

사염화탄소에 의한 간독성에 미치는 홍화자의 보호작용

정기화* · 정춘식

덕성여자대학교 약학대학

Protective Effect of *Carthamus tinctorius* L. Semen on Hepatotoxicity by Carbon Tetrachloride in Rats

Ki Hwa JUNG, Choon Sik JEONG

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

(Received November 9, 1996; accepted December 27, 1996)

Abstract – The protective effect of *Carthamus tinctorius* L. Semen on the carbon tetrachloride induced liver damaged rats were studied. First, methanol extract was prepared and the extract was fractionated with hexane, CHCl₃, BuOH and H₂O respectively. Animals were divided into 6 groups and each group was treated with each fraction respectively. To investigate the hepato-protective effect of *Carthamus tinctorius* L. Semen AST, ALT, albumin, TP, cholesterol, TG, creatinine and total bilirubin values were measured in each treated group and compared with those of control group. GST activity was increased in BuOH group compared with the control group. In malondialdehyde levels, all fractions was decreased compared with the control group. In histopathologic examination, hexane and H₂O fractions of *Carthamus tinctorius* L. Semen observed mild degree of ballooning degeneration. The results show the protective effect of Hexane, CHCl₃, BuOH and H₂O fractions on hepatotoxicity of CCl₄ by decreasing ALT, AST, bilirubin, cholesterol, TG and BUN. It seems that the decrease of MDA are related to the recovery effect. The protective effects of *Carthamus tinctorius* L. Semen fractions in hepatotoxic pathogenesis by CCl₄ was suggested in blood chemistry analysis and histopathologic examination.

Keywords □ *Carthamus tinctorius* L. Semen, ALT, AST, cholesterol, triglyceride, BUN, carbon tetrachloride, GST activity, malondialdehyde

홍화(*Carthamus tinctorius* L.)는 국화과에 속하는 일년생 식물로 개화기의 관상화를 말린 것으로 일경불순, 통경, 진통, 혈액순환촉진, 허혈제거 및 항염증작용이 있으며 (Wang 등, 1983; Xu 등, 1989) 50% methanol(MeOH)추출물은 mice에 유발된 tumour를 억제한다고 한다(Toshihiro 등, 1994). 또한 혈압강하 및 심근 흥분작용이 있으며 동물실험을 통하여 경구투여시 혈전증과 고점도혈증에 효과가 있음을 보고하였다(정찬길, 1989). 그러나 경구로 대량 혹은 장기 투여시 자궁의 수축을 촉진시켜 유산의 가능성이 있으며, 진전 호흡억제 등 신경증상을 일으키며 피부과민증상을 유발하기도 한다(이상인 등, 1982; 정보섭과 신민교, 1990). 또한 임신유지와 임신 중 황체기능을 억제하며 임신 중 신장기능에 손상을 초래할 수도 있음을 보고하였다(김상우, 1992).

홍화의 성분으로 꽃에서 홍색소 및 황색소인 carthamin 및 safflor yellow A와 B(Onodera 등, 1979; Onodera 등, 1981; Takahashi 등, 1982; Takahashi 등, 1984), flavonoid류인 kaempferol, quercetin, alkendiols인 erythro-alkane-6, 8-diols, steryl ester류인 stigmasteryl stearate, stigmasteryl linoleate과 stigmasteryl linolenate가 있으며 잎, 줄기 및 뿌리 등에서 luteolin-7-glucoside 및 polyacetylene류를 함유하며 (Kim과 Kim, 1992; 육창수 등, 1980) 씨에는 지방유가 20~30% 함유되어 있는데 주로 linoleic acid과 oleic acid의 glyceride이다(서석수, 1983). 홍화자는 홍화의 씨로서 홍화에 대한 성분연구 및 효과에 대해서는 알려져 있으나 홍화자에 대한 약효 및 성분연구는 드물다.

인체는 환경성 독성 물질과 접하게 되었을 경우 이에 적응하여 생존할 수 있도록 일종의 방어 기전을 갖고 있다. 생체내의 생리적 방어기전에 관여하는 약물의 생화학적 변형은 주로 간에서 이루어지고 있으며 그 외 신장, 폐, 위장

* To whom correspondence should be addressed.

및 결장 내에서도 일부 이루어진다.

세포는 간독성을 유발하는 용매(Mathnew와 Donald, 1963; Stewart 등 1963)로 알려진 CCl₄에 의해 간 세포 내의 endoplasmic reticulum과 미토콘드리아막의 투과성을 변화시켜서 효소의 활성 및 세포변성을 초래한다. CCl₄에 의한 간독성은 cytochrome P450에 의한 reductive dehalogenation에 의한 것으로 알려져 있다(Pohl 등, 1986).

본 실험에서는 천연물 성분의 약효와 간독성에 관여하는 기전연구의 일환으로 흰쥐에서 CCl₄에 의한 간독성에 홍화자 추출물과 분획물이 미치는 효과를 규명하였다. 홍화자의 MeOH추출물과 이를 hexane, chloroform(CHCl₃), butanol(BuOH) 및 H₂O로 계통분획하여 투여한 흰쥐에서 혈청 AST와 ALT 활성도, blood urea nitrogen(BUN), creatinine, total protein(TP), albumin, cholesterol, triglyceride(TG) 및 total bilirubin 등의 변화를 관찰하였으며 또한 조직 중의 지질과산화물을 TBA법을 이용하여 측정하고 친전자성 독성물질의 해독에 관여하는 GST 활성도를 측정하였다. 또한 간조직의 손상정도를 조직학적 검경을 통해 관찰하였다.

실험방법

실험재료

본 실험에 사용한 홍화자는 한약유통(Seoul, Korea)에서 구입하였다.

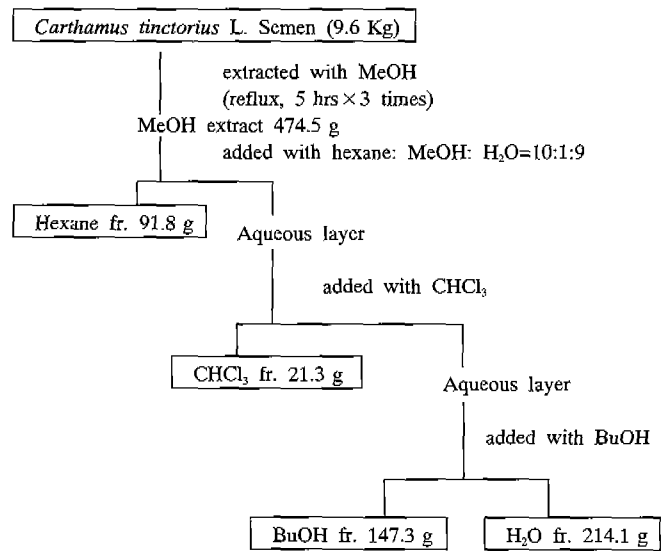
시약과 기기

시약은 carbon tetrachloride(Duksan Pharmaceutical Co., Korea), AST kit, ALT kit, protein kit, albumin kit, cholesterol kit, triglyceride kit, bilirubin kit, BUN kit 및 creatinine kit(Yeoungdong pharmaceutical Co., Korea), bovine serum albumin, 1,1,3,3-tetraethoxypropane Foline ciocalteu's phenol reagent, thiobarbituric acid, sodium citrate, sodium bicarbonate, copper sulfate, sodium potassium tartrate, CDNB, potassium phosphate, glutaraldehyde, osmium tetroxide, propylen oxide, toluidine blue, uranyl acetate, sodium acetate (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 기타시약과 추출용매는 시판 특급시약을 사용하였다.

기기는 high speed centrifuge(DuPont Sorvall instrument, Model RC-5C), ultracentrifuge(Beckman Co., Ltd. L-80), ice maker(Welbilt Co. USA), micropipet(Gilson Co.), microscope(Hitachi H-600), UV spectrophotometer(Hewlett Packard HP 8452A Diode-Array), osterizer blender(Oster Co., Listed 564A Household type), ultracut(Reich-ert-Jung), Tissue tearor (Biospec products, Inc. Model 985-370) 및 Evaporator(Eyela)를 사용하였다.

홍화자의 추출과 분획

홍화자를 MeOH로 수욕상에서 5 시간씩 3회 추출한 후



Scheme 1. Extraction and fractionation of *Carthamus tinctorius* L. Semen.

온시 여과하고 여액을 감압 농축하였다. 홍화자 MeOH 추출물을 hexane, CHCl₃ 및 BuOH로 계통 분획하여 얻은 분획물은 감압 농축하여 밀봉 냉장 보관하였으며 필요시 적정농도로 환산하여 사용하였다(Scheme 1).

실험동물의 처리 및 간독성 유발

Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 실내온도 22±1 °C에서 충분한 물과 고형 사료를 공급하여 체중이 200 g 내외가 되도록 사육하였다.

홍화자의 MeOH추출물은 500 mg과 1000 mg을 투여하여 예비실험을 거친 후 hexane, CHCl₃, BuOH 및 H₂O분획물로 나누고 200, 100, 500 및 500 mg/kg의 용량으로 3일간 경구 투여하였다.

CCl₄는 corn oil을 vehicle로 하여 각각의 홍화자추출물과 분획물 투여 3시간 후 0.2 ml/kg/day 용량으로 복강투여하여 간독성을 유발시켰다.

채혈과 혈청분리

약물 최종 투여 24시간 후 ether로 마취시키고 복부 정중선을 절개하여 심장에서 채혈하고 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리시켜 얻은 혈청을 시료로 사용하였다.

CCl₄ 간독성에 대한 홍화자 MeOH추출물의 효과

홍화자 MeOH추출물의 CCl₄에 의한 간독성에 대한 효과를 관찰하기 위해 홍화자 MeOH추출물을 경구투여한 흰쥐의 혈청으로부터 ALT와 AST 활성도, albumin, TP, cholesterol, TG, BUN 및 creatinine함량을 분석하였다.

체중과 간의 무게 측정

홍화자의 hexane, CHCl₃, BuOH과 H₂O분획투여군에 대하여 최종 약물 투여 후의 체중과 간의 무게를 측정하여 체중에 대한 간의 무게로 환산하였다.

혈청 생화학적 분석

홍화자 MeOH추출물을 hexane, CHCl₃, BuOH 및 H₂O로 계통분획하여 얻은 각 분획물을 시료로 하여 혈청 AST, ALT, albumin, TP, cholesterol, TG, BUN, creatinine 및 total bilirubin을 kit를 이용하여 분석하였다.

Microsome과 cytosol 분리

흰쥐의 간을 저출하여 PBS로 혈액 등을 제거한 후 간의 3배 용량의 0.1 M-Tris-KCl buffer(0.1 M Tris Ac, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)를 가하고 Osterizer blender를 이용하여 조직을 분쇄한 다음 8,000 g에서 30분과 10,000 g에서 30분간 원심분리한 다음 그 상정액을 취하여 105,000 g에서 90분간 초원심분리하였다.

여기에서 그 상정액인 cytosol을 분리하였다. 분리한 cytosol은 분주하여 사용하기 전까지 -70 °C의 냉동고에 보관하였다. 남은 침전물인 microsome을 동량의 0.1 M sodium pyrophosphate buffer(0.1 M sodium pyrophosphate, 1 mM EDTA, pH7.4)로 현탁시켜 144,000 g에서 60분간 초원심분리한 후 얻은 침전물인 microsome을 50 mM Tris Ac buffer(50 mM Tris-Ac, 20% glycerol, 1 mM EDTA, pH7.4)에 rehomogenation하여 -70 °C의 냉동고에 보관하였다. 이때 모든 조작은 4 °C이하에서 실시하였다.

단백정량

Microsome과 cytosol 내의 단백질량은 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 실시하였다.

즉 회석된 microsome과 cytosol 0.6 ml에 0.5 ml Lowry complex(0.2 ml 4% sodium potassium tartrate, 0.2 ml 2% copper sulfate와 10.0 ml의 4% sodium bicarbonate/0.2 N sodium hydroxide 용액을 사용 직전에 혼합한 용액)를 가하고 신속하게 혼합하였다. 15분 후 0.1 ml의 Folin Cio-calteou's phenol 시약을 가하고 즉시 섞은 후 30분간 방치하고 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질의 농도는 bovine serum albumin을 사용하여 만든 standard curve로부터 얻었다. 이 방법으로 정량한 결과 microsome은 13.26~21.60 mg/ml, cytosol은 9.25~19.61 mg/ml의 단백질을 함유하고 있었다.

GST 활성도 측정

Cytosol에 존재하는 GST 활성도는 Habig 등(1974)의 방법에 따라 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5), cytosol 단백질 25 µg을 배양액에 넣고 25 °C에서 2분간 방치 후 기질로써 1.0 mM의 CDNB와 1.0 mM의 GSH를 가하여 총량을 1.0 ml로 한 후 즉시 340 nm에서 10초 간격으로 100초 동안 흡광도를 측정하였다.

Blank로는 가열하여 불활성화한 cytosol단백질을 사용하였으며 분자흡광계수는 9.6 µM⁻¹cm⁻¹로 환산하여 계산하였다.

지질과산화물 함량 측정

Microsome의 지질과산화물은 Uchiyama 등(Uchiyama와

Mihara, 1978)의 방법에 따라 시행하였다.

Microsome 0.5 ml에 1% H₃PO₄와 0.67% TBA 시약을 가하고 95 °C water bath에서 45분 경과 후 실온까지 냉각하고 BuOH 4.0 ml를 가해서 진탕추출한 후 원심분리하여 BuOH 층을 취해 535 nm와 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

표준액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하여 검체에서의 malondialdehyde(MDA) 생성량을 계산하고 이를 nmol/mg protein으로 나타내었다.

조직학적 검경

흰쥐의 간을 1 mm³의 크기로 잘라 2.5% glutaraldehyde에 4 °C에서 2시간동안 고정하였으며 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4)로 세척하였다.

세척 후 1% osmium tetroxide 용액(pH 7.4)에 4 °C에서 1시간동안 후고정하였으며 buffer(pH 7.4)로 세척한 다음 알콜상승농도순으로 무수알콜까지(60~100%) 탈수하고 propylen oxide로 치환하였다. 치환한 조직을 epon 812에 포매한 후 60 °C oven에서 24시간 중합시킨 후 초박절기를 이용하여 semithin section(0.35 µm)과 ultrathin section(70 nm)을 행하여 절편을 제작한 후 각각 toluidine blue, uranyl acetate 및 lead citrate로 염색하여 광학현미경으로 검경하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균과 표준편차를 계산하였고 대조군과 실험군의 차이는 student t-test를 사용하여 p값이 5%미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

CCl₄ 간독성에 대한 홍화자 MeOH추출물의 효과

홍화자 MeOH추출물에서 CCl₄에 의한 간독성 효과를 관찰하기 위하여 혈청 중 ALT와 AST의 활성도를 Table I에, albumin과 TP의 변화를 Table II에, cholesterol과 TG의 변화를 Table III에, BUN과 creatinine의 변화를 Table IV에 나타내었다.

Table I. Effects of methanol extract of *Carthamus tinctorius* L. Semen on ALT and AST activities in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	ALT (KA unit/l)	AST (KA unit/l)
Untreated	-	45.5± 8.9	115.9± 18.8
CCl ₄	-	414.1± 132.0	512.9± 169.7
C. t.+CCl ₄	500	228.2± 110.9*	286.6± 23.3*
C. t.+CCl ₄	1,000	164.5± 23.4**	332.0± 73.3

C. t.: *Carthamus tinctorius* L. Semen. The values are mean S. D. (n=6).

*P<0.05 compared to the CCl₄ group.

**P<0.01 compared to the CCl₄ group.

Table II. Effects of methanol extract of *Carthamus tinctorius* L. Semen on albumin and TP levels in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Albumin (g/dl)	TP (g/dl)
Untreated	-	2.92±0.31	5.22±1.03
CCl ₄	-	2.43±0.57	4.00±0.44
C. t.+CCl ₄	500	3.26±0.57*	5.15±0.77*
C. t.+CCl ₄	1,000	2.61±0.73	5.00±0.68*

C. t.: *Carthamus tinctorius* L. Semen
The values are mean S.D. (n=6).
*P<0.05 compared to the CCl₄ group.

Table III. Effects of methanol extract of *Carthamus tinctorius* L. Semen on cholesterol and TP levels in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Cholesterol (mg/dl)	TG (mg/dl)
Untreated	-	63.5±12.2	70.2±9.1
CCl ₄	-	66.6±18.6	90.4±23.3
C. t.+CCl ₄	500	56.1±14.6	65.6±14.3
C. t.+CCl ₄	1,000	45.7±11.1	66.6±19.9

C. t.: *Carthamus tinctorius* L. Semen
The values are mean S.D. (n=6).

Table IV. Effects of methanol extract of *Carthamus tinctorius* L. Semen on BUN and creatinine levels in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
Untreated	-	10.4±0.9	0.99±0.35
CCl ₄	-	11.0±2.8	1.00±0.26
C. t.+CCl ₄	500	11.5±1.6	0.93±0.12
C. t.+CCl ₄	1,000	9.8±2.5	1.02±0.08

C. t.: *Carthamus tinctorius* L. Semen
The values are mean S.D. (n=6).

홍화자의 MeOH추출물은 CCl₄에 의한 간독성에 의해 증가된 ALT 활성도를 유의적으로 감소시켰으며, AST활성도와 cholesterol 및 TG의 함량도 감소시켰다. 간에서 합성되며 교질삼투압을 유지시키는 albumin함량은 유의적으로 증가시켰다.

이 실험을 통해 홍화자가 CCl₄에 의한 간독성을 억제시킴을 알 수 있었다.

홍화자 분획물의 간의 무게에 미치는 영향

최종 약물 투여 후 체중에 대한 간의 무게를 Table V에 나타내었다. 최종 약물 투여 후의 체중에 대한 간의 무게비를 보면 정상군의 경우 3.41±0.29 g에 비해 CCl₄투여군에서 3.96±0.73 g으로 증가하였으나 hexane, BuOH 및 H₂O 분획투여군에서는 각각 3.93±0.47 g, 3.72±0.28 g 및 3.94±0.46 g으로 감소하였다.

ALT와 AST 활성도

ALT 활성도는 CCl₄투여군의 경우 414.1±132 KA unit/l

Table V. Effects of *Carthamus tinctorius* L. Semen fractions on liver weight in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Liver weight (g)	Liver weight/100 g BW (g)
Untreated	-	5.52±3.78	3.41±0.29
CCl ₄	-	7.00±1.00	3.96±0.73
Hexane fr.+CCl ₄	200	7.20±0.78	3.93±0.47
CHCl ₃ fr.+CCl ₄	100	7.50±0.98	4.01±0.26
BuOH fr.+CCl ₄	500	6.60±0.39	3.72±0.28
H ₂ O fr.+CCl ₄	500	7.00±0.57	3.94±0.46

The values are mean±S.D. (n=6).

Table VI. Effects of *Carthamus tinctorius* L. Semen fractions on ALT and AST activities in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	ALT (KA unit/l)	AST (KA unit/l)
Untreated	-	15.5± 3.9	115.9±18.8
CCl ₄	-	414.1±132.0	512.9±169.7
Hexane fr.+CCl ₄	200	152.5± 21.7**	265.7±108.0*
CHCl ₃ fr.+CCl ₄	100	216.8± 97.5*	381.9±102.7
BuOH fr.+CCl ₄	500	69.9±32.8**	177.3± 71.2**
H ₂ O fr.+CCl ₄	500	140.3± 5.3**	286.6± 23.3*

The values are mean±S.D. (n=6).

Table VII. Effects of *Carthamus tinctorius* L. Semen fractions on bilirubin level in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Bilirubin (mg/dl)
Untreated	-	3.33±1.20
CCl ₄	-	3.89±1.32
Hexane fr. +CCl ₄	200	3.30±1.02
CHCl ₃ fr. +CCl ₄	100	2.33±1.00
BuOH fr. + CCl ₄	500	1.72±0.57*
H ₂ O fr. +CCl ₄	500	3.41±2.98

The values are mean±S.D. (n=6).
*P<0.05 compared to the CCl₄ group.

이었고 hexane분획투여군은 152.5±21.7 KA unit/l, CHCl₃분획투여군에서는 216.8±97.5 KA unit/l, BuOH분획투여군에서는 69.9±32.8 KA unit/l 및 H₂O분획투여군에서는 140.3±5.3 KA unit/l로 모든 군에서 CCl₄투여군에 비해 유의성있는 감소를 보였다(Table VI).

AST 활성도는 CCl₄투여군의 경우 512.9±169.7 KA unit/l이었고 hexane분획투여군은 265.7±108 KA unit/l, CHCl₃분획투여군은 381.9±102.7 KA unit/l, BuOH분획투여군은 177.3±71.2 KA unit/l 및 H₂O분획투여군은 286.6±23.3 KA unit/l로 CHCl₃분획투여군을 제외한 모든 군에서 유의성있는 감소를 보였다(Table VI).

Bilirubin 함량

Bilirubin함량에 있어서는 CCl₄투여군에서 3.89±1.32 mg/dl, hexane분획투여군에서 3.30±1.02 mg/dl, CHCl₃분획

투여군에서 2.33 ± 1.00 mg/dl, BuOH분획투여군에서 1.72 ± 0.57 mg/dl 및 H₂O분획투여군에서 3.41 ± 2.98 mg/dl로 모두 감소하였으며 BuOH분획투여군에서는 유의성있는 감소를 보였다(Table VII).

Albumin과 TP 함량

Albumin함량은 CCl₄투여군의 경우 2.43 ± 0.57 g/dl이었고 hexane분획투여군은 2.56 ± 1.08 g/dl, CHCl₃분획투여군은 3.13 ± 1.15 g/dl, BuOH분획투여군은 3.35 ± 0.52 g/dl 및 H₂O분획투여군은 3.93 ± 0.18 g/dl로 증가하였으며 그중 BuOH분획투여군과 H₂O분획투여군은 유의성있는 증가를 보였다(Table VIII).

TP함량에 있어서는 CCl₄투여군에서 4.00 ± 0.44 g/dl, hexane분획투여군은 4.81 ± 0.73 g/dl, CHCl₃분획투여군은 4.3 ± 1.01 g/dl, BuOH분획투여군은 5.33 ± 0.64 g/dl 및 H₂O분획투여군은 6.30 ± 0.17 g/dl로 CCl₄투여군에 비해 증가하였으며 CHCl₃분획투여군을 제외한 모든 군에서 유의성있는 증가를 보였다(Table VIII).

Cholesterol과 TG 함량

Cholesterol함량에 있어서는 정상군에서 54.8 ± 13.3 mg/dl이었고 CCl₄투여군은 55.3 ± 10.5 mg/dl, hexane분획투여군은 45.2 ± 8.2 mg/dl, CHCl₃분획투여군은 40.7 ± 14.8 mg/dl, BuOH분획투여군은 31.3 ± 7.3 mg/dl 및 H₂O분획투여군은 46.7 ± 6.8 mg/dl로 CCl₄투여군에 비하여 다소 감소하였다

(Table IX).

TG함량은 정상군에서 59.6 ± 9.1 mg/dl, CCl₄투여군은 70.4 ± 23.3 mg/dl, hexane분획투여군은 55.8 ± 8.4 mg/dl, CHCl₃분획투여군은 57.4 ± 20.7 mg/dl, BuOH분획투여군은 51.1 ± 20.7 mg/dl 및 H₂O분획투여군은 47.2 ± 11.8 mg/dl로 모든 군에서 CCl₄투여군에 비하여 감소하였다(Table IX).

BUN과 creatinine 함량

BUN함량에 있어서는 정상군에서 10.4 ± 0.9 mg/dl, CCl₄투여군은 11.0 ± 2.8 mg/dl, hexane분획투여군은 10.4 ± 1.9 mg/dl, CHCl₃분획투여군은 8.4 ± 2.0 mg/dl, BuOH분획투여군은 7.4 ± 3.8 mg/dl, H₂O분획투여군은 10.6 ± 4.1 mg/dl로 CCl₄투여군에 비하여 감소하였다(Table X).

Creatinine함량은 정상군에서 0.99 ± 0.35 mg/dl, CCl₄투여군은 1.00 ± 0.26 mg/dl, hexane분획투여군은 0.95 ± 0.08 mg/dl, CHCl₃분획투여군은 1.03 ± 0.16 mg/dl, BuOH분획투여군은 0.83 ± 0.09 mg/dl 및 H₂O분획투여군은 1.02 ± 0.03 mg/dl로 CCl₄투여군과 차이를 보이지 않았다(Table X).

GST 활성도

각 실험군의 간에서 분리한 cytosol을 시료로 CDNB를 기질로 하여 GST효소활성도를 측정하였다(Table XI).

GST활성도는 CCl₄투여군의 1.46 ± 0.32 mol/min/mg protein에 비해 BuOH분획투여군에서는 2.00 ± 0.17 mol/min/mg protein으로 유의성있는 증가를 보였다($p < 0.01$).

지질과산화물 함량

Table VIII. Effects of *Carthamus tinctorius* L. Semen fractions on albumin and TP levels in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Albumin (g/dl)	TP (g/dl)
Untreated	-	2.92 ± 0.31	5.22 ± 1.03
CCl ₄	-	2.43 ± 0.57	4.00 ± 0.44
Hexane fr.+CCl ₄	200	2.56 ± 1.08	$4.81 \pm 0.83^*$
CHCl ₃ fr.+CCl ₄	100	3.13 ± 1.15	4.30 ± 1.01
BuOH fr.+CCl ₄	500	$3.35 \pm 0.52^*$	$5.33 \pm 0.64^{**}$
H ₂ O fr.+CCl ₄	500	$3.93 \pm 0.18^{**}$	$6.30 \pm 0.17^{***}$

The values are mean \pm S.D. (n=6).

*P<0.05 compared to the CCl₄ group.

**P<0.01 compared to the CCl₄ group.

Table IX. Effects of *Carthamus tinctorius* L. Semen fractions on cholesterol and TG levels in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Cholesterol (mg/dl)	TG (mg/dl)
Untreated	-	54.8 ± 13.3	59.6 ± 9.1
CCl ₄	-	55.3 ± 10.5	70.4 ± 23.3
Hexane fr.+CCl ₄	200	45.2 ± 8.2	55.8 ± 8.4
CHCl ₃ fr.+CCl ₄	100	40.7 ± 14.8	57.4 ± 17.8
BuOH fr.+CCl ₄	500	31.3 ± 7.3	51.1 ± 20.7
H ₂ O fr.+CCl ₄	500	46.7 ± 6.8	47.2 ± 11.8

The values are mean \pm S.D. (n=6).

Table X. Effects of *Carthamus tinctorius* L. Semen fractions on BUN and creatinine levels in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
Untreated	-	10.4 ± 0.9	0.99 ± 0.35
CCl ₄	-	11.0 ± 2.8	1.00 ± 0.26
Hexane fr.+CCl ₄	200	10.4 ± 1.9	0.95 ± 0.08
CHCl ₃ fr.+CCl ₄	100	8.4 ± 2.0	1.03 ± 0.16
BuOH fr.+CCl ₄	500	7.4 ± 3.8	0.83 ± 0.09
H ₂ O fr.+CCl ₄	500	10.6 ± 4.4	1.02 ± 0.03

The values are mean \pm S.D. (n=6).

Table XI. Effects of *Carthamus tinctorius* L. Semen fractions on GST activity in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	GST (μ mol/min/mg protein)
Untreated	-	1.49 ± 0.27
CCl ₄	-	1.46 ± 0.32
Hexane fr.+CCl ₄	200	1.68 ± 0.27
CHCl ₃ fr.+CCl ₄	100	1.55 ± 0.27
BuOH fr.+CCl ₄	500	$2.00 \pm 0.17^*$
H ₂ O fr.+CCl ₄	500	1.45 ± 0.16

The values are mean \pm S.D. (n=6).

*P<0.01 compared to the CCl₄ group.

Table XII. Effects of *Carthamus tinctorius* L. Semen fractions on MDA level in the CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	MDA (nmol/mg protein)
Untreated	-	1.40±0.16
CCl ₄	-	1.60±0.09
Hexane fr.+CCl ₄	200	0.89±0.21**
CHCl ₃ fr.+CCl ₄	100	1.27±0.24*
BuOH fr.+CCl ₄	500	1.22±0.18*
H ₂ O fr.+CCl ₄	500	0.57±0.14

The values are mean ± S.D. (n=6).

*P<0.01 compared to the CCl₄ group.

**P<0.001 compared to the CCl₄ group.

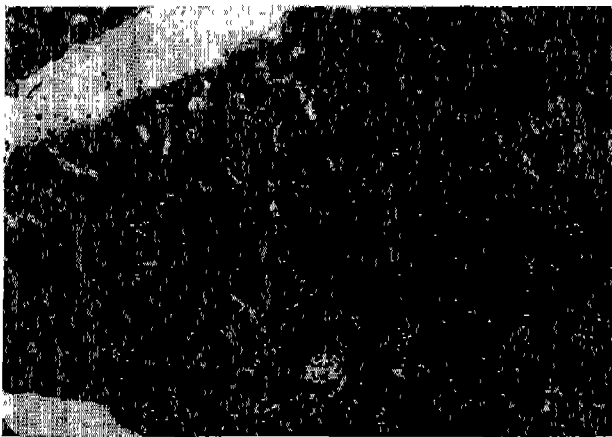


Fig. 1. Micrograph of hepatic structure in normal rats (Semithin × 200). Note well-preserved lobular architecture.

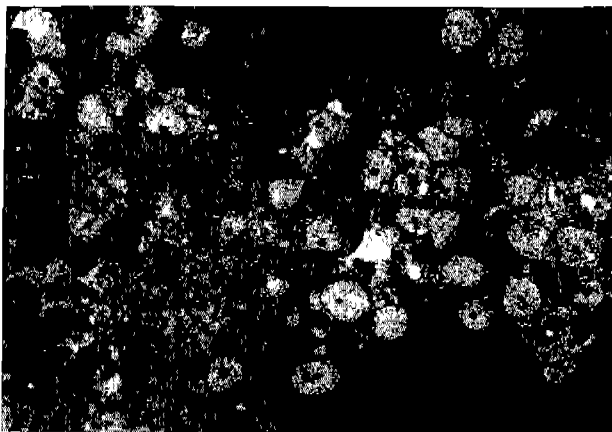


Fig. 2. Micrograph of hepatic structure in CCl₄ treated rats (Semithin × 200). Note severe ballooning-degeneration of hepatocytes.

각 실험군의 간에서 분리한 microsome을 시료로 하여 MDA 생성량을 측정하 결과 CCl₄투여군은 1.60±0.09 nmol/mg protein으로 hexane분획투여군은 0.89±0.21, CHCl₃분획투여군은 1.27±0.24, BuOH분획투여군은 1.22±0.18 및

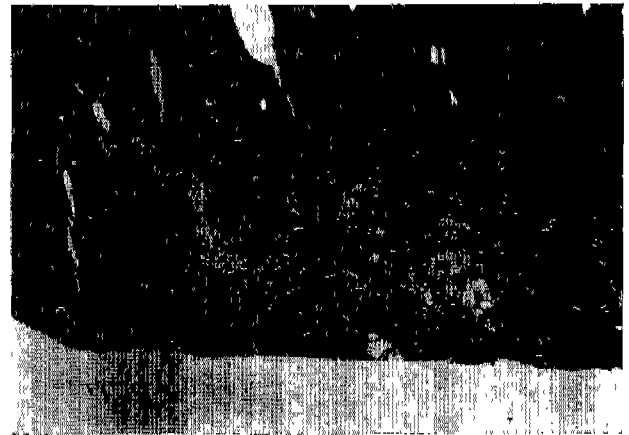


Fig. 3. Micrograph of hepatic structure in methanol extract (500 mg) treated rats (Semithin × 200). Note mild degree of ballooning degeneration.

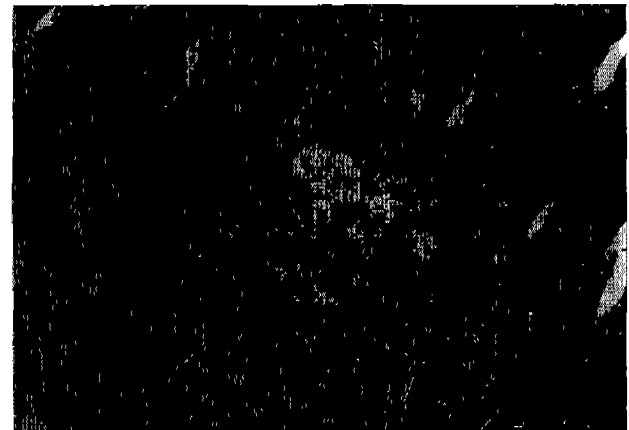


Fig. 4. Micrograph of hepatic structure in methanol extract (1000 mg) treated rats (Semithin × 200). Note mild degree of ballooning degeneration.



Fig. 5. Micrograph of hepatic structure in hexane fr. treated rats (Semithin × 200). Note mild degree of ballooning degeneration just around the central vein.

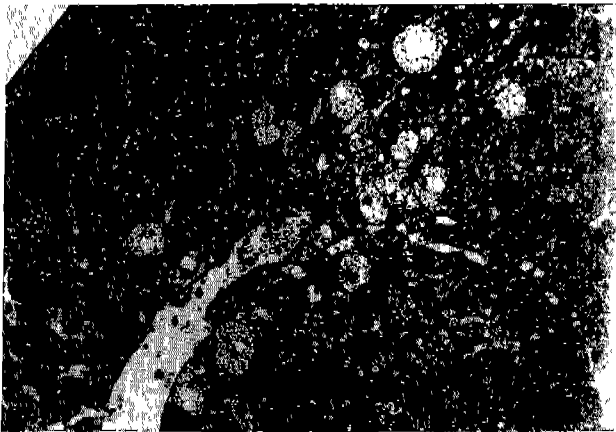


Fig. 6. Micrograph of hepatic structure in CHCl₃ fr. treated rats. (Semithin x200). Note mild degree of ballooning degeneration just around the central vein.

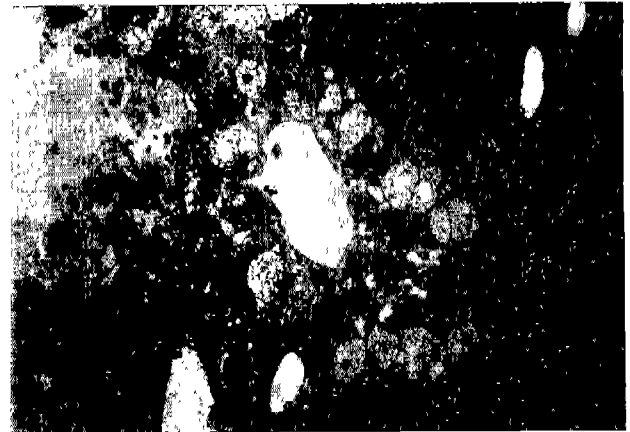


Fig. 8. Micrograph of hepatic structure in H₂O fr. treated rats. (Semithin x200). Note mild degree of ballooning degeneration just around the central vein.

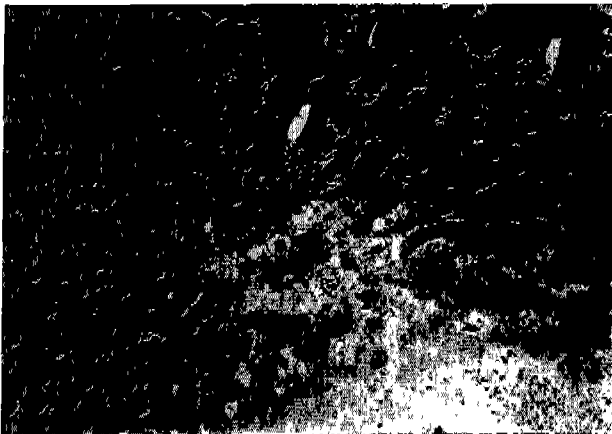


Fig. 7. Micrograph of hepatic structure in BuOH fr. treated rats. (Semithin x200). Note mild degree of ballooning degeneration just around the central vein.

H₂O분획투여군은 0.57±0.14 nmol/mg proten로 모든 군에서 유의적으로 감소하였다(Table XII).

조직학적 검경

Semithin section(0.35 μm)에 대하여 광학현미경(200배)으로 관찰한 결과를 Fig. 1에서 Fig. 8에 나타내었다.

CCl₄투여시에는 Fig. 2에 나타난 것처럼 간세포에 심한 ballooning degeneration 이 관찰되었으나 홍화자 MeOH추출물 500 mg과 1,000 mg/kg을 각각 경구투여하였을 때 ballooning degeneration의 정도가 감소하였다(Fig. 3, Fig. 4). 홍화자의 hexane, CHCl₃, BuOH 및 H₂O분획물을 200, 100, 500 및 500 mg/kg을 각각 경구투여시 주로 central vein 주변에서 완화된 ballooning degeneration을 나타내는 소견을 보였다(Fig. 5 , Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8).

고 찰

손상된 간으로부터 혈액에 방출된 간의 효소활성도 측정 은 간독성연구에 있어서 가장 유용한 방법중의 하나로 혈청 중 AST와 ALT 등의 효소활성도의 상승은 간독성으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것이다(Hayes, 1982). CCl₄는 cytochrome P450에 의해 독성이 강한 대사물로 되며 이 대사물이 간 microsomes의 막단백 thiol기와 강하게 결합하여 막의 지질과산화 반응을 촉진하여 장애를 일으켜서 간에서의 단백질합성을 억제하고 혈중에서 AST 및 ALT 등의 이탈을 일으키는 것으로 알려져 있다. Flavonoid 화합물들이 반응성 산소 free radical을 소거하여 항산화작용을 나타내며 이것이 간세포보호작용의 기전이라고 보고하였다(Wagner, 1986). 화학적인 간독성을 유발하기 위하여 CCl₄를 이용하는데 고용량의 CCl₄(2.5 ml/kg이상)를 1회 투여하더라도 1주이내에 회복되는 점을 고려하여(Nakata 등, 1985) 본 연구에서는 비교적 저용량으로 민감한 반응을 일으킬 수 있는 0.2 ml/kg의 용량으로 복강 투여하여 간독성을 유발한 흰쥐의 혈청 ALT와 AST의 활성증가에 대하여 홍화자추출물과 분획물을 투여하였더니 ALT활성도는 MeOH추출물 500과 1,000 mg/kg 투여시 각각 50.4와 67.7%, hexane, CHCl₃, BuOH 및 H₂O분획투여군이 각각 63.2%, 47.6%, 59.0% 및 66.1%의 유의적인 감소를 보였다. 또한 AST활성도는 CHCl₃분획투여군을 제외한 모든 분획투여군에서 유의적인 감소효과를 보였다. 이는 간세포의 괴사를 억제함으로써 혈청 중에 유리된 transaminase를 억제한 것으로 보인다.

Bilirubin은 물에 불용이므로 순환혈중에서는 혈청 albumin과 가역적으로 결합하여 간으로 운반되어 간에서 glucuronic acid conjugation을 받아 가용성 bilirubin으로 배

설되며 간 손상시 bilirubin이 축적된다고 한다(Kui-Nyung 등, 1993). 홍화자 BuOH분획투여군이 55.8% 감소를 보인 것은 화학물질에 의한 간손상을 홍화자가 보호함으로써 bilirubin의 축적이 감소된 것으로 보여진다

혈청에는 여러 종류의 단백질이 함유되어 있으며 그 중 albumin이 60% 정도를 차지하고 간에서 합성되어 교질삼투압을 유지시키며 bilirubin, vitamin 및 hormone 등을 세포로 운반하는 기능이 있다. 홍화자 BuOH과 H₂O분획물 투여로 albumin은 37.1과 61.7%의 증가로 단백질합성능력을 중요한 간기능의 하나로 본 Arthus(1991)의 보고와 일치함을 볼 수 있었다. 간질환과 영양장애의 지표로 사용되는 TP는 각각 33.3과 57.5%의 증가를 보였다.

지질대사와 지방간의 중요 지표 중 하나인 cholesterol은 인지질과 함께 세포막의 성분으로 담즙산의 전구체로 중요한 지질이며 간 손상시 배설장애로 인한 고cholesterol혈증이 나타나며 TG는 일종의 alcohol인 glycerol과 지방산의 ester이며 에너지원으로 대부분 음식물로 섭취되어 장관에서 흡수된다. 이것이 외인성 중성지방인 chylomicron이며 이들은 주로 간장과 피하조직에 저장되며 지방조직에 저장된 TG는 당이 에너지원으로 부족될 때 nonesterified fatty acid(NEFA)와 glycerol로 분해되어 혈중에 방출된다. 이때 에너지원으로 사용되고 남은 NEFA는 간에서 다시 TG로 변하고 이것이 다시 혈중에 유입되면 내인성 TG가 되어 지방조직에 흡수, 저장된다. 홍화자의 분획물 투여로 cholesterol과 TG함량의 감소를 보인 것은 간혈류량의 증가(Hoyumba 등, 1975)로 인한 보호작용으로 사료된다.

CCl₄가 신장에 미치는 영향을 알아보기 위해 BUN과 creatinine함량을 측정하였다. BUN함량은 정상군에서 10.4 ± 0.9 mg/dl, CCl₄투여군에서 11.0 ± 2.8 mg/dl로, creatinine함량은 정상군에서 0.99 ± 0.35 mg/dl, CCl₄투여군에서 1.00 ± 0.26 mg/dl로 별다른 변화를 보이지 않았다.

CCl₄의 대사경로는 cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase에 의해서 one electron reductive dehalogenation되면서 CCl₄는 ·CCl₃ (trichloromethyl)로 ·CCl₃ (trichloromethyl)는 O₂분자와 결합하여 ·OOCCL₃(trichloromethyl peroxy radicals)로 되어 세포막 인지질인 polyenoic fatty acids의 methyl carbones을 공격하여 지질과산화물을 일으키게 된다(Pohl 등, 1983; Butler, 1990; McCay 등, 1984; Philippe 등, 1990)

세포막 인지질은 지질과산화의 과정에서 free radical의 공격에 의해서 oxygen centered lipid peroxy radical을 거쳐 carbon centered lipid endoperoxide radical, lipid endoperoxide로 된 후 분해되어 MDA를 생성하게 되므로 지질과산화의 정도를 측정하는 지표가 된다(Johansson 등, 1985). 홍화자의 모든 분획투여군에서 MDA함량이 감소되어 지질과산화물의 억제력을 보인 것은 CCl₄의 cytochrome P450에

의한 free radical의 과다생성으로 인한 조직손상을 방어할 수 있다고 사료된다.

GST는 호기성 세포의 세포질에 주로 존재하는 효소로 세포내로 유입된 약물들이 대사되어 생성되는 oxygen free radical 및 친전자성 독성 물질의 해독에 관여하는 효소로 세포작용 및 발암 억제 작용이 있다고 알려져 있다(Chance 등, 1979; Vos 등, 1990; Ploemen, 1990; Matharo, 1989). GST활성도는 CCl₄투여군에 비해 BuOH분획투여군에서 유의성있는 증가를 보임으로써 간세포 보호작용에 영향을 미치는 것으로 생각할 수 있다.

이상과 같이 CCl₄에 의한 흰쥐의 간독성에 대한 약물 대사 관련 효소들의 활성도 변화와 간조직의 손상 정도에 미치는 홍화자추출물과 분획물의 영향을 살펴본 결과 간조직의 손상, transaminase활성도의 증가, bilirubin함량의 상승, albumin함량의 감소, cholesterol과 TG의 증가는 홍화자추출물과 분획물의 투여로써 개선시킬 수 있는데 이는 GST에 대한 변화보다는 세포막의 지질과산화 함량의 변화에 기인하는 것으로 보이며 CCl₄에 의한 간조직손상의 개선효과는 혈청학적 검사결과의 호전 뿐만 아니라 조직학적 관찰에서도 확인되었다. 또한 조직학적 관찰에서 개선효과를 보인 H₂O 분획에 대해 계속적인 성분분리 실험을 행한후 분리된 성분에 대한 간 독성에 미치는 영향이 더욱 연구되어야 할 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 1996년도 덕성여자대학교 약학연구소 및 96년도 과기처 선도기술개발 과제 연구비의 지원에 의해 수행된 것으로 연구비지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Arthus, C., G. (1991). Textbook of Medical Physiology. 8th. pp 754-764.
- Butler, T.C. (1990). Reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissue and tissue constituents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **134**, 311-319.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.
- Hayes, (1982). Principles and Methods of Toxicology, Gabriel L. Plaa and William R. Hewitt., Raben Press, pp 407-445.
- Hoyumba, A. M. Jr., Greene, H. L., Dunn, G. D. and Schenker, S. (1975). Fatty liver: Biochemical and clinical considerations. *Dig. Dis.* **20**, 142.
- Kim, K. H. and Kim, M. N. (1992). Constituents of *Carthamus*, *Yakhak Heoji.* **36**(6), 556-562.
- Kui-Nyung, Y. and Chong-Soon, R. (1993). Chemical pathol-

- ogy file, second ed., Euihak Munwhasa Co., Seoul.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. R. (1951). Protein measurement with the foline phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Matharoo, B., Faulder, G. C. and Steange, R. C. (1989). Alpha, mu and pi glutathione S-transferases: Species (Talpa Europaea) differences in their expression. *Comp. Biochem. Physiol.* **94**, 343-347.
- Mathew, J. E. and Donald, G. B. (1963). Medical Toxicology, Diagnosis and Treatment of Human Poisoning, Elsevier (pp)969-972.
- McCay, P. B., Lai, E. K., Poyer, J. L., Dubose, C. M. and Janzen, E. G. (1984). Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *J. Biol. Chem.* **259**, 2135-2143.
- Nakata, R., Tsukamoto, I., Miyoshi, M. and Kojo, S. (1985). Liver regeneration after CCl₄ intoxication in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 586.
- Onodera, J., Obara, H., Osone, M., Maruyama, Y. and Sato, S. (1981). The structure of safflomin-A, a component of safflower yellow. *ibid.* 433-436.
- Onodera, J., Saito, T. and Obara, H. (1979). Hydrolysis of carthamin. *ibid.* 1327-1330.
- Philippe, L., Gilles, L., Claude, D., Alain, B. M., et al. (1990). Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. *Biochem. Pharm.* **39**, 2027-2034.
- Ploemen, J. H. T. M., Van Ommen, B. and Van Bladeren, P. J. (1990). Inhibition of rat and human glutathione S-transferases isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathion conjugate. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 1631-1635.
- Pohl, L., Schulick, R. and George, J. (1986). Reductive oxygenation mechanism of metabolism for carbon tetrachloride to phosgene by cytochrome P450. *Mol. Pharmacol.* **25**, 318-324.
- Pohl, L., Schulick, R. and Highet, R. and George, J. (1983). Identification of dichloromethyl carbon as a metabolite of carbon tetrachloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 367-372.
- Stewart, R. D., Boettner, E. A., Southworth, R. R., et al. (1963). Acute carbon tetrachloride intoxication. *JAMA.* **183**, 994-997.
- Takahashi, Y., Miyasaka, N., Tasaka, S., Miura, I., Urano, S., Ikura, M., Mastsumoto, T. and Wada, M. (1982). Constitution of two coloring matters in the flower petals of *C. tinctorius* L. *Tetrahedron Letters.* **23**, 5163.
- Takahashi, Y., Saito, K., Yangiya, M., Ikura, M., Hikichi, K., Matsumoto, T. and Wada, M. (1984). Chemical constitution of safflower yellow B, A quinochacone C-glycoside from the flower petals of *C. tinctorius* L. *ibid.* **25**, 2471-2474.
- Toshihiro, A., Hiroto, O., Toshitake, T., Yoshimasa, K., Kunio, K., Ken, Y. and Michio, T. (1994). Erythro-hentriacontane-6,8-diol and 11 other alkane-6,8-diols from *Carthamus tinctorius*. *Phytochemi.* **36**, 105-108.
- Uchiyama, M. and Mihara, M. (1978). *Anal. Biochem.* **86**, 271-278.
- Vos, R. E. M., Van Bladeren, P. J. (1990). Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* **41**, 241-265.
- Wagner, H. Antihepatotoxic flavonoids. In: Cody, V. Middleton, E. and Harborne, J. B. (eds). (1986). Plant flavonoids in biology and medicine: biomedical pharmacology and structure-activity. A. R. Liss Inc. New York, p 14.
- Wang, X. M., Terasaki, P. I., Loon, J. Park, M. S., Chia, D. and Bernocd, D. (1983). Detection of Lewis: Antigenic determinants in Chinese medicinal herbs. *Vax. Sang.* **45**, 320-25.
- Xu, G. Z., Cai, W. M., Qin, D. X., Yan, J. H., Wu, X. L., Zhang, H. X., Hu, Y. H. and Gu, X. Z. (1989). Chinese herb "destagnation" series: Combination of radiation with destagnation in the treatment of nasopharyngeal carcinoma (NPC): a prospectective randomized trial on 188 cases. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **16**, 297-300.
- 김상우. (1992). 도인, 홍화가 입신에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 한의학 석사 학위논문.
- 서석수. (1983). 홍화의 성분 연구(II). 약학연구지 17(1), 29-33.
- 육창수 외. (1980) 약품식물학 각론, 진영출판사 pp 226-267.
- 이상인 외. (1982). 한약임상응용. 정보사 pp 321-323.
- 정보섭, 신민교. (1990). 도해 향약(생약)대사전(식물편). 영인사 pp 1034-1035.
- 정찬길. (1989). 혈전증과 고점도혈증에 미치는 황기, 계지 및 홍화의 효능에 관한 실험적 연구. 경희대학교 대학원 한의학 박사 학위논문.