Thioacetamide 유발 급성 간 손상에 대한 모과의 효과

이진아¹ · 신미래¹ · 이지혜² · 박해진³ · 노성수¹

¹대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

²한국한의학연구원 한약자원연구센터

³대구한의대학교 바이오융복합시험센터

The Effect of Chaenomeles Fructus on Thioacetamide-Induced Acute Hepatic Injury

Jin A Lee¹, Mi-Rae Shin¹, Ji Hye Lee², Hae-Jin Park³, and Seong-Soo Roh¹

¹Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

²Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine

³DHU Bio Convergence Testing Center

ABSTRACT This study investigated the effect of Chaenomeles Fructus extract (CF) on thioacetamide (TAA)-induced acute liver injury in rats. Rats were divided into five treatment groups: Normal group (Normal, n=8), TAA-induced with distilled water group (Control, n=8), TAA-induced with silymarin 100 mg/kg group (Silymarin, n=8), TAA-induced with CF 100 mg/kg group (CF100, n=8), and TAA-induced with CF 200 mg/kg group (CF200, n=8). An animal model of acute liver injury was established via an injection of TAA (200 mg/kg of body weight, I.P). Silymarin and CF extracts were administrated (P.O.) simultaneously with TAA for 3 days. Levels of GOT (glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvic transaminase), ammonia, and MPO (myeloperoxidase) were assessed in serum, and the expressions of NADPH oxidase and inflammatory related proteins were analyzed by western blot from liver tissue harvested during autopsy. Our results reveal that CF-administration significantly decreases the levels of serum GOT, GPT, ammonia, and MPO, effectively suppresses NADPH oxidase, and down-regulates the expressions of the NF-κB pathway proteins. These results indicate that administration of CF alleviates the liver injury by inhibiting NADPH oxidase and down-regulating the NF-κB pathway.

Key words: Chaenomeles Fructus, acute hepatic injury, thioacetamide, anti-inflammation

서론

과학기술의 급격한 발달로 화학 독성물질이 증가하고 신약 등이 개발되면서 현대인들은 새로운 독성물질에 대한 노출이 증대될 뿐만 아니라 과도한 스트레스, 음주 및 흡연 등에 의하여 최근 간질환 환자가 증가하는 추세이다(Park 등, 2015). 간(liver)은 외부로부터 유입되는 물질을 대사하여 소변이나 담즙을 통해 배출시키며, 저장 및 해독 기능 등 중요한 역할을 하는 기관 중 하나이다. 간 대사과정의 결과물인 대사체들은 많은 양의 활성산소종을 발생시키며, 과도한 활성산소종은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발한다. 활성산소종에 의해 유발된 산화적 스트레스는 DNA, 지질, 단백질 등 광범위한 손상을 유도할 뿐 아니라 염증반응

을 일으켜 간염을 일으키고, 만성으로 지속할 경우 간섬유화, 간암 등으로 진행하여 사망에 이르게 된다(Kim 등, 2018; Seo와 Kim, 2006; Son 등, 2017).

현재 다양한 간 보호 약물들을 발굴하기 위해 많은 연구가 진행되고 있으나 서양영정귀[Silybum marianum (L.) Gaertn.] 유래의 silymarin 이외에는 간 보호 효능을 가진 약물의 발굴 및 상업화는 뚜렷하게 이루어지지 못하고 있는 실정이다(Abenavoli 등, 2018).

모과(Chaenomeles Fructus)는 장미과(Rosaceae)에 속한 모과나무(*Chaenomeles sinensis* Koehne)의 성숙 과실을 건조한 것으로 성온미산(性溫味酸)하다. 한의학에서는 비위(脾胃)를 조화시켜 습(濕)을 제거하는 약물로 알려져 기관지염의 기침, 가래 완화와 감기 등의 처방에 널리 사용되었으며(Lee 등, 2007; Ryu 등, 2012), 청간(淸肝), 화위(和胃), 서근(舒筋), 조혈(造血), 제습(除濕) 효능이 있어 오수목과탕, 목과탕, 백작목과탕 등으로 사용되었다(Kim 등, 2015). 또한, 모과는 flavonoid, β-sitosterol, tannin, proanthocyanidin 등의 성분을 함유하고 있어 면역력 증가, 감기 예

Received 14 Jan 2021; Revised 2 Mar 2021; Accepted 8 Mar 2021
Corresponding author: Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu 42158, Korea, E-mail: ddede@dhu.ac.kr

Author information: Jin A Lee (Graduate student), Mi-Rae Shin (Professor), Hae-Jin Park (Professor), Seong-Soo Roh (Professor)

방 및 피로 개선 등에도 사용되었다(Kim 등, 2017). 그 외 많은 연구를 통해 에너지대사 조절(Kang 등, 2019), 항응혈 작용(Yoo 등, 2009), 항염증 작용(Ryu 등, 2012) 및 에탄올로 유발된 간독성에 대한 모과의 보호 효과(Lee 등, 2006)가 밝혀졌다.

본 연구에서는 모과의 급성 간 손상 동물 모델에서 모과의 간 보호 효과를 확인하기 위하여 혈액 내에서 간 손상 지표와 NADPH oxidase 및 염증성 단백질의 발현을 확인하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 그 기전에 대하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시료 추출

본 실험에 사용한 모과(Cheongdo, Korea)는 웅기한약국(Daegu, Korea)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 관능검사 후, 약전규격에 적합한 것만을 정선하여 사용하였다. 모과 추출물(CF)은 모과 200 g을 분쇄한 후 증류수 2,000 mL를 가하여 열탕 추출기에 2시간 추출하였다. 얻어진 추출물은 감압 추출장치로 농축 후 동결건조기를 이용해 완전 건조시켜 파우더(수율, 13.3%; 수분함량, 9.1%M)를 얻어 -80°C에서 보관하였으며, 실험 직전에 증류수에 희석하여 사용하였다.

시약

본 실험에 사용된 L-(+)-ascorbic acid와 diethylene glycol은 Alfa Aesar(Lancashire, UK)에서 구입하여 사용하였다. Thioacetamide(TAA), 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS), potassium persulfate, gallic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate, naringin, diethylene glycol, sodium hydroxide, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare(Little Chalfont, UK)에서 구입하였고, NADPH oxidase2(NOX2), p47^{phox}, inhibitor of nuclear factor kappa B alpha(IkBa), phosphorylation inhibitor of nuclear factor kappa B alpha(p-IkBa), phosphorylation of nuclear factor-kappa B p65(NF-κBp65), inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), tumor necrosis factor-alpha(TNF-α), interleukin-1beta(IL-1β), histone, β-actin은 Santa Cruz Biotechnology(Dallas, TX, USA)로부터 구입하였으며, 2차 항체는 GeneTex, Inc.(Irvine, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Protease inhibitor mixture, ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)에서 구입하여 사용했으며,

2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)와 dihydrorhodamine 123(DHR123)은 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)에서, ECL western blotting detection reagents는 GE Healthcare로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit은 Thermo Scientific(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(1912)을 이용하여 측정하였다. 시료 10 μL와 증류수 790 μL, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 50 μL, 20% sodium carbonate 150 μL를 혼합하여 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 UV 분광광도계(Infinite M200, Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 사용했으며 표준 검량선을 구하여 시료 추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

총 플라보노이드 함량을 측정하기 위해 시료 100 μL와 diethylene glycol 1 mL, 1 N NaOH 10 μL를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다(Lister 등, 1994). 표준물질로는 naringin을 사용했으며 표준 검량선을 구하여 시료 추출물의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

시료 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 Blois법(1958)을 이용하여 측정하였다. 농도별로 희석한 시료 용액 100 μL와 60 μM DPPH 용액 100 μL를 혼합하여 30분간 암소 상태로 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 L-ascorbic acid를 사용하였고, 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는 데 필요한 시료의 양을 IC₅₀ 값으로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (\text{OD}_{\text{blank}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{blank}}\} \times 100$$

ABTS 라디칼 소거능 측정

시료 추출물의 ABTS 자유라디칼 소거능을 측정하기 위하여 7.4 mM ABTS 용액과 2.45 mM의 potassium persulfate를 혼합하여 실온의 암소 상태에서 약 16시간 이상 방치하여 ABTS⁺를 형성시킨 후 30°C, 415 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 되도록 에탄올로 희석하였다. 그 후 농도별로 희석한 시료 용액 5 μL와 ABTS 용액 95 μL를 혼합하여 15분 동안 방치한 후 30°C, 415 nm에서 흡광도를 측정하였다(Re 등, 1999). 표준물질로 L-ascorbic acid를 사용했으며, 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는 데 필요한 시료의 양을 IC₅₀ 값으로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (\text{OD}_{\text{blank}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{blank}}\} \times 100$$

실험동물

6주령의 웅성 Sprague-Dawley rat(Daehan Biolink Co., Ltd., Chungbuk, Korea)을 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험을 진행하였다. 동물 사육실 조건은 conventional system으로 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암주기(light-dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였고, 사료(조단백질 18% 이상, 조지방 5.0% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 1.0% 이상, 인 0.85% 이상, 칼륨 0.55% 이상, 나트륨 0.25% 이상, 마그네슘 0.15% 이상; NIH-41, Zeigler Bros, Inc., Gardners, PA, USA)와 물을 충분히 공급하였다. 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대구한의대학교 동물실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)의 승인(승인번호: DHU2020-073)을 받았다.

급성 간 손상 모델

실험군은 정상군(Normal), 대조군(Control), Silymarin 100 mg/kg 투여군(Silymarin), 모과 추출물 100 mg/kg 투여군(CF100), 모과 추출물 200 mg/kg 투여군(CF200) 총 5군으로 각각 8마리씩 분류하였다. 모든 쥐는 일정한 시간에 1회/1일 체중을 측정했으며, 3일간 1회/1일 Silymarin 및 모과 추출물을 경구 투여하였고, 약물투여 1시간 후 TAA 200 mg/kg 복강 투여하였다. 실험종료 후 마취하여 간조직을 적출했으며 복대정맥에서 혈액을 채취하였다.

혈액분석

실험동물의 복대정맥에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 분리한 혈청을 이용하여 MPO(myeloperoxidase), 암모니아, GOT(glutamic oxaloacetic transaminase) 및 GPT(glutamic pyruvic transaminase) level을 측정하였다. MPO(BioVision, Milpitas, CA, USA), 암모니아(Abcam, Cambridge, UK)와 GOT, GPT(Asan, Seoul, Korea)는 시약세트를 구입하여 측정하였다.

조직 western blotting

간의 세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM Tris-HCl(pH 7.5), 2 mM MgCl_2 , 15 mM CaCl_2 , 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder(BioSpec Product, Oklahoma, USA)로 분쇄한 후 아이스 위에서 30분간 정치시켰다. 그 후 10% NP-40 용액을 첨가하여 12,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40이 더해진 buffer A에 두 번 행구고 100 μL 의 buffer C(50 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재부유시킨 뒤 10분마다 vortex를 3번 하였다. 4°C 에서 12,000 rpm으로

10분간 원심분리한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C 에서 각각 냉동 보관하였다. 간조직 세포질에서 NOX2, p47^{phox}, IkBa, p-IkBa, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 및 β -actin과 핵에서 NF- κB p65와 histone 단백질 발현을 측정하기 위하여 12 μg 의 단백질을 10~14% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody(1:1,000)를 처리하여 4°C 에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 antibody에 사용되는 2차 antibody(1:3000)를 사용하여 상온에서 1시간 30분 반응시킨 후 PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그 후 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액에 노출해 Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Seoul, Korea)을 이용하여 단백질 발현을 확인했으며, 해당 band를 ATTO Densitograph Software(ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량하였다. 각각의 단백질 수준을 정상군의 단백질 수준으로 나눈 후 상대적 비로 나타내었다(represented as 1).

조직학적 관찰

간조직을 10% neutral buffered formalin에 고정된 다음 graded alcohol로 탈수시키고 파라핀으로 포매하여 block을 제작한 후 microtome으로 5 μm 두께의 조직 절편을 제작하여 hematoxylin & eosin(H&E) 염색을 시행하였으며, xylene clearing을 거쳐 permount로 처리한 후 광학현미경으로 병변의 유무를 관찰하였다.

통계분석

*In vitro*의 수치는 평균과 표준오차로 표시하였고 *in vivo*의 수치는 평균과 표준편차로 표시했으며, SPSS program for windows version 25(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance(ANOVA) test를 실시한 후 least-significant differences(LSD) test로 사후검증을 실시하여 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ 에서 검증하였다.

결과 및 고찰

총 페놀 및 플라보노이드 함량 측정

폴리페놀 화합물은 flavonoids, tannins, lignans 등의 총칭으로 식물계에 널리 분포하며, 폴리페놀에 존재하는 하이드록실기(-OH)는 다른 화합물과 쉽게 결합하는 특성이 있어 항산화, 항염 및 항암 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다. 폴리페놀 화합물 중 하나인 플라보노이드는 활성산소종을 제거하는 효과가 뛰어나 항염증 및 항암 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Kim 등, 2012). 본 실험에서 사용한 모과 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과,

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of *Chaenomelis Fructus* extract (CF) (mg/g)

Sample	Total polyphenol	Total flavonoid
CF	71.01±0.19	5.54±0.05

All values are expressed mean±SEM of three replications.

Table 2. Scavenging activity of *Chaenomelis Fructus* on DPPH and ABTS free radical (μg/mL)

	DPPH free radical	ABTS free radical
L-Ascorbic acid	1.17±0.01	3.67±0.03
CF	18.08±0.50	87.46±0.81

All values are expressed mean±SEM of three replications.

총 폴리페놀 함량은 71.01±0.19 mg/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 5.54±0.05 mg/g으로 나타났다(Table 1).

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능 측정 방법은 항산화 활성을 측정하는 방법의 하나이다. 추출물 내의 항산화 물질이 짙은 자색을 띠는 라디칼인 DPPH를 소거시키는 정도를 나타내는 방법이다(Kim 등, 2014). 본 실험에서는 실험의 정확성을 확인하기 위해 L-ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였으며, DPPH 농도를 50% 감소시키는 데 필요한 추출물의 농도를 IC₅₀ 값으로 표현하였다. 실험 결과 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 1.17±0.01로 나타났으며, 모과 추출물의 IC₅₀ 값은 18.08±0.50으로 뛰어난 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타냈다(Table 2).

ABTS 라디칼 소거능 측정

항산화 활성을 측정하는 방법의 하나인 ABTS 라디칼 소거능 측정 방법은 potassium persulfate와 반응하여 생성된 청록색의 ABTS 라디칼이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 탈색되는 것을 이용한 방법이다(Kim 등, 2009).

DPPH 라디칼 소거법과 마찬가지로 L-ascorbic acid를 양성대조군으로 사용했으며, ABTS 농도를 50% 감소시키는 데 필요한 추출물의 농도를 IC₅₀ 값으로 표현하였다. 실험 결과 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 3.67±0.03으로 나타났으며, 모과 추출물의 IC₅₀ 값은 87.46±0.81로 뛰어난 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타냈다(Table 2).

혈액분석

GOT 및 GPT 측정: GOT 및 GPT는 간세포에 존재하다가 간 손상에 따라 혈중으로 유출되며, 혈장에서의 높은 활성도는 간조직 손상을 의미한다(Choi 등, 2020; Chung 등, 2009). GOT 측정 결과 Normal군 대비 Control군에서 약 3배 유의하게 증가했으며, Control군 대비 CF100군에서 24%, CF200군에서 25% 유의하게 감소하였다. GPT 측정 결과 Normal군 대비 Control군에서 2배 이상 유의하게 증가했으며, Control군 대비 CF100군에서 23% 유의하게 감소하였고 CF200군에서 26% 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

암모니아 측정: 암모니아는 질소 대사의 주요 부산물로써 여러 대사 장애를 유발한다고 알려져 있으며, 간에서 해독되어야 할 암모니아가 분해되지 못하면 혈중 암모니아 농도가 상승하여 여러 장애를 일으킨다(Germoush 등, 2018; Kim 등, 2018). 암모니아 측정 결과 Normal군 대비 Control군에서 50% 이상 유의하게 증가했으며, Control군 대비 Silymarin군에서 12% 감소하였다. 또한, CF100군에서 28%, CF200군에서 35% 감소하여 Normal군과 비슷한 수치를 나타냈다(Fig. 2).

MPO 측정: MPO는 호중구의 과립에서 발견되는 과산화효소로써 호중구의 침윤에 대한 지표로 사용되며, 염증성 질환에서 MPO의 과잉 생산은 염증 및 조직손상을 유발한다고 알려져 있다(Aratani, 2018). MPO 측정 결과 Normal군 대비 Control군에서 약 5배 유의하게 증가했으며, Control군 대비 CF100군에서 24%, CF200군에서 48% 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

Fig. 1. Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) activities for liver function in serum. All data are expressed mean±SD (n=8). Normal group, Normal; TAA-induced with distilled water group, Control; TAA-induced with silymarin 100 mg/kg group, Silymarin; TAA-induced with *Chaenomelis Fructus* extract (CF) 100 mg/kg group, CF100; TAA-induced with CF 200 mg/kg group, CF200. Significance: ###*P*<0.001 vs. Normal group, ***P*<0.01 vs. Control group.

Fig. 2. Ammonia level in serum. All data are expressed mean $\pm$ SD (n=8). Normal group, Normal; TAA-induced with distilled water group, Control; TAA-induced with silymarin 100 mg/kg group, Silymarin; TAA-induced with Chaenomelis Fructus extract (CF) 100 mg/kg group, CF100; TAA-induced with CF 200 mg/kg group, CF200. Significance: ^{###} $P<0.001$ vs. Normal group, ^{*} $P<0.01$, ^{**} $P<0.001$ vs. Control group.

Fig. 3. Myeloperoxidase (MPO) level in serum. All data are expressed mean $\pm$ SD (n=8). Normal group, Normal; TAA-induced with distilled water group, Control; TAA-induced with silymarin 100 mg/kg group, Silymarin; TAA-induced with Chaenomelis Fructus extract (CF) 100 mg/kg group, CF100; TAA-induced with CF 200 mg/kg group, CF200. Significance: ^{###} $P<0.001$ vs. Normal group, ^{*} $P<0.01$, ^{**} $P<0.001$ vs. Control group.

모과 추출물의 항염증 기전

NADPH oxidase 분석: NADPH oxidase(NOX)는 산소와 NADPH로부터 superoxide를 생성하는 효소이다. NOX는 막부착 단백질인 p22^{phox} 등과 세포질 인자인 p47^{phox} 등으로 구성되어 있으며, p47^{phox}의 발현을 knockdown 시킴으로써 NOX의 활성을 억제할 수 있다. NADPH oxidase는 사이토카인, 지질과산화 등으로 인해 활성화되어 반응산소종의 생성이 증가하는데, 간 내에서 NOX에 의해 발생하는 산화스트레스는 만성 C형 간염, 알코올성 간질환, 담즙 정체 간 손상 등 여러 간질환 및 간섬유화 진행을 유도하는 위험 인자로 알려져 있다(Babior, 2004; Baek, 2011; Lee 등, 2011). NADPH oxidase인 NOX2와 p47^{phox}의 발현을 확인한 결과, NOX2의 발현은 Normal군 대비 Control군에서 54% 유의하게 증가하였고 Control군 대비 CF100군과 CF200군에서 14% 유의하게 감소하였으며, p47^{phox}의 발현은 Normal군 대비 Control군에서 32% 유의하게 증가하였고 Control군 대비 CF100군과 CF200군에서 각각 17%, 16% 감소하였다(Fig. 4).

염증 전사인자 분석: NF- κ B는 염증 과정에서 많은 유전자의 조절에 관여하는 핵심 전사인자로 여러 산화 및 염증을 매개한다. NF- κ B는 I κ B와 세포질에 존재하다가 I κ B가 인산화됨으로써 핵 속으로 이동하여 target 유전자의 전사를 조절하며 염증 반응 및 여러 가지 생리적 기능을 수행한다(El-Shoura 등, 2018; Han 등, 2004). 본 실험에서 p-I κ B의 발현을 확인한 결과, Normal군 대비 Control군에서 93% 유의하게 증가하여 약 2배 증가한 수치를 나타냈으며, Control군 대비 CF100군 24%, CF200군 28%로 유의하게 감소하였다. 또한 NF- κ B의 발현은 Normal군 대비 Control군에서 57% 유의하게 증가했으며, Control군 대비 CF100군에서 21%, CF200군에서 24% 감소하였다(Fig. 5).

전염증성 단백질 및 염증성 사이토카인 분석: NF- κ B의 활성화는 iNOS, COX-2, TNF- α 및 염증성 사이토카인의 발현을 조절한다(El-Shoura 등, 2018). 또한, iNOS에 의해

Fig. 4. Expression of NADPH oxidase proteins in liver tissue. All data are expressed mean $\pm$ SD (n=8). Normal group, Normal; TAA-induced with distilled water group, Control; TAA-induced with silymarin 100 mg/kg group, Silymarin; TAA-induced with Chaenomelis Fructus extract (CF) 100 mg/kg group, CF100; TAA-induced with CF 200 mg/kg group, CF200. Significance: ^{##} $P<0.01$, ^{###} $P<0.001$ vs. Normal group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ vs. Control group.

Fig. 5. Expression of inflammation-related proteins in liver tissue. All data are expressed mean±SD (n=8). Normal group, Normal; TAA-induced with distilled water group, Control; TAA-induced with silymarin 100 mg/kg group, Silymarin; TAA-induced with Chaenomeles Fructus extract (CF) 100 mg/kg group, CF100; TAA-induced with CF 200 mg/kg group, CF200. Significance: ### P <0.001 vs. Normal group, ** P <0.01, *** P <0.001 vs. Control group.

생성된 NO는 COX-2의 발현을 증가시키며 염증성 사이토카인과 함께 염증 반응에 관여한다(Oh 등, 2019). 전염증성 단백질 iNOS와 COX-2의 발현을 확인한 결과, iNOS의 발현은 Normal군 대비 Control군에서 43% 유의하게 증가하였고 Control군 대비 CF100군 13%, CF200군 18% 유의하게 감소하였으며, COX-2의 발현은 Normal군 대비 Control군에서 57% 유의하게 증가하였고 Control군 대비 CF100군 31%, CF200군 39%로 유의하게 감소하여 Normal군과 비

슷한 수치를 나타냈다. 또한, 염증성 사이토카인 TNF-α와 IL-1β의 발현을 확인한 결과, TNF-α의 발현은 Normal군 대비 Control군에서 28% 유의하게 증가하였고 Control군 대비 CF100군 8% 감소하였고, CF200군 14%로 유의하게 감소하여 CF200군에서 Normal군과 비슷한 발현 정도를 보였으며, IL-1β의 발현은 Normal군 대비 Control군에서 55% 유의하게 증가하였고 Control군 대비 CF100군 24%, CF200군 25%로 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

Fig. 6. Expression of inflammation-related proteins in liver tissue. All data are expressed mean±SD (n=8). Normal group, Normal; TAA-induced with distilled water group, Control; TAA-induced with silymarin 100 mg/kg group, Silymarin; TAA-induced with Chaenomeles Fructus extract (CF) 100 mg/kg group, CF100; TAA-induced with CF 200 mg/kg group, CF200. Significance: ## P <0.01, ### P <0.001 vs. Normal group, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 vs. Control group.

Fig. 7. Liver histological examination through H&E staining (original magnification $\times 200$). Normal group, Normal; TAA-induced with distilled water group, Control; TAA-induced with silymarin 100 mg/kg group, Silymarin; TAA-induced with Chaenomeles Fructus extract (CF) 100 mg/kg group, CF100; TAA-induced with CF 200 mg/kg group, CF200.

조직학적 관찰

간조직에서 H&E 염색을 실시하여 염증 및 간세포의 침윤을 확인한 결과, Normal군보다 Control군에서 간의 병변과 세포의 침윤으로 인한 간 손상을 확인했으며, CF100군에서는 세포의 침윤 정도가 크게 감소하였고 CF200군에서 또한 세포의 침윤 정도가 크게 감소하여 간 손상이 뛰어나게 완화된 것을 확인하였다(Fig. 7).

요 약

본 실험에서는 thioacetamide(TAA)로 유발한 간 손상 rats에 대한 모과 추출물의 간 보호 효과를 확인하기 위하여 SD rat에게 3일간 TAA 복강투여 및 모과 추출물을 경구 투여하였고, 실험 종료 후 혈액 채취 및 간조직을 적출하였다. 혈액을 이용하여 간 손상 지표, 암모니아 및 MPO의 수치를 확인하였는데, Control군보다 모과 투여군에서 GOT, GPT, 암모니아 및 MPO의 수치가 유의하게 감소하였고, 특히 암모니아는 CF200군에서 Normal군과 비슷한 수치를 나타내었다. 간조직 western blotting을 통해 NADPH oxidase와 염증성 단백질의 발현을 확인한 결과, 모과 투여군에서 NOX2, p47^{phox}와 같은 NADPH oxidase의 발현이 감소하였고, 염증 전사인자 NF- κ B, I κ B α 와 전염증성 단백질 iNOS, COX-2 및 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β 의 발현이 유의하게 감소하였다. 또한, H&E staining을 통해 염증 및 간세포의 침윤을 확인한 결과, 모과 투여군에서 세포의 침윤 정도가 크게 감소하여 간 손상이 뛰어나게 완화된 것을 확인하였다. 이상의 결과를 종합해보면 모과 추출물은 혈액 내

간 손상 지표인 GOT, GPT 및 과산화 효소의 수치를 감소시켰으며, 산화적 스트레스의 생성을 억제함으로써 염증성 단백질의 발현을 조절하여 TAA로 인한 간 손상을 완화하는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2020년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단(No. 2018R1A5A2025272)의 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Abenavoli L, Izzo AA, Milić N, Cicala C, Santini A, Capasso R. Milk thistle (*Silybum marianum*): a concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytother Res.* 2018. 32:2202-2213.
- Aratani Y. Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys.* 2018. 640:47-52.
- Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 2004. 16:42-47.
- Baek YH. Mechanism of hepatic fibrosis: renin angiotensin system and ROS in hepatic fibrosis. *Proceeding of 23th Spring Single Topic Symposium of Korean Association for the Study of the Liver.* 2011 Mar 19. Jeonbuk, Korea. p 6-11.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958. 181:1199-1200.
- Choi JY, Kim JW, Kwon EY. Effects of the *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* kudo ethanol extract (PFE) on the improvement of metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*

2020. 49:1045-1053.
- Chung YI, Bac IY, Lee JY, Chun HS, Lee HG. Protective effects of branched-chain amino acid (BCAA)-enriched corn gluten hydrolysates on ethanol-induced hepatic injury in rats. *Korean J Food Sci Technol*. 2009. 41:706-711.
- El-Shoura EAM, Messiha BAS, Sharkawi SMZ, Hemeida RAM. Perindopril ameliorates lipopolysaccharide-induced brain injury through modulation of angiotensin- II /angiotensin-1-7 and related signaling pathways. *Eur J Pharmacol*. 2018. 834: 305-317.
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagent. *J Biol Chem*. 1912. 12:239-243.
- Germoush MO, Othman SI, Al-Qaraawi MA, Al-Harbi HM, Hussein OE, Al-Basher G, et al. Umbelliferone prevents oxidative stress, inflammation and hematological alterations, and modulates glutamate-nitric oxide-cGMP signaling in hyperammonemic rats. *Biomed Pharmacother*. 2018. 102:392-402.
- Han CW, Kim YC, Lee JH, Woo HJ. The effects of *Chunggan-haeju-tang* (*Qingganjiejiu-tang*) on NF κ B activation and apoptosis of kupffer cells. *Korean J Orient Int Med*. 2004. 25:59-70.
- Kang SY, Hyun SY, Kwon Y, Park YK, Jung HW. Effects of *Chaenomeles Fructus* extract on the regulation of myoblasts differentiation and the expression of biogenetic factors in C2C12 myotubes. *Kor J Herbol*. 2019. 34:99-107.
- Kim DH, Kwon B, Kim SJ, Kim HJ, Jeong SI, Yu KY, et al. Anti-obese effects and signaling mechanisms of *Chaenomeles sinensis* extracts in 3T3-L1 preadipocytes and obese mice fed a high-fat diet. *Herb Formula Sci*. 2017. 25:457-469.
- Kim EJ, Choi JY, Yu M, Kim MY, Lee S, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol*. 2012. 44:337-342.
- Kim HS, Ahn JJ, Choi TH, Hwang TY. Screening of DPPH radical scavenging and antimicrobial activity of extracts from local some native plants. *Korean J Food Preserv*. 2014. 21: 593-599.
- Kim JE, Jo YJ, Leem JY. The acetylcholinesterase inhibitory activity of the EtOH extract of *Chaenomeles Fructus* and its effects on the metabolism of amyloid precursor protein in neuroblastoma cells. *Kor J Pharmacogn*. 2015. 46:327-333.
- Kim KJ, Shin MR, Kim SH, Kim SJ, Lee AR, Kwon O, et al. Protective effect of Tongyuhwalhyeol-tang on liver injury in thioacetamide-induced rat. *Kor J Herbol*. 2018. 33:37-46.
- Kim YE, Yang JW, Lee CH, Kwon EK. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* Sing. (pine mushroom). *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2009. 38:555-560.
- Lee SK, Kim KM, Park KH, Park YC. Effect of NADPH oxidase inhibition on heme oxygenase-1 expression in human hepatoma cell line HepG2. *J Life Sci*. 2011. 21:1625-1630.
- Lee YM, Lee JJ, Shin HD, Lee MY. Protective effects of *Chaenomeles sinensis* Koehne extract on ethanol-induced liver damage in rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2006. 35: 1336-1342.
- Lee YM, Shin HD, Lee JJ, Lee MY. Antioxidative effect of *Chaenomeles Fructus* ethanol extract. *Korean J Food Preserv*. 2007. 14:177-182.
- Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JRL. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *J Sci Food Agric*. 1994. 64:155-161.
- Oh SL, Park HS, Kim EH, Kim YM. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Danpitang in RAW 264.7 cell. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2019. 32(3):37-47.
- Park YM, Kim JA, Kim CH, Lim JH, Seo EW. Effect of cultured *Acer tegmentosum* cell extract against hepatic injury induced by D-galactosamine in SD-rats. *Korean J Plant Res*. 2015. 28:551-560.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999. 26:1231-1237.
- Ryu HW, Kim YS, Lim EM. The antiinflammatory effects of *Chaenomeles Fructus* herba water extract on mouse RAW 264.7 cell. *J Orient Obstet Gynecol*. 2012. 25(3):1-15.
- Seo JI, Kim SW. A clinical study of drug-induced liver injury. *Dongguk J Med*. 2006. 13:37-44.
- Son JW, Jung JY, Kim KY, Hwangbo M, Park CA, Cho IJ, et al. The protective activity of Soeumin Bojungykgi-tang water extract against oxidative stress-induced hepato-toxicity. *Herb Formula Sci*. 2017. 25:509-526.
- Yoo JH, Han SH, Kil GJ. Active effect of anticoagulant effects in *Chaenomeles Fructus* water extract. *Kor J Herbol*. 2009. 24(2):7-11.