사염화탄소에 의해 유발된 흰쥐의 간독성에 미치는 흰점박이꽃무지 추출물의 간보호 효과

전정우 · 권해용 · 조유영 · 여주홍 · 이희삼*
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과

Protective Effects of Extracts of *Protaetia brevitarsis* on Carbon tetrachloride-induced Hepatotoxicity in the Mice

Jeong-Woo Chon, HaeYong Kweon, You-Young Jo, Joo Hong Yeo, Heui Sam Lee*

Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Republic of Korea

(Received June 7, 2012, Accepted October 12, 2012)

Abstract

To investigate the effects of *Protaetia brevitarsis* extracts on the protection against liver damage by carbon tetrachloride(CCl_4) in rat, two kinds of experiment were performed, firstly by the primary hepatocyte culture and secondly by the animal feeding. The primary hepatocyte culture with the extracts of *P. brevitarsis* showed significantly low activities of GPT, bile acid, and bilirubin, indicating an excellent protective effect against liver damage by CCl_4 . Especially, below molecular weight 1,000 blew the water to have 32.1% recovery degree. In the seconde experiment, serum GPT activity was significantly decreased in water fraction of *P. brevitarsis* compared to CCl_4 treatment by 98.2%. Serum concentration of bile acid and bilirubin were tended to increased by CCl_4 treatment, but water fraction of *P. brevitarsis* and silymarin recovered the level. These consistent results *in vitro* and *in vivo* suggest that the extracts of *P. brevitarsis* may have strong protective effects against liver damage induced by the potential toxicants such as CCl_4 .

Key words : *Protaetia brevitarsis*, Carbon tetrachloride, Hepatocyte, GPT, Hydroxyproline

서 론

간은 당질, 단백질, 지방을 대사하는 중심기관이며, 체내에 들어온 외부물질을 산화, 환원, 가수분해 및 포합 반응을 통해 체내로 배설하는 기능을 담당하지만, 간질환의 초기단계에서 통증이나 자각증상이 잘 나타나지 않고 상당히 악화되어서야 발견되는 ‘침묵의 장기’로 알려져 있다(Friedman 2000). 간질환의 원인은 다양한 것으로 알려져 있으며 병인학적으로 바이러스에 기인된 간질환, 약물 중독에 기인된 간질환 및 담도기능부전에 의한 간질환 등으로 분류할 수 있다. 이러한 간질환들은 간세포 파괴에 의한 해독능력 저하와 담즙분비 억제에 의한 독성물질 배설장애, 비타민 B_2 , B_3 및 C의 흡수 억제 및 축적저하에 의한 전신 권태감, 소양감, 식욕부진 및 피로 등의 증상을 나타낸다(Kim 2001).

사염화탄소(CCl_4)는 유지, 고무, 수지의 용제 등에 이용되어 산업현장에서 쉽게 노출되는 환경공해물질로서(Anita and James 1989) 간에서 단백질 합성과 글리코겐 양을 저하시키고 microsomal enzyme을 억제하며 간세포를 괴사시키므로 간세포에 독성을 나타내는 대표적인 물질이다(McCay et al. 1993, Jin et al. 2008). 사염화탄소 투여방법, 경로 및 횟수에 따라 급성간염, 지방간, 간 경변 등의 간질환 유발이 가능하기 때문에 투여물질의 효과를 밝히는데 있어 실험적으로 많이 이용되고 있는 약물로서(Recknagel 1983) 체내의 mixed function(cytochrome P-450) oxidase system에 의해 생성된 CCl_3 free radical이 간microsome의 막단백 thiol기와 강하게 공유결합 되어 결국 간세포의 지질과산화물을 촉진해서 장해를 일으키게 된다. 그 결과 간에서 단백질 합성 억제와 glycogen 감소, 혈중으로 GOT, GPT 및 LDH 등을 유리시키는 것으로 알

*Corresponding author. E-mail: lhsam@korea.kr

려져 있다(Groot and Noll 1986).

현재 사용되고 있는 간질환 치료제로는 합성약물인 interferon과 malotilate가 있으나 간독성 물질에 대한 보호 작용만 그 유효성이 인정받고 있으며 부작용 또한 빈번이 일어나서 마리아 엉겅퀴의 활성성분인 silymarin과 천연물 유래 합성 간질환 치료제인 biphenyl dimethyl dicarboxylate 개발로 천연물에 대한 관심이 고조되고 있다. 이에 신약 개발과 관련하여 천연물의 생리기능에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 간독성을 완화시킬 수 있는 생리활성 성분의 탐색과 개발에 대한 연구가 활성화되고 있다(Di Pascoli et al. 2004). 예로부터 곤충은 한약재로 자주 이용되어 왔으며 누에, 매미허물, 동충하초, 지네 등 약 30 여종이 유용한 곤충자원으로 이용되고 있다(Kang et al. 2000). 그 중에서 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis*)는 딱정벌레목(Coleoptera), 풍뎅이과(Scarabaeidae) 꽃무지아과(Cetoniinae)에 속하는 17~24 mm 크기의 식식성 곤충으로 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 및 시베리아 동부 지역에 서식하고 있으며, 5월에서 10월에 걸쳐 1~2년에 1회 발생한다고 알려져 있다(Kim and Kang 2005, Zhang 1984). 흰점박이꽃무지는 3령 성숙유충 상태로 월동하며 성충은 주간에 활동하고 복숭아, 배 등의 성숙한 과일이나 옥수수, 상수리나무 등의 즙액을 먹이로 하며, 항상 군집성이고 유충은 퇴비나 진초더미 등의 유기물이 풍부한 토양 속에서 서식하며 살아있는 식물의 지하부위는 잘 가해하지 않는 곤충으로 보고되어 있다(Kim et al. 2002). 풍뎅이류의 유충인 굼벵이는 한약재 명칭으로 제초(蟬蟥)라고 쓰이고 있으며, 간장병, 아구창, 파상풍, 이노작용 등에 사용하여 왔다. 약용으로 사용되는 굼벵이는 풍뎅이과(Scarabaeidae) 검정풍뎅이속(Holotrichia)에 속하는 검정풍뎅이(*H. diomphalia*), 섬풍뎅이(*H. formosana*), 사탕수수풍뎅이(*H. horishana*), 아카시아풍뎅이(*H. lata*), 왕떡풍뎅이(*H. morasa*), 쇠풍뎅이(*H. sinensis*) 등의 유충이다(Shin 1986). 그러나 동의보감에 기재된 굼벵이는 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)와 꽃무지아과의 풍이(*Rhomborrhina japonica*), 제주남색풍이(*R. nigra*), 검정풍이(*R. polita*), 점박이풍뎅이(*Potosia aerata*) 등이다(Park et al. 1997). 특히 흰점박이꽃무지에는 천연항생 단백질인 protaecin 등 유용한 생체활성물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Park et al. 1994) 또한 강장 및 간기능 증진 등에 효과가 있는 것으로 알려져 널리 이용되고 있으나, 과학적으로 검증이 되어있지 않고 민간에서 무분별하게 복용되고 있는 실정이다. 이에 본 연구에서는 사염화탄소에 의하여 유발되는 지질과산화에 의한 간독성에 대한 흰점박이꽃무지 추출물의 보호효과를 살펴보기 위하여 정상 흰쥐의 간세포를 일차 배양하여 *in vitro*에서 실험을 수행하였다. 일반적으로 암

세포주를 활용한 *in vitro* 실험에서 여러 효소 발현이 정상 간세포와 다르게 나타나는데, 일차 배양한 세포의 경우 정상 흰쥐에서 간세포를 분리, 배양하게 되므로 *in vivo*에서의 작용을 간접적으로 살펴볼 수 있다는 장점을 지니고 있다(Yun et al. 2006). 이에 일차 배양 간세포에 효과를 사염화탄소를 처리하여 간독성이 유발된 흰쥐에서도 간보호 효과를 확인하여 간질환 치료제나 건강기능성식품 소재로서의 개발 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험재료

흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis*)와 장수하늘소(*A. dichotoma*) 5령 유충은 경기도 구리의 초가농산으로부터 공급받아 본 연구의 소재로 사용하였다. 공급받은 즉시 액체질소를 처리하여 급속동결시킨 후에 동결건조기(Ilshin Co. Ltd, Korea)를 이용하여 동결건조 한 후에 -70°C의 초저온냉동고(Ilshin Co. Ltd, Korea)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 재료

세포배양용 및 활성 검색용 시약은 모두 Sigma-aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, horse serum과 fetal bovine serum은 Hyclone(Logan, UT, USA)의 제품을 사용하였다. 또한 사염화탄소, olive oil 및 기타시약은 Junsei chemicals(Tokyo, Japan)에서 구입하였고, glutamic pyruvic transaminase(GPT), bile acid 및 bilirubin 측정용 kit는 영동제약(Yongin, Korea)에서 구입하였다.

3. 흰점박이꽃무지 물분획물 및 유기용매 추출물의 제조

5령의 흰점박이꽃무지를 동결건조하여 분말상태로 만든 후에 분말 100 g에 증류수를 가하여 수용성 물질만을 추출하였다. 추출방법은 Sonicator(Branson Co., Danbury, CT, USA)로 2시간 동안 5회에 걸쳐서 추출한 다음 filter paper를 사용하여 여과하였다. 얻어진 물 추출액을 Spectra/Por Biotech cellulose Ester MWCO 100~500 투석막(Spectrum Co., USA)에 100 mL을 넣고 고정한 다음, 48시간동안 자성교반을 행하면서 분자량 1,000 이하의 분획물 I을 얻었고 동결건조하여 분말화하였다(yield; 20%). 이때 분자량은 겔크로마토그래피(Viscotek Co., Houston, TX, USA) 장치를 사용하여 측정하였다.

분획물 I을 얻은 다음 투석막 안에 존재하는 내용물을 다시 Spectra/Por®Biotech cellulose Ester MWCO 1,000~5,000 투석막에 100 mL을 넣고 고정한 다음, 48시간동안 자성교반을 행하면서 분자량 1,000~8,000 정도의 분획물 II을 얻었고 동결건조하여 분말화하였다(yield; 27%).

분획물 II를 얻은 다음 투석막 안에 존재하는 내용물을 다시 Spectra/Por® Biotech cellulose Ester MWCO 12,000 ~ 14,000 투석막에 100 mL을 넣고 고정한 다음, 48시간 동안 자성교반을 행하면서 분자량 8,000 ~ 13,000 정도의 분획물 III을 얻었고 동결건조하여 분말화하였다(yield; 35%).

분획물 III을 얻은 다음 투석막안에 존재하는 내용물을 다시 Spectra/Por® Biotech cellulose Ester MWCO 10,000 ~ 50,000 투석막에 100 mL을 넣고 고정한 다음, 분획물 IV을 얻었고 동결건조하여 분말화하였으며 수율(yield)은 18%였다.

또한 증류수로 추출하고 남은 잔사에 100% 메탄올을 부가한 다음 초음파로 5분 동안 5회에 걸쳐 추출하고 여과하여 유기용매 추출물을 얻었고 진공감압농축기를 이용하여 농축하였다.

4. 단백질함량 측정

단백질 양은 Bovine serum albumin을 표준으로 하여 Lowry방법으로 505 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다(Lowry et al. 1951).

5. 일차배양 간세포에서 추출물의 간보호 효과

간세포는 Berry와 Friend의 방법을 약간 수정한 Collagenase 관류법으로 분리하여 배양하였다(Berry et al. 1991). 일차 배양한 흰쥐의 간세포를 24시간 동안 배양한 후 10 mM 사염화탄소를 처리하여 인위적인 독성을 유발하고 일정농도의 각 검액을 처리하였다(Kiso et al. 2005). 그리고 배양액으로 유리된 glutamic pyruvic transaminase (GPT)의 활성은 kit를 사용하여 측정하였다(Reitman and Frankel 1957).

6. 실험동물의 사육 및 투여방법

생후 4주된 평균체중 22 ± 3 g인 ICR계 숫컷 흰쥐를 삼육실험동물센터(Osan, Korea)에서 분양받아 일주일간 적응기간을 거친 후, 난괴법(randomized complete block design)에 의해 10마리씩으로 하여 정상군, 대조군, 흰점박이꽃무지 분획물 첨가군, silymarin군으로 총 7군으로 구분하였다. Olive oil만을 투여한 정상군을 제외한 실험군은 사염화탄소를 olive oil에 섞어 50 mg/kg 농도로 3일에 한번씩 2주간 복강 주사하여 쥐의 급성 간장해를 유발하였다. 약물투여는 5주간 흰점박이꽃무지 분획물(100 mg/kg)과 silymarin(2 mg/kg)을 각각 olive oil에 현탁시킨 다음, 사염화탄소 주사 30분 후에 경구 투여하였다.

본 실험에 사용한 실험식은 AIN-76에 의거하였고, 물과 식이는 제한없이 공급하였다. 실험실 사육조건은 실내온도는 22 ± 1 , 상대습도 50 ~ 60%로 유지시켰고 명암은 12시간을 주기로 자동 조절하였다. 또한 세포배양용 흰쥐는 숫컷 Wistar계(200 ± 6 g) 흰쥐를 사용하였다.

7. 혈청 중 GPT, bile acid, bilirubin 및 hydroxyproline 활성측정

흰쥐의 안와정맥에서 채혈한 혈액을 4°C에서 30분 방치한 후 890 g에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청중의 glutamic pyruvic transaminase(GPT), bile acid, bilirubin 및 hydroxyproline을 kit을 이용하여 측정하였다.

8. 간의 조직학적인 관찰

간을 적출하여 10% 중성 포르말린으로 고정시킨 후 Hematoxylin-Eosin 염색하여 조직병리학적인 방법으로 간조직을 관찰하였다.

9. 통계처리

본 연구의 실험 결과의 통계처리는 실험군 당 평균치와 표준오차로 계산하였고 군간의 차이는 ANOVA test를 이용하였다.

결 과

1. 간세포에서 추출물의 간보호 효과

사염화탄소에 의해 유도된 간독성 회복에 대한 흰점박이꽃무지와 장수풍뎡이 추출물의 효과를 살펴보기 위하여, 사염화탄소로 독성을 유발시킨 일차배양 간세포에 흰점박이꽃무지와 장수풍뎡이 추출물을 첨가하여 배양한 후, 배양액으로 유리되는 GPT 활성과 bile acid 및 bilirubin 량을 측정하였다. 일차배양한 간세포를 사염화탄소로 독성을 유발시키면 거의 모든 세포가 괴사를 일으키나, 흰점박이꽃무지와 장수풍뎡이 추출물을 동시에 첨가한 경우에는 간세포괴사가 덜 되었음을 확인할 수 있었다. 사염화탄소 처리로 인하여 간세포가 독성을 입게 되면 GPT 효소가 배양액으로 유리되어 525.5 ± 22.2 U/mL로 증가되었지만, 흰점박이꽃무지와 장수풍뎡이 추출물을 처리하면 GPT 수치가 318.0 ± 20.8 U/mL과 481.2 ± 42.7 U/mL로 감소되어 각각 41.2%와 8.4%의 간독성 회복효과를 나타내었고, bile acid 수치는 흰점박이꽃무지 추출물(21.30 ± 1.14 μ mol/L)이 사염화탄소군(59.30 ± 1.51 μ mol/L)보다 유의적으로 낮았으며, 또한 간세포 변성이나 괴사와 관련이 깊은 bilirubin 수치에서도 흰점박이꽃무지 추출물이 사염화탄소군보다 25.5% 효과적인 것으로 확인하였다(Table 1). 결과적으로 흰점박이꽃무지 추출물은 silymarin과 유사한 결과를 보였으며 또한 장수풍뎡이 추출물보다 간독성 회복효과에 대하여 긍정적인 효과가 있을 것으로 사료된다.

2. 간세포에서 용매추출 방법에 따른 추출물의 간보호 효과

흰점박이꽃무지 추출물의 용매추출 방법에 따른 간보호

Table 1. Effects of extracts of *P. brevitaris* and *A. dichotoma* on the GPT activity of CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes.

	CCl ₄ (mM)	Conc. (μg/mL)	GPT (IU/L)	Bile acid (μmol/L)	Bilirubin (μmol/L)
Control	0	0	21.8 ± 3.3(100)	9.0 ± 2.06(100)	7.65 ± 1.30(100)
Reference	10	0	525.5 ± 22.2(0.0)	59.30 ± 1.51(0.0)	14.50 ± 1.29(0.0)
<i>P.brevitaris</i>	10	50	318.0 ± 20.8(41.2)*	21.30 ± 1.14(75.5)*	12.75 ± 2.14(25.5)
<i>A.dichotoma</i>	10	50	481.2 ± 42.7(8.4)	37.50 ± 3.81(43.3)	26.07 ± 9.07(0.0)
Silymarin	10	2	465.8 ± 46.8(11.9)	33.45 ± 2.26(51.4)*	13.03 ± 0.80(21.5)

The activity of GPT in the medium was determined. Values represent mean ± S.D. Control is the value of hepatocytes which were not challenged with CCl₄. Reference is the value of hepatocytes which were challenged with CCl₄. The % of protection is calculated as 100x(value of reference - value of sample)/(value of reference - value of control).

*Significantly different from positive control at $p < 0.05$.

Table 2. Effects of water and methanol extracts of *P. brevitaris* on the GPT activity of CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes.

	CCl ₄ (mM)	Conc. (μg/ml)	GPT (%)
Control	0	0	100.0
Reference	10	0	0.0
	10	10	29.2 ± 7.3
Water extract	10	50	38.4 ± 3.6
	10	100	47.8 ± 2.1
	10	10	0.0
Methanol extract	10	50	0.0
	10	100	12.4 ± 1.0

The activity of GPT in the medium was determined. Values represent mean ± S.D. Control is the value of hepatocytes which were not challenged with CCl₄. Reference is the value of hepatocytes which were challenged with CCl₄. The % of protection is calculated as 100x(value of reference - value of sample)/(value of reference - value of control).

*Significantly different from positive control at $p < 0.05$

효과를 알아보려고 물과 메탄올 추출물을 사염화탄소로 유도된 간독성 보호 효과를 Table 2에 나타내었다. 사염화탄소 처리로 인하여 간세포가 독성을 입게 되면 GPT 효소가 배양액으로 유리되는데, 흰점박이꽃무지 메탄올 추출물은 100 μg/mL에서 12.4%로 간독성 회복효과가 조금 보였지만 물 추출물은 농도 의존적으로 회복효과를 나타내었으며 10 μg/mL에서는 47.8%로 메탄올 추출물의 100 μg/mL보다도 2배 이상의 효과가 있는 것으로 확인되어서 용매별 추출물의 효과에서 메탄올 추출물보다 물 추출물이 간독성 회복 효과가 뛰어난 것으로 사료된다.

3. 간세포에서 추출물 분획별 단백질 함량

사염화탄소에 유도된 간독성 회복효과에 대하여 흰점박이꽃무지 유충의 추출물이 간세포 회복효과가 메탄올 추출물보다 긍정적 효과를 나타내어, 흰점박이꽃무지 물 추

Table 3. The protein contents of protein in water fractions of *P. brevitaris*

Fraction	Protein content(%)
I	10.5 ± 0.1
II	16.8 ± 1.2
III	10.0 ± 0.9
IV	26.3 ± 1.2

출물의 분자량별로 간세포 회복 능력을 알아보려고 분획을 실시하였다. 각각의 분획은 다음과 같이 분자량별로 1,000이하(I), 1,000 ~ 8,000(II), 8,000 ~ 13,000(III), 10,000 ~ 50,000(IV) 나누었으며, 각 분획별 단백질 함량에서는 분자량이 10,000 ~ 50,000의 물 분획(IV)에서 26.3 ± 1.2%로 다른 분획들보다 많은 단백질을 함유하고 있었다.

4. 간세포에서 분자량에 따른 추출물의 간보호 효과

사염화탄소에 의해 유도된 간독성 회복에 흰점박이꽃무지 추출물 분자량별로 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 간세포에 흰점박이꽃무지 물 추출물을 각 분획별로 처리 농도를 달리하여 첨가한 후, 배양액으로 유리되는 GPT 활성을 측정하였다. 사염화탄소 처리로 인하여 간세포가 독성을 입게 되면 GPT 효소가 배양액으로 유리되는데 각 분획별로 농도가 증가할수록 간독성 회복 효과를 나타내었지만 I 분획의 100 μg/mL에서 32.1%로 가장 좋은 효과를 나타내었다. 또한 추출물의 분자량이 작은 분획일수록 간독성 회복 효과가 좋아지는데 이는 저분자 분획에서 단백질보다 알칼로이드성 물질의 활성화에 의한 효과일 것으로 사료된다(Table 4).

5. 간독성 동물에서 추출물의 간보호 효과

간세포에서의 흰점박이꽃무지 물 분획물이 간보호 효과를 사염화탄소로 유도된 간독성 동물에서 간독성 회복 효과가 있는지 확인하였다.

Table 4. Effects of water fractions of *P. brevitarsis* on the GPT activity of CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes.

	CCl ₄ (mM)	Conc.(μg/ml)	GPT(%)
Control	0	0	100.0
Reference	10	0	0.0
	10	1	-22.6
Water fraction I	10	10	6.7
	10	100	32.1
	10	1	-65.3
Water fraction II	10	10	-12.5
	10	100	10.1
	10	1	-34.4
Water fraction III	10	10	-59.3
	10	100	13.8
	10	1	-122.4
Water fraction IV	10	10	-3.8
	10	100	-23.2
Silymarin	10	2	44.0

The activity of GPT in the medium was determined. Values represent mean $\pm$ S.D. Control is the value of hepatocytes which were not challenged with CCl₄. Reference is the value of hepatocytes which were challenged with CCl₄. The % of protection is calculated as 100x(value of reference - value of sample)/(value of reference - value of control).

사염화탄소를 투여함으로써 간독성이 유도되어 증가된 혈청의 GPT, bile acid 및 bilirubin 활성은 흰점박이꽃무지 분획물별로 경구투여 하였을 때 각 분획별로 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다(Table 5). 즉 정상군의 GPT 수치는 33.3 ± 4.1 U/mL이었지만 사염화탄소군은 93.7 ± 8.1 U/mL으로 높게 나타내어 사염화탄소에 의한 간독성이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 또한 I 분획 투여군은 34.4 ± 8.1 U/mL로 사염화탄소군에 비해 유의적으로 낮았으며, silymarin군보다 효과적으로

Table 6. Effects of water fraction I of *P. brevitarsis* on the contents of hydroxyproline in mice treated with CCl₄.

	CCl ₄ (mg/kg, i.p.)	Dose (mg/kg, p.o.)	hydroxyproline
Control	0	-	$0.083 \pm 0.0591(100)$
Reference	50	-	$0.204 \pm 0.082(0.0)$
Water fraction I	50	25	$0.135 \pm 0.024(57.0)^*$
Silymarin	50	10	-

Values represent mean $\pm$ S.D. CCl₄ was injected intraperitoneally, and test materials were administered orally at 30 min after injection of the CCl₄. The values in parenthesis are relative percents.

*Significantly different from positive control at $p < 0.05$.

확인되었다. I 분획 투여군의 bile acid 수치는 28.1 ± 3.9 μmol/L으로 비록 정상군보다 높았지만 사염화탄소군(40.6 ± 2.9 μmol/L)에 비해 낮은 수치를 나타내었다. 사염화탄소군의 bilirubin 수치는 5.67 ± 0.22 μmol/L으로 정상군(0.6 ± 0.05 μmol/L)에 비하여 증가되었지만 I 분획 투여군은 3.10 ± 0.70 μmol/L으로 50% 이상 감소하는 경향을 나타내어 사염화탄소에 의한 간독성 흰쥐에서도 간세포의 간독성 회복 효과와 유사하게 흰점박이꽃무지 추출물이 간질환 관련 효소 활성을 낮추어서 간독성 회복 효과가 있음을 확인하였다.

6. 간독성 동물 간의 항섬유화 효과

흰점박이꽃무지 분획물이 사염화탄소로 유도된 간독성 흰쥐의 hydroxyproline을 측정하여 간섬유화에 미치는 영향을 확인하였다(Table 6). 사염화탄소에 의하여 간독성이 유도되면 정상군에 비하여 hydroxyproline 함량이 약 3배 정도 증가됨을 알 수 있었다. 흰점박이꽃무지 I 분획 투여군의 hydroxyproline 함량은 0.135 ± 0.024 0.204 ± 0.082 μmole/g으로 사염화탄소군의 0.204 ± 0.082 μmole/g보다 감소하여 약 57% 항섬유화 효과가 있는 것을 확인하였다.

Table 5. Effects of water fractions of *P. brevitarsis* on serum GPT activity, bile acid, and bilirubin in mice treated with CCl₄.

	CCl ₄ (mg/kg, i.p.)	mg/kg, p.o.	GPT(IU/L)	Bile acid(μmol/L)	Bilirubin(μmol/L)
Control	0	0	$33.3 \pm 4.1(100)$	$9.3 \pm 2.8(100)$	$0.68 \pm 0.05(100)$
Reference	50	0	$93.7 \pm 8.1(0.0)$	$40.6 \pm 2.9(0.0)$	$5.67 \pm 0.22(0.0)$
Water fraction I	50	100	$34.4 \pm 8.1(98.2)^*$	$28.1 \pm 3.9(39.9)$	$3.10 \pm 0.70(51.5)$
Water fraction II	50	100	$38.5 \pm 4.6(91.4)^*$	$28.3 \pm 2.5(39.3)$	$3.29 \pm 0.04(47.7)$
Water fraction III	50	100	$58.0 \pm 5.6(59.1)$	$31.9 \pm 1.6(27.8)$	$4.21 \pm 0.09(29.3)$
Water fraction IV	50	100	$63.2 \pm 6.2(50.5)$	$34.6 \pm 2.9(19.2)$	$5.87 \pm 0.13(0.0)$
Silymarin	50	2	$47.0 \pm 11.1(77.3)^*$	$37.1 \pm 4.1(11.2)$	$3.83 \pm 0.18(36.9)$

Values represent mean $\pm$ S.D. CCl₄ was injected intraperitoneally, and test materials were administered orally at 30 min after injection of the CCl₄. The values in parenthesis are relative percents.

*Significantly different from positive control at $p < 0.05$.

Fig. 1. The histological photographs of liver tissues of normal and CCl₄-intoxicated mice(H&E stain, X100). (A) Liver tissue of a normal mouse, (B) Liver tissue of a CCl₄-intoxicated mouse, (C) Liver tissue of a mouse which was treated with water fraction I of *P. brevitarsis*.

7. 간독성 동물 간의 조직학적 변화

흰점박이꽃무지을 투여함으로써 나타나는 간보호 효과를 간의 병리·조직학적 측면에서 관찰하기 위하여, 간 조직을 H&E 염색을 하여 전자현미경으로 관찰을 하였다. 정상군의 간조직에서는 특별한 병변을 관찰할 수 없었으나 (Fig. 1 A), 사염화탄소군의 간조직에서 간세포가 괴사됨을 알 수 있었고, 특히 중심정맥 오른쪽에 염증세포가 증가됨을 확인할 수 있었고, 정상적인 형태의 간세포가 사라지고 콜라겐이 많이 형성되고, mitochondria의 크기가 비대해짐을 알 수 있었다(Fig. 1 B). 흰점박이꽃무지 투여군은 중심 정맥 쪽에 아주 경미한 허혈성 변성 이외에는 다른 병변을 찾을 수 없었고, 세포내 organelle이 유지된 편이고 콜라겐 형성이 매우 많이 줄어들었다(Fig. 1 C). 이와 같이 흰점박이꽃무지 투여군은 사염화탄소로 생쥐에 간독성을 유발시켰을 때 뚜렷한 간보호 활성을 나타냄을 간조직 검사로 밝힐 수 있었다.

고 찰

본 연구에서는 흰점박이꽃무지 추출물이 사염화탄소 투여로 유발된 간독성 흰쥐의 분리한 간세포에서 추출물별, 추출 용매별, 분획별로 GPT, bile acid, bilirubin을 확인하였고 간독성 흰쥐에서도 GPT, bile acid, bilirubin, hydroxyproline 및 조직학적 분석을 실시하였다.

GOT와 GPT는 생체내 TCA 회로에 있어 대사산물과 아미노산 사이에서 아미노 전이를 조절하는 효소로서 간, 신장, 심장 등에 많이 분포되어 있는 반면 혈중에서는 활성치가 낮은 것으로 알려져 있다. 이들 효소는 간질환이 유발될 경우 간손상으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 효소 활성치가 증가되기 때문에 간손상의 판단 지표로 이용되고 있다. 사염화탄소는 간세포의 막투과성을 변화시

켜 혈장 내 aminotransferase 등의 효소 활성을 증가시키며, GOT와 GPT 활성치는 사염화탄소와 같은 간 독성물질이 생체 내로 유입되면 현저하게 증가되어 간세포의 변성 및 괴사와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다 (Jung 2001).

간세포 배양액내 GPT 효소 활성은 정상 간세포에 비해서 유의적으로 높은 활성을 보임으로서 사염화탄소에 의한 간 독성을 나타내었지만 흰점박이꽃무지 추출물과 장수풍뎡이 추출물 처리하였을 때 각각 41.2%와 8.4% 회복효과를 나타내었다. 이는 에탄올 투여로 간 손상을 유도한 흰쥐의 GOT와 GPT 활성이 굼벵이 분말을 첨가한 식이를 통해 유의적으로 감소하였다는 보고와(Choi et al. 2006) 유사하였으며, 장수풍뎡이 추출물보다 흰점박이꽃무지 추출물이 간독성 회복에 효과적인 것으로 사료된다.

용매별로 추출한 흰점박이꽃무지 추출물의 간독성 회복효과에서 메탄올 추출물보다는 물 추출물에서 간 손상 회복 능력이 우수한 것으로 확인되었으며, 사염화탄소로 간독성을 유도한 일차배양 간세포에 분자량별로 분획한 물 추출물을 처리한 결과 분자량이 작은 분획에서 간 회복 능력이 우수하였는데, 이는 분자량이 1,000이하의 분획물에 함유된 알칼로이드성 물질에 의한 활성에 의한 것으로 사료된다.

사염화탄소에 의한 간독성 흰쥐에서도 간세포와 유사하게 분자량이 1,000이하 분획에서 GPT 수치가 유의적으로 낮았으며, 간 손상이나 황달, 만성 알코올 중독의 경우 증가되는 bilirubin의 수치에서도 낮은 수치를 나타내었고 간 질환 치료제인 silymarin과 유사한 치료 효과를 보여서 흰점박이꽃무지 추출물중 분자량이 1,000이하의 분획물이 사염화탄소 투여에 의한 간 손상 완화에 효과적인 것으로 사료된다. 또한 다른 원인과 관계없이 간에 염증이 유발되고 그 부위로 각종 염증세포가 밀집되면서 유리되는 각종 cytokine을 매개로 fibroblast의 콜라겐 합성이 촉진

되고 분해가 억제되어 간 섬유화가 유발되어지는데 그 콜라겐 양을 대표하는 hydroxyproline 함량인데(Poynard et al. 2008) 흰점박이꽃무지 추출물은 정상군보다 높았지만 사염화탄소군보다 유의적으로 낮아 간 섬유화 예방에도 도움이 되는 것으로 사료된다.

간에 존재하는 glutathion S-transferase 효소는 다양한 독성화합물을 해독시킴으로써 독성물질에 의한 간의 손상을 막아주는 간보호 작용에 필수적인 역할을 하는 것처럼(Naei et al. 1985), 흰점박이꽃무지 추출물은 사염화탄소와 같은 독성물질에 의해 증가된 간독성의 지표가 되는 GPT, bilirubin, hydroxyproline 같은 효소 활성을 유의성 있게 회복시킴으로써 간보호 활성에 긍정적인 효과를 나타내었으며 더불어 간질환 치료제인 silymarin과 유사한 간보호 효과를 지닌 것으로 확인되어 흰점박이꽃무지를 간질환 치료보조제나 건강기능성식품 소재로서의 개발 가능성이 높으므로 사육농가의 소득증대뿐만 아니라 국민 건강의 증진에도 기여할 것으로 기대된다.

적 요

본 연구는 사염화탄소에 의하여 유발되는 지질과산화에 의한 간독성에 대한 흰점박이꽃무지 추출물의 보호효과를 일차배양한 간세포와 간독성 흰쥐에서 GPT, bile acid, bilirubin 등의 활성 지표를 통해 간독성 회복효과를 알아보고자 하였다. 사염화탄소로 유발시킨 일차배양 간세포에 대한 흰점박이꽃무지와 장수하늘소 추출물의 간독성 회복효과는 각각 41.2%와 8.4%로 흰점박이꽃무지 유충 추출물이 간독성 회복 효과가 높게 나타났으며, 용매 추출별로는 흰점박이꽃무지 메탄올 추출물보다는 물 추출물이 농도의존적으로 간독성 회복효과가 있음을 확인하였다. 사염화탄소에 의해 간독성이 유도된 흰쥐에 흰점박이꽃무지 물추출물 분획별로 처리하였을 때, 분자량 낮을수록 효과적이며, 분자량이 1,000이하의 분획물에서 32.1%로 간독성 회복 효과가 우수하였다. 또한 흰쥐에 사염화탄소를 복강투여로 간독성을 유발한 후 흰점박이꽃무지 물분획물을 경구투여할 경우에 혈청 GPT, bile acid와 bilirubin의 활성이 정상군보다는 높았지만 사염화탄소군보다 유의적으로 감소하였고, 간섬유화와 관련된 hydroxyproline의 생성 억제에서는 분자량이 1000이하의 분획물에서 사염화탄소군보다 유의성 있게 생성을 억제하여 간섬유화를 예방하는 것으로 확인하였다. 중심정맥 쪽에 아주 경미한 허혈성 변성 이외에는 다른 병변을 찾을 수 없었고 세포 내에 organelle이 유지된 편이고 콜라겐 형성이 매우 많이 줄어들어 병리조직학적으로도 간보호 효과가 있음을 확인하였다. 이에 간독성 지표 활성을 긍정적으로 결과를

확인한 흰점박이꽃무지 추출물의 간질환 치료보조제나 건강기능성식품 소재 개발 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 농업생물연구(동충하초 생산성 향상과 누에 혈림프유래 화장품 소재 개발, PJ0085592012)에 의하여 수행되었음.

인용문헌

- Anita KC, James RT(1989) Interaction of hypoxia and carbon tetrachloride toxicity in hepatocyte monolayers. *Exp Mol Pathol* **50**, 183~192.
- Berry MN, Edward AM, Barritt GJ(1991) Laboratory technique in biochemistry and molecular biology. pp.15, Burdon, eds, Elsevier, New York.
- Choi YH, Lee KY, Yang KM, Jeong YM, Seo JS(2006) Effect of larva extract of *Allomyrina dichotoma* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **35**(10), 1349~1355.
- Di Pascoli L, Lion A, Milazzo D, Caregaro L(2004) Acute liver damage in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* **36**(1), 144~147.
- Friedman SL(2000) Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* **275**, 2247~2250.
- Groot H, Noll T(1986) The crucial role of oxygen partial pressures in haloalkane free radical mediated lipid peroxidation. *Biochem. pharmacol* **35**, 15~21.
- Jin YX, Yoo YS, Han EK, Kang IJ, Chung CK(2008) *Artemisia capillaris* and *Paecilomyces japonica* stimulate lipid metabolism and reduce hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **37**(5), 548~554.
- Jung ME(2001) Biochemical and histological effects of *Phellinus linteus* methanol extract on liver lipid metabolism of rats CCl₄ and high fat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **30**, 331~337.
- Kang IJ, Kim HK, Chung CK, Oh DH(2000) Effects of *Protaetia orientalis*(Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **29**, 479~484.
- Kim CH, Lee JS, Go MS, Park KT(2002) Economical characteristics *Protaetia orientalis submarmorea*(Burmeister)(Coleoptera: Cetoniidae). *Kor J Appl Entomol* **41**, 43~47.
- Kim HG, Kang KH(2005) Bionomical characteristic of *Protaetia brevitarsis*. *Kor J Appl Entomol* **44**, 139~144.
- Kim OK(2001) Protective effects of extracts of *Diospyros kaki* Folium against hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **30**, 97~101.
- Kiso Y, Tohkin M, Hikino H(1983) Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Planta med* **49**, 222~227.
- Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ(1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**,

- 265~271.
- McCay PB, Lai EK, Poyer JL, DuBose CM, Janzen EG(1993) Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Observation of lipid radicals in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **259**, 2135~2143.
- Naei K, Tak Y, Murad O(1985) The regulation as hepatic glutathione. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **25**, 715~744.
- Park HY, Park DS, Park SS, Oh HW, Shin SW, Lee HK, Joo CK, Hong SD(1994) Bacteria-induced antibiotic peptide, protaecin from the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* **22**, 52~58.
- Park KN, Kwon TY, Kim HG, Shin MK(1997) A herbalogical study on the HOLTRICHIA. *J Traditional Korean Medicine* **7**, 1~4.
- Poynard T, Morra R, Ingiliz P, Imbert-Bismut F, Thabut D, Mes-sous D, Munteanu M, Massard J, Benhamou Y, Ratziu V(2008) Biomarkers of liver fibrosis. *Adv Clin Chem* **46**, 131~160.
- Recknagel RO(1983) A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sciences* **33**(5), 401~408.
- Reitman S, Frankel S(1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* **28**, 56~59.
- Shin MK(1986) Clinical traditional herbalogy, pp. 482~484, Younglim Press Co.(in Korean). Seoul.
- Yun SH, Kim DH, Hyun SH, Lee SK, Jeon TW, Jeong TC(2006) Protective effects of the water extract of *Protaetia brevitarsis* larva against carbon tetrachloride-induced toxicity in the primary cultures of adult rat hepatocytes. *Yakhak Hoeji* **50**(4), 287~292.
- Zhang ZL(1984) Economic insect fauna of China. Fasc. 28, Cloeoptera : Larva of Scarabaeidae, pp27~28, Science Press, Beijing.(in Chinese)