한국환경위생학회지 제19권 제3호 (1993)
Kor. J. Env. Hlth. Soc., Vol. 19, No. 3, pp. 58~63 (1993)

原 著

肝臟障害와 Ketosis時에 Cytochrome P450IIE의 Regulatory Mechanism에 關한 硏究

윤여표 · 강원식 · 이세창 · 손동환*
충북대학교 약학대학, *원광대학교 약학대학

Regulatory Mechanism of Cytochrome P450IIE in the Rat with Hepatic Injury and Ketosis

Yeo-Pyo Yun, Won-Seek Kang, Se-Chang Lee and Dong Hwan Sohn*
College of Pharmacy, Chungbuk National University
**College of Pharmacy, Wonkwang University*

ABSTRACT

In order to elucidate the alteration of drug-metabolizing enzymes and mechanism in the animal with hepatic injury and ketosis, the regulation of P450IIE was studied in the rats with heaptic injury caused by CCl_4 and with ketosis caused by streptozotocin and high-fat diet. P450IIE expression in liver was examined by the combination of enzyme activities, Western immunoblot, and mRNA Northern blot analyses using specific polyclonal antibody and cDNA probe for P450IIE. Enzyme activity and amounts of immunoreactive P450IIE were rapidly decreased in a time-dependent manner after a single dose of CCl_4. However, the decreases in P450IIE enzyme activity and immunoreactive protein by CCl_4 were not accompanied by a decline in its mRNA level. The data thus suggested a post-translational reduction of P450IIE by CCl_4. The enzyme activities (aniline hydroxylase) in hepatic microsomes were elevated about 2-3-fold by streptozotocin and feeding with a high fat diet. This increases in enzyme activities were also accompanied by 3-fold increases in immunoreactive P450IIE protein and its mRNA. Our data thus indicated that P450IIE induction during the ketosis appears to be due to pretranslational activation.

Keywords : Cytochrome P450IIE, hepatic injury, ketosis, regulatory mechanism.

I. 서 론

Cytochrome P450은 지방산, prostaglandin, steroid 등의 내인성 물질은 물론 많은 의약품, 발암물질, 환경화학물질같은 다양한 외부물질의 일차대사를 담당하고 있는 중심효소이다.[1] Cytochrome P450은 1958년 Klingenberg와 Garfinkle에 의해 처음 확인되었고,[2,3] 1961년 Omura, Sato에 의해 P 450 hemoprotein으로 분리 확인되어 cytochrome P450이라 명명되었다.[4] 그후 다양한 기능들이 밝혀지고 multiple form이 존재함이 밝혀졌다.[5] 즉 fatty acids, prostaglandins, steroids, ketones 등 내인성 물질과 polycyclic aromatic hydrocarbons, nitrosamines, hydrazines, arylamines 등 carcinogens, 그리고 다양한 약물들의 대사에 관여함이 밝혀졌다. 또한 oxidative and reductive dehalogenation, S-, N-, and O-dealkylation, 그리고 aliphatic, aromatic hydroxylation 등의 기능이 있음이 밝혀졌다. P450은 기질특이성을 중복하고 있는 multiple form으로 존재하고, 이들은 특징적인 분자량, electrophoretic mobility, spectral properties, 서로 다른 일차구조, 면역학적 반응 및 기질특이성이 있다.[6]

P450의 독특한 특징중의 하나는 특이한 유도제에 의해 독특한 종류가 특이하게 유도된다는 것이다. 예를 들면 P450IA1, P450IA2 genes은 arylhydrocarbons에 의해서 유도되고, P450IIB1, P450IIB2 genes은 barbiturates에 의해서, P450IIIA genes은 glucocorticoids에 의해서, P450IV genes은 clofibrat-

es에 의해서 유도된다.[7] 이 ethanol-inducible form P450(P450IIE)는 ethanol, acetone, ether, benzene, pyridine 등의 화학물질과 nitrosamine같은 발암물질의 대사에 중요한 역할을 하며, 여러 질병상태에서도 유도된다.[8] P450IIE는 rabbit, rat, human에서 각각 처음으로 분리 확인되었고,[9-11] 그후에 rat과 human,[12] rabbit[13]에서 각각 cDNA가 isolate, sequence되었다. 이들 amino acid sequences는 약 80% 유사하며, 이들 genes은 9 exons를 가지고 있고 10 kb이며, splice junction은 mRNA coding region의 같은 위치에서 일어남이 밝혀졌다. 지금까지 밝혀진 P450IIE expression형태는, development 중에 5'-cytosine demethylation에 의해 transcriptional activation되고, ethanol, acetone, pyridine 등의 화학물질에 의해서는 P450IIE protein stabilization이나, translational mRNA의 증가로 밝혀졌다.[14]

의약품 대사능, 독성, 발암가능성 등은 간장장해시에 크게 영향을 받게된다. 당뇨병, fasting 등의 ketosis 상태가 약물, hormone, carcinogen 대사에 변화를 일으킨다.[15-17] 이러한 ketosis 상태나 간장장해시 약물이나 화학물질 대사능의 변화는 cytochrome P450 효소계의 변화 때문인 것으로 보고됨[18,19]에 따라 급성 간장장해시 및 ketosis시에 P450IIE의 expression, regulation mechanism을 분자수준에서 밝히려 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 처리

실험동물은 웅성 Sprague-Dawley rats(150~170 g)을 사용했고, 표준동물 사육조건(21~23℃, 50% humidity, 12 hr light-dark cycle 등) 사육장에서 사육하며, 물과 사료는 충분히 공급했다. 실험동물은 4 groups(5마리씩)으로 하여, 첫째 group은 carbon tetrachloride(2 g/kg, oral administration) 처리한 간장장해군, 둘째는 streptozotocin(60 mg/kg/day, 3 days, ip) 처리한 당뇨병군, 셋째는 high fat diet처리(70% lard 20% casein, 1.5% vitamin mixture, 3.5% salt mixture, 5% methyl cellulose without carbohydrates)한 ketosis군, 그리고 대조군으로 나누어 실험했다. 각각의 조건대로 처리한 후 간을 제거하여 microsome 제조에 사용했다.

2. Microsome preparation

Microsome preparation은 differential centrifugation 방법에 따라 제조했다.[12] Liver 약 1 g을 homogenation buffer(0.15 M KCl, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA, 1 μM leupeptin) 10 ml에서 Potter homogenizer로 homogenize한 뒤, homogenate를 spin(2,000 rpm, 10 min)하고 supernatant를 다시 spin(7,000 rpm, 15 min)한 후, 그 supernatant를 centrifuge (105,000 g, 1 hr)했다. Pellet을 homogenation buffer로 resuspend한 후 다시 centrifuge(105,000 g, 1 hr)하여 microsome을 얻었다. Protein량은 bovine serum albumin(BSA)을 standard로 하여 Lowry 등의 방법에 따라 측정했다.[20]

3. Enzyme activity assay

Aniline hydroxylase activity는 Brodie방법[21]과 Mieyal방법[22]에 따라 p-aminophenol 생성량을 측정하여 결정했다. Reaction mixture는 1 mg of protein, 1 mM NADPH, 100 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8), 5.0 mM aniline 등이었다. 이들을 혼합한 후 10분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid 0.3 ml을 가해서 종결시켰다. 이를 centrifuge 시킨 후 supernatant 1 ml에 5% phenol in 2.5 N NaOH 0.1 ml와 혼합한 후 2.5 N Na_2CO_3 0.2 ml을 가했다. 혼합반응물을 실온에서 30분 정도 정치시킨 후 630 nm에서 absorbance를 측정했다. Enzyme activity는 nmol p-aminophenol formed/min/mg microsomal protein으로 계산했다.

4. Western immunoblot analysis

Specific P450IIE polyclonal antibody는 Dr. B. J. Song(NIH)에서 제공받았다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli방법[23]에 따라 행했다. Western immunoblot은 Towbin 등의 방법[24]에 따라 수행했다. 즉 differential centrifuge 방법에 의해 얻은 microsomal prep.을 Lowry 등 방법에 따라 protein량을 측정했고, 계산에 의해 동량의 protein을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 행했다. 그후에 전기영동한 protein band를 nitrocellulose에 transfer시켰다. 이 blot을 3%(w/v) non-fat dry milk로 blocking하고 specific P450IIE antibody를 반응시켰다. 그후 alkaline phosphatase conjugated goat antirabbit IgG를 반응시키고 chromogenic substrate<5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate(BCIP)와 nitroblue tetrazolium(NBT)의 혼합>로 발색시킨 후 densitometer로 정량했다.

5. mRNA northern blot analysis

Cytochrome P450 mRNA analysis는 2.2 M formaldehyde-1% agarose gel을 사용 Northern blot을

수행했다.[25] Cytoplasmic RNA는 Chiogwin 등의 방법[26]에 따라 guanidium isothiocyanate-CsCl centrifugation 방법에 따라 행했다. Blotting은 Maniatis 등의 방법[27]에 따라 gene screen membrane을 사용하여 행했다. DNA fragments는 [α-^{32}P]dCTP(3000 Ci/mmol)와 BRL의 kit을 사용하여 nick translation시켰다. Hybridization과 prehybridization은 5×Denhardts 용액과 100 μg/ml salmon sperm DNA 그리고 1% SDS을 포함하는 6×SSC solution에서 60℃로 overnight시켰다. 2×SSC(0.1% SDS) 등으로 washing하고 X-ray film에 expose시키고 developing하여 결과를 보았다.

III. 결과 및 고찰

1. 간장장해시 cytochrome P450IIE의 regulation

간 독성물질 처리시의 변화를 알아보기 위해 CCl_4를 1회 처리한 후 enzyme 활성을 측정했다. Aniline hydroxylase 활성이 time-dependent manner로 감소되었다(Table 1). CCl_4 투여한 후 2시간만에 enzyme 활성이 대조군의 39%이었고, 24시간 후에는 16%로서 간장장해시에 Cytochrome P450IIE활성이 급격히 저하됨을 알 수 있었다.

P450IIE(Mr 52,000 daltons on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) immunoreactive protein이 CCl_4 처치 2시간만에 급격히 감소되어 24시간까지 그 상태로 유지되었다(Fig. 1). 감소형태는 P450IIE 효소활성과 같은 수준으로 감소되었다. 이들 data는 CCl_4에 의한 P450IIE의 억제는 substrate에 의한 enzyme molecule의 파괴에 의한 것임을 제시해 주고 있다.

Table 1. Cytochrome P450IIE enzyme activities in liver microsomes from ketotic rats and rats treated with CCl_4

Treatment	Aniline hydroxylase
Control	0.43± 0.05 (100%)
+CCl_4 2 hr	0.17± 0.04 (39%)
4 hr	0.16± 0.04 (37%)
8 hr	0.13± 0.03 (30%)
12 hr	0.09± 0.03 (21%)
24 hr	0.07± 0.02 (16%)
Diabetes	1.13± 0.15 (263%)
High fat	1.08± 0.13 (252%)

Data are presented as mean± SEM. n=5 for each group. Activities are shown in nmol p-aminophenol formed/min/mg microsomal protein.

CCl_4에 의한 P450IIE 효소활성과 immunoreactive protein 감소에 대한 molecular mechanism을 규명하기 위해 P450IIE cDNA probe를 사용해서 Northern blot analysis를 행하였는데, 실험결과 CCl_4 처리에 의해서 P450IIE mRNA(1.8 kb in size) level에 변화가 없었다(Fig. 2).

따라서 이들 결과들은 CCl_4에 의한 P450IIE 활성억제는 concurrent 즉 substrate가 대사를 받아 free radical로 되어서 P450IIE protein을 특이적으로 파괴시키는 것에 의한다는 것을 제시하고 있다.

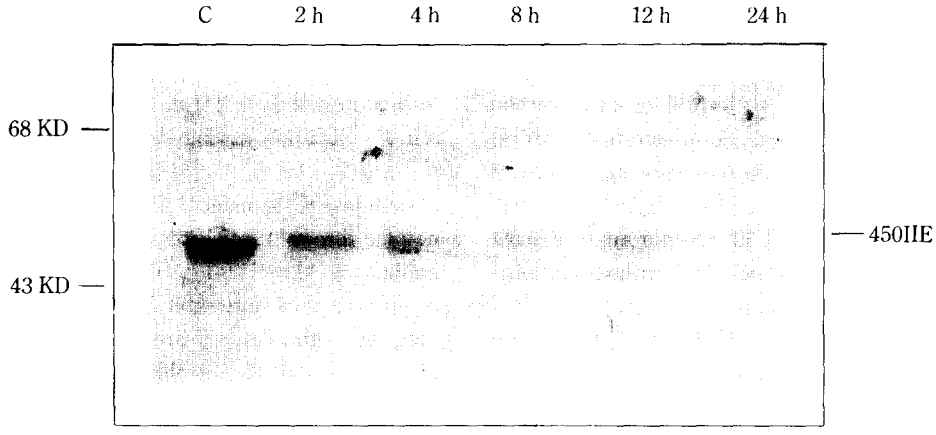

Fig. 1. Western immunoblot analysis of P450IIE in rat liver microsomes after CCl_4 treatment. Equal amounts of microsomal proteins (30 μg/well) from control and CCl_4-treated animals for different times as indicated were subjected to immunoblot analysis using specific polyclonal antiserum against cytochrome P450IIE.

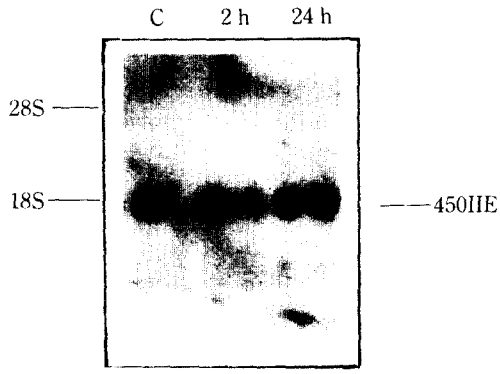

Fig. 2. Northern mRNA blot analysis for hepatic P 450IIE mRNA after CCl_4 treatment. Total cytosolic mRNA (20 μg/well) was isolated from the same two groups as described in Fig. 1 legend and subjected to Northern mRNA blot analysis using [^{32}P]-labeled cDNA probe for P450IIE.

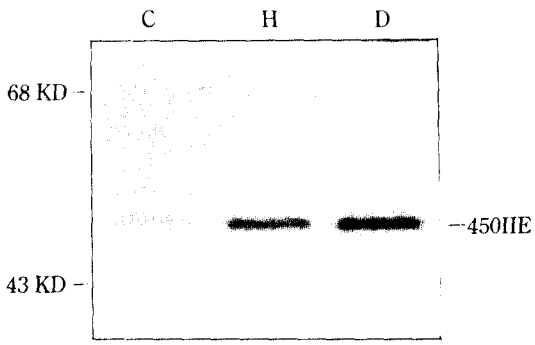

Fig. 3. Immunoblot analysis for P450IIE in hepatic microsomes from ketotic rats. Microsomal proteins from control and ketotic rats (5 μg/well) were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose filters, and then subjected to immunoblot analysis with polyclonal antibody aginst P450IIE, as detailed in the Material and Method. Microsomes were prepared from untreated control rat (C), rat fed a high-fat diet (H), and streptozotocin-induced diabetic rats (D). The molecular size markers were phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), ovalbumin (43 kDa), and carbonic anhydrase (29 kDa).

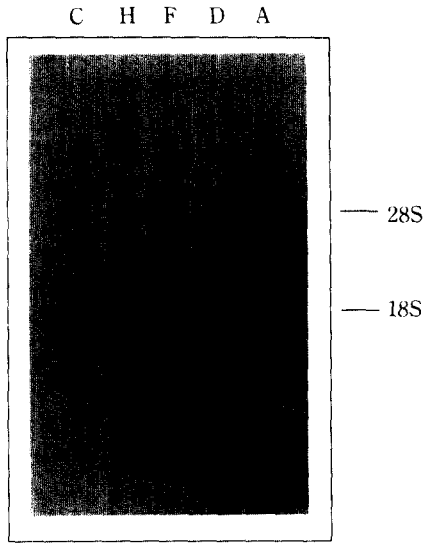

Fig. 4. Northern blot analysis for the level of P450 IIE mRNA from ketotic rats. Total cellular RNAs (15 μg/well) were isolated from the same groups as described in Fig. 3 legend and subjected to Northern mRNA blot analysis using [^{32}P]-labeled cDNA probe for P450 IIE.

2. Ketosis시의 cytochrome P450IIE의 변화

Streptozotocin 처리시 cytochrome P450IIE specific enzyme인 aniline hydroxylase 활성이 2.6배 증가되었고, high fat diet 처리시에 aniline hydroxylase 활성이 2.5배 증가되어, Ketosis시에 cytochrome P450IIE가 크게 유도되었다(Table 1).

당뇨병이나 high fat diet 처리 등 ketossis시에 P450IIE 효소활성 증가가 P450IIE protein 증가에 의한 것인지를 알아보기 위해서 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 한 후에 immunoblot analysis를 행했다. Fig. 3에서 보는 것처럼 immunoreactive P450IIE band intensity가 대조군에 비해서 3~4배 높았다.

Northern blot analysis 결과 당뇨병과 high fat diet 등 ketosis시에는 P450IIE mRNA level이 올라감을 알 수 있었다(Fig. 4). 또한 P450IIE mRNA 증가는 일반적으로 P450IIE protein 증가와 효소활성 증가와 같은 수준으로 나타났다.

대부분의 cytochrome P450의 regulation은 각각의 유도제에 의해서 transcriptional activation을 통해서 유도되는데 반하여 P450IIE expression의 regulation은 복잡하고 다양하다.[6] P450IIE는 출생 직후의 development시 transcriptional activation,[14] fasting에 의해 pretranslational activation,[18] 그리고 acetone, ethanol, pyridine과 같은 화학물질의 경우 post-translationtional activation[28]등으로 보고 되고

있다.

반면에, 본 실험결과 당뇨병과 high-fat diet 등 ketosis시에는 P450IIE 효소활성이 2~3배 증가되었고, P450IIE protein도 같은 양상으로 증가되었으며, mRNA도 같은 수준으로 증가되었다. 이로써 ketosis시에는 P450IIE가 pre-translational activation되는 것으로 추정된다.

간장장해시 특히 CCl_4의 해로운 효과들은 cytochrome P450 주로 P450IIE에 의한 대사에 의존하는 것으로 알려져 왔다.[29] 따라서 이러한 간장장해는 ethanol drinking에 의해 심화되는 것으로 보고되며,[30] P450IIE가 유도될 수 있는 다른 조건들(예컨대 ketosis 상태 등)에 의해 더욱 악화될 수 있겠다. 본 실험결과 P450IIE가 mRNA level에 변화없이 P450 IIE의 효소활성과 protein이 급격히 그리고 특이적으로 감소되는 것으로 나타났는데, 이는 CCl_4 처리에 의해 tumor necrosis factor, transforming growth factor, 그리고 actin 등에서는 upregulaton되는 것과는 비교가 된다 하겠다.[31,32] 그러므로 CCl_4에 의해서 P450IIE의 감소는 post-translational inhibition되는 것으로 생각된다. 이러한 감소가 P450IIE protein 합성속도의 감소 혹은 그것의 분해속도의 증가에 기인할 것으로 생각되는데 이에 대한 구체적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

IV. 결 론

간장장해시 cytochrome P450IIE 효소활성이 시간의존적으로 급격히 떨어졌고(24시간 후 16%), P450 IIE protein이 P450IIE 효소활성과 같은 수준으로 감소되었으나, mRNA level은 변화가 없었다. 이로써 post-translational reduction됨을 알 수 있었다.

반면에, 당뇨병과 high-fat diet 등 ketosis시에는 P450IIE 효소활성이 2~3배 증가되었고, P450IIE protein도 같은 양상으로 증가되었으며, mRNA도 같은 수준으로 증가되었다. 이로써 ketosis시에는 P 450IIE가 pre-translational activation됨을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대학육성)과제 학술연구조성비 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1) Distlerath, L. M. and Guengerich, F. P. : Enzymology of human liver cytochromes P450. ed. by F. P. Guengerich, Vol. 1, pp. 133-198, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1987.
2) Klingenberg, M. : Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 376-386, 1958.
3) Garfinkle, D. : Studies on pig liver microsomes. I. Enzyme and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **77**, 493-509, 1958.
4) Omura, T. and Sato, R. : A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **237**, PC1375-PC 1376, 1961.
5) Black, S. and Coon, M. : Comparative structures of P450 cytochromes. In cytochrome P450 : Structure, Mechanisms, and Biochemistry, ed. by P. R. Ortiz de Moncellano, pp. 161-216, Plenum Publishing Corp., New York, 1986.
6) Gonzalez, F. J. : The molecular biology of cytochrome P450s. *Phar. Rev.*, **40**(4), 243-288, 1988.
7) Okey, A. B., Robert, E. A. and Denison, M. S. : Induction of drug-metabolizing enzymes : mechanisms and consequences. *Clin. Bioch.*, **19**, 132-141, 1986.
8) Song, B. J., Matsunaga, T. and Gonzalez, F. J. : Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat. *Mol. Endocrinol.*, **1**, 542-547, 1987.
9) Koop, D. R., Morgan, E. T. and Coon, M. J. : Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P450 from liver microsome of ethanol-treated rabbits. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8472-8480, 1982.
10) Ryan, D. E., Ramanathan, L. and Levin, W. : Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P450 induced by isoniazid. *J. Biol. Chem.*, **260**, 6385-6393, 1985.
11) Wrighton, S. A., Thomas, P. E. and Levin, W. : Purification and characterization of ehtnaol-inducible human hepatic cytochrome P450j. *Arch. Biochem. Biophys.*, **258**, 292-297, 1987.
12) Song, B. J., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. : Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human P450s; transcriptional and post-transcriptional regulation of

the rat enzyme. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16689-16697, 1986.

13) Khani, S. C., Zaphiropoulos, P. G. and Coon, M. J. : cDNA and derived amino acid sequence of ethanol-inducible rabbit liver cytochrome P450 isozyme 3a ($P450_{MLC}$). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 638-642, 1987.

14) Umeno, M., Song, B. J. and Gonzalez, F. J. : The rat P450IIEI gene : complete intron and exon sequences, chromosome mapping, and correlation of development expression with specific 5'-cytosine demethylation. *J.Biol. Chem.*, **263**, 4956-4962, 1988.

15) Nebert, D. W. and Negishi, M. : Environmental and genetic factors influencing drug metabolism and toxicity. In : Mitchell J. R. eds. *Drug Metabolism and Drug Toxicity*. pp. 137-161, 1984.

16) Dixon, R. L., Hart, L. G. and Fouts, J. R. : The metabolism of drugs by liver microsomes from alloxan-diabetic rats. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **133**, 7-11, 1961.

17. Ackerman D. M. and Leibman, K. C. : Effect of experimental diabetes on drug metabolism in the rat. *Drug. Metab. Dispos.*, **5**, 405-410, 1977.

18) Hong, J., Gonzalez, F. J., Gelboin, H. V. and Yang, C. S. : The induction of a specific form of cytochrome P450 (P450IIE) by fasting. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **142**(3), 1077-1083, 1987.

19) Bellward, G. D., Chang, T., Levin, W. and Thomas, P. E. : Hepatic cytochrome P450IIE induction in the spontaneously diabetic BB rat. *Molecul. Pharmacol.*, **33**, 140-143, 1988.

20) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 255-275, 1951.

21) Brodie, B. B. and Axelrod, J. : The estimation of acetoanilide and its metabolic products, aniline, N-acetyl-1-aminophenol and p-aminophenol in biological fluids and tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **94**, 22-28, 1948.

22) Mieyal, J. J. and Blumer, J. L. : Acceleration of the antioxidation of human oxyhemoglobin by aniline and its relation to hemoglobin-catalyzed aniline hydroxylation. *J. Biol. Chem.*, **259**, 3442-3446, 1976.

23) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685, 1970.

24) Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, H. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacryl amide gels to nitrocellulose sheets procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 4350-4355, 1979.

25) Lehrach, H., Diamond, D. and Boedter, H. : RNA molecular weight determiantion by gel electrophoresis under denaturing conditons : a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751, 1977.

26) Chiogwin, J. M., Prtzybyla, A. E. and Rutter, W. J. : *Biochemistry* **18**, 5294-5299, 1979.

27) Maniatis, T., Fritch, F. F. and Sambroo, K. J. : In *Molecular cloning : A laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory. Harbor, NY, 1982.

28) Song, B. J., Veech, R. L., Park, S. S., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. : Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine dimethylase by acetone is due to protein stabilization. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3568-3572, 1989.

29) Johansson, I. and Ingelman-Sunderberg, M. : *FEBS Lett.*, **183**, 265-269, 1985.

30) Plaa, G. L., Hewitt, W. R., Souich, P., Caille, G. and S. : *J. Toxicol. Environ. Health* **9**, 235-250, 1982.

31) Czajz. K. J., Flanders, K. C., Biempica, L., Klein, C., Zern, M. A. and Weinwe, F. R. : *Growth Factor* **1**, 219-226. 1989.

32) Armendariz-Borunda, J., Seyer, J. M., Kang A. H. and Raghow, R. : *FASEB J.*, **4**, 215-221, 1990.