

## 천연 Furanocoumarin 유도체들이 간의 Cytochrome P-450 효소계에 미치는 작용기전\*

신 국 현 · 우 원 식  
서울대학교 생약연구소

The Mode of the Activity of Naturally Occurring Furanocoumarins on Hepatic Cytochrome P-450 Enzyme System

Kuk Hyun Shin and Won Sick Woo

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

**Abstract**—The effects of naturally occurring furanocoumarins on cytochrome P-450 have been investigated in rat liver microsomes. Incubation of microsomes with an NADPH-generating system and four furanocoumarins such as imperatorin, isoimperatorin, phellopterin and byakangelicin at 37° *in vitro* resulted in a significant destruction of cytochrome P-450. A single treatment(50 mg/kg, i.p.) of rats with each furanocoumarin caused a rapid loss of cytochrome P-450 accompanied by the loss of heme from the microsomes but not by the loss of cytochrome b<sub>5</sub>. It is suggested that cytochrome P-450 is specifically destroyed by furanocoumarins in a metabolic process involving destruction of its heme group and as a consequence, hepatic enzyme activities are depressed markedly.

**Keywords**—Naturally occurring furanocoumarins • destruction of cytochrome P-450 • loss of heme • imperatorin • isoimperatorin • phellopterin • byakangelicin

천연 furanocoumarin들은 한방에서 가장 빈번히 처방 투약되는 중요한 생약인 산형과 식물에 널리 분포되어있는 성분으로서 다양한 약리 및 생리활성이 있음이 보고되어 있다.<sup>1)</sup> 저자들은 강력한 간의 약물대사효소 억제물질로서 산형과 식물의 하나인 강활근으로부터 6종의 furanocoumarin<sup>2)</sup>과 백지근으로부터 3종의 furanocoumarin 성분들을 분리하여 그 작용을 보고 하였다.<sup>3)</sup> 이 실험들을 통하여 furanocoumarin 유도체 들에는 효소 억제 또는 유도의 양면성이 있으며 그 억제작용의 강도가 side chain의 polarity의 차이에 따라 달라진다는 사실과 cyto-

chrome 효소의 감소를 수반한다는 사실 등을 관찰하여보고하였다.<sup>4,5)</sup> 한편 Tinel등<sup>6)</sup>이 사람의 간 microsomal cytochrome P-450에 대한 수종의 psoralen 유도체들의 작용기전 검토에서 psoralen 들이 강력한 suicide inhibitor임을 밝힌바 있으므로 천연 furanocoumarin 성분들이 산화효소계의 key enzyme인 cytochrome P-450에 미치는 작용양식과 그 구조활성관계는 구명되어야 할 중요한 과제의 하나이다. 따라서 본 보고에서는 강활 및 백지등에서 분리된 천연 furanocoumarin 들이 간의 microsomal cytochrome P-450에 미치는 작용기전에 대하여 검토한 결과를 보고한다.

\* Part 15 in the series: Studies on crude drugs acting on drug-metabolizing enzymes. For part 14, see ref. 14.

## 실 험 방 법

### 천연 furanocoumarin의 분리 및 동정

본연구에 사용한 천연furanocoumarin 들로서 imperatorin, isoimperatorin은 감활근(Angelicae Koreanae Radix)로부터, phellopterin 및 byakangelicin 등은 백지근(Angelicae dahunicae Radix) 으로부터 전보<sup>2,3</sup>에 준하여 순수 분리하고 이화학적 성상 및 NMR data로부터 동정하였다.

### 실험동물 및 시약

체중 150~200 g의 음성 Sprague-Dawley rat 를 실험동물로하였으며 고형사료와 식수를 공급하였다. Allylisopropylacetamide는 Hoffman-LaRoche (Nutley, N.J.)로 부터 공급받았으며 SKF-525A는 Smith, Kline & French Lab로 부터 공급받았다. NADP, NADPH, glucose-6-phosphate 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase 등은 Sigma 제품을 구입하여 사용하였고 다른 cofactor들은 특급시약을 기타시약들은 일급 시약을 사용하였다.

### Microsome 효소의 제조

Rat의 경동맥을 절단하여 실험시킨후 희생시킨 다음 간을 적출하고 무게를 측정후 가위로 잘게 절단한 다음 얼음으로 냉각시킨 상태에서 1.15% KCl로 2회 세척하여 hemoglobin을 제거하고 5~7배의 1.15% KCl(동장액)-0.01 M Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> phosphate buffer pH 7.4을 가하여 homogenization하였다. 이렇게하여 얻은 homogenate는 10,000 g에서 20분간 원심분리(5°)하여 상등액을 취하여 효소원으로 하였다. 또한 이 효소원을 100,000 g에서 1시간 초원심분리(4°)하여 얻은 pellet를 상기 buffer에 재현탁시켜서 다시 초원심분리하여 얻은 pellet를 microsomes로 하였다. microsomes의 단백질 정량은 Lowry et al<sup>7)</sup>의 방법을 사용하여 실시하였으며 이를 적절히 희석하여 cytochrome P-450, cytochrome b<sub>5</sub> 또는 heme 정량을 실시하였다.

### Aminopyrine N-demethylase 활성의 측정

기질인 aminopyrine 및 MgCl<sub>2</sub> 25 μmoles를 함유한 0.1 M Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> phosphate buffer(pH 7.4) 1.0 ml, cofactor 혼액(NADP 0.65 μmole, glu-

cose-6-phosphate 10.0 μmoles, nicotinamide 50.0 μmoles 및 semicarbazide 45 μmoles를 함유한 0.5 M. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> phosphate buffer, pH 7.4) 3.0 ml, 시료액의 ethanol 용액 0.1 ml, 그리고 효소원 10,000 g 상등액 2.0 ml를 가한 6.1 ml를 반응액으로 하여 O<sub>2</sub>(5% CO<sub>2</sub>)를 기상으로 하고 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 반응 종결 후 Ladu<sup>8)</sup> 등과 Nash<sup>9)</sup>의 방법에 따라 생성된 HCHO의 양을 비색 정량하여 대사량을 측정하였다. 대조군은 시료액대신 ethanol 0.1 ml를 가한 것이며, 맹검은 기질액에서 aminopyrine 대신 MgCl<sub>2</sub> 용액, 시료액대신 ethanol 0.1 ml를 가한 것으로 하였다.

Aminopyrine 대사량(nmoles/g protein) = HC HO(μg/ml) × 83.33/mg protein(효소액 1 ml).

### Cytochrome P-450, b<sub>5</sub> 및 heme 정량

Cytochrome P-450의 정량은 Omura 및 Sato<sup>10)</sup>의 방법에 따라 환원형 cytochrome P-450 상태에서 CO binding spectra를 측정하여 실시하였다. 즉 세척한 microsomes를 EDTA 10<sup>-3</sup> M을 함유하는 phosphate buffer(pH 7.4)로 희석하여 2~3 mg/ml 단백질로 조절하고 두개의 UV cell에 나누어 넣은후 510~380 nm 사이의 base line spectrum을 그린다. 양쪽 cell에 다시 dithionite (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) 분말 소량을 가하여 용해시킨후 sample cell에 CO gas(Sigma 제품)를 20초간 통한 것을 다시 510~380 nm 사이를 scanning하여 450 nm의 흡광도로부터 P-450량을 구하였다. 이때 cytochrome P-450의 분자흡광계수를 91 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>로 하였다. Cytochrome b<sub>5</sub>의 정량은 역시 Omura & Sato의 방법<sup>10)</sup>에 준하여 microsomes 희석액 2~3 mg/ml액의 baseline scanning을 실시후 sample cell에 dithionite 분말을 소량 가하여 환원시키고 500~400 nm의 파장사이를 scanning하여 423 nm 부근의 최대흡광도로부터 cytochrome b<sub>5</sub>의 양을 구하였다. 이때 cytochrome b<sub>5</sub>의 분자흡광계수는 171 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>로 하였다.

Heme의 정량은 역시 Omura 및 Sato의 방법<sup>10)</sup>에 따라 세척한 microsomes을 동일용량의 1%(w/v) sodium deoxycholate 액과 혼합하여 solubilization 시키고 15분후 0.15 M NaOH와

25%(v/v) pyridine 혼액에 가하였다. sample cell에  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  분말 reference cell에  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  분말 소량을 가하여 500~600 nm사이를 scanning 하고 557 nm의 흡광도로부터 heme량을 구하였다. 이때 heme의 분자흡광계수는  $32.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다.

#### 지질과산화의 측정

Microsomes의 지질과산화를 Pessayre<sup>11)</sup> 등의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 microsomes 일정량(125 mg liver 상당)을 0.2 mM NADPH, 0.05 mM EDTA 및 inhibitor가 존재하는  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  phosphate buffer 용액 3.5 ml를 37°에서 20분간 incubation시킨 다음 20% trichloroacetic acid 2 ml를 가하여 생성하는 침전을 2000 rpm으로 원심분리하고 상등액 2 ml에 0.67%의 thiobarbituric acid 1 ml를 가한 다음 열탕에서 10분간 가열하고 532 nm의 흡광도를 측정하였다. 따로 incubation하지 않은 액도 동일하게 처리후 흡광도를 측정하고 반응시킨 액의 흡광도와 차를 thiobarbituric acid 반응생성량에 해당하는 것으로 하고 분자흡광계수  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 로 하여 과산화지질량으로 하였다. EDTA 및 inhibitor를 가하지 않은 액도 동일조작에 의하여 지질과산화량을 측정하였다.

#### 실험결과 및 고찰

##### 천연 Furanocoumarin들이 *in vitro*에서 Cytochrome P-450 함량에 미치는 효과

산형과 식물들에서 순수분리한 구조적으로 유사하나 side chain의 결합 분자기들의 종류나 결합위치가 상이한 4종의 천연 furanocoumarin들이 *in vitro*에서 cytochrome P-450 효소에 미치는 효과를 경시적으로 검토한 결과를 Table I에 종합하여 표시하였다. 즉 phenobarbital로 유도시킨 rat의 간 microsomes 일정량에 1.5 mM EDTA, inhibitor(각각 1 mM) 및 NADPH-generating system 등을 가하고 37°에서 0~60분까지 경시적으로 incubation하고 반응액속의 cytochrome P-450를 정량하여 그 변화를 관찰하였다.

Table I에 의하면 microsomes의 반응액에 아

무것도 가하지 않고 buffer 만을 가하거나 NADPH-generating system만을 또는 furanocoumarin들만을 가하여 incubation한 다음 cytochrome P-450을 정량한 결과 0~60분까지 거의 함량변화가 없음을 확인한 반면 Exp. 1~4까지의 실험결과를 보면 각 furanocoumarin 및 NADPH-generating system 존재하에서 incubation한 결과에서는 경시적으로 cytochrome P-450의 함량이 감소하는 것을 관찰할 수 있다. 즉 imperatorin 존재시 30분, 60분 incubation으로 27.3, 26.7% 감소, isoimperatorin 존재시 30.2, 31.2% 감소, byakangelicin 존재시 20.1 및 27.2% 감소, phellopterin 존재시 각각 30.3 및 31.5% 감소함을 인지하였다. 이 결과에 의하면 prenyl side chain이 있는 imperatorin, isoimperatorin, phellopterin 등에서 강한 cytochrome P-450 효소감소 현상을 나타냄을 관찰할 수 있으며 이는 전보의 *in vivo* 실험에서<sup>3,4)</sup> 이들 물질들의 투여시 다른 furanocoumarin들에 비하여 가장 심한 효소활성 억제(aminopyrine N-demethylase 활성)를 나타낸 것과 일치하며 polarity가 더 큰 side chain이 결합된 byakangelicin이 비교적 약한 감소현상을 보인 것도 효소 억제효과가 더 약화된 실험결과와 일치한다.<sup>3)</sup> 이 실험결과에 의하면 microsomal enzyme의 억제효과가 일어나는 것은 cytochrome P-450의 감소에 기인한다는 것을 인정할 수 있으며 이와같은 cytochrome P-450의 감소가 일어나려면 NADPH-generating system이 필수적으로 필요함이 입증되었다.

Prenyl기가 C-5에 결합되었든 C-8에 결합되었든 cytochrome P-450 파괴의 정도는 유사하였으며 furan핵이 있는 coumarin에서 모두 cytochrome P-450 감소현상을 나타낸 것으로 보아 이중결합이 있는 furan 핵이 또한 cytochrome P-450 파괴에 필수적임을 추정할 수 있다. 이와같은 결과는 최근 Mays등<sup>12)</sup>이 furanocoumarin의 일종인 8-methoxypsoralen(8-MOP)가 *in vitro*에서 활성중간체로 변하며 이 활성중간체가 간 microsomes과 공유결합 함으로서 P-450의 감소를 초래하는 것으로 제시한 가설을 뒷받침하며 현재 8-MOP의 활성 중간체의 구조

**Table I.** Time course of requirements for and *in vitro* loss of CO-binding cytochrome P-450 by various furanocoumarins and an NADPH-generating system

Incubation	CO-binding cytochrome P-450			
	0	10	30	60(min)
No additive	1.007±0.031	1.022±0.021	0.997±0.023	0.927±0.003
NADPH-generating system	0.856±0.011	0.990±0.022	0.948±0.001	0.942±0.027
Exp. 1.				
Imperatorin(1mM)	1.022±0.012	1.028±0.062	0.855±0.028	0.956±0.044
Imperatorin(1mM) +NADPH-generating system	0.946±0.045	0.837±0.048*	0.688±0.043**	0.693±0.007***
		(11.5)	(27.3)	(26.7)
Exp. 2.				
Isoimperatorin(1mM)	0.910±0.044	0.889±0.094	0.946±0.044	0.890±0.034
Isoimperatorin(1mM) +NADPH-generating system	0.908±0.057	0.753±0.101	0.634±0.005***	0.625±0.021***
		(17.1)	(30.2)	(31.2)
Exp. 3.				
Byakangelicin(1mM)	1.066±0.03	1.139±0.015	1.077±0.039	1.015±0.005
Byakangelicin(1mM) +NADPH-generating system	1.077±0.02	0.883±0.017***	0.860±0.024***	0.784±0.005***
		(18.0)	(20.1)	(27.2)
Exp. 4.				
Phellopterin(1mM)	1.316±0.022	1.447±0.032	1.170±0.018	1.303±0.006
Phellopterin(1mM) +NADPH-generating system	1.307±0.019	1.156±0.015***	0.911±0.008***	0.895±0.007***
		(11.6)	(30.3)	(31.5)

Pooled hepatic microsomes from rats induced by phenobarbital were incubated for various times under air at 37° in the presence or absence of 1 mM EDTA, an NADPH-generating system and various furanocoumarins as indicated.

The incubation mixture was placed in ice and cytochrome P-450 was measured as CO-difference spectrum of dithionite-reduced microsomes. Results are means±S.E. for three separate determinations.

Figures in parentheses indicate % loss of cytochrome P-450.

Significantly different from the corresponding control; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

는 확실히 밝혀져 있지 않으나 8-MOP의 furan ring이 산화되어 생성되는 furan epoxide로서 이 물질이 효소단백과 결합하는 것으로 추정된다.

#### ***In vitro*에서 Cytochrome P-450 파괴와 Inhibitor 농도와의 관계**

간 microsomes을 1 mM EDTA, NADPH-generating system 존재하에서 37° 1시간 incubation 할 때 천연 furanocoumarin들의 농도를 0~400 μM로 변동시켜 가했을 때 cytochrome P-450 파괴에 미치는 효과를 비교검토한 결과를 Fig. 1 A-E에 각각 표시하였다. 4종의 천연 furanocoumarin 모두가 100 μM 농도에서 강한 cytochrome P-450의 감소를 보이며 그 이상의 농도에서는 감소율의 큰 증가를 관찰할 수 없었다.

이와반면에 전형적인 cytochrome P-450 파괴 물질로 알려진 allylisopropylacetamide(AIA)<sup>13)</sup>는 25 μM에서는 별로 파괴효과가 없으나 그 이상의 농도에서는 농도의 증가에 따라 cytochrome P-450의 파괴율이 더욱 증가함을 알았다. 이는 AIA와 천연 furanocoumarin의 cytochrome P-450 파괴기전에 근본적인 차이가 있음을 암시한다.

#### ***In vivo*에서 천연 Furanocoumarin이 Cytochrome 효소계에 미치는 효과**

이제 전보에서<sup>4,5)</sup> 천연 furanocoumarin들을 mouse에 투여하고 30분후에 hexobarbital 수면시간에 미치는 효과와 간을 적출하여 aminopyrine N-demethylase 활성에 미치는 효과를 검토한 결과 hexobarbital 수면시간을 현저히 증가시키며 효소활성을 억제함을 입증한바 있으며 또한 본

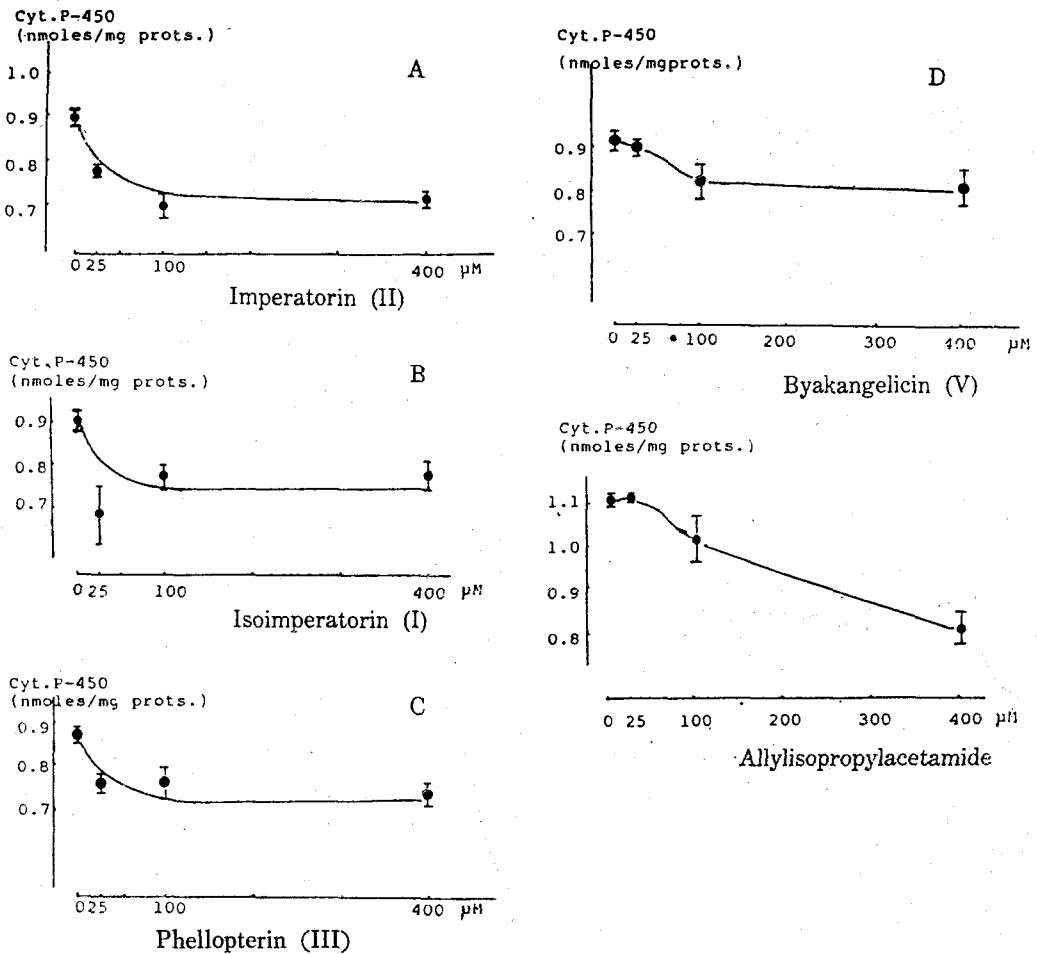


Fig. 1. *In vitro* destruction of cytochrome P-450 by furanocoumarins.

Microsomal suspensions were incubated under air at 37° in the presence of 1mM EDTA, an NADPH-generating system and various concentrations of furanocoumarins as indicated. After 60min incubation, the incubation mixture was placed in ice and cytochrome P-450 was measured. Results are means  $\pm$  S.E. for three separate determinations.

연구에서 *in vitro*에서 cytochrome P-450의 감소를 초래함이 증명되었으므로 *in vivo*에서도 cytochrome 효소계에 변동을 초래하는가를 검토하기 위하여 rat를 실험동물로 하고 각종 furanocoumarin들을 50 mg/kg씩 복강내 주사한 후 1시간후에 간을 적출하여 microsomes를 얻고 cytochrome P-450, cytochrome b<sub>5</sub> 및 total heme 단백질량에 미치는 효과를 검토한 결과를 Table II에 종합하여 표시하였다. Table II에서 보는 바와 같이 cytochrome P-450의 함량은 furanocoumarin을 투여한 모든 실험군에서 유의성있는

감소를 나타냄을 관찰하였으며 이는 *in vitro*에서 furanocoumarin들의 존재하에서 cytochrome P-450의 감소를 일으킨다는 결과와 부합하였다. Prenyl기가 C-5에 있는 isoimperatorin이 C-8에 있는 imperatorin보다 그리고 methoxyl기가 더 붙은 phellopterin이 더 강한 억제효과를 나타내었다. 한편 cytochrome b<sub>5</sub>에 있어서는 phellopterin 투여군에서만 억제를 나타내었고 다른 군에서는 유의성있는 감소현상을 관찰할 수 없었다. 한편 total heme의 함량은 cytochrome P-450의 감소와 수반하여 furanocoumarin 투여군 모

**Table II.** Effect of a single treatment of various furanocoumarins on hepatic microsomal cytochrome P-450, cytochrome b<sub>5</sub> and total heme contents in rats

Treatments	Cytochrome P-450 (nmoles/mg prot.)	Cytochrome b <sub>5</sub> (nmoles/mg prot.)	Heme (nmoles/mg prot.)
Control(0.5% CMC)	1.78±0.04	0.67±0.02	2.2±0.08
Imperatorin	1.59±0.01* (10.7)	0.61±0.01	1.5±0.13* (31.8)
Isoimperatorin	1.34±0.08** (24.7)	0.65±0.05	1.6±0.02** (27.2)
Phellopterin	1.26±0.14** (29.2)	0.55±0.03*	1.4±0.11* (36.4)
Byakangelicin	1.42±0.03** (20.2)	0.46±0.08	1.6±0.14* (27.2)

Rats were pretreated with phenobarbital (80 mg/kg daily for 3 days). Pretreated rats then received each furanocoumarin(50 mg/kg, i.p.) and were killed 1 hr later.

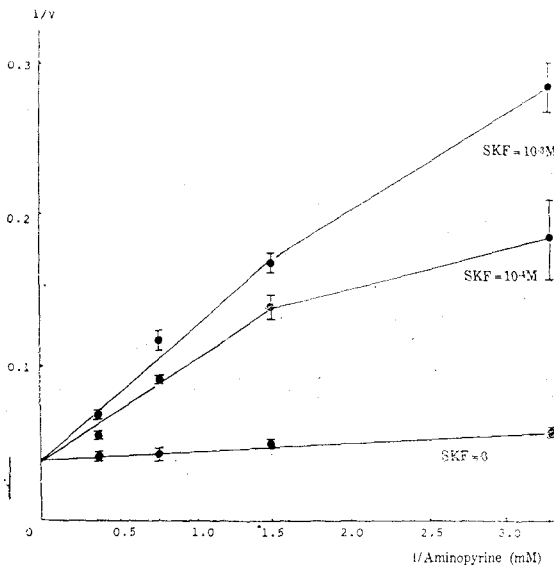
Results were means±S.E. for three separate determinations. Figures in parentheses indicate % inhibition. Significantly different from that in control animals.; \*p<0.05, \*\*p<0.01.

두에서 27~36%의 현저한 감소를 나타내었다. 이와같은 현상은 furanocoumarin 들에 의하여 cytochrome P-450가 파괴되는 기전의 하나의 중요한 요소로 생각되어지며 furanocoumarin의 side chain에 결합된 group들이 heme adduct를 형성하여 "green pigment"를 형성할 가능성을 배제할 수 없다. 또한 P-450로부터 P-420으로 변환될 가능성도 있으며 앞으로 더 구체적인 구

명이 필요할 것으로 사료된다. Prenyl기와 methoxyl기가 모두 있는 phellopterin에서 특히 강한 heme의 감소가 관찰되었다.

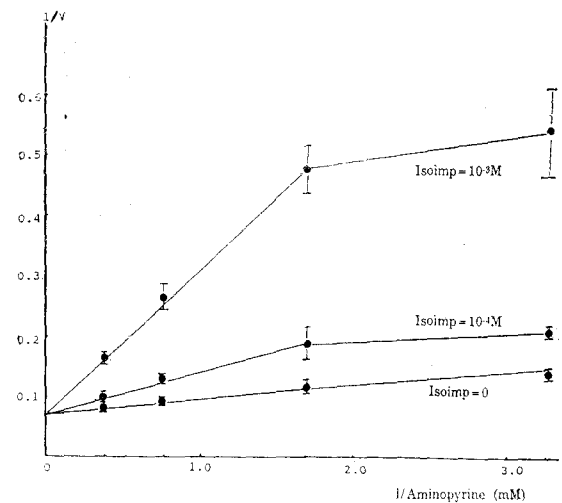
**천연 Furanocoumarin들의 효소억제의 동력학적 반응양식**

천연 furanocoumarin들의 효소억제의 동력학적반응 양식을 검토하기 위하여 기질로서 aminopyrine로 하고 aminopyrine N-demethylase 효소



**Fig. 2.** Inhibition of aminopyrine N-demethylase activity by SKF-525A. (Lineweaver Burk plots.)

The enzyme activity was measured with pooled rat liver microsomal fraction(10,000g supernatant) and an NADPH-generating system. Results are means±S.E. for three determinations.



**Fig. 3.** Inhibition of aminopyrine N-demethylase activity by isoimperatorin(Lineweaver-Burk plots).

The enzyme source and cofactors are the same as in Fig. 2.

Results are means±S.E. for three determinations.

에 대한 반응양식을 검토하여 그 결과를 Fig. 2 ~6에 표시하였다.

Type I compound의 하나로 알려진 aminopyrine을 기질로 하였을때에 Type I inhibitor인 SKF-525A가 competitive inhibition을 나타내어  $V_{max}$ 에 변동이 없으며  $K_i$  value가  $1.8 \times 10^{-5}M$ 로서 강한 억제활성이 있음이 재확인되었다. 한편 imperatorin, isoimperatorin 및 byakangelicin 모두  $V_{max}$ 에 변동을 초래하지 않음을 알았으며 따라서 모두가 competitive inhibitor임을 알 수 있고 각각의  $K_i$ 값은  $8.0 \times 10^{-5}M$ ,  $6 \times 10^{-5}M$  및  $3.5 \times 10^{-5}M$ 이었다.

Isoimperatorin, SKF-525A는 저농도에서 직선성을 벗어나므로 regression equation에 의하여 직선성을 나타내는 부분에서만  $K_i$  value를 구하였다. 또한 phellopterin의 경우는 같은 농도 범위에서 심하게 직선성을 벗어나므로  $K_i$ 를 구할 수 없었으나  $V_{max}$ 에는 변동이 없는 것으로 사료된다.

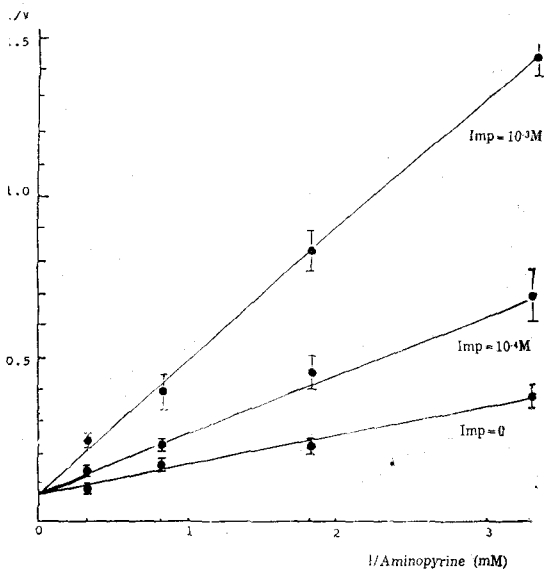


Fig. 4. Inhibition of aminopyrine N-demethylase activity by imperatorin. (Lineweaver-Burk plots).

The enzyme source and cofactors are the same as in Fig. 2.

Results are means  $\pm$  S.E. for there determinations.

천연 Furanocoumarin들이 Microsomes 지질과산화에 미치는 효과

Cytochrome-P-450이 관여하는 catalytic cycle에는 부반응으로서 지질과산화가 일어날 수 있다는 것이 알려져 있으므로 천연 furanocoumarin들에 의한 cytochrome P-450 감소가 지질과산화에 기인하는가의 여부를 검토하기 위하여 이들 물질들이 지질과산화에 미치는 효과를 검토하였다(Table III). 즉 microsomes의 내인성 Fe ion에 의해 유발되는 지질과산화가 EDTA가 존재하지 않은 조건에서는 현저히 증가함을 관찰할 수 있으며 이때 furanocoumarin들에 의하여 더 촉진되지 않는다는 사실을 관찰하였다. 오히려 furanocoumarin에 따라서는 지질과산화가 현저히 억제된다는 흥미있는 사실을 관찰하

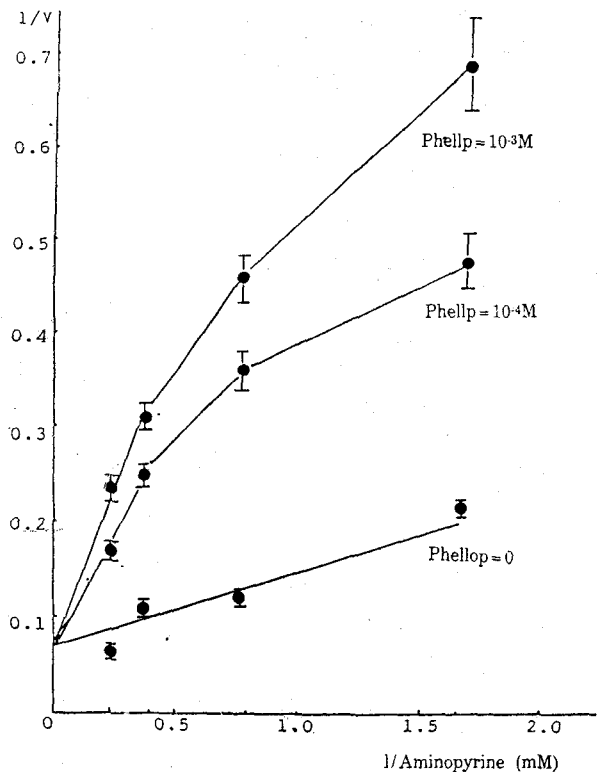


Fig. 5. Inhibition of aminopyrine N-demethylase activity by phellopterin (Lineweaver-Burk plots.)

The enzyme source and cofactors are the same as in Fig. 2.

Results are means  $\pm$  S.E. for three determinations.

**Table III.** Effect of furanocoumarins on microsomal lipid peroxidation *in vitro*

Treatments	TBA-reactants (nmol/mg prot./20min)	Significance <sup>b)</sup>
<i>Exp. 1.</i>		
<i>With EDTA</i>		
Without imperatorin	0.012±0.000	
With imperatorin	0.014±0.000	
<i>Without EDTA</i>		
Without imperatorin	0.73 ±0.09	
With imperatorin	0.38 ±0.03(47.9) <sup>a)</sup>	P < 0.05
<i>Exp. 2.</i>		
<i>With EDTA</i>		
Without isoimperatorin	0.03 ±0.004	
With isoimperatorin	0.02 ±0.005	
<i>Without EDTA</i>		
Without isoimperatorin	1.70 ±0.05	
With isoimperatorin	0.72 ±0.00(57.6)	P < 0.001
<i>Exp. 3.</i>		
<i>With EDTA</i>		
Without Phellopterin	0.026±0.001	
With Phellopterin	0.018±0.002	
<i>Without EDTA</i>		
Without Phellopterin	1.12 ±0.02	
With Phellopterin	0.44 ±0.04(60.7)	P < 0.001
<i>Exp. 4.</i>		
<i>With EDTA</i>		
Without Byakangelicin	0.082±0.001	
With Byakangelicin	0.051±0.001	
<i>Without EDTA</i>		
Without Byakangelicin	1.95 ±0.04	
With Byakangelicin	1.76 ±0.02 (9.7)	P < 0.01

Microsomes from rats pretreated with phenobarbital(80 mg/kg, i.p. for 3 days) were incubated at 37° with 0.2 mM NADPH, 0.05 mM EDTA and 1 mM furanocoumarin. In other flasks EDTA and/or furanocoumarins were omitted. After 20 min of incubation, the amount of thiobarbituric acid (TBA)-reactants was determined as illustrated in the text. The results show the means±S.E. for three separate determinations.

a) Figures in parentheses indicate % inhibition.

b) Significantly lower than that without furanocoumarin.

였다. 즉 Table III에서 보는바와 같이 imperatorin, isoimperatorin 및 phellopterin 적용군에서 거의 50% 이상의 지질과산화 억제제가 일어났다. 더 polarity가 큰 side chain이 결합된 byakangelicin 에서는 비교적 약한 억제를 보였다. 이는 furanocoumarin들의 지용성의 크기에 관련성이 있는 것으로 추정되며 또한 lipid에 대

한 affinity나 heme iron에 대한 거동에 차이가 있기때문에 일어나는 현상으로 추측된다. 이와 같은 결과에 의하면 furanocoumarin들에 의한 cytochrome P-450 파괴는 지질과산화와 직접적인 관련성이 없는 것으로 추정되며 이 furanocoumarin들에 의한 지질과산화 억제기전은 앞으로 더 검토해야할 과제로 사료된다.



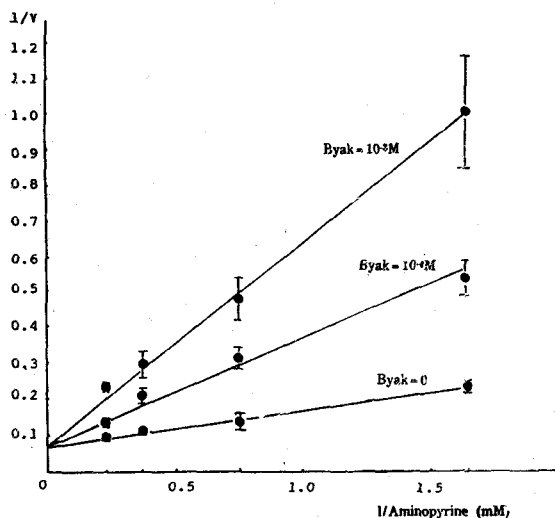


Fig. 6. Inhibition of aminopyrin N-demethylase activity(Lineweaver-Burk plots).

The enzyme source and cofactors are the same as in Fig. 2.

Results are means  $\pm$  S.E. for three determinations.

## 결 론

천연 furanocoumarin 유도체중 간의 약물대사 효소활성 억제작용이 강력한것으로 입증된 iso-imperatorin, imperatorin, phellopterin 및 by-akangelicin들이 microsomes의 cytochrome P-450 효소계에 미치는 작용기전에 대하여 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

*In vitro*에서 천연 furanocoumarin들은 cytochrom P-450을 경시적으로 파괴하며 NADPH-generating system을 필요로함이 입증되었다.

*In vivo*에서도 *in vitro* 실험과 부합되게 천연 furanocoumarin 단일회 투여(50 mg/kg, ip.)로 유의성있는 cytochrome P-450의 파괴를 나타내었으며 total heme의 현저한 감소를 수반하였으나 cyt. b<sub>5</sub>에는 큰 영향을 끼치지 않았다.

천연 furanocoumarin들은 25~100  $\mu$ M 농도에서 cytochrome P-450을 현저히 파괴하며 그 이상에서는 파괴가 더 진전되지 않았다.

천연 furanocoumarin들의 type I 기질인 ami-

nopyrine의 대사에 대한 동력학적 반응양식을 검토한 결과 competitive inhibitor임을 알았다.

천연 furanocoumarin들은 *in vitro*에서 cytochrome P-450의 지질과산화를 촉진하지 않았으며 오히려 억제하였다.

**감사의 말씀**—본 실험은 1988년도 문교부지원 학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 이루어졌다. 본 연구에 사용한 allylisopropylacetamide는 Hoffman-LaRoche(Nutley, N.J.)로부터 제공받았으며 이에 감사한다.

<1990년 1월 10일 접수 : 2월 28일 수리>

## 문 헌

1. Shin, K.H. and Chi, H.J.: *Kor. J. Pharmacogn.* 10, 1 (1979).
2. Woo, W.S., Lee, C.K. and Shin, K.H.: *Planta Medica* 45, 234 (1982).
3. Shin, K.H., Kim, O.N. and Woo, W.S.: *Kor. J. Pharmacogn.* 19, 19 (1988).
4. Woo, W.S., Shin, K.H. and Lee, C.K.: *Biochem. Pharmac.* 32, 1800 (1983).
5. Shin, K.H. and Woo, W.S.: *Arch. Pharm. Res.* 9, 81 (1986).
6. Tinel, M., Belghiti, J., Descatorre, V., Amouyal, G., Letteron, P., Geneve, J., Larrey, D. and Pessayre, D.: *Biochem. Pharmac.* 36, 951 (1987).
7. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
8. Ladu, B.N., Gaudette, L., Trousof, N. and Brodie, B.B.: *J. Biol. Chem.* 214, 741 (1955).
9. Nash, T.: *Biochem. J.* 55, 416 (1953).
10. Omura, T. and Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 239, 2370 (1964).
11. Pessayre, D.: *Gastroenterology* 83, 761 (1982).
12. Mays, D.C., Hilliard, J.B., Wong, D.D. and Gerber, N.: *Biochem. Pharmac.* 38, 1647 (1989).
13. Matteis, F.D.: *Drug Metab. Dispos.* 1, 267 (1973).
14. Shin, K.H. and Woo, W.S.: *Kor. Biochem. J.* 23(1), in press (1990).