

알코올성 간 손상 동물 모델에서 芍藥 葛根 복합물의 간 손상 보호 효과

최정원^{1#}, 김진영^{1#}, 신미래¹, 박해진^{2*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 대구한의대학교 DHU 바이오융복합시험센터

Protective effects of Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix combination on alcoholic liver disease

Jeong Won Choi^{1#}, Jin Young Kim^{1#}, Mi-Rae Shin¹, Hae-Jin Park^{2*}

1 : Department of Herbology, Korean Medicine of College, Daegu Haany University, 136, Shinchendong-ro, Suseong-gu, Deagu 42158, Republic of Korea

2 : DHU Bio Convergence Testing Center, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea

ABSTRACT

Objective : Alcoholic liver disease (ALD) is caused by excess alcohol intake. In the liver, alcohol breakdown results formation of toxic byproducts that lead to damage to tissue. This study is to investigate the therapeutic effects of Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix combination (PP) on ALD.

Methods : PP was analyzed for polyphenolic compounds and free radical scavenging activity. ALD mouse model was induced by feeding ethanol and water (Control), silymarin (50 mg/kg), low-dose (PP: 100 mg/kg) or high-dose (PP: 200 mg/kg) was orally administrated to ALD mice for 14 days. The serum was assessed with levels of AST, ALT, total bilirubin, total cholesterol, and triglyceride. Liver tissues were evaluated for ROS levels, degree of liver damage and protein expression.

Results : The 3:1 (Paeoniae Radix Alba:Puerariae Radix) ratio showed the best antioxidant values for the experiment. In ALD model, levels of AST, ALT, total bilirubin, total cholesterol, and triglyceride were significantly increased in the Control and the levels were decreased by treatment of PP. In addition, increased ROS, ONOO⁻ and MDA levels in the Control were reduced in the PP groups. Western blot analysis figured out that proteins related to ROS and cholesterol metabolism were higher in ALD than in PP-treated ALD. Antioxidant enzyme expression was low in the control group and increased by PP treatment.

Conclusion : Our results suggest that PP has the potential to be a medicine in ALD in terms of regulating oxidative stress and adjusting lipid metabolism.

Key words : Alcoholic liver disease, cholesterol, oxidative stress, Paeoniae Radix Alba, Puerariae Radix, triglycerid

*Corresponding author : Hae-Jin Park, DHU Bio Convergence Testing Center, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-7870 · Fax : +82-53-819-1496 · E-mail : hjpark@dhu.ac.kr

#First author : Jeong Won Choi, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : purpne@nate.com

Jin Young Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : jinyoung99@gmail.com

· Received : 15 December 2022 · Revised : 13 January 2023 · Accepted : 25 January 2023

I. 서론

우리나라 통계청 자료에 따르면 2021년 간질환 관련 사망 자수는 7,129명으로 전체 사망률의 13.9%를 차지하며, 그 중 알코올성 간질환 사망자가 3,824명으로 전체 간질환 사망률의 53.6%를 차지한다. 또한 한국인 간경변증의 발병 이유로 hepatitis B virus가 64.9%이며, 음주가 18.6%로 두 번째 원인으로 나타났다¹⁾. 이러한 결과는 알코올이 국민 보건에 크게 영향을 미치고 있는 것을 시사한다. 과도한 알코올의 섭취는 뇌, 심장, 췌장 등 신체의 여러 기관에 손상을 야기할 수 있다. 그 중에서도 알코올 소화 과정에서 발생하는 독성 물질은 간의 심각한 손상을 유발하며, 이 독성 물질의 축적은 지방간 (fatty liver disease), 알코올성 간염 (alcoholic hepatitis), 간경변증 (liver cirrhosis)으로 진행될 수 있는 알코올성 간질환 (alcoholic liver disease)의 원인이 된다. 체내에 흡수된 알코올은 혈류를 타고 간으로 이동한 후 alcohol dehydrogenase에 의해 acetaldehyde로 바뀐 뒤 aldehyde dehydrogenase에 의해 acetate로 대사가 되는 과정을 거친다. 이 과정에서 활성 산소 (reactive oxygen species, ROS)가 생성되는데 과도한 알코올 섭취로 인하여 과잉 생성된 ROS가 제거되지 못할 경우 세포 내 축적된 ROS로 인하여 세포 손상이 일어나거나, acetic acid가 TCA cycle로 산화되지 못하고 지방을 합성하는 대사 경로를 통해 지방간을 유도하게 된다²⁾. 이렇게 알코올로 야기된 간질환을 치료하기 위해서 스테로이드, pentoxifylline 투여 혹은 간이식을 적용하고 있으나, 이러한 치료법은 중증 이상의 알코올성 간질환에 적용가능한 방법이다. 반면, 아직까지 초기 간질환 환자의 장기간 치료와 중증으로 진행을 막기 위한 예방적 치료제는 알려진 바가 없다. 따라서 간질환 치료에 부작용이 적고 인체에 부담을 적게 주는 생약 재료의 개발의 필요성이 대두되고 있다.

芍藥 (*Paeonia lactiflora* Pallas)은 작약과 (Paeoniaceae)의 여러해살이 초본 식물로 뿌리를 약재로 사용한다.芍藥의 뿌리로부터 분리된 생리활성물질은 paeoniflorin, albiflorin, paeonol, paeonin tannin, β -sitosterol, triterpenoids 등의 성분이 있으며, 한의학에서는 진정, 진통, 진경 작용 및 해열, 이노 등의 처치에 널리 사용되고 있다. 특히芍藥의 대표 성분인 paeoniflorin은 탁월한 항산화 효과를 가지며³⁾, 항염^{4,5)}과 면역조절에 유효한 성분임이 입증되었다^{6, 7)}. 또한 albiflorin의 경우 경련 억제 효과가 있다고 보고되었다⁸⁾.

葛根 (*Pueraria lobata* Ohwi)은 콩과 (Leguminosae)에 속하는 칩의 뿌리를 지칭하는 약재로, 한의약 원료 중 가장 많이 사용되는 재료 중 하나이다.葛根은 혈압의 저하 및 혈소판 응집 억제 작용이 있다고 보고되어 고혈압, 협심증, 당뇨병의 병증의 개선 효과를 기대할 수 있다⁹⁾. 또한葛根의 주요 성분 중 isoflavonoid 계열의 daizin¹⁰⁾은 aldehyde dehydrogenase와 γ alcohol dehydrogenase를 선택적으로 억제하고 알코올 흡수를 방해함으로써 알코올 소비 및 알코올성 간 손상을 감소시켜 줄 수 있다는 보고가 있다^{11, 12)}.

따라서 본 연구에서는 염증 조절 능력과 항산화 효과가 뛰어난芍藥과 추정 담양의 치료에 널리 사용하고 있는葛根을 알코올성 간 손상 동물 모델에 복합 투여한 후 알코올성 간 손상에芍藥 葛根 복합물이 미치는 영향을 확인 하였다. 이를

위하여 간 손상 인자와 항산화 관련 인자, 관련 단백질 그리고 지방 대사 관련 요인들을 분석하였으며 본 결과를 통하여芍藥 葛根 복합물의 알코올성 간 손상 치료에 적용 가능성을 제시하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

芍藥과葛根은 용기한약국 (Daegu, Korea)에서 구매 후 200 g을 증류수 2000 mL 첨가한 후 각각 2시간동안 가열 추출하였다. 추출물은 여과 과정을 거친 뒤 감압농축기 (Buchi B-480, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)로 농축한 후, 동결 건조시켰다. 건조된 파우더는 실험 전까지 -80°C에서 보관하였으며, 사용 직전芍藥과葛根을 증류수에 녹여 적량의 비율로 섞어 사용하였다 (芍藥 수율: 11.88%, 葛根 수율: 18.82%).

2) 시약

본 실험에 사용한 Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, aluminium chloride, potassium acetate, quercetin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), potassium persulfate, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, 그리고 L-ascorbic acid은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 그리고 sodium carbonate는 DAEJUNG (Gyeonggi, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 1차 항체 gp91^{phox} (NOX2), p47^{phox}, Rac 1/2/3, SOD-1, Catalase, GPx-1/2, SREBP-1, SREBP-2, HMGCR, PPAR α , FAS, SCD-1, β -Actin 그리고 Lamin B1은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)로부터 구입하였으며, 이에 상응하는 2차 항체는 모두 GeneTex, Inc. (Irvine, CA, USA)에서 구입하였다. Protease inhibitor mixture와 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) 제품을 사용하였고 nitrocellulose membranes와 enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection reagents는 GE Healthcare (Arlington Height, IL, USA) 제품을 사용하였으며, BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) 제품을 사용하였다.

3) 실험동물

6주령 수컷 C57BL/6 mice (Daehan Biolink, Chungbuk, Korea)는 일주일간 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 동물의 사육은 조단백질 18% 이상, 조지방 5.0% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 1.0% 이상, 인 0.85% 이상, 칼륨 0.55% 이상, 나트륨 0.25% 이상, 마그네슘 0.15%

이상이 함유된 일반 사료 (NIH-41, Zeigler Bros, Inc., Gardners, PA, USA)를 충분한 물과 함께 제공하였으며, 22±2℃, 습도 50±5%, 12시간 명암주기 (light: dark cycle)의 환경에서 실시하였다. 동물 실험의 관리는 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 관리하에 승인 (승인번호: DHU2022-109)을 받아 진행하였다.

2. 방법

1) 총 polyphenol과 총 flavonoid 함량 정량

총 polyphenol 함량은 Folin-Ciocalteu's 방법¹³⁾을 통해 측정하였다. 芍藥 葛根 복합물 100 µL에 10%의 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 µL와 7.5%의 sodium carbonate 400 µL를 혼합한 후 실온에서 30분 차광 반응 시켰다. 그 후 765 nm에서 microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Switzerland)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선은 표준물질 gallic acid로 산출하였으며, 건물량 기준 총 polyphenol 함량 (mg gallic acid equivalent (GAE)/g)을 도출하였다.

총 flavonoid 함량은 aluminum chloride colorimetric 방법¹⁴⁾을 통해 측정하였다. 芍藥 葛根 복합물 100 µL는 methanol 300 µL, 10% aluminium chloride 20 µL, 1M potassium acetate 20 µL 및 증류수 560 µL와 혼합한 후 실온에서 30분 차광 반응 시켰다. 그 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질인 quercetin으로 산출된 표준 검량 선에 따라 건물량 기준 총 flavonoid 함량 (mg quercetin equivalent (QE)/g)을 도출하였다.

2) DPPH와 ABTS 자유 라디칼 소거 활성 측정

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 자유 라디칼 소거 활성은 Blois의 방법¹⁵⁾에 준하여 측정하였다. 농도별로 희석한 芍藥 葛根 복합물 100 µL를 100 µL의 60 µM DPPH 용액과 혼합한 후 실온에서 30분 차광 반응 시켰다. 이 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, IC₅₀값을 최종 산출하였다. 대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) 라디칼 소거 활성은 Re의 방법¹⁶⁾을 통해 측정하였다. ABTS⁺ 생성을 유도하기 위하여 7 mL ABTS 1 mL과 2.4 mM potassium persulfate 1 mL을 증류수 8 mL과 혼합하여 실온에서 16시간 이상 차광 보관하였으며, 사용 직전 30℃, 415 nm의 파장에서 0.70±0.02의 흡광도 값이 되도록 ethanol에 희석하였다. 농도별로 희석한 芍藥 葛根 복합물 5 µL를 ethanol에 희석한 ABTS 용액 95 µL와 혼합한 후 실온에서 15분 차광 반응 하였으며, 30℃, 415 nm에서 흡광도 측정 후 IC₅₀값을 최종 산출하였다. 대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{DPPH와 ABTS 자유 라디칼 소거 활성 (\%)} \\ = \{1 - (\text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{blank}})\} \times 100$$

3) 알코올성 간 손상 유발 및 처치

실험동물은 각 7마리씩 정상군 (Normal), 알코올성 간 손상을 유발 대조군 (Control), 간 손상 유발 및 실리마린 50 mg/kg 투여군 (Silymarin), 간 손상 유발 및 芍藥 葛根 복합물 100 mg/kg 투여군 (PPL), 간 손상 유발 및 芍藥 葛根 복합물 200 mg/kg 투여군 (PPH)으로 무작위로 분류하였다. 알코올성 간 손상은 45% ethanol을 1일 1회 5 g/kg body weight로 14일 동안 경구 투여함으로써 유발하였다. 알코올 투여 1시간 전 농도별 芍藥 葛根 복합물, 실리마린 또는 동량의 생리식염수를 경구 투여하였다. 실험 종료 후 모든 동물은 흡입 마취 후 혈액과 간 조직을 채취하였고, 채취한 혈액은 원심분리 (4,000 rpm, 10분)를 통하여 혈청을 분리한 후 간 조직과 함께 -80℃에서 보관하였다.

4) 혈액 내 AST, ALT 및 총 빌리루빈 측정

Aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)의 정량은 assay kit (Asanpharm, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였고, 총 빌리루빈 (total bilirubin)은 bilirubin assay kit (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정하였다.

5) 산화 스트레스 바이오 마커 측정

조직 내 산화 스트레스 정도를 확인하기 위하여 ROS와 peroxynitrite (ONOO⁻)의 수치를 분석하였다. ROS의 수치는 Ali의 방법¹⁷⁾에 따라 조직 10 µL, 50 mM phosphate buffer 190 µL와 1.25 µM 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA) 50 µL를 혼합한 후, emission 파장 535 nm와 excitation 파장 480 nm에서 형광값을 30분간 5분 단위로 측정하였다.

ONOO⁻의 수치는 Kooy의 방법¹⁸⁾에 따라 조직 10 µL와 DHR buffer (rhodamine buffer (pH 7.4), 5 mM DTPA, 10 mM DHR123) 180 µL를 섞은 후 37℃에서 5분간 반응시킨 후 emission 파장 535 nm와 excitation 파장 480 nm에서 형광값을 30분간 5분 단위로 측정하였다.

6) 조직 내 MDA 측정

Malondialdehyde (MDA) 수치는 간 조직에서 Mihara의 방법¹⁹⁾을 따라 측정하였다. 간 조직은 1% H₃PO₄ 75 µL와 0.67% thiobarbituric acid (TBA) 250 µL를 혼합한 후 95℃에서 45분간 반응시켰으며, 그 후 750 µL의 n-butanol 추가 후 원심분리 (3,000 rpm, 10분)하여 butanol을 분리시켰다. 분리된 상층액은 540 nm의 파장에서 측정하여 TBA 수치를 정량하였다. 표준물질로 1,1,3,3,-tetramethoxypropane을 사용하였다.

7) 혈액 내 총 콜레스테롤과 중성지방 측정

혈액에서 총 콜레스테롤 (total cholesterol, TC)와 중성지방 (triglyceride, TG)의 수치는 측정용 시액 (Asanpharm, Seoul, Korea)을 사용하여 측정하였다.

8) 간 조직의 조직학적 분석

간 조직은 hematoxylin & eosin (H&E)과 Oil red O (ORO) 염색을 통해 분석하였다. 간 조직은 10% formalin에서 고정시킨 후 탈수과정을 거쳤으며, 파라핀으로 포매함으로써 block을 제작하였다. 제작된 파라핀 block은 3 μm (H&E), 7 μm (ORO) 두께로 조직 절편을 제작하였다.

H&E 염색은 제작된 조직 절편에 hematoxylin 및 eosin 시약으로 염색을 하여 진행하였으며, ORO 염색은 60°C에서 7분 동안 ORO 완충액, 3분 동안 85% propylene glycol에서 순차적으로 반응시킨 후 harris haematoxylin에서 염색함으로써 진행하였다. 염색한 조직 절편은 광학현미경 Olympus BX51 Microscope (Olympus Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

9) 간 조직의 단백질 발현 분석

추출된 간 조직은 먼저 세포질을 분리하기 위하여 buffer A (10 mM HEPES (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail)를 첨가한 후 조직 분쇄기 (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA)로 분쇄하였으며, 얼음에서 30분간 정치하였다. 이 후 10% NP-40 용액을 첨가하고, 세포질을 포함한 상층액을 얻기 위하여 12,000 rpm에서 2분 동안 원심분리를 실시하였으며 얻어진 상층액은 -80°C에 보관하였다. 다음으로 핵을 추출하기 위하여 세포질이 제거된 pellet에 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM, PMSF, 10% glycerol)를 100 μL 첨가한 후 vortex를 10분마다 3회 실시하였다. 그 후 핵이 포함된 상층액을 분리하기 위하여 12,000 rpm (4°C, 10분)으로 원심분리를 실시하였으며, 분리된 상층액은 -80°C에 보관하였다.

추출된 세포질과 핵은 BCA 단백질 정량법으로 정량한 후 각 12 μg 씩 8-14% SDS-PAGE gel에 전기영동하였다. 크기별로 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane으로 이동시켰고 이 후 membrane에 확인하고자 하는 1차 항체 처리 후 (1:1000) 4°C에서 12시간 이상 반응시켰다. 이 후 PBS-Tween20으로

6분마다 5회 세척하였으며 2차 항체 (1:3000)를 실온에서 1시간 30분 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 PBS-Tween20으로 6분마다 5회 세척 후 ECL 용액을 사용하여 단백질 발현을 확인하고 Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci, Seoul, Korea)을 사용하여 촬영하였다. 단백질 발현 정도는 ATTO Densitograph (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)를 사용하여 정량 분석하였다.

10) 통계 분석

실험 결과의 분석 과정에서 오차 범위는 *in vitro*의 경우 평균과 표준 오차 (mean \pm standard error of mean (SEM))으로, *in vivo*의 경우 평균과 표준 편차 (mean \pm standard deviation (SD))로 표기하였다. 통계 분석은 IBM SPSS Statistics 27 (Armonk, NY, USA) 프로그램으로 one-way analysis of variance (ANOVA) test 실시 후 least-significant differences (LSD) test로 검증을 수행하였다. 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의 수준은 $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 총 polyphenol과 총 flavonoid 함량 측정

효과적인 배합 비율을 찾기 위하여 芍藥 추출물과 葛根 추출물을 다양한 비율로 섞은 후 총 polyphenol 및 총 flavonoid 함량을 측정하였다. 확인 결과, polyphenol의 경우 芍藥의 배합 비율이 높아질수록 검출량이 증가하여 芍藥:葛根의 배합 비율 3:1일 때 73.44 mg (GAE)/g으로 가장 높은 polyphenol 함량이 확인되었다. flavonoid의 경우 전체적으로 큰 증감의 양상은 확인되지 않았으나, 葛根의 함유 비율이 높아질수록 검출량이 증가됨을 확인하였다. 따라서 芍藥:葛根 배합 비율 1:3에서 가장 높은 flavonoid 함량이 검출되었다 (Table 1).

Table 1. Total Polyphenol and Total Flavonoid Contents of Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix Mixture.

	Paeoniae Radix Alba : Puerariae Radix				
	1:1	1:2	1:3	2:1	3:1
Total polyphenol mg(GAE)/g	64.53 \pm 0.55	56.64 \pm 0.05	51.62 \pm 0.06	70.56 \pm 0.30	73.44 \pm 0.08
Total flavonoid mg(QE)/g	2.80 \pm 0.05	3.05 \pm 0.06	3.15 \pm 0.05	2.51 \pm 0.05	2.39 \pm 0.02

Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix were mixed in different ratios and then each mixture measured the contents of total polyphenol and total flavonoid. GAE; gallic acid equivalent, QE; quercetin equivalent. All experiments were performed in triplicate and the values were shown as mean \pm SEM.

2. DPPH와 ABTS 자유 라디칼 소거 활성 측정

Polyphenol 및 flavonoid 함량 분석과 함께 자유 라디칼 소거 활성 능력의 측정은 한약재의 항산화 능력을 확인하기 위한 중요한 척도이다. 따라서 최적의 항산화 효과를 가지는 배합 비율을 결정하기 위하여 여러 가지 배합 비율로 섞은 芍藥과 葛根 추출물의 DPPH와 ABTS 자유 라디칼 소거능을 측정하였다. 그 결과, DPPH와 ABTS 모두 芍藥의 배합량이 증가할수록 더 높은 자유 라디칼 소거능이 확인되었으며 특히

芍藥:葛根의 배합 비율이 3:1일 경우 $29.32 \pm 1.28 \mu\text{g/mL}$ (DPPH)와 $47.57 \pm 0.91 \mu\text{g/mL}$ (ABTS)로 가장 낮은 IC_{50} 값이 측정되었다 (Table 2). 따라서 이후의 실험은 총 polyphenol 함량이 가장 높고, DPPH 그리고 ABTS의 IC_{50} 값이 가장 낮게 측정되었던 3:1의 배합 비율로 芍藥과 葛根 추출물을 혼합하여 芍藥 葛根 복합물 (PP)을 제조한 후 진행하였다.

Table 2. DPPH and ABTS Radical Scavenging Activities of Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix Mixture.

IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	L-ascorbic acid	Paeoniae Radix Alba : Puerariae Radix				
		1:1	1:2	1:3	2:1	3:1
DPPH	1.84 ± 0.01	43.40 ± 0.53	53.35 ± 0.69	55.03 ± 0.54	32.07 ± 0.21	29.32 ± 1.28
ABTS	3.67 ± 0.04	51.45 ± 0.82	53.73 ± 0.13	54.64 ± 0.73	49.24 ± 0.09	47.57 ± 0.91

Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix were mixed in different ratios and then each mixture measured the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of free radical scavenging activity by DPPH and ABTS assays. All experiments were performed in triplicate and the values were shown as mean \pm SEM.

3. 芍藥 葛根 복합물 투여에 따른 체중, 간 무게 변화 측정

알코올성 간 손상을 유발한 동물 모델에서 芍藥 葛根 복합물 투여에 따른 체중 및 간 무게의 변화의 차이를 측정하였다 (Table 3). 그 결과, 알코올성 간 손상을 유발한 모든 그룹에서 실험 종료 시점에 체중 감소를 확인하였으며, 대조군, 芍藥 葛根 복합물 저농도와 고농도 투여군의 경우 정상군 대비 유의한 감소를 보였다. 또한 실험 종료 후 간 무게를 측정한 결과, 알코올성 간 손상을 유발한 모든 그룹에서 정상군의 간 무게보다 32.2% (Control과 PPL), 26.7% (Silymarin), 그리고

20% (PPH)의 증가가 관찰되었다. 흥미롭게도 체중 대비 간 무게를 환산해 본 결과, 실리마린 또는 고농도의 芍藥 葛根 복합물을 처리했을 경우 대조군 또는 저농도의 芍藥 葛根 복합물 처리했을 경우보다 체중 대비 간 무게가 적게 증가된 것으로 확인되었는데, 이러한 결과는 고농도의 芍藥 葛根 복합물 투여가 알코올성 간 손상에서 실리마린과 유사한 효과를 보여 줄 수 있음을 의미한다.

Table 3. The Effect of PP on Body Weight, Liver Weight, and Relative Liver Weight.

	Body Weight (g)			Liver Weight (g)	Liver Weight / Body Weight (%)
	Initial	Final	Changes		
Normal	20.82 ± 0.48	20.98 ± 0.43	0.16 ± 0.19	0.9 ± 0.02	4.29 ± 0.04
Control	21.08 ± 0.24	20.51 ± 0.13	$-0.57 \pm 0.19^{##}$	$1.19 \pm 0.07^{##}$	$5.81 \pm 0.34^{##}$
Silymarin	21.18 ± 0.15	20.92 ± 0.15	-0.26 ± 0.15	$1.14 \pm 0.07^*$	$5.46 \pm 0.32^*$
PPL	21.06 ± 0.32	20.55 ± 0.32	$-0.51 \pm 0.11^*$	$1.19 \pm 0.06^{**}$	$5.78 \pm 0.28^{**}$
PPH	20.75 ± 0.3	20.36 ± 0.25	$-0.39 \pm 0.08^*$	$1.08 \pm 0.05^*$	$5.29 \pm 0.25^*$

Body weights were measured on the beginning (initial) and the last day (final) after the treatment. Liver weights were measured on the last day after sacrifice. PPL, the mixture of Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix (100 mg/kg); PPH, the mixture of Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix (200 mg/kg). The values were shown as mean \pm SD (n=7). Numbers ($^{##}$) and asterisks (*) indicate statistically significant differences from the normal group in the same column ($^{##}p < 0.01$, $^*p < 0.05$, and $^{**}p < 0.01$).

4. 혈액 내 AST, ALT, 총 빌리루빈 수치 측정

AST (aspartate aminotransferase)와 ALT (alanine aminotransferase)는 주로 간에서 발견되는 효소로서 간세포가 손상되었을 경우 혈액 내로 효소가 유입되어 혈액 내 AST와 ALT 수치가 증가하게 된다. 따라서 혈액 내 AST와 ALT 수치의 측정은 간 손상의 중요한 지표로 사용된다. 알코올을 투여 한 후 대조군에서 AST 수치와 ALT 수치가 정상군보다 유의하게 증가되는 것을 확인하였다 (Figure 1). 이렇게 증가된 수치는 실리마린 또는 芍藥 葛根 복합물을 투여하였을 때 유의성있게 감소되었으며, 芍藥 葛根 복합물의 저농도와 고농도 투여기간의 유의성은 보이지 않았다.

간에서 담즙 형태로 분비되어 체외로 배출되어야 하는 빌리루빈은 간 질환일 경우 담즙으로 전환되지 못하거나 체외로 배출되지 못하여 혈액 내 빌리루빈의 농도가 증가되게 된다²⁰⁾. 따라서 간 손상 여부를 판단하기 위하여 혈액 내 빌리루빈의

수치를 정량함으로써 芍藥 葛根 복합물의 효과를 확인하였다 (Figure 1). 우선, 알코올을 투여한 대조군은 총 빌리루빈의 수치가 정상군 1.86 ± 0.24 mg/dL에 비해 5.5배가 증가한 10.15 ± 0.96 mg/dL으로 확인되어 알코올성 간 손상이 유도되었음을 알 수 있었다. 이러한 증가는 芍藥 葛根 복합물을 저농도 또는 고농도 처리하였을 때 유의성 있게 감소되었다. 특히, 실리마린을 단독 투여한 경우 대조군 보다 1.2배 감소 (8.42 ± 1.32 mg/dL) 되었는데 반해, 芍藥 葛根 복합물의 경우 저농도 처리 시 3.8배 (2.70 ± 0.67 mg/dL), 고농도 처리 시 4배 (2.53 ± 0.42 mg/dL) 감소되어 정상 수준까지 회복되었음을 알 수 있었다.

따라서 본 실험을 통하여 芍藥 葛根 복합물의 투여가 알코올 노출에 따른 간세포의 손상을 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 알 수 있다.

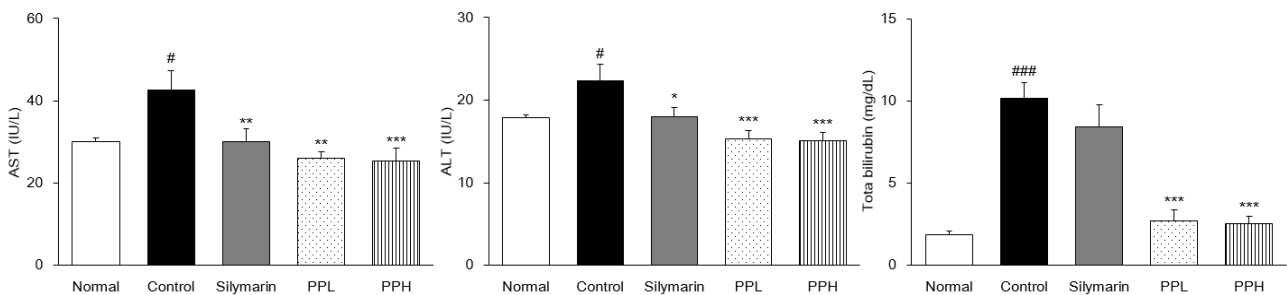


Figure 1. The effect of PP on the levels of AST, ALT, and total bilirubin in serum. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; PPL, the mixture of *Paeoniae Radix Alba* and *Puerariae Radix* (100 mg/kg); PPH, the mixture of *Paeoniae Radix Alba* and *Puerariae Radix* (200 mg/kg). The values were shown as mean \pm SD (n=7). [#]p<0.05 and ^{###}p<0.001 vs. Normal, ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, and ^{***}p<0.001 vs. Control.

5. 간 조직 내 ROS, ONOO⁻ 와 MDA 측정

높은 농도의 ROS는 DNA, 지질 (lipid) 및 단백질 (protein)에 손상을 일으켜 돌연변이나 다양한 질환을 일으킬 수 있다²¹⁾. 특히, 만성 간질환의 경우 간세포내 ROS의 생성이 증가됨으로서 간섬유화로 진행될 수 있다는 보고가 있다²²⁾. 따라서 간 조직 내 ROS 수치의 변화는 간 손상 판단의 중요한 척도가 될 수 있다.

우선 ROS의 수치를 확인 해 본 결과, 알코올성 간 손상 시, 정상군 대비 30%의 ROS 생성 증가가 나타났으며, 실리마린을 투여하였을 경우 21.9% 감소하여 정상 수준으로 낮아진 것이 확인되었다. 또한 芍藥 葛根 복합물을 투여하였을 경우 ROS 수치가 대조군보다 저농도에서는 29.5%, 고농도에서는 39.9% 유의하게 감소하여 실리마린 투여군보다 효과적으로 ROS의 생성을 억제시키는 것으로 확인되었다 (Figure 2).

다음으로 자유 라디칼 활성 산소인 superoxide (O₂⁻)와 nitric oxide (NO)의 반응과, 비-라디칼 활성 산소인 hydrogen peroxide (H₂O₂)와 nitrite (NO₂⁻)와의 반응에 의해 생성되는 ONOO⁻의 수치를 확인하였다²³⁾. 알코올성 간 손상이 유발된

대조군에서 ONOO⁻의 수치는 정상군보다 2.6배 증가되었으며, 이러한 결과는 실리마린 또는 芍藥 葛根 복합물 처리 시 감소되는 것을 확인하였다. 따라서 이러한 결과는 알코올성 간 손상에서 증가된 활성 산소가 실리마린 또는 芍藥 葛根 복합물 처리 시 감소되어졌다는 것을 의미한다.

MDA (Malondialdehyde)는 산화 스트레스로 인한 지질 과산화 (lipid peroxidation) 과정 중 생성되는 부산물로 단백질이나 DNA의 손상을 준다고 알려져 있다²⁴⁾. 알코올성 간 손상을 유발한 후 MDA 수치를 확인해 본 결과, 정상군 대비 2.9배 값이 증가된 것으로 확인되었다 (Normal: 5.35 ± 1.36 nmol/mg vs. Control: 15.41 ± 1.46 nmol/mg). 이렇게 증가된 MDA 값은 실리마린 혹은 芍藥 葛根 복합물을 투여함으로써 감소되었으며, 고농도의 芍藥 葛根 복합물을 투여하였을 때 더 효과적으로 감소되는 것을 알 수 있었다 (Silymarin: 11.75 ± 1.62 nmol/mg vs. PPL: 10.31 ± 0.9 nmol/mg vs. PPH: 8.57 ± 1.03 nmol/mg).

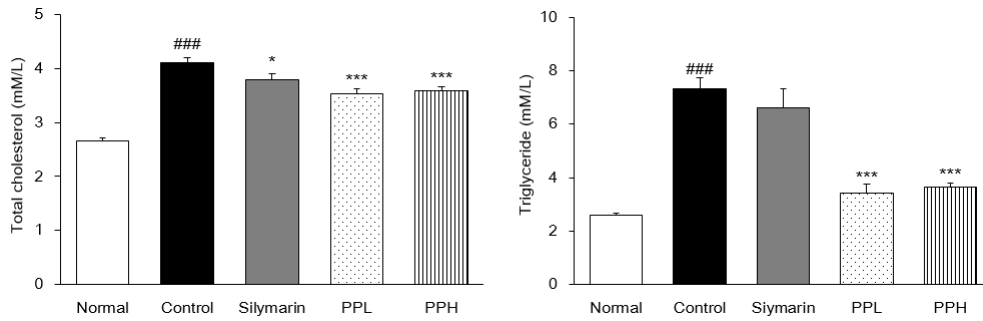


Figure 3. The effect of PP on the levels of total cholesterol and triglyceride in serum. PPL, the mixture of *Paeoniae Radix Alba* and *Puerariae Radix* (100 mg/kg); PPH, the mixture of *Paeoniae Radix Alba* and *Puerariae Radix* (200 mg/kg). The values were shown as mean±SD (n=7). ^{###}*p*<0.001 vs. Normal, ^{*}*p*<0.05 and ^{***}*p*<0.001 vs. Control.

7. 조직학적 분석

알코올 투여 후 간 조직의 손상 및 약물 투여 후의 회복을 H&E 및 ORO 염색을 통하여 확인하였다. 알코올성 간 손상이 발생하면 손상된 간 조직 내 염증반응의 증가로 호중구와 같은 면역세포의 침윤 현상이 나타나게 된다. 이러한 면역세포의 침윤 현상은 투여군에서 두드러지게 증가하였으며, 증가된 면

역세포는 실리마린이나 芍藥 葛根 복합물 처리한 군에서 감소되는 양상이 보였다 (Figure 4, H&E). 또한 알코올 투여한 대조군에서 정상군보다 현저하게 증가된 지방 축적을 확인하였으며 이러한 증가는 약물을 처리함으로써 감소되는 경향을 보였다 (Figure 4, ORO).

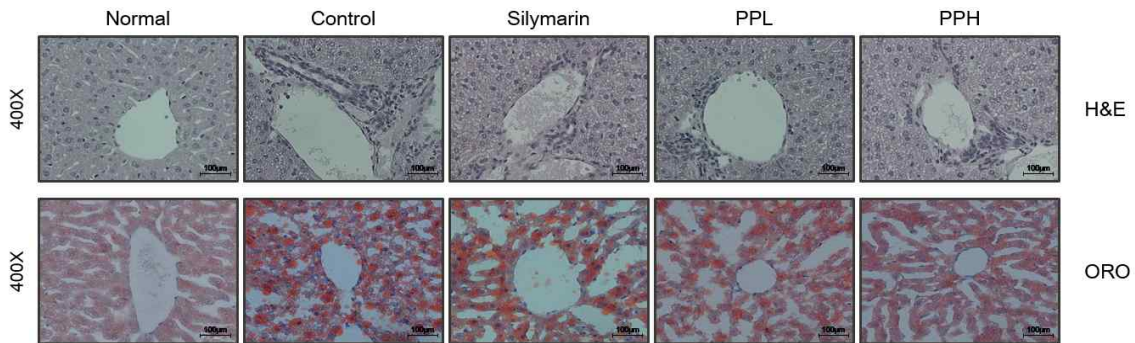


Figure 4. Histological analysis. Liver tissue were stained with hematoxylin & eosin (H&E) or Oil red O (ORO) to analyze the liver damage from alcohol (magnification, X400). PPL, the mixture of *Paeoniae Radix Alba* and *Puerariae Radix* (100 mg/kg); PPH, the mixture of *Paeoniae Radix Alba* and *Puerariae Radix* (200 mg/kg).

8. Western blot

간 조직 내 산화 스트레스를 확인하기 위하여 ROS 발생시키는 효소인 NADPH oxidase의 발현을 확인하였다 (Figure 5). NOX2의 경우 알코올 투여한 대조군에서 정상군보다 발현량이 36% 증가되었으며, 이러한 증가는 실리마린 처리군에서 34.8%, 저농도의 芍藥 葛根 복합물 처리군에서 28.5%, 고농도의 芍藥 葛根 복합물 처리군에서 31.6% 유의성있게 감소하였다. 또한 NOX2의 상위 조절 인자인 p47^{phox}의 발현 역시 대조군에서 정상군보다 26.2% 증가된 것을 확인하였는데, 이 증가는 실리마린 처리군에서 29.9%, 저농도의 芍藥 葛根 복합물 처리군에서 19.9%, 고농도의 芍藥 葛根 복합물 처리군 29%의 유의성 있는 감소가 확인되었다. Rac 1/2/3의 경우, 대조군에서 정상군보다 66.2% 발현이 증가되었으며, 실리마린 또는 芍藥 葛根 복합물 처리 시 증가된 발현이 대조군 대비 26.9% (Silymarin), 30.4% (PPL) 그리고 36.2% (PPH) 감소되었다.

다음으로 약물 투여 후 간 조직 내 항산화 상태의 변화를 확인하기 위하여 항산화 관련 효소들의 발현을 확인해보았다 (Figure 6). 우선, SOD-1의 경우 대조군에서 정상군보다 현저하게 발현량이 감소되었으며, 실리마린 혹은 芍藥 葛根 복합물 투여 시 발현량이 회복되는 현상을 확인하였다. 또한 catalase의 경우 대조군에서 발현량이 정상군보다 30.5% 감소되었는데 이 역시 실리마린 혹은 芍藥 葛根 복합물 투여 시 증가되었다. 특히 고농도의 芍藥 葛根 복합물 투여 시 대조군 대비 발현량이 33.9% 이상 증가하여 정상군 수준으로 회복된 것을 확인 할 수 있었다. 다음으로 GPx-1/2의 경우 알코올을 투여한 경우 정상군보다 45.3%이상의 발현량의 감소를 보였으며, 이 역시 실리마린 혹은 芍藥 葛根 복합물 투여시 발현량이 증가되었다.

따라서 본 결과는 알코올성 간 손상에서 증가된 활성 산소가

芍藥 葛根 복합물을 투여함으로써 활성 산소 생성과 관련된 산소 수치를 낮추었다는 것을 보여준다.
 인자 및 항산화 유도 효소들의 발현을 조절하여 조직 내 활성

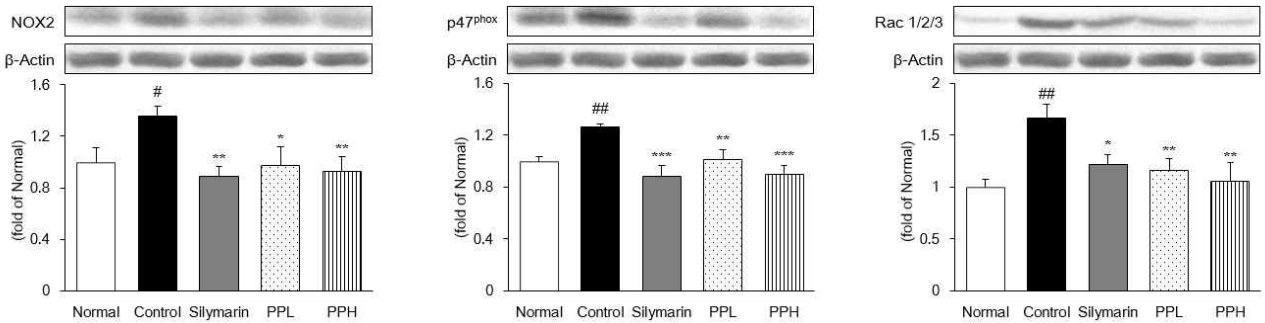


Figure 5. Expression of proteins to stimulate NADPH oxidase in liver tissue. PPL, the mixture of Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix (100 mg/kg); PPH, the mixture of Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix (200 mg/kg). NOX2, NADPH oxidase 2; Rac 1/2/3, ras-related C3 botulinum toxin substrate 1/2/3. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. Normal, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. Control.

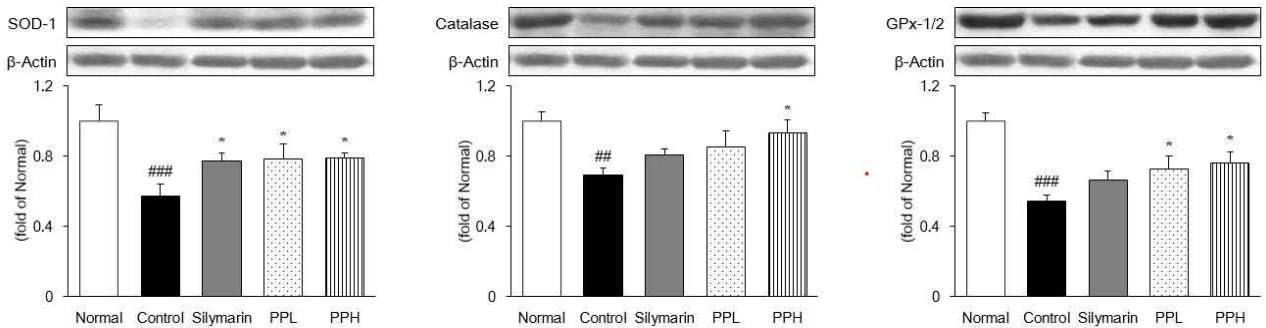


Figure 6. Expression of antioxidant enzymes in liver tissue. PPL, the mixture of Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix (100 mg/kg); PPH, the mixture of Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix (200 mg/kg). SOD-1, superoxide dismutase-1; GPx1/2, glutathione peroxidase1/2. ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ vs. Normal, * $p < 0.05$ vs. Control.

이전 결과에서 혈액 내 TC와 TG 수치가 대조군에서 확연히 증가되고 약물 처리시 감소되는 것을 확인하였다 (Figure 3). 따라서 콜레스테롤 대사를 조절하는 인자들의 간 조직 내 발현을 분석하였다 (Figure 7). SREBP-2의 발현을 확인 해 본 결과, 정상군보다 대조군에서 25.6% 발현이 증가되었으며, 실리마린 또는芍藥 葛根 복합물 투여 시 정상 수준으로 회복

되었다. 또한 혈중 콜레스테롤 수치를 조절하는 인자인 HMGCR의 경우, 대조군에서 발현량이 현저하게 증가하였는데, 이 역시 실리마린 또는芍藥 葛根 복합물 투여 시 대조군 대비 29.2% (Silymarin), 37.3% (PPL), 37.2% (PPH) 감소하는 것을 확인하였다.

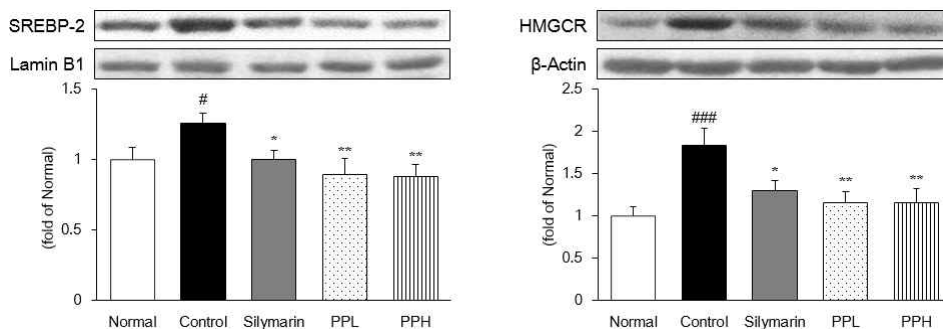


Figure 7. Expression of proteins to control cholesterol homeostasis in liver tissue. PPL, the mixture of Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix (100 mg/kg); PPH, the mixture of Paeoniae Radix Alba and Puerariae Radix (200 mg/kg). SREBP-2, sterol regulatory element-binding protein 2; HMGCR, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase. # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ vs. Normal, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. Control.

다음으로 중성지방 합성과 관련된 인자들의 발현을 분석하였다 (Figure 8). PPAR α 는 지방산의 베타산화 경로와 관련된 단백질들의 발현을 촉진시켜 세포 내 지방 축적을 줄이는 역할을 한다고 알려져 있다²⁶⁾. 따라서 알코올성 간 손상 유발 동물 모델에서 PPAR α 의 발현을 확인해 보았다. 그 결과, 대조군의 PPAR α 발현량이 정상군에 비해 31% 감소되었으며, 실리마린이나 芍藥 葛根 복합물 처리 시 발현량이 회복되는 것을 확인하였다. 특히 고농도의 芍藥 葛根 복합물 처리 시 더 효과적으로 회복되어 대조군보다 42.9% 발현량이 증가되는 경향을 확인하였다. 또한 지방산 합성 관련 단백질 SREBP-1의 발현량의 변화를 확인해본 결과, 대조군의 경우 26.5% 증가하였으며 대조군에서 증가된 양은 실리마린 처리군 15.3%, 저농도의 芍藥 葛根 복합물 처리군 26.9%, 고농도의 芍藥 葛根 복합물

처리군 29.4%의 감소 효과를 확인하였다. FAS의 경우 대조군에서 정상군보다 47.6% 발현이 증가되었으며 이 증가량 역시 실리마린 처리 시 28.2%, 저농도 芍藥 葛根 복합물 처리 시 20.1%, 고농도 芍藥 葛根 복합물 처리 시 27%가 감소되는 것을 확인하였다. SCD-1의 발현 역시 비슷한 양상으로 변화되었는데, 대조군에서 46%가 증가되었고, 이 증가된 발현 수치는 실리마린 28%, 저농도 芍藥 葛根 복합물 19.7%, 고농도 芍藥 葛根 복합물 31%만큼 감소하는 것을 알 수 있었다.

따라서 이러한 결과는 알코올성 간 손상 과정에서 확인된 TC와 TG의 증가된 수치가 芍藥 葛根 복합물의 처리 시 콜레스테롤 대사와 관련된 효소 또는 지방산 생산과 관련된 효소들을 조절함으로써 효과적으로 회복될 수 있다는 것을 보여준다.

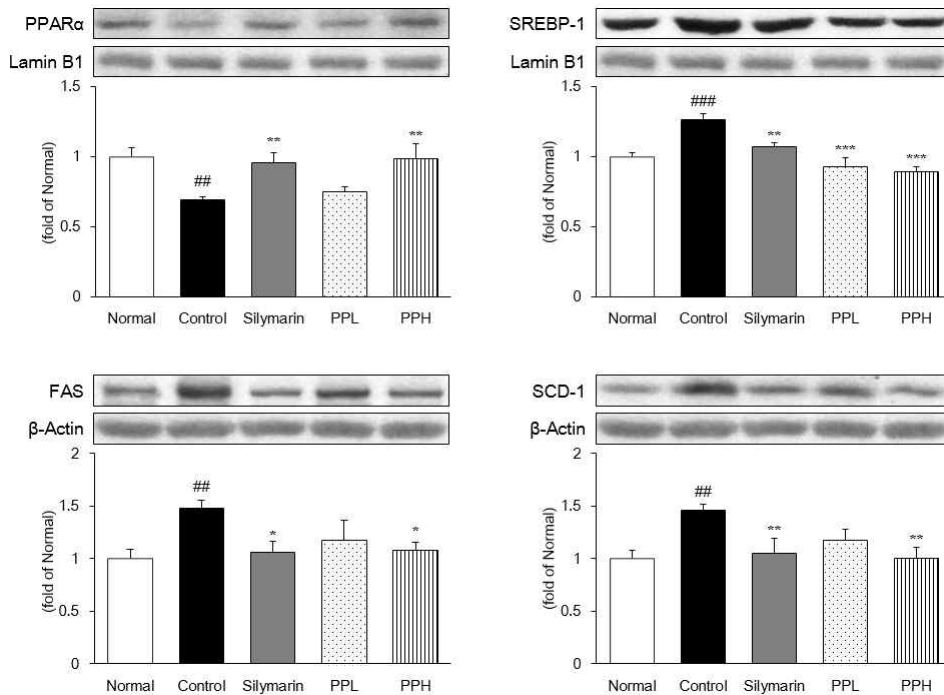


Figure 8. Expression of proteins to regulate free fatty acids in liver tissue, PPL, the mixture of *Paenoniae Radix Alba* and *Puerariae Radix* (100 mg/kg); PPH, the mixture of *Paenoniae Radix Alba* and *Puerariae Radix* (200 mg/kg). PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor alpha; SREBP-1, sterol regulatory element-binding transcription factor 1; FAS, fatty acid synthase; SCD-1, stearoyl-CoA desaturase-1. # $p < 0.01$ and ## $p < 0.001$ vs. Normal. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. and *** $p < 0.001$ vs. Control.

IV. 고 찰

알코올은 인체 내 유입된 후 대략 80%가 간에서 대사되는데 이 과정에서 여러 가지 독성물질이 생성된다. 특히 알코올 대사 과정에서 발생한 산화물질이 항산화 물질로부터 효과적으로 제거되지 못하게 되면 간 조직 내 ROS가 축적되게 되고 장기적인 ROS의 과도한 노출은 알코올성 간 손상을 야기시키게 된다²⁾. 본 연구에서는 기존에 염증 억제 효과 및 항산화 효과가 확인되었던 芍藥을 葛根과 복합 투여함으로써 芍藥 葛根 복합물이 알코올성 간 손상에 미치는 효과를 확인하였다. 이전 연구 결과에 따르면 carbon tetrachloride (CCl₄)로 염증성 간 손

상을 유발한 동물 모델에서 芍藥을 3일간 100 mg/kg (mouse)으로 투여하였을 경우 AST와 ALT 수치가 감소되었고²⁷⁾, 葛根 역시 7일간 10 mL/kg (rat)으로 투여하였을 경우 AST와 ALT가 감소되는 것이 확인되었다²⁸⁾. 또한 thioacetamide로 유발한 급성 간 손상 동물 모델에서 芍藥의 단독 투여는 catalase와 같은 항산화 관련 효소들의 발현을 향상시킴으로써 간 보호 효과를 보인다는 것이 이전 연구에서 확인되었다²⁹⁾. 이러한 芍藥의 항산화 효과는 지질 과산화에 관여하는 glutathione peroxidase의 발현을 조절하여 지질 과산화의 함량을 저해함으로써 간 보호 효과를 가진다고 알려진 葛根과 함께 투여하였을 때 간 보호의 동반 상승 효과 (synergistic

effect)를 이끌 것으로 기대할 수 있다³⁰⁾.

芍藥과 葛根은 한방의 대표적인 감기약인 갈근탕(葛根湯)의 약재로 함께 처방되어 사용되고 있으며 갈근탕 구성 성분의 총량을 11.55 g으로 기준할 때 葛根 3.75 g과 芍藥 1.88 g을 섞어 추출하여 제조한다³¹⁾. 이러한 배합 비율은 葛根의 발한(發汗)과 해열(解熱)의 기능에 근거를 둔 것으로 사료된다. 하지만, 본 연구에서는 芍藥 3: 葛根 1의 비율을 사용하여 항산화 효과를 더 향상 시키고자 하였다. 이에 대한 근거로 芍藥 葛根 복합물에 포함되어 있는 총 polyphenol 및 총 flavonoid 함량과 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정함으로써 芍藥 葛根 복합물의 항산화 효과를 확인하였다. 페놀성 화합물은 phenolic acid, flavonoid, tannin 등이 포함되며 그 중 flavonoid는 식물계에 가장 널리 분포하는 polyphenol 성분이다. 특히 polyphenol은 높은 항산화 작용으로 항암 또는 항콜레스테롤 작용을 한다고 보고된 바 있다³²⁾. 또한 ROS의 한 종류인 자유 라디칼은 생체 내 반응성이 높아 세포막 지질에 쉽게 결합하여 세포막을 파괴하거나 DNA의 손상 및 단백질의 파괴를 야기한다고 알려져 있다³³⁾. 따라서 자유 라디칼의 소거능은 항산화 효과에 대한 지표로 사용될 수 있다. 芍藥 葛根을 다양한 비율로 섞은 복합물에서 페놀성 화합물을 분석한 결과, 芍藥의 배합량이 증가할수록 polyphenol의 함유량이 증가함을 확인 할 수 있었다 (Table 1). Flavonoid의 경우 葛根의 배합량이 증가할수록 다소 증가하는 양상이 보였는데 이러한 결과는 葛根의 주요 성분들이 flavonoid의 구조적 유사체인 isoflavon에 속하여 검출량에 영향을 준 것으로 생각된다¹⁰⁾. 다음으로, 음이온 자유 라디칼 소거능을 확인하기 위한 DPPH와 양이온 라디칼 소거능을 확인하기 위한 ABTS의 결과 역시 芍藥의 배합량이 증가할수록 더 뛰어난 라디칼 제거 활성을 나타내었다 (Table 2). 따라서 이러한 결과를 토대로 추후 동물 실험에는 芍藥 3 : 葛根 1로 섞은 복합물을 사용하였다.

알코올성 간 손상 동물 모델은 45% ethanol (5 g/kg body weight)을 2주간 경구 투여하여 유발하였으며, 실험 종료 후 혈액 채취 및 간 조직을 적출하여 분석하였다. 적출 후 동물의 체중 및 간 무게의 변화를 확인 한 결과, 알코올성 간 손상이 유도된 모든 동물군에서 체중이 감소하고 간 무게가 증가하였다 (Table 3). 흥미롭게도 몸무게 대비 간 무게의 변화를 비교 분석한 결과 고농도의 芍藥 葛根 복합물 투여 시 그 변화량이 가장 적었는데 이러한 결과는 고농도의 芍藥 葛根의 투여가 가장 효과적으로 알코올성 간 손상으로의 진행을 유예시켰음을 보여준다. 이러한 예상은 AST, ALT와 총 빌리루빈의 수치 변화로도 확인된다. AST와 ALT는 정상 상태에서는 혈액에서 미량이 검출되지만, 간세포가 손상되었을 경우 혈청으로 유출되어 혈액 내 검출량이 상승된다고 알려져 있다. 본 실험에서도 같은 현상을 확인하였는데 AST와 ALT 수치 모두 알코올성 간 손상이 유도된 대조군에서 증가된 것을 알 수 있었다 (Figure 1). 이렇게 증가된 수치는 芍藥 葛根 복합물을 투여하였을 경우 저농도와 고농도 모두에서 정상 수준으로 검출량이 줄어들었으며, 이는 芍藥 葛根 복합물이 알코올로 인한 간세포 손상을 효과적으로 막았음을 보여주는 결과이다. 게다가 알코올성 간 손상의 지표로서 빌리루빈의 혈액 내 증가를 확인한 결과 이 역시 알코올 투여로 인하여 증가된 검출량이 芍藥 葛根 복합물로 인하여 현저하게 감소되는 것을 알 수 있었다. 따라서

이러한 결과는 芍藥 葛根 복합물 투여가 알코올로 인한 간세포 손상을 막는데 중요한 역할을 했다는 것을 보여준다.

다음으로 芍藥 葛根 복합물의 알코올성 간 손상 동물 모델에서의 항산화 효과를 확인하기 위해 간 조직에서 ROS, ONOO⁻ 와 MDA 수치를 정량하였다. 그 결과 알코올 투여 시 ROS, ONOO⁻ 그리고 MDA 모두 간 조직에서 생성량이 증가하는 것을 확인하였는데 이러한 결과는 알코올 투여로 인하여 활성 산소가 증가된다는 것을 의미한다. 특히 이렇게 증가된 생성량은 芍藥 葛根 복합물 투여하였을 때 감소하였으며, 저농도의 芍藥 葛根 복합물보다 고농도의 芍藥 葛根 복합물에서 더 효과적으로 줄어들었음을 확인하였다 (Figure 2). 게다가 간 조직에서 ROS 생성을 촉진하는 NADPH oxidase인 NOX2와 NOX2의 활성화를 유도하는 p47^{phox}, NOX2의 신호 기작을 유도하는 GTPase Rac의 발현³⁴⁾을 확인해본 결과, 세 가지 단백질 모두 알코올 투여로 인하여 증가하는 것을 알 수 있었다 (Figure 5). 그리고 이렇게 증가된 단백질 발현은 芍藥 葛根 복합물을 투여함으로써 효과적으로 감소하였다. 또한 알코올성 간 손상 동물 모델에서 항산화 효소들의 발현 역시 확인하였다. SOD-1은 생체 내 superoxide (O₂⁻) 라디칼을 파괴하는 항산화 효소로 자유 라디칼의 한 종류인 superoxide를 hydrogen peroxide (H₂O₂)과 dioxygen (O₂) 변환에 촉매작용을 한다고 알려져 있다³⁵⁾. Catalase와 GPx-1/2는 hydrogen peroxide를 물과 oxygen으로 전환시키는데 관여하는 항산화 효소이다. 이러한 항산화 관련 효소들은 알코올 투여로 유도된 간 손상 동물 모델에서 발현량이 유의성있게 감소하였으며 芍藥 葛根 복합물 투여 시 감소된 발현량이 회복되는 것을 확인하였다 (Figure 6). 따라서 이러한 결과들을 통하여 알코올 투여로 간 손상이 유발되면 ROS 생성이 증가되는데, 芍藥 葛根 복합물은 ROS 생성을 유도시키는 단백질들의 발현을 낮추고 이와 함께 항산화 효소의 발현을 증가시킴으로서 생체 내 산화 스트레스를 감소시킬 수 있다는 것을 알 수 있다.

지속적인 알코올의 노출은 간 조직 내 지방 방울 (lipid droplet), 중성 지방, 콜레스테롤의 축적이 발생되어 지방간으로 병변이 진행될 수 있다는 보고가 있다³⁶⁾. 중성지방은 지방효소 (lipase)에 의해 지방산의 형태로 변형되어 혈액으로 이동 후 간에서 흡수되어 대사되어지는데, 간에서 지방산의 생산이 증가하거나 혈중 지방산 농도가 높을 경우 지방산이 대사되어지지 못하고 간에 축적된다³⁷⁾. 이러한 알코올 노출에 의한 지방 축적 현상은 본 연구 결과에서도 확인 할 수 있었다. 알코올성 간 손상 동물 모델의 간 조직 사진을 확인하였을 때 면역세포의 침윤현상과 함께 지방이 조직 내 축적된 것을 확인하였으며 (Figure 4), 혈액 내에 총 콜레스테롤 및 중성지방 수치가 정상군보다 유의성있게 증가하는 것을 알 수 있었다 (Figure 3). 하지만 이렇게 증가된 콜레스테롤 및 중성지방 수치는 芍藥 葛根 복합물을 투여함으로써 감소하여 芍藥 葛根 복합물이 알코올성 간 손상에서 지방의 간 조직 내 축적을 낮출 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

지질 합성을 촉진시키는 핵심 인자는 SREBP로 3종류의 isoform이 존재하며 SREBP-1a은 장 상피세포, 심장세포, 대식세포 및 골수수지세포와 같은 빠르게 성장하는 세포에서의 지질 합성에 관여하고, SREBP-1c는 간에서 지방산과 중성지방의 합성을 촉진한다. SREBP-2는 모든 조직에서 콜레스

테를 대사를 조절한다고 알려져 있다³⁸⁾. 또한 이 SREBP는 FAS나 HMGCR 등 중성지방과 콜레스테롤 합성과 관계된 효소들의 발현을 증가시킨다. 따라서 본 연구에서 알코올성 간 손상 간 조직에서 SREBP-1, SREBP-2의 발현을 확인하였으며, 그 결과 SREBP-1과 SREBP-2 모두 대조군에서 유의성있게 증가됨을 알 수 있었다. 또한 증가된 발현량은 芍藥 葛根 복합물 처리 시 정상군 수준으로 감소하였다 (Figure 7과 Figure 8). 더불어 SREBP-1의 타겟 유전자인 FAS와 SCD-1, 그리고 SREBP-2의 타겟 유전자인 HMGCR에서도 동일한 단백질 발현 경향을 확인 할 수 있었다. PPAR α 는 간에서 발현되는 전사인자 (transcription factor)로 타겟 유전자의 대부분이 지방산 산화 조절이나 지단백질의 합성과 운반에 관련한다고 알려져 있다. 특히 PPAR α 의 활성 인자인 fibrates는 간에서 지방산 산화를 촉진시켜 중성지방의 축적을 낮추고 고밀도 지단백 콜레스테롤 수치를 상승시킨다는 보고가 있다³⁹⁾. 따라서 본 연구에서 중성지방의 변화가 PPAR α 와 관련성이 있는지 확인해보기 위하여 간 조직에서의 PPAR α 발현량을 분석해보았다 (Figure 8). 그 결과 대조군에서는 PPAR α 발현량이 감소한 반면, 고농도의 芍藥 葛根 복합물 투여군에서는 발현량이 유의성있게 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 통해 알코올 투여로 간 손상이 유도되었을 경우 SREBP-1 혹은 SREBP-2 신호체제를 통하여 혈액 내 중성지방 또는 콜레스테롤 수치를 향상시키는데, 이때 芍藥 葛根 복합물이 SREBP-1과 SREBP-2의 발현량을 조절함으로써 결과적으로 혈액 내 중성지방과 콜레스테롤 농도를 낮출 수 있는 것으로 예상할 수 있다. 이 과정에서 芍藥 葛根 복합물의 PPAR α 전사인자의 발현 조절은 간 조직 내 지방 축적을 보다 효율적으로 억제할 수 있도록 시너지 효과를 보여줄 것으로 기대할 수 있다.

V. 결 론

본 연구에서는 숙취에 효과가 있다고 알려진 葛根과 탁월한 염증 효과 및 항산화 효과를 가지는 芍藥을 혼합한 芍藥 葛根 복합물의 알코올성 간 손상에 미치는 효과를 확인하였다. 이를 위하여 우선 芍藥 葛根 복합물의 항산화 능력 및 자유 라디칼 소거능을 분석하였으며, 그 후 알코올성 간 손상이 유도된 동물 모델에 芍藥 葛根 복합물을 투여함으로써 간 조직 또는 혈액 내에서 알코올성 간 손상과 관련된 인자들의 변화를 확인하였다.

1. 芍藥 3 : 葛根 1의 비율로 섞은 芍藥 葛根 복합물의 총 polyphenol 함량은 73.44 mg (GAE)/g, 총 flavonoid 함량은 2.39 ± 0.02 mg (QE)/g이었다.
2. 芍藥 葛根 복합물의 DPPH 라디칼 소거능은 IC_{50} 9.32 ± 1.28 μ g/mL이었으며, ABTS 라디칼 소거능은 IC_{50} 47.57 ± 0.91 μ g/mL으로 확인되었다.

3. 알코올성 간 손상 유도 동물모델에서 AST, ALT, 총 빌리루빈의 혈액 내 수치가 현저하게 증가되었으나, 芍藥 葛根 복합물 투여로 AST, ALT, 총 빌리루빈 모두 유의하게 감소하였다.
4. 알코올성 간 손상 유도 동물모델에서 ROS, ONOO $^-$, MDA의 조직 내 발현은 모두 유의하게 증가되었으나, 芍藥 葛根 복합물 투여로 ROS, ONOO $^-$, MDA 모두 발현량이 대조군보다 감소하였다.
5. 알코올성 간 손상 유도 동물모델에서 총 콜레스테롤과 중성 지방의 혈액 내 수치가 유의성있게 증가되었으나, 芍藥 葛根 복합물 투여 시 총 콜레스테롤과 중성 지방 모두 유의성있게 감소되었다.
6. 알코올성 간 손상 유도 동물모델에서 알코올 투여로 향상된 ROS 생성 유도 단백질인 NOX2, p47 phox , Rac 1/2/3의 간 조직 내 발현은 芍藥 葛根 복합물 투여로 유의성있게 감소하였다.
7. 알코올성 간 손상 유도 동물모델에서 알코올 투여로 감소한 항산화 효소 SOD-1, Catalase, GPx-1/2의 간 조직 내 발현은 芍藥 葛根 복합물 투여로 유의성있게 증가하였다.
8. 알코올성 간 손상 유도 동물모델에서 알코올 투여로 증가한 콜레스테롤 대사 관련 단백질 SREBP-2와 HMGCR는 芍藥 葛根 복합물 투여로 현저하게 감소하였다.
9. 알코올성 간 손상 유도 동물모델에서 알코올 투여로 증가한 중성지방 합성 및 지방산 산화관련 인자 SREBP-1, FAS, SCD-1는 芍藥 葛根 복합물 투여로 감소하였으며 알코올 투여로 감소하였던 PPAR α 는 芍藥 葛根 복합물 투여로 증가하였다.

이상의 결과를 통하여 芍藥 葛根 복합물은 높은 항산화 능력 및 ROS 생성 유도 단백질과 항산화 효소의 발현을 조절함으로써 간 손상 과정에서 발생하는 산화 스트레스를 감소시키는 것으로 판단되며, 콜레스테롤과 중성지방의 합성에 관여하는 단백질들의 발현을 조절하여 간 조직 내 지질의 축적을 완화시킬 수 있는 것으로 보여진다. 따라서 이러한 결과는 芍藥 葛根 복합물이 알코올성 간 손상의 치료제로서의 적용 가능성이 있음을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 “사회적경제혁신성장사업” (과제번호 P0017625)과, 2022년도 정

부재원 (과학기술정보통신부 여성과학기술인 R&D 경력복귀 지원사업)으로 한국여성과학기술인육성재단의 지원 (협약번호 제 2022-339호)을 받아 연구되었습니다.

References

1. Statistics Korea, Causes of Death Statistics 2021 [cited 2022 Dec 13]. Available form : URL : https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1B34E01&conn_path=I2
2. Chae HB. Review: Alcoholic Liver Disease. *Kor. J. Gastroenterol.* 2009 ; 53(5) : 275-82.
3. Kwon MH, Min KJ, Kim YC. Inhibitory Effects of *Peonia japonica* Water Extract on Skin Aging (I) – Focussed on Alleviative Effects of Inflammation and Skin Barrier Damage -. *J. Environ. Toxicol.* 2009 ; 24(2) : 159-67.
4. Mun YJ. Anti-inflammatory activity of jakyakgamcho-tang on Lipopolysaccharide-Stimulated BV-2 Microglia Cells. *Kor. J. Herbology.* 2022 ; 37(5) : 83-8.
5. Kim MR, Kang OH, Kim SB, Kang HJ, Kim JE, Hwang HC. The Study of Anti-inflammatory Effect of Hwanggeumjakyak-tang Extract in RAW 264.7 Macrophage. *Kor. J. Herbology.* 2013 ; 28(1) : 43-50.
6. Chan K, Liu ZQ, Jiang ZH, Zhou H, Wong YF, Xu H-X, Liu L. The effects of sinomenine on intestinal absorption of paeoniflorin by the everted rat gut sac model. *J. Ethnopharmacol.* 2006 ; 103(3) : 425-32.
7. Yang HO, Ko WK, Kim JY, Ro HS. Paeoniflorin: an antihyperlipidemic agent from *Paeonia lactiflora*. *Fitoterapia.* 2004 ; 75(1) : 45-9.
8. Sugaya A, Suzuki T, Sugaya E, Yuyama N, Yasuda K, Tsuda T. Inhibitory effect of peony root extract on pentylenetetrazol-induced EEG power spectrum changes and extracellular calcium concentration changes in rat cerebral cortex. *J. Ethnopharmacol.* 1991 ; 33(1-2) : 159-67.
9. Fan LL, O'Keefe DD, Powell WW Jr. Pharmacologic studies on radix puerariae: effect of puerarin on regional myocardial blood flow and cardiac hemodynamics in dogs with acute myocardial ischemia. *Chin. Med. J.* 1985 ; 98(11) : 821-32.
10. Chiao CY, Kwon HJ, Jeong JS, Lee JH, Hong SP. Determination Method of Puerarin and Daidzin from *Puerariae Radix* by Reversed-Phase HPLC with Pulsed Amperometric Detection. *Kor. J. Herbology.* 2008 ; 23(4) : 171-7.
11. Keung WM, Vallee BL. Daidzin: a potent, selective inhibitor of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *PNAS.* 1993 ; 90(4) : 1247-51.
12. Keung WM, Vallee BL. Therapeutic lessons from traditional Oriental medicine to contemporary Occidental pharmacology. *EXS.* 1994 ; 71 : 371-81.
13. Singleton V, Rossi J. Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965 ; 16 : 144-58.
14. Woisky R, Salatino A. Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control. *J. Apic. Res.* 1998 ; 37 : 99-105.
15. Blois M. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature.* 1958 ; 181 : 1199-200.
16. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999 ; 26(9-10) : 1231-7.
17. Ali S, LeBel C, Bondy S. Reactive Oxygen Species Formation as a Biomarker of Methylmercury and Trimethyltin Neurotoxicity. *Neurotoxicology.* 1992 ; 13 : 637-48.
18. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* 1994 ; 16(2) : 149-56.
19. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* 1978 ; 86(1) : 271-8.
20. Hur K, Park IK. Clinical Usefulness of Direct/Total Bilirubin Ratio. *Lab. Med. Online.* 2018 ; 8(4) : 127-34.
21. Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India.* 2004 ; 52 : 794-804.
22. Lan T, Kisseleva T, Brenner DA. Deficiency of NOX1 or NOX4 Prevents Liver Inflammation and Fibrosis in Mice through Inhibition of Hepatic Stellate Cell Activation. *PLoS One.* 2015 ; 10(7) : e0129743.
23. Sies H, Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2020 ; 21 : 363-83.
24. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free. Radic. Biol. Med.* 1991 ; 11(1) : 81-128.
25. Baraona E, Lieber CS. Effects of ethanol on lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 1979 ; 20(3) : 289-315.
26. Hashimoto T, Cook WS, Qi C, Yeldandi AV, Reddy JK, Rao MS. Defect in peroxisome proliferator-

- activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J. Biol. Chem.* 2000 ; 275(37) : 28918-28.
27. Lee SH, Jung JY, Park SM, Jegal KH, Byun SH, Cho IJ, Kim SC, Kim KJ, Kim YW. Hepatoprotective Effect of Paeoniae Radix via Nrf2 Activation. *Kor. J. Herbology.* 2016 ; 31(1) : 33-40.
 28. Hyun DH, Jung SY, Jung SS, Ha KT, Kim CH, Kim DW, Kim JK, Choi DY. The Study of Protective Effect of Puerariae Radix against CCl4-induced Hepatotoxicity. *J Physiol & Pathol Korean Med* 2003 ; 17(2) : 297-307.
 29. Lee SH, Shin MR, Lee JH, Roh SS. Effects of water extract of Paeoniae Radix Alba on a thioacetamide induced acute liver injury rat model. *J. Nutr. Health.* 2021 ; 54(2) : 224-37.
 30. Kim OK. Protective Effects of Extract of Puerariae Radix on Hepatic Injury Induced by Carbon Tetrachloride In Rat. *KOCS.* 2017 ; 34(3) : 443-50.
 31. Kim JO, Kim SJ, Kim JB, Nam WH, Lee JB, Lee HD. Comparison of Ingredient and Efficacy of Galgeun-tang (Gegen-tang) Mix Extract Powder and Decoction. *JPPKM.* 2019 ; 33(1) : 39-47.
 32. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell. Biochem. Biophys.* 2009 ; 53(2) : 75-100.
 33. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020 ; 21(7) : 363-83.
 34. Hordijk PL. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ. Res.* 2006 ; 98(4) : 453-62.
 35. Sea K, Sohn SH, Durazo A, Sheng Y, Shaw BF, Cao X, Taylor AB, Whitson LJ, Holloway SP, Hart PJ, Cabelli DE, Gralla EB, Valentine JS. Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 2015 ; 290(4) : 2405-18.
 36. You M, Fischer M, Deeg MA, Crabb DW. Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *J. Biol. Chem.* 2002 ; 277(32) : 29342-7.
 37. Shim JJ. Secondary Causes of Fatty Liver. *STS.* 2018 ; 2018(2) : 16-22.
 38. Lee W, Seo YK. SREBP as a Global Regulator for Lipid Metabolism. *J. Life. Sci.* 2018 ; 28(10) : 1233-43.
 39. Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996 ; 12 : 335-63.