

Nifedipine 투여가 선천성 고혈압 쥐의 CYP1A1과 2B1 유도에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생리학교실, 약리학교실*
홍영숙 · 김형래 · 박혜영 · 배영숙* · 박상신**

= Abstract =

Effect of Nifedipine on Induction of Cytochrome P-450 1A1 and 2B1 in Spontaneously Hypertensive Rat

Young-Sook Hong · Hyung-Lae Kim · Hae-Young Park · Young-Sook Pae* · Sang-Shin Park**

Department of Biochemistry, Department of Pharmacology, Medical College, Ewha Womans University and
Lab. of Comparative Carcinogenesis NCI-Frederick Cancer Research and Developmental Center***

Cytochrome P-450(CYP) enzymes are important in catalyzing the biotransformation on many endogeneous compounds and xenobiotics, including drugs and carcinogens. In the present study, effect of nifedipine a voltage dependent calcium channel blocker on the induction of CYP1A1 and 2B1 was investigated. Change of CYP1A1 and 2B1 activities were measured by using specific enzyme activities and Western blot analysis. CYP1A1, as quantified by ethoxyresorufin-O-deethylase activity and Western blot with monoclonal antibody 1-7-1, increased in liver microsome of nifedipine-treated spontaneous hypertensive rat(SHR, 30mg/kg.b.w, twice a day for 3days) but not in kidney microsome. CYP2B1, as quantified by benzyloxyresorufin-O-dealkylase activity and Western blot with monoclonal antibody 2-66-3, markedly increased in liver microsome of nifedipine-treated SHR but slightly in kidney microsome. The results demonstrate that nifedipine is a potent inducer of CYP2B1 in SHR.

서 론

Cytochrome P-450(CYP)은 마이크로솜내에 있는 monooxygenase계의 마지막 성분이며¹⁾ CYP 유전자 가족은 간과 다른 조직에서 발견되는 이물질대사에 관여하는 주요한 효소 구성성분으로 세 가족이 있다²⁾. CYP 효소의 기질들은 널리 퍼져 있으며, 스테로이드나 프로스타글란딘처럼 생리학적으로 생성되는 지질들, 그리고 생물학적, 화학적으로 합성된 이물질들

이 이들 범주에 속한다³⁾. 포유 동물에서 아마도 60~200개의 다른 CYP 유전자들이 한 종족(given species) 내에 존재하고 있다⁴⁾. 이와 같은 유전자들은 다양한 조직의 소포체와 미토콘드리아에서 발견되며 그 중에서 간 조직은 CYP 유전자 발현에 주요한 근원이 된다³⁾.

많은 약물, benzo(α)pyrene, benzanthracene과 같은 발암물질, 돌연변이 유발원, 음식물 성분, 그리고 polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) 같은 지방성 유기 화합물들은 CYP1A 유전자 가족들에 의해 대사

된다⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾. 이 효소는 발암물질의 해독작용과 활성화, 두 과정을 모두 해결하는 능력을 가지고 있다⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾. 발암물질에 의한 CYP1A1의 유도에 의한 분자적 결과에 관하여 많이 연구되었으나 어떻게 이런 과정이 생물체의 생리 상태에서 조절되는지는 잘 알려져 있지 않다. 흰쥐에 있어서 CYP2B 유전자 가족에는 적어도 10개 이상의 가족이 있다. 그 중 CYP 2B1과 CYP2B2는 매우 잘 알려져 있다. 이 두 유전자 가족은 mRNA와 아미노산 서열에 있어서 98%나 상동관계를 가지고 있으며¹²⁾¹³⁾ intron과 exon의 배열이 동일하다¹⁴⁾. 또한 이 유전자들은 phenobarbital에 의해 유도되거나 구성 성분¹⁵⁾, 조직 특이성¹⁶⁾, 발달과정의 발현¹⁷⁾¹⁸⁾에 있어서 다양성을 나타낸다. 흰쥐 간장 조직에서 CYP 2B1과 CYP2B2 유전자의 전사적 활성화를 유도하는 기전에 대해서는 확실하게 알려져 있지 않다.

칼슘 channel 저해제인 nifedipine은 일반적으로 협심증과 고혈압 치료에 사용되며¹⁹⁾²⁰⁾ 시험관내에서 독특한 CYP isoenzyme에 의하여 산화되어 진다²¹⁾²²⁾²³⁾. 칼슘 channel 저해제로 다른 화학적 구조를 가진 verapamil과 diltiazem도 간조직 CYP에 의한 mixed-function oxidase계에 의해 대사되며 mixed-function oxidase계에 의하여 대사된 다른 물질, 즉 aminopyrine 또는 antipyrine의 생물학적 전환을 저해하는 작용이 있다고 보고되었다²⁴⁾²⁵⁾.

본 연구에서는 가장 흔히 쓰이는 칼슘 channel 길항제인 nifedipine의 사용시 대사되는 과정에서 CYP isoenzyme에 영향을 주게 되고 이로 인해 발암물질 등의 약물대사에 영향을 주게 되어 이 영향을 평가하기 위해서 선천성 고혈압 쥐(spontaneously hypertensive rat : SHR)에 칼슘 통로 저해제(calcium-channel blocker)인 nifedipine을 투여하여 고혈압이 치료되었을 때 SHR의 간과 신장에서 CYP1A1과 CYP2B1의 발현이 변화되는 양상을 조사하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

NADPH, resorufin, 7-ethoxyresorufin, 7-benzoyloxyresorufin은 sigma 회사에서 구입하였고 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt)와 NBT(p-nitro blue tetrazolium chloride)는 Bio-Rad 회사의 Western blot kit로 구입하였다. [α -³²P]dCTP

(3000ci/mmol)는 Amersham에서 구입하였고 그 외 시약은 특급 시약을 사용하였다. CYP2B1 cDNA는 Frank Gonzalez 박사가 제공해 주었으며 1.9kb cDNA를 EcoR I으로 소화시킨다음 agarose gel electrophoresis 방법으로 정제하였다.

2. 실험동물

실험동물은 체중 220g 내외의 수컷 SHR로 정상군과 실험군으로 구분하여 사육하였다.

1) 정상 흰쥐

정상 흰쥐에 규정 사료 및 물을 자유롭게 공급하였고 생리 식염수를 0.1ml/kg체중 씩 1일 2회 12시간 간격으로 복강내로 3일간 투여하였으며 혈압을 측정하였다.

2) 실험군 흰쥐

혈압이 180 ± 4 mmHg일 때, nifedipine을 30mg/kg 체중이 되도록 1일 2회 12 시간 간격으로 복강내로 3일간 투여하였으며 혈압을 측정하였다.

마지막 투여 후 24시간 후에 단두 처리법으로 처치하여 간장과 신장을 적출하였다.

3. 실험방법

마이크로솜 제조

간장 조직과 신장 조직을 차가운 생리 식염수로 씻어준 뒤 0.25 M sucrose 용액으로 25% 균질용액을 만들었다. 이 균질용액을 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 105,000×g에서 60분 동안 원심분리하여 생긴 침전을 0.25M sucrose 용액으로 1 g/ml되게 하였다. 마이크로솜 단백질 농도는 Lowry 방법²⁶⁾으로 정량하였고 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하였다.

CYP1A1과 CYP2B1에 선택적으로 반응을 보이는 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase와 7-Benzoyloxyresorufin-O-dealkylase활성의 측정은 다음과 같다.

7-Ethoxyresorufin-O-deethylase(EROD) 활성측정 방법 :

7-Ethoxyresorufin-O-deethylase의 활성도는 Burke와 Mayer의 방법²⁷⁾으로 정하였다. phosphate 완충용액(0.1M, pH 7.8) 2ml에 마이크로솜 10 μ l(100~200 mg 단백질), ethoxyresorufin(50 μ M in 1.25% w/v Tween 80) 20 μ l를 넣고 잘 섞은 후 50mM NADPH 10 μ l를 넣어 30°C, 30분간 항온유지한 후 형광광도계를

사용하여 500nm(excitation wavelength)와 586nm (emission wavelength)에서 측정하였다. 형광광도계는 resorufin(0.01mM in ethanol) 10 μ l로 calibration 하였다.

7-Benzyloxyresorufin-O-dealkylase(BROD) 활성측정 방법 :

7-Benzyloxyresorufin-O-dealkylase의 활성도는 Burke의 방법²⁸⁾으로 정량하였다. 반응 혼합물로 phosphate 완충용액(0.1M, pH 7.6)에 마이크로솜 10 μ l (100~200mg 단백질), benzyloxyresorufin(1mM in DMSO) 10 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C, 1분간 평형화시킨 후 NADPH(50mM) 10 μ l를 넣어 반응을 시작하였다. 최종 반응액은 2ml로 하였으며 생성된 resorufin 양을 형광광도계를 사용하여 530nm(excitation wavelength), 585nm(emission wavelength)에서 측정하였다.

Western blot :

SDS-PAGE는 Laemmli방법²⁹⁾에 따라 만들었다. 7.5% SDS-polyacrylamide gel에 microsomal protein 30g을 apply하여 전기영동시킨 뒤 nitrocellulose paper에 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 transfer했다. Transfer가 끝난 후 nitrocellulose paper를 3% non fat dry milk(in PBS) 용액으로 2시간 동안 blocking한 다음 phosphate-buffered saline(PBS)으로 씻었다. 그 후 monoclonal antibody(MAb) 1-7-1³⁰⁾과 MAb 2-66-3³¹⁾를 PBS용액으로 각각 1:200, 1:500으로 희석하여, 이 용액에 하룻밤동안 방치했다. 0.05% Tween 20(in PBS)로 2번, PBS로 1번 씻은 후에 second antibody로 goat anti-mouse IgG(alkaline phosphatase linked)를 사용하여 2시간 동안 실온에 노출시켜 conjugate시켰다. 다시 0.05% Tween 20(in PBS)이 PBS로 씻은 후에 BCIP/NBT phosphate 기질계를 사용하여 발색시켰다.

RNA slot hybridization :

각 조직의 total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 방법³²⁾에 의해 분리하였다. 분리한 20 g total RNA를 slot blot apparatus를 사용하여 nylon membran에 도포하고 80 $^{\circ}$ C oven에서 2시간 건조시켰다. nylon membran을 hybridization용액(50% formamide, 5 \times Denhardt's, 5 \times SSC, 0.5% SDS, 100 μ g/ml salmon sperm DNA)으로 55 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 prehybridization한 다음 [α -³²P]-labeled cDNA probe(2 \times 10⁶cpm/ml)로 55 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 hybridization시켰다. 그 후 nylon membran을 1 \times SSC/

0.5%SDS 용액으로 65 $^{\circ}$ C에서 15분간 3회 씻은 후에 방사선 자동 사진방법으로 hyperfilm에 노출시켰다.

결 과

SHR의 혈압이 180 \pm 4mmHg 일때 nifedipine을 30 mg/kg체중으로 12시간 간격으로 하루에 2번씩 3일간 주사한 후 SHR 혈압은 104 \pm 3.3mmHg로 정상으로 회복되었다(Table 1).

CYP1A1은 PAHs과 arylamine같은 발암성 환경물질의 대사에 중요한 역할을 한다. EROD는 CYP1A1에 매우 선택적인 효소로 Table 2에서 보는 바와 같이 효소 활성도가 SHR에 생리식염수를 투여한 군의 간장 조직에서는 0.26 \pm 0.025 pmoles/mg protein/min(이하

Table 1. Blood pressure and pulse in saline or nifedipine treated SHR

untreated SHIR	blood pressure (mmHg)	pulse
1day	181 \pm 1.9	413 \pm 24.9
	174 \pm 2.8	289 \pm 9.4
3day	181 \pm 1.9	340 \pm 0.0
	180 \pm 3.3	347 \pm 9.4
nifedipine treated SHR(3days)		
days/after last injection		
1day	121 \pm 0.94	400 \pm 0.0
	104 \pm 3.3	387 \pm 9.4
2day	91 \pm 5.2	387 \pm 9.4
	93 \pm 1.9	393 \pm 9.4
4day	120 \pm 0.0	420 \pm 16.3
	91 \pm 1.9	360 \pm 0.0
5day	111 \pm 0.9	367 \pm 9.4
	85 \pm 0.9	360 \pm 0.0
8day	91 \pm 1.6	373 \pm 9.4
	89 \pm 1.9	353 \pm 9.4

Table 2. The effect of nifedipine on 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase(EROD) activity in SHR tissue microsomes

	Ethoxyresorufin-O-deethylase activity (pmoles/mg protein/min)	
	Liver	Kidney
Saline-treated SHR	0.26 \pm 0.025	0.57 \pm 0.020
Nifedipine-treated SHR	0.97 \pm 0.058*	0.59 \pm 0.009*

Each value represents mean \pm S.D

*p<0.001 vs. saline-treated SHR

pmoles로 표시)였던 반면에 SHR에 nifedipine을 투여한 군의 간장 조직에서는 0.97 ± 0.058 pmoles로 현저한 증가가 있었다($p < 0.001$). 그러나 신장 조직에서는 SHR에 생리식염수를 투여한 군에서는 0.57 ± 0.020 pmoles이나 SHR에 nifedipine을 투여한 군에서는 0.59 ± 0.009 pmoles로 변화가 없었다.

BROD는 CYP2B1에 매우 선택적인 효소로 Table 3처럼 SHR에 생리식염수를 투여한 군의 간장 조직에서는 0.19 ± 0.037 pmoles이었으나 SHR에 nifedipine을 투여한 군의 간장 조직에서는 7.40 ± 1.070 pmoles로 크게 증가하였다($p < 0.001$). 또한 SHR에 생리식염수를 투여한 군의 신장 조직에서는 0.04 ± 0.003 pmoles이었으나 SHR에 nifedipine을 투여한 군의

신장 조직에서는 0.05 ± 0.004 pmoles로 약간의 증가가 있었다($p < 0.05$).

Fig. 1과 2에서 보는 바와 같이 CYP1A1에 반응하는 monoclonal antibody(MAb) 1-7-1을 사용하여 Western blot한 결과 SHR에 생리식염수를 투여한 군의 간장 조직에 비해 SHR에 nifedipine을 투여한 군의 간장 조직에서는 CYP1A1이 약간 증가하였으나 SHR에 nifedipine을 투여한 군의 신장 조직에서는 변화가 없었다. 또한 CYP2B1에 반응하는 MAb 2-66-3을 사용하였을 때 SHR에 nifedipine을 투여한 군의 간장 조직에서 SHR에 생리식염수를 투여한 군의 간장 조직보다 현저한 증가가 있었고 신장 조직에서는 변화가 없었다.

Fig. 3은 CYP2B1 probe를 사용하여 RNA slot hybridization을 시행한 결과이다. SHR에 nifedipine을 투여한 군의 간장 조직에서 SHR에 생리식염수를 투여한 군보다 mRNA 발현이 현저히 증가되었다.

Table 3. The effect of nifedipine on 7-Benzyloxyresorufin-O-dealkylase (BROD) activity in SHR tissue microsomes

	Benzyloxyresorufin-O-dealkylase activity (pmoles/mg protein/min)	
	Liver	Kidney
Saline-treated SHR	0.19 ± 0.037	0.04 ± 0.003
Nifedipine-treated SHR	$7.40 \pm 1.070^*$	$0.05 \pm 0.009^{**}$

Each value represents mean \pm S.D.

* $p < 0.001$ vs. saline-treated SHR

** $p < 0.05$ vs. saline-treated SHR

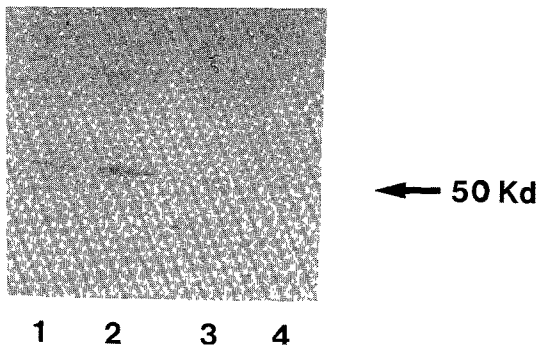


Fig. 1. Western blots of CYP1A1 in rat tissue microsome. Monoclonal antibody(MAb) 1-7-1 directed to CYP1A1 was incubated at a dilution of 1 : 200, followed by goat anti-mouse secondary antibody(1 : 1000) conjugated to alkaline phosphatase. Bands were visualized by incubation in BCIP/NBT alkaline phosphatase substrate. lane1 : Liver from saline-treated SHR
lane2 : Liver from nifedipine-treated SHR
lane3 : Kidney from saline-treated SHR
lane4 : Kidney from nifedipine-treated SHR

고찰

본 연구는 고혈압이나 심근경색제에 쓰이는 칼슘 통로 차단제(calcium-channel blocker)인 nifedipine은 이물질의 대사에 관여하는 cytochrome P-450계의 활성도에 영향을 미치고 이는 다시 발암제 등의 약물의 대사에 영향을 미쳐 의약품 독성이나 발암을 유도할 수도 있기 때문에 nifedipine의 투여에 의해 선천성

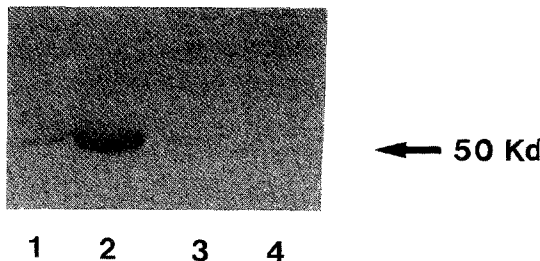


Fig. 2. Western blots of CYP1B1 in rat tissue microsome. Monoclonal antibody(MAb) 2-66-3 directed to CYP1B1 was incubated at a dilution of 1 : 500, followed by goat anti-mouse secondary antibody(1 : 1000) conjugated to alkaline phosphatase. Bands were visualized by incubation in BCIP/NBT alkaline phosphatase substrate. lane1 : Liver from saline-treated SHR
lane2 : Liver from nifedipine-treated SHR
lane3 : Kidney from saline-treated SHR
lane4 : Kidney from nifedipine-treated SHR

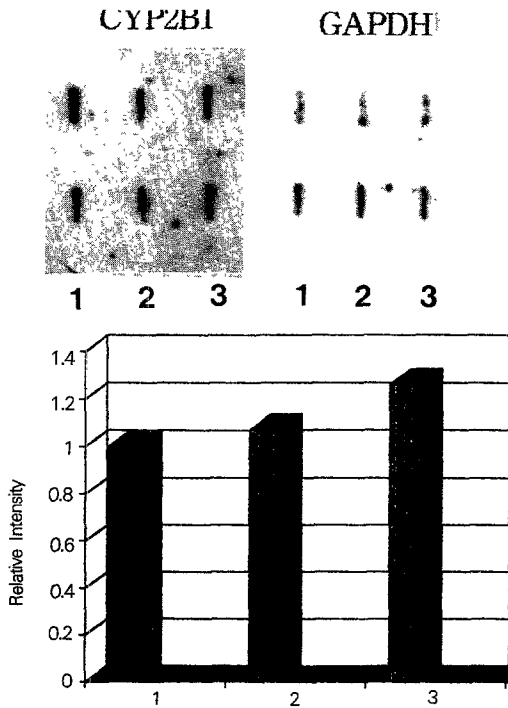


Fig. 3. Slot blot analysis for expression of CYP2B1 mRNA. RNA was obtained SHR liver microsomes.
 lane1 : Normotensive rat
 lane2 : Saline-treated SHR
 lane3 : Nifedipine-treated SHR

고혈압 쥐(SHR)의 간과 신장의 CYP1A1과 2B1의 유도에 미치는 영향을 조사하였다. 시험관 연구에서 verapamil과 diltiazem이 aminopyrine과 antipyrine이 CYP에 의하여 생물학적 전환을 할 때 경쟁적 저해제 역할을 하는 것이 입증되었다³³⁾. 그러므로 생체와 같은 상황에서 nifedipine을 과량 사용하였을 때 간 조직에서 다른 약물의 산화작용을 억제하는지 입증할 필요성이 있게 되었다. 그 결과 치료될 수 있는 양의 nifedipine 투여가 antipyrine의 pharmacokinetics에 대하여 유의있는 효과가 없으며 임상적으로 간조직 약물대사의 억제는 칼슘 길항제 약물들 사이에도 공통된 성질을 갖지 않는다는 것이 알려졌다³⁴⁾. 본 연구에서 칼슘 길항제로 nifedipine을 SHR에 투여하여 고혈압을 치료하였을 때 간과 신장에서 CYP1A1과 2B1의 발현이 변화되는 양상을 측정하기 위해 CYP1A1에 특이하게 반응하는 EROD활성과 CYP2B1에 특이하게 반응하는 BROD 활성을 측정하고, MAb 1-7-1과 MAb 2-66-3를 사용하여 Western blot을 시행하고 CYP

2B1 cDNA를 이용하여 RNA slot blot으로 확인하고자 하였다.

CYP효소들은 많은 종류의 내인적, 외인적 화합물의 생물학적 전환을 조절하는 효소이다. 3-Methylcholanthrene(3-MC)에 의해 간장 마이크로솜에서 유도되는 CYP의 주된 형태는 CYP1A1으로 PAHs나 dimethylnitrosamine과 같은 외인적 화합물의 산화를 촉매한다³⁵⁾. SHR에 nifedipine을 투여했을 때, 간장 조직에서 CYP1A1에 특이한 반응인 EROD활성은 약 3.5배 증가되었고 MAb 1-7-1으로 Western blot하였을 때에도 증가하는 현상을 보였다. 이는 nifedipine을 SHR에 투여했을 때 간조직 마이크로솜에서 CYP1A1이 유도되는 것을 확인할 수 있었다. CYP2B1은 phenobarbital에 의해 간장 조직에서 유도되는 CYP의 주된 형태³⁶⁾로 흰쥐에 있어서 CYP2B1 유전자 가족은 9~11개의 상동적 유전자를 가지고 있다. 간장 조직에서 phenobarbital에 의해 CYP2B 유전자가 유도되는 기전은 부분적으로 확립되어 있으며, 전사적으로 활성화되는 기전이 지배적이다³⁷⁾. Phenobarbital 투여로 흰쥐 간장 조직에서 CYP2B1 유전자가 23배나 증가되고³⁸⁾, 소장 점막층은 6배나 증가된다고 보고 되었다³⁹⁾. 또한, 화합물질에 의하여 유도된 발암과 독성 반응을 억제하는 organosulfur 화합물인 diallyl sulfide의 투여로 CYP2B1에 특이한 BROD활성도가 단백질 양이 증가되는 것과 더불어 현저히 증가된다고 하였다⁴⁰⁾. Nifedipine 투여로 SHR 간장조직에서 BROD활성이 약 40배 증가되고 MAb 2-66-3를 사용하여 Western blot하였을 때에도 현저한 증가를 보였으나 신장 조직에서는 변화가 없었다. 이는 nifedipine이 SHR에서 혈압이 정상적으로 치료되었을 때, 선택적으로 간장조직에서 CYP1A1과 CYP2B1의 유도물질이며, 특히 CYP2B1의 강력한 유도물질임을 알 수 있었다.

References

- 1) Guengerich FP : Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer therapy. *Cancer Res.* 1988 ; 48 : 2946-2954
- 2) Gonzalez FJ : The molecular biology of cytochrome P-450s. *Pharmacol. Rev.* 1988 ; 40 : 243-288
- 3) Porter TD, Coon MJ : *Cytochrome P-450. Multiplicity*

- of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1991 : 266 : 13469-13472
- 4) Puga A, Nebert DW : Evolution of P-450 gene superfamily and regulation of the murine CYP1A1 gene. *Biochem. Soc. trans.* 1990 : 18 : 7-10
 - 5) Nevert DW, Gonzalez FJ : P-450 genes : Structure, evolution, and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 1987 : 56 : 945-993
 - 6) Nebert DW, Nelson DR : P-450 gene nomenclature based on evolution. *Methods. Enzymol.* 1991 : 206 : 3-11
 - 7) Pelkonen O, Nebert DW : Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : etiologic role in carcinogenesis (review). *Pharmacol. Rev.* 1982 : 34 : 190-222
 - 8) Lu AY, West SB : Multiplicity of mammalian microsomal cytochrome P-450 (review). *Pharmacol. Rev.* 1979 : 31 : 277-295
 - 9) Gelboin HV : Benzo(a)pyrene metabolism, activation and carcinogenesis : role and regulation of mixed function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.* 1980 : 60 : 1107-1166
 - 10) Faletto MB, Koser PL, Battula N, et al : Cytochrome P3-450 cDNA encodes aflatoxin B1-4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 1988 : 263 : 12187-12189
 - 11) Sarthanam K, Lotlikar PD : Effect of -naphthoflavone on the metabolism aflatoxin B1 in hamsters. *Cancer Lett.* 1989 : 45 : 129-134
 - 12) Mizukami Y, Soqawa K, Suwa Y, et al : Gene structure of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983 : 80 : 3958-3962
 - 13) Yuan PM, Ryan DE, Levin W, Shively JE : Identification and localization of amino acid substitutions between two phenobarbital-inducible rat hepatic microsomal cytochrome P-450 by microsequence analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983 : 80 : 1169-1173
 - 14) Mizukami Y, Soqawa K, Suwa Y, et al : Gene structure of a major form of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 in rat liver. *J. Biol. Chem.* 1985 : 260 : 7980-7984
 - 15) Omiecinski CJ, Walz FG, Jr, Vlasuk GP : Phenobarbital induction of rat liver cytochrome P-450b and P-450e. Quantitation of specific RNAs by hybridization to synthetic oligodeoxynucleotide probes. *J. Biol. Chem.* 1985 : 260 : 3247-3250
 - 16) Omiecinski CJ : Tissue-specific expression of rat mRNAs homologous to cytochrome P-450b and P-450e. *Nucleic Acids Res.* 1986 : 1525-1539
 - 17) Giachelli CM, Omiecinski CJ : Regulation of cytochrome P-450b and P-450e mRNA expression in the developing rat. Hybridization to synthetic oligodeoxynucleotide probes. *J. Biol. Chem.* 1986 : 261 : 1359-1363
 - 18) Giachelli CM, Omiecinski CJ : Developmental regulation of cytochrome P-450 genes in the rat. *Mol. Pharmacol.* 1987 : 31 : 477-484
 - 19) Waters DD, Theroux P, Szlachcic J, Daowe F : Provocative testing with ergonovine to assess to efficiency of treatment with nifedipine diltiazem and verapamil in variant angina. *Am. J. Cardiol.* 1981 : 48 : 123-130
 - 20) Henry PD : Comparative pharmacology of calcium antagonists nifedipine, verapamil and diltiazem. *Am. J. Cardiol.* 1980 : 46 : 1047-1058
 - 21) Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, et al : Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* 1986 : 261 : 5051-5060
 - 22) Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP, Lapenson DP : Human liver microsomal steroid metabolism : identification of the major microsomal steroid hormone 6 -hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 1988 : 263 : 424-436
 - 23) Aoyama T, Yamano S, Waxman DJ, et al : Cytochrome P-450 hPCN 3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. *J. Biol. Chem.* 1989 : 264 : 10388-10395
 - 24) Edward DJ, Lavoie R, Bechman H, et al : The effect of coadministration of verapamil on the pharmacokinetics and metabolism of guinidine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1987 : 41 : 68-73
 - 25) Carrun G, Egan JM, Abernethy DR : Diltiazem treatment impairs hepatic drug oxidation : studies of antipyrine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1986 : 40 : 140-143
 - 26) Lowry OH, Rosebrogth NJ, Farr AL, Randell RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951 : 193 : 265-275
 - 27) Burke MD, Mayer RT : Ethoxyresorufin direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* 1974 : 2 : 583-588
 - 28) Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, et al : Ethoxy-, pentoxy-, and benzyloxyphenoxazone and homologues : A series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.* 1985 : 34 : 3337-3345

- 29) Laemmli UK : *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*. 1970 : 227 : 680-685
- 30) Park SS, Fujino T, West D, Guengerich FP, Gelboin HV : *Monoclonal antibodies that inhibit enzyme activity of 3-methylcholanthrene-induced cytochrome P-450*. *Cancer Res*. 1982 : 42 : 1798-1808
- 31) Park SS, Fujino T, Miller H, West D, Guengerich FP, Gelboin HV : *Monoclonal antibodies to phenobarbital-induced rat liver cytochrome P-450*. *Biochem. Pharmacol*. 1984 : 33 : 2071-2081
- 32) Chomczynsky P, Sacchi N : *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal. Biochem*. 1987 : 162 : 156-159
- 33) Renton KW : *Inhibition of hepatic microsomal drug metabolism by calcium channel blockers diltiazem and verapamil*. *Biochem. Pharmacol*. 1985 : 34 : 2549-2553
- 34) Dickinson TH, Egan JM, Abernethy DR : *Effect of nifedipine on hepatic drug oxidation*. *Pharmacol*. 1988 : 36 : 405-410
- 35) Guengerich FP, Dannan GA, et al : *Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450 : electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochromatographic properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or naphthoflavone*. *Biochemistry*. 1982 : 21 : 6019
- 36) Voigt JM, Guengerich FP, Baro J : *Localization of a cytochrome P-450 isozyme and NADPH-cytochrome P-450 reductase in rat nasal mucosa*. *Cancer Lett*. 1985 : 27 : 241-247
- 37) Hardwick JP, Gonzalez FP, Kasper CB : *Transcriptional regulation of rat liver epoxide hydratase, NADPH-cytochrome P-450 reductase and cytochrome P-450 genes by phenobarbital*. *J. Biol. Chem*. 1983 : 258 : 8081-8085
- 38) Traber PG, Wang W, McDonnell M, Gumucio J : *P-450 IIB gene expression in rat small intestine : cloning of intestinal P-450 IIB1 mRNA using the polymerase chain reaction and transcriptional regulation of induction*. *Mol. Pharma*. 1990 : 37 : 810-819
- 39) Pan J, Hong JY, Ma BL, et al : *Transcriptional activation of cytochrome P-450 2B1/2 genes in rat liver by diallyl sulfide, a compound derived from garlic*. *Arch. Biochem. Biophys*. 1993 : 302 : 337-342