

생약의 β -Glucuronidase 저해와 간장보호효과

심상범¹, 박주석¹, 김남재², 김동현^{1*}

¹경희대학교 약학대학, ²동서의학연구소

β -Glucuronidase-inhibitory Activity and Hepatoprotective Effect of Herbal Medicines

Sang-Bum Shim¹, Ju-Suk Park¹, Nam-Jae Kim² and Dong-Hyun Kim^{1*}

¹College of Pharmacy, and

²East-West Research Institute, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract - Inhibitory effect of water and ethyl acetate extract of 60 kinds of herbal medicines was investigated on β -glucuronidase. Among water extract of them, Galla Rhois had the most potent β -glucuronidase-inhibitory activity. Terminalia Fructus, Amomi Tsa-ko Fructus and Arecae Semen were also potent inhibitors. Among ethyl acetate extract of them, Galla Rhois had the most potent β -glucuronidase-inhibitory activity. Nelumbinis Semen, Ephedrae Radix and Terminalia Fructus were also potent inhibitors. The extract of Galla Rhois had potent hepatoprotective effect on CCl₄-induced hepatotoxicity of rats. These results suggest that the β -glucuronidase seems to be closely related to the liver injury, which could be prevented by the inhibitor of β -glucuronidase.

Key words - β -glucuronidase inhibitor; hepatotoxicity; herbal medicine; Galla Rhois.

β -Glucuronidase(EC 3.2.1.31)는 glucuronic acid의 β -형태의 1번 탄소에 비당체가 결합한 glucuronide unit를 가수분해하는 효소이다. 이 효소는 미생물, 식물, 동물 등에 폭넓게 분포하고 있으며, 동물에서는 주로 간장과 신장에 분포하고 있다. 이 효소중 간장에서 분리한 것은 분자량이 300,000 dalton이고 동일한 4개의 subunit로 구성되어 있으며 등전점은 5.8이다.^{1,2)} 사람의 장내세균인 *E. coli* HGU-3로부터 분리정제한 이 효소는 분자량 290,000 dalton이고 동일한 4개의 subunit로 구성되어 있으며 등전점은 4.8이었다.³⁾ 간장해, 갑상선 기능항진, 임신, 당뇨병, 쿠싱병, 본태성고혈압, 요로감염, 자궁경부암 등이 발생하면 이 효소의 활성이 증가하며, 선천적으로 β -glucuronidase가

*교신저자 : Fax 82-2-957-5030

부족하면 mucopolysaccharide storage disease를 일으키는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} Levy 등은 간독성물질을 생쥐에 투여하면 간장의 β -glucuronidase 효소활성이 증가하고 회복되면 정상치로 환원된다고 보고했다.⁴⁾ Mill 등은 생쥐에게 고지질식을 섭취시킨 결과 지방간이 생성된 경우 이 효소의 활성이 증가되었다고 보고하고 있다.⁵⁾ Pineda 등도 간질환과 혈청 β -glucuronidase 효소활성과의 상관관계를 조사한 임상결과에 의하면 급성바이러스성 및 약물로 인한 간염환자의 94%가 혈청 β -glucuronidase 활성이 현저히 증가하였고 회복과 함께 효소활성은 정상치로 떨어졌다고 보고하고 있다.⁶⁾ 일반적으로 간장약의 약효는 *in vivo*에서 CCl₄와 같은 간장해 약물에 의해 상승된 혈중 GOT나 GPT효소의 저해활성으로 평가하고 있다. 최근 저자

등에 의해 silymarin, 영지버섯의 간장보호효과에 대해 GOT와 GPT의 효소활성과 β -glucuronidase 효소 저해활성과의 상관관계를 조사하여 본 결과 silymarin이나 영지버섯이 혈청 GOT와 GPT의 효소활성을 상당히 억제하였을 뿐만 아니라 혈청 β -glucuronidase 효소활성도 억제하였다. Silymarin이나 영지버섯은 *in vitro* 실험에서도 β -glucuronidase를 효과적으로 저해하였다.^{7,8)} 이러한 결과로 미루어 보아 β -glucuronidase의 저해제를 개발한다면 간장약으로 개발이 가능할 것으로 생각된다. 그래서 본 연구에서는 생약으로부터 β -glucuronidase 저해제활성을 조사하고 그중에서 저해활성이 우수했던 오배자에 대해 간장보호효과를 조사하여 보았다.

재료 및 방법

실험재료 - 오배자 등 60종의 생약은 경동시장(홍인 약업주식회사)에서 구입하여 사용하였으며, GAM 배지는 日水製藥(株)(일본)에서 구입하여 사용하였으며, p-nitrophenyl- β -D-glucuronide 등은 Sigma사(미국)에서 구입하여 사용하였다. GOT 및 GPT 측정시약은 아산제약(주)에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 특급시약을 구입하여 사용하였다.

생약시료의 추출 - 생약 50 g에 증류수 200 ml 또는 ethyl acetate 200 ml를 가하여 수욕상에서 8 시간 동안 추출한 후 여과하고, 다시 잔사에 증류수 또는 ethyl acetate 10 ml를 가하여 4시간 동안 추출한 후 여과하여 얻은 각각의 분획을 합치고 감압 농축하여 각각의 물분획(water Ex) 또는 ethyl acetate 분획(EtOAc Ex)을 얻어 실험에 사용하였다.

β -Glucuronidase 효소의 부분 정제 - 김 등의 방법³⁾에 따라 *E. coli* HGU-3균주로부터 β -glucuronidase를 부분정제하고, SD계 흰쥐의 간장(rat liver)으로부터 얻은 β -glucuronidase는 Akao 등의 방법⁹⁾에 따라 부분정제하여 사용하였다.

β -Glucuronidase 효소활성 측정³⁾ - 0.1 M phosphate buffer 0.38 ml에 10 mM p-nitrophenyl- β -D-glucuronide 0.02 ml, 효소액 0.1 ml를 가하여 37°C에서 한 시간 반응시키고 0.5 N NaOH 0.5 ml를 가해 반응을 종료시키고 증류수 1 ml를 가하여 원심분리(2000×g, 20 min)한 후 상

등액의 흡광도를 405 nm에서 측정하였다.

간장해 모델동물 - SPF 흰쥐는 대한동물로부터 구입하여 청청구역(Myungjin Clean Rack)에서 사육하고 물과 사료(삼양사)는 자유롭게 먹을 수 있도록 하고 실험실에서 1주일이상 순화시킨후 사용하였다.

흰쥐(220-250 g Sprague-Dawley계 male)를 한군에 6마리로 하여 체중 100 g당 20% CCl₄ (olive oil로 희석)을 1 ml씩 경구투여 하여 간장해 모델 동물을 만들었다. 약물들은 각각 CCl₄투여 30분전에 경구투여하였다. 이후 24시간 후에 심장 채혈하여 Reitmann-Frankel법¹⁰⁾에 따라 혈청을 분리하여 GOT 및 GPT를 측정하였다.

결 과

생약의 β -glucuronidase 효소활성에 미치는 효과 - 현재 많이 빈용되는 생약류를 물추출분획과 EtOAc추출분획에 대하여 β -glucuronidase 효소 저해활성을 측정하였다 (Table I). 물추출분획중에 저해활성이 우수한 것은 오배자였으며, 그 다음은 가자, 초과, 빈랑자 순이었으며, ethyl acetate 추출분획중에서 저해활성이 우수한 것은 오배자였으며 그 다음은 연자육, 마황근, 가자 순이었다. 이 중에서 저해효과가 우수했던 오배자의 물추출분획에 대해 흰쥐의 간장 및 대장균의 β -glucuronidase 저해 활성에 대해 측정한 결과 50% 저해를 보이는 농도는 각각 0.02과 0.01 mg/ml이었다 (Table II).

***In vivo*에서의 간장보호효과** - CCl₄로 유도된 마우스의 간장해에 대한 오배자의 물분획의 간장보호 효과를 조사하였다 (Table III). 대조약물로 사용한 silymarin에 비해 오배자는 β -glucuronidase의 저해활성은 강하였으나 간장보호효과의 지표로 사용되는 혈중 GOT 및 GPT value를 측정한 결과 유의한 저해효과를 나타냈다. 하지만 silymarin이 GOT와 GPT에서 각각 52%, 34% 저해효과를 나타낸데 비해 오배자의 물분획은 각각 29%와 20%의 낮은 저해효과를 나타냈다.

고 찰

현재 한방에서 빈용되는 생약의 β -glucuronid-

Table I. Inhibitory effects of herbal medicines on β -glucuronidase activity of *E. coli* HGU-3

Herbal medicine ^{a)}	Inhibition (%)		Herbal Medicine	Inhibition (%)	
	Water Ex	EtOAc Ex		Water Ex	EtOAc Ex
Acanthopanax Cortex	36.3	27.1	Evodiae Fructus	23.2	-
Achyranthis Radix	19.2	11.6	Foeniculi Fructus	31.5	26.1
Aconiti Koreani Tuber	6.5	21.8	Galla Rhois	93.0	93.6
Alismatis Rhizoma	9.3	11.4	Ginseng Radix Alba	13.2	17.2
Alpiniae Fructus	34.3	23.0	Glycyrrhizae Radix	36.5	41.7
Alpiniae officinari Rhizoma	60.6	31.4	Kalopanax Cortex	37.3	20.9
Amomi Tsao-ko Fructus	71.7	62.0	Linderae Radix	24.4	32.1
Anemarrhenae Rhizoma	11.3	26.6	Liriopsis Tuber	0.2	19.2
Angelicae koreanae Radix	8.1	30.0	Lycii Fructus	7.9	7.5
Arecae Semen	71.1	19.0	Magnoliae Cortex	23.4	5.2
Armeniaca Semen	14.4	20.1	Menthae Herba	5.5	33.6
Asiasari Radix	20.4	4.3	Mori Cortex Radicis	20.0	40.2
Atractylodis Rhizoma	9.7	20.2	Moutan Cortex Radicis	35.4	17.0
Aurantii Nobilis Pericarpium	8.7	23.0	Nelumbinis Semen	14.0	87.0
Bupleuri Radix	25.2	1.7	Nepetae Spica	49.2	17.2
Caesalpiniae Lignum	-	54.4	Paeoniae Radix	26.2	9.3
Cassiae Semen	20.8	-	Perillae Herba	22.4	18.0
Chaenomelis Fructus	55.6	50.4	Phellodendri Cortex	20.5	20.7
Cinnamomi Cortex Spissus	15.6	1.4	Pinelliae Tuber	5.6	9.9
Clematidis Radix	27.7	13.1	Platycodi Radix	14.1	2.5
Cnidii Rhizoma	25.8	8.5	Polygoni Multiflori Radix	67.5	58.1
Coptidis Rhizoma	13.1	23.8	Polyporus	11.1	22.1
Cuscutae Semen	29.6	24.1	Schizandrae Fructus	7.5	29.2
Cyperii Rhizoma	15.8	4.2	Scirpi Rhizoma	22.8	11.4
Dioscorea Rhizoma	1.8	7.6	Scutellariae Radix	30.5	29.1
Ephedrae Herba	61.9	35.1	Sinomeni caulis et Rhizoma	20.0	43.0
Ephedrae Radix	61.9	85.4	Termaliae Fructus	83.3	63.5
Epimedii Herba	33.8	17.5	Uncariae Ramulus et Uncus	60.8	10.9
Eucommiae Cortex	11.6	29.2	Zingiberis Rhizoma	2.0	-
Euryales Semen	8.0	2.8	Zizyphi Fructus	-	33.4

^{a)}Final concentration was 0.08 mg/ml.

Table II. Inhibitory effects of water-soluble fraction of Galla Rhois on β -glucuronidase activity of *E. coli* HGU-3 and rat liver

	IC ₅₀ (mg/ml)	
	<i>E. coli</i> HGU-3	Rat liver
Galla Rhois	0.01	0.01
Silymarin	0.1	0.08

ase 저해능이 우수한 생약을 선별코자하였다. 그 결과 저해활성이 우수한 생약은 오배자, 가자, 빈랑자, 마황근 등이 우수했다. 그러나 실험하는 중에 생약 추출물들이 갖고있는 고유한 색깔 때문에 저해활성을 조사하지는 못한 것과 고농도에서 저해활성을 측

Table III. Effect of Galla Rhois on serum GOT and GPT activities of rats treated with CCl₄

Group	CCl ₄ (20%) (ml/kg)	Dose (mg/kg p.o.)	No. of Animal	GOT activity (Karamen units)	GPT activity (Karamen units)
Normal	-	-	6	92.9±34.2	381.9±134.2
CCl ₄ -treated control	10	-	6	2568.3±275.4*	2088.4±325.6*
Galla Rhois	10	100	6	1825.2±240.2*	1674.6±386.8*
Silymarin	10	100	6	1228.0±280.7*	1377.0±204.6*

Mean standard error. *Statistically significant compared to normal data (p<0.05). *Statistically significant compared to control data (p<0.05).

정하는 것이 곤란한 생약에 대해서는 저해활성을 조사할 수 없었다.

β -Glucuronidase 저해활성이 우수한 오배자에 대해 간장보호효과를 측정한 결과 우수한 간장보호효과를 나타냈다. 그러나 오배자는 silymarin보다 우수한 β -glucuronidase 저해효과를 보였지만 *in vivo*에서의 간장보호효과는 오히려 silymarin이 우수했다. 그래서 오배자의 주성분인 tannic acid를 분리하여 간장보호효과를 측정한 결과 전혀 효과가 없었고 오히려 CCl_4 에 의한 간손상을 촉진하였다. 이러한 효과 때문에 오배자는 silymarin보다 *in vitro* 실험에서 저해활성이 우수함에도 불구하고 간장보호효과가 낮았다. 오배자로부터 간장보호효과가 있는 성분은 분리하지 못했지만 tannic acid이외의 성분에 의해 간장보호효과를 나타낸 것으로 생각된다. 모든 생약의 β -glucuronidase 저해효과와 간장보호효과가 상관성이 있다고 할 수는 없지만 새로운 간장보호제를 검색하는 방법으로써 유효할 것으로 생각된다. 또한 간장해의 지표가 되는 것은 GOT, GPT, LDH, TG 등의 외에도 β -glucuronidase를 측정하는 것은 중요한 지표가 될 것으로 생각되며, 이 효소는 재독성화반응(retoxication)을 촉매하는 효소이므로 이 효소의 선택적인 저해제는 간장해의 치료효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

인용문헌

1. Stahl, P. D. and Fishman, W. H. (1983) β -Glucuronidase. In Bergmeyer, H. U. (ed.), Method of enzymatic analysis, Vol. 4, 246-256. Verlagie, Weinheim.
2. Baba, S., Wada, H. Kitamura, M. and Okuda, J. (1989) Handbook of clinical enzymes. 2nd, 261-263, Kodansa Scientific press, Tokyo.
3. Kim, D.-H., Jin, Y.-H., Jung, E.-A., Han, M. J. and Kobashi, K. (1995) Purification and characterization of β -glucuronidase from *E. coli* HGU-3, a human intestinal bacterium, *Biol. Pharm. Bull.* 18: 1184-1188.
4. Levy, G. A., Kerr, L. M. H. and Campell, J. C. (1948) β -Glucuronidase and cell proliferation. *Biochem. J.* 53: 462-467.
5. Mills, G. T. and Smith, E. E. B. (1951) The β -glucuronidase activity of chemically induced rat hepatoma. *Sci.* 114: 690.
6. Pineda, E. P., Goldbarg, J. A., Banks, B. M. and Rutenburg, A. M. (1959) The significance of serum β -glucuronidase activity in patients with liver disease. *Gastroenterol.* 36: 202-213.
7. Kim, D.-H., Jin, Y.-H., Park, J.-B. and Kobashi, K. (1994) Silymarin and its components are inhibitors of β -glucuronidase. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 443-445.
8. Kim, D.-H., Kim, N.-J. and Shim, S.-B. (1999) β -Glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biol. Pharm. Bull.* 22: 162-164 (1999).
9. Akao, T., Akao, T., Hattori, M., Kanaoka, M., Yamamoto, K., Namba, T. and Kobashi, K. (1991) Hydrolysis of glycyrrhizin to 18 β -glycyrrhetyl monoglucuronide by lysosome β -D-glucuronidase of animal livers. *Biochem. Pharmacol.* 41: 1025-1029.
10. Reitman, S. and Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Path.* 28: 56-63.

(1999년 1월 17일 접수)