

예덕나무피엑스의 사염화탄소 및 갈락토사민 유발 간독성에 대한 보호 및 치료효과

임화경 · 김학성* · 최흥석 · 최종원¹
충북대학교 약학대학, 경성대학교 약학대학¹

Protective and Therapeutic Effects of Malloti Cortex Extract on Carbon Tetrachloride- and Galactosamine-induced Hepatotoxicity in Rats

Hwa-Kyung LIM, Hack-Seang KIM*, Hong-Serck CHOI and Jong Won CHOI¹

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

¹College of Pharmacy, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

(Received February 4, 1999; accepted March 5, 1999)

Abstract – Hepatoprotective effects of Malloti cortex extract (MCE) from *Mallotus japonicus* against the carbon tetrachloride (CCl₄) and galactosamine (GalN) were investigated. Whereas serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels were markedly elevated after CCl₄ and GalN administration, pretreatment and posttreatment with MCE before and after the injection of CCl₄ and GalN resulted in decreases in elevated serum aminotransferase activities. Whereas CCl₄ and GalN treatment caused 3~7 fold increases in sorbitol dehydrogenase and γ -glutamyltransferase activities, pretreatment and posttreatment with MCE resulted in the blocking of CCl₄- and GalN-induced liver toxicity. The hepatoprotective effect of MCE was in part due to MCE-induced elevation of hepatic glutathione levels. Pretreatment and posttreatment with MCE also reduced increased lipid peroxidation induced by CCl₄ and GalN. These results suggest that MCE may be useful for the prevention and therapy of hepatotoxic pathogenesis. It is presumed that protective and therapeutic effects of MCE due to be inducible glutathione S-transferase and glutathione reductase activities, involving in glutathione-mediated detoxication and maintainment of glutathione content, respectively.

Keywords □ *Mallotus japonicus*, Malloti cortex extract, hepatoprotective effects, carbon tetrachloride, galactosamine

현대인들에게는 불규칙한 식사, 스트레스, 과도한 음주 및 흡연 등으로 인하여 간기능이 손상되거나, 심하면 간질환으로 발전하는 경우가 빈번하게 일어나고 있다. 이와 같은 간기능의 손상 및 간질환은 인체에 치명적인 영향을 미치며 또한 회복하기도 어렵다. 만성간염, 간경변 및 간암 등의 간질환은 거의 불치병으로 인식되어 현대인들에게 큰 위협이 되어 온 것도 사실이다. 따라서 이들 간기능 손상 및 간질환을 부작용이나 재발 없이 효과적으로 치료할 수 있는 약제의 개발이 강하게 요구되고 있다. 그 대표적인 간장치료제로 silymarin의 경우 국화과에 속하는 *Silybum marianum*의 열매에서 개발되었으며(Campos 등, 1989) 또한 가장 최근 개발된 dimethyl dimethoxy biphenylate(DDB)

는 오미자의 성분인 schizandrin과 유사한 인공합성물질로 간독성 치료효과가 보고된 바 있다(Martindale, 1989). 현재 임상적으로 널리 쓰이는 간질환치료제가 DDB, silymarin, ursodesoxycholic acid 및 vitamin B complex 등 그 질환의 심각성에 비해 치료제의 종류가 많지 않음을 볼 때 천연물에서의 간독성 해독제의 개발은 그 의의가 매우 크다고 하겠다.

예덕나무피(Malloti Cortex)는 예덕나무(*Mallotus japonicus* Mueller Agroviensis, 대극과 Euphorbiaceae)의 수피(樹皮)를 건조한 것이다. 예덕나무는 일명 야오동(野梧桐) 또는 적아백(赤芽柏) 등으로도 부르며 일본, 대만, 중국의 남부 및 한국의 남부지방에서 자생한다. 예덕나무피엑스는 현재 정장제로 사용되고 있으며(생약연구회저, 1994; 일본 약국방해설서, 1996), 항위궤양작용 및 항염증작용(喜多,

* To whom correspondence should be addressed.

1971)이 있는 것으로 알려져 있다. 독성이 없을 뿐만 아니라 일반 약리작용 및 대사에 대한 영향(關田 등, 1979)도 없는 것으로 보고된 바 있다. 성분으로는 bergenin, malloperonol, rutin 등 20여종이 있으며(일본약국방해설서, 1996), bergenin은 예덕나무피엑스의 활성성분으로 항위궤양작용(Okada 등, 1973)외에 항염작용(Swamalakshmi 등, 1984), 항고지혈작용(Jahromi 등, 1992) 등이 있고, 급성, 아급성 및 만성 독성 시험에도 독성(岡田 등, 1975)이 거의 없는 것으로 알려져 있다.

CCl_4 와 같은 간독성물질은 간조직내 지질과산화물을 유도하여 지방산 조성을 변화시켜 궁극적으로는 세포독성을 유발시킨다(Noll 등, 1984). CCl_4 가 간세포의 소포체에서 대사되어 trichloromethyl free radical 같은 대사중간체로 되어 지질과산화를 초래하고 또 지질과산화물이 생체막에 구조적인 변화를 일으키며 내부의 효소계가 파괴됨으로써 혈액 및 조직내 지질과산화물 함량이 증가하게 되어 심하면 세포괴사가 초래된다고 하였다(Fantone 등, 1982; Johansson 등, 1985; Letteron 등, 1990; Rechnagel 등, 1973).

Galactosamine(GalN)의 흰쥐에게 일회 투여하면 인간에게서 나타나는 간염과 유사한 간장질환을 유발한다. 간세포에 galactokinase와 galactose-1-P-uridyltransferase: uridine diphosphate(UDP)-glucose가 많기 때문에 GalN은 간에 특이성이 매우 높으며 다른 기관에는 거의 영향을 주지 않는다(Keppler 등, 1970; Maley 등, 1968). GalN은 간세포괴사 및 실질세포와 문맥아의 염증을 유발한다(Keppler와 Decker, 1969). 간독성은 UDP당 유도체의 형성에 의한 uridine phosphates의 농도 감소로 RNA와 glycoprotein의 생합성이 저해되어 세포막의 손상과 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가되어 유발된다(Decker 등, 1973; El-Mofty 등, 1975). GalN의 급성 중독시, glucose 항상성을 유지시키기 위한 대사장애가 일어나 간괴사가 일어나게 되며 만성중독시 간경변과 세포성 종양이 일어나게 된다(Farber 등, 1973; Iller와 Miller 등, 1972; Lesch 등, 1970).

이에 본 연구에서는 간질환의 예방 및 치료제 개발의 일환으로 사염화탄소 및 GalN으로 유발되는 간독성에 예덕나무피엑스의 간독성 예방 및 치료 효과를 검색할 목적으로 예덕나무피엑스를 용량별로 보호의 차원에서 경구로 전 투여하고 또한 치료의 차원에서는 후투여하여, 혈중의 생화학적 변화 및 간조직의 효소학적인 변동을 통해서 예덕나무피엑스의 사염화탄소 및 GalN 유발 간독성에 미치는 효과를 규명하고자 하였다.

실험방법

실험동물

한국 실험 동물센터에서 구입한 150 ± 20 g의 Sprague-

Dawley계 흰쥐를 최소한 일주일이상 본 동물실에서 일정한 조건(온도: $20 \pm 2^\circ C$, 습도: 60%, 명암: 12시간 light/dark cycle)에서 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 8마리를 한 군으로 하였다.

시료의 제조

예덕나무는 충북 속리산에서 채집하여 충북대 이경순 교수로부터 감정 후 예덕나무피를 음건하고 세절하였다. 건조한 예덕나무피 조말 1 kg에 증류수 10 L를 가하고 2시간씩 2회, 3회째에는 5 L를 가하고 2시간 $90 \sim 100^\circ C$ 수욕상에서 가온 추출하고 여과한 다음 여액을 수욕상($60^\circ C$)에서 감압농축건조(<10 mmHg)하여 예덕나무피엑스 160 g(16%)을 얻었다(일본약국방해의약품규격, 1993). 예덕나무피엑스는 증류수에 용해하여 실험에 사용하였다.

시료투여 및 사염화탄소 간독성 유발

예덕나무피엑스의 투여는 전투여(pretreatment) 및 후투여(posttreatment)의 방법으로 하였다. 예덕나무피엑스의 전투여는 예비실험 결과를 토대로 하여 다음과 같이 실험하였다. 예덕나무피엑스를 150, 300 및 600 mg/kg/day의 용량으로 7일 경구투여 후 CCl_4 를 동량의 올리브유에 용해하여 0.5 ml/kg의 용량으로 최종투여 12시간과 36시간에 복강내에 각각 투여하여 간독성을 유발시켰다. CCl_4 최종투여 12시간 경과 후 처치하였다. 예덕나무피엑스의 후투여는 실험시작과 12시간 후에 CCl_4 0.5 ml/kg을 복강투여하고 최초투여 후 24시간부터 예덕나무피엑스 150, 300 및 600 mg/kg/day을 7일간 경구투여하였다. 예덕나무피엑스 최종투여 24시간 경과 후에 처치하였다. 양성대조군으로 silymarin 100 mg/kg을 경구투여하였다. 실험동물은 실험전 8시간 동안 사료를 제거하고 물만 섭취케 하였다.

시료투여 및 galactosamine 간독성 유발

예덕나무피엑스의 투여는 전투여(pretreatment) 및 후투여(posttreatment)의 방법으로 하였다. 예덕나무피엑스의 전투여는 예비실험 결과를 토대로 하여 다음과 같이 실험하였다. 예덕나무피엑스를 150, 300 및 600 mg/kg/day의 용량으로 7일 경구투여한 다음, 24시간과 96시간에 GalN 400 mg/kg을 복강내에 투여하여 간독성을 유발시켰다. GalN 최종투여 72시간 경과 후 처치하였다. 예덕나무피엑스의 후투여는 실험시작(0시간)과 72시간 후에 GalN 400 mg/kg을 복강투여 하고 최초 GalN 투여 후 7일 후부터 예덕나무피엑스 150, 300 및 600 mg/kg/day을 7일간 경구투여 하였다. 예덕나무피엑스를 마지막으로 투여한 다음 24시간 후에 처치하였다. 양성대조군으로 silymarin 100 mg/kg을 경구투여하였다. 실험동물은 실험전 8시간 동안 사료를 제거하고 물만 섭취케 하였다.

효소원조제

흰쥐를 CO_2 gas로 마취시킨 후 복부를 절개하고 복부 대동맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여 생화학적 측정

에 사용하였으며 생리식염수를 관류한 후 채취한 간은 4배 량 정도의 인산완충액(pH 7.5)으로 마쇄하여 homogenate를 만든다. 이 homogenate를 1차 원심분리(600×g, 10분)하여 핵 및 미마쇄분을 제거한 상정액을 2차 원심분리(10,000×g, 20분)하여 mitochondrial fraction을 제거한 후 상정액은 다시 105,000×g로 1시간 원심분리하여 그 상정액(cytosolic fraction)을 효소원으로 사용하였다.

혈액성분의 측정

AST와 ALT의 활성은 Reitman과 Frankel(1957)의 방법에 따른 kit시약(아산제약)으로 실시하였다. Sorbitol dehydrogenase(SDH)의 활성은 Gerlach(1965)의 방법에 따른 kit 시약(Sigma, USA), γ -glutamyltransferase(γ -GT)의 활성은 Szaz(1969)의 방법에 따른 kit시약(아산제약)으로 측정하였다.

간효소 활성의 측정

Cytosolic fraction중 glutathione S-transferase(GST) 활성 측정은 Habig(1974) 등의 방법, glutathione reductase(GR) 활성은 Mize와 Langdon(1962)의 방법에 준하여 측정하였다. 간조직중 glutathione(GSH)과 지질과산화물(MDA) 함량 측정은 각각 Ellman법 (1959)과 Ohkawa법(1979)에 준하여 측정하였다.

단백질의 정량 및 통계처리

각 효소원 단백질 정량은 bovine serum albumin(Sigma Fr. IV)을 표준품으로 하여 Lowry 등(1951)의 Phenol 시약법에 따랐으며, 실험결과는 평균치±표준편차로 표시하였고 통계적 유의성은 Duncan's new multiple range test를 이용하였다.

실험결과

CCl₄ 유발 간독성

혈청중 alanine/aspartate aminotransferase 활성에 미치는 영향

전투여 실험에서 CCl₄ 단독투여군은 AST와 ALT의 효소 활성이 181.4 및 87.4 KA unit/ml로 정상군에 비해 각각 약 3배 증가하였다. 그러나 예덕나무피엑스를 전투여한 군은 증가된 효소활성을 현저히 감소시켰으며, 예덕나무피엑스 300 mg/kg군은 CCl₄ 단독투여군에 비해 AST와 ALT의 효소활성을 각각 약 45% 및 34%까지 억제시켜 간독성에 보호효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 1A). 또한 예덕나무피엑스를 후투여한 실험에서도 CCl₄ 단독투여군의 증가된 효소활성을 유의성있게 억제시켜, 예덕나무피엑스 300 mg/kg을 후투여한 군에서 CCl₄ 단독투여군에 비해 AST와 ALT의 활성이 각각 47%, 26%로 감소하여 치료효과가 있음을 확인하였다(Fig. 1B).

Sorbitol dehydrogenase와 γ -glutamyltransferase 활성에

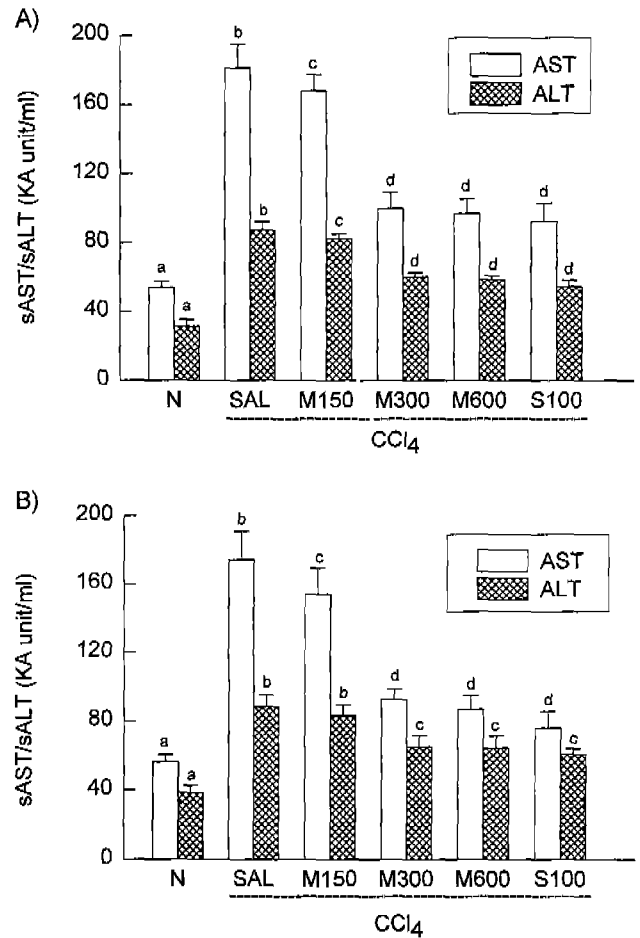


Fig. 1. Effects of *Malloti cortex extract* (M) on serum aminotransferases activities in CCl₄-intoxicated rats. A) Pre-treatment. B) Posttreatment. The data are expressed as a Mean \pm S.D. (n=8). Values having the same superscript (a,b,c,d) are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's new multiple range test. N; normal, Sal; saline, S; silymarin.

미치는 영향

전투여 실험에서, CCl₄ 단독투여군은 정상군에 비해 SDH와 γ -GT의 효소활성이 61.0 sigma unit/ml 및 189.8 mU/ml로 증가하여 CCl₄에 의한 간독성을 확인하였다. 예덕나무피엑스를 전투여한 군은 CCl₄로 증가된 효소활성을 유의성있게 감소시켜 300 mg/kg군에서는 각각 49%와 46%의 억제효과를 보였다(Table I). 이러한 억제효과는 예덕나무피엑스를 후투여한 실험에서도 같은 양상을 나타내어 예덕나무피엑스 300 mg/kg군에서 SDH와 γ -GT의 효소활성이 각각 37%와 48%까지 회복되었다.

간조직중 지질과산화물에 미치는 영향

전투여 실험에서, 정상군은 20.8 nmole/g liver인데 비해 CCl₄ 단독투여군은 67.4 nmole/g liver로 약 3.2배 증가되었으며, 예덕나무피엑스 300 mg/kg을 전투여한 군은 36%로 감소시켜 보호효과를 나타내었다(Fig. 2A). 또한 예덕나무

Table I. Effects of Malloti cortex extract (M) on sorbitol dehydrogenase (SDH) and γ -glutamyltransferase (γ -GT) in CCl₄-intoxicated rats

Group	Pretreatment		Posttreatment	
	SDH ¹⁾	γ -GT ²⁾	SDH	γ -GT
Normal	18.2±1.99 ^a	24.4±2.02 ^a	17.2±3.07 ^a	25.3±3.52 ^a
CCl ₄	61.0±4.80 ^b	189.8±17.85 ^b	59.9±4.90 ^b	190.5±16.07 ^b
M 150 mg/kg+CCl ₄	56.9±3.76 ^c	171.1±13.12 ^c	56.2±4.97 ^b	172.2±15.04 ^c
M 300 mg/kg+CCl ₄	31.2±3.57 ^d	102.8±10.29 ^d	37.6±3.42 ^c	98.7±7.77 ^d
M 600 mg/kg+CCl ₄	30.1±4.30 ^d	98.1±8.70 ^d	35.7±2.67 ^c	96.1±7.60 ^d
S 100 mg/kg+CCl ₄	24.4±2.37 ^e	91.8±15.40 ^d	23.5±1.72 ^d	81.5±7.60 ^d

The data are expressed as a Mean±S.D. (n=8). Values having the same superscript (a,b,c,d) are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's new multiple range test. Units: ¹⁾Sigma unit/ml, ²⁾mU/ml. S; silymarin.

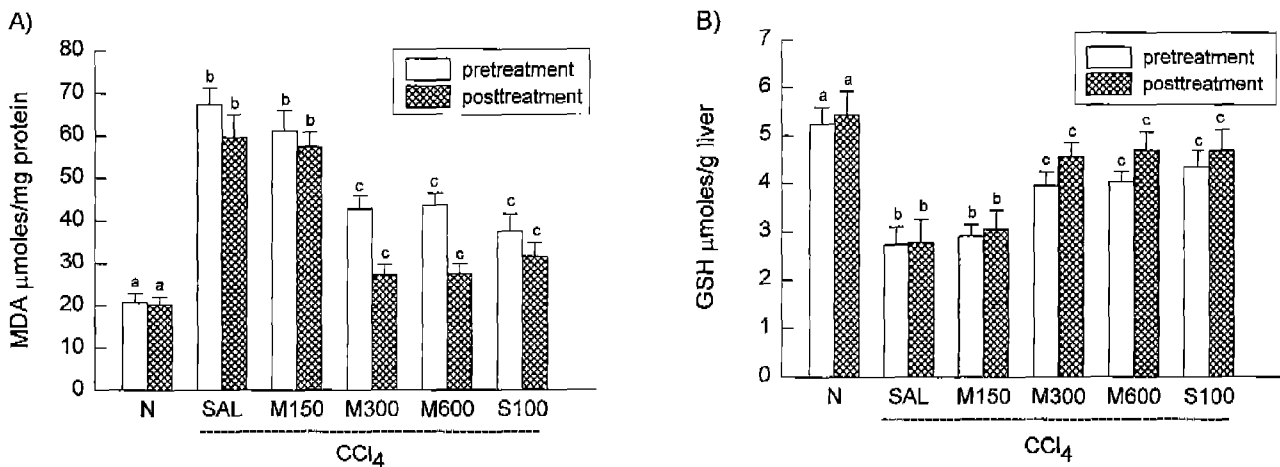


Fig. 2. Effects of Malloti cortex extract (M) on hepatic lipid peroxidation and glutathione levels in CCl₄-intoxicated rats. A) Hepatic lipid peroxidation. B) Hepatic glutathione levels. The data are expressed as a Mean±S.D. (n=8). Values having the same superscript (a, b, c, d) are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's new multiple range test. N; normal, Sal; saline, S; silymarin.

피엑스를 후투여한 실험에서도 같은 억제효과를 보여 54%의 치료효과를 나타내었다.

간조직중 glutathione 함량에 미치는 영향

전투여 및 후투여 실험에서, CCl₄ 단독투여군은 glutathione 함량이 각각 약 2.73 및 2.78 mole/g liver로 정상군보다 glutathione의 농도가 현저히 감소되었다. 한편, 예덕나

무피엑스 300 mg/kg을 전투여 및 후투여한 군은 CCl₄ 단독투여군에 비해 각각 glutathione 함량이 45% 및 64%정도로 증가되었다(Fig. 2B). 예덕나무피엑스군은 CCl₄ 간독성에 보호 및 치료효과를 나타내었다.

Glutathione S-transferase와 glutathione reductase 활성에 미치는 영향

Table II. Effects of Malloti cortex extract (M) on glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) in CCl₄-intoxicated rats.

Group	Pretreatment		Posttreatment	
	GST ¹⁾	GR ²⁾	GST	GR
Normal	252.3±13.78 ^a	24.6±1.90 ^a	248.7±15.27 ^a	26.1±2.39 ^a
CCl ₄	143.7±16.59 ^b	13.5±1.74 ^b	131.8±13.23 ^b	12.1±1.56 ^b
M 150 mg/kg+CCl ₄	152.2±13.14 ^b	14.4±1.54 ^b	149.7±15.19 ^c	13.4±1.22 ^b
M 300 mg/kg+CCl ₄	201.8±17.45 ^c	19.9±1.32 ^c	201.5±14.64 ^d	20.6±1.85 ^c
M 600 mg/kg+CCl ₄	198.4±16.54 ^c	20.0±1.55 ^c	203.0±15.52 ^d	21.3±1.91 ^c
S 100 mg/kg+CCl ₄	140.3±15.70 ^b	13.4±1.47 ^b	134.1±15.40 ^b	11.1±1.82 ^b

The data are expressed as a Mean±S.D. (n=8). Values having the same superscript (a, b, c, d) are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's new multiple range test. Units: ¹⁾1,2-dichloro-4-nitrobenzene nmole/mg protein/min, ²⁾GSH formed nmole/mg protein/min. S; silymarin.

전투여 및 후투여 실험에서, CCl₄ 단독투여군은 GST의 활성이 각각 정상군보다 약 1/2배로 활성이 현저하게 감소되었다. 예덕나무피엑스를 전투여 및 후투여한 군은 감소된 활성을 현저히 증가시켜, 300 mg/kg을 투여한 군은 40% 및 54%로 활성이 증가하였다(Table II). CCl₄ 단독 투여군의 GR의 활성은 전투여 및 후투여에서도 약 1/2배로 활성이 감소하였다. 예덕나무피엑스를 전투여 및 후투여한 군은 CCl₄ 단독 투여군보다 효소활성이 각각 약 47% 및 70% 증가하여 보호 및 치료효과를 보였다. 그러나 silymarin은 전투여 및 후투여 실험 모두 감소된 GST와 GR의 활성에 영향을 주지 않았다.

Galactosamine 유발 간독성

혈청중 alanine/aspartate aminotransferase 활성에 미치는 영향

전투여 실험에서 GalN 단독 투여군은 AST와 ALT의 효소활성이 105.8 및 56.0 KA unit/ml로 정상군에 비해 각각 약 2배 증가하였다. 그러나 예덕나무피엑스를 전투여한 군은 증가된 효소활성을 현저히 감소시켰으며, 예덕나무피엑스 300 mg/kg를 투여한 군은 AST와 ALT의 효소활성이 각각 69.0 및 39.7 KA unit/ml로 GalN 단독투여군에 비해 35%, 29% 억제하여 보호효과를 보였다(Fig. 3A). 또한 예덕나무피엑스를 후투여한 실험에서도 GalN에 의해 증가된 효소활성을 유의성있게 감소시켰으며, 예덕나무피엑스 300 mg/kg을 후투여한 군에서는 GalN 단독투여군에 비해 각각 34%, 38%까지 억제하여 GalN로 유도된 간독성에 치료효과를 나타내었다(Fig. 3B).

Sorbitol dehydrogenase와 γ -glutamyltransferase 활성에 미치는 영향

전투여 실험에서 GalN단독 투여군은 SDH와 γ -GT의 효소활성이 54.5 sigma unit/ml 및 84.2 mU/ml로 증가하여 정상군에 비해 GalN에 의한 간독성을 확인하였다. 예덕나무피엑스를 전투여한 군은 GalN로 증가된 효소활성을 유의성있게 감소시켜 300 mg/kg를 전투여한 군에서는 각각 46%, 41%의 억제효과가 관찰되었다(Table III). 마찬가지로

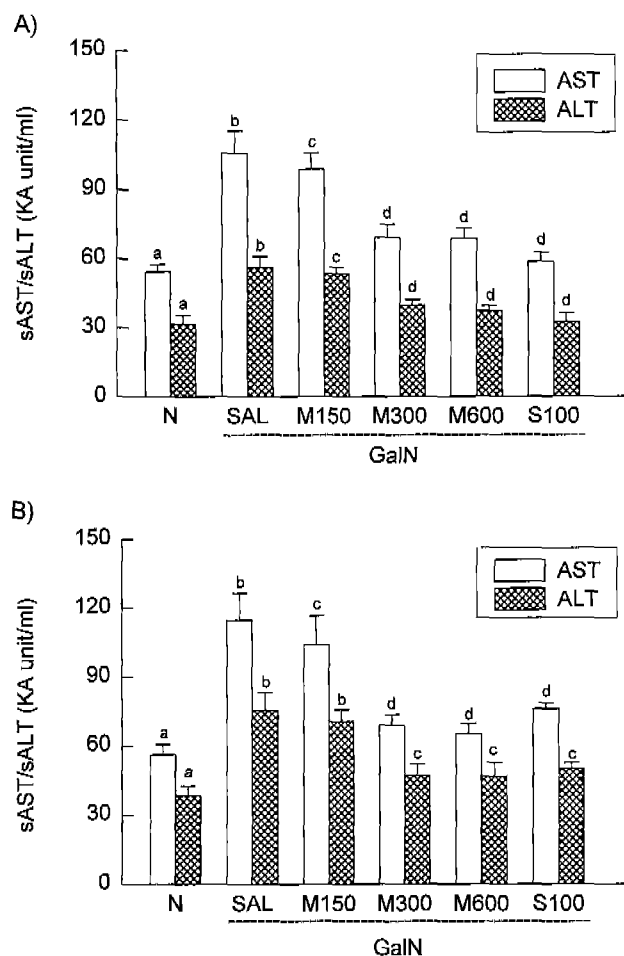


Fig. 3. Effects of *Malloti cortex extract* (M) on serum aminotransferases activities in GalN-intoxicated rats. A) Pre-treatment. B) Post-treatment. The data are expressed as a Mean \pm S.D. (n=8). Values having the same superscript (a, b, c, d) are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's new multiple range test. N; normal, Sal; saline, S; silymarin.

로, 예덕나무피엑스를 후투여한 실험에서도 같은 억제효과를 나타내어 예덕나무피엑스 300 mg/kg을 투여한 군은

Table III. Effects of *Malloti cortex extract* (M) on sorbitol dehydrogenase (SDH) and γ -glutamyltransferase (γ -GT) in galactosamine-intoxicated rats

Group	Pretreatment		Posttreatment	
	SDH ¹⁾	γ -GT ²⁾	SDH	γ -GT
Normal	18.2 \pm 1.99 ^a	24.4 \pm 2.02 ^a	17.2 \pm 3.07 ^a	25.3 \pm 3.52 ^a
GalN	54.5 \pm 5.29 ^b	84.2 \pm 4.49 ^b	49.5 \pm 4.49 ^b	82.0 \pm 6.53 ^b
M 150 mg/kg+GalN	50.3 \pm 3.94 ^c	79.4 \pm 9.07 ^b	44.6 \pm 3.66 ^c	76.2 \pm 5.37 ^c
M 300 mg/kg+GalN	29.6 \pm 4.08 ^d	49.8 \pm 4.82 ^c	31.3 \pm 2.87 ^d	45.1 \pm 4.11 ^d
M 600 mg/kg+GalN	27.8 \pm 3.24 ^d	47.6 \pm 4.32 ^c	29.7 \pm 2.28 ^d	45.1 \pm 3.19 ^d
S 100 mg/kg+GalN	29.5 \pm 2.63 ^d	35.9 \pm 4.39 ^d	32.9 \pm 2.40 ^d	47.3 \pm 3.90 ^d

The data are expressed as a Mean \pm S.D. (n=8). Values having the same superscript (a, b, c, d) are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's new multiple range test. Units: ¹⁾Sigma unit/ml, ²⁾mU/ml. S; silymarin.

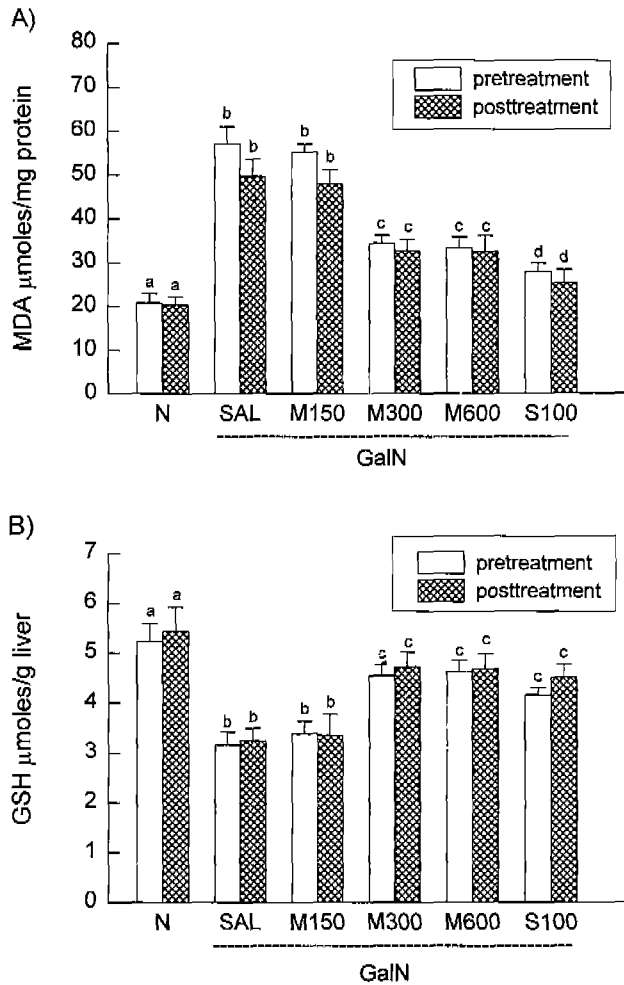


Fig. 4. Effects of Malloti cortex extract (M) on hepatic lipid peroxidation and glutathione levels in GalN-intoxicated rats. A) Hepatic lipid peroxidation. B) Hepatic glutathione levels. The data are expressed as a Mean \pm S.D. (n=8). Values having the same superscript (a, b, c, d) are not significantly different each other ($p < 0.05$) by Duncan's new multiple range test. N; normal, Sal; saline, S; silymarin.

SDH와 γ -GT의 활성이 각각 34%, 45%까지 감소되어 치료 효과를 나타내었다.

간조직 중 지질과산화물에 미치는 영향

전투여 실험에서, 정상군은 20.8 nmole/g liver인데 비해 GalN 단독투여군은 57.2 nmole/g liver로 약 2.9배 증가되었으며, 예덕나무피엑스 300 mg/kg을 전투여한 군은 40%까지 억제시켰다(Fig. 4A). 또한 후투여한 실험에서도 예덕나무피엑스 300 mg/kg 투여군은 GalN 단독투여군에 비해 지질과산화물의 함량을 34%까지 감소시켰다.

간조직중 glutathione 함량에 미치는 영향

전투여 및 후투여 실험에서, GalN 단독투여군은 glutathione 함량이 각각 약 3.16 및 3.24 mole/g liver로 정상군보다 glutathione의 농도가 현저히 감소되었다. 한편, 예덕나무피엑스 300 mg/kg을 전투여 및 후투여한 군은 GalN 단독 투여군에 비해 각각 glutathione 함량이 44% 및 46% 정도로 증가되어 GalN으로 유발된 간독성에 보호 및 치료효과가 있음을 확인하였다(Fig. 4B).

Glutathione S-transferase와 glutathione reductase 활성에 미치는 영향

전투여 및 후투여 실험에서, GalN 단독투여군은 GST의 활성이 각각 정상군보다 약 164.6 및 162.3 1,2-dichloro-4-nitrobenzene nmole/mg protein/min으로 현저히 감소된 활성을 나타내었다. 예덕나무피엑스를 전투여 및 후투여한 군은 감소된 활성을 증가시켜, 300 mg/kg을 투여한 군은 모두 28%까지 증가하였다. GalN 단독 투여군의 GR의 활성은 전투여 및 후투여시 각각 16.2 및 16.1 GSH formed nmoles/mg protein/min 정도로 활성이 감소하였다. 예덕나무피엑스 300 mg/kg를 전투여 및 후투여한 군은 GalN 단독 투여군보다 효소활성이 증가하여 각각 30%, 33%의 회복효과를 보였다(Table IV). 그러나 silymarin 투여군은 전투여 및 후투여 실험 모두 감소된 GST와 GR의 활성에 영향을 주지 않았다.

Table IV. Effects of Malloti cortex extract (M) on glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) in galactosamine-intoxicated rats

Group	Pretreatment		Posttreatment	
	GST ¹⁾	GR ²⁾	GST	GR
Normal	252.3 \pm 13.78a	24.6 \pm 1.90a	248.7 \pm 15.27a	26.1 \pm 2.39a
GalN	164.6 \pm 14.69b	16.2 \pm 1.48b	162.3 \pm 15.23b	16.1 \pm 1.80b
M 150 mg/kg+GalN	176.1 \pm 13.65b	18.4 \pm 1.58c	169.1 \pm 17.81b	17.5 \pm 1.71b
M 300 mg/kg+GalN	210.1 \pm 15.16c	21.1 \pm 1.64d	208.1 \pm 14.65c	21.4 \pm 1.87c
M 600 mg/kg+GalN	208.4 \pm 12.23c	21.3 \pm 1.27d	212.5 \pm 13.87c	21.5 \pm 1.80c
S 100 mg/kg+GalN	169.1 \pm 18.00b	15.9 \pm 0.43b	158.3 \pm 9.68b	15.5 \pm 1.10b

The data are expressed as a Mean \pm S.D. (n=8). Values having the same superscript (a,b,c,d) are not significantly different each other ($p < 0.05$) by Duncan's new multiple range test. Units: 1)1,2-dichloro-4-nitrobenzene nmole/mg protein/min, 2)GSH formed nmoles/mg protein/min. S; silymarin.

고 찰

Transaminase는 amino기 전이반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 임상적으로 가장 많이 이용되고 있는 AST와 ALT가 있는데 이들 효소들은 amino acid와 α -keto acid와의 사이에 amino기 전이반응을 촉매하는 것으로 체내에 널리 분포되어 있다. 이들이 간손상의 지표로 널리 사용되는 것은 간세포 손상시 세포 밖으로 유출되는 유출효소로서 이 과정은 세포내의 energy 공급이 감소된 결과로 세포내의 K^+ 이온이 세포외로 유출되고 Na^+ , Ca^{2+} 및 수분이 세포내로 유입이 된다. 그 결과 세포는 팽창되고, 세포막이 늘어나게 되어 세포질에 존재하는 AST와 ALT가 유출된다. 혈청 중 AST와 ALT 등의 효소활성도의 상승은 간독성으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 효소가 혈중으로 유리되어 나타내므로 간독성 연구에 이용되고 있다(Plaa and Charbonneau, 1994). 본 실험에서는 CCl_4 및 GalN 투여로 증가된 AST와 ALT 효소활성이 예덕나무피엑스의 전투여 및 후투여로 크게 감소되었다.

그 외 간기능의 지표가 되는 혈청 SDH 및 γ -GT는 간세포의 변성이나 괴사를 반영하는 효소로서 잠재성 간장애의 분류 및 급성 간염 발병의 조기진단에 필수적인 요소로서 간조직 손상시 다량 혈중으로 유출되어 그 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다(Asada와 Galambos, 1963; Whitfield 등, 1972). 예덕나무피엑스는 투여 후 SDH와 γ -GT의 활성이 억제되어 CCl_4 및 GalN에 의한 간조직의 손상이나 간세포막을 안정화시켜서 나타나는 결과가 아닌가 생각된다.

아미노당인 GalN은 galactose(Zieve 등, 1988) 대사장애를 통한 uridine triphosphate, uridine diphosphate 및 uridine monophosphate 등의 농도 감소로 RNA의 합성이 저해되어 지질의 축적을 유도하고(Decker와 Keppler, 1973; Wang과 Wendel, 1990), 또한 세포막 성분중 탄수화물의 조성과 세포내 Ca^{2+} 농도를 변화시켜 간조직의 손상을 유발한다(El-Mofly 등, 1975; Keppler 등, 1968). GalN의 급성중독시에는 간괴사, 만성중독의 경우에는 간경변과 세포성 종양이 일어나게 된다(Farber 등, 1973; Iller와 Müller 등, 1972; Lesch 등, 1970).

일반적으로 생체조직 세포막의 손상은 세포막 구성성분인 polyunsaturated fatty acid의 과산화가 그 한가지 요인으로 지적되고 있는데, 지질과산화의 생체 외적인 요인 뿐만 아니라 내적인 요인에 의하여 생성된 oxygen free radical들 때문에 야기되며, 세포의 성분이나 기질, 특히 불포화지방산이 다량 존재하는 생체막에 연쇄적인 과산화적 손상을 입힌다. 이에 근거하여 지질과산화물 함량을 측정된 결과 예덕나무피엑스를 전처리한 군은 CCl_4 및 GalN 단독 투여군에 비해 유의성있는 감소를 보였다. 이는 독성물질에 노출시 지질과산화반응이 촉진된다는 연구(Klimczak 등, 1984)

와 비교할 때 본 연구에서는 유의성있는 감소를 보였으므로 oxygen free radicals 과다생성으로 인한 조직손상을 방어할 수 있다고 사료된다.

간에서의 glutathione은 단백질이나 DNA합성, amino acid의 이동 반응 및 thiol기의 저장 등과 같이 생물학적인 중요한 여러 가지 반응에 직접 관여한다. 여러 가지 해독반응에서 체내에서 일차적으로 산화된 대사물을 포함하는 과정에서 내인성 반응체인 glutathione을 이용하여 체내의 독성물질을 전이 분해시키는 glutathione S-transferase(GST)의 역할을 생각할 수 있다(Chance 등, 1979; Matharoo 등, 1989; Ploemcn 등, 1990; Vos 등, 1990). 공격성 중간체의 해독화작용에 관여하는 GST 효소활성은 예덕나무피엑스의 전투여 및 후투여로 유의성있는 증가를 나타내었다.

친전자성 물질들과 활성산소 및 과산화지질의 최종 해독 과정에는 필연적으로 glutathione이 요구되며 이 물질의 세포내 함량 유지에는 합성계 효소와 해독반응 후 생성되는 산화형 glutathione의 glutathione reductase가 관여하고 있다. 예덕나무피엑스를 투여 후 CCl_4 및 GalN에 의한 glutathione의 함량 감소를 경감시키는 기전을 규명할 목적으로 GR의 활성을 측정된 결과 CCl_4 및 GalN 단독 투여군보다 예덕나무피엑스를 전투여 및 후투여함으로써 효소 활성이 현저히 증가되었다. 그러나 silymarin은 GST와 GR의 효소활성에 영향을 주지 않아, 예덕나무피엑스와 silymarin의 간독성 보호 및 치료효과 작용기전이 다른 것을 알 수 있다. 이상의 결과로 보아 GST의 활성이 CCl_4 의 투여로 현저히 억제되던 것이 예덕나무피엑스의 투여로 증가되는 현상은 간 조직중의 glutathione의 함량 변동에 의하여 나타나는 것으로 생각되며 glutathione의 함량의 조절은 GR의 활성변동에 의하여 조절되고 있는 것으로 사료된다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때 예덕나무피엑스에 의한 간독성의 예방 및 치료작용 기전은 glutathione을 매개로 한 해독과정에 관여하는 GST 및 생체내에서 glutathione의 함량 유지에 관여하는 glutathione reductase의 활성 유도작용에 기인되어 나타나는 것으로 생각되며, 이에 의해 유발되는 지질과산화의 생성을 예방할 수 있을 것으로 추측된다. 또한 예덕나무피엑스의 간독성의 보호 및 치료효과를 나타내는 활성성분의 간독성에 미치는 영향이 더욱 연구되어야 할 것이다.

참고문헌

- Asada, M. and Galambos, R. J. (1963). Sorbitol dehydrogenase and hepatocellular injury: an experimental and clinical study. *Gastroenterology* **44**, 578-587.
- Campos, R., 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.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527-605.
- Decker, K. and Keppler, D. (1973). Galactosamine-induced liver injury. In *Progress in liver disease*. (Popper, H. and Schaffer, F., ed.), vol. 14, p. 183, Grune & Stratton, New York.
- Decker, K., Keppler, D. and Pausch, J. (1973). The regulation pyrimidine nucleotide level and its role in experimental hepatitis. *Adv. Enzyme Regul.* **11**, 205-230.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
- El-Mofty, S. K., Scrutton, M. C., Serroni, A., Nicolini, C. and Farber, J. L. (1975). Early, reversible plasma membrane injury in galactosamine-induced liver cell death. *Am. J. Pathol.* **79**, 579-595.
- Fantone, J. C., Ward, P. A. (1982). Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Pathol.* **107**, 395-418.
- Farber, J. L., Gill, G. and Konishi, Y. (1973). Prevention of galactosamine-induced liver cell necrosis by uridine. *Am. J. Pathol.* **72**, 53-62.
- Gerlach, U. (1965). Sorbitol dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmyer, H.U., Ed), pp. 761-767, Elsevier, New York.
- 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.
- Iller, E. C. and Miller, J. A. (1972). Hepatocarcinogenesis by chemicals. In *Progress in liver disease* (Popper, H. and Schaffner, F., ed.), vol. 5, p. 699. Grune & Stratton, New York.
- Jahromi, M. A. F., Chansouria, J. P. N. and Ray, A. B. (1992). Hypolipidaemic activity in rats of bergenin, the major constituent of *Flueggea microcarpa*. *Phytother. Res.* **6**, 180-183.
- Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. (1985). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on an ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Letters* **183**, 265-269.
- Keppler, D. and Decker, K. (1969). Studies on the mechanism of galactosamine hepatitis: Accumulation of galactosamine-1-phosphate and its inhibition of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Eur. J. Biochem.* **10**, 219-225.
- Keppler, D., Lesch, R., Reutter, W. and Decker, K. (1968). Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp. Mol. Pathol.* **9**, 279-290.
- Keppler, D., Rudigier, J. F. M., Bischoff, E. and Decker K. (1970). The trapping of uridine phosphates by D-galactosamine, D-galactosamine and 2-deoxy-D-galactose. *Eur. J. Biochem.* **17**, 246-253.
- 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.
- Lesch, R., Reutter, W., Keppler, D. and Decker, K. (1970). Liver restitution after acute galactosamine hepatitis: Autoradiographic and biochemical studies in rats. *Expl. Mol. Pathol.* **12**, 58-69.
- Letteron, P., Labbe, G., Degott, C., Berson, A., Fromenty, B., Delaforge, M., Larrey, D. and Pessayre, D. (1990). Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 2027-2034.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Maley, F., Tarentino, A. L., McGarrahan, J. F. and Giacco, R. (1968). The metabolism of D-galactosamine and N-acetyl-D-galactosamine in rat liver. *Biochem. J.* **107**, 637-644.
- Martindale. (1989). The extra pharmacopoeia, the Pharmaceutical Press, p. 1613.
- Matharoo, B., Faulder, G. C. and Strange, R. C. (1989). Alpha, mu and pi glutathione S-transferases: species (*Talpa europaea*) differences in their expression. *Comp. Biochem. Physiol. B* **94**, 343-347.
- Mize, C. E. and Langdon, R. G. (1962). Hepatic glutathione reductase: I. Purification and general kinetic properties. *J. Biol. Chem.* **237**, 1589-1595.
- Noll, T. and de Groot, H. (1984). The critical steady-state hypoxic conditions in carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes, *Biochim. Biophys. Acta.* **795**, 356-362.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
- Okada, T., Suzuki, T., Hasobe, S. and Kisara, K. (1973). Bergenin 1. Antiulcerogenic activities of bergenin. *Nippon Yakurigaku Zasshi-Folia Pharmacologica Japonica* **69**(2), 369-378.
- Plaa, G. L. and Charbonneau, M. (1994). Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes, A. W., Ed), pp. 839-870, Raven Press., New York.
- Ploemen, J. H., van Ommen, B. and van Bladeren, P. J. (1990). Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 1631-1635.
- Rechnagel, R. O. and Glende, E. A. Jr. (1973). Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **2**, 263-297.
- Reitman, S. and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 56-63.
- Swarnalakshmi, T., Sethuraman, M. G., Sulochana, N., Arivudainambi, R. (1984) A noe on the antiinflammatory activity of bergenin *Curr. Sci.*, **53**(17), 917.
- Szaz, G. (1969). A kinetic photometric method for serum γ -glutamyltranspeptidase. *Clin. Chem.* **15**, 124-136.
- Vos, R. M. and van Bladeren, P. J. (1990). Glutathione S-transferase in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* **75**, 241-265.
- Wang, J. F. and Wendel, A. (1990). Studies on the hepatoto-

- xicity of galactosamine/endotoxin or galactosamine/TNF in the perfused mouse liver. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 267-270.
- Whitfield, J. B., Pounder, R. E., Neale, G. and Moss, D. W. (1972). Serum γ -glutamyl traspeptidase activity in liver disease. *Gut* **13**, 702-708.
- Zieve, L., Anderson, W. R. and Dozeman. R. (1988). Hepatic regenerative enzyme activity after diffuse injury with galactosamine: relationship to histologic alterations. *J. Lab. Clin. Med.* **112**, 575-582.
- 岡田勉 등 (1975). 基礎와 臨床, **9**(5), pp. 96-106, 日本.
- 關田潔 등 (1979). 日本新藥株式會社 資料 p. 1-6.
- 생약연구회저 (1994). 현대생약학, pp. 185-186, 학명사.
- 일본약국방해설서 (1996). D-4, P 1-3, 광천서림, 일본.
- 일본약국방외의약품규격 (1993). pp. 151-152 약업시보사, 일본.
- 喜多知子 (1971). アカメガシワ(*Mallotus japonicus* Muell. Arg.)の藥理學的研究. 西國醫誌, **27**(1), 61-75.