

Benzo(a)pyrene에 의해 유도된 간기능장애에 미치는 자근 추출액의 영향

윤수홍 · 박은주 · 오관현 · 정영건*[†] · 권오진*

효성여자대학교 약학대학 위생약학교실

*영남대학교 농축산대학 식품가공학과

The Effect of Lithospermi Radix on Benzo(a)pyrene-Induced Hepatotoxicity

Soo-Hong Yoon, Eun-Ju Park, Kwan-Hyun Oh, Yeung-Gun Chung*[†] and Oh-Jin Kwon*

Dept. of Hygienic Pharmacy, Hyosung Women's University, Hayang 713-702, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 713-800, Korea

Abstract

The present study was undertaken to compare the pharmacological activities of crude *Lithospermi radix* reported with the clinical uses in the oriental medicine. Crude *Lithospermi radix* used for the treatment of burn, eczema, blister, diuretic, scarlet fever and septicemia as antipyretic, antidotic and antiphlogistics. Therefore we tested the effects of *Lithospermi radix* water extract on the liver-protective activities in the rats. The results obtained from enzyme assay, measurement of serum and liver alanine aspartate aminotransferase (ALT, AST) and lipid composition indicated that *Lithospermi radix* water extract showed significant liver-protective activities against benzo(a)pyrene-induced hepatotoxicity.

Key words : *Lithospermi radix*, ALT, AST, benzo(a)pyrene, liver-protective activity

서 론

자근 (*Lithospermi radix*)은 지치과 (Boraginaceae)에 속하는 *Lithospermum L. erythrorhizon* Maximowicz의 뿌리를 말린 것으로¹⁾ 민간에서 해열, 해독 소염제로 피부병, 습진, 동상, 화상, 절상 등에 사용되며²⁾ 한방 의서에서는 청열, 해독 소염제로서 천연두, 성홍열, 단독, 패혈증, 악창 등의 급성염증과 화농성 병증에 내복하면 탁월한 효과가 있고 수인성 화상과 동상, 습진, 수포 등에 사용할 수 있다하여 빈용되고 있는 자원생약이다^{3,4)}. 성분에 관한 연구로 색소인 naphthoquinone 계의 acetylshikonin, shikonin, β , β -dimethylacryl-shikonin 등이 밝혀졌으며⁵⁾ 이들 물질은 항균성을 가진다⁶⁾. 그외의 국소작용으로는 histamine으로 인한 모세혈관 투과성 항진을 억제하는 작용과 자외선 조사 및 열

자극으로 인한 국소 피부열 상승 억제 작용, 창상부의 봉합 촉진 작용 등이 있는데⁷⁾ acetylshikonin과 shikonin이 이에 관여하는 것으로 알려져 있다⁸⁾.

한편 의학통계에 의하면 우리나라 사람들은 일반 아시아 여러나라보다 약 3배 이상의 높은 간염 발병율을 나타내지만⁹⁾ 임상적으로는 아직 특효약이나 효과적인 치료약이 없는 형편이므로 이들의 개발 필요성이 매우 크다고 할 수 있다. 이에 본 저자들은 그동안 문헌조사^{10,11)}를 통하여 민간요법에서 간질환에 사용되고 있는 식물들의 효능을 체계적으로 연구, 발표하여오고 있는데¹²⁻¹⁵⁾ 그 일환으로 본 실험에서는 자근의 항염증 및 해독 작용에 의해 이러한 간염 증상의 소실 및 나아가 간기능 손상의 회복 가능성이 있을 것으로 추측하여 자근 수침액의 간 보호능력을 알아보고자 benzo(a)pyrene (B(a)P)을 자근 수침액으로 전처리한 실험동물에 투여하여 간독성을 유발하는 한편 간기능의 지표로 사용되는 효소 활성도와 지질 함량의 변화를 측정하여

[†] To whom all correspondence should be addressed

간독성의 발현에 미치는 자근 수침액의 예방 및 치료 효과를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 자근은 1991년 대구시내 한약방에서 구입하여 세정, 음건하여 사용하였다.

동물 실험

체중 150 ± 20 g의 Sprague-Dawley계 웅성 rat를 일반 고형사료로 7일간 예비사육하여 환경에 적응시킨 후 난괴법에 따라 군당 6마리씩 5군으로 구분하여 실험하였으며 간장애 예방 효과군은 간기능 보호 약물로 자근 수침액 9g/day를 각각 1일 1회 일정시간에 1주일간 gastric intubation시킨 후 마지막 투여시 B(a)P 0.1mg/kg of body weight를 복강주사하여 간독성을 유발시켰고 간장애 치료 효과군은 B(a)P을 1회 주사직후부터 자근 추출액 일정량을 각각 1일 1회 1주일간 투여하였다.

실험군의 처리방법은 Table 1과 같다.

Table 1. Treatment method of experimental group

Group	Treatment
A. Normal	None
B. Drug control	Lithospermi ext. administration for 7 days
C. Toxicant control	B(a)P injection for one time
D. Drug pre-treatment	B(a)P injection for one time after group B
E. Drug after-treatment	Lithospermi ext. administration for 7 days after group C

*Each group contains 6 animal

* Rats were sacrificed 12hr after the last treatment

Table 2. The effect of Lithospermi radix extract on serum enzyme and lipid in benzo(a)pyrene treated rats

Item Group	AST	ALT	LDH	ALP	HDL cholesterol	Total cholesterol	Triglyceride	Phospholipid
A. Normal	20.52±3.00	19.80±4.01	8.93±1.70	18.98±4.79	43.30±5.77	42.31±3.86	94.40±5.92	76.04± 7.75
B. Control	26.64±3.98 ^a	21.47±5.79 ^a	10.80±1.47 ^a	22.48±2.37 ^a	48.84±3.07 ^a	52.99±7.91 ^a	82.70±7.89 ^a	87.07± 5.75 ^a
C. B(a)P	69.95±9.25 ^b	55.41±4.86 ^b	47.41±6.84 ^{ab}	45.52±8.76	30.36±9.59 ^{ab}	85.20±3.90 ^a	54.05±3.47 ^a	125.95±12.22 ^{ab}
D. Pre-treat.	53.27±6.54 ^b	35.19±0.17 ^b	30.23±1.87 ^a	26.98±2.00 ^{bc}	35.46±7.24	64.35±6.99 ^{bc}	68.85±6.48 ^c	120.52±10.99 ^c
E. After-treat.	38.52±3.30 ^{bc}	36.38±9.76 ^a	18.56±1.47 ^a	28.62±1.66 ^a	31.40±5.61 ^{cd}	61.63±4.30	64.27±7.91 ^a	96.21± 5.76

* Values are mean±S.D.

* Within the same horizontal row with different subscript letters represent significant difference

^a A vs each groups, ^b B vs each groups, ^c C vs each groups, ^d D vs each groups, ^e E vs each group (p<0.05)

생화학적 검사

ALT, AST의 활성은 Reitman-Frankel 방법¹⁶⁾, LDH의 활성은 Berga-Broida법¹⁷⁾, ALP의 활성은 Kind-King법¹⁸⁾에 준하여 측정하였다.

HDL-cholesterol, total cholesterol은 효소법¹⁹⁾, triglyceride는 Muller법²⁰⁾, phospholipid는 효소 (phospholipase)법을 사용한 kit에 의하여 비색정량하였다.

유의성 검정

실험결과는 평균 표준편차로 나타내었고 유의성은 PCS program을 이용한 t-test에 준하여 검정하였다.

결 과

B(a)P을 이용하여 유발한 간장애에서 혈청중의 효소 활성 및 지질 함량의 변동에 미치는 자근 수침액 투여의 영향은 Table 2와 같다.

자근 수침액의 투여로 혈청 효소 활성의 큰 변화는 일어나지 않았으나 B(a)P의 투여에 의해서는 AST, ALT 활성이 약 3배 이상 증가하였으며 이는 자근 수침액의 전처리로 약 34~60%, 후처리로 약 54~64%정도 감소하여 전체적으로 자근 수침액의 투여는 B(a)P의 간독성으로 증가한 transaminase의 활성 감소 작용이 우수한 것으로 나타났다.

LDH의 활성은 B(a)P의 투여로 인한 약 6배 정도의 활성 증가에 대해서 전처리로 약 46%, 후처리로 약 75% 정도의 유의성 있는 현저한 활성 감소 효과를 확인할 수 있었고 ALP의 활성은 B(a)P의 투여시 약 3배 정도의 활성 증가가 자근 수침액의 전처리로 약 70% 정도, 후 처리로 약 64%정도 감소되는 우수한 효과를 보였다.

B(a)P의 투여는 효소뿐만 아니라 혈청의 지질 성분에도 변화를 일으켜 total cholesterol 과 phospholipid

Table 3. The effect of Lithospermi radix extract on liver enzyme activity in benzo(a)pyrene treated rats

Item Group	AST	ALT	LDH	ALP
A. Normal	8.17±0.74	15.25±3.98	16.78±0.17	3.24±0.91
B. Control	13.94±1.64 ^a	17.17±2.02 ^a	18.75±1.69 ^a	3.67±0.87 ^a
C. B(a)P	56.47±4.70 ^a	51.80±4.44 ^a	49.85±2.05 ^{ab}	10.13±1.87
D. Pre-treat.	16.62±1.69 ^b	23.94±6.89 ^b	28.08±2.13 ^a	8.06±1.78 ^{ac}
E. After-treat.	17.60±1.75 ^{ac}	23.46±3.43 ^a	32.82±3.32 ^c	4.44±1.22 ^a

*Values are mean±S.D.

*Within the same horizontal row with different subscript letters represent significant difference

^aA vs each groups, ^bB vs each groups, ^cC vs each group, ^dD vs each groups, ^eE vs each groups (p<0.05)

함량은 약 2.5배 정도의 증가가 일어났고 HDL-cholesterol과 triglyceride 함량은 약 20% 전후의 감소가 일어났는데 이는 B(a)P가 체내에서 lipoprotein과 결합하여 흡수되어 흉관 림프로 이동되는 것²¹⁾과 관련되는 결과로 생각된다. 자근 수침액은 total cholesterol 함량을 약 40% 정도 회복시키는 효과를 보였을 뿐 나머지 지질의 함량 변동에 대해서는 그다지 현저하지 않은 미미한 함량의 변화를 일으키는 것으로 나타났다.

B(a)P을 이용하여 유발한 간장해에서 간장 조직중의 효소 활성 변동에 미치는 자근 수침액 투여의 영향은 Table 3과 같다.

자근 수침액의 단독 투여는 혈청과 같이 조직에서도 효소 활성의 큰 변화는 일으키지 않았으며 B(a)P의 투여에 의해서도 혈청에 비해서는 약하지만 각 효소들이 모두 전반적으로 3~4배의 활성 증가가 일어났는데 특히 AST의 활성은 약 7배 이상의 현격한 증가를 보여 혈청과 같이 transaminase에 대한 손상이 큰 것으로 나타났다. 이러한 변화는 자근 수침액의 전처리로 transaminase는 약 80% 내외, LDH는 약 66% 정도의 회복을 보였지만 ALP 활성은 약 30% 정도로 가장 저조한 회복률을 나타내었다. 자근 수침액의 후처리에 의해서는 transaminase, ALP 활성은 약 80% 정도, LDH는 약 52%정도 회복되는 결과가 관찰되므로 간장 조직에서의 독성대사 효소에 미치는 자근 수침액의 영향은 전, 후처리가 모두 유사한 것을 알 수 있다.

고 찰

각종 화학물질을 동물에 투여하였을 경우 각 물질에 대해 특징적으로 변화를 나타내는 간장해 model 동물들과 그 독성물질에 관한 연구가 많이 알려져왔는데 본 연구에서는 xenobiotic으로써 환경오염물질 뿐만 아니라 식품전반에 널리 존재하는^{22,23)} B(a)P를 간장해 유발물질로 사용하였다.

B(a)P 투여시 일어나는 간손상의 mechanism이 정확히 밝혀지지는 않고 있지만 간조직의 효소계, 면역계가 손상 혹은 파괴되고 간세포의 microsome이 큰 손상을 입게되어 mixed function oxidase(MFO) system의 전반적인 disorganization이 일어난다는 보고²⁴⁾와 각종 효소활성이 손상되고 시일의 경과에 따라 완전히 파괴된다고 보고되었다²⁵⁾.

AST, ALT 활성은 알콜, 유기용매 및 기타 toxicant에 의한 간 실질세포의 장해 발생시 혈중으로의 방출이 향진되어 나타나므로 간장해의 지표가 되는 것²⁶⁾으로 알려져 있는데 일반적으로 간염과 같은 간장해 발생시 세포막 투과성의 변화와 효소제거 비율의 차이에 의해 AST, ALT의 활성 비율이 낮아지는 반면 간괴사가 진행될 경우 그에비해 비율이 증가하며 이때 AST의 활성이 ALT에 비해 높게 나타나는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. 본 실험의 결과 B(a)P의 투여로 혈청과 간장 모두 약 3배 이상 특히 간장 AST의 경우 7배 이상의 transaminase 활성 증가가 일어났고 그 비율이 1.06 정도를 유지하며 AST가 ALT에비해 높은 것으로 미루어 보아 독성의 발현은 간괴사를 유발하는 경향으로 생각된다. 자근 수침액의 투여는 이러한 활성 증가를 60% 가까이 유의성있게 저하시키고 있다. 또한 해당계 효소의 일종으로 생체 각부분 특히 간장, 심근, 골격근 등에 분포되어 이 계통 장기의 급성, 만성 질환에서 상승하는 LDH 활성²⁸⁾과 intra-, extra hepatic cholestasis에 의존하여 primary biliary cirrhosis에서 아주 높이 상승하므로 담도폐쇄 등의 담즙분비 질환 지표로 사용되는 ALP 활성²⁹⁾ 역시 B(a)P 투여로 약 3~6배의 증가를 일으키는 것으로 나타났고 자근 수침액의 투여로 60% 이상의 회복을 보였다. 일반적으로 혈청 transaminase 활성과 ALP 활성이 동시에 높아질 경우 간세포 장애가 고도로 진행되었음을 의미하고 이때 간장에서의 담즙산 배설 장애가 수반된다고 알려져 있으므로 B(a)P 역시 유사한 기전으로 독성을 유발하고 자근 수침액의 투여는

이런 간독성 발현을 지연 혹은 해독시킬 수 있을 것으로 예상되나 어떠한 방법으로 간 실질세포의 능력상승을 일으키는지에 대해서는 뚜렷한 근거가 제시되지 않고 있으므로 이에대한 보다 자세한 실험이 진행중이다.

Toxicant의 투여로 간손상이 일어나면 지질 성분이 축적되어 심한 지방변성이 일어나 혈중에 총지질과 triglyceride의 유출이 증가하고³⁰⁾ 혈중 cholesterol 운반에서 LDL에 비해 HDL은 말초조직으로부터 간으로의 주된 운반체로 작용하므로 총 cholesterol의 함량이 증가하더라도 HDL-cholesterol의 증가는 동맥경화 등 질환의 개선에 중요한 역할을 한다^{31,32)}고 알려져있다. 본 실험에서도 B(a)P의 투여로 간 조직에서 지질축적이 일어난다는 Robinson 등³³⁾의 보고와 일치하여 총지질과 총 cholesterol 함량이 증가되었으며 이는 자근 수침액의 투여 특히 전처리의 경우 크게 저하되는 것으로 나타났다.

그러나 혈청중 총 cholesterol과 triglyceride가 동시에 증가하여 고지혈증을 유발한다는 일반적인 이론과 달리 triglyceride의 증가는 일어나지 않고 오히려 감소하는 결과가 나타났다. 지질 함량의 변동에 대해 자근 수침액의 투여는 크게 현저하지는 않으나 유의적인 함량 감소를 나타내었다. 이상과 같이 B(a)P 투여의 경우 일어나는 혈중 총 cholesterol함량의 증가와 triglyceride 함량의 감소는 간장에서의 cholesterol 합성증가와 triglyceride 이용 증가, 합성 감소에 기인한 가능성이 큰것을 시사한다고 할 수 있겠고 이때 자근 수침액의 투여는 HDL-cholesterol의 증가로 체내에서 생성된 지방성분의 말초 조직으로의 이동 촉진 및 지질성분 분해촉진 작용을 가진다고 생각되며 혈중 cholesterol 함량 저하와 간장 lipogenesis 경로의 촉진으로 간의 지질정체를 막고 phospholipid를 이용한 지질 운반 촉진, phospholipid 성분의 담즙성분으로의 변화 촉진 등의 작용을 나타낸다고 사료된다. 이러한 실험 결과 자근 수침액의 투여는 B(a)P의 투여로 인한 간 실질세포의 손상과 담즙분비 이상의 간독성에 대해 우수한 보호 효과를 가지는 것으로 생각되며 이러한 간기능 보호 효과의 자세한 성분 구명과 기전 검색을 위하여 xenobiotics 에 의한 간독성의 발현은 식이 중 단백질함량 감소에 비례한다는 Drill의 보고³⁴⁾와 다가 불포화지방산, 식이섬유소 등이 지방 성분 변화를 유발한다는 보고^{35,36)}에 착안하여 자근의 성분 검색, 유효성분 추출, *in vitro*에서의 간기능 보호 효과 검색 등 보다 세부적인 실험을 진행 중이다.

요 약

민간에서 주로 사용되는 약용식물들 중 간독성의 발

현 저해 및 간기능 보호 효과가 우수한 약물을 찾아 임상적인 약효를 밝혀보고자 하는 실험과정으로 탄소화합물의 불완전 연소 및 열분해에 의해 생성되는 간장애 물질인 benzo(a)pyrene으로 유도한 rats의 간독성 발현에 미치는 자근 수침액의 예방 및 치료 효과를 실험한 결과 자근 수침액의 투여는 B(a)P 투여로 현저하게 증가된 혈청 및 간장의 AST, ALT, LDH, ALP 활성을 유의성 있게 감소시켰고 B(a)P 투여로 증가한 혈청 total cholesterol 및 phospholipid 함량 역시 감소시킬 수 있었으나 그 효과는 현저하지 않았다. 즉, 자근 수침액의 투여는 B(a)P에 의한 간독성 발현을 유의성 있게 감소시켰으며 그 효과는 전처리가 후처리에 비해 우수하였다.

감사의 글

본 연구는 1991년도 한국과학재단 목적기초연구과제 연구비지원에 의한 연구결과의 일부이며 지면을 통해 감사드립니다.

문 헌

1. 한국약용식물연구회 : 약용식물학. (1980)
2. 韓國化學研究所 : 韓國有用植物資源研究總覽, p.170 (1988)
3. 赤松金芳 : 新訂和漢藥, 醫齒藥出版株式會社, 東京, p.650 (1974)
4. 陽本求九 : 皇漢醫學, 矯聯東方圖書公司, p.285 (1962)
5. 塚田揆, 福井광재, 羽原千里, 田端守 : 각종 자근의 naphthoquinine에 관한 비교 연구. 生藥誌, 37, 299 (1983)
6. Tanaka, Y. and Odani, T. : Pharmacodynamic study on "Shinko", I. Antibacterial effect of "Shinko", *Yakugaku Zasshi*, 92, 525 (1972)
7. 임원영 : 자근 및 당귀의 약리학적 연구 (2). 색소성분 shikonin 및 acetylshikonin의 약리작용. 日藥理誌, 73, 193 (1977)
8. Yoshizaki, F., Hisamichi, S., Kondo, Y. and Nozoe, S. : Studies on shinkon III. New Furohydroquinone derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, 30, 4407 (1982)
9. Cgang, I. M. and Yun, H. S. : Plants with liver protective activities(III). *Kor. J. Pharmacy*, 10, 79 (1979)
10. 寶善齋 : 閩閣叢書, 3, 372 (1975)
11. 民俗苑 : 林園經濟誌, 3, 156 (1991)
12. 윤수홍, 안정임, 권정숙 : 화분립의 영양생화학적인 연구. 해바라기 화분립의 지질조성과 mouse 콜레스테롤 대사에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 13, 169 (1984)
13. 윤수홍, 안정임, 권정숙 : 화분립의 영양생화학적인 연구. 해바라기 화분립의 아미노산 조성과 rat 간

- alcohol dehydrogenase 활성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, **14**, 27 (1985)
14. 권정숙, 윤수홍 : Chloroform에 의한 rat 간 및 신장장애에 미치는 화분립의 영향-병리 조직학적 소견. 한국영양식량학회지, **15**, 229 (1986)
 15. 권정숙, 윤수홍 : 화분립의 영양생화학적 연구. Chloroform에 의한 rat의 간 및 신장 장애에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, **15**, 235 (1986)
 16. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 58 (1957)
 17. Berga, L. and Broida, D. : Sigma Tech. Bull., 500-8-60 (1960)
 18. Kind, P. R. N. and King, E. J. : Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolyzed phenol with amino antipyrine. *J. Clin. Pathol.*, **7**, 322 (1954)
 19. Takayama, M., Frings, C. S. and Dunn, R. T. : A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. *Clin. Chem. Acta*, **79**, 93 (1977)
 20. Muller, D. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Chem. Clin. Biochem.*, **15**, 457 (1977)
 21. Busbee, D. L. Norman, J. O. and Ziprin, R. L. : Comparative uptake, vascular transport and cellular internalization of aflatoxin B₁ and benzo(a)pyrene. *Arch. Toxicol.*, **64**, 285 (1990)
 22. Frank, E. G. and Jerome, J. P. : Introduction to environmental toxicology. Elsevier North Holland, New York, p.360 (1978)
 23. 澤村郎二, 濱田 昭 : 食品衛生學. 南江堂, p.255 (1986)
 24. Cohen, G. M. : Target organ toxicity. CRC Press, Florida, Vol. 1, p.42 (1986)
 25. Okey, A. B., Duba, A. W. and Vella, L. M. : Binding of benzo(a)pyrene and diben(a,h)anthracene to the Ah receptor in mouse and rat hepatic cytosol. *Cancer*, **44**, 1426 (1984)
 26. LaDue, J. S., Wroblewski, F. and Karmen, A. : Transaminase activity in human blood. *Science*, **120**, 474 (1954)
 27. Bergmeyer, H. U. : Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Academic Press, Weinheim, Vol. 1, p. 20 (1974)
 28. Kim, K. H. : Laboratory methods in clinical chemistry. p.111 (1976)
 29. 김기홍 : 검사성적의 임상적 활용. 고문사, 서울, p. 104 (1980)
 30. Grey, N. J., Karls, I. and Kipnis, D. M. : Physiologic mechanisms in the development of starvation ketosis in man. *Diabetes*, **24**, 10 (1975)
 31. Gordon, T., Castelli, W., Hjortland, M., Kannel, W. and Dawber, T. : High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. *Am. J. Med.*, **62**, 707 (1977)
 32. Iwata, K., Inayama, T., Miwa, S. and Kawaguchi, K. : Effects of Chinese green tea and uolong tea on blood pressure and liver lipids in spontaneously hypertensive rats and rats with fructose induced hyperlipidaemia. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **40**, 469 (1987)
 33. Robinson, J. R., Felton, J. S., Levitt, R. C., Thorgeirsson, S. and Nebert, P. W. : Relationship between aromatic hydrocarbon responsiveness and the survival time in mice treated with various drugs and environmental compounds. *Mol. Pharmacol.*, **11**, 850 (1975)
 34. Drill, V. A. : Hepatotoxic against mechanism of action and dietary interrelationship. *Pharmacol. Rev.*, **4**, 1 (1952)
 35. Beynen, A. C. and Katen, M. B. : Why do polyunsaturated fatty acid lower serum cholesterol, *Am. J. Clin.*, **42**, 560 (1985)
 36. Judd, P. A. and Truswell, A. S. : The hypocholesterolemic effects of pectins in rats. *Br. J. Nutr.*, **53**, 409 (1985)

(1993년 1월 9일 접수)