



IMPAIRED CYTOCHROME P-450 METABOLISM  
IN VITAMIN A DEFICIENCY

SOMPORN KAMOLSIRIPICHAIPORN  
๔

A THESES SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(BIOCHEMISTRY)

อธิบดีมหาวิทยาลัย

๑๓

บัณฑิตวิทยาลัย ม.มหิดล

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY

1987

1201๑

ชื่อวิทยานิพนธ์

ผลของการขาดวิตามินเอต่อเมตาบอลิซึมของ  
ไซโตโครม พี-450

ผู้วิจัย

น.ส. สมพร กมลศิริพิชัยพร

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

นายเอเดรียน เจ แลมป์ ประธาน

ม.ร.ว. ชินุสร สวัสดิวัตน์

นายประพนธ์ วิไลรัตน์

น.ส. ประหยัด โภมารทัต

วันที่สำเร็จการศึกษา

27 พฤศจิกายน 2530

### บทคัดย่อ

ไซโตโครม พี-450 เป็นไอโซไซม์สำคัญในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็คตรอนบนเยื่อไมโทคริซึม และทำหน้าที่ควบคุมระบบการแปรสภาพสารแปลกปลอม เช่นยา หรือสารในร่างกายนิตผ่านปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน ไซโตโครม พี-450 มีหลายรูปแบบที่พบในธรรมชาติ (constitutive form) และที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ (induced form) ไอโซไซม์แต่ละรูปมีขนาด โครงสร้าง และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาต่างกัน

นักวิจัยหลายกลุ่ม ได้เสนอรายงานเกี่ยวกับผลการขาดวิตามินเอต่อระบบการแปรสภาพสารภายใต้การควบคุมของไซโตโครม พี-450 แต่ผลการทดลองที่ได้มีทั้งสอดคล้องและขัดแย้งกัน เนื่องจากสัตว์ทดลองที่ใช้ส่วนใหญ่ไม่อยู่ในสภาพที่ขาดวิตามินเออย่างแท้จริง ผลการทดลองจึงขึ้นอยู่กับระดับของวิตามินเอที่มีอยู่ในขณะนั้น เพื่อเป็นการแก้ปัญหาสำคัญดังกล่าว ดร. แลมป์และคณะ ได้พัฒนากรรมวิธีเลี้ยงดูควบคุมหนูทดลองให้ขาดวิตามินเออย่างมีประสิทธิภาพโดยการให้อาหารที่เสริมกรดเรตินอิค 18 วัน สลับกับอาหารที่ไม่มีกรดเรตินอิค 10 วัน เป็นหนึ่งวงจร การเลี้ยงแบบควบคุมกรดเรตินอิคในอาหารนี้จะทำให้วิตามินเอสะสมที่มีตั้งแต่เกิดค่อยๆ ถูกใช้ไป จนในที่สุด หนูทดลองจะอยู่ในสภาพที่ขาดวิตามินเออย่างแท้จริงหลังจากที่ผ่านการเลี้ยงตามกรรมวิธีดังกล่าวมาอย่างน้อย 5 วงจร นอกจากนั้นในระหว่างการทดลองหนูจะได้รับอาหารในปริมาณควบคุมโดยการป้อนทางปาก (force-

feeding) เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาแทรกซ้อนจากการติดเชื้อ และการขาดธาตุอาหารอื่นๆ ที่เกิดขึ้นจากการเบื่ออาหาร (secondary inanition)

การวิจัยแบบ in vivo และ in vitro ในหนูทดลองเหล่านี้ ได้บ่งชี้ให้เห็น ความสัมพันธ์อย่างจำเพาะของวิตามินเอ กับเมตาบอลิซึมของ ไซโตโครม พี-450 การเสื่อมประสิทธิภาพในการขจัดฤทธิ์ยานอนหลับ hexobarbital ทำให้นักหนูที่ขาดวิตามินเอหลับเป็นระยะเวลาสั้นกว่าหนูปกติ อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อติดตามปริมาณยาที่ติดสลาγκัมมันตรังสีในพลาสมาที่ เวลาต่างๆ กัน พบว่าเวลาหลับที่เพิ่มขึ้นเป็นผลสืบเนื่องจากการที่ยานอนหลับถูกเปลี่ยนแปลงและขจัดออกจากร่างกายที่ช้ากว่าปกติ ทั้งนี้ไม่พบความผิดปกติ ของระบบขับถ่ายหรือระบบการตอบสนองต่อฤทธิ์ยาระหว่างหนูทดลองสองกลุ่ม

การทดลองในหลอดแก้วเพื่อหาปริมาณไซโตโครม พี-450 และ แอคติวิตีของปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันในไมโครโซมที่เตรียมจากตับหนู แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงในหนูที่ขาดวิตามินเอเริ่มจากวันที่ 6 ของการทดลอง ( $T_6$ ) และทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันสุดท้าย ( $T_{13}$ ) ปริมาณของ ไซโตโครม พี-450 ที่  $T_{13}$  จะลดลง 40% ของระดับปกติ ปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันของยาหรือสารตั้งต้น 4 ชนิดคือ hexobarbital, aniline, aminopyrine และ benzphetamine ลดลงเป็นสัดส่วนกัน แต่ลักษณะ การเปลี่ยนแปลงในช่วงเวลา 13 วันของการทดลองต่างกัน ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่า การขาดวิตามินเออาจส่งผลกระทบต่อกลุ่มไซโตโครม พี-450 หลายรูปแบบในระดับที่ไม่เท่ากัน เมื่อตรวจดูความจำเพาะของไซโตโครม พี-450 ต่อสารตั้งต้นเหล่านี้ จะตั้งข้อสังเกตได้ว่าไซโตโครม พี-450 ที่ลดปริมาณไป คือ ไอโซไซม์รูป h และ j

การศึกษารูปแบบของไซโตโครม พี-450 ในตับหนูที่ขาดวิตามินเอ โดยการทำให้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสมีติเดี่ยว (SDS-PAGE) และสองมิติ (IF/SDS) ประกอบกับโครมาโตกราฟีบนคอลัมน์ DEAE-Sephacel วิธีมาตรฐานและวิธีประยุกต์ ให้ผลยืนยันและสอดคล้องกันว่าการขาดวิตามินเอยังผล ให้ปริมาณไซโตโครม พี-450 ลดลงอย่างแน่นอน โดยเฉพาะ ไอโซไซม์ที่มี ขนาดโมเลกุล 50-52 กิโลดาลตัน นอกจากนี้การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส 2 มิติ สามารถชี้เฉพาะได้ว่า ไอโซไซม์ที่ถูกกระทบคือ รูป h และอาจรวมถึงรูป f, g และ j ด้วย

นอกจากไซโตโครม พี-450 แล้ว ยังมีโปรตีนอื่นๆ บนเยื่อไมโทคริซมที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีวิตามินเอไม่เพียงพอ เช่น ปริมาณของเอนไซม์ epoxide hydrolase ที่ตรวจพบในเจล 2 มิติ ลดน้อยลงกว่าปกติ และ เอนไซม์ NADPH cyt P-450 reductase ที่ตามปกติหลังจากที่แยกผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel จะพบ 2 รูปแบบคือ RI และ RII นั้น แอคติวิตีของ RI จะลดน้อยลงอย่างเด่นชัดในหนูที่ขาดวิตามินเอ

การที่ไซโตโครม พี-450 มีปริมาณลดต่ำกว่าปกตินี้ อาจเป็นผลลัพธ์ของปรากฏการณ์หลายอย่างที่เกิดขึ้นจากการขาดวิตามินเอ เมื่อทำการศึกษาอัตราการสร้างและเสื่อมสลายของไซโตโครม พี-450 เปรียบเทียบกันระหว่างหนูทั้งสองกลุ่ม กราฟของปริมาณสารกัมมันตรังสีที่คงระดับอยู่ในไซโตโครม พี-450 ที่เวลาต่างๆ หลังจากที่ได้รับ  $^3\text{H-ALA}$  มีลักษณะเป็นกราฟไบเฟลลิก คือ แยกออกเป็น 2 ช่วงใน 50 ชั่วโมงแรก (fast phase) ปริมาณกัมมันตรังสีลดลงอย่างรวดเร็ว แล้วความชันของเส้นกราฟจะลดลงในช่วงเวลาจาก 50 ชั่วโมงเป็นต้นไป (slow phase) ค่า  $t_{1/2}$  หรือดัชนีแสดงเวลาที่ปริมาณกัมมันตรังสีลดลงกึ่งหนึ่งในช่วงของ fast phase = 12.4 ชั่วโมง ในหนูปกติ ค่า  $t_{1/2}$  ของหนูที่ขาดวิตามินเอจะลดลงเป็น 9.2 ชั่วโมง ซึ่งหมายความว่า เมื่อขาดวิตามินเอ ไซโตโครม พี-450 จะเสื่อมสลายในอัตราที่เร็วกว่าปกติถึง 26% ส่วนใน slow phase  $t_{1/2}$  ของหนูทั้งสองกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน คือประมาณ 57-59 ชั่วโมง

เมื่อศึกษาอัตราการสร้างไซโตโครม พี-450 โดยการวัดปริมาณสารกัมมันตรังสี ที่ถูกพนักเข้าไปในปริมาณเล็กน้อยภายในเวลา 2 ชั่วโมง ที่เวลา  $T_8$  ปริมาณสารกัมมันตรังสีที่วัดได้เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ยิ่งในช่วงระยะหลังคือ ที่  $T_{10}$  และ  $T_{13}$  ปริมาณสารกัมมันตรังสีลดลงถึง 20% ผลการทดลองที่ได้นี้ชี้ให้เห็นค่อนข้างชัดเจนถึงความผิดปกติของการสร้างไซโตโครม พี-450 ที่ขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่ง การขาดวิตามินเอไม่น่าจะมีผลต่อกระบวนการสร้างฮีม เนื่องจากไซโตโครม  $\text{P}_{450}$  ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีฮีมเป็นส่วนประกอบสำคัญอีกตัวหนึ่งบนเยื่อไมโทคริซม ไม่ได้รับผลกระทบเหมือนจากการขาดวิตามินเอแต่อย่างไร

จากการทดลองเหล่านี้สามารถสรุปได้ว่า ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับ ไซโตโครม พี-450 เป็นผลสืบเนื่องจากปรากฏการณ์ 2 อย่างที่เกิดควบคู่กัน ไปในภาวะที่ไม่มีวิตามินเอได้แก่ การเร่งอัตราการสลายไซโตโครม พี-450 และการเสื่อมประสิทธิภาพในการสร้างไซโตโครม พี-450 ซึ่งอาจเป็นขั้นตอนการสร้าง apoprotein หรือขั้นตอนการประกอบยึดกับส่วน apoprotein ความผิดปกติเหล่านี้อาจยังผลให้ไซโตโครม พี-450 ไม่เสถียรและ ถูกทำลายได้ง่ายขึ้น



Thesis Title                    Impaired Cytochrome P-450 Metabolism in  
   Vitamin A Deficiency

Name                                Somporn Kamolsiripichaiporn

Degree                             Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

   Dr. Adrian J. Lamb                    Major Advisor

   Dr. Jisnuson Svasti

   Dr. Prapon Wilairat

   Dr. Prayad Komaratat

Date of Graduation             November 27, 1987

#### ABSTRACT

Apart from its role in vision, molecular function of vitamin A is not known. Problems have included the wide range of abnormalities encountered in deficiency and complicating effects of secondary inanition following onset of deficiency and loss of appetite.

Hypotheses of the non-visual function of vitamin A have included a role for vitamin A in glycoprotein synthesis, or as a cofactor in enzyme activities, and in control of differentiation. The role for vitamin A in differentiation is currently the most favored hypothesis.

In the present studies, the molecular basis of vitamin A in the control of liver cytochrome P-450 levels and hepatic drug metabolizing activities was examined in some detail. Tube-fed, retinoate cycled rats were used to eliminate non-specific effects associated with secondary inanition and to ensure stringent vitamin A deficiency throughout.

Results obtained indicated a number of highly reproducible changes in drug metabolizing activity in vitamin A deficiency. Hexobarbital sleeping times increased from day 6 of deficiency ( $T_6$ ) onwards. Radioactivity present in the plasma as native or metabolized hexobarbital in the first three hours after  $^{14}C$ -hexobarbital injection indicated impaired drug transformation. Thereafter, clearance of hexobarbital or metabolites as determined by plasma  $t_{1/2}$  values revealed a slower rate of drug disposition. No change was observed in 24 hour renal excretion levels. Drug sensitivity based on concentration of hexobarbital and its metabolites at time of awakening was the same in deficient and control rats.

Impaired drug metabolism in vitamin A deficiency was confirmed by in vitro enzyme assays using hexobarbital, aminopyrine, benzphetamine and aniline as substrate probes. Kinetic studies during the deficiency phase ( $T_0 - T_{13}$ ) showed changes at  $T_6$ , as for hexobarbital sleeping times. Reduction in enzyme activities intensified in the late stages of deficiency.

Time course of changes in cyt P-450 levels were similar, whereas levels of cyt b<sub>5</sub>, another hemoprotein located in the microsomal membrane, were unaltered.

Characterization of microsomal proteins by various techniques revealed numerous changes in vitamin A deficiency. A decrease in the levels of cyt P-450 was readily apparent. DEAE-Sephacel column chromatography of solubilized microsomes followed by serial SDS-PAGE showed that the molecular weight of cyt P-450 subtypes affected in vitamin A deficiency was 50K-52K. One of these subtypes was tentatively identified by high resolution two dimensional IF/SDS electrophoresis and *in vitro* enzyme assays as cyt P-450h. Other cyt P-450 species possibly affected included cyt P-450f, g and j.

Not all proteins, however, were depressed in vitamin A deficiency; levels of some unidentified proteins increased, or were present in multiple forms.

NADPH cyt P-450 reductase was found to exist in two forms. Only the minor form of molecular weight approximately 1,000 daltons less than the major form (74K) was markedly depressed in vitamin A deficiency. Decrease in concentration of this form was probably responsible for the 15% decrease in NADPH cyt P-450 reductase activity in unfractionated microsomal fractions.

Cyt P-450 turnover rates determined after labelling of the heme moiety with <sup>3</sup>H-ALA for fast phase components increased sharply in vitamin A deficiency. Slow phase turnover rates and the ratio of fast phase to slow phase cyt P-450 were not changed. Although synthesis of cyt P-450 was depressed approximately 20% in the late stages of deficiency, total spectrally determined cyt P-450 levels decreased 50%. It seems unlikely, therefore, that altered synthesis is the primary determinant of final steady state concentrations of cyt P-450 in vitamin A deficiency, as has been proposed for fibronectin and other proteins. More probably, depressed synthesis represents a secondary response to still earlier changes in vitamin A deficiency including daily catabolic rate, the basis for which is not yet known.