

## 결명자의 타크린으로 유발한 간 세포독성 보호 성분

변에리사<sup>#</sup> · 정길생<sup>1,#</sup> · 안인파<sup>2</sup> · 리빈 · 이동성 · 고은경 · 윤권하<sup>1</sup> · 김윤철\*  
원광대학교 약학대학, <sup>1</sup>원광대학교 익산방사선연구센터, <sup>2</sup>연변대학교 약학대학

### Hepatoprotective compounds of Cassiae Semen on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells.

Erisa Byun<sup>#</sup>, Gil-Saeng Jeong<sup>1,#</sup>, Ren-Bo An<sup>2</sup>, Bin Li, Dong-Sung Lee,  
Eun-Kyung Ko, Kwon-Ha Yoon<sup>1</sup> and Youn-Chul Kim\*

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

<sup>1</sup>Institute for Radiological Imaging Science, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China

**Abstract** – Tacrine is an acetylcholinesterase inhibitor that is approved for the treatment of Alzheimer's disease. However, tacrine treatment for Alzheimer's disease results in reversible hepatotoxicity in 30-50% of patients, which seriously limits its clinical use. Accordingly, the identification of constituents in natural products that have protective effects on tacrine-induced hepatotoxicity would be valuable. In the present study, an immortalized human hepatoma cell line, HepG2 was employed to screen for agents that protect against tacrine-induced hepatotoxicity. The bioassay-guided fractionation of water extract of Cassiae Semen furnished two anthraquinones, aurantio-obtusin (**1**) and obtusifolin (**2**). Compounds **1** and **2** showed hepatoprotective effects with the protection ratio values of 55.3 +/- 0.5% and 41.2 +/- 0.8% at 160 µM, respectively.

**Key words** – *Cassia obtusifolia* L, aurantio-obtusin, obtusifolin, tacrine, hepatoprotection, HepG2

간장은 약물대사의 주요 기관이며, 소화기계로 들어온 생체외 물질로부터 전신을 방어하는 기능을 수행하고 있다. 또한 질병의 치료 목적으로 생체 내로 들어온 약물과 같은 외부 물질이 간을 통과함으로써 영양소외에도 독성물질에 노출될 위험이 여타의 장기에 비해 손상될 수 있는 확률이 비교적 높다. 사용 중인 의약품 중 600종 이상이 급성 또는 만성 간 손상을 유발할 수 있다고 보고되어 있어,<sup>1)</sup> 이 문제에 대한 심각성이 재인식되고 있다. 저자 등은 간 독성의 부작용을 가지는 의약품을 독성유발 물질로 사용하여 이에 대한 간 세포 보호활성 화합물을 천연물로부터 발견하고자 하였다.

타크린 (tacrine; 1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine hydrochloride)은 아세틸콜린에스테라제 저해제로서 알츠하이머 증후군의 치료약의 하나로 사용되고 있다. 그러나, 이 약물을 복용하는 환자의 30-50%에 있어서 가역성 간 손상

이 유발되기 때문에 투약의 제한을 비롯한 신중한 투여가 요구되고 있다.<sup>2)</sup> 따라서, 천연물로부터 타크린의 간 독성을 감소시킬 수 있는 화합물을 발견하는 것은 중요하다고 생각된다. 본 연구에서는 타크린으로 독성을 유발한 사람 간암 세포 유래의 HepG2 세포주를 대상으로 천연물 유래 화합물이 세포생존율에 대한 증가 여부를 관찰하여 간 세포 보호활성을 평가하였다. HepG2 세포주는 많은 간 세포 기능을 가지고 있으며,<sup>3)</sup> 타크린으로 유발한 흰쥐 초대 배양 간세포에 상응하는 결과를 가지는 것으로 보고되어 있다.<sup>4)</sup>

결명자는 콩과(Leguminosae)에 속하는 일년생 초본인 초결명(*Cassia obtusifolia* L.)과 동속식물인 긴강남차(*Cassia tora* L.)의 종자이며, 한방에서 청간(淸肝), 명목(明目), 이수(利水), 통변(通便)의 효능으로, 풍열(風熱)로 인한 눈의 충혈, 청맹(靑盲), 야맹증, 고혈압, 간염, 간경변으로 인한 복수(腹水), 습관성변비 등의 치료에 이용되고 있다.<sup>5)</sup> 결명자의 생리활성 성분연구로는 살충효과,<sup>6)</sup> 항유전독성효과,<sup>7)</sup> 항진균효과,<sup>8)</sup> 돌연변이 억제효과<sup>9)</sup>를 가지는 anthraquinone류와 돌연변이 억제효과<sup>9)</sup>와 간독성 억제효과<sup>10)</sup>를 가지는

<sup>#</sup>공동주저자

\*교신저자 (E-mail): yckim@wku.ac.kr

(FAX): 063-852-8837

naphthopyren 배당체류 등이 보고되어 있다. 천연물로부터 간 세포 보호활성 물질을 탐색하는 과정에서 결명자의 물 추출물이 타크린으로 유발한 HepG2 세포주 사멸에 대하여 300 µg/ml 의 농도에서 유의한 보호효과 (보호율=53.2±0.8%)를 나타냈기 때문에 함유 성분의 분리를 수행하여 얻어진 2종의 화합물에 대한 간 세포 보호활성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 본 실험에 사용한 결명자는 2007년 4월 전북 익산시 소재 대한한약국에서 구입하였으며, 시료의 일부는 표준품(WP07-18)으로 보관하고 있다.

**시약 및 기기** - Column chromatography용 담체는 Kiesel gel 60 (70~230 mesh, Merck), RP-18 Lichroprep (Merck), Sephadex LH-20 (Sigma)을 각각 사용하였다. NMR spectrum은 JEOL JNM-ECP 500 (<sup>1</sup>H, 500 MHz; <sup>13</sup>C, 125 MHz)을, ESI-MS는 API-2000 spectrometer를 사용하여 측정하였다. RPMI 1640 배지와 trypsin-ethylene diamine-tetraacetic acid (EDTA)는 Gibco Laboratories사에서 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone Laboratories사에서 구입하였다. Tacrine, silybin과 3'-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma사에서 구입하였다. 96-Well tissue culture plates와 기타 tissue culture dishes는 Nunc사 제품을 이용하였다.

**Hep G2 세포배양 및 간세포 보호활성 측정** - 사람 간암 세포 유래 HepG2 세포주는 American Type Culture Collection에서 분양하여 사용하였으며, 타크린으로 독성을 유발한 세포주에 대한 보호활성 측정은 송 등의 방법<sup>10)</sup>에 따라 실시하였다. 간략하게 설명하면, HepG2 세포 (2×10<sup>5</sup> cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 µg/ml)을 함유한 RPMI 1640 배지에 분주하고 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 37°C에서 24시간 배양한 다음, 분리된 화합물 (1, 2)의 시료 용액 (5, 10, 20, 40, 80, 160 µM)과 1.2 mM tacrine을 처리한 후 2시간 동안 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 배양하였으며, 세포생존율은 MTT 법을 활용하여 측정하였으며, 양성대조약물로는 silybin을 사용하였다. 또한, 모든 실험치는 대조군에 대한 세포보호율을 mean±S.D.로 표시하였으며, 각각 3회 반복 실험치를 이용하여 계산하였다. 통계처리는 one-way ANOVA test를 적용하여 수행하였고, *p*값이 0.01 미만을 통계학적으로 의미 있다고 간주하였다.

**추출 및 정제** - 건조된 결명자(1.0 kg)을 증류수(5 l×2회)로 2시간 동안 가열추출하여 여과하고 여액을 감압농축하여 1 l로 하였다. 이것을 *n*-BuOH (1 l×4회)로 액체분배법을 이용하여 *n*-BuOH 가용부와 증류수 가용부로 분획하였다. *n*-BuOH 가용부(11.36 g)를 감압농축하고 40% 수성 MeOH

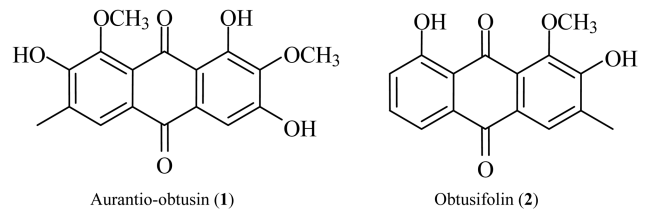


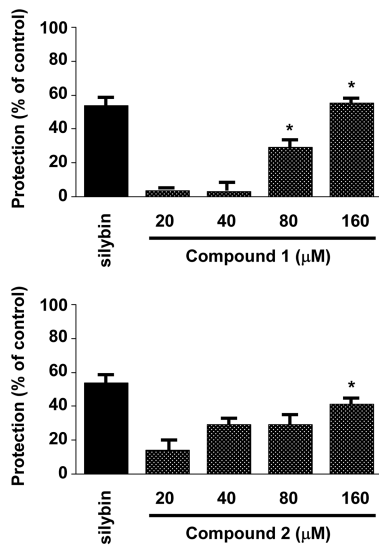
Fig. 1. Chemical structures of compounds 1 and 2.

에 현탁한 후에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc를 이용하여 극성순으로 분획을 나누었다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 가용부(721 mg)를 H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH(4:3:1) 혼합용매를 용출용매로 하는 Sephadex LH-20 column chromatography(CC)에 의하여 8개의 소분획(Fr. 1~8)으로 나누었다. Fr. 5(185 mg)는 MeOH를 이용하여 걸정화하여서 화합물 1 (30 mg, 0.0030 w/w%)을 분리하였다. Fr. 2(224 mg)는 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1) 혼합용매를 용출용매로 하는 Sephadex LH-20 CC에 의하여 3개의 소분획(Fr. 21~23)으로 나누었다. Fr. 21(192 mg)은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (100:0→50:1→20:1→10:1→0:100)을 용출용매로 한 silica gel CC를 실시하여 화합물 2 (13 mg, 0.0013 w/w%)를 얻었다.

## 결과 및 고찰

천연물로부터 간 세포 보호활성물질을 발견할 목적으로 간 독성이 알려진 타크린을 사람 간암 세포 유래의 HepG2 세포주에 처리한 후 세포생존율을 증가시키는 천연물 추출물을 검색하였다. 결명자의 물 추출물이 300 µg/ml 의 농도에서 유의한 보호효과 (보호율=53.2±0.8%)를 나타내어 함유 성분의 분리를 수행하였으며, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 가용부로부터 2종의 화합물을 분리 정제하였다. 화합물 1과 2의 구조는 문헌에 기재되어 있는 선광도, <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR의 data와 비교하여, 각각 aurantio-obtusin,<sup>11)</sup> obtusifolin<sup>12)</sup>으로 동정하였다(Fig. 1). 분리된 2종의 화합물 모두가 유의한 간 세포 보호 활성을 보였고, 각각 실험된 농도에서 농도의존적인 세포보호효과를 보였으며, 또한 각각 160 µM 에서 대조군에 대한 55.3±0.5%과 41.2±0.8%의 보호율을 나타냈다(Fig. 2). 이들 2종의 화합물은 본 실험에서 사용한 5-160 µM 의 범위에서는 세포독성을 나타내지 않았다. 한편, 간 보호 효과물질로 알려진 silybin을 양성 대조약물로 사용하였으며, silybin은 100 µM 에서 53.2±0.6%의 보호율을 나타냈다(Fig. 2).

아직까지 타크린의 간 독성 유발 기전에 대해서는 명확하게 밝혀지지 않았지만, 타크린이 간 세포의 세포 내 glutathione 농도를 변화시키는 것으로 알려져 있으며, 이 물질의 간 독성에는 활성산소종과 지질과산화와 관여하는 것으로 일부 밝혀져 있다.<sup>13)</sup> 따라서, 본 연구에서 간 세포보호



**Fig. 2.** The hepatoprotective effects of compounds 1 and 2 against tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells. Cytotoxicity was assessed after incubating for 2 h with 2 mM of tacrine in RPMI medium. Results were expressed as mean  $\pm$  S.D. of three experiments. Significantly different from the control; \* $p < 0.01$ . Silybin was used as a positive control.

활성이 인정된 2종의 화합물에 대해서는 항산화작용을 포함한 추가 기전연구가 필요할 것으로 생각된다. 결명자에서 분리한 naphtha-pyrone 배당체에 대한 사염화탄소와 galactosamine으로 유발한 간독성에 대하여 보호활성을 나타내는 보고가 있으나,<sup>14)</sup> anthraquinone계열의 화합물인 화합물 1과 2에 대해서는 아직 보고가 없는 것으로 판단된다.

## 결 론

천연물로부터 간 세포 보호활성 물질의 탐색을 목적으로 결명자의 물 추출물을 각종 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 2종의 anthraquinone계 화합물을 분리하였으며, 각각의 구조를 aurantio-obtusin (1), obtusifolin (2)으로 동정하였다. 이 화합물들은 타크린으로 유발한 Hep G2 세포주에 대하여 유의한 보호활성을 나타냈다.

## 사 사

This research was supported by a grant (PF 0320401-00) from the Plant Diversity Research Center of the 21st Century Frontier Research Program funded by the Ministry of Science and Technology of the Korean Government.

## 인용문헌

1. Jim, L. K. and Gee, J. P. (1995) Adverse effects of drugs on the liver. In Young, L. Y and Koda-Kimble, M. A. (ed.), Applied therapeutics: The clinical use of drugs, 26-1-26-17, Applied Therapeutics, Inc., Vancouver.
2. Watkins, P. B., Zimmermann, H. J., Knapp, M. J., Gracon, S. I. and Lewis, K. W. (1994) Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *J. Am. Med. Assoc.* **271**: 992-998.
3. Grant, M. H., Duthie, S. J., Gray, A. G. and Burke, M. D. (1988) Mixed function oxidase and UDP-glucuronyltransferase activities in the human Hep G2 hepatoma cell line. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 4111-4116.
4. Viau, C. J., Curren, R. D. and Wallace, K. (1993) Cytotoxicity of tacrine and velnacrine metabolites in cultured rat, dog, and human hepatocytes. *Drug Chem. Toxicol.* **16**: 227-239.
5. 정보섭, 신민교 (1998) 도해 향약(생약)대사전(식물편), 813-814. 도서출판 영림사, 서울.
6. Yang, Y. C., Lim, M. Y., Baek, Y. I. and Lee, H. S. (2003) Emodin isolated from *Cassia obtusifolia* (Leguminosae) seed shows larvicidal activity against three mosquito species. *J. Agric. Food. Chem.* **51**: 7629-7631.
7. Wu, C. H. and Yen, G. C. (2004) Antigenotoxic properties of Cassia tea (*Cassia tora* L.): Mechanism of action and the influence of roasting process. *Life. Sci.* **76**: 85-101.
8. Kim, Y. M., Lee, C. H., Kim, H. G. and Lee, H. S. (2004) Anthraquinone isolated *Cassia tora* (Leguminosae) seed show an antifungal property against Phytopathogenic fungi. *J. Agric. Food. Chem.* **52**: 6069-6100.
9. Choi, J. S., Lee, H. J., Park, K. Y., Ha, J. O. and Kang, S. S. (1996) In vitro antimutagenic effects of anthraquinone aglycones and naphthopyrone glycosides from *Cassia tora*. *Planta Med.* **63**: 11-14.
10. Wong, S. M., Wong, M. M., Seligmann, O. and Wagner, H. (1988) New antihepatotoxic naphtha-pyrone glycosides from the seeds of *Cassia tora*. *Planta Med.* **55**: 276-280.
11. Choi, J. S., Jung, J. H., Lee, H. J., and Kang, S. S. (1996) The NMR assignments of anthraquinones from *Cassia tora*. *Arch. Pharmt. Res.* **19**: 302-306.
12. Youn-Choi, H. S. and Kim, J. H. (1990) Potential inhibitors of platelet aggregation from plant sources, V.<sup>1</sup> Anthraquinones from seeds of *Cassia obtusifolia* and related compounds<sup>2</sup>. *J. Nat. Prod.* **53**: 630-633.
13. Galisteo, M., Rissel, M., Sergent, O., Chevanne, M., Cillard, J., Guillouzo, A. and Lagadic-Gossmann, D. (2000) Hepatotoxicity of tacrine: occurrence of membrane fluidity alterations without involvement of lipid peroxidation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**: 160-167.
14. Sung, S.H., Lee, E.J., Cho, J.H., Kim, H.S. and Kim, Y.C. (2000) Sauchinone, a lignan from *Saururus chinensis*, attenuates CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in primary cultures of rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.* **23**: 666-668.