

수종의 생약 물 추출물의 BNL cl.2 Cells 보호효과

강태현, 김도훈, 고용석, 김은철, 김윤철*

원광대학교 약학대학

Protective Effects of the Water Extracts of Herbal Medicine on BNL cl.2 Cells

Tai Hyun Kang, Do Hoon Kim, Yong Suk Ko,

Eun Chul Kim and Youn Chul Kim*

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract—The protective effects of the water extracts of nine kinds of medicinal herbs, which have been reputed to having the hepatoprotective activity in Chinese herbal medicine, on BNL cl.2 cells using a MTT assay were investigated. Five extracts including *Coriolus versica*, *Curcuma longa*, *Phellinus linteus*, *Polygonum aviculare*, and *Salvia miltiorrhiza* showed the protective effects on BNL cl.2 cells damaged by CCl_4 with ED_{50} values of less than 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Silymarin had been used as a positive control.

Key words—Hepatoprotective: BNL cl.2 cells; CCl_4 ; MTT assay; crude drugs.

간질환의 위험성은 뚜렷한 진단지표가 없으며 자각증상이 거의 없이 진행되다가 발현시에는 치료가 매우 어려운 상태가 된다. 천연물로부터 개발된 간질환 치료약물 중 대표적인 것으로는 silymarin, gomisin 및 glycyrrhizin 등이 있으나,¹⁾ 현재까지 간질환에 결정적으로 유효한 치료제는 없는 실정이다. 우리 나라에 있어서 간질환으로 사망하는 비율이 점차 증가하고 있어서 간질환 치료약물의 개발은 매우 중요하다. 간질환 치료제의 개발을 위한 효능 검색방법은 매우 다양하며, 그 중 비교적 간편하고 재현성이 높은 *in vitro* 방법이 널리 이용되고 있다. 최근 일차 배양 흰쥐 간세포를 이용하는 검색방법에 의한 간보호 효과물질의 탐색이 활발히 진행되고 있다.^{2,3)} 이 방법은 비교적 간단하다고 알려져 있으나 perfusion에 의한 간세포 분리 등 손쉽게 이용하기에는 어려운 점이 있다. 한편, transformed cell line인 BNL cl.2 세포주는 세포의 유지가 용이하며,

이 세포는 BALB/c mouse의 normal liver embryo에서 유래한 것으로 간기능 기전연구에 이용되고 있는 점에 착안하여,^{4,5)} 저자 등은 천연물로부터 간보호물질 탐색을 위한 기초연구의 일환으로 BNL cl.2 세포주를 이용하여 검색방법을 설정하고 이 방법에 의해 한방 및 민간에서 간질환의 치료에 널리 이용되고 있는 9종의 생약을 선정하여 각각의 물 추출물을 이용하여 CCl_4 로 유발시킨 간세포 손상에 대하여 각각의 보호활성을 MTT assay를 사용하여 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기—재료 생약은 원광제약(익산시)에서 구입하여 사용하였으며 증거표본은 원광대학교 약학대학 생약표본실에 보관되어 있다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), silymarin은 Sigma사

*교신저자 : Fax 0653-852-8837

(St. Louis, MO), D-glucose(4.5 g/l)를 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS) 및 기타 조직배양시약은 Life Technologies로부터 구입하였다. 흡광도 측정은 ELISA Reader(Molecular Devices)를 사용하였다.

표준추출물의 제조 - 건조시킨 각각의 생약은 세절하고 증류수를 가하여 100℃, 2시간 추출한 다음 여과하고 여액을 동결건조하여 물 추출물을 얻고 이를 시료로 사용하였다.

BNL cl.2 cells의 배양 및 검색조건의 검토 - BNL cl.2 cells는 10% heat-inactivated FBS, penicillin G(100 IU/ml), streptomycin(100 µg/ml)을 포함한 DMEM 배양액을 사용하여 CO₂ incubator(37℃, 5% CO₂)에서 배양하였다. BNL cl.2 cells(1×10⁶ cells/ml)를 24 well plate에 넣고 24시간 배양한 다음 DMSO에 녹인 CCl₄를 단계별 농도(0.5-4 mM)로 처리하고 각각을 2, 4, 6, 12, 18시간 후에 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다.

MTT assay - Mosmann의 방법⁶⁾을 이용하였으며, 새로 조제한 MTT 50 µg/ml가 포함된 배양액을 각 well에 100 µl씩 넣어 4시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고 DMSO를 2.0 ml/well씩 넣어 실온에서 5분간 방치하여 생성된 formazan을 용해시킨 후, ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

시료의 처리 - BNL cl.2 cells(1×10⁶ cells/ml)를 24 well plate에 넣고 24시간 배양한 다음 시료(10, 100, 500 µg/ml)와 CCl₄(1.0 mM)를 동시처리하고 12시간 배양한 다음 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 시료의 전처리 시험은 시료처리를 하고 12시간 후에 배지를 갈아준 다음 CCl₄(1.0 mM)를 넣고 12시간 배양하였으며, 시료의 후처리 시험은 CCl₄(1.0 mM)를 넣고 12시간 후에 배지를 갈아준 다음 시료를 처리하고 12시간 배양하고 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하고 linear regression법을 이용하여 ED₅₀치를 구하였다.

보호 효과율(%) =

$$\frac{\text{시료 처리군의 흡광도} - \text{CCl}_4 \text{ 처리군의 흡광도}}{\text{CCl}_4 \text{ 미처리군의 흡광도} - \text{CCl}_4 \text{ 처리군의 흡광도}} \times 100$$

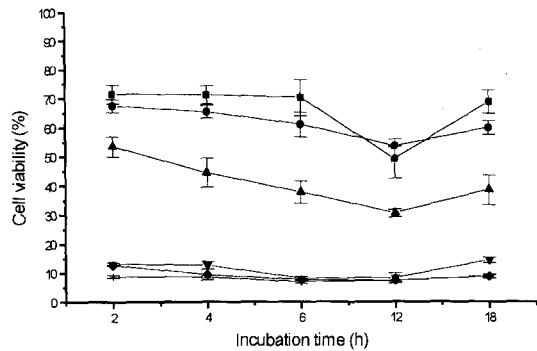


Fig. 1. Cytoviability of BNL cl.2 cells exposed to different doses of CCl₄ and times assessed by MTT assay. Each point represent the mean±SD of three independent experiments. ■: CCl₄(0.5 mM), ●: CCl₄(0.75 mM), ▲: CCl₄(1.0 mM), ▼: CCl₄(2.0 mM), ◆: CCl₄(3.0 mM), +: CCl₄(4.0 mM).

결과 및 고찰

CCl₄는 trichloromethyl free radical(CCl₃·)로 된 후 즉시 trichloromethylperoxy radical(OOCCl₃·)로 변환되며 이에 관여되는 electron은 NADPH-cytochrome P450 reductase를 통해서 NADPH로부터 cytochrome P450까지 전달된다. 이 trichloromethylperoxy radical(OOCCl₃·)의 covalent binding과 lipid peroxidation에 의해 cell damage를 일으키는 것으로 알려져 있다. 먼저 검색조건을 설정하기 위해 BNL cl.2 세포주에 대한 CCl₄의 농도 및 시간에 따른 세포독성 유발을 MTT assay를 이용하여 검토하였다(Fig. 1). CCl₄(0.5-4.0 mM)는 농도 의존적으로 세포독성을 나타냈다. BNL cl.2 세포주의 생존율은 CCl₄ 처리후 12시간까지는 배양시간에 비례하여 감소하였으나 이후 증가하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과를 검토한 결과 BNL cl.2 세포주에 대한 보호효과 시험의 검색조건으로서 CCl₄의 농도는 1.0 mM, 배양시간은 12시간이 적합하다고 생각되었으며, 시료의 조제에 이용한 DMSO는 배양액에 대한 최종농도를 0.8%이하가 되도록 하였고 이 농도에서는 세포생존율에 영향을 미치지 않았다.

한방 또는 민간에서 간보호 활성이 인정되고 있는 9종 생약의 물 추출물을 CCl₄와 동시처리 하였으며, 간질환에 대한 예방 및 치료효과를 가정하여 각각

Table I. Protective effects of water extracts of crude drugs on BNL cl.2 cells damaged by CCl₄

Samples	Used Part	Voucher specimen	ED ₅₀ (μg/ml) ^a		
			Before	Cotreatment ^c	After treatment ^d
<i>Artemisia iwayomogi</i>	Aerial parts	WP 344	187.2	149.2	>500
<i>Coriolus versica</i>	Fruiting body	WP 516	188.9	399.1	23.7
<i>Curcuma longa</i>	Rhizome	WP 320	89.7	>500	51.2
<i>Ganoderma lucidum</i>	Fruiting body	WP 288	147.7	233.1	143.0
<i>Phellinus linteus</i>	Fruiting body	WP 517	207.3	24.7	33.3
<i>Polygonum aviculare</i>	Herba	WP 445	88.2	388.4	95.4
<i>Prunus persica</i>	Seed	WP 101	>500	240.9	288.1
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Root	WP 087	210.3	174.3	53.8
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Root	WP 498	260.1	154.8	261.9
<i>Silymarin</i>	-	-	33.9	22.4	6.5

^aED₅₀ values were calculated using a linear regression method in three different doses (10, 100, 500 μg/ml). ^bThe drugs were given 12 h before CCl₄ treatment. ^cThe drugs were co-treated with CCl₄. ^dThe drugs were given 12 h after CCl₄ treatment.

시료의 전처리 및 후처리를 실시하고 세포생존율을 검토하였다(Table I). 시료의 전처리 시험에서는 편축, 울금이 각각 88.2, 89.7 μg/ml의 ED₅₀치를 나타내었고, 후처리 시험에서는 편축, 단삼, 운지, 울금, 상황의 물 추출물이 100 μg/ml이하의 ED₅₀치를 나타내었다. 또한, 동시처리에서는 상황 물 추출물이 24.7 μg/ml의 ED₅₀치를 나타내, 양성 대조약물인 silymarin(ED₅₀=22.4 μg/ml)과 동등한 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 본 연구에서는 간질환의 예방 및 치료효과의 검정을 가정하여 각각 시료의 전처리 및 후처리를 실시하였으며, 시료의 처리 방법에 따라 현저한 효과의 차이를 나타내는 경우를 발견할 수 있었다. 즉, 울금 물 추출물은 전처리와 후처리의 경우 동시처리에 비하여 높은 활성을 나타내었으며, 상황 물 추출물은 동시처리와 후처리의 경우 전처리에 비하여 약 10배의 활성 증가를 나타내었다.

본 연구에서 사용한 9종의 생약은 한방 또는 민간에서 간질환의 치료에 이용되고 있으며, 그 효과가 과학적으로 입증된 다수의 보고가 있다.⁷⁻⁹⁾ 간 기능의 기전연구에 사용되고 있는 BNL cl.2 세포주를 이용한 간세포 보호효과를 검색하는 방법은 아직 보고되지 않았으나 본 연구에서 상황을 비롯한 5종 생약의 물 추출물이 100 μg/ml이하의 ED₅₀치를 나타내었으며, 양성 대조약물인 silymarin 또한 간세포 보호효과를 나타내었다. 이는 murine embryonic normal liver cell인 BNL cl.2 세포주를 간세포

보호효과 검색에 이용할 수 있음을 의미한다. Silymarin은 lipid peroxide의 생성억제 효과가 있으며, 세포막을 안정화시켜서 각종 간독성물질에 대한 방어기능을 가진 것으로 알려져,¹⁰⁾ 본 연구에서 활성을 나타낸 생약 중에는 이러한 작용기전을 가진 물질의 존재가 추정된다.

결 론

천연물로부터 간세포 보호 활성물질 발견을 위한 기초연구의 일환으로 murine embryonic normal liver cell인 BNL cl.2 세포주를 이용하여 CCl₄를 세포독성 유발약물로 사용하여 한방 또는 민간에서 간질환 치료약물로 이용되고 있는 9종 생약의 물 추출물에 대한 효과를 검색하였다. 시료의 전처리 시험에서는 편축, 울금이 각각 88.2, 89.7 μg/ml의 ED₅₀치를 나타내었고, 후처리 시험에서는 편축, 단삼, 운지, 울금, 상황의 물 추출물이 100 μg/ml이하의 ED₅₀치를 나타내었다. 또한, 동시처리에서는 상황 물 추출물이 24.7 μg/ml의 ED₅₀치를 나타내, 양성 대조약물인 silymarin(ED₅₀=22.4 μg/ml)과 동등한 효과를 나타내었다.

사 사

이 논문은 한국과학재단 지정 의약자원연구센터 1999년도 연구비에 의해 지원되었기에 이에 감사드

됩니다.

인용문헌

1. Hikino, H. (1985) Antihepatotoxic activity of crude drugs. *Yakugaku Zasshi* 105: 109-118.
2. Kim, Y. S. and Park, K. H. (1995) Screening method for antihepatotoxic activity using CCl₄-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Kor. J. Pharmacogn.* 26: 51-56.
3. Kim, S. Y., Kim, H. P., Huh, H. and Kim, Y. C. (1997) Antihepatotoxic zeaxanthins from the fruits of *Lycium chinensis*. *Arch. Pharm. Res.* 20: 529-532.
4. Kuo, M. L., Chau, Y. P., Wang, J. H. and Lin, P. J. (1997) The role of Src kinase in the potentiation by ethanol of cytokine- and endotoxin-mediated nitric oxide synthase expression in rat hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* 52: 535-541.
5. Johnson, M., Koukoulis, G., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Iyer, A. (1993) Hepatocyte growth factor induces proliferation and morphogenesis in nonparenchymal epithelial liver cells. *Hepatology* 17: 1052-1061.
6. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
7. Choi, H. J., Kim, N. J., Kim, J. W. and Hong, N. D. (1997) Anti-lipid peroxidation and liver protective effects of *Polygonum aviculare* L. *Kor. J. Pharmacogn.* 28: 117-123.
8. Kim, D. H., Shim, S. B., Kim, N. J. and Jang, I. S. (1999) Beta-glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biol. Pharm. Bull.* 22: 162-164.
9. Hase, K., Kasimu, R., Basnet, P., Kadota, S. and Namba, T. (1997) Preventive effect of lithospermate B from *Salvia miltiorhiza* on experimental hepatitis induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Planta Med.* 63: 22-26.
10. Shriewer, H., Kastrup, W., Wiemann, W. and Rauen, H. M. (1975) The antihepatotoxic effect of silymarin on lipid metabolism in the rat disturbed by phalloidine intoxication. *Arzneim-Forsch.* 25: 188-194.

(1999년 4월 8일 접수)