

白鼠에 있어서 Hepatic Microsomal Cytochrome P-450에 대한 Diazepam, Cimetidine 및 Sulpiride의 영향

이화여자대학교 의과대학 생화학교실
김복희 · 함윤애 · 홍영숙 · 성낙응

=Abstract=

Influence of Diazepam, Cimetidine and Sulpiride on the Level of Hepatic Microsomal Cytochrome P-450 in Rats

B.H. Kim, Y.A. Ham, Y.S. Hong and N.E. Sung

Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University

Cytochrome P-450 is a terminal oxidase of the hepatic microsomal monooxygenase system associated with the oxidative biotransformation of a variety of lipophilic endogenous and exogenous compounds, and generally is assayed by CO-binding spectrophotometry of dithionite-reduced samples.

In well-fed normal male rats with or without stress condition, the effect of antiulcer drug; cimetidine, sulpiride and diazepam on the level of microsomal cytochrome P-450 were determined. Only stress condition produced no significant effect in cytochrome P-450 contents. Administration of cimetidine, sulpiride and diazepam in this condition caused a 44.1%~87.5% increment in cytochrome P-450, diazepam produced the most increase. After diazepam treatment of rats, the peak position of cytochrome P-450 shifted to a longer wave length of 452 nm.

서 론

간조직 microsome내 약물 대사 효소는 세포막과 결합되어있고 여러 내인적 물질인 스테로이드, 지방산, 및 담즙산 등과 외인적 물질인 약물, 발암물질, 살충제 및 많은 다른 이물질 대사에 관여하는 전자 전달체로서 작용한다. 이들 효소계에서 일어나는 반응들은 기질의 성질에 따라서 기질을 hydroxylation, oxidative dealkylation, deamination시키거나, nitroxide, sulfoxide를 형성한다^{1,2}. 간조직 microsome내 약물 대사 효소계는 지방(phosphatidyl choline)과 두종류의 단백질로

구성되어 있는데 하나는 cytochrome P-450이라고 불리우는 hemeprotein이고 다른 하나는 NADPH-cytochrome c reductase라고 불리우는 flavoprotein이다. 또한 reductase는 NADPH와 cytochrome P-450사이의 전자전달체인 반면에 cytochrome P-450은 이 효소계에서 기질과 산소의 결합장소이며 terminal oxidase로 작용한다^{3,4,5}.

간조직 약물 대사 효소의 활성도는 식이, 영양소, 체내의 홀몬의 변화 그리고 화학물질 섭취에 영향을 받는다^{6,7}. 스테로이드 홀몬, 약물인 barbiturates와 같은 기질과 benzopyrene과 같은 물질을 투여하면 효소 단백질의 합성을 증가시켜서 약물 대사 효소의 활성을 증

가시키고, 효소 단백질 합성 억제제로 처지하면 유도 효과를 감소시킨다²¹⁾¹⁷⁾. 약물 대사 능력이 증가할 때는 일반적으로 약물 대사 효소계의 중요한 요소인 cytochrome P-450의 농도가 증가된다¹³⁾.

저자들은 스트레스에 의하여 생성된 위궤양에 항궤양 효과가 있는 몇가지의 약물—1) Histamine H₂ receptor antagonist로서 위액 분비 억제 효과가 현저한 Cimetidine²²⁾, 2) 시상하부핵(Hypothalamic nuclei)과 망상조직(reticular substance)에 작용하며 스트레스, 신진대사장애, 교감신경자극, 시상하부질환 그리고 corticosteroid의 장기간 투여로 인하여 생기는 소화기 합병증의 치료에 사용되는 Sulpiride⁵⁾¹²⁾, 및 3) 중추신경 억제 약물로 stress ulcer시 항궤양 효과가 있는 Diazepam⁸⁾,—을 투여한 후 Microsomal Cytochrome P-450의 양을 측정하므로써 이들이 간조직 약물대사효소에 미치는 영향을 관찰하고자 한다.

실험재료 및 방법

A. 실험동물 : 체중 150g 내외의 웅성 흰쥐(sprague-dawley strain)를 사용하였다. 흰쥐는 실험실시전 1~2주간 단백질 15%, 지방 3%를 함유한 시판 배합 사료로 사육하였다.

B. 실험군 : 일정한 조건하에서 사육한 흰쥐를 다음과 같이 4군으로 구분하여 복강내로 약물을 한 번 주사한 후 복판에 사지를 매어서 역립위(逆立位)로 5시간 구속 스트레스를 가하였다¹²⁾. 그리고 5시간 후에 Ether로 경마취하여 개복하고 간장을 절제하였다.

- 1군 : Control(스트레스 안준 것)
- 2군 : 0.9% Saline(5ml/체중 kg)
- 3군 : Cimetidine(50mg/체중 kg)
- 4군 : Sulpiride(50mg/체중 kg)
- 5군 : Diazepam(1mg/체중 kg)

C. Microsomal Fraction의 분리 : 절제한 간장을 ice-cold 0.25M sucrose 용액에서 2번 씻은 후 Potter-Elvehjem Homogenizer를 사용하여 같은 Sucrose 용액으로 25% 균질용액을 만들었다. 이를 Damon/Model ice B-20A centrifuge로 15,000g에서 20분간 원심분리하고 이의 상층액을 다시 15,000g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 사용하였다. 이 상층액을 다시 105,000g에서 1시간 동안 Beckman/Model L5-50 ultracentrifuge로 원심분리하여 상층액은 버리고 남은 침전을 1g/ml 되게 0.25M Sucrose로 균질용액을 만들었다.

D. Cytochrome P-450 측정방법 : Microsomal Cy-

tochrome P-450 측정은 Varian sp-624 Spectrophotometer로 omura and sato의 방법에¹⁶⁾ 의하여 측정하였다. 준비한 microsomal fraction을 dithionite(Sodium Hydrosulfite)로 환원시키고 일산화탄소 가스를 통과시켜서 pigment의 spectrum을 읽었다. cytochrome P-450의 농도는 각각 490 nm와 450 nm 사이의 흡수율차이(extinction coefficient difference)로부터 계산하였다. 이때 molar extinction coefficient는 90mM⁻¹cm⁻¹로 하였다.

E. Microsomal Protein 측정방법 : Microsomal Protein은 Lowry 방법으로 측정하였다¹⁴⁾. 0.1N NaOH로 희석한 microsomal fraction 1 ml에 5 ml의 Lowry's reagent (100 ml of 2% Na₂CO₃ in 0.1N NaOH add 1 ml of 1% CuSO₄)를 넣고 잘 혼합하여 10분간 방치 후 Folin reagent (diluted 1:1 with H₂O) 0.5 ml를 첨가하고 35분 후에 spectronic 20(Bauch and Lomb)을 사용하여 700 nm에서 읽었다.

실험 결과 및 고찰

건강한 웅성 흰쥐에서 Hepatic Microsomal Cytochrome P-450 (CO-binding pigment)의 양은 Table 1과 Fig. 1에서와 같이 대조군이 간장 microsome 0.1ml 당 3.81 nmole인데 비해서 Saline 투여군에서 3.85 nmole, Cimetidine 투여군에서 5.55 nmole, Sulpiride 투여군에서 5.41 nmole 그리고 Diazepam 투여군에서는 7.22 nmole을 나타내었다. 대조군에 비하여 Saline 투여군에서 cytochrome P-450의 양이 약간 증가되었으나 통계학적 의미는 없었으므로 스트레스 자체는 cytochrome P-450의 양에 영향을 주지 않는다고 사료된다. Saline 투여군에 비하여 항궤양 효과가 있는 약물 투여군에서는 전체적으로 44.2%~87.5%의

Table 1. Effects of Cimetidine, Sulpiride and Diazepam on the Level of Hepatic Microsomal Cytochrome P-450 in Rats.

Treatment	Cytochrome P-450 (nmole/0.1ml Liver microsome)	Cytochrome P-450 (nmole/1mg Protein)
Control	3.81±0.01	3.13±1.93
Saline	3.85±1.21	4.84±2.20
Cimetidine	5.55±2.44*	5.04±1.93
Sulpiride	5.41±3.11*	5.07±2.07
Diazepam	7.22±1.85*	5.33±1.22

*Statistically significant (P<0.05) against Saline group.

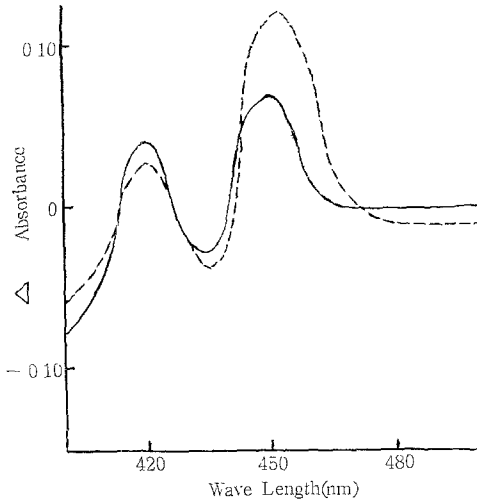


Fig 1. CO difference spectra of dithionite reduced liver microsomes from Control and Diazepam treated rats. The solid (—) and broken (---) lines represent microsomes from Control and Diazepam treated rats respectively.

증가를 보였으며 특히 Diazepam 투여군에서는 다른 약물에서 보다 현저한 증가를 보였다. Microsomal Protein 1 mg 당 cytochrome P-450의 양은 대조군이 3.13 nmole, Saline 투여군이 4.84 nmole, Cimetidine 투여군이 5.04 nmole, Sulpiride 투여군이 4.07 nmole 그리고 Diazepam 투여군이 3.33 nmole을 나타내었다.

Cytochrome P-450은 여러 약물과 Steroid 등의 대사에 관계되는 전자전달계에 관여하며 생체막과 결합된 상태로 존재한다. 즉 간장, 신장, 부신수질 그리고 장절막의 microsome과 몇개의 내분비선의 mitochondria 그리고 yeast에 존재한다. 또한 Sindney Fleischer는²¹⁾ 여러 liver cell fraction에서 cytochrome P-450의 양을 측정하였는데 이들 plasma membrane, nuclei envelope 그리고 golgi vesicle에서 보다 microsome에서 더 많은 양의 cytochrome P-450이 존재한다고 보고했다²¹⁾.

Raymond와 Menard는²⁰⁾ rat testis 그리고 Cooper 등은⁴⁾ adrenal cortex의 microsomal cytochrome P-450 함량을 측정하여 보고하였다. 이들의 결과와 비교하여 볼 때 다른 장기보다 hepatic microsomal cytochrome P-450이 가장 양이 많은 것을 알 수 있었다.

간장 약물 대사효소의 강력한 유도물질인 phenobarbital을 투여시 cytochrome P-450의 양을 현저히 증가시키고 drug hydroxylase activity와 microsomal protein 함량을 증가시킨다. 또한 이때 maximum absorption spectrum이 450 nm보다 약간 이동해서 452 nm에서 일어난다는 것은 잘 알려져있다¹¹⁾¹⁷⁾. 그리고 methyl cholanthrene을 처치한 rat의 microsomal cytochrome P-450의 최대흡수 스펙트럼이 450 nm에서 448 nm로 변화된다는 보고도 있다⁹⁾¹⁶⁾.

본 실험에서도 Fig. 1에서와 같이 대조군에서와는 다르게 약물투여군에서 최대 흡수 스펙트럼이 450 nm에서 452 nm로 옮겨지는 것을 볼 수 있었고 sulphiride, cimetidine 그리고 diazepam을 투여했을 때 cytochrome P-450의 양을 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다. 이런 결과들을 고찰하여 보면 이상의 약물들도 phenobarbital과 같이 간장 약물 대사효소를 유도하는 물질로써 drug-hydroxylase activity를 증가시킨다고 생각된다.

결 론

1) 스트레스에 의하여 생성된 위폐양에 항폐양 효과가 있는 Cimetidine, Sulpiride 그리고 Diazepam을 투여했을 때 간조직 microsomal fraction내 cytochrome P-450의 양을 측정할 결과 Cimetidine, Sulpiride 및 Diazepam도 Cytochrome P-450의 양을 증가시키는 약물이었으며 Diazepam이 Cytochrome P-450의 양을 가장 많이 증가시켰다.

2) 스트레스 자체만으로는 간조직 microsome내 cytochrome P-450의 양을 변화시키지 않았다.

3) Rats에서 Diazepam 투여 후에 환원된 간조직 microsome의 CO difference spectra에서 Cytochrome P-450의 최대흡수 스펙트럼이 450 nm에서 452 nm로 변화되었다.

—References—

- 1) Anders, J.F. and Adhip, P.N.: Influence of tryptophan on the level of hepatic microsomal cytochrome P-450 in well-fed normal, adrenalectomized and phenobarbital treated rats, *Biochem. Biophys. Acta*, 444, 453~460, 1976.
- 2) Conney, A.H. and Gilman, A.G.: Puromycin inhibition of enzyme induction by 3-methylcholanthrene and phenobarbital, *J. Biol. Chem.*, 238, 3682~3685, 1963.

- 3) Conney, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction, *Pharmacol. Rev.*, 19, 317~364, 1967.
- 4) Cooper, D.Y., Nasasimhula, S., Slade, A., Raich, W., Foroff, O. and Rosenthal, O.: P-450-containing particles from adrenal cortex mitochondria, *Life Sci.*, 4, 2109, 1965.
- 5) Dureux, J.B. and Kiffer, B.: Sulpiride in neurosurgical resuscitation and in internal medicine-Prevention of corticosteroid ulcers, *Sem. Hop. Paris*, 46, 30~33, 1970.
- 6) Gelboin, H.V. and Blackburn, N.R.: The stimulatory effect of 3-methylcholanthrene on benzpyrene hydroxylase activity in several rat tissues; Inhibition by actinomycin D. and puromycin, *Cancer Res.* 24, 356~360, 1964.
- 7) Gillette, J.R., Davis, D.C. and Sasame, H.A.: Cytochrome P-450 and its role in drug metabolism, *Annu. Rev. Pharmacol.*, 12, 57-84, 1972.
- 8) Hanson, H.M. and Brodie, D.A.: Use of the restrained rat technique for study of the anti-ulcer effect of drugs, *J. Appl. Physiol.*, 15 : 2, 291~294, 1960.
- 9) John, G.: Biological oxidation of Nitrogen, Eisevian/North clolland Biomedical. press, New-york, 185~193, 1978.
- 10) Johnnie, R.H., Marcel, U.K.M. and Compbell J.C.: Effect of protein deficiency on the inducibility of the hepatic microsomal drug metabolizing enzyme system- I . Effect on substrate interaction with cytochrome P-450, *Biochem. Pharmacol.*, 22, 1005~1014, 1973.
- 11) Ladu, D.N., Mandel, H.G. and Way, E.L.: Fundamentals of drug metabolism and drug deposition, willims and wilkans company, 206 253, 1971.
- 12) Lareng, L. and Cathala, B.: Digestive mucosa and Distress conditions-Efficacy of protective treatment with sulpiride, *Sem. Hop. Paris*, 46, 34-40, 1970.
- 13) Long, R.F.: Introduction of drug metabolizing enzymes and cytochrome P-450, *Biochem. J.* (proceedings), 115, 26p, 1969.
- 14) Lowry, O.H., Rosebrough, N.S., Farr, A.L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- 15) Miller, O.N.: Nutrition and drug metabolism, *Fed. Proc.*, 35;13, 2459-2485, 1976.
- 16) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes-II. Solubilization, purification and properties, *J. Biol. Chem.*, 239, 237, 1964.
- 17) Orrenius, S., Erricsson, J. L. E. and Ernster, L.: Phenobar-bital-induced synthesis of the microsomal drug metabolizing enzyme system and its relationship to the proliferation of endoplasmic membranes: A morphological and biochemical study, *J. Cell Biol.*, 25, 627-639, 1965.
- 18) Orrenius, S. and Ernster, L.: Molecular mechanisms of oxygen activation, Osamu Hayaishi, Kyoto, Japan, 215-244, 1974.
- 19) 백 상장 : 백서에 있어서 진통 stress와 위궤양 발생에 관한 실험, *신경정신의학*, 13 : 1, 61-71, 1974.
- 20) Raymond, H., Menard, S.A.L. and John, L. P.: The intratesticular localization of cytochrome P-450 and cytochrome P-450 dependent enzymes in the rat testis, *Endocrinology*, 97, 1587, 1975.
- 21) Sindney, F., Becca, F., Angelo, A. and Britton, C.: Cytochrome b₅ and P-450 in liver cell fraction, *Bioch. Biophys. Acta*, 225, 194-200, 1971.
- 22) Susumu, O., Kojitakeuchi, T. U. and Keijiro, T.: Effects of cimetidine, a histamine H₂-receptor antagonist, on various experimental gastric and duodenal ulcers, *Digestive Disease*, 22;8, 677-684, 1977.