

慢性 CCl₄ 中毒 Rats 에서의 Sulfobromo- phthalein의 動態에 미치는 人蔘의 影響

孫英澤 · 李民和 · 金信根

서울대학교 藥學大學

Effects of *Panax Ginseng* on the Pharmacokinetics of Sulfobromophthalein in Chronically CCl₄-Intoxicated Rats

Young Taek Son, Min Hwa Lee, and Shin Keun Kim

(Received September, 5, 1981)

In order to elucidate the effects of *Panax Ginseng* on the pharmacokinetics of sulfobromophthalein (BSP) in a pathological condition, patho-physiological changes, the kinetics of the disappearance of BSP from the blood and appearance in the bile were studied in rats.

Group I, the control group, was produced by repeated injection of olive oil 0.1ml/100g under the skin of the back twice a week for 9 weeks.

Group II, the *Ginseng* pretreated group, was produced by administration of *Ginseng* total saponin 200mg/kg/day P.O. for 10 days and subsequent injection of CCl₄ 0.1ml/100g under the skin of the back twice a week for 9 weeks.

Group III, the chronically intoxicated group, was produced by repeated injection of CCl₄ 0.1ml/100g under the skin of the back twice a week for 9 weeks.

The results obtained were summarized as follows;

1. The activities of GOT·GPT of rat blood serum, body weight, and liver weight were affected by the pretreatment with *Ginseng* saponin.
2. The kinetics of the disappearance of BSP from the blood were affected by the pretreatment with *Ginseng* saponin.
3. The appearance of BSP in the bile was significantly affected by the pretreatment with *Ginseng* saponin.

肝臟은 藥物代謝의 major site이며 病的 狀態에서는 hepatic dysfunction으로 因하여 metabolism, hepatic transport等 pharmacokinetic parameters는 크게 影響을 받는다¹⁾.

따라서, 病的 狀態에서의 藥物動態學의 研究는 pharmacokinetic parameters에 影響을 미치는 因子를 究明하는 것으로 藥物療法에서의 individualization of drug dosage에 極히 重要하다.

Takada等²⁾은 organic anion의 hepato-biliary transport 即, liver의 first-pass effect는 ① hepatic uptake from the blood, ② hepatic intracellular transport, ③ excretion into the bile canaliculi의 三段階로 나누어지며 hepatic cytoplasmic protein fraction, X, Y, Z가 關與한다고 報告하였다³⁾.

Rats의 慢性 CCl₄ 毒肝에서는 sulfobromophthalein(以下 BSP라 함)에 對한 Y-fraction의 binding ability가 50% 以上 減少하며 liver uptake에 影響을 미치며^{4,5)} CCl₄ 中毒狀態에서의 BSP의 hepato-biliary transport는 four compartment model로 解釋하였다.^{6,7)}

人蔘이 肝障害에 미치는 影響에 對한 많은 研究報告가 있으나 LD₅₀, GOT, GPT^{8,9,10)}, RNA, DNA¹¹⁾에 對한 生化學的 研究이거나 病理組織學的 研究¹²⁾ 等이며 藥物動態學的 研究는 거의 報告된 바 없다.

따라서 著者等은 慢性 CCl₄ 中毒狀態에서 BSP의 動態에 미치는 人蔘의 影響에 對한 研究에서 知見을 얻었기에 報告코자 한다.

實 驗 方 法

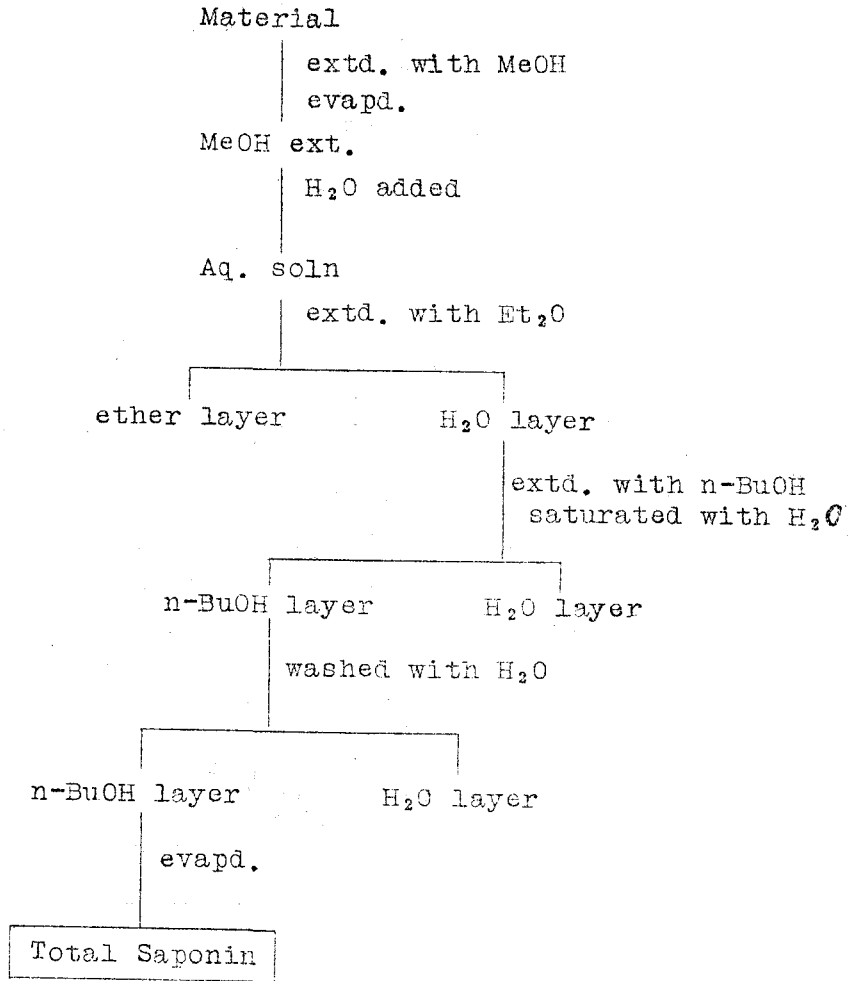
投與用 人蔘——이 實驗에 使用한 人蔘 saponin은 江華人蔘 六年根을 Scheme. 1과 같이 T. Namba 等¹³⁾의 方法으로 total saponin을 抽出하고 이 total saponin을 chloroform으로 4회 세척하고 그 잔사를 methanol에 녹여 活性炭處理를 한 後, 감압 농축하여 投與用 人蔘으로 하였다.

試 藥——ethyl ether(和光純藥), sulfobromophthalein disodium salt(Merck), carbon tetrachloride(和光純藥), olive oil(Shinyo pure chemicals Co.LTD), sodium hydroxide(關東化學), GOT·GPT 測定用 試藥 Kit(和光純藥) [GOT·GPT 基質液, dinitrophenylhydrazine(DNPH) 發色液, 4N-NaOH]

實驗動物——120~140g의 健康한 雄性 SD系 rats를 使用했다.

實驗動物 前處理——實驗動物은 control群(以下 第一群이라 함), 人蔘前處理群(以下 第二群이라 함), 慢性中毒群(以下 第三群이라 함)의 三群으로 나누었으며, 第一群은 olive oil을 0.1ml/100g로 週當 2回 9週間 skin of the back에 注射했고, 第二群은 人蔘 saponin을 200 mg/kg/day로 10日間 경구투여한 後 CCl₄[CCl₄: olive oil=3:4, v/v] 0.1ml/100g을 週當 2回 9週間 skin of the back에 注射했고, 第三群은 CCl₄[CCl₄: olive oil=3:4, v/v] 0.1ml/100g 를 週當 2回 9週間 skin of the back에 注射하였다. 三群 共히 最後注射 48時間 經過後 實施했다.

機 器——evaporator(Gallenkamp), spectrophotometer(Coleman Junior II A), centrifuge(國產, Type H-360A)



Scheme 1. Separation of Ginseng saponin

GOT·GPT 測定—Reitman·Frankel法の 變法인 日本消化器學會 肝機能研究班法¹⁴⁾으로 測定하였으며 그 檢量線은 Fig. 1과 같으며, 그 操作法은 다음과 같다.

GOT, GPT 基質液 1ml를 各各 取하여 water bath에서 37°C로 2~3分間 加温하고 plasma 0.2ml를 各各 加한 後 water bath에서 37°C로 GPT는 30分間, GOT는 1時間동안 反應시킨 後 發色試藥 1ml를 各各 加하고 轉倒混和後 증류수를 對照로 하여 波長 505nm에서 spectrophotometer로 吸光度를 測定하여 檢量線의 Karmen Unit를 읽는다.

檢量線의 作成—plasma 濃度測定用 檢量線은 BSP液(0.5g/10ml)을 33.3倍, 50倍, 100倍, 200倍, 250倍, 400倍, 500倍로 희석하여 이 희석액 0.1ml를 取하여 0.05N NaOH 3ml를 加하고 波長 578nm에를 spectrophotometer로 吸光度를 測定했으며 그 檢量線은 Fig. 2와 같다.

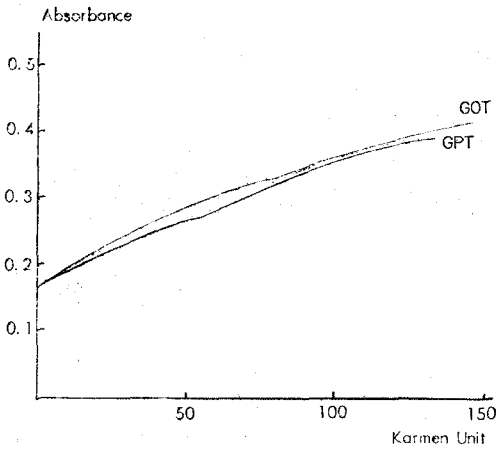


Figure 1—Calibration curve of GOT, GPT activities.

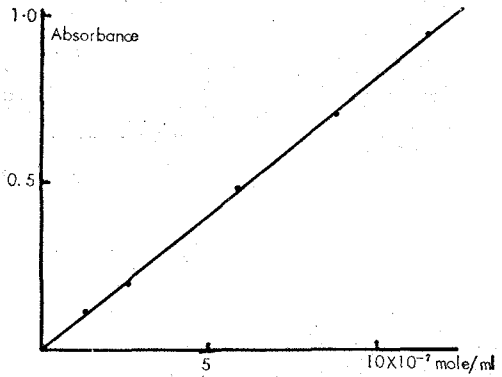


Figure 2—Calibration curve of BSP in plasma.

Bile 濃度測定用 檢量線은 BSP液(0.5/10ml)를 33.3倍, 50倍, 100倍, 200倍, 250倍, 400倍로 희석하여 이 희석액 0.1ml를 取하여 0.05N NaOH 4ml를 加하고 波長 578nm에서 spectrophotometer로 吸光度를 測定했으며 그 檢量線은 Fig. 3과 같다.

血液 및 膽汁採取—實驗動物은 ethyl ether로 마취시킨 後 대퇴부동맥과 bile duct를 polyethylene tube로 cannulation하고 BSP를 7.16 μmole 정맥주사한다.

Table I과 같이 一定時間 간격으로 血液과 膽汁을 取한다.

Table I—Sampling Time

Group A		Group B	
Plasma	Bile	Plasma	Bile
1 minute	10 minute	1 minute	10 minute
2	20	3	20
3	30	5	30
4	40	7	40
5	50	10	50
7	60	15	60
9	80	20	80
12	100	25	100
15	120	30	120
	150		150
	180		180
	210		210
	240		240

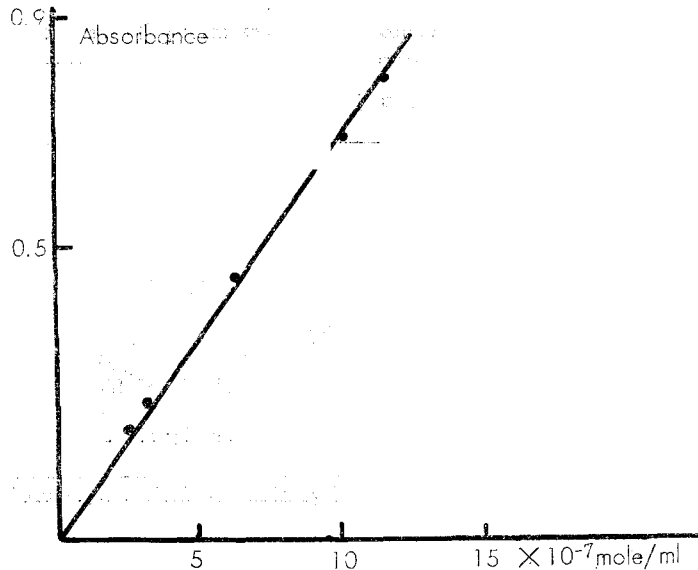


Figure 3—Calibration curve of BSP in bile.

血液採取後 heparin을 cannulae에 注入하여 凝固를 防止한다. ethyl ether 마취는 수술과 sample 採取동안 계속하며 體溫을 維持토록 한다.

分析—BSP in plasma: 血液 0.3ml를 取하여 4000 r.p.m.에서 30分間 원심분리시키고 plasma 0.1ml를 取해 0.05N NaOH 3ml를 加하여 희석시킨 後 波長 578nm에서 吸光度를 測定한다.

BSP in bile: 膽汁 0.1ml를 取하여 0.05N NaOH 4ml로 희석하고 10000 r.p.m.에서 10分間 원심분리하여 波長 578nm에서 吸光度를 測定한다.

結果 및 考察

實驗動物에 肝臟障害를 유발시키는 藥物로는 CCl_4 , chloroform, ethionine, thioacetamide, dimethylrosamine 등이 使用되었으며 tetracycline도 使用되고 있다. 이 中 CCl_4 는 經口, 皮下, 腹腔內注射 및 吸入等의 方法으로 實驗動物에 投與되며, 이들 藥物로 야기되는 肝障害에 對해 많은 研究報告^{15,16)}가 있다.

藥物動態學的인 研究는 大部分이 CCl_4 1回投與로 因한 急性中毒狀態에서의 報告¹⁷⁻²¹⁾이다.

三群의 病理·生理的 變化는 Table II와 같았다. 第三群은 第一群에 比하여 體重이 366 ± 8.8 에서 284.8 ± 10.5 로 減少, 肝重量이 12.4 ± 1.04 에서 13.8 ± 0.65 로 增加, 肝重量/體重 ratio가 0.034 ± 0.0033 에서 0.048 ± 0.0016 으로 增加하며 GOT 活性値는 99 ± 10.9 에서 647.5 ± 180.78 로, GPT 活性値는 67 ± 6.5 에서 430.0 ± 149.46 으로 各各 增加하여 有意性($p < 0.05$) 있는 差異를 보였다.

Table II —Patho-Physiological Changes among Three Groups^a

	Group I	Group II	Group III
Body Weight(g)	366±8.8	295.8±12.50	284.8±10.5 ^b
Liver Weight(g)	12.4±1.04	13.6±0.63	13.8±0.65
Liver Weight/Body Weight	0.034±0.0033	0.046±0.0024	0.048±0.0016 ^b
Plasma Transaminase Activity(Karmen's unit)			
GOT	99±10.9	353.3±82.37	647.5±180.78 ^b
GPT	67±6.5	298.3±86.36	430.0±149.46 ^b

^a, Results are given as the mean±S.E.; ^b, Significantly different(p<0.05) from Group I.

CCl₄ 中毒時 肝뿐 아니라 胃²²⁾, 血液凝固因子²³⁾ 唾液腺²⁴⁾ 生殖腺²⁵⁾ 十二指腸²⁶⁾ 小腸²⁷⁾ 等 거의 全組織臟器²⁸⁾에 影響을 준다는 報告가 있으므로 體重減少는 이에 基因한다고 思料되며 肝重量增加는 中性脂肪, 特히 triglyceride 沈着等の 理由때문이라고 思料된다. 또한 GOT·GPT 活性値의 增加로 肝機能에 異常이 招來되었음을 明確히 알 수 있다. 第二群은 人蔘前處理로 因하여 第三群에 比해 體重減少抑制, 肝重量增加抑制, GOT·GPT 活性値增加抑制 效果를 나타냈다.

Takada²⁹⁾等에 依하면 BPB(M.W. = 670.02)와 BSP(M.W. = 838.05)는 sulfonic acid group 을 가지며 이들의 hepato-biliary transport는 ① uptake by the liver parenchymal cells, ② intracellular transport, ③ secretion from the liver parenchymal cells into the bile canaliculi의 三段階로 생각할 수 있으며, 이 中 secretion 段階가 rate-limiting step이며 BSP와 glutathione의 conjugation이 가장 重要하다고 하였다. 또한 Levi等³⁰⁾에 依하면 liver cytoplasmic organic anion binding protein인 Y와 Z가 있어 이들이 organic anion의 hepatobiliary transport에 重要な 役割을 한다고 하였다. 即 Z는 hepatic storage, Y는 excretion에 關係하며 Y는 glutathione-s-transferase라고 하였다.

BSP는 肝機能檢査에 使用하는 藥物로 BSP의 plasma clearance의 減少가 肝障害의 尺度가 된다. BSP 7.16 μmole을 정맥주사한 後의 BSP의 血中濃度를 經時的으로 semilogarithmic plotting한 것은 Fig. 4와 같다.

이 曲線의 compartment model analysis는 $C_p = Ae^{-at} + Be^{-bt}$ 로 表現되며 이는 Richards의 研究報告²⁹⁾와 같다. Table II의 GOT·GPT 活性値가 增加하였던 것과 Fig. 1의 BSP의 血中 clearance의 減少는 肝機能의 損傷때문이며 完全히 一致되는 結果였다. 第一群과 第三群은 有意性있는 현저한 差異를 보였으며 第二群과 第三群도 差異를 보였다. plasma에서의 pharmacokinetic parameters는 Table III과 같다.

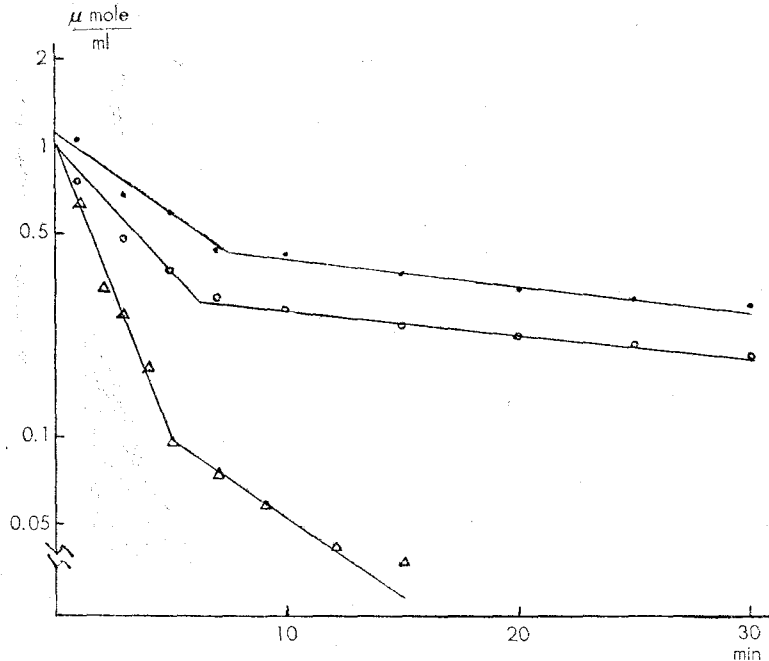


Figure 4—Plasma disappearance curves of a 7.16- μ mole dose of BSP after intravenous administration. Each point represents the mean \pm S.E. of seven rats. Curves were calculated by iterative least squares method.
Key: Δ , Group I; \circ , Group II; \bullet , Group III.

Table III—Plasma Pharmacokinetic Parameters Calculated with a Two-Compartment Model^a

Groups	Pharmacokinetic Parameters			
	A	α	B	β
I	0.9383	0.6398	0.1608	0.1138
II	0.6557	0.4141	0.3141	0.0161
III	0.7088	0.3403	0.4862	0.0197

^a, Calculated by an iterative least squares method. $C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$

第三群에서 distribution phase의 α 값은 0.3403으로 第一群의 0.6398 보다 현저히 減少하였다. 第三群의 血中濃度가 높은 것은 liver uptake에 저해를 받았기 때문이라고 思料되며 따라서 Z protein이 저해를 받았다고 思料된다. 第二群은 第三群에 비해 血中濃度가 낮았고 distribution phase의 α 값도 0.4141로 第三群의 0.3403 보다는 덜 減少하였다.

또한, 三群 共히 두 개의 phase이나 distribution phase에서 elimination phase로 轉換되는 時間, 即 曲線의 變曲點이 第一群은 5分, 第二群은 6.5分, 第三群은 7.5分으로 差異가 있었다. 即, 肝機能의 損傷으로 第三群은 第一群보다 더 늦어졌고 第二群은 第三群에 비해 덜 늦어졌다. 三群의 BSP의 담즙배설누적량은 Fig. 5와 같다. 第一群은 投與量의 92%, 第二群은 投與量의 第三群은 71%, 投與量의 49%가 배설되었다. 이 結果는 肝障害로 因하여 總담즙 배설량이 減少한다는 T. Iga 等⁴⁾의 報告와 一致한다. 이는 Y protein이 저해를 받았

기 때문이라고 思料된다. 그러나 bile flow rate에는 別로 差異가 없는 것 같았으며 이 또한 T. Iga 等⁴⁾의 報告와 一致한다. T. Iga 等⁴⁾은 bile로 배설된 BSP는 大部分이 BSP-GSP conjugate form이라 하였다

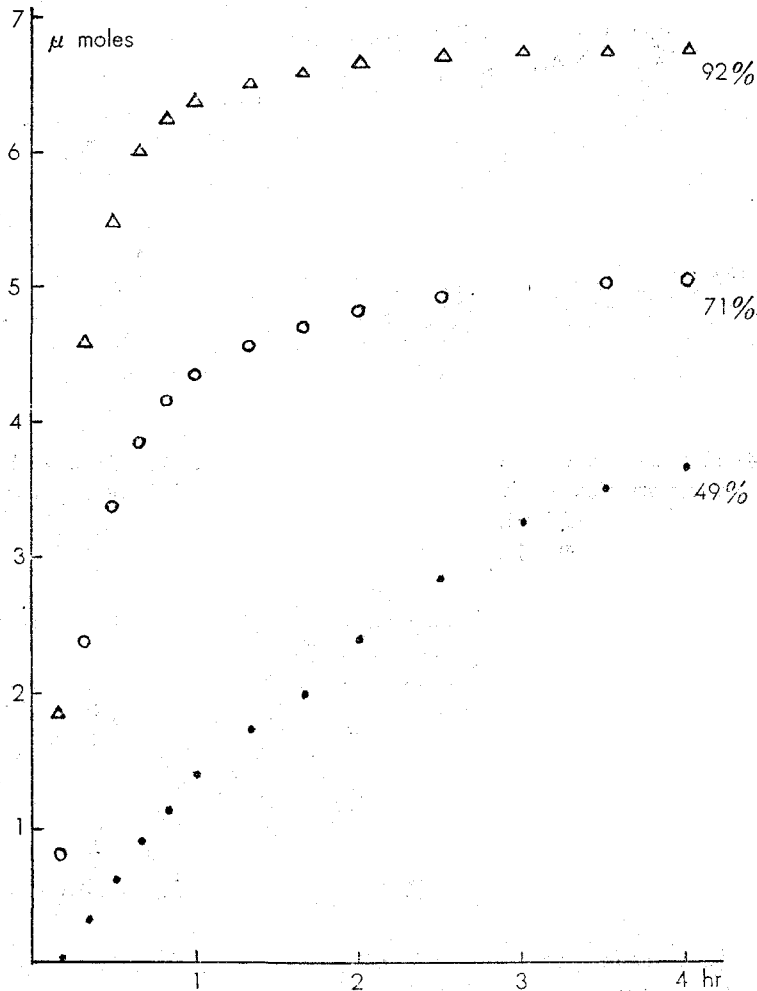


Figure 5—Cumulative biliary excretion curves of a 7.16 μ mole dose of BSP after intravenous administration. Each point represents the mean \pm S.E. of four rats. Curves were calculated by an iterative least squares method. Key: Δ , Group I; \circ , Group II; \bullet , Group III.

第二群은 第三群에 비해 總담즙배설량의 減少가 현저히 抑制되었다. 이 담즙배설누적량을 sigma-minus plotting한 것이 Fig. 6이며 이 bile pharmacokinetic parameters는 Table IV와 같았다.

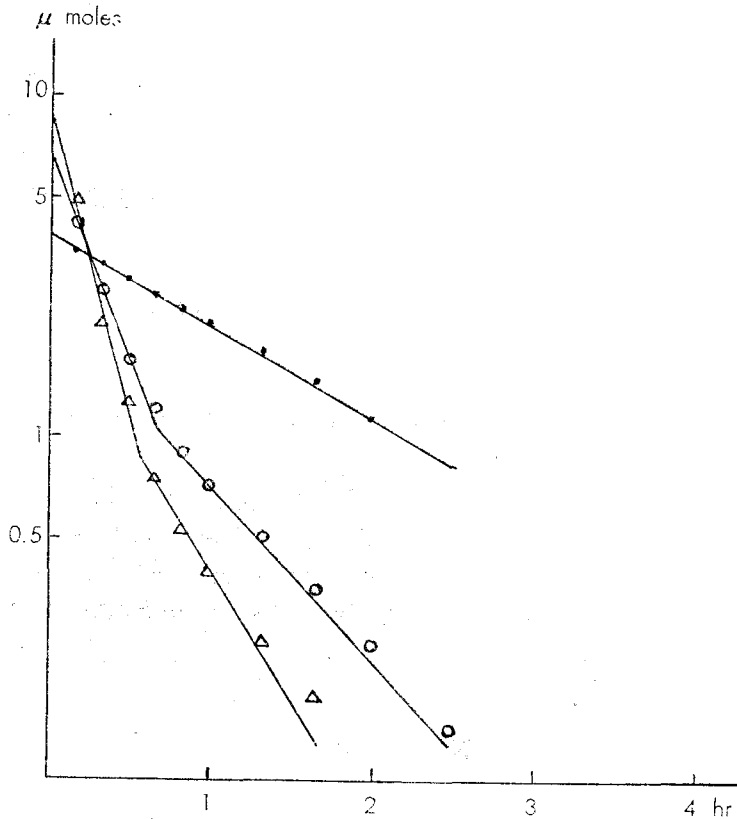


Figure 6—Sigma-minus plots of BSP excreted in the bile after intravenous administration of a 7.16 μmole dose of BSP. Each point represents the mean value of four rats.
Key: Δ , Group I; \circ , Group II; \bullet , Group III.

Table IV—Bile Pharmacokinetic Parameters Calculated with One-, and Two-Compartment Models^a

Groups	Pharmacokinetic Parameters					
	C ₀	A	α	B	β	k
I	—	9.8993	0.0996	1.3484	0.0204	—
II	—	6.7225	0.0959	2.2706	0.0185	—
III	3.9007	—	—	—	—	0.0092

^a, Calculated by an iterative least squares method.

第一群은 fast rate constant 0.0996min^{-1} 와 slow rate constant 0.0204min^{-1} , 第二群은 fast rate constant 0.0959min^{-1} 와 slow rate constant 0.0185min^{-1} 으로 두 群 모두 high dose type²⁹⁾의 two-compartment model로 analysis되고 第三群은 low dose type²⁹⁾의 one-compartment model로 analysis된다. 第三群은 compartment model 自體가 two-compartment model에서 one-compartment model로 變하며 현저한 差異를 보인다.

따라서, 담즙배설누적량과 이의 sigma-minus plot에서 第二群은 第三群에 비해 有意性있는 현저한 差異를 보였다.

또한 BSP가 bile로 배설되기 시작하는 時間도 第一群은 3~4分, 第二群은 6分, 第三群은 8~10分으로 역시 有意性있는 差異를 보였으며 이 또한 Y protein이 影響을 받았기 때문이라고 思料된다.

以上の 結果로 미루어 보건대, 人蔘은 CCl₄로 인한 慢性中毒狀態에 影響을 미치며 더욱 더 많은 研究를 해야 할 것이다.

結 論

1. 人蔘前處理群은 CCl₄ 慢性中毒群에 비해 體重減少抑制, 肝重量增加抑制, GOT·GPT 活性值增加抑制 效果를 보였다.

2. 人蔘前處理群은 CCl₄ 慢性中毒群에 비해 BSP의 血中濃度가 낮았다.

3. 人蔘前處理群은 CCl₄ 慢性中毒群에 비해 BSP의 總담즙배설량이 현저히 增加했으며 sigma-minus plotting하면 CCl₄ 慢性中毒群은 one-compartment model, control群은 two-compartment model로 해석되며 濃度式은 각각 $C_p = 3.9007e^{-0.092t}$ 및 $C_p = 6.7225e^{-0.0959t} + 2.2706e^{-0.0185t}$ 로 表現된다.

文 獻

- 1) L. Z. Benet (ed), "The effect of disease states on drug pharmacokinetics", Am. Pharm. Sciences, Washington, DC 53~95 (1976).
- 2) K. Takada, Y. Mizobuchi, and S. Muranishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**(4), 922 (1974).
- 3) A. J. Levi, Z. Gatmaitan, and I. M. Arias, *J. Clin. Invest.*, **48**, 2156 (1969).
- 4) T. Iga, Y. Sugiyama, M. Yokota, Y. Tomono, S. Awazu, and M. Hanano, *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1867 (1977).
- 5) A. Suyama, Y. Sugiyama, T. Iga, S. Awazu, and M. Hanano, *J. Pharm. Dyn.*, **2**, 105 (1979).
- 6) G. Alfieri-Rolla and G. Segre, *Europ. J. Pharmacol.*, **3**, 330 (1968).
- 7) G. Giorgi and G. Segre, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **1**, 217 (1973).
- 8) 李熙璿, 申萬鍊, 友石醫大雜誌, **6** (1), 143 (1969).
- 9) 金永萬, 申萬鍊, *ibid.*, **6** (1), 133 (1969).
- 10) 尹恆斌, 申萬鍊, *ibid.*, **5** (2), 209 (1968).
- 11) 崔永祚, 서울醫大雜誌, **13** (1), 1 (1972).
- 12) 金台原, 友石醫大雜誌, **6** (1), 1 (1969).
- 13) T. Namba, M. Yoshizaki, T. Tomomori, K. Kobashi, K. Mitsui, and J. Hase, *Yakugaku Zasshi*, **94** (2), 252 (1974).
- 14) 金井宗, 金井正光, "臨床檢査法提要" 金原出版 (1975).
- 15) G. Glaser and J. Mager, *Biochimica et Biophysica Acta* **372**, 237 (1974).
- 16) 小林立德, 日藥理誌 **62**, 333 (1966).

- 17) Curtis D. Klaassen and Gabriel L. Plaa, *Toxic. Appl. Pharmac.*, **12**, 132 (1968)
- 18) Brian G. Priestly and Gabriel L. Plaa, *Toxic Appl. Pharmac.*, **17**, 786 (1970)
- 19) R.W. Brauer and R.L. Pessotti, *Am. J. Physiol.*, **162**, 565 (1950)
- 20) R.W. Brauer, R.L. Pessotti and J.S. Krebs, *J. Clin. Invest.*, **34**, 35 (1955)
- 21) M.B. Maggio and J.M. Fujimoto, *Toxic Appl. Pharmac.*, **9**, 309 (1966)
- 22) Popper. H., "Liver structure and function", McGraw Hill N.Y. (1957)
- 23) 金成根, 카톨릭 醫大論文集, **11**, 16 (1966)
- 24) Rothbell, *Am. J. Med.*, **22**, 367 (1957)
- 25) 鄭鈞容, 第17次 病理學會學術大會抄錄集 (1964)
- 26) Bertalanffy, *Gastroenter.*, **43**, 472 (1962)
- 27) 申敬鎭, 友石醫大雜誌, **5** (2), (1968)
- 28) 金茂培, 카톨릭 醫大論文集, **11**, 16 (1966)
- 29) T.G. Richards, V.R. Tindall, and A. Young, *Clin. Sci.*, **18**, 499 (1959)