

황기 추출액이 Acetaminophen으로 유발된 마우스의 간 손상에 미치는 영향

이영선¹ · 한옥경¹ · 전태원¹ · 이은실¹ · 김광중² · 박찬우³ · 김효정^{1,2*}

1: (재)경북테크노파크, 경산대학교 한방생명자원특화센터 효능검증원, 2: 경산대학교 한의과대학, 3: 경주한방병원

Effect of *Astragali* radix Extract on Acetaminophen-induced Hepatotoxicity in Mice

Young Sun Lee¹, Ok Kyung Han¹, Tae Won Jeon¹, Eun Sil Lee¹,
Kwang Joong Kim², Chan Woo Park³, Hyo Jung Kim^{1,2*}

1: Efficacy and Safety Research Center for Traditional Oriental Medicines, Kyungsan University, Kyongbuk Technopark,
2: College of Oriental Medicine, Kyungsan University, 3: Kyongju Oriental Hospital

Astragali radix (AR) is one of the oldest and most frequently used crude drug for traditional medicine in many Asian countries. This study designed to investigate the hepatoprotective effects of the aqueous extracted AR (ARE) against acetaminophen (APAP)-induced hepatic damage in ICR mice. APAP at the dose of 450 mg/kg i.p produced liver damage in ICR mice. Serum enzyme activities of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and sorbitol dehydrogenase was dramatically decreased up to control level by pretreatment of ARE. However, hepatic glutathione level did not show a significant change between the tested groups. We also investigated TNF α mRNA gene expression on APAP-induced liver damage by RT-PCR. APAP dramatically induced TNF α mRNA gene expression in ICR mice. Pretreatment of mice with ARE led to a marked decrease of TNF α mRNA gene expression. These data indicate that 1) ARE has clearly revealed a hepatoprotective effect against APAP-induced hepatic damage in ICR mice, and 2) the protective effect of ARE may be, in part, associated with the regulation of TNF α mRNA gene expression.

Key words : *Astragali* radix, acetaminophen, hepatoprotective, RT-PCR, TNF α

서 론

황기 (*Astragalus membtanaceus* BUNGE)는 콩과식물에 속하는 다년생 초본으로 한국, 일본, 중국 등지가 주산지인 알려져 있다. 전통적으로 慈養·強壯 효과가 뛰어나며 약성은 온화해서 허를 보하고 조열을 초래치 않으므로 장기간 복용해도 유익무해한 것으로 알려져 있다¹⁾. 또한 황기의 약성으로는 주로 血壓降下, 血管擴張, 肝 보호, 간의 glycogen의 감소 방지 작용이 있음이 보고되었다²⁾. 동양의학에서 慈養·強壯 효과는 생체의 恒常性 유지에 중요한 역할을 하여 疾病豫防에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 그리고, 이러한 慈養·強壯 효과는 저하된 간 기능을 정상화 또는 촉진시킬 수 있음이 보고되었다³⁾. 황기의

간 보호 효과에 관한 보고로는 주로 사염화탄소 (CCl₄)로 유발된 간 독성의 보호효과로 일차배양 흰쥐 간세포에서의 CCl₄로 유발된 세포독성 억제 및 간 장애의 억제에 관한 연구 결과 및 CCl₄로 유발된 흰쥐의 간 손상에 미치는 황기의 효과 등이 보고되었다^{4,5)}. 肝은 각종 대사기능의 중심기관으로서 체내에 흡수되어 들어오는 여러 가지 물질들을 무독화 또는 유독화 시키는 대사과정을 수행하는 중요한 장기로 알려져 있다. 한의학에서는 주로 肝 기능의 이상상태를 肝膽濕熱, 肝火上炎, 寒滯肝膽, 肝陰不足 등으로 분류하여 간 질환의 치료에서도 이러한 원인에 따라 한의적인 치료 방향들이 사용되고 있다⁶⁾. 현재, 간에 독성을 유발할 수 있는 간 독성 물질들이 많이 보고되고 있는데, 대표적 간 독성 물질로는 CCl₄, thioacetamide, cadmium chloride 그리고 acetaminophen (APAP)이 알려져 있다⁷⁾. 특히 이 중 APAP는 해열진통제로 널리 사용되고 있으며, 사람과 동물에서 과량 복용시 치명적인 간 괴사와 심각한 중독 현상을 유발하는 것으로 알려

* 교신저자 : 김효정, 대구시 수성구 상동 165번지, 경산대학교 한의과대학
E-mail : hyokimm@yahoo.co.kr Tel : 053-770-2299
· 접수: 2002/05/23 · 수정: 2002/06/29 · 채택 : 2002/07/29

져 있다. 간에서 APAP은 cytochrome P-450에 의해서 대사되어 여러가지 대사산물을 형성하는데, 특히 N-acetyl-p-benzoquinone-imine (NAPQI)의 친전자성 화합물로 산화되어 glutathione (GSH)이 충분한 경우 포합체를 형성하여 신장으로 배설되는 것으로 알려져 있다. GSH는 주로 간세포 내에서 해독 작용에 관여하는 것으로 알려져 있는데, NAPQI의 지나친 생성은 GSH를 고갈시켜 간세포의 손상과 괴사를 초래하는 것으로 보고되었으며^{8,9)}, 또한 이러한 GSH의 고갈은 TNF α 유전자 발현을 증대시켜 간 독성을 야기하는 것으로 보고되었다¹⁰⁾. 따라서 본 실험은 APAP에 의한 간 독성의 유도에 관한 많은 연구보고가 있으나, 황기 추출액의 간 보호 효과에 관한 자료는 그리 많지 않아, 한의학에서의 일반적 투약 형태인 황기 성분이 APAP에 의해 유도된 간 독성에 간 보호 효과를 유도할 수 있는지를 검토하고자 일반적인 간 기능과 관련된 혈청학적 검사와 함께 간 독성과 관련된 사이토카인인 TNF α 의 발현 정도를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 검액의 준비

황기 10 kg에 정제수 60 kg을 가하여 고온 가압솥에서 4시간 추출한 후 착즙기로 착즙하였다. 이때 추출량은 40 kg으로 추출 BRIX는 5.5% 이었으며, 다시 2차 추출하여 최종 추출량은 35 kg으로 추출 BRIX는 3.0% 였다. 이를 300 mesh pass여과를 한 후 진공 농축하여 14.1 kg의 농축량을 얻었다. 이를 냉장고에 보관하며 사용 할 때는 일정량을 멸균 증류수에 녹인 후 열을 가하여 완전히 녹인 후 사용하였다.

2. 실험동물

무균 환경에서 사육된 5-6주령의 암컷 ICR 마우스를 (주)대 한바이오파마(충북 음성, 한국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 마우스에 사료와 물은 무제한으로 공급하면서 실험 전 약 1주간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도는 55 \pm 2% 를 유지하였다.

3. 아세트아미노펜의 투여

Acetaminophen (APAP; Sigma, USA)은 450 mg/kg의 농도로 생리식염수에 녹여 사용하였다.

4. 채혈 및 혈청분리

실험군은 정상군, APAP 단독 투여군 및 ARE 전처리 후 APAP 투여군의 3군으로 나누었다. ARE는 APAP 투여 전 3일 동안 매일 1회 200 mg/kg의 농도로 경구 투여하였으며 마지막 전처리 2시간 후 APAP (450 mg/kg)를 1회 복강 투여하였다. 정상군과 APAP 단독 투여군은 ARE 전처리 대신에 동량의 생리식염수를 경구적으로 투여하여 실험군간의 조건을 동일하게 유지시켰다. 혈청분리를 위한 혈액은 APAP 투여 24시간 후 ether 마취 하에 heart puncture하여 채취한 후 실온에 30분간 방치하였

다. 혈청을 분리하기 위하여 4 $^{\circ}$ C, 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하고, 간 기능의 지표효소 활성도 측정에 사용하였다. 간은 간 문맥을 통하여 생리식염수로 관류·적출 한 후 표면의 이물질을 제거한 뒤 무게를 측정하고 곧바로 -70 $^{\circ}$ C의 초저온냉동고에 넣어 급속 동결시켜 보관하였다.

5. 혈청 중의 간 기능 지표효소 활성도 측정

Alanine aminotransferase (ALT) 및 aspartate aminotransferase (AST) 활성도는 Reitman과 Frankel¹¹⁾의 방법에 준해 제조된 Sigma kit (Sigma, USA)를 이용하여 측정하였으며, 활성도 단위는 혈청 ml 당 Sigma-Frankel (SF) units로 표시하였다. Sorbitol dehydrogenase (SDH) 활성도는 Gerlach¹²⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 0.1 M Trizma buffer (pH 7.5) 975 μ l 에 혈청 250 μ l 및 Trizma buffer에 녹인 12 mM NADH 용액 25 μ l를 넣고 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 incubation한 후 4 M fructose 용액 250 μ l을 가하고 파장 340 nm (DU 530, Beckman, USA)에서 3~5분간 NADH의 흡광도 감소율 ($\Delta A/min$)을 측정하였다. SDH 활성도는 측정된 흡광도 감소율과 NADH의 흡광계수 ($6.22 \times 10^{-3} M \cdot cm^{-1}$)를 이용하여 계산하였다. 활성도 단위는 혈청 ml 당 mU로 표시하였다.

6. 간 조직 중의 glutathione 함량 측정

적출한 간 조직은 빙냉하에서 절편으로 만들고 절편한 동일 부위 무게의 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 넣고 homogenizer (Polytron PT-MR 2100, Kinematica, Switzerland)를 이용하여 20% (w/v) 마쇄균질액을 만들었다. 간 조직 중 GSH 함량은 Ellman¹³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 마쇄균질액 일정량에 4% sulfosalicylic acid 0.5 ml를 넣고 원심분리한 후, 상층액 일정량을 0.1 mM 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) 함유 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 넣고 반응시켜 생성된 p-nitrothiophenol을 측정하였다. GSH 함량은 조직 g 당 μ mole 로 표시하였다.

7. RT-PCR (역전사 중합효소 연쇄반응)

RNA 분리는 TRIzol을 이용하여 분리하였다. 간략하게 설명하면, 간 조직에서 TRIzol 900 μ l를 첨가하여 균질화시켰다. 여기에 클로로포름 100 μ l를 넣고 15분간 얼음에 정치시켰다. 그 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 위층을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 45분 정치한 후 원침하고, 70% DEPC-에탄올로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer에서 농도를 결정하였다. 5 \times RT buffer 2 μ l, 10 mM dATP 0.25 μ l, 10 mM dGTP 0.25 μ l, 10 mM dTTP 0.25 μ l, 10 mM dCTP 0.25 μ l, MMLV reverse transcriptase (200 U/ μ l) 0.25 μ l, RNase inhibitor (28 U/ μ l) 0.25 μ l, 50 μ M oligo dT primer 0.5 μ l, DEPC-DW 4 μ l를 PCR tube에 넣어 RT-mixture를 만들고 여기에 total RNA를 첨가하였다. 이 시퀀스를 PCR machine (PTC-100TM Programmable Thermal Controller;

MJResearch, Inc.)에 넣어 42°C에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다. PCR은 먼저 10× PCR buffer 3 μl, 25 mM MgCl₂ 1.8 μl, 10 mM dATP 0.3 μl, 10 mM dGTP 0.3 μl, 10 mM dTTP 0.3 μl, 10 mM dCTP 0.3 μl, 50 μM sense 및 antisense primer 0.25 μl, Taq polymerase (5 U/μl, Promega) 0.25 μl를 혼합하고, 여기에 DW를 넣어 최종 용액량이 20 μl되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 반응물 5 μl를 넣고 혼합한 뒤 PCR machine에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94°C에 3분간 1 cycle 반응 후, 94°C 45초, 57°C 45초, 72°C 45초간으로 35 cycles 반응시켰으며, 72°C에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동 하여 UV transilluminator를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아사 (Bioneer Co. Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

Table 1. Primer sequence used for detection of TNF α mRNA gene expression

	Oligonucleotide sequence
G3PDH	5'-CCA CCC AGA AGA CTG TGG ATG GC-3'
	5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'
TNF α	5'-AAC TAG TGG TGC CAG CCG AT-3'
	5'-CTT CAC AGA GCA ATG ACT CC-3'

8. 통계 처리

모든 실험 결과는 means±S.E로 나타내었으며, ANOVA와 Duncan's test의 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

결 과

1. 혈청 ALT 및 AST 활성도 변동

APAP에 의해 유도된 간 독성에 관한 ARE 전처리의 간 보호 효과 유무를 살펴보기 위하여 ARE를 3일간 전처리 한 후 APAP (450 mg/kg)를 복강 투여하였다. APAP 단독 투여시 혈청 ALT와 AST 활성도는 1067±336 및 411±96.1 unit/ml로서 정상군 23.1±2.0 및 36.1±4.2 unit/ml에 비해 현저히 증가되었다 (p<0.05). 그러나, ARE를 전처리 함으로서 ALT와 AST 활성은 72.1±30 및 54.7±6.3 unit/ml로 거의 정상군의 수준에 가깝게 감소하였다 (p<0.05) (Fig 1, 2).

2. 혈청 SDH 활성도 변동

ARE의 전처리가 APAP에 의해 유도된 SDH 활성도의 변화에 미치는 영향을 살펴본 결과 혈청 SDH 활성도는 APAP 단독 투여시 708±114 mU/ml로 정상군의 15.7±0.6 mU/ml에 비해 현저히 증가되었다(p<0.05). 그러나, ARE를 전처리 함으로서 SDH 활성도 33.3±20.4 mU/ml로 APAP 단독 투여군에 비하여 거의 정상군의 수준에 가깝게 감소되었다 (p<0.05) (Fig 3).

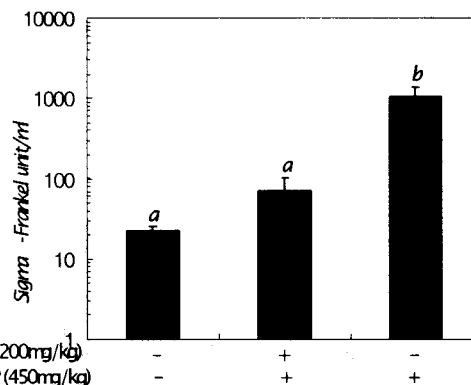


Fig. 1. Effect of ARE pretreatment on serum ALT activity in acetaminophen-treated mice. Mice were pretreated with ARE once daily for 3 days. Control mice were given saline. After the final pretreatment, mice were treated with APAP. The mice were killed 24 hr after the APAP administration. Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05.

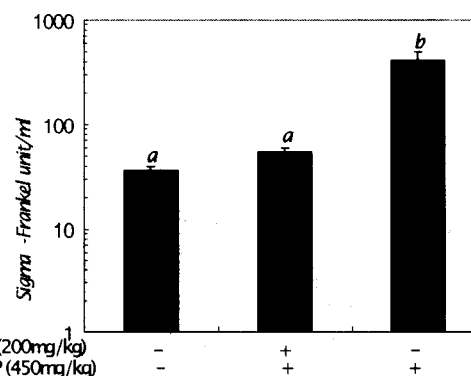


Fig. 2. Effect of ARE pretreatment on serum AST activity in acetaminophen-treated mice. Mice were pretreated with ARE once daily for 3 days. Control mice were given saline. After the final pretreatment, mice were treated with APAP. The mice were killed 24 hr after the APAP administration. Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05.

3. 간 조직 GSH 함량 변동

ARE의 전처리가 APAP 투여에 의한 간 조직 중 GSH 함량 변화에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보기 위하여 APAP 투여 24시간 후 간 조직 중 GSH 함량을 조사하였다. 전 실험군에서 GSH 함량의 변동을 살펴본 결과 정상군에서는 3.2±0.8 μ moles/g of tissues, APAP 단독 투여군에서는 3.7±1.5 μ moles/g of tissues, 그리고 ARE 전처리 후 APAP 처리시 4.3±0.9 μ moles/g of tissues로 각 실험군간 차이는 관찰되지 않았다 (Fig 4).

4. TNF α mRNA 유전자 발현양상

ARE의 APAP에 의한 간 독성의 보호 효과에 대한 작용기전을 조사하기 위하여 APAP 단독 투여와 ARE 전처리 후 APAP 투여에 의한 간 조직에서의 TNF α mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. APAP 단독 투여군에서는 TNF α mRNA 유전자 발현이 강하게 유도됨이 관찰되었으며, ARE 전투여 후

APAP를 투여한 실험군에서는 TNF α mRNA 유전자 발현이 억제되어 있음이 관찰되었다(Fig. 5).

고찰

췌장은 인체의 장기 중 가장 큰 실질성 장기로 당, 단백질, 지질 및 비타민 대사에 관여하며, 혈류조절기능 및 해독기능 등에 관여하는 인체 생리에 중요한 장기로 알려져 있다¹⁴). 간 손상에 대한 실험적 연구로는 주로 CCL₄로 유발된 간 손상에 대한 연구 보고가 활발히 진행되어 왔다¹⁵⁻¹⁷). 본 실험에서는 마우스에 간 독성을 유발하기 위하여 aspirin과 더불어 임상에서 해열진통제로 널리 사용되고 있는 약물인 APAP를 사용하였는데, 일반적으로 APAP는 적정 치료량의 투여에서는 부작용이 거의 나타나지 않으나, 대량 투여의 경우 간의 GSH 함량을 감소시켜 심한 간 독성을 유발하는 약제로 알려져 있다¹⁸). 이러한 APAP에 의해 유도된 간 독성에 대한 간 보호 효과를 측정하기 위한 실험 방법으로 설치류를 이용한 동물 모델이 광범위하게 사용되고 있다^{19,20}). APAP은 주로 간에서 cytochrome P-450에 의해 N-acetyl-p-benzoquinone-imine (NAPQI)가 생성되는데 이는 GSH가 충분한 경우 GSH 포함체를 형성하여 무독화 되는 것으로 알려져 있다. 그러나 APAP로부터 대량의 NAPQI가 대사 될 때는 GSH와 충분한 포함체를 형성하지 못하고 간 조직 단백질에 결합하여 심한 간 과사성 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다⁷). 황기는 한국을 비롯한 많은 아시아 국가에서 慈養·強壯 효과가 뛰어난 것으로 인정되어 여러 약제의 조제에 사용되고 있다. 황기에 대한 실험적 연구로는 면역기능향진, 면역기능저하의 억제와 간 보호 효과 등이 많이 보고되고 있다²¹⁻²³). 이에 본 연구에서는 황기의 APAP에 의해 유발된 간 독성의 보호 효과를 살펴보기 위하여 황기의 일반적 투약 형태인 열수 추출액을 준비하여 간 기능과 관련된 혈청 ALT, AST, SDH 활성 변동 및 간 조직에서의 GSH 함량 변화를 조사하였다. 또한 간 독성과 관련된 사이토카인인 TNF α 의 발현 정도도 측정하였다. APAP에 의한 간 손상 시 혈청 중 G 활성도가 증가하여 간세포의 손상 정도를 평가할 수 있는 지표로 혈청 ALT, AST²⁴⁻²⁶ 및 SDH²⁷ 활성도 측정이 주로 이용되고 있다. 본 실험에서 APAP (450 mg/kg) 투여에 의한 혈청 ALT, AST 및 SDH 활성도는 1067 \pm 336, 411 \pm 96.1 unit/ml 및 708 \pm 114 mU/ml로 정상군의 23.1 \pm 2.0, 36.1 \pm 4.2 unit/ml 및 15.7 \pm 0.6 mU/ml에 비해 이들 효소 활성이 현저히 증가됨이 관찰되었다 (p<0.05). 이러한 결과는 Lee 등²⁸)이 APAP를 400 mg/kg 복강 주사하여 관찰된 결과와 유사한 양상을 보였다. 그러나 황기 추출액을 전처리 함으로 인하여 혈청 ALT, AST 및 SDH 활성도는 72.1 \pm 30, 54.7 \pm 6.3 unit/ml 및 33.3 \pm 20.4 mU/ml로 APAP 단독 처리군에 비하여 이들 효소의 활성이 거의 정상군 수준으로 현저히 감소되었다 (p<0.05). 이러한 결과는 ARE 전처리가 APAP에 의해 손상된 간 조직을 보호하는 효과가 있음을 보여준다. 간 조직의 경우 GSH가 80~90% 정도 고갈될 경우 과산화적 손상을 일으키며²⁹), 40% 정도 고갈될 경우는 간 독성을 나타내지 않는 것으로 보고되고 있으며³⁰), 생체 내의 GSH는 세포 내 microsomal membrane에서 free radical에 의한 세포 손상을 방어하는 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다³¹). 이전의 여러 연구를 살펴보면 APAP에 의한 간 독성의 해독에

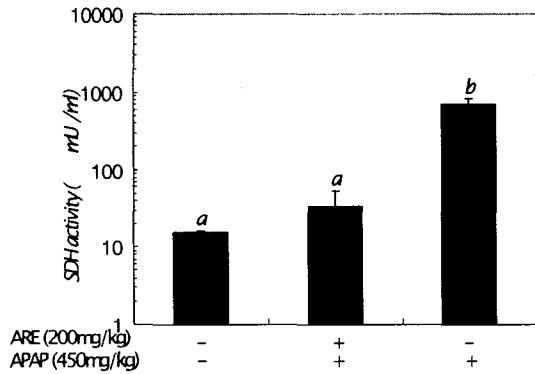


Fig. 3. Effect of ARE pretreatment on serum SDH activity in acetaminophen-treated mice. Mice were pretreated with ARE once daily for 3 days. Control mice were given saline. After the final pretreatment, mice were treated with APAP. The mice were killed 24 hr after the APAP administration. Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05.

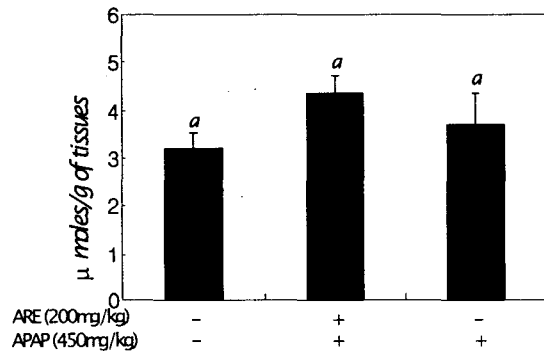


Fig. 4. Effect of ARE pretreatment on hepatic glutathione level in acetaminophen-treated mice. Mice were pretreated with ARE once daily for 3 days. Control mice were given saline. After the final treatment, mice were treated with APAP. The mice were killed 24 hr after the APAP administration. Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05.

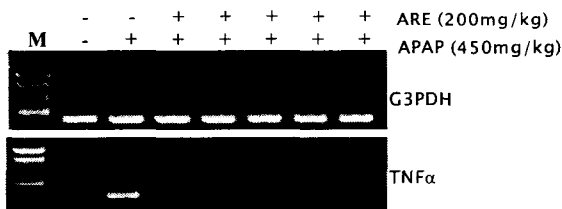


Fig. 5. Effect of ARE pretreatment on TNF α mRNA expression in acetaminophen-treated mice. Mice were pretreated with ARE once daily for 3 days. Control mice were given saline. After the final treatment, mice were treated with APAP. The mice were killed 24 hr after the APAP administration. Total RNA was prepared from liver, and TNF α mRNA was analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control genes. M: 100bp size marker.

GSH가 중요한 역할을 하며, GSH가 고갈된 상태가 되면 심각한 간 과사를 유발하는 것으로 알려져 있다³²⁻³³). 그러나, 이번 실험에서는 APAP 복강 투여 24시간 후 마우스의 간 조직 중의 GSH 함량을 살펴본 결과, 각 실험군간 차이를 관찰 할 수 없었다. 이러한 결과는 아마도 GSH의 고갈이 APAP에 의한 간 독성 초기 단계에서 이루어진 후 24시간 후 간 조직 중의 GSH 함량이 회복 수준으로 돌아왔으리라 추측된다. 사이토카인은 자연 및 특이면역의 활성화 단계 및 실행 단계에서 생산되어 염증반응을 자극하거나 저해하는 자연면역의 조절 매개자의 역할을 하며, 특정항원을 인식하여 T 세포에 의해 분비되며, 염증반응을 강하게 하거나 특수화하는데 관여하는 특이면역의 매개 조절자의 기능 등 면역반응 및 염증반응에서 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁴⁻⁴⁰). 이 중에서 종양괴사인자 (tumor necrosis factor α ; TNF α)는 자연 및 특이면역의 매개자로 특이 면역 반응과 급성 염증 반응의 중요한 연결자로 알려져 있으며, 내재성 발열원으로 뇌의 시상하부 조절부위에 있는 세포에 작용하여 열을 내리게 하는 것으로 알려져 있다. 아스피린과 같은 프로스타글란딘 합성 억제제가 TNF α 의 이러한 작용을 차단하므로 열을 내리는 것으로 알려져 있다. 또한 TNF α 는 혈관평활근의 수축강도를 이완시키므로 조직내 혈액의 유입과 혈압을 낮추는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 TNF α 가 갖는 이러한 작용은 고농도에서 치명적 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다⁴¹). 최근의 보고에 의하면 사염화탄소에 의해 유발된 간 손상시 활성화된 Kupffer 세포에서 유도된 TNF α 가 염증반응을 촉진 시켜 조직상해 및 과사를 촉진시키는 것으로 보고되었으며, APAP에 의해 유도된 마우스 간 독성에서 TNF α 와 IL-1에 관한 중화 항체의 사용으로 부분적으로 간 손상이 예방됨이 보고되었다^{42,43}). 이번 실험에서는 ARE 전처리가 APAP에 의한 간 독성과 TNF α 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하고자 APAP만 투여한 실험군의 간 조직에서의 TNF α 발현 양상과 ARE를 전처리한 후 APAP를 투여한 실험군에서의 TNF α 발현 변화를 조사하였다. APAP 단독 투여군에서는 TNF α mRNA 유전자 발현이 강하게 유도됨이 관찰되었으나, ARE를 전처리한 후 APAP를 투여한 경우 TNF α mRNA 유전자 발현이 억제되어 있음이 관찰되었다. 이상의 연구 결과들을 종합하여 보면, ARE는 APAP에 의해 유도된 마우스 간 독성에 대한 보호 효과를 가지며, 이러한 간 보호 효과에 부분적으로 TNF α mRNA 발현 조절이 일부 관여하리라 추측된다.

결 론

한의학에서의 일반적 투약 형태인 황기의 APAP에 의해 유발된 간 보호 효과를 평가하고자 마우스에 ARE를 미리 경구 투여한 후 간 독성이 유발될 수 있는 농도의 APAP을 복강 주사한 후 간 독성과 관련된 혈청수준의 ALT, AST, SDH 활성 변동, 간 조직 중의 GSH 함량 변화 및 TNF α mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. APAP (450 mg/kg) 단독 투여 시 혈청 ALT와 AST 활성도는 각각 1067 ± 336 와 411 ± 96.1 unit/ml로 정상군 23.1 ± 2.0 와 36.1 ± 4.2 unit/ml에 비해 현저히 증가되었다

($p < 0.05$). ARE 전처리 시 ALT와 AST 활성도가 72.1 ± 30 와 54.7 ± 6.3 unit/ml로 APAP 단독 투여군에 비해 현저한 감소를 나타내었다 ($p < 0.05$). 혈청 SDH 활성도는 APAP 단독 투여 시 708 ± 114 mU/ml로 정상군의 15.7 ± 0.6 mU/ml에 비해 현저히 증가되었으며 ($p < 0.05$), ARE를 전처리 함으로서 33.3 ± 20.4 mU/ml로 거의 정상군 수준으로 감소되었다 ($p < 0.05$). 그러나, ARE 전처리에 의한 APAP 투여에 의한 간 조직 중 GSH 함량 변화는 관찰되지 않았다. APAP (450 mg/kg) 단독 투여군에서는 TNF α mRNA 유전자 발현이 강하게 유도되었다. ARE 전처리 후 APAP (450 mg/kg)를 투여한 실험군에서는 TNF α mRNA 유전자 발현이 억제됨이 관찰되었다.

이상의 실험결과로 볼 때, ARE는 APAP에 의해 유도된 간 독성 예방 효과를 가지며, 이러한 간 보호 효과는 부분적으로 TNF α mRNA 유전자의 발현 조절이 관여하리라 추측된다.

참고문헌

1. 정보섭, 신민교. 도해향약(생약) 대사전(식물편), p 662-664, 영림사, 서울, 1985.
2. Borchers AT, Sakai S, Henderson GL, Harkey MR, Keen CL, Stern JS, Terasawa K, Gershwin ME. Shosaiko-to and other Kampo(Japanese herbal) medicines: a review of their immunomodulatory activities. *J. Ethnopharmacol.* 73, 1-13, 2000.
3. 백남인, 김영숙, 경종수, 박기현. 황기의 간기능 보호성분. *생약학회지* 27, 111-116, 1996.
4. 김영숙, 박기현. 수종의 전통약재가 일차 배양 흰쥐 간세포에서 CCl₄ 유발 세포독성에 미치는 영향. *생약학회지* 25, 388-394, 1994.
5. 김미려. Carbon tetrachloride로 유발된 흰쥐의 간손상에 미치는 황기의 효과. *동서의학* 19, 7-14, 1994.
6. 박경미, 문진영, 안준철, 최미정, 남경수, 임종국. 간수, 기문혈의 당귀 약침자극이 acetaminophen으로 유발된 흰쥐의 손상간에 미치는 영향. *한의학 연구소 논문집* 5, 1-13, 1996.
7. 박기숙, 서경원, 정태천, 황세진, 김효정. 간독성물질들이 아세트아미노펜 대사와 배설에 미치는 영향. *응용약물학회지* 1, 50-57, 1993.
8. Snawder JE, Roe AL, Benson RW, Roberts DW. Loss of CYP2E1 and CYP1A2 activity as a function of acetaminophen dose: relation to toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 532-539, 1994.
9. Parmar D, Ahmed G, Khandkar M, Katyare S. Mitochondrial ATPase: a target for paracetamol-induced hepatotoxicity. *Euro. J. Pharmacol.* 293, 225-229, 1995.
10. Agarwal S, Piersco N. Poly ADP-ribosylation of a 90kDa protein is involved in TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 153, 473-481, 1994.
11. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the

- determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 50-63, 1957.
12. Gerlach U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 3, p 112-117, Bergmeyer, H. U. (ed.), Academic Press, New York, 1983.
 13. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77, 1959.
 14. 김정제. 동의간계내과학, p 26-31, 집문당, 서울, 1985.
 15. 안창범, 이명종, 김갑성, 문국진, 윤종화. 인진호수침이 CCl₄ 중독 손상간에 미치는 영향. *대한침구학회지* 8, 227-239, 1991.
 16. 박신화, 이준무, 권기복. 소시호고탕가청피 약침이 CCl₄로 중독된 Rat에 미치는 영향. *대한침구학회지* 12, 149-161, 1995.
 17. 이창규. 생강탕이 CCl₄ 및 d-galactosamine에 의해 유발된 실험적 흰쥐 간 장애에 미치는 영향. *경희대학원 논문집*. 1986.
 18. Fischer LJ, Green MD, Harman AW. Levels of acetaminophen and its metabolites in mouse tissues after a toxic dose. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219, 281-286, 1981.
 19. McLean A. Models of liver disease. In: Karger, B.A(Ed.), *New Trends in the Therapy of Liver Diseases*. p 2-12, S. Karger, Basel, 1975.
 20. Handa S, Sharma A, Chakraborti K. Natural products and plants as liver protecting drugs. *Fitoterapia* 57, 307-351, 1986.
 21. Zhao KS, Mancini C, Doria G. Enhancement of the immune response in mice by *Astragalus membranaceus* extracts. *Immunopharmacology* 20, 225-233, 1990.
 22. 조성기, 문혜선, 윤연숙, 홍석일, 함용호, 정인성, 박은규. Influence of *Angelicae gigantis Radix* on the Immune System(I)-T-independent B Cell Proliferation. *대한면역학회지* 12, 113-118, 1990.
 23. Kurashige S, Akuzawa Y, Endo F. Effects of *astragali radix* extract on carcinogenesis, cytokine production, and cytotoxicity in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N'-butanolnitrosoamine. *Cancer Invest.* 17, 30-35, 1999.
 24. Robbins LS, Cotran RS. *Pathological basis of disease*. p 1009, W. B. Saunder Company, London, 1979.
 25. Plaa GL, Hewitt WR. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In *Principles and methods of toxicology*. p 599-628, Hayes, A. W. (ed.), Raven Press, New York, 2nd ed., 1989.
 26. Yamamoto H. Relation of Ca⁺⁺ accumulation and lipid peroxidation with CCl₄-induced toxicity in the rat liver. *Pharmacol. Toxicol.* 66, 213-216, 1990.
 27. Ellen, Schmidt FW. Diagnosis, Control of Progress and Therapy, Diseases of Liver. In *Method of Enzymatic Analysis*. Vol. 1, p 14-30, Bergmeyer, H. U. (ed.), Academic Press, New York, 2nd ed., 1974.
 28. Lee KJ, You HJ, Park SJ, Kim YS, Chung YC, Jeong TC, Jeong HG. Hepatoprotective effects of *Platycodon grandiflorum* on acetaminophen-induced liver damage in mice. *Cancer Lett.* 174, 73-81, 2001.
 29. Biaglow JE, Varnes ME, Roizen-Towle L, Clark EP, Epp ER, Astor MB, Hall EJ. Biochemistry of reduction of nitro heterocycles. *Biochem. Pharmacol.* 35, 77-90, 1986.
 30. Yeung JH, Chiu LC, Ooi VE. Effect of polysaccharide peptide(PSP) on glutathione and protection against paracetamol-induced hepatotoxicity in the rat. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 16, 723-729, 1994.
 31. Burk RF. Glutathione-dependent protection by rat liver microsomal protein against lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* 757, 21-28, 1983.
 32. Vermeulen NP, Bessems JG, Van de Straat R. Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. *Drug Metab. Rev.* 24, 367-407, 1992.
 33. Cohen SD, Khairallah EA. Selective protein arylation and acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* 29, 59-77, 1997.
 34. 송봉근, 이연정, 김형균, 진선두, 김성재, 김동혁. Effects of *Astragali Radix* on the Function of murine Immunocytes in Vivo and in Vitro. *대한분초학회지(분초분과학회지)* 13, 115-128, 1998.
 35. 서영준. 식품을 이용한 화학적 암예방. *식품과학과 산업* 30, 59-63, 1997.
 36. 김일영, 이상재, 김광호. Effects of *Poligon Multifri Radix* on Immunosuppreition Induced by Methotrexate in Rat. *대한 예방한의학회지* 4, 152-169, 2000.
 37. 최윤정. 사군자탕 및 사물탕이 methotrexate로 유발된 흰쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. *동국대학교대학원 박사학위논문*, 1996.
 38. Mizuno M, Yamada J, Terai H, Kozukue N, Lee YS, Tsuchida H. Differences in immunomodulating effects between wild and cultured *Panax ginseng*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 1672-1678, 1994.
 39. 박종욱, 한인숙, 서성일, 백원기, 서민호, 배지현, 최병길. Effects of Ginseng Saponin on the Cytokine Gene Expression in Human Immune System. *고려인삼학회지* 20, 15-22, 1996.
 40. Lin CH, Sheu SY, Lee HM, Lee WS, Ko WC, Sheu JR. Involvement of Protein kinase C-r in IL-1b induced cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells. *Mol. Pharmaco.* 57, 36-43, 2000.
 41. 김광혁 외. 세포·분자 면역학, p 297-330, 정문각, 서울, 1998.
 42. Simeonova PP, Gallucci RM, Hulderman T, Wilson R, Kommineni C, Rao M, Luster MI. The role of tumor

necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. Toxicol Appl Pharmacol. 177, 112-20, 2001.

43. Blazka ME, Wilmer JL, Holladay SD, Wilson RE, Luster MI. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 133, 224-234, 1995.