



HepG2 세포에서 Ethanol, Glycerol, 4-methylpyrazole 및 Isoniazid에 의한 Human CYP2E1 활성 변화

최 달 웅

고려대학교 병설 보건대학 환경보건과

Differential Role of Ethanol, Glycerol, 4-Methylpyrazole and Isoniazid on Human CYP2E1 Activity in Intact HepG2 Cells

Dal-Woong Choi

Department of Environmental Health, College of Health Sciences, Korea University, Seoul, Korea

Received August 7, 2003; Accepted August 26, 2003

ABSTRACT. The modification of CYP2E1 activity is of considerable interest because of its role in the metabolic activation of a variety of toxic chemicals. In the present studies, the time-course of changes in human CYP2E1 activities was determined after treatment with ethanol, glycerol, 4-methylpyrazole or isoniazid using intact HepG2 cells transfected by human CYP2E1. Hydroxylation of chlorzoxazone was chosen for the measurement of CYP2E1 activity. CYP2E1 protein levels were increased upon cultivation of cells in the presence of ethanol, glycerol, 4-methylpyrazole or isoniazid for 24 hr. After 24 hr cultivation, ethanol or glycerol increased CYP2E1 activities, whereas 4-methylpyrazole or isoniazid inhibited. This different effect of the chemical inducers on CYP2E1 activities persisted to subsequent 24 hr. Competitive inhibition study suggested that 4-methylpyrazole or isoniazid has stronger binding affinity to CYP2E1 than ethanol or glycerol. These results demonstrate that different binding affinity of the chemical inducers to the active site of CYP2E1 plays important role in determining real CYP2E1 activity in intact cells after treatment with the chemical inducers. Present study would be helpful in precise understanding of human CYP2E1-mediated toxicity.

Keywords: Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), Induction, Ethanol, Glycerol, 4-Methylpyrazole, Isoniazid.

서 론

Cytochrome P450 2E1(CYP2E1)은 cytochrome P450의 동종 효소로서 간 조직에 가장 높은 농도로 존재하며

Correspondence to: Dal-Woong Choi, Department of Environmental Health, College of Health Sciences, Korea University, Seoul 136-703, Korea
E-mail: dalwoong@korhealth.ac.kr

Abbreviations: CYP2E1, cytochrome P450 2E1; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis; CHZ, Chlorzoxazone; OH-CHZ, 6-hydroxyl chlorzoxazone; DPI, diphenyleiodonium; 4-MP, 4-methylpyrazole; HPLC, high-performance liquid chromatography; PBS, phosphate buffered saline

N-nitrosamines, benzene, vinyl chloride, carbon tetrachloride, acetaminophen 및 urethane 등과 같은 여러 가지 화학물질을 대사 활성화시켜 각종 조직독성 및 암 유발에 깊은 관련을 갖는다(Lieber, 1997). 또한 이 효소는 ethanol, acetone, dimethylsulfoxide(DMSO), pyrazole, 4-methylpyrazole(4-MP), imidazole, isoniazid, pyridine 등과 같은 다양한 저분자 화학물질 처리에 의해 쉽게 그 양이 증가한다고 보고 되었다(Song 등, 1986; Ryan 등, 1986; Reinke 등, 1985; Eliasson 등, 1988; Wu 등, 1990). 이렇게 증가한 효소는 독성물질의 대사활성화 정도에 지대한 차이를 유발하므로 이 효소의 유도기전은 독성학적으로 중요한 의의를 가진다. 대부분의 다른 CYP 동종효소와는 대조적으로, 이러한 저분자 화학 유도

제에 의한 CYP2E1 유도는 일반적으로 전사과정의 활성화를 야기하지 않는다. 많은 저분자 화학 유도제가 CYP2E1의 활성부위 결합에 의한 단백질 안정화에 의해 이 효소를 유도한다고 알려졌다(Eliasson 등, 1988; Song 등, 1989; Roberts 등, 1995; Yang과 Cederbaum, 1997a).

이러한 저분자 화학 유도제에 의한 CYP2E1 단백질량은 여러 논문에서 일관성 있게 증가함이 보고되고 있지만 CYP2E1 활성의 변화는 일관성 있는 결과를 보여 주지 못하였다. 각각의 실험조건에 따라 증가한 활성(Song 등, 1986; Wu 등, 1990; Yang 등, 1997b)을 또는 감소한 CYP2E1 활성(Carroccio 등, 1994)을 나타내었다. 이러한 차이는 기존의 연구에서 CYP2E1 활성 측정을 분리된 마이크로솜을 사용하여 수행해 왔기 때문이라고 생각된다. 저분자 화학 유도제의 CYP2E1 활성부위 결합에 의한 단백질 안정화는 CYP2E1의 분해를 억제하지만 다른 한편으로는 다른 기질의 CYP2E1 활성부위 결합을 억제하므로 효소 단백질량은 증가된 상태지만 실제 활성은 오히려 감소되는 결과를 유발할 수 있다. 만약 마이크로솜 분리 과정에서 결합되어 있던 화학 유도제가 분리되어 떨어진다면 실제 *in vivo*에서는 화학 유도제와의 결합에 의해 CYP2E1 양이 증가하고 활성은 억제된 상태이지만 분리된 마이크로솜에서는 오히려 증가된 CYP2E1 활성을 나타낼 수 있다. 초원심분리과정을 이용한 마이크로솜 분리과정 중에서 화학 유도제가 CYP2E1의 활성부위에서 떨어져 나갈 수 있는지에 대한 연구는 아직 이루어져 있지 않다. 이러한 문제 때문에, CYP2E1 활성을 살아있는 간 세포를 이용하여 직접 측정한다면 마이크로솜 분리과정의 영향 없이 실제 *in vivo* 상황과 유사한 조건에서 CYP2E1 활성 변화를 알 수 있겠다. 그러나 CYP2E1을 안정적으로 발현하는 간세포주가 존재하지 않기 때문에 살아있는 세포를 이용한 CYP2E1 활성 측정은 많은 어려움을 안고 있었다(Patten 등, 1992). 이러한 문제를 해결하는 최상의 방법은 transfection 기술을 이용하여 인간 간 세포주에 안정적으로 human CYP2E1을 발현시키는 것이다. 실제 CYP2E1 활성 측정은 대부분 분리된 마이크로솜을 이용하여 이루어지고 있고 살아있는 세포를 이용한 측정은 CYP2E1 발현을 확인하는 정도에서만 이루어졌고 시간변화에 따른 CYP2E1 활성 변화에는 아직 사용되지 않았다.

Peter 등(1990)에 의해 chlorzoxazone(CHZ)의 6-hydroxylation이 사람 마이크로솜에서 주로 CYP2E1에 의해 이루어진다고 알려진 이후 CHZ은 사람 CYP2E1 활성을 측정하는데 가장 이상적인 기질로서 알려져 있다. 그러나 사람 CYP2E1 활성 측정은 수술적인 간 biopsy를 필요로 하므로 수행하는데 많은 어려움이 있었다(Guengerich와 Turvy, 1991). 반면 간에서 hydroxylation된 CHZ을 혈액

에서 채취하여 CYP2E1 활성을 알아보는 방법이 인간에게 있어서 비교적 간단하고 위험을 주지 않는 CYP2E1 활성 측정법으로 알려져 있다.

본 연구에서는 일반적으로 CYP2E1 단백질 양을 증가시킨다고 알려진 ethanol, glycerol, 4-MP과 isoniazid와 같은 저분자 화학 유도제 처리 후 시간 경과에 따른 사람 CYP2E1 활성의 변화를 측정하였다. 실제 *in vivo* 상황과 유사한 조건에서 측정하기 위해서, CYP2E1이 transfection된 사람 간세포주인 HepG2 세포를 사용하여 마이크로솜의 분리 없이 세포에 의해 직접 CHZ이 hydroxylation되는 정도로 CYP2E1 활성을 측정하였다. 본 연구에서는 이러한 화학 유도제 처리 후에 CYP2E1 단백질량은 모두 증가 하였지만 CYP2E1 활성은 각각 화학 유도제의 CYP2E1에 대한 친화도에 따라 각기 다른 변화 양상을 나타냄을 보여주고 있다.

실험재료 및 방법

시약

Polyclonal human anti-CYP2E1 antibodies는 Calbiochem에서 구입하였다. Minimal essential medium (MEM) 배지는 Life Technologies에서 6-hydroxyl chlorzoxazone(OH-CHZ)은 Gentest에서 구입하였다. 그 외 모든 시약은 Sigma Chemicals에서 구입하였다.

세포배양과 용매처리

CYP2E1을 발현하는 HepG2 세포(E47 세포)는 Dr. A.I. Cederbaum(Mount Sinai school of Medicine, NY)에게서 제공 받았다(Chen과 Cederbaum, 1998). E47 세포는 사람 CYP2E1 cDNA가 삽입된 pCl-neo expression vector를, C34 세포(대조군 HepG2 세포)는 pCl-neo vector만을 가지고 있다. C34 세포와 E47 세포는 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin과 2 mM glutamine을 포함하는 MEM 배지로 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 세포들이 plates에 거의 차게 되면 각각의 농도의 저분자 화학 유도제를 포함하는 신선한 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 계속해서 배양할 경우 세포를 배지로 씻어준 후 이 화학 유도제가 들어있지 않은 신선한 배지에서 계속 배양하였다.

CYP2E1 활성 측정

본 실험에서 CYP2E1 활성은 마이크로솜의 분리 없이 살아있는 E47 세포 또는 C34 세포를 가지고 직접 측정하였다. 기질은 사람 CYP2E1 활성 측정에 매우 민감한 지표로 알려진 CHZ을 사용하였다(Peter 등, 1990). 세포가

plate에 부착되어 있는 상태에서 배지를 제거하고 incubation phosphate buffered saline(PBS)으로 바꾸어준 다음 CYP2E1 활성을 측정하였다. 이 incubation PBS에 500 μ M의 CHZ 을 넣어주고 37°C에서 60분간 incubation시킨 후 세포가 incubation PBS로 유리시킨 대사체인 OH-CHZ을 측정하였다. OH-CHZ은 Chittur와 Tracy (1997)의 방법으로 high-performance liquid chromatography(HPLC)를 사용하여 정량 하였다. HPLC 시스템에서 이동상은 22% acetonitrile과 0.5% acetic acid로 구성되어있고 유속은 1.2 ml/ml이었다. Column은 Spherisorb ODS column(125 \times 4 mm, 5 μ m)을 사용하였다. OH-CHZ는 UV detector를 사용하여 287 nm에서 측정하였고 internal standard와 standard curve를 사용하여 정량하였다. 전체 세포의 단백질량은 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였고 intact cell의 CYP2E1 활성은 pmol/min/mg protein으로 표시하였다.

마이크로솜 분획 분리와 CYP2E1 단백질 양 변화 측정

세포를 PBS에 취하여 sonication한 후 10,000 g에서 15분간 원심분리하고 그 상등액을 60분 동안 100,000 g에서 초원심분리하여 마이크로솜 분획을 얻었다. CYP2E1 단백질 양의 변화는 E47 세포의 마이크로솜을 이용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행한 후 polyclonal human anti-CYP2E1 antibodies 이용하여 Western blot(Towbin 등, 1979)을 수행하여 측정하였다. Blot은 Biomax 1D software(Kodak)를 갖춘 densitometry를 사용하여 정량화 하였다.

통계처리

여러 처치군 간의 유의성을 one-way analysis of variance(ANOVA)로 검정한 후 Newman-keuls multiple range test($p < 0.05$)로 검정하였다.

결 과

Ethanol, glycerol, 4-MP 또는 isoniazid 처리에 의한 CYP2E1 단백질 양의 변화

본 실험조건하에서 저분자 화학 유도제 처리에 의한 CYP2E1 단백질량의 변화를 알아보기 위해, E47 세포에 ethanol(100 mM), glycerol(100 mM), 4-MP(2 mM) 또는 isoniazid(2 mM)을 각각 처리하고 24시간 동안 배양한 후, CYP2E1 항체를 가지고 Western blot을 수행하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 젤 상의 54 kDa에서 사람 CYP2E1 band를 확인 할 수 있었다. 배지에 각각의 화학

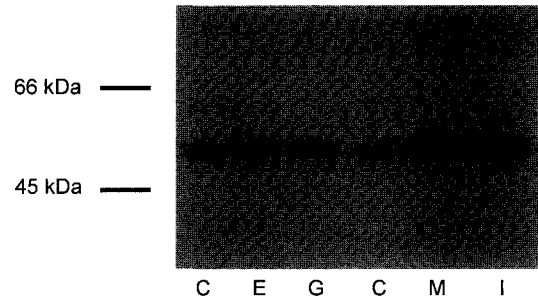


Fig. 1. Western blot analysis of microsomal CYP2E1 content from E47 cells pretreated with ethanol (100 mM), glycerol (100 mM), 4-methylpyrazole (4-MP) (2 mM) or isoniazid (2 mM) for 24 hr. Microsomes from pretreated cells were separated and CYP2E1 proteins were analyzed using anti-CYP2E1 antibody as described under experimental procedures (C : Control; E : Ethanol; G : Glycerol; M : 4-MP; I : Isoniazid).

유도제를 24시간 동안 처리한 군들에서 모두 CYP2E1 단백질량의 증가가 나타났다(Fig. 1). 화학 유도제를 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 24시간 동안 ethanol, glycerol, 4-MP 또는 isoniazid가 배지에 존재한 군에서 각각 약 240%, 230%, 340%, 350% 의 CYP2E1 단백질 양 증가를 관찰하였다.

Intact E47 세포를 이용한 CYP2E1 활성 측정

저분자 화학 유도제 처리에 의한 CYP2E1 활성 변화를 알아보기 전에 이 intact E47 세포를 이용한 CYP2E1 활성 측정법의 유효성을 확인해보았다. CHZ을 incubation PBS에 넣어주고 37°C에서 60분간 incubation시킨 후 incubation PBS와 세포내의 OH-CHZ을 추출하여 HPLC로 분석한 결과 incubation PBS로의 OH-CHZ의 유리가 incubation 시간과 세포수에 비례하여 일정하게 증가하였고 세포내의 OH-CHZ 생성은 초기 시간대에 포화되고 더 이상 증가하지 않았다(data not shown). 따라서 본 실험에서는 incubation PBS로 유리되는 OH-CHZ을 이용하여 실험을 수행하였다.

Incubation PBS에 5 μ M의 diphenyleneiodonium(DPI; cytochrome P450 reductase와 b_5 reductase의 억제제) (McGuire 등, 1998)가 CHZ과 함께 존재하였을 때는 CHZ의 hydroxylation이 완전히 억제 되었다(E47 세포, 26.4 pmol/min/mg; E47 세포+DPI, 1.9 pmol/min/mg). Cytochrome P450 reductase와 b_5 reductase가 HepG2 세포에서 충분히 발현되고 있으므로(Patten 등, 1992; Yang 등, 1997b), DPI가 cytochrome P450 reductase와 b_5 reductase를 억제하여 그 영향으로 CYP2E1 catalytic cycle이 강력하게 억제되었다고 사료된다. 또한

transfection되지 않은 보통 HepG2 세포는 CYP2E1을 발현하지 않으므로 CHZ를 C34 세포의 incubation PBS에 넣어준 후 HPLC로 분석했을 때는 OH-CHZ가 측정되지 않았다.

Ethanol, glycerol, 4-MP 또는 isoniazid 처리에 의한 차별적인 CYP2E1활성 변화

각각의 저분자 화학 유도제 처리가 E47 세포의 CYP2E1 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 배지에 각각 ethanol(100 mM), glycerol(100 mM), 4-MP(2 mM) 또는 isoniazid(2 mM)을 넣고 24시간 동안 배양한 후 CYP2E1 활성을 측정하였다. 즉, 각각의 화학 유도제 존재 하에서 E47 세포를 24시간 동안 배양한 후 신선한 배지로 세포를 씻어주어 남아있는 화학 유도제를 제거한 후 CYP2E1 활성을 측정하였다. Ethanol 또는 glycerol을 24시간 동안 처리 한 후에는 CYP2E1 활성이 각각 86%, 71% 증가 하였다(Fig. 2). 반면 4-MP 또는 isoniazid을 24시간 동안 처리 한 후에는 그 활성이 각각 52%, 48% 감소하였다.

계속하여 시간 경과에 따른 CYP2E1 활성의 변화 양상을 관찰하였다. 세포를 위와 같이 각각의 화학 유도제 존재 하에서 24시간 동안 배양한 후 신선한 배지로 씻어주어 남아있는 화학 유도제를 제거한 후 계속하여 화학 유도제가 들어있지 않은 신선한 배지로 배양하면서 각각 36, 48, 72, 96시간에 CYP2E1 활성을 측정하였다(Fig. 3). Ethanol 또는 glycerol처리에 의해 증가한 CYP2E1 활성은 48시간까지도 유의성 있는 증가를 나타냈고 72시간까지도 증가하는 경향을 나타냈지만 유의성은 없었다. 96시간에는 화학 유도제를 처리하지 않은 대조군과 유사한 값을 나타내었다. 반면 4-MP 또는 isoniazid 처리에 의

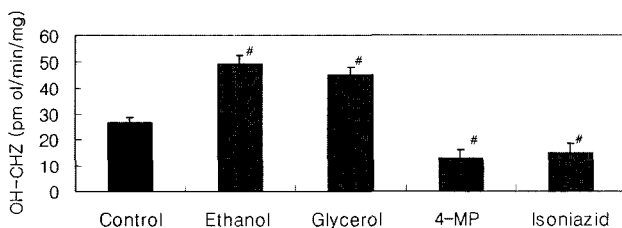


Fig. 2. Modification of CYP2E1 activity (chlorzoxazone (CHZ) hydroxylation) after 24 hr treatment of E47 cells with ethanol, glycerol, 4-methylpyrazole (4-MP) or isoniazid in the MEM medium. Cells are treated with ethanol (100 mM), glycerol (100 mM), 4-MP (2 mM) or isoniazid (2 mM) for a 24 hr period. CYP2E1 activity was then measured in the incubation PBS. Values are the mean \pm SD of 3 individual determinations. Number sign (#) indicates a significant difference from the control at $p < 0.05$.

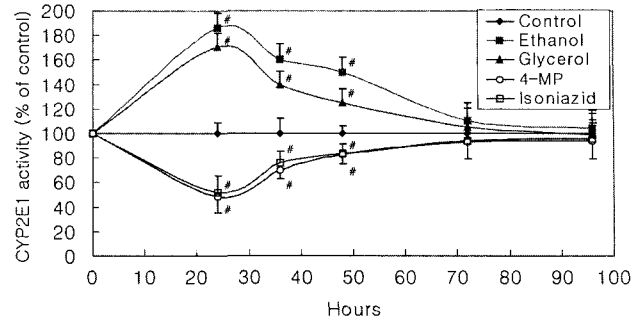


Fig. 3. Time course of CYP2E1 activity after 24 hr treatment with ethanol, glycerol, 4-methylpyrazole (4-MP) or isoniazid in the MEM medium. Cells are treated with ethanol (100 mM), glycerol (100 mM), 4-MP (2 mM) or isoniazid (2 mM) for a 24 hr period. Then cells were washed with fresh medium and the cell culture continued with fresh medium without ethanol, glycerol, 4-MP or isoniazid. CYP2E1 activity was measured at the indicated time points (24, 36, 48, 72, 96 hr) in incubation PBS. Values are the mean \pm SD of 3 individual determinations. Number sign (#) indicates a significant difference from the control value at $p < 0.05$.

해 감소한 활성은 48시간까지도 계속 억제되다가 72시간에는 그 유의성이 사라졌다. 이러한 화학 유도제 24시간 처리에 의한 CYP2E1 활성변화는 24시간부터 48시간까지 그 차별적인 효과가 유지되었으나 72시간에는 사라졌다.

Ethanol, glycerol, 4-MP 또는 isoniazid가 incubation PBS에 존재시의 CHZ hydroxylation

실험에 사용한 화학 유도제의 CYP2E1에 대한 친화도를 비교하기 위해, 각각의 화학 유도제가 incubation PBS에 존재하는 상태에서 CHZ의 hydroxylation을 측정하였다. Fig. 4는 화학 유도제가 incubation PBS에 주어진 농도로 각각 존재할 때 CHZ의 hydroxylation이 다양

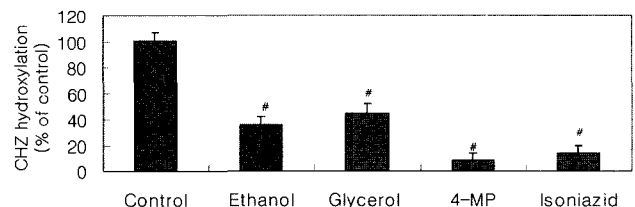


Fig. 4. Inhibition of chlorzoxazone (CHZ) hydroxylation by ethanol, glycerol, 4-methylpyrazole (4-MP) or isoniazid. Chlorzoxazone hydroxylation was measured in the presence of ethanol (10 mM), glycerol (10 mM), 4-MP (0.2 mM) or isoniazid (0.2 mM) in incubation PBS. Values are the mean \pm SD of 3 individual determinations. Number sign (#) indicates a significant difference from the control at $p < 0.05$.

한 정도로 억제됨을 보여주고 있다. 이러한 억제는 각각의 화학 유도제가 CYP2E1의 활성 부위에 대해 CHZ와 경쟁하므로 유발된다고 생각된다. CHZ의 hydroxylation은 ethanol(10 mM) 또는 glycerol(10 mM)가 incubation PBS에 존재할 때 각각 64%, 55%가 대조군에 비해 감소하였고 반면 4-MP(0.2 mM) 또는 isoniazid(0.2 mM)가 존재할 때는 각각 92%, 86%가 감소하였다. 4-MP 또는 isoniazid가 ethanol이나 glycerol 보다 강력한 억제를 나타내었다. 화학 유도제 24시간 처리시에 사용한 농도로 이 실험을 수행하면 CHZ hydroxylation 억제가 모두 강하게 나타나서 화학 유도제에 의한 억제 정도를 비교하기가 어려우므로 이 실험에서는 더 낮은 농도를 사용하였다.

고 찰

CYP2E1에 의해 대사되어 독성을 유발하는 여러 가지 화학물질의 독성 유발기전에 대한 이해에는 CYP2E1 활성 변화에 대한 정확한 정보를 요구한다. 따라서 적절한 방법에 의한 CYP2E1 활성 측정이 중요하다. 본 연구에서는 살아있는 세포를 이용하여 여러 화학물질 처리 후 시간 경과에 따른 CYP2E1 활성 변화를 측정하였다. CHZ를 incubation PBS에 넣어주어 세포에 의해 대사되게 한 다음 incubation PBS로 유리되는 OH-CHZ를 HPLC로 정량한 이 방법은 일관성 없는 결과를 유발할 수 있는 마이크로솜 분리 과정을 생략할 수 있어 CYP2E1 활성 측정에 적절하다. (1) Scrapping에 의한 세포의 수집, (2) sonication을 이용한 세포막 파괴, (3) 초원심분리 그리고 (4) 유리 pestle을 이용한 resuspension 등과 같은 마이크로솜 분리 과정 중에 CYP2E1과 결합되어 있던 화학 유도제가 분리되어 나갈 수 있기 때문이다. 또한 살아있는 세포를 사용하였기 때문에 세포내의 cofactor들이나 효소에 대한 손상도 최소화할 수 있는 장점이 있다.

본 실험에서 각각의 저분자 화학 유도제가 incubation PBS에 존재할 때는 CHZ의 hydroxylation이 모두 억제되었다(Fig 4). 4-MP와 isoniazid와 같이 구조 중에 질소 원자를 가지고 있는 화학 유도제가 질소 원자를 가지고 있지 않은 ethanol과 glycerol 보다 강한 억제를 나타내었다. Hargreaves 등(1994)은 여러 화학물질들 중에 질소 원자를 구조 속에 가지고 있는 화학물질이 랫트 CYP2E1에 대해 강한 친화력이 있다고 밝혔다. 또한 Kim과 Novak(1993)은 여러 화학 유도제에 의한 CYP2E1 활성 억제 능력이 CYP2E1에 대한 결합 친화력과 상관 관계가 있음을 보고 하였다. 따라서 4-MP와 isoniazid은 사람 CYP2E1에 대해 ethanol과 glycerol에 비해 강한 결합 친화력을 가지고 있다고 사료된다.

본 연구에서 ethanol이나 glycerol 24시간 처리 후의 CYP2E1활성은 CYP2E1 단백질 양의 변화와 비례해서 증가하였다. 그러나 4-MP이나 isoniazid 24시간 처리 후의 CYP2E1활성은 CYP2E1 단백질 양의 변화와 반대의 결과를 나타내었다. 본 연구 결과에서 관찰된 현상은 4-MP와 isoniazid의 CYP2E1 활성부위에 대한 강한 결합 친화력으로 설명될 수 있다. 4-MP와 isoniazid는 CYP2E1과 강하게 결합하고 있으므로 배지에서 이 화학 유도제가 제거된 후에도 계속 CYP2E1의 활성부위에 강하게 결합을 한 상태로 남아있게 된다. 그리하여 CHZ의 결합을 계속 억제하게 되어 비록 CYP2E1 단백질 양은 증가되었지만 CYP2E1 활성은 감소한 결과로 나타났다고 추정된다. 이와는 대조적으로 ethanol과 glycerol은 4-MP와 isoniazid에 비해 CYP2E1에 대해 상대적으로 약한 결합 친화력을 가지고 있어, 배지에서 ethanol과 glycerol가 제거되자마자 바로 CYP2E1의 활성부위로부터 떨어져 나오거나 대사되어 나간다고 생각된다. 그리하여 증가된 CYP2E1의 활성부위가 비워지게 되어 CHZ의 대사가 증가되었다고 추정된다. 그러한 결과는 CYP2E1 활성 변화가 언제나 CYP2E1 단백질 양의 변화와 비례하여 나타나는 것이 아니며 화학 유도제의 CYP2E1 결합 친화도와 이에 수반된 활성부위로부터의 제거 속도가 활성 변화에 중요한 요소임을 보여주고 있다.

본 실험법은 CHZ를 투여하고 일정 시간이 지난 후 혈액에서 OH-CHZ 양을 측정하여 간 CYP2E1 활성을 측정하는 *in vivo* 시험법과 유사한 원리이므로 실제 인간 간 CYP2E1 활성 변화를 마이크로솜 분리에 의한 방법보다 정확하게 알아낼 수 있다. 다만 제2상 효소들이 미치는 영향에 대해서는 추가 연구가 필요하겠다. 본 연구 결과는 사람이 화학 유도제에 노출 되었을 때 간 CYP2E1 활성 변화를 쉽게 예측 가능하게 하며 CYP2E1을 경유한 독성 물질들간의 상호 작용에 대한 정확한 이해를 돕는다.

감사의 글

저자는 Dr A.I. Cederbaum께 E47 세포를 제공해 주신데 대해 감사 드립니다.

참고문헌

- Carroccio, A., Wu, D. and Cederbaum, A.I. (1994): Ethanol increases content and activity of human cytochrome P450E1 in a transduced HepG2 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**, 727-733.
- Chittur, S.V. and Tracy, T.S. (1997): Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic assay for 6-hydroxy-

- chlorzoxazone and chlorzoxazone in liver microsomes, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **693**, 479-483.
- Chen, Q. and Cederbaum, A.I. (1998): Cytotoxicity and apoptosis produced by cytochrome P450 2E1 in Hep G2 cells, *Mol. Pharmacol.*, **53**, 638-648.
- Eliasson, E., Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. (1988): Ligand-dependent maintenance of ethanol-inducible cytochrome P-450 in primary rat hepatocyte cell cultures, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**, 436-443.
- Guengerich, F.P. and Turvy, C.G. (1991): Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**, 1189-1194.
- Hargreaves, M.B., Jones, B.J., Smith, D.A. and Gescher, A. (1994): Inhibition of p-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes by small aromatic and heterocyclic molecules, *Drug Metab. Dispos.*, **22**, 806-810.
- Kim, S.G. and Novak, R.F. (1993): The induction of cytochrome P4502E1 by nitrogen- and sulfur-containing heterocycles: expression and molecular regulation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **120**, 257-265.
- Lieber, C.S. (1997): Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role, *Physiol. Rev.*, **77**, 17-44.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- McGuire, J.J., Anderson, D.J., McDonald, B.J., Narayanasami, R. and Bennett, B.M. (1998): Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenylethylideneiodonium sulfate, *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 881-893.
- Patten, C.J., Ishizaki, H., Aoyama, T., Lee, M., Ning, S.M., Huang, W., Gonzalez, F.J. and Yang, C.S. (1992): Catalytic properties of the human cytochrome P450 2E1 produced by cDNA expression in mammalian cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, **299**, 163-171.
- Peter, R., Bocker, R., Beaune, P.H., Iwasaki, M., Guengerich, F.P. and Yang, C.S. (1990): Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1, *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 566-73.
- Reinke, L.A., Sexter, S.H. and Rikans, L.E. (1985): Comparison of ethanol and imidazole pretreatments on hepatic monooxygenase activities in the rat, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **47**, 97-106.
- Roberts, B.J., Song, B.J., Soh, Y., Park, S.S. and Shoaf, S.E. (1995): Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1, *J. Biol. Chem.*, **270**, 29632-29635.
- Ryan, D.E., Koop, D.R., Thomas, P.E., Coon, M.J. and Levin, W. (1986): Evidence that isoniazid and ethanol induce the same microsomal cytochrome P-450 in rat liver, an isozyme homologous to rabbit liver cytochrome P-450 isozyme 3a, *Arch. Biochem. Biophys.*, **246**, 633-644.
- Song, B.J., Gelboin, H.V., Park, S.S., Yang, C.S. and Gonzalez, F.J. (1986): Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the rat enzyme, *J. Biol. Chem.*, **261**, 16689-16697.
- Song, B.J., Veech, R.L., Park, S.S., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J. (1989): Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization, *J. Biol. Chem.*, **264**, 3568-3572.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4350-4354.
- Wu, D.F., Clejan, L., Potter, B. and Cederbaum, A.I. (1990): Rapid decrease of cytochrome P-450IIE1 in primary hepatocyte culture and its maintenance by added 4-methylpyrazole, *Hepatology*, **12**, 1379-1389.
- Yang, M.X. and Cederbaum, A.I. (1997a): Characterization of cytochrome P4502E1 turnover in transfected HepG2 cells expressing human CYP2E1, *Arch. Biochem. Biophys.*, **341**, 25-33.
- Yang, M.X., Wu, D. and Cederbaum, A.I. (1997b): Glycerol increases content and activity of human cytochrome P-4502E1 in a transduced HepG2 cell line by protein stabilization, *Alcohol: Clin. Exp. Res.*, **21**, 340-347.