

明肝補 추출물의 Acetaminophen 유도 간 손상에 대한 보호효과

김홍준¹, 목지예², 박광현³, 전인화², 김현수², 황성연^{1,4}, 장선일^{2*}

1 : 우석대학교 한의과대학 방제학교실, 2 : 전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부,
3 : 전북대학교 의학전문대학 생화학교실, 4 : 한국전통의학연구소

Protective Effect of Myeongganbo Extract on Acetaminophen-Induced Liver Injury

Hong-Jun Kim¹, Ji Ye Mok², Kwang-Hyun Park³, In Hwa Jeon², Hyeon Soo Kim²,
Sung-Yeoun Hwang^{1,4}, and Seon Il Jang^{2*}

1 : Department of Oriental Medical Prescription, Woosuk University,
2 : School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University,
3 : Department of Biochemistry, Chonbuk National University Medical School,
4 : Korea Bio Medical Science Institute

ABSTRACT

Objective : Myeongganbo (MGB) composited with *Hovenia Semen*, *Puerariae Radix* and *Dioscoreae Rhizoma* is the prescription for protection of liver function. The purpose of this study was to investigate the effects of MGB extract against acetaminophen (APAP)-induced liver injury in mice.

Methods : MGB extract was prepared by extracting with hot distilled water. The extract was freeze-dried following filtration through vacuum distillation system. Mice fasted for overnight were orally administrated with or without MGB extract of different doses (25-200 mg/kg/day). After 30 min, APAP was orally applied with a single dose (400 mg/kg). The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured in plasmas of mice. Glutathione (GSH), glutathione peroxidase GSH-px, cyclooxygenase-2 (COX-2) activity and tumor necrosis factor- α (TNF- α) level were investigated in liver homogenates. Liver sections were stained with haematoxylin & eosin, anti-TNF- α and anti-mouse COX-2 antibodies.

Results : APAP treatment remarkably increased AST and ALT activities in plasma but inhibited GSH and GSH-px levels in liver homogenates. Also, liver injury was significantly accelerated by APAP treatment. Furthermore, APAP remarkably elevated COX-2 activity and TNF- α levels in liver homogenates. However, administration of MGB extract was able to counteract these effects. Histological studies provided supportive evidence for biochemical and molecular analysis

Conclusions : These results suggest that MGB extract has potent hepatoprotective effect against APAP-induced liver injury, these properties may contribute to liver disease care.

Key words : Myeongganbo ; acetaminophen ; hepatoprotection ; cyclooxygenase-2 ; tumor necrosis factor- α

서론

간은 한의학에서나 서양의학에서나 인체의 혈액대사를 주관하고 해독기능을 담당하는 주요한 장기이다. 明肝補(myeongganbo, 이하 MGB)는 임상에서 간 보호에 효과적으로 알려진 지구자, 산약, 갈근을 중심으로 구성된 신한방조성물

이다.

지구자는 갈매나무과(Rhamnaceae) 식물인 헛개나무 *Hovenia dulcis* Thunb.의 과병을 가진 열매 또는 씨를 사용하는 것으로 性は 平하며 味는 甘酸하고 肺·胃·大腸으로 歸經하며 養陰生津·補中益氣·潤腸通便·解酒毒의 효능을 가지고 있어¹⁾ 근래 민간에서부터 사용되어 오기 시작한 약재로 간 손상이나

*교신저자 : 장선일. 전북 전주시 완산구 효자동 3가 1200, 전주대학교 대체의학대학.
· Tel : 063-220-3124. · E-mail : sonjjang@jj.ac.kr.
· 접수 : 2012년 2월 7일 · 수정 : 2012년 3월 6일 · 채택 : 2012년 3월 16일

에탄올중독에 대한 간 보호효과 등이 보고되어 있다^{2,3)}.

산약은 마과(Dioscoreaceae) 식물인 마(*Dioscorea batatas* Decne.) 또는 참마(*Dioscorea japonica* Thunb.)의 뿌리줄기(담근체)로서 그대로 또는 찌서 말린 것으로性は平하며味는甘하고脾肺腎에歸經하고補脾養胃生津益肺補腎澀精의 효능을 가지고¹⁾ 전통적으로消渴에脾胃의氣를補하며生津하는 목적으로 주로 사용하여 왔고 최근연구에 의하면 산화적 손상에 대한 항산화작용 및 항염증 작용 등이 보고되어 있다^{4,5)}.

같은 콩과(Leguminosae) 식물인 칩(*Pueraria lobata* Ohwi)의 뿌리로서 그대로 또는 주피를 제거한 것으로性は凉하고味는甘辛하며脾腎에 귀경하고解肌退熱生津透疹升陽止瀉의 효능으로東醫寶鑑에서酒傷으로 인한主藥으로 사용되어 왔으며⁶⁾ 현대적 연구에서도 알코올 대사로 인한 간 손상이나 다른 간 손상에 유의한 효과가 있는 것으로 보고되었다^{7,8)}. 그러나 이들 약물로 구성된 MGB가 급성 간 손상을 야기하는 효과에 대한 보고는 없는 실정이다.

Acetaminophen (N-acetyl-p-aminophenol, paracetamol, APAP)은 전 세계적으로 해열 및 진통에 활용되는 일반의약품으로 치료농도로 사용할 경우 비교적 안전한 약물이다. 그러나 과량의 APAP가 투입되면, 간 괴사 (liver necrosis), 신경독소 (nephrotoxicity), 간경화 (liver cirrhosis)를 유발할 뿐만 아니라 사망에 이르는 약물 부작용이 있는 것으로 잘 알려져 있다^{9,10)}. 실험동물에서 APAP의 투여 농도 중 90%는 간세포 속에 있는 glucuronic acid 또는 sulfate와 결합한 후 담즙 또는 혈장으로 방출되며, APAP의 5-10%는 P450 (CYP), 특히 CYP2E1에 의해서 대사된다⁹⁾. 이러한 APAP의 대사과정에서 발생된 N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI)과 같은 독성물은 glutathione (GSH)의 고갈을 초래함으로써 세포막을 치명적으로 손상시켜 간의 괴사를 유도하고 회복할 수 없게 하여 사망에 이르는 것으로 알려졌다¹⁰⁻¹³⁾. 특히 생체에 과량의 APAP가 투여되면, 대량의 백혈구가 유입되어 급성 염증을 유발하는 것으로 최근에 알려졌다. 즉, 염증반응을 야기하는 사이토카인으로 잘 알려진 interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1)과 IL-6와 같은 전 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)이 10시간 이내에 대량 생산되어 염증반응을 가속화시킨다^{14,15)}. 더욱이, cyclooxygenase-2(COX-2)와 prostaglandin E₂(PGE₂)와 같은 염증 매개물들이 APAP에 의해 유도되어 생체에 치명적인 손상을 야기한다¹⁶⁾. 이와 같이 APAP에 의한 간질환 환자는 약 10%에 이르고 있는데, 성인보다는 어린이에게 심각한 독성이 나타나고, 비알콜 섭취 자에 비해서 알콜 섭취 자에게서 그 독성이 심각한 것으로 보고되었다¹⁷⁾. 최근에 이러한 APAP의 독성을 제거할 수 있는 약물을 발굴하기 위해 일상적으로 우리가 섭취하고 있는 각종 식품을 비롯하여 인체에 부작용이 최소화된 한약제를 대상으로 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁸⁾.

따라서 본 연구는 인체에서 발생하는 대부분의 간질환은 염증반응과 함께 산화적 스트레스에 의해서 발생된다는 점을 감안하여, Balb/c 마우스를 대상으로 APAP에 의해 유도된 간 손상에 대한 MGB추출물의 간 보호 효과를 조사한 바 흥미로운 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

Glutathione (GSH) assay kit와 glutathione peroxidase (GSH-px) assay kit는 Calbiochem사 (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였고, COX-2 activity assay kit는 Cayman Chemicals사(Michigan, USA)로부터 구입하였다. Anti-TNF- α , anti-COX-2, anti-mouse IgG phycoerythrin, anti-mouse IgG fluorescein와 TNF- α ELISA assay kit는 R&D Systems 사(Minneapolis, USA)로부터 구입하였다. Acetaminophen (N-acetyl-p-aminophenol, paracetamol, APAP)과 기타 시약은 reagent grade급으로 Sigma-Aldrich사 (MO, USA)로부터 구입했다.

2) MGB 추출

실험에 사용한 MGB 구성 약물 등은 울산시 소재 약제상 (광명당, 대한민국)에서 구입하여 우석대한의과대학 본초방제 학교실에서 동정하였다. MGB 약물 구성은 지구자 84g, 갈근 60g, 산약 56g을 총 200 g을 정량하여 분말로 제조하고 10 배 분량의 정제수를 가하여 약탕기(대웅, Korea)에 2시간동 안 끓여 용액을 취하여 3,000 rpm으로 원심침전 시키고 상층액만 취하여 0.45 μ m 필터를 사용하여 여과한 다음 회전진 공농축기(Eyela A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축하여 시료를 회수한 후 동결건조(ILSHIN, Korea)하여 27.6 g을 회수하여 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

3) 실험동물

무균환경에서 사육된 7주령의 암컷 Balb/c계 마우스는 중앙동물실험실(서울)사로부터 구입하였다. 마우스는 1주일간 스트레스를 해소하기 위해 1주일간 낮과 밤의 주기를 12시간 씩 고정하여 사료(중앙동물실험실)와 멸균 물을 공급하면서 사육한 후 실험동물위원회의 실험 규정에 준하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) MGB 추출물의 투여

스트레스가 해소된 8주령 Balb/c계 마우스는 18시간 동안 금식시킨 후 농도별로 MGB 추출물(25-200 mg/kg)을 투여하여 30분간 방치한 다음 APAP(400 mg/kg)을 경구투여하고 3시간 동안 방치하였고, 그 후에 먹이와 물을 충분히 공급하였다. 이와 같이 APAP를 투여한 후 2일간 농도별로 MGB를 투여하면서 사망률과 생리활성 실험을 하였다. 정상 대조군은 생리식염수를 경구투여하였고, APAP 투여군은 절식된 마우에 생리식염수를 30분간 투여하고 APAP를 투여한 후 생리식염수를 MGB 투여에 사용량과 동일하게 생리식염수를 공급하였다.

2) 혈장

생리식염수를 처리한 대조군과 APAP 단독투여군 및 APAP와 MGB 추출물을 처리한 실험군의 마우스는 APAP를 투여한 후 12시간 후에 마취한 후 간 문맥으로부터 헤파린이 처리된 시린지를 이용하여 채혈한 후 3,000 rpm으로 원심 분리하고 혈장(plasma)을 얻어 -20℃에 보관하였고, ALT와 ALT 활성 측정에 사용하였다.

3) 간조직 용해물의 준비

채혈 후, 신속히 간 조직을 적출하여 얼음상자에 유지하고, 간조직의 7배가 되는 양의 냉각 완충액(0.01 M Tris-HCl, 0.0001 M EDTA-2Na, 0.01 M sucrose와 0.8% 생리식염수, pH 7.4)에 주입하여 간 조직을 마쇄한 후, 10,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액은 단백질을 정량은 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, USA)을 이용하여 제시사가 제시하는 방법에 따라 정량하였고, COX-2활성과 TNF-α 생성 측정 실험에 사용하였다.

4) AST와 ALT 측정

Alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate aminotransferase (AST)는 혈장으로부터 영동제약(경기도, 대한민국)에서 제시한 방법에 준하여 측정하였다.

5) GSH와 GSH-px 측정

준비된 간 조직 용해물을 대상으로 GSH와 GSH-px의 활성은 Calbiochem사가 제시하는 방법에 따라 측정하였다. GSH 활성은 단백질 g 당 μ mol으로 표현하였으며, GSH-px 활성은 mL당 분당 nmol로 환산하였다.

6) COX-2 activity와 TNF-α 측정

준비된 간 조직 용해물을 대상으로 COX-2 활성은 Cayman Chemicals사가 제시하는 방법에 따라 측정하였다. 간조직의 COX-2의 활성은 0.1 nM의 N,N,N',N'-tetramethyl-pphenylenediamine 이 산화되는 효소량 (nmol/min/mg protein)으로써 결정하였다.

7) 간 조직

실험 과정에 따라 대조군과 실험군을 대상으로 희생시키고, 간조직 약 5x5 mm를 적출하여 4% paraformaldehyde(pH 7.4)로 고정하고 일련의 과정을 통하여 파라핀 블록을 제작한 후, 5 μ m 간격으로 조직을 종단면으로 절편 하였다. 조직학적 검사를 위해 hematoxylin & eosin으로 염색하고 저배율(X40)에서 관찰하고 확대하면서 X200 현미경 시야에서 사진을 찍어 제시하였고, 간세포 괴사를 확인하기 위해 X400 현미경 시야에서 검정하였다(Olympus, Japan).

8) 면역화학염색

파라핀에 매몰된 피부조직을 5 μ m 간격으로 종단하여 슬라이드에 부착하고 xylene으로 파라핀을 제거한 후, 일련의 과정을 거쳐 조직표본을 준비하였다. 준비된 파라핀 조직은 1% bovine serum albumin으로 1시간동안 blocking한 후 anti-COX-2와 anti-TNF-α를 각각 1 : 100으로 희석하고 조직이 충분히 잠길 수 있도록 하여 4℃ 냉장상태에서 12시간 이상 방치하였다. 그 후 Goat anti-mouse IgG-PE와

Goat anti-mouse IgG-FITC를 1 : 500으로 희석하여 1시간 동안 실온에 방치하고, 잔여 항체를 잘 씻은 후, 커버슬립으로 봉합하여 형광현미경(Olympus, Japan)으로 검정하고 사진을 촬영하여 비교분석하였다.

9) 통계처리

모든 실험값은 평균±표준오차(mean ± SD)로 표시했으며, 통계분석은 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

결 과

1. APAP 유도 생존율과 ALT 및 AST 생성에 미치는 MGB 추출물의 영향

본 연구는 APAP 유도 간 손상에 대한 MGB 추출물의 보호 효과를 알아보기 위하여 18시간 이상 절식된 마우스에 MGB 추출물을 체중 kg 당 25-200 mg을 경구투여하고 30분 후에 APAP (400 mg/kg)를 경구투여하였다. ALT와 AST를 측정하기 위하여 12시간 후에 혈장을 얻었고, 생존율을 알아보기 위해서 APAP를 투여한 다음 3시간 후에 마우스(실험군 당 11마리)에 먹이와 물을 충분히 공급하고 MGB 추출물을 하루에 1회씩 경구투여하면서 48시간 동안 사망률을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 APAP만 투여한 대조군에서는 약 50%가 사망하였고, MGB 추출물 25 mg/kg 투여군에서는 APAP 대조군과 차이가 없었던 반면, 그 이상의 농도에서는 농도가 증가할 수록 생존율이 현저히 높았다. 특히 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서는 100% 생존하였다. MGB 추출물이 혈장의 ALT와 AST에 미치는 영향을 조사한 결과, Fig. 2에서 나타난 바와 같이 ALT와 AST가 각각 4,050±550 IU/L과 4,265±425 IU/L로 매우 높았으나, MGB 추출물 50 mg/kg 투여군(p<0.01), 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군(p<0.001)에서는 ALT와 AST가 현저히 줄어드는 효과를 보였다.

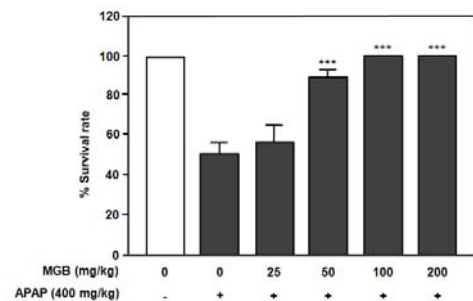


Fig. 1. Effect of Myngganbo (MGB) extract on acetaminophen (APAP)-induced mortality rate in mice. Normal control mice received only saline and APAP control mice received a single dose (400 mg/kg body weight) of APAP dissolved in saline. MGB extract (25, 50, 100 or 200 mg/kg body weight) was orally administered at 30 min before APAP administration. The accumulated survival rate was determined at 48 h later. Data represent the mean ± SD of eleven mice. *p<0.001 versus normal control group treated with saline alone. ***p<0.001 versus control group treated with AP alone.

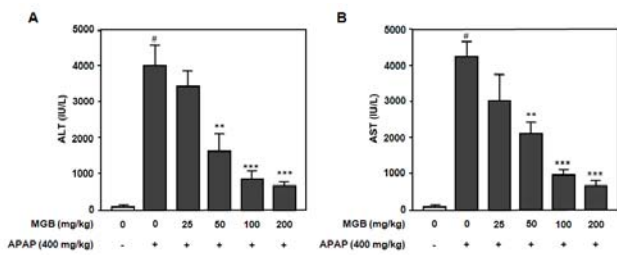


Fig. 2. Effect of Myngganbo (MGB) extract on acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicity in mice. Normal control mice received only saline and APAP control mice received a single dose (400 mg/kg body weight) of APAP dissolved in saline. MGB extract (25, 50, 100 or 200 mg/kg body weight) was orally administered at 30 min before APAP administration. Hepatotoxicity was determined at 12 h later by quantifying the plasma ALT and AST. Data represent the mean \pm SD of eleven mice. # p <0.001 versus normal control group treated with saline alone. ** p <0.01 and *** p <0.001 versus control group treated with AP alone.

2. APAP 유도 GSH와 GSH-px 활성에 미치는 MGB 추출물의 영향

또한 본 연구는 APAP 유도 간 손상에 대한 MGB 추출물의 보호 효과를 알아보기 위하여 12시간 후에 마우스 간 조직을 채취하여 용해한 다음 GSH와 GSH-px의 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 APAP을 투여한 대조군의 간 조직의 GSH와 GSH-px 함량은 각각 $5.62 \pm 0.51 \mu\text{M}$ 과 $105.2 \pm 12.5 \text{ nM}$ 로 정상 대조군에 비해서 현저히 줄어들었다(p <0.001). 그러나 50 mg/kg 이상의 MGB 추출물을 투여한 실험군은 농도 의존적으로 GSH와 GSH-px 함량이 증가하였다. 특히 MGB 추출물 100 mg/kg 투여군(p <0.01)과 200 mg/kg 투여군(p <0.001)에서는 정상 대조군과 유사할 정도로 GSH와 GSH-px 함량이 증가하였다.

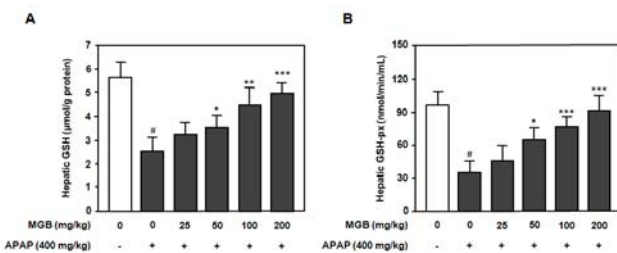


Fig. 3. Effect of Myngganbo (MGB) extract on acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicity in mice. Normal control mice received only saline and APAP control mice received a single dose (400 mg/kg body weight) of APAP dissolved in saline. MGB extract (25, 50, 100 or 200 mg/kg body weight) was orally administered at 30 min before APAP administration. Levels of hepatic GSH and GSH-px were determined at 12 h later. Data represent the mean \pm SD of eleven mice. # p <0.001 versus normal control group treated with saline alone. * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 versus control group treated with AP alone.

3. APAP 유도 간 조직의 손상에 대한 MGB 추출물의 보호효과

한편 본 연구는 APAP 유도 간 조직 손상에 대한 MGB 추출물의 보호 효과를 알아보기 위하여 18시간 이상 절식된 마우스에 MGB 추출물을 체중 kg 당 25-200 mg을 경구투여하고 30분 후에 APAP(400 mg/kg)를 경구투여한 후 12시

간 후에 간 조직을 채취하여 파라핀 조직표본을 제작한 후 H&E 염색을하여 간조직의 병변을 40배와 200배 현미경하에서 조사하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 APAP을 투여한 대조군의 간 조직의 손상은 간 조직 괴사영역이 약 80% 이상으로 염증성 백혈구 침윤이 뚜렷이 증가되어 나타났다. MGB 추출물 25 mg/kg 투여군에서는 APAP 대조군에 비해 간 조직 괴사와 백혈구 침윤이 개선되지 않았지만, MGB 추출물 50 mg/kg 투여군에서는 간 조직 괴사와 백혈구 침윤이 농도에 의존적으로 현저히 줄어들어 간 조직의 개선 효과가 뚜렷하였다. 특히 MGB 추출물 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서는 간 조직 괴사와 백혈구 침윤이 APAP 대조군에 비해서 90% 이상 개선되는 효과를 보여 정상 대조군과 유사하였다.

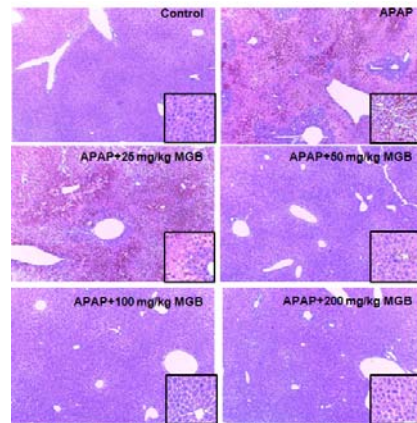


Fig. 4. Effect of Myngganbo (MGB) extract on acetaminophen (APAP)-induced hepatic injury in mice. Normal control mice received only saline and APAP control mice received a single dose (400 mg/kg body weight) of APAP dissolved in saline. MGB extract (25, 50, 100 or 200 mg/kg body weight) was orally administered at 30 min before APAP administration. Histological analysis was determined at 12 h later by H&E staining. Note narrow zone of basophilic hepatocytes and a few remaining macrophages surrounding central veins. Original magnification, 40 \times ; inset, 200 \times .

4. APAP 유도 간 조직의 COX-2와 TNF- α 의 발현에 미치는 MGB 추출물의 보호 효과

마지막으로 본 연구는 APAP가 유도하는 간 조직의 염증성 매개물의 발현 및 활성에 미치는 MGB 추출물의 효과에 대해서 알아보았다. 간 조직의 H&E 염색에서 나타난 방법과 같은 간 조직 표본은 대상으로 COX-2와 TNF- α 에 대한 발현을 조사하기 위하여 붉은 형광계통의 PE가 부착된 anti-mouse COX-2와 녹색 형광계통의 FITC가 부착된 anti-mouse TNF- α 항체를 활용하여 면역조직화학 염색을 하였고, GSH와 GSH-px 활성을 측정간 간 조직 용해물을 대상으로 COX-2 활성과 TNF- α 의 함량을 조사하였다. Fig. 5A와 Fig. 6A와 같이 정상대조군은 COX-2와 TNF- α 의 발현은 되지 않았으나, APAP 투여 대조군에서는 COX-2와 TNF- α 의 발현이 간 조직 괴사 부위에 매우 높게 발현되었다. 그러나 MGB 추출물 50 mg/kg 이상의 투여군에서는 COX-2와 TNF- α 의 발현이 현저히 억제되었다. 특히 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서는 정상 대조군과 유사할 정도로 현저히 COX-2와 TNF- α 의 발현이 억제되었다. 더불어 본 연구는 APAP가 유도하는 간 조직에서 COX-2와 TNF- α 의 활성에 미치는 MGB 추출물의 보호 효과를 알아보기 위하여 COX-2와 TNF- α 의 함량을 조사하였다. 그 결과

Fig. 5B와 Fig. 6B와 같이 정상 대조군에 비해서 APAP를 투여한 대조군의 COX-2와 TNF- α 의 활성이 현저히 증가 ($p < 0.001$)하였으나, MGB 추출물 25 mg/kg 투여군을 제외한 50 mg/kg 이상 투여군에서는 농도의존적으로 현저히 COX-2와 TNF- α 의 활성이 억제되었다.

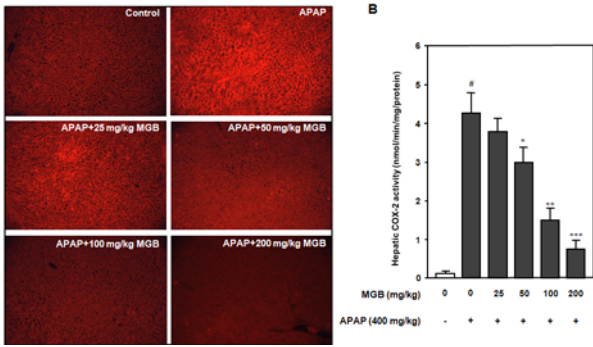


Fig. 5. Effect of Myngganbo (MGB) extract on acetaminophen (APAP)-induced COX-2 expression and activity in mice. Normal control mice received only saline and APAP control mice received a single dose (400 mg/kg body weight) of APAP dissolved in saline. MGB extract (25, 50, 100 or 200 mg/kg body weight) was orally administered at 30 min before APAP administration. (A) Immunohistological analysis was determined at 12 h later by anti-mouse COX-2 staining. (B) Hepatic COX-2 activity was determined at 12 h later by COX-2 assay. Data represent the mean \pm SD of five mice. [#] $p < 0.001$ versus normal control group treated with saline alone. ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ and ^{***} $p < 0.001$ versus control group treated with AP alone.

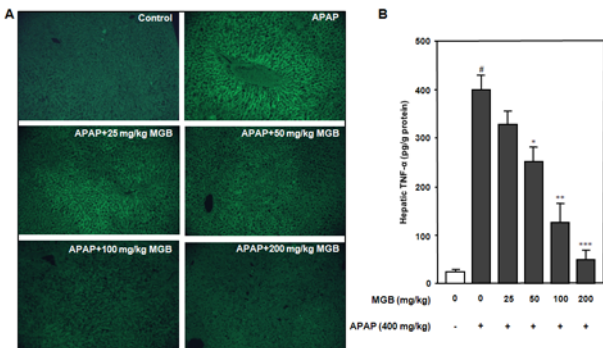


Fig. 6. Effect of Myngganbo (MGB) extract on acetaminophen (APAP)-induced TNF- α expression and activity in mice. Normal control mice received only saline and APAP control mice received a single dose (400 mg/kg body weight) of APAP dissolved in saline. MGB extract (25, 50, 100 or 200 mg/kg body weight) was orally administered at 30 min before APAP administration. (A) Immunohistological analysis was determined at 12 h later by anti-mouse TNF- α staining. (B) Hepatic TNF- α was determined at 12 h later by TNF- α ELISA assay. Data represent the mean \pm SD of five mice. [#] $p < 0.001$ versus normal control group treated with saline alone. ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ and ^{***} $p < 0.001$ versus control group treated with AP alone.

고찰

간은 한의학에서나 서양의학에서나 인체의 혈액대사를 주관하고 해독기능을 담당하는 주요한 장기로 간이 손상되면, 염증반응과 동시에 인체에 각종 질환을 야기하기 때문에 간 손상을 보호할 수 있는 약물의 개발은 대단히 중요하다. MGB는 그 동안 실험적 연구와 임상에서 간 보호에 효과적으

로 알려진 지구자, 산약, 갈근을 배합하여 구성된 신한방조성물이다.

지구자는 헛개나무의 과병을 가진 열매 또는 씨를 사용하는 것으로 養陰生津補中益氣潤腸通便解酒毒의 효능이 있고^{2,3}, 최근에는 에탄올 유도 간 조직 손상 모델동물에서 지구자 추출물을 투여한 결과 감소된 superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), 및 GSH, 등과 같은 생체 내 항산화 물질의 활성을 증가시켜 간질환을 개선시키는 보고가 있으며¹⁹, 사산화염(CCL₄) 유도 만성 간 질환 모델에서 콜라겐(collagen)의 합성을 저해시키는 지구자 추출물의 효과를 증명한 바 있다²⁰. 산약은 마 또는 참마의 뿌리 줄기로서 그대로 또는 썬서 말린 것으로 補脾養胃生津益肺補腎澀精의 효능과 함께 산화적 손상에 대한 항산화 및 항염증 작용이 있어¹ 전통적으로 消渴에 脾胃의 氣를 補하며 生津하는 목적으로 사용되어 왔다. 또한 갈근은 칩의 뿌리로서 그대로 또는 주피를 제거한 것으로 解肌退熱生津透疹升陽止瀉의 효능으로 東醫寶鑑에서 酒傷으로 인한 主藥으로 사용되어 왔다⁶. 이들 한약재는 현대적 연구에서도 알코올 대사로 인한 간 손상이나 다른 간 손상에 유의한 효과가 있는 것으로 보고되었다²⁻⁸. 그러나 이들 각각의 약물뿐만 아니라 본 연구와 같이 지구자, 산약 및 갈근으로 구성된 조성물에 대한 APAP 유도 급성 간질환 개선에 대한 연구는 없는 실정이다. 따라서 간 질환을 개선시킬 수 있는 새로운 조성물에 대한 연구가 이루어져야 할 필요성이 있다.

생체에 과량의 APAP가 투여되면 간 조직이 괴사되면서 세포내 ALT와 AST가 유리되어 혈청으로 유입되면서 혈청의 ALT와 AST 증가되어 24-96시간에 사망하게 된다⁹⁻¹¹. 이러한 특성은 혈액의 응고덩어리가 형성될 때까지 걸리는 시간 즉, prothrombin time (PT) 뿐만 아니라 transaminases와 bilirubin의 농도가 증가하고 간 조직의 괴사가 진행 된다²¹. 이때 간 독성의 지표로 잘 알려진 AST와 ALT가 증가하고 이는 혈청내로 유입되는데, APAP에 의한 간 독성 기전은 P450 cytochrome C에 의존적이라 알려졌다^{10,11}.

본 연구에서 우리는 APAP 투여에 따른 MGB 추출물이 간 독성에 대한 보호효과와 사망률을 억제하는지 알아보았다. 그 결과 APAP만 투여한 대조군의 사망률에 비해 MGB 추출물을 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서는 모두 생존하는 효과를 보였다. 또한 혈장내 AST와 ALT의 경우 경우 APAP만 투여한 대조군에 비해서 현저히 증가한 반면, MGB 추출물을 투여한 실험군에서는 농도에 의존적으로 감소하였다, 이러한 결과는 MGB 추출물의 투여는 APAP에 의해 손상된 간 조직을 복원할 수 있다는 근거를 제시해 주었다.

또한 APAP가 생체에 투여되면, 이 약물이 대사되면서 활성산소의 생성이 대량 생산되면서 생체의 항산화 물질 및 효소를 고갈시킨다⁹⁻¹¹. 본 연구는 APAP와 MGB 추출물을 투여한 마우스 생체 내 항산화 작용을 알아보기 위해서 GSH와 GSH-px 등의 활성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 APAP를 투여한 대조군은 정상 대조군에 비해 GSH와 GSH-px가 각각 약 57%와 65%가 고갈된 반면, MGB 추출액을 투여한 실험군은 농도가 증가할수록 GSH와 GSH-px의 함량이 증가되었다. 특히 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군은 GSH와 GSH-px의 양이 현저히 증가되어 정상대조군과 유사하였다. 생체에서 APAP의 투여 농도 중 90%는 간세포 속에 있는 glucuronic acid 또는 sulfate와 결합한 후 담즙도는 혈장으로 방출되고, APAP의 5-10%는 P450 (CYP), 특히 CYP2E1에 의해서 대사 된다^{10,11}. 이러한 APAP의 대

사과정에서 발생된 NAPQI와 같은 독성물은 GSH의 고갈을 초래함으로써 세포막을 치명적으로 손상시켜 간의 괴사를 유도하고 회복할 수 없게 하여 사망에 이르는 것으로 알려졌다^{21,22)}. 또한 goldthioglucose에 의한 GSH-px의 억제는 간세포에 민감하게 작용하여 APAP에 의해 유발된 간독성을 억제하지 못하는 것으로 알려졌다²¹⁾. 이와 같이 APAP로부터 간을 보호하기 위해서는 고갈된 생체내의 항산화 물질인 GSH와 항산화 효소인 GSH-px의 향상을 유도할 수 있는 약물이 필요하다.

한편 과량의 APAP가 생체에 투여되면, 대량의 백혈구가 유입되어 급성 염증을 유발하는데, 이때 염증반응을 야기하는 사이토카인으로 잘 알려진 TNF- α 를 비롯한 IFN- γ , IL-1과 IL-6와 같은 proinflammatory cytokines이 10시간 이내에 대량 생산되어 염증반응을 가속화 시킨다^{14,15)}. 더욱이, COX-2와 PGE₂와 같은 염증 매개체들이 APAP에 의해 유도되어 간 조직의 괴사를 더욱 가속시키는 것으로 알려졌다¹⁶⁾. 본 연구에서 APAP를 투여한 대조군은 간 조직의 괴사가 대량 발생하였고, 정맥 주위에 염증을 야기하는 백혈구의 침윤이 현저하였을 뿐만 아니라 TNF- α 와 COX와 같은 염증 매개체가 현저히 발현되었다(Fig. 4-6). 그러나 MGB 추출물을 투여한 실험군은 농도에 의존적으로 간 조직의 괴사와 염증성 백혈구의 침윤이 현저히 줄어들었음을 뿐만 아니라 TNF- α 와 COX-2의 발현이 억제되었다. 특히 본 연구에서 MGB 추출물 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군은 정상 대조군과 유사하게 COX-2와 TNF- α 의 발현을 억제함으로써 이들 염증매개체의 활성화와 생성을 현저히 억제시킨다는 사실을 증명하였다(Fig. 5와 6).

일반적으로 약용식물 유래 flavonoid 계열의 물질은 항산화 및 항염증 활성이 있는 것으로 알려졌다^{18,22,23)}. 본 연구에서 사용된 MGB 구성 약물의 경우에서도 지쿠자는 quercetin을 비롯한 flavonoid 계열의 물질이 풍부하여 간 보호에 효과가 있고^{24,25)}, 산약의 6-hydroxy-2,7-dimethoxy-1,4-henanthraquinone 성분은 PGE₂와 leukotrine C4을 억제하는 항염효과²⁶⁾와 갈근의 isoflavone glycoside인 tectoridin은 알콜 유도 급성 간염을 요과적으로 개선하는 것으로 알려져 있는데²⁷⁾, 본 연구에서 APAP가 유도하는 간 손상에 대한 MGB 추출물의 보호 작용은 항산화 성분뿐만 아니라 항염증 작용을 통하여 간 보호에 효과가 있다는 것이라 추정 된다. 그러나 MGB가 APAP로 유발된 간 손상의 보호에 대한 분자 기전은 앞으로 더 조사해야 확실해질 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해볼 때 MGB 추출물은 APAP에 의해 증가된 ALT와 AST를 효과적으로 억제하였으며, APAP에 의해 고갈된 생체의 항산화 물질과 효소로 알려진 GSH와 GSH-px을 증가시킴으로써 간 보호효과가 있었다. 특히 APAP에 의해 유도된 염증 매개체인 과량의 COX-2와 TNF- α 의 활성화와 생성에 대한 MGB 추출물의 억제효과는 이들 분자의 발현을 억제함으로써 이루어짐을 확인할 수 있었다. 따라서 APAP과 같은 약물에 의한 간 손상으로부터 MGB는 간 기능 보호 작용에 활용할 수 있는 좋은 처방이라 사료된다.

결론

MGB는 지쿠자, 갈근, 산약으로 구성된 간 보호 조성물로

본 연구에 사용하였다. 본 연구의 목적은 APAP가 유도하는 간 손상에 대한 MGB 추출물의 보호 효과를 조사하였다. 그 결과 APAP를 투여한 대조군은 간 조직 손상 지표 효소인 ALT와 AST가 현저히 증가되었고, 생체의 항산화 물질 및 효소로 알려진 GSH와 GSH-px가 현저히 고갈되었으며, COX-2와 TNF- α 와 같은 염증 매개체가 대량 생산되었다. 그러나 MGB 추출물을 투여한 실험군은 농도에 의존적으로 APAP에 의해 증가된 ALT와 AST를 현저히 억제시켰으며, APAP에 의해 고갈된 GSH와 GSH-px의 생성을 증가시켰을 뿐만 아니라 APAP에 의해 대량 생산된 COX-2와 TNF- α 를 현저히 억제시키는 효과가 있었다. 특히 MGB 추출물 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군은 APAP에 의해 유된 간 손상 보호효과가 정상대조군과 유사한 효과를 나타내었다. 따라서 이러한 결과는 APAP가 유도하는 간 손상에 대한 MGB 추출물의 간 보호효과를 제시해 주었으며, MGB는 간 질환 케어에 유용한 물질로 활용될 가능성이 있는 처방이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2012학년도 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine schools. Herbology[Boncho-hak]. Seoul : Young-Lim Press, 2007 : 184, 580, 734.
2. Dae-Hwan Youn, Jong-Gil Jeong, Chang-Su Na, Effects of Propolis oral administration according to mixture with Hovenia dulcis Thunb. and Artemisia capillaris Thunb. on D-galactosamine-induced liver injury in rats. The Korea journal of herbology, 2006 ; 21 : 7-19.
3. Jong Ho Kim, Young Min Seo, Ju Hyun Kim, Sun Hee Hyun, Sang Lee, Chun Hwa Kim, Mi Jeong Kang, Tae Won Jeon, Soo Hong Yoon, Tae Cheon Jeong. Protective Effects of the Water Extracts of Hovenia dulcis Thunb Against Ethanol-Induced Toxicity in Primary Cultured Rat Hepatocytes. Yakhak Hoeji, 2008 ; 52 : 56-61.
4. Jeong-Min Yang, Yung-Joon Jun, Ju-Young Nam, Mi-Young Son, Jung-Suk Sung, Dong-Il Kim, The Cell Protective Effects of Dioscoreae Rhizoma by Antioxidant Activities on HeLa Cells. The Journal of oriental obstetrics & gynecology, 2008 ; 21 : 97-107.
5. Ga-young Choi, Byoung-woo Kim, Experimental Study on the Antioxidant and Antimicrobial Properties of Dioscoreae Rhizoma. Journal of korean oriental internal medicine, 2010 ; 31 : 290-7.
6. Kyung-Hye Jeon, Yoon-Bum Kook, Literature on Applications of Prescriptions Including Pueraria

- Thunbergiana Bentham in Dongueibogam, The Korean journal of oriental medical prescription, 2009 ; 17 : 29-43.
7. Dong Hwan Hyun, Sun Yeong Jung, Sang Shin Jung, Ki Tae Ha, Cheol Ho Kim, Dong Wook Kim, June Ki Kim, Dall Yeong Choi, The Study of Protective Effect of Puerariae Radix against CCl₄-induced Hepatotoxicity, Korean journal of oriental physiology & pathology, 2003 ; 17 : 297-307.
 8. Heyong-Gyoo Park, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo, The Effects of Some Oriental Herbs Which Have Been Used in the Treatment of Alcoholic Diseases on Alcoholic Metabolism and Alcoholic Liver Damages, Journal of Korean oriental medical society, 2000 ; 21 : 186-98.
 9. Ray SD, Mumaw VR, Raje RR, Fariss MW, Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinole pretreatment, J Pharmacol Exp Ther, 1996 ; 279 : 1470-83.
 10. Webster PA, Roberts DW, Benson RW, Kearns GL, Acetaminophen toxicity in children : diagnostic confirmation using a specific antigenic biomarker, J Clin Pharmacol, 1996 ; 36 : 397-402.
 11. Albano E, Rundgren M, Harvison PJ, Nelson SD, Moldeus P, Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone-imine cytotoxicity, Mol Pharmacology, 1985 ; 28 : 306-11.
 12. Kyle ME, Miccadei S, Nakae D, Farber JL, Superoxide dismutase and catalase protect cultured hepatocytes from the cytotoxicity of acetaminophen, Biochem Biophys Res Commun, 1987 ; 149 : 889-94.
 13. Mahadevan SB, McKiernan PJ, Davies P, Kelly DA, Paracetamol induced hepatotoxicity, Arch Dis Child, 2006 ; 91 : 598-603.
 14. Ishida Y, Kondo T, Tsuneyama K, Lu P, Takayasu T, Mukaida N, The pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55 in acetaminophen-induced liver injury in mice, J Leukoc Biol, 2004 ; 75 : 59-67.
 15. Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Steinhauser ML, Matsukawa A, Gosling J, Boring L, Charo IF, Simpson KJ, Lukacs NW, Kunkel SL, Exaggerated hepatic injury due to acetaminophen challenge in mice lacking C-C chemokine receptor 2, Am J Pathol, 2000 ; 156 : 1245-52.
 16. Bhave VS, Donthamsetty S, Latendresse JR, Cunningham ML, Mehendale HM, Secretory phospholipase A₂-mediated progression of hepatotoxicity initiated by acetaminophen is exacerbated in the absence of hepatic COX-2, Toxicol Appl Pharmacol, 2011 ; 251 : 173-80.
 17. Prescott LF, Paracetamol, alcohol and the liver, Br J Clin Pharmacol, 2000 ; 49 : 291-301.
 18. Burnett BP, Bitto A, Altavilla D, Squadrito F, Levy RM, Pillai L, Flavocoxid inhibits phospholipase A₂, peroxidase moieties of the cyclooxygenases (COX), and 5-lipoxygenase, modifies COX-2 gene expression, and acts as an antioxidant, Mediators Inflamm, 2011 ; 2011 : 385780.
 19. Du J, He D, Sun LN, Han T, Zhang H, Qin LP, Rahman K, Semen Hoveniae extract protects against acute alcohol-induced liver injury in mice, Pharm Biol, 2010 ; 48 : 953-958.
 20. Fang HL, Lin HY, Chan MC, Lin WL, Lin WC, Treatment of chronic liver injuries in mice by oral administration of ethanolic extract of the fruit of Hovenia dulcis, Am J Chin Med, 2007 ; 35 : 693-703.
 21. Hinson JA, Pohl LR, Monks TJ, Gillele JR, Guengerich FP, 3-Hydroxyacetaminophen, A microsomal metabolites of acetaminophen, Evidence against an epoxide as the reactive metabolite of acetaminophen, Drug Metab Dispos, 1980 ; 8 : 289-94.
 22. Rajesh B, Parames CS, The protein fraction of *Phyllanthus niruri* plays a protective role against acetaminophen induced hepatic disorder via its antioxidant properties, Phytother Res, 2006 ; 120 : 595-601.
 23. Adamson GM, Harman AW, A role for the glutathione peroxidase/reductase enzyme system in the protection from paracetamol toxicity in isolated mouse hepatocytes, Biochem Pharmacol, 1989 ; 38 : 3323-30.
 24. Ding LS, Liang QL, Teng YF, Study on flavonoids in seeds of *Hovenia dulcis*, Yao Xue Xue Bao, 1997 ; 32 : 600-602.
 25. Hase K, Ohsugi M, Xiong Q, Basnet P, Kadota S, Namba T, Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* THUNB, on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide, Biol Pharm Bull, 1997 ; 20 : 381-385.
 26. Jin M, Lu Y, Yang JH, Jo TH, Park YI, Lee CK, Park SJ, Son KH, Chang HW, Anti-inflammatory activity of 6-hydroxy-2,7-dimethoxy-1,4-henantraquinone from tuberous roots of yam (*Dioscorea batatas*) through inhibition of prostaglandin D₂ and leukotriene C₄ production in mouse bone marrow-derived mast cells, Arch Pharm Res, 2011 ; 34 : 1495-1501.
 27. Xiong Y, Yang Y, Yang J, Chai H, Li Y, Yang J, Jia Z, Wang Z, Tectoridin, an isoflavone glycoside from the flower of *Pueraria lobata*, prevents acute ethanol-induced liver steatosis in mice, Toxicology, 2010 ; 276 : 64-72.