

# 肝俞·中脘의 大薊 藥鍼이 급성 산화적 간손상에 미치는 효과

이 정 주<sup>1</sup>·문 진 영<sup>1</sup>

<sup>1</sup>동국대학교 한의과대학 경혈학교실

## Effects of *Circii Herba* Aqua-Acupuncture (BL18, CV12) on Acute Oxidative Liver Injury

Jeong-Joo Lee<sup>1</sup>, Jin-Young Moon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Dong Guk University

### Abstract

**Objectives** : *Circii Herba* has been used as a natural drug for the treatment of stress digestive system disease. The aim of this study is to investigate the role of *Circii Herba* aqua-acupuncture solution (CHAS) in experimental oxidative liver injury.

**Methods** : In order to investigate the effects of CHAS on acute liver injury, male ICR mice were pretreated with CHAS(0.2 ml/mouse/day) at the loci of BL18 and CV12 for 6days, starved for 24hrs, and administered acetaminophen(500 mg/kg, *i.p.*). After acetaminophen administration, mice were sacrificed, and the liver was removed, rinsed with ice-cold 1.15% KCl buffer, and homogenized at 4°C. Fractions(fraction I, II, III) were isolated by differential centrifugation. Lipidperoxide, total SH, and glutathione(GSH) levels were measured in the Fraction I. In addition, activities of hepatic enzyme, such as catalase, glutathione peroxidase(GSH-Px) were measured in the Fraction II, and glutathione S-transferase(GST) was measured in the Fraction III.

**Results** : *In vivo* treatment of CHAS(BL18 and CV12) showed effective inhibition of acetaminophen induced lipid peroxidation, and showed elevations of total SH, GSH level, catalase, GSH-Px, GST activities.

**Conclusions** : These results suggested that CHAS might suppress the formation of oxidative metabolites, and prevent acetaminophen induced hepatotoxicity.

**Key words** : *Circii Herba*, BL18, CV12, Acetaminophen, Glutathione, Lipid peroxidation

## I. 서 론

大薊(대계)는 名醫別錄에 中品으로 분류되어 최초로 수록된 약재로서 養精, 保血하고, 사람으로 하여금 肥健하게 한다 하였으며, 부인과 질

환 및 출혈성 질환 등에 주로 사용되었다<sup>9)</sup>. 한편 본 약물은 국화과 Compositae에 속하는 *Circium japonicum* DC.(국명 : 영경귀)의 수초를 건조한 것으로서 性味는 甘苦凉하며, 心經과 肝經으로 작용한다. 한편 凉血止血의 효능이 있어서 血熱吐衄, 尿血崩漏등과 같은 소화기 및 비뇨생식기 계통의 출혈 증상을 치료하며, 利尿

· 교신저자: 문진영, 경북 경주시 석장동 707, 동국대학교 한의과대학 경혈학교실, Tel. 054-770-2665, Fax. 054-770-2649, E-mail : ampmoon@mail.dongguk.ac.kr

解毒하므로 膀胱炎, 尿道炎, 肝炎 및 腎臟炎 등에 사용되고, 散瘀消癰, 消腫止痛의 藥性이 있어서 각종 外科疾患 및 염증성 질환의 치료에 사용된다<sup>1,2,3,4,5,11,12,13</sup>. 이와 같이 본 약물은 문헌 및 임상적으로 다수의 효능이 알려져 있음에도 불구하고 대계 약침에 관한 실험적 연구는 지금까지 이루어지지 않고 있다는 점과, 대계가 肝經으로 작용하고 解毒 효과가 강하다는 점에 착안하여, 본 연구에서는 대계 약침액을 제조하여 마우스의 급성 산화적 간손상에 어떠한 영향을 미치는가를 규명하고자 하였다. 아세트아미노펜은 마우스에 간손상 유발을 위한 약물로 흔히 사용되는데, 본 약물을 과량투여(500 mg/kg)하면 대사과정 중에서 다량의 대사활성체와 활성 산소종이 생성되어 항산화물질인 glutathione을 고갈시킴으로써 세포막의 지질과산화 반응을 초래할 뿐만 아니라, catalase, glutathione peroxidase 및 glutathione S-transferase와 같은 항산화효소계의 정상적 기능을 파괴함으로써 세포막의 산화적 손상과 파괴를 일으킨다<sup>22-25</sup>. 따라서 본 연구에서는 대계 약침이 급성 간손상에 대한 효과를 규명하기 위하여, 간장 기능 조절 및 생체의 元氣 보호와 밀접한 관련성이 있는 肝俞 및 中脘穴에 대계 약침을 전치치한 다음, 간손상 유발제로 아세트아미노펜을 대량 투여한 후, 간조직에서 지질과산화물, total SH, glutathione의 함량과, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase 효소 활성 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 약재

본 실험에서 대계 약침을 제조하기 위하여 사용된 대계(Circii Herba)는 경북 영천에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며, 大薊草와 大薊根을 동량 혼합하여 실험에 사용하였다.

### 2) 실험 동물

본 실험에서 사용된 실험 동물은 생후 6주령의 수컷 ICR계 마우스(체중 25~30 g)로 대한 동물 실험 센터(충북, 음성)에서 분양 받아 일정한 조건으로 본 대학 사육실의 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

### 3) 시약

본 실험에 사용된 시약으로서 acetaminophen, 2-thiobarbituric acid(TBA), lauryl sulfate sodium(SDS), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), glutathione(GSH), sulfamic acid ammonium, sulfanilamide, N-1-naphthyl ethylenediamine, 5,5-dithio bis-2-nitrobenzoic acid(DTNB), ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA), glutathione reductase(GSSG-reductase), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium salt(NADPH), chlorodinitro-benzene(CDNB), bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit는 Sigma사 (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO)로 부터, 그리고 malondialdehyde tetrabutylammonium salt(MDA)는 Fluka사 (Fluka Chemie AG, Switzerland)로부터, NaN<sub>3</sub>는 Aldrich사(Aldrich Chem. Co. Milwaukee, WI)로 부터, trichloroacetic acid(TCA)는 Janssen Chimica(Belgium)로부터 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 대계 약침액의 제조

대계 약침액은 水提-알콜 沈法<sup>10)</sup>에 의해 다음과 같이 제조하였다. 먼저 大薊草와 大薊根을 각각 100 g씩 취해 細切하여 냉각 환류관이 부착된 원저 플라스크에 넣고, 증류수 800 ml를 가한 다음, 2시간 동안 추출하고 여과하였다. 여과액 중의 미량 침전물을 제거하기 위하여 2,500 rpm에서 10분간 원심분리한 다음, 상층액을 분리하였다. 상층액은 다시 rotary evaporator로 감압농축하고, 농축액에 증류수를 가하여 전량을 100 ml가 되도록 조절하였다. 위의 방법으로 제조한 대계 추출액은 다시 단계별로 75 %, 85 % 및 95 % 에탄올 용액이 되도록 99.9 % 에탄올을 첨가함으로써 각각의 단계에서 생성되는 침전물을 제거하였다. 이러한 에탄올 처리과정을 위해 먼저 대계 추출액에 99.9 % 에탄올을 가하여 75 % 에탄올 용액으로 만들어 교반하고, 냉장실에서 24시간 방치하여 생성된 침전물을 여별하여 침전물을 제거한 다음, 감압농축하였다. 이러한 처리과정을 85 % 에탄올 용액에서 1회 반복하고, 다시 95 % 에탄올 용액에서 1회 더 반복하였다. 최종 농축액에 생리식염수를 가하고, 1 N NaOH로 pH7.0으로 조절하여 전량이 200 ml가 되도록 조절한 다음, 저온에서 24시간 방치하고, membrane filter(0.22 µm, Whatman, Germany)로 여과하여 대계 약침액(Circii Herba Aqua-acupuncture Solution : CHAS) 원액으로 사용하였다.

## 2) 실험군의 분류

본 실험에서는 ICR 마우스 7마리를 한 군으로 하여, 아무런 처치도 하지 않은 정상군 (Normal), acetaminophen을 복강 투여한 대조군 (Control), 그리고 대계 약침액을 肝俞 및 中脘穴 부위로 6일간 주입한 다음 acetaminophen을 복강 투여한 대계 약침 처리군 (CHAS)으로 나누어서 실험을 행하였다. 그리고 대계 약침 처

Table I. Classification of Experimental Group

Groups	CHAS pretreatment (0.2ml/mouse for 6day)	Starved (24hr)	Acetaminophen (500mg/kg, i.p.)
Normal	-	+	-
Control	-	+	+
CHAS-1	+	+	+
CHAS-4	+	+	+

리군은 (CHAS)은 다시 대계 약침의 농도에 따라 원액 처리군 (CHAS-1)과 4배 희석액 처리군 (CHAS-4)로 나누어 실험을 행하였다(Table I).

## 3) 취혈

본 실험에서 마우스에 대계 약침액을 주입하기 위한 부위로 人體의 肝俞(BL18), 中脘(CV12)穴과 해부학적으로 상응하는 부위를 선택하여 털을 제거한 후, 이전탐측기 CS-202(삼공전자주식회사, 일본)를 사용하여 그 반응점으로 다시 확인하였다.

## 4) 대계 약침 전처리 및 아세트아미노펜 투여

대계 약침액은 마우스당 0.2 ml씩 하루 1회로 肝俞 및 中脘穴 부위에 모두 6일 동안 주입하였다. 또한 급성 산화적 간손상을 보다 효과적으로 유발시키기 위하여 대계 약침 처치가 완료된 시점으로부터 24시간 동안 마우스를 절식시키고, 아세트아미노펜(500 mg/kg)을 DMSO(2.5 ml/kg)에 현탁시켜 1회 복강 주사하였다.

## 5) 간조직 균질액과 분획의 조제

아세트아미노펜 투여가 완료된 시점으로부터 다시 24시간 후에 마우스를 diethyl ether로 마취하고, 복피를 절개하여 간을 적출하였다. 적출한 간은 빙냉 보관한 1.15 % KCl 완충용액으로 신속히 세척하여 혈액을 제거한 다음, 흡습지로 수분을 최대한 제거하였다. 그리고 간조직 균질액을 만들기 위해 수분 제거를 마친 간을 즉

시 KCl 완충용액과 10 % (w/v %)가 되도록 혼합하여 조직균질기(Teflon Plotter Elvehjem Homogenizer, Glas-Col, U.S.A)에서 마쇄하였다. 마쇄액은 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하였으며, 그 상층액을 일정량씩 취하여 간조직 분획(I)을 준비하였고, 이를 지질과산화물(Lipid peroxide : LPO), total SH, GSH의 함량 측정에 사용하였다. 또한 상층액을 취하고 남은 마쇄액을 다시 4,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 생성된 침전물에 KCl 완충용액을 일정량씩 가하여 간조직 분획(II)를 준비하였으며 이를 catalase 및 glutathione peroxidase 활성 측정에 사용하였다. 한편 상층액은 다시 20,000 rpm에서 60분간 원심분리한 후, 그 상층액을 취하여 분획(III)을 준비하였고, 이를 glutathione S-transferase 활성 측정에 사용하였다. 이상의 모든 과정은 0~4 °C에서 행하였으며, 각 분획은 일정량씩 분주하여 실험에 사용할 때까지 -70 °C에서 보관하였다

#### 6) 지질과산화물 함량 측정

간조직 균질액 중의 지질과산화물(Lipidperoxide : LPO) 함량은 TBA법<sup>18)</sup>으로 측정하였다. 간조직 균질액(fraction I)에 8.1 % SDS 0.2ml, 20 % acetic acid 용액(pH 3.5) 1.5 ml, 0.8 % TBA 1.5 ml, 증류수 0.6 ml를 가한 다음, 95 °C 항온수조에서 60분 동안 가열한 후, 실온에서 냉각시키고, 증류수 1.0 ml와 n-butanol : pyridine (15:1, v/v)의 혼합액 5.0 ml를 첨가하여 격렬하게 혼합하였다. 이 혼합액을 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 TBA 반응물질이 존재하는 n-butanol층을 분리하여 파장 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. LPO의 함량은 MDA를 사용하여 검량표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도로 표기하였다.

#### 7) Total SH 함량 측정

Total SH의 함량은 Sedlak의 방법<sup>20)</sup>에 의거하여 0.2M Tris buffer(pH 8.2) 1 ml, 0.01M DTNB 0.1 ml, methanol 4 ml를 혼합한 용액에 10 % 간조직 균질액(fraction I) 0.1 ml를 가한 다음, 24 °C에서 15분간 방치하였다. 이것을 600×g에서 30분간 원심분리한 후, 상층액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 전체 SH 농도를 millimole 흡광계수  $13\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 을 사용하여 그 양을 계산하였다.

#### 8) Glutathione 함량 측정

Glutathione(GSH)의 함량은 Hgach의 방법<sup>16)</sup>에 의거하여 10% 간조직 균질액(fraction I)에 동량의 10 % TCA 용액을 가하여 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 다음, 상층액을 취하였다. 상층액 0.1 ml에 0.01M NaNO<sub>2</sub>과 0.2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 혼합조제(1:9, v/v)하여 0.5 ml를 가하고 5분간 방치하였다. 0.5 % sulfamic acid ammonium 수용액 0.2 ml를 가하여 강하게 혼합한 후, 1 % HgCl<sub>2</sub>와 3.4 % sulfanilamide/0.4 N HCl 혼합액(1:9, v/v)을 1 ml를 가하고, 다시 0.1 % N-1-naphthyl ethyl enediamine(0.4 N HCl 용액) 1 ml를 가한 다음, 5분 동안 방치하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 표준용액으로서 125 nM GSH 용액을 사용하였다.

#### 9) Catalase 활성 측정

Catalase 활성도는 Aebi의 방법<sup>14)</sup>에 따라 먼저 50 mM phosphate 완충용액(pH 7.4)으로 희석시킨 catalase 활성 측정용 간조직 분획 부유액(fraction II) 2.0 ml에 30 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 1.0 ml를 첨가하여 240 nm에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 분해에 따른 흡광도의 감소로 측정하였다. 효소의 활성도는 1분 동안 분해된 1 μ mole의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1

unit로 정의하였고 단백질 1 mg을 기준으로 표기하였다.

#### 10) Glutathione peroxidase 활성 측정

Glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성을 측정하기 위하여 본 실험에서는 Paglia와 Lawrence의 방법<sup>17,19)</sup>에 준하여 50 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0) 50 ml에 EDTA 1 mM,  $\text{NaN}_3$  1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM, 그리고 GSSG-reductase는 1 E.U./ml를 혼합한 최대농도 반응 혼합물을 이용하여 측정하였다. 반응 혼합물 0.8 ml에 50mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 희석시킨 GSH-Px 측정용 간조직 분획 부유액(fraction III) 0.1 ml를 넣어 20 °C 항온수조에서 5분간 가온한 후 2.2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  용액 0.1 ml를 첨가하여 340 nm에서의 NADPH 흡광도 감소로 측정하였다. 효소의 활성도는 단백질 mg당 1분 동안 산화되는 NADPH의 양을 1 unit로 표기하였다.

#### 11) Glutathione S-transferase 활성 측정

Glutathione S-transferase(GST) 활성 측정을 위해 본 실험에서는 chlorodinitro benzene (CDNB)과 GSH를 기질로 사용한 Habig의 방법<sup>15)</sup>에 따라 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 6.5)으로 희석시킨 GST 측정용 간조직 분획 부유액(fraction III)에 1 mM GSH, 1 mM CDNB를 첨가하여 파장 340 nm에서 단백질 mg당 1분간 conjugated되는 CDNB의 양을 1 unit로 표기하였다.

#### 12) 단백질 정량

간조직 균질액과 각 분획에서의 단백질 정량은 Smith의 방법<sup>21)</sup>에 의하여 BCA protein assay kit를 이용하여 bovine serum albumin을 표준단백질 용액으로 이용한 표준검량선을 구하

고 그 양을 산출하였다.

#### 13) 통계 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. 실험결과

#### 1. LPO 함량

아세트아미노펜에 의한 급성 산화적 간손상의 유발 여부와 이에 대한 대개 약침의 보호 효과를 검토하기 위한 지표로 간조직 균질액 중의 LPO 함량을 측정하여, 그 결과를 1 mg protein 당 MDA nmol로 표기하였다. 그 결과, 아무런 처치도 하지 않은 정상군의 LPO 함량은  $2.69 \pm 1.00$  nmol이었으나, 아세트아미노펜을 단독 투여한 대조군에서는  $10.48 \pm 2.28$  nmol로 정상군에 비해 유의성( $p < 0.01$ ) 있는 증가를 보였다. 따라서 아세트아미노펜의 투여로 인해 마우스에 급성 산화적 간손상이 효과적으로 유발되었음을 확인할 수 있었다. 한편 대개 약침액을 肝俞 및 中脘穴 부위로 6일간 주입한 다음, 아세트아미노펜을 투여한 실험군(CHAS)에서의 결과는 다음과 같다. 대개 약침액 원액 투여군 및 4배 희석액 투여군에서의 LPO 함량은 각각  $3.98 \pm 0.65$  nmol,  $4.65 \pm 1.38$  nmol로 대조군의  $10.48 \pm 2.28$  nmol에 비해 모두 현저한 유의성( $p < 0.01$ )이 인정되는 감소를 보였다. 이상의 결과에서 간수 및 중완혈 부위에 대개 약침을 전치치함으로써 아세트아미노펜에 의한 마우스의 급성 산화적 간손상이 현저하게 억제됨을 알 수 있었다(Figure 1).

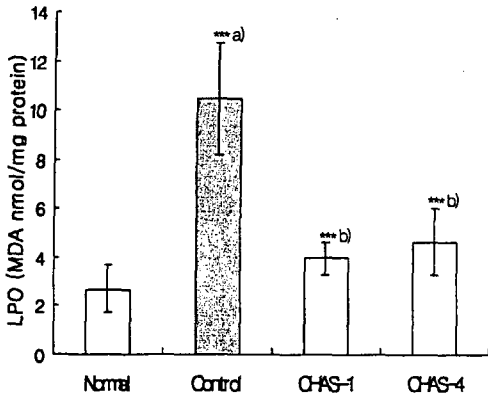


Figure 1. Effect of CHAS on Levels of Lipid Peroxide in Liver Homogenate.

The lipid peroxide content was assayed by the method of Ohkawa et al. Each value represents the mean  $\pm$  SD obtained from seven separate experiments : a), values statistically significant as compared with normal group. b), values statistically significant as compared with control data of each group.

\*\*\*,  $p < 0.01$

## 2. Total SH 및 GSH 함량에 미치는 영향

Figure 1 에서 肝俞 및 中脘穴 부위에 대계 약침을 전처치함으로써 아세트아미노펜에 의한 마우스의 급성 산화적 간손상이 현저하게 억제됨을 LPO 함량의 관찰에서 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 대계 약침이 어떠한 기전으로 간손상을 억제하였는지를 규명하기 위한 일환으로 total SH 및 GSH 함량을 측정된 결과를 1 mg protein당 nmol로 표기하였다.

### 1) Total SH 함량

마우스 간조직 균질액 중의 total SH의 함량 변화를 관찰한 결과, 아무런 처치도 하지 않은 정상군에서는  $172.40 \pm 30.00$  nmol이었으나, 아

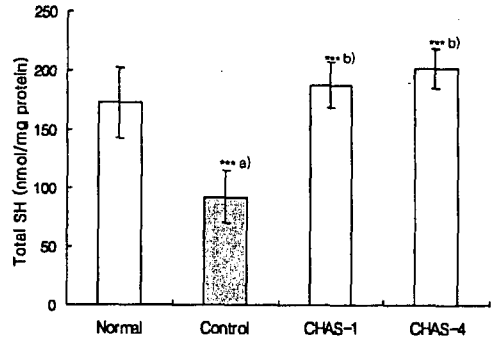


Figure 2. Effect of CHAS on Levels of Total SH in Liver Homogenate.

Total SH content was assayed by the method of Sedlak *et al.* Each value represents the mean  $\pm$  SD obtained from seven separate experiments : a), values statistically significant as compared with normal group. b), values statistically significant as compared with control data of each group. \*\*\*,  $p < 0.01$

세트아미노펜을 단독 투여한 대조군에서는  $92.38 \pm 22.80$  nmol로 정상군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 감소를 보였다. 한편 대계 약침액 원액 투여군 및 4배 희석액 투여군에서의 total SH 함량은 각각  $187.70 \pm 19.50$  nmol,  $201.80 \pm 16.90$  nmol로 모두 대조군에 비해 현저한 유의성 ( $p < 0.01$ )이 인정되는 증가를 보였다(Figure 2).

### 2) GSH 함량

간조직 균질액 중의 GSH의 함량 변화를 관찰한 결과, 아무런 처치도 하지 않은 정상군에서는  $27.62 \pm 1.72$  nmol이었으나, 아세트아미노펜을 단독 투여한 대조군에서는  $19.03 \pm 3.67$  nmol로 정상군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 감소를 보였다. 한편 대계 약침액 원액 및 4배 희석액을 肝俞 및 中脘穴에 전처치한 다음, 아세트아미노펜을 투여한 실험군에서의 GSH 함량은 각각

肝俞·中脘의 大薊 藥鍼이 급성 산화적 간손상에 미치는 효과

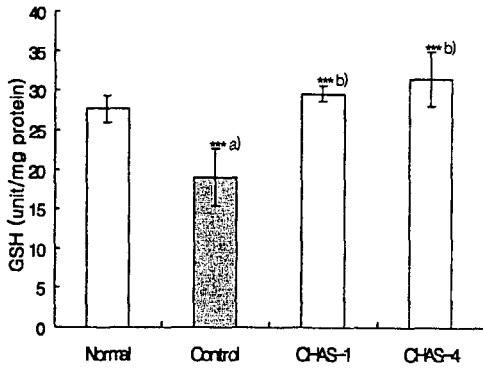


Figure 3. Effect of CHAS on Levels of GSH in Liver Homogenate.

GSH content was assayed by the method of Higach. Each value represents the mean  $\pm$  SD obtained from seven separate experiments : <sup>a)</sup> values statistically significant as compared with normal group. <sup>b)</sup> values statistically significant as compared with control data of each group. \*\*\*,  $p < 0.01$

29.59 $\pm$ 1.06 nmol, 31.48 $\pm$ 3.37 nmol로 모두 대조군의 19.03 $\pm$ 3.67 nmol에 비해 현저한 유의성 ( $p < 0.01$ )이 인정되는 증가를 보였다(Figure 3). 이상의 결과에서 아세트아미노펜의 투여로 인해 total SH 및 GSH 함량이 현저하게 감소하였다. 반면 대계 약침액을 肝俞 및 中脘穴 부위로 6일간 전처치함으로써 아세트아미노펜에 의한 total SH 및 GSH의 고갈이 현저하게 방지됨을 알 수 있었다.

### 3. 항산화 효소 활성화에 미치는 영향

마우스 간조직 균질액 중의 LPO, total SH 및 GSH 함량을 관찰한 실험결과에서 대계 약침의 전처치로 인해 아세트아미노펜에 의한 급성 산화적 간손상이 효과적으로 방어되었고, 이는 항산화물질인 total SH 및 GSH의 고갈 방지와

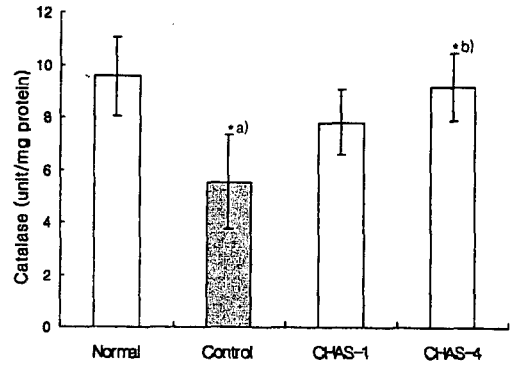


Figure 4. Effect of CHAS on Hepatic Catalase Activities in Mice.

Catalase activity was assayed by the method of Aebi. Each value represents the mean  $\pm$  SD obtained from seven separate experiments : <sup>a)</sup> values statistically significant as compared with normal group. <sup>b)</sup> values statistically significant as compared with control data of each group. \*,  $p < 0.05$

밀접한 관련성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 아세트아미노펜의 대사과정에서 발생하는 대사활성체 및 활성산소종의 제거에 결정적 역할을 담당하는 항산화 효소계의 활성 변화를 관찰함으로써 대계 약침의 간손상 보호 기전을 보다 다각적으로 검토하였다.

#### 1) Catalase 활성화

마우스 간조직으로부터 분리한 분획에서 catalase 활성 변화를 관찰한 결과를 protein 1mg당 unit로 표기하였다. 그 결과, 아무런 처치도 하지 않은 정상군에서의 catalase 활성은 9.55 $\pm$ 1.49 unit이었으나, 아세트아미노펜을 단독 투여한 대조군에서는 5.54 $\pm$ 1.80 unit로 정상군에 비해 유의성( $p < 0.05$ )있는 감소를 보였다. 반면 대계 약침액 원액 투여군 및 4배 희석액 투여군에서의 catalase 활성은 각각 7.80 $\pm$ 1.24

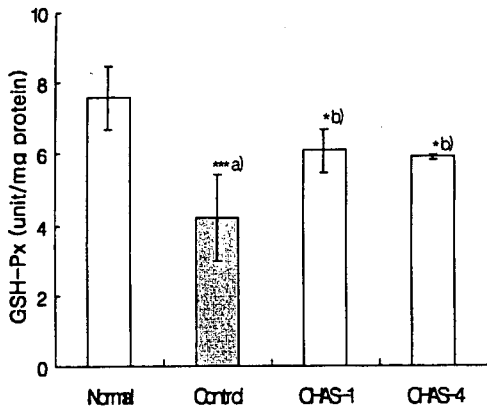


Figure 5. Effect of CHAS on Hepatic Glutathione Peroxidase Activities in Mice. Glutathione peroxidase activity was assayed by the method of Paglia and Lawrence *et al.* Each value represents the mean  $\pm$  SD obtained from seven separate experiments : a), values statistically significant as compared with normal group. b), values statistically significant as compared with control data of each group. \*\*\*,  $p < 0.01$  \*,  $p < 0.05$

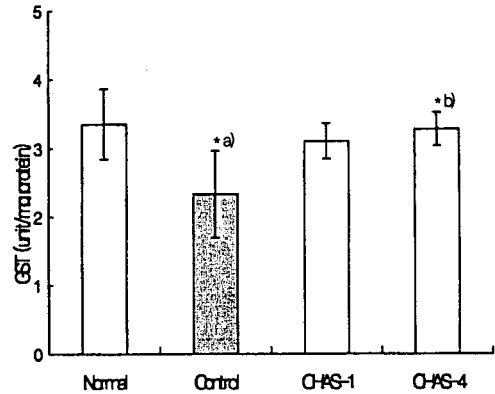


Figure 6. Effect of CHAS on Hepatic Glutathione S-Transferase Activities in Mice. Glutathione S-Transferase activity was assayed by the method of Habig. Each value represents the mean  $\pm$  SD obtained from seven separate experiments : a), values statistically significant as compared with normal group. b), values statistically significant as compared with control data of each group. \*,  $p < 0.05$

unit,  $9.18 \pm 1.30$  unit ( $p < 0.05$ )로 모두 대조군에 비해 증가하였다(Figure 4).

## 2) Glutathione peroxidase 활성

Figure 5에는 간조직 분획에서 glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성을 관찰한 결과를 protein 1mg당 unit로 표기하였다. 그 결과, 아무런 처치도 하지 않은 정상군에서의 GSH-Px 활성은  $7.58 \pm 0.88$ unit이었으나, 아세트아미노펜을 단독 투여한 대조군에서는  $4.21 \pm 1.20$ unit로 정상군에 비해 현저한 유의성( $p < 0.01$ )이 인정되는 감소를 보였다. 반면 대계 약침액 원액 투여군 및 4배 희석액 투여군에서의 GSH-Px 활성은 각각  $6.09 \pm 0.61$ unit,  $5.91 \pm 0.07$ unit로 모두 대조군에 비해 유의성( $p < 0.05$ )있는 증가를 보였

다(Figure 5).

## 3) Glutathione S-transferase 활성

마우스 간조직으로부터 분리한 분획에서 glutathione S-transferase(GST) 활성을 관찰한 결과를 protein 1mg당 unit로 표기하였다. 그 결과, 아무런 처치도 하지 않은 정상군에서의 GST 활성은  $3.35 \pm 0.51$ unit이었으나, 아세트아미노펜을 투여한 대조군에서는  $2.33 \pm 0.63$ unit로 정상군에 비해 감소하였다. 반면 반면 대계 약침액 원액 투여군 및 4배 희석액 투여군에서의 GST 활성은 각각  $3.10 \pm 0.26$ unit,  $3.27 \pm 0.24$ unit( $p < 0.05$ )로 모두 대조군의  $2.33 \pm 0.63$ unit에 비해 증가하였다(Figure 6).



#### IV. 고 찰

대계는 국화과에 속하는 영경귀의 藥名으로 名醫別錄의 中品에 최초로 수록되었으며 性味는 甘溫하고, 주로 養精, 保血하며<sup>1,9)</sup>, 涼血止血, 祛瘀消腫, 解毒消癰의 효능이 강하여 衄血, 吐血, 尿血, 便血, 崩漏, 外傷出血, 癰腫瘡毒의 치료에 주로 사용되어 왔다<sup>11)</sup>. 또한 대계는 野紅花(야홍화), 大薊草(대계초), 將軍草(장군초), 馬刺草(마자초), 牛海風(우해풍), 刺薊菜(자계채), 刺人菜(자인채), 馬薊(마계), 虎薊(호계), 描薊(묘계), 향가새, 영경귀, 가시나물 등으로 불리기도 하며, 鮮滿植物志에 따르면 우리나라와 만주 각지의 별판에 두루 나는 잡초라 하였다. 또한 本草綱目에서는 瘀血, 吐血, 鼻血, 癰腫, 帶下症 등을 다스리며, 精血을 補한다 하였고, 產寶方에는 부인의 下血에 영경귀의 뿌리 즙을 마시면 즉효가 있다 하였다<sup>5)</sup>. 특히 본 약물은 주로 肝經으로 작용하고 利尿, 清熱, 解毒의 효능이 있으므로 膀胱炎, 尿道炎, 急性腎炎, 黃疸性肝炎 등과 같은 염증성 질환의 치료에도 빈번히 사용되고 있다<sup>3,4,5,12,13)</sup>.

이와 같이 대계에 관한 문헌 및 임상적 효과가 다수 알려져 있음에도 불구하고 대계 약침에 대한 실험적 효능 검증은 지금까지 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 대계가 肝經으로 작용하고 解毒 효과가 강하다는 점에 착안하여, 대계 약침이 급성 간손상에 대한 효과를 실험적으로 규명하고자 하였다. 먼저 본 실험에서 ICR 마우스에 대계 약침액을 전처리하기 위한 부위로 中脘穴과 肝俞穴을 선택하였다. 中脘穴은 任脈의 12번째 經穴(CV12)이며, 八會穴 중 腑會이고, 胃의 腹募穴로서 脾胃 질환에 가장 많이 사용되는 常用穴 중의 하나이다. 본 經穴은 和胃氣, 化濕滯, 理中焦, 調升降의 穴性을 지니므로, 胃腸疾患, 肝膽囊疾患, 中焦諸病, 脾胃虛弱, 黃

疸, 虛勞 등의 치료에 사용된다. 특히 中脘穴은 脾胃의 機能을 도와 後天之氣를 배양함으로써 생체의 抗病力을 높이는 養生保健의 經穴로도 다용된다. 또한 肝俞穴은 足太陽膀胱經의 18번째 經穴(BL18)이고, 肝의 背俞穴이므로 肝의 병증 치료에 사용되는 대표적인 치료혈로서 營血을 補하고, 凝滯을 없애며, 氣滯를 조절하며, 肝膽의 濕熱을 제거하고 寧神 및 明目의 穴性을 지니므로, 주로 急慢性 肝病, 黃疸, 脇痛, 口苦, 脊背痛, 臟躁 및 肝血不足으로 인한 目疾의 치료에도 다용된다<sup>6-8)</sup>.

한편 본 연구에서 실험적 간손상 유발제로 사용된 아세트아미노펜은 cytochrome P-450 효소반응에 의해 대사활성체(reactive intermediates)가 생성되는데 이러한 대사활성체는 GST 효소의 매개로 인해 간조직 중의 GSH과 결합하여 안전하게 배설된다. 그러나 마우스에 아세트아미노펜을 고용량(500 mg/kg)으로 투여하면 다량의 대사활성체가 생성되므로 GSH이 고갈되며 대사활성체들은 세포내 거대분자와 결합하여 간세포에 대한 독성을 나타내게 된다. 또한 아세트아미노펜이 복합약물대사계를 거치면서 대사활성체 뿐만 아니라 superoxide anion radical, hydrogen peroxide와 같은 활성산소종(reactive oxygen species)이 생성되어 과산화지질(LPO)의 생성이 증가하고 세포막의 산화적 손상이 야기된다. 이 과정에서 생성된 superoxide anion radical은 superoxide dismutase (SOD)의 작용으로 hydrogen peroxide로 변환되며, hydrogen peroxide는 다시 catalase의 작용에 의하여 물(H<sub>2</sub>O)로 변하거나, GSH-Px의 매개로 GSH과 결합하여 물로 변하게 됨으로써 간세포의 손상으로부터 보호받게 된다. 따라서 아세트아미노펜에 의한 급성 산화적 간손상 과정 중에는 GSH의 함량 고갈과 LPO의 함량 증

가가 수반되며, 대사활성체 및 활성산소종의 제거에 중요한 역할을 담당하는 catalase, GSH-Px 및 GST의 활성 또한 중요한 의의를 지닌다<sup>22-25)</sup>.

본 연구의 결과, 아세트아미노펜을 대량 투여함으로써 마우스 간조직 중의 LPO 함량이 정상군에 비해 크게 증가하였으므로 실험적 간손상이 효과적으로 유발되었음을 알 수 있었다. 반면 대계 약침액을 간수혈 및 증완혈 부위로 6일간 전처치함으로써 LPO 함량이 아세트아미노펜 단독 투여군에 비해 현저하게 감소하였으므로 대계 약침 전처치로 인해 산화적 간손상이 효과적으로 억제됨을 알 수 있었다. 또한 대계 약침의 간손상 억제 기전을 규명하기 위하여 total SH 및 GSH의 함량을 관찰한 결과, 아세트아미노펜의 투여로 인해 total SH 및 GSH의 함량이 현저하게 감소하였으나, 대계 약침을 전처치함으로써 total SH 및 GSH의 함량이 크게 증가하였다. 이 결과에서 대계 약침의 전처치로 인해 대사활성체에 의한 GSH의 고갈이 방지되었고 이로 인해 간세포의 손상이 효과적으로 억제되었음을 알 수 있었다. 그러나 이러한 GSH의 고갈 방지 효과가 GSH 대신 대사활성체와 결합하여 이를 배설시킬 수 있는 대계 약침액의 구성 성분의 존재 때문인지, 아니면 대계 약침 처치가 GSH의 세포내 생합성을 직접적으로 촉진시킨 때문인지는 본 실험의 결과만으로는 정확하게 규명할 수 없었으므로 향후 이에 관한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 판단된다. 한편 항산화효소계의 활성 변화를 관찰한 결과, catalase, GSH-Px 및 GST의 효소 활성이 아세트아미노펜 단독 투여군에서 정상군에 비해 감소하였으나, 대계 약침의 전처치로 인해 증가하였다. 따라서 대계 약침 처치로 인해 catalase 및 GSH-Px의 활성이 정상적 수준으로 유지됨으로

써 hydrogen peroxide에 의한 세포막의 지질과 산화 반응을 차단하며, GST의 정상적 작용에 의해 대사활성체에 의한 간세포 손상 또한 억제된 것으로 판단된다. 이상의 결과에서 대계 약침은 마우스 간조직의 산화적 손상에 대한 방어 효과가 인정되며, 향후 보다 다각적인 측면에서의 실험적 검토가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

대계 약침이 마우스의 급성 간손상에 대한 효과를 규명하기 위하여, 대계 약침을 肝俞 및 中脘穴 부위로 전처치한 다음, 아세트아미노펜을 복강 투여하고, 간조직 균질액 및 각 분획에서 LPO, total SH, GSH의 함량과, catalase, GSH-Px, GST 효소 활성을 측정한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPO 함량은 아세트아미노펜 단독 투여군에서 정상군에 비해 유의성있게 증가하였으며, 대계 약침 처치군에서는 아세트아미노펜 단독 투여군에 비해 현저하게 감소하였다.
2. Total SH 및 GSH의 함량은 아세트아미노펜 단독 투여군에서 정상군에 비해 현저하게 감소하였다. 반면 대계 약침 처치군에서는 아세트아미노펜 투여로 인한 total SH 및 GSH 함량 감소가 유의성있게 방지되었다.
3. Catalase, GSH-Px 및 GST의 활성은 아세트아미노펜의 투여로 인해 크게 감소하였다. 반면, 대계 약침을 전처치함으로써 효소 활성의 저하가 현저하게 방지되었다.

이상의 연구 결과, 대계 약침액을 肝俞 및 中脘穴 부위로 전처치함으로써 아세트아미노펜에 의한 산화적 간손상이 강하게 억제되었다. 이는 대계 약침 처치로 인해 아세트아미노펜에 의한

total SH 및 GSH의 함량 고갈이 현저하게 방지된 것과 직접적인 관련성이 있을 것으로 판단된다. 또한 아세트아미노펜의 대사과정 중에서 생성되는 활성산소종의 제거에 중요한 역할을 담당하는 catalase, GSH-Px의 활성이 대개 약침 처치로 높은 수준으로 유지됨으로써 간조직의 산화적 손상이 효과적으로 억제됨을 알 수 있었다.

### 참고문헌

1. 강병수, 김영관. 방제의 체계적 구성을 위한 임상배합본초학. 서울: 영림사. 1996 : 421-3.
2. 김재익. 임상본초학강좌. 서울: 대성의학사. 2001 : 560-2.
3. 한국생약학교수협의회. 본초학. 서울: 아카데미서적. 2002 : 481-3.
4. 육창수, 김성만, 정진모, 정명숙, 김정화, 김승배. 한약의 약리성분임상응용. 서울: 계축문화사. 1982 : 594-5.
5. 김태정. 약이 되는 한국의 산야초. 서울: 국일미디어. 1994 : 578-9.
6. 전국한의과대학 침구경혈학교실. 침구학(상). 서울: 집문당. 1994 : 484-5, 730-1.
7. 임종국. 침구치료학. 서울: 집문당. 2001 : 364, 495-6.
8. 이기남, 이선동. 전통한방예방의학. 서울: 성보사. 1995 : 334.
9. 陶弘景. 名醫別錄. 北京: 人民衛生出版社. 1986 : 154-5.
10. 錢百炎. 中藥注射劑. 上海: 上海科學技術出版社. 1981 : 71-93, 130-2.
11. 范催生. 中藥采收鑑別應用全書. 南昌: 江西科學技術出版社. 1995 : 594-5.
12. 顏正華. 中藥學. 北京: 人民衛生出版社. 1991 : 458-60.
13. 中華人民共和國衛生部藥典委員會. 中華人民共和國藥典. 北京: 人民衛生出版社. 1985 : 17.
14. Aebi H. Catalase. Methods of enzymatic analysis. 2nd edition edited by Hans Ulrich Bergmeyer. 1974 : 673.
15. Habig WH, Pabst MJ, Jabby WB. Glutathione-S-transferase : the first enzymatic step mercapturic acid formation. J Biochem. 1974 : 249.
16. Higach T. Critical review on the determination of glutathione in biological perparation. Proteins. Nucleic Acid and Enzyme. 1988 ; 33 : 1370.
17. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-dificent rat liver Biochem Biophys Res Comm. 1976 ; 71 : 952.
18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochem. 1978 ; 95 : 351-8.
19. Paglia DE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. Lab Clin Med. 1967 ; 70 : 158.
20. Sedlak T, Lindsay RH. Estimation of total protein-bound and nonprotein-bound sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Chem. 1968 ; 25 : 192.
21. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985 ; 150 : 76-85.
22. 서경원, 류정상, 김효정. 마우스에서 아세트아

- 미노펜의 급성 간독성과 독물 동태학. 한국 독성학회지. 1997 ; 13(3) : 237-45.
23. Fischer LJ, Green MD, Harman AW. Levels of acetaminophen and its metabolites in mouse tissues after a toxic dose. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1981 ; 219(2) : 281-6.
24. Raheja KL, Linscheer WG, Cho CD, 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(2) : 427-32.
25. Wendel A, Feuerstein S, Kontz KH. Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo. Biochemical Pharmacology. 1979 ; 28 : 2051.