

Polymorphisms of Cytochrome P450 2E1 Gene in Korean Patients with Renal Failure

Min Yoo[†]

Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

CYP2E1 in the liver has been studied intensively because it is involved in the metabolic activation of xenobiotics. It is inducible by alcohol, so it has been suspected as the cause of cancer in the stomach and lung. The possible role of CYP2E1 has been suggested strongly as causing tissue damage in mice with renal failure. It was also suspected that 5'-flanking region of CYP2E1 gene might be involved with renal failure. So, we investigated polymorphism of restriction enzyme sites within CYP2E1 gene using the PCR-RFLP analysis. *Pst*I and *Rsa*I sites were located at 5'-flanking region and *Dra*I site was located at intron 6. All three types (W/W, W/S, S/S) were observed for these enzymes although each incidence was somewhat different depending the enzyme sites. W/W was prominent for *Pst*I whereas W/S was markedly high for *Rsa*I. Overall, polymorphic incidence in patients was somewhat higher than normal population. This research should facilitate further investigation of CYP2E1 at genetic level as the direct cause of tissue damage in various organs.

Key Words: CYP2E1, Alcohol, Polymorphism, Tissue damage, Renal failure

서 론

Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)은 산화-환원 효소로서 다양한 원인에 의해 유도된다 (Guengerich et al., 1991). 특히 알코올에 의해 유도되어 여러 물질들을 발암성 대사물질로 변환시키기에 간에서의 특성이 집중적으로 연구되어 왔다 (Seitz and Simanowsky, 1988). 알코올 외에도 CYP2E1은 N-nitrosamine, aniline, benzene, vinyl chloride, acetone 등에 의해 유도된다. CYP2E1은 N-nitrosodimethylamine (NDMA)을 대사시켜 암을 일으키는 유일한 효소라는 점에서 주목받고 있다 (Tsutsumi et al., 1993). 실제로 CYP2E1의 대사작용이 간암 및 폐암의 직접적인 원인이 된다는 사실이 여러 번 보고된 바 있다 (Uematsu et al., 1991; Kato et al., 1992). CYP2E1의 발암성은 발암원에 얼마나 노출되느냐도 중요하지만 개인적 습관

과 유전적 요인이 이에 못지않게 중요하다고 보여진다. 즉 개개인의 민감도 (sensitivity)가 CYP2E1 유전자 다형성에 의해 결정될 가능성이 높다는 것이다.

이처럼 CYP2E1에 대한 그 동안의 연구는 주로 암과 관련되어 진행되어 왔다. 그러나 다양한 대사물질을 활성화시키는 CYP2E1의 기능 때문에 암뿐만 아니라 급, 만성 장기 손상도 나타날 수 있다는 예측이 조심스럽게 제기 되어졌다. 대표적인 조직이 바로 신장이다. 신장은 10~20%의 기능만 남아있어도 환자가 감지하기 어렵기 때문에 쉽게 간과하기 쉬운 장기 중 하나이다. 최근에 산화제를 투여해 신장을 훼손시킨 생쥐에게 항산화제인 taurine을 투여하면 신장독성이 크게 감소한다는 논문이 발표되었다 (Das et al., 2010). 즉 taurine을 처리하면 CYP2E1 유전자가 억제되는데 바로 이 억제 효과로 인해 신장독성이 감소했다는 것이다. 이는 CYP2E1이 암 유발뿐 아니라 장기 손상에도 분명 영향을 미친다는 것을 보여주는 좋은 증거이다. 그러나 아직 사람에게서는 이와 같은 조직별 연구가 미미한 실정이다.

유전자 발현은 대부분 5'-flanking 부위에 의해 결정되므로 CYP2E1도 이 부분의 유전자 다형성이 중요할 것으로 여겨진다 (Hayashi et al., 1991). 본 연구는 CYP2E1

*Received: August 30, 2013 / Revised: October 25, 2013
Accepted: November 8, 2013

[†]Corresponding author: Min Yoo, Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea.
Tel: +82-53-580-5537, e-mail: ymin@kmu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

Table 1. Primers used in the experiments

| Region | Enzyme | SNP location | Primer sequence | Tm |
|--------------------|--------------|------------------------|--|---------|
| 5'-flanking region | <i>Pst</i> I | rs3813867 (C-1297G) | 5'-CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA-3' (-1409 ~ -1388) | 53.6 °C |
| | <i>Rsa</i> I | rs2031920 (C-1057T) | 5'-TTC ATT CTG TCT TCT AAT TGG-3' (-1018 ~ -996) | |
| Intron 6 | <i>Dra</i> I | rs6413432 (A7642T) | 5'-TCG TCA GTT CCT GAA AGC AGG-3' (7338 ~ 7358) | 56 °C |
| | | | 5'-GAG CTC TGA TGC AAG TAT CGC-3' (8315 ~ 8335) | |

유전자 다형성 중 대표적인 3가지 SNP (single nucleotide polymorphism), 즉 5'-flanking 부위의 *Pst*I (C1297G)과 *Rsa*I (C1057T), 그리고 intron 6에 자리한 *Dra*I (A7642T)의 다형성을 한국인 신부전 환자들에서 조사한 결과에 대한 보고이다. 그럼으로써 기존에 발표된 대조군의 경우와 비교하고, CYP2E1으로 인한 장기 손상에 대해 유전자 차원에서의 단서를 찾기 위한 데이터 구축의 발판을 마련하고자 한다.

재료 및 방법

실험 대상은 임상적으로 신부전이 확인된 남녀 환자 89명을 대상으로 실시하였다. 환자의 시료는 경북대학교 신장내과로부터 분양받았다 (IRB No, 2011-04-010). PCR-RFLP 분석을 위해 필요한 genomic DNA는 Promega (USA)의 Blood DNA Extraction kit을 사용하여 준비하였다. 준비된 DNA 100 ng에 각각의 primer 30~60 pmole, Taq DNA polymerase 0.5 U, 125 μM의 dNTP와 reaction buffer를 섞어서 총 20 μl로 만든 후 DNA thermal cycler에서 30회 증폭하였다. 반응 온도는 denaturation 95 °C, annealing 45~62 °C, extension 72 °C로 하였으며 반응의 앞뒤로 pre-denaturation과 post-extension을 각각 해당 온도에서 5분씩 추가 실시하였다. 이렇게 준비된 PCR product를 ethanol로 침전시키거나 Qiagen (USA)의 DNA Cleaning kit로 정제한 뒤 해당 제한효소로 37 °C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 1.4% agarose gel에서 전기영동하였고 그 결과를 촬영하여 통계 처리하였다. 필요한 경우에는 DNA sequencing을 실시하여 반응물의 염기서열을 직접 확인하였다. DNA sequencing은 Bioneer Co. (Korea)에 의뢰하였다. 본 연구에 사용된 primer들의 sequence와 대략적인 특성은 Table 1과 같다. 숫자는 상대적인 위치를 나타

낸 것으로 GenBank에 보고된 수치에 준하여 결정하였다.

결과 및 고찰

임상적으로 암 징후를 보이지 않는 신부전 환자 89명을 대상으로 하였다. *Dra*I의 경우는 88명을 대상으로 조사하였다. 이 중에서 남성은 47명, 여성은 42명이었다. 이번 조사는 환자들에서 어떤 유전자 다형성 패턴이 발견되는지를 보는 것이 목적이었기에 환자의 음주 및 흡연 여부는 고려하지 않았다. 즉, 신부전 환자들에서 wild type (W/W)의 homozygous만 나타나는지, 아니면 SNP homozygous (S/S)만 나타나는지, 또는 이들의 조합 (W/S)인 heterozygous를 포함한 세 가지 유형이 모두 나타나는지를 보는 것이 주된 목적이었다. GenBank에 등록된 이들 SNP 번호는 각각 rs3813867 (*Pst*I), rs2031920 (*Rsa*I), rs6413432 (*Dra*I)이다 (Table 1).

이론상 *Pst*I의 경우 PCR 반응으로 413 bp의 DNA가 증폭되는데 wild type은 효소에 의해 절단되지 않지만 SNP type은 112 bp와 301 bp의 두 개 band로 나뉘어진다. *Rsa*I의 경우는 증폭된 413 bp DNA를 효소 처리했을 때 wild type은 61 bp와 352 bp로 잘리는 반면 SNP type은 413 bp가 잘리지 않고 그대로 나타나게 된다. *Dra*I의 경우는 증폭된 PCR 산물을 효소 처리하면 wild type의 경우 304 bp와 694 bp의 두 개의 band로 절단되는데 SNP 경우는 998 bp의 단일 band를 나타내게 된다 (Fig. 1, Fig. 2). 실험 결과 *Pst*I의 경우 W/W가 64%, W/S가 29%, S/S가 7%만 관찰되었다 (성별로는 남자가 W/W 66%, W/S 23%, S/S 11% 관찰되었고, 여자는 W/W 62%, W/S 36%, S/S 2% 관찰되었다). *Rsa*I의 경우는 W/W가 52%, W/S가 28%, S/S가 20%로 SNP homozygous가 상대적으로 높게 나타났다 (성별로는 남자가 W/W 51%, W/S 23%, S/S

26% 관찰되었고, 여자가 W/W 53%, W/S 33%, S/S 14% 관찰되었다). *DraI*의 경우 W/W 57%, W/S 35%, S/S 8%로 heterozygous의 빈도가 상당히 높게 관찰되었다 (성별로는 남자가 W/W 62%, W/S 30%, S/S 8% 관찰되었고, 여자가 W/W 51%, W/S 42%, S/S 7% 관찰되었다). 실험 결과는 Fig.

3에 정리하여 요약하였다. 조사된 모든 효소의 경우 수치상 약간의 차이는 있었지만 전체적인 경향은 남녀의 구별없이 대체로 비슷하였다. 또 가능한 모든 homozygous와 heterozygote의 경우가 발견되었으며 그 빈도는 제한효소마다 다소의 차이를 나타내었다.

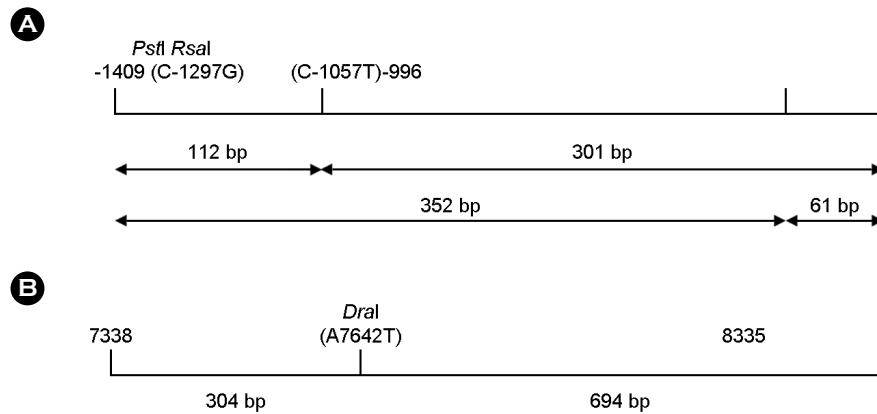


Fig. 1. Relative positions of three enzyme sites. *PstI* and *RsaI* are located within 5'-flanking region (A) whereas *DraI* is located at intron 6 (B). Numbers represent relative positions as indicated at GenBank.

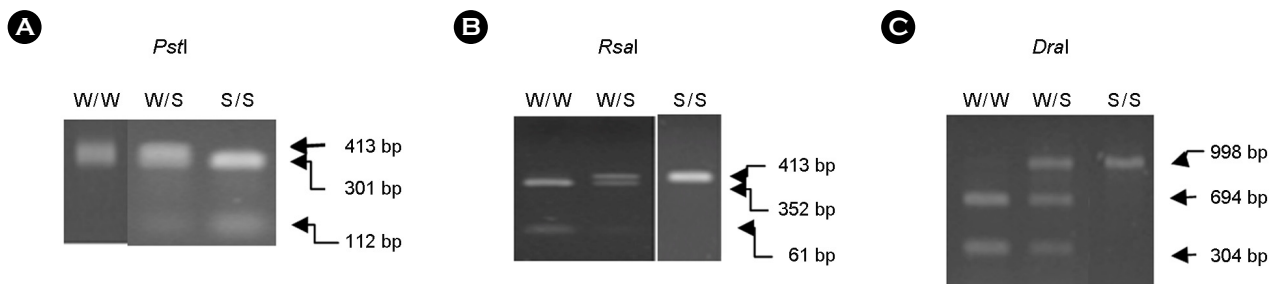


Fig. 2. Polymorphisms of CYP2E1 for *PstI*, *RsaI* and *DraI* sites. (A), (B), (C) represent electrophoretic results of *PstI*, *RsaI*, *DraI*, respectively. W/W is homozygote of wild type, W/S is heterozygote, S/S is homozygote of SNP.

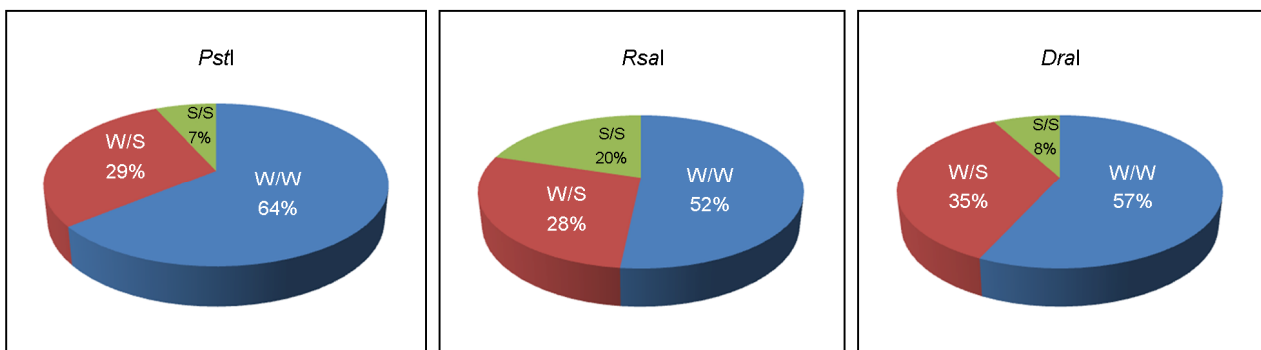


Fig. 3. Incidence of polymorphisms for three different restriction enzyme sites (W means wild type, S indicates SNP type).

5'-flanking에 위치한 *PstI*과 *RsaI* 유전자 다형성은 특별히 유전자 발현과 관련이 있을 가능성이 높다 (Guengerich et al., 1991; McCarver et al., 1998; Nam et al., 2005). 이들 발현과 관련된 연구는 우리의 변화된 식습관과 비만, 음주 등으로 인해 활성이 증대될 수 있기 때문에 향후 더 많은 환자를 대상으로 분석이 필요한 부분이다. 또한 각 환자별로 신부전의 원인이 무엇인지 구체적으로 조사하여 보다 세밀하게 분류하는 작업이 필요하다. 그 동안 한국인에서 위암 및 대장암의 원인으로 CYP2E1의 유전자 다형성을 연구한 보고들이 있었다. 이들 연구에 따르면 비록 그 동안 위암 발생에 CYP2E1의 유전자 다형성이 중요한 역할을 한다고 알려져 있었지만 (Cai et al., 1998; Ohkubo, 2006) 한국인에서는 통계적인 연관이 그다지 없었다는 상반된 보고들도 있다 (Ahn et al., 2006; Park et al., 2000). 이를 뒷받침하듯 CYP2E1 유전자의 다형성은 인종간 현저하게 차이를 보인다는 보고도 있어 (Kato et al., 1992; Fritsche et al., 2000). CYP2E1의 다형성과 암과의 연관성에 관한 결론을 쉽게 내리지 못하게 만들고 있다. 한편 일본과 중국 등 인접 국가들에서의 통계적 수치를 계속 추적하여 확인하는 것도 필요하다고 생각된다 (Kim et al., 1995). 분명한 것은 유전자 다형성과 함께 흡연, 음주 등 건강하지 못한 식습관이 추가되면 그 위험도가 증가할 것이라는 것이다.

본 실험의 결과는 정상인에서 20% 내외의 대립인자 다형성을 보인 기존의 연구 보고 (Paik SW et al., 1997)와 비교할 때 30%를 상회하는 상대적으로 높은 빈도를 보이고 있다 (W/S 기준). S/S를 포함하면 이 수치는 더욱 크게 차이가 날 것이다. 이는 일본인 집단에서 19.3%의 빈도를 보였다는 기존의 보고와 비교해도 훨씬 높은 수준이다 (Hayashi et al., 1991). 백인 집단에서는 정상인에서 불과 2~5% 정도로 낮은 다형성 빈도를 보였다는 보고가 있다 (McCarver et al., 1998). 결국 본 연구의 결과는 CYP2E1 유전자의 5'-flanking region이 신부전의 원인으로 상당한 관련이 있음을 보여주는 것이라 하겠다. 다만 본 연구가 다양한 질환의 결과로서 신부전을 나타내는 환자 전체를 대상으로 실시한 것이기 때문에 향후에는 발병 원인별로 나누어서 연구할 필요가 있다. 모집단이 늘어나면 궁극적으로 신부전의 원인별로 한국형 CYP2E1의 유전자 다형성 패턴이 완성될 수 있으리라 생각된다. 본 연구는 CYP2E1이 신부전에 영향을 미칠 수 있다는 생쥐에서의 보고를 사람에게 적용하기 위해 시도된 기초 연구라는 점에서 그 의의가 크다 하겠다.

감사의 글

본 논문을 위하여 학문적 조언과 지원을 아끼지 않은 경북대학교 류혜명 박사, 계명대학교 이효정, 박혜진 분들께 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Ahn EJ, Lee RA, Chung SS, Kim KH, Park EB. The colorectal cancer risk of meat intake, smoking, and CYP2E1 polymorphisms: The comparison of colorectal cancer patients with controls. *J Korean Surg Soc.* 2006. 71: 262-268.
- Cai L, Zheng ZL, Zhang ZF. Cytochrome P450 2E1 polymorphism and the risk of gastric cancer. *Toxicol.* 1998. 152: 276-281.
- Das J, Ghosh J, Manna P, Parames CS. Taurine protects acetaminophen-induced oxidative damage in mice kidney through APAP urinary excretion and CYP2E1 inactivation. *Toxicol.* 2010. 269: 24-34.
- Fritsche E, Pettman GS, Bell DA. Localization, sequence analysis and ethnic distribution of a 96 bp insertion in the promoter of the human CYP2E1 gene. *Mutat Res Genomics.* 2000. 432: 1-5.
- Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. Role of human cytochrome P450 2E1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol.* 1991. 4: 168-179.
- Hayashi SI, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450 2E1 gene. *J Biochem.* 1991. 110: 559-565.
- Kato S, Shieds PG, Caporaso NE. Cytochrome P450 2E1 genetic polymorphism, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res.* 1992. 52: 6712-6715.
- Kim RB, O'Shea D, Wilkinson GR. Interindividual variability of chlorzoxazone 6-hydroxylation in men and women and its relationship to CYP2E1 genetic polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 1995. 57: 645-655.
- Nam HM, Park JW, Song YJ, Yun HY, Park JS, Hyun TS. Kimchi and soybean pastes are risk factors of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2005. 11: 3175-3181.
- McCarver DG, Byun R, Hines RN, Hichme M, Wegenek W. A genetic polymorphism in the regulatory sequences of human CYP2E1: Association with increased chlorzoxazone hydroxylation in the presence of obesity and ethanol intake. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998. 152: 276-281.
- Ohkubo Y, Ueta A, Ando N, Ito T, Yamaguchi S, Mizuno K. Novel

- mutations in the cytochrome P450 2C19 gene: a pitfall of the PCR-RFLP method for identifying a common mutation. *J Hum Genet.* 2006. 51: 118-123.
- Paik SW, Yoon JH, Hwang YJ, Jang YH, Lee HS, Kim CY. Genetic Polymorphism of Cytochrome P450 2E1 in Hepatocellular Carcinoma Patients in Korea. *Korean J Gastroenterol.* 30: 503-512.
- Park JS, Kim H, Song YJ, Yun HY, Kang JW, Kim YD, Nan HM. Effects of environmental carcinogens and genetic polymorphisms of CYP2E1 and NAT2 on gastric carcinogenesis. *J Korean Surg Soc.* 2000. 59: 488-499.
- Seitz HK, Simanowsky UA. Alcohol and carcinogenesis. *Ann Rev Nutr.* 1988. 8: 99-119.
- Tsutsumi M, Matsuda Y, Takada A. Role of ethanol inducible cytochrome P450 2E1 in the development of hepatocellular carcinoma by the chemical carcinogen, N-nitrosodimethylamine. *Hepatology.* 1993. 18: 1483-1489.
- Uematsu F, Kikuchi H, Motomiya M. Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450 2E1 in a Swedish population: relationship to incidence of lung cancer. *Febs Lett.* 1993. 319: 207-211.
-