약학회지 제28권 제 1호 35~48(1984)
Yakhak Hoeji Vol. 28 No. 1

Aucubin의 藥理 및 毒性

張日武* · 尹惠淑 · 양규환**
서울大學校 生藥硏究所 · 韓國科學技術院 生物工學科**

(Received November 8, 1983)

Il-Moo Chang*, Hey-Sook Yun(Choi) and Kyu Hwan Yang**
Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110, and Dept. of Biological Science and Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Seoul 131, Korea*

Pharmacology and Toxicology of Aucubin

Abstract—Various medical surveys reveal that exceptionally high incidence rates of hepatic diseases like hepatitis and cirrhosis have occurred to Korean peoples, and even the viral hepatitis has been considered to be an endemic disease in this country. Therefore, we have made efforts to search for liver-protective/therapeutic agents from medicinal plants during the past 5 years.

As a first step, we made literature survey in which 59 plants were described to be useful for the treatments of various hepatic diseases, even though their exact pathological nature had not been characterized. Among 59 plants, 44 plants were collected in Korea and their alcoholic extracts were prepared. Then the extracts were subject to screening of their potential liver-protective activities against liver damage induced by CCl_4 in mice. The primary screening data indicated that six plants, *Alisma orientale* (Alismataceae), *Atractylodes japonica* (Compositae), *Cyperus rotudus* (Cyperaceae), *Gentiana scrabra* (Gentianaceae), *Plantago asiatica* (Plantaginaceae), and *Polygonatum japonicum* (Liliaceae) showed significant liver-protective activities to CCl_4 intoxication in mice.

Then we selected one plant for further studies, which was *Plantago asiatica* semen because it grows abundantly. Subsequent work was the isolation of active principle from *Plantago asiatica* semen. An iridoid glucoside, namely aucubin was isolated, as a candidate for the active principle. Then this compound was evaluated its liver-protective activities against liver damages induced by three different toxic substances; CCl_4, α-amanitin and D-galactosamine. We found that aucubin exhibited potent protection from liver damages produced by CCl_4 and α-amanitin, but not by D-galactosamine intoxication.

In the meantime, we met a difficulty, that was, the aucubin content in *Plantago asiatica* semen was very low. So we began to seek another plant as a source of aucubin. *Aucuba japonica* (Cornaceae) was selected for this purpose because it was reported that this plant had relatively high amount of aucubin. Soon its alcoholic extract was prepared and potential liver-protective activities were again investigated by using rat intoxicated with CCl_4. The extract showed marked liver-protective activities: protections from decreasing biliary excretion caused by CCl_4 intoxication, from increasing serum transaminases activities. In addition, histological findings of liver biopsy samples also supported the protective activities of the exract.

Accordingly we isolated more aucubin from fresh leaves of *Aucuba japonica* to carry out further studies on liver-protective activities of this iridoid glucoside, (yield was 1g from 2kg of fresh leaves). The results

This work was supported by grant RR 318 from the International Foundation for Science, Stockholm, Sweden.

* To whom reprint requests should be addressed.

obtained from successive experiments were the followings: aucubin showed marked protection from both CCl_4 and α-amanitin poisonings; aucubin itself exhibited some degree of inhibitory effects on liver RNA and protein biosyntheses, however it was not potent; such inhibitory effect may account for a possible mechanism of liver-protective activities; aucubin counteracted severe depression of liver RNA synthesis caused by α-amanitin. Pretreatment of aucubin (60mg/kg) 30 min before α-amanitin administration prevented severe hypoglycemia produced by α-amanitin intoxication. Aucubin may be used for a good antidote for fatal mushroom poisoning caused by *Amanita phalloides*; it should be also noted that more than 50% complete recovery was achieved, even when the administration of aucubin (100mg/kg, *i.p.*) was withheld for 12 hrs after α-amanitin challenge.

All the results indicated that aucubin appeared to be a potential in liver-protective agent and at least an antidote for *Amanita* mushroom poisoning. Thus we studied acute toxicity of aucubin itself. Results obtained from toxicity study indicated that the minimum lethal dose of aucubin appeared to be more than g unit, because a does of 900mg/kg, *i.p.* did not cause any death in mice. Also multiple doses (day 1, 3, 5 and 7; 20-80mg/kg, *i.p.*) did not cause any alteration in blood serum enzymes activities, and no significant histological changes were observed by these doses. Consequently aucubin seemed to be low toxic substance.

우리나라 사람들에게는 유달리 높은 간염 발병률이 나타나고 있고 더우기 바이러스성 간염의 경우 풍토병 내지 전염병이라고 할 정도의 양상을 띠고 있다.[1~4] 현재까지는 이러한 간질환에 적절한 치료약이 없는 점을 감안하여 저자들은 생약으로 부터 간질환에 유효한 성분을 분리하여 치료약으로 사용할 수 있도록 하기위하여 집중적인 연구를 지난 5년간 계속하여 왔다.

연구의 내용은 동서양의 고전 및 연구보문을 조사하여 간보호 및 치료약으로 사용한 생약에 관한 문헌적 조사, 이들 생약중 채집 및 구입이 가능한 식물을 구하여 생약엑기스 제조, 이들 엑기스를 간염 동물 모델의 하나인 CCl_4로 유발시킨 간독성에 대한 보호작용의 검색, 보호작용을 나타내는 생약중에서 자원적 측면을 고려하여 국내에서 많이 생산되는 차전자(*Plantago asiatica* seeds)를 선택하였고, 차전자로 부터 간보호 작용을 나타내는 유효성분으로 iridoid 계열물질인 aucubin을 분리하였다. 그러나 aucubin이 차전자에 소량 밖에 없으므로 aucubin이 다량 함유된 식나무(*Aucuba japonica*)로 aucubin 추출자료생약을 바꾼후 aucubin의 간보호 작용을 간염 동물모델인, CCl_4, D-galactosamine 및 α-amanitin 등으로 유발시킨 간독성에 대한 보호작용을 연구하였고, 결론적으로 aucubin의 간보호 작용은 CCl_4 및 α-amanitin 간독성에 높은 보호작용을 보여 주었기 때문에, 이러한 간보호작용의 기전을 규명하는 연구를 진행하였고, 다음은 aucubin 자체의 급성 독성 및 기타 독성 유발여부를 밝히는 연구 등으로 요약 될수 있다.

I. 肝 保護 生藥에 대한 文獻的 調査

문헌상 나타난 간질환은 현대 병리학적으로 규정된 것보다는 간염, 간경변, 강장, 보간 및 단지 간질환에 사용하였다는 것등을 망라하였고, 59종의 생약이 이러한 목적으로 사용되었음을 알 수 있었다.[5]

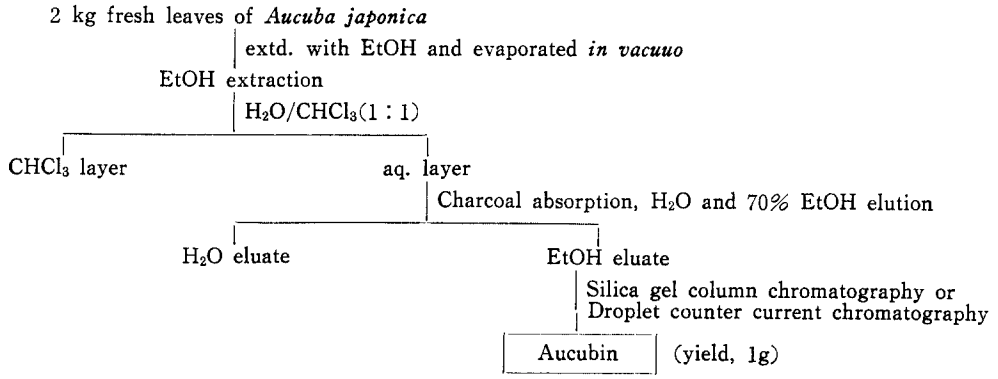
II. 肝 保護 作用 檢索

일차 검색 목적으로 CCl_4가 유발하는 간독성에 대한 생약 엑기스의 간보호작용을 검토하였다. 문헌조사를 통해 밝혀진 59종 중 44종을 국내에서 채집 또는 구입한후 이들의 알콜엑기스를 투여하였다. 검색한 44종 중 높은 간보호 작용을 나타낸것은, 차전자(*Plantago asiatica*), 백출(*Atractylodes japonica* (*alba*)), 용담(*Gentiana scabra*), 택사(*Alisma orientale*) 황정(*Polygonatum japo-*

nium) 및 향부자(*Cyperus rotundus*)등이었다.[6~9] 이들 6종의 생약에서 차전자를 선택하여 유효성분을 분리하는 일을 시도하였다. 차전자를 선택한 이유는 이것은 우리나라에서 잘 자라는 풍부한 자원식물이고, 또한 이것은 간약 및 현대 약으로 사용된(nucilaging agent) 점으로 보아 비교적 낮은 독성을 갖는 생약으로 생각할 수 있기 때문이다.

III. 차전자의 肝 保護 作用

차전자의 간 보호작용을 실험하기 위하여 CCl_4 간독성에 대한 보호작용을 측정하였다. 차전자를 메타놀로 추출한 엑기스와 이 엑기스를 더 분획하여 얻은 석유에테르 분획, 물 분획, 클로르프롬 분획 등을 만든후 각 분획 중 어느 분획이 가장 높은 보호작용을 나타내는지를 검토한 결과, 물 분획이 microsomal enzyme활성을 높게 나타냈고, serum GOT(EC. 2.6.1.1) 및 serum GPT (EC. 2.6.1.2)의 활성도 역시 낮게 나타났고, 간 조직 검사 결과도 가장 양호한 보호작용을 나타냄을 알수 있었다. 그러므로 차전자 성분중 간 보호작용을 나타내는 유효성분은 물분획에 있을 것으로 생각되어 이 물 분획으로 부터 aucubin을 분리하게 되었다. 분리 방법은 Trim 및 Hill의 방법[10]을 약간 변형시킨 방법이었으나 분리 결과 낮은 수율을 나타내었으므로 차전자 대신 식나무(*Aucuba japonica*(Cornaceae))의 잎으로 부터 aucubin을 분리하게 되었으며 방법을 약술하면 다음과 같다.[11,12]



Scheme I-Isolation of aucubin from *Aucuba japonica*. See reference 12.

IV. Aucubin의 肝 保護 作用

1. 식나무잎 엑기스의 四鹽化炭素 肝毒性에 대한 保護 作用

만약 aucubin(Fig. 1)이 진정 간 보호작용을 나타내는 유효성분 일 경우 식나무 잎엑기스 역시 간 보호작용을 나타낼 가능성이 크다. 그러므로 식나무 잎 엑기스가 CCl_4간 독성에 대한 보호작용여부를 다음과같이 검토하였다. 즉 식나무 잎 엑기스(600mg/kg/day. ***p.o.***)를 랫드에 2일간 투여한후 CCl_4(0.5mg/kg, ***i.p.***)를 투여하고 나서 24시간후에 BSP(sulfobromophthalein)의 plasma 및 bile 배출을 측정 한 결과(Table I), BSP의 %회수율은 대조군, CCl_4처리군, 엑기스+CCl_4처리군에서 각각 66.8±1.9, 56.2±1.4 및 68.9±2.2로 나타났다. 이는 엑기스+

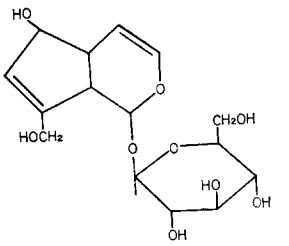


Fig. 1-Structure of aucubin.[14]

Table I-Effect of *Aucuba japonica* extract pretreatment on the CCl_4-induced changes in liver weight, bile flow, and BSP biliary excretion in rats[a].

Treatment	BSP biliary excretion (% dose/hr)	Bile flow (mg/hr/g of liver)	Liver wt. (% of body wt.)
Control[b]	66.8±1.9	2.17±0.16	2.94±0.06
Extract[c]	67.2±1.5	2.45±0.14	2.79±0.05
CCl_4[d]	56.2±1.4[f]	1.86±0.08[f]	3.26±0.10[f]
Extract+CCl_4[e]	68.9±2.2	2.20±0.13	3.45±0.08[f]

[a]Values are expressed as the mean±SE of 4 to 6 animals.
[b]Treated olive oil 1ml/kg, *i.p.*
[c]Administered 600mg/kg/day, *p.o.* for 2 days.
[d]Treated 0.5ml/kg, *i.p.* as a 50% solution in olive oil.
[e]Treated the extract (600mg/kg/day, *p.o.*) for 2 days and CCl_4 (0.5ml/kg, *i.p.*) 30 min after the second dose of the extract.
[f]Values significantly different from controls ($p<0.05$). See reference 13.

Table II-Effect of *Aucuba japonica* extract on the CCl_4-induced depression in biliary excretion of BSP[a].

Treatment	BSP biliary excretion (% dose/hr)
Control[b]	66.8±1.9
Extract[c]	68.1±1.5
CCl_4[d]	56.2±1.4[f]
CCl_4+extract (600mg/kg)[e]	60.3±1.8[f]
CCl_4+extract (1,200mg/kg)[e]	58.6±1.1[f]

[a]Values are expressed as the mean±SE of 4 to 6 animals.
[b]Treated olive oil 1ml/kg, *i.p.*
[c]Administered 1,200mg/kg/day, *p.o.* for 2 days.
[d]Treated 0.5ml/kg, *i.p.* as a 50% solution in olive oil.
[e]Administered the extract (600mg or 1,200mg/kg) twice 30 min and 3 hr after CCl_4.
[f]Values significantly different from controls ($p<0.05$). See reference 13.

CCl_4 처리군에서 CCl_4 간독성을 보호한 것으로 해석되며, 아울러 S-GPT치 역시 엑기스처리군이 낮음을 보여준다(Table II) 또한, 병리조직 검사를 실시한 결과 역시 엑기스+CCl_4처리군이 CCl_4 단독처리군보다 훨씬 손상 된 것을 볼때 이는 식나무 잎엑기스에 유효성분이 있는 것으로 사료되었고, aucubin이 바로 유효성분일 가능성을 보여 준 것이라 하겠다.[13] 그러므로 aucubin을 전술한 방법대로 분리한 후 aucubin자체가 CCl_4 간독성에 미치는 영향을 다음과 같이 검토하였다.

2. 四鹽化炭素 肝毒性에 대한 Aucubin의 保護 作用

Aucubin 자체가 microsomal enzymes system에 미치는 영향을 실험하였는데, 이는 CCl_4 간독성이 유발되었을 때 microsomal enzyme인 cytochrom P_{450}의 효소작용을 억제시키는 것을 방어하는지 여부를 관찰할 목적이었다. Microsomal enzyme 활성도는 hexobarbital 수면시간 연장을 측정하여 추정하였다.[15,16] 결과는 Table III에 보여주듯이 aucubin(340mg/kg, *p.o.*)을 CCl_4투여후 1시간후에 경구투여 한 마우스군의 경우, CCl_4 (0.2ml/kg, *p.o.*)만 투여한 마우스군의 평균수면

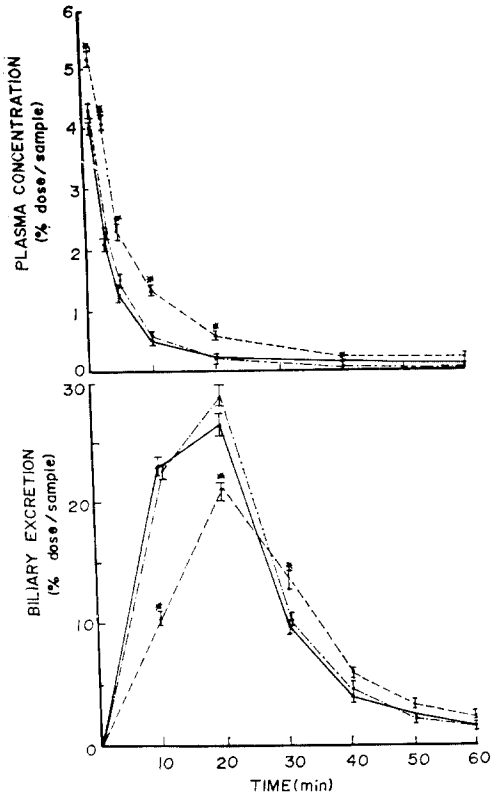


Fig. 2-Plasma concentration and biliary excretion of BSP in rats treated with CCl_4 and *Aucuba japonica* extract plus CCl_4.
Treatment groups are depicted as control (——), CCl_4(……) and extract+CCl_4(-·-·). See reference 13.

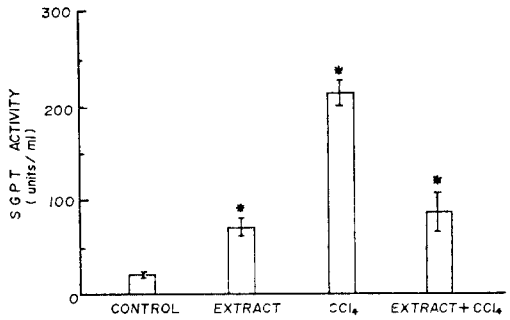


Fig. 3-Effect of *Aucuba japonica* extract pretreatment on CCl_4 induced increases in SGPT activities in rats. See reference 13.

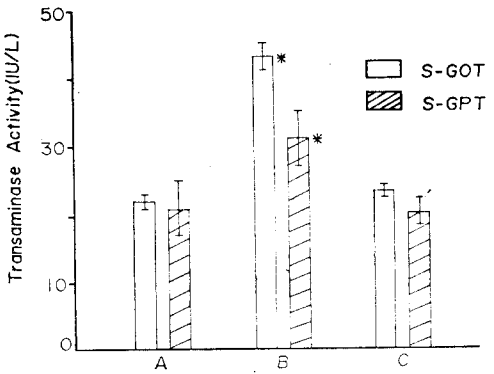


Fig. 4-Effect of aucubin on SGOT and SGPT activities.
The shaded bar represents SGPT activities and the clear bar shows SGOT activities. A. saline control; B. CCl alone treated group; C. aucubin+CCl_4 treated group. An asterisk indicates values that were significantly different from the control (p. 0. 05) See references 15, 16.

시간인 60. 5±9. 5분보다 월등히 짧은 28. 0±3. 2분을 나타냈고, 거의 대조군의 평균수면시간인 24. 8±8. 5분에 근접한 수치를 보여준다. 이는 aucubin이 CCl_4에 의한 간세포의 microsomal enzyme system의 활성도 저하를 방어한 것으로 보여진다.

이와같은 aucubin의 CCl_4간독성 방어작용을 뒷받침 하는 실험결과로, 혈청내 transaminase의 측정 결과가 있다. Fig. 4.에서 보여주듯이 CCl_4만 투여한 마우스군의 GPT 및 GOT 활성도는 매우 증가한 반면에 aucubin과 CCl_4를 함께 투여한 실험군의 효소활성도는 거의 정상치를 보여주고 있으며, 즉 saline만 투여한 대조군의 효소 활성도와 비슷한 값을 보여 준다. 그러므로 aucubin은 CCl_4간독성에 방어작용 즉 간 보호작용을 나타낸다고 볼수 있으며, 이는 식나무잎 전체 엑기스를 투여 했을때, CCl_4 간독성을 많이 방어한 결과로 보아 aucubin 이 유효성분 중의 하나임을 실증하는 것으로 생각된다. 즉 차전자에서 발견된 CCl_4 간독성 방어작용은 차전자에 존재하는 aucubin의 작용에 의한 것으로 미루어 짐작할수 있는 실험적 증거라고 생각할 수 있겠

Table III- Effect of aucubin on the duration of hypnosis induced by hexobarbital[a].

Treatment	Days					Duration of hypnosis (min)
	1	2	3	4	5	
Control	saline	saline	saline	saline	hexobarbital[e]	24.8±8.5
CCl_4[b]	saline	CCl_4	CCl_4	saline	hexobarbital[e]	60.5±9.5[f]
Aucubin+CCl_4	aucubin[c]	CCl_4+Aucubin[d]	CCl_4+aucubin[d]	saline	hexobarbital[e]	28.0±3.2

[a]Values are expressed as the mean±SE of 10 mice.
[b]Administered CCl_4, 0.2ml/kg, *p.o.* with cotton seed oil.
[c]Aucubin was dissolved in physiological saline and administered 340mg/kg, *p.o.* 1 hour after CCl_4 (0.2 ml/kg, *p.o.*) administeration.
[d]Aucubin was administered 1 hr after CCl_4 (0.2ml/kg, *p.o.*) administration.
[e]Hexobarbital sodium salt, 75mg/kg, *i.p.*
[f]Values were significantly different from the control ($p<0.05$). See reference 15, 16.

Table IV-Effects of aucubin on hepatic RNA and protein syntheses *in vivo*[a].

Treatment	Dose-schedules			(5-^{3}H) orotic acid incorporated[e]		L-(4,5-^{3}H) leucine incorporated[f]	
	30min before	0 time	30 min after	(cpm)	% of control	(cpm)	% of control
Control	—	saline	—	42,863	100	1,904	100
CCl_4[b]	—	CCl_4	—	30,081	70.2	1,086	57.0
Aucubin[c]	—	aucubin	—	25,672	59.9	1,450	76.2
Aucubin+CCl_4	aucubin	CCl_4	—	24,502	57.2	708	37.2
CCl_4+Aucubin	—	CCl_4	Aucubin	26,779	62.5	462	24.3
Actinomycin D[d]	—	actinomycin D	—	17,881	41.7	—	—

[a]All mice were fasted for 18 hrs prior to drug administration.
[b]CCl_4 was dissolved in cotton seed oil and injected 1.0mg/kg, *i.p.*
[c]Aucubin was dissolved in 0.9% saline and injected 40kg/kg, *i.p.*
[d]Actinomycin D was dissolved in 0.9% saline, 50μg/kg, *i.p.*
[e]Sixty minutes after the administration of drugs or saline, (5-^{3}H) orotic acid (Sp. Act. 29μCi/mmol) was injected to mouse (15μCi/mouse, *i.p.*) and pulse-labeled for 15 min. Incorporation rates were expressed by cpm/mg RNA. Values are were average of 4 mice.
[f]Sixty minutes after the administration of drugs or saline, L-(4,5-^{3}H) leucine (Sp. Act. 100μCi/m mol) was injected to mouse (10μCi/mouse, *i.p.*) and pulse-labeled for 15min. Incorporation rates were expressed by cpm/mg protein. Values were the average of 4 mice. See reference 15, 16.

다. 그렇다면 aucubin의 간보호작용의 약리적 작용기전은 무엇인가를 살피기 위하여 다음의 실험을 실시하였다. Table IV에서 보듯이 모든 실험마우스를 6개의 군으로 나누었다. 즉, saline만 투여한 대조군, CCl_4(1.0mg/kg)만 투여한 대조군, aucubin(40mg/kg)만 투여한 대조군, aucubin을 CCl_4투여전 30분전에 투여한 실험군 및 aucubin을 CCl_4투여후 30분후에 투여한 실험군, 그리고 actinomycin D(50μg/kg)만 투여한군으로 나누었다. 이들 실험마우스의 간세포 RNA 및 단백질 생합성 정도를 측정하여 본 결과, saline만 투여한 대조군을 100%로 가정할 때 간 세포의 RNA 합성도는 CCl_4만 투여한 경우 대조군에 비해 10.2%로써 약 30%저해작용을 보여 주었다. aucubin

자체 역시 간세포 RNA생합성에 저해작용을 나타내었는데 대조군에 비해 59.5%로 약 40%의 저해작용을 보여 주었다. Iridoid 물질의 하나인 aucubin이 이와같이 RNA생합성을 저해하는 사실을 실험적으로 밝히게 되었고, 이러한 작용이 CCl_4 간 독성에 대한 방어작용을 주는 듯이보여진다. 왜냐하면 aucubin을 CCl_4투여 후에 주어도 간세포 RNA 저해작용이 CCl_4만 투여했을 때보다 약간 더 저해 작용을 나타내나 그 정도가 많지는 않은 점이다. 반면에 간 세포 단백질 합성에 미치는 영향에 있어서는 CCl_4자체만 투여했을 경우 대조군에 비해 57%(저해작용 43%)로써, 간 세포 RNA 합성에 미치는 영향보다 훨씬 크다. 그러나 aucubin의 경우는 76.2%(저해작용 약 24%)로써 비교적 낮은 저해작용을 보여 주었다. Aucubin과 CCl_4를 pretreat, 혹은 post treat (CCl_4보다)했을 경우 단백질 합성 저해도는 상가적으로 저해됨을 볼수 있었다. 그러므로 aucubin의 간 보호작용은 RNA수준에서 일어나는듯이 보이고 간세포 단백질 합성저해작용이 CCl_4에 의해 일어나는 것은 RNA 저해작용보다 간 손상을 입히는데 적은 영향을 주는 듯이 보여진다.

Aucubin의 간 보호작용은 그 작용기전의 하나로 aucubin자체가 간세포 RNA 생합성을 저해하는 능력에 기인하는 것이 하나의 원인인 것 같고 특히 그저해정도는 간 세포를 완전히 치사하는 정도로 강한 것이 아님에 특징이 있다고 보겠다.

V. α-Amanitin肝毒性에 대한 Aucubin의 肝 保護 作用

α-amanitin은 그 화학구조가 Fig. 5에 보여 주듯이 bicyclic octapeptide ring structure이다.[17] 이 mycotoxin은 *Amanita* 독버섯중 *Amanita phalloides*(일명, destroying angel) 및 *Amanita verna*(일명, death cap)등의 독버섯에 존재하며 북미 및 유럽등에서 독버섯에 인한 중독 및 사망에 거의 전부를 차지한다.[18,19] 이 mycotoxin은 독버섯 섭취후 비교적 늦

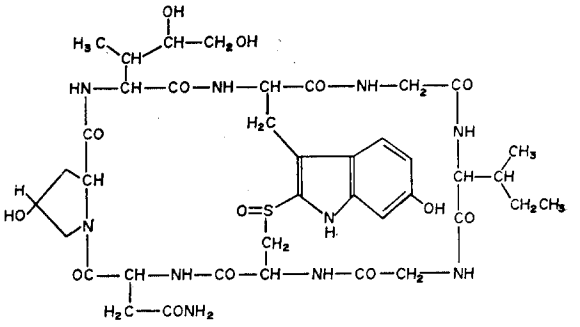


Fig. 5-Structure of α-amanitin.

Table V-Survival study *in vivo* on the antidotal effect of aucubin for α-amanitin poisoning.

Treatment	Dose(mg/kg)	Time after amanitin(hr)	Survival (mice)(%)
Control(amanitin)			0/16(0)
Aucubin	40	0.5	0/16(0)
	80	0.5	4/16(25*)
	100	1	8/16(50*)
	100	6	8/16(50*)
	100	12	8/16(50*)
	200	1	10/16(62.5*)
	200	6	8/16(50*)
	200	12	8/16(50*)

Each group consisted of 16 mice (ICR albino, 20±2 g, male). Alpha-amanitin and aucubin were dissolved in 0.9% saline. Mice in the test groups that survived longer than 10 days were recorded. Mice in the control group received a dose of 0.6mg/kg/mouse and all died within 3 to 5 days. Chi-square test, $p<0.005$. See references 28, 29, 30.

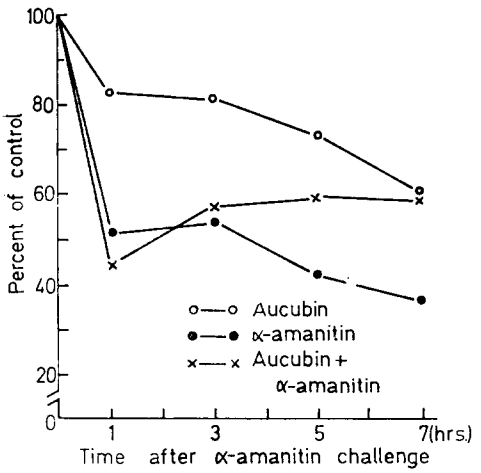


Fig. 6-Effect on liver RNA biosynthesis *in vivo*. All mice were fasted for 18 hr prior to experiment. Each group consisted of 4 mice. Each specified time comprised 4 group: the control group received saline; a group received only alpha-amanitin (0.2mg/kg); and a group treated with alpha-amanitin(0.2mg/kg) and aucubin(80mg/kg) in which each mouse received the aucubin 30 min after alpha-amanitin. At the specified time, each mouse in the four groups was injected with (5-^{3}H) orotic acid (10μCi/mouse, sp. act., 29 Ci/mmole) and pulse-labeled for 20 min[31]., Liver was removed and the RNA portion was isolated.[32] Radioactivities per mg RNA in the test groups was compared with those of the control group. See references 28, 29, 30, 31, 32.

게(6~12시간후), 독작용이 발현/진행되고, 우선, 간에 대한 높은 독작용을 나타내고, 흡수후 혈류를 통해 운반되는 것은 2차적으로 신장에 독성을 준다. 그러므로 α-amanitin은 간 독성을 일으키는 mycotoxin으로 간 질환 실험동물모델을 유발시키는 것으로 사용되어왔다. 이 간독성에 대한 해독제로 thioctic acid,[20] cytochrom C,[21] penicillin G,[22] silymarin[23]등이 유효하다고 보고되었고, 특히 thioctic acid는 임상적으로도 사용되어 왔으나 대부분 이들 해독제는 α-amanitin이 섭취되기전에 투여하거나 동시에 투여 하였을때 해독 내지 간 보호작용이 나타난다.[24,25] 그리하여 이 독버섯 해독제 개발에 대한 연구가 과거 10수년간 계속되어 왔으나 별로 효과있는 해독제가 발견되지 못한 실정이다. 이 mycotoxin의 간 독성은 α-amanitin이 간세포의 RNA합성효소인 RNA polymerase II의 효소작용을 매우 강하게 저해하는 것이 원인인 것으로 밝혀 졌다.[26,27] 전술한 CCl_4 간독성 방어 작용이, aucubin의 RNA 합성저해작용에 기인하는 점에 착안하여 aucubin이 α-amanitin 간독성에 방어 내지 해독작용을 나타내는지 여부를 다음과 같이 검토하였다.

Aucubin의 α-amanitin에대한 해독/방어작용은 survival rate를 측정하므로서 (Table V) 추정하였다.[28~30] α-amanitin의 50% mouse lethal dose는 0.3mg/kg이기때문에 이보다 많은 0.6mg/kg의 dose를 각 실험 mouse에 복강주사하였다. 이때 α-amanitin만 투여받은 대조군(0/16)은 3~5일 사이에 모두 죽었다. 반면에 aucubin의 여러 doses(40mg, 80mg, 100mg, 200mg/kg)에서, 시간별로(post-treatment)따른 survival rate 증가는 40mg/kg(30분투여)에서는 아무런 증가효과가 없었고 80mg/kg(30분후투여)에서는 25%가 생존하였고 100mg/kg(1시간, 또는 12시간후 투여) dose에서는 50%의 생존율을 보였다. 200mg/kg(1시간후 투여)에서는 62.5%, 12시간후 투여시에는 50% 생존율을 보였으며, 100mg/kg dose보다 월등한 효과는 없었다. 이와같은 survival study에서, aucubin의 α-amanitin에 대한 생존율 증가— 즉 해독 및 방어작용은 매우 의의가 있다. 왜냐하면 현재까지 보고된 해독제 들은 이들은 α-amanitin 투여전에 투여하거나, 혹은 최소한 동시에 투여시 해독/방어 작용을 나타냈으나, aucubin의 경우 α-amanitin 투여후 12시간후에 투여하여도 50% 이상의 생존율 증가를 나타냈기 때문이다. 특히 *Amanita* 독버섯에 의한 해독제로써의 가능성을 감안할때 Post-treatment시의 효과가 더욱 의의를 갖기 때문이다. 이와관련하여 aucubin의 해독/방어작용의 기

전을 살피기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다. 전술한 aucubin의 CCl_4 간독성에 대한 방어/보호작용은 aucubin 자체의 간세포 RNA 생합성저해작용에 기인하는 점에 착안하여 이러한 저해작용이 α-amanitin의 간독성에대한 해독/방어 작용을 나타내지 않나 하는 가능성을 시험하였다. 왜냐하면 α-amanitin의 간독성은 RNA polymerase II의 억제작용에 기인하는 것으로 알려졌기 때문이다. Fig. 6에서 보는바와같이 모든 실험 마우스는 실험전 18시간동안 절식을 하였다. 모든 마우스는 saline만 투여한 대조군 및 α-amanitin만 투여한 대조 군 및 aucubin만 투여한 대조군 및 aucubin과 α-amanitin을 투여한 실험군(α-amanitin 투의 30분후 aucubin 투여) 등으로 나누었다. 이때 α-amanitin은 마우스당 0.2mg/kg을 투여하였다. 다음 1, 3, 5, 7시간후에 간세포에서 일어나는 RNA 생합성을 시간별로 측정한 결과는 Fig. 6에 표시한 바와 같다. RNA 합성정도는 saline만 투여한 대조군의 것에 대한 백분율로 표시하였다. α-amanitin만 투여한 대조군은 1시간후 saline투여 대조군에 비해 RNA생합성능은 약 50%였다. 이때 aucubin(80mg/kg)만 투여한 군은 saline투여 대조군에 비해 85%이었으며 점점 감소하여 7시간후에는 대조군에 비해 60% 정도였다. 반면에 α-amanitin만 투여한 것은 7시간후에 35% 정도로 급격히 감소되었다. Aucubin과 α-amanitin을 함께 투여받은 실험군은 1시간후에 약 45%였다가 천천히 증가하여 7시간후에는 약 60% 였다. 바로 aucubin만 투여한 마우스군의 것과 비슷한 RNA 합성능을 보여주었다. Aucubin은 α-amanitin에 의한 RNA합성능 저해작용과 경쟁적으로 작용한 듯이 보이며 이러한 경쟁적 작용이 아마도 α-amanitin의 간 독성을 해독/방어하는 것으로 생각되어진다. 즉 aucubin자체가 갖고있는 약간의 RNA합성 저해작용이 α-amanitin에 의한 매우 강한 RNA 저해작용을 마치 세포손상시 나타나는 atrophy적인 방어작용과 유사한 작용을 나타낸 듯이 보여진다.

이와같은 aucubin의 α-amanitin에 대한 간독성 방어작용을 더 한층 확인하기 위하여 혈액내 glucose 변화를 측정하였다. α-amanitin 간독성에 의해 일시적으로 hyperglycemia가 나타나다 급격한 hypoglycemia를 보여준다.[19] 즉 aucubin을 투여시 hypoglycemia가 회복되는지 여부를 관찰한 결과(Fig. 7) α-amanitin에 의해 유발된 hypoglycemia를 aucubin(60mg/kg)은 방지하였음을 알수 있었다.

Aucubin은 이상과 같이 CCl_4에 대한 간독성 및 α-amanitin에 대한 간 독성에 대해 방어/보호 작용을 의의있게 나타내었다. 더우기 α-amanitin에 대하여 12시간후에도 aucubin이 해독/방어효과를 보여준 것은 이 iridoid 물질이 *Amanita* 독버섯에 대한 좋은해독제로써의 가능성을 보여준다고 하겠다.

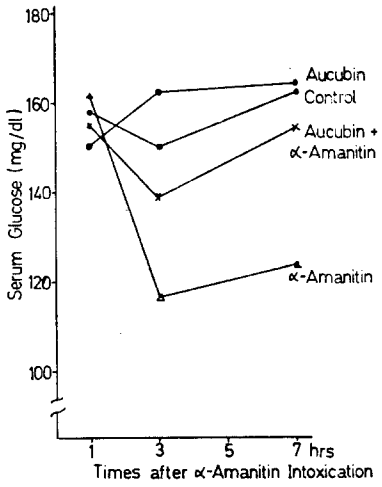


Fig. 7-Effect on glucose content in serum. Each group consisted of 4 mice. Control group received only saline. Alpha-amanitin (0.1mg/kg) alone treated group (—△—△—△—), aucubin alone treated group (— • — • — • —), and aucubin (60mg/kg) plus alpha-amanitin (0.1mg/kg) treated group (—×—×—×—) in which aucubin was administered 30 min before alpha-amanitin challenge. All mice were fasted for 18 hr before experiments.

VI. Aucubin의 急性 毒性 및 血液에 대한 毒性 硏究

Aucubin 자체가 나타낼지도 모르는 독성에

Table VI-Acute toxicity of aucubin.

Treatment	Dose (mg/kg)	Death (number)	SGOT (IU/L)	Alkaline phos. (IU/L)	Triglyceride (mg/dL)
Aucubin	100	0	261	236	no test
	300	0	194	157	35
	600	0	179	135	39
	900	0	162	no test	51

All mice received *i.p.* aucubin dissolved in saline. Each group consisted of 10 mice(ICR, 20±2g, male). No death was observed 24hr after administrations. Results were average of 10 mice/group. See references 33, 34.

Table VII-Dose-schedule and effects of multiple doses in serum enzymes and chemistry.

Treatment(mg/kg)	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7	Results
Control	saline	saline	saline	saline	normal range
Aucubin(20, 40, 80)	liver biopsy			liver biopsy	normal range*
	enz. assay	enz. assay	enz. assay	enz. assay	

Each group consisted of 18 mice. Control group received *i.p.* only saline.

Test groups received *i.p.* one of 20, 40 and 80mg/kg doses on specified days. On day 1 and 7 liver biopsy was undertaken. On specified days, 3 mice were sacrificed for measuring serum enzyme activities and chemistry. Serum enzymes and chemistry were measured as the followings: SGPT, SGOT, alkaline phosphatase, triglyceride, BUN, total protein and glucose. All enzyme activities were measured by ABA 200 auto blood analyzer (Abbott). See references 33, 34.

* Normal range: no significant differences in enzyme activities in tests groups compared with those of the saline control group.

대해서, 급성독성 및 혈액 효소및 여러 대사물질에 미치는 영향을 조사하였다. Aucubin이 전술한 바와 같이 우수한 해독/간보호작용을 갖는다 하더라도 aucubin자체가 독성이 높으면 약으로써 별 의의가 없기 때문에, 독성연구는 매우 관심있는 실험으로 생각되기 때문이다.

1. 急性 毒性

마우스 10마리의 하나의 군으로 하여 1군당 aucubin, 100mg/kg, 300mg/kg, 600mg/kg, 900mg/kg을 각 마우스에 복강주사를 한후 24시간후 죽은 마우스를 조사하였다. Table VI에 보여주는 바와 같이 900mg/kg dose에서도 치사된 마우스는 하나도 없었다. 이로 미루어 최소치사량(minimum lethal dose)은 복강주사 할때 g unit를 넘는 용량으로 보인다. 이와관련하여 식나무열매(aucubin함량이 높음)의 액기스를 마우스에 투여시 MLD가 20g/kg인 것으로 보고 된 점을 감안 할때[35], aucubin은 비교적 낮은 급성독성을 나타내는 것으로 보인다. 또한 전술한 바와 같이 aucubin은 RNA 또는 protein 생합성 저해작용이 있으므로 높은 dose(>300mg/kg)에서 이와 같은 작용이 발현될 가능성이 있고 Table VI에서 보듯이 SGOT 및 alkaline phosphatase 효소작용이 >300mg/kg에서 점차 감소 한 경향을 보여주는 것과 관련성이 있다고 보여진다. 즉 300mg/kg이상의 dose에서 치사는 일으키지 않으나 RNA 또는 protein 생합성 억제작용때문에 이들 효소 활성도가 낮아진 듯이 생각된다.

2. 血液 酵素에 미치는 影響

마우스를 한 군당 18마리씩 하여 각 마우스 당 aucubin 20mg/kg, 40mg/kg, 80mg/kg를 그룹별로 1일 1회 day 1, 3, 5, 7에 복강투여 하였으며 day 1, 3, 5, 7, 에 3마리 씩 선별하여 혈액효소의 활성도를 측정하였다. (Table VII). 이때 측정한 효소는 SGPT, SGOT, alkaline phosphatase 및 triglyceride, blood urea nitrogen, total protein 및 glucose양을 측정 비교하였다. 대조군으로는 생리식염수만 공급받았으며, 대조군과 비교하여 세 doses(20, 40, 80mg/kg)의 aucubin에서 별로 효소활성도 차이나 glucose, triglyceride, total protein, BUN량의 차이를 찾을 수 없었다. 또한 day 1, 3, 5, 7에서 효소 활성도를 측정한 실험마우스의 간을 적출하여 병리조직을 검사한 결과 역시 대조군과 비교하여 차이를 광학현미경적이로는 발견 할수 없었다.[33] 그러므로 전술한 급성독성 연구에서 aucubin의 최소치사량(MLD)은 1g/kg를 넘으며, 아울러 multiple dose를 투여시에도 20~80mg/kg(4 times/week)에서 대조군과 비교하여 혈액 효소활성도에 별 차이를 발견치 못하였으므로 aucubin은 비교적 독성이 적은 물질로 판단된다.

VII. 癌 細胞의 核酸 代謝에 미치는 影響

Aucubin의 생물활성작용으로 RNA생합성을 저해하는 것은 앞에서 밝힌바 있으나 이러한 작용이 간세포 이외의 것에도 동일한 작용을 나타내는지를 밝히기 위하여 Leukemia SN36[35] 및 Sarcoma 180 암세포를 배양하여 핵산대사를 관찰하였다.[12] Aucubin농도 0.5mM 및 1.0mM에서 이 암세포의 RNA 생합성은 배양후 40분에서 약 30% 및 46%씩 억제되었음을 알수 있었고 이는 aucubin의 RNA 생합성 저해작용이 간세포 이외에서도 발현되는 실험적 증거이다(Fig. 8). 그러나 이러한 저해작용이 암세포를 치사

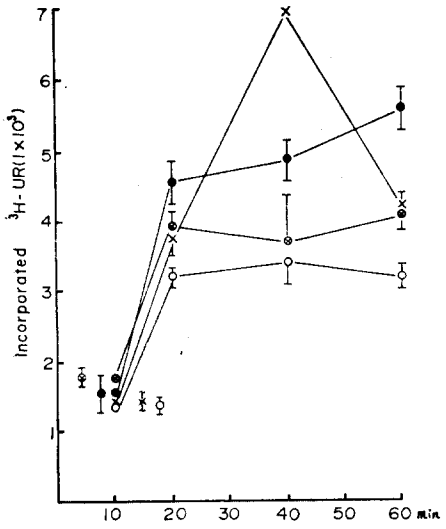


Fig. 8-Effect of aucubin on RNA synthesis in leukemia SN 36 *in vitro*.
Measurement of incorporation of (5-^{3}H) uridine into trichloroacetic acid insoluble portion in leukemic cells were assumed to be the rates of RNA biosynthesis. Control (—×—×—×); aucubin 0.5mM (— • — • —); aucubin 1.0mM (—⊗—⊗—⊗—); actinomycin D 8×10^{-5}mM (—○—○—○) See references 12.

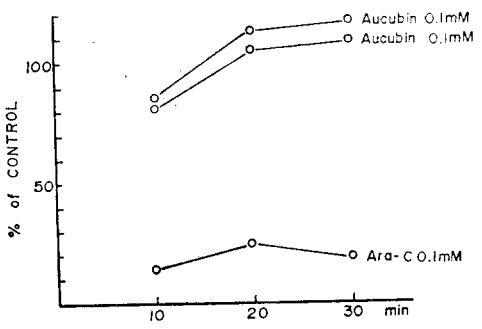


Fig. 9-Effect of aucubin on DNA synthesis in sarcoma 180 *in vitro*. Reaction flask contained: 2×10^7 sarcoma 180 cells; 0.1 or 1.0mM of aucubin; 0.1 mM of arabinosyl cytosine (positive control); 10 μCi/of ^{3}H-TdR and Fisher's medium to give a final volume of 15ml. All reaction flasks were preincubated for 10 min with drugs before addition of radioactive TdR. See references 36, 37.

시키지는 않는듯이 보이는데 aucubin 20mg/kg, 40mg/kg, 60mg/kg의 용량을 Leukemia SN36이 복강에 이식된 마우스에 day 1~6일까지 6회 투여시에 항암효과를 발휘하지 못하였다.[12]

이는 aucubin의 급성독성 연구에서 보듯이 aucubin의 RNA 생합성 저해작용이 결코 치사에 미치는 세포독성이 강한 물질이 아니라는 점과 일치한다.

또한 DNA에 대한 저해작용 유무를 알기 위해 sarcoma 180 배양 암세포에서 aucubin 농도 0.1 mM 및 1.0mM를 유지하였을 때 30분동안 DNA합성 저해작용은 관찰되지 않았다. 그러므로 aucubin의 주된 생물활성작용은 DNA 생합성 억제보다 RNA 생합성 억제작용인 것으로 사료된다.[36]

結 論

차전자(*Plantago asiatica* seeds) 및 식나무(*Aucuba japonica*)잎에서 분리한 iridoid glucoside인 aucubin은 CCl_4에 의해 유발된 간독성 및 α-amanitin에 의하여 일어난 간독성에 방어/보호 작용을 나타냈다. 실험동물간독성 모델 중의 하나인 D-galactosamine에 의해 유발된 간독성에 대해서는 의의있는 방어/보호작용을 aucubin은 나타내지 않았다(unpublished results). Aucubin의 CCl_4 간독성에 대한 방어작용은 aucubin을 CCl_4투여 전 혹은 투여 후에 실험동물에 주어도 방어 효과가 나타났다. 방어효과의 작용기전은 aucubin 자체의 간세포 RNA생합성 및 protein합성에 대한 저해작용으로 보이며 이 저해작용은 간세포를 치사 내지 크게 손상시키는 정도는 아닌 것으로 보인다. 또한 α-amanitin에 대한 aucubin의 방어/보호 작용은 α-amanitin 투여 후 12시간이 지난 다음에 aucubin(100mg/kg)을 일회 투여하여도 50%이상의 생존율을 보여 주었다. 그러므로 aucubin의 방어/보호작용은 이 물질이 *Amanita* 독버섯 중독의 해독제로 쓰일 가능성을 보여준다. α-amanitin 간독성의 주된 생화학적 독성기전은 이 mycotoxin이 간세포의 RNA polymerase II에 대한 강한 효소억제작용 때문인 것으로 알려졌다. 그러므로 aucubin의 해독내지 방어작용이 α-amanitin에 의해 억제되는 간 세포 RNA polymerase II에 대한 효소작용에 어떠한 영향을 미치는 것을 밝히기 위해 간세포의 RNA생합성에 미치는 영향을 조사한 결과, aucubin 자체는 약간의 RNA 생합성 억제 작용을 나타냈고, α-amanitin과 aucubin을 함께 투여한 경우 α-amanitin에 의해 크게 억제된 RNA생합성이 점차 aucubin자체에 의한 억제정도로 증가됨을 알수 있었다. 그러므로 aucubin의 간세포 RNA생합성 억제작용이 α-amanitin간독성에 대한 해독/방어작용을 주는 듯이 보인다. 이러한 aucubin의 RNA생합성 억제작용은 간세포 이외의 암세포인 leukemia SN 36 및 sarcoma 180을 ***in vitro***로 배양시켰을 때도 관찰되었다. 그러므로 aucubin 더 나아가 iridoid glycoside 계열물질의 생물활성 작용의 하나가 이와같은 RNA 생합성 억제작용이 아닌가 여겨진다. Aucubin 자체의 독성연구 결과 최소치사용량(MLD)는 1g이 넘는 것으로 나타났으며 aucubin을 80mg/kg씩 4회 1주일동안 반복투여하여도 마우스 혈액효소(alkaline phosphatase, GPT, GOT) 및 BUN, glucose, triglyceride 및 total protein의 양에는 큰 영향을 미치지 않았고, 간 조직검사의 결과 역시 상기의 용량 및 투여회수에서는 이상을 발견치 못하였다. 그러므로 aucubin은 비교적 독성이 낮은 물질 임을 알 수 있었다.

Aucubin의 생물활성작용의 하나인 RNA 및 protein생합성 억제작용이 모든 iridoid 계열물질의 특징적인 효과인지는 이들 물질을 더욱 많이 조사해 볼 필요가 있고, 특히 천연물에 많이 존재하는 이들 물질의 생물활성 작용의 하나를 밝힌데 의의가 있다고 하겠다. 더나아가 aucubin이 *Amanita* 독버섯 해독제로써의 개발 및 기타 간 질환의 치료제로써의 개발을 위한 기초적 연구로써 더욱 계속할 의의가 있다고 하겠다.

文 獻

1. R.D. Woodson and K.M. Cahill, *J. Am. Med. Assoc.* **219**, 1191(1972).
2. J.Y. Kim, *Korea J. Internal Med.* **18**, 705(1975).
3. H.H. Known and D.J. Suh, *ibid.* **20**, 423(1977).
4. In *Advances in Viral Hepatitis*, Technical Report Series, **602**(1977), W.H.O.
5. H.S. Yun(Choi) and I.-M. Chang, *Kor. J. Pharmacog.* **8**, 125(1977).
6. I.-M. Chang and H.S. Yun(Choi), *Korean J. Pharmacog.* **9**, 139(1978).
7. I.-M. Chang and H.S. Yun(Choi), *ibid.* **10**, 79(1979),
8. H.S. Yun(Choi) and I.-M. Chang, in *Proceedings of the Symposium on Recent Advances in Natural Products Research*, (B.H. Han and W.S. Woo, Ed) (1979) 41-44, Seoul National University Press.
9. H.S. Yun(Choi) and I.-M. Chang, *Asian J. Pharmacy* **4**, 3(1982).
10. A.R. Trim and R. Hill, *Biochem. J.* **50**, 310(1952).
11. Y.C. Park, in M.S. Thesis, *Pharmacology of Aucubin*, Seoul National University (1982).
12. I.-M. Chang, Y.C. Park and H.S. Yun(Choi), *Kor. Biochem. J.* **15**, 200(1982).
13. K.H. Yang, T.J. Kwon, S.Y. Choe, H.S. Yun and I-M. Chang, *Drug and Chem. Toxicol.* **14**, 429 (1983).
14. L.J. El-Naggar and J.L. Beal, *J. Natural Products* **43**, 649(1980).
15. I-M. Chang, J.C. Ryu, Y.C. Park, H.S. Yun and K.H. Yang, *Drug and Chem. Toxicol.*, **14** 443 (1983).
16. J.C. Ryu, in M.S. Thesis, *Biochemical Evaluation of Liver Protective Activity of Plantago asiatica Seed and Aucubin Glucoside*, Seoul National University (1981).
17. T. Wieland, *Science* **159**, 946(1968).
18. W. Litten, *Sci. Am.* **232**, 91(1975).
19. K.F. Lampe, *Ann. Rev. Pharmocol. Toxicol.* **19**, 85(1975).
20. J. Kubička, *Mykol. Mitteil.* **7**, 92(1963).
21. G.L. Florsheim, *Science* **177**, 808(1972).
22. G.L. Florsheim, *Arch. Pharmacol.* **293**, 171(1976).
23. J. Choppin and A. Desplaces. *Arzneim, Forsch.* **29**, 63(1979).
24. B.J. Culliton, *Science* **185**, 600(1975).
25. B. Paaso and D.G. Harrison, *Am. J. Med.* **58**, 505(1975).
26. M. Cochet-Meilhac and P. Chambon, *Biochim. Biophys. Acta* **353**, 160(1979).
27. L. Fiume and F. Stirpe, *ibid.* **123**, 643(1966).
28. I.-M. Chang, Y.S. Kim and H.S. Yun (Choi), *Drug and Chem. Toxicol.* Submitted.
29. Y.S. Kim, in M.S. Thesis, *Liver Protective Activities of Aucubin against Hepatic Damage Induced by Alpha-amanitin*, Seoul National University (1983).
30. I.-M. Chang and H.S. Yun (Choi), *Potential Antidote of Aucubin against Amanita Mushroom Poisoning* presented at Symposium on Toxic Mushrooms and Poisonous Fungi in 3rd International Mycology Congress, Tokyo, Japan Aug. 28-Sept. 3, (1983).
31. T. Gasses, J.D. Moyer, and R.E. Handschumacher, *Science* **213**, 777(1981).
32. G.A. LePage and C. Heidelberger, *J. Biol. Chem.* **188**, 593(1957).
33. I.-M. Chang and H.S. Yun (Choi), *Kor. J. Pharmacog.* **14**, 83(1983).

34. K.S. Chang, in M.S. Thesis, *Pharmacology and Toxicology of Aucubin*, Seoul National University (1983).
35. A.M. Leveau and N. Durand, *Pl. Méd. et. Phytochér.* **13**, 199(1979).
36. K. Nakamura, *Gann* **47**, 561(1956).
37. I.-M. Chang, K.S. Chang and H.S. Yun (Choi), *Kor. Biochem. J.* **16** 322(1983)