

## 柴胡 사포닌류(Saikosaponins)의 약리작용( I )

—Acetaminophen에 의한 약물대사계의 변화 및 간독성에 미치는 영향—

이 정 식 · 이 정 규 · 최 중 원  
경성대학교 약학대학

### Pharmacologic Activities of Saikosaponins( I )

—Effects on Drug Metabolizing Enzymes Modification and Liver  
Toxicities due to Acetaminophen—

Jeong-Sik Lee, Chung Kyu Lee and Jong-Won Choi

College of Pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

**Abstract**—Saikosaponins, originally isolated from *Bupleuri Radix*, were reported to exhibit diverse biological activities especially concerning with liver function. To elucidate the mode of protective action of saikosaponins on liver injury due to the acetaminophen administration, effects on drug metabolizing enzymes system and some transferase activities were checked. As the result, activities of transferases were shown to be strengthened by saikosaponin treatments significantly.

**Keywords**—saikosaponins·liver protective effects·UDP-glucuronyltransferase activity·aminotransferase activity

시호(*Bupleuri Radix*)는 미나리아재비과(*Umbelliferae*)에 속하는 시호(*Bupleurum falcatum*), 협엽시호(*B. scorzonera*) 또는 북시호(*B. chinense*)의 근경 또는 전초를 말린 것으로 한방에서는 해열, 진통, 진정 및 보간 등의 목적으로 광범위하게 사용되고 있다.<sup>1,2)</sup> 그 화학적 성분은 주로 saikosaponin a, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, c 및 d 등의 사포닌류와  $\alpha$ -spinasterol 및 stigmasterol 등의 스테롤 성분으로<sup>3,4)</sup> 생리활성을 나타내는 성분은 saikosaponin류이며<sup>5-7)</sup> 그중에서도 saikosaponin d가 다양한 활성을 나타냄이 보고되었다.<sup>8)</sup> 특히 시호의 crude saponin은 중추신경억제작용<sup>9)</sup>, 항염작용<sup>10)</sup> 및 해열작용<sup>11)</sup> 등을 발휘함이 밝혀져 있으며, 흰쥐나 토끼에 saikosaponin을 전처리하고, 인위적으로 사염화탄소나 galactosamine으로 간손상을 야기시킨 후 그 회복정도를 검토한 실험에서는 서로 상반된 결과<sup>8,12)</sup>의 보고도 있으나 아

직까지 saikosaponin의 간 해독기전에 대하여서는 확실한 기전이 밝혀져 있지 않다.

해열진통제인 acetaminophen은 acetanilid 및 phenacetin의 활성 대사물질로 간에서 대사되어 신장으로 배설되며 과용량의 투여는 간장과 신장괴사를 유발한다고 보고된 바 있다.<sup>13)</sup>

본 연구에서는 saikosaponin류의 간의 약물대사기능에 미치는 영향과 이의 활성물질을 구명할 목적으로 시호성분인 saikosaponin, saikosaponin a 및 saikosaponin d의 투여가 간독성을 유발하는 acetaminophen의 생체내 대사계의 변화 및 독성에 어떤 영향을 주는가를 검토하였다.

### 실험재료 및 방법

시약 및 기구—Acetaminophen, ATP disodium salt(ATP), NAD, NADPH 및 UDP-glucuronic

acid sodium salt(UDPGA)는 Sigma사로부터, saikosaponin, saikosaponin a 및 saikosaponin d는 Wako사로부터, *p*-nitrophenol은 Katayama사의 제품을 사용하였고 기타 모든 시약은 실험목적에 합당한 특급 내지 일급품을 사용하였다. 실험에 사용한 기구는 UV-240 spectrophotometer (Shimadzu model JZ-21), refrigerated centrifuge (Beckman Co.) 및 automatic preparative ultracentrifuge(Hitachi 659-7) 등 이었다.

**실험동물 및 처치**—본 대학 동물사에서 일정한 조건으로 사육한 외관상 건강한 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐(100~150 g)와 ICR계 웅성 생쥐(17~22 g)를 사용하였다. Saikosaponin, saikosaponin a 및 saikosaponin d의 투여는 반응용량 곡선에 참조하여 5 mg/kg(생리식염수에 용해)을 실험군의 복강내로 7일간 하였으며, 간 손상의 유도는 Fischer 등의 방법<sup>14)</sup>에 준하여 acetaminophen을 400 mg/kg(olive oil에 현탁) 주사하여 유도하였으며 대조군은 동량의 생리 식염수와 olive oil을 복강내로 주사하였다. 급성독성 실험시에는 acetaminophen(600 mg/kg)을 1회 복강내에 주사하였다. 실험동물은 실험전 24시간 동안 물만주고 절식시켰다.

**효소원의 제조**—실험동물을 CO<sub>2</sub> gas로 가볍게 마취시킨 복부 대동맥에서 혈액을 채취하고 0.9% 생리 식염수로 관류시킨 간장을 적출하여 평량한 후 간 조직 1 g당 4배량의 0.25M sucrose 용액을 가하여 빙냉하여 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondria fraction을 제거한 상정액을 얻어 105,000×g에서 1시간 원심분리하여 침전을 microsomal fraction을 얻어 0.25M sucrose 용액에 현탁시킨 다음 다시 원심분리하였다. 이때 얻은 침전을 소량의 0.25M sucrose용액에 재현탁시킨 것을 aminopyrine demethylase, aniline hydroxylase 및 UDP-glucuronyltransferase 활성측정의 효소원으로 사용하였다. 한편 채취한 혈액은 4°C에서 20분간 방치하여 응고시킨 다음 600×g에서 15분간 원심분리하여 혈청을 취하였으며 이것을 aminotransferase의 활성 측정 및 acetaminophen 농도측정 실험에 사용하였다.

**Aniline hydroxylase의 활성 측정**—Bidlack 등<sup>15)</sup>의 방법에 준하였다. 10 mM MgCl<sub>2</sub>와 150 mM KCl이 함유된 50 mM Tris 완충액(pH 7.4)에 기질로서 1 mM aniline과, 0.5 mM NADPH 및 효소액(300~400 μg의 단백질)을 가해 최종 반응액이 2.0 ml되게 하고, 이 반응액을 37°C에서 15분간 반응시킨 후 재단백시약(20% trichloroacetic acid) 1.0 ml를 가하여 반응을 종료시킨 후 원심 분리하여 얻은 상정액에 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>와 0.2N NaOH(2% phenol 함유)시액 2.0 ml를 가한 후 37°C에서 30분간 발색시켜 640 nm에서 그 흡광도를 측정하고 검량선에 준하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성하는 *p*-aminophenol의량을 nmole로 표시하였다.

**Aminopyrine demethylase의 활성 측정**—Bidlack 등<sup>15)</sup>과 Nash 등<sup>16)</sup>의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 0.1 M Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> phosphate 완충액(pH 7.5)에 기질로서 2 mM aminopyrine과 0.5 mM NADPH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 1 mM semicarbazide 및 효소액(300~400 μg의 단백질)을 가해 최종 반응액이 2.0 ml되게 하고 이 반응액을 37°C에서 15분간 반응시킨 후 15% ZnSO<sub>4</sub> 0.5 ml와 포화 Ba(OH)<sub>2</sub> 0.5 ml를 가해 반응을 종료시켰다. 반응액을 원심분리하여 상정액을 취하고 Nash시액 0.8 ml를 가한 후 60°C에서 30분간 발색시켜 415 nm에서 그 흡광도의 변화를 읽고 같은 방법으로 미리 검정한 검량선에 준해 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성하는 formaldehyde의량을 n mole로 표시하였다.

**UDP-glucuronyltransferase의 활성 측정**—Reinke 등<sup>17)</sup>의 방법에 준하여 0.01M phosphate 완충액(pH 7.0)에 1 mM *p*-nitrophenol, 3 mM UDPGA, 1 mM MgCl<sub>2</sub> 0.02% BSA, 0.05% Triton X-100 및 효소액(50~100 μg의 단백질)을 가하여 반응액이 1.0 ml되게 하였다. 이 반응액을 37°C에서 5분간 반응시킨 다음 0.6N HClO<sub>4</sub> 0.25 ml를 가하여 반응을 종료시키고 원심분리하여 얻은 상정액 0.5 ml에 1.6 M glycine 완충액(pH 10.3) 2.0 ml를 가하여 436 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 검량선에 준해 효소의 활성도를

산정하였다. 효소의 활성도는 분당 1 mg의 단백질이 *p*-nitrophenol을 소실시키는량을 n mole로 나타내었다.

**혈청중 aminotransferase의 활성 측정**—Reitmen과 Frankel의 방법<sup>18)</sup>에 준해 조제된 kit 시약을 사용하여 측정하였다. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) 기질액 1.0 ml에 혈청 0.2 ml를 첨가하고 37°C에서 ALT의 경우에는 30분, AST의 경우에는 60분간 반응시킨 후 정색시약 1.0 ml를 넣어 반응을 종료시키고 0.4N NaOH 10 ml를 가해 잘 섞은 다음 10분간 방치하고 505 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 검량선에 준해 활성도를 산정하였다. 활성의 단위는 혈청 ml당 Karmen unit로 표시하였다.

**혈액중 acetaminophen의 정량**—Poulsen 등<sup>19)</sup>의 방법에 준하여 측정하였다. 혈청 0.5 ml에 단백질을 침전시킬 목적으로 10% trichloroacetic acid를 넣어 원심분리한 후 얻은 상정액을 6N HCl 0.5 ml, 10% sodium nitrate 1 ml를 가하여 2분간 방치한 후 15% sulfamic acid 1 ml를 가한 후 NaOH 2.5 ml를 첨가하여 30분간 방치한 후 430 nm에서 그 흡광도를 측정하여 표준곡선에서 농도를 산출하였다. 단위는 혈청 100 ml당 mg수로 표시하였다.

**Acetaminophen에 의한 급성독성의 측정**—Saikosaponin (5 mg/kg)을 7일간 전처리한 실험군과 생리 식염수만을 주사한 대조군에 acetaminophen 600 mg/kg 복강내로 투여한 다음 14일 후에 사망률을 측정하였다.

**단백질의 정량**—단백질의 농도는 Lowry 등<sup>20)</sup>의 방법에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다. 한편 실험결과의 통계처리에는 Duncan's new multiple range test를 이용하였다.

## 실험 결과

**Saikosaponin 투여에 따른 간 UDP-glucuronyltransferase 활성변동**—Saikosaponin (5 mg/kg)의 투여기간을 달리하면서 간 UDP-glucuronyltransferase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결

과는 표 1에 나타난 바와 같다. 생리식염수를 투여한 대조군의 효소활성은  $16.1 \pm 1.03$  n moles of *p*-nitrophenol/mg protein/min이었으며 saikosaponin을 투여하면서 경시적으로 효소의 활성을 측정하였을 때 1일, 3일 및 5일 투여군에서는 각각  $15.9 \pm 0.73$ ,  $18.0 \pm 0.81$  및  $20.6 \pm 1.86$  n moles로서 대조군과 별다른 효소활성의 변동을 볼 수 없었다. 그러나 saikosaponin을 7일 및 10일 투여한 군에서는 효소의 활성이  $25.6 \pm 1.86$  및  $26.5 \pm 1.87$  n moles로서 대조군에 비해 각각 59.0 및 64.6% 정도의 유의적인 증가를 보였다. 따라서 이후의 실험에서는 saikosaponin의 투여기간을 7일간으로 정하였다. 한편 saikosaponin의 투여용량을 달리하면서 간 UDP-glucuronyltransferase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 생리 식염수만을 투여한 대조군의 활성이  $16.1 \pm 1.03$  n moles인데 비해 2.5 mg/kg 투여군에서는  $18.7 \pm$

**Table 1.** Change of the hepatic microsomal *p*-nitrophenol UDP-glucuronyltransferase (UDPG) activity in rat with the variation of treatment days and dose of saikosaponin

Treatments	UDPG activity (n moles/mg protein/min)	% of Control
Days		
0(control)	$16.1 \pm 1.03^a$	—
1	$15.9 \pm 0.73^a$	99
3	$18.0 \pm 0.81^b$	112
5	$20.6 \pm 1.86^c$	128
7	$25.6 \pm 1.86^d$	159
10	$26.5 \pm 1.87^d$	165
Dose(mg/kg)*		
0.0(control)	$16.1 \pm 1.03^e$	—
2.5	$18.7 \pm 0.77^f$	116
5.0	$25.6 \pm 1.52^g$	159
10.0	$26.4 \pm 2.38^g$	164

Six rats of each group were injected i.p. daily with saikosaponin (5 mg/kg) for 1, 3, 5, 7 or 10 days in case of days variation test and were also injected daily for seven days in case of dose variation test. \*All the animals were decapitated 24hrs after the final dosing. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means  $\pm$  S.D. (n=6), of which followed by the same superscript as control are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

0.77 n moles로 약 16% 증가를 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 그러나 5.0 mg/kg과 10.0 mg/kg 투여한 실험군에서는  $25.6 \pm 1.52$  n moles와  $26.4 \pm 2.38$  n moles로서 대조군에 비해 약 59%와 63.9%의 유의적인 증가를 관찰할 수 있었다. 따라서 이하의 실험에서는 saikosaponin을 kg당 5 mg을 투여하여 실험을 행하였다.

**Saikosaponin이 시험관내 간 UDP-glucuronyltransferase 활성 변동에 미치는 영향**—*In vitro* 실험에서 saikosaponin 투여에 의해 효소의 활성이 유의성 있게 증가됨이 관찰되었으므로 saikosaponin이 시험관내에서 간 UDP-glucuronyltransferase 활성에 어떤 영향을 주는가를 관찰한 결과는 그림 1과 같다. 여기서 알 수 있듯이 saikosaponin을  $10^{-3}$  g/ml까지 시험관내에 첨가하여도 UDP-glucuronyltransferase 활성은 대조군과 별다른 차이가 없었다.

**Saikosaponin 투여에 의한 간 UDP-glucuronyltransferase의 동력학적 특성**—Saikosaponin 투여에 의해서 UDP-glucuronyltransferase와 기질과의 반응속도가 어떻게 변화하는가를 검토한 결과는 그림 2와 같다. Saikosaponin을 투여한 실험군과 생리식염수를 주사한 대조군의 간

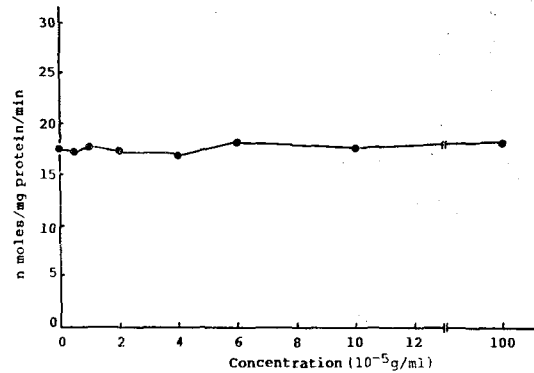


Fig. 1. Effects of saikosaponin on the hepatic microsomal *p*-nitrophenol UDP-glucuronyltransferase activity *in vitro*

The assay procedure was described in the experimental methods. Each value is the mean of four separate experiments.

으로 부터 얻은 효소원을 첨가시킨 다음 *p*-nitrophenol의 농도를 달리하면서 UNP-glucuronyltransferase의 활성을 측정하여 double reciprocal plot로 나타내었을 때 대조군의  $V_{max}$ 치는 22.2 n moles/mg protein/min인데 비해 saikosaponin 투여군의  $V_{max}$ 치는 31.3 n moles로서 약 1.3배 정도 현저히 증가됨을 관찰할 수 있었으나  $km$ 치

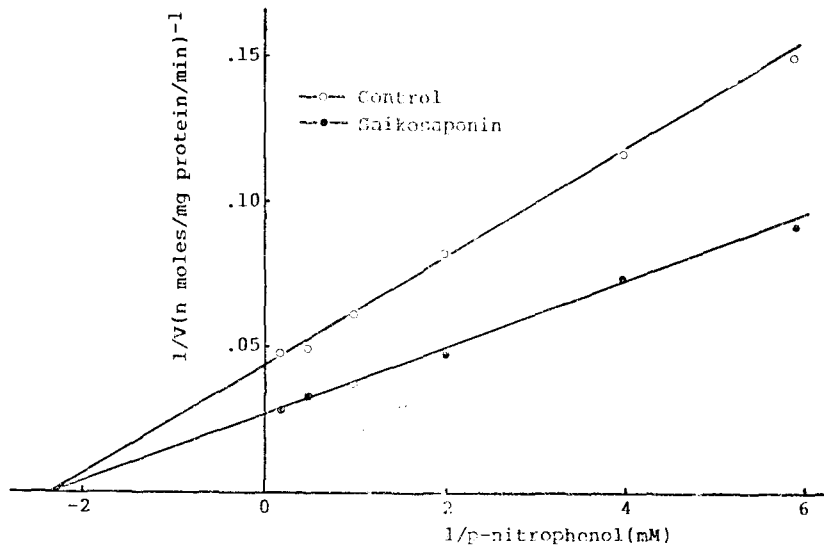


Fig. 2. Double reciprocal plots of the hepatic microsomal *p*-nitrophenol UDP-glucuronyltransferase activity as a function of *p*-nitrophenol at fixed level of UDP-glucuronic acid (3mM)

Rats were received saikosaponin (5 mg/kg) i.p. daily for seven consecutive days. The assay procedure was described in the experimental methods. Each datum represents the means for three experiments.

는 대조군이 419  $\mu\text{M}$ , saikosaponin 투여군이 415  $\mu\text{M}$ 로서 두 실험군 사이에 별다른 차이가 없음을 알 수 있었다.

**Saikosaponin a 및 saikosaponin d 투여에 의한 간 UDP-glucuronyltransferase 활성 비교**—표 I 과 그림 1에서 saikosaponin 5 mg/kg 을 7일간 투여함으로써 대조군에 비해 간 UDP-glucuronyltransferase의 활성 변동이 saikosaponin 성분 중 saikosaponin a, saikosaponin d에는 어떤 영향이 있는가를 관찰할 목적으로 실험동물에 투여한 다음 간 UDP-glucuronyltransferase의 활성변동을 비교 관찰한 결과는 표 II와 같다. 생리식염수를 투여한 대조군의 효소활성이  $16.1 \pm 1.04$  n moles of *p*-nitrophenol/mg protein/min 인데 비해 saikosaponin a의 효소 활성은  $17.5 \pm 1.19$  n moles로서 대조군에 비해 다소 증가하는 영향은 있었으나 유의성은 없었으며 saikosaponin d를 투여한 실험군에서는  $26.4 \pm 1.86$  n moles로서 saikosaponin 투여군과 유사하게 대조군에 비해 약 64%로 현저한 증가를 관찰할 수 있었다.

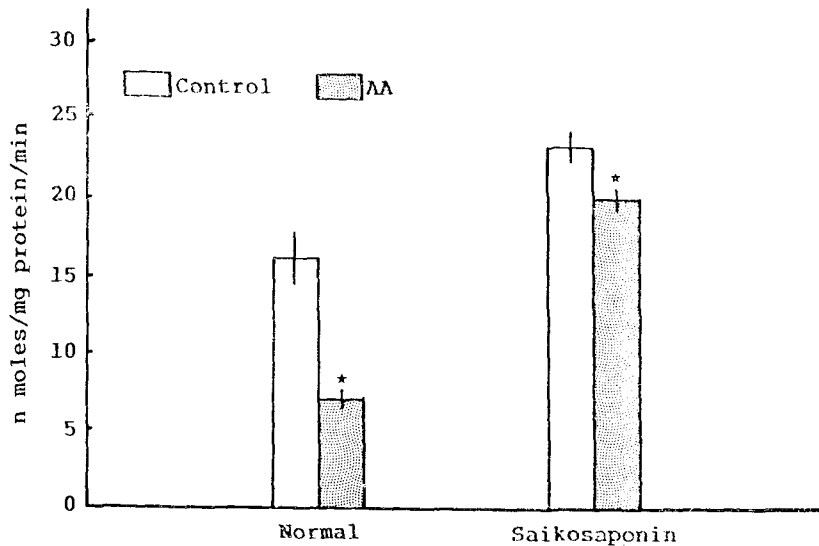
**Saikosaponin 투여가 간 aniline hydroxylase 및 aminopyrine demethylase 활성에 미치는 영향**—생리식염수를 주사한 대조군과

**Table II.** Effects of saikosaponins a and d on the hepatic microsomal *p*-aminophenol UDP-glucuronyltransferase(UDPG) activities in rats

Treatments	UDPG activity (n moles/mg protein/min)	% of Control
Control	$16.1 \pm 1.04^a$	100
Saikosaponin a	$17.5 \pm 1.19^a$	109
Saikosaponin d	$26.4 \pm 1.86^b$	164

Rats were injected samples(5 mg/kg) i.p. daily for seven days, and sacrificed 24hr after the final dose. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means  $\pm$  S.D. (n=6), of which followed by the same superscript as control are not significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

saikosaponin을 주사한 실험군에서 간 aniline hydroxylase와 aminopyrine demethylase의 활성을 비교관찰한 성적이 표 III이다. Aniline hydroxylase의 경우 대조군의 효소활성이  $0.86 \pm 0.059$  n moles *p*-nitrophenol/mg protein/min인데 비해 saikosaponin 투여군에서는  $0.87 \pm 0.061$  n moles로서 효소의 활성변동을 관찰할 수 없었다. 한편 aminopyrine demethylase의 경우도 유사한 양



**Fig. 3.** Effects of saikosaponin on the hepatic microsomal *p*-nitrophenol UDP-glucuronyltransferase activity in acetaminophen-treated rats

Rats were injected saikosaponin(5 mg/kg) i.p. daily for seven consecutive days, and were sacrificed 24hrs after the acetaminophen(AA, 400 mg/kg, p.o.) treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Each value is the mean  $\pm$  S.D. of six experiments. Significantly different from control(\*,  $p < 0.05$ ).

**Table III.** Effect of saikosaponin on the hepatic microsomal aniline hydroxylase(AH) and aminopyrine demethylase(AD) activities in rats

Treatments	AH activity* ( <i>p</i> -aminophenol n moles/mg protein/min)	AD activity* (HCHO n moles/mg protein/min)
Contol	0.86±0.059(7)	3.48±0.39(7)
Saikosaponin	0.87±0.061(8) <sup>a)</sup>	3.49±0.27(8) <sup>a)</sup>

\*; Each value is the mean±S.D. of each observation given in parenthesis. The assay procedure was described in the experimental methods.

<sup>a)</sup> non-significant from control.

상을 나타내었다.

**Acetaminophen** 투여에 의한 간 **UDP-glucuronyltransferase** 활성변동에 미치는 **saikosaponin**의 영향—생리식염수와 saikosaponin을 7일간 주사하고 acetaminophen을 복강내로 투여 하였을 때 간장중 UDP-glucuronyltransferase 활성변동을 그림 3에 나타내었다. 대조군의 효소 활성이 16.1±1.03 *p*-nitrophenol n moles/mg protein/min인데 비해 acetaminophen 투여한 실험군은 6.8±0.55 n moles로서 약 2.5배 정도 효소활성을 억제하였으나 saikosaponin을 전처리한 다음 acetaminophen을 주사한 실험군의 효소 활성은 18.6±1.49 n moles로 대조군 수준 이상으로 회복 되어짐을 볼 수 있었다.

혈중 **acetaminophen** 농도에 미치는 **saikosaponin**의 영향—Saikosaponin과 생리식염수를 전처리한 실험군과 대조군에 acetaminophen을 복강내로 1회 주사한 후 1시간이 경과된 다음 혈액중의 acetaminophen 농도를 관찰한 결과는 표 IV와 같다. 생리식염수를 투여하고 acetaminophen을 주사한 실험군의 혈중 농도는 0.34±0.042 mg/ml serum인데 비해 saikosaponin을 전처리한 실험군에서는 0.21±0.051 mg/ml로 acetaminophen의 혈중농도가 약 35%정도 감소함을 알 수 있었다.

**Saikosaponin**이 **acetaminophen** 투여에 의한 혈청 **aminotransferase** 활성에 미치는 영향—Saikosaponin을 7일간 전처리한 실험군과 생리식염수를 주사한 대조군에 acetaminophen을 복강내에 투여하여 혈청 aminotransferase 활성변

**Table IV.** Effects of saikosaponin on the acetaminophen(AA) level in acetaminophen-treated rats

Treatments <sup>a)</sup>	AA level(mg/ml serum)
Control(AA onty)	0.34±0.042
Saikosaponin+AA	0.21±0.051 <sup>b)</sup>

<sup>a)</sup> Rats were injected saikosaponin(5mg/kg) or saline i.p. daily for seven days and were sacrificed 24 hrs after the acetaminophen (400 mg/kg) treatments p.o.

<sup>b)</sup> Significantly different from control( $p < 0.05$ ).

동을 관찰한 결과는 표 V에 나타난 바와 같다. ALT의 경우 생리식염수만을 투여한 대조군이 37.05±4.57 Karmen unit인데 비해 acetaminophen을 투여한 실험군에서는 340.3±32.88 Karmen unit로 약 9배 정도의 현저한 증가를 보였으나 saikosaponin을 전처리한 다음 acetaminophen을 투여한 실험군에서는 65.1±7.17 Karmen unit로 상당히 감소됨을 볼 수 있었다. 한편 AST의 경우에도 ALT의 활성과 유사하게 acetaminophen 투여군에서 현저히 증가되었으며 saikosaponin을 전처리함으로써 대조군 수준에 가깝게 감소됨을 볼 수 있었다.

**Acetaminophen**의 급성독성에 미치는 **saikosaponin**의 영향—생리식염수를 투여한 대조군과 saikosaponin을 주사한 실험군에 acetaminophen (600 mg/kg)을 1회 복강주사하고 14일간 생쥐의 사망율을 측정된 실험결과는 표 VI에 나타난 바

**Table V.** Effect of saikosaponin on the serum aminotransferase in acetaminophen-treated rats

Treatments	Enzyme activity (Karmen unit/ml serum)	
	ALT*	AST**
Control	37.1±4.57 <sup>a)</sup>	66.0±5.75 <sup>d)</sup>
Acetaminophen	340.3±32.88 <sup>b)</sup>	164.2±7.89 <sup>e)</sup>
Saikosaponin	37.4±3.60 <sup>a)</sup>	61.8±5.03 <sup>d)</sup>
Saikosaponin+ Acetaminophen	65.1±7.17 <sup>c)</sup>	93.9±4.47 <sup>f)</sup>

Values are the means±S.D.(n=6), of which followed by the same superscript as control are not significantly different( $p < 0.05$ ). The assay procedure was described in experimental methods.

Abbreviations: \*alanine aminotransferase and \*\*aspartate transferase.

**Table VI.** Effect of saikosaponin on the mortality of mice after acetaminophen treatment

Treatment	% Mortality
Control(Acetaminophen only)	71.3±7.37
Saikosaponin+acetaminophen	39.0±3.41*

Ten mice of three observations for each group were injected saikosaponin(5 mg/kg) i.p. daily for seven days, and given acetaminophen(600 mg/kg) 24hr after the final dosing of saikosaponin. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means±S.D., the number of observation is given in parenthesis.

\*; Significantly different from control( $p < 0.05$ ).

와 같다. 생쥐 20마리를 한군으로 하여 3회 실험을 시행한 결과 생리식염수만을 주사하고 acetaminophen을 투여한 실험군의 사망율이 71.3±7.37%인데 비해 saikosaponin을 전처리하고 acetaminophen을 투여한 실험군에서는 사망율이 39.0±3.41%로 acetaminophen 단독투여군에 비해 현저한 사망율의 감소를 관찰할 수 있었다.

## II. 찰

시효의 사포닌성분인 saikosaponin의 전처리가 acetaminophen에 의해 유도된 간독성의 경감 기전에 어떻게 작용하는가를 검토하고자 본 실험을 시도하였다. 일반적으로 간장에서 일어나는 해독작용은 간세포의 smooth endoplasmic reticulum에 존재하는 대사 효소계에 의하여 무독 또는 불활성화되어 체외로 배출되는 phase I 반응과 포합반응들로 이루어지는 phase II 반응으로 나눌 수 있다.<sup>21)</sup> Phase II 반응은 phase I 반응을 거친 약물이나 내인성 및 외인성 물질에 glucuronic acid나 sulfate를 결합시키는 과정으로서 이 반응의 촉매 효소로서 UDP-glucuronyltransferase와 sulfotransferase 등을 들 수 있다.<sup>22)</sup> Saikosaponin이 UDP-glucuronyltransferase 활성에 미치는 영향을 검토하였을 때 체중 kg당 5 mg을 7일간 이상 투여한 실험군에서 유의성있는 효소활성 증가작용을 나타내었다. 이와같은 효소활성변동을 동력학적으로 검토할 목적으로 *p*-nitrophenol의 농도를 변화시켜 가면서 관찰한 실험성적에서 Km치는 대조군과 saikosaponin 투여군 사이에

별다른 차이를 관찰할 수 없었으나  $V_{max}$ 치가 1.3배 정도 현저히 증가되었다. *In vivo* 실험에 의한 saikosaponin의 UDP-glucuronyltransferase 활성 증가현상의 직접 작용 여부를 검사하기 위하여 시험관내에 saikosaponin의 농도를 점차적으로 증가시켜가면서 관찰한 *in vitro* 실험에서는 반응액 중에 첨가농도를  $10^{-3}$  g/ml로 하여도 UDP-glucuronyltransferase의 활성에는 별다른 영향을 미치지 못하였다. 이와같은 실험성적은 saikosaponin이 체내에 흡수되어 이때 생성된 대사산물이 관여하고 있을 가능성을 시사해 주고 있다.

해열 진통제로서 널리 이용되는 acetaminophen의 체내대사는 간 microsomal UDP-glucuronyltransferase와 cytosolic sulfotransferase에 의해 이루어진다.<sup>23)</sup> Acetaminophen의 독성을 유발시킬 목적으로 이 약물의 증독량을 투여하고 혈중 acetaminophen의 농도 변화를 관찰한 실험에서 생리식염수를 투여한 대조군에 비해 saikosaponin을 7일간 전처리한 군에서 acetaminophen의 체내 농도가 현저히 감소됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 앞의 실험성적과 관련지어 검토하여 볼때 acetaminophen의 유도작용에 의하여 나타나는 결과임을 추측할 수 있다. 그러므로 phase I 반응의 대표적인 효소인 aniline hydroxylase와 aminopyrine demethylase의 활성 변화를 관찰한 실험에서 saikosaponin 투여가 별다른 활성변화를 나타내지 않았으므로 saikosaponin이 이와같은 과정에 관여하여 acetaminophen이 유도하는 간독성에 예방효과를 나타낸 것이라고는 생각할 수 없었다.

한편 간기능 검사의 지표로 많이 이용되는 ALT와 AST<sup>24)</sup>의 활성 변동에서도 acetaminophen에 의해 현저히 증가되던 aminotransferase의 활성증가가 saikosaponin의 투여로 정상수준에 가깝게 개선되어짐을 볼 수 있었다. 급성독성 시험에서 증독량의 acetaminophen을 단독투여할 경우 71.3%의 사망률을 보인데 반해 saikosaponin과 병용투여시에는 39.0%로 낮아져 독성을 크게 경감시킴을 알 수 있다.

이상과 같은 saikosaponin의 투여에 의한 포합 효소중 UDP-glucuronyltransferase의 활성증가의

활성물질을 관찰할 목적으로 saikosaponin<sup>7)</sup>중 saikosaponin a, saikosaponin d를 투여하여 관찰한 실험 성적에서 saikosaponin a는 UDP-glucuronyltransferase 활성에 영향을 주지 않았으나 saikosaponin d는 효소활성을 유의성 있게 증가시키는 점으로 보아 saikosaponin에 의한 본 효소의 유도작용은 saikosaponin d에 의해 나타날 것으로 생각되며 이러한 결과는 시호성분 중 활성을 나타내는 물질은 saikosaponin이며 이중 saikosaponin a와 saikosaponin d가 주작용을 하고 있으며 saikosaponin d가 작용이 더 강하게 나타난다는 결과를 뒷받침하는 것으로 생각된다. 따라서 saikosaponin 투여시 포함반응 촉매 효소 활성 증가작용은 acetaminophen 등의 독성물질을 해독하는데 관여할 것으로 생각되어지며 이와같은 acetaminophen의 간해독 효과는 saikosaponin의 성분 중 saikosaponin d도 관여하고 있을 가능성을 시사하고 있다. 실험동물의 간 UDP-glucuronyltransferase의 활성증가 작용기전은 saikosaponin과 saikosaponin d의 직접 작용이라기 보다는 이들의 대사산물에 의하여 나타날 것으로 생각되어지며 이와같은 작용은 생체 방어 작용에 기여하는 해독 작용에 영향을 미칠 것으로 추측되며 한약과 신약의 동시 처방 조제의 임상적인 응용을 설명하는 기초자료가 될 것으로 사료된다.

## 결 론

Saikosaponin의 해독기전을 추구할 목적으로 phase I에 관여하는 효소인 aniline hydroxylase와 aminopyrine demethylase, 그리고 phase II에 관여하는 UDP-glucuronyltransferase의 활성에 어떤 영향을 주는가를 검토하는 한편 acetaminophen의 중독량을 투여한 실험동물에서 saikosaponin의 작용을 생화학적 및 형태학적 측면에서 비교 관찰하여 다음과 같은 실험결과를 얻었다. Saikosaponin의 투여로 aniline hydroxylase와 aminopyrine demethylase의 활성에는 영향을 미치지 않았다. 반응용량시험과 투여기간에 따른 결과에 따른 기초적 실험에서 saikosaponin을 7일간 투여하였을 때 UDP-glucuronyltransferase의

활성이 유의성 있게 증가되었다.

Saikosaponin을 전처리한 실험군에서 acetaminophen에 의한 치사율이 감소되었으며 간기능의 생화학적 검사에서는 saikosaponin을 전처리함으로써 acetaminophen에 의한 간손상이 저지되었다. Saikosaponin d를 투여하고 관찰한 실험에서도 UDP-glucuronyltransferase 활성이 증가되었다. 이상의 실험결과로서 saikosaponin 투여에 의한 UDP-glucuronyltransferase 활성 증가에 의하여 acetaminophen의 대사를 촉진시킴으로서 acetaminophen에 의해 유도되는 간손상을 예방할 것으로 사료되며 이와 같은 효과는 saikosaponin중 saikosaponin d가 주작용을 하는 것으로 생각된다.

(1993년 2월 10일 접수 : 2월 24일 수리)

## 참 고 문 헌

1. 江蘇新醫學院：中藥大事典，上海科學技術出版社，下冊，pp.1832-1837(1978).
2. 임금철：동양의약총서 5, 인준사, p.42(1990).
3. Kubota, T., Tonami, T. and Hinoh, H.: *Tetrahedron Lett.* 3333(1967).
4. Kubota, T. and Hinoh, H.: *Tetrahedron Lett.* 303(1968).
5. Shibata, M.: *Yakugaku Zasshi* 90, 398(1970).
6. Yokoyama, H., Hiai, S. and Oura, H.: *Chem. Pharm. Bull.* 29, 555(1981).
7. Abe, H., Kenishi, H., Komiya, H. and Arichi, S.: *Planta Medica* 42, 356(1981).
8. Abe, H., Saikaguchi, M., Odashima, S. and Arichi, S.: *Arch. Pharmacol.* 320, 66(1982).
9. Takagi, K. and Shibata, M.: *Yakugaku Zasshi* 89, 712(1969).
10. Mizushima, Y., Sakai, S. and Yamamura, M.: *Biochem. Pharmacol.* 19, 227(1970).
11. Shibata, M., Yoshida, R., Motohashi, S. and Fukushima, M.: *Yakugaku Zasshi* 93, 1660(1973).
12. Arichi, S., Konishi, H. and Abe, H.: *Acta Hepat. Jpn.* 19, 430(1978).
13. Michell, J.R., Thorgeirsson, S.S., Jollow, D.J. and Kaiser, H.: *Clin. Pharmac. Ther.* 16, 676(1974).



14. Fischer, L.J., Green, M.D. and Harman, A.W.: *J. Pharm. Exp. Ther.* 29, 281(1981).
15. Bidlack, W.R. and Lowery, D.L.: *Biochem. Pharmacol.* 31, 311(1982).
16. Nash, T.: *J. Biol. Chem.* 55, 416(1953).
17. Reinke, L.A., Moyer, M.J. and Notley, K.A.: *Biochem. Pharmacol.* 35, 439(1986).
18. Reitman, S. and Frankel, S.: *Pathol.* 28, 58 (1957).
19. Poulsen, H.E., Lerche, A. and Pedersen, N.T.: *Biochem. Pharmacol.* 34, 727(1985).
20. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265(1951).
21. Cronic, T. and Williams, G.M.: *Biochem. Pharmacol.* 34, 3029(1985).
22. Tukey, R.H. and Tephly, T.R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 565(1981).
23. Amouyal, G., Lary, D., Lotteron, P., Geneve, J., Labbe, G., Belghiti, J. and Pessähre, D.: *Biochem. Pharmacol.* 36, 2349(1987).
24. Linscheer, W.C., Raheja, K.L., Cho, C. and Smith, N.J.: *Gastroenterology* 78, 100(1980).