

## 흰쥐와 물고기의 Hepatic Cytochrome P-450에 의한 AAF N-and Ring-Hydroxylation에 관한 연구\*

梨花女子大學校 醫科大學 生化學教室

洪 永 淑

=Abstract=

### Cytochrome P-450 Dependent N-and Ring-Hydroxylation of AAF of Various Fish Liver Compare with Rat Liver

Young Sook Hong

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

2-Acetylaminofluorene (AAF) is a useful model compound for studying the biochemical mechanisms of hydroxylation since it could undergo hydroxylation at several carbon atoms in the ring as well as on the nitrogen atom.

These hydroxylation reactions are important due to the fact that N-hydroxylation is an activation step in the carcinogenic process whereas ring-hydroxylation is an inactivation step. Both N-and ring-hydroxylation of AAF occur in the liver microsomes in the presence of NADPH and molecular oxygen.

The present studies were undertaken to investigate the hepatic microsomal hemoproteins P-450 and the N-and ring-hydroxylation of AAF in vitro in the rat, rabbit and carp, crucian and sea bass. N-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene in liver microsomes from carp, crucian and sea bass was formed 5%, 9% or 42% respectively.

These results indicate that N-acetylarylamines can be N-oxidized by a cytochrome P-450 dependent mixed function oxidase in fish liver microsomes.

### 緒 論

물고기를 이용한 발암에 관한 연구는 1961<sup>1)</sup>년 Wood 와 Larson에 의해 美國 全域에 散在한 양식장의 무지개 송어(rainbow trout)에서 간암이 발견된 후 부터였다. 특히 최근 심각한 공해에 의해 유출되는 대부분의 化學物質들이 分解되거나 活性化된 상태로 유지되며 最終적으로 水系에 많이 蓄積되므로 물고기를 材料로 한 發癌現象에 대한 연구가 관심을 끌게 되었다<sup>2)</sup>.

다<sup>3)</sup>.

2-Acetylaminofluorene(AAF)은 많은 種族에서 肝 癌을 일으키는 發癌原이다. 즉 guinea pig을 제외한 흰 쥐, 생쥐, hamster 그리고 토끼에서 AAF의 일부는 發癌物質이 아닌 monophenol의 誘導體로 glucuronide 및 sulfate와 結合되어서 膽汁이나 尿에 排泄되고<sup>4)~8)</sup> 나머지는 N-hydroxy AAF가 生成되는 것을 發見하였다<sup>9)</sup>.

AAF의 N-과 ring-hydroxylation은 活性과 非活性 過程이다<sup>10)</sup>. 이 hydroxylation은 NADPH 그리고 O<sub>2</sub>

\* 이 논문은 1979년도 생활과학연구원 연구비에 의하여 이루어진 것임.

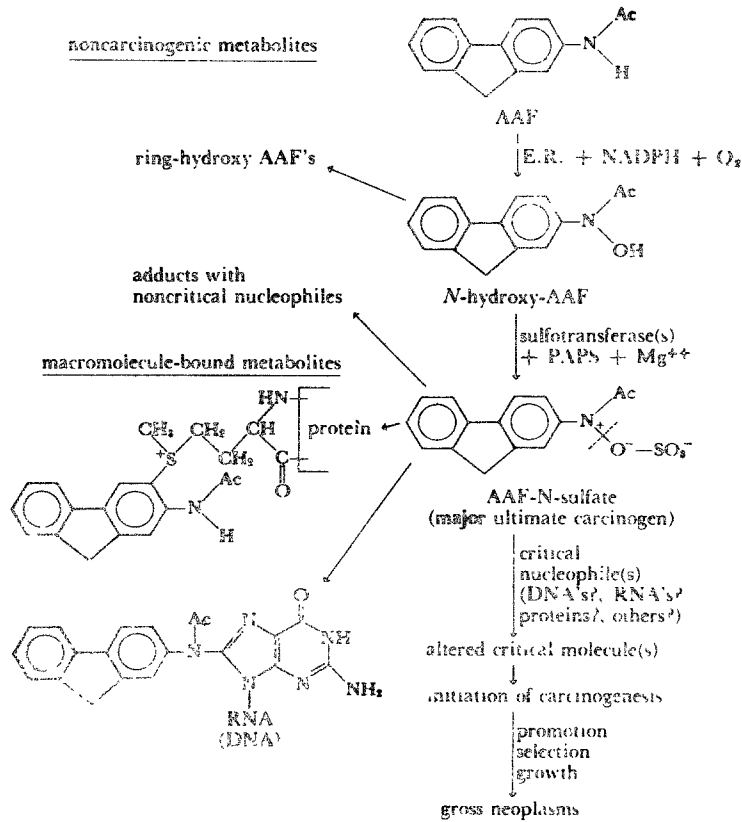


Fig. 1. Activation of 2-Acetylaminofluorene.

가 존재하고 liver endoplasmic reticulum 속에 있는 enzyme system에 의하여 촉매된다(Fig. 1)<sup>11)</sup>.

AAF N-hydroxylation에서 cytochrome P-450의 역할은 1973년까지 밝혀지지 않았었다.

그 후 여러 종族的 liver microsome에 의한 AAF N-hydroxylation은 CO-O<sub>2</sub> 혼합물이 존재하므로 상당히抑制되는 것을發見하였다<sup>12)13)</sup>. 이러한結果들은 AAF N-hydroxylation이 cytochrome P-450 mixed function oxidase system을 통하여 일어난다는 것을示唆해 주는 것이다. 이런 hydroxylation의 活性은 흰쥐와 hamster의 liver microsome에서 현저한 差가 있다는報告가 많이 있다<sup>14)15)16)</sup>. 이와같이 活性이 種族에 따라 變化가 있음에도 불구하고와의 比較研究報告는 아직 없다.

著者는 흰쥐와 몇가지 물고기에서 hepatic microsomal P-450과 monooxygenase system에 관한 AAF의

hydroxylation을 比較 研究하여 報告하고자 한다.

### 實驗材料 및 方法

#### 1) 實驗動物

體重 100~150g 내외의 雄性 흰쥐와 體重 2kg 내외의 雄性 토끼를 實驗에 使用하였다. 붕어와 잉어는 南大門 市場에서 살아있는 것을 購入하였고 농어와 방어는 仁川 부두에 들어오는 배에서 直接 購入하여 使用하였다.

#### 2) 試藥

2-Acetamino[9-<sup>14</sup>C] fluorene(sp. radioactivity 6.7 mCi/m mol)은 Tracer Lab.(Waltham, Mass, U.S.A.)에서 購入하였다. 그 외 NADPH, HEPES 및 Bovine Serum albumin은 Sigma Co.(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. U.S.A.)를 使用하였다.

### 3) Hepatic microsomes의分離

절제한 간장을 ice-cold Saline으로 2~3회 씻어서 혈액을除去한後 0.25M Sucrose溶液으로 25% 균질 용액을 만들었다. 이 용액을 15,000에서 20분간 遠心分離해서 核과 mitochondria를 除去하였다. 이 上層液을 다시 105,000에서 60분 동안 遠心分離하여 上層液을 버리고 microsome 沈澱을 0.25M Sucrose 溶液으로 1gm/ml 되게 균질 용액을 만들었다.

### 4) Microsomal Cytochrome P-450의 測定

Microsomal Cytochrome P-450의 測定은 Omura 와 Sato 方法에 의하였다<sup>17)</sup>. Cytochrome P-450의 濃度는 各各 500nm와 450nm 사이의 吸收率 差異(extinction coefficient difference)로 計算하였고 이때 molar extinction coefficient는  $91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다.

### 5) Microsomal Protein의 測定

Microsomal Protein의 測定은 Bovine Serum albumin을 표준용액으로 Lowry方法을 使用하였다<sup>18)</sup>.

### 6) Incubation 및 Assay法

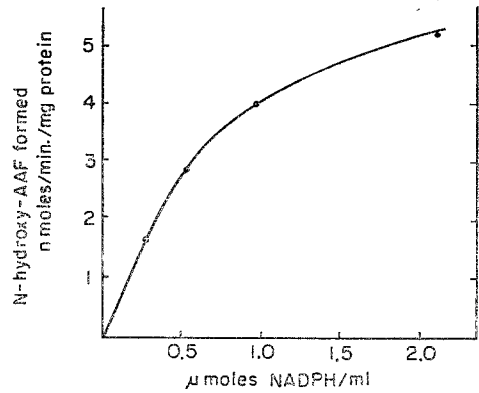
AAF N-과 ring-hydroxylation을 위한 incubation medium으로는 50mM HEPES buffer pH 7.8, 100mM KF, 0.1mM [ $^{14}\text{C}$ ]-9-AAF 0.2 $\mu\text{Ci}$ , 272mM Acetone 및 microsomal fraction을 넣어 總量을 1.0ml로 하였으며 37°C에서 5분간 Preincubation한다. 그 다음 2 mM NADPH를 加하여 30分間 공기중에서 incubation 하였다(Table 1). Incubation 후에 4ml의 ice-cold 1M sodium acetate buffer(pH 6.0)을 各 試驗管에 加하였다. hydroxylated metabolite는 ethyl ether를 使用하여 抽出하고 N-과 ring-hydroxy AAF는 cyclohexane: t-butanol: acetic acid: H<sub>2</sub>O가 18:2:2:1 인 solvent system을 使用하여 paper chromatography로 分離하고 liquid scintillation counter로 radio active를 測定 定量하였다<sup>19)</sup>.

Irving<sup>20)</sup>은 AAF-Hydroxylation에서 NADPH가 필

**Table 1.** Incubation medium for AAF Hydroxylation

	mM
HEPES buffer, pH 7.8	50
NADPH	2
KF	100
AAF containing 0.2 uci (9- $^{14}\text{C}$ -AAF)	0.10
Acetone	272
Various microsomal fractions as indicated water to a final volume of 1.0 ml	

Incubated in air for 30 min. at 37°C



**Fig. 2.** Effect of NADPH concentration on N-hydroxylation of 2-AAF by rat liver microsomes.

요하다는 것을 제시해 주었다. 본 실험에서는 incubation medium에 적절한 NADPH량을 결정하기 위해서 NADPH 량에 따른 N-hydroxy AAF량을 測定하여 가장 maximum activity를 나타내는 량을 취하였다.

## 實驗成績

건강한 雄性 흰쥐에서 hepatic microsomal cytochrome P-450의 량은 Table 2와 같다.

**Table 2.** The level of hepatic microsomal cytochrome P-450 in rats and rabbits

Species	Cytochrome P-450	
	nmoles/g liver	nmoles/mg protein
Rat	0.884±0.043	0.843±0.007
Rabbit	1.711±0.070	0.942±0.012

Mean±S.E.

흰쥐의 cytochrome P-450의 량은 0.843±0.007n mole/mg protein으로써 Sidney<sup>21)</sup>와 Hawswirth<sup>22)</sup>의 結果와 같은 値를 보여 주었다.

물고기에서 Hepatic Microsomal Cytochrome P-450의 량은 Table 3과 같다.

민물고기으로써 잉어와 붕어의 Cytochrome P-450의 량은 각각 0.159±0.002nmole/mg protein과 0.051±0.001nmole/mg protein을 나타냈으며 잉어가 붕어보다 enzyme의 량이 많았다. 그리고 바닷물고기으로써 농어는 0.180±0.007nmole/mg protein으로 잉어와 비슷한 値를 보여 주었다. 그외에 방어와 뱀장어도 mic-

**Table 3.** The level of hepatic microsomal cytochrome P-450 in carp, crucian and sea bass

Species	Cytochrome P-450	
	nmoles/g liver	nmoles/mg protein
Carp	0.177±0.012	0.159±0.002
Crucian	0.040±0.002	0.051±0.001
Sea bass	0.020±0.001	0.180±0.007

Mean±S.E.

rosomal fraction을 분리하여 Cytochrome P-450을測定하였으나 enzyme은 검출할 수 없었다.

흰쥐와 토끼의 microsomal enzyme에 의한 AAF-hydroxylation은 Table 4와 같다.

**Table 4.** The N- and ring-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene by rat and rabbit liver microsomal fractions

Species	nmoles formed/30 min/mg protein		
	Total hydroxy AAF	Ring-hydroxy AAF	N-hydroxy AAF
Rat	5.655±0.798	5.456±0.101	0.199±0.033
Rabbit	3.542±0.635	3.368±0.557	0.259±0.172

Mean±S.E.

Table 4에서 보는바와 같이 흰쥐에서 ring-hydroxy AAF는 5.456±0.101로 총 Hydroxy-AAF량의 96%를 차지하고 N-hydroxy AAF는 0.199±0.033으로 4%만을 나타냈다. 토끼는 흰쥐보다 약간 낮은치를 보여 주었으나 ring-hydroxy AAF는 3.368±0.557로 95%를 나타내었고 N-hydroxy AAF는 0.259±0.172로 5%를 차지 하였다.

흰쥐와 토끼는 AAF의 대사물인 N-과 ring-hydroxy AAF가 같은 비율로 형성됨을 보여 주었다.

민물고기인 붕어와 잉어 그리고 바닷물 고기인 농어에서 microsomal enzyme에 의한 N-and ring-hydroxy AAF는 Table 5와 같다.

**Table 5.** The N- and ring-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene by carp, crucian, and sea bass

Species	nmoles formed/30 min/mg protein		
	Total hydroxy AAF	Ring-hydroxy AAF	N-hydroxy AAF
Carp	9.087±0.798	8.598±0.773	0.454±0.040
Crucian	15.925±0.952	14.557±0.632	1.368±0.320
Sea bass	0.137±0.002	0.080±0.017	0.058±0.017

Mean±S.E.

Table 5에서 보는 바와 같이 민물고기인 잉어는 8.598±0.773으로 Ring-hydroxy AAF가 95%를 나타냈고 N-hydroxy AAF는 0.454±0.040으로 5%를 나타내었다. Crucian은 14.557±0.632로 Ring-OH AAF가 91%이고 N-hydroxy AAF는 1.368±0.320로 9%였다. 또한 바닷물고기인 농어는 Ring-hydroxy AAF가 0.080±0.017로 58%고 N-hydroxy AAF가 0.058±0.017로 42%를 나타냈다. 잉어나 붕어에 比較하여 농어는 전체적인 metabolite의 양이 적으나 N-hydroxy AAF를 形成하는 比率는 5배 이상 높았다.

## 考 察

Secondary와 Tertiary N-alkylarylamines의 N-oxidation은 flavoprotein이 필요한 mixed function oxidase에 의하여 촉매되는<sup>23)</sup> 반면 primary arylamine의 N-oxidation은 Cytochrome P-450 system에 의하여調節된다<sup>24)</sup>. 여러 種族에서 分離한 Hepatic microsome이 N-과 Ring-hydroxylation 시키는 能力은 AAF에 대한 發癌現象(Carcinogenesis)이 動物의 감수성에 따라 다르다는것을 설명해 주는 것이다. Buhler<sup>25)</sup>는 무지개 송어 간장에도 포유동물에서와 같이 microsomal oxygenase를 갖고 있다는 것을 報告했다. Cramer<sup>26)</sup>등은 무지개 송어 간장에서 흰쥐의 간장에서와 비슷한 Ring-hydroxy AAF의 형성을 관찰할수 있었다고 했다.

이런 관점에서 흰쥐와 토끼 그리고 붕어, 잉어와 농어에서, hepatic microsomal hemoprotein인 P-450을 분리하여 AAF-Hydroxylation을測定 比較한 結果는 흰쥐와 토끼는 hepatic cytochrome P-450의 양도 비슷하였고 N-과 Ring-hydroxy AAF를 형성하는 양도 같은 경향을 보여 주었다. 물고기에서 민물 고기인 잉어와 붕어는 잉어가 붕어보다 enzyme의 양이 2배나 많으나 N-hydroxy AAF의 형성은 오히려 붕어가 더 많았다. 바닷물 고기인 농어는 AAF의 活性化 과정인 N-hydroxy AAF가 다른 種族에 比較해서 5배 높은치를 보여 주었다. 이는 농어가 가장 감수성이 예민한 물고기라는 것도 나타내 주는 것이다. 그러나 민물고기와 바닷물고기에서 差異는 더 많은 研究를 필요로 한다고 사료된다.

최근 수족관 속에 물고기에 대한 Chemical Carcinogenesis에 대한 많은 報告가 있다<sup>27-31)</sup>. N-nitrosamines, aromatic amines 및 polycyclic aromatic hydrocarbons은 무지개 송어, guppy 및 xenopus laevis 등에 liver tumor의 형성이 보고 되었다.

이런 물고기를 environmental chemical을 검출하는

때 이용하는 것은 예민성, 경제적과 시간적으로 불배도 매우 좋은 方法이라 할 수 있다.

Elcombe<sup>32)</sup> 등은 물고기도 hepatic microsomal hemoproteins P-450의 다양한 형태를 갖고 polycyclic aromatic hydrocarbons를 투여 하였을때 Cytochrome P-450의 변화를 가져온다고 報告했다.

本 實驗에서는 chemical carcinogens 또는 약물에 의하여 hemoprotein P-450의 양이 유도 됨이 없이 정상물고기 에서도 흰쥐와 토끼에서와 같이 polycyclic aromatic amine인 2-Acetylaminofluorene을 活性化시키는 monooxygenase system이 있음을 示唆해 주었다.

### 結 論

흰쥐와 토끼 그리고 몇가지 물고기에서 hepatic microsomal hemoprotein인 P-450을 分離測定한 結果 흰쥐는  $0.843 \pm 0.007$  nmoles/mg protein 토끼는  $0.942 \pm 0.012$  nmoles/mg protein였다. 물고기에서 잉어는  $0.159 \pm 0.002$  nmoles/mg protein 붕어는  $0.051 \pm 0.001$  nmoles/mg protein 그리고 농어는  $0.180 \pm 0.007$  nmoles/mg protein을 얻었다.

또한 AAF의 N-과 ring-hydroxylation은 흰쥐와 토끼에서 각각 4~5%와 96~95%였고 물고기에서 붕어와 잉어는 각각 9~5%와 91~95%였고 농어에서는 42%와 58%를 나타내었다. 이상의 결과는 물고기에서도 포유동물과 같이 hemoprotein과 monooxygenase system을 나타내 주었다.

### —References—

- 1) Wood, E.M. and C.P. Larson: Hepatic carcinoma in rainbow trout, Arch. Pathol., 7: 471—479, 1961.
- 2) Lotlikar, P.D., E.C. Miller, J.A. Miller, and J. E. Halver: Metabolism of the carcinogen 2-acetylaminofluorene, Exp. Biol. Med., 124: 160—163, 1967.
- 3) Wellings, S.R.: Neoplasia and primitive vertebrate phylogeny: Echinoderms, prevertebrates and fishes—a review, NALLCancer Inst. Monogr. 31: 59—128, 1969.
- 4) Miller, E.C., J.A. Enomoto, M.: Cancer Research, 24: 2018, 1964.
- 5) Morris, H.P., C.A. Velat, B.P. Wagner, M Dahlgard, F.E. Ray: studies of carcinogenicity

in the rate of derivatives of aromatic amines related to N-2-fluorenylacetamide, J. Nat. Cancer., Inst., 24: 149, 1960.

- 6) Irving, C.C.: In metabolic conjugation and metabolic hydrolysis(Fishman, W.H., ed.) Vol.1, 53—119, 1970.
- 7) Weisburger, J.H. and E.K. Weisburger: Biochemical formation and pharmacological toxicological, and pathological properties of hydroxylamines and hydroxamic acids, pharmacol. Rev., 25, 1—66, 1973.
- 8) Clayson, D.B. and R.C. Garner: In chemical carcinogens(searle, C.E., ed.) American Chemical Society, Washington, D.C., 366—461, 1976.
- 9) Miller, E.C., J.A. Miller: Mechanisms of Chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules, pharmacol. Rev., 18: 805, 1966.
- 10) Miller, J.A.: Carcinogenesis by Chemicals: An overview-G.H.A. Clowes Memorial Lecture, Cancer Res. 30, 559—576, 1970.
- 11) Irving, C.C.: Enzymatic N-hydroxylation of the carcinogen 2-acetylaminofluorene and the metabolism of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene-9-<sup>14</sup>C in vitro, J. Biol. Chem., 239, 1589—1596, 1964.
- 12) Gutmann, H.R. and P. Bell: Specificity of N-hydroxylation of arylamides, Fed. Proc. 32, 665, 1973.
- 13) Thorgeirsson, S.S., D.J. Jollow, H. Sasame, I. Green, and J.R. Mitchell: The role of cytochrome P-450 in N-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene, Mol. Pharmacol., 9, 398—404, 1973.
- 14) Alvares, A.P., G. Schilling, W. Levin, and R. Kuntzman: Studies on the induction of C0-binding pigments in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene, Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 521—526, 1967.
- 15) Gutman, H.R. and P. Bell: N-hydroxylation of arylamides by the rat and guinea pig: Evidence for substrate specificity and participation of cytochrome P-450, Biochem. Biophys. Acta, 498, 229—243, 1977.
- 16) Lotlikar P.D., Y.S. Hong, and W.J. Baldy: 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.
- 17) Omura, T. and R. Sato: The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes II. Solubilization, Purification and Properties, *J. Biol. Chem.*, 239 : 237, 1964.
  - 18) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
  - 19) Lotlikar, P.D., K. Wertmar and L. Luha.: Role of mixed function amine oxidase in N-hydroxylation of 2-AAF by Hamster liver microsomal preparations, *Biochem. J.*, 136, 1137—1140, 1973.
  - 20) Irving, C.C.; N-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene in the rabbit, *Cancer Res.*, 22 : 867—73, 1962.
  - 21) Sidney, F., F. Becca, A. Angelo, and C. Britton: Cytochrome  $b_5$  and P-450 in liver cell fraction, *Biochim. Biophys. Acta*, 225, 194—200, 1971.
  - 22) Hauswirth, J.W. and P.P. Nair: Effects of different vitamin E-deficient basal diets on hepatic catalase and microsomal cytochrome P-450 and  $b_5$  in rats, *Am. J. Clin. Nutr.*, 28, 1087—94, 1975.
  - 23) Masters, B.S.S. and D.M. Ziegler: *Arch. Biochem. Biophys.*, 145, 351—364, 1970.
  - 24) Uehleke, H., F. Schnitzner, and K.H. Hulmer: Hoppe-Seyler's *Z. physiol. Chem.*, 351, 1475—1484, 1970.
  - 25) Buhler, D.R.; *Fed. Proc.* 25, 343, 1966.
  - 26) Cramer, J.W., J.A. Miller, and E.C. Miller: The hydroxylation of the carcinogen 2-acetylaminofluorene by rat liver: stimulation by pretreatment in vivo with 3-methylcholanthrene, *J. Biol. Chem.*, 235, 250—256, 1960.
  - 27) Gennady B. Pliss and Veniamin V. Khudoley: Tumor induction by carcinogenic agents in Aquarium fish, *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 129—132, 1975.
  - 28) Tokatoshi Ishikawa, N. Kuwabara, and Takayama: Spontaneous ovarian tumors in domestic carp, *J. Natl. Cancer Inst.*, 57, 579—580, 1976.
  - 29) Matsushima, T. and T. Sugimura: Experimental carcinogenesis in small Aquarium fishes, *Prog. Exp. Tumor Res.*, 20, 367—379, 1976.
  - 30) Kyono, Y. and N. Egami: The effect of temperature during the diethylnitrosamine treatment on liver tumorigenesis in the fish, *Europ. J. Cancer*, 13, 1191—1194, 1977.
  - 31) Elcombe C.R., R.B. Franklin and John J. Lech: Induction of microsomal hemoprotein(s) P-450 in the rat and rainbow trout by polyhalogenated biphenyls, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 320 : 193—203, 1979.
  - 32) Elcombe, C.R. and J.J. Lech: Induction and characterization of cytochrome(s) P-450 mediated monooxygenation in rainbow trout, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* in Press, 1978.