생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
38(1) : 22 ~ 26 (2007)

불두화 지상부의 진통소염작용 및 간 보호 효과

허연구 · 강자훈 · 이숙연 · 임동술*
삼육대학교 약학과

Antiinflammatory, Analgesic and Hepatoprotective Effects of Aerial part of *Viburum sargentii* for. *sterile*

Youn Koo Huh, Ja Hoon Kang, Sook Yeon Lee, and Dong Sool Yim*
Department of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

Abstract – Leaves and stem of *Viburnum sargentii* for. *sterile* (Caprifoliaceae) has been used as therapeutic agents as a pain of the joints, skin disease as styptics, analgesics for traditional folk medicines. The present study describes the preliminary evaluation of biological activities-analgesic, anti-inflammatory, hepatoprotective activities, of its methanol extract, ethyl acetate fraction and butanol fraction. Among them butanol fraction showed the highest activity in inflammation and writhing test.

Key words – *Viburnum sargentii* for. *sterile*, analgesic activity, anti-inflammatory activity, hepatoprotective activity

불두화(*Viburnum sargentii* for. *sterile*)는 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 다년생 낙엽관목으로 우리나라 전역에 걸쳐 자라며 잎은 대생으로 보통 3개의 얕은 열이 있고 꽃은 방사상 모양으로 펴져 처음 꽃이 필 때는 녹색이고 활짝 피면 흰색, 꽃이 질 때면 노란색으로 변하고 무성화로 열매를 맺지 않는다.[1] 또한 같은 외양의 유성화로 붉은 열매를 맺는 것이 백당나무(*Viburnum sargentii* Koehne) 로 알려져 있으며 두 종류 다 주로 관상용으로 정원에 많이 식재되어 있다.[1,2] 백당나무의 생약명은 계수조(鷄樹條)이고 열매는 계수조과(鷄樹條果), 어린 가지와 잎을 계수조협미(鷄樹條莢未)라고 하고 한약학적 고찰에서는 성미(性味)는 감고평(甘苦平)으로 달고 쓰며, 평하고 약효로는 거풍통락(祛風通絡)하여 관절이 쑤시고 아픈 증상, 타박상으로 인한 염좌 등을 치료한다고 기록되었다.[2,3] Viburnum 속 식물의 성분으로는 iridoid, flavonoid, diterpenoid 그리고 triterpenoid 등이 풍부하다고 보고되었다.[4,5] Iridoid 성분으로 *V. betulifolium* 에서는 viburnalloside, viburtinal,[6] 그리고 *V. tinus*와 *V opulus*에서 viburtinal, viburtinoside A, B 등이 보고되었다.[7] Diterpenoids로 *V. awabuki*에서 vibsanin A-E를 비롯해 neovibsanin, vibsanin G, H, K 등[8]이 그리고 *V. odoratissimum*에서 vibsanin L. I 그리고 14-hydroxy vibsanin F 등이 보고되었다.[9] *V. sargentii*에서 3종의 iridoid 배당체인 7,10,2'-triacetyl suspenolide F, viburtinoside IV와 V 그리고 epicatechin이 분리, 보고되었다.[10] 또한 Viburnum 속 식물의 약리작용으로는 간보호작용,[7] 항암작용,[11] 진경작용,[12] 등이 보고되어 있다. 이에 저자 등은 불두화가 백당나무의 대용으로 사용이 가능하리라는 전제아래 새로운 의약자원의 개발목적으로 본 실험을 행하여 지견을 얻어 보고하고자 한다.

*교신저자(E-mail) : yimds@syu.ac.kr
(FAX) : 02-3399-1617

재료 및 방법

시료 – 불두화의 잎과 줄기를 2000년 9월에 삼육대학교 교정에서 채집, 음건, 세절하여 사용하였다. 재료는 삼육대학교 약학과 이숙연 교수께 감정을 받아 사용하였으며 표본은 삼육대학교 약학과 생약학 실험실에 보관하였다(표본번호 H-01-006).

실험동물 – 생쥐는 ICR계의 체중 20 ± 2 g의 수컷과 흰쥐는 Sprague-Dawley계 체중 200 ± 20 g의 수컷을 대한 실험동물(주)에서 구입하여 사용하였다. 온도 22 ± 2°C에서 12시간 간격으로 명암을 조절해 사육하여 1주일동안 적응시킨 후 실험하기에 적당한 동물들을 실험에 사용하였다. 적응기간 동안에는 고형사료(삼양사료 Co.)와 물을 충분하게 공급하였다.

추출 및 분리 – 음건하여 세절한 불두화의 잎과 줄기 2 kg을 MeOH을 가하여 수욕상에서 4시간씩 3회 환류 추출하여 여과 후 농축하여 MeOH Ex.를 얻었고 이 MeOH 추출

물을 증류수에 현탁시켜 n-hexane, ethyl acetate 그리고 n-butanol을 사용하여 연속, 분획하여 감압 농축하여 각각의 분획을 얻었다.

실험기기 및 시약 – Micrometer는 Mitutoyo Corp. 사용하였고 UV Spectrophotometer로는 Spectroline Model Cm-10을, Plethysmometer는 Ugo Basil사의 Comerio-Varese7510을 사용하였다. Carrageenan, arachidonic acid(AA), piroxicam 등은 Sigma사 제품을 사용하였고 s-GPT, s-GOT는 Asan Pharm의 kit를 사용하여 측정하였다. Ursodeoxycholic acid (UDCA)와 Silymarin은 광동제약에서 제공받아 사용하였고 acetic acid와 CCl_4는 특급시약을, 추출은 일급시약을 사용하였다.

시료의 투여 – MeOH Ex. 1000 mg/kg, EtOAc fraction 500 mg/kg 그리고 BuOH fraction 500 mg/kg의 sample을 1%-carboxy methyl cellulose (CMC) 용액에 현탁시켜 각각의 실험동물에 경구투여 하였다.

Arachidonic acid에 의한 염증반응에 대한 억제 효과 – Young과 Rao 등[13,14]의 방법으로 각 실험군당 12마리의 ICR계 생쥐를 사용하였고 arachidonic acid 처리 1시간 전에 대조군은 1% CMC를, 다른 실험군은 각각의 시료를 투여하였다. Arachidonic acid는 acetone에 녹여(100 mg/ml) 오른쪽 귀(2 mg/ear, 안쪽과 바깥쪽에 10 μl)에 autopipette를 사용하여 국소적으로 적용하였고 control group에는 acetone을 적용하였다. 각 시료는 경구투여하고 대조약물로 piroxicam 3 mg/kg을 사용하였다. 생쥐의 ear thickness는 arachidonic acid 처치 전(Tb)과 처치 후(Ta) 1시간 뒤에 측정하여 변화량(ΔT)을 구했고 부종억제률 %I는 다음과 같이 구했다.

$$\% I = (Ta - Tb)/Tb \times 100$$

Carrageenan 유도에 의한 부종억제 효과 – 각 실험군당 8마리의 Sprague-Dawley계의 흰쥐를 사용하여 Winter 등[15,16]의 방법을 사용하여 측정하였다. Carrageenan 투여 30분 전에 흰쥐의 오른쪽 발바닥의 용적을 측정한 후 각 시료를 경구투여 하였고 대조약물로는 piroxicam 5 mg/kg을 1% CMC에 현탁시켜 경구투여 하였다. 부종은 1% carrageenan (0.1 ml/rat)을 피하 주사하여 유발시켰고, 1시간 간격으로 5회에 걸쳐 발바닥의 용적을 측정하되 매회 3-4회씩 측정하여 평균값을 사용하였다. 각각의 측정결과에서 각 실험군의 평균값(Vt)을 구하였고, 시료투여 전 측정값(Vo)과 비교하여 그 변화량(ΔV)을 측정하여 각 군의 부종 억제율을 구하였다.

$$\% I = (Vt - Vo)/Vo \times 100$$

Writhing Test에 의한 진통 효과 – ICR계의 생쥐 10마리를 한 실험군으로 하여 Whittle 등[17]의 방법을 사용하였다. 각 시료를 경구 투여하였고 30분후에 0.7% 초산 생리식염액 (0.2 ml/20 g)을 복강 내 주사하였다. 복강 내 주사 10분 후에 10분 동안 writhing syndrome이 일어나는 횟수를 측정하였다. 이때 control 군에는 1% CMC를 투여하였으며 대조약물로 piroxicam 3 mg/kg씩 경구투여 하였다.

사염화탄소 유도 간독성에 대한 간보호 효과 – Mclean 등[18]의 방법에 따라 체중 20±2 g의 ICR계 생쥐 10마리를 한 실험군으로 하여 시료를 2일 간 투여하였다. 3일째 간독성을 일으키기 위하여 1 ml/kg의 사염화탄소를 신선한 olive oil에 희석하여 경구 투여하였다. 각 시료를 경구투여 하였고 대조약물로 silymarin 30 mg/kg과 UDCA 30 mg/kg을 1% CMC에 현탁시켜 경구 투여하였다. 각 군에 시료 투여 시작 후 4일째에 ether로 마취하여 생쥐 심장으로부터 혈액을 채취하여 1,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였고 아울러 각 실험군의 간을 적출하여 간무게를 측정하였다. 혈청 transaminase의 측정은 Reitman-Frankel법을 사용하였고 s-GPT, S-GOT측정용 시약을 사용하였다.

통계처리 – 모든 data는 mean±standard error mean(SEM)나 percentage로 나타내었으며 유의성 검정을 위해서 ANOVA test와 Neuman-keul test를 실시하였고 p value 0.05 이하인 경우에 유의성이 있다고 하였다.

결과 및 고찰

Arachidonic acid에 의한 염증반응에 대한 억제효과 – Arachidonic acid를 이용하여 생쥐의 귀에 염증을 유발시켜 측정한 결과는 Fig. 1과 같이 control 대비 MeOH Ex.가

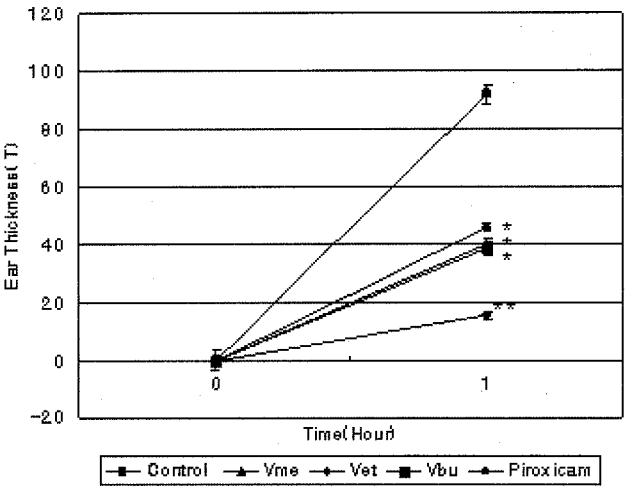

Fig. 1. Topical anti-inflammatory activity on mouse ear edema induced by arachidonic acid. *Significantly different from the control group ($p<0.05$); **Significantly different from the control group ($p<0.01$). Vme: *Viburnum sargentii* for. *sterile* MeOH Ex. Vet: *Viburnum sargentii* for. *sterile* ethyl acetate fraction Vbu: *Viburnum sargentii* for. *sterile* butanol fraction.

56.5%, EtOAc fraction이 50.4%, BuOH fraction이 58.3% 억제하였으며 각 시료 투여군에서 유의성($p<0.05$) 있는 효과를 보여주었고 BuOH fraction에서 가장 좋았다. 하지만 대조약물인 piroxicam의 83.4%에는 미치지 못하였다. Arachidonic acid는 피부에서 염증을 유발시키는 물질로 생쥐의 귀에 국소적으로 처치하면 arachidonic acid가 cyclooxygenase와 lipoxygenase pathway를 거쳐 생산된 대사물인 prostaglandins와 leukotrienes가 짧은 염증반응(hypermia, pain, edema, cellular infiltration 등)을 유발하고 6시간 정도 지나면 사라지게 되며 cylooxygenase와 lipoxygenase의 억제제에 의해 반응이 억제되나 cylooxygenase억제제 보다 lipoxygenase억제제에 더 선택적으로 반응하는 것으로 알려져 있다. Arachidonic acid에 의한 염증반응은 부종 유발시간이 빠르고 혈관 투과성과 eicosanoid 생합성의 현저한 증가, 약간의 세포 유입, 짧은 작용시간 등의 특징을 갖고 있다.[13,14]

Carrageenan 유도에 의한 부종억제 효과 – 흰쥐의 뒷발바닥에 carrageenan을 주사하여 부종을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 시료 투여후 2시간까지는 부종억제율이 미약하게 변화하였으나 3시간 이후부터 5시간까지도 부종억제율에 유의성이 나타났다($p<0.01$). MeOH Ex.투여군은 control 대비 부종억제율이 3시간에 87%, 4시간에 91.3%이고 EtOAc fraction 투여군은 82.3%, 85.8%이고 BuOH fraction 투여군은 76.4%, 84.5%였다. Carrageenan은 sulfide polysaccharide로 염증반응의 생화학적 기전이 명확하지 않으나 Rosa 등[19]에 의하면 chemical mediator로 histamine, serotonin, prostaglandins, kinin 등이 염증유발에 관여하는 것으로 추정된다. Carrageenan에 의한 부종은 초기에는 histamine, serotonin, bradykinin 등이 관여하고 말기에는 prostaglandins 등의 arachidonate 대사산물이 호중구 동원을 일으켜 부종을 일으

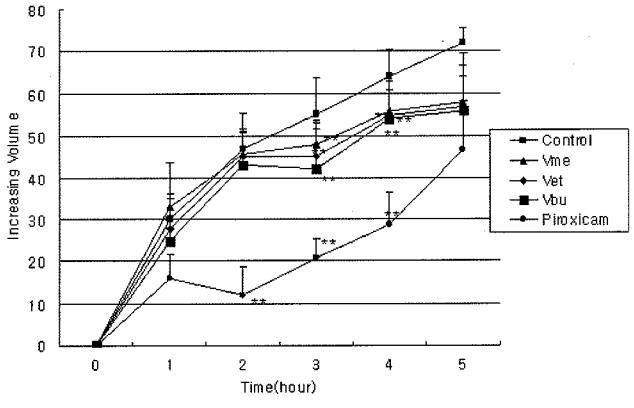

Fig. 2. Anti-inflammatory activity on rat hind-paw edema induced by carrageenan. *Significantly different from the control group ($p<0.05$); **Significantly different from the control group ($p<0.01$). Vme: *Viburnum sargentii* for. *sterile* MeOH Ex. Vet: *Viburnum sargentii* for. *sterile* ethyl acetate fraction Vbu: *Viburnum sargentii* for. *sterile* butanol fraction.

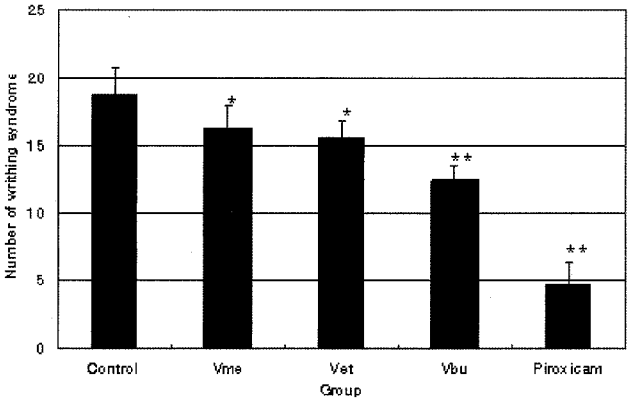

Fig. 3. Analgesic activity on the writhing syndrom in mice. *Significantly different from the control group ($p<0.05$); **Significantly different from the control group ($p<0.01$). Vme: *Viburnum sargentii* for. *sterile* MeOH Ex. Vet: *Viburnum sargentii* for. *sterile* ethyl acetate fraction Vbu: *Viburnum sargentii* for. *sterile* butanol fraction.

킨다고 알려져 있다. Gilligan 등[20]은 부종조직에서 초기상태에(2 h) substance P가 급격한 증가가 일어남을 보고하였고 Bileviciute등[21]은 amide peptide의 농도가 carrageenan 투여 후 15분 이내에 2배 이상 상승되고 30분에 최고에 도달했다가 천천히 감소하여 24시간까지 증가된 상태로 존재함을 보고하였다.

Writhing Test에 의한 진통작용 – 진통효과를 측정한 결과는 Fig. 3과 같이 BuOH frction 투여군에서 유의성 있는 ($p<0.01$) 결과를 얻을 수 있었다. Writhing response에 의한 진통효과의 검정은 최초로 Brittain 등[22]이 phenylquinone을 사용하였으나 그 후 초산을 사용하였다. 0.7% 초산 생리식염액의 복강주사에 의한 10분간 발생한 writhing syndrome이 control군에서는 18.7회 발생하였으나 MeOH Ex. 투여군에서는 16.3회, EtOAc fraction 투여군에서는 14.7회, BuOH fraction 투여군은 12.5회 그리고 대조약물인 piroxicam투여군에서는 4.7회로 나타났다.

사염화탄소 유도 간독성에 대한 간보호작용 – 혈청 중 s-GOT, s-GPT 측정값은 Fig. 4와 같이 모든 시료 투여군에서 유의성 있는 ($p<0.05$) 결과를 보였다. GPT 측정값은 독성대조군은 73, MeOH Ex. 투여군은 58.3, EtOAc fraction 투여군에서는 54.7, 그리고 BuOH fraction 투여군은 55.3 unit으로 나타났으며 대조약물인 UDCA와 silymarin은 각각 33.4와 29.4 unit으로 유의성 있었다($p<0.01$). GOT값은 독성군이 132.5, MeOH Ex.투여군은 95.2, EtOAc fraction 투여군에서는 93.7, 그리고 BuOH fraction 투여군은 89.1 unit으로 나타났으며 대조약물인 UDCA와 silymarin은 각각 72.3와 62.1 unit으로 유의성 있었다($p<0.01$). CCl_4에 의한 간독성은 microsome의 cytochrome p450에 의해 CCl_4가 trichloromethyl free radical($\cdot CCl_3$)을 생성하고 생성된 이 radical이 O_2와 반

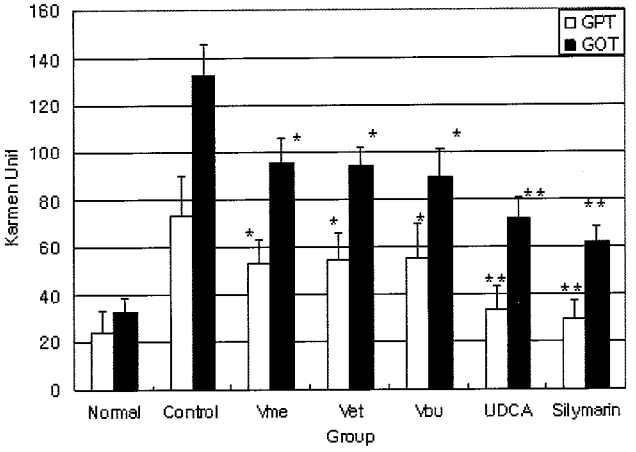

Fig. 4. The hepatoprotective effect on GPT, GOT in CCl_4-induced hepatotoxicity. *Significantly different from the control group (p< 0.05); **Significantly different from the control group (p<0.01). Vme: *Viburnum sargentii* for. *sterile* MeOH Ex. Vet: *Viburnum sargentii* for. *sterile* ethyl acetate fraction, Vbu: *Viburnum sargentii* for. *sterile* butanol fraction, UDCA: Ursodeoxycholic acid.

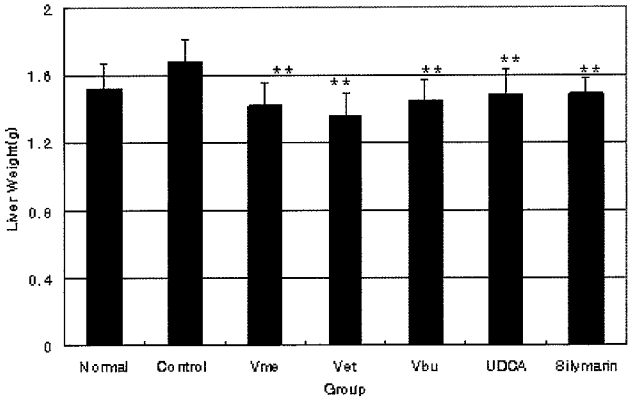

Fig. 5. Liver weight variations in CCl_4-toxicated mice. *Significantly different from the control group (p<0.05); **Significantly different from the control group (p<0.01). Vme: *Viburnum sargentii* for. *sterile* MeOH Ex. Vet: *Viburnum sargentii* for. *sterile* ethyl acetate fraction Vbu: *Viburnum sargentii* for. *sterile* butanol fraction, UDCA: Ursodeoxycholic acid.

응하여 trichloromethyl peroxy radical($\cdot CCl_3O_2$)을 생성하며 이것이 미토콘드리아 등의 세포내 소기관의 lipid peroxidation을 유발하여 toxicity를 나타낸다고 알려져 있다. 또 미토콘드라아 내에서 생성된 trichloromethyl free radical($\cdot CCl_3$)은 미토콘드리아의 DNA에 공유결합하여 미토콘드리아의 구조와 기능에 직접 손상을 입히기도 하는 것으로 알려져 있다.[23,24] 또한 각 group의 적출된 간의 무게는 Fig. 5에서 보듯 silymarin과 UDCA와 유사한 결과를 보여주고 있어 역시 간보호작용이 있음을 확인 할 수 있었다.

결 론

주로 정원수로 사찰 주위나 정원에 널리 식재되는 불두화 (*Viburnum sargentii* for. *sterile*)의 지상부인 잎과 줄기 추출물의 약리활성을 검색한 결과는 다음과 같다.

1. Arachidonic acid에 의해 유발된 염증반응에 있어서는 MeOH Ex. 1000 mg/kg에서 49.44%와 EtOAc fraction, BuOH fraction 각각 500 mg/kg에서 53.54%와 62.8%로 유의성 있는 (p<0.05) 항염증작용을 나타냈다.

2. Carrageenan에 부종억제효과에 있어서는 시료투여 후 3-4시간대에 EtOAc, BuOH fraction 부분에서 각각 control 대비 82.2%, 85.8%와 76.4%, 84.5%로 유의성(p<0.01) 있게 억제하였다.

3. Writhing Test에 의한 진통실험에서는 MeOH Ex.와 EtOAc fraction에서 control 대비 87%, 83.4%로 약한 (p<0.05) 진통작용을, BuOH fraction에서는 66.8%로 비교적 강한 (p< 0.01) 진통효과를 나타내었다.

4. 사염화탄소에 의한 간보호실험에서 혈청 transaminase의 측정결과 모든 시료투여군에서 미약한 (p<0.05) 간보호 효과를 관찰할 수 있었다. 아울러 적출 간의 무게에 있어서는 모든 시료투여군에서 유의성 있는 (p<0.01) 결과를 나타내었다.

사 사

본 논문은 삼육대학교 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 이창복 (1982) 대한식물도감, 298 향문사, 서울.
2. 안덕균 (1998) 한국 본초도감, 318 교학사, 서울.
3. 김창민 등 (1997) 완역 중약대사전, 247, 248 도서출판 정담, 서울.
4. Plouvier, V. (1992) Bulletin du Museum National du Museum d' Histoire Naturelle (vols. 3-4e ser., section B). Paris, Adansonia, 461.
5. Glasby GS. (1991) Dictionary of Plants Containing Secondary Metabolites, 336 Taylor and Francis, London.
6. Jensen,S.R. Nielsen B.J. and Norn V. (1985) Iridoids from *Viburnum betulifolium*, *Phytochemistry* **24**: 487-489.
7. Mohamed M.A., Marzouk M.S., Moharram F.A., El-Sayed M.M. and Baiuomy A.R. (2005) Phytochemical constituents and hepatoprotective activity of *Viburnum tinus Phytochemistry* **66**: 2780-2786
8. Fukuyama Y., Minami H., Kagawa M., Kodama M. and Kawazu K. (1999) Chemical conversion of vibsanin C to vibsanin E and structure of 3-hydroxy-vibsanin E from

Viburnum awabuki, *J. Nat. Prod.* **62**: 337-339.
9. Kubo M., Chen I.S. and Fukuyama Y. (2001) Vibsane-type diterpenes from Taiwanese *Viburum odoratissimum. Chem. Pharm. Bull.* **49**: 242-245.
10. Tomassini L., Gao J., Serafini M. and Nicoletti M. (2005) Iridoid glucoside from *Viburnum sargentii. Nat. Prod. Res.* **19**: 667-671.
11. Shen Y.C., Lin C.L., Chien S.C., Khalil A.T., Ko C.L. and Wang C.H. (2004) Vibsane diterpenoids from leaves and flowers of *Viburnum odoratissimum. J. Nat. Prod.* **67**: 74-77.
12. Nocholson J.A., Darby T.D. and Jarboe C.H. (1972) Viopudial, a hypotensive and smooth muscle antispasmodic from *Vibrunum opulus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **140**: 457-461.
13. Young, J.M., Spires, D.A., Bedord, C.J., Wagner, B., De Ballaron, S.J. and Young, L.M. (1984) The mouse ear inflammatoryresponse to topical arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.*, **82**: 367-371.
14. Rao, T.S., Currie, J.L., Shaffer, A.F. and Isakson, P.C. (1993) Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and Tetradecanoylphobol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation* **17**: 723-741.
15. Winter, C.A., Risley, E.A. and Nuss, G.W. (1962) Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as assay for anti-inflammatory drugs. *Pro. Soc. Exp. Biol.* **111**: 544-547.
16. Nakamura, H., Yokoyama, Y., Motoyoshi, S., Seto, Y., Kadokawa, T. and Shimizu, T. (1982) Anti-inflammatory activity of a non-steroidal anti-inflammatory agent, zomepirac sodium, in experimental animals. *Yakugaku Zasshi* **79**: 509-527.
17. Whittle, B.A. (1964) The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and non-narcotic analgesics. *Br. J. Pharmaco. Chemother* **22**: 246-253.
18. Mclean A.E. (1967) The effect of diet and vitamin E on liver injury due to carbon tetrachloride. *Br. J. Exp. Pathol.* **48**: 632-636.
19. Di Rosa M., Giroud J.P. and Willoughby, D.A. (1971) Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* **104**: 15-29.
20. Gilligan, J.P., Lovato, S.J., Erior, M.D. and Jeng, A.Y. (1994) Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation* **18**: 285-292.
21. Bileviciute, I., Lundeberg, T., Ekblom, A. and Theodorsson, E. (1993) Bilateral changes of substance P-, neurokinin A-, calcitonin gene-related peptide- and neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat knee joint synovial fluid during acute monoarthritis. *Neurosci. Lett.* **153**: 37-40.
22. Brittain R.T., Lehrer D.N. and Spencer, P.S. (1963) Phenylquinone writhing test Interpretation of data. *Nature* **200**: 895-896.
23. Zhang, B.H., Gong, D.Z. and Mei, M.H. (1999) Protection of regenerating liver after partial hepatectomy from carbon tetrachloride hepatotoxicity in rat: Role of hepatic stimulator substance. *J. Gastroenterol. Hapato.* **14**: 1010-1017.
24. Plaa, G.L. and Hewitt, W.R. (1989) Detection and evaluation of chemically induced liver injury. Principles and Methods of Toxicology ed. by A.W. Hayes 599-628 Raven Press, New York.

(2006년 12월 20일 접수)