

우황과 사향의 간세포 보호효과

최영주, 이미경¹, 손여원*, 이흠숙², 김영중¹, 민홍기

국립보건원 생물공학과, ¹서울대학교 약학대학, ²서울산업대학교 식품공학과

Antihepatotoxic Activity of Bezoar Bovis and Moschus

Youngju CHOI, Mikyeong LEE¹, Yeowon SOHN*, Heumsook LEE², Youngchoong KIM¹
and Hongki MIN

Division of Biotechnology, National Institute of Health

¹College of Pharmacy, Seoul National University

²Department of Food Engineering, Seoul National Polytechnic University

(Received July 6, 1996; accepted september 10, 1996)

Abstract - The antihepatotoxic activity of Bezoar Bovis and Moschus was investigated by *in vitro* assay method using galactosamine and carbon tetrachloride-induced cytotoxicity in primary-cultured rat hepatocytes. The antihepatotoxic activity was evaluated by measuring the level of glutamate pyruvate transaminase and sorbitol dehydrogenase which were released from the necrotic hepatocytes to the culture medium. In galactosamine-intoxicated hepatocytes, the chloroform fraction of Bezoar Bovis reduced the level of glutamate pyruvate transaminase and sorbitol dehydrogenase resulting in 65% and 59% protection, respectively. The *n*-Hexane fraction of Moschus resulted in 45% and 40% protection, respectively in this system. In the case of carbon tetrachloride-intoxicated rat hepatocytes, Bezoar Bovis did not have significant effect and only the aqueous fraction of Moschus showed 42% and 40% protection, respectively.

Keywords □ antihepatotoxic activity, galactosamine, carbon tetrachloride, Bezoar Bovis, Moschus, primary-cultured rat hepatocytes

한방에서 금·만성간염 및 간경화증의 치료제로 쓰이고 있는 편자환으로부터 간세포 보호작용을 나타내는 성분을 찾아내기 위하여 일차적으로 구성생약 중에서 우황(Bezoar Bovis)과 사향(Moschus)의 간세포 보호효과를 일차 배양한 흰쥐의 간세포를 이용하여 알아보았다.

우황은 소의 담낭 중에 생긴 결석으로 담즙색소 bilirubin, cholesterol, cholic acid, deoxycholic acid, carotenoids, cystine, cysteine 등으로 구성되어 있고 적혈구 신생 촉진작용, 진정작용, 강심작용, 혈압상승 및 강하작용, 이담작용, 진경작용 등이 있으며 실험적 혈전증 유발로 인한 허혈성 심장장애에 대한 효과(Kubo 등, 1984) 및 불규칙한 심장박동에 대한 개선효과(Takahashi 등, 1989) 등이 보고되어 있고 진경, 진정, 해열, 해독 강심약으로 사용되어 왔다. 사향은 사향노루 수컷의 사향선(musk sac, pod)분비물을 건조한 것으로 유효성분은 muscone이며 그밖에 cholesterol, calcium phosphate, ammonium carbonate, 지방, 무

기질, 섬유질 등이 함유되어 있고 강심작용, 항염증작용, β-adrenaline 효과증강작용, 모세혈관 투과성 항진억제작용, 항트롬빈작용 등이 있으며 흥분, 강심, 강장, 진정, 진경, 배농 해독약으로 쓰여왔다(한대석, 1988; 한덕용, 1989).

간세포 보호작용은 흰쥐의 간세포를 2단계 collagenase 관류방법으로 분리하여 일차배양한 후 galactosamine 및 사염화탄소로 세포손상을 유발시키고 우황 및 사향의 total methanol extract 및 *n*-hexane, chloroform, *n*-butanol, 물 분획물을 첨가하여 간세포의 괴사를 어느 정도 회복시키는가를 측정하여 검색하였다. 회복정도는 배양액을 취하여 간세포로부터 배양액 중으로 유리되어 나오는 glutamate pyruvate transaminase(GPT) 및 sorbitol dehydrogenase(SDH)의 활성을 측정하여 판단하였다.

실험방법

실험동물

실험에 사용한 흰쥐(Wistar, male, 150~200 g)는 국립보건안전연구원 무균동물실에서 공급받아 온도 23±2℃, 습

* To whom correspondence should be addressed.

도 55±10%로 유지하면서 12시간 간격으로 명암을 바꾸어 주면서 사육하였다.

생약 및 시약

실험에 사용한 우황 및 사향은 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 생약추출용 methanol과 분획용 *n*-hexane, chloroform, *n*-butanol 및 물은 시약용 1급을 사용하였다. L-alanine, amphotericin B, bovine serum albumin (fraction V), collagen, collagenase, dexamethasone, dimethyl sulfoxide (DMSO), insulin, L-serine, urethane 등은 Sigma Chemical Company (U.S.A)제품을 사용하였고 fetal bovine serum, Hank's balanced salt solution (HBSS), trypan blue solution, Waymouth's MB 752/1은 GIBCO (U.S.A)제품을 사용하였다.

생약시료의 제조

우황 및 사향을 건조, 세절한 것을 각각 10 g씩 80% methanol 200 ml로 상온에서 초음파로 3시간씩 3회 반복추출한 후, 여과 및 감압농축하여 total methanol extract를 제조하였다. 이것을 Fig. 1과 같이 분획하여 *n*-hexane, chloroform, *n*-butanol 및 물의 4개 분획물을 제조하였다. 각각의 분획물은 Speed Vac (Savant, U.S.A)을 이용하여 건조시키고 물 및 DMSO에 용해시켜 시료로 제조하였다.

흰쥐의 간세포 배양

간세포는 Berry와 Friend의 방법(Berry와 Friend, 1969)을 약간 수정한 2단계 collagenase 관류방법으로 분리하였다 (Berry 등, 1991; Kleiman 등, 1979).

배양조건

세포현탁액을 얻은 후 5×10⁵ cells/ml이 되도록 희석하고 collagen으로 도포한 배양용기에 이식한 후 일정한 습도를 유지하는 37℃ 배양기(Sanyo, Japan)에서 5% CO₂/95% air의 혼합기체를 계속 공급하면서 간세포를 배양하였다. 배양액은 Waymouth's MB 752/1 medium, 10% fetal bovine serum, 2.0 mg/ml bovine serum albumin(fraction V),

10⁻⁶ M dexamethasone, 10⁻⁷ M insulin, 5.32×10⁻³ M L-serine, 4.09×10⁻² M L-alanine, 2.67×10⁻² M NaHCO₃, 10,000 IU/100 ml penicillin G, 10,000 IU/100 ml streptomycin과 500 µg/100 ml amphotericin B 로 구성된 것을 사용하였다.

Galactosamine에 의한 간독성 유도

간세포를 배양한 지 3시간이 지난 후 1.5 mM galactosamine이 첨가된 배양액으로 갈아주고 14시간동안 배양하여 세포독성을 유도하였다(Kiso 등, 1983a).

사염화탄소에 의한 간독성 유도

간세포를 배양한 지 3시간 후에 새로운 배양액으로 갈아주고 24시간동안 더 배양한 다음, 10 mM 사염화탄소를 첨가한 배양액으로 갈아주고 1.5시간 동안 배양하여 세포독성을 유도하였다(Kiso 등, 1983b).

간세포 보호효과의 검색

galactosamine(1.5 mM)을 14시간 동안 처리한 후 새 배양액으로 갈아주고 생약시료를 100 µg/ml의 농도로 투여하여 24시간 배양하였다. 사염화탄소(10 mM)와 동시에 생약시료를 100 µg/ml의 농도로 첨가하여 1.5시간 동안 반응시켰다. 각각의 배양액을 취하여 배양액으로 유리된 GPT 및 SDH의 활성을 측정하였다.

Glutamate pyruvate transaminase(GPT) 활성 측정

배양액중의 GPT의 활성은 Reitman-Frankel의 방법 (Reitman과 Frankel, 1957)을 이용하여 측정하였다.

Sorbitol dehydrogenase(SDH) 활성 측정

배양액중의 SDH의 활성은 Gerlach의 방법(Gerlach, 1965)을 이용하여 측정하였다.

실험결과

Galactosamine으로 유도된 간독성에 대한 우황과 사향 분획물의 효과

Galactosamine으로 독성이 유발된 간세포에 우황과 사향 분획물을 투여하고 간세포로부터 배양액 중으로 유리되는 GPT 및 SDH 값을 측정한 결과 우황의 chloroform 분획물과 사향의 *n*-hexane 분획물이 그 값을 낮추어 줌으로써 정상 간세포에 대하여 우황은 65%와 59%, 사향은 45%와 40%의 보호효과를 나타내었다. 극성 용매인 *n*-butanol과 물 분획물에서는 두 생약 모두 거의 효과가 없었던데 비하여 비극성 용매인 *n*-hexane과 chloroform 분획물에서 상대적으로 높은 효과를 보였다(Table I).

사염화탄소로 유도된 간독성에 대한 우황과 사향 분획물의 효과

사염화탄소로 간독성을 유발하고 GPT 및 SDH 값을 측정하여 간세포 보호효과를 비교한 결과 우황의 *n*-butanol 분획물이 29%와 21%, 물 분획물이 24%와 25%로 효과가 낮게 나타났으며 사향의 물 분획물이 42%와 40%의 보호

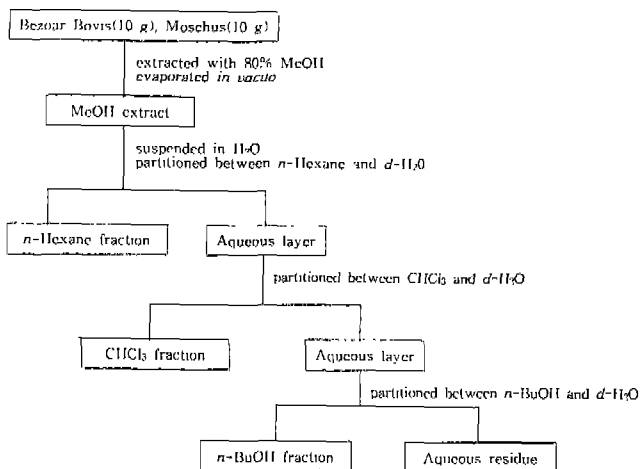


Fig. 1. The extraction and fractionation of Bezoar Bovis and Moschus.

Table I. Effects of fractions of Bezoar Bovis and Moschus on GPT and SDH in galactosamine-intoxicated primary cultured rat hepatocytes^{a)}

Substances (100 µg/ml)	Protection (%) ^{d)}			
	Bezoar Bovis		Moschus	
	GPT	SDH	GPT	SDH
Total methanol extract	9.1	8.2	16.1	17.1
<i>n</i> -Hexane Fraction	36.9	32.6	45.4	40.3
CHCl ₃ Fraction	64.9	59.2	30.9	31.3
<i>n</i> -BuOH Fraction	9.0	15.2	-	-
H ₂ O Fraction	7.7	6.0	2.1	-
Vehicle control ^{b)}	100	100	100	100
Control ^{c)}	0	0	0	0

^{a)}After preculture (3 hr), hepatocytes were exposed to medium containing 1.5 mM galactosamine for 14 hr. After then, the medium was replaced with a fresh medium and a sample. After 24 hr further incubation, GPT and SDH values in the medium were measured.

^{b)}Vehicle control is the value of hepatocytes which were not challenged with galactosamine. The values of vehicle control of GPT and SDH were 29.2±1.5 IU/L and 3.0±0.1 Unit/ml, respectively.

^{c)}Control is the value of hepatocytes which were challenged with galactosamine and not treated. The control values of GPT and SDH were 85.3±1.6 IU/L and 41.2±0.2 Unit/ml, respectively.

^{d)}The % of protection is calculated as 100×(GPT or SDH values of Control - GPT or SDH values of Sample)/(GPT or SDH values of Control - GPT or SDH values of Vehicle control)

효과를 나타내었다(Table II).

고찰

우황(Bezoar Bovis)과 사향(Moschus)을 80% methanol로 추출하여 total methanol extract를 제조하고 이를 물에 현탁시킨 후 *n*-hexane, chloroform, *n*-butanol의 순서대로 극성을 높여가면서 분획하여 각 분획물의 간세포 보호작용을 검색하였다. 간세포 보호효과는 galactosamine 및 사염화탄소로 세포손상을 입은 일차배양세포에 각 분획물을 100 µg/ml의 농도로 투여한 후 배양액 중으로 유리되는 GPT 및 SDH 값을 측정함으로써 결정하였다.

GPT 및 SDH는 GOT(glutamate oxaloacetate transaminase), alkaline phosphatase, γ-glutamyltransferase 등과 더불어 간질환의 진단에 널리 사용되는 효소로 GPT는 간의 parenchymal cell에만 존재하며 간염이나 간경화 등으로 간세포가 괴사를 입었을 때 유리되어 세포괴사의 정도에 따라 혈장내에서 활성이 증가한다(Price와 Stevens, 1989). SDH는 주로 간과 신장 등의 세포질 및 mitochondria에 존재하며 건강인의 혈청에서는 거의 검출되지 않으므로 간손

Table II. Effects of fractions of Bezoar Bovis and Moschus on GPT and SDH in CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes^{a)}

Substances (100 µg/ml)	Protection (%) ^{d)}			
	Bezoar Bovis		Moschus	
	GPT	SDH	GPT	SDH
Total methanol extract	12.3	9.1	13.0	11.2
<i>n</i> -Hexane Fraction	15.2	17.3	19.1	13.9
CHCl ₃ Fraction	4.9	7.3	-	1.3
<i>n</i> -BuOH Fraction	29.0	21.2	21.2	19.3
H ₂ O Fraction	23.7	24.6	42.0	39.8
Vehicle control ^{b)}	100	100	100	100
Control ^{c)}	0	0	0	0

^{a)}After preincubation (24 hr) of the isolated rat hepatocytes, the cultured hepatocytes were exposed to medium containing 10 mM CCl₄ and a sample. At 1.5 hr after the CCl₄ challenge, GPT and SDH values in the medium were measured.

^{b)}Vehicle control is the value of hepatocytes which were not challenged with CCl₄. The values of vehicle control of GPT and SDH were 25.3±1.8 IU/L and 2.8±0.1 Unit/ml, respectively.

^{c)}Control is the value of hepatocytes which were challenged with CCl₄ and not treated. The control values of GPT and SDH were 108.3±1.9 IU/L and 48.8±0.2 Unit/ml, respectively.

^{d)}The % of protection is calculated as 100×(GPT or SDH values of Control - GPT or SDH values of Sample)/(GPT or SDH values of Control - GPT or SDH values of Vehicle control)

상의 지표로 사용된다(Gerlach, 1965).

실험결과 우황과 사향 분획물의 간세포 보호효과는 독성 유발물질의 종류에 따라 상이한 결과를 보였다. Galactosamine으로 유도된 간독성에 대하여 우황과 사향 모두 극성이 낮은 *n*-hexane과 chloroform 분획물에서 *n*-butanol과 물 분획물에 비하여 상대적으로 높은 효과를 나타내었다. 사염화탄소로 간독성을 유도한 경우에는 galactosamine의 경우에 비하여 전반적으로 효과가 낮았으며 극성이 높은 물 분획물의 효과가 상대적으로 높았다. 이러한 결과는 galactosamine과 사염화탄소의 간독성유발기전이 다른데서 기인한다고 생각된다.

서로 다른 작용기전을 갖고 있는 galactosamine과 사염화탄소에 대한 각 분획물의 효과가 상반되게 나타남을 볼 때 우황과 사향에 포함되어 있는 여러 성분들이 독성기전에 따라 특이하게 작용하여 독성을 억제시키거나 회복시키는 등의 보호효과를 나타낸다고 추정할 수 있다. 지금까지 알려진 바로는 galactosamine은 기능 및 형태에 있어서 바이러스성 간염과 유사한 간독성을 일으키며 RNA와 단백질의 합성을 억제시키는 물질로 간에서 galactose와 같은 경로를 거쳐 UDP-galactosamine으로 대사되는데 이것은 glycoprotein을 형성할 수 없으므로 uridine만 소모하게 되어 결국 간의 UTP, UDP-sugar들을 고갈시킨다(Medline 등,

1970). 따라서 galactosamine을 사용한 활성검색에서 간세포의 RNA와 단백질 합성정도를 측정함으로써 간세포 보호효과가 이러한 독성기전과 관련이 있는지를 보다 구체적으로 밝힐 수 있을 것이다.

사염화탄소에 의한 독성기전은 사염화탄소가 간의 활면소포체에 존재하는 cytochrome P-450 system에 의하여 trichloromethyl radical($\cdot\text{CCl}_3$)로 대사되어 유발되기 시작하며 trichloromethyl radical은 산소와 결합하여 trichloromethylperoxy radical($\cdot\text{O}_2\text{CCl}_3$)을 형성하거나 불포화지방으로부터 수소원자를 끌어내 lipid radical을 생성하여 지질의 과산화 등을 일으키며 단백질이나 지방과도 공유결합을 형성한다. 한편 이러한 반응성이 높은 radical들은 cytochrome P-450 자체와도 결합하여 소포체내의 이들 효소들을 파괴시킨다(Gravela 등, 1979; Ballantyne 등, 1993). 따라서 이와 같이 사염화탄소의 대사과정에 관계하는 여러가지 매개물질들, 즉, 지질 과산화의 지표물질인 malondialdehyde 생산량, radical scavenger로 작용하는 superoxide dismutase의 활성, 세포내의 triglyceride 축적정도, 단백질 합성정도, 간세포내의 cytochrome P-450의 양을 측정하거나 이물질의 대사과정에 중요한 역할을 하는 glutathione-S-transferase의 활성 등을 측정함으로써 각 분획물이 나타내는 보호효과가 어떤 경로를 통하여 이루어졌는지를 추정할 수 있을 것이다.

본 실험결과 간세포손상의 광범위한 지표물질인 GPT와 SDH의 활성은 서로 비슷한 수준으로 검출되므로 이를 일차 검색법으로 하여 보호효과를 나타낸 우황과 사향 분획물에 대하여 위와 같이 여러 각도에서 활성검색을 병행함으로써 보호효과를 나타내는 성분 및 작용기전을 보다 구체적으로 설명할 수 있을 것이다.

우황과 사향 등의 동물생약은 주로 자양, 강장의 목적으로 한방에서 환제나 total extract의 형태로 사용되어 왔으나 total methanol extract 보다는 각각의 분획물에서 독성물질에 따라 특이한 활성을 나타내는 것으로 보아 각각의 성분들이 서로 다른 독특한 약리활성을 갖고 있으며 이 성분들이 서로의 활성에 억제효과를 미칠 수도 있으리라 여겨지므로 성분분리를 통하여 그 약리효과를 더욱 높일 수 있을 것이다. 또한 성분연구를 계속하여 각 성분들의 생리활성기전을 구체적으로 연구할 경우 매우 흥미로운 결과를 얻을 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

- Ballantyne, B., Marrs, T. and Turner, P. (1993). In *General & Applied Toxicology*, Vol. 1, pp. 112, 619-662, Stockton Press, New York
- Berry, M. N., Edward, A. M. and Barritt, G. J. (1991). In *Laboratory technique in biochemistry and molecular biology* (Burdon, R. H. and Knippenberg, P. H., eds.), Vol. 21, pp. 15-58, Elsevier, Amsterdam, New York
- Berry, M. N. and Friend, D. S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* **43**, 506-520
- Gerlach, U. (1965). Sorbitol Dehydrogenase In *Methods of Enzymatic Analysis*(Bergmeyer, H. U., Ed.), pp. 112-117, Verlag Chemic Press, Weinheim, Germany
- Gravela, E., Albano, E., Dianzani, M., Poli, G. and Slater, T. (1979). Effects of carbon tetrachloride on isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **178**, 509-512
- Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. (1983a). Assay method for antihepatotoxic activity using galactosamine-induced cytotoxicity in primary-cultured hepatocytes. *J. Nat. Prod.* **46**, 841-847
- Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. (1983b). Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Planta Medica.* **49**, 222-225
- Kleiman, H. K., Mcgoodwin, E. B., Rennard, S. and Hartin, G. R. (1979). Preparation of collagen substrates for cell attachment. *Anal. Biochem.* **94**, 308-312
- Kubo, M., Matsuda, H. and Arichi, S. (1984). Pharmacological study on animal crude drugs(I). *Shoyakugaku Zasshi* **38**, 59-64
- McDline, A., Schaffner, F. and Popper, H. (1970). Ultrastructural features of galactosamine-induced hepatitis. *Exp. Mol. Pharmacol.* **12**, 201-211
- Price, N. C. and Stevens, L. (1989). In *Fundamentals of Enzymology*. pp. 454-455, Oxford University Press, New York
- Reitman, S. and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 56-63
- Takahashi, K., Azuma, J., Park, S., Awata, N., Kishimoto, S., Namba, T. and Shaffer, S. W. (1989). Pharmacological study of a traditional chinese medicine. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **63**, 317-330
- 한대석 (1988). 생약학. pp. 415-416, 419-420, 동명사, 서울
- 한덕용 (1989). 현대생약학. pp. 319-320, 322-323, 학창사, 서울