

유기용매에 의한 CYP2E1의 유도발현 :
단백질합성 효율의 증가에 따른 조절규제기전

김상건 · Raymond F. Novak*

덕성여자대학교 약학대학

*Institute of Chemical Toxicology, Wayne State University

**INDUCTION OF CYP2E1 BY ORGANIC SOLVENTS:
THE ROLE OF ENHANCED TRANSLATIONAL EFFICIENCY**

Sang Geon Kim and Raymond F. Novak*

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

*Wayne State University, Detroit, Michigan, U.S.A.

(Received May 31, 1993)

(Accepted July 8, 1993)

ABSTRACT: Pyridine and acetone are efficacious inducers of CYP2E1 in both rats and rabbits. The response in the elevation of CYP2E1 levels, changes in CYP2E1 mRNA levels, and enhanced translational processing of hepatic CYP2E1 mRNA during the early phase of CYP2E1 induction by the solvents pyridine and acetone were examined. Time-dependent increase in CYP2E1 levels occurred at early times (6-24h) following a single dose of pyridine treatment, as assessed by Western immunoblot analysis, whereas the levels in CYP2E1 mRNA transiently decreased at 12 h post-treatment, returning to the level present in untreated animals. Autoradiographic analysis of [¹⁴C]leucine-labeled microsomal proteins isolated at 6 h from the animals treated with the solvent showed an enhanced intensity of a band migrating in the region of CYP2E1, relative to control. The effects of pyridine on the distribution of CYP2E1 polysomal mRNA was examined to determine whether increased ribosomal loading on CYP2E1 mRNA is associated with the rapid induction of CYP2E1 protein. Northern and slot blot analyses of fractions from the cytoplasmic extracts using a CYP2E1-specific oligonucleotide probe revealed a shift in distribution of CYP2E1 message from monoribosomal fractions towards the heavier polyribosomal fractions following the solvent treatment, providing evidence that induction of CYP2E1 at early times following pyridine treatment involves enhanced translational

efficiency through increased loading of ribosomes on CYP2E1 mRNA. These results suggest that induction of CYP2E1 occurs through an enhanced rate of protein synthesis in the absence of transcriptional activation.

Key Words: CYP2E1, pyridine, acetone, translational efficiency

I. 서 론

Cytochrome P4502E1 (CYP2E1)은 N-nitrosodimethylamine(NDMA), benzene 및 acetone을 포함하는 다양한 구조의 소분자 유기화합물을 대사하는 약물대사 효소이다 (Casazza *et al.*, 1984; Johansson *et al.*, 1988; Koop *et al.*, 1989; Patten *et al.*, 1986; Peng *et al.*, 1982; Seeff *et al.*, 1986; Tu *et al.*, 1983; Yoo *et al.*, 1987). 이 효소에 의하여 생성되는 공격성 대사중간체는 화합물에 의한 조직의 손상과 관련이 있으며, 발암물질의 대사 및 활성화에 관여하기도 한다 (English *et al.*, 1985; Olson *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 1976; Snyder *et al.*, 1980; Wrighton *et al.*, 1986). CYP2E1의 발현이 절식, 당뇨병상태 및 임신중에도 변화되지만, 다양한 구조의 소분자 유기화합물에 의하여 현저한 유도증가가 일어나는 것으로 알려져 있다. 이 효소를 유도증가하는 화합물로는 ethanol, acetone, trichloroethylene, benzene, imidazole 및 pyrazole이 있다 (Koop *et al.*, 1985). 이들 화합물중 질소를 함유한 물질의 일부는 *in vitro*와 *in vivo*에서 MI complex를 형성하며, 동물에 투여시 CYP2E1을 포함하여 여러 P450을 유도한다.

발현이 변화되는 여러 P450 중 CYP2E1의 유도증가는 유전자 전사속도의 증가를 수반하지 않는 것으로 보인다. 따라서 이 효소의 증가는 단백질 합성속도의 증가에 기인하거나, 단백질의 분해가 저해되어 일어나는 단백질 안정화가 기여한다고 할 수 있다. 본 연구에서는 pyridine 또는 acetone 등 유기용매를 각각 랫드와 래비트에 투여한 후 간 조직중 CYP2E1의 발현 및 그 대사적인 의의를 관찰하였고, CYP2E1을 유도하는 이들 화합물이 CYP2E1의 발현에 미치는 구조활성 상관관계 및 분자 수준의 조절규제 기전을 고찰하였다. 계속 연구의 일환으로 질소와 유허을 함유하는 수종의 heterocycle이 CYP2E1의 효소활성도에 미치는 억제적 효과와 CYP2E1과 결합하는 친화력을 시험관내에서 측정 비교하였으며, 이들 약물을 랫드에 투여한 후에 2E1의 발현을 효소활성도, 면역화학적 분석 및 RNA blot hybridization 분석방법으로 측정하였다.

II. 실험 방법

Microsomes 분획은 differential centrifugation에 의하여 분리하였으며, pyrophosphate buffer에 세척한 후 -70°C 에 보관하여 필요시 사용하였다. p-Nitrophenol, aniline hydroxylase 및 NDMA demethylase assay 등은 발표된 방법을 이용하였다 (Kim *et al.*, 1988; Novak *et al.*, 1989). SDS-PAGE는 Laemmli 등의 방법을 따랐고, 7.5% SDS-PAGE 후 nitrocellulose paper에 전이된 단백질을 anti-CYP2E1 antibody를 이용하여 면역화학적으로 분석하였다. Total RNA는 개선된 single-step method인 thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction 방법을 따랐다 (Kim and Novak, 1990). Poly(A)⁺ RNA는 total RNA를 oligo(dT)-cellulose column을 통과시킴으로서 분리하였다. 19-mer CYP2E1-specific oligonucleotide는 DNA synthesizer로 합성하였으며 그 서열은 문헌에 보고 하였다(Kim and Novak, 1990). RNA slot blot hybridization은 RNA를 $15\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC}$: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate)에 희석한 후 nitrocellulose paper에 blotting하여 $6\times\text{SSPE}$ ($1\times\text{SSPE}$: 0.15 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 , and 1 mM Na_2

EDTA, pH 7.4)하에서 5'-end-labeled oligonucleotide probe로 실시하였다. 나아가 CYP2E1의 순수정제, form특이적 번역항체생산, PCR증폭, RNA hybridization 분석, [¹⁴C]leucine incorporation, polyribosomal analysis 및 poly(A)⁺ tail analysis 등 생화학적 또는 분자생물학적인 방법을 이용하여 유기용매에 의한 CYP2E1의 유도발현 기작을 연구하였다 (Kim and Novak, 1990; Kim *et al.*, 1991, 1991a).

III. 실험결과 및 고찰

Cytochrome P450의 유도증가 및 대사적 의의

랫드 또는 래비트를 solvent인 pyridine으로 3~4일간 전처치 (100 mg/kg 체중, i.p.)한 후 간 조직을 적출하고 이로부터 얻은 microsomes분획 중의 전 Cytochrome P450의 함량을 측정하였을 때 약 2~2.5배의 증가를 관찰할 수 있었다. Cytochrome P450의 superfamily중 CYP2E1에 특이적으로 대사되는 화합물을 기질로 이용하여 대사속도를 측정하였을 때 p-nitrophenol, N-nitrosodimethylamine, aniline의 대사율이 pyridine전처치한 후 분리한 간 microsomes에서 6~8배 향상되었고, 유도물질인 pyridine자체를 pyridine N-oxide로 대사하는 반응이 현저히 증가되었다. 유도된 microsomes에 의하여 촉매되는 pyridine의 pyridine N-oxide로의 전환은 p-nitrophenol에 의하여 경쟁적으로 억제되었고, 이러한 특이적 대사억제는 pyridine N-oxide의 생성이 CYP2E1에 의하여 높은 친화력으로 대사된다는 증거로 볼 수 있다. 약물에 의하여 유도된 CYP2E1은 담배와 담배연기성분 중의 하나인 3-hydroxypyridine을 2,5-dihydroxypyridine으로 대사하고, 생성물인 2,5-dihydroxypyridine은 redox-cycling, NADPH oxidation 및 DNA strand scission을 유발하는 물질인 것으로 판명되었다. 이상의 결과는 CYP2E1효소가 질소를 함유한 heterocycle을 산화대사하며, 생성된 대사물 중의 일부는 활성형물질로 전환되어 생체내의 macromolecules을 공격할 수 있음을 의미한다.

CYP2E1의 면역생화학적 분석

Pyridine처리를 한 후 얻은 래비트 간 microsomes으로부터 CYP2E1을 순수정제하였다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE분석에 의하여 단일 band인 것으로 나타났으며, Edman degradation에 의한 N-terminus의 분석에서도 기존에 발표된 ethanol 유도성 CYP2E1의 아미노산 서열과 동일하게 나타나 CYP2E1인 것을 확인하였다. 순수정제된 단백질을 goat에 주사한 후 채취한 혈청으로부터 form-specific polyclonal antibody를 얻을 수 있었으며, 유기용매를 전처치한 후 분리한 간 조직에서 CYP2E1 단백질의 양적증가가 현저한 것을 항체를 이용한 Immunoblot으로 확인하였다.

CYP2E1 mRNA수준의 정량

약물투여 후 6, 12 및 24시간의 CYP2E1 mRNA의 수준을 slot 및 Northern blot 분석에 의하여 정량하였다. CYP2E1 단백질의 증가를 관찰할 수 있는 각 시점에서 CYP2E1 mRNA의 양적인 증가를 관찰할 수 없었으며, 오히려 초기에는 현저한 CYP2E1 mRNA의 감소가 관찰되었다. 이 결과는 CYP2E1 단백질의 유도증가가 mRNA의 양적인 증가를 수반하지 않는 전사 후 조절규제 기전을 따르는 것을 의미한다.

CYP2E1 단백질 합성에 관한 연구

CYP2E1의 유도증가에 단백질 합성이 기여하는 가능성을 관찰하기 위하여 pyridine처리를 하거나 하지 않은 동물에 [¹⁴C]leucine을 주사하고 CYP2E1 band intensity의 변화를 관찰하였다. 약물을 전처치한 동물에 있어서 동위원소의 도입이 3~4배 증가하는 것을 관찰할 수

있었다. 또한 동물을 cycloheximide로 전처리하였을 때 pyridine에 의한 CYP2E1의 유도증가가 현저히 감소하였으며, Actinomycin-D에 의하여는 영향을 받지 않아 CYP2E1 유도증가에 단백질 합성이 기여하는 가능성을 제시하였다. CYP2E1 유도증가에 단백질 합성이 관여하는 지를 직접적으로 증명하기 위하여 CYP2E1 polyribosomal mRNA의 이동여부 (shift)를 10~50% sucrose density gradient로 분석하였다. 약물을 전처리한 동물로부터 얻은 cytoplasmic extract에서 CYP2E1 polyribosomal mRNA가 무거운 분획으로 현저히 이동하는 것을 관찰하였다. 이는 monoribosomes이 CYP2E1 mRNA로 mobilization되어 활성형 polyribosomes으로 전환됨을 의미한다. 이같은 polyribosomal analysis의 결과 및 병행하여 실시한 poly(A)⁺ tail analysis의 증거에 따르면 pyridine 유기용매 투여 후 초기에 발생하는 mRNA수준의 감소는 polyribosome의 동원에 따른 단백질 합성의 증가에 기인하는 것으로 사료된다. Pyridine 외로 유기용매인 acetone을 사용하여 유사한 실험결과를 얻었으며, 이들 약물에 의한 효소유도의 기전은 동일한 것으로 보인다. 나아가 질소나 유황을 함유한 heterocycles에 의한 CYP2E1의 유도여부를 관찰하였다. 이들 화합물 중에서 thiazole은 대사억제 및 효소친화력이 높았으며 *in vivo*에서는 5배의 효소유도작용을 나타냈다. Pyrazine 및 pyridazine은 *in vitro*에서의 효소친화력은 낮았으나 *in vivo*에서는 높은 효소유도작용을 보였다. CYP2E1을 유도하는 화합물은 24 또는 48시간에 공통적으로 CYP2E1 mRNA의 수준을 감소시켰으며 (약 80%), 이러한 mRNA의 감소는 CYP2E1 mRNA 이용율의 증가에 따르는 전사 후 조절규제 기전으로 해석된다 (Kim and Novak, 1993).

본 연구의 결과는 pyridine, acetone 등의 유기용매와 수종의 heterocycle이 CYP2E1의 효소유도발현에 영향을 주며, 효소유도는 CYP2E1 mRNA의 감소를 수반하고, 단백질 합성의 증가가 효소유도에 기여하는 것을 지지한다.

참고문헌

- Casazza, J.P., Felver, M.E. and Veech, R.L. (1984): The metabolism of acetone in rat, *J. Biol. Chem.*, **259**, 231-236.
- English, J.C. and Anders, M.W. (1985): Evidence for the metabolism of N-nitrosodimethylamine and carbon tetrachloride by a common isozyme of cytochrome P-450, *Drug Metab. Dispos.*, **13**, 449-452.
- Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. (1988): Benzene metabolism by ethanol-, acetone-, and benzene-inducible cytochrome P-450 (2E1) in rat and rabbit liver microsomes, *Cancer Res.*, **48**, 5387-5390.
- Kim, S.G., Williams, D.E., Schuetz, E.G., Guzelian, P.S. and Novak R.F. (1988): Pyridine Induction of Cytochrome P-450 in the Rat: Role of P-450j (alcohol-inducible form) in Pyridine N-oxidation, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **246**, 1175-1182.
- Kim, S.G. and Novak, R.F. (1990): Induction of Rat Hepatic P450IIE1 (CYP2E1) by Pyridine: Evidence for a Role of Protein Synthesis in the Absence of Transcriptional Activation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **166**(3), 1072-1079.
- Kim, S.G. and Novak, R.F. (1990): The Role of P450IIE1 in the Metabolism of 3-Hydroxypyridine, a Constituent of Tobacco Smoke: Redox Cycling and DNA Strand Scission by the Metabolite 2,5-Dihydroxypyridine, *Cancer Research*, **50**, 5333-5339.
- Kim, S.G. and Novak, R.F. (1990): Cytochrome P450IIE1 Metabolism of Pyridines:

- Evidence for Production of a Reactive Intermediate Which Exhibits Redox-cycling Activity and Causes DNA Damage, In: Biological Reactive Intermediates IV, Edited by C.M. Witmer *et al.*, pp. 753-758, Plenum Press, New York.
- Kim, S.G., Shehin, S.E., States, J.C. and Novak, R.F. (1990): Evidence for Increased Translational Efficiency in the Induction of P450IIE1 by Solvents: Analysis of P 450IIE1 mRNA Polyribosomal Distribution, Biochemical Biophysical Research Communication, **172**(2), 767-774.
- Kim, S.G., Philpot, R.M. and Novak, R.F. (1991): Pyridine Effects on P450IIE1, IIB and IVB Expression in Rabbit Liver: Characterization of High and Low Affinity Pyridine N-oxidases, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **259**(1), 470-477.
- Kim, S.G., Reddy, S.L., States, J.C. and Novak, R.F. (1991): Pyridine Effects on Expression and Molecular Regulation of Cytochrome P450IA Gene Subfamily, Molecular Pharmacology, **40**(1), 52-57.
- Kim, S.G. and Novak, R.F. (1993): The Induction of Cytochrome P4502E1 by Nitrogen- and Sulfur-containing Heterocycles: Expression and Molecular Regulation, Toxicology and Applied Pharmacology, **120**(2), 257-265.
- Koop, D.R., Crump, B.L., Nordbloom, G.D. and Coon, M.J. (1985): Immunochemical evidence for induction of the alcohol-oxidizing cytochrome P-450 of liver microsomes by diverse agents: ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole and isoniazid, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **82**, 4065-4069.
- Koop, D.R., Laethem, C.L., Schnier, G.G. (1989) Identification of ethanol-inducible P450 isozyme 3a (P4502E1) as a benzene and phenol hydroxylase, Toxicol. Appl. Pharmacol., **98**, 278-288.
- Nelson, S.D., Mitchell, J.R., Timbrell, J.A., Snodgrass, W.R. and Corcoran, G.B. (1976): Isoniazid and iproniazid activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat, Science, **193**, 901-903.
- Novak, R.F., Kaul, K.L. and Kim, S.G. (1989): Induction of the Alcohol-inducible Form of Cytochrome P-450 by Nitrogen-containing Heterocycles: Effects on Pyridine N-oxide Production, Drug Metabolism Review, **20**(2-4), 781-792.
- Olson, M.J., Kim, S.G., Reidy, C.A., Johnson, J.T. and Novak, R.F. (1991): Oxidation of 1,1,1,2-tetrafluoroethane in rat liver microsomes is catalyzed primarily by cytochrome P4502E1, Drug Metab. Dispos., **19**, 298-303.
- Patten, C.J., Ning, S.M., Lu, A.Y.H. and Yang, C.S. (1986) : Acetone-inducible cytochrome P-450: purification, catalytic activity and interaction with cytochrome b5, Arch. Biochem. Biophys., **251**, 629-638.
- Peng, R, Tu, Y.Y. and Yang, C.S. (1982) : The induction and competitive inhibition of a high affinity microsomal nitrosodimethylamine demethylase by ethanol, Carcinogenesis, **3**, 1457-1461.
- Seeff, L.B., Cuccherini, B.A., Zimmerman, H.J., Adler, E. and Benjamin, S.B. (1986) : Acetaminophen hepatotoxicity in alcoholics, Ann. Intern. Med., **104**, 399-404.
- Snyder, R, Goldstein, B.G., Sellakumar, A.R., Bomberg, I., Laskin, S. and Albert, R.E. (1980) : The inhalation toxicology of benzene: Incidence of hematopoietic neoplasms and hematotoxicity in AKR/J and C57BL/6J mice, Toxicol. Appl. Pharmacol., **54**, 323-331.
- Tu, Y.Y., Peng, R., Chang, Z-F and Yang, C.S. (1983) : Induction of a high affinity

- nitrosamine demethylase in rat liver microsomes by acetone and isopropanol, *Chem. Biol. Interact.*, **44**, 247-260.
- Wrighton, S.A., Thomas, P.E., Molowa, D.T., Haniu, M., Shively, J.E., Maines, S.L., Watkins, P.B., Parker, G., Mendez-Picon, G., Levin, W. and Guzelian, P.S. (1986): Characterization of ethanol-inducible human liver N-nitrosodimethylamine demethylase, *Biochemistry*, **25**, 6731-6735.
- Yoo, J.H., Cheung, R.J., Patten, C.J., Wade, D. and Yang, C.S. (1987): Nature of N-nitrosodimethylamine demethylase and its inhibitors, *Cancer Res.*, **47**, 3378-3383.