J. Fd Hyg. Safety 15(3), 226–234 (2000)

사염화탄소에 의한 간손상에 미치는 현호색의 효과 및 그 기전

서인옥 · 정춘식 · 정기화†
덕성여자대학교 약학과

Mechanism and Effect of *Corydalis ternata* on the CCl_4-Induced Hepatotoxicity

In-Ok Surh, Choon Sik Jeong and Ki Hwa Jung†
College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

ABSTRACT – Protective effect of *Corydalis ternata* against the carbon tetrachloride-induced toxicity was investigated. Carbon tetrachloride(CCl_4) induces hepatotoxicity due to the reactive free radical($CCl_3 \cdot$) generated by cytochrome P-450 enzyme. We examined effects of hexane, chloroform, butanol and water fractions prepared from the *Corydalis ternata* methanol extract. Rats were treated with those for 3 days, and liver microsomes and cytosols were prepared at 24 hour after last treatment. Hepatoprotective activity of the water fraction was higher than that of other fractions. To examine mechanism of the hepatoprotective effect of *Corydalis ternata*, we measured contents of malondialdehyde(MDA), cytochrome P450(CYP), glutathione, calcium as well as the activities of NADPH-CYP reductase, glutathione S-transferase(GST), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX) and catalase. The fraction inhibited production of MDA, content of CYP and calcium in liver of water fractions - treated rats as compared with those of CCl_4-treated rats. The GST activity was increased. We speculate that the O_2 radical scavenging activities of the water fraction might play a key role in the mechanism opposing the progression of CCl_4-induced hepatotoxicity, but the activities of SOD, GPX, CAT were decreased. These results suggest that the mechanism might be mainly due to the decrease of CYP contents, act as calcium channel blocker and increase of GST activity rather than O_2 radical scavenging activities.

Key worlds □ Carbon tetrachloride, Hepatotoxicity, *Corydalis Tuber*, Cytochrome P450, Calcium channel blocker

현호색(*Corydalis tuber*)은 양귀비꽃과(Papaveraceae)에 속하는 식물로서 들현호색(*Corydalis ternata*) 의 덩이 줄기이다. 현호색은 여러해살이풀로 높이는 약 15 cm정도이다. 땅속줄기는 뻗으면서 곳곳에 여러 개의 둥근 덩이줄기를 생성하며 번식하고 붉은 자색의 꽃이 4월에 핀다.

현호색 methanol extract는 항염증 작용을 나타내며,[1] 현호색의 성분으로 tetrahydropalmatine, protopine, corydaline, dehydrocorydaline 및 hydrastine 등의 alkaloid가 분리 보고되어 있다.[2]

사염화탄소(CCl_4)는 cytochrome P450에 의해서 C-Cl 결합이 깨지면서 trichloromethyl radicals를 생성하고 다시 O_2와 반응하여 trichloromethyl peroxy radicals를 생성한다. 이렇게 생성된 radicals는 세포막의 인지질인 polyenoic fatty acid의 methyl carbon을 공격해서 지질과산화를 야기하여 간세포 괴사를 일으키며, 또한 calcium pump를 불활성화 시킨다.[3] 유해한 free radicals를 방어하는 항산화 효소 체계는 reactive oxigen species를 직접 제거하는 역할을 하는 일차적 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPX)와 체내 환원된 glutathione(GSH)의 양을 증가시키는 역할을 하는 2차적 항산화 효소인 glutathione reductase(GR)와 glucose-6-phospho dehydrogenase(G-6-PD)로 구성된다.

본 연구에서는 현호색의 methanol추출물과 hexane, chloroform, butanol 및 물 분획물에 대한 간 손상 보호효

†Author to whom correspondence should be addressed.

과를 검색하고 유의성 있는 효과를 나타낸 물 분획물을 이용하여 간손상 보호효과와 그 기전을 밝히고자 하였다. 즉 현호색이 간손상에 미치는 영향을 보기 위하여 혈액 중의 alanine aminotransferase(ALT)활성, cholesterol량 및 triglyceride(TG)량과, 간조직의 cholesterol량, TG량, 지질과산화물 함량을 측정하고, 현호색의 간손상 보호효과의 기전을 밝히기 위해 phaseI 대사에 관여하는 cytochrome P450(CYP)량과 calcium함량, phaseII 대사에 관여하는 GSH량과 glutathione S-transferase(GST)활성, 항산화효소인 SOD활성, GPX활성 및 CAT활성을 측정하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 현호색은 경동 시장 내 한약건재상으로부터 구입하였다.

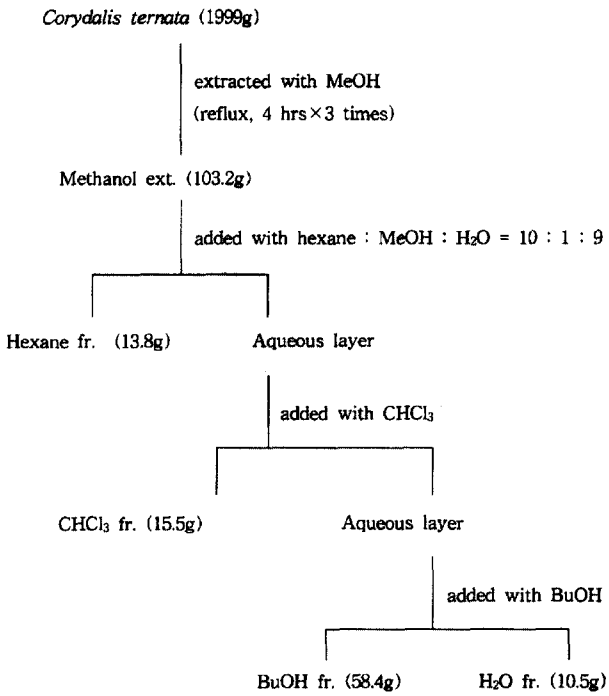
시약 및 기기

실험에 사용한 시약으로서 carbon tetrachloride(Duksan Pharmaceutical Co., Korea), ALT kit, total bilirubin kit, albumin kit, TP kit, cholesterol kit, TG kit (Yeongdong Pharmaceutical Co., Korea), Tris acetate, EDTA, Tris base, glycerol, dithionite, foline ciocalteau's phenol reagent, bovine serum albumin, thiobarbituric acid, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, xanthine, cytochrome c, xanthine oxidase, NADPH, sodium dithionite, cumene hydroperoxide, hydrogen peroxide, 1-chloro-2,4-dinitrobenzen(CDNB), GSH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB), L-ascorbic acid(Sigma chemical Co., St Louis, MO, USA)을 사용했으며 기타시약 및 추출 용매는 시판 특급시약을 사용하였다.

기기로서 high speed centrifuge (DuPont Sorvall instrument, Model RC 5C), ice maker (Welbilt Co. USA), micropipette (Gilson medical electronics, France), UV-spectrophotometer (Hewlett Packard HP 8452A Diode-Array), ultracentrifuge (Beckman Co., Ltd. L-80), tissue tearor (Biospec products, Inc. Model 985-370) 및 evaporator (Eyela)를 사용하였다.

실험 동물

Sprague-Dawley계 웅성 흰 쥐를 삼육실험동물 연구소 (주)에서 공급받아 실내 온도 22±2℃에서 충분한 물과 고형사료(삼양사료)를 공급하여 환경에 적응시킨 후 체중 200~220g의 흰 쥐를 실험에 사용하였다.



Scheme 1. Extraction and fractionation of Corydalis ternata.

현호색의 추출과 분획

현호색을 Schem 1과 같이 methanol로 수욕상에서 4시간씩 5회 추출한 후 온시 여과하고 여액을 감압 농축하였다. 현호색 methanol추출물을 hexane, chloroform 및 butanol로 계통분획하여 얻은 분획물은 감압 농축하여 밀봉 냉장 보관하였으며 필요시 적정농도로 환산하여 사용하였다.

간 손상 유발과 현호색 분획물 투여

Carduus Marianus 추출물과 각 분획물은 수득률에 따라 환산하여 0.5% CMC에 현탁하여 3일간 경구투여 하였다. CCl_4는 corn oil을 vehicle로 하여 예비실험결과를 토대로 하여 0.45 mL/kg 용량으로 약물 최종 투여 3시간 후에 복강 투여하고 24시간 절식시켜 간 손상을 유발하였다.

채혈 및 혈청 분리

CCl_4투여 24시간 후 흰 쥐를 ether로 마취시키고 복부 정중선을 절개하여 심장에서 채혈하였다. 이를 3000 rpm에서 15분간 원심 분리시켜서 얻은 혈청을 검체로 사용하였다.

혈액 생화학적 분석

ALT 활성도, Cholesterol 함량 및 TG 함량은 kit를 이용하여 분석하였다.

간조직중 cholesterol 및 TG 함량 측정

CCl_4투여 24시간 후 적출한 간 조직 중의 일부를 취하여 phosphate buffer (pH 7.0)에 넣고 약 1분간 분쇄한 후 10% liver homogenate를 만들어 kit를 이용하여 분석하였다.

지질과산화물 함량 측정

Microsome의 지질과산화물 함량측정은 Uchiyama등[4]의 방법에 따라 시행하였다.

CYP 함량 측정

Microsome에 존재하는 CYP 함량은 Omura등[5]의 방법에 따라 시행하였다. Microsome을 단백질량이 1~2 mg/mL이 되도록 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)에 현탁시켰다. 현탁용액을 semimicrocuvette에 1 mL씩 넣어 reference cell과 sample cell로 하고 소량의 dithionite를 각 cell에 가한 후 450 nm와 490 nm에서 기준선을 정하였다. Sample cell에 CO기체를 1bubble/sec의 속도로 1분간 bubbling시킨 후 다시 450 nm와 490 nm에서 CYP-CO binding complex의 흡광도를 측정하였다. CYP함량은 CYP-CO complex형성 전후의 각각 450 nm와 490 nm사이의 흡광도의 차이로 계산하였다.

간조직중 calcium함량 측정

간균질액을 원심분리하여 o-cresolphthalein complexon과 반응시킨 다음 25℃, 546 nm에서 흡광도를 측정하였다.

GSH 함량 측정

간 조직중의 GSH량은 thiol기에 DTNB를 작용시켜 형성된 p-nitrothiophenol anion을 비색 정량 하는 원리로 Ellman[6]의 방법에 따라 실시하였다.

GST 활성도 측정

Cytosol에 존재하는 GST 활성도는 Habig등[7]의 방법에 따라 시행하였으며 CDNB가 GST에 의하여 GSH와 포합되었을 때 고유의 노란 색이 탈색되는 속도를 측정함으로써 효소의 활성도를 산출하였다.

SOD 활성도 측정

Cytosol에 존재하는 SOD의 활성도는 Fridovich, I. 등[8]의 방법을 변형하여 시행하였다.

즉 xanthine이 xanthine oxidase에 의해 uric acid로 전환될 때 생성되는 superoxide anion이 황적색을 띄는 cytochrome c를 환원시켜 적색으로 변화시켜 환원형 cytochrome c에 의해 550 nm의 흡광도가 증가된다. 이 때 superoxide dismutase가 존재하면 생성된 superoxide anion을 hydrogen peroxide로 전환시키므로 superoxide anion이 cytochrome c를 환원하는 작용을 저해한다. 따라서 cytochrome c의 환원작용이 저해되는 정도를 측정하여 SOD활성도를 측정하였다.

GPX 활성도 측정

Cytosol에 존재하는 GPX의 활성도는 Flohe등[9]의 방법에 따라 시행하였다.

즉 GSH가 cumene hydroperoxide와 반응하여 산화형 glutathione(GSSG)가 형성되고 GSSG가 NADPH를 산화시키면서 GSH으로 환원되므로 340 nm에서 NADPH환원량을 측정하여 계산하였다.

CAT 활성도 측정

Cytosol에 존재하는 CAT의 활성도는 Aebi[10]의 방법에 따라 시행하였다. 즉 과산화수소가 240 nm에서 최대 흡광도를 나타내므로 CAT에 의해서 소모되는 과산화수소의 양을 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준편차를 계산하고, 각 군간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 p 값이 0.05미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

현호색 methanol 추출물과 분획물이 간 손상에 미치는 영향

현호색 methanol 추출물과 분획물이 CCl_4 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 혈청 중 ALT 활성도 측정

Table 1. Effect of methanol extract of *Corydalis ternata* on plasma ALT activity in CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	ALT (KA unit/L)
Control	-	26.0± 3.8
CCl_4	-	217.4±75.7
MeOH ext. +CCl_4	500	158.8±66.6
MeOH ext. +CCl_4	1000	75.3±22.8*
CM ext. +CCl_4	150	118.7±53.7

The values are expressed as mean ±S.D. (n=8)

*$P < 0.001$ compared to the CCl_4 group

Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.

MeOH, methanol; CM, *Carduus marianus*

Table 2. Effect of fractions of *Corydalis ternata* on plasma ALT activity in CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	ALT (KA unit/L)
Untreated	-	26.0± 3.8
CCl_4	-	217.4±75.7
Hex fr. +CCl_4	700	129.7±58.4
$CHCl_3$ fr. +CCl_4	800	133.8±90.2
BuOH fr. +CCl_4	1000	150.3±60.8
H_2O fr. +CCl_4	300	125.2±50.9*
CM ext. +CCl_4	150	118.7±53.7

The values are expressed as mean ±S.D. (n=8)
*$P < 0.05$ compared to the CCl_4 group
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.
Hex, hexane; $CHCl_3$, chloroform; BuOH, butanol; H_2O, water; CM, *Carduus marianus*

결과를 Table 1, 2에 나타내었다.

ALT 활성도는 CCl_4 단독 투여군은 217.4±75.7 KA unit/L이었고 methanol 추출물 500 mg/kg 투여군은 158.8 ±66.6 KA unit/L, methanol 추출물 1000 mg/kg 투여군은 75.3±22.8 KA unit/L, *Carduus Marianus* ext. 투여군은 118.7±53.7KA unit/L로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 methanol 추출물 1000 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다.

ALT 활성도는 CCl_4 단독 투여군은 217.4±75.7 KA unit/L이었고 hexane 분획물 투여군은 129.7±58.4 KA unit/L, chloroform 분획물 투여군은 133.8±90.2 KA unit/L, butanol 분획물 투여군은 150.3±60.8 KA unit/L, 물 분획물 투여군은 125.2±50.9 KA unit/L, *Carduus Marianus* ext. 투여군은 118.7±53.7 KA unit/L로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 물 분획물 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다.

현호색 물 분획물이 간 손상에 미치는 영향

혈청 ALT활성도

현호색 물 분획물이 CCl_4 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 혈청 중 ALT 활성도 측정 결과를 Table 3에 나타내었다.

ALT 활성도는 CCl_4 단독 투여군은 243.8±83.2 KA unit/L이었고 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 141.0±27.0 KA unit/L, 물 분획물 300 mg/kg 투여군은 80.4±24.9 KA unit/L, *Carduus marianus* ext. 투여군은 94.4±44.6 KA unit/L로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 물 분획물 300 mg/kg 투여군과 *Carduus marianus* ext. 투여군에서

Table 3. Effect of water fraction of *Corydalis ternata* on plasma ALT activity in CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	ALT (KA unit/L)
Untreated	-	26.0±3.8
CCl_4	-	243.8±83.2
H_2O fr. +CCl_4	100	141.0±27.0
H_2O fr. +CCl_4	300	80.4±24.9*
CM ext. +CCl_4	150	94.4±44.6*

The values are expressed as mean ±S.D. (n=6)
*$P < 0.05$ compared to the CCl_4 group
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.
H_2O, water; CM, *Carduus marianus*

Table 4. Effects of water fraction of *Corydalis ternata* on plasma cholesterol and TG levels in CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Cholesterol (mg/dL)	TG (mg/dL)
Untreated	-	44.6±5.0	26.9±8.36
CCl_4	-	67.1±12.3	41.7±5.3
H_2O fr. +CCl_4	100	48.7±12.3*	29.4±11.7
H_2O fr. +CCl_4	300	67.3± 9.2	51.7±8.0*
CM ext. +CCl_4	150	52.2± 8.4	35.0±17.5

The values are expressed as mean ±S.D. (n=6)
*$P < 0.05$ compared to the CCl_4 group
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.
H_2O, water; CM, *Carduus marianus*

유의성 있는 감소를 보였다. 혈청 중 ALT는 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내게 된다.[11] 본 실험에서 ALT활성도는 methanol 추출물 1000 mg/kg투여군과 H_2O 300 mg/kg투여군에서 유의성있는 감소를 보였으며 이는 양성대조약물인 *Carduus marianus* ext.투여군과 유사한 활성도의 감소를 나타낸 것으로 간 손상 억제 효과가 기대된다.

혈청 cholesterol과 TG 함량

현호색 물 분획물이 CCl_4 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 혈청 중 cholesterol과 TG 함량 측정 결과를 Table 4에 나타내었다.

Cholesterol 함량은 CCl_4 단독 투여군은 67.1±12.3 mg/dL이었고, 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 48.7±12.3 mg/dL, 물 분획물 300 mg/kg 투여군은 67.3±9.2 mg/dL,

Carduus marianus ext. 투여군은 52.2±8.4 mg/dL로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 물 분획물 100 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다.

TG 함량은 CCl_4 단독 투여군은 41.7±5.3 mg/dL이었고 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 29.4±11.7 mg/dL, 물 분획물 300 mg/kg 투여군은 51.7±8.0 mg/dL, *Carduus marianus* ext. 투여군은 35.0±17.5 mg/dL로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 물 분획물 100 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 증가를 보였다.

간조직 중 cholesterol과 TG 함량

현호색 물 분획물이 CCl_4 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 간 균질액에서의 cholesterol과 TG 함량 측정 결과를 Table 5에 나타내었다.

Cholesterol 함량은 CCl_4 단독 투여군은 5.7±2.2 mg/g liver이었고, 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 4.9±0.7 mg/g liver, 물 분획물 300 mg/kg 투여군은 4.6±1.0 mg/g liver, *Carduus marianus* ext. 투여군은 4.6±0.8 mg/g liver로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 모든 처치군에서 감소하는 경향을 보였다.

TG 함량은 CCl_4 단독 투여군은 20.6±2.6 mg/g liver이었고, 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 14.2±2.5 mg/g liver, 물 분획물 300 mg/kg 투여군은 16.4±2.6 mg/g liver, *Carduus marianus* ext. 투여군은 18.6±1.8 mg/g liver로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 물 분획물 100 mg/kg 투여군과 물 분획물 300 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다.

CCl_4 단독 투여군에서 간조직의 cholesterol 및 TG가 현저히 증가하였으며 물 분획물 100 mg/kg 투여군과 물 분획물 300 mg/kg 투여군의 간 조직의 cholesterol 및 TG의 감소는 간에서 지방대사 및 lipoprotein의 합성이 회복된 것에 의한 것으로 생각된다.

Table 5. Effects of water fraction of *Corydalis ternata* on hepatic cholesterol and TG levels in CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Cholesterol (mg/g liver)	TG (mg/g liver)
Untreated	-	3.5±0.6	13.4±2.3
CCl_4	-	5.7±2.2	20.6±2.6
H_2O fr. +CCl_4	100	4.9±0.7	14.2±2.5*
H_2O fr. +CCl_4	300	4.6±1.0	16.4±2.6*
CM ext. +CCl_4	150	4.6±0.8	18.6±1.8

The values are expressed as mean ±S.D. (n=6)
*$P < 0.05$ compared to the CCl_4 group
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.
H_2O, water; CM, *Carduus marianus*

Table 6. Effect of water fraction of *Corydalis ternata* on MDA level in the liver microsome of CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	MDA (nmol/mg protein)
Untreated	-	1.07±0.03
CCl_4	-	1.52±0.04
H_2O fr. +CCl_4	100	1.55±0.07
H_2O fr. +CCl_4	300	1.38±0.02*
CM ext. +CCl_4	150	1.24±0.11*

The values are expressed as mean ±S.D. (n=6)
*$P < 0.01$ compared to the CCl_4 group
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.
H_2O, water; CM, *Carduus marianus*

지질과산화물 함량

현호색 물 분획물이 CCl_4 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 간 microsome에서의 지질과산화물 함량 측정 결과를 Table 6에 나타내었다.

MDA 함량은 CCl_4 단독 투여군은 1.07±0.03 nmol/mg protein이었고, 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 1.55±0.07 nmol/mg protein, 물 분획물 300 mg/kg 투여군은 1.38±0.02 nmol/mg protein, *Carduus marianus* ext. 투여군은 1.24±0.11 nmol/mg protein으로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 모든 처치군에서 감소하는 경향을 보였으며 물 분획물 300 mg/kg 투여군과 *Carduus marianus* ext. 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다.

CCl_4가 간세포의 ER에서 대사되어 trichloromethyl radical과 같은 대사 중간체로 되어 지질과산화를 초래하고 지질과산화물이 생체막에 구조적인 변화를 일으키며 내부의 효소계가 파괴됨으로써 혈액 및 조직내 과산화지질함량이 증가하게 된다는 연구결과에 근거하여[12] 지질과산화물을 TBA법에 근거하여 측정한 결과 물 분획물 300 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였으므로 현호색 물 분획물이 free radicals 과다 생성으로 인한 조직 손상의 방어에 효과가 있는 것으로 생각된다.

CYP 함량

현호색 물 분획물이 CCl_4 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 간 microsome에서의 CYP 함량을 Table 7에 나타내었다.

CYP 함량은 CCl_4 단독 투여군은 16.75±0.42 nmol/mg protein이었고 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 16.76±0.65

Table 7. Effect of H_2O fraction of *Corydalis ternata* on CYP level in the liver microsome of CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	CYP (nmol/mg protein)
Untreated	-	13.04±0.271
CCl_4	-	16.75±0.42
H_2O fr. +CCl_4	100	16.76±0.65
H_2O fr. +CCl_4	300	14.53±0.63*
CM ext. +CCl_4	150	14.25±0.32*

The values are expressed as mean ±S.D. (n=6)
*P < 0.001 compared to the CCl_4 group
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.
H_2O, water; CM, *Carduus marianus*

Table 8. Effect of water fraction of *Corydalis ternata* on calcium level in the liver of CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Calcium (mg/g liver)
Untreated	-	0.46±0.02
CCl_4	-	0.59±0.06
H_2O fr. +CCl_4	100	0.49±0.03*
H_2O fr. +CCl_4	300	0.50±0.07
CM ext. +CCl_4	150	0.45±0.04*

The values are expressed as mean ±S.D. (n=6)
*$P < 0.05$ compared to the CCl_4 group
***$P < 0.001$ compared to the CCl_4 group
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.
H_2O, water; CM, *Carduus marianus*

Table 9. Effect of water fraction of *Corydalis ternata* on GSH level in the liver of CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	GSH (μmol/g tissue)
Untreated	-	42.62±1.99
CCl_4	-	39.07±8.49
H_2O fr. +CCl_4	100	43.47±2.38
H_2O fr. +CCl_4	300	46.39±6.74
CM ext. +CCl_4	150	28.72±1.80

The values are expressed as mean ±S.D. (n=6)
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.
H_2O, water; CM, *Carduus marianus*

nmol/mg protein, 물 분획물 300 mg/kg 투여군은 14.53± 0.63 nmol/mg protein, *Carduus marianus* ext. 투여군은 14.25±0.32 nmol/mg protein으로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 물 분획물 300 mg/kg 투여군과 *Carduus marianus* ext. 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다. CCl_4는 약물 대사 효소 중에서 phaseI 약물 대사 효소인 CYP와 NADPH-CYP reductase에 의해서 대사되며 매우 반응성이 강한 대사 중간체를 형성하여 단백 합성 및 약물대사 효소 활성에 변화를 일으킨다. 따라서 독성물질의 대사에 관여하는 CYP의 활성 및 발현의 선택적인 억제는 조직 손상 및 암발생을 차단할 수 있다.[13] 물 분획물 300 mg/kg 투여군에서 CYP함량이 유의성있게 감소한 것으로 보아 현호색 물 분획물이 CYP함량을 감소시켜 CCl_4에 의한 조직 손상 방어에 효과가 있는 것으로 생각된다

간조직중 calcium함량

현호색 물 분획물이 CCl_4 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 간 균질액에서의 calcium 함량 측정 결과를 Table 8에 나타내었다.

Calcium함량은 CCl_4 단독 투여군은 0.59±0.06 mg/g liver 이었고, 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 0.49±0.03 mg/g liver, 물 분획물 300 mg/kg 투여군은 0.50±0.07 mg/g liver, *Carduus marianus* ext. 투여군은 0.45±0.04 mg/g liver로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 물 분획물 100 mg/kg 투여군과 *Carduus marianus* ext. 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다. 간 조직중의 calcium함량은 CCl_4 단독 투여군에 비하여 모든 처치군에서 감소하는 경향을 보였으며 특히 물 분획물 100 mg/kg 투여군과 *Carduus marianus* ext. 투여군에서 유의성 있는 감소를 보여 CCl_4에 의한 조직 손상에 대해 calcium channel blocker (CCB)로서 작용하여 보호 효과를 나타냈다고 볼 수 있다.

GSH 함량

현호색 물 분획물이 CCl_4 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 간 균질액에서의 GSH 함량 측정 결과를 Table 9에 나타내었다.

GSH 함량은 CCl_4 단독 투여군은 39.07±8.49 μmol/g liver이었고, 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 43.47± 2.38 μmol/g liver, 물 분획물 300 mg/kg 투여군은 46.39± 6.74 μmol/g liver, *Carduus marianus* ext. 투여군은 28.72 ±1.80 μmol/g liver로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 모든 처치군에서 차이를 보이지 않았다. 비효소적 항산화제인 GSH는 여러 세포의 endogenous, exogenous 화합물의 해독에 관여하는 물질로서 GSH의 thiol기에 포합하여 해독화하여[14] 단백질이나 DNA의 합성, γ-glutamyl amino acid등과 같은 물질의 이동, 효소활성의 조절 및 활성 산소나 유리기에 의한 세포 손상예방 등 생물학적으로 중요한 여러 반응에 관여한다.[15] 본 실험에서 물 분획물 100 mg/kg 투여군과

Table 10. Effect of water fraction of *Corydalis ternata* on GST activity in the liver cytosol of CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	GST (μmol/min/mg protein)
Untreated	-	2.66±0.03
CCl_4	-	1.74±0.11
H_2O fr. +CCl_4	100	1.99±0.56
H_2O fr. +CCl_4	300	2.01±0.07**
CM ext. +CCl_4	150	2.29±0.18**

The values are expressed as mean ±S.D. (n=6)
**$P < 0.01$ compared to the CCl_4 group
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.
H_2O, water; CM, *Carduus marianus*

300 mg/kg 투여군에서 GSH함량이 다소 증가한 것은 oxidative stress의 감소에 의한 것으로 생각된다.

GST 활성도

현호색 물 분획물이 CCl_4 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 간 cytosol에서의 GST 활성도 측정 결과를 Table 10에 나타내었다. .

GST 활성도는 CCl_4 단독 투여군은 1.74±0.11 μmol/min/mg protein이었고, 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 1.99±0.56 μmol/min/mg protein, 물 분획물 300 mg/kg 투여군은 2.01±0.07 μmol/min/mg protein, *Carduus marianus* ext. 투여군은 2.29±0.18 μmol/min/mg protein으로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 모든 처치군에서 증가하는 경향을 보였으며 물 분획물 300 mg/kg 투여군과 *Carduus marianus* ext. 투여군에서 유의성 있는 증가를 보였다.

간 cytosol의 phaseII 대사 효소인 GST는 bilirubin, heme 및 steroids와 같은 내인성 물질과의 결합, prostaglandin을 포함한 lipid hydroperoxide와 nucleotide peroxide의 해독화에 중요한 역할을 한다.[16] 물 분획물 300 mg/kg 투여군에서 GST활성이 유의성 있게 증가한 것으로 보아 현호색 물 분획물이 GST활성을 증가시켜 CCl_4에 의한 조직 손상 방어에 효과가 있는 것으로 생각된다.

SOD 활성도

현호색 물 분획물이 CCl_4 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 간 cytosol에서의 SOD 활성도 측정 결과를 Table 11에 나타내었다.

SOD 활성도는 CCl_4 단독 투여군은 33.7±6.2 Unit/mg protein이었고, 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 34.2±5.3 Unit/mg protein, 물 분획물 300 mg/kg 투여군은 28.2±5.7 Unit/mg protein, *Carduus marianus* ext. 투여군은 28.3±3.6 Unit/mg protein으로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다. SOD는 두 분자의 superoxide anion을 hydrogen peroxide와 oxygen molecule로 전환시켜 superoxide anion radicals에 의해 생기는 산화적 손상에 대한 세포의 방어에 일차적으로 관여한다.[17] 본 실험에서는 SOD의 활성증가에 의한 항산화 효과의 증대를 기대하였으나 오히려 감소된 것은 CYP함량의 감소로 인하여 사염화탄소의 대사가 감소되어 free radicals의 생성이 감소하여 유도되지 않은 것으로 생각된다.

Table 11. Effect of water fraction of *Corydalis ternata* on SOD activity in the liver cytosol of CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	SOD (Unit/mg protein)
Untreated	-	28.1±9.5
CCl_4	-	33.7±6.2
H_2O fr. + CCl_4	100	34.2±5.3
H_2O fr. + CCl_4	300	28.2±5.7
CM ext. + CCl_4	150	28.3±3.6

The values are expressed as mean ±S.D. (n=6)
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.
H_2O, water; CM, *Carduus marianus*

GPX 활성도

현호색 물 분획물이 CCl_4 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 간 cytosol에서의 GPX 활성도 측정 결과를 Table 12에 나타내었다.

GPX 활성도는 CCl_4 단독 투여군은 3.00±0.09 nmol NADPH/min/mg protein이었고, 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 3.20±0.29 nmol NADPH/min/mg protein, 물 분획

Table 12. Effect of water fraction of *Corydalis ternata* on GPX activity in the liver microsome of CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	GPX (nmol NADPH/min/mg protein)
Untreated	-	1.41±0.23
CCl_4	-	3.00±0.09
H_2O fr. +CCl_4	100	3.20±0.29
H_2O fr. +CCl_4	300	2.90±0.25
CM ext. +CCl_4	150	3.21±0.51

The values are expressed as mean ± S.D. (n=6)
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.
H_2O, water; CM, *Carduus marianus*

Table 13. Effect of water fraction of *Corydalis ternata* on CAT activity in the liver cytosol of CCl_4 treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	CAT (Unit/mg protein)
Untreated	-	28.5±4.6
CCl_4	-	50.3±13.2
H_2O fr. +CCl_4	100	36.7±5.1*
H_2O fr. +CCl_4	300	42.0±15.9
CM ext. +CCl_4	150	29.1±7.5***

The values are expressed as mean ±S.D. (n=6)
*P < 0.05 compared to the CCl_4 group
***P < 0.001 compared to the CCl_4 group
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.45 mL/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment.
H_2O, water; CM, *Carduus marianus*

물 300 mg/kg 투여군은 2.90±0.25 nmol NADPH/min/mg protein, *Carduus marianus* ext. 투여군은 3.21±0.51 nmol NADPH/min/mg protein으로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 모든 처치군에서 차이를 보이지 않았다. 과산화수소를 소거하는 효소인 GPX는 일종의 peroxidase로 많은 조직에 존재하며 $NADP^+$를 전자수용체로하여 H_2O_2를 제거하면서 환원형 glutathione(GSH)을 산화형 glutathione(GSSG)으로 전환시킨다.[18] 본 실험에서는 GPX에 의한 항산화 작용의 증가가 기대되었으나 각 처치군 사이에서 큰 변화는 보이지 않았다.

CAT 활성도

현호색 물 분획물이 CCl_4 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 간 cytosol에서의 CAT 활성도 측정 결과를 Table 13에 나타내었다.

CAT 활성도는 CCl_4 단독 투여군은 50.3±13.2 Unit/mg protein이었고, 물 분획물 100 mg/kg 투여군은 36.7±5.1 Unit/mg protein, 물 분획물 300 mg/kg 투여군은 42.0±15.9 Unit/mg protein, *Carduus marianus* ext. 투여군은 29.1±7.45 Unit/mg protein으로 CCl_4 단독 투여군에 비하여 모든 처치군에서 감소하는 경향을 보였으며 특히 물 분획물 100 mg/kg 투여군과 *Carduus marianus* ext. 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다.

CAT는 간에 가장 많이 존재하며 대부분의 호기성 세포에 함유되어 있다. 체내에서 지방의 자동산화, 유기물의 산화 및 superoxide dismutase에 의해 생성된 hydrogen peroxide를 GPX와 함께 산소와 H_2O로 전환시키는 작용을 하는 산화환원 효소의 일종으로[19] GPX에 비해 Km값이 높기 때문에 과산화수소의 농도가 높을 때 주로 작용한다. 본 실험에서는 CCl_4 단독 투여군에 비하여 모든 처치군에서 CAT의 활성도가 감소한 것을 볼 수 있으며 이는 oxidative stress의 감소에 의한 것으로 생각된다.

이러한 결과로 볼 때 현호색 물 분획물 300 mg/kg 투여군에서 ALT활성도와 cholesterol함량의 감소, 간 조직 중의 TG 및 MDA 함량의 저하등으로 사염화탄소에 의한 간손상 보호효과를 확인하였으며 이는 phaseI 대사에 관여하는 CYP 함량의 감소와 CCB로서의 작용 및 phaseII 대사에 관여하는GST 활성도의 증가에 기인한 것으로 생각된다. 또한 항산화 효소의 감소는 CYP함량의 감소로 인하여 사염화탄소의 대사가 감소되어 free radicals의 생성이 감소하여 유도되지 않는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2000학년도 덕성여자대학교 연구비의 지원으로 수행된 것으로 연구비 지원에 깊이 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 현호색의 methanol 추출물에 대하여 사염화탄소에 의한 간 손상 보호효과를 확인한 후 이를 hexane, chloroform, butanol 및 물로 계통분획하여 사염화탄소에 의한 간 손상 보호효과를 검색하였다. 이 결과 현호색 물 분획물이 유의성 있는 간 보호효과를 보임으로써 간손상 보호효과를 확인하고 그 기전을 밝히고자 하였다. 그 결과 혈액중의 ALT활성 및 cholesterol함량은 사염화탄소 단독투여군에 비하여 감소하였으며 간조직의 TG와 지질과산화물 함량은 사염화탄소 단독투여군에 비하여 감소하여 사염화탄소에 의한 지방의 축적이나 세포막의 손상은 억제된 것으로 보인다. 기전연구를 위하여 측정한 CYP함량과 calcium함량은 사염화탄소 단독투여군에 비하여 감소하였으며 GST활성도는 사염화탄소 단독투여군에 비하여 증가하였다. 항산화 효소의 유도로 인하여 증가할 것으로 기대한 SOD, GPX, CAT활성도는 모든 처치군에서 감소하는 경향을 보여 간손상 보호 효과는 free radical scavenging effect 보다는 CYP함량의 감소와 CCB로서의 작용 및 GST활성도의 증가에 기인한 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Kubo, M., Matsuda, H., Tokuoka, K., Ma, S., Shiomoto, H.: Anti-inflammatory activities of methanolic extract and alkaloidal components from Corydalis tuber. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 262-265 (1994)
2. Qicheng, F. and Hao, H.: Chemical study on alkaloids from Corydalis bulleyana. *Planta Med.* **32**, 193-198 (1986)
3. Farber, J. L. and El-Mofty, S. K.: The biochemical pathology of liver cell necrosis. *Am. J. Pathol.* **81**, 237-250 (1975)
4. Uchiyama, M. and Mihara, M.: *Anal. Biochem.* **86**, 271-278 (1978)
5. Omura, T and Sato, R.: Carbon monoxide-bending pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239 (1964)
6. Ellman, G. L.: Tissue Sulfhydryl groups. *Arch. biochem, biophy* **82**, 70-77 (1959)
7. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B.: Glutathione S-transferase : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Bio. Chem.* **249**, 7130-7139 (1974)
8. Fridovich, I.: Xanthine oxidase. CRC handbook of methods for oxygen radical research. New York, CRC Press (1985)
9. Flohe, L., Wolfgng, A. and Gunzler, W. A.: Assay of glutathione peroxidase. In Methods in enzymatic analysis, Newyork, Academic Press, Inc., **105**, 114-121 (1984)
10. Aebi, H.: Catalase Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed, Verlag.chemie., 2, 673-684 (1974)
11. Plaa, G. L. and Hewit, W. R.: Principles and methods of toxicology, Raben Press, 407-445 (1983)
12. Butler, T. C.: Reduction of carbon tetrachloride in vivo and reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissues and tissue constituents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **134**, 311-319 (1990)
13. Brady, J. F., Xiao, F., Wang, M. H., Li, Y., Ning, S. M., Gapac, J. M. and Yang, C. S.: Effects of disulfiram on hepatic cytochrome P450 2E1, other microsomal enzymes, and hepatotoxicity in rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **108**, 366-373 (1991)
14. Parke, D. V: The importance of diet and nutrition in the detoxication of chemicals. In food, nutrition and chemical toxicity. Smith-Gordon, London, 1-15 (1993)
15. Meister, A. and Anderson, M. E.: Glutathione, Ann. Revi. Biochem., **52**, 711-760 (1983)
16. Ketterer, B. Meyer, D. J. and Clark, A. G.: Soluble glutathione transferase isoenzymes. In Glutathione Conjugation (B. Ketterer and H. Sies eds.), Academic Press, London, 74-135 (1988)
17. Ho, Y. S. and Crapo, J. D.: FEBS Letters **229**, 256-260 (1988)
18. Jones, D. P., Eklow, L., Thor, H., Orrenius, S.: Metabotism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes, relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H_2O_2. *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 505-516 (1981)
19. Deisseroth, A. and Dounce, A. L.: Catalase Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role, *Physiol. Rev.*, **50**, 3-24 (1970)