

승마추출물이 흰쥐의 사염화탄소 유발 간독성에 미치는 효과

정기화* · 정춘식 · 노혜림

덕성여자대학교 약학대학

The Effect of *Cimicifuga heracleifolia* on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Rats

Ki Hwa JUNG*, Chun Sik CHUNG and Hye Rim NO

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714

(Received March 4, 1996; accepted March 13, 1996)

Abstract – The effect of *Cimicifuga heracleifolia* on CCl₄-induced hepatotoxicity was investigated. *Cimicifuga heracleifolia* has been used to diaphoresis, antipyretics and detoxification in oriental remedy. We examined the effect of *Cimicifuga heracleifolia* methanol extract by blood chemical analysis and histopathologic examination. ALT and AST were decreased by 38% and 67% in pretreatment group of *Cimicifuga heracleifolia* compared to CCl₄ control group respectively. There were significant changes neither in total protein, albumin, triglyceride and cholesterol nor in BUN and creatinine. In histopathologic examination, there were severe necrosis and hemorrhage with infiltration of inflammatory cells around the central vein, zone 3 in the liver of CCl₄ treated rat. Ballooning degeneration of hepatocytes were frequently noted in the periphery of the hemorrhagic necrosis. In *Cimicifuga heracleifolia* pretreatment group, we observed mild degree of ballooning degeneration and inflammatory cell infiltration. No gross necrosis was observed. We measured malondialdehyde (MDA) formation by TBA method. It showed that the formation of MDA in *Cimicifuga heracleifolia* pretreatment group was decreased compared to the CCl₄ control group. We got the result of the effect of *Cimicifuga heracleifolia* on CCl₄-induced hepatotoxicity by decreasing serum ALT and AST. It seems that the decrease of lipid peroxidation is related to the recovery effect.

Keywords □ ALT, AST, total protein, albumin, triglyceride, cholesterol, BUN, creatinine, carbon tetrachloride, malondialdehyde, ballooning degeneration

최근의 재정경제원 통계를 보면 우리나라 사람의 사망원 인중 2위가 암인데, 암의 종류별로는 간암이 위암의 뒤를 이어 두번째로 높은 비율을 차지하고 있다. 간암뿐만 아니라 만성 간질환과 간경변증으로 숨진 경우가 전체 사망원인 중 7% 이상을 차지한다는 사실을 감안하면 우리나라 성인의 사망원인으로서 간질환의 중요성을 알 수 있다(박재갑, 1991).

최근들어 천연물연구를 통한 신약개발과 관련하여 많은 연구가 진행되어져 왔다. 간독성 해독제 개발에 대한 지금까지의 연구로는 polychlorinated biphenyls(오진희, 1988)와 acetaminophen으로 유발된 간독성에 미치는 숙지황, 오수유, 향부자, 대황, 금은화, 강활, 시호 및 토복령 등의 효과가 이미 보고된 바 있다(정계영, 1993; 정정숙, 1992; 김은주, 1992). 또한 대표적인 간장 치료제인 silymarin(SLM)의 경우 국화과에 속하는 *Silybum marianum*(=Carduus marianus)의 열

매에서 개발되었으며(Martindale, 1989; Relando 등, 1989) 또한 가장 최근 개발된 biphenyl dimethyl dicarboxylate(BDD)는 오미자와의 성분인 schizandrin과 유사한 인공합성물질로, 임상 연구를 통해 만성간염환자의 증상을 호전시키고 간기능이 현저히 향상됨이 보고되어 있으며, CCl₄ 유발 간독성의 경우 Kupffer cell 활성을 통한 간독성치료효과가 보고된 바 있다(안영근 등, 1992). 현재 임상치료시 일반적인 간장약과 병용 투약되어지는 vitamin B complex(VBH)는 조효소 역할을 하므로 탄수화물, 지방산 및 아미노산 합성과 산화·환원반응의 촉매, 약물해독반응 등에 관여하고 있다(Alfred 등, 1991). 현재 임상적으로 널리 쓰이는 간질환치료제가 BDD, SLM, ursodesoxycholic acid 및 VBH 등 그 질환의 심각성에 비해 치료제의 종류가 많지 않음을 볼 때 천연물에서의 간독성해독제의 개발은 그 의의가 매우 크다고 하겠다.

승마는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 승마 (*Cimicifuga heracleifolia* Komarov)의 뿌리줄기이다. 東醫寶

* To whom correspondence should be addressed.

鑑 등에 의하면 脾胃가 약한 사람을 다스리고 구창, 구기에 수렴작용이 있고 치주염, 인후비통에 사용한다고 알려져 왔다. 알려진 성분으로는 cimicifugoside, methylcimicifugoside 및 acetylclimigenoside 등의 배당체와 그 genin, isomethylclimigenol 및 cimifugol 등이 있으며, 소염·진통·해열·부종억제·중추억제·면역억제작용 및 마우스의 실험적 간장해에 대한 예방효과 등이 보고된 바 있다(이창복, 1989; 중약대사전, 1985; 유시명 등, 1964; 한대석 등, 1991; 육창수 등, 1972).

CCl_4 는 잘 알려진 간독성이 있는 용매로 methylchloroform과 trichloroethylene 같은 독성이 적은 용매의 출현에 따라 사용이 점차 줄어 왔다(Mathew 등, 1963). 성인에 있어서 경구나 흡입시 5-10 ml의 양으로도 사망할 수 있다 (Stewart, 1963). 정확한 작용기전은 알려져 있지 않지만 C-Cl bond가 깨지면서 생긴 trichloromethyl과 monoatomic chlorine free radicals가 지질과산화를 야기하여(Gordis, 1969) 결과적으로 간세포괴사를 일으키며(Pohl 등, 1986) trichloromethyl radical은 지질이나 단백과 공유결합산물을 만들어서 O_2 와 반응, trichloromethyl peroxy radicals를 생성 혹은 chloroform을 만든다(Pohl, 1983).

본 논문에서는 천연물 성분의 약효와 간독성에 관여하는 기전연구의 일환으로 승마에서 CCl_4 유발 간독성에 대한 억제효과를 보았고, 이를 다시 흰쥐를 사용하여 혈청 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), blood urea nitrogen(BUN), creatinine, total protein(TP), albumin, cholesterol, triglyceride의 변화, 지질과산화 정도, GST효소 활성도 및 조직학적 검경을 통해 승마추출물이 CCl_4 유발 간독성에 미치는 효과를 규명하고자 하였다.

실험방법

실험재료

본 실험에 사용한 승마는 시중 한약전재상으로부터 구입하였다.

시약 및 기기

Silymarin, Vitamin B complex, Carbon tetrachloride (Duksan Pharmaceutical Co., Korea), AST kit, ALT kit (Yeongdong Pharmaceutical Co., Korea), Hematoxylin (Fischer Scientific Co., USA), Eosin(Merck Co.), Xylene (Yakuri Pure Chemicals. Co., Ltd., Japan), Canada balsam (Kanto Chemical Co., Inc., Japan), Paraplast Thiobarbituric acid (B.D.H., USA), Bovine serum albumin, 4-chloro-1-naphthol, EDTA, glycine, β -mercaptoethane, Tris base, sodium citrate, Foline Ciocalteu's phenol reagent, 1, 1, 4, 4-Tetraethoxypropane(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 기타 시약 및 추출용매는 시판특급시약을 사용하

였다. 기기는 Automatic power supply(Vision Scientific Co., Ltd.), High speed centrifuge(DuPont Sorvall Instrument, Model RC 5C), Ice maker (Welbilt Co. USA), Microscope (Olympus Optical., Ltd.), UV-spectrophotometer(Hewlett Packard HP 8452A Diode-Array), Ultracentrifuge(Beckman Co., Lid. L-80), 자동혈청생화학분석기(Abbott, Spectrum), Osteriser blender(Oster Co., Listed 564A Household type) 및 Autotechnicon(Shandon Citadel 2000)을 사용하였다.

실험동물

실험동물로는 대한동물의 Sprague-Dawley계 흰쥐(수컷)를 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 충분한 물과 고형사료(삼양사료)를 공급하여 사육하여 적응시킨 후 체중이 흰쥐는 200 g내외, 마우스는 30 g내외가 되었을 때 실험에 사용하였다.

추출

잘 건조된 승마를 세절한 후 70% methanol로 수육상에서 5시간 4회 추출한 후 여과하고, 여액을 감압농축하여 methanol추출물의 분말시료를 얻어 검체로 사용하였으며 검체는 생리식염수에 녹여 동물에 투여하였다.

간장해 유발

승마추출물은 예비실험결과를 토대로 하여 2 g/kg/day의 용량으로 3일 경구투여 후 CCl_4 는 corn oil을 vehicle로 하여 0.2 ml/kg/day 용량을 3일째 되는 날 최종 투여 3시간 후에 복강투여하여 간독성을 유발시켰다.

채혈 및 혈청분리

약물 최종투여 24시간후 18시간가량 절식시켜 ether로 마취시키고 복부정중선을 절개하여 심장에서 채혈하고, 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 혈청을 시료로 사용하였다.

CCl_4 간독성에 대한 예비실험

승마추출물의 CCl_4 유발 간독성에 대한 효과는 Reitman-Frankel method(Reitman 등, 1957)에 의하여 aspartate aminotransferase(AST)와 alanine transferase(ALT)의 효소단위로 측정하였다. AST는 L-aspartate와 α -ketoglutarate를 기질액으로, ALT는 DL-alanine과 α -ketoglutarate를 기질액으로 하여 2, 4-dinitrophenylhydrazine으로 발색시킨 후 각각 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

급성독성실험

수컷 마우스 6마리를 1군으로 하여 승마추출물 5,000 mg/kg을 경구투여한 후, 행동의 이상유무를 관찰하고 72시간까지의 사망수를 측정하여 급성독성을 관찰하였다.

혈청생화학적 분석

흰쥐를 사용하여 승마추출물은 2 g/kg/day, SLM은 150 mg/kg/day, VBH는 0.28 ml/kg/day의 용량으로 3일간 경구 투여하였다. CCl_4 는 corn oil을 vehicle로 하여 0.2 ml/kg/day 용량을 3일째 되는 날 최종투여 3시간 후에 투여하여 간독성을 유발하였다.

분리된 혈청을 자동혈청생화학분석기(Abbott, Spectrum)를 통해 aminotransferases(ALT, AST), albumin, total protein(TP), cholesterol, triglyceride(TG), blood urea nitrogen(BUN) 및 creatinine을 분석하였다.

Cytosol의 분리

승마추출물을 투여 후 18시간가량 절식시키고, 경부이탈하여 치사시켰다. 간조직을 적출하여 생리식염수로 perfusion하여 세척한 후 2배 용량의 0.1 M Tris-KCl buffer(0.1 M Tris Ac, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 with Tris base)를 가하여 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직은 8,000 g에서 30분, 10,000 g에서 90분간 초원심분리시켜 상정액인 cytosol을 분리하였다. 분리한 cytosol은 분주하여 사용하기 전까지 -70°C에서 보관하였다. 모든 조작은 4°C이하에서 실시하였다.

Microsome의 분리

상정액인 cytosol을 취하고 남은 침전인 microsome을 0.1 M sodium pyrophosphate buffer(0.1 M sodium pyrophosphate와 1 mM EDTA)에서 혼탁하여 100,000 g에서 60분간 다시 초원심분리하여 세척한 후 microsome을 얻었다. 얻어진 microsome을 50 mM Tris-Ac buffer(50 mM Tris-Ac, 20% glycerol, pH 7.4 with Tris base)에 재분산시킨 후 분주하여 사용하기 전까지 -70°C에서 보관하였다. 모든 조작은 4°C 이하에서 실시하였다.

단백정량

단백정량은 Lowry방법(Lowry 등, 1951)에 따라 회색된 microsome 및 cytosol 0.6 ml에 0.5 ml Lowry complex(0.2 ml 4% sodium potassium tartarate, 0.2 ml 2% copper sulfate와 10.0 ml의 4% sodium bicarbonate/0.2 N sodium hydroxide용액을 사용직전에 혼합한 용액)를 가하고 신속하게 혼화하였다. 15분 후 0.1 ml의 Folin Ciocalteou's phenol 시약을 가하고 즉시 섞은 후 30분간 방치하고 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질농도는 bovin serum albumin을 사용하여 만든 standard curve로부터 얻었다. 이 방법으로 정량한 결과 microsome은 50-85 mg/ml, cytosol은 50-72 mg/ml의 단백질을 함유하고 있었다.

GST 효소 활성도 측정

Cytosol의 GST활성은 Habig 등의 방법(Habig 등, 1974)에 따라 시행하였다. 배양액에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5), cytosol protein 25 µg을 넣고 25°C에서 2분간 방치 후 기질로서 1.0 mM의 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene(CDNB)과 1.0 mM의 glutathion(GSH)을 가하여 총량을 1.0 ml로 한 후 즉시 340 nm에서 15초 간격으로 60초 동안 흡광도를 측정하였다. Blank로는 가열하여 불활성화한 cytosol 단백질을 사용하였다.

Lipid Peroxidation 측정

Microsome의 lipid peroxidation은 Uchiyama 등의 방법

(Uchiyama 등, 1978)에 따라 시행하였다. Microsome 0.5 ml에 1% H₃PO₄, 0.67% TBA시약을 가하고 95°C에서 45분간 수육상에서 가열한 후 실온까지 냉각하고 butanol 4.0 ml를 가해서 진탕추출한 후 원심분리하여 butanol층을 취해 535 nm와 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준액으로는 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane을 사용하여 검체에서의 malondialdehyde(MDA)생성량을 계산하고 이를 nmol/mg protein으로 나타내었다.

조직학적 검경

승마추출물을 투여 24시간 후 실험전 18시간가량 절식시키고 흰쥐를 마취시켜 복부정중선을 절개하였다. 간을 적출 후 두께 약 0.2 mm정도로 자른 후 비옹고형고정제(변성형 고정제)인 10% formalin용액을 채운 유리vial에 넣어 4°C에서 24시간 방치하였다.

세포가 충분히 고정된 후 조직내에 남아있는 고정액은 흐르는 수돗물에 충분히 수세하였다. 각 군의 조직을 Autotechnicon(Shandon Citadel 2000)을 사용해서 투명(clearing) 및 침투과정을 하였다. 일정모양의 paraffin block을 만들기 위해 embedding center(Lipshaw)를 사용하였다. Paraffin침투과정이 끝난 조직을 paraffin warming chamber에 넣고 base mold에 paraffin을 채운 후 조직을 base mold에 안착시키고 cryo-plate에 올려놓고 굳은 후 base mold를 떼어놓았다. Paraffin block을 박절기(microtome)에서 4 µm 두께로 자른 후 슬라이드글라스위에 올려 60°C hot plate에서 건조부착시켰다. 절편이 부착된 슬라이드글라스를 60°C의 oven에 넣어 조직이외의 paraffin을 녹이고 xylene에서 10분씩 3회 처리한 후 100%, 95%, 80% 및 70% ethanol순으로 2회씩 2분간 처리하여 함수시켰다. H&E염색은 함수과정 후 탈이온수에서 10분간 처리한 후 Harris's hematoxylin으로 염색하였다. 흐르는 상수로 세척하고 95% ethanol로 8분동안 처리한 후, 0.5% eosin으로 2분동안 염색하였다. 95%와 100% ethanol로 탈수한 후 말리고 xylene으로 처리한 후 밀봉하였다. 모든 검경은 200배율로 했다.

통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 계산하였고, 각군간의 차이는 Student t-test를 사용하여 p값이 5%미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과

흰쥐에 대한 승마추출물의 효과

CCl₄유발 간독성에 대해 흰쥐 혈청의 ALT치 변화를 본 결과를 Table I에 나타내었다. 이 실험에서 승마는 CCl₄유발 간독성을 억제함을 알 수 있었다.

급성독성실험

시료투여 후 72시간까지의 사망수를 관찰한 급성독성실

Table I. Effects of *Cimicifuga heracleifolia* on the serum ALT activity in CCl₄-treated rats

Treatment	ALT	
	Activity (KA unit/l)	Inhibition (%)
Untreated	47.8± 10.2	
CCl ₄	602.2± 124.2	
S+CCl ₄	407.9± 48.3*	36

The values are expressed as mean±S.D. (n=6-8). *p<0.05 compared to the CCl₄ group.

Percent inhibition was acquired by
 $\{1-(CCl_4+S \text{ value-untreated value})/(CCl_4 \text{ value-untreated value})\} \times 100$
S(Cimicifuga heracleifolia).

Table II. Mouse mortality by the *Cimicifuga heracleifolia*

Animal	Sex	Route of administration	Minimum lethal dose (mg/kg)
mouse	male	p.o.	5000*

*Six animals were alive.

Table III. Effects of S, VBH and SLM on the serum aminotransferases activities in CCl₄-treated rats

Treatment	ALT		AST	
	Activity (KA unit/l)	Inhibition (%)	Activity (KA unit/l)	Inhibition (%)
Untreated	43.2± 13.2		197.2± 19.7	
CCl ₄	665.9± 171.0		562.7± 360.7	
S+CCl ₄	430.7± 107.8*	38	417.6± 212.5	67
S+VBH+CCl ₄	411.4± 64.4**	52	394.6± 135.3	74
S+SLM+CCl ₄	411.4± 292.1	41	452.8± 326.2	51
VBH+CCl ₄	409.3± 117.1*	41	390.0± 273.5	79
SLM+CCl ₄	374.0± 209.0*	47	377.6± 180.8	86

The values are expressed as mean±S.D.(n=6-8). *p<0.05, **p<0.01 compared to the CCl₄ group.

Percent inhibition was acquired by
 $\{1-(CCl_4+S \text{ value-untreated value})/(CCl_4 \text{ value-untreated value})\} \times 100$
S(Cimicifuga heracleifolia), VBH(vitamin B complex), SLM(silymarin).

험의 결과는 Table II와 같다. 시료 5,000 mg/kg을 수컷 마우스에 경구투여시 6마리 중에서 1마리도 사망하지 않아 이 시료의 경구투여시 최소치사량은 5,000 mg/kg로 나타났고 이때 동물의 행동이상은 관찰할 수 없었다.

ALT 및 AST

혈청 ALT치는 S+CCl₄투여군, S+VBH+CCl₄투여군, VBH+CCl₄투여군 및 SLM+CCl₄투여군에서 CCl₄투여군에 비해 유의성있는 감소를 보였다.

혈청 AST치는 S+CCl₄투여군, S+VBH+CCl₄투여군, S+SLM+CCl₄투여군, VBH+CCl₄투여군 및 SLM+CCl₄투여군

Table IV. Effects of S, VBH and SLM on albumin and total protein in CCl₄-treated rats

Treatment	Albumin (mg/dl)	Total Protein (mg/dl)
Untreated	2.00± 1.81	6.28± 0.80
CCl ₄	1.05± 0.14	6.07± 0.70
S+CCl ₄	0.99± 0.11	6.43± 0.66
S+VBH+CCl ₄	1.17± 0.14	6.59± 0.66
S+SLM+CCl ₄	1.33± 0.09*	6.22± 0.92
VBH+CCl ₄	1.32± 0.04*	6.14± 0.36
SLM+CCl ₄	1.30± 0.30	5.29± 2.54

The values are expressed as mean±S.D.(n=6-8). *p<0.01 compared to the CCl₄ group. S(*Cimicifuga heracleifolia*), VBH(vitamin B complex), SLM(silymarin).

Table V. Effects of S, VBH and SLM on cholesterol and triglyceride in CCl₄-treated rats

Treatment	Cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Untreated	63.5± 12.2	80.2± 15.7
CCl ₄	63.6± 18.6	128.2± 30.3
S+CCl ₄	56.3± 16.8	106.8± 55.5
S+VBH+CCl ₄	47.7± 15.6	95.5± 57.1
S+SLM+CCl ₄	45.5± 13.7	110.9± 57.3
VBH+CCl ₄	58.2± 21.9	110.1± 44.0
SLM+CCl ₄	57.3± 17.9	118.6± 69.5

The values are expressed as mean±S.D.(n=6-8). S(*Cimicifuga heracleifolia*), VBH(vitamin B complex), SLM(silymarin).

에서 CCl₄투여군에 비해 감소를 나타내었다(Table III).

Albumin 및 Total protein(TP)

혈청 albumin치는 S+SLM+CCl₄투여군과 VBH+CCl₄투여군에서 유의성있는 증가를 보였다.

TP치는 SLM으로 전처치한 군을 제외한 나머지군에서 다소 증가하였다(Table IV).

Cholesterol 및 Triglyceride(TG)

Cholesterol치는 S+CCl₄투여군, S+VBH+CCl₄투여군, S+SLM+CCl₄투여군, VBH+CCl₄투여군 및 SLM+CCl₄투여군에서 정상투여군에 비해 다소 감소하였다.

TG치는 S+CCl₄투여군, S+VBH+CCl₄투여군, S+SLM+CCl₄투여군, VBH+CCl₄투여군 및 SLM+CCl₄투여군에서 CCl₄투여군에 비해 감소하였다(Table V).

BUN 및 Creatinine

BUN 및 creatinine치는 S+CCl₄투여군, S+VBH+CCl₄투여군, S+SLM+CCl₄투여군, VBH+CCl₄투여군 및 SLM+CCl₄투여군에서 정상군에 비하여 별다른 차이를 볼 수 없었다(Table VI).

GST효소 활성도 측정

각 실험군의 간에서 분리한 cytosol을 시료로 CDNB를

Table VI. Effects of S, VBH and SLM on BUN and creatinine in CCl₄-treated rats

Treatment	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
Untreated	15.8±2.6	0.45±0.30
CCl ₄	17.3±3.0	0.40±0.18
S+CCl ₄	18.9±4.1	0.37±0.11
S+VBH+CCl ₄	18.5±4.0	0.36±0.16
S+SLM+CCl ₄	21.5±6.8	0.39±0.04
VBH+CCl ₄	18.0±3.7	0.54±0.27
SLM+CCl ₄	24.0±7.5	0.56±0.23

The values are expressed as mean±S.D.(n=6-8). S(*Cimicifuga heracleifolia*), VBH(vitamin B complex), SLM(silymarin).

Table VII. Glutathione S-transferase activity toward CDNB in the cytosol from rats treated with S, VBH and SLM

Treatment	Activity (μmol/min/mg protein)
Untreated	2.13±0.23
CCl ₄	1.53±0.15
S+CCl ₄	1.52±0.37
S+VBH+CCl ₄	2.09±0.27*
S+SLM+CCl ₄	1.94±0.45
VBH+CCl ₄	1.96±0.59
SLM+CCl ₄	2.04±0.51

The values are expressed as mean±S.D.(n=6-8). *p<0.05 compared to the CCl₄ group. S(*Cimicifuga heracleifolia*), VBH(vitamin B complex), SLM(silymarin).

Table VIII. Effects of S, VBH and SLM on malondialdehyde in the microsome of rats

Treatment	Malondialdehyde level (nmol/mg protein)
Untreated	1.15±0.13
CCl ₄	1.33±0.05
S+CCl ₄	0.96±0.12**
S+VBH+CCl ₄	0.78±0.04**
S+SLM+CCl ₄	0.88±0.18*
VBH+CCl ₄	0.79±0.06*
SLM+CCl ₄	0.68±0.03***

The values are expressed as mean±S.D.(n=6-8). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to the CCl₄ group. S(*Cimicifuga heracleifolia*), VBH(vitamin B complex), SLM(silymarin).

기질로 하여 GST효소활성도를 측정하였다. GST효소활성도는 S+VBH+CCl₄투여군에서 CCl₄투여군에 비해 유의성 있는 증가를 보였으며 S+SLM+CCl₄투여군, VBH+CCl₄투여군 및 SLM+CCl₄투여군에서는 다소 증가하였다(Table VII).

Lipid Peroxidation 측정

각 실험군의 간에서 분리한 microsome을 시료로 MDA

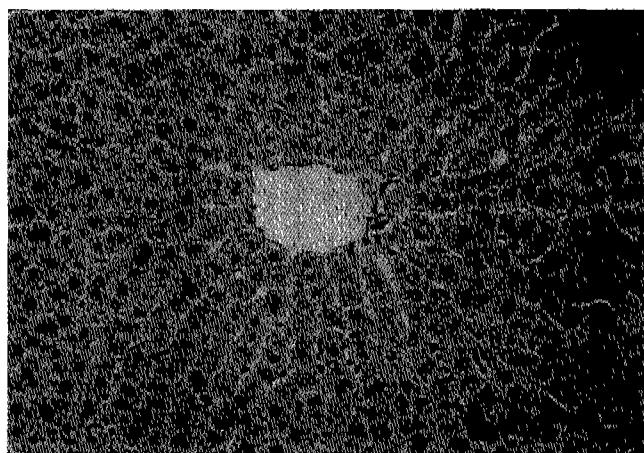


Fig. 1. Untreated group of normal liver (H&E, ×200). Note well-preserved lobular architecture.

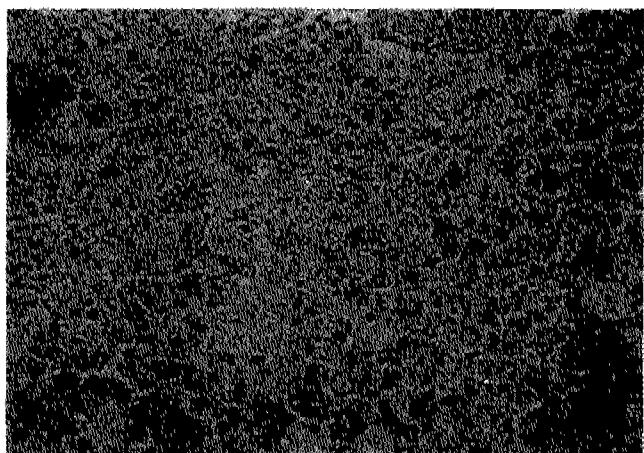


Fig. 2. CCl₄ (H&E, ×200). Note severe necrosis and hemorrhage with infiltration of inflammatory cells around the central vein(CV), zone 3. Ballooning degeneration of hepatocytes are frequently noted in the periphery of the hemorrhagic necrosis.

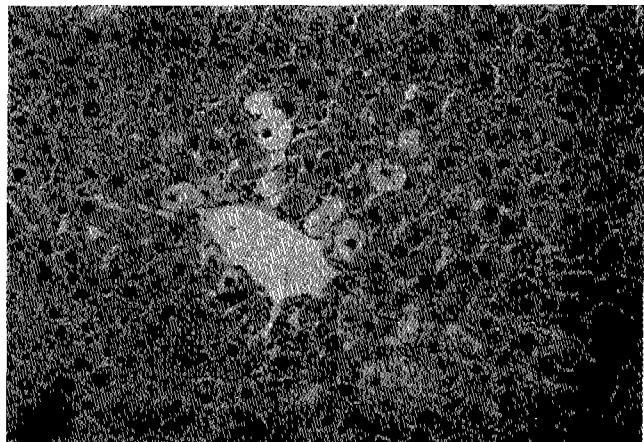


Fig. 3. S+CCl₄ (H&E, ×200). Note mild degree of ballooning degeneration and inflammatory cell infiltration just around the central vein. No gross necrosis is observed. S (*Cimicifuga heracleifolia*).

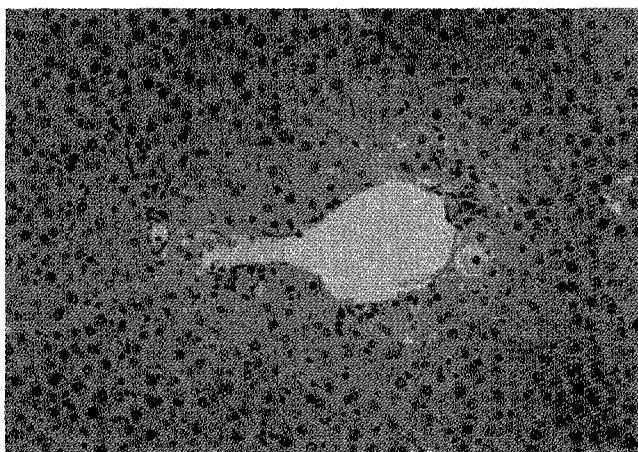


Fig. 4. S+VBH+CCl₄ (H&E, $\times 200$). Note mild degree of inflammatory cell infiltration, ballooning degeneration and pericentral necrosis. S(*Cimicifuga heracleifolia*), VBH(vitamin B complex).

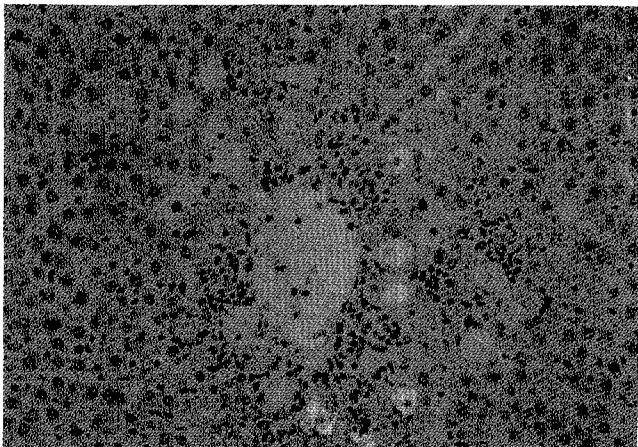


Fig. 5. S+SLM+CCl₄ (H&E, $\times 200$). Note moderate degree of inflammatory cell infiltration and ballooning degeneration in zone 3. The degree of histological damage is similar to SLM group. S(*Cimicifuga heracleifolia*), SLM(silymarin).

생성량을 측정한 결과 S+CCl₄투여군, S+VBH+CCl₄투여군, S+SLM+CCl₄투여군, VBH+CCl₄투여군 및 SLM+CCl₄투여군에서 CCl₄투여군에 비해 유의성있는 감소를 나타내었다 (Table VIII).

조직학적 검경

200배로 본 결과를 Fig. 1에서 Fig. 7에 나타내었다. CCl₄투여시 central vein(CV, zone 3)주변에서 염증세포침윤과 함께 심한 괴사 및 출혈을 볼 수 있었다. S+CCl₄투여군에서는 CV주변의 염증세포침윤 및 ballooning degeneration 정도가 완화됨이 보였으며, S+VBH+CCl₄투여군 역시 염증세포침윤 및 ballooning degeneration 정도의 완화와 중심주위 괴사 완화가 보였다. SLM+CCl₄투여군에서는 다른 군에 비해 상대적으로 조직학적상해가 크나 괴사범위를

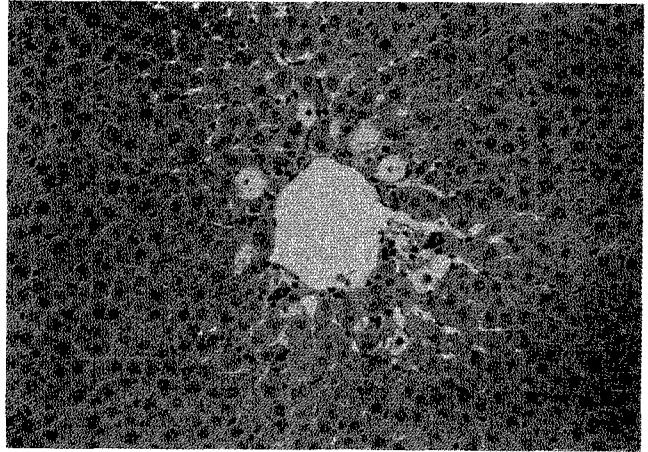


Fig. 6. VBH+CCl₄ (H&E, $\times 200$). Note scantily inflammatory cells and ballooning degeneration of hepatocytes confined to the small pericentral area. Large hyperchromatic nuclei, prominent nucleoli and frequent binucleated hepatocytes are suggestive of active regeneration following necrosis due to CCl₄ injection. VBH(vitamin B complex).

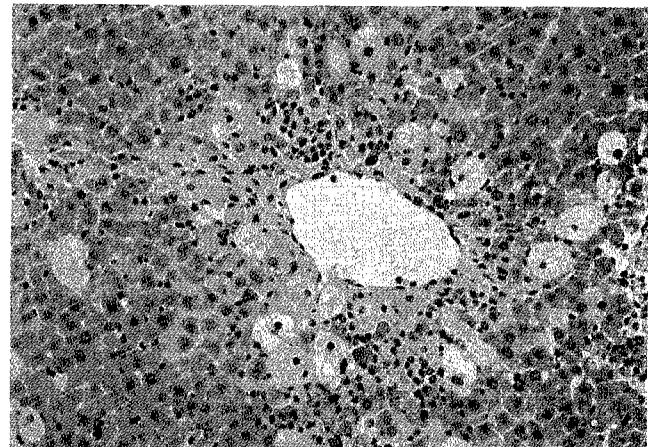


Fig. 7. SLM+CCl₄ (H&E, $\times 200$). Note moderate degree of inflammatory cell infiltration and ballooning degeneration with pericentral necrosis. Degree of histological damage is relatively higher than those of other experimental groups; however, the extent of necrosis is less than one-eighth of CCl₄ injection control group. SLM(silymarin).

볼 때 CCl₄투여군에 비해 감소됨을 알 수 있었다. S+SLM+CCl₄투여군은 SLM+CCl₄투여군과 비슷한 정도의 상해를 보였다. VBH+CCl₄투여군에서는 염증세포가 거의 없고 ballooning degeneration 역시 거의 없음을 볼 수 있었다. 거대 다염색체, 증식된 핵과 2핵소체 간세포들은 CCl₄로 유발된 간손상에 대해 재생된 것임을 보여주었다.

고 칠

천연약물인 생약은 과거 수천년동안 그 경험적 사용을

바탕으로 질병치료에 이용되어져 왔다. 그러나 그 광범위한 사용에 비해 정확한 약리작용이나 독성에 대한 연구없이 치료제로 사용되는 경우가 대부분이다. 인체는 간에 독작용을 일으키는 활성대사중간체로 전환될 수 있는 수많은 환경오염물질들과 약물에 노출되어 있다. 더욱 아직 그 독작용이 명확히 밝혀져 있지 않은 수많은 생약물을 고려해 볼 때 그 심각성은 더욱 커진다.

손상된 간으로부터 혈액에 방출된 간의 효소활성도 측정은 간독성연구에 있어서 가장 유용한 방법중 하나로서 (Awallacce, 1982) 혈청 중 AST와 ALT 등의 효소활성도의 상승은 간독성으로 인한 간세포의 파괴와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것이다(Hayes, 1982). AST활성도증가에 비해 ALT활성도증가가 훨씬 높게 상승된 결과는 ALT가 AST보다 간의 실질세포파괴에 더욱 직접적인 관련이 있다는 일반적인 견해와 일치되는 결과라고 생각된다(Wallach, 1978; Widman, 1983).

CCl_4 와 같은 간독성물질은 간조직내 과산화지질을 유도하여 지방산조성을 변화시켜 궁극적으로는 세포독성을 유발시킨다(Noll 등, 1984). 본 연구에서는 비교적 저용량으로 민감한 반응을 일으킬 수 있는 CCl_4 0.2 ml/kg 용량을 사용하였다. 일반적으로 간독성물질들은 간독성을 유발할 뿐 아니라 고용량이나 장기투여하는 경우 신장독성을 유발한다. 본 실험에서는 간이 손상된 경우 신장에 미치는 영향을 알아보려는 목적으로 BUN치와 creatinine치를 측정하였다. 간에서만 합성되며 교질삼투압을 유지시키는 albumin에 있어서 승마추출물투여시 CCl_4 투여군에 비해 별다른 변화가 없었으며 간질환과 영양장애의 지표로 사용되는 TP치 역시 유의성있는 변화를 보이지 않았다.

정상 간세포내의 지질량은 합성을, 이용률 및 분비율이 평형을 이룬 상태이다. 지방간의 근본적인 병태생리는 특히 간세포내의 중성지방이 혈장으로 분비되는 과정이 차단되는 것으로 지방간에서 간 중성지방이 억제되면 간 혈류량이 증가되어 조직학적으로 유효하게 작용할 수 있다는 보고도 있다(Hoyumba 등, 1975; Lombardi, 1966). 승마추출물투여시 지질대사와 지방간의 중요지표중 하나인 cholesterol 및 TG치에 있어서 유의성있는 변화를 보이지 못하였으나 다소 감소하였다.

CCl_4 가 간세포의 소포체에서 대사되어 trichloromethyl free radical같은 대사중간체로 되어 지질과산화를 초래하고 또 지질과산화물이 생체막에 구조적인 변화를 일으키며 내부의 효소계가 파괴됨으로써 혈액 및 조직내 과산화지질 함량이 증가하게 된다는 연구결과에 근거하여(Johansson 등, 1985; Pechnagel 등, 1973; Butler 등, 1990; Philippe 등, 1990; Fantone 등, 1982) 지질과산화를 thiobarbituric acid법을 이용하여 측정한 결과 모든 투여군에서 CCl_4 투여군에

비해 유의성있는 감소를 보였다. 이는 독성물질에 의해 노출된 동물실험에서는 지질 과산화반응이 촉진된다는 연구(Klimczak 등, 1984)와 비교할 때 본 연구에서는 유의성있는 감소를 보였으므로 oxygen free radicals과다생성으로 인한 조직손상을 방어할 수 있다고 사료된다.

간 cytosol 분획의 phase II 대사효소인 GST는 친전자 xenobiotics에 glutathione의 thiol기를 포함하는 반응 등 생체내에서 다양한 기능을 가진 dimeric효소이며, 또한 intracellular transport에 관여하며, 이러한 GST의 포함작용, 수송작용에 의해 내인성 또는 외인성 독성화합물의 해독화 작용이 가능하게 된다(Chance 등, 1979; Vos 등, 1990; Ploemen 등, 1990; Matharoo 등, 1989). 공격성중간체의 해독화과정에 관여하는 GST효소활성도의 변화는 CCl_4 유발간독성에 대한 승마추출물의 효과에 대한 작용점이 될 가능성이 있었으므로 검토하였으나 유의성 있는 변화를 보이지 않았고 VBH와 SLM을 전처리한 군에서 증가를 보였다. 이는 VBH가 약물해독반응 등에 관여하고 있다는 Alfred 등(1991)의 주장과 일치함을 보여주고 있다.

CCl_4 로 유발되는 조직학적 병변으로는 지질과산화로 인해 형성되는 free radical에 의한 midzonal과 centrilobular regions에 집중된 피사와 Kupffer 세포의 증가및 염증세포침윤 등을 볼 수 있었는데, 이에 대해 승마추출물은 중심정맥주위의 balloonity degeneration과 염증세포침윤정도를 감소시킴으로 CCl_4 로 유발된 간독성에 대해 억제효과가 있었음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- Alfred, G. G., Theodore, W. R., Alan, S. N. and Palmer, T. (1991). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th, Maxwell Macmillan International Editions, pp. 1523-1552.
- Arthus, C. G. (1991). *Textbook of Medical Physiology*, 8th, pp. 754-764.
- Awallacce. (1982). *Principles and Method of Toxicology*, Raven Press, 407-445.
- Butler, T. C. (1990). Reduction of carbon tetrachloride *in vivo* and reduction of carbon tetrachloride and chloroform *in vitro* by tissues and tissue constituents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **134**, 311-319.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527.
- Fantone, J. C., Ward, P. A. (1982). Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Pathol.* **107**, 397-418.
- Gordis, E. (1969). Lipid metabolites of carbon tetrachloride. *J. Clin. Invest.* **48**, 203-209.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.
- Hayes. (1982). *Principles and Methods of Toxicology*, Gabriel L. Plaa and William R. Hewitt, Raven Press, pp. 407-445.

- Hoyumba, A. M., Jr., Greene, H. L. Dunn, G. D. and Schenker, S. (1975). Fatty liver: Biochemical and clinical considerations. *Dig. Dis.* **20**, 1142.
- Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. (1985). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on and ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Letters.* **183**, 265-269.
- Klimczak, J., Wisniewska-Knypl, J. M. and Kolakowski, J. (1984). Stimulation of lipid peroxidation and heme oxygenase activity with inhibition of cytochrome P-450 monooxygenase in the liver of rats repeatedly exposed to cadmium. *Toxicology* **32**, 267-276.
- Lombardi, B. (1966). Considerations on the pathogenesis of fatty liver. *Lab. Invest.* **15**, 1.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. R. (1951). Protein measurement with the foline phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Martindale(The Extra Pharmacopoeia), (1989). **29th**, The pharmaceutical Press, p. 1613.
- Matharoo, B., Faulder, G. C. and Steange, R. C. (1989). Alpha, mu and pi glutathione S-transferases: Species(Talpa Europaea) differences in their expression. *Comp. Biochem. Physiol.* **94**, 343-347.
- Mathew, J. E. and Donald, G. B. (1963). Medical Toxicology, Diagnosis and Treatment of Human Poisoning, Elsevier, pp. 969-972.
- Noll, T. and Groot, H. (1984). The critical steady-state hypoxic conditions in carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes, *Biochim. Biophys. Acta.* **795**, pp. 356-362.
- Pechnagel, R. O. and Glende, E. A. Jr. (1973). Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of lethal cleavage. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **2**, 263-297.
- Philippe, L., Gilles, L., Claude, D. and Alain, B. et al. (1990). Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. *Biochem. Pharm.* **39**, 2027-2034.
- Ploemen, J. H. T. M., Van Ommen, B. and Van Bladeren, P. J. (1990). Inhibition of rat and human glutathione S-transferases isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathion conjugate. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 1631-1635.
- Pohl, L., Schulick, R., Hightet, R. and George, J. (1983). Identification of dichloromethyl carbene as a metabolite of carbon tetrachloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 367-372.
- Pohl, L., Schulick, R. and George, J. (1986). Reductive oxygenation mechanism of metabolism of carbon tetrachloride to phosgene by cytochrome p. 450. *Mol. Pharmacol.* **25**, 318-324.
- Reitman, S. and Frankel, S. (1957). *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 58-63.
- Relando, C., Garrido, A., Guerra, R. and Valenzuela, A. (1989). Silybin Dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by Acetaminophen on rat liver. *Planta Medica* **55**, 417-419.
- Stewart, R. D., Boettner, E. A., Southworth, R. R., et al. (1963). Acute carbon tetrachloride intoxication. *JAMA.* **183**, 994-997.
- Uchiyama, M. and Mihara, M. (1978). *Anal. Biochem.* **86**, 271-278.
- Vos, R. E. M. and Van Bladeren, P. J. (1990). Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* **41**, 241-265.
- Wallach, J. (1978). Interpretation of Diagnostic tests, 3th, Little&Brown and Co., Boston, **57**.
- Widman, F. K. (1983) Clinical interpretation of laboratory tests, 9th, F. A. Davis Co., Philadelphia, **295**.
- 김은주 (1992). 토복령 추출물이 Acetaminophen 간독성에 미치는 효과, 덕성여자대학교 석사학위논문.
- 박재갑 (1991). 인간생명과학, 서울대학교 의과대학, 서울대학교 출판부, pp. 449-461.
- 안영근 등 (1992). Biphenyl-Dimethyl-Dicarboxylate가 사염화 탄소로 투여된 생쥐의 면역 생물학적 반응에 미치는 효과.
- 오진희 (1988). 수중의 해독성 생약추출물이 Polychlorinated Biphenyls류의 독성에 미치는 영향에 관한 연구, 덕성여자대학교 석사학위논문.
- 유시명, 한대석 (1964). 약학총서 본초학, 동명사.
- 육창수, 안덕균 (1972). 현대본초학, 고문사.
- 이창복 (1989). 대한식물도감, 향문사.
- 정계영 (1993). Acetaminophen에 의한 간독성에 미치는 금은화의 효과, 덕성여자대학교 석사학위논문.
- 정정숙 (1992). Acetaminophen에 의한 간독성에 미치는 강활의 효과, 덕성여자대학교 석사학위논문.
- 증약대사전 (1985). 상해과학기술출판사, 소학관.
- 한대석 등 (1991). 생약학, 동명사.