

알코올 및 사염화탄소에 의해 유발된 급만성 간손상에 대한 지구자 열수추출물의 보호효과

김영식^{1#}, 박주연¹, 권용범¹, 임동욱², 송미경², 최호영², 김호철^{2*}

1 : 뉴메드 한의과학기술연구소, 2 : 경희대학교 한의과대학 본초학교실

Hepatoprotective Effects of *Hovenia dulcis* Extract on Acute and Chronic Liver Injuries induced by Alcohol and Carbon Tetrachloride.

Young-Sik Kim^{1#}, Juyeon Park¹, Yongbeom Kwon¹, Dong Wook Lim², MiKyung Song²,
Ho-Young Choi², Hocheol Kim^{2*}

1 : Korea Institute of Science and Technology for Eastern Medicine, NeuMed Co., Ltd.

2 : Dept. of Herbal Pharmacology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to evaluate the hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* extract on acute and chronic liver injuries induced by alcohol and CCl₄ in mice and rats.

Methods : In acute alcohol-induced liver injury, mice were administered *Hovenia dulcis* extracts (60 and 200 mg/kg) orally before and after alcohol administration. In chronic alcohol-induced liver injury, mice were administered alcohol containing liquid diet for 4 weeks. The mice were administered *H. dulcis* extracts (60 and 200 mg/kg) mixed with the liquid diet. In acute CCl₄-induced liver injury, rats received a single dose of CCl₄ (2 mL/kg in olive oil, intraperitoneally). Rats were administered *H. dulcis* extracts (30, 100 and 300 mg/kg) before and after CCl₄ administrations. After the ends of the administrations, the serum levels of AST and ALT were measured using chemical analyzer, and γ -GTP levels were measured using spectrophotometer.

Results : In acute alcohol-induced liver injury, *H. dulcis* extracts treated group showed significant reduction in ALT levels compared to those of control group. In chronic alcohol-induced liver injury, it inhibited weight-loss compared to normal group and showed significant reduction in AST, ALT and γ -GTP levels compared to control group. In acute CCl₄-induced liver injury, it also showed significant reduction in AST, ALT levels compared to control group.

Conclusions : The results show that *H. dulcis* extract has hepatoprotective effect in acute and chronic alcohol-induced liver injury and acute CCl₄-induced liver injury. These findings suggest that *H. dulcis* could be a potent hepatoprotective agent.

Key words : *Hovenia dulcis*, hepatoprotective effect, carbon tetrachloride, alcohol, liver

서론

간질환은 인구 10만 명당 13.5명으로 사망원인순위 8위를 차지하고 있으며, 40대에서는 자살을 제외하고 암에 이어 사

망률 2위를 차지하는 질환¹⁾으로 생산활동이 왕성한 40~50대에 합병증이 쉽게 발생하기 때문에 가정의 존립에 영향을 미치게 되며 궁극적으로 사회의 생산성을 저하시키는 요인이 되고 있다²⁻³⁾. 우리나라 만성 간질환 환자를 대상으로 한 조사

*교신저자 : 김호철, 서울특별시 동대문구 경희대로 26 130-701

· Tel : 02-961-0419 · E-mail : hckim@khu.ac.kr

#제1저자 : 김영식, 서울특별시 동대문구 이문로 88 3층 130-831

· Tel : 02-564-9140 · E-mail : yjbsik@gmail.com

· 접수 : 2013년 6월 19일 · 수정 : 2013년 7월 10일 · 채택 : 2013년 7월 19일

에서 간경변증 발생 원인으로 알코올은 18.6%를 차지하여 64.9%인 B형 간염바이러스 다음으로 많은 비중을 차지하는 것으로 나타났는데 B형 간염과 C형 간염은 지속적인 예방과 치료를 통해 제도적으로 관리되고 있어 발생빈도가 감소하고 있으나 알코올성 간질환은 그 발생 빈도가 상대적으로 증가하고 있으며 사회, 문화, 관례적으로 허용되는 음주에 의해 발생하는 특성 때문에 의료인의 관심이 낮은 상황이다⁴⁾.

알코올성 간질환 치료는 금주가 핵심이며, 그 외 영양제, 스테로이드제, 항산화제 투여, anticytokine therapy, 간이식 등이 있으나 효과가 인정되는 것은 스테로이드와 pentoxifyline 뿐이며 그 외의 치료법은 그 효과가 증명된 바 없는 실정이다⁵⁾.

헛개나무(*Hovenia dulcis* Thunb.)는 갈매나무과의 낙엽교목으로 지구자 나무 또는 괴조, 호깨나무, 호로깨나무라고도 하며 우리나라에서는 설악산, 오대산, 지리산 및 한라산 등에 주로 자라며 일본과 중국에도 분포한다⁶⁻⁷⁾. 헛개나무는 지구자(枳椇子)라는 한약명으로 『唐本草』에 처음 기재된 이래 '枳椇子', '雞距子', '木蜜', '拐枣' 등의 이름으로 열매자루가 달린 열매 또는 씨를 사용하고 있으며⁸⁻⁹⁾, 甘酸, 平하고 養陰生津, 補中益氣, 潤腸通便, 解酒毒의 효능이 있어 전통적으로 熱病煩渴, 嘔吐呃逆, 小兒疳積, 小便不利, 飲酒中毒 등에 사용하였다¹⁰⁾.

헛개나무의 씨와 열매에는 (+)-ampelopsin, laricetrin, myricetin, (+)-gallocatechin 등의 flavonoid류, hovenitin I, II, III 등의 flavonol류, frangulanine 등 alkaloid류¹¹⁻¹²⁾, hovenidulciosides A₁, A₂, B₁, B₂ 등¹³⁻¹⁴⁾의 triterpene glycoside류 성분이 보고되어 있으며 약리작용으로는 항산화¹⁵⁻¹⁹⁾, 아질산염 소거¹⁹⁾, 알코올 분해^{6,19-20)}, 항암²¹⁻²²⁾, 항돌연변이²²⁾, 지질개선²²⁾, 항당뇨^{15,23)}, 간보호^{6,11-12,14,24-29)} 등이 보고되어 있다.

지구자는 특히 간보호 효과가 알려져 있다. 지구자 알코올 추출물은 사염화탄소(CCl₄) 또는 알코올 유도 급성 간손상 동물모델에서 혈청의 AST, ALT 증가를 억제하고²⁶⁻²⁸⁾, MDA, hydroxyproline 증가를 억제함이 보고되어 있으며^{27,29)}, 지구자 열수추출물은 CCl₄ 또는 D-galactosamine/LPS 유도 간손상 모델에서 혈장 내 AST, ALT, LDH, ALP 수준을 감소시키며^{6,12, 24)}, 급성 알코올 유도 간손상 동물모델에서도 혈중 알코올 농도를 저하시키고 혈장 내 AST 수준을 감소시켜 간보호 효과를 나타냄이 보고되었다⁶⁾.

특히 알코올로 인한 간손상은 장기간의 알코올 섭취에 의해 진행되기 때문에 만성적인 알코올 섭취에 의한 간손상에 대한 효과 검증이 필요하다. 그러나 이전 연구에서 전통적으로 사용해온 지구자 열수추출물에 대한 만성 알코올 유도 동물모델에서의 실험보고가 없었던 바, 본 연구에서는 만성 알코올 유도 간손상 동물모델에서 28일간 알코올이 함유된 액체식이와 함께 지구자 열수추출물을 투여하여 간보호 효과를 평가하였으며 급성 알코올 및 CCl₄ 유도 간독성 동물모델에서 그 효과를 검증하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

급성 및 만성 알코올 유도 간손상 실험을 위하여 7주령의 수컷 C57BL/6 생쥐를, CCl₄ 유도 간독성 실험을 위하여 7주령의 수컷 Sprague-Dawley(SD) 흰쥐를 (주)샘타코(한국)에서 공급받아 실험동물로 사용하였으며 항온항습(실내온도 22±2°C, 상대습도 55±10%)과 12시간(07:00~19:00) 간격의 명암주기 환경에서 자유롭게 공급된 증류수와 고형사료로 7일간 사육하였다.

2) 약재 및 추출분말 제조

실험에 사용된 지구자(*Hovenia dulcis*)는 경동시장 약수당 약업사에서 구입한 중국 호북성 산으로 경희대학교 한의과대학 분초학교실에서 검증을 받아 (Voucher No. FE426025) 사용하였다. 지구자 50 g을 10배수의 물로 100°C 에서 4시간 2회 가온 환류 추출한 후 감압 농축하여 농축액을 동결건조하여 지구자 추출분말을 얻었다. 추출 수율은 26.9%이었으며 시료번호 HP426으로 부여 후 사용하였다.

2. 실험방법

1) 급성 알코올 섭취로부터의 간 보호효과 실험

(1) 실험동물과 투여방법

7일간 적응시킨 생쥐를 무작위로 대조군, 알코올투여군, silymarin 200 mg/kg 투여군, HP426 60 mg/kg 투여군, HP426 200 mg/kg 투여군으로 나누었다. 7일간 적응시킨 실험동물은 12시간 절식시킨 후 알코올 4.8 g/kg body weight (40% EtOH, 15.2 mL/kg)을 대조군을 제외한 나머지 군에 1회 경구투여 하였으며, silymarin, HP426은 알코올 투여 1시간 전, 3시간 후 총 2회, 경구투여 하였다.

알코올과 실험물질을 투여한 실험동물은 Jing Zhao 등³⁰⁾의 방법에 따라 알코올 투여 후 6시간 후 채혈하여 혈청을 분석하였다.

(2) 혈액 조제

알코올 마지막 처리 이후부터 6시간 후 마취(isoflurane, 포란액®, 중외제약) 하여 복부 정중선을 따라 개복하고 복대 동맥으로부터 채혈하였으며, 채취한 혈액은 실온에 1시간 방치한 후 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층의 혈청을 분리한 후 간 기능의 지표효소 활성도 측정 전까지 -70°C에 넣어 보관하였다.

(3) 혈청 중간 기능 지표효소 활성 측정

Alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) 활성도는 각 기질과 효소반응을 이용한 비색법에 의해 제조된 assay kit(Medex, Korea)로 혈청화확검사기기(VetTest 8008; IDEXX Laboratories, USA)를 이용하여 측정하였다.

2) 만성 알코올 섭취로부터의 간 보호효과 실험

(1) 실험동물과 실험식이의 조제

5일간 적응시킨 생쥐를 대조군은 6마리, 에탄올 투여군은 12마리씩 4군으로 무작위로 나누어, Lieber-Decarli liquid

diet(Bethlehem, PA, USA)를 ad libitum으로 자유롭게 3일 간 공급하였다.

실험식의 구성성분은 Table 1과 같으며, 대조군과 알코올투여군의 액체식은 기본적으로 1 kcal/mL 열량을 함유한다. 알코올이 함유되지 않은 대조군의 식이는 알코올을 대신 같은 열량의 maltose dextrin으로 대체하여 열량을 기준으로 지방에서 35%, 단백질에서 18%, 탄수화물에서 47%가 공급되었으며 알코올투여군 식이의 경우, 지방과 단백질은 대조군의 것과 같으며 탄수화물은 11%로 줄이고 대신에 알코올에서 36%가 공급되도록 조성되었다. 이때 사료 중 알코올 함량은 점진적으로 높이면서 적응시켜 최종적으로 사료 1,000 g 중 50 g의 알코올을 첨가한 (약 36% kcal) 사료로 사육하였다³¹⁾.

Table 1. Composition of Experimental Liquid Diets

Ingredients (g/L diet)	Control diet	Ethanol diet
Casein (100 Mesh)	41.40	41.40
L-cystein	0.50	0.50
DL-Methionine	0.30	0.30
Corn oil	8.50	8.50
Olive oil	28.40	28.40
Safflower oil	2.70	2.70
Maltose Dextrin	115.20	25.60
Cellulose	10.00	10.00
Salt Mix #210011 ¹⁾	8.75	8.75
Vitamin Mix #310011 ²⁾	2.50	2.50
Choline Bitartrate	0.53	0.53
Xanthan Gum	3.00	3.00
Ethanol ³⁾	0.00	50.00

¹⁾Salt mix #210011 (g/kg mix): Calcium Phosphate, dibasic, 500; Sodium Chloride, 74; Potassium Citrate, monohydrate, 220; Potassium Sulfate, 52; Magnesium Oxide, 24; Manganese Sulfate H₂O, 4.6; Ferrous Sulfate 7H₂O, 4.95; Zinc Carbonate, 1.6; Cupric Carbonate, 0.3; Potassium Iodate, 0.01; Sodium Selenite, 0.01; Chromium Potassium Sulfate, 0.55; Sodium Fluoride, 0.06; Sucrose, finely powdered, 117.92.

²⁾Vitamin Mix #310011 (g/kg mix): Thiamin HCl, 0.6; Riboflavin, 0.6; Pyridoxine HCl, 0.7; Niacin, 3.0; Calcium Pantothenate, 1.6; Folic Acid, 0.2; Biotin, 0.02; Vitamin B12 (0.1%), 10; Vitamin A Acetate (500,000 IU/g), 4.8; Vitamin D3 (400,000 IU/g), 24; Menadione Sodium Bisulfite, 0.08; P-Amino Benzoic Acid, 5; Inositol, 10; Dextrose, 939.

³⁾Ethanol: 95%

본 연구에 사용된 Lieber-DeCarli liquid diet는 가루 상태로 구입한 후 매일 아침 사료 공급 전 가루 상태에 증류수를 첨가하여 액상 상태로 만들어 제조하였다. HP426 투여군은 매일 60 mg/kg, 200 mg/kg 의 농도로 식이에 첨가하였다. 매일 같은 시간에 액상 상태로 식이를 공급하였기 때문에 사료 섭취량은 mL로 측정하였고, 실험동물의 몸무게도 1일 1회 같은 시간에 측정하였으며 총 실험식의 공급기간은 28일이었다.

(2) 혈액 조제

희생 전 12시간 절식시킨 후 마취(isoflurane, 포란액®, 중외제약) 하여 복부 정중선을 따라 개복하고 복대동맥으로부터 채혈하였으며, 채취한 혈액은 실온에 1시간 방치한 후 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층의 혈청을 분리한 후 간 기능의 지표효소 활성도 측정 전까지 -70°C에 넣어 보관하였다.

(3) 혈청 중 간 기능 지표효소 활성 측정

Alanine aminotransferase(ALT), aspartate

aminotransferase(AST) 활성도는 각 기질과 효소반응을 이용한 비색법에 의해 제조된 assay kit(Medex, Korea)로 혈청 화학검사기기(VetTest 8008; IDEXX Laboratories, USA)를 이용하여 측정하였으며 Gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GTP) 활성도는 비색법에 의해 제조된 MaxDiscovery™ gamma-glutamyl Transferase(GGT) Enzymatic assay kit(Bio scientific corp., USA)로 분광광도계(SPECTRAMax PLUS 384 microplate spectrophotometer; Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정하였다.

3) 간독성 보호효과 실험

(1) 실험동물과 투여방법

7일간 적응시킨 흰쥐를 무작위로 대조군, 사염화탄소군, silymarin 200 mg/kg 투여군, HP426 30 mg/kg 투여군, HP426 100 mg/kg 투여군, HP426 300 mg/kg 투여군으로 나누었다. 7일간 적응시킨 실험동물을 12시간 절식시킨 후 사염화탄소와 olive oil을 1:4로 희석하여 2 mL/kg의 농도로 1회 복강 투여하였다.

사염화탄소에 의한 간손상이 유발 후 5시간부터 일어나며³²⁾, silymarin은 경구 투여 시 1.7-2.2시간에서 최대 혈중농도를 나타내므로³³⁾ 사염화탄소에 의해 간손상이 일어나는 유발 5시간 후에 silymarin의 최대혈중농도가 맞춰지도록 사염화탄소 유발 3시간 후에 silymarin을 투여하며 혈중농도를 유지하기 위해 반감기가 4시간이고, 발현시간이 3~4시간 이므로 silymarin을 4시간 간격으로 2회 더 투여하여 총 3회 투여하였다. HP426의 경우 식물성 한약의 반감기가 5~6시간이므로 혈중농도의 유지를 위해 사염화탄소 유발 1시간 전, 유발 5시간, 11시간 후 총 3번 투여하였다.

(2) 혈액 조제

사염화탄소 투여 24시간 후 마취(isoflurane, 포란액®, 중외제약) 하여 복부 정중선을 따라 개복하고 복대동맥으로부터 채혈하였으며, 채취한 혈액은 실온에 1시간 방치한 후 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층의 혈청을 분리한 후 간 기능의 지표효소 활성도 측정 전까지 -70°C에 넣어 보관하였다.

(3) 혈청 중 간 기능 지표효소 활성 측정

Alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) 활성도는 각 기질과 효소반응을 이용한 비색법에 의해 제조된 assay kit(Medex, Korea)로 혈청 화학검사기기(VetTest 8008; IDEXX Laboratories, USA)를 이용하여 측정하였다.

4) 통계처리

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 One-way ANOVA로 통계처리 하였으며 사후 검증은 Dunnett의 T3으로 실시하여 유의성($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)을 검정하였다.

결 과

1. 급성 알코올 섭취로부터의 간 보호효과

1) 혈청 중 AST, ALT 활성

급성 알코올 투여에 따른 혈청 AST, ALT 활성 상승에 대한 HP426의 억제효과를 실험한 결과, 혈중 AST 농도는 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가되었으며($p<0.001$), HP426투여군은 대조군 대비 60, 200 mg/kg 용량에서 각각 8.2%, 8.6% 감소하는 경향을 나타냈으나, 통계적 유의성은 없었다. 혈중 ALT 농도는 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였으나($p<0.001$), HP426투여군은 대조군 대비 60, 200 mg/kg 용량에서 각각 15.1%, 15.5% 유의하게 감소하였다(Fig. 1, Table 2).

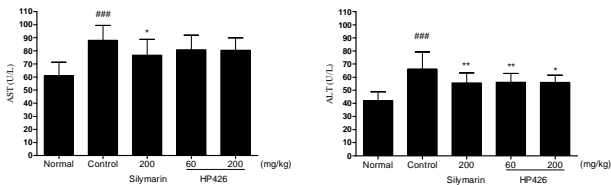


Fig. 1. The effect of HP426 on serum AST levels(left) and ALT levels(right) with hepatic damage induced by administration of alcohol. Values are represented as mean \pm SD. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ compared with ethanol group. *** $p<0.001$ compared with control group. Data obtained were analyzed by Dunett's T3-test.

Table 2. Effects of HP426 on Serum Aminotransferase Activities after Acute Ethanol Consumption

Groups	Dose (mg/kg)	AST (U/L) ^a	ALT (U/L) ^b
Normal		61.1 \pm 10.2	42.1 \pm 6.8
Control		88.1 \pm 11.4 ^{###}	66.3 \pm 13.0 ^{###}
Silymarin	200	76.7 \pm 12.0 [*]	55.8 \pm 7.4 ^{**}
HP426	60	80.9 \pm 11.1	56.3 \pm 6.6 ^{**}
HP426	200	80.5 \pm 9.3	56.0 \pm 5.5 [*]

Values are represented as mean \pm SD. Data obtained were analyzed by Dunett's T3-test. ^{###} Significantly different from normal group, ^{###} $p<0.001$. ^{*}, ^{**} significantly different from control group, ^{*} $p<0.05$, ^{**} $p<0.01$. a, AST: aspartate aminotransferase; b, ALT: alanine aminotransferase

2. 만성 알코올 섭취로부터의 간 보호효과

1) 체중 및 생존률

실험식이의 28일간 투여 후 실험동물의 최종 무게를 비교한 결과 대조군(19.1 \pm 1.3 g, $p<0.001$)과 silymarin 투여군(20.0 \pm 1.1 g, $p<0.01$), HP426 60 mg/kg 투여군(20.8 \pm 0.9 g, $p<0.01$)은 정상군(23.1 \pm 0.4 g) 대비 유의하게 체중이 감소하였으나, HP426 200 mg/kg 투여군(21.8 \pm 0.9 g)은 정상군과 유의적인 차이가 없었다(Table 3).

Table 3. Effects of HP426 on Body Weight after Chronic Ethanol Consumption

Groups	Dose (mg/kg)	Final body weight (g)
Normal		23.1 \pm 0.4
Control		19.1 \pm 1.3 ^{###}
Silymarin	200	20.0 \pm 1.1 ^{**}
HP426	60	20.8 \pm 0.9 ^{**}
HP426	200	21.8 \pm 0.9

Values are represented as mean \pm SD. Data obtained were analyzed by Dunett's T3-test. ^{###} significantly different from normal group, ^{###} $p<0.001$. ^{**}significantly different from control group, ^{**} $p<0.01$.

4주 실험을 진행하는 동안 알코올 섭취로 인한 생존률을 비교한 결과, 정상군에서만 100% 생존률을 나타내었으며, 대조군은 50%, silymarin 200 mg/kg 75%, HP426 60, 200 mg/kg 투여군은 각각 75%, 87.5%의 생존률(%)을 나타내었다(Table 4).

Table 4. Effects of HP426 on Survival Rate for 4 Weeks Oral Administration in Mouse

Groups	Dose (mg/kg)	Days after administration				
		0	7	14	21	28
Normal		100	100	100	100	100
Control		100	100	100	80	50
Silymarin	200	100	100	100	100	75
HP426	60	100	100	100	100	75
HP426	200	100	100	100	100	87.5

2) 혈청의 지방간 주요 표지자 농도 변화

알코올 투여에 따른 혈청 AST, ALT, γ -GTP 활성 상승에 대한 HP426의 억제효과는 Table 5와 같다. 4주째 나타난 혈중 AST 농도는 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가되었으나($p<0.001$), HP426투여군은 대조군 대비 60, 200 mg/kg 용량에서 각각 45.7%, 87.5% 유의하게 감소하였다. 혈중 ALT 농도는 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였으나($p<0.001$), HP426투여군은 대조군 대비 60, 200 mg/kg 용량에서 각각 39.2%, 84.6% 유의하게 감소하였다. 혈중 γ -GTP 농도 또한 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였으며($p<0.001$), HP426투여군은 200 mg/kg 농도에서 대조군 대비 47.4% 유의하게 감소하였다($p<0.001$)(Fig. 2).

Table 5. Effects of HP426 on Serum Aminotransferase Activities after Chronic Ethanol Consumption

Groups	Dose (mg/kg)	AST(U/L) ^a	ALT (U/L) ^b	γ -GTP (IU/L) ^c
Normal		69.3 \pm 9.3	48.5 \pm 12.6	20.4 \pm 10.1
Control		732.5 \pm 38.8 ^{###}	722.3 \pm 46.3 ^{###}	84.6 \pm 21.1 ^{###}
Silymarin	200	402.6 \pm 92.4 ^{###}	377.4 \pm 106.4 ^{###}	44.5 \pm 7.7 ^{###}
HP426	60	445.7 \pm 200.3 ^{###}	392.0 \pm 182.6 ^{###}	68.5 \pm 13.7
HP426	200	112.8 \pm 45.6 ^{###}	90.6 \pm 55.8 ^{###}	44.5 \pm 20.0 [*]

Values are represented as mean \pm SD. Data obtained were analyzed by Dunett's T3-test. ^{###} significantly different from normal group, ^{###} $p<0.001$. ^{*}, ^{###} significantly different from control group, ^{*} $p<0.05$, ^{###} $p<0.001$. a, AST: aspartate aminotransferase; b, ALT: alanine aminotransferase; c, γ -GTP: gamma-glutamyl transpeptidase.

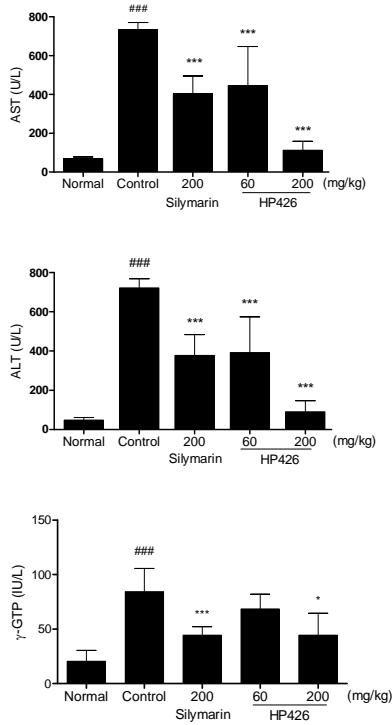


Fig. 2. The effect of HP426 on serum AST levels, ALT levels and γ -GTP levels with hepatic damage induced by administration of alcohol. Values are represented as mean \pm SD. Data obtained were analyzed by Dunett's T3-test. ### significantly different from normal group, $p < 0.001$. *, **, *** significantly different from control group, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$.

3. 간독성 보호효과

CCl₄ 투여에 따른 혈청 AST, ALT 활성 상승에 대한 HP426의 억제효과는 Table 6과 같다. 혈청 AST 농도는 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가되었으나($p < 0.001$), HP426의 투여군은 대조군 대비 30, 100, 300 mg/kg 용량에서 각각 48.1%, 48.3%, 63.3% 유의하게 감소하였다. 혈청 ALT 농도는 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가되었으나($p < 0.001$), HP426의 투여군은 대조군 대비 30, 100, 300 mg/kg 용량에서 각각 33.8%, 30.3%, 55.4% 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

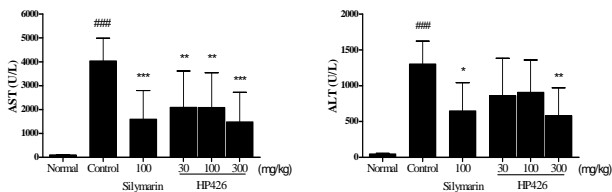


Fig. 3. The effect HP426 on serum AST levels(left) and ALT levels(right) with hepatic damage induced by administration of carbon tetrachloride. Values are represented as mean \pm SD. Data obtained were analyzed by Dunett's T3-test. ### $p < 0.001$ compared with normal group, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ compared with control group.

Table 6. Effects of HP426 on Serum Aminotransferase Activities after Carbon Tetrachloride Injection

Groups	Dose (mg/kg)	AST (U/L) ^a	ALT (U/L) ^b
Normal		105.0 \pm 5.0	50.3 \pm 9.4
control		4039 \pm 944.1 ^{###}	1304 \pm 318.6 ^{###}
Silymarin	200	1603 \pm 1193 ^{***}	649.4 \pm 394.3 [*]
HP426	30	2098 \pm 1518 ^{**}	862.9 \pm 519.7
HP426	100	2089 \pm 1456 ^{**}	908.6 \pm 449.1
HP426	300	1482 \pm 1238 ^{***}	580.6 \pm 390.8 ^{**}

Values are represented as mean \pm SD. Data obtained were analyzed by Dunett's T3-test. ### significantly different from normal group, $p < 0.001$. *, **, *** significantly different from control group, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$. a, AST: aspartate aminotransferase; b, ALT: alanine aminotransferase.

고찰

알코올 유도 급성, 만성 간손상 동물모델과 CCl₄ 유도 급성 간독성 동물모델을 이용하여 지구자 열수추출물의 간보호 효과에 대하여 평가한 결과 지구자 추출물은 간손상의 주요 표지자인 혈중 AST, ALT, γ -GTP의 활성 상승을 억제시켜 간보호 효과를 나타내었다.

지구자 열수추출물은 알코올 유도 급성 간손상 동물모델에서 알코올 투여 1시간 전, 3시간 후 총 2회 200 mg/kg의 농도로 투여하였을 때 혈청 ALT 활성을 대조군 대비 15.5% 유의하게 감소시켜 간보호 효과를 나타내었다. 알코올은 대사 과정에서 자유유리기를 생성하고 생체 내 산화스트레스를 유발하여 간손상을 일으키기 때문에 알코올성 간손상 관련 실험에서 많이 사용되고 있다. 알코올은 alcohol dehydrogenase, microsomal cytochrome P450 type 2E1(CYP2E1), catalase에 의해 분해되어 acetaldehyde로 대사되며 과량의 알코올 대사에 의해 생성된 acetaldehyde는 acetaldehyde-protein 부산물과 지질과산화물을 생성시켜 간독성에 관여한다^{26,34-35}. 간세포가 손상되면 수송기능 및 막 투과성에 변화를 초래하여 결국 세포로부터 AST 및 ALT와 같은 효소가 순환계로 다량 방출되게 되는데 이는 독성화 과정 중 간 조직 막의 손상을 의미하므로³⁶ 혈청 aminotransferase 활성의 변화는 오랫동안 간손상 및 간보호의 지표로서 유용하게 사용되어 왔다³⁷. 본 연구결과는 헛개나무 열매 물추출물이 흰쥐 일차 배양 간 세포에서 간세포질 효소인 LDH의 배양액 내 유리를 유의성 있게 억제하고²⁵, 흰쥐의 알코올 유도 급성 간손상 모델에서 혈청 내 AST를 감소⁶시킨 이전의 연구와 유사한 결과이다. 특히 ALT는 간 이외의 심근, 골격근, 신장, 적혈구, 뇌 등에 존재하는 AST에 비해 거의 전적으로 간에만 존재하여 간세포 손상의 더 좋은 지표³⁸로 알려져 있으므로 ALT가 유의하게 감소한 본 연구결과는 지구자 열수추출물이 알코올로 인한 급성 간세포 손상을 억제함을 의미한다.

알코올 유도 만성 간손상 동물모델에서 지구자 열수추출물을 28일간 200 mg/kg의 농도로 투여하였을 때 지구자 추출물 투여군은 정상군과 체중의 차이를 보이지 않았고 혈청 AST, ALT, γ -GTP 활성이 대조군 대비 각각 87.5%, 84.6%, 47.4% 유의하게 감소되었다. 장기간의 알코올 섭취는 AST, ALT의 활성 증가와 함께 γ -GTP의 활성을 높이는 데 γ -GTP는 γ -glutamyl기를 다른 peptide나 1-amino

acid에 전이하는 전이 효소로서 간 특이효소로 알려져 있다³⁹⁾. 간장 질환에서 ALP와 유사하나 더 민감하게 반응하는 효소이며 간조직의 손상 시 혈중으로의 유출이 증가되므로 간 기능의 지표 검사에 많이 이용되고 있다⁴⁰⁻⁴¹⁾. 특히 알코올에 민감하게 반응하는 효소이기 때문에 임상에서 음주력 판정 지표로 많이 이용되고 있으며 습관성 음주자에서 일반적으로 높고, 알코올성 간염에서 현저히 증가된다⁴²⁻⁴⁷⁾. 따라서 본 연구 결과는 지구자 열수추출물이 만성적인 알코올 섭취에 의한 간세포 손상을 억제함을 의미한다.

CCl₄ 유도 급성 간독성 동물모델에서 지구자 열수추출물은 CCl₄ 유발 1시간 전, 유발 5시간, 11시간 후 총 3회, 300 mg/kg의 농도로 투여되었을 때 혈청 AST, ALT 활성을 대조군 대비 63.3%, 55.4% 유의하게 감소시켰다. CCl₄ 유도 급성 간독성 동물모델은 일반적으로 사용되는 급성 간염 동물 모델로서 CCl₄는 CYP2E1에 의해 대사되어 CCl₃⁻을 생성하며, 소포체 내 막단백질과 지질에 결합해 막 인지질의 다중 불포화 지방산의 과산화 변성을 일으켜 간손상을 일으키는 것으로 알려져 있다⁴⁸⁻⁵¹⁾. 본 연구결과는 CCl₄ 유도 급성 간독성 동물모델에서 지구자 열수추출물이 AST, ALT의 수치를 약 50%^{6,24)} 감소시켜 간보호 효과를 나타냄을 보고한 이전 연구와 유사한 결과이며 지구자 열수추출물이 급성 독성에 의한 간세포 손상을 억제함을 의미한다.

결론

지구자 열수추출물이 알코올 유도 급성, 만성 간손상 동물 모델과 CCl₄ 유도 급성 간독성 동물모델에서 간보호 효과가 있는지를 알아보기 위해 ALT, AST, γ -GTP 활성을 측정 한 결과 다음과 같다.

1. 알코올 유도 급성 간손상 동물모델에서 지구자 열수추출물은 대조군에 비하여 AST 농도를 감소시키는 경향을 보였고 ALT 농도를 유의하게 감소시켰으며, 이는 알코올로 인한 급성 간세포 손상을 억제하는 것으로 생각된다.
2. 알코올 유도 만성 간손상 동물모델에서 지구자 열수추출물은 장기간 알코올 섭취에 따른 식욕감퇴로 인한 체중의 감소를 억제하였고 대조군에 비하여 AST, ALT, γ -GTP 농도를 유의하게 감소시켰으며, 이는 만성적인 알코올 섭취에 의한 간세포 손상을 억제하는 것으로 생각된다.
3. CCl₄ 유도 급성 간독성 동물모델에서 지구자 열수추출물은 대조군에 비하여 AST, ALT 농도를 유의하게 감소시켰으며, 이는 급성 독성에 의한 간세포 손상을 억제하는 것으로 생각된다.

요약하면 지구자 열수추출물은 급성 알코올 및 독성에 의한 간세포 손상 뿐 아니라 만성 알코올 섭취에 의한 간세포 손상을 억제하는 것으로 생각된다. 이 결과로 보아 지구자 추출물은 급성 간 독성 및 장기간의 알코올성 손상으로부터 간

을 보호하는데 도움을 주며, 간 건강의 관리와 간질환의 치료에 효과적인 소재로 활용될 가능성이 있다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 2단계 두뇌한국21사업과 보건복지부 한의약선도기술개발사업의 연구비지원(과제고유번호: B110072)에 의하여 수행되었음

Reference

1. Statistics Korea, 2011 Korea statistical yearbook, Daejeon:Statistics Korea, 2011 : 148-52.
2. Kim DJ, Kim HS, Choi WC, Kim YS, Park CK, Lee YS. Liver disease in society: Present and future - Emphasis on disability rating -. Korean J Hepatol, 2009 ; 15(5) : 50-68.
3. Kim DJ, Kim HS, Yim HJ, Suh JI, Cheong JY, Kim IH, Tark WY, Lee YS, Lee S, Lee JY. Problems faced by Korean patients with chronic liver disease and the role of the Korean Association for the Study of the Liver -Emphases on social discrimination, insufficiency of reimbursement coverage, and deficiency of the welfare system, Korean J Hepatol, 2008 ; 14(2) : 125-35.
4. Lee HJ. Update and Perspectives on alcoholic liver disease in Korea 2010. Korean J Hepatol, 2010 ; 16(2) : 23-44.
5. Chae HB. Alcoholic Liver Disease. Korean J Gastroenterol, 2009 ; 53(5) : 275-82.
6. Kim HT, Kim DD, Ku SK, Kim JW, Lim MK, Oh TH, Lee KW. Therapeutic Effects of Hovenia Dulcis Thunb Extract on CCl₄ Induced Liver and Kidney Damage in Rats. J Vet Clin, 2011 ; 28(1) : 20-7.
7. Kim SM, Kang SH, Ma JY, Kim HJ. A study on the Extraction and Efficacy of Bioactive Compound from *Hovenia dulcis*. Korean J Biotechnol Bioeng, 2006 ; 21(1) : 11-5.
8. Shin DH, Cho MR. The study on Zhi Ju Zi (枳椇子). Kor J Herbology, 2002 ; 17(1) : 81-91.
9. Korea Food & Drug Administration(KFDA). The Korean Herbal Pharmacopoeia, The KFDA Notification 2013-56, 2013 : 331-2.
10. Textbook Compilation Committee of college of Korean Medicine, Herbology. Seoul: Younglim, 1991 : 734.
11. Yoshikawa M, Murakami T, Ueda T, Yoshizumi S, Ninomiya K, Murakami N, Matsuda H, Saito M, Fujii W, Tanaka T, Yamahara J. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, hovenitins I, II, and III, isolated from hoveniae semen seu

- fructus, the seed and fruit of *Hovenia dulcis* THUNB. (Rhamnaceae): inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakugaku Zasshi*. 1997 ; 117(2) : 108-18.
12. Na CS, Chung NC, Yang KH, Kim SH, Chung HS, Dong MS. Hepatoprotective and Blood Alcohol Lowering Effects of Fruit Peduncle Extract of *Hovenia dulcis* var. *Koreana* in the In Vitro and In Vivo Animal Models. *Yakhak Hoeji*. 2004 ; 48(1) : 34-40.
 13. Yoshikawa M, Murakami T, Ueda T, Matsuda H, Yamahara J, Murakami N. Bioactive saponins and glycosides. IV. Four methyl-migrated 16, 17-seco-dammarane triterpene glycosides from Chinese natural medicine, *hoveniae semen seu fructus*, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* THUNB.: Absolute stereostructures and inhibitory activity on histamine release of *hovenidulciosides* A1, A2, B1, and B2. *Chem Pharm Bull*. 1996 ; 44(9) : 1736-43.
 14. Kim OK. Protective Effects of Extracts of *Hovenia dulcis* Thunb on Hepatotoxicity in Carbon Tetrachloride Intoxicated Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2001 ; 30(6) : 1260-5.
 15. Ahn BS, Kim JW, Kim HT, Lee DS, Lee KW. Antioxidant Effects of *Hovenia Dulcis* in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Vet Clin*. 2010 ; 27(4) : 366-73.
 16. Hu W, Lee KB, Wang MH. Antioxidant Activities of Various Extracts of *Hovenia dulcis* Thunb Fruits. *Korean J Plant Res*. 2010 ; 23(3) : 207-13.
 17. Choi JK, Han HS, Lee YJ. Study on Antioxidant Effect of *Hoveniae Semen cum Fructus* and *Hoveniae Ramulus* on Liver Cells Isolated from Oxidatively Stressed Rat. *Kor J Herbology*. 2009 ; 24(3) : 129-38.
 18. Cho JY, Moon JH, Park KH. Isolation and Identification of 3-Methoxy-4-hydroxybenzoic Acid and 3-Methoxy-4-hydroxycinnamic Acid from Hot Water Extracts of *Hovenia dulcis* Thunb and Confirmation of Their Antioxidative and Antimicrobial Activity. *Korean J Food Sci Technol*. 2000 ; 32(6) : 1403-8.
 19. Jeong CH, Shim KH. Some Functional Properties of Extracts from Leaf and Fruit Stalk of *Hovenia dulcis*. *Korean J Postharvest Sci Technol*. 2000 ; 7(3) : 291-6.
 20. An SW, Kim YS, Kim MH, Lee BI, Lee SH, Kwon HI, Hwang B, Lee HY. Comparison of Hepatic Detoxification activity and reducing Serum Alcohol concentration of *Hovenia dulcis* THUNB and *Alnus japonica* Steud. *Korean J Medicinal Crop Sci*. 1999 ; 7(4) : 263-8.
 21. Lee MK, Kim YG, An SW, Kim MH, Lee JH, Lee HY. Biological activities of *Hovenia dulcis* THUNB. *Korean J Medicinal Crop Sci*. 1999 ; 7(3) : 185-92.
 22. Hong YL, Kim MH, Ahn C, Lee HY, Kim JD. Studies on the biological activities of the extracts from *Hovenia dulcis* Thunb. *J Agr Sci* 2000 ; 11 : 1-11.
 23. Ji Y, Chen S, Zhang K, Wang W. Effects of *Hovenia dulcis* Thunb on blood sugar and hepatic glycogen in diabetic mice. *Zhong Yao Cai*. 2002 ; 25(3) : 190-1.
 24. Ma JY, Kim SW. Effect of *Hovenia dulcis* on liver protection in SD male rats treated with CCl₄. *Kor J Ori Med*. 2006 ; 12(1) : 103-9.
 25. Kim JH, Seo YM, Kim JH, Hyun SH, Lee SK, Kim CH, Kang MJ, Jeon TW, Yoon SH, Jeong TC. Protective Effects of the Water Extracts of *Hovenia dulcis* Thunb Against Ethanol-Induced Toxicity in Primary Cultured Rat Hepatocytes. *Yakhak Hoeji*. 2008 ; 52(1) : 56-61.
 26. You YH, Jung KY, Lee YH, Jun WJ, Lee BY. Hepatoprotective Effects of *Hovenia dulcis* Fruit on Ethanol-Induced Liver Damage in vitro and in vivo. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2009 ; 38(2) : 154-9.
 27. Du J, He D, Sun L, Han T, Zhang H, Qin L, Rahman K. Semen *Hoveniae* extract protects against acute alcohol-induced liver injury in mice. *Pharm Biol*. 2010 ; 48(8) : 953-8.
 28. Hase K, Ohsugi M, Xiong Q, Basnet P, Kadota S, Namba T. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* THUNB. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Biol Pharm Bull*. 1997 ; 20(4) : 381-5.
 29. Fang H, Lin H, Chan M, Lin W, Lin W. Treatment of chronic liver injuries in mice by oral administration of ethanolic extract of the fruit of *Hovenia dulcis*. *Am J Chin Med*. 2007 ; 35(4) : 693-703.
 30. Zhao J, Chen H, Li Y. Protective effect of bicyclol on acute alcohol-induced liver injury in mice. *Eur J Pharmacol*. 2008 ; 586(1-3) : 322-31.
 31. Lieber CS, DeCarli LM. The feeding of ethanol in liquid diet. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986 ; 10(5) : 550-3.
 32. Zimmerman HJ. The spectrum of hepatotoxicity. *Perspect Biol Med*. 1968; 12(1) : 135-61.
 33. Kim JH, Jang SW, Kweon JW, Kim WB, Choi YW. Improved Dissolution Characteristics of Silymarin and Their Bioavailability in Rats. *J Kor Pharm Sci*. 2003 ; 33(1) : 61-5.
 34. Lee HC, Hwang SG, Kang YK, Sohn HO, Moon

- JY, Lim HB, Jeon BH, Lee DW. Influence of *Protactia brevitarsis* Extract on Liver Damage Induced by Carbon Tetrachloride and Ethanol in Rats. *J Life Sci.* 2001 ; 11(5) : 405-14.
35. Tuma J, Casey CA. Dangerous byproducts of alcohol breakdown—focus on adducts. *Alcohol Res Health.* 2003 ; 27(4) : 285-90.
36. Zimmerman HJ, Seeff LB. Enzymes in hepatic disease. In: Goodly, E.L. (Ed.), *Diagnostic Enzymology.* Philadelphia: Lea & Febiger. 1970 : 1-38.
37. Molander DW, Wroblewski F, La Due JS. Transaminase compared with cholinesterase and alkaline phosphatase an index of hepatocellular integrity. *Clin Res Proc.* 1955 ; 3 : 20-4.
38. Kim YJ. Interpretation of Liver Function Tests. *Korean J Gastroenterol.* 2008 ; 51(4) : 219-24.
39. Szasz G. A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl transpeptidase. *Clin Chem.* 1969 ; 15(2) : 124-36.
40. Selinger MJ, Matloff DS, Kaplan MM. γ -Glutamyl transpeptidase activity in liver disease: serum elevation is independent of hepatic GGTP activity. *Clin Chim Acta.* 1982 ; 125(3) : 283-90.
41. Lee HH, Yoon JS, Song SY. Protective Effect of *Lithospermum erythrorhizon* on Galactosamine Induced Liver Injury. *Korean J Microscopy.* 2010 ; 40(1) : 29-35.
42. Barouki R, Chobert M, Finidori J, Aggerbeck M, Nalpas B, Hanoune J. Ethanol Effects in a Rat Hepatoma Cell Line: Induction of γ -Glutamyltransferase. *Hepatology.* 1983 ; 3(3) : 323-9.
43. Friedman SL. Acetaldehyde and alcoholic fibrogenesis: fuel to the fire, but not the spark. *Hepatology.* 1990 ; 12(3) : 609-12.
44. Yates WR, Petty F, Brown K. Risk factors for alcohol hepatotoxicity among male alcoholics. *Drug Alcohol Depend.* 1987 ; 20(2) : 155-62.
45. Gjerde H, Amundsen A, SKOG O, Mørland J, Aasland O. Serum Gamma-glutamyltransferase: an epidemiological indicator of alcohol consumption? *Br J Addict.* 1987 ; 82(9) : 1027-31.
46. Persson J, Magnusson PH. Comparison between different methods of detecting patients with excessive consumption of alcohol. *Acta Med Scand.* 1988 ; 223(2) : 101-9.
47. Choi K, Kim BI, Cho YK, Park CY, Sohn JI, Jeon WK, Kim H, Chung ES, Keum DG, Lee HY, Lee SJ. Diagnostic usefulness of serum γ -glutamyl transferase(GGT) activity in fatty liver and relationship with other factors. *Korean J Med.* 1999 ; 57(6) : 1006-13.
48. Cho MK, Choi TS. The study of the spontaneous recovery time in acute hepatitis induced by CCl_4 in three mouse strains. *Korean J Lab Anim Sci.* 2004 ; 20(1) : 104-8.
49. Kim IS, Kim JW, Kim HT, Lee SD, Ku SK, Do YJ, Lee KW. Effects of *Epimedium Koreanum* Extract on the Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage and Its Related Organ Damages in Rats. *J Vet Clin.* 2011 ; 28(4) : 357-64.
50. Brown R, Miller J, Miller E. The metabolism of methylated aminoazo dyes IV. Dietary factors enhancing demethylation in vitro. *J Biol Chem.* 1954 ; 209(1) : 211-22.
51. Cignoli EV, Castro JA. Lipid peroxidation, necrosis and the in vivo depression of liver glucose 6-phosphatase by carbon tetrachloride. *Exp Mol Pathol.* 1971 ; 14(1) : 43-56.