

백화사설초 메탄올 추출물이 acetaminophen으로 유도된 생쥐의 급성 간손상에 대한 효능 연구

김종대*, 문진영**

Abstract

Effects of *Oldenlandiae Diffusae Herba* Methanol Extract on Acetaminophen Induced Acute Liver Injury in Mice

Jong-Dae Kim* and Jin-Young, Moon**

Department of Internal Medicine*, Department of AM-Pointology**,
College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : *Oldenlandiae Diffusae herba* has been used as a natural drug for tumor, inflammation and liver disease in traditional medicine. This study was performed in order to investigate the antioxidative effects of *Oldenlandiae Diffusae herba* methanol extract(ODHM) on acetaminophen induced acute liver injury in mice.

Methods : In order to investigate the protective effect of ODHM on acute hepatic injury *in vivo*, ICR mice were pretreated with ODHM, and then treated with acetaminophen(500mg/kg). And the levels of LPO and glutathione(GSH), antioxidative enzyme activities were measured. The levels of LPO were measured by TBA method. And catalase activity was measured as the decrease in hydrogen peroxide absorbance at

* 동국대학교 한의과대학 내과학교실

** 동국대학교 한의과대학 경혈학교실

240nm on spectrophotometer using 30mM hydrogen peroxide. Superoxide dismutase(SOD) was assayed by recording the inhibition of nitro blue tetrazolium reduction with xanthine and xanthine oxidase. Glutathione peroxidase(GPX) activity was determined by the modified coupled assay developed by Paglia and Lawrence. The reaction was started by addition of 2.2mM hydrogen peroxide as substrate. The change in absorbance at 340nm was measured for 1min on spectrophotometer. Glutathione-S-transferase(GST) activity was assayed with CDNB as substrate and enzyme activity of GST towards the glutathione conjugation of CDNB. And Total SH and GSH levels were measured.

Results : *In vivo* study, LPO levels of acetaminophen treatment group were significantly higher than other groups. This increased level was significantly reduced by ODHM pretreatment. The acetaminophen treatment resulted in a decrease of catalase, GPX, SOD and GST activities. By contrast, ODHM pretreatment markedly increased compare to those of untreated groups. Total SH and GSH levels were reduced by of acetaminophen treatment, and ODHM pretreatment significantly increased GSH levels.

Key words : *Oldenlandiae Diffusae herba*, acetaminophen, lipid peroxide, glutathione, antioxidative enzyme

I. 서 론

백화사설초(白花蛇舌草)는 꼭두서니과에 속한 일년생 초본인 실낙시들풀(백운풀)의 소뿌리를 건조한 것으로 산기슭의 습지에 나며, 우리나라에서는 제주도, 중국에서는 長江以南의 지방에 분포한다. 본 약물은 寒無毒, 微苦甘한 性味를 지니고, 心, 肝, 脾, 胃, 大腸, 小腸經으로 들어가 약리적 효능을 나타내며, 清熱 利濕 解毒 消癰의 효능을 지니고 있어서 주로 해수, 천식, 편도선염, 인후염, 장염, 이질, 황달, 간염, 골반염, 자궁의 염증 등에 대한 주치를 가지고 있다¹⁻⁵⁾. 백화사설초에 관한 연구와 관련하여 항암, 항균, 항산화 및 간장보호 효과 등이 실험적으로 보고된 바 있다. 특히 본 약물의 간장보호 효과에 대한 구체적인 기전 규명에 관한 연구는 아직까지 미흡한 실정이다. 최근 저자 등은 백화사설초 열수 추출물의 간장 보호 효과를 항산화효소 및 항산화물질계에 미치는 영향을 중심으로

관찰하여 본 약물이 자유기에 의한 간조직의 산화적 손상을 억제함으로써 간장 보호 활성을 지님을 보고한 바 있다⁶⁾. 자유기에 의한 간세포의 손상을 억제하는 약리적 활성을 지닌 약물의 탐색은 간장 보호제 개발 연구에 있어서 주요 부분을 차지하고 있다.

따라서 본 연구에서는 백화사설초의 간장 보호 효과에 대해 더욱 심도있는 연구를 진행하고자 백화사설초 메탄을 추출물을 대상으로 간장 보호 효과와 그 기전을 규명하고자 하였다. 먼저 마우스에 백화사설초 추출물을 일정 기간 용량별로 전처치한 다음, 급성 산화적 간손상을 유발시킬 목적으로 아세트아미노펜을 투여하였다. 마우스에 아세트아미노펜을 대량 투여하면 활성 대사산물이 생성되어 간조직내의 glutathione 함량이 고갈되며, 결국 활성대사체는 세포의 필수 거대분자들과 결합하여 간세포에 치명적 손상을 야기하는 것으로 알려져 있다⁷⁻¹⁰⁾.

또한 백화사설초 메탄을 추출물 투여가 아세트아미노펜에 의한 급성 산화적 간손상에

대한 효과를 검토하기 위한 지표로 지질과산화물 및 glutathione 함량을 관찰하였으며, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, glutathione -S-transferase 등의 항산화효소 활성의 변화를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시 약

본 실험에 사용된 시약으로서 2-thiobarbituric acid(TBA), lauryl sulfate sodium(SDS), hydrogen peroxide(H_2O_2), acetaminophen, glutathione(GSH), glutathione reductase(GSSG-reductase), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium salt(NADPH), chlorodinitro-benzene(CDNB), sulfamic acid ammonium, sulfanilamide, N-1-naphthyl ethylene diamine, biconchonic acid(BCA) protein assay kit는 Sigma사(Sigma Chem. Co. St. Louis, MO)로부터, 그리고 malondialdehyde tetrabutylammonium salt(MDA)는 Fluka사(Fluka Chemie AG, Switzerland)로부터, trichloroacetic acid(TCA)는 Janssen Chimica (Belgium)로부터 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다.

2. 백화사설초 메탄올 추출물의 제조

본 실험에 사용한 백화사설초(Oldenlandiae Diffusae Herba)는 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 또한 백화사설초 메탄올 추출물을 제조하기 위하여 본 실험에서는 백화사설초 150g을 분말로 만들어 상온에서 99.5% 메탄올 용액에 3시간 담그고 여과하는 과정을 3회 반복하였다. 취

중 여과액을 감압농축기로 농축한 다음, 동결건조기 중에서 건조하여 분말상의 백화사설초 메탄올 추출물 12.98g을 얻었으며 이를 검액으로 사용하였다.

3. 실험동물 및 실험군의 분류

본 실험에서 사용한 실험동물은 생후 6주령의 수컷 ICR계 마우스(체중 25~30g)로 대한 동물 실험 센터에서 분양받아 일정한 조건으로 본 대학 사육실의 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 마우스 7마리를 한 군으로 하여, 아무런 처치도 하지 않은 대조군[Control], acetaminophen만을 복강 투여한 실험군[AA], 그리고 백화사설초 메탄올 추출물을 6일간 경구로 음용시킨 다음 acetaminophen을 복강 투여한 실험군[ODHM]으로 나누어서 실험을 시행하였다. 그리고 [ODHM]군은 다시 백화사설초 추출물의 투여 용량에 따라 500mg/kg 용량으로 전처치한 실험군[ODHM1], 300mg/kg 용량으로 전처치한 실험군[ODHM2], 100mg/kg 용량으로 전처치한 실험군[ODHM3]으로 나누어 실험을 행하였다(Scheme 1).

4. 검액 투여 및 간손상 유발

백화사설초 메탄올 추출물은 증류수에 용해하여 6일간 경구로 음용시켰으며, 급성 간손상의 유발을 위해서 백화사설초 투여가 완료된 시점으로부터 마우스를 24시간 절식시킨 다음, acetaminophen (500mg/kg)을 DMSO (2.5ml/kg)에 현탁시켜서 복강 주사하였다.

5. 간조직 균질액과 분획의 조제

아세트아미노펜을 복강주사한 시점으로부터 24시간 후에 마우스를 마취하고 복피를 절개하여 간문맥으로 1.15% KCl 완충용액을 주입하여 관류시킨 후 간을 적출하였다. 적출

Scheme 1. Classification of Experimental Groups

Groups	ODHM (mg/kg, 6days)	Starved (24hr)	AA (500mg/kg, i.p.)
Control	—	+	—
AA †	—	+	+
AA+ODHM1 †	500	+	+
AA+ODHM2	300	+	+
AA+ODHM3	100	+	+

† AA group was injected acetaminophen ;

† AA+ODHM group was fed *Oldenlandiae Diffusae Herba* methanol extract for 6days and injected acetaminophen.

한 간은 빙냉 상태에서 KCl 완충용액과 혼합하여 조직균질기를 사용해 10%(w/v%) 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄액을 600×g에서 10분간 원심분리하고 그 상층액을 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리한 다음, 침전물을 KCl 용액에 재현탁하여 미토콘드리아 분획으로 사용하였다. 상층액은 다시 105,000×g에서 1시간 동안 원심분리하여 사이토졸 분획으로 취하였다. 이상의 모든 과정은 0~4℃에서 행하였으며, 각 분획은 일정량씩 나누어 실험에 사용할 때까지 -70℃에서 냉동보관하였다.

6. 지질과산화물 함량 측정

마우스 간조직 균질액에서의 지질과산화물 함량은 Ohkawa의 TBA법¹¹⁾에 따라 측정하였다. 먼저 간조직 균질액에 8.1% SDS 0.2ml, 20% acetic acid 완충용액(pH 3.5) 1.5ml, 0.8% TBA 1.5ml, 증류수 0.6ml를 가한 다음, 95℃ 항온수조에서 60분 동안 반응시킨 후, 수돗물로 냉각시키고, 증류수 1.0ml와 n-butanol : pyridine (15:1, v/v)의 혼합액 5.0ml를 첨가하여 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 4,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 TBA 반응물질이 존재하는 n-butanol층을 취하여 파장 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 과산화지질의 함량은 MDA로 검량 표준 곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를

MDA 농도(nmol/mg protein)로 표기하였다.

7. 항산화효소 활성 측정

1) Catalase 활성도

미토콘드리아 분획에서의 catalase 활성은 Aebi의 방법¹²⁾에 준하여 측정하였다. 먼저 50mM phosphate 완충용액(pH 7.4)으로 희석시킨 미토콘드리아 부유액 2.0ml에 30mM의 H₂O₂ 용액 1.0ml를 첨가하여 파장 240nm에서 H₂O₂ 분해에 따른 흡광도의 감소로 측정하였다. 효소의 활성은 1분 동안 분해된 1μmole의 H₂O₂를 1unit로 정의하였고 단백질 1mg을 기준으로 환산하여 표기하였다.

2) Glutathione peroxidase(GPX) 활성도

미토콘드리아 분획에서의 GPX 활성도는 Paglia와 Lawrence의 방법¹³⁻¹⁴⁾에 준하여 측정하였다. 먼저 50mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0) 50ml에 EDTA 1mM, NaN₃ 1mM, NADPH 0.2mM, GSH 1mM, 그리고 GSSG-reductase는 1E.U./ml를 혼합한 최대농도 반응 혼합물을 이용하여 측정하였다. 반응 혼합물 0.8ml에 50mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.0)으로 희석시킨 미토콘드리아 부유액 0.1ml를 넣어 20℃ 항온

수조에서 5분간 가온한 후 2.2mM H₂O₂ 용액 0.1ml를 첨가하여 파장 340nm에서의 흡광도 감소로 측정하였다. 효소의 활성도는 단백질 mg당 1분 동안 산화되는 NADPH nmole로 1unit로 환산하여 표기하였다.

3) Superoxide dismutase (SOD) 활성도

간조직내 사이토졸 분획에서의 superoxide dismutase(SOD) 활성도는 Oberley와 Oyanagui의 방법¹⁵⁻¹⁶⁾에 의하여 xanthine과 xanthine oxidase(XOD) 반응계에서 생성되는 superoxide anion(O₂⁻)이 SOD에 의해 분해됨으로써 환원형 NBT의 생성량 감소 정도를 파장 560nm에서 2분 동안 흡광도의 변화로 측정하였다. 효소의 활성도는 NBT의 최대 환원을 50% 저지하는데 필요한 SOD의 양을 1unit로 표기하였다.

4) Glutathione-S-transferase 활성도

간조직내 사이토졸 분획에서의 glutathione-S-transferase(GST) 활성도는 chlorodinitro-benzene (CDNB)과 GSH를 기질로 사용한 Habig의 방법¹⁷⁾으로 측정하였다. 먼저 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 6.5)으로 희석시킨 사이토졸 부유액에 1mM GSH, 1mM CDNB를 첨가하여 25℃에서 1분 동안 파장 340nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. 효소의 활성도는 단백질 mg당 1분간 conjugated되는 CDNB의 nmol로 표기하였다.

8. 항산화물질 함량 변화 측정

1) Total SH 함량 측정

Total SH의 함량은 Sedlak의 방법¹⁸⁾에 의하여 0.2M Tris buffer(pH 8.2) 1ml, 0.01M DTNB 0.1ml, methanol 4ml를 가한 후, 이 혼합액에 10% 간세포 균질액 0.1ml를 취하여

24℃에서 15분간 방치하였다. 이것을 600×g에서 30분간 원심분리한 후, 상층액을 412nm에서 흡광도를 측정하여 전체 SH농도를 millimole 흡광계수 13cm⁻¹mM⁻¹을 사용하여 그 양을 계산하였다.

2) Glutathione(GSH) 함량 측정

GSH의 함량은 Higach의 방법¹⁹⁾에 의하여 10% 간세포 균질액에 동량의 10% trichloroacetic acid 용액을 가하여 3,000rpm에서 20분간 원심분리한 상층액을 시료로 하였다. 시료 0.1ml에 0.01M NaNO₂과 0.2N H₂SO₄를 혼합조제(1 : 9, v/v)하여 0.5ml를 가한 다음에 5분간 방치시켰다. 0.5% sulfamic acid ammonium 수용액 0.2ml를 가하여 강하게 혼합한 후 1% HgCl₂와 3.4% sulfanilamide/0.4N HCl 혼액(1 : 9, v/v)을 1ml 가하고 0.1% N-1-naphthyl ethylenediamine(0.4N HCl 용액)을 1ml 가한 다음, 5분이 경과한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 표준용액으로서 125nM GSH 용액을 사용하였다.

9. 단백질 정량

간조직 균질액과 미토콘드리아 및 사이토졸 분획에서의 단백질 정량은 모두 BCA protein assay kit를 이용하여 bovine serum albumin을 표준단백질 용액으로 이용한 표준 점광선을 구하고 그 양을 산출하였다²⁰⁾.

10. 통계적 처리

본 실험에서 얻은 실험군간의 결과에 대하여 Student's *t*-test를 실시하여 유의성 여부를 검증하였고, 그 결과 *p*값이 0.05 이하인 경우에 유의성을 인정하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. 지질과산화물의 함량

마우스에 급성 간손상을 유발시킬 목적으로 고용량의 아세트아미노펜(AA)을 복강 투여(500mg/kg)하여 간 조직에서의 지질과산화물의 함량을 측정된 결과를 MDA nmol로 표기하였다. 그 결과 아세트아미노펜만을 투여한 실험군(AA)의 지질과산화물의 함량은 3.77nmol로 아무런 처치도 하지 않은 대조군(control)의 1.06nmol에 비해 유의성있는 증가($p < 0.01$)를 보였다. 한편 백화사설초 메탄을 추출물을 6일간 경구투여한 다음 아세트아미노펜을 처리한 실험군(AA+ODHM)에서의 지질과산화물의 함량은 다음과 같다. 먼저 백화사설초를 500mg/kg 용량으로 투여한 실험군(ODHM1)에서는 0.97nmol, 300mg/kg 용량으로 투여한 실험군(ODHM2)에서는 0.86nmol, 100mg/kg 용량으로 투여한 실험군(ODHM3)에서는 1.21nmol로 모두 AA군에 비해 유의성있는 감소($p < 0.01$)를 보였다. 이 결과에서 아세트아미노펜의 투여로 인해 마우스 간조직에서의 급성 산화적 간손상이 유발되었으며, 백화사설초 메탄을 추출물의 전처치에 의해 아세트아미노펜에 의한 산화적 간손상이 유의성있게 억제됨을 알 수 있었다(Table I).

2. 항산화 효소 활성화에 미치는 영향

백화사설초 메탄을 추출물은 아세트아미노펜에 의한 마우스 간조직의 급성 산화적 손상을 현저하게 억제하였으므로 본 실험에서는 산화적 간손상에 대한 보호 기전을 규명하고자 항산화효소계에 미치는 영향을 검토하였다. 적출한 마우스 간조직으로부터 미토콘드리아와 사이토졸 분획을 분리하고 항산화 효소 각각의 활성 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

(1) Catalase 활성화도

마우스 간조직의 미토콘드리아 분획을 이용하여 catalase 활성을 관찰한 결과, AA군은 2.58unit로 대조군의 4.13unit에 비해 현저하게 감소($p < 0.01$)하였다. 한편 백화사설초 메탄을 추출물을 500mg/kg, 300mg/kg 및 100mg/kg의 용량으로 전처치한 다음 아세트아미노펜을 투여한 실험군에서는 각각 2.95unit, 3.68unit($p < 0.05$), 2.68unit로 모두 AA군에 비해 증가되었다(Table II).

(2) Glutathione peroxidase 활성화도

미토콘드리아 분획에서 glutathione peroxidase(GPX) 활성을 관찰한 결과, AA군은 2.63unit로 대조군의 4.96unit에 비해 효소의 활성화도가 유의성있게 감소($p < 0.05$)하였다. 한편 백화사설초 메탄을 추출물을 500mg/kg, 300mg/kg 및 100mg/kg의 용량으로 전처치한 다음 아세트아미노펜을 투여한 실험군에서는 각각 5.15unit($p < 0.01$), 9.81unit($p < 0.01$), 5.30unit($p < 0.02$)로 모두 AA군에 비해 효소 활성이 현저하게 증가하였다(Table II).

(3) Superoxide dismutase 활성화도

사이토졸 분획을 이용하여 superoxide dismutase(SOD) 활성의 변화를 관찰한 결과, AA군은 1.64unit로 대조군의 2.37unit에 비해 효소 활성이 현저하게 감소($p < 0.01$)하였다. 한편 백화사설초 메탄을 추출물을 500mg/kg, 300mg/kg 및 100mg/kg의 용량으로 전처치한 다음 아세트아미노펜을 투여한 실험군에서는 각각 2.26unit, 2.36unit($p < 0.01$), 2.38unit($p < 0.01$)로 모두 AA군에 비해 효소 활성이 증가하였다(Table III).

(4) Glutathione-S-transferase 활성화도

사이토졸 분획에서 glutathione-S-transferase(GST) 활성을 관찰한 결과, AA군

이 0.65unit로 대조군의 0.88unit에 비해 효소의 활성이 현저하게 감소($p < 0.01$)하였다. 한편 백화사설초 메탄올 추출물을 500mg/kg, 300mg/kg 및 100mg/kg의 용량으로 전처치한 다음 아세트아미노펜을 투여한 실험군에서는 각각 1.03unit($p < 0.01$), 1.03unit($p < 0.01$), 0.91unit($p < 0.01$)로 모두 AA군에 비해 효소 활성이 현저하게 증가하였다(Table III).

3. Total SH 및 GSH 함량에 미치는 영향

(1) Total SH의 함량

마우스 간조직에서 total SH의 함량의 변화를 관찰한 결과, 아세트아미노펜만을 투여한 AA군은 157.38nmol로 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 179.76nmol에 비해 유의성있는 감소($p < 0.05$)를 보였다. 한편 백화사설초 메탄올 추출물을 500mg/kg, 300mg/kg 및

100mg/kg의 용량으로 전처치한 다음 아세트아미노펜을 투여한 실험군에서는 각각 208.10nmol($p < 0.01$), 191.81nmol($p < 0.05$), 202.98nmol($p < 0.01$)로 AA군에 비해 total SH의 함량이 현저하게 증가하였다(Table IV).

(2) Glutathione(GSH) 함량

간조직에서 GSH의 함량 변화를 관찰한 결과, AA군이 13.59nmol로 대조군의 22.12nmol에 비해 유의성있는 감소($p < 0.01$)를 보였다. 한편 백화사설초 메탄올 추출물을 500mg/kg, 300mg/kg 및 100mg/kg의 용량으로 전처치한 다음 아세트아미노펜을 투여한 실험군에서는 각각 16.52nmol($p < 0.02$), 19.73nmol($p < 0.01$), 17.80nmol($p < 0.02$)로 AA군에 비해 GSH의 함량이 현저하게 증가하였다(Table IV).

Table I. Effect of ODHM on the Levels of Lipid Peroxide in Mice Liver Tissue

Groups	Lipid Peroxide (MDA nmol/mg protein)
Control	1.06±0.11
AA †	3.77±0.22 *** ^{a)}
AA+ODHM1 ‡	0.97±0.22 *** ^{b)}
AA+ODHM2 ‡	0.86±0.14 *** ^{b)}
AA+ODHM3 ‡	1.21±0.14 *** ^{b)}

† AA group was injected acetaminophen ;

‡ AA+ODHM group was fed *Oldenlandiae Diffusae Herba* methanol extract for 6days and injected acetaminophen. All data are the mean±S.E. of triplicated determination.

a) : values stastically significant as compared with control group.

b) : values stastically significant as compared with AA group.

(*** : $p < 0.01$)

Table II. Effect of ODHM on Hepatic Catalase and Glutathione Peroxidase Activities in Mice

Groups	Catalase activity	GPX Activity
	(unit/mg protein)	
Control	4.13±0.19	4.96±0.96
AA †	2.58±0.15 ***a)	2.63±0.39 *a)
AA+ODHM1 †	2.95±0.42	5.15±0.48 ***b)
AA+ODHM2 †	3.68±0.55 *b)	9.81±1.43 ***b)
AA+ODHM3 †	2.68±0.13	5.30±0.95 **b)

† AA group was injected acetaminophen ;

† AA+ODHM group was fed *Oldenlandiae Diffusae Herba* methanol extract for 6days and injected acetaminophen. All data are the mean±S.E

a) : values statistically significant as compared with normal group.

b) : values statistically significant as compared with control data of each group.

(* : p<0.05, ** : p<0.02, *** : p<0.01)

Table III. Effect of ODHM on on Hepatic Superoxide Dismutase and Glutathione-S-Transferase Activities in Mice

Groups	SOD Activity	GST Activity
	(unit/mg protein)	
Control	2.37±0.10	0.88±0.05
AA †	1.64±0.06 ***a)	0.65±0.04 ***a)
AA+ODHM1 †	2.26±0.28	1.03±0.07 ***b)
AA+ODHM2 †	2.36±0.08 ***b)	1.03±0.07 ***b)
AA+ODHM3 †	2.38±0.13 ***b)	0.91±0.05 ***b)

† AA group was injected acetaminophen ;

† AA+ODHM group was fed *Oldenlandiae Diffusae Herba* methanol extract for 6days and injected acetaminophen. All data are the mean±S.E

a) : values statistically significant as compared with normal group.

b) : values statistically significant as compared with control data of each group.

(*** : p<0.01)

Table IV. Effect of ODHM on Levels of Total SH and GSH in Liver Homogenate

Groups	Total SH	GSH
	(nmol/mg protein)	
Control	179.76±5.47	22.12±0.93
AA †	157.38±7.49 *a)	13.59±0.79 ***a)
AA+ODHM1 †	208.10±12.20 ***b)	16.52±0.52 **b)
AA+ODHM2 †	191.81±10.80 *b)	19.73±1.01 ***b)
AA+ODHM3 †	202.98±7.69 ***b)	17.80±0.70 **b)

† AA group was injected acetaminophen ;

† AA+ODHM group was fed *Oldenlandia Diffusae Herba* methanol extract for 6days and injected acetaminophen. All data are the mean±S.E

a) : values statically significant as compared with normal group.

b) : values statically significant as compared with control data of each group.

(* : p<0.05, ** : p<0.02, *** : p<0.01)

IV. 고 찰

백화사설초는 종양, 간장질환, 염증성 질환 등의 치료에 사용되고 있는 약물로서 본 약물에 관한 실험적 연구로는 약물 성분 분석²¹⁾, 항암효과²²⁻²⁶⁾, 항균 및 자유기 소거효과²⁷⁾, 간장보호 효과 연구²⁸⁻²⁹⁾ 등이 있으나, 주로 항암활성에 대한 연구가 대다수이고, 간장보호 효과와 그 기전에 관한 연구는 다소 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 백화사설초 메탄을 추출물의 마우스의 산화적 간손상에 대한 보호 효과를 검토하였다. 백화사설초 메탄을 추출물의 항산화작용에 의한 간장보호 효과를 *in vivo*에서 검토하기 위하여 본 연구에서는 마우스의 간장에 급성 산화적 손상을 유발시킬 목적으로 아세트아미노펜을 사용하였다. 아세트아미노펜에 의해 유도되는 간세포의 괴사는 이미 마우스를 대상으로 급성 산화적 간손상의 실험모델로서 광범위하게 이용되어 왔으며, 본 약물에 의한 간손상

기전은 대사활성체가 간장의 glutathione pool을 고갈시키며, 또한 세포내 단백질 및 다른 거대분자와 대사활성체가 결합함으로써 간손상이 야기되는 것으로 알려져 있다.

따라서 아세트아미노펜에 의한 급성 간손상 과정에는 glutathione 함량 감소와 대사활성체에 의한 지질과산화 반응이 수반된다. 지질과산화 반응은 간장 기능의 부전을 야기하는 기본적 기전 중의 하나로 중요시되어 왔으며, 이는 간장의 기능 악화를 초래하는 일종의 연쇄적 현상으로 논의되고 있다.

따라서 아세트아미노펜에 의한 급성 산화적 간손상에는 지질과산화물의 함량 증가가 수반된다. 이러한 지질과산화 반응에 의한 간손상을 예방과 관련한 간장보호제의 약리적 기전은 glutathione의 대사와 밀접하게 관련되어 있을 뿐만 아니라, 간조직내에서 superoxide를 제거하는 superoxide dismutase, 그리고 H₂O₂의 제거하는 catalase, glutathione peroxidase과 같은 항산화 효소들도 중요한 역할을 담당하는데 이러한 효소들은 대사활

성체에 의한 지질과산화 반응의 연쇄적 진행을 차단한다. 본 연구에서는 백화사설초 메탄을 추출물의 간장 보호 효능을 검토하기 위하여 마우스를 대상으로 백화사설초 메탄을 추출물을 경구투여로 6일간 전처리한 다음, 아세트아미노펜을 마우스에 대량 복강 투여(500mg/kg)하여 급성 산화적 간손상을 유발시킨 후, 간 조직 균질액에서의 지질과산화물의 함량, 간조직 균질액으로부터 분리한 미토콘드리아와 사이토졸 분획에서의 항산화효소 활성도, 그리고 간조직내에서의 항산화물질인 glutathione의 함량 변화를 중심으로 관찰하였다.

먼저 마우스 간조직 균질액의 지질과산화물의 함량을 측정된 결과, 아세트아미노펜 단독 투여군은 아무런 처치도 하지 않은 대조군에 비해 유의성있는 증가를 보였다. 이 결과에서 아세트아미노펜의 대량 투여로 인해 마우스에 급성 산화적 간손상이 유의성있게 유발되었음을 알 수 있었다. 한편 백화사설초 추출물을 전처리한 다음 아세트아미노펜을 투여한 실험군에서는 지질과산화물의 함량이 아세트아미노펜 단독 투여군에 비해 유의성있게 감소하였다.

따라서 백화사설초 메탄을 추출물의 전처리로 인해 마우스 간조직의 산화적 손상이 강하게 억제됨을 알 수 있었다. 또한 아세트아미노펜에 의한 급성 간손상에 대한 백화사설초 메탄을 추출물의 억제 기전을 규명하고자 catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase 및 glutathione-S-transferase로 구성되는 항산화효소들의 활성 변화를 검토하였다. 그 결과, 아세트아미노펜의 투여로 인해 마우스 간조직내의 항산화효소들의 활성도가 감소함을 알 수 있었다. 이 결과에서 아세트아미노펜의 대사활성체에 의한 연쇄적 지질과산화 반응을 항산화효소들이 효과적으로 차단하지 못하므로 결국 마우스 간조직의 산화적 손상이 야기된 것으로 판단된다. 반면

백화사설초 메탄을 추출물을 전처리한 실험군에서는 항산화효소들의 활성이 아세트아미노펜 단독 투여군에 비해 높게 나타났다. 따라서 백화사설초 메탄을 추출물의 투여는 아세트아미노펜에 의한 항산화효소 활성의 감소를 방지함으로써 간조직의 지질과산화 반응이 억제된 것으로 사려된다.

또한 간조직 균질액에서 total SH 및 glutathione의 함량 변화를 측정된 결과, 아세트아미노펜 단독 투여군에서는 대조군에 비해 유의성있는 감소를 보였다. 반면, 백화사설초 메탄을 추출물의 전처리한 다음 아세트아미노펜을 투여한 실험군에서는 total SH 및 glutathione의 함량이 거의 대조군의 수준으로 유지됨을 알 수 있었다. 따라서 백화사설초 추출물이 아세트아미노펜에 의한 급성 간손상에 대한 보호효과를 나타내는 기전은 일차적으로는 아세트아미노펜에 의한 glutathione의 고갈을 억제함에 있으며, 이차적으로는 항산화효소 활성을 증가시킴으로써 대사활성체에 의한 간조직의 연쇄적 지질과산화 반응을 차단함에 기인하는 것으로 판단된다.

V. 결 론

백화사설초 메탄을 추출물이 아세트아미노펜에 의한 산화적 급성 간손상에 대한 효과를 마우스를 대상으로 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 아세트아미노펜을 복강주사한 실험군에서 지질과산화물의 함량은 대조군에 비해 유의성있게 증가하였다. 한편 백화사설초 메탄을 추출물을 전처리한 실험군에서는 아세트아미노펜 단독 투여군에 비해 지질과산화물의 생성을 유의성있게 억제하였다.
2. 백화사설초 메탄을 추출물의 간장보호 활

성에 관한 기전을 규명하고자 항산화효소인 catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase 및 glutathione-S-transferase의 활성도를 관찰한 결과, 아세트아미노펜을 복강주사한 실험군에서 대조군에 비해 효소활성이 감소하였다. 한편 백화사설초 메탄올 추출물을 전처치한 실험군에서는 아세트아미노펜 단독 투여군에 비해 높은 효소 활성도를 보였다.

3. 아세트아미노펜의 투여로 인해 total SH 및 GSH의 함량은 대조군에 비해 현저하게 감소하였다. 한편 백화사설초 메탄올 추출물을 전처치한 실험군에서는 아세트아미노펜 단독 투여군에 비해 유의성있는 증가를 보였다.

이상을 종합하면 백화사설초 메탄올 추출물은 아세트아미노펜의 활성대사체에 의한 급성 산화적 간손상을 억제하였으며, 이는 본 약물이 항산화 효소와 항산화 물질로 구성된 항산화 방어 체계를 통한 것임을 알 수 있다. 본 연구의 결과를 바탕으로 백화사설초는 간장 보호제로서의 개발 가능성이 강하게 시사되므로, 이에 관한 연구를 지속적으로 수행할 계획이다.

참 고 문 헌

1. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울 : 영림사. 1998 : 223-224
2. 정보섭, 신민교. 도해향약대사전. 서울 : 영림사. 1990 : 926-927
3. 徐樹楠. 中藥臨床應用大全. 石家莊 : 河北科學技術出版社. 1999 : 723-724
4. 徐國鈞, 何宏賢, 徐珞珊, 金蓉鸞. 中國藥材學. 中國醫藥科技出版社 : 1596-1597
5. 鄭虎占, 董澤宏, 余靖. 中藥現代研究與應用. 北京 : 學苑出版社. 1997 : 1533-1538
6. 김형환, 김종대, 문진영 : 마우스에서 아세트아미노펜의 급성간독성과 백화사설초 추출물의 보호효과. 동양의학 2001 ; 27(2) : 78-86
7. 서경원, 류정상, 김효정 : 마우스에서 아세트아미노펜의 급성 간독성과 독물 동태학. Korean J. Toxicol. 1997 ; 13(3) : 237-245
8. Wendel, A., Feuerstein, S. and Kontz, K.H. : Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo. Biochemical Pharmacology 1979 ; 28 : 2051
9. Raheja, K.L., Linscheer, W.G., Cho, C.D. and Mahany, D. : Protective effect of propylthiouracil independent of its hypothyroid effect on acetaminophen toxicity in the rat. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1981 ; 220 : 427
10. Fischer, L.J., Green, M.D. and Harman, A.W. : Levels of acetaminophen and its metabolites in mouse tissues after a toxic dose. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1981 ; 220 : 427
11. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. : Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochem. 1978 ; 95 : 351-358
12. Aebi H. Catalase. Methods of enzymatic analysis. 2nd ed. edited by Hans Ulrich Bergmeyer. 1974 : 673-684
13. Paglia D.E. and Valentine W.N. : Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 1967 ; 70 : 158-169
14. Lawrence R.A. and Burk R.F. :

- Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976 ; 71 : 952-958
15. Oberley L.W. and Spitz P.R. *Methods in Enzymology*, edited by Colowick SP and Kaplan NO. Acad. Press 105(ed. Packer L), 1984 ; 457-464
 16. Oyanagui Y. : Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* 1984 ; 42 : 290-296
 17. Habig W.H., Pabst M.J. and Jabby W.B. : Glutathione-S-transferase; the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biochem.* 1974 ; 249 : 7130-7139
 18. Sedlak, T. and Lindsay, R.H. : Estimation of total protein-bound and nonprotein-bound sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Chem.* 1968 ; 25 : 192
 19. Higach, T. : Critical review on the determination of glutathione in biological perparation. *Proteins, Nucleic Acid and Enzyme* 1988 ; 33 : 1370
 20. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke B.J. and Klenk D.C. : Measurement of protein using bicichoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985 ; 150 : 76-85
 21. 김영희 : 백화사설초의 성분에 관한 연구. *한국약용작물학회지* 1995 ; 3(2) : 91-95
 22. 우원홍, 문구, 전병훈 : 암세포의 증식과 분화에 미치는 백화사설초 메탄올 추출물의 효과. *동의병리학회지* 1998 ; 12(2) : 105-107
 23. 김성훈, 송규용, 유시용 : 백화사설초 핵산분획과 다당체가 항암 및 항전이 활성에 미치는 영향(Ursolic acid 와 Asperuloside 병용 투여시 항암 및 항전이 효과에 관한 연구). *동의병리학회지* 1999 ; 13(1) : 65-75
 24. 김성훈 : 백화사설초로부터 분리된 항암 활성물질에 관한 연구. *대전대학교 한의학연구소논문집* 1996 ; 4(2) : 1-25
 25. 김성훈 : 백화사설초로부터 분리한 ursolic acid 의 자연살해효과와 항전이작용. *대전대학교 한의학연구소논문집* 1997 ; 5(2) : 523
 26. 송호준, 김태현 : 백화사설초 전탕액 투여가 마우스의 항종양 면역반응에 미치는 영향. *대한본초학회지* 1994 ; 9(1) : 83-97
 27. 서인교, 김상찬, 이진태, 변준석, 변성희 : 백화사설초 추출물의 항균실험 및 SOD유사활성, 전자공여능에 관한 연구. *대한방제학회지* 2000 ; 8(1) : 299-318
 28. 김미려 : Carbon tetrachloride 로 유발된 간 손상에 미치는 백화사설초와 동충하초의 효과. *동서의학* 1994 ; 19(2) : 52-59
 29. 김미려 : Carbon tetrachloride 와 백화사설초 및 동충하초의 병용투여가 간장 및 혈청성분에 미치는 영향. *동서의학* 1994 ; 19(3) : 5-10

감사의 글

본 연구는 2,001년도 동국대학교 학술논문 연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.