

대황황련해독탕의 사염화탄소 유발 간장해 보호효과 및 급성독성

김영석 · 정은아¹ · 장종철 · 양형길 · 김남재^{1*} · 조기호 · 배형섭 · 이경섭 · 김동현²

경희대학교 한의과대학, ¹동서의학연구소, ²약학대학

Effect of Daewhang-whangryunhaedok-Tang on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity and Acute Toxicity

Kim Young-Suk, Jung Eun-Ah,¹ Chang Jong-Chul, Yang Hyung-Kil, Kim Nam-Jae,^{1*}

Cho Gi-Ho, Bae Hyung-Sup, Lee Kyung-Sup and Kim Dong-Hyun²

College of Oriental Medicine, ¹East-West Medical Research Institute and

²College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-702, Korea

Abstract – This study was performed to evaluate hepatoprotective effect of Daewhang-whangryunhaedok-Tang(DWT) on liver injured rats induced by CCl₄ and the acute oral toxicity of it in mice. The activities of serum transaminase(ALT/AST), alkaline phosphatase(ALP) and lactic dehydrogenase (LDH), the levels of serum total cholesterol(TC) and triglyceride(TG), change of liver enlargement, and inhibitory activities of lipid peroxidation, catalase and glutathione-S-transferase(GST) in liver microsome were determined in hepatotoxic rats induced by CCl₄. DWT was significantly reduced the serum ALT, AST, ALP, LDH, TC and TG levels. And, the increase of lipid peroxidation, decrease of catalase and GST activities in the liver microsome of CCl₄-intoxicated rat were significantly improved by the treatment of DWT. Male and female mice were administered maximum dosages of 5,000 mg/kg b.w. of DWT. After single oral administration of DWT to mice, we observed them daily for 2 weeks. DWT did not induce any toxic signs in the mortalities, clinical signs, body weight changes, and gross necropsy findings of mice. Based on these results, it is concluded that DWT may have the hepatoprotective effect on CCl₄ induced hepatotoxicity in rats. Also, DWT may have no side effect and its LD₅₀ value may be over 5,000 mg/kg b.w. in mice.

Key words – Daewhang-whangryunhaedok-Tang; hepatotoxicity; hepatoprotective drugs; CCl₄; acute oral toxicity

간은 인체에서 가장 큰 장기이며 소화배설기능, 영양소 저장, 새로운 물질합성, 해로운 화학물질의 해독시키는 기능 등을 담당하고 있다. 간의 주요한 기능은 대사와 해독작용으로 외부로부터 유입되는 세균이나 virus와 같은 미생물 뿐만 아니라 섭취된 각종 화학물질 등 외인성 이물들은 주로 간에 존재하는 각종 효소들에 의하여 대사되어 약효를 발현시키는 물질 또는 독성을 유발시킬 수 있는 물질을 만드는 역할을 담당한다.¹⁾ 한편, 간장은 매우 완충능력이 큰 기관이지만 여러 가지 물리화학적 자극뿐만 아니라 stress와 같은 정신적 인자를 포함하여 외부의 손상에 대하여 직접적으로 반응함으로써 간염, 간경화 등 간장해 질환이 유발되기 쉽다.

간질환에 대한 치료는 우선 원인을 제거하는 것이 가장

중요하며 원인을 제거하기 위하여 간장해 치료약이 많이 개발되어 사용되고 있으나 결정적으로 유효한 약물은 별로 없다. 한편, 우리 나라를 비롯하여 동아시아 지역에서는 천연물을 기원으로 하는 한약재를 조합한 한방방제가 간장해 치료 및 간보호 약물로서 오랜 기간동안 경험적으로 널리 이용되고 있다.

한방약물로부터 간장해 치료약물 및 보호약물을 개발할 목적으로 지질과산화 형성억제효과나 CCl₄, d-galactosamine 등 화학물질 처치로 유발된 간장해에 대한 보호효과를 지닌 약물을 여러 연구자들에 의하여 보고된 바 있다.^{2,3,4,5)} 이에 옛부터 상한(傷寒)에 열이 나며 번조(煩燥)해하고 잠을 자지 못하거나 일체의 열독(熱毒)을 치료하는 데 유효한 것으로 기록되어 있는 황련해독탕^{6,7)}에 대황을 가미한 대황황련해독탕의 간장해 보호효과를 검토하고자 하였다.

대황황련해독탕은 황련, 황금, 황백, 치자로 구성되어 있

*교신저자(E-mail) : njkim@khmc.or.kr

는 황련해독탕에 다양한 활성을 나타내는 대황을 가미하여 방제를 구성한 것으로 황련해독탕의 효능에 비하여 대황을 가미함으로써 *in vitro* 및 *in vivo*에서 항고지혈증 효과가 증강됨을 보고한 바 있다.^{8,9)} 따라서, 대황황련해독탕의 간장해보호작용을 추구하고자 하는 연구의 일환으로서 지질과산화에 기인하는 것으로 알려진 CCl_4 처치로 간장해를 유발시킨 후 혈중의 생화학적 변화 및 간조직의 효소학적 변동을 통하여 간장해 보호효과를 평가하였다. 그리고 대황황련해독탕의 안전성을 평가하고자 1회 경구 투여 급성독성에 대한 영향을 검토하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에서 사용한 황금, 황련, 황백, 치자, 대황은 서울시 경동시장에서 구입하여 대한약전의 규정에 적합한 것을 사용하였으며,¹⁰⁾ voucher specimen은 본 연구소에 보관하고 있다.

시료의 조제 - 시료의 조제는 전보^{8,9)}와 동일한 방법에 따라 80% 에탄올로 추출하여 동결건조한 것으로 처방비율에 따라 조합하여 사용하였고, 대황황련해독탕의 처방내용은 황련, 황금, 황백, 치자 및 대황은 동량의 비율로 하였다.

시약 및 기구 - 시약으로 혈청 중 transaminase(ALT & AST), alkaline phosphatase 및 lactic dehydrogenase 효소활성도와 total cholesterol 및 triglyceride 함량 측정용 kit 시약은 아산제약주식회사(한국), glutathione, EDTA-K, KCl, sucrose는 Sigma사(미국) 제품을, thiobarbituric acid는 BDH Chemical사(영국), trichloroacetic acid는 Lancaster사(영국)을 각각 사용하였으며 그 외 시약은 일급시약을 사용하였다. 본 실험에 사용한 기계는 분광광도계(Jasco Co., V-530 UV/vis spectrophotometer, 일본/Shimadzu Co., Model UV-160A, 일본), 감압농축기(EYELA Co., Model NE-1, 일본), 동결건조기(EYELA Co., Model FD-1, 일본) 등을 사용하였다.

실험동물 - 실험동물로는 서울 성북구 소재 중앙동물사육장으로부터 분양받은 ICR계 체중 25 g 전후의 숫컷 및 암컷 생쥐와 Sprague-Dawley계 체중 250 g 전후 숫컷 흰쥐를 사용하였고 삼양유지사료(주)의 고형사료로 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하면서 사육하였다. 실험은 특별히 명시하지 않는 한 $24 \pm 2^\circ C$ 에서 실시하였다.

CCl_4 간독성 유발 흰쥐에 미치는 영향 - 흰쥐 한 군을 6마리로 하여 검액 100 mg/kg 및 200 mg/kg을 각각 3일간 경구 투여하고 최종 투여 3시간 후 corn oil를 vehicle로 한 20% CCl_4 를 1 mL/100 g의 용량으로 경구투여하여 간장해를 유발시켰다.¹¹⁾ CCl_4 를 투여하고 18시간 절식 시킨 후

ether로 가볍게 마취시켜 심장채혈 하고 아래의 방법에 준하여 혈청을 분리하고, 또한 간을 적출하여 microsome 분획물을 얻었다. 대조군은 시료대신 saline을 경구투여하고, 정상군은 시료대신 saline을 경구투여하고 20% CCl_4 대신 corn oil를 투여하였으며 양성대조약물로 silymarin 200 mg/kg를 사용하여 비교·관찰하였다.

혈청 효소활성도 및 지질성분의 측정 - 혈액은 약 30분간 상온에서 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중 alanine transaminase(ALT)와 aspartate transaminase(AST) 효소활성도의 측정은 Reitman & Frankel의 방법,¹²⁾ alkaline phosphatase(ALP) 효소활성도 측정은 Kind-King법,¹³⁾ lactic dehydrogenase(LDH) 효소활성도는 젖산 기질법¹⁴⁾에 따라 측정하였다. 그리고, 혈청 중 total cholesterol(TC) 함량 측정은 Allain 등의 효소법,¹⁵⁾ 혈청 중 triglyceride(TG) 함량 측정은 Saldesai 등의 효소법¹⁶⁾에 준하여 측정하였다.

간 microsome 분획 - 흰쥐를 ether로 마취시키고 복부를 절개하여 간문맥에 polyethylene tube를 삽입하여 $4^\circ C$ 0.9% NaCl 용액으로 간을 세척한 후 간을 적출하여 간(습중량)과 1.15% KCl의 비가 1:9의 비율로 1.15% KCl을 가하여 세척하였다. 간조직 3 g을 5배 용량의 A용액(10 mM Tris, 0.21M mannitol, 0.07M sucrose, 0.1 mM EDTA)으로 homogenation 한 후 600 g로 10분간 원심분리한 후 상정액을 8,000 g로 10분간 원심분리하여 얻은 상정액을 다시 100,000 g로 60분동안 원심분리하여 침전을 microsome 분획으로 하고 0.05M phosphate buffer 15mL에 현탁하여 사용하였다.

지질과산화 형성억제활성 측정 - Yokozawa 등¹⁷⁾의 방법에 따라 1 mL의 간 microsome 분획물에 TBA시약(0.375% TBA/15% TCA/0.25N HCl) 2 mL을 넣고 섞은 후 끓는 물에서 15분 동안 가열하여 발색시키고 얼음물 중에서 식힌 다음 1000xg에서 10 min간 원심분리하여 pellet를 제거하고 535 nm에서 흡광도를 측정하여 비교·관찰하였다.

GST(Glutathion S-transferase) 효소활성의 측정 - Habig 등¹⁸⁾의 방법에 따라 0.25 mM phosphate buffer(pH6.5) 350 μ l, 효소원으로 간 microsome 분획물 50 μ l를 넣고 $25^\circ C$ 에서 2분간 방치후 기질로서 2.5 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB) 400 μ l와 5 mM glutathione 200 μ l을 가하여 총량을 1 mL로 한 후 즉시 340 nm에서 3분간 흡광도를 측정하였다.

Catalase 효소활성의 측정 - Chance, B 등¹⁹⁾의 방법에 따라 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 1.5 mL에 효소원으로 간 microsome 분획물 100 μ l를 가하고 30 mM H_2O_2 용액의 3배 희석액을 1 mL 가하여서 240 nm에서 흡광도 변화를 2

분간 관찰하여 측정하였다.

급성 독성 실험 - 식품의약품 안전청 고시 제 1998-56호에 준하여 암수 생쥐를 이용하여 실시하였다.²⁰⁾ 순화기간 중 건강하다고 판정되는 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균 체중이 비슷한 개체를 선택하여 1군당 암수 각각 5마리로 무작위법을 이용하여 군분리를 실시하였다. 투여용량의 설정은 예비시험결과를 토대로 하여 경구투여할 수 있는 최대용량을 5 g/kg으로 하여 이것을 최고용량군으로 설정하고 일정 공비 0.5로 5개의 용량군과 대조군을 설정하였다. 모든 실험 동물을 5시간 동안 절식시킨 뒤, 경구용 존데를 이용하여 각 검액을 경구로 투여하였다. 투여 용량은 투여 직전 체중에 따라 산출하였다. 모든 시험동물에 대한 임상증상 관찰 및 사망동물수는 약물투여직후부터 6시간 동안은 매 시간 마다 관찰하였으며, 투여 익일부터 2주간은 1일 1회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망유무를 관찰하였다. 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여 직전과 투여 5일, 10일 및 14일에 체중을 측정하였다. 시험종료 후 동물의 체중을 측정 한 후 모든 생존 동물을 에테르로 마취시켜 처사 시킨 후 육안적으로 외관 및 내부장기의 이상 유무를 관찰하였다. 도중 폐사 동물에 대해서도 같은 방법으로 검사하였다.

통계학적 분석 - 모든 실험결과는 평균±표준오차로 나타내었으며, 자료분석은 Student's *t*-test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

실험결과

CCl₄ 간독성 유발 흰쥐의 혈청 중 효소활성도에 대한 효과 - CCl₄에 의해 유발된 간장해 흰쥐에 있어서 alanine transaminase(ALT)와 aspartate transaminase(AST) 효소활성에 미치는 대황황련해독탕의 효과를 Table I에 제시하였다. 우선 ALT 효소활성도에 대한 영향은 CCl₄ 처치 대조군이 비처치 정상군에 비하여 $p < 0.001$ 의 유의한 증가를 보였고 대황황련해독탕 100 mg/kg 및 200 mg/kg 처치군에서 각각 309.1 ± 29.2 Karmen unit와 253.3 ± 28.6 Karmen unit로 $p < 0.05$ 와 $p < 0.01$ 의 유의한 상승억제효과를 나타내었다. 그리고, CCl₄ 처치 대조군의 AST 효소활성도는 정상군에 비하여 $p < 0.001$ 의 유의한 증가를 보였고 대황황련해독탕 100 mg/kg 및 200 mg/kg 처치군에서 각각 1147.3 ± 50.6 Karmen unit와 951.8 ± 56.4 Karmen unit로 대조군에 비하여 각각 $p < 0.01$ 의 유의한 상승억제효과를 나타내었다. 또한 양성비교약물로 사용한 silymarin 200 mg/kg 투여군에서도 대조군에 비하여 혈청 중 ALT 및 AST 효소활성의 상승을 유의하게 억제시킴을 알 수 있었다.

Table I. Effects of *Daewhang-whangryunhaedok-Tang* on Serum Alanine Aminotransferase(ALT) and Aspartate Aminotransferase(AST) Activities in CCl₄-intoxicated Rats

Group	Dose (mg/kg, p.o)	Serum aminotransferase activities (Karmen Units)	
		ALT	AST
Normal	-	64.1±9.5	380.5±9.8
Control	-	455.0±44.7 ^{###}	1589.2±143.7 ^{###}
Sample	100	309.1±29.2* (43.6)	1147.3±50.6** (36.6)
	200	253.3±28.6** (51.6)	951.8±56.4** (52.7)
Silymarin	200	284.5±21.5** (43.6)	1119.1±107.7* (38.9)

Values are means±S.E. of 6 rats.

The values in parenthesis are % of protection that is calculated as $100(\text{values of CCl}_4 \text{ control-values of sample})/(\text{values of CCl}_4 \text{ control-values of normal})$.

#; Statistically significant compared with the normal value (###: $p < 0.001$)

; Statistically significant compared with the control value (: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$)

Table II. Effects of *Daewhang-whangryunhaedok-Tang* on Alkaline Phosphatase (ALP) and Lactate Dehydrogenase (LDH) Activities in CCl₄-intoxicated Rats

Group	Dose (mg/kg, p.o)	Serum ALP activity	Serum LDH activity
		(K-A unit)	(Wroblewski unit)
Normal	-	39.7±4.9	994.6±66.8
Control	-	107.5±8.4 ^{###}	2309.8±190.4 ^{###}
Sample	100	55.7±3.5*** (76.4)	1627.0±133.2** (51.9)
	200	48.6±4.0*** (86.9)	1409.2±107.4** (68.5)
Silymarin	200	64.0±4.9*** (64.1)	1863.7±96.1* (33.9)

Values are means±S.E. of 6 rats.

The values in parenthesis are % of protection that is calculated as $100(\text{values of CCl}_4 \text{ control-values of sample})/(\text{values of CCl}_4 \text{ control-values of normal})$.

#; Statistically significant compared with the normal value (###: $p < 0.001$)

; Statistically significant compared with the control value (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$)

그리고, 혈청중 alkaline phosphatase(ALP) 및 latic dehydrogenase(LDH) 효소활성에 미치는 검액의 효과를 Table II에 제시하였다. CCl₄로 처치한 대조군의 혈청중 ALP 효소활성도는 비처치 정상군에 비하여 $p < 0.001$ 의 유의한 ALP 효소활성도의 증가를 관찰할 수 있었다. 검액 100 mg/kg 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 55.7 ± 3.5 K-A unit와 $48.6 \pm$

4.0 K-A unit로 대조군에 비하여 각각 $p < 0.001$ 의 유의한 상승억제효과를 관찰할 수 있었다. 그리고, 혈청 중 LDH 효소활성은 CCl_4 처치한 대조군에 정상군에 비하여 $p < 0.001$ 의 유의한 증가를 보였고 대황황련해독탕 100mg/kg 및 200 mg/kg 처치군에서 각각 1627.0 ± 133.2 Wroblewski unit와 1409.2 ± 107.4 Wroblewski unit로 모두 $p < 0.01$ 의 유의한 상승억제효과를 나타내었다. 또한 양성비교약물로 사용한 silymarin 200 mg/kg 투여군에서도 대조군에 비하여 혈청 중 ALP 및 LDH 효소활성의 상승을 유의하게 억제시킴을 알

Table III. Effect of *Daewhang-whangryunhaedok-Tang* on Serum Total Cholesterol and Triglyceride Levels in CCl_4 -intoxicated Rats

Group	Dose (mg/kg, p.o)	Serum lipid levels(mg/dL)	
		Total cholesterol	Triglyceride
Normal	-	97.0±5.7	78.0±7.6
Control	-	150.7±13.9 ^{##}	282.5±22.2 ^{###}
Sample	100	103.0±5.8 ^{**} (88.8)	113.6±16.3 ^{***} (77.7)
	200	83.4±5.7 ^{***} (125.4)	94.7±6.8 ^{***} (88.6)
Silymarin	200	102.6±8.3 ^{**} (89.6)	152.3±15.7 ^{**} (55.5)

Values are means±S.E. of 6 rats.

The values in parenthesis are % of protection that is calculated as 100(values of CCl_4 control-values of sample)/(values of CCl_4 control-values of normal).

; Statistically significant compared with the normal value (##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.001$)

* ; Statistically significant compared with the control value (**: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$)

Table IV. Effects of *Daewhang-whangryunhaedok-Tang* on Liver Weight in CCl_4 -intoxicated Rats

Group	Dose (mg/kg, p.o)	Liver Weight (g/100g rat)	Therapeutic Rate (%)
Normal group	-	4.81±0.24	-
Control group	-	6.67±0.19 ^{###}	-
Sample	100	6.29±0.29	20.5
	200	5.96±0.37*	38.6
Silymarin	200	5.74±0.28 ^{**}	50.3

Values are means±S.E. of 6 rats.

Therapeutic rate is % of protection that is calculated as 100(values of CCl_4 control-values of sample)/(values of CCl_4 control-values of normal).

; Statistically significant compared with the normal value (###: $p < 0.001$)

* ; Statistically significant compared with the control value (: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$)

수 있었다.

CCl_4 간독성 유발 흰쥐의 혈청 중 지질함량에 대한 효과 - CCl_4 에 의해 유발된 간장해 흰쥐에 있어서 혈청 중 total cholesterol(TC) 및 triglyceride(TG) 함량에 대한 검액의 효과를 Table III에 제시하였다. 우선 TC 함량에 대한 영향은 CCl_4 처치 대조군이 비처리 정상군에 비하여 $p < 0.01$ 의 유의한 증가를 보였고 대황황련해독탕 100 mg/kg 및 200 mg/kg 처치군에서 각각 103.0 ± 5.8 mg/dL와 83.4 ± 5.7 mg/dL로 $p < 0.01$ 과 $p < 0.001$ 의 유의한 상승억제효과가 인정되었다. 그리고, TG 함량 역시 CCl_4 처치 대조군은 정상군에 비하여 $p < 0.001$ 의 유의한 증가를 보였고 대황황련해독탕 100 mg/kg 및 200 mg/kg 처치군에서 각각 113.6 ± 16.3 mg/dL와 94.7 ± 6.8 mg/dL로 대조군에 비하여 각각 $p < 0.001$ 의 유의한 상승억제효과를 나타내었다. 또한 양성비교약물로 사용한 silymarin 200 mg/kg 투여군에서도 대조군에 비하여 혈청 중 TC 및 TG 함량의 상승을 유의하게 억제시킴을 알 수 있었다.

CCl_4 간독성 유발 흰쥐의 간 중량에 대한 효과 - CCl_4 에 의해 유발된 간장해 흰쥐에 있어서 간을 적출하여 얻은 습중량에 대한 대황황련해독탕의 효과를 Table IV에 나타냈다. 간의 습중량은 CCl_4 처치 대조군은 비처리 정상군에 비하여 $p < 0.001$ 의 유의한 증가를 나타내었고, 대황황련해독탕 200 mg/kg 처치군에서 5.96 ± 0.37 g/100 g(b.w)으로 대조군에 비하여 $p < 0.05$ 의 유의한 상승억제효과를 나타내었다. 반면에 저농도 100 mg/kg 투여군에서는 다소 억제시키는 경향을 보이나 통계적으로 유의차는 인정되지 않았고, 양성비교약물 silymarin 200 mg/kg 투여군에서도 유의한 간 중량 상승억제효과가 인정되었다.

CCl_4 간독성 유발 흰쥐의 간 중 지질과산화물 형성억제, catalase 및 glutathione-S-transferase(GST) 효소활성도에 대한 효과 - CCl_4 에 의해 유발된 간장해 흰쥐로부터 적출한 간을 homogenation 한 후 원심분리하여 얻은 microsome 분획물의 지질과산화물 형성과 catalase 및 GST 효소활성에 대한 검액의 효과를 Table V에 제시하였다. 간의 지질과산화 정도는 TBARS법에 따라 535 nm에서의 흡광도 변화로 하였다. 간 microsome 분획에 있어서 CCl_4 처치 대조군의 간에서의 지질과산화는 비처리 정상군에 비하여 $p < 0.01$ 의 유의한 흡광도의 증가를 나타내어 지질과산화가 촉진됨을 알 수 있었고 검액 200 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 $p < 0.05$ 의 유의한 지질과산화 형성억제효과가 관찰되었고, 저농도 처치군에서는 다소 억제시키는 경향을 보였다. 그리고, microsome 분획중의 catalase 효소활성도는 240 nm에서 120초간 흡광도의 변화로 하였다. CCl_4 처치 대조군은 비처리 정상군에 비하여 유의하게 감소됨이 인정되었

Table V. Effects of *Daewhang-whangryunhaedok-Tang* on Thiobarbituric Acid Reactive Substance(TBARS), Catalase and Glutathione-S-Transferase Activities in CCl₄-intoxicated Rats

Group	Dose (mg/kg, p.o)	TBARS (abs/535nm)	Catalase activities (Δabs/120sec)	Glutathione-S-transferase activities (mU/mL)
Normal	-	0.034±0.001	0.045±0.002	15.0±1.3
Control	-	0.047±0.003 ^{##}	0.040±0.002 [#]	9.8±1.1 ^{##}
Sample	100	0.041±0.002 (47.4)	0.046±0.002* (105.9)	14.6±1.1** (92.5)
	200	0.039±0.003* (64.1)	0.058±0.002*** (317.6)	14.7±0.3*** (94.6)
Silymarin	200	0.040±0.002* (51.3)	0.048±0.003* (147.1)	18.4±1.0*** (165.5)

Values are means±S.E. of 6 rats.

The values in parenthesis are % of protection that is calculated as 100(values of CCl₄ control-values of sample)/(values of CCl₄ control-values of normal).

; Statistically significant compared with the normal value(#:p<0.05 and ##:p<0.01)

* ; Statistically significant compared with the control value(*:p<0.05, **:p<0.01 and ***:p<0.001)

다. 반면에 검액 100 mg/kg 및 500 mg/kg 투여군에서는 각각 대조군에 비하여 p<0.05와 p<0.001의 유의한 catalase 효소활성도 감소억제효과가 인정되었다.

또한, 간 microsome 분획에서 CCl₄ 처치 대조군에서의 GST 효소활성은 정상군에 비하여 p<0.01의 유의한 감소를 나타내었다. 검액 100 mg/kg 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 대조군에 비하여 p<0.01과 p<0.001의 유의한 GSH 효소활성도 감소억제효과가 인정되었다. 양성비교약물 silymarin 200 mg/kg 투여군에서도 유의한 간 중 catalase 및 GST 효소활성의 감소억제효과를 나타냈다.

급성독성 - 대황황련해독탕의 최대용량으로 5,000 mg/kg 으로 하고 0.5의 공배로 5군으로 구분하여 생쥐 암수에 1회

경구투여한 결과 대조군 및 전체 시험물질 투여군의 암수 모든 동물군에서 사망에는 발견되지 않아 대황황련해독탕 단회 경구투여시 LD₅₀이 암수 모두 5,000 mg/kg 이상임을 알 수 있었다(Table VI). 또한, 대조군 및 전체 시험물질 투여군의 암수 동물에서 시험물질에 기인하는 이상소견은 발견되지 않았고, 14일 후에 전 생존동물의 도살부검에서 시험물질 투여에 기인한다고 사료되어지는 어떠한 유의할 만한 병변은 관찰되지 않았다. 그리고, 대조군 및 대황황련해독탕 시험물질을 투여한 모든 실험군의 암수 동물에서 시험 전기간을 통하여 체중변화는 대조군에 비하여 유의성이 있는 차이를 나타내지 않았고 투여용량군 간의 체중변화에 있어서도 용량의존성을 나타내지 않았다(Table VII).

Table VI. Survivals in Mice orally treated with Single Dosage of *Daewhang- whangryunhaedok-Tang*

Sex	Dose (mg/kg, p.o.)	Days after treatment														Final Mortality
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Male	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	312.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	0(Control)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	312.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	0(Control)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Sample size is 0.1 mL/10 g.

Table VII. Body Weight Change in Mice orally treated with Single Dosage of *Daewhang-whangryunhaedok-Tang*

Group	Dose (mg/kg, p.o)	Time course(day)			
		0	5	10	14
Male	-	32.2±0.4	33.4±0.5	33.8±0.7	34.8±0.7
	312.5	27.2±5.9	29.1±6.3	29.6±6.6	31.6±7.0
	625.0	29.8±6.4	29.2±6.5	30.1±6.7	31.4±7.1
	1,250	29.9±6.3	30.0±6.6	31.2±6.9	31.5±6.9
	2,500	32.6±0.7	33.0±0.3	34.2±0.4	35.8±1.2
	5,000	32.2±0.6	32.2±1.0	32.6±0.2	35.4±0.7
Female	-	30.0±1.3	30.0±0.9	30.8±1.1	34.6±1.4
	312.5	26.2±5.8	26.9±5.9	27.7±6.0	28.3±6.2
	625.0	26.6±5.7	26.0±5.7	26.4±5.8	27.9±6.1
	1,250	25.3±5.5	25.0±5.3	26.0±5.5	26.5±5.6
	2,500	31.4±0.4	31.2±1.0	32.6±0.7	33.8±0.6
	5,000	29.2±0.4	29.0±0.5	30.0±0.4	31.4±0.7

Values are means±S.E. of 5 mice.

고찰 및 결론

대황황련해독탕은 황련, 황금, 황백, 치자로 구성되어 있는 황련해독탕에 대황을 가미한 복합제제로 DPPH free radical scavenger 효과, 지질과산화 형성억제효과 및 항고지혈증 효과가 있음을 보고한 바 있으며^{8,9)} 본 연구에서는 대황황련해독탕의 간장해에 대한 영향을 검토하였다.

간질환 치료제 개발과 약효 검증을 위하여 CCl₄, d-galactosamine, 에탄올, ethionine 등과 같은 간독성 물질이나 바이러스 감염 등에 의한 급·만성 간장해 병태모델동물이나 초대배양 간세포를 이용하는 방법, 면역기능의 증진에 의한 간염치료효과, 만성질환 모델을 위한 bile duct ligation에 의한 방법 등이 많이 이용되고 있다.²¹⁾ 특히 작용 약물의 특성에 따라 실험모델을 선택하여 이용되고 있다. 또한, 간질환에 대한 한방약물의 치료효과나 screening은 여러 연구자들에 의하여 검토되어 오고 있으며, 많은 약물들이 유효한 것으로 보고되고 있다.

본 연구에서는 급성 간장해 유발물질인 CCl₄를 흰쥐에 경구투여함으로써 유발된 간장해에 대한 대황황련해독탕의 영향을 검토하였다. CCl₄는 대표적인 간 독성물질의 하나로 간 조직내 과산화지질을 유도하여 지방산조성을 변화시켜 궁극적으로 세포독성을 유발시킨다. 즉, 간세포 괴사형 간장해를 일으키는 물질인 CCl₄를 경구투여하면 간 microsome의 약물대사효소인 cytochrome P-450 system에 의하여 free radical metabolite인 trichloromethyl free radical(\cdot CCl₃)로 대사되어 유발되기 시작하여 trichloromethyl free radical은 산소와 결합하여 trichloromethylperoxy radical(\cdot OOCCl₃)을 형성하거나 불포화지방으로부터 수소원자를 끌어내 lipid

radical을 생성하여 지질의 과산화 등을 일으키며 단백질이나 지방과도 공유결합을 형성한다.²²⁾ 한편, 이러한 반응성이 높은 free radical들은 cytochrome P-450 자체와도 결합하여 소포체내의 이들 효소들을 파괴시켜 세포손상을 일으키는 것으로 알려져 있다.^{23,24)} 따라서, CCl₄ 처치로 유발된 흰쥐의 간장해의 진단은 손상된 간으로부터 혈액에 방출된 alanine/aspartate transaminase(ALT/AST), γ -glutamyltransferase(γ -GPT), alkaline phosphatase(ALP), latic dehydrogenase(LDH) 등의 효소활성도를 측정하는 방법을 이용하였다. 즉, 간 독성연구에 있어서 가장 유용한 방법 중 하나로서 이용되고 있는 혈청중 transaminase(ALT/AST) 효소활성도는 간 독성으로 인해 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 효소가 혈중으로 이행되어 혈장내에서 활성이 증가된다.²⁵⁾

본 실험에서 CCl₄를 경구투여함으로써 간장해가 유발되어 혈청중의 transaminase(ALT/AST), LDH 및 ALP 효소활성의 유의한 증가와 혈청 중 지질인 TC 및 TG 함량의 유의한 증가가 인정되어 양호하게 간장해 병태모델이 작성되었다. 따라서, 대황황련해독탕의 간장해 보호효과를 검토하기 위하여 CCl₄ 처치 전에 검액을 전투여하여 간보호효과를 검토한 바 ALT, AST, ALP 및 LDH 효소활성의 증가를 유의하게 억제시킴이 인정되었다. 특히 대황황련해독탕 200 mg/kg 투여군에서는 ALT, AST, ALP 및 LDH 효소활성도는 CCl₄ 처치 대조군에 비하여 각각 51.6%, 52.7%, 86.9%와 68.5%의 유의한 간장해 개선효과가 인정되었다. 또한, 혈청지질성분인 TC 및 TG 함량에 대해서도 대황황련해독탕 200 mg/kg 투여군에서는 각각 125.4%와 88.6%의 유의한 치료효과가 인정되었고, 특히 혈청 TC 함량에 대해서는 거의 정상치 이하로 저하시킴을 알 수 있었다. 그리고,

본 실험에서 사용한 양성대조약물 silymarin 200 mg/kg 투여군에서도 간장해 지표로 이용한 효소활성도나 혈청지질 함량에 대하여 유의한 개선효과가 인정되었다.

간중량에 미치는 영향을 살펴보면 정상군의 간 중량비는 전체 체중의 약 3% 정도이며 CCl_4 처치시에는 정상군에 비하여 간 중량이 증가하는 것으로 보고되어 있다.²⁶⁾ 따라서, 대황황련해독탕 투여에 의한 간중량 증가억제효과는 200 mg/kg 투여군에서는 CCl_4 처치 대조군에 비하여 44.2%의 유의한 개선효과가 인정되었다.

CCl_4 를 생체내에 투여하면 대사과정에서 free radical metabolite를 생성하고 이는 각종 막지질의 과산화유발시켜 세포손상을 초래하게 된다. 따라서, CCl_4 처치로 유발된 간장해 흰쥐의 간을 적출하여 균질화하고 ultracentrifuge를 이용하여 microsome 분획을 얻어 지질과산화 형성억제효과와 지질과산화반응에 관여하는 catalase 및 glutathione S-transferase(GST) 효소활성도를 측정하여 비교·평가하였다.

생체조직 중에서 산화를 받기 쉬운 불포화지방산을 많이 함유하고 있는 것은 생체막이고 생체막의 산화는 자동산화로 free radical 연쇄반응에 의한다. 따라서, 지질이 free radical 연쇄반응에 의하여 malone dialdehyde(MDA)가 생성되며 생성된 MDA의 측정은 TBARS법에 따라 535 nm에서의 흡광도 변화로 하였으며 간 microsome 분획에서 CCl_4 처치 대조군은 정상군에 비하여 유의한 지질과산화량의 증가가 인정되었다. 대황황련해독탕 200 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 64.1%의 유의한 지질과산화 개선효과가 인정되어 지질과산화로 인한 조직손상을 방어할 수 있다고 생각된다.

생체내 생명현상에서 필수적인 산화환원반응의 일종으로 생성되는 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 효소 중 하나가 catalase이다. Catalase는 다수의 과산화수소 생성효소들과 복합체를 형성하여 peroxisome에 주로 분포하고 과산화수소 증가에 따른 조직손상을 방어하는 효과가 있다고 알려져 있다.²⁷⁾ 그리고, catalase는 방사선 조사, 약물투여 및 환경의 변화 등 생체내에서의 oxygen free radicals 생성을 증가시키는 조건에서 catalase 활성도가 증가되며, 또한 catalase를 투여하면 oxygen free radical의 과다생성으로 인한 조직손상을 방어할 수 있다고 하였다.^{28,29)}

CCl_4 처치로 유발된 간장해 흰쥐의 간에서의 catalase 효소활성도는 240 nm에서 120초간 흡광도의 변화로 측정하였다. 간 microsome 분획에서의 catalase 효소활성도는 CCl_4 처치 대조군에서는 비처리 정상군의 효소활성에 비하여 약 11%의 유의한 감소가 인정되었고, 대황황련해독탕 200 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 유의한 catalase 효소활성도 감소억제효과가 인정되었고 정상으로 회복되었다.

GST는 glutathione과 각종 외래화학물과의 반응을 촉매하는 효소로 간에 많이 존재하고 특히 친전자 xenobiotics에 glutathione의 thiol기를 포함하는 반응 등 생체내에서 다양한 기능을 가지고 있다. 이러한 GST의 포합작용, 수송작용에 의해 내인성 또는 외인성 독성물질의 해독화 작용을 발현하게 된다.^{27,30,31)} 따라서, CCl_4 와 같이 생체 내에서 대사되어 free radical을 형성하는 친전자성 중간체의 해독화 과정에 관여하는 GST 효소활성도 변화는 CCl_4 유발간독성 흰쥐에서 CCl_4 처치 대조군은 비처리 정상군에 비하여 간 microsome 분획에서 34.7%의 유의한 감소가 인정되었다. 대황황련해독탕 200 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 94.6%의 유의한 GST 효소활성도 감소억제효과가 인정되었다. 한편, 양성비교약물 silymarin 200 mg/kg 투여군에서도 유의한 간 중 지질과산화형성억제효과, catalase 효소활성 감소억제효과 및 GST 효소활성의 감소억제효과를 나타내었다.

그리고, 대황황련해독탕 안전성을 평가하기 위하여 ICR 계 암수 생쥐에 1회 경구투여하고 2주간 관찰하는 급성독성에 미치는 영향을 검토한 바 최고용량 5,000 mg/kg 투여시에도 사망하는 동물이 없고, 체중변동이나 임상증상 및 부검소견에서도 별다른 이상이 발견되지 않아 매우 안전성이 높음이 인정되었다.

이상의 실험결과를 종합하면 대황황련해독탕은 CCl_4 처치로 유발된 간장해 흰쥐에서 혈청 중 aminotransferase(ALT/AST), alkaline phosphatase 및 lactic dehydrogenase 효소활성도와 혈청 지질성분인 total cholesterol 및 triglyceride 함량 역시 유의한 상승억제효과가 인정되었다. 또한, CCl_4 처치로 유발된 간장해 병태모델 흰쥐 간의 microsome 분획물에서 대황황련해독탕 처치로 지질과산화 형성억제효과, catalase 및 glutathione-S-transferase 효소활성의 유의성이 있는 개선효과가 인정되었다. 결론적으로 대황황련해독탕은 CCl_4 처치 간장해 병태모델 흰쥐에서 간장해 보호효과가 인정되었다. 그리고, 대황황련해독탕 최대용량 5,000 mg/kg 경구투여시 검액 투여에 기인하는 사망 예는 물론 임상증상에 대하여 별다른 이상이 발견되지 않아 LD_{50} 은 5,000 mg/kg 이상으로 매우 안전한 약물로 인정되었다.

인용문헌

1. Plaa, G. L. (1991) Toxic responses of the liver. In: Casarett and Doull's Toxicology (M. O. Amdur, J. Doull and C. D. Klassen, Eds., pp. 334-353. Pergamon Press, New York
2. Hikino, H. (1985) Antihepatotoxic activity of crude drugs. *Yakugaku Zasshi* **105**(2): 109-118
3. 홍남두, 김병운, 김남재, 심재옥(1988) 생약복합제제의 약효연구(제 38보) 가미인진오령산이 실험적 간장해에 미치

- 는 영향. 생약학회지 **19**(4): 270-277
4. 최혁재, 김남재, 김중우, 홍남두(1997) 마디풀(*Polygonum aviculare* L.) 성분의 지질과산화억제 및 간보호에 미치는 효과. 생약학회지 **28**(3): 117-123
 5. Kim, D-H., Sim, S-B., Kim, N-J. and Chang, I-S. (1999) β -Glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Bio. Pharm. Bull.* **22**(2): 162-164
 6. 이태호 편저(황도연 원저)(1977) 신정대역 대방약합편. 서울, 행림출판사. p.106-107
 7. 조기호 편저(1999) 한방처방의 동서의학적 해석방법. 서울, 고려의학. pp. 510-516
 8. Kim, Y. S., Jung, E. A., Chang, J. C., Yang, H. K., Kim, N. J., Cho, C. H., Bae, H. S., Lee, K. S. and Kim, D. H. (2001) Effect of Daewhang-Whangryunhaedoktang (Daio-Orange-dokuto) on Hyperlipidemia. submitted in *J. Ethnopharmacol.*
 9. 김영석, 정은아, 장종철, 야형길, 김남재, 조기호, 배형섭, 이경섭, 김동현(2001) 대황황련해독탕의 항고지혈증 작용. 생약학회지. **32**(2): 145-152
 10. The Korean Pharmacopia 7th Edition. pp 721, 766, 778, 779, 781 (1997)
 11. S. Maeda, K. Sudo, Y. Miyamoto, S. Takeda, M. Shinbo, M. Aburada, Y. Ikeya, H. Taguchi and M. Harada (1982) Pharmacological studies on Schzandra Fruits. II. *Yakukagu Zasshi* **102**(6): 579-588
 12. Reitman, S. and Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic acid and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Phathol.*, **28**: 56-63
 13. Kind, P.R.N and King, E.J. (1954) Estimation plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with aminoantipyrine. *J. Clin. Path.* **7**: 322-326
 14. Wroblewski, F. and J.S. LaDue (1955) Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**: 210-213
 15. Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. and Fu, P. C. (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20**: 470-475
 16. Sardesai, V. M. and Mannig J. A. (1968) The determination of triglycerides in plasma and tissues. *Clin. Chem.* **14**: 156-158
 17. Yokozawa, T., Dong, E., Wu Liu, Z., Oura, H. and Nishioka, I. (1996) Antioxidation activity of Wen-Pi-Tang *in vitro*. *Natural Medicines* **50**(3): 243-246
 18. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* **249**: 7130-7139
 19. Chance, B. and Machly, A. C. (1955) Assay of catalase and peroxidase. Vol. II. Academic Press, New York, pp. 764-775
 20. 식품의약품안전청고시 제 1999-61호 의약품 등의 독성시험기준, 식품의약품안전청(1999. 12. 22 제정)
 21. 小澤 光 (1984) 新薬開発のための薬效スクリーニング法(I). 丸善, 東京, p. 69-111
 22. Noll, T. and de Groot, H. (1984) The critical steady-state hypoxic conditions in carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in rat liver microsome. *Biochim. Biophys. Acta* **795**: 356-362
 23. Rechnagel, R. O. and Glende, E. A. Jr. : Carbon tetrachloride hepatotoxicity (1973) an example of lethal cleavage. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **2**: 263-297
 24. Gravela, E., Albano, E., Dianzani, M., Poli, G. and Slater, T. (1979) Effects of carbon tetrachloride on isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **178**: 509-512
 25. Hayes (1982) Principles and Method of Toxicology, Gabriel L. Plaa and William R. Hewitt., Raben Press. pp. 407-445
 26. 양재현, 최철웅, 김대근, 이강노, 지옥표(1996) 백모등 엑스의 간기능개선 효과. 생약학회지 **27**: 167-172
 27. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**: 527-605
 28. Gutteridge, J.M.C., Beard, A.P.C. and Quinlan, G.J. (1983) Superoxide-dependent lipid peroxidation. Problem with the use of catalase as a specific probe for Fenton-derived hydroxyl radicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**: 901-907
 29. Yosjikawa, T., Murakami, M., Yoshida, N., Seto, O. and Kondo, M. (1983) Effects of superoxide dimutase and catalase on disseminated intravascular coagulation in rats. *Thromb. Haemostas.* **50**: 869-872
 30. 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
 31. 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

(2001년 12월 14일 접수)