

백서에 있어서 Thiamine 결핍이 Cytochrome P-450과 Drug Hydroxylation에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

김복희 · 홍영숙 · 성낙응

= Abstract =

Effects of Thiamine Deficiency on Drug Hydroxylation and Level of Cytochrome P-450 in the Rats

Bok Hoi Kim, Young Sook Hong and Nak Eung Sung

Department of Biochemistry, School of Medicine, Ewha Womans University

Our studies are concerned with cytochrome P-450 content and 2-acetylaminofluorene N-and ring-hydroxylation by thiamine deficient rat liver microsomes.

Incubation medium contained 100mM HEPES buffer pH 7.8, 2mM NADPH, 100mM KF, 100nM [¹⁴C]-AAF and microsomal protein. After 30min, incubation at 37°C, ring and N-hydroxy-9-¹⁴C-AAF formations are assayed by radioactivity measurements after paper chromatography separation.

The concentration of cytochrome P-450 is elevated in microsomes from rats fed the deficient diet. It appears that the thiamine deficient rat liver is capable of producing effects on the drug hydroxylation enzymes.

서 론

백서의 간조직에서 microsome내 약물대사효소의 활성을 변화시키는 요인으로는 주위환경, 홀몬, 약물, 식이 및 영양상태 등이 알려져 있다. Kato 등은⁶⁾ 기아상태에서 aminopyrine, aniline의 대사가 증가된 반면에 sucrose를 과량 섭취하였을 때는 이런 물질의 대사가 감소하며, 단백질과 지질이 결핍되었을 때 역시 이런 물질의 대사가 저하된다고 보고하였다. 그리고 William Gross 등은¹⁶⁾ Thiamine hydrochloride를 백서에 과량 투여하였을 때 microsome내 약물 대사효소의 중요한 구성원인 cytochrome P-450의 함량을 감소시키고 cytochrome C-reductase의 활성을 저하시킨다고 하였으며, Wade 등은¹⁵⁾ Thiamine의 antagonist인 oxythia-

mine과 neopyrithiamine을 투여했을 때 cytochrome P-450의 함량이 증가되며 aniline의 대사가 촉진됨을 관찰하였다. 또는 암환자에서 Thiamine 함량이 감소되며¹⁾, 화학적 발암물질인 2,4-diaminoanisole, benzo-pyrene 및 methylcholanthrene을 백서에 투여시 cytochrome P-450의 함량이 증가된다는 보고가 있다.⁴⁾²⁾⁷⁾

저자들은 Thiamine이 결핍된 흰쥐에서 간조직 microsome내 cytochrome P-450의 함량을 측정하고, 화학적 발암원의 모델 화합물로서 polycyclic aromatic hydrocarbones에 속하는 2-Acetylaminofluorene(AAF)를 사용하여 이의 N-과 ring hydroxylation 과정을 살펴봄으로서 Thiamine이 microsome내 약물대사효소와 발암물질 대사에 미치는 영향을 관찰하고 이를 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

실험결과 및 고찰

A) 실험 동물 및 실험군

체중 50g 내외의 웅성흰쥐(wistar strain)를 사용하였다. 흰쥐는 15일 동안 sucrose 73%, vitamin free casein 16%, nonnutrient cellulose 4%, salt mixture (USP XIX) 2%, Corn Oil 3% 및 Thiamin-free vitamin fortification mixture (NBC) 2%를 포함한 배합사료로 사육하였다(Table 1). 대조군은 위의 배합사료에서 Thiamine을 vitamin mixture kg당 1g씩 공급하였다.

B) 실험방법

백서를 희생시킨 후 간장을 절제하여 microsome을 분리하였고, microsomal Protein은 Lowry 방법⁸⁾으로

Table 1. Diets composition

	Percent
Sucrose	73%
Vitamin free casein	16%
Non-nutrient cellulose	4%
Salt mixture	2%
Corn oil	3%
Thiamin free vitamin mixture	2%

측정하였으며 Bovine Serum Albumin을 표준액으로 사용하였다. Microsomal cytochrome P-450은 Varian SP-624 Spectrophotometer를 사용하여 Omura와 Sato의 방법¹³⁾에 의해서 측정하였으며 준비한 microsomal fraction을 dithionite(Sodium Hydrosulfite)로 환원시키고 일산화탄소 가스를 통과시킨 후 pigment의 spectrum을 읽었다. Cytochrome P-450의 농도는 각각 490nm와 450nm 사이의 흡수율 차이(extinction coefficient difference)로부터 계산하였고 이때 molar extinction coefficient는 $91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다.

AAF N-and ring hydroxylation을 위한 incubation medium으로는 50mM HEPES buffer pH 7.8, 2mM NADPH, 100mM KF, 0.1mM [¹⁴C]-9-AAF 0.2μCi, 272mM Acetone 및 microsomal fraction을 넣어 총량을 1.0ml로 하였으며 37°C에서 30분동안 공기중에 incubation하였다(Table 2). 총 Hydroxy AAF를 추출하고 N-과 ring hydroxy AAF를 Paper chromatography로 분리한 후 radioactive measurement에 의해서 정량하였다.

Table 2. Incabation medium for AAF hydroxylation

	mM
HEPES buffer, pH 7.8	50
NADPH	2
KF	100
AAF Containing 0.2μCi (9- ¹⁴ C-AAF)	0.10
Acetone	272
Variaus microsomal fractions as indicated	
Water to a final volume of 1.0ml	

Incubated in air for 30 min at 37°C

Thiamine 결핍군은 15일 식이 후에 대조군에 비해서 현저하게 체중이 적었으며, 대조군이 평균 체중증가가 44.5 ± 3.31 g인데 비해서 Thiamine 결핍군은 23.9 ± 2.13 g으로 53.7% 밖에 되지 않았다(Table 3). microsome내 단백질의 양은 전체 효소 단백질양을 표시하는데¹⁶⁾ Thiamine 결핍군에서 microsome내 단백질의 양은 약간 감소되었으나 통계학적 의의는 없었다(table 3). 이는 Thiamine 결핍시 전체효소 단백질 함량을 변화시키지 않음을 의미한다. 그러나 어떤 특수한 효소 단백질 함량 변화의 가능성을 배제할 수는 없다. Hepatic microsome내 cytochrome P-450의 양은 Thiamine 결핍군에서 단백질 1mg당 0.352 ± 0.007 nmoles이었으며, 대조군이 0.241 ± 0.007 nmoles임과 비교할 때 약 46% 증가됨을 관찰할 수 있었다(Table 4). 이는 William Gross¹⁷⁾과 A.E. Wade¹⁵⁾이 보고한 바와 같다.

Table 3. Effect of thiamine deficiency on growth rate, liver weight and hepatic microsomal protein in rats

Group	Average total weight gain (g)	Liver Weight (g)	Microsomal protein (mg/g Liver)
Control	$44.5 \pm 3.31^*$	3.36 ± 0.26	37.5 ± 3.3
Thiamine deficiery	$23.9 \pm 2.13^*$	2.74 ± 0.12	33.7 ± 3.7

* Significantly different from controls(P<0.01)

간조직 microsome내 약물대사에 관여하는 3가지 구성원 —cytochrome P-450, NADPH cytochrome C reductase, 및 phospholipid— 층에서 cytochrome P-450은 산소의 활성화와 기질결합에 대한 역할 때문에

Table 4. Effect of thiamine deficiency on Microsomal cytochrome P-450 in rats

	Cytochrome P-450 Nmoles/mg protein nmoles/g liver	
Control	0.241±0.007	0.831±0.027
Thiamine Deficiency	0.352±0.007	1.216±0.108
Significantly different from controls(P<0.01)		

가장 중요하다. 지난 10년간 간조직 microsomes내 cytochrome P-450은 여러가지 형태가 존재하고 있고 여러 유도물질로 전처치한 동물에서 분리한 간조직 microsomes내 cytochrome P-450은 그 Spectral property와 기질에 대한 촉매역할이 변화된다는 것을 암시하는 많은 연구가 행하여 졌으며⁹⁾, 이러한 것은 간조직 microsomes내 약물대사 연구 결과를 설명하는 데 중요한 개념이다. Sladek와 Mannering은¹⁴⁾ 3-methylcholanthrene 같은 polycyclic hydrocarbons를 투여하였을 때 cytochrome P-450의 새로운 형태(P₁ 450)가 생성된다고 하였으며 이들은 ethylisocyanide와 결합하여 특정한 흡수 스펙트럼을 형성한다. A.E. Wade등은¹⁵⁾ Thiamine 결핍시 증가된 cytochrome P-450은 ethylisocyanide 흡수능 높이의 비율이 높은 것을 관찰함으로써 Thiamine이 결핍되면 cytochrome P₁-450의 새로운 유사체를 합성하는 좋은 조건이 만들어 진다고 생각하였다.

Aromatic amines, amides, polycyclic aromatic hydrocarbons, nitrosamines와 aflatoxin을 포함하는 많은 화학적 발암물질은 몇몇 동물에서 발암물질이 되기전에 대사하여 활성화 되어야 한다¹⁰⁾¹¹⁾. 본 실험실

Table 5. Effect of thiamine deficiency on the N-and ring-hydroxylation of 2-Acetylaminofluorene(AAF) by rat liver microsomes

	AAF Total concentration(nmoles)	nmoles of Hydroxy AAF formed/30min per nmol of Cytochrome P-450	
		N-	ring-
Control	3.91±0.08	1.78±0.05	2.14±0.09
Thiamine Deficiency	4.23±0.35	2.35±0.23	1.88±0.08

Significantly different from controls(P<0.05)

에서는 polycyclic aromatic hydrocarbons에 속하는 2-AAF를 화학적 발암원의 대사를 연구하는데 모델화합물로 사용하였다. AAF의 간조직 내 microsomes에 의한 hydroxylation은 NADPH와 O₂의 존재하에 일어나며 활성화되는 과정인 N-hydroxylation과 비활성화되는 과정인 ring-hydroxylation이 있다(Fig. 1). Ring-hydroxy AAF는 rat, rabbit 및 mouse에서 쉽게 발암원이 아닌 monophenols로 되어서 glucuronide, sulfate와 결합하여 뇨와 담즙으로 배설된다¹¹⁾¹²⁾. 그러나 AAF의 대사물인 N-hydroxy AAF는 glucuronic acid와 결합하여 뇨에 배설되며, AAF에 의해서 발암현상이 일어나는 동물에서 AAF보다 강한 발암원이 된다⁵⁾¹²⁾. 2-AAF를 대조군과 실험군 각각의 microsomal fraction으로 Hydroxylation시켰을 때 Thiamine 결핍군은 ring hydroxylation보다 N-hydroxylation을 증가시켜서 AAF를 활성화시킴을 관찰할 수 있었다(Table 5). Lotlikar등⁷⁾은 여러 동물에서 3-methyl-

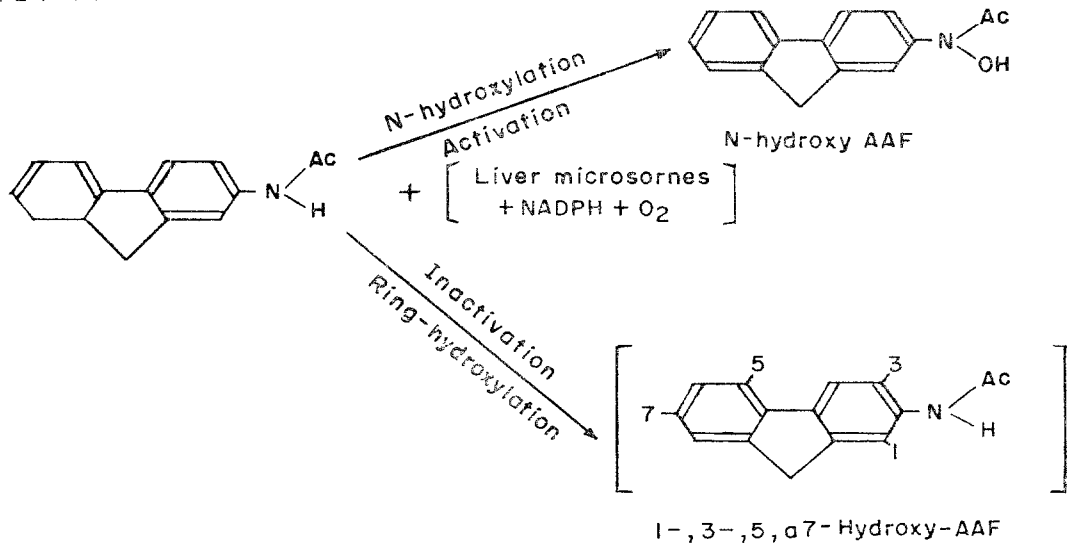


Fig. 1. Metabolic hydroxylation of 2-acetylaminofluorene.

cholanthrene을 전처리 했을 경우 간조직내 microsome의 AAF대사능력이 동물종류에 따라서 현저한 차이가 있음을 관찰하였는 데 백서에서는 methylcholanthrene을 전처리한 경우는 비교적 N-보다 ring hydroxylation을 증가시킨다고 보고하였다. 이와 비교하여 볼 때 thiamine 결핍시는 methylcholanthrene을 전처리 하였을 때와 다르게 2-AAF의 Hydroxylation 능력이 변화되었다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 Thiamine 결핍시에 증가되는 cytochrome P-450은 methylcholanthrene을 전처리했을 때와 ethylisocyanide 흡수결 비율은 같으나 polycyclic aromatic hydrocarbon인 2-AAF의 hydroxylation 능력은 다르게 변화되었으므로, Methyl cholanthrene을 전처리하여 유도되는 cytochrome P-450과는 다른 형태라고 사료된다.

결 론

Thiamine이 결핍된 흰쥐에서 간조직 microsome내 cytochrome P-450의 함량을 측정하고, 화학적 발암원의 모델 화합물로서 polycyclic aromatic hydrocarbon에 속하는 2-acetyl aminofluorene을 사용하여 이의 N-과 ring-hydroxylation 과정을 관찰하였다.

1) Thiamine이 결핍된 흰쥐에서 간조직 microsome내 cytochrome P-450의 양이 증가되었다.

2) Thiamine이 결핍된 흰쥐에서 증가되는 cytochrome P-450은 2-acetylaminofluorene의 N-hydroxylation을 증가시켜다.

—References—

- 1) Basu, T. K. and Dickerson, W. T.: The Thiamine status of early cancer patients with particular reference to those with breast and bronchial carcinomas, *Oncology*, 33, 250—252, 1976.
- 2) Cameron, R., Sweeney, G. D. Jones, K., Lee, G. and Farber, E.: A relative deficiency of cytochrome P-450 and arylhydrocarbon [Benzopyrene] hydroxylase in hyperplastic nodules induced by 2-Acetylaminofluorene in rat liver, *Cancer res.*, 36, 3888—3893. 1976.
- 3) Clayson, D. B. and Garner, R. C.: Chemical carcinogenesis (Searle, C. E., ed) American

- chemical society, Washington, D.C., 366—461, 1976.
- 4) Dybing, E. and Thorgeirsson, S.S.: Metabolic activation of 2,4-diaminoanisole, hair-dye component-I, *Biochem. pharma.* 26, 729—734, 1977.
- 5) Irving, C.C., Wiseman, R.J. and Young, J.M.: Carcinogenicity of 2-acetylaminofluorene and N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in the rabbit, *Cancer Res.*, 27, 838—848, 1967.
- 6) Kato, R. and Takanaka, A.: Effect of Starvation on the in vivo metabolism and effect of drugs in female and male rats, *Jap. J. Pharmacol.* 17 : 208—217, 1967.
- 7) Lotlikar, P.O., Hong, Y.S. and Baldy, W.J.: cytochrome P-450 dependent N-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene, *Biological oxidation of nitrogen*, (Gorrod, J.W. ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical press, 185—193, 1978.
- 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- 9) Lu, A.Y.H.: Liver microsomal drug-metabolizing enzyme system: functional components and their Properties, *Fed. Proc.*, 35 : 2460—2463, 1976.
- 10) Magee, P. N., Montesano, R. and Preussman, R.: Chemical carcinogenesis (Searle, C.E. ed.) American chemical. society, Washington, D.C., 491—625, 1976.
- 11) Miller, J.A.: Carcinogenesis by chemicals, *Cancer Res.*, 30, 559—576, 1970.
- 12) Miller, E.C., Miller, J.A. and Hartmann, H.A. N-hydroxy-2-Acetylaminofluorene: a metabolite of 2-acetylaminofluorene with increased carcinogenic activity in the rat, *cancer Res.*, 21, 815—824, 1961.
- 13) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of Liver microsomes- II. Solubilization, Purification and Properties., *J. Biol. Chem.*, 239 : 237, 1964.
- 14) Sladek, N.E. and Mannering, G.J.: Induction of drug metabolism. II. Qualitative differences

- in the microsomal N-demethylating systems stimulated by polycyclic hydrocarbons and by phenobarbital., *Mol. Pharma.* 5, 186—199, 1969.
- 15) Wade, A.E. and Wu, B.C. Holbrook, C.M. and William, O.: Effects of thiamin antagonists on drug hydroxylation and properties of cytochrome P-450 in the rat, *Biochem. pharma.* 22, 1573—1580, 1973.
- 16) William, G. and Wade, A.E.: The effect of thiamine consumption on liver microsomal drug-metabolizing pathways, *J. Pharma. Exp. Ther.*, 176 : 3, 758—765, 1971.
-