

실험동물에서 복합천연물 (DW) 의 지질 과산화 억제와 간섬유화 저해 효과 검색

정재열** · 임진이** · 박선영** · 서의석** · 제갈승주*** · 김기영***

*원광대학교 의과대학 병리학교실, **한의학전문대학원, ***원광보건대학 임상병리과

(Received June 21, 2001; Revised July 20, 2001)

The Extracts from Natural Product Complex (DW) Suppress Lipid Peroxidation and Inhibit Liver Fibrosis (Cirrhosis) in Rats

Jae-Yeal Jeung**, Jin-A Lim**, Sun-Young Park**, Eui Seuk Suh**,
Seung-Joo Jekal*** and Ki-Young Kim***

**Department of Pathology, Medical School and

***Professional Graduate School of Oriental Medicine Wonkwang University Iksan, Korea

***Department of Clinical Pathology Wonkwang Health Science College Iksan, Korea

Abstracts — The chronic cholestasis induce to biliary liver fibrosis (cirrhosis) and the increased products of ROS(reactive oxygen species) cause to the liver damage. In this study, the antioxidant and antifibrotic effect of dried extracts of oriental medicine (DW) was investigated under the liver fibrotic (cirrhotic) condition. The female Sprague-Dawley rats were divided in 5 groups (Normal, Op-2, Op-4, OpDW-2, OpDW-4). Except for normal group, the rats were induced to biliary liver fibrosis (cirrhosis) by the operation of bile duct ligation/scission (BDL/S) and were observed in 2 weeks or 4 weeks. And the prepared DW was treated p.o. 2 ml/day/rats in 2 weeks or 4 weeks for OpDW groups. At the time of sacrifice, the liver, kidney, spleen were weighed and the ratio of organ weight/body weight was calculated. The MDA, the hyp and biochemical parameters (GOT, GTP, ALP, t-bili) were measured in sera and liver tissue of rats. The histological change was observed on liver tissue. In the result, the hepatomegaly and splenomegaly appeared in all BDL/S operated rats, and significantly lower liver weight was observed in OpDW-4 group compared with in Op-4 group ($p < 0.05$). The level of clinical parameters in sera of all liver fibrosis (cirrhosis) developed rats was higher than in normal group. Especially, the value of GOT in OpDW-2 group and ALP in OpDW-4 group showed significantly lower than in Op-2 group and Op-4 group ($p < 0.01$, $p < 0.005$). The content of hyp in all operation groups was significantly higher than in normal group ($p < 0.05 \sim < 0.005$), and showed significantly lower value in the OpDW-4 group than in Op-4 group ($p < 0.05$). The product of lipid peroxidation(MDA) increased significantly under the fibrotic(cirrhotic) condition ($p < 0.05 \sim < 0.005$), and the MDA value in OpDW-4 group decreased significantly in Op-4 group ($p < 0.005$). The histological change (bile duct proliferation, fibrosis, collagen bundle) was similarly observed in Op-2 group and in OpDW-2 group, but the weak fibrosis and bile duct proliferation were observed in OpDW-4 group compared with in Op-4 group. In conclusion, lipid peroxidation and severe liver damage were activated by bile duct obstruction, and the measurement of MDA and hyp can be useful monitor for the screening of antioxidant and antifibrotic effect in experimental liver fibrosis (cirrhosis). The 4 weeks treatment with DW extracts suppressed lipid peroxidation and inhibited fibrotic (cirrhotic) process in BDL/S operated rats.

Keywords □ Liver fibrosis, lipid peroxidation, MDA, collagen, antifibrotic effect

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 063-850-6775 (팩스) 063-852-2110

Oxidative stress에 의한 ROS(reactive oxygen species)의 생성은 간염유화,^{1,2)} 신장염,^{3,4)} 피부질환,⁵⁾ 당뇨병⁶⁾ 등의 여러 가지 질환의 원인이 될 수 있으며, 특히 free radical(NO⁻, OH⁻, O₂⁻)은 분자상 산소가 활성산소로 변화하여 다른 분자들과 반응하면서 생성되어 노화, 염증, 발암, 동맥경화^{7,8)}와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 불포화지방산이 풍부한 세포막은 생성된 free radical에 의해서 지질과산화의 표적이 되어 세포소기관(organelles)이 정상적인 구조 및 기능을 잃게 되며 국소적인 손상과 아울러 aldehyde와 같은 지질과산화의 분해산물이 생성부위에서 멀리 떨어진 부위로 이동하여 세포손상을 일으키게 된다.⁹⁾ 최근의 보고에 의하면 지질과산화는 간염유화에서 collagen gene transcription을 modulation 또는 stimulation시키는 것으로 알려져 있고,^{10,11)} 지질과산화의 분해물은 황인, CCl₄, 간독성 물질, alcohol consume, 만성 담즙울체(chronic cholestasis)등에 의해서 증가되며,¹²⁻¹⁴⁾ 인간과 랫드의 간조직과 혈장에서 뿐만 아니라 심장조직, 신장조직 등에서도 증가된다고 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁶⁾ 과음, 당뇨, 비만 등은 지방간의 원인으로 지질결합 단백질의 저하, 지방 이동의 저해, 과산화 지질의 축적 등에 의해서 시작되어,¹⁷⁾ 지방간염(steatohepatitis), 간염(hepatitis), 간염유화(liver fibrosis)를 거쳐 간경변(liver cirrhosis)으로 진행된다고 보고되고 있다.¹⁸⁾ 간경화(간염유화)는 간조직의 동양혈관주위와 간정맥주위에 세포외기질 단백질(extracellular matrix protein) 특히 collagen fiber의 과도한 침착으로 인한 형태학적 변화를 의미한다. 간경화는 tissue formation과 tissue remodeling의 과정으로 세포외기질 단백질의 과도한 침착 또는 scar formation으로 특징지어지며, 이때에 myofibroblast, fat storing cell(HSC: hepatic stellate cell)등이 과도하게 증식되는 것으로 보고되고 있다.^{19,20)}

최근에는 지질과산화와 HSC의 성장, 분화등과 관련하여 간염유화(경화)의 치료기전연구에서 항산화 효과와 항염유화 효과에 대한 검색이 진행이 되고 있다. 항산화 물질(antioxidant compounds)은 반응성 산소중간생성물(reactive oxygen intermediate)에 의한 공격에 대항하는 작용이 있어서, 심혈관 동맥경화와 관련하여 지질과산화를 저해할 수 있는 항산화 물질(flavonoids, carotinoids, vitamine C, E등)²¹⁻²³⁾ 효과에 대한 보고가 많다. 지질과산화를 억제 또는 방지

할 수 있는 기능, 즉 항산화 효과는 간보호 효과 및 항염증 작용이 있는 것으로 보고되고 있으며, 간질환(alcohol abuse, liver fibrosis)에 대한 효과 검색은 항산화물질의 간세포 보호 가능성에 대해서 punicalagin,²⁴⁾ nees,²⁵⁾ 소시호탕,²⁶⁾ 인진, silymarin²⁷⁾을 중심으로 연구가 진행되고 있고 대부분이 항염유화 효과가 있는 물질들이 선정되고 있다. 최근 천연물에서 기원한 약물로는 옴담의 주성분인 UDCA, 오미자에서 추출한 DDB, Silybum marianum에서 추출한 silymarin이 임상에 사용되고 있으며 영지균사체, 인진고탕, 인삼등에서 항염유화 효능에 대한 보고가 있고²⁸⁻³¹⁾ 결명자(Cassia sp.),³²⁾ 황금(Scutellaria baicalensis),³³⁾ Goodyera species³⁴⁾등이 간독성물질에 대해서 간보호 효과가 있는 천연물로 보고되고 있으며, 세계 각국에서 한약재(천연물)를 대상으로 많은 연구의 진행과 함께 항염유화 효과에 대한 연구가 진행되고 있다.

이에 본 연구에서는 이미 지질과산화물의 분해물인 MDA와 간염유화(경화)와 연관성이 있다는 실험 결과³⁵⁾를 토대로 하여 천연물의 항염유화 효과와 항산화효과와의 상호연관성과 이러한 작용이 복합적으로 나타날 수 있을 것인가에 대해서 알아보고자 간염유화를 유도한 랫드에 복합생약의 건류추출물을 2주, 4주간 투여하여 간기능의 지표인 생화학적 수치 및 결합조직 단백질의 변화를 나타내는 collagen의 양과 지질과산화 정도를 나타내는 MDA의 농도를 관찰하였다.

실험방법

실험동물

10주령 Sprague-Dawley 랫드(170~230 g)를 5개군(정상군, Op-2군, Op-4군, OpDW-2군, OpDW-4군)으로 구분하여 사육하였다. 사육환경은 밤과 낮의 리듬을 구분하였고 사료와 물을 자유롭게 공급하였다.

간염유화 유도 및 약물 투여 방법

정상군을 제외하고 랫드에 Kountras 등³⁶⁾의 방법에 따라 담도를 결찰하여(bile duct ligation/scission) 간염유화를 유도하였다. 3가지의 천연물[갈근(D): 1.5 kg, 양파(W): 1.5 kg, 산머루목(etc): 1.0 kg)은 건류중류법으로 72시간 처리하여 농축된 엑기스를 여과하여 2주와 4주간 경구투여(2 ml/rat/day)하였다.

실험재료의 채취

2주, 4주간의 관찰 후, 실험동물을 희생시켜 간조직과 혈청을 시료로 사용하였다. 혈청은 심장에서 채혈하여 2시간 이상 실온에 방치한 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 -20°C에 보관하여 사용하였다. 간조직의 일부는 hydroxyproline 측정을 위하여 -70°C에서 보관하였으며 나머지 간조직은 10% 중성 포르말린에 고정하여 hematoxylin & eosin, Masson's trichrome 염색에 사용하였다.

혈청생화학적 검사

Glutamate pyruvate transaminase(GPT), glutamate oxalate transaminase(GOT), total bilirubin, BUN, creatinine을 BML-kit를 사용하여 분석하였다.

총 collagen(hydroxyproline) 양 측정

간조직내 hydroxyproline(hyp)양의 측정은 Jamall 등³⁷⁾의 방법에 따라 간조직을 염산으로 가수분해시켜 isopropylalcohol을 넣고 chloramine-T로 산화시켜 Ehrlich's reagent solution(p-dimethylaminobenzaldehyde)으로 발색시킨 후 558 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

MDA 측정

Okawa 등¹²⁾의 방법에 따라 혈청시료와 표준물질(tetramethoxypropane)에 0.2% SDS, 20% acetic acid, 0.8% thiobarbiturate를 가하여 95°C에서 반응시킨 후 냉각시켰다. 그런 다음 butanol을 가하고 원심분리하여 532 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

조직염색 및 소견

간조직을 H & E, Masson's trichrome 방법으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 조직소견은 담관증식, 섬유화, 염증, scar formation의 정도를 +, ++, +++로 표시하였다.

통계처리

Student's t-test를 사용하였고, means±SD으로 표시하였으며 p-value를 구하여 유의성을 검증하였다. 또한 각각의 parameter들 사이에서 상관관계(regression)를 조사하였다.

실험결과

일반적인 관찰 - 간섬유화(경화)를 유도한 Op-2군, Op-4군 그리고 DW 경구투여군인 OpDW-2군, OpDW-4군의 랫드 귀에서 황달이 출현하였고, proximal bile duct에서는 담즙 울체가 관찰되었으며, OpDW-2군, OpDW-4군의 담즙양은 Op-2군, Op-4군보다 약간 적었고(1~3 ml), 또한 담즙색은 약간 맑았다(Fig. 1).

체중, 장기 무게 및 장기/체중 변화 - 정상군에 비해서 Op군과 OpDW군에서 간중대, 비중대가 관찰 되었다(Table I). 간 무게는 Op-4군, OpDW-4군에서 모두 정상군보다 유의성 있게 높게 나타났고(p<0.005), 간/체중의 무게비 또한 Op-4군, OpDW-4군 뿐만 아니라 Op-2군, OpDW-2군에서도 유의성 있게 높게 관찰되었다(Table I, p<0.005). OpDW-4군에서 간무게(18.8%, p<0.05), 간/체중 비(p<0.05)는 Op-4군과 비교했을 때 유의성 있게 낮았다. 신장, 비장의 무게와 비장/체중, 신장/체중은 정상군보다 Op-2, 4군과 OpDW-2, 4군에서 모두 높았으며, 비장/체중 비에서는 Op-2군보다 OpDW-2군에서 유의성있게 낮았다(p<0.05, Table I).

혈청생화학적 변화 - 정상군에 비해서 Op-2군, Op-



Fig. 1 - The bile juice of expanded proximal bile duct from a rat in op-4 group and OpDW-4 group. a: bile juice from a rat in Op-4 group, b: bile juice from a rat in OpDW-4 group

Table I - The weight of organ and the ratio of organ/body weight in normal, fibrotic and DW treated rats

Group	normal	Op-2	Op-4	OpDW-2	OpDW-4
Liver weight(g)	9.66 ± 1.30	11.66 ± 0.98	21.10 ± 1.90**	12.09 ± 2.26	17.05 ± 3.95**,#
Kidney weight(g)	1.92 ± 0.21	2.23 ± 0.46	2.34 ± 0.18*	2.12 ± 0.49	2.11 ± 0.31
Spleen weight(g)	0.60 ± 0.10	1.13 ± 0.31*	1.42 ± 0.21*	0.78 ± 0.29*	1.36 ± 0.42*
Ratio of LW/BW(%)	3.75 ± 0.24	5.89 ± 0.45**	7.66 ± 0.69**	6.11 ± 1.17**	6.56 ± 1.31**,#
Ratio of KW/BW(%)	0.75 ± 0.05	1.13 ± 0.29*	0.85 ± 0.06	1.08 ± 0.31*	0.82 ± 0.08
Ratio of SW/BW(%)	0.24 ± 0.05	0.58 ± 0.19*	0.52 ± 0.08*	0.40 ± 0.16*,#	0.48 ± 0.13*,#
Number of animal	6	6	11	5	6

*The significant value different from normal ($p < 0.05$), **The significant value different from normal ($p < 0.005$), #The significant value different from Op-4 group ($p < 0.05$)

Op-2: The 2 weeks observed rats group after BDL/S Operation

Op-4: The 4 weeks observed rats group after BDL/S Operation

OpDW-2: The 2 weeks observed rats group after BDL/S Operation and treatment with DW

OpDW-4: The 4 weeks observed rats group after BDL/S Operation and treatment with DW

Table II - The value of clinical parameters in sera of normal, fibrotic and DW treated rats

Group	normal	Op-2	Op-4	OpDW-2	OpDW-4
GOT	44.0 ± 13.2	238.5 ± 44.8*	317.3 ± 72.3*	154.7 ± 35.8*#	264.5 ± 100.0*
GTP	21.8 ± 6.7	32.3 ± 9.3	30.4 ± 4.5	24.7 ± 4.9	33.5 ± 9.5
BUN	17.7 ± 1.5	19.5 ± 4.2	21.7 ± 4.8	19.8 ± 4.2	17.1 ± 5.4
ALP	161.4 ± 95.1	261.0 ± 65.5*	291.1 ± 38.2*	231.5 ± 82.1*	214.1 ± 57.9*#
T-bilirubin	0.09 ± 0.18	8.4 ± 1.3*	6.5 ± 0.56*	6.7 ± 2.8*	6.4 ± 1.7*
Number of animal	6	6	11	5	6

*The significant value different from normal ($p < 0.01$), #The significant value different from Op-2 group ($p < 0.005$), ##The significant value different from Op-4 group ($p < 0.05$)

4군, OpDW-2군, OpDW-4군에서 GOT, GTP, ALP, t-bilirubin의 수치가 유의성 있게 높게 나타났고, OpDW-2, OpDW-4군과 Op-2군, Op-4군을 비교했을 때 GOT, ALP, t-bili의 수치가 낮았으나 유의성은 관찰되지 않았으며, 단지 OpDW-2군의 GOT 수치가 Op-2군과 비교했을 때 유의성 있게 낮았다(Table II, $p < 0.01$). 그리고 OpDW-4군의 ALP수치는 Op-4군과 비교했을 때 유의성 있게 낮았다($p < 0.05$).

MDA 농도의 변화 - 혈청중 MDA 농도는 Op군과 OpDW군 모두에서 정상군보다 유의성 있게 높았다 ($p < 0.05$). 그러나 Op-2군, Op-4군보다 MDA농도가 OpDW-2군, OpDW-4군에서 낮았으며 특히 OpDW-4군에서는 Op-4군보다 유의성있게 낮았다(Fig. 2a, $p < 0.001$).

Hydroxyproline양의 변화 - 정상군과 비교했을 때 Op군과 OpDW군에서 모두 유의성 있게 높은 hyp양이 관찰되었으나($p < 0.05 \sim < 0.005$), OpDW-4군의 hyp 양은 Op-4군과 비교했을 때 유의성 있게 낮았다(Fig. 2b, $p < 0.05$).

MDA와 hyp, GOT, ALP T-bili와의 상관성 - 정상군에서는 MDA와 GOT, t-bili와 상관성이 있었고(Table

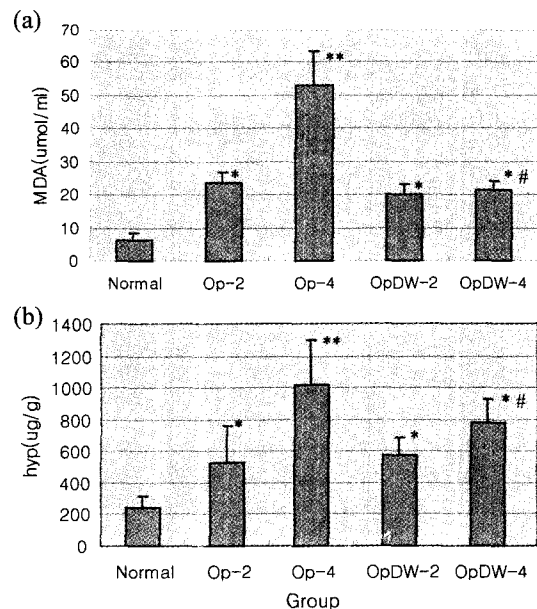


Fig. 2 - The diagrams of (a) MDA in sera and (b) hyp in liver tissue of rats. *The significant value different from normal ($p < 0.05$), **The significant value different from normal ($p < 0.005$), #The significant value different from Op-4 group ($p < 0.05$)

Table III – The correlation between MDA and GOT, ALP, hyp of normal, fibrotic and DW treated rats

Group	GOT/MDA	GTP/MDA	ALP/MDA	hyp/MDA	t-bili/MDA	n
Normal	0.666	0.550	0.014	0.509	0.656	6
Op-group	0.552	0.198	0.251	0.673	0.540	17
OpDWgroup	0.440	0.502	0.252	0.385	0.398	12

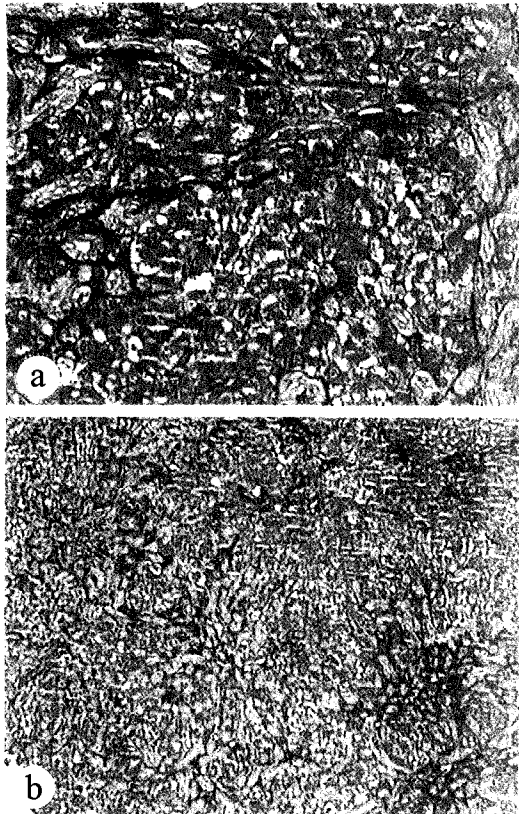


Fig. 3 – Masson's trichrome stained liver tissue from fibrotic (cirrhotic) rat. (a) The liver tissue of BDL/S operated rat ($\times 80$), (b) The liver tissue of BDL/S operated rat ($\times 40$)
 ← : collagen fiber, ← : bile duct proliferation

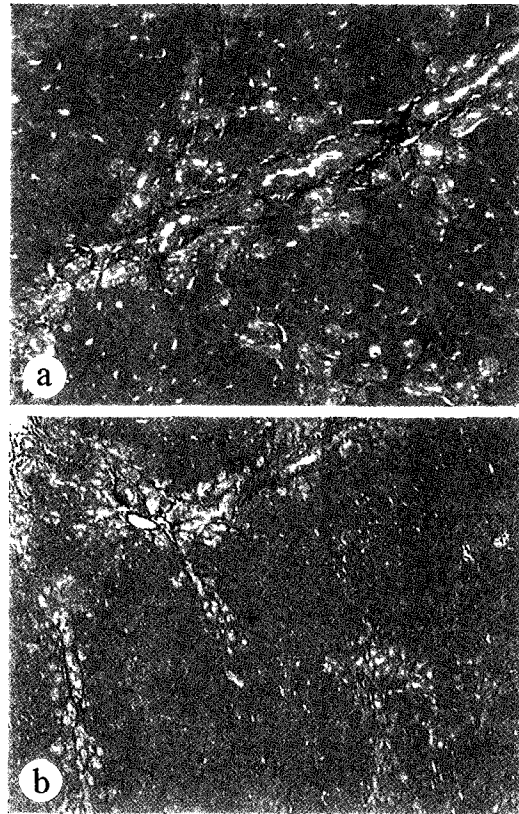


Fig. 4 – Masson's trichrome stained liver tissue of DW treated rats. (a) The liver tissue of in 4 weeks DW treated rat after BDL/S operation ($\times 80$), (b) The liver tissue of in 4 weeks DW treated rat after BDL/S operation ($\times 40$)
 ← : collagen fiber, ← : bile duct proliferation

III, $r=0.666$, $r=0.656$), Op군에서는 MDA와 hyp가 상관성이 있으며($r=0.673$), OpDW군에서는 다른 parameter와 상관성은 전혀 나타나지 않았다(Table III).

조직학적 변화 – 정상군보다는 Op-2, 4군과 OpDW-2, 4군 모두에서 담관증식(++~+++), 섬유화(++~+++), portal triads에서의 과도한 collagen fiber 축적, 간세포의 팽대와 핵의 붕괴 등이 관찰되었다(Fig. 3a, 3b). 그러나 OpDW-4군에서 담관증식이 주로 portal triads에 편재되어 있고 stroma로 진전된 것이 많지 않았으나, Op-4군에서는 portal triads와

stroma에서도 담관증식이 관찰되었다. OpDW-4군에서 간세포의 중창은 Op-4군보다 약하고, 세포질의 파괴와 핵붕괴 등은 Op군보다는 상태가 좀더 약하게 관찰되었다(Fig. 4a, 4b).

고 찰

각종 화학물질의 대사과정에서 생성된 free radical(NO^{\cdot} , OH^{\cdot} , O_2^{\cdot})은 지질과산화물의 개시물질로

서 나타나는데 이는 분자상 산소와 직접 반응하여 organic peroxy free radical(유기과산화)을 형성하고^{9,38)} 독특한 세포장해를 일으켜 간괴사에까지 이르게 된다. *In vivo* 실험에서 지질과산화는 간, 신장, 심장 뇌 등에서 장기손상을 일으킨다고 알려져 있으며,^{39,40)} 특히 지질과산화 분해물이 담즙울체에 기인하는 실험적 간섬유화의 간, 신장, 심장의 조직에서 증가되었다는 보고가 있고,²⁾ 지질과산화를 억제 할 수 있는 물질은 항산화 효과가 있는 것으로 간주되고 있으며 여러 가지 천연물에서 항산화 효과가 검색되고 있다.^{33,34)} 간섬유화는 간구성 세포의 정량적인 변화와 형태학적 변화를 수반하고, 특히 ECM(extracellular matrix protein)의 간조직내 합성과 분해의 불균형이 일어나서 과도한 ECM의 축적을 일으킨다. 따라서 항섬유화 효과는 과도한 EMC의 조직내 축적을 방지하거나 합성을 억제하고 분해를 촉진하는 것이다.

간질환과 관련하여 지금까지 penicillamine,^{41,42)} 16,16-dimethyl prostaglandin E₂,⁴³⁾ biphenyl dimethyl dicarboxylate,⁴⁴⁾ colchicine,⁴⁵⁾ glucocorticoid,⁴⁶⁾ malotilate,⁴⁷⁾ interferon- γ ,⁴⁸⁾ pentoxifylline⁴⁹⁾ 및 prolyl 4-hydroxylase inhibitor인 pyridine-2,4-dicarboxylic-diethylamide(SO 885)와 pyridine-2,4-dicarboxylic-di(2-methoxyethyl) amide(HOE 007)⁵⁰⁾ 등의 간섬유화 억제 효과에 대한 많은 연구가 진행되고 있으나 임상에 적용시 항섬유화 작용이 미약하거나 또는 그 부작용이 심하여 뚜렷한 항섬유화 효과가 있는 물질이 아직까지 없는 실정이다. 따라서 지질과산화 분해물의 정량적인 측정과 간섬유화의 지표(간조직중 collagen 축적량)의 측정은 항산화 및 항섬유화 효과를 동시에 검색할 수 있다는 점에서 큰 의미가 있다.

본 연구에서는 천연물 건류 추출액(DW)의 항섬유화 효과와 항산화 효과를 검색하기 위해 간조직중 hyp(총 collagen)양과 지질과산화 분해물인 MDA(malondialdehyde)를 측정하여 그 효과를 검색하였다. 일차적으로 본 시험에 앞서 이미 BDL/S 수술방법으로 간섬유화(경화)를 유도한 랫드에서 MDA와 다른 parameter에 대한 결과³⁶⁾를 확인하여 천연물의 투여기간을 2주, 4주로 결정하였으며, 데이터 해석에도 많이 참고하였다.

본 실험에서 간섬유화(경화)를 유도한 수술군과 DW(천연물)투여군 모두에서 정상군 동물과 비교했을 때 귀와 눈주위에 황달, expanded proximal bile duct에 담즙울체가 나타났으나, DW투여군(OpDW-2, 4

군)의 담즙색이 수술군(Op-2, 4군)보다 맑고 투명한 것으로 미루어 보아 DW의 투여가 황달을 악화시키는 효과가 있음이 육안적인 관찰에서 파악되었다(Fig. 1).

장기의 무게와 장기/체중의 비는 정상군보다 Op-2, 4군과 OpDW-2, 4군에서 모두 높게 나타났으며, Op군과 OpDW군을 서로 비교 했을 때 OpDW-2군에서 비장/체중비가 17.2%($p < 0.05$), OpDW-4군에서 간무게와 간/체중비가 19.2%($p < 0.05$)로 유의성 있게 낮게 나타남으로서(Table I) DW의 4주간 투여는 담즙울체에 기인하는 비종대와 간종대를 악화시킬 수 있는 가능성이 나타났다. 이는 영지균사체추출물을 4주간 투여 후 간종대가 약화되었다는 박등²⁹⁾의 연구결과와 유사하다.

본 실험의 Op군과 OpDW군 모두에서는 정상군보다 혈청중 GOT, ALP, t-bilirubin의 수치가 유의성 있게 높게 나타났고($p < 0.05 \sim < 0.005$), OpDW-2군에서는 GOT, GTP, BUN, t-bilirubin이 Op-2군보다 수치가 낮았으나 유의성은 검증되지 않았으며(Table II), OpDW-4군에서 ALP의 수치가 Op-4군보다 유의성 있게 낮았다($p < 0.05$). 간섬유화의 지표인 hyp수치는 opDW-2군에서 op-2군보다 높게 나타났지만, opDW-4군에서는 op-4군보다 유의성 있게 낮게 관찰되었다($p < 0.05$, Fig. 2b). 조직학적 관찰에서 약간 경미한 간세포 종창, 섬유화와 육안적인 관찰에서 경미한 황달출현, 간조직중 유의성 있게 낮은 hyp 수치, 혈청 진단지표에서 낮은 수치가 나타남으로서 간기능 개선, 간보호 및 항섬유화 효과의 가능성이 높게 나타났다.

항산화 효과와 관련하여 Shimizu등²⁶⁾은 DMN(dimethylnitrosamine)으로 유도한 간섬유화 동물의 간조직중 지질과산화 분해물인 MDA 수치의 유의성 없는 감소를 보고하였으나, 본 연구에서는 MDA가 Op군과 OpDW군에서 정상군보다 약 3~8.5배정도 유의성 있게 높게 나타났고 Op-2군과 OpDW-2군에서 거의 비슷한 양상을 보였다(Fig. 2a). 그러나 OpDW-4군에서 59.4%($p < 0.005$, Fig. 2a) 유의성 있게 낮은 것으로 미루어 보아 항산화 효과 있다고 사료된다. 이와 유사한 결과에 대해서 Ljubumic등⁵¹⁾은 common bile duct ligation으로 담즙울체성 간손상을 유도한 랫드에서 UDCA를 24일간 투여하였을 때 혈청 간기능 지표의 개선효과는 없으나 지질과산화는 억제되었다고 보고하였다.

또한 최근에 Yasuda등¹⁸⁾은 lipid peroxide인 MDA와 hepatic collagen양 사이에서 유사한 변화양상을

보고하고 있으나, 아직은 뚜렷한 조직중 hyp와 혈청중 MDA와의 상관관계에 대한 보고는 없다. 그러나 본 실험에서 측정된 hyp와 MDA는 수술후 4주군의 비교에서 두 지표사이에 중간정도의 상관관계를 나타내고 있고($r=0.673$, Table III) 항섬유화와 관련하여 간조직중 hyp가 OpDW-4군에서 Op-4군보다 24.5%($p<0.05$) 유의성 있게 낮음으로서 항섬유화 효과가 있으며, Op 군에서는 MDA와 hyp가 중간정도의 상관성($r=0.673$)이 있었으나 OpDW군에서는 상관성이 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 BDL/SC로 간섬유화(경화)를 유도한 랫드에서 간조직중 hyp는 혈청중 PNIIP(procollagen III peptide)와 상관성이 있으나, 항섬유화 효과가 있는 경우에는 상관성이 관찰되지 않는다는 김 등⁵²⁾의 보고와 일치한다.

따라서 천연물 또는 약물이 항산화 및 항섬유화 효능이 있는 경우에는 각 지표들 사이에 상관성이 없을 가능성이 있으며, 간섬유화가 유도되었을 경우에는 지질과산화 분해물인 MDA의 농도가 간조직중 hyp와 상관성이 있다고 생각된다. 혈청중 MDA의 측정과 간조직 중 hyp의 측정은 항산화와 항섬유화효과의 검색에 좋은 지표로 사용할 수 있고 혈청과 간기능 진단지표인 MDA와 hyp의 상관관계를 조사하는 것은 항산화, 항섬유화 효과 검색에 유용하리라 사료된다. 또한 DW는 4주간의 투여에서 간, 간/체중비, ALP, MDA, hyp가 유의성 있게 비투여군(수술군) 보다 낮은 수치를 나타냄으로서 확실한 항산화, 항섬유화 효과가 있다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 원광대학교 한의학전문대학원 BK21사업비, 2000년 교비에 의해 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Szuster-Ciesielska, A., Daniluk, J. and Kandefr-Szerszen, M. : Alcohol-related cirrhosis with pancreatitis. The role of oxidative stress in the progression of the disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* **49**(2), 139 (2001).
- 2) Ljubuncic, P., Tanne, Z. and Bomzon, A. : Evidence of

a systemic phenomena for oxidative stress in cholestatic liver disease. *GUT* **47**(5), 710 (2000).

- 3) Maria-Liisa, S., Heikki, A., Anni, H., Fulvio, U., Tom, M., Antonella, R., Dontscho, K., and Harry, H. : Lipid peroxidation in human proteinuric disease. *Cell Biol. Immunol. Pathol. Intern. Soc. Nephrol.* **59**(2), 481 (2001).
- 4) Diamond, J. R. : The role of reactive oxygen species in animal models of glomerular disease. *Am. J. Kidney Dis.* **19**, 292 (1992).
- 5) Cracoski, J. L., Marpeau, C., Carpentier, P. H., Imbert, B., Hunt, M., Stanke-Labesque, F. and Bessard, G. : Enhanced in vivo lipid peroxidation in scleroderma spectrum disorders. *Arthritis Rheum.* **44**(5), 1143 (2001).
- 6) Stanely Mainzen Prince, P. and Menon, V. P. : Antioxidant action of *Tinospora cordifolia* root extract in alloxan diabetic rats. *Phytother. Res.* **15**(3), 213 (2001).
- 7) Young, I. S. and McEneany, J. : Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* **29**(2), 358 (2001)
- 8) Miller, E. R., Appel, L. J. and Risby, T. H. : Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation; Results from a randomized clinical trial. *Circulation* **98**(22), 2390 (1998).
- 9) Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. and Freeman, B. A. : Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation; The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 481 (1991).
- 10) Lyon, B. L., Schwarz, R. I. : Ascorbate stimulation of PAT cells causes an increase in transcription rates and a decrease in degradation rates of procollagen mRNA. *Nucleic Acids Res.* **12**, 2569 (1984).
- 11) Lee, KS., Bruck, M., Houghlum, K., Chojkier, M. : Activation of hepatic stellate cells by TGF α and collagen typeII mediated by oxidative stress through c-myb expression. *J. Clin. Invest.* **96**, 2461 (1995).
- 12) Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351 (1979).
- 13) Bacon, B. R., Tavill, A. S., Brittenham, G. M., Park, C. H. and Recknagel, R. O. : Hepatic lipid peroxidation

- in vivo* in rats with chronic iron overload. *J. Clin. Invest.* **71**, 429 (1983).
- 14) Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. : Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527 (1979).
 - 15) Tasi, L. Y., Lee, K. T., Tsai, S. M., Lee, S. C. and Yu, S. H. : Changes of lipid levels in blood and liver tissues of patients with obstructive jaundice. *Clin. Chim. Acta.* **215**, 41 (1993).
 - 16) Cutrin, J. C., Zingaro, B., Camandola, S., Boveris, A., Pompella, A., Poli, G. : Contribution of gamma glutamyl transpeptidase to oxidative damage of ischemic rat kidney. *Kidney International.* **57**(2), 526 (2000).
 - 17) Leclercq, I., Horsmans, Y., Desager, J-P, Delzenne, N. and Geubel, A. : Reduction in hepatic cytochrome P-450 is correlated to the degree of liver fat content in animal models of steatosis in the absence of inflammation. *J. Hepatol.* **28**(3), 410 (1998).
 - 18) Yasuda, M., Shimizu, I., Shiba, M., Ito, S. and Ito, S. : Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats, *Hepatology* **29**, 719 (1999).
 - 19) Clement, B., Grimaud, J. A., Campion, J. P., Deugnier, Y. and Guillouzo, A. : Cell types involved in collagen and fibronectin production in normal and fibrotic human liver. *Hepatology* **6**, 225 (1986).
 - 20) Maher, J. J., Bissell, D. M., Friedmann, S. L. and Roll, F. J. : Collagen measured in primary cultures of normal rat hepatocytes derives from lipocytes within the monolayer. *J. Clin. Invest.* **82**, 450 (1989).
 - 21) Thurnham, D. I. : Carotenoids; functions and fallacies. *Proc. Nutr. Soc.* **53**, 77 (1994).
 - 22) Riemersma, R. A., Wood, D. A., Macintyre, CCA., Elton, R. A., Gey, K. F. and Oliver, M. F. : Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamin A, C, and E and carotene. *Lancet* **337**, 1 (1991).
 - 23) Gey, K. F., Moser, U. K., Jordan, P., Stahelin, H. B., Eichholzer, M. and Ludin, E. : Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: An epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 787S (1993).
 - 24) Lin, C. C., Hsu, Y. F., Lin, T. C. and Hsu, H. Y. : Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen induced liver damage in rats. *Phytother. Res.* **15**(3), 206 (2001).
 - 25) Trivedi, N. P. and Rawal, U. M. : Hepatoprotective and antioxidant property of andrographis paniculata (Nees) in BHC induced liver damage in mice. *Indian J. Exp. Biol.* **39**(1), 41 (2001).
 - 26) Shimizu, I., Ma, Y. R., Mizobuchi, Y., Liu, F., Miura, T., Nakai, Y., Yasuda, M., Shiba, M., Horie, T., Amagaya, S., Kawada, N., Hori, H. and Ito, S. : Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology* **29**, 149 (1999).
 - 27) Locher, R., Suter, P. M., Weyhenmeyer R. and Vetter W. : Inhibitory action of silybinin on low density lipoprotein oxidation. *Arzneim-Forsch* **48**(I), 236 (1998).
 - 28) 林正燦 : 四物茵陳湯 投與가 CCl₄ 中毒 肝細胞 損傷에 미치는 影響에 關한 實驗的 研究. 大韓韓方內科學會紙, **1**(1), 70 (1976).
 - 29) 박은진, 김기영, 김재백, 김수웅, 이승룡, 손동환: 영지로부터 추출한 다당체의 실험적 간경화에 대한 섬유화 억제효과. *약학회지* **38**(3), 338 (1994).
 - 30) Schuppan, D. : Chronische Hepatitis-Antifibrotische Therapieausaetze *Z. Allg. Med.* **71**, 11531 (1995).
 - 31) Batta, A. K., Saken, G., Arora, R. and Sheffer, S. : Effect of ursodeoxycholic acid on bile acid metabolism in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **10**, 414 (1998).
 - 32) Jafri M, M. A., Jalis, S., Kalim, J. and Surender, S. : Hepatoprotective activity of leaves *Cassia occidentalis* against paracetamol and ethyl alcohol intoxication in rats. *J. Ethnopharmacol.* **66**, 355 (1999).
 - 33) Inoue, T. and Jackson, E. K. : Strong antiproliferative effects of baicalein in culures rat hepatic stellate cells. *Eur. J. Pharmacol.* **378**(1), 129 (1999).
 - 34) Xiao-Ming, D., Ning-Yi, S., Yang, C., Nobuta, I. and Yukihiro, S. : Hepatoprotective aliphatic glycosides from three *Goodyera* species. *Biol. Pharm. Bull.* **23**(6), 731 (2000).
 - 35) Kim, K. Y., Suh, E. S., Park, S. Y. and Lim, J. A.: The bile duct obstruction stimulated lipid peroxidation and liver fibrosis (cirrhosis) in animal. *J. Toxicology* in press.
 - 36) Kountras, J., Billing, B. H. and Scheuder, P. J. : Prolonged bile duct obstruction: a new experimental

- model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Path.* **65**, 305 (1984).
- 37) Jamall, I. S. and Finelli, V. N. : A single method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissue. *Anal. Biochem.* **112**, 70 (1981).
- 38) Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. and Freeman, B. A. : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite; Implications for endothelial injury iron nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 1620 (1990).
- 39) Solin, M. L., Ahola, H., Hatia, A., Ursini, F., Montine, T., Roveri, A., Kerjaschki, D. and Holthofer, H. : Lipid peroxidation in human proteinuric disease. *Kidney Int.* **59**(2), 481 (2001).
- 40) Johnson, R. J., Lovett, D., Lehrer, R. I. Couser, W. G., Klebanoff, S., J. : Role of oxidants and proteases in glomerular injury. *Kidney Int.* **45**, 352 (1994).
- 41) Neubauer, J., Cristensen, E., Portmann, B., Caballeri, J., Rodes, J. and Ranek, L. : Double blind controlled trial of d-penicillamine in patients with primary biliary cirrhosis. *GUT* **26**, 114 (1985).
- 42) Wiesner, R. M., Dickson, E. R., Lindor, D., Jorgensen, R., LaRusso, N. F. and Baldus, W. : A controlled clinical trial evaluating cyclosporin in the treatment of primary biliary cirrhosis: A preliminary report. *Hepatology* **7**, 1025 (1987).
- 43) Ruwart, M. J., Wilkinson, K. F., Rus, B. D., Vidmaz, T. J., Hahn, E. G., Peters, K. M., Hendley, K. S., Appelman, H. D., Kim, K. Y. and Schuppan, D. : The integrated value of serum procollagen III peptide over time predicts hepatic hydroxyproline content and stainable collagen in a model of dietary cirrhosis in the rat. *Hepatology* **10**, 801 (1989).
- 44) Nan, J. X., Park, E. J., Kim, H. J., Ko. G. Sohn, D. H. : Antifibrotic effects of the methanol extract of *Polygonum aviculare* in fibrotic rats induced by bile duct ligation and scission. *Biolog & Pharmaceut. Bulletin.* **23**(2), 240 (2000).
- 45) Kershenobich, H. D., Vargas., Garcia-Tsao, G., Perez-Tamayo, R. and Rojkind, M. : Effectiveness of colchicine in patients with cirrhosis. *Hepatology* **7**, 1104 (1987).
- 46) Guzelian, D. S., Lindblad, W. J. and Diegelmann, R. F. : Glucocorticoids suppress formation of collagen by the hepatocyte: Studies in primary monolayer cultures of paraenchymal cells prepared from rat liver. *Gastroenterology.* **86**, 897 (1984).
- 47) Ala-Kokko, L., Stenback, F. and Ryhanen, L. : Preventive effect of malotilate on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* **113**, 177 (1989).
- 48) Svegliati Beroni, G., Curto, P., Recchioni, A., Mancini, R., Benedetti, A., Jezequel, A. M. and Oralan, F. : Interferon-gamma reduces liver injury and collagen deposition in dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. *Hepatology* **18**, 209A (1993).
- 49) Peterson, T. C. : Pentoxifylline prevents fibrosis in an animal model and inhibits platelet-derived growth factor-driven proliferation of fibroblasts. *Hepatology* **17**, 486 (1993).
- 50) Boker, K., Schwarting, G., Kaule, G., Gunzler, V. and Schmidt, E. : Fibrosis of the liver in rats induced by bile duct ligation: Effects of inhibition of prolyl 4-hydroxylase. *J. Hepatol.* **13**, 35 (1991).
- 51) Ljubuncic, P., Tanne, Z., Bomzon, A. : Ursodeoxycholic acid suppresses extent of lipid peroxidation in diseased liver in experimental cholestatic liver disease. *Dig. Dis. Sci.* **45**(10), 1921 (2000).
- 52) Kim, K. Y. : Pharmakologische Pruefung potentieller Antifibrotika in einem Ratten-Leberfibrose-Modell sowie Ermittlung der Stoffwechselwege zirkulierender Prokollagen-Peptide. *Dissertation*, Berlin (1991).