

타크린으로 유발한 간 세포 독성에 대한 백두산 식물 추출물의 보호 효과

이동성[#] · 정길생^{1#} · 안인파² · 리빈 · 변에리사 · 윤권하¹ · 김윤철*
원광대학교 약학대학, ¹원광대학교 의산방사선연구센터, ²연변대학교 약학대학

Hepatoprotective Effects of Plants Extracts from Baekdu Mountain on Tacrine-induced Cytotoxicity in HepG2 Cells

Dong-Sung Lee[#], Gil-Saeng Jeong^{1#}, Ren-Bo An², Bin Li, Erisa Byun,
Kwon-Ha Yoon¹ and Youn-Chul Kim*

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

¹Institute for Radiological Imaging Science, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

²College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China

Abstract – The present study represents the screening of the protective effects of herbal methanolic extracts from Baekdu mountain against tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells. Tacrine is an acetylcholinesterase inhibitor, and used for the treatment of Alzheimer's disease. However, administration of tacrine for the treatment of Alzheimer's disease results in a reversible hepatotoxicity in 30-50% of patients, consequently limiting clinical use. Therefore, studies for natural products with protective effect on the tacrine-induced hepatotoxicity would be valuable as providing potential therapeutic use. 109 plant sources were collected in Baekdu mountain, and extracted with methanol. These extracts had been screened the protective effects against tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells at the 100 and 300 µg/ml. Of these, ten methanolic extracts, roots of *Ampelopsis japonica*, aerial parts of *Berberis amurensis*, aerial parts of *Sedum aizoon*, aerial parts of *Lespedeza tomentosa*, aerial parts of *Lespedeza juncea*, aerial parts of *Hypericum ascyron*, stem barks of *Syringa reticulata*, fruits of *Gleditsia japonica*, aerial parts of *Chamaenerion angustifolium*, branches of *Ginkgo biloba*, showed significant protective effects against tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells.

Key words – Tacrine, HepG2, Methanol extracts, Baekdu Mountain, Cytoprotection

간 질환은 높은 발병률과 사망률을 지속적으로 나타내는 현대 생활의 주요한 질병 중 하나이며, 여러 가지 원인으로 부터 간을 보호하는 연구가 진행 되고 있다. 간장은 약물대사의 주요 기관이며, 소화기계로 들어온 생체 외 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. 예로, 사용 중인 의약품 중 600종 이상이 급성 또는 만성 간 손상을 유발할 수 있다고 보고되어 있어,¹⁾ 이 문제에 대한 심각성이 재인식되고 있다.

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 손상이 유발되기 때문에 투약의 제한을 비롯한 신중한 투여가 요구되고 있다.²⁾ 따라서, 천연물로부터 타크린의 간 독성을 감소시킬 수 있는 화합물을 발견하는 것은 중요하다고 생각된다. 본 연구에서는 타크린으로 독성을 유발한 사람 간 암 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,³⁾ 타크린으로 유발한 흰쥐 초대 배양 간세포에 상응하는 결과를 가지는 것으로 보고되어 있다.⁴⁾

[#]공동저자

*교신저자(E-mail): yckim@wku.ac.kr

(FAX): 063-852-8837

Table I. Protection of MeOH extracts from plants of Baekdu mountain on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells

Plant samples	Parts	Protection %	
		100 ug/ml	300 ug/ml
<i>Trifolium lupinaster</i> L.	aerial part	29.1%	39.3%
<i>Gleditsia japonica</i> Miquel var. <i>koraiensi</i>	fruit	67.6%	64.1%
<i>Cirsium pendulum</i> Fisch.	aerial part	21.2%	34.7%
<i>Epimedium koreanum</i> Nakai	aerial part	17.2%	8.9%
<i>Saussurea pulchella</i> Fisch.	aerial part	11.5%	-
<i>Polygonum sieboldii</i> Meisn.	aerial part	23.7%	11.2%
<i>Lespedeza tomentosa</i> Sieb ex Maxim.	aerial part	47.2%	61.0%
<i>Polygonum senticosum</i> (Meisn.) Franch. Et	whole plant	-	-
<i>Cirsium segetum</i> Bunge	aerial part	0.7%	6.5%
<i>Cirsium pendulum</i> Fisch.	aerial part	7.7%	-
<i>Cynanchum ascyrifolium</i> Matsum	aerial part	27.0%	27.7%
<i>Lepidium apetalum</i> willdenow	whole plant	14.1%	6.5%
<i>Viburnum burejaticum</i> Regel	aerial part	0.3%	-
<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> for. <i>viridi</i>	leaf	-	-
<i>Taraxacum mongolicum</i> Hand	aerial part	0.0%	4.9%
<i>Galeopsis bifida</i> Boenn	aerial part	36.5%	45.1%
<i>Vicia unijuga</i> A.Br.	aerial part	33.3%	43.0%
<i>Lespedeza juncea</i> (L. f.) Pers.	aerial part	45.7%	63.8%
<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	root	3.2%	-
<i>Rubia cordifolia</i> L.	aerial part	42.2%	47.5%
<i>Clematis hexapetala</i> Pall.	aerial part	25.6%	25.0%
<i>Artemisia siversiana</i> Ethhard. ex Willd	aerial part	-	-
<i>Ampelosis japonica</i> Makino	root	54.4%	51.9%
<i>Angelica dahurica</i> Bentham et Hooker	root	15.8%	30.4%
<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	root	21.9%	30.1%
<i>Euonymus alatus</i> Siebold	branch	46.4%	64.8%
<i>Allium tuberosum</i> Rottler	seed	-	16.4%
<i>Ganoderma lucidum</i> Karsten	whole plant	28.5%	28.4%
<i>Morus alba</i> Linn	branch	28.0%	21.1%
<i>Ixeris chinensis</i> (Thunb.)Nakai	whole plant	31.5%	33.4%
<i>Carex mongolica</i> Bar. Et Skv. Sp. Nov	whole plant	20.5%	9.0%
<i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gaertn	whole plant	9.8%	44.3%
<i>Doellingeria scaber</i> (Thunb) Ness	aerial part	43.0%	35.6%
<i>Caridius crispus</i> L.	aerial part	24.4%	30.0%
<i>Cicuta Virosa</i> L	aerial part	18.1%	-
<i>Veronica anagallis-aquatica</i> L.	whole plant	23.2%	6.8%
<i>Ranunculus japonicus</i> Thunb.	whole plant	19.3%	46.6%
<i>Asparagus schoberioides</i> Kunth.	aerial part	29.3%	33.6%
<i>Cirsium setosum</i> (Willd.) Bieb.	aerial part	21.4%	26.8%
<i>Ligusticum acutilobum</i> Seit. Et Zucc.	root	21.9%	34.7%
<i>Zea mays</i> L.	pistil	-	-
<i>Jeffersonia dubia</i> (Maxim) Benth et Hook	whole plant	1.9%	-

Table I. Continued

Plant samples	Parts	Protection %	
		100 ug/ml	300 ug/ml
<i>Typha orientalis</i> Presl	inflorescence	10.3%	-
<i>Heracieum moellendouffii</i> Hance	root	14.0%	7.9%
<i>Menispermum dauricum</i> DC.	aerial part	6.3%	15.9%
<i>Melampyrum roseum</i> Mxsim.	whole plant	8.7%	6.2%
<i>Pulsatillada dahurica</i> (Fisch. Ex DC.)	aerial part	24.1%	21.6%
<i>Sedum aizoon</i> L.	aerial part	49.4%	58.1%
<i>Arisacma amurense</i> Maxim. var. <i>violaceum</i>	rhizome	25.7%	20.8%
<i>Platycodon grandiflorum</i> A. De Candolle	root	-	-
<i>Sambucus williamsii</i> Hance	branch	38.3%	29.8%
<i>Morus alba</i> L.	root bark	35.5%	29.8%
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	root	36.0%	2.7%
<i>Arthraxon hispidus</i> Makino var. <i>brevisseus</i>	whole plant	2.2%	35.2%
<i>Erigenron canadensis</i> L.	aerial part	27.2%	42.0%
<i>Sophora flavescens</i> Aiton	root	-	-
<i>Caulophyllum robustum</i> Maxim.	root	-	-
<i>Caltha palustris</i> L. var. <i>sibirica</i> Regel	aerial part	8.5%	11.4%
<i>Tilia amurensis</i> Rupr.	branch	8.3%	26.3%
<i>Polygonum hydropiper</i> L.	whole plant	30.6%	23.1%
<i>Securinega suffruticosa</i> (Pall) Rehd.	branch	51.5%	49.2%
<i>Dianthus chinensis</i> L.	whole plant	7.8%	13.6%
<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	branch	33.2%	23.1%
<i>Acer mono</i> Maximowicz.	leaf	19.8%	21.4%
<i>Tribulus terrestris</i> L.	whole plant	11.8%	18.6%
<i>Metaplexis japonica</i> (Thunb.) Makino	whole plant	41.5%	47.0%
<i>Alopecurus aequalis</i> Sobol.	whole plant	-	-
<i>Caulophyllum robustum</i> Maxim.	aerial part	10.4%	16.5%
<i>Ribes mandshuricum</i> (Maxim.) Kom.	branch	47.4%	50.1%
<i>Oryza sativa</i> L.	fruit	9.9%	2.1%
<i>Rumex acetosa</i> L.	aerial part	24.3%	34.9%
<i>Xanthium strumarium</i> Linn	fruit	15.1%	18.2%
<i>Artemisa stolonifera</i> Maxim.	aerial part	29.6%	44.9%
<i>Polygonatum odoratum</i>	rhizome	20.4%	9.3%
<i>Leonurus astemisia</i> (Iour.) S.Y.Hu	fruit	-	-
<i>Arabis pendula</i> L.	aerial part	31.2%	31.7%
<i>Ranunculus repens</i> L.	aerial part	24.2%	41.5%
<i>Axyris amaranthoides</i> L.	aerial part	31.8%	28.7%
<i>Malva verticillata</i> L.	aerial part	23.3%	1.5%
<i>Allium macrostemon</i> Bunge	rhizome	28.9%	25.8%
<i>Delphinium maackianum</i> Regel	aerial part	42.5%	36.1%
<i>Populus davidiana</i> Dode	aerial part	48.2%	20.4%
<i>Lychnis fulgens</i> Fish.	aerial part	47.6%	-
<i>Hypericum ascyron</i> L.	aerial part	65.4%	29.0%

Table I. Continued

Plant samples	Parts	Protection %	
		100 ug/ml	300 ug/ml
<i>Ginkgo biloba</i> L.	leaf	7.0%	22.3%
<i>Pyrus ussuriensis</i> Maxim.	leaf	-	-
<i>Salsola collina</i> Pall.	whole plant	23.2%	35.1%
<i>Acanthopanax senticosus</i> Harm.	stem bark	23.9%	21.4%
<i>Galium verum</i> L.	whole plant	-	-
<i>Impatiens noli-tangere</i> L.	whole plant	27.5%	26.8%
<i>Artemisia sacrorum</i> Ledeb.	aerial part	45.6%	42.6%
<i>Clematis hexapetala</i> Pall.		32.2%	25.4%
<i>Viscum colcratum</i> (Kom.) Nakai	whole plant	-	-
<i>Codonopsis pilosula</i> Nannfeldt	root	-31.4%	-
<i>Syringa reticulata</i>	stem bark	58.8%	67.5%
<i>Siegesbeckia pubescens</i> Makino	aerial part	12.0%	-
<i>Bupleurum chinensis</i> DC.	root	42.9%	-
<i>Symurus deltoids</i> Nakai	aerial part	9.6%	18.6%
<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi	rhizome	4.1%	-
<i>Ginkgo biloba</i> L.	branch	72.6%	46.3%
<i>Aquilegia oxysepala</i> Trautv.	aerial part	-	8.1%
<i>Lycium chinense</i> Miller	fruit	10.5%	11.2%
<i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz.	root bark	5.4%	-
<i>Sanguisorba parviflora</i> (Maxim.) Takeda-S.	aerial part	12.3%	33.0%
<i>Malva verticillata</i> L.	aerial part	41.7%	42.3%
<i>Berberis amurensis</i> Rupr	aerial part	55.3%	52.8%
<i>Leonurus macranthus</i> Maxim.	aerial part	45.5%	-
<i>Chamaenerion angustifolium</i>	aerial part	25.1%	69.9%
<i>Melilotus albus</i> Desr	aerial part	19.9%	-

백두산은 북한의 양강도 삼지연군(三池淵郡)과 중국 동베이지방(동북지방; 만주)의 지린성(길림성)이 접하여 있는 한국 최고봉산으로, 해발 고도는 2,744 m이고, 총면적은 8,000 km²이며, 또한 백두산 식물의 분포는 2,000 m에 달하는 고도 차이로 인하여, 그 모양과 성질이 다른 여러 가지 식물들이 분포하고 있다.⁵⁾ 따라서, 본 연구는 위와 같은 다양한 백두산 식물 자원의 MeOH 추출물로부터 간독성의 부작용을 가지는 의약품을 독성유발 물질로 사용하여, 이에 대한 간 세포 보호 활성을 탐색하였으며, 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 백두산 식물의 MeOH 추출물은 2007년 5월에 중국 연변대학교 약학대학에 제공 받았으며, 각각의 식물 MeOH 추출물은 DMSO에 녹여 50 mg/ml의 농도로 stock solution을 제조하였으며 이를 RPMI

1640 배지로 희석하여 사용하였다.

시약 및 기기 - RPMI 1640 배지와 trypsin-ethylene diaminetetraacetic 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. 흡광도는 BioRad사의 Microplate Reader를 이용하여 측정하였다.

HepG2 세포배양 및 간 세포 보호활성 측정 - 사람 간 암 세포 유래 Hep G2 세포주는 American Type Culture Collection에서 분양하여 사용하였으며, 타크린으로 독성을 유발한 세포주에 대한 보호활성 측정은 변 등의 방법⁶⁾에 따라 실시하였다. 간략하게 설명하면, HepG2 세포 (2×10⁵ cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 µg/ml)을 함유한 RPMI 1640

배지에 분주하고 5% CO₂ 배양기 내에서 37°C에서 24시간 배양한 다음, 백두산 식물 MeOH 추출물의 시료 용액 (100, 300 µg/ml)과 1.2 mM tacrine을 처리한 후 2시간 동안 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였으며, 세포생존율은 MTT법을 활용하여 측정하였으며, 양성대조약물로는 silybin 100 µM을 사용하였다. 또한, 모든 실험치는 대조군에 대한 세포보호율을 mean±S.D.로 표시하였으며, 각각 3회 반복 실험치를 이용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

백두산 식물 MeOH 추출물로부터 간 세포 보호활성물질을 발견할 목적으로 간 독성이 알려진 타크린을 사람 간암 세포 유래의 HepG2 세포주에 처리한 후 세포생존율을 증가시키는 추출물을 검색하였다. 총 109종의 백두산 식물 MeOH 추출물을 각각 100, 300 µg/ml의 농도에서 간 보호 효과를 검색한 결과를 Table I에 나타내었으며, 그 중 유의한 간 보호 효과를 나타내는 10종의 식물 추출물은 *Ampelopsis japonica*(뿌리), *Berberis amurensis*(지상부), *Sedum aizoon*(지상부), *Lespedeza tomentosa*(지상부), *Lespedeza juncea*(지상부), *Hypericum ascyron*(지상부), *Syringa reticulata*(수피), *Gleditsia japonica*(과실), *Chamaenerion angustifolium*(지상부), *Ginkgo biloba*(가지)의 추출물이며 각각의 보호율은 Fig. 1과 같다. 한편, 간 보호 효과물질로 알려진 silybin을 양성 대조약물로 사용하였으며, silybin은 100

µM에서 53.2±0.6 µM의 보호율을 나타냈다(Fig. 1).

비록 아직까지 타크린의 간 독성 유발 기전에 대해서는 명확하게 밝혀지지 않았지만, 타크린이 혈청의 alanine aminotransferase 농도를 현저하게 증가시켜 간독성을 유도하며,^{7,8)} 간 세포의 세포 내 glutathione 농도를 변화시키는 것으로 알려져 있으며, 약물대사효소인 CYP 1A2의 활성 억제를 통하여 tacrine의 간 세포 독성을 감소시킬 수 있다는 보고가 있다.⁹⁾ 또한 tacrine의 간 독성에는 활성산소종과 지질과산화물이 관여하는 것으로 일부 밝혀져 있다.¹⁰⁾ 그러므로, 본 연구의 간 세포 보호 활성 검색을 통하여 그 효과가 인정된 10종의 백두산 식물 MeOH 추출물에 대해서는 활성 물질 분리, 정제 연구와 각각의 간 보호 기전에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다. *Ampelopsis japonica*, *Berberis amurensis*, *Sedum aizoon*, *Lespedeza tomentosa*, *Hypericum ascyron*, *Syringa reticulata*, *Chamaenerion angustifolium*, *Gleditsia japonica*의 9종에서 유래한 추출물, 분획물, 화합물 등에 대한 간 보호와 관련된 연구 보고는 없었으며, *Ginkgo biloba*의 간 보호와 관련된 보고는 있었으나,¹¹⁻¹⁴⁾ tacrine의 간세포 독성으로부터 보호 효과에 대해서는 아직 보고가 없는 것으로 판단된다.

결론

백두산 식물 MeOH 추출물로부터 간 세포 보호활성 추출물의 탐색을 목적으로, 백두산 유래 109종의 식물 MeOH

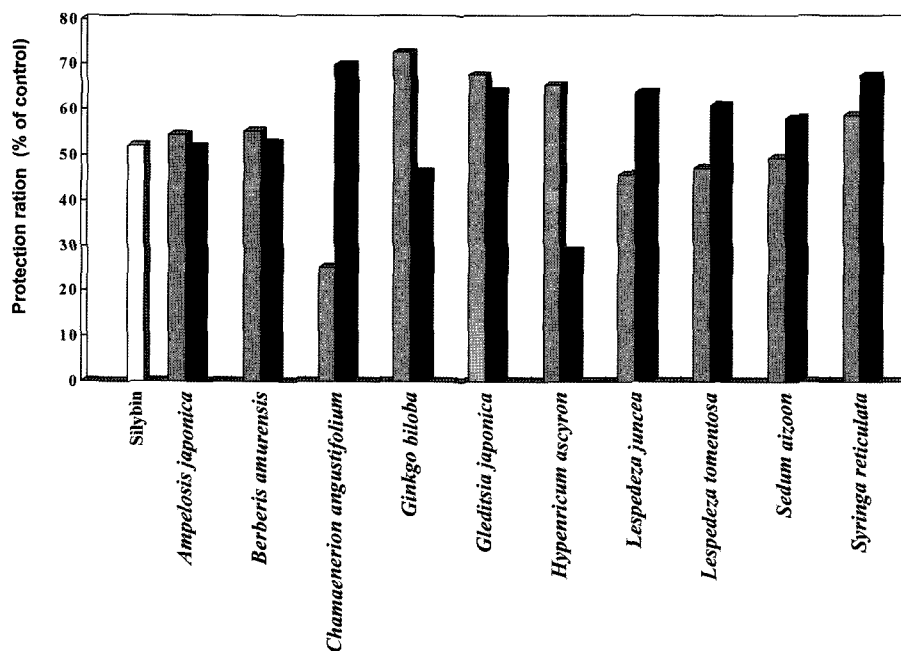


Fig. 1. Hepatoprotective effects of ten MeOH extracts against tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells. Cytotoxicity was assessed after incubating for 2 h with 2 mM of tacrine in RPMI medium. Results were expressed as mean±S.D. of three experiments (white bar : silybin 100 µM, grey bar : 100 µg/ml, black bar : 300 µg/ml).

추출물을 타크린으로 유발한 Hep G2 세포주에 대한 보호 활성을 검색하였으며, 그 중 유의한 보호활성을 나타내는 것으로는 *Ampelopsis japonica*(뿌리), *Berberis amurensis*(지상부), *Chamaenerion angustifolium*(지상부), *Ginkgo biloba*(가지), *Gleditsia japonica*(과실), *Hypericum ascyron*(지상부), *Lespedeza juncea*(지상부), *Lespedeza tomentosa*(지상부), *Sedum aizoon*(지상부), *Syringa reticulata*(수피) 추출물들이 있었으며, 앞으로 이상의 결과를 바탕으로 활성 물질의 분리, 정제 연구와 간 보호 활성의 기전 연구가 진행되어야 한다고 생각한다.

사 사

본 연구는 한국학술진흥재단 중점연구소 지원 연구비 (J03203)에 의해 이루어 졌으며 이에 감사를 드립니다.

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. 주팅칭, 연중카이, 주서우보우 (2005) 백두산 식물도감, 10-12. 도서출판 일진사, 서울.
6. Byun, E., Jeong, G. S., An, R. B., Li, B., Lee, D. S., Ko, E. K., Yoon, K. H., and Kim, Y. C. (2007) Hepatoprotective compounds of Cassiae Semen on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**: 400-402.
7. Farlow, M., Gracon, S. I., Hershey, L. A., Lewis, K. W., Sadowsky, C. H., Dolan-Ureno, J. (1992) A controlled trial of tacrine in Alzheimer's disease. *JAMA.* **268**: 2523-2529
8. Watkins, P. B., Zimmerman, H. Y., Knapp, M. J., Gracon, S. I., Lewis, K. W. (1994) Hepatotoxic effects of administration in patients with Alzheimers disease. *JAMA.* **271**: 992-998.
9. Meng, Q., Ru, J., Zhang, G., Shen, C., Schmitmeier, S., Bader, A. (2007) Re-evaluation of tacrine hepatotoxicity using gel entrapped hepatocytes. *Toxicol Lett.* **168**: 140-147.
10. Galisteo, M., Rissel, M., Sergeant, 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.
11. Yao, P., Li, K., Song, F., Zhou, S., Sun, X., Zhang, X., Nüssler, A. K., Liu, L. (2007) Heme oxygenase-1 upregulated by *Ginkgo biloba* extract: potential protection against ethanol-induced oxidative liver damage. *Food. Chem. Toxicol.* **45**: 1333-1342.
12. Naik, S. R., Panda, V. S. (2007) Antioxidant and hepatoprotective effects of *Ginkgo biloba* phytosomes in carbon tetrachloride-induced liver injury in rodents. *Liver. Int.* **27**: 393-399.
13. Yuan, G., Gong, Z., Li, J., Li, X. (2007) *Ginkgo biloba* extract protects against alcohol-induced liver injury in rats. *Phytother. Res.* **21**: 234-238.
14. Shenoy, K. A., Somayaji, S. N., Bairy, K. L. Evaluation of hepatoprotective activity of *Ginkgo biloba* in rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* **46**: 167-174.

(2008년 2월 26일 접수)