

HepG2 세포에서 용매에 의한 차별적인 사람 사이토크롬 P450 2E1활성 변화

최달웅[†]

고려대학교 병설 보건대학 환경보건과

Differential Role of Solvents on Human Cytochrome P450 2E1 Activity in Intact HepG2 Cells

Dal Woong Choi[†]

Department of Environmental Health, College of Health Sciences, Korea University, Seoul, Korea

(Received July 15, 2003; Accepted August 22, 2003)

ABSTRACT

The modification of CYP2E1 activity is a matter of considerable interest because of its role in the metabolic activation of a variety of environmental toxicants. In the present study, the time-course of changes in human CYP2E1 activities was determined following treatment with solvents (acetone, dimethylsulphoxide or pyridine) using intact HepG2 cells transfected by human CYP2E1. Hydroxylation of chlorzoxazone was used for the measurement of CYP2E1 activity. CYP2E1 protein level was increased upon cultivation of cells in the presence of the solvents for 24 hr. Determination of CYP2E1 activities after 24 hr cultivation with the solvents demonstrated that acetone or dimethylsulphoxide increased, whereas pyridine inhibited the activities. This differential effect of the solvents on CYP2E1 activities persisted to subsequent 24 hr. Competitive inhibition study suggested that pyridine has stronger binding affinity to CYP2E1 than acetone or dimethylsulphoxide. These results demonstrate that different binding affinity of the solvents to CYP2E1 plays important role in determining real CYP2E1 activity in intact cells after exposure to the solvents. Present study would be helpful in precise understanding of human CYP2E1-mediated toxicity.

Keywords: Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), Activity, Acetone, Dimethylsulphoxide, Pyridine

I. 서 론

사이토크롬 P450 2E1(CYP2E1)은 사이토크롬 P450의 동종 효소로서 간 조직에 가장 높은 농도로 존재하며 N-nitrosamines, benzene, vinyl chloride, carbon tetrachloride, acetaminophen 및 urethane 등과 같은 여러 가지 화학물질 등을 대사 활성화시켜 각종 조직독성 및 암 유발에 깊은 관련을 갖는다.¹⁾ 또한 이 효소는 ethanol, acetone, dimethylsulfoxide(DMSO), glycerol, pyrazole, 4-methylpyrazole, imidazole, isoniazid, pyridine 등과 같은 다양한 저분자 화학물질, 용매, 약물 등의 처리에 의해 쉽게 그 양이 증가한다고 보고 되었다.²⁻⁸⁾

이렇게 증가한 효소는 여러 환경 독성 물질의 대사활성화 정도에 지대한 차이를 유발하므로 이 효소의 유도기전에 대한 정확한 이해는 환경 독성학적 관점에서 중요하다. 대부분의 다른 사이토크롬 P450 동종효소와는 대조적으로, 이러한 저분자 화학 유도제에 의한 CYP2E1 유도는 일반적으로 전사과정의 활성화를 야기하지 않는다. 많은 저분자 화학 유도제가 CYP2E1의 활성부위 결합에 의한 단백질 안정화에 의해 이 효소를 유도한다고 알려져 있다.⁹⁻¹¹⁾

이러한 저분자 화학 유도제에 의한 CYP2E1 단백질 양은 여러 논문에서 일관성 있게 증가함이 보고되고 있지만 CYP2E1 활성의 변화는 일관성 있는 결과를 보여 주지 못 하였다. 각각의 실험조건에 따라 증가한 활성^{2,6,7)}을 또는 감소한 CYP2E1 활성¹²⁾을 나타내었다. 이러한 차이는 기존의 연구에서 CYP2E1 활성 측정을 분리된 마이크로솜을 사용하여 수행해 왔기 때문이라

[†]Corresponding author : Department of Environmental Health, College of Health Sciences, Korea University
Tel: 82-2-940-2861, Fax: 82-2-943-5304
E-mail : dalwoong@korhealth.ac.kr

고 생각된다. 저분자 화학 유도제의 CYP2E1 활성부위 결합에 의한 단백질 안정화는 CYP2E1의 분해를 억제하지만 다른 한편으로는 다른 기질의 CYP2E1 활성부위 결합을 억제하므로 효소 단백질량은 증가된 상태지만 실제 활성은 오히려 감소되는 결과를 유발할 수 있다. 만약 마이크로솜 분리과정에서 결합되어 있던 화학 유도제가 분리되어 떨어진다면 실제 *in vivo*에서는 화학 유도제와의 결합에 의해 CYP2E1 양이 증가하고 활성은 억제된 상태이지만 분리된 마이크로솜에서는 오히려 활성이 증가된 결과를 나타낼 수 있다. 초원심분리과정을 이용한 마이크로솜 분리과정 중에서 화학 유도제가 CYP2E1 활성부위에서 떨어져 나갈 수 있는지에 대한 연구는 아직 이루어져 있지 않다. 이러한 문제 때문에, CYP2E1 활성을 살아있는 간세포를 이용하여 직접 측정한다면 마이크로솜 분리과정의 영향 없이 실제 *in vivo* 상황과 유사한 조건에서 CYP2E1 활성 변화를 알 수 있겠다. 그러나 CYP2E1을 안정적으로 발현하는 간세포가 존재하지 않기 때문에 살아있는 세포를 이용한 CYP2E1 활성측정은 많은 어려움을 안고 있었다.¹³⁾ 이러한 문제를 해결하는 최상의 방법은 transfection 기술을 이용하여 인간 간 세포주에 안정적으로 사람 CYP2E1을 발현시키는 것이다. 실제 CYP2E1 활성 측정은 대부분 분리된 마이크로솜을 이용하여 이루어지고 있고 살아있는 세포를 이용한 측정은 CYP2E1 발현을 확인하는 정도에서만 이루어졌고 시간변화에 따른 CYP2E1 활성변화에는 아직 사용되지 않았다.

Peter등¹⁴⁾에 의해 chlorzoxazone(CHZ)의 6-hydroxylation이 사람 마이크로솜에서 주로 CYP2E1에 의해 이루어진다고 알려진 이후 CHZ는 사람 CYP2E1 활성을 측정하는데 가장 이상적인 기질로서 알려져 있다. 그러나 사람 CYP2E1 활성 측정은 수술적인 간 biopsy를 필요로 하므로 수행하는데 많은 어려움이 있었다.¹⁵⁾ 반면 간에서 hydroxylation된 CHZ를 혈액에서 채취하여 CYP2E1 활성을 알아보는 방법이 사람에게 있어서 비교적 간단하고 위험을 주지 않는 CYP2E1 활성 측정 방법으로 알려져 있다.

많은 산업 용매는 산업 현장에서 피부나 소화기계를 통해서 뿐만 아니라 액체로서 상온에서 증발하는 능력을 가지고 있기 때문에 많은 양이 호흡기계를 통해서 흡수된 후 순환계를 통해 간으로 운반되어 간의 대사 효소를 유도하거나 간독성을 유발한다. 따라서 본 연구에서는 CYP2E1 단백질 양을 증가시킨다고 잘 알려진 많은 화학 유도제 중 주로 산업 현장에서 용매로 많이 쓰이는 acetone, DMSO와 pyridine을 선택하여

이들 용매 처리 후 시간 경과에 따른 사람 CYP2E1 활성의 변화를 측정하였다. 실제 *in vivo* 상황에서의 유사한 조건에서 측정하기 위해서, 사람 CYP2E1이 transfection된 사람 간세포주인 HepG2 세포를 사용하여 마이크로솜의 분리 없이 세포에 의해 직접 CHZ가 hydroxylation되는 정도로 CYP2E1 활성을 측정하였다. 본 연구는 사람이 산업 용매에 노출 되었을 때 간 CYP2E1 활성 변화를 쉽게 예측 가능하게 하며 CYP2E1을 경유한 환경 독성 물질들간의 상호 작용에 대한 정확한 이해를 돕는다.

II. 연구방법

1. 시약

Polyclonal human anti-CYP2E1 항체는 Calbiochem (L.A., U.S.A.)에서 구입하였다. Minimal essential medium(MEM) 배지는 Life Technologies(Rockville, U.S.A.)에서 6-hydroxyl chlorzoxazone(OH-CHZ)은 Gentest(Woburn, U.S.A.)에서 구입하였다. 그 외 모든 시약은 Sigma Chemicals(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였다.

2. 세포배양과 용매처리

CYP2E1을 발현하는 HepG2 세포(E47 세포)는 Dr. A.I. Cederbaum(Mount Sinai school of Medicine, N.Y., U.S.A.)에게서 제공 받았다.¹⁶⁾ E47 세포는 사람 CYP2E1 cDNA가 삽입된 pCI-neo expression vector를, C34 cell(control HepG2 cells)은 pCI-neo vector만을 가지고 있다. C34 세포와 E47 세포는 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin과 2 mM glutamine을 포함하는 MEM 배지로 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 세포들이 plates에 거의 차게 되면 각각의 농도의 용매(acetone, DMSO 또는 pyridine)를 포함하는 신선한 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 계속해서 배양할 경우 세포를 배지로 씻어준 후 이 용매가 들어있지 않은 신선한 배지에서 계속 배양하였다.

3. CYP2E1활성 측정

본 실험에서 CYP2E1 활성은 마이크로솜의 분리 없이 살아있는 E47 세포 또는 C34 세포를 가지고 직접 측정하였다. 기질은 사람 CYP2E1 활성 측정에 매우 민감한 지표로 알려진 CHZ를 사용하였다.¹⁴⁾ 세포가 plate에 부착되어 있는 상태에서 배지를 제거하고 배양 phosphate buffered saline(PBS)으로 바꾸어준 다음

CYP2E1 활성을 측정하였다. 이 배양 PBS에 500 μ M의 CHZ를 넣어주고 37°C에서 60분간 배양시킨 후 세포가 배양 PBS로 유리시킨 대사체인 OH-CHZ를 측정하였다. OH-CHZ는 Chittur와 Tracy의 방법¹⁷⁾으로 high-performance liquid chromatography(HPLC)를 사용하여 정량 하였다. HPLC 시스템에서 이동상은 22% acetonitrile과 0.5% acetic acid로 구성되었고 유속은 1.2 ml/ml이었다. Column은 Spherisorb ODS column (125×4 mm, 5 μ m)을 사용하였다. OH-CHZ는 UV detector를 사용하여 287 nm에서 측정하였고 내부표준 물질과 표준곡선을 사용하여 정량 하였다. 전체 세포의 단백질량은 Lowry 등의 방법¹⁸⁾으로 측정하였고 intact 세포의 CYP2E1 활성은 pmol/min/mg protein으로 표시하였다.

4. 마이크로솜 분획 분리와 CYP2E1 단백질 양 변화 측정

세포를 PBS에 취하여 sonication한 후 10,000 g에서 15분간 원심분리하고 그 상등액을 60분 동안 100,000 g에서 초원심분리하여 마이크로솜 분획을 얻었다. CYP2E1 단백질 양의 변화는 E47 세포의 마이크로솜을 이용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행한 후 polyclonal human anti-CYP2E1 항체를 이용하여 Western blot¹⁹⁾을 수행하여 측정하였다. Blot은 Biomax 1D 프로그램(Kodak, N.Y., U.S.A.)를 갖춘 densitometry를 사용하여 정량화 하였다.

5. 통계처리

여러 처리군 간의 유의성을 one-way analysis of variance(ANOVA)로 검정한 후 Newman-keuls multiple range test로 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Acetone, DMSO 또는 pyridine 노출에 의한 CYP2E1 단백질 양의 변화

본 실험조건하에서 용매 노출에 의한 CYP2E1 단백질 양의 변화를 알아보기 위해, E47세포에 acetone (100 mM), DMSO(100 mM) 또는 pyridine(2 mM)을 각각 처리하고 24시간 동안 배양한 후, CYP2E1 항체를 가지고 Western blot을 수행하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 젤상의 54 kDa에서 사람 CYP2E1 band를 확인 할 수 있었다. 배지에 각각의 용매를 24시간

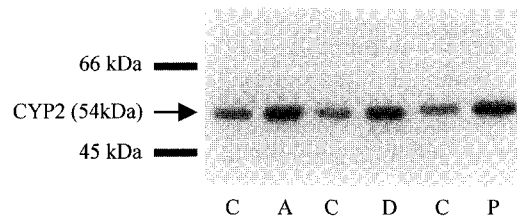


Fig. 1. Western blot analysis of microsomal CYP2E1 content from E47 cells pretreated with acetone (100 mM), DMSO (100 mM) or pyridine (2 mM) for 24 hr. Microsomes from pretreated cells were separated and CYP2E1 proteins were analyzed using anti-CYP2E1 antibody as described under experimental procedures (C : control; A : acetone; D : DMSO; P : pyridine).

동안 처리한 군들에서 모두 CYP2E1 단백질량의 증가가 나타났다(Fig. 1). 용매를 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 24시간 동안 acetone, DMSO, 또는 pyridine이 배지에 존재한 군에서 각각 약 240%, 따라서 본 실험 조건에서 각각의 용매 노출에 의해 사람 CYP2E1 단백질 양이 증가함을 알 수 있었다.

2. Intact E47 세포를 이용한 CYP2E1 활성 측정

용매 처리에 의한 CYP2E1 활성 변화를 알아보기 전에 이 intact E47 세포를 이용한 CYP2E1 활성 측정법의 유효성을 확인해보았다. CHZ를 배양 PBS에 넣어주고 37°C에서 60분간 배양시킨 후 배양 PBS와 세포내의 OH-CHZ를 추출하여 HPLC로 분석한 결과 배양 PBS로의 OH-CHZ의 유리가 배양 시간과 세포수에 비례하여 일정하게 증가하였고 세포내의 OH-CHZ 생성은 초기 시간대에 포화되고 더 이상 증가하지 않았다(data not shown). 따라서 본 실험에서는 배양 PBS로 유리되는 OH-CHZ를 이용하여 실험을 수행하였다.

배양 PBS에 5 μ M의 diphenyleneiodonium(DPI; 싸이토크롬 P450 reductase와 b₅ reductase의 억제제)가 CHZ와 함께 존재하였을 때는 CHZ의 hydroxylation이 완전히 억제 되었다(E47 세포, 26.4 pmol/min/mg; E47 세포 + DPI, 1.9 pmol/min/mg). 싸이토크롬 P450 reductase와 b₅ reductase가 싸이토크롬 P450 활성화에 필수적이기 때문에, DPI가 CYP2E1 catalytic cycle을 강력하게 억제하였다고 사료된다. 또한 transfection되지 않은 보통 HepG2 세포는 CYP2E1을 발현하지 않으므로 CHZ를 C34 세포의 배양 PBS에 넣어준 후 HPLC로 분석했을 때는 OH-CHZ가 측정되지 않았다.

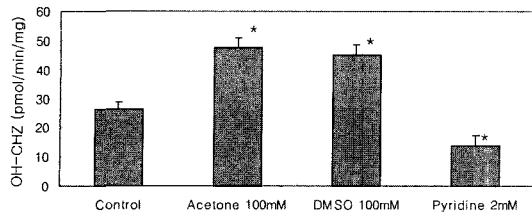


Fig. 2. Modification of CYP2E1 activity after 24 hr treatment of E47 cells with acetone, DMSO or pyridine in the MEM medium. Cells are treated with acetone (100 mM), DMSO (100 mM) or pyridine (2 mM) for a 24 hr period. CYP2E1 activity was then measured in the incubation PBS. Values are the mean \pm SD of 3 individual determinations. Asterisk (*) indicates a significant difference from the control. (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

3. Acetone, DMSO 또는 pyridine 노출에 의한 차별적인 CYP2E1 활성 변화

각각의 용매 처리가 E47 세포의 CYP2E1 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 배지에 각각 acetone (100 mM), DMSO(100 mM) 또는 pyridine(2 mM)을 넣고 24시간 동안 배양한 후 CYP2E1 활성을 측정하였다. 즉, 각각의 용매가 배지 속에 존재 하에서 E47 세포를 24시간 동안 배양한 후 신선한 배지로 세포를 씻어주어 남아있는 용매를 제거한 후 CYP2E1 활성을 측정하였다. Acetone 또는 DMSO를 24시간 동안 처리한 후에는 CYP2E1 활성이 유의성 있게 각각 80%, 72% 증가($p < 0.05$)하였다(Fig. 2). 반면 pyridine을 24시간 동안 처리 한 후에는 그 활성이 48% 감소($p < 0.05$)하였다.

계속하여 시간 경과에 따른 CYP2E1 활성의 변화 양상을 관찰하였다. 세포를 위와 같이 각각의 용매 존재 하에서 24시간 동안 배양한 후 신선한 배지로 씻어주어 남아있는 용매를 제거한 후 계속하여 용매가 들어 있지 않은 신선한 배지로 배양하면서 각각 36, 48, 72, 96시간에 CYP2E1 활성을 측정하였다(Fig. 3). Acetone 또는 DMSO 처리에 의해 증가한 CYP2E1 활성은 48 시간까지도 유의성 있는 증가($p < 0.05$)를 나타냈고 72 시간까지도 증가하는 경향을 나타냈지만 유의성은 없었다. 96시간에는 용매를 처리하지 않은 대조군과 유사한 값을 나타내었다. 반면 pyridine 처리에 의해 감소한 활성은 48시간까지도 계속 억제($p < 0.05$)되다가 72시간에는 그 유의성이 인정되지 않았다. 따라서 각각의 용매 노출에 따라 CYP2E1 단백질량은 모두 증가하였지만 CYP2E1 활성은 다르게 변화함을 알 수 있었다.

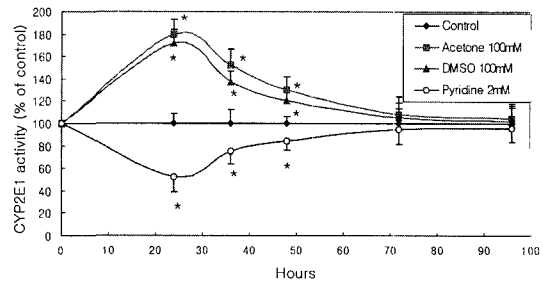


Fig. 3. Time course of CYP2E1 activities after 24 hr treatment with acetone, DMSO or pyridine in the MEM medium. Cells are treated with acetone (100 mM), DMSO (100 mM) or pyridine (2 mM) for a 24 hr period. Then cells were washed with fresh medium and the cell culture continued with fresh medium without acetone, DMSO or pyridine. CYP2E1 activity was measured at each indicated time points (24, 36, 48, 72, 96 hr) in incubation PBS. Values are the mean \pm SD of 3 individual determinations. Asterisk (*) indicates a significant difference from the control value. (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

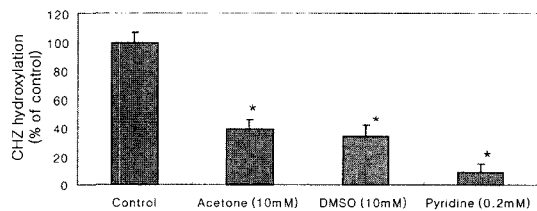


Fig. 4. Inhibition of chlorzoxazone hydroxylation by acetone, DMSO or pyridine. Chlorzoxazone hydroxylation was measured in the presence of acetone (10 mM), DMSO (10 mM) or pyridine (0.2 mM) in incubation PBS. Values are the mean \pm SD of 3 individual determinations. Asterisk (*) indicates a significant difference from the control. (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $p < 0.05$).

4. Acetone, DMSO 또는 pyridine이 배양 PBS에 존재시의 CHZ hydroxylation

실험에 사용한 용매의 CYP2E1에 대한 친화력을 비교하기 위해, 이번에는 각각의 용매가 CHZ와 동시에 배양 PBS에 존재하는 상태에서 CHZ의 hydroxylation을 측정하였다. Fig. 4는 용매가 배양 PBS에 주어진 농도로 각각 존재할 때 CHZ의 hydroxylation이 다양한 정도로 억제됨을 보여주고 있다. 이러한 억제는 각각의 용매가 CYP2E1의 활성부위에 대해 다른 기질인 CHZ와 경쟁하므로 유발된다고 생각된다. CHZ의 hydroxylation은 acetone(10 mM) 또는 DMSO(10 mM)

가 배양 PBS에 존재할 때 각각 61%, 66%가 대조군에 비해 유의성 있게 감소($p < 0.05$)하였고 반면 pyridine (0.2 mM)이 존재할 때는 91%가 감소($p < 0.05$)하였다.

본 실험에서 각각의 용매가 배양 PBS에 CHZ와 동시에 존재할 때는 CHZ의 hydroxylation이 모두 억제되었다. 다만 그 억제 정도에 있어서 사용한 농도로 비교해 보았을 때 pyridine이 acetone이나 DMSO보다 훨씬 강력한 억제를 나타내었다. Hargreaves 등²⁰⁾은 저분자 화학물질 구조중에 질소 원자를 가진 물질은 랫 CYP2E1에 대해 강한 친화력이 있다고 보고하였다. 그리고 다른 연구에서 화학 유도제에 의한 랫 마이크로솜 CYP2E1 활성 억제 능력이 CYP2E1에 대한 결합 친화력과 상관 관계가 있음이 알려져 있다.²¹⁾ 또한 본 실험과 같은 조건에서 분자 구조 중에 질소원자를 가지고 있는 pyrazole로 실험을 수행한 결과도 pyridine이 인간 CYP2E1 활성과 단백질에 미치는 효과와 같은 경향의 결과를 나타내었다(data not shown). 즉, 배양 PBS에 CHZ와 같이 존재 하였을 때 pyrazole은 질소 원자를 가지고 있지 않은 acetone과 DMSO 보다 훨씬 강력하게 CHZ hydroxylation을 억제 하였고 24시간 처리 후에도 CYP2E1 활성을 억제시켰다. 따라서 pyridine은 사람 CYP2E1에 대해 acetone과 DMSO에 비해 강한 결합 친화력을 가지고 있다고 사료된다.

본 연구에서 acetone이나 DMSO 24시간 처리 후의 CYP2E1 활성은 CYP2E1 단백질 양의 변화와 비례해서 증가하였다. 그러나 pyridine 24시간 처리 후의 CYP2E1 활성은 CYP2E1 단백질 양의 변화와 반대의 결과를 나타내었다. 본 연구 결과에서 관찰된 현상은 pyridine의 CYP2E1 활성부위에 대한 강한 결합 친화력으로 설명될 수 있다. Pyridine은 CYP2E1과 강하게 결합하고 있으므로 배지에서 pyridine이 제거 된 후에도 계속 CYP2E1의 활성 부위에 강하게 결합을 한 상태로 남아있게 된다. 그리하여 CHZ의 결합을 계속 억제하게 되어 비록 CYP2E1 단백질 양은 증가 되었지만 CYP2E1 활성은 감소한 결과로 나타났다고 추정된다. 이와는 대조적으로 acetone과 DMSO는 pyridine에 비해 CYP2E1에 대해 상대적으로 약한 결합 친화력을 가지고 있어, 배지에서 acetone과 DMSO가 제거되자마자 바로 CYP2E1의 활성부위로부터 떨어져 나오거나 대사되어 나간다고 생각된다. 그리하여 증가된 CYP2E1의 활성부위가 비워지게 되어 CHZ의 대사가 증가되었다고 추정된다. 그러한 결과는 CYP2E1 활성변화가 언제나 CYP2E1 단백질 양의 변화와 비례하여 나타나는 것이 아니며 용매의 CYP2E1 결합 친화력과 이에 수반된 활성 부위로부터의 제거 속도가 활성변화에 중요

한 요소임을 보여주고 있다.

CYP2E1에 의해 대사되어 독성 및 암을 유발하는 여러 가지 환경 독성물질의 독성 예측이나 방지에는 CYP2E1 활성 변화에 대한 정확한 정보를 필요로 한다. 따라서 적절한 방법에 의한 CYP2E1 활성 측정이 중요하다. 본 연구에서는 살아있는 세포를 이용하여 여러 용매 처리 후 시간 경과에 따른 CYP2E1 활성 변화를 측정하였다. CHZ를 배양 PBS에 넣어주어 세포에 의해 대사되게 한 다음 배양 PBS로 유리되는 OH-CHZ를 HPLC로 정량한 이 방법은 일관성 없는 결과를 유발할 수 있는 마이크로솜 분리 과정을 생략할 수 있어 CYP2E1 활성 측정에 적절하다. (1) Scrapping에 의한 세포의 채취, (2) sonication을 이용한 세포막 파괴, (3) 초원심분리 그리고 (4) pestle을 이용한 resuspension 등과 같은 마이크로솜 분리 과정 중에 CYP2E1과 결합되어 있던 용매가 분리되어 나갈 수 있기 때문이다. 또한 살아있는 세포를 사용하였기 때문에 세포내의 cofactor들이나 효소에 대한 손상도 최소화 할 수 있는 장점이 있다.

본 실험법은 CHZ를 투여하고 일정 시간이 지난 후 혈액에서 OH-CHZ 양을 측정하여 간 CYP2E1 활성을 측정하는 *in vivo* 시험법과 유사한 원리이므로 실제 사람 간 CYP2E1 활성 변화를 마이크로솜분리에 의한 방법보다 정확하고 간단하게 알아낼 수 있다. 따라서 본 연구 결과는 사람이 산업 용매에 노출 되었을 때 간 CYP2E1 활성 변화를 쉽게 예측 가능하게 하며 CYP2E1을 경유한 환경 독성 물질들간의 상호 작용에 대한 정확한 이해를 돕는다.

IV. 결 론

대부분의 다른 사이토크롬 P450 동종효소와는 대조적으로, 저분자 화학 유도제에 의한 CYP2E1 유도는 일반적으로 전사과정의 활성화를 야기하지 않고 CYP2E1의 활성 부위 결합에 의한 단백질 안정화에 의해 이 효소를 유도한다고 알려져 있다. 이러한 이유 때문에 기존에 사용해 왔던 분리된 마이크로솜을 이용한 CYP2E1 활성 측정은 일관성 없는 잘못된 결과를 초래할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 사람 CYP2E1이 transfection된 사람 간세포주인 HepG2 세포를 사용하여 마이크로솜의 분리 없이 살아있는 세포로 용매 (acetone, DMSO 또는 pyridine) 처리 후 시간 경과에 따른 사람 CYP2E1 활성의 변화를 측정하였다. 각각의 용매를 24시간 동안 처리한 군에서 모두 CYP2E1 단백질 양의 증가가 나타났다. 하지만 Acetone 또는

DMSO를 24시간 처리 한 후에는 CYP2E1 활성이 증가한 반면 pyridine을 24시간 처리 한 후에는 그 활성이 감소하였다. 이러한 용매 24시간 처리에 의한 차별적인 CYP2E1 활성 변화는 48시간까지 그 효과가 유지되었다. Competitive inhibition study 결과 pyridine은 사람 CYP2E1에 대해 acetone과 DMSO에 비해 강한 결합 친화력을 나타내었다. 본 실험에서는 용매에 노출된 후 CYP2E1 단백질 양은 모두 증가 하였지만 CYP2E1 활성은 각각 용매의 CYP2E1에 대한 친화력에 따라 각기 다른 변화 양상을 나타냄을 보여주고 있다. 본 연구는 용매 노출 후 CYP2E1 활성 변화가 언제나 CYP2E1 단백질 양의 변화와 비례하여 나타나는 것이 아니며 용매의 CYP2E1에 대한 결합 친화력이 사람 CYP2E1 활성 변화에 중요한 요소임을 보여주고 있다.

감사의 글

저자는 Dr. A.I. Cederbaum께 E47 세포를 제공해 주신데 대해 감사 드립니다.

참고문헌

- Lieber, C. S. : Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. *Physiological Review*, **77**, 17-44, 1997.
- Song, B. J., Gelboin, H. V., Park, S. S., Yang, C. S. and Gonzalez, F. J. : Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the rat enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **261**, 16689-16697, 1986.
- Ryan, D. E., Koop, D. R., Thomas, P. E., Coon, M. J. and Levin, W. : Evidence that isoniazid and ethanol induce the same microsomal cytochrome P-450 in rat liver, an isozyme homologous to rabbit liver cytochrome P-450 isozyme 3a. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **246**, 633-644, 1986.
- Reinke, L. A., Sexter, S. H. and Rikans, L. E. : Comparison of ethanol and imidazole pretreatments on hepatic monooxygenase activities in the rat. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, **47**, 97-106, 1985.
- Eliasson, E., Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. : Ligand-dependent maintenance of ethanol-inducible cytochrome P-450 in primary rat hepatocyte cell cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **150**, 436-443, 1988.
- Wu, D. F., Clejan, L., Potter, B. and Cederbaum, A. I. : Rapid decrease of cytochrome P-450IIE1 in primary hepatocyte culture and its maintenance by added 4-methylpyrazole. *Hepatology*, **12**, 1379-1389, 1990.
- Yang, M. X. and Cederbaum, A. I. : Glycerol increases content and activity of human cytochrome P-450E1 in a transduced HepG2 cell line by protein stabilization. *Alcoholism: Clinical Experimental Research*, **21**, 340-347, 1997.
- Kim, S. G., Williams, D. E., Schuetz, E. G., Guzelian, P. S. and Novak, R. F. : Pyridine induction of cytochrome P-450 in the rat: role of P-450j (alcohol-inducible form) in pyridine N-oxidation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **246**, 1175-1182, 1988.
- Song, B. J., Veech, R. L., Park, S. S., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. : Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 3568-3572, 1989.
- Roberts, B. J., Song, B. J., Soh, Y., Park, S. S. and Shoaf, S. E. : Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 29632-29635, 1995.
- Yang, M. X. and Cederbaum, A. I. : Characterization of cytochrome P450E1 turnover in transfected HepG2 cells expressing human CYP2E1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **341**, 25-33, 1997.
- Carroccio, A., Wu, D. and Cederbaum, A.I. : Ethanol increases content and activity of human cytochrome P450E1 in a transduced HepG2 cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **203**, 727-733, 1994.
- Patten, C. J., Ishizaki, H., Aoyama, T., Lee, M., Ning, S. M., Huang, W., Gonzalez, F. J. and Yang, C. S. : Catalytic properties of the human cytochrome P450 2E1 produced by cDNA expression in mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **299**, 163-171, 1992.
- Peter, R., Bocker, R., Beaune, P. H., Iwasaki, M., Guengerich, F. P. and Yang, C. S. : Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chemical Research in Toxicology*, **3**, 566-573, 1990.
- Guengerich, F. P. and Turvy, C. G. : Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **256**, 1189-1194, 1991.
- Chen, Q. and Cederbaum, A.I. : Cytotoxicity and apoptosis produced by cytochrome P450 2E1 in Hep G2 cells. *Molecular Pharmacology*, **53**, 638-648, 1998.
- Chittur, S. V. and Tracy, T. S. : Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic assay for 6-hydroxychlorzoxazone and chlorzoxazone in liver microsomes. *Journal of Chromatography B*, **693**, 479-483, 1997.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and

- Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275, 1951.
19. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America*, **76**, 4350-4354, 1979.
20. Hargreaves, M. B., Jones, B. J., Smith, D. A. and Gescher, A. : Inhibition of p-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes by small aromatic and heterocyclic molecules, *Drug Metabolism and Disposition*, **22**, 806-810, 1994.
21. Kim, S. G. and Novak, R. F. : The induction of cytochrome P4502E1 by nitrogen- and sulfur-containing heterocycles: expression and molecular regulation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **120**, 257-265, 1993.