

## 담도폐색 흰쥐에서 Cholic Acid 와 Phenobarbital 투여 대한 Hepatic Microsomal Cytochrome P-450 Apoprotein 의 변화\*

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

성낙응 · 김복희 · 홍영숙

이화여자대학교 의과대학 의과학교실

최            금            자

= Abstract =

### **Qualitative Alteration in Hepatic Microsomal Cytochrome P-450 Apoproteins Associated with Bile Duct Ligation, and the Administration of Cholic Acid and Phenobarbital**

Nak Eung Sung, Eok Hoi Kim, and Young Sook Hong

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

Kum Ja Choi, M.D.

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

We have investigated in rat liver whether different forms of cytochrome P-450 are altered in hepatic disorders associated with impaired drug metabolism. Total hepatic cytochrome P-450 is decreased after either bile duct ligation or the administration of estradiol. In contrast, phenobarbital administered alone increases hepatic content of cytochrome P-450, and when administered with estradiol the reduction in cytochrome P-450 was prevented.

Four forms of microsomal cytochrome P-450 apoproteins, ranging in molecular weight from 50 000 to 58,000, were tentatively identified in a sodium dodecyl sulfate (SDS)-6M urea polyacrylamide gel electrophoresis system. Phenobarbital administration increased primarily band IV(50,000 daltons). Bile duct ligation was associated with a marked reduction in bands II and III while bands II and III were decreased with estradiol benzoate administration. Simultaneous administration of phenobarbital and estradiol demonstrated a return of band I and an increase in density of bands III and IV. Simultaneous administration of cholic acid and estradiol demonstrated a return of band I and not altered in band III and IV.

\*본 논문은 생활과학연구원 연구비에 의하여 실행된 것임.

These studies support the hypothesis that multiple forms of cytochrome P-450 are present in liver microsomal membranes and that alterations in specific apoproteins may be associated with an increase or a decrease in the functional properties of cytochrome P-450.

## 서 론

많은 내인적 물질 그리고 fatty acid, steroid, alkane, insecticide, 많은 종류의 carcinogen 및 그의 다른 화합물을 포함하는 외인적 물질들은 여러 조직속에 endoplasmic reticulum 에 있는 mixed-function oxidase system 에 의하여 대사 되어진다. 어떤 경우는, 대사 결과 독성이나 carcinogenic 특성을 형성하고 다른 경우는 해독작용을 하기도 한다<sup>1)2)</sup>. Hepatic microsomal mixed-function oxidative metabolism 의 대부분은 CO 가스에 예민한 terminal oxidase 인 cytochrome P-450 을 포함하는 enzyme system 에 의하여 촉매된다<sup>3)4)</sup>. 그러므로 각종 간경변은 mixed-function oxidase system 의 기질들인 약물, steroid 및 fatty acid 등의 대사장애를 초래하게 된다<sup>5)</sup>. Mackinon 등은<sup>6)</sup> extrahepatic biliary obstruction 과 ethinyl estradiol 의 약리학적인 반응을 주었을때 담즙량이 감소되었다. 이런 감소는 mixed-function oxidase system 의 주요성분인 microsomal cytochrome P-450 의 양을 의의있게 감소시킨다고 보고 하였다<sup>7)8)</sup>. 이와같이 cytochrome P-450 의 양을 감소시키는 mechanism 은 이런 hemoprotein 의 분해를 증가시키는것 보다 오히려 합성물의 감소에 기인한다고 하였다<sup>9)</sup>. Mackinon 등은<sup>9)</sup> 담도폐색후에 나타나는 약물대사와 cytochrome P-450 의 감소는 cytochrome P-450 합성자체의 감소이외에 담즙산의 간내 축적같은 부수적 요소들이 약물대사 반응의 억제 영향을 줄 수 있다는 것을 시사했다. 또한 최근 많은 보고들은 microsomal cytochrome P-450 의 다른 molecular form 이 간장내 존재 한다고 보고 하였다<sup>10-15)</sup>.

이에 저자들은 hepatic microsomal cytochrome P-450 에 대한 bile acid 의 직접적인 영향 및 담도폐색과 estradiol benzoate 를 투여하므로 생긴 담즙분비 이상과 cholestasis 가 cytochrome P-450 의 어떤 molecular form 을 감소시키는 것인지를 조사하려고 이 실험을 시도 하였다.

## 실험재료 및 방법

### A. 실험재료

**실험동물**: 전 실험을 통해서 wistar strain 체중 150g 내의 웅성 흰쥐를 사용 하였다.

**시 약**: Cholic acid 는 Nakarai chemicals LTD., Phenobarbital 은 Elkins-Sinn Inc., Estradiol benzoate 는 Hankook Vet. Med. Co. LTD 를 사용 하였다. 그리고 Bovine serum albumin, catalase, ovalbumin, carbonic anhydrase 및 Myoglobin 은 Sigma Co. 제를 사용 하였다.

### B. 실험방법

제 1 실험군: 대조군으로 체중 100g 당 0.9% Saline 1ml 을 가벼운 ether 마취 하에서 서혜부를 절개하여 대퇴정맥에 직접 주사하고 3일간 정상사육 하였다.

제 2 실험군: 0.5mM 의 cholic acid 1ml 를 가벼운 ether 마취하에서 우측 서혜부를 절개하여 대퇴정맥에 서서히 주사 하였다<sup>16)</sup>.

제 3 실험군: 가벼운 ether 마취하에서 상복부 정중 절개에 의하여 담도를 이중 결찰하고 수술후는 3일간 정상 사육 하였다.

제 4 실험군: 담도를 이중 결찰후 0.5mM 의 cholic acid 1ml 을 대퇴정맥에 주사 하였다.

제 5 실험군: Estradiol benzoate (5mg/kg/day in propylene glycol)을 5일동안 피하주사 하였다<sup>9)</sup>.

제 6 실험군: Phenobarbital(80mg/kg/day in 0.9% saline)을 복강내로 5일간 주사 하였다<sup>9)</sup>.

제 7 실험군: Estradiol 과 phenobarbital 을 동시에 주사 하였다.

이상의 실험 동물들을 12시간 금식시킨 후 가벼운 ether 마취하에서 간을 절제 하였다. 상기 동물에서 취한 간을 ice-cold isotonic sucrose 로 25% homogenate 를 만들었고 microsomal fraction 을 분리하였다<sup>17)</sup>. Microsomal P-450 은 molar extinction coefficient  $91\text{mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$  를 사용하면서 Omura 와 Sato 방법에 의하여 측정하였다<sup>3)</sup>. 단백질 측정은 bovine serum albumin 을 standard 로 사용하고 Lowry 방법<sup>18)</sup>에 의하여 측정 하였다.

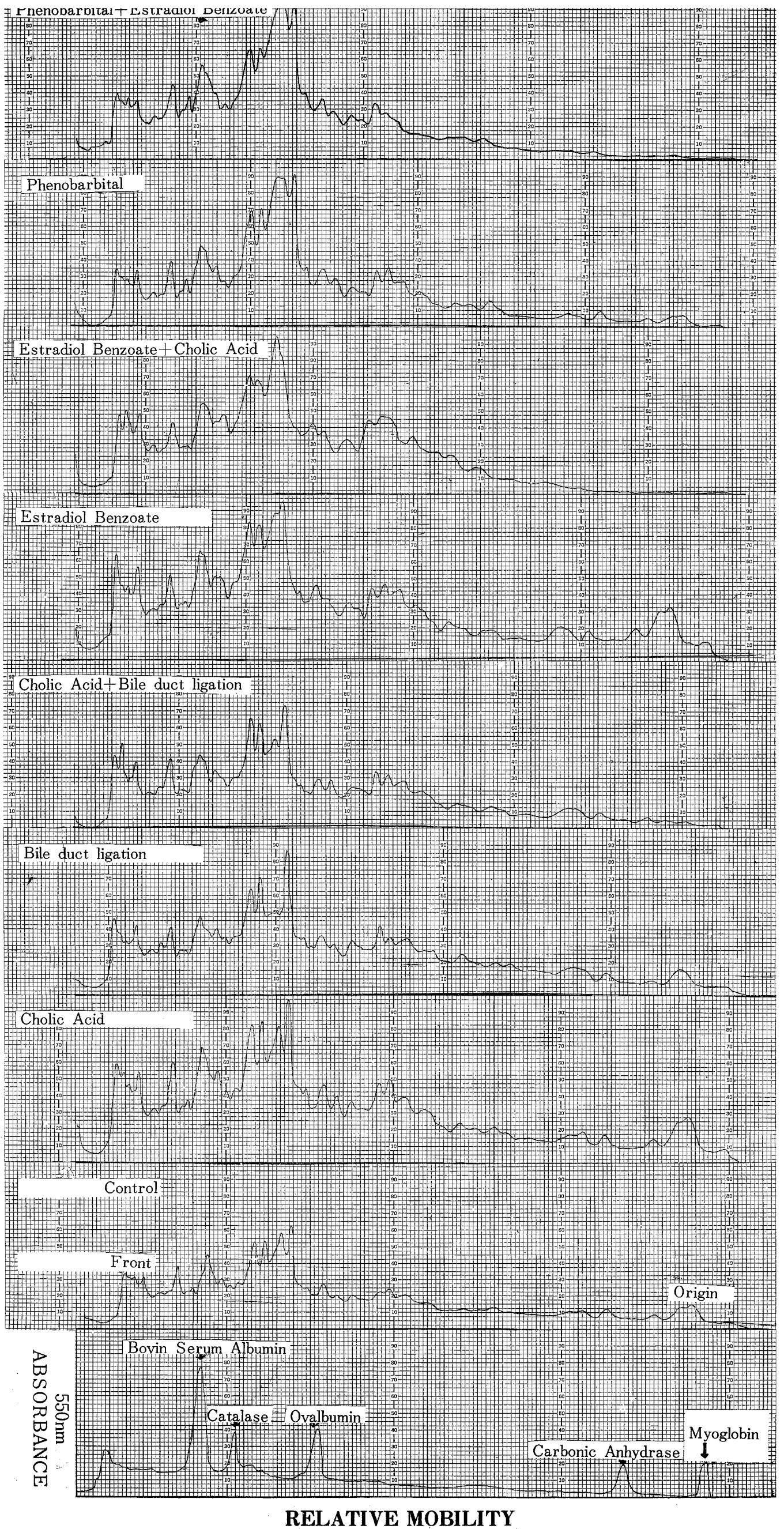


Fig. 1. Scan of 9.5% polyacrylamide-SDS-6M urea vertical slab gel electrophoresis of microsomal proteins from cholic acid, bile duct ligation, cholic acid and bile duct ligation, estradiol, estradiol and cholic acid, phenobarbital and estradiol, and phenobarbital-treated rats. Coomassie blue-staining and scanning were performed as described in materials and methods. Molecular weight markers for bovine serum albumin (68,000 daltons), catalase (60,000 daltons), ovalbumin (43,500 daltons), carbonic anhydrase (30,000 daltons), and myoglobin (17,000 daltons) are shown by arrows.

**Polyacrylamide gel electrophoresis:** 대조군과 실험군의 동물에서 microsomal fraction 은 polyacrylamide vertical slab gel 에서 전기영동 하였다. Microsomal protein 은 1% Sodium dodecyl sulfate(SDS) 에서 용해 되었고 20% glycerol(V/V), 0.5%  $\beta$ -mercaptoethanol(V/V) 그리고 6M urea 를 100°C 에서 2 분간 가열 하였다. Tracking dye 로 0.003% bromphenol blue 를 사용 하였다. 대조군과 실험동물의 microsome 들은 9.5% poly acrylamide-1% SDS-6M urea slab gel 6mA/gel 에서 Laemmli 방법<sup>19)</sup>에 따라서 전기영동 하였다. Gel 은 12.5% TCA 속에 0.1% Coomassie blue 및 50% methanol 속에서 고정 및 염색 하였고 탈색용액으로 10% acetic acid 를 사용하였다. 각 전기영동은 myoglobin(M.W. 17,000), carbonic anhydrase(30,000), ovalbumin(45,000), catalase(60,000) 및 bovine serum albumin(68,000)을 분자량의 표시로 사용 하였다.

Coomassie blue 로 염색된 polyacrylamide gel 들은 단백질을 위해서 550nm 에서 scan 하였다. Scanning apparatus 는 Beckman model R-112 를 사용하였다.

## 실험 결과

### Cholic Acid 투여의 영향

Cholic acid 만을 투여한 흰쥐와 담도폐색한 흰쥐에서 cholic acid 의 cytochrome P-450 에 대한 영향은 Table 1 과 같다. 0.5mM 의 cholic acid 를 투여 하였을 때 대조군 보다 cytochrome P-450 의 양이 유의있게 증가 하였다( $P < 0.01$ ). 담도폐색한 후 총 hepatic cytochrome P-450 량은 대조군 보다 유의있게 감소

**Table 1.** Effects of cholic acid administered on total hepatic cytochrome P-450 in the bile duct ligated-rats\*

Group	Cytochrome P-450 (n moles/mg protein)
Control	3.921 $\pm$ 0.381
0.5mM cholate	6.350 $\pm$ 0.456**
Bile duct ligation #	2.088 $\pm$ 0.365**
Bile duct ligation plus cholic acid #	3.061 $\pm$ 0.238***

\* Each value represents Mean  $\pm$  S.D.

# After 3 days of bile duct ligation.

\*\* Significantly different from control value.  
P < 0.01

\*\*\* Significantly different from bile duct ligation alone. P < 0.01

**Table 2.** Effect cholestasis and phenobarbital on cytochrome P-450

Group	Cytochrome P-450 (n moles/mg Protein)
Control	4.423 $\pm$ 0.401
Estradiol	3.205 $\pm$ 0.256**
Phenobarbital	16.626 $\pm$ 0.826
Estradiol plus Phenobarbital	15.861 $\pm$ 0.949***

\* Each Value represents Mean  $\pm$  S.D.

\*\* Significantly different from control value.  
P < 0.05

\*\*\* Significantly different from control value.  
P < 0.001

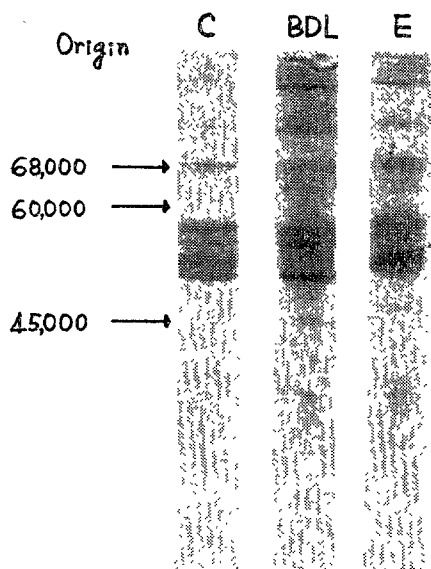
함을 보였고 다시 cholic acid 를 주었을 때 대조군보다는 적은 양이지만 담도폐색한 군보다는 cytochrome P-450 의 양이 증가됨을 보여 주었다( $P < 0.01$ ).

Estradiol 에 의한 cholestasis 에서 총 hepatic cytochrome P-450 량은 Table 2 와 같다.

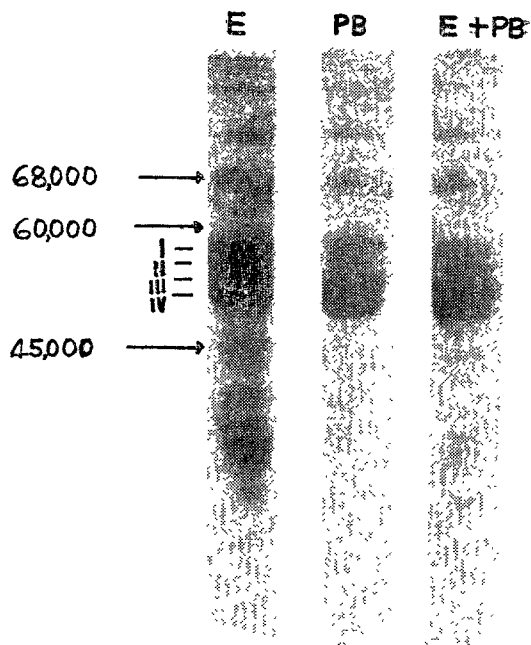
Estradiol 을 투여한 군은 hepatic cytochrome P-450 이 유의있게 감소됨을 보여 주었다( $P < 0.05$ ). Estradiol 과 phenobarbital 을 같이 준 군의 hepatic P-450 량은 estradiol 만을 준 군보다 현저하게 증가 되었다( $P < 0.001$ ).

### Polyacrylamide gel electrophoresis

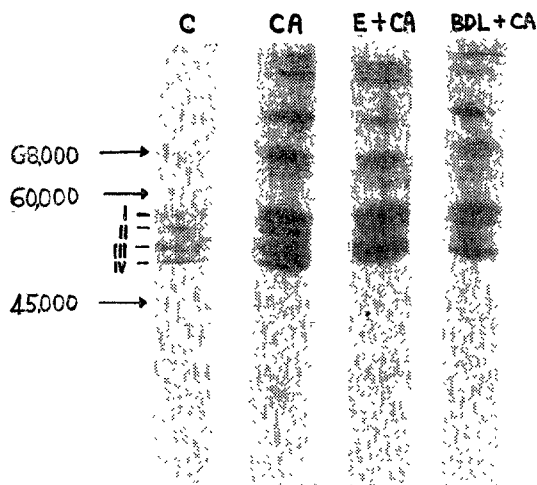
Cholic acid 투여군, 담도폐색한군, 담도폐색후 cholic acid 투여군, estradiol 투여군, estradiol 과 cholic acid 투여군, phenobarbital 투여군 그리고 estradiol 과 phenobarbital 을 같이 투여한 군에서 microsomal protein 을 9.5% polyacrylamide-SDS-6M urea slab gel electrophoresis 한 것을 densitometer 에 scanning 한 결과는 Fig. 1 과 같다. Microsomal protein 은 coomassie blue 로 염색했고 550nm 에서 scanning 했다. 주요한 단백질은 gel 속에 분자량이 50,000~58,000 부위에 위치해 있다. 이들 분자량은 Shapiro et al. 방법<sup>20)</sup>에 의하여 계산 하였고 이부위의 coomassie blue 에 염색된 단백질의 Rf 는 0.63~0.76 사이였다. 9.5% polyacrylamide-SDS-6M urea slab gel 에서 microsomal fraction 의 분리는 Fig. 2, 3 및 4 에 나타났다. Coomassie blue-staining pattern 의 변화는 분자량 50,000~58,000 dalton 에서 볼 수 있다. 그러므로 cytochrome P-450 apoprotein 은 SDS-polyacrylamide gel 에서 50,000~58,000 dalton 부위에 위치해 있다는 결론을 얻었다. Fig. 2 에서 estradiol 과 담도폐색을 했을 때 cytochrome P-450 apoprotein 의 다른 변화를 관찰할 수 있었다. 저자들은 입서로 이들



**Fig. 2.** Electrophoretic pattern of microsomal proteins from control(C), bile duct ligation (BDL), estradiol benzoate(E)-treated rats. Identical amounts of microsomal protein (60 ug) were co-electrophoresed on 9.5% polyacrylamide-SDS-6M urea slab gel, stained with coomassie blue. Migration of the molecular weight markers bovine serum albumin (68,000), catalase (60,000) and ovalbumin(45,000) are indicated.



**Fig. 4.** Electrophoretic pattern of microsomal proteins from estradiol benzoate (E)-treated, phenobarbital-treated and estradiol plus phenobarbital(E+PB)-treated rats on 9.5% polyacrylamide-SDS-6M urea slab gel stained with coomassie blue. Molecular weight markers bovine serum albumin(68,000), catalase(60,000) and ovalbumin(45,000) is indicated. The pattern of protein band staining molecular weight region 50,000~58,000 is shown. Identical amount(60 ug) of protein from each microsomal fraction was applied to gel.



**Fig. 3.** Identical amounts of protein(60 ug) from microsomal fractions collected from control (C), cholic acid(CA), estradiol benzoate plus cholic acid(E+CA)-treated, bile duct-ligated plus cholic acid(BDL+CA)-treated rats electrophoresed on 9.5% polyacrylamide-SDS-6M urea slab gel and stained with coomassie blue. The migration of molecular weight markers bovine serum albumin(68,000), catalase(60,000), and ovalbumin(45,000) is indicated.

cytochrome P-450 apoprotein 을 4개의 protein band 로 구별하였고 shapiro et al 방법<sup>20)</sup>에 의하여 protein 의 분자량을 분류했다. 즉 Band I 은 58,000, Band II 는 55,000, Band III 는 53,000 그리고 Band IV 는 50,000 이다.

담도폐색군은 Band I 이 대조군보다 약간 감소 하였고 Band III 는 현저히 감소 하였다. estradiol 투여는 Band II 와 III 가 감소 하였다. Fig. 3 는 cholic acid 만 을 투여 했을때는 Band I 과 II 는 약간 증가하였고 Band IV 는 많은량이 증가 하였다.

담도폐색군에 cholic acid 를 투여했을 때 Band I 은 정상 회복했고 Band III 는 약간 증가했으나 정상 보다는 낮았다. Estradiol 투여군이 cholic acid 를 동시 투여했을때 Band II 가 정상 복귀는 안되고 Band III 가 정상보다 증가 되었다. Fig. 4 는 phenobarbital 만을 투여한 것은 Band III 와 IV 가 현저히 증가했고 estradiol

에나 phenobarbital을 주었을 때는 Band II는 정상 환원 되었고 Band III와 IV가 현저히 증가 됨을 볼 수 있었다.

## 고 찰

수많은 최근 보고들은 hepatic microsomal cytochrome P-450의 multiple form의 존재와 독특한 기질 특이성과 기질 유발성을 보고 하였다<sup>10-15</sup>. 담도폐색과 estradiol 투여로 생긴 담즙분비 이상은 cytochrome P-450의 량과 약물대사가 감소됨을 보여 주었다<sup>6,7</sup>. 이와같이 담도폐색후 약물대사와 cytochrome P-450량의 감소는 이차적인 복합성 때문이다. 첫째는 microsomal fraction의 분리(Isolation)의 감소이다. 둘째로 de novo 합성의 감소 때문에 cytochrome P-450의 량이 감소하는 것이다<sup>6</sup>. 일반적으로 hepatic microsomal cytochrome P-450의 subunit는 분자량이 47,000에서 59,000 사이라는 것이 알려 졌다<sup>10-14</sup>. 저자들은 9.5% SDS-polyacrylamide slab gel system에서 50,000~58,000 dalton의 분자량을 갖는 단백질들을 확인했다. 또한 cytochrome P-450 apoprotein의 분자량 50,000~58,000 범위내에서 4개의 Band를 확인했다. 이런 결과는 Mackinnon에 등의 보고와 일치하는 것이다. Phenobarbital은 여러종류의 microsomal hydroxylation 반응이 강력한 inducer이다<sup>21,22</sup>. 그리고 phenobarbital을 투여했을때 주로 분자량이 낮은 Band IV가 증가 되었고 분자량이 큰 Band I과 II는 약간만이 증가했다. Cholic acid도 역시 분자량이 적은 Band IV를 증가시킨 것으로 보아 microsomal hydroxylation에 inducer임에 틀림없으나 아직 보고된바 없고 앞으로 더 많은 연구를 필요로 한다.

이 보고의 주요한 목적은 cholestasis일때 cytochrome P-450 apoprotein을 선택적으로 상실한 가능성을 검사하는 것이다. 이런 가능성은 담도폐색한 동물에서 일반적으로 Band I, III와 IV가 감소됨을 확인하였고 반면 estradiol 투여는 단지 Band II와 III만을 감소시켰다. 그러므로 cytochrome P-450 apoprotein의 multiple form은 cholestatic 억제와 약리학적인 유도에서 서로 다른 반응을 나타낸다는 결론을 얻을 수 있었다. Estradiol을 투여한 흰쥐에서 cytochrome P-450 apoprotein 량의 감소는 cytochrome P-450의 상대적인 합성률의 감소와 관계가 있다<sup>8</sup>. 그리고 phenobarbital은 이런 상대적인 합성률을 증가 시킨다<sup>15,23</sup>. 이런 연구에서 multiple cytochrome P-450 form은 liver microsomal membrane에 존재한다는 증거를 더해 주

는 것이고 기질에 대한 특이성은 어떤 hydroxylation 반응을 감소시키거나 증가시키는 독특한 molecular form을 준다는 것을 제시해 주는 것이다. 또한 독특한 apoprotein의 변화는 cytochrome P-450의 량과 기능면을 증가 또는 감소시키는 것과 관련되어 있다.

## 결 론

총 hepatic cytochrome P-450은 담도폐색이나 estradiol을 투여 하였을때 감소했다. 이와는 반대로 phenobarbital을 투여 했을때는 cytochrome P-450의 hepatic content가 증가한다. 그리고 estradiol 투여와 phenobarbital을 투여했을때 cytochrome P-450의 감소를 예방 하였다. Cholic acid를 투여했을때도 cytochrome P-450의 량을 증가시켰고 estradiol과 같이 투여했을때 cytochrome P-450의 감소를 어느정도 예방할 수 있었다.

Sodium dodecyl sulfate(SDS)-6M urea polyacrylamide gel electrophoresis system에 의해서 분자량이 50,000~58,000 범위에서 4가지 band를 확인할 수 있다. 이런 형태를 확인할 수 있는 것은 cytochrome P-450의 multiple form이 liver microsomal membrane에 존재한다는 것과 specific apoprotein의 변화는 cytochrome P-450의 기능면을 증가시키거나 감소시킨다는 것을 제시해 주는 것이다.

## —References—

- 1) Miller, J.A.: Carcinogenesis by chemicals. *Cancer Res*, 30 : 559-576, 1970.
- 2) Gillette, J.R., J.R. Mitchell and B.B. Brodie: *Annu. Rev. Pharmacol*, 14 : 271-288, 1974.
- 3) Omura, T. and R. Sato: The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239 : 237, 1964.
- 4) Lu, A.Y.H. and M.J. Coon: *J. Biol. Chem.* 239 : 2370, 1964.
- 5) McLuen, E.F. and J.R. Foutes: *J. pharmac. Exp. Therap.* 131 : 7, 1961.
- 6) Mackinnon, A.M. and F.R. Simon: Reduced synthesis of hepatic microsomal cytochrome P-450 in the bile duct ligated rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56 : 437, 1974.
- 7) Mackinnon, A.M. and F.R. Simon: Pharmacological reversal of cholestasis-associated decrease

- in hepatic cytochrome P-450. *Biochem, Pharmac.* 24 : 748, 1975.
- 8) Mackinnon A.M., E. Sutherland and F.R. Simon: *Gastroenterology.* 65 : 558, 1973.
  - 9) Mackinnon, A.M., E. Sutherland and F.R. Simon: Qualitative alteration in hepatic microsomal cytochrome P-450 apoproteins associated with bile duct ligation, and the administration of Ethinyl Estradiol and phenobarbital. *Biochem. Pharmac.* 27 : 29, 1978.
  - 10) Comai, K. and J.L. Gaylor: Existence and separation of three forms of cytochrome P-450 from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 248 : 4947, 1973.
  - 11) Alvarez, A.P. and P. Siekevitz: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54 : 923, 1973.
  - 12) Welton, A.F. and S.D. Aust: Multiplicity of cytochrome P-450 hemoproteins in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56 : 898, 1974.
  - 13) Welton, A.F., F.O. O'Neal, L.C. Chaney and S.D. Aust: Multiplicity of cytochrome P-450 hemoproteins in rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 250 : 5631, 1975.
  - 14) Haugen, D.A., M.C. Coon and D.W. Nebert: Induction of multiple forms of mouse liver cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 251 : 1817, 1976.
  - 15) Huang, M.T., S.B. West and A.Y.H. Lu: Separation, purification and properties of multiple forms of cytochrome P-450 from the liver microsome of phenobarbital treated Mice. *J. Biol. Chem.* 251 : 4659, 1976.
  - 16) Choi, K.J., Y.S. Hong and N.E. Sung: Effects of exogenous cholic acid on total hepatic cytochrome P-450 and  $b_5$  in the bile duct-ligated rats. *Ewha Med. J.* 3 : 21, 1980.
  - 17) Weihing, R.R., V.C. Manganiello, R. Chiu and A.H. Phillips: Purification of hepatic microsomal membranes. *Biochemistry*, 11 : 3128, 1972.
  - 18) Lowry, O.H., N.F. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265, 1951.
  - 19) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680, 1970.
  - 20) Shapiro, A.L., E. Vinuels and J.V. Maizel Jr.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28 : 815, 1967.
  - 21) Conney, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmac. Rev.* 19 : 317, 1967.
  - 22) Lu, A.T.H., R. Kuntzman, S. West, M. Jacobson and A.H. Conney: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. *J. Biol. Chem.* 247 : 1727, 1972.
  - 23) Dehlinger, P.J. and R.T. Schimke: Effect of phenobarbital, 3-methyl-cholanthrene, and hematin on the synthesis of protein components of rat liver microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* 247 : 1257, 1972.