygenase의 억제 여부를 P450 효소로 측정하고 phase II에서 GST유도는 간에서 분리한 cytosol에서 CDNB와 DCNB에 대한 전반적인 효소 활성도를 알아본 후 western blot으로 Ya, Yb1, Yb2, Yc, Yp 및 Yk subunits에서 Glu-DDTC에 의해 GST로 유도된 각각의 protein양을 확인함으로써 GST 유도 기전을 알아보려고 하였다.

## 실험 방법

### 실험동물 및 시약

실험 동물인 SD계 수컷 흰쥐와 ICR 계 수컷 마우스는 대한 실험 동물 센터에서 구입하였고, 실험에 사용한 disul-

firmam은 Sigma 제품을 사용하였고 glucose-diethyldithiocarbamate(Glu-DDTC)는 원광 대학교에서 분양 받아 사용하였다. 그 이외에 사용한 시약은 Aldrich 및 Sigma 제품을 사용하였다.

### 실험동물 전처리

수컷 SD계 흰쥐(150~200 g)와 ICR 계 마우스(30~50 g)을 약물 주사 전 24시간 절식시키고 Glu-DDTC 200 mg/kg을 복강 주사하여 4시간, 24시간경과 후 간을 적출하였고, disulfiram 역시 200 mg/kg을 복강 주사하여 4시간 경과 후 간을 적출하였다. 또 Glu-DDTC를 용량별로 10, 50, 200 mg/kg을 복강 주사하고 24시간 경과 후 간을 적출하였으며 disulfiram은 동일 용량으로 복강 주사하고 4시간 경과 후 간을 적출 하였다.

### Cytosol 및 microsome 분리

Cytosol 및 microsome의 분리는 Gengerich(Gengerich, 1977; Van der Hoven and Coon, 1974; Gengerich, 1989) 등의 분획 원심 분리 방법을 사용하였다.

### GST Assay

CDNB와 DCNB의 효소 활성은 CDNB와 DCNB를 기질로 하여 분광 광도계에서 흡광도 변화를 모니터링 함으로써 측정하였다(Booth 등, 1961).

### Protein Assay

단백질 정량은 표준 bovine serum albumin(BSA)을 사용하여 Lowry법으로 정량하였다(Lowry 등, 1951).

### Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Laemmli(Laemmli, 1970)의 방법으로 전기 영동하였다.

### Western blot

전기영동 후 gel을 nitrocellulose filter에 옮긴 후 western blot(Bollag and Eldstein, 1991)하였다. Horseradish peroxidase을 사용하여 2차 항체 anti-IgG와 conjugate를 이용하였다. 현상액으로 30 mg/ml chloronaphtol soln. 2 ml, methanol 20 ml, TBS 100 ml, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.6 ml을 첨가하여, 반응한 단백질이 보라색으로 나타난 것을 확인하였다. GST 각 subunits를 1:100~1:400으로 희석하였다.

### p-Nitrophenol (PNP) hydroxylation

PNP hydroxylation의 활성은 PNP가 4-nitrocatechol로 대사 되는 것을 측정하였다(Koop, 1986).

### Dimethylnitrosamine (DMN) demethylation

DMN demethylation의 활성은 DMN이 formaldehyde로 대사 되는 것을 측정하였다(Palakodety 등, 1988).

### Pentoxoresorufin O-dealkylation

Pentoxoresorufin O-dealkylation의 활성은 pentoxoresorufin이 형광성 resorufin으로 대사 되는 것을 측정하였다(Kelley 등, 1990).

### Ethoxycoumarin O-deethylation (ECOD)

Ethoxycoumarin O-deethylation의 활성은 7-ethoxycoumarin이 형광성 7-hydroxycoumarin으로 대사 되는 것을 측정하였다(Greenlee and Polands, 1978; Guengerich, 1978).

### Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation

Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation의 활성은 6 $\beta$ -hydroxytestosterone으로 대사 되는 것으로 측정하였다(Brian 등, 1990).

### Statistics

두 그룹간의 통계적인 차이를 확인하기 위하여 Student's *t* test를 사용하였다.

## 실험 결과

### Glu-DDTC와 disulfiram의 P450에 대한 효과

Glu-DDTC(4h, 24h)와 disulfiram(4h)을 시간별, 농도별(10, 50 및 200 mg/kg)로 복강 투여 후 간에서 분리한 microsome에서 P450 각 isozyme에 대한 효소 억제 정도를 측정하였다. P450 2E1의 지표 활성도는 demethylnitrosamine(DMN) demethylation과 p-nitrophenol(PNP) hydroxylation을 측정하였다. 그 결과 Glu-DDTC의 4시간, 24시간 경과후의 DMN demethylation으로 알아본 2E1의 효소 활성도는 대조군에 비해 68.8 및 92.5%이었으며 PNP hydroxylation은 56.0 및 96.5%로 감소하였다(Table I).

Disulfiram과 비교한 4시간 후의 활성도는 DMN demethylation에서 보면 Glu-DDTC와 disulfiram에서 각각 68.8 및 59.2%이고 PNP hydroxylation에서는 56.0 및 52.4%로 P450 2E1에 대한 활성도는 모두 4시간 후에 감소되었음을 확인 할 수 있었다(Table I). 농도에 따른 Glu-DDTC의 효과를 DMN demethylation의 10, 50 및 200 mg/kg용량에서 보면 각각 대조군에 비해 81.8, 70.0 및 65.7%로 활성 억제를 보였으며 PNP hydroxylation에서도 각각 89.4, 87.5 및 51.6%로 억제되었다. 따라서 Glu-DDTC는 용량 의존적으로 P450 2E1에 대한 억제 효과가 증가됨을 확인할 수 있었다.

Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation으로 측정한 P450 3A4의 활성도와 pentoxoresorufin O-dealkylation으로 측정한 P450 2B의 활성도에는 Glu-DDTC와 disulfiram 모두 증가나 감소 현상을 볼 수 없었다.

Ethoxycoumarin O-deethylation으로 본 P450 1A2의 활성은 Glu-DDTC 투여 4시간, 24시간 경과 후에 43.4 및 87.7%이며 4시간 경과 후에 비교한 disulfiram에서는 43.6%로 Glu-DDTC와 비슷한 감소율을 보였다. Glu-DDTC는 10, 50 및 200 mg/kg으로 농도를 높일수록 95.6, 58.2 및 35.9%로 효소 활성 억제 효과가 커지며 disulfiram 역시 50 및 200 mg/kg에서 42.5 및 48.7%로 대조군의 활성도에 비하여 약 50%의 감소율을 관찰할 수 있었다.

### Glu-DDTC와 disulfiram의 GST 활성도에 대한 영향

Glu-DDTC와 disulfiram을 복강 투여 후 간에서 분리한 cytosol에서 CDNB와 DCNB에 대한 GST 활성도를 측정하였다. Glu-DDTC를 복강 투여한 흰쥐에서 4시간, 24시간 경과 후 CDNB와 DCNB에 대한 GST의 활성도는 대조군에 비해 각각 152, 186% 및 148, 199%로 증가됨을 보였다(Table II). Disulfiram을 복강 투여 4시간 후 CDNB와 DCNB에 대한 활성도는 대조군과 비교해 볼 때 각각 97.3%, 114.7%로 차이가 나타나지 않았다. 농도에 대한 GST 유도 정도를 관찰하기 위하여 Glu-DDTC와 disulfiram을 각

**Table I.** Time response for the inhibition of microsomal P450 activities by Glu-DDTC and disulfiram

P450 activity	Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation (3A4)	Pentoxoresorufin O-dealkylation (2B)	PNP hydroxylation (2E1)	DMN demethylation (2E1)	Ethoxycoumarin O-deethylation (1A2)
Control	2.57 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup> (100.0%) <sup>b</sup>	0.99 $\pm$ 0.00 (100.0%)	24.60 $\pm$ 0.31 (100.0%)	8.06 $\pm$ 4.56 (100.0%)	2.87 $\pm$ 1.12 (100.0%)
Glu-DDTC 4 hr	2.10 $\pm$ 0.24 (81.7%)	1.13 $\pm$ 0.00 (114.0%)	13.7 $\pm$ 2.92 <sup>*</sup> (56.0%)	5.55 $\pm$ 0.07 <sup>*</sup> (68.8%)	1.24 $\pm$ 0.75 <sup>**</sup> (43.2%)
Glu-DDTC 24 hr	2.39 $\pm$ 0.31 (93.0%)	1.15 $\pm$ 0.03 (116.0%)	23.8 $\pm$ 3.76 <sup>**</sup> (96.5%)	7.46 $\pm$ 0.77 <sup>**</sup> (92.5%)	2.52 $\pm$ 0.74 <sup>**</sup> (87.8%)
Disulfiram 4 hr	2.63 $\pm$ 0.32 (93.0%)	1.06 $\pm$ 0.00 (107.0%)	12.9 $\pm$ 0.84 <sup>*</sup> (52.4%)	4.78 $\pm$ 0.19 <sup>*</sup> (59.2%)	1.25 $\pm$ 0.30 <sup>*</sup> (43.6%)

a: Each value represents mean  $\pm$  SD (n=3)(nmol/min/mg protein).

b: Number in parenthesis represents relative percentage of the control.

Rats were administrated Glu-DDTC and disulfiram by single i.p. injection of 200 mg/kg and then sacrificed 4 hr and 24 hr after dosing.

\* = P < 0.01, \*\* = P < 0.05

**Table II.** Time response for the induction of rat hepatic GST activities by Glu-DDTC and disulfiram.

GST activity	CDNB	DCNB
Control	6.02 ± 0.78 <sup>a</sup> (100.0%) <sup>b</sup>	0.44 ± 0.04 (100.0%)
Glu-DDTC 4 hr	9.16 ± 0.40 <sup>**</sup> (152.2%)	0.65 ± 0.04 <sup>**</sup> (147.7%)
Glu-DDTC 24 hr	11.18 ± 1.75 <sup>***</sup> (185.9%)	0.88 ± 0.14 <sup>***</sup> (198.9%)
Disulfiram 4 hr	5.86 ± 0.16 (97.3%)	0.39 ± 0.01(88.6%)

a: Enzyme activity was measured by using 1-chloro-2,4-dinitro-benzene (CDNB) and 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) as substrates ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein).

b: Number in parenthesis represents relative percentage of the control.

Rats were administrated Glu-DDTC and disulfiram by single i.p. injection of 200 mg/kg and then sacrificed 4 hr and 24 hr after dosing.

\*\* =  $P < 0.05$

**Table III.** Increase of GST activities in hepatic cytosol by Glu-DDTC

Glu-DDTC (mg/kg)	CDNB		DCNB	
	rat	mouse	rat	mouse
Control	7.40 ± 0.18 <sup>a</sup> (100.0%) <sup>b</sup>	18.0 ± 2.83 (100.0%)	0.14 ± 0.04 (100.0%)	0.29 ± 0.00 (100.0%)
10	7.85 ± 0.82 <sup>**</sup> (106.1%)	26.7 ± 2.51 <sup>**</sup> (148.3%)	0.21 ± 0.01 <sup>**</sup> (150.0%)	0.40 ± 0.13 <sup>**</sup> (141.0%)
50	9.69 ± 1.65 <sup>**</sup> (131.0%)	29.5 ± 3.00 <sup>**</sup> (163.8%)	0.25 ± 0.01 <sup>**</sup> (100.0%)	0.40 ± 0.07 <sup>**</sup> (143.0%)
200	11.74 ± 1.09 <sup>*</sup> (159.0%)	48.0 ± 2.01 <sup>*</sup> (266.6%)	0.37 ± 0.09 <sup>*</sup> (265.4%)	0.40 ± 0.07 <sup>**</sup> (142.1%)

Enzyme activity was measured by using 1-chloro-2,4-dinitro-benzene (CDNB) and 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) as substrates ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein).

Rat and mice were given a single intraperitoneal injection of 10, 50 and 200 mg/kg Glu-DDTC.

a: Each value represents mean ± SD (n=3 or 4).

b: Number in parenthesis represents relative percentage of the control.

\* =  $p < 0.01$ , \*\* =  $P < 0.05$

각 10, 50 및 200 mg/kg을 복강 투여 후 CDNB와 DCNB에 대한 GST 활성도를 측정된 결과 Glu-DDTC는 CDNB와 DCNB 각 농도에 대하여 106, 131, 159% 및 150, 177, 265%로 활성도가 증가하는 것을 알 수 있었다. Glu-DDTC를 동일한 농도로 주사한 마우스의 경우 CDNB와 DCNB 각 농도에 대하여 148.3, 163.8, 266.6% 및 141.0, 143.0, 142.1%로 용량 의존적인 증가를 보임으로써 종간의 차이는 볼 수 없었다(Table III). Disulfiram을 Glu-DDTC와 동일한 농도로 복강 투여 후 GST 활성도를 측정된 결과 대조군과 비슷한 효소 활성도를 보임으로써 GST 유도 효과가 없는 것으로 판단되었다.

#### Glu-DDTC의 western blot에 의한 GST subunits의 특이적 유도 효과

Glu-DDTC에 의한 GST 활성도와 GST subunit의 protein 양과의 상관 관계를 확인하기 위하여 Glu-DDTC 10, 50 및 200 mg/kg를 6  $\mu\text{g}$  protein으로 loading한 western blot으로 알아보았다.

Yk, Yp subunits는 높은 투여 용량(200 mg/kg Glu-DDTC/kg)에서 protein 양을 20  $\mu\text{g}$  까지 증가시켜 blotting 하여도 band가 확인되지 않았으므로 GST subunit Yk, Yp는 유도에는 영향을 주지 않는 것으로 추정된다. Ya, Yb1, Yb2,

Yc subunits는 protein양을 6  $\mu\text{g}$ 으로 blotting하였을 때 효소 유도 여부를 확인할 수 있었다. Glu-DDTC를 농도별로 western blot하였을 때 Ya subunit는 Yb1, Yb2 및 Yc subunit에 비해 뚜렷이 보였고 농도에 따른 효소 유도 경향도 확인할 수 있었다. Yc subunit는 농도에 따른 band의 차이는 없었으므로 GST 유도에 용량 의존성이 없는 것으로 예상된다. Yb1 subunit는 Glu-DDTC의 농도가 증가할수록 band가 진했으므로 Ya subunit와 마찬가지로 용량 의존적인 효소 유도 효과를 확인할 수 있었다. Yb2 subunit는 Glu-DDTC를 처리한 시료와 대조군과의 차이는 있었지만 농도에 따른 차이는 없었다(Table IV, Fig. 1).

#### 고 찰

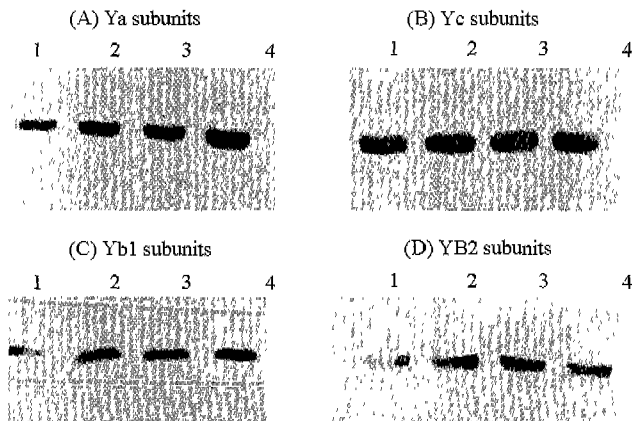
본 연구에서는 nitrosamine의 대사를 활성화시키는 대표적인 phase I의 효소인 cytochrome P450(P450)을 억제함과 동시에 GST같은 nonoxidative detoxifying enzyme을 활성화시켜 독성이나 발암성물질에 대하여 방어 작용을 가한다고 알려진 disulfiram의 생체내 주요 대사체인 N,N-diethylthio carbamate(DDTC)의 유도체인 Glu-DDTC가 chemical carcinogen에 대한 신체 방어 작용 가능성을 phase I의 microsomal monooxygenase 감소 여부 및 phase II의

**Table IV.** Western blot analysis of GST subunits expressed in control and Glu-DDTC treated rat hepatic cytosol

Glu-DDTC (mg/kg)	Yk	Yp	Ya	Yc	Yb1	Yb2
Control	ND	ND	+	+	+	+
10	ND	ND	++	+	++	++
50	ND	ND	+++	+	+++	++
200	ND	ND	++++	+	++++	++

+++ strong band, ++ moderate band, + weak band, ND not detectable.

Each sample was loading at the protein amount of 6 ug.



**Fig. 1.** Western blot analysis of GST subunits expressed in Glu-DDTC rat liver. Lane 1 is control and lane 2, 3 and 4 are 10, 50 and 200 mg Glu-DDTC respectively.

GSH와 관련된 효소인 cytosolic GST의 유도 가능성으로 알아보았다.

DDTC는 aldehyde dehydrogenase 활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며 그 기전은 mechanism based inactivation으로 보고되고 있다. 따라서 Glu-DDTC에 의한 phase I의 microsomal monooxygenase의 억제 여부를 알아보기 위하여 P450 효소 활성도로 알아본 결과 2E1과 1A2에 대하여 특이적으로 억제 효과를 보였고, 기타 다른 P450 동위 효소인 2B, 3A4에 대해서는 억제되지 않았다. 또한 2E1과 1A2에 대한 억제 작용은 Glu-DDTC의 높은 농도(200 mg/kg)에서 약 60%를 보였다.

P450 2E1은 에탄올과 저분자성 독성 물질의 대사 활성화에 관여하므로, P450 1A2 효소는 aromatic amine과 특히 아미노산에서 유래되는 Glu-1, PhIPs, Trp P-1, Trp P-2 등의 발암 물질의 대사 활성화에 관여한다. 인체에서 이들 두 효소에 대한 약물 대사 및 내인성 물질의 대사의 역할은 미미하므로 이 두 효소의 선택적인 억제는 화학적 발암 억제에 커다란 기여가 되리라고 기대된다.

Phase II의 무독화 대사과정의 대표적인 효소인 GST 유도 여부의 측정에는 Glu-DDTC를 복강 투여한 흰쥐와 마우스의 간으로부터 분리한 cytosol에서 측정하였다. GST에

대한 전반적인 활성도는 CDNB와 DCND에 대한 효소 활성도로 측정하였으며 복강 투여 4시간과 24시간 경과 후에 효소 활성도는 계속 증가됨을 확인하였다. GST는 적어도 7개의 subunits가 존재하며 이들 subunits 모두가 상대적인 활성도의 차이가 있으나 주로 CDNB와 DCND에 대해 활성을 나타낸다. 그러나 CDNB와 DCND에 대한 GST 효소 활성 측정만으로 각 subunit의 활성 변화를 알 수 없으므로 GST subunit 활성이 translation level에서 GST 유도 경향을 알아보기 위하여 western blot으로 확인해 보았다.

Glu-DDTC 10, 50 및 200 mg/kg 투여에 따른 GST Ya, Yc, Yb1, Yb2, Yp 및 Yk subunits 생성을 protein 양으로 확인하였을 때 GST Ya, Yb1 subunits에 있어서 Glu-DDTC 농도 증가에 따라 protein 양이 증가하였고, GST Yb2 subunit는 대조군에 비해 protein이 증가함을 알 수 있었으나 용량 의존적인 증가는 확인되지 않았다.

전반적인 GST 특이적인 효소 활성화를 측정하였을 때 CDNB에 대한 효소 활성은 Ya, Yc, Yb1 및 Yb2 sub-unit의 활성화에 의한 것이며, DCNB에 대한 효소 활성은 주로 Yb1, Yb2 subunit의 활성화에 있다고 보고되었다(Mannervik 등 1985). 본 연구에서 관찰된 Glu-DDTC에 의한 GST 유도 효과는 protein 증가에 의한 것이며, 부분적으로 Yb2 subunit도 효소 유도에 영향을 미친다고 예상된다. 이러한 결과로부터 Glu-DDTC의 phase II 과정에서 이물질에 대한 무독화 대사에 중요한 효소인 GST의 활성 증가는 GST subunit Ya, Yb1 및 Yb2 protein 증가에 따른 결과로 해석된다.

본 연구에서 phase II의 GST 유도 기전 규명을 위하여 각 subunit에 대한 protein 양의 증가를 알아 보았을 뿐이므로 GST 유도 기전에 대한 더 많이 연구되어야 한다. 특히 GST 유도의 molecular mechanism에 대한 Pearson의 연구에서 주요 GST에 대한 mRNA가 증가된다는 것이 발견되었고(Pearson 등, 1983), 비슷한 Picket의 연구에서 phenobarbital이나 3-methylcholanthrene를 복강 투여한 흰쥐의 GST enzyme content 및 활성도 증가는 Ya mRNA의 translation activity와 일치한다고 발표되었다(Ding and Pickett, 1985). 이러한 관점에서 볼 때 Glu-DDTC에 의한 GST의 유도 효과는 GST enzyme content 및 활성도의 증가

뿐만 아니라 GST 각 subunit에 대한 mRNA 의 증가 가능성에 관한 검토가 과제로 남아있으며, 실험 동물상에서 밝혀진 Glu-DDTC의 GST 유도 효과에 견주어 human에서 GST 유도 가능성도 정립되어야 할 과제이다.

### 감사의 말씀

이 논문을 위해 협력해주신 한국 과학 기술 연구원에 김 동현 박사님께 진심으로 감사드리며, Glu-DDTC를 합성해주신 원광대학교 이병훈 교수님께도 감사드립니다.

### 참고문헌

- B. H. Lee., Bartram, B., Schmezer, P. and Wiessler, M. (1994). Sugar-linkage dithiocarbamates as modulators of metabolism and genotoxic properties of N-nitroso compound. *J. Med. Chem.*, **37**, 3154-3162.
- Bollag, D. M. and Edelman, S. J.(1991). Immunoblotting. In : Protein methods. New York, Wiley-Liss Inc., 18.1-18.88
- Booth, J., Boyland, E. and Sims, P.(1961). An enzyme from rat liver catalyzing conjugation with glutathione *J. Biochem.*, **79**, 516-524.
- Boyland, E. and Chasseaud, L. F.(1969). The role of glutathion and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.*, **32**, 173.
- Brian, W. R., Sari, M. A., Iwasaki, M., Shimada, T., Kaminsky, L. S. and Guengerich, F. P.(1990). Catalytic activities of human liver cytochrome P450 3A4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.*, **29**, 11280-11292.
- Ding, V. D-H. and Pickett, C. B. (1985). Transcriptional regulation of rat liver glutathione S-transferase genes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Arch. Biochem. Biophys.*, **240**, 553-559.
- Greenlee, W. F. and Polands, A.(1978). An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity: Induction of hepatic enzyme activity in C57 BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **205**, 596-605.
- Guengerich, F. P.(1977). Studies on the activation of an model furan compound : toxicity and covalent binding of 2-(N-ethylcarbamoyl hydroxymethyl)-furan. *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1909-1915.
- Guengerich, F. P.(1989). Analysis and characterization of enzymes: In Principles and Methods of Toxicology. 2nd Edition, edited by Hayes, A. W., New York: Raven Press, 777-786.
- Guengerich, F. P. (1978). Separation and purification of multiple forms of three liver apparently homogeneous cytochrome P450 isolated from liver microsomes of phenobarbital and 3-methylcholanthrene-treated rats. *J. Biol. Chem.*, **253**, 7931-7939.
- Hayes, J. D. and Mantle, T. J.(1986). Use of immunoblot techniques to discriminate between the glutathione S-transferase Yf, Yk, Ya, Yn/Yb and Yc subunits and to study their distribution in extrahepatic tissues. *Biochem. J.*, **233**, 779-788.
- Kelly, M., Womack, J. and Safe, S.(1990). Effects of cytochrome P-450 monooxygenase inducers on mouse hepatic microsomal metabolism of testosterone and alkoxyresorufines. *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 1991-8.
- Ketter, B.(1988). Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **202**, 343-361.
- Ketterer, B.(1986). Detoxification reactions of glutathion and glutathion transferases. *Xenobiotica*, **16**, 357-373.
- Koop, D. R.(1986). Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P450 isozyme 3a. *Mol. Pharmacol.*, **39**, 399-404.
- Laemmli, U. K.(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.(1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M. and Jornvall, H.(1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferases common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 7202.
- Namane, A., Gouyette, C., Fillion, M-P., Fillion, G. and Huynhdinh, T. (1992). Improved brain delivery of AZT using a glycosylphosphotriester prodrug. *J. Med.Chem.*, **35**, 3039-3044
- Palakodety, R. B., Clejan, L. A., Krikun, G., Feierman, D. E. and Gederbaum, A. I. (1988). Characterization and identification of pyrazole-inducible form of cytochrome P450. *J. Biol. Chem.*, **263**(2), 878-884.
- Pearson, W. R., Windle, J. J., Morrow, J. F., Benson, A. M. and Talalay, P.(1983). Increased synthesis of glutathione S-transferases in response to anticarcinogenic antioxidants. Cloning and measurement of messenger RNA. *J. Biol. Chem.*, **258**, 2053-2062.
- Smith, M.T. and S. Orrenius.(1984). Studies on drug metabolism and drug toxicity in isolated mammalian cells. In "Drug Metabolism and Drug Toxicity" Ed. by J. R. Michell and M. G. Horing Raven Pres. New York 71-119.
- Van der Hoven, T. A., and Coon, M. J.(1974). Preparation and properties of partially purified cytochrome P450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P450 reductase from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **249**, 6302-6310.