

清肝解酒湯의 항산화 작용에 관한 실험적 연구

이지은, 이장훈

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Experimental Study of *Chungganhaeju-tang* (*Qingganjiejiu-tang*) on Oxidative Stress

Ji-eun Lee, Jang-hoon Lee

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Objectives : Oxidative stress seems to play a major role in mechanisms by which ethanol causes liver injury. Previous studies have shown that treatment with *Chungganhaeju-tang* (*Qingganjiejiu-tang*, CGHJT) has protective effects on alcoholic liver disease. The aim of this study was to investigate the effects of *Chungganhaeju-tang* on oxidative stress.

Materials and Methods : *In vitro*, we evaluated the inhibitory activities of CGHJT on DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), xanthine oxidase, trypsin, and hyaluronidase, and measured cell viability, and proliferation. In the cell culture model, we measured the activities of superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) after CGHJT treatment in C34 and E47 cell lines. HepG2 cells transfected with/without the cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) gene. *In vivo*, we measured malondialdehyde levels in the liver tissue and alcohol concentration in the blood.

Results : CGHJT showed significant free radical scavenging activity against DPPH and xanthine oxidase in the *in vitro* study, and increased cell viability, proliferation, and activities of superoxide dismutase, catalase in C34 and in E47 cell lines. CGHJT reduced malondialdehyde levels and blood alcohol concentration *in vivo*, as well.

Conclusions : This study suggests that CGHJT has antioxidant effects on oxidative stress by reducing lipid peroxidation and inhibiting the ethanol induced suppression of antioxidant enzyme activities.

Key words : *Chungganhaeju-tang* (*Qingganjiejiu-tang*), oxidative stress, CYP2E1, ethanol

1. 서론

국민건강보험에서 발표한 자료에 의하면 2008년 알코올성 간질환으로 17만 명이 진료 받았으며, 이로 인한 진료비 지출은 670억으로 2004년의 360억에 비해 2배 가까이 증가하였다¹. 우리나라의 음주 경향을 고려할 때 앞으로 간질환에서 알코올이 차

지하는 비중이 더욱 증가할 것으로 보이는데, 통계청의 <2008년 국민건강 영양조사>에 의하면, 우리나라 성인의 월간 음주율은 58.7%, 1회 평균 음주량이 7잔 이상(여자: 5잔), 주 2회 이상의 고위험 음주율은 2007년 16.6%에서 2008년 20.2%로 해마다 높아지는 추세이다.

알코올은 섭취 후 주로 간에서 대사되는데 alcohol dehydrogenase(ADH), cytochrome P450 2E1(CYP2E1) 및 catalase 3가지 효소계를 통해 acetaldehyde로 산화된다. 과도하게 생성된 아세트알데히드는 acetaldehyde-protein 부산물과 지질 과산화물의 생성을 유발해

· 교신저자: 이장훈 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
TEL: 02-958-9118 FAX: 02-958-9120
E-mail: komclive@khmc.or.kr

간독성에 관여한다². 또한 알코올 대사에 의해 유도되는 CYP2E1, p450 reductase, NADPH oxidase, aldehyde oxidase, xanthine oxidase 등은 생체 내 활성 산소종(reactive oxygen species)을 생성하고, 과량의 알코올 대사에서 이러한 효소들은 다량의 자유 유리기(free radical)를 발생시켜 생체 내 산화 스트레스(oxidative stress)를 유발하며 알코올성 간손상의 주요 원인이 된다. 만성적인 알코올 섭취는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione 등과 같은 항산화 물질의 생성이나 작용을 저해하여 산화 스트레스를 촉진하여 간세포 손상을 일으킨다³.

淸肝解酒湯(이하 CGHJT)은 對金飮子에 茵陳芩散을 合方하고 解酒毒의 要藥인 葛根, 赤楊 등을 가미한 처방으로 임상에서 알코올성 간질환의 치료에 빈용되는 처방이다.

淸肝解酒湯에 대한 연구로는 알코올성 간손상에 서 각종 생화학적 지표를 정상화시키고^{4,5}, 임상증상을 개선시키는 효과가 입증된 바 있으며⁵, 최근에는 알코올 대사관련 유전자의 발현과 TNF- α , IL-1 β 등 사이토카인 발현에 영향을 미치고^{6,7}, 항산화효소인 glutathione의 생성과 전자조절인자인 NF- κ B를 활성화시킴으로써 알코올 유도성 apoptosis를 억제하고 간세포 활성을 높여 간보호 작용이 있으며^{8,9}, TGF- β 1의 합성을 억제하고 fibroblast의 증식과 섬유화 유발 유전자 발현을 억제함이 보고된 바 있다¹⁰. 또한 CYP2E1에 의한 알코올성 세포독성을 억제하고, 관련 유전자 발현 증가를 감소시킨다고 보고하였다¹¹. 최근에는 유전자 발현의 산물인 단백질에 대한 연구도 시행되어 청간해주탕이 알코올성 간손상으로 인한 섬유화 및 단백질 산화 억제 효과가 있음을 밝혔다^{12,13}.

현재 산화 스트레스는 알코올성 간손상의 주원인으로 여겨지고 있으며, cytochrome p450 2E1 (CYP2E1)이 알코올성 산화스트레스에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁴. 따라서 본 연구에서는 산화스트레스에 대한 청간해주탕의 효과를

살펴보고자, 시험관 내에서 청간해주탕이 항산화, 항염증 반응에 관계된 효소 활성에 미치는 영향을 관찰하였고, CYP2E1 유전자가 포함된 E47 세포주를 이용하여 알코올로 인한 CYP2E1 관련 산화스트레스에 대한 항산화 효소 활성을 확인하였으며, 지질과산화와 혈중 알코올 농도에 미치는 영향을 동물 실험을 통해 관찰하여 유의한 결과를 얻어 이에 보고하고자 한다.

II. 실험

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해¹⁵에 근거하여 경희의료원 한방병원에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 아래와 같다(Table 1). 실험에 사용한 검액의 조제는 淸肝解酒湯 1첩 분량(118 g)을 증류수 1000 ml에 넣고 3시간씩 2회 환류추출 후 감압 농축하고, 동결건조기를 이용하여 19.47 g의 건조추출물(수율 16.5%)을 얻었다.

Table 1. Prescription of *Chungganhaeju-tang*(CGHJT)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
茵 陳	Leaf and stalk of <i>Artemisiae capillaris</i> Herba	30
陳 皮	Peel of <i>Aurantii Nobilis</i> Pericarpium	12
葛 根	Root of <i>Puerariae Radix</i>	12
赤 楊	Young branch and bark of <i>Alny Cortex et Ramulus</i>	12
白 朮	Root of <i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	8
茯 苓	Sclerotium of <i>Hoelen</i>	8
澤 瀉	Root of <i>Alismatis Rhizoma</i>	8
豬 苓	Sclerotium of <i>Polyporus</i>	8
厚 朴	Bark of <i>Magnoliae Cortex</i>	8
砂 仁	Seed of <i>Amomi Semen</i>	6
甘 草	Root of <i>Glycyrrhizae Radix</i>	6
Total amount		118

2) 시약 및 장비

시약은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, xanthine sodium salt, bovine serum, xanthine oxidase, nitrotetrazolium blue chloride, copper(II) chloride, trypsin inhibitor, DMAB (p-dimethylaminobenzaldehyde), hyaluronidase, hyaluronic acid는 Sigma(U.S.A) 제품을, ascorbic acid, sodium carbonate, casein은 Junsei Chemical Co., Ltd.(Japan) 제품을, sodium hydroxide, phosphoric acid, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, calcium chloride anhydrous는 Yakuri Pure Chemicals (Japan) 제품을, trypsin은 Difco Laboratories(U.S.A) 제품을, phenol reagent는 Wako(Japan) 제품, TBA (4,6-dihydroxy-2-mercapto pyrimidine)는 Alfa Aesar (U.S.A) 제품을, sodium acetate는 Ishisu Pharmaceutical Co., LTD.(Japan) 제품을, sodium bicarbonate는 Shinto Pure Chemical(Japan) 제품을, gallic acid는 Hayashi Pure Chemical(Japan) 제품을, trichloroacetic acid, hydrochloride는 Dae Jung Chemical (Korea) 제품을 사용하였다.

본 실험에 사용한 기계로는 분광광도계(Shimadzu Co., Model UV-160A, Japan) Vortex genie 2 (Scientific Industries, USA), ultra centrifuge(Vision Scientific, Model VS-6000CFN, Korea), Shaking water bath(Han back Scientific Co., Model MB-205SW, Korea), 농축기는 Büchi rotavapor R-220(Rose Scientific Ltd., Canada)을 사용하였고, 초저온 냉동기는 Ultra low temperature freezer, 동결건조기는 Ilshin programmable freeze dryer (Ilshin Lab. Co., Ltd., Korea)를 사용하였다.

3) 동물

셀타코(Seoul Korea)에서 구입한 체중 25~40 g 의 8주된 ICR 계통으로, 알비노 중형이며 Institute of Cancer Research(U.S.A)에서 육종된 대표적인 실험동물(Mouse)을 사용하였다.

2. In Vitro 실험

1) 효소 활성도 측정

(1) DPPH 저해 활성도 측정

Free radical scavenging 작용은 비교적 안정한 free radical 인 DPPH를 이용한 Blois의 방법¹⁶을 사용하여 측정하였다. 淸肝解酒湯을 메탄올에 녹여 검액으로 준비한 후 1 ml씩 취하고 DPPH 용액 (5.92 mg/MeOH 100 ml)을 0.25 ml 넣고 실온에서 30분간 방치하였다. 이후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 free radical 소거활성능을 계산하였으며, 양성 대조군으로는 Vit. C를 사용하였다. 각 농도별로 저해율을 측정하여 ED₅₀을 계산하였다.

(2) Xanthine Oxidase I저해 활성도 측정(NBT method)

0.05 M의 sodium carbonate buffer(pH 10.5)를 1.05 ml 넣고, 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.15% bovine serum, 0.75 mM NBT를 50 µl씩 넣고 검액을 150 µl 넣은 후 10분간 실온에서 방치하였다. 6 mM의 xanthine oxidase(as start soln)를 50 µl 넣고 20분간 상온에서 반응시킨 후 6 mM의 CuCl₂로 반응을 종결시켰다. 560 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 계산하였으며, 양성 대조군으로는 Vit. C를 사용하였다. 각 농도별로 저해율을 측정하여 ED₅₀을 계산하였다.

(3) 폴리페놀 함량 측정

Folin-Ciocalteu 변법¹⁷에 따라 측정하였다. 검액 0.05 ml에 4.2 ml의 증류수를 가한 후, 0.25 ml의 Folin-Ciocalteu's phenol 시약을 넣고 8분간 교반하였다. 20% Na₂CO₃ 용액을 0.5 ml 첨가하고 vortexing 후 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid로 STD curve를 그린 후 측정된 흡광도 수치를 적용해 폴리페놀의 함량을 계산하였다.

(4) Trypsin 저해 활성도 측정

Trypsin 효소 저해활성은 Anson¹⁸과 Tsutomu¹⁹ 등의 방법에 준하였다. 즉 trypsin 20 µg/ml 및 시료를 1/15 M phosphate buffer(pH7.6)에 용해시킨 검액을 각각 40 µl와 100 µl씩 취하고 0.5% casein

용액을 0.36 ml 가한 후 37 °C에서 10분간 유지하였다. 5% trichloroacetic acid를 1 ml씩 넣어 반응을 종결시킨 후, 0.05 M HCl을 40 µl 넣은 후 3000 rpm, 4 °C에서 10분간 원심분하여 상등액을 얻었다. 각 상등액을 0.25 ml를 취한 후 증류수 0.25 ml와 혼합한 후 0.5 M NaOH를 1 ml 가했다. Phenol 희석액을 0.3 ml씩 가한 후에 37 °C 수욕 상에서 15분간 incubation하고 660 nm에서 흡광도를 측정하여 억제율을 산출하였다.

(5) Hyaluronidase 저해 활성도 측정

각 검액을 0.1 ml씩 취하고 hyaluronidase 용액 (71.8 mg/10 ml)을 0.05 ml 가한 후 잘 혼합한 다음 37 °C에서 20분간 incubation한 다음, activator로서 12.5 mM CaCl₂를 가하고 잘 혼합하여 다시 20분간 incubation한다. 기질로서 0.12% hyaluronic acid-K 용액(36 mg/30 ml)을 0.25 ml 가한 다음 다시 40분간 incubation하고, 0.4N NaOH 0.1 ml 및 potassium brate 용액(boric acid 49.44 g에 증류수 1 L를 넣어 녹인 용액에 KOH 22.4 g을 가하여 용해한 용액) 0.1 ml를 가하여 100 °C의 끓는 수욕 상에서 3분간 가열하였다. 흐르는 물에 식힌 후 발색제로서 DMAB 시약(p-dimethylaminobenzaldehyde 10 g을 빙초산: 10N HCl(7:1) 용액 100 ml에 녹인 용액을 다시 빙초산으로 10배 희석함) 3 ml를 가하여 37 °C에서 20분간 incubation한 다음 585 nm에서 흡광도를 측정하여 저해 활성을 산출하였다²⁰.

2) 세포 실험

(1) Cell Culture

세포주는 HepG2 cell에 CYP2E1 유전자를 transfection 시킨 E47세포와 vector로 쓰인 pCI-Neo vector만 들어있는 C34 세포를 이용하였다(Arthur I. Cederbaum 제공). 세포 배양은 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamine이 포함된 배지를 사용하여 5%CO₂, 37 °C 로 배양하였다. 약제 처리 시에는 2% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamine이 포함된 배지에 약제를 필요한 농도로 희석하여 처리하였다.

(2) 약제 준비 및 처리

淸肝解酒湯 118 g을 증류수로 추출하여 동결건조기를 이용하여 동결건조분말엑기스를 만든 후, 이를 세포배양액에 100 mg/ml의 농도로 녹이고 0.22 µm syringe filter를 이용하여 멸균한 다음 필요한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

(3) 세포 활성도 검사(MTT assay)

세포의 활성 유무를 확인하기 위해서 MTT assay (3-(4,5 dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay)를 이용하였다. MTT solution(2 mg of MTT in 1 ml of DMEM)을 준비한 후, 각각의 배지에 200 µl의 solution을 가한다. 이것을 45분간 37 °C로 incubating 한 후에 시료를 제거하고 100 µl N-propanol을 각각의 배지에 가하고 5-10분간 흔들어 준다. 각 배지의 solution에서 50 µl를 취한 후 96-well plate로 옮긴 후 570 nm에서 ELISA Reader로 분석하였다.

(4) 세포 증식도 검사(BrdU assay)

세포 증식도는 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III(Roche, Swiss)를 이용하여 측정하였다. 계대 배양한 세포를 96-well plate에 5000/well씩 분주하고 37 °C, 5% CO₂에서 배양하고 각 well 에 BrdU labeling solution을 첨가하여 37°C에서 3시간 배양하였다. 배양배지를 제거하고 wash medium(containing 10% FBS)으로 세포를 세척하였고 wash medium을 제거한 후 pre-cooled fixative로 25 °C에서 30분간 세포를 고정한 후 wash medium으로 세척하였다. Wash medium을 제거하고 nucleases working solution(per well)으로 30분간 37 °C(in the absence of CO₂)에서 세포를 배양한 후, nucleases working solution을 제거하고 wash medium(containing 10% serum per well)으로 세포를 세척하였다. Wash medium을 제거하고 100 µl of anti-BrdU-POD, Fab fragments, working solution으로 37 °C에서 30분간 incubation 반응시킨 antibody conjugate를 제거하고 washing buffer로 세척하였다. Washing buffer를 제거하고 peroxidase substrate를

각 well에 첨가하여 positive sample들이 녹색으로 보일 때까지 30분간 반응시킨 후 microplate reader로 405 nm에서 sample들의 흡광도를 측정하였다.

(5) 항산화 효소 활성 측정

① Superoxide dismutase(SOD) assay

Superoxide dismutase(SOD) 활성은 SOD Assay Kit(Cayman Chemical Company, USA)를 이용하여 실험하였다. SOD 활성 측정은 xanthine과 xanthine oxidase의 반응에서 생성된 superoxide anion radical이 tetrazolium salt와 반응하여 formazan dye를 형성하는 원리를 이용하였다²¹. 즉, cell scraper를 이용하여 세포를 수거한 후 1000 Xg로 4 °C에서 10분간 원심분리하고, 이렇게 얻은 pellet에 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, 70 mM sucrose 및 20 mM HEPES를 첨가하여 차가운 상태로 sonicator를 이용하여 균질화한 다음, 4 °C에서 1500 Xg로 원심분리하여 상청액을 수거하여 측정에 사용하였다. SOD의 측정은 각 well에 200 μ l의 희석된 radical detector와 10 μ l의 검액을 넣은 후 20 μ l의 xanthine oxidase를 첨가하여 반응을 개시하였다. 20분간 흔들어서 실온에서 반응시킨 후 460 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② Catalase(CAT) assay

Catalase(CAT) 활성은 CAT Assay Kit(Cayman Chemical Company, USA)를 이용하여 측정하였다. CAT 활성 측정은 메탄올이 적절한 농도의 H₂O₂ 하에서 효소와 반응하는 것을 이용한 것으로, 생성된 formaldehyde의 양은 4-amino-3-hydrozino-5-mercapto-1,2,4-triazole(Purpald)이 aldehyde와 bicyclic heterocycle을 형성하여 보라색으로 변하는 비색법으로 측정하였다²². 즉, cell scraper를 이용하여 세포를 수거한 후 1000 Xg로 4 °C에서 10분간 원심분리하고, 이렇게 얻은 pellet에 1 mM EDTA, 50 mM potassium phosphate를 함유하는 1 ml의 차가운 용액을 첨가하고 sonicator를 이용하여 균질화한 다음, 4 °C에서 1500 Xg로 원심분리하여 상청액을 수거하여 측정에 사용하였다. CAT의 측정은 각 well

에 100 μ l의 assay buffer, 30 μ l의 methanol과 함께 20 μ l의 검액을 넣은 후 20 μ l의 hydrogen peroxide를 첨가하여 반응을 개시하였다. 20분간 흔들어서 실온에서 반응시킨 후 30 μ l의 potassium hydroxide를 각 well에 첨가하여 반응을 정지시키고, 다시 30 μ l의 Purpald를 첨가한 후 실온에서 10분간 흔들어서 추가로 반응시킨 다음 10 μ l의 potassium periodate를 첨가하여 실온에서 추가로 5분간 흔들어서 반응을 정지시키고, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. In Vivo 실험

1) 실험군 및 검액 투여

실험동물은 멸균한 polycarbonate cage에 방사선 멸균한 시판 고형 사료(대한실험동물센터)와 정제된 물을 자유 공급하였으며 2주 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 본 실험을 시작하였다. 실험 기간 동안 명암주기 12시간 간격, 온도 25±2 °C, 습도 55%로 실험실 환경을 유지하였다.

본 실험에 사용한 약제의 내용 및 용량은 표1과 동일하며, 얻어진 동결건조 엑기스를 증류수에 희석하여 사용하였다.

실험동물을 (1) 정상군 (2) CCl₄ 단독 투여군 (3) CCl₄ + 淸肝解酒湯 1 g/kg (4) CCl₄ + 淸肝解酒湯 2 g/kg으로 각 6마리씩 나누어 실험을 시행하였으며 4일간 경구 투여 하였다.

2) 간조직내 malondialdehyde 함량 측정

흰쥐에 4일간 淸肝解酒湯을 경구 투여한 후 5일째에 올리브오일 96%와 CCl₄ 4% 혼합액을 1 ml/100 g의 용량으로 복강 투여하여 간독성을 유발한 후, 다음날 간을 각각 적출하여 homogenizer로 균질화하였다. 균질액을 다시 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상청액을 취해 liver homogenate로 사용하였다. Homogenate 0.5 ml을 취하여 10% SDS 0.4 ml을 가하고, 37 °C에서 30분간 incubation시킨 후에 1% H₃PO₄ 수용액 3 ml를 넣고 0.6% TBA 1ml를 가한 다음 100 °C에서 45분간 가열하

었다. 흐르는 물에 방치하여 냉각시킨 후 n-butanol 을 4 ml를 넣고 혼합한 뒤, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 정량용 검액으로 사용하였고, 535 nm에서 흡광도를 측정하였다²³.

3) 혈중 알코올 농도 측정

Mouse에게 淸肝解酒湯을 경구투여한 후, 30분 뒤에 40% 알코올을 10 ml/kg의 용량으로 경구 투여하였다. 그로부터 30분 뒤 mouse의 심장에서부터 혈액을 채취하고 헤파린이 처리된 vacuum tube 에 옮긴 뒤 4 °C, 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청내의 에탄올 함량을 호소비 색법에 입각한 NAD-ADH reagent kit를 사용하여 340 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다²⁴.

4. 통계처리

본 실험에서 얻어진 자료에 대한 실험군 간의 통계학적 유의성을 Student's t-test에 의해 검정하였으며, $p < 0.05$ 이하의 유의성만을 각 군 간의 통계

학적 차이로 보았다.

III. 결 과

1. In Vitro 실험 결과

1) 효소 활성도

(1) DPPH, Xanthine Oxidase 저해 활성도

항산화 능력을 보기 위하여 DPPH와 xanthine oxidase(XO) 저해 활성도를 측정하였다. 淸肝解酒湯 시료를 농도별로 측정하였으며, 널리 알려진 항산화제인 Vit. C를 대조군으로 사용하였다.

측정 결과, 淸肝解酒湯은 농도가 높아짐에 따라 DPPH 소거능이 증가하였으며, ED₅₀을 계산한 결과는 0.019 mg/ml로, 유의한 항산화 활성을 나타내었다(Table 2). XO 저해 활성도 역시 淸肝解酒湯의 농도가 높아짐에 따라 증가하였으며, ED₅₀을 계산한 결과는 0.537 mg/ml로 항산화 활성을 나타내었다(Table 3).

Table 2. DPPH Inhibitory Activity

CGHJT		Vit. C	
Concentration (mg/ml)	inhibitory ratio (%)	Concentration (mg/ml)	inhibitory ratio (%)
0.0005	3.1	0.0001	3.4
0.001	7.8	0.0005	6.4
0.005	13.4	0.001	10.9
0.01	32.1	0.0025	44.1
0.025	63.4	0.005	90.5
ED ₅₀ (mg/ml)	0.019	ED ₅₀ (mg/ml)	0.003

Table 3. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity

CGHJT		Vit. C	
Concentration (mg/ml)	inhibitory ratio (%)	Concentration (mg/ml)	inhibitory ratio (%)
-	-	0.0016	11.86
0.008	5.53	0.008	19.32
0.04	12.95	0.004	26.09
0.2	40.61	0.02	39.85
1	79.26	0.1	86.75
ED ₅₀ (mg/ml)	0.537	ED ₅₀ (mg/ml)	0.044

(2) 폴리페놀 함량

폴리페놀은 다양한 식물계에서 발견되는 항산화 성분이다. 본 실험에서는 清肝解酒湯 시료 농도 0.5 mg/mL, 2 mg/mL에서 폴리페놀을 측정하여 평균 함량을 구한결과 0.091 mg/mL로 측정되어 清肝解酒湯의 폴리페놀 함량은 높지 않았다.

(3) Trypsin, Hyaluronidase 저해 활성도

清肝解酒湯의 항염증 활성을 검색하고자 염증에 관여하는 효소인 trypsin과 hyaluronidase의 활성 억제도를 측정하였다. 실험 결과 清肝解酒湯은 농도가 올라감에 따라 trypsin과 hyaluronidase 활성을 억제하였으나, ED₅₀을 계산한 결과는 20.811 mg/ml, 109.89 mg/ml로 기존 연구들과 비교했을 때 큰 의미가 없는 것으로 보인다^{39,40}.

2. 세포 실험 결과

1) 세포 활성도

清肝解酒湯이 CYP2E1 transfection과 에탄올 처리에 대하여 세포 활성도에 얼마나 영향을 미치는지 확인하기 위해 MTT assay를 시행하였다. HepG2 cell에 CYP2E1 유전자를 transfection 시킨 E47세포와 vector로 쓰인 pCI-Neo vector만 들어있는 C34 세포를 이용하여, 100 mM의 에탄올만 단독 투여한 군과 농도별로 清肝解酒湯을 투여 (50, 100, 200 µg/ml)군의 24, 48시간 후 세포활성도를 MTT assay를 시행하여 관찰하였다. 에탄올 투여로 인하여 C34, E47 세포 모두 활성도가 유의하게 떨어졌으며, C34 세포에 비해 E47 세포가 에탄올 투여로 활성도가 더 감소하였는데 이는 CYP2E1의 영향으로 보인다. 清肝解酒湯은 에탄올 투여로 인한 활성도 감소를 C34, E47 세포에서 모두 유의하게 억제하는 결과를 보였다(p<0.01). C34 세포, E47 세포 모두 농도에 따른 큰 차이가 없었다(Table 4).

Table 4. Effect of CGHJT on Cell Viability (MTT Assay)

Cell	Time	Normal (media only)	Ethanol only	Ethanol + CGHJT 50	Ethanol + CGHJT 100	Ethanol + CGHJT 200
C34	24h	1.191±0.206	0.973±0.119 [†]	1.524±0.307 ^{**}	1.391±0.099 ^{**}	1.313±0.195 ^{**}
E47		1.218±0.136	0.843±0.074 ^{**††}	1.179±0.040 ^{**}	1.131±0.133 ^{**}	1.167±0.142 ^{**}
C34	48h	0.749±0.114	0.575±0.103 ^{**}	0.927±0.102 ^{**}	0.788±0.088 ^{**}	0.886±0.060 ^{**}
E47		0.931±0.133	0.697±0.071 ^{**}	0.972±0.126 ^{**}	0.935±0.117 ^{**}	0.915±0.150 ^{**}

All values are mean ± S.D. (n=6).

* : Statistically significant compared with C34 group (** : p<0.01).

† : Statistically significant compared with normal group († : p<0.05, †† : p<0.01).

‡ : Statistically significant compared with ethanol group (‡‡ : p<0.01).

2) 세포 증식도

세포 증식도를 알아보기 위하여 BrdU assay를 시행하였다. 에탄올 투여로 인하여 C34, E47(CYP2E1 transfected) 세포 증식도가 모두 유의하게 떨어졌으며, E47 세포의 경우 C34 세포보다 더욱 세포 증식도가 낮아지는 결과를 보였으며, 이는 CYP2E1의 영향으로 보인다. 清肝解酒湯은 C34세포에서는 에탄올에 의한 세포 증식도 저하를 억제하는 결과

를 보였으나, 48시간 후의 200 µg/ml 외에는 통계적으로 유의하지 않았다. 清肝解酒湯은 E47 세포에 대해 모든 농도에서 현저한 세포 증식도 저하 억제 효과를 보였다(p<0.001). 그림2는 정상군의 증식도를 100으로 하여 실험군들의 효과를 비교한 것인데, 清肝解酒湯의 투여가 에탄올에 의한 세포 증식도 저하를 억제하는 것을 명확히 보여준다 (Table 5).

Table 5. Effect of CGHJT on Cell Proliferation (BrdU Assay)

Cell	Time	Normal (media only)	Ethanol	Ethanol + CGHJT 50	Ethanol + CGHJT 100	Ethanol + CGHJT 200
C34	24h	0.433±0.083	0.346±0.037 [†]	0.376±0.054	0.373±0.019	0.366±0.046
E47		0.432±0.039	0.285±0.021 ^{**††}	0.403±0.025 ^{†††}	0.395±0.034 ^{†††}	0.413±0.044 ^{†††}
C34	48h	0.432±0.041	0.391±0.019 ^{††}	0.403±0.013	0.401±0.027	0.427±0.031 [‡]
E47		0.408±0.028	0.328±0.016 ^{**†††}	0.427±0.033 ^{†††}	0.419±0.044 ^{†††}	0.453±0.060 ^{†††}

All values are mean ± S.D. (n=6).

* : Statistically significant compared with C34 group (** : p<0.01).

† : Statistically significant compared with normal group († : p<0.05, †† : p<0.01).

‡ : Statistically significant compared with ethanol group (‡ : p<0.05, ††† : p<0.001).

3) 항산화 효소 활성

(1) SOD 활성

淸肝解酒湯의 항산화 효과를 확인하기 위해 SOD 활성을 측정하였다. SOD 활성도는 lineatized rate(LR)로 환산한 후 계산하였으며, 1 unit은 superoxide radical을 50% 제거하는 데 필요한 효소 양으로 표시하였다(U/ml). 측정결과, 에탄올 투여로 인하여 C34, E47(CYP2E1 transfected) 세포

에서 SOD 활성도가 모두 떨어졌으며, E47 세포의 경우 C34 세포보다 48시간 후 현저하게 SOD 활성도가 떨어졌다. 淸肝解酒湯은 50 µg/ml 군에서는 SOD 활성도 저해 억제 효과가 명확하지 않았고 100, 200 µg/ml 농도에서는 C34, E47 세포에서 SOD 활성 저하를 억제하는 효과를 보였으며, 200 µg/ml 농도에서 뚜렷한 활성도 저해 억제 효과를 보였다(Table 6).

Table 6. Effect of CGHJT on SOD Activity

Cell	Time	Normal (media only)	Ethanol	Ethanol + CGHJT 50	Ethanol + CGHJT 100	Ethanol + CGHJT 200
C34	24h	2.024	1.437	1.396	2.232	1.962
E47		1.953	1.423	1.403	2.024	2.183
C34	48h	4.385	3.519	3.550	4.722	5.583
E47		4.700	2.405	2.766	2.683	3.208

C34 cell is pCI-Neo vector transfected HepG2 cell. E47 cell is CYP2E1 transfected HepG2 cell.

(2) CAT 활성

淸肝解酒湯의 항산화 효과를 확인하기 위해 CAT 활성을 측정하였다. CAT 활성도 계산에서 1 unit은 25 °C에서 1분에 1.0 nmol의 formaldehyde를 형성하는데 필요한 효소 양으로 표시하였다(nmol/min/ml). 측정결과, 에탄올 투여로 인하여 C34, E47(CYP2E1 transfected) 세포에서 CAT 활

성도가 24시간 후에는 큰 변화가 없었으나, 48시간 후 현저하게 떨어졌다. 淸肝解酒湯은 48 시간 후 저해된 CAT 활성도를 회복시키는 효과를 보였으며 이는 E47 세포에서 더욱 뚜렷하였고 농도별 큰 차이는 보이지 않았다(Table 7). 그림1은 대조군의 CAT를 100으로 하여 각 실험군들의 효과를 표시한 것이다(Fig. 1).

Table 7. Effect of CGHJT on Activity

Cell	Time	Normal (media only)	Ethanol	Ethanol + CGHJT 50	Ethanol + CGHJT 100	Ethanol + CGHJT 200
C34	24h	51.063	45.16	49.275	52.695	55.027
E47		65.053	63.576	63.265	62.799	58.524
C34	48h	90.545	65.441	81.685	77.799	86.581
E47		156.142	128.162	165.391	168.189	170.365

C34 cell is pCI-Neo vector transfected HepG2 cell. E47 cell is CYP2E1 transfected HepG2 cell.

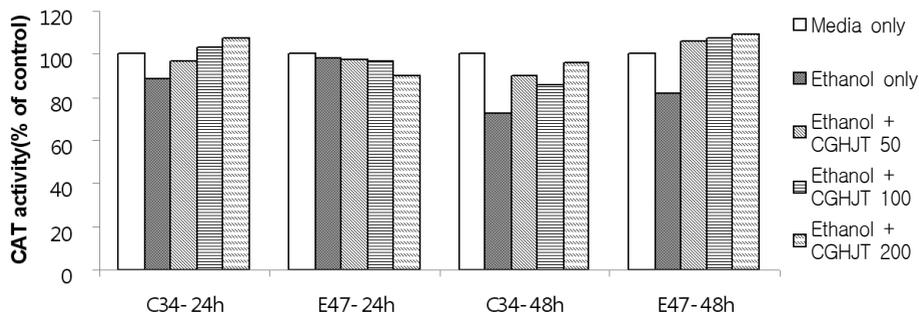


Fig. 1. Effect of CGHJT on CAT activity

C34 cell is pCI-Neo vector transfected HepG2 cell. E47 cell is CYP2E1 transfected HepG2 cell.

2. In Vivo 실험 결과

1) 간조직내 malondialdehyde 함량

清肝解酒湯이 지질과산화에 미치는 영향을 평가하기 위해, cytochrome P450 2E1 isozyme이 관련된 간 microsome의 약물대사 효소계를 통해 지질과산화를 야기하여 간세포괴사를 일으키는 것으로 알려진

CCl₄를 투여하여²⁵, 지질과산화 과정으로 생성되는 대표적인 활성 알데히드인 MDA(malondialdehyde)의 양을 측정하였다. 실험 결과 간조직에서 MDA 생성량은 control 군보다 清肝解酒湯 투여군에서 모두 유의성 있는 감소를 보였다(p<0.05)(Table 8).

Table 8. MDA concentration in CCl₄ treated mice liver

	Normal	Control (CCl ₄)	CCl ₄ + CGHJT (1g/kg)	CCl ₄ + CGHJT (2g/kg)
MDA (mM/mg protein)	0.766±0.103	1.188±0.264**	0.878±0.097†	0.823±0.128†

All values are mean ± S.D. (n=6).

* : Statistically significant compared with control group (** : p<0.01).

† : Statistically significant compared with normal group († : p<0.05).

2) 혈중 알코올 농도 변화

알코올의 산화속도와 밀접한 관계가 있는 체내 알코올 혈중 농도에²⁶ 清肝解酒湯이 어떤 영향을

끼치는지 측정하였다. 清肝解酒湯 투여군의 경우 대조군에 비하여 약 8.5%의 유의한 감소를 보였다(p<0.05)(Table 9).

Table 9. Changes of alcohol concentration in serum

	Control	CGHJT (1 g/kg)
ethanol (mg/dl)	41.41±2.77	37.88±3.47*
inhibitory effect		8.51%

All values are mean ± S.D. (n=10)

* : Statistically significant compared with control group

(* : p<0.05)

IV. 고찰

간질환은 2009년 사망원인 통계에 의하면 한국인의 10대 사망원인 중 하나이며, 간암은 폐암에 이어 2번째로 사망률이 높은 암이다. 국민건강보험과 건강보험 심사평가원의 자료에 따르면 2008년 한 해 간질환으로 진료받는 환자는 130만 명 정도로 약 4900억원의 진료비가 지출되었다¹. 이러한 의료비는 해마다 증가하는 추세인데, 그동안 B형 간염 바이러스에 대한 예방 백신 사업으로 바이러스에 의한 간질환은 점차 줄고 있으나, 알코올에 의한 간질환은 빠르게 증가하고 있고 그에 따른 진료비도 증가하고 있다. 우리나라의 경우 음주 문화 특성상, 회식자리 등에서 폭음과 과음으로 인한 고위험 음주 빈도가 높는데 이는 그만큼 알코올로 인한 간손상 문제에 심각하게 노출될 수 있음을 의미한다. 그러나 알코올 간질환에 대한 많은 연구 노력과 투자에도 불구하고 아직까지는 충분한 효과를 담보할 수 있는 치료법이나 약물이 매우 부족한 실정으로, 금주와 영양 관리의 대중 요법 외의 확실한 치료법은 없는 실정이다²⁷.

알코올성 간질환은 알코올 대사와 밀접한 관계가 있다. 간에서 대사되는 알코올의 섭취량이 증가할수록 간질환의 발생빈도도 증가한다. 섭취한 알코올은 2-10%는 직접 폐, 소변, 또는 땀으로 배설되나 대부분은 간에서 대사되며, 주로 alcohol dehydrogenase (ADH), cytochrome P450 2E1(CYP2E1) 및 catalase 3가지 효소계에 의한 산화경로를 통해 NAD⁺가 NADH로 환원되어 아세트알데히드(acetaldehyde)

로 대사된다. 급성이나 만성적인 에탄올에 대한 노출은 지질과산화의 증가, protein carbonyl 생성, 1-hydroxyethyl radical(HER) 생성, 지질 라디칼 생성, 간내 항산화제의 감소 등의 소견을 보여 산화 스트레스를 유발하며 이는 알코올 간손상의 기전에서 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{28,29}.

소량의 알코올은 ADH 효소를 통해 빠르게 산화될 수 있다. 그러나 과량의 알코올을 마시거나 습관적인 음주의 경우 ADH 만으로는 에탄올 대사가 어려워 CYP2E1과 catalase 효소가 동원된다. 습관적 음주인은 cytochrome P450 효소(특히 CYP2E1)가 정상인에 비해 5-10배 항진된 채 유지되어 상습 음주자는 CYP2E1이 알코올 대사에서 차지하는 역할이 정상인에 비하여 상대적으로 크다. 이러한 CYP2E1에 의한 대사과정은 생체 내 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)과 지질과산화 산물들을 생성하는 주원인이 된다²⁸. CYP2E1은 에탄올 외에도 사염화탄소, 아세트아미노펜, 벤젠, 할로탄과 같은 많은 독성물질들의 대사와 활성화에 관여한다. CYP2E1은 많은 양의 superoxide(O²⁻)와 hydrogen peroxide(H₂O₂)를 생성하고 철분이 존재할 때는 hydroxyl radical(OH)과 같은 강력한 산화제를 생성하여 산화스트레스를 유발한다³⁰. 에탄올 투여 후 CYP2E1을 유도하였을 때 지질과산화 증가하며, CYP2E1 억제제를 투여하였을 때 산화스트레스가 감소하고 간손상이 감소하였다는 결과는 이를 뒷받침한다³¹. 최근에는 CYP2E1이 에탄올에 의한 산화성 DNA 손상과 간암 발생에 중요하다는 보고가 있었다³².

전술한 바와 같이 알코올 간손상과 산화스트레스는 밀접한 연관성을 인정받고 있으며, 그 과정에서 CYP2E1의 역할이 주목 받고 있다. 그에 따라 항산화제 및 CYP2E1 억제제 투여를 통해 간손상을 줄이려는 연구가 계속 되고 있으며 실험적인 수준으로 확실하게 효과적일 뿐 아니라 장기간 사용에도 안심하고 사용할 수 있는 약제 개발이 요구되고 있다.

본 실험에서 사용한 清肝解酒湯은 酒傷의 대표적인 처방으로 濕痰을 제거하는 對金飲子에 清熱利濕하는 茵陳四苓散을 合方하고 解酒毒의 要藥인 葛根, 赤楊 등을 加味하여 구성된 方劑이다.

清肝解酒湯에 대한 연구로는 동물 실험을 통해, 알코올 대사 과정에서 ADH의 활성을 억제하고, 알코올에 의해 야기된 비정상적 LFT level을 호전시키는 작용이 있음이 검증되었고⁴, 임상 실험을 통해서도 알코올성 간손상 환자의 임상 증상 및 LFT level을 호전시키는 작용이 있음이 보고된 바 있다⁵. 또한 에탄올과 아세트알데히드에 의해 유발된 HepG2 cell의 감소된 세포활성과 세포증식을 증가시키고, apoptosis를 감소시키며 알코올 대사관련 유전자인 ALDH 유전자 발현에는 영향을 미치지 않으나⁶, TNF- α , IL-1 β 의 발현을 감소시키며⁷, glutathione의 생성을 촉진하여 apoptosis를 감소시키고⁸, NF- κ B의 활성화 및 inflammatory cytokine mRNA의 발현 감소를 통하여, kupffer cell에서 ethanol 및 acetaldehyde induced apoptosis를 억제시켜 간보호 효과가 있음이 확인되었다⁹. TGF- β 1 합성을 억제하고, fibroblast의 증식과 섬유화 유발 유전자 발현을 억제하는 효과가 있음도 보고된 바 있다¹⁰. 또한 CYP2E1에 의한 알코올 유발 세포활성 저하와 apoptosis를 억제하고, 알코올 간손상 관련 유전자인 TNF- α , TGF- β 1, Collagen-1 α , IL-1 β 의 발현 증가를 감소시킨다고 보고하였다¹¹. 최근에는 유전자 발현의 산물인 단백질에 대한 연구도 시행되어 清肝解酒湯이 알코올성 간손상으로 인한 섬유화 및 단백질 산화 억제 효과가 있음을 밝혔다^{12,13}.

본 연구는 清肝解酒湯이 산화 스트레스에 대해 미치는 영향을 알아보기 위하여 시행되었다. 이를 위해 우선 시험관 내에서 清肝解酒湯이 항산화, 항염증 반응에 관계된 효소 활성에 미치는 영향을 관찰하고, CYP2E1 transfected HepG2 cell을 이용하여 알코올로 인한 CYP2E1 관련 산화스트레스에 대한 작용을 항산화 효소 활성을 통해 세포 레벨

에서 확인하였으며, 동물 실험을 통해 지질과산화에 대한 효과를 관찰하고, 혈중 알코올 농도에 미치는 영향을 관찰하였다.

清肝解酒湯이 항산화 작용이 있는지 알아보기 위해 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), xanthine oxidase(XO) 효소에 대한 저해 활성도를 측정하였다. DPPH는 free radical의 일종으로 항산화물질과 반응하여 환원되어 탈색되므로 항산화능 측정에 많이 이용된다. XO는 산소를 수소 수용체로 이용하여 xanthine을 요산형으로 산화하는 반응을 촉매하여 free radical을 생성한다. 또한 xenobiotics 중 CCl₄, ethanol 및 toluene 등의 투여시 간 또는 혈액 중 XO의 활성이 증가된다고 알려져 있다³³.

실험 결과, 清肝解酒湯은 DPPH와 XO 활성도를 농도에 비례하여 억제하여 항산화 활성이 있음을 보여주었다. ED₅₀을 계산한 결과는 DPPH는 0.019 mg/ml, XO는 0.537 mg/ml 였다.

폴리페놀은 적어도 한 개 이상의 hydroxyl기가 치환되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 식물계에 널리 분포되어 있다. 폴리페놀은 전자를 수용하는 메커니즘으로 다양한 생리활성 작용을 하는 것으로 알려져 있는데 그 대표적인 것 중 하나가 항산화효과로, 많은 한약물에서도 높은 함량의 폴리페놀을 함유하고 있다는 여러 연구 보고가 있다^{34,35}. 清肝解酒湯의 항산화 활성과 폴리페놀과의 관련성을 검토하기 위해 清肝解酒湯 추출물의 폴리페놀 함량을 측정하였다. 그 결과 0.091 mg/mL의 폴리페놀을 함유하는 것으로 측정되었다. 이는 이전의 녹차(10.98 mg/g), 갈근(5.50 mg/g), 인진(6.69 mg/g) 등의 폴리페놀 함량 보고와 비교할 때 낮은 함량으로 시료 추출 방법 차이에 의해 폴리페놀의 양이 적게 측정되었을 수는 있으나^{34,35}, 본 실험에서 清肝解酒湯의 항산화 활성은 폴리페놀과는 그다지 관련이 없는 것으로 사료된다.

清肝解酒湯이 oxidative stress에 수반되는 염증 반응³⁶에 대한 영향을 알아보기 위해 염증에 관여하는 효소인 trypsin과 hyaluronidase의 활성 억제

도를 측정하였다. Trypsin은 serine protease 중 하나로 혈관 확장이나 모세혈관의 투과성 항진 등을 촉진하여 백혈구의 유주를 간접적으로 촉진하여 염증에 관여하는 chemical mediator인 kinin의 유리에 관여하는 효소로 알려져 있다³⁶. Hyaluronidase는 mucopolysaccharide-splitting enzyme의 하나로써 모세혈관 투과성에 관여하고, chemical mediator의 유리에도 관여하는 등 염증 발현과 관련이 있는 효소로, hyaluronidase 저해 활성 검색법이 천연물로부터 항염증제 개발을 위한 screening법으로도 이용되고 있다³⁸.

실험 결과, 淸肝解酒湯은 항염증 활성은 보여주지 못하였다. 淸肝解酒湯의 trypsin 저해 활성도는 ED₅₀이 20.811 mg/ml, hyaluronidase 저해 활성도는 ED₅₀이 109.89 mg/ml 이었다. 기존 보고들에서 유의성 있는 한약물의 경우 5-10 mg/ml의 농도에서 50% 이상의 trypsin 및 hyaluronidase 저해 활성도를 보여주었다는 것을 고려할 때, 이에 대한 淸肝解酒湯의 저해 활성도는 큰 의미가 없다고 사료된다^{39,40}.

알코올 간손상에서 산화 스트레스 생성에 큰 역할을 하는 CYP2E1에 대한 淸肝解酒湯의 역할을 관찰하기 위해 CYP2E1 transfected HepG2 cell을 이용하여 세포 활성과 항산화 효소 활성을 확인하였다.

MTT assay를 시행하여 淸肝解酒湯이 CYP2E1 transfection과 에탄올 처리에 대하여 세포 활성도에 미치는 영향을 관찰한 결과, CYP2E1 transfection은 에탄올 투여로 인한 세포의 활성도 저하를 증가시켰으며, 淸肝解酒湯을 이러한 활성도 저하를 모두 유의하게 억제하는 결과를 보였고(p<0.01), 농도에 따른 큰 차이는 보이지 않았다.

BrdU assay를 시행하여 淸肝解酒湯이 CYP2E1 transfection과 에탄올 처리에 대하여 세포 증식도에 미치는 영향을 관찰한 결과, 에탄올 투여로 인하여 C34, E47 세포 증식도가 모두 유의하게 떨어졌으며, CYP2E1 transfection은 이러한 증식도 저

하를 더욱 강화하였다. 淸肝解酒湯은 E47세포에서 강력한 세포 증식도 저하 억제 효과를 보였으며(p<0.001), 200 µg/ml 농도에서 가장 강한 억제 효과를 보였으나 효과가 농도와 비례하지는 않았다. 淸肝解酒湯은 C34 세포에서도 증식도 저하를 억제하는 결과를 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다.

Superoxide dismutase(SOD)는 metalloenzyme로서 함유되어 있는 Cu, Zn, Mn 및 Fe 같은 금속 이온의 종류에 따라 구분되며, superoxide anion radicals에 의해 생기는 산화적 손상에 대한 세포의 방어를 일차적으로 관여하는 항산화 효소로 알려져 있다⁴¹. 실험 결과, 淸肝解酒湯은 CYP2E1 transfection과 에탄올 처리 후 저해된 SOD 활성을 회복시키는 효과가 있었으며 이는 100 µg/ml 이상의 농도에서 관찰되었고 농도가 올라감에 따라 효과가 높아지는 경향을 보였다.

CAT는 cytochrome계를 보유하고 있는 모든 호기성 세포에 널리 분포되어 있는 효소로서 특히 간에 가장 많이 함유되어 있다. 이 효소는 과산화수소를 물과 산소로 분해시키는 역할을 담당하고 있다⁴². 실험 결과, 淸肝解酒湯은 CYP2E1 transfection과 에탄올 처리에 대한 CAT 활성도 저하를 회복시키는 효과를 보였으며, 이는 E47 세포(CYP2E1 transfected)에서 더욱 뚜렷하였고 농도별 큰 차이는 보이지 않았다.

마우스를 이용한 동물 실험을 통해 淸肝解酒湯이 지질과산화에 미치는 영향을 알아보고, 알코올 혈중 농도를 측정하였다.

마우스에 CCl₄를 투여하여 간독성을 일으킨 후, 지질과산화 과정으로 생성되는 대표적인 활성 알데히드로서, 지질과산화의 정도를 측정하는 지표가 되는 MDA(malondialdehyde)의 양을 간조직에서 확인하였다⁴³. CCl₄에 의한 간독성은 세포막을 구성하는 지질의 과산화에 의한다는 것이 정설로 받아들여지고 있는데, 이는 주로 간 microsome의 약물대사 효소계인 CYP2E1을 통해 C-Cl 결합이 떨

어져 trichloromethyl free radical이 형성되고, 이 radical이 지질이나 세포내 거대분자와 결합하여 일어나는 일련의 과정을 통하여 유발된다고 알려져 있다⁴⁴.

실험 결과 간조직에서 MDA 생성량은 control 군보다 淸肝解酒湯 투여군에서 모두 유의성 있게 낮았으며($p < 0.05$), 淸肝解酒湯의 농도에 따른 차이는 보이지 않았다.

알코올의 혈중 농도는 알코올의 산화속도와 밀접한 관계를 가지고 있으며 이러한 혈중 농도는 알코올의 약리 작용을 조절하는 중요한 인자로 보고된 바 있다⁴⁵. 실험 결과 淸肝解酒湯 투여군의 경우 대조군에 비하여 약 8% 정도의 유의한 혈중 알코올 농도 감소를 보여($p < 0.05$), 음주로 인한 체내의 알코올 대사를 촉진시키는 효과가 있음을 확인하였다.

이상에서, 淸肝解酒湯은 DPPH와 xanthine oxidase 효소 활성을 억제하였고, CYP2E1에 의한 항산화 효소(SOD, CAT) 활성 저하를 억제하는 작용이 있었으며, 지질과산화 산물인 MDA 생성을 억제하고 혈중 알코올 농도를 낮추는 효과가 있었다. 향후 청간해주탕의 항산화 효능과 관련하여 추출 방법과 농도별 차이에 따른 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

淸肝解酒湯의 항산화 작용을 알아보기 위해, DPPH, xanthine oxidase 효소와 trypsin, hyaluronidase 효소 활성도를 관찰하고, CYP2E1-transfected HepG2 cell에서 에탄올 투여 후 세포 활성도와 증식도, 항산화 효소(SOD, CAT) 활성을 관찰하였으며, 지질과산화 생성물인 MDA 함량과 혈중 알코올 농도에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 淸肝解酒湯은 DPPH와 xanthine oxidase 효소

활성을 유의하게 저해하여 항산화 작용이 확인되었다.

2. 淸肝解酒湯의 폴리페놀 함유량은 미미하여, 淸肝解酒湯의 항산화 효능과 폴리페놀과의 연관성은 없었다.

3. 淸肝解酒湯의 trypsin, hyaluronidase 저해 활성은 미미하였다.

4. 淸肝解酒湯은 에탄올 투여 후 CYP2E1에 의한 세포 활성도 및 증식도 저하를 유의하게 억제하였다.

5. 淸肝解酒湯은 에탄올 투여 후 CYP2E1에 의한 항산화 효소(SOD, CAT) 활성 저하를 억제하였다.

6. 淸肝解酒湯은 CCl₄로 유발된 지질과산화 생성물인 MDA를 유의하게 억제하였다.

7. 淸肝解酒湯은 혈중 알코올 농도를 감소시켰다.

이상에서 淸肝解酒湯은 산화스트레스에 대한 항산화 작용이 있는 것으로 관찰되었으며, 향후 淸肝解酒湯의 추출 방법과 농도별 차이에 따른 항산화 효능에 대해서는 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 통계청 홈페이지. [http://kosis.kr/gen_etl/start.jsp?orgId=350&tblId=TX_35001_A061&conn_path=I2&path=.](http://kosis.kr/gen_etl/start.jsp?orgId=350&tblId=TX_35001_A061&conn_path=I2&path=)
2. Tuma DJ, Casey CA. Dangerous by-products of alcohol breakdown-focus on adducts. *Alcohol Res Health* 2003;27:285-90.
3. Castillo T, Koop DR, Kamimura S, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol, carbon tetrachloride and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology* 1992;16:992-6.
4. 광미애, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올대

- 사 및 손상간에 미치는 영향. 대한한의학회지 2000;21(1):68-76.
5. 이장훈, 박신명, 김영철, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올성 지방간에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. 대한한의학회지 2001;22(4):107-13.
 6. 김영태, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올 대사관련 유전자 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2003;24(1):123-33.
 7. 김병삼, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 에탄올 매개성 cytokine 발현에 미치는 영향. 대한한의학회지 2003;24(1):190-201.
 8. 윤여광, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 인체간세포의 Glutathione 생성에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2004;25(1):81-91.
 9. 한창우, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 kupffer cell의 NF- κ B 활성화 및 세포사멸에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2004;25(1):59-70.
 10. 이지현, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 TGF- β 1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2005;26(1):93-106.
 11. 이지은, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 CYP2E1-transfected HepG2 cell에서 알코올유발 세포독성에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2006;27(1):27-39.
 12. 정윤중, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올성 간손상 Proteome에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2007;28(1):68-78.
 13. 전재현, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올 유발 간섬유화와 단백질 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2008;29(2):469-89.
 14. Arthur I. Cederbaum, Yong Lu, Defeng Wu. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* 2009;83:519-48.
 15. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인텍스사; 1998, p. 58, 65, 274, 286, 310, 501, 522, 536, 566, 610, 700.
 16. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;181:1199-200.
 17. Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 1981;58:966-8.
 18. Anson ML. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 1938;22:79-89.
 19. Uchiyama T, Kamikawa H, Xen-ichi O. Antiinflammatory effect of extract from Phellodendri cortex. *J Med Pharm Soc WAKAN-YAKU* 1989;6:158-64.
 20. Kim YS, Noh YK, Lee GI, Kim YK, KS, Min KR. Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. *Kor J Pharmacogn* 1995;26(3):265-72.
 21. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte(hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
 22. Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 1988;174(1):331-6.
 23. Naik SR, Panda VS. Antioxidant and hepatoprotective effects of Ginkgo biloba phytosomes in carbon tetrachloride-induced liver injury in rodents. *Liver Int* 2007;27(3):393-9.
 24. Cho MH, Shim SM, Lee SR, Mar WC, Kim GH. Effect of Evodiae fructus extracts on gene expressions related with alcohol metabolism and antioxidation in ethanol-loaded mice. *Food Chem Toxicol* 2005;43(9):1365-71.
 25. Guengerich FP, Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 1991;4:391-407.
 26. Lieber CS, Barasona E, Hernandez R, Kubota S, Sato N, Kawano S, et al. Impaired oxygen

- utilization, a new metabolism for the hepatotoxicity of ethanol in sub-human primates. *J Clin Invest* 1989;83:1682-90.
27. 알코올 간질환. 채희복. 대한소화기학회지 2009; 53:275-82.
 28. Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* 2009;83:519-48.
 29. Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M, Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* 1997;25:351-5.
 30. Kessova I, Cederbaum AI. CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003;3:509-18.
 31. Morimoto M, Hagbjork AL, Wan YJ, Fu PC, Clot P, Albano E, et al. Modulation of experimental alcohol-induced liver disease by cytochrome P450 2E1 inhibitors. *Hepatology* 1995;21:1610-7.
 32. Bradford BU, Kona H, Isayama F, Kosyk O, Wheeler MD, Akiyama TE, et al. Cytochrome P450 CYP2E1, but not nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase is required for ethanol-induced oxidative DNA damage in rodent liver. *Hepatology* 2005;41:336-44.
 33. Cassidy DA, Mcleod R, Clarke DJ. Regulation of hepatic xanthine oxidoreductase expression by treatment of rats with xenobiotic agents. *Biochem Soc Trans* 1997;25(4):S563.
 34. 김은영, 백인희, 김정현, 김성란, 유미라. 항산화 활성을 나타내는 약용식물 소재 탐색. 한국식품과학회지 2004;36(2):333-8.
 35. 문지숙, 김선재, 박윤미, 황인식, 김의형, 박정옥 등. 약용식물 추출물에 대한 항미생물 활성 검 색과 폴리페놀 함량. 한국식품저장유통학회지 2004;11(2):207-13.
 36. McCord JM. Free radicals and inflammation: protection of synorial fluid by superoxide dismutase. *Science* 1974;185:529-31.
 37. Nakagawa H, Watanabe K, Shuto K. Anti-inflammatory effect of proteinase inhibitors on carrageenin-induced inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 1983;32:1191-5.
 38. 문태철, 정광원, 정규찬, 손건호, 김현표, 강삼 식, 등. 천연물로부터 염증성 포스포리파제 A2 저해제 검색. 약학회지 1997;41(5):565-70.
 39. 박중훈, 최혁재, 정석희, 김남재, 김동현. 빈용 한약재의 진통 소염 활성. 생약학회지 2001; 32(4):257-68.
 40. 최수임, 이윤미, 허태련. 생약재 추출물의 hyaluronidase 저해 및 라디칼 소거 활성 검 색. 한국생물공학회지 2003;18(4):282-8.
 41. Korycka-Dahl M, Richardson T, Hicks C. Superoxide Dismutase Activity in Bovine Milk Serum. *J. Food Protection* 1979;42:867-71.
 42. Baudrimont I, Ahouandjivo R, Creppy EE. Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in vero cells in culture by several agents. *Chem Biol Interact* 1997;104:29-40.
 43. Dianzani MU. Lipid peroxidation in ethanol poisoning: a critical reconsideration. *Alcohol* 1985;20:161-73.
 44. Recknagel RO. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev* 1967;19:145-208.
 45. Lieber CS, Barasona E, Hernandez R, Kubota S, Sato N, Kawano S, et al. Impaired oxyzen utilization, a new metabolism for the hepatotoxicity of ethanol in sub-human primates. *J Clin Invest* 1984;83:1682-90.