약학회지 제40권 제3호 320~325(1996)
Yakhak Hoeji Vol. 40, No. 3

사염화탄소에 의해 유발된 간독성에 대한 galangin의 보호효과

정배동* · 김천호* · 김정한 · 허문영#
*강원대학교 수의학과, 강원대학교 약학과
(Received October 27, 1995)

Protective Effects of Galangin on Carbon tetrachloride-Induced Hepatotoxicity

Bae Dong Jung*, Cheon Ho Kim*, Jung Han Kim, Moon Young Heo#
**Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea*
Department of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract—In order to evaluate the protective effects of galangin on CCl_4-induced hepatotoxicity, GOT, GPT and malondialdehyde(MDA) values were measured in ICR mice. Galangin, flavonoid compound, was administered orally for six days and immediately CCl_4 was injected intraperitoneally after the last dose of galangin. Mice were sacrificed at 24h after the administration of CCl_4. In the multiple pre-treatments for 6 consecutive days, galangin showed more potent protective effects than silymarin as reference active compound in serum GOT, GPT and MDA values in the liver at all doses tested. Antioxidative activity was determined by measuring the amounts of MDA formed from ethyl linoleate by H_2O_2 *in vitro*. Galangin showed higher inhibition than silymarin. These results demonstrate a possible hepato-protective role of galangin against CCl_4-induced hepatotoxicity *in vivo* and H_2O_2-induced lipid peroxidation *in vitro*. Therefore, galangin may be capable of protecting hepatotoxicity.

Keywords □ Hepatotoxicity, GOT, GPT, MDA, Lipid peroxidation, Flavonoid, Galangin.

Flavonoid 화합물은 식물중에 폭 넓게 존재하며 일상생활중에서도 1일 약 1 g 이상 섭취하고있다고 알려져있다.[1] 따라서 이들의 생리활성에 대한 여러가지 연구가 진행되어왔는데, 특히 고혈압과 동맥경화억제작용, 호흡기능촉진, 진경작용, 심박동감소작용, 항염증작용, 혈관순환 개선작용과 간장보호작용 등 여러가지 생리활성을 갖고 있음이 보고되었다.[2]

본 연구에서 사용한 galangin은 flavonoid 화합물 중 flavonol화합물로서 C-2, 3번 위치에 이중결합과 3, 5, 7번 탄소에 OH group을 갖고 있으며, 고량강(*Alpinia officinarum*)등에 함유되어 있는 성분으로서 본 저자들의 여러 연구결과 유전독성억제효과가 우수한 물질로 판명되었다.[3-5] Galangin은 *in vitro*에서 CCl_4 유도 rat liver microsomal lipid peroxidation에 대한 억제효과[6]와 rat liver microsome에서 $FeSO_4$+Cystein 유도 lipid peroxidation에 대한 억제효과[7]가 보고된 바 있다. 본 연구에서는 주로 지질과산화에 의한 간독성에 미치는 영향을 알아보기위하여 사염화탄소에 대한 간독성억제효과를 기존의 간보호작용물질로서 잘 알려진 silymarin을 활성비교물질로 하여 실험하였다.

이에 본 연구자는 flavonoid 화합물 중 하나인 galangin이 간손상에서 대해 미치는 영향을 살펴보고자 *in vivo* 실험으로서 사염화탄소를 처리한 생쥐에 galangin을 투여한 후 혈청 GOT, GPT와 간세포중 과산화생성물인 malondialdehyde(MDA)를 측정하여 생화학적 변화를 관찰하고, 이와 함께 간보호 작용기전연구의 일환으로 *in vitro*에서 Fenton's reagent에 의해 유발된

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0361-50-6914 (팩스) 0361-53-9647

과산화지질생성반응에 대한 galangin의 억제효과를 연구하였다.

실험방법

시약 및 재료 - Galangin은 Aldrich사에서 구입하였고 HPLC로 순도(99.9%이상)를 확인 후 사용하였다. Silymarin(51.7%,화덕약품 NP00096)은 사용시 100%로 환산하여 투여하였다. Carbon tetrachloride와 olive oil등 기타 시약들은 Junsei Chemical사에서 구입하였으며 2-thiobarbituric acid는 Sigma사에서 구입하였다. GOT와 GPT 측정용 kit는 Wako사에서 구입하였다.

투여방법 - ICR 수컷 생쥐(6~8주, 20~25 g)에 olive oil만을 경구투여하여 음성대조군으로 하였다. CCl_4를 적당량 마이크로피펫으로 취하여 olive oil에 희석시키고 마우스 25 g기준 0.1 m*l*를 투여하여 체중 kg당 50 mg 용량이 되도록 복강투여한 군을 양성대조군으로 하였다. 약물투여군에서는 galangin 또는 silymarin을 olive oil에 현탁시켜 조제한 검액을 24시간 간격으로 6일간 체중 kg당 0.01, 0.1 및 1 mg 용량으로 사전경구투여하였고 CCl_4는 6일째 복강투여하였다. CCl_4 투여후 24시간에 채혈 및 간을 적출하였다.

혈청중 GOT, GPT 활성측정방법 - 채혈은 생쥐를 에텔로 흡입 마취시킨 후 복강절개하고 1 m*l* 주사기를 사용하여 복대동맥에서 이루어졌다. 혈청은 채혈한 혈액을 4°C에서 1시간 방치한 다음 37°C에서 1시간 동안 보관한 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻었다. 이 혈청으로 Wako kit사용법에 맞추어 GOT와 GPT 활성을 측정하였다.

과산화지질 측정방법 - 채혈 후 간을 적출하여 0.9% saline에 세척하고 -70°C에서 24시간 보관한 다음 homogenizer로 균질화시키고 9000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 post mitochondrial supernatant에서의 과산화생성물인 malondialdehyde(MDA)를 TBA법[8]에 의하여 측정하였다.

단백질함량 측정방법 - 과산화지질 측정을 위해 균질화한 간에서 얻은 post mitochondrial supernatant를 이용하여 Lowry 법[9]으로 측정하였고 소혈청알부민을 표준물질로 하여 검량선을 작성하였다.

***In vitro* galangin의 항산화효과 측정방법** - Galangin의 간장보호작용과 기전연구의 일환으로 *in vitro*에서의 과산화지질생성 억제효과를 관찰하였다. Fenton's reagent를 이용한 Kitta등의 방법[10]으로 *in vitro*에서 측정하였다. 증류수 100 m*l*에 sodium dodecyl sulfate를 2%가 되도록 가온하여 용해시키고 0.75 mmol KCl, 0.25 mmol Tris (pH7.4), 1 mol $FeCl_2$와 0.025 mmol H_2O_2를 첨가시켰다. 이 용액 4.89 m*l*에 10 μ*l* ethyl linoleate를 첨가한 후 미리 만들어 보관한 galangin과 silymarin 용액을 10^{-3} M 부터 10^{-8} M 까지의 농도로 0.1 m*l*씩 각각 분주하였다. 이 모든 양이 각 시료당 5 m*l*가 되도록 하였다. 만들어진 시료는 voltex mixer로 즉시 혼합하고 과산화지질계에 대한 빛의 영향을 차단시키기 위해 aluminum foil로 감싸고 나서 16시간 동안 55°C에서 배양시켰다. 16시간이 지난 후 각각의 시료에 50 μ*l*의 4% BHT 에탄올용액을 분주하여 산화를 정지시킨 다음 항산화효과를 TBA법으로 측정하였다.

결 과

GOT와 GPT활성에 미치는 galangin 투여의 영향 - Fig. 1과 2에 galangin 및 silymarin 투여에 의한 CCl_4유도 GOT, CPT활성에 미치는 영향을 나타내었다. 양성대조군의 GOT 활성치 1063±109 karmen units(이하, 단위생략)에 비하여 galangin 0.01 mg/kg 투여군에서 GOT 369±52($P<0.01$), 0.1 mg/kg 투

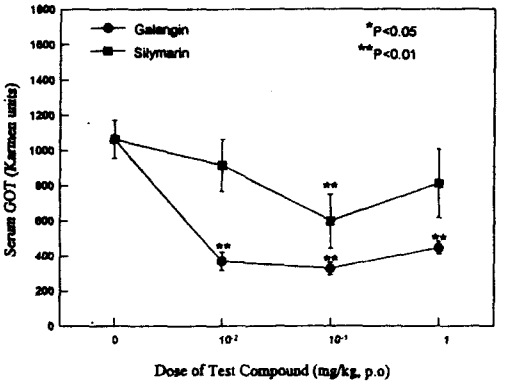

Fig. 1 — Effect of multiple pre-treatment with galangin and silymarin on GOT values in mice treated with carbon tetrachloride (50 mg/kg, i.p.). **Significantly different from the control group at $p<0.01$. Each bars represent mean±S.E. (12 mice for control group and 10 mice for treated group each).

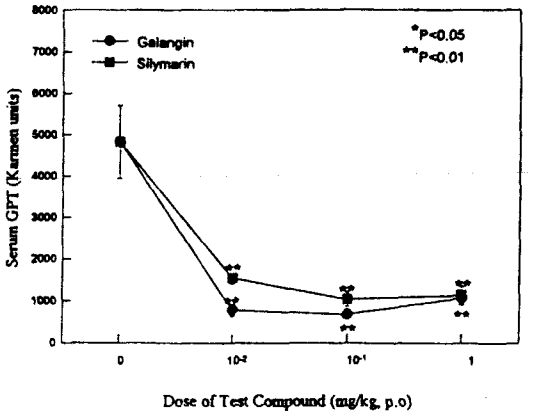

Fig. 2—Effect of multiple pre-treatment with galangin and silymarin on GPT values in mice treated with carbon tetrachloride (50 mg/kg, i.p.) ** Significantly different from the control group at $p<0.01$. Each bars represent mean±S.E.(12 mice for control group and 10 mice for treated group each).

여군에서 GOT 326±36($p<0.01$), 1 mg/kg 투여군에서 GOT 445±37($p<0.01$)로서 CCl_4 투여로 인한 GOT활성치의 증가를 유의성있게 억제시켰으나 높은 농도에서는 억제정도가 다소 감소하는 것을 보였다. 한편, Silymarin 0.01 mg/kg 투여군에서는 GOT 활성치가 917±149, 0.1 mg/kg 투여군에서 GOT 596±154($p<0.01$), 1 mg/kg 용량에서 811±196로서 galangin보다 모든 투여용량에서 억제효과가 낮았다.

한편, 양성대조군의 GPT 활성치 4817±882 karmen units(이하, 단위생략)에 비하여 galangin 0.01 mg/kg 투여군에서 GPT 779±143($p<0.01$), 0.1 mg/kg 투여군에서 GPT 675±117($p<0.01$), 1 mg/kg 투여군에서 GPT 1068±166($p<0.01$)로서 CCl_4 투여로 인한 GPT 활성치의 증가를 유의성있게 ($p<0.01$) 억제시켰으나 높은 농도에서는 억제정도가 GOT에서 처럼 다소 감소하는 것을 보였다. Silymarin 0.01 mg/kg 투여군에서는 GPT 1540±127($p<0.01$), 0.1 mg/kg

Table I—Effects of multiple pre-treatment with galangin and silymarin on liver weight/body weight in mice treated with carbon tetrachloride

Treatment[b]			Liver weight/Body weight[a]	
CCl_4 (mg/kg, i.p.)	test compound (mg/kg, p.o.)	n	Galangin	Silymarin
0	0	17	0.058±0.002	0.058±0.002
50	0	12	0.060±0.001	0.060±0.001
50	0.01	10	0.063±0.001	0.060±0.001
50	0.1	10	0.060±0.002	0.060±0.002
50	1	10	0.062±0.001	0.057±0.002

[a] Values are mean±S.E.
[b] Test compound was administered orally for six days, and immediately CCl_4 was injected intraperitoneally after the last dose of test compound.

Table II—Effects of multiple pre-treatment with galangin and silymarin on MDA nmole/mg protein values in mice treated with carbon tetrachloride

Treatment[b]			Liver MDA(nmole/mg protein)[a]	
CCl_4 (mg/kg, i.p.)	test compound (mg/kg, p.o.)	n	Galangin	Silymarin
0	0	17	0.33±0.02	0.33±0.02
50	0	12	0.65±0.02	0.65±0.02
50	0.01	10	0.32±0.03**	0.40±0.03**
50	0.1	10	0.41±0.03**	0.41±0.04**
50	1	10	0.34±0.02**	0.44±0.04**

[a] Values are mean±S.E.
[b] Test compound was administered orally for six days, and immediately CCl_4 was injected intraperitoneally after the last dose of test compound. ** Significantly different from positive control at $p<0.01$.

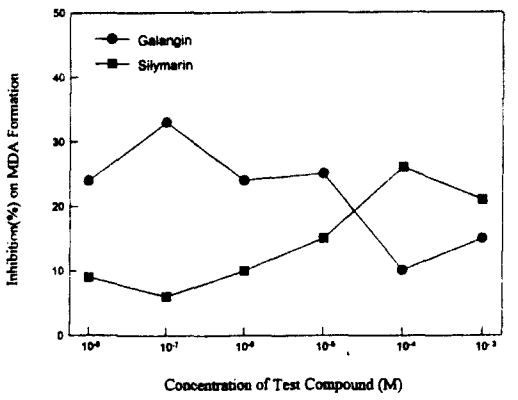

Fig. 3 — Effect of galangin and silymarin on MDA formation induced by ethyl linoleate and H_2O_2. Points are mean values for 3 determinations.

투여군에서 GPT 1040±175($p<0.01$), 1 mg/kg 용량에서 GPT 1142±211($p<0.01$)로서 galangin처럼 모든 투여용량에서 유의성있는 감소를 보였다. 따라서 galangin은 GOT와 GPT에 있어서 silymarin보다 억제효과가 다소 높은 경향을 나타내었다. 또한 Table I에서 나타낸 바와 같이 galangin 및 silymarin 투여에 의한 CCl_4투여군에 대한 간장 및 체중무게비의 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다.

MDA 생성에 미치는 galangin 투여의 영향 – Table II에 galangin및 silymarin 투여에 의한 CCl_4유도 MDA생성에 미치는 영향을 나타내었다. 양성대조군의 MDA 함량은 0.65±0.02 nmole/mg protein(이하 단위생략)로서 galangin 0.01 mg/kg 투여군에서 0.32±0.03($p<0.01$)로 galangin의 연속투여에 의해 MDA 함량이 유의성있게 감소되었다. Silymarin 0.01 mg/kg 투여군에서는 0.40±0.03($p<0.01$), 0.1 mg/kg에서 0.41±0.04($p<0.01$), 1 mg/kg에서 0.44±0.03($p<0.01$)로서 silymarin 투여에 의해서도 MDA함량이 유의성있게 감소되었다. 그러나 MDA 생성에 있어서도 galangin은 silymarin보다 같은 투여용량에서 억제효과가 다소 큰 경향을 나타내었다.

***In vitro*에서 galangin의 항산화효과** – Fig. 3에 Fenton's reagent에 의해 생성되는 ethyl linoleate의 지질과산화에 대한 galangin 및 silymarin의 억제효과를 나타내었다. 양성대조군을 기준으로 하여 지질과산화억제율을 산출하였을 때 galangin은 10^{-3} M에서 15%, 10^{-4} M에서 10%, 10^{-5} M에서 25%, 10^{-6} M에서 24%, 10^{-7} M에서 33%, 10^{-8} M에서 24%로 억제효과를 나타내었으며, silymarin은 10^{-3} M에서 21%, 10^{-4} M에서 26%, 10^{-5} M에서 15%, 10^{-6} M에서 10%, 10^{-7} M에서 6%, 10^{-8} M에서 9%로 억제효과가 나타났다. 여기에서도 galangin은 silymarin에 비해 낮은 농도범위(10^{-5}~10^{-8} M)에서 억제효과가 비교적 크게 나타났으나 높은 농도(10^{-4}~10^{-3} M)에서는 작게 나타났다.

고 찰

본 연구의 결과 생쥐에게 CCl_4를 복강투여하므로써 유발된 혈청 GOP, GPT의 활성 증가에 대하여 galangin은 0.01, 0.1, 1 mg/kg의 용량으로 6일간 사전경구투여에 의해서 유의성있는 억제효과를 보였다. Silymarin 또한 같은 시험용량에서 억제효과를 보였으나 galangin쪽의 억제활성이 더 큰 편이었으며, 특히 GOT활성의 경우에 억제경향이 더 컸다. 한편, CCl_4에 의한 지질과산화에 대해서 galangin과 silymarin은 모두 유의성 있는 MDA 생성의 감소효과를 보였는데 이것에서도 galangin이 silymarin보다 다소 높은 억제효과를 보였다. 또한, ***in vitro***에서 Fenton's reagent에 의해 유발되는 MDA 생성에서 galangin은 silymarin보다 항산화효과가 크게 나타났다.

CCl_4는 cytochrome p-450에 의해 독성이 강한 대사물로 되고 결국 간세포의 지질과산화를 일으키고 중심정맥부위에서 지방변성 및 괴사를 일으킨다. 이 대사물이 간 microsomes의 막단백 thiol기와 강하게 결합하여 막의 지질과산화 반응을 촉진하여 장애를 일으켜서 간에서의 단백합성억제, 혈중에서 GOT, GPT등의 이탈을 일으키는 것으로 알려져 있다. Wagner[11]는 flavonoid 화합물들이 반응성 산소프리라디칼을 소거하여 항산화작용을 나타내며 이것이 간세포보호작용의 기전이라고 밝힌 바 있다. Silymarin은 현재 간질환치료제로서 널리 쓰이고 있는 flavonoid화합물이며 흡수율의 증가를 위하여 합성한 silybin phosphatidyl choline complex(IdB1016)은 혈청내 GOT, GPT, γ-GT, total bilirubin의 농도를 감소시켰다고 보고되어 있다.[12] Afanas'EV등[13]은 rutin과 quercetin의 지질과산화억제작용의 기전은 free radicals에 대한 소거와 Fe^{2+} ion과의 착화라고 밝혔고, Mora등[7]은 지질과산화에 대한 flavonoid계 성분들의 구조와 활성관계를 연구한 결과 polymethoxylated flavonoid류의 성분들이 다른 flavonoid계 성분들에 비해 더 강한 지질과산화 억

제효과를 가지고 있다고 보고하였다.

*in vivo*에서 CCl_4에 의한 간 세포의 지질과산화에 대해서 galangin과 silymarin은 시험용량에서 모두 유의성 있는 감소효과를 보였는데 galangin이 silymarin보다 다소 높은 억제효과를 보였다. 이같은 galangin의 지질과산화억제작용은 CCl_4의 cytochrome p450에 의해 생성된 프리라디칼의 소거작용과 함께 cytochrome p 450의 대사활성화를 저해하는 기전도 간과할 수 없다. 본 연구자등의 다른 연구[14]에서 galangin의 benzo(a) pyrene유도 cytochrome p450의 활성저해를 보고한 바 있다.

*in vitro*에서 Fenton's reagent에 의해 유발되는 MDA 생성에서 galangin은 silymarin보다 항산화효과가 크게 나타내었다. 본 연구에서 사용한 galangin은 flavonol화합물로서 C-2, 3위치에 이중결합을 갖고 3, 5, 7번 탄소에 OH group을 갖는 구조적인 특징을 보이고 있는 화합물이다. Pratt등[15]이 flavonoid 구조중의 3-hydroxy, 4-keto group 또는 5-hydroxy, 4-keto group에 의해 금속이온을 킬레이트화하거나 페놀성기의 프리라디칼소거작용이 항산화작용과 깊은 관련이 있다고 보고한 것처럼 galangin은 프리라디칼들을 소거, 또는 금속이온의 킬레이트화를 통한 chain breaking antioxidant로서 작용하고 있는 것으로 보여진다.

이상과 같은 *in vivo* 및 *in vitro*시험의 결과를 종합해 볼 때 galangin은 비교적 낮은 투여용량에서 silymarin보다 CCl_4에 의해 유도된 GOT, GPT 활성의 억제효과와 생성 free radical인 · CCl_3에 의해 야기되는 지질과산화 및 Fenton's reagent에 의해 야기되는 지질과산화를 억제시킴으로써 간세포독성 및 지질과산화에 대해 억제효과를 나타내는 것으로 추정되며 작용기전에 대한 보다 심도있는 연구가 필요한 물질이라고 보여진다.

결 론

천연 flavonoid 중의 하나인 galangin을 대상으로 *in vivo*에서 CCl_4에 의해 유도된 간독성인 GOT, GPT활성 및 지질과산화에 대한 억제효과를 관찰하였다. Galangin은 활성비교물질로서 동일하게 시험한 silymarin 보다 GOT, GPT활성을 비교적 크게 억제시켰고, MDA생성도 크게 억제시켰다. 한편, *in vitro*에서 유도된 지질과산화에 대해 낮은 농도범위에서 galangin이 silymarin 보다 큰 억제경향을 나타내었다. 따라서 galangin은 CCl_4에 의해 유도된 GOT, GPT활성의 억제효과와 생성 free radical인 · CCl_3에 의해 야기되는 지질과산화 및 Fenton's reagent에 의해 야기되는 지질과산화를 억제시킴으로써 간독성 및 지질과산화에 대해 억제효과를 나타내는 것으로 판단되었다.

문 헌

1) Kuhanu, J. : The flavonoids. A class of semi-essential food components, their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet* **24**, 117 (1976).
2) Harborne, J. B. : Nature, Distribution and function of plant flavonoid In: Cody, V., Middleton, E. and Harborne, J. B.(eds).: Plant flavonoids in biology and medicine. A. R. Liss, New York, pp.15 (1986).
3) Heo, M. Y., YU, K. S., Kim, K. H., Kim, H. P. and Au, W. W. : Anticlastogenic effect of flavonoid against mutagen-induced micronuclei in mice. *Mutation Research* **284**, 243 (1992).
4) Heo, M. Y., Lee, S. J., Kwon, C. H., Kim, S. W., Sohn, D. H. and Au, W. W. : Anticlastogenic effects of galangin against bleomycin-induced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes. *Mutation Research* **311**, 225 (1994).
5) Heo, M. Y., Lee, H. J., Sohn, S. J. and Au, W. W. : Anticlastogenic effects of galangin against mitomycin C-induced micronuclei in reticulocytes of mice. *Mutation Research*, in press (1996).
6) Cholbi, M. R., Paya, M. and Alcaraz, M. J. : Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl_4-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia* **47**, 195 (1991).
7) Mora, A., Paya, M., Rios, J. L. and Alcaraz, M. J. : Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem. Pharm.* **40**, 793 (1990).
8) Ohtka, H., Ohishi, N. and Yaki, k.: *Anal. Chem.* **95**, 351 (1979).
9) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

10) Kitta, K., Hagiwara, Y., Shibamoto, T. : Antioxidative activity of an isoflavonoid, 2″-0-glycosylisovitexin isolated from green barley leaves. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1843 (1992).

11) Wagner, H.: Antihepatotoxic flavonoids. In : Cody, V. Middleton, E. and Harborne, J. B. (eds). Plant Flavonoids in Biology and Medicine:Biomedical Pharmacological and Structure-Activity. A. R. Liss Inc. New York, p.14 (1986)

12) Buzzelli, G., Moscarella, s. and Giusti, A. : A Pilot Study on the liver Protective effect of silybin-Phosphatidylcholine complex (IdB1016) in chronic active hepatitis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **31**, 456 (1993).

13) Afanas'EV, I. B., Dorozhko, A. and Brodskii, A. V. : Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharm.* **38**, 1763 (1989).

14) Kim, H. K., Heo, M. Y., Kim, K. H. and H. P. Kim : Effects of antimutagenic flavonoid, galangin, on benzo(a)pyrene metabolism in mice. *Korean Biochem. J.* **24**, 141 (1991).

15) Pratt, D. E. : Role of flavones and related compounds in retarding lipid oxidative flavor changes in foods. In: Kats, I.(eds), ACS symposium series 26, American Chemical Society, Washington DC, p.1 (1976).