

苦椒가 白鼠의 肝 마이크로솜 Cytochrome P₄₅₀에 미치는 影響

孔 泳 玉 · 金 昌 洙 · 金 洛 斗 · 趙 允 成

서울대학교 藥學大學

Effect of Capsicum Components on Liver Microsomal Cytochrome P₄₅₀ in Rat.

Young Ok KONG, Chang Soo KIM, Nak Doo KIM and Yun Sung CHOUGH

College of Pharmacy, Seoul National University

The investigation is involved with the effect of Capsicum component on the drug metabolism. To investigate the effects of Capsicum component on, in vivo, drug metabolism in rat, Capsicum acetone extract was given intraperitoneally to mice or rats. The duration of loss of righting reflex was determined as hexobarbital sleeping time in mice. Plasma hexobarbital concentration was also measured by Brodie's method. The rats were pretreated with Capsicum extract acutely or chronically. As the results, hexobarbital sleeping time and plasma hexobarbital concentration were increased by 31.2% and 12.3% in acute study, whereas were decreased by 27.5% and 23.0% in chronic study. An attempt was made to determine if there were any influences on enzyme activities in rats pretreated with Capsicum extract chronically. Microsomal fraction was isolated from rat liver and quantity of cytochrome P₄₅₀ and b₅ in the microsomal fraction were determined by Omura's method. It was found that the quantity of cytochrome P₄₅₀ was increased by 22.4%. The results suggest that microsomal drug metabolizing enzyme may be induced by chronic administration of Capsicum component, whereas it may be inhibited by acute administration of Capsicum component.

서 론

苦椒(*Capsicum annuum* L.)는 가지과 (Solanaceae)에 속하는 一年草의 成熟한 果實을 乾燥한 것으로 韓國人의 食生活에 重要한 調味料로 使用되어 왔다.

1876年 Thresh¹⁾에 의해 처음으로 辛味成分이 單離되어 capsaicin이라고 命名된 이후 여러

研究者들^{2,3)}에 의해 構造가 研究되어 왔으며 最近에는 지금까지 capsaicin結晶이라고 불려온 것은 capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homodihydrocapsaicin등 數種의 近緣化合物의 混合物임이 判明되었다. 또한 酵母 및 細菌類에 대해 活性이 있는 抗菌性 物質인 capsicidin이 最近 發見된 바 있다⁴⁾.

苦椒가 生體에 미치는 影響에 관하여 diastase의 消化率을 높이며⁵⁾ 消化液分泌를 亢進시켜 消

化機能을 旺盛하게 한다는 報告⁶⁾ 外에 小腸의 glucose吸收를 阻害하는 作用⁷⁾ 및 장티푸스백신의 効力이 苦椒經口投與에 의해 더욱 增加한다는 報告가 있다⁸⁾. 韓國人들이 相當量의 苦椒를 攝取하고 있음을 감안하여 血液 및 肝機能에 미치는 作用을 관찰한 바 韓⁹⁾ 等은 苦椒를 投與(0.5g/kg)한 家兔에서 體重이 增加하였고 血液, 尿, 血糖值, 肝機能 等の 檢査室的 所見에 異常을 發見할 수 없었다고 報告한 바 있다.

저자들의 研究室에서는 苦椒가 肝의 藥物代謝機能에 미치는 影響에 관하여 研究한 바 있으며 前報¹⁰⁾에서 苦椒아세톤 抽出物을 慢性的으로 投與한 白鼠에서 antipyrine의 血中濃度가 對照群에 비해 減少되며 同一하게 處理한 白鼠의 肝에서 分離한 microsomal supernatant가 antipyrine의 代謝를 促進시킨(in vitro)을 報告하여 苦椒엑기스의 慢性投與가 肝의 藥物代謝酵素를 誘導한다고 시사한 바 있다. 따라서 本 研究에서는 苦椒엑기스를 慢性投與한 후 hexobarbital sleeping time 및 hexobarbital 血漿濃度를 測定하여 苦椒에 의한 酵素誘導여부를 確認하고 나아가서 microsomal fraction을 分離하여 藥物代謝酵素系의 terminal oxidase인 cytochrome P₄₅₀의 含量을 測定하였다.

실 험 방 법

實驗材料

1. 苦椒엑기스 : 前報¹⁰⁾의 方法에 의해 抽出한 아세톤 엑기스를 0.01%의 Tween 80을 含有하는 生理的食鹽水에 乳化시켜 慢性投與用 試料로 使用하였다.

2. Carbon monoxide gas : 적하여두, 온도계, 가스도출관, 안전관을 장치한 環底플라스크에 98%濃黃酸을 넣고 적하여두로부터 87% formic acid를 소량씩 滴加하면서 水浴上에서 反應液을 서서히 加熱하여 液溫이 60~70°C가 되면 이후 이 溫度를 유지하면서 formic acid를 滴加하여 가스를 發生시켰다. 發生가스에 點火해 보아 청색불꽃을 내며 緩和하게 燃燒할 때부터 가스를 捕集하기 시작하였다. 가스를 濃黃酸을 통과시

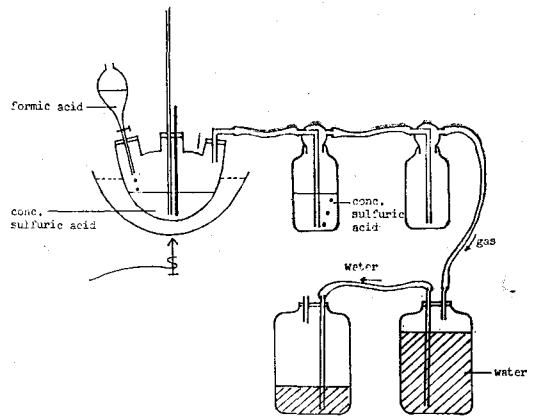


Fig. 1. Apparatus for carbon monoxide gas preparation.

켜 脫水하고 空氣의 混入을 막기 위해 充分時間(약 10分) 동안 發生하는 가스를 날려 보낸 후 貯子瓶中の 물과 置換하여 捕集하였다. 이상의 操作은 通風室內에서 進行하였다. 가스使用時에는 물이 든 병을 가스가 든 병보다 높게 하여 물에 의한 壓力으로 가스를 도출시켜 使用하였다 (Fig. 1).

3. 實驗動物 : 서울大學校 實驗動物飼育場에서 飼育하고 있는 健康한 雄性마우스 및 雄性 Sprague-Dawley系 白鼠를 使用하였다.

4. 試藥 : Hexobarbital sodium, CaO로 脫水한 후 再蒸溜한 메탄올 10ml에 금속소디움 0.194g과 hexobarbital 2g을 넣어 溶解시키고 60~80°C 水浴에서 攪拌하여 매우 粘稠한 半圓形物을 얻었다. 여기에 CaCl₂로 脫水한 에틸을 가하고 攪拌한 후 에틸층을 傾瀉하는 조작을 5~6회 반복하여 suspension상태로 한 다음 에틸을 揮散시켜 白色 粉末狀의 hexobarbital sodium을 製造하였다.

Albumin, bovine serum (fr. V) (Nakarai Chemicals Ltd.)

實驗方法

1. 苦椒엑기스(以下 苦椒)의 急性 및 慢性投與가 hexobarbital 睡眠時間에 미치는 效果

1) 急性效果

25~30g의 마우스에 苦椒 50mg/kg을 腹腔內 投與하고 對照群에는 生理的食鹽水を 投與하였

다. 苦椒投與 2시간후 hexobarbital sodium 100 mg/kg을 腹腔內 投與하고 正向反射消失후 回復하기까지의 시간을 測定하여 hexobarbital에 의한 睡眠時間으로 하였다.

2) 慢性効果

20g내외의 마우스 10마리를 1群으로 하여 苦椒 50mg/kg/day를 30일간 腹腔內 投與하고 對照群에는 生理的 食鹽水를 投與하였다. 마지막 投與로 부터 24시간후에 hexobarbital sodium 100mg/kg을 腹腔內 投與하고 1)과 同一한 方法으로 hexobarbital에 의한 睡眠時間을 測定하였다.

2. 苦椒의 急性 및 慢性投與가 hexobarbital 血漿濃度에 미치는 效果

1) 急性效果

250~300g의 白鼠에 苦椒 50mg/kg을 腹腔內 投與하고 2시간후 hexobarbital sodium 60mg/kg을 腹腔內 投與하였다. Hexobarbital投與 5분후 머리에 타격을 가해 致死시키고 胸곽을 切開한 다음 心臟으로 부터 syringe로 血液을 채취, Brodie等¹¹⁾의 方法에 의해 hexobarbital 血漿濃度를 測定하였다(Fig. 2).

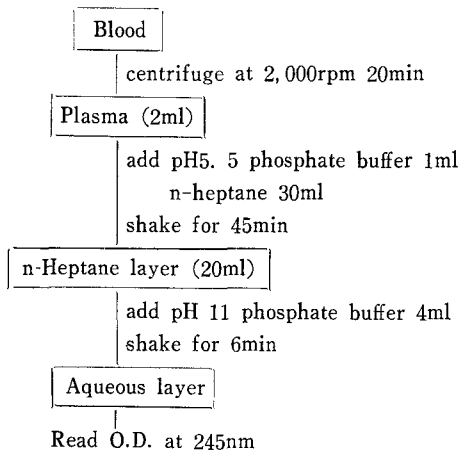


Fig. 2. Determination of hexobarbital concentration in plasma.

2) 慢性效果

100g내외의 白鼠에 苦椒 50mg/kg/day를 40일간 腹腔內 投與하고 마지막 投與로 부터 24시간후에 hexobarbital sodium 60mg/kg을 腹腔內

投與하였다. Hexobarbital 投與 5분후에 머리에 타격을 가해 致死시킨 후 1)과 同一한 方法으로 hexobarbital 血漿濃度를 測定하였다.

3. 苦椒의 慢性投與가 肝 microsome의 cytochrome P₄₅₀, b₅ 및 protein에 미치는 效果

55~60g의 白鼠에 苦椒 50mg/kg/day를 30일간 腹腔內 投與하고 마지막 投與后 24시간 동안 絶食시킨 다음 머리에 타격을 가해 致死시켰다. 腹部를 切開한 후 肝을 生理的 食鹽水로 灌流하여 皮를 除去한 다음(in situ) 摘出하였다.

1) Microsomal fraction의 製造

摘出한 肝을 肝 重量의 4배의 1.15% KCl-0.01 M phosphate buffer (pH 7.4, 0°C)에 넣고 가위로 미세하게 자른 다음 Potter Elvehjem glass homogenizer를 使用하여 60초간 homogenize 하였다. Homogenate를 0°C, 9000×g에서 20분간 원심분리하고 fat층을 거즈여과로서 除去한 후 다시 9000×g에서 20분간 원심분리하였다. 상등액 중 12ml을 취해 preparative ultracentrifuge를 使用하여 100,000×g에서(온도 0°C) 1시간동안 원심분리하였다. 상등액은 버리고 pellet을 0.1M phosphate buffer (EDTA 10⁻³M, pH 7.4) 20ml에 suspend시킨 것을 microsomal suspension으로

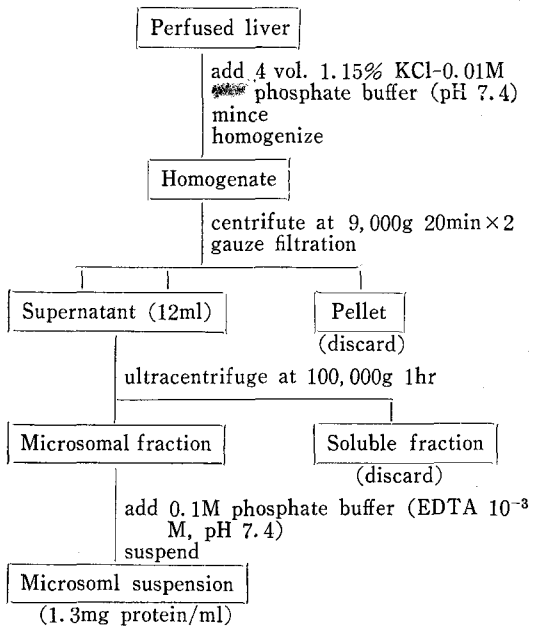


Fig. 3. Preparation of microsomal fraction.

하여 使用하였으며 이 suspension중의 protein량을 Lowry法¹²⁾에 의해 定量한 결과 1.3mg/ml이었다(Fig. 3).

2) Cytochrome P₄₅₀含量 測定

Omura等¹³⁾의 方法에 의해 삼각플라스크에 microsomal suspension 5ml을 넣고 19K needle을 통해 1분간 CO가스를 bubbling시킨後 還元劑로서 sodium dithionite 40mg을 넣고 잘 混合한 다음 1분간 더 CO가스를 bubbling시켰다. 이상의 조작은 ice bath 위에서 행하였다. Bubbling이 끝난 후 10분 이내에 UV spectrophotometer (Unicam SP 1750)를 使用하여 波長 400~500nm에서 microsomal suspension에 sodium dithionite만을 가한 reduced microsome과 CO bound microsome간의 difference spectrum을 그렸다. 450nm와 480nm에서의 吸光度의 차이를 cytochrome P₄₅₀·CO complex에 의한 吸光量으로 하고 Omura等¹³⁾에 의한 cytochrome P₄₅₀ CO complex의 mole吸光係數 91mM⁻¹cm⁻¹을 利用하여 cytochrome P₄₅₀의 量을 計算하였다.

3) Cytochrome b₅含量 測定

UV spectrophotometer를 使用하여 波長 400~500nm에서 microsomal fraction에 sodium dithionite를 가해 還元시킨 reduced microsome과 oxidized microsome간의 difference spectrum을 그렸다. 426nm와 500nm에서의 吸光度의 차이를

還元型 cytochrome b₅에 의한 吸光量으로 하고 Omura等¹³⁾에 의한 還元型 cytochrome b₅의 mole 吸光係數 171mM⁻¹cm⁻¹을 利用하여 cytochrome b₅의 量을 計算하였다.

실험 결과

1. 苦椒의 急性 및 慢性投與가 hexobarbital 睡眠時間 및 血漿濃度에 미치는 效果

1) 急性效果

苦椒의 急性投與群에서 hexobarbital sodium 100mg/kg에 의한 睡眠時間은 62.2±4분으로 對照群의 47.4±3분에 비해 31.2% 增加하였고 hexobarbital sodium 60mg/kg 投與 5분후의 血漿濃度は 28.8±1.1μg/ml로서 對照群의 25.6±0.7μg/ml에 비해 12.3% 增加하였다(Table I).

2) 慢性效果

苦椒억기스 慢性投與群에서 hexobarbital sodium 100mg/kg에 의한 睡眠時間은 51.8±8분으로 對照群의 71.4±6분에 비해 27.5% 減少하였고 hexobarbital sodium 60mg/kg 投與 5분후의 血漿濃度は 17.7±1.5μg/ml로서 對照群의 23.0±1.6μg/ml에 비해 23.0% 減少하였다 (Table II).

Table I. Effect of Acute Administration of Capsicum Extract on Hexobarbital Sleeping Time and Plasma Hexobarbital Concentration.

	Control	Treated	% Change
Hexobarbital Sleeping Time(min)	47.4±3 ^a (33) ^b	62.2±4 [*] (23)	31.2
Plasma Hexobarbital Conc. (μg/ml)	25.6±0.7 (5)	28.8±1.1 [*] (5)	12.3

a: Mean±S.E. b: Parentheses indicate number of animals. *: Statistically significant (P<0.05)

Table II. Effect of Chronic Administration of Capsicum Extract on Hexobarbital Sleeping Time and Plasma Hexobarbital Concentration.

	Control	Treated	% Change
Hexobarbital Sleeping Time (min)	71.4±6 ^a (16) ^b	51.8±8 [*] (7)	27.5
Plasma Hexobarbital Conc. (μg/ml)	23.0±1.6 (6)	17.7±1.5 ^{**} (6)	23.0

a: Mean±S.E. b: Parentheses indicate number of animals.
*: Statistically significant (P=0.05) **: Statistically significant (P<0.05)

Table III. Effect of Chronic Administration of Capsicum Extract on Content of Cytochrome P-450, b₅ and Protein.

	Control	Treated	% Change
Cytochrome P-450 (n moles/g liver)	4.02±0.3 ^a (8)	4.92±0.3 ^a (8)	22.4
Cytochrome b ₅ (n moles/g liver)	5.30±0.6 (8)	5.34±0.6 (8)	
Microsomal protein (mg/g liver)	9.09±0.8 (8)	11.38±0.6 ^a (8)	25.2

a: Mean±S.E. b: Parentheses indicate number of animals. *: Statistically significant (P<0.05)

2. 苦椒의 慢性投與가 肝 microsome의 cytochrome P₄₅₀, b₅ 및 protein에 미치는 効果

苦椒엑기스 30일 慢性投與群에서 cytochrome P₄₅₀은 4.92±0.3nmoles/g liver로서 對照群의 4.02±0.3nmoles/g liver에 비해 22.4% 增加하였고 cytochrome b₅는 苦椒엑기스 投與群과 對照群간에 有意性있는 차이가 없었다. Protein은 苦椒엑기스 30일 慢性投與群에서 11.38±0.6mg/g liver로서 對照群의 9.09±0.8mg/g liver에 비해 25.2% 增加하였다.

고 찰

苦椒엑기스를 慢性的으로 投與한 마우스에서 hexobarbital睡眠時間 및 白鼠에서 hexobarbital 血漿濃度を 對照群과 比較하였으며 in vitro에서 microsomal cytochrome P₄₅₀의 含量變化를 測定하였다. 苦椒엑기스를 30일간 이상 慢性的으로 投與한 후 hexobarbital 睡眠時間이 단축되었으며 또한 血漿濃도가 低下함은 肝의 藥物代謝酵素가 增加해 있음을 示唆한다. 急性的으로 苦椒엑기스를 投與한 경우에는 hexobarbital 睡眠時間이 연장되었으며 또한 血漿濃度も 증가한 것으로 보아 急性的으로 投與한 경우에는 肝의 藥物代謝酵素가 抑制되는 것 같다. 즉 苦椒엑기스의 慢性的 投與는 外部에서 投與하는 藥物에 어떤 影響을 미치는 것으로 思料된다. 韓等⁹⁾의 報告와 著者들의 實驗에서 苦椒를 慢性的으로 投與時 SGPT 및 SGOT에 影響을 미치지 않는 점, 또한 一般的으로 苦椒慢性投與는 體重의 增加를 招來한다는 事實은 苦椒가

肝의 機能에는 별 影響을 주지 않으면서 藥物代謝酵素에 대하여 酵素를 抑制 또는 誘導하는 것으로 思料된다. 藥物代謝酵素의 誘導效果를 檢討할 目的으로 苦椒를 同一期間 處理한 白鼠의 肝에서 cytochrome P₄₅₀의 含量變化를 測定한 結果 肝 gram 당 protein 및 cytochrome P₄₅₀이 25.2%, 22.4% 增加하여 藥物代謝酵素의 誘導效果를 強力히 뒷받침하고 있다. 그러나 이러한 苦椒엑기스의 效果가 苦椒中에 含有된 capsaicin등의 成分에 의한 것인지 또는 기타 抽出物에 의한 것인지는 더 檢討해 볼 과제이다.

本 實驗에서는 苦椒末을 溶媒로 抽出하여 얻은 capsaicin함유엑기스를 腹腔으로 投與하였다. 抽出溶媒로는 色素, phospholipid등의 移行이 적은 아세톤을 使用하였다. 苦椒엑기스 投與量은 50mg/kg(i.p.)으로 苦椒엑기스의 LD₅₀ 700mg/kg(i.p.)¹⁰⁾의 1/14에 해당하며 韓國人의 苦椒末 一日 平均 攝取量 5g¹⁴⁾의 약 8배에 해당하는 양이다. Hexobarbital血漿濃度 測定時 hexobarbital 投與 5분후에 血漿濃도를 測定한 것은 Helcomb等¹⁵⁾의 報告에서 hexobarbital 靜脈投與時 血中濃도가 60%로 減少하는 시기를 택한 것이다. Cytochrome P₄₅₀ 測定時 CO가스 bubbling이 끝난 후 10분 이내에는 吸光度의 차이(ΔO.D 450~480nm)가 一定하였고 그 후에는 차차 減少함을 觀察하였으므로 吸光度 測定時間을 10분 이내로 하였다. 本 實驗에서는 肝細胞內 microsomal monooxygenase enzyme system 가운데 terminal oxidase인 cytochrome P₄₅₀에 대한 影響만을 觀察하였으나 그밖에 cytochrome P₄₅₀ reductase¹⁶⁾나 lipid factor¹⁷⁾등도 藥物代謝에 관여하는 것으로 알려져 있으므로 이들에 대한 苦椒엑기스의 影響에 관해서도 研究되어 밝혀지리라 믿는다.

결 론

1. 苦椒엑기스 急性投與時 hexobarbital 睡眠 시간이 31.2%, hexobarbital 血漿濃도가 12.3% 增加하였다.

2. 苦椒엑기스 慢性投與時 hexobarbital 睡眠 시간이 27.5%, hexobarbital 血漿濃도가 23.0% 減少하였다.

3. 苦椒엑기스 慢性投與時 microsomal cytochrome P₄₅₀의 含量이 22.4%, microsomal protein 의 含量이 25.2% 增加하였다.

4. 苦椒엑기스 慢性投與에 의하여 肝藥物代謝 酵素가 誘導되며 急性投與에 의하여 肝藥物代謝 酵素가 抑制되는 것으로 思料된다.

Hexobarbital을 제공하여 주신 서울대 生藥研究所 李殷芳助教授 및 申國鉉助教授에게 感謝한다. 본 연구의 일부는 아산사회복지사업재단 연구비에 의해 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다. (1979. 2.1 接受)

문 헌

1. Thresh, J.C.: *pharm. J. and Trans.*, 7, 21, 259,

473 (1876-7).
 2. Micko, K.: *J. Am. Chem. Soc.*, 2, 219 (1910).
 3. Nelson, E.K.: *J. Am. Chem. Soc.*, 41, 1115 (1919).
 4. Gal, I.E.: *Experimentia*, 21, 383 (1965).
 5. 平田吾一: 岡山醫誌, 265, 116 (1912).
 6. 川島四郎, 邊, 小林: 糧食誌, 119, 331 (1936).
 7. 門英雄: 消化器, 42, 1 (1943).
 8. Zenko, Gu: *Chosen Med. Assoc.*, 30, 894 (1940).
 9. 韓心錫, 韓鎮觀: 最新醫學, 4, 1305 (1961).
 10. 鄭海仙: 서울大學校 碩士學位論文 (1976).
 11. Brodie, B.B., Burns, J.J., Mark, L.C., Lief, P.A. Bernstein, E. and Papper, E.M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 109, 26 (1953).
 12. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
 13. Omura, T. and Sato, R.: *J. Biol. Chem.*, 239, 2370 (1964).
 14. 韓國食品研究文獻總覽 p. 193, 韓國食品科學會發行 (1971).
 15. Helcomb, R.R., Gerber, N. and Bush, M.T.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 188, 15 (1974).
 16. Gillette, J.R.: *Biological Aspects of Antimetabolites and Drug Hydroxylation*, vol.16 in the Federation of European Biochemical Society Symposia Series, Academic Press, NY, pp.109-124 (1969).
 17. Lu, A.Y.H., Junk, K.W. and Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.*, 244, 3714 (1969).