마늘 추출물이 간 손상 랫드의 조직학적 변화에 미치는 효과 연구

이태종[†] · 민경진*

대구파티마병원 병리과, *계명대학교 대학원 공중보건학과
(2010. 6. 21. 접수/2010. 7. 15. 수정/2010. 8. 12. 채택)

A Study of the Histological Effects of Garlic Extract in a Liver-damage Rat Model

Tae-Jong Lee[†] · Kyung-Jin Min*

Department of Pathology, Daegu Fatima Hospital, Daegu 701-600, Korea

*Department of Public Health, Keimyung University, Daegu 702-701, Korea

(Received June 21, 2010/Revised July 15, 2010/Accepted August 12, 2010)

ABSTRACT

In this study we examined the effects of water extract of garlic on carbon tetrachloride-induced liver injury, and demonstrated increased beneficial enzyme and anti-oxidant activity as well as histopathological changes (by Hematoxylin-Eosin (H&E) staining, Trichrome staining, and TEM examination), and showed that the treatment was dose-dependent and safe. A total of 42 male Sprague-Dawley rats were divided equally (n=7) into six groups. To induce hepatotoxicity in these subjects, carbon tetrachloride diluted in an equal volume of olive oil was intraperitoneally administrated at 0.5 ml/kg (0.20 g/kg/day) once a day for five days. Water extract of Korean-grown garlic was administered via a stomach sonde once a day, 5 days a week, for a total of 4 weeks. Groups received 0.35 g/kg (E1), 0.70 g/kg (E2), or 1.40 g/kg (E3), with the dose adjusted for body weight. Administration of garlic extract resulted in positive physiological effects in terms of reduced oxidative stress and toxicity, and induced functional changes in the liver. Comparing the subject groups (E1, E2, E3) administered different doses of garlic extract, the importance of morphological analysis in further studies is emphasized, because morphological changes indicating hepatotoxicity could occur, even though beneficial enzyme activities were found to be elevated.

Keywords: garlic, liver damage, antioxidant, CCl₄, Hematoxylin-Eosin (H&E) stain, Masson's trichrome stain

I. 서 론

경제성장에 따라 생활양식 및 식생활이 변화되면서 육류, 주류, 가공식품 및 다양한 기호성 식품의 과다한 섭취가 지속적으로 증가하고 있으며, 이로 인하여 간질환, 고혈압, 비만증, 당뇨, 고지혈증, 심장질환, 암 등과 같은 각종 성인병 및 난치병의 발병율이 증가하고 있다. 이 중에서 특히 간질환 환자의 발병률이 증가되고 있는데, 일반적으로 만성간염, 간경화증, 간암 등과 같은 만성적 간질환 등은 조기발견을 통한 치료가 생존율을 높일 수 있다. 아울러, 산업과 사회구조가 복잡해지고 의료기술이 발달함에 따라 수명이 연장됨으로써

현대인들은 난치성 질병의 예방 및 건강증진을 목적으로 다양한 기능성 식품을 이용하고 있다. 이에 본 논문은 기능식품의 과용에 따른 간질환 환자에게 미치는 영향을 알아보기 위해, 마늘열수추출물의 용량을 달리하여, 사염화탄소에 의한 랫드의 간 손상을 유발시켜 간 손상에 미치는 영향과 항산화 및 용량의 중요성을 알아보았다. 많은 건강증진용 기능성 식품 중에서도 전통적으로 널리 음식에 포함되어져 오고 있는 마늘(garlic, *Allium sativum*)에 대한 생체 기능성에 최근 들어 관심이 높은 실정이며, 마늘의 다양한 생리활성기능이 알려지면서 과량섭취에 따른 일부 부작용에도 불구하고 전 세계적으로 식재료로 널리 이용되고 있다.¹⁾ 원산지가 중앙아시아나 지중해 연안지방으로 알려진 마늘은 전 세계적으로 널리 분포되어 재배되고 있는 백합과에 속하는 인경채소이다. 우리나라에서도 단군신화에도 등장할 만큼 오래전부터 재배되었으며,²⁾ 동의보감이나 본초

[†]Corresponding author : Department of Pathology, Daegu Fatima Hospital
Tel: 82-53-940-7484, Fax: 82-53-940-7273
E-mail : taejongok@hanmail.net

강목 등과 같은 전통 한의학 및 민간요법에서는 마늘을 일종의 약제나 포괄적인 건강증진 식재료로 사용되어 왔다.

이와 같이 마늘은 고대로부터 우리선조들이 특유의 맛과 향 때문에 음식의 향신료 및 조미료로 널리 이용되었고, 근래에는 마늘의 다양한 생리활성 작용을 이용하여 강장 및 강정식품을 개발하고 있으며 마늘의 사용도 마늘잎추출물, 통마늘, 통마늘 추출물, 익힌 마늘, 익힌 마늘 추출물 등 다양한 형태 및 가공 형태로 조미료, 식육가공 소스, 라면스프 등의 많은 식품의 원료에 첨가되어 활용되고 있다.^{3,4)}

마늘의 생물학적 효능과 기능에 관한 연구들을 살펴보면, 마늘분말을 식이와 혼합하여 급식 받은 랫드에서 혈청 콜레스테롤 저하기능,⁵⁾ 콜레스테롤 식이로 실험적으로 유발시킨 고지혈증 및 고혈압이 병발된 랫드에서 마늘을 투여하여 HDL-cholesterol의 체내 형성 증가 및 이러한 기전을 통한 심장 질환의 개선효과,⁶⁾ 화학적 발암물질로 유발된 간암,⁷⁾ 위암,⁸⁾ 자궁경부암⁹⁾ 등과 같은 악성종양이나 암 관련 증상에 대한 강력한 항암, 해독 및 항균 작용¹⁰⁾ 등이 알려져 있다.

아울러 마늘은 강력한 항산화제로 작용하여, 발암성 물질이나 유기용제와 같은 산업독성물질의 체내 유입으로 생성된 자유 라디칼(Free radical)의 독성기능을 완화 또는 제거하여, 독성 물질로 인한 세포 및 세포막에 있어서 과산화반응에 대한 직접적인 방어효과가 있다고 보고되어져 있다.¹¹⁾ 이러한 실험적 연구보고 이외에 마늘은 예로부터 전통의학을 중심으로 암이나 심혈관질환의 개선과 완화에 많이 이용되었는데, 주요한 생리활성 성분으로 *Allicin*이 알려져 있으며 최근 들어 점차 마늘의 효능에 대한 연구 분야도 다양화되는 추세이다.¹²⁾

사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl₄)는 대표적인 유기용매의 하나로 간 독성의 특성을 가지고 있는 무색의 액체로서, 실험동물에게 경구 및 복강내로 투여시 주로 소장으로 흡수되어 급성 중독을 유발한다고 알려져 있다.¹³⁾ 사염화탄소의 사용은 할로겐화합물로서 우수한 탈지효과로 인해 자동차나 금속산업 현장의 기계 및 부품세정제로 여전히 널리 사용되고 있으며 이러한 사용에 따라 일부 작업장에서는 간독성, 신장 독성을 유발한다고 보고되어져 있다.¹⁴⁾ 또한 동물실험을 통하여 사염화탄소는 간장, 폐장, 신장과 같은 다양한 장기에서 악성종양을 일으키는 것으로 알려져 있어 공중보건상 심각한 위해성의 문제를 내포하고 있다. 사염화탄소의 독성기전으로, CCl₄는 cytochrome P-450에 의해

반응성이 높은 독성 자유라디칼인 CCl₃·(CCl₄ + e⁻ → CCl₃· + Cl⁻)로 전환되어 직접적인 세포상해를 일으키며, C-Cl bond가 깨어지면서 발생된 trichloromethyl radical과 monoatomic chlorine free radical이 지질 과산화를 야기한다고 알려져 있다.¹⁵⁾ 한편, 본 연구에서 양성대조군으로 사용된 실리마린(*Cardus marianus*)은 영경귀로 알려져 있는 *Silybum marianum*에서 추출된 polyphenolic flavonoid로서 항산화작용과 세포막을 안정화시킴으로써 간세포 보호 및 재생작용을 가지며, 간해독능력 증가와 glutathione과 같은 항산화시스템의 보존 작용을 나타내어 다양한 원인에 의한 간 질환의 치료제 및 치료 보조제로 최근 널리 이용되고 있는 약물로 알려져 있다.¹⁶⁾ 최근 현대 의학의 발전에 따라 각종 의약품이 개발되고 치료에 응용되고 있으나 여전히 만성적인 난치병의 치료와 개선에는 한계가 있으며, 또한 지속적인 약물사용에 따른 부작용도 많이 발생하고 있는 현실이다. 따라서 독성이 적으면서 치료효과가 입증된 천연물질에 의한 필요성이 높게 대두되고 있으며, 대체요법과 건강식품 개발이 지속적으로 이루어지고 있는 상황이다. 천연물질 중의 하나이며 항산화작용을 가진 대표적인 식물인 마늘의 CCl₄에 의한 간 손상에 대한 기능학적 및 형태학적 영향을 분석하는 것은 마늘이 중요한 기능성 식품으로 개발 및 활용될 수 있는 기반연구 차원에서 간 손상을 유발시켜 간 손상에 미치는 영향과 항산화 및 용량의 중요성을 알아 간질환의 진단 시 기능학적 검사와 더불어 조직학적 검사의 병행실시의 중요성과 필요성을 확인하여 건강증진 등과 같은 공중보건학적 측면에서 매우 의의가 있을 것으로 생각된다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

염색시약 hematoxylin은 Sigma사(USA)의 제품을, 그 외 일반시약들은 특급품을 사용하였다. 실험기기로 homogenizer(IKA, T25 basic, Malaysia), mini centrifuge (Hitachi, MIKRO 200R, Japan), electronic balance(Sartorius, CP224S, Germany), Microtome (Leica, RM2235, Germany)을 사용하였다. 시료추출은 초고속 감압 저온 추출기(COSMOS-660, Korea)를 사용하였다. 투사전자현미경은 Hitachi H-7100(Japan)를 사용하였다. 조직학적실험의 관찰은 Olympus BX51 light microscope(Olympus, Japan), ProgRes C14 plus digital camera system(Olympus, Japan)을 사용하였다.

2. 시료 조제

경북 영천의 재래시장에서 구입한 마늘 600 g을 껍질을 벗긴 후 물 6 l를 가하여 100°C의 온도, 60분간 초고속 감압 저온추출기로 열수 추출한 후 0.6 l로 농축하여 1일 투여량씩 진공 파우치 포장 후, 냉장보관 하였다. 동결 건조로 측정된 마늘 열수추출물의 수율(yield rate)은 34.50%였다.

3. 실험동물 및 시료처리

간 손상 모델의 제작에 사용하는 사염화탄소(CCl₄, Sigma Co.)의 투여량은 본 실험 개시 전 Sprague Dawley(SD) 24마리의 랫드를 대상으로 예비실험을 실시하여 투여용량을 설정하였다. 투여용량은 사염화탄소를 olive oil에 1:1의 비율로 희석하여 체중 kg당 0.5 ml(0.23 g/kg/day)로 대조군, 양성대조군, 실험군 E1, E2, E3군에 1일 1회 격일간격으로 4회 복강내 주사하여 간 손상을 유발하였다. 마늘추출물(*Allium sativum* extracts, ASE)은 간 손상이 유발된 랫드에 지정된 용량으로 1일 1회 일정한 시간대에 주 5회씩 4주간 경구 투여용 주사기를 사용하여 실험군에 경구 투여하였다. 정상군 및 대조군은 동량의 생리식염수(0.25 ml/kg BW/day)를 경구 투여하였다.

양성대조군으로는 간염 치료제로 널리 사용되는 Silymarin(SM, Madans AG, Germany)을 0.25 ml(0.30 g/kg/day)의 용량으로 sonde를 이용하여 경구 투여하였다. 실험동물은 정상군, 대조군, 양성대조군, 실험군 E1, E2, E3 6개 군으로 나누어 각 군마다 SD 랫드 7마리씩을 임의로 배치하여 본 실험에서는 총 42마리를 사용하였다.

<실험군의 분류>

정상군(Normal, N): saline 투여(0.25 ml/kg /day)

대조군(Control, C): CCl₄ 투여 후+saline(0.25 ml/kg/day)

양성대조군(Positive Control, PC): CCl₄ 투여 후+SM 0.25 ml(0.30 g/kg/day)

실험군 1(Experimental 1, E1): CCl₄ 투여 후+ASE 0.25 ml(0.35 g/kg/day)

실험군 2(Experimental 2, E2): CCl₄ 투여 후+ASE 0.5 ml(0.70 g/kg/day)

실험군 3(Experimental 3, E3): CCl₄ 투여 후+ASE 1.0 ml(1.40 g/kg/day)

생체 실험동물의 처치는 일중 변동리듬을 감안하여 일정한 시간에 실시하였다. 실험종료 12시간 전부터 절식시킨 후, diethyl ether로 흡입 마취시키고 조직학적

변화를 보기위해 10% 포르말린 용액에 고정하였다. 일부 간 조직은 -80°C에 보관하였다. 간 조직은 생리식염수로 간 문맥을 통하여 관류시켜 조직 내 혈액을 제거시킨 후 적출하였다.

4. 유해산소 효소 활성 및 지질과산화 함량 측정

1) 효소시료의 조제

간 조직을 빙냉 하에서 절취한 조직 중 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25 M 인산완충액을 가하여 glass teflon homogenizer를 이용하여 20%(w/v) 마쇄균질액을 만든다. 이 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미 마쇄 부분을 제거한 다음 상층액을 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 얻었다. 마쇄균질액은 thiobarbituric acid 반응에 사용하였고, 상층액은 효소활성에 측정하였다.

2) Xanthine oxidase (XO)

활성도 XO는 Stripe와 Della¹⁷⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분 동안 반응하여 기질인 xanthine으로부터 생성된 uric acid의 양을 nmole로 표시하였다.

3) Superoxide dismutase (SOD)

간 조직 중 SOD 활성도는 헤마톡실린 자동산화의 억제정도를 관찰하는 Martin 등¹⁸⁾의 방법에 따라 0.1 mM EDTA가 함유된 50 mM 인산 완충액(pH 7.5)에 10 μM hematoxylin 및 효소액을 가해 25°C에서 반응시켜 생성된 hematein을 560 nm에서 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 활성도 단위는 효소액을 넣지 않은 반응액 중의 hematoxylin 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 unit로 하여 단백질 1 mg이 1분 동안 반응한 unit로 표시하였다.

4) Catalase (CAT)

CAT 활성도는 hydrogen peroxide를 기질로 하여 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 그 흡광도를 읽고 분자흡광계수(E=0.04 mM⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi¹⁹⁾의 방법에 준하였다. 활성도 단위는 간 조직의 효소액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분 동안 반응하여 감소되는 hydrogen peroxide 양을 nmole로 표시하였다.

5) Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)

지질과산화 TBARS 시험은 Ohkawa 등²⁰⁾의 방법에 따라 측정하였다. 효소 시료 속의 과산화지질을 산성조

건 하에서 thiobarbituric acid 용액과 가열 반응시켜 생긴 TBARS의 흡광도를 500 nm에서 측정하였다. TBARS 함량은 단백질 g당 nmole로 표시하였다.

5. 조직학적 관찰

간 조직의 광학현미경적 변화를 관찰하기 위해 통상적인 조직처리 과정을 수행하였다. 적출된 간 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 12시간 고정하고 흐르는 물에 수세한 다음, 탈수(에탄올 70%, 80%, 95%, 100%), xylene으로 투명, 파라핀 침투과정을 거쳐 포매하고 microtome을 이용하여 4 µm 두께의 박절편을 제작하여 탈 파라핀 함수 후 일반염색으로 H&E 염색하였다. 그리고 특수염색으로는 Masson's trichrome stain을 시행하였다.

1) Hematoxylin - Eosin (H&E) 염색 관찰

4 µm 두께의 박절편을 제작하여 xylene에 탈paraffin한 후, 함수 과정을 거쳐, 흐르는 물에 수세하였다. Harris hematoxylin 용액에 옮겨 5분간 핵을 염색한 후 흐르는 물에 수세하고 1% HCl-alcohol 용액으로 3회 침적 후 충분히 수세하여 1% ammonia 용액으로 청색화 하며 Eosin 용액에 3분간 세포질을 염색한 후 80% 에탄올로 이동하여, 95%, 95%, 100%, 100% 에탄올을 사용하여 탈수시켰다. 청명 과정을 거친 후 Canada balsam으로 봉입 후 현미경 검경하였다.

2) Masson's trichrome staining 염색 관찰

4 µm 두께의 박절편을 제작하여 탈 파라핀, 함수, 증류수에 수세한 후 Masson²¹⁾ 방법에 따라 Bouin 용액에 옮겨 56°C 1시간 매염처리한 후 흐르는 물에 수세하고 Weigert iron hematoxylin 용액에 10분간 염색한 후 수돗물에 10분간 수세하였다. Biebrich scarlet-acid fuchsin 용액에 5분간 염색 후 증류수에 행구었다. Phosphomolybdic-phosphotungstic acid 용액으로 15분간 분별 염색 후 Aniline blue 용액에 5분간 염색하였다. 0.5% glacial acetic acid 용액에 3분간 감별 후 탈수, 청명 과정을 거친 후 Canada balsam으로 봉입, 광학현미경 검경하였다.

6. 전자현미경적 관찰

간 조직의 미세구조를 관찰하기 위해 적출한 간 조직을 1 mm 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1 M 인산완충액, pH 7.4, 1-4°C)에 2시간 전 고정하고 0.1 M 인산완충액으로 세척한 후 osmium tetroxide 용액에 2시간 후 고정을 실시하고 같은 완충

액으로 세척하여 단계별 alcohol로 탈수하고 propylene oxide로 치환 후 Luft와 John²²⁾ 방법에 준하여 Epon 혼합물로 포매하여 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 유리칼을 사용하여 1 µm로 박절하여 toluidine blue 염색을 실시하여 광학현미경상에서 관찰 부위를 선택한 다음 RMC 회사 MT-XL형 초박절기로 Dupont 다이아몬드 칼을 부착하여 회색(40-60 nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 얻어 grid에 부착시킨 뒤 Reynolds²³⁾ 방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-7100형 투과전자현미경으로 가속 전압 75 Kv로 관찰하였다.

7. 자료분석

통계적 분석은 SPSS 18.0 for windows(SPSS Inc., USA)를 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 각 그룹 간의 차이를 검정하기 위해 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 하였다. 통계학적 유의 수준은 $p < 0.05$ 에서 실시하였다.

III. 연구결과 및 고찰

1. 유해산소 효소 활성 및 지질과산화 함량 측정

간장 조직의 항산화능 관련된 유해산소 효소 활성 및 지질과산화 함량 연구결과에서, XO, SOD, CAT 활성치 및 TBARS 함량은 대조군이 정상군에 비하여 XO와 TBARS가 각각 유의하게 높았고, 양성대조군과 마늘을 투여한 실험군(E1, E2, E3)에서는 대조군에 비하여 XO와 TBARS는 유의하게 낮았으며, 실험군(E)별로 XO와 TBARS의 활성도는 E2에서 모두 가장 낮게 나타났다. SOD와 CAT는 정상군에 비하여 대조군이 유의하게 낮았다. 양성대조군과 실험군(E1, E2, E3)은 대조군에 비하여 유의하게 높았으며 실험군간 비교에서 E2군에서 가장 높게 나타났다. 이는 마늘추출물이 SOD와 CAT를 활성화시켜 사염화탄소 독성에 의한 지질과산화에 대한 항산화 효과를 갖는 것으로 사료된다. 이는 마늘 첨가 식이가 랫드에서 지질 과산화를 억제한다는 보고와²⁵⁾ 아플라톡신으로 유발된 간 손상 후 마늘추출물을 투여하여 SOD, CAT, GST, GPx가 현저하게 증가할 수 있다는 보고²⁶⁾와 일치하였으며, 또한 항산화 지질효소 활동 변화에 대한 보고도 있다.^{11,27)} 아울러, 전자공여능을 측정한 *in vitro* 실험에서 마늘 열수추출물의 농도 의존형 DPPH 라디칼 소거활성도 본 연구의 결과와 일치되었다. 이와 같은 결과는 마늘 열수추출물이 유해산소의 발생을 감소시키고 생성된 유해

Table 1. Effect of *Allium sativum* extract on hepatic XO, SOD, CAT and TBARS activity of CCl₄-induced hepatotoxicity in rats

Group	Normal	Control		Experimental		
	N	C	PC	E1	E2	E3
XO ¹⁾	1.68±0.31 ^c	2.17±0.37 ^d	1.94±0.36 ^c	1.39±0.15 ^{ab}	1.31±0.13 ^a	1.44±0.19 ^b
SOD ²⁾	17.70±1.29 ^b	12.94±1.21 ^a	19.71±1.30 ^b	25.96±1.27 ^c	34.01±1.13 ^{cd}	24.46±1.23 ^c
CAT ³⁾	6.53±0.43 ^c	4.33±0.47 ^a	5.51±0.65 ^b	7.06±0.17 ^c	8.94±0.20 ^d	8.77±0.61 ^d
TBARS ⁴⁾	2.33±0.13 ^b	4.09±0.15 ^d	2.87±0.70 ^c	2.35±0.20 ^b	1.72±0.30 ^a	2.15±0.40 ^b

Values are mean±SD of 7 rats.

¹⁾Unit: nmole 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate/mg protein/min

²⁾Unit: U (50% inhibition of autooxidation of hematoxylin)/mg protein/min

³⁾Unit: nmole H₂O₂ reduced/mg protein/min

⁴⁾Unit: nmole/mg protein

Values with different superscripts are significantly different (p<0.05) by ANOVA and Duncan's multiple range test. compared to the C group by ANOVA and Duncan's multiple range test.

산소의 해독을 촉진시켜 생체의 산화적 손상을 감소시키는 우수한 항산화 효과가 있음을 입증하는 것으로써 간조직의 손상 또는 보호, 개선에 있어서 마늘의 효능이 입증되었다고 할 수 있었다(Table 1).

2. 조직학적 관찰

간장이 일반적으로 손상을 받으면 간세포 변성과 세포내 대사산물의 축적을 비롯한 간세포 내부의 변화, 간세포 괴사 및 세포자멸사(apoptosis) 등의 변화가 일어나고 염증세포 침윤, 간세포 섬유화 반응이 나타나며 간 내 담관계의 변화나 동모양혈관(sinusoid)의 변화가 주요 병변이다.^{10,30)} 광학현미경적 관찰에서 사염화탄소로 손상이 유도된 간세포는 중심정맥 주위부분들에서 세포괴사와 지방변화가 광범위하게 일어나고,²⁸⁾ 핵과 세포질의 농축과 부종으로 간 실질세포의 퇴행성 변화를 일으켜 섬유화가 생성되고 간 경변으로 진행되는 것을 조직의 H&E 염색 및 특수염색법으로 관찰이 가능하다.²⁹⁾

본 실험에서 H&E 염색의 정상군은 간소엽 구조와 간 문맥역의 형태가 잘 유지되어 있고 세포질과 원형의 핵이 모두 뚜렷하고, 세포의 괴사나 염증세포의 침윤과 같은 이상소견을 찾아볼 수 없는 정상적인 간 조직을 보였다. 대조군은 중심정맥을 둘러싸고 국소적 공포(vacuolization)와 괴사를 보였는데, 국소괴사와 가교상 괴사(bridging necrosis)가 현저히 나타나며 괴사된 간세포는 경미한 fibrin으로 형태를 유지하고 염증세포의 출현과 지방변성이 뚜렷하게 관찰되었다. 양성대조군은 중심정맥을 둘러싸고 방사상 배열의 정상적 구조에 가까우며 괴사나 apoptosis 등이 많이 줄어든 형태를 보였다. 실험군(E1, E2, E3)은 용량군별로 개체간의 차이는 다소 있었으나 대조군에서 보다 중심정맥 주위

의 국소괴사의 범위가 좁아졌으며 가교상 괴사는 관찰되지 않았다. 약간의 apoptosis 등이 있고 지방변성은 많이 줄어들어 전반적으로 마늘을 투여한 실험군에서 간세포 손상은 대조군에 비해 뚜렷하게 회복되는 양상을 나타내었다.

이러한 간세포의 개선효과는 dimethylnitrosamine으로 간 손상 유도된 랫드에서 간장 질환 치료 보조제인 콜린 산화물인 betaine 투여가 간세포회복기능이 있음을 조직학적으로 입증한 연구결과³⁰⁾와 매우 유사하였다. 그러나 마늘 고유의 독성으로 인해 마늘의 투여용량이 높아질수록 유해산소 효소 활성화 및 지질과산화 함량 측정결과와는 약간의 차이가 있었지만 조직학적 관찰에서는 E3군에서는 염증과 간 손상이 대조군보다 심해질 수 있다는 사실을 본 연구에서 확인할 수 있었다. 이러한 관찰은 간질환시에는 초기에 혈액학적 및 혈액생화학적 검사와 함께 조직학적 검사가 병행되어 시행하는 것이 질환의 정확한 진단과 예방에 유리할 것이다(Fig. 1).

본 연구에서 교원섬유의 발현 정도를 알아보기 위해 시행한 Masson's trichrome 염색결과 정상군에서 중심정맥과 소엽주변에 교원섬유가 청색으로 염색된 부분들이 선명하게 관찰되었다. 대조군에서는 중심정맥과 소엽주변이 괴사되어 있어 교원섬유가 미세하게 불규칙적으로 관찰되었다. 양성대조군에서는 중심정맥과 소엽주변이 청색으로 염색되어진 부분이 관찰되었다. 실험군(E1, E2, E3)에서는 중심정맥과 소엽주변이 진한 청색으로 염색되어 정상군의 염색정도와 가까우며 대조군에 비해 교원섬유가 E1, E2에서 많이 회복되었다. Dimethylnitrosamine을 투여한 랫드의 간에서 trichrome 염색을 실시하여 collagen이 정상군에 비해 증가한다는 보고³¹⁾와 교원섬유는 간 기능의 관리방법과 정도에 따

Fig. 1. Histological observation on CCl_4 -induced hepatotoxicity in rats treated with *Allium sativum* extracts. H&E stain, $\times 200$. A: Normal group, B: Control group, C: Positive control group, D: Experimental group I, E: Experimental group II, F: Experimental group III.

Fig. 2. Histological observation on CCl_4 -induced hepatotoxicity in rats treated with *Allium sativum* extracts. Masson's trichrome stain, $\times 200$. A: Normal group, B: Control group, C: Positive control group, D: Experimental group I, E: Experimental group II, F: Experimental group III.

라 다르게 나타난다는 보고³²⁾을 기반으로 본 연구에서는 E1, E2 실험군에서 collagen이 정상군에 가까웠으며 추출물을 투여한 실험군에서 섬유소의 재생이 유의하게 나타나 투여량에 따른 영향이 있는 것은 본 실험과 유사하였다(Fig. 2).

3. 전자현미경적 관찰

본 실험의 결과 중에서 전자현미경적(transmission

electron microscope, TEM) 관찰은 정상군에서 핵은 정상적인 구조이며 미토콘드리아는 규칙적인 모양과 크기를 유지하며 과립세포질망과 무과립세포질망이 규칙적이고 fibrous filament와 lipid droplet는 관찰되지 않았다. 대조군에서 핵은 불규칙한 구조이며 미토콘드리아는 부종과 내외막이 파괴된 것이 관찰되었고 과립세포질망과 무과립세포질망이 불규칙적이고 다수의 fibrous filament와 lipid droplet가 관찰되며 Kupffer's

Fig. 3. Transmission electron microscopic analysis of the CCl_4 -induced hepatotoxicity in rats treated with *Allium sativum* extracts, $\times 15,000$. A: Normal group, B: Control group, C: Positive control group, D: Experimental group I, E: Experimental group II, F: Experimental group III.

cell이 많이 관찰되었다. 양성대조군에서 핵은 정상적인 구조에 가까우며 미토콘드리아는 약간의 부종이 있으며 과립세포질망과 무과립세포질망이 규칙적이고 fibrous filament는 보이지 않으며 lipid droplet는 소수가 관찰되었다. 실험군(E1, E2, E3)에서 군별 모두 정상구조에 가까우며 미토콘드리아는 경미한 부종이 있었으나 정상군의 조직 구조 형태에 가까웠다. 과립세포질망과 무과립세포질망이 규칙적이고 fibrous filament와 lipid droplet는 줄어들었으며 E3에서는 Kupffer's cell과 괴사가 조금 관찰되어 E1, E2보다 회복이 덜하였다.

본 실험을 볼 때 정상 간의 조직에서 hepatic stellate cell(HSC)는 lipid droplet 및 과립내형질망이 잘 배열되며,³³⁾ 간 손상 시 간의 섬유화에 HSC 활성화로 인해 이행세포단계를 변화되어 섬유화에 관여한다는 보고³⁴⁾와 일치하며 lipid droplet의 감소와 조면내형질세포가 증가되고 근섬유세포는 filamentous skeleton을 보이며 간 손상 변화에 지표가 된다는 보고³⁵⁾와 본 실험은 유사한 조직의 형태를 보였다. 이상의 결과로 볼 때 마늘 추출물이 간 손상 과정에서 독성효과를 저하시켜 간세포를 회복시키는데 상당한 효과와 투여량에 따라 회복정도가 다르게 나타남을 전자현미경적(TEM)으로 비교 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

IV. 결 론

마늘추출물의 투여가 사염화탄소에 의한 랫드의 간

손상에 미치는 영향과 항산화 및 기능을 알아보기 위하여 사염화탄소를 olive oil에 1:1 동량 희석하여 1일 1회 격일간 4회 복강내 투여하여 간 손상을 유발한 랫드에 마늘추출물을 4주간 지정된 용량으로 실험군에 일일 1회, 주 5회, 4주간 위준대를 사용하여 경구 투여하였다. 실험동물은 정상군, 대조군, 양성대조군, 실험군 E1, E2, E3, 총 6개 군으로 나누어 각 군당 S-D 랫드 7마리씩, 총 42마리를 사용하였다. 최종 실험 12시간 전부터 절식시킨 후, diethyl ether로 흡입 마취시키고 기능학적 검사인 항산화 실험과 조직검사인 H&E, Masson's trichrome, 전자현미경적 관찰을 비교분석함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 유해산소 대사 효소 활성 변동 실험에서 XO 활성, TBARS 함량은 대조군이 정상군, 양성대조군에 비해 유의하게 높았고 실험군은 대조군에 비하여 유의하게 낮았으며 실험군별은 XO와 TBARS 모두 E2에서 가장 낮게 나타났다. SOD와 CAT는 대조군이 정상군에 비해 유의하게 낮았고 양성대조군과 실험군은 대조군에 비하여 유의하게 높았으며 실험군 간은 SOD와 CAT는 모두 E2에서 가장 높게 나타났다.

2. 간세포의 광학현미경적 관찰에서 H&E 염색 결과로 정상군에서 보다 대조군에서는 중심정맥을 중심으로 국소적 공포와 가교상 괴사 및 지역괴사가 현저히 나타나며 세포사한 간세포는 경한 fibrin으로 형태를 유지하고 염증 반응과 지방변성이 현저히 관찰되었다. 양성대조군은 중심정맥을 중심으로 방사상 배열의 정상

적 구조에 가까우며 괴사, 지방변성, 염증반응 등이 많이 줄어들었다. 실험군은 군별 간의 차이는 조금 있었으나 대조군에서 관찰되는 것 보다 중심정맥 주위의 지역괴사 넓이가 좁았으며 가교상 괴사는 보이지 않았다. 약간의 염증반응 등이 있었고 지방변성은 없었다. Masson's trichrome stain으로 염색한 결과 정상군에서 보다 대조군에서는 중심정맥과 소엽주변이 괴사가 있어 교원섬유가 미세하게 불규칙적으로 관찰되었다. 양성대조군에서는 중심정맥과 소엽 주변이 청색으로 염색되어진 부분이 관찰되었다. 실험군 간은 중심정맥과 소엽 주변이 진한 청색으로 염색되어 정상군의 염색 정도와 큰 차이가 없었다. 본 동물 조직실험으로 볼 때 사람에게도 확대적용가능성이 있으며, 간장 질환 시 초기에도 조직검사의 필요성이 나타났다.

3. 전자현미경관찰 결과는 정상군에서 보다 대조군에서는 핵은 불규칙한 구조이며 미토콘드리아는 부종과 내외막이 파괴된 것이 관찰되었고 과립세포질망과 무과립세포질망이 불규칙적이고 다수의 fibrous filament와 lipid droplet는 관찰되며 Kupffer's cell이 많이 관찰되었다. 양성대조군에서 핵은 정상적인 구조에 가까우며 미토콘드리아는 약간의 부종이 있으며 과립세포질망과 무과립세포질망이 규칙적이고 fibrous filament는 보이지 않으며 lipid droplet는 소수가 관찰되었다. 실험군에서 군별 모두 정상구조에 가까우며 미토콘드리아는 부종이 있었으나 정상군에 가까웠다. 과립세포질망과 무과립세포질망이 규칙적이고 fibrous filament와 lipid droplet는 관찰되지 않았으며 E3 군에서 조금 관찰되었다.

이상의 조건을 미루어 볼 때 실험군별 투여에 따른 마늘추출물이 간 기능을 개선시켜 간질환 진행을 억제시키고 있는 것으로 사료된다. 따라서 간질환 진단 시에는 조직검사가 필수적이고 기능검사와 조직학적 검사를 초기에 병행실시를 하여야 될 것으로 사료되며, 마늘투여는 ASE 0.5 ml/(0.70 g/kg/day) 이하가 적당할 것으로 추정되며 투여 용량 및 마늘추출물 성분별 효능 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Venkatesh, S., Reddy, G. D., Reddy, B., Reddy, M., Reddy, M. and Appa Rao, V. A. : Antihyperglycemic activity of *Caralluma attenuata*. *Fitoterapia*, **74**, 247-279, 2009.
- Kim, J. G. and Park, J. Y. : Inhibitory effect of garlic on the growth of *aspergillus parasiticus*. *Korean Journal of Environmental Health*, **35**(2), 95-99, 2009.
- Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M. and Drzewiecki, J. : Raw and boiled garlic enhances plasma lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Life Sciences*, **78**, 655-663, 2006.
- Nasim, S. A., Dhir, B., Samar, F., Rashmi, K., Mahmooduzzafar, K. and Mujib, A. : Sulphur treatment alters the therapeutic potency of alliin obtained from garlic leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 888-892, 2009.
- Kamanna, V. S. and Chandrasekhara, N. : Hypocholesteremic activity of different fractions of garlic. *Indian Journal of Medical Research*, **79**, 580-583, 1984.
- Chetty, K. N., Calahan, L., Harris, K., Dorsey, C., Hill, W., Chetty, D. S. and Jain, S. K. : Garlic attenuates hypercholesterolemic risk factors in olive oil fed rats and high cholesterol fed rats. *Pathophysiology*, **9**, 127-132, 2003.
- Samaranayake, M. D. P., Angunawela, S. M. D., Jayasekera, S., Iwai, S. and Fukushima, S. : Inhibition of chemically induced liver carcinogenesis in Wistar rats by garlic (*Allium sativum*). *Phytotherapy Research*, **14**, 564-567, 2000.
- Sparmins, V. L., Barany, G. and Wattenberg, L. W. : Effect of organosulfur compounds from garlic and onions on benzopyrene induced neoplasia and GST activity in the mouse. *Carcinogenesis*, **9**, 131-134, 2000.
- Hussain, S. P., Jannu, L. N. and Rao, A. R. : Chemopreventive action of garlic on methylcholanthrene induced carcinogenesis in the uterine cervix of mice. *Cancer Letters*, **49**, 175-180, 1990.
- Dorant, E., van den Brandt, P. A., Goldbohm, R. A., Hermus, R. J. J. and Sturmans, F. : Garlic and its significance for the prevention of cancer in humans: a critical view. *Breast Journal of Cancer*, **67**, 424-429, 1993.
- Hu, J. J., Yoo, J. S., Lim, M., Wang, E. J. and Yang, C. S. : Protective effects of diallyl sulfide on acetaminophen-induced toxicities. *Food and Chemical Toxicology*, **34**, 963-969, 1996.
- Vimal, V. and Devaki, T. : Hepatoprotective effect of allicin on tissue defense system in galactosamine/endotoxin challenged rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **90**, 151-154, 2004.
- Robbins, B. : The absorption, distribution and excretion of carbon tetrachloride in dogs under various conditions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **37**, 203-216, 1997.
- Louria, D. B. and Bogden, J. D. : The dangers from limited exposure to carbon tetrachloride. *Critical Reviews of Toxicology*, **7**, 177-188, 1980.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M. and Venkatachalam, M. A. : Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine protease. *American Journal of Pathology*, **151**, 1205-1213, 1997.

16. Ferenci, P., Dragosics, B., Dittrich, H., Benda, H., Lochs, L., Base, S. and Scheider, W. : Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *Journal of Pathology*, **9**, 105-113, 1999.
17. Stripe, F. and Della, C. E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase(type D) oxidase(type O). *Journal of Biological Chemistry*, **244**(14), 3855-3863, 1969.
18. Martin, J. P., Dailey, M. and Sugarman, E. : Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autooxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **255**, 329-336, 1987.
19. Aebi, H. : Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, **105**, 121-126, 1984.
20. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, **95**, 351-358, 1979.
21. Masson, P. : Carcinoids (Argentaffin-cell tumors) and nerve hyperplasia of the appendicular mucosa. *America. Journal Pathology*, **4**(3), 181-211, 1928.
22. Luft, J. H. and John, H. : Improvement in epoxy resin embedding method. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, **9**, 409-414, 1961.
23. Reynolds, E. S. : The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, **17**, 208-212, 1963.
24. Hiroshi, S., Yasuhide, M., Masuko, M. and Tojiro, T. : Effects of some vegetable extracts on the growth of human cell lines measured by WST-1 assay. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, **43**, 64-65, 1996.
25. Park, K. and Choi, H. : Modification of hepatic microsomal cytochrome P450 2E1 enzyme by garlic powder in rat hepatocarcinogenesis. *Journal of Biochemical Molecular Biology*, **30**, 73-79, 1997.
26. Sheen, L. Y., Wu, C. C., Lii, C. K. and Tsai, S. J. : Effect of diallyl sulfide and diallyl disulfide, the active principles of garlic, on the aflatoxin B1-induced DNA damage in primary rat hepatocytes. *Toxicology Letters*, **122**, 45-52, 2001.
27. Gedik, N., Kabasakal, L., Sehirli, O., Ercan, F., Sirvanci, S., Keyer-Uysal, M. and Sener, G. : Long-term administration of aqueous garlic extract(AGE) alleviates liver fibrosis and oxidative damage induced by biliary obstruction in rats. *Life Sciences*, **76**, 2593-2606, 2005.
28. Amdur, M. O., Dodll, J., Klaassen, C. D. and Doulls, J. : *Toxicology*; New York: Pergamon press, 1991.
29. Anthony, P. P., Ishak, K. G. and Nayak, N. C. : The morphology of cirrhosis. *Journal of Clinical Pathology*, **31**, 395-401, 1977.
30. Kim, S. K., Seo, J. M., Chae, Y. R., Jung, Y. S., Park, J. H. and Kim, Y. C. : Alleviation of dimethylnitrosamine-induced liver injury and fibrosis betaine supplementation in rats. *Chemico-Biological Interactions*, **177**, 204-211, 2009.
31. Joseph, G., vanden Rao, K R., Stern, R. and Chandrakasan, G. : Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. *Toxicology*, **156**, 129-138, 2001.
32. Sato, M., Kakubari, M., Kawamura, M., Sugimoto, J., Sugimoto, K., Matsumoto, L. and Ishii, T. : The decrease in total collagen fibers in the liver by hepatocyte growth factor after formation of cirrhosis induced by thioacetamide. *Biochemical Pharmacology*, **59**, 681-690, 2005.
33. Wake, K. : Perisinusoidal stellate cells in the liver. *Hepatology Rapid Little Reviews*, **1**, 11-16, 1995.
34. Schmitt-Graff, A., Kruger, S., Bochar, F., Bochar, Gabbiani, G. and Denk, H. : Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *American Journal of Pathology*, **138**, 1233-1242, 1991.
35. Bioulac-Sage, P. and Balabauo, C. : Proliferation and phenotypic expression of perisinusoidal cells. *Journal of Hepatology*, **15**, 284-287, 1992.