

柴苓湯이 에탄올 투여로 유발된 흰쥐의 간손상에 미치는 방어효과

김범희 · 최영현*

동의대학교 한의과대학 & 동의대학교 한의학연구소

Effects of *Shiryung-tang* Extract on the Liver Injury induced by Ethanol in Rats

Bum Hoi Kim, Yung Hyun Choi*

College of Oriental Medicine and Research Institute of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Alcoholic liver disease (ALD) is a major cause of morbidity and mortality around the world. Although much progress has been made in understanding the pathogenesis of ALD, there remains no effective therapy for it. Accumulated evidence indicates that oxidative stress is the main pathological factors in the development of ALD. Ethanol administration causes accumulation of reactive oxygen species (ROS), including superoxide, hydroxyl radical, and hydrogen peroxide. ROS, in turn, cause lipid peroxidation of cellular membranes, and protein and DNA oxidation, which results in hepatocyte injury. In addition to pro-oxidants formation, antioxidants depletion caused by ethanol administration also results in oxidative stress. The objective of this study is to investigate the effects of *Shiryung-tang* extract on the chronic alcoholic liver injury induced by EtOH. Male Sprague Dawley rats were used in this study. All rats were maintained under standard laboratory conditions (23±1°C, 12h light/12h dark cycles). All animals (n=30) were randomly divided into following groups: (1) Normal group, treated with distilled water (n=10); (2) Control group, treated with ethanol (n=10); (3) Sample group, treated with ethanol + pharmacopuncture (n=10). For oral administration of ethanol in Control and Sample group, the ethanol was dissolved in distilled water in concentrations of 25%(v/v). Throughout the experiment of 8 week, the rats were allowed free access to water and standard chow. Sample group were administrated by *Shiryung-tang* extract daily for 8 weeks. Control group were given normal saline for same weeks. As a results, the oral administration of ethanol for 8 weeks leads to hepatotoxicity. The levels of hepatic marker such as HDL-cholesterol, triglyceride, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were altered. The ethanol also increased lipid peroxidation and depletion of antioxidant enzyme activities as well as hepatic tissue injury. However, the treatment of *Shiryung-tang* extract prevented all the alterations induced by ethanol and returned their levels to near normal. These data suggest that *Shiryung-tang* extract could have a beneficial effect in inhibiting the oxidative damage induced by chronic ethanol administration. Therefore, *Shiryung-tang* extract can be a candidate to protect against EtOH-induced liver injury.

Key words : *Shiryung-tang*, Alcoholic liver disease(ALD), reactive oxygen species (ROS), aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase

서 론

간(肝)은 음식의 소화, 당저장, 대사조절, 약물해독, 호르몬 생성 등의 다양한 기능을 가진 중요한 장기이다. 간에 대한 손상은 화학물질, 약물, 바이러스 등에 의해 발생되는데, 알콜에 의한

간손상이 가장 흔한 손상의 형태이다^{1,2}. 알콜성 간손상 (Alcoholic liver disease: ALD)이란 간세포의 지방변성, 염증반응, 간세포 괴사를 포함하여 점진적인 섬유화에 이르기까지의 다양한 형태적 변화를 말한다³. 일반적으로 알콜은 위장관에서 빠르게 흡수되며 흡수된 알콜의 95~98%는 간의 해독작용을 통하여 물과 탄산가스로 분해된다. 간세포의 알콜 분해작용은 간조직의 alcohol dehydrogenase(ADH)에 의해서 에탄올이 acetaldehyde로 분해되고 다시 acetaldehyde dehydrogenase

* 교신저자 : 최영현, 부산광역시 부산진구 양정2동 산45-1 동의대학교

· E-mail : bume@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-7411

· 접수 : 2013/08/11 · 수정 : 2013/09/15 · 채택 : 2013/09/28

(ALDH)에 의해서 아세테이트로 다시 분해되어 최종으로 물과 탄산가스로 된다. 만약 과도한 양의 알코올을 지속적으로 흡수할 경우에는 부산물로 생겨나는 과량의 수소는 간 세포내에서 NADH의 농도를 증가시키고 결과적으로 NAD/NADH의 비율을 감소시켜 중성지방의 합성을 증가시킨다. 또한 간 조직의 산성농도를 저하시켜 독성이 강한 산소기를 생산하므로 간세포에 손상을 일으킨다^{4,6)}. 만성적인 음주는 ADH 이외에도 간세포의 microsome의 알코올을 산화효소계의 작용을 유도하여 이 과정에서 산화적 스트레스(oxidative stress)와 지질과산화(lipid peroxidation)가 일어난다. 산화적 스트레스는 활성산소(reactive oxygen species: ROS) 생성과 antioxidant에 의한 제거작용 사이의 불균형에 의해 일어나는데, 유해한 ROS의 과도한 생성은 세포막지질, 단백질합성, DNA 등에 심각한 손상을 일으킬 수 있다^{7,8)}.

에탄올의 산화작용은 독성 대사산물과 free radical을 생성하여 산화적 스트레스를 유발하는데, 이에 따라 지질과산화의 증가와 superoxide dismutase(SOD), catalase와 같은 내인성 항산화 효소 활성의 결핍을 초래한다. 이러한 효소들의 부족은 알콜성 간손상에 직접관여하는 것으로 알려졌다⁹⁾. 이전의 많은 동물실험과 임상연구를 통해 간세포 손상에 대해 방어기능을 가진 천연 항산화물질들의 효과를 밝혔으나¹⁰⁻¹⁴⁾, 아직 한약물의 간세포 보호효과에 대해서는 연구가 부족한 실정이다.

시령탕(柴苓湯)은 청열의 효능이 있는 소시호탕(小柴胡湯)과 오령산(五苓散)을 합한 방제로, 주로 상한 열병에 열독을 제거하는데 사용되었으며, 淸熱利濕, 疏肝理氣하는 효능이 있어 간손상에 많이 사용되는 처방이다^{15,16)}. 시령탕에 대한 실험적 연구로는 고혈압 및 고지혈증에 방어효과가 보고되었으며¹⁷⁾, 임상연구를 통해 대장포진후 신경통환자에 유의한 효과가 있는 것으로 밝혀졌다¹⁸⁾. 시령탕의 간기능 보호에 관한 연구로는 시령탕과 그 가미방들이 thioacetamide에 의한 흰쥐의 간손상에 보호효과가 있으며¹⁹⁾, galactosamine에 의한 흰쥐의 간손상에도 유의한 효과가 있는 것으로 보고되었다^{20,21)}.

본 연구의 목적은 시령탕 물추출물이 만성적인 알콜투여에 의해 유발된 간손상에 대한 보호효과를 검증하기 위한 것이며, 이를 위해 흰쥐에 EtOH을 장기간 투여하여 만성적 간손상을 유발하고 간기능관련 인자들과 간세포의 해부조직학적 변화 그리고 산화적 스트레스 지표에 대한 시령탕의 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에서는 (주)샘타코 (경기도, 대한민국)에서 구입한 10주령, 약 250 g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 30마리를 사용하였다. 흰쥐는 온도 23~24℃, 습도 40~60%, 조명 12시간 명/암이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균 음수와 사료를 자유롭게 공급하여 사육하고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물의 제조와 실험군의 분리

본 연구에 사용된 시령탕은 동의대학교 한방병원을 통해 구입하였으며, 약물 조성은 Table 1과 같다. 시령탕 5척 분량인 180.85 g을 증류수 2 L와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과액을 감압농축하여 동결건조시켜 물추출액기스 71.2 g을 얻었다. 투여량은 흰쥐 체중 100 g당 61.0 mg을 음용수에 녹여 경구 투여하였다.

실험군의 분리는 흰쥐를 무작위로 10마리씩 나누어 알콜을 투여하고 동일량의 생리식염수를 투여한 Control군, 알콜 투여기간 중에 시령탕 추출물을 경구 투여한 Sample군과, 그리고 아무런 처치도 가하지 않은 Normal군으로 분리하였다.

3. 만성 알콜성 간손상의 유발과 약물투여

Normal군을 제외한 Control군, Sample군의 모든 실험동물에게 물대신 25%의 EtOH(Sigma - Aldrich Chem. Co., St. Louis, Missouri, USA) 용액을 8주간 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사료는 모든 군에서 전체 실험기간 동안 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

Sample군의 경우 매일 일정한 시간에 시령탕 추출액을 한차례 경구투여 하였으며, Control군에는 동일량의 생리식염수를 경구투여 하였다.

4. 체중 측정

실험동물의 체중은 전체 실험기간동안 주2회 측정하였으며, 실험 마지막날에는 부검 직전 체중을 측정하였다.

5. 혈액생화학적 검사

실험동물을 안락사 시킨 후 심장 혹은 하대정맥에서 혈액을 채혈하였다. 혈액을 냉장고에 2시간정도 방치한 후 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 채취한 혈청 내 HDL-Cholesterol, Total cholesterol, Triglyceride의 농도와 AST(Aspartate Aminotransferase), ALT(Alanine Aminotransferase) 등의 수치를 측정하였다.

6. 간 중량의 변화

혈액채취 후 간을 적출하여 육안으로 관찰한 후, 미세저울을 이용하여 무게를 측정하였다. 간의 중량은 절대장기중량과 체중에 대한 상대장기중량(%)으로 표시하였다.

7. 해부조직학적 관찰

해부조직학적 염색을 위해 간조직을 4% formalin에 48시간 동안 고정시키고 50, 80, 95 및 99.9%의 EtOH에 순차적으로 담귀서 탈수시킨 후, xylene으로 행구고 paraffin으로 포매하였다. 위조직을 5 μm 두께의 절편으로 자르고 hematoxylin-eosin (H&E) 염색법으로 염색한 후, 현미경으로 통해 관찰하였다.

8. Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정²²⁾

SOD의 활성은 xanthine과 산소가 xanthine oxidase에 의하여 uric acid와 hydrogen peroxide로 전환되는 과정에서 생성되는 superoxide ion를 측정함으로써 결정하였다. 실험동물로부터

적출된 간조직을 homogenizer를 이용하여 sucrose buffer와 함께 4℃에서 균질화시킨후 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액을 SOD Assay Kit를 사용하여 450nm에서 측정하였다.

9. Catalase 활성 측정²³⁾

Catalase는 SOD에 의해 발생되는 H₂O₂를 물과 산소로 분해하는 역할을 한다. 실험동물로부터 간조직을 적출하여 간조직을 homogenizer를 이용하여 sucrose buffer와 함께 4℃에서 균질화시킨후 원심분리하여 상층액을 분리한 후, H₂O₂와 인산칼슘 완충액과 25℃에서 30초간 반응시켜 240 nm에서 측정하였다.

10. 통계학적 분석

측정된 모든 자료는 ANOVA 분석을 통해 유의성 여부를 확인 후, student's t-test를 사용하여 P<0.05 및 P<0.01의 유의수준으로 검증하였다. 모든 값의 수치는 평균±표준편차(mean±standard deviation)로 표시하였다.

Table 1. Herbal Composition of Siryung-tang¹⁸⁾

본초명	학명	weight(g)
시호	Bupeuri Radix	6
택사	Alismatis Rhizoma	4.87
백출	Atractylodis Rhizoma Alba	2.81
저령	Polyporus	2.81
적복령	Poria rubra	2.81
반하	Pinelliae Rhizoma	2.62
황금	Scutellariae Radix	2.25
인삼	Ginseng Radix	2.25
감초	Glycyrrhizae Radix	2.25
육계	Cassiae cortex	3.75
생강	Zingiberis Rhizoma	3.75
합계		36.17

결 과

1. 체중의 변화

8주간의 실험기간동안 Normal, Control, Sample군에서 모두 시간이 지남에 따라 체중이 전반적으로 증가하는 양상을 나타내었다. 하지만, 전체 실험기간에서 Control군과 Sample군이 Normal군에 비해 체중증가가 적은 편이었다. 다만, 7주와 8주째의 체중변화에서는 Sample군이 Control군에 비해 유의성 있는 증가가 나타났(Fig. 1).

2. 혈액생화학적 변화

8주간의 장기간의 알콜투여 후 혈액생화학적 변화를 관찰한 결과는 Table 2와 같다. HDL-Cholesterol의 경우 Control군과 Sample군에서 Normal군에 비해 감소된 값을 나타내었다. 한편 Control군과 Sample군의 비교에서는 Sample군이 Control군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(P<0.05). Total cholesterol 수치의 비교에서는 Control군과 Sample군에서 모두 Normal군에 비해 상승된 수치를 나타내었는데, Control군이 Normal군에 비해 유의성 있게 상승한 반면(P<0.05), Sample군의 경우는 Control군에 비해 감소되었으나 유의성은 없었다. Triglyceride의

비교에서도 Control군과 Sample군 모두에서 Normal군에 비해 상승된 값을 나타내었는데, Control군이 Normal군에 비해 유의성 있게 상승하였으며(P<0.01) Sample군에서는 Control군에 비해 감소되었으나 마찬가지로 유의성은 없었다.

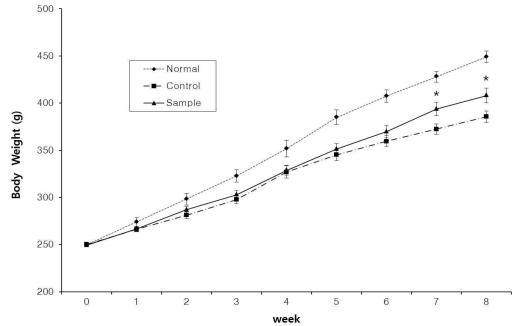


Fig. 1. Body weight changes of male SD rats during the 8 weeks toxicological assessment. Compared with Normal group(n=16), mean body weight of both Control (n=16) and Sample(n=16) group was decreased for whole 8 weeks, and mean body weight of Sample group was significantly increased after the seventh week compared with Control group. (* p < 0.05 compared with Control group.)

Table 2. Blood Serum Chemistry Values in Rats of Normal, Control and Sample Groups

Group	Normal	Control	Sample
HDL-Cholesterol (mg/dL)	44.58±10.69	29.03±5.70**	37.65±8.31*
Total Cholesterol (mg/dL)	81.36±11.97	91.42±8.27*	87.71±10.48
Triglyceride (mg/dL)	45.74±9.33	58.65±12.65**	53.52±6.09

HDL-Cholesterol, High density lipoprotein-Cholesterol. Data shown as mean±S.D. were analysed by the Student's t-test. (#: P<0.05 compared with Normal group. ##: P<0.01 compared with Normal group. *: P<0.05 compared with Control group.)

3. 간기능에 미치는 영향

ALT와 AST의 값의 변화를 통해 간기능에 미치는 영향을 관찰하였다(Table 3). 우선, ALT값의 변화를 살펴보면 8주간의 알콜투여 후 Control군에서 Normal군에 비해 유의성 있는 상승이 나타났(P<0.01). 반면, Sample군에서는 Control군에 비해 유의성 있게 감소되었다(P<0.05). AST의 변화에서도 Control군이 Normal군에 비해 유의성 있는 증가가 나타났는데(P<0.01), Sample군에서는 Control군에 비해 유의성 있는 감소가 관찰되었다(P<0.05).

Table 3. Blood Serum Chemistry Values in Rats of Normal, Control and Sample Groups

Group	Normal	Control	Sample
ALT(GPT) (IU/L)	29.03±5.70	42.46±9.69**	38.10±11.42*
AST(GOT) (IU/L)	71.22±12.62	97.10±18.35**	82.35±11.82*

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase. Data shown as mean±S.D. were analysed by the Student's t-test.##: P<0.01 compared with Normal group. *: P<0.05 compared with Control group.)

4. 간 중량의 변화

실험동물로부터 간을 적출한 후 중량을 측정하여 비교한 결과, Control군과 Sample군에서 모두 Normal군에 비해 간의 중량이 감소되었는데, Control군이 Normal군에 비해 유의성 있게 감소되었으며(P<0.05), Sample군의 경우는 Control군에 비해 약간

증가하였으나 유의성은 없었다(Table 4).

Table 4. Liver weight of Rats in Normal, Control and Sample Groups

Group	Normal	Control	Sample
Liver weight(g)	13.54±3.87	10.36±2.28#	11.70±3.76

Data shown as mean±S.D. were analysed by the Student's t-test. (#: P<0.05 compared with Normal group.)

5. 간세포의 해부조직학적 변화

8주간의 알콜 경구투여 후 간조직을 H&E염색을 통해 관찰한 결과, Control군의 간세포에서 Normal군에 비해 뚜렷한 조직학적 변화가 관찰되었다. 즉, 염증세포 침윤과 관련된 공포(ballooning)의 형성, 지방변성, 수포변성(hydropic degeneration) 등의 변화가 나타났다. Sample군의 경우에도 이와 같은 변화가 관찰되었으나, Control군에 비해 현저히 감소된 양상이었다(Fig. 2).

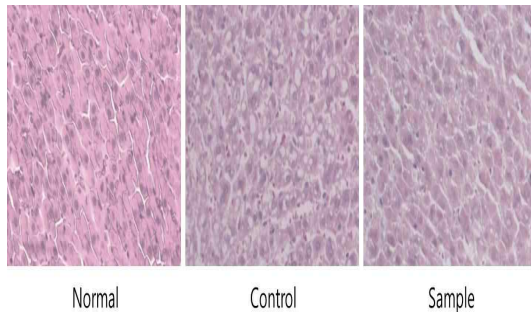


Fig. 2. Liver sections stained with hematoxylin and eosin. Control group showed severe histopathological alterations such as ballooning, fatty and hydropic degeneration. Whereas, the changes detected in Sample group are considered to be mild compared to Control group.

6. Superoxide dismutase(SOD)와 catalase 효소의 변화

알콜을 투여한 동물의 간조직에서 SOD와 catalase 효소의 변화를 측정하였는데, SOD의 수치변화에서 8주간 알콜을 투여한 Control군의 경우 Normal군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(P<0.01). 반면, 알콜투여 기간 중 시령탕 추출물을 경구 투여한 Sample군에서는 Control군에 비해 유의성 있는 증가가 관찰되었다(P<0.05). catalase의 수치변화에서도 Control군의 경우 Normal군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(P<0.01). 반면, 시령탕 추출물을 경구투여한 Sample군에서는 Control군에 비해 증가되었으나 유의성은 없었다(Table 5).

Table 5. Superoxide dismutase(SOD) and catalase in Rats of Normal, Control and Sample Groups

Group	Normal	Control	Sample
SOD (u/mg protein)	49.83±8.40	40.87±4.18**	47.23±7.55*
Catalase (u/mg protein)	27.47±6.04	21.01±4.7*	25.44±5.17

Data shown as mean±S.D. were analysed by the Student's t-test. (##: P<0.01 compared with Normal group. *: P<0.05 compared with Control group.)

고찰

장기간의 알콜 투여는 실험동물의 체중감소를 유발하는 것

으로 알려져 있다^{24,25}. 본 실험에서도 8주간의 실험기간 중 알콜을 투여한 Control군과 Sample군에서 알콜을 투여하지 않은 Normal군에 비해 체중이 감소되는 결과를 나타내었다. 다만, Sample군에서 Control군에 비해 체중감소가 전반적으로 줄어드는 경향이 나타났는데, 특히 7주와 8주째에서는 Sample군이 Control군에 비해 체중의 유의성 있는 증가가 나타났다. 이는 시령탕 투여가 알콜로 인한 체중감소를 회복시켜 주는 효과가 있음을 나타내는 결과라 할 수 있다.

HDL cholesterol은 말초조직 및 혈관 벽에 축적된 cholesterol을 제거하여 cholesterol ester로 변화시켜 간으로 운반 후 담즙산으로 배설시키는 역할을 하며²⁶, triglyceride는 체내 cholesterol을 결정하는 중요한 지표로서 고리포단백혈증(hyperlipoproteinemia)이나 이상지질혈증(dyslipidemia), 고중성지방혈증(triglyceridemia)등을 진단하는데 있어 사용된다. 오랜 기간동안의 알콜투여는 간에서의 지방침윤을 유발하고 지방대사의 변화를 통해 oxidation를 감소시키고 지방산의 합성을 증가시켜 간에서의 triglyceride의 축적을 유발하는 것으로 알려져 있다^{27,28}. 본 연구에서 8주간의 알콜 투여 후 Control군과 Sample군에서 Normal군에 비해 HDL-Cholesterol의 수치가 감소되었으나 Sample군에서 Control군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(P<0.05). 또한 Triglyceride는 Control군과 Sample군 모두에서 Normal군에 비해 상승된 값을 나타내었는데, Sample군에서는 Control군에 비해 상대적으로 감소된 수치를 나타내었다. 이와 더불어 total cholesterol 수치의 비교에서도 Control군과 Sample군에서 모두 Normal군에 비해 증가되었으나, Sample군이 Control군에 비해 상대적으로 감소된 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 시령탕 추출물의 투여가 장기간의 알콜 투여로 유발된 혈중 지질농도의 변화를 회복시켜주는 효과가 있음을 나타내는 결과라 할 수 있다.

간손상이 유발될 경우, 체내의 다양한 효소들이 증가하거나 감소되는데 이러한 효소들의 변화를 통해 간손상의 정도를 가늠하게 된다. 간손상에 의해 변화되는 효소들은 크게 두가지로 나눌 수 있다. 하나는 손상된 간세포로부터 혈액으로 유리되어 나오는 효소들이고, 또 하나는 정상적인 간에 의해서만 분비되는 효소들로 간손상이 일어날 경우 감소되게 되는 효소들이다. 첫 번째 그룹의 효소들이 간손상의 지표로 사용되는데, AST와 ALT가 이에 속한다^{4,5}. AST와 ALT 모두 거의 대부분의 동물과 인체의 세포에서 발견되는데, 이 효소들의 활성은 다양한 조직에서 다르게 나타난다. ALT와 AST 효소는 간손상의 진단에 있어 매우 민감한 지표로서, 간세포막이 손상받을 경우 이 효소들은 혈액 속으로 유리되게 된다. 이를 측정하여 간손상의 유형과 범위를 결정한다^{29,30}. 본 실험에서 8주간의 알콜투여는 ALT와 AST의 상승을 유발하였는데 이는 장기간의 알콜투여로 인해 간기능이 손상되었음을 나타내는 것이다. 반면, 시령탕을 투여한 Sample군에서는 Control군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다. 즉, 시령탕은 알콜투여로 인해 증가된 ALT와 AST의 활성을 감소시키는 결과를 나타낸 것이다. 이러한 결과는 시령탕이 간세포 구조의 손상을 막아 ALT와 AST의 증가를 억제하는 효능을 가지고

있음을 나타내는 것이라 할 수 있다. 이러한 추론은 현미경을 통한 조직학적 관찰을 통해서도 확인되는데, 8주간의 알콜 경구투여 후 간조직을 H&E염색을 통해 관찰한 결과, Control군의 간세포에서 Normal군에 비해 염증세포 침윤과 관련된 공포(ballooning)의 형성, 지방변성, 수포변성(hydropic degeneration) 등의 뚜렷한 조직학적 변화가 관찰된 반면, Sample군의 경우에는 이러한 변성이 Control군에 비해 현저히 감소된 양상으로 관찰되었다. 이러한 해부조직학적 변화는 간의 실질장기에 영향을 미치게 되는데, 본 실험에서 간의 중량을 비교한 결과, 알콜의 장기간 투여한 Control군과 Sample군에서 모두 Normal군에 비해 간의 중량이 감소되었다. Sample군의 경우는 Control군에 비해 증가하였는데, 비록 유의성은 없었으나 이러한 결과는 시령탕 투여가 간세포의 퇴행적 변화를 억제하여 간 실질조직을 보호하는 효과가 있음을 나타내는 것이라 할 수 있다.

한편, 과도한 알콜섭취는 reactive oxygen species(ROS) 생성을 증가시킬 뿐 아니라 항산화효소들의 감소를 유발하여 결국에는 심각한 간손상으로 이어지는 산화적 스트레스를 일으킨다³⁰⁾. 즉, 산화적 스트레스는 ROS생성과 antioxidant에 의한 제거작용 사이의 불균형에 의해 일어나는데, 유해한 ROS의 과도한 생성은 세포막지질, 단백질합성, DNA 등에 심각한 손상을 일으킬 수 있다. 체내의 조직변성에 있어 산화적 스트레스와 염증이 중요한 역할을 담당한다는 것은 이미 알려진 사실이다. 간손상에서 있어 Kupffer cell의 활성화와 neutrophil의 침윤이 ROS와 산화적 스트레스를 악화시키는 proinflammatory cytokine들의 주요 요인이 된다. 결국, 항산화 작용 및 체내에서 생성된 free radical의 활성을 제거하는 것은 간독성의 치료에서 중요한데, 인체는 free radical에 의해 유발된 손상을 막는 방어시스템을 가지고 있다. 이러한 시스템은 superoxide dismutase(SOD), catalase와 같은 항산화효소들에 의해 이루어진다. 이들 효소들은 ROS의 분해를 촉진시키는 일차적인 효소방어체계의 역할을 수행한다. SOD는 superoxide anion의 불균등화(dismutation)반응을 촉진하고, catalase은 H₂O₂의 감소에 촉매작용을 하여 reactive free oxygen과 hydroxyl radical로부터 조직을 보호하는 역할을 한다. SOD 효소활성의 저하는 간세포 손상을 직접적으로 나타내주는 중요한 지표이며, catalase은 모든 동물 조직에 넓게 분포되어 있는 항산화 효소로서 특히 간에서 높은 활성을 가지게 된다. 본 실험에서 SOD와 catalase 효소의 변화를 관찰한 결과, SOD의 비교에서 8주간 알콜을 투여한 Control군의 경우 Normal군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈으며(P<0.01), 시령탕을 경구투여한 Sample군에서는 Control군에 비해 유의성 있는 증가가 관찰되었다(P<0.05). Catalase의 변화에서도 Control군의 경우 Normal군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었으며(P<0.01), 비록 유의성은 없었으나 Sample군에서는 Control군에 비해 증가된 결과를 나타내었다. 이처럼 알콜 투여군의 경우 SOD 활성이 현저히 감소된 결과를 보였는데, 이는 알콜 투여로 인한 간손상에서 SOD와 catalase 모두가 감소가 일어난다는 이전연구 결과와도 일치하는 것이다³¹⁾. 이러한 효소들의 감소는 superoxide anion이 과도하게 생성된 탓으로 여겨지는데, 과도한 superoxide anion은

SOD 효소를 감소시키고, 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다. SOD 효소가 활동을 못하게 되면, superoxide anion은 H₂O₂로 변하지 못하게 된다. 이는 결과적으로 H₂O₂ 제거 효소인 catalase을 감소시키고, 활성을 억제하게 된다. 반면, 시령탕을 투여한 Sample군에서는 SOD와 catalase의 값이 모두 증가하여 활성감소를 방어하는 결과를 보였는데, 이러한 결과로써 시령탕이 SOD와 catalase을 증가시킴으로써 free radical 제거를 촉진하는 효능을 가진 것으로 사료된다.

마지막으로 본 연구에는 시령탕의 만성적인 알콜 투여로 인한 간손상에 대한 보호효과만을 검증하였으나, 그 외 다양한 유형의 간손상에서도 시령탕이 보호효과를 가질 것으로 예상되는 바 다양한 동물모델에서의 효능검증은 추후 지속적인 연구를 통해 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

만성적인 알콜투여로 유발된 간손상에 대한 시령탕의 보호효과를 검증하기 위하여 흰쥐에 25% EtOH을 8주간 경구투여하여 만성적 간손상을 유발하고 시령탕 물추출물을 투여한 결과, 시령탕은 만성적인 알콜섭취로 인한 체중감소를 완화시켰으며, 혈액생화학적 검사에서는 과도한 알콜섭취로 인한 HDL-Cholesterol의 감소를 유의성 있게 회복시키고, triglyceride와 total cholesterol의 생성을 억제하였다. 또한, ALT와 AST의 상승을 유의하게 감소시켰으며 간세포의 해부조직학적 변화에 있어서도 공포형성, 지방변성과 같은 병리적 변화를 감소시켰다. 알콜로 인한 산화적 스트레스에 대해서는 SOD와 catalase의 감소를 억제하는 결과를 나타내었다.

이와 같은 결과로 시령탕은 만성적인 알콜투여로 인한 간손상에 보호효과가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Crawford, J.M. Histologic findings in alcoholic liver disease. Clin Liver Dis. 16(4):699-716, 2012
2. Casey, C.A., Nanji, A., Cederbaum, A.I., Adachi, M., Takahashi, T. Alcoholic liver disease and apoptosis. Alcohol Clin Exp Res. 25(5):49-53, 2001
3. Younossi, Z.M. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. Aliment Pharmacol Ther. 2008;28(1):2-12, 2008.
4. Albano, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. Proc Nutr Soc. 65(3):278-290, 2006.
5. Dey, A., Cederbaum, A.I. Alcohol and oxidative liver injury. Hepatology. 43(2):63-74, 2006.
6. Joy Hoskeri, H., Krishna, V., Vinay Kumar, B., Shridar, A.H., Ramesh Babu, K., Sudarshana, M.S. In vivo prophylactic effects of oleanolic acid isolated from

- chloroform extract of *Flaveria trinervia* against ethanol induced liver toxicity in rats. *Arch Pharm Res.* 35(10):1803-1810, 2012.
7. Bourogaa, E., Nciri, R., Mezghani-Jarraya, R., Racaud-Sultan, C., Damak, M., E.L., Feki, A. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Hammada scoparia* against ethanol-induced liver injury in rats. *J Physiol Biochem.* 69(2):227-237, 2013.
 8. Panchal, S.K., Brown, L. Cardioprotective and hepatoprotective effects of ellagitannins from European oak bark (*Quercus petraea* L.) extract in rats. *Eur J Nutr.* 52(1):397-408, 2013.
 9. Thong-Ngam, D., Samuhasaneeto, S., Kulaputana, O, Klaikeaw N.N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 13(38):5127-5132, 2007.
 10. Feroz, Z., Khan, R.A., Amber, Mahayrookh. Hepatoprotective effect of herbal drug on CCl₄ induced liver damage. *Pak J Pharm Sci.* 26(1):99-103, 2013.
 11. Islam, M.R., Parvin, M.S., Islam, M.E. Antioxidant and hepatoprotective activity of an ethanol extract of *Syzygium jambos* (L.) leaves. *Drug Discov Ther.* 6(4):205-211, 2012.
 12. Ravikumar, S., Gnanadesigan, M., Inbaneson, S.J., Kalaiarasi, A. Hepatoprotective and antioxidant properties of *Suaeda maritima* (L.) dumort ethanolic extract on concanavalin-A induced hepatotoxicity in rats. *Indian J Exp Biol.* 49(6):455-460, 2011.
 13. Sathaye, S., Bagul, Y., Gupta, S., Kaur, H., Redkar, R. Hepatoprotective effects of aqueous leaf extract and crude isolates of *Murraya koenigii* against in vitro ethanol-induced hepatotoxicity model. *Exp Toxicol Pathol.* 63(6):587-591, 2011.
 14. Nwozo, S.O., Oyinloye, B.E. Hepatoprotective effect of aqueous extract of *Aframomum melegueta* on ethanol-induced toxicity in rats. *Acta Biochim Pol.* 58(3):355-358, 2011.
 15. 이상인 외. 방제학. 서울. 영림사. pp 92-93, 287-289, 1990.
 16. 노승현 외. 방제학. 서울. 계축문화사. pp 93-95, 166-167, 1984.
 17. 이정수, 김병탁, 금병탁. 柴岑湯이 高血壓 및 高脂血症에 미치는 影響. 대전대학교 한의학연구소 논문집 10: 319-332, 1997.
 18. 손지영, 이성근, 이기상, 박준영, 윤효진. 대상포진 후 신경통 환자의 시령탕(柴領湯) 치험 1례. 동의생리병리학회지 20(6):1779-1784, 2006.
 19. 안규석, 김광호. 시령탕이 Thioacetamide에 의한 白鼠肝損傷에 미치는 影響. 경희한의대논문집 6(1):17-32, 1983.
 20. 김길환. 柴岑湯이 Galactosamine에 의한 흰쥐의 肝毒性에 미치는 影響. 동의생리병리학회지 11(2):121-130, 1996.
 21. 최현, 박호식. Galactosamine의 肝損傷에 對한 加味柴岑湯의 效果에 關한 研究. 원광한의대논문집 6(1):67-87, 1989.
 22. Sun, M., Zigman, S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem.* 90(1):81-89, 1978.
 23. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126, 1984.
 24. 이정규, 최종원, 김혜경, 한용남. 홍삼 산성다당체의 생리활성 연구(II)- 알코올성 고지혈증에 미치는 영향. 고려인삼학회지. 23(1):8-12, 1999.
 25. 서부일, 박지하, 최홍식, 김승모, 구덕모, 김미려, 박진현. 은복과 한약재 복합물이 알콜 투여로 유발된 흰쥐의 고지혈증과 간 손상의 예방에 미치는 영향. 대한본초학회지 23(1):9-15, 2008.
 26. Castelli, W.P., Garrison, R.J., Wilson, P.W., Abbott, R.D., Kalousdian, S., Kannel, W.B. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA.* 256(20):2835-2838, 1986.
 27. Walker, J.E., Gordon, E.R. Biochemical aspects associated with an ethanol-induced fatty liver. *Biochem J.* 119(3):511-516, 1970.
 28. Hong, H., Johnson P. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in exercised and hypertensive rat tissues. *Int J Biochem Cell Biol.* 27(9):923-931, 1995.
 29. Lieber, C.S. Liver diseases by alcohol and hepatitis C: early detection and new insights in pathogenesis lead to improved treatment. *Am J Addict.* 10: 29-50, 2001.
 30. Wu, D., Cederbaum, A.I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health.* 27(4):277-284, 2003.
 31. Panda, V., Ashar, H., Srinath, S. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Garcinia indica* fruit rind in ethanol-induced hepatic damage in rodents. *Interdiscip Toxicol.* 5(4):207-213, 2012.