

## 아세트아미노펜으로 유도된 간독성에 대한 계혈등 물추출물의 간세포 보호효과

이인우, 최홍식\*, 김승모

대구한의대학교 한의학과 간계내과학교실

### Hepatoprotective Activity of *Spatholobi Caulis* Water Extract against Acetaminophen-induced Toxicity in Rats

In-Woo Lee, Hong-Sik Choi\*, Seung-Mo Kim

Department of Oriental Internal Medicine, Daegu Haany University

#### ABSTRACT

**Objectives :** The present study was evaluated the protective roles of *Spatholobi Caulis* in hepatotoxic rats due to APAP overdose.

**Methods :** In experiments, rats were orally administrated with the aqueous extract of *Spatholobi Caulis* (SCE; 50, 100 mg/kg) for 4 days and then, orally gavage with APAP (1.2 g/kg) to induce acute liver damage.

**Results :** Oral injection of APAP caused severe hepatic injury. Plasma ALT, AST and LDH levels were significantly elevated, but SCE significantly decreased ALT, AST and LDH to the normal level. In histopathological analysis, peripheral hemorrhage around portal triads and central necrosis around central veins were founded after APAP treatment. However, these histopathological changes were recovered by SCE pretreatment. SCE also decreased the percentage of generative hepatic regions (%/mm<sup>2</sup> hepatic parenchyma), the numbers of inflammatory cells (cells/mm<sup>2</sup> hepatic parenchyma) and the number of degenerative hepatic cells (N/100 hepatic cells) which were significantly elevated after APAP injection. Furthermore, SCE down-regulated the contents of hepatic MDA and up-regulated hepatic GSH. SCE also inhibited the decrease in the expression of pro-caspase-3 by APAP treatment.

**Conclusions :** Collectively, these data indicate that SCE protected APAP-induced hepatic damages through antioxidative and anti-apoptotic process. These findings the significant therapeutic potential of SCE during APAP-induced liver injury.

**Key words :** *Spatholobi Caulis*, Acetaminophen, Hepatoprotective Activity

## 서 론

鷄血藤 (*Spatholobi Caulis*)은 콩과 (Leguminosae) 밀화두 (*Spatholobus suberectus* Dunn)의 덩굴줄기로 補血活血 효과가 있어 瘀血, 月經不順, 貧血의 치료에 사용되고 있으며<sup>1,2)</sup>, 최근의 연구에서는 염증억제 효과<sup>3)</sup>, 항산화 효과<sup>4)</sup>, 항노화 작용<sup>5)</sup>, 뇌혈류개선 작용<sup>6,7)</sup>, 세포주기 억제 및 세포사멸유도 작용<sup>8,9)</sup>, 지질대사조절 작용<sup>10)</sup>, 면역조절 작용<sup>11)</sup> 및 관절염 억제<sup>12,13)</sup> 등의 다양한 약리 작용을 가지는 것으로 보고되고 있다. 계혈등의 구성화합물로는 formononectin, daidzein,

isoliquiritigenin, sativan, stigmasterol, campesterol, medicagol, psudobaptigenin 등의 flavonoid 및 sterol 계열 화합물이 등이 알려져 있다<sup>14,15)</sup>.

아세트아미노펜 (acetaminophen, APAP)은 세계적으로 광범위하게 사용되고 있는 해열진통제로, 과다 복용 시에 급성 간독성을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>16,17)</sup>. 실제로, 미국에서 발생하는 급성 간독성은 대부분 APAP에 의한 것으로 보고되었으며<sup>18)</sup>, 간이식이 요구되는 심각한 간손상에서도 APAP가 주요원인으로 보고되고 있다<sup>19)</sup>.

치료제로 복용된 APAP의 85-90%는 일차적으로 간에서

\*교신저자 : 최홍식. 대구시 수성구 신천동로 136. 대구한의대학교 한의학과 간계내과학교실.  
· Tel : 010-5116-1461. · Fax : 053-770-2189. · E-mail : cheldu@unitel.co.kr.  
· 접수 : 2011년 7월 25일 · 수정 : 2011년 9월 5일 · 채택 : 2011년 9월 17일

대사된 후 배설되어 무독하지만, 소량 (약 4%)의 APAP가 간 내의 cytochrome P450 효소에 의해 반응성이 강한 독성 대사물질인 N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)을 생성함으로써 간독성을 유발하게 된다<sup>20,21</sup>. NAPQI는 glutathione (GSH)과 결합하여 urine으로 배설이 되면 무해하나, 과도하게 생성된 NAPQI로 인해 GSH의 감소가 야기되고 GSH와 결합하지 못한 NAPQI에 의해 간세포가 손상을 받게 된다<sup>22</sup>. mouse나 rat를 이용하여 APAP로 간손상을 유도한 실험동물모델은 간손상 환자와 유사한 임상학적, 생리화학적 소견을 나타내어 APAP에 의한 급성 간손상을 연구하는데 많이 사용되어지고 있다<sup>23</sup>.

본 연구에서는 계혈등 물추출물 (SCE; *Spatholobi Caulis* Water Extract)의 APAP로 유도된 급성 간독성에 대한 보호 효과를 알아보고자 혈액학적 평가, 조직학적 평가, GSH level, malondialdehyde (MDA) 함량, pro-caspase-3 발현을 평가해 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. SCE의 제조

계혈등은 대원약업사 (대구, 한국)에서 구입하여 관능평가를 실시한 후, 300 g을 물 1.5 L에 넣고 대용약탕기로 3시간 전탕한 후 추출물을 거어조로 1차 여과하고, 이 여과물을 3000×g에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후의 상층액을 취하여 0.2 µm filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고, 이 농축액을 Ultra-Low temperature freezer (Nihon freezer, Japan)에서 동결시켰다. 동결된 계혈등 추출물을 동결건조기 (Labconco, USA)로 동결 건조하여 추출물 22.78 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20°C에서 보관하였다. SCE의 수율은 7.59%였으며, 처치시에는 H<sub>2</sub>O에 녹여 사용하였다.

### 2. 시약

metaphosphoric acid (MPA), APAP, GSH, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), MDA는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. pro-caspase-3 및 actin antibody는 Santacruz Biotechnology Inc. (Santacruz, CA, USA)에서 구입하였다. GSH kit는 Oxis International (Portland, OR, USA)로부터 구입하였으며, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) kit는 Pointe Scientific Inc. (Canton, MI, USA)부터 구입하였다. 20 mM Tris Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM b-glycerophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1µg/ml leupeptin가 함유된 lysis buffer는 Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고, Nitrocellulose transfer membrane (NC membrane)은

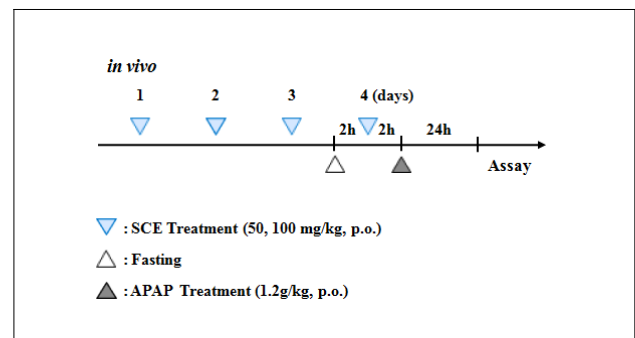
Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였다.

### 3. 실험동물의 사육

실험동물은 6주령 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (180-200g)를 효창사이언스 (대구, 한국)로부터 공급받아 1주일 동안 동물실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 20-23°C, 습도 60%, 12시간 light/dark cycle을 유지하고, 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 음료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 4. 실험동물의 처치

각 실험군은 5마리로 배정하였으며, 아무런 처리를 하지 않은 군을 Normal군으로 하고, 급성 간손상을 유발시킬 목적으로 APAP (1.2g/kg, p.o.)만을 투여한 군을 APAP군으로 하였으며, APAP (1.2kg,p.o)와 SCE를 저농도 (50 mg/kg)로 투여한 50 mg/kg SCE군, APAP (1.2kg,p.o)와 SCE를 고농도 (100 mg/kg)로 투여한 100 mg/kg SCE군으로 나누어 실시하였다. SCE 50 mg/kg와 100 mg/kg는 4일 동안 경구투여 하였으며 간손상을 유도하기 위해 4일째 SCE를 투여한 때로부터 2시간후 APAP를 투여하고, 이후 24시간 후 실험동물을 희생하였다. (Scheme 1)



Scheme 1. Schedule of SCE and APAP treatment *in vivo*

### 5. 혈액생화학적 검사

혈액은 실험동물의 복대정맥으로부터 3 ml이상을 채취한 후 3000×g, 4°C에서 10 분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청중 ALT, AST, LDH는 Analysis kits와 Automated blood chemistry analyzer (Photometer 5010, Robert Riele GmbH & Co KG, Berlin, Germany)를 사용하여 분석하였다.

### 6. 조직학적 평가

간 실질조직의 일부를 채취하여 10% 중성포르말린에 고정시킨 다음 일반적인 방법으로 탈수 및 파라핀 포매를 실시하고, 3~4 µm의 절편을 제작하여 Hematoxylin-eosin 염색을 실시한 후 광학현미경 (Nikon, Japan) 하에서 관찰하였다. 간 실질 중 변성부위의 비율 (%/mm<sup>2</sup> of hepatic parenchyma) 및

변성 간세포의 수 (N/1000 hepatocytes)를 자동영상분석장치 (DMI-300 Image Processing; DMI, Korea)를 이용하여 각각 평가하였다.

## 7. 간 조직 중의 MDA 함량 측정

간 조직 0.5 g에 4.5 ml의 1.15% KCl을 넣고 균질화하여 균질화액 500  $\mu$ l에 1% phosphoric acid 3 ml과 0.6% thiobarbituric acid 1 ml을 넣은 후 95°C에서 45분간 끓여 차갑게 식힌 후 4 ml의 n-butanol을 넣은 후 3000 $\times$ g에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA Standard curve는 1,1,3,3-tetraethoxypropane (malondialdehyde, MDA)을 사용하여 535nm 흡광도를 측정하였다.

## 8. GSH 함량 측정

적출한 간 조직 0.1 g을 0.9% NaCl에 세척하여 간 조직의 물기가 없도록 하였다. 1 ml의 5% MPA buffer를 넣고 glass homogenizer로 마쇄하여 균질화한 후 15000 $\times$ g에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리하여 나온 상등액을 10000 $\times$ g에서 10분간 한번 더 원심분리하여 상등액을 취하였으며, 상등액 300 $\mu$ l와 GSH determination kit에 있는 시약인 solution R3 600 $\mu$ l, solution R1 50 $\mu$ l, solution R2 50 $\mu$ l를 차례로 혼합하며 vortex를 한 후 25°C의 어두운 곳에서 10분 동안 반응을 시킨 후 405nm 흡광도를 측정하였다.

## 9. Pro-caspase-3 단백질 발현 측정

분리한 간 조직 0.1 g에 1ml의 20 mM Tris Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM b-glycerophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 $\mu$ g/ml leupeptin, 1mM PMSF를 함유하는 buffer를 넣고 균질화시킨 후 4°C에서 20분 동안 15,000 $\times$ g로 원심분리하여 얻은 상층액을 BCA 정량법을 이용하여 정량하였다. 정량하여 얻은 protein 50 $\mu$ g을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)에 전기영동시킨 후 단백질을 NC membrane으로 transfer하였다. 이 membrane을 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1%

Tween 20을 함유한 PBS 용액)로 2시간 blocking한 후 pro-caspase-3, actin의 antibody를 PBS에 희석하여 반응시켰다. 반응 후 0.1% Tween 20을 함유한 PBST 용액으로 세척한 다음, 2차 antibody인 rabbit anti-Goat IgG와 반응시킨 후 ECL chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. Densitometric analysis를 위해 Image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용하였다.

## 10. 통계적 검증

실험 결과는 mean  $\pm$  S.D.로 나타내었으며, 처치군간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman-Kleuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검증은 p<0.05 또는 p<0.01로 하였다.

## 실험결과

### 1. SCE가 APAP로 유도된 간의 혈액학적 변화에 미치는 영향

SCE가 APAP로 유도된 급성 간손상에 대한 간세포 보호 효과를 평가하기 위해 혈액생화학적인 변화를 관찰한 결과, ALT는 Normal에서는 52.80  $\pm$  4.52 IU/L이었으나, APAP로 간손상을 유도한 경우는 133.20  $\pm$  12.37 IU/L로 유의하게 증가하였다. 이러한 증가는 SCE 50, 100 (mg/kg)의 투여로 각각 95.60  $\pm$  2.86, 72.40  $\pm$  10.71 (IU/L)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 1A). AST는 Normal에서는 38.40  $\pm$  4.35 IU/L이었으나, APAP로 간손상을 유도한 경우는 98.80  $\pm$  11.41 IU/L로 유의하게 증가하였으며, 이러한 증가는 SCE 50, 100 mg/kg의 투여로 각각 63.20  $\pm$  5.23, 57.40  $\pm$  10.92 (IU/L)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 1B). LDH는 Normal에서는 60.60  $\pm$  17.68 IU/L이었으나, APAP로 간손상을 유도한 경우는 214.20  $\pm$  48.12 IU/L로 유의하게 증가하였으며, 이러한 증가는 SCE 50, 100 mg/kg의 투여로 각각 173.80  $\pm$  36.38, 49.00  $\pm$  22.45 (IU/L)로 감소하였으며, SCE 100 mg/kg에서는 유의성이 인정되었다 (Fig. 1C).

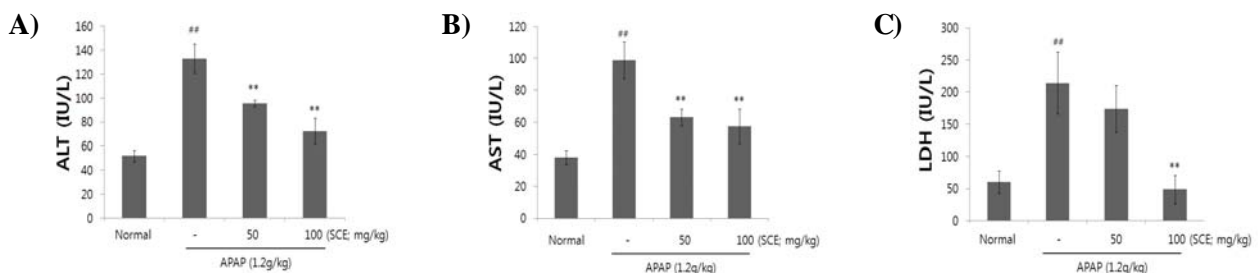


Figure 1. Effect of SCE on Enzyme levels in APAP-induced liver toxicity.

ALT(A), AST(B) and LDH(C) activities were monitored in the serum of rats that had been orally pretreated with SCE (50 or 100 mg/kg for 4 days) treatment. Blood samples were obtained 24 after APAP (APAP 1.2 g/kg, body weight, p.o.) treatment. Values represent mean  $\pm$  SD (n = 5) (#, significant as compared to normal, ## P<0.01; \*, significant as compared to APAP alone, \*\* P<0.01)

## 2. SCE가 APAP로 유도된 간의 조직학적 변화에 미치는 영향

SCE가 APAP에 의해 유도된 간독성에 미치는 효과를 조직

학적으로 평가를 한 결과, APAP를 투여한 경우 간세포의 공포화, 지방소적의 간세포내 축적 및 염증세포 침윤과 같은 소엽중심성 괴사 소견이 관찰되었으나, 이들 APAP 투여에 의한 간 손상은 SCE의 투여에 의해 현저하게 감소되었다 (Fig. 2).

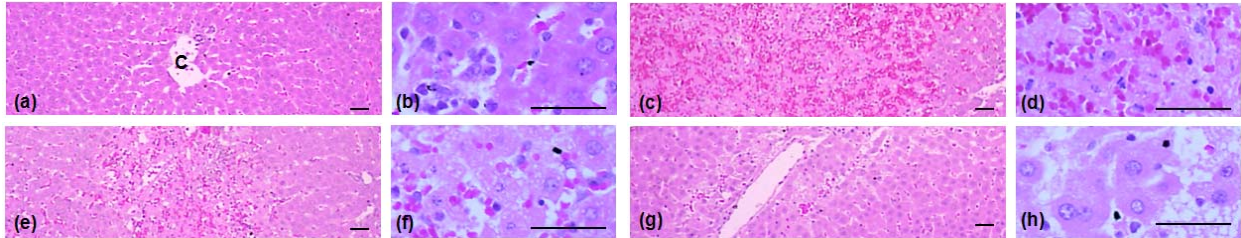


Figure 2. Changes on Histological Profiles of the Liver.

Note that centrolobular congestion, necrosis, inflammatory cell infiltrations were detected in APAP alone. However, dramatically decreases of severity of these APAP-intoxicated hepatopathies were detected in the both two dosages of SCE treated mice as compared with APAP control, respectively. Normal (a, b), APAP alone (c, d), SCE 50mg/kg (e, f) and SCE 100 mg/kg (g, h) Dosage-Treated Mice. C, central vein, All HE stain; Scale bars = 80 $\mu$  m.

간 변성율은 Normal에서는 4.76  $\pm$  1.17%를 나타내었으며, APAP에 의해서는 49.60  $\pm$  10.51%로 유의하게 증가되었다. 그러나, 이러한 간 변성율의 증가는 SCE 50, 100 (mg/kg)에서 각각 29.38  $\pm$  9.00, 13.81  $\pm$  5.74 (%)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 3A). 염증세포의 침윤 수는 Normal에서는 16.60  $\pm$  13.65 cell을 나타내었으며, APAP에 의해서는 614.40  $\pm$  190.42 cell로 유의하게 증가되었다. 그러나, 이러한 염증세포의 침윤은

SCE 50, 100 (mg/kg)에서 319.80  $\pm$  139.40, 64.00  $\pm$  22.74 (cell)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 3B). 변성 간세포의 수는 Normal에서는 17.40  $\pm$  5.59 cell을 나타내었으나, APAP에 의해서는 239.80  $\pm$  62.85 cell로 유의하게 증가되었다. 그러나, 이러한 변성 간세포의 수의 증가는 SCE 50, 100 (mg/kg)에서 137.60  $\pm$  41.73, 51.40  $\pm$  13.90 (cell)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 3C).

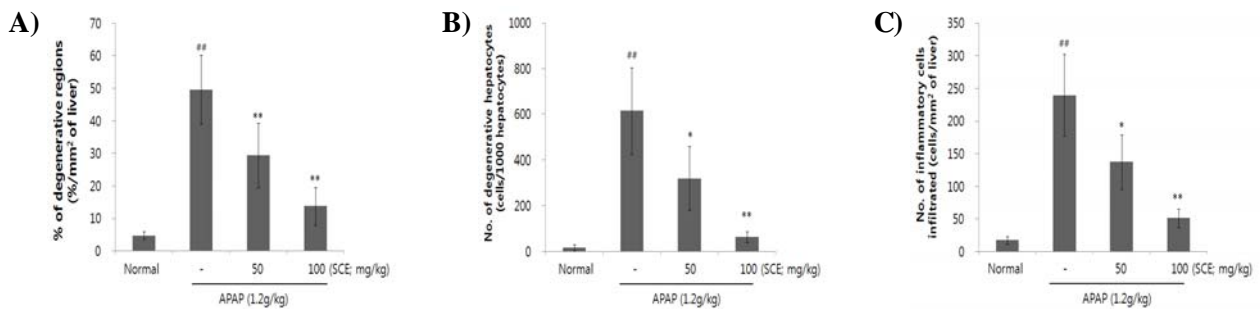


Figure 3. Effect of SCE on hepatopathies in APAP-induced liver toxicity.

Hepatopathies were observed in the liver of rats that had been orally pretreated with SCE (50 or 100 mg/kg for 4 days) treatment. The liver samples were obtained 24 after APAP (APAP, 1.2 g/kg body weight, p.o.) treatment. (A) Percentage of hepatic degenerative regions (%), (B) Numbers of inflammatory cells (cells/mm<sup>2</sup>), (C) Number of degenerative hepatocytes (N/1000 cells) Values represent mean  $\pm$  SD (n = 5) (#, significant as compared to normal, ##P<0.01; \*, significant as compared to APAP alone, \*\*P<0.01)

## 3. SCE가 APAP로 유도된 간조직의 MDA level에 미치는 영향

SCE가 APAP로 유도된 지질과산화에 대한 억제 효과를 살펴보기 위하여 MDA 함량을 조사한 결과, Normal에서 MDA를 100%로 하였을 때, APAP로 간손상을 유도한 경우는 150.18  $\pm$  19.37%로 유의하게 증가하였으며, 이러한 증가는 SCE 50, 100 mg/kg의 투여로 각각 99.92  $\pm$  2.61, 100.91  $\pm$  12.42 (%)로 감소하였다 (Fig. 4).

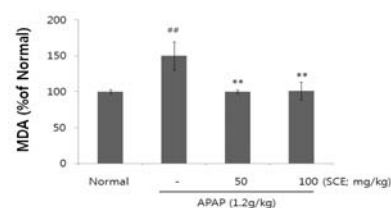


Figure 4. Effect of SCE on hepatic MDA in APAP-treated rats. MDA levels were measured in 10% homogenates of liver samples from rats subjected to SCE (50 mg/kg or 100 mg/kg) for 4 days and then treated with APAP (1.2 g/kg body weight, p.o.) for 24 hour. Values represent mean  $\pm$  SD (n = 5) (#, significant as compared to normal, ## P<0.01; \*, significant as compared to APAP alone, \*\* P<0.01)

#### 4. SCE가 APAP로 감소된 간조직의 GSH level에 미치는 영향

SCE의 항산화 효과를 측정하기 위하여 간 조직내의 GSH 함량을 관찰한 결과, Normal 그룹의 GSH level을 100%로 하였을 때, APAP 그룹은  $71.99 \pm 3.42\%$ 의 GSH level을 보여 APAP에 의해 GSH가 유의하게 감소하였다. 그러나 SCE는 50 및 100 mg/kg의 투여에서 각각  $90.65 \pm 11.09$ ,  $98.55 \pm 11.07$  (%) 수준으로 GSH level을 회복시켰다 (Fig. 5).

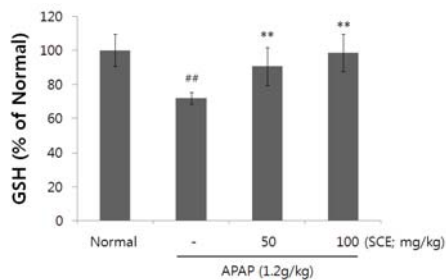


Figure 5. Effect of SCE on hepatic GSH in APAP-treated rats. Rats were subjected to SCE (50 or 100 mg/kg) for 4 days and then treated with APAP (1.2 g/kg body weight, p.o.) for 24 hour. Hepatic GSH levels were determined as described in the materials and methods section. Values represent mean  $\pm$  SD (n = 5) (#, significant as compared to normal, ## P(0.01); \*, significant as compared to APAP alone, \*\* P<0.01)

#### 5. SCE가 APAP로 유도된 pro-caspase-3의 단백질 발현에 미치는 영향

APAP로 유도된 간세포 자멸사에 미치는 SCE의 효과를 살펴보기 위하여 pro-caspase-3의 단백질 발현을 조사한 결과, SCE는 APAP에 의해 감소된 pro-caspase-3 발현량을 점진적으로 증가시켰다 (Fig. 6A). 단백질 발현량을 densitometer로 측정하여 Normal을 100%로 하였을 때, APAP군은  $43.10 \pm 9.78\%$ 로 발현량이 유의하게 감소하였으며, 100 mg/kg의 SCE 투여로 인해  $94.54 \pm 12.52\%$ 로 발현량이 유의하게 증가하였다 (Fig. 6B).

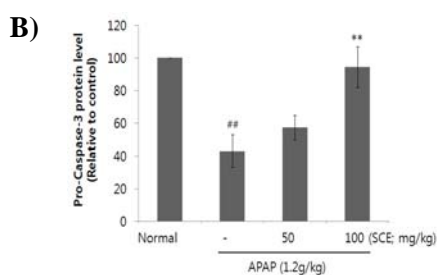
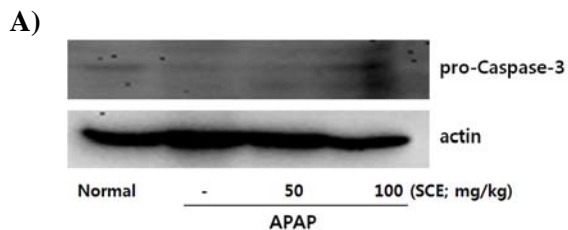


Figure 6. Effect of SCE on expression of pro-caspase-3 proteins. Total tissue lysates were obtained by homogenization and centrifugation as described in the materials and methods section. Pro-caspase-3 proteins from total lysates were monitored by immunoblot analysis. Equal loading of proteins was verified by actin protein immunoblotting (A). The relative protein levels were measured by scanning densitometry as described in the materials and methods (B).

## 고찰

콩과 (Leguminosae) 식물인 밀화두 (*Spatholobus suberectus* Dunn)의 덩굴줄기를 건조한 계혈등 (*Spatholobi Caulis*)은 行血補血, 活血祛瘀, 舒筋活絡하는 효능이 있어 生理痛과 生理不順, 産後 血虛, 貧血 등의 치료에 사용하고 있으며, 또한 관상동맥과 말초혈관을 확장하는 작용이 있어 혈액순환을 촉진시켜 혈압을 하강시키고 혈중지질을 낮춰줌으로써 동맥경화로 인한 고혈압 또는 심장병, 협심증에 사용된다<sup>1,2)</sup>.

APAP는 다른 non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)계 진통제에 비해 위장장애가 적다는 이유로 널리 복용되고 있는 해열진통제로서, 적정량을 복용했을 경우 인체에 무해하나 과량 투여시 급성 간독성을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>16-19)</sup>. 미국 식품의약국 (FDA)은 APAP를 하루에 4g 이상을 섭취하지 못하도록 하고 있으며, 간이 나빠거나 술을 많이 마신 경우에는 상용량보다 낮은 양을 섭취해도 간독성이 유발될 수 있다고 보고 있다<sup>24,25)</sup>.

이러한 APAP의 간손상은 대사과정에서 생성된 활성산소나 반응성이 증대된 APAP 대사산물이 세포내 거대분자들과 결합하여 세포의 괴사를 초래한다고 보고되고 있다<sup>20,21,26,27)</sup>. 일반적으로 치료 용량 이내의 APAP는 glucuronyl transferase와 sulfotransferase에 의해 각각 글루쿠로닐화 (Glucuronidation), 설펜화 (Sulfation) 과정을 거쳐 무독한 대사체로 체외 배출된다. 하지만 소량의 APAP는 cytochrome P450 효소에 의해 NAPQI로 전환되는데 GSH와 결합하면 안전하게 배출되지만 GSH의 고갈로 결합하지 못한 NAPQI는 세포내의 거대분자들과 결합하여 간독성을 유발하게 된다<sup>21,27)</sup>. 또한 NAPQI는 간의 Kupffer cells을 활성화시켜 superoxide anion, hydroxy radical, hydrogen peroxide 등의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이나 nitro oxide, peroxynitrite와 같은 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)의 생성을 증가시키기도 한다<sup>28-30)</sup>. 더불어 APAP로 유도된 간독성에서 NAPQI는 DNA 나선절단 (DNA strand breaks)을 일으키거나 간세포의 apoptosis와 necrosis를 조장한다<sup>31,32)</sup>.

세포 내에서 이러한 산화적 스트레스는 단백질, 지질, DNA 등의 손상을 유발하며, 이러한 손상으로부터 세포를 보호하기 위해 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화효소와 GSH, vitamin C, melanin 등의 항산화물질을 통한 방어체계가 가동되고 있다<sup>33,34)</sup>. APAP에 의한 급성 간독성에는 liver failure의 주요한 기전 중의 하나인 지질과산화 반응이 일어나는데<sup>30,35)</sup>, 이러한 지질과산화는 GSH 및 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화효소에 의해 지질과산화 반응이 차단된다<sup>36,37)</sup>.

APAP에 의한 간손상에 대하여 항산화물질인 N-acetylcysteine (NAC)의 치료효과는 잘 알려져 있으며, APAP의 혈중농도에 관계없이 NAC을 조기 투여할 경우 간손상을 최소화할 수 있다는 연구결과들이 보고되었다<sup>38-40)</sup>. 특히, NAC은 조기투여가 실행되지 않았을 경우라도 투여하지 않은 것에 비해 나은 예후를 보여, APAP로 인한 간독성 위험을 현저히 낮추는 것으로 알려져 있다<sup>41,42)</sup>. 이 외에도 손상된 간을 치료하기 위해 cytochrome P450 효소를 억제하는 약물을 사용하기도 하나 간손상이 초래된 후에는 효과를 기대하기 어렵다<sup>43)</sup>.

본 연구에서는 活血祛瘀 작용을 지닌 계혈등이 APAP로 유도된 급성 간독성에 대한 보호 효과를 평가하고자, *in vivo*에서 SCE를 전치치한 후에 APAP를 단회 투여하여 간독성을 유발한 후에 먼저 혈액학적, 조직학적 분석을 통해 간보호 효과를 살펴보았다.

*in vivo*상에서 APAP는 단회 투여로 실험동물에서 급성 간독성을 유발하기에, SCE를 4일 동안 경구 투여하고 마지막 날 SCE 투여 2시간후 APAP를 투여한 다음 24 시간 후에 rat를 희생시키고 혈액과 간을 적출하여 SCE의 효과를 살펴 보았다.

간손상시 일반적으로 다량의 ALT, AST, LDH 등이 혈중으로 분비되며<sup>44,45)</sup>, ALT는 간손상시 민감하게 변화하므로 AST와 함께 간장질환의 유력한 지표로 널리 이용되고 있다<sup>46,47)</sup>. LDH는 심질환, 간질환 등에서 상승하는 것으로 알려져 있다<sup>48)</sup>.

혈액학적 분석으로 ALT, AST, LDH를 살펴본 결과, APAP는 Normal에 비해 현저하게 상승된 수치를 보였으나, SCE에 의해 유의하게 수치가 감소하였다. 더불어, 조직학적 평가에서도 APAP를 단독 처치한 간조직에서 관찰되었던 간세포의 공포화, 지방소적의 간세포내 축적 및 염증세포 침윤과 같은 소엽중심성 괴사가 SCE에 의해 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한 Normal의 간조직의 변성율이  $4.76 \pm 1.17\%$  인데 반해 APAP를 단독 처치한 간조직은  $49.60 \pm 10.51\%$ 의 간 변성율을 보여 간손상이 확인되었다. 하지만 이러한 간손상은 SCE에 의해 유의하게 감소되었으며, APAP에 의해 증가된 염증세포의 침윤 수도 SCE에 의해 감소되었다. 따라서, SCE는 APAP에 의한 간독성을 해독하는 과정에서 역할을 수행한 것으로 사료되며, 이를 규명하기 위해, MDA 및 GSH 함량변화 및 pro-caspase-3의 발현량에 대한 SCE의 영향을 살펴보았다.

APAP에 의해 유도되는 급성 간손상에서 대사 활성중간체에 의해 지질과산화반응이 일어나는데<sup>49)</sup>, 간조직 내에서 지질과산화는 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소들의 역할 부진으로 인해 과도하게 생성된 자유라디칼들에 의해 진행된다고 알려져 있다<sup>50-52)</sup>.

간 조직으로 부터 MDA 함량변화를 조사해 본 결과, APAP 단독 처리한 간 조직에서 Normal에 비해 현저하게 증가된 MDA 함량이 관찰되었으나, SCE에 의해 감소되었다. 이러한 결과로부터, SCE가 지질과산화를 억제함으로써 APAP에 의한 간손상을 보호한다고 할 수 있다.

GSH는  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase에 의해 cysteine, glutamic acid, glycine이라는 세 개의 아미노산

이 인산 결합을 이루고 있는 화합물로 독성물질의 배출을 촉진시킴으로써 간 손상을 막아주는 항산화 물질이다<sup>49,53,54)</sup>. 많은 연구 결과들에서 발표된 것처럼 APAP에 의한 간독성화 과정에서 생산된 NAPQI는 GSH의 양을 급격히 고갈시키며, 이로 인해 세포 괴사 반응이 진행된다고 알려져 있다<sup>21,27,55)</sup>. 본 실험에서도 APAP를 단독으로 처치한 간 조직에서 현저하게 감소된 GSH 함량을 확인할 수 있었으며, 이러한 GSH의 감소는 SCE에 의해 회복되었다. 따라서 SCE는 APAP로 유도된 간독성에서 GSH의 고갈을 방지하고 지질과산화를 억제함으로써 간 보호 작용을 발휘하는 것으로 추측된다.

APAP에 의한 간손상이 necrosis에 의한 것인지 혹은 apoptosis에 의한 것인지는 아직까지 명확하게 밝혀지지는 않았지만, 많은 연구자들은 APAP에 의한 간손상이 apoptosis에 기인한다고 발표하고 있다<sup>56-60)</sup>. 그 결과, APAP에 의해 pro-caspase-3의 발현이 감소되어 apoptosis가 유도되었음을 추측할 수 있었으며, SCE에 의해 발현량이 다시 증가되었다. 따라서, SCE는 APAP가 유도한 apoptosis 과정을 억제함으로써 간 손상을 방어할 것으로 사료되나, apoptosis 과정에서 SCE의 명확한 역할을 규명하기 위해서는 연구가 더 필요하다.

이상의 결과들로부터 SCE는 APAP로 유도된 급성 간독성에 대해 유의한 보호 효과를 가진 것으로 생각되며, 이러한 SCE의 간보호 효과는 급격한 GSH의 감소에 대한 방어 효과와 지질과산화 억제 효과로 설명할 수 있다. 더불어, SCE는 apoptosis로 유도되는 간손상에서 pro-caspase-3를 억제함으로써 간 보호에 관여할 것으로 추측된다. 이는 계혈등이 간손상에 대한 예방 및 치료제로서의 활용가능성을 보여 준 것으로, 향후 계혈등에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결론

본 연구는 Acetaminophen (APAP) 단회 투여로 급성 간독성을 유발한 rat에 대한 계혈등 물추출물 (SCE)의 간보호 효과를 평가하였다.

그 결과 SCE는 APAP에 의해 증가된 ALT, AST, LDH 수치 및 간 조직의 변성율, 침윤된 염증세포의 수 및 변성 간세포수, hepatic MDA 함량을 유의하게 감소시켰으며, 또한 APAP에 의해 감소된 Hepatic glutathione (GSH)를 유의하게 증가시켰다. 이러한 결과로 보아 계혈등은 APAP로 유도된 급성 간독성에 대해 유의한 보호 효과를 나타내었으며, 특히 GSH의 감소를 억제하고 지질과산화를 막음으로써 간보호 효과를 나타낸 것으로 보여 진다.

## 참고문헌

1. Colleges of Oriental Medicine, Herbology professor's association, Herbology, Seoul : Young-Lim Publisher, 1992 : 445-6.
2. Hu-Zhan Zheng(鄭虎占), Modern study of traditional chinese medicine(中藥現代研究與應用).

- Beijing : xue-yuan Publisher(學苑出版社). 1998 : 2539-46.
3. Choi SI, Park SJ, Byun SH, Lee JR, Park MK, Kim SC. Effects of *Spatholobi Caulis* MeOH Extract on the Production of NO and Pro-inflammatory Cytokines in LPS-activated Raw264.7 Cells. *Korean J. Herbology*. 2009 ; 24(2) : 21-7.
  4. Cha BC, Lee EH, Noh MA. Antioxidant Activity of *Spatholobus suberectus* Dunn. *Kor. J. Pharmacogn*. 2005 ; 36(1) : 50-5.
  5. Sim GS, Kim JH, Lee DH, Park SM, Pyo HB, Zhang YH, et al. Effects of the *Spatholobi calulis* extract on Antioxidation and Inhibition of Matrix Metalloproteinase in Human Skin Fibroblasts. *Korean J. Biotechnol, Bioeng*. 2005 ; 20(1) : 40-5.
  6. Lee SL, Jeong HW. Experimental Effects of SPATHOLOBI CAULIS on the Cerebral Blood Flow and Lactate Dehydrogenase Activity. *Korean J. Oriental Phyology & Pathology*. 2006 ; 20(1) : 25-30.
  7. Lee SL, Choi CH, Baek JU, Youn DH, Jeong SH, Han U, et al. Experimental Study of *Patholobi Caulis* on the Transient Cerebral Ischemia in Rats. *Korean J. Oriental Phyology & Pathology*. 2007 ; 21(5) : 1127-34.
  8. Kim DC, Ramachandran S, Baek SH, Kwon SH, Kwon KY, Cha SD, Bae I, Cho CH. Induction of growth inhibition and apoptosis in human uterine leiomyoma cells by isoliquiritigenin. *Reprod Sci*. 2008 ; 15/6 : 552-558.
  9. Ha ES, Lee EO, Yoon TJ, Kim JH, Park JO, Lim NC, Jung SK, Yoon BS, Kim SH. Methylene chloride fraction of *Spatholobi Caulis* induces apoptosis via caspase dependent pathway in U937 cells. *Biol Pharm Bull*. 2004 ; 27(9) : 1348-52.
  10. Wang W, Wang J, Zhao D, Liu H, Zhou W, Chen K. Comparison of *Spatholobus suberectus* Dunn *Euonymus alatus* (Thunb.) Sied, and *Eupolyphage sinensis* Walkeron regulation of plasma lipid. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1991 ; 16 : 299-301, 320.
  11. Lam TL, Lam ML, Au TK, Ip DT, Ng TB, Fong WP, Wan DC. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci*. 2000 ; 67(23) : 2889-96.
  12. Choi JS, Song TW, Kim DH. A Study on the effect *Spatholobus suberectus* Dunn on the inhibition of arthritis by collagen on the mouse. *Kor. J. Herbology*. 2003 ; 18 : 79-88.
  13. So HG, Oh MS, Kim DH. Immunity Responses of the *Spatholobus suberectus* Dunn to Synovial Cells Isolated from Patients with Rheumatoid Arthritis. *Korean. J. Oriental Phtsiol Pathol*. 2003 ; 17 : 780-6.
  14. Yoon-JS. Flavonoids of *spatholobus suberectus* [master's thesis]. Seoul : Graduate school, Seoul University : 2003.
  15. Zhu You Ping. Chinese materia medica. Harwood academic publisher. The Netherlands. 1998 : 468-470.
  16. Farrell S. Toxicity, acetaminophen. *eMedicine Journal* 2009 ; (September) : 3.
  17. Ruepp S, Tonge R, Shaw J, Wallis N, Pognan F. Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. *Toxicological Sciences*. 2002 ; 65 : 135-50.
  18. Larson A, Polson J, Fontana R, Davern T, Lalani E, Hynan L, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure : results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*. 2005 ; 42 : 1364-72.
  19. Knight T, Fariss M, Farhood A, Jaeschke H. Role of lipid peroxidation as a mechanism of liver injury after acetaminophen overdose in mice. *Toxicological Sciences*. 2003 ; 76 : 229-36.
  20. Goldfrank L, Flomenbaum N. Goldfrank's toxicologic emergencies : McGRAW-Hill Professional ; 2006.
  21. Nelson SD. Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury. *Drug Metab Rev*. 1995 ; 27 : 147-77.
  22. Gunawan BK, Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver disease. *Clin Liver Dis*. 2007 ; 11 : 459-75.
  23. Hao Y, Linling C, Michael H, Numsen H Jr, Robert M, Cynthia J. Lactoferrin protects against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Hepatology*. 2010 ; 51 : 1007-16.
  24. Lee WM. Acetaminophen and the US Acute Liver Failure Study Group : lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology*. 2004 ; 40 : 6-9.
  25. Fischer LJ, Green MD, Harman AW. Levels of acetaminophen and its metabolites in mouse tissue after a toxic dose. *J Pharmacol EXP Ther* 1986 ; 219 : 281-286
  26. Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci*. 2006 ; 9 : 31-41.
  27. James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*. 2003 ; 31(12) : 1499-506.
  28. Michael SL, Pumford NR, Mayeux PR, Niesman MR, Hinson JA. Pretreatment of mice with

- macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Hepatology*. 1999 ; 30 : 186-95.
29. Hinson JA, Reid AB, McCullough SS, James LP. Acetaminophen induced hepatotoxicity : role of metabolic activation, reactive oxygen/nitrogen species, and mitochondrial permeability transition. *Drug Metabolism Reviews*. 2004 ; 36 : 805-22.
  30. Hinson JA, Bucci AR, Irwin LK, Michael SL, Mayeux PR. Effect of inhibitors of nitric oxide synthase on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Nitric Oxide*. 2002 ; 6 : 160-7.
  31. Bergman K, Muller L, Teigen SW. Series : The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol : a regulatory review. *Mutation Research*. 1996 ; 349 : 263-88.
  32. Dybing E, Holme JA, Gordon WP, Soderlund EJ, Dahlin DC, Nelson SD. Genotoxicity studies with paracetamol. *Mutation Research*. 1984 ; 138 : 21-32.
  33. Ismail NA, Okasha SH, Dhawan A, Abdel-Rahman AO, Shaker OG, Sadik NA. Antioxidant enzyme activities in hepatic tissue from children with chronic cholestatic liver disease. *Saudi J Gastroenterol*. 2010 ; 6(2) : 90-4.
  34. Dhaunsi GS, Singh I, Orak JK, Singh AK. Antioxidant enzymes in ciprofibrate-induced oxidative stress. *Carcinogenesis*. 1994 ; 15(9) : 1923-30.
  35. Olaleye MT, Akinmoladun AC, Ogunboye AA, Akindahunsi AA. Antioxidant activity and hepatoprotective property of leaf extracts of *Boerhaavia diffusa* Linn against acetaminophen-induced liver damage in rats *Food Chem Toxicol*. 2010 ; 48(8-9) : 2200-5.
  36. Das J, Ghosh J, Manna P, Sil PC. Acetaminophen induced acute liver failure via oxidative stress and JNK activation : protective role of taurine by the suppression of cytochrome P450 2E1. *Free Radic Res*. 2010 ; 44(3) : 340-55.
  37. Zaher H, Buters JT, Ward JM, Bruno MK, Lucas AM, Stern ST, Cohen SD, Gonzalez FJ. Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998 ; 152(1) : 193-9.
  38. Prescott LF. Paracetamol : past, present, and future. *Am J Ther* 2000 ; 7 : 143-7
  39. Keays R, Harrison PM, Wendon JA, Forbes A, Gove C, Alexander GJM, Williams R. Intravenous acetylcysteine in paracetamol induced fulminant hepatic failure : a prospective controlled trial. *BMJ* 1991 ; 303 : 1026-9
  40. Makin AJ, Wendon J, Williams R. A 7-year experience of severe acetaminophen-induced hepatotoxicity(1987-1993). *Gastroenterology* 1995 ; 109 : 1907-16
  41. Yang R, Miki K, He X, Killeen ME, Fink MP. Prolonged treatment with N-acetylcysteine delays liver recovery from acetaminophen hepatotoxicity. *Crit Care*. 2009 ; 13 : R55.
  42. Makin AJ, Williams R. Acetaminophen-induced hepatotoxicity : predisposing factors and treatments. *Adv Intern Med*. 1997 ; 42 : 453-83
  43. Ahn BM. Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure *J Korean Med Assoc*. 2006 ; 49(9) : 846-53
  44. Dudley RE, Svoboda DJ, Klaassen C. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1982 ; 65 : 302-13.
  45. Skilleter D, Cain K, Dinsdale D, Paine A. Biochemical mechanisms and morphology selectivity in hepatotoxicity : Studies in cultures of hepatic-parenchymal and non-parenchymal cells. *Xenobiotica*. 1985 ; 15 : 687-93.
  46. Clark JM, Diehl AM. Defining nonalcoholic fatty liver disease : implications for epidemiologic studies. *Gastroenterology*. 2003 ; 24 : 248-50.
  47. Scheig R. Evaluation of tests used to screen patients with liver disorders. *Prim Care*. 1996 ; 23 : 551-60.
  48. Sherlock S, Dooley J. Diseases of liver and biliary system. London : Blackwell Science. 2002 : 23.
  49. Fisher LJ, Green MD, Harman AW. Levels of acetaminophen and its metabolites in mouse tissues after a toxic dose. *J Pharmacol Exp Therapeut*. 1982 ; 221 : 407-13.
  50. Muller L. Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes : mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicology*. 1986 ; 40 : 285-92.
  51. Manca D, Ricard AC, Trottier B, Chevalier G. Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology*. 1991 ; 67 : 303-23.
  52. Bray TM, Taylor CG. Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 1993 ; 71 : 746-75.
  53. Han D, Shinohara M, Ybanez MD, Saberi B, Kaplowitz N. Signal transduction pathways involved in drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol*. 2010 ; 196 : 267-310.
  54. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med*. 2009 ; 30(1-2) : 29-41.
  55. Dahlin, DC, Miwa GT, Lu AYH, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine : a cytochrome



- P-450 mediated oxidation product of acetaminophen. *Biochemistry*. 1984 ; 81 : 1327-331.
56. Ferret PJ, Hammoud R, Tulliez M, Tran A., Trebeden H, Jaffray P, Malassagne B, Calmus Y, Weill B, Batteux F. Detoxification of reactive oxygen species by a nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase cures acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *Hepatology*. 2001 ; 33 : 1173-80.
57. Kanno S, Ishikawa M, Takayanagi M, Takayanagi Y, Sasaki K. Potentiation of acetaminophen hepatotoxicity by doxapram in mouse primary cultured hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 2000 ; 23 : 446-550.
58. Ray SD, Mumaw VR, Raje RR, Fariss MW. Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996 ; 279 : 1470-83.
59. Ray SD, Jena NA. hepatotoxic dose of acetaminophen modulates expression of BCL-2, BCL-X(L), and BCL-X(S) during apoptotic and necrotic death of mouse liver cells in vivo. *Arch. Toxicol.* 2000 ; 73 : 594-606.
60. Zhang H, Cook J, Nickel J, Yu R, Stecker K, Myers K, Dean NM. Reduction of liver Fas expression by an antisense oligonucleotide protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Biotechnol.* 2000 ; 18 : 862-67.