

## 실험적 간장해에 의한 지질 함량 변동에 대한 택사 추출액의 영향

서민지·하현·윤수홍

대구효성가톨릭대학교 약학대학

### Effects of Alismatis Rhizoma Extracts on Lipid Components in Experimental Liver Injury

Min Ji Seo, Hun Ha and Soo Hong Yoon

Taegu Hyosung Catholic University, College of Pharmacy

#### ABSTRACT

The protective and therapeutic effects of Alismatis Rhizoma extracts on rat liver injury induced by carcinogenic polycyclic hydrocarbon, benzo(a)pyrene were investigated in rats. Serum and liver triglyceride, total-cholesterol level and serum HDL-cholesterol content were measured. Alismatis Rhizoma extracts inhibited the enhanced production of lipid in chemically induced liver injury. Among 4 fractions, CHCl<sub>3</sub> fraction revealed the most powerful liver-protective effect.

Our results strongly suggest that Alismatis Rhizoma be a promising liver-protective agent.

#### 서론

택사(Alismatis Rhizoma)는 Alismataceae에 속하는 *Alisma orientale* Juzepczuk 및 동속식물의 근경으로 이노 및 항염증작용 등이 있어 한방에서 널리 쓰이고 있는 생약이다.<sup>1)</sup>

1960년에 Kobayashi는 택사로부터 glucose, fructose, sucrose와 lipotropic substance인 choline 및 lecithin의 존재를 확인하였다. 성분으로는 triterpene계인 alisol A, B, C와 alisol A monoacetate, alisol B monoacetate와 alisol C monoacetate 등을 함유하고<sup>2,3)</sup> 있으며, Tomada 등<sup>4)</sup>은 precipitation procedure를 이용하여 택사의 유효성분 확인과 분리 방법에 대해 보고하고 있다. 또한 택

사의 수침액으로부터 acidic polysaccharide의 분리, 구조 결정과 면역학적인 활성 등에 대해 보고<sup>5)</sup>하고 있다. Yamahara 등<sup>6)</sup>은 alisol이 토끼에서 angiotensin I에 대해 contractile 반응을 억제한다고 한다.

한편 간기능 개선효과가 시사되는 생약으로부터의 유효성분을 규명하기 위하여 택사를 극성이 다른 용매로 추출하였다. rat에 발암성 돌연변이 물질로 알려진 benzo(a)pyrene(이하 B(a)P라 함)을 투여하여 실험적 간장해를 유발시킨뒤 택사 분획의 영향을 혈청과 간조직의 수종 지질 성분의 변동을 지표로 하여 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

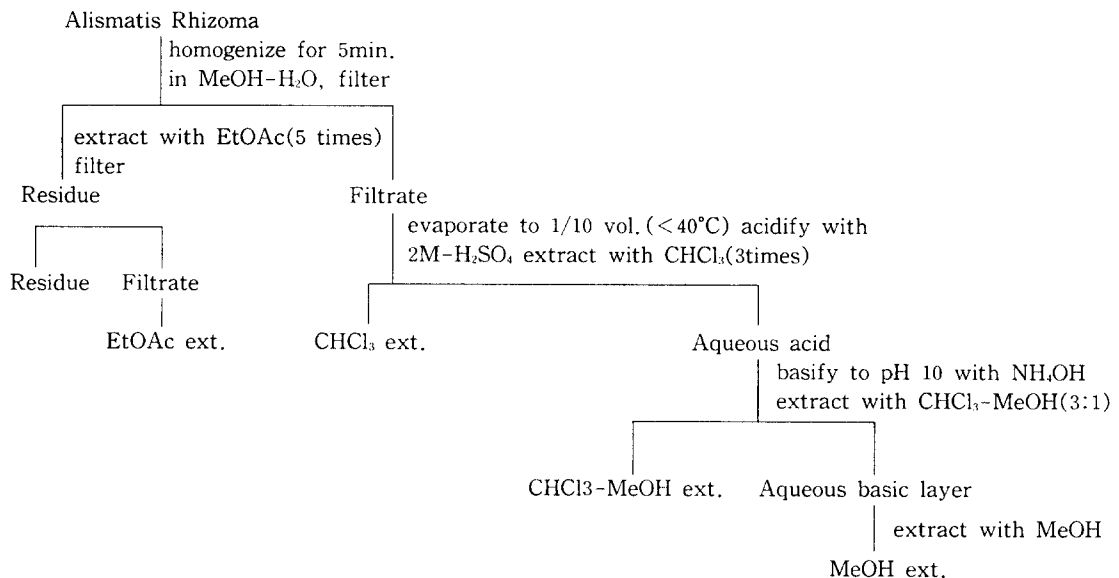
본 실험에 사용된 택사는 1992년 시중 한약 약재상에서 구입하여 감별 확인 후 사용하였다.

### 실험동물

체중 200~250g 범위의 Sprague-Dawley계 웅성 rat를 1주일간 예비 사육한 후 사용하였고, 각 실험군 당 6 마리를 1개군으로 하여 실시하였다. 고형사료와 물은 자유로이 섭취시켰다. 투여 방법은 간장해 예방 처치군은 택사 추출액 0.15g/kg를 1일 1회 일정시간에 1주일간 gastric incubation 후, 마지막 투여시 B(a)P 0.1mg/kg을 i.p. 주사하여 간독성을 유발시켰고, 간장해 치료처치군은 B(a)P를 1회 주사직후부터 택사 추출액 0.15g/kg를 각각 1일 1회 1주일간 투여하였다.

### 분획의 조제

Harborne의 방법<sup>7)</sup>에 따라, 먼저 methanol:H<sub>2</sub>O (4:1)혼액으로 여과 추출하고, 극성의 차이를 이용한 EtOAc, CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>:methanol(3:1)혼액과 methanol 등의 4종의 분획을 얻었다.



**Scheme 1.** A procedure for extracting Alismatis Rhizoma and fractionating into different classes according to the polarity.

### 지질 함량 측정

실험동물을 ether마취시킨 다음 복부정중선을 따라 개복한후, 하대정맥으로부터 혈액을 채취하였고, 간은 생리식염수로 10% 마쇄액을 만든 후, Folch 등<sup>8)</sup>의 방법에 따라 CHCl<sub>3</sub>:methanol(2:1)혼합액으로 지질을 추출하였다. Triglyceride 함량은 Muller의 방법<sup>9)</sup>에 따라 측정하였고, 총 cholesterol과 HDL-cholesterol 함량은 효소법<sup>10)</sup>에 준하여 측정하였다. 실험결과의 통계처리는 PCS Program을 이용한 t-test에 준하였다.

## 결과 및 고찰

### 혈청 및 간조직의 triglyceride의 함량 변화

간손상을 일으키는 많은 물질은 triglyceride의 형태로 parenchymal cell에 지방축적을 일으킨다. 일반적으로 triglyceride의 축적은 parenchymal cell에 의한 triglyceride의 합성과 순환계로의 방출사이의 불균형에 의해 일어난다고 한다.

Table 1에서와 같이 혈청 triglyceride함량은 대조군의 59.03±3.21mg/dl, 55.33±2.45mg/dl, 40.10±3.54mg/dl와 47.16±2.04mg/dl인데 비해, B(a)P 투여로 현저하게 증가하였다. Triglyceride

함량은 텍사 각 추출액의 투여로 전, 후처리에서 모두 유의성 있는 감소를 보였으나, 그 효과는 EtOAc 분획의 전처리에서 70.80±1.15mg/dl로 65%, 후처리에서 77.42±11.07mg/dl로 60%정도의 감소를 나타냈다. 또한 CHCl<sub>3</sub>분획의 전처리로 62.40 13.82mg/dl로 약 70%의 함량 감소를 보였다.

간조직 중 triglyceride 함량도 B(a)P 투여로 336.11±22.05mg/g, 336±22.05mg/g, 215±1.00mg/g와 215±1.00mg/g로 현저하게 증가하였다. 텍사 추출액의 투여로 모두 유의성 있는 감소를 보였다. 그러나 EtOAc 분획의 전처리로 154.00±12.61mg/g으로 약 54%의 감소를 나타냈고 나머지 분획의 투여로 감소효과는 나타냈지만 EtOAc 분획의 전처리만큼은 내지는 않았다(Table 2).

보통 지방 축적이 간에 일어나면 low-density lipoprotein합성이 억제되고, 또한 지질 합성은 증가되어 결과적으로 간조직의 triglyceride는 축적되고, 혈액 중으로의 triglyceride 방출은 감소하는 것이 보고<sup>11,12,13)</sup>되고 있으나, 본 실험의 결과와는 서로 상반되는

것이어서 보다 많은 연구가 필요하다고 본다.

**혈청 및 간조직의 총 cholesterol 함량 변화**

B(a)P 투여는 혈청 총 cholesterol함량을 대조군에 비해 약 2.5~4배 정도 증가시켰으며, 이에 대해 텍사 추출액의 전처리, 후처리에서 모두 유의성 있는 감소를 보였는데, 특히 CHCl<sub>3</sub>분획의 투여로 전처리에서 65.57±6.35mg/dl와 후처리에서 63.93±0.62mg/dl로 약 55%와 56% 정도로 감소 효과를 나타냈다(Table 3).

B(a)P 투여로 증가된 간조직 중 총 cholesterol 함량은 텍사 추출액의 전처리, 후처리로 모두 유의성 있는 감소를 보였으나, 그 효력에 있어서는 CHCl<sub>3</sub>분획 투여했을때, 전처리와 후처리에서 95.63±6.54mg/g과 93.52±11.67mg/g으로 약 69%와 56% 이상의 효력을 나타냈고, EtOAc 분획의 투여도 80.50±7.55mg/g과 96.33±12.12mg/g으로 전처리에서 63%, 후처리에서 56% 정도의 높은 감소효과를 나타냈다(Table 4).

**Table 1.** Effects of Alismatis Rhizoma extracts on serum triglyceride levels against B(a)P-induced liver damage in rats.

Treatment	EtOAc	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub> :Methanol	Methanol
Normal	59.03±3.21 <sup>1)</sup>	55.33±2.45	40.10±3.54	47.16±2.04
B(a)P	202.87±5.43 <sup>a</sup>	202.87±5.43 <sup>a</sup>	196.83±15.49 <sup>a</sup>	93.83±15.49 <sup>a</sup>
Alismatis	61.94±8.71 <sup>b</sup>	55.94±10.45 <sup>b</sup>	77.16±1.36 <sup>a,b</sup>	72.39±8.10 <sup>b</sup>
Alismatis→B(a)P <sup>2)</sup>	70.80±1.15 <sup>a,b</sup>	62.40±13.82 <sup>b</sup>	120.00±8.06 <sup>a,b,c</sup>	110.49±5.39 <sup>a,b,c</sup>
B(a)P→Alismatis <sup>3)</sup>	77.42±11.07 <sup>b</sup>	100.00±9.94 <sup>a,b</sup>	103.80±0.96 <sup>a,b,c</sup>	118.60±0.76 <sup>a,b,c</sup>

<sup>1)</sup>mg/dl <sup>2)</sup>Alismatis Rhizoma extracts were given orally to rats once a day for a week Prior to B(a)P administration. <sup>3)</sup>After single B(a)P administration, extracts were given once a day for a week. Each value represents Mean±S.D.(n=6). Within the same column, different superscripts represent significant difference(p<0.05).

**Table 2.** Effects of Alismatis Rhizoma extracts on liver triglyceride levels against B(a)P-induced liver damage in rats.

Treatment	EtOAc	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub> :Methanol	Methanol
Normal	113.89±5.50 <sup>1)</sup>	133.33±0.00	94.29±2.02	94.29±2.02
B(a)P	336.11±22.05 <sup>a</sup>	336.11±22.05 <sup>a</sup>	215.00±1.00 <sup>a</sup>	215.00±1.00 <sup>a</sup>
Alismatis	117.22±27.22 <sup>b</sup>	148.41±40.61 <sup>b</sup>	122.86±12.12 <sup>b</sup>	111.43±14.14 <sup>b</sup>
Alismatis→B(a)P <sup>2)</sup>	154.00±12.61 <sup>b</sup>	225.60±12.50 <sup>a,b</sup>	160.72±5.06 <sup>a</sup>	160.00±4.04 <sup>a,b,c</sup>
B(a)P→Alismatis <sup>3)</sup>	197.41±18.55 <sup>a,b</sup>	196.43±17.86 <sup>b</sup>	157.15±10.10 <sup>a,b</sup>	145.72±14.15 <sup>a,b</sup>

<sup>1)</sup>mg/dl <sup>2)</sup>Alismatis Rhizoma extracts were given orally to rats once a day for a week Prior to B(a)P administration. <sup>3)</sup>After single B(a)P administration, extracts were given once a day for a week. Each value represents Mean±S.D.(n=6). Within the same column, different superscripts represent significant difference(p<0.05).

**Table 3.** Effects of *Alismatis Rhizoma* extracts on serum total cholesterol levels against B(a)P-induced liver damage in rats.

Treatment	EtOAc	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub> :Methanol	Methanol
Normal	34.67±3.00 <sup>1)</sup>	55.00±0.47	49.88±0.57	49.88±0.57
B(a)P	134.00±5.03 <sup>a</sup>	146.17±22.41	111.09±1.15 <sup>a</sup>	111.09±1.15 <sup>a</sup>
<i>Alismatis</i>	52.50±7.09 <sup>b</sup>	58.40±5.90	61.62±4.58 <sup>b</sup>	64.86±3.24 <sup>a,b</sup>
<i>Alismatis</i> →B(a)P <sup>2)</sup>	64.67±5.48 <sup>b</sup>	65.57±6.35 <sup>b</sup>	79.47±2.33 <sup>a,b,c</sup>	59.46±15.90 <sup>b</sup>
B(a)P→ <i>Alismatis</i> <sup>3)</sup>	75.00±0.58 <sup>a,b</sup>	63.93±0.62 <sup>a,b</sup>	76.26±6.87 <sup>a,b</sup>	57.57±8.42 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>mg/dl <sup>2)</sup>*Alismatis Rhizoma* extracts were given orally to rats once a day for a week Prior to B(a)P administration. <sup>3)</sup>After single B(a)P administration, extracts were given once a day for a week. Each value represents Mean±S.D.(n=6). Within the same column, different superscripts represent significant difference(p<0.05).

**Table 4.** Effects of *Alismatis Rhizoma* extracts on liver total cholesterol levels against B(a)P-induced liver damage in rats.

Treatment	EtOAc	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub> :Methanol	Methanol
Normal	53.50±3.78 <sup>1)</sup>	83.44±0.56	63.79±0.03	63.79±0.03
B(a)P	222.00±9.87 <sup>a</sup>	216.57±19.57 <sup>a</sup>	241.36±6.96 <sup>a</sup>	241.36±6.96 <sup>a</sup>
<i>Alismatis</i>	89.67±5.03 <sup>a,b</sup>	87.19±2.81 <sup>b</sup>	80.66±9.74 <sup>a,b</sup>	66.87±0.02 <sup>a,b</sup>
<i>Alismatis</i> →B(a)P <sup>2)</sup>	80.50±7.55 <sup>a,b</sup>	95.63±6.54 <sup>b</sup>	118.36±0.57 <sup>a,b,c</sup>	157.44±0.08 <sup>a,b,c</sup>
B(a)P→ <i>Alismatis</i> <sup>3)</sup>	96.33±12.12 <sup>a,b</sup>	93.52±11.67 <sup>b</sup>	167.67±3.48 <sup>a,b,c</sup>	118.04±13.91 <sup>a,b,c</sup>

<sup>1)</sup>mg/dl <sup>2)</sup>*Alismatis Rhizoma* extracts were given orally to rats once a day for a week Prior to B(a)P administration. <sup>3)</sup>After single B(a)P administration, extracts were given once a day for a week. Each value represents Mean±S.D.(n=6). Within the same column, different superscripts represent significant difference(p<0.05).

**Table 5.** Effects of *Alismatis Rhizoma* extracts on serum HDL-cholesterol levels against B(a)P-induced liver damage in rats.

Treatment	EtOAc	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub> :Methanol	Methanol
Normal	30.60±6.62 <sup>1)</sup>	28.45±0.75	22.89±6.71	22.89±6.71
B(a)P	28.80±3.67	22.03±2.95 <sup>a</sup>	15.66±3.41	15.66±3.41
<i>Alismatis</i>	34.39±7.78	28.52±4.32	22.49±3.68	26.20±4.66
<i>Alismatis</i> →B(a)P <sup>2)</sup>	30.56±4.70	15.29±1.73 <sup>a,b,c</sup>	20.08±4.08	20.61±0.86
B(a)P→ <i>Alismatis</i> <sup>3)</sup>	27.86±3.23	20.00±1.14 <sup>a,c</sup>	21.15±2.86	20.18±1.54

<sup>1)</sup>mg/dl <sup>2)</sup>*Alismatis Rhizoma* extracts were given orally to rats once a day for a week Prior to B(a)P administration. <sup>3)</sup>After single B(a)P administration, extracts were given once a day for a week. Each value represents Mean±S.D.(n=6). Within the same column, different superscripts represent significant difference(p<0.05).

#### 혈청 HDL-cholesterol 함량 변화

B(a)P 0.1mg/kg을 i.p. 투여로 normal군에 비해 혈청 HDL-cholesterol의 감소를 가져오기는 했으나, 유의성 있는 감소를 보인 경우는 CHCl<sub>3</sub>분획 투여의 경우이며, 이에 대한 텍사 추출액의 투여가 혈청 HDL-cholesterol 함량 변동에 별 영향을 미치지 않

았다. 그런데 CHCl<sub>3</sub>분획 투여의 경우를 제외하고는 유의성은 없지만 B(a)P투여로 감소한 HDL-cholesterol함량이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다 (Table 5).

간독성 물질에 대한 여러가지 비특이성 protective mechanism으로는 간세포 자체가 외부 독성물질에 대해 저항할 수 있는 세포의 재생성의 촉진과 reti-

culoendothelial system의 기능과 단백질 생합성의 활성화 등을 들수 있다.<sup>14)</sup>

## 결 론

한방에서 널리 쓰고 있는 생약 중 하나인 택사가 이뇨, 항염증작용뿐만 아니라 항지간 작용도 한다<sup>15)</sup>는 사실에 근거하여 강력한 carcinogenic mutagen인 B(a)P을 rat에 복강내 투여하여 실험적 간장해를 유발시켜 병태 model을 만들고, 택사를 용매 극성별로 추출하여, 그 간장해 효과를 screening할 목적으로 혈청과 간조직의 지질 함량 변동을 관찰하였다.

B(a)P의 투여로 혈청과 간의 지질 함량은 대조군에 비해 유의성 있게 변화하였다. 본 실험에서 4가지 분획중 특히 CHCl<sub>3</sub>분획 투여는 B(a)P로 인한 실험적 간장해의 parameter중 혈청과 간조직의 지질 함량 변동에 큰 영향을 나타냈다. 따라서 택사는 간보호제로서의 가능성도 크며, 그 활성성분의 규명에는 앞으로 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. a)Murata T., Imai Y., Hirata T. and Miyamoto M. Biological-Active Triterpenes of Alismatis Rhizoma. I. Isolation of the Alisols, Chem. Pharm. Bull., 18(7), 1347, 1970; b)Murata T. and Miyamoto M., Biological-Active Triterpenes of Alismatis Rhizoma. II. The structures of Alisol A and Alisol A Monoacetate, Chem. Pharm. Bull., 18(7), 1354, 1970; c)Kamiya K., Murata T. and Nishikawa M., Biological-Active Triterpenes of Alismatis Rhizoma. III. The X-Ray Crystallography of Alisol A(23, 24)-Acetonide 11-Monobromoacetate, Chem. Pharm. Bull., 18(7), 1362, 1970; d)Murata T. Shinohara M. and Miyamoto M., Biological-Active Triterpenes of Alismatis Rhizoma. IV. The structures of Alisol B and Alisol B Monoacetate and Alisol C Monoacetate--Some reactions of the -Hydroxy Epoxide of the Alisol B Derivatives, Chem. Pharm. Bull., 18(7), 1369, 1970
2. a)Kobayashi T., Studies on Lipid Metabolism. II. Manufacture of Lipotropic Substances from Alisma platago L., Yakugaku Zasshi, 80, 1456, 1960; b)Kobayashi T., Studies on Lipid Metabolism. III. Lipotropic Effect of Alisma platago L. Extract, Yakugaku Zasshi, 80, 1460, 1960; c)Kobayashi T., Studies on Lipid Metabolism. IV. Several biological criteria of Alisma platago L. Extract, Yakugaku Zasshi, 80, 1465, 1960; d)Kobayashi T., Studies on Lipid Metabolism. VI. Fatty Liver by Hepatotoxic Agents and Lipid Metabolism in rats. Carbon Tetrachloride-injured Fatty Liver, Yakugaku Zasshi, 80, 1612, 1960
3. a)Yoshikawa M., Hatakeyama S., Tanaka N., Fukuda Y., Murakami N. and Yamahara J., Orientalols A, B, and C, Sesquiterpene Constituents from Chinese Alismatis Rhizoma and Revised Structures of Alismol and Alismoxide, Chem. Pharm. Bull., 40(9), 2582, 1992; b)Yoshikawa M., Fukuda Y., Hatakeyama S., Tanaka N., Matsuda H., Yamahara J. and Murakami N., Sulfoorientalols A, B, C and D, Four New Biologically Active Sesquiterpenes from Alismatis Rhizoma, Chem. Pharm. Bull., 41(6), 1194, 1994; c)Yoshikawa M., Hatakeyama S., Tanaka N., Fukuda Y., Murakami N., Yamahara J. and Murakami N., Crude Drugs from Aquatic Plants I. On the Constituents of Alismatis Rhizoma. (1). Absolute Stereostructures of Alisols E 23-Acetate, F, and G, Three New Prostate-Type Triterpenes from Chinese Alismatis Rhizoma, Chem. Pharm. Bull., 41(11), 1948, 1993; d)Yoshikawa M., Hatakeyama S., Tanaka N., Matsuoka T., Yamahara J. and Murakami N., Crude Drugs from Aquatic Plants. II. On the Constituents of the Rhisomes of Alisma orientale Jujep. Originating from Japan, Taiwan and China. Absolute Stereostructures of 11-Deoxyalisols B and B 23-Acetate, Chem. Pharm. Bull., 41(12), 2109, 1994; e)Yoshikawa M., Yamaguchi S., Chatani N., Nishino Y., Matsuoka T., Yamahara J. Murakami N., Matsuda H. and Kobo M., Crude Drugs from Aquatic Plants III. Quantative Analysis of Triterpene Constituents in Alismatis Rhizoma by means of High Performance Liquid Chromatography on the Chemical Change of the Constituents during Alismatis Rhizoma Processing, Chem. Pharm. Bu-

- ll., 41(11), 1948, 1993; f)Yoshikawa M., Hatakeyama S., Tanaka N., Matsuoka T., Yamahara J. and Murakami N. Crude Drugs from Aquatic Plants. II. On the Constituents of the Rhizomes of *Alisma orientale* Juzep. Originating from Japan, Taiwan and China. Absolute Stereostructures of 11-Deoxyalisols B and B 23-Acetate, *Yakugaku Zasshi*, 114(4), 241, 1994; g)Yoshikawa M., Yamguchi S., Hatakeyama S., Matsuda H., Tanaka N., Yamahara J. and Murakami N. Crude Drugs from Aquatic Plants. V. On the Constituents of *Alismatis Rhizoma*. (3). Stereostructures of Water-Soluble Bioactive Sesquiterpenes, Sulfoorientalols a, b, c and d from Chinese *Alismatis Rhizoma*, *Chem. Pharm. Bull.*, 42(12), 2430, 1994
4. Tomoda M., Shimizu N. and Katoh K. New Methods for Identification of *Alismatis Rhizoma* by means of Electrophoresis, Paper Partition Chromatography, and Thin-Layer Chromatography, *Chem. Pharm. Bull.*, 32(7), 2845, 1984
  5. Tomoda M., Gonda R., Shimizu N. and Ohara N., Characterization of an Polysaccharide Having Immunological Activities from the tuber of *Alisma orientale*, *Biol. Pharm. Bull.*, 17(5), 572, 1994
  6. Yamahara J., Matsuda H., Murakami H. and Fujimura H., The Active Principle of *Alismatis Rhizoma* which inhibits Contractile Response in Aorta, *Chem. Pharm. Bull.*, 34(10), 4422, 1986
  7. Harborne J.B. : *Phytochemical Methods*, A guide to modern techniques of plant analysis, 2nd edition, 6, 1973
  8. Folch J., Lee M. and Stanley S.G.H., A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 226, 497, 1957
  9. Muller P. H., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 15, 457, 1977
  10. Richmond V., *Clin. Chem. Biochem.*, 198, 1350, 1973
  11. Lombardi B. and Ugazio G., Serum lipoproteins in rats with carbon tetrachloride induced fatty liver, *J. Lipid Res.*, 6, 498, 1965
  12. Seakins A. and Robinson D. S., The effect of the administration of carbon tetrachloride on the formation of plasma lipoproteins in the rat, *Biochem. J.*, 86, 401, 1963
  13. Maling H.M., Frank A. and Horning M.G., Effect of carbon tetrachloride on hepatic synthesis and release of triglycerides, *Biochim. Biophys. Acta*, 64, 540, 1962
  14. Castro J.A., DeFerreyra E.C., De Castro C. R., Defenos O. M. Diaz Gomez, Gram T. E., Reagan R.L. and Guarino A.M., Studies on the role of protein synthesis in cell injury by toxic agents, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 41, 305, 1977