

흰쥐의 일차배양 간세포에서 Daidzin, Daidzein, Genistein 및 Puerarin의 간 보호 활성 평가

박진구 · 천호준 · 김영식* · 강삼식* · 최재수** · 이선미#

성균관대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학, **부경대학교 수산과학대학

(Received February 20, 2007; Revised March 5, 2007)

Hepatoprotective Activities of Daidzin, Daidzein, Genistein and Puerarin in Primary Cultured Rat Hepatocytes

Jin-Goo Park, Ho-Joon Cheon, Yeong Shik Kim*, Sam Sik Kang*, Jae Sue Choi** and Sun-Mee Lee#

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

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

**Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Abstract — The aim of this study was to investigate the protective activities of daidzin, daidzein, genistein or puerarin, active isoflavonoids of *Puerariae Radix*, on the hepatocyte injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄, 10 mM), *tert*-butyl hydroperoxide (TBH, 0.5 mM) and D-galactosamine (GalN, 30 mM). Primary cultures of rat hepatocytes (18 hr cultured) were treated with CCl₄, TBH or GalN and various concentrations (0.1, 1, 10 and 100 μM) of daidzin, daidzein, genistein or puerarin. CCl₄ significantly increased the levels of lactate dehydrogenase (LDH), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). The increase in LDH level was attenuated by daidzein, genistein and puerarin. Puerarin also inhibited the increase in AST level induced by CCl₄. The increases in LDH and ALT levels induced by TBH were significantly attenuated by daidzin and genistein treatments. GalN markedly increased the levels of LDH, ALT and AST. These increases were significantly attenuated by daidzein. Daidzin also inhibited the increases in LDH and AST levels induced by GalN. The increases in LDH and ALT levels were attenuated by genistein and puerarin, respectively. These results suggest that daidzin and daidzein possess hepatoprotective activities.

Keywords □ daidzin, daidzein, genistein, puerarin, hepatoprotective activity, primary cultured hepatocyte

갈근(*Puerariae radix*)은 콩과(Leguminosae)에 속하는 *Pueraria lobata* Bentham의 주피를 제거한 뿌리로서 한의학에서는 해열, 발한, 진경작용을 나타내어 감기, 해열 및 소염진통약으로 널리 쓰이고 있으며,^{1,2)} 간장 질환 개선제로도 사용되어 오고 있다.³⁾ 갈근의 생리활성성분 중 daidzin은 알코올의 1차 대사산물인 acetaldehyde를 분해하는 acetaldehyde dehydrogenase를 선택적으로 억제하며,⁴⁾ genistein은 지방간을 유발시킨 생쥐의 지방조직에서 지질 감소 및 지방산의 산화를 통해 간보호 효과를 나타낸다⁵⁾고한다. 또한 puerarin은 지방간을 유도시킨 흰쥐에서 cholesterol의 생성과 담즙산의 분비를 조절하여 간보호 작용을

나타내며,⁶⁾ 더 나아가 간 섬유화도 억제한다⁷⁾고 한다. 이와 같이 갈근의 간장 보호 작용이 단편적으로 연구 발표되어지고 있으나 현재까지 갈근의 생리 활성 성분에 대한 체계적인 연구는 매우 미약한 실정이다.

Carbon tetrachloride(CCl₄), *tert*-butyl hydroperoxide(TBH) 및 D-galactosamine(GalN)은 대표적 간독성 유도 물질로서 이들을 흰쥐의 일차 배양 간세포에 처치함으로써 간 보호 약물의 활성 검색에 이용하고 있다. CCl₄는 간에 직접적인 손상을 일으키는 대표적인 물질로서 cytochrome P450 monooxygenase의 농도가 높은 간 중심부인 중심소엽에서 CCl₃ 라디칼로 활성화되어 간독성을 유발한다.⁸⁾ TBH는 간세포 지질과산화물을 일으키는 대표적인 물질로서 간세포 내에서 radical을 형성하여 간세포의 고사나 괴사를 일으킨다.^{9,10)} 또한 GalN은 간세포의 단백질 및 RNA 합성을 억제하여 간손상을 일으키며, GalN에 의해 손상된 간세포

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로

(전화) 031-290-7712 (팩스) 031-292-8800

(E-mail) sunmee@skku.edu

포의 기능과 형태의 변화는 바이러스성 간염에 의한 것과 유사하다¹¹⁾고 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 CCl₄, TBH 및 GalN으로 간독성을 유발시킨 흰쥐의 일차 배양 간세포 모델을 이용하여 갈근의 대표적인 생리활성 물질인 daidzin, daidzein, genistein 및 puerarin의 간세포 보호 활성을 알아보고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

실험에 사용한 갈근은 경상북도 영천에서 재배한 것을 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), CCl₄, TBH 및 GalN 등은 Sigma 사(St. Louis, MO., U.S.A.)에서, lactate dehydrogenase(LDH), alanine aminotransferase(ALT) 및 aspartate aminotransferase(AST) assay kit는 (주)아이비디-랩, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline 등은 GIBCO-BRL사(GRAND Island, NY, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였으며 기타 일반 시약들은 특급 시약을 구입하여 사용하였다. ¹H- 및 ¹³C-NMR spectrum은 JEOL JNM-ECP 400(¹H-NMR 400 MHz; ¹³C-NMR 100 MHz) spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. Chemical shift value는 parts per million(ppm) 단위로 나타내었다. 추출 및 분리용 용매는 시약용 1급을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄(0.25 μm)을 사용하였으며, 발색시약은 50% sulfuric acid를 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 silica gel(70~230 mesh, Merck), Sephadex LH-20(25~100 mm, Sigma), 그리고 Diaion HP-20(250~850 mm, Supelco)을 사용하였다.

실험동물

본 실험은 성균관대학교의 실험동물 관리 및 사용에 대한 규정에 따라 수행되었다. 체중 180~220 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 (주)현대바이오로부터 공급 받아 온도 23±1°C, 상대 습도 55±15% 및 300~500 Lux의 조도로 12시간 간격으로 명암이 조절되는 성균관대학교 약학대학 동물 사육실에서 일주일 이상 순화시킨 후 육안적 증상을 관찰하여 정상적인 동물만을 실험에 사용하였으며, 고품 사료 및 물은 자유롭게 섭취시켰다.

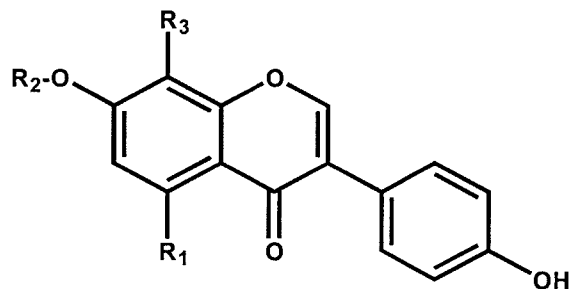
시료의 추출 및 분리

*Pueraria lobata*의 분리방법은 다음과 같다.¹²⁾ 갈근 12 kg을 분쇄하여 환류 냉각기를 부착한 집기병에 담은 후 9l의 MeOH을

넣은 후 수욕상에서 3시간 추출하였다. 그리고 추출액은 여과하였으며 rotary vacuum evaporator를 사용하여 농축하였다(40°C). 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 총 2.5 kg MeOH 농축액을 얻었다. MeOH 추출 농축액을 증류수에 현탁시키고, 동량의 CH₂Cl₂를 가하여 분획할때기로 CH₂Cl₂ 층과 H₂O 층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후, CH₂Cl₂ 층을 감압 농축하여 CH₂Cl₂ 분획을 얻었다. 남은 H₂O 층에 다시 EtOAc를 동량 가해서 H₂O 층과 EtOAc 층을 분획하는 조작을 3회 반복 실시한 후, EtOAc 층을 감압 농축하여 EtOAc 분획을 얻고, 나머지 H₂O 층에 동일한 방법으로 *n*-BuOH을 가하여 상층의 *n*-BuOH 층과 H₂O 층을 분획하였다. 얻어진 분획 중 EtOAc 분획(43 g)을 지름 6 cm인 silica gel column에 loading시켜 CH₂Cl₂/MeOH (gradient)를 용출액으로 하여 유출시켜 분획 fr1-fr14를 얻었다. 분획 fr10을 MeOH로 재결정화시켜 daidzein(2.4 g)을 얻었으며, 나머지 여액을 silica gel column에 loading시켜 CH₂Cl₂/MeOH (20 : 1)로 용출시켜 genistein(2 g)을 얻었다. 또한 *n*-BuOH 분획(400 g)을 지름 12 cm인 Diaion HP-20 column에 loading시켜 H₂O, H₂O : MeOH(3 : 2), H₂O : MeOH(2 : 3) 그리고 MeOH 용출액으로 유출시켜 분획 fr1-fr4를 얻었다. 분획 fr1을 Sephadex LH-20 column에 loading시켜 MeOH로 용출시켜 분획 fr1-1-fr1-10을 얻었으며, fr1-5를 silica gel column에 loading시켜 CH₂Cl₂/MeOH/H₂O(26 : 14 : 5)로 용출시켜 puerarin(12.8 g)을 얻었다. 분획 fr2를 silica gel column에 loading시켜 CH₂Cl₂/MeOH (10 : 1)로 용출시켜 daidzin(3 g)을 얻었다(Fig. 1).

일차 간세포 분리 및 배양

흰쥐의 간세포는 Berry와 Friend의 방법^{13,14)}을 변형한 2단계 collagenase 관류법을 이용하여 분리하였다. 흰쥐를 pentobarbital



Daidzein R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H

Genistein R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = H

Daidzin R₁ = H, R₂ = Glc, R₃ = H

Puerarin R₁ = H, R₂ = H, R₃ = Glc

Fig. 1 - Chemical structures of daidzein, genistein, daidzin, and puerarin.

sodium(40 mg/kg, 복강내 주사)으로 마취하여 복부를 개복한 후, 간 문맥에 21 gauge catheter를 삽관하여 CO₂와 O₂의 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 원심 분리한 후 상등액을 버리고 침전된 간세포를 BSA가 함유된 완충용액에 현탁시켜 다시 원심 분리하였다. 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 5×10⁵ cells/ml이 되도록 조절하여, collagen type I으로 미리 도포된 배양 용기에 이식하였다. 배양액으로는 10% FBS, 500 U/l insulin, 7 mg/l glucagon, 20 mg/l epidermal growth factor, 7500 mg/l hydrocortisone, 10⁵ U/l penicillin, 100 mg/l streptomycin, 250 mg/l amphotericin B를 포함하는 DMEM을 사용하여 일정한 온도와 습도가 유지되는 37°C 배양기에서 O₂ 95%와 CO₂ 5%의 혼합기체를 공급하여 배양하였다. 배양 4시간 후 새로운 배양액으로 교환하였다.

MTT assay를 이용한 세포독성 측정

Mossmann의 방법¹⁵⁾을 일부 수정하여 24-well plate에 간세포를 2.5×10⁵ cells/ml 농도로 접종하여 18시간 동안 배양한 후 daidzin, daidzein, genistein 그리고 puerarin을 각 농도별(0.1, 1, 10, 100 및 200 μM)로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 동안 추가 배양하였다. 이 후 MTT(0.25 mg/ml)가 함유된 배양액으로 교환하여 4시간 동안 처리 후 생성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide(300 μl/well)에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

CCl₄에 의한 간세포 독성 유도

Kiso의 방법¹⁶⁾을 일부 수정하여 간세포를 배양한지 18시간 후 10 mM CCl₄를 함유한 배양액으로 교체하여 간세포 독성을 유발하였다. CCl₄ 처리와 동시에 daidzin, daidzein, genistein 및 puerarin을 각 농도별(0.1, 1, 10 및 100 μM)로 처리하여 24시간 동안 세포를 배양한 후 그 배양액을 취하여 간세포 보호작용을 알아보았다.

TBH에 의한 간세포 독성 유도

Tseng의 방법¹⁷⁾을 일부 수정하여 간세포를 배양한지 18시간 후 0.5 mM TBH를 함유한 배양액으로 교체하여 간세포 독성을 유발하였다. TBH 처리와 동시에 daidzin, daidzein, genistein 및 puerarin을 각 농도별(0.1, 1, 10 및 100 μM)로 처리하여 1시간 동안 세포를 배양한 후 그 배양액을 취하여 간세포 보호작용을

알아보았다.

GalN에 의한 간세포 독성 유도

Kiso¹⁸⁾의 방법을 일부 수정하여 간세포를 18시간 배양한 후 배양액을 제거하고 30 mM GalN을 함유한 배양액으로 갈아준 다음 daidzin, daidzein, genistein 및 puerarin을 각 농도별(0.1, 1, 10 및 100 μM)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 340 nm에서 spectrophotometer로 측정하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

간은 물질의 대사 및 합성기능, 영양소저장, 생체 이물질의 생체 내 전환 등 다양한 기능을 가진 인체 내 가장 큰 장기이다.

최근 현대인들은 음주, 흡연, 약물, 환경오염이나 정신적 스트레스 등의 여러 외인적 요인들에 매우 노출되기 쉬우며 이에 따라 간질환이 국내외적으로 급격히 증가하는 추세이다. 간장은 다른 장기와는 달리 재생과 수복이 잘 이루어지지만 간손상이 심할 경우 생명에 치명적 영향을 나타낸다. 이러한 심각성에 비해 현재 간질환 치료제는 종류가 많지 않을 뿐 아니라 화학물질의 경우 치료 효능에 비해 부작용이 빈번히 보고되고 있다. 따라서 최근에는 화학물질 보다는 부작용이 적고 오래 전부터 널리 사용되어 그 임상적 효능이 입증된 천연물로부터 유래된 간질환 치료제에 대한 관심이 집중되고 있으나 천연물의 경우 과학적인 검증 없이 주로 민간요법 내지는 한약재로서 사용되고 있으므로 보다 과학적인 접근이 필요하다. 이에 본 연구에서는 임상적으로 간 보호작용이 알려진 한약제인 갈근으로부터 분리된 생리활성 성분 중 daidzin, daidzein, genistein 및 puerarin의 간 보호 활성을 일차 배양 간세포를 이용한 급성 간독성 모델을 이용해 알아보았다.

Daidzin, daidzein, genistein 및 puerarin의 IC₅₀

Daidzin, daidzein, genistein 및 puerarin의 세포독성 측정과 더불어 농도 범위 결정을 위해 MTT assay를 시행하여 일차 배

Table I – Cytotoxicity of daidzin, daidzein, genistein and puerarin in primary cultured rat hepatocytes

Compound	IC ₅₀ (mM)
Daidzin	>200
Daidzein	>200
Genistein	>200
Puerarin	>200

After isolation and incubation for 18 hr, hepatocytes were treated with daidzin, daidzein, genistein and puerarin in DMEM for 72 hr and then cell viability was evaluated by MTT reduction. IC₅₀ values were determined by viability of hepatocyte cell cultures by 50%.

양 간세포에서 대조군에 비해 생존율이 50%가 되는 약물의 농도를 측정하였다. Table I에서 보는 바와 같이 daidzin, daidzein, genistein 및 puerarin의 IC₅₀은 모두 200 μ M를 넘는 수치를 나타내었으며, 이를 바탕으로 약물의 처치 농도는 100 μ M을 최고 농도로 하여 10, 1 및 0.1 μ M의 4가지 농도로 정하였다.

Daidzin, daidzein, genistein 및 puerarin이 CCl₄로 유도된 간독성에 미치는 영향

CCl₄는 간세포 내 약물대사 효소에 의해서 CCl₃ radical로 활성화되어 간독성을 유발한다. 이렇게 생성된 free radical은 인근 지질막을 공격하여 지질의 과산화화를 일으키며,¹⁹⁾ 세포막이나 세포소기관에 존재하는 단백질의 구조와 기능을 파괴하며, Ca²⁺의 항상성을 깨트려 세포의 괴사를 일으키는 것으로 알려져 있다.²⁰⁾ 이러한 간독성에 의해 간세포의 괴사와 조직의 파괴가 진행됨에 따라 세포질 내에 존재하는 효소인 LDH, ALT 및 AST가 배양액으로 유리된다. 따라서 세포 배양액에서 이러한 효소들의 농도 증가는 간손상 지표로 사용된다.²¹⁾ CCl₄ 처치시 단독군의 경우 LDH, ALT 및 AST의 활성이 각각 182.1 \pm 14.8%, 200.0 \pm 35.4% 및 194.4 \pm 6.5%로 대조군에 비해 현저한 증가를 나타내어 간독성이 유발되었음을 알 수 있었다. Daidzin은 저농도인 0.1 μ M의 농도에서만 LDH 및 ALT의 활성을 114.2 \pm 9.3% 및 108.3 \pm 15.4%로 CCl₄ 단독군에 비해 현저히 억제하였다(Fig. 2). Daidzein은 고농도인 100 μ M을 제외한 모든 농도 즉, 0.1, 1 및 10 μ M의 농도에서 LDH의 활성을 116.6 \pm 6.9%, 115.2 \pm 6.5% 및 120.1 \pm 10.4%로 CCl₄ 단독군에 비해 현저히 억제하였으며(Fig. 3), genistein은 0.1 및 1 μ M의 저농도에서 LDH의 활성을 각각 현저히 억제하였으나 ALT 및 AST의 활성에는 별 다른 영향을 미치지 못하였다(Fig. 4). Puerarin은 1, 10 및 100 μ M의 농도에서 LDH 활성을 각각 104.9 \pm 13.4%, 93.9 \pm 15.6% 및 135.3 \pm 18.6%로 CCl₄ 단독군에 비해 현저히 억제하였으며, AST 활성도 1 및 10 μ M의 농도에서 각각 255.9 \pm 18.1%, 251.3 \pm 20.4%로 현저히 억제하였다(Fig. 5). 이상의 결과로 보아 CCl₄로 유도된 간독성에서 갈근의 활성성분 중 daidzein 및 puerarin이 간보호 활성이 있음을 알 수 있다.

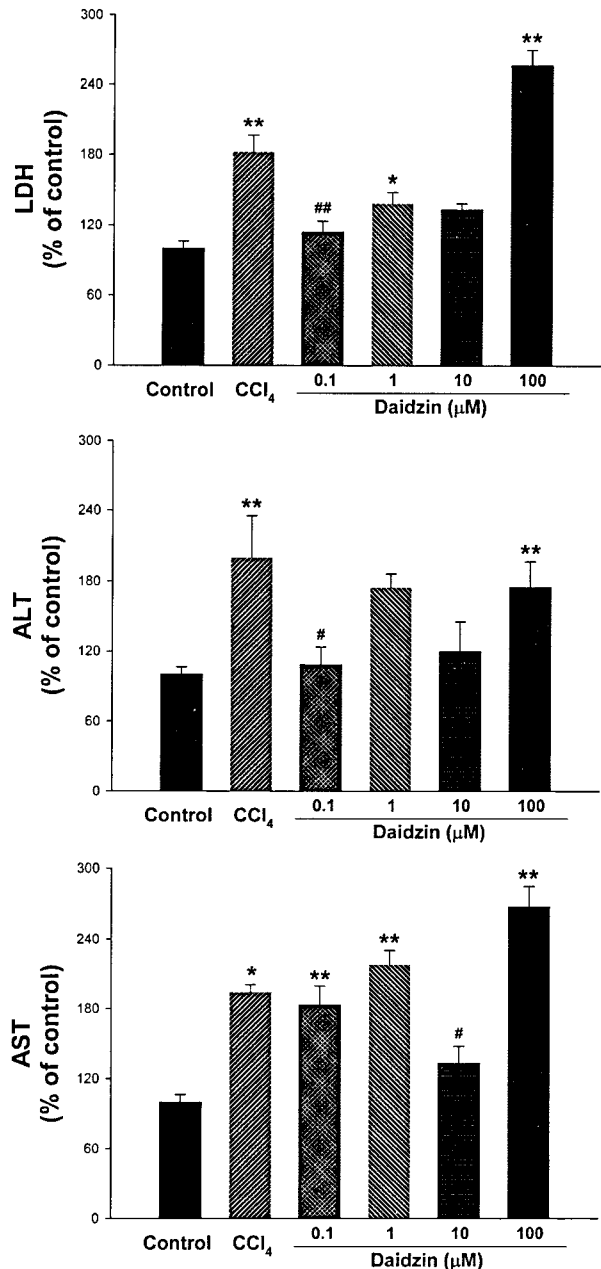


Fig. 2 – Hepatoprotective effect of the daidzin on CCl₄-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means \pm S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. **** Significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$) from control group. ### Significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$) from CCl₄-treated group.

Daidzin, daidzein, genistein 및 puerarin이 TBH로 유도된 간독성에 미치는 영향

TBH는 간세포 내에서 두가지 경로에 의해 대사된다. 한 과정은 cytochrome P450에 의해 peroxy 및 alkoxy radical 등과 같은 독성물질로 전환되며, 이러한 radical이 초기 세포막의 지질과

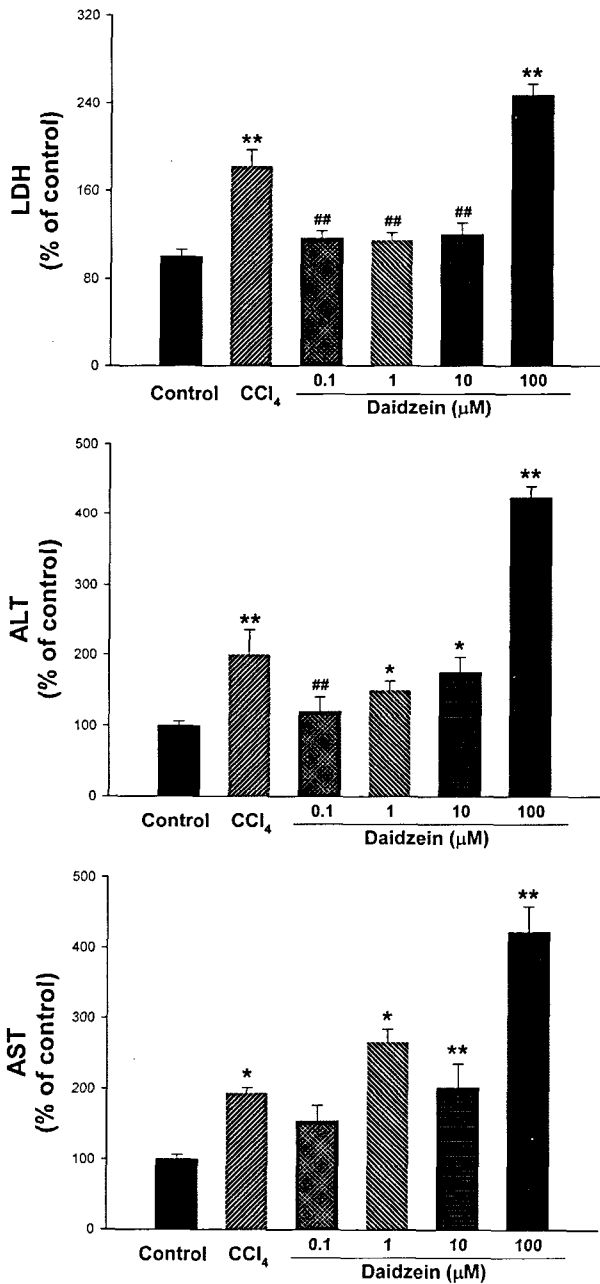


Fig. 3 - Hepatoprotective effect of the daidzein on CCl₄-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means±S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. *** Significantly different (P<0.05, P<0.01) from control group. ## Significantly different (P<0.01) from CCl₄-treated group.

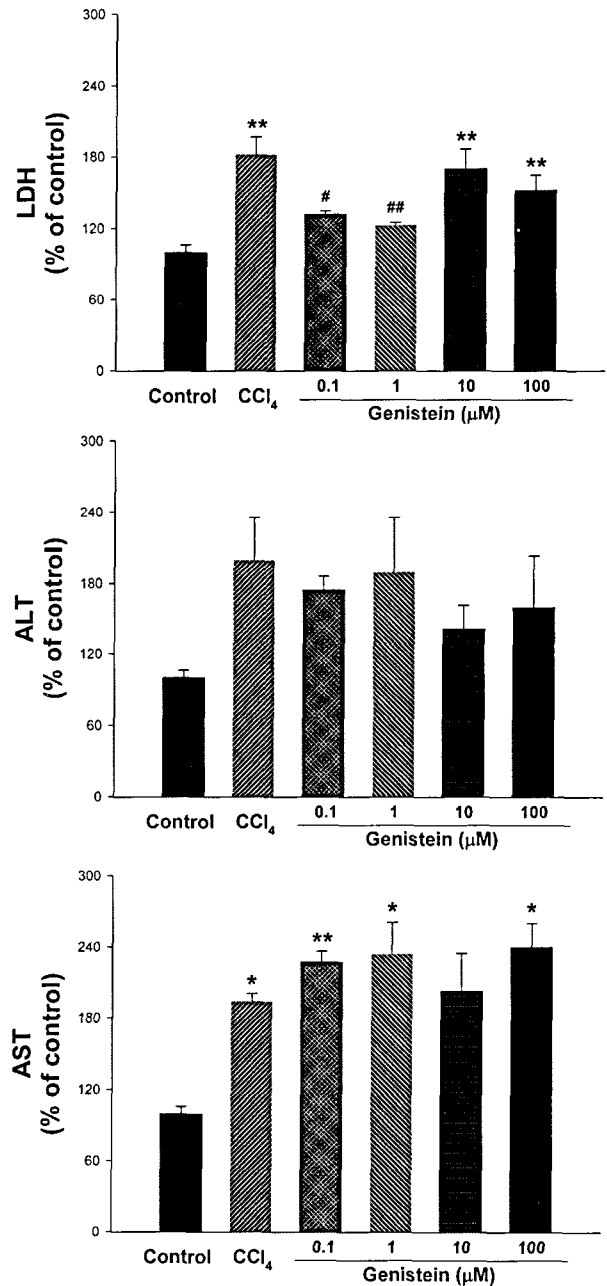


Fig. 4 - Hepatoprotective effect of the genistein on CCl₄-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means±S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. *** Significantly different (P<0.05, P<0.01) from control group. #,## Significantly different (P<0.05, P<0.01) from CCl₄-treated group.

산화물을 일으킨다. 또 다른 대사과정은 글루타치온 과산화효소가 TBH와 결합하여 *t*-butyl alcohol과 산화형 글루타치온으로 전환됨으로써 해독되는 과정이다.²²⁾ 이러한 대사과정을 통하여 간세포 내에서 TBH는 radical를 생성하게 되고, 이렇게 생성된 radical이 세포막을 구성하는 불포화 지방산과 직접 및 간접적으로 반응

하여 과산화 과정을 통해 간세포의 고사나 괴사를 일으킨다.^{9,10)} TBH 단독군의 경우 LDH, ALT 및 AST 활성은 대조군에 비해 각각 291.2±85.8%, 607.1±18.1% 및 314.7±22.2%로 현저한 활성 증가를 나타내었다. Daidzin은 1 및 100 μM의 농도에서 LDH 활성이 각각 198.0±11.5% 및 321.4±10.4%로 TBH 단독

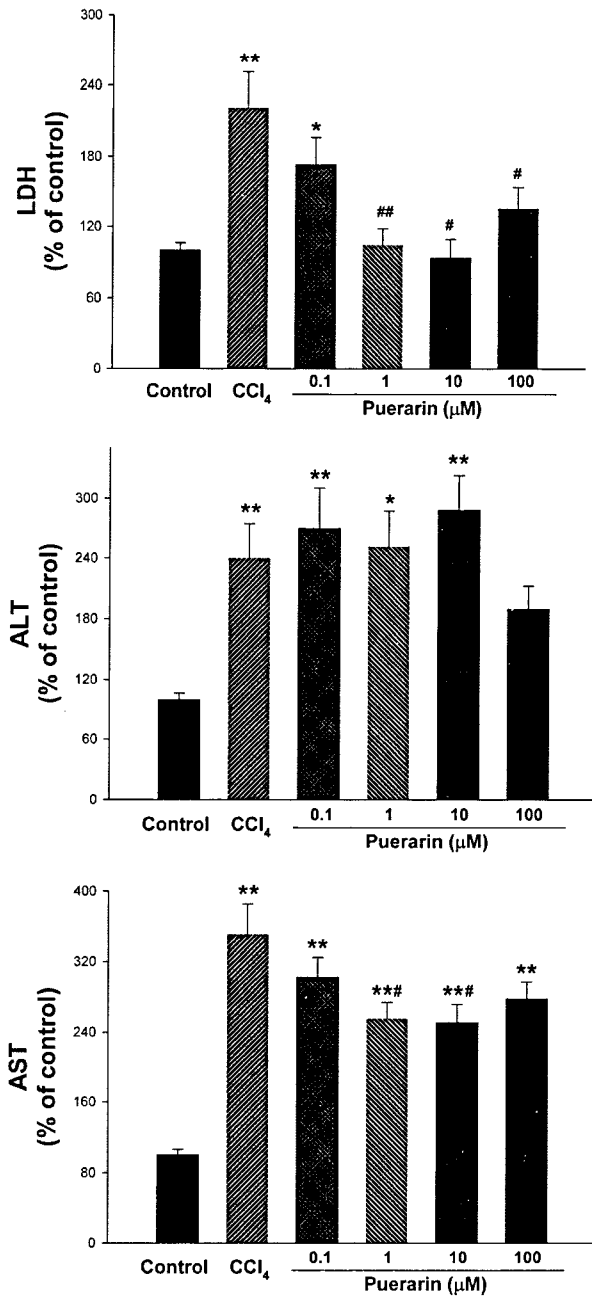


Fig. 5 – Hepatoprotective effect of the puerarin on CCl₄-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means±S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. *** Significantly different (P<0.05, P<0.01) from control group. ### Significantly different (P<0.05, P<0.01) from CCl₄-treated group.

군에 비해 현저히 억제되었으며, 0.1 및 1 μM의 농도에서는 ALT의 활성을 각각 391.0±18.3% 및 467.8±49.9%로 억제하였다 (Fig. 6). Genistein은 1, 10 및 100 μM의 농도에서 각각 209.8±19.4%, 203.9±22.3% 및 125.7±15.1%로 LDH 활성을 현저히 억제하였으며, ALT 활성도 같은 농도에서 각각 415.7±

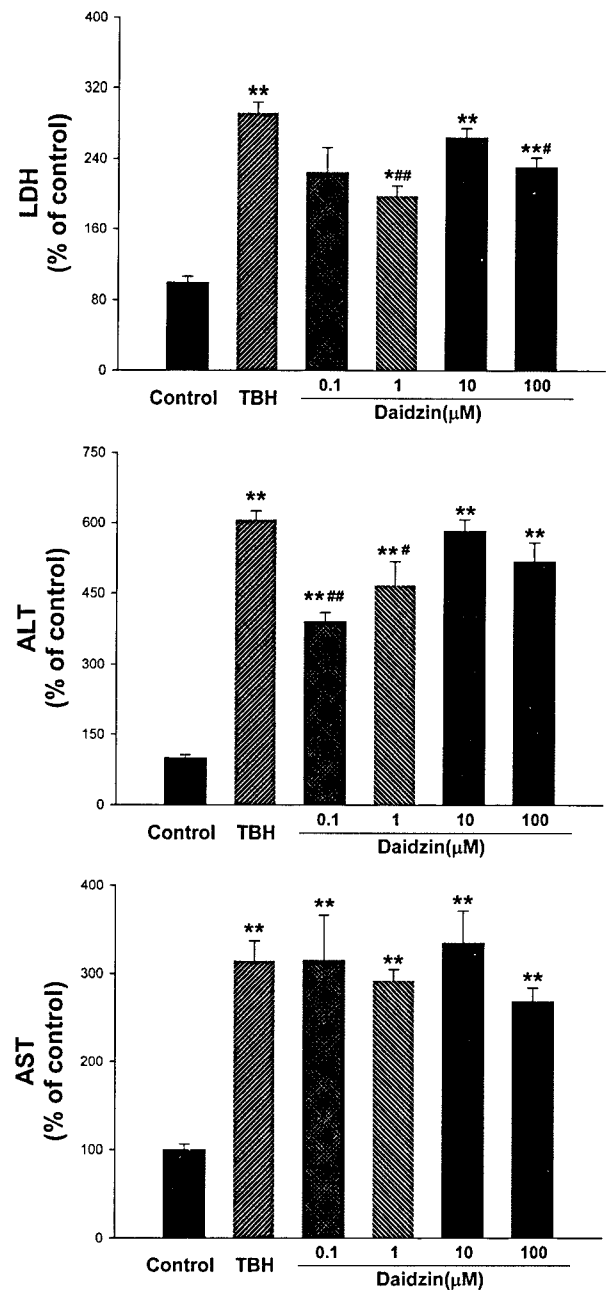


Fig. 6 – Hepatoprotective effect of the daidzin on TBH-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means±S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. *** Significantly different (P<0.05, P<0.01) from control group. ### Significantly different (P<0.05, P<0.01) from TBH-treated group.

32.2%, 432.1±50.5% 및 219.2±26.9%로 TBH 단독 처리군에 비해 현저히 억제하였다 (Fig. 8). 그러나 이와는 달리 daidzin과 puerarin은 TBH로 유도된 LDH, ALT 및 AST 활성 증가에 별 다른 영향을 미치지 못하였다 (Fig. 7 및 Fig. 9). 이상의 결과를 종합하여 볼 때 daidzin과 genistein은 TBH로 유도된 단독성에

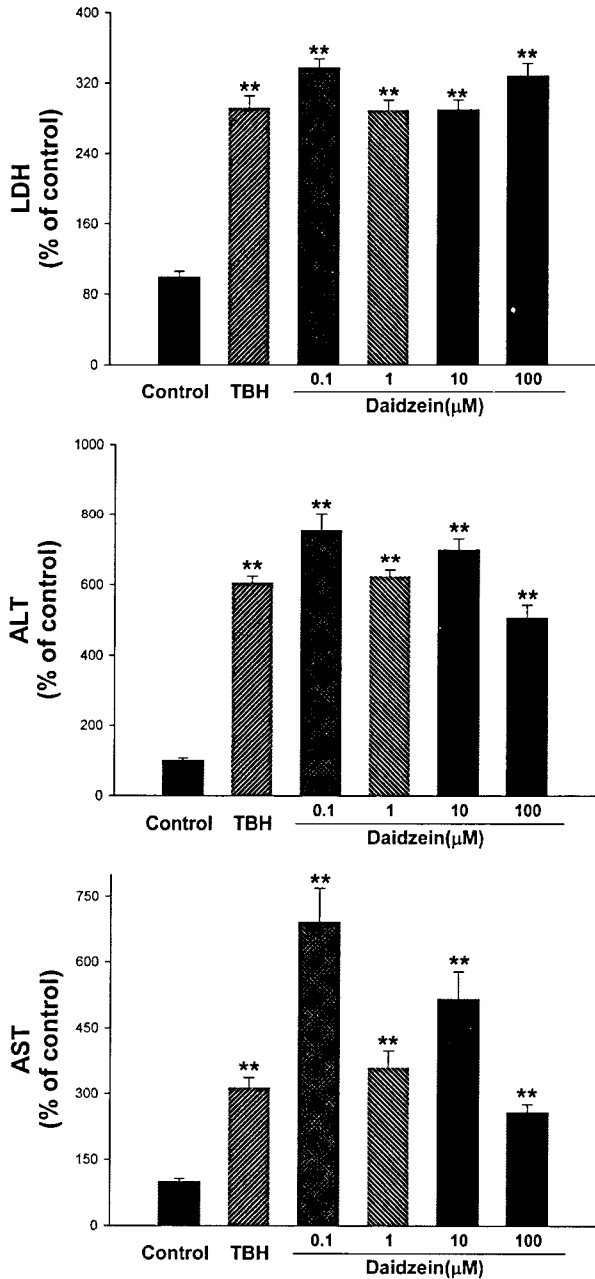


Fig. 7 – Hepatoprotective effect of the daidzein on TBH-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means±S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. ** Significantly different (P<0.01) from control group.

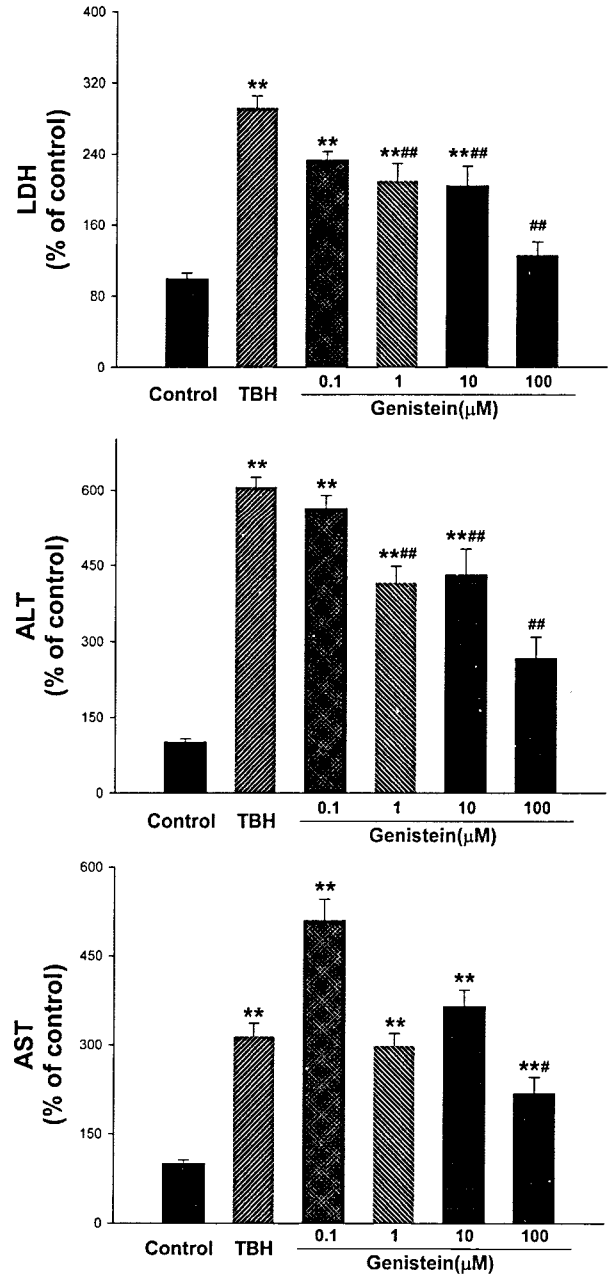


Fig. 8 – Hepatoprotective effect of the genistein on TBH-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means±S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. ** Significantly different (P<0.01) from control group. ### Significantly different (P<0.05, P<0.01) from TBH-treated group.

탁월한 간보호 활성을 나타냄을 알 수 있다.

Daidzin, daidzein, genistein 및 puerarin이 GalN으로 유도된 간독성에 미치는 영향

아미노당인 GalN은 galactose의 대사장애를 통한 UTP, UDP 및 UMP 등의 농도 감소로 RNA 합성이 저해되어 지질 축적을

유도하고,^{23,24)} 또한 세포막 성분인 탄수화물의 조성과 세포 내 Ca²⁺ 농도를 변동시켜 간손상을 유발한다^{25,26)}고 알려져 있다. GalN 단독군은 대조군에 비해 각각 LDH, ALT 및 AST 활성을 288.9±17.7%, 343.3±21.6% 및 410.0±23.9%로 현저히 증가시켰다. Daidzin은 LDH 활성을 저농도인 0.1 μM을 제외하고 모든

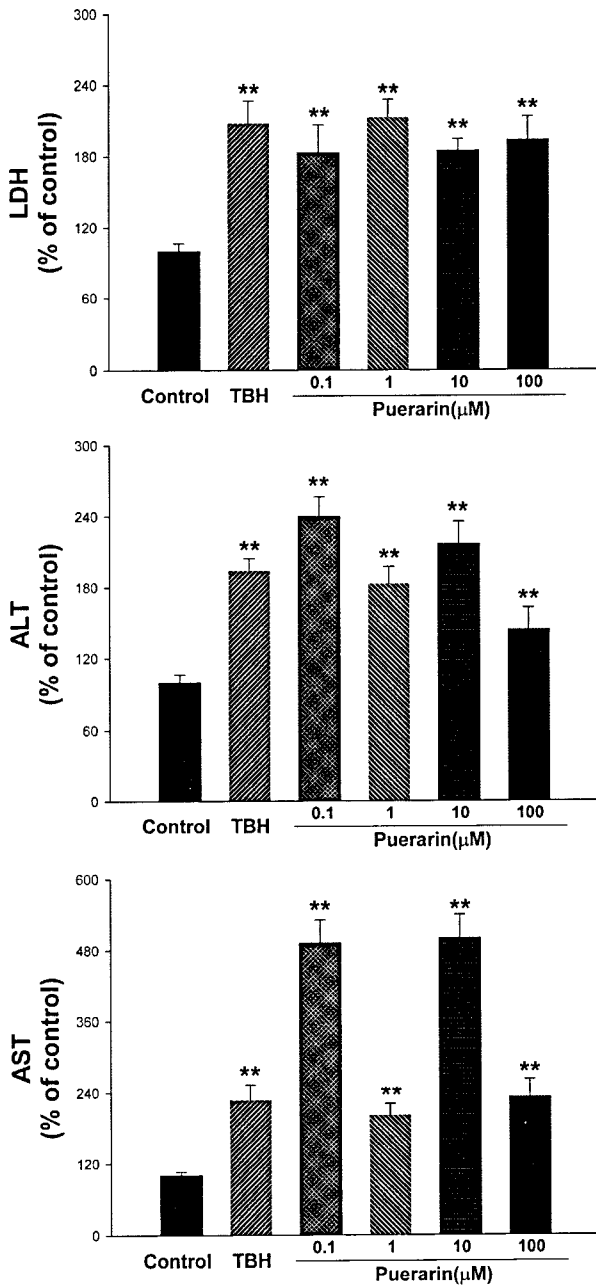


Fig. 9 – Hepatoprotective effect of the puerarin on TBH-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means±S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. ** Significantly different (P<0.01) from control group.

농도 즉, 1, 10 및 100 μM의 농도에서 각각 216.5±13.1%, 177.6±9.9% 및 169.4±11.3%로 GalN 단독군에 비해 현저히 억제하였으며, ALT 활성은 10 μM의 농도에서 236.7±8.0%로 현저히 억제하였다. 또한 AST 활성은 10 및 100 μM의 농도에서 각각 256.6±8.8% 및 219.8±14.7%로 현저히 억제하였다(Fig. 10). Daidzein은 LDH의 활성을 0.1, 1, 10 및 100 μM의 모든 농

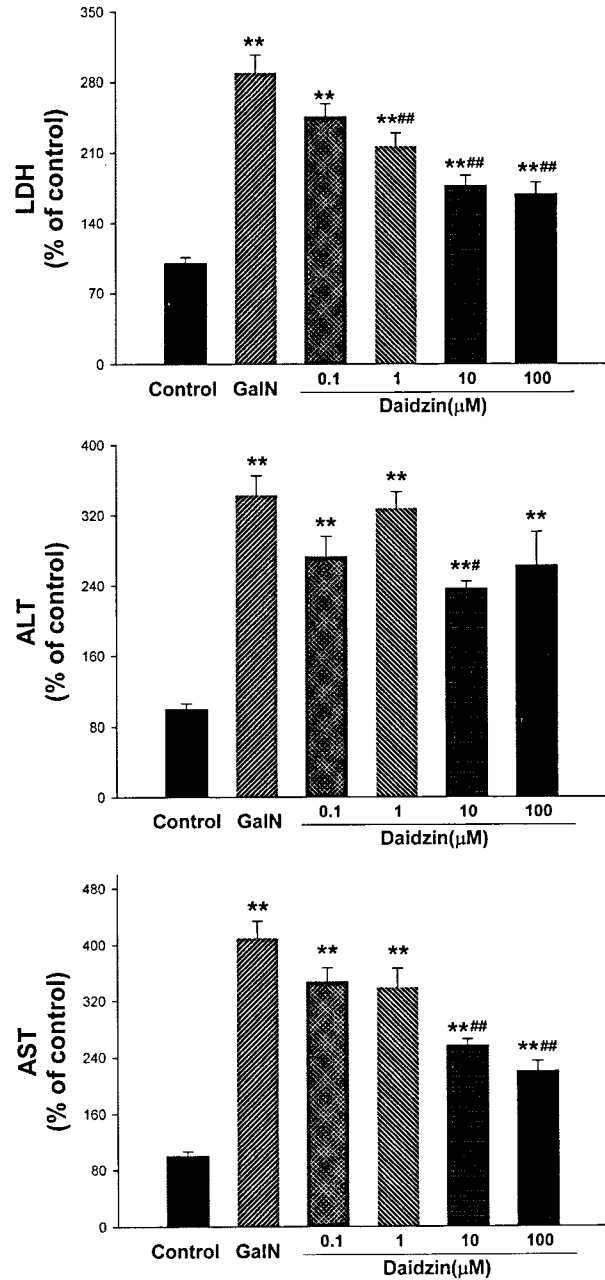


Fig. 10 – Hepatoprotective effect of the daidzin on GalN-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means±S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. ** Significantly different (P<0.01) from control group. ### Significantly different (P<0.05, P<0.01) from GalN-treated group.

도에서 234.3±3.9%, 225.4±6.8%, 169.4±4.6% 및 178.3±3.9%로 GalN 단독군에 비해 현저히 억제하였으며, ALT 활성은 10 및 100 μM의 농도에서 220.0±7.3% 및 210.0±31.3%로 현저히 억제하였다. 또한 AST 활성도 10 및 100 μM의 농도에서 225.8±6.9% 및 172.7±6.7%로 유의적으로 억제되었다(Fig. 11).

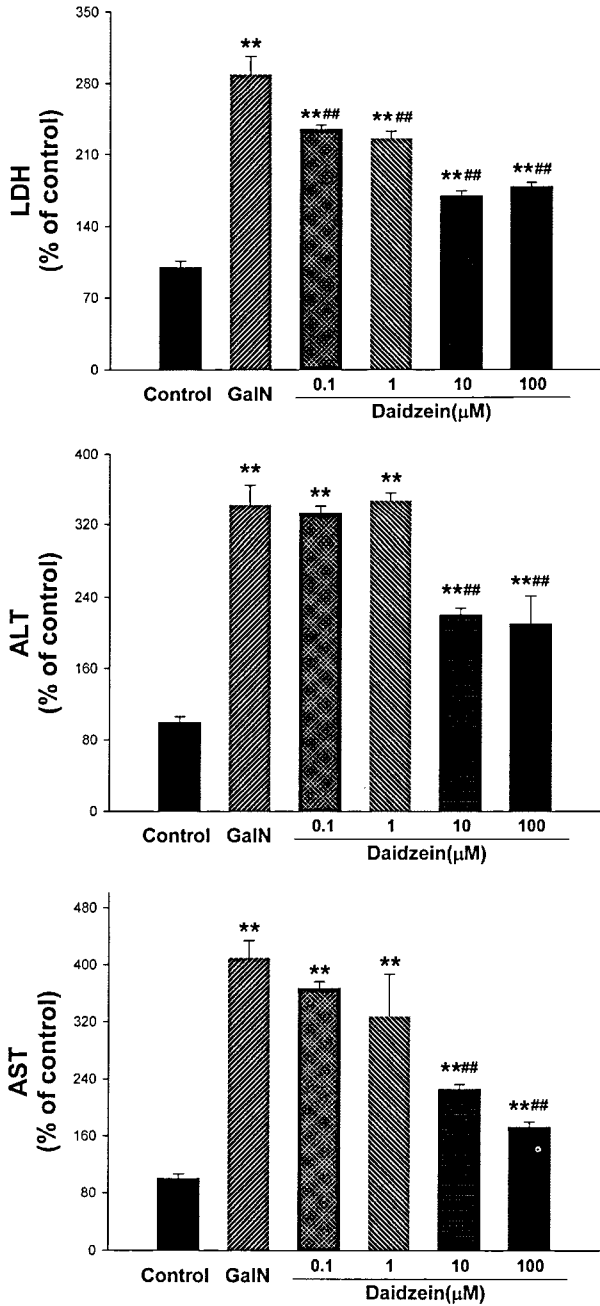


Fig. 11 – Hepatoprotective effect of the daidzein on GalN-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means ± S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. ** Significantly different (P<0.01) from control group. ## Significantly different (P<0.01) from GalN-treated group.

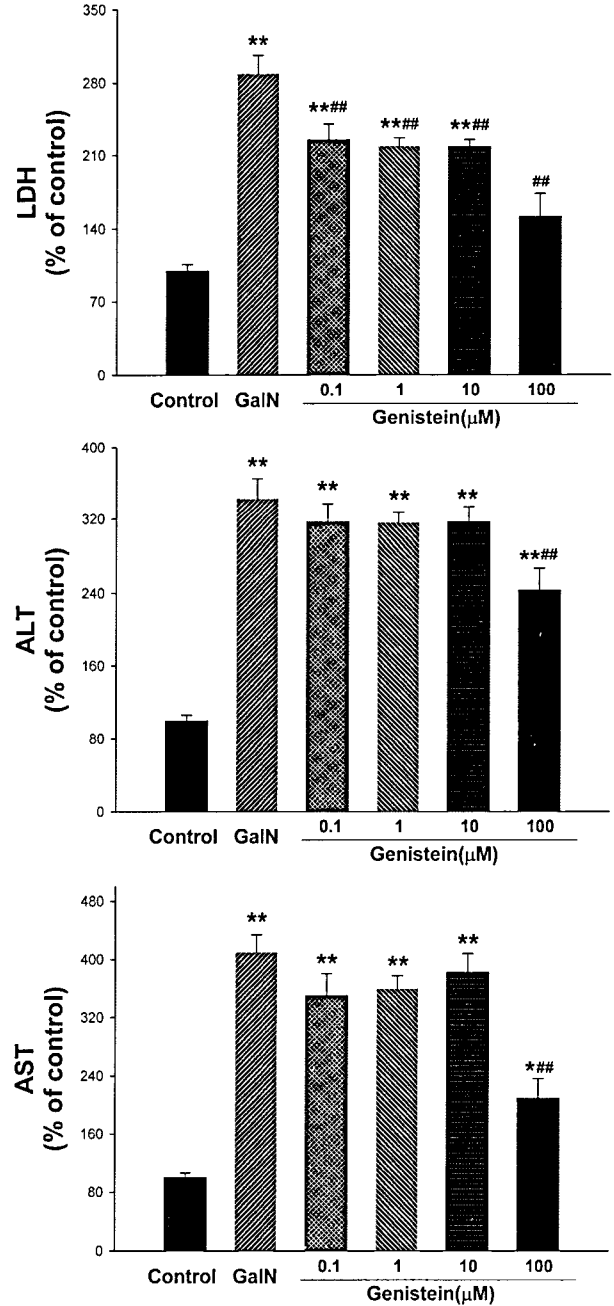


Fig. 12 – Hepatoprotective effect of the genistein on GalN-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means ± S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. *** Significantly different (P<0.05, P<0.01) from control group. ## Significantly different (P<0.01) from GalN-treated group.

Genistein은 100 μM의 고농도에서만 LDH, ALT 및 AST 활성을 각각 151.6±21.6%, 243.3±22.8% 및 209.5±26.5%로 GalN 단독군에 비해 현저히 억제하였다(Fig. 12). Puerarin은 LDH 활성을 10 및 100 μM의 농도에서 각각 167.1±9.4% 및 134.3±

16.0%로 현저히 억제하였으며, ALT 활성은 1, 10 및 100 μM의 농도에서 각각 130.0±10.0%, 144.0±14.7% 및 110.0±18.4%로 현저히 억제하였다(Fig. 13). 이상의 결과로 보아 daidzin과 daidzein이 GalN으로 유도된 간세포 독성을 현저히 억제하여 탁

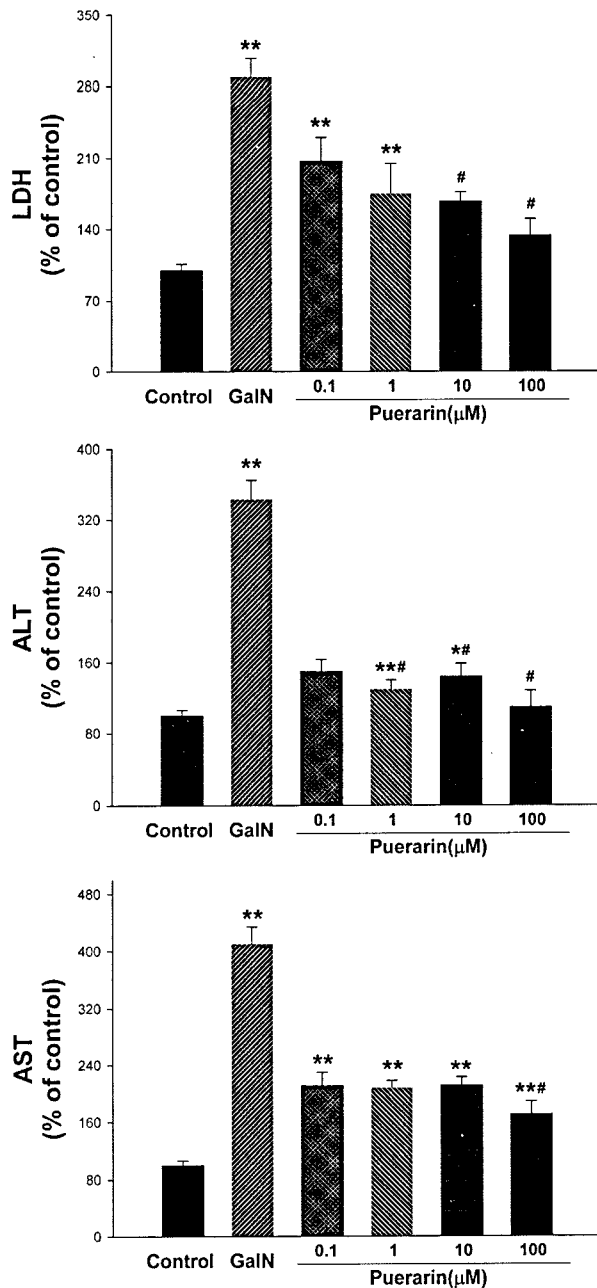


Fig. 13 – Hepatoprotective effect of the puerarin on GalN-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Results are given as means \pm S.E.M. from 6 wells each and are expressed as the percent of untreated control of respective experiment. *** Significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$) from control group. # Significantly different ($P < 0.05$) from GalN-treated group.

월한 간보호 활성을 나타냄을 알 수 있다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 갈근의 생리활성성분인 daidzin 및 daidzein이 흰쥐의 일차배양 간세포의 급성 간독성에 대하여 탁월한 보호 활성을 나타내는 것으로 여겨지며, 향후 생체내 여러 간질환 모델에서 이들의 효능과 작용기전 연구가 뒷받침 되

어져야 할 것으로 생각된다.

감사의 말씀

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

문헌

- 1) Kang, K. A., Chae, S., Koh, Y. S., Kim, J. S., Lee, J. H., You, H. J. and Hyun, J. W. : Protective effect of *Puerariae radix* on oxidative stress induced by hydrogen peroxide and streptozotocin. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1154 (2005).
- 2) 생약학교재편찬위원회 : 생약학, 제5판, 동명사, 서울 p. 210 (2003).
- 3) Keung, W. M. and Vallee, B. L. : Therapeutic lessons from traditional oriental medicine to contemporary occidental pharmacology. *EXS* **71**, 371 (1994).
- 4) Keung, W. M. and Vallee, B. L. : Daidzin and its antidipsotropic analogs inhibit serotonin and dopamine metabolism in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2198 (1998).
- 5) Lee, Y. M., Choi, J. S., Kim, M. H., Jung, M. H., Lee, Y. S. and Song, J. H. : Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets. *Nutrition* **22**, 956 (2006).
- 6) Yan, L. P., Chan, S. W., Chan, A. S., Chen, S. L., Ma, X. J. and Xu, H. X. : Puerarin decreases serum total cholesterol and enhances thoracic aorta endothelial nitric oxide synthase expression in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Life Sci.* **79**, 324 (2006).
- 7) Zhang, S., Ji, G. and Liu, J. : Reversal of chemical-induced liver fibrosis in Wistar rats by puerarin. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 485 (2006).
- 8) Recknagel, R. O. : Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **19**, 145 (1967).
- 9) Esterbauer, H., Zollner, H. and Schur, R. J. : Hydroxyalkenals; cytotoxic products of lipidperoxidation. *Science Biochem.* **1**, 311 (1988).
- 10) 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).
- 11) 송진호, 박미정, 김은, 김영중 : 인삼 분획물이 Galactosamine에 의하여 손상된 일차배양한 흰쥐의 간세포에 미치는 영향. *약학회지* **34**, 341 (1990).
- 12) Kinjo, J. E., Furusawa, J. I., Baba, J., Takeshita, T., Yamasaki, M. and Nohara, T. : Studies on the constituents of *Pueraria lobata* III. Isoflavonoids and related compounds in the roots and the voluble stems. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 4846 (1987).

- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) Mossmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferative and cytotoxic assays. *Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) 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).
- 19) Mujumdar, A. M., Upadhye, A. S. and Pradhan, A. M. : Effect of *Azadirachta indica* leaf extract on CCl₄ induced hepatic damage in albino rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Science* **60**, 363 (1998).
- 20) Recknagel, R. O. and Glende, E. A. : Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **2**, 263 (1973).
- 21) Clawson, G. A. : Mechanism of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pathol. Immunopathol. Res.* **8**, 104 (1989).
- 22) 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 (1968).
- 23) 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).
- 24) Reutter, W., Keppler, D., Lesch, R. and Decker, K. : Glycoprotein metabolism in galactosamine-induced hepatitis. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* **75**, 363 (1969).
- 25) Keppler, D., Lesch, R., Reutter, W. and Decker, K. : Experimental hepatitis induced by galactosamine. *Exp. Mol. Pathol.* **9**, 279 (1968).
- 26) Mofty, S. K., Scrutton, M. C., Serroni, A., Nicolini, C. and Farber, J. L. : Early, reversible plasma membrane injury in galactosamine-induced liver cell death. *Am. J. Pathol.* **79**, 579 (1975).