

호두仁 에탄올 抽出物의 四鹽化炭素 유도 肝纖維化 억제 효과

장선일 · 임창경¹ · 유진덕¹ · 김희수¹ · 윤용갑^{1*}

임류노피아 부설연구소, 1:원광대학교 한의과대학 방제학교실

Inhibitory effects of the *Juglans sinensis* Walnut Ethanol Extract on Carbon Tetrachloride-induced hepatic fibrosis in Rats

Seon Il Jang, Chang Kyung Lim^{1*}, Jin Duk Ryu^{1*}, Hui Soo Kim^{1*}, Yong Gab Yun^{1*}

Department of Immunology, Institute of Immunopia, 1:Department of Oriental Medical Prescription, Wonkwang University

The inhibitory effects of the *Juglans sinensis* walnut ethanol extract (JSWE) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced fibrosis, serum transaminases (GOT and GTP), hepatic glutathione (GSH), serum pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6) were investigated in rats. JSWE significantly inhibited on CCl₄-induced fibrosis in dose-dependent manner. Moreover, JSWE significantly inhibited on the serum levels of GOT, GTP, IL-1 β , and IL-6 in dose-dependent manner in CCl₄-induced fibrosis rat. However, JSWE markedly increased the production of hepatic GSH in a dose-dependent manner. These results show that JSWE may explain some known biological activities of *Juglans sinensis* walnut including their anti-fibrotic and anti-inflammatory effects, and is of considerable benefit in the treatment for liver diseases.

Key words : *Juglans sinensis* Walnut, Fibrosis, Transaminases, Glutathione, Pro-inflammatory Cytokines

서 론

肝纖維化(hepatic fibrosis)는 肝硬化(cirrhosis)의 전 단계로서 細胞媒介蛋白質(extracellular matrix protein, EMP), 특히 콜라겐의 과도한 蓄積으로 발생된다^{1,2}. 肝이 損傷되면, 지방과 ratinoid 저장 細胞라 불리는 hepatic stellate cell이 活性化되어 EMP가 합성된다. 이 細胞의 活性化는 glutathione(GSH)의 枯竭에 의한 解毒作用의 失敗 또는 cytochrome C P450(CYP450)의 發現 및 Kupffer cell과 염증반응으로부터 유입된 免疫細胞에 의해 nitric oxide(NO), superoxide anion(O₂⁻), peroxy-nitrate 와 같은 자유 유리기(free radical)에 의해 간세포의 損傷을 초래함은 물론, interleukin-1 β (IL-1 β)와 IL-6같은 pro-inflammatory cytokines들의 작용에 의해 肝纖維化가 촉진된다^{3,5}. 損傷된 肝組織에서 hepatic stellate cell은 傷處를 봉입하기 위해서 活性化되고 계속적으로 增殖하면서 근섬유아세포(myofibroblast-like cell)로 변형되고, 이러한 과정에서 細胞質內 ratinoid가 소실되면서 α

-smooth muscle actin(α -SMA)이 合成되면서 collagen(type I, II, III), fibronectin, laminin, 및 proteoglycan과 같은 EMP를 過量 생산한다^{1, 4-6}. 이와 같이 EMP가 過量 생산되면서 肝纖維化가 계속적으로 진행되고, nodule이 형성되면서 肝硬化에 이른다¹.

Kupffer cell이 활성화되면 염증반응이 일어나는데, 이때 Kupffer cell은 O₂, hydroxide(OH), 과산화물 (H₂O₂)등과 같은 反應酸素 中間物質(reactive oxygen species, ROS)을 생산하고, IL-1 β 와 IL-6 등 pro-inflammatory cytokine들이 증가되어 더욱 더 肝細胞(hepatocyte)에 손상을 주어 결국 細胞死滅에 이르게 한다^{9,11}. 또한 活性化된 Kupffer cell은 transforming growth factor- β (TGF- β), tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 cytokine을 생산하고 이로 인해서 肝細胞의 死滅뿐만 아니라 hepatic stellate cell의 活性를 유도하는 것으로 알려졌다¹¹⁻¹⁵. 한편 lipid peroxidation은 콜라겐 유전자 發現을 促進시키는 것으로 알려졌고, 最近에 hepatic stellate cell은 lipid peroxidation의 산물인 malondialdehyde (MDA)에 의해 유도된 자유유리기에 의해 活性化된다는 報告가 있다. 그런데 type I collagen의 發現과 ROS는 抗酸化劑에 의해 抑制 될 수 있다^{16,17}.

최근 植物 由來 抗酸化劑의 관심이 높아지면서 이와 관련

* 교신저자 : 윤용갑, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학
· E-mail : yunyg@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-6834
· 접수 : 2003/07/22 · 수정 : 2003/08/30 · 채택 : 2003/10/08

된 研究가 활발히 進行되고 있다. 특히 日本에서는 小柴胡湯인 Sho-saiko-to(TJ-9)을 대상으로 肝纖維化 抑制 기전에 대한 研究가 밝혀지면서 中國을 비롯한 여러 나라에서 식물성 유래 항산화제와 관련된 간질환 연구가 활발히 進行되고 있다^{19,21)}. 즉, 전통적으로 東洋에서 사용되고 있는 植物 藥劑의 研究가 現代 生物學적인 方法에 의해 그 藥效를 證明하고 기전을 밝히기 위한 研究가 活潑히 進行되고 있다. 호두는 가래나무과(Juglandaceae) 호두나무(Julans sinensis)의 種仁으로 滋養, 強精, 鎮咳, 潤腸의 效能이 있는 것으로 알려졌다²²⁾. 호두의 化學 性分은 지방유를 함유하고 그 主要性分은 리놀레산의 글리세리드이다. 또한 蛋白質 ·비타민 B2 ·비타민 B1 등이 풍부하여 食用과 藥用으로 많이 쓰인다. 종자는 그대로 먹기도 하고 호두 기름은 食用 외에도 化粧品이나 香料의 混合物로서 活用한다. 호두 기름의 藥理效果는 기름에 함유된 혼합 지방산이 體重의 증가를 促進시켜 血清 膽固醇의 함유량을 높이지만 혈액의 콜레스테롤량은 비교적 떨어진다. 한편, 호두는 強精이나 消化의 強化에도 效能이 있는 것으로 報告되었다^{22,23)}. 그러나 6월 경 어린 호두는 核이 연하고 果肉이 발달된 시기로 果肉과 核에는 많은 抗酸化劑²⁴⁾가 포함되어 肝保護作用이 있다하여 경험적으로 中國 연변지방에서 肝硬化患者에게 빈번하게 사용되고 있으나, 肝保護作用에 대한 報告는 없는 실정이다. 따라서 本 研究는 果肉 및 核을 포함하는 果實을 에탄올로 抽出(Juglans sinensis walnut etnanol extract)하여 凍結 건조한 후에 JSWE가 四鹼化炭素(CCl₄)로 誘發된 랫트의 肝纖維化에 어떠한 影響을 미치는지 조사하였다. 그 결과 JSWE가 처리된 랫트의 肝組織은 콜라겐과 肝細胞 變形을 크게 抑制하는 효과가 있었을 뿐만 아니라 transaminases(GOT와 GTP)와 pro-inflammatory cytokines(IL-1β와 IL-6) 등을 현저히 줄여주는 효과가 있었으며, CCl₄에 의해 고갈된 glutathione(GSH)을 向上시키는 효과가 있었다.

재료 및 방법

1. 實驗動物

루이스 랫트 (체중 180 ±20 g)는 SLC, Inc(일본)로부터 구입하여 항온 및 항습이 유지되고 낮과 밤을 12시간씩 조절되는 사육장 (엠펙이티디, 서울)에서 유지하고, 무균 물과 사료를 충분히 공급하면서 실험했다.

2. 試藥

Carbon tetrachloide(CCl₄), glutamate-oxalate-transaminase (GOT), glutamate-pyruvate-transaminase(GTP), Formalin, Sodium chloride, Pottasium chloride, Disodium hydrogen phosphate, Potassium dihydrogen phosphate, Anti-collagen antibody, L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid등은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Anti-murine IL-1β와 anti-murine IL-6는 R&D System(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. Immunohistochemistry staining kit는 Dako(Glostrup, Denmark)로부터 구입했다. 그 외 실험에 사용된

시약은 분석 등급이상을 사용하였다.

3. 抽出物의 製造

전북 진안군 부귀면 수향 신기마을로 부터 구입한 6월산 어린 호두를 대상으로 에탄올 추출하였다. 어린 호두 3 kg을 두께 2 mm 정도로 잘게 절편한 후 30% 에탄올 용액 2 L에 주입하고 실온에서 3개월 간 방치하였다. 그 후 추출물(Juglans sinensis walnut extracts) 을 0.45 μm 여과막을 통과시켜 동결건조하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

4. 藥物 投與 및 肝纖維化 誘導

추출물 JSWE를 루이스 랫트 체중 kg 당 1 ml의 생리식염수에 100-500 mg되게 농도를 적정하고 마리당 1 ml 씩 경구투여하였다. 대조군은 생리식염수만 투여하였다. 이때 실험동물은 각 실험군 당 10마리를 사용하였고, 6일간 상기의 약물을 투여한 후 CCl₄와 올리브오일(1:3)을 혼합하여 마리 당 1 ml씩 4주간 주 당 2회 복강에 주사하였고, 약물은 4주간 매일 1회 경구투여하였다.

5. GOT와 GTP 測定

약물투여가 완료된 랫트는 에테르로 마취한 후 심장에서 약 2 ml의 혈액을 취하고 4°C에서 4시간 방치한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 대상으로 혈청내로 유리된 GOT 또는 GPT의 양을 Sigma 진단키트를 이용하여 통상적으로 권장하고 있는 Sigma사의 방법에 준하여 그 흡광도를 측정하여 결정하였다.

6. Hepatic GSH 測定

약물 투여가 완료된 랫트를 대상으로 면역조직화학 염색 조직 표본 제작과 같이 PBS로 간 조직에 유리된 혈액을 제거하고 간조직을 적출하여 액체질소에 주입하여 급냉하고 조직을 마쇄한 다음 세포용해용액을 주입하여 세포용출액을 제조하고 단백질 정량 한 후 Chemicon International Inc.(Temecula, CA, USA)사가 권장하는 방법을 이용하여 hepatic GSH를 측정하였다.

7. IL-1β와 IL-6의 測定

GOT와 GTP 측정에서와 같이 약물이 투여된 랫트로부터 혈청을 분리하여 혈청내 IL-1β와 IL-6 량을 측정하였다. 혈청내로 유리된 IL-1β와 IL-6의 측정은 각 사이토카인에 대한 assay kit (R&D System Inc., Minneapolis, USA)를 이용하여 ELISA법으로 정량하였다.

8. 免疫組織化學 染色

藥物이 투여된 랫트를 대상으로 anti-murine collagen antibody를 이용하여 간조직내 콜라겐 형성을 조사하였다. 먼저, 약물투여가 완료된 랫트를 에테르로 마취하여 미정부에 헤파린을 주사하고, 10분 후에 다시 에테르로 마취한 다음 肝大靜脈에 시린지를 삽입하고 헤파린이 함유된 생리식염수를 1 m 높이에 서 자연 낙하시키면서 간에 유리된 혈액을 제거한 후 4% 중성 포르말린 용액을 통과시켜 조직을 고정한 후 주의 깊게 간조직

을 적출하여 4% 포르말린 용액에 약 16시간 고정하였다. 고정된 조직은 파라핀 메몰과정을 수행하여 조직표본을 제작하였다. 그 후 마이크로톰을 이용하여 5-6 μm로 절편하여 젤라틴이 코팅된 슬라이드에 접착한 후 면역조직화학 염색을 하였다. 파라핀이 제거된 조직을 대상으로 Tris buffer(pH 7.4)에 주입한 후 비특이성을 없애주기 위해서 0.2% BSA와 5%skim milk를 이용하여 blocking을 한 다음 anti-murine collagen antibody를 부착시키고 Dako System사가 권장하는 방법을 이용하여 면역조직화학 염색을 수행하였다. 콜라겐 형성은 광학현미경을 이용하여 검경하였고, 사진을 촬영하여 그 특징을 조사하였다.

9. Sirius red 染色

콜라겐 염색은 Ishak 등²⁵⁾의 방법에 따라 파라핀이 제거된 간 조직을 포화 picric acid와 1% Fast green이 함유된 0.1 % Sirius red F3B 용액에 30분간 방치한 후 증류수로 2회 세척하고 70% 에탄올로 간단히 탈수시킨 다음 자일렌으로 세척하고 커버 슬립을 덮어 봉입하여 현미경으로 검경하고 촬영하여 콜라겐 합성정도를 판정하였다. 실리우스 레드 염색상태에 따른 간 섬유화의 스코어는 Ishak 등²⁵⁾의 방법에 따라 스코어 0은 간 섬유화 없는 정상세포, score 1은 섬유 셉타 (fibrous septa)가 약간 있거나 없이 일부 문맥주위에 약간의 섬유소 팽창, score 2는 섬유 셉타 (fibrous septa)가 약간 있거나 없이 대부분 문맥주위에 섬유소 팽창, score 3은 문맥과 문맥사이에 섬유가교(portal to portal(P-P) bridging)가 형성되고 전 문맥으로 섬유소 팽창, score 4는 문맥과 문맥(P-P)사이 뿐만 아니라 문맥에서 중심 (portal to central(P-C)까지 뚜렷한 섬유가교가 형성되어 전 문맥주변으로 섬유소 팽창, score 5는 nodule 형성(간경화 초기 증상)과 함께 뚜렷한 P-P/P-C 섬유가교가 형성, score 6은 심한 nodule 형성으로 간경화 상태 등 6가지로 나누어 평가하였다.

10. 統計

분석결과는 ANOVA로 분석하였으며, 유의성은 Student's T-test를 통해 검증하였다.

결과 및 고찰

호두는 가래나무과(Juglandaceae) 호두나무(Julans sinensis)의 種仁으로 滋養, 強精, 鎮咳, 潤腸의 效能이 있는 것으로 알려져²²⁾, 호두仁의 滋養強壯 效果와 肝機能과의 聯關성이 있는지 알아보았다. 本 研究에서는 CCl₄에 의해 誘導된 肝纖維化에 어린 호두 抽出物인 JSWE가 어떠한 影響을 미치는지 알아보기 위해서 JSWE를 體重 kg 당 하루에 100-500 mg을 1주일간 經口 投與한 다음 CCl₄를 1주당 2회씩 4주간 腹腔에 주사하고 매일 藥物을 上記와 같은 濃度로 4주간 經口 投與하였다. 그 結果 Fig. 1 과 같이 肝組織內 纖維化는 生理食鹽水만 投與한 正常 對照群에서는 콜라겐 형성이 거의 觀察되지 않았지만, 生理食鹽水와 CCl₄ 投與群은 뚜렷하게 콜라겐 形成이 增加되었다. 藥物의 效果를 判定하기 위해서 L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid (OTC)를 參

考藥物²⁶⁻²⁷⁾로 쓴 結果 CCl₄에 의해 增加된 콜라겐 形成을 크게 抑制하여 正常 對照群과 비슷한 效果를 나타내었다. JSWE가 投與된 實驗群에서는 濃度가 增加할 수록 콜라겐 形成이 현저히 줄어들었고, 특히 500 mg/kg 投與群에서는 參考藥物인 OTC와 비슷하게 콜라겐 形成을 抑制하였다.

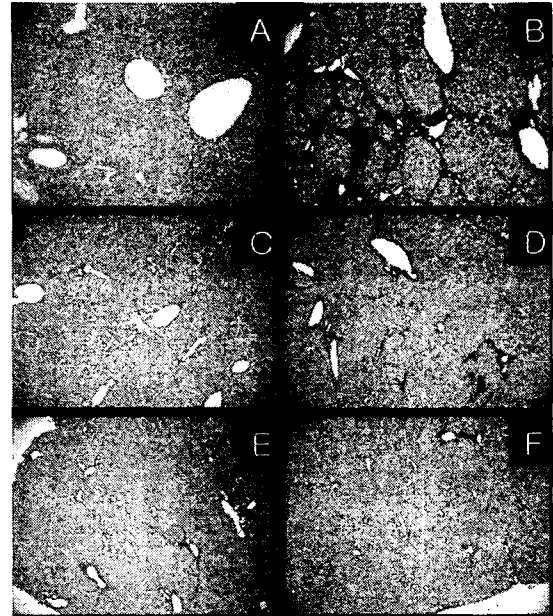


Fig. 1. Inhibitory effects of JSWE on CCl₄-induced fibrosis in rat liver. Rats were pretreated with or without JSWE (100-500 mg/kg, p.o.) for 1 weeks (one time/day), and then treated with CCl₄ (2 times/week, i.p.) and JSWE (one time/day, p.o.) for 4 weeks. Negative (A) or positive (B) control rats were given saline or CCl₄ alone. The rats were killed 4 weeks after CCl₄ and JSWE administration. Liver tissues were stained with immunohistochemistry using anti-murine collagen antibody as described in materials and methods. C = 500 mg/kg of OTC, D = 100 mg/kg of JSWE, E = 250 mg/kg, F = 500 mg/kg.

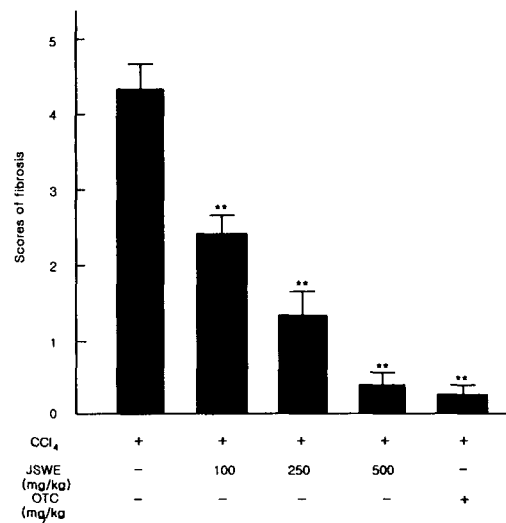


Fig. 2. Inhibitory effects of JSWE on CCl₄-induced fibrosis in rat liver. Rats were treated with CCl₄ or CCl₄ plus a various JSWE (100-500 mg/kg) as described in Fig. 1. Liver tissues were stained with Sirius red. A numerical scoring system for grading hepatic fibrosis was determined by method of Ishak et al.²⁶⁾. Data are means ± SD of n=5. ** = P<0.01 compared with the CCl₄ treated group.

또한 本 研究에서는 肝纖維化를 測定하기 위해서 Sirius red 染色을 수행하여 肝纖維化에 따른 肝硬變을 조사하였다. Ishak 등²⁵⁾의 方法과 같이 肝硬變을 조사한 結果, Fig. 2와 같이 JSWE의 濃도가 增加할 수록 肝纖維化가 크게 抑制되는 效果가 있었다. 이러한 結果는 免役組織化學 染色 및 Sirius red 染色의 結果와 一致하여 JSWE가 pro-cysteine 유도와 抗酸化劑로 잘 알려진 OTC와 유사한 效果가 있었음을 證明해 주었다.

JSWE 투여에 따른 CCl₄ 유도 肝纖維化에 있어 血清內 transaminases (GOT와 GTP)의 變化를 알아보기 위해서 藥物 投與가 完了된 랫트를 대상으로 GOT와 GTP를 조사하였다. 그 結果 Fig. 3과 같이 JSWE의 濃도가 增加할 수록 현저히 GOT는 물론 GTP도 현저히 抑制되었고, GTP의 경우 500 mg/kg JSWE 投與群에서는 參考藥物인 OTC 投與群과 유사하게 현저히 抑制되었다. 또한 JSWE가 hepatic glutathione (GSH)에 어떠한 影響을 미치는 지 알아보기 위해서 肝組織內 細胞 溶出液을 제조하여 GSH량을 測定하였다. 그 結果 Fig. 4와 같이 正常 對照群의 경우 蛋白質 1g당 약 9.2 μmol이 함유되었던 반면, 生理食鹽水와 CCl₄ 投與群에서는 蛋白質 1 당 1.2 μmol로 현저히 GSH가 고갈된 현상을 알 수 있었다. 그러나 參考藥物인 OTC 投與群에서는 15.2 μmol로 크게 增加되었다. OTC는 N-acetylcysteine과 함께 pro-cysteine 유도 藥物로 알려져²⁴⁾, 이들 藥物은 hepatic GSH를 增加시켜 抗酸化 效果가 매우 좋은 것으로 알려졌다²⁵⁾. 本 研究에서도 JSWE가 肝纖維化 抑制에 效果에 있어서 hepatic GSH의 增加를 통해 이루어질 수 있는지 알아보려 하였다. 그 結果 CCl₄에 의해 고갈된 hepatic GSH를 증가시키는 效果가 있었고, 500 mg/kg JSWE 投與群에서는 對照群과 유사하게 GSH가 回復되는 效果가 있었다. 그러나 OTC의 경우보다는 GSH 增加率 이 낮았다. 그러나 以上の 結果는 JSWE가 hepatic GSH를 增加시켜 肝纖維化를 抑制하는 것을 時事해 주고 있다.

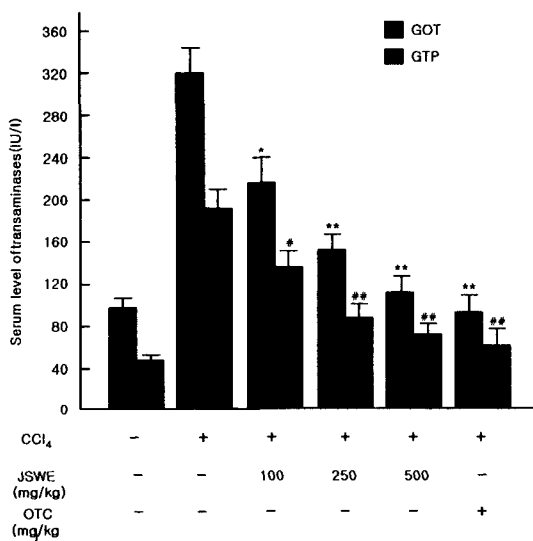


Fig. 3. Inhibitory effects of JSWE on the levels of CCl₄-induced transaminases (GOT and GTP) in rat serum. Rats were treated with CCl₄ or CCl₄ plus a various JSWE (100-500 mg/kg) as described in Fig. 1. Data are means ± SD of n=5. * = P<0.05 or ** or ## = p<0.01 compared with the CCl₄ treated group.

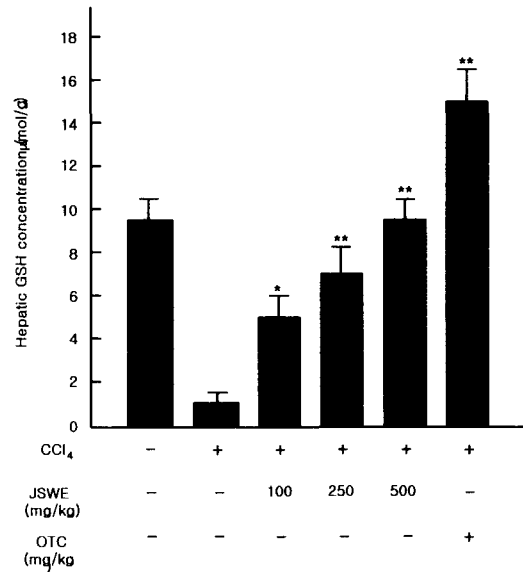


Fig. 4. Increasing effects of JSWE on the level of CCl₄-induced hepatic glutathione (GSH) in rat liver tissue. Rats were treated with CCl₄ or CCl₄ plus a various JSWE (100-500 mg/kg) as described in Fig. 1. Data are means ± SD of n=5. * = P<0.05 or ** = p<0.01 compared with the CCl₄ treated group.

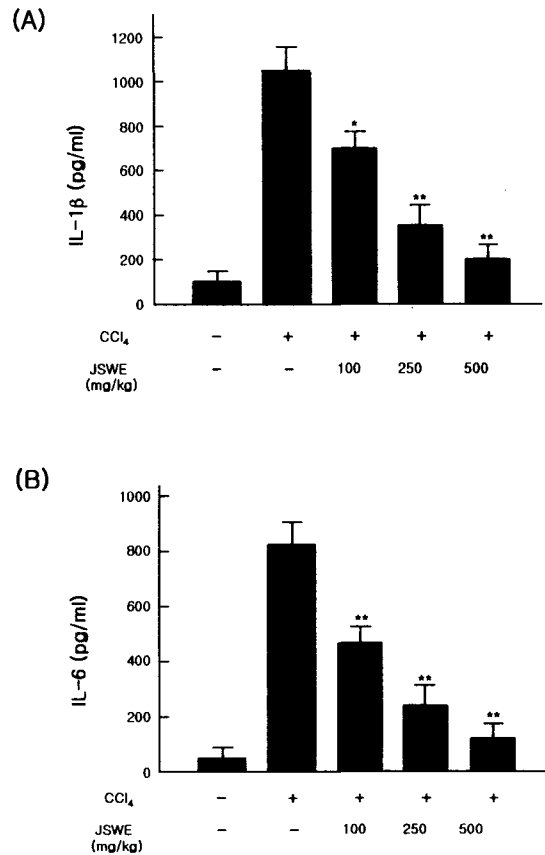


Fig. 5. Inhibitory effects of JSWE on the productions of CCl₄-induced IL-1β (A) and IL-6 (B) in rat serum. Rats were treated with CCl₄ or CCl₄ plus a various JSWE (100-500 mg/kg) as described in Fig. 1. Data are means ± SD of n=5. * = P<0.05 or ** = p<0.01 compared with the CCl₄ treated group.

한편 CCl₄가 유도하는 肝纖維化는 Kupffer cell이 活性化되어 肝細胞 損傷을 주는 경우와 유사한 기전을 가지고 있는 것으로 알려졌다. Kupffer cell이 活性化되면 일련의 reactive oxygen species (ROS)을 다량 生産하지만, 염증반응을 증가시키는 IL-1 β 와 IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine들을 過量 生産하는 것으로 알려졌다^{3,5}. 특히 IL-6는 hepatic stellate cell를 刺戟하여 collagen과 같은 ECM의 生産을 促進함으로써 肝纖維化를 促進시키는 것으로 알려졌다³. 따라서 本 研究에서는 JSWE가 CCl₄에 유도되는 肝纖維化 抑制에 있어 IL-1 β 와 IL-6과 같은 pro-inflammatory cytokine의 生産에 어떠한 影響을 미치는지 조사하였다. 그 結果 JSWE의 濃도가 增加할 수록 CCl₄에 의해 增加된 IL-1 β 와 IL-6의 生産을 현저히 抑制시키는 效果가 있었다 (Fig. 5A와 B).

肝纖維化(hepatic fibrosis)는 肝硬化(liver cirrhosis)의 전 단계로서 만성 肝疾患을 가진 患者에서 EMP, 특히 콜라겐의 과도한 蓄積으로 發生되는데, 肝이 損傷되면 hepatic stellate cell은 傷處를 봉입하기 위해서 活性化되고 계속적으로 增殖하면서 근섬유아세포(myofibroblast-like cell)로 變形되고, 이러한 과정에서 cellular ratinoid가 소실되면서 α -smooth muscle actin(α -SMA)이 合成되고 collagen(type I, II, III), fibronectin, laminin, 및 proteoglycan과 같은 EMP를 過量 生産한다. 이와 같이 EMP가 過量 生産되면서 肝纖維化가 계속적으로 進行되고, nodule이 形成되면서 肝硬化에 이른다¹⁻⁹. 특히 肝纖維化는 GSH의 고갈에 의한 解毒作用의 실패 또는 cytochrome C P450(CYP450)의 發現 및 Kupffer cell과 염증반응으로부터 유입된 免疫細胞에 의해 nitric oxide(NO), superoxide anion(O₂⁻), peroxynitrate 와 같은 자유 유리기(free radical)에 의해 유발된다¹¹. 최근 植物 由來 抗酸化劑의 관심이 높아지면서 이와 관련된 研究가 活潑히 進行되고 있다. 특히 日本에서는 Sho-saiko-to (TJ-9)을 대상으로 肝纖維化 抑制 기전에 대한 研究가 밝혀지면서 中國을 비롯한 여러 나라에서 植物 由來 抗酸化劑와 관련된 肝疾患 研究가 活潑히 수행되고 있다¹⁹⁻²¹.

이러한 점을 勘察하여 本 研究에서 사용된 JSWE는 어린 호두 果實 전체를 에탄올 30% 에탄올 용액으로 抽出한 藥物이다. 호두의 化學 成分은 지방유를 함유하고 그 主要 成分은 리놀레산의 글리세리드이다. 또한 蛋白質 · 비타민 B2 · 비타민 B1 등이 풍부하여 食用과 藥用으로 많이 쓰인다. 호두 기름의 藥理效果는 기름에 함유된 混合 지방산이 體重의 增加를 促進시켜 血清 알부민의 함유량을 높이지만 血液의 콜레스테롤량은 비교적 떨어뜨리는 效果가 있다. 그러므로 호두는 強精劑이나 消化器의 強化에도 效能이 있는 것으로 民間藥으로 호두仁이라하여 널리 사용되고 있다²²⁻²⁴. 그러나 6월 경 어린 호두는 핵이 연하고 과육이 발달된 시기로 果肉과 核에는 많은 抗酸化劑가 포함되어 肝 保護作用이 있다하여 경험적으로 中國 연변지방에서 肝硬化 患者에게 빈번하게 사용되고 있는 실정이다. 그러나 肝保護作用에 대한 文獻적인 根據는 없는 실정이다. 최근에 Ahn등²³은 家兔를 대상으로 mercury chloride 유도 急性 腎不全症에 호두 抽出物이 效果가 있고, 그 기전은 lipid peroxidation을 抑制하는 抗

酸化 效果가 있음을 報告한 바 있다. 肝組織內에서 lipid peroxydation이 促進되면 肝纖維化가 促進되는 것으로 잘 알려졌다. 그러므로 本 研究에서 JSWE의 肝纖維化 抑制는 上記에서 보여준 效果 이외에도 lipid peroxydation 抑制 效果가 있을 수 있음을 시사해주고 있다. 앞으로 JSWE의 肝纖維化 抑制 기전을 보다 상세하게 밝히기 위해서는 抗酸化 效果 기전을 研究해야 될 것으로 思料된다.

以上的 結果를 綜合하면, 어린 호두 抽出物인 JSWE는 CCl₄가 유도하는 肝纖維化를 抑制시키는 뛰어난 效果가 있었고, 肝纖維化 抑制 기전은 GHS를 增加시켜 肝細胞를 保護할 뿐만 아니라 IL-1 β 와 IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokines를 抑制시킴으로서 이루어진 것으로 推定된다. 따라서 JSWE는 肝纖維化 抑制 및 肝細胞 保護에 有用하게 活用될 수 있으며, 이에 대한 상세한 기전은 앞으로 研究해야할 課題로 남아 있다.

결론

렛트를 대상으로 CCl₄ 유도 肝纖維化, 血清內 유리되는 amino transferases (GOT와 GTP), pro-inflammatory cytokines (IL-1 β 와 IL-6) 및 hepatic glutathione(GSH)에 미치는 어린 호두 果實 抽出物(*Juglans sinensis* walnut etnanol extract, JSWE)의 效果를 조사하였다. 그 結果 JSWE는 濃도에 의존적으로 四氯化炭素(CCl₄)가 유도하는 肝纖維化를 抑制시켰을 뿐만 아니라 血清內로 유리되는 GOT, GTP, IL-1 β 및 IL-6 등을 抑制시키는 效果가 있었다. 더욱이 JSWE는 CCl₄에 의해 고갈된 hepatic GSH을 增加시켜 肝細胞를 保護해 주었다. 이러한 結果는 어린 호두 抽出物인 JSWE가 肝纖維化를 抑制시키는 뛰어난 效果가 있었고, JSWE의 肝纖維化 抑制 기전은 GHS를 增加시켜 肝細胞를 保護할 뿐만 아니라 IL-1 β 와 IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokines를 抑制시킴으로서 이루어진 것으로 思料된다. 따라서 JSWE는 肝纖維化 抑制 및 肝細胞 保護에 有用하게 活用될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Arthur M.J. Fibrosis and altered matrix degradation. *Digestion*. 59: 376-380, 1998.
2. Rojkind M. and Dunn M.A. Hepatic fibrosis. *Gastroenterol*. 76: 849-863, 1979.
3. Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol. Aspects Med*. 21: 49-98, 2000.
4. Gressner A.M. and Bachem M.G. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 10: 30-46, 1990.
5. Hendriks H.F., Verhoofstad W.A., Brouwer A., de Leeuw A.M., and Knook D.L. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp Cell Res*. 160: 138-149, 1985.
6. Schuppan D. and Porov Y. Hepatic fibrosis: From bench to

- bedside. Gastroenterol Hepatol. 17 Suppl 3: S300-S305, 2002.
7. Gabele E., Brenner D.A., and Rippe R.A. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. Front Biosci. 8: D69-77, 2003.
 8. Murphy F., Arthur M., and Iredale J. Developing strategies for liver fibrosis treatment. Expert Opin Investig Drugs. 11: 1575-585, 2002.
 9. Kusunose M., Qiu B., Cui T., Hamada A., Yoshioka S., Ono M., Miyamura M., Kyotani S., and Nishioka Y. Effect of Sho-saiko-to extract on hepatic inflammation and fibrosis in dimethylnitrosamine induced liver injury rats. Biol Pharm Bull. 25: 1417-1421, 2002.
 10. Guo M.Z., Li X.S., Xu H.R., Mei Z.C., Shen W., and Ye X.F. Rhein inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. Acta Pharmacol Sin. 23: 739-744, 2002.
 11. Liu X., Huang M., Cheng N., Xiao W., and Wang Y. Effects of genistein on the fenestrae, proliferation and nitric oxide synthesis of liver sinusoidal endothelial cells from carbon tetrachloride-induced experimental hepatic fibrosis rats. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 10: 200-203, 2002
 12. Maher J.J.. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. Semin Liver Dis. 2001; 21: 417-426.
 13. Melgert B.N., Olinga P., Van Der Laan J.M., Weert B., Cho J., Schuppan D., Grootuis G.M., Meijer D.K., and Poelstra K.. Targeting dexamethasone to Kupffer cells: effects on liver inflammation and fibrosis in rats. Hepatology. 2001; 34: 719-28.
 14. Heller J., Sogni P., Barriere E., Tazi K.A. Chauvelot-Moachon L., Guimont M.C., Bories P.N., Poirel O., Moreau R., and Lebrec D.. Effects of lipopolysaccharide on TNF-alpha production, hepatic NOS₂ activity, and hepatic toxicity in rats with cirrhosis. J Hepatol. 33: 376-381, 2000.
 15. Kim K.Y, Choi I., and Kim S.S. Progression of hepatic stellate cell activation is associated with the level of oxidative stress rather than cytokines during CCl₄-induced fibrogenesis. Mol Cells. 10: 289-300, 2000
 16. Iredale J.P., Murphy G., Hembry R.M., Friedman S.L., and Arthur M.J. Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. J Clin Invest. 90: 282-287, 1992.
 17. Milani S., Herbst H., Schuppan D., Grappone C., Pellegrini G., Pinzani M., Casini A., Calabro A., and Ciancio G.. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. Am. J. Pathol. 144: 528-537, 1994.
 18. Ohnishi N., Okada K., Yoshioka M., Kuroda K., Nagasawa K., Takara K., and Yokoyama T. Studies on interactions between traditional herbal and western medicines. V. effects of Sho-saiko-to (Xiao-Cai-hu-Tang) on the pharmacokinetics of carbamazepine in rats. Biol Pharm Bull. 25: 1461-1466, 2002.
 19. Akbar S.M., Yamamoto K., Abe M., Ninomiya T., Tanimoto K., Masumoto T., Michitaka K., Horiike N., and Onji M. Potent synergistic effect of sho-saiko-to, a herbal medicine, during vaccine therapy in a murine model of hepatitis B virus carrier. Eur J Clin Invest. 29: 786-92, 1999.
 20. Shimizu I., Ma Y.R., Mizobuchi Y., Liu F., Miura T., Nakai Y., Yasuda M., Shiba M., Horie T., Amagaya S., Kawada N., Hori H., and Ito S. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. Hepatol. 29: 149-160, 1999.
 21. Kayano K., Sakaida I, Uchida K., and Okita K. Inhibitory effects of the herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) on cell proliferation and procollagen gene expressions in cultured rat hepatic stellate cells. J Hepatol. 29: 642-649, 1998.
 22. 鄭普燮, 辛民教. 圖解 鄉藥(生藥) 大辭典(植物篇). 永林社. 287-291, 1990
 23. Ohsugi, M., Fan, W., Hase, K., Xiong, Q., Tezuka, Y., Komatsu, K., Namba, T., Saitoh, T., Tazawa, K., Kadota, S. Activeoxygen scavenging activity of traditional nourishing-tonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*. J. Ethnopharmacol. 67: 111-119, 1999.
 24. Ahn C.B., Song C.H., Kim W.H., and Kim Y.K. 2002. Effects of *Juglans sinensis* Dode extract and antioxidant on mercury chloride-induced acute renal failure in rabbits. J. Ethnopharmacol. 82: 45-49, 2002.
 25. Gwilt P.R., Radick L.E., Li X.Y., Whalen. J.J., and Leaf C.D. Pharmacokinetics of 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a cysteine prodrug, and cysteine. J Clin Pharmacol. 38:945-950, 1998.
 26. Ravindranath V., and Boyd M.R. Effect of modulators of glutathione synthesis on the hepatotoxicity of 2-methylfuran. Biochem Pharmacol. 41: 1311-1318, 1991.
 27. Ishak K., Baptista A., Bianchi L., Callea F., De Groote J., Gudat F., Denk H., Desmet V., and Korb G. Histological grading and staging of chronic hepatitis. J. Hepatol. 22: 696-699, 1995.