

고혈압성 흰쥐(Spontaneous Hypertensive Rat)에서 Nifedipine 투여가 UDP-Glucuronosyltransferase에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생화학교실, 약리학교실*

홍 영 숙·배 영 숙*

=Abstract=

Induction of Hepatic Microsomal UDP-Glucuronosyltransferase Activity in Nifedipine Treated Rats

Young-Sook Hong

Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University

Young-Sook Pae

Department of Pharmacology, College of Medicine, Ewha Womans University

UDP-Glucuronosyltransferase(UDPGT) activity was studied in hepatic microsomal preparation from rats treated with nifedipine. The substrates 1-naphthol, P-nitrophenol, 4-methylumbelliferone and bilirubine were used. With 1-naphthol, nifedipine 2 and 4 weeks treatment caused 6- and 7.3-fold, respectively, increase in activity over the control value. With 4-methylumbelliferone, nifedipine 2 and 4 weeks treatment caused 5- and 6-fold increase in activity over the control value. With P-nitrophenol, nifedipine 2 and 4 weeks treatment caused both approximately 3-fold increase in activity over the control value. However bilirubin-UDPGT activity was not affected by this inducer effects of nifedipine on the hepatic monooxygenase system in rats were investigated. P-Nitroanisole-O-demethylase, NADPH-cytochrome C reductase activity and cytochrome P-450 content in nifedipine treated rats were significantly increased to 390, 290 and 150% of control rats, respectively.

The selectivity of nifedipine of UDP-glucuronosyltransferase was investigated in rat liver microsomes and compared with their effect on monooxygenase reactions. Similar to 3-methylcholanthrene-type selectively stimulated the glucuronidation induced both UDPGT₁ and monooxygenase activity, probably through a common receptor protein.

서 론

고혈압성 흰쥐(SHR)에서는 유리칼슘이 증가되

며 이로인해 혈관평활근 긴장도도 증가되고 따라서 말초혈관 저항이 상승하여 혈압이 상승한다¹⁾²⁾. 이에 대하여 항고혈압제제인 nifedipine은 주로 세

포막에 존재하는 칼슘 투과성 통로를 선택적으로 봉쇄하여 혈관평활근내의 유리칼슘 농도를 감소시킨다. 이에 따라 혈관저항은 감소되고, 혈관이완 효과도 혈압을 저하시키게 된다³⁾. 최⁴⁾는 Ca^{++} -channel 봉쇄제인 nifedipine을 SHR에 투여하여 혈압의 하강효과를 관찰한바 있다. 이와같이 항고혈압제인 nifedipine투여는 SHR에서 혈압하강효과가 있으며 동시에 약물해독작용에도 영향이 기대 되었다.

UDP-Glucuronosyltransferase(UDPGT)(EC 2, 4, 1, 17)는 약물해독작용과 내인성 화합물 즉 빌리루빈이나 스테로이드 홀몬제거에 이용되는 효소군이다. 그리고 UDPGT에 의하여 촉매되는 glucuronic acid와의 결합은 정량적으로 중요한 phase II 반응 이다⁵⁾.

또한 UDPGT활성은 기질 특이성에 따라 독특한 형의 효소를 갖는다⁶⁾. 3-Methylcholanthrene(3-MC)에 의하여 유도된 UDPGT₁은 1-naphthol과 4-nitrophenol과 같은 기질들의 결합을 특이하게 촉매 한다. Phenobarbital(PB)에 의하여 유도된 UDPGT₂는 부피가 큰 구조를 가진 chloramphenicol과 testosterone과 같은 기질들에 결합(conjugation)을 증가 시킨다. 이와같은 효소들은 세포막 주로 endoplasmic reticulum(ER) 막 속에 결합되어 있으나 golgi apparatus, nucleus envelops, 그리고 plasma membrane속에도 존재 한다⁷⁾⁸⁾.

Pregnenolone-16 α -carbonitrile(PCN)에 의하여 유도된 Sprague-Dawley 흰쥐 간조직에서 digitoxigenin monodigitoxoside(DIG)에 대한 UDPGT의 활성이 증가 하였다⁹⁾. 이것은 PCN유도로 UDPGT의 독특한 형이 선택적으로 DIG나 빌리루빈과 glucuronide를 형성한다는 것을 제시 한다¹⁰⁾¹¹⁾. 빌리루빈-UDPGT가 유전적으로 없는 흰쥐인 Gunn 흰쥐에서 PCN을 투여해도 DIG와 빌리루빈에 대한 UDPGT에 활성이 없었다¹²⁾. 이와같은 결과는 독특한 형의 UDPGT가 PCN에 의하여 유도된 것을 제시하는 것이다.

본 연구에서는 SHR에 nifedipine투여로 유도된 UDPGT가 4개의 다른 glucuronic acid acceptor(1-naphthol, 4-nitrophenol, 4-methylumbelliferone 그리고 bilirubin)와의 특이성을 관찰 하고자 하였다.

그리고 phase I 과 Phase II 의 유도성 비교는 활성화와 비활성화 반응 사이에 균형이 세포내에 반응성이 강한 대사산물의 축적을 결정하는 것이라고 한다면 흥미있는 것이다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물은 이화여자대학교 의과대학 동물실에서 3개월 이상 시판 혼합사료로 사육한 체중 250 gm 내외의 고혈압성 흰쥐(SHR)를 사용 하였다.

실험동물은 다음의 실험군으로 나누었다(n=마리수).

1) 대조군 : SHR에 0.9% 생리 식염수 0.1ml/100gm을 복강내를 투여 하였다(n=6).

2) Nifedipine 1회 투여군 : SHR에 nifedipine 1 mg/kg을 1회 복강내로 투여 하였다(n=6).

3) Nifedipine 7일 투여군 : SHR에 nifedipine 1 mg/kg을 7일간 1일 2회씩 복강내로 투여 하였다(n=6).

4) Nifedipine 2주 투여군 : SHR에 nifedipine 1 mg/kg 1주간, 2mg/kg 1주간 1일 2회씩 복강내로 투여 하였다(n=6).

5) Nifedipine 4주 투여군 : SHR에 nifedipine 1 mg/kg 1주간, 2mg/kg 1주간, 4mg/kg 1주간, 4mg/kg 1주간, 8mg/kg 1주간을 1일 2회씩 복강내로 투여 하였다(n=6).

실험동물에 사용한 nifedipine(Bayer Co.) 5gm은 polyethylene glycol 1 liter에 녹여서 사용 하였다.

2. 실험방법

각 실험군에서 간조직을 절제 하였으며 절제한 간조직은 0.25M-Sucrose 용액으로 20% 균질용액을 만들어 마이크로솜을 분리 하였다¹³⁾. 단백질 측정은 Lowry등의 방법¹⁴⁾으로 측정 하였으며 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용 하였다.

Cytochrome P-450은 Omura와 Sato방법¹⁵⁾으로 측정 하였으며 이때 molar extinction coefficient는 $91mM^{-1} Cm^{-1}$ 로 하였다. NADPH-cytochrome C reductase 함량은 Omura와 Takesue방법¹⁶⁾을 사용

하였으며 550nm에서 흡광도 증가를 molar extinction coefficient $21.1 \text{ mM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ 을 사용하여 계산하였다. P-Nitroanisole-O-demethylase 활성은 Netter와 Seidel방법¹⁷⁾으로 측정 하였으며 molar extinction coefficient는 $14.5 \text{ mM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ 사용 하였다. UDP-Glucuronosyltransferase활성은 기질로써 P-nitrophenol을 사용하였을때 Burchell의 방법¹⁸⁾으로 incubation 혼합물은 25 μ mole의 Tris-HCl buffer(pH 7.4)와 0.1 μ mole UDP-glucuronic acid 그리고 microsome(1.0~2.0mg의 protein)과 10분간 37 $^{\circ}$ C에서 incubate한후 405nm에서 그 흡광도를 측정 하였다. Bilirubin을 사용하였을때는 Van Roy와 Heirwegh¹⁹⁾의 방법으로 incubation혼합물은 0.1M Tris-HCl(pH 7.4), 5mM MgCl₂, 0.3mM bilirubin, 3mM UDP-glucuronic acid 그리고 microsome(2mg의 protein)과 10분간 37 $^{\circ}$ C에서 incubate한후 530nm에서 그 흡광도를 측정 하였다. 기질로써 1-naphthol을 사용 하였을때 Bock과 White²⁰⁾의 방법으로 incubate혼합물은 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4), 5mM MgCl₂, 0.5mM 1-naphthol, 3mM UDP-glucuronic acid 그리고 microsome(1mg protein)과 2분간 37 $^{\circ}$ C에서 incubate한 후 그 fluorescence를 emission 330nm와 excitation 290nm에서 측정 하였다. 기질로써 4-methylumbelliferone을

사용 하였을때 Lilienblum²¹⁾등의 방법으로 incubation혼합물은 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.4), 5mM MgCl₂, 0.5mM 4-methylumbelliferone, 3mM UDP-glucuronic acid 그리고 microsome(0.5mg의 protein)가 30분간 37 $^{\circ}$ C에서 incubation 한 후 emission 365nm와 excitation 315nm에서 glucuronide의 fluorescence를 측정 하였다.

실험 결과

Nifedipine투여로 UDPGT의 활성은 표I에 나타났다. 기질로써 1-naphthol과 4-methylumbelliferone에 대한 UDPGT활성은 nifedipine 1mg/kg 1회 투여군은 별 영향이 없었고 1주 투여군은 각각 2와 2.7배, 2주 투여군은 각각 6과 5배 그리고 4주 투여군은 각각 7.3과 6배 증가로 두 기질은 nifedipine 투여량을 증가 하였을때 UDPGT 활성도 같은 경향으로 증가 하였다(Fig. 1-A, B). 기질로써 4-nitrophenol은 nifedipine 1주 투여군은 1.7배 2주 투여군은 3.2배로 최고치에 달하고 4주 투여군은 2주 투여군과 거의 같은 치를 나타냈으며 오히려 약간 감소하는 경향이였다(Fig. 1-C). 기질로써 빌리루빈은 nifedipine 4주 투여군은 약간 증가 하였으나 그의 군은 별 영향이 없었다(Fig. 1-

Table 1. Effects of nifedipine administration on rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities

Treatment	Substrates			
	1-Naphthol	4-Methylumbelliferon	4-Nitrophenol	Bilirubin
control	1.741±0.187	4.682±0.203	1.040±0.510	0.312±0.082
SHR+Nifedipine 1회	1.806±0.204 (103.7%)	4.817±0.451 (102.9%)	0.941±0.209 (87.9%)	0.305±0.076 (97.8%)
SHR+Nifedipine 1주	3.503±0.159 ^b (201.2%)	12.630±0.944 ^a (269.8%)	1.833±0.229 ^b (176.3%)	0.245±0.075 (78.5%)
SHR+Nifedipine 2주	10.445±1.793 ^a (599.9%)	23.437±3.182 ^a (500.5%)	3.290±0.147 ^b (316.3%)	0.323±0.054 (103.5%)
SHR+Nifedipine 4주	12.790±2.581 ^a (734.6%)	28.421±3.459 ^a (607.0%)	3.281±0.399 ^b (315.5%)	0.356±0.086 (114.1%)

Each value represents the mean ±SD. of 6 individual experiments.

a. Significantly different from control value P<0.001

b. Significantly different from control value p<0.01

D).

Nifedipine 투여로 유도된 monooxygenase의 활성은 표 2에 나타내었다. 표 2에서 보는 바와 같이 P-nitroanisole-O-demethylase 활성은 nifedipine 1주 투여군에서 1.3배, 2주 투여군은 3.7배, 4주 투여군은 3.9배 증가로 투여량에 따라 증가됨을 나

타내었다. NADPH-cytochrome C reductase의 활성은 nifedipine 1회 투여로 1.7배, 1주 투여군은 2.6배로 증가폭이 감소 하였다. Cytochrome P-450의 함량은 nifedipine 2주 투여군 까지는 별 영향이 없었으나 4주 투여군은 1.5배 증가 하였다.

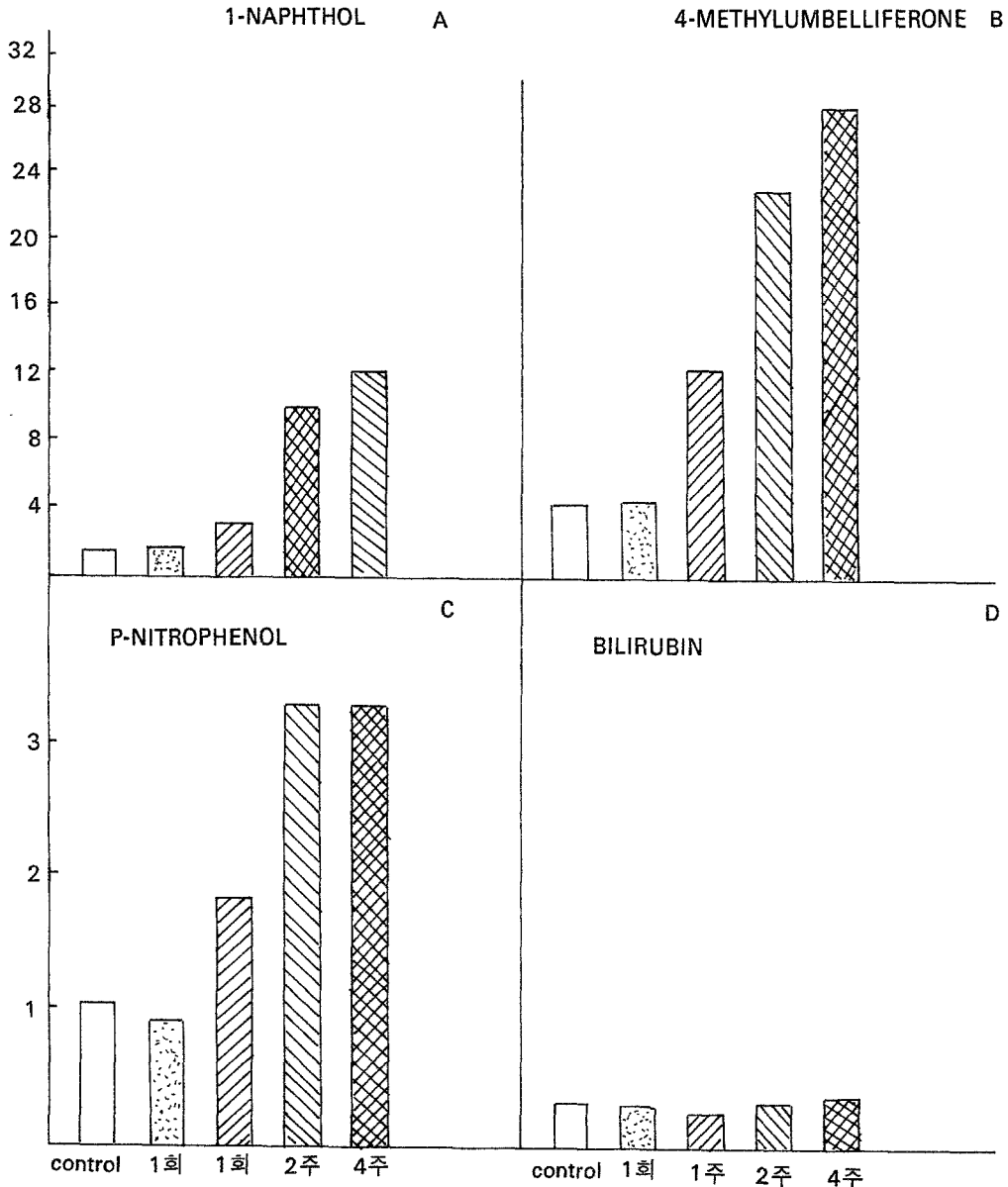


Fig. 1. UDP-Glucuronosyltransferase activity toward 1-naphthol(A), 4-methylumbelliferone(B), P-nitrophenol(C) and bilirubin(D) in nifedipine treated rats.

Table 2. Effect of nifedipine administration on rat liver microsomal monooxygenase activities

Treatment	Enzyme Activities		
	nmole/min per mg protein		nmole/mg protein
	0-demethylase	NADPH-cytochrome C reductase	Cytocrome P-450
control	0.592±0.416	13.931±1.194	0.945±0.070
SHR + Nifedipine	1.037±0.053	23.846±1.299 ^b	0.855±0.261
1회	(108.9%)	(171.2%)	(90.5%)
SHR + Nifedipine	1.281±0.122 ^c	36.859±2.109 ^a	1.000±0.253
1주	(134.6%)	(264.6%)	(105.8%)
SHR + Nifedipine	3.493±0.081 ^a	47.794±2.099 ^a	1.023±0.483
2주	(366.9%)	(343.1%)	(108.3%)
SHR + Nifedipine	3.716±1.644 ^b	40.499±8.100 ^a	1.426±0.178 ^c
4주	(390.3%)	(290.7%)	(150.9%)

Each value represents the mean ± S. D of 6 individual experiments.

- a. Significantly different from control value P<0.001
- b. Significantly different from control value p<0.01
- c. Significantly different from control value p<0.05

고 찰

최근 nifedipine은 항고혈압제로 사용되고 있으며 이는 혈관 평활근내의 유리칼슘 농도를 감소시키므로 혈관저항이 감소되고 혈관이완 효과로 혈압을 저하시키게 된다³⁾. 그러므로 nifedipine 투여로 SHR에서 혈압 하강효과를 보고한 바 있다⁴⁾. 이와같이 nifedipine의 항고혈압제로서 그의 많은 약리작용이 밝혀졌으나 간조직내에서 해독작용이나 monooxygenase 또는 mixed-function oxidase system에 관한 영향은 많은 보고가 없다.

본 연구는 SHR의 복강내로 nifedipine을 투여하였을때 UDPGT활성과 monooxygenase 활성을 측정 하였다.

Glucuronidation은 내인성과 이물질(xenobiotics)의 대사산물과 UDP-glucuronic acid가 UDPGT에 의하여 수용성 물질이 되어 쉽게 배설되는 과정이다²²⁾²³⁾. 이 transferase의 활성은 여러 화합물 즉 phenobarbital(PB), polycyclic hydrocarbon 그리고 butylated hydroxy anisole(BHA)와 같은 식품 방부제에 의하여 포유동물 간조직에서 유도된다²⁴⁾. UDPGT는 cytochrome P-450과 비슷하게 multiple form으로 존재하며 기질에 따라서 특이

성을 나타낸다. Bock⁸⁾등은 3-MC와 PB 투여에 의하여 2가지의 다른 UDPGT 효소들을 분리하여 UDPGT₁과 UDPGT₂로 분류 하였다. 이와같은 독특한 형의 효소는 태아의 발달과정, 조직분포등 여러가지 요인에 따라 다른 활성을 갖는다

본 연구에서 nifedipine에 의하여 유도되는 UDPGT는 어떤 특이성이 있나를 확인 하기 위해서 기질로써 1-naphthol, 4-methylumbelliferone, 4-nitrophenol 및 bilirubim을 사용 하였다. 그 결과 nifedipine에 의하여 유도된 UDPGT의 활성은 1-naphthol과 4-methylumbelliferone-UDPGT의 활성이 현저히 증가되는 것으로 미루어 보아 UDPGT₁이 활성화 됨을 알 수 있었다.

Owen²⁵⁾은 benzo(a)pyrene monooxygenase와 4-methylumbelliferone-UDPGT는 둘다 3-MC에 의하여 유도되며 Ah locus로 불리우는 single genetic locus에 의하여 조절 되어 진다고 보고 하였다. 이와같이 서로 똑같이 유도되는 협동적인 유도는 MC-type 유도물질들을 위하여 공통된 receptor 단백질 통하여 촉매되는 것이다. 흰쥐 간조직 UDPGT₁과 monooxygenase가 똑같이 증가하는 것은 대사와 관계있는 효소들이 협동적으로 함께 유도된다는 것을 의미하는 것이다.

생물체로 부터 polycyclic aromatic 화합물의 배설과 비활성을 용이하게 하는 요인은 많은 연구들이 보고하여 왔다. UDPGT₁이 benzo(a)pyrene phenol²⁶⁾, quinol²⁷⁾을 쉽게 결합시키고 dihydrodiol을 적게 형성한다고 보고된바 있다. 또한 benzo(a)pyrene monooxygenase 활성은 흰쥐 간조직 마이크로솜에서 glucuronidation과 동시에 자극되는 것을 보고 하였다²⁸⁾.

본 연구는 nifedipine투여로 유도된 UDPGT가 3-MC-type와 PB-type 유도와 같은 경향이 었으며 협동적 유동성을 나타냈다. 그러나 bilirubin-UDPGT의 유도는 nifedipine 투여로 별영향이 없었다.

Nifedipine은 혈압하강효과와 함께 간조직 마이크로솜의 약물대사과정인 monooxygenase효소와 동시에 glucuronidation의 자극으로 협동적 유도를 나타내며, 이는 약물해독과정의 활성화를 강력히 시사하는 것이다. 그리고 nifedipine에 의한 cytochrome P-450과 UDPGT₁ 활성이 동시에 증가하는 협동적유도의 유의성이 앞으로 계속 연구되어야 한다고 생각된다.

References

- 1) Aoki K, Kawaguchi Y, Sato K, Kondo S and Yamamoto M : *Clinical and pharmacological properties of calcium antagonists in essential hypertension in humans and spontaneously hypertensive rats. J Cardiovas* 1982 : 4(suppl 3) : 298-302
- 2) Wei JR, Janis A and Daniel EE : *Studies on subcellular fractions from mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats ; alterations in both calcium uptake and enzyme activities. Blood Vessels* 1976 : 13 : 293-308
- 3) Gross R, Kirchheim H and K von Olshausen : *Effects of nifedipine on coronary and systemic hemodynamics in the conscious dog. Arzneim-Forsch. Drug Res* 1979 : 29 : 1361-1368
- 4) Choi KR PhD : *Thesis in Ewha womans university. 1988*
- 5) Dutton GJ : *Glucuronidation of Drugs and other compounds. CRC Press, Boca Raton, FL. 1980*
- 6) Burchell B : *in Reviews in Biochemical Toxicology. New York/Amsterdam, Elsevier/North-holland, 1984 : 3 : pp653-704*
- 7) Bock KW, Bock-Henning BS, Lilienblum W, Pfeil H and Volp RF : *in Advances in Exp. Med Biol New York, Plenum, 1980 : 136 : pp53-73*
- 8) Bock KW, Josting D, Lilienblum W, Pfeil H : *Purification of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase ; Separation of two enzyme forms inducible by 3-methylcholanthrene or phenobarbital. Eur J Biochem* 1978 : 98 : 19-26
- 9) Magdalou J, Antoine B, Ratanasavanh, D Siest G : *Phenobarbital induction of cytochrome p-450 and UDP-glucuronosyltransferase in rat-liver plasma membranes. Enzyme* 1982 : 28 : 41-47
- 10) Antoine B, Magdalou J, Siest G : *Functional heterogeneity of UDP-glucuronosyltransferase in different membranes of rat liver. Biochem Pharmacol* 1983 : 32 : 2623-2632
- 11) Watkins JB, Gregus Z, Thomson TN and Klaassen CD : *Induction studies on the functional heterogeneity of UDP-glucuronosyltransferases. Toxicol Appl Pharmacol* 1982 : 64 : 439-448
- 12) Watkins JB, Klassen CD : *Induction of UDP-glucuronosyltransferase. activities in Gunn, heterozygous, and Wister rat livers by pregnenolone-16 alpha-carbonitrile. Drug Meta Dispos* 1982 : 10 : 590-594
- 13) Lotlikar PD, Enomoto M, Miller JA and Miller EC : *Species variation in the N-and ring-hydroxylation of 2-AAF and effects of 3-MC pretreatment. Proc Soc Exp Med* 1967 : 125 : 341-346
- 14) Lowry OH, Rosebroung NJ, Farr AL and Randall RT : *Protein measurment with the folin phenol reagent. J Biol Chem* 1951 : 193 : 265-275
- 15) Omura T and Sato R : *Carbon monoxide binding pigment of liver microsome II. solubilization, purification and properties. J Biol Chem* 1964 : 239 : 2370-2378
- 16) Omura T and Takesus S : *A new method for simultaneous purification of cytochrome b₅ and*

- NADPH-cytochrome C reductase from rat liver microsomes. J Biochem* 1970 : 67 : 249-257
- 17) Netter KJ and Seider G : *An adaptively stimulated demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. J Pharmacol Expt Therp* 1961 : 196 : 146-161
 - 18) Burchell B and Weatherhill P : *P-Nitrophenol UDP-glucuronosyltransferase (rat liver). Methods in Enzymology* 1981 : 77 : 169-177
 - 19) Van Roy FP and Heiywegh KPM : *Determination of bilirubin as acceptor. Phamacol J* 1968 : 107 : 507-518
 - 20) Bock KW and White INH : *UDP-glucuronosyltransferase in perfused rat liver and in microsomes : Influence of phenobarbital and 3-methylcholanthrene. Eur J Biochem* 1974 : 46 : 415-459
 - 21) Lilienblum 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
 - 22) Falnay, CN and Tephly TR : *Differential Induction of Rat Liver Microsomal UDP-glucuronosyltransferases from rat liver microsomes. Arch Biochem Biophys* 1983 : 227 : 248-258
 - 23) Mackenzie PI : *Rat liver UDP-glucuronosyltransferase sequence and expression of a cDNA encoding a phenobarbital-inducible form. J Biochem* 1986 : 261 : 6119-6125
 - 24) Stewart J and McCrary JP : *Comparison of the glucuronidation ability of liver microsomes from rats treated with 3-methylcholanthrene or phenolic antioxidants. Xenobiotica* 1987 : 17 : 1039-1046
 - 25) Owens IS : *Genetic regulation of UDP-glucuronosyltransferase induction by polycyclic aromatic compounds in mice. J Biol Chem* 1977 : 252 : 2827-2833
 - 26) Bock KW, Von Clausbruch UC, Kaufmann R, Lilienblum W, Oesch F, Pfeil H and Platt KL : *Functional heterogeneity of UDP-glucuronosyltransferase in rat tissues. Biochem Pharmacol* 1980 : 29 : 495-500
 - 27) Lind C, Vadi H and Eruster L : *Metabolism of benzo(a)pyrene-3,6-quinone and 3-hydroxybenzo(a)pyrene in liver microsomes from 3-methylcholanthrene treated rats. Archs Biochem Biophys* 1978 : 190 : 97-108
 - 28) Bock KW, Bock-Henning BS, Lilienblum W and Volp RF : *Release of mutagenic metabolites of glucuronidation and sulfation by salicylamide. Chem Biol Interact* 1981 : 36 : 167-177