

## 황백의 주요 구성 화합물에 의한 약물대사효소 및 약물수송단백 저해능 평가

구혜영 · 김현미 · 손지홍 · 유광현\*

인제대학교 약리학교실 · 약물유전체연구센터

Inhibition of Drug-metabolizing Enzyme and Drug Transporter by Major Components of *Phellodendri cortex*. Hei-Young Ku, Hyunmi Kim, Ji-Hong Shon, Kwang-Hyeon Liu\*. *Department of Pharmacology and Pharmacogenomics Research Center, Inje University College of Medicine, Busan 614-735, Korea*

**Abstract** We evaluated the potential of major components of *Phellodendri cortex* to inhibit the activities of CYP2D6 and p-glycoprotein. The abilities of berberine, palmatine, limonin, and rutaecarpine to inhibit CYP2D6-mediated dextromethorphan *O*-demethylation and calcein AM accumulation were tested using human liver microsomes and L-MDR1 cell, respectively. Berberine strongly inhibited CYP2D6 isoform activity, whereas limonin and rutaecarpine did not. The IC<sub>50</sub> value of berberine was reduced after preincubation with microsomes in the presence of NADPH generating system, suggesting that berberine is a mechanism based inhibitor. In addition, all chemicals tested, didn't show inhibitory effect on p-glycoprotein activity. These results suggest that berberine has potential to inhibit CYP2D6 activity *in vitro*. Therefore, *in vivo* studies investigating the interactions between berberine and CYP2D6 substrates are necessary to determine whether inhibition of CYP2D6 activity by berberine is clinically relevant.

**Key words :** *Phellodendri cortex*, berberine, palmatine, CYP2D6, p-glycoprotein

### 서 론

약물상호작용이란 한 약물의 효과가 병용하여 섭취되는 다른 물질(타 약제, 음식물, 건강보조제)에 의해 측정 가능한 정도로 변화되는 경우로 결과적으로 약물효과가 기대하는 정도에 미달하거나 또는 더 과도하게 나타나 부작용으로 이어질 수 있으며, 대수롭지 않은 형태로도 나타날 수 있다 [10]. 약물상호작용의 주요한 원인으로 병용투여되는 약물이 다른 약물의 체내 동태를 결정하는 약물대사효소 및 약물수송단백의 활성을 억제하는 작용이나 발현을 유도하여 활성을 높임으로서 발생하는 것으로 알려져 있다. 이러한 약물대사효소 또는 약물수송단백을 매개로 한 약물상호작용은 병용 투여되는 약제들 뿐만 아니라 섭취하는 음식물 [4,6]과 한약재 [3,11]에

기인해서도 발생한다. 특히 한약재의 경우 다양한 천연식물체 성분이 복합성분으로 다양한 종류의 화합물 형태를 함유하고 있어, 이중 특정 성분(들)이 약물대사효소 또는 약물수송체에 영향을 미치게 되고 결과적으로 병용투여되는 약제의 체내동태 변화를 유발하게 되는 것이다. 천연한약재의 사용은 동양권에서 뿐만 아니라 최근 서양에서도 건강보조제의 일부로써 사용 빈도가 증가 추세에 있으며, 이러한 한약재 사용의 증가로 의약품간의 상호작용으로 인한 임상적 문제점들에 대한 보고가 근래에 이루어지고 있다. 하지만 전통적으로 사용해온 한약재의 안전성에 대한 깊은 신뢰성과 다양한 복합성분에 대한 연구적인 접근성의 어려움으로 체계적인 기전적인 고찰이 부족한 실정이다.

황백 (*Phellodendri cortex*)은 운향과 (rutaceae)에

\* Corresponding author

Phone: +82-51-890-6412, Fax: +82-51-893-1232

E-mail: dstlkh@inje.ac.kr

속한 황백나무의 주피를 벗겨낸 줄기껍질로서, 오래전부터 중국, 일본, 한국에서 한방 천연약제로서 사용되어 왔다 [9]. 황백은 또한 자율신경 실조증, 설사, 염증, 고혈압 및 발열의 치료 목적으로 국내에서 널리 사용되고 있는 황련해독탕을 구성하고 있는 주요 한약재로 알려져 있다. 황백으로부터 분리된 생리활성물질에는 berberine, palmatine, limonin, rutaecarpine, magnoflorine, obacunone 등 여러가지 화합물이 알려져 있다 [12]. 이 중 황백의 주요 구성성분인 berberine (0.6~ 2.5%)은 식물 알칼로이드의 일종으로 항균, 항바이러스, 해독, 소염, 면역증강, 항부정맥, 혈압강하와 같은 약리효과를 가지고 있다 [9]. 최근 한 보고에 따르면 berberine이 cytochrome P450(CYP) 효소군 중에서 흔히 임상상에서 처방되는 정신과계 또는 심혈관계 약제의 대사에 주요하게 관여하는 것으로 알려져 있는 CYP2D6에 대한 활성 저해능을 가지는 것으로 소개된 바 있다 [5]. 이러한 결과로부터 berberine이 함유된 항백을 복용할 경우 병용되는 CYP2D6 기질약제와의 상호작용 가능성을 예상해 볼 수 있겠다. 한편 항백에는 berberine 이외의 다양한 약리활성을 가지는 주요 구성성분인 palmatine, limonin 등이 있으며 이들에 대한 약물상호작용능에 대한 조사는 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 황백의 사용으로 인한 약물상호작용 발생 가능성을 예측하기 위하여, 황백을 구성하고 있는 주요 생리활성물질인 berberine, palmatine, limonin 및 rutaecarpine (Fig. 1)을 대상으

로 인체 CYP2D6 효소 활성 및 p-glycoprotein 단백질 활성 저해 효과를 평가하고자 하였다.

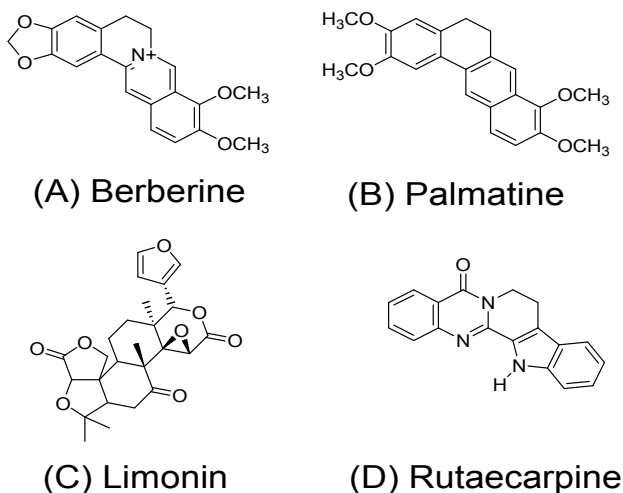
## 재료 및 방법

### 시약

Berberine, palmatine, limonin, rutaecarpine, phenacetin, levallorphan, dextromethorphan, dextrorphan, glucose 6-phosphate, NADP, glucose-6-phosphate dehydrogenase, calcein AM, cyclosporine A, para-aminohippuric acid 및 triton-X-100 는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Pooled human liver microsomes (H161)은 BD Gentest (Woburn, MA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 본 연구에 이용된 시약은 모두 실험에 이용 가능한 최상급을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 L-MDR1 세포주는 Schinkel 박사 (Netherland Cancer Institute, Amsterdam, Netherlands)로부터 분양받았다.

### CYP2D6 활성 저해능 평가

CYP2D6 활성도 억제에 대한 연구는 dextromethorphan *O*-demethylation 에 의해 생성되는 dextrorphan의 생성 속도를 측정함으로써 평가하였다 [8]. 즉, dextromethorphan (5  $\mu$ M) 만을 혹은 dextromethorphan과 함께 억제제로 황백의 주요 구성 화합물 (2 - 200  $\mu$ M)을 같이 0.25 mg/ml의 인체 마이크로솜을 함유하고 있는 100 mM 인산 완충액 (pH 7.4)에서 37°C에서 5 분간 배양하였다. 이 후 NADPH 재생성계 (3.3 mM glucose-6-phosphate, 1.3 mM NADP, 3.3 mM MgCl<sub>2</sub> 및 1.0 unit/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase)를 첨가함으로써 반응을 시작하고, 30 분 간의 반응 후 각 tube를 얼음위에 놓고 내부표준물질로서 levallorphan (30 ng/ml)을 포함하고 있는 아세트니트릴을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 화합물의 mechanism-based 저해 기전 규명 실험에서는 기질을 넣기 전에 억제제와 마이크로솜, NADPH 재생성계를 함께 37°C에서 30 분간 반응시킨 후, 기질을 첨가하여 30분간 추가 배양하였다. 반응 정지후, 원심분리기에서 5 분간 원심분리 (20,000×g) 한 후 상층액을 직접 LC/MS/MS 시스템에 주입하였다. Dextrorphan 및 내부표준물질인 levallorphan을 분리하기 위해 Phenomenex사의 Gemini C18 컬럼 (50 ×



**Fig. 1.** Chemical structures of berberine (A), palmatine (B), limonin (C), and rutaecarpine (D).

2.0 mm, 5  $\mu$ m)을 사용하였고, 이동상은 water : acetonitrile (60 : 40, v/v)에 0.1%의 formic acid를 첨가하여 사용하였다. 이 때 이동상의 유속은 0.2 ml/min 로 유지하였으며, 탠덤질량분석기 (API300 LC/MS/MS system, Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 검출하였다. 탠덤질량분석기 이온소스는 electrospray 방법 (positive mode)을 사용하였고, 이온화 전압은 5 kV, 탈용매화 온도는 400°C, 오리피스 및 링 전압은 각각 80 V 및 400 V로 조정하였다. 질소가스 흐름속도의 분무가스는 1.04 l/min, 커튼가스는 1.44 l/min 및 보조가스는 4.0 l/min으로 조정하였고, 충돌가스 (질소) 압력은  $3.3 \times 10^{-5}$  torr 이었다. 분석물질의 정량을 위하여 MRM (multiple reaction monitoring) 정량모드를 이용하였고, dextrophan 및 levallorphan의 선택질량으로서는 각각  $m/z$  258>157 및 284>157를 사용하였다. 데이터 분석을 위해서는 Analyst software (version 1.2)를 사용하였다.

### P-glycoprotein 활성 저해능 평가

L-MDR1 세포는 96well plate에  $1.0 \times 10^5$ /ml로 분주하여 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Thermo Fisher Scientific Inc., Logan, Utah) 배지를 첨가하여 배양하였다. 24시간 배양 후에 berberine (2.5 및 25  $\mu$ M)과 calcein AM (0.5  $\mu$ M)을 각 well에 처리하였다. 24시간 후, triton-X-100으로 1시간동안 lysis시킨 후, multilabel plate reader (Victro3, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA)를 이용하여 calcein의 형광 (여기파장 485 nm, 방출파장 535 nm)을 측정하였다. 또한 기존에 p-glycoprotein 단백질 활성 억제 효과가 알려져있는 cyclosporin A (10  $\mu$ M) 및 para-aminohippuric acid (1 mM)을 각각 positive 및 negative control로 사용하여 본 실험결과의 적합성을 검증하였다.

### 효소역학 경수 산출 및 평가

CYP2D6 동효소에 특이한 기질 약물인 dextromethorphan으로 부터 대사체인 dextrophan 생성에 대한 저해제의 CYP2D6 활성 억제에 대한 경수( $IC_{50}$ )는 약동학 분석 프로그램인 WinNonlin (Version 2.0, Pharsight, Apex)을 이용하여 비선형 최소자승 회귀 분석법을 이용하여 산출하였다.

## 결과 및 고찰

### CYP2D6 활성 억제능 탐색

황백의 주요 구성 화합물인 berberine, palmatine, rutaecarpine 및 limonin의 CYP2D6 동효소 저해 활성을 평가한 결과, 200  $\mu$ M 농도에서 berberine과 palmatine은 강력한 저해 활성 (> 70%)을 나타내었으나, limonine과 rutaecarpine은 CYP2D6 활성 저해 효과를 가지고 있지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 또한 berberine과 palmatine은 농도 의존적으로 CYP2D6 활성을 저해하는 것으로 나타났다 (Fig. 3). Berberine의 CYP2D6 매개 dextromethorphan *O*-demethylation 활성 저해능은 ( $IC_{50} = 17.5 \mu$ M) 이전에 보고된 CYP2D6 매개 bufuralol 1'-hydroxylation 저해능과 ( $IC_{50} = 45 \mu$ M) 유사하였다 [2]. 한편, CYP2D6

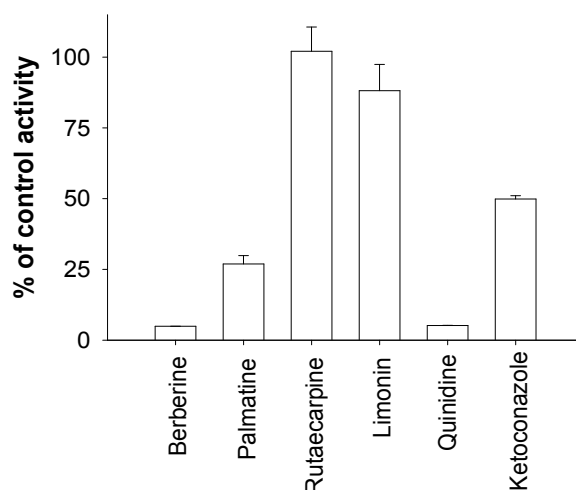


Fig. 2. Inhibitory effects of major components of Phellodendri cortex on CYP2D6-catalyzed dextromethorphan *O*-demethylation.

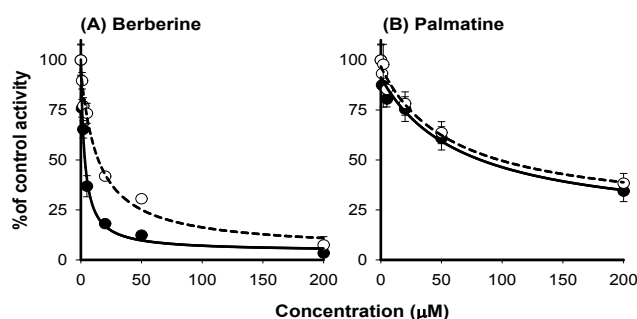


Fig. 3. Concentration-dependent inhibition of CYP2D6-catalyzed dextromethorphan *O*-demethylation by berberine (A) and palmatine (B) (without pre-incubation (○), with pre-incubation (●)).

활성 저해능에 대한 사전배양 (pre-incubation) 효과를 조사한 결과, palmatine과 달리 berberine은 NADPH 재생성계와의 사전 배양에 의해 CYP2D6 활성을 6배 정도 더 강하게 저해하는 것을 알 수 있었다 (Table 1).

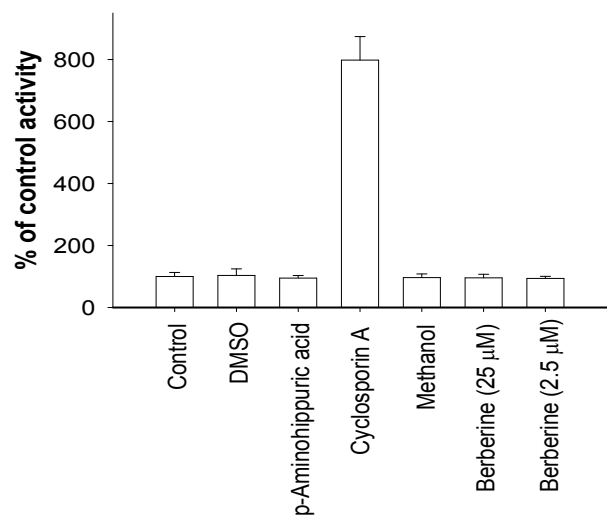
Berberine (Fig. 1)은 화학 구조내에 methylenedioxyphenyl 그룹을 가지고 있으며, 일반적으로 methylenedioxyphenyl 그룹을 가지고 있는 화합물은 CYP 동효소 활성에 대한 저해능을 가지는 것으로 보고되고 있다 [1,7]. Chatterjee와 Franklin의 연구 결과에 의하면, berberine은 마이크로솜에 의해 대사되고, 이 대사체가 CYP와 공유결합을 형성하는 것으로 되어 있다 [2]. 따라서 berberine의 CYP2D6 활성 저해효과 역시 berberine이 가지고 있는 methylenedioxyphenyl 그룹에 기인할 것으로 기대된다. 한편 berberine과 구조적으로 유사하나, methylenedioxy 그룹을 가지고 있지 않는 palmatine의 경우, berberine에 비해 낮은 CYP2D6 저해 활성을 ( $IC_{50} = 111.6 \mu M$ ) 나타내는 것으로 보아, CYP2D6 활성의 저해에 있어 methylenedioxyphenyl 그룹이 중요하게 관여함을 알 수 있다. 상기의 연구 결과는 berberine이 *in vitro*에서 강력한 CYP2D6 활성 저해능을 가지고 있음을 의미한다. 그러나 이의 임상적 중요성을 규명하기 위해서는 임상시험을 통하여 *in vitro*에서 나타난 CYP2D6 저해 효과를 검증할 필요가 있을 것이다.

### P-glycoprotein 활성 저해능 탐색

항암제의 다약제내성 발현과 관련하여 가장 대표적인 약물수송단백의 하나인 p-glycoprotein (p-gp) 단백질 활성의 기능에 대한 황백의 주요 구성 성분의 저해효과는 p-gp가 과발현된 세포주인 L-MDR1 세포주를 이용하여 탐색하였다 [14]. P-gp의 저해제로 알려져있는 cyclosporin A의 경우는 강력하게 p-gp의 기능을 저해하였고, 저해활성이 없는 para-aminohippuric acid는 p-gp 기능 저해능을 보이지 않는 것으로 나타나 (Fig. 4), 본 연구에 사용한 세포주 시스템이 p-gp 기능 억제능을 평가하기에 적합한 시스템이라는 것을 확인할 수 있었다 [13]. 본 연구에서 평가한 황백을 구성하고 있는 4가지 주요 성분들은 p-gp의 기능에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 상기의 연구 결과는 이들 물질이 약물수송단백의 하나인 p-gp에 대한 저해 효과가 없음을 의미하며, 따라서

**Table 1.** Effect of berberine and palmatine on dextromethorphan O-demethylase activity in human liver microsomes.

	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	
	with pre-incubation	without pre-incubation
Berberine	$3.5 \pm 0.5$	$17.5 \pm 3.2$
Palmatine	$108.2 \pm 21.9$	$111.6 \pm 18.4$



**Fig. 4.** Inhibitory effects of berberine on calcein AM accumulation in L-MDR1.

p-gp 기능의 매개를 통한 약물상호작용 가능성은 없을 것으로 기대된다.

### 요 약

본 연구는 황백에 함유되어 있는 주요 화합물인 berberine, palmatine, limonin 및 rutaecarpine의 CYP2D6 및 p-glycoprotein 활성에 대한 저해정도를 탐색함으로써, 황백을 다른 양약과 병용시 약물상호작용을 유발할 수 있는 가능성을 평가하고자 하였다. 인체 간 마이크로솜 시료에 CYP2D6 동효소의 기질약물인 dextromethorphan과 NADPH 재생성계 및 저해제 (200  $\mu M$ )를 첨가한 후 반응시켜 생성된 대사물을 LC/MS/MS를 이용하여 정량하여 CYP2D6 동효소 활성의 변화를 평가하였다. 또한 약물수송단백인 p-glycoprotein의 활성은 L-MDR1 세포주를 이용한 calcein AM 추적 실험을 통하여 평가하였다. 그 결과 식물 알칼로이드인 berberine에서 강력한 CYP2D6 활성 저해능을 관찰하였으며, 저해 효과는

농도 의존적으로 증가하였으며, mechanism-based 저해 기전을 나타내었다. 그러나 limonine과 rutacarpine은 CYP2D6 저해 활성을 보이지 않았고, p-glycoprotein 기능에 대해서는 평가한 어떤 화합물도 저해 활성을 나타내지 않았다. 황백의 주요 성분인 berberine의 CYP2D6 활성 저해능을 고려할 때, 황백을 CYP2D6 기질약제와 병용시 약물상호작용을 유발할 가능성을 보여준다. 이러한 황백의 CYP2D6를 매개로한 임상적인 약물상호작용 가능성은 임상시험을 통하여 추가적인 검증이 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 논문은 2005년도 인제대학교 학술연구조성비 보조에 의한 것임.

## 참고 문헌

- Bertelsen, K. M., Venkatakrisnan, K., Von Moltke, L. L., Obach, R. S. and Greenblatt, D. J. 2003. Apparent mechanism-based inhibition of human CYP2D6 *in vitro* by paroxetine: comparison with fluoxetine and quinidine. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 289-293.
- Chatterjee, P. and Franklin, M. R. 2003. Human cytochrome p450 inhibition and metabolic-intermediate complex formation by goldenseal extract and its methylenedioxyphenyl components. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 1391-1397.
- Holstege, C. P., Mitchell, K., Barlotta, K. and Furbee, R. B. 2005. Toxicity and drug interactions associated with herbal products: ephedra and St. John's Wort. *Med. Clin. North Am.* **89**, 1225-1257.
- Huang, S. M., Hall, S. D., Watkins, P., Love, L. A., Serabjit-Singh, C., Betz, J. M., Hoffman, F. A., Honig, P., Coates, P. M., Bull, J. *et al.* 2004. Drug interactions with herbal products and grapefruit juice: a conference report. *Clin. Pharmacol. Ther.* **75**, 1-12.
- Ingelman-Sundberg, M. 2005. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* **5**, 6-13.
- Kim, H., Yoon, Y. J., Shon, J. H., Cha, I. J., Shin, J. G. and Liu, K. H. 2006. Inhibitory effects of fruit juices on CYP3A activity. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 521-523.
- Kim, J. Y., Baek, M., Lee, S., Kim, S. O., Dong, M. S., Kim, B. R. and Kim, D.H. 2001. Characterization of the selectivity and mechanism of cytochrome P450 inhibition by dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylenedioxybiphenyl-2,2'-dicarboxyl ate. *Drug Metab. Dispos.* **29**, 1555-1560.
- Kim, M. J., Kim, H., Cha, I. J., Park, J. S., Shon, J. H., Liu, K. H. and Shin, J. G. 2005. High-throughput screening of inhibitory potential of nine cytochrome P450 enzymes *in vitro* using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrum* **19**, 2651-2658.
- Kim, O. C., 2001. *Phellodendri cortex*. In: Kim O. C. (ed), *Herbal Pharmacology*, Zibmoondang, pp. 138-140.
- Kim, O. N., 2003. Drug interaction. In: Kim O. N. (ed), *Clinical Pharmacology*, 6<sup>th</sup> Ed., SooMoonSa, pp. 475-479.
- Singh, Y. N. 2005. Potential for interaction of kava and St. John's wort with drugs. *J. Ethnopharmacol.* **100**, 108-113.
- Society for the research of pharmacognosy, 2000. *Phellodendri cortex*. In: Society for the research of pharmacognosy (ed), *Modern Pharmacognosy*, Hakchangsa, pp. 176-180.
- Suzuyama, N., Katoh, M., Takeuchi, T., Yoshitomi, S., Higuchi, T., Asashi, S. and Yokoi, T. 2006. Species differences of inhibitory effects on P-glycoprotein-mediated drug transport. *J. Pharm. Sci.*
- Tanaka, K., Hirai, M., Tanigawara, Y., Ueda, K., Takano, M., Hori, R. and Inui, K. 1997. Relationship between expression level of P-glycoprotein and daunorubicin transport in LLC-PK1 cells transfected with human MDR1 gene. *Biochem. Pharmacol.* **53**, 741-746.