

가미청간탕(加味淸肝湯)이 Rat의 알콜성 지방간에 미치는 영향

정성현 · 임동술 · 이숙연*

삼육대학교 약학과

The Effects of Ka-Mi-Chung-Gan-Tang on Rat with Alcoholic Fatty Liver

Cheng Xuan Zheng, Dongsool Yim, and Sookyeon Lee*

Department of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

Abstract – Chronical intake of alcohol can cause alcoholic fatty liver. Fatty liver is caused by fat infiltration: the state of high rate of fat in liver cells and by losing the balance between the synthesis and the secretion of fatty acid. It could be developed into liver necrosis and cirrhosis. Ka-Mi-Chung-Gan-Tang (KMCGT) is a decoction used for fatty liver as oriental medicines in China. The prescription is composed of Ginseng Radix, Bupleuri Radix, Scutellariae Radix, Pinelliae Tuber, *Artemisiae capillaris* Herba, Gardeniae Fructus, Zingiberis Rhizoma, Zizyphi Fructus and Glycyrrhizae Radix etc. We have induced alcoholic fatty liver by ethanol administration (6 g/kg, single dose/day, for a week) on rats and observed changes of triglyceride, cholesterol and lipid peroxidation in liver tissues of them. Also we checked the activities of GOT and GPT in blood of rats. KMCGT inhibited significantly the increase of triglyceride, cholesterol, lipid peroxidation level and effectively the increase of malondialdehyde (MDA).

Key words – Alcoholic fatty liver, Ethanol, Lipid peroxidation, Ka-Mi-Chung-Gan-Tang (KMCGT)

우리나라에서 간질환의 발생률은 다른 외국에 비해 상당히 높은 편으로 그 이유는 주로 높은 간염 virus 보균율과 독특한 음주문화 때문인 것으로 간주되고 있다. 특히 만성적인 알코올 섭취나 또는 비만으로 인해 나타나는 지방간은 근래에 들어 흔히 발생하는 간병변 가운데 하나로 이는 간세포내에서 지방이 증가하는 현상으로 간의 무게에서 지방이 차지하는 비율이 5%가 넘을 때를 말하며¹⁾ 또한 간에서의 지방산의 생합성과 분비의 균형이 깨어져 나타나는 것으로 알려져 있다.²⁾ 지방간은 간질환의 초기질환으로 간의 비대화나 진행정도에 따라 세포의 괴사 또는 간경화 등 고질적인 질환으로 진전되기도 한다. 알코올성 지방간은 만성적인 알코올섭취에 의해서 뿐만 아니라 고용량의 알코올을 일회 섭취에 의해서도 유도될 수 있다고 알려져 있고³⁾ 알코올에 의한 간질환은 Cytochrome P-450 2E1과 밀접하게 관련되어 있으며 아울러 lipid peroxidation이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.⁴⁾ 즉 만성적인 ethanol의 섭취에 의한 알코올성 지방간의 유도는 ethanol 대사에 의한 지

방산의 지속적인 공급과, 지방산의 합성을 매개하는 효소의 활성증가로 인한 Acetyl Co A로부터 지방산의 합성증가 또는 간세포막의 손상으로 인한 triglyceride의 분비 장애 등이 원인이 되어 진행되어 진다고 알려져 있다.²⁾

그동안 많은 연구자들에 의해 여러 생약에서 간보호 물질을 찾는 연구가 진행되어 여러 가지 생약들과 그 성분들이 검증되었다.⁵⁻⁷⁾ 더욱이 한의서인 상한론이나 동의보감에는 경험적인 한약처방들이 많이 수록되어 있어 한의약학에서는 많이 응용되고 있다. 대표적으로 현대약학 및 의학적 측면에서 볼 때 소시호탕, 인진호탕 및 인진오령산 등이 간질환 치료에서 임상적 효능이 인정된다고 보고되었다.⁸⁾ 하지만 알코올성 지방간에 관련된 연구는 그리 많지 않은 상황이다.

청간탕은 황금, 당귀, 생지황, 목단피, 승마, 황련, 치자 등으로 구성되며 주로 간질환에 사용되고 인진호가 가해진 인진청간탕, 시호가 가해진 시호청간탕⁹⁾ 등이 있다.

이에 저자 등은 중국에서 비만으로 전해 내려오는 한약처방 중 지방간치료제로써 임상적으로 가장 많이 쓰이고는 있으나 학문적 근거가 약함을 인지하여 청간탕(淸肝湯)의 처

*교신저자(E-mail) : leesy@syu.ac.kr
(FAX) : 02-948-5370

방을 택하고 실험적으로 근거를 확립하기 위해 이 처방에 다른 약재들을 가감하여 가미청간탕(加味淸肝湯)을 조제하고 아울러 이전과는 다른 복용방법을 적용하여 알코올성 지방간에 미치는 영향을 측정하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 인삼(*Ginseng Radix*), 시호(*Bupleuri Radix*), 황금(*Scutellariae Radix*), 반하(*Pinelliae Tuber*), 인진호(*Artemisiae capillaris Herba*), 치자(*Gardeniae Fructus*), 건강(*Zingiberis Rhizoma*), 산조인(*Zizyphi Fructus*) 및 감초(*Glycyrrhizae Radix*) 등을 서울 경동시장에서 구입하여 생약을 일정 비율로 조합하고 열수 추출하여 가미청간탕을 조제하였다. 표본은 삼육대학교 생약학 교실에 보관하였다(표본번호 가미청간탕-01-001).

실험동물 - 흰쥐는 Sprague-Dawley계의 체중 200 ± 20 g의 수컷을 대한실험동물(주)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 5\%$ 에서 사육하여 1주일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 적응기간동안에는 고형사료(삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하였다.

시약 및 기구 - 본 실험에 사용된 모든 시약 및 용매는 특급으로서 Sigma사 또는 Aldrich사의 시약을 사용하였고 s-GOT와 s-GPT활성 측정을 위해 kit(Asan Pharm. Co. Seoul, Korea)을 사용하였다. 기구로는 UV-spectrophotometer (Spectronics Corporation, Westbury, New York, U.S.A.; Spectroline R, Model Cm-10, Fluorescence Analysis Cabinet) 및 Centrifuge (Sigma. 1-15) 등을 사용하였다.

가미청간탕 투여 방법 - 흰쥐에 일주일 동안 30% ethanol 20 ml/kg을 1일 1회씩 경구 투여하였고 8일째 되는 날부터 실험이 끝날 때 까지 절식시키고 Scheme 1에 의거하여 8일째의 22시와 9일째의 08시에 음성대조군에는 olive oil (1 ml/마리)만을, 양성대조군에 UDCA(10 mg/kg)를 olive oil에 현탁시켜 각각 경구 투여하였고 양성대조군인 UDCA 투여군과 가미청간탕 투여군은 8일째 18, 20시와 9일째 06시

에 각각 UDCA와 가미청간탕을 경구 투여하였다. Olive oil의 투여목적은 완하제로 배설물의 배설을 촉진시키는데 있다.

간조직 중 Triglyceride의 함량 측정 - 간조직 중 triglyceride 함량은 Van Handel과 Zilvermit의 방법¹⁰⁾을 Butler 등이¹¹⁾ 변형시킨 방법으로 측정하였다. 간을 적출하여 chloroform으로 추출한 후 saponification에 의해 생긴 glycerol를 산화시킨 다음 chromotropic acid(4,5-dihydroxy-naphthalene-2,7-disulfonic acid)를 가해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

간조직 중 Cholesterol의 함량 측정 - 간조직 중 Cholesterol 함량은 Zlatis와 Zak의 방법¹²⁾을 변형하여 측정하였다. 간을 적출하여 chloroform과 methanol(2:1)로 추출한 후 o-phthalaldehyde를 가하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Glutathione의 활성 측정 - Glutathione은 enzymatic recycling method¹³⁾를 이용하여 측정하였다. 간을 적출하여 homogenate를 만든 후 원심분리하여 NADPH 용액과 5,5'-dithio-bis(20nitrobenzoic acid)용액을 가하고 상온에서 4분간 방치한 후 412 nm에서 약 2분간 흡광도의 변화를 측정하였다.

간조직 중 Lipid peroxidation의 함량 측정 - 간조직 중 Lipid peroxidation은 thiobarbituric acid법¹⁴⁾을 이용하여 측정하였다. 간을 적출하여 간조직 1 g당 9배량의 1.15%-KCl 용액을 가해 homogenate를 만든 후 0.4 ml에 8.1% SDS용액, 0.8% thiobarbituric acid 1.5 ml 및 20% acetic acid 1.5 ml를 가하여 반응액이 4.0 ml되게 한 후 마개를 막고 95°C 의 수조에서 60분간 가열하였다. 가열이 끝난 후 n-butanol을 가하여 TBA반응물을 추출한 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 유기층을 취해 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화지질의 함량은 간조직 1 g당 malondialdehyde의 μmol 수로 나타내었다.

혈중 Transaminase 활성 측정 - 실험 10일째 되는 날에 각 군의 흰쥐를 ether로 마취하여 심장으로부터 혈액을 채취하고 1500 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 transaminase의 측정은 Reitman-Frankel법을 사용하였고, 이를 위해 s-GOT, s-GPT 측정용 kit을

Scheme 1. Experimental schedule for effects of Ka-Mi-Chung-Gan-Tang on Rats with Alcoholic Fatty Liver

Day		Control	Ethanol	UDCA	KMCGT
	For a Week	-	Ethanol	Ethanol	Ethanol
8th Day	18:00	-	-	UDCA	KMCGT
	20:00	-	-	UDCA	KMCGT
	22:00	olive oil	olive oil	UDCA+olive oil	KMCGT+olive oil
9th Day	06:00	-	-	UDCA	KMCGT
	08:00	olive oil	olive oil	UDCA+olive oil	KMCGT+olive oil
10th Day	Level checked	Triglyceride,	Cholesterol,	Lipid peroxidation and	GOT and GPT

UDCA : Ursodeoxycholic acid, KACGT: Ka-Mi-Chung-Gan-Tang, Olive oil : ml/마리.

사용하였다.

통계처리 - 모든 data는 mean ± standard error mean (S.E.)나 percentage로 나타내었으며 유의성 검정을 위해 Anova test를 실시하였고 정상군 혹은 다른 군과의 비교를 위해 Neuman-Keuls test를 실시하였고 $p < 0.05$ 수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

Triglyceride와 Cholesterol의 변화 - 간조직중의 지방의 함량을 알아보기 위해서 Triglyceride의 함량과 Cholesterol의 함량 변화를 조사하여 Table I에 나타내었다. 에탄올이 1일 1회 1주일간 경구투여 되었을 때 간조직의 중성지방인 Triglyceride 함량을 대조군의 2배 가까운 41.77과 15.77로 유의성 있게 증가시킴으로 지방간 생성을 유발하는 것을 확인할 수 있었고 이는 알코올 대사에 의한 지방산 공급 과다 또는 acetyl Co A로부터 지방산의 합성 증가 또는 간세포막의 손상으로 인한 triglyceride의 분비장애에 의해 야기된 것으로 추정된다.²⁾ Triglyceride의 함량이 가미청간탕 투여군에서 14.02로 유의성($p < 0.01$)있게 억제됨을 확인할 수

Table I. Effect of Ka-Mi-Chung-Gan-Tang on hepatic triglyceride and cholesterol level in rats treated repeatedly with ethanol for a week

	No. of animals	Triglyceride level (mg/g liver)	Cholesterol level (mg/g liver)
Control	6	10.75 ± 1.01	6.42 ± 1.03
EtOH	6	20.35 ± 1.18	15.77 ± v3.07
UDCA+EtOH	6	15.11 ± 1.74**	8.40 ± 0.38**
KMCGT+EtOH	6	14.02 ± 1.23**	8.05 ± 1.24**

EtOH: Ethanol treated group, UDCA+KMCGT: Ursodeoxycholic acid and Ka Mi Chung Gan Tang treated group. Each value represents the mean ± S.E. **Significantly different from the rats treated with ethanol only ($p < 0.01$).

Table II. Effect of Ka-Mi-Chung-Gan-Tang on hepatic glutathione and hepatic lipid peroxidation level in rats treated repeatedly with ethanol for a week

	No. of animals	Glutathione level (mol/g liver)	MDA level (mol/g liver)
Control	6	5.31 ± 0.87	208.67 ± 22.33
EtOH	6	3.41 ± 1.05	343.34 ± 33.09
UDCA+EtOH	6	3.75 ± 0.98*	205.05 ± 20.34**
KMCGT+EtOH	6	4.91 ± 0.87**	203.67 ± 41.67**

EtOH: Ethanol treated group, UDCA+KMCGT: Ursodeoxycholic acid and Ka Mi Chung Gan Tang treated group. Each value represents the mean ± S.E. **Significantly different from the rats treated with ethanol only ($p < 0.05$). *Significantly different from the rats treated with ethanol only ($p < 0.01$).

Table 3. Effect of Ka-Mi-Chung-Gan-Tang on serum GOT, GPT level in rats treated repeatedly with ethanol for a week.

	No. of animals	GOT (karmen unit)	GPT (karmen unit)
Control	6	27.60 ± 4.08	30.57 ± 4.59
EtOH	6	41.77 ± 4.63	53.01 ± 5.55
UDCA+EtOH	6	33.11 ± 3.31	35.43 ± 2.79
KMCGT+EtOH	6	37.07 ± 0.59	34.56 ± 6.45

EtOH: Ethanol treated group, UDCA+KMCGT: Ursodeoxycholic acid and Ka-Mi-Chung-Gan-Tang treated group. Each value represents the mean ± S.E.

있었고 또한 간조직의 cholesterol 값도 8.05로 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소되었음을 확인할 수 있었다.

Glutathione의 변화와 과산화지질의 변화 - Glutathione은 알코올 분해과정 중에 생성되는 아세트알데히드가 세포의 지질과 단백질을 손상시켜주는 것을 막아주고 또 세포에서 생성되는 활성산소를 제거해 주는 항산화제의 역할을 담당하고 있다고 알려져 있다.¹⁵⁾ 아울러 지방의 과산화작용에 의해 생성되는 물질인 MDA는 triglyceride의 함량과 비례하는 것으로 알려져 있다. 알코올의 일주일 연속적인 투여로 인해서 알코올 투여군의 간조직중의 glutathione 함량이 3.41로 감소되었음을 확인할 수 있었다. 아울러 MDA의 함량은 343.34로 증가되었음을 확인하였다. 반면 가미청간탕을 투여한 투여군의 간세포내의 glutathione 함량이 4.91로 UDCA 투여군의 3.75에 비해서 유의성 있는($p < 0.01$) 증가효과를 확인할 수 있었고 MDA 측정치는 203.67로 Control 보다도 나은 유의성 있는($p < 0.01$) 감소치를 나타내었다. 본 실험에서도 MDA 함량이 Triglyceride 함량과 비례하는 것을 확인할 수 있었다.

GOT, GPT의 변화 - 가미청간탕의 투여가 혈중 transaminase 활성에 미치는 결과는 Table III과 같다. 본 실험에서 유의성 있는 결과를 확인할 수는 없었지만 가미청간탕이 GOT와 GPT 수치를 저하시키는 경향이 있음을 확인하였다.

결 론

가미청간탕의 알콜성 지방간 생성 억제작용에 대한 실험의 결과는 다음과 같다.

1. 가미청간탕이 에탄올 투여로 인한 triglyceride와 cholesterol level 상승을 모두 유의성 있게 억제함으로써 에탄올에 의한 지방간 생성에 대한 억제작용을 확인할 수 있었다.
2. 가미청간탕은 에탄올 투여로 인한 간 homogenate에서의 MDA 함량증가와 glutathione 함량저하에 유효하게 억제시키는 효과를 보였다.

3. 본 실험에서는 일주일간 에탄올 투여에 의해 혈청 중 GOT와 GPT 수치가 충분히 증가하지 않았기 때문에 가미청간탕의 간보호 효과를 뚜렷하게 관찰할 수는 없었지만 혈청 중 GOT와 GPT 수치를 저하시키는 경향을 확인하였다.

따라서 본 실험에서 가미청간탕이 알콜성 지방간 생성을 억제하는 활성이 있는 새로운 생약복합 처방임을 확인할 수 있었으나 작용기전은 명확하지 않다. 따라서 추후 작용 기전을 밝히는 연구가 지속되어야 할 것 같다.

사 사

본 논문은 보건장학회의 지원에 의해 연구되었으므로, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Dianzani M.U., Meeks, R.G., Harrison S.D. and Bull R.J. (1991) Biochemical aspects of fatty liver in Hepatotoxicology. CRC press: 327-399.
2. Baraona, E. and Lieber, C.S. (1979) Effects of ethanol on lipid metabolism, *J. Lip. Res.*, **20**: 289-315.
3. Mallov, S., Bloch, J.L. (1956) Role of hypophysis and adrenals on fatty infiltration of liver resulting from acute ethanol intoxication, *Am. J. physiol.*, **184**: 29-34.
4. Ekstrom, G., Ingelman-Sundberg M. (1989) Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducibile cytochrome P450(P11E1), *Biochem. Pharmacol.*, **38**: 1313-1319.
5. Hye Sook Yun-Choi, Il Moo Chang (1977) Plants with Liver Protective Activities (I) *Kor. J. Pharmacogn* **8**: 125-129.
6. Mroueh M. Saab Y. Rizkallah R. (2004) Hepatoprotective activity of Centaurium erythraea on acetaminophen-induced hepatotoxicity in *at. Phytother Res.* **18**: 431-433.
7. Lee K.J., Choi C.Y., Chung Y.C., Kim Y.S., Ryu S.Y., Roh S.H., Jeong H.G. Protective effect of saponins derived from roots of Platycodon grandiflorum on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity. *Toxicol Lett.* **147**: 271-82.
8. 한국한약학 연구회(1997) 임상상용방제해설-조제지침서 및 엑스제 방제: 167. 정담, 서울.
9. 대한약사회(1995) 한약조제지침서 해설: 89-91. 대한약사회, 서울.
10. Van Handel, E., Zilversmit, D.B. (1957) Micromethod for the direct determination of serum triglycerides, *J. Lab. Clin. Med.*, **50**: 52-157.
11. Butler, W.M., Maling, H.M., Horning, M.G., Bordie, B.B. (1961) The direct determination of liver triglycerides, *J. Lipid. Res.*, **2**: 95-96.
12. Zlatis A., Zak B. (1969) Study of a new cholesterol reagent, *Anal. Biochem.*, **29**: 143-148.
13. Griffith, O.W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl pyridine, *Anal. Biochem.*, **106**: 207-212.
14. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**: 351-358.
15. Ernest Hodgson and Frank E. Guthrie (1982) Introduction to Biochemical Toxicology: 341-356.

(2004년 7월 19일 접수)