

천련자(川楝子) 추출물이 肝機能에 미치는 影響(I)

—천련자의 분획이 약물대사효소계 및 담즙분비에 미치는 영향—

金 富 生·崔 鐘 元·李 晶 揆

慶星大學校 藥學大學

The Effects of *Meliae toosendan Fructus* on Liver Function (I)

—Effects of Each Fractions from *Meliae toosendan Fructus* on Drug Metabolism Enzyme System and Bile Secretion—

Busaeng Kim, Jong-Won Choi and Chung Kyu Lee

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

Abstract—*Meliae toosendan Fructus* is the fruit of *Melia toosendan* SIEB. et Zucc. (Meliaceae), which is written in oriental terminology as clearing heat and drying dampness, and also explained using liver, stomach and small intestine for channels entered. Among the five fractions prepared from methanol whole extractive of the herb, the chloroform fraction which suggests the presence of triterpenoid, flavonoid and alkaloid stimulated the activities of drug metabolizing enzymes and bile secretion and lowered the serum transaminase activities of liver damaged by carbon tetrachloride.

Keywords—*Meliae toosendan Fructus* · *Melia toosendan* · Meliaceae · liver protective activity

천련자(川楝子 *Meliae toosendan Fructus*)는 천련 *Melia toosendan* SIEB. et Zucc. (*M. azedarach* var. *toosendan*, 멸구슬나무과 Meliaceae)의 果實로서 長圓形 혹은 近球形, 길이 1.5~2 cm, 직경 1.7~2.3 cm의 核果이며 황색 또는 밤색으로 익는다. 內果皮는 견고한 木質이며 보통 6~8개의 큰 홈이 있다. 종자는 편평하며 길이 약 1 cm로 흑색이고 지방을 많이 함유한다. 금영자(金鈴子) 등의 별명이 있다.^{1,2)}

韓方의 효능은 肝機能 혹은 肝과 胃의 기능부조로 인한 腹痛 및 疝痛등에 玄胡索과 함께 사용된다(用于肝氣郁滯 或 肝胃不和所致的 脇肋腕腹疼痛·常如延胡索同用, 如金鈴子散—「本經」).³⁾

成分 및 生理活性에 관한 연구로는 최근에

limonoid인 toosendanin(=chuanliansu)을 비롯한 수종의 triterpenoid성분, 즉 melianone, melianol 및 lipomelianol 등이 분리된 것이 전부이고⁴⁾ 근연생약인 고련자 혹은 고련피에 비해 연구보고가 거의 없는 편이다.^{5~10)}

따라서 천련자의 생리활성과 그 유효성분을 밝히기 위해 천련자의 메탄올 총추출물로 부터 분획을 얻고 이를 대상으로하여 肝機能 및 膽機能에 미치는 영향을 검색하였으므로 그 결과를 보고한다.

實 驗

재료—본실험에 사용된 천련자는 시중 한약제

전문점을 통하여 구입된 중국산으로 감별, 확인 후 사용하였다.

시약—추출용매는 모두 1급품을 사용하였으며 정색시약과 동물실험에 사용된 것은 모두 실험 목적에 합당한 규격품을 사용하였다.

실험동물—실험동물은 일주일이상 실험실의 환경에 적응시킨 건강한 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐 (170~210 g)와 ICR계 혹은 dd계 웅성 생쥐 (18~22 g)를 사용하였다.

분획의 제조—종자를 제거한 천련자가루(3.7 kg)를 95% 메탄올에 담구어 초음파세척기로 4회 추출한 후 감압농축하여 메탄올 총추출물을 얻었다(642 g). 이 총추출물을 다시 99.5% 메탄올에 녹여 불용성의 당류 및 무기물을 여과하여 제거하고 여액을 농축하여 메탄올추출물을 얻었다(358 g). 이 메탄올추출물의 일부(310 g)를 취하여 물에 현탁한 후 *n*-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 용매로 하여 극성의 차이를 이용한 4종의 분획을 얻은 다음, 마지막 수층은 감압농축한 후 다시 메탄올 가용분과 불용분으로 나눔으로써 모두 6종의 분획을 얻었다. 이상의 각 분획에 대해서 알칼로이드, 플라보노이드 및 triterpenoid류의 존재를 확인하기 위하여 Dragendorff 정색반응, Mg-HCl 반응 및 Liebermann-Burchard반응 등으로 예비검색을 실시하였다.

투여액의 조제—경구투여용 사염화탄소액은 4 ml의 CCl₄를 식물유에 용해하여 정확하게 100 ml가 되도록 하여 체중 20 g당 1 ml를 투여하면 0.2 ml CCl₄/kg의 비율이 되게 조제하였으며, 시료액은 5% Tween 80용액에 현탁하여 0.4 ml/20 g(표시 mg/kg body weight)의 비율로 경구투여 하였는데 최고투여량은 급성독성 시험에서 얻은 LD₅₀치의 1/2량이 넘지 않도록 하였다.

급성독성 측정—얻어진 분획의 동물실험용량을 정하고 메탄올 총추출물과 각 분획의 대체적인 독성을 알아보기 위하여 Behrens-Kärber법에 따라 50% 치사량(LD₅₀)을 측정하였다.

In vivo 간기능 측정—천련자의 추출물이나 분획이 간기능의 저하 혹은 손상에 어떤 효능을 미치는가를 알기 위하여 Scheme I과 같은 전처리 과정¹¹⁾을 거친 실험동물을 대상으로 hexobarbital에 의한 수면시간의 변화, strychnine에 의한 사망을 측정 및 간기능의 변화를 나타내는 transaminase 효소들의 활성을 측정하였다. 한편 담즙분비량의 측정실험에서는 전처리하지 않은 정상 흰쥐를 하루동안 물만 공급하고 절식시킨 후 담관내에 직접 가는 튜브를 삽입하여 측정하였다.

1) Hexobarbital 수면시간 측정—간기능에 미치는 효과를 검정하기 위한 첫 단계로서 약물 대사효소계에 미치는 효과를 hexobarbital 수면시간을 지표로 하여 측정하였다.¹²⁾ 즉 각군 7마리의 생쥐를 Scheme I과 같이 전처리하고 최종처리 24시간 후에 70 mg/kg의 hexobarbital-Na를 복강주사 하여 수면시간을 측정하였다. 수면시간은 hexobarbital을 주사한 시간부터 정향반사의 회복시간까지로 하였다.

2) Strychnine 사망을 측정—약물대사효소계에 미치는 보다 직접적인 영향을 관찰하기 위하여 Scheme I과 같이 전처리한 실험동물의 strychnine 사망을 측정하였다.¹²⁾ 즉, 최종처리 24시간 후에 50%의 사망율을 보이는 strychnine용액(20마리중 10마리의 생쥐가 사망하는 용량, 이 실험에서는 strychnine nitrate 1.2 mg/kg, i.p.)을 투여하고 30분이내에 사망하는 동물의 수를 세었다.

3) 담즙분비량 측정—담즙분비량의 측정방법

Scheme I. Time schedule for pretreatments to determine the liver function*

Exp. groups	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
Normal control	vehicle	vehicle	vehicle	vehicle
CCl ₄ control	vehicle	CCl ₄	CCl ₄	vehicle
Sample treated	sample	sample+CCl ₄	sample+CCl ₄	vehicle

* All treatments were carried out orally. In case of sample treated group, carbon tetrachloride was administered 30 mins after the sample dosing(days 2 and 3).

은 Sudoh 등의 방법을 수정한 Lee 등의 방법¹³⁾을 이용하였다. 즉 각군 5마리의 흰쥐에게 하루 동안 물만 자유로이 공급하고 절식시키고 다음날 오전 10시경 1시간 동안 사료를 공급한 후 다시 한 시간 후 사료를 1회 경구투여하고 90분 후 20% urethane 용액 1 ml(1 g/kg)를 피하주사하여 마취시켰다. 실험동물을 고정대에 고정된 후 개복하고 십이지장으로 부터 총담관내에 외경 1.2 mm의 teflon 관을 삽입하여 결찰한 후 30분 간 조용히 실내온도를 20°C로 유지하면서 안정시킨 후 첫 분비량을 측정하고 이후 30분 간격으로 3시간동안 총 7회 분비량을 측정하여 그 평균치를 비교하였다. 동시에 대표적인 담즙분비 촉진제인 phenobarbital을 비교약물로 사용하였다.

4) 혈중 transaminase활성 측정—혈중 GOT 및 GPT활성에 미치는 효과를 Kessler 등의 방법¹⁴⁾에 따라 실시하였다. 즉, 각군 5마리의 흰쥐를 Scheme I과 같이 전처리하고 5일째 채혈하여 얻은 혈청을 GOT 및 GPT-kit (AM 101-K, Asan)로 555 nm에서 비색정량 하였다.

結果 및 考察

급성독성(LD₅₀)—천련자추출물과 각 분획의 경구투여시의 대체적인 독성과 실험용량의 안전한 산정을 위해 실시한 급성독성시험에 의한 50% 치사량(LD₅₀)의 결과는 Table I과 같다. 결과에 의하면 hexane 분획을 제외하고는 LD₅₀

Table I. Acute toxicities of each fractions from methanol whole extract of the fruit of *Melia toosendan* expressed by 50% lethal dose

Fractions	LD ₅₀ (g/kg)*
Methanol Extract	0.82
Hexane Fraction	0.37
Chloroform Fraction	1.52
Ethyl acetate Fraction	0.68
Butanol Fraction	0.78
Water Fraction	1.67

* LD₅₀ Values were obtained from 10 mice in each group, p.o., by Behrens-Kärber method.

치가 700 mg/kg 이상으로 독성은 매우 약한 편으로 나타났다. 그러나 hexane 분획은 훨씬 낮은 0.37 g/kg이며 액체상태라는 점을 감안하면 종자로 부터 독성이 강한 지방유성분이 혼입된 것으로 생각되며 이 독성성분에 관하여서는 추후 보다 깊은 검토가 필요한 것으로 판단된다. 이 결과를 토대로 이후의 각 실험에서는 경구투여시의 실험용량을 LD₅₀치의 1/2 이내가 되도록 하였다.

In vivo 간기능에 미치는 영향—간기능을 측정하기 위해서는 흔히 약물대사효소계의 활성 측정¹⁵⁾, 지질 과산화물 생성 측정¹⁶⁾, 혈중 효소류의 측정¹⁷⁾, 담즙분비량 측정¹⁸⁾ 및 간조직검사¹⁹⁾ 등의 방법이 이용된다. 본 연구에서 천련자추출물의 약물대사효소계의 활성에 미치는 영향은 생쥐를 Scheme I과 같이 전처리한 후 hexobarbital에 의한 수면시간과 strychnine에 의한 사망율을 지표로 하였고, 전처리과정을 거치지 않은 정상 흰쥐에 있어서의 담즙분비량의 변화를 측정하였다. 이들 결과를 참고하여 유효한 분획을 대상으로 혈중 효소류의 활성에 미치는 영향을 GOT 및 GPT의 활성변화를 지표로 하여 검토하였다.

1) 간 약물대사효소계에 미치는 영향—Hexobarbital과 strychnine은 간 약물대사효소계의 mixed function oxidase계에서 대사되므로 이들 약물의 체내 지속시간은 약물대사효소계의 기능, 나아가 간기능의 강약을 측정하는 지표가 된다. 천련자 추출물에 의한 hexobarbital 수면시간과 strychnine 사망율에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table II에 나타난 바와 같다. 즉 수면시간 측정에 있어서 정상동물의 경우 70 mg/kg의 hexobarbital-Na에 의해 63분 정도의 수면시간을 나타내고 사염화탄소로 간 기능이 손상된 경우 (CCl₄ challenged group)는 약물대사시간이 크게 지연되어(148분, 234.7%), 130% 이상의 증가를 보인 것은 일단 간기능의 훼손에 의한 약물대사효소계의 약화를 의미하므로 negative control로서 인정할 수 있었다. 이러한 조건에서 시료처리군, 즉 각각 400 및 700 mg/kg의 메탄올추출물과 클로로포름 분획을 경구투여한 그룹의 수면시간은 각각 103.2 및 87.5분으로 정상대조

Table II. Effects of each fractions from methanol whole extract of the fruit of *Melia toosendan* on hexobarbital(HB)—induced hypnosis and strychnine mortality in mice treated as time schedule

Treatments	Dose (mg/kg, p.o.)	HB hypnosis ¹⁾		Strychnine ²⁾ mortality
		Mean±S.E.	Ratio(%) ³⁾	
Control	—	63.2± 5.8	—	5/10
CCl ₄ challenged	—	148.3±22.3	234.7	10/10
Methanol extract	400	103.2± 8.5	163.3	7/10
Hexane fraction	150	200.8±24.2	317.7	9/10
Chloroform fraction	700	87.5±10.3	138.4	6/10
Ethyl acetate fraction	300	158.3±10.7	250.5	8/10
Butanol fraction	350	150.7±13.5	238.4	10/10
Water fraction	800	140.2±12.1	221.8	8/10

1) Expressed as mean sleeping time in minutes±standard error of seven mice.

2) Strychnine dosage was made to adjust 50% mortality in normal control group(Strychnine · NO₃ 1.2 mg/kg, i.p.).

3) Expressed as % of control and significance by Student-t test,

* p<0.01 and ** p<0.05.

군(63.2분)보다는 연장되었으나 사염화탄소 투여군의 경우보다 단축되어 회복의 경향을 인정할 수 있었으나 정상상태까지 완전히 회복시키지는 않았다. 그의 분획을 투여한 군에서는 오히려 수면시간을 증가시킴으로써 약물대사효소계를 억제하는 효과만을 보였다. 이러한 결과가 효소억제현상²⁰⁾에 기인한 것인지 아니면 오히려 간독성을 유발한 것인지는 보다 정밀한 실험을 거쳐 구명해야 할 것으로 판단된다.

한편 보다 직접적인 간기능의 변화를 나타낼 수 있는 strychnine에 의한 사망율에 미치는 영향을 검토하는 실험에서도 메탄올 추출물을 비롯한 대부분의 분획의 투여군이 사염화탄소 처리군보다는 사망율(10/10)을 감소시켰으나 정상대조군보다는 훨씬 증가하여 독성의 발현여부를 의심케 한다.

다만 hexobarbital 수면시간 및 strychnine 사망율의 변화 실험 모두에서 클로로포름분획 투여군이 대조군에 가까이 회복시킨 점은 앞의 급성독성 실험의 결과(LD₅₀=1.52 g/kg)와 부합되는 유효분획으로 간주할 수 있었다.

2) 담즙분비에 미치는 영향—천련자의 각 분획을 대상으로 담즙분비에 미치는 영향을 검토한 실험 결과는 Table III에서 보는 바와 같이 3시간동안 총 7회에 걸쳐 측정된 분비량의 평균

Table III. Effects of each fractions from methanol whole extract of the fruit of *Melia toosendan* on bile secretion in normal rats

Treatments ¹⁾	Dose (mg/kg, p.o.)	Bile juice amount ²⁾ (mg/30 mins)	% of Control
Control	—	307± 54	—
Phenobarbital	50	445±115	145.0
Methanol extract	400	389± 90	126.7
Hexane fraction	150	315±127	102.6
Chloroform fraction	700	380± 87	123.8
Ethyl acetate fraction	300	335±102	109.1
Butanol fraction	350	317± 85	103.3
Water fraction	800	403±121	131.3

1) Samples were administered single to fasted rats.

2) Expressed as means±S.E. obtained for every 30 mins during 3 hrs after treatments.

Significance by Student-t test as * p<0.01 and ** p<0.05.

치로 비교해 볼 때 대표적인 담즙분비 촉진제인 phenobarbital을 50 mg/kg 투여한 군의 분비량은 445 mg으로 대조군보다 45%의 증가를 나타내었고 메탄올 추출물과 클로로포름 분획은 사용농도에서 20%이상의 유의적인 증가현상을 나타내었다. 이것은 앞의 약물대사효소계 활성측정 실험에서 나타난 결과와 더불어 천련자성분의 간기

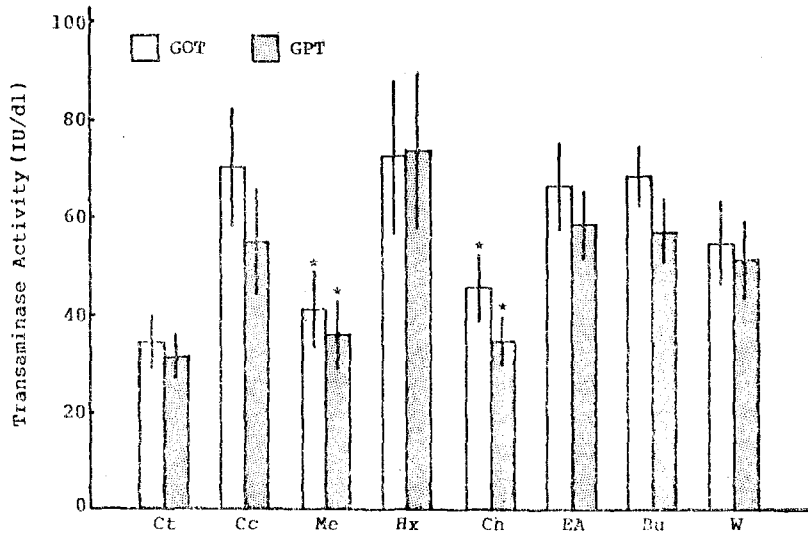


Fig. 1. Effects of each fraction from *Meliae toosendan* Fructus on serum transaminase activity in rats treated as time schedule

Ct, normal control group; Cc, carbon tetrachloride challenged group; Me, methanol extract; Hx, hexane fraction; Ch, chloroform fraction; EA, ethyl acetate fraction; Bu, butanol fraction and W, water fraction. The fractionation procedure is described in experimental methods. Significance; * $p < 0.05$.

능보호 기능을 짐작케 한다. 다만 이들 투여물의 담즙분비 증가현상이 담즙산 의존성인지 아니면 phenobarbital과 같은 비의존성²¹⁾인지의 여부는 계속 구명되어야 할 것이다.

한편 이와 같은 담즙분비 증가현상과 앞서의 약물대사효소계의 활성회복 결과를 근거로하여 클로로포름 분획을 유효분획으로 판단하고 유효성분을 분리하고자 칼럼 크로마토그래피법에 의한 성분분리를 실시중이다.

3) 혈중 transaminase의 활성에 미치는 영향—간기능의 정상여부를 확인하는 가장 간편하며 확실한 요소가 되는 혈중 transaminase 활성 측정실험에서는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 정상군의 경우 GOT 및 GPT가 각각 34 및 32 IU/dl인데 반해 사염화탄소 처치군은 각각 70 및 55 IU/dl로 나타나서 사염화탄소 처치에 의한 간 손상 상태가 확실하게 나타났다. 이런 상태의 실험동물에 메탄올 추출물과 약물대사효소계 실험에서 유효한 것으로 판명된 클로로포름 분획을 투여할 경우 GOT치는 각각 45 IU내외, 그리고 GPT치는 35 IU내외이며 통계적으로 유의한 ($p < 0.01$) 것으로 나타나서 사염화탄소에 의한 간 손상을 상당히 회복시켰음을 알 수 있다.

結 論

한방에서 간기능 보호약으로 사용되는 천련자의 함유성분을 구명하고 효능을 검정하기 위한 연구의 일환으로 메탄올 추출물 및 6종의 분획을 얻어 사염화탄소로 손상된 생쥐 및 흰쥐의 간기능회복정도 및 정상 흰쥐의 담즙분비에 미치는 영향을 검토한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다

1. 천련자의 메탄올 추출물과 클로로포름 분획은 hexobarbital 수면시간 및 strychnine 사망율을 지표로 실시한 실험에 의해 간약물대사효소계의 활성과 담즙의 분비율 유의적으로 증가시키며 사염화탄소중독으로 증가된 혈중 transaminase의 활성을 정상치에 가깝도록 저하시켰다.
2. 유효분획으로 판명된 클로로포름분획에는 알칼로이드, 트리테르페노이드 및 플라보노이드 성분이 함유되어 있다.

(1993년 2월 10일 접수 : 2월 24일 수리)

參 考 文 獻

- 1) 中國醫學科學院 藥物研究所等編 : 中藥誌, 第3册,

- 第2版, 人民衛生出版社, 北京, pp. 162-167 (1961).
- 2) 江蘇新醫學院編: 中藥大辭典, 上册, 第1版, 上海科學技術出版社, pp. 232-234 (1977).
 - 3) 高木敬之郎: 和漢藥物學, 第1版, 廣川書店, 東京 pp. 275-276 (1982).
 - 4) Nakanishi, T., Inada, A. and Lavie, D.: *Chem. Pharm. Bull.* 34, 100(1986).
 - 5) 周風梧: 中藥學, 上册, 第1版, 山東中醫學院, pp. 188-189 (1989).
 - 6) Kraus, W.: Biological active compounds from Meliaceae, in *Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products*, Proc. 2nd Int. Conf., Budapest, pp. 331-345 (1983).
 - 7) Duke, J.A.: *Handbook of Medicinal Herbs*, CRC Press, USA, pp. 303-304 (1985).
 - 8) Srivastava, S.D.: *J. Nat. Prod.* 49, 56(1986).
 - 9) Marco, J.A., Barbera, O., Sanz, J.F. and Paradera, J.S.: *J. Nat. Prod.* 49, 170(1986).
 - 10) Siddiqui, S., Siddiqui, B.S., Faizi, S. and Mahmood, T.: *J. Nat. Prod.* 51, 30(1988).
 - 11) Chang, I.-M., Ryu, J.C., Park, Y.C., Yun (Choi), H.S. and Yang, K.H.: *Drug and Chem. Toxicol.* 6, 443(1983).
 - 12) Woo, W.S., Shin, K.H., Kim, I.C. and Lee, C.K.: *Arch. Pharm. Res.* 1, 13(1978).
 - 13) Lee, E.B. and Han, Y.N.: *Kor. J. Pharmacogn.* 17, 292(1986).
 - 14) Kessler, G., Russek, R., Leon, L., Delea, A. and Cupiola, R.: *Technicon. Int. Congr. I*, 67(1970).
 - 15) Sudoh, A., Yusana, S., Umezū, K. and Saitoh, T.: *Folia Pharmacol. Japon* 87, 265(1986).
 - 16) Gallagher, C.H.: *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 40, 241(1961).
 - 17) Reitman, S. and Frankel, S.: *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56(1957).
 - 18) Recknagel, R.O.: *Pharmacol. Rev.* 19, 145(1967).
 - 19) Conney, A.H.: *Pharmacol. Rev.* 19, 317(1967).
 - 20) Simon, F.R., Sutherland, E. and Accatino, L.: *J. Clin. Invest.* 59, 849(1977).