

## Acetaminophen 유도 마우스 간 손상에 대한 加減拱辰丹 추출물의 간보호 효과

김홍준<sup>1</sup>, 목지예<sup>2</sup>, 박광현<sup>3</sup>, 정승일<sup>4</sup>, 황병순<sup>4</sup>, 황성연<sup>1,5</sup>, 조정근<sup>6</sup>, 장선일<sup>2,6\*</sup>

1 : 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실, 2 : 전주대학교 아토피·건강전문연구소,  
3 : 전북대학교 의약전문대학원 생화학교실, 4 : 전주생물소재연구소, 5 : 한국전통의학연구소,  
6 : 전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부

### Hepatoprotective Effect of Gagam-GongJin-dan extract against Acetaminophen-Induced Liver Injury in Mice

Hong-Hun Kim<sup>1</sup>, Ji-Ye Mok<sup>2</sup>, Kwang-Hyun Park<sup>3</sup>, Seung-Il Jeong<sup>4</sup>, Byung-Soon Hwang<sup>4</sup>,  
Sung-Yeoun Hwang<sup>1,5</sup>, Jung-Keun Cho<sup>6</sup> and Seon-Il Jang<sup>2,6\*</sup>

1 : Department of Oriental Medical Prescription, Woosuk University,  
2 : Jeonju University Atopy & Health Research Institute,  
3 : Department of Biochemistry, Chonbuk National University Medical School,  
4 : Jeonju Biomaterials Institute, 5 : Korea Bio Medical Science Institute,  
6 : School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University

### ABSTRACT

**Objective :** *Gagam-Gongjin-dan* (GGD) is an oriental medicinal prescription composited with *Cervi parvum Cornu*, *Corni Fructus*, *Angelica Gigantis Radix*, *Lycii Fructus*, *Dioscoreae Rhizoma*, *Citri Pericarpium*, *Gastrodiae Rhizoma*, *Agastachis Herba*, *Cassiae cortex*, *Scutellariae Radix* and *Schisandrae Fructus*. The purpose of this study was to investigate the effects of GGD extract against acetaminophen (APAP)-induced liver injury in mice.

**Methods :** GGD extract was prepared by extracting with methanol for 7 days. The extract was freeze-dried following filtration through vacuum distillation system. The first, we investigated the antioxidant effects of GGD extract on electronic donating ability (DPPH), nitrite (NO) scavenging and superoxide dismutase (SOD)-like activity. The next, we investigated the possible hepatoprotective effect of GGD extract administration against acetaminophen-induced liver injury in mice. Mice were orally administrated with or without GGD extract of different doses (25-100 mg/kg/day) one times per day for 6 days. After 3 days, APAP was orally applied with a single dose (400 mg/kg).

**Results :** GGD extract increased DPPH, NO and SOD-like activities in dose dependant. APAP treatment significantly increased aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities in plasma. Also, APAP treatment significantly evaluated lipid peroxidation product thiobarbituric reacting substances (TBARS) and depleted some antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, d-aminolevulinate dehydratase and glutathione peroxidase activities) in liver homogenates compared to the control group. However, the orally administration of GGD extract was able to counteract these effects. Histological studies provided supportive evidence for biochemical analysis

**Conclusions :** These results suggest that GGD extract has a potential antioxidant and hepatoprotective effect against APAP-induced liver injury, these properties may contribute to liver disease care.

**Key words :** Gagam-GongJin-dan, hepatoprotection, antioxidant, acetaminophen,

\*교신저자 : 장선일, 전북 전주시 완산구 효자동 3가 1200, 전주대학교 대체의학대학 건강관리전공.  
· Tel : 063-220-3124, · E-mail : sonjjang@jj.ac.kr  
· 접수 : 2010년 8월 15일 · 수정 : 2010년 9월 10일 · 채택 : 2010년 9월 13일

## 서론

拱辰丹은 元末 危亦林的 『世醫得效方』 虛損篇<sup>1)</sup>에 최초로 수록된 처방으로 助陽補精하는 鹿茸, 養血潤燥하는 當歸, 固精強陰·助陽收澁하는 山茱萸, 開竅하는 麝香的 4가지 약물로 구성된 처방으로 先天의 氣를 補하고 水升火降을 순조롭게 하여 心身을 補益함으로서 장부의 虛損에 대한 예방 및 치료를 하는 방제로 볼 수 있다. 『東醫寶鑑』<sup>2)</sup>에는 肝虛藥으로 되어 있어 주로 眞氣나 선천의 稟賦가 약한 상태에 사용하는 것이라 설명하고 있으며 그 효능과 조제용법을 『世醫得效方』을 인용하여 기록하고 있다.

拱辰丹에 대한 실험적 연구로는 張<sup>3)</sup>은 혈청 thyroxine, cortisol, testosterone 및 혈중 hemoglobin의 함량 변화를 통하여 공진단의 強精補氣하는 효능이 우수하다고 보고하였고 김<sup>4)</sup>은 Rosette 형성세포수, 적혈수용집소가, 적혈구용혈소가, 혈청 중 testosterone 농도변화 등을 통하여 공진단이 면역반응, 피로회복 및 내분비 기능에 효과가 있다고 보고하였다. 그리고 정<sup>5)</sup>과 황<sup>6)</sup>은 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 실험모델과 A $\beta$ 로 유도된 Alzheimer's disease 생체 실험모델에서 拱辰丹이 효과가 있다고 보고하였다. 또 최<sup>7)</sup>는 공진단의 성분분석 및 항산화작용을 분석하여 공진단의 성분이 항산화 및 항노화작용이 있는 아미노산과 무기질 성분이 많이 있음을 밝혀내었다. 성<sup>8)</sup>은 뇌허혈 모델에서 공진단이 뇌신경의 보호 및 재생을 촉진한다고 보고하였고 김<sup>9)</sup>은 신경성장인자(NGF)의 분비유도 및 유사효과를 통하여 뇌신경보호 효과와 인지, 학습능력을 증가시킬 수 있음을 보고하였다.

Acetaminophen (N-acetyl-p-aminophenol, paracetamol, APAP)은 전 세계적으로 해열 및 진통에 활용되는 일반의약품이다. 일반적으로 과량의 APAP가 투입되면, 간 괴사(liver necrosis), 신경독소(nephrotoxicity), 간경화(liver cirrhosis)를 유발할 뿐만 아니라 사망에 이르는 약물 부작용이 있는 것으로 잘 알려져 있다<sup>10,11)</sup>. 실험동물에서 APAP의 투여 농도 중 90%는 간세포 속에 있는 glucuronic acid 또는 sulfate와 결합한 후 담즙 도는 혈장으로 배출되며, APAP의 5-10%는 P450 (CYP), 특히 CYP2E1에 의해서 대사 된다<sup>11)</sup>. 이러한 APAP의 대사과정에서 발생된 N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI)과 같은 독성물은 glutathione (GSH)의 고갈을 초래함으로써 세포막을 치명적으로 손상시켜 간의 괴사를 유도하고 회복할 수 없게 하여 사망에 이르는 것으로 알려졌다<sup>12-14)</sup>. APAP에 의한 간질환 환자는 약 10%에 이르고 있는데, 성인보다는 어린이에게 심각한 독성이 나타나고, 알코올을 섭취하지 않는 자에 비해서 섭취하는 자에서 그 독성이 심각한 것으로 보고되었다<sup>15)</sup>.

최근 CITES에 속해 있는 사향에 대한 논란으로 사향을 사용하는 대표적인 처방인 공진단은 사향대신에 다른 방향성 理氣藥類를 가감하여 사용하는 처방들이 소개되어 지고 있다. 동의보감을 보면, 공진단과 같은 조문에 黑元이라는 처방

이 당귀와 녹용만으로 사향을 사용하지 않더라도 공진단과 같은 의미의 약효를 낼 수 있다는데 착안하여 기존의 공진단에 사향을 제외한 새로운 처방의 조합을 만들었고, 최근에 본 교실에서는 鹿茸, 山茱萸, 當歸, 枸杞子, 山藥, 陳皮, 天麻, 藿香, 桂皮, 黃芩, 五味子 등 약물로 구성된 加減拱辰丹 (Gagam-GongJin-dan, GGD) 추출물을 활용하여 BALB/c 계 마우스를 대상으로 obalbumin (OVA)에 의해 유도된 항체와 CCL27/CTACK의 생산, 발 부종반응(footpad swelling response) 및 림프절 세포의 CCR10의 발현에 미치는 효과를 조사한 결과 우수한 항염증 효과가 있음을 보고한 바 있다<sup>16)</sup>. 동의보감에서처럼 공진단이 肝虛에 사용하는 약이라면 이를 기반으로 한 GGD 추출물 역시 간질환에 일정한 효과가 있을 것이라 생각되었다.

따라서 본 연구는 인체에서 발생하는 대부분의 간질환은 염증반응과 함께 산화적 스트레스에 의해서 발생된다는 점을 감안하여, GGD 추출물을 대상으로 항산화 능력을 측정된 후 Balb/c 마우스를 대상으로 APAP에 의해 유도된 간독성에 미치는 GGD 추출물의 효과를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

Acetaminophen (N-acetyl-p-aminophenol, paracetamol, APAP), aminolevulinic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), dithiothreitol (DTT), DL-dithiothreitol, thiobarbituric acid, mono & dibasic potassium phosphate, acetic acid, ortho-phosphoric acid, trichloroacetic acid, superoxide dismutase, catalase, GPx catalyses, sodium chloride는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), AST & ALT kit는 영동제약(경기도, 한국)으로부터 구입했다. Protein assay kit는 Bio-Rad사로부터 구입했다. 기타 시약은 reagent grade급으로 Sigma-Aldrich사(MO, USA)로부터 구입했다.

#### 2) GGD의 추출

실험에 사용한 鹿茸, 山茱萸, 當歸, 枸杞子, 山藥, 陳皮, 天麻, 藿香, 桂皮, 黃芩, 五味子 등은 울산시 소재 약제상(광명당)에서 구입하여 우석대한의과대학 본초방제학교실에서 동정하였다. 加減拱辰丹 추출물(Gagam-GongJin-dan extract, GGDE)의 구성은 Table 1과 같으며, 구성 약물 500g를 분말로 제조하여 증류수(1.5L)로 3시간 동안 추출기로 열수 추출하였다. 추출물은 0.45 $\mu$  m 필터를 사용하여 여과한 후 동결 건조기(Model, EYELA FDU-2100, Japan)에서 건조하여 48.9g를 회수한 후 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Table 1. Oriental herbal medicine composition of Gagam-GongJin-dan (GGD)

Drug name	Crude drug name	Scientific name	%
鹿茸	Cervi Parvum Cornu	<i>C. elaphus</i> L.	20
山茱萸	Corni Fructus	<i>Cornus officinalis</i> SIEB. et ZUCC.	20
當歸	Angelicae Gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i> NAKAI	20
枸杞子	Lycii Fructus	<i>Lycium chinense</i> MILL.	10
山藥	Dioscoreae Rhizoma	<i>Dioscorea batatas</i> DECNE.	10
陳皮	Citri Unshius Pericarpium	<i>Citrus unshiu</i> MARKOVICH	10
天麻	Gastrodiae Rhizoma	<i>Gastrodia elata</i> BL.	2
藿香	Agastachis Herba	<i>Agastache rugosa</i> (FISCH. et MEYER) O.KUNTZE	2
桂皮	Cinnamomi Cortex	<i>Cinnamomum cassia</i> PRESL.	2
黃芩	Scutellariae Radix	<i>Scutellaria baicalensis</i> GEORGI	2
五味子	Schisandrae Fructus	<i>Schisandra chinensis</i> BAILL.	2

### 3) 실험동물

무균환경에서 사육된 7주령의 암컷 BALB/c계 마우스는 중앙동물실험실사(서울)로부터 구입하였다. 마우스는 1주일간 스트레스를 해소하기 위해 1주일간 낮과 밤의 주기를 12시간씩 고정하여 사료(중앙동물실험실)와 멸균 물을 공급하면서 사육한 후 실험동물위원회의 실험 규정에 준하여 실험에 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) GGDE의 전자공여능(DPPH 라디칼 소거능)

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma, USA) 라디칼 소거능은 Blois의 방법<sup>17)</sup>으로 측정하였다. 시료를 MeOH로 녹여 최종 농도가 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml이 되도록 1.5 ml tube에 넣고 0.3 mM DPPH 500 µl를 넣어 총량이 1 ml가 되도록 하였다. 실온에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader(Bio-Tek, USA)로 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능 =  $100 - \{(\text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100\}$

### 2) GGDE의 SO 소거 활성 측정

Superoxide anion (SO) 소거능의 활성 측정은 Marklund 등의 방법<sup>18)</sup>으로 측정하였다. 일정농도의 시료 0.2 ml, Tris-HCl buffer[50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane + 10 mM EDTA, pH 8.5] 3 ml, 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml을 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시키고 1 N HCl 1 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 UV/VIS spectrophotometer(Bekman, Germany)를 사용하여 흡광도를 측정하였으며 SOD 유사활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

SOD 유사활성능 (%) =  $100 - \{(\text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100\}$

### 3) GGDE의 아질산염 (nitrite) 소거능

Gray와 Dugan의 방법<sup>19)</sup>에 따라 일정 농도의 시료 1 ml에 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액 1 ml를 가한 뒤 0.1 N HCl과 0.2 M citrate buffer를 이용하여 각각 pH 1.2, 3.0 및 6.0으

로 보정한 다음 총 부피를 10 ml로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 각 반응액 1 ml를 취하여 2% acetic acid 3 ml와 30% acetic acid 용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 ml를 가하고 잘 혼합하여 실온에서 15분간 방치한 후 ELISA reader(Bio-Tek, USA)로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거능은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

아질산염 소거능 (%) =  $100 - \{(\text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100\}$

### 4) GGDE의 투여

8주된 BALB/c계 마우스는 실험군당 10마리를 수용하여 사망률을 조사에 사용하였고, 나머지 실험에는 6마리씩 나누어 수용하였다. 먼저, 음성대조군과 양성대조군은 단지 생리식염수만 투여했고, GGDE은 여러 농도(50-200 mg/kg)로 3일간 하루에 1회 경구투여한 후 공복상태에서 양성대조군과 GGDE 투여군을 대상으로 마우스 kg 당 400 mg의 APAP를 1회 경구투여하였다. 그 후 GGDE 투여군은 상기와 같은 농도로 GGD를 3일간 투여했다.

### 5) 혈장

혈액은 마지막 약물을 투여하고 다음날 heparin이 처리된 주사기를 이용하여 심장에서 채혈한 후 4°C, 3,000 rpm으로 원심 분리하고 혈장(plasma)을 얻어 -20°C에 보관하였고, AST와 ALT 활성에 사용하였다.

### 6) 간조직 용해물의 준비

채혈 후, 신속히 간 조직을 적출하여 얼음상자에 유지하고, 간조직의 7배가 되는 양의 0.85% NaCl을 주입하여 간조직을 마쇄한 후, 10,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액은 단백질을 정량하고 실험에 사용하였다.

### 7) 단백질 정량

단백질 정량은 표준 단백질 우태아 혈청 albumin을 사용하여 Lowery 등<sup>20)</sup> 방법으로 측정하였다.

### 8) Lipid peroxidation 측정

간 조직 상층액을 37°C에 1시간 동안 방치한 후, 지질 산화를 측정하였다. Thiobarbituric acid reactive

species (TBARS) 산물은 Ohkawa 등<sup>21)</sup>의 방법에 준하여 측정하였다.

### 9) AST와 ALT 측정

Aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)는 혈장으로부터 영동제약에서 제시한 방법에 준하여 측정하였다.

### 10) $\sigma$ -Aminolevulinatase 측정

$\sigma$ -ALA-D 활성의 측정은 porphobilinogen 형성을 측정하는 Sassa<sup>22)</sup>의 방법에 준하여 실험하였다. 시료를 37°C에서 1시간 동안 방치한 후, 반응산물은 Ehrlich-porphobilinogen salt에 대한  $6.1 \times 10^4 M^{-1}$  몰라 흡수계수를 가진 555 nm에서 측정하였다.

### 11) Superoxide dismutase 측정

Misra와 Fridovich<sup>23)</sup>의 방법에 따라 간 조직 상층 액을 20배(0.85% NaCl) 희석하여 SOD 활성을 측정하였다. 요약하면, pH 10에서 신속하게 자동 산화되는 핑크색의 산물을 UV spectrophotometer (Beckman Coulter)를 이용하여 480 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 50% 효소를 억제하는 양을 효소의 1 unit로 계산하였고, SOD의 활성은 단백질 g 당 unit로 계산하였다.

### 12) Catalase 측정

Catalase 활성은 Aebi<sup>24)</sup>의 방법에 준하여 측정하였다. 요약하면, 간 조직 상층 액 10 ml을 quartz cuvette에 주입하고 인산완충액(pH 7.0)에 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 신속하게 주입하여 반응시켰다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 분해율은 120초 동안 240 nm에서 UV spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. Catalase의 활성은 단백질 g 당 unit로 계산하였다.

### 13) Glutathione peroxidase 측정

GPx 활성은 Paglia와 Valentine<sup>25)</sup>의 방법에 따라 cumen hydroperoxide에 의한 GSH의 산화되는 양을 측정하였다. glutathione reductase and NADPH 존재 하에 산화된 GSH는 NADPH에서 NADP+로 즉시 전환되기 때문에 340 nm UV spectrophotometer로 감소된 흡광도를 측정하여, 간 조직 상층 액의 GPx 활성을 mM NADPH/mg protein/min으로 계산하였다.

### 14) 통계처리

모든 실험 값은 평균±표준오차(mean ± SD)로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

## 결 과

### 1. GGDE의 항산화 효과

GGD 추출물의 항산화에 대한 효과를 알아보기 위해서 DPPH와 NO 라디칼 소거능 및 SOD 유사 활성을 측정하였

다. 먼저 GGDE의 DPPH 라디칼 소거능을 알아보기 위해 합성 항산화제로 잘 알려진 butylated hydroxy toluene (BHT, 800  $\mu$ g/ml)와 비교하였다. 그 결과 Fig. 1A와 같이 GGDE의 DPPH 라디칼 소거능은 농도에 의존적으로 증가했으며, 200  $\mu$ g/ml의 농도에서 BHT와 유사한 효과가 있었고, 400  $\mu$ g/ml과 800  $\mu$ g/ml에서는 BHT보다 우수한 효과가 있었다. 또한 GGDE를 대상으로 NO의 소거능을 측정 한 결과 Fig. 1B와 같이 GGDE의 농도가 증가할수록 NO 소거능력이 증가하였다. SOD 유사 활성의 경우에 있어서도 Fig. 1C과 같이 GGDE의 농도에 의존적으로 그 활성이 증가하였다.

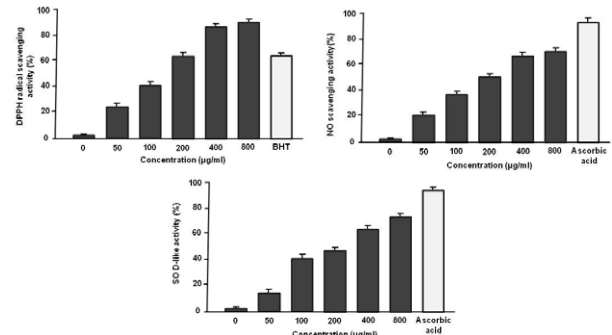


Fig. 1. Effects of Gagam-GongJin-dan (GGD) extract on electron donating (DPPH) and nitrate (NO) radical scavenging activity, and superoxide dismutase (SOD)-like activity. Reference compound for antioxidant used 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT). Values are shown as mean  $\pm$  S.D. from 3 replicates.

### 2. APAP 투여에 따른 간독성과 사망에 미치는 GGDE의 효과

본 연구에서 우리는 APAP 투여에 따른 주적이 간 독성 뿐만 아니라 사망에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 Table 2와 같이 APAP (400 mg/kg)만 투여한 양성대조군에서는 2일째 2마리와 3일째 1마리가 사망하였고, 그 이후에는 모두 생존하여 6일 동안 누적 사망률이 30%였다.

마우스 1 kg 당 50 mg의 GGDE를 투여한 저농도 실험군에서는 1일째 1마리와 4일째 1마리가 사망하여 6일간 누적 사망률은 20%였고, 마우스 1 kg당 100 mg와 200 mg 주적 투여군에서는 실험 마우스 모두 생존하였다. 먹이의 공급은 중앙동물실험(서울)에서 제공되는 사료를 사용하였으며, 먹이 섭취량은 정상 대조군에 비해 APAP 투여군이 약 20% 정도 감소하였으나, 마우스 1 kg 당 100 mg GGDE의 투여군과 200 mg/kg GGDE의 투여군에서는 정상대조군과 먹이 섭취량이 비슷하였다. 이와 같이 GGDE는 APAP 유도 사망률을 억제하는 근거를 조사하기 위해서, APAP를 투여하고 72시간 후에 혈장의 AST와 ALT를 조사하였다. 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군은 AST와 ALT가 각각  $65 \pm 7$  unit/L와  $95 \pm 9$  unit/L로 정상 범위 내에 있었지만, APAP가 투여된 양성 대조군은 AST가  $120 \pm 11$  unit/L과 ALT가  $189 \pm 15$  unit/ml로 현저하게 증가했다( $p < 0.001$ ). 이러한 결과는 APAP가 간독성을 유발하여 사망을 유도하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 GGDE를 3일 동안 투여하고 APAP를 경구투여한 다음 72시간 후에 혈장의 AST와 ALT 실험 결과 50 mg/kg에서는 큰 변화가 없었지만 100 mg과

200 mg 투여군에서는 이들 효소의 활성이 현저히 감소되었다( $p < 0.05$ ).

Table 2. Effects of GGD extract on APAP-induced hepatotoxicity in mice<sup>a)</sup>

Treatment	Plasma AST (Unit/L)	Plasma ALT (Unit/L)	Mortality (%) <sup>b)</sup>
Control	65 ± 7	95 ± 9	0
APAP	127 ± 13 <sup>c)</sup>	198 ± 18 <sup>c)</sup>	30
GGDE (mg/kg)	50	115 ± 12	20
	100	78 ± 12 <sup>d)</sup>	0
	200	70 ± 9 <sup>e)</sup>	0

<sup>a)</sup>Control mice received only saline and APAP alone treated mice received a single dose (400 mg/kg body weight). GGD extract treated groups received the different dose of GGD extract (50–200 mg/kg body weight) one times per day for 3 days, and then received a single dose (400 mg/kg body weight) and/or GGD extract on times per day for 3 days. Hepatotoxicity was determined 72 h later by quantifying the plasma AST and ALT. Data represent the mean ± S.E. of ten mice.

<sup>b)</sup>Mortality was determined 7 days after AP administration.

<sup>c)</sup> $p < 0.001$  versus negative control group treated with saline alone.

<sup>d)</sup> $p < 0.05$  and <sup>e)</sup> $p < 0.01$  versus control group treated with AP alone.

### 3. APAP 투여에 따른 간조직 손상에 미치는 GGDE의 효과

GGDE가 APAP에 의해 유도되는 간 손상을 보호하는데 효능이 있다는 사실을 알아보기 위해서 간조직을 H&E 염색을 한 후 현미경으로 간조직의 형태를 조사하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 APAP만을 투여한 실험군에서는 간세포가 심하게 괴사(necrosis)되는 현상이 관찰되었다. 대조적으로 100 mg과 200 mg GGDE를 투여한 실험군에서는 괴사되는 간세포가 현저히 줄어드는 간손상 보호 효과가 있었다.

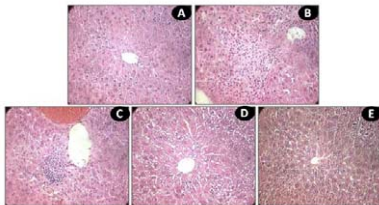


Fig. 2. Effects of GGDE on liver tissue morphological change in acetaminophen (APAP)-treated mice. Control mice received only saline and APAP alone treated mice received a single dose (400 mg/kg body weight). GGDE treated groups received the different dose of GGDE (50–200 mg/kg body weight) one times per day for 3 days, and then received a single dose (400 mg/kg body weight) and/or GGDE on times per day for 3 days. Histological analysis was determined 72 h later by H&E staining. Data represent the mean ± S.E. of three mice. Magnification rate: 400X.

### 4. APAP 투여에 따른 지질산화에 미치는 GGDE의 효과

우리는 APAP가 투여된 마우스의 지질산화량을 알아보기 위해서 TBARS량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 아무런 약물이 투여되지 않은 정상 대조군(49.5 ± 12.5 nM/g tissue)에 비해서 APAP가 투여된 양성대조군은 MDA가 조직 g 당 155.5 ± 13.3 nM로 매우 증가되어 지질산화가 촉진된다는 사실을 확인하였다( $p < 0.001$ ). 그러나 GGDE를 투여한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소하였다. 특히

100–200 mg/kg 투여군에서는 현저히 감소하였다( $p < 0.05$ 와  $p < 0.01$ ). 이러한 결과는 GGDE가 APAP에 의해 간조직에 형성된 TBARS 억제에 효능이 있음을 나타내 주었다.

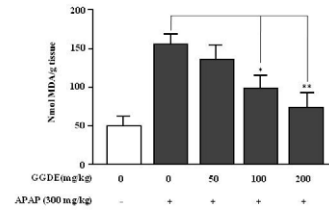


Fig. 3. Effect of GGDE on TBARS formation in the live tissues of APAP-treated mice. Control mice received only saline and APAP alone treated mice received a single dose (400 mg/kg body weight). GGDE treated groups received the different dose of GGDE (50–200 mg/kg body weight) one times per day for 3 days, and then received a APAP single dose and/or GGDE on times per day for 3 days. TBARS levels determined 72 h later. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus control group treated with APAP alone.

### 5. APAP 투여에 따른 $\sigma$ -ALA-D의 활성은 GGDE의 효과

우리는 AP 투여에 의한  $\sigma$ -ALA-D의 활성과 주치의 효능을 알아 본 결과 Fig. 4과 같이 APAP 단독 투여군은 20.1 ± 5.1 unit/ml로 무런 약물이 투여되지 않은 정상 대조군(51.6 ± 5.2 unit/ml)에 비해 현저히 감소되었으나 ( $p < 0.001$ ), 50 mg/kg의 주적 투여군을 제외한, 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서는 정상 대조군과 비슷하게 복원되는 결과를 얻었다( $p < 0.05$ 와  $p < 0.01$ ).

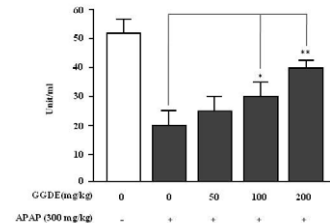


Fig. 4. Effect of GGDE on  $\sigma$ -ALA-D activity in the live tissues of APAP-treated mice. Control mice received only saline and APAP alone treated mice received a single dose (400 mg/kg body weight). GGDE treated groups received the different dose of GGDE (50–200 mg/kg body weight) one times per day for 3 days, and then received a APAP single dose and/or GGDE on times per day for 3 days.  $\sigma$ -ALA-D levels determined 72 h later. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus control group treated with APAP alone.

### 6. APAP 투여에 따른 간조직의 항산화효소 활성에 미치는 GGDE의 효과

한편 우리는 APAP와 GGDE를 투여한 마우스 생체 내 항산화 작용을 알아보기 위해서 먼저 SOD의 활성을 측정하였다. Fig. 5A와 같이 정상 대조군(41.6 ± 6.0 unit/ml)에 비해 APAP 투여는 18.2 ± 3.5 unit/ml로 SOD 활성의 감소되었으나( $p < 0.001$ ), 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서는 정상 대조군과 비슷하게 복원되는 결과를 얻었다( $p < 0.05$ 와  $p < 0.01$ ). Catalase의 경우 Fig. 5B와 같이 정상 대조군

( $3.9 \pm 0.5$  unit/ml)에 비해 APAP 투여군은  $2.2 \pm 0.3$  unit/ml로 간조직 내에서 catalase 활성은 현저히 감소되었으나( $p < 0.001$ ), 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서는 정상 대조군과 비슷하게 복원되는 결과를 얻었다( $p < 0.05$ 와  $p < 0.01$ ). 마지막으로 우리는 APAP에 의해 손상 받은 간 조직에 주적이 미치는 영향을 알아보기 위하여, GPx의 활성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5C와 같이 정상 대조군( $11.5 \pm 1.5$  unit/ml)에 비해 APAP 투여는  $5.9 \pm 1.6$  unit/ml로 GPx의 활성을 현저히 억제시켰으나( $p < 0.001$ ), APAP 투여에 의해 감소된 GPx의 활성을 주적 투여군은 농도에 의존적으로 증가시키는 효과가 있었다. 특히 200 mg/kg GGDE 투여군에서는 정상 대조군과 비슷하게 복원되는 효과가 있었다( $p < 0.01$ ).

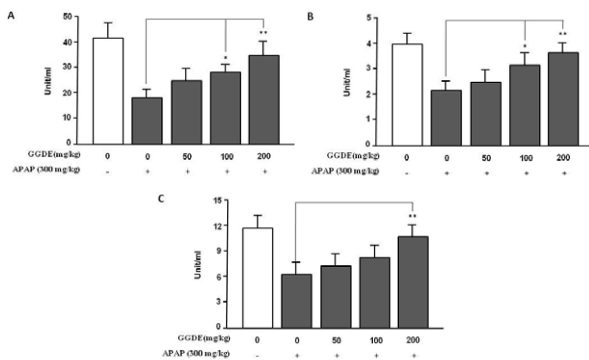


Fig. 5. Effect of GGDE on SOD (A), catalase (B) and GPx (C) activity in the live tissues of APAP-treated mice. Control mice received only saline and APAP alone treated mice received a single dose (400 mg/kg body weight). GGDE treated groups received the different dose of GGDE (50–200 mg/kg body weight) one times per day for 3 days, and then received a APAP single dose and/or GGDE on times per day for 3 days. SOD, catalase and GPx levels determined 72 h later. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. from 5 mice. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus control group treated with APAP alone.

## 고찰

危亦林的『世醫得效方』虛損<sup>1)</sup>에 최초로 수록된 拱辰丹은 先天의 氣를 補하고 水升火降을 순조롭게 하여 心身을 補益함으로서 장부의 虛損에 대한 예방 및 치료를 하는 방제이다. 동의보감<sup>2)</sup>에는 肝虛藥으로 되어 있으며 그 효능과 조제 용법을 세의득효방을 인용하여 기록하고 있다.

그러나 공진단의 대표적인 약인 사향은 예로부터 희귀고가 약품이어 사용이 어려웠고 근래에 들어와 CITES 부속서 1에 속해 있는 사향에 대한 사용 문제가 사회적인 이슈가 되기도 했다. 이에 최근에는 사향을 사용하는 대표적인 처방인 공진단에 사향을 대체하여 다른 방향성 理氣藥류를 가감하여 사용하는 처방들이 소개되어 지고 있다. 동의보감을 보면 공진단과 같은 조문에 黑元이라는 처방이 당귀와 녹용만으로 사향을 사용하지 않더라도 공진단과 같은 의미의 약효를 낼 수 있다는데 착안하여 기존의 공진단에 사향을 제외한 새로운 처방의 조합을 만들었고 최근에 본 교실에서는 鹿茸, 山茱萸, 當歸의 세가지 약재에 枸杞子, 山藥, 陳皮, 天麻, 藿香, 桂皮, 黃芩, 五味子 등 약물로 구성된 加味拱辰丹(Gami-GongJin-dan, GGD) 추출물을 활용하여 BALB/c계 마우스

를 대상으로 obalbumin (OVA)에 의해 유도된 혈청내 항체와 CCL27/CTACK의 생산, 발부종반응(footpad selling response) 및 림프절 세포의 CCR10의 발현에 미치는 효과를 조사한 결과 우수한 항염증 효과가 있음을 보고한 바 있다<sup>16)</sup>. 즉, OVA에 의해서 증가된 발의 부종, 혈청내 OVA 특이 IgE, IgG1과 IgG2a의 생산, CTACK/CCL27의 생산 및 CTACK/CCL27 ligand인 특이적 수용체 CCR10의 발현을 현저히 억제하는 효과가 있었다.

拱辰丹에 대한 실험적 연구로는 張<sup>3)</sup>은 혈청 thyroxine, cortisol, testosterone 및 혈중 hemoglobin의 함량 변화를 통하여 공진단의 強精補氣하는 효능이 우수하다고 보고하였고 김<sup>4)</sup>은 Rosette 형성세포수, 적혈수용집소가, 적혈구용혈소가, 혈청 중 testosterone 농도변화 등을 통하여 공진단이 면역반응, 항피로 및 내분비 기능에 효과가 있다고 보고하였다. 그리고 정<sup>5)</sup>과 황<sup>6)</sup>은 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 실험모델과 A $\beta$ 로 유도된 Alzheimer's disease 생체 실험모델에서 拱辰丹이 효과가 있다고 보고하였다. 또 최<sup>7)</sup>는 공진단의 성분분석 및 항산화작용을 분석하여 공진단의 성분이 항산화 및 항노화작용이 있는 아미노산과 무기질 성분이 많이 있음을 밝혀내었다. 성<sup>8)</sup>은 뇌허혈 모델에서 공진단이 뇌신경의 보호 및 재생을 촉진한다고 보고 하였고 김<sup>9)</sup>은 신경성장인자(NGF)의 분비유도 및 유사효과를 통하여 뇌신경보호 효과와 인지, 학습능력을 증가시킬 수 있음을 밝혀냈다.

본 연구에서 加減拱辰丹의 효능을 검증하기 위해서, 기존의 拱辰丹에서 처럼 추출물 자체의 항산화 효과와 또한 추가로 APAP를 투여에 따른 간손상에 대한 효과를 조사하였다. 먼저 GGDE 자체의 항산화 효과를 측정된 결과 농도에 의존적으로 DPPH 및 NO 라디칼 소거능 및 SOD 유사 활성이 증가되었다(Fig. 1). 최<sup>7)</sup>가 제시한 공진단의 효과는 우수하였다고 하였으나, 본 연구에서 조사한 拱辰丹의 항산화 효과는 본 연구에서 사용한 GGDE의 농도에서 30% 이하였으나(자료는 보여주지 않았음), GGDE는 매우 항산화 활성이 우수하였다. 이러한 GGDE의 항산화 효과를 극대화 시킨 구성약물은 사향이 아닌 황금과 오미자를 첨가한 효과라 사료된다. 황금의 주요성분은 bacalin으로 생체에서 bicalcin으로 전환되는 대사 작용과 함께 항산화 효과가 우수하며, 황금의 또 다른 성분인 wogonin도 항산화 효과가 우수한 것으로 알려졌다. 이와 같이 황금 유래 플라보노이드계 화합물은 항산화 효과를 나타내는 결정적인 성분으로 알려졌다<sup>26)</sup>. 더불어 오미자의 주요성분인 anthocyanin과 Schisandrin B는 항산화 효과가 매우 높아 생체의 장기 손상을 보호하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>27,28)</sup>. 우리는 가감공진단의 항산화 효과를 확인 한 후 APAP가 유도하는 간 손상에 대한 보호효과를 조사하였다.

생체에 과량의 APAP가 투여되면 간 조직이 괴사에 이르면서 파괴된 세포로부터 유리되어 혈청 내 AST와 ALT 증가된다<sup>29,30)</sup>. 일시적으로 과량의 APAP가 투여되면 72–96 시간 간 독성이 최대로 나타나 사망할 수 있다. 이러한 특성은 혈액의 응고덩어리가 형성될 때까지 걸리는 시간 즉, prothrombin time(PT) 뿐만 아니라 transaminases와 bilirubin의 농도가 증가하고 간 조직의 괴사가 진행 된다<sup>31)</sup>. 이때 간 독성의 지표로 잘 알려진 AST와 ALT가 증가하고

이는 혈청내로 유입되는데, AP에 의한 간 독성 기전은 P450 cytochrome C에 의존적이라 알려졌다<sup>32)</sup>.

본 연구에서 APAP 투여에 따른 주적이 간 독성 뿐만 아니라 사망에 미치는 영향을 알아 결과 APAP만 투여한 양성 대조군의 사망률에 비해 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서는 모두 생존하는 효과를 보였다. 또한 혈장내 AST와 ALT의 경우 경우 APAP만 투여한 양성 대조군에 비해서 현저히 증가한 반면, GGDE를 투여한 실험군에서는 농도에 의존적으로 감소하였다. 이러한 결과는 GGDE 투여는 APAP에 의해 손상된 간조직을 복원할 수 있다는 근거를 제시해 주었다. 또한 본 연구에서는 APAP 투여에 따른 간손상을 복원하는 GGDE의 효과를 알아보기 위해서 간조직을 조사한 결과 200 mg/kg 투여군에서는 정상 조직과 유사할 정도로 APAP에 의해 유도된 간손상을 보호하는 효과가 있음을 확인 하였다(Fig. 2).

생체에 APAP가 투여되면, 이 약물이 대사되면서 활성산소의 생성과 함께 지질 산화가 촉진되어 간독성을 유발할 수 있다<sup>32)</sup>. APAP가 투여된 마우스의 지질산화량을 알아보기 위해서 Fig. 3과 같이 TBARS량을 측정하였다. 약물이 투여되지 않은 정상 대조군에 비해서 APAP가 투여된 양성대조군은 MDA가 매우 증가된 반면, GGDE를 투여한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소하였다. APAP는 지질산화를 촉진시키는 TBARS를 형성하여 간 조직 내에 축적하는 것으로 알려져 있다<sup>33)</sup>. 지질산화와 관련되어 있는 산화적 스트레스는 대표적으로 APAP에 의해 유도되는 것으로 알려져 있는데, GGD 추출물은 APAP에 의해 유발되는 지질산화를 억제하여 간 기능을 보호하는 것이라 사료된다. 더불어  $\sigma$ -ALA-D는 산화적 스트레스 산물로 알려진 반응 산소중간물질의 형성을 억제하는 물질로 알려졌다<sup>34)</sup>. APAP는 산화적 스트레스를 유발하여 간 조직내에  $\sigma$ -ALA-D의 활성을 억제시키는 것으로 보고되었다<sup>35)</sup>. APAP의 반응대사 산물로 알려진 NAPQI는  $\sigma$ -ALA-D의 SH<sup>-</sup> 그룹과 직접 반응할 수 있는 물질로 고농도의 AP은 더욱 많은 NAPQI를 생산해 결국 GSH를 고갈 시키는 것으로 알려졌다<sup>36)</sup>. APAP 투여에 의한  $\sigma$ -ALA-D의 활성과 주적의 효능을 알아 본 결과 Fig. 4과 같이 APAP단독 투여군은 아무런 약물이 투여되지 않은 정상 대조군에 비해 현저히 감소되었으나, GGDE를 투여한 경우 그 활성이 복원되는 결과를 얻었다. 이러한 결과는 GGD 추출물이 APAP에 의해 유발된 간 독성을 해소시키는데 효능이 있다는 것을 시사해 주었다.

한편 본 연구에서는 APAP와 가감공진단을 투여한 마우스 생체 내 항산화 작용을 알아보기 위해서 SOD, catalase, GPx 등의 활성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 100 mg/kg 또는 200 mg/kg GGDE 투여군에서는 SOD, catalase, GPx 등 생체내 항산화 효소가 현저히 향상됨을 확인할 수 있었다. APAP 투여에 의한 SOD의 감소는 cytochrome C P450을 경유해 형성된 NAPQI의 축적에 따라 O<sup>-</sup>이온을 감소시키는 NADPH의 억제와 관련되어 있다<sup>37)</sup>. 또한 catalase는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 가수분해하는 생체 내 중요한 항산화 효소로서 작용한다<sup>38)</sup>. 특히 goldthioglucose (GTG)에 의한 GPx의 억제는 간세포에 민감하게 작용하여 APAP에 의

해 유발된 간독성을 억제하지 못하는 것으로 알려졌다<sup>39)</sup>. 본 연구에서 사용한 가감공진단의 항산화 효과는 지질산화를 억제하고 생체내 SOD, catalase 및 GPx의 활성을 증가시킴으로써 APAP독성을 억제하는 효과라 사료된다. 이러한 결과는 GGD 추출물에 함유된 鹿茸, 山茱萸, 當歸, 枸杞子, 山藥, 陳皮, 天麻, 藿香, 桂皮, 黃芩, 五味子 등 생약에 포함된 항산화 성분뿐만 아니라 간 보호에 작용하는 여러 가지 성분이 복합적으로 작용하는 항산화 효과라 추정 된다. 그러나 가감공진단이 APAP로 유발된 간손상의 보호에 대한 분자기전은 앞으로 더 조사해야 확실해질 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해볼 때 GGD 추출물은 DPPH 전자공여, NO 및 SO 라디칼 등의 소거능력에 우수한 효과가 있었으며, APAP에 의해 증가된 AST, ALT와 지질산화를 효과적으로 억제하였고, 저하된  $\sigma$ -ALA-D, SOD, catalase 및 GPx의 활성을 증가시킴으로써 간 손상을 보호하는 기능이 있음을 알 수 있었다. 따라서 APAP과 같은 약물에 의한 간손상으로부터 加減拱辰丹은 간 기능 보호 작용에 활용할 수 있는 좋은 처방이라 사료된다.

## 결론

加減拱辰丹은 鹿茸, 山茱萸, 當歸, 枸杞子, 山藥, 陳皮, 天麻, 藿香, 桂皮, 黃芩, 五味子 등 11가지약제로 구성된 처방으로 拱辰丹의 대체 처방으로 개발되었다. 본 연구의 목적은 加減拱辰丹 추출물(GGDE) 차체의 항산화 효과와 acetaminophen (APAP) 유도 마우스 간손상에 대한 GGDE의 효과를 조사하기 위한 것이다. GGDE는 7일 동안 메탄올로 추출하였으며, 감압증류 후 여과하여 동결건조 하였다. 먼저, GGD 추출물의 전자공여능(DPPH), 아질산 소거능(NO) 및 음이온 슈퍼옥사이드 유사(SOD) 활성을 조사하고, 마우스를 대상으로 APAP-유도 간손상에 대한 GGDE의 보호효과를 조사하였다. 마우스에 여러 가지 농도의 GGDE(50-200 mg/kg)을 총 6일 동안 하루에 1회 경구투여 하였다. GGDE를 3일 동안 투여한 후 양성 APAP(400 mg/kg)을 투여하였다. GGDE는 DPPH, NO 소거능 및 SOD 유사 활성을 농도에 의존적으로 증가시켰다. 마우스에 APAP 투여는 혈청의 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 그리고 간조직 용해물에서 thiobarbituric reacting substances (TBARS)와 같은 지질산화를 증가 시킨 반면, 항산화 효소[(SOD, catalase, d-aminolevulinatase dehydratase ( $\sigma$ -ALA-D), 및 glutathione peroxidase (GPx)의 활성을 고갈시켰다. 그러나 GGDE의 경구투여는 이러한 APAP 투여에 따른 지질산화를 억제시켰으며, 고갈된 항산화 효소의 활성을 증가시켰다. 이와 같은 생화학적 변화에 대한 사실을 제시하기 위해서 조직학적인 연구를 통해 GGD 추출물의 투여에 대한 효과를 증명하였다. 따라서 이상의 결과는 GGDE의 투여가 APAP 유도 간손상에 대한 우수한 항산화 및 간보호 효과가 있다는 사실을 제시해 주었으며, 간 질환 치료에 유용한 물질로 활용될 가능성이 있음을 시사해 주었다.



## 참고문헌

1. 危亦林. 世醫得效方. 도서출판 醫聖堂, 1990 : 271.
2. 許浚. 新對譯東醫寶鑑. 법인문화사, 2007 : 1251.
3. 장용훈. 拱辰丹이 强精補氣作用에 미치는 영향. 대구한의과대학 대학원, 1989.
4. 김장현. 拱辰丹이 면역반응, 항피로 및 내분비기능에 미치는 영향. 경희대학교대학원, 1990.
5. 장하정, 성우용, 이승현, 손지형, 한승혜, 정효창. 공진단(拱辰丹)이 알츠하이머형 치매 환자에게 미치는 영향. 동의신경정신과학회지, 2004 ; 15 : 141-48.
6. 정대규, 황선미. 공진단(拱辰丹)이 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 병태(病態)모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지, 2004 ; 15 : 103-18.
7. 최금희, 박치상. 拱辰丹의 성분 분석 및 抗酸化 작용에 미치는 영향. 大韓本草學會誌, 2007 ; 22 : 51-63.
8. 성기문, 허래경, 송봉근. 공진단이 MCAO모델 흰쥐에서 gliosis 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지, 2009 ; 30 : 674-84.
9. Moon E, Her Y, Lee JB, Park JH, Lee EH, Kim SH, Oh MS, Jang CG, Kim SY. The multi-herbal medicine Gongjin-dan enhances memory and learning tasks via NGF regulation. Neurosci Letters, 2009 ; 466 : 114-119.
10. Ray SD, Mumaw VR, Raje RR, Fariss MW. Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. J Pharmacol Exp Ther, 1996 ; 279 : 1470-83.
11. Webster PA, Roberts DW, Benson RW, Kearns GL. Acetaminophen toxicity in children: diagnostic confirmation using a specific antigenic biomarker. J Clin Pharmacol, 1996 ; 36 : 397-402.
12. Albano E, Rundgren M, Harvison PJ, Nelson SD, Moldeus P. Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone-imine cytotoxicity. Mol Pharmacology, 1985 ; 28 : 306-11.
13. Kyle ME, Miccadei S, Nakae D, Farber JL. Superoxide dismutase and catalase protect cultured hepatocytes from the cytotoxicity of acetaminophen. Biochem Biophys Res Commun, 1987 ; 149 : 889-94.
14. Mahadevan SB, McKiernan PJ, Davies P, Kelly DA. Paracetamol induced hepatotoxicity. Arch Dis Child, 2006 ; 91 : 598-603.
15. Prescott LF. Paracetamol, alcohol and the liver. Br J Clin Pharmacol, 2000 ; 49 : 291-301.
16. 김홍준, 황성연, 지예, 황병순, 정승일, 장선일. Balb/c 마우스에서 ovalbumin 면역반응에 대한 加味拱辰丹 추출물의 억제효과. 大韓本草學會誌, 2009 ; 24 : 127-35.
17. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 1958 ; 181 : 1199-200.
18. Marklund, S., Marklund, G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem, 1975 ; 47 : 468-74.
19. Gray, J.I., Dugan, J.R.L. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. J Food Sci, 1975 ; 40 : 981-85.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951 ; 193 : 265.
21. Ando K, Beppu M, Kikugawa K. Evidence for accumulation of lipid hydroperoxides during the aging of human red blood cells in the circulation. Biol Pharm Bull, 1995 ; 18 : 659-63.
22. Sassa S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. Enzyme, 1982 ; 28 : 133-45.
23. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem, 1972 ; 247 : 3170-5.
24. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol, 1984 ; 105 : 121-6.
25. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med, 1967 ; 70 : 158-67.
26. Jang SI, Kim HJ, Hwang KM, Jekal SJ, Pae HO, Choi BM, Yun YG, Kwon TO, Chung HT, Kim YC. Hepatoprotective effect of baicalin, a major flavone from *Scutellaria radix*, on acetaminophen-induced liver injury in mice. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2003 ; 25 : 585-94.
27. Chen N, Chiu PY, Ko KM. Schisandrin B enhances cerebral mitochondrial antioxidant status and structural integrity, and protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. Biol Pharm Bull, 2008 ; 31 : 1387-91.
28. Kim SH, Joo MH, Yoo SH. Structural identification and antioxidant properties of major anthocyanin extracted from Omija (*Schizandra chinensis*) fruit. J Food Sci, 2009 ; 74 : C134-40.
29. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med, 1967 ; 70 : 158-67.
30. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani TA. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl4-induced hepatotoxicity in rodents. Fitoterapia, 2002 ; 73 : 557-63.
31. Hinson JA, Pohl LR, Monks TJ, Gillele JR, Guengerich FP. 3-Hydroxyacetaminophen. A microsomal metabolites of acetaminophen.



- Evidence against an epoxide as the reactive metabolite of acetaminophen. *Drug Metab Dispos.* 1980 ; 8 : 289-94.
32. Olaleye MT, Rocha BT. Acetaminophen-induced liver damage in mice: effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. *Exp Toxicol Pathol.* 2008 ; 59 : 319-27.
  33. Katikova O. Effect of mexidol on the homeostatis and lipid peroxidation in paracetamol poisoning. *Eksp Klim Farmakol.* 2002 ; 65 : 53-6.
  34. Arnaiz SL, Llesuy S, Curtr in JC, Boveris A. Oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver. *Free Radical Biol Med.* 1995 ; 19 : 303.
  35. Folmer V, Soares JC, Rocha JBT. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 ; 34 : 1279.
  36. Bechara EJH. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Brazil J Med Biol Res.* 1996 ; 29 : 841.
  37. Bessems JM, Vermeulen NPE. Paracetamol (Acetaminophen)-induced toxicity : molecular and biochemical mechanism. *Analogues Protective Approaches* 2001.
  38. Rajesh B, Parames CS. The protein fraction of *Phyllanthus niruri* plays a protective role against acetaminophen induced hepatic disorder via its antioxidant properties. *Phytother Res.* 2006 ; 12 0 : 595-601.
  39. Adamson GM, Harman AW. A role for the glutathione peroxidase/reductase enzyme system in the protection from paracetamol toxicity in isolated mouse hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1989 ; 38 : 3323-30.