

## Benzo(a)pyrene에 의해 유도된 흰쥐의 간 장애에 미치는 강활 Methanol 추출물의 효과

윤수홍<sup>1</sup> · 하헌<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>대구가톨릭대 약학과, <sup>2</sup>상록병원 약제과

### Effects of Methanolic Extract of *Angelicae koreana* Radix against Benzo(a)pyrene Induced Liver Injury in Rats

Soo-Hong Yoon<sup>1</sup> and Hun Ha<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Pharmacy, Catholic University of Taegu, Kyongsan 712-702, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Pharmacy, Sangrok Hospital, Kyongju 780-881, Korea

#### Abstract

To evaluate the preventive effects of methanolic extract of *Angelica koreana*(MEAK), this extract was given to rats orally at various doses of 10, 50 and 100 mg/kg before hepatotoxicant, benzo(a)pyrene treatment. The increased serum enzyme levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) by benzo(a)pyrene induction were significantly lowered in a dose dependent manner after pretreatment with MEAK. Furthermore, MEAK also decreased the elevated lipid levels after benzo(a)pyrene administration. These results revealed that MEAK could afford a significant protective action in the alleviation of benzo(a)pyrene induced hepatocellular injury.

**Key words :** *Angelica koreana*, benzo(a)pyrene induction, hepatocellular injury.

#### 서론

강활(*Angelica Koreana* Radix)은 Umbelliferae(산형과)에 속하는 속근초를 일컫는데, 중국 약전에서는 *Notopterygium incisum* 또는 *Notopterygium forbesii*의 뿌리 혹은 뿌리줄기를 말린 것을 말한다(한국생약학교수협회 1994). 풍한감모(風寒感冒)와 풍한습비(風寒濕痺)를 제거하는 작용이 있어 진통, 소염 등의 효능을 나타내므로, 민간에서 주로 관절염, 두통, 근육통 등에 사용하고 있다(Ryu & Yook 1968, Moon *et al* 1999, Sarker & Nahar 2004). 현재까지 주성분으로는 여러 형태의 coumarine계 물질(Yook & Ryu 1970, Suk 1976, Lee & Woo 1982, Kwon *et al* 1991, Ryu *et al* 2001, Seo 2002)과 sesquiterpene류(Chi 1974) 등이 알려져 있고, 생리활성작용으로는 강활 에탄올 추출물의 종양 괴사인자 생성 억제 작용(Cho *et al* 1998)의 보고가 알려져 있을 뿐이다.

다환방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons)중에 가장 많이 연구된 것이 benzo(a)pyrene(Miller & Ramos 2001)인데, 이는 여러 종에서 발암성, 돌연변이성, 세포독성 그리고 최기성(催奇性)을 나타낸다(Weinstein *et al* 1976, Neibert 1989, Miller & Ramos 2001)고 한다. 독성을 나타내는데

있어서 간이 대표적 장기로 알려져 있으므로, 본 실험에서도 간 손상 유발 물질로 정하였다(Okey *et al* 1984, Uno *et al* 2001). 따라서 본 실험에서는 여러 농도의 강활 methanol 추출물로 전처리 후, 실험동물에 benzo(a)pyrene을 투여하여 간 독성을 유발하는 한편, 간 기능의 지표로 사용되는 효소 활성과 지질 함량의 변화를 측정하여 강활의 간 보호 효과를 관찰하였다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 시료의 조제

대구약령시에서 구입한 강활을 세정, 음건하고, 70% methanol을 가하여 실온에서 24시간 동안 추출한 후, Whatman No.1 여과지로 여과한 후, 감압 농축시켜 동결 건조하였다. 강활 건조 중량에 대한 methanol 추출물의 수득율은 13% (w/w)였다.

##### 2. 실험동물 및 처치

평균 체중이 180±20 g인 외견상 건강한 4주령의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 일반 고형사료(삼양사, 서울)와 물을 충분히 공급하며 1주일 동안 환경에 적응시킨 후, 10마리씩 5군으로 난괴법에 따라 분리하여 Table 1과 같이 실험

\* Corresponding author : Hun Ha, Tel : +82-54-751-6778, Fax : +82-54-751-4479, E-mail : hunha@hotmail.com

Table 1. Experimental design

Group	MEAK <sup>1)</sup>	Benzo(a)pyrene <sup>2)</sup>
Normal	-	-
B(a)P	-	0.1
MEAK 10mg/kg+B(a)P	10	0.1
MEAK 50mg/kg+B(a)P	50	0.1
MEAK 100mg/kg+B(a)P	100	0.1

MEAK : methanol extract of *Angelica koreana* <sup>2)</sup>mg/kg.

에 사용하였고, 사육실의 온도는 25±2°C로 유지하였으며, 12시간 주기로 명암을 조절하였다.

강활 투여군에게 매일 일정시간에 추출물 10, 50, 100 mg/kg을 2주간 동안 경구투여한 후, 마지막 투여 2시간 후 benzo(a)pyrene 0.1 mg/kg을 복강 투여하였다. 이후 흰쥐를 24시간 절식시킨 다음 에테르로 마취시켜 개복하여 복부대동맥으로부터 채혈하였다. 채혈한 혈액을 실온에서 30분간 방치한 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 혈청을 효소 활성 및 지질 함량 측정 시료로 사용하였다.

### 3. 효소 활성 및 지질 함량 측정

혈청중의 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 활성도는 Reitman-Frankel법으로, alkaline phosphatase 활성도는 Kind-King법에 준하였으며, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride 함량은 효소법으로 조제된 아산제약 시약을 사용하였다.

### 4. 통계처리

실험결과 통계처리는 Student's *t*-test에 준하여 평균±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성은  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

강활 methanol 추출물의 안전성을 검증하기 위해 경구 투여 후 흰쥐의 행동 변화를 관찰한 결과, 10, 50, 100 mg/kg 범위에서는 비정상적인 행동 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 200 mg/kg 이상에서는 경미하게 느린 움직임과 식욕 부진 등이 나타났다.

### 1. 혈청 Transaminase 활성에 미치는 영향

간으로부터 혈액으로 방출된 효소의 활성 측정은 간 손상 연구에서 가장 유용한 방법 중의 하나인데, 특히 혈청 중

AST 및 ALT의 활성상승은 간 손상으로 인한 간세포 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것이므로 간세포의 변성 및 괴사의 지표가 된다(McCay 1984).

사람에게는 오염된 공기의 흡입과 오염된 식품의 섭취가 benzo(a)pyrene에 노출되는 주된 경로(Waldman *et al* 1991, Phillips 1999)인데, 주로 난방에 쓰이는 석탄이나 목재의 연소(EPA 1985)와 또 다른 형태는 직연(Adams *et al* 1987)과 작업장에서의 노출(Arnould *et al* 1999) 등이다.

Benzo(a)pyrene을 투여하여 급성 간장해를 유발한 흰쥐 혈청중의 효소 활성도 변화에 미치는 강활 추출물의 영향은 Table 2에 나타나 있다. Benzo(a)pyrene의 투여로 AST는 113.71 ± 3.42 karmen unit로 정상군에 비해 약 4배, ALT는 170.27 ± 3.14 karmen unit로 약 5.6배 증가되어 간의 손상 정도가 현저하였다. 반면 증가한 효소활성은 강활 추출물 투여 농도가 증가함에 따라 현저히 감소하였는데, 100 mg/kg 투여군에서는 AST와 ALT가 각각 34.24±6.16 karmen unit과 23.52±4.21 karmen unit으로 거의 정상군 수준으로 회복되었다. 이는 강활 추출물이 benzo(a)pyrene에 의한 간독성으로 증가한 AST와 ALT의 활성을 회복시키는 역할을 하였다.

간에 존재하는 aminotransferase는 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행되고 있다는 사실을 나타내며, 결과적으로 혈중으로 이들 효소를 방출케 되어 혈청 효소의 활성 증가를 야기시키는데, 이는 간세포의 변성 및 괴사의 지표가 된다(Zimmerman 1978).

한편 ALP 활성도는 benzo(a)pyrene투여로 100.27±8.26 king

Table 2. Changes in serum levels of AST, ALT and ALP in benzo(a)pyrene intoxicated rats pretreated with MEAK

	AST <sup>1)</sup>	ALT <sup>1)</sup>	ALP <sup>2)</sup>
Normal	27.32±2.12	30.36±2.16	45.22±4.36
B(a)P	113.71±3.42*	170.27±3.14*	100.27±8.26*
MEAK 10 mg/kg+B(a)P	70.43±4.19	55.34±5.61**	54.78±6.21**
MEAK 50 mg/kg+B(a)P	42.25±3.21**	40.74±5.39	53.26±5.14
MEAK 100 mg/kg+B(a)P	34.24±6.16	23.52±4.21**	52.19±6.16

MEAK : methanol extract of *Angelica koreana*.

<sup>1)</sup> karmen unit, <sup>2)</sup>king armstrong unit.

Each value represents mean±SD of 10 rats.

\*  $p < 0.05$  : as compared with normal group,

\*\*  $p < 0.05$  : as compared with benzo(a)pyrene induced group.

armstrong unit으로 정상군에 비해 약 2.2배 정도 활성 증가를 보였다. 그리고 강활 추출물 투여군에서는 강활 추출물의 농도 증가와는 관계없이 정상군과 거의 비슷한 활성도로 회복되었다.

## 2. 혈청 지질 함량에 미치는 영향

혈청 총지질은 주로 cholesterol과 cholesterolester, phospholipid 그리고 triglyceride로 구성된다. 혈청 cholesterol의 약 70%가 ester화된 것인데, 이 ester화가 주로 간에서 일어나서, 혈청 cholesterol 함량 변화가 간 기능 시험에 자주 적용된다(Ganong 1989).

Benzo(a)pyrene을 투여하여 급성 간장애를 유발한 흰쥐 혈청중의 지질 함량 변화에 미치는 강활 추출물의 영향은 Table 3에 나타나 있다. Total cholesterol 함량은 benzo(a)pyrene 투여로는 315.67±8.11 mg/dL로 정상군과 비교할 때, 약 5.3배 정도 증가하였는데, 추출물 전처리군에서 정상군 수준은 아니지만 용량 의존적으로 유의성 있는 회복을 나타냈다.

한편, HDL-cholesterol은 benzo(a)pyrene 처리로 35.62±7.46 mg/dL로 감소했는데, 강활 추출물 투여로 유의성은 없지만 약간의 함량 증가를 나타냈다.

Triglyceride 함량은 benzo(a)pyrene투여로 252.78±8.93 mg/dL로 약 2.5배의 증가를 보였다. 강활 추출물 전처리로 투여 용량과는 관계없이 정상군 수준으로 회복되었다.

Benzo(a)pyrene 투여로 증가된 혈청 cholesterol과 triglyce-

ride 함량은 biliary obstruction과 급성 간 손상과 연관이 있고 (Cornelius 1989) 이는 혈청 효소 변화와 함께 관찰해 볼 때, benzo(a)pyrene 투여로 야기된 급성 간세포 손상과 cholestasis(Schlager 1982)가 유발됨을 시사한다.

## 요약 및 결론

본 연구는 민간에서 소염 진통제로 널리 쓰이는 강활의 급성 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 실험동물에 다환 방향족 탄화수소이며 환경공해물질인 benzo(a)pyrene (0.1 mg/kg)을 복강 투여하여 급성 간 손상을 유도하였다. 이러한 실험동물에 강활 methanol 추출물을 투여하여 혈청 효소활성도 및 지질 함량의 변화를 측정하였다. Benzo(a)pyrene의 투여에 의하여 혈청 AST, ALT 및 ALP 활성은 유의성 있게 증가하였으며, 강활 추출물은 증가한 AST와 ALT 효소 활성을 추출물의 용량에 따라 감소시켰다. 한편 benzo(a)pyrene의 투여에 의하여 혈청 total cholesterol과 triglyceride 함량은 상당히 증가하였는데, 강활 추출물 투여로 정상군 수준으로 회복되었다. 따라서 강활 methanol 추출물은 benzo(a)pyrene에 의해 야기된 간 실질세포의 손상과 담즙 분비 이상 등의 간 독성에 대해 보호 효과를 가지는 것으로 사료된다. 현재 이에 대한 활성물질의 분리 등의 연구가 진행되고 있으며, 그동안 민간요법으로 이용되어온 임상적 효과는 곧 밝혀질 것으로 기대된다.

## 문헌

- 한국생약학교수협의회 (1994) 본초학, 대한약사회, 65-67.
- Adams JD, O'Mara-Adams J, Hoffman D (1987) Toxic and carcinogenic agents in undiluted mainstream smoke and side-stream smoke of different types of cigarettes. *Carcinogenesis* 8: 729-731.
- Arnould JP, Pfohl-Leszkowicz A, Bach V, Libert JP, Belegaude J (1999) Biological monitoring exposure of workers from plant producing carbon electrode: Quantification of benzo(a)pyrene-DNA adducts in leucocytes by a 32O-postlabelling method and an immunoassay. *Hum Exp Toxicol* 18: 314-321.
- Chi HJ (1974) Sesquiterpene of Korean Quinghuo. *Korean J Pharmacogn* 5: 7-8.
- Cho JY, Lee JS, Park JS, Park MH (1998) Isolation of inhibitory components on tumor necrosis factor-alpha production from *Angelica koreana*. *Yakhkhoeji* 42: 125-131.
- Cornelius CE (1989) Liver Function. In: JJ Kaneko (Ed.) *Cli-*

**Table 3. Changes in serum levels of total cholesterol, HDL-cholesterol and triglyceride in benzo(a)pyrene intoxicated rats pretreated with MEAK**

	Total cholesterol <sup>1)</sup>	HDL-cholesterol <sup>1)</sup>	Triglyceride <sup>1)</sup>
Normal	59.36±7.26	42.68±5.16	99.65±6.42
B(a)P	315.67±8.11*	35.62±7.46	252.78±8.93*
MEAK 10 mg/kg+B(a)P	100.26±4.65**	41.52±8.56	90.78±5.61**
MEAK 50 mg/kg+B(a)P	92.15±4.59**	38.62±3.68	87.54±7.82
MEAK 100 mg/kg+B(a)P	85.68±3.75**	39.78±5.16	93.62±4.59

MEAK : methanol extract of *Angelica koreana*.

<sup>1)</sup> karmen unit, <sup>2)</sup> king armstrong unit.

Each value represents mean±SD of 10 rats.

\* p<0.05 : as compared with normal group,

\*\* p<0.05 : as compared with benzo(a)pyrene induced group.

- nical Biochemistry of Domestic Animals. Academic Press. San Diego, CA 364-397.
- EPA (1985) Health effect assessment for benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic carbons, Vol IV, EPA 440/4-85-020-V4. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington DC.
- Ganong WF (1989) Review of Medical Physiology. 14ed, Appleton & Lange 254-258.
- Kwon YS, Woo ER, Kim CM (1991) A study on the constituents of bioactive fractions of *Ostericum koreanum* Kitagawa. *Korean J Pharmacogn* 22: 156-161.
- Lee JK, Woo WS (1982) Coumarine constituents from the roots of *Angelica koreana*. *Korean J Pharmacogn* 13: 10-13.
- McCay Pb, Lai EK, Poyer JL, Dubose CM, Jansen EG (1984) Oxygen-and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *J Biol Chem* 259: 2135-2143.
- Miller KP, Ramos KS (2001) Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo(a)pyrene and related hydrocarbons. *Drug Meta Rev* 33: 1-35.
- Moon YH, Go JJ, Park JY (1999) The antiinflammatory and analgesic activities of Gumiganghwaltang. *Korean J Pharmacogn* 30: 18-24.
- Nebert DW (1989) The Ah locus: Genetic differences in toxicity, cancer, mutation and birth defects. *Crit Rev Toxicol* 20: 153-174.
- Okey AB, Dube AW, Vella LM (1984) Binding of benzo(a)pyrene and dibenzo(a,h)anthracene to the Ah receptor in mouse and rat hepatic cytosol. *Cancer Res* 44: 1426-1432.
- Phillips DH (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res* 443: 139-147.
- Ryu KS, Yook CS (1968) Pharmacognostical study on the root of *Angelica Koreana*. *Yakhakhoeji* 12: 50-58.
- Ryu SY, Kou NY, Choi HS, Ryu H, Kim TS, Kim KM (2001) Cnidicine a coumarine, from the root of *Angelica koreana*, inhibits the degranulation of mast cell and the NO generation in RAW264.7 cells. *Planta Med* 67: 172-174.
- Sarkers SD, Nahar L (2004) Natural medicine, the genus *Angelica*. *Curr Med Chem* 11: 1479-1500.
- Schlager R, Haux P and Kattermann R (1982) Studies on the mechanism of the increase in serum alkaline phosphatase activity in cholestasis: significance of the hepatic bile acid concentration for the leakage of the alkaline phosphatase from rat liver. *Enzyme* 28: 3-13.
- Seo EK, Kim KH, Kim MK, Cho MH, Choi E, Kim K, Mar W (2002) Inhibitors of 5 alpha-reductase type I in LNCaP cells from the roots of *Angelica Koreana*. *Planta Med* 68: 162-163.
- Suk KD (1976) Studies on the umbelliferous rhizoma and root (III). The original plant of Korean Quinghuo(Gangwhal). *Korean J Pharmacogn* 7: 25-33.
- Uno S, Dalton TF, Shertzer HG, Genter MB, Warshawsky D, Talaska G, Nebert DW (2001) benzo(a)pyrene induced toxicity: paradoxical protection in Cyp1a1(-/-) knockout mice having increased hepatic BaP-DNA adduct levels. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 1049-1056.
- Waldman JM, Liou PJ, Greenberg A, Butler JP (1991) Analysis of human exposure to benzo(a)pyrene via inhalation and food ingestion in the Total Human Environmental Exposure study (THEES). *J Exp Anal Environ Epidemiol* 1: 193-225.
- Weinstein IB, Jeffrey Am, Jennette KW, Blobstein SH, Harvey RG, Harris C, Autrup H, Kasai H, Nakanishi K (1976) benzo(a)pyrene diol epoxides as intermediates in nucleic acid binding *in vitro* and *in vivo*. *Sci* 193: 592-595.
- Yook CS, Ryu KS (1970) Coumarine components in the fruits of *Angelica Koreana*. *Korean J Pharmacogn* 1: 77-78.
- Zimmerman HJ (1978) Hepatotoxicity. The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. Appleton-Century-Croft, New York. pp 167-197.

(2005년 7월 19일 접수, 2005년 9월 15일 채택)