

[報 文]

## 사염화탄소의 간독성에 대한 파두 다당류분획의 예방효과

이은경 · 길이룡 · 소동수 · 창동신  
전선덕 · 정명규\* · 문창규†

서울대학교 약학대학, \*신문대학교 공과대학

### Hepatoprotective Effects of Polysaccharides of *Croton tiglium* on CCl<sub>4</sub> Intoxication

Eun-Kyung Lee, Lee-Yong Khil, Dhong-Su So, Tong-Shin Chang, Sun-Duck Jeon,  
Myung Kiu Chung\* and Chang-Kiu Moon

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

\*Department of Environmental Engineering, Sun Moon University

Asan 336-840, Korea

#### ABSTRACT

In present study, we fractionated polysaccharides from *Croton tiglium* and investigated their hepatoprotective effects on CCl<sub>4</sub> intoxication. Polysaccharide fraction of which molecular weight is over 300,000 (HP) showed the most potent hepatoprotective effects on CCl<sub>4</sub> intoxication. Lipid peroxidation, sAST and sALT were used as parameters to evaluate the liver damage. Glucose, xylose and arabinose were found to be monosaccharides composing sugar moiety of HP.

**Key words** : *Croton tiglium*, Polysaccharides, Hepatoprotective effects.

#### 서 론

저자 등은 간장 보호 작용을 갖는 생약 성분을 검색하는 일련의 연구들을 실시하여 황백피 (*Phellodendron amurense*), 유향 (*Boswellia carterii*), 인삼 (*Panax ginseng*), 소목 (*Caesalpinia sappan*) 등으로부터 얻은 다당류가 사염화탄소에 의한 급성 간독성에 현저한 보호 효과를 나타낸다는 결과를 얻어 보고한 바 있다.<sup>1,2)</sup>

본 논문에서는 파두의 다당류 분획이 CCl<sub>4</sub>에 의한

간독성에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. 파두는 *Croton tiglium* (*Euphorbiaceae*)의 종자로 그 지방 성분인 croton oil은 준하제로 알려져 있으며 한방에서 소량을 사용하여 상습 변비, 소화 불량, 아메바성 이질 치료에 쓰인다고 보고되어 있다.<sup>3)</sup> 특히 파두유 중에는 tumor promotor 작용이 강력한 phorbol ester가 함유되어 맹독성 물질로 알려져 있다.<sup>4,5)</sup> 따라서 본 실험에서는 파두를 석유 에테르로 수회 추출하여 파두유를 완전히 제거한 후, 물로 추출한 수용성 추출물로부터 Caldes, G의 추출 방법<sup>6)</sup>으로 다당류를 분

† 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로 (전화) 02-880-7843 (팩스) 02-884-4580

획하고 한외여과기를 사용하여 분자량 300,000을 기준으로 재분획하였으며 각 단계의 분획에 대하여 간독성 예방효과를 검색하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에 사용된 Sprague Dawley female Rat (SD Rat)은 서울대학교 실험 동물 사육장에서 공급받아 2주간 실험환경에서 적응시킨 후, 몸무게  $200 \pm 20$ g의 것을 사용하였다. 사료는 고휘 사료(삼양유지공업(주))를 사용하였다.

### 2. 시료의 투여

암컷 SD Rat를 6마리씩 1군으로 하여 정상 대조군과  $\text{CCl}_4$  단독투여군, 파두 총수용성 추출물(CT) 1, 20, 100 mg/kg/day 전처리투여군으로 나누어, 각 시험군에 1일 1회, 4일간 식염수에 현탁시킨 시료를 복강내에 주사하고, 정상 대조군과  $\text{CCl}_4$  단독투여군에는 시료량과 동량의 생리 식염수를 같은 방법으로 투여하였다. 4일째 되는 날 절식시킨 후  $\text{CCl}_4$  (2.5 ml/kg/day, Merck Co.)를 동량의 corn oil과 혼합하여 경구 투여하였다. 정상 대조군에는 corn oil을 동일량 투여하였다. 12시간 단식시킨 후 5일째 되는 날, 혈청과 간을 적출하여 효소 활성을 측정하였다.<sup>7)</sup>

파두 총수용성 추출물(CT)을 여러 다당류 분획으로 분리한 후, vitamin E(d- $\alpha$ -Tocopherol, Riken Vitamin Co., Ltd. Tokyo) 투여군(350 mg/kg/day p.o.)을 양성 대조군으로 하여 위와 동일한 schedule로 각 분획을 투여하고 각각의 활성을 측정하였다.

### 3. 파두의 총수용성 물질의 추출 및 다당류 분획

파두의 총수용성 물질은 Caldes 등<sup>6)</sup>의 다당류 추출 방법을 수정하여 다음과 같은 방법으로 분획 및 추출하였다. 다음의 모든 조작은 4°C 저온실에서 행하였다. *Croton tiglium* L. 250g을 mortar로 잘게 분쇄하고, Asahina extraction장치에서 석유에테르로 24시간 연속 추출하여 oil성분을 제거한 다음 건조시켰다. 그 일부를 취하여 총분량의 증류수로 추출한 후 농축하고 최종적으로 동결건조하였다(CT). 잔여 유성분제거 잔사 그람당 5ml의 부피로 차가운 0.5M NaOH를 가하고 저온실에 하룻밤 방치하였다. 침전물

을 여과하고 추출액에 3 volume의 차가운 95% 에탄올을 혼합하여 저온실에서 하룻밤 방치하였다. 상등액을 decantation한 다음 4°C에서 8,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 모았다(분획 A). 침전물은 차가운 증류수에 녹여 일부만 남기고(분획 B) 나머지는 차가운 15% trichloroacetic acid (TCA, Wako Pure Chem. Ind., Ltd)를 가한 후 ice bath에서 1시간 방치했다. 12,000 ×g에서 1시간 동안 원심분리하고 상등액을 모아 4 volume의 차가운 95%의 에탄올을 가하여 저온실에 하룻밤 방치하였다. 4°C에서 8,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 침전물을 2% sodium acetate용액에 녹여 중화시켰다. 2 volume의 차가운 에탄올을 가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 상등액을 12,000 ×g로 15분간 원심분리하여 침전물을 모았다(분획 C). 분획 A와 B는 각각 에탄올을 제거하고 중화시켰다.

4°C 저온실에서 한외여과장치(Amicon 8200)에 분자량 30만 이상을 포집할 수 있는 filter를 넣고 시료(분획 B, C)를 충전한 다음, 질소가스로 가압(55 psi, 3.7 atm)하여 여과하고 수 회 증류수로 세척하였다. 얻어진 각 세분획(HT, LT, HP, LP)은 고진공동결건조기(Edward Ep03)로 건조하였다.

분획 A LM : 저분자량 물질의 분획

분획 B HT : 분자량 30만 이상의 다당류와 단백질의 혼합 분획

LT : 분자량 30만 미만의 다당류와 단백질의 혼합 분획

분획 C HP : 분자량 30만 이상의 다당류 분획

LP : 분자량 30만 미만의 다당류 분획

### 4. sAST, sALT 활성 측정

시료를 투여한 SD rat를 12시간 절식시킨후 혈청을 취하여 Reitman과 Frankel의 방법<sup>8)</sup>을 이용하여 sAST, sALT의 활성을 측정하였다. 각각의 기질액을 1ml씩 취하여 37°C에서 2~3분간 가온한 후 검혈청 0.2ml를 가하고 sAST는 60분간, sALT는 30분간 반응시켰다. 반응 종료후 즉시 발색액을 1ml씩 가하고 실온에서 20분간 방치한 후 0.4N NaOH를 10ml씩 가하고 충분히 혼합하여 증류수를 blank로 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. 과산화 지질 함량의 측정

시료를 투여한 SD rat를 12시간 절식시킨 후 간을

신속히 적출하고 차가운 식염수로 perfusoin하였다. 간 무게의 5배 용량의 차가운 1/20 M phosphate buffer (pH 7.4)를 가하고 homogenation시켜 cap tube에 500 µl씩 취하였다. 여기에 7% sodium dodecyl sulfate (SDS, Kokusan Chem. Co.)용액 500 µl를 가한 후 37°C에서 30분간 Incubation하고 ice bath에 급냉시켰다. 냉각 상태로 0.1 N HCl 2 ml와 0.67% thiobarbituric acid (TBA, Merck Co.) 1ml를 가하여 Vortex mixer로 격렬하게 섞고 95°C 수욕상에서 50분간 끓인 후 ice bath에 급냉하였다. 완전히 식은 후 n-butanol 5 ml로 추출하고 3,00 rpm에서 10분간 원심분리한 후 즉시 상등액을 취하여 535 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다. Standard로는 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane (Wako Pure Chem. Ind., Ltd.)을 사용하였다.<sup>9-11)</sup>

**6. HP의 총 당함량 및 단백질 함량 측정과 구성 당류의 확인**

다당류 함량은 anthrone test<sup>12)</sup>로 측정하였고 단백질 함량은 Lowry 법<sup>14)</sup>을 사용하여 측정하였으며 구성 당류는 HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography)로 확인하였다.

HP (MW ≥ 300,000) 5mg에 10ml의 4N trifluoroacetic acid를 가하여 reflux장치에서 가수 분해시켰다. 가수 분해 후 rotary vacuum pump로 trifluoroacetic acid를 증발시키고 1ml의 증류수를 가하여 녹였다. 시료와 standard monosaccharide (10% Glucose, galactose, arabinose, xylose)를 HPTLC plate (silica gel precoated, 5 × 10cm)상에 spotting하여 solvent system (ethylacetate: pyridine: water = 120:50:40)으로 전개한 후 spraying reagent를 뿌려서 100°C에서 2~5분간 가열하였다.<sup>13)</sup>

**7. 통계처리**

모든 실험결과는 Student's *t*-test를 사용하여 P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

**결과 및 고찰**

파두 다당류 분획의 CCl<sub>4</sub>에 의한 간독성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 파두의 유성분을 제거한 후

**Table 1.** Effects of CT of *Croton tiglium* on sAST and sALT activities in CCl<sub>4</sub> treated rats.

Group	sAST activities (U/L)	sALT activities (U/L)
Normal control	86 ± 2	48 ± 6
CCl <sub>4</sub>	4929 ± 793	1479 ± 390
CCl <sub>4</sub> +CT <sup>a)</sup> (1mg/kg/day)	2725 ± 1035	561 ± 172
CCl <sub>4</sub> +CT(20mg/kg/day)	326 ± 66**	100 ± 25*
CCl <sub>4</sub> +CT(100mg/kg/day)	150 ± 29**	60 ± 14*

All values are the mean ± SE

<sup>a)</sup> CT : Total water extract

\* : p < 0.01 compared with CCl<sub>4</sub> group

\*\* : p < 0.001 compared with CCl<sub>4</sub> group

**Table 2.** Antilipidperoxidative effect of CT of *Croton tiglium* on the liver homogenate in CCl<sub>4</sub> treated rat.

Group	N	MDA content (nmole/g liver weight)	Inhibition <sup>b)</sup> (%)
Normal control	6	1.68 ± 0.21	-
CCl <sub>4</sub>	6	4.50 ± 0.77	-
CCl <sub>4</sub> +CT <sup>a)</sup> (20mg/kg/day)	6	2.76 ± 0.63*	39.3

All values are the mean ± SE

<sup>a)</sup> CT : Total water extract

<sup>b)</sup> Based on CCl<sub>4</sub> group

\* : p < 10<sup>-4</sup> compared with CCl<sub>4</sub> group

얻은 총수용성 물질을 CT라 명명하고 실험에 사용하였으며, CT를 정상 랫드에 투여했을 때 sAST와 sALT에는 유의할만한 차이가 인정되지 않아 (data는 제시하지 않았음) 정상 랫드에는 영향이 없는 것으로 관찰되었다. Table 1에 나타난 바와 같이 사염화탄소 (2.5 ml/kg)를 투여한 군은 정상 대조군에 비해 sAST와 sALT 효소 활성치가 매우 급격히 상승하였으며, 파두 수용성 물질을 투여 용량 (1, 20, 100 mg/kg/day)에 따라 현저하게 낮추는 경향을 보이고 있음을 나타내고 있다. 이 결과로부터 투여 용량이 20 mg/kg의 경우로도 우수한 간독성 예방 효과가 입증되어 이후의 CT투여 용량은 이 용량으로 하였다.

CT가 과산화 지질 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 간 조직중의 MDA양을 측정한 결과, Table 2에서와 같이 CT는 사염화탄소 투여에 의하여 현저히 상승한 lipid peroxide의 양을 39.3% 억제시켰다. 따라서 CT는 CCl<sub>4</sub>에 의한 간 세포의 괴사를 예방할

것으로 추정할 수 있다.

위의 결과에서 파두의 수용성 물질인 CT가 간장 보호 활성을 갖고 있다는 것이 밝혀졌으므로 그 활성 물질을 찾아내는 실험을 시도하였다. 먼저 파두의 수용성 물질을 고분자 물질과 저분자 물질로 나눈 후 고분자량 물질을 다당류의 순수 분획과 단백질이 혼합된 분획으로 나누었으며 이들 분획도 분자량 30만 이상과 그 미만으로 나누어 총 5개 분획으로 나누었다. 이상의 각 분획을 20 mg/kg/day 용량으로 투여한 rat에

**Table 3.** Effects of each fraction of *Croton tiglium* on sAST and sALT activities in CCl<sub>4</sub> treated rats.

Group	sAST activities (U/L)	sALT activities (U/L)
Normal control	105 ± 4	35 ± 3
CCl <sub>4</sub>	3474 ± 232	891 ± 29
CCl <sub>4</sub> +CT <sup>a)</sup>	1294 ± 188**	346 ± 78**
CCl <sub>4</sub> +HP <sup>b)</sup>	956 ± 112#	176 ± 24**
CCl <sub>4</sub> +LP <sup>c)</sup>	3289 ± 206	770 ± 74
CCl <sub>4</sub> +HT <sup>d)</sup>	1937 ± 287*	308 ± 51*
CCl <sub>4</sub> +LT <sup>e)</sup>	2330 ± 156	653 ± 120
CCl <sub>4</sub> +LM <sup>f)</sup>	3493 ± 120	754 ± 75

All values are the mean ± SE

<sup>a)</sup> CT : Total water extract

<sup>b)</sup> HP : Polysaccharide fraction (MW ≥ 300,000)

<sup>c)</sup> LP : Polysaccharide fraction (MW < 300,000)

<sup>d)</sup> HT : Polysaccharide+Protein fraction (MW ≥ 300,000)

<sup>e)</sup> LT : Polysaccharide+Protein fraction (MW < 300,000)

<sup>f)</sup> LM : Fraction of low MW extract

\* : p < 10<sup>-3</sup> compared with CCl<sub>4</sub> group

\*\* : p < 10<sup>-4</sup> compared with CCl<sub>4</sub> group

# : p < 10<sup>-5</sup> compared with CCl<sub>4</sub> group

\*\* : p < 10<sup>-6</sup> compared with CCl<sub>4</sub> group

**Table 4.** Effects of HP on sAST and sALT activities in CCl<sub>4</sub>-intoxicated rats.

Group	sAST activities (U/L)	sALT activities (U/L)
Normal control	102 ± 4	40 ± 2
CCl <sub>4</sub>	2445 ± 152	1479 ± 42
CCl <sub>4</sub> +Vitamin E (350mg/kg/day)	1244 ± 121*	287 ± 14**
CCl <sub>4</sub> +HP <sup>a)</sup> (20mg/kg/day)	795 ± 63**	159 ± 17**

All values are the mean SE

\* : p < 10<sup>-4</sup> compared with CCl<sub>4</sub> group

\*\* : p < 10<sup>-6</sup> compared with CCl<sub>4</sub> group

<sup>a)</sup> HP : Polysaccharide fraction (MW ≥ 300,000)

**Table 5.** Antilipidperoxidative effect of HP on the liver homogenate in CCl<sub>4</sub> treated rat.

Group	N	MDA content (nmole/mg protein)	Inhibition <sup>b)</sup> (%)
Normal control	6	0.636 ± 0.018	-
CCl <sub>4</sub>	6	1.280 ± 0.047	-
CCl <sub>4</sub> +Vitamin E	6	0.802 ± 0.059**	31.4
HP <sup>a)</sup> +CCl <sub>4</sub>	6	0.773 ± 0.056**	39.6

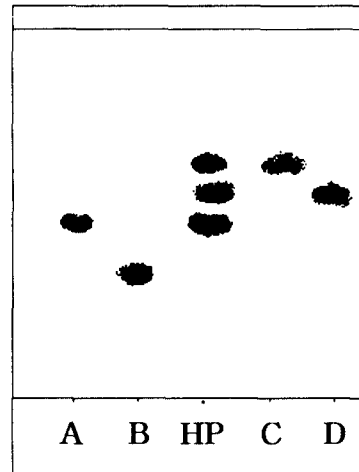
All values are the mean ± SE

\* : p < 10<sup>-3</sup> compared with CCl<sub>4</sub> group

\*\* : p < 10<sup>-4</sup> compared with CCl<sub>4</sub> group

<sup>a)</sup> HP : Polysaccharide fraction (MW ≥ 300,000)

<sup>b)</sup> Based on CCl<sub>4</sub> group



**Fig. 1.** High performance thin layer chromatogram of monosaccharides from polysaccharide fraction (MW ≥ 300,000) of *Croton tiglium* L.

A : Glucose

B : Galactose

C : Xylose

D : Arabinose

HP: Polysaccharide fraction (MW ≥ 300,000)

사염화탄소로 독성을 유발시켜 CT투여군을 양성 대조군으로 하여 sAST와 sALT 효소 활성을 측정한 결과를 Table 3에 나타냈다. 투여한 분획들 중에서 HP 분획 즉 분자량 30만 이상의 다당류 분획에서 가장 현저한 간장 보호 효과가 나타났다. 이 분획을 vitamin E (350 mg/kg/day p.o.) 투여군을 양성 대조군으로 하여 실험한 결과 Table 4에서와 같이 HP는 vitamin E의 경우보다 더 우수한 간장 보호 작용을 나타

내었다. 또한 지질 과산화 억제 작용도 Table 5에 제시된 바와 같이 vitamin E 투여군은  $CCl_4$  처리군을 기준으로 하였을 때 MDA 함량을 vitamin E 투여군은 31.4% HP 투여군은 39.6%를 감소시키는 것으로 관찰되었다. 이와 같은 결과는 HP가 vitamin E와 유사한 radical 제거작용을 가질 것으로 추정된다. 파두의 간장 보호 작용의 주요 활성 물질인 HP 분획의 물질 조성을 알아보기 위하여 Anthrone test와 Lowry method를 이용하여 HP 분획의 당함량과 단백질 함량을 측정된 결과 당이 73% 단백질이 28.5%가 함유된 것으로 확인되었다. 단백질 함량은 HP가 제단백과정을 거쳤다는 점을 감안할 때 주로 다당류에 결합된 단백질 성분일 것으로 사료된다.

HP분획의 다당류 조성을 분석한 HPTLC 결과는 Fig. 1과 같으며 glucose, xylose, arabinose 등으로 구성되어 있음을 알 수 있었으나 각 다당류의 정확한 구성비와 그들이 연결되어 있는 입체 구조는 본 실험에서는 검토하지 않았다.

## 결 론

1. 파두 다당류 분획의 사염화탄소에 의한 간독성억제효과를 지질과산화, sAST, sALT를 독평가지표로서 사용하여 검색하였다.
2. 파두의 총수용성분획은 사염화탄소에 의한 간지질과산화를 현저히 억제하였으며 급격히 상승한 혈청 AST, ALT 수준도 개선시켜 사염화탄소에 의한 간독성예방 효과가 있음이 확인되었다.
3. 한외여과기법을 활용하여 분획하고 간독성 예방효과를 측정된 결과, 분자량 300,000 이상의 다당류(HP)가 가장 강력한 사염화탄소에 의한 간독성예방효과를 나타내었다.
4. HP의 당부위를 구성하는 다당류를 HPTLC로 분석한 결과 glucose, xylose, arabinose로 구성되었음을 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Ann, M.Y., Effects of brazilin, hematoxylin and some phyto-based polysaccharides on carbon tetrachloride and galactosamine-induced acute liver injuries, *A thesis, Seoul National University* (1984)
2. Moon, C.K., Park, K.S., Kim, S.G., Won, H.S., Chung, J.H., Brazilin protects cultured rat hepatocytes from  $BrCCl_3$ -induced toxicity. *Drug Chem. Toxicol.*, **15**, 81-91 (1992)
3. 이선우 · 이용규, *생약학*, 동명사, 259 (1985)
4. Berenblum, I., The mechanism of carcinogenesis, *Cancer Res.*, **1**, 807-814 (1941)
5. Helmut, S., *Oxidative Stress.*, Academic Press Inc., London, (1984)
6. Caldes, G., Prescott, B., Tomas II, C.A. and Baker, P.J Characterization of polysaccharide from *Carthamus tinctorius* that cross reacts with type III pneumococcal polysaccharide, *J. Gen. APPI. Microbiol.*, **27**, 157-172 (1981)
7. Levin, J.B., Automation in Analytical Chemistry, Technicon Symp. *Mediad*, New York, (1966)
8. Reiman, S. and Frankel, S.K., A colorimetric method for determination of serum glutamic oxoacetic and glutamic pyruvic transaminase., *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, p.56 (1957)
9. Pryor, W.A. and Castle, L., Chemical methods for the detection of lipidhydroperoxides, *Method. Enzymol.*, **105**, 293-9 (1984)
10. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid, *J. Lipid Res.*, **19**, 1053-1057 (1978)
11. Masugi, F. and Nakamura, T., Measurement of thiobarbituric acid value in liver homogenate solubilized with sodium dodecylsulfate and variation of the values affected by vitamin E and drugs., *Vitamins*, **51**, 21-29 (1977)
12. Norris, J.R., Estimation of total polysaccharide content, *Method. Microbiol.*, **5B**, p.242 (1971)
13. Kalplan, A., *Clinical Chemistry: Interpretation and Techniques*, Lea & Febiger, Philadelphia, p.283 (1972)
14. Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H., *Method. Immunol.*, 3rd. Ed., 71-92 (1972)

1. Ann, M.Y., Effects of brazilin, hematoxylin