

Piperine의 진통작용 기전에 관한 연구

殷 載 淳

全州 又石大學 藥學科

(Received June 29, 1986)

A Study on the Mechanism of Analgesic Action of Piperine

Jae Soon Eun

Department of pharmacy, Jeonju Woo Suk University, Jeonju 520, Korea

Abstract—It was carried out to detect the analgesic action of piperine by hot-plate method and to elucidate its mechanism in rats. Piperine (30mg/kg i.p.) produced profound analgesia, which was blocked by naloxone (10mg/kg). Chronic intraperitoneal administration of piperine significantly increased the contents of β -endorphin in rat midbrain. In the chronic piperine-treated groups, significant decreases of maximum opiate binding were observed. However, Kd value in these groups were not changed.

Piperine이 중추신경억제 작용이 있다는 사실^{1,2)}이 밝혀진 후 부터, piperine유도체의 합성 및 약리작용에 관한 연구가 보고되었으^{3~7)}, 최근 Liu 등⁸⁾은 piperine이 뇌내 serotonin합성을 촉진함으로써 항경련작용이 나타난다고 보고하였다.

한편 Lee 등⁹⁾은 tail-clip pressure와 writhing syndrome을 지표로 piperine의 진통작용에 대한 실험을 한 결과, acetaminophen의 진통작용에 비하여 70배, aminopyrine의 진통작용에 비하여 1.5배 정도 강력한 진통작용이 있음을 보고하였다.

Hughes 등¹⁰⁾ 및 Belluzi 등¹¹⁾은 뇌에는 진통작용을 나타내는 opioid peptides가 존재하며, 그 함량 분포에 따라 자극을 가하면 진통작용을 일으키고, opiate antagonist는 이 전기자극에 의한 진통효과를 차단하며, 장기간의 동통이나 자극으로 뇌척수액내 opioid peptides 농도가 변동된다고 하였다.

따라서 본 저자는 piperine의 진통작용에 대한 기전을 규명하여 보고자, hot-plate latency(HPL)을 지표로 piperine의 진통작용에 대한 실험을 하였으며, 이 진통작용이 naloxone에 의해 차단된다는 사실에 따라, 통각기전에 직접적인 관계

를 가지고 있는 뇌내 β -endorphin함량과 opiate 수용체의 상관관계를 살펴본 결과, piperine이 뇌내 β -endorphin의 함량을 증가시켜 진통작용을 나타내고 있다는 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

실 험 방 법

시약 및 기기—본 실험에서 사용한 시약은 piperine(Sigma Co.), β -endorphin[I-125](New England Nuclear Co.), [³H]-morphine sulfate(New England Nuclear Co.), [³H]-morphine sulfate(New England Nuclear Co.), morphine hydrochloride(Sam Sung pharm. Co.) 및 Naloxone hydrochloride(Sigma Co.)이었으며, 사용기기는 specific [³H]-morphine binding측정시에는 liquid scintillation counter(Packard)를 사용하였고, β -endorphin(I-125) 측정시에는 gamma-counter(Packard)를 사용하여 radioactivity를 측정하였다.

실험동물—체중 200g 내외의 흰쥐(Sprague-Dawley)를 자웅 구별없이 6마리를 1군으로 하여 사용하였으며, 대조군에는 생리식염수 0.2ml를, Vehicle군에는 70% ethanol 0.2ml를 그리고

실험군에는 70% ethanol 0.2ml에 piperine(30mg/kg)을 용해시켜 복강내 투여 하였고, 장기 약리 효과를 검정한 경우에는 1일 1회씩 3일, 1주, 2주 및 4주간 복강내로 각각 투여하고 최종 투약 1일 후 실험에 사용하였다.

疼痛 측정—동통측정은 hot-plate 법¹²⁾을 이용하였다. 즉 온도를 $55 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지시킨 hot-plate상부에 지름 20cm, 높이 20cm의 투명한 원통을 올려 놓고, 실험동물을 그 안에 넣은 후, hind paw licking을 보일때까지의 반응시간(hot plate latency; HPL이라 함)을 측정하여 동통에 대한 반응성의 지표로 하였다.

뇌내 β -endorphin함량의 측정—뇌내 β -endorphin의 측정은 동물을 단두하여 중뇌를 채취한 다음, 표본을 즉시 wet tissue g당 glacial acetic acid 9ml로 homogenate를 만들고, 원심(10,000g, 30min.)시킨 후, supernate를 동량의 acetone과 혼합하여 다시 동일방법으로 원심시킨 다음, supernate를 분리하여 60°C 에서 air로 증발 건조시켜 얻어진 표본을 β -endorphin(I-125) radioimmunoassay kit를 사용하여 측정하였다. 즉 0.1M phosphate buffer로 건조된 supernate를 희석한 다음, Ice water bath내에서 5ml용량의 siliconized tube에 assay buffer, 희석된 supernate, β -endorphin(I-125) 그리고 β -endorphin에 대한 rabbit antiserum을 넣어 mixer로 2~5초 섞은 후, 4°C 에서 24시간 incubation시키고, ice water bath내에서 charcoal suspension을 stirring시키면서 0.5 ml씩 tube에 넣고 잘 혼합하여, 4°C 에서 2,400 rpm으로 10분간 원심시켜 얻은 supernate의 radioactivity를 Gamma-counter로 측정하였다. Radioactivity의 정량적인 환산은 동시에 행한 β -endorphin의 표준곡선으로부터 산출하였으며, 단백질은 Lowry 등¹³⁾의 방법으로 측정하였다.

뇌내 Specific [^3H]-morphine binding의 측정—뇌내 opiate receptor binding은 흰쥐를 단두하여 약 0.5g의 중뇌를 채취하여, 표본을 즉시 얼음으로 냉각시킨 20배 용량의 50mM tris-HCl buffer (pH 7.4)로 homogenate를 만든 다음, 이 homogenate에 대한 [^3H]-morphine의 saturable binding을 Goldstein 등¹⁴⁾의 방법에 의해 측정하

였다. 즉 여러 농도의 nonlabeled morphine 0.75 ml를 각각 0.05ml의 [^3H]-morphine(specific activity 60 Ci/nM)을 혼합하여 37°C 수욕상에서 5분간 preincubation한 다음, 0.5ml의 homogenate를 혼합하여 동일 조건에서 15분간 incubation하여, 진공여과기(Toyo MF-12)를 이용, nitrocellulose filter paper(pore size $0.8\mu\text{m}$, Whatman Co.)로 여과하고, 빙냉한 tris-HCl으로 수차례 세척하였다. 다음 여과지를 1ml의 ethylene-glycol-monoethylether에 완전히 용해시키고 counting cocktail 9ml를 가하여 liquid scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다. specific binding은 total binding으로 부터 non-labeled morphine $10\mu\text{M}$ 존재하에 얻어진 non-specific binding치를 제하여 산출하였다. 결합된 [^3H]-morphine의 양은 p mole/mg protein으로 표시하였으며, B_{max} 와 K_d 치는 Akera 등의 방법¹⁵⁾에 의해 산출하였다. 얻어진 실험성적은 paired 또는 unpaired-student's t-test로 유의성을 검정하였다.

실험결과 및 고찰

疼痛에 대한 piperine의 영향—동통반응이 발현할 때까지의 시간(Hot-plate Latency; HPL)은 saline만을 투여한 대조군은 9.6 ± 1.5 초였고, Vehicle만을 투여한 군은 HPL이 9.0 ± 1.2 초였으며, 장기투여시에 HPL은 변동되지 않았으나, piperine(30mg/kg) 투여군에서는 piperine투여 전에는 HPL이 9.8 ± 1.3 초였으나, 약물투여 1시간 후에는 23.7 ± 3.7 초, 2시간 후에는 33.2 ± 4.0 초로 최고에 도달 하였으며 (Table I 참조), piperine 3일, 1주 및 2주 장기 투여시에 HPL은 각각 16.3 ± 1.8 초, 14.5 ± 1.7 초 그리고 22.7 ± 2.6 초로 효과는 지속적이었다 (Table II 참조). piperine의 진통작용과 opiate계와의 관계를 보고자, naloxone(10mg/kg)과 동시에 piperine을 투여한 결과, HPL은 9.1 ± 1.5 초였고, naloxone처리로 piperine의 진통작용이 차단되는 것으로 보아, piperine의 진통작용이 뇌내 opiate계와 밀접한 관계를 가지고 있음을 알 수 있다.

Table I—Effects of piperine (30mg/kg) on the response to pain of rats and its modification by naloxone (10mg/kg).

Groups	Before	After treatment of piperine			
	Treatment	1Hr.	2Hrs.	4Hrs.	8Hrs.
Saline	9.6±1.5	8.8±1.1	9.7±1.2	9.0±1.0	9.8±1.8
Control (Vehicle)	9.0±1.2	9.8±1.3	10.2±2.5	9.5±1.0	8.9±1.1
Piperine	9.8±1.3	23.7±3.7*	33.2±4.0*	26.6±2.2*	24.1±2.8*
Naloxone+Piperine	9.1±1.5	7.8±0.6**	7.5±0.7**	6.4±0.8**	6.1±0.6**

Each value represents the mean of hot plate latency (second) with SE from 6 experiments.

*: Significantly different from the control group ($p < 0.05$).

** : Significantly different from the piperine-treated group ($p < 0.05$).

Table II—Effects of piperine (30mg/kg) on the response to pain of rats.

Group	Before treatment	After treatment of piperine		
		3 days	7 days	14 days
Control (Vehicle)	9.4±1.1	9.1±1.2	9.5±1.3	9.3±1.4
Piperine	9.7±1.2	16.3±1.8*	14.5±1.7*	22.7±2.6

Each value represents the mean of hot plate latency (second) with SE from 6 experiments.

*: Significantly different from the control group ($p < 0.05$)

腦내 β -endorphin 함량에 미치는 piperine의 영향—Vehicle만을 투여한 군에서는 β -endorphin 함량은 68.4 ± 6 ng/mg protein이었고, piperine 30mg/kg을 3일, 1주, 2주 및 4주간 투여하였을 때, 뇌내 β -endorphin 함량은 각각 87.0 ± 7.7 , 93.8 ± 10.4 , 95.1 ± 9.2 그리고 90.6 ± 9.8 ng/mg protein으로서 대조군에 비하여 현저히 증가하였다 (Table III 참조).

Table III—Effects of piperine (30mg/kg) on the content of β -endorphin in rat midbrain.

Groups	Content of β -endorphin (ng/mg protein)
Control (Vehicle)	68.4 ± 6.5
Piperine	
3 days	87.0 ± 7.7*
1 wk.	93.8 ± 10.4*
2 wks.	95.1 ± 9.2*
4 wks.	90.6 ± 9.8*

Each value represents the mean ± SE from 6 experiments.

*: Significantly different from the control group ($p < 0.05$)

Specific [3 H]-morphine binding에 미치는 piperine의 영향—뇌내 β -endorphin 함량을 측정 한 동일 표본에서 specific opiate receptor binding 을 시행한 결과, 정상표본에서 maximum opiate binding (B_{max})는 0.51 ± 0.08 p mole/mg protein 이었고, vehicle 장기투여로 opiate binding B_{max} 는 변동하지 않았다. 그러나 piperine 장기투여 표본에서는 opiate binding B_{max} 는 처리 1주일부

Table IV—Effects of piperine (30mg/kg) on specific [3 H]-morphine binding in rat midbrain homogenates.

Groups	B_{max} (pmol/mg protein)
Control (vehicle)	0.51 ± 0.08
Piperine	
3 days	0.49 ± 0.05
1 wk.	0.42 ± 0.03
2 wks.	0.31 ± 0.04*
4 wks.	0.36 ± 0.08*

Each value represents the mean ± SE from 6 experiments.

*: Significantly different from the control group ($p < 0.05$).

터 감소하여 2주 및 4주에는 각각 0.31 ± 0.04 , 그리고 0.36 ± 0.08 p mole/mg protein으로 대조군에 비해 현저히 감소하였다(Table IV 참조). 한편 모든 실험군에서 K_d 치는 piperine장기투여로 변화하지 않았다(Table V 참조).

Piperine에 의한鎮痛作用과 腦내 β -endorphin 함량 및 Specific [3 H]-morphine binding과의 상관관계—상술한 실험성적에서 뇌내 β -endorphin함량과 진통작용 및 maximum opiate binding간의 상관관계를 산출하여 보면 각각 $r=0.809$ 와 $r=-0.755$ 로 유의한 상관관계가 있음

Table V—Effects of piperine(30mg/kg) on the apparent K_d values for specific [3 H]-morphine binding in rat midbrain homogenates.

Groups	K_d (nM)
Control(vehicle)	0.79 ± 0.08
Piperine	
3 days	0.85 ± 0.09
1 wk.	0.88 ± 0.07
2 wks.	0.80 ± 0.09
4 wks.	0.84 ± 0.08

Each value represents the mean \pm SE from 6 experiments.

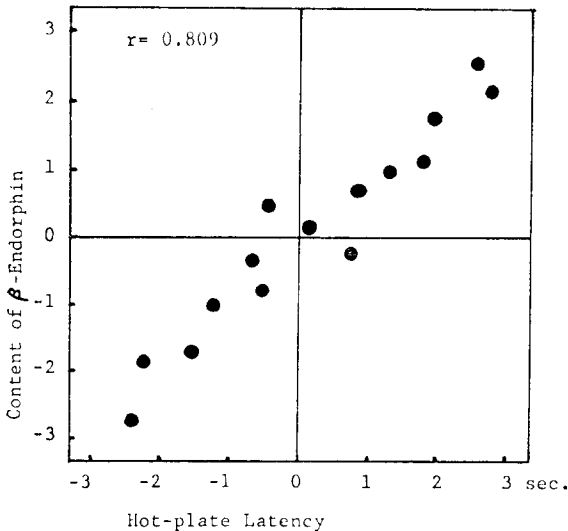


Fig. 1—Correlation between hot-plate latency and β -endorphin content in chronic piperine-treated rats.

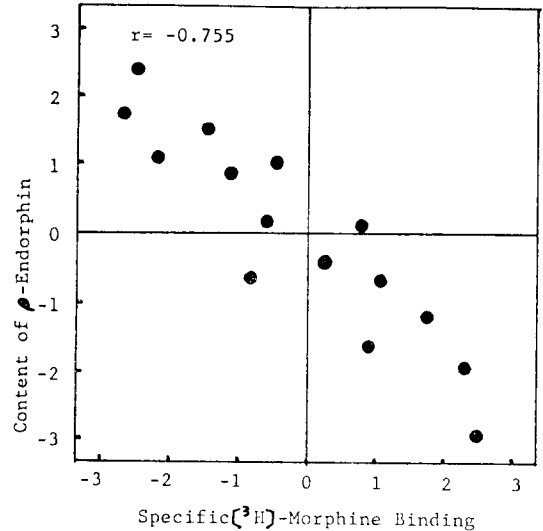


Fig. 2—Correlation between specific [3 H]-morphine binding and content of β -endorphin in chronic piperine-treated rats.

을 알 수 있다((Fig. 1, Fig. 2 참조).

본 실험에서 piperine 장기투여로 maximum opiate binding은 현저히 감소하고 K_d 치는 변동하지 않았다는 사실은, opiate수용체의 변동이 질적인 변동이 아닌 수적변동임을 의미하며, 뇌내 β -endorphin함량변동과 B_{max} 변동이 유의한 상관관계를 가지고 있음은 opiate수용체의 수적감소가 piperine에 의한 뇌내 β -endorphin함량 증가에 따른 receptor regulation에 의한을 시사하고 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 한편 동통에는 뇌내 opiate계 외에도 GABA-ergic신경계¹⁹⁻²⁰⁾를 포함하여 그와 다른 기전이 밀접히 관계되어 있기 때문에, 이 점은 앞으로 더 연구하여야 할 과제라 생각된다.

결 론

piperine(30mg/kg)의 진통작용은 naloxone(10 mg/kg) 처리로 차단되며, piperine의 장기투여는 뇌내 β -endorphin함량을 증가시키고, maximum opiate binding은 감소시키며, K_d 치는 변화시키지 못했다. 이러한 결과는 뇌내 β -endorphin함량이 증가됨으로서 opiate receptor의 수적변화가 일어나 진통작용이 나타나는 것이라 사료된다.

문헌

- 1) W.S. Woo, E.B. Lee and K.H. Shin: Central nervous depressant activity of piperine. *Arch. Pharm. Res.* **2**, 121 (1979).
- 2) K.H. Shin, H.S. Yun, W.S. Woo and C.K. Lee: Pharmacologically active principle of Piper retrofractum. *Kor. J. Pharmacogn.* **10**, 69 (1979).
- 3) J.S. Eun, J.K. Rim, W.J. Kim, W.S. Woo and E.B. Lee: Syntheses and Central Nervous depressant activities of piperine derivatives. *Yakhak Hoeji* **27**, 283 (1983).
- 4) H.K. Lee, J.K. Rim, E.B. Lee and W.S. Woo: Syntheses and central nervous depressant activity of piperine derivatives (Ⅲ) N-piperoyl amino acids. *Yakhak Hoeji* **27**, 289 (1983).
- 5) K.H. Shin and W.S. Woo: Effect of piperine on hepatic mixed function oxidase system. *Korean Biochem. J.* **18**, 9 (1985).
- 6) Y.Q. pei: A review of pharmacology and clinical use of piperine and its derivatives. *Epilepsia* **24**, 177 (1983).
- 7) Y.K. Shim, J.K. Rim, E.B. Lee and W.S. Woo: Studies on the synthesis and central nervous dispressant activities of piperine derivatives(IV). *Yakhak Hoeji* **29**, 253 (1985).
- 8) G.Q. Liu, S. Algeri, A. Ceci, S. Garattini, M. Gobbi and S. Murai: Stimulation of serotonin synthesis in rat brain after antiepilepsirine. *Biochemical Pharmacology.* **33**, 3883 (1984).
- 9) E.B. Lee, K.H. Shin and W.S. Woo: Pharmacological study on piperine. *Arch. Pharm. Res.* **7**, 127 (1984).
- 10) Hughes J. Smith T.W., Kosterlitz H.W., Fothergill L.A., Morgan B.A. and Morris H.R.: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature (London).* **258**, 577 (1975).
- 11) Belluzi J.D., Grant N., Garsky V., Sarantakis D., Wise C.D. and Stein I.: Analgesia induced in vivo by central administration enkephalin in rat. *Nature(London).* **260**, 625 (1976).
- 12) Bowman W.C. and Rand M.J.: Drugs used to relieve pain. *Textbook of pharmacology. 2nd ed.* Blackwell Scientific Publication (London) pp.16 (1980).
- 13) Lowry C.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Rendal R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 14) Goldstein A., Lowney L.I. and Pal B.K.: Stereospecific and non-specific interactions of the morphine congener levorlorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Nat. Acad. Sci. (USA)* **68**, 1742 (1979).
- 15) Akera T. and Cheng V.K.: A simple method for the determination of affinity and binding site concentration in receptor binding studies. *Biochimica et Biophysica.* **470**, 412 (1977).
- 16) Akil A., Mayer D.J. and Liebeskind J.C.: Antagonism of stimulation-produced analgesic by naloxone, a narcotic antagonist. *Science* **191**, 961 (1976).
- 17) Mayer D.J. and Hayer R.L.: Stimulation-produced analgesia, Development of tolerance and cross-tolerance to morphine. *Science* **188**, 941 (1985).
- 18) Hosobucci Y., Rossier J., Broom F.E. and Suillemin R.: Stimulation of human periaqueductal gray for pain relief increases immunoreactive β -endorphin in venticular fluid. *Science.* **203**, 279 (1979).
- 19) Olson R.W.: Drug interaction at the GABA receptor ionopore complex. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **22**, 245 (1982).
- 20) Study R.E. and Baker J.L.: Diazepam and pentobarbital: Fluctuation analysis reveals different mechanism for potentiation of r-aminibutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **354** (1981).