

解肝煎의 抗酸化 活性 및 肝細胞의 酸化的 損傷에 대한 保護效果

안병태, 김종대, 문진영¹

동국대학교 한의과대학 간계내과학교실, ¹경혈학교실

Abstract

Antioxidative and Protective Effects of Haeganjeon Extract on Oxidative Damage of Hepatocytes

Byungtae Ahn, Jongdae Kim, Jinyoung Moon¹

Dept. of Internal Medicine, ¹Dept. of AM-Pointology,
College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : Haeganjeon(HGJ) has been used for the treatment of liver disease in traditional medicine. The present study was carried out to evaluate the antioxidant and protective effects of HGJ extract on oxidative damage of hepatocytes by *tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP).

Methods : In the linoleic acid water-alcohol system, the levels of lipid peroxide(LPO) were determined by TBA method. The scavenging effect of HGJ on α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH) radical was determined according to the method of Hatano. In the Fenton system(ferrous ion reaction with hydrogen peroxide), the levels of hydroxyl radical induced LPO in rat liver homogenate were determined according to the method of TBA. Inhibitory effect of HGJ on superoxide generation was measured by xanthine-xanthine

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

oxidase system. In order to evaluate antioxidative activity of HGJ in the liver cell, cultured normal rat liver cells(Ac2F) were prepared and incubated with or without HGJ. After 18hr, cells placed in DMEM medium without serum, and then incubated with 1mM *tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP) for 2hrs. Viable cells were detected by MTT assay.

Conclusions: In the linoleic acid autoxidation system, HGJ extract significantly inhibited the time course of the lipid peroxidation. These effects were similar to those of BHA. HGJ extracts showed about 70% scavenging effect on DPPH radical. And HGJ extract inhibited the lipid peroxide formation in rat liver homogenate induced by hydroxyl radical derived from Fenton system. In addition, HGJ extract protected the cell death induced by *t*-BHP and significantly increased cell viability in the normal rat liver cell. These result indicated that HGJ extract might play a protective role against oxidative hepatic cell injury by means of free radical scavenger.

Key words : Haeganjeon, lipid peroxidation, DPPH radical, Fenton system

I. 서 론

간세포의 손상 기전 중에서 활성산소종 혹은 자유기에 의한 산화적 손상이 차지하는 비중이 큰 것으로 알려져 있는데, 이는 기타 장기에 비해서 간세포막에 풍부하게 존재하는 불포화지방산이 자유기에 의해 공격을 받기 쉽다는 조건을 지니기 때문일 것으로 보고되고 있다¹⁻²⁾.

따라서 생체내에서 생성되는 자유기의 생성을 억제하거나 소거함으로써 세포의 산화적 손상을 예방하거나 치료할 수 있는 천연물의 탐색에 최근 관심이 집중되고 있으며³⁻⁶⁾, 특히 한약 단방 및 복합처방을 대상으로 이들의 항산화 활성 및 간세포의 산화적 손상 억제 효능에 관한 연구가 진행되고 있다⁷⁻¹¹⁾. 해간전(解肝煎)은 경약전서(景岳全書)에 수록된 처방으로 진피(陳

皮), 반하(半夏), 후박(厚朴), 복령(茯苓), 소엽(蘇葉), 작약(芍藥), 사인(砂仁)으로 구성되어 있으며, 임상에서 간장 기능 장애의 손상을 치료할 목적으로 사용되어 왔다¹²⁾. 한편 해간전에 관한 실험적 연구로서 CCl₄로 유도된 흰쥐의 간장 손상에 미치는 효과¹³⁾가 보고된 바 있으며, 해간전의 구성 약물 중 작약¹⁴⁻¹⁶⁾에 대한 항산화 효과가 보고되어 있을 뿐이다. 이와 같이 해간전은 한방 임상에서 간장 기능장애의 치료에 사용되어 온 중요한 처방 중의 하나이지만, 본 처방의 간세포 보호 효과 및 그 기전을 규명한 객관적 연구는 아직까지 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 해간전의 항산화 활성 및 간세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과를 검토하고자 지질자동산화계, DPPH radical, Fenton 반응계, xanthine-xanthine oxidase 반응계에서 지

질과산화 반응 억제 효과, 자유기 소거 및 생성 억제 효과를 관찰하였다. 그리고 *tert*-butyl hydroperoxide에 의해 유도된 간세포의 산화적 손상에 대한 효과를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 약재

본 실험에서 사용한 해간전(解肝煎)의 구성 약물인 진피(陳皮), 반하(半夏), 후박(厚朴), 복령(茯苓), 소엽(蘇葉), 작약(芍藥), 사인(砂仁)은 각각 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며, 해간전(Haeganjeon : HGJ)의 처방 구성은 경약전서(景岳全書)에 준하였으며¹²⁾, 한첩의 용량은 다음과 같다.

The Composition of Haeganjeon

약재명	생약명	용량(g)
진 피	Aurantii nobilis Pericarpium	6.0
반 하	Pinelliae Rhizoma	6.0
후 박	Machili Cortex	6.0
복 령	Hoelen	6.0
소 엽	Perillae Folium	4.0
작 약	Paeoniae Radix	4.0
사 인	Amomi Semen	3.0
총 량		35.0

2. 세포 및 동물

흰쥐의 정상 간세포(Ac2F)는 일본 HSRRB (Health Science Resources Bank, Osaka, Japan)로부터 분주받아 배양하여

사용하였다. Fenton 반응계 실험에서 간조직 균질액의 조제를 위해 체중 200g 내외의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대한 동물 실험 센터에서 구입하여 사용하였다.

3. 시약

Linoleic acid, 2-thiobarbituric acid(TBA), lauryl sulfate sodium(SDS), α, α -diphenyl- β -picryl hydrazyl(DPPH), *tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP), (4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MIT), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), L-glutamine, butylated hydroxytoluene(BHT), 3-t-Butyl-4-Hydroxyanisole (BHA), hydrogen peroxide(H₂O₂)는 Sigma사 (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO)로 부터, 그리고 fetal bovine serum(FBS) 및 antibiotic/antimycotics는 Gibco사(Gibco BRL, Life Techno. Inc., NY, U.S.A.)로부터, malondialdehyde tetrabutylammonium salt(MDA)는 Fluka사(Fluka Chemie AG, Switzerland)로부터, DL- α -Tocopherol, ferrous chloride(FeCl₂)는 Wako사(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)로부터, trichloroacetic acid(TCA)는 Janssen Chimica(Belgium)로부터 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다.

4. 검액의 제조

해간전 5첩 분량(175g)을 가늘게 분쇄하여 냉각 환류관이 부착된 원저 플라스크에 넣고, 3배량의 증류수를 가한 다음, 3시간 동안 추출하고 여과하였다. 여액은 rotary evaporator로 감압농축한 다음, 동결건조

기 중에서 건조하여 분말상의 해간전 추출물을 얻었으며 이를 시료로 사용하였다.

5. 지질자동산화계에서의 항산화 활성 측정

1) Linoleic acid 현탁액 조제

Linoleic acid 현탁액은 Osawa 등의 방법¹⁷⁾에 따라 linoleic acid 0.13ml, 99.0% ethanol 10ml, 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 10ml을 혼합하고, 해간전 추출물 농도별로 첨가한 다음, 증류수로 total volume을 25ml로 조절하였다. 이 혼합액을 test tube에 넣고 40℃에서 배양하여 지질의 자동산화를 유도하였다.

2) 과산화지질 함량 측정

과산화지질의 함량은 Ohkawa 등의 방법¹⁸⁾에 따라 TBA법으로 정량하였다. 40℃에서 배양시킨지 6일째 되는 시점에서 linoleic acid 현탁액 50 μ l에 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2ml, 20% acetic acid(pH 3.5, 10N NaOH) 1.5 ml, 0.8% TBA 수용액 1.5ml을 넣고, 증류수로 이 혼합액의 전량을 4ml로 조절한 다음, 5℃에서 60분간 방치하고, 다시 95℃에서 60분간 발색시킨 뒤, 흐르는 수돗물에서 냉각시켜 spectrophotometer (Gilford, ResponseTM, U.S.A)를 사용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 과산화지질의 함량을 계산하기 위해 MDA 검량표 준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA μ M로 표기하였다.

6. DPPH radical 소거효과 측정

DPPH radical에 대한 해간전 추출물의 소거 효과는 Hatano 등의 방법¹⁹⁾에 의거

하여 측정하였다. 농도별 해간전 추출물과 증류수의 혼합물 4ml을 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 1ml와 혼합하여 잘 흔들어 준 다음, 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. Fenton 반응계에서의 항산화 활성 측정

1) 간조직 균질액 조제

먼저 흰쥐를 diethyl ether(Junsei Chem. Co., Japan)로 마취한 다음, 복피를 절개하여 간문맥을 노출시켰다. 10cc 주사기에 1.15% KCl 완충용액을 넣고 간문맥으로 perfusion시켜 혈액을 제거하였다. 그 후 흰쥐의 간장을 적출하고 즉시 빙냉상태의 KCl 완충용액에 여러 번 세척한 후, 수분을 완전히 제거하였다. 적출한 간 조직은 조직균질기(Teflon Plotter Elvehjem Homogenizer, Glas-Col, U.S.A.)를 사용하여 KCl 완충용액으로 20% (w/v) 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄 균질액을 700 \times g에서 10분간 원심분리한 다음 상정액을 취하였으며, 실험에 사용할 때까지 -70℃에서 냉동 보관하였다.

2) Hydroxyl radical 소거능 측정

간조직 균질액에 10mM FeCl₂, 30mM H₂O₂ 및 농도별 해간전 추출물이 첨가된 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4)의 반응 용액의 전량을 1ml로 하여 37℃에서 10분간 반응시킨 다음, TBA법으로 과산화지질의 함량을 측정하였다.

8. Xanthine-XOD 반응계에서의 항산화 활성 측정

Xanthine-XOD 반응계에서 생성되는

superoxide anion($O_2^{\cdot-}$)에 대한 해간전 추출물의 생성 억제 효과를 측정하기 위하여 다음과 같이 반응용액을 조제하였다. 먼저 250 μ M xanthine 0.5ml과 농도별 해간전 추출물 0.1ml, 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 1.3ml을 함유하는 반응 용액을 실온에서 3분간 정치한 다음, 0.1unit xanthine oxidase를 첨가하여, 반응 용액의 총량을 2ml로 조절한 후, 290nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하였다. 본 실험의 결과는 대조군에 대한 생성 억제효과(%)로 환산하여 표기하였다.

9. 세포배양계에서의 항산화 작용 측정

1) 세포 배양

흰쥐의 정상 간세포(Ac2F)를 10% FBS-DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하여, 2~3일마다 한번씩 75-cm² plastic flask(Corning Co., U.S.A)에서 subculture하여 세포주를 유지하였다.

2) 농도별 해간전 추출물의 간세포 독성 측정

정상 간세포(Ac2F)에 대한 해간전 추출물의 세포 독성을 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 배양 간세포를 5×10⁴cells/well이 되도록 넣고, 해간전 추출물을 농도별로 희석하여 well당 20 μ l씩 첨가한 다음, 10% FBS-DMEM배지로 전량을 200 μ l로 조절하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 18시간 배양한 다음, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

3) 간세포의 산화적 손상에 대한 억제 효과 측정

흰쥐 정상 간세포가 t-BHP에 의한 산화적 손상 및 세포괴사에 대한 해간전 추출물의 세포보호 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 간세포를 5×10⁴cells/well이 되도록 분주하고 농도별 해간전 추출물을 well당 20 μ l씩 첨가한 다음, 10% FBS-DMEM배지로 total volume을 2ml로 조절하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 18시간 배양하였다. 그 후 CMF-PBS로 2회 세척하고 SFM을 well당 200 μ l씩 가하고, t-BHP의 최종농도가 1mM이 되도록 첨가한 다음, 이를 다시 120분 배양시킨 후, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

4) MTT assay

세포 생존율의 측정을 위한 MTT assay는 Sladowski 등의 방법²⁰⁾을 따라 행하였다. 간세포를 배양시킨 96-well plate에 MTT를 총 용량의 10%가 되도록 넣고, 4시간 배양시킨 다음, 90×g에서 10분간 원심분리하였다. 그 후 상층 배지를 제거하고 EtOH/DMSO(1:1 v/v)를 well당 600 μ l씩 넣고 20분간 shaking한 다음, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT dye [3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]가 blue formazan을 형성하는 것을 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

10. 통계적 처리

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

Ⅲ. 실험 결과

1. 지질자동산화계에서의 항산화 효과

Linoleic acid의 지질자동산화계에서 생성되는 과산화지질에 대한 해간전 추출물의 농도별 효과를 관찰하였다. 배양 6일째 되는 시점에서 과산화지질의 함량을 측정 한 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군에서 과산화지질의 함량은 23.40 μ M이었으나, 항산화제인 BHT 및 BHA를 첨가한 실험군에서는 각각 0.09, 4.07 μ M로 대조군에 비해 과산화지질의 생성을 유의성($p < 0.01$)있게 억제하였다.

한편 해간전 추출물을 농도별로 8,000,

4,000, 2,000, 1,000, 800, 400, 200 μ g을 첨가한 실험군에서는 과산화지질의 함량이 각각 2.95, 3.26, 2.17, 3.99, 3.70, 5.13, 7.15 μ M로 대조군에 비해 모두 유의성($p < 0.01$)있는 억제 효과를 보였으며, 특히 최고 90%를 상회하는 억제효과를 나타내었다. 이 결과에서 해간전 추출물은 항산화제인 BHA와 유사한 수준의 항산화 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 해간전 추출물을 농도별로 100, 50 μ g을 첨가한 실험군에서도 과산화지질의 함량이 각각 17.90, 20.91 μ M로 대조군의 23.40 μ M에 비해 지질의 자동산화가 억제되었으나 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다(Table I).

Table I. Antioxidative Activity of HGJ in the Linoleic Acid System

Groups	Concentration	MDA	Inhibition of Control (%)
	(μ g)	(μ M)	
Control	-	23.40 \pm 0.96	-
1% BHT	-	0.09 \pm 0.01 ***	99.60
1% BHA	-	4.07 \pm 0.55 ***	82.58
HGJ	8,000	2.95 \pm 0.88 ***	87.39
	4,000	3.26 \pm 1.32 ***	86.05
	2,000	2.17 \pm 0.33 ***	90.72
	1,000	3.99 \pm 0.46 ***	82.44
	800	3.70 \pm 0.40 ***	84.16
	400	5.13 \pm 0.21 ***	78.04
	200	7.15 \pm 1.57 ***	69.37
	100	17.90 \pm 3.32	23.33
50	20.91 \pm 1.33	10.65	

Autoxidation of linoleic acid in the water-alcohol system, the degree of oxidation was measured by the TBA method. The reaction mixture contained 50 μ l of sample, 0.2ml of 8.1% sodium dodecylsulfate(SDS), 1.5ml of 20% acetic acid solution(pH 3.5), and 1.5ml of 0.8% aqueous solution of TBA. The pH of 20% acetic acid solution was adjusted with 10N NaOH. The mixture was finally made up to 4.0ml with distilled water, and placed at 5 $^{\circ}$ C for 60min, and then heated at 95 $^{\circ}$ C for 60min. After cooling with tap water, the absorbance was measured at 532nm. Each values are the mean \pm standard error of triplicate experiments. * : values statistically significant as compared with control data of each group. (*** : $p < 0.01$)

2. DPPH radical 소거 효과

해간전 추출물이 DPPH radical에 대한 소거 효능을 검토하기 위하여 농도별 해간전 추출물과 DPPH radical 용액을 반응시키고, 흡광도의 변화를 관찰한 다음, 그 결과를 자유기 소거능(RSA: Radical Scavenging Activity) %로 환산하여 표기하였다. 본 실험의 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군에 비해 항산화제인 BHT, BHA 및 tocopherol을 첨가한 실험군에서 각각 90.36, 86.28, 81.05%의 강한 자유기 소거 효과를 보였다. 한편 해간전 추출물을 농

도별로 4,000, 2,000, 1,000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300 μ g을 첨가한 실험군에서의 자유기 소거능은 각각 70.51, 67.12, 67.97, 63.73, 65.76, 61.02, 61.86, 60.68, 56.61, 54.92%로 모두 50%를 초과하는 자유기 소거능을 보였으며, 특히 최고 70%를 넘는 강한 소거 효과를 나타내었다. 또한 해간전 추출물을 200, 100, 50 μ g씩 첨가한 실험군에서도 각각 44.90, 31.53, 18.81%의 농도 의존적인 자유기 소거 효과를 보였다(Table II).

Table II. Scavenging Effect of HGJ on DPPH Radical

Groups	Concentration	RSA(%)' of control
	(μ g)	(%)
BHT		90.36 \pm 2.79
BHA		86.28 \pm 3.10
Tocopherol		81.05 \pm 2.47
HGJ	4,000	70.51 \pm 1.56
	2,000	67.12 \pm 2.76
	1,000	67.97 \pm 1.74
	900	63.73 \pm 3.24
	800	65.76 \pm 2.68
	700	61.02 \pm 3.00
	600	61.86 \pm 2.94
	500	60.68 \pm 4.19
	400	56.61 \pm 4.43
	300	54.92 \pm 4.19
	200	44.90 \pm 4.97
	100	31.53 \pm 5.87
	50	18.81 \pm 5.80

The effects of HGJ on DPPH radical were determined according to the method of Hatano. HGJ in 4ml of distilled water were added to a methanolic solution of DPPH(1mM, 1ml). The mixture was shaken and left to stand at room temperature for 30min ; the absorbance of the resulting solution was measured spectrophotometrically at 517nm. Each values are the mean \pm standard error of triplicate experiments. * RSA : Radical Scavenging Activity(%) = [(Control O.D. - Experimental O.D.) / Control O.D.] \times 100.

3. Fenton 반응계에서의 항산화효과

해간전 추출물이 hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$)에 대한 효과를 검토하기 위하여 H_2O_2 - Fe^{2+} 로 구성되는 Fenton 반응계에서 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응 억제 효과를 관찰하였다. 본 실험의 결과, 흰쥐의 간조직을 Fenton 반응계와 반응시키지 않은 정상군[Normal]에서의 과산화지질의 함량은 $3.41\mu\text{M}$ 이었다. 반면 간조직을 Fenton 반응계에서 반응시킨 대조군[Control]에서의 과산화지질의 함량은 $18.40\mu\text{M}$ 로 정상군에 비해 유의성($p<0.01$) 있는 증가를 보였다. 한편 Fenton 반응계에 항산화제인 BHT를 1% 농도로 첨가한 실험군에서는 과산화지질의 함량이 $4.66\mu\text{M}$ 로 대조군에 비해 약 74%의 강한 억제 효과를 보였다.

또한 해간전 추출물을 농도별로 1,000,

$800\mu\text{g}$ 을 첨가한 실험군에서는 과산화지질의 함량이 각각 5.13, $5.91\mu\text{M}$ 로 대조군에 비해 유의성($p<0.01$) 있는 억제 효과를 보였으며, 이 결과에서 해간전 추출물은 1% BHT에 근접하는 항산화 효과가 있음을 알 수 있었다. 그리고 해간전 추출물을 400, $200\mu\text{g}$ 을 첨가한 실험군에서의 과산화지질의 함량은 7.62, $8.71\mu\text{M}$ 로 대조군에 비해 유의성($p<0.02$) 있는 억제 효과를 보였고, 100, $80\mu\text{g}$ 을 첨가한 실험군에서도 과산화지질의 함량이 9.18, $10.30\mu\text{M}$ 로 대조군에 비해 유의성($p<0.05$) 있는 억제효과를 나타내었다. 본 실험의 결과, 해간전 추출물은 Fenton 반응계에서 생성된 hydroxyl radical에 의한 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응을 농도의존적으로 유의성있게 억제함을 알 수 있었다(Table III).

Table III. Effect of HGJ on the Lipid Peroxidation of Rat Homogenate induced by Fenton Reaction System

Groups	Concentration (μg)	MDA (μM)	Inhibition of Control (%)
Normal	-	3.41 ± 0.96	-
Control	-	18.40 ± 1.16 ***a)	-
1% BHT	-	4.66 ± 0.06 ***b)	74.64
HGJ	1,000	5.13 ± 0.11 ***b)	72.09
	800	5.91 ± 0.28 ***b)	67.85
	400	7.62 ± 0.33 **b)	58.52
	200	8.71 ± 0.24 **b)	52.29
	100	9.18 ± 1.10 *b)	50.04
	80	10.30 ± 0.83 *b)	44.10

HGJ in 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) were added to homogenate (7.5mg/ml), 1mM FeCl_2 , 3mM H_2O_2 . The mixture was shaken at 37°C for 10min. The level of lipid peroxidation induced by hydroxyl radical derived from H_2O_2 - Fe^{2+} in rat liver homogenate was determined according to the method of TBA. Each values are the mean \pm standard error of triplicate experiments.

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

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

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

4. Xanthine-XOD 반응계에서의 superoxide 생성 억제 효과

해간전 추출물의 항산화 기전을 보다 심도있게 규명하고자 본 실험에서는 xanthine-XOD 반응계에서 생성되는 superoxide ($O_2^{\cdot-}$)에 대한 효과를 관찰하였다. 본 실험에서는 290nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하여 그 결과를 대조군에 대한 생성 억제효과(%)로 환산하여 표기하였다. 그 결과, 해간전 추출물을 농도별로 1,000, 800, 600, 400, 200, 100, 50 μ g을 첨가한 실험군에서 아무런 처치도 하지 않은 대조군에 비해 각각 61.81, 51.27, 42.72, 36.46, 31.11, 27.75, 25.31%의 농도 의존적인 superoxide 생성 억제 효과를 나타내었다. 특히 이 결과에서 해간전 추출물은 최고 60%를 넘는 강한 superoxide 생성 억제 효과를 나타내었다(Table IV).

5. 해간전 추출물의 간세포 독성

해간전 추출물이 간세포의 산화적 손상에 대한 효과를 검토하기 위한 전단계 실험으로 먼저 본 실험에서는 해간전 추출물의 안전성을 규명하고자 하였다. 본 실험에서는 흰쥐의 배양 정상 간세포(Ac2F)에 해간전 추출물을 농도별로 전처리한 다음, 18시간 배양시키고, 배양 종료 시점에서 세포의 생존율을 MTT assay로 측정함으로써 본 약물의 간세포 독성 여부를 관찰하였다. 본 실험의 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 해간전 추출물을 well당 1,000, 500, 200, 100, 50, 20 μ g을 첨가한 실험군에서 세포의 생존율이 각각 96.53, 97.29, 95.88, 95.34, 98.39, 98.47%로 모두 100%에 가까운 세포 생존율을 보임과 동시에 특이할 만한 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다.

Table IV. Inhibitory Effect of HGJ on Superoxide Generation Induced by Xanthine-Xanthine Oxidase System

Groups	Concentration	Inhibition of Control
	(μ g)	(%)
HGJ	1,000	61.81 \pm 1.08
	800	51.27 \pm 2.48
	600	42.72 \pm 2.70
	400	36.46 \pm 0.65
	200	31.11 \pm 2.05
	100	27.75 \pm 2.18
	50	25.31 \pm 2.27

The reaction mixture contained HGJ, 250 μ M xanthine, 0.1M phosphate buffer(pH 7.0) was left to stand at room temperature for 3min. After 0.1unit of xanthine oxidase was added, the absorbance of reaction mixture was measured spectrophotometrically at 290nm for 1min. All data are the mean \pm standard error of triplicate experiments.

이 결과에서 해간전 추출물을 1,000 μ g 용량으로 전처리 하더라도 배양 정상 간세포의 생존율에는 별다른 영향을 미치지 않는 안전한 농도임을 알 수 있었다 (Table V).

6. 간세포의 산화적 손상에 대한 억제 효과

이전의 실험에서 해간전 추출물을 96-well plate에서 well당 1,000 μ g 이하의 용량으로 전처리 하더라도 배양 정상 간세포의 생존율에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 본 실험에서는 해간전 추출물이 *t*-BHP로 유도되는 정상 간세포(Ac2F)의 산화적 손상에 대한 보호 효과를 검토하였다. 먼저 96-well plate에 배양한 간세포에 해간전 추출물을 이전의 실험에서와 동일한 농도로 전처리하고, 18시간 배양시킨 다음, *t*-BHP를 well당 최종 농도가 1mM이 되도록 처리하고 다시 2시간 배양함으로써 간세포의 산화적 손상을 유도하

였다. 배양 종료 시점에서 세포의 생존율을 MTT assay로 측정하였다. 본 실험의 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, *t*-BHP만을 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 60.32%로 대조군에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 감소를 보였다.

이 결과에서 *t*-BHP의 처리에 의해 약 40%의 간세포가 산화적 손상으로 괴사되었음을 알 수 있었다. 한편 해간전 추출물을 농도별로 well당 1,000, 500, 200, 100 μ g을 전처리한 다음, *t*-BHP를 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 각각 83.01($p < 0.01$), 89.99($p < 0.01$), 74.06($p < 0.05$), 71.44($p < 0.01$)%로 *t*-BHP 단독 처리군에 비해 세포 생존율이 유의성있게 증가하였고, 특히 최고 90%에 가까운 세포 생존율을 보였다. 또한 해간전 추출물을 농도별로 well당 50, 20 μ g씩 전처리한 다음, *t*-BHP를 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 각각 64.57,

Table V. Cytotoxicity of HGJ on Cultured Normal Rat Liver Cell

Groups	Concentration	Viability(%) of control
	(μ g/well)	(%)
HGJ	1,000	96.53 \pm 10.83
	500	97.29 \pm 1.84
	200	95.88 \pm 3.77
	100	95.34 \pm 2.93
	50	98.39 \pm 5.47
	20	98.47 \pm 6.80

Normal rat liver cells(Ac2F) were plated on 75-cm² plastic flasks in 20ml of DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum. And cells were incubated under 5% CO₂, 95% air, at 37°C. The cells(5 \times 10⁴cells/well) were incubated at 37°C for 2hrs. After washing, HGJ were added various concentration. Viable cells were detected by MTT assay. All data are the mean \pm standard error of triplicated determination.

Table VI. Effect of HGJ on *t*-BHP Induced Lipid Peroxidation in Cultured Normal Rat Liver Cell

Groups	Concentration	Viability(%) of control
	($\mu\text{g}/\text{well}$)	(%)
<i>t</i> -BHP †	-	60.32±0.99 ***a)
HGJ‡	1,000	83.01±5.25 ***b)
	500	89.99±3.19 ***b)
	200	74.06±5.52 *b)
	100	71.44±0.39 ***b)
	50	64.57±2.74
	20	63.81±1.57

Normal rat liver cells(Ac2F) were plated on 75-cm² plastic flasks in 20ml of DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum. And cells were incubated under 5% CO₂, 95% air, at 37°C. The cells(5×10⁴cells/well) were incubated at 37°C for 2hrs. After washing, HGJ were added various concentration. After preincubation for 18hrs, *t*-BHP(final concentration 1mM) was added, and the reaction mixture was incubated for 2hrs. Viable cells were detected by MTT assay. All data are the mean±standard error of triplicated determination.

† : *t*-BHP treated group, ‡ : HGJ extract pretreated and *t*-BHP treated group.

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

b) : values statistically significant as compared with *t*-BHP data of each group.

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

63.81%로 *t*-BHP 단독 처리군에 비해 세포 생존율이 다소 높게 나타났으나, 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다. 이상의 실험결과에서 해간전 추출물은 간세포의 생존율에 영향을 주지 않은 안전한 농도에서 *t*-BHP에 의한 간세포의 산화적 손상을 유의성있게 억제함을 알 수 있었다(Table VI).

IV. 고 찰

활성산소종 및 자유기는 생체내에서 세포막의 인지질을 구성하는 불포화지방산의 탄화수소 결합을 공격하여 연쇄적인 지질

과산화 반응을 일으켜 세포막의 파괴 및 세포의 괴사를 야기함과 동시에 세포내 거대분자의 손상을 일으킨다²¹⁻²²). Hydroxyl radical 및 superoxide anion 등과 같은 자유기에 의한 세포막의 지질과산화 반응은 궁극적으로 세포의 산화적 손상과 괴사를 야기하는 중요한 기전 중의 하나이다.

또한 간장의 세포막을 구성하는 인지질에는 불포화지방산이 많으므로 간장은 산화적 스트레스에 의한 손상 위험성이 비교적 높다. 따라서 최근 간장 보호제의 개발과 관련한 연구에서 간세포의 산화적 손상을 방어할 수 있는 약물의 탐색에 관심이 높아지고 있으며²³), 특히 한약 단방 혹은 복합 처방을 중심으로도 이러한 연구가 이

루어지고 있다. 해간전(解肝煎)은 경약전서(景岳全書)의 신방팔진(新方八陣) 중 화진(和陣)에 소속된 11번째 처방이다. 본 처방의 약물 구성은 진피(陳皮), 반하(半夏), 후박(厚朴), 복령(茯苓), 소엽(蘇葉), 작약(芍藥), 사인(砂仁)이며, 그 주치에 관해서는 “治暴怒傷肝, 氣逆脹滿, 陰滯等證, 如兼肝火者宜用化肝煎”이라 하였다. 그리고 본 처방의 임상 활용에 있어서 백개자(白芥子)를 加味하면 협늑창통(脇肋脹痛)을, 지각(枳殼), 향부자(香附子), 곽향(藿香)을 加味하여 흉격기체(胸膈氣滯)를 치료한다 하였다¹²⁾.

한편 해간전에 관한 연구로서는 CCl₄에 의한 흰쥐의 간손상에 대한 효과가 보고된 바 있고, 본 처방의 구성 약물 중 작약에 관한 연구가 일부 보고되어 있을 뿐이다. 해간전은 한방 임상에서 간장 기능장애의 치료에 사용되어 온 중요한 처방 중의 하나이지만, 본 처방의 간세포 보호 효과 및 그 기전을 규명한 객관적 연구는 아직까지 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 해간전이 간세포 보호 효과 및 그 기전을 검토하고자 지질자동산화계, DPPH radical, Fenton 반응계, xanthine-xanthine oxidase 반응계 및 세포배양계를 이용하여 지질과산화 억제 효과, 자유기 소거 및 생성 억제 효과, 그리고 간세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과를 관찰하였다. 먼저 불포화지방산인 linoleic acid를 40°C에서 배양하여 지질의 자동산화를 유발시킨지 6일째 되는 시점에서 과산화지질의 생성에 대한 해간전 추출물의 농도별 효과를 관찰한 결과, 해간전 추출물의 첨가에 의해 지질의 자동산화가 현저하게 억제되었고 항산화제인 BHA와 유사한 수준의 항산화 효과를

보였다.

이 결과에서 해간전 추출물은 자유기를 소거함으로써 지질과산화 반응의 진행을 차단한 것으로 판단된다. 따라서 해간전 추출물이 자유기에 대한 효과를 검토하기 위하여 본 연구에서는 DPPH radical에 대한 소거 효과, Fenton 반응계에서 hydroxyl radical에 대한 효과 및 xanthine-XOD 반응계에서의 superoxide 생성에 대한 효과를 관찰하였다. 그 결과, 해간전 추출물은 DPPH radical을 최고 70% 이상 소거하였으며, hydroxyl radical에 의한 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응 또한 현저하게 억제하였다. 그리고 xanthine-XOD 반응계에서 superoxide 생성을 최고 60% 이상 억제하였다. 이와 같이 자유기에 대한 영향을 관찰한 실험에서 해간전 추출물은 자유기를 강하게 소거하거나 그 생성을 억제하는 약리적 활성을 나타내었다. 이상의 결과에서 해간전 추출물은 지질의 자동산화를 강하게 억제하였고, 그 기전은 주로 본 약물의 자유기 소거 효과에 기인하는 것으로 판단된다. 이미 잘 알려진 바와 같이 기존의 항산화제인 BHT 및 BHA 등과 같은 물질은 항산화 효능이 뛰어나면서도 불구하고 극소량에서도 그 약물 자체의 세포 독성이 심각하여 생체에 사용할 수 없다²⁴⁾.

따라서 해간전 추출물이 비록 항산화 효능이 현저하다 하더라도 약물 자체의 세포 독성 여부는 중요하므로 본 연구에서는 흰쥐의 정상 간세포를 배양하여 농도별 해간전 추출물의 세포 독성을 평가하였다. 본 실험의 결과, 해간전 추출물을 96-well plate에서 well당 1,000 μ g 용량 이하로 전처리할 경우, 흰쥐의 배양 정상 간세포의 생존율에는 별다른 영향을 미치지 않음을

알 수 있었다. 이 결과는 이전에 보고된 다수 한약 단방 및 복합 처방의 간세포 독성 실험 결과와 비교할 때 안전성이 뛰어난 것으로 판단된다. 이상의 결과들을 바탕으로 해간전 추출물이 간세포의 산화적 손상을 방어할 수 있는가를 검토하였다. 본 실험에서는 해간전 추출물을 농도별로 전처리하고 흰쥐의 배양 정상 간세포에 산화적 손상을 유발시키기 위하여 *t*-BHP를 처리하였다.

그 결과, 해간전 추출물은 간세포에 안전한 농도에서 *t*-BHP에 의한 간세포의 산화적 손상 및 세포 괴사를 유의성있게 방어하였다.

V. 결 론

해간전 추출물의 지질과산화 반응 억제 효과, 자유기 소거 효과 및 생성 억제 효과, 그리고 *t*-BHP로 유도되는 간세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과 등을 검토한 결과, 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 해간전 추출물은 linoleic acid의 지질자동산화를 유의성있게 억제하였으며, 특히 특히 최고 90%를 상회하는 억제효과를 보임에 따라, 본 약물은 항산화제인 BHA와 유사한 수준의 항산화 효과가 있음을 알 수 있었다.
2. 해간전 추출물은 DPPH radical에 대하여 유의성있는 소거효과를 보였으며, 특히 최고 70%를 넘는 강한 자유기 소거효과를 나타내었다.
3. 해간전 추출물은 Fenton 반응계에서 생성된 hydroxyl radical에 의한 흰쥐 간

조직의 지질과산화 반응을 농도 의존적으로 유의성있게 억제하였다.

4. 해간전 추출물은 xanthine-XOD 반응계에서의 superoxide 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 최고 60%를 넘는 강한 superoxide 생성 억제 효능을 나타내었다.
5. 해간전 추출물의 간세포 독성 실험의 결과, 본 약물을 96-well plate에서 well 당 1,000 μ g 용량 이하로 전처리할 경우, 흰쥐의 배양 정상 간세포의 생존율에는 별다른 영향을 미치지 않는 안전한 농도임을 알 수 있었다.
6. 해간전 추출물은 간세포의 생존율에 영향을 주지 않은 안전한 농도에서 *t*-BHP에 의한 간세포의 산화적 손상을 효과적으로 방어함을 알 수 있었다.

參 考 文 獻

1. 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
2. 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
3. Schrauzer G. N. : Selenium. Mechanistic aspects of anticarcinogenic action. Biol. Trace Elem. Res. 1992 ; 33 :

- 51-62
4. Ip C., Hayes C., Budnick R. M. and Ganther H. E. : Chemical form of selenium, critical metabolites, and cancer prevention. *Cancer Res.* 1991 ; 51 : 595-600
 5. Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Norinobu S., Choi S. W., Kawakishi S. and Osawa T. : Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D-Glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* 1994 ; 42 : 2407-2410
 6. Ruch R. J., Cheng S. J. and Klaunig J. E. : Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from chinese green tea. *Carcinogenesis.* 1989 ; 10 : 1003-1008
 7. 김성일, 문진영, 김갑성, 김두희, 남경수, 임종국. 자유기에 의한 지질과산화 반응에 대한 황금 약침액의 항산화 효능. *대한예방의학회지.* 1997 ; 1 : 48-54
 8. 김영해, 김갑성. 호도약침액의 항산화 효과에 대한 연구. *대한한의학회지.* 1996 ; 17(1) : 9-20
 9. 안준철, 문진영, 임종국. 당귀 약침액의 항산화효능에 관한 연구. *대한침구학회지.* 1996 ; 13 : 254-262
 10. 김태기, 박선동, 문진영 : 시호사물탕이 *t*-BHP로 유도된 간세포의 산화적 손상 및 자유기에 의한 지질과산화 반응에 미치는 영향. *방제학회지.* 2000 ; 8(1) : 241-255
 11. 김종대, 문진영 : 백화사설초 메탄올 추출물이 acetaminophen으로 유도된 생쥐의 급성 간손상에 관한 연구. *방제학회지.* 2001 ; 9(1) : 355-366
 12. 장개빈. 경약전서. 상해 : 상해과학기술출판사, 1959 : 988
 13. 이승재 : 해간전이 Cabon tetrachloride 로 유도한 흰쥐의 간중독에 미치는 영향. *동국대학교 석사학위논문* 1996
 14. 임창수, 김갑성 : 작약 약침액의 항산화효능에 관한 연구. *대한침구학회지.* 1997 ; 14(2) : 191-198
 15. 임창수, 김갑성 : 작약 약침의 항산화효능에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 1999 ; 16(3) : 269-286
 16. 문진영 : 작약 약침액이 *tert*-butyl hydroperoxide로 유도된 흰쥐 배양 간세포의 지질과산화반응 및 항산화효소활성에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 2000 ; 17(3) : 176-187
 17. Osawa, T., Namiki, M. : A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agric. Biol. Chem.* 1981 ; 45 : 735-739
 18. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. : Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochem.* 1978 ; 95 : 351-358
 19. Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T. : Two new flavonoids and other constituents in licorice root : their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* 1988 ; 36 : 2090-2097
 20. Sladowski, D., Steer, S. J., Clothier, R. H. and Balls, M. : An improved

- MTT assay. *J. Immun. Methods* 1993 ; 157 : 203-207
21. Ames, B. N., Cahcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P. : Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer. A hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981 ; 78 : 6858-6862
22. Aruoma, O. I., Kaur, H. and Halliwell, B. : Oxygen free radicals and human disease. *J. Roy. Soc. Health* 1991 ; 111(5) : 172-177
23. Glascott P. A., Gilfor E. and Farber J. L. : Effects of vitamin E on the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. *Mol. Pharmacol.* 1992 ; 41 : 1155-1162
24. Branen A. L. : Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS* 1974 ; 52 : 59-63