

선향초 추출물의 간보호 효과

강세찬 · 이창민 · 구현정 · 안동호¹ · 최 한 · 이재현 · 박종필 · 이미현
정의수 · 곽종환 · 이민경¹ · 오좌섭 · 지옥표*
성균관대학교 약학대학, ¹주)바이오크리아

Hepatoprotective Effects of Aqueous Extract from Aerial Part of Agrimmony

Se Chan Kang, Chang Min Lee, Hyun Jung Koo, Dong Ho Ahn¹, Han Choi, Jae Hyun Lee,
Jong Phil Bak, Mi Hyun Lee, Eui Su Choung, Jong Hwan Kawk,
Min Kyung Lee¹, Joa Sub Oh, and Ok Pyo Zee*

College of Pharmacy, SungKyunKwan University, Suwon 440-746, Korea
¹BIOKOREA CO., LTD., Seoul 135-280, Korea

Abstract – Hepatoprotective effects of an aqueous extract prepared from the aerial parts of *Agrimonia eupatoria* L., a species of agrimmony, were investigated in experimental liver-damaged models. To investigate hepatoprotective effects, the agrimmony extract were fed orally to experimental animals. Thereafter a single dose of hepatotoxin, carbon tetrachloride (CCl₄) or D-galactosamine was orally administrated. Chronic liver damage was induced by oral administration of CCl₄ for 2 weeks (1 time/day). Hepatoprotective effects were monitored by estimating serum AST and ALT levels. The results showed that the agrimmony extract significantly reduced AST and ALT levels compared with those of control group in both acute and chronic animal models. It was concluded that the agrimmony extract have hepatoprotective effects against rat liver injury induced by CCl₄ or D-galactosamine.

Key words – Agrimmony extract, *Agrimonia eupatoria* L., acute/chronic liver damage, carbon tetrachloride, D-galactosamine

최근 간염백신의 개발로 인하여 간염에 대한 효과적인 예방은 실시되고 있으나, 간염 바이러스에만 특이적으로 작용할 수 있는 약물의 개발에는 현실적인 어려움이 있어, 손상된 간세포의 부활, 인체의 면역기능 및 간 기능을 증진시켜 간접적으로 간염을 치료하려는 시도가 이루어지고 있다. 이들 중 생약제로부터 분리된 glycyrrhizin, shizandrin 및 silymarin 등은 만성간염 치료제로서 이용되고 있으며, 다양한 생약으로부터 간염치료제 또는 간기능 보호제 개발 연구가 보고되고 있다.¹⁾ Silymarin은 항산화작용과 막 안정화를 유지시킴으로써 간세포 보호작용을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 현재까지 간질환에 유효한 물질을 평가하기 위하여 silymarin을 양성 대조군으로 실험동물에 사용하여 왔으며, 이때 간장독성 유발약물로 CCl₄ (사염화탄소), D-galactosamine, thioacetamide 등이 사용되고 있다.^{2,4)} 간보

호제 및 항염증약으로 치료효과가 구전되어온 생약들 중 석곡 (*Dendrobium moniliforme*)과 밤종피 (*Castanea crenata*) 추출물은 CCl₄로 유발된 간 상해 흰쥐 모델에서 경구투여 시 대조군에 비하여 ALT (Alanine aminotransferase), AST (Aspartate aminotransferase)의 활성을 유의성 있게 저하시킴으로써 간염치료 효과 등을 나타낼 가능성이 보고된 바 있다.⁵⁾

최근 민간요법으로 간암 등에 이용되어왔던 선향초의 한종인 *Agrimonia eupatoria* L.가 B형 간염바이러스를 억제하는 효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있다.⁶⁾ 선향초 (*Agrimmony*)는 장미과에 속하는 다년생 숙근초로서, 본 연구에 사용된 큰등골짚신나물 (*Agrimonia eupatoria* L.)외에 짚신나물 (*Agrimonia pilosa* L.), 산짚신나물 (*Agrimonia coreana* N.) 및 털짚신나물 (*Agrimonia coreana Pilosella* Satake) 등이 알려져 있으며, 이들을 통틀어 용아, 용아초, 황아초, 황용초, 지선초 등으로 부르기도 한다. 전통적으로 선향초는 폐암, 간암, 식도암, 종양, 통증제거, 지형, 지사,

*교신저자(E-mail) : opzee@skku.ac.kr
(FAX) : 031-290-7778

토혈, 혈뇨, 자궁출혈, 결기 등의 약용으로 널리 이용되어 왔으며,⁷⁾ 항바이러스 효과,⁸⁾ 항종양 효과,⁹⁾ 당뇨치료¹⁰⁾의 효과가 보고된 바 있다. 또한, 선학초의 일종인 짚신나물 (*A. pilosa*)의 뿌리 추출물이 인체 간암세포주인 HepG2생육을 억제하며, tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)로 유도된 흰쥐 일차배양 간세포의 세포독성을 보호하는 효능이 보고된 바 있으며, 이에 대한 주요성분으로 isocoumarin이 보고된 바 있다.¹¹⁾

따라서, 본 연구에서는 CCl₄ 및 D-galactosamine으로 유도된 흰쥐 급성 간장해 모델 및 CCl₄로 유도된 흰쥐 만성 간장해 모델을 통하여 선학초 한 종인 큰등골짚신나물 (*A. eupatoria*) 추출물의 간보호 효과를 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에서는 (주)바이오크리아 (서울)로부터 구입한 큰등골짚신나물 (*A. eupatoria* L.)을 정확히 감별하여 사용하였으며, 선학초 지상부를 건조시킨 후 분쇄하여 분쇄물 1g당 증류수 40 ml를 가하고, 60°C에서 1시간 동안 추출한 다음, 그 추출액을 고속원심분리하고 상등액을 0.2 μm의 여과막을 통과시켜 불용성분을 제거하여 수용성 추출물을 획득하였다. 이 추출물을 건조하였을 때 추출물 1 ml당 건조무게는 약 3.0 mg이었다. 사용된 선학초 추출물은 성균관대학교 생약학연구실에 보관하였으며, 사용시 까지 -20°C에 보관하였다.

실험동물 - 본 실험에서 사용된 실험 동물은 (주)중앙동물실험에서 구입한 200 g 전후의 Spargue-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였다. 사료는 삼양유지(주)의 소동물용 고품사료를 사용하였으며, 물은 상수를 사용하여 충분히 공급하면서 실험실 환경에서 1주간 순화시킨 후 사용하였다. 실험기간 중 사육실 환경조건은 실내온도 23±1°C, 상대습도 55±5%, 환기회수 10-18회/hr으로 하였으며, timer를 이용하여 12시간씩 명암을 주기적으로 교환하였고, 조도는 300-500 Lux로 하였다.

D-galactosamine 유도 급성 간장해 모델 - D-galactosamine은 박테리아의 lipopolysaccharide (LPS)와 병용투여하였으며, 시험에 사용된 웅성 흰쥐에 D-galactosamine (200 mg/kg)과 LPS (60 μg/kg)을 복강주사하며, 선학초 추출물 0, 16, 80 및 400 mg/kg을 D-galactosamine/LPS 투여 4시간 전 및 후에 경구로 투여하였다.¹²⁾ 양성 대조군으로 ursodeoxycholate(UDCA, Sigma, 미국) 25 mg/kg 및 silymarin (Sigma, 미국) 25 mg/kg을 이용하여 선학초 추출물 투여군과 동일한 시간 및 경로로 투여하였다. 양성대조시약 및 선학초 추출물의 최종 투여 후 24시간 후에 ether 마취 하에 개복하여 복부 대동맥으로부터 채혈한 후 원심분리하여 혈

청을 취하여 생화학분석에 이용하였다.

CCl₄ 유도 급성 간장해 모델 - 순화된 웅성 흰쥐에 CCl₄ : 1% CMC (1:4 v/v %) 5 ml/kg을 복강주사하며, 선학초 추출물 0, 16, 80 및 400 mg/kg을 CCl₄ 투여 4시간 전 및 후에 경구로 투여하였다. 양성 대조군으로 Ursodeoxycholate (UDCA, Sigma, 미국) 25 mg/kg 및 Silymarin (Sigma, 미국) 25 mg/kg을 이용하여 선학초 추출물 투여군과 동일한 시간 및 경로로 투여하였다.¹²⁾ 양성대조시약 및 선학초 추출물의 최종 투여 후 48시간 후에 ether 마취하에 개복하여 복부 대동맥으로부터 채혈한 후 원심분리하여 혈청을 취하여 생화학분석에 이용하였다.

CCl₄ 유도 만성 간장해 모델 - 순화된 웅성 흰쥐에 CCl₄ : Olive oil 40% 용액을 0.5 ml/kg 용량으로 6일간 경구투여한 후, 7일째부터 선학초 추출물 0, 3.2, 16 및 80 mg/kg을 CCl₄ 투여 4시간 전 및 후에 경구로 14일간 투여하였다.¹²⁾ 마지막 투여 후 1일 간 절식시켜 ether마취 하에 복부대동맥으로부터 채혈 후 치사시켜 간을 적출하여 무게변화를 측정하였다.

혈액학적 검사 - 혈액학적 검사는 복부대동맥에서 채혈 후 EDTA-2K 처리된 시험관에 혼합하여, 자동측정장치 (JT Counter, Coulter Co., Miami, 미국)를 이용하여 WBC, RBC, Hb, HCT를 측정하였다.

혈청 생화학적 검사 - 복부대동맥에서 채취된 혈액을 혈청분리관 (RM603PS, Iatron Co., 일본)을 이용하여 혈액을 실온에서 응고시킨 후, 냉장고속원심분리기 (Avanti 30, Beckman Co., 미국)를 사용하여 5,000 rpm에 10분간 원심분리하였다. 분리된 혈청은 deep freezer (-70°C)에 보관하였으며, 생화학 자동분석기 (Advia 1650, Jeol Co., 일본)를 사용하여 ALT, AST, LDH 등을 측정하였다.

통계학적 분석 - 모든 시험결과는 평균±표준오차로 나타내었으며, 대조군과 투여군 사이의 통계학적 유의성은 Dunnett's test를 이용하여 $P<0.05$, $P<0.01$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 화학적 급성 및 만성 간장해 질환 모델을 통하여 선학초 (*Agrimony*; *Agrimonia* species, Rosaceae) 추출물의 간보호 효과에 대하여 연구하고자 하였다. D-galactosamine/LPS로 유도된 웅성 흰쥐를 음성대조군 (CON(-))으로 하고, 선학초 추출물 16, 80 및 400 mg/kg 용량으로 경구투여 하였을 때, CON(-)군은 AST 및 ALT수치가 각각 1261.2±99.4 및 675.4±6.8 IU/L로 화학적으로 간장해를 유도하지 않은 흰쥐(vehicle)의 AST 및 ALT 수치인 203.5±15.0 및 51.2±4.5 IU/L 보다 크게 증가된 반면, 선학초 추출물 투여군은 양성대조군으로 UDCA와 silymarin이

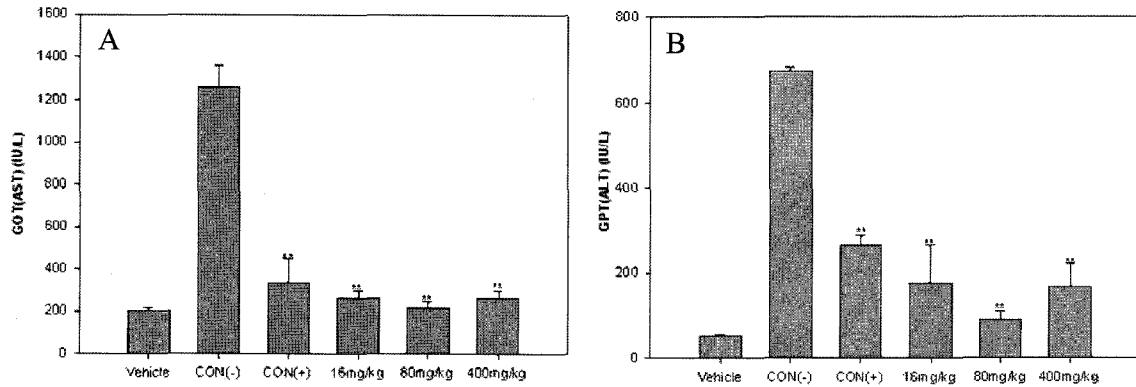


Fig. 1. Effects of *A. eupatoria* L. extracts on serum parameters in the D-galactosamine/LPS-treated rats. A, serum AST levels; B, serum ALT levels. Data represent the means±S.D. (n=6). Values significantly different from the controls group (CON(-)) are indicated (*) at $P<0.05$ and (**) at $P<0.01$. Vehicle: Olive oil, CON(-): D-galactosamine/LPS, CON(+): D-galactosamine/LPS with silymarin and UDCA.

병용 투여된 CON(+)군과 마찬가지로 AST 및 ALT수치가 용량 의존적으로 감소하여 ($P<0.05$ 및 $P<0.01$) 선학초 추출물에 의한 간보호 효과가 나타났다. 그러나, 고농도 투여군인 400 mg/kg투여군에서는 선학초 추출물 경구투여에 의한 간 보호효과가 나타났으나, 16 및 80 mg/kg에 비하여 AST및 ALT시험항목 모두에서 간보호 효과가 미약하였다 (Fig. 1). 이는 선학초 추출물을 고농도로 투여시 급성 간손상을 일으키거나, 고농도의 선학초 추출물 투여로 인한 간 대사 상승 등의 다른 생물학적 작용기전에 의하여 나타날 가능성이 있으므로, 선학초 추출물 고농도 투여시의 독성연구 등이 더 필요하다. 또한, 혈액학적 분석에서 WBC, RBC, Hb 및 HCT수치는 선학초 추출물 투여로 인한 변화가 관찰되지 않았다 (data not shown).

CCl₄로 유도된 간장해 모델에서는 복대동맥으로부터 채혈된 혈액에서의 혈청 AST 및 ALT 수치의 변화를 측정 한 결과, 화학적으로 간장해를 유도하지 않은 정상군 (vehicle)에 비하여 유의성 있게 증가하여 간장해가 유발되었음을 확

인하였고, 음성대조군 (CON(-))의 AST 및 ALT수치는 각각 349.7 ± 19.2 및 178.0 ± 15.0 IU/L이었으며, 선학초 추출물 16 mg/kg, 80 mg/kg을 경구투여 한 실험군의 수치가 음성대조군에 비하여 감소하여 선학초 추출물에 의한 간장해 보호효과가 유의성 있게 나타났다 ($P<0.05$ 및 $P<0.01$). CCl₄로 유도된 간장해 모델에서는 400 mg/kg에서 선학초 추출물 경구투여에 의한 간 보호효과가 거의 나타나지 않았으며, 이는 D-galactosamine/LPS유도 간손상 모델에서와 마찬가지로 선학초 추출물을 고농도로 투여시 급성 간손상을 일으키거나, 고농도의 선학초 추출물 투여로 인한 간 대사 상승 등의 다른 생물학적 작용기전에 의하여 나타날 가능성이 있으므로, 선학초 추출물 고농도 투여시의 독성연구 등이 더 필요하다 (Fig. 2). 또한, 혈액학적 분석에서 D-galactosamine/LPS 투여모델과 마찬가지로 WBC, RBC, Hb 및 HCT수치는 선학초 추출물 투여로 인한 변화가 관찰되지 않았다 (data not shown).

선학초 추출물에 의한 만성 간장해 치료효과를 규명하기

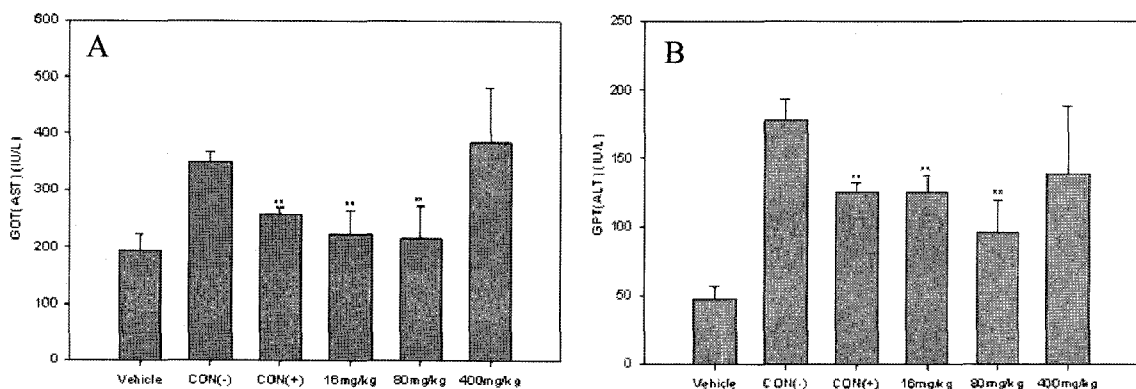


Fig. 2. Effects of *A. eupatoria* L. extracts on serum parameters in the CCl₄-treated rats. A, serum AST levels; B, serum ALT levels. Data represent the means±S.D. (n=6). Values significantly different from the controls group (CON(-)) are indicated (*) at $P<0.05$ and (**) at $P<0.01$. Vehicle: Olive oil, CON(-):CCl₄, CON(+):CCl₄ with silymarin and UDCA.

위하여 CCl₄로 간장해를 유발한 이후 선학초 추출물을 1일 1회 14일간 경구투여 한 결과, 체중대비 음성 대조군에서 감소된 간무게가 선학초 추출물에 의하여 회복되었으나, 16 mg/kg 투여군에서만 통계적으로 대조군에 비해 유의성 있게 나타나, 용량의존적인 양상을 나타내지 않았다 ($P<0.05$) (Table I). 혈액학적 분석결과, WBC, RBC, Hb 및 HCT항목에서 선학초 추출물 투여로 인한 통계적으로 유의성 있는 결과가 나타나지 않아 선학초 추출물은 혈액학적 지표에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Table II).

혈청내 간장 손상지표인 AST와 ALT 및 LDH (lactic dehydrogenase)를 측정된 결과, CCl₄로 간장해를 유도한 대조군의 수치가 정상 대조군에 비해 유의성 있게 증가 하였으며, 선학초 추출물 3.2, 16, 80 mg/kg 투여군에서 용량의

존적으로 유의성 있게 감소 ($P<0.05$ 및 $P<0.01$)하여 선학초 추출물에 의한 만성 간장해 치료효과를 가지는 것으로 관찰되었다 (Table III). 간독성 물질인 CCl₄가 간세포에 손상을 주게 되면, 손상을 입은 간세포에 의한 신호전달이 Kupffer cell을 활성화시키며, 이때 활성화된 Kupffer cell에 의한 활성산소종의 형성은 간 세포에 지질과산화와 같은 산화적 손상을 주게 되어 결국 간세포 사멸을 초래하게 된다.¹³⁾ 본 연구에서 양성 대조군으로 사용된 silymarin 및 UDCA는 이와 같이 활성화된 Kupffer cell에 의한 활성산소종의 형성을 선택적으로 억제하여 간장보호효과를 나타낸다는 보고가 있다. 또한, 본 연구의 결과 선학초 추출물은 CCl₄ 및 D-galactosamine/LPS으로 유도된 간독성으로부터 모두 보호작용을 나타내었다. 두가지 독성물질에 의한 간독성 유발기전

Table I. Effects of *A. eupatoria* L. extract on liver weights in the CCl₄-induced liver damage models

Parameters	Vehicle ^a	Treatment dose of agrimmony extract ^b			
		0 mg/kg	3.2 mg/kg	16 mg/kg	80 mg/kg
Body Weight(g)	283.4±24.57	258.6±20.40	272.50±17.15	264.8±15.70	256.9±11.13
Liver Weight(g)	14.5±2.19	12.1±1.49	13.9±1.89	14.5±1.11	12.3±0.81
RP ^c	5.1±0.4	4.7±0.3	5.1±0.4	5.5±0.3*	4.8±0.4

Each data represents mean±standard error of 6 rats.

^aVehicle: Olive oil treatment.

^bTreatment dose of agrimmony extract: CCl₄ was treated described in material and methods.

^cRP: Relative liver weights (g%).

Significantly different from the control value (0 mg/kg): *, $p<0.05$, **, $p<0.01$.

Table II. Effects of *A. eupatoria* L. extracts on hematological values in the CCl₄-treated rats

Parameters	Vehicle ^a	Treatment dose of agrimmony extract ^b			
		0 mg/kg	3.2 mg/kg	16 mg/kg	80 mg/kg
WBC(IU/L)	9.5±0.97	8.2±0.7	8.9±1.52	7.3±0.48	9.3±1.29
RBC(IU/L)	7.6±0.20	8.1±0.28	8.0±0.22	8.1±0.32	8.0±0.24
Hb(g/dl)	14.4±0.48	14.8±0.41	14.6±0.19	15.5±0.73	14.4±0.66
HCT(%)	47.6±2.17	48.8±1.52	47.4±0.75	49.8±2.26	46.6±1.08

Each data represents mean±standard error of 6 rats.

^aVehicle: Olive oil treatment.

^bTreatment dose of agrimmony extract: CCl₄ was treated described in material and methods.

Table III. Effects of *A. eupatoria* L. extracts on serum parameters in the CCl₄-treated rats

Parameters	Vehicle ^a	Treatment dose of agrimmony extract ^b			
		0 mg/kg	3.2 mg/kg	16 mg/kg	80 mg/kg
AST(IU/L)	118.0±17.23	640.8±46.98	566.5±26.91**	429.0±21.68**	401.0±25.29**
ALT(IU/L)	37.0±2.74	608.2±59.01	593.7±31.45	513.0±32.30**	462.4±34.28**
LDH(IU/L)	1736.6±156.68	1974.0±112.57	1943.7±173.63	1356.0±151.18**	1050.4±130.09 **

Each data represents mean±standard error of 6 rats.

^aVehicle: Olive oil treatment.

^bTreatment dose of agrimmony extract: CCl₄ was treated described in material and methods.

Significantly different from the control value (0 mg/kg): *, $p<0.05$, **, $p<0.01$.

은 서로 다른 것으로 알려져 있다. 즉, CCl₄의 간독성 유발은 주로 free radical에 의하여 유발되는 것이고 D-galactosamine/LPS는 주로 RNA와 단백질 합성의 저해 및 탄수화물 대사에 이상을 초래하여 나타나는 것으로 보고되어 있다.¹⁴⁾ 따라서, 선학초 추출물은 항산화작용에 의해서만 간독성 보호작용을 나타내는 것이 아니라 다른 기전에 의해서도 나타남을 알 수 있었으며, 이와 관련된 간보호 작용기전에 대한 연구가 필요하다.

결론적으로 본 연구의 결과 선학초 (*A. eupatoria*) 수용성 추출물은 화학적으로 간장해가 유도된 동물시험 모델에서 대표적 간손상 지표인 AST, ALT의 수치를 회복시킴으로써 간기능 보호효과를 나타내는 것으로 판단되었다. 그러나, 본 연구의 결과는 대표적 간손상 지표인 AST 및 ALT수치에 대한 회복효과에 국한되어 있어, 향후 선학초 추출물의 유효성분 분리 및 구조규명과 더불어 체중변화 및 간무게 변화에 대한 선학초 추출물이 미치는 영향, AST 및 ALT외의 간대사 지표에 대한 연구, 이와 관련하여 간장보호 작용기전 등에 대한 연구가 진행 되어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 경기도 지역협력연구사업비 지원으로 수행되었으며, 시험에 사용된 시료의 추출과 공급에 도움을 주신 (주)바이오크리아 이영성 대표이사께 감사 드립니다.

인용문헌

- Lee, J.W., Chio, J.H. and Kang, S.M. (1992) Screening of medicinal plants having hepatoprotective activity effect with primary cultured hepatocytes intoxicated using carbon tetrachloride cytotoxicity. *Kor. J. Pharmacogn.* **23**: 268-275.
- Ferenci, P., Dragosics, B., Dittrich, H., Frank, H., Benda, L., Lochs, H., Meryn, S., Base, W. and Schneider, B. (1989) Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J. Hepatol.* **9**: 105-113.
- Mascher H., Kikuta, C. and Weyhenmeyer, R. (1993) Diastomeric separation of free and conjugated silibinin in plasma by reversed phase HPLC after specific extraction. *J. Liquid Chromatogr.* **16**: 2777-2789.
- Lee, K.M., Harm, K.B., Cho, S.W., Oh, T.Y., Choi, S.M., Kim, J.H., Ahn, B.O., Kwon, J.W. and Kim, W.B. (2002) Curcuma extract enhances hepatoprotective action of silymarin in experimental liver damage models. *J. Appl. Pharmacol.* **10**: 12-18.
- Moon, J.-O. and Park, J.-H. (1997) Screening of the hepatoprotective drugs from folk medicines. *Kor. J. Pharmacogn.* **28**: 156-161.
- Kwon, D.H., Kwon, H.Y., Kim, H.J., Chang, E.J., Kim, M.B., Yoon, S.K., Song, E.Y., Yoon, D.Y., Lee, Y.H., Choi, I.S. and Choi, Y.K. (2005) Inhibition of hepatitis B virus by an aqueous extract of *Agrimonia eupatoria* L. *Phytother. Res.* **19**: 355-358.
- Kang, B.S. (1992) Medical herbs. Young-Rym-Sa, Seoul, pp. 384-386.
- Min, B., Kim, Y., and Tomiyama, M. (2001) Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities. *Phytother. Res.* **15**: 481-486.
- Miyamoto, M., Kishi, N. and Koshiura R. (1987) Antitumor effect of agrimonin, a tannin of *Agrimonia pilosa* Ledeb., on trans-plantable rodent tumors. *Jpn. J. Pharmacol.* **43**: 187-195.
- Swanston-Flatt, S., Day, C. and Bailey, C. (1990) Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia* **33**: 462-464.
- Park, E.J., Oh, H.C., Kang, T.H., Sohn, D.H. and Kim, Y.C. (2004) An isocoumarin with hepatoprotective activity in HepG2 and primary hepatocytes from *Agrimonia pilosa*. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 944-946.
- 정기화, 윤유식 (2004) 간기능 관련 기능성 시험, 229-231. 한국보건공정서연구회, 서울.
- Dehmlow, C., Erhard, J. and de Groot, H. (1996) Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology* **23**: 749-754.
- Zimmerman, H.J. (1999) Hepatotoxicity; The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver, 2nd Ed., 111. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

(2006년 1월 10일 접수)