

Microsomal Cytochrome P-450 등위효소에 의해 촉매되는 산화반응

박 기 현

한국인삼연조연구소

1. 머리 말

이 총설은 cytochrome P-450의 일반적인 특성과 이에 따른 여러 물질의 대사 특성들을 간단히 정리한 것이다. 또한 cytochrome P-450의 기질 및 이물질 첨가에 의한 스펙트럼변화의 특성에 관해 현재까지 보고된 내용을 요약했으며 flavonoids 화합물의 특성과 이에 의한 cytochrome P-450의 활성억제에 관해 기술하였다.

이 총설은 또 본인이 앞서 발표한 「Cytochrome P-450 isoenzymes에 대한 최근의 연구동향」(화학과 공업의 진보(1985), 25(7), 497, 대한화학회 발행)과 「Microsomal Cytochrome P-450s의 특이성」(생화학 총설집(1986), 1, 309, 한국 생화학회 발행)을 보완하는 성격을 지니고 있으므로 관심이 있는 분은 이들 총설을 참고하면 도움이 되지 않을까 생각한다. cytochrome P-450 연구에 국내 학자들의 많은 참여가 있기를 기대한다.

2. P-450의 일반적인 특성과 기질대사

동물체에 많은 약물과 화학물질들의 처리는 간의 cytochrome P-450-dependent monooxygenases(P-450, MOs) 합성을 유도하는데, 적어도

여러 시간이 간의 이와같은 효소농도의 증가를 위해 요구되며 그 시간은 새로운 단백질이 합성되는 시간이다. 그러나 MO system의 유도는 이물질(xenobiotics)대사를 촉진하지만 여러 스테로이드홀몬과 다른 정상적인 체액 구성 성분들의 활성을 감소시킨다.¹⁾

이 효소들은 약물 뿐만 아니라 환경오염 물질 그리고 생체내 여러 기질을 대사하는데, MOs의 이와같은 증가는 생화학적으로 상당한 중요성을 갖고 있으며 생체내의 정상적인 기질과 이물질의 대사를 촉진하는 쪽으로 이끌어 이들 화합물이 변경된 활성을 나타내기 때문이다. 그러나 *in vitro*에서 MO system의 활성도 증가는 효소유도와 달리 활성화 과정이 새로운 효소단백질의 합성에 달려있는 것은 아니다. 그런데 생체내 이물질 산화의 기작이 간의 microsomes(mis)에서 폭넓게 연구되어 왔지만 포유류 중 특히, 흰쥐, 생쥐, 토끼에서 주로 이루어졌다. mis는 동물의 간을 균질화(homogenization)하는 과정 중에 간 세포의 망상조직으로부터 만들어지는데 한 종류 이상의 일종의 핵단백질인 P-450의 등위효소들이 여기에 들어 있어 이들이 이물질 산화에 관여하고 있다. 따라서 P-450에 의한 산화반응 일반적으로 microsomal oxidation이라 말하는데 이때 NADPH와 O₂가 필요하다. ¹⁸O₂와 H₂¹⁸O에 의한 실험에서 산화된 화합물의 산소는 불이

아닌 분자상의 산소에서 유래되며 각각의 산소 분자로부터 두번째 산소는 NADPH에 의해 물로 환원된다는 것을 밝혀낸 후 P-450이 구체적으로 발견되기 전 1957년 Mason²⁾은 이와 같은 효소를 mixed function monooxygenase(MFO)라 분류하였다. 그 후 Estabrook 등³⁾은 MFO가 P-450의존성이며 구조적으로 철에 리간드하는 황원자를 갖고 있음을 관찰하였다. 그리고 P-450은 헤모글로빈의 CO-difference spectrum (헤모글로빈의 CO adduct는 420nm에서 peak를, 450nm에서 trough를 나타냄)과는 반대로 450nm에서 특징적인 최대흡수를, 410nm에서 trough를 나타내는 CO adduct를 형성한다고 보고하였다. Fig.1은 몇가지 조건에서 microsomal P-450의 스펙트럼을 각각 나타낸 것으로 P-450과 P₁-450의 스펙트럼 특성을 Table 1에 요약하였다. 그러나 이들 효소는 동물조직 뿐만아니라, 식물, 미생물에도 널리 분포되어 있으며 multigene family인 것으로 밝혀졌다. 이의 주된 기능

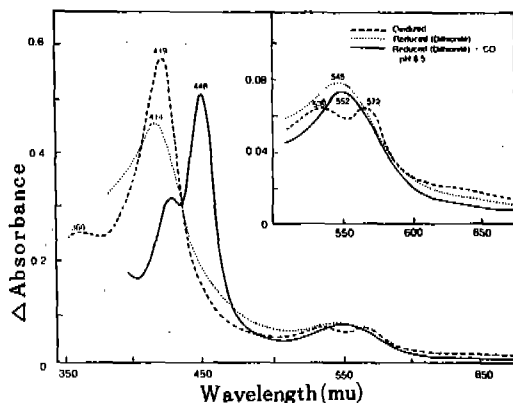


Fig. 1. Absolute spectra of solubilized microsomal P-450 hemoprotein(cytochrome P₁-450) from of rats treated with 3-methylcholanthrene. The hemoprotein was solubilized by treating microsomes with Triton N-101 and fractionating the supernatant on a DEAE cellulose column. The preparation was free of cytochrome b₅, but contained a small amount of P-420 hemoprotein.

----- Oxidized
 Reduced(Dithionite)
 ——— Reduced(Dithionite) · CO pH 6.5

Table 1. Absorption peaks and molar extinction coefficients of absolute spectra of soluble cytochromes P-450 and P₁-450^a

Conditions	Cytochrome P-450 ^b		Cytochrome P ₁ 450 ^c	
	max(mu)	(mM ⁻¹ cm ⁻¹)	max(mu)	(mM ⁻¹ cm ⁻¹)
Oxidized	360	49.2	360	45.7
	Soret 418	104.2	419	120.3
	537	12.9	537	13.5
	568	12.3	568	13.4
Reduced	Soret 418	86.0	414	90.1
	545	14.9	545	16.4
Reduced+ CO	423	65.8	423	60.0
	Soret 450	89.1	448	108.0
	548	13.9	551	15.4

^aThe hemoprotein were solubilized by treating microsomes with Triton N-101 and fractionating the supernatant on a DEAE cellulose column. The preparations were free of cytochrome b₅, but they contained small amounts of P-450.

^bThe preparation contained 3.24 mu moles of P-450 hemoprotein/mg of protein, an increase of 4.3-fold over that contained in the microsomes from which the preparation was obtained. Recovery of hemoprotein was 15.5%.

^cThe preparation contained 4.42mu moles of P-450 hemoprotein/mg of protein, an increase of 3.5-fold over that contained in the microsomes from which the preparation was obtained. Recovery of hemoprotein was 13.9%.

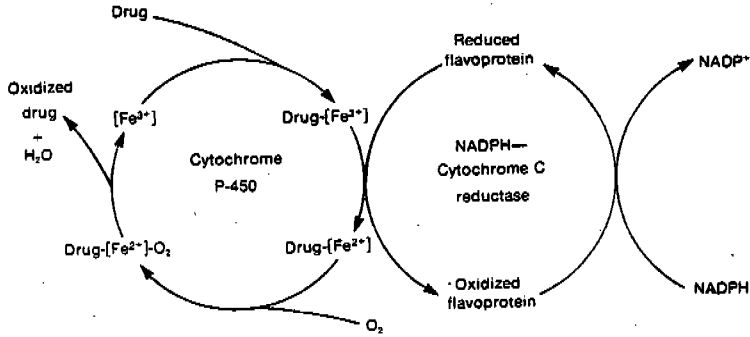


Fig. 2. Electron transport sequence in the cytochrome P-450 system.

은 한 마디로 지질친화성물질 (lipophilic substances)의 monooxygenation이다.^{2,6)} P-450으로 알려진 이와 같은 효소는 환원을 위해 전자전달계가 필요하며 이것은 flavoprotein enzyme, cytochrome c reductase, cytochrome P-450 reductase로 구성되어 있다. P-450에 의해 촉매되는 산화반응은 기질 (RH)로서 약물을 예로 들어 Fig. 2로 설명할 수 있으며 $RH + O_2 + NAD(P)H + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NAD(P)^+$ 로 요약할 수 있다. 즉, 기질 (또는 약물을 포함한 이물질)을 대사하는데 처음 P-450의 oxidized form (ferric)은 간의 미소에서 flavin mononucleotide (FMN)와 flavin adenine dinucleotide (FAD)를 갖고 있는 일종의 flavoprotein (NADPH-P-450-reductase)이 환원된 pyridine nucleotide로부터 cytochrome에 전자를 전달한다. 다시말해 hemoprotein-substrate complex를 형성하기 위해 기질과 상호반응한 후 계속해서 하나의 전자에 의해 환원이 일어나 reduced (ferrous) cytochrome P-450-substrate complex로 된다. 이때의 전자는 NADPH-P-450 reductase에 의해 정상적으로 공여된다. 그러나 NADPH가 없는 상태에서는 MFO에 의한 산화속도가 느리게 일어날 수 있기 때문에 전자들이 변경된 경로를 통해 전달되는 것으로 알려졌다. 즉, 이것은 cytochrome b₅와 NADH-cytochrome b₅ reductase이다. 그 다음 환원된 P-450-substrate complex는 분자상의 산소와 결합하여 불안정한 산화상태로 된다. 이것은 NADPH-P-450 reduct-

ase나 NADH-cytochrome b₅ reductase를 통해 전자를 받아들이고 수산화된 생성물인 산화형 P-450과 불로 분해된다.^{7,8)} 따라서 MFO에 의한 반응으로부터 P-450을 terminal oxidase 또는 monooxygenase라 부르기도 한다. 그런데 P-450 함량이나 NADPH-P-450 reductase의 활성도가 기질의 산화에 관련되는 것은 사실이지만 최근까지의 연구결과로는 이와 같은 반응기작에 대한 설명이 항상 만족할 만한 것은 되지 못한다. 또한 P-450에 의한 이물질 대사의 여러 단계는 각각 제한된 속도를 나타내는 것으로 믿어지나 최종단계 중의 하나인 C-H bond의 분열은 기질산화에서 실로 the rate limiting step인 것 같이 보인다.

Table 2는 P-450 (동위효소)을 유도하는 두 종류의 유도물질에 대한 생화학적인 그리고 약리적인 특성과 이의 차이점⁹⁾을 정리한 것이다.

한편 P-450의 동위효소 중의 b type 유도제인 phenobarbital (PB)은 reductase도 유도하는데 이것은 재구성제에서 P-450 활성을 나타내게 하는 필수성분이기도 하다.¹⁰⁾

그리고 곤충과 포유류로부터 정제된 reductase는 효소 mol 당 FAD와 FMN이 각각 1 mole이 들어있는 약 80,000 daltons를 갖는 하나의 flavoprotein이다.¹¹⁾

1) 간에 의한 약물대사

간은 약물등을 대사하는 가장 중요한 기관이며 동물체의 다른 기관에 있는 효소들은 독특한

기질특이성을 나타내는데 간의 효소는 그렇지 않다.

약물의 대사물은 보통 불활성반응에 의한 것인데 어떤 경우엔 아주 활성이 크며 또한 독성을 나타내기도 한다. 더구나 활성을 나타내는 대사물의 약리적인 활성은 본래의 화합물의 활성과는 아주 다르다. 달리 말해서 어떤 화합물들은 생체에 주사했을 때 불활성을 나타내나 약물대사 효소들에 의해 활성물로 전환되는데 약물대사는 일반적으로 4종류의 반응으로 요약되고 있으며 **oxidation, reduction, hydrolysis, conjugation** 등으로 구분된다.

간의 망상조직에서 약물대사 효소는 P-450 계

로 알려진 MFO이며 약물분자의 지질용해성을 중요한 특성으로 들 수 있다. 왜냐하면 약물은 간세포속에 들어가야 하며 망상조직속에 침투해야 하기 때문이다. 그리고 나서 P-450에 결합한다. 그러나 이 효소는 상당히 비 특이적인 효소계이기 때문에 많은 기질들 사이에서 경쟁적인 억제 가 일어나기도 한다. 때문에 생체에서 대부분의 약물들의 농도는 간의 효소를 최고에 이르게 하기 위한 농도에는 미치지 못한다. 그러므로 P-450기질들 사이의 경쟁은 정상인에서는 문제 될 것이 없다.⁸⁾ 그러나 약물을 대사하는 효소계의 활성도는 신생아에서는 아주 낮기 때문에 신생아에게 지질용해성 약물을 투여하기에는 여러

Table 2. Differences between hepatic effect of phenobarbital and polycyclic hydrocarbons

Characteristic	Phenobarbital	Polycyclic aromatic hydrocarbons
Onset of effects	8-12hr	3-6hr
Time of maximum effect	3-4hr	24hr
Liver enlargement	Marked	Slight
Protein synthesis	Large increase	Small increase
Phospholipid synthesis	Marked increase	No effect
Liver blood flow	Increase	No effect
Ligandin content	Increase	Slight increase
Biliary flow	Increase	No effect
Enzyme components		
Cytochrome P-450	Increase	No effect
Cytochrome P-448	No effect	Increase
NADPH-cytochrome c reductase	Increase	No effect
Substrate specificity		
N-Demethylation of ethylmorphine and meperidine	Increase	No effect
N-Demethylation of 3-methyl-4-methyl-aminobenzene	Increase	Increase
Aliphatic hydroxylation of hexobarbital and pentobarbital	Increase	No effect
Aromatic hydroxylation of benzo(a)pyrene and zoxazolamine	Increase	Large increase
4-Hydroxylation of biphenyl	Increase	Increase
2-Hydroxylation of biphenyl	Slight increase	Increase
Dehalogenation of halothane	Increase	No effect
Glucuronidation of bilirubin	Increase	Increase
Sulfoxidation of chlorpromazine	Increase	No effect

어려움이 따른다.

한편 약물대사 속도는 식이 (diet)에 의해 상당히 영향받는다.^{12,13)} 예를 들면 단식이나 기아상태에서는 hexobarbitone과 chlorpromazine의 산화적인 대사가 억제된다. 반면에 흰쥐의 경우 단백질 첨가한 식이에선 이들 대사가 증가되는데 약 20%의 정상수준에서 약 50%정도 산화를 촉진시킨다. 이것은 microsomal enzymic activity가 증가되었기 때문인데 이와같은 효과는 흰쥐의 female에서 보다 male에서 더 증가된다. 그리고 식이에서 또한 탄수화물 함량은 산화효소의 효과를 조절하는데 중요한 인자이다.¹⁴⁾

2) P-450에 의한 Arachidonic acid 대사

필수지방산의 일종인 arachidonic acid는 P-450에 의해 ω -oxidation과 ω -1 oxidation이 일어나는데 토끼의 경우 간의 미소체는 물론 renal cortex의 미소체와 정제된 renal P-450에 의해 촉매된다.^{15,16)} 이때 생성되는 대사물은 ω -oxidation

으로부터 20-OH-eicosatetraenoic과 eicosatetraenoic-1,20-dionic acids가 생성되고 ω -1 oxidation으로부터 19-OH eicosatetraenoic과 19-oxo eicosatetraenoic이 생성된다. 다른 arachidonic acid의 대사산물들은 PB에 의해 유도된 microsomal P-450 (hepatic 또는 renal)에 의해 생성된다. 이와같은 지방산의 이중결합에서 epoxidation에 의해 생성되는 물질들은 14(15)oxido-, 11(12)oxido-, 8(9)oxido-와 5(6)oxido-eicosatrienoic acid로 생성된 epoxide들은 그 다음 hepatic microsomes분획, renal cortical microsomes분획, cytosol분획, 정제된 microsomal epoxide hydrolase에 의해 좀더 또 다른 diols로 전환될 수 있다.^{16,17)}

최근에 P-450에 의해 대사되는 arachidonic acid는 흰쥐 (Hemle) loop의 ascending limb로부터 분리한 세포에 국한되어 있음이 밝혀졌다.¹⁸⁾

세포에 ¹⁴C-arachidonic acid를 첨가한 후 인큐베이션하면 그동안 많이 연구된 lipoygenase에 의한 생성물과는 전혀 다른 주 생성물을 생성

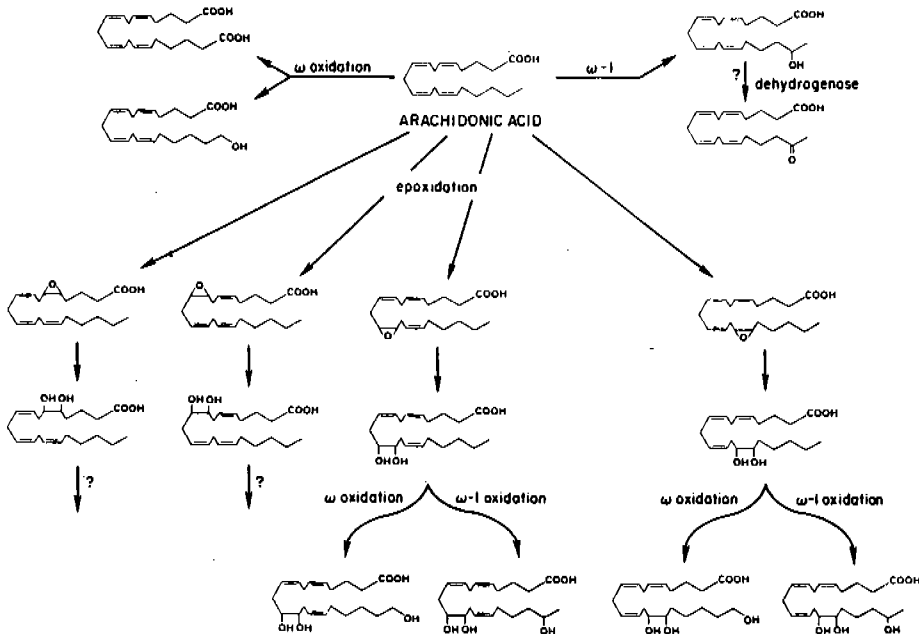


Fig. 3. Metabolic pathways for arachidonic acid through ω , ω -1 oxidation and epoxygenase pathways.

하며 이들의 생성은 indometacin에 의해 억제되고 SKF-525A와 CO에 의해 부분적으로 억제되는 사실은 대사산물이 P-450에 의해 생성된다는 것을 암시하는 것이다. Fig. 3은 P-450에 의한 arachidonic acid의 자세한 대사과정을 단계적으로 나타낸 것이다.¹⁹⁾

3) 콜레스테롤의 대사

콜레스테롤이 스테로이드 홀몬으로 전환되는 과정은 Fig. 4와 같이 C-20과 C-22에서 두 번의 지속적인 MFO에 의한 산화에 의해 결과

지의 산화적인 분해가 먼저 일어나 six-carbon fragment인 isocaproic aldehyde와 pregnenolone을 생성한다.²⁰⁾ 전체적인 반응식은 Fig. 4와 같으며 추가되는 전자 전달체가 flavin과 P-450 사이에 들어 가는 것을 제외하곤 MFO에 의한 수산화반응의 대표적인 반응이라 볼 수 있다. RH라고 표시된 콜레스테롤의 C-20에서 수산화반응이 일어나는데 최종적으로 P-450은 다시 Fe³⁺으로 된다. Fig. 4의 반응식들은 먼저 제시한 P-450에 의한 cycle(Fig.2)에 대하여 각각의 반응단계별로 알기 쉽게 풀어 쓴 것이라 할

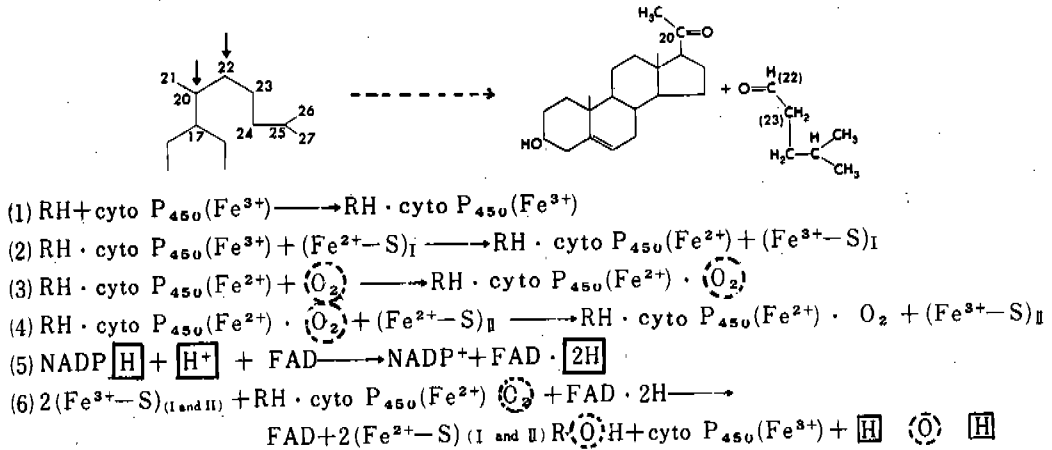


Fig. 4. Conversion of cholesterol to pregnenolone.

수 있다. 어떤든 그 후의 반응은 C-22의 수산화로 위와 같은 메카니즘에 의해 진행되며 pregnenolone과 isocaproic aldehyde를 생성하기 위해 C-20과 C-22 사이에 추가의 산화반응인 분열이 일어난 후 pregnenolone은 progesterone으로 전환된다.

4) 어류에서의 P-450활성도

현재까지 연구된 대부분의 동물에서 간이나 이와 유사한 조직은 약물을 포함한 이물질의 산화를 위해 가장 높은 특이성을 갖는 효소활성도를 나타낸다. 따라서 담수어와 같은 어류의

간 MFO system도 일반동물과 같이 최대 활성을 위해 NADPH와 분자상의 산소를 요구하며 미토콘드리아에서 어떤 활성을 나타낸다 해도 mis에 주로 분포되어 있다. NADH는 연구된 몇 종류의 어류에서 NADPH대신 치환될 수 있는 것으로 알려져 있으나 이 때는 상당히 낮은 활성도를 나타낸다.⁷⁾

Table 3과 같이 P-450은 어류의 간 mis에서 specific content가 보통 0.1~0.5nmole/mg microsomal protein을 나타내며 이것은 흰쥐와 토끼에서 측정되는 함량의 약 절반 수준이다. spiny lobster나 blue crab의 NADPH-P-450

Table 3. Hepatic microsomal cytochrome P-450 content, NADPH-cytochrome c reductase activity, and mixed-function oxidase activities in selected marine species compared with the rat and the rabbit.

Species	Cytochrome P-450 content (nmoles/mg microsomal protein)	NADPH-cytochrome c reductase activity (nmoles product/min/mg protein)	Benzo(a)pyrene		Benzphetamine
			hydroxylase activity (fluorescence units/min/mg protein)	7-Ethoxycoumarin O-deethylase activity (nmoles product/min/mg protein)	N-demethylase activity (nmoles product/min/mg protein)
Rat	1.04	70.0	3.2	-	-
Rabbit	1.52	48.0	5.0	3.5	6.5
Sheepshead	0.29	56.0	3.2	0.19	1.0
Winter flounder	0.17	-	2.5	0.32	0.59
Mullet	0.47	53.0	3.0	0.15	2.78
Stingray	0.43	49.0	0.78	0.08	0.74
Little skate	0.32	60.0	0.17	0.32	1.1
Spiny lobster	0.88	4.6	0.03	< 0.001	0.07
Blue crab	0.18	5.2	< 0.01	< 0.001	0.02

reductase의 활성도는 다른 동물체보다 상당히 낮으나 그 특성은 유사하다. Table 3에 제시한 수치는 사용된 측정방법에서 정확하게 측정될 수 있는 가장 낮은 수치를 나타낸 것이다. 여러 기질에 대하여 MFO측정을 위한 최적조건 (*in vitro*)은 어류에 대해 최적온도 조건이 37°C 보다 일반적으로 낮은 것을 제외하고 흰쥐와 토끼의 분석방법과 같다. 추운지방의 어류에 대한 최적온도는 26°C이며 북해의 것은 30°C, 미국 플로리다 해안에서 잡히는 어류의 경우 35°C이다. 따라서 포유류에서와 같은 온도에서 분석할 경우 효소 활성도가 떨어진다. 그러나 조류의 경우 40°C~43°C에서 가장 강력한 효소 활성도를 나타낸다.²⁰⁾ 따라서 이들 관찰 결과로부터 이물질 산화를 위해서는 동물의 종류에 따라 그 효소활성도의 최적온도가 각각 다름을 알 수 있다.

한편 어류에 의한 이물질대사 연구 (*in vivo*)는 체계적으로 연구된 것이 별로 없다. 방향족과 지방족 탄화수소의 산화적인 대사가 어류에 의해 일어난다는 보고가 있으나 극히 감도가 높은 분석방법이 더욱 요구되고 있다. 지방족과 방향족 탄화수소 그리고 PCB_s의 산화 대사물

들은 보통 포유류에 의한 것보다 어류에 의해 더욱 느리게 배설되고 있다. 대사와 배설의 정도와 그 속도는 물질의 화학구조에 따라 상당한 차이가 있다. 일반적으로 어류는 방향족 탄화수소보다 지방족 탄화수소를 좀 더 빨리 대사하고 배설한다. PCB isomer를 포함하여 방향족 탄화수소들은 대단히 늦게 대사될 뿐더러 또한 배설도 늦다.⁷⁾

3. P-450의 스펙트럼 특성과 이의 변화

다른 핵단백질과 같이 P-450은 가시부분에서 특징적인 흡수를 나타내기 때문에 많은 유기 ligands와 약간의 무기 ligands의 첨가는 스펙트럼의 혼란을 가져온다. 즉, P-450의 기질이나 또는 어떤 이물질들은 효소의 산화형과 상호반응하여 단백질의 특성에 혼란을 일으킴으로써 특징적인 spectral shifts를 나타내어 스펙트럼 변화가 일어난다.²²⁾ 이와 같은 spectral interaction은 어떤 기질의 대사 과정에서 P-450의 작

용에 대한 기준으로 이용되어 왔다.^{10,23-27)} 그러나 P-450이 들어있는 mis의 특별한 상태는 light scattering을 일으키며 이것은 절대성을 나타내는 스펙트럼의 기능적인 파장이기 때문에 그와 같은 변화에 의한 정량적인 측정에는 하나의 sloping baseline 때문에 바람직하지 않다. microsomal cytochrome의 절대성을 나타내는 스펙트럼과 비 특이적인 흡수, light scattering, difference spectrum 등으로 인하여 split-beam spectrophotometer의 양쪽 cuvettes에 mis를 넣으므로써 균형을 잃게 된다. 그 다음 시료 cuvette의 mis에 어떤 ligand를 첨가한 후 일어나는 차이만이 difference spectrum으로 나타난다 (Fig. 5-A). 따라서 이와 같은 사실은 P-450 특성 연구에 중요한 방법으로 사용되고 있으며 Schenkman 등²³⁾에 의해 최초로 시도되었다. 산화된 P-450의 가장 중요한 difference spectra는 Type I인데 385~390nm에서 최대흡수를, 418~427nm에서 trough를 나타내며 여러 약물과, 지방산, 스테로이드를 포함하여 환경 오염물질, 살충제, benzphetamine, aminopyrine, benzo(a) pyrene, hexobarbital, barbiturate, chlorinated hydrocarbons, DDT, DDD, dicofol, chlorpromazine, SKF, 7-ethoxycoumarin 등을 Type I ligands로 들 수 있다. 그러나 DDT는 모든 동물의 mis에서 가장 적은 Type I spectrum을 나타내며 dicofol은 양과 흰쥐 그리고 파리의 mis에서 가장 큰 Type I difference spectrum을 보인다. 그리고 DDD는 생쥐와 토끼의 mis에서 가장 큰 스펙트럼 반응을 보인다.²¹⁾ 이들 물질들은 활성화된 산소와의 상호반응과 흡수 스펙트럼의 혼란, 양쪽 모두가 일어날 정도로 hem iron에 상당히 가깝게 접근되어 있어 단백질의 hydrophobic site에 결합하는 것으로 믿어진다. Type I ligand의 다수가 P-450의 기질일지라도 Km과 Ks(concentration required for half-maximal spectral development) 사이의 정량적인 관계를 표시하기는 어렵다.¹¹⁾ 한편, Type II는 Fig. 5-C와 같이 425~435nm에서 최대흡수를, 390~410nm

에서 trough를 나타낸다. 이에 속하는 물질들은 aniline, nicotinamide, pyridine, ellipticine, metyrapone, octylamine-1, imidazole, 그리고 aliphatic amines 등을 들 수 있다.¹¹⁾ 그리고 어류의 mis에도 aniline 또는 pyridine을 첨가하면 Type II의 스펙트럼변화가 관찰되기도 한다.⁷⁾

이것은 입체적으로 접근할 수 있는 sp² 또는 sp³의 결합되지 않은 전자들과 함께 질소원자를 갖고 있는 유기화합물과 결합되어 있다. 이와 같은 ligands는 자주 MFO 활성도의 억제제로 작용한다.¹¹⁾ 그 이유는 억제제로 작용하는 물질의 산소원자에 있는 비 공유전자쌍이 P-450-Fe(III)의 6번째 배위위치에 결합하여 ligand

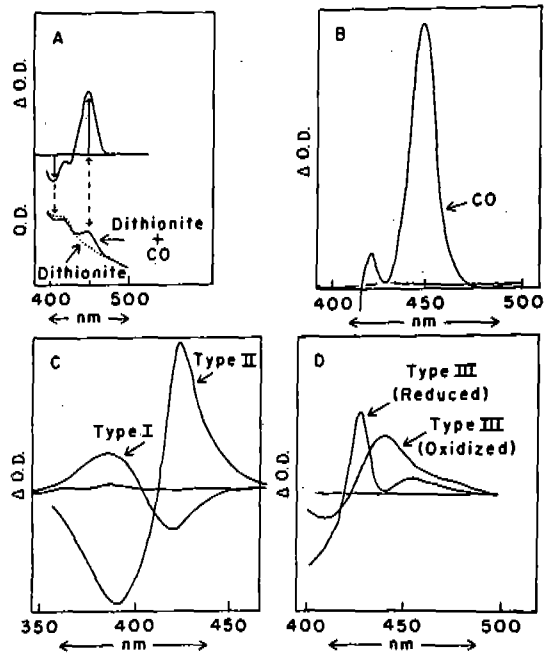


Fig. 5. Spectral characteristics of cytochrome P-450. A. Principle of difference spectroscopy. B. Carbon monoxide-reduced cytochrome P-450 difference spectrum. C. Type I and Type II difference spectra with oxidized cytochrome P-450. D. Type III difference spectra with oxidized and reduced cytochrome P-450.

complex를 변형시키거나 또는 전자전달에 따른 P-450의 산화상태가 변환되는 것으로 부터 야기되는 것으로 추측된다.^{24, 25)}

Fig. 6은 hexobarbital (Type I)과 aniline (Type II)의 스펙트럼 변화를 비교한 것이다.⁴⁾

한편 acetanilide, rotenone, ketones, phenacetin 등에 의해 나타나는 소위 reversed Type I (또는 modified Type II) 스펙트라는 420nm에서 최대흡수를, 385~390nm에서 trough를 유도한다. 이것은 endogenous ligand의 치환 때문인 듯하며 또한 이미 지적한 바와 같이 질소원자에 같은 방법으로 산소가 활성을 나타내는 것이 가능¹¹⁾하기 때문인 것으로 생각된다. 즉, 이것은 hem iron의 6번째 ligand 위치에 상호반응하는 하나의 nucleophile로 볼 수 있다. 환원된 P-450의 가장 중요한 difference spectra는 잘 알려진 CO spectrum인데 이것은 450nm에서 최대흡수를 나타낸다고 먼저 지적한 바 있다. 그런데 Type III 스펙트럼은 430~455nm에서 pH 의존성인 두개의 peak를 나타낸다 (Fig. 5-D). 그러므로 peak가 pH 의존성에 의해 다르게 나타나

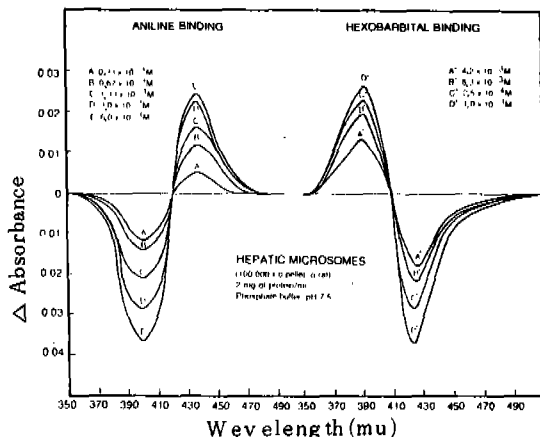


Fig. 6. Type I and type II binding spectra given by different concentrations of typical type I and type II compounds (hexobarbital, type I; aniline, type II)

기 때문에 pH 평형점이 측정될 수 있다. 즉, 나타난 peak들이 같은 크기일 때는 pH가 같다. 이와 같은 기준은 서로 다른 P-450의 특성을 밝히는 데 이용된다.¹¹⁾ Type III ligand로 가장 많이

Table 4. Spectral interactions of insecticides with cytochrome P-450 of mammalian and insect microsomes.

Insecticide	Sheep		Rabbit		Rat		Mouse		Housefly, Fc		Housefly, CSMA	
	Type	Size	Type	Size	Type	Size	Type	Size	Type	Size	Type	Size
Nicotine	II	0.434	II	0.540	II	0.505	II	0.522	II	0.412	II	0.255
Rotenone	a	0.094	a	0.130	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Allethrin	I	0.270	I	0.160	I	0.362	I	0.278	b	0.300	b	0.286
p, p'-DDT	I	0.166	I	0.076	I	0.103	I	0.112	I	0.120	ND	-
TDE	I	0.283	I	0.219	I	0.310	I	0.330	I	0.100	ND	-
Kelthane	I	0.314	I	0.057	I	0.345	I	0.295	I	0.154	ND	-
Carbaryl	I	0.174	c	0.088	I	0.270	I	0.200	I	0.133	ND	-
Baygon	I	0.362	I	0.104	I	0.105	I	0.215	I	0.136	ND	-
Zectran	I	0.261	I	0.171	I	0.200	I	0.103	I	0.115	ND	-
Zinophos	II	0.377	II	0.321	II	0.242	II	0.312	II	0.321	II	0.166
Malathion	I	0.269	I	0.093	I	0.263	I	0.150	I	0.228	ND	-

Symbols: a, absorption minimum at 395nm and maximum at 415nm in sheep or at 417 in rabbit; b, absorption minimum at 445-447nm and maximum 415-418nm; c, Δ A calculated as difference in A at 407 and 427nm; ND, no detectable spectrum formation.

Table 5. Species variation in the components of microsomal electron transport pathways.

Species	Cytochrome P-450 ($\Delta A/\text{mg protein}$)	NADPH-cytochrome c reductase ($\Delta A/5 \text{ min}/\text{mg protein}$)	NADPH oxidase ($\Delta A/5 \text{ min}/\text{mg protein}$)
Mouse	0.09	1.44	0.16
Rat	0.10	1.56	0.14
Rabbit	0.12	1.85	0.14
Guinea pig	0.10	-	-
Pig	0.06	3.32	0.20
Sheep	0.08	0.66	0.03
Chicken	0.02	2.03	0.11
Bobwhite quail	0.03	4.03	0.38
Japanese quail	0.04	3.32	0.23
Turkey	0.03	1.64	0.10
Large mouth bass	0.02	-	-
Drosophila	0.01	0.99	0.16
Tobacco hornworm	0.01	3.69	0.09
Mosquito	-	0.28	0.14
Housefly, CSMA	0.03	2.75	0.22
Housefly, Fc	0.03	3.43	0.35

Table 6. Species variation in microsomal oxidation of xenobiotics *in vitro*.

Substrate oxidation	Rabbit	Rat	Mouse	Guinea pig	Hamster	Chicken	Trout	Frog
Coumarine 7-hydroxylase (nmole/mg/hr)	0.86	0.00	0.00	0.45	-	-	-	-
Biphenyl 4-hydroxylase (nmoles/mg/min)	3.00	1.50	5.70	1.40	3.80	1.70	0.22	1.15
Biphenyl 2-hydroxylase (nmoles/mg/min)	0.00	0.00	2.20	0.00	1.80	0.00	0.00	0.15
2-Methoxybiphenyl demethylase (nmoles/mg liver/hr)	5.20	1.80	3.40	2.20	2.30	2.00	0.60	0.40
4-Methoxybiphenyl demethylase (nmoles/mg liver/hr)	8.00	3.00	3.20	2.30	2.30	1.70	0.40	0.90
p-Nitroanisole, O-demethylase (nmoles/mg/15min)	32.00	4.93	20.33	-	-	11.33	-	-
2-Ethoxybiphenyl deethylase (nmoles/mg liver/hr)	5.30	1.60	1.40	2.10	2.50	1.70	0.60	0.40
4-Ethoxybiphenyl deethylase (nmoles/mg liver/hr)	7.80	2.80	1.80	2.30	1.80	1.50	0.40	0.90
Ethylmorphine N-demethylase (nmoles/mg/min)	4.00	11.60	13.20	5.40	-	-	-	-
Aldrin epoxidase (nmoles/mg/min)	0.34	0.45	3.35	-	-	0.46	0.006	-
Parathion desulfurase (nmoles/mg/min)	2.11	4.19	5.23	8.92	7.75	-	-	-

연구된 물질은 ethylisocyanide인데 이것은 불안정한 상호결합 물질이기 때문에 그 ligand는 쉽

게 치환될 수 있다. 그러나 methylenedioxyphenyl synergists와 SKF-525 A 같은 화합물들은 안정

한 Type III 복합물을 형성하는데 그것은 공유 결합을 하며 MFO에 의한 반응을 억제시키는 메카니즘에 관련되어 있다.¹¹⁾ Table 4는 여러 살충제가 각각의 동물이나 파리의 종에 따라 나타나는 Type I 또는 Type II의 스펙트럼 종류와 이의 크기(size)를 상호비교한 것이다. 유기인제 살충제는 CSMA의 mis에서 측정할 수 없는 difference spectrum을 나타내나 Fc 파리에서는 Type I difference spectrum을 나타낸다. 그리고 생쥐 간의 mis에선 Type II, 흰쥐, 토끼, 양의 간 mis에선 Type I, II의 혼합형 difference spectrum을 보이고 있다.

이상의 여러 Type ligand와는 달리 어떤 기질들의 대사산물들은 환원된 P-450과 복합물을 형성할 수 있으며 이때는 455nm에서 최대흡수가 일어난다.²⁸⁾ 이와 같은 Type의 P-450-metabolite complex는 단지 NADPH존재 하에서 만이 분광학적으로 관찰될 수 있으며 생성물은 이와 같은 복합물 형성을 위하여 필요하다. 이런 Type의 복합물의 관찰은 특이한 반응에 있어서 P-450의 관여에 대한 훌륭한 증거를 제공해 주고 있다. 현재까지의 여러 결과로부터 스펙트럼의 정도(magnitude)와 기질 산화속도 사이에 어떤 관계를 정립하는 데는 실패했으며 기질 또는 이물질 첨가에 의한 스펙트럼 변화가 보통 어떤 화합물과 P-450사이의 상호반응만을 측정하기 때문에 P-450의 촉매적인 역할에 대한 결론은 다른 연구에 의해 수행되어야만 한다. 그리고 모든 동물의 P-450이 같다면 Type II / Type I 결합의 비와 spectral size에서 상호 유사성이 기대되나 그렇지 않은 점으로 미루어 보아 종(species)의 변화는 이런 면에서도 확실하다고 볼 수 있다(Table 4). 이와 같은 사실을 뒷받침할 수 있는 증거²⁹⁾로는 Table 5에서 보는 바와 같이 곤충과 고등동물에 이르기까지 P-450 함량이나 NADPH-cytochrome c reductase의 활성도 등을 상호 비교한 결과와 Table 6과 같이 각각의 동물들에 의한 기질 또는 이물질 산화정도를 관찰한 결과 만으로도 명백하다

고 하겠다.²¹⁾ 이상의 결과들은 또한 각 동물의 P-450특성을 연구하는 데에도 좋은 자료로 활용될 수 있으리라 생각된다.

4. Flavonoids의 특성과 P-450동위 효소 활성도에 미치는 영향

1) Flavonoids의 특성

flavonoids는 자연에 널리 존재하는 식물성분 중의 하나로 채소와 같은 식품을 통해 우리는 항상 섭취하고 있다. 이들 물질의 생물학적 활성도의 여러 관점은 그동안 상당한 관심의 대상이 되어 왔으며 이에는 P-450활성도를 조절하는 flavonoids의 약리학적 특성에 집중되어 왔다. flavonoids는 coumarin과 유사한 benzo-*r*-pyrone 유도체이며 광합성을 하는 세포에는 대부분 들어 있는, 식물계에서 흔한, 성분으로 알려져 있다. 현재까지 약 500여종의 유도체가 보고되었으며 식품으로 식물체를 먹는 모든 동물은 이에 의해 영향을 받는다고 볼 수 있다. 따라서 수 세기 동안 내과의사에 의해 질병치료 목적으로 flavonoids의 투여가 시도되어 왔다.³⁰⁾

Fig. 7는 자연에 존재하는 주요 flavonoids의 구조를 상호 비교한 것이며, Table 7는 flavone을 기준 물질로 하여 각각의 유도체에 대한 화학 이름을 나열한 것이다. flavonoids는 aglycones, glycosides, methylated derivatives로서 존재하며 flavonoid aglycone 모두는 치환부분으로 벤젠고리(A)를 갖고 있고 2-위치에 phenyl고리(B)를 전달할 수 있는 six-member ring(C)으로 되어 있다. 그리고 flavonoids는 B고리 즉, phenyl고리에서 쉽게 산화되는데³¹⁾ 이때 산소원자가 결합되면서 phenyl고리가 열린다. 이때의 전기화학적 전위는 측정되지 않았으나 이미 알려진 반응 대상물의 전위로부터 산출될 수 있다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 벤젠고리와 결합되어 있는 benzenoid에서 치환부분의 위치는 flavonoids(2-위치)와 isoflavonoids(3-위치)로 이들로부터 flavonoids를 분류하는 기준으로 한다.

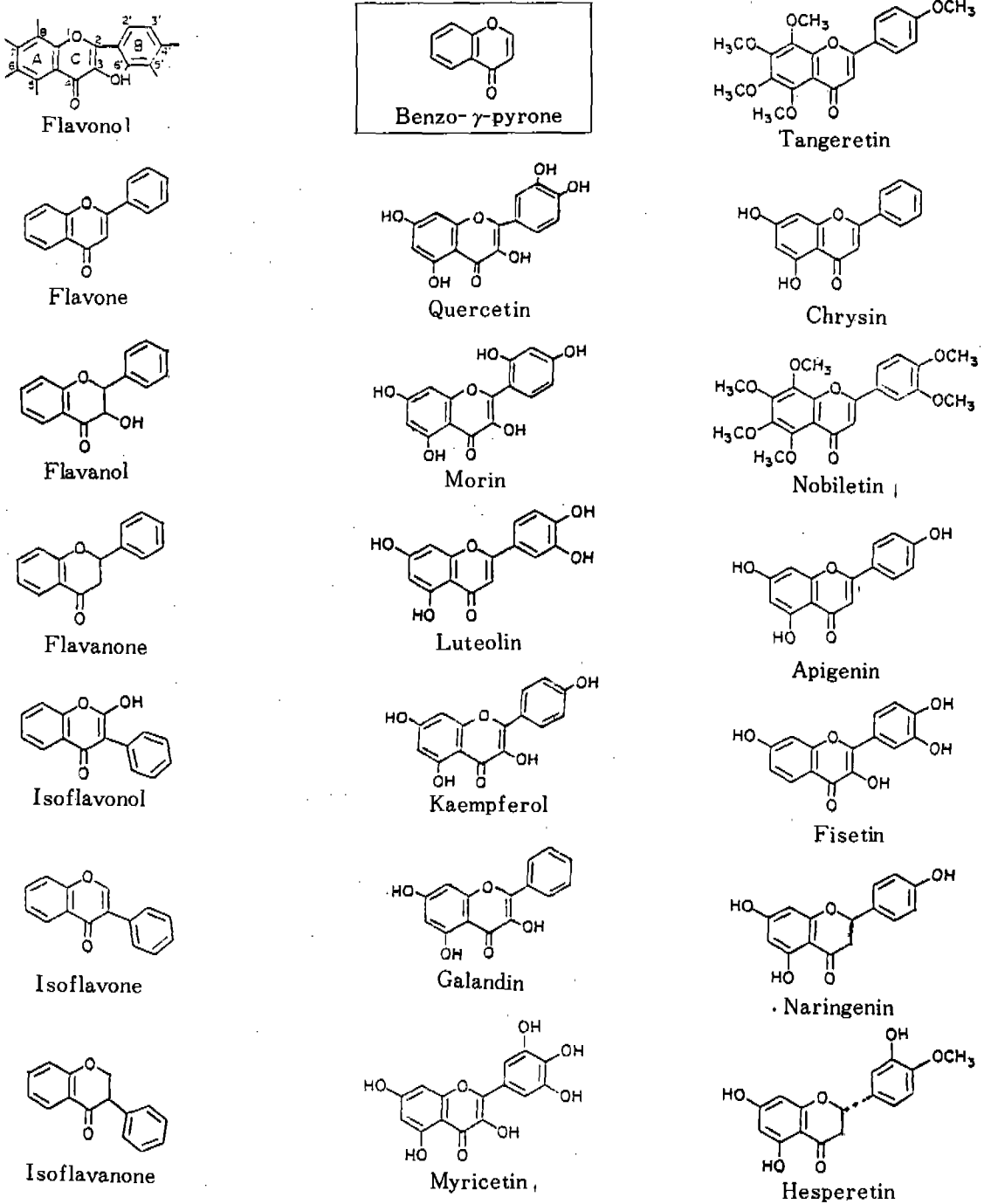


Fig.7. Structures and common names of naturally occurring flavonoids.

Table 7. Naturally occurring flavonoids.

Common name	Chemical name
Apigenin	4', 5, 7-Trihydroxyflavone
Chrysin	5, 7-Dihydroxyflavone
Fisetin	3, 3', 4', 7-Tetrahydroxyflavone
Flavanone	2, 3-Dihydroflavone
Galangin	3, 5, 7-Trihydroxyflavone
Hesperetin	3', 5, 7-Trihydroxy-4'-methoxyflavanone
Kaempferol	3, 4', 5, 7-Tetrahydroxyflavone
Morin	2', 3, 4', 5, 7-Pentahydroxyflavone
Myricetin	3, 3', 4', 5, 5', 7-Hexahydroxyflavone
Naringenin	4', 5, 7-Trihydroxyflavanone
Nobiletin	5, 6, 7, 8, 3', 4'-Hexamethoxyflavone
Quercetin	3, 3', 4', 5, 7-Pentahydroxyflavone
Tangeretin	5, 6, 7, 8, 4'-Pentamethoxyflavone

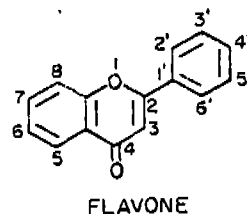


Table 8. Common, naturally occurring flavonoids.

Name	Class	R ₂	R ₃	R ₇	R _{2'}	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	Fluorescence*	Abbreviation
Quercetin	Flavonol	OH	OH	OH	H	OH	OH	H	Yellow-orange	Q
Quercitrin	Flavonol	O-rh	OH	OH	H	OH	OH	H	Orange	Q-3-rh
Myricitrin	Flavonol	O-rh	OH	OH	H	OH	OH	H		
Luteolin	Flavone	H	OH	OH	H	OH	OH	H		
Kaempferol	Flavonol	OH	OH	OH	H	H	OH	H	Orange	K
Apigenin	Flavone	H	OH	OH	H	H	OH	H		
Rutin	Flavonol	O-rh	OH	OH	H	OH	OH	H	Yellow-orange	Q-3-rh-gluc
Hesperetin	Flavanol	H	OH	OH	H	OH	O-me	H		
Eriodictyol	Flavonol	H	OH	OH	H	OH	OH	H		
Hesperidin	Flavonol	H	OH	O-rut	H	OH	O-me	H		
Chrysin	Flavone	H	OH	OH	H	H	H	H	Orange	
Techtochrysin	Flavone	H	OH	O-me	H	H	H	H		
Silybin	Flavonol	OH	OH	OH	H	H	O-lign-O	H		
Morin	Flavonol	OH	OH	OH	OH	H	OH	H		
Naringen	Flavanone	H	OH	OH	H	H	OH	H	Blue-grey	
Taxifolin	Flavonol	OH	OH	OH	H	OH	OH	H	Orange	
Pinocembrin	Flavanone	H	OH	OH	H	H	H	H		
Galangin	Flavonol	OH	OH	OH	H	H	H	H		
Robinin	Flavonol	O-gal-rh	OH	OH	H	H	OH	H	Yellow-grey	K-3-rh-gal-7-rh
Diosmetin	Flavone	H	OH	OH	H	OH	O-me	H		
Kaempferide	Flavonol	OH	OH	OH	H	H	O-me	H		
Fisetin	Flavonol	OH	H	OH	H	OH	OH	H		
Rhamnetin	Flavonol	OH	OH	O-me	H	OH	OH	H		

*The colour changes on methylation.

rh=rhamnoside, gal=galactose, lign=lignan, rut=rutside, me=methyl, gluc=glucose.

flavonols는 3-위치에 수산기가 있으며 C₂~C₃ 이중결합으로 되어 있어 flavanones와는 다르다. 그러나 flavonoids는 3, 5, 7과 3', 4', 5'의 위치에서 가끔 수산화반응이 일어난다. glycoside가 형성될때 glycosidic linkage는 3 또는 7-위치에서 일어나는 것이 정상적이며 이때의 당은 L-rhamnose, D-glucose, glucorhamnose, galactose, arabinose 중 어느 하나이다.³⁰⁾ Table 8은 flavonoids 화학구조를 표로 정리하여 생체에 대한 활성 연구에 상호비교할 수 있도록한 것이다. flavonoids는 화학구조상 nucleosides, isooaloxazine, folic acid와 유사하며 이와 같은 유사성은 그들의 생리적인 활성에 대한 현재의 수많은 가설의 기초를 이루고 있다.³⁰⁾ 그런데 이들의 화학적인 높은 반응성은 free radical을 제거할 수 있는 그리고 전자전달을 촉진시킬수 있는 능력^{32~36)}에서와 같이 중금속이온과 생물학적인 고분자^{37, 54)}에 대한 그들의 binding affinity로서 표시된다.

flavonoids에 의해 효소활성도가 억제된다는 많은 보고가 있으나 그 효소들은 aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)^{38~40)}를 비롯한 수 십종의 효소에 이르며 flavonoids에 의한 효소활성화는 단지 proline hydroxylase의 경우만이 알려졌다.³⁰⁾ 그러나 후자의 효과는 active site의 안

정화나 또는 acid/base catalysis인 allosteric mechanism에 의한 것 보다는 오히려 flavonoids의 전기화학적인 전위에 기인되는 것으로 생각된다.

flavonoids에 의해 영향받는 여러 효소들은 분명히 flavonoids 분자의 서로 다른 부분과 결합하며³⁰⁾ 이와같은 예는 Table 9와 같다. 또한 flavonoids는 Cu⁺⁺, Zn⁺⁺와 같은 2가 이온의 중금속에 대해 강력한 친화력을 나타낸다.

flavonoids의 화학구조적인 특성과 전자적인 특성 그리고 수산기 치환 위치 등은 flavonoids가 네번째의 전이원소에 대하여 d₃-electron을 위한 ligand를 형성할 수도 있다는 것을 시사한다.³⁰⁾ 그리고 이미 지적한 바와 같이 free radical의 강한 scavenger로서 평가되기도 하며 또한 free radical을 생성하는 여러반응을 촉매하는 중금속과의 결합으로부터 이들 생성을 억제할 수도 있다. 한편 몇 종류의 flavonoids는 Ames test^{41~45)}에서 그리고 포유류 동물세포^{46, 47)}에서 돌연변이를 나타내는 것으로 증명되었으나 유사한 물질에 의해 나타나는 것보다 그 정도는 상당히 약한 것이다. 그중에서도 quercetin과 kaempferol은 가장 높은 돌연변이 활성을 나타냈으며 특히 흰쥐의 urinary bladder와 장에서 quercetin의 발암성이 관찰되었음에도⁴⁸⁾

Table 9. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency.

Enzyme	Part of flavonoid molecule likely to interact with enzyme
β -Glucuronidase	Carbohydrate
β -Galacturonidase	Carbohydrate
Hyaluronidase	Carbohydrate
Alkaline phosphatase	Phenyl ring
Arylsulphatase	Phenyl ring or benzopyrone ring
DOPA decarboxylase	Phenyl ring
Lipases	Phenol (Me ²⁺ chelator)
ATPases	Benzopyrone ring
c-AMP phosphodiesterase	Benzopyrone ring
Catechol-O-methyltransferase	Phenyl ring
Aryl hydroxylase	Benzopyrone ring
Aldose reductase	Benzopyrone ring
Proline hydroxylase	Benzopyrone ring

생쥐, 흰쥐, hamster에서는 quercetin의 발암성이 관찰되지 않는다^{49,50)}

이와같이 돌연변이를 유발하는 물질이 어떻게 해서 발암물질이 아닐지도 모른다는 설명은 아직 부족하다. 그러나 quercetin이 상당한 initiation activity를 갖는것은 가능하지만 tumor promoting activity는 거의 없다. 반면 전형적인 발암물질은 양쪽의 성질을 다 갖고 있다.⁵¹⁾ 더구나 flavonoids는 일반적으로 발암물질의 전구물질이 발암성물질로 전환되는 것을 억제⁵²⁾ 하는 것으로 알려졌으며 특히 quercetin은 p-dimethylaminoazobenzene의 발암성을 억제한다.⁵³⁾ 만일 돌연변이 유발효과가 있다면 그것은 DNA의 염기사이에 benzopyrone system의 삽입으로 나타나는 듯하며 flavonoids와 핵산의 유사성으로 기인되는 것으로 생각된다. 그러나 Ames test에 대한 positive 결과는 동물에서 나타나는 oncog-

enesis이외의 결과들에 대한 새로운 특징일 뿐이기 때문에 실제의 돌연변이와 정상적인 유전자의 억제사이를 구분할 수는 없다. 이와같은 예로서 적당량(1 gr <day (adult patient)의 flavonoids 투여는 어떤 이상을 나타낼 수 있는 side effect가 전혀 관찰되지 않았다.⁵⁴⁾ 질병을 치료하기 위한 flavonoids의 사용은 화학이란 학문이 생긴것보다 더 오래되기 때문에 상당히 폭넓게 경험에 의해 사용되어 왔다. 그러나 최근까지도 flavonoids에 관한 생화학 또는 약리학분야에서 우리가 알고있는 지식은 이들 물질을 의학적인 면에서 합리적으로 적용하기에는 아직 부족하다는 점이다. 그러나 어떤 질병에 치료의 목적으로 flavonoids가 사용된 임상적인 경험은 지금까지 아주 제한된 범위내에서 이루어졌으며 flavonoids가 사용되었다 하더라도 그것은 봉랍(propolis)과 같이 다른 천연물질과의 혼합물

Table 10. Diseases treated with flavonoids.

Disease	Target	Flavonoids	Result proven
Inflammation	PG synthesis	Quercetin etc.	Local pain relieved; body temp normalized
Diabetes mellitus	Aldose reductase	Quercetin etc.	Pressure in eye reduced
Allergy	Capillary wall(PG)	Rutin/citrin	Bleeding ceased
	H ⁺ -ATPase of mast cell	Disodium chromoglycate	Secretion of histamine etc. prevented
		Quercetin etc.	Symptoms disappeared
Headache	PG synthesis	Quercetin etc.	Pain relief
Parodontosis	Capillary wall(PG)	Quercetin etc.	Bleeding ceased; gum tissue normalized
Cancer	(Na ⁺ -K ⁺)ATPase	Quercetin etc.	Cells normalized (only tissue culture tested)
Virus infection	H ⁺ -ATPase of lysosome membrane	Quercetin etc.	Coat removal prevented
Common cold	H ⁺ -ATPase of lysosome membrane	Quercetin etc.	No scientific evidence
Chemical oncogenesis	Aryl hydroxylase Epoxide hydrolase	Quercetin etc.	Only laboratory experiment
Bee sting	PG synthesis	Quercetin etc.	Local pain relieved
Oral surgery	PG synthesis	Quercetin etc.	Local pain relieved
Stomach/duodenal ulcer	PG synthesis	Quercetin etc.	Bleeding stops; pain relief

PG=prostaglandins, thromboxanes and leucotrienes.

이었다.⁵⁵⁾

봉랍에 많은 flavonoids가 들어있다 해도 화분이 존재하기 때문에 알러지 환자에게는 주의가 필요하다. 그러나 이와같은 사실은 어느 flavonoids도 바람직한 효과를 나타내지 않았다는 것을 반드시 의미하는 것은 아니다. Table 10은 질병에 치료효과가 있다고 주장되고 있는, 그리고 어떤 경우엔 증명되기도 한 질병과 사용된 물질들에 대한 생화학적인 설명⁵⁶⁾을 포함하여 정리한 것이다. flavonoids는 AHH와 epoxide hydrolase 두 효소를 유도하는데^{38, 39, 57~58)} AHH는 방향족 화합물의 해독에 필요하고 epoxide 중간체 사물은 가수분해 대신 부가반응을 거쳐 유독물질이 될 수 있어 flavonoids에 의한 AHH유도는 생체의 일방적이 아닌 균형을 이루는 요인이 되어 다시 한번 생체의 오묘함을 생각할 수 있다.

한편 flavonoids는 동물에서 대사되는데 특히 간에서 이루어진다.^{60, 61)} 표지된 flavonoids의 대사물질인 3,5-dihydroxyphenylacetate와 3-hydroxyphenylacetate는 뇨에서 검출되며⁶²⁾ flavonoids의 어느 잔여물도 체내에 축적되지 않는다. flavonoids의 독성은 동물에서 대단히 낮은 편이며 흰쥐에 대한 LD₅₀는 대부분의 flavonoid가 2~10gr/animal로서⁵⁴⁾ 인체에 이와 비슷한 용량의 투여는 실제적인 것이 되지 못하기 때문에 인체의 질병 예방수단으로 flavonoids는 1gr < 1일 (성인 이하의 용량이 권장되어 왔다.³⁰⁾

그러나 flavonoids의 용해성은 상당히 넓은 범위를 나타내기 때문에 피부나 점막표면을 통한 침투와 장으로부터 flavonoids의 흡수비율을 산정하기는 상당히 어렵다.⁶²⁾

bacterial glycosidases가 flavonoids의 aglycones을 유리하므로^{42, 63)} 구강으로 섭취한 flavonoids는 장에서 aglycone의 형태로서 상당히 존재하는 것으로 생각되며 상피조직 속으로 담즙산의 micelles과 함께 흡수되는 것이 틀림없다. 그다음에 혈액속으로, 그리고 문맥을 통해 flavonoids의 주된 부분이 간에 직접적으로 전달되는 듯하며 이곳에서 분해가 일어난다. 혈액의 pl-

asma protein에 특히 강하게 methylation되어 있는 많은 aglycones의 낮은 극성때문에 flavonoids의 친화력에 관련하여 밝혀진 것은 거의 없으나 그들은 serum albumin에 결합³⁰⁾되어 있는 것으로 생각된다.

flavonoids의 이와같은 특이적인 결합특성 때문에, 그리고 가시범위에서 그들의 chromophores 때문에 조직으로부터 이들 화합물의 분리는 어렵지 않으므로 좀 더 pharmacokinetics 연구가 이루어져야 할 줄 안다.

2) Flavonoids가 P-450활성에 미치는 영향

P-450-dependent MOs의 활성화도에 미치는 효과는 천연물질중 flavonoids에 대하여 Conney등에 의해 최근에 집중적으로 연구되고 있으며 본인의 연구실에서도 방법을 달리한 몇가지 연구에서 이들 물질에 의한 활성화도 억제 또는 촉진 연구가 수행되고 있다. 간의 mis에 의한 benzo(a)pyrene(BP)수산화 반응에 대하여 flavonoids중 합성 7,8-benzoflavone(α -naphthoflavone, ANF)활성화 효과는 Wiebel과 Gelboin⁶⁴⁾에 의해 최초로 연구되었으며 신생 흰쥐로부터 분리한 간 mis에 ANF를 첨가하면 BP수산화를 촉진시키지만 대조구(성체)의 흰쥐로부터 분리한 mis에는 거의 효과가 없음을 관찰하였다.

한편 Conney등^{65~67)}은 인체의 간 mis에 ANF를 첨가했을 때(in vitro)BP, BP 7,8-dihydrodiol, BP 9,10-dihydrodiol, aflatoxin B₁, an-

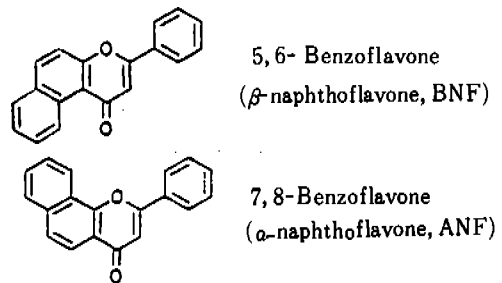


Fig. 8. Synthetic Flavonoids.

tipyrine, zoxazolamine의 대사속도를 증가시키는 것을 발견했으나 7-ethoxycoumarin, coumarin, hexobarbital의 대사에는 별 영향이 없음을 관찰하였다. 따라서 이들 결과는 인체의 간에

는 multiple MOs가 존재하며 천연의 flavonoids는 아니지만 합성 ANF가 MOs의 활성화에 특이성을 갖고 있음을 나타낸 것이다. 그리고 그 후의 연구에서 천연의 flavonoids가 BP 수산화

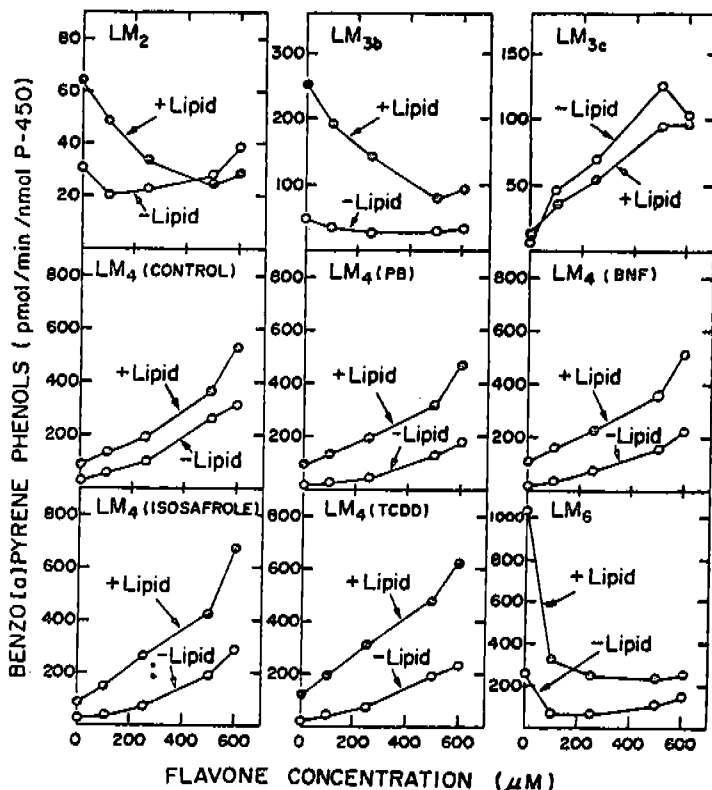


Fig. 9. Effect of flavone on benzo(a)pyrene metabolism by cytochrome P-450 isozymes from rabbit liver microsomes. Two-tenths nmol of cytochrome P-450 was used for all assays except for cytochrome P-450_{LM}, where 0.05 nmol of cytochrome was used. Eight hundred units of NADPH-cytochrome P-450 reductase and 0.5 μmol of NADPH were used for each assay in the reconstituted system. Cytochrome P-450_{LM} from liver microsomes of phenobarbital (PB)-treated rabbits contained 16.8 nmol of cytochrome/mg of protein. Cytochrome P-450_{LM3b} and cytochrome P-450_{LM3c} from liver microsomes of untreated rabbits contained 15.7 nmol of cytochrome and 7.3 nmol of cytochrome/mg of protein, respectively. Cytochrome P-450_{LM} (control) from liver microsomes of untreated rabbits contained 6.5 nmol of cytochrome/mg of protein. Cytochrome P-450_{LM} from liver microsomes of phenobarbital-treated rabbits contained 8.1 nmol of cytochrome/mg of protein. Cytochrome P-450_{LM} from liver microsomes of β-naphthoflavone (BNF)-treated rabbits contained 12 nmol of cytochrome/mg of protein. Cytochrome P-450_{LM} from liver microsomes of isosafrole-treated rabbits contained 7.8 nmol of cytochrome/mg of protein. Cytochrome P-450_{LM} from liver microsomes of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-treated rabbits contained 19.1 nmol of cytochrome/mg of protein. Cytochrome P-450 from liver microsomes of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated rabbits contained 12.8 nmol of cytochrome/mg of protein. ○—○, in the absence of dilauroylphosphatidylcholine; ●—● in the presence of 15 μg of dilauroylphosphatidylcholine.

의 활성화를 촉진하고 인체의 간 mis에 의해 aflatoxin B₁ 2,3-dihydrodiol로, 그리고 돌연변이 물질로 aflatoxin B₁의 대사가 촉진되며⁶⁸⁾ 특히 flavone, tangeretin, nobiletin등이 인체 간의 MOs활성도를 증가시킨다고 보고하였다.

ANF나 또는 flavone은 인체 뿐 아니라 토끼, 햄스타의 간 mis에서 BP수산화반응 (*in vitro*)을 여러 배 촉진시키지만 흰쥐나 guinea pig의 경우에 이와 같은 활성화가 거의 일어나지 않는 것은¹⁰⁾ MFO system이 서로 다르기 때문인 것으로 생각된다. 그리고 ANF와 flavone은 P-450 reductase의 상호반응을 증가시키면서 적어도 부분적으로 간의 mis에서 BP의 수산화를 촉진시킨다.¹⁰⁾ Fig.8은 합성 flavonoids와 상호비교하면 본 내용이 보다 쉽게 이해되리라 생각된다. 그리고 ANF와 BNF는 flavonoids화합물에 대한 생화학적인 활성연구에 때때로 기준물질로 사용되기도 한다.

토끼 간의 mis으로 부터 분리한 5종의 P-450동위효소들의 각각에 대하여 BP가 phenol로 대사되는데 따른 flavone과 ANF의 효과는 이

들을 첨가한 재구성계에서 서로 다른 P-450 동위효소에 의해 BP대사에 대한 높은 특이성을 보인다. 즉, Fig.9에서와 같이 NADPH, P-

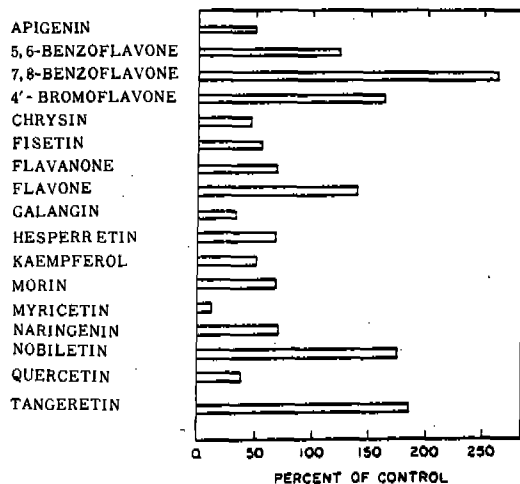


Fig 10. Effect of flavonoids on benzo(a)pyrene hydroxylase activity in human liver microsomes. Liver was obtained from a 60-year-old male Caucasian. The concentration of each compound was 50 μM.

Table 11. Effect of several flavonoids on the metabolism of aflatoxin B₁ to aflatoxin B₁ 2,3-dihydrodiol by human liver microsomes. Liver was obtained from a 63-year-old male Caucasian. Flavonoids were added in 80 μl of anhydrous dimethyl sulfoxide to the 2-ml incubation mixtures. One mg of human liver microsomal protein was used in each assay. Concentrations marked with an asterisk were at or slightly above the limit of solubility in this reaction mixture.

Compound	Concentration (μM)	Aflatoxin B ₁ 2,3-dihydrodiol formed (nmol/15min/mg protein)	% of control
Control	0	0.3	100
Flavone	50	0.7	233
	500	1.4	466
7,8-Benzoflavone	50	2.8	933
	100	2.8	933
Tangeretin	50	0.6	200
	250	0.8	267
	500	0.7	233
Nobiletin	50	0.4	133
	500	0.4	133

450 reductase, dilauroylphosphatidylcholine, P-450 LM_{3c}, (또는 P-450 LM₄)의 재구성제에서 MO system에 600 μM의 flavone 첨가는 BP대사를 5배이상 촉진하였고 P-450 LM₂(또는 P-450 LM_{3b}, P-450 LM₆) 재구성제에선 반대로 억제효과를 나타냈다. 따라서 이들 결과는 flavone에 의한 BP대사가 재구성제에 사용된 P-450 동위효소의 type(isozyme)에 달려 있음을 암시하는 것이다.⁶⁹⁾

한편, 인체의 간 mis에 apigenin, chrysin, fisetin, flavanone, galangin, hesperetin, kaempferol, morin, myricetin, naringenin, quercetin 등의 첨가는 (in vitro) BP의 수산화 반응을 억제 하였으나 flavone, nobiletin, tangeretin, ANF는 같은 조건에서 BP 수산화 반응을 여러 배 증

가 시켰다 (Fig. 10) 그러나 BP 수산화 반응을 증가시키는 이들 물질은 aflatoxin B₁이

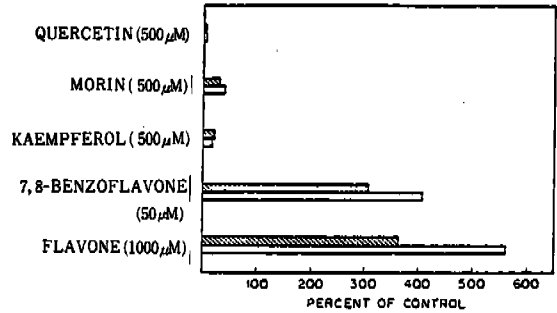


Fig. 11. Effect of flavonoids on the metabolism of [³H]benzo(a)pyrene to total metabolites by human liver microsomes. Liver was obtained from a 75-year-old male Caucasian. ▨, radioactive assay; □, fluorescent assay.

Table 12. Inhibitory effect of flavonoids on cytochrome c reductase in human liver microsomes. Microsomes were prepared from a liver biopsy sample obtained from a 46-year-old male Caucasian, and in each assay, 0.06 mg of microsomal protein was incubated with NADPH and cytochrome c.

Compound	Concentration (μM)	Reduced cytochrome c (nmol/min/mg cytochrome P-450)	% of control
Quercetin	0	39	100
	5	34	87
	10	33	85
	50	22	56
	100	6	15
	500	2	5
Morin	0	45	100
	5	40	89
	10	40	89
	50	37	82
	100	33	73
	500	12	27
Kaempferol	0	41	100
	50	37	90
	100	23	56
	500	14	31
7,8-Benzoflavone	0	39	100
	50	39	100
	100	40	102
	200	38	97
	500	39	100
Flavone	0	39	100
	250	39	100
	500	44	87

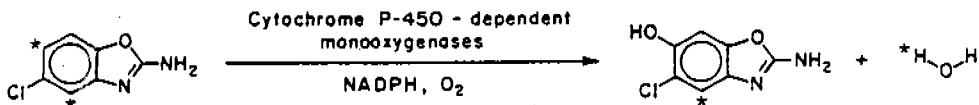


Fig. 12. Metabolism of [4,6-³H]zoxazolamine by microsomal cytochrome P-450 dependent monooxygenase

2,3-dihydroxyafatoxin B₁으로 대사되는 것을 촉진시켰고 aflatoxin B₁이 발암성물질로 활성화되는 것을 증가시켰다 (Table 11). 또한 quercetin, morin, kaempferol은 인체의 간 mis에서 P-450 reductase를 억제시켰으나 반면에 flavone, ANF는 어떤 효과도 없었다 (Table 12). 이들 결과⁵²⁾는 quercetin, morin, kaempferol의 억제효과가 P-450의 환원을 억제하는 것에 의해

적어도 부분적으로 억제되는 것으로 생각된다.

한편 Fig. 11는 ³H-BP 대사에 대한 flavonoids의 효과를 형광분석법과 방사성 분석법으로 각각 측정 한 것으로 형광분석법이 상당히 감도가 예민한 것으로 나타났다.⁵²⁾

*in vitro*에서 microsomal MOs의 activators는 *in vivo*에서도 약물대사가 촉진될 수 있다는 가능성을 Conney 등⁷⁰⁾이 처음으로 보고했는데 이와 같은 model 화합물로서 zoxazolamine을 사용

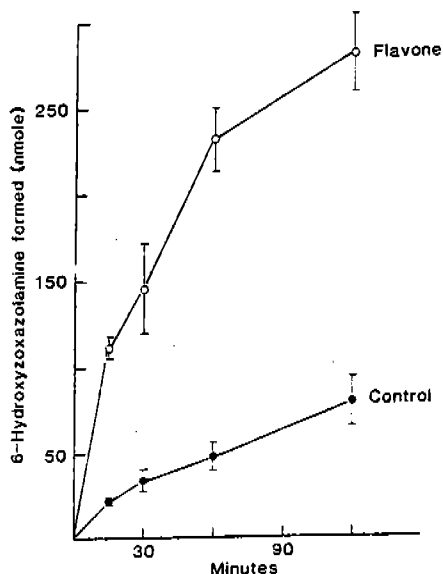


Fig. 13. Time course for the *in vivo* metabolism of zoxazolamine in the presence and absence of flavone. Rats were injected intraperitoneally with 740 nmole of [4,6-³H] zoxazolamine, followed by an injection of 5 μmole of flavone in polyethylene glycol 400 or with polyethylene glycol 400 alone. The animals were killed at the times indicated. Tritiated water was measured and the data are expressed as 6-hydroxyzoxazolamine. Each point represents the mean ± standard error from four animals.

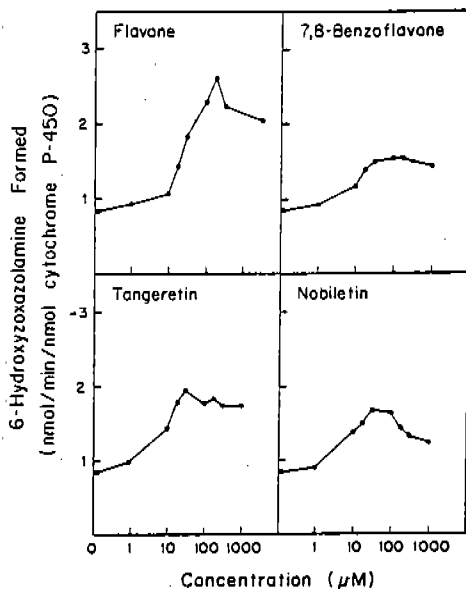


Fig. 14. Stimulatory effect of flavone, tangeretin, nobiletin and 7,8-benzoflavone on the hydroxylation of zoxazolamine by rat liver microsomes. Flavonoids were added to liver microsomes obtained from 5-day-old rats. Formation of tritiated water was measured and the data are expressed as 6-hydroxyzoxazolamine. Each point represents the mean from two separate determinations.

하였다. 이 물질은 치료제로서 현재는 사용되지 않는다 해도 약물산화에 영향을 주는 인자에 대한 연구를 위해 아주 우수한 화합물이다.

zoxazolamine은 Fig. 12와 같이 간의 mis에서 P-450-dependent MO에 의해 6-OH-zoxazolamine으로 대사되는데 근육 이완제로서 중요한 작용을 한다.⁷¹⁻⁷⁴⁾ 신생 흰쥐의 간 mis에 의해 zoxazolamine이 대사되는데 flavone의 첨가는 6-OH-zoxazolamine의 형성을 여러 배로 촉진시켰으며 (*in vitro*) flavone의 i.p. 주사는 zoxazolamine을 계속적으로 투여한 상태에서 흰쥐의 전체 대사

속도를 즉시 증가시켰다 (Table 13, Fig. 13). 이 같은 사실은 *in vitro*에서 간 mis의 MOs의 activator인 이물질이 생체내에서도 산화적인 약물대사를 촉진시킨다는 최초의 관찰 결과이기도 하다. 그후의 연구에서 Conney 등⁷⁵⁾은 합성 flavonoids가 zoxazolamine이 6-OH-zoxazolamine으로 대사되는데 미치는 효과를 비교 검토하였다. 즉, 5일된 흰쥐 (10g)에서 분리한 간 mis에 nobiletin, tangeretin, flavone, ANF 등을 각각 첨가했을 때 zoxazolamine의 대사를 촉진하며 (Fig. 14) flavone은 특히 이의 수산화 반응에 대

Table 13. Dose-response for the stimulation of zoxazolamine hydroxylation by flavone. For *in vitro* studies, flavone was added to liver microsomes obtained from 5-day-old rats. Formation of tritiated water was measured and the data are expressed as 6-hydroxyzoxazolamine. Each point represents the mean \pm standard error from three determinations. For *in vivo* studies, rats were injected intraperitoneally with 740 nmole of [4,6-³H]zoxazolamine, immediately followed by an injection of either flavone in polyethylene glycol 400 or polyethylene glycol 400 alone. The animals were killed 15 minutes later. Tritiated water in homogenates of the whole rats was measured and the data are expressed as 6-hydroxyzoxazolamine. Each point represents the mean \pm standard error from four animals.

<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
Flavone concentration (μ M)	6-Hydroxy-zoxazolamine formed (nmole/min per nmole of cytochrome P-450)	Flavone dose (μ mole per rat)	6-Hydroxy-zoxazolamine formed (nmole/15 min)
0	1.22 \pm 0.01	0	32.4 \pm 2.1
10	1.34 \pm 0.02 *	0.1	34.9 \pm 1.9
25	1.71 \pm 0.03 *	0.25	38.5 \pm 1.0 *
50	2.14 \pm 0.04 *	1.0	56.3 \pm 4.1 *
100	2.91 \pm 0.04 *	2.0	77.9 \pm 13.4 *
250	3.45 \pm 0.14 *	5.0	107.1 \pm 8.7 *
300	3.19 \pm 0.07 *	10.0	98.2 \pm 26.4 *

* Statistically different from controls (P < .05) by Student's t-test.

한 Km과 Vmax 값을 변화시키는 것이 확인되었다 (Fig. 15). 이때 사용된 흰쥐는 Fig. 16와 같이 zoxazolamine의 대사가 신생 흰쥐에서 더 예민하게 대사되기 때문에 선택된 것이다. 또한 740nmol의 zoxazolamine을 전처리한 흰쥐에 flavone, nobiletin, tangeretin, ANF 각각의 5 μ

mol의 i.p. 투여는 6-OH-zoxazolamine으로의 대사를 직접적으로 촉진시켰으며 생체내의 zoxazolamine의 수산화에서 Fig. 17과 같이 5 μ mol의 flavone투여 (i.p.)는 zoxazolamine (740~3000nmol)의 생체내 대사를 3~5배 촉진시켰다. 즉, flavone에 의해 증가되는 정도는 zoxazolamine투

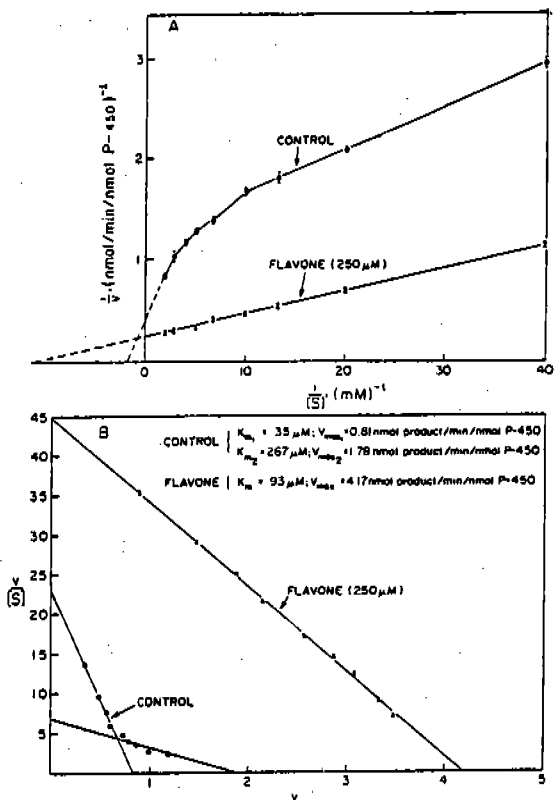


Fig. 15. Effect of varying the zoxazolamine concentration on the flavone-dependent activation of zoxazolamine hydroxylation in rat liver microsomes. Flavone (250 μM) was added to liver microsomes from 5-day-old rats. Formation of tritiated water was measured and initial rates are expressed as nmol 6-hydroxyzoxazolamine formed per minute per nanomole of cytochrome P-450. Each point represents the mean of nine separate determinations. A double reciprocal plot (with S.E. values) is described in A and an Eadie-Scatchard plot is given in B.

여량에 좌우 되었다. flavone은 대조구 또는 PB를 처리한 흰쥐가 사용되었을 때 생체내외에서 zoxazolamine의 대사를 촉진하였으며, BNF를 처리한 흰쥐를 사용했을 때는 *in vivo*는 물론 *in vitro*에서도 억제하는 흥미있는 결과를 보였다 (Fig. 18). 그리고 flavone이 zoxazolamine의 대사뿐만 아니라 BP대사를 상당히 촉진시키지

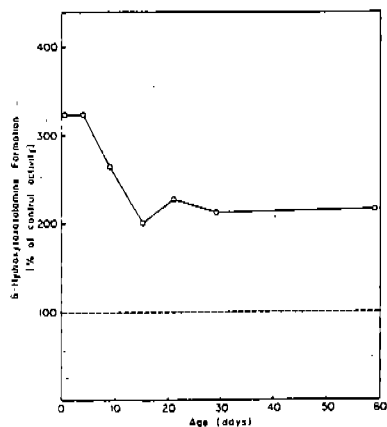


Fig. 16. Effect of age on the stimulation of *in vitro* zoxazolamine hydroxylation by flavone. Flavone (250 μM) was added to liver microsomes obtained from rats of different ages. Formation of tritiated water was measured and the data are expressed as 6-hydroxyzoxazolamine. One hundred percent of control refers to the rate of 6-hydroxyzoxazolamine formation in the absence of flavone. Each point represents the mean from two separate determinations.

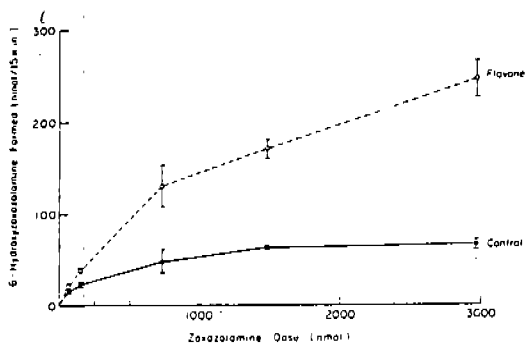


Fig. 17. Effect of the dose of zoxazolamine on the flavone-dependent activation of zoxazolamine metabolism *in vivo*. Rats were injected i.p. with the described amounts of [4,6-³H]zoxazolamine, immediately followed by an injection of 5 μmol of flavone in polyethylene glycol 400 or polyethylene glycol 400 alone. The animals were killed 15 min later and the data are expressed as 6-hydroxyzoxazolamine formed. Each point represents the mean ± S.E. from four animals.

Table 14. Stimulation of *in vivo* zoxazolamine and benzo(a)pyrene hydroxylation by flavone. Liver microsomes were prepared from 5-day-old rats. Each reaction mixture contained 100 μ mol of potassium phosphate (pH 7.4), 3 μ mol of magnesium chloride, 0.1 μ mol of EDTA, 20 μ mol of glucose-6-phosphate, 1 U of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 0.5 μ mol of NADPH, 500nmol of [4,6- 3 H]zoxazolamine or 80 nmol of benzo(a)pyrene and various concentrations of flavone in a final volume of 0.95ml. The reactions were initiated by the addition of 50 μ l of a suspension of microsomes containing 0.5nmol of cytochrome P-450 and were terminated after 10min. The metabolism of [4,6- 3 H]zoxazolamine to tritiated water was measured and data are expressed as 6-hydroxyzoxazolamine. The metabolism of benzo(a)pyrene to fluorescent phenolic metabolites was measured and the data are expressed as 3-hydroxybenzo(a)pyrene(3-OHBP).

Flavone Conc.	6-Hydroxyzoxazolamine formed	3-OHBP formed
μ M	nmol/min/nmol cytochrome P-450	pmol/min/nmol cytochrome P-450
0	1.22 ^a (100) ^b	47.9 ^a (100) ^b
10	1.34 (110)	95.2 (199)
100	2.91 (239)	176.8 (369)
250	3.45 (283)	

^a Values represent data from at least two separate determinations.

^b Values in parentheses represent the percent of control activity.

Table 15. Dose-response for the *in vivo* effect of flavone on benzo(a)pyrene hydroxylation. Six-day-old rats were injected i.p. with 1 μ mol of [G- 3 H]benzo(a)pyrene in 20 μ l of dimethyl sulfoxide. This was immediately followed by an injection of the indicated amounts of flavone in 40 μ l of polyethylene glycol 400 or polyethylene glycol 400 glycol alone. The animals were killed 60min later and the data are expressed as nanomoles of benzo(a)pyrene metabolized. Each value represents the mean \pm S. E. from at least three animals.

Dose of Flavone	Benzo(a)pyrene Metabolized
μ mol	nmol/60min
0	7.6 \pm 1 (100) ^a
0.25	5.3 \pm 1 (70)
0.5	4.5 \pm 1 (59)
1.0	4.0 \pm 1 (53)
2.5	4.5 \pm 1 (59)
5.0	4.4 \pm 1 (58)

^a Values in parentheses represent the percent of control activity.

만 (Table 14) BP 대사의 경우 *in vivo*에서 flavone의 농도증가에도 별 영향을 받지 않았다 (Table 15).

Table 16은 *in vitro*에서 apigenin, chrysin, fisetin, morin, quercetin 등이 zoxazolamine의 수산화물 억제시킨 결과를 rutin, flavone의 결과와 상호 비교한 것으로 flavone의 경우 이들과는 뚜렷하게 zoxazolamine의 대사를 촉진시켰

다. 그러나 *in vivo* (Table 17)에서 quercetin과 apigenin은 생체내 대사에 어떤 영향도 미치지 않았음을 시사하고 있다. 한편 mis AHH의 경우 *in vitro*에서 합성 flavonoid인 ANF에 의해 억제 또는 촉진되는 것으로 알려졌는데 이것은 동물과 조직의 전처리에 따라 서로 다르게 나타나기 때문이다.⁷⁶⁾ 이와 비교해서 BNF는 동물에 투여했을 때 (*in vivo*) 높은 AHH 활성도를 나타

Table.16. Effect of flavonoids on the hydroxylation of zoxazolamine by rat liver microsomes. Flavonoids (final concentration, 250 μM) were added to liver microsomes obtained from 5-day-old rats. The metabolism of [4, 6-³H] zoxazolamine to tritiated water was measured and the data are expressed as 6-hydroxyzoxazolamine.

Flavonoid	6-Hydroxyzoxazolamine formed ^a
	nmol/min/nmol cytochrome P-450
None	1.45 ± 0.1 (100) ^b
Quercetin	0.44 ± 0.1 ** (30)
Fisetin	0.54 ± 0.1 ** (37)
Apigenin	0.80 ± 0.1 ** (55)
Morin	0.99 ± 0.1 ** (68)
Chrysin	1.08 ± 0.1 ** (74)
Rutin	1.29 ± 0.1 (89)
Flavone	5.00 ± 0.1 ** (345)

^aValues represent the mean ± S. E. of three determinations.
^bValues in parentheses represent the percent of control activity.
 **Significantly different from control (P < .01) by student's t test

Table 17. Effect of various flavonoids on the *in vivo* hydroxylation of zoxazolamine. Animals were injected i. p. with 740 nmol of [4, 6-³H] zoxazolamine, immediately followed by an injection of 5 μmol of the flavonoids listed below in 40 μl of polyethylene glycol 400 or polyethylene glycol 400 alone. The animals were killed 15 min later.

Flavonoid	6-Hydroxyzoxazolamine formed ^a
	nmol/15min
Experiment 1	
None	38.4 ± 2 (100) ^b
Flavone	213.5 ± 10 * (556)
7, 8-Benzoflavone	71.0 ± 5 * (185)
Nobiletin	86.1 ± 16 * (224)
Tangeretin	110.9 ± 4 * (289)
Experiment 2	
None	25.8 ± 3 (100)
Flavone	108.4 ± 18 * (420)
Apigenin	23.5 ± 5 (91)
Quercetin	24.8 ± 1 (96)

^aValues represent the mean ± S. E. from at least three animals.
^bValues in parentheses represent the percent of control activity.
 *Significantly different from controls (P < .05) by Student's t test.

내는 P-450 동위효소를 유도한다.⁷⁷⁾

그리고 수산기를 갖고 있는 flavonoids는 일반적으로 *in vitro*에서 P-450 활성도를 억제하고 반면에 수산기가 없는 것은 직접적으로 촉진시킨다.⁶⁸⁾ 그러나 수산기가 있는 flavonoids에 의한 P-450 활성도의 억제 메카니즘에 관해서는 연구된 바가 없다. BNF를 전처리한 mis에대

해 quercetin (10~250 μM) 은 ethoxyresorufin O-deethylation을 15~80% 억제하며 quercetin의농도에 따라 서로 다르게 나타나는 하나의 complex inhibition pattern을 보인다. 이때의 반응속도론적인 특성은 Table 18과 같다. quercetin은 또한 *p*-nitroanisole demethylation과 BP 수산화물을 억제하나 대조구와 비교했을 때 BP 대사산

Table 18. Kinetic parameters associated with quercetin inhibition of P-450 reactions.

Ethoxyresorufin deethylation, BNF-microsomes	Inhibition	K_m (μM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ nmol P-450 ⁻¹)	K_i (μM)
Control		0.14	1.0	0 -
10 nM Q	Competitive	0.14	0.99	0.034
25 nM Q	Competitive	0.20	0.90	0.034
50 nM Q	Mixed	0.33	0.78	0.133
100 nM Q	Mixed	0.60	0.40	0.133
250 nM Q	Mixed	0.75	0.30	0.133

K_m and V_{max} values were calculated from Line weaver-Burk plots.

Table 19. Inhibitory effect of quercetin on various monooxygenase activities of liver microsomes from differently pretreated rats.

Induction of microsomes ^a	Inhibition of monooxygenase activities ^b : I_{50} (μM)		
	Benzo(a) pyrene hydroxylase	7-Ethoxycoumarin O-deethylase	Aniline hydroxylase
PB	125	100	42
MC	60	10	55

a; Microsomes contained 2.14 and 1.51 nmole cytochrome P-450 per mg of protein, respectively, for PB and MC-treated rats.

b; Substrate concentrations were 0.08, 0.5 and 1.34mM respectively for benzo(a) pyrene hydroxylase, 7-ethoxycoumarin O-deethylase and aniline hydroxylase. Microsomal protein concentrations were 1,1 and 2.5mg/ml for benzo(a) pyrene hydroxylase, 7-ethoxycoumarin O-deethylase and aniline hydroxylase.

c; I_{50} (inhibitor concentration giving 50% inhibition of enzymatic activity) was determined from inhibition curves obtained with nine inhibitor concentrations. The values are the average of duplicate experiments.

물의 각각의 비율을 변화시키지는 않는다.⁷⁸⁾

본인의 연구실에서는 PB 또는 3-methylcholanthrene(MC)를 획취에 전처리한 후 P-450 동위효소 유도 정도를 monoclonal antibodies와 ³⁵S-anti-mouse IgG를 첨가하여 RIA⁸⁰⁾에 의해 측정된 결과 PB-와 MC-mis에 P-450-b와 P-450-c type의 동위효소가 주된 부분으로 각각 존재하는 것을 확인하였다⁸¹⁾(Fig. 19). 이와 같은 mis의 각각에 대하여 quercetin에 의한 benzo(a)pyrene hydroxylase(BPH 또는 AHH), 7-ethoxycoumarin O-deethylase(ECDE), aniline hydroxylase(AH)의 inhibitory potency(I_{50})를 Lesca 등의 방법⁸²⁾에 따라 관찰하여 MC-mis-BPH 또는 -ECDE에 의한 기질산화에 querc-

etin이 강력한 활성억제제로 작용하는 것을 알았다(Table 19). 따라서 quercetin은 P-450-c type에 의한 BPH, ECDE의 binding site와의 상호결합에 의해 그 활성을 억제한다고 볼 수 있으며, Table 20에서 PB-또는 MC-mis의 AH는 quercetin이 P-450-b는 물론 -c type의 동위효소에도 강력한 결합력을 가지고 있음을 보이고 있다.

그리고 동위효소 유도물질 처리에 따른 inhibition mode는 Table 20과 같이 일정하게 나타나지 않았으나 측정된 MO에 따라서는 ECDE를 제외하고는 mixed 또는 non-competitive type이었다.⁸³⁾

P-450-dependent MOs에 관련된 flavonoids의 연구와는 다소 다르지만 Hoyoku 등⁷⁹⁾은 quercetin과 다른 flavonoids가 tumor promoter의 활

Table 20. Kinetic parameters associated with inhibition of cytochrome P-450 dependent enzymes by quercetin.

Enzyme	Induction of microsomes	K _m (uM)	V _{max} (nmol/min/mg)	Inhibition type	K _i (uM)
Benzo(a)pyrene hydroxylase	PB	2.5	0.2	Non-Competitive	36
	MC	1.54	2.0	Non-Competitive	22.3
7-Ethoxycoumarin O-deethylase	PB	1000	33.33	Competitive	5.6
	MC	50	20	Mixed	0.9
Aniline hydroxylase	PB	80	1	Mixed	0.4
	MC	37.7	0.23	Mixed	1.4

*K_m, V_{max} values and inhibition type were obtained from Lineweaver-Burk plots.

*K_i values were calculated from Dixon plots.

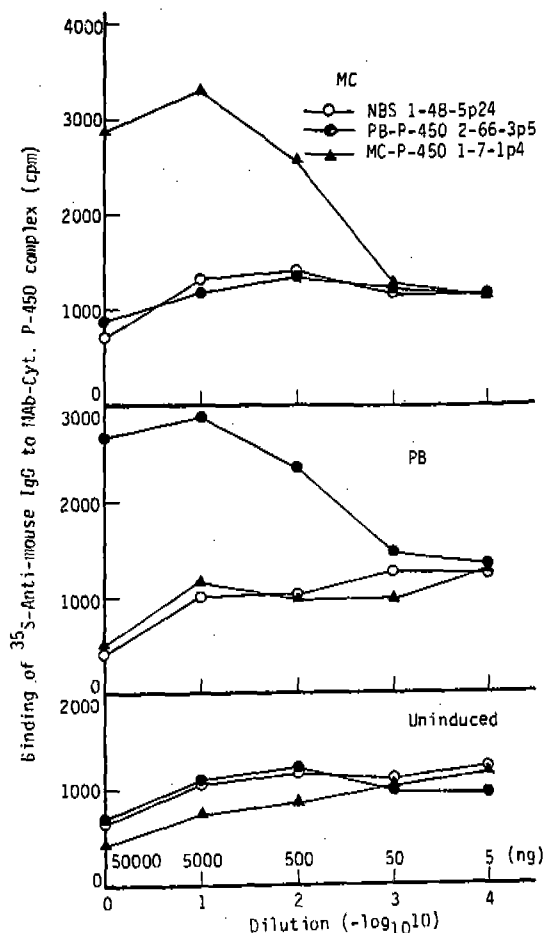


Fig. 19. Specific binding of MAb to cytochrome P-450 isozymes. The concentration of MAb was adjusted to 0.5mg/ml and diluted.

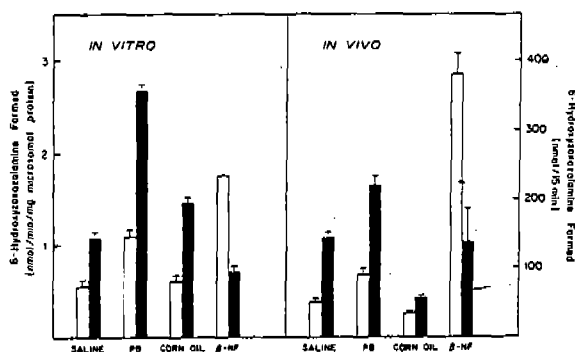


Fig. 18. Effect of treatment with inducers of microsomal monooxygenases on the in vitro and in vivo activation of zoxazolamine hydroxylation by flavone. PB and β -NF refer to sodium phenobarbital and 5,6-benzoflavone, respectively. For in vitro studies, flavone (250 μ M) was added to liver microsomes from 9-day-old rats. Tritiated water was measured and the data are expressed as nanomoles of 6-hydroxyzoxazolamine formed per minute per milligram of microsomal protein. For in vivo studies, rats were injected i.p. with 740nmol of [4,6-³H]zoxazolamine, immediately followed by an injection of 5 μ mol of flavone in polyethylene glycol 400 or polyethylene glycol 400 alone. The animals were killed 15 min later and the data are expressed as nanomoles of 6-hydroxyzoxazolamine formed per 15 min. Values represent the mean \pm S. E. from at least three determinations (in vitro studies) or from four animals (in vivo studies).

성에 미치는 효과를 검토하였다. quercetin 은 HeLa cell의 인지질속에 무기인산 (^{32}P i)의 결합을 억제하는데 이때 강력한 증양 promoter인 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate(TPA)에 의해 증가되었으며 flavonoids중에서 luteolin은 또한 TPA 활성억제에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 그리고 구조와 활성에 관련된 연구로 수산화된 flavone과 flavonol이 좀 더 강력한 억제 효과를 갖고 있었다. 그리고 quercetin과 luteolin은 또다른 강력한 tumor promoter인 dihydro-oleocidin B에 의해 억제되었다. 따라서 tumor promoter의 생물학적인 활성에 대한 quercetin의 억제효과는 일부 주장되고 있는 quercetin의 돌연변이성⁴¹⁻⁴⁵)에도 불구하고 동물체에 이와 같은 flavonoid에 의한 비-발암성에 관련이 있다는 것은 대단히 흥미로운 일이다.

5. 맺 음 말

생체내의 산화반응을 통하여 수 많은 화학물질의 분해나 합성등에 관여하는 P-450의 기능에 대한 생화학적인 중요성은 현재에도 우리에게 많은 의문을 주고 있다. 결론적으로 현재까지의 연구를 종합해 볼때 인체의 P-450이 특히 약물대사에서 중요한 역할을 한다는 구체적인 것, 직접적인 증거가 명확치 않은 상태이다. 따라서 P-450의 다양한 기능에 대한 해명에 많은 학자들의 초점이 모아 지고 있으며 그것은 인체의 P-450과 동 식물 또는 미생물의 P-450과는 어떤 차이가 있는가, microsomal system과 reconstituted system 그리고 *in vivo* system 등이 연구결과가 서로 일치되지 않는 경우 그 이유는 어디에 있는가 등등이다. 또한 개체간의 차이가 있다면 그것은 유전적인 것인가 또는 후천적인 것인가 등이 연구되어야 할 것이다. 그리고 인체는 물론 포유류 사이의 P-450에 따른 분자 유전학적인 특성의 차이가 무엇인지 해명될때 P-450연구의 새로운 장이 열릴 것이다.

P-450유도물질에 의한 유도 메카니즘도 이와함께 연구되어야만 P-450기능의 해명에 대한 좀더 빠른 접근이 가능하리라 생각된다. 그러나 P-450에 대한 의문이 하나씩 해명되고 있는 현재의 추세로 미루어 앞으로 머지않아 이의 의문점들이 풀리리라 기대된다. 어쨌든 P-450연구 결과는 궁극적으로 약리학 또는 임상 의학에 응용하기 위한 것이지만, 한편으로 환경오염에 의한 해수, 토양의 정화에까지 널리 응용될 전망이다.

참 고 문 헌

1. Conney, A. H., (1967) *Pharmacol. Review* 19, 317.
2. Mason, H. S. (1957), *Adv. Enzymol.*, 19, 79.
3. Estabrook, R. W., Cooper, D. Y., and Rosenthal, O. (1963), *Biochem. Z.*, 338, 741.
4. Mannering, G. J., (1972), *Microsomal enzyme systems which catalyze drug metabolism*, eds. La Bu, B., Mendel, H., and Leong, W. E., *Drug metabolism and Drug Deposition*, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 206~252.
5. Nebert, D. W. (1979), *Mol. Cell. Biochem.*, 27, 27.
6. Nebert, D. W., Eisen, H. J., Negishi, M., Lang, M. A., and Hjelmeland, L. M. (1981), *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21, 431.
7. John, R. B., Margaret, O. J., and John, B. P. (1980), *In Introduction to Environmental Toxicity*, ed. Frank, E. Guthrie, and Jerome, J. P. pp. 172 ~ 177, Elsevier, New York.

8. Charles J. F., Jay, C. B., Howard, C. B., Howard, C. K., James, W. O., and Michael, J. P. (1979), In *Medical Cell Biology*, pp516~519, Saunders, Philadelphia.
9. Jusko, W. J., (1978), *J. Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 6, 39.
10. Huang, M. T., Chang, R. L., Fortner, J. G., and Conney, A. H. (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, 6829.
11. Ernest, H., and Walter, C. D. (1982), In *Introduction to Biochemical Toxicology*, ed. Ernest, H., and Frank, E. G., pp. 67~72, Elsevier, New York.
12. Dixon, R. L., Shultice, R. W., and Fouts, J. R. (1960), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103, 333.
13. Kato, R. and Takanaka, A. (1967), *Jap. J. Pharmac.*, 18, 356.
14. Kato, K. (1953), *J. Antibiot. Japan*, A6, 130, 184.
15. Capdevila, J., Chacos, N., Werringloer, J., Prough, R. A., and Estabrook, R. (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci., US A.* 78, 5362.
16. Oliw, E. H., Guengerich, P., and Oates, J. A. (1982), *J. Biol. Chem.*, 257, 3771.
17. Morrison, A. R., and Pascoe, N. (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78, 7375.
18. Ferreri, N. R., Schwartzman, M., Ibrahim, N. G., Chandler, P. N., McGiff, J. C. (1984), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 231, 441.
19. Philip, N., John, T., Barbara, A. J., Aubrey, R. M., and James, B. L., (1986), *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 69.
20. Wilhelm, R. F. (1982), In *Human Biochemistry*, pp. 214~217, Macmillan, New York.
21. Arun, P. K., and Ernest, H. (1982), In *Introduction to Biochemical Toxicology*, ed. Ernest, H., and Frank, E. G., pp. 107~124, Elsevier, New York.
22. Gillete, J. (1969), *Biochemical Aspects of Antimetabolites and Drug Hydroxylation*, Fed. European Biochem. Soc., ed. Shuger, D., 16, 109, Academic Press, London.
23. Schenkman, J. B., Remmer, H., and Estabrook, R. W. (1967), *Mol. Pharmacol.*, 3, 113.
24. Delaforge, M., Ioannides, C., and Parke, D. V. (1980), *Arch. Toxicol. Suppl.*, 4, 45.
25. Delaforge, M., Ioannides, C., and Parke, D. V. (1980), *Chem-Biol. Interaction*, 32, 101.
26. Ralph, I. M., Gunsalus, I. C., and Karl, M. D. (1982), *J. Biol. Chem.*, 257, 12517.
27. Wayne, L. B., Melissa, M., and William, J. C. (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 10092.
28. Franklin, M. R. (1977), *Pharmacol. and Ther.*, Part A2. 227~245.
29. Kulkarni, et al. (1976), *Comp. Biochem. Physiol.*, 5413. 509.
30. Havsteen, B. (1983), *Biochemical Pharmacol.*, 32, 1141.
31. Swain, T. (1976), In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, ed Goodwin, T. W., Academic press, London.
32. Mukohato, H., Nakabayashi, S., and Higashida, M., (1978), *FEBS Lett.*, 85, 215.
33. Heyman, S., Kinoshito, H. (1976), *J. Biol. Chem.*, 240, 877.

34. Varma, S. P., Mikuni, I., and Kinoshito, J. H. (1973), 188, 1215.
35. Hers, H. G., (1960), *Biochem. Biophys. Acta.*, 37, 120.
36. Dons, R. F., and Doughty, C. C. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.*, 452, 1.
37. Dick, W. E. Jr, (1981), *J. Agri. Fd. Chem.*, 29, 305.
38. Brown, S., Wiebel, F. J., Gelboin, H. V., and Minna, J. D. (1978), *Molec. Cell. Biol.*, 2.
39. Dock, L., Underman, O., Graslund, A., and Jernstron, J. D. (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 1275.
40. Meehan, T., and Straub, K. (1979), *Nature*, 277, 410.
41. Almeda, S., Bing, D. H., Laura, R., and Friedman, P. A. (1981), *Biochemistry*, 20, 3731.
42. Brown, J. P., (1980), *Mutation Res.* 75, 243.
43. Bjeldanes, L. F., and Chang, G. W. (1977), *Science*, 197, 577.
44. Salm, R. K., Basu, R., and Sharma, R. (1981), *Mutation Res.*, 89, 69.
45. Meltz, M. L., and MacGregor, J. T. (1981), *ibid.*, 88, 317.
46. Amacher, D. E., Paillet, S. C., Turner, G. N., Ray, V. A., and Salsbury, D. S. (1980), *ibid.*, 72, 447.
47. Carver, J. H., Carrano, A. V., and MacGregor, J. T. (1983), *ibid.*, 113, 45.
48. Pamukcu, A. M., Yalciner, S., Hatcher, J. F., and Bryan, G. T. (1980) *Cancer Res.*, 40, 3468.
49. Hirono, I., Ueno, I., Hosaka, S., S., Takanashi, H., Matsushima, T., Sugimura, T., and Natori, S. (1981), *Cancer Letters*, 13, 15.
50. Morino, K., Matsukura, M., Kawachi, T., Ohgaki, H., Sugimura, T., and Hirono, I. (1982), *Carcinogenesis*, 3, 93.
51. Sugimura T. (1979), *Naturally occurring Genotoxic Carcinogens.* ed. Miller, E. C., Miller, J. A., Hirono, I., Sugimura, T., and Takayama, S., Japan Sci. Press, Tokyo Univ. Park Press, Baltimore.
52. Buening, M. K., Chang, R. L., Huang, C. M., Fortner, J. G., Wood, A., and Conney, A. H. (1981), *Cancer Res.*, 41, 67.
53. Nagase, S., Fujimaki, C., and Isaka, H. (1964), *Proc. Japan. Cancer. Assoc.*, 23rd Meet., pp. 26.
54. Lahaun, H., and Perucker, H., (1975), *In Methoden der Organischen Chemie* ed. Muller, E., pp. 962. Thieme, Stuttgart.
55. Baird, I. M., Hughes, R. E., Wilson, H. K., Daries, J. E. W., and Howard, A. N. (1979), *Am. J. Clin. Nutr.*, 32, 1686.
56. Voelter, W., and Jung, G., (1978), *Experimental and Clinical Results*, Springer, Berlin.
57. Wattenberg, L. W., Page, M. A., and Leong, J. L., (1968), *Cancer Res.*, 28, 934.
58. Lake, B. G., and Parke, D. V., (1972), *Biochem. J.*, 130, 86.
59. Alworth, W. L., Dang, L. C., Ching, L. M., and Viswanathan, T. (1980), *Xenobiotica*, 10, 395.
61. Scheline, R. R., (1978), *Mammalian Metabolism of Plant Xenobiotics*, Academic Press, London.
62. Metzner, J., Bekemeier, H., Schnei-

- dewind, E. M., and Wenzel, U., *Pharmazie*, 34, 185.
63. Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi-A., and Ames, B. N., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 77, 4961.
 64. Wiebel, F. J., and Gelboin, H. V., (1975), *Biochem. Pharmacol.*, 24, 1511.
 65. Kapitulnik, J., Poppers, P. J., Buening, M. K., Fortner, J. G., and Conney, A. H. (1977), *Clin. Pharmacol. Ther.*, 22, 475.
 66. Buening, M. K., Fortner, J. G., Kappas, A., and Conney, A. H. (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 82, 348.
 67. Thakker, D. R., Levin, W., Buening, M. K., Yagi, H., Lehr, R. E., Wood, A. W., Conney, A. H., and Jerina, D. M. (1981), *Cancer Res.*, 41, 1389.
 68. Buehing, M. K., Chang, R. L., Huang, M-T., Fortner, J. G., Wood, A. W., and Canney, A. H. (1981), *Cancer Res.* 41, 67.
 69. Huang, M. T., Johnson, E. F., Ursula, M-E., Koop, D. R., Coon, M. J., and Conney, A. H., (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, 10897.
 70. Lasker, J. M., Huang, M-T., and Conney, A. H., (1982), *Science*, 216, 25.
 71. Kamijo, K., and Koelle, G. B., (1955), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 88, 565.
 72. Geiger, L. E., Cervoni, P., Bertino, J. R., and Monteleone, F., (1958), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 123, 164.
 73. Conney, A. H., Trousof, N., and Burns, J. J., (1960), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 128, 333.
 74. Tomaszewski, J. E., Jerina, D. M., Levin, W., and Conney, A. H., (1976). *Arch. Biochem. Biophys.*, 176, 788.
 75. Lasker, J. M., Huang, M. T., and Conney, A. H., (1984), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 229, 162.
 76. Wiebel, F. J., Gelboin, H. V., Buu-Hoi, N. P., Stout, M. G., and Burnham, W. S., (1974), In *Chemical Carcinogenesis*, eds TS' O P. O. P., and Dipaolo, J. A., pp. 249~270, Dekker, New York.
 77. Haugen, D. A., Coon, J. J., and Nebert, D. W., (1976), *J. Biol. Chem.*, 251, 1817.
 78. Rosemary, L. S., and Michael, A. M., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, 240, 345.
 79. Hoyoku, N., Minako, N., Hirota, F., and Takashi, S., (1983), *Cancer Lett.*, 21, 1.
 80. Park, S. S., Fugino, T., West, T., Guengerich, P., and Gelboin, H. V. (1982) *Cancer Res.*, 42, 1798.
 81. Mun, J. Y., Lee, Y. H., and Park, K. H. (1986), *Korean Biochem. J.*, 19, 315.
 82. Lesca, P., Leconte, P., Pelaprat, D., Paoletti, C., and Mansuy, D., (1980), *Biochem. Pharmacol.*, 29, 3231.
 83. Mun, J. Y., and Park, K. H., (1986), *Unpublished Data.*