약학회지 제32권 제 1 호 55~71 (1988)
Yakhak Hoeji Vol. 32, No. 1

Piperine이 적출 백서 정관내의 교감신경계에 미치는 영향

殷 載 淳
全州又石大學 藥學科
(Received January 28, 1988)

Effect of Piperine on Peripheral Sympathetic Nervous System in Isolated Vas deferens of Rat

Jae Soon Eun
Department of Pharmacy, Jeonju Woo Suk University, Jeonju 520, Korea

Abstract—To elucidate one of the effect of piperine on the peripheral sympathetic nervous system, influence of piperine upon the contractile action of norepinephrine, methoxamine and tyramine as well as uptake and release of [^{3}H]-norepinephrine has been investigated in naive and chronic piperine-treated vas deferens of rats. pA_2 value for α_1-adrenoceptor of phentolamine was significantly increased. Chronic piperine-treated group was markedly shown increased efflux of [^{3}H]-norepinephrine and muscular tension, but was not affected the neuronal up-take and release of [^{3}H]-norepinephrine. It can be concluded that potentiation of the effect of norepinephrine by acute and chronic piperine treated group may be due to the change of affinity of α_1-adrenoceptor, and partly due to possible modification of storage mechanism.

Piperine의 중추신경억제작용이 강력하다고 밝혀진 후,[1,2] 신약개발을 위한 piperine유도체의 합성 및 약리작용에 관한 연구가 보고되었으며,[3~5] 약물대사에 관여하는 효소억제제로서 piperine에 대한 연구도 보고되었다.[6~9] 또한 저자는 최근 piperine의 또 다른 중추신경계에 대한 작용으로서 piperine이 진통작용을 유발하며, 이는 piperine이 뇌내 β-endorphin함량을 증가시키고, opiate수용체의 수적 변동을 일으켜 진통작용을 유발함을 확인한 바 있다.[10] 그러나 piperine의 약리학적 작용기전에 대한 연구는 극히 드물며 특히 자율신경계에 대한 효과는 거의 알려져 있지 않다.

따라서 저자는 정상 또는 piperine단기, 장기 투여 적출 백서 정관 표본에서 norepinephrine 효과와 유리에 미치는 piperine의 영향을 검토하여 교감신경계에 대한 piperine의 작용기전을 추구하고자 본 실험을 시도하였다.

실 험 방 법

시약 및 기기—본 실험에 사용한 시약은 piperine(Sigma Co.), tyramine·HCl(Sigma Co.), L-arterenal bitartrate(Sigma Co.), [^{3}H]-(+)-norepinephrine(New England Nuclear Co.), protosol(New England Nuclear Co.) 및 Imipramine·HCl(Sigma Co.) 이었으며, 사용기기는 Physiograph(Narco MK-IV) 및 Isometric transducer(Narco, F-60)을 사용하였으며, radioactivity는 Liquid scintillation counter(Packard)로 측정하였다.

실험동물—체중 200g내외의 웅성백서(Sprague-Dawley)를 실험기간 동안 물과 사료를 충분히 섭취할 수 있는 동일한 조건하에 사육하여 실험에 사용하였으며, 장기처리군에서 vehicle군에는 70% ethanol 0.2ml를, 그리고 실험군에는 70% ethanol 0.2ml에 piperine(15mg/kg)을 용해시켜 각각 1주, 2주 및 4주간 1일 1회 복강내로 투여

하고 최종투약 1일 후 실험에 사용하였다.

적출 백서 정관의 수축력 측정—표본은 동물을 두부 타격으로 치사시킨 후, 정관을 적출하여 37°C, 95%O_2+5%CO_2로 포화시킨 Krebs-Henseleit bicarbonate solution이 들어있는 organ bath내에 현수하고 근편의 수축력은 Isometric transducer를 통하여 physiograph에 기록하였고, resting tension은 0.5g을 가하였다. 근편을 현수하고 약 6분간 영양액으로 수차 세척한 다음 실험을 시작하였다. Bath내 약물 투여는 20분 간격으로 하였고, piperine(3×10^{-6}M)은 70%ethanol에 용해시켜 norepinephrine 투여 10분전에 전처리하였으며 투여량은 0.1ml로 일정하게 하였다. 장기투여 군에서의 수용체의 질적, 양적변동을 관찰한 실험에서 근편수축력에 대한 norepinephrine의 ED_{50}을 산출하고, α_1-adrenoceptor에 대한 phentolamine의 친화력은 여러 농도의 phentolamine 존재하에서 norepinephrine의 근수축 작용을 관찰하여 Arunlakshana와 Shield의 방법[11]에 따라 pA_2치를 산출하였다.

위 실험에 사용한 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution의 전해질 조성은 118mM NaCl, 27.2mM $NaHCO_3$, 4.0mM KCl, 1.0mM KH_2PO_4, 1.2mM $MgSO_4$, 1.8mM $CaCl_2$ 및 11.1mM glucose였다.

[^{3}H]-Norepinephrine uptake와 efflux의 측정—[^{3}H]-norepinephrine efflux는 Arun 등의 방법[12]으로 측정하였다. 즉 백서의 정관을 적출하여 30분간 Krebs buffer에 배양한후 [^{3}H]-norepinephrine(specific activity 15Ci/mmol) 1μCi/ml를 함유한 Krebs buffer에 옮겨 30분간 배양하였다. 다음 표본을 imipramine(545μg/L)를 함유한 Krebs buffer에 다시 10분간 세척한후, 5ml 용적의 organ bath내 1cm간격의 두 백금 전도자 사이에 0.5g의 resting tension을 가하여 현수하고 30분간 네번 세척한 다음 실험을 시작하였다. 전기자극은 1Hz/oms, 100V의 전류로 3분간 가하였고, 전기자극시의 근편의 수축력 변동은 Isometric transducer를 통하여 physiograph로 기록하였다. Basal efflux는 전기자극 5분전에 채집한 용액내의 radioactivity로, 전기자극에 의한 tritium의 fractional release는 전기자극 종료 후, 바로 채집한 용액의 radioactivity에서 basal efflux를 제한 값으로 정하였다. 또한 [^{3}H]-norepinephrine의 total uptake는 표본조작은 같으나 organ bath내에 현수하지 않고 바로 tritium이 loading된 정관을 1ml의 protosol에 넣어 12~18시간 동안 55°C water bath에 incubation하여 용출시킨 후, radioactivity를 측정하였다. radioactivity는 모아진 sample에 aquasol 5ml를 가하여 Liquid scintillation counter로 측정하였다. 본 실험에 사용한 Krebs buffer의 조성은 NaCl 118, KCl 4.7, $NaHCO_3$ 2.5, $MgSO_4$ 0.45, KH_2PO_4 1.03, $CaCl_2$ 2.5, glucose 11.1, Sodium edetate 0.067 및 Ascorbic acid 0.07(mM)이었다.

실험성적은 Mean±S.E.M.으로 표시하였고 유의성 검정은 Student's t-test를 적용하였다.

실 험 결 과

Norepinephrine의 평활근 수축효과에 미치는 piperine의 영향—정상표본의 실험에서는 6예의 vehicle 처리군에서 norepinephrine은 용량에 비례하는 근 수축을 일으켰고, 용량반응 곡선으로부터 구한 ED_{50}은 3.728±0.201μM이었으며 최대수축력은 1.902±0.290g/100mg tissue였다. 한편 6예의 piperine 3×10^{-6}M처리군에서 norepinephrine의 평활근 수축효과는 현저히 강화되었으며, ED_{50}은 1.982±0.164μM로 대조군에 비하여 유의하게 감소되었고, 최대수축력은 3.016±0.364g/100mg tissue로 현저히 증가되었다(Table I, Fig. 1 참조).

Piperine장기투여 표본 실험에서는 1일 piperine 15mg/kg(i.p.)을 1주, 2주 및 4주간 처리한 백서 적출 정관표본에서 norepinephrine의 ED_{50}은 각각 3.23±0.31, 4.02±0.39 및 4.45±0.45μM로 대조군에 비하여 현저히 감소되었고 최대수축력은 각각 2.07±0.11, 2.54±0.20 및 2.82±0.16g/100mg tissue로 대조군에 비하여 현저히 증가되었다(Table II 참조).

Methoxamine의 평활근 수축효과에 미치는 piperine의 영향—methoxamine은 norepinephrine

Table I—Influence of piperine on the ED_{50} and maximum effect of contractile action of norepinephrine in isolated vas deferensof rat.

	ED_{50} of NE (μM)	Maximum effect (g/100mg tissue)
vehicle(alcohol)	3.728±0.201	1.902±0.290
piperine(3μM)	1.982±0.164*	3.016±0.364*

Concentration of piperine in bath was 3×10^{-6}M. Each value represents the mean±SEM from 6 experiments.
*; Significantly different from the value of vehicle group ($P<0.05$).

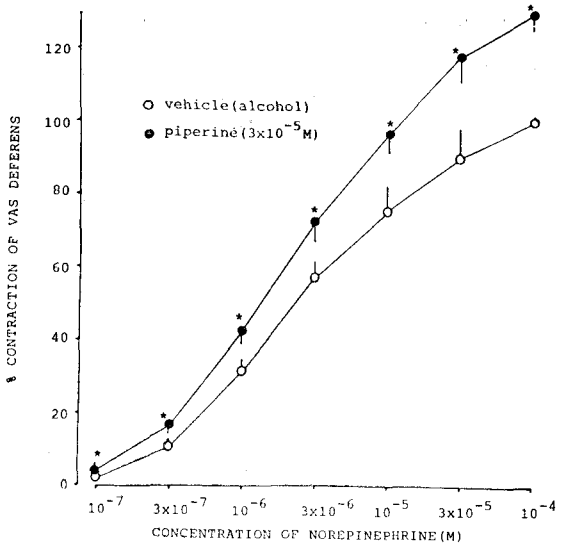

Fig. 1—Influence of piperine(30μM) on the contractile action of norepinephrine in isolated vas deferens of rat. Each point with vertical bar represents the mean with SEM from 6 experiments. *; Significantly different from the value of the vehicle group($P<0.05$).

과는 달리 neuronal uptake가 일어나지 않음이 알려져 있다. 각각 6예의 vehicle처리군과 piperine 30μM처리군에서 methoxamine의 근 수축효과를 관찰하였던 바, 대조군에서의 methoxamine ED_{50}은 4.20±0.23μM이었고 최대수축력은 0.524±0.101g/100mg tissue로 piperine처리는 methoxamine 효과를 현저히 강화시켰다(Table III, Fig. 2 참조).

Piperine장기투여가 tyramine효과에 미치는 영향—Vehicle 1주, 2주 및 4주 처리군에서 tyramine의 ED_{50}은 각각 20.38±2.11, 16.56±1.78 및 14.82±1.26μM로 vehicle처리 기간에 따라 감소되었으며 최대수축력은 각각 2.90±0.17, 3.50±0.21 및 4.20±0.33g/100mg tissue로 vehicle처리기간에 따라 증가되었다. piperine 처리군에서 tyramine의 ED_{50}은 대조군에 비하여 현저히 증가되었으며, 최대수축력은 현저히 감소되었다(Table IV 참조).

Table II—Influence of piperine treatment on the contractile effect of norepinephrine in the isolated vas deferens of rat.

	ED_{50} of NE (μM)	Maximum effect (g/100mg tissue)
1 week		
vehicle(alcohol)	4.43±0.30	1.62±0.12
piperine treatment	3.23±0.31*	2.07±0.11*
2 weeks		
vehicle(alcohol)	6.23±0.48	1.83±0.14
piperine treatment	4.02±0.39*	2.54±0.20*
4 weeks		
vehicle(alcohol)	7.27±0.54	2.21±0.12
piperine treatment	4.45±0.45*	2.82±0.16*

Piperine treatment was performed by i.p. injection of 15mg/kg.
Each value represents the mean±SEM from 6 experiments.
*; Significantly different from the value of vehicle group ($P<0.05$).

Table III—Influence of piperine on the ED_{50} and maximum effect of contractile action of methoxamine in isolated rat vas deferens.

	ED_{50} of methox. (μM)	Maximum effect (g/100mg tissue)
vehicle(alcohol)	4.20±0.23	0.524±0.101
piperine(30μM)	3.15±0.17*	0.994±0.128*

Concentration of piperine in bath was 3×10^{-5}M. Each value represents the mean±SEM from 6 experiments.
*; Significantly different from the value of vehicle group ($P<0.05$).

α-Adrenoceptor의 pA_2치에 미치는 piperine의 영향—상술한 성적에서 norepinephrine의 효과 변동이 α-adrenoceptor의 질적 변동에 기인하

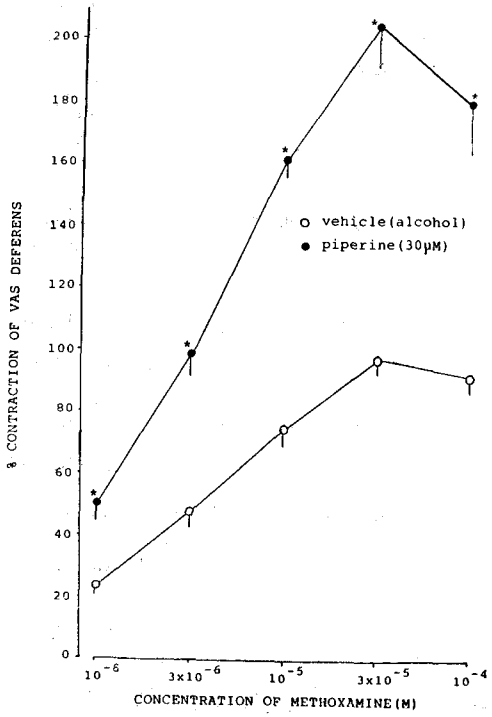

Fig. 2—Influence of piperine(30μM) on the contractile action of methoxamine in isolated vas deferens of rat. Other legends are the same as in Fig. 1.

Table IV—Influence of piperine treatment on the contractile effect of tyramine in the isolated vas deferens of rat.

	ED_{50} of tyramine (μM)	Maximum effect (g/100mg tissue)
1 week		
vehicle(alcohol)	20.38±2.11	2.90±0.17
piperine treatment	34.41±4.30*	2.04±0.18*
2 weeks		
vehicle(alcohol)	16.56±1.78	3.50±0.21
piperine treatment	28.30±3.21*	2.46±0.20*
4 weeks		
vehicle(alcohol)	14.82±1.26	4.20±0.33
piperine treatment	24.11±3.09*	2.56±0.24*

Piperine treatment was performed by i.p. injection of 15mg/kg.
Each value denotes the mean±SEM from 6 experiments.
*; Significantly different from the value of vehicle group ($P<0.05$).

Table V—Influence of chronic piperine treatment on the pA_2 value of α_1-adrenoceptor for phenotolamine in isolated vas deferens of rat.

	pA_2 value for phentolamine
1 week	
vehicle(alcohol)	8.48±0.32
piperine treatment	9.66±0.40*
2 weeks	
vehicle(alcohol)	8.33±0.27
piperine treatment	10.85±0.48*
4 weeks	
vehicle(alcohol)	8.36±0.30
piperine treatment	11.11±0.46*

Piperine treatment was performed by i.p. injection of 15mg/kg.
The pA_2 values were calculated by ED_{50}s in the absence or presence of various concentration of phentolamine.
Each value denotes the mean of 6 experiments.
*; Significantly different from the value of vehicle group ($P<0.05$).

는지 보고자 piperine 1주, 2주 및 4주간 처리 표본에서 phentolamine에 대한 α_1-adrenoceptor의 pA_2치를 산출하였다. pA_2치는 각각 9.66±0.40, 10.85±0.48 및 11.11±0.46μM로 대조군에 비하여 유의하게 증가되었다(Table V 참조).

[^{3}H]-Norepinephrine 유리에 미치는 piperine의 영향—각각 6예의 백서에서 vehicle 또는 1일 piperine 15mg/kg(i.p.)을 1주, 2주 및 4주간 투여한 백서의 정관 표본에서 전기자극전 [^{3}H]-norepinephrine의 basal efflux와 total uptake 그리고 전기자극에 따른 근 편의 tension 및 [^{3}H]-norepinephrine의 fractional release를 관찰하였다.

Total uptake는 vehicle처리 1주군에서 [^{3}H]-norepinephrine 총유입량은 148.17±5.76nCi/100 mg tissue이었으며 vehicle처리 2주 또는 4주군에서는 시간 경과에 따라 더욱 감소하였다. piperine처리군에서 [^{3}H]-norepinephrine 총유입량은 vehicle처치군에서와 비슷하였다. Vehicle 투여 1주군에서 [^{3}H]-norepinephrine의 basal efflux는 3.33±0.17nCi/100mg tissue였으며, 2주

또는 4주군에서는 시간경과에 따라 감소하는 경향을 보였다. piperine처리 1주군에서의 basal efflux는 2.70±0.20nCi/100mg tissue로 대조군에 비하여 현저히 감소되었으며, 2주 또는 4주군에서도 대조군에 비하여 현저히 감소되었다(Fig. 3 참조).

전기자극에 의한 total tension에서 resting tension을 가한 tension은 vehicle처리 1주군에서 0.96±0.09g/100mg tissue였으며, 2주 및 4주군에서는 증가되는 경향을 보였다. piperine처리 1주군에서 tension은 1.42±0.11g/100mg tissue로 대조군에 비하여 현저히 강화되었으며, piperine처리 2주 및 4주군에서의 tension도 대조군에 비하여 현저히 강화되었다. Fractional release는

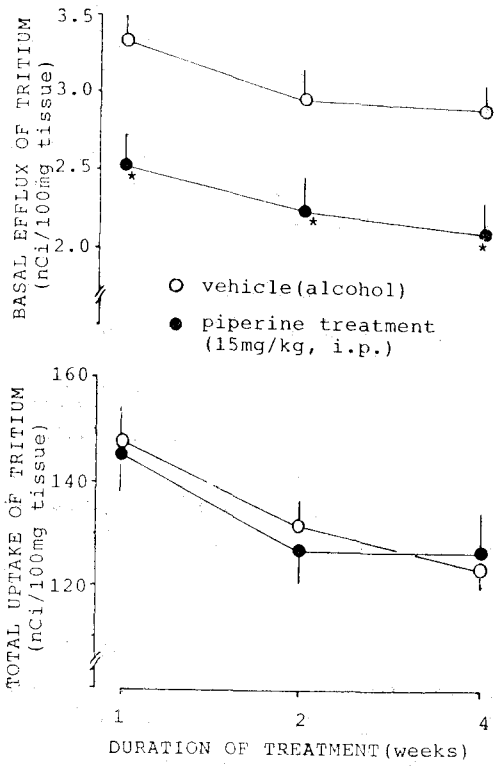

Fig. 3—The effect of chronic piperine treatment(15 mg/kg, i.p.) on total uptake and basal efflux of [^{3}H]-norepinephrine. Basal efflux is the amount of radioactivity spontaneously released within 5 minutes before electrical stimulation. Each point with vertical bar denotes the mean with SEM from 6 experiments.
*; Significantly different from the value of vehicle group ($P<0.05$).

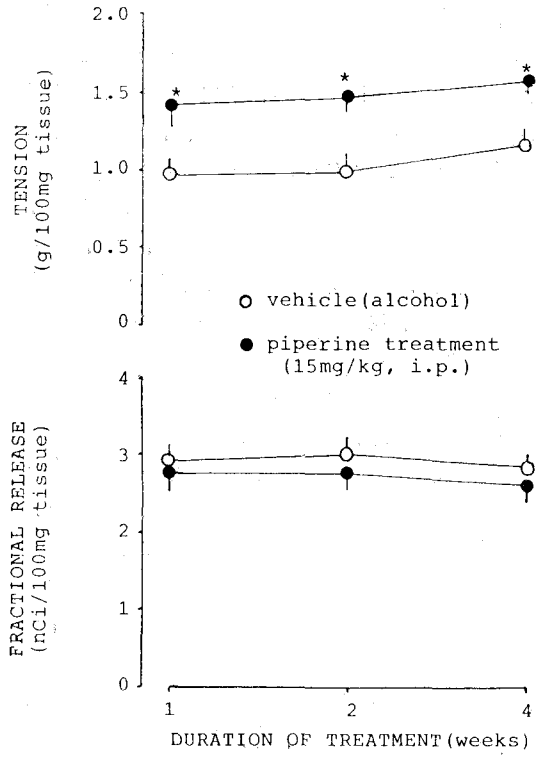

Fig. 4—The effect of chronic piperine treatment(15 mg/kg, i.p.) on tension development(above) and the fractional release of tritium following electrical stimulation(1Hz, 1ms, 100V, for 3 min.). Each point with vertical bar represents the mean with SEM from 6 experiments.
*; Significantly different from the value of the vehicle group ($P<0.05$).

vehicle처리 1주군에서 2.94±0.20nCi/100mg tissue였으며 vehicle처리 2주 또는 4주군에서의 fractional release도 vehicle처리 1주군의 치와 비슷하였다. 또한 1주, 2주 및 4주간 piperine처리군에서 fractional release는 대조군에서와 비슷하였다(Fig. 4 참조).

고 찰

본 연구에서 piperine에 의한 norepinephrine 효과 강화기전은 수용체의 수 또는 질적 변조, amine pump억제, catecholamine생성 및 유리기전에 대한 작용등을 생각할 수 있다. piperine의 α-adrenoceptor에 대한 작용은 piperine장기처리로

norepinephrine효과 뿐만 아니라, methoxamine 효과도 강화되었으며, 특히 phentolamine에 대한 α_1-adrenoceptor의 pA_2치가 증가되었던 점등으로 미루어 α_1-adrenoceptor의 친화력이 증가되었음을 알 수 있다. methoxamine은 amine pump를 통한 neuronal uptake가 일어나지 않으며, 그 주 작용이 α_1-adrenoceptor에만 작용함이 알려져 있다.[13] 따라서 bath내 piperine처리로 인한 methoxamine효과 강화기전은 neuronal uptake차단과는 무관함을 의미한다.

piperine이 [^{3}H]-norepinephrine uptake에 영향을 미치지 못하였던 점은 이와같은 사실을 더욱 뒷받침한다. piperine장기투여는 [^{3}H]-norepinephrine release에 영향을 미치지 못하였으며, tyramine 효과를 저하시켰다. 본성적과 piperine 장기투여에 의한 [^{3}H]-norepinephrine의 basal efflux가 증가된 점을 감안할 때 적어도 일부는 piperine이 catecholamine store에 작용하여 그 약리적 작용을 나타냄을 추측할 수 있다. 그러나 본 실험만으로는 store의 수, 크기, 새로이 생성된 norepinephrine에 대한 binding affinity 등의 변동을 알 수 없으며, 이는 더욱 추구하여야 할 문제이다.

결 론

말초 교감신경계에 대한 piperine의 영향을 규명하여 보고자, 정상군, vehicle군 및 piperine 장기투여 적출 정관 표본에서 norepinephrine, methoxamine, tyramine의 근 수축효과와 [^{3}H]-norepinephrine의 유입 및 유출을 관찰하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 시험관내 piperine첨가는 norepinephrine의 효과를 강화시켰고, piperine장기투여는 norepinephrine의 ED_{50} 감소와 최대수축력의 증가를 일으켰다.

2. piperine 장기투여는 methoxamine의 ED_{50}을 감소시켰고 최대수축력을 증가시켰다.

3. piperine 장기투여는 tyramine ED_{50}을 증가시켰고 최대수축력을 감소시켰다.

4. piperine 장기투여는 phentolamine에 대한 α_1-adrenoceptor의 pA_2치를 증가시켰다.

5. piperine 장기투여는 [^{3}H]-norepinephrine의 neuronal uptake와 fractional release에는 영향을 나타내지 못하였으나 basal efflux의 감소를 일으켰고 평활근 tension의 증가를 일으켰다.

문 헌

1) Woo, W.S., Lee, E.B. and Shin, K.H.: Central nervous depressant activity of piperine. *Arch. Pharm. Res.*, **2**, 121 (1979).
2) Shin, K.H., Yun, H.S., Woo, W.S. and Lee, C.K.: Pharmacologically active principle of piper retrofractum. *Kor. J. Pharmacogn.*, **10**, 69 (1979).
3) Eun, J.S., Rim, J.K., Kim, W.J., Woo, W.S. and Lee, E.B.: Syntheses and central nervous depressant activity of piperine derivatives. *Yakhak Hoeji*, **27**, 283 (1983).
4) Pei, Y.Q.: A review of pharmacology and clinical use clinical use of piperine and its derivatives. *Epilepsia*, **24**, 177 (1983).
5) Eun, J.S.: Studies on the structure-activity relationship of pharmacological effect in piperine analogues. *Jeon-ju Woo Suk University (press)*, **8**, 45 (1986).
6) Shin, K.H. and Woo, W.S.: Effect of piperine on hepatic mixed function oxidase system. *Korean Bio-Chem. J.*, **18**, 9 (1985).
7) Atal, C.K., Bubey, R.K. and Singh, J.: Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* **258**, 232 (1984).
8) Singh, Dubey, R.K. and Atal, C.K.: Piperine-mediated inhibition of glucuronidation activity in isolated epthelial cells of the guinea-pig small intestine. *ibid.*, **488**, 236 (1985).
9) Bauer, E. and Reutter, W.: Inhibition of uridine diphosphoglucose dehydrogenase by galactosaminel-phosphate and UDP-galactosamine. *Biophys. Acta*, **11**, 293 (1973).
10) Eun, J.S.: A study on the mechanism of analgesic action of piperine. *Yakhak Hoeji*, **30**, 169 (1986).

11) Arunlakshara, O. and Schield, H.O.: Some quantitative uses of drug antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, **14**, 48 (1959).
12) Arun. R.W.: A maximum contraction and substantial quantities of tritium can be obtained from TEA treated [^{3}H]-Noradrenaline preloaded, rat vas deferens in response to single electrical shock. *Br. J. Pharmacol.*, **68**, 425 (1980).
13) Goth, Andres: *Medical Pharmacology*, Mosby Press, 11th ed., 168 (1984).