

# 황금의 간보호활성 및 Cytochrome P450 발현조절에 관한 연구

하기태 · 정상신 · 김철호<sup>1</sup> · 최달영 · 김준기\*

동국대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 성균관대학교 자연과학부 생명과학과

## Study on the Hepatoprotective Effect and Cytochrome P450 Regulation of Scutellaria Radix

Ki Tae Ha, Sang Shin Jeong, Cheorl Ho Kim<sup>1</sup>, Dall Yeong Choi, June Ki Kim\*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Dongguk University,  
1: Molecular and Cellular Glycobiology Unit, Department of Biological Sciences, Sungkyunkwan University

In this study, the liver protective effect of the hot water extracts of Scutellaria radix (SR) was investigated. The SR exhibited a hepatoprotective activity against CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in Sprague-Dawley (SD) rats and Chang cell. And the SR also showed significant decrease of malodialdehyde (MDA) and increase of glutathion (GSH), catalase activity in rat liver homogenate. The expression of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), measured by RT-PCR and western blot, was significantly decreased in the SR treated SD rats and Chang cell. But CCl<sub>4</sub> and SR has no significant effect on 1A1 and 3A1 isoform of cytochrome P450. Based on these findings, it is suggested that hepatoprotective effects of SR possibly related to antioxidative effects and downregulation of CYP2E1 expression.

Key words : Scutellaria radix, cytochrome P450 2E1, carbon tetrachloride, hepatoprotection, antioxidative effect

### 서 론

실험적인 간독성 유발에 흔히 사용되는 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)는 혈청내 transaminase의 증가 등 각종 효소활성에 변화를 초래하며<sup>1)</sup>, 급성적으로는 간세포의 종창, 지방성 혹은 소엽중심성 괴사 등이 일어나고 만성적으로는 간경변을 초래한다<sup>2)</sup>. 사염화탄소는 그 자체로는 무해하지만, 지용성 약제나 기타 화합물의 대사에 관여하는 cytochrome P450에 의해 반응성이 높은 독성 free radical인 CCl<sub>3</sub>로 전환되어<sup>3)</sup>, 세포막의 인지질 과산화 및 내형질체망의 구조와 기능 파괴, 미토콘드리아 및 세포내 효소활성의 파괴 등 다양한 세포 상해를 일으켜 세포의 괴사나 지방변성을 초래한다<sup>4,6)</sup>.

본 연구에 사용된 황금(Scutellaria radix)은 순형과의 다년생 초본인 속썩은 풀(Scutellaria baicalensis Georgi)의 뿌리로서<sup>7)</sup>, 주로 清熱燥濕, 瀉火解毒하는 작용으로 쓰여지고 있고<sup>8)</sup>, 약리효과는 해열작용, 염증억제, 이노작용, 위액분비 억제 및 항균작용이 있는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>.

최근에는 황금이 약물성 및 담관결찰로 유발된 간장해에 대

하여 보호작용이 있으며<sup>10)</sup>, 황금약침역도 흰쥐의 간세포내에서 항산화효과가 있음<sup>11)</sup>이 보고되었다. 또한 김 등<sup>12)</sup>은 황금 및 그 구성 flavonoid 성분이 aflatoxin B1의 대사에 관련된 cytochrome P450 isoform의 활성화에 영향을 미친다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 황금 열수추출물을 사용하여 백서의 혈청내 GOT, GPT, ALP 효소 활성 및 조직학적 소견과 간조직 내 LPO, GSH, catalase의 함량 및 활성을 통하여 간보호 활성을 검사하였으며, 사염화탄소의 대사과정에 핵심적인 작용을 하는 cytochrome P450의 발현에 대하여 RT-PCR 및 western blot 방법을 이용하여 검증하였다. 이상과 같이 in vivo 에서 실험한 결과 유의한 성적을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 시료

실험에 사용된 황금은 충북 제천지방에서 재배한 속썩은 풀(Scutellaria baicalensis Georgi)의 2년근 이상된 뿌리를 채취하여 주피를 벗긴 후 건조한 것으로, 성심한약재(경북 경주)에서 구입하여 동국대학교 본초학교실에서 검증한 후 정선하여 사용하였다. 황금 300 g에 증류수 1.5 l 를 넣고 100℃에서 3시간 동안 가

\* 교신저자 : 김준기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학

· E-mail : graywolf@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2650

· 접수 : 2007/10/27 · 채택 : 2007/11/30

열한 후 여과하여 약 650 ml의 전탕액을 얻었으며, 이를 4℃에 냉장보관한 후 동물실험에 사용하였다.

## 2. 실험동물 및 처치

실험용 동물은 체중 150±20 g의 Sprague-Dawley계 웅성 rat를 사용하였으며, 7일간 동국대학교 한의과대학 동물실험실에서 일정한 조건 (온도 : 20±2℃, 습도 : 60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

실험동물은 4개의 군(정상군, 대조군, 전처리군, 후처리군)으로 나누었으며, 6마리를 한군으로 사용하였다. 정상군은 mouse용 고형사료와 물을 제한없이 공급하였으며, 대조군은 7일간 고형사료와 물을 제한없이 공급한 후 carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)를 0.5 ml/kg/day 용량으로 복강주사하여 간독성을 유발시켰다. 황금추출물 전처리군은 CCl<sub>4</sub> 투여 7일전부터 10 ml/kg/day 용량으로 음용시킨 후 8일째에 CCl<sub>4</sub>를 0.5 ml/kg/day 용량으로 복강주사하여 간독성유발 시킨 다음, CCl<sub>4</sub> 투여 24시간 후에 심장천자를 통해 혈액을 채취하고 간을 적출하였다. 황금추출물 후처리군은 7일간 고형사료와 물을 제한없이 공급한 후 CCl<sub>4</sub>를 0.5 ml/kg/day의 용량으로 복강주사하여 간독성을 유발한 후 황금추출물을 10 ml/kg/day 용량으로 투여하여 48시간 후 심장천자를 통해 혈액을 채취하고 간을 적출하여 실험에 사용하였다.

## 3. 생체시료의 제조

실험동물을 ethyl-ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복하여 복부 대동맥에서 채혈하였으며 채혈한 혈액은 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 혈청을 분리하여 GOT, GPT, ALP 측정 효소원으로 사용하였다.

생리식염수 (0.9% NaCl)로 관류시킨 간은 조직이 손상되지 않도록 주의하여 혈액이 충분히 제거될 때까지 생리식염수로 잘 씻어내고 whatman 여과지로 생리식염수를 제거한 후 -70℃에 동결 보존하여 사용하였다. 효소 활성도 측정을 위해 전체 조직의 4배 용량의 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하여 4℃에서 homogenizer로 4분간 균질화하였다. 이 균질액을 1000 × g에서 15분간 원심분리하여 상층액은 과산화지질 (lipid peroxide) 및 glutathion 함량을 측정하기 위한 시료로 사용하였고, 나머지 상층액은 600 × g에서 15분간 원심분리하여 핵과 세포잔해를 제거한 상층액을 취한 후 다시 12,000 × g에서 30분간 원심분리하여 미토콘드리아를 제거한 상층액을 catalase 활성도를 측정하기 위한 시료로 사용하였다. 상기의 조작은 특별한 언급이 없는 경우는 모두 4℃에서 실시하였다.

## 4. 혈청내 효소활성의 측정

### 1) GOT 및 GPT의 활성측정

혈청중 GOT 및 GPT 활성측정은 Reitman-Frankel의 방법<sup>13)</sup>에 따라 조제된 시약 Kit(아산제약)를 사용하여 측정하였다. GOT, GPT 기질액 1.0 ml을 시험관에 가하여 37℃에서 5분간 방치한 다음 혈청 0.2 ml을 넣어 잘 혼합한 후 37℃에서 GOT는 60분, GPT는 30분간 반응시킨 뒤 정색시약 1.0 ml을 첨가하여 잘

혼합하여 실온에서 20분간 방치하여 반응을 종료시키고, 0.4 N NaOH 용액 10 ml을 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 약 10분간 방치하였다가 60분 이내에 505 nm에서 증류수를 대조로 흡광도 변화를 측정하였다. 혈청중 GOT, GPT의 활성도는 작성한 표준 검량곡선에서 산출하였으며 혈청 1 ml 당 IU/ℓ로 나타내었다.

### 2) ALP의 측정

혈청중 ALP 활성측정은 Petkova 등<sup>14)</sup>의 방법에 따라 조제된 시약 Kit를 사용하여 실시하였다. 기질액 2.0 ml을 시험관에 가하여 37℃에서 5분간 방치한 후 여기에 혈청 0.05 ml을 가하여 잘 혼합하여 37℃에서 15분간 반응시켰다. 정색시약 2.0 ml을 넣고 충분히 잘 혼합한 후 실온에서 10분 이상 방치시키고 60분 이내에 500 nm에서 시약 blank를 대조로 흡광도의 변화를 측정하였다. 혈청중 ALP의 활성도는 표준검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 d당 King-Amstrong unit로 나타내었다.

## 5. 조직 절편의 제작 및 염색

간 조직을 10% 중성 포르말린에 2시간 이상 고정시킨 다음 automated tissue processing 후 embedding하여 paraffin block을 만든 다음 5 μm의 절편을 만들어 slide glass에 부착 후 xylene으로 탈파라핀화 한다. 그후 100%, 90%, 80%, 70%, 60% ethanol 순으로 흡수시키고 hematoxylin으로 핵을 염색한 후 1% HCl로 탈색한 다음 0.3% ammonia water로 중화를 시켰다. 세포질 염색을 위해 eosin으로 염색한 후 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ethanol 순으로 탈수과정을 거쳤다. 청명과정으로 xylene I 및 II에 담갔다가 canada balsam으로 mounting하여 광학현미경으로 조직을 관찰하였다.

## 6. 항산화활성에 대한 측정

### 1) 단백질의 정량

단백질의 정량은 Bradeford의 방법에 따라 Sigma사(USA)의 Bradford reagent를 이용하였으며, bovine serum albumin을 사용하여 표준곡선을 산출하여 단백질을 측정하였다.

### 2) 간 조직의 Lipid peroxide(LPO) 함량측정

조직내 지질 과산화물의 함량 측정은 Ohkawa 등<sup>15)</sup>의 TBA 법으로 측정하였다. 즉 조직 마쇄 균질액을 1,000 × g에서 원심분리한 후 20% 간조직 균질액 0.4 ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2 ml, 20% acetate buffer (pH 3.5) 1.5 ml와 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 1.5 ml을 가한다음 95℃ 항온수조에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 n-butanol:pyridine (15:1, v/v)의 혼합액 5 ml를 첨가하여 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 TBA 반응물질이 존재하는 n-butanol c층을 취하여 파장 532 nm에서 흡광도를 측정한 다음, 검량표준 곡선에 준하여 과산화지질 함량을 간조직 1 mg당 생성된 malondialdehyde (MDA) 함량을 nmol로 나타내었다.

### 3) 간 조직의 Glutathion (GSH) 함량측정

간 조직중의 glutathione 함량은 Ellman<sup>16)</sup>의 방법에 의하여 측정하였다. 먼저 간 조직 균질액을 1,000 × g에서 원심분리한 후

상층액에 4% sulfosalicylic acid를 가하여 혼합한 후 1,000 × g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 sulf-hydryl group이 발색제인 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (1 mM DTNB) 용액과 혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였으며 Glutathion 함량은 protein 1 mg당 nmol로 나타내었다.

4) 간 조직의 Catalase 활성측정

조직내 catalase 활성도는 Aebi<sup>17)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 효소원 일정량을 넣고 기질로서 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액을 가하여 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 1분간 측정하였다. 대조실험으로는 기질인 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 대신에 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)을 가해 다른 조건은 위와 동일하게 하여 흡광도의 변화를 측정하였으며, 효소의 활성도는 1분 동안에 1 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

5. Cytochrome P450 isoform의 mRNA 발현 측정

1) Total RNA의 분리 및 정량

Total RNA의 분리는 takara사의 catrimox-14TM RNA isolation kit ver 2.11을 사용하였다. Rat liver total RNA의 경우에는 -70℃에 보관중이던 간조직 1 g을 homogenizer를 이용하여 잘 분쇄한 다음 cartrimix-14 buffer 1 ml로 lysis시켜 실온에서 10,000 rpm으로 5분간 원심분리를 한다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 pellet에 DEPC 1 ml을 첨가하여 12,000 rpm으로 2분간 다시 원심분리를 한다. 상등액을 제거시킨 pellet에 guanidinium 0.5 ml 첨가하여 vortex한 후 phenol/chloroform/iso-amylalcohol (25:24:1)을 0.5 ml 첨가시켜 vortex하여 12,000 rpm으로 3분간 원심분리한 후 상등액을 취해 iso-propylalcohol을 equeal volume 넣어 잘 혼합한 후 -20℃에 30분간 방치시킨다. 다시 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상등액을 제거시킨 pellet을 70% 에탄올로 washing시키고 나서 진공하에 건조시켜 0.1% DEPC 용액 1 ml에 녹여 사용하였다. Chang cell의 total RNA는 -70℃에 보관한 배지를 제거한 cell culture plate에 catrimox-14 buffer 1 ml을 첨가하여 lysis시켜서 RNA를 분리하였으며 이하의 과정은 rat liver 조직에서의 RNA 분리와 동일하다.

2) cDNA 합성 및 RT-PCR

cDNA 합성은 RNA PCR kit (AMV)를 사용하였다. 본 실험에서는 Total RNA 1 μg/μl를 주형으로 사용하였으며, MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM), 10xRNA PCR buffer, RNase free distilled H<sub>2</sub>O, dNTP (10 mM), AMV reverse transcriptioase XL, Oligo dT (2.5 pmol/μl)가 되게 넣고 total volume을 20 μl가 되게 해서 혼합한 후 RT 반응을 수행하였다. 즉 30℃에서 10분간 반응시키고 42℃에서 30분간 annaling시켜 신장할 수 있도록 만들어 주고 99℃에서 5분, 5℃에서 5분간 1 cycle을 실시한다. 합성된 cDNA는 sense 및 antisense primer(20 pmol) 각각 1 μl 첨가하고 10x PCR buffer 5 μl, 2.5 mM dNTP 1 μl, LA taq polymerase 1 μl를 첨가한 다음 sterile distilled H<sub>2</sub>O로 total volume 50 μl가 되도록 PCR tube에서 혼합한 후, 95℃에서 5분간 95℃에서 1분 간 denaturation 후 68℃에서 1분간 annaling시키고, 72℃에서 1분

30초 동안 35 cycle 반응시킨 다음 72℃에서 5분 동안 elongation 한다. 각각의 PCR product는 10 μl 씩 1.2% ETBR stained agarose gel 상에서 loading하여 전기영동을 시행하여 분석하였다. Cytochrome P450 isoform 각각의 PCR을 위하여 사용된 sense, antisense primer는 아래의 표와 같다(Table 1).

Table 1. The primer sequences which were used in PCR reaction of three cytochrome P450 isoforms and β-Actin.

Gene	sense primer	antisense primer	product size
CYP1A1	GTTCCTCAAGTCTGAA GAG	CATATGGCACAGATGAC ATTGG	509 bp
CYP3A1	GGAATTCGATGTGGAG TGC	AGGTTTGCCTTCTCTTG CC	329 bp
CYP2E1	ACCACCAGCACAACCTCT GAGATATGG	CAATTCATGCGGGCCA GGCCTTCTCC	435 bp
β-Actin	GCTGCCTGACGGTCAG GTCA	CTTGCCTCAGGAGGAG CAA	266 bp

6. Cytochrome P450 2E1의 단백질발현 측정

배지를 제거하고 -70℃에 보관한 cell culture plate에 protein extraction buffer를 300 μl 첨가시켜 cell을 모아 glass homogenizer를 사용하여 균질화한 후, 4℃ 12000 rpm에서 10 min간 원심분리를 하여 supernatent만 모아서 -70℃에 보관하였다가 실험에 사용하였다. 단백질의 정량은 앞에서 언급한 바와 같이 Bradeford의 방법에 따라 시행하였다. 냉동보관한 단백질을 얼음위에서 녹여 20 μg이 되도록 계산하여 loading한 후 10% SDS-PAGE로 전기영동하여 분리시켰다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 transfer시킨 후, 5% skim milk를 함유한 TBS-T (0.1% Tween20 in TBS)를 이용하여 상온에서 1시간 incubation하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하였다. TBS-T로 10분간 2회 washing 후 anti-CYP2E1 antibody (0.5% BSA added TBS-T로 1:1000으로 희석하여 사용)를 primary antibody로 하여 4℃에서 overnight incubation하여 항원항체 반응을 일으킨 후, TBS-T로 10분간 2회 washing하고 2차 항체로 HRP-conjugated anti-rabbit IgG (0.5% BSA added TBS-T로 1:2000으로 희석하여 사용)로 상온에서 1시간 incubation한 다음 ECL solution을 사용하여 암실에서 X-ray film에 약 3시간 감광시킨 후 develop하여 단백질의 발현양상을 분석하였다.

7. 실험 성적의 통계처리

실험 결과에 대한 통계적인 분석은 SAS (The SAS System for Windows, version 6.12, SAS Institute, U.S.A.)을 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 각 실험 군간의 유의성을 검증할 때에는 Student's t-test로 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. Rat 혈청 GOT, GPT 및 ALP에 대한 황금추출물의 영향

각 실험군의 Rat를 희생시켜 혈액을 채취하여 혈청을 분리

한 후 GOT, GPT 및 ALP를 측정된 결과가 Table 2와 같다. GOT 측정결과, 정상군(Control)은 24.2±1.54 IU/ℓ 인데 비하여 CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군(CCl<sub>4</sub>)은 104.3±4.81 IU/ℓ 로 증가하였다. 황금추출물을 7일간 투여한 후 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 전처리군(SR+CCl<sub>4</sub>)에서는 49.6±13.01 IU/ℓ 로 활성이 감소함을 알 수 있었으나 통계적인 유의성은 없었다. 그러나 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 2일간 황금추출물을 투여한 후처리군(CCl<sub>4</sub>+SR)에서는 25.9±2.47 IU/ℓ 로 유의성있는 감소를 나타내었다. GPT를 측정된 결과, 정상대조군은 32.8±4.4 IU/ℓ 인데 비하여 CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군은 98.08±2.25 IU/ℓ 로 증가하였다. 황금추출물을 7일간 투여한 후 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 전처리군에서는 53.2±6.51 IU/ℓ 로 활성이 유의성있게 감소하였으며, CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 2일간 황금추출물을 투여한 후처리군에서는 33.2±3.59 IU/ℓ 로 유의성있는 감소를 나타내었다. 또한 ALP를 측정된 결과, 정상대조군은 9.65±0.60 20K-A unit인데 비하여 CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군은 34.6±2.95 20K-A unit로 증가하였다. 황금추출물을 7일간 투여한 후 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 전처리군에서는 10.8±1.53 20K-A unit로 활성이 유의성있게 감소하였으며, CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 2일간 황금추출물을 투여한 후처리군에서는 12.1±1.97 20K-A unit로 유의성있는 감소를 나타내었다.

**Table 2. The effect of the hot water extract of *Scutellaria Radix* (SR) on serum GOT, GPT and ALP levels with hepatic damage induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>).**

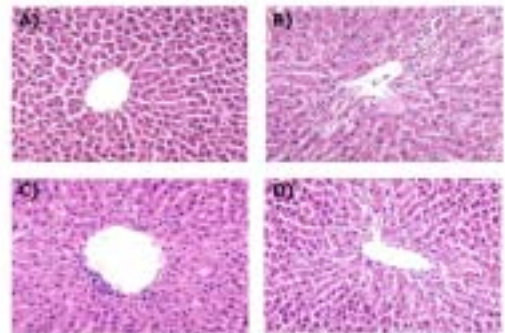
	GOT <sup>1)</sup>	GPT <sup>2)</sup>	ALP <sup>3)</sup>
Control	24.2±1.54	32.8±4.4	9.65±0.60
CCl <sub>4</sub>	104.3±4.81	98.08±2.25	34.6±2.95
SR + CCl <sub>4</sub>	49.6±13.01	53.2±6.51 <sup>a)</sup>	10.8±1.53 <sup>a)</sup>
CCl <sub>4</sub> + SR	25.9±2.47 <sup>*</sup>	33.2±3.59 <sup>b)</sup>	12.1±1.97 <sup>b)</sup>

Each value represents the mean±S.D. of 6 rats Unit : <sup>1)</sup> IU/ℓ, <sup>2)</sup> IU/ℓ, <sup>3)</sup> ALP 20K-A unit <sup>a)</sup> Significantly different from the group(\* : P < 0.05) <sup>b)</sup> Significantly different from the group (\* : P < 0.05)

**2. Rat liver의 조직소견 미치는 황금추출물의 영향**

각각의 실험군을 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 24시간 후에 희생시켜 간조직을 적출하여 생리식염수(0.8% NaCl)로 관류시키고 잘 씻은 다음 -70℃에 동결 보존하였다가 포르말린 고정 및 파라핀 포매 등의 조작을 통하여 조직절편을 제작하였으며, hematoxylin and eosin 방법으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. CCl<sub>4</sub>를 처리하지 않은 정상대조군은 간세포들이 central vein을 중심으로 정상적인 소엽구조를 유지하면서 잘 배열되어 있으며, 기타의 조직학적인 구조 또한 정상으로 나타났(Fig. 1A). CCl<sub>4</sub>를 처리하여 간독성을 유발한 대조군의 간조직은 간소엽의 정상적인 구조가 명확하지 않으며, 간세포는 less eosinophilic하며 세포질 내에 많은 액포(vacuole)가 관찰되었다. 또한 central vein 주위에서는 중성구의 침윤과 간세포의 중장이 관찰되었으며, hepatic sinusoid의 구조 또한 붕괴되었고 pyknotic nucleus를 포함한 퇴행성 세포가 혈관주위 구역에서 발견되고 있다(Fig. 1B). CCl<sub>4</sub>를 처리하기 7일 전부터 황금추출물을 투여한 전처리군 및 CCl<sub>4</sub>를 처리한 후 2일간 황금추출물을 투여한 후처리군에서는 정상군과 마찬가지로 central vein을 중심으

로 간세포가 정상적인 소엽구조를 이루면서 배열되어 있으며, 간세포의 조직학적 구조는 일부 세포에서 액포가 발견되고 있으나 전체적으로는 정상으로 나타났다(Fig. 1C, D).



**Fig. 1. Light micrograph of paraffin-embedded mouse liver.** All section were stained with hematoxylin and eosin. (A) Photomicrograph (X 100) of a section taken from the liver of normal control rat treated with olive oil. (B) Photomicrograph (X 100) of a section taken from the liver of rat treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg). (C) Photomicrograph (X 100) of a section taken from the liver of rat treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) after administration with SR (10 ml/kg) for 7 days. (D) Photomicrograph (X 100) of a section taken from the liver of rat treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) and then treated with SR (10 ml/kg) for 2 days.

**3. Rat liver의 항산화 효소활성에 대한 황금추출물의 영향**

각각의 실험군의 Rat를 희생시켜 혈액을 채취하여 간조직을 채취한 후 균질화하여 원심분리 한 후 지질과산화, GSH 및 catalase를 측정된 결과이다(Table 3). MDA 방법으로 측정된 지질과산화도 결과, 정상대조군은 6.62±1.05 nmol/g인데 비하여 CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군은 15.35±2.39 nmol/g로 증가하였다. 황금추출물을 7일간 투여한 후 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 전처리군에서는 9.14±1.44 nmol/g로 활성이 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었으며, CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 2일간 황금추출물을 투여한 후처리군에서는 6.44±0.49 nmol/g로 유의성있는 감소를 나타내었다. GSH의 함량을 측정된 결과, 정상대조군은 2.63±0.18 nmol/g인데 비하여 CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군은 1.67±0.21 nmol/g로 감소하였다. 황금추출물을 7일간 투여한 후 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 전처리군에서는 2.46±0.35 nmol/g로 활성이 유의하게 증가하였으며, CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 2일간 황금추출물을 투여한 후처리군에서는 2.75±0.32 nmol/g로 유의성있는 증가를 나타내었다. 또한 Catalase의 활성을 측정된 결과, 정상대조군은 15.69±0.6 unit/mg인데 비하여 CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군은 7.99±0.68 unit/mg로 현저히 감소하였다. 황금추출물을 7일간 투여한 후 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 전처리군에서는 16.13±0.98 unit/mg로 활성이 유의하게 증가하였으며, CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 2일간 황금추출물을 투여한 후처리군에서는 11.53±0.77 unit/mg로 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다.

**4. Rat liver의 CYP1A1 mRNA 발현에 대한 황금추출물의 영향**

각각의 실험군을 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 희생시켜 간조직을 채취하여 mRNA를 추출한 다음 Table 1에서 언급한 rat CYP1A1 gene의 sense와 antisense primer를 이용하여 RT-PCR

을 시행하여 그 산물을 0.5% agarose gel에서 전기영동하여 Figure 2의 결과를 얻었다. CCl<sub>4</sub>를 처리하지 않은 정상대조군과 CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군에서는 CYP1A1이 거의 같은 농도로 발현하고 있으나 (Lane 1, 2), 황금추출물을 처리한 군에서는 전처리군 및 후처리군 모두에서 CYP1A1의 발현이 낮아진 것을 확인할 수 있다(Lane 3, 4). 이것으로 보아 CYP1A1은 CCl<sub>4</sub>에 의하여 유도되지는 않으나, 황금추출물에 의하여 mRNA의 발현이 억제되는 것을 알 수 있다.

Table 3. The effect of SR on lipid peroxidation, GSH and catalase levels with hepatic damage induced by CCl<sub>4</sub>.

	LPO <sup>1)</sup>	GSH <sup>2)</sup>	Catalase <sup>3)</sup>
Control	6.62±1.05	2.63±0.18	15.69±0.6
CCl <sub>4</sub>	15.35±2.39	1.67±0.21	7.99±0.68
SR + CCl <sub>4</sub>	9.14±1.44	2.46±0.35 <sup>a)</sup>	16.13±0.98 <sup>a)</sup>
CCl <sub>4</sub> + SR	6.44±0.49 <sup>b)</sup>	2.75±0.32 <sup>b)</sup>	11.53±0.77

Each value represents the mean±S.D. of 6 rats Unit : <sup>1)</sup>, <sup>2)</sup> nmol/g, <sup>3)</sup> unit/mg <sup>a)</sup> Significantly different from the group (\* : P < 0.05) <sup>b)</sup> Significantly different from the group (\* : P < 0.05)

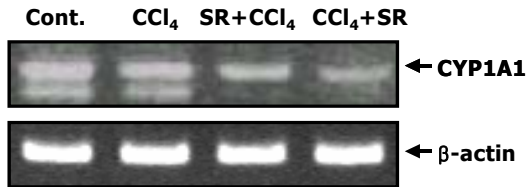


Fig. 2. The CYP3A1 mRNA expression levels of CCl<sub>4</sub> and SR treated rat liver. Rat CYP3A1 (329bp) RT-PCR product was loaded in 0.5% ETBR-stained agarose gel. The templates of the reaction were total mRNAs from the liver of rats which were treated with olive oil (0.5 ml/kg) as normal control (lane 1), treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) as positive control (lane 2), treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) after administration of SR (10 ml/kg) for 7 days (lane 3) and treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) before administration of SR (10 ml/kg) for 2 days. (lane 4)

5. Rat liver의 CYP3A1 mRNA 발현에 대한 황금추출물의 영향  
 각각의 실험군을 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 희생시켜 간조직을 채취하여 mRNA를 추출한 다음 Table 1에서 언급한 rat CYP3A1 gene의 sense와 antisense primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하여 그 산물을 0.5% agarose gel에서 전기영동하여 Fig. 3의 결과를 얻었다. CCl<sub>4</sub>를 처리하지 않은 정상대조군과 CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군에서는 CYP3A1이 거의 같은 농도로 발현하고 있으며(Lane 1, 2), 황금추출물을 처리한 군에서는 전처리군 및 후처리군 모두에서 CYP3A1의 발현이 약간 낮아진 것을 확인할 수 있으나 유의성은 없다(Lane 3, 4). 이것으로 보아 CYP3A1은 CCl<sub>4</sub>에 의하여 유도되지 않으며, 황금추출물에 의해서도 mRNA의 발현이 변화하지 않는 것을 알 수 있다.

6. Rat liver의 CYP2E1 mRNA 발현에 대한 황금추출물의 영향  
 각각의 실험군을 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 희생시켜 간조직을 채취하여 mRNA를 추출한 다음 Table 1에서 언급한 rat CYP2E1 gene의 sense와 antisense primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하여 그 산물을 0.5% agarose gel에서 전기영동하여 Fig. 4의 결과를 얻었다. CCl<sub>4</sub>를 처리하지 않은 정상대조군에서는 CYP2E1의 mRNA가 매우 낮은 농도로 발현하고 있으나(Lane 1),

CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군에서는 CYP2E1이 매우 높은 농도로 발현하고 있음을 알 수 있다(Lane 2). 또한 황금추출물을 처리한 군에서는 전처리군 및 후처리군 모두에서 CYP2E1의 발현이 정상에 가까운 농도로 낮아진 것을 확인할 수 있다(Lane 3, 4). 이것으로 보아 CYP2E1은 CCl<sub>4</sub>에 의하여 발현량이 매우 증가하며, 황금추출물에 의해서 발현이 억제되고 있음을 알 수 있다.

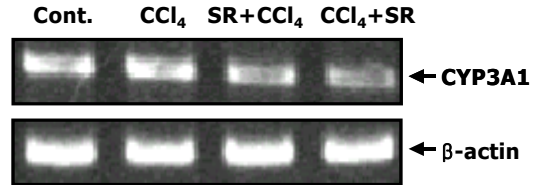


Fig. 3. The CYP2E1 mRNA expression levels of CCl<sub>4</sub> and SR treated rat liver. Rat CYP2E1 (435bp) RT-PCR product was loaded in 0.5% ETBR-stained agarose gel. The templates of the reaction were total mRNAs from the liver of rats which were treated with olive oil (0.5 ml/kg) as normal control (lane 1), treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) as positive control (lane 2), treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) after administration of SR (10 ml/kg) for 7 days (lane 3) and treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) before administration of SR (10 ml/kg) for 2 days. (lane 4)

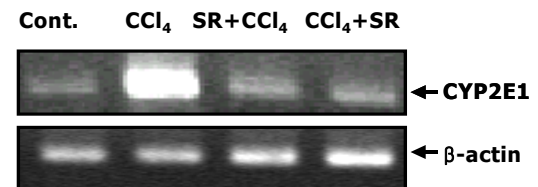


Fig. 4. The CYP2E1 protein expression levels of CCl<sub>4</sub> and SR treated rat liver. Western blot was carried out by using rat CYP2E1 specific polyclonal antibody. The sample of the SDS-PAGE were total proteins from the liver of rats which were treated with olive oil (0.5 ml/kg) as normal control (lane 1), treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) as positive control (lane 2), treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) after administration of SR (10 ml/kg) for 7 days (lane 3) and treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) before administration of SR (10 ml/kg) for 2 days(lane 4).

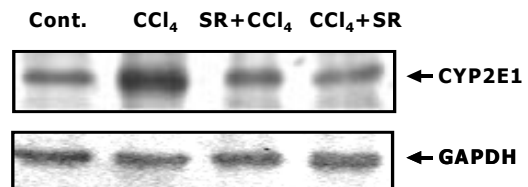


Fig. 5. The CYP2E1 protein expression levels of CCl<sub>4</sub> and SR treated rat liver. Western blot was carried out by using rat CYP2E1 specific polyclonal antibody. The sample of the SDS-PAGE were total proteins from the liver of rats which were treated with olive oil (0.5 ml/kg) as normal control(lane 1), treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) as positive control (lane 2), treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) after administration of SR (10 ml/kg) for 7 days (lane 3) and treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) before administration of SR (10 ml/kg) for 2 days(lane 4).

7. Rat liver의 CYP2E1 단백질 발현에 대한 황금추출물의 영향  
 각각의 실험군을 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 희생시켜 간조직을 채취하여 단백질을 추출하여 전기영동하여 nitro-cellulose membrane에 이동시킨 다음, rat CYP2E1에 특이적인 1차 항체와 anti-rabbit IgG를 이용하여 western blot을 시행하여 ECL 방법으로 신호를 검출하여 Fig. 5의 결과를 얻었다. CCl<sub>4</sub>를 처리하지 않은 정상대조군에서는 CYP2E1 단백질이 매우 낮은 농도로 발현하고 있으나(Lane 1), CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군에서는 CYP2E1이 매

우 높은 농도로 발현하고 있음을 알 수 있다(Lane 2). 또한 황금추출물을 처리한 군에서는 전처리군 및 후처리군 모두에서 CYP2E1의 발현이 정상에 가까운 농도로 낮아진 것을 확인할 수 있다(Lane 3, 4). 이것으로 보아 CYP2E1 단백질은 CCl<sub>4</sub>에 의하여 증가하며, 황금추출물에 의해서 발현량이 억제되는 것을 알 수 있다.

## 고 찰

간장해는 담즙분비 장애와 간실질 장애의 2가지로 대별되는데, 실험적인 모델로 담즙분비 장애는 담관결찰을 통한 수술적 방법이 흔히 사용되고 간실질 장애는 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>), D-galactosamine, thioacetamide ethionine 등을 이용한 독성 동물모형이 흔히 사용되고 있다<sup>18)</sup>. 이 가운데 CCl<sub>4</sub>는 free radical에 의한 대표적인 세포손상으로서 실험적인 간실질 장애를 유도하기 위해서 많이 사용된다<sup>19)</sup>. CCl<sub>4</sub>는 원래 간독성이 없는 안정된 유기용매이지만 간세포의 활면 내형질세망(smooth endoplasmic reticulum)에 존재하는 대사효소인 cytochrome P450에 의하여 매우 불안정한 free radical인 CCl<sub>3</sub>로 전환되어 산화적인 세포손상을 유발한다<sup>20)</sup>. CCl<sub>3</sub>에 의한 산화적 손상은 가장 먼저 세포막에서 시작하는데 세포막의 인지질에 포함된 불포화지방산에서 수소원자를 공여받아 자신은 CHCl<sub>3</sub>로 변하고 불포화지방산에 여분의 전자를 제공함으로써 지질의 free radical화를 유발하고, 이 radical이 산소와 반응하여 유기 과산화물을 형성한다. 이러한 유기 과산화물은 그 자체가 free radical로 작용하여 새로운 free radical을 형성하게 되어 인지질이 지속적으로 과산화된다<sup>21)</sup>.

세포막의 인지질이 과산화되면 세포막에서 가까운 내형질세망으로 반응이 진행되어 세포내 소기관 중에서 내형질세망의 구조와 기능이 가장 먼저 파괴되는데, 실험적으로 CCl<sub>4</sub> 투여 후 30분 이내에 간세포의 단백질 합성이 저하되며 2시간 이내에 전자현미경으로 내형질세망의 종창과 리보솜의 탈락, 그리고 폴리솜의 해리를 관찰할 수 있다<sup>22,23)</sup>. 세포손상이 진행됨에 따라 간세포의 단백질 합성능력이 저하되므로 지질수용 단백질의 합성까지 장애를 받게되면 지질이 내형질세망에서부터 축적되기 시작하여 세포질로 확산된다. 즉 간세포가 tryglyceride를 분비하기 위해서 필요한 지질수용 단백질이 부족하므로 tryglyceride가 결합한 지질단백의 형태를 만들수 없어서 세포질 내에 tryglyceride가 다량으로 축적되어 CCl<sub>4</sub> 중독의 특징인 지방간이 된다<sup>24)</sup>. 또한 내형질세망의 지질과산화 과정 중에는 작은 조각으로 잘린 비교적 안정된 fatty aldehyde가 생겨나는데, 이 fatty aldehyde는 주위로 확산되어 세포막이나 미토콘드리아 등에 손상을 일으킨다고 보고되고 있다. 따라서 내형질세망에 이어서 미토콘드리아가 손상되므로 세포막의 이온채널의 에너지원이 되는 ATP가 감소되어 세포막의 투과성이 증가되고 세포 전체의 종창이 일어난다. 세포막의 손상은 다량의 칼슘을 세포내로 들어오게 하여 칼슘이 미토콘드리아 내에 축적되어 미토콘드리아의 기능이 소실된다. 이후의 세포변화는 허혈성 손상에서와 비슷하게 진행되어 결국 세포의 괴사로 이어진다<sup>25)</sup>.

황금(*Scutellaria radix*)은 순형과의 다년생 초본인 속썩은 풀

(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 뿌리로서 그 해에 새로 돌아난 뿌리는 子芩, 2년 미만의 新根은 條芩, 2년근 이상의 오래된 뿌리는 古芩이라고 분류하는데<sup>7)</sup> 본 실험에서는 2년근 이상된 古芩을 사용하였다. 황금은 心, 肝膽, 脾, 大小腸으로 귀경하고 淸熱燥濕, 瀉火解毒하는 효능이 있어서 風熱, 肺熱咳嗽, 風熱, 濕熱瀉痢, 腸癰, 黃疸, 熱淋 등의 질환에 사용되었다<sup>8)</sup>. □□傷寒論□□에서 小柴胡湯 및 大柴胡湯 등의 처방에 사용된 이래<sup>26)</sup> 黃疸, 肝脹 등의 질환에 사용되었으며, □□東醫寶鑑□□「湯液」篇에서는 五臟補瀉 중 肝에서 “涼用鱉甲·黃芩·黃連·草龍膽·草決明·柴胡·羚羊角”이라고 하여 涼肝하는 주약으로 인식하였다<sup>27)</sup>. 또한 약리효과로는 항균소염, 혈압강하, 지질강하, 이노작용 및 간기능 개선 등이 있는 것으로 알려져 있다<sup>28)</sup>. 최근에는 황금이 약물성 및 담관결찰로 유발된 간섬유화를 억제하는 작용이 있으며<sup>10)</sup>, 황금약침액이 흰쥐의 간세포내에서 항산화효과가 있음<sup>11)</sup>이 보고되었다. 또한 김등<sup>12)</sup>은 황금 및 그 구성 flavonoid 성분이 aflatoxin B1의 대사에 관련된 cytochrome P450 isoform의 활성에 영향을 미친다고 보고하였으며, 황금에서 추출한 flavonoid들이 human liver microsome의 cytochrome P450 효소 특히 1A2 isoform의 활성을 억제하는 것으로 보고되었다<sup>29)</sup>. 이러한 보고를 볼 때 황금은 간질환의 치료 및 예방에 효과가 있을 것으로 생각되어 전처리 및 후처리군으로 나누어 본 연구를 진행하였으며, 간보호작용의 기전과 관련하여 cytochrome P450과의 관련성에 대하여 실험하였다.

간세포의 손상을 검사하기 위하여 임상적으로 흔히 혈청내의 GOT, GPT 및 ALP와 같은 효소의 활성도를 검사하는데<sup>30)</sup>, 본 연구에서는 이러한 효소활성을 in vivo에서 실험하여 간손상의 정도를 간접적으로 측정하였다. 먼저 동물실험의 경우 각각의 실험군을 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 전처리군은 24시간, 후처리군은 48시간 후에 희생시켜 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 효소활성을 측정하였다. 그 결과 GOT, GPT, ALP 모두 정상대조에 비하여 CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군에서 증가하였으며, 황금추출물을 7일간 전투여한 군에서는 각 효소의 활성이 모두 억제되었으나 GOT의 경우에는 통계적인 유의성이 없었다. 후처리군에서는 GOT, GPT, ALP 모두 유의하게 감소하였다. 또한 본 연구에서는 각각의 실험군에서 적출한 간조직을 절편으로 제작하여 hematoxylin and eosin 방법으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰한 결과, 혈청효소치에서 나타난 바와 같은 간보호작용을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

따라서 황금추출물이 CCl<sub>4</sub>로 유도된 실험적 간손상에 있어서 간보호활성을 가짐을 확인할 수 있었으며, 그 기전을 확인하기 위하여 rat의 간조직에서 CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상의 경로로 알려진 산화적 손상기전과 연관된 지질과산화(LPO), 생체내 천연항산화물질인 GSH 및 항산화효소인 catalase의 활성을 검사하였으며, 또한 in vivo에서 CCl<sub>4</sub>를 CCl<sub>3</sub>로 biotransformation하는 효소인 cytochrome P450의 유전자 및 단백질 발현에 대하여 실험하였다.

지질과산화(Lipid Peroxidation; LPO)는 식물 및 동물에서 잘 정립된 세포 상해기전으로 세포나 조직에 있어서 산화적 스트레스의 지표로서 사용되고 있다. 과산화지질은 불안정하며 반응성 carbonyl 화합물을 포함하는 여러 가지 화합물의 복합물로 분해

된다. 불포화지방산이 과산화되면 malonaldehyde (MDA)와 4-hydroxyalkenals을 분해산물로 생성하는데, Malonaldehyde (MDA)와 4-hydroxyalkenals의 측정은 지질과산화의 지표로 사용되고 있다<sup>31)</sup>. 본 연구에서는 각각의 실험군에서 채취한 간조직을 균질화하여 원심분리한 후 지질과산화물인 MDA를 측정된 결과, 정상군에 비하여 CCl<sub>4</sub>만을 처리한 대조군에서 증가하였으나 황금추출물을 전처리한 실험군에서는 MDA의 생성이 억제되었으나 통계적인 유의성은 없었으며, 후처리한 군에서는 유의성 있게 억제됨을 알 수 있었다.

Glutathione( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine; GSH)은 핵산화적이고 대부분의 호기성 세포의 항산화 시스템뿐만 아니라 대사과정에 있어서도 중심적인 역할을 하는 자연 발생적인 tripeptide이다<sup>32)</sup>. GSH는 glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and thiol transferase 등 여러 가지 효소에 중요한 역할을 하는 조효소(coenzyme)로 작용한다. 그리고 약물대사와 갈슘대사,  $\gamma$ -glutamyl cycle, 혈소판 및 세포막 기능에 있어 주된 역할을 한다. 또한 GSH는 생체 이물질의 독성제거 및 단백질의 -SH기 레벨의 유지, thiol-disulfide의 교환, 과산화물과 free radical의 제거, 세포막에서 아미노산의 통과 등 여러 가지 생명현상에 있어서 핵심적인 역할을 한다. 세포내 GSH의 생리적인 수치는 대체로 1~10 mM의 범위를 유지하고 있다<sup>33)</sup>. 본 실험에서는 GSH를 측정된 결과 정상군에 비하여 CCl<sub>4</sub>만을 처리한 대조군에서 유의하게 감소하였으며, 황금추출물의 전처리군 및 후처리군에서 모두 유의성있는 증가를 확인하였다.

세포내의 효소성 항산화제로는 SOD, catalase, glutathione peroxidase (GSH-PX), glutathione reductase 등이 있다. 이러한 항산화효소들은 O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그리고 유기 peroxide, OH 라디칼 등의 독성을 탈독성화하거나 약화시키는데, 이들 항산화제 중 SOD, catalase, glutathione peroxidase 등에 대하여 많은 연구가 시행되고 있다<sup>34)</sup>. 활성산소종의 하나인 과산화수소는 정상적인 호기성 대사과정 및 병리적인 활성산소종의 생산에 의한 독성 산물이다. Catalase (EC1.11.1.6, 2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductase)는 dismutation을 통해서 또한 peroxidatic activity를 나타냄으로써 과산화수소를 파괴하는 효소이다<sup>35)</sup>. 본 연구에서는 각각의 실험군에서 catalase 활성을 측정된 결과 정상군에 비하여 CCl<sub>4</sub>만을 처리한 대조군에서는 유의하게 감소하였고, 황금추출물을 7일간 전처리한 군에서 유의성있는 증가를 보였으며 2일간 후처리한 군에서는 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다.

Cytochrome P450은 체외에서 들어오는 환경물질을 대사는 중추적인 역할을 하는 효소로서, 간, 폐, 신장, 뇌, 피부 및 태반 등 전반적인 기관의 내형질세망(endoplasmic reticulum; ER)에 존재하며 특히 간에서 다량으로 발현하는 것으로 알려져 있다<sup>36,37)</sup>. Cytochrome P450에는 여러 가지 다양한 isozyme이 존재하는데, 그 중에서 gene subfamily 1, 2, 3, 4의 isoform이 약물대사와 관련되어 흔히 발현하는 것으로 알려져 있다<sup>38)</sup>. 특히 ethanol에 의해서 유도되는 2E1 isoform이 사염화탄소로 인한 간손상에 주로 관여하는 것으로 알려져 있으며<sup>39)</sup>, 1A1 isoform도 3-methylcholanthrene (MC)와 사염화탄소의 동시투여에서

3-MC의 단독투여보다 더 높은 발현을 보인다는 보고가 있었다<sup>40)</sup>. 또한 ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides (EBIFs)에 의한 rat의 간독성모델에서 1A1/2 및 3A isoenzyme의 발현이 증가한다는 보고가 있었다<sup>41)</sup>. 따라서 본 연구에서는 황금추출물이 사염화탄소를 통하여 유발되는 cytochrome P450 isoform 중 1A1, 3A1 및 2E1의 발현을 조절하는지 살펴보기 위하여 RT-PCR과 western blot을 이용하여 mRNA 및 단백질의 발현 정도를 비교하였다. 각각의 실험군을 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 황금추출물 전처리군은 24시간 후, 후처리군은 48시간 후에 희생시켜 간조직을 채취하여 mRNA를 추출한 다음 Table 1에서 언급한 sense와 antisense primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하여 그 산물을 0.5% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다. CYP1A1의 경우에는 CCl<sub>4</sub>를 처리하였을 때 정상군과 mRNA의 발현 정도에 큰 차이를 보이지 않았으나, 황금추출물의 전처리 및 후처리에 의하여 발현이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). CYP3A1은 CCl<sub>4</sub> 처리 및 황금추출물의 전처리, 후처리에 의하여 발현이 변화하지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 그러나 2E1 isoform의 경우 정상군에서는 매우 낮은 농도로 발현하고 있으나 CCl<sub>4</sub>를 처리한 대조군에서는 매우 높은 농도로 발현하였으며, 황금추출물을 전처리한 실험군과 후처리한 군에서는 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 4) 또한 western blot을 통하여 2E1 단백질의 발현을 확인한 결과 RT-PCR과 일치하는 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 결과는 Wong 등<sup>42)</sup>이 CYP2E1 유전자 결실시킨 생쥐에는 사염화탄소를 투여하여도 정상대조군과는 달리 GOT, GPT 수치가 증가하지 않으며 간손상이 발생하지 않음을 보고한 것과 일치하는 것으로 CCl<sub>4</sub>를 통하여 유도된 간손상모델에서는 cytochrome P450 isoform 중에서 2E1이 핵심적인 역할을 하는 것을 알 수 있으며, 황금추출물이 2E1의 발현을 억제함으로써 간보호작용을 나타내는 것으로 생각할 수 있다.

이상의 결과에서 황금은 CCl<sub>4</sub>로 유발된 실험적 간손상 모델에서 in vivo에서 간보호활성을 가지고 있음을 확인하였으며, 그 기전은 간조직내 항산화계의 활성증강과 CCl<sub>4</sub>를 독성라디칼인 CCl<sub>3</sub>로 전환하는 효소인 cytochrome P450 특히 2E1 isoform의 발현조절과 관련된 것임을 시사한다.

## 결론

사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)로 유발된 간손상 모델을 통하여 황금의 간보호활성 및 사염화탄소의 활성화에 관여하는 효소인 cytochrome P450의 발현조절에 대하여 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻게 되었다. 웅성 rat를 이용한 in vivo 실험계에서 간손상의 혈청학적 지표인 GOT, GPT, ALP 등이 모두 CCl<sub>4</sub>를 투여한 군에 비하여 황금을 처리한 군에서 유의성있는 감소가 나타났으며, 특히 전처리군에 비하여 후처리군에서 더 유의성있는 감소가 나타났다. 또한 간조직에 대한 병리조직학적 검사에서는 CCl<sub>4</sub>로 유발된 간조직의 파괴가 황금의 처리에 의하여 회복되는 것을 확인하였다. 지질과산화물(MDA)의 함량은 CCl<sub>4</sub>를 투여한 대조군에 비하여 황금을 처리한 군 특히 후처리군에서 현저히

감소하였으며, 간조직 내 GSH 함량 및 catalase 활성은 CCl<sub>4</sub>를 처리한 군에 비하여 황금을 처리한 군에서 전처리 및 후처리군 모두에서 증가하였다. Cytochrome P450 isoform 중에서는 1A1 및 3A1은 CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상 모델과는 큰 관련성이 없었으며, 2E1이 CCl<sub>4</sub>에 의하여 증가되었으나 황금의 투여에 의하여 전처리 및 후처리군에서 유의한 감소를 나타내었다. 이상의 결과에서 황금은 CCl<sub>4</sub>로 유발된 간손상에 대하여 보호활성이 있음을 in vivo에서 확인할 수 있었으며, 그 기전은 간조직내 항산화계의 활성화 및 CYP2E1의 발현억제에 의한 것으로 생각된다.

### 참고문헌

- 조병권. 사염화탄소 투여로 인한 血清內 各種酵素의 活性變動에 關하여. 경북대학교 대학원 박사학위논문, 1984.
- 서혜진. 사염화탄소의 반복투여가 백서 간장에 미치는 병리조직학적 연구. 영남대학교 대학원 석사학위논문, 1987.
- Fernandez, G., Villarruel, M.C., de Toranzo, E.G., Castro, J.A. Covalent binding of carbon tetrachloride metabolites to the heme moiety of cytochrome P-450 and its degradation products. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 35(2):283-290, 1982.
- Tomasi, A., Albano, E., Banni, S., Botti, B., Corongiu, F., Dessi, M.A., Iannone, A., Vannini, V., Dianzani, M.U. Free-radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria. A study of the mechanism of activation. Biochem. J. 246(2):313-317, 1987.
- Le Page, R.N., Cheeseman, K.H., Osman, N., Slater, T.F. Lipid peroxidation in purified plasma membrane fractions of rat liver in relation to the hepatotoxicity of carbon tetrachloride. Cell. Biochem. Funct. 6(2):87-99, 1988.
- Srivastava, S.P., Chen, N.Q., Holtzman, J.L. The in vitro NADPH-dependent inhibition by CCl<sub>4</sub> of the ATP-dependent calcium uptake of hepatic microsomes from male rats. Studies on the mechanism of the inactivation of the hepatic microsomal calcium pump by the CCl<sub>4</sub> radical. J. Biol. Chem. 265(15):8392-9399, 1990.
- 辛民教. 원색임상분초학. 서울, 남산당, pp 308-309, 1986.
- 李尙仁. 本草學. 서울, 修書院, pp 501-503, 1991.
- 小學館. 中藥大辭典. 上海科學技術 出版社, p 132, 1985.
- Nan, J.X., Park, E.J., Kim, Y.C., Ko, G., Sohn, D.H. Scutellaria baicalensis inhibits liver fibrosis induced by bile duct ligation or carbon tetrachloride in rats. J Pharm Pharmacol 54(4):555-563, 2002.
- 김성일, 김갑성, 도원석. 황금약침액의 흰쥐 간세포내의 항산화 효과에 관한 연구. 대한침구학회지 16(1):497-509, 1999.
- Kim, B.R., Kim, D.H., Park, R., Kwon, K.B., Ryu, D.G., Kim, Y.C., Kim, N.Y., Jeong, S., Kang, B.K., Kim, K.S. Effect of an extract of the root of Scutellaria baicalensis and its flavonoids on aflatoxin B1 oxidizing cytochrome P450 enzymes. Planta Med 67(5):396-399, 2001.
- Reitman, S. and Frankel, S. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases, Am. J. Clin. Pathol. 28: 58-63, 1957.
- Petkova, J., Popova, N., Kemileva, Z. Changes of enzyme activity in some organs following thymectomy. Agressologie. 14(5):323-326, 1973.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95(2):351-358, 1979.
- Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77, 1959.
- Aebi, H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105: 121-126, 1984.
- Poli G. Liver damage due to free radicals. Br Med Bull. 49(3):604-620, 1993.
- Kamokawa, A., Ohta, S., Tatsugi, A., Kumasaka, M. and Shinoda, M. Experimental Production of Various Types of Cholestasis and the Effects of Cystemine. YAKUGAKU ZASSHI. 106(8):709, 1986.
- Noguchi, T., Fong, K.L., Lai, E.K., Olson, L. and McCay, P.B. Selective early loss of polypeptides in liver microsomes of CCl<sub>4</sub>-treated rats. Relationship to cytochrome P-450 content. Biochem. Pharmacol. 31(5):609-614, 1982.
- Weddle, C.C., Hornbrook, K.R. and McCay, P.B. Lipid peroxidation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. J. Biol. Chem. 251(16):4973-4978, 1976.
- Clawson, G.A., Sesno, J., Milam, K., Wang, Y.F., Gabriel, C. The hepatocyte protein synthesis defect induced by galactosamine involves hypomethylation of ribosomal RNA. Hepatology. 11(3):428-434, 1990.
- Watanabe, A., Akamatsu, K., Takesue, A., Taketa, K. Dysregulation of protein synthesis in injured liver. A comparative study on microsomal and cytosole enzyme activities, microsomal lipoperoxidation and polysomal pattern in D-galactosamine and carbon tetrachloride-injured livers. Enzyme. 23(5):320-327, 1978.
- Poli, G., Chiarpotto, E., Albano, E., Cottalasso, D., Nanni, G., Marinari, U.M., Bassi, A.M., Dianzani, M.U. Carbon tetrachloride-induced inhibition of hepatocyte lipoprotein secretion: functional impairment of Golgi apparatus in the early phases of such injury. Life Sci. 36(6):533-539, 1985.
- Biasi, F., Albano, E., Chiarpotto, E., Corongiu, F.P., Pronzato, M.A., Marinari, U.M., Parola, M., Dianzani, M.U., Poli, G. In vivo and in vitro evidence concerning the



- role of lipid peroxidation in the mechanism of hepatocyte death due to carbon tetrachloride. *Cell Biochem Funct.* 9(2):111-118, 1991.
26. 崔達永, 金俊錡. 傷寒論釋講, 서울, 大星文化社, p 149, 163, 1998.
  27. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, pp 512-515, 971, 1992.
  28. 陳存仁. 圖說漢方醫藥大辭典(I). 東京, 講談社, p 146, 1982.
  29. Kim, J.Y., Lee, S., Kim, D.H., Kim, B.R., Park, R., Lee, B.M. Effects of flavonoids isolated from *Scutellariae radix* on cytochrome P-450 activities in human liver microsomes. *J Toxicol Environ Health A.* 65(5-6):373-381, 2002.
  30. Chenoweth, M.B. and Hake, C.L. The smaller halogenated aliphatic hydrocarbons. *Ann. Rev. Pharmac.* 2: 363-398, 1962.
  31. Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine.* 11: 81-128, 1991.
  32. Dolphin, D., Poulson, R. and Avramovic, O., Eds., *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects*, Vols A & B, J. WILEY and Sons, 1989.
  33. Anderson, M.E. Enzymatic and chemical methods for the determination of glutathione; In: *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects*, Vol.A, Dolphin D., Poulson R. and Avramovic O. Eds., John WILEY and Sons, pp 339-365, 1989.
  34. Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 37(9-10):949-962, 1999.
  35. Deisseroth, A. & Dounce, A.L. Catalase: Physical and Chemical Properties, Mechanism of Catalysis, and Physiological Role, *Physiol. Rev.* 50: 319-375, 1970.
  36. Biasi, F., Albano, E., Chiarotto, E., Corongiu, F.P., Pronzato, M.A., Marinari, U.M., Parola, M., Dianzani, M.U., Poli, G. In vivo and in vitro evidence concerning the role of lipid peroxidation in the mechanism of hepatocyte death due to carbon tetrachloride. *Cell Biochem Funct.* 9(2):111-118, 1991.
  37. Gwebu, E.T., Ttewyn, R.W., Cornwell, D.G. and Panganamala, R.V. Vitamin E and inhibition of platelet lipooxygenase. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 28: 361-369, 1980.
  38. Rogers, J.F., Nafziger, A.N., Bertino, J.S. Jr. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am J Med.* 113(9):746-750, 2002.
  39. Koop, D.R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J.* 6(2):724-730, 1992.
  40. Degawa, M., Mikami, K., Namiki, M., Hashimoto, Y. Inhibition of the induction and activity of hepatic P450IA isozymes by in vivo administration of carbon tetrachloride to rats. *Biol Pharm Bull.* 16(12):1248-1250, 1993.
  41. Ronis, M.J., Ingelman-Sundberg, M., Badger, T.M. Induction, suppression and inhibition of multiple hepatic cytochrome P450 isozymes in the male rat and bobwhite quail (*Colinus virginianus*) by ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides (EBIFs). *Biochem Pharmacol.* 48(10):1953-1965, 1994.
  42. Wong, F.W., Chan, W.Y., Lee, S.S. Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 153(1):109-118, 1998.