

細胞色素P450之酵素調控及毒理意義

翁祖輝 康熙洲 趙裔智 陳怡蓓

國立台灣大學醫學院毒理學研究所

摘要

藥物或環境化合物的藥效或毒性與其代謝有密切的關係。細胞色素P450 (Cytochrome P450) 酵素系統負責許多藥物、致癌物、食品添加物、環境污染物的氧化代謝反應。P450系統有龐多同功酵素，因此造成其廣泛受質特異性，目前P450依其氨基酸序列有統一的命名系統。微粒體P450酵素系統受不同生理及環境因子所調控，在調控過程表現出明顯的種族及組織特異性，此特性在危險評估及考量毒性標的器官時是重要考慮因素。P450酵素可受許多化學物質所誘導，典型誘導物包括苯巴比妥、3-甲基膽蒽及乙醇等。P450可受許多藥物、化合物、及天然物之純品或混合物所抑制。P450基因調控機轉有多樣性，在轉錄、轉譯階段都可被不同因素調控。P450的多型性在藥物代謝方面及疾病感受性具有重要意義。表現人類P450基因的細胞株對瞭解P450在藥物代謝或毒性會有重要貢獻。鈣離子進入細胞之機轉調控可能與P450有關連。傳統中藥對P450同功酵素可能產生誘導或抑制的作用。最後討論未來P450研究走向。

關鍵詞: 細胞色素P450，單氧酵素，誘導，抑制，藥物毒性。

前言

細胞色素P450(Cytochrome P450, 簡稱P450)是生物體內代謝外來物質包括藥物、食品添加物、致癌物及環境污染物最重要的酵素之一。P450酵素系統也能代謝許多內生性物質如脂肪酸、類固醇及維他命等。P450鐵基質蛋白代謝外來物質時是將外來物質的毒性降低，但是有時P450在代謝後卻將外來物質毒性激發成對人或動物具有致突變性、致癌性或致畸胎性的產物，因此P450同時具有解毒及代謝活化的雙重角色。外來物代謝酵素P450主要存在於內質網。將近30年P450研究發展過程有許多重要的階段，如肝切片及微粒體代謝能力的發現、微粒體P450鐵基質蛋白與一氧化碳結合產生在450nm的光譜、酵素活性的分析、誘導研究現象及調控機轉之起步及蓬勃發展、P450蛋白純化及酵素系統的重組、P450多源及單源抗

體的抗體的培養、P450cDNA的選殖及定序、P450構造及功能探討。這些方面的重要研究成果在其他綜論文章都有非常精闢的討論^(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)。本篇綜論主要目的在提供P450一般生化及毒理概念、P450調控機轉及P450在藥理、生理、毒性測試的部份運用。本文另一目的是提供各研究領域的科學工作人員一些P450研究現況，並且希望能引發研究興趣或構想。

細胞色素P450之多樣性(Multiplicity)

P450在自然界中分佈廣泛，細菌、植物、魚類、鳥類、哺乳動物及人類都含有P450。在高等動物中，大部份P450代謝酵素存在肝，這些P450也存在腎、肺、腦、性腺及皮膚等器官。代謝藥物等外來物質的P450主要在內質網，因為在抽取內質網過程所得到的是微粒體，因此一般稱微粒體P450(microsomal

P450)。也有P450存在於粒線體膜內生物質代謝合成⁽⁸⁾，在細菌*Pseudomonas putida*, *Bacillus megaterium* 中P450是存在胞漿中⁽⁹⁾。P450可以代謝的化學物質龐雜⁽³⁾，目前大約有300多種P450同功酵素，多種P450的命名方式從前極為複雜，在最近幾年已有統一命名方式廣被接受，此命名方式是Nebert等人依氨基酸順序不同來區別P450⁽¹⁰⁾，此系統將Cytochrome P450中之CYP做為字頭，再用阿拉伯數字1,2,3,4...做為P450的族 (family)，接著用英文大寫字母A,B,C,D...做為P450的亞科 (subfamily)，最後再用阿拉伯數字指明P450的成員 (member)，例如CYP3A4、CYP2D6則分別代表重要的環境污染物及藥物代謝酵素。目前P450大家族 (superfamily) 有36族，其中哺乳動物P450有12族及22亞科。第1,2,3,4 P450族負責藥物及食品中之外來物的代謝，主要表現於肝，肝外器官也有相當含量。第17,19,21,22 P450族則負責哺乳動物肝外組織膽固醇及類固醇荷爾蒙之代謝。一般而言，同一亞科內P450氨基酸順序有約55%的相似性，在同一族P450則有約40%的相似性。CYP命名系統的確對初學P450的人解除了許多不必要的障礙，例如大鼠CYP1A1從前在不同實驗室分別被稱為P-448⁽¹¹⁾、P-450c⁽¹²⁾、P-450 bNF-B⁽¹³⁾。

鑑別不同P450同功酵素大約有6種標準，這些鑑別標準的建立應歸功於Lu和Coon⁽¹⁴⁾首次成功將P450純化並重組酵素系統之催化活性⁽⁶⁾，不斷改進純化技術導致大量P450蛋白得以研究P450結構及培養其抗體^(15, 16)。P450鑑別標準為一氧化碳差異光譜、sodium dodecyl sulfate-聚丙烯膠電泳、酵素活性、免疫化學分析、胜肽圖譜及氨基酸順序⁽¹⁾。雖然最終極的方法是氨基酸順序，但在研究過程其他五種標準中兩、三種就可大致讓研究者推知是否為不同的P450同功酵素。

從藥物、食品分析研究觀點而言，P450的多樣性使研究外來物之代謝與毒性更形複雜，然而微粒體是可簡易獲得之生化系統，可供P450外來物交互作用研究之用。由微粒體研究經常可獲得不同P450同功酵素對藥、毒物代謝毒性所扮演的角色之重要訊息，提供更進一步研究之良好基礎資料。

細胞色素P450之調控

P450酵素系統極易受許多生理及環境因素之調控而產生誘導(induction)及抑制(inhibition)的現象，這種調控作用對藥物或環境化合物產生之藥效或毒性有極重要的影響。一般而言，對藥物及外來物代謝毒性影響因素包括種、組織、性別、年齡、食物、疾病、營養狀況及化學物暴露。許多研究顯示實驗動物P450可受多類化學物之誘導或抑制，這些P450誘導物或抑制物對瞭解P450調控機轉及P450在外來物代謝及毒性所扮演的角色有很大的貢獻^(17, 18, 19, 20, 21)。一般P450之誘導物可分成四大類。第一類以苯巴比妥(phenobarbital, PB)為代表性化學物，最易被PB誘導之P450為2B1/2。第二類屬多環芳香烴及衍生物以3-甲基膽蒽(3-methylcholanthrene, 3-MC)為代表物，最能誘導P4501A1。世紀之毒戴奧辛(2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin, TCDD)也屬此類誘導物。第三類為以乙醇(ethanol)為代表物，此類誘導物經常是強的P4502E1誘導物。第四類則以pregnenolone 16 α -carbonitrile(PCN)為P4503A1最強的誘導劑為代表。在此值得一提的是多氯聯苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)同時具有PB及3-MC誘導P4502B1及1A1之能力^(22, 23)，其原因是PCBs含有許多同質異構物(isomers)，這些同質異構物又可分成類似PB或3-MC的誘導物。在考慮藥品或環污物誘導能力時，化學物質本身的純度極為重要，有些少量不純物質是非常強的P450誘導物，如多氯聯苯或垃圾燃燒物中的polychlorinated dibenzofuran(PCDF)是極強的P4501A1的誘導物就是一例⁽²³⁾。

P450調控機轉也有多樣性。在許多階段包括基因轉錄，RNA處理修飾(processing)、穩定及轉譯，酵素穩定，都有一種或多種P450經由這種機轉而調控其不同組織或細胞表現^(8, 21)。在P450調控機轉研究中最徹底的應為P4501A1，此P450具有重要毒理學意義，因為它是Polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)所誘導的主要P450，同時也是動物或人體最重要的PAH類致癌物的代謝酵素^(24, 25)。P4501A1誘導機轉有一aryl hydrocarbon(Ah)或TCDD受體(receptor)所參與。最近研究顯示Ah受體在細胞漿中是和一heat shock protein (hsp)結合成一不具誘導P450能力的複合體(complex)，當Ah或TCDD進入細胞與此Ah受體複合體結合後會釋出hsp而與另一Ah receptor nuclear translocator (Arnt)複合後，轉移至細胞核內和P4501A1基

因5'上游的xenobiotic responsive element (XRE) 結合⁽²⁶⁾ 而後啟動P4501A1的轉錄作用。除了XRE外，也有數據顯示有其他調控位置供轉錄因子(transcription factor)及可能的抑制因子(repressor)的結合。在這一連串的誘導作用後產生更多的P4501A1蛋白和細胞中鐵基質結合後，嵌入內質網膜上，進行將PAH型化合物代謝成毒性較低的氧化反應，如 aryl hydrocarbon hydroxylation (AHH)，而將代謝物排除至細胞外，也有將毒物代謝活化成更具毒性之產物產生許多致突變性或致癌性之毒理作用⁽¹⁹⁾。最近 Nebert⁽⁷⁾提出一新觀念，Ah locus製造出之Ah receptor可調控多種藥物、毒物代謝酵素的基因聯組(gene battery)除了P4501A1外，還有P4501A2、phase II 酵素含 glutathione S-transferase(Gsta 1)，UDP-glucuronosyltransferase (Ugt1* 06)，NAD(P)H: menadione oxidoreductase(Nmo1)，aldehyde dehydrogenase(Ahd4)。這個基因聯組可同時並且迅速的誘導一套外來物代謝酵素，提供細胞對不同化學物之進行多種生物轉換反應。

P4501A1誘導機轉有Ah受體的參與，因此根據構效關係原理，強的P4501A1誘導物皆為PAH類似TCDD的結構。其中研究最多者為3-MC、 β -naphthoflavone、及benzo(a)pyrene等。和P4501A1極不相同的是P4502E1，它可被ethanol誘導之外，尚可被acetone、isoniazid、trichloroethylene等不具化學結構相似性的藥物及有機溶劑所誘導^(27, 28)。這個現象反映出在誘導P4502E1機轉較不可能有受體的參與，事實上誘導2E1這個重要藥物及致癌物代謝酵素機轉尚未有受質的報導，其他機轉如蛋白的穩定及機因轉錄的誘導在不同動物中已被證實存在^(29, 30)。

P450的種(species)和組織(tissue)的差異性可由其誘導性表現出。這種差異性在藥物或毒物的藥性或毒性的跨種外推(species extrapolation)或標的器官之評估時扮演中極重要的角色。例如，環境污染物多氯聯苯是大鼠肝、肺P450的強誘導物^(22, 31)，但是在兔肝中PCBs無明顯的誘導作用，在兔肺中，PCBs更是強的P450抑制物^(32, 33, 34)。代謝酵素種及組織差異性可用乙醇誘導P450再做討論(Fig.1)。乙醇對大鼠P4502E1的誘導作用大於對倉鼠及兔P4502E1的誘導作用^(35, 36, 37, 38)。乙醇能誘導倉鼠腎、肺及兔腎P4502E1，但是對兔肺

P4502E1則無明顯誘導作用。乙醇對大鼠P4502B1有誘導作用，但在倉鼠中，乙醇卻是P4502B的抑制物。乙醇對人P4502E1及2B之調控作用至今仍無明確報導。上述PCBs及乙醇例子很明顯的指出P450的組織及種的差異性，很難對其誘導性在跨種、跨組織做統一性的預測，這特點對藥物、食品及環境污染物之毒理研究分析及危險評估而言是一重要的考慮因素。

雖然大部份P450文獻報導重於P450誘導作用，但是也有許多研究專注於P450的抑制作用^(39, 40, 41)，許多生理及環境因素如疾病及不良營養狀況，暴露於環境污染物如重金屬含鉛、鎘、汞等，對動物及人類P450能有抑制作用。抑制P450的化學物質含藥物、食品添加物等其他環污化合物。P450抑制物依其作用機轉一般可分為三類，第一類是可逆性抑制物，如metyrapone能和P450蛋白及/或鐵基質產生可逆性的親脂結合及鐵離子共軛結合，第二類是抑制物如chloramphenicol是需經過P450代謝後與P450蛋白共價結合而產生抑制作用，第三類如aminogluthethimide則抑制特定之類固醇代謝酵素如aromatase的活性。P450抑制物對P450的代謝機轉或結構研究有許多貢獻，最近也有已知一些化學物質具有潛能可發展成一些特定P450同功酵素的抑制物⁽⁴²⁾。有趣的是藥物及食品中合成或天然類黃酮(flavonoids)可抑制或增加動物或人類P450酵素活性^(5, 17)，這些抑制或增加活性作用機轉除了直接與P450結合產生抑制作用外，可能藉由間接機轉如增加P450代謝受質時所需電子輸送的效率。除了純品外，一些含高量類黃酮的天然物萃取物對P450也有抑制作用。例如葡萄柚汁對阻斷鈣離子通道藥物nifedipine及dihydropyridine之代謝具有抑制作用⁽⁵⁾。

細胞色素P450之多型性(polymorphism)

細胞色素P450 參與了大部份外來物及一些內生性物質的代謝，由於物種演進，適應及突變等因素，造成了生物及人類個體間 P450在活性表現或基因上的差異性⁽⁴³⁾，這種非一致性的現象並非只存在P450 酵素系統，例如N-acetyltransferase多型性在藥物及致癌物代謝也扮演重要角色⁽⁴⁴⁾。但因為P450系統是代謝外

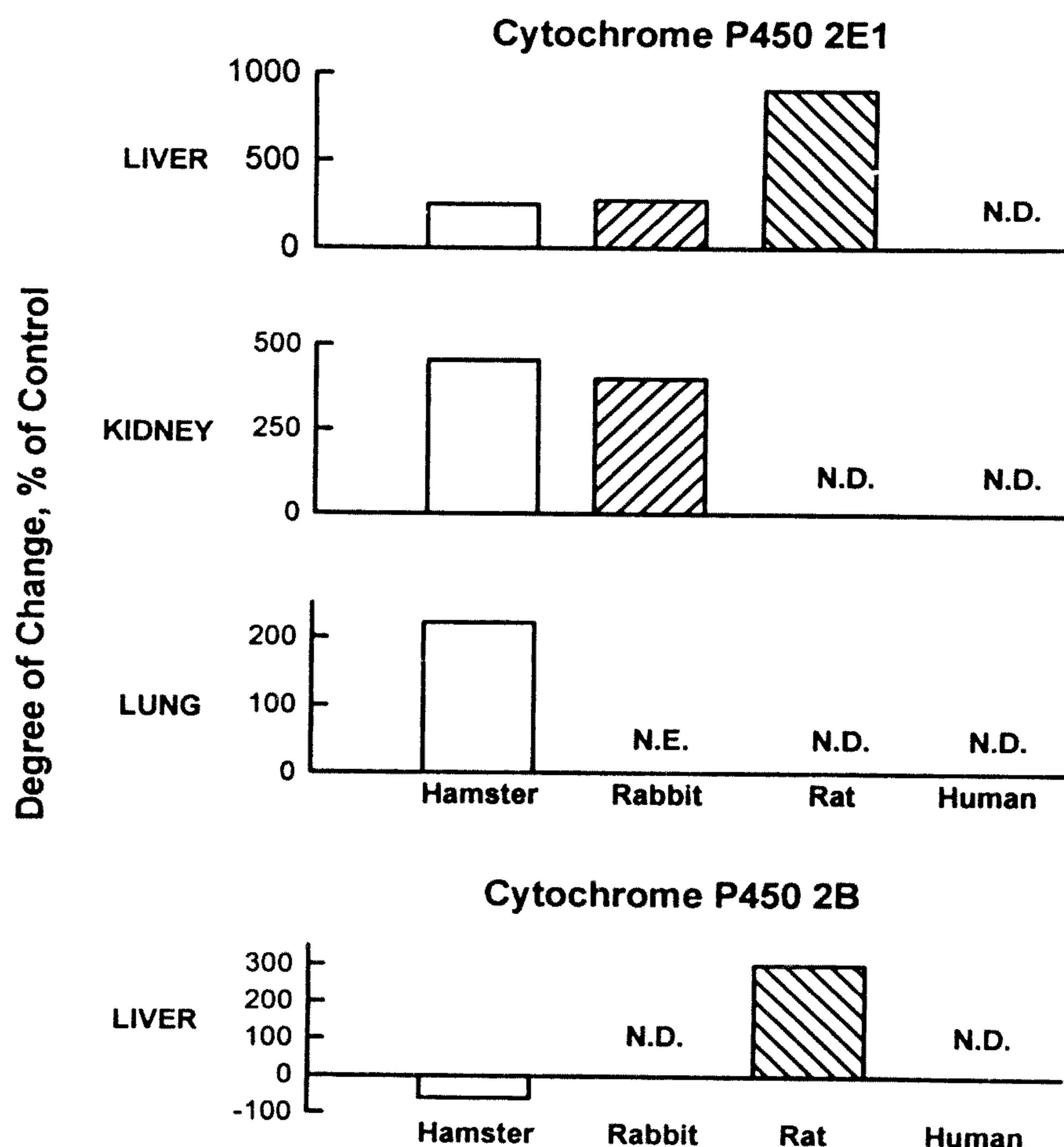


Figure 1. Changes of cytochromes P450 2E1 and 2B protein levels elicited by ethanol administration in various species. Each bar represents the degree of increase or decrease of P450 protein expressed as % of the protein level in control animals. Data were obtained from densitometric analysis of immunoblots of liver microsomes from controls and animals administered ethanol^(35,36,37,38). N.D.: not determined; N.E.: no effect.

來物質重要的酵素,尤其是參與某些致癌物質的活化過程,因此近來許多學者即針對P450的多型性與癌症之間的相關性做研究,例如:有研究指出異常的P4501A1、2E1基因型即與肺癌的罹患有關^(45,46),此類基因可能會製造出高活性的酵素進而增加了致癌物質被活化的機會。P450的多型性最明顯是影響到藥物及內生性物質的代謝,P4502D6就是一個常被舉出影響藥物代謝的例子⁽⁴⁷⁾,由於P4502D6基因的變異,會產生活性較低的酵素,擁有這種基因變異型的人代謝某些藥物的能力較差,例如降血壓藥debrisoquin。而在內生性物質代謝上,P45011B2的差異性則影響到醛類脂醇(alosterone)生合成中羥基化步驟的進行⁽⁴⁸⁾。因此P450酵素系統的多型性不論是對外來物或內生

性物質的代謝都有很大的影響。

根據目前的研究P450的多型性在人種間亦有分佈的差異性,如P4502D6多型性有種族差異性,在白人中約有5%到10%屬差的代謝能力,但是在台灣的中國人2D6差的代謝者只有約1%⁽⁴⁹⁾。以P4501A1為例,罹患肺癌者其基因具有突變的日本人約30-33%⁽⁵⁰⁾美國黑人約17%,而高加索人種有9-14%⁽⁵¹⁾,因而有學者推論這種基因分佈的差異性或許與人種罹患肺癌的比率有相關性⁽⁵²⁾。所以P450的多型性不單只是一個基礎科學上的研究,更是臨床及公共衛生上的問題。由於研究方法的進步,愈來愈多有關不同P450的多型性被發現,不論是對致癌性的調查或是藥物、內生性物質代謝的差異及其他研究,都有顯著成果,但是因為

Table 1. Changes of cytochrome P450-dependent catalytic activities elicited by scutellariae radix, gentianae scabrae radix, and lung-tan-hsieh-gan-tang (LTX) in rat liver

Assay	Control	LTX	Gentianae Scabrae Radix	Scutellariae Radix
Aryl hydrocarbon hydroxylation, pmol OHBP/ min/mg protein	335 ± 12	331 ± 76	503 ± 56 *	425 ± 89
Pentoxyreso- rufin O- dealkylation, pmol/RF/min /mg protein	19 ± 3	23 ± 4	18 ± 5	9 ± 1 *

Male Wistar rats were pretreated orally with scutellariae radix, gentianae scabrae radix, and Lung-Tan-Hsieh-Gan-Tang (LTX) at 2, 2, and 6 g/kg/day for 4 days, respectively. Liver microsomes were prepared and catalytic activities were determined. Data were taken from Kang et al. ⁽⁶⁴⁾. Each value represents mean ± S.E. for at least 5 animals.

* Value significantly different from the respective control value, *p* < 0.05.

P450酵素家族非常龐雜，所以要完全瞭解P450多型性對人類之藥物食品代謝及毒性的意義可能還需要更多、更精進的分子流病及其他有關研究。

細胞色素P450表現於細胞株

藥品或環境用藥在上市之前，必需要有詳細的毒理資料，及對人體健康所可能產生的影響之評估。這些相關毒性試驗或基礎毒理研究中經常需要使用動物作為研究模式。儘管動物實驗模式有許多優點，也有其他模式無法取代者，但是因應社會觀念改變及經濟、時間等考慮因素，逐漸有強烈需要在決定毒性試驗時考慮用其他生物模式來取代動物模式。近代生物技術的發展對P450之毒理研究也有直接貢獻，利用新的生物技術已經可以將不同P450基因包括人類P450基因長期穩定表現於人類β-淋巴胚瘤AHH-1TK+/-細胞，小鼠胚胎C3H10T1/2細胞，倉鼠V79及CHO細胞，也可將P450基因短暫表現於HepG2，HeLa細胞。這些表現P450

的細胞株已經成功的用於偵測藥物及環境化合物如aflatoxin B₁, benzo(a)pyrene, 2-amino-3-methyl-imidazo [4,5-f] quinolone(IQ)的毒性，並且更重要是瞭解人類P450在這些藥物、環境化合物之代謝與毒性中的意義^(53, 54, 55)。另外利用細菌或酵母菌可大量表現正常或突變P450基因，所得純化後P450酵素除了提供代謝與毒性研究之外，也可供P450蛋白構造與功能探討之用⁽⁵⁶⁾。

細胞色素P450與鈣離子傳送

Alvarez等人認為P450可能與細胞內鈣離子濃度的調控有關，他們證實P450的抑制物，尤其P4501A的抑制物，在大鼠胸腺細胞中會阻斷因內部儲存鈣之排空所引發之鈣灌流^(57, 58)。他們亦證實攜鈣素(calmodulin)的拮抗物會增加細胞膜對錳離子的通透性，此通透性亦可被P450的抑制物所阻斷。根據這些觀察，他們提出了以下的假設：在鈣離子儲存內質網胞器中，存有一可藉活化P450而開啟細胞膜之鈣離

子通道的因子。此活性可被經由一種攜鈣素相關之機制所抑制。Aussel等人於T細胞中亦發現類似的結果，P450抑制物包括 α -naphthoflavone、imidazole antimycotics、econazole、clotrimazole及miconazole，和脂肪氧化酵素(lipoxygenase)抑制物nordihydroguaiaretic acid及eicosatetraenoic acid⁽⁵⁹⁾。這些物質，以阻斷鈣離子進入的方式，減少CD3所誘導之人類T細胞增生。最近從Graier等人對內皮細胞的研究中發現花生四烯酸(arachidonic acid)的代謝物 5,6-epoxyeicosatrienoic acid(5,6-EET)是活化內皮細胞鈣離子進入的第二信息(second messenger)⁽⁶⁰⁾，而5,6-EET是花生四烯酸經由NADPH相關之P450單氧酵素所合成。P450可調控質膜鈣離子通透性之假說似乎在嗜中性球、胸腺細胞及內皮細胞中已有研究，然而，此機制是否在其他類型的細胞中亦存在，以及此機制在生理上之重要性仍有待進一步探討。

細胞色素P450與傳統中藥之研究

傳統中藥一向是國人及國際藥學、藥理研究重要課題之一。在迫切需要將傳統中藥科學化及標準化之際，中藥毒理研究也漸被重視，文獻中也陸續有中藥材或成分對P450酵素系統及其他代謝酵素的報導，如人參、甘草及異奎林生物鹼能誘導大鼠肝微粒體P450含量及相關單氧酵素代謝活性。中藥之誘導P450作用和保肝對抗CCl₄肝毒性之現象同時發生，因此有可能中藥所誘導之P450或其他酵素具有解毒功能⁽⁶¹⁾。除了誘導作用外，也有報導指出中藥具有抑制P450及代謝酵素的能力，半枝蓮及百花蛇舌草的水萃取物對大鼠肝微粒體P4501A1相關的7-ethoxyresorufin O-deethylation活性產生體外的抑制作用⁽⁶²⁾，對致癌物benzo(a)pyrene之DNA結合及代謝也產生抑制作用。黃芩萃取物中的類黃酮也具有降低大鼠肝代謝酵素NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase的能力⁽⁶³⁾。龍膽瀉肝湯(Lung-Tan-Hsieh-Gan-Tang)是國人最常用中藥材之一，其中成分含龍膽草(gentianae scabrae radix)、黃芩(scutellariae radix)、山梔子、木通、澤瀉、甘草等。將龍膽瀉肝湯複方、龍膽草及黃芩單方抽取物分別餵食大鼠後對肝微粒體P450系統產生不同的變化⁽⁶⁴⁾。龍膽草增加AHH活性，黃芩卻降低pentoxyresorufin代謝活性(Table 1)，免疫轉印分析

結果顯示龍膽瀉肝湯及黃芩可誘導一種P4501A1相關的蛋白，龍膽草則無影響。這些結果指出中藥材成分對藥物代謝酵素能產生許多微妙的調控作用，至於各成分之間是否有加成或拮抗等不同的交互作用，及其對藥物代謝或毒性的影響，更值得繼續研究。此類型P450研究對傳統中藥的科學化或標準化將有幫助。

結 論

在這30年來P450研究領域就像其他酵素和蛋白研究領域一樣，在研究技術有驚人的發展。P450的三世紀研究發展對藥物、環境化合物的生化及毒理研究有密切的關係，互相之間也有重要的相輔相成之貢獻。將來P450的研究發展有許多方向，如研究人類P450同功酵素在藥物及環境化合物之代謝與毒性所扮演的角色，發展利用非侵襲性方法檢驗不同族群之P450並預知人類對疾病的感受性，研究一套可同時表現許多人類P450同功酵素及代謝酵素之細胞株系統篩檢外來物毒性，另外對P450的正常生理功能也應繼續探討。這些研究方向都需有完整的P450基礎生物醫學研究為基礎及其他相關研究領域之配合。

誌 謝

本文研究承蒙行政院衛生署委託研究計畫DOH-84-HR-307及DOH-85-HR-307資助，謹此致謝。

參考文獻

1. Lu, A.Y.H. and West, S.B. 1980. Multiplicity of Mammalian Cytochromes P-450. *Pharmacol. Rev.* 31: 277-296.
2. Alvares, A.P. 1981. Cytochrome P-450s: Research Highlights of the Last Two Decades. *Drug Metab. Rev.* 12: 431-436.
3. Coon, M.J., Ding, X., Pernecky, S.J. and Vaz, A.D.N. 1992. Cytochrome P450: Progress and Predictions. *FASEB J.* 6: 669-673.
4. Gonzalez, F.J. 1992. Human Cytochromes P450: Problems and Prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* 13:346-352.
5. Guengerich, F.P. 1995. Influence of Nutrients

- and Other Dietary Materials on Cytochrome P-450 Enzymes. *Am. J. Clin. Nutr.* 61 (suppl.) : 651S-658S.
6. Ryan, D.E. and Levin, W. 1990. Purification and Characterization of Hepatic Microsomal Cytochrome P-450. *Pharmac. Ther.* 45: 153-239.
7. Nebert, D.W. 1994. Drug-Metabolizing Enzymes in Ligand-Modulated Transcription. *Biochem. Pharmacol.* 47: 25-37.
8. Porter, T.D. and Coon, M.J. 1991. Cytochrome P450. Multiplicity of Isoforms, Substrates, and Catalytic and Regulatory Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 266: 13469-13472.
9. Fulco, A.J. 1991. P450_{BM-3} and Other Inducible Bacterial P450 Cytochromes: Biochemistry and Regulation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31: 177-203.
10. Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K. and Nebert, D.W. 1993. The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12: 1-51.
11. Alvares, A.P., Schilling, G., Levin, W. and Kuntzman, R. 1967. Studies on the Induction of CO-Binding Pigments in Liver Microsomes by Phenobarbital and 3-Methylcholanthrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29: 521-526.
12. Ryan, D.E., Thomas, P.E., Korzenioski, D. and Levin, W. 1979. Separation and Characterization of Highly Purified Forms of Liver Microsomal Cytochrome P-450 from Rats Treated with Polychlorinated Biphenyls, Phenobarbital, and 3-Methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* 254: 1365-1374.
13. Guengerich, F.P. 1977. Separation and Purification of Multiple Forms of Microsomal Cytochromes P-450: Activities of Different Forms of Cytochromes P-450 towards Several Compounds of Environmental Interests. *J. Biol. Chem.* 252: 2970-3979.
14. Lu, A.Y.H. and Coon, M.J. 1968. Role of Hemoprotein P-450 in Fatty Acid ω -Hydroxylation System from Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* 243: 1331-1332.
15. Park, S.S., Fujino, T., West, D., Guengerich, F.P. and Gelboin, H.V. 1982. Monoclonal Antibodies Inhibiting Enzyme Activity of Cytochrome P-450 from 3-Methylcholanthrene-Treated Rats. *Cancer Res.* 42: 1798-1808.
16. Gelboin, H.V. 1993. Cytochrome P450 and Monoclonal Antibodies. *Pharmacol. Rev.* 45: 413-453.
17. Conney, A.H. 1982. Induction of Microsomal Enzymes by Foreign Chemicals and Carcinogenesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* 42: 4875-4917.
18. Whitlock, Jr. J.P. 1986. The Regulation of Cytochrome P-450 Gene Expression. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26: 333-369.
19. Nebert, D.W. and Gonzalez, F.J. 1987. P450 Genes: Structure, Evolution, and Regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 945-993.
20. Gonzalez, F.J. 1989. The Molecular Biology of Cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* 40: 243-288.
21. Okey, A.B. 1990. Enzyme Induction in the Cytochrome P-450 System. *Pharmac. Ther.* 45: 241-298.
22. Alvares, A.P. and Kappas, A. 1977. Heterogeneity of Cytochrome P-450s Induced by Polychlorinated Biphenyls. *J. Biol. Chem.* 252: 6373-6378.
23. Safe, S.H. 1994. Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Environmental Impact, Biochemical and Toxic Responses, and Implications for Risk Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 24: 87-149.
24. Guengerich, F.P. 1992. Metabolic Activation of Carcinogens. *Pharmac. Ther.* 54: 17-61.
25. Gonzalez, F.J. and Gelboin, H.V. 1994. Role of Human Cytochromes P450 in the Metabolic Activation of Chemical Carcinogens and Toxins. *Drug Metab. Rev.*

- 26: 165-183.
26. Gonzalez, F.J., Liu, S.-Y. and Yano, M. 1993. Regulation of Cytochrome P450 Genes: Molecular Mechanism. *Pharmacogenetics* 3: 51-57.
27. Koop, D.R., Crump, B.L., Nordblom, G.D. and Coon, M.J. 1985. Immunochemical Evidence for Induction of the Alcohol-oxidizing Cytochrome P-450 of Rabbit Liver Microsomes by Diverse Agents: Ethanol, Imidazole, Trichloroethylene, Acetone, Pyrazole, and Isoniazid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4065-4069.
28. Yang, C.S., Yoo, J.-S. H., Ishizaki, H. and Hong, J. 1990. Cytochrome P450IIE1: Roles in Nitrosamine Metabolism and Mechanisms of Regulation. *Drug Metab. Rev.* 22: 147-159.
29. Song, B.-J., Veech, R.L., Park, S.S., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J. 1989. Induction of Rat Hepatic N-Nitrosodimethylamine Demethylase by Acetone is Due to Protein Stabilization. *J. Biol. Chem.* 264: 3568-3572.
30. Song, B.-J., Gelboin, H.V., Park, S.S., Yang, C.S. and Gonzalez, F.J. 1986. Complementary DNA and Protein Sequences of Ethanol-inducible Rat and Human Cytochrome P-450s. *J. Biol. Chem.* 261: 16689-16697.
31. Alvares, A.P. and Ueng, T.-H. 1987. Regulation of Pulmonary Cytochromes P-450 by Xenobiotics. In "Current Topics in Pulmonary Pharmacology and Toxicology" Vol. 2, pp. 136-159. Hollinger M.A. (ed) Elsevier, New York, U.S.A.
32. Ueng, T.-H., Eiseman, J.-L. and Alvares, A.P. 1980. Inhibition of Pulmonary Cytochrome P-450 and Benzo(a)pyrene Hydroxylase in Rabbits by Polychlorinated Biphenyls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 1743-1749.
33. Ueng, T.-H. and Alvares, A.P. 1981. Selective Loss of Pulmonary Cytochrome P-450I in Rabbits Pretreated with Polychlorinated Biphenyls. *J. Biol. Chem.* 256: 7536-7542.
34. Ueng, T.-H. and Alvares, A.P. 1985. Selective Induction and Inhibition of Liver and Lung Cytochrome P-450-Dependent Monooxygenases by the PCBs Mixture, Aroclor 1016. *Toxicology.* 35: 83-94.
35. Johansson, I., Ekstrom, G., Scholte, B., Puzycki, D., Jornvall, H. and Ingelman-Sundberg, M. 1988. Ethanol-, Fasting-, and Acetone-inducible Cytochromes P-450 in Rat Liver: Regulation and Characteristics of Enzymes Belonging to the IIB and IIE Gene Subfamilies. *Biochemistry* 27: 1925-1934.
36. Porter, T.D., Khani, S. and Coon, M.J. 1989. Induction and Tissue-specific Expression of Rabbit Cytochrome P450IIE1 and IIE2 Genes. *Mol. Pharmacol.* 89: 61-65.
37. Ueng, T.-H., Friedman, F.K., Miller, H., Park, S.S., Gelboin, H.V. and Alvares, A.P. 1987. Studies on Ethanol-inducible Cytochrome P-450 in Rabbit Liver, Lungs and Kidneys. *Biochem. Pharmacol.* 36: 2689-2691.
38. Ueng, T.-H., Ueng, Y.-F., Tsai, J.-N., Chao, I.-C., Chen, T.-L., Park, S.S., Iwasaki, M. and Guengerich, F.P. 1993. Induction and Inhibition of Cytochrome P-450-dependent Monooxygenases in Hamster Tissues by Ethanol. *Toxicology.* 81: 145-154.
39. Ortiz de Montellano, P.R. and Reich, N.O. 1986. Inhibition of Cytochrome P-450 Enzymes. In "Cytochrome P-450" pp. 273-314. Ortiz de Montellano, P.R. (ed) Plenum Publishing, New York, U.S.A.
40. Murray, M. 1987. Mechanism of the Inhibition of Cytochrome P-450-mediated Drug Oxidation by Therapeutic Agents. *Drug Metab. Rev.* 18: 55-81.
41. Testa, B. 1990. Mechanisms of Inhibition of Xenobiotic-metabolizing Enzymes. *Xenobiotica.* 20: 1129-1137.
42. 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.
43. Nebert, D.W. 1991. Role of Genetics and Drug Metabolism in Human Cancer Risk. *Mutat. Res.* 247: 267-281.
44. Kadlubar, F.F. 1994. Biochemical Individuality and its Implications for Drug and Carcinogen Metabolism: Recent Insights

- from Acetyltransferase and Cytochrome P4501A2 Phenotyping and Genotyping in Humans. *Drug Metab. Rev.* 26: 37-46.
45. Kaname, K., Kei, N., Kazue, I., Akira, Y., Nahomi, S. and Junko, W. 1990. Identification of Genetically High Risk Individuals to Lung Cancer by DNA Polymorphisms of the Cytochrome P4501A1 Gene. *FEBS Lett.* 263: 131-133.
46. Kato, S., Shield, P.G., Caporaso, N.E., Sugimura, H., Trivers, G.E, Tucker, M.A., Trump, B.F., Weston, A. and Harris, C.C. 1994. Analysis of Cytochrome P450 2E1 Genetic Polymorphisms in Relation to Human Lung Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1: 485-489.
47. Meyer, U.A. 1990. Genetic Polymorphisms of Drug Metabolism. *Fund. Clin. Pharmacol.* 4: 595-615.
48. Mitsuuchi, Y., Kawamoto, T., Rosler, A., Naiki, Y., Miyahara, K., Toda, K., Kuribayashi, I., Orii, T., Yasuda, K., Miura, K., Nakao, K., Imura, H., Ulick, S. and Shizuta, Y. 1992. Congenitally Defective Aldosterone Biosynthesis in Humans: The Involvement of Point Mutations of the P-450_{C18} Gene(CYP11B2) in CMO II Deficient Patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182:974-979.
49. Wang, S.-L., Huang, J.-D., Lai, M.-D., Liu, B.-H. and Lai, M.-L. 1993. Molecular Basis of Genetic Variation in Debrisoquin Hydroxylation in Chinese Subjects: Polymorphism in RFLP and DNA Sequences of CYP2D6. *Clin. Pharmacol. Ther.* 53: 410-418.
50. Kawajiri, K., Nakachi, K., Watanabe, J. and Hayashi, S. 1993. The CYP1A1 Gene and Cancer Susceptibility. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 14: 77-87.
51. Cosma, G., Crofts, F., Taioli, E., Toniolo, P. and Garte, S. 1993. Relationship between Genotype and Function of the Human CYP1A1 Gene. *J. Toxicol. Environ. Hlth.* 40: 309-316.
52. Shields, P.G., Caporaso, N.E., Falk, R.T., Sugimura, H., Trivers, G.E., Trump, B.F., Hoover, R.N., Weston, A. and Harris, C.C. 1993. Lung Cancer, Race and a CYP1A1 Genetic Polymorphism. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2: 481-485.
53. Gonzalez, F.J., Crespi, C.L. and Gelboin, H.V. 1991. cDNA-Expressed Human Cytochrome P450s: a New Age of Molecular Toxicology and Human Risk Assessment. *Mutat. Res.* 247: 113-127.
54. Langenbach, R., Smith, P.B. and Crespi, C. 1992. Recombinant DNA Approaches for the Development of Metabolic Systems Used in In Vitro Toxicology. *Mutat. Res.* 277: 251-275.
55. Crespi, C., Langenbach, R. and Penman, B.W. 1993. Human Cell Lines, Derived from AHH-1 TK+/- Human Lymphoblasts, Genetically Engineered for Expression of Cytochromes P450. *Toxicology.* 89: 89-104.
56. Johnson, E.F., Kronbach, T. and Hsu, M.-H. 1992. Analysis of the Catalytic Specificity of Cytochrome P450 Enzymes through Site-Directed Mutagenesis. *FEBS J.* 6: 700-705.
57. Alvarez, J., Montero, M. and Garcia-Sancho, J. 1991. Cytochrome P-450 May Link Intracellular Ca²⁺ Stores with Plasma Membrane Ca²⁺ Influx. *Biochem. J.* 274: 193-197.
58. Alvarez, J., Montero, M. and Garcia-Sancho, J. 1992. Cytochrome P450 May Regulate Plasma Membrane Ca²⁺ Permeability According to the Filling State of the Intracellular Ca²⁺ Stores. *FASEB J.* 6: 786-792.
59. Aussel, C., Breittmayer, J.P., Ticchioni, M., Pelassy, C. and Bernard, A. 1994. Regulation of T Cell Activation by Cytochrome P450 Inhibitors. *Cellular Immun.* 155: 436-445.
60. Graier, W.F., Simecek, S. and Sturek, M. 1995. Cytochrome P450 Monooxygenase-Regulated Signalling of Ca²⁺ Entry in Human and Bovine Endothelial Cells. *J. Physiol.* 482: 259-274.
61. Lu, G.-T. 1991. Effects of Some Compounds Isolated from Chinese Medicinal Herbs on

- Hepatic Micrsomal Cytochrome P-450 and their Potential Biological Consequences. *Drug Metab. Rev.* 23: 439-465.
62. Wang, B.Y.Y., Lau, B.H.S., Yamasaki, T. and Teel, R.W. 1993. Modulation of Cytochrome P450IA1-Mediated Mutagenicity, DNA Binding and Metabolism of Benzo[a]pyrene by Chinese Medicinal Herbs. *Cancer Lett.* 68: 75-68.
63. Liu, X.-F., Liu, M.-L., Iyanagi, T., Legesse, K., Lee, T.D. and Chen, S. 1990. Inhibition of Rat Liver NAD(P)H:Quinone Acceptor Oxidoreductase (DT-Diaphorase) by Flavonoids Isolated from the Chinese Herb *Scutellariae Radix* (Huang Qin). *Mol. Pharmacol.* 37: 911-915.
64. Kang, J.-J., Chen, Y.-C., Kuo, W.-C., Chen, T., Cheng, Y.-W., Kuo, M.L. and Ueng, T.-H. Modulation of Microsomal Cytochrome P450 by *Scutellariae Radix* and *Gentianae Scabre Radix* in Rat Liver. *Am. J. Chin. Med.* in press.

Cytochrome P450: Enzyme Regulation and Toxicological Significance

TZUU-HUEI UENG, JAW-JOU KANG, I-CHI CHAO AND YI-CHIEN CHEN

Institute of Toxicology, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

The pharmacological and toxicological responses of drugs and environmental chemicals are dependent upon metabolism of the compounds. Cytochrome P450 (P450)-dependent monooxygenases are the primary enzyme system responsible for the oxidative metabolism of drugs, carcinogens, food additives, and environmental chemicals. The underlying basis for the broad substrate specificity of P450 is that there are multiple forms of P450. A nomenclature system based on amino acid sequence homology is adopted for the increasing number of P450 hemoproteins. P450 genes are subject to regulation by many physiological and environmental factors. Regulation of P450 enzymes shows marked species and tissue specificity which plays an important role in species and tissue extrapolation of chemical risk assessment and target organ toxicity. P450 isoforms are readily inducible follow-

ing exposure to foreign compounds of which phenobarbital, 3-methylcholanthrene, and ethanol are the prototypic inducing agents. Many drugs and natural compounds are potent inhibitors of P450 and dependent catalytic activity. Mechanism of P450 regulation also shows multiplicity at the transcriptional, translational, and post-translational stages. Polymorphism and racial difference are important determinants of drug metabolism and susceptibility to diseases in humans. Traditional Chinese medicines have the ability to induce and inhibit multiple forms of P450 monooxygenases. Expression of human P450 in mammalian cell lines provides an alternative system to study the functions of P450s in xenobiotic metabolism and toxicity in humans. P450 may be associated with regulation of cellular entry of calcium. Finally, the perspective of future P450 research is discussed.

Key words: Cytochrome P450, monooxygenase, induction, inhibition, drug, toxicity.

