

Ionone 류에 의한 랫트의 간엽별 cytochrome P450 유도 특성에 관한 연구

구희경¹ · 정태천^{1*} · 천영진² · 윤철호³ · 노정구¹ · 최인경*

덕성여자대학교 약학대학,
¹한국화학연구소 안전성연구센터,
²중앙대학교 약학대학,
³배재대학교 생화학과

Induction of Cytochrome P450 by Ionones in Liver Lobes of Sprague Dawley Rats

Hee Kyoung Gu¹, Tae Cheon Jeong^{1*}, Young Jin Chun², Chul-Ho Yun³,
Jung Koo Roh¹ and In Kyung Choi*

College of Pharmacy, Duk-Sung Women's University, Seoul, Korea

¹Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon, Korea

²College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, Korea

³Department of Biochemistry, Pai-Chai University, Taejon, Korea

(Received November 8, 1997)

(Accepted November 30, 1997)

ABSTRACT: Inductive effects of cytochrome P450 2B1 by α - and β -ionone were characterized in individual liver lobes of male Sprague Dawley rats. When rats were administered ionones orally at 100, 300, and 600 mg/kg for 24 hr, cytochrome P450 2B1 was induced dose-dependently in liver S-9 fractions as measured by P450 2B-specific monooxygenases and Western immunoblotting. The activity of P450 1A- and P450 2B-specific monooxygenases was differentially expressed in each lobe of normal liver. In addition, the monooxygenase activity was induced by α - and β -ionone with different potency in each lobe of the liver. Our present results indicate that the different induction of P450s by α - and β -ionone in each lobe may explain different susceptibilities of rat liver lobes to certain hepatotoxicants which require metabolic activation for their toxicity and that α - and β -ionone may be useful model inducers of P450 2B1 in studying the toxic mechanism of certain toxicants which may require the metabolic activation by P450.

Key Words: α -Ionone, β -Ionone, Cytochrome P450 2B1, Induction, Liver lobes

I. 서 론

면역 독성물질 및 간 독성물질 등은 체내 유입 후 독성발현을 위하여 대사활성화 과정이 요구되는 경우가 많은데, dimethylnitrosamine, cyclophosphamide, carbon tetrachloride 및 thioacetamide 등이 그 예이다. 이러한 독성물질들에 있어서 대사활성화 과정의 필요여부를 판정하기 위하여 다양한 *in vivo* 및 *in vitro* 시험방법이 연구되어 왔다. *In vivo* 실험에서는 시험물질을 투여하기 전에 약물대사 효소계를 유도하는 cytochrome P450 (P450) 유도제를 전투여하고, 전투여하지 않은 대조군의 결과를 비교하게 된다. P450 유도제로는 P450 1A1을

유도시키는 3-methylcholanthrene과 β -naphthoflavone, P450 2B1을 유도시키는 phenobarbital, P450 2E1을 유도시키는 ethanol, 그리고 P450 3A1을 유도시키는 dexamethasone 등이 있지만, 이들 중 현재까지의 연구결과를 종합하면 오직 phenobarbital만이 자체의 면역독성이 없었을 뿐, 나머지 유도제들은 자체가 면역독성을 유발하여 P450과 면역독성의 관계를 연구할 때 별로 도움이 되지 못하는 것으로 알려져 있다(Guengerich, 1987; Holsapple 등, 1993; White 등, 1985).

한편, *in vivo* 실험시에 P450 유도제의 전처리에 의해 면역독성의 증감이 확인되었을 때, P450 억제제들을 전투여하는 실험을 추가로 진행하므로써 화학물질의 면역독성과 P450에 의한 대사활성화 간의 관계를 확증할 수가 있다. P450 억제제로는 SK&F 525-A,

*To whom correspondence should be addressed.

disulfiram, aminoacetonitrile 및 기타 특정 isozyme에 특이적인 억제제들이 많이 알려져 있고, 현재까지의 연구결과로는 P450 2E1 억제제인 aminoacetonitrile이 P450 활성을 억제하는 용량에서 면역독성이 없음이 밝혀져 carbon tetrachloride, dimethylnitrosamine, 그리고 ethyl carbamate 등 P450 2E1에 의해 대사활성화가 되는 면역독성물질에 대한 대사작용의 역할규명에 이용이 되었다 (Haggerty 등, 1988; Jeong 등, 1995a; Kaminski 등, 1990). 최근 특정 isozyme에 대한 선택적인 억제제들이 많이 보고되고 있으므로, 이들 억제제의 유용성을 살펴보는 연구가 활발히 진행된다면, *in vivo*에서 P450과 면역독성간의 관계를 규명할 수 있는 좋은 시스템을 개발할 수 있을 것으로 보인다(Halpert 등, 1994; Halpert, 1995).

따라서 면역기능에 영향을 주지 않는 동시에 특정 P450 효소활성을 유도시키거나 억제하는 물질에 대한 탐색연구가 화학물질의 대사활성화와 면역 독성 및 간독성 간의 관계를 규명하는데에 필수적으로 사료된다. 본 연구에서는 이러한 물질에 대한 탐색 연구의 일환으로 식물에 다량 존재하고 있는 α - 및 β -ionone의 P450 유도특성을 랫트에서 연구하였다. 이미 β -ionone을 피하투여시 랫트에서 P450 2B1을 유도시키는 사실을 Jeong 등(1995c)이 밝힌 바, 본 연구에서는 각 간엽별로 α - 와 β - 유도체의 P450 유도특성을 비교하고자 하였으며, 이를 위하여 P450 효소 활성도 측정 및 Western immunoblotting을 이용하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험동물

한국화학연구소 실험동물 육종실에서 입수한 6~8주령의 특정병원체 부재 Sprague Dawley계 랫트 수컷을 실험에 사용하였다. 4~5주령의 동물을 입수하여 무작위로 polycarbonate cage에 5마리씩 분리수용하여 최소한 1주 이상 순화시켰으며, 감마선을 조사시킨 제일사료(대전)와 자외선 살균수를 자유로이 섭취시켰다. 동물실의 환경조건은 실내온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 40~60%를 유지하였고, 150~300 Lux의 조도로 12시간씩 명암을 조절하였다.

2. 실험재료

Ethoxyresorufin, pentoxyresorufin, methoxyresorufin, benzyloxyresorufin, resorufin, α -ionone, 그리고 β -ionone은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, 미국) 제품을

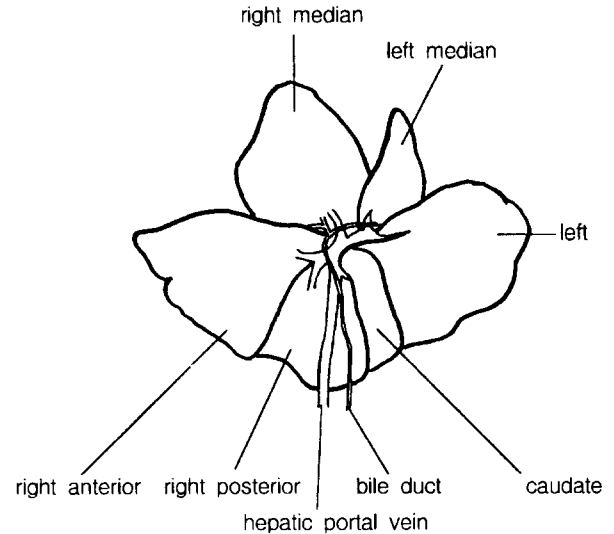


Fig. 1. Nomenclature used for lobes of rat liver. A view of the dorsal surface of the liver.

구입하여 사용하였고, alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG, alkaline phosphatase substrate kit, 그리고 단백질 정량시약은 Bio-Rad사(Richmond, CA, 미국) 제품을 구입하여 사용하였다. 랫트의 P450 2B1에 대한 polyclonal 항체는 Kaminsky 등(1981)의 방법에 준하여 토끼에서 생산하여 사용하였다.

3. 실험동물의 처치

α - 및 β -ionone을 corn oil에 혼합하고 10 ml/kg의 용량으로 조제하여 경구투여하였으며, 24시간 후 실험동물을 CO_2 gas로 마취시키고 방혈치사 시켰다. 간을 적출하고 Fig. 1에 도시한 각 lobe별로 간 조직을 제거하여 실험에 사용하였다.

4. 간 S-9 분획의 분리

각 lobe를 3배량의 냉 0.1 M potassium phosphate 완충액(pH 7.4)를 가하여 균질화시켰다. 이 균질액을 4°C 에서 10분간 $9,000 \times g$ 로 원심분리한 후 상등액을 주의해서 취하여 0.5 ml 씩 분주하고 -70°C 에서 보관하였으며, 이렇게 분리한 분획내의 단백질은 bovine serum albumin을 표준품으로 삼아 Bradford(1976)의 방법에 준하여 정량하였다.

5. Monooxygenase의 측정

Ethoxyresorufin O-deethylase(EROD) 활성은 Burke와

Meyer(1976)의 방법에 준하여 약간 변형된 방법으로 측정하였다. 반응용액은 2 mg/ml의 bovine serum albumin, 10 μ M dicumarol, 5 mM glucose 6-phosphate, 5 units/ml의 glucose 6-phosphate dehydrogenase 및 5 μ M NADPH를 가한 0.1 M potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5)를 사용하였으며, 기질로는 2.5 μ M 7-ethoxyresorufin을 이용하였다. 반응 생성물인 resorufin은 585 nm에서의 형광을 측정하여 정량하였고, 그 결과를 nmole resorufin/min per mg protein으로 표현하였다. Pentoxyresorufin O-depentylyase(PROD) 활성은 Lubet 등 (1985)의 방법에 준하여 EROD 활성측정과 동일한 방법으로 측정하였다. 모든 시험조건 및 반응물의 조성은 EROD 활성측정과 동일하였고 기질의 경우에만 2.0 μ M pentoxyresorufin을 사용하였다. Methoxyresorufin O-demethylase(MROD)와 benzyloxyresorufin O-debenzylase(BROD)는 Burke 등(1994)의 방법에 준하여 측정하였고, 이때 기질은 2.0 μ M의 농도로 사용하였고, 반응용액의 조성은 EROD 측정시와 동일하게 사용하였다.

6. Western immunoblotting

실험동물을 경추탈구하고 방혈시킨 다음, 간을 적출하여 원심분리한 S-9 fraction을 이용하여, 10 또는 20 μ g의 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 상에서 전기영동한 후, nitrocellulose filter에 전기적으로 단백질을 이동시켰다. 이 filter를 2.5% non-fat dry milk 용액으로 30 분간 처리하여, 비특이적인 항체결합을 방지하였고, P450 2B1 isozyme에 대한 polyclonal antibody 용액(1:2000 희석액)을 상온에서 2시간 반응시켰다. 여기에 alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG antibody를 2 시간 반응시켰다. 면역화학적 염색을 위하여 nitrocellulose filter에 5-bromo-4-indolyl phosphate, nitroblue tetra-

zolium 그리고 0.1 M Tris 완충액이 1:1:10 으로 혼합된 용액을 사용하여 발색시켰다. 각 단계마다의 filter 세척을 위해 Tween-20이 0.5% 함유되어 있는 Tris-buffered saline을 이용하였다.

7. 통계처리

모든 시험의 결과는 평균값 \pm 표준오차로 표시한 후, 대조군에 대비한 유의성의 여부를 P<0.05 또는 P<0.01 수준에서 Dunnett's t-test를 실시하여 검정하였다. 유의성이 확인된 시험군은 별표(* 또는 **)로 표시하였다.

III. 실험결과

본 연구에서는 이미 P450 2B1 유도능이 밝혀진 β -ionone과 더불어 구조적 이성질체인 α -ionone의 약물 대사 효소계에 미치는 영향을 실험하기 위하여 Sprague Dawley계 랫트에서 P450 1A 및 P450 2B에 대한 영향을 동종효소에 특이적인 효소활성도의 측정과 Western immunoblotting 시험을 통하여 수행하였다. 특히 간을 구성하는 6개의 각 엽(lobe)에 따라 약물대사 효소의 발현이 다르게 나타나는 연구보고에 착안하여 각 엽에 대한 영향을 각각 연구하였다(Matsubara 등, 1982; Matsubara 등, 1983).

Table 1에서는 α - 및 β -ionone이 P450 1A1 특이적인 EROD에 미치는 영향을 조사한 결과를 나타내었다. EROD 활성은 유의성은 없었으나, 우측 중간엽(right median lobe) 및 좌엽(left lobe)에서 상대적으로 높았고, 우측 후엽(right posterior lobe)에서 낮게 나타났다. 한편 시험물질 투여시 각 엽마다 서로 다른 양상으로 EROD 활성이 유도되었는데, 특히 α -ionone의 경우 우측 중간엽과 좌엽에서 용량상관성을 보이며 유도가 많이 일어났고, β -ionone의 경우에도 마찬가지로 용량상관성과 유의성을 보이지는 않았다.

Table 1. Effects of α - and β -ionone on ethoxyresorufin O-deethylase in male Sprague Dawley rats.

Lobes	Dose (mg/kg)	Vehicle	α -ionone			β -ionone		
			100	300	600	100	300	600
Caudate		4.50 \pm 0.36	3.51 \pm 0.55	3.60 \pm 0.80	3.94 \pm 0.66	4.03 \pm 0.41	5.83 \pm 0.22	6.16 \pm 1.27
Right posterior		3.04 \pm 0.21	3.05 \pm 0.36	6.16 \pm 1.24*	4.10 \pm 0.60	2.89 \pm 0.38	5.54 \pm 1.38	4.19 \pm 0.23
Right anterior		4.62 \pm 0.25	5.09 \pm 0.62	5.61 \pm 0.82	5.99 \pm 0.81	5.88 \pm 0.49	5.13 \pm 0.28	5.03 \pm 0.88
Right median		4.78 \pm 0.23	4.93 \pm 0.63	6.26 \pm 0.57	7.80 \pm 0.19**	6.05 \pm 0.54	5.21 \pm 0.13	4.96 \pm 0.25
Left median		3.90 \pm 0.25	4.80 \pm 0.30	5.57 \pm 0.98	4.16 \pm 0.30	4.11 \pm 0.22	5.77 \pm 0.36*	3.60 \pm 0.25
Left		4.72 \pm 0.24	6.16 \pm 0.06**	7.42 \pm 0.50**	5.59 \pm 0.28*	7.78 \pm 0.89	6.93 \pm 1.04	7.21 \pm 1.11

The values indicate mean activity \pm S.E. of three animals.

Activity=nmole resorufin produced/min per mg protein.

*, P<0.05; **, P<0.01.

Table 2. Effects of α - and β -ionone on methoxyresorufin O-demethylase in male Sprague Dawley rats.

Lobes	Dose (mg/kg)	Vehicle	α -ionone			β -ionone		
			100	300	600	100	300	600
Caudate		3.16±0.12	2.98±0.33	2.61±0.10	3.05±0.61	2.36±0.09	3.22±0.22	3.74±0.52
Right posterior		2.47±0.36	2.75±0.12	3.89±0.22	2.40±0.22	2.27±0.20	4.07±0.50*	3.89±0.63
Right anterior		3.17±0.43	3.20±0.04	2.75±0.16	2.99±0.43	2.86±0.09	3.70±0.35	2.98±0.09
Right median		2.44±0.17	2.93±0.40	3.44±0.26	4.12±0.46*	3.39±0.33	3.33±0.23	3.83±0.43*
Left median		2.70±0.29	3.13±0.21	3.32±0.43	2.97±0.04	3.21±0.17	3.52±0.21	3.14±0.22
Left		2.42±0.20	3.92±0.26**	3.80±0.46**	2.76±0.04	3.13±0.16	3.26±0.20	3.48±0.28*

The values indicate mean activity \pm S.E. of three animals.

Activity=nmole resorufin produced/min per mg protein.

*, P<0.05; **, P<0.01.

Table 2에서는 P450 1A2에 비교적 특이성이 높은 MROD에 미치는 영향을 나타내었다. MROD 활성은 정상군의 경우 유의성은 없었으나, caudate lobe와 우측 전엽(right anterior lobe)이 상대적으로 활성이 높았다. 한편, 시험물질 투여시 우측 중간엽 및 좌엽에서 유도가 많이 일어났고, β -ionone의 경우에는 우측 후엽(right posterior lobe)에서도 유도현상을 관찰할 수 있었다.

Table 3에서는 P450 2B에 특이적인 PROD 활성에 미치는 영향을 실험한 결과를 나타내었다. PROD 활성은 정상군의 경우 우측전엽과 좌엽을 제외하고는 각 엽별로 큰 차이가 없었고, 대부분의 엽에서 α -와 β -

ionone의 투여시 유도현상을 관찰할 수 있었다. 각 물질에 의한 유도현상의 양상은 차이를 보여 α -ionone의 경우 우측 중간엽과 좌엽에서 PROD 활성의 유도가 뚜렷한 반면, β -ionone 투여시에는 좌엽에서 뚜렷한 유도를 보였고 우측 중간엽에서의 유도는 α -ionone 보다 약하게 나타났다.

Table 4에서도 P450 2B에 특이적인 BROD 활성에 미치는 영향을 실험한 결과를 도시하였다. BROD 활성은 정상군에서 큰 차이는 없었고, α - 및 β -ionone 처리시에 역시 서로 다른 BROD 활성의 유도를 나타내었다. 즉, α -ionone 투여시에는 우측 중간엽에서 BROD

Table 3. Effects of α - and β -ionone on pentoxyresorufin O-depentylase in male Sprague Dawley rats.

Lobes	Dose (mg/kg)	Vehicle	α -ionone			β -ionone		
			100	300	600	100	300	600
Caudate		1.50±0.28	2.05±0.48	2.99±0.48*	4.50±0.97*	1.65±0.09	4.39±0.44**	3.85±1.11*
Right posterior		1.65±0.12	2.55±0.56	3.90±1.11*	3.20±0.06*	1.58±0.05	1.95±0.11	3.39±1.35
Right anterior		1.00±0.09 ¹⁾	1.59±0.30	3.10±0.31**	4.89±0.73**	2.27±0.28	3.38±0.64**	3.34±0.60*
Right median		1.26±0.06	2.02±0.10*	5.98±1.14**	11.35±1.17**	2.91±0.40	4.40±0.37**	5.19±0.82**
Left median		1.49±0.11	2.03±0.25	4.70±0.99**	5.01±1.65**	1.82±0.08	4.46±0.37**	3.41±0.70**
Left		1.05±0.09	1.77±0.33	4.11±0.87**	8.93±2.15**	2.96±0.48*	4.40±0.39**	9.18±0.40**

The values indicate mean activity \pm S.E. of three animals

Activity=nmole resorufin produced/min per mg protein

*, P<0.05; **, P<0.01.

¹⁾Significantly different from caudate lobe at P<0.05.

Table 4. Effects of α - and β -ionone on benzyloxyresorufin O-debenzylase in male Sprague Dawley rats.

Lobes	Dose (mg/kg)	Vehicle	α -ionone			β -ionone		
			100	300	600	100	300	600
Caudate		3.35±0.18	3.26±0.12	3.27±0.11	3.44±0.37	2.75±0.11	3.86±0.47	4.39±0.65
Right posterior		2.51±0.27	2.93±0.07	3.78±0.36*	3.13±0.56	2.71±0.46	4.00±0.58	3.48±0.14
Right anterior		3.07±0.34	3.02±0.17	3.11±0.22	3.87±0.44	3.22±0.14	3.71±0.26	3.76±0.19
Right median		2.98±0.30	3.06±0.48	3.71±0.24	5.88±0.66*	3.59±0.39	4.41±0.27*	3.93±0.15
Left median		2.88±0.37	3.13±0.26	3.66±0.19	3.60±0.21	3.41±0.04	4.04±0.25	3.73±0.27
Left		2.45±0.04	3.59±0.35*	4.28±0.39**	3.31±0.16	3.43±0.35	4.61±0.43**	5.22±0.52**

The values indicate mean activity \pm S.E. of three animals

Activity=nmole resorufin produced/min per mg protein

*, P<0.05; **, P<0.01.

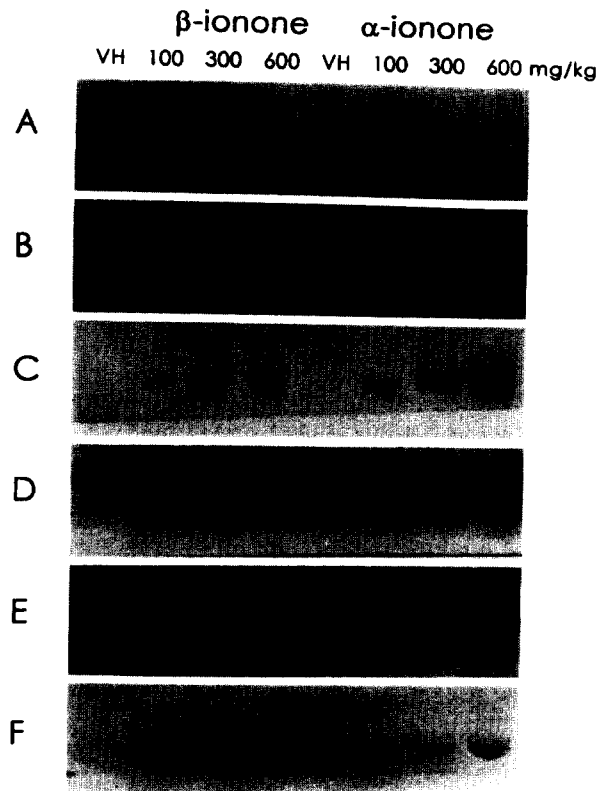


Fig. 2. Western immunoblotting for P450 2B protein in rat liver S-9 fractions isolated from livers treated with α - and β -ionone. The proteins from S-9 fractions isolated from liver lobes were used. A, caudate; B, right posterior; C, right anterior; D, right median; E, left median; F, left lobe.

활성이 약 2배 정도 유도되는데에 반하여, β -ionone 투여시에는 우측 중간엽에는 영향이 적었고 좌엽에서 약 2배이상 유도되었다.

Fig. 2에서는 α - 및 β -ionone 투여시 각 엽에서 발현되는 P450 2B1 단백질의 발현변화를 알아보기로자 Western immunoblotting 실험을 수행한 결과를 나타내었다. 그 결과 전체적으로 α -ionone 및 β -ionone 투여시 각 엽에서 P450 2B 단백질의 증가를 확인할 수 있었으며 전체적으로 β -ionone이 α -ionone에 비하여 P450 2B 단백질을 잘 유도시키며 우측 중간엽과 좌엽에서 특히 유도가 잘 일어나, 효소활성측정의 결과와 일치하는 것으로 사료되었다. 그러나 우측 중간엽(Fig. 2D)의 경우에는 20 μ g의 단백질을 사용하였고, 다른 엽은 10 μ g의 단백질을 사용하여 엽간의 정확한 단백질 발현을 비교하기에는 어려움이 있었다.

결론적으로 α - 및 β -ionone을 랫트에 24 시간 동안 투여할 때, P450 2B 효소활성을 유의성있게 증가시켰으며, 이는 P450 2B 단백질의 증가에 기인한 것으로 판단되었다. 또한 P450 2B 효소활성 및 단백질의 유도는 간

의 각엽별로 서로 차이를 보여, P450 2B에 의해 대사활성화가 일어나는 약물 및 독성물질의 독성발현도 각 엽별로 서로 다르게 나타날 수 있음을 암시해 주었다.

IV. 고 찰

P450은 체내 물질의 대사뿐만 아니라 체내에 유입된 화학물질의 대사 무독화에 직접적으로 관여하는 매우 중요한 효소군으로 다양한 동종효소(isozyme)들로 구성되어 있다. 또한 P450은 자체로는 독성이 없는 일련의 화학물질의 체내 대사 활성화에도 관여하기 때문에 독성학 연구 분야에서도 매우 중요하다. 화학물질에 의해 유발되는 독성의 기작 연구시에 P450에 의한 대사 활성화작용이 필요한가의 연구를 위해서는 P450 유도제나 억제제가 요구되는 관계로 이에 관한 연구가 필요하여 최근에는 특정 동종효소에 대해 특이성이 높은 유도제나 억제제의 개발 연구가 활발하다. 본 연구자들은 화학물질에 의해 유발되는 면역독성 및 간독성에 있어서 대사활성화의 역할을 규명하기 위한 연구의 일환으로 P450 유도제의 탐색에 대한 연구를 수행하여 β -ionone이란 천연물질이 면역계 및 간에 독성을 유발하지 않으면서 P450 2B1을 유도시키는 사실을 밝혔다 (Jeong 등, 1995b, 1996). *In vivo* 실험에서는 시험물질을 투여하기 전에 약물대사효소를 유도하는 P450 유도제를 전처리하고, 전처리 하지 않은 대조군과 결과를 비교하게 된다. P450 유도제로는 각 동종효소를 특이적으로 유도시키는 물질이 많이 알려져 있기는 하나, 이들 중 현재까지의 연구결과를 보면 오직 phenobarbital만이 자체의 면역독성이 없었을 뿐, 나머지 유도제들은 자체가 면역독성을 유발하여 P450과 면역독성의 관계를 연구할 때 별로 도움이 되지 못하는 것으로 알려져 있다(White 등, 1985; Halsapple 등, 1993). β -Ionone은 그 화학식이 4-[2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl]-3-buten-2-one 으로 *Boronia megastigma*를 비롯한 많은 식물에 존재하는 성분으로 retinoic acid, β -carotene, 및 vitamin A의 모핵이 되는 구조를 갖고 있다. β -Ionone이 P450을 유도할 것이라는 예측은 Parke와 Rahman(1969)이 최초로 biphenyl 4-hydroxylase 활성의 증가와 hexobarbital 수면시간의 연장에 영향을 준다는 사실을 밝혀 가능해졌으나, 이후 약물대사 효소계에 대한 영향이 정확히 평가되지 못한 채로 모델 P450 유도제로 사용되었다. 즉, cocaine은 심각한 간독성을 유발하는데, 이때 P450 효소에 의한 대사활성화가 필요하여 β -ionone을 전투여할 때 cocaine의 간독성이 크게 증강되는 것이 보고되었고(Thompson 등, 1984; Roth 등,

1992), 최근, cocaine의 번역독성 기작 연구에서도 β -ionone이 모델 P450 유도제로 사용된 바있다(Jeong 등, 1995b, 1996). β -Ionone은 약물대사 및 독성연구에 가장 널리 쓰이는 실험동물인 Sprague Dawley계 랫트에서도 P450 2B1 효소를 유도시키는 사실을 밝힌 바있다(Jeong 등, 1995c). 본 연구에서는 β -ionone의 P450 유도현상을 더욱 연구하기 위하여 P450 1A 및 P450 2B 효소 활성화에 대한 영향을 간의 각 엽별로 연구하고자 하였고, 또한 구조적 이성질체인 α -ionone (4-[2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl]-3-buten-2-one)의 영향도 살펴보고자 하였다. 그 결과 α - 및 β -ionone 모두 Sprague Dawley계 랫트에서 P450 2B 효소활성을 크게 증가시켰으며, 이러한 사실은 Western immunoblotting 실험에서도 확인할 수 있었다. 또한 본 연구에서 시도한 경구를 통한 단회투여에 의해서 24시간 내에 약물대사능의 유도가 일어나는 것을 확인하여 앞으로 이들 물질을 모델 P450 유도제로 사용할 때 기존의 피하를 통한 2회 반복 투여경로를 대체할 수 있을 것으로 사료되었다. 실제로 본 연구자들의 최근 연구에 의하면 P450 2B1에 의해 대사활성화가 일어나는 thioacetamide에 의한 간독성이 β -ionone을 전처리할 때 더욱 증강되는 것을 확인하였으며(논문 준비중), 이때 β -ionone 전처리는 실험동물의 간기능에 전혀 영향을 주지 않는 것으로 나타나 약물대사효소계와 관련한 화학물질의 독성기작 연구에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 시사해 주었다.

한편 α - 및 β -ionone 투여시 간의 각엽에서 유도되는 효소활성의 양상이 모든 엽에서 동일하지 않았고 우측 중간엽 및 좌엽에서 특히 유도가 많이 일어나, 간을 구성하는 각 엽에서의 약물대사 효소 발현이 동일하게 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. 실제로 Matsubara 등(1982)은 랫트의 간엽에 따라 P450 효소활성이 서로 다르게 분포되어 있음을 밝힌바 있는데, 이들의 연구에 의하면 P450 함량이 중간엽에 많이 분포되어 있으며, phenobarbital을 투여할 때 중간엽에서 역시 많이 증가하며, β -naphthoflavone 투여시에는 간의 모든 엽에서 고르게 P448, 즉 P450 1A 동종효소들이 증가한다고 보고하였고, P450 1A에 특이적인 효소활성인 7-alkoxycoumarin O-dealkylation은 좌엽에서 특히 많이 증가한다고 보고하였다. 또한 Matsubara 등(1983)은 간 독성물질인 사염화탄소를 랫트에 투여할 때, P450의 불활성화가 중간엽에서 가장 심하게 일어나며, 간손상의 정도(괴사 및 변성)도 중간엽 및 우측엽에서 심각하게 일어나는 것을 보고하여 각 간엽이 대사활성화가 요구되는 사염화탄소와 같은 독성물질에 대한 감수성이 서로 다름을 암시하였다. 또한 Dyroff 등(1986)도

diethylnitrosamine을 이용한 간암유도 모델에서 중간엽 및 좌엽이 우측 전후엽 및 caudate lobe보다 더 감수성이 크다는 결과를 보고한바 있다. 이러한 결과들은 본 연구의 결과와도 일치하는 결과로 사료되어 각종의 P450 동종효소에 대한 본격적인 연구가 필요한 것으로 여겨진다.

본 연구의 결과 α - 및 β -ionone은 P450 2B 효소활성을 중간엽 및 좌엽에서 비교적 크게 유도시킨 바, 간독성물질을 투여할 때 이들 엽에서의 독성이 심각하게 나타날 것이라고 예상된다. 또한 각 간엽별로 P450의 분포가 다르게 나타나므로, 독성시험에 수반되어 진행되는 간에 대한 병리조직검사에 있어서도 모든 엽별로 조직검사를 수행할 수는 없더라도 최소한 동일한 엽의 유사위치에서의 시료제작이 조직검사의 정확성을 기하기 위하여 필요한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 덕성여대 연구과제 연구비 일부와 과학기술처 주관 G7 연구과제 '화학물질의 독성연구' 연구비에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Burke, M.D. and Meyer, R.T. (1975): Inherent specificities of purified cytochrome P-450 and P-448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation. *Drug Metab. Dispos.* **3**, 245-253.
- Burke, M.D., Thompson, S., Weaver, R.J., Wolf, C.R. and Mayer, R.T. (1994): Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 723-936.
- Dyroff, M.C., Richardson, F.C., Popp, J.A., Bedell, M. A. and Swenberg, J.A. (1986): Correlation of O⁴-ethyldeoxythymidine accumulation, hepatic initiation and hepatocellular carcinoma induction in rats continuously administered diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* **7**, 241-246.
- Guengerich, F.P. (1987): Chapter I. Enzymology of rat liver cytochromes P-450 in *Mammalian Cytochromes P-450. Vol. I.* (Guengerich, F.P. (Ed.)), CRC Press, Boca Raton, Florida, p.1-54.
- Haggerty, H.G., Boise, L.H., Jordan, S.D. and Hol-

- sapple, M.P. (1988): Differential effects of coadministration of aminoacetonitrile on immunosuppression and hepatotoxicity produced by dimethylnitrosamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**, 774-780.
- Halpert, J.R. (1995): Structural basis of selective cytochrome P450 inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 29-53.
- Halpert, J.R., Guengerich, F.P., Bend, J.R. and Correia, M.A. (1994): Selective inhibitors of cytochromes P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **125**, 163-175.
- Holsapple, M.P., Eads, M., Stevens, W.D., Wood, S.C., Kaminski, N.E., Morris, D.L., Poklis, A., Kaminski, E.J. and Jordan, S.D. (1993): Immunosuppression in adult B6C3F1 mice by chronic exposure to ethanol in a liquid diet. *Immunopharmacol.* **26**, 31-51.
- Jeong, T.C., Cha, S.W., Park, J.I., Ha, C.S., Han, S.S. and Roh, J.K. (1995a): Role of metabolism in ethyl carbamate-induced suppression of antibody response to sheep erythrocytes in female Balb/C mice. *Int. J. Immunopharmac.* **17**, 1034-1044.
- Jeong, T.C., Jordan, S.D., Matulka, R.A., Stanulis, E. D., Kaminski, E.J. and Holsapple, M.P. (1995b): Role of metabolism by esterase and cytochrome P-450 in cocaine-induced suppression of the antibody response. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**, 407-416.
- Jeong, T.C., Jordan, S.D., Matulka, R.A., Stanulis, E. D., Park, S.S. and Holsapple, M.P. (1996): Immunosuppression by acute exposure to cocaine is dependent on metabolism by cytochrome P-450. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 1257-1265.
- Jeong, T.C., Kim, H.J., Lee, S.S., Yang, K.H., Yun, C.-H., Han, S.S. and Roh, J.K. (1995c): Induction of liver cytochrome P450 2B1 by β -ionone in Sprague Dawley rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 198-202.
- Kaminski, N.E., Barnes, D., Jordan, S.D. and Holsapple, M.P. (1990): The role of metabolism in carbon tetrachloride-mediated immunosuppression. *In vivo studies. Toxicol. Appl. Pharmacol.* **102**, 9-20.
- Kaminsky L.S., Fasco M.J. and Guengerich, F.P. (1981): Production and application of antibodies to rat liver cytochrome P-450. *Meth. Enzymol.* **74**, 262-272.
- Lubet, R.A., Meyer, R.T., Cameron, J.W., Nims, R.W., Burke, M.D., Wolff, T. and Guengerich, F.P. (1985): Dealkylation of pentoxyresorufin; A rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**, 43-48.
- Matsubara, T., Mori, S., Touchi, A., Masuda, Y. and Takeuchi, Y. (1983): Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats; evidence for different susceptibilities of rat liver lobes. *Japan. J. Pharmacol.* **33**, 435-445.
- Matsubara, T., Touchi, A. and Ogawa, A. (1982): Heterogeneous distribution of the cytochrome P-450 monooxygenase system in rat liver lobes. *Japan. J. Pharmacol.* **32**, 999-1011.
- Parke, D.V. and Rahman, H. (1969): The effects of some terpenoids and other dietary nutrients on hepatic drug-metabolizing enzyme. *Biochem. J.* **113**, 12p.
- Roth, L., Harbison, R.D., James, R.C., Tobin, T. and Roberts, S.M. (1992): Cocaine hepatotoxicity: influence of hepatic enzyme inducing and inhibiting agents on the site of necrosis. *Hepatology* **15**, 934-940.
- Thompson, M.L., Shuster, L., Casey, E. and Kanel, G. C. (1984): Sex and strain differences in response to cocaine. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1299-1307.
- White, K.L., Jr., Lysy, H.H. and Holsapple, M.P. (1985): Immunosuppression by polycyclic aromatic hydrocarbons: a structure activity relationship in B 6C3F1 and DBA/2 mice. *Immunopharmacol.* **9**, 155-164.