

사염화탄소에 의한 간손상에 미치는 고본의 보호작용

정춘식 · 정기화*
덕성여자대학교 약학대학

Protective Effects of *Angelica tenuissima* Nakai on Hepatototoxicity by Carbon Tetrachloride in Rats

Choon-Sik JEONG and Ki Hwa JUNG*

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

(Received November 2, 2002 ; accepted November 30, 2002)

Abstract – Hepatoprotective activity of methanol extract of *Angelica tenuissima* Nakai on the CCl₄-induced hepatotoxicity was investigated. To elucidate the hepatoprotective activity and free radical scavenging effect, we examined alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin, total protein, cholesterol, malondialdehyde (MDA) levels in serum and activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) in hepatic tissue as compared with those of carbon tetrachloride-induced rats. The action mechanism also has been estimated by quantitative analysis of cytochrome P450 (CYP), NADPH-CYP reductase for phase I metabolism and glutathion (GSH), glutathion S-transferase (GST) level for phase II metabolism. Treatment of *Angelica tenuissima* methanol extract significantly lowered the levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. In addition, the levels of cholesterol, triglyceride, MDA, CAT were decreased, and SOD was activated. This result indicates that the hepatoprotective effect of *Angelica tenuissima* methanol extract on the CCl₄-induced hepatotoxicity would be originated from reduction of the NADPH-CYP reductase, GSH and the enhancement of the activities of GST, CYP.

Key words □ *Angelica tenuissima*, hepatoprotective effect, lipid peroxydation, free radical scavenger

1998년 통계청 사망 원인 통계 연보에 의하면 인구 10만 명당 남성의 간암 사망률은 30.3명으로 세계에서 가장 높고, 만성 간 질환으로 인한 사망률도 39.7명으로 더욱 높은 것으로 나타나고 있으며 40대 남성 사망 원인의 1위를 차지하고 있다.

인체는 알코올, 약물, 화학물질 및 여러 가지 환경 오염 물질 등이 유입되면 생체는 이들을 이물질로 인식하여 체외로 배설시킴으로써 무독화하려는 방어 체계를 가동시키며, 간은 무독화 변환 과정이 일어나는 주요 기관이다. 세포 손상을 일으킬 수 있는 활성 물질은 간의 약물 대사 효소계에 의해 대사되어 체외로 배설되거나 물질에 따라서는 약물 대사 효소계를 억제 또는 유도함으로써 다른 약물의 대사를 지연 또는 활성화하여 약물의 약효 또는 독성에 영향을 미친다. 이러한 간의 약물 대사 효소계는 크게 두 가지로 구분할 수 있다. Phase I 대사는 관능

기 (-OH, -NH₂ 및 -SH)를 약물 분자에 도입하는 반응으로서 산화, 환원 및 가수분해 반응이 있다(Sipes 등, 1991). Phase I 대사 중 산화 반응은 간 microsome의 mixed function oxidase system에 의해 이루어진다. Mixed function oxidase system은 NADPH와 산소분자를 필요로 하는 대사 효소계이며 cytochrome P450이 중요한 역할을 한다. 즉 cytochrome P450은 약물 대사 효소계의 전자 운반 과정에서 전자 수용을 담당하며 NADPH와 NADPH-cytochrome P450 reductase를 필요로 한다. Phase I 대사를 통하여 대부분의 이물질은 무독화(detoxification) 되지만 경우에 따라서는 더 활성화된 중간 대사 산물(metabolic activation)로 전환되어 발암성이나 다양한 독성을 나타내거나 유효한 약물로 변환되어 약효를 나타내기도 한다.

Phase II 대사에서는 UDP-glucuronyl transferase, sulfotransferase 및 glutathione S-transferase (GST) 등의 효소에 의하여 phase I 대사를 통해 더 활성화된 중간 대사 산물이 UDP-glucuronic acid 및 glutathione 등의 내인성 물질들과 포함됨으로써 대부분이 불활성화되어 이들 약

*To whom correspondence should be addressed.
본 연구는 2002 학년도 덕성여자대학교 약학연구소의 연구비 지원으로 이루어졌음.

물의 작용을 소실시키고 동시에 수용성을 증가시켜 신장이나 담즙을 통해 배설함으로써 해독화한다.

특히 혈장 중의 GST의 측정은 특정 장기의 손상을 반영하는 조직 상해의 지표로 사용된다(Geoffrey와 John, 1994).

CCl_4 는 phase I 약물 대사 효소 중 cytochrome P450과 NADPH-cytochrome P450 reductase에 의해서 trichloromethyl radicals와 trichloromethyl peroxy radicals ($\cdot OOCCL_3$)을 생성하여 세포막의 인지질인 polyenoic fatty acid의 methyl carbon을 공격해서 지질과산화물을 야기하여 간세포 괴사를 일으킨다(McCay 등, 1984; Butler 등 1990). 또한 이런 radicals는 microsome 지질의 불포화 지방산 측쇄의 methylene 결합을 공격하여 약물 대사 효소 활성화와 단백질 합성을 저하시키고 간에서의 급성 지방 변성을 일으키며 lipoprotein의 생성과 유리를 차단해서 급속한 지방 축적을 야기한다(北川清雄, 1982).

藜本(*Angelica tenuissima*, Nakai)은 지신, 미경, 산천궁, 돌반향이라고도 하며 산형과(Umbelliferae)에 속하는 다년생 초본인 고본의 근을 채취하여 건조한 것이다(육창수, 1984). 고본은 우리나라 고산에 자생하고, 또한 재배하기도 있다(유상영과 한 대석, 1962).

고본의 성미는 약간 따스하고 매우며 쓰고 독이 없다. 거풍에 능하고, 겸하여 한습과 정수리에 동통을 다스림으로써(황도연, 1989) 악풍, 두풍, 진신통, 풍두통을 없애며 풍사로 손발을 오그렸다 폈다하는 것과 머리가 무거우며 어지러운 것을 치료할 뿐 아니라 고혈압 및 부인병, 습진에도 효과가 있다(박영신 등, 1993).

본 연구는 고본이 오장의 풍사에 효과가 있음에 착안하여 methanol추출물이 CCl_4 로 유발된 간손상에 미치는 보호효과를 확인하고 그 기전을 규명하고자 한다. 즉 고본이 간손상에 미치는 영향을 보기 위하여 혈액 생화학적 분석으로 ALT와 AST활성, albumin량, TP량, cholesterol량을 측정하고, 간조직에 미치는 영향을 보기 위하여 TG량, 지질과산화물 함량을 측정하였다. 지질과산화에 미치는 영향과 free radical scavenging 작용을 확인하기 위하여 malondialdehyde (MDA)의 양과 superoxide dismutase (SOD) 활성도 및 catalase (CAT) 활성도를 측정하였다.

또한 고본의 간손상 보호효과의 기전을 밝히기 위해 phase I 대사에 관여하는 cytochrome P450 (CYP), NADPH-CYP reductase활성과 phase II대사에 관여하는 glutathion (GSH) 함량, GST 활성을 측정하였다.

시약 및 기기

Carbon tetrachloride (Duksan pharmaceutical Co., Korea), ALT kit, AST kit, total bilirubin kit, albumin kit,

TP kit, cholesterol kit, TG kit (Yeongdong pharmaceutical Co., Korea), Tris-acetate, EDTA, Tris base, glycerol, folin ciocalteou's phenol, bovine serum albumin, thiobarbituric acid, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, xanthine, cytochrome c, xanthine oxidase, NADPH, sodium dithionite, cumene hydroperoxide, hydrogen peroxide, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), GSH, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)(Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA), 기타 시약 및 추출 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기기로서 High speed centrifuge (DuPont Sorvall instrument, Model RC 5C), ice maker (Welbilt Co. USA), micro-pipette (Gilson medical electronics, France), UV-spectrophotometer (Hewlett Packard HP 8452A Diode-Array), ultracentrifuge (Beckman Co., Ltd. L-80), tissue tearor (Biospec products, Inc. Model 985-370) 및 evaporator (Eyela)를 사용하였다.

고본의 추출

본 실험에 사용한 고본은 경동 시장 내 한약건재상으로부터 구입하여 세척하고 음건하였다.

잘 건조된 고본을 methanol로 수욕상에서 5시간씩 4회 추출한 후 은시 여과하고, 여액을 감압 농축하여 분말로 한 것을 검체로 사용하였다.

실험 동물

체중 150~250 g의 Sparague-Dawley계 수컷 흰쥐를 $22 \pm 2^\circ C$ 에서 2주 이상 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용하였고 고형사료(삼양사료) 및 물을 충분히 공급하였다.

채혈 및 혈청 분리

고본 추출물은 수득율에 따라 1,000 mg/kg을 수용액에 현탁하여 3일간 경구투여 하였다. CCl_4 는 corn oil을 vehicle로 하여 0.45 mL/kg용량으로 약물 최종 투여 3시간 후에 복강 투여하고 18시간 가량 절식시켜 간손상을 유발시켰다.

약물 최종 투여 24시간 후 ether로 마취시키고 복부 정중선을 절개하여 심장에서 채혈하고, 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 혈청과 간조직을 이용하여 실험을 실시하였다.

혈액 생화학적 분석

혈장 ALT, AST와 albumin 함량 및 cholesterol 함량은 kit를 이용하여 분석하였다. Total protein(TP) 측정은 Biuret법을 이용하여 단백을 측정하는 biuret reagent를 이용하여 분석하였다.

간조직 중 cholesterol 및 triglyceride 측정

약물 최종 투여 24시간 후 적출한 간조직 중 일부를 취하여 phosphate buffer (pH 7)에 넣고 1분간 분쇄한 후 10% liver homogenate를 만들고 triglyceride을 kit를 이용하여 분석하였다.

Microsome 및 cytosol 분리

약물 최종 투여 24시간 후 적출한 간조직을 생리식염수로 씻고 세절한 후 3배 용량의 0.1 M Tris-KCl buffer (0.1 M Tris acetate, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 with Tris base)를 가하고 osterizer blender를 이용하여 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직은 high speed centrifuge로 8,000 g에서 30분, 105,000 g에서 90분간 초원심분리시켜 상정액인 cytosol을 분리하였다. 상정액인 cytosol을 취하고 남은 침전인 microsome을 0.1M sodium pyrophosphate buffer (0.1 M sodium pyrophosphate와 1 mM EDTA)에서 재혼화하여 144,000 g에서 60분간 다시 초원심분리하여 세척한 후 microsome을 얻었다. 얻어진 microsome을 50 mM Tris acetate buffer (50 mM Tris acetate, 20% glycerol, pH 7.4 with Tris base)에 재분산시킨 후 분주하여 사용하기 전까지 -70°C 에서 보관하였다. 모든 조작은 4°C 이하에서 실시하였다.

단백정량

회석된 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 hydroxide 용액을 사용 직전에 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. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 사용하여 만든 standard curve로부터 얻었다(Lowry 등, 1951).

지질과산화물 함량에 미치는 영향

Microsome 0.5 ml에 1% H_3PO_4 , 0.67% thiobarbituric acid 시약을 가한 후 95°C 에서 45분간 진탕한 후 실온까지 냉각하고 butanol 4.0 ml를 가해서 진탕 추출한 후 원심 분리하여 butanol 층을 취해 535 nm와 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준액으로는 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane을 사용하여 검체에서의 malondialdehyde 생성량을 계산하고 이를 nmol/mg protein으로 나타내었다(Uchiyama와 Mihara, 1978).

Superoxide dismutase 활성에 미치는 영향

Xanthine이 xanthine oxidase에 의해 uric acid로 전환될

때 생성되는 superoxide anion이 황적색을 띠는 cytochrome c를 환원시켜 적색으로 변화시켜 환원형 cytochrome c에 의해 550 nm의 흡광도가 증가된다. 이 때 superoxide dismutase가 존재하면 생성된 superoxide anion을 hydrogen peroxide로 전환시키므로 superoxide anion이 cytochrome c를 환원하는 작용을 저해한다. 따라서 cytochrome c의 환원작용이 저해되는 정도를 측정하여 SOD 활성도를 측정하였다. 2.0 mL의 혼합용액(5 μmol xanthine, 2 μmol cytochrome c, 0.1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8)을 cuvette에 넣은 후 20 μL 의 cytosol을 첨가하여 1-2분간 기주신을 설정한 다음 0.1 mM EDTA용액에 약 0.2 U/mL의 xanthine oxidase를 함유하는 용액 30 μL 를 첨가하여 반응을 시작함과 동시에 550 nm에서 흡광도 증가 속도를 측정하여 활성도를 계산하였다. 이 때의 cytochrome c의 분자흡광계수는 $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 환산하여 계산하였다(Fridovich, 1995).

Catalase 활성에 미치는 영향

과산화수소가 240 nm에서 최대 흡광도를 나타내므로 catalase에 의해서 소모되는 과산화수소의 양을 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 기질 1.3 mL (25 mM H_2O_2 in 50 mM phosphate buffer, pH7.0)을 cuvette에 넣은 후 20 μL 의 cytosol을 첨가하여 즉시 240 nm에서 흡광도 감소 속도를 측정하여 활성도를 계산하였다. 이 때의 과산화수소의 몰흡광계수는 $40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 환산하여 계산하였다(Aebi, 1974).

Phase II대사

Cytochrome P450 측정

Microsome을 단백질량이 1~2 mg/ml이 되도록 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)에 현탁시켰다. 현탁 용액을 semi-microcuvette에 1 ml씩 넣어 reference cell과 sample cell로 하고 소량의 sodium dithionite를 각 cell에 가한 후 400~500 nm에서 기준선을 정하였다. Sample cell에 CO기체를 1 bubble/sec의 속도로 1분간 bubbling시킨 후 다시 400~500 nm에서 cytochrome P450-CO binding complex의 흡광도를 측정하였다. Cytochrome P450은 cytochrome P450-CO complex 형성 전후의 각각 450 nm와 490 nm사이의 흡광도 차이로 계산하였으며, 이때 분자흡광계수를 $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 환산하여 계산하였다(Omura와 Sato, 1964).

NADPH-CYP reductase 활성도 측정

Microsome에 300 μmol potassium phosphate (pH 7.7), 40 nmol cytochrome c를 함유하는 최종부피 1 mL의 반응액에 0.1 μmol NADPH를 첨가하여 반응을 시작함과 동시에 파장 550 nm에서 1분간 흡광도 증가속도를 측정하여

여 활성도를 산출하였다. 이 때 반응은 30°C에서 실시하였으며 cytochrome c의 환원속도는 파장 550 nm에서 분자흡광계수를 $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 환산하여 계산하였다 (Strovel와 Digman, 1978).

Phase II 대사

Glutathion S-transferase 활성 측정

Cytosol에 존재하는 GST는 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene가 GST에 의해 glutathione과 포합 되었을 때의 고유의 노란색이 탈색되는 속도를 측정함으로써 활성도를 산출하였다. 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5)에 cytosol 단백질 25 μg 를 넣고 25°C에서 2분간 방치 후 기질로써 1.0 mM의 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene와 1.0 mM의 glutathione를 가하여 총량을 1.0 ml로 한 후 즉시 340 nm에서 10초 간격으로 100초 동안 흡광도를 측정하였다. Blank로는 가열하여 불활성화한 cytosol 단백질을 사용하였으며 분자흡광계수를 $9.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 환산하여 계산하였다(Habig 등, 1974).

Glutathion 함량 측정

간 조직중의 GSH량은 thiol기에 DTNB를 작용시켜 형성된 p-nitrothiophenol anion을 비색 정량 하는 원리로 Ellman(Ellman, 1959)의 방법에 따라 실시하였다. 완충용액 2.5 mL(100 mM potassium phosphate buffer, pH7.5)에 homogenate 25 μL 와 6 mM DTNB 100 μL 를 넣고 실온에서 3분 방치후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. GSH의 함량은 GSH를 사용하여 만든 standard curve로부터 산출하였다(Ellman, 1959).

통계처리

모든 실험 결과는 평균치와 표준오차를 계산하고, 각 군간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 p값이 0.05미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

혈청 ALT 및 AST 활성에 미치는 영향

간조직의 손상은 세포 내부에 존재하는 효소가 혈액으로 유출되는 것을 측정하거나 pericentral necrosis를 관찰함으로써 확인할 수 있다. 따라서 간으로부터 혈액에 방

출된 간의 효소 활성도 측정은 간손상 연구에 있어서 가장 유용한 방법 중의 하나이며, 특히 혈장 중 ALT와 AST 등의 효소 활성도의 상승은 간손상으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것이므로 간세포의 변성 및 괴사의 지표가 된다.

혈청 ALT 및 AST활성도에 관한 결과는 Table I과 같다.

CCl_4 투여군의 혈장 ALT 활성도는 205.39 ± 25.03 KA Unit/l이었으며, 고본 methanol 추출물 투여군은 CCl_4 로 유발된 간손상에 의해 증가한 ALT 활성도를 116.1 ± 26.17 KA Unit/l로 억제시켰다.

혈장 AST 활성도는 CCl_4 투여군은 943.42 ± 148.73 KA Unit/l이었으며, 고본 methanol 추출물 투여군은 443.81 ± 112.78 KA Unit/l로 CCl_4 로 유발된 간손상에 의해 증가한 AST 활성도를 유의적으로 억제시켰다.

본 실험에서 고본 추출물 투여군은 CCl_4 에 의해 증가된 혈장 ALT 활성도 및 AST 활성을 감소시키고 대조약 물인 *Carduus marianus*의 활성만큼 CCl_4 로 인한 간손상 억제 효과가 있음을 확인하였다.

Albumin과 TP 함량 및 cholesterol 함량에 미치는 영향

혈액에는 여러 종류의 단백질이 함유되어 있고 그 중 albumin이 60%정도를 차지한다. Albumin은 간에서만 생산되는 단백질이므로 간기능이 저하되면 albumin의 감소가 나타난다. 약물 최종투여 24시간 후 채취한 혈청중의

Table I. Effects of methanol extract of *Angelica tenuissima* on ALT and AST activities in CCl_4 treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	ALT (KA unit/l)	AST (KA unit/l)
Untreated	-	19.46 ± 2.97	80.40 ± 33.69
CCl_4	-	205.39 ± 25.03	943.42 ± 148.73
Methanol ex. + CCl_4	1000	$116.11 \pm 26.17^*$	$443.81 \pm 112.78^{**}$
CM ext. + CCl_4	150	$108.70 \pm 33.70^*$	$432.41 \pm 132.61^{**}$

The values are expressed as mean \pm S.D. (n=6).

CM: *Carduus marianus*.

*P<0.05 compared to the CCl_4 group.

**P<0.01 compared to the CCl_4 group.

Table II. Effects of methanol extract of *Angelica tenuissima* on albumin, TP and Cholesterol levels in CCl_4 treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Albumin (g/dl)	TP (g/dl)	Cholesterol (mg/dl)
Untreated	-	5.06 ± 0.62	5.69 ± 0.36	44.60 ± 5.00
CCl_4	-	4.38 ± 0.80	5.21 ± 0.21	68.21 ± 4.85
Methanol ex. + CCl_4	1000	4.44 ± 0.56	5.20 ± 0.76	68.68 ± 7.17
CM ext. + CCl_4	150	3.56 ± 0.89	5.74 ± 0.66	52.20 ± 8.40

The values are expressed as mean \pm S.D. (n=6).

CM: *Carduus marianus*.

albumin과 TP 및 cholesterol 함량에 미치는 영향은 Table II와 같다.

Albumin함량은 CCl₄투여군의 경우 4.38±0.80 g/dl이었고 고본 methanol 추출물 투여군은 4.44±0.56 g/dl로 약간 증가를 보였으나 TP함량에 있어서는 변화를 보이지 않았다. 지질대사와 지방간의 중요 지표 중 하나인 cholesterol은 인지질과 함께 세포막의 성분으로 담즙산의 전구체로 중요한 지질이며 간 손상시 배설장애로 인하고 cholesterol혈증이 나타낸다. Cholesterol 함량에 있어서는 CCl₄투여군은 68.21±4.85mg/dl이었고 고본의 methanol 추출물 투여군은 68.68±7.17 mg/dl로 거의 변화가 없는 것으로 나타났다.

간조직 중 triglyceride에 미치는 영향

CCl₄는 세포기관 중 endoplasmic reticulum에 손상을 초래하여 지질과 단백 합성 및 효소 활성도에 지대한 영향을 미치게 된다. 따라서, 내인성 triglyceride와 phospholipid의 합성 정도가 변화되고 특히, triglyceride의 수송형인 apoprotein과 lipoprotein의 합성이 저하되어 triglyceride이 간세포 내에 축적된다(北川満雄, 1982).

고본의 methanol 추출물의 CCl₄로 유발된 간손상에 대한 효과를 관찰하기 위하여 간조직 중 triglyceride에 미치는 영향은 Table III와 같다. CCl₄ 투여군은 21.70±4.80 mg/g이었으며, 고본의 methanol 추출물 투여군은 투여군과 비교할 때 20.44±2.66 mg/g으로 다소 감소됨으로써 간손상을 예방하는 것으로 생각된다.

Table III. Effects of methanol extract of *Angelica tenuissima* on hepatic triglyceride levels in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Triglyceride (mg/g Liver)
Untreated	-	20.48±1.86
CCl ₄	-	21.70±4.80
Methanol ex.+CCl ₄	1000	20.44±2.66
CM ext. + CCl ₄	150	18.36±3.90

The values are expressed as mean±S.D. (n=6)
CM: *Carduus marianus*

Table IV. Effects of methanol extract of *Angelica tenuissima* on MDA , SOD levels and Catalase activity in the CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	MDA (nmol/mg protein)	SOD (unit/mg protein)	Catalase (units/mg)
Untreated	-	0.67±0.23	12.70±4.68	28.52±5.21
CCl ₄	-	0.84±0.17	7.14±1.28	35.94±11.07
Methanol ex. + CCl ₄	1000	0.73±0.16	13.50±4.36**	33.34±5.12
CM ext. + CCl ₄	150	0.71±0.07	12.31±3.60**	29.14±7.53*

The values are expressed as mean±S.D. (n=6).
CM: *Carduus marianus*.

* P<0.05 compared to the CCl₄ group.
** P<0.01 compared to the CCl₄ group.

간조직의 과산화지질, SOD 및 Catalase 활성에 미치는 영향

세포막의 인지질은 free radical의 공격에 의해서 oxygen centered lipid peroxy radical을 거쳐 carbon centered lipid endoperoxide radical 및 lipid endoperoxide로 된 후 분해되어 malondialdehyde를 생성하게 되므로 지질과산화의 정도를 측정하는 지표가 된다(Johansson와 Ingelman-Sundberg, 1985). 또한 Xanthine이 xanthine oxidase에 의해 uric acid로 전환될 때 생성되는 superoxide anion이 황적색을 띠는 cytochrome c를 환원시켜 적색으로 변화시켜 환원형 cytochrome c에 의해 550 nm의 흡광도가 증가된다. 이 때 superoxide dismutase가 존재하면 생성된 superoxide anion을 hydrogen peroxide로 전환시키므로 superoxide anion이 cytochrome c를 환원하는 작용을 저해한다. 따라서 cytochrome c의 환원작용이 저해되는 정도를 측정하여 SOD 활성도를 측정하였다.

고본의 methanol 추출물 투여군의 CCl₄로 유발된 간손상에 대한 항산화작용을 확인하기 위하여 간 micro-some 중 malondialdehyde 와 간 cytosol에서의 SOD 활성도 및 catalase활성도를 측정한 결과는 Table IV와 같다. 즉 MDA량은 CCl₄ 투여군에서 0.84±0.17 nmol/mg protein이었으며 고본의 methanol 추출물 투여군에서는 0.73±0.16 nmol/mg protein으로 감소되었다. SOD 활성도는 CCl₄ 투여군에서 7.14±1.28 Unit/mg protein이었고, 고본의 methanol 추출물 투여군은 13.50±4.36 Unit/mg protein으로 CCl₄ 투여군에 비하여 증가하는 경향을 나타냈다. Catalase활성도는 CCl₄ 투여군에서 35.94±11.07 Unit/mg 이었고, 고본의 methanol 추출물 투여군은 33.34±5.12 Unit/mg로 CCl₄ 투여군에 비하여 다소 감소하였다. 이로서 고본의 methanol 추출물의 항산화작용을 확인할 수 있었으며 고본의 methanol 추출물의 간손상 보호작용은 항산화작용에 의한 것이라 생각된다.

Cytochrome P450 및 NADPH-CYP reductase 활성에 미치는 영향

CCl₄는 phase I 약물 대사 효소인 cytochrome P450에

의해서 대사되며 매우 반응성이 강한 대사 중간체를 형성하여 조직손상을 일으킨다. 따라서 독성 물질의 대사에 관여하는 cytochrome P450의 활성 및 발현의 선택적인 억제는 조직 손상 및 암발생을 차단할 수 있다(Brady 등 1991). NADPH-cytochrome p450 reductase는 phase I 산화반응 관련 효소로서 mixed function oxidase system에서 quinone독성 유발에 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 있다.

고본의 methanol 추출물 투여군의 CCl₄로 유발된 간 손상에 대한 방어 기전을 확인하기 위하여 간 microsome 중 cytochrome P450와 NADPH-CYP reductase 활성을 측정된 결과는 Table V와 같다. CYP 450 활성은 CCl₄ 투여군은 58.31±6.47 nmol/mg protein이었으며, 고본의 methanol 추출물 투여군은 81.04±5.02 nmol/mg protein으로 CCl₄ 투여군보다 유의성 있게 증가되었고 이는 *Carduus marianus* 투여군과 비슷하다. NADPH-CYP reductase 활성은 CCl₄ 투여군은 113.84±8.12 nmol/min/mg protein이었으며 고본의 methanol 추출물 투여군은 99.72±9.36 nmol/min/mg protein으로 약간의 감소를 보였다.

Glutathione S-transferase 및 Glutathion 활성에 미치는 영향

간 cytosol 분획의 phase II 대사 효소인 glutathione S-transferase는 세포내로 유입된 약물들이 대사되어 생성되는 oxygen radicals 및 친전자성 xenobiotics에 glutathione

의 thiol기를 포함하며, 세포간의 물질 이동에도 관여하는 등 다양한 기능을 가지고 있다. 이러한 glutathione S-transferase의 포합작용과 수송작용에 의해 내인성 또는 외인성 독성 화합물의 해독화 작용이 가능하게 된다. CCl₄의 대사에 의해 생긴 free radicals도 glutathione S-transferase에 의해 glutathione과 포함되나 glutathione이 소모되면 과산화지질의 생성이 증가되고 독성을 일으키게 되므로 그 방어 작용으로서 glutathione S-transferase의 유도 발현이 증가된다(Chance 등, 1979; Vos와 Van Bladeren, 1990).

고본의 methanol 추출물 투여군의 CCl₄로 유발된 간 손상에 대한 방어 기전을 확인하기 위하여 간 cytosol 중 glutathione S-transferase 활성도 및 GSH 함량을 측정된 결과는 Table VI와 같다. GST 활성도는 CCl₄ 투여군은 0.75±0.10 μmol/min/mg protein이었으며, 고본의 methanol 추출물 투여군은 1.19±0.24 μmol/min/mg protein으로 CCl₄ 투여군과 비교할 때 유의적으로 증가되었다.

GSH함량을 측정한 결과 CCl₄ 투여군은 128.6±27.4 μmol/g liver이었으며, 고본의 methanol 추출물 투여군은 121.9±29.6 μmol/g liver로 CCl₄ 투여군에 비하여 다소 감소하였다.

이 결과 고본 methanol 추출물의 간손상 보호작용은 albumin 양의 증가, TG 양의 감소, MDA 양의 감소, SOD 치의 증가 및 caltalse의 감소에 의한 것이며 이는 간의 Phase I대사계의 효소인 CYP 450의 증가와 NADPH-CYP reductase의 감소와 함께 Phase II대사계의

Table V. Effects of methanol extract of *Angelica tenuissima* on cytochrome P450 level and NADPH-CYP reductase level in the CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Cytochrome P450 (μmol/mg protein)	NADPH-CYP reductase (nmol/min/mg protein)
Untreated	—	86.62±10.05	73.12±4.00
CCl ₄	—	58.31±6.47	113.84±8.12
Methanol ex. + CCl ₄	1000	81.04±5.02*	99.72±9.36
CM ext. + CCl ₄	150	81.36±4.88*	106.81±32.21

The values are expressed as mean±S.D. (n=6).

CM: *Carduus marianus*.

*P<0.01 compared to the CCl₄ group.

Table VI. Effects of methanol extract of *Angelica tenuissima* on GST activity and GSH levels in CCl₄ treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	GST activity (μmol/min/mg protein)	GSH (μmol/g liver)
Untreated	—	1.34±0.10	89.48±29.74
CCl ₄	—	0.75±0.10	128.6±27.4
Methanol ex. + CCl ₄	1000	1.19±0.24*	121.9±29.6
CM ext. + CCl ₄	150	1.28±0.20	108.7±8.80

The values are expressed as mean±S.D. (n=6).

CM: *Carduus marianus*.

* P<0.05 compared to the CCl₄ group.

효소인 GST activity의 증가와 GSH의 감소에 기인한 것으로 확인되었다.

참고문헌

- Aebi, H. (1974). Catalase in "Methods of enzymatic analysis", (Vergmeyer H.U., eds). 2, 673, Academic Press. New York.
- Brady, J.F., Xiao, F., Wang, M.H., Li, Y., Ning, S.M., Gapac, J.M. and Yang, C.S. (1991). Effects of disulfiram on hepatic cytochrome P450 2E1, other microsomal enzymes and hepatotoxicity in rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 366-373.
- 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. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59, 527.
- Ellman, G.L. (1950). Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70.
- Fridovich, I.: Xanthine oxidase, CRC handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, New York.
- Geoffrey, J.B. and John, O.H. (1994). Glutathion S-transferase; Biomedical Applications. *Advances in clinical chemistry*, 30, 281-380, Scotland.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974). Glutathion S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Bio. Chem.*, 249, 7130-7139.
- 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.
- 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.
- McCay, P.B., Lai, E.K., Poyer, J.L., Dubose, C.M. and Janzen, E.G. (1984). Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism, *J. Biol. Chem.*, 259, 2135-2143.
- Omura, T. and Sato, R. (1964). Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239.
- Sipes, I.G. and Grandolfi, A.J. (1991). Biotransformation of Toxicants, *Toxicology: The Basic Sciences of Poisons*. (M. O., Klassen, M. O. Amdur, and J. Doull Ed), Pergamon Press, New York.
- Strovel, H.W. and Digman, J.D. (1978). Biological oxidations, microsomal, cytochrome P-450, and other hemoprotein systems, *Methods in enzymology: biomembranes*, 134-176., II. Academic Press, New York.
- 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.
- 박영신, 윤경환, 박명철, 김현옥, 김중정. (1993). 가정동의대전, 동의과학원, 여강출판사.
- 北川清雄. (1982). 독성학, 남강당.
- 유상영, 한대석. (1962). 본초학, 동명사.
- 육창수(1984). 한국 본초학, 동명사.
- 황도연(1989). 증맥방약학편: 남산당 149.