

## 인체 간 조직의 Cytochrome P450 3A4의 활성화에 대한 몇가지 억제제의 영향

오현숙\* · 이갑상\* · 김복량<sup>1</sup>

\*원광대학교 농대 농화학과, <sup>1</sup>원광대학교 의대 생화학교실

### Effects of Several Inhibitors of Human Liver Microsomal Cytochrome P450 3A4 on Catalytic Activities of the Enzyme

Hyun Sook Oh\*, Kap Sang Lee\* and Bok Ryang Kim<sup>1</sup>

\*Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture  
and Department of Biochemistry, <sup>1</sup>College of Medicine,  
Won Kwang University, Iri 570-749, Korea

(Received February 20, 1995)

(Accepted March 10, 1995)

**ABSTRACT :** Microsomes from human liver sample HL 110 oxidized aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) to AFB<sub>1</sub> exo-8,9-epoxide which was detected as a glutathione (GSH) conjugate with excess GSH S-transferase and to aflatoxin Q<sub>1</sub> (AFQ<sub>1</sub>; 3 $\alpha$ -hydroxyaflatoxin B<sub>1</sub>), and testosterone to 6 $\beta$ -hydroxytestosterone. Anti-P450 3A4 nearly completely inhibited all of the reactions. Some flavonoids inhibited all of the reactions. While other flavonoids stimulated 8,9-epoxidation and inhibited 3 $\alpha$ -hydroxylation. Gestodene inhibited all of the reactions when gestodene was metabolized by human liver microsomal P450 3A4 prior to adding substrate. But, gestodene was added in the enzyme mixtures in the presence of AFB<sub>1</sub>, it could not inhibit 8,9-epoxidation of AFB<sub>1</sub>. Nifedipine and troleandomycin inhibited both of the reactions of AFB<sub>1</sub> but only 3 $\alpha$ -hydroxylation was inhibited by the oxidation product of nifedipine. Although, troleandomycin was known as a mechanism-based inhibitor, the chemical did not show any detectable inhibitory effect on 6 $\beta$ -hydroxylation of testosterone. The results suggest that there are several different substrate-binding sites on P450 3A4.

**Key Words :** P450 3A4, Aflatoxin B<sub>1</sub>, 8,9-Epoxidation, Aflatoxin Q<sub>1</sub>, Testosterone, Gestodene

### I. 서 론

Cytochrome P450 함유 효소군(P450)은 척추동물의 간 조직에 주로 분포된 heme protein으로 방대한 종류의 xenobiotic chemical뿐 아니라 소수성인 여러 생체 물질들을 산화 혹은 환원 시키는 활성을 가지고 있다(Porter과 Coon, 1991). 척추동물의 한 species당 서로 다른 P450유전자들이 30여종 이상이 발현되고 있음이 밝혀졌는데, 분포되어 있는 개개 효소들은 변이가 심하게 진행되어 species에 따라 분포된 대부분의 효소들은 서로 다르다. Nelson 등(1993)에 의하면 P450 1A1, P450 1A2 및 P450 2E1 등 일부를 제외한 대부분의 인체내 간조직에 분포된 P450들은 다른 동물에 존재하지 않는다고 한다. 따라서

실험동물을 이용해서 밝혀진 발암 물질이나 약물등의 대사 과정들이 인체 내에서도 그대로 진행된다고 할 수는 없다.

P450 3A4는 성인 간조직에 존재하는 P450 효소들 중 가장 많이 분포하고 있는 인체 간 조직의 주된 약물대사 효소이다(Bork 등, 1989; Guengerich, 1990). P450 3A4가 처음으로 분리될 때는 nifedipine을 산화하는 활성을 이용하였는데(Guengerich 등, 1986), 그 이후로 많은 종류의 발암물질, 약물, 그리고 steroid들을 산화시키고 있음이 밝혀졌다. 즉, 20여 종이상의 dihydropyridine의 산화, (R)-warfarin 10-hydroxylation, erythromycin N-demethylation, quinidine 3-hydroxylation과 N-oxidation, cyclosporin M1-, M17-, 및 M21-oxidation, midazolam 1-, 및 4-hydroxylation, terfenadine C- 및 N-oxidation, FK 506 oxidation, dapsone N-hydroxylation, testosterone 6 $\beta$ -

<sup>1</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로

hydroxylation,  $\Delta^4$ - androstenedione 6 $\beta$ -hydroxylation, cortisol 6 $\beta$ -hydroxylation, progesterone 6 $\beta$ - 및 16 $\alpha$ -hydroxylation, 17 $\beta$ -estradiol 2-hydroxylation, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol 2-hydroxylation, dehydroepiandrosterone 3-sulfate 16 $\alpha$ -hydroxylation, aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 8,9-epoxidation 및 3 $\alpha$ -hydroxylation, aflatoxin G<sub>1</sub> 9,10-epoxidation, sterigmatocystin 2,3-epoxidation, 7,8-dihydroxybenzo[a]pyrene의 epoxidation, pyrrolizidine alkaloid의 N-oxidation 및 desaturation 그리고 기타 물질들의 산화반응에 P450 3A4가 관계하고 있다(Gillam 등, 1993; Guengerich 등, 1994). 최근에 항암제로 널리 쓰이기 시작한 taxol의 인체내의 대사에 P450 3A4가 관여하고 있음이 밝혀졌다(Harris *et al.*, 1994). 7,8-benzoflavone은 인체 간 조직의 microsomes에 의한 benzo[a]pyrene, zoxazolamine 및 antipyrine 등의 hydroxylation과 aflatoxin B<sub>1</sub>의 대사(Buening *et al.*, 1978)를 증가시킨다. Raney 등(1992)에 의하면 AFB<sub>1</sub>은 P450 3A4에 의하여 AFB<sub>1</sub> exo-8,9-epoxide와 aflatoxin Q<sub>1</sub>(AFQ<sub>1</sub>; 3 $\alpha$ -hydroxylation)으로 대사되는데, 7,8-benzoflavone은 allosteric효과를 통하여 epoxide 형성 반응은 증가시키고 AFQ<sub>1</sub> 형성 반응은 감소시킨다고 하였다. 이 작용은 한 종류의 효소와 한 종류의 기질에서 동시에 서로 다른 두 종류의 산물이 형성되며, 한 종류의 effector에 의해서 동시적으로 한 반응은 촉진되고 다른 반응은 억제되는 특이한 효소 반응인 것이다(Guengerich *et al.*, 1993). 또한 Raney 등은 aflatoxin B<sub>2</sub>가 3 $\alpha$ -hydroxylation 반응에 영향을 주지 않으면서 8,9-epoxidation반응만을 억제하였다고 보고 하였다(1992). 이에 본 연구진은 P450 3A4의 catalytic site는 하나지만, 기질들이 결합하는 binding site는 최소한 두군데 이상일 것으로 추론하였다. 따라서 7,8-benzoflavone이 P450 3A4에 작용할때 그 효소의 구조에 영향을 주어 3 $\alpha$ -hydroxylation 반응으로 가는 P450 3A4와 AFB<sub>1</sub>의 결합은 억제될 것이고, 8,9-epoxidation반응으로 가는 P450 3A4와 AFB<sub>1</sub>의 결합은 촉진될 것이다.

위의 가설을 입증하기 위해서, P450 3A4의 선택적인 mechanism-based inhibitor인 gestodene(Guengerich, 1990) 및 troleandomycin(Brian 등, 1990), 그리고 nifedipine이 P450 3A4에 의해 산화되어 형성되는 pyridine유도체 등이 P450 3A4에 의한 AFB<sub>1</sub>의 두가지 반응과 P450 3A4에 의해 대사되는 testosterone의 6 $\beta$ -hydroxylation 반응에 미치는 영향을 인체 간 조직의 microsomes으로 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약

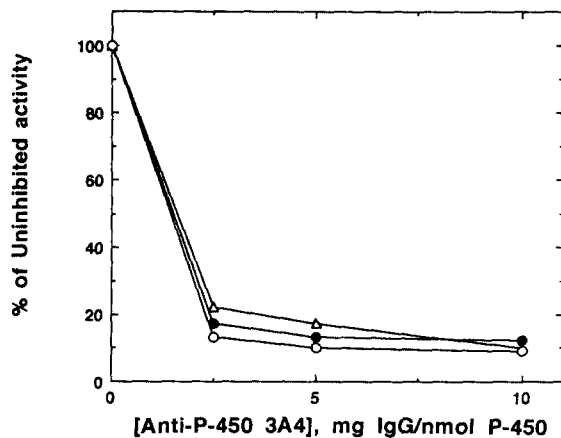
AFB<sub>1</sub>, testosterone, troleandomycin, nifedipine, glucose 6-phosphate, NADP<sup>+</sup>, yeast glucose 6-phosphate dehydrogenase 및 각종 flavonoid 화합물 등은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입 하였으며, gestodene (13-ethyl-17 $\beta$ -hydroxy-18,19-dinor-17 $\alpha$ -pregna-4,15-dien-20-yn-3-one)과 nifedipine의 pyridine 유도체 (2,6-dimethyl-4-(2'-nitrophenyl)-3,5-pyridine dicarboxylic acid dimethyl ester) 등은 Guengerich 박사 (Vanderbilt대학교, USA)로부터 얻었다.

### 2. 인체 간 조직의 microsomes 분획 및 anti-P450 3A4 조제

본 실험에 이용한 인체 간 조직은 Tennessee Donor Services (Nashville, TN, USA)를 통해서 얻은 Human Liver Sample HL 110이었으며, Wang 등이 보고한 방법(1983)에 따라서 microsomes 분획을 얻었다. 이 분획의 P450 함량을 Omura-Sato 방법으로 측정할 바, 0.95 nmol/mg protein이었다. 이 표품을 -80°C로 보관하면서 효소 활성도 측정의 시료로 이용하였다. 정제된 인체 cytochrome P450 3A4에 대한 Ig G type의 항체를 토끼로부터 얻었다 (Guengerich 등, 1986). 분리된 항체를 50 mg/ $\mu$ L로 맞춘 후 -20°C에서 보관하였다.

### 3. AFB<sub>1</sub> 대사 활성의 측정

인체 Microsomes의 cytochrome P450 3A4에 의한 AFB<sub>1</sub>의 8,9-epoxidation반응과 3 $\alpha$ -hydroxylation 반응의 측정은 다음과 같은 조건으로 실시하였다. 반응의 혼합물은 총 1 mL로 100 pmol의 HL 110 microsomes, 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.4), 5 mM glutathione(GSH), 0.6 mg의 mouse liver cytosol, 50  $\mu$ M AFB<sub>1</sub>, 5 mM glucose 6-phosphate, 1.0 mM NADP<sup>+</sup> 및 1.0 IU의 yeast glucose 6-phosphate dehydrogenase등으로 이루어졌다. 이 혼합물을 37°C에서 10분간 반응시키고, 110 mL의 초산을 첨가하여 반응을 종료시킨 후, -70°C로 10 시간동안 보관하였다. 해동 후 3,000 $\times$ g에서 10분간 원심 분리하여 침전된 단백질을 제거하였다. AFB<sub>1</sub> 대사물들은 Raney 등이 기술한 방법(1992)을 약간 변형하여 Beckman HiPLC을 이용하여 분석하였다. 즉, 사용된 column은 Ultrasphere ODS C-18 reverse-phase column (Beckman, 5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm) 이었고, 용출용매는 20 mM am-

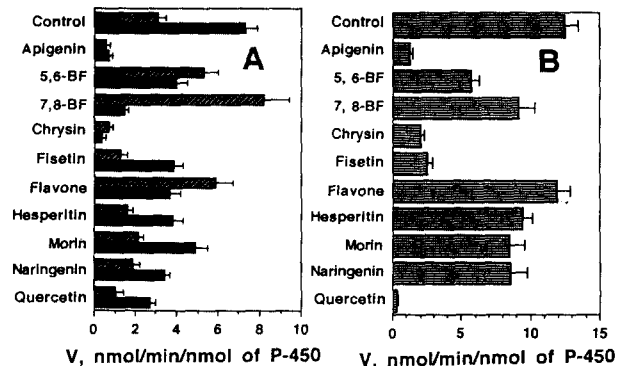


**Fig. 1.** Effects of anti-P450 on oxidation of AFB<sub>1</sub> and testosterone. Microsomes from human liver sample HL 110 containing 0.1 nmol of P-450 in 0.5 mL final volume, were preincubated at 23°C for 30 min with various amounts of rabbit anti-P450 3A4 (Ig G). The assay for the oxidations of AFB<sub>1</sub> and testosterone were completed as described under materials and Methods. The formation of AFB<sub>1</sub> exo-8, 9-oxide: GSH conjugate (●), and AFQ<sub>1</sub> (○) and 6β-hydroxytestosterone (△) were estimated by HPLC.

monium acetate (acetic acid로 pH 4.0을 만듦)인 용매 A와 acetonitrile: methanol: H<sub>2</sub>O가 4.5 : 4.5 : 1.0의 비율로 혼합된 용매 B로 이루어졌으며, 용출 속도는 1.5 mL/min이었다. 90% A-10% B로 된 용매로 column을 평형시킨 후, 20 mL의 시료를 주입하자마자 상기된 용매를 연속된 농도 구배 방식으로 20분동안에 걸쳐서 30% A-70% B로 변화시키면서 시료를 용출하였다. 이어서, 5분동안에 걸쳐서 용출 용매를 90% A-10% B로 변화시켰다. AFB<sub>1</sub> 대사물질은 360 nm에서 검사하였다. AFB<sub>1</sub> exo-8,9-oxide: GSH conjugate의 retention time은 9.59 min, AFQ<sub>1</sub>은 13.25 min 그리고 AFB<sub>1</sub>는 15.48 min이었다. 각 대사물질들의 peak 면적을 Beckman Integrator (Model 427)로 측정하여 external standard 방식으로 AFB<sub>1</sub> exo-8,9-oxide: GSH conjugate와 AFB<sub>1</sub>의 농도를 산출하였다.

#### 4. Testosterone 대사의 활성 측정

Testosterone의 6β-hydroxylation반응의 측정은 Brian 등 방법(1990)을 일부 수정하여 실시하였다. 즉, 100 pmol의 HL 110 microsomes, 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.4)에 200 μM의 testosterone을 첨가한 뒤, 37°C에서 3분간 보관했다. 곧, 5 mM glucose 6-phosphate, 1.0 mM NADP<sup>+</sup> 및 1.0 IU의 yeast glucose 6-phosphate dehydrogenase를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응용액의 총 부피는 1.0 mL이었다. 2 mL의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 가하여 반응을 종료하고, 1.0 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>



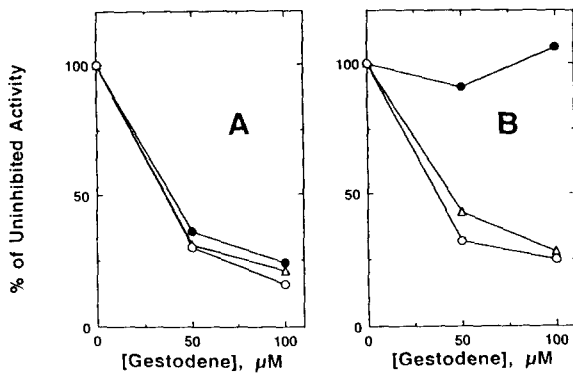
**Fig. 2.** Effects of various flavonoids on oxidations of AFB<sub>1</sub> and testosterone in human liver microsomes. Microsomes from human liver sample HL 110 were incubated with 50 μM testosterone in the presence of 50 μM of the indicated flavonoid for 10 min at 37°C. The formation of AFB<sub>1</sub> exo-8, 9-oxide : GSH conjugate (▨), AFQ<sub>1</sub> (■) and 6β-hydroxytestosterone (▩) were measured by HPLC. Values are mean ± SE (n=3) calculated by sigma plot.

(pH 10.5) - 2.0 M NaCl 용액 100 mL를 첨가하였다. 각 vial을 강하게 진탕시킨 후, 3,000×g에서 10분동안 원심 분리하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층을 분리하였다. 분리된 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층을 질소 가스로 증발시키고 200 mL의 CH<sub>3</sub>OH를 가하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>에 의해 추출된 testosterone 및 6β-hydroxytestosterone 등을 용해시켰다. 이 용액 20 mL를 Ultrasphere ODS C-18 reverse-phase column (Beckman, 5 μm, 4.6×250 mm)에 주입 후, Beckman HPLC를 이용하여 64% CH<sub>3</sub>OH-36% H<sub>2</sub>O (v/v)의 용매로 용출시켰다. 용출속도는 1.5 mL/min이었으며, 254 nm에서 분석하였다. Area의 면적을 이용한 external standard 방법으로 형성된 산물을 정량하였다.

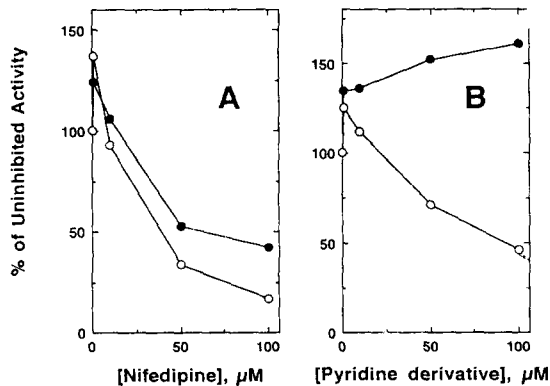
#### 5. 항체 단백질 및 화학 물질에 의한 효소 활성의 억제

총 0.5 mL의 부피에, 정제된 cytochrome P450 3A4에 대한 토끼의 polyclonal 항체 (Ig G type)를 인체 간조직 HL 110 microsomes 100 pmol에 2.5, 5.0 및 10.0 mg Ig G/nmol P-450 농도로 첨가한 뒤, 23°C에서 30분간 반응시켰다. 그 후 이것을 효소원으로 이용하여 AFB<sub>1</sub>과 testosterone의 산화 반응을 위에서 기술한 바와 같이 측정하였다.

Cytochrome P450 3A4에 대한 mechanism-based inhibitor인 gestodene과 troleandomycin을 NADPH-generating system이 있는 조건에서, 100 pmol의 HL microsomes 그리고 완충용액 등에 100 μM까지 첨가한 뒤 37°C에서 20분동안 반응시켰다. 곧이어 50 μM AFB<sub>1</sub>, 5 mM GSH 및 0.6 mg의 mouse cytosol, 혹은 200 μM testosterone을 첨가한 후 37°C에서 10분간 반응시켰다. 단,



**Fig. 3.** Effect of gestodene on oxidation of AFB<sub>1</sub> and testosterone in human liver microsomes. In the left panel experiment (A), the indicated concentrations of gestodene were added to 100 pmol of P-450 and NADPH-generating system, and the mixtures were preincubated for 20 min at 37°C. AFB<sub>1</sub> or testosterone was then added in all mixtures and incubation was done for 10 min at 37°C. In the right panel experiment (B), the indicated concentrations of gestodene were added to 100 pmol of P-450, NADPH-generating system, and 50 μM AFB<sub>1</sub> or 200 μM testosterone. And then, the reactions were incubated for 10 min at 37°C. The formation of AFB<sub>1</sub> exo-8,9-oxide : GSH conjugate (●), AFB<sub>1</sub> exo-8,9-oxide (○) and 6β-hydroxytestosterone (△) were measured by HPLC.



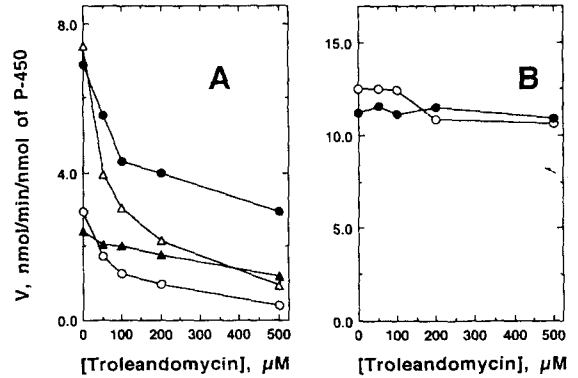
**Fig. 4.** Effects of nifedipine and its pyridine derivative on oxidations of AFB<sub>1</sub> in human liver microsomes. The formation of AFB<sub>1</sub> exo-8,9-oxide : GSH conjugate (●) and AFB<sub>1</sub> exo-8,9-oxide (○) were measured in the presence of the indicated concentrations of nifedipine (A) or its pyridine derivative (B).

gestodene를 이용한 일부의 실험은 gestodene을 기질과 동시에 첨가하였다.

### III. 결 과

#### 1. 인체 간 조직으로 부터 얻은 microsomes의 AFB<sub>1</sub> 및 testosterone 대사에 대한 Anti-P450 3A4의 역 억제 효과

AFB<sub>1</sub>이 인체 간조직인 HL 110 microsomes에 의해 AFB<sub>1</sub> exo-8,9-epoxide와 AFB<sub>1</sub> exo-8,9-oxide로 대사되는 반응이 HL



**Fig. 5.** Inhibition of AFB<sub>1</sub> oxidations and testosterone 6β-hydroxylation by troleandomycin in human liver microsomes. Reaction mixtures, containing the indicated concentrations of troleandomycin, were prepared as described under Materials and Methods without substrate. All samples were preincubated with or without 20 μM 7,8-benzoflavone for 20 min at 37°C. AFB<sub>1</sub> (50 μM) or testosterone (200 μM) was then added in all samples and the samples were incubated for 10 min at 37°C. The left panel (A) shows the formation of AFB<sub>1</sub> exo-8,9-oxide : GSH conjugate (circles) and AFB<sub>1</sub> exo-8,9-oxide (triangles) with 7,8-benzoflavone (filled circles and triangles) or without 7,8-benzoflavone (open circles and triangles). The right panel (B) shows the formation of 6β-hydroxytestosterone with (filled circles) or without (open circles) 7,8-benzoflavone.

110 microsomes내의 P450 3A4 활성화에 의해 진행되는지, 그리고 testosterone이 6β-hydroxytestosterone으로 전환되는 반응이 P450 3A4의 활성화에 의해 진행되는지를 조사하였다(Fig. 1). Anti-P450 3A4를 투여하지않은 HL 110 microsomes은 GSH conjugate로 측정된 AFB<sub>1</sub> exo-8,9-epoxide, AFB<sub>1</sub> exo-8,9-oxide 및 6β-hydroxytestosterone을 각각 2.9, 7.4 그리고 12.5 pmol/(min nmol of P-450) 속도로 대사하였다. HL 110 microsomes에 정제된 anti-P450 3A4를 P-450의 nmol당 2.5 에서 10.0 mg을 첨가한 바, 낮은 농도에서는 AFB<sub>1</sub> 형성반응이 약간 더 민감하게 저해되었으나, 고 농도에서는 3가지 효소 반응의 속도 모두가 대조군의 90% 정도가 감소되었다. 따라서, 3가지의 반응은 HL 110 microsomes에 존재하는 P450 3A4에 의해 진행되는 것으로 분석되었다.

#### 2. 인체 간 조직으로 부터 얻어진 microsomes의 AFB<sub>1</sub> 및 testosterone 대사에 대한 각종 flavonoid의 영향

식물체에 널리 분포되거나, 화학적으로 합성된 flavonoid 화합물들은 P450 1A1, P450 1A2, P450 3A4 및 여러 cytochrome P450 효소들의 활성을 증가 또는 감소시키는 것으로 알려져 (Guengerich, 1992), 이들이 P450 3A4에 의해 대사되는 상기 3가지 반응에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2). 50 μM의 각종 flavonoid들 각각을

반응의 혼합물에 첨가한 바, hesperitin, morin 및 naringenin 등은 AFB<sub>1</sub>의 8,9-epoxidation 및 3 $\alpha$ -hydroxylation 반응들, 그리고 testosterone의 6 $\alpha$ -hydroxylation 반응들을 대조군과 비교할 때 비슷한 비율로 약간의 활성을 억제하였다. 또한, apigenin 및 chrysin은 3가지 반응을 모두 심하게 억제하였다. 5,6-Benzoflavone, 7,8-benzoflavone 그리고 flavone 등은 testosterone의 대사는 크게 변화시키지 않으면서, AFB<sub>1</sub>의 8,9-epoxidation 반응은 보다 향진시켰고 동시에 3 $\alpha$ -hydroxylation 반응은 모두 감소시켰다. Quercetin과 fisetin 등은 testosterone의 대사 반응을 보다 더 억제하였다.

### 3. 인체 간 조직으로 부터 얻어진 microsomes의 AFB<sub>1</sub> 및 testosterone 대사에 대한 화학 물질들의 억제 효과

AFB<sub>1</sub>의 8,9-epoxidation 및 3 $\alpha$ -hydroxylation 반응 그리고 testosterone의 6 $\beta$ -hydroxylation 등은 HL 110 microsomes내의 P450 3A4라는 단일 효소에 의해 대사되므로, P450 3A4 효소의 활성에 영향을 선택적으로 주는 화학물질이 상기 3가지 반응들에 미치는 영향을 조사함은 P450 3A4 효소의 활성 부위에 대한 좋은 정보를 줄 것이다. Gestodene은 P450 3A4 효소에 의해 대사되면서 그 효소의 활성부위를 비가역적으로 변화시켜, 활성을 상실시키는 억제제로 알려진 물질이다 (Guengerich, 1990). 이를 AFB<sub>1</sub>이나 testosterone 처리전에 HL 110 microsomes에 노출시켜서 P450 3A4 효소를 불활성시키고, 기질들을 각각 첨가하여 상기 3가지 효소 반응을 측정할 바, 모두 비슷한 정도로 감소되었다 (Fig. 3 A). 이 결과는 본 실험조건에서도 gestodene은 강력한 mechanism-based inhibitor임과 3가지 효소 반응이 P450 3A4 효소에 의해서 진행되고 있음을 확인해줬다. 그러나, gestodene을 AFB<sub>1</sub>이나 testosterone 등의 기질과 동시에 HL 110 microsomes에 노출시키면, AFB<sub>1</sub>의 3 $\alpha$ -hydroxylation 반응과 testosterone의 6 $\beta$ -hydroxylation 반응은 gestodene에 의해서 저해되었으나, AFB<sub>1</sub>의 8,9-epoxidation 반응은 gestodene의 존재 여부에 무관하였다 (Fig. 3B). 이 결과는 P450 3A4 효소에 정상적인 기질이 존재하면 gestodene이 P450 3A4 효소에 의해 대사되어 mechanism-based inhibitor로 전환되지 않고 있음을 시사하고 있다.

Fig. 4의 A는 P450 3A4 효소의 대표적인 기질 중의 하나인 nifedipine이 AFB<sub>1</sub>의 두 가지 대사에 미치는 영향을 조사한 것이다. nifedipine에 의해서 AFB<sub>1</sub>의 8,9-epoxidation 반응과 3 $\alpha$ -hydroxylation 반응들이 모두 억제되었다. 반면에, nifedipine이 P450 3A4 효소에 의해 대

사될 때에 합성되는 nifedipine의 pyridine 유도체는 3 $\alpha$ -hydroxylation 반응은 억제시켰으나, 8,9-epoxidation 반응은 오히려 향진시켰다 (Fig. 4B).

HL 110 microsomes의 P450 3A4 효소에 의한 AFB<sub>1</sub> exo-8,9-oxide : GSH conjugate와 AFQ<sub>1</sub>의 형성 속도는 20  $\mu$ M의 7,8-benzoflavone 존재시, 각각 238% 및 32%로 증가 및 감소되었는데, 이 활성들이 troleandomycin에 의해 모두 억제되었다 (Fig. 5A). Troleandomycin의 억제효과는 7,8-benzoflavone이 없을 때 더욱 두드러졌다. 같은 P450 3A4 효소에 의해 진행되는 testosterone의 6 $\beta$ -hydroxylation 반응은 AFB<sub>1</sub>의 두 가지 산화반응들과 달리 20  $\mu$ M의 7,8-benzoflavone에 대해 영향을 거의 받지 않았다 (Fig. 5B). 또한, testosterone의 6 $\beta$ -hydroxylation 반응은 troleandomycin에 의해 거의 억제되지 않았다.

## IV. 고 찰

인체 간 조직의 microsomes에 의해서 AFB<sub>1</sub>은 AFQ<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub> exo-8,9-epoxide, 혹은 AFB<sub>1</sub> endo-8,9-epoxide 등으로 대사되는데, P450 1A2는 AFB<sub>1</sub>을 주로 AFM<sub>1</sub>으로 대사하면서 소량의 AFQ<sub>1</sub>과 두 가지 isomer 형태의 AFB<sub>1</sub> 8,9-epoxide를 동일한 양 만큼 합성한다 (Ueng 등, 1995). 또한 P450 1A1은 오직 소량의 AFM<sub>1</sub>만을 형성하며 (Guo 등, 1994), P450 3A4와 구성 아미노산 서열이 85% 정도 같은 P450 3A5는 AFB<sub>1</sub> exo-8,9-epoxide를 주로 합성한다 (Gillam 등, 1995). P450 3A4는 AFQ<sub>1</sub>을 주로 형성하면서 AFB<sub>1</sub> exo-8,9-epoxide도 합성한다 (Raney 등, 1992). HL 110 microsomes에 의한 AFB<sub>1</sub>의 대사 산물은 AFQ<sub>1</sub>과 AFB<sub>1</sub> exo-8,9-epoxide만 나타났고, AFQ<sub>1</sub>이 주된 대사물질 (data not shown) 이므로 본 AFB<sub>1</sub>의 대사는 HL 110 microsomes내의 P450 3A4에 의해서만 진행된 것으로 사료된다. 아울러 anti-P450 3A4에 의해 두 대사물질의 형성이 대부분 억제되어 (Fig. 1), AFB<sub>1</sub>은 P450 3A4에 의해서 대부분이 대사되고 있음을 보여주고 있다. Testosterone의 6 $\beta$ -hydroxylation 반응도 Brian 등의 보고 (1990)와 같이 anti-P450 3A4에 의해 거의 저해되어 P450 3A4에 의해 진행됨을 확인하였다. Flavonoid는 benzo- $\gamma$ -pyrone류의 물질로 식물체에 널리 분포되어 있으며 500여종의 천연 및 합성 유도체들이 알려져 있다 (Havsteen, 1983). 그 중 몇 종류의 flavonoid들은 몇 종류의 P450 효소들의 활성을 변화시키는 allosteric effector (Guengerich, 1992; Raucy와 Johnson, 1985; Lasker 등, 1984; Huang 등, 1981)로 알려졌는데, P450 3A4에 의해서 진행되는 상기 세가지 반응들의 속도를 한 반응은 증가시키면서 다른 반응은 억제시키는 등 다양한 방식으로

영향을 주어 (Fig. 2), 여러가지 방법으로 P450 3A4가 자신의 기질을 인식하고 대사함을 나타내주었다.

Gestodene은 구강피임제로 이용되는 17 $\alpha$ -acetylenic steroid의 일종으로, P450 3A4에 의해 17 $\alpha$ -acetylenic 기가 산화될 때 P450 3A4의 porphyrin에 결합하여 P450 spectra를 파괴하고 활성부위의 친핵체에 결합하여, P450 3A4를 비가역적으로 불활성화시킨다 (Guengerich, 1990). Fig. 3의 A와 같이 gestodene을 기질이 없는 조건에서 microsomes의 P450 3A4에 노출시키면 mechanism-based inhibitor로 전환되어 taxol(Harris 등, 1994)과 nifedipine 대사(Guengerich, 1990)나 마찬가지로 세 가지 효소 반응들이 모두 감소되었다. 반면, 기질과 동시에 gestodene을 첨가하면 두 가지의 대사는 억제되었으나, AFB<sub>1</sub>의 8,9-epoxidation반응의 활성이 그대로 살아있어 mechanism-based inhibitor(Guengerich, 1990)로 작용하고 있지 않음을 보여준다 (Fig. 3B). 그러므로 Fig. 3의 B에서 나타난 두가지 대사의 억제효과는 기질의 유사물질이라고 말할 수 있는 gestodene이 P450 3A4의 기질 결합 장소에 대해서 AFB<sub>1</sub>과 testosterone과의 경쟁 때문일 것으로 생각할 수 있다. 반면 8,9-epoxidation을 유도하는 P450 3A4의 기질 결합 부위는 gestodene의 결합 부위와 달랐을 것이다. 따라서 P450 3A4에는 AFB<sub>1</sub>에 대한 결합 부위가 최소한 두 군데가 있는데, 한 부위와 결합하면 AFQ<sub>1</sub>로 대사되고 다른 부위에 결합되면 AFB<sub>1</sub> exo-8,9-epoxide로 대사된다고 추론할 수 있다. Raney 등 (1992)은 aflatoxin B<sub>2</sub>가 AFB<sub>1</sub>의 8,9-epoxidation 반응을 억제하였지만 3-hydroxylation 반응은 억제하지 않았다고 보고 하였으며, Fig. 4의 B에서와 같이 P450 3A4에 의해 nifedipine에서 만들어지는 pyridine유도체는 3-hydroxylation 반응은 억제치 않고 8,9-epoxidation 반응만을 감소하였다. 이와같은 결과도 P450 3A4의 활성 장소에 AFB<sub>1</sub>이 최소한 두 군데에서 결합된다는 것을 나타내고 있다. 그러나, 두 가지 AFB<sub>1</sub> 산화반응 모두가 nifedipine에 의해 차단되었음은 P450 3A4에 AFB<sub>1</sub>이 결합되는 두 군데의 장소가 매우 인접되어 있음을 보여준다. 인체 간 조직에 분포되어 있는 P450 효소들 중에서 P450 3A4의 heme에 결합하여 P450 3A4의 활성을 불활성화 시키는 것으로 알려진 troleandomycin (Pressayre 등, 1983; Harris 등, 1994)은 AFB<sub>1</sub>의 대사는 효율적으로 감소시켰으나, 놀랍게도 testosterone의 대사는 전혀 억제하지 못했다 (Fig. 5의 A 및 B). 이 결과는 반복된 실험으로 확인 되어 troleandomycin는 P450 3A4 효소에 대한 mechanism-based inhibitor가 아닐 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

P450 3A4는 여러 steroid들의 산화에 높은 regiose-

lectivity가 있어 그 활성 부위가 loose pocket은 아니지만 (Guengerich, 1992), 이상의 결과들을 종합할 때 P450 3A4는 다양한 기질들을 다양한 방식으로 대사하는데, 그 효소의 활성 부위에는 기질 결합 부위가 여러 군데이며 기질의 종류에 따라 서로 경쟁관계일 수도 있고, 그렇지 않을 수도 있을 것이다. 따라서 이미 P450 3A4의 기질이라고 알려진 많은 물질들이 서로 경쟁관계인지를 조사하여 P450 3A4가 기질에 결합되는 기전을 밝힐 수있고 아울러, chemical inhibition test를 통해서 특정 물질을 대사하는 P450 효소를 알아내는 방법의 효율성을 극대화할 수 있을 것이다.

## 참고문헌

- Bork, R.W., Muto, T., Beaune, P.H., Srivastava, P.K., Lloyd, R.S. and Guengerich, F.P. (1989): Characterization of mRNA species related to human liver cytochrome P-450 nifedipine oxidase and regulation of catalytic activity, *J. Biol. Chem.*, **264**, 910-919.
- Brian, W.R., Sari, M.-A., Iwasaki, M., Shimada, T., Kaminsky, L.S. and Guengerich, F.P. (1990): Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 3A4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry*, **29**, 11280-11292.
- Buening, M.K., Fortner, J.G., Kappas, A. and Conney, A.H. (1978): 7,8-Benzoflavone stimulates the metabolic activation of aflatoxin B<sub>1</sub> to mutagens by human liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 348-355.
- Gillam, E.M.J., Baba, T., Kim, B.R., Ohmori, S. and Guengerich, F.P. (1993): Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and purification and reconstitution of the enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 123-131.
- Gillam, E.M.J., Guo, Z., Ueng, Y.-F., Yamazaki, H., Cock, I., Reilly, P.E.B., Hooper, W.D. and Guengerich, F.P. (1995): Expression of cytochrome P450 3A5 in *Escherichia coli*: Effects of 5' modifications, purification, spectral characterization, reconstitution condition and catalytic activities, *Arch. Biochem. Biophys.*, in press
- Guengerich, F.P. (1990): Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P-450 3A4 by gestodene, *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 363-371.
- Guengerich, F.P., Kim, B.R., Gillam, E.M.J. and Shimada, T. (1993): Mechanism of enhancement and inhibition of cytochrome P450 catalytic activities. In 8th Int. conference on cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics, and Molecular Biology (Lechner M), (John Libbey Eurotext, Chichester,

UK)

- Guengerich, F.P., Martin, M.V., Beaune, P.H., Kremers, P., Wolff, T. and Waxman, D.J. (1986): Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism, *J. Biol. Chem.*, **261** : 5051-5060.
- Guo, Z., Gillam, E.M.J., Ohmori, S., Tukey, R.H. and Guengerich, F.P. (1994): Expression of modified human cytochrome P450 1A1 in *Escherichia coli*: effects of 5' substitution, stabilization, purification, spectral characterization and catalytic properties, *Arch. Biochem. Biophys.*, **312**, 436-446.
- Harris, J.W., Rahman, A., Kim, B.R., Guengerich, F.P. and Collins, J.M. (1994): Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and of an unknown P450 enzyme, *Cancer Res.*, **54**, 4026-4035.
- Havsteen B. (1983): Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 1141-1148.
- Huang, M.-T., Chang, R.L., Fortner, J.G. and Conney, A.H. (1981): Studies on the mechanism of activation of microsomal benzo[ $\alpha$ ]pyrene hydroxylation by flavonoids, *J. Biol. Chem.*, **256**, 6829-6836.
- Kim, B.R., Baba, T., Gillam, E.M.J. and Guengerich, F.P. (1993): 3 $\alpha$ -hydroxylation and 8,9-epoxidation of aflatoxin B1 by cytochrome P450 3A4 : Evidence for allosteric behavior in microsomal membranes and a recombinant enzyme, *FASEB J.*, **7**, A1168.
- Lasker, J.M., Huang, M.-T. and Conney, A.H. (1984): *In vitro* and *in vivo* activation of oxidation drug metabolism by flavonoids, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **299**, 162-170.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K. and Nebert, D.W. (1993): The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature, *DNA and Cell Biol.*, **12**, 1-51.
- Pressayre, D., Tinel, M., Larrey, D., Cobert, B., Funck-Brentano, C. and Babany, G., (1983): Inactivation of cytochrome P-450 by a troleandomycin metabolite. Protective role of glutathione, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **224**, 685-691.
- Porter, T.D. and Coon, M.J. (1991): Cytochrome P450: Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulation mechanisms, *J. Biol. Chem.*, **266**, 13469-13472.
- Raney, K.D., Shimada, T., Kim, D.H., Groopman, J.D., Harris, T.M. and Guengerich, F.P. (1992): Oxidation of aflatoxins and sterigmatocystin by human liver microsomes: Significance of aflatoxin Q1 as a detoxification product of aflatoxin B1, *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 202-210.
- Raucy, J.L. and Johnson, E.F. (1985): Variations among untreated rabbits in benzo[ $a$ ]pyrene metabolism and its modulation by 7,8-benzoflavone, *Mol. Pharmacol.*, **27**, 296-301.
- Ueng, Y.-F., Shimada, T., Yamazaki, H. and Guengerich, F.P. (1995): Oxidation of aflatoxin B1 by bacterial recombinant human cytochrome P450 enzymes, *Chem. Res. Toxicol.*, in press.