

## 항신료의 약물대사효소 CYP3A4 저해효과

차 배 천

상지대학교 생명자원과학대학 생명산업학과

### Inhibitory Effect of a Drug Metabolizing Enzyme CYP3A4 on Spices

Bae Cheon Cha

Department of Bio-industry and technology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

**Abstract** – For the determination of inhibiting cytochrome P450(CYP)3A4 activity, an improvement HPLC method was established by using a new internal standard and solvent system. Moreover, CYP3A4 amount for a optimum reaction of enzyme was determined by a comparative study with a variety concentration of enzyme. Using a established method, inhibitory effect of CYP3A4 that is drug metabolizing enzyme investigated on EtOAc extracts of 5-class spices. As a result of experiment, EtOAc extract of white pepper (*Piper nigrum* L.) showed strong inhibitory activity. On a continuous experiment, the fraction 2, 4 and 5 of white pepper EtOAc extract showed remarkable inhibitory activity. Piperine, a main constituent of pepper was not included in these fractions. It is suggested that major compounds for the inhibitory activity of white pepper may be other ingredient that is not piperine.

**Key words**—Cytochrome P450(CYP)3A4, a drug metabolizing enzyme, spices, white pepper, HPLC method.

Cytochrome P450(CYP450)은 약물대사의 산화에 관여하는 중요 효소로서 heme을 가진 hemoprotein형 monooxygenase로 약물대사 반응의 약 8할에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> Cytochrome P450은 환원상태에서 일산화탄소와 결합하여 450 nm에서 최고의 흡광도를 나타내므로 색소(pigment)의 의미로 P450으로 명명되어졌으며 간장 microsome의 단백 함량중 20% 정도를 차지한다.

이들 cytochrome P450에는 많은 종류가 있으나 약물대사의 대부분은 CYP1, CYP2 및 CYP3의 세 개 족에 의해 이루어진다.<sup>2)</sup> 그 중 특히 대부분의 약물대사에 관여하는 효소로서는 전 CYP의 30%를 차지하는 CYP3족 중의 CYP3A4가 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup> CYP3A4는 위장관에 풍부하며 이는 전신 흡수 전 장내에서 많은 약물의 대사에 관여하여 경구 투여 약물의 생체 내 유용율을 조절하며, 임상 약물의 50% 이상이 CYP3A4에 의해 산화되어지는 것으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 이 CYP3A4와 같은 약물대사 효소는 외부로부터 투여되는 약물에 의해 약물대사 속도가 변화를 받는 경우가 있는데 예를 들면 proadifen, ketoconazole과 같은 물질은 간장 microsome에 의한 산화대사를 억제하여 약물대

사 효소를 저해하는 효소 저해 약물이고,<sup>5)</sup> benzopyrene, phenobarbital 및 스테로이드 호르몬은 약물대사 효소의 기능을 증가시키는 효소 촉진 물질이다.<sup>6,7)</sup> 이들 효소 저해와 효소 촉진 약물은 약물의 대사 속도에 영향을 미쳐 생체 내에 다양한 약리적 변화를 발생시키므로 약물 투여시 이들의 특성을 이용하여 약물 사용시의 약물치료에 적절히 이용할 수 있다. 예를 들어 독성이 강한 약물의 투여시에는 약물 대사 촉진 물질을 병용 투여하여 약효 발현 후의 신속한 대사를 통해 체외 배출을 촉진하여 독성을 경감시킬 수 있고, 다량 투여 약물이나 배설 속도가 빠른 약물의 투여시에는 효소 저해 약물을 병용 투여하여 약물의 투여량의 감소 및 생체 이용률을 높여 보다 안전한 약물 사용을 유도 할 수 있다.<sup>8)</sup>

본 연구는 최근 약물의 사용 빈도가 증가되고 다량 투여에 따라 발생하는 약물 사용시의 많은 문제점을 해소하고, 동시에 약물의 생체 내 이용률을 향상시켜 보다 효율적인 약물 사용을 위한 연구의 일환으로 수종의 약물대사 효소 중 가장 양이 풍부하고 많은 약물의 대사를 담당하고 있는 CYP3A4 효소 저해제를 천연물로부터 탐색하는 연구를 수행하고자 한다. 다양한 천연물 및 식품 중 식생활에서 빈번하게 사용되어지고 있는 향신료에 대하여 그들이 약물대사

\*교신저자(E-mail) : bccha@mail.sangji.ac.kr  
(FAX) : 033-730-0503, (TEL) : 033-730-0554

효소인 CYP3A4에 미치는 저해효과를 탐색하기 위하여 CYP3A4 효소저해 활성을 확인 하기 위한 생물활성 실험법을 검토하고, 확립된 생물활성 실험법을 이용하여 향신료의 저해효과를 탐색하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 본 실험에 사용한 향신료는 강원도 원주시에 서 시판되고 있는 국산품을 구입하여 음건하고 세절하여 사용하였다. 이 식물들의 표본은 상지대학교 생명산업학과 응용천연물표본실에 보관중이다.

**실험기기 및 시약** - 분석을 위한 순상 column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(partical size 70~230 mesh, ASTM, Merck)을 사용하였고, 성분 확인용 TLC plate는 Kiesel gel 60F<sub>254</sub>(Art. 5715, Merck)를 사용하였다. 효소 반응을 위한 CYP3A4는 Gentest Corporation사 제품을, 그 외 glucose-6-phosphate, NADP<sup>+</sup> 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase는 Wako사 제품을 사용하였다. 기질로 사용된 nifedipine과 내부표준물질인 phenol은 Aldrich사 제품을 구입하여 사용하였고, MeOH 등의 분석시약은 모두 HPLC용 시약을 사용하여 측정하였다. 기타 용매는 1급 시약을 사용하여 실험하였다. 또한 HPLC로는 Varian POLARIS 200을 사용하였다.

**추출 및 분획** - 음건한 향신료는 각각 후추는 80 g, 적고추는 90 g, 청고추는 115 g, 양파는 32 g, 파는 213 g을 추출 용기에 넣고 MeOH 500 ml 또는 1000 ml 로 3회 환류 추출하여 얻어지는 용액을 농축하여 후추 MeOH ext.(35 g), 적고추 MeOH ext.(51 g), 청고추 MeOH ext.(18 g), 양파 MeOH ext.(13 g) 및 파 MeOH ext.(10 g)를 각각 얻었다. 이를 EtOAc와 H<sub>2</sub>O 1:1로 분배하여 얻어지는 EtOAc 용액을 농축하여 후추 EtOAc ext.(3.7 g), 적고추 EtOAc ext.(5.9 g), 청고추 EtOAc ext.(1.3 g), 양파 EtOAc ext.(0.5 g) 및 파 EtOAc ext.(0.4 g)를 각각 얻었다. 한편 후추 EtOAc ext.(3.5 g)는 silicagel column chromatography를 이용하여 *n*-hexane에서 *n*-hexane-EtOAc 및 EtOAc 용매계로 분획하여 5분획화 하였다.

**CYP3A4 저해반응 및 HPLC 분석법 확립** - CYP3A4 활성은 nifedipine을 기질로 하는 산화 반응을 기초로 하여 실시하였다.<sup>9)</sup> 기질인 nifedipine과 대사물을 확인하고, 동시에 대사 저해효과를 확인하기 위하여 강력한 저해효과를 가진 것으로 알려진 ketoconazole을 이용하여 다음과 같이 반응시킨 후 반응물에 대하여 HPLC 분석법을 검토하였다.<sup>10)</sup> 5 ml의 반응용 용기에 0.25 μM ketoconazole, 50 μM nifedipine, 5 mM glucose-6-phosphate, 0.5 mM NADP<sup>+</sup>, 0.5 mM

MgCl<sub>2</sub> 및 4.3 μg/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase를 100 mM 인산 완충용액(pH 7.4)에 녹인 후 37°C에서 5 분간 preincubation을 하였다. 동시에 CYP3A4 효소도 37°C에서 5 분간 preincubation을 하였다. CYP3A4 40 pmol을 반응용기에 가한 후 37°C에서 1시간 incubation을 하였다. 반응 후 MeOH 100 μl 를 가하여 반응을 정지시킨 후 ether 1 ml 로 추출하고, ether를 휘산시켜 잔유물을 얻었다. 이 잔유물을 100 μl MeOH에 녹인 후 20 μl 를 주입하여 분석하였다. HPLC는 역상 HPLC용 column(TSK-gel ODS)을 사용하였고, 이동상은 MeOH:H<sub>2</sub>O을 1:1에서 7:3까지 변화시켜 최적의 용매 조건을 검토하였다. 용매 이동 속도는 1 ml/min으로 하였고, 검출은 UV 254 nm에서 실시하였다. 또한 내부표준물질은 nifedipine과 nifedipine 대사물이 겹치지 않는 화합물을 검토하였다.

**최적 반응을 위한 효소량의 검토** - 상기 실험에서 확립된 HPLC 분석법과 CYP3A4 효소 반응을 이용하여 nifedipine과 nifedipine 대사체의 저해반응을 명확히 파악할 수 있는 최적 반응을 확립하기 위하여 80 pmol에서 20 pmol 까지 효소의 양을 변화시킨 효소반응을 검토하여 효소의 최적 농도를 확정하였다.

**향신료 EtOAc extract 및 후추 분획의 저해활성 측정** - 각 향신료 EtOAc extract 5 mg을 DMSO 1 ml 에 녹인 후 최종농도가 25 μg/ml 가 되도록 시료를 가한 후 CYP3A4 저해반응 및 HPLC 분석법에 따라 향신료의 저해효과를 실시하였다. 동시에 우수한 효과를 나타낸 후추의 EtOAc 분획에 대해서는 최종농도가 0에서 25 μg/ml 가 되도록 9개의 농도로 만들어 CYP3A4 저해반응 및 HPLC 분석법에 따라 저해효과를 실시한 후 각 분획의 IC<sub>50</sub>치를 산출하였다. IC<sub>50</sub>치는 excell에서 분산형 차트를 구하고, 다항식 함수에서 계산하여 수치를 산출하였다.

## 결과 및 고찰

현재 경구투여에 의해 약물대사효소인 CYP3A4의 효소 작용을 저해하는 천연물들이 다수 보고되어져 있고, 그 중 특히 자몽주스는 cyclosporin, midazolam 및 dihydropyridine 형과 같은 칼슘채널 차단제와 triazolam과 같은 다양한 약물의 대사에 있어 이들 약물의 대사효소인 CYP3A4를 저해함으로 인하여 이들 약물의 대사속도를 저해하는 효과를 나타내는 것으로 보고되어져 있다.<sup>11,12)</sup> 그 외에도 우리의 일상 생활에서 쉽게 접할 수 있는 많은 천연물과 식품 중에서도 약물의 대사효소에 영향을 미치는 물질이 다수 보고되어져 있다.<sup>13-18)</sup> 한편 본 연구에 사용된 천연물인 향신료는 식욕 촉진이나 맛의 부가를 위해 음식물의 첨가제로서 일

상 생활에 다양하게 사용되는 식품으로서, 그 중 후추는 향신료로서 널리 사용되며 terpene, steroid, lignan, flavone, amide alkaloid계와 같은 다양한 구조를 가진 600여종의 화합물이 있는 것으로 알려져 있으며,<sup>19)</sup> 그 중 amide alkaloid 계인 piperine이 주성분이며, 이의 약효로는 항균, 항염증, 항암 등과 같은 다양한 생리활성이 알려져 있다.<sup>20)</sup> 이들 향신료들의 CYP3A4 저해활성을 검토하기 위한 HPLC 분석법, 효소의 최적반응을 위한 효소 농도 및 저해효과를 연구한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

**HPLC 분석법 확립** - CYP3A4 효소 저해활성을 명확하게 분석하기 위한 HPLC 분석법을 확립하기 위하여 nifedipine을 기질로 하는 산화 반응을 기초로 하여 강력한 저해효과를 가진 것으로 알려진 ketoconazole을 이용하여 효소 반응을 시킨 후 반응물에 대하여 HPLC 분석법을 검토한 결과 HPLC 분석을 위한 이동상은 MeOH : H<sub>2</sub>O의 비율이 65 : 35에서 최적의 용매 조건을 보였다. 또한 내부표준물질은 nifedipine과 nifedipine 대사물이 겹치지 않는 화합물을 검토한 결과 phenol이 가장 적합하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 것과 같이 내부표준물질 피크는 retention time이 2.8 min, nifedipine 대사체 피크는 3.9 min에서 nifedipine 피크는 5.5 min에서 확인할 수 있었다.

**최적 반응을 위한 효소량의 검토** - 확립된 HPLC 분석법과 CYP3A4 효소 반응을 이용하여 nifedipine과 nifedipine 대사체의 저해반응을 명확히 파악할 수 있는 최적 반응을 확립하기 위하여 80 pmol에서 20 pmol 까지 효소의 양을 변화시킨 효소반응을 검토한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 저해효과를 가장 명확히 파악할 수 있는 효소의 최적 농도는 28 pmol로 확정하였다.

**향신료 EtOAc extract 및 후추 분획의 저해활성 측정** - 각 향신료 EtOAc extract의 최종농도 25 µg/ml 에서 약물대

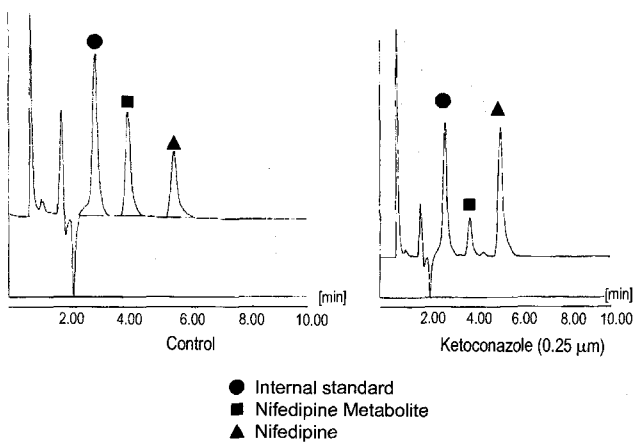


Fig. 1. HPLC Chart of CYP3A4 Inhibition by Ketoconazole.

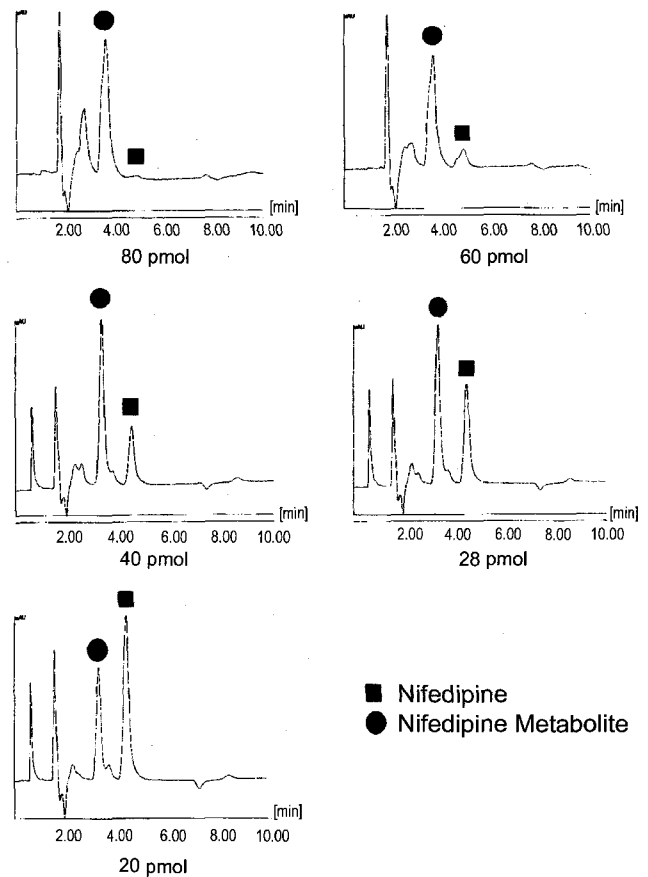


Fig. 2. Metabolite of nifedipine with a variety concentration of enzyme.

Table I. CYP3A4 inhibitory effect of EtOAc extracts from 5-class spices

Sample	Inhibition Rate (%)*
<i>Piper nigrum</i> L. (white pepper)	94
<i>Capsicum annuum</i> L. (red pepper)	50
<i>Capsicum annuum</i> L. (blue pepper)	57
<i>Allium cepa</i> L. (onion)	69
<i>Allium fistulosum</i> L. (green onion)	74
Piperine	84

\*Inhibition rate at 25 µg/ml concentration of each EtOAc extracts and piperine.

사효소 CYP3A4 저해반응을 검토한 결과 Table I에 나타난 바와 같이 후추가 94% 효소 반응을 억제하는 강력한 저해효과를 나타내었다. 계속하여 우수한 효과를 나타낸 후추의 EtOAc ext. 5종 분획에 대해서도 최종농도가 0에서 25 µg/ml 가 되도록 9개의 농도로 만들어 CYP3A4 저해효과의 IC<sub>50</sub>를 구한 결과, Table II에 나타난 것처럼 분획 2, 4 및 5에서 대조군으로 사용한 후추의 주성분인 piperine 보다 5

**Table II.** CYP3A4 inhibitory effect of white pepper fractions

Sample	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
EtOAc extract	1.5
Fraction 1	20.5
Fraction 2	0.9
Fraction 3	1.3*
Fraction 4	0.8
Fraction 5	0.7
Piperine	4.9(17.2 µM)

\*Main fraction of piperine.

배 이상의 강력한 효과를 나타내었다. 이들은 후추의 주성분으로 알려진 piperine이 함유되지 않은 분획으로서 piperine이 함유된 분획인 분획 3보다 저해효과가 우수함을 고려할 때 후추의 CYP3A4 저해효과는 piperine이 아닌 다른 화합물들이 저해효과를 나타냄을 알 수 있었다.

## 결 론

약물 사용시의 많은 문제점을 해소하고, 동시에 약물의 생체내 이용률을 향상시켜 보다 효율적인 약물 사용을 위한 연구의 일환으로 수종의 약물대사 효소 중 가장 양이 풍부하고 많은 약물의 대사를 담당하고 있는 CYP3A4 효소 저해제를 천연물로부터 탐색하는 연구를 수행한 결과 다음과 같은 지견을 얻었다.

1. CYP3A4 저해효과가 알려진 ketoconazole을 이용하여 약물대사효소 저해활성 검토를 위한 HPLC 분석법을 확립하였다.
2. 확립된 분석법을 사용하여 약물대사효소 저해실험에 적합한 CYP3A4 효소 농도를 결정하였다.
3. 5종의 향신료에 대한 저해효과 실험 결과 후추가 가장 우수한 저해활성을 보였고, 후추 분획에서는 후추의 주성분으로 알려진 piperine을 함유하지 않은 분획들이 강력한 CYP3A4 저해효과를 나타내었다.

## 사 사

본 연구는 상지대학교 2001년 평가대미 교내연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Wrighton, S. A. and Stevens, J. C. (1992) The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit. Rev.*

*Toxicol.* **22**: 1-21.

2. Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C. and Nebert, D. W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**: 1-42.
3. Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. and Guengerich, F. P. (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**: 414-423.
4. Rendic, S. and DiCarlo, F. J. (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab. Rev.* **29**: 413-580.
5. Williams, M. L., Lennard, M. S., Martin, I. J. and Tucker, G. T. (1994) Interindividual variation in the isomerization of 4-hydroxytamoxifen by human liver microsomes: involvement of cytochromes P450. *Carcinogenesis* **15**: 2733-2738.
6. Granberg, A. L., Brunstrom, B. and Brandt, I. (2000) Cytochrome P450-dependent binding of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and benz. *Arch. Toxicol.* **74**: 593-601.
7. Rushmore, T. H. and Kong, A. N. (2002) Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr. Drug Metab.* **3**: 481-490.
8. Kumar, G. N. and Surapaneni, S. (2001) Role of drug metabolism in drug discovery and development. *Med. Res. Rev.* **21**: 397-411.
9. Fukuda, K., Ohta, T., Oshima, Y., Ohashi, N., Yoshikawa, M. and Yamazoe, Y. (1997) Specific CYP3A4 inhibitors in grapefruit juice: furocoumarin dimers as components of drug interaction. *Pharmacogenetics* **7**: 391-396.
10. Peter de, B., Diederik, F. S., Kehrler, J. V., and Alex, S. (2001) Liquid chromatographic determination of ketoconazole, a potent inhibitor of CYP3A4-mediated metabolism. *J. Chromatogr. B* **753**: 395-400.
11. Yee, G. C., Stanley, D. L., Pessa, L. J., Dalla Costa, T., Beltz, S. E., Ruiz, J. and Lowenthal, D. T. (1995) Effect of grapefruit juice on blood cyclosporin concentration. *Lancet* **345**: 955-956.
12. Hukkinen, S. K., Varhe, A., Olkkola, K. T. and Neuvonen, P. J. (1995) Plasma concentrations of triazolam are increased by concomitant ingestion of grapefruit juice. *Clin. Pharmacol. Ther.* **58**: 127-131.
13. Dresser, G. K., Wachter, V., Wong, S., Wong, H. T. and Bailey, D. G. (2002) Evaluation of peppermint oil and ascorbyl palmitate as inhibitors of cytochrome P4503A4 activity *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Pharmacol. Ther.* **72**: 247-255.

14. Tsunoda, S. M., Harris, R. Z., Christians, U., Velez, R. L., Freeman, R. B., Benet, L. Z. and Warshaw, A. (2001) Red wine decreases cyclosporine bioavailability. *Clin. Pharmacol. Ther.* **70**: 462-467.
15. Muto, S., Fujita, K., Yamazaki, Y. and Kamataki, T. (2001) Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. *Mutat. Res.* **479**: 197-206.
16. Budzinski, J. W., Foster, B. C., Vandenhoeck, S. and Arnason, J. T. (2000) An *in vitro* evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. *Phytomedicine* **7**: 273-282.
17. Obach, R. S. (2000) Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**: 88-95.
18. Henderson, M. C., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Deinzer, M. L. and Buhler, D. R. (2000) *In vitro* inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica* **30**: 235-251.
19. Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O. D., Prasad, A. K., Wengel, J., Olsen, C. E. and Boll, P. M. (1997) Phytochemistry of the genus piper. *Phytochemistry* **46**: 597-673.
20. Stohr, J. R., Xiao, P. G. and Bauer, R. (2001) Constituents of Chinese Piper species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.* **75**: 133-139.

(2003년 3월 6일 접수)