

홍삼 Ginsenoside의 Cytochrome P450 저해 활성 평가

류창선 · 신장현* · 신병찬* · 심재한* · 양현동* · 이성우* · 김봉희#

충남대학교 약학대학, *보문고등학교

(Received January 20, 2015; Revised April 8, 2015; Accepted April 8, 2015)

In vitro Assessment of Cytochrome P450 Inhibition by Red Ginseng Ginsenosides

Chang Seon Ryu, Jang Hyun Shin*, Byoung Chan Shin*, Jae Han Sim*, Hyeon Dong Yang*,
Sung Woo Lee* and Bong-Hee Kim#

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

*Bomoon High School, Daejeon 300-812, Korea

Abstract — In the present study we evaluated comparative herb-drug interaction potential of red ginseng total powder, ginsenoside Rg1, and Rb1 by inhibition of CYP isoforms including CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4 using pooled human liver microsomes (HLMs). As measured by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, red ginseng total powder inhibited significantly activities of CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 and testosterone 6-beta hydroxylation by CYP3A4, but the IC_{50} values were higher than 556 $\mu\text{g/ml}$. Activities of CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4 were inhibited by ginsenoside Rb1. Also, activities of CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and testosterone 6-beta hydroxylation by CYP3A4 were inhibited by ginsenoside Rg1. The IC_{50} values of ginsenoside Rb1 and Rg1 were higher than 200 $\mu\text{g/ml}$. Based on IC_{50} values against CYP isoforms, ginsenosides-drug interactions by CYP inhibition may be very low in clinical situations.

Keywords □ cytochrome P450, red ginseng, ginsenoside, drug-drug interaction

국내 65세 이상의 고령 인구가 2010년에 전체인구의 11.1%를 차지하며 2030년 2.3배, 2060년에는 3배 이상 증가하여 1726만 명에 이를 것으로 예상된다.¹⁾ 고령 인구의 만성 질환의 유병률이 높아짐에 따라 고령 환자에 대한 의약품 처방 빈도가 증가하였으며 우리나라 전체 노인의 88.5%가 평균 2.5개의 각종 만성 질환에 시달리고 있다.²⁾ 만성질환의 복합이환자는 68.3%로 노인 중 처방약을 3개월 이상 복용하고 있는 비율은 84.0%로 높게 보고되었다.²⁾ 2010 소비자안전센터의 ‘고령자 건강기능식품 실태 조사 결과’에 따르면, 최근 1년 이내에 건강기능식품을 섭취한 경험이 있는 응답자가 전체의 76.2%로 나타났다.³⁾ 우리나라의 건강기능식품 시장규모는 2011년을 기준으로 1조 3,682억으로

전년대비 28.2% 성장하였다.⁴⁾

건강기능식품이 치료약과 같은 성분을 함유하거나 치료약의 작용을 상승시키는 작용을 할 경우, 중대한 상호작용이 나타날 수 있다. 간은 약물대사의 중추로 약물대사 효소 중 가장 중요한 효소계인 cytochrome P450(CYP) 효소는 다양한 내인성 및 외인성 물질에 의해 그 발현과 활성이 조절되며 약물의 병용 투여 시 CYP 효소 저해와 유도는 임상약물치료에서 약물-약물 상호작용(drug-drug interaction, DDI)을 유발하는 대표적인 기전이다.⁵⁾

본 연구에서는 건강기능식품의 2011년 품목의 생산액 기준으로 7,191억원으로 전체의 52.6%를 점유하며 1위를 차지하며,⁴⁾ 만성질환 환자가 가장 많이 복용하는 제품인 홍삼을 약물상호작용 시험 약물로 선정하였다. 선행 연구에서 recombinant CYP 효소와 형광 기질을 이용하여 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, 및 CYP3A4 효소에 대한 ginsenoside의 inhibition이 보고되었다.⁶⁾ 따라서 본 연구에서는 홍삼 total 분말과 함께 대표적인 성분인 ginsenoside Rg1과 Rb1에 대한 CYP 효소의 억

#Corresponding Author

Bong-Hee Kim

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

Tel.: 042-821-5935 Fax.: 042-823-6566

E-mail: bhkimnh@cnu.ac.kr

제효과를 평가하였다. 이미 확립된 미국 Draft FDA guidance for industry, drug interaction studies⁷⁾를 바탕으로 인간 간세포로부터 분리된 liver microsomes을 활용하여 8개 CYP 효소 isoform에 대한 억제효과를 LC-MS/MS로 분석하는 방법을 이용하였다.

실험방법

시약

Phenacetin, acetaminophen, coumarin, 7-hydroxycoumarin, bupropion, tolbutamide, 4-hydroxytolbutamide, dextromethorphan, dextrorphan, chlorzoxazone, 6-hydroxychlorzoxazone, testosterone, fluvoxamine, furafylline, ketoconazole, carbamazepine, ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1 및 환원된 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. Hydroxybupropion, 4'-hydroxymephenytoin, 1-hydroxymidazolam, 및 6 β -hydroxy-testosterone는 BD Gentest Co.(Woburn, MA)로부터 구입하였다. Midazolam은 부광약품(서울)로부터 구입하였다. Pooled human liver microsomes(BD UltraPool™ HLM 150, lot 38289)은 BD Gentest Co.(Woburn, MA)로부터 구입하였다. 홍삼 제품은 한국인삼공사로부터 구입하였고 해당 제품은 홍삼 분말 100%로 구성되어있다. 지표성분으로 ginsenoside Rb1과 ginsenoside Rg1을 합하여 18 mg/g이다. 모든 시약은 분석용 또는 구입 가능한 가장 높은 등급을 사용하였다.

CYP 직접 저해 평가

8×12 rack(1.2 ml; VWR, Emeryville, CA)에 8-well tube strips 을 반응에 이용하였다. CYP 효소 저해 평가방법은 알려진 CYP 효소 직접 저해제를 이용하여 IC₅₀ 값과 용량 반응 곡선을 작성하여 설정되었다.⁸⁾ 반응 용액은 최종 농도 1 mg/ml human microsomal protein, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4), 1 mM NADPH와 다양한 CYP 효소 isoform의 CYP 효소 isoform-specific 개별 기질의 혼합액(A set: phenacetin(CYP1A2), coumarin(CYP2A6), S-mephenytoin(CYP2C19), dextromethorphan(CYP2D6), and midazolam(CYP3A4); B set: bupropion(CYP2B6), tolbutamide(CYP2C9), chlorzoxazone(CYP2E1), and testosterone(CYP3A4)에 의해 최종 부피 200 μ l로 구성되었다. 기질은 각각의 Michaelis-Menten constant(K_m) 값에 맞게 다음과 같이 농도를 설정하였다: phenacetin 50 μ M, coumarin 5 μ M, bupropion 50 μ M, tolbutamide 100 μ M, S-mephenytoin 100 μ M, dextromethorphan 5 μ M, chlorzoxazone 50 μ M, midazolam 5 μ M, 및 testosterone 50 μ M. 기질 농도의 보고된 K_m 값을 토대로 설정하였다.⁶⁾ 모든 실험에 사용된 기질은

acetonitrile에 녹여 계열 희석하였다. 반응에 사용된 기질에 포함된 acetonitrile의 조성은 최종 1.0%(A set) 및 0.5%(B set)이 되도록 설정하였다. 37°C에서 5분간의 pre-incubation 한 후에, 최종농도 1 mM NADPH를 가하여 반응을 시작하였다. 반응 용액은 10분간 37°C 진탕배양기를 이용하여 incubation 하였다. 200 μ l 부피의 ice-cold 반응 종결액(내부 표준물질로 50 nM carbamazepine을 포함한 acetonitrile)을 가하여 반응을 종결한다. 각 반응액을 4°C, 3,000 rpm, 20분간 원심분리한 후, 각 샘플 반응액(A, B set)은 96 well에 1:1로 희석한다. CYP 효소 저해의 양성대조군으로 CYP 3A4의 선택적인 저해제인 ketokonazole을 사용하여 동일한 조건으로 실험하였다.

농도 분석 방법

미리 확립된 분석 조건을 이용하여,⁸⁾ 반응시킨 약물들을 Shimadzu LC-20A prominence UFLC(Shimadzu Corp. Tokyo, Japan)와 Turbo IonSpray™ source(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)가 장착된 API3200™ Q-trap LC-MS/MS (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 구성된 분석 시스템을 이용하여 분석하였다. 샘플 10 μ l를 주입하여 0.7 ml/min의 유속으로 Atlantis C18 컬럼(5 μ m 4.6×150 mm; Waters)과 SecurityGuard™ C18(2.0×4.0 mm i.d., Phenomenex, Torrance, CA) 가드 컬럼을 이용하여 분리하였다. 이동상으로 0.1% formic acid가 각각 포함된 탈이온수(이동상 A)와 acetonitrile(이동상 B)를 이용하였다. 두 이동상은 linear gradient를 이용하여 0.1분까지 100% A로 유지한 후 4분까지 50%로 증가시키고 0.1분간 유지하였다. 설정된 장비의 조건은 다음과 같다: 이온 소스 온도, 600°C; nebulizing gas flow, 50 l/min; auxiliary gas flow, 4.0 l/min; curtain gas flow, 20 l/min; and collision gas(nitrogen) pressure, 3.4×10⁻⁵ Torr. 초순도 질소 가스가 CUR(curtain gas), CAD(collisionally activated dissociation)와 NEB(nebulizer gas)를 위해 사용되었다. MRM transitions, collision energies와 머무름시간은 각각 대사체와 내부 표준물질에 대해 측정되었다. 샘플의 분석은 positive와 negative(6-hydroxychlorzoxazone) multiple reaction monitoring(MRM) scan mode를 이용하여 각각 형성된 대사체와 내부 표준물질의 peak 넓이를 통해 계산하였다. 분석의 dwell 시간은 각 채널 별로 0.08초로 설정하였다. 분석된 값들은 Analyst™ 소프트웨어(version 1.4.2, Applied Biosystems, Foster City, CA)를 통해 처리하였다. 정량성을 위한 표준물질(0.977-4000 nM)은 내부 표준물질을 포함하는 상태로 ice-cold acetonitrile에 녹여 pooled human liver microsomes에 미리 처리하여 분석하였다. 표준검량선은 linear least-squares regression에 따라 사용된 구간에서 직선형이 되도록 설정되었다($r^2 > 0.999$). 표준검량선의 정밀도 및 정확도는 20% 이내로 측정되었다.

자료 분석

저해제에 의한 CYP 효소에 의한 활성은 대조군의 백분율로 환산하였다. 모든 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. CYP 효소 저해의 IC₅₀를 구하기 위한 선형 분석은 *GraphPad Prism*, version 5.0.(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하였다.

실험결과

특정 CYP isozyme에 대한 inhibition 양상을 확인하고 실제 약물의 투여 시 발생할 수 있는 약물상호작용을 판단하기 위해서 cocktail assay를 실시하였다. 홍삼 total 분말, 주요 성분인 ginsenoside Rb1과 Rg1에 대하여 in vitro에서 CYP inhibition 시험을 수행하였다. 홍삼 total 분말의 농도는 0, 6.17, 18.5, 55, 166.6, 500, 1500 µg/ml로 설정하였고, 시중에 판매되고 있는 홍

삼 분말 100% 제품의 lot number가 다른 6종을 합하여 실험하였다. 양성대조군으로는 CYP3A4 inhibitor인 ketoconazole를 사용하여, 기존 문헌의 IC₅₀ value와 비교하여 유사한 값을 나타냄으로 본 실험계가 잘 구축되었음을 확인하였다(data are not shown).

홍삼 total 분말의 CYP isoform에 대한 IC₅₀ 값은 CYP1A2에서 1227±111 µg/ml, CYP2A6에서 2753±151 µg/ml, CYP2B6에서 556±54 µg/ml, CYP2C9에서 1571±104 µg/ml, CYP2C19에서 1699±228 µg/ml, CYP2D6에서 895±192 µg/ml, CYP2E1에서 1223±391 µg/ml, testosterone을 기질로 한 CYP3A4에서 657±143 µg/ml로 관찰되었다(Fig. 1). Midazolam을 기질로 사용한 CYP3A4에서는 억제효과를 보이지 않았다.

홍삼 지표성분인 ginsenoside Rb1와 ginsenoside Rg1의 CYP 효소 억제능을 평가하기 위해 0, 6.17, 18.5, 55, 166.6과 500 µg/ml 농도의 시험물질을 사용하였다. Ginsenoside Rb1에 대한 각 CYP isoform의 IC₅₀ 값은 CYP2B6에서 478±22 µg/ml, CYP2C9

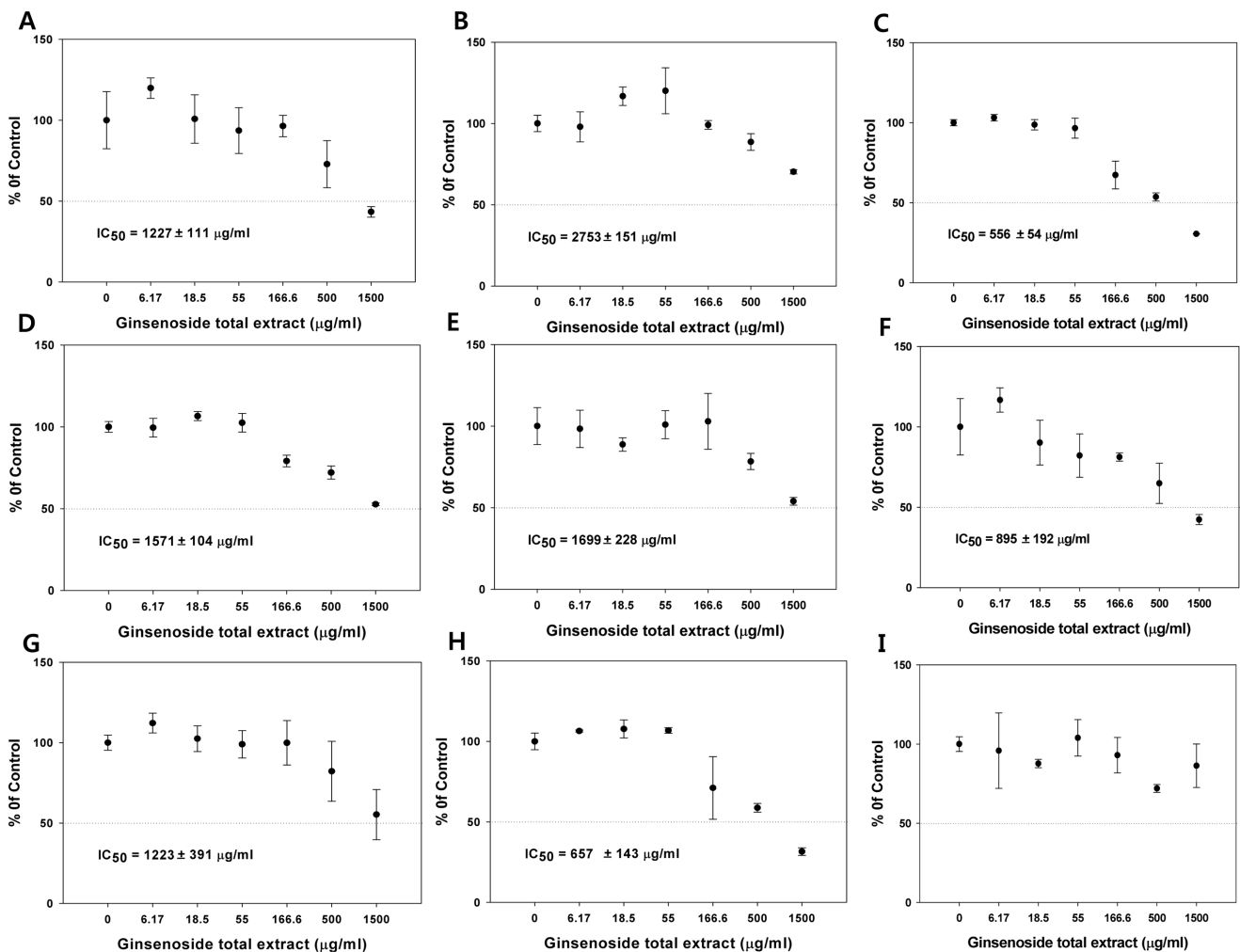


Fig. 1 – Effect of red ginseng total powder on activities of CYP1A2 (A), CYP2A6 (B), CYP2B6 (C), CYP2C9 (D), CYP2C19 (E), CYP2D6 (F), CYP2E1 (G), CYP3A4 (testosterone as a substrate) (H), and CYP3A4 (midazolam as a substrate) (I) in pooled human liver microsomes. Each data point represents the mean±SD of three independent samples.

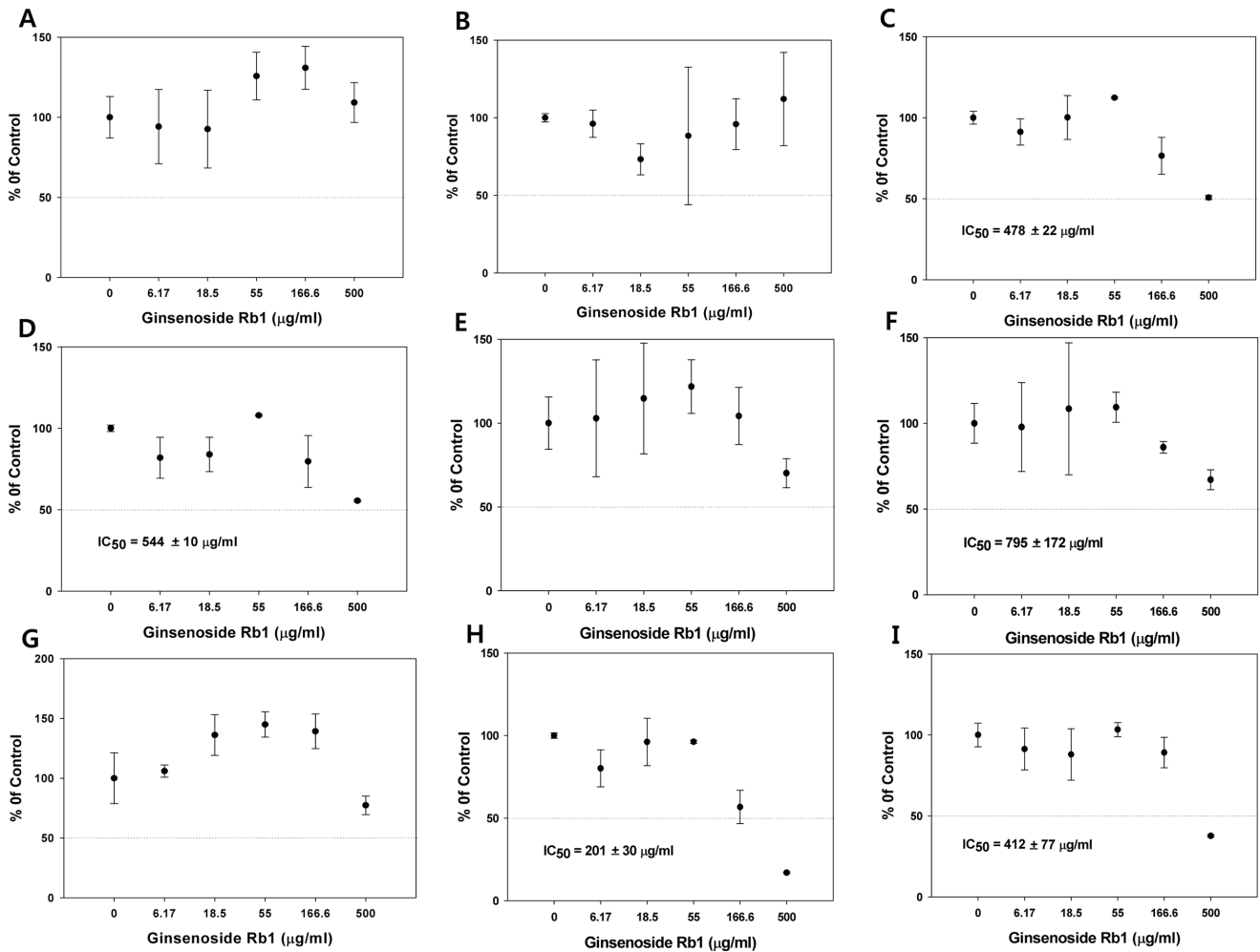


Fig. 2 – Effect of ginsenoside Rb1 on activities of CYP1A2 (A), CYP2A6 (B), CYP2B6 (C), CYP2C9 (D), CYP2C19 (E), CYP2D6 (F), CYP2E1 (G), CYP3A4 (testosterone as a substrate) (H), and CYP3A4 (midazolam as a substrate) (I) in pooled human liver microsomes. Each data point represents the mean \pm SD of three independent samples.

에서 544 ± 10 $\mu\text{g/ml}$, CYP2D6에서 795 ± 172 $\mu\text{g/ml}$, CYP3A4의 testosterone 기질에서 201 ± 30 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 midazolam 기질에서 412 ± 77 $\mu\text{g/ml}$ 로 관찰되었다(Fig. 2). 나머지 다른 CYP isoform에 대해서는 IC_{50} 값을 산출할 수 없었다.

Ginsenoside Rg1에 대한 각 CYP isoform의 IC_{50} 값은 CYP1A2에서 1058 ± 89 $\mu\text{g/ml}$, CYP2A6에서 782 ± 116 $\mu\text{g/ml}$, CYP2B6에서 712 ± 91 $\mu\text{g/ml}$, CYP2C9에서 705 ± 131 $\mu\text{g/ml}$, CYP2C19에서 250 ± 15 $\mu\text{g/ml}$, CYP2D6에서 647 ± 66 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 CYP3A4의 testosterone 기질에서 923 ± 179 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다(Fig. 3). CYP2E1과 midazolam을 기질로 이용한 CYP3A4는 IC_{50} 값을 산출할 수 없었다.

고 찰

인삼, 홍삼 그리고 그로부터 유래한 주요 성분인 ginsenoside

에 의한 CYP 효소의 억제 및 유도에 관하여서는 선행연구가 진행되었다. Ginsenoside 12종에 대한 *in vitro* 실험에서 CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 및 CYP3A4에 대해 저해를 평가하여 보고하였으나 일부 다른 CYP isoform에 대한 평가는 수행되지 않았으며 100 μM 이상의 농도에서 IC_{50} 값을 산출하지 않았다.⁹⁾ 또한 표준화된 인삼추출물과 ginsenoside를 이용한 연구에서 human CYP1A1, CYP1A2와 CYP1B1의 활성 억제가 보고되었다.¹⁰⁾ 또한 DNA-expressed human P450 enzymes과 형광 기질을 이용한 assays 결과로부터 ginsenoside CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4에서의 저해가 평가되었으나 최고 농도를 50 μM 로 설정하여 상대적으로 약한 저해가 관찰되었으며 결과적으로 IC_{50} 값을 산출할 수 없었다.⁶⁾ 본 연구에서는 FDA guidance를 바탕으로 8개 CYP isoform에 대한 9개의 기질을 활용하여 홍삼 total 분말과 ginsenoside Rb1 그리고 ginsenoside Rg1에 의한 CYP 효소 억제를 pooled human liver microsomes

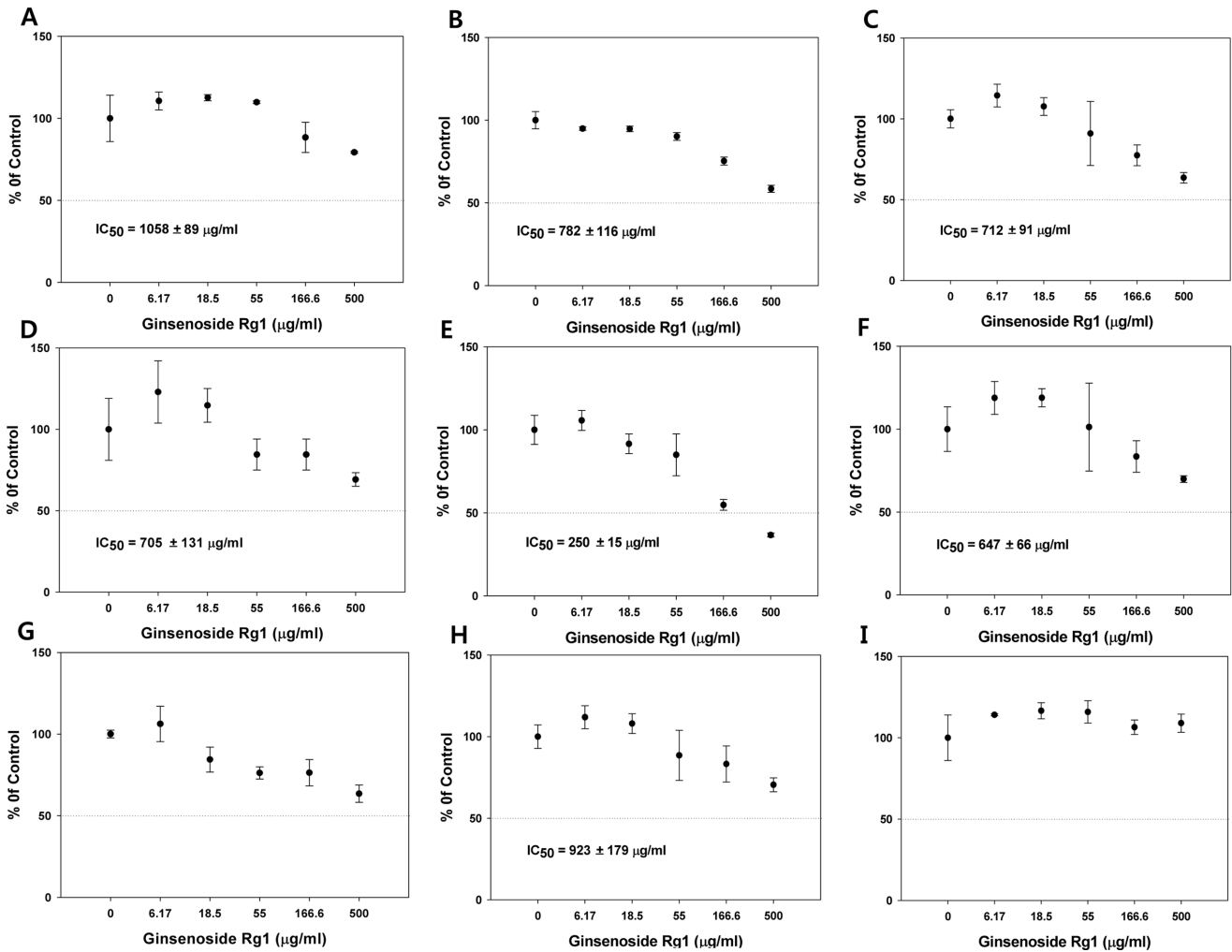


Fig. 3 – Effect of ginsenoside Rg1 on activities of CYP1A2 (A), CYP2A6 (B), CYP2B6 (C), CYP2C9 (D), CYP2C19 (E), CYP2D6 (F), CYP2E1 (G), CYP3A4 (testosterone as a substrate) (H), and CYP3A4 (midazolam as a substrate) (I) in pooled human liver microsomes. Each data point represents the mean±SD of three independent samples.

과 LC-MS/MS를 이용하여 확인하였다. 또한 개별적인 isoform에 대한 IC₅₀ value를 산출하고 기존의 실험결과와 비교 분석할 수 있었다. 본 연구는 홍삼 total 분말의 CYP 효소 억제 효과는 지표 성분인 ginsenoside Rg1과 Rb1에 기인할 가능성을 시사한다. 또한 기존에 보고되지 않은 CYP2B6와 CYP2E1에 대한 저해 여부를 확인하였다.

임상시험에서 ginsenoside Rb1을 10 g 복용 시 Rb1의 최고 혈중 농도는 20 ng/ml,¹¹⁾ 랫드에서 ginsenoside Rg1을 150 mg/kg 복용 시 Rg1의 최고 혈중 농도는 1134 ng/ml¹²⁾으로 보고되었다. 조직분포 실험에서 10 mg/kg 용량의 ginsenoside Rg1을 정맥주사하였을 때 간으로의 분포는 신속하였으며 최대 조직 농도는 약 1135 ng/g으로 측정되었다.¹²⁾ Ginsenoside Rg1의 약동학 평가에서 간과 혈장의 최대 농도는 유사하였다.¹²⁾ 현재 건강기능식품의 기준 및 고시에서 홍삼은 기능성분(지표성분)인 ginsenoside

Rg1, Rb1 및 Rg3 일일 섭취량은 최대 80 mg으로 고시하였다.¹³⁾ 따라서 일반적인 상용량의 홍삼이 CYP 효소를 억제하여 의약품과 상호작용을 발생할 가능성은 낮을 것으로 판단된다.

결론

대표적인 건강기능식품인 홍삼과 홍삼의 주요 성분인 ginsenoside Rg1과 Rb1에 의한 8개의 CYP isoform에 대한 억제효과를 pooled human liver microsomes과 LC-MS/MS를 이용하여 평가하였다. 실험결과 홍삼 total 분말, ginsenoside Rb1와 ginsenoside Rg1은 각각 개별 isoform에서 유의적인 저해가 관찰되었다. CYP isoform의 억제 양상을 분석한 결과 홍삼 total 분말의 CYP 효소 억제효과는 지표성분인 이들 ginsenoside에 기인하였다. CYP isoform에 대한 시험물질의 IC₅₀ 값과 약동학 평

가에서 얻은 혈장 및 조직에서의 ginsenoside 농도를 고려할 때, 일반적인 상용량의 홍삼이 CYP 효소를 억제하여 의약품과 상호작용을 발생할 가능성은 매우 낮을 것이다.

감사의 말씀

이 연구는 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음.

References

- 1) 통계청 : 장래인구추계: 2010-2060. 2011 available online: http://kostat.go.kr/smart/news/file_dn.jsp?aSeq=252623&ord=13 [Accessed 31 March 2015].
- 2) 한국보건사회연구원, 2011년 노인실태조사, 2011 (2011) available online: http://www.prism.go.kr/homepage/researchCommon/downloadResearchAttachFile.do?jsessionId=23737876FD5A92CDD57CE1F71558724Fnode02?work_key=001&file_type=CPR&seq_no=001&pdf_conv_yn=N&research_id=1351000-201100144 [Accessed 31 March 2015].
- 3) 소비자안전센터, 고령자 건강기능식품 실태조사 결과 (2010).
- 4) 식품의약품안전처, 2011년 건강기능식품 생산실적 분석결과 (2012).
- 5) Guengerich, F. P. : Role of cytochrome P450 enzymes in drug_drug interactions. *Adv. Pharmacol.* **43**, 7 (1997).
- 6) Henderson, G. L., Harkey, M. R., Gershwin, M. E., Hackman, R. M., Stern, J. S. and Stresser, D. M. : Effects of ginseng components on c-DNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sci.* **65**, 209 (1999).
- 7) U.S. Food and drug administration: Draft FDA guidance for industry, drug interaction studies — study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations (2012).
- 8) Lee, K. S. and Kim, S. K. : Direct and metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition assays for evaluating drug-drug interactions. *J. Appl. Toxicol.* **33**, 100 (2013).
- 9) Liu, Y., Zhang, J. W., Li, W., Ma, H., Sun, J., Deng, M. C. and Yang, L. : Ginsenoside metabolites, rather than naturally occurring ginsenosides, lead to inhibition of human cytochrome P450 enzymes. *Toxicol. Sci.* **91**, 356 (2006).
- 10) Chang, T. K., Chen, J. and Benetton, S. A. : In vitro effect of standardized ginseng extracts and individual ginsenosides on the catalytic activity of human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1. *Drug. Metab. Dispos.* **30**, 378 (2002).
- 11) Wang, C. Z., Kim, K. E., Du, G. J., Qi, L. W., Wen, X. D., Li, P., Bauer, B. A., Bissonnette, M. B., Musch, M. W., Chang, E. B. and Yuan C. S. : Ultra-performance liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry analysis of ginsenoside metabolites in human plasma. *Am. J. Chin. Med.* **39**, 1161 (2011).
- 12) Feng, L., Wang, L., Hu, C. and Jiang, X. : Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of ginsenoside Rg1 in rats. *Arch. Pharm. Res.* **33**, 1975 (2010).
- 13) 식품의약품안전처, 건강기능식품의 기준 및 규격 고시, 2014 available online: http://www.foodnara.go.kr/hfoodi/industry/main/sub.jsp?Mode=view&boardID=s_0503_bbs&num=407&tpage=1&keyfield=&key=&bCate= [Accessed 31 March 2015].