

# 肝細胞의 산화적 손상에 대한 白花蛇舌草의 항산화효과

안중환, 김형환, 이재중, 박철수, 김미랑, 김종대, 문진영\*

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 한의과대학 경혈학교실\*

## The Anti-Oxidative Effects of Oldenlandiae Diffusae Herba Extract on Oxidative Hepatic Injury

Jung-Hwan An, Hyeong-Hwan Kim, Chae-Jung Lee, Chul-Soo Park, Mi-Rang Kim, Jong-Dae Kim, Jin-Young Mun\*

Dept. of Internal Medicine, College of oriental medicine, Dongguk University  
Dept. of Meridianology, College of oriental medicine, Dongguk University\*

**Objective** : This study was designed to investigate the anti-oxidative effects of *Oldenlandiae Diffusae* Herba Water extract (ODHW) on lipid peroxidation by free radicals oxidative hepatic injury.

**Methods** : In order to evaluate anti-oxidative activities of ODHW in the liver cell, cultured normal rat liver cells(Ac2F) were incubated with or without ODHW. After 16 hours to 18 hours of experiment, cells were placed in DMEM medium without serum, and then incubated with 1mM tert-butyl hydro-peroxide(t-BHP) for two hours. Viable cells were detected by MTT assay. The levels of LPO induced by hydroxyl radical derived from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup> system in rat liver homogenate were determined by means of TBA. Inhibitory effect of ODHW on superoxide generation was measured by xanthine-xanthine oxidase system.

**Results** : In the linoleic acid autoxidation system, ODHW exhibited antioxidant activity, which inhibited 85% of linoleic acid peroxidation. These effects were similar to those of dl-a-tocopherol. ODHW showed scavenging effects on DPPH radical, inhibited superoxide generation in xanthine-xanthine oxidase system, and also inhibited lipid peroxidation of rat liver tissue with hydroxyl radical derived from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup> system. In addition, ODHW protected the cell death induced by t-BHP and it significantly increased cell viability in a normal rat liver cell(Ac2F)

**Key Words** : *Oldenlandiae diffusae* herba water extract (ODHW), anti-oxidative effects

## 1. 緒 論

간질환은 우리 나라 성인병의 사망원인 4위를 차지하고 있으며 원인은 B형 간염 바이러스의 높은 보유율과 정신적인 스트레스 및 과음이다<sup>1</sup>. 최근 새로운 약제의 임상적 응용으로 인한 여러가지 유형의 독작용들이 나타나고 있어 약물로 인한 간손상이 우려되고 있다.

활성산소종 혹은 자유기는 생체의 정상적 대사과정에서 생성되며, 또한 방사선, 흡연, 약물, 음주 등에 의해서도 생

성된다. 활성산소는 주로 세포막의 불포화지방산과 결합하여 지질과산화반응을 일으키며, 세포내 거대분자들과 결합하여 세포의 산화적 손상을 야기한다. 이러한 불포화지방산들은 주로 뇌, 간장 등을 구성하는 세포의 막에 풍부하게 존재하므로 뇌와 간장 등은 활성산소에 의한 산화적 손상이 일어날 위험성이 기타 장기에 비해 높다<sup>2,4</sup>.

한편 시호<sup>5</sup>, 당귀<sup>6</sup>, 작약<sup>7</sup>, 황금<sup>8</sup> 등의 단방과 시호사물탕<sup>9</sup>, 소시호탕<sup>10</sup> 등과 복합처방을 대상으로 이러한 활성산소에

의한 간장의 산화적 손상을 방어할 수 있는 약물을 실험적으로 연구한 보고가 다수 있으나 백화사설초에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

백화사설초(白花蛇舌草)는 꼭두서니과에 속한 일년생 초본인 실낱시들풀(백운풀)의 全草를 건조한 것으로 성질은 차고(寒) 독이 없으며(無毒), 맛은 약간 달고 쓰며(微苦甘), 심, 간, 비, 위, 대장, 소장경으로 들어가는 약이다. 또한 清熱利濕, 解毒, 消癰의 효능과 항종양, 항균 및 소염의 약리 작용을 나타낸다고 알려져 있고<sup>11-13</sup> 관련된 실험적 연구로는 성분 분석<sup>14</sup>, 항암효과<sup>15-16</sup>, 항균 및 항산화효과<sup>17</sup>, 간장보호 효과 연구<sup>18-19</sup> 등이 있다.

따라서 저자는 백화사설초가 항산화 활성에 의한 간 손상 개선에 응용가능하다고 보았으며 이를 규명하기 위하여 지질자동산화계에서의 과산화지질 생성억제 효과 및 자유기 소거효과를 관찰하고, 세포배양계에서 t-BHP에 의한 간세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과를 검토하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 재료

#### 1) 세포 및 동물

본 실험에 사용한 흰쥐의 정상 간세포(Ac2F)는 일본 HSRRB (Health Science Resources Bank, Osaka, Japan)로부터 분주받아 사용하였다. 또한 본 실험에서 간조직 균질액의 조제를 위해 체중 200g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대한 동물 실험 센터에서 구입하여 사용하였다. 사용한 실험 동물은 생후 6주령의 수컷 ICR계 마우스(체중 25~30g)로 대한 동물 실험 센터에서 분양받아 일정한 조건으로 본 대학 사육실의 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 시약

본 실험에 사용된 시약으로서 linoleic acid, 2-thiobarbituric acid(TBA), lauryl sulfate sodium(SDS),  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picryl hydrazyl(DPPH), tert-butyl hydroperoxide(t-BHP), (4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), L-glutamine, butylated hydroxytoluene(BHT), 3-t-Butyl-4-Hydroxyanisole(BHA),

hydrogen peroxide( $H_2O_2$ )는 Sigma사 (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO)로부터, 그리고 fetal bovine serum(FBS) 및 antibiotic/antimycotics는 Gibco사(Gibco BRL, Life Techno. Inc., NY, U.S.A.)로부터, malondialdehyde tetrabutylammonium salt(MDA)는 Fluka사 (Fluka Chemie AG, Switzerland)로부터, DL- $\alpha$ -Tocopherol, ferrous chloride( $FeCl_2$ )는 Wako사(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)로부터, trichloroacetic acid(TCA)는 Janssen Chimica(Belgium)로부터 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검액의 제조

본 실험에서 백화사설초 추출물을 제조하기 위하여 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 백화사설초를 정선하여 사용하였고, 추출용매인 물은 이온교환수지를 통과시킨 증류수를 사용하였다. 백화사설초(*Oldenlandia Diffusae Herba*) 추출을 위해 백화사설초 150g을 취해 세절하여 냉각 환류관이 부착된 원저 플라스크에 넣고, 3배량의 증류수를 가한 다음, 3시간 동안 추출하고 여과하였다. 여액은 rotary evaporator로 감압농축한 다음, 동결건조기 중에서 건조하여 분말상의 백화사설초 추출물(ODHW) 16.17g을 얻었으며 이를 검액으로 사용하였다.

#### 2) Linoleic acid의 자동산화 억제 효과 측정

##### (1) Linoleic acid 현탁액 조제

Linoleic acid 현탁액은 Osawa 등의 방법<sup>20</sup>에 따라 linoleic acid 0.13ml,

99.0% ethanol 10ml, 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 10ml을 혼합하고, 백화사설초 추출물 농도별로 첨가한 다음, 증류수로 total volume을 25ml로 조절하였다. 이 혼합액을 test tube에 넣고 40℃에서 배양하여 지질의 자동산화를 유도하였다.

##### (2) 지질과산화물의 함량 측정

지질의 자동산화에 의한 지질과산화물의 함량을 측정하기 위하여 본 실험에서는 Ohkawa 등의 TBA법<sup>21</sup>에 따라 정량하였다. 즉 40℃에서 배양시킨지 11일째가 되는 시점에 linoleic acid 현탁액 50 $\mu$ l에 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2ml, 20% acetic acid(pH 3.5, 10N NaOH) 1.5 ml, 0.8% TBA 수용액 1.5 ml을 넣고, 증류수로 이 혼합액의 total volume을 4ml로 조절한 다음, 5℃에서 60분간 방치하고, 다시 95℃에서 60분간 발색시킨 뒤, 흐르는 수돗물에서 냉각시켜 spectrophotometer (Gilford, Response™, U.S.A)를 사용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 지질과산화물의 함량은 MDA 검량표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA $\mu$ M로 표기하였다.

##### 3) DPPH radical 소거효과 측정

DPPH radical에 대한 백화사설초의 소거 효과를 알아보기 위하여 Hatano 등의 방법<sup>22</sup>에 따라 다음의 실험을 실시하였다. 먼저 농도별 백화사설초 추출물과 증류수의 혼합물 4ml을 1.5 $\times$ 10<sup>-4</sup>M DPPH/MeOH 1ml와 혼합하여 잘 흔들어 준 다음, 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Fenton 반응계에서의 항산화 효과 측정

(1) 간조직 균질액 조제

흰쥐를 diethyl ether(Junsei Chem. Co., Japan)로 가볍게 마취한 다음, 복피를 절개하여 1.15% KCl 완충용액으로 2회 간문맥을 통하여 perfusion시킨 다음, 간을 적출하고, 다시 KCl 완충용액으로 여러번 세척한 후, 흡습기로 수분을 완전히 제거시키고 간 조직의 무게를 평량하였다. 적출한 간 조직을 빙냉상태에서 조직균질기(Teflon Plotter Elvehjem Homogenizer, Glas-Col, U.S.A.)를 사용하여 KCl 완충용액으로 20% (w/v%) 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄 균질액을 700×g에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 취하였으며, 실험에 사용할 때까지 -70℃에서 냉동보관하였다.

(2) Hydroxyl radical에 의한 지질과산화 반응에 대한 효과 측정

흰쥐 간조직 균질액에 10mM FeCl<sub>2</sub>, 30mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 농도별 백화사설초 추출물이 첨가된 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4)의 반응용액을 1ml로 하여 37℃에서 10분간 반응시킨 다음, TBA법으로 과산화지질의 함량을 측정하였다.

5) Xanthine-XOD 반응계에서 superoxide의 생성 억제 효과 측정

백화사설초 추출물이 xanthine-XOD 반응계에서의 superoxide anion(O<sup>2-</sup>) 생성 억제 효과를 측정하기 위하여 다음과 같이 반응용액을 조제하였다. 먼저 250μM xanthine 0.5ml와 농도별 백화사설초 추출물 0.1ml 및 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 1.3ml를 함유하는 반응용액을 실험

실에서 3분간 정치한 다음, 0.1unit xanthine oxidase를 첨가하여, 반응용액의 총량을 2ml로 조절한 후, 290nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하였다. 본 실험의 결과는 xanthine-XOD 반응계서 생성된 superoxide가 전자수용체로 작용하는 cytochrome c에 전자를 공여함으로써 발생하는 cytochrome c의 환원정도를 단위 시간당 흡광도의 변화로 측정하여 대조군에 대한 생성 억제효과(%)로 환산하여 표기하였다.

6) 세포배양계에서의 항산화작용 측정

(1) 세포배양

정상 간세포(Ac2F)를 10% FBS-DMEM 배지로 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하여, 2~3일마다 한번씩 75-cm<sup>2</sup> plastic flask(Corning Co., U.S.A)에서 subculture하여 세포주를 유지하였다.

(2) 농도별 백화사설초의 세포독성 측정

정상 간세포(Ac2F)에 대한 백화사설초 추출물의 세포독성을 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 배양 간세포를 5×10<sup>4</sup>cells/well이 되도록 넣고, 백화사설초 추출물을 농도별로 희석하여 well당 200μl씩 첨가한 다음, 10% FBS-DMEM배지로 total volume을 2ml로 조절하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 18시간 배양한 다음, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

(3) 항산화작용 측정

흰쥐의 정상 간세포에 t-BHP에 의한 산화적 손상 및 세포괴사에 대한 백화사설초 추출물의 세포보호 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 간세포를 5×10<sup>4</sup>cells/well이 되도록 분주하고 농도별 백화사설초 추출물을 well

당 200μl씩 첨가한 다음, 10% FBS-DMEM배지로 total volume을 2ml로 조절하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 18시간 배양하였다. 그 후 CMF-PBS로 2회 세척하고 SFM을 well당 2ml씩 가하고, t-BHP의 최종농도가 1mM이 되도록 첨가한 다음, 이를 다시 120분 배양시킨 후, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

(4) MTT assay

세포 생존율의 측정을 위한 MTT assay는 Sladowski 등의 방법을 따라 행하였다. 간세포를 배양시킨 96-well plate에 MTT를 총 용량의 10%가 되도록 넣고, 4시간 배양시킨 다음, 90×g에서 10분간 원심분리하였다. 그 후 상층 배지를 제거하고 EtOH/DMSO(1:1 v/v)를 well당 600μl씩 넣고 20분간 shaking한 다음, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT dye [3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]가 blue formazan을 형성하는 것을 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 통계

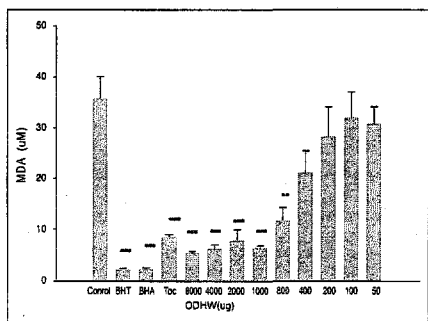
본 실험에서 얻은 실험군간의 결과에 대하여 Student's t-test를 실시하여 유의성 여부를 검증하였고, 그 결과 p값이 0.05 이하인 경우에 유의성을 인정하였다.

### III. 實驗 結果

#### 1. 지질자동산화 억제 효과

백화사설초 추출물이 linoleic acid의 자동산화계에서 생성되는 지질과산화물의 함량에 미치는 효과를 농도별로

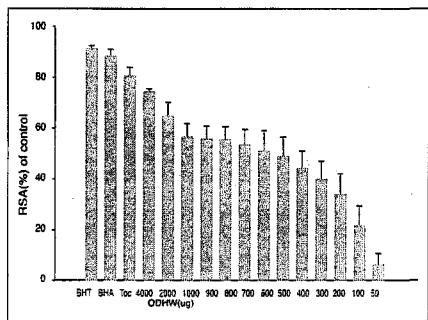
관찰하였다. 그 결과 아무런 처치도 하지 않은 대조군에서 지질과산화물의 함량은 35.58 $\mu$ M이었으나, 항산화제인 BHT, BHA 및 tocopherol을 첨가한 실험군에서는 각각 1.84, 1.95, 8.43 $\mu$ M로 대조군의 35.58 $\mu$ M에 비해 지질과산화물의 생성이 현저하게 억제되었다. 한편 백화사설초 추출물을 농도별로 8,000, 4,000, 2,000, 1,000, 800 $\mu$ g을 첨가한 실험군에서는 지질과산화물의 함량이 각각 5.31, 5.92, 7.69, 6.28, 11.52 $\mu$ M로 대조군에 비해 모두 60%를 넘는 지질자동산화에 대한 억제효과를 보였으며, 특히 최고 85%까지 강하게 억제되었다. 이 결과에서 백화사설초 추출물은 항산화제인 tocopherol과 유사한 수준의 항산화력을 보였다. 또한 백화사설초 추출물을 농도별로 400, 200, 100, 50 $\mu$ g을 첨가한 실험군에서도 지질과산화물의 함량이 각각 20.90, 28.12, 31.87, 30.66 $\mu$ M로 대조군의 35.58 $\mu$ M에 비해 지질과산화물의 생성이 억제되었다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Antioxidative Activity of ODHW in the Linoleic Acid System Each values are the mean  $\pm$  standard error of triplicate experiments.  
Toc : Tocopherol  
\* : values statistically significant as compared with control data of each group.  
( \*\* :  $p < 0.02$ , \*\*\* :  $p < 0.01$  )

## 2. DPPH radical 소거 효과

백화사설초 추출물의 자유기 소거능을 검토하기 위하여 본 실험에서는 DPPH radical 용액에 농도별 백화사설초 추출물을 반응시키고, 그 결과를 RSA(Radical Scavenging Activity) %로 표기하였다. 본 실험의 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군에 비해 항산화제인 BHT, BHA 및 tocopherol을 첨가한 실험군에서 각각 91.54, 88.28, 80.96%의 강한 자유기 소거능을 나타내었다. 한편 백화사설초 추출물을 농도별로 4,000, 2,000, 1,000, 900, 800, 700, 600 $\mu$ g을 첨가한 실험군에서의 자유기 소거능은 각각 74.41, 64.58, 56.44, 55.93, 55.42, 53.73, 51.02%로 모든 실험군에서 50%를 초과하는 소거능을 보였으며, 특히 최고 74%를 넘는 강한 소거능을 나타내었다. 또한 백화사설초 추출물을 500, 400, 300, 200, 100, 50 $\mu$ g으로 소량 첨가한 실험군에서도 각각 49.15, 44.58, 40.34, 34.07, 21.53, 6.27%의 농도의존적인 자유기 소거능을 보였다(Fig. 2).



**Fig. 2.** Scavenging Effect of ODHW on DPPH Radical  
\* RSA : Radical Scavenging Activity (%) = [(Control O.D. - Experimental O.D.) / Control O.D.]  $\times$  100.

## 3. Hydroxyl radical에 의한 지질과산화 반응 억제 효과

생체의 산화적 손상을 야기하는 자유기 중에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있는 hydroxyl radical ( $\cdot$ OH)에 대한 백화사설초 추출물의 효과를 검토하기 위하여 본 실험에서는  $H_2O_2-Fe^{2+}$ 로 구성되는 Fenton 반응계를 사용하여 hydroxyl radical을 생성시켰다. 또한 이 반응계에 흰쥐의 정상 간조직 균질액을 첨가함으로써 hydroxyl radical에 의한 지질과산화 반응을 유도하였다. 그 결과, 간조직을 Fenton 반응계와 반응시키지 않은 정상군에서의 지질과산화물의 함량은 3.51 $\mu$ M이었다. 반면 간조직을 Fenton 반응계와 반응시킨 대조군에서의 지질과산화물의 함량은 18.30 $\mu$ M로 정상군에 비해 현저하게 증가하였다. 이 결과에서 Fenton 반응계에서 생성된 hydroxyl radical은 간조직과 반응하여 지질과산화물의 생성을 현저하게 증가시킬 수 있었다. 한편 이 반응계에 항산화제인 BHT를 첨가한 실험군에서는 지질과산화물의 함량이 4.58 $\mu$ M로 대조군에 비해 약 74%의 억제 효과를 보였다. 또한 백화사설초 추출물을 농도별로 1,000, 800, 400, 200, 100, 80 $\mu$ g을 첨가한 실험군에서는 지질과산화물의 함량이 각각 7.93, 7.78, 8.99, 10.10, 10.17, 11.59 $\mu$ M로 대조군에 비해 56.61, 57.46, 50.81, 44.76, 44.33, 36.57%의 지질과산화물 생성 억제 효과를 보였다. 본 실험의 결과, 백화사설초 추출물은 hydroxyl radical에 의한 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응을 유의성있게 억제함을 알 수 있었다. (Fig. 3).

#### 4. Xanthine-XOD 반응계에서의 superoxide 생성 억제 효과

생체의 산화적 손상을 야기하는 자유기 중에서 hydroxyl radical과 더불어 중요한 역할을 담당하는 자유기로 알려져 있는 superoxide(O<sup>2·-</sup>)에 대한 백화사설초 추출물의 효과를 검토하였다. 본 실험에서는 xanthine-XOD 반응계를 사용하여 superoxide를 생성시키고 이 반응계에 농도별 백화사설초 추출물을 첨가하였을때의 자유기 생성 변화를 관찰하였다. 그 결과, 백화사설초 추출물을 농도별로 1,000, 800, 600, 400,

200, 100, 50µg을 첨가한 실험군에서 무첨가군인 대조군에 비해 각각 60.06, 56.44, 52.82, 43.99, 42.55, 35.02, 35.75%의 superoxide 생성 억제 효과를 나타내었다. 이 결과에서 백화사설초 추출물은 최고 60%를 넘는 강한 자유기 생성 억제 효능을 보였다(Fig. IV).

#### 5. 농도별 백화사설초의 배양 간세포에 대한 독성

이상의 in vitro 실험 결과에서 백화사설초 추출물은 지질과산화 반응을 억제하였고, 또한 이러한 효과는 본 약물이 자유기 생성을 억제하거나 소거하는 효능에 기인함을 알 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 본 실험에서는 백화사설초 추출물의 간세포에 대한 독성을 검토하고, 또한 간세포에 독성을 나타내지 않는 안전한 농도범위내에서 간세포의 산화적 손상을 억제할 수 있는가를 규명하고자 하였다. 먼저 백화사설초 추출물의 간세포 독성 여부를 관찰하기 위하여 96-well plate에 흰쥐의 정상 간세포 (Ac2F)를 배양하고, 백화사설초 추출물을 농도별로 전처리한 다음, 일정 시간 경과후 세포 생존율을 MTT assay로 측정하였다.

그 결과 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 백화사설초 추출물을 well당 1,000, 500, 200µg을 첨가한 실험군에서는 각각 83.44, 88.62, 90.69%의 세포 생존율이 다소 감소하였다. 한편 백화사설초 추출물을 well당 100, 50, 20, 10, 5µg을 첨가한 실험군에서는 각각 97.33, 98.47, 98.14, 99.95, 97.81%의 세포 생존율을 보였다. 이 결과에서 백화사설초 추출물을 배양 간세포에 100µg 이하로 처리할 경우 모두 100%에 가까운 세포 생존율을 보였으므로 정상 간세포

에 대한 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다(Fig. V).

#### 6. 간세포의 산화적 손상에 대한 억제 효과

간세포의 산화적 손상에 대한 백화사설초의 보호 효과를 관찰하기 위하여 먼저 흰쥐 정상 간세포를 96-well plate에 배양한 다음, 백화사설초 추출물을 농도별로 전처리하였다. 일정시간 배양시킨 다음, 간세포의 산화적 손상을 유도하기 위해 저농도의 t-BHP를 첨가하고 세포 생존율을 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, t-BHP만을 처리한 실험군에서는 59.05%의 세포 생존율을 나타내었다. 이 결과에서 t-BHP를 처리함으로써 약 41%의 간세포가 산화적 손상으로 괴사되었음을 알 수 있었다. 한편 백화사설초 추출물을 농도별로 well당 1,000, 500µg을 전처리한 다음, t-BHP를 처리한 실험군에서는 각각 63.11, 64.39%로 t-BHP 단독 처리군의 59.05%에 비해 다소 높은 세포생존율을 보였다. 한편 백화사설초 추출물을 농도별로 well당 200, 100, 50, 20, 10µg을 전처리한

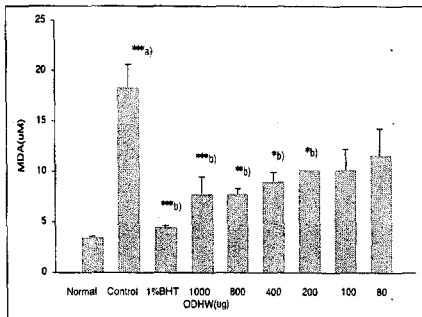


Fig. 3. Effect of ODHW on the Lipid Peroxidation of Rat Homogenate induced by Fenton Reaction System a) : values statically significant as compared with normal data of each group. b) : values statically significant as compared with control data of each group. (\* : p<0.05, \*\* : p<0.02, \*\*\* : p<0.01)

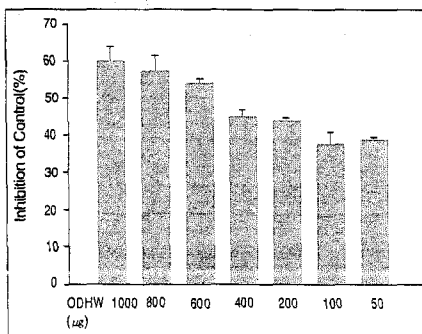


Fig. 4. Inhibitory Effect of ODHW on Superoxide Generation Induced by Xanthine-Xanthine Oxidase System

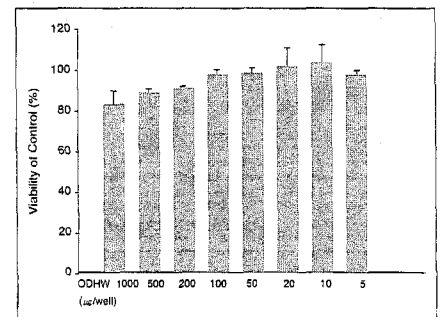
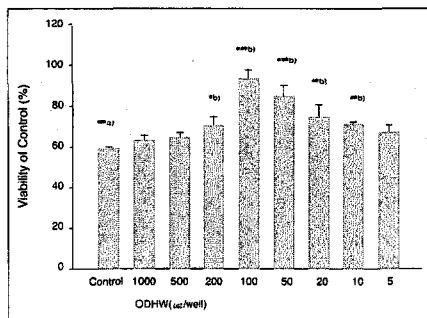


Fig. 5. Cytotoxicity of ODHW on Cultured Normal Rat Liver Cell Values statically significant as compared with control data of each group. (\*\* : p<0.02, \*\*\* : p<0.01)

다음, t-BHP를 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 각각 70.26, 93.43, 84.57, 74.64, 71.21%로 t-BHP 단독 처리군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다. 또한 백화사설초 추출물을 5 $\mu$ g을 전처리한 실험군에서는 67.16%로 t-BHP 단독 처리군에 비해 다소 높은 세포 생존율을 보였으나 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 세포배양계를 이용한 실험결과에서 간세포에 독성을 나타내지 않는 용량으로 백화사설초 추출물을 처리하여도 t-BHP에 의한 간세포의 산화적 손상 및 괴사를 효과적으로 방어함을 알 수 있었다(Fig. VI).



**Fig. 6.** Effect of ODHW on t-BHP Induced Lipid Peroxidation in Cultured Normal Rat Liver Cell  
 a) : values statistically significant as compared with control data of each group.  
 b) : values statistically significant as compared with t-BHP data of each group. (\* : p<0.05, \*\* : p<0.02, \*\*\* : p<0.01)

#### IV. 考 察

백화사설초(白花蛇舌草)는 산기승의 습지에 나며, 우리나라에서는 제주도, 중국에서는 長江以南의 지방에 분포하며 異名은 蛇舌草라고 되어 있어 『名醫別錄』과 『新修本草』에 기록된 蛇舌과

혼돈할 수 있으나 약성이나 주치로 볼 때 전혀 다른 약물이다<sup>24-25</sup>. 본 약물의 性味는 甘苦, 寒涼으로 나타나 있으며 清熱, 解毒, 利濕, 消腫, 消癰, 抗癌 등의 효능이 있어 瘡毒, 腸癰, 咽喉腫痛, 小便不利, 肺熱咳嗽, 熱淋, 濕熱黃疸 등의 치료에 응용되고 있다<sup>26-27</sup>.

한편 백화사설초와 관련한 실험적 연구로는 성분 분석<sup>14</sup>, 항암효과<sup>15-16</sup>, 항균 및 항산화효과<sup>17</sup>, 간장보호 효과 연구<sup>18-19</sup> 등이 있으나, 주로 抗癌 활성에 대한 연구가 대다수이고, 항산화 활성에 의한 간장보호 효과에 관한 연구는 다소 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 백화사설초 추출물의 항산화 활성 및 배양 정상 간세포의 산화적 손상에 대한 효과, 그리고 마우스의 산화적 간손상에 대한 보호 효과를 종합적으로 검토하였다. 그 결과 백화사설초 추출물은 linoleic acid를 이용한 지질자동산화계에서 지질과산화물의 생성을 현저하게 억제하였다. 또한 지질과산화 반응의 개시와 진행 과정에 있어서 주된 역할을 담당하는 자유기에 대한 본 약물의 소거 효과를 알아보기로 DPPH radical과 반응시킨 결과, 백화사설초 추출물은 농도 의존적인 자유기 소거효과를 보였으며, 최고 74%를 상회하는 강한 소거능을 보였다. 이와 같은 결과에서 백화사설초 추출물은 자유기에 대한 강한 전자공여능을 가지며, 이로 인해 지질과산화물의 생성 또한 억제할 수 있는 것으로 판단된다.

그리고 생체 내에서 지질과산화 반응에 의한 산화적 손상 유발에 주된 역할을 하는 자유기로 알려진 hydroxyl radical에 대한 본 약물의 영향을 관찰하고자 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 Fe<sup>2+</sup>로 구성되는 Fenton 반응계를 사용하여 hydroxyl radical을 생성시켰다. 또한 이 반응계

에 흰쥐의 정상 간조직 균질액을 첨가함으로써 hydroxyl radical에 의한 지질과산화 반응을 유도하였다. 그 결과, 백화사설초 추출물은 hydroxyl radical에 의한 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응을 유의성있게 억제하였다.

또한 hydroxyl radical과 더불어 산화적 손상을 유발 인자로서 중요시되는 자유기인 superoxide에 대한 본 약물의 생성 억제 효과를 xanthine-XOD 반응계를 이용하여 관찰하였다. 백화사설초 추출물은 xanthine-XOD반응계에서 superoxide의 생성에 대하여 최고 60%를 넘는 강한 억제 효능을 보였다.

이상과 같은 백화사설초 추출물의 자유기 생성억제효과, 자유기 소거효과 및 지질과산화물 생성 억제 효과를 바탕으로 본 약물이 간세포의 산화적 손상에 대한 효능을 알아보려고 본 연구에서는 배양 정상 간세포를 이용하여 세포 수준에서의 항산화 활성 및 간세포 보호효과를 검토하였다. 먼저 본 약물의 간세포 독성 여부를 평가하기 위하여 배양 정상 간세포에 농도별로 처리한 결과, 백화사설초 추출물을 well당 100  $\mu$ g 이하로 처리할 경우 모두 100%에 가까운 세포 생존율을 보였으며, 간세포에 대한 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 따라서 이 결과를 바탕으로 간세포에 안전한 농도로 백화사설초를 처리할 때 간세포의 산화적 손상을 억제할 수 있는가를 검토하였다. 본 연구에서 배양 정상 간세포에 산화적 손상을 유발시킬 목적으로 사용된 t-BHP의 독성은 급성 oxidative stress로 인한 세포의 비가역적 손상에 관한 기전연구의 모델로서 자주 사용되어 왔는데 특히 1mM 이하의 저농도에서 유발되는 간세포의 괴사기전은 세포막 지질의 과산화반응이 수반된다고 알려져 있으며 t-

BHP를 간세포에 처리할 경우 항산화 물질인 세포내 GSH은 신속한 감소를 보인다고 보고된 바 있다<sup>28,29</sup>. 따라서 본 연구에서는 흰쥐의 배양 정상 간세포에 백화사설초 추출물을 농도별로 전처리 한 후, t-BHP를 최종농도가 1mM이 되도록 첨가한 다음 세포의 생존율을 MTT assay로 관찰하였다. 그 결과 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 t-BHP 단독 처리군에서의 세포 생존율은 약 59%로 감소하였다. 한편 백화사설초 추출물을 전처리한 실험군에서는 t-BHP 단독 처리군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이와같은 세포배양계를 이용한 실험 결과에서 백화사설초 추출물은 간세포에 안전한 농도로 처리하여 t-BHP에 의한 간세포의 산화적 손상 및 괴사를 강하게 억제함을 알 수 있었다.

## V. 結 論

백화사설초 추출물의 항산화 효과를 규명하기 위하여 지질과산화 반응 억제 효과, 자유기 소거효과, 그리고 간세포의 산화적 손상에 대한 보호효과 등을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백화사설초 추출물은 linoleic acid의 자동산화계에서 생성되는 지질과산화물의 생성을 유의성있게 억제하였으며, 특히 항산화제인 tocopherol과 유사한 수준의 항산화력을 보였다.
2. DPPH radical을 이용한 자유기 소거능 실험의 결과, 백화사설초 추출물은 최고 74%를 넘는 강한 자유기 소거효과를 나타내었다. 또한 백화사설초 추출물은 Fenton 반응계에서 hydroxyl radical에 의한 간조직의 지질과산화 반응을 유의성있게 억제하였으며, xanthine-XOD 반응계에서의

superoxide 생성을 현저하게 억제하였다.

3. 세포배양계에서 백화사설초 추출물은 정상 간세포에 독성을 나타내지 않는 용량 범위에서 t-BHP에 의한 간세포의 산화적 손상 및 괴사를 유의성 있게 억제하였다.

## 參考文獻

1. 서광식, 이병석, 성재규 등. 최근 5년간 간경변의 원인파 합병증에 관한 고찰. 대한간학회지 1997; 3: 202-209.
2. Nordmann R, Ribiere C and Rouach H. Implication of free radical mechanism in ethanol induced cellular injury. J. Free. Radic. Biol. Med. 1992; 12: 219-240.
3. Halliwell B. Free radical, antioxidant and human disease. Lancet. 1994; 344: 721-724.
4. Aruoma, O. I., Kaur, H. and Halliwell, B. : Oxygen free radicals and human disease. J. Roy. Soc. Health 1991; 111(5): 172-177.
5. 문진영, 임종국 : 시호 약침제제의 자유기 소거능 및 지질과산화 억제효능에 관한 연구. 대한침구학회지. 1998; 15(2) : 135-145.
6. 안준철, 문진영, 임종국 : 당귀 약침액의 항산화효능에 관한 연구(II). 대한침구학회지. 1997; 14 : 383-395.
7. 임창수, 김갑성 : 작약 약침의 항산화효능에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999; 16(3) : 269-286.
8. 김성일, 문진영, 김갑성, 김두희, 남경수, 임종국 : 자유기에 의한 지질과산화 반응에 대한 황금 약침액의 항산화 효능. 대한예방의학학회지. 1997; 1 : 48-54.
9. 김태기, 박선동, 문진영 : 시호사물탕이 t-BHP로 유도된 간세포의 산화적 손상 및

자유기에 의한 지질과산화 반응에 미치는 영향. 방제학회지. 2000; 8(1): 241-255.

10. 오세용, 이준무 : 肝俞, 膽俞의 小柴胡湯藥鍼處理가 CCl<sub>4</sub> 中毒 Rat의 肝機能恢復에 미치는影響. 대한침구학회지. 1995; 16(1) : 271-280.
11. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울 : 영림사, 1998 : 223-224.
12. 徐樹楠. 中藥臨床應用大全. 石家莊 : 河北科學技術出版社, 1999 : 723-724.
13. 鄭虎占, 董澤宏, 余靖. 中藥現代研究與應用. 北京 : 學苑出版社, 1997 : 1533-1538.
14. 김영희. 백화사설초의 성분에 관한 연구. 한국약용작물학회지. 1995; 3(2) : 91-95.
15. 우원홍, 문구, 전병훈. 암세포의 증식과 분화에 미치는 백화사설초 메탄올 추출물의 효과. 동의병리학회지. 1998; 12(2) : 105-107.
16. 김성훈, 송규용, 유시용. 백화사설초 핵산분획과 다당체가 항암 및 항전이 활성에 미치는 영향(Ursolic acid 와 Asperuloside 병용 투여시 항암 및 항전이 효과에 관한 연구). 동의병리학회지. 1999; 13(1) : 65-75.
17. 서인교, 김상찬, 이진태, 변준석, 변성희. 백화사설초 추출물의 항균실험 및 SOD 유사활성, 전자공여능에 관한 연구. 대한방제학회지. 2000; 8(1) : 299-318.
18. 김미려. Carbon tetrachloride 로 유발된 간 손상에 미치는 백화사설초와 동충하초의 효과. 동서의학. 1994; 19(2) : 52-59.
19. 김미려. Carbon tetrachloride 와 백화사설초 및 동충하초의 병용투여가 간장 및 혈청성분에 미치는 영향. 동서의학. 1994; 19(3) : 5-10.
20. Osawa, T., Namiki, M. : A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. Agric. Biol. Chem. 1981; 45 : 735-739.
21. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. : Assay

- for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochem.* 1978 ; 95 : 351-358.
22. Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T. : Two new flavonoids and other constituents in licorice root : their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* 1988 ; 36 : 2090-2097.
23. Sladowski, D., Steer, S. J., Clothier, R. H. and Balls, M. : An improved MTT assay. *J. Immun. Methods* 1993 ; 157 : 203-207.
24. 顏正華. 中藥學. 北京; 人民衛生出版社: 1991, 200-201.
25. 宋昊堃, 金台峴. 白花蛇舌草 煎湯液 투여가 마우스의 항종양 면역반응에 미치는 영향. *본초분과학회지.* 1994 ; 9(1) : 83-97.
26. 中國의학과학원. 中國本초도감. 北京; 인민위생출판사: 1994, 232.
27. 新文豐出版公司. 中藥大辭典. 臺北; 新文豐出版公司: 1971, 654.
28. Masaki N, Kyle ME and Farber JL: Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989 ; 270 : 672-680.
29. Shertzer HG, Bannenberg GL, Zhu H, Liu RM and Moldeus P: The role of thiols in mitochondrial susceptibility to iron and tert-butyl hydroperoxide-mediated toxicity in cultured mouse hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 1994 ; 7 : 358-366.