

# DMN으로 유발된 흰쥐의 간섬유화에 미치는 大薊의 효과

박성규<sup>1</sup> · 이은주<sup>1</sup> · 길재호<sup>2</sup> · 배현수 · 홍무창 · 신민규\*

경희대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 경희대학교 한의과대학 방제학교실, 2: 경희대학교 체육대학 스포츠의학전공

## Cirsii Japonici Herba Extract Decreases the Dimethylnitrosamine-induced Hepatic Fibrosis in Rats

Seong Kyu Park<sup>1</sup>, Eun-Ju Lee<sup>1</sup>, Jae Ho Kihl<sup>2</sup>, Hyun Su Bae, Moo Chang Hong, Min Kyu Shin\*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University,  
1: Department of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University,  
2: Department of Sports Medicine, Kyunghee University

**Objectives :** Cirsii Japonici Herba (CJH) is one of medicinal plants that has been frequently used for styptic purposes in Asian countries. In order to evaluate a hepatoprotective effects of CJH in the liver fibrotic diseases, the present study investigated how CJH improves a hepatic function in the dimethylnitrosamine(DMN) treated rat. **Methods :** CJH were orally administered to rats that has been treated with DMN. Subsequently, the amount of blood L-asparate aminotransferase (AST), L-alanine aminotransferase (ALT), and hydroxyproline were quantitated. Several histopathological markers for examining the degree of hepatic fibrosis were investigated by H-E and Masson-Trichrome staining. **Results :** DMN treatment caused a increase of relative liver weight to the body at 14 days after DMN induction. Administration of CJH with 100mg/kg and 1,000mg/kg dose decreased significantly the AST level elevated by DMN injection(p<0.01). But ALT level was not improved. The hydroxyproline level was reduced by a simultaneous treatment of CJH with DMN for 7 days, but not recovered completely to its normal value. CJH administration improved conspicuously the DMN-induced histopathological changes of liver such as granuloma, but cell necrosis and fibrosis were not improved with CJH 1,000mg/kg dose. **Conclusion :** These results indicate that CJH has protective effect on liver injury and can inhibit liver fibrosis Induced by DMN in rats.

**Key words :** Cirsii Japonici Herba, liver fibrosis, dimethylnitrosamine, hydroxyproline, rat

### 서 론

간경변은 간염 등으로 인한 간세포의 지속적인 파괴와 이에 따른 섬유화 현상 (liver fibrogenesis) 및 재생결절 (nodule)로 간이 굳어지고 모양이 일그러지는 병증으로, 약 20-40%가 간암으로 진행된다<sup>1)</sup>. 간염의 경우 간의 염증이 소멸되면 간기능이 회복될 수 있고 상대적으로 많은 치료제가 개발되어있으나, 간경변의 경우는 일단 섬유화가 진행되면 정상간으로 복원 될 수 없는 특징이 있으며, 만성간질환 및 간경변에 의한 사망률이 계속적으로 증가하고 있다. 간손상으로 인한 섬유화는 간세포괴사 이후에 나

타나고 또한 zone 1의 portal-portal fibrous bridges를 일으키는 경계면 간염이 생긴 이후에 나타난다<sup>2)</sup>.

Dimethylnitrosamine(DMN)은 광범위하게 분포되어 있는 발암물질로서 음식, 흡연, 공업화된 환경과 관련이 있다. 알콜 및 CCl<sub>4</sub> 등이 in vivo에서 간손상 유발 물질로서 잘 알려져있지만, DMN은 간 섬유화의 유발에 빈번하게 사용되는 물질이다<sup>3)</sup>. DMN으로 유발된 간경화 모델은 CCl<sub>4</sub> 모델에 비하여 매우 빠르게 ECM protein을 간에서 침착시키며, 특히 collagen과 심각한 hepatocellular necrosis는 섬유화 억제 약물의 검색에 유용한 수단이다<sup>4)</sup>.

大薊은 국화과에 속한 다년생 宿根草本인 영경귀(Cirsium japonicum var. ussuriense Kitam.) 및 同屬 近緣植物의 全草를 건조한 것을 말하며 心·肝經으로 歸經하여 涼血止血하고 祛瘀消腫하는 효능이 있어서 각종 出血證에 양호한 치료효과가 있다.

\* 교신저자 : 신민규, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

· E-mail : shinmk@khu.ac.kr, Tel : 02-961-0333

· 접수 : 2004/01/07 · 수정 : 2004/02/23 · 채택 : 2004/03/22

이 외에도 임상에서는 利膈作用과 利尿作用이 있어 急·慢性肝炎이나 腎炎에 적용하여 일정한 치료효과가 있다<sup>9)</sup>. 大薊에 관한 연구로는 권<sup>6)</sup>, 김<sup>7)</sup> 등의 연구가 있었으며 이는 주로 止血 효과에 대한 실험이었고, 이<sup>8)</sup> 등의 抗酸化에 대한 효과, 임<sup>9)</sup> 등의 肝機能에 미치는 영향에 관해 효과적이라는 보고가 있었으며, 차<sup>10)</sup> 등의 hepG<sub>2</sub> cell을 사용한 간세포 산화독성에 미치는 영향에 관한 연구가 보고 되었다. 그러나 간손상에 대한 기존의 연구들은 대부분 CCl<sub>4</sub>를 이용한 간손상에 관한 것으로서 간섬유화를 특징으로 하는 간경화모델의 조직변화에 관한 대개의 효과에 대한 연구는 보고되지 않았다.

이에 DMN을 이용한 간섬유화 동물 모델을 구축한 후 투여군이 간조직의 섬유화 억제에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 혈청중의 생화학적 지표, collagen 및 병리조직학적 비교 관찰을 실시하여 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 재료 및 동물

#### 1) 동물

실험동물은 200±20g 내외 7주령의 wistar계 수컷 흰쥐(중앙동물실험, 한국)를 고탄사료(삼양 배합사료 실험동물용, 삼양유지사료, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 7일간 실험실 환경(온도 22±2°C, 습도 55±5%, light/dark 12h)에 적응시킨 후 사용하였다.

#### 2) 약제

본 실험에 사용된 大薊 (Cirsii Japonici Herba (CJH), 울릉도, 한국, 2002)는 평화건강 제약사 (서울)에서 구입하였고 경희대학교 한의과대학 방제학교실에서 확인한 후 실험에 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 p-dimethylnitrosamine(DMN), 4-hydroxyproline, Sodium acetate(trihydrate), Trisodium citrate, Citric acid monohydrate, Chloramin T., AST 및 ALT kit는 sigma 제품(Sigma Co., U.S.A.)을 사용하였고, Isopropanol(Merck, Germany)과 HCl, Perchloric acid(Duksan, Korea)를 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 환류추출기(Duksan, Korea), Rotary evaporatory(Eyela, Japan), Freeze dryer(Eyela, Japan), pH meter(Hanna-8417, U.S.A.), UV- spectrophotometer (Molecular devices, U.S.A.) 등 이었다.

### 2. 방법

#### 1) 시료의 조제

건조된 大薊 125.5g을 분쇄기로 분말화하여 70% ethanol (Duksan, Korea) 1 l 가 담긴 플라스크에 넣고 실온에서 sonicator (Branson, U.S.A.)로 10분간 추출하여 상청액을 포집 하였다. 이를 85%, 100% ethanol을 이용하여 같은 방법으로 추출한 후 상청액을 모두 혼합하였다. 거즈로 여과한 여액을 evaporator (Eyela, Japan)로 농축한 후, lyophilizer(Eyela, Japan)로 동결건조하여 건조추출물 27.32g (수율 21.77%)을 회수하였다. 동결 건조한 추출물들을 일정량의 증류수에 용해한 후 경구투여하였다.

#### 2) 실험군

한약제가 DMN으로 유발된 간섬유화에 미치는 영향을 측정하기 위하여 각 실험군 당 흰쥐 10마리를 1군으로 하여, 정상군 (Normal), DMN 투여군(Control), DMN 및 대계 100mg/kg 병행 투여군, DMN 및 대계 1,000mg/kg 병행 투여군으로 나누었다.

#### 3) 간경화 유발 및 시료 투여

실험 동물은 1주일의 적응 기간이 지난후, 간경화를 유발하기 위하여 DMN 40mg/kg의 용량을 복강내에 1회 주사하였다<sup>11)</sup>. 1주일이 경과한 날부터 대계 투여군에 대하여 각각 저용량 (100mg/kg) 및 고용량(1,000mg/kg)을 7일간 매일 1회씩 경구투여 하였다. DMN 투여군은 같은 양의 증류수 2ml를 7일간 매일 경구투여 하였다. 위와 같은 방법으로 7회 경구투여 한 후 흰쥐를 ether로 가볍게 마취하여 심장으로부터 채혈하였다. 채혈한 혈액은 실온에서 약 30분 정도 방치한 후 원심분리기에 넣고 2,000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다.

### 3. 간기능 측정

#### 1) 간장 및 체중의 변화<sup>12)</sup>

체중은 2일 간격으로 측정하였고, 심장 채혈 후 각 개체들로부터 간장을 적출한 즉시 전자저울(Mettler, U.S.A.)로서 중량 (Wet weight)을 측정하였다.

#### 2) 혈액 생화학적 분석

##### (1) 혈중 AST 함량 측정

Aspartate aminotransferase(AST)의 활성은 1ml의 L-aspartate 200mM, 2-oxoglutarate 12mM, malate dehydrogenase 600unit/L, NADH 0.25mM이 함유된 Hepes 완충용액(pH 7.8)에 100μl의 혈청을 더하여 340nm에서의 흡광도의 시간당 감소율로 측정하였다. 사용시약은 AST kit를 사용하여 UV spectrophotometer로 측정하였다.

##### (2) 혈중 ALT 함량 측정

Alanine aminotransferase(ALT)의 활성은 1ml의 L-alanine 400mM, 2-oxoglutarate 12mM, lactate dehydrogenase 2,000unit/L, NADH 0.25mM이 함유된 Hepes 완충용액(pH 7.4)에 100μl의 혈청을 더하여 340nm에서의 흡광도의 시간당 감소율로 측정하였다. 사용시약은 ALT kit를 사용하여 UV spectrophotometer로 측정하였다.

##### (3) 혈중 Total Bilirubin(T-Bil) 함량 측정

혈중 Bilirubin의 측정은 A.A.B.법<sup>13)</sup>에 의하여 UV spectrophotometer로서 bilirubin 측정용 kit를 이용하여 측정하였다. 즉, 총 빌리루빈의 경우 혈청에 완충액 1ml과 다이피린시액 1ml을 넣고, 실온에서 10분간 방치 후 페링시액 1ml을 첨가하여 600nm의 파장으로 측정하였다. 표준혈청 20mg/ml을 시액블랭크로 설정하였다. 이 방법은 혈청 중의 간접 빌리루빈을 다이피린시액에 의하여 디아조 시액과 반응을 할 수 있도록 한 후, 다시 디아조 시액을 가하여 총빌리루빈을 측정하는 것이다.

##### (4) 혈중 Albumin 함량 측정

혈중 Albumin의 측정은 B.C.G.법<sup>14)</sup>에 의하여 UV spectrophotometer로서 albumin 측정용 kit를 이용하여 측정하

였다. 혈청 20 $\mu$ l를 정색시약과 함께 혼합하여 실온에서 10분간 방치 후 시약 블랭크를 대조로하여 630nm에서 흡광도를 측정하여 표준액의 검정선에 의하여 albumin 양을 계산하였다. 이 방법은 albumin이 pH4.0 부근에서 BCG와 반응하여 albumin 양에 비례하여 녹색을 나타내므로 파장 630nm에서 흡광도를 측정하여 albumin 양을 측정하는 것이다.

(5) LDH(lactate dehydrogenase) 함량 측정

혈중 LDH의 측정은 효소법(젖산 기질법)<sup>15)</sup>에 의하여 UV spectrophotometer로서 LDH 측정용 kit를 이용하여 측정하였다. 기질액 500 $\mu$ l와 정색시약 500 $\mu$ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치 후 혈청 50 $\mu$ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하고, 희석반응정 지역 3ml을 첨가한 뒤, 혼합하여 570nm에서 시약 블랭크를 대조로 흡광도를 측정하였다. 혈청 중의 LDH는 젖산을 탈수소화시켜 피루빈산을 생성하는데 이때 보조소 NAD는 환원되어 NADH로 된다. 이때 생성된 NADH는 1-Methoxy PMS의 존재하에 NTB(Nitrotetrazolium blue)를 환원시켜 디포르마잔을 생성한다. 이 디포르마잔의 정색을 비색정량하여 LDH의 활성을 측정한다.

3) Collagen 함량 측정(Hydroxyproline Levels in the Liver)

Hydroxyproline의 함량을 간장의 collagen 양의 기준으로 하였다<sup>16)</sup>. 적출된 간장으로부터 0.2g의 조직을 채취하여 6 N HCl 용액 4ml과 함께 균질화 하였다. teflon 처리된 시험관에 넣고 110 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 가수분해하였다. 이것을 50 $\mu$ l 씩 시험관에 나누어 65 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 증발시켰다. Isopropanol 1.2ml을 각각 넣고, 0.56% 완충 chloramine-T 용액을 0.2ml 씩 첨가했다. 10분이 경과한 후 1.0ml의 Ehrlich's 용액을 각각 넣었다. 각각을 충분히 혼합하고 50 $^{\circ}$ C에서 90분간 배양하여 발색시켰다. UV spectrophotometer를 이용하여 558nm에서 증류수를 대조로하여 흡광도를 측정하였다.

4) 병리조직학적 관찰

각 실험군에서 부검한 흰쥐의 간장 조직을 육안적으로 관찰한 후 10% 중성 formalin에 고정하였다. 이들 고정된 조직은 파라핀 포매 과정을 거쳐 로타리 마이크로톰으로 4 $\mu$ m 두께로 조직 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin(H-E) 및 Masson trichrom 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다.

4. 통계처리

실험성적은 평균치 $\pm$ 표준편차(Mean $\pm$ SD)로 나타내었으며, 대조군과 실험군의 평균의 차이를 검정할 때에는 Student's t-test로 검정하여 P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 간장 및 체중의 변화

DMN 투여후 실험 동물의 체중은 급격하게 감소하였으며 일부 동물은 2주동안 생존하지 못하였다. DMN 투여로 인한 체중 감소는 대계 투여에 의하여 회복되지 않았다.

간장과 체중의 비율은 정상군에 비하여 DMN 투여 대조군

이 유의성있게 증가하였다. 대계-100mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 감소하였으나, 대계-1,000mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 증가하였다.(Fig. 1, Table 1)

Table 1. Mean body and relative liver weights

| Groups and treatment | No. of rats | body weight (g)  | Liver weighr (g) | liver/body weight ( $\times$ 100) |
|----------------------|-------------|------------------|------------------|-----------------------------------|
| Normal               | 9           | 331.9 $\pm$ 9.1  | 11.5 $\pm$ 1.1   | 3.47 $\pm$ 0.31                   |
| Control              | 8           | 255.5 $\pm$ 17.2 | 9.1 $\pm$ 1.4    | 3.53 $\pm$ 0.34                   |
| CJH-100mg/kg         | 6           | 268.7 $\pm$ 17.1 | 9.7 $\pm$ 1.6    | 3.45 $\pm$ 0.25                   |
| CJH-1,000mg/kg       | 8           | 286.3 $\pm$ 18.9 | 11.0 $\pm$ 0.9   | 3.83 $\pm$ 0.25                   |

Value represent mean $\pm$ SD. Control rats were prepared by intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine 14 days.

Fig. 1 Effect of Cirsii Japonici Herba extract on liver weight in the DMN-treated rat. Liver weight was measured at 14 days after beginning experiment in the rats treated with DMN alone and DMN with Cirsii Japonici Herba extract. Cirsii Japonici Herba extracts were administered orally for 1 weeks after 1weeks of DMN treatment. Values represent mean $\pm$ SD. CJH100 : Cirsii Japonici Herba extract 100mg/kg, CJH1000 : Cirsii Japonici Herba extract 1,000mg/kg

2. 혈액 생화학적 분석

1) 혈중 AST(GOT) 함량 측정

정상군의 혈중 AST 함량 108.6 $\pm$ 9.9 U/I에 비하여 대조군은 151.9 $\pm$ 33.6 U/I으로 유의한 상승을 보였고(n=6, p=0.02), 대계-100mg/kg 투여군에서는 118.4 $\pm$ 48.8 U/I, 대계-1,000mg/kg 투여군에서는 99.5 $\pm$ 16.1 U/I (n=6, p=0.010)으로 용량의존적인 상승 억제효과를 관찰할 수 있었다. (Table 2)

2) 혈중 ALT(GPT) 함량 측정

정상군의 혈중 ALT 함량 53.6 $\pm$ 7.5 U/I에 비하여 대조군은 84.9 $\pm$ 26.9 U/I으로 유의한 상승을 보였고(n=6, p=0.04), 대계-100 mg/kg 투여군에서는 79.1 $\pm$ 21.3 U/I, 대계-1,000mg/kg 투여군에서는 83.0 $\pm$ 17.1 U/I으로 상승 억제효과를 나타내었다. (Table 2)

3) 혈중 Total Bilirubin(T-Bil) 함량 측정

정상군의 혈중 total bilirubin 함량 0.24 $\pm$ 0.02mg/dl에 비하여 대조군은 0.37 $\pm$ 0.09mg/dl으로 상승을 보였고(n=6, p=0.01), 대계-100mg/kg 투여군에서는 0.31 $\pm$ 0.02mg/dl, 대계-1,000mg/kg 투여군에서는 0.31 $\pm$ 0.01mg/dl으로 상승 억제효과를 나타내었다(Table 2).

4) 혈중 Albumin 함량 측정

정상군의 혈중 albumin 함량 3.60 $\pm$ 0.09g/dL에 비하여 대조군은 3.46 $\pm$ 0.54g/dL으로 감소를 보였고, 대계-100mg/kg 투여군에서는 3.65 $\pm$ 0.16g/dL, 대계-1,000mg/kg 투여군에서는 3.75 $\pm$ 0.10g/dL으로 상승하였다. (Table 2)

5) 혈중 LDH(lactate dehydrogenase) 함량 측정

정상군의 혈중 LDH 함량 713.20±194.28IU/L에 비하여 대조군은 916.40±394.44IU/L으로 상승하였고, 대계-100mg/kg 투여군에서는 415.80±169.94IU/L, 대계-1,000mg/kg 투여군에서는 556.25±56.59IU/L으로 나타났다. (Table 2)

**Table 2. Effects of administration of Cirsii Japonici Herba extract on AST, ALT levels in Hepatopathic rats for 7d.**

| Groups and treatment | AST(U/l)    | ALT(U/l)   | T-Bil (mg/dl) | Alb(g/dl) | LDH (IU/L)    |
|----------------------|-------------|------------|---------------|-----------|---------------|
| Normal               | 108.6±9.9   | 53.6±7.5   | 0.24±0.02     | 3.60±0.09 | 713.20±194.28 |
| Control              | 151.9±33.6* | 84.9±26.9* | 0.37±0.09**   | 3.46±0.54 | 916.40±394.44 |
| CJH-100mg/kg         | 118.4±48.8  | 79.1±21.3  | 0.31±0.02     | 3.65±0.16 | 415.80±169.94 |
| CJH-1,000mg/kg       | 99.5±16.1   | 83.0±17.1  | 0.31±0.01     | 3.75±0.10 | 556.25±56.59  |

Each value is the mean±SD of 6 experiments. # Significantly different from the normal value(#p<0.05) \* Significantly different from the control value(\*p<0.05). CJH : Cirsii Japonici Herba extract. Control rats were prepared by intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine 14 days.

**3. Decrease of collagen content (Hydroxyproline Levels in the Liver)**

간섬유화를 유발한 흰쥐의 간조직에서 collagen 함량을 정량하기 위하여 hydroxyproline level을 측정하였고, 정상군의 hydroxyproline level은 0.1048이었으며 DNM 투여군에서는 0.1198으로 발현이 증가되었다. 대계-100mg/kg투여군에서는 발현정도가 0.1107로서 DNM 투여군 보다는 발현이 감소되었으며, 대계-1,000mg/kg투여군에서는 발현정도가 0.1136로서 DNM 투여군 보다는 발현이 감소되었다(Table 3).

**Table 3. Effects of administration of Cirsii Japonici Herba extract on Hydroxyproline Levels in Hepatopathic rats for 7d.**

| Groups and treatment | Hydroxyproline(O.D.) | Inhibition Rate(%) |
|----------------------|----------------------|--------------------|
| Normal               | 0.1048±0.005         | -                  |
| Control              | 0.1198±0.007*        | 100                |
| CJH-100mg/kg         | 0.1107±0.002         | 60.7               |
| CJH-1,000mg/kg       | 0.1136±0.007         | 41.3               |

Each value is the mean±S.D. of 6 experiments. # Significantly different from the normal value(#p<0.05) \* Significantly different from the control value(\*p<0.05). CJH : Cirsii Japonici Herba extract. Control rats were prepared by intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine 14 days.

**4. Histopathological changes**

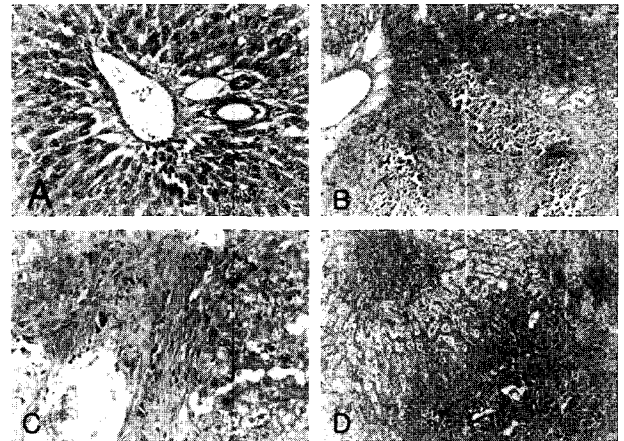
간섬유화를 유발한 흰쥐에서 Hematoxylin & Eosin 및 Masson-Trichrome 염색으로 간조직을 관찰하였다. 정상군에서는 간소엽의 입체구조가 잘 유지되었고, 문맥 주위 및 중심정맥 주위의 섬유화 및 간세포 괴사나 염증반응은 관찰되지 않았다(H-E 염색). Masson-Trichrome 염색 결과 collagen은 관찰되지 않았다.(Fig.2, 3) DNM 투여군에서는 간소엽의 입체구조가 소실되었고 문맥주위와 중심정맥 주위로 어느 정도의 섬유화가 관찰되었다. 간조직 전반에 걸쳐 간세포 괴사는 관찰되지 않았으나, 염증반응이 관찰되었다. 문맥주위 및 중심정맥 주위로 비교적 많은 collagen이 관찰되었다.(Fig.2, 3) 대계-100mg/kg투여군에서는 간소엽의 입체구조가 소실되었고 문맥주위와 중심정맥 주위로 어느 정도의 섬유화가 관찰되었다. 간조직 전반에 걸쳐 간세포 괴사는 관찰되지 않았으나, 염증반응이 심하게 관찰되었다. 문맥주위 및 중심정맥 주위로 비교적 많은 collagen이 관찰되었

다.(Fig.2, 3) 대계-1,000mg/kg투여군에서는 간소엽의 입체구조가 소실되었고 문맥주위와 중심정맥 주위로 심한 정도의 섬유화가 관찰되었다. 간조직 전반에 걸쳐 간세포 괴사가 심하게 관찰되었으며, 염증반응이 심하게 관찰되었다. 문맥주위 및 중심정맥 주위로 많은 collagen이 관찰되었다.(Fig.2, 3)

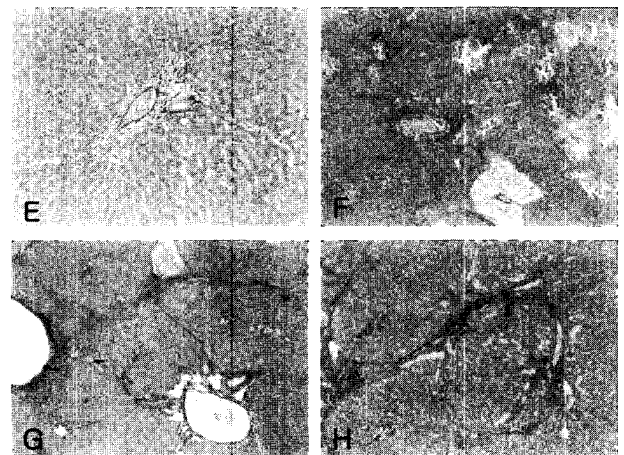
**Table 4. Effects of the administration of Cirsii Japonici Herba extract on Liver Fibrosis Area in hepatopathic rats.**

| Groups and treatment | Normal | Control | CJH-100mg/kg | CJH-1,000mg/kg |
|----------------------|--------|---------|--------------|----------------|
| Fibrosis             | -      | ++      | ++           | +++            |
| Granuloma            | -      | +++     | +            | -              |
| Necrosis             | -      | -       | -            | ++             |
| Nuclear change       | -      | ++      | ++           | ++             |
| Mitoses              | WNL    | +       | +            | +              |
| Neutrophils          | -      | ++      | ++           | ++             |
| Lymphocytes          | -      | +       | ++           | ++             |

Fibrosis : - : Normal connective tissue, + : portal, ++ : periportal, +++ : septal, ++++ : cirrhosis. Others : - : absent, + : mild(focal), ++ : moderate(several foci), +++ : severe(multifocal)



**Fig. 2. Photomicrographs of Liver Tissue from Liver-Injury Rats (stain Hematoxylin-Eosin)** A: Normal rat. B: Rat liver-injury after administration of water (control). C: Rat liver-injury after administration of water extract of Cirsii Japonici Herba-100mg/kg dose. D: Rat liver-injury after administration of water extract of Cirsii Japonici Herba- 1,000mg/kg dose.



**Fig. 3. Photomicrographs of Liver Tissue from Liver-Injury Rats (stain Masson trichrome)** E: Normal rat. F: Rat liver-injury after administration of water (control). G: Rat liver-injury after administration of water extract of Cirsii Japonici Herba-100mg/kg dose. H: Rat liver-injury after administration of water extract of Cirsii Japonici Herba- 1,000mg/kg dose.

## 고찰 및 결론

간경변은 지속적이고 반복적인 미만성 간손상과 그 결과로 섬유화와 간세포의 재생결절이 형성되는 질환이다. 간손상의 구조가 대부분 파괴되어 문맥역과 중심정맥의 입체적 위치관계가 파괴된 것이라 할 수 있다. 이러한 간경변증은 만성적인 다양한 장애가 여러 단계의 과정을 거쳐 간에 가해진 결과로서 생기며, 모든 형태의 만성간질환에서 야기될 수 있다. 만성간질환의 원인은 다양하지만 진행하면 결과적으로 조직학적 양상은 같다<sup>2)</sup>.

간손상 유발 물질로 알콜 및 CCl<sub>4</sub> 등이 in vivo에서 잘 알려져 있지만, DMN은 간 섬유화의 유발에 빈번하게 사용되는 물질이다. 간섬유화 유발에 대하여 CCl<sub>4</sub> 모델은 6주간의 처치가 소요되는데 비하여<sup>17)</sup>, DMN 모델은 3주간의 비교적 짧은 처치 기간이 소요되는 것으로 알려져 있다<sup>18)</sup>. 특히 본 실험에 사용된 DMN 모델은 1회 복강주사 후 2주후에 간섬유화가 유발되는 장점이 특징이다<sup>19)</sup>.

간장과 체중의 비율은 정상군에 비하여 DMN 투여 대조군이 유의성있게 증가하였다. 대계 투여군에서는 대조군에 비하여 통계적인 유의성이 관찰되지 않았으며 이것은 대계의 투여가 DMN으로 유발된 간손상에 대하여 부분적인 회복 효과가 있음을 의미하는 것이다.

간기능을 검사하기 위하여 여러 가지 생화학적 검사는 간 및 담도계 질환의 검색 및 병의 경과 관찰 등에 그 유용성이 인정되고 있다. 간경변증의 경우는 AST가 ALT보다 높으며 대계 AST가 ALT보다 2배 이상 증가한다<sup>20)</sup>. 본 실험의 결과 DMN으로 간손상이 유발된 대조군에서 AST의 함량이 151.9±33.6U/I로서 ALT 함량 84.9±26.9U/I에 비하여 2배 정도 증가하여 간섬유화로 인한 간경변증이 유발되었음을 확인할 수 있다. 특히 AST의 함량에서 대계 투여군은 농도 의존적인 효과가 관찰되었으며 고농도 투여군(1,000mg/kg)에서 현저하게 유의성있는 효과를 나타내었다(p<0.01). ALT함량은 대계 투여군이 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. Bilirubin은 헤모글로빈의 구성성분인 헴(heme)의 대사산물로서 간에서 포함 배설되는데 간질환이 있으면 정체되어 혈중 농도가 증가된다. 본 실험에서 total bilirubin 함량은 대계 투여군이 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. Albumin은 간이 심하게 손상되면 알부민, 프로트롬빈, 피브리노겐 및 여러 단백질의 생성이 감소된다. albumin은 긴 반감기를 가지고 있고 만성질환의 정도를 나타내는 지표로 해석된다. 본 실험에서 albumin 함량은 대계 투여군이 대조군에 비하여 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. LDH(Lactate Dehydrogenase)는 해당작용(Glycolysis system)의 최종 단계에서 작용하는 효소로서, L-lactate를 pyruvate로 전환하는 가역반응을 촉매한다. 간질환에서 LDH의 증가는 aminotransferase 활성치만큼 예민하지는 않지만, 중독성 간염의 경우는 10배이상의 증가를 보인다. 본 실험에서 LDH 함량은 대계 투여군이 대조군에 비하여 감소된 경향을 보였으나 유의성은 없었다.

간섬유화를 유발한 흰쥐의 간조직에서 collagen 함량을 정량

하기 위하여 hydroxyproline level을 측정된 결과, 정상군에 비하여 DNM 투여군은 유의성있게 증가하여 간조직의 섬유화가 유도되었음을 알 수 있다(p<0.05). 대계투여군에서는 대조군보다 hydroxyproline level이 감소하여 간조직의 섬유화를 억제하는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었다. 병리조직학적 변화를 비교하기 위하여 Hematoxylin & Eosin 및 Masson-Trichrome 염색으로 간조직을 관찰하였다. 정상군에 비하여 DNM 투여군에서 괴사는 관찰되지 않았으나, 섬유화 및 염증반응이 관찰되었으며, 비교적 많은 collagen이 관찰되었다. 특히 심한 granuloma가 관찰되었다. 대계-100mg/kg투여군에서는 대조군에 비하여 유사한 병리조직학적 소견을 나타내었으나, 대조군에서 나타난 granuloma 소견은 경미하게 관찰되었다. 대계-1,000mg/kg투여군에서는 대조군에 비하여 염증반응은 유사하였으나, 대조군에서 나타나지 않은 괴사가 중등도로 진행된 소견을 나타내었으며, 섬유화도 더욱 진행되었다. 그러나 대조군에서 나타난 granuloma 소견은 관찰되지 않았다. 따라서 간조직의 섬유화 억제 효과를 관찰하기 위하여 Hematoxylin & Eosin 및 Masson-Trichrome 염색에 의해 간조직의 입체구조, 간세포괴사, 섬유화, 염증반응 및 collagen 발생정도 등을 비교한 결과 대계 투여군은 섬유화 억제 효과가 관찰되지 않았다.

이상의 결과에서 대계는 DMN 투여로 유발된 흰쥐의 간섬유화에 대하여 특히 혈중 AST 함량을 유의성 있게 개선하는 효과를 보였으며, 혈중 ALT 함량, total bilirubin 함량, albumin 함량, LDH 함량에서 개선 경향을 나타내었으며, 간조직에서 hydroxyproline level을 감소시켜 간조직의 섬유화를 억제하는 경향을 나타내었다.

## 참고문헌

1. 이문호. 내과학. 서울:금강출판사. 1003-1018, 1979.
2. 전국한의과대학 간계내과학교수 공저. 간계내과학. 서울:동양의학연구원. 323-325, 2001.
3. Ma JY, Yang JM, Nam JS, Che JH, Cheon WK, Kim NJ, KO BS, Park KJ, Lee YS, Jung KY. Gamiijiya-tang Decreases the Dimethylnitrosamine-Induced Hepatic Fibrosis in the Rats. Korean Journal of Pharmacognosy. 28(4):215-224, 1997.
4. George J, Ramesh Rao K, Stern R. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. Toxicology. 156:129-138, 2001.
5. 안덕균, 이상인. 본초학. 서울:영림사. 390-391, 1991.
6. 권남원, 송병기. 生地黃 및 大薊가 생쥐의 혈장 Prothrombin Time에 미치는 영향. 경희대학교 한의과대학. 5:259-268, 1982.
7. 김종훈, 송병기. 膠艾四物湯加 大薊가 혈액응고 및 지혈작용에 미치는 영향. 경희대학교 한의과대학. 7:167-180, 1984.
8. 이백천, 정영기, 류병호. 영경퀴로부터 분리한 Silymarin 및 Silybin이 Macrophages에 의한 사람 Low Density Lipoprotein의 산화에 대한 항산화 효과. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25(3):286-292, 1997.

9. 임상선, 김미혜, 이종호. 쑥 및 영경귀가 식이성 고지혈증 흰 쥐의 간기능, 체지방 및 담즙산 농도에 미치는 영향. 한국영양학회지. 30(7):797-802, 1997.
10. 차윤엽. 大薊의 HepG2 cell 酸化抑制 효과 및 유전자 발현 profile 分析에 대한 연구. 경희대학교 한의과대학. 2003.
11. Ono M, Miyamura M, Kyotani S, Saibara T, Onishi S, Nishioka Y. Effects of Sho-saiko-to extract on liver fibrosis in relation to the changes in hydroxyproline and retinoid levels of the liver in rats. J. Pharm. Pharmacol. 51(9):1079-1084, 1999.
12. Ma JY, Yang JM, Nam JS, Che JH, Cheon WK, Kim NJ, KoBS, Park KJ, Lee YS, JungKY. Gamijiya-tang Decreases the Dimethylnitrosamine-Induced Hepatic Fibrosis in the Rats. Kor. J. Pharmacogn. 28(4):215-224, 1997.
13. 이삼열. 임상병리검사법. 연세대학교 출판부. 269-271, 1996.
14. 김정천, 김정만. 임상검사법 제요. 고문사. 490-492, 499-501, 435-437, 423-425, 476-478, 392-393, 439-441, 505-506, 1999.
15. 하지용, 백태현, 이재복. 柴胡四物湯이 CCl<sub>4</sub>로 유발된 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한동의병리학회지. 11(2):27-36, 1997.
16. George J, Chandrakasan G. Molecular characteristics of dimethylnitrosamine induced fibrotic liver collagen. Biochim. Biophys. Acta. 1292:215-222, 1996.
17. Guo MZ, Li XS, Xu HR, Mei ZC, Shen W, Ye XF. Rhein inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. Acta Pharmacol Sin. 23(8):739-44, 2002.
18. Ohara K, Kusano M. Anti-transforming growth factor-beta1 antibody improves survival rate following partial hepatectomy in cirrhotic rats. Hepatol Res. 24(2):174, 2002.
19. Nishioka Y, Yoshioka S, Kusunose M, Cui T, Hamada A, Ono M, Miyamura M, Kyotani S. Effects of extract derived from Eriobotrya japonica on liver function improvement in rats. Biol Pharm Bull. 25(8):1053-7, 2002.
20. 이삼열. 임상병리해석법. 연세대학교 출판부. 39, 44, 51-52, 60-64, 1991.