

## 흰쥐의 일차배양 간세포에서 Glycyrrhizin 및 Baicalin의 간 보호 활성 평가

김성화 · 천호준 · 박진구 · 김영식\* · 강삼식\* · 허광화\*\* · 이승호\*\* · 손건호\*\*\* · 이선미#  
성균관대학교 약학대학, \*서울대학교 약학대학, \*\*영남대학교 약학대학, \*\*\*안동대학교 식품영양학과  
(Received October 16, 2006; Revised November 20, 2006)

## Hepatoprotective Activities of Glycyrrhizin and Baicalin in Primary Cultured Rat Hepatocytes

Sung-Hwa Kim, Ho Jun Cheon, Jin-Gu Park, Yeong Shik Kim\*, Sam Sik Kang\*,  
Guang Hua Xu\*\*, Seung Ho Lee\*\*, Kun Ho Son\*\*\* and Sun-Mee Lee#

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

\*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-747, Korea

\*\*College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

\*\*\*Department of Food Science and Nutrition, Andong National University, Gyeongbuk 760-749, Korea

**Abstract** — The aim of this study was to investigate the protective effects of glycyrrhizin, active glycosides of Glycyrrhizae Radix, and baicalin, bioactive flavonoid isolated from Scutellariae Radix, on hepatocyte injury induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>, 10 mM), *tert*-butyl hydroperoxide (TBH, 0.5 mM), and D-galactosamine (GalN, 30 mM). Primary cultures of rat hepatocyte (18 hr cultured) were treated with CCl<sub>4</sub>, TBH, or GalN and various concentrations (0.1, 1, 10, and 100 μM) of glycyrrhizin or baicalin. Activity was accessed by determining the release of lactate dehydrogenase (LDH) and aminotransferases. CCl<sub>4</sub> significantly increased the levels of LDH, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) and these increases were prevented by baicalin concentrations of 0.1, 1, and 100 μM. The increases in ALT and AST levels were reduced by glycyrrhizin concentration of 100 μM. The level of LDH was markedly increased by TBH, and this increase was reduced by both glycyrrhizin and baicalin. ALT and AST levels were increased by TBH, which were prevented by glycyrrhizin and baicalin, respectively. GalN markedly increased the levels of LDH, ALT and AST. These increases was significantly reduced by both glycyrrhizin and baicalin. These results suggest that glycyrrhizin and baicalin possess the hepatoprotective activity.

**Keywords** □ glycyrrhizin, baicalin, hepatoprotective activity, primary cultured hepatocyte

감초는 콩과의 다년생 식물인 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch의 뿌리 및 뿌리줄기로서 한의학에서는 위장질환, 간질환, 호흡기염증 및 피부질환 등에 널리 사용되어오고 있다.<sup>1,2)</sup> 최근 연구에 따르면 감초의 주요 생리활성성분인 glycyrrhizin은 흰쥐의 대식세포에서 염증매개인자로 알려진 prostaglandin E<sub>2</sub>의 분비를 억제하며,<sup>3)</sup> HepG2 세포에서 *tert*-butyl hydroperoxide(TBH)에 의한 간독성을 억제한다고 한다.<sup>4)</sup> 또한 glycyrrhizin은 인간 hepatoblastoma 세포에서 tumor necrosis factor-α로 유도된 세포사멸을 억제하며,<sup>5)</sup> 더 나아가 활성산소와 지질과산화물을 억제함으로써 간염에도 효과적인 것으로 알려져 있다.<sup>6,7)</sup>

황금은 꿀풀과의 다년생 식물인 *Scutellaria baicalensis* Georgi의 뿌리로 항염증, 항암, 항근 및 콜레스테롤 저하작용이 보고되고 있으며, 현재 항고혈압약으로 한방처방에 빈번히 사용되고 있다.<sup>8)</sup> 황금의 주요 생리 활성성분인 baicalin은 인간 간암세포에서 항암 활성을 나타내며,<sup>9)</sup> 흰쥐의 결장암 생성을 억제한다고 한다.<sup>10)</sup> 또한 흰쥐에서 carrageenan으로 유도된 염증 및 포도상구균에 의해 발현되는 여러 염증매개 인자들의 분비 억제 작용이 있으며,<sup>11-13)</sup> 간세포에서의 항산화 작용이 보고 되고 있다.<sup>14)</sup> 이와 같이 감초와 황금은 임상적으로 간 질환 치료에 사용되어오고 있으나 이들의 일부 효능만이 과학적으로 밝혀지고 있을 뿐 이들의 주요 활성성분인 glycyrrhizin과 baicalin의 간세포 보호 활성에 대한 연구는 매우 미약한 실정이다.

현재 carbon tetrachloride(CCl<sub>4</sub>), TBH 및 D-galactosamine (GalN)으로 간독성이 유발된 일차배양 간세포가 간 보호 약물의

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 031-290-7712 (팩스) 031-292-8800  
(E-mail) sunmee@skku.edu

활성 검색 및 간 질환 기전 연구를 위한 생체 외 모델로 널리 사용되고 있다. CCl<sub>4</sub>는 간세포 내 cytochrome P450 2E1(CYP2E1)에 의해 CCl<sub>3</sub> radical로 활성화되어 세포 독성을 나타내며,<sup>15)</sup> TBH는 간세포 내 cytochrome P450에 의해 radical을 형성하여 간세포의 세포고사나 세포괴사를 일으키고,<sup>16,17)</sup> GalN은 간세포 내 RNA와 단백질합성 저해를 통해 독성을 유발한다.<sup>18,19)</sup>

따라서 본 연구에서는 CCl<sub>4</sub>, TBH 및 GalN으로 독성을 유발시킨 일차 배양 흰쥐 간세포를 이용하여 glycyrrhizin과 baicalin의 간세포 보호 활성을 알아보려고 하였다.

**실험 방법**

**시약 및 기기**

실험에 사용한 감초는 대구광역시 약령시장, 황금은 전남 순천에서 재배한 황금을 구입하여 경희대학교 이재현 교수의 감정을 받아 사용하였다. Type I collagen, collagenase type IV, insulin, epidermal growth factor, hydrocortisone, glucagon, antibiotic antimycotics, trypan blue, bovine serum albumin (BSA), methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide(MTT), CCl<sub>4</sub>, TBH 및 GalN 등은 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)에서, lactate dehydrogenase(LDH), alanine aminotransferase(ALT) 및 aspartate aminotransferase(AST) assay kit는 (주)아이비디랩, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 및 fetal bovine serum(FBS) 등은 GIBCO-BRL사(GRAND Island, NY, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약들은 특급 시약을 구입하여 사용하였다. Fraction collector는 Advantec의 SF-160을 사용하였다. <sup>1</sup>H- 및 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 Bruker ARX 250(250 MHz) spectrometer를 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane를 사용하였고, chemical shift value는 part per million(ppm) 단위로 나타내었다. 추출 및 분리용 용매는 시약용 1급을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub> 및 RP-18을 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 silicagel(70~230 mesh, Merck), MCI-gel CHP-20P(75~150 μm, Mitsubishi Chem. Co.), RP-18(40~63 μm, Merck), 등을 사용하였다. 발색시약은 vanillin-sulfuric acid 시액, 10% sulfuric acid, 1% FeCl<sub>3</sub>/ethanol 용액, anisaldehyde sulfuric acid 시액을 사용하였다.

**실험동물**

체중 180~220 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 (주) 현대 바이오로부터 공급 받아 온도 23±1°C, 상대습도 55±15% 및 300~500 Lux의 조도로 12시간 간격으로 명암이 조절되는 성균관대학교 약학대학 동물 사육실에서 일주일이상 순화시킨 후 육안적 증상을 관찰하여 정상적인 동물만을 실험에 사용하였으며, 고형 사료 및 물은 자유롭게 섭취시켰다.

**시료의 추출 및 분리**

Glycyrrhizin의 분리는 다음과 같다.<sup>20)</sup> 감초 12 kg을 MeOH로 상온에서 일주일씩 3회 반복 추출하여, 추출액을 모아 감압 농축하였다. 감압 농축한 MeOH 추출액을 증류수에 현탁시키고, 동량의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 가하여 분획할때기로 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층과 H<sub>2</sub>O 층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층을 감압 농축하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획을 얻었다. 남은 H<sub>2</sub>O 층에 다시 EtOAc를 동량 가해서 H<sub>2</sub>O 층과 EtOAc 층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후, EtOAc 층을 감압 농축하여 EtOAc 분획을 얻고, 나머지를 H<sub>2</sub>O 분획으로 하였다. 얻어진 분획 중 EtOAc 분획(150 g)을 지름 10 cm인 silica gel column에 loading시켜 EtOAc/n-hex.(1, 5, 10, 20, 40, 70, 100%)를 용출액으로 하여 용출시켜 분획 fr1~fr7을 얻었다. 분획 fr5를 silica gel column에 loading시켜 EtOAc/n-hexane gradient(0%~100%)용매로 용출시켜 분획 fr51~fr58을 얻었다. 그 중 분획 fr58을 MCI-gel CHP 20P (H<sub>2</sub>O-MeOH), RP-18(H<sub>2</sub>O-MeOH) 등으로 정제하여 glycyrrhizin (2.8 g)을 얻었다. Baicalin의 추출 및 분리는 다음과 같다. 황금 20 kg을 80°C에서 70% ethanol(30 l)로 12시간씩 3회 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 70% EtOH extract 약 6 kg을 얻었다. 이 중 5.9 kg을 물 20 l에 녹여 여기에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(15 l)를 가하여 분획할때기로 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>와 수층으로 분획한

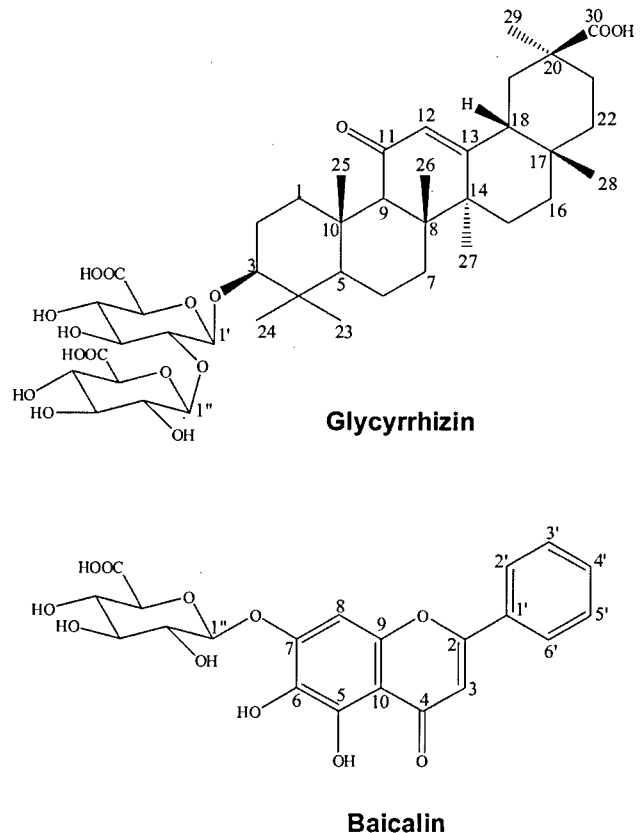


Fig. 1 - Chemical structures of glycyrrhizin and baicalin.

다음  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  층을 감압 농축하여  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extract(300 g)을 얻었고 다시 수층은 상기와 같은 방법으로 EtOAc(15 l), n-BuOH(15 l)순으로 추출하여 EtOAc extract 120 g, n-BuOH extract 2.2 kg과  $\text{H}_2\text{O}$  extract 1.6 kg을 얻었다. 이들 중 BuOH extract 50 g을 silica gel column으로 분리하였는데 column(길이 80 cm, 지름 8 cm)에 silica gel(70~230 mesh)을 25 cm 채우고 용매는  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  100% mobile phase의 elution을 시작하여  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH=7:1 순으로 극성을 높이면서 fraction 1~10을 얻었고 이중 fraction 7번 소분획을 silica gel(less than 230 mesh)을 사용하여  $\text{CHCl}_3$  : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$ =7:3:1~52:28:8의 조건으로 baicalin을 분리하였다(Fig. 1).

### 일차 간세포 분리 및 배양

흰쥐의 간세포는 Berry와 Friend의 방법<sup>21,22)</sup>을 변형한 2단계 collagenase 관류법을 이용하여 분리하였다. 흰쥐에 pentobarbital sodium(40 mg/kg)을 복강 내 주사하여 마취한 후 개복한 뒤, 간 문맥에 21 gauge catheter를 삽관하여  $\text{CO}_2$ 와  $\text{O}_2$ 의 혼합기체를 공급해 주면서 Krebs-Ringer-HEPES 완충용액과 collagenase로 구성된 소화용액을 15 ml/min의 속도로 10분간 재순환시켰다. 간세포가 소화된 후 간막을 벗겨 간세포가 유리되게 한 다음, nylon mesh를 사용하여 여과하였다. 여과액은 200 rpm에서 3분간 원심분리한 후 상등액을 버리고 침전된 간세포를 BSA가 포함된 완충용액에 현탁시켜 다시 원심분리하였다. 침전된 간세포를 배양액에 다시 현탁시켜 세포 현탁액을 얻은 뒤, trypan blue 용액으로 생존율을 측정하여, 생존율이 90% 이상인 경우에만 실험에 사용하였다. 생존율이 90% 이상되면 간세포의 농도가  $5 \times 10^5$  cells/ml이 되도록 조절하여, collagen type I로 미리 도포된 배양 용기에 이식하였다. 배양액으로는 10% FBS, 500 U/l insulin, 7  $\mu\text{g/l}$  glucagon, 20  $\mu\text{g/l}$  epidermal growth factor, 7500  $\mu\text{g/l}$  hydrocortisone,  $10^5$  U/l penicillin, 100 mg/l streptomycin, 250  $\mu\text{g/l}$  amphotericin B를 포함하는 DMEM을 사용하였으며 일정한 온도와 습도가 유지되는 37°C 배양기에서  $\text{O}_2$  95%와  $\text{CO}_2$  5%의 혼합기체를 공급하여 배양하였다. 배양시작 4시간 후 새로운 배양액으로 교환하였다.

### MTT assay를 이용한 세포독성 측정

간세포를 24 well plate에 세포농도  $2.5 \times 10^5$  cells/ml로 조절하여 18시간 동안 배양한 후 glycyrrhizin 및 baicalin을 각 농도별로(0.1, 1, 10, 100 및 200  $\mu\text{M}$ ) 처리한 후 72시간 동안 추가 배양하였다. 72시간 후 MTT(0.25 mg/ml)가 함유된 배양액으로 교환하여 4시간 동안 처리 후 생성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide(300  $\mu\text{l/well}$ )에 녹여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### $\text{CCl}_4$ 에 의한 간세포 독성 유도

Kiso의 방법<sup>23)</sup>을 일부 수정하여 간세포를 배양한지 18시간 후 10 mM  $\text{CCl}_4$ 를 함유한 배양액으로 교체하여 간독성을 유도하였으며, 동시에 glycyrrhizin 및 baicalin을 각 농도별(0.1, 1, 10 및 100  $\mu\text{M}$ )로 처리하여 24시간 동안 세포를 배양한 후 그 배양액을 취하여 간세포 보호작용을 알아보았다.

### TBH에 의한 간세포 독성 유도

Tseng의 방법<sup>24)</sup>을 일부 수정하여 간세포를 배양한지 18시간 후 0.5 mM TBH를 함유한 배양액으로 교체하여 간독성을 유도하였으며, 동시에 glycyrrhizin 및 baicalin을 각 농도별(0.1, 1, 10 및 100  $\mu\text{M}$ )로 처리하여 1시간 동안 세포를 배양한 후 그 배양액을 취하여 간세포 보호작용을 알아보았다.

### GalN에 의한 간세포 독성 유도

Kiso의 방법<sup>25)</sup>을 일부 수정하여 간세포를 배양한지 18시간 후 30 mM GalN을 함유한 배양액으로 교체하여 간독성을 유도하였으며, 동시에 glycyrrhizin 및 baicalin을 각 농도별(0.1, 1, 10 및 100  $\mu\text{M}$ )로 처리하여 48시간 동안 세포를 배양한 후 그 배양액을 취하여 간세포 보호작용을 알아보았다.

### LDH, ALT 및 AST 활성

세포 독성이 유도된 간세포의 배양액을 취하여 LDH, ALT 및 AST의 활성을 아이비디-랩 측정 kit인 C121, C123 및 C124를 사용하여 spectrophotometer로 각각 측정하였다.

### 통계처리

모든 측정 결과는 평균값±표준오차로 나타내었으며, 실험군 간의 차이는 Dunnett's *t*-test를 사용하여 통계적 유의성을 나타내었고,  $P < 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의적 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 실험 결과

### Glycyrrhizin 및 baicalin의 cytotoxicity

Glycyrrhizin 및 baicalin 세포독성 측정과 더불어 농도 범위

Table I - Cytotoxicity of glycyrrhizin and baicalin in primary cultured rat hepatocytes

Compound	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
Glycyrrhizin	625.2
Baicalin	807.3

After isolation and incubation for 18 hr, hepatocytes were treated with glycyrrhizin and baicalin in DMEM for 72 hr and then cell viability was evaluated by MTT reduction. IC<sub>50</sub> values were determined by viability of hepatocyte cell cultures by 50%.

결정을 위하여 MTT assay를 시행하였다. MTT assay를 시행하여 일차 배양 간세포에서 대조군에 비해 생존율이 50%가 되는 약물의 농도를 측정하였다. 그 결과 Table I에서 보는 바와 같이 glycyrrhizin과 baicalin의 IC<sub>50</sub>은 각각 625.2 및 807.3 μM이었다.

Glycyrrhizin 및 baicalin이 CCl<sub>4</sub>로 유도된 간독성에 미치는 영향

Fig. 2에서 보는 바와 같이 간장 손상 지표인 LDH, ALT 및 AST 수치는 CCl<sub>4</sub> 단독군의 경우 각각 220.0±8.0, 255.7±

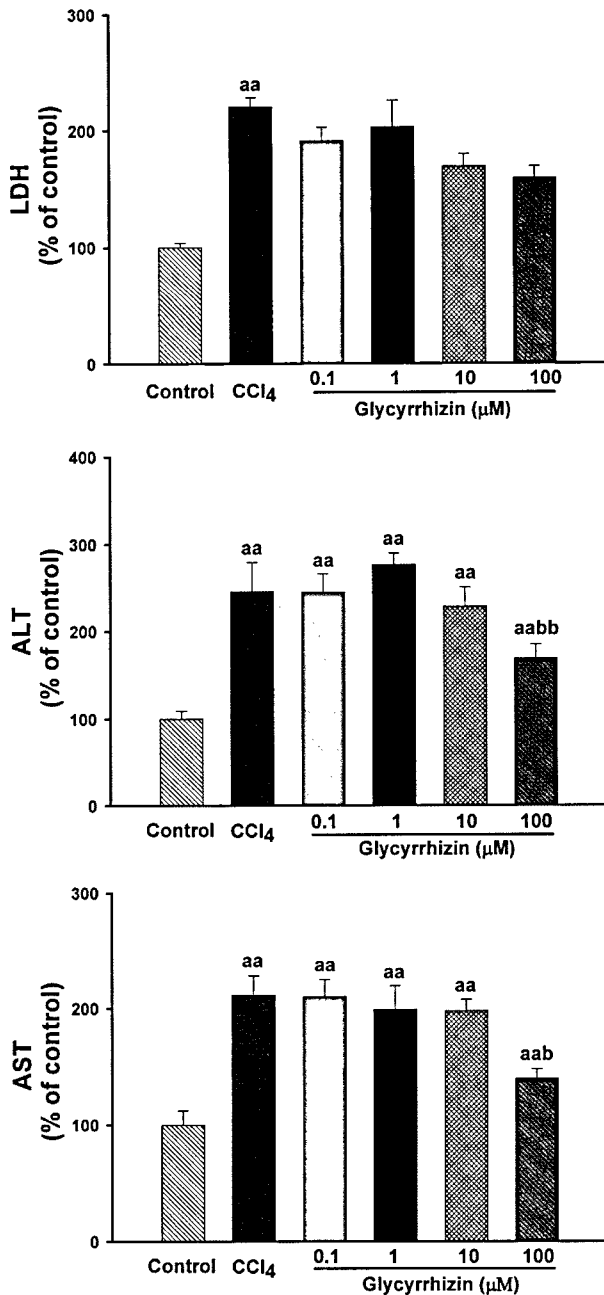


Fig. 2 – Hepatoprotective effect of the glycyrrhizin on CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means±S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. <sup>aa</sup> Significantly different ( $P<0.01$ ) from control group. <sup>b,bb</sup> Significantly different ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) from CCl<sub>4</sub>-treated group.

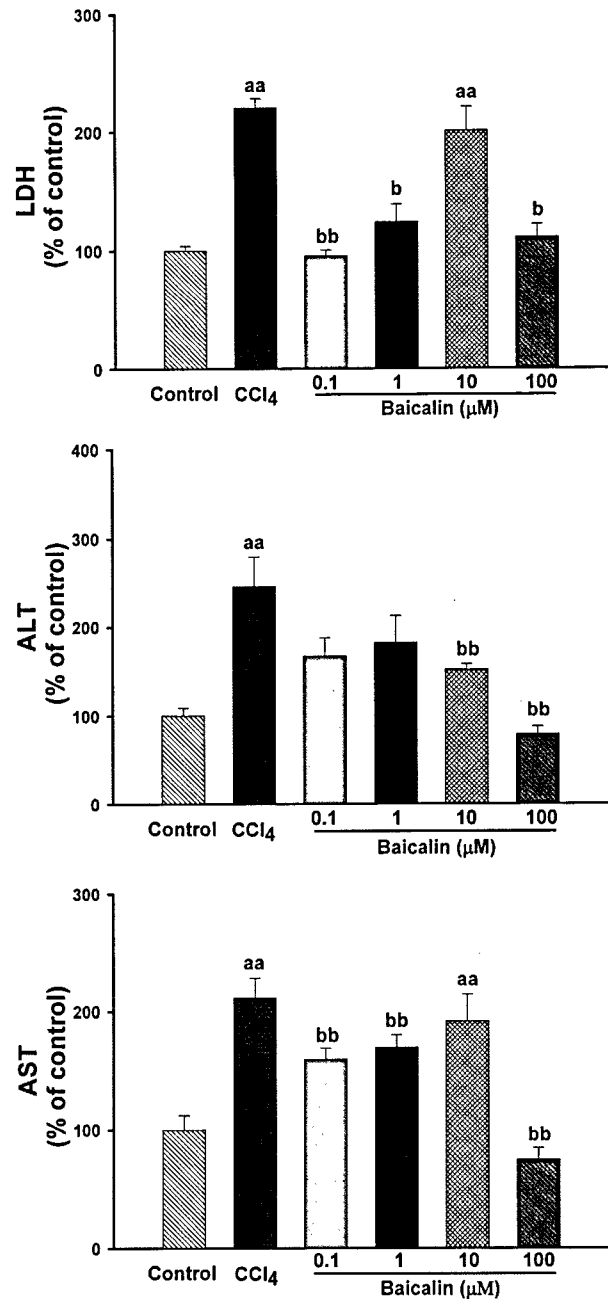


Fig. 3 – Hepatoprotective effect of the baicalin on CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means±S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. <sup>aa</sup> Significantly different ( $P<0.01$ ) from control group. <sup>b,bb</sup> Significantly different ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) from CCl<sub>4</sub>-treated group.

21.4 및 211.3±16.9%로 대조군에 비해 현저한 활성 증가를 나타내었다. Glycyrrhizin은 CCl<sub>4</sub>로 유도된 LDH 활성 증가에는 별다른 영향을 미치지 않았으나 glycyrrhizin 100 μM의 농도

에서 ALT 수치는 168.6±15.9%로, AST 수치는 139.8±8.4%로 CCl<sub>4</sub> 단독군에 비해 현저히 억제되었다. Fig. 3에서와 같이 LDH 활성은 baicalin 0.1, 1 및 100 μM의 농도에서 각각 95.4±4.9, 124.1±15.0 및 111.1±11.3%로 CCl<sub>4</sub> 단독군에 비해 LDH 활성을 현저히 억제하였으며, baicalin 10 및 100 μM 농도에서도 ALT 수치가 CCl<sub>4</sub> 단독군에 비해 각각 151.5±6.1, 78.8±

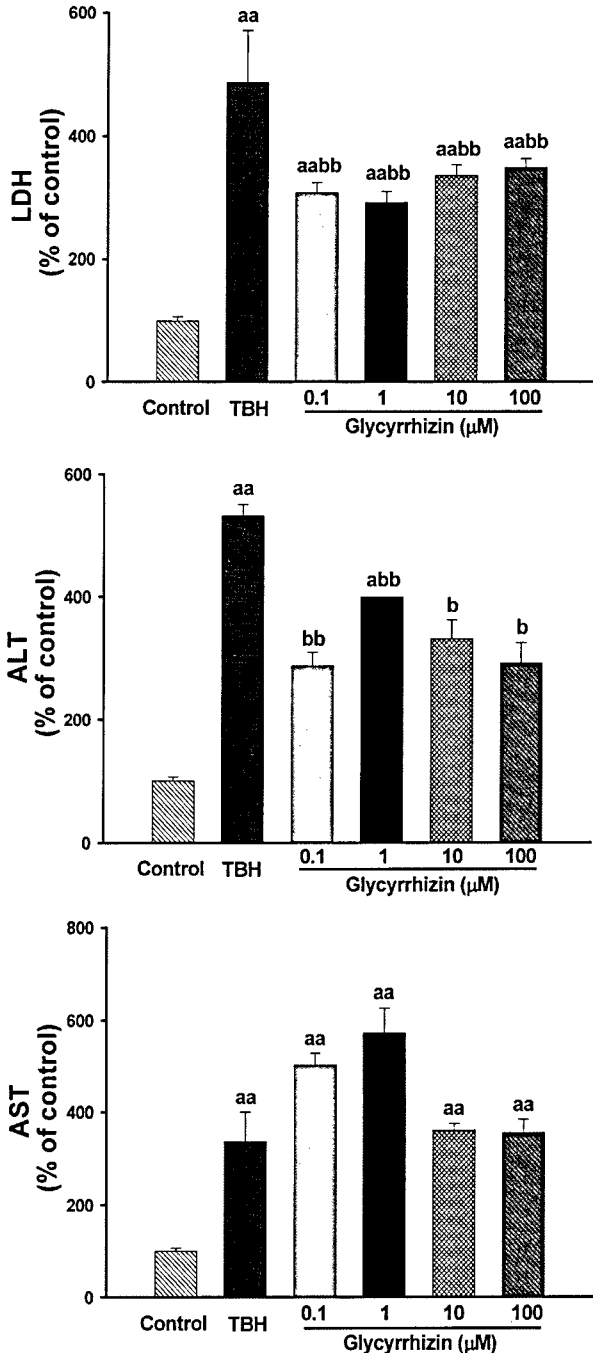


Fig. 4 – Hepatoprotective effect of the glycyrrhizin on TBH-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means±S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. <sup>a,aa</sup> Significantly different ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) from control group. <sup>b,bb</sup> Significantly different ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) from TBH-treated group.

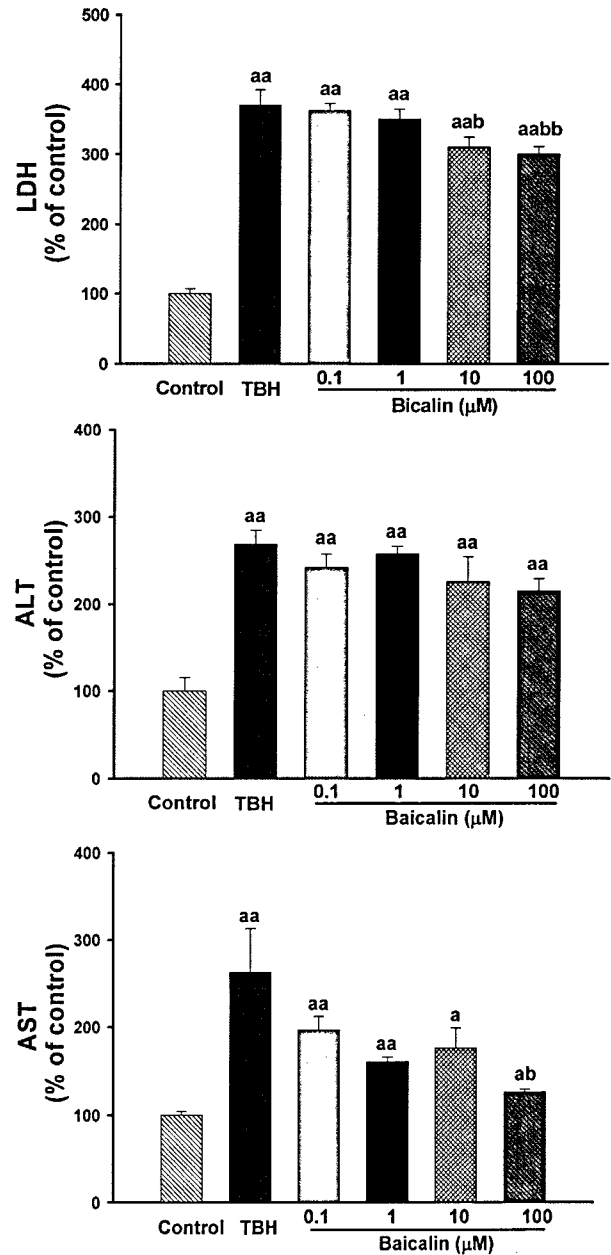
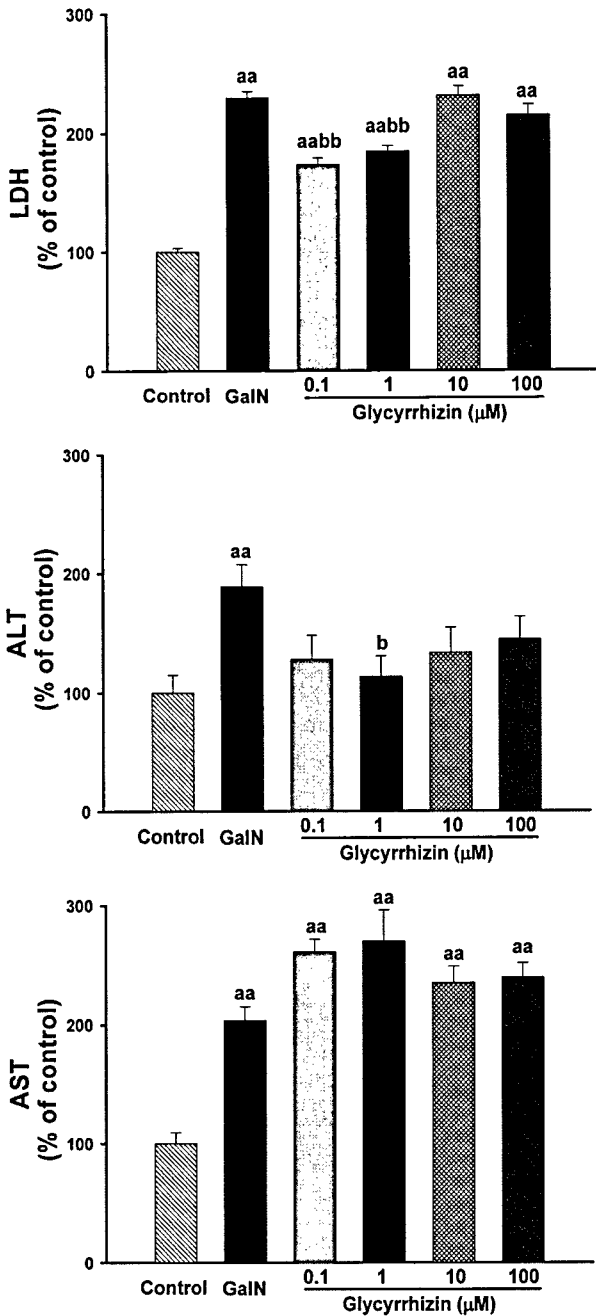


Fig. 5 – Hepatoprotective effect of the baicalin on TBH-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means±S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. <sup>a,aa</sup> Significantly different ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) from control group. <sup>b,bb</sup> Significantly different ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) from TBH-treated group.

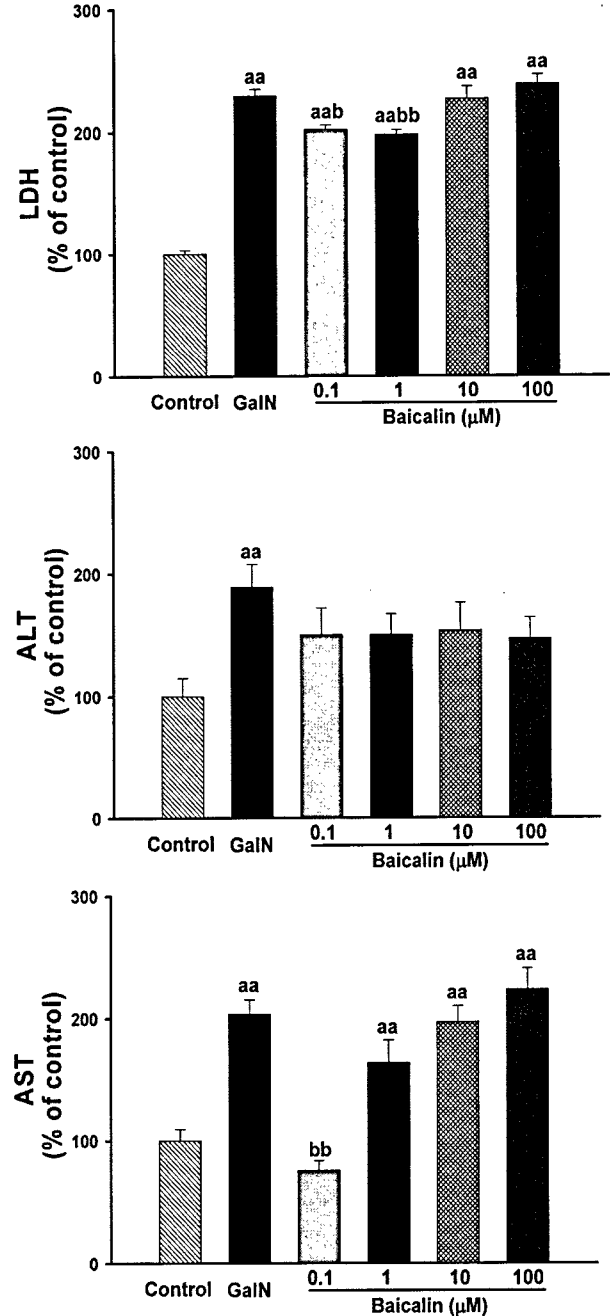
9.0%로 ALT 활성을 현저히 억제하였다. 또한 AST 수치는 baicalin 0.1, 1 및 100  $\mu\text{M}$ 의 농도에서  $\text{CCl}_4$  단독군에 비해  $159.8 \pm 9.2$ ,  $169.4 \pm 10.8$  및  $74.5 \pm 9.8\%$ 로 AST의 활성을 현저히 억제하였다.

**Glycyrrhizin 및 baicalin이 TBH로 유도된 간독성에 미치는 영향**

Fig. 4에서 보는 바와 같이 LDH, ALT 및 AST 활성은 TBH 단독군의 경우 각각  $486.6 \pm 84.1$ ,  $531.8 \pm 18.7$  및  $335.5 \pm 64.4\%$



**Fig. 6** – Hepatoprotective effect of the glycyrrhizin on GalN-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means  $\pm$  S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. <sup>aa</sup> Significantly different ( $P < 0.01$ ) from control group. <sup>b, bb</sup> Significantly different ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) from GalN-treated group.



**Fig. 7** – Hepatoprotective effect of the baicalin on GalN-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means  $\pm$  S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. <sup>aa</sup> Significantly different ( $P < 0.01$ ) from control group. <sup>b, bb</sup> Significantly different ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) from GalN-treated group.

로 대조군에 비해 현저한 활성 증가를 나타내었다. 이러한 LDH 및 ALT 활성 증가는 glycyrrhizin 모든 농도에서 TBH 단독군에 비해 현저히 억제되었다. 그러나 이외는 달리 glycyrrhizin은 AST 활성에는 별다른 영향을 미치지 않았다. Fig. 5에서와 같이 TBH 단독군의 경우 대조군에 비해 LDH, ALT 및 AST 활성이 각각  $370.1 \pm 22.5$ ,  $269.2 \pm 15.4$  및  $262.5 \pm 50.6\%$ 로 현저한 증가를 나타내었다. Baicalin 10 및 100  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 각각  $310.8 \pm 14.1$  및  $301.3 \pm 10.7\%$ 로 TBH 단독군에 비해 현저한 LDH 활성 감소를 나타내었으나, TBH로 유도된 ALT 활성에는 별다른 영향을 미치지 않았다. TBH로 유도된 AST 활성은 baicalin 100  $\mu\text{M}$ 의 농도에서  $125.9 \pm 3.4\%$ 로 TBH 단독군에 비해 현저히 감소되었다.

#### Glycyrrhizin 및 baicalin이 GalN으로 유도된 간독성에 미치는 영향

Fig. 6에서 보는 바와 같이 LDH, ALT 및 AST 활성은 GalN 단독군의 경우 각각  $229.2 \pm 5.2$ ,  $188.9 \pm 18.6$  및  $203.5 \pm 11.5\%$ 로 대조군에 비해 현저한 활성 증가를 나타내었다. 이러한 LDH 활성의 증가는 glycyrrhizin 0.1과 1  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 GalN 단독군에 비해 현저한 LDH 활성 억제를 나타내었으며, glycyrrhizin 1  $\mu\text{M}$ 의 농도에서도 GalN 단독군에 비해 현저하게 ALT 활성이 감소되었다. 그러나 이외는 달리 glycyrrhizin은 AST 활성에는 별다른 영향을 미치지 않았다. Baicalin 또한 0.1 및 1  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 GalN 단독군에 비해 GalN으로 유도된 LDH 활성 증가를 현저히 억제하였으나 GalN으로 유도된 ALT 수치에는 별다른 영향을 미치지 않았다. GalN으로 유도된 AST 활성의 증가는 baicalin 0.1  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 GalN 단독군에 비해 현저히 감소하였다(Fig. 7).

## 고 찰

간 질환 치료를 위한 연구는 전세계적으로 널리 행하여지고 있으며, 특히 간 질환 및 간염의 이환율이 높은 동양권에서 많은 연구가 이루어지고 있다. 현재 간 질환 치료제로 임상적으로 몇몇 화학물질이 사용되고 있으나 이들의 치료효과의 한계와 부작용이 빈번히 발생되므로 최근에는 천연물로부터 유래된 물질에 대한 관심이 집중되고 있다. 따라서 본 연구에서는 임상적으로 간보호작용이 알려진 약제인 감초와 황금으로부터 분리된 glycyrrhizin과 baicalin의 간 보호 활성을 알아보기 위하여 일차 배양 간세포를 이용한 급성 간독성 실험을 수행하였다.

먼저 glycyrrhizin과 baicalin의 간세포 독성작용을 알아보기 위하여 일차 배양 간세포를 이용한 MTT assay를 시행한 결과 glycyrrhizin과 baicalin의  $\text{IC}_{50}$ 가 각각 625.2 및 807.3  $\mu\text{M}$ 로 본

실험에서 사용된 glycyrrhizin과 baicalin의 최고농도인 100  $\mu\text{M}$  처치시도 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

$\text{CCl}_4$ 는 간세포내의 CYP2E1에 의해  $\text{CCl}_3$  radical로 활성화되어 세포막이나 세포소기관에 존재하는 지질과 단백질들의 구조와 기능을 파괴하여 간독성을 나타낸다. 또한 간독성이 유발된 세포들은 세포막이 손상되어 세포내 효소인 LDH, ALT 및 AST가 세포 외로 유리되므로 세포 배양액내의 이러한 효소들의 농도 증가는 유용한 간손상 지표로 사용되고 있다.<sup>26)</sup> 본 연구 결과에서 보듯이  $\text{CCl}_4$  처치 시 LDH, ALT 및 AST 수치가 현저히 증가되었으며 glycyrrhizin은 100  $\mu\text{M}$ 의 고농도에서만  $\text{CCl}_4$ 로 유도된 ALT 및 AST 수치를 현저히 억제하였다. 그러나 이외는 달리 baicalin 처치 시 10 및 100  $\mu\text{M}$ 의 농도에서  $\text{CCl}_4$ 로 증가된 ALT 수치를 억제하였을 뿐 아니라 모든 처치 농도에서  $\text{CCl}_4$ 로 증가된 LDH와 AST를 현저히 억제하였다. 이상의 결과로 보아 baicalin이 glycyrrhizin에 비해  $\text{CCl}_4$ 에 의한 간세포 독성에 대해 탁월한 간세포 보호 작용이 있음을 알 수 있었다.

간세포 내에서 TBH는 두 가지 경로에 의해 대사된다. 한 과정은 일차 배양된 간 세포 내에서 cytochrome P450에 의해 peroxy 및 alkoxy radical 등과 같은 독성물질로 전환되며, 이러한 radical이 초기 세포막의 지질과산화물을 일으킨다. 또 다른 대사과정은 환원형 글루타치온은 과산화효소가 TBH와 결합하여 *t*-butyl alcohol과 산화형 글루타치온으로 전환됨으로써 해독되는 과정이다.<sup>27)</sup> 이러한 대사과정을 통하여 간세포 내에서 TBH는 radical을 생성하게 되고, 이렇게 생성된 radical이 세포막을 구성하는 불포화 지방산과 직접 및 간접적으로 반응하여 과산화 과정을 통해 간세포의 세포고사나 세포괴사를 일으킨다.<sup>16,17)</sup> 본 실험결과에서 감초의 glycyrrhizin은 모든 처치 농도에서 TBH로 인한 LDH 및 ALT의 증가를 뚜렷이 억제하였으며, 황금의 baicalin 또한 고농도에서 TBH로 유도된 LDH 및 ALT 수치를 현저히 억제하였다. 이러한 결과는 Junei<sup>4)</sup>와 Hwang<sup>14)</sup>의 실험 결과와도 유사하게 나타났으며, glycyrrhizin과 baicalin의 간세포 보호 작용은 아마도 항산화 작용을 통해 나타나는 것으로 여겨진다.

간세포 내에 GalN의 처치는 인간의 바이러스성 간염과 유사한 간독성을 나타내며,<sup>28)</sup> 이는 GalN이 간세포 내에 RNA와 단백질 합성 저해를 통해 독성을 유발한다고 한다. 감초의 glycyrrhizin은 일부 저농도에서 GalN으로 유도된 LDH 및 ALT 증가를 억제하는 효과를 뚜렷이 나타내었으며, 황금의 baicalin도 저농도 처치시 GalN으로 유도된 LDH 및 AST의 증가를 현저히 억제하였다.

이상의 결과를 보아 감초의 glycyrrhizin과 황금의 baicalin은 흰쥐의 일차배양 간세포에서 우수한 급성 간독성 억제 작용을 나타내는 것으로 여겨진다. 또한 본 결과를 바탕으로 현재 생체 내 동물 모델을 이용한 간장 보호 효능 및 작용기전 연구가 진행 중이다.

## 감사의 말씀

본 연구는 2005년도 식품의약품안전청 한약재 생리활성성분의 효능확인 연구(06082한약효630)의 지원으로 수행되었습니다.

## 문헌

- 1) Olukoga, A. and Donaldson, D. : Licorice and its health implications. *J. R. Soc. Health* **120**, 83 (2000).
- 2) Sticher, O. : In Haensel, R., Sticher, O. and Steinegger, E. (Eds), *Pharmakognosi-Phytopharmazie*, 6<sup>th</sup> ed, Springer, Berlin, p. 542 (1999).
- 3) Ohuchi, K., Kamada, Y., Levine, L. and Tsurufuji, S. : Glycyrrhizin inhibits prostaglandin E2 production by activated peritoneal macrophages from rats. *Prostaglandins Med.* **7**, 457 (1981).
- 4) Junei, K., Tomoki, H., Ryota, T., Tsuneatsu, N., Masafumi, O., Toshihiro N. and Hikaru, O. : Hepatoprotective constituents in plants 14. Effects of soyasapogenol B, sophoradiol, and their glucuronides on the cytotoxicity of *tert*-butyl hydroperoxide to HepG2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1357 (2003).
- 5) Yoshikawa, M., Toyohara, M., Usda, S., Shiroy, A., Takeuchi, H., Nishiyama, T., Yamada, T., Fukui, H. and Ishizaka, S. : Glycyrrhizin inhibits TNF-induced, but not Fas-mediated, apoptosis in the human hepatoblastoma lin HepG2. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 951 (1999).
- 6) Kiso, Y., Tohkin, M., Hikino, H., Hattori, M., Sakamoto, T. and Namba, T. : Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin. I: Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta Med.* **50**, 298 (1984).
- 7) Takino, T. : The effects of hepatotherapeutic drugs on chronic liver disease evaluated by double blind trials in Japan. *J. Kyoto Perfect Univ. Med.* **93**, 689 (1984).
- 8) Zhang, D. Y., Wu, J., Ye, F., Xue, L., Jiang, S., Yi, J., Zhang, W., Wei, H., Sung, M., Wang, W. and Li, X. : Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis*. *Cancer Res.* **14**, 4037 (2003).
- 9) Motoo, Y. and Sawabu, N. : Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines. *Cancer Lett.* **1**, 91 (1994).
- 10) Fukutake, M., Yokota, S., Kawamura, H., Iizuka, A., Amagaya, S., Fukuda, K. and Komatsu, Y. : Inhibitory effect of *Coptidis Rhizoma* and *Scutellariae Radix* on azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in rat colon. *Biol. Pharm. Bull.* **8**, 814 (1998).
- 11) Chou, T. C., Chang, L. P., Li, C. Y., Wong, C. S. and Yang, S. P. : The antiinflammatory and analgesic effects of baicalin in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *Anesth. Analg.* **6**, 1724 (2003).
- 12) Krakauer, T., Li, B. Q. and Young, H. A. : The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines. *FEBS Lett.* **500**, 52 (2001).
- 13) Lin, C. C. and Shieh, D. E. : The anti-inflammatory activity of *Scutellaria rivularis* extracts and its active components, baicalin, baicalein and wogonin. *Am. J. Chin. Med.* **1**, 31 (1996).
- 14) Hwang, J. M., Wang, C. J., Chou, F. P., Tseng, T. H., Hsieh, Y. S., Hsu, J. D. and Chu, C. Y. : Protective effect of baicalin on *tert*-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Arch. Toxicol.* **79**, 102 (2005).
- 15) Mujumdar, A. M., Upadhye, A. S. and Pradhan, A. M. : Effect of *Azadirachta indica* leaf extract on CCl<sub>4</sub> induced hepatic damage in albino rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Science* **60**, 363 (1998).
- 16) Esterbauer, H., Zollner, H. and Schur, R. J. : Hydroxyalkenals; cytotoxic products of lipidperoxidation. *Science Biochem.* **1**, 311 (1988).
- 17) Vaca, C. E., Vodicka, P. and Hemminki, K. : Determination of malonaldehyde-modified 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA by 32P-postlabelling. *Carcinogenesis* **13**, 593 (1992).
- 18) Decker, K. and Keppler, D. : Galactosamine-induced liver injury. In Popper, H. and Schaffner, F. (Eds.), *Progress in Liver Disease*, Grune, Stratton, New York, p. 183 (1972).
- 19) Konishi, Y., Shinozuka, H. and Farber, J. L. : The inhibition of rat liver nuclear ribonucleic acid synthesis by galactosamine and its reversal by uridine. *Lab. Invest.* **30**, 751 (1974).
- 20) Shim, S. B., Kim, N. J. and Kim, D. H. :  $\beta$ -Glucosidase inhibitory activity and hepatoprotective effect of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid from the rhizomes of *Glycyrrhiza uralensis*. *Planta Med.* **66**, 40 (2000).
- 21) Berry, M. N. and Friend, D. S. : High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* **43**, 506 (1969).
- 22) Kleinman, 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 (1979).
- 23) Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. : Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Planta Med.* **49**, 222 (1983).
- 24) Tseng, T. H., Wang, C. J., Kao, E. S. and Chu, H. Y. : Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by *tert*-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* **101**, 137 (1996).
- 25) Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. : Assay method for antihepatotoxic activity using galactosamine-induced cytotoxicity in primary-cultured hepatocytes. *J. Nat. Prod.* **46**, 841



- (1983).
- 26) Clawson, G. A. : Mechanism of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pathol. Immunopathol. Res.* **8**, 104 (1989).
- 27) Rush, G. F., Gorski, J. R., Ripple, M. G., Sowinski, J., Bugelski, P. and Hewitt, W. R. : Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **78**, 473 (1985).
- 28) Taniguchi, H., Yomota, E., Nogi, K. and Onoda, Y. : Effects of anti-ulcer agents on ethanol-induced gastric mucosal lesions in D-galactosamine-induced hepatitis rats. *Arzneimittelforschung* **52**, 600 (2002).