

柴胡 사포닌류(saikosaponins)의 약리작용(II)

—Saikosaponin이 간 대사효소계 및 과산화지질 함량에 미치는 영향—

이 정 식 · 이 정 규 · 최 중 원
경성대학교 약학대학

Pharmacologic Activities of Saikosaponins (II)

—Effects of Saikosaponin on Metabolizing Enzymes and Lipid Peroxide Contents in Liver—

Jeong-sik Lee, Chung Kyu Lee and Jong-Won Choi
College of Pharmacy, Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract—As a part of pharmacological studies of saikosaponins, which were reported to exhibit diverse biological activities especially concerning with liver function, effects of saikosaponin on metabolizing enzymes and lipid peroxide contents in liver were examined. As the result, UDP-glucose dehydrogenase activity and lipid peroxidation which were due to acetaminophen were inhibited by saikosaponin treatment. But other metabolizing enzyme activities were not modified.

Keywords—saikosaponin · liver metabolizing enzyme activities · lipid peroxidation

한방의 주요 생약의 하나인 시호(Bupleuri Radix)에 관한 연구로는 saponin류 및 sterol류 등의 성분과 중추신경억제작용, 항염증작용, 해열작용 및 간기능에 미치는 효과 등의 생리활성에 관한 연구 등이 보고되어 있으며,¹⁻⁷⁾ 이를 토대로 前報⁸⁾에서는 시호성분인 saikosaponin, saikosaponin a 및 saikosaponin d 투여가 acetaminophen의 생체내 변화에 어떤 영향을 주는가를 구명하기 위하여 acetaminophen 대사과정에서 phase I 및 phase II 단계에 작용하는 간 transaminase류와 transferase류 및 약물대사효소에 미치는 영향을 검토하였다. 本報에서는 saikosaponin이 기타 간 대사효소계 및 간조직중의 과산화지질 함량에 미치는 영향을 검토하였다.

실험재료 및 방법

시약 및 기구—Acetaminophen, ATP disodium

salt(ATP), NAD, NADPH 및 UDP-glucose sodium salt (UDPG)는 미국의 Sigma사 제품을, malondialdehyde는 미국의 Aldrich사 제품을, thiobarbituric acid와 saikosaponin은 일본의 Wako사 제품을, *p*-nitrophenol은 일본의 Katakayama사 제품을 사용하였고 기타 모든 시약은 실험목적에 합당한 규격품을 사용하였다. 실험에 사용한 기구는 UV-240 spectrophotometer (Shimadzu, model JZ-21), refrigerated centrifuge (Beckman Co.), automatic preparative ultracentrifuge (Hitachi 659-7) 등 이었다.

실험동물의 처치 및 효소원의 제조—前報⁸⁾에서 사용한 바와 같으며 단 105,000×g에서 1시간 원심분리하여 얻은 cytosolic fraction을 sulfotransferase, glutathione S-transferase 및 UDP-glucose dehydrogenase 활성측정 등의 효소원으로 사용하였고 별도의 간조직 마쇄액을 과산화지질 및 acetaminophen의 정량에 사용하

였다.

Sulfotransferase의 활성 측정—Dawsen 등⁹⁾의 방법에 준하여 0.25 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.4)에 기질인 0.25 mM *p*-nitrophenol, 2 mM K₂SO₄, 5 mM ATP, 0.01 mM MgCl₂와 효소액 (20~40 μg의 단백질)을 가하여 반응액이 2.0 ml 되게 하였다. 이 반응액을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 100°C 열탕에 2분간 넣어 반응을 종료시킨 다음 원심분리하여 얻은 상정액에 0.2 M glycine 완충액 (pH 10.4) 2.0 ml를 가하여 400 nm에서 흡광도를 측정하고 검량선에 준해 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 기질을 소실시키는 양을 n mole수로 표시하였다.

Glutathione S-transferase의 활성 측정—Habig 등¹⁰⁾의 방법에 준하여 0.1 M potassium phosphate 완충액 (pH 6.5)에 1 mM의 glutathione, 1 mM의 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 및 효소액 (10~20 μg의 단백질)을 가하여 반응액이 3.0 ml 되게 하였다. 이 반응액을 25°C에서 5분간 반응시킨 후 제단백시약 (20%-trichloroacetic acid)을 가하여 반응을 종료시킨 후 이때 생성된 thioether의 흡광도를 340 nm에서 측정하고 1-chloro-2,4-dinitrobenzene의 mole 흡광계수 (9.6 M⁻¹ cm⁻¹)를 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성하는 1,2-dichloro-4-nitrobenzene의 양을 n mole수로 표시하였다.

UDP-glucose dehydrogenase의 활성 측정—Strominger 등¹¹⁾의 방법에 준하여 50 mM potassium phosphate 완충액 (pH 7.4)에 1.5 mM UDPG, 1 mM NAD 및 효소액 (400~500 μg의 단백질)을 가하여 반응액이 2.0 ml 되게 하였다. 이 반응액을 37°C에서 5분간 반응시킨 후 이때 생성된 NADH의 흡광도를 340 nm에서 측정하고 검량선에 준해 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성하는 NADH의 양을 n mole수로서 나타내었다.

간조직 중 과산화지질의 함량 측정—Ohkawa 등¹²⁾의 방법에 준해 간조직 1 g당 9배량이 1.5% -KCl 용액을 가해 마쇄한 다음 0.4 ml에 8.1% -sodium dodecylsulfate, 20% acetate 완충

액 (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid 1.5 ml를 가하여 반응액이 4.0 ml 되게 한 후 95°C에서 1시간 동안 발색시키고 실온에서 냉각한 다음 반응을 종료시켰다. 여기에 *n*-butanol-pyridine 혼액 (15:1)을 섞은 다음 원심분리하여 홍색의 유기층을 취한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화지질의 함량은 환조직 1 g당 malondi-aldehyde의 n mole수로 나타내었다.

간조직 중 acetaminophen의 정량—Poulsen 등¹³⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 간조직마쇄액 0.5 ml에 10% trichloroacetic acid를 넣어 단백질을 침전시킨 후 원심분리한 후 얻은 상정액에 6 N HCl 0.5 ml, 10% sodium nitrate 1 ml를 가하여 2분간 방치하고 15% sulfamic acid 1 ml를 가한 후 NaOH 2.5 ml를 첨가하여 30분간 방치한 다음 430 nm에서 그 흡광도를 측정하여 표준곡선에 의하여 산출한 농도를 간조직 1 g당 mg수로 표시하였다.

단백질의 정량—단백질의 양은 Lowry 등¹⁴⁾의 방법에 준해 bovine serum albumin을 표준으로 하여 측정하였다.

통계처리—실험자의 통계처리는 Duncan's new multiple range test를 이용하였다.

실 험 결 과

Saikosaponin 투여에 따른 간 sulfotransferase의 활성 변동에 미치는 영향—Saikosaponin의 투여 기간을 달리하면서 간 sulfotransferase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과는 표 I과 같다. 생리 식염수와 saikosaponin을 처리한 대조군과 시료를 투여한 실험군의 효소 활성을 관찰하였을 때 대조군은 1.33±0.10 n moles *p*-nitrophenol/mg protein/min인데 비해 1일 및 3일 투여군에서는 1.4 n moles 정도였으며 5일, 7일 및 10일 투여한 군에서도 대조군의 효소활성이 다소 증가되나 통계적인 유의성은 없었다.

Saikosaponin 투여가 간 glutathione S-transferase 활성에 미치는 영향—생리식염수와 saikosaponin을 주사한 대조군과 실험군에서 간 glutathione S-transferase 활성 변동을 관찰한 결과는 표 II와 같다. 대조군의 효소 활성이

Table I. Change of the hepatic microsomal sulfotransferase activity in rat after scheduled-administration of saikosaponin

| Day | Sulfotransferase activity* (p-nitrophenol n moles/ mg protein/min) |
|-------------|--|
| 0 (Control) | 1.33 ± 0.10 |
| 1 | 1.41 ± 0.11 |
| 3 | 1.42 ± 0.12 |
| 5 | 1.37 ± 0.13 |
| 7 | 1.46 ± 0.14 |
| 10 | 1.48 ± 0.08 |

Rats were injected i.p. daily with saikosaponin (5 mg/kg) for 1, 3, 5, 7 or 10 days, and were sacrificed 24 hrs after the final injection. The assay procedure was described in the experimental methods.

* Values are means±S.D. for six experiments and are not significantly different from control (Day 0).

Table II. Effect of saikosaponin on the hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity in rats

| Treatment ¹⁾ | Glutathione S-transferase activity ²⁾ |
|-------------------------|--|
| Control | 115.1 ± 3.36 |
| Saikosaponin | 112.5 ± 2.09 ³⁾ |

¹⁾ Rats were injected with saikosaponin(5 mg/kg) or saline i.p. daily for seven days, and were decapitated 24 hrs after the final dose.

²⁾ Expressed as conjugated 1,2-dichloro-4-nitrobenzene n moles/mg cytosolic protein/min (means±S.D. for six experiments).

³⁾ Not significantly different from control. The assay procedure was described in the experimental methods.

115.1±3.36 n moles conjugated 1,2-dichloro-4-nitrobenzene/mg protein/min인데 비해 saikosaponin 투여군에서는 112.5±2.09 n moles로서 별다른 효소 활성 변동을 관찰할 수 없었다.

Acetaminophen 투여에 의한 간 **UDP-glucose dehydrogenase** 활성변동에 미치는 **saikosaponin**의 영향—생리식염수를 투여한 대조군과 saikosaponin을 전처리한 실험군에 acetaminophen을 주사한 다음 간 UDP-glucose dehydrogenase 활성 변동을 관찰한 결과는 그림 1

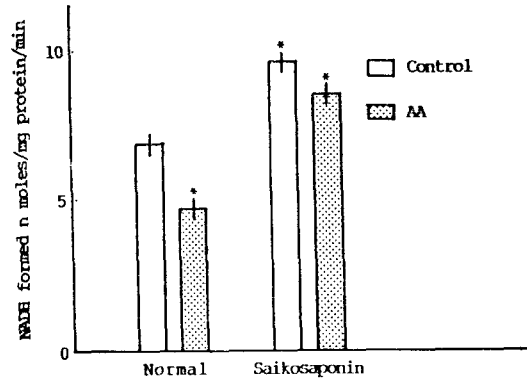


Fig. 1. Effect of saikosaponin on the hepatic cytosolic UDP-glucose dehydrogenase activity in acetoaminophen(AA) treated rats

Rats were injected with saikosaponin (5mg/kg) i.p. daily for seven days and decapitated 24 hrs after acetaminophen (400 mg/kg, p.o.) treatment. The assay procedure was described in experimental methods. Values are means±S.D. for six experiments. Significantly different from normal control (*, p<0.05).

Table III. Effects of saikosaponin on the acetaminophen (AA) level in acetaminophen-treated rats

| Treatments ¹⁾ | AA level | |
|--------------------------|------------|---------------------------|
| | mg/g liver | mg/ml serum ²⁾ |
| Control(AA only) | 0.98±0.08 | 0.34±0.042 |
| Saikosaponin+AA | 0.70±0.34* | 0.21±0.051* |

¹⁾ Rats were treated with saikosaponin(5 mg/kg) or saline i.p. daily for seven consecutive days and were sacrificed 24 hrs after the acetaminophen (400 mg/kg) treatments p.o.

²⁾ Previously published data. See reference 8.

* Significantly different from control (p<0.05).

과 같다. 대조군의 효소 활성이 6.84±0.48 n moles NADH/mg protein/min인데 비해 acetaminophen만을 투여한 실험군은 4.74±0.39 n moles로 대조군에 비해 약 45% 정도의 활성억제 경향이 나타났다. Saikosaponin만을 투여한 실험군과 saikosaponin을 전처리한 다음 acetaminophen을 주사한 실험군의 효소 활성은 각각 9.96±0.48 n moles와 9.21±0.43 n moles로 대조군에 비하여 약 45.6% 및 34.7% 정도의 현저한 활성증가를 볼 수 있었다.

Table IV. Effect of saikosaponin on increase in body weight and relative weights of liver in acetaminophen-treated rats

| Treatments | Wt. increase (g/day) | Relative liver weight (% body weight) | % of Control |
|------------------------------|----------------------|---------------------------------------|--------------|
| Control | 1.27 ± 0.16 | 2.93 ± 0.08 | 100 |
| Acetaminophen | 1.35 ± 0.05* | 3.50 ± 0.24** | 119 |
| Saikosaponin | 1.34 ± 0.04* | 2.89 ± 0.06* | 99 |
| Saikosaponin + Acetaminophen | 1.32 ± 0.06* | 2.96 ± 0.08* | 101 |

Rats were injected saikosaponin (5 mg/kg) or saline i.p. daily for seven days and acetaminophen (400 mg/kg, i.p.) was treated 24 hrs after the final injection of sample. The animals were sacrificed 24 hrs after acetaminophen treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means ± S.D. (n=6)

*; not significant and **; significant from control ($p < 0.05$).

간조직 중의 acetaminophen 농도에 미치는 saikosaponin의 영향—Saikosaponin과 생리식염수를 전처리한 실험군과 대조군에 있어서의 간조직중 acetaminophen 양을 측정 한 결과는 표 III 같다. 간조직중에서의 acetaminophen의 양은 혈중 acetaminophen의 양과 마찬가지로,⁸⁾ 대조군의 경우 0.98 ± 0.076 mg/g liver에 비해 saikosaponin 전처리군에서는 0.70 ± 0.13 mg/g으로 약 40% 정도 감소함을 알 수 있었다.

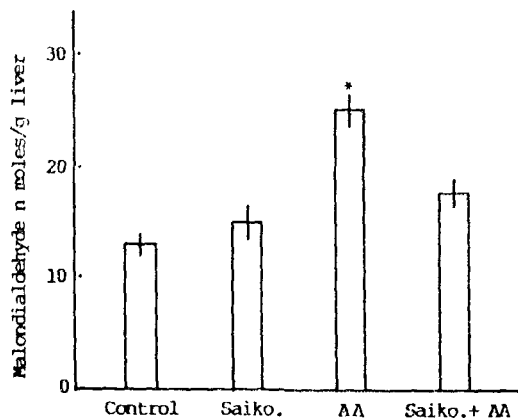


Fig. 2. Effect of saikosaponin on the formation of lipid peroxide in acetaminophen treated rat livers

Rats were injected with saikosaponin (Saiko., 5 mg/kg) i.p. daily for seven days and decapitated 24 hrs after acetaminophen (AA, 400 mg/kg) p.o. treatment. The assay procedure was described in experimental methods. Significantly different from control (*, $p < 0.05$).

Saikosaponin이 acetaminophen 투여에 의한 체중과 간중량의 변화에 미치는 영향—Saikosaponin을 전처리한 실험군과 생리식염수를 주사한 대조군에 acetaminophen을 복강내로 투여하여 체중과 간 무게를 비교 관찰한 결과는 표 IV에 나타난 바와 같다. 표에서 알 수 있듯이 각 실험군에서의 체중비의 변화는 대조군에 비하여 각 실험군에서 유의성 있는 증가를 관찰할 수 없었으며, 한편 간 무게를 체중 kg당 상대적 중량으로 환산한 비율의 변화를 보았을 때, acetaminophen 투여군에서는 3.50 ± 0.24 g으로 대조군의 2.93 ± 0.08 g에 비해 약 20%의 증가를 관찰할 수 있었고 saikosaponin을 전처리한 다음 acetaminophen을 투여한 군에서는 2.96 ± 0.09 g으로 유의적 변화를 볼 수 없었다.

Saikosaponin이 acetaminophen 투여에 의한 간조직 중의 과산화지질 함량에 미치는 영향—Saikosaponin을 전처리한 실험군과 생리식염수를 주사한 대조군에 acetaminophen을 투여한 후 간조직중의 과산화지질 함량에 어떤 영향을 미치는가를 검토한 결과는 그림 2와 같다. 생리 식염수만을 투여한 대조군의 malondialdehyde 함량이 13.7 ± 0.69 n moles/g tissue인데 비해 acetaminophen 투여군에서는 26.9 ± 3.13 n moles로 약 2배 정도 증가되었으며 saikosaponin을 전처리한 다음 acetaminophen을 주사한 실험군에서는 17.1 ± 1.04 n moles로 별다른 차이를 볼 수 없었으므로 지질과산화가 억제됨을 알 수 있

었다.

고 찰

일반적으로 체내에 흡수된 약물을 포함한 이 물질들은 주로 간장에서 대사되어 활성을 잃게 되는 점^{15,16)}을 감안하여 saikosaponin의 간 해독 작용기전을 연구할 일련의 실험중 sulfotransferase 활성, glutathione S-transferase 활성, UDP-glucose dehydrogenase 활성 및 간조직중의 과산화지질과 acetaminophen의 농도에 미치는 saikosaponin의 영향 등을 관찰하였다. 실험의 결과를 보면 sulfotransferase 활성에 미치는 saikosaponin의 영향에서는 유의성있는 변화를 보이지 않았으며 acetaminophen의 중독량을 투여하고 간조직내 acetaminophen의 농도 변화를 관찰한 실험에서 생리식염수를 투여한 대조군에 비해 saikosaponin을 7일간 전처리한 군에서 acetaminophen의 조직내 농도가 현저히 감소됨을 알 수 있었다. Acetaminophen을 과량 투여한 조건하에서 sulfotransferase 및 UDP-glucuronic acid(UDPGA)의 생성과정에 관여하는 UDP-glucose dehydrogenase¹⁷⁻¹⁹⁾의 활성억제가 saikosaponin의 전처리로 정상화되는 것은 UDPGA를 매개로 하는 효소 중 UDP-glucuronyltransferase에 선택적으로 작용하여 나타나는 결과로 예측된다. 체내에서 생성된 acetaminophen의 반응성 대사물질은 다시 glutathione S-transferase에 의하여 glutathion과 포합반응물을 형성하여 무독화되고²⁰⁻²²⁾ 따라서 약물대사 효소계중 포합효소인 glutathione S-transferase의 활성 변동에 관련된 본 실험에서 saikosaponin 투여가 별다른 활성변화를 나타내지 않았다는 것은 saikosaponin은 acetaminophen이 유도하는 간독성에 경감 혹은 예방효과를 나타낸다고 생각할 수 없다. 한편 saikosaponin을 전처리한 후 acetaminophen을 투여했을 때 간장의 무게에 어떤 영향이 있는가를 보았을 때 acetaminophen의 투여로 간장의 무게가 대조군에 비해 증가되던 현상이 saikosaponin 전처리로 정상수준으로 감소되었으며 acetaminophen에 의해 증가되던 지질과산화합량이 감소됨을 관찰할 수 있었다.

이상의 실험결과를 종합하여 볼 때 saikosaponin 투여에 의한 약물대사효소의 활성증가 작용기전은 saikosaponin류의 직접 작용이라기 보다는 이들의 대사산물에 의하여 나타나는 것으로 추측된다.

결 론

Saikosaponin의 해독기전을 추구할 목적으로 약물대사양식중 phase II 단계에 관여하는 UDP-glucose dehydrogenase, sulfotransferase 및 glutathione S-transferase의 활성에 어떤 영향을 주는가를 검토하는 한편, acetaminophen의 중독량을 투여한 실험동물에서 saikosaponin의 작용을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Saikosaponin의 투여로 sulfotransferase 및 glutathione S-transferase 활성에는 영향을 미치지 않았다. Saikosaponin을 전처리한 다음 acetaminophen을 투여했을 때 조직중 acetaminophen의 농도가 감소하였으며 acetaminophen에 의해 감소되던 UDP-glucose dehydrogenase의 활성이 saikosaponin의 전처리로 증가되었다. 실험결과로서 나타난 대사활성의 증가 혹은 간기능 보호작용은 saikosaponin류의 대사산물에 의한 것임이 추정되며 이들 대사산물에 의한 작용양식의 검토가 필요하다.

〈1993년 5월 1일 접수 : 5월 25일 수리〉

참 고 문 헌

1. Shibata, S., Kitagawa, I. and Fujimoto, H.: *Chem. Pharm. Bull.* 14, 1023 (1966).
2. Kubota, T., Tonami, F. and Hinoh, H.: *Tetrahedron*, 23, 3333 (1967).
3. Kubota, T. and Hinoh, H.: *Tetrahedron Lett.* 303 (1968).
4. Shibata, M.: *Yakagaku Zasshi* 90, 398 (1970).
5. Abe, H., Sakaguchi, M., Yamada, M., Arichi, S. and Odashima, S.: *Planta Med.* 40, 366 (1980).
6. Arichi, S., Konishi, H. and Abe, H.: *Acta Hepat. Jpn.* 19, 430 (1978).

7. Fisher, L.J. Green, M.D. and Harman, A.W.: *J. Pharm. Exp. Ther.* 29, 281 (1981).
8. Lee, J.-S., Lee, C.K. and Choi, J.-W.: *Kor. J. Pharmacogn.* 24, 69 (1993).
9. Dawson, J.R. and Bridges, J.W.: *Biochem. Pharmacol.* 30, 2409 (1981).
10. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: *J. Biol. Chem.* 249, 7130 (1974).
11. Strominger, J.L., Maxwell, Axelrod J. and Kalckar, H.M.: *J. Biol. Chem.* 224, 79 (1957).
12. Ohkawa, H., Chishi, N. and Yaki, K.: *Anal. Biochem.* 95, 351 (1979).
13. Poulsen, H.E., Lerche, A. and Pedersen, N.T.: *Biochem. Pharmacol.* 34, 727 (1985).
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
15. Moldeus, P.: *Biochem. Pharmacol.* 27, 2859 (1978).
16. Linscheer, W.C., Raheja, K.L., Cho, C. and Smith, N.J.: *Gastroenterology* 78, 100 (1980).
17. Galinsky, R.E. and Levy, G.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219, 14 (1981).
18. Aw, T.Y. and Jones, D.P.: *J. Biol. Chem.* 257, 8997 (1982).
19. Hjelle, J.J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237, 750 (1986).
20. Potter, W.Z., Davis, D.C., Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Gillette, J.R. and Brodie, B.B.: *ibid.* 187, 203 (1973).
21. Jollow, D.J., Thorgeirsson, S.S., Potter, W.Z., Hashimoto, M. and Mischell, J.R.: *J. Pharmacology* 12, 251 (1974).
22. Mitchell, J.R., Thorgeirsson, S.S., Jollow, D.J. and Kaiser, H.: *Clin. Pharmac. Ther.* 16, 676 (1974).