

영양각산이 Thioacetamide 유발 간손상에 미치는 영향

신미래^{1#}, 김정조¹, 김수현¹, 이지혜¹, 권오준², 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 경북지역사업평가단

Effect of Youngyanggak-san against Thioacetamide Induced Acute Liver Damage in Rat

Mi-Rae Shin^{1#}, Kyeong Jo Kim¹, Soo Hyun Kim¹, Ji-Hye Lee¹, O Jun Kwon², Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbol, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

2 : Gyeongbuk Institute for Regional Program Evaluation, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The current study is to evaluate the hepatoprotective effect of youngyanggak-san (YGS) on thioacetamide (TAA)-induced acute liver injury in rats.

Methods : YGS is composed of Glycyrrhizae Radix, Asiasari Radix, Cimicifugae Rhizoma, Saigae Tataricae Cornu. While N-YGS (non-youngyanggak-san) doesn't include Saigae Tataricae Cornu. Two samples were administrated TAA together for 3 days. Thirty-six rats were divided into four groups. Rats except for the normal group were received TAA (200 mg/kg of body weight, I,P) were divided into three groups (n=9/group) : Group 1 (TAA only), Group 2 (TAA + 200 mg/kg YGS) and Group 3 (TAA + 200 mg/kg N-YGS). Acute liver damage confirmed using histological examination. The factors associated with oxidative stress and liver function activity measured in serum. Also, expressions of inflammation related proteins were investigated by western blot analysis.

Results : Oxidative stress factors such as ROS and ONOO⁻ in the Group 2 was manifested by a significant rise compared with Group 1. YGS markedly decreased the elevated ROS and ONOO⁻. Furthermore, YGS significantly reduced the levels of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) The nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation induced by TAA led to increase both inflammatory mediators and cytokines. While YGS administration remarkably suppressed such the overexpression. In addition, the histopathological analysis showed that the liver tissue lesions were improved obviously in YGS treatment.

Conclusion : YGS provided a hepatoprotective effect on acute liver damage through the suppression of oxidative stress. Especially, this effect enhanced markedly when Saigae Tataricae Cornu is included.

Key words : Acute liver damage, Youngyanggak-san, Thioacetamide, Oxidative stress, Anti-inflammatory

I. 서 론

2016년 통계청에서 발표한 국내 사망원인 통계에 따르면 10대 사망원인 중에서 간질환이 8위를 차지하고 있으며 남자의 사망률은 20.2%로 여자의 사망률보다 13.8% 높게 나타났다¹⁾. 현대인들은 불규칙한 식사, 스트레스, 피로, 영양섭취의 불균형,

음주 등으로 면역력이 상실하게 되고, 특히 이는 독성물질로부터 신체를 보호해야하는 간기능이 손상되어 만성간염, 간경변 및 간암 등으로 진행하게 되며 현대인들에게 큰 위협을 주고 있다. 특히 간질환 중 급성간손상은 신체의 해독 대사 과정의 기능적 오류를 유발하여 신경 행동 및 기능 합병증이 뒤따르게 된다^{2,3)}.

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2350 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Mi-Rae Shin, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : with750@naver.com

· Received : 12 December 2017 · Revised : 20 December 2017 · Accepted : 15 January 2018

현재 산화적 스트레스 상태에서 야기되어지는 자유라디칼에 대한 연구에 관심이 모아지고 있다. 염증단계에서는 상처 부위로 유주한 호중구나 대식세포에서 자유 라디칼을 분비하게 되는데 이는 상처 부위에 존재하는 박테리아를 제거함으로써 감염을 방지하고 세포내 신호 전달의 중요한 역할을 수행하지만 과도하게 생성될 경우 산화적 스트레스가 발생하기 때문에 자유라디칼은 조직손상 및 병리학적 염증 진행에 결정적인 역할을 하고 있는 것으로 보고가 되고 있다. 활성산소종 (Reactive oxygen species; ROS)은 세포의 정상적인 물질대사에서 생성되는 산소의 환원 대사물로 세포 내 대사의 균형이 깨지게 되면 과잉으로 생성된다. 세포 내 과도하게 증가된 ROS는 세포자멸사를 증가시키며 이는 DNA, 단백질, 지질과 반응하여 급·만성 간질환을 포함한 암, 동맥경화, 당뇨, 신경퇴화 등 다양한 질병의 요인으로 간주된다. 따라서 세포 내 활성산소종의 억제에는 관련 질환을 치료하는데 있어서 중요한 기전으로 판단되어진다⁴⁾.

영양각산(羚羊角散)은 영양각(羚羊角, Saigae Tataricae Cornu), 승마(升麻, Cimicifugae Rhizoma), 세신(細辛, Asiasari Radix), 감초(甘草, Glycyrrhizae Radix)로 구성된 東醫寶鑑의 처방으로, 간열(肝熱)과 폐풍(肺風)으로 인해 발생하는 빙에내장(氷翳內障) 등을 치료하는데 사용되는 처방이다⁵⁾. 군약(君藥)인 영양각은 새가영양(賽加羚羊, Saiga tatarica L.)의 뿔을 건조한 것으로, 성미(性味)는 寒鹹하고 肝, 心經으로 귀경하며, 평간식풍(平肝息風), 청간명목(淸肝明目), 청열해독(淸熱解毒)의 효능이 있어 고열경간(高熱驚癇), 자간(子癇), 두통현훈(頭痛眩暈), 목적예장(目赤翳障) 등의 질환에 사용되는 본초이다. '본초강목(本草綱目)'에 영양각은 "羚羊角, 入厥陰肝經, 肝開竅於目, 其發病也, 目暗障翳, 而羚羊角能平之."로 언급되어있고, 방약합편(方藥合編)⁶⁾에서는 "羚羊角寒明目 淸肝解毒且却驚"로 설명하고 있다. 최근 강⁷⁾ 실험을 통해 영양각이 자유라디칼에 의해 야기된 신경독성에 보호 효과를 가짐이 밝혀졌다. 승마(升麻)는 肺, 脾, 胃, 大腸經으로 귀경하고 微寒, 辛微甘한 성미로, 발표(發表)와 더불어 청열해독(淸熱解毒)의 작용이 있으며, 효과적인 항산화작용이 있어 산화적 손상으로부터 DNA나 지질을 보호할 수 있음이 보고되었다^{8,9)}. 세신(細辛)은 辛溫한 성미로 心, 肺, 腎經으로 귀경하며 거풍산한(祛風散寒), 통규지통(通竅止痛), 온폐화음(溫肺化飲)의 효능이 있으며, 다양한 통증 및 염증을 억제하는데 효과가 있다^{10,11)}. 감초(甘草)는 성미가 平甘하고 心, 肺, 脾, 胃經으로 귀경하며 方中에서 조화약(調和藥)으로 작용한다. 감초는 활성성분 중의 하나인 Glycyrrhizin을 4-13%를 함유하고 있으며 간보호 효과가 우수한 것으로 보고되어 있다^{12,13)}.

이들 4가지 약재 중 영양각은 방제의 君藥이자 유일하게 肝으로 귀경하므로 영양각산의 간질환에서의 효과가 영양각에서 비롯되었을 것으로 판단하여, 영양각산(youngyanggak-san; YGS)과 영양각산去영양각(non-youngyanggak-san; N-YGS)을 가지고 Thioacetamide로 유발한 급성간손상 모델에서 영양각산의 간보호 효과 및 그 기전에 대하여 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

생후 6주령의 Sprague-Dawley (SD) 체중 200 g 내외의 흰쥐 (나라바이오텍, 서울)를 구매하여, 물과 고형사료 (조단백질 22.1% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조지방 8.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 인 0.4% 이상, 칼슘 0.6% 이상, 항생제 무첨가, 삼양사)를 충분히 공급하며 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암주기는 12시간 주기로 조절하였다. 실험은 대구한의대학교 동물 실험윤리위원회의 승인 (DHU2017-076)을 얻어 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다.

2. 시료 추출



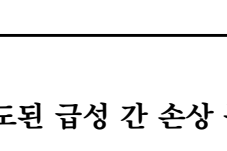
본 실험에 사용한 甘草(중국산), 細辛(중국산), 升麻(중국산), 羚羊角(중국산)은 웅기한약국(대구, 한국)에서 구입한 것을 생약 규격집에 맞추어 약전규격에 적합한 것만을 정선하여 사용하였다. Youngyanggak-san (YGS)는 총 분량 52.5 g에 10배수의 증류수 525 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 감압 추출장치로 농축한 후 동결 건조기를 이용하여 완전 건조시켜 6.8 g의 파우더를 얻었다 (수율 13%). Non-youngyanggak-san (N-YGS)는 간으로 귀경하는 약재인 羚羊角을 제외한 뒤 총 분량 75 g에 10배수의 증류수 750 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 감압 추출장치로 농축한 후 동결 건조기를 이용하여 완전 건조시켜 24 g의 파우더를 얻었으며 (수율 32%) YGS와 N-YGS 파우더는 냉동(-80°C) 보관한 후 실험 직전에 녹여 실험에 사용하였다 (Table 1).

3. 시약

본 실험에 사용된 Thioacetamide (TAA), potassium persulfate, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), dithiothreitol (DTT)는 Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 ECL Western Blotting Detection Reagents는 GE Healthcare (Arlington Height, IL, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Phospho-I κ B α (p-I κ B α), nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ Bp65)cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), β -actin, histone와 2차 항체인 Rabbit IgG antibody, Mouse IgG antibody는 GeneTex, Inc. (GeneTex, San Antonio, TX, USA)에서 구입하여 사용하였다. 단백질 정량을 위한 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였으며 protease inhibitor mixture, ethylenediaminetetraacetic acid

(EDTA), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) assay kit는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다.

Table 1. Composition of Youngyanggak-san and Non-youngyanggak-san

Youngyanggak-san (YGS)			Non-youngyanggak-san (N-YGS)	
Herbal name	Amount (g)		Herbal name	Amount (g)
甘草	7.5		甘草	15
細辛	15		細辛	30
升麻	15		升麻	30
羚羊角	15			
Total	52.5			75

4. TAA로 유도된 급성 간 손상 동물모델

실험군은 정상군 (Normal), 대조군 (Vehicle), 영양각산 추출물을 200 mg/kg/day로 투여한 군 (YGS), 영양각산추출물 양각 추출물을 200 mg/kg/day로 투여한 군 (N-YGS)으로 각 군별로 9마리씩 4군으로 나누는 뒤 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 모든 쥐는 일정한 시간에 1회/1일 체중을 측정하였으며, 정상군을 제외한 나머지 군은 1회/1일 3일 동안 TAA (200 mg/kg/day)를 복강투여 하였으며¹⁴⁾, 약물처리군은 YGS 또는 N-YGS를 200 mg/kg/day로 3일간 경구 투여 하였다. 실험종료 당일 마취 후 복대정맥에서 혈액을 채취하여 4,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심 분리 후 -80℃ 냉동고에 보관하였고, 실험동물의 간 조직은 즉시 적출하여 -80℃에 보관하였다.

5 산화적 스트레스 바이오마커 측정

Reactive Oxygen Species (ROS) 측정은 Kooy의 방법을 시행하였다¹⁵⁾. 혈청과 25 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 0분부터 매 5분씩

35분간 emission 파장 530 nm와 excitation 파장 485 nm를 이용하여 30분간 측정하여 산출된 값을 계산하였다. ONOO⁻는 각 샘플을 pH 7.4의 rhodamine buffer와 5 mM DHR123과 섞은 후 5분간 37℃에서 흔들어 준 후 5분씩 30분간 emission wavelength 535 nm와 excitation wavelength 480 nm를 이용하여 측정하여 산출된 값을 계산하였다.

6. 혈중 Ammonia 분석

TAA는 간세포에 cytotoxic한 물질로, 심한 간손상을 유발하게 되고, 간에서 해독해야 할 암모니아가 상승하기에 간에서 분해를 못하게 되고, 이는 혈중의 암모니아 농도를 올라가게 하는 요인이 된다. 혈중 암모니아 측정은 ammonia assay kit (Abcam, Cambridge, UK)의 프로토콜에 따라 측정하였다.

7. 간 손상 지표 분석

혈청의 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)는 assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)의 프로토콜에 따라 측정하였다.

8. 조직 Western blotting

간의 세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (BioSpec Product, Oklahoma, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 헹구고 100 μl의 buffer C (50 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재부유 시킨 뒤 10분마다 vortex를 3번 하였다. 4℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80℃에서 각각 냉동 보관하였다. 간 조직 세포질의 β-actin, TNF-α, IL-6, COX-2, iNOS, p-IκBα와 세포핵의 histone, NF-κBp65 단백질을 발현을 측정하기 위하여 9 μg의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4℃에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체 (1:1000)에 사용되는 2차 항체 (1:3000)를 사용하여 상온에서 1시간 30분 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co. Ltd, Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)프로그램을 사용하여 정량하였다.

9. 조직학적 관찰

간 조직을 10% neutral buffered formalin에 24시간 동안 고정시킨 다음 graded alcohol로 탈수시키고, 파라핀으로 포매하여 block을 제작한 다음 microtome으로 4 mm 두께의 조직 절편을 제작하여 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 시행한 뒤 xylene clearing을 거쳐 permount로 처리한 후 광학현미경 위에서 특이 병변의 유무를 관찰하였다.

10. 통계분석

모든 수치는 평균과 표준오차로 표시하였으며, SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하여 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 p -value < 0.05에서 검증하였다.

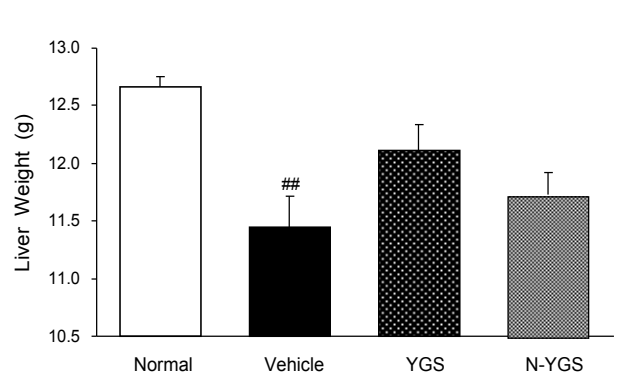
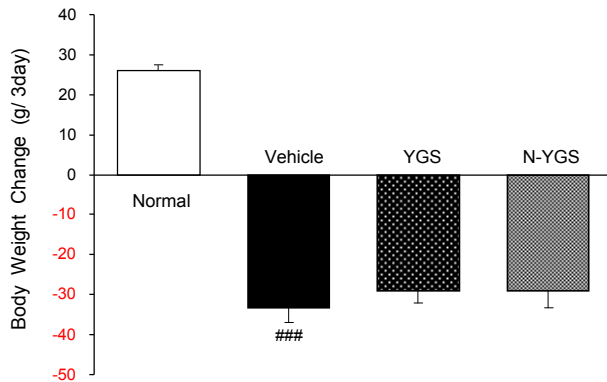


Fig. 1. Body weight change (g) and Liver weight (g) Vehicle, TAA-induced control rat; YGS, TAA-induced with Youngyanggak-san 200 mg/kg body weight rat; N-YGS, TAA-induced with Non-youngyanggak-san 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SEM, $n=7$ rat per group. Significance: ### $p < 0.001$ vs. normal rat

2. 혈중 암모니아 및 간 손상 지표 분석

분리한 혈청을 이용하여 혈중 Ammonia와 간 손상 지표인 ALT 및 AST를 측정하였다. 혈중 Ammonia 농도 측정 결과, 정상군 ($3.87 \pm 0.10 \mu\text{mol}/\mu\text{l}$)에 비하여 대조군 (6.75 ± 0.44)은 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.001$). 상승된 Ammonia는 YGS 처리군 (2.98 ± 0.29)과 N-YGS 처리군 (4.56 ± 0.46) 둘 다에서 유의성 있게 감소를 나타내었으며 YGS 처리군이 N-YGS 처리군보다 효과적으로 Ammonia가 감소하는 것을 보여주었다 (Fig. 2A). 간 손상 지표인 ALT 및 AST를 측정 하였다. ALT 측정 결과, 정상군 ($6.3 \pm 0.2 \text{ IU/L}$)에 비하여 대조군 (49.7 ± 8.3)은 유의성 있게 증가하였고 ($p < 0.001$), YGS 처리군 (15.0 ± 1.8)과 N-YGS 처리군 (23.5 ± 2.4)은 유의성 있게 감소하는 모습을 보였다 ($p < 0.001, p < 0.05, \text{reps.}$). AST 측정 결과, 정상군 ($67.8 \pm 2.2 \text{ IU/L}$)에 비하여 대조군 (307.5 ± 60.1)은 유의성 있게 증가하였고 ($p < 0.001$), YGS 처리군 (65.3 ± 7.9)과 N-YGS 처리군 (112.7 ± 12.2) 둘 다에서 유의성 있게 감

III. 결 과

1. 체중변화 및 절대적 간 중량 분석

실험기간동안 체중변화는 정상군 ($25.9 \pm 1.1 \text{ g}$)은 체중의 증가를 보였으나 TAA 대조군 ($-33.3 \pm 3.5 \text{ g}$)은 정상군에 비해 유의적인 체중감소를 보였다 ($p < 0.001$). 반면 YGS 처리군 ($-29.0 \pm 2.9 \text{ g}$)과 N-YGS 처리군 ($-29.1 \pm 4.1 \text{ g}$)은 TAA 대조군에 비해 체중감소가 억제되는 경향을 보였으나 유의적으로 높은 값을 보이지는 않았다. 또한 절대적 간 중량은 정상군 ($12.67 \pm 0.08 \text{ g}$)에 비해 TAA 대조군 ($11.45 \pm 0.27 \text{ g}$)에서 유의적으로 낮은 값을 보였으며 ($p < 0.01$) YGS 처리군 ($12.11 \pm 0.23 \text{ g}$)과 N-YGS 처리군 ($11.73 \pm 0.19 \text{ g}$)는 TAA 대조군에 비해 약간 높은 경향을 보이기는 하였으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다. YGS 처리군은 N-YGS 처리군에 비해 절대적 중량이 3.2% 증가하였다 (Figure 1).

소하였다 ($p < 0.01, p < 0.05, \text{reps.}$), (Fig. 2B-C).

3. 혈청 내 ROS 및 ONOO- 측정

ROS의 측정 결과, 정상군 ($14.9 \pm 1.8 \text{ fluorescence/min/ml}$)에 비하여 대조군 (359.6 ± 89.9)은 유의성 있게 증가하였으며 ($p < 0.001$), YGS 처리군 (87.5 ± 9.5)과 N-YGS 처리군 (122.3 ± 21.0) 둘 다에서 유의성 있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.01, p < 0.05, \text{resp.}$). 하지만 YGS 처리군이 N-YGS 처리군에 비해 ROS 함량이 감소하여 이는 YGS 처리군이 N-YGS 처리군보다 산화적 스트레스를 억제하는 것으로 나타내었다 (Fig. 3A).

ONOO⁻ 측정 결과, 정상군 ($30319 \pm 73.2 \text{ fluorescence/ml}$)에 비하여 대조군 (35579 ± 1532.0)은 유의성 있게 증가하였으며 ($p < 0.01$), YGS 처리군 (30573 ± 233.2)과 N-YGS 처리군 (311159 ± 523.4) 둘 다 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.01, p < 0.05, \text{resp.}$) (Fig. 3B).

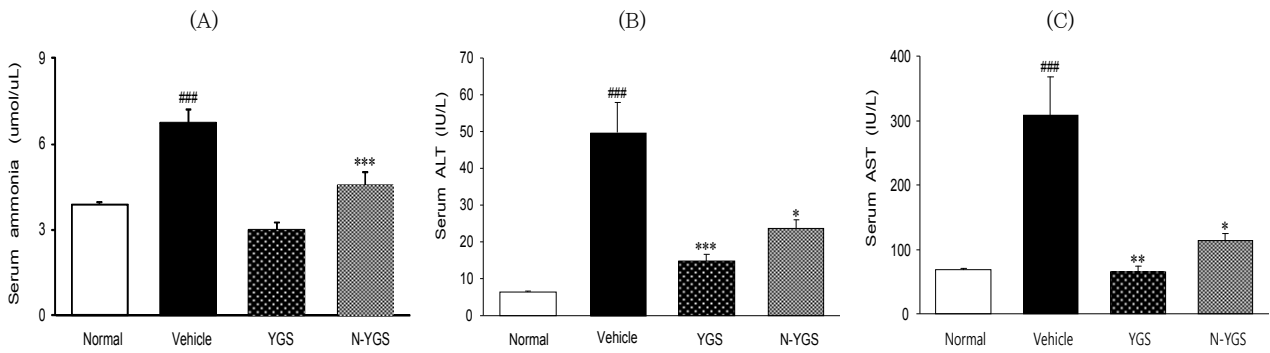


Fig. 2. Ammonia concentration, ALT and AST in serum. Serum ammonia concentration (A), Serum ALT level (B), Serum AST level (C) Vehicle, TAA-induced control rat; YGS, TAA-induced with Younggyanggak-san 200 mg/kg body weight rat; N-YGS, TAA-induced with Non-younggyanggak-san 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SEM, n=7 rat per group. Significance: ### $p < 0.001$ vs. normal rat, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. TAA-induced control rat.

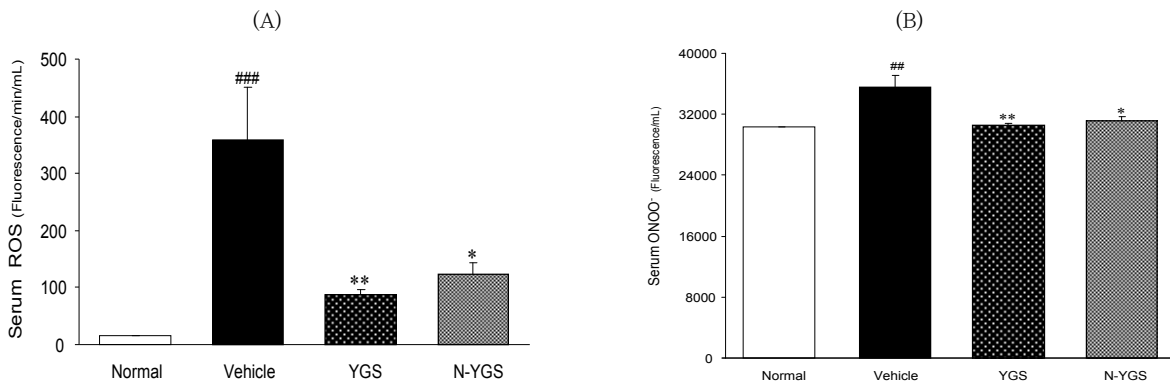


Fig. 3. Oxidative stress biomarkers in serum. Serum ROS level (A), serum ONOO⁻ level (B). Vehicle, TAA-induced control rat; YGS, TAA-induced with Younggyanggak-san 200 mg/kg body weight rat; N-YGS, TAA-induced with Non-younggyanggak-san 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SEM, n=7 rat per group. Significance: ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. normal rat, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. TAA-induced control rat.

4. 간 조직의 염증인자 발현

간 조직에서 western blot을 실시하여 염증성 매개인자인 p-I κ B α 와 NF- κ Bp65의 발현을 확인하였다. 그 결과 p-I κ B α 는 정상군 (1.00 \pm 0.08)에 비하여 대조군 (1.18 \pm 0.17)은 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). YGS 처치군 (0.93 \pm 0.20)은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고 ($p < 0.05$), N-YGS 처치군 (1.12 \pm 0.19)은 감소하는 경향을 나타냈다 (Fig. 4A).

NF- κ Bp65의 단백질 발현은 정상군 (1.00 \pm 0.27)에 비하여 대조군 (3.62 \pm 1.08)은 유의성 있게 증가하였고 ($p < 0.001$), YGS 처치군 (1.59 \pm 0.40), N-YGS 처치군 (1.90 \pm 0.25)은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하는 모습을 나타냈다 ($p < 0.001$, $p < 0.01$, resp.) (Fig. 4B).

염증성 매개인자인 COX-2, iNOS 그리고 염증성 싸이토카인인 TNF- α , IL-6의 발현량을 측정된 결과, COX-2의 경우 정상군 (1.00 \pm 0.13)에 비하여 대조군 (1.18 \pm 0.08)은 유의성 있게 증가하였고 ($p < 0.01$), YGS 처치군 (0.75 \pm 0.19),

N-YGS 처치군 (0.82 \pm 0.20)은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하는 모습을 나타냈다 ($p < 0.001$) (Fig. 5A). iNOS는 정상군 (1.00 \pm 0.10)에 비하여 대조군 (1.44 \pm 0.31)은 유의성 있게 증가하였고 ($p < 0.01$), YGS 처치군 (0.94 \pm 0.40), N-YGS 처치군 (0.98 \pm 0.21)은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하는 모습을 나타냈다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, resp.) (Fig. 5A). TNF- α 의 발현량은 대조군 (1.60 \pm 0.21)은 정상군 (1.00 \pm 0.11)에 비하여 유의성 있게 증가하였으며 ($p < 0.001$), YGS 처치군 (0.91 \pm 0.28)과 N-YGS 처치군 (1.12 \pm 0.41)에서는 대조군에 비하여 유의하게 감소하는 모습을 보였다 ($p < 0.001$, $p < 0.05$, resp.) (Fig. 5B). IL-6의 단백질 발현은 정상군 (1.00 \pm 0.13)에 비하여 대조군 (1.34 \pm 0.22)은 유의성 있게 증가하였으며 ($p < 0.01$), YGS 처치군 (0.88 \pm 0.28)과 N-YGS 처치군 (0.95 \pm 0.21)에서는 대조군에 비하여 유의하게 감소하는 모습을 보였다 ($p < 0.01$) (Fig. 5B).

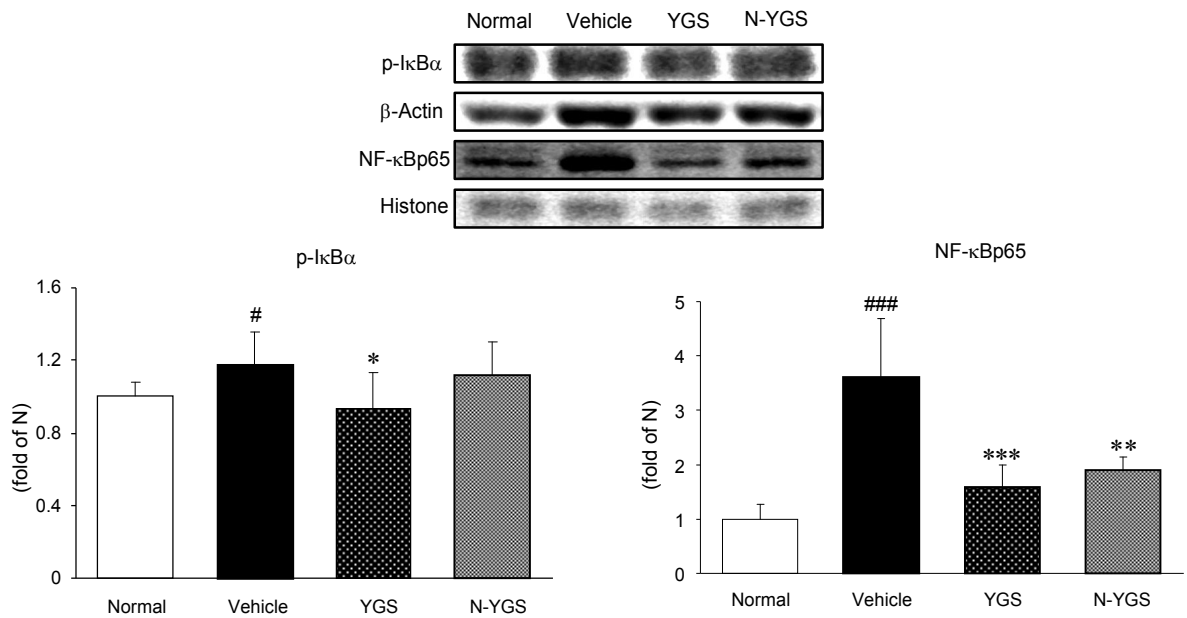


Fig. 4. Expression inflammation-related proteins in liver. Inflammation-related proteins p-IkBα; (A), NF-κBp65; (B). Vehicle, TAA-induced control rat; YGS, TAA-induced with Youngyanggak-san 200 mg/kg body weight rat; N-YGS, TAA-induced with Non-youngyanggak-san 200 mg/kg body weight. All data are expressed means ± SEM, n=7 rat per group. Significance: #*p*<0.05, ###*p*<0.001 vs. normal rat, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs. TAA-induced control rat.

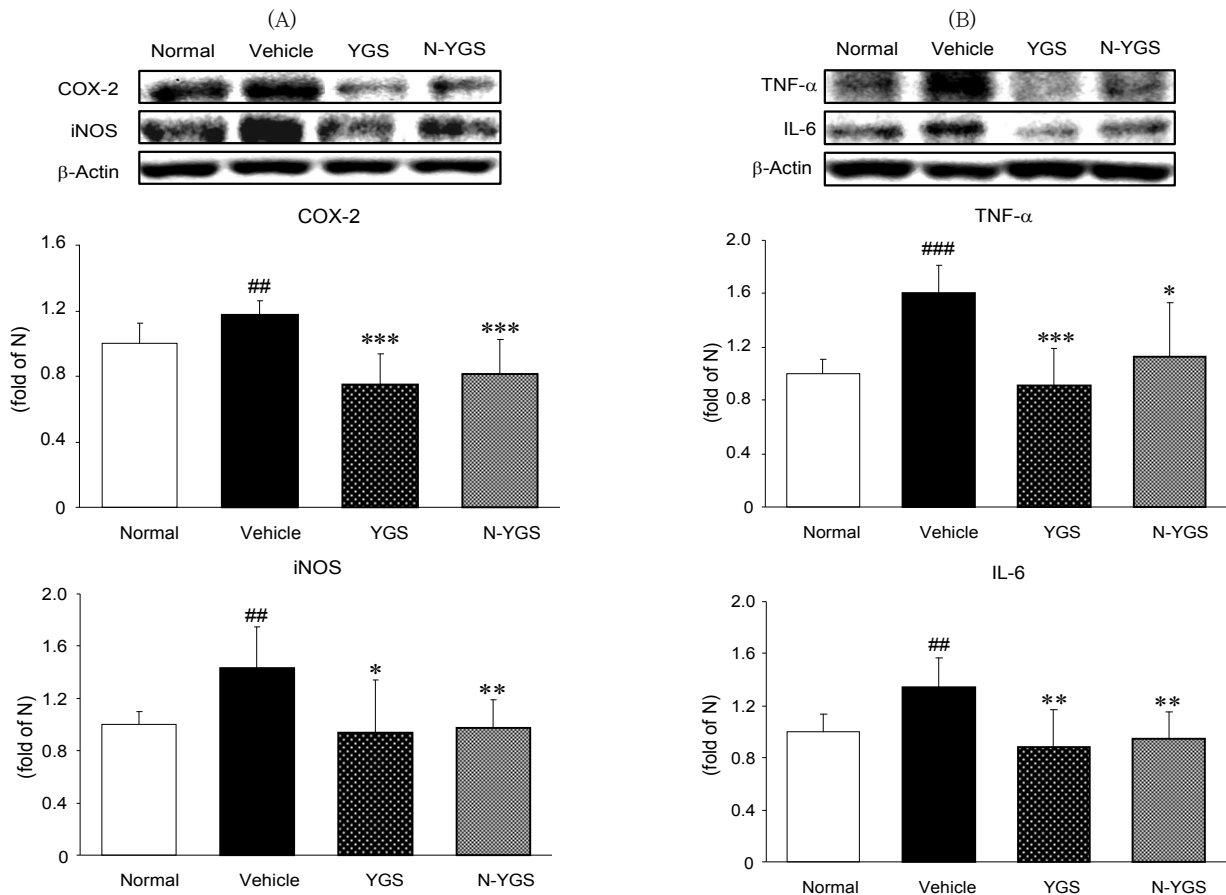


Fig. 5. Expression inflammation-related proteins in liver. Inflammatory mediators COX-2 and iNOS (A), Inflammatory cytokines TNF-α and IL-6 (B). Vehicle, TAA-induced control rat; YGS, TAA-induced with Youngyanggak-san 200 mg/kg body weight rat; N-YGS, TAA-induced with Non-youngyanggak-san 200 mg/kg body weight. All data are expressed means ± SEM, n=7 rat per group. Significance: ##*p*<0.01, ###*p*<0.001 vs. normal rat, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs. TAA-induced control rat.

5. 간 조직학적 분석

부검 후, 적출한 간 조직에 H&E염색을 한 다음, 광학 현미경을 이용하여 관찰한 결과, 정상군 (A)에 비하여 대조군 (B)에서는 TAA에 의한 간 손상 병변 정도와 염증세포 침윤 정도가 늘어남을 관찰할 수 있었으며 TH 투여군 (C)에서는 대조군에 비하여 염증세포 침윤 정도가 크게 감소한 모습을 관찰할 수 있었다. GTH 투여군 (D)에서는 TH 투여군에 비하여 간손상 완화 정도가 뚜렷하지 않았다 (Fig. 6).

TAA에 의한 간세포 손상을 조직병리학적으로 분석해보면, 정상군에서 관찰되는 간세포의 모습과는 달리 TAA를 주사한 쥐에서는 광범위한 간세포의 necrosis 및 hypertrophy가 관찰되었으나 YGS 처치군이 N-YGS 처치군보다 염증성 병변을 현저하게 완화시켜주었다.

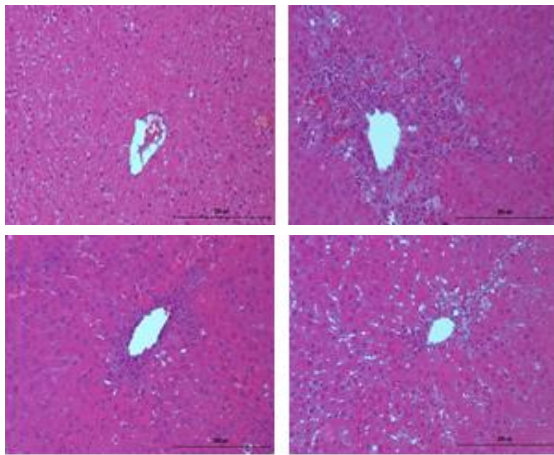


Fig. 6. Histopathological analysis. Liver tissues were stained with H&E (Original magnification $\times 200$). Vehicle, TAA-induced control rat; YGS, TAA-induced with Youngyanggak-san 200 mg/kg body weight rat; N-YGS, TAA-induced with Non-youngyanggak-san 200 mg/kg body weight.

IV. 고 찰

간은 약물이거나 이물질을 대사적으로 제거하는데 가장 중요한 역할을 수행하는 장기이다. 따라서 여러 화학물질들에 의해 손상을 쉽게 받을 수 있는 주요 표적 장기라고 할 수 있다. 산화적 스트레스 (oxidative stress)란 생체의 산화·환원 작용의 이상에 의해 활성산소의 생산과 이에 대한 방어 작용 간의 불균형으로 야기되어진다¹⁶⁾. 자유라디칼이 증가하고 이 자유라디칼을 제거하려는 작용이나 산화적 손상에 대한 복구 작용이 감소할 경우에 발생하게 되며 이는 세포손상의 주요 원인으로 주목받고 있는 활성산소종 (ROS)을 증가시키게 되고 이는 간의 염증, 괴사, 섬유화를 유발시키는 것으로 알려져있다. 활성산소종은 분자 구조 상 가장 바깥쪽에 1 개 이상의 쌍을 이루지 못한 전자들을 가지는 자유라디칼로서 반응성이 높아 여러 가지 생체분자와 결합하고 특히 세포 구성성분인 핵산, 단백질, 지질 등과 반응하는 물질을 말한다. 과도하게 생성된 활성산소종은 정상세포를 공격하여 산화적 스트레스를 유발하고 세포구조의

비가역적 파괴, 투과성 증대로 인한 세포손상을 유발한다¹⁷⁾.

TAA는 thioono-sulfur를 함유하고 있는 유기황화합물로서 1948년 최초로 랫드를 이용한 간독성실험에 이용되었으며¹⁸⁾, 현재는 항진균제, 유기용제, 고무의 가황 촉진제, 연료의 안정제 등으로 사용되고 있다. TAA는 잘 알려진 간독소 물질로 TAA의 급성 또는 만성 노출이 간에 손상, 염증, 경화증, 뇌증 및 심염증을 일으켰다고 보고되어있다^{19,20)}.

이에 본 연구는 산화적 스트레스에 의한 급성 간 손상 동물 모델에서 영양각산의 간보호 효과를 확인하기 위해 영양각산 (YGS)과 간으로 귀경하는 약제인 영양각을 제외한 영양각산 去영양각 (N-YGS)을 경구투여 한 후 산화적 스트레스 개선 효과, 혈액 내 간 손상 지표 물질의 변화, 염증관련 인자 및 조직학적 변화를 관찰하였다.

간 보호 효과를 확인하기 위하여 6주령의 수컷 쥐에 200 mg/kg/day로 3일간 TAA를 복강투여 하여 산화적 스트레스에 의한 급성간손상을 유도하였고, YGS와 N-YGS를 200 mg/kg/day로 3일간 경구투여 한 뒤 부검하여 얻은 혈청 및 간조직을 분석하여 항염증 효과를 평가하였다. TAA는 급성 간질환을 일으키는 독성 물질로 유발된 간 염증으로 인해 간문맥을 통해 운반되어온 암모니아가 간에서 urea로 대사되지 못하여 혈중 암모니아 수치를 올라가게 하는 요인이 된다. 따라서 고암모니아혈증은 급성 또는 만성 간질환의 잘 알려진 합병증이다²¹⁾. 혈중 암모니아 수치를 확인한 결과 정상군에서는 3.87 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ 였으며, TAA 유발 대조군에서는 6.75 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ 로 1.7배 상승한 양상을 보였다. YGS 처치군과 N-YGS 처치군 둘다에서 유의성 있는 감소를 보였지만, YGS 처치군이 N-YGS 처치군보다 더 효과적으로 암모니아를 제거하는 것으로 나타났다. 간 손상 지표로 널리 이용되는 AST와 ALT를 측정하였다. AST (Aspartate Amino Transferase)는 간, 심장, 근육, 신장 (콩팥)에 존재하는 효소로서 이들 조직이 손상되면 혈중으로 유리되어 수치가 올라가며 ALT (Alanineaminotransferase)는 심장이나 간에 이상이 있을 때 혈액 중에서 다량 검출되어 조직의 이상을 진단할 때 임상학적으로 매우 중요한 효소이다. 혈중 AST와 ALT를 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비해 각각 유의한 증가를 나타내었고²²⁾, YGS 처치군은 유의하게 감소되는 것으로 나타나 YGS의 투여는 급성 간 손상에 유효할 것으로 기대된다.

산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS와 ONOO⁻를 측정된 결과 정상군에 비해 대조군은 유의한 증가를 보였으며, 이는 N-YGS보다는 YGS의 투여에 의해 더 효율적으로 억제되어지는 것을 보였다.

산화적 스트레스에 의한 염증반응으로 유발된 TAA 간 손상 동물모델에서의 염증관련 단백질을 분석하기 위하여 p-I κ B α 와 염증 반응의 전사인자인 NF- κ Bp65의 단백질 발현을 측정하였다. NF- κ B는 면역기능과 세포사 등 다양한 세포활동을 조절하는 전사인자로 알려져 있다. NF- κ B의 발현은 염증성 질병이나 암의 발생에 중요한 역할을 하는데 I κ B α 는 이러한 NF- κ B와 결합하여 NF- κ B가 핵 안으로 이동하는 것을 막아 활성을 억제한다²³⁾. 그러나 염증이 심화되면 I κ B α 가 인산화가 되면서 NF- κ B와 분리되게 되고 NF- κ B가 핵 내로 이동하게 된다.

활성화 되어 핵 내로 들어간 NF- κ B는 염증성 매개인자와 염증성 사이토카인을 유도하게 된다²⁴⁾. COX-2는 PGE₂를 형성시켜 염증반응이나 종양생성에 중요한 역할을 하며 iNOS는 NO의 대량 생성에 의해 발현되어 세포내에서 염증매개물질로 작용한다. 인체가 염증성 자극에 노출되면 TNF- α 의 발현이 나타나고, TNF- α 는 각종 염증과 세포독성이 나타난다²⁵⁾. IL-6는 TNF- α 와 함께 T 세포의 분화를 자극하고, 염증반응을 촉진하는 사이토카인으로 알려져 있다. 따라서 염증성 매개인자인 COX-2, iNOS와 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6의 발현량을 확인하였다. YGS와 N-YGS 처치에 따라서 염증관련 단백질이 유의성 있게 억제되었고, 특히 YGS 처치가 N-YGS 처치보다 더 탁월한 감소효과를 나타내었다.

V. 결 론

본 연구에서는 영양각산 (YGS)과 간으로 귀경하는 한약재 羚羊角를 제외한 영양각산去영양각 (N-YGS)을 경구투여하여 급성 간 손상 동물모델에서의 간 보호 효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 영양각산의 경구 투여는 TAA로 유발된 간 손상 동물모델에서 영양각산去영양각의 투여보다도 암모니아를 효과적으로 억제시켰으며 간 손상 지표인 AST 와 ALT를 유의성 있게 감소시켰다.
2. 영양각산의 경구 투여는 산화적 스트레스 관련 인자인 ROS, ONOO- 수치를 영양각산去영양각 처치군보다 효과적으로 감소시켜 간 손상을 개선시킨 것으로 나타났다.
3. 영양각산의 경구 투여는 간 조직 내 p-I κ B α 의 증가로 NF- κ Bp65의 활성을 억제시켰고 이를 통해 염증성 매개인자인 COX-2와 iNOS의 발현을 유의성 있게 감소시켰고, 또한, 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6 분비 또한 유의성 있게 억제시켰다.
4. 영양각산의 경구 투여는 간세포의 necrosis 및 hypertrophy와 같은 염증성 병변을 영양각산去영양각 처치군보다 현저하게 완화시켜주었다.

따라서 급성 간 손상 시 영양각산은 NF- κ B 염증 과정을 억제하여 간 보호 효과를 보이는 것으로 나타났으며 또한, 이는 간으로 귀경하는 한약재인 영양각에 의해 더 우세한 개선 효과를 보이는 것으로 판단되어진다.

감사의 글

이 연구결과는 2016년도 한국한의학연구원에서 시행한 한의 이론과학화사업 (과제번호: K16817)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Korean statistical Information Service, Official Website, Retrieved Dec. 1, 2017, from http://kosis.kr/statisticsList/statisticsListIndex.do?menuId=M_01_01&vwcd=MT_ZTITLE&parmTabId=M_01_01#SelectStatsBoxDiv
2. Ashkani-Esfahani S, Bagheri F, Emami Y, Esmaeilzadeh E, Azarpira N, Hassanabadi N, Keshtkar M, Farjam M, Koohi-Hosseiniabadi O, Noorafshan A. Protective Effects of Co-Enzyme Q10 on Thioacetamide-Induced Acute Liver Damage and Its Correlation With Behavioral, Biochemical, and Pathological Factors. Iran Red Crescent Med J. 2016 ; 18(8) : e29166.
3. Kim OK. Protective Effects of Extracts of Diospyrus kaki Folium against Hepatotoxicity in Carbon Tetrachloride Intoxicated Rats. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2001 ; 30(1) : 97-101.
4. Balboa MA, Balsinde J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. Biochim Biophys Acta. 2006 ; 1761 : 385-391.
5. Korean Traditional Knowledge Portal, Official Website, Retrieved Dec. 1, 2017, from
6. <http://www.koreantk.com/ktkp2014/medicine/medicine-view.view?medCd=M0002585> Hwang DY. Compilation of Formulas and Medicinals Addendum, Namsandang 1998 : 323.
7. Kang GS. Effects of Cornu Saigae Tataricae Extracts on cultured spinal motor neurons damaged by oxygen free radical : Wonkkwang University Graduate School, 2002.
8. Li X, Lin J, Gao Y, Han W, Chen D. Antioxidant activity and mechanism of Rhizoma Cimicifugae. Chem Cent J. 2012; 6(1) : 140.
9. Ryu SY. Efficacy of Prescription and Medicinal Herb of Taeemin in Sasang Constitutional Medicine; Yiksan : Wonkkwang University Graduate School, 2015.
10. Jang JY, Lee JH, Shin HK, Choi YH, Lee JD, Choi BT. Partially purified Asiasari radix inhibits melanogenesis through extracellular signal-regulated kinase signaling in B16F10 cells. Int J Mol Med. 2010 ; 25: 287-292.
11. Oh SM, Kim J, Lee J, Yi JM, Oh DS, Bang OS, Kim NS. Anticancer potential of an ethanol extract of Asiasari radix against HCT-116 human colon cancer cells in vitro. Oncol Lett. 2013 ; 5(1) : 305-310.
12. Rahman S, Sultana S. Chemopreventive activity of glycyrrhizin on lead acetate mediated hepatic oxidative stress and hyperproliferative activity in Wistar rats, Chem-Biol Interact. 2006 ; 160: 61-69.
13. Gumprich E, Dahl R, Devereaux MW, Sokol RJ.

- Licorice compounds glycyrrhizin and 18beta-glycyrrhetic acid are potent modulators of bile acid-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 2005 ; 280(11) : 10556-10563.
14. Luo M, Dong L, Li J, Wang Y, Shang B. Protective effects of pentoxifylline on acute liver injury induced by thioacetamide in rats. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015 ; 8(8) : 8990-8996.
15. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*, 1994 ; 16(2) : 149-156.
16. Wang X, Wu Q, Liu A, Anadón A, Rodríguez JL, Martínez-Larrañaga MR, Yuan Z, Martínez MA. Paracetamol: Overdose-induced oxidative stress toxicity, metabolism, and protective effects of various compounds in vivo and in vitro. *Drug Metab. Rev.* 2017 ; 2 : 1-83.
17. Montuschi P, Barnes P, Roberts LJ. Insights into oxidative stress: the isoprostanes. *Curr Med Chem*, 2007 ; 14 : 703-717.
18. Shashi K, Ramaiah, Udayan Apte, and Harihara M. Mehendale. Cytochrome P4502E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. *Drug metabolism and disposition*, 2001 ; 29(8) : 1088-1095.
19. Kumar G, Sharmila Banu G, Vanitha Pappa P, Sundararajan M, Rajasekara Pandian M. Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. *J Ethnopharmacol*. 2004 ; 92 : 37-40.
20. Okuyama H, Makamura H, Shimahara Y, Uyama N, Kwon YW, Yamaoka N, Yodoi J. Overexpression of thioredoxin prevents thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *J Hepatol*, 2002 ; 42 : 117-123.
21. Brusilow SW. Hyperammonemic encephalopathy. *Medicine*. 2002 ; 81 : 240-249.
22. de David C, Rodrigues G, Bona S, Meurer L, González-Gallego J, Tuñón MJ, Marroni NP. Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicol Pathol*, 2011 ; 39(6) : 949-957.
23. Nafees S, Ahmad ST, Arjumand W, Rashid S, Ali N, Sultana S. Carvacrol ameliorates thioacetamide-induced hepatotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in liver of Wistar rats. *Hum Exp Toxicol*, 2013 ; 32(12) : 1292-1304.
24. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol*, 2000 ; 164(12) : 6509-6519.
25. Jia L, Liu J, Song Z, Pan X, Chen L, Cui X, Wang M. Berberine suppresses amyloid-beta-induced inflammatory response in microglia by inhibiting nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *J Pharm Pharmacol*, 2012 ; 64(10) : 1510-1521.