

化肝煎이 아세트아미노펜에 의한 간독성에 미치는 영향

박철수, 김기열, 이채중, 안중환, 김종대, 남경수¹⁾

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 의과대학 약리학교실¹⁾

Protective Effect of Whagan-Jeon (*huaganjian*) on Acetaminophen-induced Hepatotoxicity

Chul-Soo Park, Gi-Yeol Kim, Chae-Jung Lee,
Jung-Hwan An, Jong-Dae Kim, Gyong-Soo Nam¹⁾

Dept. of Internal Medicine, College of oriental medicine, Dongguk University
Dept. of Pharmacology, College of medicine, Dongguk University¹⁾

Objective : This study was performed to investigate the activity of *Whagan-Jeon (huaganjian)* in protection against acetaminophen (AAP)-induced hepatotoxicity and the possible mechanisms in vivo.

Methods : The following were performed: Serum ALT, depletion of hepatic glutathione (GSH) levels, the microsomal p-nitrophenol hydroxylation activity, microsomal aniline hydroxylation activity, genomic DNA fragmentation and its reversal, hepatic glutathione-S-transferase (GST) activity, and hepatic NAD(P)H:quinone oxidoreductase (QR) activity

Results : *Whagan-Jeon (huaganjian)* protected against AAP-induced hepatotoxicity by the increase of GSH levels, inhibition of P450 2E1-specific metabolic activities, attenuation of hepatic DNA damage, and induction of GST and QR activities in vivo.

Conclusions : In conclusion, *Whagan-Jeon (huaganjian)* was effective in protection against AAP-induced hepatotoxicity. (J Korean Oriental Med 2002;23(3):33-42)

Key Words: *Whagan-Jeon (huaganjian)*, acetaminophen (AAP), hepatotoxicity.

서론

비스테로이드성 항염증약 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)은 전세계적으로 매해 수십억 달러의 시장규모이며, 미국에서는 해마다 7천

만 이상을 처방하고 있다. 이들 중 진통해열제인 acetaminophen (AAP: N-acetyl-p-aminophenol, paracetamol, tylenol)의 수요가 최대이다. AAP는 치료적 복용량으로는 부작용이 매우 적으나 과량을 섭취하거나 알콜과 같은 약들과 혼합 복용하면 간독성을 유발하고, 심한 경우 간기능 상실과 죽음의 원인이 된다²⁾.

AAP의 대사를 살펴보면 치료적 복용량으로는 일차적으로 glucuronidation, sulfation이나 배설에 의해

· 접수 : 2002년 4월 3일 · 채택 : 2002년 5월 27일
· 교신저자 : 박철수, 경북 경주시 용강동 357번지 동국대학교
경주한방병원 의국
(Tel. 054-770-1342, E-mail: chals2@lycos.co.kr)

해독된다. 그러나 AAP의 복용량이 증가하면 이 물질은 cytochrome P450 (CYP 450) 의존성 mixed function oxidase system에 의해 대사되어³⁾ 매우 반응성이 높은 quinone 물질인 N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI)를 생성한다⁴⁾. 이 대사물은 환원형 glutathione (GSH)을 산화형 glutathione (GSSG)으로 변환시키는 산화제로서 작용하든지 전자친화물질로서 세포내물질 특히 GSH와 공유적으로 결합하여 GSH adduct를 형성한다⁵⁾. 이와같이 과량의 AAP의 섭취에 의해 많은 양의 NAPQI가 생성되며 GSH의 결핍에 의해 NAPQI가 단백질이나 DNA와 반응하면 결국 간독성을 일으키게 된다⁶⁾.

독성생성을 위한 one-electron reduction경로 이외에 quinone물질은 NAD(P)H: quinone oxidoreductase (QR)에 의해서나 2 분자의 GSH에 의한 산화의 two-electron reduction 경로에 의해 환원되어 무독성의 hydroquinone으로 환원될 수도 있다. 이러한 two-electron reduction은 독성 semiquinone이나 oxygen radicals의 생성없이 일어나므로 NAPQI의 one-electron reduction에 의한 독성에 대한 방어경로가 된다⁷⁾.

AAP을 오용하면 심각한 간독성과 죽음까지 초래할 수 있으나 이러한 현상을 예방하기 위하여 methionine, N-acetyl cysteine이나 비슷한 thiol 물질같은 해독제와의 혼합투여에 관한 방법이 널리 알려져 있지 않고, 실제로 AAP 과용에 의한 간 독성 유발이 매우 빈번히 일어난다. 예를 들면, 영국에서는 간기능 상실의 가장 흔한 원인이 AAP의 독성이며 간이식의 원인이 되고 있다고 보고되었다⁸⁾.

AAP로 인해 유도된 간독성에 대한 한약의 연구는 시호⁹⁾, 강활¹⁰⁾, 금은화¹¹⁾, 토복령¹²⁾ 등이 이루어 진적이 있으며 複方으로는 귀비탕¹³⁾이 연구된 바 있다. 본 연구에서는 경약전서¹⁴⁾에 나오는 化肝煎(Whagan-Jeon)이 AAP에 의해 유발된 간독성에 미치는 영향을 살펴 보았다. 생체에서의 화간전이 AAP에 의한 간 독성에 미치는 효과 측정은 생쥐 혈청의 alanine-aminotransferase (ALT)의 측정, AAP에 의해 유도된 cytochrome P450 2E1 활성에 미치는 영향, DNA fragmentation 및 GSH 함량에의 영향 등으로 실험하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시약

cytochrome C, ellagic acid, bovine serum albumin (BSA), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADP), flavin adenine dinucleotide (FAD), dicoumarol, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, menadione, laury sulfate (sodium dodecyl sulfate), 9,10-dimethyl-1,2-benz-anthracene (DMBA), NADP+, crystal violet, glutathione reductase, triton X-100, chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), cupric sulfate, KOH, glucose, thiamine, phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA), biotin, vitamin B12, ferric citrate, $CaCl_2 \cdot H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , yeast extract proteose peptone, ethoxy-resorufin, perchloric acid, diphenyl amine, H_2SO_4 , p-nitrophenol, acetic acid, potassium phosphate, acetaldehyde, GPT optimized alanin-aminotransferase EC 2.6.1.2 UV-test, binchinchonic acid protein kit는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서, fetal bovine serum (FBS)은 JBI사 (Daegu, Korea) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

2) 화간전의 처방

본 실험에 사용한 약제는 동국대학교 부속 경주한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 구성은 등량으로 다음과 같다.

Prescription of Whagan-Jeon(huaganjian)

Herbs	Botanical Name	Dose(g)
靑皮	<i>Citri Reticulatae Viride Pericarpium</i>	8
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	8
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	8
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	6
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	6
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	6
貝母	<i>Fritillariae Cirrhosae Bulbus</i>	8
Total amount		50(g)

3) 실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 4주령의 수컷 ICR mouse (체중 20-25 g)를 대한실험동물센터에서 구입하여 본 대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도 20 ± 2℃, 습도 40~60%)하에서 7일간 안정화시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험 기간 중 사료와 물은 자유로이 먹게 하였다.

2. 실험방법

1) 화간전 열수추출액의 제조

화간전 50 g에 정제수 400 ml을 가한 뒤 3시간 진탕하여 추출하였다. 4℃, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 전량을 감압농축하였다. 이 농축된 용액을 pH 7.4로 적정한 후, 4℃에서 24시간 방치하여 여과하고, 동결건조한 후 시료로 사용하였다.

2) 화간전에 의한 in vivo에서의 AAP 간독성 해독 효과

(1) 실험동물의 실험군 분류

실험군은 마우스 10 마리를 한 군으로 하여, 시료를 투여하지 않은 대조군 (Control : Group 1), 화간전을 마우스 무게 kg당 200 mg으로 14일간 각각 경구투여한 군 (Group 2), 마우스 무게 kg당 200 mg의 화간전을 14일간 경구투여하고 AAP를 마우스 무게 kg당 400 mg으로 복강주사를 통해 투여한 군 (Group 3), 화간전을 마우스 무게 kg당 400 mg으로 14일간 각각 경구투여한 군 (Group 4), 마우스 무게 kg당 400 mg의 화간전을 14일간 경구투여하고 AAP를 마우스 무게 kg당 400 mg으로 복강주사를 통해 투여한 군 (Group 5) 그리고 AAP만을 마우스 무게 kg당 400 mg으로 투여한 군(Group 6)으로 나누었다 (Table 1).

(2) 혈청 ALT 활성측정

간독성은 혈청의 ALT를 측정하여 결정하였다. ALT 함량은 340 nm에서 NADH의 흡광도 감소에 의해 효소활성을 측정하는 Bergmeyer 등¹⁵⁾의 방법을 이용한 Sigma kit(no. 59-UV)로 측정하였다. 만약 효소활성이 측정 한계 수치 (즉, AAP를 처리한 실험군)를 능가하면, 혈청 샘플을 kit 제품에서 제시한 방법

에 따라 0.9 % saline으로 희석하여 사용하였다.

(3) 마우스 간조직으로부터 microsome과 사이토졸 분리

각 실험군에서 시료와 AAP 투여가 완료되고 24시간이 지난 후 마우스를 질식시킨 다음 복피를 절개하여 간 조직을 취하였다. 간은 무균상태에서 0.15 M KCl buffer (pH 7.0)로 perfusion시킨 후 적출하고, 다시 여러번 세척한 다음 흡습지로 수분을 제거하여 액체 질소에서 급냉하여 실험에 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다. Microsome과 사이토졸 부유액의 분리는 Benson 등¹⁶⁾의 방법에 따라 4℃에서 행하였다. 즉, 0.25 M sucrose 용액 (각 조직 g당 5.0 ml)으로 빙냉상태에서 조직균질기를 사용하여 마쇄하였다. 이 마쇄액을 원심분리 (9,000×g, 20분)시킨 후 침전물은 제거하였으며, 상층액은 1 ml당 0.25 M sucrose 용액에 녹인 0.1 M CaCl₂를 0.2 ml의 부피로 첨가하여 빙냉상태에서 30분간 방치하였다. 다시 2차 원심분리 (2,700×g, 20분)시켜 침전물은 microsomal fraction으로, 상층액은 사이토졸 부유액으로 하여 각각의 실험에 시료로 사용하였다.

(4) GSH 생성량 측정

GSH 생성량 측정은 간조직의 마쇄액 (homogenate)으로 세포내에서 측정된 방법에 준하여 실시하였다. GSH 함량은 GSH 표준 곡선에 의하여 산출하였고, GSH 생성량은 시료를 투여하지 않은 대조군에 대한 시료를 투여한 마우스 간조직의 함량의 비로 나타내었다.

(5) 단백질 정량

마우스 간조직의 homogenate, microsome과 사이토졸의 단백질 함량은 binchinchoninic acid solution protein kit를 사용하여 bovine serum albumin을 표준 단백질 용액으로 이용한 표준곡선을 구하고 그 양을 계산하였다.

(6) 4-nitrophenol (NP) hydroxylase assay

4-NP hydroxylase 활성은 Koop¹⁷⁾와 Kim and Novak¹⁸⁾의 방법으로 측정하였다. 실험군의 microsome 1 mg protein/ml을 0.1 M potassium phosphate buffer에 부유시킨 후 NADPH-generating

system (1 mM NADP+, 9 mM glucose-6-phosphate dehydrogenase)과 함께 37℃에서 20분간 shaking하면서 반응시키고 0.5 ml의 0.6 N perchloric acid를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그리고 16,000×g에서 2분간 원심분리하고 1 ml의 상층액을 0.1 ml의 10 N NaOH와 섞은 후 4-nitrocatechol의 생성을 546 nm에서 측정하였다.

(7) Aniline hydroxylase assay

Aniline hydroxylase 활성은 Briodie와 Axelrod¹⁹⁾의 방법을 이용하여 p-aminophenol 형성 측정으로 실험하였다. 4-nitrophenol hydroxylase assay와 같은 방법으로 실시한 후 0.5 ml의 0.6 N perchloric acid를 첨가하여 반응을 정지시킨다. 그리고 0.1 ml의 5% phenol in 2.5 M NaOH와 2.5 M sodium carbonate를 첨가하여 30분간 발색시킨 후 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(8) 정량적 DNA fragmentation assay

분광광도기를 이용하여 간의 DNA fragmentation(절편화)을 측정하였다. 각 실험군 동물의 간을 차가운 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100, pH 8.0)에서 분쇄하였다. Homogenates는 침전물의 chromatin과 상층액의 fragmented DNA를 분리하기 위하여 27,000×g에서 20분간 원심분리하였다²⁰⁾. 침전물은 0.5 N perchloric acid로 부유시키고 상층액은 높은 농도의 perchloric acid를 첨가하여 0.5 N이 되게 하였다. 90℃에서 15분간 끓인 후 1500×g에서 10분간 원심분리하여 단백질을 세포의 부스러기를 제거하고 상층액은 diphenylamine(DPA; 1.5g + 1 ml H₂SO₄ + 100 ml glacial acetic acid + 50 mM CH₃CHO)를 첨가하여 상온에서 16~20 시간동안 방치하였다. 분광광도계를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 조절군(control)의 DNA fragmentation [(fragmented DNA)/(fragmented DNA + intact DNA)]은 전체 DNA 함량 중 상층액의 DNA양을 %로 표현하였으며 시료 처리의 효과는 조절군의 fragmentation의 %로 나타내었다.

(9) Enzymes 활성 측정

① QR 활성 측정

QR 활성 측정은 Prochaska²¹⁾의 방법에 준하여 0.25 M sucrose로 희석한 조직 사이토졸 부유액 50 μl에 reaction mixture 200 μl를 첨가하여 측정하였다. QR 활성 유도는 시료를 투여하지 않은 대조군에 대한 시료를 투여한 마우스 간조직의 효소 활성의 비로 나타내었다.

② GST 활성 측정

GST 활성은 0.25 M sucrose로 희석시킨 조직 사이토졸 부유액 20 μl에 세포내에서 측정된 방법에 준하여 실시하였다. GST 활성 유도는 시료를 투여하지 않은 대조군에 대한 시료를 투여한 마우스 간조직의 효소 활성의 비로 나타내었다.

실험결과

1. 화간전에 의한 in vivo에서의 AAP 간독성 해독 효과

생체에서의 실험을 시작하기 전에 AAP과 화간전의 사용량과 지속기를 결정하기 위한 실험을 실시하였다. 두가지 농도의 AAP (400과 500 mg/kg, i.p)과 비독성의 화간전 농도 (200과 400 mg/kg, i.g)를 선택하여 실험한 결과, AAP 500 mg/kg에 의하여 생쥐의 치사현상이 있었으므로 400 mg/kg농도를 간독성 예방효과 실험에 사용하였다. 그리고 예방효과 최대의 평가를 위하여 유도된 간독성이 연구목적에 적절하고 치사원인이 되지 않는 실험동물에서의 예방효과 연구를 위한 시간대인 화간전의 14회 전투여와 AAP의 1회 후투여를 선택하였다. 그리고 다음 사항

Table 1. Classification of Experimental Groups

Groups	Animal number	Treatment	
		Whagan-jeon (mg/kg, i.g)	AAP (mg/kg, i.p)
Group 1	10	Vehicle	Vehicle
Group 2	10	200 (14 days)	-
Group 3	10	200 (14 days)	400 (1 day)
Group 4	10	400 (14 days)	-
Group 5	10	400 (14 days)	400 (1 day)
Group 6	10	-	400 (1 day)

을 본 생체연구에서의 중요한 목적으로 하였다 : (i) 화간전 전투여에 의하여 AAP에 의해 유도된 간독성의 방어효과, (ii) 화간전에 의한 AAP 유도의 간 GSH 고갈 회복효과, (iii) 화간전의 AAP에 의한 간의 DNA 파편화 현상 억제효과, (iv) AAP에 의한 CYP2E1 효소활성 억제효과 측정을 위하여 p-nitrophenol hydroxylase와 aniline hydroxylase 활성 측정, (v) 간의 GST와 QR 활성에 미치는 영향을 측정하였다.

1) ALT 활성

간세포에서 방출되는 효소인 ALT는 일차적으로 간 손상의 정도를 반영하므로 흔히 간독성의 표지로서 사용된다. Table 1은 AAP에 의해 유도된 간독성과 화간전에 의한 그 예방효과를 증명하였다. AAP 400 mg/kg의 투여에 의하여 심각한 간독성을 유발하였다. 즉 AAP 처리에 의하여 ALT 활성이 조절군의 10.7배를 증가시켰다. 그러나 화간전만의 200, 400 mg/kg 투여는 간독성을 유발하지 않았으며 화간전 200과 400 mg/kg 투여 후 AAP의 처리에 의하여 간독성 방지 효과를 확인할 수 있었다 (Table 2).

Table 2. Protective Effect of *Whagan-jeon* on Acetaminophen (AAP)-induced Hepatotoxicity in Mice

Treatment	Serum ALT (U/L) ^a
Control	133.0±59.3
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg)	174.4±61.3
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg)	196.3±66.1
AAP (400 mg/kg)	1321.8±144.2
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg) + AAP	955.1±87.7*
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg) + AAP	699.8±75.8**

^a Each value represents the mean±SD of ten mice. Statistically significant difference from the value obtained in AAP-treated mice (*P<0.05, **P<0.01).

2) GSH 함량 측정

화간전을 14일간 생쥐에 투여 (intra-gastric applicator)한 후 AAP 투여 (intraperitoneal)에 의한 각 실험군의 GSH 함량을 측정하였다 (Table 3). 화간전만의 투여에 의하여 간의 GSH 함량이 약간 증가

하였다. 그리고 AAP만에 의한 GSH 함량은 무처리한 실험군 GSH의 47.5%로 GSH 고갈 현상을 관찰할 수 있었으며, 화간전 전투여 후 AAP처리에 의하여 GSH 함량 증가현상이 있었으며, 높은 농도 (400 mg/kg)의 화간전이 낮은 농도 (200 mg/kg)보다 더 효율적이었다. 그러나 화간전과 AAP을 처리하지 않은 무처리군인 대조군과 비교하면 완전히 GSH 함량이 회복되지 않고 21.7%의 GSH 함량 고갈 현상이 관찰되었다.

Table 3. Protective Effect of *Whagan-jeon* on Acetaminophen (AAP)-induced Depletion of Hepatic Glutathione (GSH) Levels.

Treatment	Glutathionea (% control) ^b
Control	100.0±11.8
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg)	114.8±19.5
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg)	131.7±20.4
AAP (400 mg/kg)	47.5±6.1
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg) + AAP	56.3±7.4
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg) + AAP	78.3±8.9*

^a Each value represents the mean±SD of ten mice. ^b Control hepatic GSH level was 76 nM/mg protein. * Statistically significant difference from the value obtained in AAP-treated mice (P<0.05)

3) CYP 2E1 활성

마우스에서 AAP의 대사활성은 CYP450 2E1에 의해 일어나므로 p-nitrophenol hydroxylation과 aniline hydroxylation이 P450 2E1의 활성측정을 위하여 사용

Table 4. Effect of *Whagan-jeon* on the Microsomal P-nitrophenol Hydroxylation Activity of AAP-treated Mice.

Treatments	P-Nitrophenol hydroxylation ^a (nmol/min/mg protein)
Control	1.64±0.19
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg)	1.43±0.21
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg)	1.21±0.10
AAP (400 mg/kg)	4.77±0.53
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg) + AAP	3.09±0.48*
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg) + AAP	2.14±0.31**

^a Each value represents the mean±SD of ten mice. Statistically significant difference from the value obtained in AAP-treated mice (*P<0.05, **P<0.01)

되고 있다²²⁻²⁴). AAP가 생쥐의 cytochrome P450 2E1에 미치는 영향을 살펴본 결과 CYP 2E1 특이적 기질 p-nitrophenol의 hydroxylation이 AAP처리에 의하여 증가되어 대조군의 1.87배가 되었다 (Table 4). 또한 CYP 2E1 특이의 aniline의 hydroxylation의 활성화도 AAP을 처리한 생쥐에서 증가하였다 (Table 5), 그러나 화간전이 AAP에 의해 유도된 생쥐 간 microsone의 CYP 2E1 효소 활성을 저해하여 200과 400 mg/kg 투여에 의하여 4-NP hydroxylase는 35-55% (Table 4), aniline hydroxylase는 26-44%의 억제효과가 있었다 (Table 5).

Table 5. Effect of *Whagan-jeon* on the Microsomal Aniline Hydroxylation Activity of AAP-treated Mice.

Treatments	Aniline hydroxylation* (nmol/min/mg protein)
Control	0.47±0.07
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg)	0.38±0.14
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg)	0.33±0.20
AAP (400 mg/kg)	1.54±0.23
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg) + AAP	1.14±0.26*
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg) + AAP	0.87±0.16**

* Each value represents the mean±SD of ten mice. Statistically significant difference from the value obtained in AAP-treated mice (*P<0.05, **P<0.01).

4) DNA 절편화

화간전과 AAP 상호작용에 의한 genomic DNA의 보전·변화측정을 위하여 sedimentation assay (×27,000g)에 의한 정량적 평가결과는 (Table 6)과 같았다. 화간전 200과 400 mg/kg만의 투여에 의하여서는 genomic DNA 보전에 변화가 없었다. 그러나 AAP 투여에 의하여 DNA fragmentation이 2.1배 증가하였으나 화간전 투여에 의하여 AAP에 의한 DNA fragmentation에 영향을 미치어 DNA 손상 억제에 매우 효율적이었다. 즉, 200과 400 mg/kg의 화간전 투여 후 AAP 처리에 의하여 DNA fragmentation이 각각 조절군의 174.5%와 134.4%로 나타났으므로 두 농도 모두가 AAP에 의해 유도된 DNA fragmentation을 완

전히 전환시키지는 못하였다. 이는 매우 심하게 손상된 세포가 회복과 수선의 과정에 있음을 나타내었다. 전체적 경향으로 보았을 때 정량적 DNA 파편화 결과는 앞서 Table 2에서 설명한 ALT에 의한 간독성의 양상과 비슷하였다.

5) GST 및 quinone reductase 활성

마우스 간의 GST 활성은 AAP 처리에 의하여 무처리군인 조절군의 71.9% GST 활성 저하가 일어났으며 화간전 400 mg/kg 투여에 의하여 96.4%로 증가하여 유의성있는 GST 활성변화를 관찰할 수 있었다 (Table 7). 그리고 QR 활성화도 AAP에 의하여 저하되었으나 화간전 400 mg/kg에 의하여 활성화증가현상이 나타났다 (Table 8).

Table 6. AAP-induced Genomic DNA Fragmentation and its Reversal by *Whagan-jeon* Preexposure.

Treatments	Liver DNA fragmentation (% control)
Control	100.0±12.3
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg)	108.9±10.1
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg)	98.8±11.3
AAP (400 mg/kg)	214.9±19.3
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg) + AAP	174.5±19.1
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg) + AAP	134.4±11.7**

Results are mean±SD for 10 mice per group. Statistically significant difference from the value obtained in AAP-treated mice (**P<0.01).

Table 7. Effect of *Whagan-jeon* Treatment on Hepatic Glutathione-S-transferase (GST) Activity in Mice.

Treatments	Glutathione-S-transferase* (% control) ^b
Control	100.0±10.1
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg)	109.8±21.5
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg)	136.1±23.7
AAP (400 mg/kg)	71.9±8.1
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg) + AAP	88.3±10.4
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg) + AAP	96.4±6.9*

^a Each value represents the mean±SD of ten mice. ^bControl hepatic GST activity was 129 nmole/min/mg protein. * Statistically significant difference from the value obtained in AAP-treated mice (P<0.05).

Table 8. The Effect of *Whagan-jeon* Pretreatment on Hepatic NAD(P)H:quinone Oxidoreductase (QR) Activity in Mice.

Treatments	NAD(P)H:quinone oxidoreductasea (% control) ^b
Control	100.0±9.6
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg)	123.7±19.3*
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg)	141.1±24.1**
AAP (400 mg/kg)	80.1±10.3
<i>Whagan-jeon</i> (200 mg/kg) + AAP	96.3±8.7
<i>Whagan-jeon</i> (400 mg/kg) + AAP	115.4±12.1*

^a Each value represents the mean±SD of ten mice.

^b Control hepatic QR activity was 261 nmole/min/mg protein.

Statistically significant difference from the value obtained in AAP-treated mice (*P<0.05, **P<0.01).

고 찰

AAP 등 약물에 의한 간중독은 한방적으로 黃疸, 脇痛, 鬱症, 積聚, 臌脹, 濕病 등의 病証 범위에 속하는데²⁵⁻²⁶, 化肝煎은 경약전서에서 新方八陣 중 寒陣에 속한 처방으로서 怒氣傷肝으로 氣逆動火하여 발생된 煩熱脇痛, 脹滿動血 등을 치료한다고 되어있으며 유²⁷는 CCl₄에 의한 간중독에 화간전이 유의한 효과가 있다고 하였었다.

혈청 ALT의 증가는 간세포막의 radical에 의한 지질과산화현상을 직접적으로 반영한다. AAP의 biological reactive intermediates는 아릴화(arylate)하는 단백질이며 손상된 간세포에서 혈청으로 분비된다²⁸. Nelson과 Pearson²⁹에 의하면 AAP에 내전된 단백질의 방출은 다른 세포 물질 즉 ALT와 유사하여 세포 손상의 단계에서 늦게 나타난다. 즉 본 실험의 결과에 의하면 독성과과정에서 매우 늦은 시간대에 24시간에 AAP에 의한 독성이 나타났으므로 이러한 앞선 보고들과 일치한다. AAP 대사는 biological reactive intermediates 즉 NAPQI의 생성과 oxidative stress의 유도이다. 그러므로 항산화 작용이 있는 물질은 AAP의 대사과정 중 해독작용을 할 수 있다. 그래서 AAP에 의한 지질과산화현상을 억제하며 독성 radical의 생성을 최소화한다. 그러므로 화간전은 아마도 항산화작용이 있어서 화간전과 AAP 처리군에서 혈청 ALT의 감소현상이 있었을 것이다.

DNA와 세포의 genomic apparatus의 안정성은 다양한 외부적 요인인 고에너지 radiations, 환경성 독성 물질들이나 내부적 요인인 산화적 손상에 의해 공격을 받아서 DNA 손상을 초래한다. 이러한 공격의 영향을 최소화하기 위하여 여러 DNA 수선경로에 의하여 DNA가 보전된다. 세포손상방지에서 DNA 수선의 중요성 때문에 이러한 경로에서의 손상은 생체에서의 병인적 요소로 직접적인 관련이 있다. Ray 등²⁸에 의하면 AAP가 간의 Ca²⁺ 농도를 증가시키고 이는 DNA를 파편화시키는 핵의 endonuclease를 활성화시킨다고 보고하였다. 본 연구결과에 의하면 화간전 자체는 genomic DNA의 영향이 없었으나 화간전 전 처리후 AAP을 처리한 실험군은 AAP에 의해 유도된 DNA 분절현상을 방지하였다. AAP이 DNA 수선효소, poly(ADP-Ribose)polymerase에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으므로, 아마도 이 효소의 활성이 화간전에 의하여 변화된 것으로 보인다. 그러나 화간전 200mg/kg 투여에 의하여 AAP에 의한 DNA fragmentation의 억제가 부분적이었으며 400 mg/kg 농도에서 더 높은 억제현상을 관찰할 수 있었다. 이 효과가 간세포 핵의 endonuclease의 활성억제인지 세포로의 Ca²⁺의 이입방지에 의한 것인지는 본 연구에서는 알 수 없었다.

보통 섭취한 AAP의 5% 이하가 간의 cytochrome P450에 의하여 매우 반응성이 높은 독성 퀴논 중간체인 NAPQI로 산화된다. 이 전자친화물질은 공유적으로 세포내 물질과 결합하고, glutathione을 고갈시키며, oxidative stress의 원인이 되고 간세포의 calcium과 thiol에 변화를 주어 간 손상을 유발한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 AAP의 농도가 증가할수록 세포독성이 증가하였으며 AAP처리에 의해 세포독성 유도 후 화간전을 처리하였을 때 LDH 방출 측정에 의하면 세포독성이 감소함을 알 수 있었다. 생쥐의 간에서는 AAP가 CYP2E1에 의하여 대사되어 지고³⁰⁻³¹, 분리된 microsome 연구에 의하면 비록 그 독성의 정도 결정을 위한 NAPQI의 형성에 미치는 상대적인 비율은 밝혀지지 않았지만, 사람의 간은 AAP에서 NAPQI로의 대사활성은 CYP1A2,

CYP2E1과 CYP3A4에 의하여 일어난다고 알려져 있다. 또한 사람의 간에서 NAPQI에 의한 독성의 정도를 결정하는 CYP1A2의 역할은 이 단백질 성분을 V79세포로의 형질전환에 의해 AAP의 세포독성이 유발되는 것도 증명되었다.

다른 연구팀에 의하면 AAP의 독성이 여러 간세포의 종류에 따라 달랐으며 이는 각세포들이 cytochrome P450 dependent monooxygenase system을 통한 AAP가 NAPQI로의 전환에 차이가 있기 때문이며, Tee 등은 간세포에 대한 AAP의 독성이 종간의 차이를 보이며 이 차이는 NAPQI 형성의 차이에 의해서 나타남을 증명하였다³²⁻³³⁾.

또한 본 연구에서는 생쥐 생체에서 화간전이 간의 microsomal P450 2E1 특이적인 monooxygenase활성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 화간전 전투여는 생쥐 간의 microsomal P450 2E1 특이적 p-nitrophenol hydroxylation과 aniline hydroxylation을 감소시켰으므로 AAP의 대사물 형성감소에 의한 간손상의 억제현상이 나타난 것으로 보인다.

CYP 2E1은 전체 cytochrome P450의 8-11%를 차지하며 독성학적으로 매우 중요한 효소로서 ethanol, acetone, diethyl ether, N-nitrosamine, benzene 과 CCl₄등의 대사에 관여한다³⁴⁻³⁹⁾. 특히 CYP 2E1은 nitrosamines과 같은 많은 발암물질의 대사에도 중요한 역할을 한다⁴⁰⁾. 그러므로 화간전도 CYP 2E1의 활성을 억제하여 대사활동 억제에 의한 많은 xenobiotics의 독성을 저해할 것으로 기대된다.

결론

화간전이 AAP에 의해 유발된 간독성에 미치는 영향을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. AAP의 처리에 의한 혈청 ALT활성 증가에 대하여 화간전의 200, 400 mg/kg 투여후 방지 효과를 확인할 수 있었다
2. AAP에 의한 GSH 고갈에 대하여 화간전 전투여 후 GSH 함량 증가현상이 있었으며, 높은 농도 (400

mg/kg)의 화간전이 낮은 농도 (200 mg/kg)보다 더 효율적이었다. 그러나 화간전과 AAP을 처리하지 않은 무처리군인 대조군과 비교하면 완전히 GSH 함량이 회복되지 않고 21.7%의 GSH 함량 고갈 현상이 관찰되었다.

3. 생쥐 생체에서 화간전이 간의 microsomal P450 2E1 특이적인 monooxygenase활성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 화간전 전투여는 생쥐 간의 microsomal P450 2E1 특이적 p-nitrophenol hydroxylation과 aniline hydroxylation을 감소시켰으므로 AAP의 대사물 형성감소에 의한 간손상의 억제현상이 나타난 것으로 보인다.

4. AAP 투여에 의하여 DNA fragmentation이 2.1배 증가하였으나 화간전 투여에 의하여 AAP에 의한 DNA fragmentation에 영향을 미치어 DNA 손상 억제에 매우 효율적이었다.

5. AAP 처리에 의한 QR의 활성과 화간전에 의한 그 변화를 측정 한 결과, 화간전 처리에 의하여 QR 활성이 유의성 있게 증가하였다. 생쥐에서는 QR 활성이 AAP에 의하여 저하되었으나 화간전 400 mg/kg에 의하여 활성증가현상이 나타났다.

6. 마우스 간의 GST 활성은 AAP 처리에 의하여 무처리군인 조절군의 71.9% GST 활성 저하가 일어났으며 화간전 400 mg/kg 투여에 의하여 96.4%로 증가하여 유의성있는 GST 활성변화를 관찰할 수 있었다.

본 연구의 결과에 의하면 화간전은 AAP에 의해 유도된 간손상에 관여하는 여러 기전들 즉, ALT 활성 증가, GSH 고갈현상, cytochrome P450, QR, GST 효소 활성, genomic DNA 변화등에서 간손상 회복효과 있었으므로 화간전은 간독성 치료에 매우 효율적인 생약임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Chiu S, Bhakthan NMG. Experimental acetaminophen-induced hepatic necrosis. Lab Invest. 1978;39:193-203.

2. Spooner JB, Harvey J. History and usage of paracetamol. *J Int Med Res.* 1976;4:1-6.
3. Patten CJ, Thomas PE, Guy RL, Lee M, Gonzalez FJ, and Guengerich FP. Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human microsomes and their kinetics. *Chem Res Toxicol.* 1993;6:511-518.
4. Dahlin DC, Miwa GT, Lu A YH, Nelson SD. N-acetyl-p-benzo-quinone imine: a cytochrome P-450 mediated oxidation product of acetaminophen. *Biochemistry.* 1984;81:1327-1331.
5. Buckpitt AR, Rollins DE, Mitchell JR. Varying effects of sulfhydryl nucleophiles on acetaminophen oxidation and sulfhydryl adduct formation. *Biochem. Pharmacol.* 1979;28: 2941-2946.
6. Moore M, Thor H, Moore G, Nelson S, Moldeus P, Orrenius S. The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca²⁺. *J Biol Chem.* 1985;260:13035-13040.
7. Hajos AKD, Winston GW. Role of cytosolic NAD(P)H quinone oxidoreductase and alcohol dehydrogenase in the reduction of p-nitrosophenol following chronic ethanol ingestion. *Arch Biochem Biophys.* 1992;295:223-229.
8. Multimer DJ, Ayres RCS, Neuberger JM, Davies MH, Holguin J, Buckels JAC. Serious paracetamol poisoning and the results of liver transplantation. *Gut.* 1994;35:809-814.
9. 강혜경. Acetaminophen에 의해 유도된 급성 간독성에 미치는 시호의 효과. 덕성여대 대학원. 1993.
10. 정정숙. Acetaminophen의 간독성에 미치는 강활의 효과. 덕성여대 대학원. 1993.
11. 정규영. Acetaminophen에 의한 간독성에 미치는 금은화의 효과. 덕성여대 대학원. 1993.
12. 김은주. 토복령추출물이 Acetaminophen 간독성에 미치는 효과. 덕성여대 대학원. 1993.
13. 배창욱. 귀비탕이 acetaminophen으로 유도된 간중독 백서에 미치는 영향. 동국대 대학원. 2001.
14. 張介賓. 景岳全書. 서울:정담. 1999:1083.
15. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem.* 1978;24:58-73.
16. Benson AM, Hunkeler MJ, Talalay P. Increase of NAD(P)H : quinone reductase by dietary antioxidants: Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc Natl Acad Sci (U.S.A).* 1980;77:5216-5220.
17. Koop DR. Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Mol Pharmacol.* 1986;29:399-404.
18. Kim SG, Novak RF. The induction of cytochrome P450 2E1 by nitrogen- and sulfur-containing heterocycles: expression and molecular regulation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993;120:257-265.
19. Brodie BB, Axelrod L. The estimation of acetanilide and its metabolic products, aniline, N-acetyl-p-aminophenol and p-aminophenol (free and conjugated) in biological fluids and tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 1948;94:22-28.
20. Ray SD, Sorge CL, Kamendulis L, Corcoran GB. Ca²⁺ activated DNA fragmentation in dimethyl nitrosamine-induced hepatic necrosis. effects of Ca²⁺ endonuclease and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;236: 2467-2471.
21. Prochaska HJ, Talalay P, Sies H. Direct protective effect of NAD(P)H : quinone reductase against menadione-induced chemiluminescence of postmitochondrial fractions of mouse liver. *J Biol Chem.* 1987;262:1931-1937.
22. Dicker E, MaHugh T, Cederbaum AL. Increased oxidation of p-nitrophenol and aniline by intact hepatocytes isolated from pyrazole rats. *Biochem Biophys Acts.* 1990;1035:249-256.

23. Ryan DE, Levin W. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol Ther.* 1990;45:153-239.
24. Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J.* 1992;6:724-730.
25. 陳可冀. 실용중서의결합내과학. 북경:북경의과대학 중국협화의과대학 연합출판사. 1998:760.
26. 王伯祥. 중의간담병학. 북경:중국의약과기출판사. 1997:238.
27. 유정원, 박선동. 화간전이 carbon tetrachloride로 유도한 간중독 흰쥐에 미치는 영향. *동국대 한의학연구소 논문집.* 1995;3:313-325.
28. Ray SD, Kamendulis L, Gurule MW, Yorkin RD, Corcoran GB. Ca^{2+} antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. *FASEB J.* 1993;7:453-463.
29. Nelson SD, Pearson PG. Covalent and noncovalent interactions in acute lethal cell injury caused by chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990;30:169-195.
30. Tonge RP, Kelly EJ, Bruschi SA, Kalhorn T, Eaton DL, Nebert DW. Role of CYP1A2 in the hepatotoxicity of acetaminophen: investigations using CYP1A2 null mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;153:102-108.
31. Zaher H, Busters JTM, Ward JM, Bruno MK, Lucas AM, Stern ST. Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;152:193-199.
32. Tee LBG, Davies DS, Seddon CE, Boobis AR. Species differences in the hepatotoxicity of paracetamol are due to differences in the rate of conversion to its toxic metabolite. *Biochem. Pharmacol.* 1987;36:1041-1052.
33. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.
34. Morgan ET, Koop DR, Coon MJ. Catalytic activity of cytochrome P-450 isozyme 3a isolated from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J Biol Chem.* 1982;257:13951-13957.
35. Brady JF, Lee MJ, Li M, Ishizaki H, Yang CS. Diethyl ether as a substrate for acetone/ethanol-inducible cytochrome P-450 and as an inducer for cytochrome(s) P-450. *Mol Pharmacol.* 1988;33:148-154.
36. Thomas PE, Bandiera S, Maines LL, Ryan DE, Levin W. Regulation of cytochrome P-450j, a high-affinity N-nitrosodimethylamine demethylase. in rat hepatic microsomes. *Biochemistry.* 1987;26:2280-2289.
37. Yang CS, Tu YY, Koop DR, Coon MJ. Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes. *Cancer Res.* 1985;45:1140-1145.
38. Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on an ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Lett.* 1985;183:265-269.
39. Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Benzene metabolism by ethanol-, acetone-, and benzene-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat and rabbit liver microsomes. *Cancer Res.* 1988;48:5387-5390.
40. Yang CS, Yoo JSH, Ishizaki H, Hong JY. Cytochrome P450 IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanism of regulation. *Drug Metab Rev.* 1990;22:147-159.