

# 越鞠丸 메탄올 추출물이 산화적 간손상에 미치는 효과

문진영

동국대학교 한의과대학 경혈학교실

## Abstract

### Effects of Wolgukwhan Methanol Extract on Oxidative Liver Injury

Jinyoung Moon

Department of AM-Pointology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

**Objectives :** In traditional medicine, *Wolgukwhan* has been used for the treatment of digestive system disease, such as indigestion, brash, ructation, nausea and vomiting. This study was purposed to investigate the effects of *Wolgukwhan methnol extract* (WGWM) on oxidative liver cell injury.

**Methods :** *In vivo* assay, we administered acetaminophen(500mg/kg, *i.p.*) to starved mice 24hrs after pretreatment of WGWM for 6days. In the liver homogenates, lipid peroxide and glutathione(GSH) levels were measured. In addition, activities of hepatic enzyme, such as catalase, glutathione peroxidase(GPX), glutathione S-transferase(GST) were measured in the hepatic mitochondrial and cytosolic fractions.

---

교신저자 : 문진영

경상북도 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 경혈학교실

TEL : 054)770-2665

FAX : 054)770-2649

E-mail : ampmoon@mail.dongguk.ac.kr

접수일자 : 2002. 10. 21      채택일자 : 2002. 12. 21

\* 본 연구는 2002년도 동국대학교 학술논문 연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Results: *In vivo* administration of WGWM showed effective inhibition of acetaminophen induced lipid peroxidation and elevations of glutathione level. The acetaminophen treatment resulted in a decrease of catalase, GPX and GST activities. By contrast, WGWM pretreatment increased compare to those of untreated groups.

Conclusions: These results suggested that WGWM might protect against lipid peroxidation by free radicals, destruction of hepatic cell membranes.

Key words: Wolgukwhan, acetaminophen, glutathione, hepatic enzyme

## I. 서론

생체에서 활성산소종(reactive oxygen species) 및 자유기(free radical)는 세포막의 지질과산화 반응을 통한 세포괴사를 야기함과 동시에 돌연변이, 암, 노화 등의 발생과도 밀접한 관련성이 있는 것으로 보고되어 있다. 지질과산화 반응(lipid peroxidation)은 세포의 산화적 손상을 일으키는 가장 잘 알려진 기전 중의 하나이며<sup>1-6)</sup>, 이러한 세포의 산화적 손상은 항산화 방어시스템에 의해 보호된다<sup>7-8)</sup>. 아세트아미노펜은 간세포의 산화적 손상 유발제로 빈번히 사용되는데, 본 약물을 대량 투여하면 cytochrome P-450의 효소 반응 결과, 다량의 활성대사체가 생성되어 심각한 산화적 간손상이 초래되며, 특히 이 과정에는 활성대사체에 의하여 항산화물질인 glutathione의 고갈과 이로 인한 세포막의 지질과산화 반응이 수반되는 것으로 알려져 있다<sup>9-12)</sup>. 월국환(越鞠丸)은 단계심법(丹溪心法)에 수록된 처방으로서 행기해울(行氣解鬱)의 효능이 있어 胸膈痞滿, 脘腹脹痛, 噯腐吞酸, 惡心嘔吐, 飲食不消 등의 주로 소화기능 장애의 치료에 사용되는 것으로

알려져 있다<sup>13-14)</sup>. 또한 월국환에 대한 실험적 연구로는 항스트레스 효과<sup>15)</sup>, 비만 생쥐의 난소와 임신에 미치는 효과<sup>16)</sup> 및 위 궤양에 미치는 영향<sup>17)</sup> 등이 보고된 바 있으나, 본 처방의 간장 보호 효과에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 급성 산화적 간손상에 대한 월국환의 효능을 검토하기 위한 일환으로 월국환 메탄올 추출물을 마우스에 전처리한 다음, 아세트아미노펜의 대량 투여로 급성 간손상을 유발시켰다. 그리고 월국환 메탄올 추출물의 간세포 보호 효능을 규명하기 위한 지표로 지질과산화물의 함량, glutathione 함량 및 catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase 등과 같은 항산화 효소 활성도의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 약재

월국환(越鞠丸)의 구성 약물인 창출(蒼朮), 향부자(香附子), 川芎(천궁), 신곡(神麴), 치자(梔子)는 동국대학교 부속한방병

원(경북, 경주)에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며, 월국환(Wolgukwhan : WGW) 처방 구성은 단계심법(丹溪心法)<sup>13)</sup>에 준하였으며, 실험에 사용한 약물의 용량은 다음과 같다.

The Composition of Wolgukwhan

약재명	생약명	용량(g)
창출	Atractylodis Rhizoma	30
향부자	Cyperi Rhizoma	30
천궁	Cnidii Rhizoma	30
신곡	Massa Medicata Fermentata	30
치자	Gardeniae Fructus	30
총량		150

## 2. 시약

본 실험에 사용된 시약으로서 2-thiobarbituric acid(TBA), lauryl sulfate sodium(SDS), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), acetaminophen, glutathione(GSH), sulfamic acid ammonium, sulfanilamide, N-1-naphthyl ethylenediamine, 5,5-dithio bis-2-nitrobenzoic acid(DTNB), ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA), glutathione reductase(GSSG-reductase), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium salt(NADPH), chlorodinitro-benzene(CDNB), bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit는 Sigma사 (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO)로 부터, malondialdehyde tetrabutylammonium salt(MDA)는 Fluka사(Fluka Chemie AG, Switzerland)로부터, NaN<sub>3</sub>는 Aldrich사(Aldrich Chem. Co. Milwaukee, WI)로 부터 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 모두 특급시약을 사용

하였다.

## 3. 검액의 제조

월국환 메탄올 추출물을 제조하기 위하여 본 실험에서는 월국환 150g을 분말로 만들어 상온에서 99.5% 메탄올 용액에 3시간 담그고 여과하는 과정을 3회 반복하였다. 최종 여과액을 감압농축기로 농축한 다음, 동결건조기 중에서 건조하여 분말상의 월국환 메탄올 추출물 20.52g(수율 : 13.68 %)을 얻었으며 이를 검액으로 사용하였다.

## 4. 실험동물 및 실험군의 분류

본 실험에서 사용된 실험 동물은 생후 6주령의 수컷 ICR계 마우스(체중 25~30g)로 대한 동물 실험 센터에서 분양받아 일정한 조건으로 본 대학 사육실의 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 또한 실험군은 ICR 마우스 7마리를 한 군으로 하여, 아무런 처치도 하지 않은 정상군 [Normal], acetaminophen만을 복강 투여한 대조군[Control], 그리고 월국환 추출액을 6일간 경구로 투여한 다음 acetaminophen을 복강 투여한 월국환 투여군[WGWM]으로 나누어서 실험을 행하였다. 그리고 월국환 투여군[WGWM]은 다시 월국환의 투여 용량에 따라 500mg/kg 용량으로 전처치한 실험군과 250mg/kg 용량으로 전처치한 실험군, 그리고 100mg/kg 용량으로 전처치한 실험군으로 나누어 실험을 행하였다.

## 5. 검액 투여 및 간손상 유발

월국환 추출물은 6일간 경구로 처치하였으며, 급성 간손상의 유발을 위해서 월국

환 투여가 완료된 시점으로부터 마우스를 24시간 절식시킨 다음, acetaminophen(500 mg/kg)을 DMSO에 현탁시켜서 복강 주사(2.5ml/kg) 하였다.

## 6. 미토콘드리아 및 사이토졸 분획의 조제

아세트아미노펜을 복강주사한 시점으로부터 24시간 후에 마우스를 마취하고 복피를 절개하여 간문맥에 1.15% KCl 완충용액을 주입하여 관류시킨 후 간을 적출하였다. 적출한 간은 빙냉 상태에서 KCl 완충용액과 혼합하여 조직균질기를 사용해 10%(w/v) 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄액을 600×g에서 10분간 원심분리하고 그 상층액을 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리한 다음, 침전물을 KCl 용액에 재현탁하여 미토콘드리아 분획으로 사용하였다. 상층액은 다시 105,000×g에서 1시간 동안 원심분리하여 사이토졸 분획으로 취하였다. 이상의 모든 과정은 0~4℃에서 행하였으며, 각 분획은 일정량씩 나누어 실험에 사용할 때까지 -70℃에서 냉동보관하였다.

## 7. 지질과산화물의 함량 측정

간조직 중 지질과산화물 함량은 Ohkawa의 TBA법<sup>18)</sup>에 의하여 간조직 균질액에 8.1% SDS 0.2ml, 20% acetic acid 완충용액(pH 3.5) 1.5ml, 0.8% TBA 1.5ml, 증류수 0.6ml를 가한 다음, 95℃ 항온수조에서 60분 동안 반응시킨 후, 냉각시키고, 증류수 1.0ml와 n-butanol : pyridine (15:1, v/v)의 혼합액 5.0ml를 첨가하여 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 4,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 TBA 반응물질이 존재하는 n-butanol층을 취하여 파장 532nm

에서 흡광도를 측정하였다. 한편 과산화지질의 함량은 malondialdehyde tetrabutyl ammonium salt(MDA)로 검량표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도로 표기하였다.

## 8. 항산화물질 함량 변화 측정

### 1) Total SH 함량 측정

Total SH의 함량은 Sedlak의 방법<sup>19)</sup>에 의하여 0.2M Tris buffer(pH 8.2) 1ml, 0.01M DTNB 0.1ml, methanol 4ml를 가한 후, 이 혼합액에 10% 간세포 균질액 0.1ml를 취하여 24℃에서 15분간 방치하였다. 이것을 600×g에서 30분간 원심분리한 후, 상층액을 412nm에서 흡광도를 측정하여 전체 SH농도를 millimole 흡광계수  $13\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 을 사용하여 그 양을 계산하였다.

### 2) Glutathione(GSH) 함량 측정

GSH의 함량은 Higach의 방법<sup>20)</sup>에 의하여 10% 간세포 균질액에 동량의 10% trichloroacetic acid 용액을 가하여 3,000rpm에서 20분간 원심분리한 상층액을 시료로 하였다. 시료 0.1ml에 0.01M  $\text{NaNO}_2$ 과 0.2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 혼합조제(1 : 9, v/v)하여 0.5ml를 가한 다음에 5분간 방치시켰다. 0.5% sulfamic acid ammonium 수용액 0.2ml를 가하여 강하게 혼합한 후 1%  $\text{HgCl}_2$ 와 3.4% sulfanilamide/0.4N HCl 혼합액(1 : 9, v/v)을 1ml 가하고 0.1% N-1-naphthyl ethyl enediamine(0.4N HCl 용액)을 1ml 가한 다음, 5분이 경과한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 표준용액으로서 125nM GSH 용액을 사용하였다.

## 9. 항산화효소 활성도의 변화 측정

### 1) Catalase 활성 측정

미토콘드리아 분획에서의 catalase 활성도는 Aebi의 방법<sup>21)</sup>에 준하여 측정하였다. 먼저 50mM phosphate 완충용액(pH 7.4)으로 희석시킨 간 미토콘드리아 부유액 2.0ml에 30mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 1.0ml를 첨가하여 240nm에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 분해에 따른 흡광도의 감소로 측정하였다. 효소의 활성도는 1분 동안 분해된 1μmole의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1 unit로 정의하였고 단백질 1mg을 기준으로 표기하였다.

### 2) Glutathione peroxidase 활성 측정

미토콘드리아 분획에서의 GPX 활성도는 Paglia와 Lawrence의 방법<sup>22-23)</sup>에 준하여 측정하였다. 먼저 50mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.0) 50ml에 EDTA 1mM, NaN<sub>3</sub> 1mM, NADPH 0.2mM, GSH 1mM, 그리고 GSSG-reductase는 1E.U./ml를 혼합한 최대농도 반응 혼합물을 이용하여 측정하였다. 반응 혼합물 0.8ml에 50mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.0)으로 희석시킨 미토콘드리아 부유액 0.1ml를 넣어 20℃ 항온수조에서 5분간 가온한 후 2.2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 0.1ml를 첨가하여 340nm에서의 NADPH 흡광도 감소로 측정하였다. 효소의 활성도는 단백질 mg당 1분 동안 산화되는 NADPH nmole로 표기하였다.

### 3) Glutathione S-transferase 활성 측정

사이토졸 분획에서의 glutathione S-transferase(GST) 활성도는 chlorodinitrobenzene (CDNB)과 GSH를 기질로 사용하

Habig의 방법<sup>24)</sup>으로 측정하였다. 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 6.5)으로 희석시킨 사이토졸 부유액에 1mM GSH, 1mM CDNB를 첨가하여 파장 340nm에서 단백질 mg당 1분간 conjugated되는 CDNB의 nmol로 표기하였다.

## 10. 단백질 정량

간조직 균질액과 미토콘드리아 및 사이토졸 분획에서의 단백질 정량은 모두 BCA protein assay kit를 이용하여 bovine serum albumin을 표준단백질 용액으로 이용한 표준검량선을 구하고 그 양을 산출하였다<sup>25)</sup>.

## 11. 통계적 처리

본 실험에서 얻은 실험군간의 결과에 대하여 Student's *t*-test를 실시하여 유의성 여부를 검증하였고, 그 결과 *p*값이 0.05 이하인 경우에 유의성을 인정하였다.

## Ⅲ. 실험 결과

### 1. 지질과산화물의 함량

월국환 메탄올 추출물이 급성 산화적 간손상에 대한 효과를 검토하기 위하여 ICR 마우스에 월국환 메탄올 추출물을 6일간 경구 투여한 다음, 아세트아미노펜을 복강 투여(500mg/kg)하고, 간조직에서의 지질과산화물의 함량을 측정하였다. 그 결과, 정상군[Normal]의 지질과산화물의 함량은 3.48nmol이었으나, 아세트아미노펜을 투여한 대조군[Control]에서는 10.99nmol로 정상군에 비해 유의성(*p*<0.01) 있게 증가하

였다. 반면, 월국환 메탄을 추출물을 500, 250, 100mg/kg의 용량으로 전처치한 다음, 아세트아미노펜을 투여한 실험군 [WGWM]에서의 지질과산화물의 함량은 각각 3.59, 3.72, 5.35nmol로 대조군에 비해 모두 유의성 있는 감소( $p < 0.01$ )를 보였다.

따라서 월국환 메탄을 추출물의 경구 투여로 인해 아세트아미노펜에 의한 마우스의 산화적 간손상은 억제됨을 알 수 있었다.(Table I).

## 2. Total SH 함량

마우스 간조직에서 total SH의 함량을 측정된 결과, 아무런 처치도 하지 않은 정상군[Normal]에서는 168.38nmol이었으나, 아세트아미노펜을 투여한 대조군[Control]에서는 89.88nmol로 정상군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 감소를 보였다. 반면 월국환 메탄을 추출물을 500, 250, 100mg/kg의 용량으로 전처치한 다음, 아세트아미노펜을 투여한 실험군[WGWM]에서의 total SH의 함량은 각각 198.49, 207.28, 190.05nmol로 모두 대조군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ )있게 증가하였다(Table II).

## 3. Glutathione 함량

마우스 간조직에서 glutathione(GSH)의 함량을 측정된 결과, 아무런 처치도 하지 않은 정상군[Normal]에서는 28.00nmol이었으나, 아세트아미노펜을 투여한 대조군 [Control]에서는 18.86nmol로 정상군에 비해 유의성( $p < 0.02$ ) 있는 감소를 보였다. 반면 월국환 메탄을 추출물을 500, 250, 100mg/kg의 용량으로 전처치한 다음, 아세트아미노펜을 투여한 실험군[WGWM]에서는 각각 29.94nmol( $p < 0.01$ ), 28.91nmol

( $p < 0.05$ ), 27.06nmol( $p < 0.05$ )로 모두 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Table II).

## 4. Catalase 활성도

마우스 간조직으로부터 분리한 미토콘드리아 분획에서 catalase 활성도의 변화를 관찰한 결과, 아무런 처치도 하지 않은 정상군[Normal]에서의 catalase 활성은 8.53unit이었으나, 아세트아미노펜을 투여한 대조군[Control]에서는 5.77unit로 정상군에 비해 감소하였다. 반면 월국환 메탄을 추출물을 500, 250, 100mg/kg의 용량으로 전처치한 다음, 아세트아미노펜을 투여한 실험군[WGWM]에서의 catalase 활성은 각각 7.49, 8.45, 7.76unit로 모두 대조군에 비해 증가하였으나, 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다(Table III).

## 5. Glutathione peroxidase 활성도

미토콘드리아 분획에서 glutathione peroxidase(GPX) 활성도를 관찰한 결과, 아무런 처치도 하지 않은 정상군[Normal]에서의 GPX 활성은 7.05unit이었으나, 아세트아미노펜을 투여한 대조군[Control]에서는 4.71unit로 정상군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게 감소하였다. 반면 월국환 메탄을 추출물을 500, 250, 100mg/kg의 용량으로 전처치한 다음, 아세트아미노펜을 투여한 실험군[WGWM]에서의 GPX 활성은 각각 6.77, 5.54, 5.18unit로 모두 대조군에 비해 증가하였으나 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다(Table IV).

## 6. Glutathione S-transferase 활성도

마우스 간 조직으로부터 분리한 사이토졸 분획에서 glutathione S-transferase

(GST) 활성도를 관찰한 결과, 아무런 처치도 하지 않은 정상군[Normal]에서의 GST 활성은 2.24unit이었으나, 아세트아미노펜을 투여한 대조군[Control]에서는 1.54unit로 정상군에 비해 감소하였다. 반면 월국

환 메탄올 추출물을 500, 250, 100mg/kg의 용량으로 전처치한 다음, 아세트아미노펜을 투여한 실험군[WGWM]에서의 GST 활성은 각각 2.20, 3.78(p<0.02), 2.11unit로 대조군에 비해 증가하였다(Table V).

Table I. Effect of WGWM on Levels of Lipid Peroxide in Liver Tissue

Groups	Dose	Lipid Peroxide
	(mg/kg)	(MDA nmol/mg protein)
Normal	-	3.48 ± 0.37
Control	-	10.99 ± 0.99 ***a)
WGWM	500	3.59 ± 0.30 ***b)
	250	3.72 ± 0.27 ***b)
	100	5.35 ± 0.69 ***b)

Values are mean ± standard error

a): values statistically significant as compared with normal group.

b): values statistically significant as compared with control data of each group.

(\*\*\* : p<0.01 )

Table II. Effect of WGWM on Levels of Total SH and GSH in Liver Homogenate

Groups	Dose	Total SH	GSH
	(mg/kg)	( nmol/mg protein )	
Normal	-	168.38 ± 16.11	28.00 ± 0.86
Control	-	89.88 ± 12.79 ***a)	18.86 ± 1.79 **a)
WGWM	500	198.49 ± 12.07 ***b)	29.94 ± 1.86 ***b)
	250	207.28 ± 11.55 ***b)	28.91 ± 2.18 *b)
	100	190.05 ± 18.07 ***b)	27.06 ± 0.92 *b)

Values are mean ± standard error

a): values statistically significant as compared with normal group.

b): values statistically significant as compared with control data of each group.

( \* : p<0.05, \*\* : p<0.02, \*\*\* : p<0.01 )

Table III. Effect of WGWM on Hepatic Catalase Activities in Mice

Groups	Dose	Catalase Activity
	(mg/kg)	(unit/mg protein)
Normal	-	8.53 ± 1.44
Control	-	5.77 ± 1.06
WGWM	500	7.49 ± 0.36
	250	8.45 ± 0.50
	100	7.76 ± 0.70

Values are mean ± standard error

Table IV. Effect of WGWM on Hepatic Glutathione Peroxidase Activities in Mice

Groups	Dose	Glutathione Peroxidase Activity
	(mg/kg)	(unit/mg protein)
Normal	-	7.05±0.50
Control	-	4.71±0.69 *
WGWM	500	6.77±0.55
	250	5.54±0.82
	100	5.18±0.15

Values are mean ± standard error

\*: values statistically significant as compared with control data of each group.

( \* : p<0.05 )

Table V. Effect of WGWM on Hepatic Glutathione S-Transferase Activities in Mice

Groups	Dose	GST Activity
	(mg/kg)	(unit/mg protein)
Normal	-	2.24±0.40
Control	-	1.54±0.27
WGWM	500	2.20±0.29
	250	3.78±0.66 **
	100	2.11±0.62

Values are mean ± standard error

\*: values statistically significant as compared with control data of each group.

( \*\* : p<0.02 )

## IV. 고찰

월국환은 단계심법의 육울(六鬱)편에 수록된 처방으로 제해울(諸解鬱)의 효능이 있어 기울(氣鬱), 습울(濕鬱), 담울(痰鬱), 열울(熱鬱), 혈울(血鬱) 및 식울(食鬱)과 같은 모든 울증(鬱症)의 치료에 사용된다. 본 처방 중의 향부자는 행기해울(行氣解鬱)의 효능이 있어 군약(君藥)이 되고, 천궁은 활혈거어(活血祛瘀)하므로 혈울을 치료하고, 치자는 청열사화(淸熱瀉火)하는 효능이 있어 화울을 치하며, 창출은 조습운비(燥濕

運脾)하므로 습울을 치하고, 신평은 소식도체(消食導滯)하므로 식울을 치하여 모두 신약(臣藥)에 속한다<sup>13-14)</sup>. 한편 월국환은 실험적으로 스트레스<sup>15)</sup>, 비만 생쥐의 임신<sup>16)</sup> 및 위궤양<sup>17)</sup>등에 유효하다고 보고된 바 있다. 그러나 월국환의 간장 보호 효과에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 월국환 추출물의 간장 보호 효과를 규명하기 위한 일환으로 월국환 메탄올 추출물을 마우스에 경구투여한 다음, 아세트아미노펜으로 유도된 급성 산화적 간손상에 대한 효과를 관찰하였다. 본 연구에서 간장의 산화적 손상 유발제로 사용



된 아세트아미노펜은 500mg/kg의 용량으로 마우스에 복강 투여하면 복합약물대사계를 경과하여 활성대사체가 생성되며, 이러한 활성대사산물들은 간세포내에 존재하고 있는 항산화물질인 glutathione(GSH)과 결합하고 이를 고갈시켜서 산화적 간손상이 초래되는 것으로 알려져 있다. 따라서 아세트아미노펜에 의한 산화적 간손상 과정에는 GSH 함량의 감소와 지질과산화물 함량의 증가가 수반된다<sup>9,12)</sup>.

본 실험의 결과, 아세트아미노펜 단독 투여군에서 간조직에서의 지질과산화물의 함량이 정상군에 비해 현저하게 증가하였으므로 아세트아미노펜에 의해 산화적 간손상이 효과적으로 유발되었음을 알 수 있었다. 반면 월국환 메탄올 추출물을 전처리한 실험군에서는 지질과산화물의 함량이 아세트아미노펜 단독 투여군에 비해 유의성 있게 감소하였으므로 월국환 메탄올 추출물은 마우스 간조직의 산화적 손상을 억제함을 알 수 있었다.

이 결과를 바탕으로, 월국환 메탄올 추출물의 간세포 보호 기전을 검토하기 위하여 간조직에서의 total SH 및 GSH 함량을 측정하였다. 그 결과, 아세트아미노펜 단독 투여군에서 total SH 및 GSH 함량은 정상군에 비해 현저하게 감소하였다. 이 결과는 아세트아미노펜의 간장 손상 기전이 주로 GSH의 함량 감소에 기인한다는 기존의 연구와 일치하였다. 한편 월국환 메탄올 추출물을 전처리한 실험군에서는 total SH 및 GSH 함량이 아세트아미노펜 단독 투여군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 이 결과에서 나타난 바와 같이 월국환 메탄올 추출물을 전처리한 실험군에서 GSH 함량이 증가한 정확한 기전은 알 수 없었

다. 다만 월국환 메탄올 추출물의 유효 성분중에 아세트아미노펜의 활성대사체와 직접 결합하여 소거함으로써 GSH 함량 감소를 방지하고, 또한 이로 인해 간조직의 지질과산화반응이 차단됨으로써 결국 산화적 간손상이 억제된 것일 수 있다.

또 하나의 기전으로서 월국환 메탄올 추출물 자체가 마우스 간조직내에서 GSH 함량을 직접적으로 증가시킬 수 있을 가능성도 있으므로 이에 관한 연구는 계속 진행할 계획이다. 한편 간조직에서 분리한 미토콘드리아 및 사이토졸 분획에서 항산화효소들의 활성 변화를 관찰한 결과, 아세트아미노펜 단독 투여군에서는 catalase, GPX 및 GST 활성이 다소 감소하였다. 반면 월국환 메탄올 추출물을 전처리한 실험군에서는 효소 활성이 조금 증가하였다.

그러나 본 실험에서는 항산화 효소들의 활성에 있어서 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과에서 월국환 메탄올 추출물은 아세트아미노펜의 투여로 유발된 급성 산화적 간손상을 유효하게 방어하였고, 이는 주로 활성대사체에 의한 GSH 함량의 고갈을 차단하였기 때문으로 판단된다.

## V. 결 론

월국환 메탄올 추출물이 아세트아미노펜으로 유도된 마우스의 급성 간손상에 대한 효과를 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다. 아세트아미노펜의 투여로 인해 간조직에서 지질과산화물의 함량은 현저하게 증가하였으며, total SH 및 GSH의 함량은 감소하였다. 반면, 월국환 메탄올 추출물의

전처치에 의해 지질과산화물의 함량이 유의성있게 감소하였고, total SH 및 GSH의 함량은 증가하였다. 또한 항산화 효소의 활성 변화를 관찰한 결과, catalase, glutathione peroxidase 및 glutathione S-transferase의 활성도는 아세트아미노펜을 투여한 대조군에서 정상군에 비해 감소하였으나 월국환 메탄올 추출물을 전처치한 실험군에서는 대조군에 비해 효소 활성도가 다소 증가하였다. 이상의 결과에서 월국환 메탄올 추출물은 활성산소종 및 자유기에 의한 간세포의 산화적 손상을 유효하게 방어할 수 있을 것으로 판단된다.

## 參 考 文 獻

1. Brattin W.J., Glende E.A. and Recknagel R.O. : Pathological mechanisms in carbon tetra-chloride hepatotoxicity. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1985 ; 1 : 27-38
2. Sakaida I., Marlene E. and Farber J.L. : Autophagic degradation of protein generates a pool of ferriciron required for the killing of cultured hepatocytes by an oxidative stress. *Mol. Pharmacol.* 1989 ; 37 : 435-442
3. Nordmann R., Ribiere C. and Rouach H. : Implication of free radical mechanism in ethanol induced cellular injury. *J. Free. Radic. Biol. Med.* 1992 ; 12 : 219-240
4. Masaki N., Kyle M.E. and Farber J.L. : tert-Butyl hydroperoxide kills cultured hepatocytes by peroxidizing membrane lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989 ; 269 : 390-399
5. Masaki N., Kyle M.E. and Farber J.L. : Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989 ; 270 : 672-680
6. Sun Y. : Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *J. Free. Radic. Biol. Med.* 1990 ; 8 : 583-599
7. Halliwell B. : Free radical, antioxidant and human disease. *Lancet.* 1994 ; 344 : 721-724
8. Seifter E., Mendecki J., Holtzman S., Kanofsky J.D., Freidenthal E., Davis L. and Weinzweig J. : Role of vitamin A and  $\beta$ -carotene in radiation protection, relation to antioxidant properties. *Pharmacol. Ther.* 1988 ; 39 : 357-365
9. 서경원, 류정상, 김효정 : 마우스에서 아세트아미노펜의 급성 간독성과 독물 동태학. *Korean J. Toxicol.* 13(3) : 237-245, 1997
10. Wendel A., Feuerstein S. and Kontz K.H. : Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo. *Biochemical Pharmacology* 1979 ; 28 : 2051
11. Raheja K.L., Linscheer W.G., Cho C.D. and Mahany D. : Protective effect of propylthiouracil independent of its hypothyroid effect on acetaminophen toxicity in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1981 ; 220 : 427

12. Fischer L.J., Green M.D. and Harman A.W. : Levels of acetaminophen and its metabolites in mouse tissues after a toxic dose. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1981 ; 220 : 427
13. 주진형 : 단계의집, 북경, 인민위생출판사 1995 : 304
14. 이상인, 박선동 : 한방임상처방학, 서울, 영림사 1998 : 274-275
15. 구병수 : 월국환 및 월국환가미방이 항스트레스 효과에 관한 실험적 연구, 동국대학교 박사학위논문, 1996
16. 양성우, 월국환이 비만생쥐의 난소반응과 임신에 미치는 영향, 경희대학교 석사학위논문, 2000
17. 문상원 : 월국환과 칠기탕이 백서의 실험적 위궤양에 미치는 영향, 동국대학교 석사학위논문, 1998
18. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. : Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochem.* 1978 ; 95 : 351-358
19. Sedlak T. and Lindsay R.H. : Estimation of total protein-bound and nonprotein-bound sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Chem.* 1968 ; 25 : 192
20. Higach T. : Critical review on the determination of glutathione in biological preparation. *Proteins, Nucleic Acid and Enzyme* 1988 ; 33 : 1370
21. Aebi H. : Catalase. *Methods of enzymatic acalysis.* 2nd edition edited by Hans Ulrich Bergmeyer. 1974 : 673
22. Paglia D.E. and Valentine, W.N. : Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Lab. Clin. Med.* 1967 ; 70 : 158
23. Lawrence R.A. and Burk R.F. : Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1976 ; 71 : 952
24. Habig W.H., Pabst M.J. and Jabby W.B. : Glutathione-S-transferase : the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biochem.* 1974 : 249
25. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke B.J. and Klenk D.C. : Measurement of protein using bicichoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985 ; 150 : 76-85