

열다한소탕과 청심연자탕의 Cytochrome P450 활성 연구

진성은 · 하혜경 · 신현규

한국한의학연구원 한약기초연구그룹

Abstract

Effects of Yuldahanso-tang and Chungsimyonja-tang on Cytochrome P450 Activities

Seong-Eun Jin, Hye-Kyung Ha, Hyeun-Kyoo Shin

Basic Herbal Medicine Research Group, Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine

Objectives

The purpose of this study is to investigate the inhibitory or inductive potentials of Yuldahanso-tang (YDT) and Chungsimyonja-tang (CST), herbal formulas for Taeumin, on cytochrome P450 (CYP450) drug metabolizing enzyme. The mechanisms for the herbal formula-drug interaction has not been well reported in spite of the chance for co-administration with conventional drugs.

Methods

To evaluate the interaction potential of YDT-drug or CST-drug, the fluorescence-based enzyme assays on CYP450 isozymes including CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 and CYP2E1 were established *in vitro*. The inhibitory effects of herbal formulas were characterized with IC₅₀ values.

Results

YDT showed inhibitory effects on CYP2D6 and CYP2E1-mediated metabolism, while it exhibited weak inhibition on CYP3A4 and CYP2C19 relatively. CST exerted relatively weak inhibitory effects on the four CYP450 isozymes compared to that of YDT.

Conclusions

These results suggest that the herbal formula-drug interaction could be occur when YDT are co-administered with drugs mediated by CYP2D6 or CYP2E1.

Key Words: Cytochrome P450, herb-drug interactions, Yuldahanso-tang, Chungsimyonja-tang, Taeumin

I. 緒論

최근 한약에 대한 관심이 높아지면서 한약재의 소비가 증가하고 있지만, 한약과 양약을 동시 복용할 경우 독성 및 부작용을 유발할 가능성이 있다. 이는 기본적으로 약물상호작용에 기인하며 간에서 약물의 생체전환 및 대사에 핵심적인 역할을 하는 cytochrome P450 (CYP450) 활성화와 관련이 있다¹. 외인성 물질에 의해 유발되는 간손상을 약인성 간독성 (drug-induced hepatotoxicity)이라고 하며, 2005년 정부에서 발표한 약인성 간독성 사례 314 중 82례 (약 26%)가 한약에 의한 것으로 보고되었다². 양약의 CYP450 활성화와 저해에 대한 연구는 많이 보고되어 있지만 한약에 대해서는 인삼³, 감초⁴, 천궁⁵, 갈근⁶, 향부자⁷, 당귀⁸, 생강⁹ 등과 같은 단일 약제에만 제한되어 있으며, 여러 가지 한약재를 조합하여 이루어진 한약 처방의 약물상호작용에 대한 연구는 부족한 실정이다.

한의학에서는 1894년 이제마의 『동의수세보원』 저술 이후 사람의 체질을 체격, 얼굴형태, 성격, 정서 및 약물에 대한 반응 등을 종합적으로 검사하여 태양인, 태음인, 소양인, 소음인의 4가지 체질로 구분한다¹⁰. 본 연구에서는 대표적인 태음인 처방 중 열다한소탕 (熱多寒少湯)과 청심연자탕 (淸心蓮子湯)을 선정하여 CYP450 isozyme (CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP2E1) 활성화에 대한 영향을 평가함으로써 이들 처방과 약물간의 상호작용 가능성을 평가하였다.

II. 材料 및 方法

1. 시약

Vivid[®] CYP450 Screening Kits (Vivid[®] CYP3A4 Green, Vivid[®] CYP2C19 Blue, Vivid[®] CYP2D6 Blue and Vivid[®] CYP2E1 Blue)는 Invitrogen Co. (Camarillo, CA, USA)로부터 구입하였으며, CYP3A4에 대한 기질로 DBOMF, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP2E1에 대한 기질

로 EOMCC를 사용하였다. Ketoconazole, miconazole, quinidine 및 sodium diethyldithiocarbamate trihydrate는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 기타 시약은 분석용 등급을 사용하였다.

2. 열다한소탕 및 청심연자탕 추출물 조제

열다한소탕 및 청심연자탕의 구성 한약재를 Table 1과 같이 무게 비율로 배합하고 10배의 물을 가한 후 100°C에서 2시간 동안 추출하였다 (COSMOS-660, Kyung Seo Machine Co., Incheon, Korea). 추출액은 여과 후 건조하여 처방 추출물 분말을 얻었으며 수득율은 Table 1과 같다. 모든 구성 한약재는 전문가 감별 후 사용하였으며, 각 구성 한약재들의 표본은 한국한의 학연구원 한약기초연구그룹에 보관하였다.

3. Cytochrome P450 isozyme assay

Vivid[®] CYP450 Screening Kit (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP2E1을 비롯한 CYP450 isozyme에 대한 열다한소탕 및 청심연자탕 추출물의 영향을 평가하였다.

각 추출물과 sodium diethyldithiocarbamate trihydrate는 PBS, ketoconazole, quinidine 및 miconazole은 acetonitrile (ACN)에 녹인 후 최종 ACN 농도가 각 효소 활성화에 영향을 미치지 않는 0.02%가 되도록 준비하였다. 농도별 각 추출물과 양성 대조군 및 음성 대조군 (0.02% ACN/PBS)을 96 well black plate의 각 well에 40 µL씩 분주하고, P450 BACULOSOME[®]과 glucose-6-phosphate 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase로 구성된 Regeneration System을 50µL 첨가하여 상온에서 20분간 반응시켰다. 이어서 10 µL의 Vivid[®] Substrate와 NADP⁺를 첨가하여 반응을 시작하고, EnVision2103 Multilabel Reader (PerkinElmer Inc., Massachusetts, USA)를 이용하여 CYP3A4에 대해서는 excitation과 emission 파장 각각 485와 535 nm에서 15

Table 1. The Compositions of Herbal Formulas

Crude drug	Componented crude drugs (g)	
	<i>Yuldahanso-tang</i>	<i>Chungsimyonja-tang</i>
Puerariae Radix	15.0	
Scutellariae Radix	7.50	3.75
Angelicae Tenuissimae Radix	7.50	
Raphani Semen	3.75	3.75
Platycodonis Radix	3.75	
Cimicifugae Rhizoma	3.75	
Angelicae Dahuricae Radix	3.75	
Nelumbinis Semen		7.50
Dioscoreae Radix		7.50
Asparagi Radix		3.75
Liriopsis Tuber		3.75
Polygalae Radix		3.75
Acori Graminei Rhizoma		3.75
Zizyphi Spinosi Semen		3.75
Longanae Arillus		3.75
Thujae Semen		3.75
Chrysanthemi Flos		3.75
Total (g)	45.0	52.5
Yield (%)	29.0	20.5

분, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP2E1에 대해서는 각각 405와 450 nm에서 60분간 형광도의 변화를 측정하였다.

각 CYP450 isozyme에 대한 추출물의 억제율 (%)은 다음의 공식으로 계산하였다. 억제율 (%) = $[1 - (S_1 - S_0)/(C_1 - C_0)] \times 100$, C_1 은 직선성을 나타내는 구간에서 반응 후 대조군의 형광도, C_0 는 대조군의 초기 형광도, S_1 은 반응 후 시료의 형광도, 그리고 S_0 는 시료의 초기 형광도이다. 실험값은 mean \pm SEM (n = 3)으로 나타내었다.

CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP2E1에 대한 양성 대조군으로 각각 ketoconazole, miconazole, quinine 및 sodium diethyldithiocarbamate trihydrate를 사용하였다.

III. 結果 및 考察

태음인의 肝熱證 (간열열증), 癩病 (온병), 燥熱病 (조열병), 手指焦黑斑瘡病 (수지초흑반창병),

虛勞夢泄 (허로몽설) 등을 치료하기 위해 열다한소탕을 처방하며, 虛勞夢泄無度 (허로몽설무도), 腹痛泄瀉 (복통설사), 舌卷中風 (설권중풍), 食滯 (식체), 胸腹痛 (흉복통) 등의 증상에 청심연자탕을 처방하는 경우가 많다. 열다한소탕은 갈근, 황금, 고본, 나복자, 길경, 승마 및 백지의 7가지로 구성되며¹¹, 뇌경막증 및 급성기 중풍환자의 치료에 효과가 있고^{12,13}, hydrogen peroxide, xanthine oxidase/hypoxanthine 계에서 산소자유기에 의한 산화적 손상에 대한 방어효과가 있다고 보고되었다^{14,15}. 청심연자탕은 황금, 나복자, 연자육, 산약, 천문동, 맥문동, 원지, 석창포, 산조인, 용안육, 백자인 및 감국화의 12가지로 구성되며¹¹, 항노화¹⁶, 항알러지¹⁷ 및 항스트레스 효과¹⁸를 나타낸다고 보고되었다.

이와 같이 열다한소탕 및 청심연자탕의 약리학적 효능은 알려져 있지만 한약은 여러 한약재의 배합으로 이루어지며 양약과 병행하여 복용하는 경우가 많기 때문에 한약 처방의 대사에 대한 연구가 필요한 실정이다.

한약을 비롯한 다양한 외인성 물질들은 주로 간

Table 2. IC₅₀ Values of the Extracts of Herbal Formulas for the Metabolism Mediated by CYP450 Isozymes

	CYP3A4	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1
<i>Yuldahanso-tang</i>	471.18 µg/mL	427.1 µg/mL	102.51 µg/mL	151.48 µg/mL
Positive control	3.02 nM	3.05 µM	5.96 nM	7.76 µM
<i>Chungsimyongja-tang</i>	638.38 µg/mL	> 1000 µg/mL	948.86 µg/mL	490.55 µg/mL
Positive control	1.17 nM	1.54 µM	5.59 nM	9.83 µM

Ketoconazole, miconazole, quinidine and sodium diethyldithiocarbamate trihydrate were used as positive controls for CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 and CYP2E1, respectively. The values are the means of triplicate experiments.

microsome에 존재하는 약물대사효소인 CYP450에 의해 대사되는 반면, CYP450을 억제 또는 유도함으로써 다른 약물 대사에도 영향을 미쳐 약리학적 효능뿐 아니라 부작용이나 독성을 유발할 수 있다^{19,21}. CYP450은 여러 family 및 subfamily로 분류되며 그 중 CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP2E1이 인체 약물대사에서 중요한 것으로 보고되었다²². 따라서 본 연구에서는 대표적인 태음인 처방 중 열다한소탕 및 청심연자탕이 CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP2E1 중 어떤 CYP450 isozyme에 의해 대사되는지 조사함으로써 태음인의 체질에 맞는 한약과 양약의 동시 복용에 대한 안전성 기준을 확립하고자 하였다.

Vivid CYP450 Screening kit을 이용하여 열다한소탕과 청심연자탕 물 추출물의 CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP2E1에 대한 억제 또는 유도 활성을 검색하였으며, 각 isozyme에 대한 양성 대조군으로 ketoconazole, miconazole, quinidine 및 sodium diethyldithiocarbamate trihydrate를 사용하였다. 각 추출물의 CYP450 isozyme에 대한 억제 활성은 IC₅₀ 값으로 비교하였다 (Table 2).

Ketoconazole, miconazole, quinidine 및 sodium diethyldithiocarbamate trihydrate은 각각 CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP2E1의 활성을 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다. 열다한소탕 물 추출물은 1000 µg/mL 이하에서 CYP3A4, CYP2D6 및 CYP2E1을 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났으며, CYP2C19에 대해서는 250-1000 µg/mL에서 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 1-4). 특히 CYP2D6와 CYP2E1에 대한 IC₅₀ 값이 각각 102.51과 151.48 µg/mL

로 CYP3A4 (IC₅₀ = 471.18 µg/mL) 및 CYP2C19 (IC₅₀ = 427.10 µg/mL)에 비해 상대적으로 CYP2D6와 CYP2E1을 강하게 억제하는 것으로 나타났다.

따라서 열다한소탕을 항고혈압제인 debrisoquine, 기침에 사용되는 dextromethorphan, 베타 블로커 제제에 속하는 metoprolol, propranolol 및 timolol, 항우울제로 사용되는 amitriptyline, desipramine 및 imipramine, 그리고 항정신병 제제인 perphenazine 및 thioridazine 등과 같이 CYP2D6에 의해 대사되는 양약과 복용하거나 해열 진통제인 acetaminophen 및 근육이완제로 사용되는 chlorzoxazone과 같이 CYP2E1의 기질이 되는 양약을 함께 복용하면, 약물의 혈중 농도가 높아져 독성 및 부작용을 유발할 수 있다. 따라서 열다한소탕을 복용할 경우 CYP2D6 및 CYP2E1의 기질이 되는 약물을 함께 복용하지 않는 것이 안전하다. 또한 알코올이 CYP2E1을 유도하는 것으로 알려져 있어 음주 후 열다한소탕을 복용하면 활성 중간 대사체의 생성이 증가함으로써 술에 의한 간손상과 함께 추가적인 간손상의 상승작용을 유발하게 된다^{23,24}.

한편, 청심연자탕 물 추출물은 62.5-1000 µg/mL에서 CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP2E1을 농도 의존적으로 억제하지만, 열다한소탕에 비해 모두 상대적으로 낮은 억제율을 나타냈다 (Fig. 1-4). 특히 CYP2C19에 대해서는 1000 µg/mL에서 34.60%의 억제율을 나타냈으며 (IC₅₀<1000 µg/mL), CYP3A4, CYP2D6 및 CYP2E1에 대한 IC₅₀ 값이 각각 638.38, 891.17 및 471.76 µg/mL로 열다한소탕보다 약물상호작용에 영향을 덜 미칠 것으로 판단되었다.

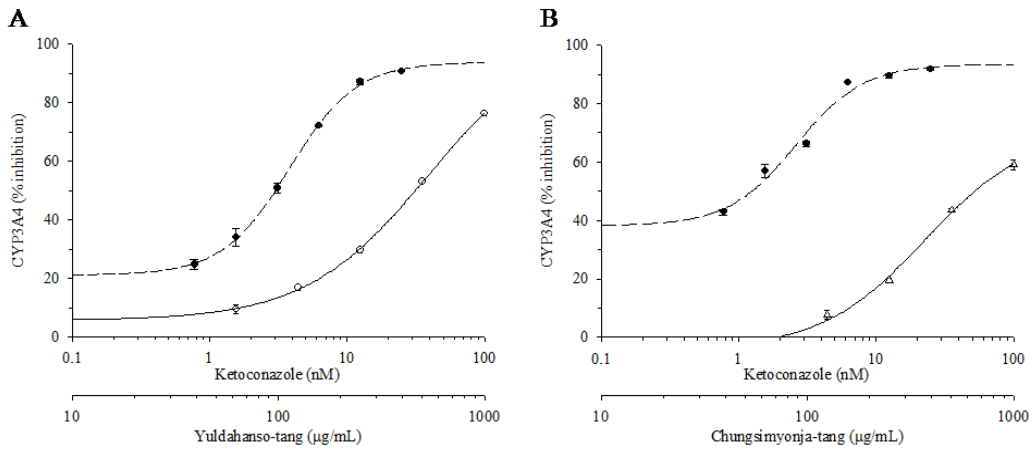


Figure 1. Effects of herbal formulas on CYP3A4.

The black circles, white circles and white triangles represent the inhibition of ketoconazole, *Yuldahanso-tang* (YDT) and *Chungsimyonja-tang* (CST), respectively (●: ketoconazole, ○: YDT, △: CST). Ketoconazole was used as the positive control. Herbal formulas and ketoconazole were used at the indicated concentrations. The data represent the mean \pm SEM of triplicate experiments.

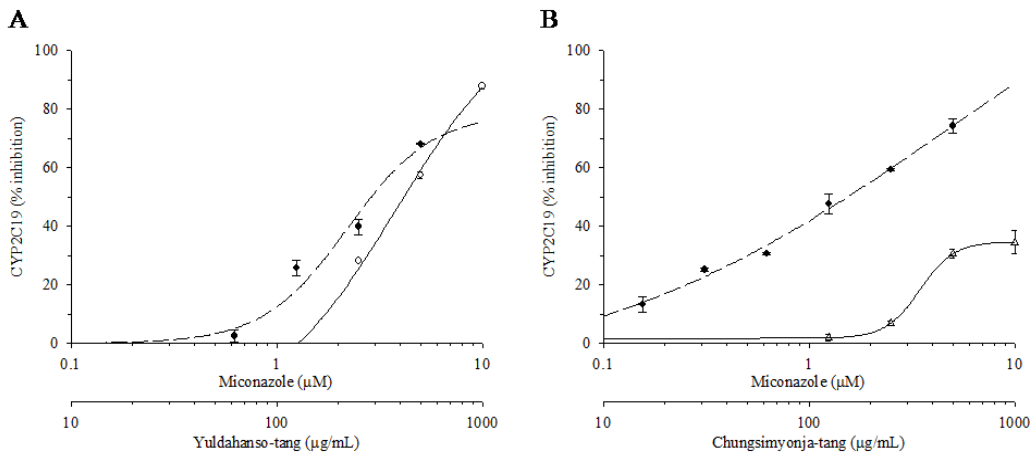


Figure 2. Effects of herbal formulas on CYP2C19.

The black circles, white circles and white triangles represent the inhibition of miconazole, *Yuldahanso-tang* (YDT) and *Chungsimyonja-tang* (CST), respectively (●: miconazole, ○: YDT, △: CST). Miconazole was used as the positive control. Herbal formulas and miconazole were used at the indicated concentrations. The data represent the mean \pm SEM of triplicate experiments.

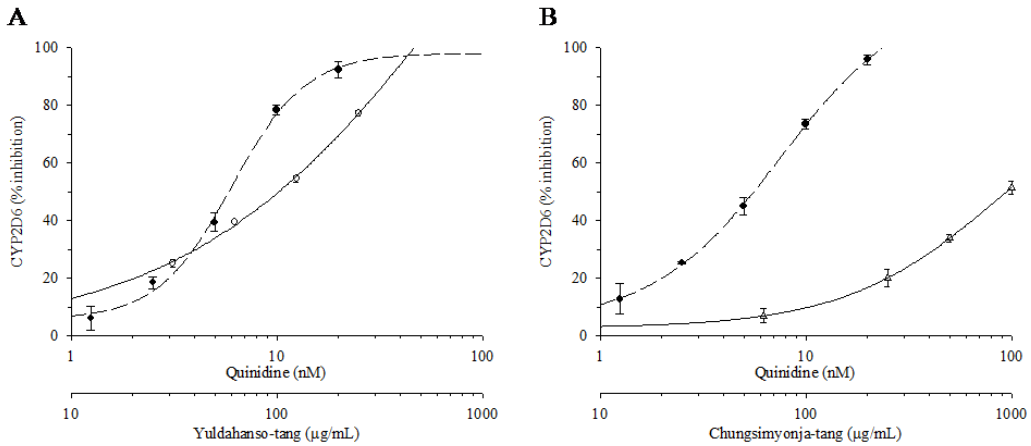


Figure 3. Effects of herbal formulas on CYP2D6.

The black circles, white circles and white triangles represent the inhibition of quinidine, *Yuldahanso-tang* (YDI) and *Chungsimyonja-tang* (CST), respectively (●: quinidine, ○: YDI, △: CST). Quinidine was used as the positive control. Herbal formulas and quinidine were used at the indicated concentrations. The data represent the mean \pm SEM of triplicate experiments.

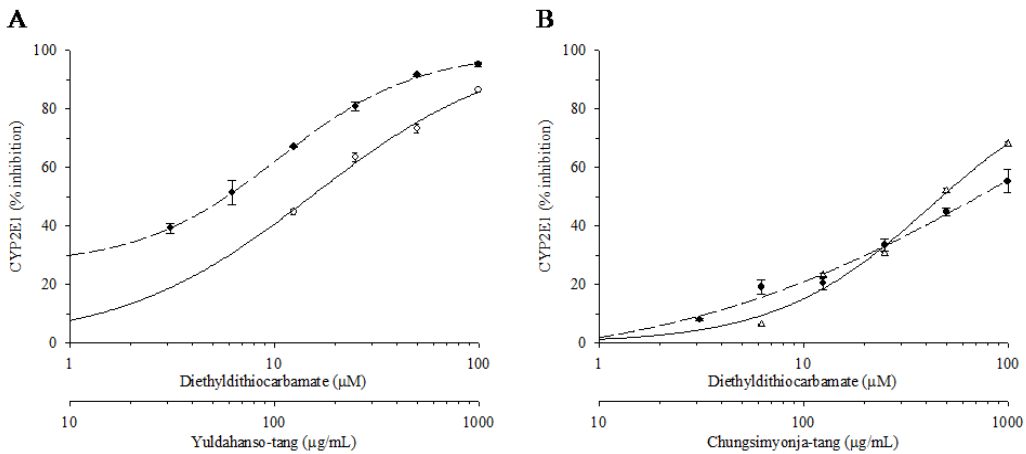


Figure 4. Effects of herbal formulas on CYP2E1.

The black circles, white circles and white triangles represent the inhibition of diethyldithiocarbamate trihydrate (DDC), *Yuldahanso-tang* (YDI) and *Chungsimyonja-tang* (CST), respectively (●: DDC, ○: YDI, △: CST). DDC was used as the positive control. Herbal formulas and DDC were used at the indicated concentrations. The data represent the mean \pm SEM of triplicate experiments.

IV. 結 論

태음인에게 처방되는 열다한소탕 및 청심연자탕

물 추출물에 대하여 인체 약물대사에 관련된 CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP2E1에 대한 활성을 검색한 결과, 열다한소탕은 비교적 CYP2D6 및 CYP2E1에 대

한 억제 활성이 높은 반면 청심연자탕은 4종의 CYP450 isozyme 활성에 크게 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다. 따라서 태음인이 열다한소탕을 복용할 경우 CYP2D6 및 CYP2E1에 의해 대사되는 약물의 처방에 주의가 요구된다.

V. 感謝의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '표준한방처방 EBM 구축사업 (K12031)'에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

VI. 參考文獻

1. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol.* 2001;35:297-306.
2. Park YC, Park HM, Lee SD. Inducible Mechanisms Hepatotoxicity caused by Traditional Korean Medicines in a View of Toxicology. *J Korean Oriental Med.* 2011;32(4):48-67. (Korean)
3. Henderson GL, Harkey MR, Gershwin ME, Hackman RM, Stern JS, Stresser DM. Effects of ginseng components on c-DNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sci.* 1999;65:PL209-PL214.
4. Paolini M, Pozzetti L, Sapone A, Cantelli-Forti G. Effect of licorice and glycyrrhizin on murine liver CYP-dependent monooxygenases. *Life Sci.* 1998;62:571-582.
5. Tang JC, Zhang JN, Wu YT, Li ZX. Effect of the water extract and ethanol extract from traditional Chinese medicines *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, *Ligusticum chuanxiong* Hort. and *Rheum palmatum* L. on rat liver cytochrome P450 activity. *Phytother Res.* 2006;20:1046-1051.
6. Guerra MC, Speronia E, Broccolia M, Canginia M, Pasini P, Minghetti A et al. Accelerated communication Comparison between Chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone puerarin: Antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. *Life Sciences.* 2000;67:2997-3006.
7. Jeong HK, You HJ, Chang YS, Park SJ, Moon YH, Woo ER. Inhibitory effects of medicinal herbs on cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *J Pharmacognosy.* 2002;33(1):35-41.
8. Liu Y, Yang L. Early metabolism evaluation making traditional Chinese medicine effective and safe therapeutics. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006;7(2):99-106.
9. Zhou S, Gao Y, Jiang W, Huang M, Xu A, Paxton JW. Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug Metab Rev.* 2003;35(1):35-98.
10. Kim KY. Consideration about medicine historical view of Je-Ma Lee. *J Sasang Constitut Med.* 1994;6(1):11-19. (Korean)
11. National federation of department of sasang constitutional medicine, colleges of oriental medicine. *Sasang constitutional medicine.* 2nd Ed. Seoul:Jipmoondang. 2004:418-420.
12. Choi YJ, Han JH, Kim KY, Kang SY. Effects of yuldahansotang water extract on blood pressure, regional cerebral blood flow and pial arterial diameter. *J Sasang Constitut Med.* 1998;10(1):285-293. (Korean)
13. Choi JS, Kim KY, Kim HM, Ju JC. Studies on the cytokine production regulation in human astrocytes by Yuldahansotang. *J Sasang Constitut Med.* 2001;13(1):61-69. (Korean)
14. Lee JH, Park HS, Kim KY. Effects of Yuldahansotang water extract on cultured primary hippocampal cell culture damaged by hydrogen peroxide. *J Sasang Constitut Med.* 2002;14(1):79-89. (Korean)
15. Hong JH, Kim KW, Yu DG, Park HS, Kim HS. Effects of Yuldahansotang water extract on cultured spinal sensory neurons damaged by xanthine oxidase/hypoxanthine. *J Sasang Constitut Med.* 2001;13(1):88-96. (Korean)

16. Lim JP, Ahn TW. The anti-oxidative and immune-regulatory effect of Chungsimyeonja-tang in aged rat. *J Sasang Constitut Med.* 2007;19(3):227-241. (Korean)
17. Park SC. Effects ChungSimYeonJaTang (CSYJT) on control of immune-function in highly purified mouse B cell and Mast cell. *J Sasang Constitut Med.* 2003; 15(2):166-179. (Korean)
18. Hong SC, Ko BH, Song IB. An experimental study on the anti-stress effect by taceumin Chongsimyonjatang. *J Sasang Constitut Med.* 1995;7(2):227-240. (Korean)
19. Kato R, Chiesara E, Vassanelli P. Further studies on the inhibition and stimulation of microsomal drug-metabolizing enzymes of rat liver by various compounds. *Biochem Pharmacol.* 1964;13:69-83.
20. Conney AH. Pharmacological implication of microsomal enzyme induction. *Pharmacol Rev.* 1967;19:317-366.
21. Neter KJ. Inhibition of oxidative drug metabolism in microsomes. *Pharm Ther.* 1980;10:515-535.
22. Lee HW, Kim DW, Phapale PB, Lim MS, Park J, Seo JJ et al. In vitro inhibitory effects of Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san on human cytochrome P450 isoforms. *J Clin Pharm Ther.* 36, 496-503, 2011.
23. Park YC, Kim MD, Lee SD. Proposed mechanisms and further study for Korean traditional medicines-drug interaction in a view of toxicology. *Kor J Oriental Preventive Medical Society.* 2011;15(1):1-16. (Korean)
24. Elizabeth LM. Update: Clinically significant cytochrome P450 drug interactions. *Pharmacotherapy.* 1998;18(1):84-112.