

# 도인 추출물의 간보호 및 항섬유화 효과

남극성, 박은전, 손동환, 고건일  
원광대학교 약학대학 약학과

## Abstract

### Hepatoprotective and antifibrotic effects of extracts from *Persicae Semen*

Na Ji-Xing, Eun-Jeon Park, Dong Hwan Sohn, and Geonil Ko

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

This study was carried out to investigate the liver protective effects of extracts from *Persicae Semen* (WT-003, WT-005, WT-006). The acute hepatic injury was induced by intraperitoneal injection of alpha-naphthylisothiocyanate (75 mg/kg, p.o.) and treated with WT-006 (100 mg/kg/day, 200 mg/kg/day, 400 mg/kg/day). The experimental hepatic fibrosis was induced by bile duct ligation/scission(BDL/S), duration of 4 weeks and treated with WT-003, WT-005 or WT-006 (200 mg/kg/days for 4 week). In acute liver injury, WT-006 (200 or 400 mg/kg) lowered serum alanine transferase(ALT) and aspartate transferase(AST) significantly. In fibrotic rats, WT-006 treatment inhibited the hydroxyproline deposition in liver and lowered serum AST, ALT and ALP, significantly.

These results suggest WT-006 extract, which does not contain amygdalin, from *Persicae Semen* have liver protective and antifibrotic effects in rats.

---

교신저자 : 고 건 일

원광대학교 약학대학 약학과

Tel : 063)850-6820, E-mail: giko@wonkwang.ac.kr

접수 : 2004/ 11/ 15 채택 : 2004/ 11/ 23

**Key Word** : *Persicae Semen*, liver, alpha-naphtylisothiocyanate, bile duct ligation/scission

## I. 서 론

간은 reserve capacity가 큰 장기로서 초기단계에서 통증이나 자각증상이 잘 나타나지 않고 상당히 악화되어서야 발견되는 '침묵의 장기'라 불린다.<sup>1)</sup> 즉 간섬유화 및 경화의 위험성은 뚜렷한 진단방법이 없어서 뿐만 아니라 자각증상이 거의 없이 진행되다가 증세 발현시에는 치료가 매우 어려운 상태가 되기 때문에 조기진단이 어렵다는 것이다. 또한 무엇보다도 현재까지 뚜렷한 치료제가 개발되지 않고 있다는 점이 이 질환의 극복에 커다란 문제점으로 지적되고 있다. 만성 간장질환은 대부분이 간경화로 이행되는데 간경화는 간의 섬유화 과정으로부터 시작되며 간섬유화 억제작용이 있는 신약개발에 구미의 많은 제약기업들이 활발히 참여하고 있다. 현재 사용되고 있는 대부분의 약물은 간경화가 상당히 진행된 경우에는 별로 치료효과가 없는 상태에 있다.<sup>2)</sup>

이에, 본 연구팀은 간 섬유화를 효과적으로 억제할 수 있으면서, 간독성이 없는 새로운 물질을 찾고자 연구를 거듭한 결과, 예로부터 혈전폐색성맥관염, 항염증, 혈조, 혈체, 골증, 한열, 동통, 산후의 혈병, 어혈, 복부의 혈액정체, 행혈, 폐농양, 화농성염증 또는 고혈압에 대한 약리효과가 알려진 도인(*Persicae Semen*)으로부터 얻어진 추출물 WT-006의 간보호 및 항섬유화 효과를 검색하였다. 그간 도인의 간섬

유화 억제효능은 아미그달린을 함유하는 메탄올 또는 에탄올 추출물에서 확인된 바 있으나<sup>3,4)</sup> 본 연구에서는 성분분석 결과 아미그달린을 전혀 함유하지 않는 수용성 고분자물질을 주성분으로 하는 추출물의 간섬유화 억제 및 간보호 효과를 검색하고자 하였다.

## II. 실험방법

### 1. 도인 추출물의 제조

한국 정보노산(주)에서 구입한 도인을 원광대학교 약학대학 김윤철 교수로부터 확인 검증한 후, 이 도인 5kg을 분쇄하고, 4,200ml의 아세톤으로 실온에서 매회 6시간씩 8회 추출한 다음, 이 추출액을 감압 농축하여 541g의 추출물을 얻고, WT-003라 하였다. 잔사를 실온에서 메탄올 7,000ml로 매회 5시간씩 3회 추출 후, 감압 농축하여 메탄올 추출물 320g을 얻고, 탈지잔사를 실온에서 건조하여 1.9kg의 탈지잔사를 얻었다. 한편, 메탄올 추출물을 WT-004라 하였다. 메탄올 추출물(WT-004)을 1,200ml의 헥산으로 추출하여 지방유를 없애고, 헥산에 녹지 않은 불용성 물질을 부탄올-물(2:1) 2,000ml로 분획 추출한 다음, 얻어진 부탄올 분획과 물 분획을 감압 농축하여 부탄올 분획물질 35g과 물 분획물질 236g을 얻었다. 물 분획물질은 WT-005라 하였다. 상기의 메탄올 추출물의 탈지잔사(脫脂殘渣) 1.9kg을 탈이

온수 8ℓ로 실온에서 2시간 동안 교반하고, 4℃에서 12시간 방치한 후, 여과한 여액을 동결건조하여 추출물 325g을 얻고, 이를 WT-006이라 하였다 (그림 1).

## 2. 도인 추출물 WT-006의 조성분석

도인 추출물 중 약효가 확인된 WT-006의 분획을 취하여 당, 단백질, 아미노산조성 및 아미그달린 함유여부를 분석하였다. 총당은 포도당을 표준물질로 하여 페놀-황산법으로, 5탄당은 아라비노스를 표준물질로 하여 클로로글루시놀 아세트산법으로, 그리고 단백질은 로우리법으로 측정하였고, 아미노산은 아미노산 분석기(amino acid analyzer, Oharmacia사)로 측정하였다. 가스 크로마토그래피(베리안(Varian)사, GC 3500)를 이용하여 구성당을 동정하고, 구성당의 함량을 중량%값으로 나타내었다. 분석결과를 표 1에 나타내었다. 한편, 가스 크로마토그래피 조건은 다음과 같다. 디텍터: FID(flame ionization detector); 컬럼: Supelco fused silica capillary column; 컬럼 온도: 260℃; 캐리어 가스: N<sub>2</sub>(15 psi); 체류시간: 30분

아미그달린 함유여부는 박층크로마토그래프법(Thin Layer Chromatography; TLC)으로 아미그달린 표준품 (Sigma Chemical Co., USA)과 반점(spot)의 이동거리(Rf치)를 비교하여 확인하였으며 전개용매는 부탄올:초산:물 (4:1:1)을, 정색시약으로는 10% 황산을 사용하였다.

## 3. 실험동물

실험동물로는 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 삼육실험동물(경기도 오산)에서 공급받아 각 실험군으로 분류하고 1주일 이

상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 자연채광하에서 흰쥐용 케이지에 3-4마리씩 넣어 사용하였으며 온도는 20-24℃, 상대습도 50-60%를 유지하였고 시판사료(신촌실험동물사료)와 정제수를 자유로이 공급하였다.

## 4. 사염화탄소에 의한 급성 간장해 유도 및 도인추출물 투여

α-나프틸이소티오시아네이트에 의한 간보호 효과 검사

α-나프틸이소티오시아네이트(ANIT)는 담즙정체를 유발하여 간 독성을 나타낸다. 따라서, ANIT를 처리한 흰쥐에 도인 추출물 중 WT-006을 투여하였다. 즉, 체중 180~210g인 웅성 흰쥐(대한 실험동물센터; 충북 음성)를 1주일 동안 실험실 환경에 적응시키고, 사료와 물을 충분히 공급하였다. 실험에 사용된 각 군과 실험동물의 수는 다음과 같다.

1군(n=5) 정상군

2군(n=5) ANIT에 의한 간 독성 유발군

3군(n=5) ANIT에 의한 간 독성 유발후, WT-006 투약군(100mg/kg/day, p.o.)

4군(n=5) ANIT에 의한 간 독성 유발후, WT-006 투약군(200mg/kg/day, p.o.)

5군(n=5) ANIT에 의한 간 독성 유발후, WT-006 투약군(400mg/kg/day, p.o.)

1군과 5군은 대응량의 증류수를, 다른 군은 각각의 약물을 손데를 이용하여 경구 투여하였다. 30분 후, 1군에는 대응량의 옥수수오일(동방유량사 제품)을, 2~5군에는 옥수수오일에 ANIT를 75mg/kg이 되도록 녹인 후, 경구 투여하였다. 48시간이 경과한 후, 흰쥐를 마취하고, 심장천자하여 혈액을 취하고, 상온에서 1시간 이상 방치한

뒤, 원심분리하여 혈청을 얻고, 영하 20℃에서 보관하였다.

## 5. 담도결찰(Bile duct ligation/scission; BDL/S)에 의한 간경화 유도

흰쥐를 ether로 전마취하고 ketamine과 xylazine으로 마취하 회복하여 원위담도와 근위담도를 봉합사로 묶고 그 사이를 자른 후 생리식염수를 약 2 ml주입하고 복부를 봉합하였다.<sup>5)</sup> Sham군은 마취하 회복하여 생리식염수를 2ml 가하고 봉합하였다. 담도결찰 수술을 행한 간경화 동물군을 수술한 날부터 4주간 도인 추출물 WT-006(200mg/kg/day), WT-005(200mg/kg/day) 및 WT-003(200mg/kg/day)을 증류수에 용해시켜 손데로 경구 투여하였고, 마취하고 회복한 후 생리식염수 2ml를 주입하고 봉합하여 얻은 대조군에는 동량의 증류수를 경구 투여하였다. 4주 후, 흰쥐를 마취하고, 심장으로부터 혈액을 채취한 뒤, 즉시 간을 적출하여 습중량을 측정하였다. 혈청과 간조직은 영하 20℃에서 보관하였다.

실험에 사용된 각군과 실험동물의 수는 다음과 같다.

6군 (n=12) 담도결찰 간섬유화 동물

7군 (n=13) 담도결찰 간섬유화 동물에서 WT-006을 200mg/kg/day 경구투여

8군 (n=12) 담도결찰 간섬유화에서 WT-005을 200mg/kg/day 경구투여

9군 (n=10) 담도결찰 간섬유화에서 WT-003을 200mg/kg/day 경구투여

10군 (n=4) 대조군

11군 (n=4) 대조군에서 WT-006을 200mg/kg/day 경구투여

12군 (n=4) 대조군에서 WT-005을 200

mg/kg/day 경구투여

13군 (n=4) 대조군에서 WT-003을 200mg/kg/day 경구투여

대조군은 수술후 1주일간은 체중의 감소를 보였으나, 건강상태가 양호하였다. 6~9군은 수술 2일 후부터 모두 진한 황색의 뇨를 분비하였으며, 4일 후부터 귀와 발바닥 등에 황달이 관찰되었다. 체중은 초기 1주일간은 감소하였다. 대조군이나 시험군 모두에서 관찰된 실험초기의 체중감소는 수술에 의한 것으로 생각된다. 4주 후 체중을 측정된 뒤, 간을 채취하여 습중량을 측정하고, 체중 100g당 간 습중량치를 비교하였다.

## 6. 혈청의 이화학적 검사

급성간독성시 간보호효과 검색은 혈청중 ALT(Alanine transaminase), AST(Aspartate transaminase), ALP(Alkaline phosphatase) 및 T-Bil(Total-bilirubin)의 양을 측정하였다. 간섬유화 억제효과 검색은 혈청중 AST, ALT, ALP, Bilirubin 수치를 Auto dry chemistry analyzer를 사용하여 분석하였다.

## 7. 간조직중 hydroxyproline양 측정

간조직중 hydroxyproline양은 Jamall 등의 방법에 따라 측정하였다.<sup>6)</sup> 즉 6N HCl의 5% 간 homogenate를 110℃에서 가수분해시킨 다음 chloramine-T로 산화시키고 Ehrlich's reagent 용액으로 발색시켜 558 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 8. 자료의 통계처리

모든 결과는 mean±S.D.로 나타내었으며 통계처리는 one-way ANOVA analysis

를 한 다음 Tukey's multiple comparison test로 통계처리를 하였다. 통계처리 결과 p 수치가 0.05이하인 경우를 유의한 차로 판정하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 도인 추출물 WT-006의 조성

본 발명의 도인 추출물은 람노스 0~0.4 중량%, 리브오스 10~90중량%, 크실로스 0~0.4중량%, 만노스 0~3중량%, 갈락토스 0.5~3.0중량% 및 글루코스 1.0~5.0중량%의 당조성; 아스파탁산 0.1~4중량%, 트레오닌 0~2.9중량%, 세린 0.5~5.0중량%, 글루타민 5~35중량%, 프롤린 0~1.0중량%, 글리신 0~5.0중량%, 알라닌 0.1~3.0중량%, 시스틴 0.2~1.8중량%, 발린 0~3.0중량%, 메티오닌 0.3~3.2중량%, 이소류신 0~3.0중량%, 류신 1.0~5.5중량%, 페닐알라닌 1.0~6.0중량%, 히스티딘 0~2.0중량%, 리신 0.5~5.0중량%, 아르기닌 0.2~3.5중량% 및 암모니아 0~14.5중량%의 아미노산 조성 및 40~50중량%의 총 단백질 조성을 가지며; 아미그달린은 함유하지 않았다 (표1). 아미그달린 함유여부는 박층크로마토그래프법(Thin Layer Chromatography; TLC)으로 아미그달린 표준품 (Sigma Chemical Co., USA) 과 반점(spot)의 이동거리(Rf치)를 비교하여 확인하였다. 분석결과는 그림 2에 나타내었다. 그림2에서 나타난 바와 같이 도인 추출물 WT-006은 아미그달린 표준품의 반점과 같은 위치에 반점이 나타나지 않음으로써 아미그달린을 함유하지 않음이 확인되었다. 반면에 WT-005는 아미그달린과 같은 위치에서 반점이 나타남으로써

WT-005에는 아미그달린이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

#### 2. 급성 간독성시 도인 추출물 WT-006의 간보호효과 검색

표 2로부터, 본 발명의 도인 추출물 WT-006을 100mg, 200mg 및 400mg을 처리한 3~5군에서는 2군에 비해 ALT값이 각각 55%, 45%, 53% 감소하였고, AST값은 31%, 31%, 28% 감소하였으며, 빌리루빈 값은 26%, 23%, 41% 감소하였다는 것을 알 수 있다. 즉, 이로부터 아미그달린을 함유하지 않는 수용성 고분자 물질을 주성분으로 하는 도인 추출물 WT-006의 간 보호 효과를 확인할 수 있었다.

#### 3. 담도결찰에 의한 간섬유화시 도인 추출물 WT-006의 항섬유화효과 검색

표 3의 결과에 있어서, 간경화를 유도한 실험동물군에서 간의 중량은 증가되었으며, 담도결찰 간경화 동물에 도인 추출물 WT-006, WT-005 및 WT-003를 처리한 경우에는 간의 습중량이 약간 감소하였으나, 이에 대한 유의성은 적었다. 한편, 도인 추출물 WT-006 200mg을 처리한 7군에서는 ALT, AST 및 ALP값이 6군에 비해 각각 45%, 42%, 38% 감소하였고, 8군(WT-005)과 9군(WT-003)에 비해 간 섬유화 억제효과가 탁월하다는 것을 알 수 있었다. 표 4로부터, 간 섬유화를 유발시킨 동물에 있어서 히드록시프롤린의 양은 본 발명의 도인 추출물 WT-006 200mg/kg/day의 투여에 의해 6군에 비해 37%가 유의성이 있게 감소되므로, 간 섬유화가 억제된다는 것을 알 수 있었다. 반면, 8~9군

에서도 6군에 비해 각각 10%, 19% 감소하였지만, 유의성은 적었다. 또한, 11~13군에서는 10군에 비해 투여 전이나 투여 후에 히드록시프롤린의 양에 있어서 약간의 증가 또는 감소가 관찰되어 그다지 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다.

위 결과로부터 아미그달린을 함유하지 않는 수용성 고분자 물질을 주성분으로 하는 도인 추출물 WT-006이 ANIT에 의한 급성 간독성 및 담도결찰에 의한 간섬유화 시 간보호 및 항섬유화 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

#### 《 감사의 말씀 》

본 연구는 원광대학교 교내연구비(2003)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 參 考 文 獻

- 1) R.G. Meeks, S.D. Harrison, R.J. Bull, *Hepatotoxicology*, CRC press, New York. U.S.A., pp.78-79 (1991).
- 2) S.L. Friedman, *Liver fibrosis—from bench to bedside*, J. Hepatol., 38, S38-53(2003).
- 3) K. Akamatsu, "Wakanyaku," Ishiyaku Publications, Tokyo, 1996, p.372.
- 4) S. Tin, "Kanpouiyakudaiziten," Vol. II, Kodansha, Tokyo, 1982, p.134.
- 5) J.X. Nan, E.J. Park, B.K. Yang, C.H. Song, G. Ko, D.H. Sohn, Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats, *Arch. Pharm. Res.*, 24, 327-32 (2001).
- 6) I.S. Jamall, V.N. Finelli, S.S. Que Hee, A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissue, *Anal. Biochem.*, 112, 70-78 (1981).

《 Figure Legends 》

Fig. 1. Scheme of extract preparation from Persicae Semen.

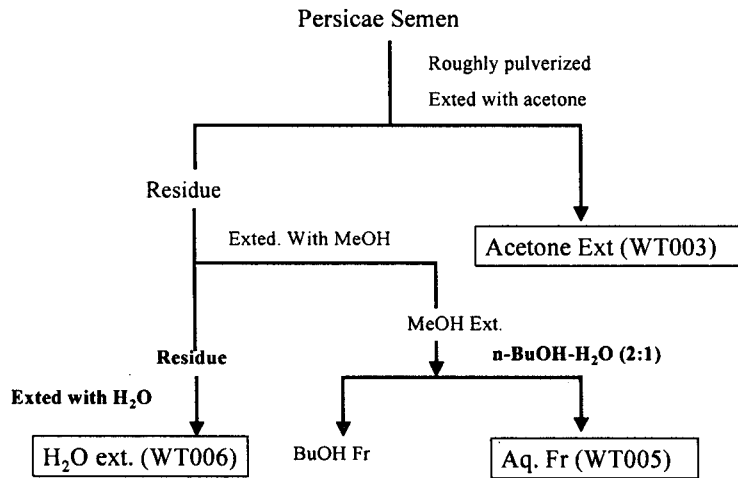


Fig. 2. Result of thin layer chromatography (TLC) shows that amygdalin is not contained in extract WT-006 prepared from Persicae Semen.

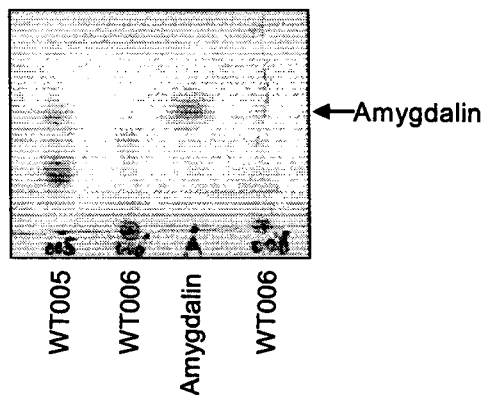


Table I. Composition of WT-006 extract from Persicae Semen.

Composition	Contents (w/w%)	Sugars	Composition (w/w%)	Amino acids	Composition (w/w%)
sugar	7.29	rhamnose	0.340.36	aspartic acid	3.73.9
protein	42.29	ribose	84.7594.5	threonine	2.42.5
unidentified	45.42	xylose	0.340.38	serine	4.14.9
		mannose	2.73.0	glutamic acid	31.032.4
		galactose	2.42.6	proline	0.91.0
		glucose	4.04.3	glycine	3.84.8
				alanine	2.32.6
				cystine	1.21.8
				valine	4.76.1
				methionine	2.83.2
				isoleucine	2.32.8
				leucine	4.35.1
				phenylalanine	5.26.1
				histidine	1.82.1
				lysine	3.84.2
				arginine	3.03.2
				ammonia	14.014.5

Table II. Serum parameters in ANIT-intoxicated rats treated with WT-006

Group	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	ALP(IU/L)	T-Cho(IU/L)	T-Bil(mg/dl)
1	24±8*	96±16*	367±56*	78±12*	0.3±0.1*
2	1227±145	1968±126	1072±166	492±78	6.6±1.9
3	549±182*	1366±317	1076±177	394±79	4.9±0.7
4	673±153*	1356±188*	1401±227	422±48	5.1±0.5
5	582±161*	1422±283*	1026±158	364±68*	3.9±0.4*

Results shows the mean±S.D.

\*: Significantly different from group 2,  $p < 0.05$ .



Table III. Hepatoprotective effect of Persicae Semen extracts in fibrotic liver.

Group	liver (g)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ALP (IU/L)	Bilirubin (mg/dL)
6	8.6±0.9 <sup>#</sup>	142±20 <sup>#</sup>	717±146 <sup>#</sup>	1265±172 <sup>#</sup>	8.1±1.7 <sup>#</sup>
7	7.8±1.2 <sup>#</sup>	78±17 <sup>#,*</sup>	417±84 <sup>#,*</sup>	783±112 <sup>#,*</sup>	7.8±1.9 <sup>#</sup>
8	8.2±1.3 <sup>#</sup>	90±12 <sup>*</sup>	496±44 <sup>*,*</sup>	528±68 <sup>*,*</sup>	7.1±1.4 <sup>#</sup>
9	8.4±0.8 <sup>#</sup>	89±14 <sup>*,*</sup>	463±162 <sup>*,*</sup>	673±249 <sup>*,*</sup>	7.0±1.9 <sup>#</sup>
10	3.2±0.3	24±13	106±21	354±56	0.3±0.1
11	3.3±0.4	22±15	73±34	265±86	0.3±0.2
12	3.1±0.3	29±9	110±19	239±65	0.3±0.1
13	3.4±0.5	36±12	78±39	365±76	0.4±0.1

Results shows the mean±S.D.

\* : Significantly different from Group 6, p<0.05.  
# : Significantly different from Group 10, p<0.05.

Table IV. Hydroxyproline contents in fibrotic liver treated with extracts from Persicae Semen

Group	Hydroxyproline(μg/g liver)	Group	Hydroxyproline(μg/g liver)
6	1077±195 <sup>*</sup>	10	322±57
7	674±196 <sup>*,#</sup>	11	287±67
8	966±187 <sup>*</sup>	12	354±39
9	874±150 <sup>*</sup>	13	319±48

Results shows the mean±S.D.

\* : Significantly different from group 10, p<0.01.  
# : Significantly different from group 6, p<0.01.