

Acetaminophen에 의해 손상된 마우스 간세포에서 哈蟆油의 간세포보호 효과

이장천^{#*}

상지대학교 한의과대학 본초방제학교실

Hepatoprotective Effect of *Forest frog's oviduct oil* on Acetaminophen-induced Liver Injury in Mice.

Jang Cheon Lee^{#*}

Department of Herbal Prescription, College of Oriental Medicine, Sangji University, Wonju, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study is that the protective effects of habmayou on acetaminophen (AP)-induced hepatotoxicity were investigated in mice.

Methods : Before administering AP mice supplied with only water were left alone for 18 hours. after concentration and dissolution in poly ethylglycol AP 400mg per 1kg of mouse weight, we injected AP titrated density with a physiological saline solution into the abdominal cavity of mouse to induce hepatotoxicity. we researched mortality rate and the shape of liver tissue of mouse.

Results : Treatment with habmayou (250 mg/kg, p.o.) 0.5 h after AP administration significantly prevented an increase in plasma alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities and AP-induced hepatic necrosis, and also reduced AP-induced mortality from 46% to 0%. In addition, oral treatment with habmayou significantly prevented AP-induced depletion of glutathione (GSH) contents. However, habmayou treatment, by itself, did not affect hepatic GSH contents.

Conclusion : These results show that the hepatoprotective effects of habmayou against AP overdose may be due to its ability to block the bioactivation of AP by regeneration of hepatonecrotic cells.

Key words : *Forest frog's oviduct oil*, habmayou, acetaminophen, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase.

서론

Acetoaminophen(AP)은 진통 및 해열제로 세계에 서 가장 보편적으로 사용되는 약물의 일종으로 그 화학명칭은 N-acetyl-p-aminophenol이다¹⁾. 이 약물은 치료 농도에서 안정하지만, 과량 투약하면 인간 및 실험동물에서 모두 급성 간세포의 괴사를 유발하여 사망을 유발하는 원인이 된다²⁾. 낮은 농도의 AP를 투약 하면, 체내에서 생변이를 통해 비독성 gluconic acid와 sulfate 결합으로 독성을 제거해 진통 및 해열의 효과를 나타낸다. 즉, AP는 간에서 N-acetyl-p-benzoquinoneimine(NAPQI)로 전환되는데, 전환된 대사산물은 glutathione과 결합하여 정상적으로 독성을 나타내지 않는다³⁾. 그러나 과량의 AP가 투약되면, 간에서 gluconic acid와 sulfate 결합하여 비독성을 나타 내는 능력이 상실되어 높은 반응성 NAPQI가 축적되면서 간독성을 유발하게 되고, 결국 생명체를 사망에 이르게 한다. AP 투약에 의한 간손상 모델로는 마우스와 햄스터가 잘 알려져 있고, 인체에서도 비슷한 현상이 보고되고 있다⁴⁾. 따라서 AP에 의한 독성을 제거하는 약물의 발굴은 인류의 보건을 위한 중요한 일이다. 최근에 AP의 독성을 제거하는 기전이 알려 지면서^{1, 5)}, 약물의 개발이 활발히 진행되고 있다. 즉, L-2-oxothiazolidine-6-carboxylate(OTC)과N-acetyl cysteine(NAC) 등 pro-cysteine 약물^{6,7)} 황금(Scutellariae Radix)와 마늘(Galic) 등 천연 약물^{8,9)}이 AP 독성 제거에 대한 효과가 있음이 보고되었다. 황금은 flavonoid 계열의 baicalin 과 마늘은 diallyl sulfide은 CYP2E1의 발현을 억제함으로써 AP에 의한 간 독성을 제거하는 것으로 알려졌다.

蛤蟆油는 蛤士蟆油³⁾이며 즉 林蛙의 輸卵管을 건조한 것이다. 性味歸經은 甘鹹, 平, 無毒하고 肺, 腎經에 入하여 補腎益精, 潤肺養陰시키는 효능으로 病後, 產後虛弱, 吐血, 盜汗^{19,20)} 등에 사용된다.

성분은 주로 단백질을 풍부하게 함유하며 脂肪은 겨우 4%정도이고 糖類는 10%이다. 그 중에는 인체에 필수적인 아미노산의 함량이 매우 높다. 소량의 P과 Ca 비타민 A, B, C 및 인체에 유익한 여러 가지 호르몬, 미량원소, 불포화지방산(특히 아라킨산, EPA, DHA 등)도 함유한다.^{16,17,18)} 풍부한 영양분과 단백질 맛으로 자양식품 및 약재로서의 가치가 높다.

그러나 이러한 합마유에 대한 모델동물에 의한 간독성에 대한 보호효과에 대한 보고는 없다. 따라서 본 연구는 이와 같이 오래 동안 간보호에 사용되어온 합마유의 추출물에 대한 간보호작용의 효과를 증명하기 위해서, 과량의 AP를 마우스에 투여하여 간독성을 유발한 후 약물의 효과를 조사한바 흥미로운 결과

를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약

Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)와 glutathione (GSH) assay kit, hematoxylin, eosin 등은 Sigma Chemical(St. Louis, Mo U.S.A)에서 구입했으며, 모든 용매는 분석 등급으로 Sigma와 Merk(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2. 실험동물

6주령의 Balb/c계 마우스 40 마리를 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)로부터 확보하고, 2주간 스트레스를 해소한 다음 8주령을 대상으로 실험에 사용하였다. 마우스의 유지는 무균 및 항온·항습이 유지되는 사육장 (엠제이티디, 서울)에서 유지하고, 무균 물과 사료를 충분히 공급하면서 실험했다.

3. 약물의 추출 및 제조

실험에 사용한 약제는 중국 길림성 장춘 중의학원에서 구입하였으며, 표본은 상지대학교 한의과대학 본초방제학교실에 보관 중에 있다. 실험에 사용한 합마유 추출물의 제조는 건조된 합마유 20 g을 세절하여 분말화하고 50 ml의 에탄올을 주입한 후 7일간 방치하였다. 합마유 추출액은 알콜성분을 증발시키는 방법으로 제거하고 잔액은 동결 건조하여 실험에 사용 하였다.

4. AP투약에 의한 간독성 유발

AP를 투여하기 전 마우스는 물만 공급하면서 18시간 방치한 후 마우스 체중 1 kg 당 400 mg을 poly ethylglycol에 농축용해한 후 생리식염수로 농도를 적정한 다음 복강에 주사하여 간독성을 유발하여 사망률과 간조직의 형태를 조사하였다.

5. 간독성 측정

간독성 측정은 약물이 투여된 마우스 심장으로부터 채혈한 후 plasma를 분리한 다음 ALT와 AST 분

광광도 측정 kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo U.S.A)를 이용하였다.

6. GSH 측정

간의 GSH 측정은 약물이 투여된 마우스를 신속하게 후경골탈추방법으로 희생시킨 후 간조직을 제거하고 0.02 M 냉각 EDTA 용액에 세척한 다음 무게를 측정하였다. Non-protein liver GSH는 Ellman's reagent 이용하여 측정하였다. 요약하면, 간조직을 0.02 EDTA를 주입하고 조직을 마쇄한 후 단백질을 조직으로부터 유리시키고 5% trichloroacetic acid를 이용하여 단백질을 침전하고 0.2 M EDTA가 함유되어 있는 0.4 M tris 완충액(pH 8.9)를 주입하고 단백질을 용해하였다. 시료는 메탄올에 dithionitrobenzoic acid를 첨가하여 발색하고 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 간의 GSH 측정은 농도에 따른 표준 GSH 곡선을 먼저 측정한 후 각 조직의 흡광도를 측정하여 계산하였다.

7. 조직염색

각 약물이 투여하고 24시간이 경과된 마우스를 에터에 마취한 후 흉강과 복강을 절개하여 심장에 헤파린이 함유된 생리식염수를 충분히 주입하여 전신의 혈액을 제거한 후 신속히 간조직을 절취하여 중성포르말린(pH 7.4)에 고정하여 파라핀 매물 방법으로 조직 표본을 제작하였다. 제작된 표본은 4-5 μ m로 절편하고 일련의 탈수방법으로 수행하고 hematoxylin과 eosin을 이용하여 통상적인 방법으로 염색하여 100배의 현미경하에서 조직검경을 하였다.

8. 간조직 세포의 괴사 측정

약물이 투여한 후 24시간 후에 간조직을 적출하여 상기와 같이 조직염색을 한 후 현미경 시야에서 AP에 의해 손상된 간조직 세포의 재생 정도에 따라 0-4까지 점수를 주어 약물의 효과를 판정하였다.

0점: 정상 조직 표본

1점: 재생중인 세포가 대부분이고 10%이하 손상된 조직 표본

2점: 재생중인 세포가 70-90%이고 10-20% 사이의 손상된 조직 표본

3점: 재생중인 세포가 40-60%이하로 심각하게 손상 받은 조직 표본

4점: 정상 세포가 거의 없고 대부분 괴사되었거나 재생 상태의 세포가 없는 조직 표본

9. 통계 분석

실험 결과는 평균값 \pm 표준편차로 표현했다. 통계 분석은 Student's t-test를 이용하였다.

결 과

1. 합마유 추출물 투여에 따른 생존율에 미치는 영향

마우스 생존율에 있어 AP 투여에 따른 합마유 추출물의 효과를 알아보기 위하여, AP(400 mg/kg. bw)를 투여하고 30분 후에 여러 가지 농도(50-500 μ g/마리)로 합마유 추출물을 투여하고 48시간까지 생존율을 조사하였다. 그 결과 Table 1과 같이 낮은 농도에서는 생존율이 유의 있게 증가되지 않았지만, 농도가 증가할수록 그 생존율이 높아졌고, 250 μ g에서는 100% 생존하는 효과가 있었다.

Table. 1. Effect of Forest frog's oviduct oil on AP-induced mortality in mice^{a)}

Concentration of habmayou	Mortality (%) ^{b)}
0	45.2 \pm 3.5
50	30.3 \pm 3.7
100	15.5 \pm 4.0
250	0
500	0

a) Mice were treated with a various concentration (50-250 μ g/mouse) of habmayou, 0.5 h after treatment with AP (400 mg/kg. i.p.). Contraol mice were given saline. Data represents the mean \pm S.D. from 5 mice.

b) Mortality was determined 48 h after AP administration.

2. 합마유 추출물이 AP 투여에 의해 손상된 간조직에 미치는 영향

AP를 투여하고 30분 후에 여러 가지 농도(50-250 μ g/마리)로 합마유를 투여한 다음 24시간에 간조직을 적출하여 표본을 제작하고 간조직의 재생 정도를 알아보았다. 그 결과 Fig. 1과 같이 AP만 투여한 대조군은 대부분의 세포가 괴사되었거나 진행 중이었으나, 합마유가 투여된 마우스의 간조직 세포는 농도에 의

존적으로 재생되는 효과를 보였다. 특히 개체 당 250 μg 을 투여한 약물군은 그 재생 효과가 현저했다(Fig. 2).

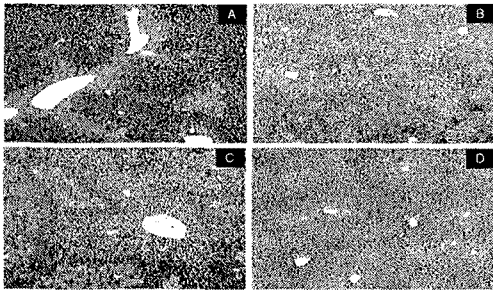


Fig. 1. Effects of habmayou on AP-induced liver damage in mice. Mice were treated with a various concentration (50-250 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) of habmayou, 0.5 h after treatment with AP (400 mg/kg, i.p.). Contraol mice were given saline. The mice killed 24 h after AP administration. Histological analysis was determined as described in materials and methods. A: Control (saline alone); B: The treated group with 50 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ of habmayou; C: The treated group with 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ of habmayou; D: The treated group with 250 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ of habmayou.

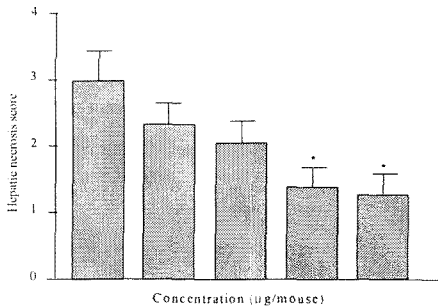


Fig. 2. Effects of habmayou on AP-induced liver damage in mice. Mice were treated with a various concentration (50-250 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) of habmayou, 0.5 h after treatment with AP (400 mg/kg, i.p.). Contraol mice were given saline. The mice killed 24 h after AP administration. Hepatic necrosis score were determined as described in materials and methods. Each column represents the mean \pm S.D. from three independent experiments. * $p < 0.05$ indicates significant differences from control group.

3. 합마유 추출물이 plasma AST와 ALT에 미치는 영향

AP를 투여하고 30분 후에 여러 가지 농도(50-250 $\mu\text{g}/\text{마리}$)로 합마유를 투여한 다음 24시간에 심장으로 부터 채혈 한 후 plasma를 분리한 다음 AST와 ALT를 조사하였다. 그 결과 Table 2와 같이 합마유 투여

군에 있어 농도 의존적으로 감소되는 효과가 있었다. 따라서 합마유를 투여한 실험군에서는 간조직의 재생 효과가 진행됨을 확인할 수 있었다.

Table. 2. Effect of Forest frog's oviduct oil on AP-induced hepatotoxicity in mice^{a)}

Concentration of habmayou	Plasma AST (U/L) ^{b)}	Plasma ALT (U/L) ^{b)}
0	2800 \pm 220	3500 \pm 180
50	1500 \pm 120	1900 \pm 135
100	950 \pm 109	1050 \pm 115
250	180 \pm 23	380 \pm 53
500	150 \pm 15	220 \pm 20

a) Mice were treated with a various concentration (50-250 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) of habmayou, 0.5 h after treatment with AP (400 mg/kg, i.p.). Contraol mice were given saline.

b) AST and ALT were determined as described in materials and methods. Data represents the mean \pm S.D. from 5 mice.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indicates significant differences from control group.

4. 합마유 추출물이 plasma AST와 ALT에 미치는 영향

AP를 투여하고 30분 후에 여러 가지 농도(50-250 $\mu\text{g}/\text{마리}$)로 합마유를 투여한 다음 24시간에 마우스를 희생시키고 간조직을 적출하여 GSH의 변화를 알아보았다. AP를 처리하지 않고 합마유를 농도별로 처리한 결과 Fig. 3과 같이 증가하는 경향이 있었지만 유의한 변화는 없었다. 그러나 AP를 처리한 대조군은 간조직 단백질 1 mg 당 10 nmol 이하로 약물이 처리되지 않은 정상대조군에 비해 현저히 GSH가 고갈되었음을 확인할 수 있었다. 이와 같이 간조직내의 고갈된 GSH의 변화에 미치는 합마유의 영향을 알아보기 위하여 마우스 당 여러 가지 농도의 합마유(50-500 μg)를 투여한 결과 농도 의존적으로 GSH가 현저히 증가되었다. 특히 250 μg 과 500 μg 투여군에서는 유의성 있게 증가 효과를 보였다. 따라서 합마유를 투여한 실험군에서 생존율의 증가는 AP 투여에 의한 손상된 간을 재생시켜 정상적인 GSH의 level을 유지시켜준 것으로 사료된다.

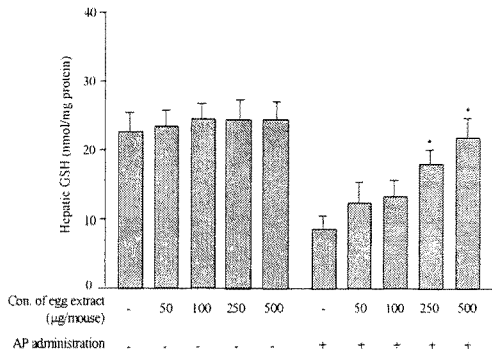


Fig. 3. Effects of habmayou on AP-induced GSH depletion in mice. Mice were treated with a various concentration (50-250 µg/mouse) of habmayou, 0.5 h after treatment with AP (400 mg/kg, i.p.). Control mice were given saline. The mice killed 24 h after AP administration. Hepatic cellular GSH contents were determined as described in materials and methods. Each column represents the mean \pm S.D. from three independent experiments. * $p < 0.05$ indicates significant differences from control group.

고찰

마우스를 비롯한 설치류에서 AP에 의한 간손상의 유발은 간보호 효과를 나타내는 약물의 스크리닝에 보편적으로 이용되는 모델로 잘 확립되었다²⁾. 한의학에서는 전통적으로 만성 소모성 질환에 많이 이용되어 왔으나 합마유가 간보호 효과에 미치는 영향에 대한 기전이 보고된 적은 없다. 그러므로 본 연구에서는 합마유의 간기능 개선 또는 간질환 치료 효과를 알아보기 위하여, 마우스를 대상으로 AP을 투여하여 간독성을 유발한 후 합마유 추출물을 이용하여 간보호 효과를 조사하였다.

과량의 AP(400 mg/kg)를 투여하여 간손상을 유발하고 30분 후에 여러 가지 농도로 합마유 추출물을 처리한 결과, 마우스 당 250 µg와 500 µg 농도에서 100% 생존하는 효과가 있었다(Table 1). 또한 마우스 당 250 µg에서 AP에 의해 간조직 세포의 손상에 따른 재생 효과가 매우 현저했고(Fig 1), plasma AST와 ALT의 뚜렷한 감소 효과를 보였다(Table 2). 이러한 원인을 알아보기 위해서 간조직내의 GSH의 변화를 알아본 결과, 난 합마유에 의한 생존을 향상은 피사에 빠진 세포의 재생을 도와 고갈된 GSH level을 높여준 결과임을 알 수 있었다(Fig. 3).

AP는 간에서 N-acetyl-p-benzoquinoneimine(NAPQI)로 전환되는데, 전환된 대사산물은 glutathione에 의해 독

성이 제거된다³⁾. 그러나 과량의 AP가 투약되면, 간에서 gluconic acid와 sulfate 결합하여 비독성을 나타내는 GSH의 능력이 상실되어 높은 반응성 NAPQI가 축적되면서 간독성을 유발하게 되고, 결국 생명체를 사망에 이르게 한다. AP 투여에 의한 간손상 모델로는 마우스와 햄스터가 잘 알려져 있고, 인체에서도 비슷한 현상이 보고되고 있다^{1,5)}. 따라서 AP에 의한 독성을 제거하는 약물의 발굴은 인류의 보건을 위한 중요한 일이다.

OTC와 NAC과 등 pro-cysteine 약물⁶⁾ 황금(Scutellariae Radix)과 마늘(Galic) 등 천연 약물^{6,9)}이 AP 독성 제거에 대한 효과가 있음이 보고되었다. 황금은 flavonoid 계열의 baicalin과 마늘은 diallyl sulfide은 CYP2E1의 발현을 억제함으로써 AP에 의한 간 독성을 제거하는 것으로 알려졌다.

합마유는 補虛退熱, 強腎益精의 효능으로 病後恢復, 產後虛弱, 肺癆咳血, 盜汗, 精力不足, 疲勞 등 소모성 질병을 치료하는 약물로 알려졌고 다양한 미량원소와 각종 비타민, 다종의 호르몬 등을 함유하며 주성분은 거의 단백질이다. 治肺癆吐血, 治神經衰弱, 治病後失調和盜汗不止 등 증에도 활용된다.^{11,12,14,16)}

이상의 결과를 요약하면, 합마유는 AP에 의해 손상된 간조직 세포를 보호할 수 있는 중요한 약물임을 확인할 수 있었고, 그 생물학적 기전은 AP 투여에 따른 간조직의 고갈된 GSH의 복원을 유도함으로써 그 효과를 발휘하는 것으로 사료된다. 따라서 합마유는 인체의 손상된 간을 보호 또는 간질환을 개선하는데 이용될 수 있을 것으로 사료되지만, 앞으로 그 기전 연구가 더 수행되어야 할 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 acetaminophen (AP)에 의해 유도된 마우스 간손상에 있어 합마유 투여에 따른 간보호 효과를 알아보았다. AP를 투여한 후 합마유(250 µg/마리)를 처리한 결과 AP 유도 plasma alanine aminotransferase와 aspartate aminotransferase 활성 증가에 대한 감소 및 간세포 피사의 억제에 대한 우수한 효과가 있었으며, 특히 AP 투여에 의한 46%의 높은 사망률을 합마유 투여에 의해 0%로 억제하는 효과가 있었다. 합마유 단독으로는 glutathione(GSH) 양에는 영향을 주지 않았지만, AP에 의해 고갈된 GSH의 양을 복원하는 효과가 있었다.

이상의 결과를 요약하면, 합마유는 AP에 의해 손상된 간조직 세포를 보호할 수 있는 중요한 약물임을

확인할 수 있었고, 그 기전은 AP 투여에 따른 간조직의 고갈된 GSH의 복원을 유도함으로써 그 효과를 발휘하는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 상지대학교의 교비 지원에 의해서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Oviedo J, Wolfe MM. Alcohol, acetaminophen, and toxic effects on the liver. *Arch Intern Med.* 162(10):1194-1195. 2002.
- Dargan PI, Jones AL. Acetaminophen poisoning: an update for the intensivist. *Crit Care.* 6(2):108-10. 2002.
- Hazai E, Vereczkey L, Monostory K. Reduction of toxic metabolite formation of acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(4):1089-1094. 2002.
- Tee LB, Boobis AR, Huggett AC, Davies DS. Reversal of acetaminophen toxicity in isolated hamster hepatocytes by dithiothreitol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 83(2):294-314. 1986.
- Kozer E, McGuigan M. Treatment strategies for early presenting acetaminophen overdose: a survey of medical directors of poison centers in North America and Europe. *Hum Exp Toxicol.* 21(3):123-127. 2002.
- Hazelton GA, Hjelle JJ, Klaassen CD. Effects of cysteine pro-drugs on acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Pharmacol Exp Ther.* 237(1):341-9. 1986.
- Macrides TA, Naylor LM, Kalafatis N, Shihata A, Wright PF. Hepatoprotective effects of the shark bile salt 5beta-scymnol on acetaminophen-induced liver damage in mice. *Fundam Appl Toxicol.* 33(1):31-37. 1996.
- Jang SI, Kim HJ, Hwang KM, Jekal SJ, Pae HO, Choi BM, Yun YG, Kwon TO, Chung HT, Kim YC. Hepatoprotective effect of baicalin, a major flavone from *Scutellaria radix*, on acetaminophen-induced liver injury in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 25(4):585-594. 2003.
- Sumioka I, Matsuura T, Kasuga S, Itakura Y, Yamada K. Mechanisms of protection by S allylmercaptocysteine against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Jpn J Pharmacol.* 78(2):199-207. 1998.
- 李時珍. 圖解本草綱目(初版). 서울: 高文社. 1973:1323
- 國家中醫藥管理局中華本草編纂委會. 中華本草. 第九冊. 上海: 上海科學技術出版社. 1997:374~376
- 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 上海: 上海科學技術出版社. 1977: 1650~1651
- 任仁安. 中藥鑑定學. 서울: 圖書出版 醫聖堂. 1993: 578~579
- 鄧明魯等. 中國動物藥. 長春: 吉林人民出版社. 1981:277~278
- 中華人民共和國藥典委員會. 中華人民共和國藥典(2000年版), 第1版, 北京:化學工業出版社. 2000
- 李長泉 外. 東醫藥用動物學 第1版. 서울: 圖書出版 醫聖堂. 2002: 374~377
- 趙文英等. 蛤蟆油的化學成分. 瀋陽藥科大學學報. 1996; 13(4): 276
- 趙文英等. 蛤蟆油的化學成分的研究. 瀋陽藥科大學學報. 1997; 14(1): 24
- 楊倉良等. 動物本草, 第1版. 北京: 中醫古籍出版社. 2001; 741~743, 831~832
- 高士賢. 中國動物藥誌, 第1版. 長春: 吉林科學技術出版社. 1996:561~565