

## 적출관류 간에서 대황, 마황 및 황금이 7-에톡시쿠마린의 대사에 미치는 영향

최기환<sup>#</sup> · 김순선 · 박윤주 · 정혜주 · 안미령 · 서수경 · 신윤용\* · 김동섭 · 장영섭

식품의약품안전청 국립독성연구소, \*이화여자대학교 약학대학

(Received April 30, 1998)

### Effects of Rhei Rhizoma, Ephedrae Herba and Scutellariae Radix on the Metabolism of 7-Ethoxycoumarin in Isolated Rat Liver

Ki Hwan Choi<sup>#</sup>, Soon Sun Kim, Youn Joo Park, Hye Joo Chung,  
Mee Ryung Ahn, Soo Kyung Suh, Yhun Yhong Sheen\*,  
Dong Sup Kim and Young Sup Chang

*Korea Food and Drug Administration, National Institute of  
Toxicological Research, Seoul, 122-704, Korea*

*\*College of Pharmacy, Ewha womans University, Seoul 120-750, Korea*

**Abstract**—In order to study the effects of Rhei rhizoma, Ephedrae herba and Scutellariae radix on hepatic metabolism, we examined the pretreatment effect of those on the metabolism of 7-ethoxycoumarin (EC). Water extracts (1 g/kg) of Rhei rhizoma, Ephedrae herba and Scutellariae radix were administered orally to rats for 7 days, respectively. Livers were then isolated and perfused with 100 μM EC for 2 hours. The metabolites of EC, 7-hydroxycoumarin, sulfate conjugate and glucuronide conjugate were measured in the perfusates. The amount of glucuronide conjugates was decreased in Rhei rhizoma pretreated rats ( $p < 0.01$ ), however, 7-hydroxycoumarin was increased in Ephedrae herba pretreated rats ( $p < 0.01$ ). We examined whether the change of enzyme activity is related to the change of cytochrome P4501A1 and P4502B1 mRNA level in the perfused rat liver, which are responsible for EC metabolism. CYP1A1 and CYP2B1 mRNA level was increased, which was not statistically significant with rhei rhizoma nor ephedrae herba pretreatment. We also assessed the hepatotoxicity of Rhei rhizoma, Ephedrae herba and Scutellariae radix. The activities of ALT and AST were assayed at 24 hours after 7 days administration. Only the ratio of ALT over AST was increased in ephedrae herba pretreated rats ( $p < 0.05$ ). Lipid peroxidation was increased in Rhei rhizoma treatment ( $p < 0.05$ ), while histopathological examination performed after liver perfusion did not show any difference compared with vehicle treatment. These results suggest that Ephedrae herba pretreatment increases the *o*-deethylation of 7-ethoxycoumarin in rats, which may be mediated by CYP1A1 mRNA induction.

**Keywords** □ Rhei rhizoma, Ephedrae herba, Scutellariae radix, hepatotoxicity, metabolism, isolated rat liver perfusion, 7-ethoxycoumarin.

천연물은 전세계적으로 오랜 기간동안 사용되면서 일  
반인들 사이에서 독성이 없거나 있다하더라도 미약한 것

으로 막연하게 생각되어 왔으며, 특히 우리나라에서는  
특정질환의 치료 뿐 만 아니라 건강증진의 목적으로 생  
약재의 복용이 증가되고 있으나 명확한 작용 및 대사기  
전이 밝혀져 있지 않은 실정이다. 최근 유럽에서는 오랜  
기간동안 안전하게 사용되었던 *germander*가 체중감소

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-380-1809 (팩스) 02-352-9446

의 목적으로 다량 복용시 간질환을 유발시켜 판매가 금지되고 간독성 작용기전에 대한 연구가 수행되는 등<sup>1,2)</sup> 생약재의 안전성에 대한 객관적 검증의 필요성이 대두되고 있는 시점이다. 이와 아울러 천연물에 의한 간독성은 다른 이물질 및 기타 약물의 해독 및 체내 동태에도 영향을 미칠 수 있으므로 천연물이 간 대사에 미치는 영향에 대한 적절한 연구·검토가 필요한 것으로 사료된다.

마황은 *Ephedra sinica Atayf* 및 동속식물(*Ephedraceae*)의 초질경(草質莖)으로 진해, 발한, 해열 등의 목적으로 한방제제에 빈용되는 생약으로 ephedrine, pseudoephedrine, ephedroxane, norephedrine 등을 함유하고 있으며 항염증작용, 교감신경흥분작용, 체중감소작용, 기관지확장작용, 이뇨작용 등 많은 약리작용이 보고되어 있다.<sup>3-5)</sup> 또한 황금은 대한약전에 썩은 풀 *Scutellaria baicalensis Georgi(Libriatae)*의 주피를 벗긴 뿌리로 기재되어 있으며, 건위·소화·지사·소염 등의 목적으로 사용되는 생약재이다. 황금은 baicalin, baicalein, wogonin, wogonin glucuronide, oroxylin A glucuronide, skullcapflavone I, II 등을 함유하고 있으며 담즙배설 촉진작용, 이뇨작용, 항염증작용, 항 allergy 작용, 지질대사개선작용, arachidonic acid 대사계에 대한 작용 등 많은 약리작용이 보고되어 있다.<sup>6,7)</sup> 그러나 최근 체중감소의 목적으로 복용한 마황에 의해 급성간염이 유발되었음이 보고되었고<sup>8)</sup> 황금에 의한 간독성 가능성이 제시된 바 있다.<sup>9)</sup>

이에 본 연구에서는 다량의 시료를 사용해야 하는 생체내 실험의 단점이 보완되고 생체내 대사작용을 조사할 수 있는 적출간 관류법을 이용하여 간염등 간질환 유발 사례가 보고되고 있는 마황 및 황금과 실제 임상에서 이들 천연물과 복합해서 자주 사용되고 있는 대황을 선정하여 이들 천연물이 랫드에서 7-ethoxycoumarin 대사에 미치는 영향을 관찰함으로써 간의 약물 대사기능에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 즉, 관류액 내 7-ethoxycoumarin의 대사체인 7-hydroxycoumarin, sulfate 포함체, glucuronide 포함체의 양을 측정 비교하고 적출관류간에서 7-ethoxycoumarin specific 하다고 알려진 cytochrome P4501A1 및 P4502B1 mRNA를 측정함으로써 이들 천연물이 7-ethoxycoumarin의 대사에 미치는 영향을 측정 비교하였다. 또한 이들 천연물이 간에 미치는 독성 정도를 평가하기 위하여 혈청 ALT 및 AST 활성, 적출관류간에 대한 lipid peroxidation 정도를 측정하고 조직병리학적인 변화를

관찰하였다.

## 실험재료 및 방법

**시약 및 실험동물** - 대한약전 규격의 대황, 마황, 황금은 한약유통(Seoul, Korea)으로부터 구입하였으며, 7-ethoxycoumarin은 Fluka Chemical AG(Milwaukee, WI, USA)로부터, 7-hydroxycoumarin,  $\beta$ -glucuronidase, sulfatase, phenol equilibrated, chloroform 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, malony murine leukemia virus reverse transcriptase, TRIzol reagent는 Gibco-BRL(Gasthersberg, MD, USA)로부터, RNasin은 Promega(Madison, WI, USA)로부터 ketamine chloride는 유한양행(Seoul, Korea)으로부터 구입하였으며, RNA 측정용 시약은 molecular biology grade로, 그의 다른 시약은 시약급으로 사용하였다. primer는 서울대학교 기초과학공동연구원에 합성을 의뢰 구매하여 사용하였다. 실험동물은 국립독성연구소에서 생산된 5주령의 웅성 Sprague Dawley rat를 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 10\%$ , 12시간 조명주기 조건 하에서 체중이 250~300g이 될 때까지 사육하여 사용하였으며 이때 물과 사료는 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다.

**추출물 제조 및 약물투여** - 대황, 마황, 황금 각 1kg으로부터 수침엑스를 제조하여 185g, 450g, 350g의 powder를 얻었으며 HPLC를 이용하여 분석한 결과 대황은 지표성분인 sennoside B가 검출되지 않았고 마황은 ephedrine으로서 4.64%(w/w), 황금은 baicalin으로서 18.43%(w/w)가 각각 검출되었으며 그 분석 조건은 Table I과 같다. 제조한 대황, 마황, 황금 수침엑스를 1g/kg, 10ml/kg 용량으로 7일간 경구투여하였으며 대조군에는 vehicle로 사용한 물을 투여하였다.

**혈중 ALT 및 AST 활성측정** - 마지막 약물투여 24시간 후 복대정맥으로부터 혈액을 채취하여 약 2시간 방치 후 4,000g에서 30분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며 혈액생화학 자동분석기(Technichon RA-XT)를 이용하여 ALT 및 AST 활성을 측정하였다.

**Lipid peroxidation 측정** - 적출관류간으로부터 Trush등<sup>10)</sup>의 방법을 응용하여 lipid peroxidation 측정을 위한 간소포체 분획을 제조하였다. 적출관류간을 미세가위로 세절한 후 간 무게의 약 4배가 되는 Tris-

**Table 1**— Analytical conditions of HPLC

대황(sennoside B)	
Column	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub> (25 cm×4.6 mm, 5 $\mu$ m, WATERS)
Mobile phase	methanol/5% acetic acid (40:60)
Detector	UV Detector (254 nm)
Flow rate	1.0 ml/min
Sensitivity	0.1Aufs
마황(ephedrine)	
Column	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub> (25 cm×4.6 mm, 5 $\mu$ m, WATERS)
Mobile phase	0.1 M citric acid buffer (pH 3.0) : acetonitrile (86:14)
Detector	UV Detector (254 nm)
Flow rate	1.0 ml/min
Sensitivity	0.1Aufs
황금(baicalin)	
Column	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub> (25 cm×4.6 mm, 5 $\mu$ m, WATERS)
Mobile phase	THF 145 ml, Dioxane 125 ml, methanol 50 ml, acetic acid 20 ml and 5% phosphoric acid 2 ml to make 1 L
Detector	UV Detector (280 nm)
Flow rate	1.0 ml/min
Sensitivity	0.1Aufs

HCl buffer(150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)를 첨가한 후 polytron을 사용하여 균질화하였다. 균질액을 600 g에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 15,000 g에서 20분간 원심분리하였다. 다시 상등액을 취하여 105,000 g에서 1시간 동안 원심분리하여 침전층을 취하고 Tris-HCl buffer로 재현탁시켜 Bose<sup>등</sup><sup>11)</sup>의 방법을 응용하여 간세포체 중의 lipid peroxidation의 정도를 측정하는 지표로 malondialdehyde 생성정도를 측정하였다. 제조한 microsome 분획 0.3 ml에 8% trichloroacetic acid(TCA) 0.9 ml를 가하고 4°C, 10,000 g에서 5분간 원심분리하여 상등액 1 ml를 취하여 0.2% NaOH를 함유하는 1% thiobarbituric acid 용액 0.25 ml를 가하여 혼합한 후 100°C에서 20분간 가열하여 발색시켰다. 실온으로 냉각시킨 후 Elisa Reader(Molecular Device, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, MDA 생성량은 1,1,3,3-tetramethoxypropane을 농도환산을 위한 표준물질로 사용하여 nmole/mg protein으로 환산하여 나타내었다. 이 때 검체중의 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준물질로 사용, BCA protein assay kit를 사용하여 측정하였다.

**조직학적 관찰** - 적출 관류 후 간 우엽의 일정부위를 잘라내어 10% neutral buffered formalin 용액으로

48시간 이상 고정시켰다. 일반적인 탈수, 치환 및 침투 과정을 거쳐 파라핀에 포매시킨 후 4  $\mu$ m로 절편하여 H&E 염색을 실시하였으며 광학 현미경하에서 조직의 병변 유무를 관찰하였다.

**7-ethoxycoumarin(EC) 대사체 분석** - 흰쥐에 ketamine chloride(100 mg/kg)를 복강내 주사하여 마취시킨 후 Sies<sup>등</sup><sup>12)</sup>의 방법에 따라 간 문맥에 polyethylene catheter(18 gauge)를 삽입하고 관류액을 일정 속도(3~4 ml/g liver/min)로 관류시키면서 간을 적출하여 perfusion block에 옮긴다. 이 때 사용한 관류액은 Krebs-Henseleit Bicarbonate buffer(KHB, pH 7.4)로서 관류하는 동안 혼합기체(O<sub>2</sub>: 95%, CO<sub>2</sub>: 5%)를 지속적으로 주입하여 간 세포에 산소를 공급하였다. 적출한 간 조직의 안정된 생리적 조건을 유지하기 위하여 perfusion block에 옮긴 후 처음 15분간은 KHB만을 관류시키고 그 후 100  $\mu$ M 7-ethoxycoumarin(EC)이 용해되어 있는 KHB를 2시간 동안 관류시키면서 일정 시간 간격으로 관류액을 채취하여 관류액 중의 대사산물을 Cha<sup>등</sup><sup>13)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 15분 간격으로 채취한 관류액 1 ml에 0.5 M Tris-HCl buffer(pH 7.4) 0.1 ml, 40 U의  $\beta$ -glucuronidase를 함유하는 Tris-HCl buffer 0.1 ml, 0.4 U의 sulfatase를 함유하는 Tris-HCl buffer 0.1 ml를 각각 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 incubation 하여 포합체들이 효소에 의해 완전히 가수분해되도록 한 후, 15% TCA 0.1 ml를 첨가하여 관류액을 산성화시키고 chloroform 4 ml를 첨가하여 7-hydroxycoumarin(HC)을 추출하였다. Chloroform 층으로 이행된 유리형 HC 3 ml를 취하고, 0.01 M NaOH-1.0 M NaCl Alkaline Salt 용액 4 ml를 넣고 상기와 같이 혼합한 후 원심분리하여 fluorescence spectrophotometer(SFM25, Kontron Instrument)를 사용하여 excitation wavelength 360 nm와 emission wavelength 450 nm에서 형광도를 측정하였다. 각 포합체의 정량은 HC을 같은 추출과정으로 얻은 HC standard curve에 의하여 HC의 절대값으로 환산하고 간 무게, 관류속도를 고려하여 nmol HC/g liver/min으로 환산하였다.

#### Cytochrome P450 1A1 및 cytochrome P450 2B1 mRNA 측정

**Total RNA의 분리** - 적출관류간으로부터 Chomczynski<sup>등</sup><sup>14)</sup>의 방법을 변형하여 total RNA를 분리하였

다. 적출후 2시간 이상 관류시킨 간의 좌엽 0.25 g을 잘라내어 TRIzol 2.5 ml를 가한 후 조직분쇄기를 이용하여 균질화시키고 0.5 ml의 chloroform을 가하여 15초 동안 혼합한 후 상온에서 2~3분간 방치시켰다. 4°C, 12,000 g에서 15분 동안 원심분리하고 수층을 취하여 동일용량의 isopropanol을 가하여 상온에서 10분간 침전시켰다. 다시 12,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 pellet을 취하여 75% ethanol로 세척한 후 건조시켜 0.1% DEPC-treated water에 용해시켰다.

**Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)** - RT-PCR은 Paola등<sup>15)</sup>의 방법에 따라 실시하였다. 분리한 총 RNA 3 µg에 oligo(dT)<sub>15</sub> 20pmol을 가하여 70°C에서 10분간 방치한 후 재빨리 얼음에서 식혔다. 잠시후 1 mM dNTP(dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 1 µl, 0.1 M DTT 2 µl, 5×first strand buffer 4 µl(BRL), M-MLV-RT 200 units, RNasin 20 units를 가하여 섞고 23°C에서 10분, 37°C에서 60분간 반응시키고 95°C에서 10분간 가열하여 RT 반응을 종결시켰다. 총 RT반응액 20 µl중 2 µl를 취하여 2.5 mM dNTP 1 µl, tag polymerase 1 unit, Table II에 나타난 forward/reverse primer 각각 3µmol, capillary 10×reaction buffer(750 mM Tris-HCl pH 9.0, 200 mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Tween), 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2 µl를 가하여 총 반응액 20 µl를 capillary로 옮겨 양끝을 봉입한 후 아래와 같은 조건으로 thermal cycler(대한 medical, Korea)에서 30 cycle을 작용시켰다.

pre-denaturation	94°C	10 sec
annealing	58°C	30 sec
elongation	72°C	60 sec
denaturation	94°C	10 sec
post-elongation	72°C	10 sec

PCR product는 2% agarose gel상에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 확인하였고 band

를 각각 잘라 1M NaCl 용액에서 12시간이상 elution시킨 후 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

**통계학적 처리**

실험결과는 unpaired Student's t-test를 사용하였으며, p<0.05 또는 p<0.01 수준에서 유의성을 검정하였다.

**결 과**

**혈중 ALT 및 AST 활성** - 약물투여에 의한 7-ethoxycoumarin의 대사변화와 관련 간독성 유발여부를 평가하기 위하여 대황, 마황 및 황금 수침엑스를 7일간 투여하고 마지막 투여 24 시간 후에 혈청 ALT 및 AST 활성을 측정하여 그 결과를 ALT/AST ratio로 나타내었다(Table III). 마황 투여군에서 만성 간염정도를 나타내는 지표의 하나인 ALT/AST ratio가 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내었다(p<0.05).

**Lipid peroxidation 측정** - 대황, 마황 및 황금 수침엑스를 7일간 투여하고 마지막 투여 24 시간 후에 적출간의 소포체 분획에서 lipid peroxidation의 하나의 지표로 malondialdehyde 생성정도를 측정하였다. 대황 투여군에서 세포막 손상지표인 간소포체내 lipid peroxidation(MDA 생성)이 Table IV에서와 같이 증가하였다(p<0.05).

**조직학적 관찰결과** - 간독성 지표의 하나로 대황,마

**Table III**—Effects of Rhei rhizoma, Ephedrae herba and Scutellariae radix on ALT/AST ratio in rat liver perfused with 7-ethoxycoumarin

	Control	Rhei rhizoma	Ephedrae herba	Scutellariae radix
ALT/AST	0.60±0.09	0.54±0.04	0.50±0.05*	0.52±0.07

Each value represents mean±S.D. from 7-10 rats. \* means significantly different from control group (p<0.05).

**Table II**—Primer sequence<sup>16,17)</sup>

Primer	bps	Sequence	PCR product size(bps)
CYP1A1-FP	20	5'-CCATGACCAGGAACCTATGGG-3'	341
CYP1A1-RP	20	5'-TCTGGTGAGCATCCAGGACA-3'	
CYP2B1-FP	20	5'-TCACACCGGCTACCAACCCT-3'	201
CYP2B1-RP	20	5'-CTGTGGGTTCATGGAGAGCTG-3'	
β-Actin-FP	18	5'-CCTCTATGCCAACACAGT-3'	153
β-Actin-RP	18	5'-AGCCACCAATCCACACAG-3'	

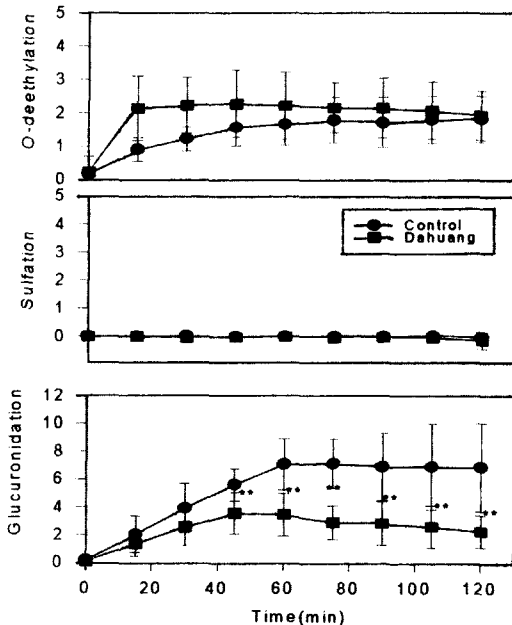
**Table IV**—Effects of Rhei rhizoma, Ephedrae herba and Scutellariae radix on lipid peroxidation in rat liver microsome perfused with 7-ethoxycoumarin

	Control	Rhei rhizoma	Ephedrae herba	Scutellariae radix
MDA levels (nmol/mg protein)	0.2±0.02	0.2±0.05*	0.1±0.02	0.1±0.02

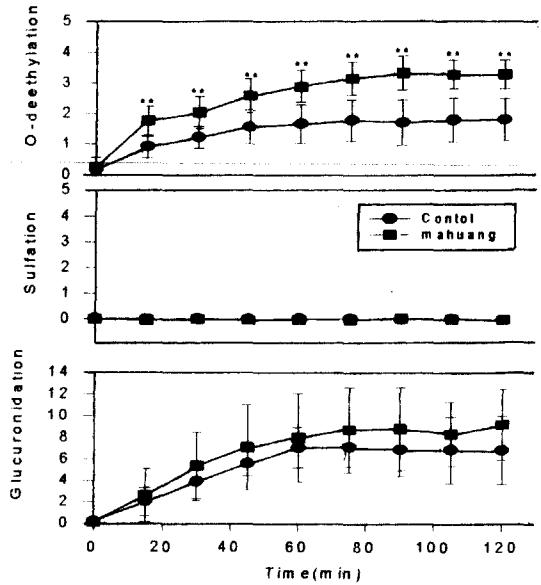
Each value represents mean±S.D. from 5-6 rats. \* means significantly different from control group (p<0.05).

황 및 황금 투여군에서 측정된 조직학적 관찰결과는 대조군에 비해서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

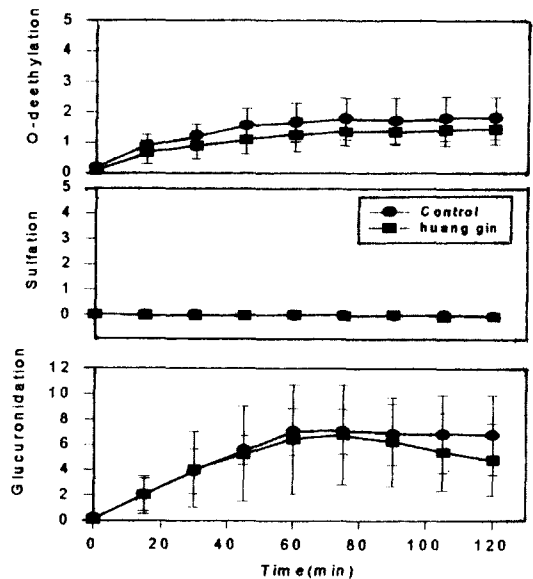
**7-ethoxycoumarin의 대사에 미치는 영향** - 대황, 마황, 황금 수침엑스(1g/kg, 7 days, po)의 투여가 7-ethoxycoumarin의 대사에 미치는 영향을 살펴보고자 2시간 동안 적출간관류를 시행하면서 15분 간격으로 대사체를 분석하여 대조군과 비교하였다. Fig. 1에서와 같이 대황수침엑스 투여군의 경우 7-ethoxycouma-



**Fig. 1**—Effect of Rhei rhizoma on the formation of EC metabolites in rat perfusates. Water extract of Rhei rhizoma (1g/kg/day, po) is pretreated for 7 days and vehicle for control. Values are mean±S.D. of 8 separate experiments, expressed as 7-hydroxycoumarin produced/g liver/min. An asterisk denotes a significant difference from the control at \*\*p<0.01.



**Fig. 2**—Effect of Ephedrae herba on the formation of EC metabolites in rat perfusates. Water extract of Ephedrae herba (1g/kg/day, po) is pretreated for 7 days and vehicle for control. Values are means±S.D. of 8 or 9 separate experiments, expressed as 7-hydroxycoumarin produced/g liver/min. An asterisk denotes a significant difference from the control at \*\*p<0.01.

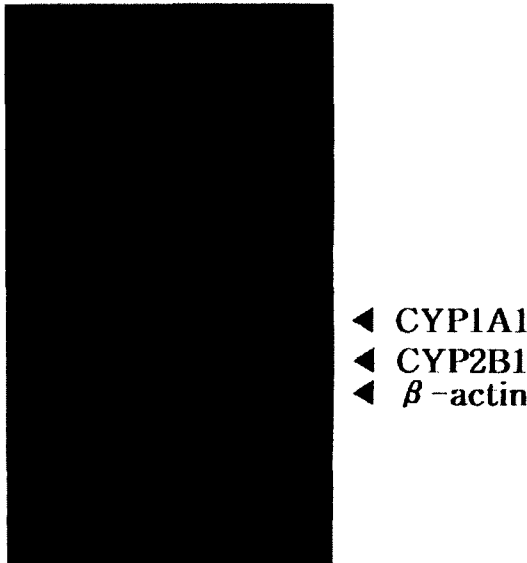


**Fig. 3**—Effect of Scutellariae radix on the formation of Ec metabolites in rat perfusates. Water extract of Scutellariae radix (1g/kg/day, po) is pretreated for 7 days and vehicle for control. Values are means±S.D. of 8 separate experiments, expressed as 7-hydroxycoumarin produced/g liver/min.

rin의 glucuronidation을 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰고(p<0.01), o-deethylation은 증가시켰지만 유의성을 나타내지는 않았다. 마황 수침엑스 투여군에서는 Fig. 2에서와 같이 7-ethoxycoumarin의 o-deethylation을 유의성 있게 증가시켰다(p<0.01). 반면, glucuronidation은 통계학적으로 유의성은 없었으나 증가하는 경향을 보였다. 그러나 Fig. 3에서와 같이 황금 수침엑스 투여군은 7-ethoxycoumarin의 대사에 별다른 영향을 미치지 않았다.

**Cytochrome P450 1A1 및 P450 2B1 mRNA 측정 -**

**고 찰**



**Fig. 4**—PCR products of  $\beta$ -Actin, CYP1A1 and CYP2B1 form rat livers perfused with 7-ethoxycoumarin. Vehicle (lane 1) or water extracts (1g/kg) of Rhei rhizoma (lane 2), Ephedrae herba (lane 3) and Scutellariae radix (lane 4) were pretreated orally for 7 days before liver perfusion.

**Table V**—The quantitation of CYP1A1 and CYP2B1 mRNAs after 2hrs 7-ethoxycoumarin perfusion in rats pretreated with vehicle or water extracts (1g/kg, po) of Rhei rhizoma, Ephedrae herba and Scutellariae radix for 7 days.  $\beta$ -actin was used as a internal standard

	Control	Rhei rhizoma	Ephedrae herba	Scutellariae radix
CYP2B1/ $\beta$ -actin	1.1 $\pm$ 0.05	1.0 $\pm$ 0.03	1.2 $\pm$ 0.43	0.8 $\pm$ 0.15
CYP1A1/ $\beta$ -actin	0.3 $\pm$ 0.02	0.4 $\pm$ 0.14	0.9 $\pm$ 0.71	0.4 $\pm$ 0.10

Each value represents mean  $\pm$ S.D. from 3 rats.

대황, 마황 수침엑스 투여에 의한 7-ethoxycoumarin의 대사변화와 관련하여 관련효소의 생합성 증가/감소에 의한 것인지 여부를 살펴보고자 적출관류간에서 total RNA를 분리한 후 RT-PCR을 실시하여 CYP 1A1 및 CYP 2B1 mRNA 생합성 변화여부를 대조군과 비교하였다. Fig. 4 및 Table V에서와 같이 대조군에 비하여 마황투여군에서 CYP 1A1 level이 증가하였지만 통계적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았다.

약물 대사연구방법의 일환으로 지난해 확립한 적출관류법은 간 전체를 실험에 사용하는 방법으로 생체 내 다른 장기의 영향없이 순수하게 간에서만 일어나는 약물의 변화를 관찰할 수 있으며 약물대사시 필요한 여러 보조인자들은 간세포 내에 존재하거나 재생되는 것을 이용하기 때문에 비교적 *in vivo*에 근접한 대사연구 방법이라고 할 수 있다.<sup>18,19)</sup> 이 방법은 관류액을 통해 약물을 직접 간에 적용할 수 있는 장점을 가지고 있으나 본 실험에서는 천연물이 간 대사에 미치는 영향을 살펴보고자 하였으므로 비교적 장기간 복용하는 천연물의 특성을 고려하여 관류액에 직접 적용하는 대신 천연물은 실험동물에 일정기간 직접 투여하고 7-ethoxycoumarin을 관류액에 적용 그 대사에 미치는 영향을 관찰하였다. 7-ethoxycoumarin은 cytochrome P450 1A1 및 P450 2B1에 의하여 대사되어 Fig. 5와 같은 대사체를 생성하는 것으로 알려져 있으며, 적출관류법을 통해 phase I 반응과 phase II 반응을 동시에 관찰하기 위한 모델 약물로 사용하였다.

지난해 간독성물질인 CCl<sub>4</sub> 투여(0.75 ml/kg, ip)에 의하여 7-ethoxycoumarin의 glucuronide 포함체 생성량이 대조군에 비하여 최대 10% 이하로 감소되고 o-deethylation은 50%이상 감소되었음을 관찰하였고 이와 관련 CYP 2B1 mRNA level이 증가함을 확인한 바 있다.<sup>20)</sup> 본 실험에서 1g/kg의 용량으로 대황 수침엑스를 7일간 랫드에 경구투여한 후 45분 이후부터 7-ethoxycoumarin의 o-deethylation에 영향없이 glucuronidation을 약 40% 이상 감소시켰다. 이러한 결과는 대황이 간에서 UDP-glucuronosyltransferase에 의해 이루어지는 7-ethoxycoumarin의 대사를 감소시키는 것을 시사한다. 대황의 주성분중 하나인 emodin이 대사되어 포함체를 형성하는 것으로 알려져 있으므로<sup>21)</sup>

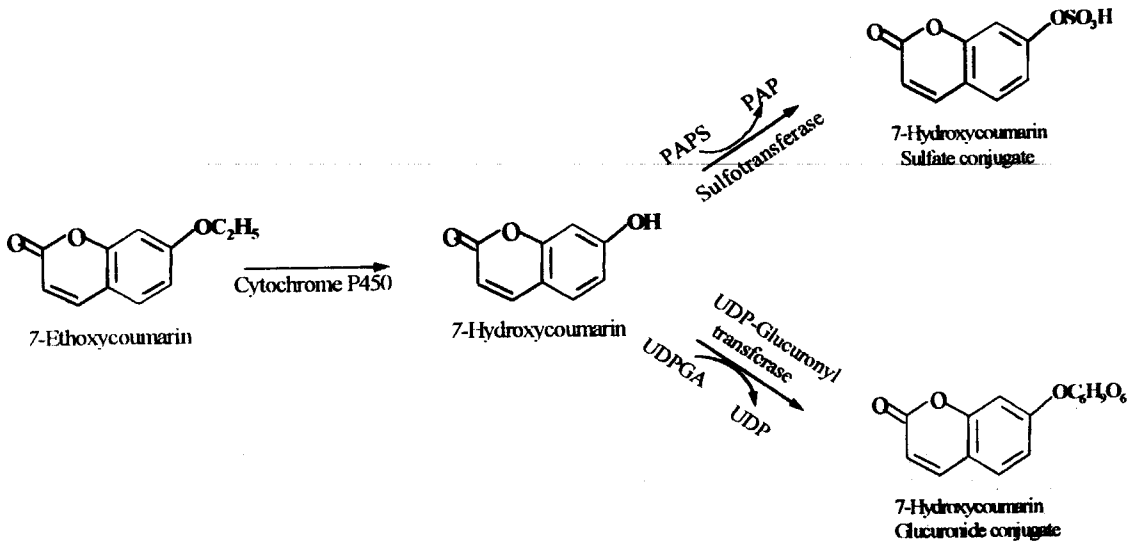


Fig. 5 — Biotransformation pathway of 7-ethoxycoumarin

이에 의한 간세포내 UDP-glucuronic acid 감소를 생각해 볼 수 있다. 또한 대황투여가 직접 UDP-glucuronosyltransferase 활성을 감소시켰을 가능성도 생각해 볼 수 있다. BHA(butylated hydroxyanisole)는 여러 물질의 독성을 감소시키는 것으로 알려져 있는데 mouse에서 UDP-glucuronosyltransferase 활성과 UDP-glucuronic acid level이 증가함이 관찰된 바 있다.<sup>22)</sup> Acetaminophen은 약 60% 이상이 glucuronidation에 의해 배출되는 것으로 알려져 있으며 랫드에서 UDP-glucuronosyltransferase의 유전적 결함에 의해 acetaminophen 간독성이 유발될 수 있음이 밝혀진 바 있다.<sup>23)</sup> 앞으로 대황이 진통해열제로 널리 사용되고 있는 acetaminophen의 glucuronidation에 미치는 영향을 살펴보는 것도 흥미로울 것이며, glucuronidation에 영향을 미치는 대황의 성분을 확인하기 위한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

한편 1 g/kg의 용량으로 7일간의 마황수침엑스 경구 투여는 랫드에서 15분 이후 7-ethoxycoumarin의 *o*-deethylation을 약 2배이상 증가시켰다. 이러한 결과는 마황이 7-ethoxycoumarin의 *o*-deethylation에 관여하는 효소의 활성을 증가시켰음을 의미한다. 본 실험에서는 이러한 활성증가가 7-ethoxycoumarin specific하다고 알려진<sup>24, 25)</sup> cytochrome P450 1A1 및 P450 2B1의 생합성 증가/감소에 의한 것인지 여부를 살펴보고자 적출관류간에 대한 mRNA level 차이를 살펴보았다. 그 결과, 마황투여군에서 대조군에 비하여 CYP 1A1 lev-

el이 증가하였지만 통계적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 마황의 어떤 특정 성분이 cytochrome P450을 induction하는지에 대하여 현재까지 알려진 바는 없으며, 본 연구와 관련하여 현재 마황의 주성분인 ephedrine이 배양간세포에서 cytochrome P450을 induction하는지 여부에 관한 실험을 진행중이다.

또한 이들 천연물이 간에 미치는 독성 정도를 평가하기 위하여 혈청 ALT 및 AST 활성을 측정하고 적출관류간에 대한 lipid peroxidation 정도의 측정 및 조직병리학적인 변화를 관찰하였다. 마황투여군에서 만성간염 정도를 나타내는 지표의 하나인 ALT/AST ratio<sup>26)</sup>의 변화가 관찰되어 마황의 만성간염 유발 가능성을 제시하며, 대황투여군에서는 적출관류간에 대한 lipid peroxidation 정도가 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었음을 관찰하였는데 이는 대황투여에 의해 간세포체막이 손상되었을 가능성을 시사한다. 대황의 간세포 독성은 anthraquinone 유도체인 rhein에 의한 영향을 고려해 볼 수 있다.<sup>27)</sup> 그러나 두 군 모두 조직학적 관찰결과는 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았다. 따라서 이들 천연물의 간독성 정도는 다른 간독성 지표의 측정 등 좀 더 심도있는 기전 연구가 필요한 것으로 사료된다.

## 문 헌

- 1) Loeper, J., Descatoire, V., Letteron, P., Moulis,

- C., Degott, C., Dansette P., Fau D. and Pessayre, D. : Hepatotoxicity of Germander in Mice. *Gastroenterology* **106**, 464 (1994).
- 2) Lekehal, M., Pessayre, D., Lereau, J. M., Moulis, C., Fouraste, I. and Fau, D. : Hepatotoxicity of the Herbal Medicine Germander : Metabolic activation of its furano diterpenoids by cytochrome P4503A depletes cytoskeleton-associated protein thiols and forms plasma membrane blebs in rat hepatocytes. *Hepatology* **24**, 212 (1996).
  - 3) Duncan, P. E., Griffin, J. P. and Solomon, S. S. : Bronchodilator drug efficacy via cyclic AMP. *Thorax*. **30**(2), 192 (1975).
  - 4) Dulloo, A. G., Seydoux, J. and Girardier, L. : Peripheral mechanism of thermogenesis induced by ephedrine and caffeine in brown adipose tissue. *Int. J. Obes.* **15**(5), 317 (1991).
  - 5) Hikino, H., Konono, C., Takata, H. and Tamada, M. : Antiinflammatory principle of ephedra herbs. *Chem. Pharm. Bull.* **28**(10), 2900 (1980).
  - 6) Lin, M. T., Liu, G. G., Wu, W. L. and Chern, Y. F. : Effects of chinese herb, huang chin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) on thermoregulation in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **30**(1), 59 (1980).
  - 7) Chiu, H. F., Lin, C. C., Yen, M. H., Wu, P. S. and Yang, C. Y. : Pharmacological and pathological studies on hepatic protective crude drugs from Taiwan(V) : The effects of *Bombax malabarica* and *Scutellaria rivularis*. *Am. J. Chin Med.* **20**(3-4), 245 (1992).
  - 8) Nadir, A., Agrawal, S., King, P. D. and Marshal, J. B. : Acute hepatitis associated with the use of chinese herbal product, ma-huang. *Am. J. Gastroenterol.* **91**(7), 1436 (1996).
  - 9) Larrey, D. and Pageaux, G. P. : Hepatotoxicity of herbal remedies and mushrooms. *Seminars in liver disease* **15**(3), 183 (1995).
  - 10) Trush, M. A., Mimmaugh, E. G., Ginburg, E. and Gram, T. E. : Studies on the in vitro interaction of mitomycin C, nitrofurantoin and paraquat with pulmonary microsomes. -Stimulation of reactive oxygen dependent lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 805 (1982).
  - 11) Bose, R., Schnell, C. L., Pinsky, C. and Zitko, V. : Effects of excitotoxins on free radical indices in mouse brain. *Toxicol. Lett.* **60**, 211 (1992).
  - 12) Sies, H. : The use of perfusion of liver and other organs for the study of microsomal electron transport and cytochrome P<sub>450</sub> systems. *Meth. Enzymol.* **54**, 48 (1978).
  - 13) Cha, Y. N., Dong, M. S. and Hong, S. S. : Functional relationship between initial oxidation of 7-ethoxycoumarin and subsequent conjugation of 7-hydroxycoumarin in isolated perfused rat livers. *Chem. Biol. Interactions* **61**, 125 (1987).
  - 14) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156 (1989).
  - 15) Omiecinski, C. J., Redlich, C. A. and Costa, P. : Induction and development expression of cytochrome P450iA1 messenger RNA in rat and human tissue. *Cancer Research* **50**, 4315 (1990).
  - 16) Traber, P. G., Wang, W., McDonnell, M. and Gumucio, J. J. : P450IIB gene expression in rat small intestine-cloning of intestinal P450IIB1 mRNA using the polymerase chain reaction and transcriptional regulation of induction. *Mol. Pharmacol.* **37**, 810 (1990).
  - 17) Heuvel, J. P. V., Clark, G. C., Kohn, M. C., Tritscher, A. M., Greenke, W. F., Lucier, G. W. and Bell, D. A. : Dioxin-responsive genes-examination of dose response regulationships using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Cancer Research* **54**, 62 (1994).
  - 18) Scholz, R., Hansen, W. and Thurman, R. G. : Interaction of mixed-function oxidation with biosynthetic processes : inhibition of gluconeogenesis in perfused rat liver by aminopyrine. *Eur. J. Biochem.* **38**, 64 (1973).
  - 19) Conway, J. G., Kauffman, F. C., Tsukada, T. and Thurman, R. G. : Glucuronidation of 7-hydroxycoumarin in periportal and pericentral regions of the liver lobule. *Mol. Pharmacol.* **23**, 487 (1983).
  - 20) Chang, Y. S., Choi, K. H., Kim, S. S., Park, Y. J., Ahn, M. R., Chung, H. J., Kim, D. S., Ahn, B. W. and Sheen, Y. Y. : Studies on effect of natural products on hepatic metabolism(I). *Ann.*



- Report of KFDA 1, 487 (1996).
- 21) Bachmann, M. and Schlatter, C. : Metabolism of [<sup>14</sup>C]emodin in the rat. *Xenobiotica* **11**(3), 217 (1981).
  - 22) Hjelle, J. J., Hazelton, G. A. and Klassen, C. D. : Increase UDP-glucuronosyltransferase activity and UDP-glucuronic acid concentration in the small intestine of butylated hydroxyanisole-treated mice. *Drug Metabolism and Disposition* **13**, 68 (1985).
  - 23) De Moris, S. M. and Wells, P. G. : Deficiency in bililubin UDP-glucuronyltransferase as a genetic determinant of acetaminophen toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**(1), 323 (1988).
  - 24) Rosenberg, D. W. : Tissue specific induction of carcinogen inducible cytochrome P450 isoform, P450IA1, in colonic epithelium. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**(1), 223 (1991).
  - 25) Shen, S. and Strobel, H. W. : The role of cytochrome P450 lysine residues in the interaction between cytochrome P450IA1 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**(1), 83 (1992).
  - 26) Bonacini, M., Hadi, G., Govindagajan, S. and Kindsay, K. L. : Utility of a discriminated score for diagnosing advanced fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am. J. Gastroenterol.* **92**(8), 1302 (1997).
  - 27) Bironite, D. and Olineger, K. : The hepatotoxicity of rhein involves impairment of mitochondrial functions. *Chem. Biol. Interact.* **103**(1), 35 (1997).