

## 수종 지혈 한약물이 Cytochrome P450 3A4 활성에 미치는 영향

황진우, 고재언\*, 고호연\*\*, 최유경\*, 박종형\*, 전찬용\*

국립의료원 한방진료부 한방내과, \*경원대학교 한의과대학 내과학교실, \*\*세명대학교 한의과대학 내과학교실

### Influence of Five Herbal Medicines on Cytochrome P450 3A4 Drug-Metabolizing Enzymes in Human Liver Microsomes

Jin-woo Hwang, Jae-eon Go\*, Ho-yeon Go\*\*, You-kyung Choi\*, Jong-hyung Park\*, Chan-yong Jun\*

Department of Oriental internal Medicine, National Medical Center,

\*Department of internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

\*\*Department of internal Medicine, College of Oriental Medicine, Semyung University

#### ABSTRACT

**Objects** : The aim of this study was to investigate the influence of five herbal medicines on cytochrome P450 3A4 drug-metabolizing enzymes in human liver microsomes.

**Methods** : To use human liver microsomes, an extract of five herbal medicines, which are *Artemisia princeps* Pampan, *Sophora japonica* Linne, *Panax notoginseng* F. H. Chen, *Lithospermum erythrorhizon* Sieb., and *Cirsium maackii* Maxim, which together are called *Jihyulyak*(止血藥, drugs for arresting bleeding, hemostatics), was co-incubated and measured for relative enzyme activity in incubation condition compared to ketoconazole, a representative inhibitor of CYP 3A4.

**Results** : We showed that all five of the traditional herbal medicines had no inhibition effect of CYP 3A4 at 10, 20, 30, 40, and 50 $\mu$ g/ml doses in human liver microsomes, although *Sophora japonica* Linne(SJL) showed a little inhibition at about 81% inhibition rate of control. However, this result is not enough to prove that SJL has a CYP 3A4 inhibition effect. Moreover, we can't make sure that those rates had significant induction effect on CYP 3A4.

**Conclusions** : The result of this study could support that those herbal medicines are safer than chemical drugs, even if this is the basic step to prove that result.

**Key words** : cytochrome p450 3A4, herbs, ketoconazole, herb-drug interaction

### 1. 緒 論

최근 다양한 약물의 개발과 함께 장기간 다제병  
용요법을 시행하는 환자들이 늘어나고 있다. 이에  
약물상호간 작용을 예측하여 부작용을 최소화하고  
약리작용을 극대화하는 것이 무엇보다 중요하다<sup>1</sup>.

그 중 Cytochrome P450 (CYP450)는 steroid hormones,  
fatty acids, prostaglandins과 같은 내인성 물질 및  
외인성 물질 (특히 약물)의 산화적 대사 (oxidative  
metabolism)에 관여함으로써 이들 물질이 소변이  
나 담즙으로 쉽게 배설될 수 있도록 친수성 물질  
로 전환시키는 헴 (heme)을 함유한 효소군을 일컬  
으며, 모든 식물과 동물에서 발견된다<sup>2</sup>. 간에서 발현  
되는 CYP 450 효소들 중 가장 대표적인 것은 CYP  
3A4 형태로 다른 CYP 형태들 보다는 erythromycin  
과 cyclosporine등의 더 많은 범위의 기질들에 반응

· 교신저자: 전찬용 서울 송파구 송파동 20-8  
경원대학교 서울한방병원  
TEL: 02-425-3456 FAX: 02-425-3560  
E-mail: joncy@kyungwon.ac.kr

한다<sup>3</sup>. CYP 3A4 효소는 인간의 체내에서 모든 약물대사의 50% 이상에 관여한다<sup>4</sup>. 일본에서는 감포약제, 소청롱탕 등의 성분과 효능을 밝히고, 그것들이 CYP 3A4 효소에 영향을 미치는지에 대해서도 연구하는 등의 과학적인 접근을 시도하고 있다<sup>5,6</sup>.

약물상호작용이란 한 약물의 효과가 앞서서 혹은 동시에 투여된 다른 물질(다른 약물, 음식물, alcohol 등)에 의해 측정 가능한 정도로 변형되는 것을 말하며, 약물 상호작용의 결과는 임상이가 원하는 형태로, 혹은 부작용으로, 혹은 대수롭지 않은 형태로 나타날 수 있다<sup>7</sup>. 예전에는, 약물상호작용에 대한 연구가 많았으나, 최근에는 한약재와 약물의 상호작용을 연구하는 움직임이 빈번하며, 그런 연구들과 더불어 한약재와 한약재 사이의 연구도 여러 분야에서 진행되고 있다<sup>8</sup>. 특히, 서양에서도 활발히 연구되고 있는 St. John's wort의 경우 CYP 3A4의 대표적인 inducer로 작용을 하며, 이는 cyclosporine 과 innadivir 같은 약물들과 약물 상호작용을 일으켜 혈청 소멸을 촉진 시키는 역할을 한다는 것도 연구를 통하여 알려져 있다<sup>9</sup>. CYP 효소들의 반응성을 측정하기 위해 사람의 간 또는 쥐의 간에서 적절한 세포미립체들을 이용한 방법이 많으며, 이를 측정하기 위해 Liquid-Chromatography / Mass Spectrometry 방법을 이용하여 기질과 효소의 반응을 측정한다<sup>10</sup>.

艾葉(*Artemisia princeps* Pampan)은 <東醫寶鑑·血門><sup>11</sup>에 “治吐血便尿, 一切失血, 搗取汁飲, 乾者煮服”이라 하여吐血, 衄血, 便血, 尿血 등一切의 피가 나는 증상을 치료한다 하였고, 散寒止痛, 溫經止血的 효과가 있다<sup>12</sup>.

槐花(*Sophora japonica* Linne)는 <東醫寶鑑·血門><sup>11</sup>에 “涼血, 能止咯唾血及下血, 炒爲末, 熱酒取末二錢調服. 又治齒衄舌衄, 爲末糝之”라 하여 피를 서늘하게 하여 각혈, 타혈과 하혈을 멎게 하고 또한 齒衄과 舌衄을 다스린다 하였고, 涼血止血, 清肝瀉火的 효과가 있다<sup>12</sup>.

三七根(*Panax notginseng* F. H. Chen)은 散瘀止

痛, 消腫定痛的 효과가 있으며<sup>12</sup>, 紫草(*Lithospermum Erythrorhizon* Sieb.)는 活血涼血, 解毒透疹 작용이 있다<sup>12</sup>.

大薊草(*Cirsivm maackii* Maxim)는 <東醫寶鑑·血門><sup>11</sup>에 “俱治一切血疾, 能破血止血”이라 하여 일체의 피가 나는 증상을 치료하는데, 어혈을 없애주고 피를 멎게 해준다 하였고, 涼血止血, 祛瘀消腫의 효능이 있다<sup>12</sup>.

최근 CYP 3A4의 대표적 inhibitor로 알려진 Ketoconazole은 병용투여 약물의 파괴대사를 느리게 하여, 여러 가지 이상반응 및 심각한 이상반응을 유발한다<sup>13,14</sup>. 현재 한방의료기관을 이용하는 분들 중 대다수는 노령군으로 한약과 양약을 병용하는 경우가 많다. 그렇지만, 이에 대한 한약-양약 상호작용에 대한 연구 등이 매우 부족한 실정이다. 이에 다섯 가지의 지혈약으로 간의 CYP 3A4 효소 활성 억제에 관한 연구를 진행하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材 料

#### 1) 약 재

본 실험에서 사용한 지혈약 艾葉(*Artemisia princeps* Pampan), 槐花(*Sophora japonica* Linne), 三七根(*Panax notginseng* F. H. Chen), 紫草(*Lithospermum Erythrorhizon* Sieb), 大薊草(*Cirsivm maackii* Maxim.)의 5종은 음니허브 (Kyungbuk, Korea)에서 구입하여 100 g 정량 후 1 L의 80% 에탄올을 가하여 15분씩 두 번, 총 30분 동안 sonication 하였다. 그리고 Filter 2 여과지 (Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압여과 하였다. 이 여과액을 감압농축기 (Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후, 얻어진 농축액을 동결 건조하여 (Freezedryer, Matsushita, Japan) 각각 13.84 g, 35.4 g, 24 g, 39.5 g, 25.5 g의 분말을 얻어 (수율 : 13.84%, 35.40%, 24%, 39.50%, 25.50%) 농도에 따라 40 mg/ml in DMSO

의 stock으로부터 stock과 DMSO의 양을 계산하여 희석하였다(농도: 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )(Table 1).

Table 1. List of Used Herbal Medicines in Study

No.	Scientific name	Korean name	Part of using	Yield
1	<i>Artemisia princeps</i> Pampan	애엽, 艾葉	Leaves	13.84%
2	<i>Sophora japonica</i> Linne	괴화, 槐花	Flowers	35.40%
3	<i>Panax notoginseng</i> F. H. Chen	삼칠근, 三七根	Roots	24%
4	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Sieb.	자초, 紫草	Roots	39.50%
5	<i>Cirsium maackii</i> Maxim	대계초, 大薊草	Leaves	25.50%

## 2) Human Liver Microsome

최소 연령 10 세부터 최고연령 70 세까지의 다양한 질환과 치료 경력을 가진 사람들을 대상으로 남성 기증자 15 명, 여성 기증자 7 명의 간에서 채취한 Microsome을 한독바이오테크 (수입 : BD Biosciences)에서 구입하였다. 각각의 Vial은 0.5 ml의 양으로 구성되어 있으며, 여기에는 20 mg/ml의 단백질이 250 mM의 농도로 sucrose안에 함유되어 있다. 보관은 항상  $-80^{\circ}\text{C}$ 의 Ultra low freezer (Sanyo, Japan)에서 항시 실험 직전까지 보관하였으며, 실험하기 바로 전에 꺼내어 실온에서 인위적인 열을 가하지 않고 녹인 후 사용하였다.

## 3) 시 약

본 실험에서 사용된 chemical들 (Dimethyl sulfoxide (DMSO), 1 M ketoconazole in DMSO : CYP3A4 index inhibitor, 10 mM midazolam in DMSO : CYP3A4 substrate, 16  $\mu\text{M}$  Terfenadine : Internal standard, 1 M Kpi buffer (pH 7.4), 0.1M Glucose-6-phosphate (G-6-P), 10 mM NADP<sup>+</sup>, 1 unit/ml Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P dehydrogenase)등의 모든 시약은 Sigma에서 구입하였다. 0.1% Acetic Acid, 100% Methanol (HPLC grade), 100% Acetonitrile (HPLC grade), 0.1%

Formic Acid의 용매는 J.C Baker에서 구입하여 그대로 혹은 3차 증류수에 희석하여 사용하였다. 이 모든 시약과 용매는 한국과학기술연구원 (KIST)의 대사유전체센터에서 공급해주었다. Solid Phase Extraction을 위한 Oasis SPE Kit는 웅기과학 (Waters Korea 대리점)에서 구입하여 사용하였다. CYP protocol에 따른 실험을 위한 glass tubes, 1.5 ml microtubes 그리고 LC/MS-MS에서의 Auto-sampling을 위한 inserts와 vials 또한 KIST 대사유전체센터에서 지원을 해주었다.

## 2. 방법

### 1) Cytochrome P450 cassette assay

먼저 3차 증류수를 138  $\mu\text{l} \times 100$  [75 (=샘플 개수, 즉 같은 샘플을 3번 반복해서 실험하기 때문에 하나의 샘플 $\times 3$ 이 되고, 5가지 dose를 측정하기 때문에 5 한약제  $\times$  반복 횟수  $\times 5$  dose = 75 가 된다.) + 6 (Control 수 + Ketoconazole 수) + 19 (extra)] 정도 준비하고, Kpi-buffer도 역시 20  $\mu\text{l} \times 100$ 으로 준비한다. 이 때, 1 mM Ketoconazole과 10 mM midazolam은 실온에서 녹인 후 vortexing 해 놓는다. 각각의 Glass tube에 알아보기 편하게 Labeling을 한 다음, pre-mixture (3차 증류수 13800  $\mu\text{l}$  + 1 M Kpi buffer 2000  $\mu\text{l}$  + 10 mM midazolam 100  $\mu\text{l}$ )를 만든다. 이렇게 만든 pre-mixture를 준비해 놓은 glass tube들에 159  $\mu\text{l}$ 씩 넣어준다. Control로 지정한 3개의 glass tube들에는 1  $\mu\text{l}$ 의 DMSO를, Negative Control로 지정한 3개의 glass tube들에는 1  $\mu\text{l}$ 의 1 mM Ketoconazole을 넣고, 다른 tube들에는 각각에 들어가야 할 농도의 한약제를 각각 1  $\mu\text{l}$ 씩 넣는다. Ultra low freezer에서 Human Liver Microsome을 꺼내어 실온에서 녹인 후, 각각의 glass tube에 10  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 vortexing한다. 그런 다음 5 분간  $37^{\circ}\text{C}$  water bath에서 pre-incubation 시킨다. 그 사이에 ice bucket에 ice를 가득 채운 후, on ice에서 NADPH Generating System (NGS)을 만든다. 0.1 M G-6-P, 10 mM NADP<sup>+</sup>, G-6-P

dehydrogenase를 2 : 1 : 0.0045의 비율로 넣고 vortexing하여 잘 섞일 수 있도록 해준다. 이 때, 주의할 점은 G-6-P dehydrogenase의 효소 활성을 떨어뜨리지 않기 위하여 반드시 ice bucket 내에서 mixture를 만들어야 하며, 또한 G-6-P dehydrogenase가 들어가는 양이 극히 소량이기 때문에, 0.1 M G-6-P와 10 mM NADP<sup>+</sup>의 첨가량을 늘려주어 enzyme activity가 확실히 일어날 수 있도록 만들어 주어야 한다. 5 분간의 pre-incubation이 끝나면, 순서에 따라 각각 30  $\mu$ l의 NGS를 넣고 vortexing하여 다시 30 분간 waterbath에서 incubation 시킨다. 그 사이 enzyme activity를 중지시키기 위한 stop solution을 만든다. 0.1% Acetic acid에 나중에 LC/MS-MS에서 찍은 peak가 제대로 나왔는지 여부를 알기 위하여 Internal Standard로써 0.16  $\mu$ M로 Methanol에 녹아있는 Terfenadine을 넣어준다. 이 때, Terfenadine이 들어가는 final concentration은 0.16  $\mu$ M이 되므로 계산하면, 400  $\mu$ l의 Acetic Acid  $\times$  100 [75 (=샘플 개수 + 6 (Control수 + Ketoconazole수) + 19 (extra))] + 40000  $\mu$ l  $\times$  0.01 (0.16  $\mu$ M Final concentration / 16  $\mu$ M stock) = 400  $\mu$ l의 IS (terfenadine in MeOH)를 넣고 vortexing해준다. 30 분 incubation이 끝나면, 처음 NGS를 넣었던 순서에 맞추어서 stop solution을 넣어준다. 그 후 Solid Phase Extraction (SPE) 과정을 거쳐 N<sub>2</sub> Evaporator에서 MeOH을 증발시킨 후, 0.1% Formic Acid 와 100% Acetonitrile이 85 : 15의 비율로 만들어진 solution을 1.5 ml microtube들에 각각 50  $\mu$ l씩 넣고, 5 분간 격렬한 vortexing을 한 후 LC/MS-MS용 insert가 들어있는 Auto-sampling vial에 그대로 옮긴 후 LC/MS-MS API 2000 (Agilent, U.S.A)을 이용하여 각 sample들의 metabolite산출 반응을 측정하였다.

## 2) Solid Phase Extraction

Stop solution으로 enzyme activity가 멈춘 glass tube들의 샘플을 SPE용 96 well plate에 filtration 하기 전에 먼저 MeOH로 activation을 시켜주어야

한다. SPE용 96 well plate를 SPE cassette위해 장착시키고, 그 밑에는 waste tray를 넣어 장착시킨다. 사용될 샘플의 수 (total 81개)만큼의 well 각각에 1ml의 MeOH 넣고 sealing tape pad를 이용하여, 마개를 막은 후, 펌프를 켜서 압력을 걸어주면 MeOH이 filter를 통해 나오게 되고, 이로써 activation이 된 것이다. 그 후, 0.1% Acetic Acid 각 1 ml로 같은 방법으로 2차 Activation을 시켜주고, 각각의 well에 sample을 정확히 넣고, 역시 같은 방법으로 압력을 가하여 sample들을 filter를 통해 투과시킨다. 그러면, filter에는 샘플 중 원하는 파트 들만이 남아 있게 되고, 0.1% Acetic Acid 각 1 ml로 두 번의 washing을 해준 다음, 1 ml의 HPLC grade (purity 99%) MeOH을 각 well에 넣어주고 sealing후 압력을 가하여 elution시킨다. 이 때 샘플을 받기 위하여 waste tray를 96 well sample collection plate로 교체해 주어야 한다. 이렇게 받은 sample들을 정교하게 pipetting하여 조심스레 1.5 ml microtube들에 옮긴 후, N<sub>2</sub> Evaporator를 이용하여 Evaporation시켜주면 원하는 샘플만 남게 된다.

## 3) 다섯 가지 지혈약의 CYP 3A4 활성도 측정 방법

Human Liver Microsome과 Kpi buffer그리고 3차 증류수가 섞여있는 glass tube에 DMSO 1  $\mu$ l 넣어주고 이는 Control로 사용되었다. CYP 3A4의 대표적인 inhibitor로 알려져 있는 1 mM로 희석된 Ketoconazole 역시 1  $\mu$ l을 앞에서 설명한 것과 같이 준비된 glass tube에 넣어 Negative Control로써 다섯 종류의 한약재와 비교하였다. 각각의 한약재는 먼저 40 mg/ml stock의 농도로 DMSO에 녹인 후, 계산을 통하여 10, 20, 30, 40, 50  $\mu$ g/ml의 농도로 DMSO로 희석하였다. 각각의 농도로 희석된 한약재 역시 준비된 각각의 glass tube에 1  $\mu$ l씩 넣어 주었다. 그 후 NADPH generating system으로 효소활성을 일으키기 위하여 1 M G-6-P, 10 mM NADP<sup>+</sup>와 G-6-P dehydrogenase을 섞은 솔루션을

넣어준다. 결과는 LC/MS-MS시스템을 통해 수치화 되어 나오게 되고 세 번의 반복실험에 의해 나온 결과의 평균값을 구해준다. 이 때 DMSO는 control로 쓰였으므로 100%로 보면 된다. 그리고 나머지 1 mM Ketoconazole과 10~50  $\mu\text{g/ml}$ 의 각각의 한약재가 일으킨 대사반응의 수치는 control을 100%로 놓았을 때의 비율로 계산하였다.

### III. 結果

#### 1. CYP3A4 효소반응으로 인한 Midazolam의 변환

Midazolam은 LC/MS를 이용하여 Cytochrome P450 3A4의 효소반응을 측정하는 substrate로써 많이 쓰이며, CYP3A4 enzyme activity가 일어나게 되면, midazolam이 1-OH-midazolam으로 바뀐 metabolite를 내어 놓게 되어 효소와 기질의 반응성을 측정할 수 있다<sup>15</sup>(Fig. 1).

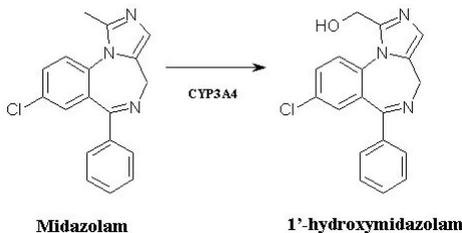


Fig. 14. Structural change of midazolam can occur when midazolam has interaction with NADPH generating system on 37°C incubation.

1'-hydroxymidazolam can be produced according to the enzyme activity with CYP 3A4.

#### 2. 다섯 가지 지혈약의 CYP3A4 활성도 측정 결과

##### 1) 艾葉(Artemisia princeps Pampan)의 CYP3A4 활성도

Control로 사용한 DMSO의 enzyme activity를 100%로 하였을 때 negative control인 Ketoconazole의 enzyme activity는 6.22%로 측정되었다.

艾葉(Artemisia princeps Pampan)의 10~50  $\mu\text{g/ml}$

에서의 enzyme activity는 각각  $113.05 \pm 56.18\%$ ,  $157.52 \pm 3.91\%$ ,  $114.93 \pm 3.23\%$ ,  $97.09 \pm 14.81\%$ ,  $128.50 \pm 12.54\%$ 로 나타내었다. 40  $\mu\text{g/ml}$ 에서 control인 DMSO에 비하여 미세하게 inhibition 되었으나 이는 negative control로 사용된 ketoconazole처럼 inhibition 시키지는 않았음을 관찰할 수 있으며, 10, 20, 30, 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 control DMSO 보다 높은 활성도를 나타내었다(Fig. 2).

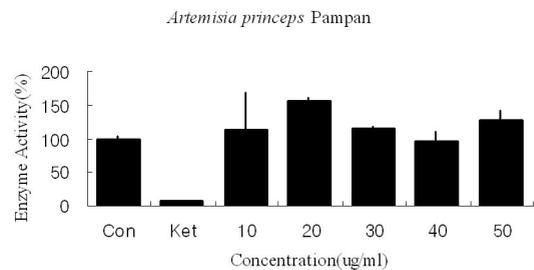


Fig. 2. CYP 3A4 inhibition rate of *Artemisia princeps* Pampan in human liver microsome.

Each dose of *Artemisia princeps* Pampan compared to DMSO as a control and Ketoconazole (Ket.) as an outstanding inhibitor. Data are represented as means and standard deviations (n=3).

##### 2) 槐花(Sophora japonica Linne)의 CYP 3A4 활성도

Control로 사용한 DMSO의 enzyme activity를 100%로 하였을 때 negative control인 Ketoconazole의 enzyme activity는 6.22%로 측정되었다.

槐花(Sophora japonica Linne)의 10~50  $\mu\text{g/ml}$ 에서의 enzyme activity는 각각  $81.47 \pm 0.34\%$ ,  $97.79 \pm 0.92\%$ ,  $114.71 \pm 0.58\%$ ,  $108.12 \pm 1.61\%$ ,  $149.71 \pm 0.66\%$ 로 나타내었다. control인 DMSO에 비하여 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 81%, 20  $\mu\text{g/ml}$ 에서 미세하게 inhibition 되었으나 이는 negative control로 사용된 ketoconazole처럼 inhibition 시키지는 않았음을 관찰할 수 있으며, 30, 40, 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 control DMSO 보다 높은 활성도를 나타내었다(Fig. 3).

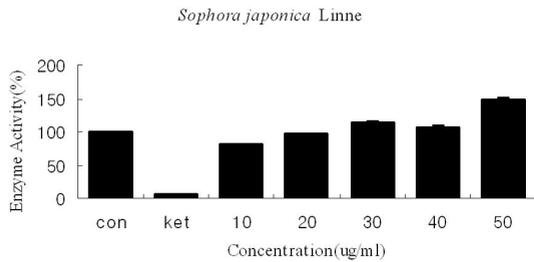


Fig. 3. CYP 3A4 inhibition rate of *Sophora japonica* Linne in Human Liver Microsome.

Each dose of *Sophora japonica* Linne compared to DMSO as a control and Ketoconazole as an outstanding inhibitor. Data are represented as means and standard deviations(n=3).

3) 三七根(*Panax notginseng* F. H. Chen)의 CYP 3A4 활성화도

Control로 사용한 DMSO의 enzyme activity를 100%으로 하였을때 negative control인 Ketoconazole의 enzyme activity는 6.22%로 측정되었다.

三七根(*Panax notginseng* F. H. Chen)의 10~50  $\mu\text{g/ml}$  에서의 enzyme activity는 각각 261.32  $\pm$  1.00%, 262.5  $\pm$  2.79%, 248.09  $\pm$  1.35%, 286.76  $\pm$  2.05%, 303.24  $\pm$  1.72%로 나타내었다. 10~50  $\mu\text{g/ml}$  에서 모두 negative control로 사용된 ketoconazole의 enzyme activity 6.22%와 비교하여 ketoconazole 처럼 inhibition 시키지는 않았으며 오히려 control인 DMSO enzyme activity보다 높게 측정됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

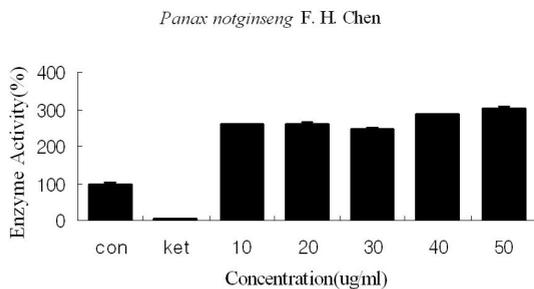


Fig. 4. CYP 3A4 inhibition rate of *Panax notginseng* F. H. Chen in Human Liver Microsome.

Each dose of *Panax notginseng* F. H. Chen compared to DMSO as a control and Ketoconazole as an outstanding inhibitor. Data are represented as means and standard deviations(n=3).

4) 紫草(*Lithospermum Erythrorhizon* Sieb.)의 CYP 3A4 활성화도

Control로 사용한 DMSO의 enzyme activity를 100%으로 하였을때 negative control인 Ketoconazole의 enzyme activity는 6.22%로 측정되었다.

紫草(*Lithospermum Erythrorhizon* Sieb.)의 10~50  $\mu\text{g/ml}$  에서의 enzyme activity는 각각 126.92  $\pm$  21.14%, 156.29  $\pm$  5.78%, 143.01  $\pm$  9.70%, 152.68  $\pm$  3.05%, 147.09  $\pm$  4.43%로 나타내었다. 10~50  $\mu\text{g/ml}$  에서 모두 negative control로 사용된 ketoconazole의 enzyme activity 6.22%와 비교하여 ketoconazole 처럼 inhibition 시키지는 않았으며 오히려 control인 DMSO enzyme activity보다 높게 측정됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

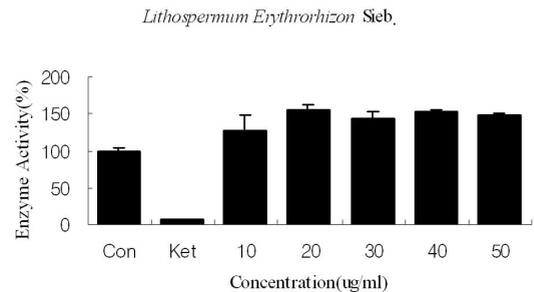


Fig. 5. CYP 3A4 inhibition rate of *Lithospermum Erythrorhizon* Sieb. in Human Liver Microsome.

Each dose of *Lithospermum Erythrorhizon* Sieb. compared to DMSO as a control and Ketoconazole as an outstanding inhibitor. Data are represented as means and standard deviations(n=3).

5) 大薊草(*Cirsium maackii* Maxim)의 CYP 3A4 활성화도

Control로 사용한 DMSO의 enzyme activity를 100%으로 하였을때 negative control인 Ketoconazole

의 enzyme activity는 6.22%로 측정되었다.

大薊草(*Cirsium maackii* Maxim)의 10~50  $\mu\text{g/ml}$ 에서의 enzyme activity는 각각  $163.87 \pm 7.05\%$ ,  $198.37 \pm 3.40\%$ ,  $122.14 \pm 12.17\%$ ,  $141.72 \pm 3.52\%$ ,  $90.44 \pm 7.31\%$ 로 나타내었다. 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 control인 DMSO에 비하여 미세하게 inhibition 되었으나 이는 negative control로 사용된 ketoconazole처럼 inhibition 시키지는 않았음을 관찰할 수 있으며, 10~40  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 control DMSO 보다 높은 활성도를 나타내었다(Fig. 6).

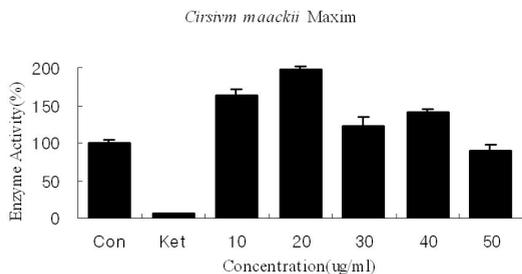


Fig. 6. CYP 3A4 inhibition rate of *Cirsium maackii* Maxim in Human Liver Microsome.

Each dose of *Cirsium maackii* Maxim compared to DMSO as a control and Ketoconazole as an outstanding inhibitor. Data are represented as means and standard deviations ( $n=3$ ).

#### IV. 考 察

생체내의 약물상호작용은 약물을 필요로 하는 환자에게 있어서 아주 미세한 차이부터 생명에 지장을 줄 수 있을 정도까지의 큰 범위로 영향을 미친다. 특히, 최근에 사람들의 삶의 질이 향상되어 지식수준이 올라가면서, 약물의 사용과 처방과 함께 사람들이 많은 관심을 보이고 있는 분야가 약물상호작용이다.

CYP450는 1958년에 Klingenberg와 Garfinke가 microsome을 NADH와 dithionide (hydrosulfide)으로 환원시킨 후, 일산화탄소를 통과시키면 450nm에서 최대흡광도를 나타내는 색소가 있음을 발견한

후, 1962년에 Omura와 Sato가 이것이 cytochrome형의 heme단백질이라는 것을 밝혀내어 이를 CYP450이라고 명명하게 되었다<sup>16</sup>. 주로 간세포의 내부원형질의 망상구조 (endoplasmic reticulum)의 막에 존재하며, 소장, 신장, 폐, 뇌에도 소량 존재한다<sup>17</sup>. 약물대사 효소로 알려진 CYPs 효소는 외부로부터 흡수된 이물질을 다양한 화학적 반응으로 대사 전환물질로 바꾸어 배출하는 기능을 한다. MDR (Multi Drug Resistance) 효소와 마찬가지로 간, 신장, 위장, 폐 등 신체의 다양한 조직에 존재하여 외부의 이물질에 대하여 신체를 방어하는 기능을 수행하며, 각 조직에 따라 존재하는 isoform이 다양하다<sup>18</sup>.

본 실험에서는 CYP450의 많은 isoform들 중에서도 가장 많이 발현되며, 간에서의 약물대사에 가장 크게 관여하는 CYP 3A4 반응성을 Human Liver Microsome을 사용하여 측정하였다.

한방 약물은 수중 한약의 조합 또는 비율을 조정하여 약효를 증강시키며 부작용 경감의 목적으로 사용되어 왔다. 그러나, 이들 전통약물에는 수많은 성분들이 함유되어 있고, 이들 성분간의 상호작용 등에 의하여 흡수, 대사, 분포, 및 배설 등을 촉진 또는 저해시킬 수 있으며, 이는 약리작용의 발현과 매우 복잡하고, 밀접한 관계를 갖고 있을 것으로 추정되고 있다.

최근 한방의료기관을 이용하는 노인군은 성인질환 또는 노인성질환으로 약약을 복용 중으로, 한약 양약을 병용하는 경우가 많다<sup>19-21</sup>. 전 세계적으로도 한약과 양약과의 상호작용에 대해 많은 연구들이 시행되고 있지만, 국내에서 우리나라 국민을 대상으로 하는 연구는 적은 실정이다.

한방제제로 뿐만 아니라 민간요법으로도 널리 사용되고 있는 艾葉(*Artemisia princeps* Pampan)은 菊花科(국화과 ; Compositae)에 속한 多年生草本인 쑥의 葉으로 溫有小毒하고, 味辛苦하여 肝脾腎經에 歸經하며, 散寒止痛, 溫經止血的 효능을 나타내는 약물이다<sup>12</sup>. 艾葉은 연구를 통하여 우수한

지혈 작용 및 항산화 작용을 통하여 심혈관 질환에 유효한 작용이 있다<sup>22-25</sup>.

槐花(*Sophora japonica* Linne)는 豆科(콩과: Leguminosae)에 속한 落葉 喬木인 회화나무의 꽃과 꽃봉오리를 乾燥한 것으로 性微寒無毒하고, 味苦하여 肝 大腸經으로 歸經하여 涼血止血, 清肝瀉火의 효능을 나타내는 약물이다<sup>12</sup>. 성분상으로 혈관의 탄력성 증진 및 모세혈관의 투과성에 관여하며 항산화 효과와 염증 매개 물질억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>26,27</sup>.

三七根(*Panax notoginseng* F. H. Chen)은 五加科(두릅나무과: Araliaceae)에 속한 多年生 草本인三七의 뿌리를 乾燥한 것으로 性溫無毒하고 味甘微苦하여 肝胃經으로 歸經하며 散瘀止血, 消腫定痛의 효과가 있다<sup>12</sup>. 연구에서 혈전의 형성을 억제하고 출혈경향을 완화시키며, 혈액의 점도를 떨어뜨리는 작용 및 염증 매개 물질의 억제효과 있는 것으로 보고되고 있다<sup>28,29</sup>.

紫草(*Lithospermum Erythrorhizon* Sieb.)는 紫草科(지치과: Boraginaceae)에 속한 多年生 草本인 지치의 뿌리를 乾燥한 것으로 性寒無毒하고, 味甘하며 心肝經으로 歸經하여 涼血活血, 解毒透疹의 효과가 있다<sup>12</sup>. 紫草는 연구를 통하여 아토피등과 관련된 알러지 반응에 영향을 준다고 알려져 있다<sup>30,31</sup>.

大薊草(*Cirsium maackii* Maxim)는 菊花科(국화과: Compositae)에 속한 多年生 宿根草本인 엉겅퀴의 全草를 乾燥한 것으로 性涼無毒하고 味는 甘苦하며 心肝經으로 歸經하여 涼血止血, 祛瘀消腫의 효과가 있다<sup>12</sup>. 大薊草는 연구를 통하여 활성산소 소거능 및 CYP 2E1의 활성을 처리 농도에 의존하여 저해함이 알려져 있다<sup>32</sup>.

최근 한약재 역시 약물상호작용에 큰 이슈가 되고 있으므로, 지혈 한약재인 艾葉, 槐花, 三七根, 紫草, 大薊草가 약물상호작용에 어떠한 영향을 주는지에 대한 실험의 첫 단계로 Human Liver Microsome에서의 반응성을 각각의 농도 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 측정하였다.

연구의 신뢰도를 높이기 위하여 최근 CYP450 activity 측정에 많이 사용되고 있는 LC/MS-MS 측정법을 사용하였다.

艾葉은 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 97%로 컨트롤 보다 아주 미세하게 낮게 측정 되었지만 CYP 3A4를 억제하는 반응성은 있다고 볼 수 없다. 하지만, 이 결과는 CYP 3A4에 대한 약물상호작용이 일어나지 않으므로 다른 약물과 함께 복용하게 되어도 큰 영향을 끼치지 않는다는 것을 추측할 수 있었다.

槐花는 10, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 81%, 97%정도로 미세하게 컨트롤 보다 떨어지는 것을 알 수 있었으나 50% 미만의 억제율을 보이지 않으므로 CYP 3A4를 억제한다고 보기는 힘들다.

三七根, 紫草, 大薊草 역시도 대부분이 컨트롤 보다 낮은 억제율을 보이고 있어 CYP 3A4를 억제하지 않는다는 결론이 나왔다. 또한, 이 결과들이 CYP 3A4유도 (induction)를 한다고 보기는 어렵다. 수치상으로 컨트롤 보다 증가함을 보였지만, CYP 3A4의 유도를 보기 위해서는 다른 방법에서의 실험이 요구된다.

더 나아가서, 더 정확하고 확실한 결과를 얻기 위해서는 약재의 반응성을 시간별로 정확히 측정하여 판독하는 Kinetic Study를 비롯하여, 세포에서의 RNA, 단백질 레벨 측정, 동물 실험을 통한 각각의 조직들에 대한 RNA, 단백질 레벨 측정 등의 전 임상 단계 실험이 먼저 진행이 되어야 할 것이다. 그리고 그 결과들을 토대로 임상 실험을 진행하여 한약재의 우수성과 안정성을 증명할 수 있다는 목표를 가지고 실험을 진행하여야 할 것이다.

마지막으로, 약물상호작용을 일으키는 정도는 개인마다 다양하게 나타나는데, CYP450에 존재하는 약물의 양과 CYP450에 대한 약물의 친화도 뿐만 아니라 나이, 영양상태, 질환상태, 다양한 CYP450에 의한 대사경로 등에 따라 차이를 나타내기 때문에 더 많은 연구가 in vitro, in vivo상에서 뿐만 아니라 임상을 통해서 진행되어야 할 것이다.

## V. 結論

본 연구에서는 지혈약의 한약재로 알려져 있는 艾葉, 槐花, 三七根, 紫草, 大薊草의 다섯 가지 한약재가 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 다양한 농도에서 약물상호작용에 크게 관여가 되며, 특히 간에서 크게 반응성을 나타내는 CYP 3A4에 대한 반응성을 알아보았다. CYP 3A4 억제제로 잘 알려져 있는 Ketoconazole과 함께 비교 실험 하여 어느 정도 CYP 3A4 억제에 대해 유의성을 나타내는 지를 측정해 보았다.

그 결과, 대부분의 농도가 50%의 억제율을 산출시키지 못하였으며, Ketoconazole뿐만 아니라, 컨트롤로 사용한 DMSO 보다도 높은 평균값을 나타내었다. (n=3) 이 결과는 CYP 3A4가 유도되었음을 말해줄 수 있는 자료는 되지 못하지만, 다섯 가지 한약재들이 약물상호작용에 있어서 안정성을 나타내고 있음을 말해준다고 볼 수 있다.

## 참고문헌

1. Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.* 2006;8(1):E101-11.
2. Guengerich FP. Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv.* 2003;3(4):194-204.
3. Guengerich FP. Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *FASEB J.* 1992;6(2):745-8.
4. Iwata, H., Tezuka, Y., Usia, T., Kadota, S., Hiratsuka, A., Watabe, T. Inhibition of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2D6 by extracts from 78 herbal medicines. *Journal of Traditional Medicines.* 2004;21(1):42-50.
5. Takahashi K, Uejima E, Morisaki T, Takahashi K, Kurokawa N, Azuma J. In vitro inhibitory

effects of Kampo medicines on metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. *J Clin Pharm Ther.* 2003;28(4):319-27.

6. Makino T, Mizuno F, Mizukami H. Does a kampo medicine containing schisandra fruit affect pharmacokinetics of nifedipine like grapefruit juice?. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(10):2065-9.
7. 서울대학교 의과대학편저. 임상약리학. 서울: 서울대학교출판부; 2006, p. 211.
8. Pal D, Mitra AK. MDR- and CYP3A4-mediated drug-herbal interactions. *Life Sci.* 2006;78(18):2131-45.
9. Shufeng Zhou, Yihuai Gao, Wenqi Jiang, Min Huang, Anlong Xu, James W. Paxton. Interactions of Herbs with Cytochrome P450, *Drug Metabolism.* 2003;35(1):35-98.
10. Lee SK, Jun IH, Yoo HH, Kim JH, Seo YM, Kang MJ, Lee SH, Jeong TC, Kim DH. Characterization of in vitro metabolites of deoxypodophyllotoxin in human and rat liver microsomes using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008;22(1):52-8.
11. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 法仁文化社; 2005, p. 418, 419, 3531, 418, 673.
12. 全國韓醫科大學本草學教室 共編著. 本草學. 서울: 永林社; 2000, p. 196, 197, 390, 393, 394, 400, 405.
13. Park JY, Kim KA, Shin JG, Lee KY. Young. Effect of ketoconazole on the pharmacokinetics of rosiglitazone in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2004;58(4):397-402.
14. Davidson MH. Does differing metabolism by cytochrome p450 have clinical importance?. *Curr Atheroscler Rep.* 2000;2(1):14-9.
15. Emoto C, Iwasaki K. Relative roles of CYP2C19

- and CYP3A4/5 in midazolam Xenobiotica. 2007;37(6):592-603.
16. 서울대학교 약제부. Pharmacy Newsletter of Drug Information. 2004;24(9).
  17. Flockhart DA, Desta Z, Mahal SK. Selection of drugs to treat gastro-oesophageal reflux disease: the role of drug interactions. Clin Pharmacokinet. 2000;39(4):295-309.
  18. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2006;2(6):875-94.
  19. Jan WC, Lin LC, Chieh-Fu-Chen, Tsai TH. Herb-drug interaction of Evodia rutaecarpa extract on the pharmacokinetics of theophylline in rats. J Ethnopharmacol. 2005;102(3):440-5.
  20. Johnston BC, Wu P, Mills E. Herb-drug interaction implications in pediatric practice: an overview of pharmacokinetic trials. Arch Pediatr Adolesc Med. 2005;159(7):692.
  21. Braun L. Herb-drug interaction guide. Aust Fam Physician. 2001 Feb;30(2):151.
  22. 김봄님, 이경섭, 송병기. 艾葉 및 阿膠藥鍼이 止血效果에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2000;13(2):46-59.
  23. 최윤영, 김재효, 전문기, 임정아, 김경식, 손인철. 艾葉(艾葉) 추출(抽出) 약침(藥鍼)이 허혈성(虛血性) 손상(損傷)에 미치는 효과(效果). 경락경혈학회지. 2004;21(1):15-27.
  24. 김재효, 장진요, 박병림, 김경식, 손인철. 흰쥐의 一過性 前腦 虛血 損傷에 대한 艾葉 약침의 신경보호 작용. 대한한의학회지, 대한한의학회지. 2003;24(2):81-93.
  25. 윤성목, 조경희, 손윤희, 남경수, 남종국. 艾葉(艾葉) 약침액(藥鍼液)에 의한 Phase II 효소 활성 유도. 경락경혈학회지, 2001;18(1):1-9.
  26. 박성진, 정병희, 최영수, 박성혜, 김종대. 槐花(槐花)의 식품영양학적 접근 및 생리활성물질 함량분석. 동의생리병리학회지, 2007;21(1):171-80.
  27. 이지은, 이주연, 최정일, 김종관, 김성조. 槐花추출물이 대식세포에서의 nitric oxide와 interleukin-6의 생성에 미치는 영향. 대한치주과학회지. 2005;35(1):9-19.
  28. 박정애, 최승훈, 안규석. 三七根이 瘀血病態模型에 미치는 影響. 동의병리학회지. 1992;7:15-26.
  29. 박용기, 정효원. 三七根의 LPS에 의해 활성화된 腦神經膠細胞로부터의 炎症媒介物質 生成 抑制效果. 대한본초학회지. 2006;21(4):93-101.
  30. 김시혜, 정혁상, 조백건, 이진용, 김덕근. 紫草가 아토피 피부염에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2004;18(1):63-75.
  31. 권미화, 이진용, 김덕근. 紫草가 항알러지 염증 반응에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2005;26(3):110-23.
  32. 김혁, 이효승, 박원환, 문진영. 大薊 추출물의 활성산소 소거능 및 Cytochrome P450 효소 저해효과. 대한본초학회지. 2007;22(1):53-61.