

황금(*Scutellariae Radix*)의 에타놀추출물과 플라보노이드 성분들의 독성평가

정종평¹ · 구 영¹ · 배기환²

¹서울대학교 치과대학 치주과학교실

²충남대학교 약학대학

I. 서 론

치주질환의 진행에 가장 중요한 요소는 구강의 주위 환경변화, 국소침착 치태 및 세균의 증가 그리고 신체의 방어기전의 변화등을 들 수 있겠다. 이러한 요소들의 변화는 독자적으로 일어나는 것이 아니고 서로 연관되어 나타나는 것이라고 볼 수 있다. 이중 국소인자로서 치은연하 치태세균의 증가 중 특히 혐기성 세균 및 이들에 의한 독소의 국소 분비는 조직의 여러 세포에 대한 면역반응을 유발하고 따라서 조직의 산물인 cytokine의 생산 및 염증유발 국소인자의 생산을 지시하게 된다고 본다. 이러한 조직의 염증반응은 한편으로는 조직파괴를 촉진하고, 국소적으로는 치주인대의 파괴, 치조골의 흡수를 유발하게 되고 이렇게 파괴된 조직내부는 2차적인 섬유화 현상을 유발하게 된다. 이중 염증반응과 관련되어 생산되는 cytokine으로는 IL-1 β 가 있으며 세포의 염증산물로 생산되는 물질로는 PGE₂를 들 수 있겠다. 이 두 물질은 상호 연관되어 생산을 자극하거나 증강시키며 염증의 중요인자로 존재하게 된다^{1,2,3)}.

최근 연구에 의하면 이 두 물질과 관련되어 치주조직파괴에 직접적으로 관련되어 있는 물질로는 collagenase를 들 수 있다. 치주조직

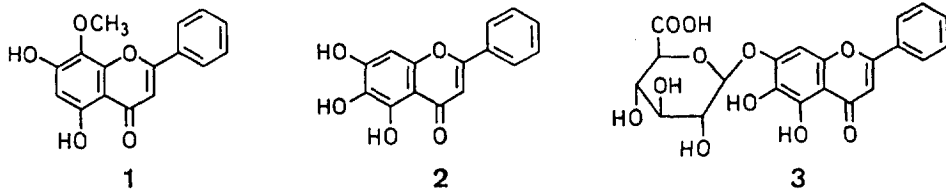
파괴와 직접적으로 관련된 collagenase는 다형 핵백혈구에서 생산되는 것과 섬유아세포에서 생산되는 것으로 구분되고 있다. 이 collagenase의 생산은 IL-1 β , PDGF-BB 및 TGF- β 에 의하여 직·간접적으로 조절되고 있음이 밝혀졌다^{4,5)}. 따라서 이러한 염증의 진행과 관련된 인자들의 활동차단이 치주질환의 진행에 직접적으로 영향을 주게 되는 것은 명확한 사실이라고 보겠다. 이러한 염증 진행인자의 생산억제제로는 스테로이드성 및 비스테로이드성 항염제가 현재까지 가장 많이 쓰이고 있으며 tetracycline 또한 collagenase의 활동억제에 탁월한 효과를 보임으로서 치주조직파괴, 염증진행의 차단제로 tetracycline을 선호하고 있다^{6,7)}. 그러나 이러한 염증치료제 및 예방제의 효과는 전신적인 투여에 따르는 효과와 더불어 장기투여시의 후유증을 유발하는 예가 나타나고 있다. 최근 생약에서의 항염 물질추출 연구가 활발히 진행되어 왔으며 이중 *Scutellaria baicalensis*에 대한 효과를 연구한 결과가 보고되고 있다^{8,9,10)}. 이 황금(*Scutellariae Radix*)의 에타놀추출물의 항염효과는 이 물질의 PGE₂ 및 collagenase에 대한 활동차단 효과로 나타나고 있으며 이러한 효과는 실험관 실험을 통하여 우수하다고 판정되고 있다^{11,12,13)}. 그러나 황금(*Scutellariae Radix*)의 에타놀추출물의 독성에

* 본 논문은 한국학술진흥재단 연구비(1993. No. 62) 지원에 의하여 이루어짐.

대한 연구는 미진하며 전래의 용법에 의한 사용에서 독성에 관한 문헌보고는 없는 형편이다. 따라서 보다 과학적으로 이러한 독성검사를 실시하고자 이들 약물을 각각 급성 구강독성 실험, 급성 정주독성실험, 14일 급식시험 및 점막자극성시험을 실시하였다.

II. 연구재료 및 방법

본 실험의 연구방법은 Becci¹⁴⁾ 등이 연구한 단기독성 연구방법과 Kim¹⁵⁾의 연구방법을 따라 실시하였다. 본 실험에 사용된 *Scutellariae Radix*의 에타놀추출물인 Wogonin(1), Baicalein(2) 및 Baicalin(3)의 화학구조식은 다음과 같다.



실시하였다.

나) 급성 정주 독성실험 (acute intravenous toxicity test)

백서를 각 군당 자·웅 5마리씩을 10마리 사용하였다. 총군을 5개군으로 나누었으며 각 군당 각기 다른 약물을 투여하도록 하였다. 투여 약물의 농도는 3단계로 나누어 증류수에 부유시켜 만들어 20 μ m 를 정맥주사로 투여를 실시하였다. 정맥주사 투여후 15일간 관찰하였으며 체중 측정은 투여 1일과 15일에 그리고 사망시에 측정하였으며 사망한 동물은 부검하고 장기에 대한 조직병리학적 검색을 실시하였다. 또한 15일된 실험군도 희생하여 부검하였다.

다) 14일 급식시험 (14 days feeding study)

백서를 각 군당 자·웅 5마리씩 10마리로서 실험을 실시하였고 백서의 연령은 6주된 것을 사용하였다. 실험군은 각각 5군으로 나누어 각 약물당 3가지의 다양한 농도로 하여 50mg

가) 급성 구강독성실험 (acute oral toxicity test)

Sprague-Dawley계의 백서(약 200g)을 사용하였다. 자·웅 각 5마리씩 10마리를 1개군으로 하여 5군으로 나누었다. 제 1군은 DMSO(0.5%) 투여군, 제2군은 *Scutellariae Radix*의 EtOH ex. 투여군 제3군은 Wogonin 투여군, 제4군은 Baicalein 투여군, 제5군은 Baicalin 투여군으로 나누었으며 약물의 농도는 각각의 약물당 3단계로 나누어 50mg/ml, 100mg/ml, 200mg/ml를 증류수에 suspension을 만들어 1ml을 투여하였다. 구강내로 투여 후 15일간 관찰하였으며 체중 측정은 투여 1일과 15일에 그리고 사망시에 측정하였으며 사망한 동물은 부검하고 장기에 대한 조직병리학적 검색을

/ml, 100mg/ml, 200mg/ml 사료와 혼합 공급하고 동물의 행동을 관찰하였다. 14일 급식동안 증독증상 여부를 계속 관찰하였고 체중과 1일 섭취량 등을 매일 측정하였다. 14일째 모든 실험 동물을 희생시켜 부검하여 장기에 대한 조직병리학적 검사를 실시하였다.

라) 점막 자극성 시험 (mucouse membrane irritation studies)

성숙한 Hamster의 협낭을 실험부위로 하였다. 자·웅 5마리씩 10마리를 실험에 사용하였고 3가지 단계로 희석한 약물 0.5ml을 협낭에 도포하였다. 도포는 1일 1회씩 5일간 시행하였으며 대조군과 비교 관찰하였다. 관찰은 매일 처치전 협낭 점막의 erythema, edema, petechia, tissue damage등을 관찰하였다. 체중은 시술 직전, 1일, 6일에 측정하였으며 매일 식사량, 배설량, 행동특성, 증독증상 여부, 사망률 등을 관찰하였다. 6일째 희생시킨 후 협낭

조직을 적출하여 접막의 조직상태를 육안으로 확인하며 변화를 관찰한 후 조직병리학적 연구를 실시하였다.

III. 연구결과

가) 급성구강독성실험 (acute oral toxicity test)

급성 구강독성 실험은 Sprague-Dawley계의 백서(약200g)을 사용하였으며 암, 수 각 5마리씩 10마리를 1개군으로 하여 각 약물을 세 농도로 하여 구강내로 투여한 후 15일동안 관찰하였으며 체중 측정은 1일 과 15일에 그리고 사망시에 측정하였으며 사망한 동물은 부검하고 장기에 대한 조직병리학적 검사를 실시하였다. 15일 관찰하는 동안 Scutellariae Radix의 EtOH ex., Wogonin, Baicalein, Baicalin 투여군 모두에서 식사량의 변화, 설사등 이상현상, 운동성저하등의 중독증상을 관찰할 수 없었으며 대조군과 같이 모두 건강한 상태를 유지하고 있었다. 체중 역시 1일과 15일에 대조군과 비교하여 측정된 결과 커다란 차이가 나타나지 않았다. 실험종료후 생존한 모든 동물을 희생시켜 행한 조직 검사에서도 간, 신장, 비장, 심장, 허파, 뇌, 부신등의 장기에는 이상이 없음을 확인할 수 있었다. Scutellariae Radix의 EtOH ex., Wogonin, Baicalein, Baicalin 투여군의 LD 50 값은 Table 1과 같다.

나) 급성 정주독성 (acute intravenous toxicity test)

급성 정주독성 실험은 Sprague-Dawley계의 백서(약200g)을 사용하였으며 자, 용 각 5마리씩 10마리를 1개군으로 하여 각 약물을 세 농도로 하여 증류수에 부유시켜 정맥에 주사로 투여한 후 15일간 관찰하였으며 체중측정은 1일과 15일에 그리고 사망시 측정하였으며 사망한 동물은 부검하고 장기에 대한 조직병리학적 검사를 실시하였다. 또한 실험 종료후 생존한 모든 동물은 희생하여 부검을 하였다. 투여후 15일간 관찰하는 동안 Scutellariae Radix의 EtOH ex., Wogonin, Baicalin, Baicalein 투여군 모두의 급성 정주독성은 (LD 50) 27mg/kg이며 모두에서 설사, 이상한 행동, 활동성의 저하, 먹이량의 변화등의 중독증상은 보이지 않았으며 체중도 1일과 15일 측정된 결과 대조군과의 차이는 보이지 않았다. 실험 종료후 생존한 모든 동물을 희생시켜 행한 조직검사에서도 대조군에 비해 이상이 없음을 확인할 수 있었다.

다) 14일 급식실험 (14 days feeding study)

14일 급식실험도 역시 Sprague-Dawley계의 백서를 사용하였으며 자, 용 5마리씩 10마리를 1개군으로 하여 각 약물을 세농도로 하여 사료와 혼합하여 공급하고 14일동안 중독증상 여부와 체중, 1일먹이 섭취량 등을 매일 관찰하였다.

Table 1. Acute toxicity of EtOH ex.(Scutellariae Radix), Wogonin, Baicalin and Baicalein

Route of administration	compounds	LD50(mg/kg)	95% confidence interval(mg/kg)
Oral(rat)	EtOH ex. of Scutellariae Radix	1430	1360 - 1650
	Wogonin	1320	1240 - 1570
	Baicalein	1250	1190 - 1440
	Baicalin	1330	1270 - 1490

Table 2. Acute intravenous toxicity of EtOH ex.(Scutellariae Radix) wogonin, Baicalin and Baicalein.

Route of administration	Compounds	LD 50(mg/kg)	95% confidence interval(mg/kg)
Intravenous (rat)	EtOH ex. of Scutellariae Radix	30	20-32
	Wogonin	28	25-32
	Baicalein	31	28-33
	Baicalin	27	24-31

14일째 모든 동물을 희생시켜 부검하여 장기에 대한 조직병리학적 검사도 실시하였다. 14일 동안 관찰하는 동안 Scutellariae Radix의 EtOH ex., Wogonin, Baicalein, Baicalin 투여군 모두에서 대조군과 비교하여 체중의 변화는 거의 없었으며 1일 섭취량 또한 대조군과 크게 차이를 보이지 않았다. 식이효율은 증가체중(g)을 먹는량(g)으로 나누어 비교해 보았다. 실험종료 후 생존한 모든 동물은 희생시켜서 행한 조직 검사에서도 모든 장기들이 대조군과 비교하여 이상이 없음을 확인하였다. Scutellariae Radix의 EtOH ex., Wogonin, Baicalein, Baicalin 투여군의 체중은 Table 3, 4, 5, 6 과 같다.

라) 점막 자극성 실험 (mucous membrane irritation studies)

점막 자극성 실험은 성숙한 Hamster의 협낭을 실험부위로 하였다. 암·수 각 5마리씩

Table 3. Body weight data of rats fed diets containing EtOH ex. of Scutellariae Radix

sex/treatment level(mg/ml)	body weight (g)(mean± S.D)
male	50 202± 11
	100 198± 13
	200 195± 16
female	50 151± 8
	10 149± 9
	20 145± 7

10마리를 실험에 사용했고 세농도로 희석한 각 약물을 1일 1회씩 Hamster를 마취한 후 협낭을 꺼내서 약제를 도포하였다. 이러한 방법으로 5일간 시행하였으며 대조군과 비교하여 관찰하였다. 관찰은 매일 처치전 협낭점막의 홍반, 부종, 조직손상 등을 관찰하고 체중은 시술직전, 1일, 6일에 측정하였으며 매일 식사량, 행동 특성, 중독증상 여부등을 관찰하였다. 5

Table 4. Body weight data of rats fed diets containing Wogonin

sex/treatment level(mg/ml)	body weight (g)(mean± S.D)
male	50 201± 12
	100 199± 19
	200 196± 11
female	50 147± 8
	100 150± 8
	200 143± 9

Table 5. Body weight data of rats fed diets containing Baicalein

sex/treatment level(mg/ml)	body weight (g)(mean± S.D)
male	50 196± 17
	100 195± 24
	200 197± 13
female	50 146± 8
	100 151± 7
	200 144± 8

Table 6. Body weight data of rats fed diets containing Baicalin

sex/treatment level(mg/ml)	body weight (g)(mean± S.D)
male	50 198± 11
	100 203± 15
	200 197± 11
female	50 148± 6
	100 149± 11
	200 143± 7

일간 관찰하는 동안 체중의 변화는 1일과 6일 모두 대조군에 비교하여 변화가 없었으며 식사량, 중독증상여부, 행동특성등의 변화 역시 관찰할 수 없었다. 또, 매일 도포전 관찰한 협낭부분의 홍반, 부종, 조직손상등의 상태도 Scutellariae Radix의 EtOH ex., Wogonin, Baicalein, Baicalin 등 모든 약제에서 아무런 이상이 없음을 관찰하였다.

Table 7. Mucouse membrane irritation studies of EtOH ex.(Scutellariae Radix), Wogonin, Baicalin and Baicalein.

Route of administration	Compounds	LD 50(mg/kg)	95% confidence interval(mg/kg)
Mucouse membrane (Hamster)	EtOH ex. of Scutellariae Radix	>100	-
	Wogonin	>100	-
	Baicalein	>100	-
	Baicalin	>100	-

IV. 총괄 및 고안

황금(Scutellariae Radix)은 전래의 전통 한 방제재로서 항균효과를 위시하여 항염효과가 있음이 전해져 내려오고 있으나, 이에 대한 실험적 증명은 최근 Tsao등⁸⁾, 류인철등⁹⁾, Chung등¹²⁾의 연구결과 상세히 밝혀졌으며 이 물질의 세포증식에 미치는 영향도 Kasai등¹⁰⁾, Chung등¹²⁾의 연구에 의하여 최근에 밝혀졌다. 이러한 일련의 연구결과는 이 생약추출물이 항균효과 뿐만 아니라 항염효과를 나타내고 또한 조직의 세포증식에 크게 도움이 됨으로서 임상에서의 이용에 관한 많은 도움을 주는 근거라고 보겠다. 그러나 이러한 임상에서의 응용에 관한 긍정적인 연구를 뒷받침하는 이 추출물의 독성 및 변이원성 실험에 관한 부분의 연구는 대단히 미진한 편이다. 한편 변이원성에 관하여 Morimoto등¹⁶⁾, Sweet등¹⁷⁾ 및 노정구등¹⁸⁾이 연

구하였으며, 이들의 연구결과로는 Rec-assay법 및 Ames assay법을 통하여 황금의 에타놀추출물의 상당한 돌연변이 유발성을 나타냈으며 기형유발성 가능성도 개진되었다. 이러한 일련의 연구결과는 상당량의 황금의 에타놀추출물을 장기간 복용시 돌연변이 유발이나 기형유발 가능성이 있다는 결과라고 보겠다. 그러나 본 연구에서는 장기, 대량 복용에 의한 연구가 아닌 실험관 실험내에서 얻은 항염 및 세포증식에 효과가 있는 적절한 농도의 황금의 에타놀추출물에 대한 급성 구강독성, 급성정주독성, 14일 급식실험, 점막자극성실험 등에 관한 실험을 실시한 것이며 급성 구강독성 연구에서는 LD50 측정치가 황금의 에타놀추출물, Wogonin, Baicalein 및 Baicalin 모두에서 1240-1650 mg/kg 범위내에 있으며 급성 정주독성 실험결과 50mg/ml, 100mg/ml 및 200mg/ml 투여군 모두에서 뚜렷한 체중 감소를 보이지

않았다. 또한 14일 급식 실험을 통한 실험에서도 비정상적인 체중감소는 보이지 않았다. 이러한 일련의 연구결과는 항염효과 및 세포 증식 효과를 나타내는 정도의 농도에서의 투여로서는 독성을 나타내고 있지 않음을 보이고 있다. 최근 Dauge-Dauge¹⁹⁾의 연구결과 이 추출물이 Zeolites, chrysotile-asbestos에 의한 발암 및 변이원성 역할을 감소시키는 영향을 가지고 있다고 발표하고 있다. 따라서 이러한 최근의 연구결과를 볼때 황금의 에타놀추출물에는 다양한 역할을 하는 flavonoids 가 존재함이 확인되었으며 이러한 여러 역할은 이 추출물의 중요성분을 순수분리하여 적절히 이용한다면 매우 좋은 임상효과를 나타내리라고 생각된다. 현재까지의 연구결과로는 황금의 에타놀추출물 중 Wogonin, Baicalein, Baicalin이 각각 약간의 차이를 가지고 IL-1 β 생산 차단, PGE₂ 생산차단, collagenase 활성화 차단 및 세포활성도 증강등에서 서로 다른 효과를 보이는 바 이들 순수분리된 물질을 이용한 치주질환 조직재생 및 항염치료제로의 사용보다는 추출물 그 자체를 이용하여 국소도포 내지는 전신투여를 한다면 보다 효과적인 치주질환 치료제로의 이용이 가능하다고 생각된다.

참고문헌

- Masada MP, R Persoon, JS Kenney, SW Lee, RC Page and AC Allison : Measurement of interleukin 1- β and 1- γ in gingival crevicular fluid : implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 25 : 156-163, 1990
- Sismey-Durrant HJ, Hopps RM. : Effect of lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* on prostaglandin E2 and interleukin-1 γ release from rat periosteal and human gingival fibroblasts in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 6 : 378-380, 1991
- Takada H, J Mihara, I Morisaki and Hamada : Induction of interleukin-1 γ and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated by bacteroides lipopolysaccharides *Infect Immun* 59 : 295-301, 1991
- Richards D., Rutherford RB : The effects of interleukin-1 γ on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. *Archs Oral Bio* 33 : 237-243, 1988
- Robert C., Newton and Covington M. : The activation of human fibroblast prostaglandin E production by interleukin 1. *Cellular Immunology* 110 : 338-349, 1987
- Uehara A, Kohda H, Takasugi Y and Namiki M : Inhibition of interleukin-1 γ release from cultured human peripheral blood mononuclear cells by prednisolone. *Experientia* 45 : 166-167, 1989
- Golub, LM, Ramamurthy N, McNamara TF, Gomes B, Wolff M, Casino A, Kapoor A, Zambon JJ, Ciancio SG, Schneir M. : Tetracyclenes inhibit tissue collagenase activity : A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodont Res.* 19 : 651-655, 1984
- Tsao TF, Newman MG, Kwok YY and Horikoshi AK : Effect of chinese and western antimicrobial agents of selected oral bacteria. *J Dent Res* 61 : 1103-1106, 1982
- Kubo, M., K. Yoshiyuki, O. Tsutomu, T. Tadato and N. Kensuke : Studies on *Scutellaria radix* Part II. the antibacterial substance, *Planta Med.*, 43(2) : 194-201, 1981
- Kasai, A., Shinohara, M. and Ohura, K. : Effects of chinese medicines on human pulp cells in vitro. *J Dent Res.* 71 : (IADR abstracts) 557, 1992
- Kimura Y., Okuda H., Arichi S. : Studies on *Scutellariae radix*, Effects of various flavonoids on arachidonate metabolism in leukocyte. *Planta Medica* 51 : 132-136, 1985

12. Chung, C.P., Park, JB. and Bae, KW. : Pharmacological effects of methanolic extract from the root of *Scutellaria Baicalensis* and its flavonoids on human gingival fibroblast. *Planta Med.* 61 : 150-153, 1995
13. 류인철, 손성희, 정종평, 배기환 : 생약추출물이 세포성장 및 cytokine 생산에 미치는 영향. *대한 치주과학회지* 23 : 37-47, 1993.
14. Becci PJ, Schwartz H, Barnes HH, Southard GL. : Short term toxicity studies of sanguinarine and of two alkaloid extracts of *sanguinaria canadensis*. *J Toxicol Environ Health* 20 : 199-208, 1987
15. Kim PY. : The Korean regulations and procedures for safety assessment.. In *Research and development for procedures involving risk assessment of toxic chemicals.* Chang IM, Park CW ed. 31-44, Seoul, Korea
16. Morimoto I., Watanabe, F., Osawa, T., Okitsu T. and Kada, T. : Mutagenicity screening of crude drugs with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella/microsome* reversion assay. *Mutation Res.* 97 : 81-102, 1982
17. Sweet, DV. : Registry of toxic effects of chemical substances(1985-86 edition) 53001 U.S. Department of Health and Human Services, 1987
18. 노정구, 김용화, 한상섭, 김성훈, 이현걸 : 화학물질의 독성평가 및 방법개발. 한국화학연구소, 1-68, 1987
19. DaugeI'-Dauge NO., Durnev AD, Kulakova AV., Seredenin SB. and Velich Kovskii BT. : Corpuscular mutagenesis and its prevention. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk.* 1 : 29-38, 1995

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF ETHANOLIC EXTRACT FROM THE ROOT OF SCUTELLARIAE RADIX

Chong-Pyoung Chung¹, Young Ku¹ and Ki-Hwan Bae²

¹ *Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University*

² *College of Pharmacy, Chung-Nam University*

Flavonoids from *Scutellariae Radix* possessed a dual function both as an anti-inflammatory agent and an enhancer of cellular activity in gingival fibroblast.

The purpose of this study was to evaluate on the toxicity of ethanolic extract from the root of *Scutellariae Radix* Georgi and its flavonoids, Wogonin, Baicalein, and Baicalin were isolated and purified by the following method. The crude drug was extracted with ethyl acetate and the residue was dissolved in ethyl alcohol. The ethyl alcohol soluble fraction was separated, concentrated, and then chromatographed on a silica gel column. The acute oral LD 50 in rats was determined for EtOH ex. of *Scutellariae Radix* and three compounds were evaluated with a single oral gavage at three graded dosage levels. The acute intravenous LD 50 was determined with a single intravenous injection via the jugular vein at three graded dosage levels. Groups of 5 male and 5 female rats, 6 week of age at the start of the study, were fed diets containing 3 graded dosage levels for 14 days. Groups of 5 male and 5 female hamster received 0.5ml of the test article at once in a day for 5 days to the buccal cheek pouch for two minutes each. The acute oral LD50 for EtOH ex. of *Scutellariae Radix* is 1430mg/kg, and for Wogonin 1320mg/kg, for Baicalein 1250mg/kg, for Baicalin 1330mg/kg. The acute intravenous toxicity of EtOH ex. of *Scutellariae Radix* and its extracts was found to be 27mg/kg body weight. No toxic effects were observed in rats fed up to 200mg/kg of EtOH ex. of *Scutellariae Radix*, Wogonin, Baicalein and Baicalin in the diet for 14 days. The acute Mucose Membrane LD 50 in hamsters was found to be greater than 100mg/kg.

These results suggested that EtOH ex. of *Scutellariae Radix* and its flavonoids are safe for oral care products using limited amount of extract.