



Original Article / 원저

사염화탄소 유도성 급성 간 손상 모델에서 蒲公英 열수 추출물 4종의 간 보호 효능 연구

최범락^{1,2#}, 조일제^{3#}, 정수진⁴, 김재광³, 이대건³, 구세광^{3*}, 박기문^{2**}

¹뉴트라코어, ²성균관대학교 식품생명공학과, ³대구한의대학교 한의과대학,
⁴전북대학교병원 의생명연구소

Protective effects of four types of Taraxaci Herba water extract on carbon tetrachloride-induced acute liver injuries in mice

Beom-Rak Choi^{1,2#}, Il Je Cho^{3#}, Su-Jin Jung⁴, Jae Kwang Kim³, Dae Geon Lee³,
Sae Kwang Ku^{3*}, Ki-Moon Park^{2**}

¹Nutraco Co., Ltd.,

²Department of Foodscience and Biotechnology, Sungkyunkwan
University,

³College of Korean Medicine, Daegu Haany University,

⁴Biomedical Research Institute of Chonbuk National University Hospital

ABSTRACT

Objectives : Present study investigated hepatoprotective effects of four types of Taraxaci Herba water extract (TL-F, Taraxaci Herba leaf originated from foreign country; TR-F, Taraxaci Herba root originated from foreign country; TL-K, Taraxaci Herba leaf originated from Korea; TR-K, Taraxaci Herba root originated from Korea) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced acute liver injury.

Methods : Mice were administered orally with 200 mg/kg of TL-F, TR-F, TL-K, or TR-K for seven days, and intraperitoneally injected with 0.5 mL/kg of CCl₄ 1 h after last Taraxaci Herba treatment. Silymarin (100 mg/kg) was used as a positive drug. Body weight gain, relative liver weight, serum biochemistry, histopathological and immunohistochemical analyses, and hepatic antioxidant capacity were determined to investigate the hepatoprotective

© 2020 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

effect of four extracts.

Results : Administration of four types of Taraxaci Herba extract increased body weight gain, and decreased relative liver weight in CCl₄-injected mice. As compared to CCl₄ group, TL-F and TR-F significantly decreased serum aspartate aminotransferase activity, while four extracts reduced CCl₄-induced alanine aminotransferase activity. In addition, TL-F and TR-F significantly decreased the numbers of degenerated hepatocytes, infiltrated inflammatory cells, cleaved caspase-3 positive cells, and cleaved PARP positive cells in hepatic tissues. Moreover, TL-F, TR-F, and TR-K administration reduced the lipid peroxidation and nitrotyrosine, and increased glutathione, superoxide dismutase, and catalase activities in hepatic tissues. There were no statistical differences between TL-F- and silymarin-treated group.

Conclusion : Of four extracts tested, present results suggest that TL-F is the most favorable candidate against CCl₄-induced acute liver injury through enhancing antioxidant activity.

Key words : Acute liver injury, Antioxidant activity, Carbon tetrachloride (CCl₄), Oxidative stress, Taraxaci Herba water extract.

I. 서론

간은 내인적/외인적 물질에 대한 대사와 해독, 알부민을 포함한 다양한 혈장 단백질의 생성을 통한 혈액 항상성 유지, 혈당 조절 등의 기능을 담당하는 주요 장기이다. 특히 간은 물질대사 과정에서 활성산소종 (reactive oxygen species)과 활성질소종 (reactive nitrogen species)을 빈번하게 발생시키며, 정상적인 생리 상태에서는 내인적으로 존재하는 다양한 항산화 물질들과 항산화 방어 시스템의 유도를 통하여 생성된 활성산소종을 효과적으로 제거하여 항상성을 유지한다. 그러나 과도하게 생성된 활성산소종은 산화적 스트레스를 유도하여 세포 내 다양한 생체 분자들의 기능을 저하시켜 간 조직의 손상을 유도할 수 있다¹⁾. 알코올성 간질환, 비알코올성 간질환, 바이러스성 간질환, 지방간, 간섬유화 및 간경화를 포함한 다양한 급만성 간질환의 발병 과정에서 산화적 스트레스의 생성이 주요 병리기전으로 인식되어 산화적 스트레스의 제어가 다양한 급만성 간질환의 발생을 억제할 수 있는 약물 작용점으로 제시되었다. 따라서 항산화 효과가 높은 本草와 方劑를 활용하여 다양한 급만성 간

질환의 예방과 치료를 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다.

사염화탄소 (CCl₄, carbon tetrachloride)는 세탁 시 용제, 냉방기기의 냉매 또는 소화기에 사용되어 왔던 유기용매로써 인체와 실험동물에서 급만성 간질환을 유도할 수 있는 대표적인 독성 물질 중 하나로 알려진 화합물이다²⁾. 인체에 유입된 CCl₄는 간 실질 세포 내 소포체에 존재하는 cytochrome P450 2E1에 의하여 trichloromethyl 라디칼 (radical)로 전환되며 세포 내 핵산, 단백질, 지질 등의 생체 분자와 공유 결합을 형성하여 지질 대사를 포함한 다양한 세포 내 대사과정을 교란한다. 더불어 trichloromethyl 라디칼은 간 조직 내에서 산소와 반응하여 trichloromethylperoxy 라디칼로 빠르게 전환되어 세포 내 산화적 스트레스를 통한 손상을 가속화시킨다³⁾. 따라서 CCl₄는 cytochrome P450 2E1이 많이 분포하고 있는 간 조직의 zone 3 영역부터 불포화 지방산의 과산화를 촉진하여 세포막을 붕괴시키고 다양한 생체 분자의 기능을 저하시켜 간 실질세포의 손상과 괴사를 유도하는 것으로 보고되었다⁴⁾.

#B.-R. Choi and I. J. Cho contributed equally to this work.

*Corresponding author : Sae Kwang Ku. Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-819-1549, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : gucci200@hanmail.net

**Corresponding author : Ki-Moon Park. Department of Foodscience and Biotechnology, Sungkyunkwan University, 2066, Seobu-ro, Jangan-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 16419, Republic of Korea.

Tel : +82-31-290-7806, E-mail : Pkm1001@skku.edu

•Received : July 2, 2019 / Accepted : September 17, 2019

蒲公英은 菊花科에 속하는 다년생 草本인 민들레 또는 同屬近緣植物을 봄과 여름에 꽃 피기 전후에 채취하여 晒乾한 藥材이다. 蒲公英은 性이 寒하고, 味가 苦甘하며 肝胃經으로 入하여 清熱解毒, 消腫散結, 利尿通淋의 효능이 있어 疔瘡腫毒, 乳癰, 瘰癧, 目赤, 肺癰, 腸癰, 濕熱黃疸, 熱淋澀痛 병증의 치료에 활용되어 왔다⁵⁾. 또한 蒲公英은 《醫宗金鑑》에 出典하는 五味消毒飲의 구성 本초로써 金銀花, 野菊花, 紫花地丁, 紫背天葵子과 함께 內腹 또는 外用하여 清熱解毒 효능으로 疔瘡 및 疔毒에 사용된다⁶⁾. 동물수준에서의 연구를 통하여 蒲公英 추출물이 급성 간 손상^{7,8)}, 알코올성 간 손상⁹⁾, 대사성 간 손상과^{10,11)} 간섬유화 모델에서¹²⁾ 간 보호 효능이 있음이 보고되었다. 그러나 蒲公英을 급만성 간질환과 관련된 食醫藥 복합제제의 구성 藥물 중 하나로써 활용하기 위해서는 표준 대조 藥물과의 효능 비교 연구와 더불어 시료 또한 실험실 수준에서의 소량 추출이 아닌 상업화가 가능한 대량으로 추출된 표준시료를 활용한 연구가 수반되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 CCl₄ 유도성 급성 간 손상모델을 활용하여 상업적으로 활용 가능한 표준화된 4종의 蒲公英 열수 추출물의 간 보호 효능을 silymarin과 비교함으로써 蒲公英 추출물을 급만성 간질환의 치료 및 예방과 관련된 후보 소재로서의 가능성을 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 蒲公英 열수 추출물 및 시약

국산 蒲公英 잎 (TL-K, Taraxaci leaf-Korea), 국산 蒲公英 뿌리 (TR-K, Taraxaci root-Korea), 외산 蒲公英 잎 (TL-F, Taraxaci leaf-foreign country) 및 외산 蒲公英 뿌리 (TR-F, Taraxaci root-foreign country) 열수 추출물 각 25 kg을 PHYTONUTRIMEDI (Jeonju, Korea)에서 구입하였다. Cleaved caspase-3 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), cleaved poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), nitrotyrosine 항체는 Millipore (Temecula, CA, USA), 4-hydroxynonenal 항체는 Abcam (Cambridge, UK)에서 각각 구입하였으며, Vectastain Elite ABC kit와 peroxidase substrate kit는 Vector Lab (Burlingame, CA,

USA)에서 구입하였다. Silymarin, CCl₄, thiobarbituric acid, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), H₂O₂, nitroblue tetrazolium 및 hematoxylin-eosin을 포함한 분석용 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 실험동물의 사육과 시험물질의 처치

동물실험은 대구한의대학교의 동물실험윤리위원회의 허가를 받아 동물실험윤리규정을 준수하여 실행되었다 (연구윤리 승인번호, DHU2016-078). SPF/VAF Outbred CrljOri:CD1 (ICR) 6주령 수컷 마우스를 오리엔트 바이오 (Seongnam, Korea)로부터 공급받아 온도 20-25°C, 습도 40-60%와 12시간 간격의 밤낮 주기를 일정하게 유지시킨 환경에서 1주일간 순화시킨 후 시험물질 투여 전날 체중을 기준으로 총 7개군 (N=10/group)으로 분리하였다. 蒲公英 추출물과 silymarin의 투여 용량은 선행 연구에 근거하여 설정하였다^{10,12,13)}. 멸균 증류수에 용해한 4종의 蒲公英 추출물 (각 200 mg/kg)과 silymarin (100 mg/kg)을 매일 1회씩 총 7일간 경구 투여하였으며, 마지막 시험물질 투여 1시간 후에 olive oil에 희석한 CCl₄ (0.5 mL/kg)를 복강 투여하여 급성 간 독성을 유발하였다. Vehicle 그룹은 멸균 증류수와 olive oil만을 경구와 복강으로 각각 투여하였다. 모든 실험동물은 CCl₄ 투여 24시간 후에 isoflurane (Hana Pharm., Hwasung, Korea) 흡입으로 희생시켜 혈액과 간 조직을 획득하였다.

3. 체중 변화량 (weigh gain) 및 간 상대중량비 (relative liver weight ratio)의 측정

모든 실험동물은 실험 시작과 종료 12시간 전부터 모든 실험동물을 절식 시킨 후 (물은 제외), 최초 시험물질 투여 직전과 실험 종료 후 실험동물의 무게를 자동 전자저울 (Precisa Instrument, Zuerich, Switzerland)로 측정하여 체중 변화량을 계산하였으며, 실험동물을 희생시킨 후 획득한 간 조직의 무게를 실험동물의 무게로 나누어 간 상대중량비를 계산하였다.

4. Aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 활성 측정

실험동물로부터 획득한 혈액으로부터 혈청을 분리하고, 혈청 중 AST와 ALT 활성은 자동화된 혈액분

석기를 이용하여 측정하였다 (DriChem NX500i; Fuji Medical System, Tokyo, Japan).

5. 조직학적 분석과 면역조직화학 분석

간 조직에 대한 조직학적 분석과 면역조직화학 분석은 기확립된 방법에 따라 수행하였다¹⁴⁾. 간략하게, 좌측 외좌엽 (left lateral lobe)을 formalin 고정, paraffin 포매, 및 3-4 μm 의 크기로 절편하고 hematoxylin-eosin으로 염색하였다. 간 실질세포 (1000 개) 중 괴사, 지방축적 및 중창 소견을 보이는 변성 간 실질세포의 수와 간 실질부 (1 mm^2)에 침윤된 염증세포의 수를 광학현미경 (Nikon, Tokyo, Japan) 하에서 이미지 분석 소프트웨어 (iSolution FL ver 9.1, IMT iSolution; Vancouver, Quebec, Canada)를 이용하여 측정하였다. 간 조직 자체의 peroxidase 활성을 0.3% H_2O_2 가 포함된 메탄올을 이용하여 제거하고 10 mM citrate buffer (pH 6.0)에서 antigen retrieval을 수행한 후 normal horse serum을 이용하여 간 조직 중 비특이적 항체 반응을 억제하였다. 간 조직에 1차 항체를 첨가하여 4°C에서 12시간 이상 반응시킨 후 biotin이 결합된 2차 항체와 반응시켰다. 반응이 종료된 간 조직은 ABC reagent와 peroxidase substrate kit (Vector Lab)를 이용하여 상온에서 3분간 발색하였다. 간 실질세포 (1000 개) 중 20% 이상의 강도로 염색된 세포를 면역반응 양성세포로 판정하여 이미지 분석 소프트웨어를 이용하여 그 수를 측정하였다.

6. 지질과산화 측정

분리된 간 조직을 0.01 M Tris-HCl (pH 7.4) 용액 하에서 파쇄하고, 12,000 $\times g$ 에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 간 균질액 중 지질과산화 정도는 thiobarbituric acid를 이용하여 생성된 malondialdehyde의 양을 525 nm에서의 흡광도를 측정하여 분석하였으며, 간 균질액의 총 단백질 함량으로 보정하였다¹⁵⁾.

7. 항산화능 분석

간 조직 중 glutathione (GSH)의 함량은 간 균질액에 25% trichloroacetic acid를 첨가하여 얻은 상층액과 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)를 반응시킨

후 412 nm에서의 흡광도를 측정하여 분석하였다¹⁶⁾. 간 균질액 중 superoxide dismutase (SOD) 활성은 Sun 등 (1988)¹⁷⁾의 방법에 따라 xanthine과 xanthine oxidase에 의하여 생성된 라디칼과 nitroblue tetrazolium이 반응하여 생성된 formazan을 560 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였으며, SOD 1 U은 1분 동안 초기 nitroblue tetrazolium의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다. Catalase 활성은 Aebi (1974)¹⁸⁾의 방법에 따라 H_2O_2 분해능을 240 nm에서 흡광도로 측정하였으며, catalase 1 U은 25°C, pH 7.8 조건에서 1분 동안 1 nM의 H_2O_2 를 분해하는 효소의 양으로 정의하였다. 간 균질액 중 catalase와 SOD 활성은 총 단백질 함량으로 보정하여 specific activity를 결정하였다.

8. 통계적 검증

모든 데이터는 mean \pm SD로 표기하였으며, 각 그룹간 통계적 유의성은 일원배치 분산분석을 수행한 후, 등분산 가정의 성립 여부에 따라 Fisher's least significant difference test 또는 Dunnett T3 test로 사후 검정하였다. 각 그룹간 통계적 유의성은 P 값이 0.05 또는 0.01 미만을 기준으로 검정하였다.

III. 실험 결과

1. CCl_4 에 의한 급성 간 손상 동물에서 蒲公英 추출물 4종의 투여가 체중 및 간 증량에 미치는 영향

4종의 蒲公英 추출물의 간 보호 효능을 비교 연구하기 위하여 ICR 마우스에 7일간 매일 1회씩 200 mg/kg의 농도로 경구 투여하고, 마지막 蒲公英 추출물 투여 1시간 후 0.5 mL/kg의 CCl_4 를 복강 투여하였다. 대조 약물로써 100 mg/kg silymarin을 7일간 매일 경구 투여하였으며, CCl_4 투여 24시간 후에 동물을 희생하였다. 최초 4종의 蒲公英 추출물 또는 silymarin 투여 전 실험동물의 체중과 실험 종료 후 실험동물의 체중을 비교하여 얻은 실험동물의 증체량의 변화에 있어 CCl_4 그룹은 vehicle 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하게 증체량의 감소를 보였으며, 7일간의 4종의 蒲公英 추출물 또는 silymarin 투여는 CCl_4 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하게 증체량의 감소를 억제하였다. 4종의 蒲公英 추출물과 silymarin 투여 그룹과의 간증체량 변화는 통계적으

로 인정되지 않았다 (Figure 1A). CCl₄ 투여는 급성 간 손상에 의하여 간 상대증량비를 vehicle 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 蒲公英 추출물 또는 silymarin 투여는 CCl₄에 의한 간 상대

증량비의 증가를 통계적으로 유의하게 억제하였다. 특히 TL-F와 TR-F의 투여에 의한 간 상대증량비의 변화는 silymarin 투여 그룹과 통계적으로 대등하였다 (Figure 1B).

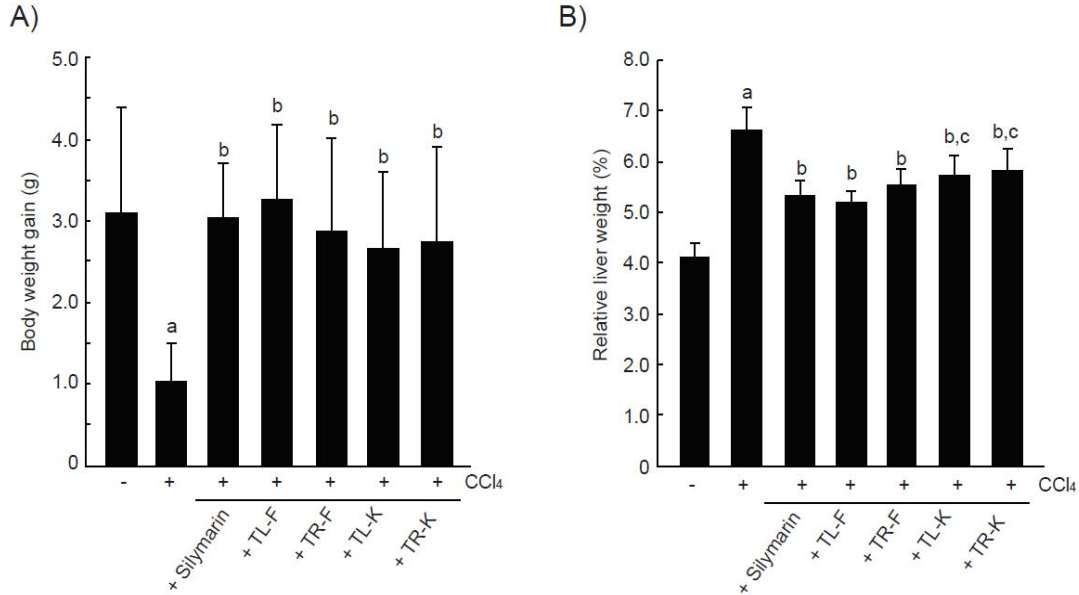


Figure 1. The effects of four types of Taraxaci Herba extract on body weight gain and relative liver weight in CCl₄-injected mice. Body weight gain (A) and relative liver weight (B) were measured as described in method sections. All values are expressed as the mean \pm SD of ten mice (^a $P < 0.01$ versus vehicle-treated group; ^b $P < 0.01$ versus CCl₄-treated group; ^c $P < 0.01$ versus CCl₄ + silymarin-treated group).

2. CCl₄에 의한 급성 간 손상 동물에서 蒲公英 추출물 4종의 투여가 AST와 ALT 활성에 미치는 영향
선행 연구와 유사하게¹⁴⁾, CCl₄의 투여는 급성 간 손상의 혈액학적 지표인 AST와 ALT 활성을 vehicle 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가시켰다. 4종의 蒲公英 추출물 또는 silymarin 투여는 CCl₄에 의하여 증가한 혈청 내 AST 활성을 모두 감소시키는 경향을 나타내었으나, silymarin, TL-F, TR-F 투여

에 의한 AST 활성 감소만이 CCl₄ 투여 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하였다. Silymarin 그룹과 비교하여 TL-F와 TR-F 투여에 의한 AST 감소는 통계적으로 대등하였다 (Figure 2A). 4종의 蒲公英 추출물 또는 silymarin 투여는 CCl₄에 의하여 증가한 ALT 활성을 모두 통계적으로 유의하게 감소시켰으며, TL-F의 투여는 silymarin 투여 그룹보다 더 낮은 ALT 활성을 나타내었다 (Figure 2B).

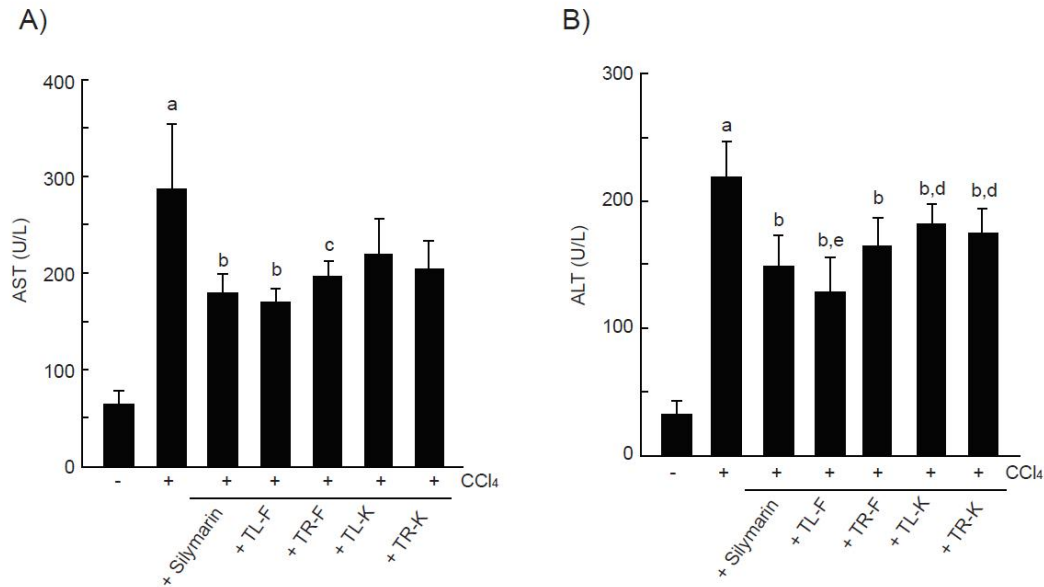


Figure 2. The effects of four types of Taraxaci Herba extract on liver function in CCl₄-injected mice. Serum AST (A) and ALT (B) activities were measured using an automated blood chemistry analyzer. All values are expressed as the mean \pm SD of ten mice (^a $P < 0.01$ versus vehicle-treated group; ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$ versus CCl₄-treated group; ^d $P < 0.01$, ^e $P < 0.05$ versus CCl₄ + silymarin-treated group).

3. CCl₄에 의한 급성 간 손상 동물에서 蒲公英 추출물 4종의 투여가 간 조직의 형태학적 변화에 미치는 영향

선행 연구와 유사하게¹⁴⁾, hematoxylin-eosin으로 염색한 간 조직에 대한 조직병리학적 관찰을 통하여 CCl₄ 투여가 간 실질세포의 공포화, 간 실질세포 내 지방산물의 축적, 종창 및 염증세포의 침윤을 동반한 소엽 중심성 괴사를 확인하였으며, 4종의 蒲公英 추출물과 silymarin 투여는 CCl₄ 투여에 의한 소엽 중심성 괴사를 현저하게 억제하였다 (Figure 3A). 특히 조직 형태학적 정량 연구를 통하여 CCl₄ 투여에 의하여 간 조직 내 변성 간 실질세포의 수와 염증세포의

침윤이 통계적으로 유의하게 증가함을 확인하였으며, silymarin, TL-F 및 TR-F의 투여는 CCl₄에 의하여 증가한 변성 간 실질세포의 수를 통계적으로 유의하게 감소시켰다. TL-F와 TR-F의 투여에 의한 변성 간 실질세포의 수 감소는 silymarin 투여 그룹과 통계적으로 대등하였다 (Figure 3B, upper). 더불어 silymarin, TL-F, TR-F 및 TR-K의 투여는 CCl₄에 의하여 증가한 간 실질부에 침윤된 염증세포의 수를 통계적으로 유의하게 감소시켰으며, TL-F 투여에 의한 염증세포의 수 감소는 silymarin 투여 그룹과 통계적으로 대등하였다 (Figure 3B, lower).

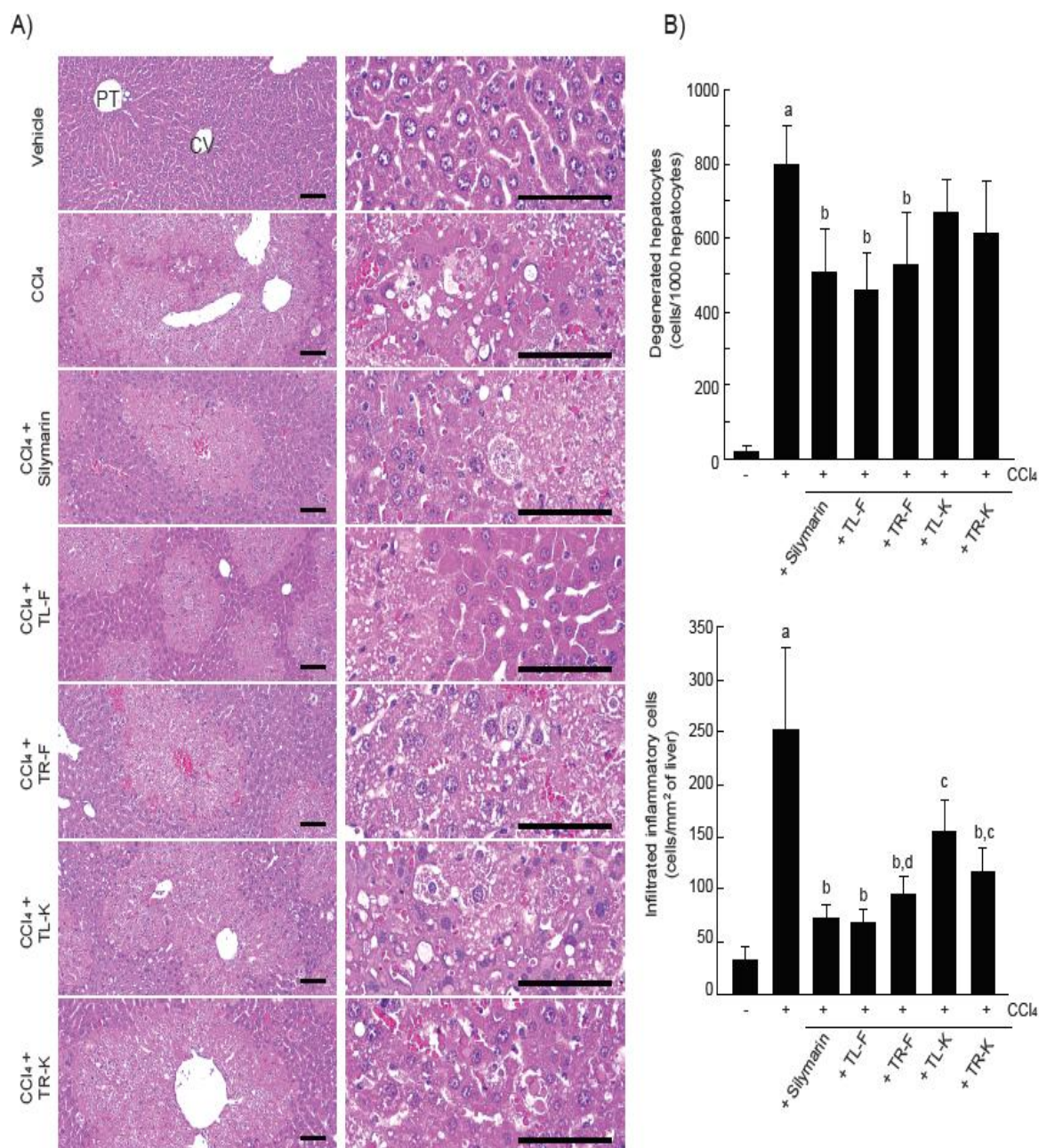


Figure 3. Histopathological analysis. (A) The liver tissues were stained with hematoxylin–eosin. Scale bars indicate 120 μ m. (B) The effects of four types of Taraxaci Herba extract on hepatocyte degeneration (upper) and inflammatory cells infiltration (lower) in CCl₄-injected mice. All values are expressed as the mean \pm SD of ten mice (^a*P* < 0.01 versus vehicle-treated group; ^b*P* < 0.01 versus CCl₄-treated group; ^c*P* < 0.01, ^d*P* < 0.05 versus CCl₄ + silymarin-treated group). CV = central vein; PT = portal triad.

4. CCl₄에 의한 급성 간 손상 동물에서 蒲公英 추출물 4종의 투여가 간 실질세포의 자멸사와 간 조직 내 산화적 스트레스에 미치는 영향

蒲公英 추출물 4종의 간 보호 효능에 산화적 스트레스의 억제를 통하여 간 조직을 보호하는지 확인하기 위하여 세포자멸사 및 산화적 스트레스와 관련된 지표들에 대한 면역조직화학 분석을 수행하였다. 선행 연구와 유사하게¹⁴⁾, CCl₄의 투여는 간 조직 내 cleaved caspase-3, cleaved PARP, nitrotyrosine 및 4-hydroxynonenal 양성세포의 수를 증가시켰다. TL-F, TR-F, TR-K 및 silymarin 투여는 CCl₄에 의하여 증가한 간 조직 내 이들 양성세포의 수를 통계적으로 유의하게 감소시켰으며, TL-K의 투여에 의해서는 cleaved caspase-3와 4-hydroxynonenal 양성세포의 수 감소만이 통계적으로 유의하였다. 더불어 TL-F 투여 그룹만이 silymarin 투여 그룹과 비교하여 관찰한 모든 면역조직화학 지표들이 통계적으

로 동등하였다 (Figure 4).

4종의 蒲公英 추출물 투여에 의한 항산화능의 변화를 연구하기 위하여 간 조직 내 지질과산화 정도와 더불어 대표적인 항산화 시스템인 GSH 함량 및 SOD와 catalase 활성을 측정하였다. 4-Hydroxynonenal 면역조직화학 결과와 일치하게 CCl₄의 투여는 간 조직 내 지질과산화를 증가시켰으며, GSH, SOD 및 catalase 활성을 통계적으로 유의하게 감소시켜 간 조직 내 산화적 스트레스가 증가하였음을 확인하였다. 그러나 4종의 蒲公英 추출물과 silymarin은 모두 CCl₄에 의하여 증가한 지질과산화와 GSH, SOD 및 catalase 활성 감소를 통계적으로 유의하게 억제하였다. 특히 TL-F, TR-F 및 TR-K 투여에 의한 이들 인자들의 변화는 모두 silymarin 투여 그룹과 비교하여 대등하였으며, TL-K 투여 그룹의 경우 SOD 활성의 증가만이 silymarin 투여 그룹과 비교하여 대등하였다 (Table 1).

Table 1. The effect of four types of Taraxaci Herba extract on hepatic antioxidant system in CCl₄-injected mice

	Lipid peroxidation (nM MDA/mg protein)	GSH contents (nM/mg protein)	SOD activity (U/mg protein)	Catalase activity (U/mg protein)
Vehicle	1.56 ± 0.92	41.07 ± 10.06	421.81 ± 144.55	249.90 ± 116.39
CCl ₄	8.65 ± 1.50 ^a	3.13 ± 1.19 ^a	59.79 ± 25.75 ^a	45.69 ± 15.57 ^a
CCl ₄ + silymarin	6.04 ± 1.22 ^b	17.73 ± 3.79 ^b	183.15 ± 80.63 ^b	133.64 ± 30.11 ^b
CCl ₄ + TL-F	5.55 ± 0.99 ^b	22.18 ± 3.77 ^b	203.88 ± 38.09 ^b	149.19 ± 31.56 ^b
CCl ₄ + TR-F	6.39 ± 0.75 ^b	16.20 ± 3.85 ^b	164.17 ± 34.50 ^b	114.14 ± 36.43 ^b
CCl ₄ + TL-K	7.03 ± 0.92 ^{b,e}	9.79 ± 4.39 ^{c,d}	108.33 ± 31.05 ^c	83.27 ± 23.91 ^{c,e}
CCl ₄ + TR-K	6.68 ± 0.81 ^b	12.37 ± 4.03 ^b	121.66 ± 25.97 ^b	108.33 ± 23.82 ^b

All values are expressed as the mean ± SD of ten mice (^a*P* < 0.01 versus vehicle-treated group;

^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.05 versus CCl₄-treated group; ^d*P* < 0.01, ^e*P* < 0.05 versus CCl₄ + silymarin-treated group).

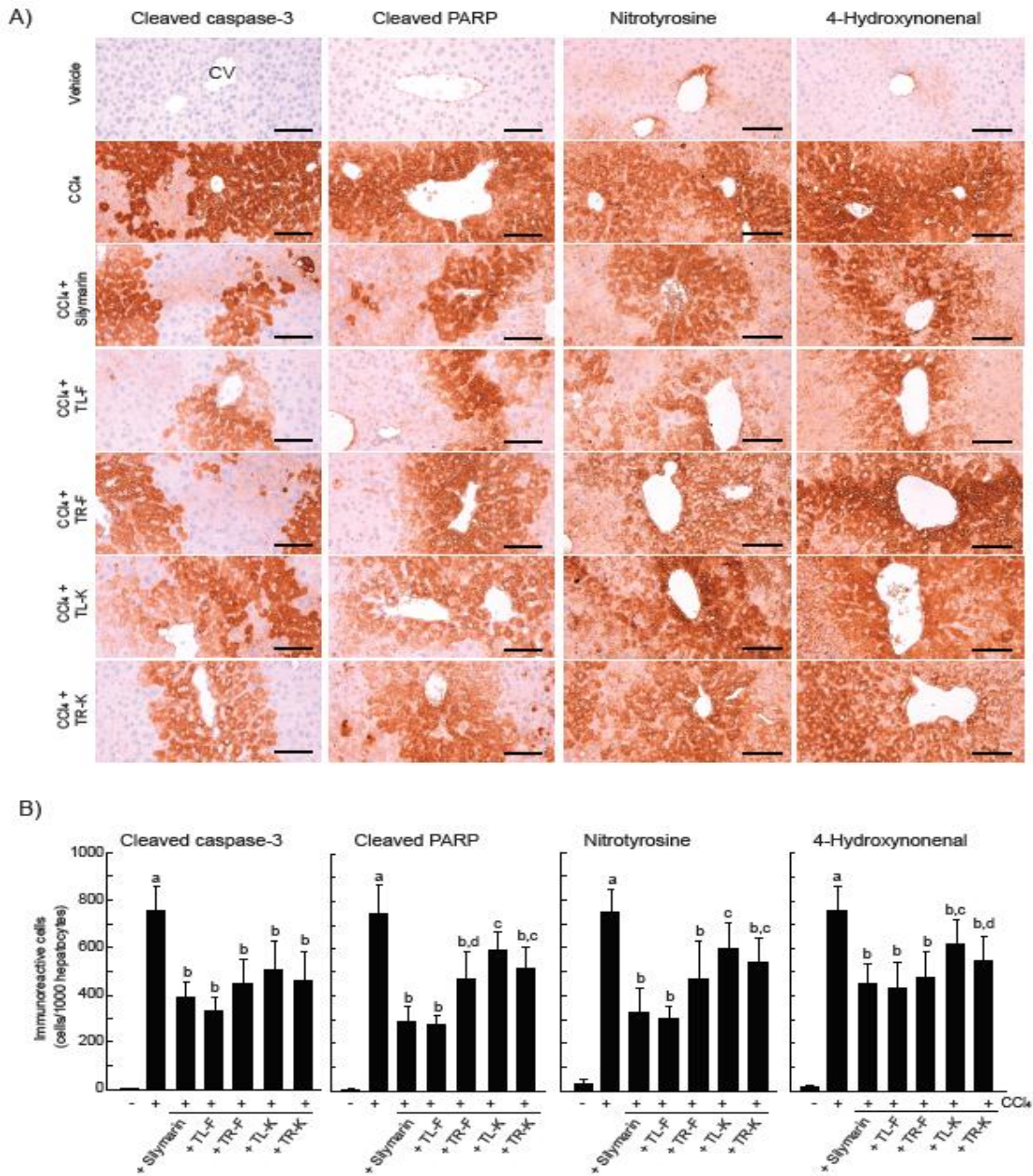


Figure 4. The effects of four types of Taraxaci Herba extract on hepatocyte apoptosis and oxidative stress in CCl₄-injected mice. (A) Liver sections were stained using cleaved caspase-3, cleaved PARP, nitrotyrosine, and 4-hydroxynonenal antibodies. Scale bars indicate 120 μm. (B) The hepatocytes occupied by over 20% of immunoreactivity were counted as number of immunoreactive cells. All values are expressed as the mean ± SD of ten mice (^a*P* < 0.01 versus vehicle-treated group; ^b*P* < 0.01 versus CCl₄-treated group; ^c*P* < 0.01, ^d*P* < 0.05 versus CCl₄ + silymarin-treated group). CV = central vein.

IV. 고찰

세계 약 2,000여종의 민들레 중 국내에는 흰민들레 (*Taraxacum coreanum* Nakai), 서양민들레 (*T. officinale* (L.) Weber ex F.H.Wigg), 민들레 (*T. platycarpum* Dahst.), 산민들레 (*T. ussuriense* Kom), 한라민들레 (좁민들레) (*T. hallaisanense* Nakai)의 5종이 자생하는 것으로 보고되었으며^{19,20}, 비휴면성과 자가수정을 통한 번식 적응도가 높은 귀화종인 서양민들레가 우점종이다²¹. 세포 및 동물수준에서의 의과학적 연구를 통하여 蒲公英 추출물이 항산화²², 항암²³, 기억력 개선²⁴, 항당뇨²⁵, 항알레르기²⁶, 항염 효능을²⁷ 가지고 있음이 보고되었으며, 다양한 급만성 간 질환에 대한 간 보호 효과 또한 규명되었다⁷⁻¹². 그러나 기원종, 약용 부위, 산지, 채취 시기, 추출 용매, 추출 방법 및 추출 조건에 따라 추출물 내 함유된 활성 성분들의 종류와 함량에 차이가 있을 것으로 추정되어 蒲公英 추출물을 상업적으로 활용하기 위해서는 대량으로 확보 가능한 표준화된 소재를 중심으로 효능 연구가 반드시 수반되어야 한다.

본 연구에서는 간질환 치료와 예방을 위한 신규 복합 약물 개발의 일환으로 CCl₄로 유도된 급성 간 손상 동물모델에서 표준화된 蒲公英 열수 추출물 4종의 간 보호 효능을 연구하여 4종의 추출물 중 TL-F가 silymarin과 대등한 간 보호 효능을 나타냄을 규명하였다. Schütz 등 (2005)은 서양민들레 (*T. officinale*) 잎이 뿌리에 비하여 phenolic acid류와 flavonoid류 화합물들을 더 많이 함유하고 있는 것으로 보고하였으며²⁸, 특히 잎에 chicoric acid, chlorogenic acid 및 monocafeoyltartaric acid를 포함하는 hydroxycinnamic acid 유도체류와 luteolin, isorhamnetin, quercetin 및 apigenin을 포함하는 flavonoid류 화합물의 배당체 등이 함유되어 있음을 보고하였다²⁹. 따라서 자생지, 채취 시기 및 추출 조건 등에 따라 4종의 蒲公英 열수 추출물에 함유된 유효성분들의 함량이 상이하여 각 추출물의 투여에 따른 간 보호 효능에 차이가 발생한 것으로 추정되며, TL-F의 우수한 간 보호 효능과 관련된 유효성분들의 함량 및 핵심적인 역할을 담당하는 유효성분을 규명하는 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

CCl₄는 급만성 간질환을 유도하기 위해 실험동물에 사용되는 대표적인 간 독성 물질로써 간 조직의 비

대, 지질 대사 변화를 통한 지질 산물의 축적, 간 조직 내 산화적 스트레스를 통한 간 실질세포의 변성과 사멸을 유도하고, 염증세포 침윤을 통한 간염을 유발한다^{4,14}. 더불어 CCl₄의 반복 투여는 간 실질세포의 사멸과 염증의 반복으로 간 정상세포의 활성화를 통한 간 조직 내 세포외 기질의 축적을 초래하여 간섬유화를 유도하는 것으로 보고되었다¹². 본 연구에서도 vehicle 투여 그룹과 비교하여 0.5 mL/kg의 CCl₄ 투여에 의하여 증체량이 감소하고 간 조직의 비대를 통한 간 상대중량비가 증가함을 확인하였다. 더불어 조직형태학, 혈액생화학 및 면역조직화학 분석을 통하여 간 조직 내 변성 간 실질세포의 수, 침윤된 염증세포의 수, cleaved caspase-3 및 cleaved PARP 양성세포의 수가 증가하였으며, 혈액으로 유리된 AST와 ALT 활성이 증가하여 CCl₄에 의하여 급성 간 손상이 유도되었음을 확인하였다. 비록 TL-K와 TR-K의 투여 그룹의 경우, AST 활성과 변성 간 실질세포의 수에서 CCl₄ 그룹과 비교하여 통계적 유의성을 나타내지 못하였지만, 蒲公英 열수 추출물 4종은 모두 CCl₄에 의한 유도된 급성 간 손상과 관련된 지표들을 억제하여 간 보호 효능이 있음을 확인하였다. 또한 TL-F 투여 그룹에서의 모든 간 보호 효능과 관련된 지표들의 변화는 양성 대조약물인 silymarin과 비교하여 대등하였다.

CCl₄는 간 조직 내 내인적 항산화 시스템과 활성산소종 (또는 활성질소종) 생성 사이의 불균형에 기반한 산화적 스트레스에 의하여 급성 간 손상을 유도한다. 본 연구에서도 선행 연구결과와 유사하게¹⁴, CCl₄ 투여 그룹에서 간 조직 내 4-hydroxynonenal과 malondialdehyde와 같은 지질과산화물의 증가와 더불어 활성질소종이 세포 내 단백질과의 공유결합으로 생성되는 nitrotyrosine 을 포함하는 양성세포의 수를 증가시켰으며, 반면에 내인적 항산화 물질인 환원형 GSH와 내인적 항산화 효소인 SOD와 catalase의 활성을 감소시켜 산화적 스트레스가 유도되었음을 확인하였다. 본 연구에서는 TL-K 투여 그룹에서의 nitrotyrosine 양성세포의 수를 제외하고 CCl₄ 투여에 의하여 유도된 산화적 스트레스를 4종의 蒲公英 열수 추출물 투여에 의하여 억제됨을 규명하였다. 더불어 본 연구에서 관찰한 모든 산화적 스트레스와 관련된 지표들의 억제 효능에 있어 TL-F 투여 그룹의 변화들은 양성 대조약물인 silymarin 투여 그룹과 대등하였다. 따라

서 이상의 결과를 통하여 蒲公英 열수 추출물들이 산화적 스트레스의 억제를 매개로 CCl₄에 의하여 유도된 급성 간 손상으로부터 간 조직을 보호하는 효능을 갖는 것으로 생각된다. 향후 상업화를 위한 다양한 후속 연구가 지속적으로 이루어진다면 급만성 간질환 치료 및 예방을 위한 方劑의 신규 藥材 또는 천연물 복합제제를 구성하는 구성 藥材의 하나로써 蒲公英을 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결론

본 연구에서는 CCl₄로 유도한 간 손상 모델에서 蒲公英 열수 추출물 4종의 간 보호 효능을 대조약물인 silymarin과 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 7일 동안의 蒲公英 열수 추출물 (TL-F, TR-F, TL-K 및 TR-K) 4종의 투여는 CCl₄에 의한 증체량의 감소와 간 상대중량비의 증가를 통계적으로 유의하게 억제하였다.
2. TL-F와 TR-F의 투여는 CCl₄에 의한 혈중 AST와 ALT 활성 증가를 통계적으로 유의하게 억제하였으며, TL-K와 TR-K는 ALT 활성 증가만을 억제하였다.
3. TL-F와 TR-F의 투여는 CCl₄에 의한 간 조직 중 변성된 간 실질세포, 침윤된 염증세포의 수, cleaved caspase-3와 cleaved PARP 양성세포의 수를 통계적으로 유의하게 억제하였다. TL-K의 투여는 cleaved caspase-3 양성세포의 수만을 억제하였으며, TR-K의 투여는 cleaved caspase-3와 cleaved PARP 양성세포의 수를 억제하였다.
4. TL-F, TR-F 및 TR-K의 투여는 CCl₄에 의한 간 조직 중 nitrotyrosine 양성세포의 수, 4-hydroxynonenal 양성세포의 수, lipid peroxidation의 증가와 GSH, SOD, 및 catalase의 감소를 통계적으로 유의하게 억제하였으며, TL-K의 투여는 nitrotyrosine 양성세포의 수를 제외한 모든 변화를 억제하였다.
5. TL-F 투여 그룹은 silymarin 투여 그룹보다 혈중 ALT 활성을 통계적으로 유의하게 감소시켰으며, 이외의 모든 간 보호 효능은 silymarin 투여 그룹과 대등하였다.

이상의 결과를 통하여 4종의 蒲公英 열수 추출물들

이 CCl₄에 의하여 유도된 산화적 스트레스를 억제하여 간 조직을 보호하는 효능이 있음을 확인하였으며 이 중 TL-F의 간 보호 효능이 가장 우수함을 제시하였다. 향후 다양한 후속 연구가 지속적으로 이루어진다면 급만성 간질환 치료 및 예방을 위한 方劑의 신규 가미 藥材 또는 천연물 복합제제의 구성 藥材의 하나로써 蒲公英을 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2019년도 한국연구재단 (2018R1A5A2025272)의 연구개발비 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2014;20:8082-91.
2. Rechnagel RO, Glende EA Jr. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1973;2:263-97.
3. Packer JE, Mahood JS, Mora-Arellano VO, Slater TF, Willson RL, Wolfenden BS. Free radicals and singlet oxygen scavengers: reaction of a peroxy-radical with beta-carotene, diphenyl furan and 1,4-diazobicyclo (2,2,2)-octane. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;98:901-6.
4. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* 2003;33:105-36.
5. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine School. *Herbology.* Seoul:Younglimsa. 2008:243-5.
6. Korean Medicine University Herbal Prescription Professors. *Herbal Prescription.* Seoul:Younglimsa. 2009:589-590.
7. Colle D, Arantes LP, Gubert P, da Luz SC, Athayde ML, Teixeira Rocha JB, et al. Antioxidant properties of *Taraxacum officinale* leaf

- extract are involved in the protective effect against hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. *J Med Food*. 2012;15:549–56.
8. Park CM, Cha YS, Youn HJ, Cho CW, Song YS. Amelioration of oxidative stress by dandelion extract through CYP2E1 suppression against acute liver injury induced by carbon tetrachloride in Sprague–Dawley rats. *Phytother Res*. 2010;24:1347–53.
 9. You Y, Yoo S, Yoon H–G, Park J, Lee Y–H, Kim S, et al. *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol–induced oxidative stress. *Food Chem Toxicol*. 2010;48:1632–7.
 10. Davaatseren M, Hur HJ, Yang HJ, Hwang J–T, Park JH, Kim H–J, et al. Dandelion leaf extract protects against liver injury induced by methionine– and choline–deficient diet in mice. *J Med Food*. 2013;16:26–33.
 11. Davaatseren M, Hur HJ, Yang HJ, Hwang J–T, Park JH, Kim H–J, et al. *Taraxacum officinale* (dandelion) leaf extract alleviates high–fat diet–induced nonalcoholic fatty liver. *Food Chem Toxicol*. 2013;58:30–6.
 12. Domitrović R, Jakovac H, Romić Z, Rahelić D, Tadić Z. Antifibrotic activity of *Taraxacum officinale* root in carbon tetrachloride–induced liver damage in mice. *J Ethnopharmacol*. 2010;130:569–77.
 13. Wang R, Feng X, Zhu K, Zhao X, Suo H. Preventive activity of banana peel polyphenols on CCl₄–induced experimental hepatic injury in Kunming mice. *Exp Ther Med*. 2016;11:1947–54.
 14. Park SM, Kim SW, Jung EH, Ko HL, Im CK, Lee JR, et al. *Sipjeondaebo–tang* alleviates oxidative stress–mediated liver injury through activation of the CaMKK2–AMPK signaling pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018;2018:8609285.
 15. Jamall IS, Smith JC. Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxidase dismutase and lipid peroxidation in the rat heart: a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1985;80:33–42.
 16. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein–bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968;25:192–205.
 17. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988;34:497–500.
 18. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU. *Methods in Enzymatic Analysis*. New York:Academic Press. 1974:673–86.
 19. Lee YN. *New Flora of Korea*. Seoul:Kyohaksa. 1998:866.
 20. Jung BS, Kim IH. *Illustrated natural drugs encyclopedia*. Seoul:Namsandang. 1984:77.
 21. Park HW, Park IK. Distribution of *Taraxacum* in the western area of Kyonggido, Korea. *J Ecol Field Biol*. 1997;20:1–8.
 22. Kim HW, Kim BJ, Lim SH, Kim HY, Lee SY, Cho SI, et al. Anti–oxidative effects of *Taraxaci Herba* and protective effects on human HaCaT keratinocyte. *Kor J Herbology*. 2009;24:103–8.
 23. Seo K–J, Park K–M, Joh S–H, Yang S–J. Effects of *Taraxaci Herba* on cell death in breast cancer cells. *J Korean Obstet Gynecol*. 2015;28:1–14.
 24. Sohn M–K, Shin Y–W. A comparative study of memory improving effects of *Taraxaci herba* on scopolamine–induced amnesia in mouse. *Kor J Herbology*. 2012;27:27–35.
 25. Oh CH, Shin NS, Kwan J, Lee KG, Lee SR, Lee CH. Antidiabetic effect of water extract from *Taraxacum coreanum* Nakai in type II diabetic mice. *Korean J Oriental Physiol Pathol*. 2012;26:707–13.
 26. Jang M–H, Choi J–S, Bae N–Y, Ahn T–W. Effect of TAM (*Taraxacum mongolicum*) on Th2 cytokine production in MC/9 mast cells. *J*

- Sasang Constitutional Medicine. 2012;24:54-65.
27. Lee M-H, Song S-H, Ham I-H, Bu Y-M, Kim H-C, Choi H-Y. Anti-inflammatory effect and contents from the aerial part and root of the various *Taraxacum* spp. distributed in Korea. Kor J Herbology. 2010;25:77-84.
28. Schütz K, Kammerer DR, Carle R, Schieber A. Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2005;19:179-86.
29. Schütz K, Carle R, Schieber A. *Taraxacum*-A review on its phytochemical and pharmacological profile. J Ethnopharmacol. 2006;107:313-23.