

## Butylated Hydroxyanisole과 Butylated Hydroxytoluene 투여가 흰쥐 간조직 UDP-Glucuronosyltransferase 활성 증가

이화여자대학교 의과대학 생화학교실  
홍 영 숙

= Abstract =

### Increased UDP-Glucuronosyltransferase Activity in the Liver of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene-Treated Rats

Young Sook Hong

*Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University*

Butylated hydroxyanisole(BHA) has been shown to decrease the toxicological and carcinogenic potential of a variety of chemicals. One possible mechanism for chemoprotection is that BHA increases intestinal UDP-glucuronosyltransferase activity and thereby enhances the elimination of the toxicants. Given that I.P injection is a major route of xenobiotic exposure, we have investigated the action of BHA and BHT on glucuronidation capacity in the liver of rats. Simple injection of BHA(100mg/kg or 200mg/kg) and BHT(100mg/kg or 200mg/kg) produced a significant increase in microsomal glucuronidation. Furthermore, the concentration of UDP-glucuronic acid, the co-substrate required for glucuronidation reaction was increased almost 2-fold. Administration of BHA and BHT also increased UDP-glucose concentration and UDP-glucose dehydrogenase activities approximately 2-fold. These findings show that BHA and BHT administration increase hepatic glucuronidation capacity and suggest that BHA and BHT may enhance the biotransformation of xenobiotics, and hence excretion, of a variety of carcinogen and or toxins is potentially very important.

### 서 론

Glucuronidation은 내인성 화합물이나 유독성의 내인성 대사산물들을 제거하는 과정중 하나이다. 이런과정은 UDP-glucuronic acid로부터 glucuronic acid를 여러가지 화합물과 결합시켜 배설되기 쉬운 수용성화합물의 생성을 촉매하는 UDP-glucurono-

syltransferase(UDPGT)에 의하여 수행된다<sup>1)</sup>. 이효소는 multiple form으로 존재하며 이들은 약물, 홀몬 그리고 다양한 종류의 xenobiotics(이물질)에 의하여 유도된다. 그리고 여러가지 기질들에 의하여 다른 특이성이 나타나진다<sup>2~7)</sup>. 다양하게 다른 화합물들 즉 anticonvulsant(진경제)약물인 phenobarbital(PB), polycyclic hydrocarbon인 3-

methylcholanthrene(3-MC) 그리고 음식의 방부제인 butylated hydroxyanisole(BHA)은 포유동물 간 조직에서 이런 transferase 활성화의 유도를 모두 나타내왔다<sup>8)9)</sup>. 생쥐의 식이에 BHA를 첨가 해서 투여 했을 때 생쥐 간조직 마이크로솜의 UDPGT의 활성이 증가되었고 생쥐의 hepatocyte에서 acetaminophen과 harmol glucuronidation의 속도를 현저히 증가 시킴을 보고하여왔다<sup>10~13)</sup>. 이런 효과에 더해서, BHA는 생쥐 간조직에서 UDP-glucose dehydrogenase 활성을 증가 시키는 것이 발견 되었다<sup>10)11)</sup>. 이효소는 glucuronidation에 필요한 기질인 UDP-glucuronic acid를 UDP-glucose의 산화를 촉매하므로 형성되게 한다.

본 연구에서는 BHA와 BHT를 투여 하고 여러 가지 aglycone을 썼을 때 UDP-glucuronosyltransferase의 활성과 UDP-glucose, UDP-glucuronic acid 및 UDP-glucose dehydrogenase를 측정하여 BHA와 BHT가 UDP-glucuronic acid의 생합성에 관한 효과를 관찰 하고자 하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험동물

정상조건으로 사육한 체중 250g 내외의 성숙한 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 사용하였고 100mg과 200 mg/kg bodyweight의 BHA와 BHT 투여는 corn oil에 용해해서 복강내로 한번 주사 하였다. 대조군은 1.0ml의 corn oil을 복강내로 주사하였다. 모든 실험동물은 24시간 금식시킨후 절두하여 간장을 절제 하였다.

### 2. 실험방법

각 실험군에서 절제한 간조직은 0.15M KCl과 0.05M Tris-HCl, pH7.2, 그리고 10% glycerol buffer용액으로 25% 균질용액을 만들어 마이크로솜을 분리 하였다<sup>14)</sup>. 단백질을 측정하는 Lowry<sup>15)</sup> 등의 방법으로 측정 하였으며 표준물질로서는 bovine serum albumin을 사용하였다.

UDP-glucuronosyltransferase 활성은 기질로써 p-nitrophenol을 사용하였을 때 Burchell<sup>16)</sup>의 방법으로 incubation 혼합물은 25 $\mu$ mole의 Tris-HCl buffer(pH7.4)와 0.1 $\mu$ mole UDP-glucuronic acid 그리고

microsome(1.0~2.0mg의 protein)과 10분간 37°C에서 incubation한후 405nm에서 그 흡광도를 측정하였다. Bilirubin을 사용하였을 때는 Van Roy와 Heirwegh<sup>7)</sup>의 방법으로 incubation 혼합물은 0.1M Tris-HCl(pH7.4), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3mM bilirubin, 3 mM UDP-glucuronic acid 그리고 microsome(2mg의 protein)과 10분간 37°C에서 incubation한후 530 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 기질로써 1-naphthol을 사용 하였을 때 Bock과 White<sup>18)</sup>의 방법으로 incubation 혼합물은 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.4), 5mM MgCl<sub>2</sub> 0.5mM 1-naphthol, 3mM UDP-glucuronic acid 그리고 microsome(1mg protein)과 2분간 37°C에서 incubation 한 후 그 fluorescence를 emission 330nm와 excitation 290nm에서 측정 하였다. 기질로써 4-methylumbelliferone을 사용하였을 때 Lilienblum<sup>19)</sup> 등의 방법으로 incubation 혼합

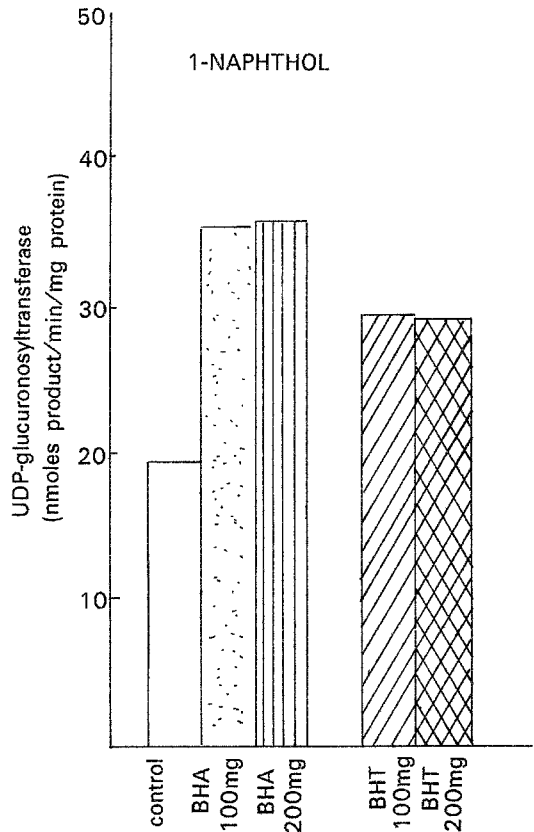


Fig. 1. Rate of UDP-glucuronosyltransferase conjugation of 1-naphthol in the liver microsome from control, BHA and BHT-treated rats.

물은 0.1M Tris-HCl buffer(pH7.4), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM 4-methylumbelliferone, 3mM UDP-glucuronic acid 그리고 microsome(0.5mg의 protein)을 30 분간 37°C에서 incubation 한 후 emission 365nm와 excitation 315nm에서 glucuronide의 fluorescence를 측정 하였다. UDP-glucose와 UDP-glucuronic acid의 농도는 Koppler와 Decker<sup>20)</sup>와 Watkins와 Klaassen<sup>21)</sup>의 방법으로 측정 하였다.

### 실험결과

흰쥐에서 BHA와 BHT 투여로 UDPGT의 활성의 변화는 acceptor로서 1-naphthol, 4-nitrophenol, 4-methylumbelliferone과 bilirubin을 사용하여 측정

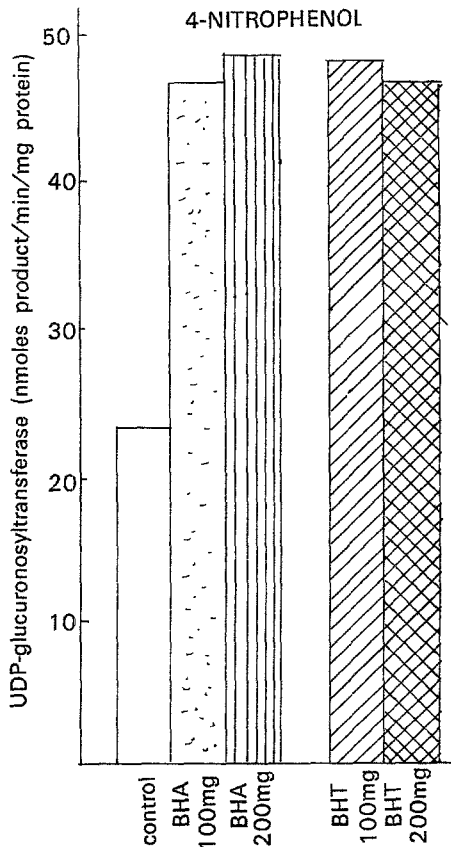


Fig. 2. Rate of UDP-glucuronosyltransferase conjugation of 4-nitrophenol in the liver microsomes from control, BHA and BHT-treated rats.

하여 Fig. 1, 2, 3 및 4에 나타내었다. Acceptor로서 1-naphthol과 4-nitrophenol의 glucuronidation은 100mg/kg과 200mg/kg의 BHA를 투여하였을때 약 2배 정도 증가되었다. 동시에 100mg/kg과 200mg/kg의 BHT를 투여 하였을때 4-nitrophenol의 glucuronidation은 약 2배 증가로 같은 경향이였다. 그러나 1-naphthol의 glucuronidation은 BHT투여로 약간 낮은 1.5배 증가 하였다.

4-methylumbelliferone의 glucuronidation은 BHA와 BHT 투여에서 모두 약 13% 정도만이 증가 되었다. 그러나 bilirubin의 glucuronidation은 100mg/kg과 200mg/kg의 BHA 투여로 약 4~5배로 증가 되었고 BHT 투여로 약 3배 증가되었다.

BHA와 BHT 투여로 UDP-glucose의 농도는 1.8~2.5배 까지 증가 되었으며(Fig. 5), UDP-glucuronic acid의 농도는 1.6~1.9배까지 증가되었다

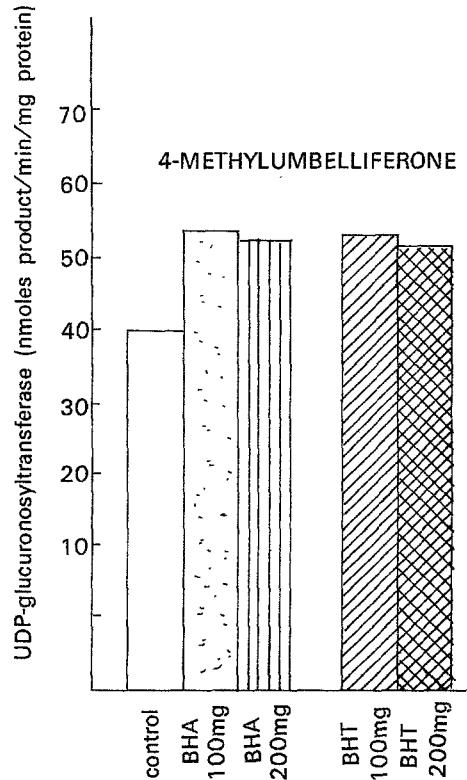


Fig. 3. Rate of UDP-glucuronosyltransferase conjugation of 4-methylumbelliferone in the liver microsomes from control, BHA and BHT-treated rats.

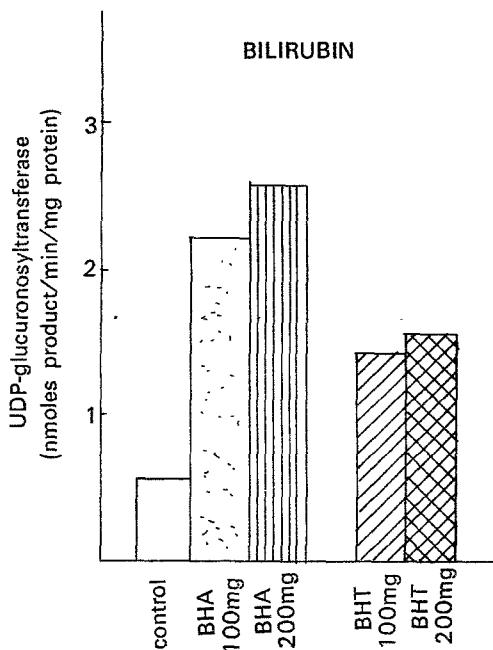


Fig. 4. Rate of UDP-glucuronosyltransferase conjugation of bilirubin in the liver microsome from control, BHA and BHT-treated rats.

(Fig. 6). 또한 UDP-glucose dehydrogenase의 농도는 1.6~1.7배 증가 됨으로써 같은 경향을 나타내었다(Fig. 7).

## 고 찰

항산화제인 BHA와 BHT는 구조적으로 다양한 화합물 즉 polycyclic hydrocarbons, halogenated solvents, drugs 및 식물의 toxin들의 carcinogenic과 hepatotoxic 효과를 감소시키는 것으로 알려져 왔다<sup>22)23)</sup>. BHA의 protective 효과는 여러가지 toxic 또는 carcinogenic metabolites들의 해독작용을 하는 여러가지 효소의 활성을 증가시키는 능력 때문이라고 생각된다.

Phase II biotransformation pathway는 BHA 투여로 생쥐에서 증가 된다고 보고되어 왔다. 음식물의 항산화제인 BHA와 BHT 투여로 흰쥐 간조직내 glucuronidation의 양이 증가되는 것을 지적하였다. 이와같은 결론은 BHA와 BHT를 투여한 흰쥐에서 UDP-glucuronic acid의 농도와 특이한

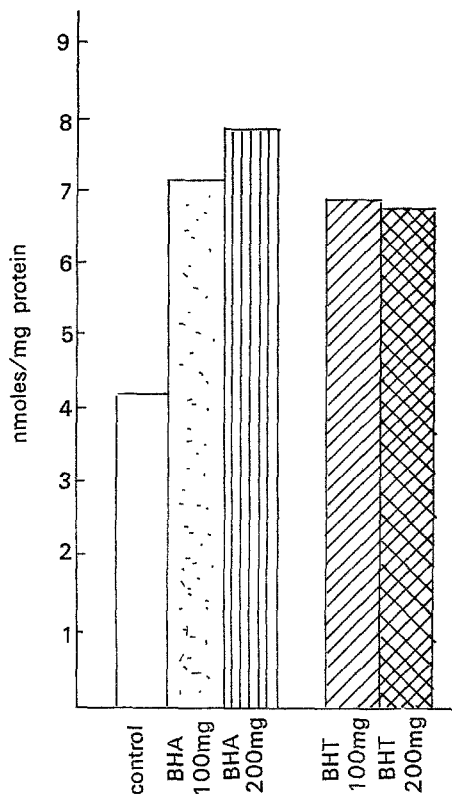


Fig. 5. Concentration of UDP-glucuronic acid in the liver of control, BHA and BHT-treated rats.

기질에 대한 UDP-glucuronosyltransferase의 활성이 모두에서 증가 한것을 기초로 내린 것이다.

생화학적, 약리학적 및 ontological 연구에서 흰쥐 간조직 UDP-glucuronosyltransferase가 적어도 3가지 형이 존재 한다는 강력한 증거를 제공하여 왔다<sup>24)</sup>.

본 연구에서 BHA와 BHT투여로 1-naphthol, 4-nitrophenol 및 4-methylumbelliferone를 가지고 측정한 활성도도 현저히 증가 되었다. 그러나 4-methylumbelliferone은 중간정도로 증가 되었다. 이와 같은 증가는 경구투여한 것보다 복강내로 주사한 것이 더 많아 증가 되었다. 이런 enzyme 활성의 증가는 BHA와 BHT의 투여로 몇개의 UDPGT specific 활성이 증가 되며 이는 immunochemical 연구로 확인 되어야 한다.

UDPGT의 cosubstrate로 UDP-glucuronic acid의 농도 변화는 hepatocyte, 간 그리고 동물전체<sup>25)26)27)</sup>에서 xenobiotic glucuronidation되는 율에 영향

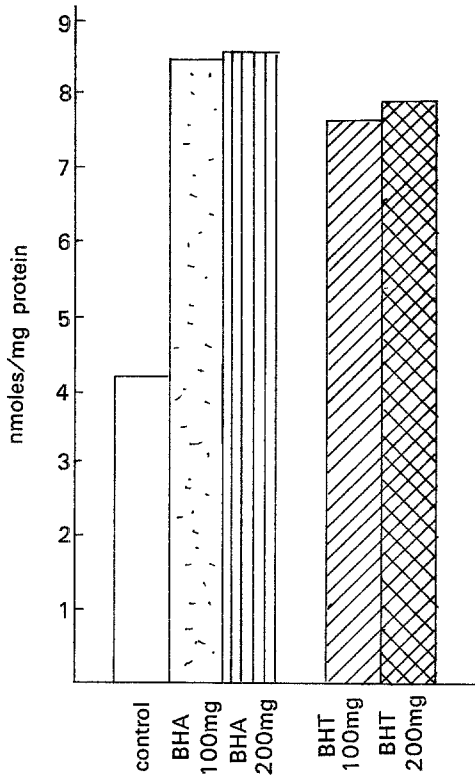


Fig. 6. Concentration of UDP-glucose in the liver of control, BHA and BHT-treated rats.

을 준다. 이것이 알려져 왔다. BHA와 BHT 투여로 간조직 마이크로솜내 UDP-glucuronic acid의 농도가 증가되었다. 이는 glucuronic acid pathway의 중간산물, 효소 그리고 생성물들의 평가는 즉각적 전구물질인 UDP-glucose의 농도를 증가시키는 것과 필요한 효소인 UDP-glucose dehydrogenase의 활성을 자극 하므로써 UDP-glucuronic acid의 농도를 증가시킨다는 것을 지적 하였다.

이와같은 결과는 Cha와 그의 동료들<sup>11)</sup>에 의한 것과 같이 BHA와 BHT투여로 UDP-glucose dehydrogenase 활성이 상당히 증가하는 것은 UDP-glucuronic acid의 농도가 증가하는 것과 연관된다는 것을 나타내는 것이다. 간조직 UDP-glucuronic acid 농도를 증가시키는 BHA와 BHT의 능력은 생체내 glucuronidation의 률을 조절하는 UDP-glucuronosyltransferase 활성을 자극하는 것이다.

결국 BHA와 BHT는 어떤 xenobiotic의 carcino-

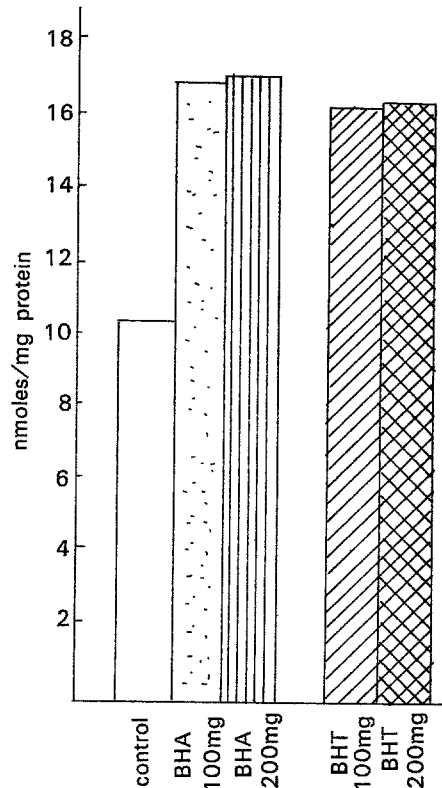


Fig. 7. Activity of UDP-glucose dehydrogenase in the liver of control, BHA and BHT-treated rats.

genic 그리고 hepatotoxic 효과를 감소시키는 BHA와 BHT의 능력은 매우 중요한 연구분야로 되어 왔다. BHA가 여러 생화학적 pathway에 대한 효과, 즉 glucuronidation을 자극하는 능력을 유도해 낼수 있었으며 이런 사실로 다양한 carcinogen과 toxin의 배설이 매우 중요한 것이다.

## References

- 1) Kasper CB and Henton D : *Glucuronidation. In Enzymatic Basis of Detoxification, Vol II, edited by W.B. Jacoby* (New York : Academic Press) 1980 : pp 4-36
- 2) Tukey RH and Tephy TR : *Purification and properties of rabbit liver esterase and p-nitrophenol UDP-glucuronosyltransferase. Arch Biochem Biophys* 1981 : 209 : 565-578
- 3) Watkin JB, Gregus Z, Thompson TN and Klaasen

- CD : *Introduction studies on the functional heterogeneity of rat liver UDP-glucuronosyltransferase. Toxicol Appl Pharmac* 1982 : 64 : 439-446
- 4) Bock KW, Liliënblum W and Pfeil H : *Functional heterogeneity of UDP-glucuronosyltransferase activities in C57Bl/6 and DBA/2 mice. Biochem Pharmac* 1982 : 31 : 1273-1277
  - 5) Dalany CN and Tephly TR : *Separation, purification and characterization of three isozymes of UDP-glucuronosyltransferase from rat liver microsomes. Arch Biochem Biophys* 1983 : 227 : 248-258
  - 6) Sato K, Kithahara a, Yin Z, Ebina T, Satoh K, Isuda H, Ito N and Dempo K : *Molecular forms of glutathione S-transferase and UDP-glucuronosyltransferase as hepatic preneoplastic marker enzymes. Annals of the New York Academy of Science* 1983 : 417 : 213-223
  - 7) Mackenzie PI : *Rat liver UDP-glucuronosyltransferase : Sequence and expression of a cDNA encoding a phenobarbital-inducible form. J Biol Chem* 1986 : 261 : 6119-6125
  - 8) Bock KW, Frohling W, Remmer H and Rexer B : *Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on substrate specificity of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase. Biochem Biophys Acta* 1973 : 327 : 46-56
  - 9) Hazenilton GA, Hjelle JJ and Klaassen CD : *Effects of butylated hydroxyanisole on hepatic glucuronidation capacity in mice. Toxicol Appl Pharmac* 1985 : 78 : 280-290
  - 10) Cha YN and Bueding E : *Effect of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole administration on the activities of several hepatic microsomal and cytoplasmic enzymes in mice. Biochem Pharmacol* 1979 : 28 : 1917-1921
  - 11) Cha YN and Heine S : *Comparative effects of dietary administration of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole and 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene on several hepatic enzyme activities in mice and rats. Cancer Res* 1982 : 42 : 2609-2615
  - 12) Rahimtula AD, Jernstrom B, Dock L and Moldeus P : *Effects of dietary and in vitro 2(3)-t-butyl-4-hydroxyanisole and other phenols on hepatic enzyme activities in mice. Br J Cancer* 1982 : 45 : 935-944
  - 13) Modules P, Dock L, Cha YN, Berggren M and Jernstrom B : *Elevation of conjugation capacity in isolated hepatocytes from BHA-treated mice. Biochem Pharmacol* 1982 : 31 : 1907-1910
  - 14) Stewart J and McCary JP : *Comparison of the glucuronidation ability of liver microsomes from rats treated with 3-methylcholanthrene or phenolic antioxidants. Xenobiotics* 1987 : 17 : 1039-1046
  - 15) Lowry OH, Reosenbroung NJ, Farr AL and Randall RT : *Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem* 1951 : 193 : 265-275
  - 16) Burchell B and Weatherhill P : *p-Nitrophenol UDP-glucuronosyltransferase (rat liver). Methods in Enzymology* 1981 : 77 : 169-177
  - 17) Van Roy FP and Heiywegh KPM : *Determination of bilirubin as acceptor. Pharmacol J* 1968 : 107 : 507-518
  - 18) Bock KW and White INH : *UDP-glucuronosyltransferase in perfused rat liver and in microsome : Influence of phenobarbital and 3-methylcholanthrene. Eur J Biochem* 1974 : 46 : 415-459
  - 19) Liliënblum w, Walli AK and Bock KW : *Differential induction of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities by various inducing agents. Biochem Pharmac* 1982 : 31 : 907-913
  - 20) Keppler D and Decker K : *Studies on the mechanism of galactosamine hepatitis : accumulation of galactosamine-1-phosphate and its inhibition of UDP-glucose pyrophosphorylase. Eur J Biochem* 1969 : 10 : 219-225
  - 21) Wakin JB and Klaassen CD : *Determination of hepatic uridine 5-diphosphoglucuronic acid concentration by conjugation with diethylstilbestrol. J Pharmacol Methods* 1982 : 7 : 145-151
  - 22) Kim HL and Jones LP : *Protective effects of butylated hydroxyanisole, ethoxyquin and disulfiram on acute pyrrolizidine alkaloids poisoning in mice. Res. Commun. chem. pathol. Pharmacol.* 36 : 341-344
  - 23) Asher SS, Dolan P and Bueding E : *Chemoprotective effects of two dithiotiones and of butylhydroxyanisole against carbon tetrachloride and acetaminophen toxicity. Hepatology* 3 : 932-935
  - 24) Bock KW, Burchell B, Dutton GJ, Hanninen O, Mulder GJ, Owens IS, Siest G and Tephly TR : *UDP-glucuronosyltransferase activities. Biochem. Pharmacol.* 1983 : 32 : 953-955
  - 25) Hazelton GH, Hjelle J and Klaassen CD : *Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) on hepatic glucu-*

- ronosyltransferase activities and UDP-glucuronic acid metabolism in mice. Toxicologist 1984 : 4 : 131-135*
- 26) Singh J and Schwartz LR : *Dependence of glucuronidation rate on UDP-glucuronic acid levels in isolated hepatocytes. Biochem Pharmacol 1981 : 30 : 3252-3254*
- 27) Gregus Z, Watkins JB, Thompson TN and Klaassen CD : *Depletion of hepatic uridine diphosphoglucuronic acid decreases the biliary excretion of drugs. J Pharmacol. Exp Ther 1983 : 225 : 256-262*