J. Toxicol. Pub. Health
Vol. 15, No. 1, pp. 95-101, 1999

Cytochrome P450 3A4에 의한 Aflatoxin B_1의 산화에 대한 Dehydronifedipine의 영향

김복량* · 권강범[1] · 김동현[2]
원광대학교 의과대학 생화학교실, [1]한의과대학 생리학교실, [2]한국과학기술연구원 생체대사연구센터

The Effect of Dehydronifedipine on the Oxidation of Aflatoxin B_1 by Cytochrome P450 3A4

Bok-Ryang Kim*, Kang-Beom Kwon[1] and Dong-Hyun Kim[2]

Department of Biochemistry, School of Medicine and
[1]Department of Physiology, School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, 570-749
[2]Bioanalysis and Biotransformation Research Center,
Korea Institute of Science and Technology, Seoul, 136-650
(Received October 19, 1998)
(Accepted December 20, 1998)

ABSTRACT : *Cytochrome P450 (CYP) 3A4 metabolizes aflatoxin B_1 (AFB_1) to AFB_1-exo-8,9-epoxide (8,9-epoxidation) and aflatoxin Q_1 (AFQ_1; 3α-hydroxylation) simultaneously. We investigated whether each metabolite was formed via its own binding site of CYP3A4 active site. Kinetics of the formation of the two metabolites were sigmoidal and consistent with the kinetics of substrate activation. The Hill model predicted that two substrate binding sites are involved in the oxidation of AFB_1 by CYP3A4. Dehydronifedipine, a metabolite of nifedipine generated by CYP3A4, inhibited the formation of AFQ_1 without any inhibition in the formation of AFB_1-exo-8,9-epoxide. Dehydronifedipine was found to act as a reversible competitive inhibitor against 3α-hydroxylation of AFB_1. V_{max} and $S_{0.5}$ of the 8,9-epoxidation were not changed in the presence of 0, 50, or 100 μM dehydronifedipine. $S_{0.5}$ of 3α-hydroxylation was increased from 58±4 μM to 111±8 μM in the presence of 100 μM nifedipine whereas V_{max} was not changed. These results suggest that there exist two independent binding sites in the active site of CYP3A4. One binding site is responsible for AFB_1-exo-8,9-epoxidation and the other is involved in 3α-hydroxylation of AFB_1. Dehydronifedipine might selectively bind to the site which is responsible for the formation of AFQ_1 in the active site of CYP3A4.*

Key Words : *AFB_1, AFQ_1, Cytochrome P450 3A4, Dehydronifedipine, Substrate binding site*

Ⅰ. 서 론

포유동물에서 cytochrome P450 (P450)효소들은 200여종이 발견되었는데, 발현되는 효소는 species에 따라 그리고 발현되는 양은 개체에 따라서 크게 상이하다(Nelson, 1993). P450 3A(CYP3A)계 효소들 중 CYP3A1, CYP3A2 및 CYP3A9 등은 랫드, CYP3A6는 토끼, CYP3A8은 원숭이, 그리고 CYP3A3, CYP3A4, CYP3A5 및 CYP3A7 등은 사람에게서 각각 발현되고 있다. CYP3A3는 소장에서 발현되지만 간에서는 발현되지 않으며, CYP3A7은 태아의 간에서 발현되고 성인의 간에는 발현되지 않는다(Guengerich, 1992). CYP3A5는 성인의 간에서 발현되나 백인에서 조사된 대상의 30%만이 간조직에서 발현되었고, 그 양이 CYP3A4의 25% 미만이었다고 한다.

CYP3A4는 조사된 모든 백인과 일본인에서 그 활성이 나타났으며, 성인의 간에 존재하는 총 P450 함량의 10~60%(평균; 30%)를 차지하여 가장 대표적인 사람의 약물대사 효소로(Guengerich, 1990) 발암물질, 약물, steroids 등 현재까지 80여종 이상의 물질의 대사에 관여한다고 보고되어 있다(Gillam 등, 1993; Guengerich, 1994). 한 종류의 P450 효소에 의해 대사되는 두 가지

*To whom correspondence should be addressed

이상의 물질들이 동물의 체내로 유입되면 약물상호작용 현상에 의해 유입된 약물들의 pharmacokinetic parameter가 변동되어 심각한 secondary toxic effect를 초래할 수 있다. 그러므로, 인체에 유입되는 여러 약물이나 물질들간의 약물상호작용을 예측하기 위해서는 대사에 관여하는 P450 효소의 확인(reaction phenotyping)이 요구된다 (Harris 등, 1994).

대부분의 효소들은 기질의 특이성이 높아서 한 종류의 물질이나 그것과 구조가 매우 유사한 극소수의 물질만을 대사한다. 그러므로 unisubstrate반응을 촉매하는 효소에 기질로 작용하는 두 종류 물질이 유입되면 서로 경쟁관계가 되어 inhibitory drug interaction을 초래할 것이다. 이런 원리를 이용하여 특정 P450 효소에 의해 대사되는 물질이 임의의 화합물의 대사를 억제시키는 지의 여부로 그 임의의 물질을 대사하는 P450 효소를 확인할 수 있다. 이 방법이 가장 흔히 이용되고 있는 reaction phenotyping방법인 chemical inhibition test(CIT; Parkinson, 1996) 이다. 이는 P450 효소에 의해 대사되는 물질들 사이에서의 경쟁관계, 알려진 비경쟁적 저해제나 mechanism-based inhibitor에 의한 저해 등의 여부로 판정한다. 최근에도 이 방법을 이용하여 여러 물질들이 CYP3A4에 의해 대사되고 있음을 확인하였다. 그러나 CYP3A4에 의해 대사되는 cyclosporin A의 대사에 midazolam, nifedipine, diltiazem 및 verapamil 등 CYP3A4의 기질들은 억제작용을 보였으나, 동일한 효소의 기질들인 quinidine, omeprazole, imipramine 등은 cyclosporin A의 대사에 어떠한 영향도 주지 않았다(Chiu, 1993). 또한 taxol의 metabolite B로 대사에는 CYP3A4가 관여하나 CYP3A4의 기질인 nifedipine이나 CYP3A4의 억제제로 알려진 naringenin은 대사에 영향을 주지 않는 것으로 보고되어 있다(Harris 등, 1994). 이러한 결과는 CYP3A4의 경우 활성부위에 기질 결합부위가 두 개이상 존재한다는 가설을 지지하여 주고 있으며 Shou 등(1994)은 CYP3A4의 기질 두 개가 동시에 결합한다는 사실을 보고한바 있다.

본 연구진은 최근에 CYP3A4의 active site에는 AFQ_1을 형성하는 부위와 AFB_1-exo-8,9-epoxide를 형성하는 부위가 독립적으로 존재할 가능성을 시사하는 결과를 보고하였으며(Kim 등, 1997), 본 연구에서는 AFB_1의 대사 kinetics 분석과 dehydronifedipine을 이용한 억제실험으로 P450 3A4의 활성부위에서 AFB_1이 서로 독립적인 2개의 결합부위에 각각 결합하여 서로다른 대사체를 형성한다는 결과를 얻어 이를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

Aflatoxin B_1, glutathione(GSH), dilauroyl phosphatidylcholine(DLPC), dioleoyl phosphatidylcholine(DOPC), phosphatidylserine(PS), glucose 6-phosphate, $NADP^+$, glucose 6-phosphate dehydrogenase 및 그 외의 일반시약들은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, HPLC용 용매는 Merck(Frankfrurter, Germany) 제품을 사용하였다.

2. CYP3A4, NADPH-cytochrome P450 Reductase와 Cytochrome b_5의 분리

1) CYP3A4의 발현 및 분리

Gillam 등(1993)이 개발한 CYP3A4의 expression vector (10~15 ng) 를 *E. coli* DH5αF'IQ Max Efficiency Competent 세포에 heat shock 방법으로 transformation시킨 후 SOC media에서 2 hr 동안 배양한 후 LBamp plate에서 overnight 방치하였다. Single colony를 LBamp media에서 배양 후 TB media에 접종하고 30°C에서 24시간 배양하고 1 mM IPTG를 투여한 뒤 24시간동안 배양한 후에 세포를 분리하였다. 분리된 세포에 lysozyme(300×g/g cells)을 처리하여 spheroplast를 얻고, 1.0 mM PMSF, 2.0 μM leupeptin, 0.04 U/mL aprotinin 그리고 1.0 μM bestatin등의 용액에 녹이고 sonication을 실시하여 membrane를 얻었다(Fisher 등, 1992). Membrane를 0.6% sodium cholate로 용해시킨 후 20% glycerol, 0.4% Emulgen 911 그리고 1.0 mM DTT를 포함하는 20 mM Tris-acetate 완충용액(pH 7.5)으로 3배 희석하였다. 이 용액을 상기 완충용액으로 평형시킨 DEAE Sephacel column과 10 mM potassium phosphate, pH 7.4, 20% glycerol, 0.1 mM DTT 그리고 0.05% sodium cholate로 평형시킨 Hydroxylapatite column을 이용하여 CYP3A4를 정제하였다.

2) NADPH-cytochrome P450 Reductase와 Cytochrome b_5의 분리

NADPH-cytochrome P450 reductase는 Guengerich와 Martin(1980)이 기술한 방법으로 가토의 liver microsomes 용액을 n-octylamino-Sepharose 4B column(2.5×15 cm)으로 분리하였으며, 사람의 간 조직에 존재하는 cytochrome b_5는 Shimada 등(1986)이 기술한 방법을 이용하여 분리하였다.

3) CYP3A4의 활성도 검사

AFB_1이 CYP3A4에 의해 AFQ_1과 AFB_1-exo-8,9-epoxide로 전환되는 반응들은 Kim 등(1998)이 보고한 방법으로 분석하였다. 즉, NADPH-P450 reductase(200 pmol), cytochrome b_5(100 pmol), 200 μg sodium cholate, glutathione(3 mM), DOPC, DLPC 및 PS가 1 : 1 : 1로 섞인 혼합물을 20 μg을 첨가하여 100 pmol의 정제된 CYP3A4를 1~2초 동안 sonication으로 reconstitution을 시킨 뒤 이것을 효소원으로 이용하였다. 반응 혼합물은 총 1 mL이며 100 pmol의 CYP3A4, 50 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.5), 2 mM glutathione, 0.6 mg mouse liver cytosol, 50 μM AFB_1, 5 mM glucose 6-phosphate, 1.0 mM $NADP^+$ 및 1.0 IU yeast glucose 6-phophate dehydrogenase 등이 포함된다. 이 혼합물을 37°C에서 10분간 반응시키고, 37 μL formic acid를 첨가하여 반응을 종료시킨 후 -70°C에서 10시간 동안 보관하여 단백질을 침전하였다. 3,000×g에서 10분간 원심 분리하여 침전된 단백질을 제거한 후 AFB_1 대사물들은 Raney 등(1992)이 기술한 방법을 약간 변형시킨 방법으로 Beckman사의 HPLC(Model 142)를 이용하여 분석하였다. 사용된 column은 Ultrasphere ODS C-18 reversed-phase column(Shiseido, 5 μm, 4.6×250 mm)이었고, 용출 용매는 20 mM ammonium acetate (acetic acid로 pH 4.0 조정)인 용매 A와 acetonitrile : methanol : H_2O를 4.5 : 4.5 : 1.0의 비율로 혼합된 용매 B로 이루어졌으며 용출속도는 1.0 ml/min로 조정하였다. 90% A-10% B의 비율로된 용매로 column을 평형시킨 후 20 μL의 시료를 주입하고, 연속적인 농도 구배 방식으로 20분 동안에 걸쳐서 30% A-70% B의 비율로 용출용매를 변화시키면서 시료를 용출시키며 AFB_1 대사물질은 360 nm에서 측정하였다(Gillam 등, 1993; Oh 등, 1995; Kim 등, 1997).

4) Dehydronifedipine의 억제기전

AFB_1의 농도를 0에서부터 120 μM까지 변화시켜서 만든 AFB_1의 대사측정 혼합물에 0, 50 및 100 μM의 dehydronifedipine를 각각 첨가하여 3α-hydroxylation 및 8,9-epoxidation 반응이 dehydronifedipine에 의해 어떤 방식으로 저해되는 지를 분석하였다. 통계처리와 sigmoidal curve의 분석은 Sigma plot을 이용하여 실시하였다.

III. 결 과

1. CYP3A4에 의한 AFB_1의 대사에 대한 Dehydronifedipine의 작용

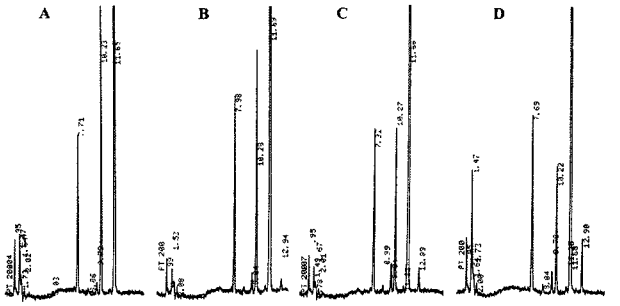

Fig. 1. HPLC analysis for oxidation products of AFB_1 formed by CYP3A4. CYP3A4 was incubated with AFB_1, NADPH-P450 reductase, cytochrome b_5, GSH, and other components described under Materials and Methods in the absence of dehydronifedipine (A), or in the presence of 50 μM (B), 100 μM(C), or 200 μM (D) dehydronifedipine for 10 min at 37°C. The indicated peaks were identified as the GSH conjugate of AFB_1-exo-8,9-epoxide (t_R: 7.7 min), AFQ_1 (10.2 min), AFB_1 (11.7 min), and dehydronifedipine (12.9 min) by comparison of t_R with authetic standards.

정제한 CYP3A4에 의해 AFB_1은 AFQ_1(t_R: 10.2 min)과 AFB_1-exo-8,9-epoxide(t_R: 7.7 min)로 대사되었으며, AFB_1-exo-8,9-epoxide는 glutathione과 glutathione S-transferase를 이용하여 glutathione conjugate를 만든 후 분석하였다. 두 대사물질의 형성비율은 3.8 : 1.0으로 나타났다(Fig. 1A). 이 비율은 HL 110 microsomes에 의해 만들어지는 두 대사물질의 비율인 2.4 : 1.0보다 높게 나타났다(Kim 등, 1995). HL 110 microsomes에는 CYP3A4뿐 아니라, CYP1A1과 1A2 등이 존재하는데 이들은 주로 AFB_1-exo-8,9-epoxide과 aflatoxin M_1을 형성하기 때문일 것이다. 본 연구에서는 정제된 CYP3A4를 이용하였기 때문에 그 비율이 높게 나온 것으로 분석되었다. Dehydronifedipine을 첨가하면 AFQ_1의 peak가 첨가된 dehydronifedipine(t_R: 12.9 min)의 농도에 반비례하게 감소되었다(Fig. 1B, 1C, 1D 및 Fig. 2). 반면, AFB_1-exo-8,9-epoxide의 형성에는 거의 영향을 주지 않아 두 대사물질의 형성비율이 dehydronifedipine의 농도가 100 μM일 때 1 : 1 정도이었다가 200 μM에서는 AFQ_1의 peak가 AFB_1-exo-8,9-epoxide의 peak보다 오히려 더 작아졌다. 따라서 dehydronifedipine은 AFB_1-exo-8,9-epoxide의 형성에는 전혀 영향을 주지 않으면서 AFQ_1의 형성반응만을 선택적으로 저해하는 작용을 나타냈다.

2. Preincubation에 따른 dehydronifedipine의 억제효과

Dehydronifedipine이 AFQ_1의 형성반응을 가역적으로 억제하는지 혹은 비가역적으로 억제하는 지를 조사

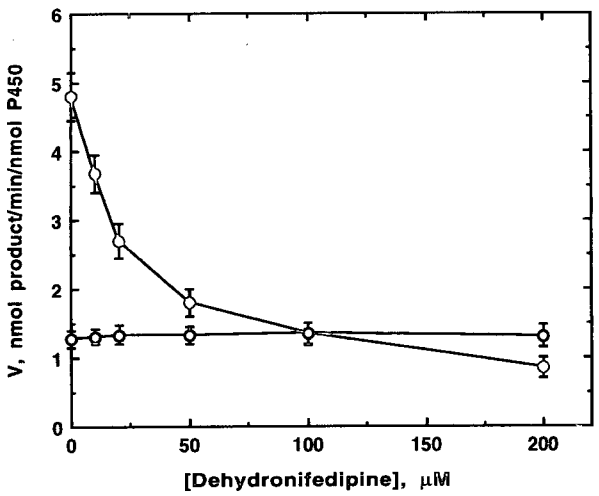

Fig. 2. Effect of dehydronifedipine on AFB_1 oxidations by CYP3A4. AFB_1 oxidations were done with CYP3A4 and others as described in the legend to Fig. 1. The formation of AFB_1-exo-8,9-epoxide (○) and AFQ_1 (○) were measured by HPLC. The results are shown as means±SD of triplicate experiments.

하기 위해서 기질인 AFB_1을 제외한 모든 반응 혼합물을 첨가하고 100 μM의 dehydronifedipine을 투여하여 5, 10, 20 그리고 30분간 37°C에서 preincubation을 실시하였다. 그 후 AFB_1을 투여하여 10분간 반응을 진행시켰다. Dehydronifedipine을 투여치 않은 대조군에서

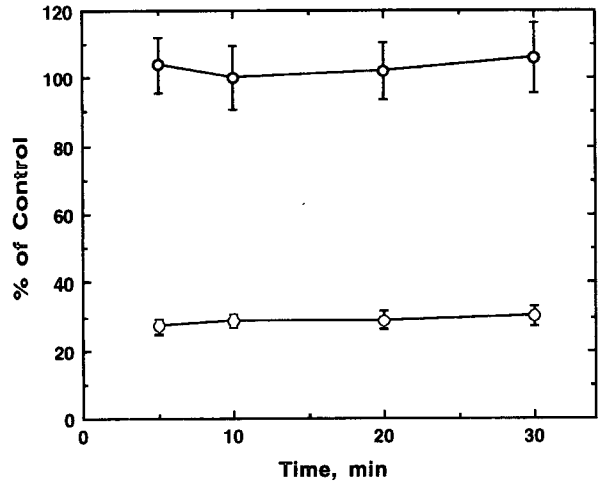

Fig. 3. Inhibition of AFB_1 oxidations by CYP3A4 as a function of preincubation time with dehydronifedipine. CYP3A4 was preincubated with all of reaction mixtures except AFB_1 in the absence and presence 100 μM dehydronifedipine for the indicated time at 37°C. After preincubation, incubation was done with AFB_1 for 10 min. The formation of AFB_1-exo-8,9-epoxide (○) and AFQ_1 (○) were measured by HPLC. Control velocities of the formation of AFB_1-exo-8,9-epoxide and AFQ_1 were 1.30 and 4.82, 1.32 and 4.76, 1.28 and 4.75, or 1.17 and 4.51 nmol/min/nmol P450 for 5, 10, 20, or 30 min of preincubation. The results are shown as means±SD of triplicate experiments.

5, 10, 20 그리고 30분간 preincubation을 실시할 때 AFB_1-exo-8,9-epoxide와 AFQ_1의 형성속도는 각각 1.30과 4.82, 1.32와 4.76, 1.28과 4.75 그리고 1.17과 4.51 nmol/min/nmol P450로 분석되었다. AFQ_1의 형성을 억제하는 dehydronifedipine의 효과는 전처리 시간과는 무관하게 대조군 활성의 70~73%정도를 일정하게 저해시켰다(Fig. 3). 이 결과는 dehydronifedipine이 AFQ_1의 합성반응을 억제하는 방식이 비가역적인 방법이 아님을 보여주고 있다. 왜냐하면 Oh 등(1995)이 보고한 바와 같이 mechanism-based inhibitor 등의 비가역적인 억제제들은 전처리하는 시간에 비례적으로 효소의 활성을 불활성화 시키기 때문이다. 또한, 효소와 dehydronifedipine을 같이 섞었다가 gel-filtration으로 분리하였더니 CYP3A4의 활성이 재생되었는데(unpublished data)이 결과와 Fig. 3은 dehydronifedipine이 AFQ_1의 형성을 가역적으로 저해하고 있는 것을 시사하고 있다. 한편, AFB_1-exo-8,9-epoxide의 형성 반응에 대한 dehydronifedipine의 작용은 Fig. 1과 Fig. 2에서와 같이 전혀 영향을 주지 못하였다(Fig. 3).

3. AFB_1의 산화 반응에 대한 Dehydronifedipine의 억제기전

AFB_1의 농도에 따른 AFQ_1과 AFB_1-exo-8,9-epoxide 형성 속도의 변화는 일반적인 효소반응들과 같은 hyperbolic curve 양상으로 나타나지 않고, sigmoidal curve 양상으로 나타났다(Fig. 4). 이와 같은 양상은 Ueng 등(1997)과 Guengerich 등(1994)이 보고한 바가

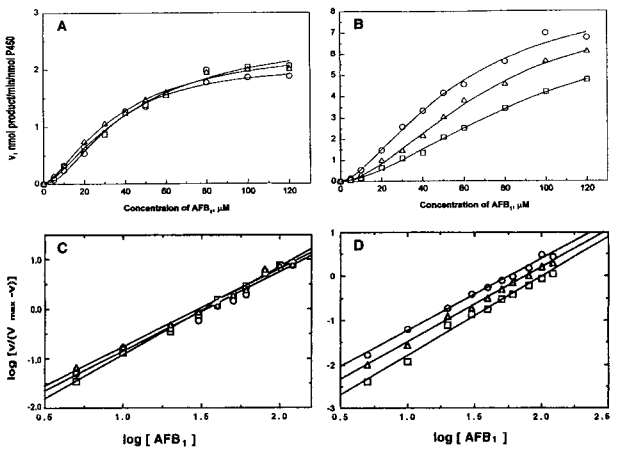

Fig. 4. *V vs S* plot of AFB_1 oxidations by CYP3A4. Parts A and B show the formation of AFB_1-exo-8,9-epoxide and AFQ_1 in the absence (○) and presence of 50 μM (△) or 100 μM (□) dehydronifedipine, respectively. Parts C and D show the same results as fitted to plots of $\log[v/(V_{max}-v)]$ vs $\log S$.

Table 1. Parameters for AFB_1 oxidations catalyzed by CYP3A4

Reaction	Dehydronifedipine (μM)	Vmax (nmol/min/nmol P450)	$S_{0.5}$ (μM)	n
8,9-Epoxidation	0	2.10±0.32	34±4	1.77±0.13
	50	2.34±0.26	38±3	1.60±0.11
	100	2.42±0.41	41±5	1.57±0.18
3α-Hydroxylation	0	9.26±0.78	58±4	1.62±0.14
	50	8.96±0.82	74±7*	1.70±0.15
	100	9.10±0.67	111±8*	1.79±0.15

Values were expressed as means±SD of triplicate experiments.
*significantly difference from control ($P<0.05$).

있다. 따라서 Michaelis-Menten 방정식을 $v=(V_{max}S^n)/(S_{0.5}^n+S^n)$로 전환시키고, $\log[v/(V_{max}-v)]$ 대 $\log[AFB_1]$의 그래프를 이용해서 Sigma Plot으로 V_{max}, $S_{0.5}$ 그리고 n값 등을 구하였다(Fig. 5 및 Table 1). 최대 속도인 V_{max}는 AFB_1-exo-8,9-epoxide를 형성하는 8,9-epoxidation 반응에서는 2.10±0.32 nmol/min/nmol P450이였으며 AFQ_1을 형성하는 3α-hydroxylation 반응에서는 9.26±0.78 nmol/min/nmol P450으로 나타났다. $S_{0.5}$는 sigmoidal model에서 최대 속도의 절반을 보이는 기질의 농도를 나타내는데, 3α-hydroxylation반응에서는 58±4 μM이었으며, 8,9-epoxidation 반응에서는 34±4 μM로 분석되었다. n값은 cooperativity나 기질이 효소에 결합하는 갯수를 나타내는데(Segel, 1975), 두 반응에서 각각, 1.77과 1.62로 나타나 Ueng 등(1997)이 보고한 2.3 및 2.1과는 약간 상이하였으나, Gallagher 등이 보고한 결과(1996)와는 비슷하였다. Dehydronifedipine이 50과 100 μM로 존재할 때 AFB_1의 두 가지 대사물질들이 만들어지는 최대 속도는 dehydronifedipine이 투여되지 않았을 때의 속도와 차이가 없었다. 반면, $S_{0.5}$값은 8,9-epoxidation의 반응에서 첨가한 dehydronifedipine의 양에 의해 변동되지 않았으나, 3α-hydroxylation의 반응에 대해서는 dehydronifedipine의 농도가 0, 50 및 100 μM에서 각각 58±4, 74±7 그리고 111±8 μM로 분석되어, 첨가한 dehydronifedipine의 농도에 비례하여 증가하였다. Dehydronifedipine이 가역적인 억제제이므로 (Fig. 3), 이와 같은 결과는 dehydronifedipine이 AFB_1-exo-8,9-epoxide 형성 반응에는 전혀 관여치 않으면서, AFQ_1의 형성 반응에 대해서는 경쟁적 저해제로 작용하고 있는 것을 나타내고 있다.

Ⅳ. 고 찰

Raney 등(1992)에 의하면 CYP3A4에 의해서 AFB_1이 AFQ_1과 AFB_1-exo-8,9-epoxide로 전환되는 반응에서, 7,8-benzoflavone은 allosteric 효과에 의해 AFB_1-exo-8,9-epoxide의 형성반응은 증가시키고 AFQ_1의 형성반응은 감소시키며, 또한 AFB_2는 AFQ_1의 형성에는 영향을 주지 않으면서 AFB_1-exo-8,9-epoxide의 형성을 억제한다고 하였다. CYP3A4에 의한 AFB_1의 대사는 이와 같이 한 가지의 효소와 한 가지의 기질에서 동시에 서로 다른 종류의 종산물이 형성되며, 한 종류의 effector에 의해 한 쪽 반응은 촉진시키고 동시에 다른 반응은 억제시키는 특이한 효소반응이라고 보고하였다(Guengerich, 1994; Ueng 등, 1997). Gestodene은 CYP3A4를 포함하는 CYP3A계 효소군에 의해 17α-acetylene 기가 산화될 때 CYP3A의 porphyrin에 결합하여 P450 spectrum을 파괴하여 CYP3A를 비가역적으로 불활성화시킨다(Guengerich, 1990). 그러므로 gestodene으로 CYP3A의 활성을 억제하기 위해서는 기질을 첨가하기 전에 이들만을 반응시키는 preincubation과정을 실시하여야 한다(Guengerich, 1990; Harris 등, 1994). Pirmohamed 등(1992)에 의하면 마우스의 CYP 3A와 결합하는 carbamazepine과 6β-hydroxycortisol의 형성반응 등은 preincubation과정을 실시하지 않아도 gestodene에 의해서 저해되었다고 한다. 그들은 마우스의 CYP3A의 활성이 사람의 CYP3A의 활성보다 더 높기 때문에 이와 같은 현상이 나타났다고 주장하였다.

그러나 본 연구진이 보고(Kim 등, 1997)한 바와 같이 gestodene이 CYP3A4의 활성을 억제하기 위해서는 먼저 활성부위내의 기질 결합부위에 결합되어야 하는데 그 결합부위를 통해서 대사되는 기질의 반응은 활성화되지 않은 gestodene에 의해서 억제될 수 있다는 것이다. 그러므로 CYP3A4에 AFQ_1의 형성반응(Kim 등, 1997)뿐 아니라, carbamazepine과 6β-hydroxycortisol의 형성반응 등도 같은 이유에서 활성화 되지 않은 gestodene에 의해서 억제되는 것으로 여겨진다. 본 연구도 CYP3A4에 의해 AFB_1이 AFQ_1과 AFB_1-exo-8,9-epoxide로 전환되는 반응이 두개의 서로 다른 기질결합부위에 AFB_1이 결합하여 진행됨을 dehydronifedipine을 이용하여 밝히고자 하였다. Dehydronifedipine은 nifedipine이 CYP3A4에 의해 대사될 때 형성되는 물질이다(Guengerich 등, 1986). 이 물질은 Fig. 2와 Fig. 3에서와 같이 AFB_1-exo-8,9-epoxide가 형성되는 반응에는 영향을 주지 않으면서 AFQ_1의 형성반응만을 가역적인 방식으로 억제하는 물질로 밝혀졌다. 두 종류의 대사물질의 형성반응들은 기질인 AFB_1의 농도에 대해 sigmoid 형태로 나타났는데, 그 억제기전이 기질과 경쟁적이었다(Fig. 4).

경쟁적인 저해제는 기질이 효소의 활성 부위에 있는

기질의 결합부위에 결합하는 것을 차단하는 물질이므로, 기질의 결합부위에 특이적으로 결합하는 것이다. 따라서, dehydronifedipine은 AFB_1이 CYP3A4에 결합하여 AFQ_1으로 전환되는 장소에 선택적으로 결합하며, 이 부위는 AFB_1이 결합되어 AFB_1-exo-8,9-epoxide가 형성되는 부위와 겹치지 않으므로 3α-hydroxylation의 반응이 dehydronifedipine에 의해서 저해되지 않는 것으로 사료된다. 이 결과는 CYP3A4의 활성부위에 7,8-benzoflavone과 phenanthrene이 동시에 결합되어 대사된다는 보고(Shou 등, 1994)보다 더 분명하게 CYP3A4의 활성부위에는 결합하는 부위가 여러개 있음을 보여주고 있다. 그러므로, 이미 CYP3A4의 기질로 밝혀진 기질들 사이에서도 이용하는 기질의 결합부위에 따라서 drug interaction이 나타나거나, 혹은 나타나지 않을 수도 있을 것이다. 이 개념은 일반적 효소의 기질의 특이성(기질 결합부위가 한 개라는 근거에 기인됨)에 토대로 고안된 reaction phenotyping을 위한 CIT의 모호성을 설명할 수 있는 이론적 근거를 제공할 것이다. 또한, 동일 효소에 의해 대사되는 기질들 사이에서 경쟁관계가 성립하지 않을 수 있는데 이는 임상적 치료에 매우 유익하게 이용될 수 있을 것이다. 고가의 치료제(taxol 등)나 부작용이 큰 치료약물(cyclosporine 등)은 사람에 많은 양을 투여할 수 없어 체내에서 잔류하는 시간을 높이려는 시도를 하고 있다. 이 방법은 P450 효소의 선택적 억제제, 특히 mechanism-based inhibitor를 사용하여 해당 P450 효소를 비가역적으로 억제한다. 이 경우 그 P450 효소의 활성부위가 완전히 파괴되어 그 효소로 촉매되어야하는 여러 내인성 물질과 xenobiotics들의 대사도 모두 차단되어 부작용이 수반될 것이다(Delaforge 등, 1983; Braian 등, 1990; Kharasch 등, 1993; Lindstrom 등, 1993). 고가 혹은 부작용이 큰 치료제가 P450 효소에 의해 대사될 때 이용하는 기질 결합부위를 경유해서 대사되는 다른 무독한 물질을 투여하면, 그 치료제의 대사를 억제시키면서 다른 기질의 결합부위를 통해 대사되는 물질들은 정상적으로 대사할 수 있으므로 부작용 감소와 약효 증강의 가능성이 있다.

결론적으로 CYP3A4는 적어도 2개의 기질 결합부위가 존재하며 dehydronifedipine은 기질결합 부위중 AFB_1-exo-8,9-epoxide 생성을 유도하는 결합부위에 선택적으로 결합하여 효소활성을 저해하였다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 원광대학교 교비 연구비의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Chiu, L. (1993): The use of vitro metabolism studies in the understanding of new drugs, *JPM*, **29**, 77-83.

Gallagher, E.P., Kunze, K.L., Stapleton, P.L. and Eaton, D.L. (1996): The kinetics of aflatoxin B_1 oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **141**, 595-606.

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.

Guengerich, F.P. and Martin, M.V. (1980): Purification of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, and epoxide hydratase from a single preparation of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**, 365-379.

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.

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. (1992): Minireview: Human cytochrome P-450 enzymes. *Life Sci.*, **50**, 1471-1478.

Guengerich, F.P., Kim, B.R., Gillam, E.M.J. and Shimada, T. (1994): Mechanism of enhancement and inhibition of cytochrome P450 catalytic activities. In *Proceedings, 8th Int. conference on cytochrome P450*: Biochemistry, Biophysics, and Molecular Biology (Lechner MC, ed.), John Libbey Eurotext, Chichester, UK, 97-101.

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.

Kharasch, E.D. and Thummel, K.E. (1993): Human alfentanil metabolism by cytochrome P450 3A3/4. An explanation for interindividual variability in alfentanil clearance? *Anesth. Analg.*, **76**, 1033-1039.

Kim, B.R. and Kim, D.H. (1998): Influence of glu-

tathione on the catalytic activity of reconstituted cytochrome P450 3A4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **242**, 209-212.

Kim, B.R., Oh, H.S. and Kim, D.H. (1997): Differential inhibition of aflatoxin B_1 oxidation by gestodene action on human liver microsomes. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **43**, 839-846.

Kim, B.R., Oh, H.S. and Kim, H.J. (1995): Reaction mechanism of troleandomycin on the activity of human liver microsomal cytochrome P450 3A4. *Korean J. Toxicol.*, **11**, 329-335.

Lindstrom, T.D., Hanssen, B.R. and Wrighton, S.A. (1993): Cytochrome P450 complex formation by dirithromycin and other macrolides in rat and human livers. *Antimicrobial Agents Chemother.*, **37**, 265-269.

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 Cell Biol.*, **12**, 1-51.

Oh, H.S., Lee, K.S. and Kim, B.R. (1995): Effects of several inhibitors of human liver microsomal cytochrome P450 3A4 on catalytic activities of the enzyme. *Korean J. Toxicol.*, **11**, 23-29.

Parkinson, A. (1996): Biotransformation of xenobiotics in Toxicology (Klaassen, C.D.,Ed), McGraw-Hill, New York, 113-186.

Pirmohamed, M., Neil R. Kitteringham., Breckenridge, A.M. and Park, B.K. (1992): The effect of enzyme induction on the cytochrome P450-mediated bioactivation of carbamazepine by mouse liver microsomes. *Biochem, Pharmacol.* **44**, 2307-2314.

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 Q_1 as a detoxification product of aflatoxin B_1. *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 202-210.

Segel, I.H. (1975): Enzyme kinetics, John Wiley and Sons, New York, pp. 346-464.

Shimada, T., Misono, K.S. and Guengerich, F.P. (1986): Human liver microsomal cytochrome P-450 mephenyltoin 4-hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. Purification and characterization of two similar forms involved in the reaction. *J. Biol. Chem.*, **261**, 909-921.

Shou, M.J., Grogan, J.A. Mancewicz, K.W. krause, F. J. Gonzalez, H.V. Gelboin, and K.R. Korzekwa. (1994): Activation of CYP3A4: Evidence for the Simultaneous binding of two substrate in a Cytochrome P450 active site. *Biochemistry* **33**, 6450-6455.

Ueng, Y.F., Kuwabara T, Chun Y.J. and Guengerich F.P. (1997): Cooperativity in oxidations catalyzed by cytochrome P450 3A4. *Biochemistry* **36**, 370-381.