

樗根白皮 成分의 生理生活에 관한 研究(I)

—메탄올 추출물과 클로로포름 분획이 Epoxide 분해계에 미치는 영향—

金 鐘 · 崔鐘元 · 金惠京 · 朴銖完 · 李晶揆

慶星大學校 藥學大學

Studies on the Biologic Activities of the Constituents of Ailanthi Cortex Radicis(I)

—Effects of Methanol Extract and its Chloroform Fraction
on Epoxide Hydrolyzing System in Liver—

Jong Kim, Jong-Won Choi, Hyekyung Kim, Soo Wan Park and Chung Kyu Lee

College of Pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract—For the bioical survey, effects of Ailanthi Cortex Radicis, the root bark of *Ailanthus altissima*(Simaroubaceae) on epoxide hydrolyzing enzymes were checked. The methanolic extract and its chloroform fraction were shown to activate the liver metabolizing enzyme system including epoxide hydrolase system which was monitored by activities of transaminase, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and epoxide hydrolase system in bromobenzene treated rats. But they showed no effect on glutathione S-transferase activity.

Keywords—Ailanthi Cortex Radicis • *Ailanthus altissima* • Simaroubaceae • liver enzyme activity • epoxide hydrolase activity

지근백피(樗根白皮)는 소태나무과(Simaroubaceae)에 속하는 중국 원산의 낙엽교목인 가중나무(혹은 가죽나무 *Ailanthus altissima*) 및 동속의 근연식물의 주피를 제거한 수피 또는 근피로서¹⁾ 민간 및 한방에서 촌충구제, 고초열, 지질, 적백리(赤白痢) 및 지사 등의 목적으로 사용된다.²⁻⁵⁾

성분으로는 樹皮로부터 quassinoid류로 총칭되는 amarolide류, ailanthonelike류, glaucarubinone류, glaucarubolone류, chapide류, chaparinone류, shinjulactone 14종(A~L) 및 shinjudilactone 등이 분리되었고, 種子로부터는 苦味性 quassinoid glycoside인 shinjuglycoside 4종(A~D)과 indole alkaloid인 canthin-6-one류 5종과 β -

carboline 유도체 8종이 분리 되었으며, 앞으로 부터는 canthin-6-one, 1-methoxycanthin-6-one과 4-methoxy-1-vinyl- β -carboline 등이 분리, 보고되었다.⁶⁾

이들 성분의 생리활성에 관한 연구로는 glaucarubinone과 ailanthonelike 등의 항아메바작용 및 항말라리아작용에 관한 것⁷⁾을 제외하면 거의 없는 편이다.

본 연구자 등은 樗根白皮의 韓方的 효능을 약리학적으로 증명하고 有效成分을 구명하기 위하여 메탄올 추출물과 이로부터 얻은 4종의 분획 중 클로로포름 분획을 대상으로 흰쥐에 bromobenzene을 투여함으로써 유발된 epoxide의 분해계에 대한 영향을 검토하여 이에 보고한다.

實驗材料 및 方法

재료 및 실험동물—실험에 사용한 재료는 시중에 유통되는 국산 저근백피로 가죽나무의 근피입을 확인하고, 세절된 것을 그대로 사용하였다. 실험동물은 본교 동물사육실에서 계대, 관리하는 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐(180~200 g)로 의견상 건강한 것을 사용하였다.

추출 및 분획—세절된 저근백피(2.9 kg)를 수욕상에서 메탄올로 4회 추출한 후 감압농축하여 메탄올 추출물(368 g)을 얻고 이것을 물에 현탁한 후 차례로 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 butanol로 분획하여 4종의 분획을 얻었다.

In vivo 동물실험 및 투여액 조제—흰쥐에 1% Tween 80 용액에 현탁시킨 메탄올 추출물과 클로로포름 분획을 6주간 경구투여 하였다(대조군에는 1% Tween 80 saline 용액 투여). 마지막 투여 후 24시간째 부터 1% Tween 80 용액에 현탁시킨 bromobenzene을 체중 kg당 310 mg씩 1일 2회 복강주사 하였다.

효소원의 조제—실험동물을 CO₂ gas로 마취시킨 후 복부대동맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 aminotransferase, alkaline phosphatase 및 lactate dehydrogenase 활성 측정용 효소원으로 사용하고 간조직은 따로 생리식염수를 관류한 후 채취하여 4배량 정도의 인산완충액(pH 7.5)으로 마쇄하여 homogenate를 만든다. 이 homogenate를 10,000×g로 10분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 제거한 후 상정액은 다시 105,000×g로 1시간 원심분리하여 상정액 cytosolic fraction은 glutathione S-transferase 활성 측정용 효소원으로, 침전 microsomal fraction은 0.25 M sucrose용액으로 한번 세척한 후 기타 epoxide hydrolase 등의 활성 측정용 효소원으로 사용한다. 각 효소원의 단백질 정량은 bovine serum albumin(Sigma, Fr. IV)을 표준으로 Lowry 등⁷⁾의 phenol 시약법에 따랐다.

Aminotransferase 활성 측정—혈중 aminotransferase 활성은 실험과정에 따라 처리하여 얻은 혈청을 Reitmann 등⁸⁾의 방법에 따라 조작하

고 GOT 및 GPT-kit(AM 101-K, Asan)로 505 nm에서 비색정량하였다.

Lactate dehydrogenase 활성 측정—Young 등⁹⁾의 방법에 따라 6.3 μmol의 NAD와 50 μmol의 *l*-lactate를 함유하는 완충액(pH 8.9)의 반응액에 효소원 50 μl를 가하여 340 nm에서의 흡광도의 증가율을 관찰함으로써 활성을 측정하였다.

Alkaline phosphatase 활성 측정—Kind와 King¹⁰⁾의 방법에 따라 kit 시약(Asan, ALP)으로 측정하였다.

Epoxide hydrolase 활성 측정—Hasegawa 등¹¹⁾의 방법에 따라, 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 기질로서 3 mM *trans*-stilbene oxide(TSO)와 효소원(100~200 μg의 단백질)을 가하여 반응액이 3.0 ml가 되도록 하였다. 이 반응액을 37°C에서 20분간 반응시키고 이때 소실되는 기질의 양을 229 nm에서의 흡광도의 감소로 측정하고 표준점량선에 의해 산정하였다. 효소활성도는 1분당 1 mg의 효소(단백질)에 의해 소비되는 기질의 양을 nmole수로 나타내었다.

Glutathione S-transferase의 활성 측정—Habig 등¹²⁾의 방법에 따라 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⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성하는 1,2-dichloro-4-nitro-benzene의 양을 nmole수로 표시하였다.

Lipid peroxide량 측정—Ohkawa 등¹³⁾의 방법에 따라 효소원 0.4 ml에 8.1% sodium dodecylsulfate 0.2 ml, 20% acetate 완충액(pH 3.5) 1.5 ml 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 5 ml의 *n*-butanol : pyridine

혼액(15:1)을 가하여 잘 섞은 다음 원심분리하여 흡색의 유기층을 취하고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화지질의 함량은 조직 1g 당 malondialdehyde의 nmole수로 나타낸다.

實驗結果 및 考察

혈중 **transaminase** 활성에 미치는 영향—저근백피의 효능을 검토하기 위한 일련의 연구중 우선 메탄올추출물과 클로로포름분획을 대상으로 간 대사효소계에 미치는 영향을 보면 *in vivo* 혈중 **transaminase**의 활성에 미치는 효과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 즉 시료를 50 mg/kg의 용량으로 6주간 투여한 후 bromobenzene(BB)으로 간손상을 유도하였을때 대조군의 상승한 GOT 및 GPT치를 현저히 감소시켜 거의 정상치로 회복시켰음을 알 수 있었으며 이러한 효과는 클로로포름분획 투여군에서 더욱 현저하였다.

혈중 **lactate dehydrogenase** 및 **alkaline phosphatase** 활성에 미치는 영향—같은 방법으로 실시한 혈중 **lactate dehydrogenase** 및 **alkaline phosphatase**에 미치는 영향도 Fig. 2에 나타난 바와 같이 혈중 **transaminase** 활성에 미치는 영향과 유사한 양상을 나타내었으며 클로로포름분획 투여군에서 보다 현저하게 나타난 점도 동일하다. 이로 미루어 보아 저근백피의 클로로포름분획에는 BB에 의해 유발된 간독성을 경감시키는 성분이 함유되어 있는 것으로 판단된다.

간조직중 **epoxide hydrolase** 및 **glutathione**

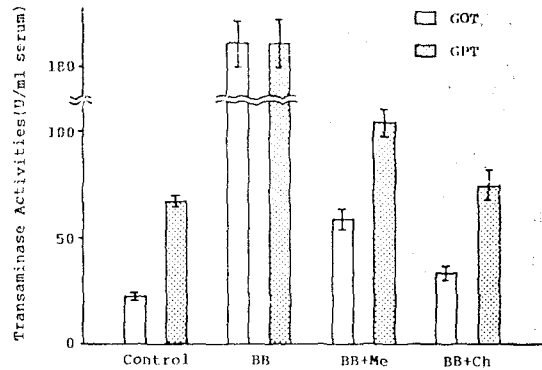


Fig. 1. Effects of the root bark of *Ailanthus altissima* on serum transaminase activities in rat

S-transferase 활성과 지질과산화에 미치는 영향—BB에 의해 유발된 혈중 생화학적 변화가 저근백피의 메탄올추출물과 클로로포름분획 투여로 현저히 감소되는 기전을 찾기 위한 목적으로

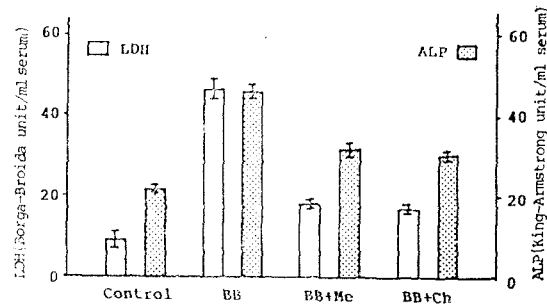


Fig. 2. Effects of the root bark of *Ailanthus altissima* on the activities of lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase in rat

Table I. Effects of the root bark of *Ailanthus altissima* on the activities of epoxide hydrolase (EH), glutathione S-transferase(GST) and lipid peroxidation(LPO) in rat

Treatments*	EH ¹⁾	GST ²⁾	LPO ³⁾
Control	8.6±0.50	284.6±9.59	14.0±0.92
Bromobenzene	5.4±0.31†	305.1±8.78 ^{N.S.}	63.3±3.24†
Methanol Extract and Bromobenzene	6.5±0.22†	279.1±8.93 ^{N.S.}	34.5±3.03†
Chloroform fr. and Bromobenzene	7.1±0.20†	282.6±5.87 ^{N.S.}	22.6±6.80†

*Bromobenzene(310 mg/kg, i.p.) was injected twice after the final treatments of samples(50 mg/kg, p.o., six weeks).

Control group was treated with vehicle only.

Significance: †p<0.05 and N.S.; not significant versus control by Duncan's analysis.

Activities were represented as: ¹⁾ trans-stilbene oxide nmole/mg protein/min, ²⁾ 1,2-dichloro-4-nitrobenzene glutathione nmol/mg protein/min and ³⁾ malondialdehyde nmole/g tissue.

같은 방법으로 BB에 의해 손상된 간조직중의 지질과산화물 함량의 변화를 관찰하였던 바 특이한 반응을 보였다. 즉 지질과산화물을 해독하는 epoxide hydrolase의 활성에 대하여서는 bromobenzene 투여로 저하된 활성을 현저히 회복시켰으며 지질과산화물을 형성하는 효소인 lipid peroxidase의 활성은 저하시켰다. 반면에 또다른 epoxide 분해제인 glutathione S-transferase의 활성에는 별다른 영향을 미치지 않았다(Table I). BB의 투여로 인한 간조직중의 지질과산화와 간기능의 생화학적 변동(Figs. 1, 2)이 현저히 개선된 것을 저근백피 추출물과 분획의 전처리로 인해 BB의 투여로 억제된 epoxide hydrolase 활성이 증가되어 BB의 투여로 생성된 강한 독성 물질인 3,4-oxide체를 무독성인 3,4-dihydrodiol 체로의 변환반응^{14,15)}이 촉진된 결과로 판단된다.

結 論

이상과 같이 저근백피의 메탄올 추출물과 이로부터 얻은 4종의 분획중 클로로포름 분획을 대상으로 간기능에 미치는 일련의 실험을 통하여 얻은 결론은 다음과 같다.

1. 메탄올 추출물과 클로로포름 분획은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 epoxide hydrolase의 활성을 증가시킴으로서 bromobenzene으로 유도한 간기능 손상을 회복시키는데 이것은 epoxide hydrolase의 활성화에 기인한다.

2. Epoxide 분해제의 하나인 glutathione S-transferase의 활성에는 별다른 영향을 보이지 않았다.

〈1993년 12월 21일 접수 : 1994년 1월 5일 수리〉

參 考 文 獻

1. 保健社會部 : 大韓藥典外韓藥(生藥)規格集, 서울, p.111 (1984).
2. 陸昌洙 : 原色韓國藥用植物圖鑑, 제 4 판, 아카데미서적, 서울, p.325 (1993).
3. 江蘇新醫學院(中國) : 中藥大辭典, 제 1 판, 下冊, 上海, pp.2587~2589 (1979).
4. 赤松金芳 : 新訂和漢藥, 제 1 판, 東京, 醫齒藥出版社, pp.289~290 (1970).
5. 許鴻源 : 少用中藥之研究, 제 1 판, 台北, 行政院衛生署中醫藥委員會, pp.65~66 (1974).
6. Tang, W. and Eisenbrand, G.: *Chinese Drugs of Plant Origin*, New York, Springer-Verlag, pp.51~57 및 인용문헌 (1992).
7. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
8. Reitmann, S. and Frankel, S.: *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 58 (1957).
9. Young, D.S., Pastaner, L.E. and Gibberman, V.: *Clin. Chem.* 21, 323 (1975).
10. Kind, P.R.N. and King, E.J.: *J. Clin. Pathol.* 7, 322 (1954).
11. Hasegawa, L.S. and Hammock, B.D.: *Biochem. Pharmacol.* 31, 1979 (1982).
12. Habig, W.H., Pabit, M.J. and Jakoby, W.B.: *J. Biol. Chem.* 249, 7130 (1974).
13. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K.: *Anal. Biochem.* 95, 351 (1979).
14. Reid, W.D., Cristie, B., Krishima, G., Mitchell, J.R. and Brodie, B.B.: *Pharmacology* 6, 41 (1971).
15. Monks, T.J., Highget, R.J. and Lau, S.S.: *Mol. Pharmacol.* 34, 492 (1988).