

흰쥐에 있어서 Styrene에 의한 간장의 Microsomal Cytochrome P450의 유도

한국산업안전공단 산업보건연구원*, 순천향대학교 자연과학대학 화학과**

김기웅* · 장성근** · 정효석* · 이준연* · 문영한* · 박상신*

— Abstract —

Induction of Hepatic Microsomal Cytochrome P450 by Styrene in Rat

Ki-Woong Kim*, Sung Keun Chang**, Hyo Seok Joung*,
Jun Yeon Lee*, Young Hahn Moon* and Sang Shin Park*,

*Korea Industrial Safety Corporation Industrial Health Research Institute**
*Dept. Chemistry, Natural Science college, Soonchunhyang University***

The effects of styrene on the induction of cytochrome P-450s (P450), (P4501A1/2, P4502B1/2 and P4502E1) and activities of other related enzymes were investigated in the male Sprague Dawley rats which were treated with styrene 500 (S1), 1,000 (S2) 1,500 (S3) mg/kg in olive oil intraperitoneally once a day for two days and sacrificed for the preparation of liver microsomes after 24 hrs.

1. The contents of total protein and P450 in the microsomes derived from the styrene treated groups were slightly higher than those from the control group except those from the S3 group (1,500 mg styrene/kg body weight). The decreases in microsomal protein contents was prominent in the S3 ($p < 0.05$), but the P450 contents was increased significantly in the S2 ($p < 0.05$).

2. The activities of NADPH-P450 and NADH b_5 reductase in hepatic microsomes derived from the treated groups were significantly increased in the treated groups ($p < 0.05$).

3. The activities of PROD were also prominently increased with the treatment of styrene except in S3 group, but the activity of EROD was decreased by styrene treatment. The activities of pNPH in the styrene treated groups were higher than that of the control group ($p < 0.05$).

5. Western blotting with monoclonal antibodies against P4502B1/2 isozymes showed the presence of P4502B1/2 in hepatic microsomes from the rats treated with styrene, and the

increase in the densities of immunoblots were correlated with the dosages of styrene. The blot densities against P4501A1/2 and P4502E1 were slightly increased in the styrene treated groups compared with the control group.

These results suggested that styrene could primarily induce P4502B1/2 as major and P4501A1/2 and P4502E1 in minor forms for the metabolism of styrene in rats.

Key Words : Styrene, P450 monooxygenases, P4501A1/2, P4502B1/2, P4502E1

I. 서 론

Styrene은 지방질 및 수지류에 대한 용해성이 뛰어나 경화성 플라스틱 제조와 중합체 생성 원료로 산업체 및 실험실에서 널리 사용되고 있다 (IPCS, 1983). Styrene에 대한 연구는 사람과 동물을 대상으로 하여 대사기전 및, 독성현상과 관련한 많은 연구가 수행되고 있다 (Carlsson, 1981; 정호근 등, 1994; Nakajima 등, 1994; Kim 등, 1997).

Styrene은 호흡기계와 피부 접촉을 통하여 체내로 흡수된다 (Lauwerys와 Hoet, 1993). 흡수된 styrene은 체내의 이물질 (xenobiotics) 대사효소인 cytochrome P-450 (P450)에 의해서 styrene 7,8-oxide로 1차 대사변형된 후 (Watabe 등, 1981), epoxide hydrolase에 의하여 가수분해되어 (Cantoni 등, 1978) phenylethylene glycol로 변형된 후 phenylglyoxylic acid, benzoic acid와 hippuric acid로 배설된다 (Ohtsuji와 Ikeda, 1971). Styrene의 대사에 있어서 전반적인 대사속도의 결정은 P450에 의하여 styrene 7,8-oxide로 변형되는 단계라 할 수 있다.

P450은 함량에 따른 정도의 차이는 있으나 체내의 전반적인 기관에 분포하고 있는데, 특히 세포질 망상조직의 microsome에 cytochrome b₅ (b₅)와 함께 single polypeptide의 heme 단백질로 존재하는 독특한 단백질이다 (박기현, 1986). 이 효소는 hydroxylation, N-oxidation, sulfoxidation, peroxidation, dehalogenation 및 N-, S-deamination 등의 다양한 반응을 촉매하여 styrene 뿐만 아니라 benzene, toluene, xylene과 같은 monocyclic aromatic hydrocarbon (MAH)계 유기용제 (Parke와 Williams, 1953; Ogata 등, 1970; Cohr와 Stock-

holm, 1979), 다환고리 방향족탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 및 많은 화학물질 (김기웅 등, 1994; Lewis, 1995; 김기웅 등, 1995; Osawa 등, 1995; Rajasenani 등, 1995; Stroop 등, 1996)과 약물 등의 대사와 endogeneous substances인 fatty acid, steroid hormone, prostaglandin 등의 대사에 있어서 중요한 역할을 한다. 따라서 많은 연구자들이 화학물질 및 약물등과 같은 이물질 대사에 있어서 P450의 역할, 작용기전 및 기질에 따른 동위효소 (P450 isozymes)의 선택적 유도 (induction)등과 관련된 연구를 활발히 수행하고 있다 (Osawa 등, 1995; Sabzevari 등, 1995; Mannering과 Shoeman, 1996; Kim 등, 1997; Nakajima, 1997). Nakajima 등 (1992)에 의하면 Male Wistar계 흰쥐를 실험동물로 하여 benzene을 폭로시킨 후 P450 동위효소와 관련된 연구에서 benzene의 대사에 있어서 P4502E1 형태의 동위효소가 관여하며, toluene으로 부터 p-cresol 형성에 P4502B1/2가 관여한다고 보고 하였다. Sequeir 등 (1992)은 ethylbenzene에 의해서 P4502B1/2 동위효소가 유도된다고 하였으며, Guengerich 등 (1991)은 halogenated 유기용제인 trichloroethylene 대사에 있어서 P4502E1 동위효소가 관여한다고 보고하였다. Nakajima 등 (1994)은 유도물질을 처리하지 않은 흰쥐의 간장 microsomes을 분리하여 styrene 대사에 있어서 P450 동위효소에 대한 in vitro 실험을 한 결과, styrene을 styrene glycol로 대사변형 시키는데 P4501A1/2, P4502B1/2, P4502E1과 P4502C11/6의 동위효소가 관여한다고 보고하였다. 이와같이 styrene을 대상으로 하여 P450 동위효소와 관련된 대부분의 연구들은 in vitro 실험에 의한 연구로서 styrene 대사과정에 어떤 동위효소가 관여하는지를 관찰한 연구이다.

따라서 본 연구에서는 Sprague Dawely계 수컷 흰쥐를 이용하여 유도물질로 styrene을 처리한 후, 생체내 (in vivo)에서 styrene 폭로에 의하여 P450 의존성 효소들의 변화와 어떤 P450 동위효소가 유도되는지를 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

Bovine serum albumin (BSA), cytochrome C, EDTA, 7-ethoxyresorufin, glucose 6-phosphate, glucose 6-phosphate dehydrogenase, glycerol, KCl, NaCl, NADPH, NADH, olive oil, sucrose, TEMED 등은 Sigma 사 (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였으며, 투여물질인 styrene은 Aldrich 사 (Milwaukee, WI, USA)로 부터 구입하여 사용하였다. Western Immunoblot kit은 TROPIX 사 (Bedford, MA, USA)에서 구입하였으며, 그 밖의 일반적인 생화학 시약은 Sigma 사와 Aldrich 사로 부터 구입하여 사용하였다.

본 연구에 사용된 실험동물은 Sprague Dawley 계 6주령된 수컷 흰쥐 (170±10 g)로서 한국화학연구원 안전성센터로 부터 분양받아 실험 1주일 전부터 온도 (23±2°C), 습도 (55±5%) 및 채광조절 (12hr light/dark)된 사육장에서 사료와 음용수를 자유로이 섭취시켰으며, styrene을 투여물질로 하여 실험을 수행하였다. 실험군은 처리하지 않은 군 (VC, vehicle control), olive oil (C, control)과 500 (S1), 1,000 (S2), 1,500 (S3) mg styrene/kg 체중 투여군으로 하여 총 5개 실험군으로 하였으며 각각의 실험군은 4 마리로 하였다. 투여물질인 styrene을 olive oil에 용해시켜 1일 1회씩 2일간 연속하여 복강주사 하였으며 마지막 투여 24 시간 후에 ether로 마취시킨 다음, 즉시 간을 절제하여 실험에 사용하였다. 또한 Western immunoblot 분석에 의하여 styrene의 투여가 어떤 형태의 P450 동위효소를 유도하는지를 확인하기 위하여 사용된 3-methylcholanthrene (MC) (P4501A1/2) 과 phenobarbital (PB) (P4502B1/2)은 olive oil에 각각 20 mg/kg, 40 mg/kg으로 용해시켜 3일 동안 연속하여 복강주사한 흰쥐 간장의 micro-

somes을 사용하였으며, P4502E1 동위효소의 유도를 확인하는데 사용된 microsomes은 ethanol을 증류수에 4 g/kg 으로 희석시켜서 3일 동안 연속하여 경구투여한 후 간장에서 분리한 microsomes을 사용하였다.

2. 방법

간장의 microsomes 분획의 분리는 차등원심분리 방법 (Park과 Kim, 1984)에 의해서 분리하였으며, 분획된 microsomes은 -70°C에서 냉동보관 하여 단백질, cytochrome P-450 monooxygenase 활성도 및 Western blot 분석 등을 측정하였다.

1) P450 dependent monooxygenase 활성도 측정

Microsomal 단백질의 함량은 BSA를 표준물질로 하여 Lowry 등 (1951)의 방법에 따라 측정하였으며, P450 함량은 Omura와 Sato방법 (1964)에 따라서 microsomes에 일산화탄소 (CO)를 2분 동안 bubbling 시킨 후 450nm와 490nm에서 흡광도 차이를 측정하여 몰흡광계수 $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로부터 함량을 결정하였다. NADPH-cytochrome C (P450) reductase 활성도는 Master 등 (1967)의 방법으로 측정하였다. 반응 혼합물로 microsomes (250 μg /ml)과 0.3nmol potassium phosphate buffer (pH 7.7), 40nmol cytochrome C를 혼합한 후 0.1 nmol NADPH를 넣고 550 nm에서 3분 동안 흡광도를 측정하여 몰흡광계수 $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 reductase의 활성도를 측정하였다. NADH-cytochrome b_5 reductase의 활성도는 Hultquist (1978)의 방법에 따라서 측정하였다. 반응 혼합물로 35 nmol cytochrome C, 1.0 M EDTA, 0.1 μM Tris-HCl과 microsomes (25 μg)을 혼합한 후 60 nmol NADH를 넣고 550 nm에서 3분 동안 흡광도를 측정하여 몰흡광계수 $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 reductase 활성도를 측정하였다.

2) Catalytic enzymes 활성도 측정

기질의 종류에 따라서 P450 동위효소의 활성도가 특이성을 보이는데, P4501A는 ethoxyresorufin O-deethylase (EROD)에 대해서, P4502B는 pentoxyresorufin O-dealkylase (PROD)와

P4502E1은 p-nitrophenol hydroxylase (pNPH)에 대하여 선택적인 활성을 나타낸다.

따라서 금번 연구에서는 EROD와 PROD의 활성도는 Klotz 등의 방법에(1984) 따라서 기질의 종류를 달리하여 EROD는 ethoxyresorufin을 PROD는 pentoxyresorufin를 기질로 하여 측정하였다. pNPH의 활성도는 Koop 방법(1986)에 의해서 p-nitrophenol이 간장의 microsomes에 의해서 생성되는 4-nitrocatechol 양을 측정하여 상대적인 효소의 활성도를 측정하였다.

3) Western Immunoblot 분석

Microsomal 단백질에 대한 전기영동은 Laemmli (1970) 방법에 의해서 Bio-Rad Protein Ixi Cell apparatus를 사용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE, 8.5%)을 만든 후 각각의 시료를 10 μ 씩 gel위에 loading하여 전기영동을 실시한 후, Millipore 사 (Bedford, MA, USA)의 Immobilon-P nitrocellulose membrane을 microsomal 단백질이 분리된 gel 위에 올려 놓고 235 mA로 전류를 조절하여 Immobilon-P nitrocellulose membrane 으로 이전 시켰다. Western immunoblot 분석은 anti-mouse P4501A1/2 (MAb 1-7-1), P4502B1/2 (MAb 2-66-3)와 P4502E (MAb 1-98-1) 단일세포성항체를 이용하여 Ko 등 (1987)의 방법을 변형하여 TROPIX 사 (Bedford, MA, USA)의 Western-Light Plus™ kit을 사용하여

Chemiluminescence 방법으로 실시 하였다. 이 방법은 Immobilon-P nitrocellulose membrane 상에 결합된 항체의 작용에 의해서 chemiluminescent 기질이 분해될 때 발생하는 형광을 x-ray film에 폭로시켜 전개된 반응 띠를 관찰하여 유도를 확인하는 방법이다. 단일세포성항체는 공동연구자인 박상신 박사로부터 제공받아 실험에 사용하였다.

4) 자료분석

자료분석은 PC/SPSS 통계프로그램을 이용하여 실험군에 있어서 측정된 결과를 일원배치로 분산분석 하였고, Scheffe 방법으로 실험군간의 평균치를 비교하였다.

III. 결 과

1. P450 dependent monooxygenase 활성도 변화

실험동물로 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 이용하여 유도물질로 styrene을 처리한 후 간장의 microsomes에 있어서 단백질과 P450 함량 변화와 P450 및 b₅ reductase 활성도를 측정한 결과는 Table 1에 표시한 바와 같다. Styrene을 처리한 S1과 S2 실험군에 있어서 간장의 microsomal protein의 함량은 대조군(C)과 비교시 차이를 보이지 않았으나 vehicle (VC) 실험군과 S3군에서는 감소된 측정치를 보였다 (p<0.05).

또한, 간장의 microsomal P450 총합량은 micro-

Table 1. Effects of styrene treatment on the hepatic microsomal protein, P450 contents and activities of P450 reductase and b₅ reductase.

Treatment	Total microsomal protein (mg/ml)	P450 content (nmole/mg protein)	P450 reductase		b ₅ reductase (nmole/mg protein/min)
			(nmole/mg protein/min)		
VC	28.94±1.611	0.40±0.059	0.018±0.0013		0.303±0.0119
C	37.75±2.821	0.52±0.040	0.016±0.0011		0.261±0.0091
S1	37.42±1.909	0.56±0.033	0.022±0.0024*		0.461±0.0244*
S2	38.39±1.054	0.67±0.015*	0.022±0.0021*		0.371±0.0219*
S3	23.88±1.654*	0.48±0.076	0.021±0.0012*		0.359±0.0078*

a) Groups of rats were given intraperitoneal injections of styrene mg/kg body weight in olive oil once a day for two days and were killed 24 hrs later.

b) Values are expressed as mean±S.D. from four rats (VC, vehicle control; C, control; S1, styrene 500 mg/kg; S2, styrene 1,000 mg/kg; S3, styrene 1,500 mg/kg). * p<0.05.

somal protein의 함량변화와 비슷한 경향의 측정치를 보였는데, S2 군에서만 대조군보다 통계학적으로 유의한 증가를 나타냈다. P450은 redox 작용에 의해서 이 물질을 대사시키는데, 그러기 위해서는 전자-전달계로부터 전자가 공급 되어야 한다. 이때 P450에 전자를 전달하는 전자-전달계가 NADPH-P450 reductase와 NADH-b₅ reductase이다. 따라서 이들 reductase의 활성도가 styrene의 투여로 인하여 어떤 영향을 보이는지를 관찰하였다. 그 결과, NADPH-P450 reductase의 활성도는 대조군에서보다 styrene 처리군에 있어서 통계학적으로 유의한 활성도의 증가를 보였으나 (p<0.05) 투여량에 따른 용량-반응의 상관성은 없었다. NADH-b₅ reductase의 활성도도 NADPH-P450 reductase와 같은 경향의 결과를 보였다.

2. Catalytic enzymes 활성도 측정

PHAs계 물질의 처리에 의해서 선택적으로 유도되는 P4501A1/2 형태의 동위효소는 EROD의 활성도에 특이한 변화를 가져온다. Styrene 처리에 의해서 나타난 결과는 Table 2와 같다.

Styrene의 투여량 증가에 따라서 EROD의 활성도는 증가되는 경향을 보였으나 대조군과 비교시 styrene 투여군에 있어서 활성도의 감소가 나타났다. 그러나 S1군에서만 통계학적으로 유의한 감소를 보였다 (p<0.05). PROD 활성도는 P4502B1/2 동위효소에 특이적인 선택성을 보이는데, 측정 결과는 Table 2에 나타내었다. Styrene 투여군에 있어서의 PROD의 활성도는 대조군의 활성도 측정치인

0.326 pmol pentoxyresorufin/mg of microsomal protein/min보다 투여군 모두에 있어서 활성도의 증가를 보였으나 S3군을 제외한 기타의 투여군에서 통계학적으로 유의한 차이를 보였다 (p<0.05).

또한, ethanol과 acetone 등에 의해서 선택적인 유도가 일어나는 P4502E1 형태의 동위효소는 주로 pNPH와 aniline p-hydroxylase (AH)의 활성도에 특이한 변화를 보이는데, 금번 연구에서는 pNPH의 활성도를 측정하였다. 그 결과는 Table 2와 같다.

대조군에서의 pNPH의 활성도는 700.25 pmol 4-nitrocatechol/mg of protein/min으로 측정되었으나 styrene 투여군의 경우에 있어서 대조군의 측정치보다 투여군 모두에 있어서 통계학적으로 유의한 증가를 보였다 (p<0.05).

3. Western Immunoblot 분석

Styrene의 투여 농도를 500, 1,000, 1,500 mg/kg 체중으로 하여 2일 동안 복강 주사한 후 분리한 간장의 microsomes을 이용하여 P4501A1/2, P4502B1/2 및 P4502E1의 유도를 monoclonal antibodies를 이용하여 분석하였다.

Fig. 1.에서 볼 수 있는 바와 같이 styrene을 투여한 흰쥐 간장의 microsomes에 있어서 P4502B1/2 단백질의 양이 현저히 증가 하였으며, 투여량의 증가에 따라서 유도된 단백질의 양도 비례하여 증가되는 것을 immunoblot에서 확인할 수 있었다. 또한 P4501A1/2와 P4502E1 단백질의 양도 대조군에서보다 styrene 투여군에서 다소 증가 되었다.

Table 2. Effects of styrene treatment on the hepatic microsomal P450-dependent catalytic enzyme activities.

Treatment (mg/kg)	Enzyme Activities (pmole/mg protein/min)		
	EROD	PROD	pNPH
VC	0.856±0.1141	0.214±0.0028	846.45±3.848
C	0.864±0.0597	0.326±0.0085	700.25±27.745
S1	0.571±0.1468*	0.467±0.0363*	879.80±8.885*
S2	0.745±0.1468	0.500±0.0226*	781.04±26.933*
S3	0.788±0.0421	0.326±0.0707	1010.61±11.107*

a) Groups of rats were given intraperitoneal injections of styrene mg/kg body weight in olive oil once a day for two days and were killed 24 hrs later.

b) Values are expressed as mean±S.D. from four rats (VC, vehicle control; C, control; S1, styrene 500 mg/kg; S2, styrene 1,000 mg/kg; S3, styrene 1,500 mg/kg). * : p<0.05.

IV. 고 찰

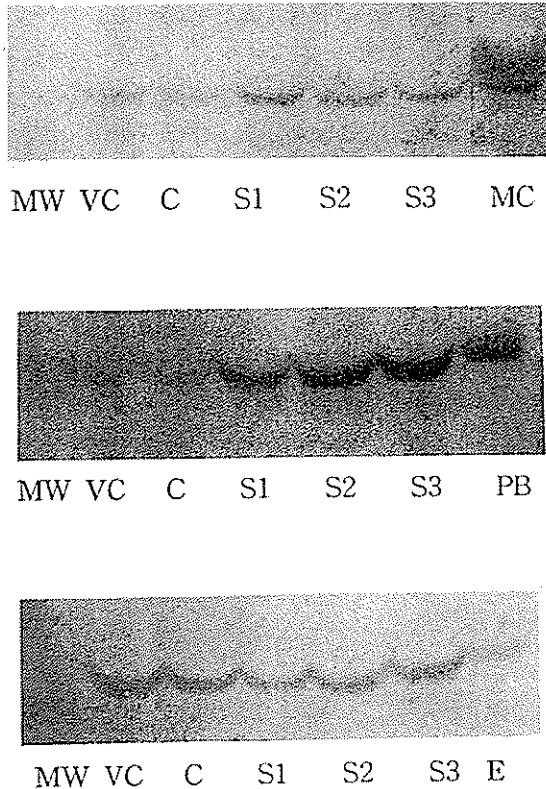


Fig. 1. Western immunoblot analysis for microsomes of rats treated with styrene utilizing mouse monoclonal anti-rat P4501A1/2, P4502B1/2 and P4502E1 antibodies. Liver microsomes (10 μ g) were loaded for the group: MW, Molecular weight (54 kDal) standard marker; VC, vehicle control; C, control; S1, styrene 500 mg/kg; S2, styrene 1,000 mg/kg; S3, styrene 1,500 mg/kg; MC, 3-Methylcholanthrene; PB, Phenobarbital; E, Ethanol a) P4501A1/2, b) P4502B1/2 and c) P4502E1.

Styrene을 olive oil에 용해시켜 흰쥐에 투여 하였으므로 olive oil에 의해서 특정한 P450의 동위효소가 유도되는지의 확인과 결과에 대한 정확한 해석을 위하여 아무런 물질도 투여하지 않은 (VC) 흰쥐 간장의 microsomes에 있어서 P4501A1/2, P4502B1/2 및 P4502E1 형태의 동위효소가 유도되는지를 측정된 결과 대조군과 차이를 보이지 않았다.

금번 연구에 있어서는 Sprague Dawley계 숫컷 흰쥐를 이용하여 styrene의 투여 농도를 500, 1,000 및 1,500mg/kg 체중으로 하여 2일 동안 복강 주사한 후 간장에 있어서 styrene의 대사에 관여하는 P450 의존성 효소의 활성도가 투여 농도 변화에 따라서 어떤 변화를 보이며, P4501A1/2, P4502B1/2 및 P4502E1 형태에 대한 monoclonal antibodies를 이용하여 생체내 (in vivo)에서 styrene이 어떤 동위효소를 유도하는지를 관찰 하였다. 먼저, 유도물질(inducer)로 styrene을 투여한 후 간장의 microsomal protein과 P450의 함량을 대조군의 측정치와 비교한 결과, microsomal protein의 함량은 S3 투여군에서 현저한 감소를 보였으며 ($p < 0.05$), P450의 함량은 S2군에서 통계학적으로 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$). 또한 P450에 의해서 이물질이 대사되는 과정에 요구되는 전자를 전달해 주는 NADPH-P450 reductase와 NADH-b₅ reductase의 활성도 변화도 대조군에서 보다 styrene 투여군에 있어서 증가된 활성도의 측정치를 보였다($p < 0.05$). 생체는 자기보호 차원에서 이물질에 대한 자발적인 방어기전을 가지고 있는데, 그러한 표현으로는 외부로부터 흡수되는 이물질에 대해 특이한 반응을 보이는 이물질 대사 효소들의 활성화 현상이라 할 수 있다. 즉, 폭로물질의 종류와 농도에 따라서 이물질 대사효소의 함량과 활성도가 변화를 보이는데 (Nebert와 Gonzalez, 1987), 금번 연구에서 styrene의 투여에 의해서 나타난 microsomal protein, P450의 함량 및 P450 의존성 전자-전달체인 NADPH-P450과 NADH b₅ reductase의 활성도 등이 증가된 결과도 자기방어 기전에 의해 이물질을 해독대사 시키기 위한 현상으로 보여진다. 이물질에 대한 해독대사 과정에서 P450의 중요한 역할은 비극성 물질을 극성 물질로 전환시켜 phase II 효소를 포함한 체내의 구성물질과 결합을 용이하게 하는 것이다. P4501A1/2 동위효소가 선택적인 특성을 갖는 기질은 PAHs계 물질로서 aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)와 EROD의 활성을 보이며 (Lu와 West, 1980), P4502B1/2 형태의 동위효소는 PROD에 활성을 보

인다 (Ryan 등, 1979; Guengerich 등, 1982). Ethanol과 acetone 등은 P4502E1/2 형태의 동위효소에 특이적인 반응을 보이는 pNPH와 AH 등에 활성을 나타낸다 (Peng 등, 1982; Ko 등, 1987; Umeno 등, 1988). 따라서 금번 연구에 있어서는 MAHs계 유기용제인 styrene의 투여농도를 달리하여 복강주사한 후 간장의 microsomes P450 의존성 촉매효소중 EROD, PROD 및 pNPH에 대한 활성도의 변화를 측정 하였다. 먼저, EROD의 활성도 변화를 보면, 대조군에서의 활성도 보다 styrene 투여군에 있어서 감소된 측정치를 보였다. 대조군과 투여군에 있어서 PROD의 활성도를 비교해 보면 S3 군을 제외한 투여군에 있어서 PROD의 활성도가 통계학적으로 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.05$). pNPH의 활성도 변화를 보면, 대조군의 활성도보다 styrene 투여군에 있어서의 활성도가 현저한 증가를 나타냈다($p < 0.05$). 이상의 결과를 보면, styrene이 P4502B1/2와 P4502E1에 선택적인 활성을 보이는 PROD와 pNPH의 활성도를 증가 시켰으나 P4501A1/2에 선택적인 활성을 보이는 EROD의 활성도는 대조군 보다 감소된 측정치를 보였다. 그러나 이들 P450 의존성 촉매효소는 기질에 따라서 선택성을 가지고 있으나 기질의 중복성도 내포하고 있어서 단지 EROD, PROD와 pNPH 활성도의 변화만 가지고 styrene에 의해서 어떤 형태의 동위효소가 유도된다고 단정할 수 만은 없다. 물론 이들 촉매효소의 활성도 변화를 가지고 어떤 형태의 동위효소가 유도될 것이라는 예상을 할 수 있다. 그러나 특정한 형태의 P450 동위효소에 대한 monoclonal antibodies를 이용한 western immunoblot 분석을 통한 결과보다는 정확하다고 볼 수 없다. 따라서 P4501A1/2, P4502B1/2 및 P4502E1에 대한 monoclonal antibodies를 이용하여 western immunoblot를 통하여 확인하였다. 유도물질로 styrene의 투여량을 달리하여 복강주사한 후 간장의 microsomes을 사용하여 얻은 결과에서는 P4502B1/2 단백질의 양적인 증가가 뚜렷이 나타났으며, 투여량의 증가에 따른 P4502B1/2 단백질의 양도 비례적으로 증가되는 것을 관찰 하였다. 또한 P4501A1/2 동위효소에 특이한 반응을 보이는 EROD의 활성도는 대조군에서 보다 styrene을 투여한 군에 있어서 감소된 측정치를 보였으나, 단일

세포성향체를 이용하여 western immunoblot한 결과, P4501A1/2 형태의 단백질이 대조군에서 보다 다소 증가된 것을 관찰 하였으며, 대조군 보다 styrene 투여군에 있어서 P4502E1 형태의 동위효소에 선택적인 활성을 보이는 pNPH의 활성도가 현저하게 증가되었으나 monoclonal antibody를 이용한 western immunoblot의 결과에서는 P4502E1 단백질의 양적인 증가가 다소 나타났으나 현저하지는 않았다. Fourman 등(1989) 과 Nakajima 등(1994)에 의한 in vitro 실험에서 styrene이 styrene glycol로 대사변형 시키는데 P4501A1/2, P4502B1/2, P4502E1 및 P4502C11/6가 관여한다고 보고하였으며, Kim 등(1997)도 사람의 간장 microsomes을 이용한 in vitro 실험에서 저농도의 styrene 대사에는 주로 P4502E1 동위효소가, 고농도의 styrene 대사에는 P4502C8과 P4502B6 형태의 동위효소가 관여한다고 보고 하였다.

금번 우리의 in vivo 실험에서는 styrene에 의해서 P4502B1/2 형태의 동위효소가 유도되며, P4501A1/2와 P4502E1 형태의 동위효소도 styrene의 대사에 관여하는 것을 단일세포성향체를 이용하여 관찰할 수 있었다. 그러나 in vitro 실험과 in vivo 실험 결과를 비교해 보면, 먼저 in vitro 실험은 styrene의 대사과정에서 어떤 형태의 P450 동위효소가 관여하는지를 밝히고자 하는 연구로 볼 수 있으나, in vivo 실험은 이물질이 체내로 흡수될 경우에 자기방어 측면에서 이들을 해독대사 시키기 위해서 어떠한 형태의 단백질이 유도발현 되는지를 분자수준에서 접근하고자 하는 연구라 볼 수 있다. 또한 in vitro 실험에서는 특정한 형태의 P450 동위효소에 영향을 줄 수 있는 요인을 어느 정도는 제거할 수 있으나 in vivo 실험에서는 생체 합성물질과 호르몬 등의 영향에 의해서 매우 복잡하다고 볼 수 있다.

따라서 금번 연구에서는 styrene의 대사에 있어서 단계별로 어떤 형태의 P450 동위효소가 관여하는지에 대한 in vitro 실험을 하지 않아서 확실히 알 수는 없지만, 생체내에서는 styrene에 의해서 주로 P4502B1/2 형태의 동위효소가 유도되는 것을 발견할 수 있었다.

본 연구는 동물을 대상으로 하여 수행한 연구결과로서 사람을 대상으로한 연구와는 다소의 차이가 있을 것으로 보인다. 그러나 styrene에 의해서

P4502B1/2 동위효소가 주로 유도된다는 결과를 얻음으로 인하여 styrene에 폭로되는 근로자에 대한 개인간의 차이에서 오는 styrene의 대사능력 및 독성현상등을 유전자 polymorphism 분석을 통한 연구를 수행하는데 기초자료가 될 것으로 보인다.

V. 결 론

Sprague Dawley계 수컷 흰쥐에 olive oil에 용해시킨 styrene을 체중 kg당 500(S1), 1,000(S2), 1,500(S3) mg을 1일 1회씩 2일간 연속하여 복강주사한 후 마지막 투여 24시간 후에 희생시켜 간장의 microsomes을 분리하여 P450 동위효소의 유도와 다른 효소의 활성도에 styrene이 미치는 영향을 연구하였다.

1. 간장의 microsomal 단백질의 함량을 대조군과 styrene 투여군을 비교한 결과 S1과 S2군에서는 차이가 없었으나 S3군에서는 통계학적으로 유의한 감소를 보였으며 ($p < 0.05$), P450의 함량 변화도 microsomal 단백질의 측정치와 비슷한 경향을 보였으나 S2군에서만 현저한 증가가 관찰되었다 ($p < 0.05$).

2. 간 microsomes의 NADPH-P450 reductase 및 NADH b₅ reductase의 활성도는 대조군 보다 styrene 처리군에 있어서 통계학적으로 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.05$).

3. P450 의존성 촉매효소의 활성도에 styrene이 미치는 영향을 본 결과, 대조군과 비교시 EROD의 활성도는 감소된 측정치를 보였으며, PROD의 활성도는 S3군을 제외한 기타의 투여군에서 현저한 증가를 보였으며 ($p < 0.05$), pNPH의 활성도는 대조군 보다 styrene 투여군 모두에 있어서 통계학적으로 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.05$).

4. 단일세포성향체를 이용하여 Western blotting한 결과, styrene을 처리한 간 microsomes에서 P4502B1/2 동위효소가 유도되었으며, styrene 투여량 증가에 따라 유도된 단백질의 양도 비례하여 증가되는 것을 immunoblot에서 확인 하였다. P4501A1/2과 P4502E1 동위효소는 styrene을 처리한 군에서 다소 증가되는 것을 관찰하였다.

이상의 결과에 있어서 styrene에 의해서 주로 P4502B1/2 동위효소가 유도되며, P4501A1/2와

P4502E1 형태의 동위효소도 다소 유도되는 것으로 보인다.

REFERENCES

- 김기웅, 강성규, 최병순, 이종성, 김종성, 문영한. Trichloroethylene 처리한 흰쥐의 이물질 대사효소의 활성도에 관한 연구. 대한산업의학회지 1994;6:323-331.
- 김기웅, 장성근, 김양호, 문영한. Cytochrome P-450 의존성 radical 전달에 의한 benzene, toluene, xylene의 대사기전 연구. 한국독성학회지 1995;11:205-213.
- 박기현. Microsomal Cytochrome P-450s의 특이성. 생화학총설집, 한국생화학회 1986;1:309-334.
- 정호근, 강성규, 양정선, 김기웅, 이종성, 조영숙, 박인정. 스티렌 폭로 근로자들의 기증 및 혈중 스티렌과 요중 만델산의 관계 분석. 대한산업의학회지 1994;6:113-121.
- Cantoni L, Salmona M, Facchinetti T, Pantarotto C, Belvedere G. Hepatic and extrahepatic formation and hydration of styrene oxide in vitro in animals of different species and sex. Toxicol Lett 1978;2:179-186.
- Carlsson A. Distribution and elimination of ¹⁴C-styrene in rat. Scand J Work Environ Health 1981;7:45-50.
- Cohr KH, Stockholm J. Toluene. a toxicology review. Scand J Work Environ Health 1979;5: 71-90.
- Fourman GI, Harris C, Guengerich FP, Bond JR. Stereoselectivity of styrene oxidation in microsomes and purified cytochrome P-450 enzymes from rat liver. J Pharmacol Exp Ther 1989;248:492-497.
- Guengerich FP, Dannan GA, Wright ST, Martin MV, Kaminsky LS. Purification and characterization of liver microsomal cytochrome P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunological properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or β -naphthoflavone. Biochemistry 1982;21:6019-6030.
- Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. Role of cytochrome IIB1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. Chem Res Toxicol 1991;4:168-179.
- Hultquist DE. Methemoglobin reduction system of erythrocytes. Methods in Enzymology 1978;52: 463-473.
- IPCS. Styrene from Environmental Health

Criteria 26. Geneva: WHO, 1983.

Kim H, Wang RS, Elovaara E, Raunio H, Pelkonen O, Aoyama T, Vainio H, Nakajima T. Cytochrome P450 isozymes responsible for the metabolism of toluene and styrene in human liver microsomes. *Xenobiotica* 1997;27:657-665.

Klotz AV, Stegemen JJ, Walch C. An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: A continuous visible spectrophotometric methods for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. *Anal Biochem* 1984;140:138-145.

Ko I-Y, Park SS, Song BJ, Patten C, Tan Y, Hah YC, Yang CS, Gelboin HV. Monoclonal Antibodies to Ethanol-Induced Rat Liver Cytochrome P-450 That Metabolizes Aniline and Nitrosamines. *Cancer Research* 1987;47:3101-3109.

Koop DR. Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol inducible cytochrome P-450 isozymes 3a. *Mol Pharmacol* 1986;29:339-404.

Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head a bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

Lauwerys RR, Hoet P. Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring. Second edition, Boca Raton, Florida, Lewis Publishers, 1993, pp 143-159.

Lewis DF. Three-dimensional models of human and other mammalian microsomal P450s constructed from an alignment with P450102 (P450bm³). *Xenobiotica* 1995;25:1355-1369.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:401-404.

Lu AYH, West SB. Multiplicity of mammalian microsomes P-450. *Pharmacol Rev* 1980;31: 277-295.

Mannering GJ, Shoeman JA. Murine cytochrome P4503A is induced by 2-methyl-3-buten-2-ol (meparfynol), and tert-amyl alcohol. *Xenobiotica* 1996;26:487-493.

Master BSS, Williams CHJr, Kamin H. The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome C reductase from pig liver. *Methods in Enzymology* 1967;10:565-580.

Nakajima T. Cytochrome P450 Isoforms and Metabolism of Volatile Hydrocarbons of Low Relative Molecular Mass. *J Occup Health* 1997;39:83-91.

Nakajima T, Wang R-S, Elovaara E, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Vainio H, Aoyama T. CYP2C11 and CYP2B1 are major cytochrome P450 forms involved in styrene oxidation in liver and lung microsomes from untreated rats, respectively. *Biochem Pharmacol* 1994;48:637-642.

Nakajima T, Wang R-S, Elovaara E, Park SS, Gelboin HV, Vainio H. A comparative study on the contribution of cytochrome P450 isozymes to metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in rat liver. *Biochem Pharmacol* 1992;43:251-257.

Nebert DW, Gonzalez FJ. P450 Gene: Structure, Evolution and Regulation. *Ann Rev Biochem* 1987;56:945-993.

Ogata M, Tomokuni K, Takatsuka Y. Urinary excretion of hippuric acid and m- or p-methyl-hippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and m- or p-xylene as a test of exposure. *Br J Ind Med* 1970;27:43-51.

Ohtsuji H, Ikeda M. The metabolism of styrene in rat and the stimulatory effect of phenobarbital. *Toxicol Appl Pharmacol* 1971;18:321-328.

Omura T, Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964;239: 2370-2378.

Osawa Y, Davila JC, Nakatsuka M, Meyer CA, Darbyshire JF. Inhibition of cytochrome P450 by reactive intermediates. *Drug Meta Rew* 1995;27: 61-72.

Parke DV, Williams RT. Studies in detoxication. The metabolism of benzene containing ¹⁴C-benzene. *Biochem J* 1953;54:231-238.

Park KH, Kim CR. Induction of the different forms cytochrome P-450 isozymes and comparison of aryl hydrocarbon hydroxylase levels on rat tissues by chemical treatment. *The Korean Biochem J* 1984;17:10-19.

Peng R, Tu YY, Yang CS. The inhibition and competitive inhibition of a high affinity microsomal nitrosodimethylamine demethylase by ethanol. *Carcinogenesis* 1982;3:1457-1461.

Rajasenan R, Riley RJ, Leeder JS. Expression and Inducibility of Antigens in Severe Combined Immunodeficient Mice Recognized by Human Anti-P450 Antibodies. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;135:89-99.

Ryan DE, Thomas PE, Korzeniowski D, Levin

W. Separation and characterization of highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyl, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene. *J Biol Chem* 1979;254: 1365-1374.

Sabzevari O, Hatcher M, O'Sullivan M, Kentish P, Gibson G. Comparative induction of cytochrome P4504A in rat hepatocyte culture by the peroxisome proliferators, bifonazole and clofibrate. *Xenobiotica* 1995;25:395-403.

Sequeir DJ, Eyer CS, Cawley GF, Nick TG, Backes WL. Ethylbenzene-mediated induction of cytochrome P450 isozymes in male and female rats. *Biochem Pharmacol* 1992;44:1171-1182.

Stroop CJM, Paul Dutmer AAH, Horbach GJ. Changes in Chromatin Structure and Nuclear Matrix Association of the Rat Cytochrome P4502B1/2 (CYP2B1/2) Gene Following Induction with Phenobarbital. *J Biochem Toxicol* 1996;11: 59-65.

Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Human ethanol-inducible P450IIE1: Complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry* 1988;27:9006-9013.

Watabe T, Ozawa N, Yoshikawa K. Stereochemistry in the oxidative metabolism of styrene by hepatic microsomes. *Biochem Pharmacol* 1981;30:1695-1698.