*J. Fd Hyg. Safety 14(2), 172–178 (1999)*

# 사염화탄소로 유발된 간손상에서의 효소 활성도의 변화로 본 홍화자 분획물의 간손상 보호 작용

정춘식† · 정기화 · 정정숙
덕성여자대학교 약학대학 약학연구소

# Hepatoprotective Effect of Subfractions of *Carthamus tinctorius* L. Semen on the Reversal of Biotransformation Enzyme Activities in $CCl_4$-induced Hepatotoxic Rats

**Choon-Sik Jeong†, Ki-Wha Jung and Jeong-Suk Jeong**
*Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea*

**ABSTRACT** – Previous studies have shown that methanol extract and its butanol fraction of *Carthamus tinctorius* L. Semen have the hepatoprotective effect on the $CCl_4$-induced hepatotoxicity. The hepatoprotective effect of subfractions has been evaluated by analyzing blood and hepatocyte biochemical analyses and biotransformation enzyme analyses. Treatment of BS-5 subfraction has significantly decreased the activities of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. In addition, the levels of cholesterol and triglyceride in liver have been decreased as compared with that of $CCl_4$ treated rats. The hepatoprotective effect of BS-5 subfraction on the $CCl_4$-induced hepatotoxicity would be mediated of the attenuation of the level of cytochrome P450 and the enhancement of the activity of glutathion S-transferase.

**Key words** □ *Carthamus tinctorius* L. Semen, Hepatoprotective effect, $CCl_4$, Hepatotoxicity, Alanine aminotransferase, Aspartate aminotransferase, Cytochrome P450

1994년 의료 보험 관리 공단 통계 연보에 의하면 B형 간염, 알코올성 간질환, 간경변증 및 간암을 포함한 만성 간질환은 우리 나라 성인에게 있어서 입원 빈도 5위의 높은 유병율을 나타내는 질환이며, 특히 과도한 스트레스나 음주, 흡연 및 약물로 인하여 간기능의 손상이 점차 빈번하게 일어나고 인체에 치명적인 위협을 가하고 있다.

인체는 알코올, 약물, 화학물질 및 여러 가지 환경 오염물질 등이 유입되면 생체는 이들을 이물질로 인식하여 체외로 배설시킴으로써 무독화하려는 방어 체계를 가동시키며, 간은 무독화 변환 과정이 일어나는 주요 기관이다. 세포 손상을 일으킬 수 있는 활성 물질은 간의 약물 대사 효소계에 의해 대사되어 체외로 배설되나 물질에 따라서는 약물 대사 효소계를 억제 또는 유도함으로써 다른 약물의 대사를 지연 또는 활성화하여 약물의 약효 또는 독성에 영향을 미친다. 이러한 간의 약물 대사 효소계는 크게 두 가지로 구분할 수 있다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

Phase I 대사는 관능기 (-OH, -$NH_2$ 및 -SH)를 약물 분자에 도입하는 반응으로서 산화, 환원 및 가수분해 반응이 있다.[1] Phase I 대사 중 산화 반응은 간 microsome의 mixed function oxidase system에 의해 이루어진다. Mixed function oxidase system은 NADPH와 산소분자를 필요로 하는 대사 효소계이며 cytochrome P450이 중요한 역할을 한다. 즉 cytochrome P450은 약물 대사 효소계의 전자 운반 과정에서 전자 수용을 담당하며 NADPH와 NADPH-cytochrome P450 reductase를 필요로 한다. Phase I 대사를 통하여 대부분의 이물질은 무독화되지만 (detoxification) 경우에 따라서는 더 활성화된 중간 대사 산물로 전환되어 발암성이나 다양한 독성을 나타내거나 유효한 약물로 변환되어 약효를 나타내기도 한다 (metabolic activation).

Phase II 대사에서는 UDP-glucuronyl transferase, sulfotransferase 및 glutathione S-transferase 등의 효소에 의하여 phase I 대사를 통해 더 극성화된 중간 대사 산물이 UDP-glucuronic acid 및 glutathione 등의 내인성 물질들과 포합됨으로써 대부분이 불활성화되어 이들 약물의 작용을 소실

시키고 동시에 수용성을 증가시켜 신장이나 담즙을 통해 배설함으로써 해독화한다.

Phase II 약물 대사 효소 중 glutathione S-transferase는 친전자성 물질에 glutathione의 thiol기를 포합 하여 해독화에 관여하는 효소로서 약 13종의 subunit가 보고되었으며 $\alpha$, $\mu$, $\pi$ 및 $\theta$의 4개의 family를 이루고 있고 같은 family 내에서 heterodimer 또는 homodimer로 존재한다. Glutathione S-transferase는 간에 높은 농도로 존재하며 혈장 중의 농도가 간손상의 민감한 지표로도 사용될 수 있으며, 어떤 isozyme의 발현은 특정 장기에만 제한되므로 혈장 중의 glutathione S-transferase의 측정은 특정 장기의 손상을 반영하는 조직 상해의 지표로 사용된다.[2]

$CCl_4$는 phase I 약물 대사 효소 중 cytochrome P450과 NADPH-cytochrome P450 reductase에 의해서 trichloromethyl radicals와 trichloromethyl peroxy radicals( · OO-$CCl_3$)을 생성하여 세포막의 인지질인 polyenoic fatty acid의 methyl carbon을 공격해서 지질과산화를 야기하여 간세포 괴사를 일으킨다.[3, 4] 또한 이런 radicals는 microsome 지질의 불포화 지방산 측쇄의 methylene 결합을 공격하여 약물 대사 효소 활성과 단백 합성을 저하시키고 간에서의 급성 지방 변성을 일으키며 lipoprotein의 생성과 유리를 차단해서 급속한 지방축적을 야기한다. 홍화자 (*Carthamus tinctorius L.*, Semen)는 홍화의 씨로서 관상 동맥 확장 및 혈압을 낮추는 작용이 있으며 고콜레스테롤혈증을 개선시키고 혈전을 치료하는 효과가 있다고 보고되었다.[6] 또한 최근에 민간에서는 골절 및 골다공증의 예방제로 사용되고 있다.

본 연구실에서는 천연물의 간손상 보호 효과에 대해 검색을 실시하였고, CCl4로 유발된 간손상에 대한 홍화자의 methanol 추출물과 이를 계통 분획한 분획물이 유효한 효과를 나타낸다고 보고하였다.[7]

따라서, 본 연구에서 $CCl_4$로 유발된 간손상에 대하여 유효한 효과를 나타내었다고 보고된 홍화자 분획물의 유효 성분을 추적하고자 재분획을 실시하고, $CCl_4$로 유발된 간손상에 대한 보호 효과를 혈장 및 조직 생화학적 분석을 통해 확인하고자 한다. 또한 간보호 효과에 대한 기전을 규명하고자 phase I 약물 대사 효소인 cytochrome P450 및 phase II 약물 대사 효소인 glutathione S-transferase에 미치는 영향을 측정하여 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 홍화자는 경동 시장 내 한약건재상으로부터 구입하였다.

### 시약

Carbon tetrachloride (Duksan pharmaceutical Co., Korea), Carduus marianus ext., alanine aminotransferase kit, aspartate aminotransferase kit, cholesterol kit, triglyceride kit (Yeongdong pharmaceutical Co., Korea), Tris acetate, EDTA, Tris base, glycerol, foline ciocalteu's phenol reagent, bovine serum albumin, sodium dithionite, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, glutathione (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA), silica gel (Kieselgel 60, 70~230 mesh ASTM, Merck, Art. 7734), TLC plate (Kieselgel 60, $F_{254}$, precoated, Merck, Art. 5714), anisaldehyde $H_2SO_4$ reagent, $FeCl_3$ reagent를 사용하였으며 기타 시약 및 추출용매는 시판 특급 시약을 사용하였다.

### 기기

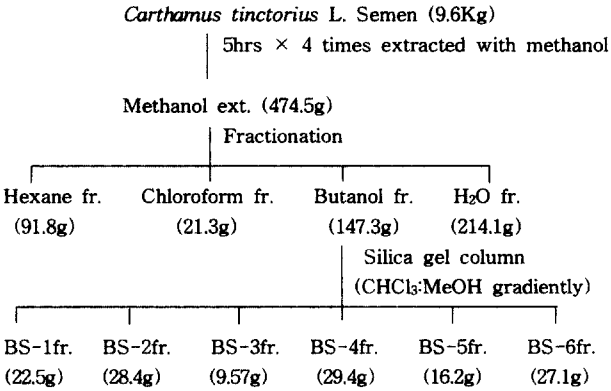
High speed centrifuge (DuPont Sorvall instrument, Model RC 5C), ice maker (Welbilt Co. USA), micropipette (Gilson medical electronics, France), UV-spectrophotometer (Hewlett Packard HP 8452A Diode-Array), ultracentrifuge (Beckman Co., Lid. L-80), osterizer blender (Oster Co., Listed 564A Household type), microscope (Olympus optical., Ltd.)를 사용하였다.

### 홍화자의 추출 및 분획

잘 건조된 홍화자를 scheme 1과 같이 methanol로 수욕상에서 5시간씩 4회 추출한 후 온시 여과하고, 여액을 감압 농축하였다. Methanol 추출물은 hexane, chloroform, butanol 및 $H_2O$ 가용부로 계통적으로 분획하고 각 분획물은 감압 농축하였다.

### 유효 성분의 분리 및 동정

홍화자 butanol 분획물을 methanol에 용해시키고 silica




**Scheme 1. Fractionation of *Carthamus tinctorius* L. Semen**

gel로 coating하였다. 이 분말을 silica gel를 충진시킨 silica gel column에 넣고 chloroform과 methanol 혼액으로 gradient elution(0% → 100%) 하였다. 용출액은 thin layer chromatography를 실시하여 TLC 상에서 UV lamp로 관찰하여 같은 Rf값을 나타내는 분획을 합하여 6개의 subfraction을 얻었다 (BS-1 fraction ~ BS-6 fraction).

### 실험 동물 처치

체중 150~250 g의 Sparague-Dawley계 수컷 흰쥐를 22±2°C에서 2주 이상 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용하였고 고형사료(삼양사료) 및 물을 충분히 공급하였다.

흥화자 각 분획물은 수득율에 따라 0.5% CMC 액에 현탁하여 3일간 경구투여 하였다. $CCl_4$는 corn oil을 vehicle로 하여 0.4 mll/kg용량으로 약물 최종 투여 3시간 후에 복강 투여하고 18시간 가량 절식시켜 간손상을 유발시켰다.

### 채혈 및 혈장 분리

약물 최종 투여 24시간 후 ether로 마취시키고 복부 정중선을 절개하여 심장에서 채혈하고, 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 얻은 혈장을 시료로 사용하였다.

### 혈장 aminotransferase 활성 측정

혈장 alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase를 kit를 이용하여 분석하였다.

### 간조직 중 cholesterol 및 triglyceride 측정

약물 최종 투여 24시간 후 적출한 간조직 중 일부를 취하여 phosphate buffer (pH 7)에 넣고 1분간 분쇄한 후 10% liver homogenate를 만들고 cholesterol과 triglyceride를 kit를 이용하여 분석하였다.

### Microsome 및 cytosol 분리

약물 최종 투여 24시간 후 적출한 간조직을 생리식염수로 씻고 세절한 후 3배 용량의 0.1 M Tris-KCl buffer (0.1 M Tris acetate, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 with Tris base)를 가하고 osterizer blender를 이용하여 조직을 마쇄하였다. 마쇄된 조직은 high speed centrifuge로 8,000g에서 30분, 10,000 g에서 90분간 초원심분리시켜 상징액인 cytosol을 분리하였다. 상징액인 cytosol을 취하고 남은 침전인 microsome을 0.1 M sodium pyrophosphate buffer (0.1 M sodium pyrophosphate와 1 mM EDTA)에서 재혼화하여 100,000 g에서 60분간 다시 초원심분리하여 세척한 후 microsome을 얻었다. 얻어진 microsome을 50 mM Tris acetate buffer (50 mM Tris acetate, 20% glycerol, pH 7.4 with Tris base)에 재분산시킨 후 분주하여 사용하기 전까지 -70°C에서 보관하였다. 모든 조작은 4°C 이하에서 실시하였다.

### 단백정량

희석된 microsome 및 cytosol 0.6 ml에 0.5ml Lowry complex (0.2 ml 4% sodium potassium tartarate, 0.2 ml 2% copper sulfate와 10.0 ml의 4% sodium bicarbonate / 0.2 N sodium hydroxide 용액을 사용 직전에 혼합한 용액)를 가하고 신속하게 혼화하였다. 15분 후 0.1 ml의 folin ciocalteou's phenol 시약을 가하고 즉시 섞은 후 30분간 방치하고, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질농도는 bovine serum albumin을 사용하여 만든 standard curve로부터 얻었다.[8]

### Cytochrome P450 측정

Microsome을 단백 질량이 1~2 mg/ml이 되도록 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)에 현탁시켰다. 현탁 용액을 semi-microcuvette에 1ml씩 넣어 reference cell과 sample cell로 하고 소량의 sodium dithionite를 각 cell에 가한 후 400~500 nm에서 기준선을 정하였다. Sample cell에 CO기체를 1 bubble/sec의 속도로 1분간 bubbling시킨 후 다시 400~500nm에서 cytochrome P450-CO binding complex의 흡광도를 측정하였다. Cytochrome P450은 cytochrome P450-CO complex 형성 전후의 각각 450 nm와 490 nm사이의 흡광도 차이로 계산하였으며, 이때 분자흡광계수를 91 $mM^{-1}cm^{-1}$로 환산하여 계산하였다.[9]

### Glutathion S-transferase 활성 측정

Cytosol에 존재하는 glutathione S-transferase는 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene가 glutathione S-transferase에 의해 glutathione 과 포합되었을 때의 고유의 노란색이 탈색되는 속도를 측정함으로써 활성도를 산출하였다. 0.1M phosphate buffer (pH 6.5)에 cytosol 단백질 25 μg를 넣고 25°C에서 2분간 방치 후 기질로써 1.0 mM의 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene와 1.0mM의 glutathione를 가하여 총량을 1.0 ml로 한 후 즉시 340 nm에서 10초 간격으로 100초 동안 흡광도를 측정하였다. Blank로는 가열하여 불활성화한 cytosol 단백질을 사용하였으며 분자흡광계수를 91 $\mu M^{-1}cm^{-1}$로 환산하여 계산하였다.[10]

### 통계처리

모든 실험 결과는 평균치와 표준오차를 계산하고, 각 군

간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 p값이 0.05미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 혈장 Alanine aminotransferase 및 aspartate aminotransferase 활성에 미치는 영향

간조직의 손상은 세포 내부에 존재하는 효소가 혈액으로 유출되는 것을 측정하거나 pericentral necrosis를 관찰함으로써 확인할 수 있다. 따라서 간으로부터 혈액에 방출된 간의 효소 활성도 측정은 간손상 연구에 있어서 가장 유용한 방법 중의 하나이며, 특히 혈장 중 alanine aminotransferase와 aspartate aminotransferase 등의 효소 활성도의 상승은 간손상으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것이므로 간세포의 변성 및 괴사의 지표가 된다.[11]

$CCl_4$ 투여군의 혈장 alanine aminotransferase 활성도는 277.1±71.4 KA Unit/l이었으며, 홍화자 BS-1과 BS-2 분획투여군은 $CCl_4$로 유발된 간손상에 의해 증가한 alanine aminotransferase 활성도를 억제하지 못하였다. 홍화자 BS-3과 BS-6 분획투여군은 각각 158.8±54.1 KA Unit/l과 217.7±173.0 KA Unit/l로 CCl4로 유발된 간손상에 의해 증가한 alanine aminotransferase 활성도를 각각 47.1%, 23.7% 억제하였다. 홍화자 BS-5 분획투여군과 양성대조군은 각각 131.7±39.9 KA Unit/l과 101.5±39.6 KA Unit/l로 $CCl_4$에 의해 증가된 alanine aminotransferase 활성도를 각각 57.9%, 69.9% 억제하여 유의성을 나타내었다(Table 1).

혈장 aspartate aminotransferase 활성도는 $CCl_4$ 투여군은 946.7±96.6 KA Unit/l이었으며, 홍화자 BS-4와 BS-5 분획투여군은 각각 823.3±321.6 KA Unit/l과 676.4±347.2 KA Unit/l로 $CCl_4$로 유발된 간손상에 의해 증가한 aspartate aminotransferase 활성도를 각각 13.4%, 29.4% 억제하였다. 양성대조군은 432.4±132.6 KA Unit/l로 $CCl_4$ 투여군에 비해 55.9% 억제를 보였다(Table 1).

본 실험에서 BS-5 분획투여군은 $CCl_4$에 의해 증가된 혈장 alanine aminotransferase 활성도 및 aspartate aminotransferase 활성을 감소시키는 것으로 보아 $CCl_4$로 인한 간손상 억제 효과가 있음을 확인하였다.

### 간조직 중 cholesterol 및 triglyceride에 미치는 영향

$CCl_4$는 세포기관 중 endoplasmic reticulum에 손상을 초래하여 지질과 단백 합성 및 효소 활성도에 지대한 영향을 미치게 된다. 따라서, 내인성 triglyceride와 phospholipid의 합성 정도가 변화되고 특히, triglyceride의 수송형인 apoprotein과 lipoprotein의 합성이 저하되어 triglyceride 및 cholesterol이 간세포 내에 축적된다.[5]

홍화자 butanol subfractions의 $CCl_4$로 유발된 간손상에 대한 효과를 관찰하기 위하여 간조직 중 cholesterol를 측정한 결과 $CCl_4$ 투여군은 8.4±0.5 mg/g이었으며, 홍화자 BS-1, BS-2, BS-3 분획투여군은 $CCl_4$로 유발된 간손상에 의해 증가한 cholesterol을 감소시키지 못하였다. 홍화자 BS-4, BS-5, BS-6 분획투여군 및 양성대조군은 각각 7.8±1.4 mg/g, 7.2±2.3 mg/g, 8.3±1.8 mg/g 및 5.8±0.9 mg/g으로 $CCl_4$ 투여군과 비교할 때 감소되었다(Table 2).

간조직 중 triglyceride는 $CCl_4$ 투여군은 17.7±10.2 mg/g이었으며, 홍화자 BS-1, BS-2, BS-3, BS-4, BS-5, BS-6

**Table 1. Effects of subfractions of *Carthamus tinctorius* L. Semen on plasma alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities in $CCl_4$ treated rats**

| Treatment | Dose(mg/kg, p.o.) | ALT(KA Unit/l) | Inhibition(%) | AST(KA Unit/l) | Inhibition(%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Untreated | - | 26.0± 3.8 | - | 105.8± 15.5 | - |
| CCl4 | - | 277.1± 71.4 | - | 946.7± 96.6 | - |
| BS-1 fr.+$CCl_4$ | 100 | 382.4±148.9 | -42.0 | 937.9±285.7 | 0.9 |
| BS-2 fr.+$CCl_4$ | 100 | 324.2±153.6 | -18.8 | 1079.4±580.4 | -14.4 |
| BS-3 fr.+$CCl_4$ | 50 | 158.8± 54.1 | 47.1 | 913.2±308.7 | 3.6 |
| BS-4 fr.+$CCl_4$ | 100 | 264.5±195.4 | 5.0 | 823.3±321.6 | 13.4 |
| BS-5 fr.+$CCl_4$ | 65 | 131.7± 39.9* | 57.9 | 676.4±347.2 | 29.4 |
| BS-6 fr.+$CCl_4$ | 100 | 217.7±173.0 | 23.7 | 877.3±590.8 | 7.5 |
| CM ext.+$CCl_4$ | 150 | 101.5± 39.6** | 69.9 | 432.4±132.6** | 55.9 |

The values are mean±S.D. (n=6). Rats were treated with each agent for three consecutive days. $CCl_4$ (0.4 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. Inhibition (%) was acquired by {1 - (agent + $CCl_4$ value - untreated value)/($CCl_4$ value - untreated value)}×100. *, Significantly different from the $CCl_4$ treated rats (Student's t-test, $p<0.05$). **, Significantly different from the $CCl_4$ treated rats (Student's t-test, $p<0.01$). CM, *Carduus marianus*; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

**Table 2. Effects of subfractions of *Carthamus tinctorius* L. Semen on hepatic cholesterol and triglyceride levels in $CCl_4$ treated rats**

| Treatment | Dose (mg/kg, p.o.) | Choles-terol(mg/g Liver) | % Change | Triglycer-ide(mg/g Liver) | % Change |
|---|---|---|---|---|---|
| Untreated | - | 7.1±0.3 | - | 15.1± 1.7 | - |
| $CCl_4$ | - | 8.4±0.5 | 100 | 17.7±10.2 | 100 |
| BS-1 fr.+$CCl_4$ | 100 | 9.7±2.7 | 115 | 13.8±10.3 | 78 |
| BS-2 fr.+$CCl_4$ | 100 | 10.7±1.4 | 127 | 12.1± 3.3 | 68 |
| BS-3 fr.+$CCl_4$ | 50 | 8.7±1.7 | 103 | 9.1± 2.8 | 51 |
| BS-4 fr.+$CCl_4$ | 100 | 7.8±1.4 | 93 | 9.3± 4.2 | 52 |
| BS-5 fr.+$CCl_4$ | 65 | 7.2±2.3 | 86 | 8.5± 2.5 | 48 |
| BS-6 fr.+$CCl_4$ | 100 | 8.3±1.8 | 98 | 10.0± 2.4 | 57 |
| CM ext.+$CCl_4$ | 150 | 5.8±0.9* | 70 | 14.7± 1.9 | 83 |

The values are mean±S.D. (n=6). Rats were treated with each agent for three consecutive days. $CCl_4$ (0.4ml/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. *, Significantly different from the $CCl_4$ treated rats (Student's t-test, $p<0.01$). CM, *Carduus marianus*.

분획투여군 및 양성대조군은 각각 13.8±10.3 mg/g, 12.1±3.3 mg/g, 9.1±2.8 mg/g, 9.3±4.2 mg/g, 8.5±2.5 mg/g, 10.0±2.4 mg/g 및 14.7±1.9 mg/g으로 모든 투여군에서 $CCl_4$ 투여군과 비교할 때 감소되었다(Table 2).

본 실험에서 BS-5 분획투여군의 간조직 중 cholesterol과 triglyceride의 감소는 간에서의 지방 대사 및 lipoprotein의 합성이 회복된 것으로 생각된다.

## Cytochrome P450에 미치는 영향

$CCl_4$는 phase I 약물 대사 효소인 cytochrome P450에 의해서 대사되며 매우 반응성이 강한 대사 중간체를 형성하여 조직손상을 일으킨다. 따라서 독성 물질의 대사에 관여하는 cytochrome P450의 활성 및 발현의 선택적인 억제는 조직 손상 및 암발생을 차단할 수 있다.[12]

홍화자 butanol subfractions의 $CCl_4$로 유발된 간손상에 대한 방어 기전을 확인하기 위하여 간 microsome 중 cytochrome P450을 측정한 결과 $CCl_4$ 투여군은 0.40±0.05 μmol/mg protein이었으며, 홍화자 BS-1, BS-3 및 BS-6 분획투여군은 $CCl_4$ 투여군보다 증가되었다. 홍화자 BS-4, BS-5 분획투여군 및 양성대조군은 각각 0.27±0.09 μmol/mg protein, 0.31±0.05 μmol/mg protein 및 0.30±0.04 μmol/mg protein으로 $CCl_4$ 투여군과 비교할 때 감소되었다(Table 3).

본 실험에서 홍화자 BS-4 및 BS-5 분획투여군의 cytochrome P450 감소는 $CCl_4$의 대사물인 매우 반응성이

**Table 3. Effects of subfractions of *Carthamus tinctorius* L. Semen on cytochrome P450 level in $CCl_4$ treated rats**

| Treatment | Dose (mg/kg, p.o.) | CYP ( μ mol/mg protein) | % Change |
|---|---|---|---|
| Untreated | - | 0.24±0.02 | - |
| $CCl_4$ | - | 0.40±0.05 | 100 |
| BS-1 fr.+$CCl_4$ | 100 | 0.40±0.09 | 100 |
| BS-2 fr.+$CCl_4$ | 100 | 0.38±0.03 | 93 |
| BS-3 fr.+$CCl_4$ | 50 | 0.43±0.06 | 106 |
| BS-4 fr.+$CCl_4$ | 100 | 0.27±0.09 | 65 |
| BS-5 fr.+$CCl_4$ | 65 | 0.31±0.05 | 74 |
| BS-6 fr.+$CCl_4$ | 100 | 0.42±0.04 | 102 |
| CM ext.+$CCl_4$ | 150 | 0.30±0.04 | 75 |

The values are mean±S.D. (n=6). Rats were treated with each agent for three consecutive days. $CCl_4$ (0.4 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. CM, *Carduus marianus*; CYP, cytochrome P450.

강한 대사 중간체 형성을 감소하여 간손상 억제할 것으로 생각된다.

## Glutathione S-transferase 활성에 미치는 영향

간 cytosol 분획의 phase II 대사 효소인 glutathione S-transferase는 세포내로 유입된 약물들이 대사되어 생성되는 oxygen radicals 및 친전자성 xenobiotics에 glutathione의 thiol기를 포함하며, 세포간의 물질 이동에도 관여하는 등 다양한 기능을 가지고 있다. 이러한 glutathione S-transferase의 포합작용과 수송작용에 의해 내인성 또는 외인성 독성 화합물의 해독화 작용이 가능하게 된다. $CCl_4$의 대사

**Table 4. Effects of subfractions of *Carthamus tinctorius* L. Semen on glutathione S-transferase activity in $CCl_4$ treated rats**

| Treatment | Dose (mg/kg, p.o.) | GST( μ mol/min/mg protein) | % Change |
|---|---|---|---|
| Untreated | - | 1.43±0.10 | - |
| $CCl_4$ | - | 1.18±0.15 | 100 |
| BS-1 fr.+$CCl_4$ | 100 | 1.19±0.04 | 101 |
| BS-2 fr.+$CCl_4$ | 100 | 1.17±0.07 | 98 |
| BS-3 fr.+$CCl_4$ | 50 | 1.26±0.12 | 106 |
| BS-4 fr.+$CCl_4$ | 100 | 1.38±0.14 | 117 |
| BS-5 fr.+$CCl_4$ | 65 | 1.38±0.12 | 117 |
| BS-6 fr.+$CCl_4$ | 100 | 1.25±0.03 | 106 |
| CM ext.+$CCl_4$ | 150 | 1.36±0.07 | 115 |

The values are mean±S.D. (n=6). Rats were treated with each agent for three consecutive days. $CCl_4$ (0.4ml/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. CM, *Carduus marianus*; GST, glutathione S-transferase.

에 의해 생긴 free radicals도 glutathione S-transferase에 의해 glutathione과 포합되나 glutathione이 소모되면 과산화지질의 생성이 증가되고 독성을 일으키게 되므로 그 방어작용으로서 glutathione S-transferase의 유도 발현이 증가된다.[13-16]

홍화자 butanol subfractions의 $CCl_4$로 유발된 간손상에 대한 방어 기전을 확인하기 위하여 간 cytosol 중 glutathione S-transferase 활성도를 측정한 결과 $CCl_4$ 투여군은 1.18±0.15 μmol/min/mg protein이었으며, 홍화자 BS-3, BS-4, BS-5, BS-6 분획투여군 및 양성대조군은 각각 1.26±0.12 μmol/min/mg protein, 1.38±0.14 μmol/min/mg protein, 1.38±0.12 μmol/min/mg protein, 1.25±0.03 μmol/min/mg protein 및 1.36±0.07 μmol/min/mg protein으로 $CCl_4$ 투여군과 비교할 때 증가되었다(Table 4).

본 실험에서 특히 홍화자 BS-4 및 BS-5 분획투여군의 glutathione S-transferase 활성도가 $CCl_4$ 투여군에 비해 17% 증가한 것은 $CCl_4$의 대사에 의해 생긴 free radicals의 과산화지질에 대한 방어 작용에 의해 glutathione S-transferase의 활성이 증가되는 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 나타난 바와 같이 홍화자 butanol subfractions 중 BS-5 분획물의 $CCl_4$로 유발된 간손상에 대한 보호 효과를 혈장 및 조직 생화학적 분석을 통해 확인하였으며, 이는 cytochrome P450 감소와 glutathione S-transferase의 활성 증가를 통해 간손상 보호 작용을 나타낸 것으로 생각된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 99년도 덕성여자대학교 약학연구소와 과기처 선도기술개발과제 연구비의 지원으로 수행된 것으로 연구비 지원에 깊이 감사드립니다.

## 국문요약

본 연구소에서는 사염화탄소로 유발된 간손상에 대한 홍화자 메탄올 추출물과 이를 계통 분획한 분획물의 보호 효과를 이미 보고하였다. 본 실험에서는 혈장과 조직 생화학적 분석으로 홍화자 분획물의 간보호 효과를 확인하며, 간보호 작용에 대한 기전을 살펴보기 위하여 약물 대사 효소에 미치는 영향을 측정하였다. 홍화자 butanol subfractions 중 BS-5 분획물은 $CCl_4$로 간손상을 유발시킨 흰쥐에서의 혈장 ALT와 AST 활성과 간조직 중 cholesterol and triglyceride를 감소시켰으며, 이러한 BS-5 분획물의 $CCl_4$로 유발된 간손상에 대해 보호 작용은 cytochrome P450 감소와 glutathione S-transferase의 활성 증가에 기인된 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Sipes, I. G. and Grandolfi, A. J.: Biotransformation of Toxicants, Toxicology: The Basic Sciences of Poisons, ed. by M. O. Klassen, M. O. Amdur, and J. Doull, New York, Pergamon Press (1991)
2. Geoffrey, J. B. and John, O. H.: Glutathion S-transferase ; Biomedical Applications. *Advances in Clinical Chemistry* **30**, 281-380, Scotland (1994)
3. McCay, P. B., Lai, E. K., Poyer, J. L., Dubose, C. M. and Janzen, E. G.: Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolosm, *J. Biol, Chem.* **259**, 2135-2143 (1984)
4. 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)
5. 北川淸雄 : 독성학, 남강당 (1982)
6. 중약대사전, 소학관, 689-691 (1985)
7. 강혜경: 사염화탄소에 의한 간독성에 미치는 홍화자추출물의 억제 효과. 덕성여자대학교 박사 학위논문 (1997)
8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. R.: Protein measurement with the foline phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951)
9. Omura, T. and Sato, R.: Carbon monoxide-bending pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **239** (1964)
10. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B.: Glutathion S-transferase: The first enztymatic step in mercapturic acid formation. *J. Bio. Chem.* **249**, 7130-7139 (1974)
11. Hayes: *Principles and Methods of Toxicology*, Gabriel L. Plaa and William R. Hewitt., Raben Press, 407-445 (1982)
12. 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)

13. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527 (1979)
14. Vos. R. E. M. and Van Bladeren, P. J.: Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* **41**, 241-265 (1990)
15. Ploemen, J. H. T. M., Van Ommen, B. and Van Bladeren, P. J.: Inhibition of rat and human glutathione S-transferases isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathion conjugate. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 1631-1635 (1990)
16. Matharoo, B., Faulder, G. C. and Steange, R. C.: Alpha, mu and pi glutathione S-transferases: Species (Talpa Europaea) differences in their expression. *Comp. Biochem. Physiol.* **94**, 343-347 (1989)