



Original Article / 원저

사염화탄소 유발 급성 간 손상에 대한 발효 오미자박 및 헛개과병 추출물의 혼합 비율에 따른 간 보호효능

박혜림^{1,2#}, 제갈경환^{3#}, 최범락¹, 김재광^{4*}, 구세광^{2*}

¹뉴트라코어, ²대구한의대학교 한의과대학 해부조직학교실,
³대구한의대학교 한의과대학 원전학교실, ⁴한국한의학연구원 한의기술응용센터

Hepatoprotective effect of fermented Schizandrae Fructus Pomace extract and Hoveniae Semen Cum Fructus extract combination mixtures against carbon tetrachloride-induced acute liver injured mice

Hye-Rim Park^{1,2#}, Kyung Hwan Jegal^{3#}, Beom-Rak Choi¹, Jae Kwang Kim^{4*}, Sae Kwang Ku^{2*}

¹Nutracore Co., Ltd, ²Department of Anatomy and Histology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, ³Department of Korean Medical Classics, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, ⁴Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : Present study investigated the hepatoprotective effects and the optimal mixing ratio of fermented Schizandrae Fructus Pomace (fSFP) and Hoveniae Semen Cum Fructus (HSCF) extract combination in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced acute liver injury mice.

Methods : ICR mice were orally administered with 200 mg/kg of fSFP, HSCF and mixtures of fSFP and HSCF [MSH (w:w); 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 2:1, 4:1, 6:1, and 8:1] for 7 consecutive days. Silymarin (100 mg/kg) was administered as a reference drug. 0.5 mL/kg of CCl₄ was injected intraperitoneally to induce acute liver injury. Body weight gain, relative liver weight, serum chemistry, histopathological analysis, and hepatic endogenous antioxidants capacities were observed.

Results : All diverse combinations of MSH significantly reduced relative liver weight increase by CCl₄. In addition, MSH administrations significantly decreased the elevation of serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities by CCl₄. Histopathological observation indicated that all MSH treatments significantly reduced the increase of degenerated hepatocytes, inflammatory cell infiltration, and histological activity index score by CCl₄. Moreover, all MSH administrations reduced the elevation of malondialdehyde contents, and ameliorated the reduction of hepatic glutathione contents, superoxide dismutase activity, and catalase activity. Among the various mixing ratio of MSH combinations, MSH 1:1 and 2:1 showed the most potent anti-oxidative stress, and hepatoprotective effect.

Conclusion : Present results suggest that 1:1 and 2:1 combinations of MSH is promising herbal formulation with the hepatoprotective effect against oxidative stress.

Key words : Schizandrae Fructus, Hoveniae Semen Cum Fructus, Carbon tetrachloride, Acute liver injury, Herb-herb combination.

I. 서론

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 세포 내의 정상적인 에너지 생성 과정에서 자연 생성되며, 세포의 증식, 분화, 염증반응, 상처 회복, 신호전달 등의 생리적 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 따라서 세포의 생존과 항상성 유지에 있어 ROS의 생성 및 조절은 필수적이며, 인체의 세포는 체내에 생성되는 superoxide radical, hydroxyl radical 등의 과도한 ROS의 축적을 제어하기 위한 항산화 시스템으로써 glutathione(GSH), superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT) 등의 효소 기반 방어체계를 갖추고 있다²⁾. 하지만 생리적 한계치를 초과하여 생성된 ROS는 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하며, 특히 자유라디칼과 세포막 인지질의 주요 구성 성분인 불포화 지방산과의 반응을 통하여 발생하는 지질과산화(lipid peroxidation)는 연쇄적 반응을 통하여 세포 내 세포소기관과 핵산을 파괴하여 세포사멸을 야기하는 등의 비가역적 손상을 초래한다³⁾.

간은 인체의 대사과정에 관여하는 주요 장기로서 에너지 대사, 단백질 및 담즙의 합성, 해독 등의 기능을 수행한다. 특히 간은 알코올, 약제 등의 해독 및 물질대사 과정에서 생성되는 대사체로 인하여 산화적 스트레스에 대한 노출이 빈번하다⁴⁾. 이로 인해 간 조직 내에서 과도하게 생성 및 축적되는 산화적 스트레스는 직접

적으로 간실질세포의 사멸을 일으켜 간 손상을 야기하며, 염증 및 섬유화 반응을 유도하므로 급만성 간질환의 주요한 원인 인자로 알려져 있다⁴⁻⁶⁾. 따라서 간 조직 내 산화적 스트레스의 제어는 급만성 간질환의 예방 및 치료에 있어 필수적이며, 이에 항산화 효능을 나타내는 천연물을 활용한 간 보호 약물의 개발연구가 지속해서 시도되고 있다⁷⁾.

오미자(五味子)는 오미자과(*Schisandraceae*) 오미자나무(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.)의 열매로 한의학에서는 收斂固澁, 益氣生津하는 效能으로 喘咳, 口渴, 自汗, 盜汗, 滑精 등의 치료에 활용되어 왔다⁸⁾. 오미자는 항염증, 항산화, 항암, 항비만, 항바이러스 효과가 등이 보고된 바 있으며, 특히 간질환에 있어 알코올성 지방간, 소포체 스트레스에 대한 보호효과가 보고된 바 있다⁹⁻¹²⁾. 또한 오미자는 식용·약용을 위한 재배 및 가공이 상대적으로 많은 소재로서 가공 오미자 제품의 생산 및 발효 부산물인 착즙 후 박(pomace)의 고부가가치화를 위한 연구가 시도되고 있다. 이에 오미자박의 생물학적 활성 연구로서 항염 효능이 보고된 바 있으며, 오미자박이 오미자 열매와 유사하거나 보다 우수한 항혈전, 항균, 항산화 활성을 나타냄이 제시되었다¹³⁻¹⁵⁾. 헛개과병은 갈매기나무과(*Rhamnaceae*) 헛개나무(*Hovenia dulcis* Thunb.)의 열매로 한의학에서는 지구자(枳椇子)라 불리우며 養陰生津, 補中益氣, 解酒毒하는 효능으로

#These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author: Jae Kwang Kim, Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 70 Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu, 41062, Republic of Korea.

Tel : +82-53-940-3823, Fax : +82-53-940-3899, E-mail : kiriwiry@gmail.com

*Corresponding author: Sae Kwang Ku, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1 Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-819-5149, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : gucci200@hanmail.net

•Received : February 3, 2023 / Revised : February 17, 2023 / Accepted : February 20, 2023

Table 1. The operating conditions of HPLC for schizandrin and myricetin analysis.

Parameter	Schizandrin	Myricetin
Analytical column	CAPCELL PAK C18(MG II), 4.6 × 250 mm, 5 μm	Eclipse Plus C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm
Injection volume	10 μL	20 μL
Column temperature	30 °C	30 °C
Mobile phase	A: water with 0.05% TFA B: acetonitrile	A: water with 0.05% TFA B: acetonitrile
Detector	UV (254 nm)	UV (372 nm)
Flow rate	0.70 mL/min	1.0 mL/min

煩渴, 嘔吐, 飲酒中毒의 치료에 활용되어 왔다⁸⁾. 특히 헛개과병은 주독(酒毒)의 치료에 활용되어온 문헌적 기록에 근거하여 간 보호효능에 대한 연구가 활발히 진행되어, 알코올, 사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl₄), lipopolysaccharide 및 D-galactosamine으로 유발된 간 손상에 대한 보호효능이 연구된 바 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

상기에 기술한 바와 같이 오미자와 헛개과병 각각의 소재는 급만성 간질환의 치료 및 예방에 대한 활용 가능성이 제시된 바 있으나, 발효 오미자박 및 헛개과병의 혼합투여를 활용한 급성 간 손상에 대한 상승적 약리효능의 연구는 제시된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 CCl₄ 투여 유도 간 손상에 대한 발효 오미자박 및 헛개과병 혼합 추출물의 효능 비교를 통하여 급만성 간질환에 대한 발효 오미자박과 헛개과병 혼합 추출물의 간 보호효능 및 최적 혼합 비율을 도출하여 이를 신규 복합 조성물로서 제시하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질 및 재료

발효 오미자박(fermented Schizandrae Fructus Pomace; fSFP, Batch No. fSFP200129) 및 헛개과병(Hoveniae Semen Cum Fructus; HSCF, Batch No. HDF200326) 추출물 분말은 (주)뉴트라코어(Suwon, Korea)로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 지표성분으로써 발효 오미자박 추출물에서의 schizandrin 함량 및 헛개과병 추출물에서의 myricetin 함량을 각각의 실험조건에 따라 high performance liquid chromatography(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)로 확인한 뒤 실험에 사용하였다(Table 1). 표준품을 활용한 성분함량 측정 결과, 발효 오미자박 추출물에서의 schizandrin 함량은 1.2 mg/g,

헛개과병 추출물에서의 myricetin 함량은 0.34 mg/g으로 확인되었다(Figure 1).

9종의 발효 오미자박 추출물 및 헛개과병 추출물 혼합물 MSH(mixture of fSFP and HSCF)[fSFP:HSCF ratio(w:w): 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 2:1, 4:1, 6:1, 8:1]는 각각의 중량 비율에 따라 최종 추출물 질량의 합이 200 mg이 되도록 측정 후, 10 mL의 멸균증류수에 희석하여 최종적으로 20 mg/mL이 되도록 하여 투여에 사용하였다. Myricetin 표준품은 ChromaDex(Irvine, CA, USA)에서 구매하였으며, silymarin, olive oil, CCl₄, hematoxylin-eosin staining solution, schizandrin 표준품 등 실험에 사용된 기타 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다.

2. 실험동물의 체중 및 간 상대중량의 측정

실험동물의 무게를 투여의 시작과 종료 각각에 전자저울(Precisa Instrument, Zürich, Switzerland)을 활용하여 측정하여 증체량(weight gain)을 계산하였으며, 실험 종료 후 획득한 간의 무게를 측정하여 실험동물의 체중으로 나눈 값을 간 상대중량으로 나타내었다.

3. 실험동물의 사육 및 처치

6주령 ICR male 마우스 140수를 (주)오리엔트바이오(Seongnam, Korea)로부터 구입하였으며 1주간 온도 20-25°C, 습도 30-35%의 사육환경에서 순화한 뒤 실험에 사용하였다. 실험군은 vehicle, CCl₄, CCl₄+silymarin, CCl₄+fSFP, CCl₄+HSCF, CCl₄+MSH 1:1, CCl₄+MSH 1:2, CCl₄+MSH 1:4, CCl₄+MSH 1:6, CCl₄+MSH 1:8, CCl₄+MSH 2:1, CCl₄+MSH 4:1, CCl₄+MSH 6:1, CCl₄+MSH 8:1의 총 14군(10

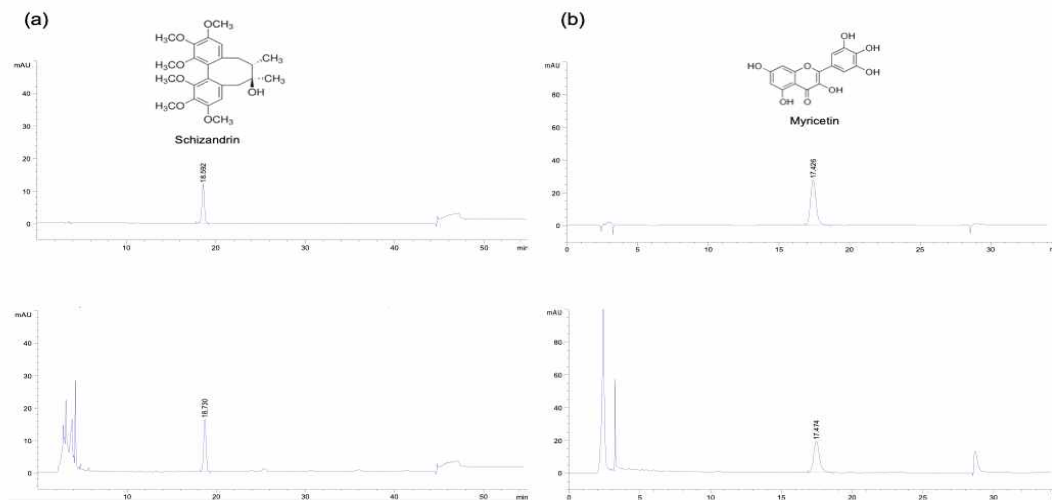


Fig. 1. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis. (a) Schizandrin standard (upper chromatogram), and schizandrin in fermented *Schizandrae Fructus pomace* (fSFP) extract (lower chromatogram), (b) myricetin standard (upper chromatogram), and myricetin in *Hoveniae Semen Cum Fructus* (HSCF) extract (lower chromatogram).

mice/group)으로 구성되었다. 100 mg/kg의 silymarin (양성 대조군) 혹은 200 mg/kg의 fSFP, HSCF 및 이의 비율별 현탁액(MSH)을 7일간 경구 투여하였으며, 급성 간 손상 유발을 위하여 마지막 경구 투여 1시간 뒤 CCl_4 (0.5 mL/kg)를 복강 투여하였다. vehicle 투여의 경우 7일간 시험 물질 대신 동량의 증류수를 경구 투여하였으며, CCl_4 복강 투여 대신 동량의 olive oil을 복강 투여하였다. CCl_4 복강 투여 24시간 후 모든 실험동물을 희생하여 혈액 및 간 조직을 획득하였다. 본 연구의 모든 동물실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)의 승인(DHU2020-068)을 받아 윤리규정을 준수하여 수행되었다.

4. 혈청 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) 활성 측정

마우스 부검시 복대 정맥으로부터 1 mL의 정맥혈을 채취하였으며 원심분리(Labocene 1236 MGR, Gyrozen, Daejeon, Korea)를 통해 혈청을 획득하여, 분석 전까지 -150°C 에 보관하였다. 혈청 내의 ALT, AST 활성은 automated blood analyzer(Model Dri-Chem NX500i, Fuji Medical System, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

5. 조직형태학적 분석

간 조직의 조직형태학적 분석은 기확립된 방법에 따라 분석하였으며^{19,20}, 간략하게 다음과 같이 수행되었다. 마우스 부검시 실험동물 간의 외좌엽(left lateral lobe)을 분리하여 10% neutral buffered formalin에 고정하였다. 이후 파라핀에 포매한 뒤, 3-4 μm 로 절편하여 조직형태학적 관찰을 위해 hematoxylin-eosin으로 염색하였다. 간 조직의 손상 정도를 평가하기 위하여 간 조직의 융합성 괴사(confluent necrosis), 국소 용해성 괴사(focal lytic necrosis), 세포자멸사(apoptosis), 국소성 염증 및 간문맥 염증을 종합적으로 평가하는 modified histological activity index(HAI) grade score²¹)를 활용하였으며, 변성 간실질세포의 수(cells/1,000 hepatocytes), 변성 면적(%/mm²), 침윤된 염증세포의 수(cells/mm²)를 이미지 분석 소프트웨어(Solution FL ver 9.1, IMT Solution; Vancouver, Quebec, Canada)를 이용해 측정하여 제시하였다.

6. 지질과산화 측정

간 조직 내의 지질과산화 정도를 측정하기 위하여 간 균질액 내의 malondialdehyde(MDA) 양을 정량하였다²²). 0.01M Tris-HCl(pH 7.4) 용액 및 bead beater(taco™ Prep, GeneResearch Biotechnology, Taichung, Taiwan)을

이용하여 간 조직을 분쇄한 뒤, 원심분리(12,000 ×g, 15 min)를 통하여 얻은 상층액을 간 균질액으로 획득하여 분석까지 -150°C 초저온 냉동고에 보관하였다. 간 균질액을 thiobarbituric acid(TBA)와 반응시켜 생성된 MDA-TBA adduct를 525 nm에서의 흡광도로 측정하여 MDA 양을 산출하였으며, 총 단백질 함량으로 보정하여 표기하였다.

7. 간 조직 내 GSH 함량 및 SOD, CAT 효소 활성도 측정

GSH 함량은 간 균질액을 25% trichloroacetic acid와 반응 후, 원심분리한 상층액을 2-nitrobenzoic acid와 반응시켜 412 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다²²⁾. SOD 활성도는 superoxide radical에 의해 nitrotriazolium blue가 formazan으로 변환되는 반응을 억제하는 정도를 560 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. 1분간 초기 nitrotriazolium blue의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 효소의 활성도를 1 U로 정의하여 나타내었다²³⁾. CAT 활성도는 H₂O₂ 분해능을 240 nm에서의 흡광도를 측정하여 산출하였으며, 1분간 1 nM의 H₂O₂를 분해하는데 필요한 CAT 효소의 활성도를 1 U로 정의하여 표기하였다. GSH 함량 및 SOD, CAT 효소의 활성도는 간 균질액 내의 총 단백질 함량으로 보정하여 나타내었다.

8. 통계학적 분석

모든 데이터는 mean ± SD(standard deviation)로 표기하였다. 모수적 검정으로 one-way ANOVA(analysis of variance) test를 수행하였으며, *post-hoc* 분석으로 Tukey's Honest Significant Difference(HSD) test를 수행하였다. 비모수적 검정의 경우 Kruskal-Wallis H test 및 Mann-Whitney U test를 수행하여 그룹 간 통계적 유의성을 확인하였다. *P* < 0.05인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였으며, 모든 통계적 검정은 SPSS 14.0K software(SPSS Inc, Chicaco, IL, USA)를 사용하여 수행되었다.

III. 실험 결과

1. 발효 오미자박 추출물 및 헛개과병 추출물의 혼합투여가 CCl₄에 의해 유발된 급성 간 손상 마우스의 체중 및 상대 간 중량에 미치는 영향

급성 간 손상 유발 물질인 CCl₄ 투여와 시험물질인 발효 오미자박 추출물, 헛개과병 추출물 및 이의 혼합투여가 실험동물의 체중증가에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 시험물질의 투여 전과 CCl₄ 투여 24시간 후 실험동물의 체중을 각각 측정하여 증체량(weight gain)을 산출하였다(Figure 2a). 통계적 검증 결과, 모든 시험물질의 투여에 의한 체중 변화는 통계적 유의성이 인정되지 않았다.

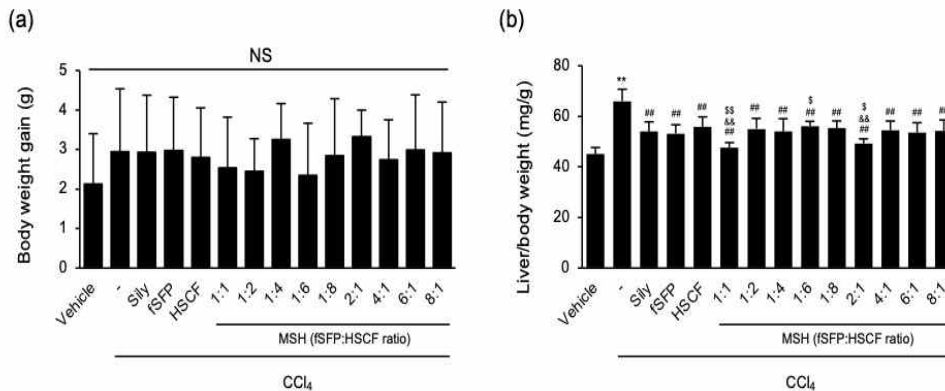


Fig. 2. The effect of fSFP and HSCF extract combination on (a) body weight gain and (b) relative liver weight in CCl₄-challenged mice. All values are expressed as the mean ± SD of 10 mice. Significant *versus* vehicle group, ***P* < 0.01; *versus* CCl₄-treated group, ##*P* < 0.01; *versus* CCl₄ + fSFP-treated group, \$*P* < 0.05, \$\$*P* < 0.01; *versus* CCl₄ + HSCF-treated group, &&*P* < 0.01. Sily, silymarin; fSFP, fermented Schizandrae Fructus Pomace; HSCF, Hoveniae Semen Cum Fructus; MSH, Mixture of fSFP and HSCF; NS, not significant.

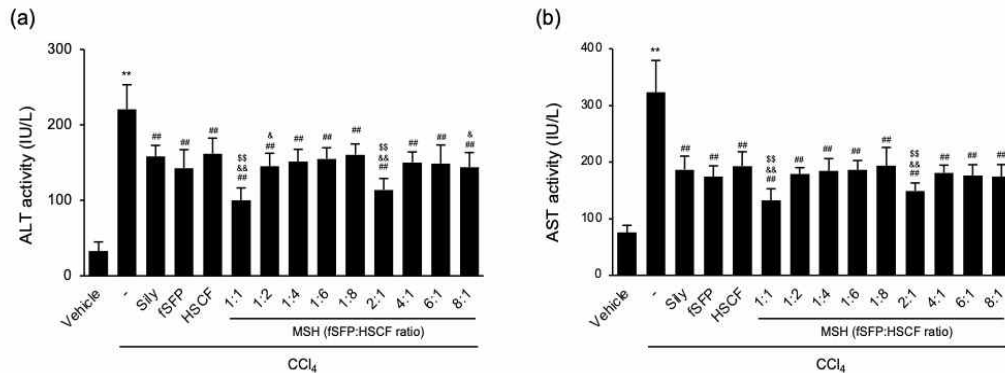


Fig. 3. The effect of fSFP and HSCF extract combination on serum ALT and AST activity in CCl₄-challenged mice. Activity of (a) ALT and (b) AST in serum was detected using an automated blood analyzers. All values are expressed as the mean \pm SD of 10 mice. Significant *versus* vehicle group, ** $P < 0.01$; *versus* CCl₄-treated group, ## $P < 0.01$; *versus* CCl₄ + fSFP-treated group, \$\$ $P < 0.01$; *versus* CCl₄ + HSCF-treated group, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$. Sily, silymarin; fSFP, fermented Schizandrae Fructus Pomace; HSCF, Hoveniae Semen Cum Fructus; MSH, Mixture of fSFP and HSCF.

이전 연구 결과와 일치하게²⁰⁾, CCl₄ 투여는 vehicle 투여군 대비 상대적 간 중량을 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 이는 대조물질인 silymarin 투여로 유의하게 감소하였다. 시험물질인 발효 오미자박 추출물, 헛개과병 추출물의 단독투여 및 이의 혼합비율별 투여는 CCl₄ 투여로 인하여 증가한 상대 간 중량의 증가를 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 특히 발효 오미자박 추출물과 헛개과병 추출물의 혼합비율 1:1, 2:1 투여군은 발효 오미자박 추출물, 헛개과병 추출물 단독투여군에 비하여 통계적으로 유의한 추가적 상대 간 중량의 감소를 나타내었다(Figure 2b).

2. 발효 오미자박 추출물 및 헛개과병 추출물의 혼합투여가 CCl₄에 의해 유발된 급성 간 손상 마우스의 혈청 내 ALT 및 AST 활성에 미치는 영향

발효 오미자박 추출물, 헛개과병 추출물 및 이의 혼합투여가 급성 간 손상에 대한 보호효과를 나타내는지 확인하기 위하여 간 손상 혈중 지표인 ALT, AST의 혈청 내 활성도를 측정하였다. CCl₄ 투여는 기존에 알려진 바와 같이 혈중 ALT, AST 활성을 vehicle 투여군 대비 통계적으로 유의하게 증가시켰다²⁰⁾. 또한 대조물질인 silymarin의 투여는 CCl₄ 투여에 의해 증가된 ALT 및 AST 활성을 통계적으로 유의하게 감소시켰다.

시험물질인 발효 오미자박 추출물, 헛개과병 추출물의 단독투여와 이의 혼합비율별 투여군 모두에서 CCl₄ 투여군에 비하여 ALT 및 AST 활성도가 통계적으로 유의하게 감소함을 확인하였다. 특히 발효 오미자박 추출물과 헛개과병 추출물의 혼합비율 1:1, 2:1 투여군에서 가장 낮은 ALT 및 AST 활성도를 나타내었으며, 이는 발효 오미자박 추출물, 헛개과병 추출물의 단독투여군에 비하여 통계적으로 유의하게 더욱 감소된 것임을 확인하였다(Figure 3).

3. 발효 오미자박 추출물 및 헛개과병 추출물의 혼합투여가 CCl₄에 의해 유발된 급성 간 손상 마우스의 간의 조직병리학적 변화에 미치는 영향

조직병리학적 변화를 관찰하기 위하여 획득한 간 조직에 대한 hematoxylin-eosin 염색을 통하여 CCl₄ 투여, 발효 오미자박 추출물, 헛개과병 추출물 및 이의 혼합투여가 미치는 영향을 확인하였다(Figure 4, 5). CCl₄ 투여군에서는 간세포의 공포화, 간세포 내 지방소적의 축적, 염증세포 침윤 등의 소엽 중심성 괴사 소견이 관찰되었으며, 간 변성율(%/mm²), 변성 간세포 수(cells/1,000 hepatocytes), 침윤된 염증세포(cells/mm²)의 증가와 더불어 HAI score가 통계적으로 유의하게 증가하였다. 이러한 소엽 중심성 괴사는 대조물질인 silymarin 투여,

발효 오미자박 추출물 단독, 헛개과병 추출물 단독, 발효 오미자박과 헛개과병의 혼합투여군 모두에서 통계적으로 유의하게 감소하였다. 특히 발효 오미자박 추출물과 헛개과병 추출물의 혼합비율 1:1, 2:1 투여군의 경

우, 측정된 간 변성율, 변성 간세포 수, 침윤된 염증세포, HAI score의 모든 측정 항목에서 오미자박 추출물, 헛개과병 추출물 단독투여군에 비하여 통계적으로 유의한 추가적 감소를 확인하였다(Figure 4, 5).

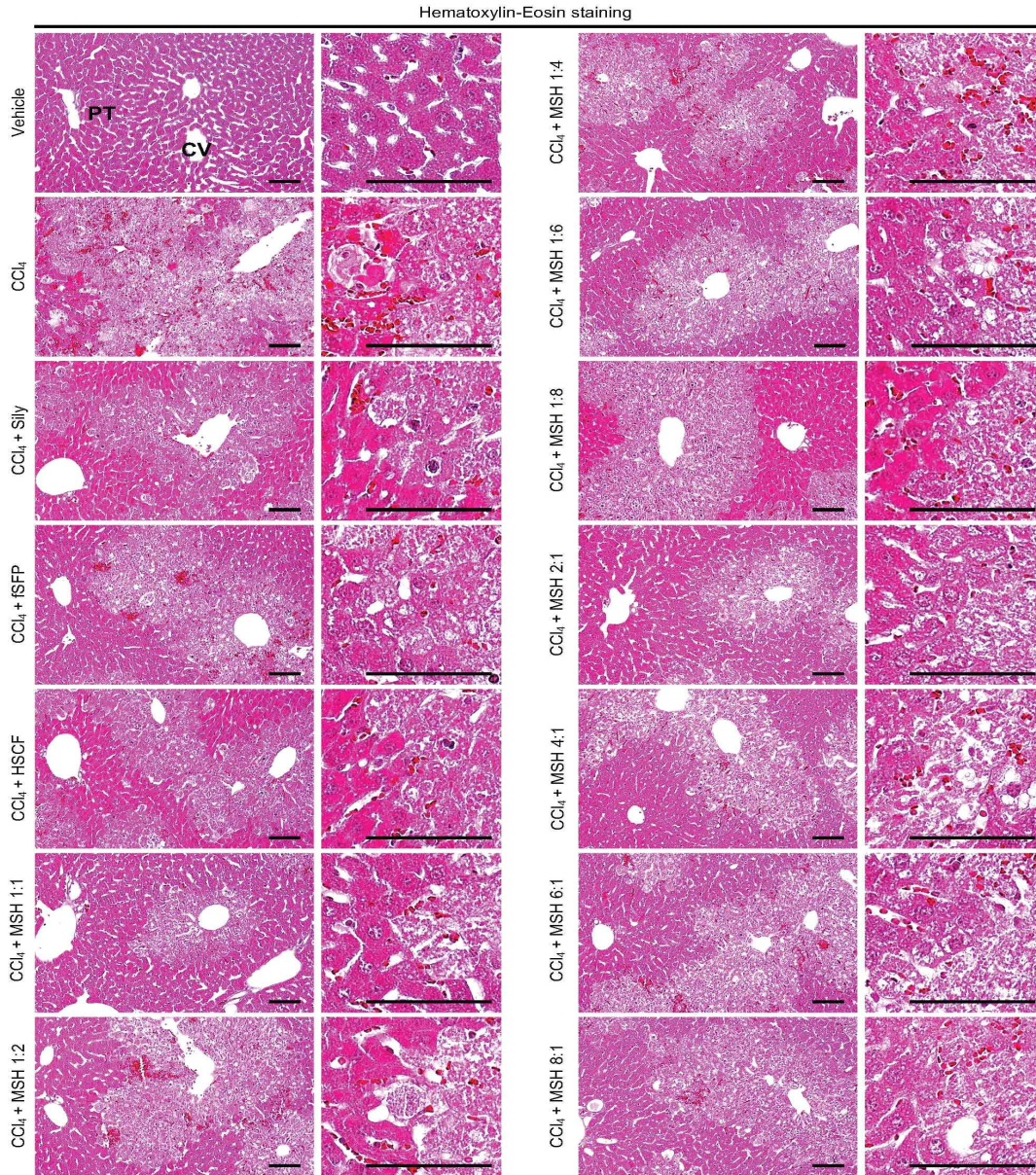


Fig. 4. Representative histopathological profiles of the hepatic tissues. Crossly trimmed left lateral lobe of mouse liver was stained with hematoxylin–eosin, and observed under a light microscope equipped with camera systems. Scale bars indicate 120 μ m. Sily, silymarin; fSFP, fermented Schizandrae Fructus Pomace; HSCF, Hoveniae Semen Cum Fructus; MSH, Mixture of fSFP and HSCF; CV, central vein; PT, portal triad.

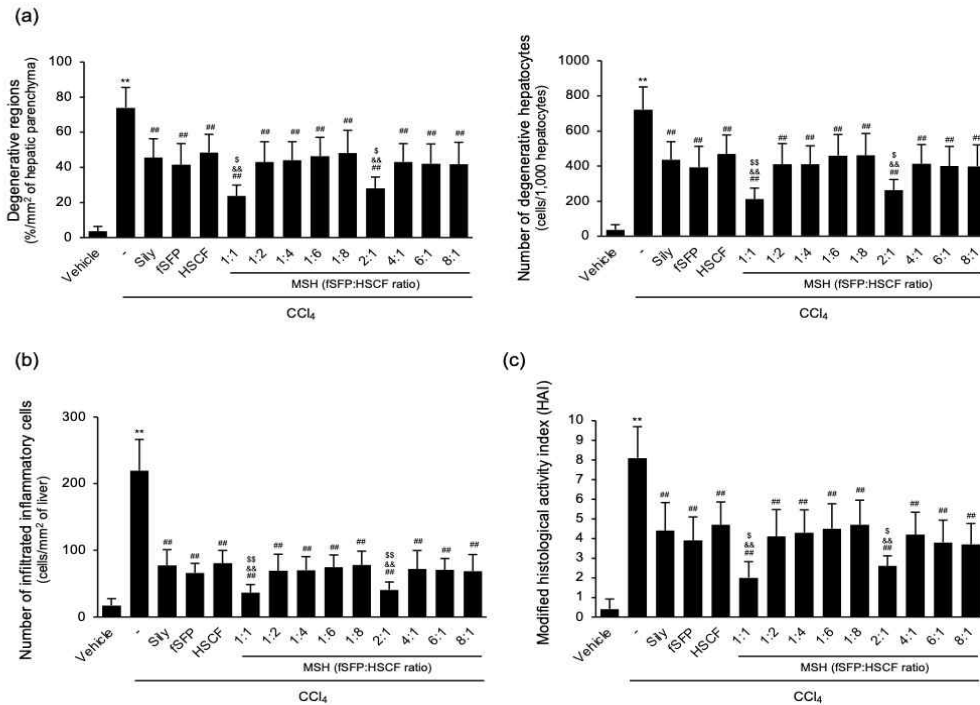


Fig. 5. Histomorphometrical analysis of the hepatic tissues. (a, left) Percentage of degenerative regions and (a, right) the number of degenerative hepatocytes, (b) the number of infiltrated inflammatory cells in the liver parenchyma was calculated using a computer-based automated image analyzer. (c) Modified HAI grading scores were evaluated based on assessment of confluent necrosis, focal lytic necrosis, apoptosis, and focal/portal inflammation. All values are expressed as the mean \pm SD of 10 mice. Significant *versus* vehicle group, ** $P < 0.01$; *versus* CCl₄-treated group, ## $P < 0.01$; *versus* CCl₄ + fSFP-treated group, \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$; *versus* CCl₄ + HSCF-treated group, && $P < 0.01$. Sily, silymarin; fSFP, fermented Schizandrae Fructus Pomace; HSCF, Hoveniae Semen Cum Fructus; MSH, Mixture of fSFP and HSCF.

4. 발효 오미자박 추출물 및 헛개과병 추출물의 혼합투여가 CCl₄에 의해 유발된 간 조직 내 산화적 스트레스에 미치는 영향

발효 오미자박 추출물, 헛개과병 추출물 및 이의 혼합투여가 CCl₄에 의해 유발된 산화적 스트레스의 억제를 통하여 간 보호효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 간 조직 내의 산화적 스트레스 관련 인자 및 효소의 활성을 측정하였다. CCl₄로 유발되는 지질과산화에 대한 억제효능을 평가하기 위하여 간 조직 내 지질과산화 산물인 MDA의 양을 측정하였으며, 내재적 항산화 인자로 알려져 있는 GSH 함량 및 항산화 효소인 SOD, CAT의 간 균질액 내 활성도를 측정하였다. CCl₄ 투여

에 의하여 간 조직 내의 MDA 함량은 유의하게 증가하였으며, 반면 GSH의 함량은 통계적으로 유의하게 감소하였다. 항산화 효소인 간 조직 내 SOD, CAT 활성 또한 CCl₄ 투여에 의하여 통계적으로 유의하게 감소하였다. 반면 발효 오미자박 추출물, 헛개과병 단독투여 및 이의 혼합투여에 의하여 MDA 축적 감소, GSH 함량 증가 및 SOD, CAT 활성도의 증가가 통계적으로 유의하게 나타났다. 특히 발효 오미자박 추출물과 헛개과병 추출물의 혼합비율 1:1, 2:1 투여군의 경우, 발효 오미자박 추출물, 헛개과병 추출물 단독 투여군에 비하여 통계적으로 유의미한 MDA의 추가적 감소 및 GSH 함량, SOD 활성도, CAT 활성도의 추가적 증가를 확인하였다(Figure 6).

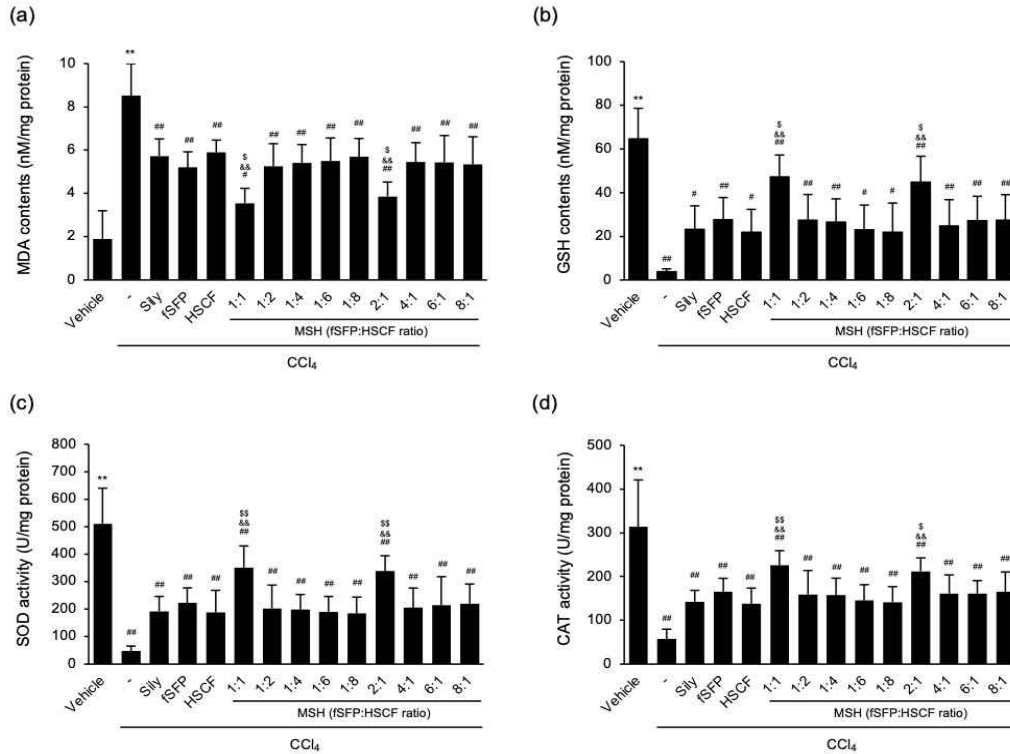


Fig. 6. The effect of fSFP and HSCF extract combination on endogenous antioxidant system in the hepatic tissues of CCl₄-challenged mice. (a) MDA contents, (b) GSH contents, (c) SOD activity, (d) CAT activity in the hepatic homogenate were measured as described in method and material section. All values are expressed as the mean \pm SD of 10 mice. Significant *versus* vehicle group, ** $P < 0.01$; *versus* CCl₄-treated group, ## $P < 0.01$; *versus* CCl₄ + fSFP-treated group, \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$; *versus* CCl₄ + HSCF-treated group, && $P < 0.01$. Sily, silymarin; fSFP, fermented Schizandrae Fructus Pomace; HSCF, Hoveniae Semen Cum Fructus; MSH, Mixture of fSFP and HSCF.

IV. 고찰

간질환은 한국인의 주요 사망원인 가운데 하나이며, 경제적으로 가장 활발한 중장년층에서의 사망률이 높아 사회경제적 부담이 큰 질환이다²⁴). 하지만 간 건강의 중요성에도 불구하고 이에 대한 효율적이며 부작용이 적은 치료제의 개발은 더디게 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 전통 의학적, 영양학적 소재로 널리 활용되고 있는 오미자와 헛개과병을 활용하여 저비용, 저독성의 측면에서 강점이 있는 급만성 간 손상 예방 및 치료 소재를 개발하고자 하였으며, 이에 CCl₄로 유도된 급성 간 손상 마우스 모델을 활용하여 발효 오미자박 추출물과 헛개과병 추출물의 혼합비율에 따른 간 보호

효능을 연구하여 이의 최적 혼합비율을 도출하고자 하였다.

화학적 유기용제로 활용되어온 CCl₄는 투여 용량 및 기간에 따라 급성 간 손상 및 간섬유화 등을 유도하는 것으로 알려져, 실험동물에서 간 보호효능을 나타내는 유효소재의 탐색에 활용되는 간독성 물질 중 하나이다^{17,20,25}). CCl₄는 간에서 cytochrome P450에 의하여 대사되어 trichloromethyl radical을 형성하여 핵산, 단백질 및 지방 등의 분자를 파괴하여 간세포 독성을 일으킨다. 또한 trichloromethyl radical은 다시 산화되어 trichloromethylperoxy radical을 발생시키며 이는 불포화 지방산과 반응하여 지질과산화물 촉발함으로써 간세포 사멸을 유발한다²⁵). 본 연구에서 발효 오미자박 추출물과 헛개과병 추출물의 다양한 혼합비율에 따른 투

여는 CCl₄로 인하여 유발된 혈청 ALT 및 AST 활성, 변성 간실질세포 수, 변성 면적, 염증세포 침윤 및 HAI Score의 증가를 유의하게 개선하였으며 이를 통해 간 보호효능을 나타냄을 확인하였다. 특히 발효 오미자박 추출물 및 헛개과병 추출물 1:1, 2:1 혼합비율에서 각각의 단독투여에 비하여 우수한 간 보호효능을 나타내어 높은 상용화 가능성을 확인하였다.

SOD, CAT, glutathione peroxidase(GPx) 등에 의하여 수행되는 효소적 항산화성 방어기전의 활성화는 산화적 스트레스 및 지질과산화 방어를 중추적인 역할을 수행한다^{26,27}. 이들 효소는 반응성 높은 자유라디칼을 소거하여 세포막, 미토콘드리아 등 세포소기관의 손상을 막고 세포사멸을 방지하여 조직손상을 예방한다²⁷. 반면 실험동물에 대한 CCl₄ 투여는 SOD, CAT, GPx 항산화 효소의 활성을 감소시키며 조직 내의 지질과산화물인 MDA의 축적을 증가시키는 것으로 알려져 있다²⁸. 본 연구에서 발효 오미자박 추출물과 헛개과병 추출물의 다양한 혼합비율에 따른 투여는 CCl₄로 인하여 유발된 산화적 스트레스 지표인 MDA 축적 증가, GSH 함량 감소 및 SOD, CAT 효소 활성도 감소를 개선하였다. 이는 발효 오미자박 추출물 및 헛개과병 추출물의 혼합투여가 간 조직 내의 효소적 항산화성 방어기전의 활성을 회복시킴으로써 CCl₄ 투여로 유도된 산화적 스트레스 및 지질과산화를 개선하여 간 보호효능을 나타냄을 시사한다.

오미자와 헛개과병 각각의 항산화 시스템 활성 증가효능은 항산화 유전자의 주요 전사 조절자로 알려진 nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2) 활성화를 통하여 이루어짐이 다수 보고된 바 있다. Nrf2는 glutamate cysteine ligase catalytic subunit(GCLC), heme oxygenase-1(HO-1), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1(NQO1) 등의 항산화 유전자의 전사를 직접 조절함으로써, 산화적 스트레스로부터 유발되는 간질환에 있어 주요한 치료적 목표 분자로 인식되고 있다²⁹. 오미자의 경우 유래 lignan이 간세포주에서 Nrf2의 핵 내 이동 및 antioxidant response element(ARE) 영역에 대한 결합을 통해 전사활성화를 유도함이 보고되었으며³⁰, 오미자 추출물 및 유효성분의 acetaminophen, CCl₄ 등으로 유도된 간 손상에 대하여 Nrf2/ARE 활성화를 통한 간 보호효능이 보고된 바 있다³¹⁻³³. 헛개과병의 경우, Nrf2/ARE 활성화를 통하여 간실질세포주에서 유발된 산화적 스트레스에 대한 간 보호효능이 보고된 바 있

며³⁴, 알코올로 유도된 간 손상 마우스에서의 Nrf2 유전자 활성화를 통한 간 보호효과가 확인되었다¹⁶. 따라서 본 연구의 발효 오미자박과 헛개과병의 혼합투여에 의한 간 보호효능은 Nrf2/ARE 신호의 활성화를 통한 내재적 항산화 인자의 활성 증가를 통하여 이루어지는 것으로 예상되며, 향후 Nrf2/ARE 신호에 관여하는 직접적 유효성분 및 이의 상승적 약리기전에 관한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

오미자의 주요 활성성분은 schizandrins, gomisins, schisantherins 등의 dibenzocyclooctadiene 구조의 lignan으로 이의 항산화 효과와 항암 효과가 다수 보고된 바 있다^{9,10}. 특히 오미자 유래 활성 성분 중 schizandrin류의 경우 간질환에 효능 연구가 활발히 진행되어 schizandrin A의 비알콜성 지방간 개선 효과, 만성 간 손상에 대한 항산화 및 항염 효능 및 schizandrin B의 지방간 억제, 간섬유화 억제 효과가 보고된 바 있다³⁵⁻³⁹. 헛개과병은 myricetin, dihydromyricetin, hovenitins, hovenodulinol 등의 주요 활성 성분이 알려져 있으며 이들의 간 손상에 대한 효과가 보고된 바 있다⁴⁰. 종합하여 볼 때, 향후 추가적 연구를 통하여 발효 오미자박과 헛개과병의 간 보호 주요 활성 성분 및 이의 상승적 기전에 관련한 연구가 확보된다면 발효 오미자박과 헛개과병 1:1 및 2:1 혼합물 추출물이 간 손상 치료 및 예방에 대한 신규 복합 조성물로서 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

V. 결론

본 연구는 CCl₄로 유도된 간 손상 마우스 모델에서 발효 오미자박 추출물 및 헛개과병 추출물의 비율별 혼합투여에 따른 간 보호효능을 확인하였으며, 발효 오미자박 추출물 단독, 헛개과병 추출물 단독투여와 비교 연구하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1. 발효 오미자박과 헛개과병의 비율별 혼합추출물 투여는 CCl₄에 의한 상대 간중량의 증가를 통계적으로 유의하게 감소시켰으며, 특히 발효 오미자박과 헛개과병 1:1, 2:1 비율의 혼합투여에서 발효 오미자박 추출물 및 헛개과병 추출물 각각의 단독투여보다 더욱 유의하게 감소함을 확인하였다.
2. 발효 오미자박과 헛개과병의 비율별 혼합추출물 투여는 CCl₄에 의하여 유발된 혈청 내 ALT 및 AST 활성의 증가를 통계적으로 유의하게 억제하였으며,



특히 발효 오미자박과 헛개과병 1:1, 2:1 비율의 혼합투여에서 발효 오미자박 추출물 및 헛개과병 추출물 각각의 단독투여보다 더욱 유의하게 감소함을 확인하였다.

3. 발효 오미자박과 헛개과병의 비율별 혼합추출물 투여는 CCl₄에 의하여 유발된 간 실질질의 변성 면적 및 변성 간세포 수, 침윤된 염증세포의 수, HAI score의 증가를 통계적으로 유의하게 감소시켰으며, 특히 발효 오미자박과 헛개과병 1:1, 2:1 비율의 혼합투여에서 발효 오미자박 추출물 및 헛개과병 추출물 각각의 단독투여보다 더욱 유의하게 감소함을 확인하였다.
4. 발효 오미자박과 헛개과병의 비율별 혼합추출물 투여는 CCl₄에 의하여 유발된 간 조직 내 MDA 축적의 증가와 GSH 함량 감소 및 SOD, CAT 효소 활성의 감소를 통계적으로 유의하게 회복시킴을 확인하였으며, 특히 발효 오미자박과 헛개과병 1:1, 2:1 비율의 혼합투여에서 발효 오미자박 추출물 및 헛개과병 추출물 각각의 단독투여보다 더욱 유의하게 회복시킴을 확인하였다.

이상의 결과를 바탕으로 CCl₄로 유도된 간 손상에 대하여 발효 오미자박과 헛개과병의 비율에 따른 혼합투여는 산화적 스트레스를 억제함으로써 간 손상을 보호하는 효능이 있음을 규명하였다. 또한 9종의 혼합비율 중에서 발효 오미자박과 헛개과병의 1:1, 2:1 비율 혼합에서 간 보호효능이 가장 우수함을 확인하였다. 본 연구와 더불어 향후 추가적 유효성분 및 분자생물학적 기전에 대한 후속연구의 진행을 통해 발효 오미자박 및 헛개과병 복합제제의 급만성 간질환에 대한 신규 예방 및 치료소재로의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2020년도 중소벤처기업부(과제번호: S2940975)의 기술개발사업 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev*

- Mol Cell Biol.* 2020;21(7):363–83.
2. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(2):532–53.
3. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 482(3):419–25.
4. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2014;20(25):8082–91.
5. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol.* 2001;35(2): 297–306.
6. Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011;26(1):30–46.
7. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(11):26087–124.
8. Professors of herbology in colleges of Korean medicine. *Herbology.* Seoul:Yeonglimsa. 2004:685–737.
9. Szopa A, Ekiert R, Ekiert H. Current knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species: a review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies. *Phytochem Rev.* 2017;16(2):195–218.
10. Kopustinskiene DM, Bernatoniene J. Antioxidant Effects of Schisandra chinensis Fruits and Their Active Constituents. *Antioxidants (Basel).* 2021; 10(4):620.
11. Park HJ, Lee SJ, Song Y, Jang SH, Ko YG, Kang SN, et al. Schisandra chinensis prevents alcohol-induced fatty liver disease in rats. *J Med Food.* 2014;17(1):103–10.
12. Jang MK, Nam JS, Kim JH, Yun YR, Han CW, Kim BJ, et al. Schisandra chinensis extract ameliorates nonalcoholic fatty liver via inhibition

- of endoplasmic reticulum stress. J Ethnopharmacol. 2016;185:96-104.
13. Seo YM, Kim HJ, Lee EJ, Chung CW, Sung HJ, Sohn HY, et al. Effects of Pomace of *Schizandra chinensis*, Schizandrin, and Gomisins A on LPS-induced Inflammatory Responses in RAW264.7 Cells. J Life Sci. 2018;28(3):339-44.
 14. Kim MS, Sung HJ, Park JY, Sohn HY. Evaluation of Anti-oxidant, Anti-microbial and Anti-thrombosis Activities of Fruit, Seed and Pomace of *Schizandra chinensis* Baillon. J Life Sci. 2017;27(2):131-8.
 15. Kim HJ, Seo YM, Lee EJ, Chung CW, Sung HJ, Sohn HY, et al. Anti-proliferative and Pro-apoptotic Activities by Pomace of *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill. and Schizandrin. J Life Sci. 2018;28(4):415-20.
 16. Cho IJ, Kim JW, Jung JJ, Sung SH, Kim JK, Lee NJ, et al. Hepatoprotective effects of hoveniae semen cum fructus extracts in ethanol intoxicated mice. J Exerc Nutrition Biochem. 2016;20(1):49-64.
 17. Kim YS, Park J, Kwon Y, Lim DW, Song M, Choi HY, et al. Hepatoprotective Effects of *Hovenia dulcis* Extract on Acute and Chronic Liver Injuries induced by Alcohol and Carbon Tetrachloride. Kor J Herbology. 2013;28(4):25-32.
 18. 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.
 19. Choi BR, Cho IJ, Jung SJ, Kim JK, Park SM, Lee DG, et al. Lemon balm and dandelion leaf extract synergistically alleviate ethanol-induced hepatotoxicity by enhancing antioxidant and anti-inflammatory activity. J Food Biochem. 2020;44(8):e13232.
 20. Choi B-R, Cho IJ, Jung S-J, Kim JK, Lee DG, Ku SK, et al. Study on the hepatoprotective effects of lemon balm and dandelion leaf extract combination in carbon tetrachloride-mediated liver injured mice. Herb Formular Sci. 2019;27(3):199-211.
 21. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. J Hepatol. 1995;22:696-9.
 22. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem. 1968;25:192-205.
 23. Sun Y, Larry WO, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem. 1988;34:497-500.
 24. Chung W. The cost of liver disease in Korea: methodology, data, and evidence. Clin Mol Hepatol. 2015;21(1):14-21.
 25. Scholten D, Trebicka J, Liedtke C, Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. Lab Anim. 2015;49:4-11.
 26. Zimmermann R, Flohe L, Weser U, Hartmann HJ. Inhibition of lipid peroxidation in isolated inner membrane of rat liver mitochondria by superoxide dismutase. Febs Letters. 1973;29:117-20.
 27. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alex J Med. 2018;54(4):287-93.
 28. Kang KS, Kim ID, Kwon RH, Lee JY, Kang JS, Ha BJ. The effects of fucoidan extracts on CCl₄-induced liver injury. Arch Pharm Res. 2008;31(5):622-7.
 29. Shin SM, Yang JH, Ki SH. Role of the Nrf2-ARE Pathway in Liver Diseases. Oxid Med Cell Longev. 2013;2013:763257.
 30. Lee SB, Kim CY, Lee HJ, Yun JH, Nho CW. Induction of the phase II detoxification enzyme NQO1 in hepatocarcinoma cells by lignans from the fruit of *Schizandra chinensis* through nuclear accumulation of Nrf2. Planta Med. 2009;75(12):1314-8.
 31. Shan Y, Jiang B, Yu J, Wang J, Wang X, Li H, et



- al. Protective Effect of Schisandra chinensis Polysaccharides Against the Immunological Liver Injury in Mice Based on Nrf2/ARE and TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *J Med Food*. 2019;22(9):885–95.
32. Chen Q, Zhang H, Cao Y, Li Y, Sun S, Zhang J, et al. Schisandrin B attenuates CCl₄-induced liver fibrosis in rats by regulation of Nrf2-ARE and TGF- β /Smad signaling pathways. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:2179–91.
33. Zhao J, Ding K, Hou M, Li Y, Hou X, Dai W et al. *Schisandra chinensis* essential oil attenuates acetaminophen-induced liver injury through alleviating oxidative stress and activating autophagy. *Pharm Biol*. 2022;60(1):958–67.
34. Cho IJ, Kim JW, Jung JJ, Sung SH, Ku SK, Choi JS. In vitro protective effects of Hoveniae Semen cum Fructus extracts against oxidative stress. *Toxicol Environ Health Sci*. 2016;8:19–27.
35. Jeong MJ, Kim SR, Jung UJ. Schizandrin A supplementation improves nonalcoholic fatty liver disease in mice fed a high-fat and high-cholesterol diet. *Nutr Res*. 2019;64:64–71.
36. Yan T, Liu B, Li F, Wu B, Xiao F, He B, et al. Schizandrin ameliorates behavioral disorders in hepatic injury mice via regulation of oxidative stress and neuroinflammation. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2021;43(2):212–22.
37. Yan LS, Zhang SF, Luo G, Cheng BC, Zhang C, Wang YW, et al. Schisandrin B mitigates hepatic steatosis and promotes fatty acid oxidation by inducing autophagy through AMPK/mTOR signaling pathway. *Metabolism*. 2022;131:155200.
38. Wang HQ, Wan Z, Zhang Q, Su T, Yu D, Wang F, et al. Schisandrin B targets cannabinoid 2 receptor in Kupffer cell to ameliorate CCl₄-induced liver fibrosis by suppressing NF- κ B and p38 MAPK pathway. *Phytomedicine*. 2022;98:153960.
39. Li Z, Zhao L, Xia Y, Chen J, Hua M, Sun Y. Schisandrin B Attenuates Hepatic Stellate Cell Activation and Promotes Apoptosis to Protect against Liver Fibrosis. *Molecules*. 2021;26(22):6882.
40. Yoshikawa M, Murakami T, Ueda T, Yoshizumi S, Ninomiya K, Murakami N, et al. 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.