

## 사염화탄소로 유도된 Cytochrome P-450 활성도의 전환으로 본 *Hedera rhombea* 잎의 메탄올 추출물의 간독성 감소작용

홍영숙 · 김형래 · 배영숙\* · 박상신<sup>1</sup>

이화여자대학교 의과대학 생화학교실, <sup>1</sup>약리학교실

### Chemoprotective Effect of Methanol Extract of *Hedera rhombea* Leaves on the Reversal of Cytochrome P-450 Activities Induced by Carbon Tetrachloride

Young-Sook HONG, Hyung-Lae KIM, Young-Sook PAE\* and Sang-Shin PARK<sup>1</sup>

Department of Biochemistry, Department of Pharmacology\*

Medical College, Ewha Womans University, Seoul, Korea and <sup>1</sup>Lab. of Comparative Carcinogenesis, NCI-Frederick Cancer Research and Developmental Center Frederick, MD. 21702 USA

(Received September 6, 1995; accepted October 3, 1995)

**Abstract**—The carbon tetrachloride(CCl<sub>4</sub>) has been demonstrated to have a hepatotoxic effect in human or many other species. To investigate the enzyme induction of mixed function oxygenases in liver of male Sprague-Dawley rats a single 0.1, 0.5 ml/kg dose of carbon tetrachloride were given. At 24 hr after a single dose of 0.1 ml CCl<sub>4</sub>/kg weight, methanol extract of *Hedera rhombea* leaves was administered with 100, 500 mg/kg weight. Assays of 7-ethoxyresorufin-O-deethylation(EROD), 7-benzyloxyresorufin-O-dealkylation(BROD), 4-nitrophenol-UDP-glucuronosyltransferase(UDPGT), Western blot and RNA slot blot were used as representatives of the activities of cytochrome P-450 enzymes. The change of the activity of CYP1A1 form measured by EROD assay and Western analysis using 1-7-1 monoclonal antibody was not observed. The activity CYP2B1 form by BROD assay and using 2-66-3 monoclonal antibody was remarkably increased. Elevated level of CYP2B1 mRNA was shown by slot hybridization with 2B1-specific probe. Administration of methanol extract of *Hedera rhombea* leaves reversed the enzyme activity and the level of mRNA, which suggest the chemoprotective effect of methanol extracts of *Hedera rhombea* leaves to carbon tetrachloride hepatotoxicity.

**Keywords** □ cytochrome P-450(CYP) 1A1, CYP2B1, BROD(7-benzyloxyresorufin-O-dealkyl-ation), monoclonal antibody(MAb) 2-66-3, RNA slot hybridization.

사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)는 작업환경에서 쉽게 접촉할 수 있고 일반적인 지방족 할로젠화탄화수소 가운데 가장 위험한 물질로 사람을 비롯한 거의 모든 종속에서 간독성을 나타내며(Gilman 등, 1985) 치명적으로 간을 손상시킨다. 사염화탄소 투여시 일어나는 간세포의 병변은 미토콘드리아와 소포체에서 볼 수 있으나 마이크로솜의 mixed-function oxidase에 의해 대사작용이 활성화되어 자유라

디칼(CCl<sub>3</sub>CO·, CCl<sub>3</sub>·)로 전환된 다음 생체막의 불포화 지방산을 공격하여 지질 과산화물을 생성함으로써 생체막의 손상을 초래하고(Recknagel 등, 1967) 결국 간의 산소결핍으로 독성작용이 나타난다.

진핵세포의 소포체 효소계인 cytochrome P-450(CYP)은 aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB), acetaminofluorene(AAF), benzo(a)pyrene 및 nitrosamine과 같은 발암물질 등을 포함하는 외인성 물질을 활성화시키며, 지방산 및 eicosanoid 홀몬 및 스테로이드 홀몬과 barbiturate, 저지혈증약 및 피임약

\*To whom correspondence should be addressed.

같은 수 많은 외인성 약물을 직접 비활성화 시킨다(Cooney, 1986; Chen 등, 1991). 한편 CYP의 효소활성도는 여러가지 화합물에 의하여 변한다. Phenobarbital과 PCBs와 저지혈증과 같은 간 중앙 촉진제에 의해 CYP multigene family의 유전자의 발현이 유도된다(Chen 등, 1991; Nevert 등, 1991). 발암물질인 N,N-diethylnitrosamine(DEN)에 의해 생긴 암전단계 병변(preneoplastic lesion) 간조직에서는 셋 또는 네 종류의 CYP 효소의 발현이 감소되었다. 이같이 CYP 효소의 발현의 감소와 더불어 procarcinogen의 활성화가 감소된다는 사실로 미루어보아 암 전단계에서 세포 독성물질에 의한 CYP 효소활성도의 변화가 중요함을 제시하였다(Chen 등, 1991; Chen 등, 1989).

본 연구는 사염화탄소의 투여로 손상된 간조직에서 mixed-function oxidase계의 하나인 CYP 효소 중 약물 대사에 중요한 역할을 하는 phenobarbital로 유도된 CYP 1A1과 2B1의 변화를 유전자 발현과 효소활성도를 측정하여 알아보았다. 한편 민간요법으로 출혈, 만성적인 코감기, 황달, 결석증 그리고 경련 등에 쓰여져온 송악(*Hedera rhombea*, Araliaceae)이 사염화탄소에 의해 저해된 CYP의 활성화 및 유전자 발현을 회복시킬 수 있는지를 CYP1A1 및 2B1에 특이한 효소활성도 측정, Western blot 분석 및 mRNA에 대한 slot blot hybridization 분석을 통해 조사하였다.

## 실험방법

### 실험재료

NADPH, UDP-glucuronic acid, carbon tetrachloride, resorufin, 7-ethoxyresorufin, 7-benzyloxyresorufin은 Sigma 회사에서 구입하였고 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate *p*-toluidine salt)와 NBT(*p*-nitro blue tetrazolium chloride)는 Bio-Rad 회사의 Western blot kit로 구입하였다. [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP(3000 Ci/mmol)는 Amersham에서 구입하였고 그 외 시약은 특급시약을 사용하였다.

### 실험동물

실험동물은 체중 200~250 g의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)로 정상군과 실험군으로 구분하여 사육하였다.

#### 정상군 흰쥐

정상 흰쥐에 규정사료 및 물을 자유롭게 공급하였고 생리 식염수를 0.1 ml/kg체중 씩 1일 1회 복강내로 투여하였다.

#### 실험군 흰쥐

사염화탄소를 0.1 ml/kg체중과 0.5 ml/kg체중(올리브유로 1:1의 부피비율로 섞음)이 되도록 각각 1일 1회 흰쥐 복강내로 투여하였다. 또한, 사염화탄소를 0.1 ml/kg체중 1회 복강내로 주사한 후, 이어 생약 메탄올 추출물을 100 mg/kg체중, 500 mg/kg체중이 되도록 1회 복강내로 주

사하였다.

제1 실험군: 사염화탄소 0.1 ml/kg체중이 되게 흰쥐 복강내로 1일 1회 주사하였다.

제2 실험군: 사염화탄소 0.5 ml/kg체중이 되게 흰쥐 복강내로 1일 1회 주사하였다.

제3 실험군: 사염화탄소 0.1 ml/kg체중이 되게 복강내로 주사한 후 동시에 생약 메탄올 추출물 100 mg/kg체중 되게 1회 복강내로 주사하였다.

제4 실험군: 사염화탄소 0.1 ml/kg체중이 되게 복강내로 주사한 후 동시에 생약 메탄올 추출물 500 mg/kg체중 되게 1회 복강내로 주사하였다.

## 실험방법

### 송악 Methanol 추출물

송악(*Hedera rhombea*) 잎 2.45 Kg을 메탄올 90 L로 4 시간 동안 3번 추출하여 얻은 용액을 감압, 농축한 후 polyethyleneglycol에 녹였다(Choi 등, 1993).

### 마이크로솜 제조

흰쥐의 간조직을 적출해서 0.25 M sucrose 용액을 조직의 3배 되게 넣고 균질화 시켰다. 이 균질 용액은 600 ×g에서 20분 동안 원심분리하고 상등액을 다시 10분 동안 원심분리하였다. 이 상등액을 100,000 ×g에서 60분 동안 원심분리하여 얻어진 침전물을 0.25 M sucrose 용액을 사용하여 부유시켰다.

마이크로솜 단백질 농도는 0.1 N NaOH 용액중에서 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry 시약과 Folin 시약으로 반응시켜 700 nm에서 흡광도를 측정하여 Lowry 방법(Lowry 등, 1951)으로 측정했다.

### 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase(EROD) 활성화 측정 방법

7-Ethoxyresorufin-O-deethylase의 활성화는 Burke의 fluorometry방법(Burke 등, 1974)으로 정하였다. phosphate 완충용액(0.1 M, pH 7.8) 2 ml에 마이크로솜 10  $\mu$ l (100~200 mg 단백질), ethoxyresorufin(50 M in 1.25% w/v Tween 80) 20  $\mu$ l를 넣고 잘 섞은 후 50 mM NADPH 10  $\mu$ l를 넣어 30°C, 30분간 항온유지한 후 형광광도계를 사용하여 excitation과 emission 파장을 각각 510, 586 nm로 하여 측정하였다. 형광광도계는 resorufin(0.01 mM in ethanol) 10  $\mu$ l로 calibration하였다.

### 7-Benzyloxyresorufin-O-dealkylase(BROD) 활성화 측정 방법

7-Benzyloxyresorufin-O-dealkylase의 활성화는 Burke의 fluorometry방법(Burke 등, 1985)으로 정하였다. 반응혼합물로 phosphate 완충용액(0.1 M, pH 7.6)에 마이크로솜 10  $\mu$ l(100~200 mg 단백질), benzyloxyresorufin (1 mM in DMSO) 10  $\mu$ l를 넣고 37°C, 1분간 평형화시킨 후 50 mM NADPH 10  $\mu$ l를 넣어 반응을 시작하였다. 최종반응액은 2 ml로 하였으며 생성된 resorufin 양을 형광광도계를 사용하여 excitation과 emission 파장을

각각 530, 585 nm로 하여 측정하였다.

#### 4-Nitrophenol UDP-glucuronosyltransferase(UDPGT) 활성도 측정 방법

Brian의 fluorometry방법(Brian 등)으로 4-nitrophenol UDP-glucuronosyltransferase의 활성도를 측정하였다. 0.5 M tris-maleate와 1 mM 4-nitrophenol(pH 7.4) 125  $\mu$ l, 마이크로솜, 증류수의 총 부피가 200  $\mu$ l되게 한 후에 37°C에서 5분 동안 평형화시킨 후, 20 mM UDP glucuronic acid 50  $\mu$ l를 넣어 37°C에서 10분간 항온유지한 후 0.5 M trichloroacetic acid 0.5 ml를 넣고 잘 섞은 후 얼음에 5분 동안 보관한 다음, 2000 g에서 10분 동안 원심분리하여 단백질을 제거하였다. 상등액 400  $\mu$ l와 2 M sodium hydroxide 400  $\mu$ l를 잘 섞은 후에 증류수 2.2 ml를 넣고 405 nm에서 생성된 4-nitrophenylglucuronide를 측정하였다.

#### Western blot

SDS-PAGE는 Laemmli방법(Laemmli, 1970)에 따라 시행하였다. Microsomal분획 단백질 30  $\mu$ g을 0.25 M sucrose 용액을 사용하여 총 부피가 10  $\mu$ l되게 한 후에 10  $\mu$ l의 protein denaturing buffer와 잘 섞어 100°C 끓는물에서 2분 동안 처치하고 원심분리한 상등액을 gel에 apply하였다. 전기영동은 150 V, 80 mA에서 1시간 전개한 후 이어 200 V, 80 mA에서 시행하였다. 이 gel을 nitrocellulose paper에 4°C에서 60 V, 15 mA로 하룻밤 동안 transfer 했다. 이 paper를 PBS로 씻은 후에 3% non fat dry milk(in PBS)용액으로 2시간 동안 blocking하였고 1:200 및 1:500으로 희석한 monoclonal antibody (MAb) 1-7-1(Fujino 등, 1982)과 MAb 2-66-3(Fujino 등, 1984)로 하룻밤동안 방치했다. 0.05% Tween 20(in PBS)와 PBS로 씻은 후에 5% goat serum/PBS 용액으로 1:1000으로 희석한 alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG로 2시간 동안 실온에 처치하였다. 이를 0.05% Tween 20(in PBS)과 PBS로 씻은 후에 BCIP/NBT phosphate를 기질로 사용하여 발색시켰다.

#### RNA slot hybridization

간조직 500 mg당 4.2 M guanidium soln과 0.1 M mer-

captoethanol 5.0 ml로 균질화시킨 후, 2 M sodium acetate(pH 4.0) 0.5 ml, phenol 5.0 ml, chloroform : isoamyl alcohol(49 : 1) 1 ml를 넣어 세포를 균질화하였다. 10,000  $\times$ g로 20분간 원심분리한 후 RNA phase에 isopropanol을 5.0 ml 가해 동일한 조건으로 원심분리하여 얻은 RNA침전을 75% ethanol로 씻고 DEPC로 처리한 증류수에 녹인후 농도를 측정했다. 20  $\mu$ g의 RNA를 slot blot apparatus(BRL)를 사용하여 Nitran paper에 loading하였고 이를 50% formamide, 5 $\times$ Denhardt's, 5 $\times$ SSC, 0.5% SDS, 100  $\mu$ g/ml salmon sperm DNA 조성된 완충용액으로 55°C에서 하룻밤 동안 prehybridization하였다. CYP 2B1 cDNA를 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP를 사용하여 random-priming하여 probe를 만들었고 이를 1.0 $\times$ 10<sup>6</sup> cpm되게 prehybridization용액에 넣고 55°C에서 하룻밤 동안 hybridization하였다. 표지된 nitran paper를 1 $\times$ SSC/0.5%SDS 용액으로 65°C에서 15분씩 4번 membrane을 씻은 후에 hyperfilm(Amersham)에 autoradiogram을 시행하였다 (Josef, 1994).

### 실험결과

사염화탄소 투여군과 사염화탄소군에 송악 (*Hedera rhombea* 콩) 잎의 메탄올 추출물을 투여하였을 때 흰쥐 간 조직에서 CYP1A1과 CYP2B1의 발현을 관찰하고자 하였다. CYP1A1에 특이한 반응인 7-ethoxyresorufin-O-deethylase(EROD)활성도와 CYP 2B1에 특이한 반응인 7-benzoyloxyresorufin-O-dealkylase(BROD)활성도를 측정하여 Table I과 II에 나타내었다.

EROD활성도는 사염화탄소 투여군의 경우 0.1 ml 투여군과 0.5 ml 투여군은 대조군에 비해 활성이 현저히 감소함을 나타냈다(p<0.001). 송악 메탄올 추출물 투여군의 경우 사염화탄소만 0.1 ml 투여한 군에 비해 활성도는 변화가 없었으나 사염화탄소 0.5 ml를 투여한 군 보다는 활성도가 증가했다(p<0.05). 대조군에 비해서는 송악 추출물 100 mg/kg 투여군과 500mg/kg 투여군 모두 활성도의 감소정도는 같았다(p<0.01). 이는 사염화탄소와

**Table I.** The effect of methanol extract on 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in carbon tetrachloride treated rat liver microsomes.

Treatment	nmoles/mg protein/min
control	0.45 $\pm$ 0.010*
CCl <sub>4</sub> 0.1 ml	0.34 $\pm$ 0.010*
CCl <sub>4</sub> 0.5 ml	0.29 $\pm$ 0.007*
CCl <sub>4</sub> 0.1 ml + Methanol extract 100 mg	0.35 $\pm$ 0.039 <sup>a</sup>
CCl <sub>4</sub> 0.1 ml + Methanol extract 500 mg	0.35 $\pm$ 0.033 <sup>ab</sup>

\*significantly different from control value, p<0.001 <sup>a</sup>significantly different from control value, p<0.01 <sup>b</sup>significantly different from CCl<sub>4</sub> 0.5 ml value, p<0.05.

**Table II.** The effect of methanol extract on 7-Benzoyloxyresorufin-O-dealkylase (BROD) activity in carbon tetrachloride treated rat liver microsomes.

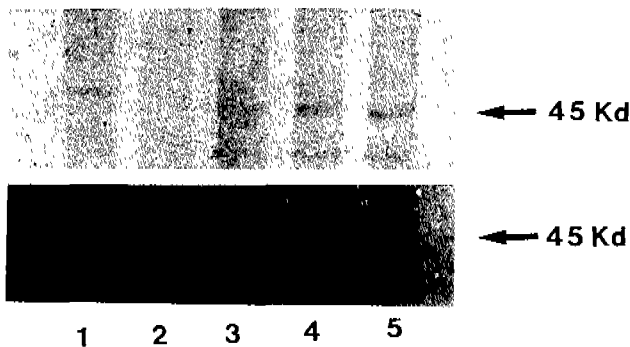
Treatment	nmoles/mg protein/min
control	0.20 $\pm$ 0.005*
CCl <sub>4</sub> 0.1 ml	0.07 $\pm$ 0.006*
CCl <sub>4</sub> 0.5 ml	0.05 $\pm$ 0.006*
CCl <sub>4</sub> 0.1 ml + Methanol extract 100 mg	0.11 $\pm$ 0.014* <sup>ab</sup>
CCl <sub>4</sub> 0.1 ml + Methanol extract 500 mg	0.11 $\pm$ 0.012* <sup>ab</sup>

\*significantly different from control value, p<0.001 <sup>a</sup>significantly different from CCl<sub>4</sub> 0.1 ml value, p<0.02 <sup>b</sup>significantly different from CCl<sub>4</sub> 0.5 ml value, p<0.01.

**Table III.** The effect of methanol extract on 4-Nitrophenol UDP-glucuronosyltransferase activity in carbon tetrachloride treated rat liver microsomes.

Treatment	nmoles/mg protein/min
control	0.59 ± 0.103*
CCl <sub>4</sub> 0.1 ml	3.11 ± 0.133*
CCl <sub>4</sub> 0.5 ml	3.82 ± 0.177*
CCl <sub>4</sub> 0.1 ml + Methanol extract 100 mg	2.49 ± 0.010* <sup>a</sup>
CCl <sub>4</sub> 0.1 ml + Methanol extract 500 mg	2.18 ± 0.074* <sup>b</sup>

\*significantly different from control value,  $p < 0.001$  <sup>a</sup>significantly different from CCl<sub>4</sub> 0.1 ml value,  $p < 0.01$  <sup>b</sup>significantly different from CCl<sub>4</sub> 0.1 ml value,  $p < 0.001$

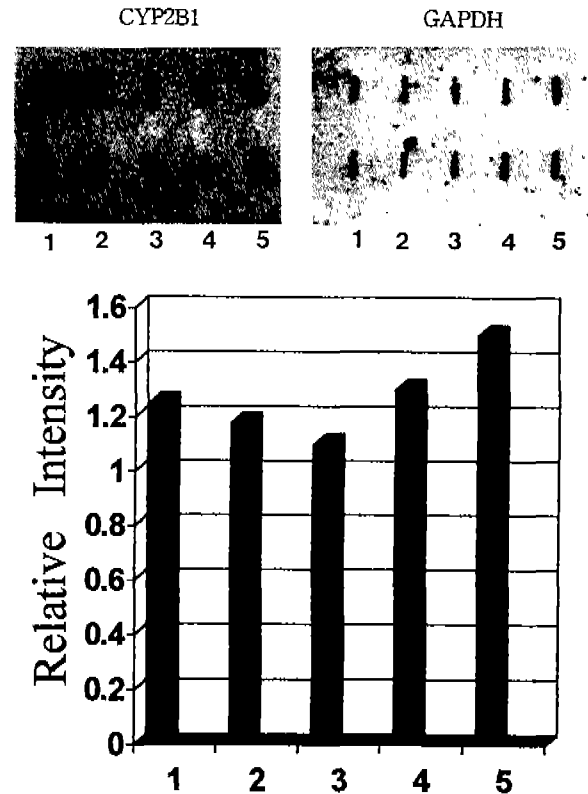


**Fig. 1.** Western blots of CYP2B1 in rat tissue microsomes. Monoclonal antibody(MAb) 2-66-3 directed to CYP2B1 was incubated at a dilution of 1 : 500, followed by goat anti-mouse secondary antibody(1 : 1000) conjugated to alkaline phosphatase. Bands were visualized by incubation in BCIP/NBT alkaline phosphatase substrate.  
lane 1: Liver from saline-treated rat, lane 2: Liver from CCl<sub>4</sub> 0.1 ml-treated rat, lane 3: Liver from CCl<sub>4</sub> 0.5 ml-treated rat, lane 4: Liver from CCl<sub>4</sub> 0.1 ml + Methanol extract 100 mg-treated rat, lane 5: Liver from CCl<sub>4</sub> 0.1 ml + Methanol extract 500 mg-treated rat.

송악 메탄올 추출물 투여로 CYP1A1활성에는 별 영향이 없다는 결과를 보여 주었다.

BROD활성도는 사염화탄소 투여군의 경우 대조군에 비하여 0.1 ml 투여군과 0.5 ml 투여군은 모두 통계학적으로 유의있게 감소하였다( $p < 0.001$ ). 송악 메탄올 추출물 동시 투여군의 경우는 사염화탄소만 투여한 군보다 활성도가 사염화탄소만 0.1 ml를 투여한 군이나 0.5 ml를 투여한 군보다 모두 통계학적으로 유의있게 증가했으나 ( $p < 0.02$ ,  $p < 0.01$ ) 대조군에 비하여는 모두 유의있게 감소하였다( $p < 0.001$ ).

UDPGT 활성은 Table III에 나타낸 바와 같으며 대조군에 비하여 모든 실험군의 활성이 증가하였다. UDPGT 활성이 대조군에 비하여 사염화탄소 0.1 ml 투여군과 0.5 ml 투여군은 현저히 증가되었고( $p < 0.001$ ), 송악 메탄올 추출물 동시 투여군의 경우 100 mg 투여군의 활성도와 500 mg 투여군의 활성도는 모두 사염화탄소



**Fig. 2.** Slot blot analysis for expression of CYP2B1 mRNA. RNA was extracted from control rat liver, rat liver treated with CCl<sub>4</sub> and rat liver treated with CCl<sub>4</sub> plus methanol extract.

lane 1: Liver from saline-treated rat, lane 2: Liver from CCl<sub>4</sub> 0.1 ml-treated rat, lane 3: Liver from CCl<sub>4</sub> 0.5 ml-treated rat, lane 4: Liver from CCl<sub>4</sub> 0.1 ml + Methanol extract 100 mg-treated rat, lane 5: Liver from CCl<sub>4</sub> 0.1 ml + Methanol extract 500 mg-treated rat.

0.1 ml과 0.5 ml 투여군에 비해 활성도가 통계학적으로 유의있게 감소되었으나( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) 대조군에 비하면 아직 높은 활성치를 갖고 있으므로 정상적으로 회복되었다고는 생각할 수 없었다.

Monoclonal antibody(MAb) 1-7-1과 MAb 2-66-3을 사용한 Western blotting하였으며 MAb 2-66-3의 결과는 그림1에 나타내었다. CYP1A1에 반응하는 MAb 1-7-1을 사용하여 immunoblotting한 결과는 양적 변화를 관찰할 수 없었다. 그러므로 CYP1A1의 양적변화는 사염화탄소 투여와는 크게 관계가 없었다고 생각된다. CYP2B1에 반응하는 MAb 2-66-3을 사용하여 immunoblotting한 결과는 대조군과 비교해서 사염화탄소군은 CYP2B1이 현저히 감소하여 거의 반응하지 않았으며 송악 메탄올 추출물 투여군의 강도는 대조군보다는 약한 반응을 보이고 사염화탄소 투여군보다는 높은 반응을 보이고 있다. 이런 결과는 CYP2B1에 선택적으로 반응하는 BROD 활성도가 사염화탄소 투여군에서 감소하고 송악 메탄올 추출물 투여군에서 사염화탄소군보다 증가하는 결과와 일치하는

경향을 보였다.

CYP2B1 유전자의 발현을 RNA slot hybridization 방법으로 조사하였다. CYP2B1은 대조군에 비해서 사염화탄소 0.1 ml/투여군과 0.5 ml/투여군의 순서로 CYP2B1이 감소되었고 송악 메탄올 추출물 투여군들은 대조군보다 100 mg, 500 mg 투여군의 순서로 CYP2B1이 증가되는 것을 관찰 할 수 있었다(그림 2).

## 고 찰

사염화탄소는 용매, 가공식품, 육수(陸水) 및 공기 등 많은 주위환경에서 쉽게 접촉할 수 있고 사람에게 치명적인 간 손상을 주는 물질로 사염화탄소에 의해 사람에게서 일어난 독성작용에 대한 많은 경우들이 이미 보고된 바 있고(Bruckner 등, 1986) 사람의 장기 중 주로 간과 신장의 손상이 오지만 특히 간 손상은 치명적이다. Hepatocarcinogenesis 동안 두드러진 현상은 약물대사 효소의 발현이 변화되는 것이다. 다양하게 다른 약물을 투여하므로 유도된 발암전 손상과 종양에 의한 손상들은 공통적으로 phase I 효소들(예를들면, cytochromes P-450(CYP))의 발현을 감소시키고 phase II 효소들(예를들면, epoxide hydrolase, glutathion-S-transferase, glucuronosyltransferase)의 발현을 증가시킨다고 보고 되었다. 선택적으로 일어나는 이러한 변화를 "resistance phenotype"이라 부르고 이것은 세포 독성적이고 유전자 독성적인 물질에 의한 종양 촉진에 필요한 중요한 생화학적 성분이다. 최근 몇년 동안 비유전자 독성적인 물질에 의한 간 종양 촉진에서 나타나는 CYP들의 중요한 역할에 대하여 많은 연구가 진행되어 왔다(Chen 등, 1989; Curtis 등, 1979). Phenobarbital과 그 밖의 일반적인 간 종양 촉진제(예를 들면, PCBs, 저지방혈증제)는 CYP들에 의한 약물대사 효소계를 유도한다. 사염화탄소와 간 종양 촉진 사이의 관련된 연구들이 이루어져 왔으며(Faber 등, 1985) 사염화탄소의 독성은 간장 mixed function oxidase계에 의하여 우선 대사되므로 나타난다. 그러므로 사염화탄소 투여 후 간장 손상 정도를 조절하는 간조직의 mixed function oxidase계의 역할이 중요한 인자인 것을 밝힐 필요가 있다.

본 실험은 사염화탄소 투여로 유도된 간장의 독성이 CYP2B1 발현과 UDP-glucuronosyltransferase(UDPGT) 활성에 미치는 변화를 측정하고 간장 보호작용이 있는 *Hedera rhombea* 잎의 메탄올 추출물을 투여 했을 때 이들의 효과를 측정하기 위하여 기질 특이적인 BROD 활성, UDPGT활성, MAb 1-7-1과 MAb 2-66-3을 사용하여 Western blot 과 RNA slot blot으로 확인하였다.

사염화탄소 투여로 CYP2B1에 특이하게 반응하는 BROD활성이 현저히 감소되는 결과를 얻었다. 이는 여러 다른 발암물질에 의하여 유도된 간의 hyperplastic lesion 마이크로솜의 dealkylation 활성과 CYP2B1 발현이 감

소되는 결과와 일치하였다 (Curtis 등, 1979; Davis 등, 1980; Buchmann 등, 1989). 이런 결과는 사염화탄소에 의하여 유도된 간 독성작용과 화학물질, 발암물질에 의하여 유도된 hyperplastic nodule에서 모두 dealkylation활성과 CYP2B1 발현이 대조군에 비하여 감소됨을 확인하므로써 phenobarbital과 그 외 다른 물질에 의하여 소생이 가능하다고 생각되었다. Kraupp-Grasl 등(1990)은 오랫동안 음식에 phenobarbital을 투여했을 때 암컷 Wistar 흰쥐에 AFB를 1회 투여로 유도된 손상에 phenobarbital가 종양 촉진제로 효과적이라는 것을 입증하였다. 이런 결과들은 AFB 투여로 유도된 간의 hyperplastic lesion이 phenobarbital에 의하여 독특한 방법으로 성별과 종족에서 촉진되는 가능성을 보여주었다. 그러나 phenobarbital을 투여했을 때 이들 활성과 발현이 증가되는 것이 확인되었다(Chen 등, 1991).

Western blot과 RNA slot blot은 사염화탄소가 CYP2B1을 선택적으로 발현을 감소시킨다는 것을 보여주고 이 약물에 의하여 간 독성작용으로 CYP2B1의 유도되는 양도 억제되고 송악 메탄올 추출물의 흡수로 인한 CYP2B1의 회복으로 이 성분이 간 독성작용을 억제하고 간 손상을 회복시킨다는 것을 확인시켜주었다.

UDPGT는 hydroxy, carboxyl, sulfhydryl 또는 amino group 등을 포함하고 있는 다양한 화합물과 UDP-glucuronic acid가 반응하여 glucuronic acid의 conjugation을 촉매하는 효소이며 이 때 형성된 glucuronide는 비활성 중간대사물질이고 소변이나 담즙과 함께 배설된다(Amelizad 등, 1988). 그러므로 체내에 독성물질이 흡수되면 glucuronic acid가 이 독성물질과 결합하여 glucuronide를 형성하게 되고 이 glucuronide의 형성이 증가되면 UDPGT활성이 증가하게 된다. 본 실험에서 투여한 사염화탄소의 양이 증가할수록 UDPGT활성이 증가하는 것은 사염화탄소를 해독하기 위하여 glucuronide의 형성이 증가되므로 UDPGT활성이 증가되는 것으로 생각 된다. 송악 메탄올 추출물을 동시에 투여하였을 때 이 효소의 활성이 감소되는 것을 관찰하였다. 송악 메탄올 추출물을 투여하였을 때 UDPGT활성이 감소되는 것은 생약 추출물에 의하여 사염화탄소에 의한 간 독성 작용이 제거되는 것으로 추측된다.

사염화탄소는 치명적인 간 독성작용을 나타내는 대표적인 물질로 투여량에 따라 그 효과는 증가하고 송악 메탄올 추출물은 사염화탄소의 독성효과를 감소시키는 화학 물질에 대한 보호 효과를 보였고 이 효과는 사염화탄소에 의해 선택적으로 유도되는 CYP2B1이 저해되어 회복되는 것을 알 수 있었다.

## 참고문헌

- Amelizad, Z., Asamoto, M., Ichihara, A., Inoue, T., Ito, N., Moore, M.A., Nakamura, T., Oesch, F., Satoh, K. and

- Tsuda, H. (1988). Effect of modifying agents on the phenotypic expression of cytochrome P-450, glutathione S-transferase molecular forms, microsomal epoxide hydrolase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in rat liver preneoplastic lesions. *Carcinogenesis*. **9**, 547-554.
- Brian, B., Philip, W. 4-Nitrophenol UDP-glucuronyltransferase. *Method in Enzymology*. **77**, 169-170.
- Bruckner, J. V., Mackenzie, W. F. and Muralidhara, S. (1986). Oral toxicity of carbon tetrachloride: Acute, Subacute, and Subchronic studies in rats. *Fund. Appl. Toxicology*. **6**, 16-34.
- Buchmann, A., Kunz, W., Oesch, F., Schmitt, R., Schwarz, M. and Wolf, C. R. (1987). Development of cytochrome P-450-altered preneoplastic and neoplastic lesions during nitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res*. **34**, 3337-3345.
- Buchmann, A., Kuhlmann, W., Kunz, H.W., Oesch, F., Schwarz, M. and Wolf, C. R. (1987). Expression and inducibility of drug-metabolizing enzymes in preneoplastic and neoplastic lesion of rat liver during nitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *Arch. Toxicol.* **60**, 198-203.
- Burke, M. D. and Mayer, R. T. (1974). Ethoxyresorufin direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug. Metab. Dispos.* **2**, 583-588.
- Burke, M. D., Elcombe, C. R., Halpert, J. and Thompson, S. (1985). Ethoxy-, pentoxy-, and benzyloxyphenoxazone and homologues: A series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 3337-3345.
- Chen, Z. Y. and Eaton, D. L. (1991). Differential regulation of cytochrome(s) P450 2B1/2 by phenobarbital in hepatic hyperplastic nodules induced by aflatoxin B1 or diethylnitrosamine plus 2-acetylaminofluorene in male F344 rats. *Toxi. Appl. Pharmacology*. **111**, 132-144.
- Chen, Z. Y., Farber, E. and Harris, I. (1989). The biochemical-molecular pathology of the stepwise development of liver cancer: New insights and problems. *In Liver Cell Carcinoma*. 273-279.
- Choi, K. A., Choi, Lee, I. R., Lee, M. S. and Seo, E. K. (1993). Pharmacological activities and the constituents of the leaves of *Hedera rhombea* Bean(II): On the constituents of the leaves. *Arch. Pharm. Res.* **16**, 331-335.
- Conney, A. H. (1986). Induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes. *the first Bernard B. Brodie lecture at Pennsylvania State University. Life Sci.* **39**, 2493-2518.
- Curtis, L. R., Mehendale, H. M. and Williams, W. L. (1979). Potentiation of the hepatotoxicity of carbon tetrachloride following preexposure to chlordecone in the male rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **51**, 283-293.
- Davis, M. E. and Mehendale, H. M. (1980). Functional and biochemical correlates of chlordecone exposure and its enhancement of CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity. *Toxicology*. **15**, 91-103.
- Farber, E., Ho, R. K., Roomi, M. W. and Sarma, D. S. R. (1985). A common biochemical pattern in preneoplastic hepatocyte nodules generated in four different models in the rat. *Cancer Res*. **45**, 564-571.
- Farr, A. L., Lowry, O. H., Randell, R. J. and Rosebrough, N. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Fujino, T., Gelboin, H. V., Guengerich, F. P., Park, S. S. and West, D. (1982). Monoclonal antibodies that inhibit enzyme activity of 3-methylcholanthrene-induced cytochrome P-450. *Cancer Res*. **42**, 1798-1808.
- Fujino, T., Geiboin, H. V., Guengerich, F. P., Miller, H. and Park, S. S. (1984). Monoclonal antibodies to phenobarbital-induced rat liver cytochrome P450. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 2071-2081.
- Gilman, A. G. (1985). Carbon tetrachloride. *The pharmacological basis of therapeutics*. **7**, 1635-1636.
- Josef, S. (1994). Inhibition of cytochromes P450 1A by nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 3559-3563.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*. **227**, 680-685.
- Nebert, D. W., Nelson D. R. (1991). The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* **10**, 1-14.
- Recknagel, R. O. (1967). Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **19**, 145.
- Recknagel, R. O., Glende E. H. J., Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An examples.