

## 적출간 관류법에 의한 N,N-dimethylformamide의 대사 및 간독성

연세대학교 원주의과대학 예방의학교실 및 직업의학연구소 · 생리학교실\* · 내과학교실\*\*

고상백 · 차봉석 · 강명근 · 고상열 · 이종우\* · 권상옥\*\*

— Abstract —

### The Metabolism and Liver Toxicity of N,N-dimethylformamide in the Isolated Perfused Liver

Sang Baek Koh, Bong Suk Cha, Myung Guen Kang,  
Sang Yeol Koh, Jung Woo Lee\*, Sang Ok Kwon\*\*

*Department of Preventive Medicine and Institute of Occupational Medicine,  
Physiology\*, and Internal Medicine\*\*, Yonsei University, Wonju College of Medicine*

N,N-dimethylformamide(DMF) is a solvent which is widely used in the industrial work-place. It causes the liver damages to the chronically exposed workers and is also well known as the hazardous material to generate occupational malignancies. DMF is mainly metabolized into N-hydroxymethyl-N-methylformamide(HMMF) by the microsomal cytochrome p-450. HMMF breaks down to NMF. However, the detailed mechanism of its toxicity are unknown.

In this experiment, the metabolism and the toxicity of DMF was investigated using an isolated perfused liver model. DMF(0, 10, 25mM) were added into recirculating perfusate of the isolated perfused rat liver. Samples were collected at 0, 30, 45, 60, 75, 90 minutes from inferior vena cava. The gas-chromatography was used to analyze the metabolite of DMF. The changes in the oxygen consumption rate by DMF were monitored during perfusion. The enzyme activity(AST, ALT, LDH) in the perfusate were measured to find out whether DMF causes hepatotoxicity.

As perfusion continued, DMF concentration in the perfusate decreased, and NMF 1.16mM was detected. The oxygen consumption rate increased both at 10mM and 25mM DMF concentration. However, when SKF 525A, a known inhibitor of cytochrome p-450, had been pretreated (300uM) before DMF addition, the oxygen consumption rate was significantly inhibited, indicating that cytochrome p-450 system is responsible for the conversion to NMF. With DMF addition, the activity of AST, ALT, and LDH significantly

increased time dependently and dose dependently. However, the pretreatment of perfused liver with SKF 525A showed that the release of AST, ALT and LDH was inhibited.

In summary, it is found that DMF is metabolized to NMF in liver, and that cytochrome p-450 mono-oxygenase is suggested to play a role in the biotransformation of NMF. The time course of DMF toxicity in relation to NMF formation is compatible with hypothesis that the hepatotoxicity of DMF is mediated via NMF.

Further study combined with in vivo experiment through the toxicological approaches is expected.

**Key Words :** N,N-dimethylformamide, N-methylformamide, Isolated Perfused Rat Liver, Cytochrom p-450, Hepatotoxicity

## I. 서 론

N,N-Dimethylformamide(DMF)는 육안으로 무색 또는 담황색의 액체이며, 분자식은  $(\text{CH}_3)_2\text{NCHO}$ 로 분자량은 73.09이다. DMF는 물과 유기액체에 녹고 수지나 폴리머를 잘 녹이는 성질이 있어 유기용제로 널리 쓰인다. 특히 합성 피혁공장에서 많이 쓰이며, 이외에도 보호코팅, 접착제, 필름과 인쇄용 잉크의 보조용제로도 흔히 사용된다. 고온에서 분해되어 밀폐된 용기의 압력을 높이고, 사염화탄소와 그밖의 할로겐화합물, 철, 강한 산화제 등과 접촉하여 연소하거나, 폭발할 수 있다. 특히 연소할 때 디메틸아민과 일산화탄소 등 유독가스와 증기가 발생한다. 또한 DMF는 호흡기 뿐만 아니라 피부를 통해 흡수되며(Mraz와 Nohova, 1992), 고농도에 노출시 호흡부전 및 근육의 무긴장증과 같은 일차적인 반응이 나타난다(Horn, 1961; Palmen 등, 1993). 장기적으로 노출될 경우 주로 간독성을 유발하며, 그외 해당질환, 알코올에 대한 불내성 및 기타 건강장애를 일으킬 수가 있다(Clayton 등, 1963; Redlich 등, 1988; Mraz 등, 1989; 강성규 등, 1991; Wang 등, 1991; Rojenberg, 1994; 김수근 등, 1995). Ducatman 등(1986)은 고환에서 발생한 직업성 암을 보고하였다. 따라서 미국산업위생사협회(ACGIH)나 미국산업안전보건청(OSHA)에서는 허용농도(TLV)를 10ppm, 30mg/m<sup>3</sup>(피부)로 정하였고, 생물학적 노출지표(BEI)로 DMF의 요중 대사산물인 N-methylformamide(NMF)량을 40mg/g creatinine 이하로 고시하고 있다. 현재 우리나라에서는 요중 대사산물 NMF를 분석하기 위해 가스크로마토그래피를

이용하는 분석방법을 제시하고 있다(특기협 및 작기협, 1995). 그러나 생물학적 모니터링 및 건강장애에 대한 연구는 2례에 불과하며(강성규 등, 1991; 정호근 등, 1992), 체계적인 분석방법에 대한 자료도 드문 실정이다.

Scailteur 등(1984)은 DMF는 호흡기를 통한 흡입량의 50%가 요중 N-hydroxymethyl N-methylformamide (HMMF)로 대사되고 4%가 NMF로 대사된다고 보고하고 있다. Barnes와 Ranta (1972)는 흰쥐에 DMF를 투여한 뒤 가스크로마토그래피를 이용하여 요중으로부터 DMF와 dimethylacetamide의 대사산물 중 NMF와 acetamide 등을 분석하였으며, Brindley 등(1983)도 가스크로마토그래피로 NMF를 검출하였으나, 사실상 DMF의 주 대사산물인 HMMF가 가스크로마토그래피 주입시 주입구의 고온에 의해 분해된 산물이라고 하여 NMF 검출에 대해 좀더 구체적인 기전을 제시하였다. Mraz 등(1989)은 DMF의 대사산물이 HMMF, NMF, N-acetyl-(N-methylcarbamoyl) cysteine(AMCC)의 세 가지이고, 주 대사 물질이 HMMF이지만 인간의 경우 22.8%가 최종 AMCC로 대사된다. 반면, 설치류의 경우 AMCC는 거의 검출되지 않는다고 하여 종간 대사산물의 차이가 있음을 보고하였다. 그러나 DMF의 대사기전에 대해 아직 명확히 알려진 바는 없다. 일부 보고에 의하면 DMF는 간에서 주로 산화반응에 의하여 대사된다. 즉, 간장의 microsome에 있는 mixed function oxidase 즉 cytochrome p-450에 의해 산화과정을 거쳐 HMMF 및 NMF로 대사되는 것으로 알려져 있다(Imazu 등, 1992; Mraz 등, 1993; Chieli 등, 1995).

DMF는 고양이, 쥐, 토끼, 개 등을 이용한 다양한 동물실험에서 간독성이 있는 것으로 보고되었다 (Wiles와 Narcisse, 1971). DMF에 노출된 근로자에서도 간기능 검사 수치 증가를 보고하고 있다 (Lareo 등, 1995; Sakai 등, 1995). 독성을 일으키는 농도에 대해서 Massman(1956)은 쥐에 경구 투여할 경우, DMF의 LD<sub>50</sub>를 3500mg/kg으로 보고하였다. 최근에는 독성의 기전을 이해하기 위해 쥐에서 DMF와 NMF 및 HMMF의 대사와 관련된 독성에 대한 비교연구에 관심을 모으고 있으며, DMF에 의한 독성이 그 자체의 작용보다는 NMF나 HMMF와 같은 생체내 대사산물의 작용과 더 많은 관련이 있다고 하였다(Scailteur 등, 1984; Bulcke 등, 1994).

따라서 DMF의 간대사 및 독성 연구를 위해서는 주 표적기관인 간에 영향을 줄 수 있는 다른 요인을 최소화하고 DMF의 대사를 관찰하는 것이 이상적일 것이다. 이에 본 연구에서는 간에서의 대사산물을 관찰하고 간독성에 미치는 영향을 동시에 확인할 수 있는 장점을 가진 적출간 관류(isolated liver perfusion) 모델을 이용하였다. 적출간 관류법은 Bernard(1885)가 처음으로 보고한 이래 간의 생리 및 병태생리를 연구하는 가치있는 도구이며, 다른 유효한 기법(예; liver slices, isolated and cultured cells, isolated organells)과 함께 간기능을 평가하는 중요한 실험모델이다. 적출간 관류법이 흔히 사용되는 이유는 생체내(*in vivo*) 모델과는 달리 관류액으로부터 시료를 반복해서 얻을 수 있고, 검사물질을 여러가지 농도로 간에 쉽게 폭로시킬 수 있으며, 생체내에서 불가능한 온도변화를 줄 수 있기 때문이다. 또한 다른 기관계(organ system)와 혈장성분 및 신경-호르몬 효과(neural-hormonal effect)로부터 독립적으로 실험을 수행할 수 있다. 그외에도 다른 생체의(*in vitro*) 모델과는 달리 적출간 관류법은 간의 구조, 세포극성(cell polarity), 담즙의 흐름 등의 유지가 가능하다는 장점을 지니고 있다(Gores 등, 1988). 그러나 DMF의 대사 및 독성을 적출간 관류로 확인한 보고는 아직 거의 없다.

따라서 본 연구에서는 적출간 관류법을 이용하여 첫째, 문정맥을 통해 관류한 DMF의 시간에 따른 농도 변화와 대사산물인 NMF를 정량 분석하고, 둘째, cytochrome p-450에 의한 DMF 대사과정을

평가하기 위해 관류기간 동안 산소소모율의 변화를 관찰하며, 셋째 DMF의 간독성 작용을 살펴보고자 간기능 검사 수치의 변화를 관찰하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 가. 화학물질

순도 99.5%의 디메틸포름아미드(N-N-dimethylformamide; Merck, New Jersey, USA)와 순도 99% 이상의 엔메틸포름아미드(N-methylformamide; Fluka, Buchs, Switzerland)를 사용하였으며, 가스크로마토그래피(Varian 3300, Australia) 분석시 혼합시약으로 사용하기 위해 99.5%의 메탄올을 사용하였다.

#### 나. 실험동물

체중이 300-350g인 Sprague-Dawley계 흰쥐를 실험대상으로 실험 시작 일주일 전부터 실험동물의 사육장내 환경을 25±2℃, 습도 65±5%로 유지하여 실험동물을 적응시켰다. 실험동물은 대조군, DMF 10mM, DMF 25mM에 각각 8례씩 총 24마리를 할당하였다. 사료는 삼양사 제품을 이용하였고, 식수는 간을 적출하기 직전까지 자유롭게 섭취하게 하였다.

### 2. 실험방법

#### 가. 대사물질 분석 방법

관류액을 시간(0, 30, 45, 60, 75, 90분)에 따라 1ml씩 취해 메탄올로 1 : 1 비율로 혼합하여 직접 가스크로마토그래피에 주입하였다. 주입하는 방법은 표준액 및 관류액 1ml에 메탄올 1ml를 가해 잘 섞고, 원심분리 (1000×g)한 후, 상층액 1μl를 가스 크로마토그래피에 주입하였다.

가스크로마토그래피는 불꽃 이온화 검출기를 이용하였고 그 구체적인 조건은 Table 1과 같다.

#### 나. 분석물질 평가 및 정량방법

DMF는 간에서 대사되면서 농도가 감소하므로 시간에 따라 농도를 측정하여 그 변화를 확인하였다. 또한 DMF의 생물학적 모니터링에 흔히 사용되는 DMF 대사산물의 일종인 NMF를 이용하여 간에서

의 대사여부를 확인하기 위해 분석물질로 추가하였다. 분석물질을 정량 분석하기 위해 표준액(DMF와 NMF 8 : 2비율의 혼합용액)을 농도별로 분석한 후 아래와 같이 검량식을 구하였으며, 관류액내에 포함된 DMF와 NMF의 가스크로마토그래피의 peak에 대한 면적값으로 검량식에 대입하여 농도를 산출하였다(Fig. 1, Fig. 2).

DMF 표준용액을 이용한 검량식

$$y = 0.0002146x + 0.0001756 \quad R^2 = 0.999$$

NMF 표준용액을 이용한 검량식

$$y = 0.00014x + 0.000187 \quad R^2 = 0.993$$

다. 적출 간 관류법

1) 간적출

간 적출은 먼저 Na<sup>+</sup> thiopental(40 mg/Kg)를 복강내 주입하여 마취하였다. 치골로부터 가슴상부에

걸쳐 정중선 절개를 하였다. 간문맥과 하대정맥이 노출되도록 한 뒤, 관류액이 채워진 폴리에틸렌 튜브(polyethylene tube 1.3mm)를 간문맥에 삽입한 후 고정시켰다. 흉곽을 절개하여 노출하고 같은 크기의 폴리에틸렌 튜브를 우심방을 경유하여 하대정맥에 삽입하였다. 신장정맥 위 하대정맥을 묶고 절찰하였다. 간을 완전히 분리해 낸 후 적출간 관류기구(Fig. 3)에 옮겼다.

2) 관류액

관류액은 Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB)를 사용하였으며, 그 성분은 NaCl 117, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.9, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.4, NaHCO<sub>3</sub> 24.8 mM이었다(Table 2). 관류액은 온도 36℃로 유지시켜 주고, 95% 산소와 5% 이산화탄소를 충분히 공급하여 pH 7.4가 되도록 하였다.

Table 1. Gas chromatography conditions for detection of dimethylformamide metabolite

Description	Conditions
Column	∅ 0.53mm × L 15m, Quardrex Carbowax 20M
Injector	split/splitless (initial 0.5 min; splitless, and then; split)
Gas	He 10ml/min (40℃)
Temperature	detector: 230℃, injector: 230℃ column: 60℃(1min) 30℃/min, 120℃(1min) 20℃/min, 220℃(1min)

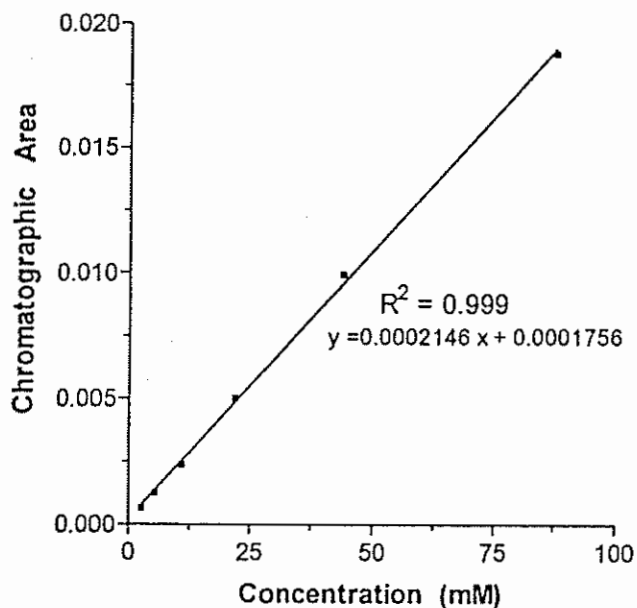


Fig. 1. Calibration curve of DMF

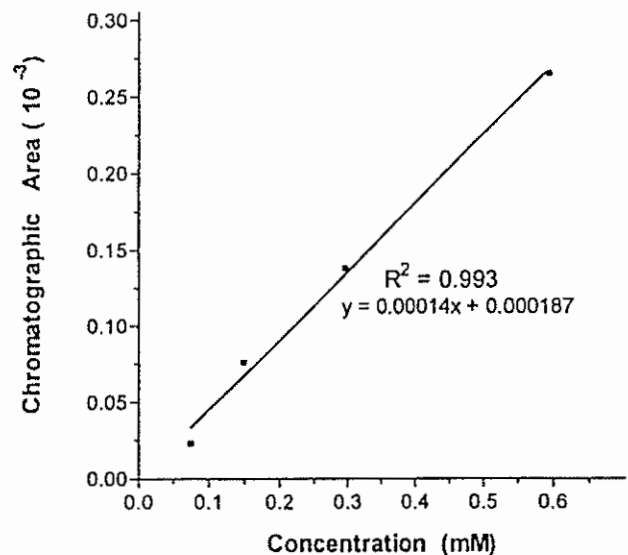


Fig. 2. Calibration curve of NMF

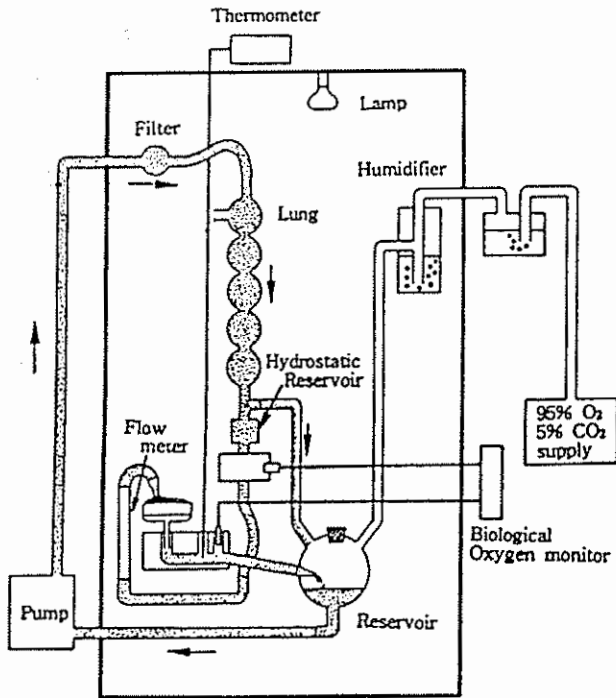


Fig. 3. Isolated perfused rat liver model

### 3) 관류속도의 측정

간 관류에 사용한 KRB 용액량은 140ml이었으며, 관류압은 28 cmH<sub>2</sub>O가 유지되게 하였다. 이때 DMF 투여하기전의 관류 속도는 50.5±2.45 ml/min이었다. 간문맥의 관류속도는 Gilmont Flowmeter F-1300을 이용하여 측정하였다. 이 측정값은 보정표를 이용하여 실제 관류속도를 계산하였다.

### 4) 산소소모율의 측정

산소소모율은 산소추출율, 간문맥의 관류속도 및 간 무게를 측정하여 아래 계산식에 의해 구하였다. 산소추출율은 간문맥으로 들어가는 산소포화도와 하대정맥으로 나가는 산소포화도의 차이이며, Biological oxygen monitor(YSI Model 53)를 이용하여 측정하였다. 간 무게는 관류를 시행하고 난 후 폴리에틸렌 튜브를 제거하여 저울에 올려 측정하였다.

$$\begin{aligned} & \text{관류액내 산소의 양: } SO_2 \text{ } (\mu\text{l/ml}) \\ & = \alpha \times PO_2 \text{ } (\alpha: 0.024 \text{ ml O}_2 / \text{ml} / 760 \text{ mmHg}) \\ & = 0.024 \text{ ml O}_2 / \text{ml of solution} / 760 \text{ mmHg} \times \\ & \quad (760 \times 95 / 100) \text{ mmHg} \end{aligned}$$

Table 2. Components in Krebs-Ringer bicarbonate buffer solutions

Components	Concentration (mM)
NaCl	117
KCl	4.7
CaCl <sub>2</sub>	1.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2
NaHCO <sub>3</sub>	24.8
MgSO <sub>4</sub>	1.4
Glucose	5.5

$$= 0.0228 \text{ ml O}_2 / \text{ml of solution} (=22.8 \mu\text{l O}_2 / \text{ml of solution})$$

간에 의한 산소 섭취량: (μl/min)

$$= \text{관류액 내 산소의 양} \times \text{관류속도} \times \text{산소포화도} (\%) \text{의 차이} / 100$$

산소소모율: (μl O<sub>2</sub> / min / gm)

$$= \text{간에 의한 산소 섭취량} \times 1 / \text{간무게} (\text{gm})$$

### 5) 시약 투여 및 시료의 포집

DMF의 대사 및 독성을 비교하기 위해 대조군과 DMF 10, 25mM을 간문맥에 들어가는 관류액에 투여하고, 관류 후 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90분에 하대정맥으로부터 나오는 관류액에서 시료를 포집하였다.

또한 DMF의 산소소모율의 특성을 파악하기 위하여 SKF-525A (proadifen, β-diethylaminoethyl-diphenylpropylacetate) 300 μM을 전처치한 뒤, 30분후에 DMF를 투여하여 DMF만 투여한 군과 서로 비교하였다.

### 6) 간독성 측정

대조군, DMF(10, 20mM) 및 SKF 525A 전처치후 DMF의 간독성을 측정하기 위해 관류액을 시간별로 수집하고, BM/Hitachi 747(Boehringer Mannheim)을 이용하여 37 °C에서 Bergmeyer (1986) 방법으로 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH)를 측정하였다.

### 3. 통계처리

결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였으며, 각 농도에 따른 대사 및 독성 효과는 Kruskal-Wallis 검정 방법에 의하여 p값이 0.05 이하일 때 유의한 차이의 한계로 삼았다.

## III. 실험 결과

### 1. 대사물질의 측정

#### 가. 검출 조건 및 크로마토그램

가스 크로마토그래피의 DMF 대사물질의 검출 조건을 결정하기 위하여, 먼저 DMF와 NMF를 8 : 2 비율로 만든 혼합용액 1ml에 메탄올 1 ml를 가해 표준용액을 만들어 원심분리 후 상층액 1 $\mu$ 를 가스

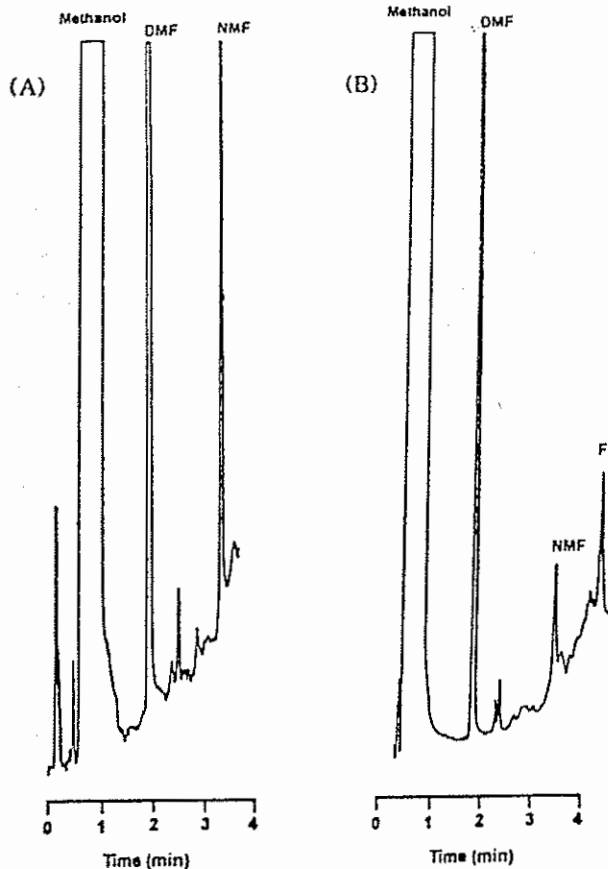


Fig. 4. Gas chromatograms of DMF standard solution and DMF in perfusate  
(A) Gas chromatogram of DMF standard solution  
(B) Gas chromatogram of DMF in perfusate

크로마토그래피에 주입하여 Fig. 4 (A)와 같은 크로마토그램을 얻었다. 메탄올의 경우 0.36분에 가장 먼저 peak를 보였고, DMF가 1.97분에, NMF가 4.17분에 각각 peak를 보였다.

Fig. 4 (B)는 DMF 25 mM을 관류액에 투여 후 90분이 경과한 시료를 분석한 크로마토그램의 예이다. 표준 용액의 크로마토그램과 비교해 볼 때 peak 면적의 차이를 보이지만, 똑같은 시간대에 peak를 보여 DMF와 NMF의 검출을 확인할 수 있었다.

#### 나. 대사물질의 농도

적출간 관류시 DMF 25mM을 관류액에 투여한 후 0, 30, 45, 60, 75, 90분에 각각 시료를 채취하여 DMF와 NMF를 측정하였다. DMF 농도는 시간에 따라 점차 감소하였다. NMF는 관류시작 전 관류액에서는 검출되지 않았고, 30분 때부터 조금씩 증가하지만 뚜렷한 변화 양상을 찾을 수 없는 미량이 검출되기 시작하였다. 그러나 75분 때부터는 대사물질이 증가하기 시작하여 90분에 1.16mM이 검출되었다(Table 3).

### 2. 적출 관류 간에서 DMF와 간대사

#### 가. DMF가 관류속도에 미치는 영향

KRB 용액을 28cmH<sub>2</sub>O의 일정한 압력으로 관류할 때 초기 관류속도는  $50.5 \pm 2.45$  ml/min이었으며, DMF를 가하지 않은 대조군에서는 이러한 관류속도가 실험종료 90분까지 변화없이 지속되었다. 그러나 DMF 10 및 25mM 투여군은 약물 투여 20분부터 점차 감소하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 5).

Table 3. Concentration of DMF and NMF in perfusate with time

Time (min)	DMF	NMF
0	24.98 $\pm$ 0.04	-
30	16.09 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01
45	13.41 $\pm$ 0.16	0.26 $\pm$ 0.02
60	11.63 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.05
75	10.36 $\pm$ 0.12	0.80 $\pm$ 0.04
90	9.34 $\pm$ 0.09	1.16 $\pm$ 0.11

나. DMF가 간의 산소소모율에 미치는 영향

산소소모율은 간문맥을 통하여 들어가는 관류액과 간정맥으로 빠져나오는 관류액간의 산소포화도의 차이(산소추출율)와 관류속도의 곱으로 구하게 되는데 대조군에서는 산소추출율이나 관류속도의 변화가 없으므로 실험기간 동안 산소소모율은 거의 일정하였

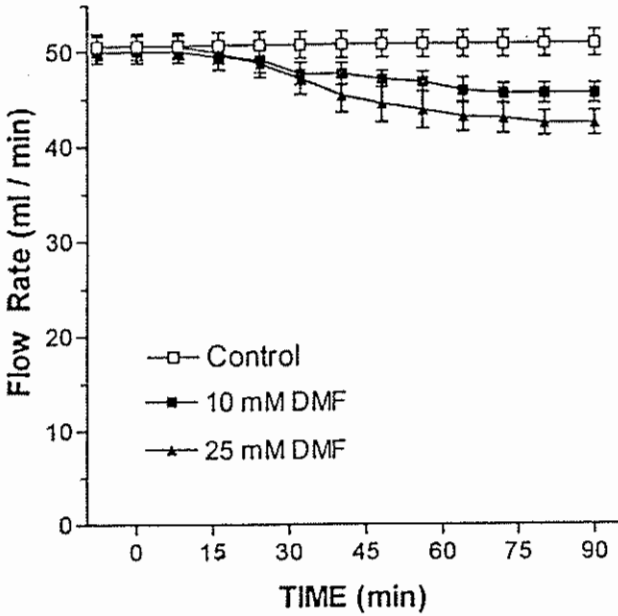


Fig. 5. Effect of DMF on perfusion flow in the portal vein

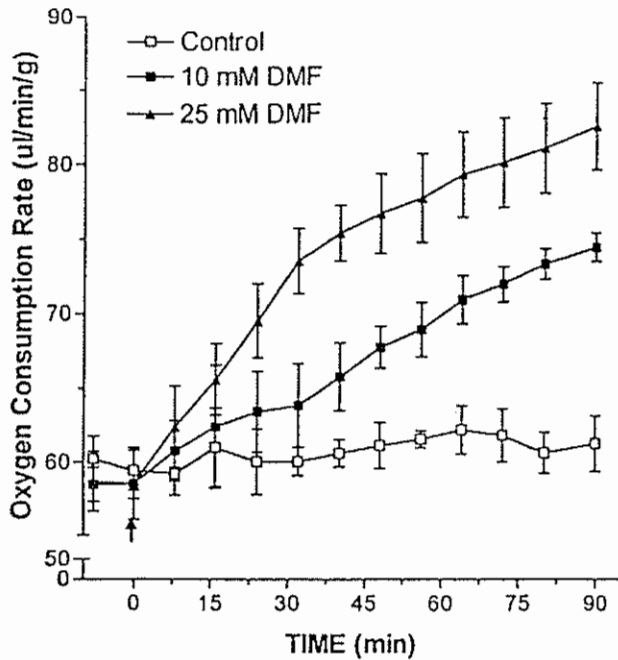


Fig. 6. Effect of DMF on oxygen consumption rate with time

다. DMF의 경우는 약물 투여 후 관류속도는 다소 감소하였으나, 그에비해 산소추출율이 매우 커졌기 때문에 산소소모율이 증가되었고, 이러한 현상은 DMF의 농도에 비례하였으며, 유의한 차이 ( $p < 0.01$ )를 보였다(Fig. 6).

다. SKF-525A(proadifen)가 DMF의 산소소모율 변화에 미치는 영향

간의 microsome 약물대사 억제제인 SKF-525A 300 uM을 전처리하고 30분 후 DMF 25 mM을 투여하였다. SKF-525A 투여 후 10분 이내에 간 관류속도는 50.5 ml/min에서 26.3 ml/min 까지 일시적으로 감소하다가 다시 증가하여 43.2ml/min으로 유지되었으며, 시간이 지나도 약물을 가하기 전의 관류속도까지는 회복되지 않았다. 이와같은 관류속도의 감소로 인하여 SKF-525A에 의한 산소소모율은 대조군보다 감소하는 결과를 보였다. SKF-525A 투여 30분 후 DMF 25 mM을 투여하였는데 산소소모율이 시간에 따라 조금씩 증가하는 경향을 보였다(Fig. 7).

### 3. DMF의 간독성 작용

DMF 10 및 25 mM과 대조군의 간독성 효과를

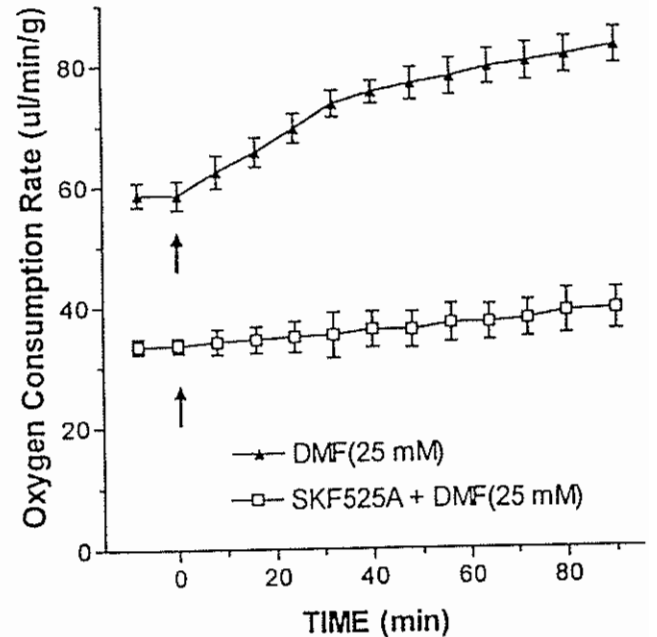


Fig. 7. Effect of DMF on oxygen consumption rate after pretreatment of SKF 525A

비교하기 위해 관류액을 시간별로 수집하여 AST, ALT, LDH를 측정하였다. 관류시간에 따라 대조군에서 관류액내의 AST, ALT 및 LDH 농도가 약간씩 증가하였으나, DMF 투여군에서는 60분경 부터 급격히 증가하여 대조군과 현저한 차이( $p < 0.01$ )

를 보였으며, 이러한 현상은 약물농도에 비례하였다 (Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10).

그러나 SKF-525A 전처치한후 DMF를 투여한 결과, DMF에 의한 AST, ALT, LDH 증가가 억제되었다(Fig. 11, Fig. 12, Fig. 13).

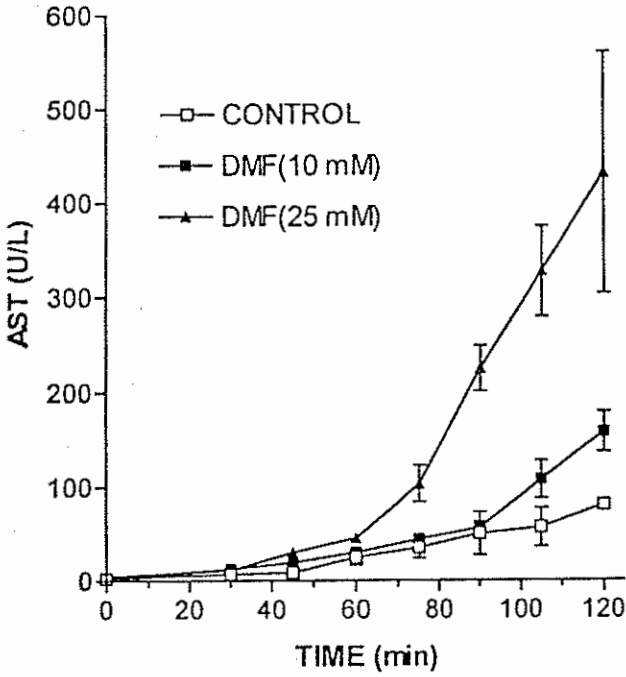


Fig. 8. Perfusate AST concentration with time after administration of DMF

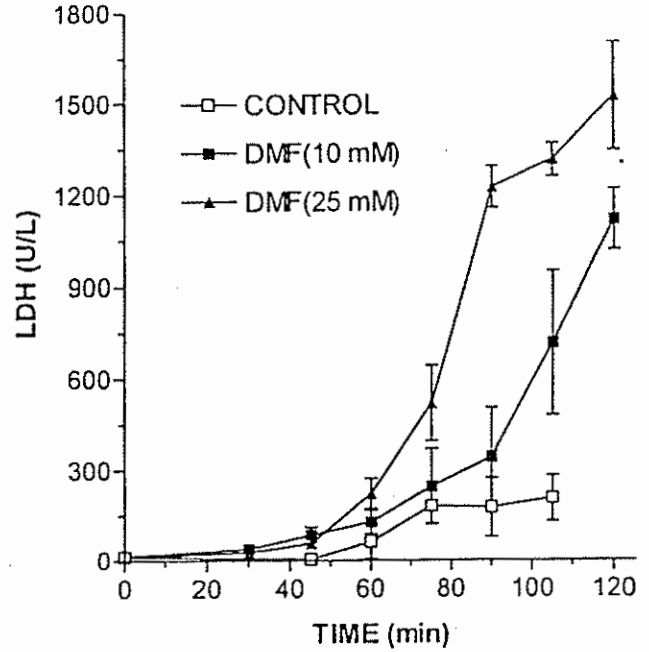


Fig. 10. Perfusate LDH concentration with time after administration of DMF

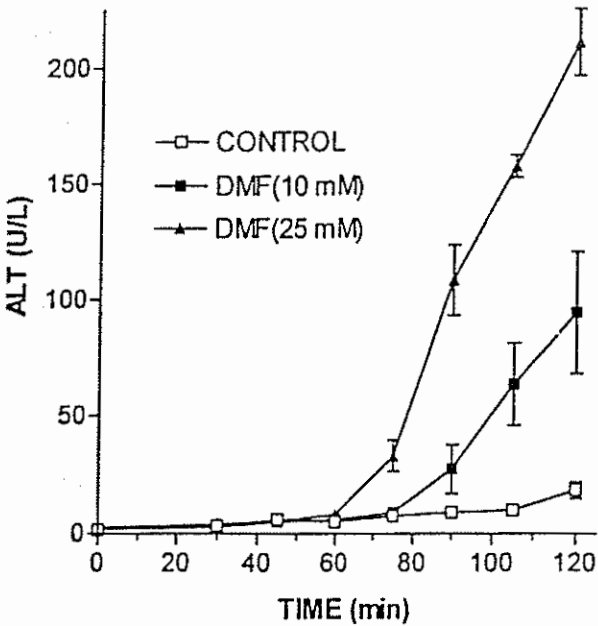


Fig. 9. Perfusate ALT concentration with time after administration of DMF

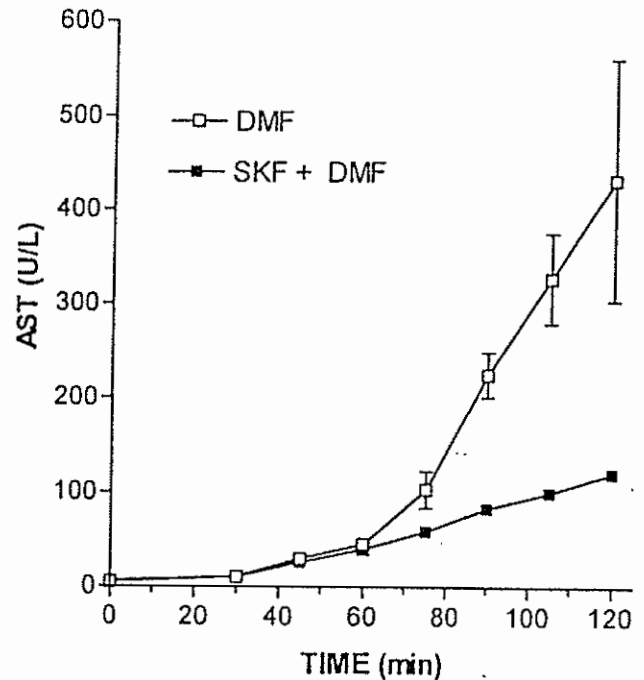


Fig. 11. Perfusate AST concentration with time after pretreatment of SKF 525A



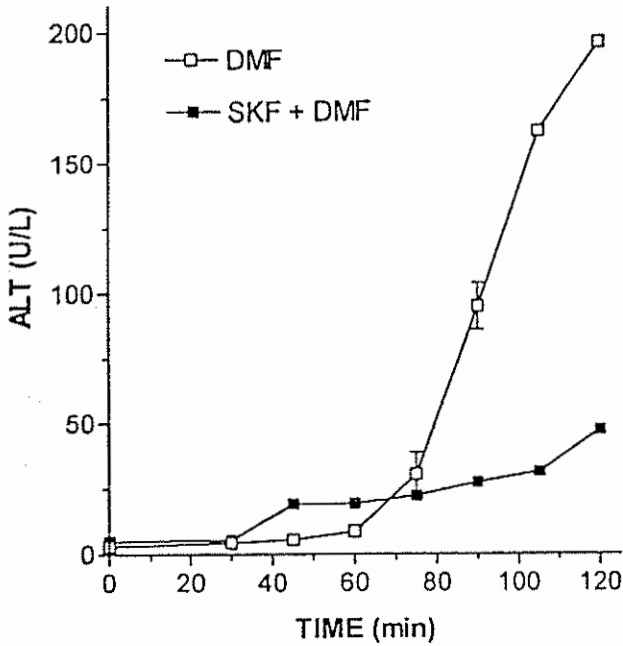


Fig. 12. Perfusate ALT concentration with time after pretreatment of SKF 525A

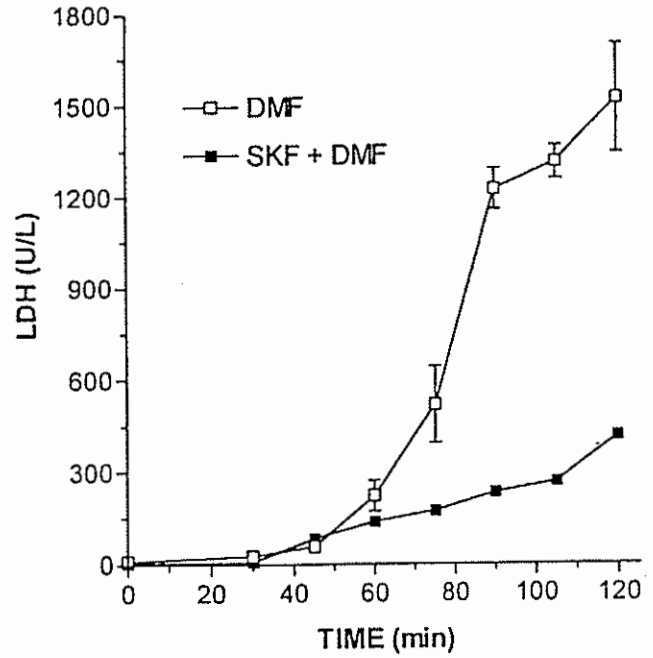


Fig. 13. Perfusate LDH concentration with time after pretreatment of SKF 525A

#### IV. 고 찰

DMF는 생체내에서 대사되어 소변으로 배출된다. 그 중 생물학적 모니터링에 사용되는 주 물질은 소변내 NMF이며, 최근에는 N-acetyl- (N-methyl-carbamoyl) cysteine (AMCC)도 근로자에서 주요한 노출 지표로 활용되고 있는 추세이다 (Mraz와 Nohova, 1992; Lareo 등, 1995; Sakai 등, 1995). 그러나 DMF의 대사 경로는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. 일부 규명된 바로는 DMF가 체내에 흡수되면 간에서 NMF로 대사되며 (Barnes와 Ranta, 1972; Kimmerle와 Eben, 1975), 이 대사물질에 의해 간독성이 유발된다 (Whitby 등, 1984; Mraz 등, 1989). 하지만 가스 크로마토그래피로 검출되는 요중 대사산물인 NMF는 대부분 HMMF라고 밝혀졌고, 이는 액체상태에서 안정되어 있는 HMMF가 가스 크로마토그래피의 고온에 의해 NMF로 분해되는 것으로 보고하고 있다 (Brindly 등, 1983; Scailteur 등, 1984; Kestell 등, 1986; Mraz 등, 1989). 결국 DMF는 간에서 산화반응에 의해 주로 HMMF로 대사되며, HMMF는 빠른 속도로 NMF로 분해된다. 그러나 HMMF의 생물학적 특성 및 대사소실과정 (meta-

bolic fate)은 명확하지 않으며, 그 동족체인 N-(hydroxymethyl)formamide (HMF)는 간독성이 없는 것으로 알려져 있다 (Cooksey 등, 1983).

반면 NMF와 더불어 DMF 최종 대사물질 AMCC도 간독성이 있는 물질로 보고하고 있다 (Kestell 등, 1987). 이 대사 경로 역시 명확히 규명되지 않았지만, DMF 대사산물 HMMF와 NMF는 methylisocyanate (MIC)로 알려져 있는 반응성 중간대사물질을 경유하며, MIC는 다시 glutathion과 포합반응 (conjugation)이 일어나고, 아세틸화되어 AMCC로 대사된다 (Kestell 등, 1987; Pearson 등, 1991; Mraz와 Nohova, 1992). 그러나 이러한 대사과정은 종에 따라 큰 차이가 있다. 인간과 설치류 사이의 대사과정에 대한 Mraz 등 (1989)의 비교연구에 의하면, 대기중 60mg/m<sup>3</sup>의 DMF를 8시간 동안 폭로시켜 28 - 60umol/kg가 흡수된 건강한 지원자 10명의 경우, 72시간 후 투여 용량의 22.8%가 AMCC로 요중에서 검출되었고, 간독성도 확인되었다. 그러나 설치류의 경우에는 DMF 0.1, 0.7, 7.0 mmol/kg을 투여했을 때 AMCC는 투여 용량의 1.1 - 5.2%만이 검출되었다. 이는 인간과 설치류에서 DMF가 AMCC로 대사되는 과정에 양적인 차이가 있다는 증거가 되며,

설치류에서는 AMCC가 거의 검출되지 않는다는 것을 의미한다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐를 대상으로 하였으므로 DMF가 NMF로 대사되는 과정 및 독성만으로 제한하였다.

분석에 앞서 가스크로마토그래피 분석시 NMF 검출조건을 안정되게 하기 위해 Lareo 등(1995)이 제시한 NMF 기화점보다 훨씬 높은 온도인 230°C로 주입구 온도를 설정하여 NMF를 분석하였다. 분석 결과 DMF 25mM 투여 후 관류 30분부터 NMF가 검출되기 시작하였으며, 75분 후부터 대사물질이 증가하기 시작하여 최고 1.16mM이 검출되어 DMF 투여 농도의 4.6%가 NMF로 대사되었다. 이는 Mraz 등(1989)과 Bulcke 등(1995)의 보고와 다소 차이를 보이는데, 그 이유로는 적출 간을 통해 평가함으로써 오래동안 간 대사를 관찰할 수 없어, 실험 방법 및 실제 대사기간의 설정 등의 차이로 나타날 수 있으며, 또는 Lareo 등(1995)이 제시하였듯이 가스크로마토그래피의 분석조건이 다르기 때문으로 추측된다.

DMF 대사는 주로 간에서 일어나며 cytochrome p-450에 의한 산화과정을 거쳐 HMMF 및 NMF로 대사된다고 알려져 있다. Imazu 등(1992)은 쥐에 DMF를 피하로 투여하여 관찰한 결과, 간장내 microsomal cytochrom p-450이 DMF 대사과정에 이용됨으로써 대조군에 비해 cytochrom p-450이 34% 감소함을 보고하였다. Mraz 등(1993)에 의하면 cytochrome p-450 특이항체가 DMF가 HMMF로 대사되는 과정을 억제한다고 하였다. Chieli 등(1995)도 DMF 산화과정에 cytochrome p-450이 관여함을 확인하였고, cytochrom p-450을 활성화 시키는 아세톤을 전처치한 군에서 더 많이 대사됨을 보고한바 있다. 그러나 간장의 microsome에 있는 cytochrome p-450에 의해 일어나는 약물대사과정에 대한 평가를 위해서는 대사속도를 결정하는 요인에 대하여 세심한 고려가 선행되어야 하며, 그 요인을 적절히 조절해야만 한다. 왜냐하면 약물효소계의 마지막 전자 수용을 담당하는 cytochrome p-450은 NADPH와 O<sub>2</sub>가 반드시 필요하기 때문이다(Thurman와 Scholz, 1969; 이우주와 김정환, 1993). 따라서 본 연구에서는 적출간 관류법을 통해 대사속도에 영향을 주는 요인을 보정하고, DMF 대사상태를 파악하고자 하였다. 적출간

관류를 이용하여 DMF 대사상태를 평가할 때 대사 속도에 영향을 주는 결정요인 중 하나는 실험동물의 영양 상태와 에너지 상태이다. 왜냐하면 적출간관류법은 처음에 간을 적출하여 관류기구에 옮기는 동안 수분이 소요되며, 이 기간동안 mitochondria 내막의 호흡전자전달계가 억제되고, ATP/ADP 비율이 급격히 감소되어 glycogenolysis가 촉진된다(김윤수, 1992). 따라서 충분한 glycogen이 간내에 축적되어 있지 않으면, glycogen이 hexose monophosphate shunt를 거쳐 분해되는 동안 공급되는 NADPH가 부족해 cytochrome p-450의 약물대사과정을 평가하는데 지장을 초래한다(Thurman와 Scholz, 1969). 이에 본 연구에서는 실험동물로부터 간 적출하기 직전까지 자유로이 식이를 섭취하게 하였으며, glucose를 미리 관류액에 첨가해서 실험을 시행하였다. 연구결과 DMF 25mM의 경우 대사과정 중 간에서 산소추출율이 크게 증가하였고, DMF 10mM의 경우도 시간에 따라 산소추출율이 증가하였다. 그런데 대개 간 문맥의 관류속도가 증가하면 산소추출율은 감소하고, 관류속도가 감소하면 상대적으로 간세포가 저산소 상태에 놓이게 되므로 이를 보상하기 위해 산소추출율이 증가하게 마련이다(Lee, 1985). 따라서 산소소모율을 알아보기 위해서는 산소추출율과 함께 관류속도를 동시에 측정하여 산소소모율을 산출해야 한다(Carlson와 Lefer, 1976; Lee, 1985). 본 연구에서는 시간에 따라 관류속도가 감소하지만, 일반적으로 정상간에서 관류속도가 감소 폭 만큼 보상작용으로 증가하는 산소추출율보다 더 크게 산소추출율이 증가하는 현상이 나타났다. 결국 대조군에서는 산소소모율이 거의 일정하였고, 반면 DMF의 경우 산소소모율이 증가되었고, 농도에 비례하였다. 이는 앞서 대사물질의 측정 결과에서 보았듯이 시간에 따라 DMF가 간에서 대사되면서 DMF의 농도가 감소하고, NMF가 검출되는 것과 관계가 있다. 또한 cytochrome-p450의 억제제인 SKF-525A 전처치한 후 DMF 투여한 군의 산소소모율과 디메틸포름아미드만 투여한 군의 산소소모율을 비교해 본 결과, DMF만 투여한 군에서는 증가하는 산소소모율이 SKF-525A에 의해 전처치한 군에서 억제되었다. 이는 Palmen 등(1993)이 cimetidine을 이용하여 DMF의 cytochrome-p450 의존하여 탈메틸화되는 과정

을 억제하였다고 보고한 결과와 일치하였다. 이는 DMF가 cytochrome p-450과 연관되어 산소 분자와 NADPH (reduced nicotinamide diphosphate)를 사용하여 다른 대사산물로 대사되기 때문이라고 추측할 수 있다.

DMF의 간독성 작용을 보기 위해 이 연구에서는 관류액내의 간기능을 반영하는 효소들을 측정하였다. 디메틸포름아미드의 경우에 간독성을 보기 위해 적출간 관류 모델을 적용한 예는 없지만, 다른 독성 물질을 적용한 예는 여러 연구가 있다. Rasenack 등(1980)과 Neuman 등(1985)은 간독성을 보기 위해 관류액내 AST, ALT, LDH 등의 간기능 효소 및 다른 지표를 각각 활용한 바 있으며, Strubelt 등(1996)도 수은, 카드뮴, 구리의 간독성을 보기 위해 유속, 담즙 분비 등을 관찰하고, 관류액 내 LDH 및 ATP 농도를 측정하였다. 위 연구들은 서로 다른 물질을 다루고 있어서 그 결과를 비교할 수 없지만, 독성작용을 보는데 관류속도 혹은 간기능 효소치를 이용한 공통점을 지니고 있다. 그 결과는 대조군의 경우 간독성의 지표의 변화를 보이지는 않지만, 독성물질은 유속 및 간기능 효소의 변화가 현저함을 보고하고 있다. 본 연구 결과 AST, ALT, LDH의 변화를 동시에 측정한 결과 DMF의 경우 60분을 전후로 하여 증가하기 시작하며, 시간이 흐를수록 현저한 차이를 보였다. 또한 저농도(10 mM) 보다 고농도(25 mM)에서 더 높은 수치를 보여, 농도에 따라 간독성 작용이 있었다. SKF 525A 전처치한 후 DMF 25mM를 투여한 결과를 보면, AST, ALT 및 LDH의 변화는 대조군에 비해 다소 높은 수치를 보이거나 DMF를 단독 투여한 경우보다는 변화의 폭이 작았다. 그런데 SKF 525A는 약물자체의 약리학적 작용은 별로 없고 다만 간장 microsome에 의한 산화대사를 억제한다는 사실(이우주와 김경환, 1993)을 감안해 보면, DMF 단독 투여군에서 현저한 변화를 보이는 간기능 효소치가 SKF 525A 전처치 후 억제되는 것을 볼때, DMF 대사과정과 간 독성사이에는 깊은 관련성이 있는 것으로 추측된다. 이는 Bulke 등(1994)이 DMF와 NMF를 쥐에 동시에 투여할 경우 24시간 안에 NMF가 먼저 독성을 일으키는 현상과 비슷한 결과이다. 그러나 이 결과만으로는 Lundberg 등(1981)과 Bulke 등(1994)의 DMF의 독성작용의

지연효과를 추측하기는 어렵다. 이는 연구의 제한점으로 적출간관류 모델로 시간을 2시간 이상 설정하기에 무리가 있기 때문이다. 그러나 생체실험(*in vivo*)과는 달리 간에 직접 DMF를 투여하여 간의 대사과정 및 독성작용을 동시에 확인해 볼 수 있으므로, 독성이 용량과 관련되어 있다는 가설과 함께, 적출간에서 DMF가 대사되면서 산소소모율이 증가하는 현상과 관련하여 DMF 독성작용이 대사물질을 매개로 이루어진다는 가설을 뒷받침한다고 볼 수 있다. 앞으로 생체실험과 함께 본 연구의 제한점을 보완한다면 더욱 의미있는 결과를 확인할 수 있으리라 생각된다.

## V. 결 론

적출간 관류법을 적용하여, 직접 간에 디메틸포름아미드를 투여하여 대사과정을 관찰하고, 간에 미치는 영향을 알아보고자 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 적출간을 통해 관류한 DMF 25mM은 시간에 따라 관류액내 DMF 농도가 감소하였고, NMF가 1.16mM이 검출되어 DMF 투여 농도의 4.6%가 대사되었다.
2. 관류 시간에 따라 산소소모율은 DMF 농도에 따라 비례하여 증가하였고, DMF 25mM의 경우 가장 높은 산소소모율을 보였다.
3. DMF 투여 후 관류 초기에는 관류속도의 변화가 없다가 관류 20분 전후로 관류속도가 다소 감소하였다.
4. cytochrome p-450 억제제인 SKF-525A 300 uM을 전처치 한 후 DMF 25mM을 투여한 결과, 산소소모율의 증가가 억제되었다.
6. DMF의 간 독성작용을 적출간 관류를 통해 평가해 본 결과, 대조군에 비해 DMF 농도에 따라 AST, ALT, LDH가 증가하였다.
7. SKF 525A 전처치는 DMF에 의한 AST, ALT, LDH 증가를 억제시켰다.

이와같은 실험결과로 볼 때 DMF는 간에서 대사되며, 대사과정 중 cytochrome p-450에 의한 산화반응이 관여함을 확인하였다. 또한 DMF투여후 점

차 간독성지표가 증가하고, 이는 농도에 비례하며, SKF 525A 전처치후에는 이런 독성작용이 억제되는 것을 알 수 있었다. 그러나 DMF가 다른 대사물질에 미치는 영향 및 독성의 지연 작용을 파악하는 데는 한계가 있었다. 이후 독성학적 접근을 통해 생체실험과 병행할 필요성이 있다.

## REFERENCES

- 강성규, 강재연, 이경용, 정호근. 디메틸포름아미드에 의한 간기능 장애에 관한 연구 대한산업의학회지 1991; 3(1); 58-64
- 김수근, 이수근, 정규철 디메틸포름아미드 폭로가 원인으로 추정되는 전격성 간염 1에 대한산업의학회지 1995; 7(1); 186-190
- 김윤수: 생화학. 제3판. 서울, 의학문화사, 1992, pp 12-1-66
- 이우주, 김경환: 약동학. 홍사석 엮음: 이우주의 약리학 강의. 제3판. 서울, 선일문화사, 1993, pp 49-57
- 정호근, 강성규, 이경용, 강재연. 디메틸포름아미드 취급 근로자의 생물학적 대사물질 측정에 관한 연구 대한산업의학회지 1992; 4(2); 144-150
- 특수건강진단기술협의회, 작업환경측정기술협의회. 유가용제 건강진단의 길잡이 1995 ; 234-236
- Barnes JR, Ranta KE: The Metabolism of dimethylformamide and dimethylacetamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 23: 271-276.
- Bergmeyer HU, Hoder M, Rej R: Internatioal Federation of Clinical Chemistry(IFCC) Scientific Commitee, Analytical Section: Approved recommendation (1985) on IFCC methods measurement of catalytic concentration of enzymes. part 2. IFCC method for aspatate aminotransferase. *J Clin Chem Biochem* 1986; 24(7): 497-510
- Bergmeyer HU, Hoder M, Rej R: Internatioal Federation of Clinical Chemistry(IFCC) Scientific Commitee, Analytical Section: Approved recommendation (1985) on IFCC methods measurement of catalytic concentration of enzymes. part 3. IFCC method for alanine transferase. *J Clin Chem Biochem* 1986; 24(7): 481-495.
- Bernard C: On the mechanism of formation of sugar in the liver. *Comptes Rendus Academie Sciences* 1855; 41:461. Translated by Dancyger F, Gabriel ML. In: Great experiments in biology, edited by Gabriel ML and S Fogel, 1955, Prentice-Hall, p 93-97
- Brindley C, Gescher A, Ross D: Studies of the metabolism of dimethylformamide in mice. *Chem Biol Interact* 1983; 45: 387-392.
- Bulcke MV, Rosseel MT, Wijnants P, Buylaert W, Belpaire FM: Metabolism and hepatotoxicity of N,N-dimethylformamide, N-hydroxymethyl-N-Methylformamide, and N-methylformamide in the rat. *Arch Toxicol* 1994; 68: 291-295.
- Carlson RP, Lefer AM: Hepatic cell integrity in hypodynamic states. *Am J Physiol* 1976; 231 (5): 1408-1413.
- Chieli E, Saviozzi M, Menicagli S, Branca T, Gervasi PG: Hepatotoxicity and P-450 2E1 dependent metabolic oxidation of N,N dimethylformamide in rat and mice. *Arch Toxicol* 1995; 69(3): 165-170.
- Clayton JW, Barenes JR, Hood DB, Schepers GWH: The inhalation toxicity of dimethylformamide(DMF). *Am Ind Hyg Assoc J* 1963; 24: 144-154.
- Cooksey PG, Gate EN, Gescher A, Hickman JA, Langdon SP, Stevens MFG: The formation and metabolism of N-hydroxymethyl compounds. IV. Cytotoxicity and antitumor activity of N-hydroxymethylformamide, a putative metabolite of N-methylformamide. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 3037-3043.
- Ducatman AM, Conwill D, Crawl J: Germ cell tumors of the testicle among aircraft repairment. *J Urol* 1986; 136: 834-835.
- Gores GJ, Kost LJ, LaRusso NF: The Isolated Perfused Rat Liver; Conceptual and Practical Considerations. *Hepatology* 1988; 6(3): 511.
- Horn HJ: Toxicology of dimethylformamide. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1961; 3: 12-24.
- Imazu K, Fujjishiro K, Inoue N: Effect of dimethylformamide on hepatic microsomal monooxygenase system and glutathion metabolism in rats. *Toxicology* 1992; 72(1): 41-50.
- Kestell P, Gill MH, Threadgill MD, Gescher A, Howarth OW, Curzon EH: Identification by proton NMR of N-(Hydroxymetyl)-N-methylformamide as the major urinary metabolite of N,N-dimethylformamide in mice. *Life Sci* 1986; 38: 719-724.
- Kestell P, Threadgill MD, Gescher A, Gledhill AP, Shaw AJ, Farmer PB: An investigation of the relationship between the hepatotoxicity and the metabolism of N-alkylformamides. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 240(1): 265-270.

- Kimmerle G, Eben A: Metabolism studies of N,N-dimethylformamide. II. Studies in persons. *Int Arch Arbeitsmed* 1975; 34: 127-136.
- Lareo AC, Perico A, Bavazzano P, Soave C, Perbellini L: Biological monitoring of workers exposed to N,N-demethylformamide I. Method of analysis. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 67: 41-46.
- Lee JW: Role of extracellular ATP in hepatic hemodynamics and glucoregulation (Thesis). Chicago, Loyola University of Chicago, 1985
- Lee JW, Filkins JP: Exogenous ATP and Hepatic Hemodynamics in the Perfused Rat Liver. *Circ Shock* 1988; 24: 99-110.
- Lunderberg I, Lunderberg S, Kronevi T: Some observations on dimethylformamide hepatotoxicity. *Toxicology* 1981; 22: 1-7.
- Massman W: Toxicological investigation on dimethylformamide. *Br J Ind Med* 1956; 13: 51-54.
- Mraz J, Cross H, Gescher A, Threadgill MD, Flek J: Differences between rodents and humans in the metabolic toxification of N,N-dimethylformamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 98(3): 507.
- Mraz J, Nohova H: Absorption, metabolism and elimination of N,N-dimethylformamide in humans. *Int Arch Occup Environ Health* 1992; 64: 85-92.
- Mraz J, Jheeta P, Gescher A, Hyland R, Thummel K, Threadgill MD: Investigation of the mechanistic basis of N,N-dimethylformamide toxicity. Metabolism of N,N-dimethylformamide and its denaturated isotopomers by cytochrome p-450 2E1. *Chem Res Toxicol* 1993; 6(2): 197-207.
- Neuman MG, Eshchar J, Cotariu D, Ben-Sason R, Ziv E, Bar-on H, Ishay JS: Hepatotoxicity of Hornet's venom sac extract in isolated perfused rat liver. *Acta Pharmacol Toxicol* 1985; 56: 133-138.
- Palmen NGM, Evelo CTA, Borm PJA, Henderson PTh: Toxicokinetics of dimethylacetamide(DMAC) in rat isolated perfused liver. *Hum Exp Toxicol* 12: 27-135, 1993
- Pearson PG, Slatter JG, Rashed MS, Han DH, Baillie TA: Carbamoylation of peptides and proteins in vitro by S-(N-methylcarbamoyl) glutathione and S-(N-methylcabamoyl)-cysteine, two electrophilic S-linked conjugates of methylisocyanate. *Chem Res Toxicol* 1991; 4: 436-444.
- Rasenack J, Koch HK, Nowack J, Lesch R, Decken K: Hepatotoxicity of D-Galactosamine in the isolated perfused rat liver. *Exp Mol Pathol* 1980; 32: 264-275.
- Redlich CA, Beckett WS, Sparer J, Barwick KW, Riely CA: Liver disease associated with occupational exposure to the solvent dimethylformamide. *Ann Intern Med* 1988; 108: 680-686.
- Rojenberg J: Solvent. Ladou J, eds: *Occupational Medicine*. Connecticut, Prentice Hall, 1990, pp 385-386
- Sakai T, Kageyama H, Araki T, Yosida T, Kuribayashi T, Masuyama Y: Biological monitoring of workers exposed to N,N-dimethylformamide by determination of the urinary metabolites, N-methylformamide and N-acetyl-S-(N-methylcarbamoyl) cysteine. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 67: 125-129.
- Scailteur V, de Hoffmann E, Buchet JP, Lawerys RR: Study on in vivo and in vitro metabolism of dimethylformamide in male and female rats. *Toxicology* 1984; 29(3): 221.
- Strubelt O, Kremer J, Tilse A, Keogh J, Pentz R, Younes M: Comparative studies on the toxicity of mercury, cadmium, and copper toward the isolated perfused rat liver. *J Toxicol Environ Health* 1996; 47: 267-283.
- Thurman RG, Scholz O: Mixed function oxidation in perfused rat liver The Effect of aminopyrine on oxygen uptake. *European J. Biochem* 1969; 10: 459-467.
- Wang JD, Lai MY, Chen JS, LinJM, Chiang JR, Shan SJ, Chang WS: Dimethylformamide induced liver damage among synthetic leather workers. *Arch Environ Health* 1991; 46: 161.
- Whitby H, Gescher A, Levy L: An investigation of the mechanisms of hepatotoxicity of the antitumor agent N-methylformamide in the rat. *Drug Metab Dispos* 1984; 14: 746-749.
- Wiles JS, Narcisse JK: The acute toxicity of dimethylamide in several animal species. *Am Ind Hyg Assoc J* 1971; 32: 539-545.