

쑥갓의 간독성 보호작용

강현정 · 이은주¹ · 성상현¹ · 김영중¹ · 송은숙² · 박미정³ · 이흠숙*

서울산업대학교 식품공학과, ¹서울대학교 약학대학,
²숙명여자대학교 생명과학과, ³서울산업대학교 안경광학과

Anti-hepatotoxic Activity of *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum* Extract

Hyun-Jung Kang, Eun-Ju Lee¹, Sang-Hyun Sung¹, Young-Choong Kim¹,
Eun-Sook Song², Mi-Jung Park³ and Heum-Sook Lee*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology

¹College of Pharmacy, Seoul National University

²Department of Life Science, Sookmyung Women's University

³Department of Visual Optics, Seoul National University of Technology

Total methanolic extract of *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum* (Compositae) was revealed to have anti-hepatotoxic activity against galactosamine-induced toxicity on primary cultured rat hepatocytes. After successive partitioning with chloroform, *n*-butanol, and water, the chloroform fraction showed a significant inhibition activity of 51% at 50 ppm, compared with that of silybin, 45.9% at 100 μ M. The chloroform fraction was subjected to silica gel column chromatography and yielded active CH-II, CH-V and CH-VI subfractions, and the anti-hepatotoxic activity of these subfractions were 47.6, 56.3, and 23.2%, respectively, at 50 ppm. Total glutathione contents of CH-II, CH-V, and CH-VI increased by 49.8, 43.9, and 47.5% of the control, respectively at 50 ppm, whereas that of silymarin was, 59.7% at 100 μ M after challenged with galactosamine. The ratio of (reduced glutathione) / (total glutathione) in CH-II, CH-V and CH-VI subfraction showed similar values of 0.86-0.87 at 50 ppm, whereas that of silymarin was, 0.85 at 100 μ M. The incorporation of [³H]-uridine uptake into RNA was not affected by these active subfractions.

Key words: *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum*, anti-hepatotoxic activity, glutamic pyruvic transaminase, galactosamine, primary cultured rat hepatocytes

서 론

현대인의 식품섭취 목적은 전통적인 식품으로부터의 영양 공급이나 기호성 충족의 목적과 더불어 식품이 가진 생체조절 기능을 이용하여 건강을 유지하려는 경향으로 변하고 있다. 실제로 역학조사와 실험동물을 사용한 여러 연구결과에 의하면 식이 섭취에 의해서 암을 포함한 여러 질병의 발생을 예방할 수가 있으며, 특히 식물성 식품의 섭취량과 동맥경화, 고혈압, 당뇨병, 간장질환 등의 성인병 유발빈도는 반비례함이 보고된 바 있다⁽¹⁾.

생리활성을 가지는 식품으로부터 활성성분을 도출하기 위

하여서는 활성을 검색할 수 있는 간편하면서도 감도와 선택성이 높은 검색법이 확립되어야 한다. 최근 간장보호 활성 검색법으로 인간의 간세포와 그 기능이나 생화학적 성질이 유사하다고 알려진⁽²⁾ 흰쥐의 간세포를 일차 배양하는 방법이 확립되어⁽³⁾, 사염화탄소나 galactosamine(GalN)을 작용시켜 인위적으로 독성이 유발된 일차배양 간세포는 간장 질환의 *in vitro* 모델로 제시되고 있다^(4,5). 즉, 흰쥐로부터 직접 분리하여 배양한 간세포를 사염화탄소나 galactosamine으로 처리하여 인위적으로 독성을 유발시키면 궁극적으로 간세포가 괴사되면서 간세포 내의 glutamic pyruvic transaminase(GPT)가 배양액 중으로 유리된다. 이때 활성 식품의 추출물을 사염화탄소나 galactosamine으로 간세포에 독성을 유발시키면서 투여하였을 때 배양액 중으로 유리되는 GPT값이 유의성 있게 감소되면 간세포 보호 활성을 갖는다고 할 수 있다. 이러한 방식으로 일상생활에서 흔히 섭취하는 과채류의 간세포 보호 활성을 검색하던 중 쑥갓(*Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum*)의 CHCl₃ 분획물이 유의성있는 간세포 보호

*Corresponding author : Heum-Sook Lee, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, 172 Kongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-143, Korea
Tel: 82-2-970-6436
Fax: 82-2-976-6460
E-mail: heum@snut.ac.kr

활성을 가짐을 알 수 있었다.

쑥갓은 국화과(Compositae)에 속하는 지중해 연안산의 일년 내지 이년초로서⁽⁶⁾ 향기가 독특하여 유럽과 아시아지역에서 광범위하게 사용되어 왔다. 쑥갓의 생리활성 및 성분대 대한 연구로는 sesquiterpenoid의 항균 및 세포독성^(7,8)에 대한 보고가 있을 뿐 체계적인 연구는 미미한 실정이다.

본 연구에서는 쑥갓의 total methanol 추출물을 CHCl₃, n-butanol, H₂O로 순차적으로 분획, 추출하여 사염화탄소와 galactosamine으로 독성을 유발시킨 일차배양 흰쥐의 간세포를 검색계로 이용하여 간세포 보호 활성 유무를 일차적으로 검색하여 쑥갓의 CHCl₃ 분획이 galactosamine으로 유발된 흰쥐의 일차배양 간세포 독성에 대하여 간세포 보호 활성을 가짐을 확인하였으며, silica gel 컬럼 크로마토그래피를 이용한 추적·분리를 통하여 활성 소분획을 분리하고 확인된 소분획에 대하여 RNA합성에 미치는 영향과 glutathione의 양에 미치는 영향을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

쑥갓은 1999년 2월에 서울대학교 약학대학 부속 약초원에서 공급받아 사용하였으며, 증거표본은 서울대학교 약학대학 부속 약초원에 보존하였다. 실험동물로 흰쥐(Wistar, male, 150~200 g)는 서울대학교 실험동물 사육장으로부터 공급받은 것을 온도 22±1°C, 습도 60±5%로 유지하며 12시간 간격으로 명암을 바꿔주는 사육실에서 사료와 물을 충분히 섭취하도록 하였다. 일차배양 간세포는 실험 하루 전부터 굶겨 공복 상태인 흰쥐에서 직접 취하였다.

시약 및 기기

재료의 추출과 컬럼 크로마토그래피용 용매로는 덕산화학(Seoul, Korea)의 제품을 증류하여 사용하였고 박층 크로마토그래피용 용매와 anisaldehyde는 덕산화학의 분석용 일급시약을 사용하였다. 간세포 배양 및 보호 활성 측정용 시약인 Waymouth MB 752/1 medium, bovine serum albumin(fraction V), dexamethasone, insulin, L-serine, L-alanine, carbon tetrachloride, collagen, collagenase(Type IV), 5,5'-dithiobis[2-nitrobenzoic acid](DTNB), glutathione(GSH), glutathione disulfide reductase(GSSG-R), NaHCO₃, penicillin, streptomycin, amphotericin B, gentamycin sulfate, Hank's balanced salt solution(HBSS), trypan blue solution, 2-vinyl pyridine, urethane, dimethyl sulfoxide(DMSO), hydroxyl amine, hypoxanthine, EDTA, sulfanilic acid, N-1-naphthyl ethylenediamine은 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, horse serum과 fetal bovine serum은 Hyclone(Logan, UT, USA)의 제품을 사용하였다. GPT kit는 영동제약(Seoul, Korea)의 제품을 사용하였고, Intralipos는 녹십자 의료공업(Seoul, Korea)의 제품을 사용하였다. [³H]-Uridine과 Aquasol은 NEN(Wilmington, DE, USA)의 제품을 사용하였으며, silymarin과 silybin은 부광약품으로부터 기증받아 사용하였다.

컬럼 크로마토그래피용 silica gel은 Kiesel gel 60(230~400 mesh, Art. 9385, Merck, Germany)을 사용하였고, 컬럼 크로

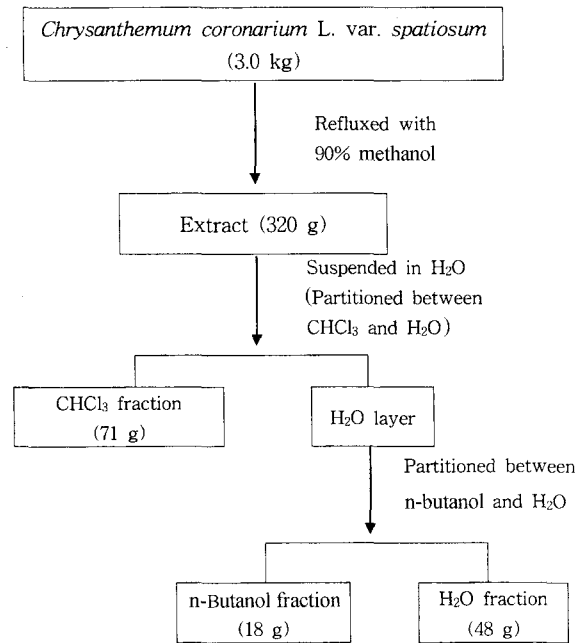


Fig. 1. Extraction and fractionation of *Chrysanthemum coronarium* L. var. *spatiosum*.

마토그래피용 Sephadex는 LH-20(bead size 25~100 μm, Sigma 사)을 사용하였다. 박층 크로마토그래피용 precoated plates는 Kiesel gel 60 F₂₅₄(Art. 5715, Merck, Germany)를 사용하였다. 동결건조는 Freeze-dryer (Ilshin, Seoul, Korea)를 사용하였고, 세포배양은 Water-jacked CO₂ incubator(Forma Scientific Co., USA)를 사용하였다.

추출 및 활성 분획의 제조

음지에서 건조시킨 쑥갓의 전초 3 kg을 잘게 절단하여 환류냉각장치를 부착시킨 추출기에서 90% methanol로 60~70°C에서 3회 추출한 후 여과하여 추출액을 모으고 감압농축하여 총 추출물 320 g을 얻었다. 이 추출물을 물에 현탁시킨 후 극성에 따라 CHCl₃과 n-butanol, H₂O로 순차적으로 분획하여 CHCl₃ 분획물 71 g, n-butanol 분획물 18 g과 H₂O 분획물 48 g을 얻었다.

Galactosamine으로 인위적으로 독성을 유발시킨 일차배양한 흰쥐의 간세포에 대하여 각각의 분획물로 간세포 보호 활성을 측정된 결과 CHCl₃ 분획에 활성이 있음을 확인하고 컬럼 크로마토그래피를 통하여 다시 소분획으로 분리하여 활성과 박층 크로마토그래피의 pattern 분석을 병행하며 생리활성이 있는 소분획을 추적 확인 하였다.

간세포 배양

흰쥐의 간세포는 Berry와 Friend의 방법^(9,10)을 약간 수정한 2단계 collagenase 관류법으로 분리하였다. 흰쥐를 urethane (1 g/kg body weight)으로 마취시키고 70% 에탄올로 복부를 소독한 후 개복하였다. 간 문맥에 21 gauge catheter를 삽관하여 약 50 mL의 HBSS 용액을 30 mL/min의 속도로 관류시켰으며, 동시에 하대정맥을 신정맥 아래에서 잘라 혈액을 제거하였다. 다음 흉강을 열고 상대정맥에 18 gauge catheter를 삽

관한 다음 하대정맥을 묶어서 간조직을 통과한 소화액이 상 대정맥을 통하여 원래의 용기 내로 되돌아오는 재순환이 되 도록 하였다. 재순환은 37°C에서 O₂ 95%와 CO₂ 5%의 혼합 기체를 공급해 주면서 HBSS 95 mL과 collagenase 5 mL (10 mg/mL HBSS, 최종 농도 0.05%)로 구성된 소화액으로 10~15분간 수행하였다. 그 후 간을 적출하여 용기에 옮긴 후, 적당량의 HBSS를 가하고 간막을 가위로 찢어 간세포를 유리시킨 다음, gauze 및 lens paper를 사용하여 여과하였다. 여과액은 50 g에서 2분간 원심분리한 다음 상정액을 버리고 침전된 간세포를 다시 배양액으로 현탁시켜 원심분리하였다. 침전된 간세포를 새로운 배양액에 현탁시켜 세포 현탁액을 얻은 다음 세포 생존율이 85% 이상 되면 5×10⁵ cells/mL 농 도로 배양용기에 이식하여 배양하였다. 배양환경은 일정한 온도와 습도가 유지되는 37°C 배양기에서 O₂ 95%와 CO₂ 5%의 혼합기체를 공급하여 유지하였다.

배양액으로는 Waymouth MB 752/1 medium, 5% fetal bovine serum, 2.0 mg/mL bovine serum albumin(fraction V), 1.0 μM dexamethasone, 0.1 μM insulin, 5.32×10⁻² M L-serine, 4.09×10⁻² M L-alanine, 2.67×10⁻² M NaHCO₃, 100 IU/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 5 μg/mL amphotericin B 또는 50 μg/mL gentamycin sulfate로 구성된 것을 사용하였다.

Galactosamine에 의한 간세포의 독성유도

간세포를 배양한지 1.5시간이 지난 후 배양액을 1.5 mM galactosamine을 함유한 배양액으로 1.5시간 동안 처리하여 세포독성을 유도하였다. 시료의 간세포 보호활성은 새 배양 액으로 갈아주고 효과를 검색하고자 하는 시료를 각 농도별 로 투여하고 24시간 더 배양한 후 그 배양액을 취하여 간세 포 보호활성을 측정하였다⁽⁴⁾.

시료의 제조

시료를 HBSS 원충용액으로 용해시키거나 또는 DMSO(final conc. 0.1% 이하)나 99.9% ethanol(final conc. 1% 이하)로 용해시킨 후 HBSS로 희석시켜 이를 millipore membrane (0.22 μm, Millex-GV, USA)을 사용하여 여과시켜 무균상태로 제조하였다. 화합물이 HBSS에 용해되지 않을 경우에는 Intralipos를 용제로 하여 제조하였다.

Glutamic pyruvic transaminase(GPT) 활성의 측정

세포독성이 유도된 간세포의 배양액을 취하여 GPT kit를 사용하여 Reitman-Frankel의 방법⁽¹¹⁾으로 GPT의 활성을 측정 하였다.

RNA 생합성 측정

RNA 생합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 [³H]-uridine 을 배양액에 첨가하여 방사성 동위원소로 표지된 uridine이 배양세포의 RNA에 incorporation되는 정도를 측정하였다. 배 양액을 제거한 후 HBSS로 3회 세척하고 10% trichloroacetic acid를 1 mL 가하여 단백질을 침전시켰다. 1 mL의 ethanol : ether(3 : 1, v/v)의 혼합용매를 가하여 잔존하는 trichloroacetic acid를 제거한 후 1 N NaOH 200 μL로 단백질을 용해시켰

다. 그 중 150 μL를 취하여 scintillation cocktail인 Aquasol 3 mL를 가한 후 방사능을 측정하였다⁽¹²⁾.

간세포 상정액의 제조

배양용기의 배양액을 제거한 후 3 mL의 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.6)를 가하여 세포 현탁액을 준비하였 다. 이와 같이 준비한 세포 현탁액을 15초 동안 균질화 시 킨후 12,500×g에서 15분 동안 원심분리하여 간세포 상정액 을 제조하였다⁽¹³⁾.

Total glutathione(GSH)과 glutathione disulfide(GSSG) 양의 측정

간세포 내의 total GSH의 양은 Hissin 등의 방법⁽¹⁴⁾을 이용 하였으며, 간세포의 상정액을 GSH의 양을 측정하기 위한 검 액으로 사용하였다. 1 mL cuvette에 0.3 mM NADPH 700 μL, 6 mM DTNB 100 μL 및 간세포 상정액 200 μL을 가한 후, 미리 가온한 50 units/mL GSSG-R 10 μL를 가하고 잘 혼합 한 후, 즉시 412 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 즉, 흡 광도가 직선상으로 증가하는 부분을 2분간 15초 간격으로 측 정하였다.

간세포 상정액 200 μL에 2-vinyl pyridine을 4 μL 가한 후 25°C에서 30분간 반응시킨후 간세포 내의 GSSG의 양을 측 정하였다. Reduced GSH의 양은 total GSH의 양에서 GSSG 의 양을 빼서 계산하여 (reduced GSH)/(total GSH) 값을 산 출하였다.

통계처리

통계적 유의성을 검토하기 위해 대조치로부터의 변동을 ANOVA test에 의하여 판정하였다. p값이 5% 미만일 때 통 계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

일차 배양한 흰쥐의 간세포를 이용하여 간세포 보호작용 을 검색하기 위하여 썬갠 total methanol 추출물을 사염화 탄소와 galactosamine으로 각각 세포의 독성을 유도하여 배 양액 증으로 유리되는 GPT값을 측정하였다. 썬갠 total methanol 추출물은 galactosamine에 의한 세포의 독성은 어느 정도 차단시켰으나 사염화탄소에 의한 독성에는 활성을 나 타내지 않아 total methanol 추출물을 다시 CHCl₃, *n*-buthanol, H₂O 분획으로 나누어 galactosamine 독성에 의한 간세포 보 호작용을 검색한 결과 50 ppm의 농도에서 각각 51.2%, 10.6%, 23.1%의 간세포 보호 활성을 나타내었다. 이때 동일 한 실험계에서 같은 농도의 간세포 보호약물인 대조구 silybin 의 간세포 보호활성은 41.3%이었다(Fig. 2).

이 결과로부터 가장 활성이 높은 CHCl₃분획을 선택하여 이로부터 활성물질의 추적·분리를 시도하였다. CHCl₃:methanol (130 : 1, v/v)로 시작하여 점차 극성을 높여가면서 분리하는 gradient silica gel column chromatography를 시행하여 어느 정도 활성을 나타낸 소분획 CH-I-CH-VI을 얻고 이들 소분 획의 간세포보호 활성을 검색한 결과 CH-II의 간세포보호 활 성이 50 ppm의 농도에서 47.6%, CH-V와 CH-VI은 50 ppm에

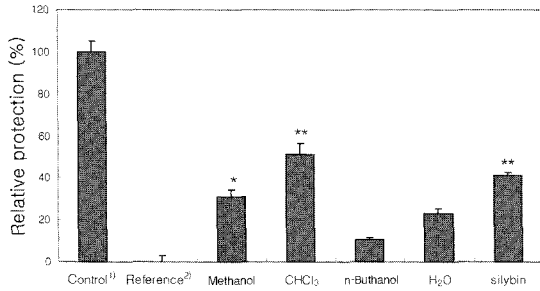


Fig. 2. Effects of each fraction of *C. coronarium* var. *spatiosum* on the activity of GPT on GalN-intoxicated primary cultured rat hepatocytes.

All at 50 ppm ¹⁾control is the value of hepatocytes which were not challenged with GalN. The control value of GPT was 45.06 ± 3.55 IU/L. ²⁾Reference is the value of hepatocytes which were challenged with GalN. The reference value of GPT was 97.24 ± 7.62 IU/L. The % of protection is calculated as 100x(GPT value of reference-GPT value of sample)/(GPT value of reference-GPT value of control). Significantly different from reference value *:p<0.05, **:p<0.01.

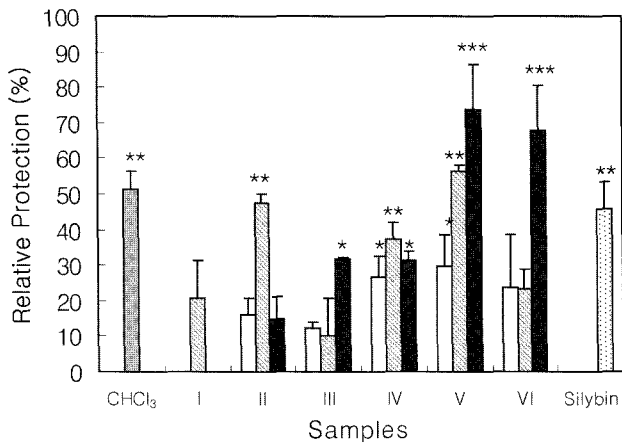


Fig. 3. Effects of CHCl₃ subfractions on the activity of GPT on GalN-intoxicated primary cultured rat hepatocytes.

The experimental protocol is same as in Fig. 2. Significantly different from reference value *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001. □: 25 ppm, ▨: 50 ppm, ■: 100 ppm, CHCl₃: 50 ppm, silybin: 100 μM.

서 각각 56.3%와 23.2%의 보호활성을, 100 ppm의 농도에서는 각각 73.8%와 67.9%의 보호활성을 보여 대조구 silybin 100 μM 농도에서의 45.9%에 비하여 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3). 그러나 CH-II의 경우는 100 ppm으로 농도를 높여 간세포에 투여한 결과 보호활성이 14.9%로 50 ppm에서의 활성보다 오히려 감소하였다. 이는 CH-II의 분획 중에 간세포 보호활성을 나타내는 물질 뿐만이 아니라 세포독성을 가지는 물질이 공존할 가능성을 보여주는 결과라고 생각할 수 있겠다. CH-V와 CH-VI는 TLC pattern 분석이 매우 유사하여 두 소분획을 합하여 다시 컬럼 크로마토그래피를 행하여 CH-(V+VI)-d~CH-(V+VI)-j의 소분획을 얻었고 이들 활성 소분획에서의 간세포 보호활성은 CH-(V+VI)-d, -e, -j는 10 ppm의 농도에서 각각 27.7%, 17.5%, 17.0%이었으며 50 ppm의 농도에서는 각각 41.3%, 51.3%, 47.2%로 농도 의존적으로 활성이 높아짐을 보였다. 그러나 CH-(V+VI)-g와 -h는 10 ppm의

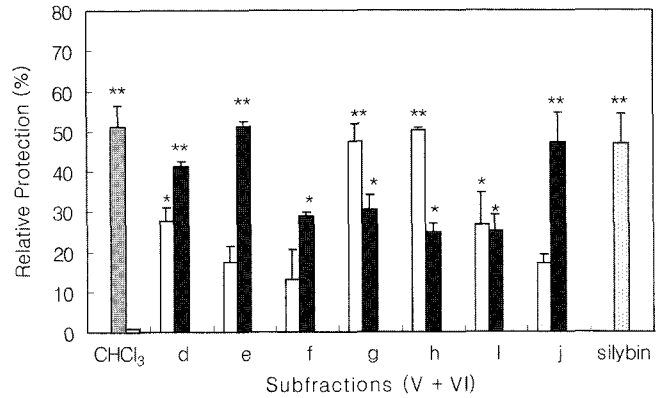


Fig. 4. Effects of subfractions from CH-(V+VI) on the activity of GPT on GalN-intoxicated primary cultured rat hepatocytes. The experimental protocol is same as in Fig. 2. Significantly different from reference value *:p<0.05, **:p<0.01.

Table 1. Effects of each fraction of *C. coronarium* var. *spatiosum* on [³H]-uridine uptake¹⁾

	Concentration (ppm)	DPM ± S.D (arbitrary unit)	DPM ratio ⁴⁾
Control ²⁾		12210.3 ± 849.5	
Reference ³⁾		2189.8 ± 252.5	1.0
CH-II	50	2262.3 ± 391.0	1.0
	100	2367.9 ± 239.8	1.1
CH-V	50	2321.8 ± 165.3	
	100	2265.4 ± 289.5	1.0
CH-VI	50	2183.0 ± 259.2	1.0
	100	2299.1 ± 178.1	1.0

¹⁾[³H]-Uridine (final concentration, 1 μCi/mL) was incorporated into the hepatocytes and counted β-emission with LSC.

²⁾Control is the value of hepatocytes which were not challenged with GalN.

³⁾Reference is the value of hepatocytes which were challenged with GalN.

⁴⁾DPM ratio is calculated as the (DPM value of compounds treated/ DPM value of GalN-treated).

낮은 농도에서 이미 47.3%와 50.2%의 높은 보호활성을 보 이다가 50 ppm의 농도에서는 각각 30.4%와 24.9%로 그 활성이 오히려 감소함을 보였다. 이 분획에서도 역시 보호활성을 가지는 물질과 세포독성을 가지는 물질이 공존함을 추정할 수 있었다. 이는 수종의 *Chrysanthemum*속 식물로부터 암 세포주에 대한 세포독성물질이 함유되어 있다는 문헌의 보고⁶⁾와 유사한 결과라 할 수 있겠다(Fig. 4).

보호 활성이 확인된 CH-II, CH-V, CH-VI에 대하여는 RNA 생합성에 미치는 결과를 알아보기로자 [³H]-uridine을 배양액에 첨가하여 방사성 동위원소로 표지된 uridine이 RNA에 incorporation 되는 정도를 측정하였으나 RNA 생합성에는 영향을 미치지 않았다(Table 1). 또한 간세포의 상정액을 검액으로 하여 total GSH의 양과 (refused GSH)/(total GSH)의 값을 산출하였다. total GSH의 양은 galactosamine으로 독성이 유

Table 2. Effects of CHCl₃ subfractions on the contents of total GSH and reduced GSH on GalN-intoxicated primary cultured rat hepatocytes

Sample	Concentration (ppm)	Total GSH ³⁾ ± S.D	Reduced GSH ± S.D	(Reduced GSH)/(Total GSH)
Control ¹⁾		145.7 ± 14.7	119.1 ± 15.6	0.816
Reference ²⁾		47.0 ± 0.2	24.7 ± 7.8	0.525
CH-II	50	72.6 ± 7.8*	63.3 ± 7.1*	0.871
	100	64.2 ± 0.7*	54.6 ± 3.7*	0.851
CH-V	50	63.9 ± 13.3	55.3 ± 13.3	0.863
	100	63.1 ± 1.2*	53.8 ± 1.0*	0.853
CH-VI	50	69.2 ± 14.8	60.5 ± 14.0	0.872
	100	75.1 ± 1.4***	61.9 ± 3.6*	0.824
Silymarin	100 μM	87.0 ± 2.7***	74.0 ± 2.7*	0.850

¹⁾Control is the value of hepatocytes which were not challenged with GalN.

²⁾Reference is the value of hepatocytes which were challenged with GalN.

³⁾GSH: nmol/mg protein.

Significantly different from reference value *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001.

발되지 않은 control 군에 대비하여 CH-II, V, VI의 분획 50 ppm 농도에서 각각 49.8%, 43.9%, 47.5%의 수준으로 회복되어 silymarin 100 μM 농도에서의 59.7%수준의 회복효과와 비교할 때 매우 유의성 있는 결과를 나타내었다(Table 2). (reduced GSH)/(total GSH) 값은 CH-II, V, VI가 각각 0.871, 0.863, 0.872를 보여 silymarin 100 μM에서의 값인 0.850과 유사한 수치를 나타내었다.

일반적으로 간세포 보호 활성 검색시험에서 간세포 독성 유도시 사염화탄소에 의한 독성기전은⁽¹⁵⁻¹⁹⁾ 지질과산화의 지표물질인 MDA 생산량, superoxide dismutase의 활성, 세포내의 triglyceride 축적정도, glutathione S-transferase의 활성등과 밀접한 관계가 있으며 galactosamine에 의한 독성은 주로 RNA와 단백질의 합성에 영향을 준다고 알려져 있다⁽¹²⁾. 한편, McMillan 등⁽²⁰⁾은 일차배양된 흰쥐의 간세포에서 galactosamine이 methionine에 의하여 증가되는 glutathione 생합성 과정을 억제함으로써 glutathione을 고갈시키는 작용을 갖는다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 썩갯이 지질과산화를 유발하는 사염화탄소에 의한 간독성에는 보호효과를 나타내지 못하고(Fig. 5) 간염과 유사한 간세포 독성을 유발시키는 galactosamine의 작용은 크게 약화시키는 결과를 보였다. 이러한 썩갯의 galactosamine으로 유도된 간독성에 대한 작용은 RNA 생합성 과정에 관여한다기 보다는 McMillan 등의 보고와 관계된 glutathione 생합성능을 회복시킴으로써 나타나는 결과라고 할 수 있겠다. 이러한 연구 결과는 썩갯이 간보호 식품으로서 응용될 수 있을 것이라는 가능성을 시사하고 있다. 그러나 간세포 보호활성의 확실한 기전을 밝히기 위하여서는 썩갯의 GSH 생합성 회복능과 관련된 좀 더 상세한 연구가 수행되어야 할 것이며 활성이 확인된 소분획에서의 순수한 활성물질의 분리가 이루어져야 하고 이에 따른 구조 결정과 활성과의 관계도 규명되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

썩갯의 total methanol 추출물이 galactosamine으로 독성을 유발시킨 흰쥐의 일차배양 간세포에서 유리되는 GPT의 활성을 유의성 있게 감소시켜 간세포 보호활성을 보임을 알 수 있었다. Total methanol 추출물을 다시 CHCl₃, *n*-butanol, H₂O 분획으로 나누어 galactosamine 독성에 의한 간세포 보호작용을 재검색한 결과, 50 ppm의 농도에서 간세포 보호작용을 가지는 대조약물 silybin의 41.3% 보호효과에 비하여 각각 51.2%, 10.6%, 23.1%의 보호활성을 나타내었다. 이 중 가장 활성이 큰 CHCl₃ 분획을 가지고 활성의 추적 분리 방법으로 소분획 CH-II, V, VI의 활성 subfraction을 얻고 이를 다시 TLC와 활성검색을 병용하여 CH-(V+VI)-d, -e, -j의 sub-subfraction을 얻을 수 있었으며 이들은 50 ppm의 농도에서 각각 41.3%, 51.3%, 47.3%의 보호활성을 보였다. 활성 소분획 CH-II, V, VI는 모두 [³H]-uridine uptake 시험을 통한 RNA 생합성에는 영향을 미치지 않았으나 total GSH 값은 간세포 보호약물인 silymarin 대조구 100 μM 농도에서의 59.7% 수준의 회복효과에 비하여 각각 49.8%, 43.9%, 47.5%의 회복효과를 보였다. 또한 (reduced GSH)/(total GSH) 값도 silymarin 100 μM에서의 0.850에 비하여 각각 0.871, 0.863, 0.872로 유사한 수치를 나타내었다.

이 연구결과로 썩갯의 간세포 보호작용을 처음으로 검색, 확인하였으며 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 활성이 있는 CHCl₃ 소분획을 분리하였으므로 이들 소분획으로 부터 더욱 활성물질을 순수분리하여 그 구조를 밝히고 간세포 보호활성의 기전에 대하여도 다양한 방향의 연구가 수행되어야 할 것이다.

참고문헌

- Huang, M.T., Ferraro, T. and Ho, C.T. Cancer chemoprevention

- by phytochemicals in fruits and vegetables, pp. 2-14. In: Food Phytochemicals for Cancer Prevention I. Huang, M.T., Osawa, T., Ho, C.T. and Roson, R.T. (eds.). American Chemical Society, USA (1994)
2. Andre, G. and Christiane, G. Research in Isolated and Cultured Hepatocytes, p. 314. Elsevier, New York, USA (1986)
 3. Freshney, R.I. Manual of basic technique, p.1. In: Culture of Animals. Alan, R. (eds.). Liss Inc., New York, USA (1984)
 4. Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. Assay method for anti-hepatotoxic activity using galactosamine induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. J. Nat. Prod. 46: 651-654 (1983)
 5. Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. Assay method for anti-hepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. Plant. Med. 49: 222-225 (1983)
 6. Lee, C.B. Illustrated Flora of Korea, p. 753. Hyangmoonsa, Seoul (1982)
 7. Jang, D.S., Nam, S.H., Choi, S.U. and Jang, M.S. Antibacterial activity of some *Chrysanthemum* spp. Agric. Chem. Biotechnol. 39(4): 315-319 (1996)
 8. Jang, D.S., Park, K.H., Kim, H.M., Hong, D.H., Chun, H.K., Kho, Y.H. and Yang, M. S. Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from several Compositae plants. Part I. Cytotoxicity against cancer cell lines. Kor. J. Pharmacogn. 29: 243-247 (1998)
 9. Berry, M.N. and Friend, D.S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cell. J. Cell Biol. 43: 506-520 (1969)
 10. Kleiman, H.K., Mcgoodwin, E.B., Rennard, S.I. and Martin, G.R. Preparation of collagen substrates for cell attachment.; Effect of collagen concentration and phosphate buffer. Anal. Biochem. 94: 308-312 (1979)
 11. Reitman, S. and Frankel, S.A. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. Am. J. Clin. Pathol. 28: 56-63 (1957)
 12. Karner, A. Regulation of the rate of synthesis of messenger ribonucleic acid by growth hormone. Biochem. J. 92: 449-457 (1964)
 13. Gibson, G.G. and Skelf, P. Techniques and experiments illustrating drug metabolism, pp. 239-271. In: Introduction to Drug Metabolism. Gibson, G.G. and Skelf, P. (eds.). Chapman and Hall, New York, USA (1988)
 14. Hissin, P.J. and Hill, R. A fluorometric method of determination of oxidized and reduced glutathione on tissue. Anal. Biochem. 74: 214-226 (1976)
 15. Slipes, I.G., Kroshna, G. and Gillett, J.R. Bioactivation of carbon tetrachloride, chloroform and bromotrichloromethane. Life Sci. 20: 1541-1548 (1977)
 16. Groot, H. and Noll, T. The crucial role of low steady oxygen partial pressures in haloalkane free-radical mediated lipid peroxidation. Biochem. Pharmacol. 35: 15-26 (1986)
 17. McCord, J.M. and Fridovich, J. Superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 244: 6049-6055 (1969)
 18. Ohkawa, Y., Ohisi, N. and Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 351-358 (1979)
 19. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases. J. Biol. Chem. 249: 7130-7135 (1974)
 20. McMillan, J.M. and Jollow, D.J. Galactosamine hepatotoxicity; Effect of galactosamine on glutathione resynthesis in rat primary hepatocyte cultures. Toxicol. Appl. Pharmacol. 115: 234-240 (1992)

(2002년 10월 23일 접수; 2003년 1월 20일 채택)