

Prokinetic Activities of Extracts from the Dried Rhizomes and Roots of *Gentiana scabra* Bunge in Mice

Hyun-Tai Lee*

Biopharmaceutical Engineering Major, Division of Applied Bioengineering, College of Engineering, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

Received May 17, 2019 / Revised June 7, 2019 / Accepted June 11, 2019

The dried rhizomes and roots of *Gentiana scabra* (GS) have been frequently prescribed as a traditional folk medicine in East Asia (including China, Japan, and Korea) for the treatment of various pathophysiological conditions, such as inflammatory skin diseases, anorexia, indigestion, gastric infections, and diabetes mellitus. In the present study, the effects of aqueous (GS-W) and ethanolic (GS-E) extracts of GS on gastrointestinal (GI) motor function were investigated by measuring the *in vivo* gastric emptying rate (GER) and the intestinal transit rate (ITR) in mice. The GER was significantly increased by GS-W at a dose of 1 g/kg. The ITR was significantly increased by GS-W (at doses of 0.1 and 1 g/kg) or GS-E (at a dose of 1 g/kg) in a dose-dependent manner. Furthermore, the ITR value of GS-W (at a dose of 1 g/kg) appeared to be higher than that of cisapride, which was the most prominent prokinetic agent in the 1900s but was removed from the market in 2000 due to its fatal side effects. The above results suggest that GS-W might be a potential prokinetic agent to replace cisapride.

Key words : Cisapride, gastric emptying, *Gentiana scabra*, intestinal transit, prokinetic

서 론

용담(龍膽; *Gentiana scabra* Bunge)은 용담과(Gentianaceae)의 여러해살이풀로서 우리나라 전역의 산과 들에서 자라며, 세계적으로는 중국 동북부 및 대만, 일본, 러시아 동부 등지에 분포한다. 이 식물의 근경(根莖; rhizome) 및 뿌리(root)를 말린 한약재 역시 '용담'으로 불리며, 우리나라와 중국 및 일본 등 동아시아 지역에서 아주 오래 전부터 각종 염증성 피부 질환, 소화불량, 식욕부진, 위염, 당뇨병 등의 치료를 위한 약재로 한의학에서 널리 처방되어 왔다[2, 12-14]. 한편, 용담 추출물 및 그 함유 성분들에 대한 생명과학 및 서양 의학적 연구 결과들을 살펴보면, 항염증[3, 8, 14], 간(肝) 보호[4, 9], 항당뇨[12], 혈액 응고 방지[1], 면역 조절 활성[7] 등이 보고된 바 있다. 여기에서 흥미로운 사실은, 동양의 전통 의학에서는 용담이 그 건위(健胃) 효능에 기반하여 소화불량 및 식욕부진 개선에 적극적으로 활용되어 왔음에도 불구하고, 현대 생명과학 및 서양 의학에서는 용담이 위장관 운동 기능에 미치는 영향에 대한 연구 성과 또는 보고가 전무하다는 점이다. 물론, 소화불량 및 식욕부진의 원인을 파악하기 위해서는 위장관 평활근의 운동 기능 이외에도 소화 효소의 활성 변화를 비롯하여

다양한 요인들에 대한 검토 및 고찰이 필요하지만, 기본적으로 위장관 운동 기능에 대한 검토는 필수적이다. 이에 본 연구에서는, 용담이 위(胃) 및 소장(小腸)의 운동 기능에 어떠한 영향을 미치는지 검토하고자 하였다. 이를 위해, 먼저 용담의 열수 및 에탄올 추출물을 각각 제조하였으며, 이들 추출물이 위장관 운동 기능에 미치는 영향을 검토하기 위하여, 실험 동물에서 *in vivo* 위 배출 속도 및 위장관 이송률을 측정하였다.

재료 및 방법

용담 추출물 제조

본 연구에 사용된 한약재 용담(*Gentiana scabra*; GS), 즉 여러해살이풀 용담의 말린 근경 및 뿌리는 대한생약제품(주)(부산, 대한민국)에서 구입하였으며, 입자 크기 5 mm 미만이 되도록 용담을 분쇄한 후 열수 및 에탄올 추출물을 각각 제조하였다. 열수 추출물(GS-W)의 경우, 분쇄한 용담 100 g에 증류수(distilled water; DW) 1 l를 가한 후 100°C에서 3시간 중탕하는 방법을 3회 반복하여 추출액을 얻었다. 에탄올 추출물(GS-E)의 경우, 분쇄한 용담 100 g에 에탄올 500 ml를 가하고 40°C에서 2시간 sonication 후 상온에서 하루 방치하는 방법을 3회 반복하여 추출액을 얻었다. 이렇게 얻은 추출액들을 여과, 감압 농축, 동결 건조하여 최종적으로 분말 상태의 추출물을 얻었다. 그 결과, 100 g의 용담으로부터 최종 건조량 43.5 g의 GS-W 및 12.0 g의 GS-E를 각각 얻을 수 있었으며, 위장관 운동 촉진 활성을 가진 것으로 알려진 대표적 한약재인 진피(陳皮, *Aurantii Nobilis Pericarpium*; ANP) [5, 10] 및 지실(枳實, *Poncirus Fructus*; PF) [6]의 수율과 비교하였다(Table 1).

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1534, Fax : +82-505-182-6871

E-mail : hlee@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Comparison of yields of extracts from GS, ANP, and PF

Extract	Yield (% w/w)
GS-W	43.5
GS-E	12.0
ANP-W	38.3
ANP-E	21.1
PF-W	24.4

“-W” and “-E” represent “aqueous” and “ethanolic” extracts, respectively.

시약

본 연구에 사용된 ascorbic acid, cisapride, Evans blue, methyl cellulose, metoclopramide, phenol red, trichloroacetic acid는 모두 Sigma-Aldrich 社(St. Louise, MO, USA)로부터 구입하였다.

실험 동물

㈜샘타코(오산, 대한민국)에서 구입한 4주령 ICR 마우스를 동의대학교 자연과학관 내 실험 동물 사육실에서 2주일 이상 사육하여 새로운 환경에 충분히 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물실은 온도 25±1℃, 습도 55±5%, 조명 시간 7 am-7 pm의 환경 조건을 항상 유지하였으며, 멸균 처리된 사료(동아원(주), 서울, 대한민국) 및 DW를 실험 동물이 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 모든 동물 실험은 동의대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에, 동 위원회의 규정을 준수하여 수행되었다(승인 번호: R2018-009).

위 배출 속도 측정

본 연구에서는 phenol red meal (0.05%, w/w in DW with 1.5% methyl cellulose)의 위 배출 속도(gastric emptying rate; GER)를 측정하는 방법[6]을 사용하였다(Fig. 1). 체중 25-30 g

의 수컷 ICR 마우스를 약 20시간 절식시켰으며, 물은 자유롭게 마실 수 있도록 하였다. DW에 녹인 GS-W 또는 GS-E를 각각 0.01, 0.1, 1 g/kg씩 용량 별로 경구 투여하였으며, 대조군에는 DW를, 양성 대조군에는 DW에 녹인 metoclopramide 20 mg/kg을 각각 경구 투여하였다[11]. 시험 약물 경구 투여 후 30분 경과 시점에서 phenol red meal 1.5 ml 경구 투여하였으며, phenol red 투여 15분 후 실험 동물을 안락사시키고 즉시 개봉한 다음, 위-식도 접합부 및 유문부를 클램프로 막은 상태로 위를 적출하여 생리 식염수로 세척하였다. 세척한 위에 0.1 N NaOH 25 ml를 가하고 균질화한 후 1시간 방치하였으며, 상층액 5 ml에 20% trichloroacetic acid (w/v) 0.5 ml를 가한 후 3,000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하였다. 상층액 1 ml과 0.5 N NaOH 4 ml를 혼합한 후, 분광 광도계(U-3000; Hitachi 社, Tokyo, Japan)를 사용하여 560 nm에서 흡광도(A₅₆₀)를 측정하였다. GER 산출을 위해, phenol red 투여 직후 실험 동물을 안락사시키고 상기 방법에 의해 흡광도(즉, 위 배출 0% 시의 A₅₆₀)를 측정하였으며, 다음의 식을 활용하여 GER 값을 계산하였다.

$$GER (\%) = \{1 - (\text{시험 약물 투여 후 측정된 } A_{560} / \text{위 배출 } 0\% \text{ 시의 } A_{560})\} \times 100$$

위장관 이송률 측정

본 연구에서는 용담 추출물이 위장관 이송률에 미치는 영향을 검정하기 위해 Evans blue 용액(5%, w/v in DW)의 위장관 이송률(intestinal transit rate; ITR)을 측정하는 방법[10]을 사용하였으며, 양성 대조 약물로서 cisapride 1 mg/kg을 꼬리 정맥에 정맥 내 주입하였다(Fig. 2). 물에 녹지 않는 cisapride를 녹여 정맥 내에 안전하게 주입할 수 있는 용매로 0.57 M ascorbic acid를 선택하였다[5]. 체중 25-30 g의 수컷 ICR 마우스를 약 20시간 절식시켰으며, 물은 자유롭게 마실 수 있도록 하였다. 실험 동물은 무작위로 대조군, cisapride 투여군,

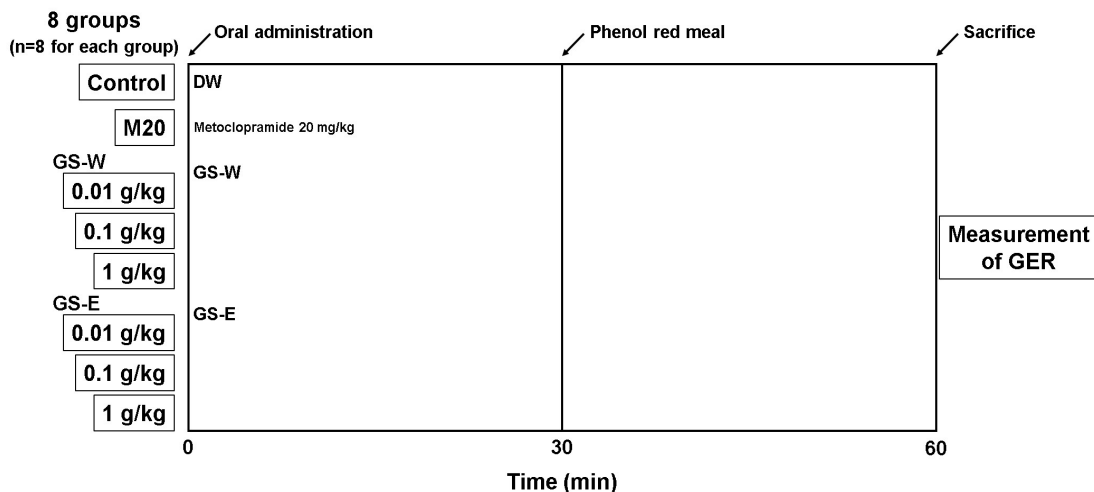


Fig. 1. Scheme for the measurement of *in vivo* GER in mice.

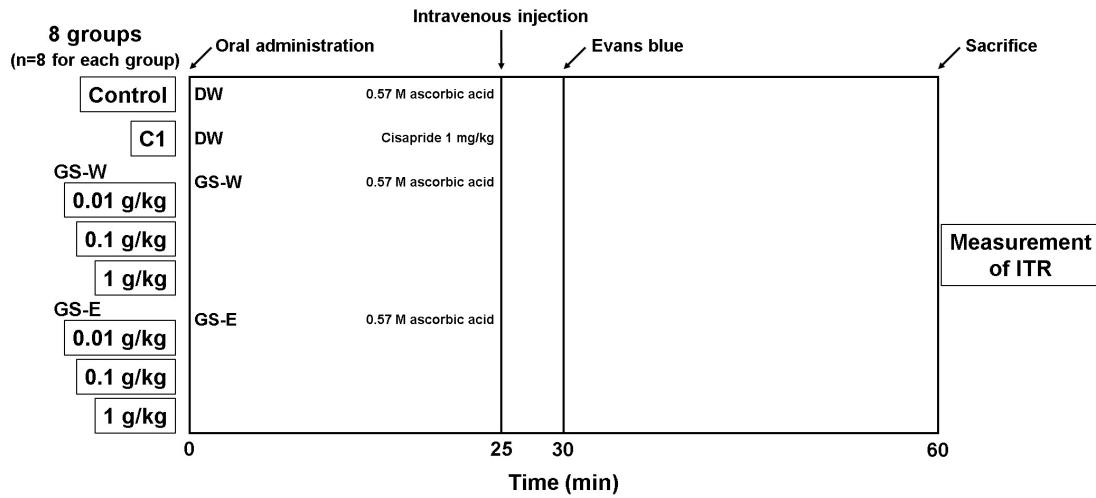


Fig. 2. Scheme for the measurement of *in vivo* ITR in mice.

GS-W 투여군, GS-E 투여군의 4군으로 나누었다. 대조군에는 DW 경구 투여 후 25분 경과 시점에서 0.57 M ascorbic acid 용액을 정맥 내 주입하였다. Cisapride 투여군에는 DW 경구 투여 후 25분 경과 시점에서 0.57 M ascorbic acid 용액에 녹인 cisapride를 1 mg/kg의 용량으로 정맥 내 주입하였다. GS-W 및 GS-E 투여군에는 시료를 DW에 녹여 각각 0.01, 0.1, 1 g/kg의 용량으로 경구 투여하였고, 25분 경과 시점에서 0.57 M ascorbic acid 용액을 정맥 내 주입하였다. 용담 추출물 또는 DW를 경구 투여 후 30분 경과 시점에서 Evans blue 0.1 ml 경구 투여하였으며, Evans blue 투여 후 30분 경과 시점에서 실험 동물을 안락사시킨 다음, 소장 전체를 적출하여 신속하게 일직선으로 배열하였다. 소장 전체의 길이(유문부-맹장 입구) 및 Evans blue가 이동한 거리를 줄자로 측정하여 ITR의 지표로 삼았다.

$$\text{ITR (\%)} = (\text{Evans blue가 이동한 거리/소장 전체의 길이}) \times 100$$

통계 처리

모든 군의 실험 결과 수치는 평균±표준 오차(mean±SEM)로 나타내었다. 군 간의 유의성 검정은 일원 배치 분산 분석(one-way ANOVA) 및 Student's *t*-test를 통해 이루어졌으며, *p*<0.05일 때 유의적인 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

용담 열수 추출물(GS-W) 및 에탄올 추출물(GS-E)이 위 및 소장의 운동성에 어떠한 영향을 주는지 각각 파악하기 위해, *in vivo* phenol red 위 배출 속도(GER) 측정 실험 및 Evans blue 위장관 이송률(ITR) 측정 실험을 수행하였다. GER 측정 실험에서, 양성 대조군인 metoclopramide 20 mg/kg 투여군의 GER (75.12±4.00%)은 대조군(61.03±3.50%)에 비해 유의적

(*p*<0.05)으로 높았다(Fig. 3). GS-W 투여군의 경우, 10 mg/kg (57.43±4.11%) 및 100 mg/kg (58.09±4.28%) 투여 시에는 대조군보다 수치 상으로는 조금 낮은 GER 값을 보였으나, 군 간의 유의적인 차이는 없었다. 반면, GS-W 1 g/kg 투여 시의 GER은 71.05±4.20%로서 대조군에 비해 유의적(*p*<0.05)으로 높았음은 물론, 양성 대조군에 근접(*p*>0.05)하는 높은 수치를 기록하였다(Fig. 3). 한편, GS-E 투여군의 GER은 각각 57.27±3.56%(10 mg/kg), 54.63±4.52%(100 mg/kg), 64.07±4.74%(1 g/kg)로서, 어느 투여 용량에서도 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3). 흥미롭게도, (GS-W 투여군에서와 비슷한 양상으로) GS-E 10-100 mg/kg 투여 시, 유의적인 차이는 아니지만 대조군과 비교할 때 GER 값이 수치 상으로 감소하는 양상을 보였다. 이는 저용량(100 mg/kg 이하) 투여 시에는

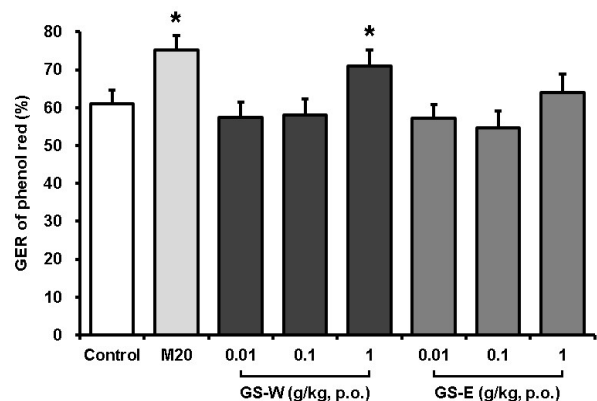


Fig. 3. Effects of GS extracts on GER in mice. The GER (%) of phenol red during a 15 min period following an oral administration of a phenol red meal 30 min after pre-treatment with each test drug in experimental animals (n=8 for each bar). Metoclopramide was administered orally at a dose of 20 mg/kg (M20). Significant difference (**p*<0.05) compared with control.

용담 추출물이 GER을 오히려 저해하는 용량 구간이 존재할 수도 있음을 시사하는 결과이며, 향후 투여 용량을 좀 더 세분화하여 실험함으로써 그 가능성에 대해 검정할 계획이다.

ITR 측정 실험에서, 양성 대조군인 cisapride 1 mg/kg 투여군의 ITR (67.61±3.14%)은 대조군(56.88±1.95%)에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높았다(Fig. 4). GS-W 투여군의 ITR은 각각 60.02±4.27%(10 mg/kg), 68.99±3.95%(100 mg/kg), 75.09±4.30%(1 g/kg)로서 용량 의존적 증가 양상을 나타내었으며, 100 mg/kg($p<0.05$) 및 1 g/kg($p<0.01$) 투여 시의 ITR은 대조군에 비해 유의적으로 높았다. 특히, GS-W 1 g/kg 투여 시의 ITR은 대조군과 비교한 유의 수준이 본 연구의 실험 전체를 통틀어 유일하게 ' $p<0.01$ '을 기록했다(Fig. 4). 한편, GS-E 투여군의 ITR은 각각 59.82±3.70%(10 mg/kg), 64.47±4.52%(100 mg/kg), 69.05±4.18%(1 g/kg)로서 역시 용량 의존적 증가 양상을 보였으며, 1 g/kg 투여 시의 ITR은 대조군에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높았다(Fig. 4). 이러한 결과들은 용담 추출물이 *in vivo* 위장관 이송률을 유의적으로 증가시킨다는 최초의 연구 보고이며, 대조군 대비 GS-W 1 g/kg 투여군의 ITR 유의 수준이 ' $p<0.01$ '로서 cisapride 투여군의 ITR (대조군 대비 유의 수준 ' $p<0.05$ ')보다 간접적으로 우위를 보인다는 점 역시 크게 주목할 만하다. 왜냐하면, 20세기 말 최고의 위장관 운동 촉진제로 각광 받았던 cisapride는 심장 부정맥을 유발하는 심각한 부작용이 드러나는 바람에 2000년 이후 이미 시장에서 철수되었으며, cisapride의 예전 위상을 대신할 만큼의 강력한 약효를 나타내는 신약은 아직까지도 출현하지 못한 실정이기 때문이다[10, 15]. 한편, 위장관 운동 촉진 활성이 보고된 바 있는 한약재들(Table 1)의 1 g/kg투여 시 ITR은 각각 72.81±5.54%(지실 열수 추출물; PF-W), 73.64±5.61%(진피 열수 추출물; ANP-W), 67.60±5.05%(진피 에탄올 추출물; ANP-E)였으

며[5, 10], 본 연구를 통해 얻은 용담 열수 추출물 1 g/kg투여 시의 ITR (75.09±4.30%)보다 높은 경우는 없었다.

이상과 같이, 본 연구에서는 용담 열수 추출물(GS-W)이 실험 동물에서 위 배출 속도 및 위장관 이송률을 모두 유의적으로 증가시켰음을 최초로 보고하였다. 이는, cisapride를 대체할 수 있는 새로운 위장관 운동 촉진제로서 GS-W가 그 강력한 후보 물질이 될 수 있음을 시사하는 결과라 할 수 있다. 향후 단회 투여 경구 독성 시험을 통한 안전성 데이터 확보, 각종 위장관 운동 기능 저해 상황에서의 효능 검정, 그리고 활성을 나타내는 유효 성분 탐색 등 심도 깊은 추가 연구들을 통해, 궁극적으로 인간의 위장관 운동 기능 저해 상황을 개선하는 신약 또는 건강 보조제로의 개발을 도모하고자 한다.

References

1. Cai, W., Xu, H., Xie, L., Sun, J., Sun, T., Wu, X. and Fu, Q. 2016. Purification, characterization and *in vitro* anti-coagulant activity of polysaccharides from *Gentiana scabra* Bunge roots. *Carbohydr. Polym.* **140**, 308-313.
2. Ikeshiro, Y. and Tomita, Y. 1983. A new bitter secoiridoid glucoside from *Gentiana scabra* var. *buergeri*. *Planta Med.* **48**, 169-173.
3. Kim, M. S., Cho, W. J., Hwang, S. Y., Lee, J. R., Park, S. J., Kim, S. C. and Jee, S. Y. 2008. Inhibitory effect of *Gentiana Radix* MeOH extract on pro-inflammatory mediator production in lipopolysaccharide activated Raw 264.7 cells. *J. Kor. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **21**, 28-38.
4. Ko, H. J., Chen, J. H. and Ng, L. T. 2011. Hepatoprotection of *Gentiana scabra* extract and polyphenols in liver of carbon tetrachloride-intoxicated mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **30**, 179-187.
5. Lee, H. T. 2014. Prokinetic activity of ethanolic extracts from dried *Citrus unshiu* peels in mice. *J. Life Sci.* **24**, 260-265.
6. Lee, H. T., Seo, E. K., Chung, S. J. and Shim, C. K. 2005. Prokinetic activity of an aqueous extract from dried immature fruit of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *J. Ethnopharmacol.* **102**, 131-136.
7. Li, W., Li, L. Y., Zhou, W., Hwang, I., Ma, J. Y. and Kim, Y. H. 2015. Triterpenoids isolated from the rhizomes and roots of *Gentiana scabra* and their inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 2124-2130.
8. Li, W., Zhou, W., Kim, S., Koo, J. E., Kim, Y., Koh, Y. S., Shim, S. H., Ma, J. Y. and Kim, Y. H. 2015. Three new secoiridoid glycosides from the rhizomes and roots of *Gentiana scabra* and their anti-inflammatory activities. *Nat. Prod. Res.* **29**, 1920-1927.
9. Qu, Z. X., Li, F., Ma, C. D., Liu, J., Li, S. D. and Wang, W. L. 2015. Effects of gentiana scabra bage on expression of hepatic type I, III collagen proteins in *Paragonimus skrjabini* rats with liver fibrosis. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **8**, 60-63.
10. Ryu, J. H. and Lee, H. T. 2013. Effects of dried *Citrus unshiu* peels on gastrointestinal motility in rodents. *Arch. Pharm. Res.* **36**, 641-648.

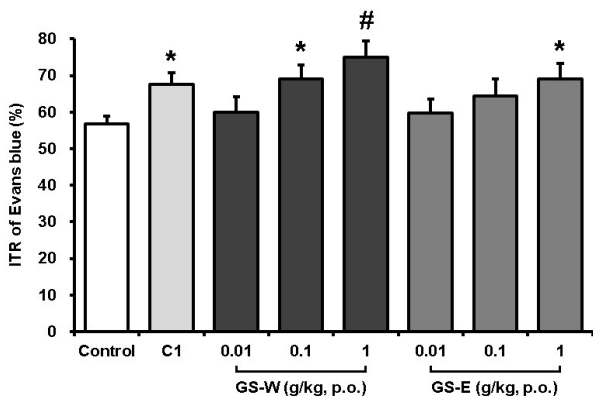


Fig. 4. Effects of GS extracts on ITR in mice. The ITR (%) of Evans blue during a 30 min period following an oral administration of an Evans blue solution 30 min after pretreatment with each test drug in experimental animals (n=8 for each bar). Cisapride was injected intravenously at a dose of 1 mg/kg (C1). Significant difference ($*p<0.05$ and $#p<0.01$) compared with control.

11. Suchitra, A. D., Dkhar, S. A., Shewade, D. G. and Shashindran, C. H. 2003. Relative efficacy of some prokinetic drugs in morphine-induced gastrointestinal transit delay in mice. *World J. Gastroenterol.* **9**, 779-783.
12. Suh, H. W., Lee, K. B., Kim, K. S., Yang, H. J., Choi, E. K., Shin, M. H., Park, Y. S., Na, Y. C., Ahn, K. S., Jang, Y. P., Um, J. Y. and Jang, H. J. 2015. A bitter herbal medicine *Gentiana scabra* root extract stimulates glucagon-like peptide-1 secretion and regulates blood glucose in *db/db* mouse. *J. Ethnopharmacol.* **172**, 219-226.
13. Tang, W. and Eisenbrand, G, 1992. Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine, pp. 549-553, Springer: Berlin, Germany.
14. Yang, B., Kim, S., Kim, J. H., Lim, C., Kim, H. and Cho, S. 2019. *Gentiana scabra* Bunge roots alleviates skin lesions of contact dermatitis in mice. *J. Ethnopharmacol.* **233**, 141-147.
15. Zeinali, F., Stulberg, J. J. and Delaney, C. P. 2009. Pharmacological management of postoperative ileus. *Can. J. Surg.* **52**, 153-157.

초록 : 용담 추출물의 위장관 운동 촉진 활성

이현태*

(동의대학교 공과대학 바이오응용공학부 바이오의약공학전공)

용담(*Gentiana scabra*)의 근경 및 뿌리를 말린 한약재는 우리나라, 중국, 일본을 포함하는 동아시아 지역에서 아주 오래 전부터 각종 염증성 피부 질환, 소화불량, 식욕부진, 위염, 당뇨병 등의 치료를 목적으로 한의학에서 널리 처방되어 왔다. 본 연구에서는 용담이 위장관 운동 기능에 미치는 영향을 검정하기 위해 용담의 열수 및 에탄올 추출물을 각각 제조하였으며, 마우스에서 *in vivo* 위 배출 속도 및 위장관 이송률을 측정하는 실험을 수행하였다. 위 배출 속도는 용담 열수 추출물 1 g/kg 투여 시 유의적으로 증가하였다. 위장관 이송률은 용담 열수 추출물 0.1 및 1 g/kg 투여 시, 그리고 용담 에탄올 추출물 1 g/kg 투여 시 유의적으로 증가하였으며, 두 추출물 모두 용량 의존적 증가 양상을 보였다. 더욱이, 용담 열수 추출물 1 g/kg 투여 시의 위장관 이송률은, 1990년대까지 임상에서 가장 강력한 위장관 운동 촉진제로 쓰였으나 2000년 이후 부작용으로 시장에서 철수된 약물인 *cisapride* 투여 시보다 그 수치가 높았다. 이러한 결과들은 용담 열수 추출물이 잠재적으로 *cisapride*를 대체할 수 있는 위장관 운동 촉진제로 개발 가능한 후보 물질임을 시사한다.