

# 吳茱木瓜湯의 自由라디칼 消去活性 및 肝 細胞 保護效果

정옥삼<sup>1)</sup>, 윤용갑<sup>2)</sup>, 김윤철

원광대학교 약학대학 약학과, 태화당한의원<sup>1)</sup>, 원광대학교 한의과대학 방제학교실<sup>2)</sup>

## Abstract

### Free Radical Scavenging and Hepatoprotective Effects of Osumokkya-tang

Jeong Ok-Sam<sup>1)</sup>, Yun Young-Gab<sup>2)</sup>, Kim Youn-Chul

College of Pharmacy, Wonkwang University, Tai-Hwa-Dang Oriental Medicine Clinic<sup>1)</sup>,  
Department of Prescription, in Oriental Medicine Wonkwang University<sup>2)</sup>

In order to find the new hepatoprotective agents preliminary screening of twelve prescriptions which have been used for the treatment of hepatic disease in Oriental traditional medicine has been carried out. Both DPPH free radical scavenging and hepatoprotective effect on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells are performed.

Osumokkya-tang which is one of the prescription belongs to interior-warming properties showed the DPPH free radical scavenging effect as well as hepatoprotective activity significantly. It is also suggested that its hepatoprotective effect is derived from *Chaenomelis Fructus*.

---

Key word : Osumokkya-tang, *Chaenomelis Fructus*, free radical scavenging, hepatoprotective, Hep G2 cells

---

교신저자 : 김윤철

원광대학교 약학대학 약학과

Tel : 063) 850-6823

E-Mail : yckim@wonkwang.ac.kr

접수 : 2005/ 11/ 13

채택 : 2005/ 11/ 25

## I. 緒 論

肝 保護 연구에 사용되는 사염화탄소, 갈락토사민 등의 독성물질은 실제로 사람에게 접촉할 기회가 거의 없는 것들이다. 따라서, 에탄올, 곰팡이 毒 및 肝 毒性 유발 의약품 등을 사용하는 것이 보다 바람직하다고 생각된다. 본 研究에서는 새로운 肝 疾患 치료제 개발을 위한 기초연구의 일환으로서 타크린(1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine hydrochloride)으로 유발한 Hep G2 細胞에 대한 보호효과 및 DPPH 自由라디칼 消去活性을 검색하였다.

타크린은 acetylcholinesterase 阻害劑로서 알츠하이머증후군 치료제로 사용되고 있는 약물이다. 그러나, 이 약물은 投與用量에서 30-50%의 환자에 있어서 可逆性 肝 毒性을 나타내는 副作用을 가지는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. Hep G2 細胞는 不滅化 된 人 肝 癌 細胞로서 일차배양 肝 細胞의 기능을 가진다는 사실이 알려져 있으며<sup>2)</sup>, Hep G2 細胞와 흰쥐 일차배양 肝 細胞는 타크린 誘發 毒性에 대하여 相關性이 인정되고 있다<sup>3)</sup>. 한편, 타크린의 肝 毒性에 대한 작용기작은 아직 명확하게 밝혀지지 않은 상태이지만 酸化的 스트레스가 하나의 원인으로 생각되고 있다<sup>4)</sup>.

自由라디칼은 생체막의 불포화지방산을 공격하여 과산화지질을 유발하며, 이는 노화, 발암, 동맥경화 및 肝 疾患 등과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다<sup>5)</sup>. 따라서, 새로운 自由라디칼 消去能을 가지는 물질의 발견은 의미 있는 것으로 생각된다. 저자 등은 韓方에서 肝 疾患 치료목적으로 이용되고 있는 12종의 처방에 대하여

肝 細胞 보호효과 및 DPPH 自由라디칼 消去活性을 검색하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗材料

#### 1) 試料

실험에 사용한 韓藥材는 2002년 8월 전라북도 익산시 소재 한약건재상에서 구입하였으며, 외부형태 등을 확인하고 細末하여 사용하였다. 試料의 증거표본은 원광대학교 약학대학 표본실에 보관되어 있다.

#### 2) 추출물 및 분획물의 조제

12종의 처방은 Table 1과 같으며 각각 出典에 따른 용량을 정확히 취하여 등근 플라스크에 넣고 3배량의 증류수를 가하여 100℃에서 2시간 가열 추출하였다. 가열이 끝난 후 열시에 여과하고 여액은 감압농축기를 사용하여 건조하고 각각의 물 추출물을 얻었다. 吳茱木瓜湯의 물 추출물은 5배량의 증류수에 녹인 다음 분액깔대기에 넣고 동량의 부탄올을 가하여 진탕한 후 부탄올층과 수층을 각각 농축하여 분획물을 얻었다.

#### 3) Hep G2 細胞

Hep G2 細胞는 한국세포은행에서 구입하여 RPMI 1640 (Sigma사) 배양용액으로 배양하여 실험에 사용하였다.

#### 4) 試藥

Ascorbic acid, 1,1-diphenyl-2-phenylhydrazyl (DPPH), dimethylsulfoxide (DMSO), tacrine은 Sigma사에서, RPMI와 EDTA는 GIBCO Laboratories (Grand Island, NY)에서, FBS는 Hyclone Laboratories사에서 각각 구입하였고, 96 well tissue culture plates는 Nunc사 제품을 사용하였다.

## 2. 實驗方法

### 1) DPPH 라디칼 消去活性 檢索法<sup>6)</sup>

0.1 mM DPPH 에탄올 용액 (1 ml), 에탄올 (1 ml), 0.05 M Tris-HCl 완충용액 (pH 7.4; 0.95 ml)의 혼합용액에 시료 에탄올 용액 (50  $\mu$ l)을 넣고 실온에서 30분간 반응시켜 각 반응액의 吸光度를 517 nm에서 측정하였다. 대조로는 시료 대신 에탄올을 넣어 시료의 吸光度 감소 정도를 검토하였으며, DPPH 라디칼을 50% 消去시키는 시료의 농도를 IC50值로 나타내었다. 시료는 단계별로 희석한 4가지 농도를 이용하였으며, 각각 3회 측정하여 평균치를 구하였다. 陽性 대조약물로는 L-ascorbic acid를 사용하여 DPPH 自由라디칼 消去活性을 비교하였다.

### 2) Hep G2 細胞 保護 活性 檢索法

Hep G2細胞(2  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well)는 10% heat-inactivated FBS, penicillin G (100 IU/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml)을 함유한 RPMI 배양용액을 사용하여 CO<sub>2</sub>배양기 중에서 37 $^{\circ}$ C로 배양하였다. 타크린으로 유발한 독성시험은 MTT법을 이용하여 세포생존율을 계산하였다<sup>7)</sup>. 細胞毒性的 여부는 1 mM의 타크린의 존재 또는 부재(대

조군)하에서 3시간 배양하여 판단하였다. 시료는 완충용액으로 용해하였으며, 4가지 농도 (50, 100, 200, 500  $\mu$ g/ml)로 각각 3회 측정하였다. 결과는 대조군과 비교하여 50%의 세포생존율을 나타내는 시료의 농도를 EC50值로 표시하였다. 陽性 대조약물로는 silybin(Sigma社)을 사용하였고, 결과는 mean  $\pm$  S.D.로 나타냈으며, 통계처리에는 one-way ANOVA test를 사용하였다.

## III. 結果 및 考察

### 1. 한방처방의 抽出率, DPPH 라디칼 消去活性 및 간 세포 보호효과

본 연구에서 사용한 12종의 한방처방은 2시간 열수 추출하였을 때 시료에 따라 抽出率의 차이가 크게 나타났으며, 一貫煎이 33.3 w/w%로 가장 높은 추출율을 나타낸 반면 暖肝煎이 가장 낮은 抽出率(8.6 w/w%)을 보였다 (Table 2). DPPH 라디칼 소거활성은 4종의 처방이 100  $\mu$ g/ml이하의 IC50치를 나타냈으며, 吳茱萸湯, 吳茱萸木瓜湯, 茵陳蒿湯, 清膽利濕湯 물 추출물의 IC50치는 각각 66.31, 66.30, 31.85, 93.09  $\mu$ g/ml이었다(Table 2). 한편, 타크린으로 유발한 간 세포독성에 대해서는 吳茱萸木瓜湯, 龍膽瀉肝湯, 清膽行氣湯이 보호효과를 나타냈으며, 이 중 吳茱萸木瓜湯은 62.7  $\mu$ g/ml의 EC50치가 관찰되었다. 이는 양성 대조약물로 사용한 silybin(EC50 value = 38.4  $\mu$ g/ml)이 단일 화합물임을 고려할 때 吳茱萸木瓜湯의 간 세포 보호효과는 매우 우수한 것으로 판단된다. 이상의 결과로부터 타크린으로 유발되는 간 세포독성에 대한 吳茱

木瓜湯의 보호효과는 항산화작용에 기인하는 것으로 추정된다.

## 2. 吳茱木瓜湯의 간 세포 보호효과

Fig. 1은 吳茱木瓜湯과 이 방제의 구성 약재인 吳茱萸 및 木瓜 물 추출물이 타크린으로 간 독성을 유발시킨 Hep G2세포에 대한 보호효과를 나타낸 것이다. 각 시료의 EC50値를 비교한 결과, 吳茱木瓜湯과 木瓜 물 추출물이 양성 대조약물로 사용한 silybin에 비하여 우수한 간 세포 보호효과를 나타냄을 알 수 있었다. 한편, 吳茱木瓜湯에 함유된 간 세포 보호효과물질을 규명하기 위한 기초연구의 일환으로 吳茱木瓜湯의 분획물에 대한 간 세포 보호효과를 검토하였다(Fig. 2). 吳茱木瓜湯 물 추출물을 증류수에 현탁한 후 부탄올을 가하여 진탕하고, 얻어진 부탄올 층과 수층을 각각 감압농축하여 부탄올 가용부와 물 가용부를 얻었으며, 이들에 대한 간 세포 보호효과를 검정하였다. 그 결과 吳茱木瓜湯의

물 가용부가 부탄올 가용부에 비하여 간 세포 보호효과가 우수함을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 吳茱木瓜湯에 함유된 간 세포 보호효과물질은 극성이 강한 물질임이 추정되었다.

## IV. 結 論

새로운 肝 疾患 치료제 개발을 위한 기초 연구의 일환으로 韓方에서 치료에 이용되고 있는 處方을 중심으로 예비검색을 실시하고 선정된 吳茱木瓜湯에 대하여 타크린으로 毒性을 誘發한 사람 肝 세포 유래 세포주인 Hep G2 細胞에 대한 保護 效果를 검토한 결과 木瓜 물 추출물이 현저한 간 세포 보호효과를 나타냄을 알 수 있었다. 또한, 吳茱木瓜湯에 함유된 간 세포 보호활성이 수층으로 이행되는 것으로부터 활성물질이 극성 또는 고분자물질로 추정되었다.

Table 1. Prescriptions used for the experiment

處方名	構成藥材 (重量: g)	出典
當歸四逆湯	當歸(9), 桂枝(9), 白芍藥(12), 細辛(6), 炙甘草(3), 木通(6), 大棗(9)	傷寒論
吳茱萸湯	吳茱萸(9), 人參(9), 大棗(9), 生薑(9)	傷寒論
吳茱萸木瓜湯	吳茱萸(9), 木瓜(12), 食鹽(2)	驗方新編
暖肝煎	小茴香(6), 肉桂(6), 烏藥(9), 沈香(3), 當歸(9), 茯苓(9), 生薑(9), 枸杞子(12)	景岳全書
龍膽瀉肝湯	龍膽(9), 生地黃(15), 當歸(9), 柴胡(9), 木通(12), 澤瀉(9), 車前子(12), 梔子(9), 黃芩(12), 甘草(3)	醫宗金鑑
茵陳蒿湯	茵陳蒿(60), 梔子(9), 大黃(9)	傷寒論
清膽行氣湯	柴胡(9), 黃芩(9), 半夏(9), 木香(9), 鬱金(9), 大黃(後下, 9), 枳殼(9), 香附子(9), 玄胡索(9), 白芍藥(15)	中國南開醫阮方
清膽利濕湯	柴胡(9), 黃芩(9), 半夏(9), 木香(9), 鬱金(9), 大黃(9), 車前子(9), 木通(9), 梔子(9), 茵陳蒿(15)	中國南開醫阮方
清膽瀉火湯	柴胡(15), 黃芩(15), 半夏(15), 木香(15), 鬱金(15), 大黃(生, 15), 芒硝(15), 梔子(9), 龍膽(9), 茵陳蒿(30)	天津南開醫阮方
芍歸膠艾湯	川芎(6), 阿膠(9), 甘草(6), 艾葉(9), 當歸(6), 芍藥(18), 乾地黃(30)	金匱要略
四物湯	熟地黃(20), 白芍藥(24), 當歸(12), 川芎(3)	和劑局方
一貫煎	沙參(9), 麥門冬(9), 當歸(9), 生地黃(18), 枸杞子(9), 川楝子(6)	榆州醫活

Table 2. Hot water extraction yields, DPPH free radical scavenging (DFRS) and hepatoprotective activities (HA) of twelve prescriptions

處方名	抽出率 (%)	DFRS (IC <sub>50</sub> : µg/ml)	HA (EC <sub>50</sub> : µg/ml)
當歸四逆湯	12.5	>200	>500
吳茱萸湯	11.5	66.31	>500
吳茱木瓜湯	26.3	66.30	62.7
暖肝煎	8.6	>200	>500
龍膽瀉肝湯	9.7	199.75	472.2
茵陳蒿湯	15.8	31.85	>500
清膽行氣湯	10.0	>200	497.1
清膽利濕湯	8.8	93.09	>500
清膽瀉火湯	16.1	112.03	>500
芎歸膠艾湯	31.8	>200	>500
四物湯	22.3	>200	>500
一貫煎	33.3	>200	>500
L-ascorbic acid	-	0.42	-
Silybin	-	-	38.4

## Figure legends

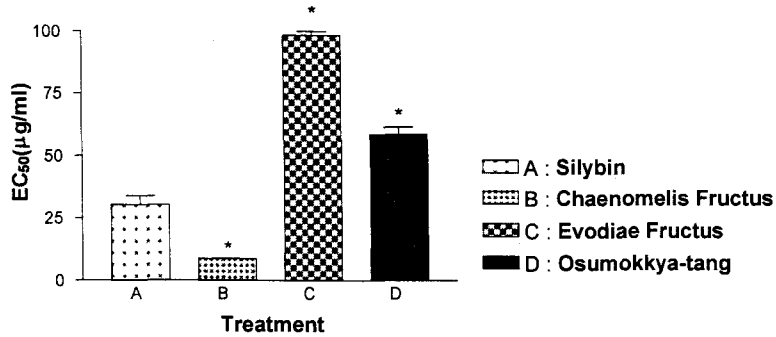


Fig. 1. Hepatoprotective effects of Osumokkya-tang and its components against tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. Data were expressed as the means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \* $P < 0.05$ ; indicates a significant difference from the control.

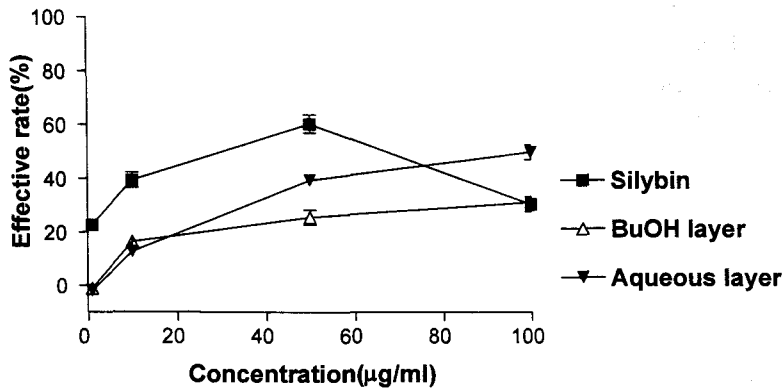


Fig. 2. Hepatoprotective effects of Osumokkya-tang and its fractions against tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. Data were expressed as the means  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

## 參 考 文 獻

1. Watkins P.B., Zimmerman H.J., Knapp M.J. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *J. Am. Med. Assoc.* 271: 992-8 (1994).
2. Grant M.H., Duthie S.J., Gray A.G. Mixed function oxidase and UDP-glucuronyltransferase activities in the human Hep G2 hepatoma cell line. *Biochem. Pharmacol.* 37: 4111-6 (1988).
3. Viau C.J., Curren R.D., Wallace K. Cytotoxicity of tacrine and velnacrine metabolites in cultured rat, dog, and h

- uman hepatocytes. *Drug Chem. Toxicol.* 16: 227-39 (1993).
4. Osseni R.A., Debbasch C., Christen M.O. Tacrine-induced reactive oxygen species in a human liver cell line: the role of anethole dithiolethione as a scavenger. *Toxicol. In Vitro* 13: 683-8 (1999).
  5. Halliwell B., Gutteridge J.M. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and anti-oxidant therapy. *Lancet* 23: 1396-7 (1984).
  6. Kumar V.P., Shashidhara S., Kumar M.M., Sridhara B.Y. Effect of *Luffa echinata* on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. *J. Pharm. Pharmacol.* 52: 891-4 (2000).
  7. Benoit G.G., Naud C.F., Simard M.A. Noninterference of cytochrome P450 1A2 in the cytotoxicity of tacrine using genetically engineered V79 Chinese hamster cells for stable expression of the human or rat isoform and two human hepatocyte cell lines. *Chem. Pharmacol.* 53: 423-7 (1997).