

G009가 Peroxidizers에 의해 유발된 지질 과산화에 미치는 영향

이준우*, 정 훈, 이승목¹, 김기남, 한만덕, 이승룡, 김수웅, 강상모²

일양약품(주) 중앙연구소 생물공학연구소, ¹약리독성실, ²건국대학교 공과대학 미생물공학과

Effect of G009 on Lipid Peroxidation Induced by Peroxidizer in Rats

June-Woo LEE*, Hoon JEONG, Seung-Mok LEE¹, Ki-Nam KIM, Man-Deuk HAN,
Seung-Yong LEE, Su-Ung KIM and Sang-Mo KANG²

Biotechnology Lab., ¹Pharmacological and Toxicological Lab., Central
Research Institute, Il Yang Pharmaceutical Co. Ltd., Yongin 449-900, Korea

²Department of Microbiological Engineering, College of Engineering,
KonKuk University, Seoul 110-750, Korea

(Received June 17, 1996; accepted September 10, 1996)

Abstract—In this study, the anti-lipidperoxidative effects of G009, a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* IY009, was determined in ascorbic acid-Fe²⁺-adenosine 5-diphosphate-intoxicated rat. In a model of ascorbic acid-Fe²⁺-adenosine 5-diphosphate-induced hepatotoxicity in rat, G009 exhibited anti-lipidperoxidative effect in rat liver homogenate, and that malondialdehyde values of the liver homogenate inhibited from 48.1% to 74.8% in comparison to controls (p<0.05). The malondialdehyde formation in serum inhibited 66.5% at 100 mg/kg of G009. Also, serum levels of glutamic oxaloacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase in peroxidizer-induced rats treated with G009 was decreased compared with control. Especially, the formation of lipid peroxides in serum was related to glutamic pyruvic transaminase levels. These results suggest that G009 has a protective effect on ascorbic acid-Fe²⁺-adenosine 5-diphosphate-induced hepatic injury through an inhibition of lipid peroxidation in liver.

Keywords □ G009, lipid peroxidation, malondialdehyde, glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase, peroxidizer.

담자균류로부터 분리한 다당류의 약리활성에 대한 연구는 1970년대 후반부터 인공 재배 또는 균사체의 액체배양에 의한 양산 체계가 갖춰지면서 활발히 진행되기 시작하여 현재는 항암제 및 간장질환치료제 등이 개발되어 임상에서 이용되고 있는 실정이다(Tsukagoshi 등, 1974; 박 등, 1993). 이들의 간장질환 치료기작은 간염 virus의 감염에 의해 저하된 면역능을 회복시킴으로서 그 효과를 나타낸다고 알려졌으며(박 등, 1993), *Coriolus versicolor*로부터 얻어진 다당류를 만성간염 환자에 투여한 결과, HB_s항체의 출현과 HB_e항원이 소실되는 효과가 있었으며(平澤燦, 1982), CCl₄로 독성이 유발된 실험동물에서도 간기능을 개선시키는 효과가 있다(허 등, 1989; 허, 1990)고 보고하였다.

영지(*Ganoderma lucidum*)는 담자균류로서, 한국, 중국 및 일본에서는 오래 전부터 강장, 간염, 고혈압 및 암 등의

질환에 대한 민간요법 약제로 이용되어져 왔다. 영지의 간장질환 치료효과는 1980년대부터 연구되기 시작하였으며, 이것의 열수 추출물은 CCl₄로 유발된 흰쥐의 실험적 간중독에 유효하며(이 등, 1985), methotrexate에 의해 유발되는 간의 급성 병변을 억제하는 효과가 있다고 보고하여(이, 1990), 영지 다당류의 간장질환 치료효과에 대한 연구가 관심을 끌기 시작하였다. 또한 최근에 CCl₄로 독성이 유발된 초대배양 간세포 독성에 대한 다당류의 보호효과(Lee 등, 1992), ethanol에 의해 유도된 급성 지방간 형성 억제능 및 thioacetamide로 유발된 급성간염 모델에 대한 혈청 transaminase의 활성을 저하시키는 효과가 있다고 보고하였다(Lee 등, 1994). 또한 박 등(1994)은 bile duct ligation에 의해 유발된 간 섬유화를 억제하는 효과가 있는 것으로 보고하였다. 이상의 결과들로부터 영지로부터 분리된 다당류는 급·만성간염 및 간섬유화를 억제하는 성분을 함유하며, 이러한 약리효과는 간장 질환의 보호 및 치료제로의 개발

* To whom correspondence should be addressed.

가능성을 시사하고 있다.

그러나 지금까지 영지 다당류의 간장질환 치료능에 관한 보고는 많으나, 그 작용기전에 관한 연구는 미미한 실정이다. 실제로 성인병, 노화, 암 및 간질환 등은 지질 과산화와 밀접한 관계가 있다고 알려졌으므로, G009가 지질 과산화에 미치는 영향을 측정할 필요가 있다.

본 연구에서는 영지 배양 균사체를 알칼리 추출하여 얻은 다당류인 G009가 지질 과산화가 유발된 흰쥐에서 지질 과산화물 생성 억제 및 간보호 효과가 있는지를 알아보았다.

실험방법

실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 웅성의 SD계 흰쥐(200~250 g)는 삼육 축산에서 구입하여 사용하였으며, ascorbic acid, butylated hydroxytoluene(BHT), ferrous sulfate, adenosine 5-diphosphate(ADP), ferric chloride, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(β -NADPH), pyridine, 2-thiobarbituric acid(TBA), 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)는 Sigma 사(St. Louis, USA)의 것을 사용하였다. DL- α -tocopherol과 CCl_4 는 Wako chemical Co.(Tokyo, Japan), glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)와 glutamic pyruvic transaminase(GPT)는 Iatron 사(Tokyo, Japan), triglyceride, total cholesterol 및 phospholipid 등의 측정을 위한 kit는 아산제약(주), 이외의 모든 시약은 특급 또는 일급품 이상의 것을 사용하였다.

G009의 조제

20 l 발효조(Marubishi, MSJ-N₂)에 배양용 배지 14 l 를 넣고 멸균한 다음, 10%의 종균을 접종하여 27.5℃에서 5일간 배양하였다. 배양된 균사체 배양물에 NaOH를 가해 최종 농도가 2 N이 되게 조정하여 실온에서 24시간 방치 한 후, acetic acid로 중화(pH 7.0)시키고, 이를 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액은 한외여과막(MW, 10,000)을 이용하여 10 kD 이상의 다당류만을 농축하였으며, 이를 증류수를 이용한 한외여과를 반복 실시하여 수세, 농축한 다음 동결 건조하여 G009를 조제하였다.

생체내 지질 과산화 유발

생체내 지질 과산화 유발은 Kimuya 등(1981)의 방법에 따라 ascorbic acid- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, ascorbic acid- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ -ADP, ADP- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, ADP- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ -ascorbic acid 계를 이용하였다. 이들의 투여 농도는 각각 예비실험을 통하여 지질 과산화 유발 정도를 확인하여 결정하였다. 생체내 지질 과산화에 대한 G009의 영향을 알아보기 위해, 흰쥐에 G009를 1일 1회씩 3일간 경구 또는 복강투여하였다. 지질 과산화 유발제 ascorbic acid, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 ADP는 시료투여 2일째 복강투여하였으며, 1시간 후에 G009를 복

강 또는 경구 투여하고, 24 시간 경과한 다음 흰쥐를 실험에 이용하였다.

혈청 및 간 homogenate의 분리

과산화가 유발된 흰쥐는 ether로 마취시키고, 흰쥐의 복부를 열어 하대동맥으로부터 채취한 혈액을 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 간 homogenate를 얻기 위해서는 50 ml용 주사기로 50 mM Tris-Cl buffer(pH 7.4) 30 ml를 portal vein으로부터 하대정맥으로 혈액이 흘러나오도록 관류를 행하였다. 이후 간을 적출하여 50 mM Tris-Cl-150 mM KCl buffer(pH 7.4)로 세척하고 잘게 썰어, Homogenizer(Polytron, Switzerland)을 이용하여 빙냉하에서 균질화를 시켰다. 혈청과 간 homogenate는 -70℃에 보관하면서 사용하였다.

혈청 및 간 homogenate의 지질 과산화 측정

혈청내의 지질 과산화는 内藤(金田 등, 1983)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 즉, cap tube에 시료를 투여한 후 얻은 혈청 0.3 ml, 0.05N HCl 3 ml 및 0.67% TBA 1 ml 를 가하여 혼합하여 95℃에서 30분간 반응시킨 다음 호르는 물에 냉각시켰다. 간 homogenate의 지질 과산화 정도는 Yoden(1980)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 간략하면, cap tube에 0.5 ml의 간 homogenate(0.2 g equivalent of liver), 0.1 N HCl 0.5 ml, 4% SDS 0.5 ml, 증류수 0.5 ml 및 0.5% TBA 2 ml를 가하여 95℃에서 30분간 반응시킨 다음 호르는 물에 냉각시켰다.

냉각시킨 반응액은 buthanol : pyridine(15:1, v/v)혼합액 4 ml를 가하여 3,200 rpm에서 10분간 원심분리를 행한 후, 상층액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로서 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)를 이용하여 시료 내의 MDA 생성량을 정량 하였으며, 저해율은 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{\text{MDA of control} - \text{MDA of sample}}{\text{MDA of control} - \text{MDA of normal}} \times 100(\%)$$

GOT 및 GPT의 측정

지질 과산화에 의해 유발된 G009의 간 보호효과는 혈청내의 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)와 glutamic pyruvic transaminase(GPT)의 활성을 Lippi와 Guidi 방법(1970)에 의해 측정하였으며, 간보호능(%)은 아래 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Hepatoprotective activity(\%)} = \frac{\text{Value of control} - \text{Value of sample}}{\text{Value of control} - \text{Value of normal}} \times 100(\%)$$

TC, TG 및 PL의 측정

지질 과산화에 의해 유발된 흰쥐 혈청내의 total chole-

terol(TC)와 triglyceride(TG)를 측정하기 위한 Kit는 金井 등의 방법(1983), phospholipids(PL) 측정 Kit는 岡部와 藤井 방법(1980)을 토대로 하고 있다.

통계처리

본 실험에서의 결과는 mean±S.E.로 나타내었으며, 통계학적 분석은 one-way analysis of variance(ANOVA)의 Duncan's multiple range test를 SPSS(Statistical Package for the Social Science)를 이용하여 유의성 검정을 실시하였다.

실험결과

In vivo에서의 지질 과산화 유발 조건의 검토

생체내 지질 과산화 유발조건을 알아보기 위하여, 과산화 유발제인 ascorbic acid, ADP, Fe²⁺ 및 Fe³⁺를 흰쥐에 복강 투여하고, 간 homogenate 및 혈청내의 MDA를 측정한다. 결과는 Table I과 같다. 간 homogenate의 경우, 정상적인

Table I. Effects of various peroxidizers on lipid peroxide formation and serum transaminase in rats

	Liver homogenate (MDA, nM/ml)	Serum (MDA, nM/ml)	GOT (KU/ml)	GPT (KU/ml)
Normal	67.8±4.2	1.56±0.10	69.5± 3.0	29.6±2.0
AsA-FeSO ₄	84.9±2.3*	3.18±0.29*	125.0± 7.4*	53.8±6.1*
AsA-FeSO ₄ -ADP	120.5±8.2*	3.92±0.29*	126.7± 5.0*	62.6±5.4*
ADP-FeCl ₃	74.7±3.8*	2.82±0.12*	98.9± 9.3*	36.3±2.8*
ADP-FeCl ₃ -AsA	95.6±7.5*	3.01±0.11*	144.9±11.1*	44.5±3.8*

*Significantly different from the normal, P<0.05.

Each value represents mean±S.E. of 6 rats.

AsA: Ascorbic acid 176 mg/kg, FeSO₄: FeSO₄ · 7H₂O 65.8 mg/kg, ADP: Adenosine 5-diphosphate 5 mg/kg, FeCl₃: FeCl₃ · 6H₂O · 64 mg/kg.

흰쥐의 MDA치는 각각 liver g당 67.8 nM 이었으나, 176 mg/kg의 ascorbic acid와 65.8 mg/kg의 FeSO₄ · 7H₂O를 투여한 경우에는 84.9 nM로 나타났다. Ascorbic acid와 FeSO₄ · 7H₂O를 176 mg/kg과 65.8 mg/kg에 5 mg/kg의 ADP를 첨가하여 투여한 경우에 있어서는 liver g당 120.5 nM로서 약 1.8배가 증가하였다. Fe²⁺ 대신에 Fe³⁺를 사용한 경우는 95.6 nM/g liver의 MDA를 생성하였다. 정상적인 흰쥐의 혈청내 MDA치는 1.56 nM/ml이었으며, ascorbic acid-Fe²⁺-ADP 사용 시는 3.92 nM/ml의 MDA를 생성하였다.

또한 지질 과산화를 유발시킨 후, 간 기능 지표 인자인 GOT와 GPT를 측정한다. 결과, 정상군의 GOT와 GPT는 각각 69.5와 29.6 KU/ml로 나타났다. Ascorbic acid, FeSO₄ · 7H₂O 및 ADP로 지질 과산화를 유도시킨 경우에 GOT와 GPT는 각각 126.7 KU/ml와 62.6 KU/ml로 나타났다.

Ascorbic acid-Fe²⁺-ADP로 독성 유발된 흰쥐의 지질 과산화와 간 손상의 상관성을 알아보기 위하여 Table I을 plotting한 결과는 Fig. 1과 2에 나타났다. 간 homogenate에서의 MDA와 혈청 transaminase는 GPT에서 높은 상관성을 나타냈으며(r=0.8243), GOT의 경우는 상관성이 낮은 것으로 조사되었다(r=0.5192). 혈청내의 MDA 생성량과 transaminase의 관계는 MDA 생성량이 많을수록 GOT 및 GPT가 증가되는 것으로 나타났으며, GPT의 경우는 MDA 생성량과 높은 상관성을 나타냈다(r= 0.9328).

상기의 결과로부터 지질 과산화 유발과 간 독성은 어느 정도 상관성이 있었으며, 생체내 지질 과산화 유발은 176 mg/kg의 ascorbic acid, 65.8 mg/kg의 FeSO₄ · 7H₂O 및 5 mg/kg의 ADP를 사용할 때에 적절한 것으로 사료되며, 이와 같은 결과는 Kimuya 등(1981)과 일치하는 결과였다.

G009 경구투여에 의해 지질 과산화에 미치는 영향

간 homogenate에서의 영향

Ganoderma lucidum IY009의 액체배양 균사체로부터 분

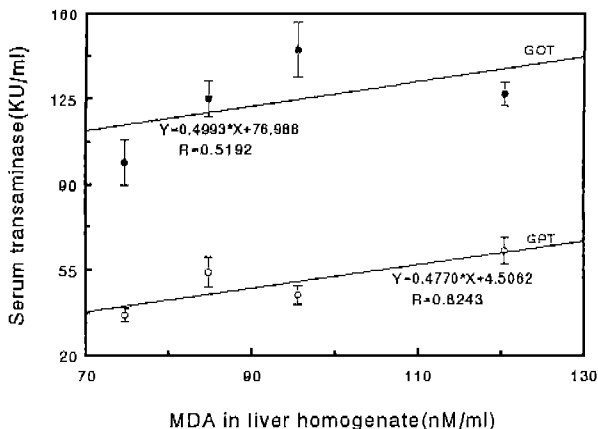


Fig. 1. The correlation between MDA formation and serum transaminase activities in ascorbic acid-Fe²⁺-ADP-induced rat liver homogenate. This result is plotted by Table I.

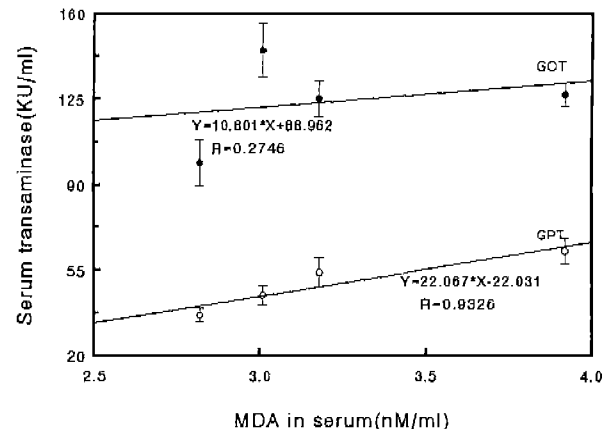


Fig. 2. The correlation between MDA formation and serum transaminase activities in ascorbic acid-Fe²⁺-ADP-induced rat serum. This result is plotted by Table I.

Table II. Effects of G009 on the ascorbic acid-FeSO₄-ADP-induced lipid peroxide formation in the liver homogenate by oral administration

Sample	Dose (mg/kg)	Liver homogenate (MDA, nM/g liver)	Inhibition (%)
Normal	-	67.1±6.0*	-
Control	-	119.0±8.6 [#]	-
G009	25	109.6±6.5* [#]	18.1
G009	50	100.3±7.3* [#]	36.0
G009	100	83.2±7.0* [#]	69.0
G009	200	85.5±6.9* [#]	64.5
Tocopherol	20	77.3±5.6* [#]	80.3

*Significantly different from the control, P<0.05.

[#]Significantly different from the normal, P<0.05.

Each value represents means±S.E. of 6 rats.

Table III. Effects of G009 on the ascorbic acid-FeSO₄-ADP-induced lipid peroxide formation in the serum by oral administration

Sample	Dose (mg/kg)	Liver homogenate (MDA, nM/g liver)	Inhibition (%)
Normal	-	1.70±0.06*	-
Control	-	3.82±0.19 [#]	-
G009	25	3.24±0.19* [#]	27.4
G009	50	2.88±0.27* [#]	44.3
G009	100	2.41±0.18* [#]	66.5
G009	200	2.35±0.23* [#]	69.3
Tocopherol	20	1.98±0.20* [#]	86.8

*Significantly different from the control, P<0.05.

[#]Significantly different from the normal, P<0.05.

Each value represents means±S.E. of 6 rats.

Table IV. Effects of G009 on the serum transaminase and lipids in rat given ascorbic acid-FeSO₄-ADP orally

Sample	Dose (mg/kg)	GOT (KU/ml)	GPT (KU/ml)	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	PL (mg/dl)
Normal	-	72.6±3.9*	31.6±1.3*	45.6±3.9*	49.5±2.6*	52.1±3.2*
Control	-	128.1±8.1 [#]	59.4±6.9 [#]	48.3±3.8	56.9±2.2 [#]	56.2±2.3 [#]
G009	25	116.8±9.2* [#]	45.3±5.7* [#]	52.4±2.0	57.3±3.2 [#]	62.2±3.0 [#]
G009	50	98.4±15.2* [#]	57.4±11.2* [#]	47.2±2.8*	51.2±3.5* [#]	58.1±3.0 [#]
G009	100	107.1±10.2* [#]	55.7±8.2* [#]	51.1±2.4	54.3±3.0 [#]	53.9±4.1* [#]
G009	200	108.2±10.1* [#]	47.5±8.4* [#]	44.7±3.2* [#]	50.2±3.6* [#]	56.0±3.8* [#]
Tocopherol	20	138.3±8.0* [#]	71.6±6.4* [#]	45.2±1.3* [#]	51.5±4.1* [#]	56.0±3.1* [#]

TC: Total cholesterol, TG: Triglyceride, PL: Phospholipids. *Significantly different from the control, P<0.05.

[#]Significantly different from the normal, P<0.05. Each value represents means±S.E. of 6 rats.

리한 다당류 G009의 지질 과산화 억제능을 알아보기 위하여, ascorbic acid-Fe²⁺-ADP로 유도된 지질 과산화에 대한 G009의 농도별 영향을 조사한 결과는 Table II와 같다. G009를 25, 50, 100 및 200 mg/kg의 농도로 투여한 결과, 간 homogenate 내의 MDA 생성량은 109.6, 100.3, 83.2 및 85.5 nM/g liver로 농도에 의존적인 감소 경향을 나타내었다. 또한 대조약물로 사용한 tocopherol을 20 mg/kg(Kimuya *et al.*, 1981) 투여시의 지질 과산화 저해율은 80.3%로 조사되었다.

혈청내에서의 영향

정상 흰쥐 혈청내의 MDA치는 1.70 nM/ml이고, 지질 과산화 유발시 3.82 nM/ml로 약 2.2배 증가하는 것으로 나타났다(Table III). G009를 25, 50, 100 및 200 mg/kg의 농도로 투여한 결과, MDA 생성량은 각각 3.24, 2.88, 2.41 및 2.35 nM/ml로 농도에 의존적인 감소 경향을 나타내었다. 대조약물로 사용한 tocopherol을 20 mg/kg 투여시 MDA 생성 저해율은 86.8%로 조사되었다.

혈청내의 GOT, GPT 활성에 미치는 영향

G009의 간보호능을 알아보기 위해 혈청내의 GOT, GPT, TC, TG 및 PL을 측정할 결과는 Table IV와 같다. GOT는 50 mg/kg 농도에서 98.4 KU/ml로 53.5%의 간보호능을 나

타내었으며, GPT는 25 mg/kg에서 가장 높은 50.7%의 간보호능을 나타내었다. Tocopherol의 경우는 오히려 GOT 및 GPT치를 모두 상승시키는 것으로 나타남으로써, 항산화능과 간보호능과는 반드시 일치하지 않는 것으로 나타났다.

G009 복용투여에 의해 지질 과산화에 미치는 영향

간 homogenate에서의 영향

지질 과산화가 유도된 흰쥐에 G009를 복용투여하고 간 homogenate로부터 지질 과산화 억제정도를 측정할 결과는 Table V와 같다. 즉, ascorbic acid-Fe²⁺-ADP 처리군의 MDA치는 120.5 nM/g liver로서 정상군에 비해 각각 약 1.9배 증가를 나타내었다. G009를 복용투여한 후, MDA치를 측정할 결과는 농도에 의존적으로 감소하였으며, 50 mg/kg의 투여군에서 74.8%의 가장 높은 지질 과산화 저해율을 나타내었다. 양성대조 물질로 사용한 tocopherol은 85.6%의 지질 과산화 생성억제능을 나타내어 항산화 효과가 우수함을 알 수 있었다.

혈청내에서의 영향

G009 복용투여 후 혈청내의 지질 과산화 억제능을 측정할 결과는 Table VI와 같다. Ascorbic acid-Fe²⁺-ADP 처리군의 MDA치는 3.72 nM/ml로서 정상군에 비해 약 2.1배의 증가를 나타내었다. G009를 농도를 달리하여 복용투여한

Table V. Effects of G009 on the ascorbic acid-FeSO₄-ADP-induced lipid peroxide formation in the liver homogenate by intraperitoneal injection

Sample	Dose (mg/kg)	Liver homogenate (MDA, nM/g liver)	Inhibition (%)
Normal	-	62.9±4.1*	-
Control	-	120.5±4.4 [#]	-
G009	5.0	92.8±6.0* [#]	48.1
G009	12.5	79.9±5.9* [#]	70.5
G009	25.0	77.7±4.8* [#]	74.3
G009	50.0	77.4±5.7* [#]	74.8
Tocopherol	5.0	71.2±7.2* [#]	85.6

*Significantly different from the control, P<0.05.

[#]Significantly different from the normal, P<0.05.

Each value represents mean±S.E. of 6 rats.

Table VI. Effects of G009 on the ascorbic acid-FeSO₄-ADP-induced lipid peroxide formation in the serum by intraperitoneal injection

Sample	Dose (mg/kg)	Serum (MDA, nM/ml)	Inhibition (%)
Normal	-	1.77±0.09*	-
Control	-	3.72±0.14 [#]	-
G009	5.0	3.29±0.13* [#]	22.1
G009	12.5	2.91±0.13* [#]	41.5
G009	25.0	2.95±0.15* [#]	39.5
G009	50.0	2.87±0.25* [#]	43.6
Tocopherol	5.0	2.48±0.20* [#]	63.6

*Significantly different from the control, P<0.05.

[#]Significantly different from the normal, P<0.05.

Each value represents mean±S.E. of 6 rats.

Table VII. Effects of G009 on the serum transaminase and lipids in rat given ascorbic acid-FeSO₄-ADP intraperitoneally

Sample	Dose (mg/kg)	GOT (KU/ml)	GPT (KU/ml)	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	PL (mg/dl)
Normal	-	75.1± 4.5*	32.2± 2.0*	46.7±4.0*	48.7±3.2*	51.9±4.3*
Control	-	121.2± 6.8* [#]	50.4± 4.7 [#]	61.6±9.2 [#]	55.1±4.6 [#]	54.9±6.9 [#]
G009	5.0	100.7± 6.8* [#]	46.7± 6.1* [#]	52.2±4.5 [#]	56.7±7.2 [#]	64.8±5.4 [#]
G009	12.5	99.3±10.8* [#]	44.1± 7.1* [#]	48.5±6.3* [#]	50.9±6.4* [#]	59.6±6.7 [#]
G009	25.0	93.5± 8.4 [#]	43.4± 8.7* [#]	53.1±5.8* [#]	51.9±7.2* [#]	52.5±4.2* [#]
G009	50.0	110.7±10.2* [#]	47.2± 7.0* [#]	58.4±6.6* [#]	51.4±7.3* [#]	53.8±7.1* [#]
Tocopherol	5.0	11.7± 7.0* [#]	49.5±10.0* [#]	57.1±6.7* [#]	62.3±6.6* [#]	65.7±9.5* [#]

TC:Total cholesterol, TG:Triglyceride, PL:Phospholipids. *Significantly different from the control, P<0.05.

[#]Significantly different from the control, P<0.05. Each value represents mean±S.E. of 6 rats.

후, 혈청내의 MDA치를 측정된 결과는 농도에 의존적으로 감소함을 알 수 있었으며, 50 mg/kg의 투여군에서는 43.6%의 저해율을 나타내었다. 양성대조군인 tocopherol의 경우는 63.6%의 지질 과산화 생성억제능을 나타내어 항산화 효과가 우수함을 알 수 있었다.

혈청내의 GOT, GPT 활성에 미치는 영향

G009를 복강투여하고 혈청내의 GOT와 GPT의 활성을 측정된 결과는 Table VII에 나타내었다. Ascorbic acid-Fe²⁺-ADP 처리군의 GOT는 121.2 KU/ml, GPT는 50.4 KU/ml로 나타났다. G009를 5.0, 12.5, 25.0 및 50 mg/kg의 농도로 투여하였을 때, 5.0~25.0 mg/kg에서는 농도 의존적이었으나, 50 mg/kg에서는 감소되는 경향을 나타내었다. 그러나 항산화제로 널리 이용되고 있는 tocopherol은 간 homogenate와 serum에서 강력한 지질 과산화 억제능을 나타내었으나, GOT 및 GPT에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

고 찰

영지는 간장보호 및 지질 과산화를 억제시키는 물질을 함유하고 있는 것으로 알려졌다(Liu 등, 1979; Chung, 1987

및 Kubo 등, 1980). 영지의 간보호 효과에 대한 종래의 연구는 CCl₄를 이용한 급·만성 간염 모델을 이용하여 혈청내의 GOT 및 GPT치의 변화 등에 관한 연구가 주를 이루어 왔다. CCl₄의 간독성 작용 기작은 이의 중간 대사물에 의한 간세포막의 지질 과산화가 직접적인 원인으로 밝혀짐에 따라, 지질 과산화와 간세포 독성간의 상관성을 조사할 필요가 있다. 그러므로 본 연구는 영지 군사체를 액체배양한 배양액으로부터 분리한 G009의 생체내 지질 과산화 억제능, 간보호능 및 이들간의 상관성을 조사하였다.

급·만성 간염 model로 가장 많이 알려진 CCl₄의 간상해 기전은 자유 래디칼에 의한 지질 과산화가 주를 이루고 있다고 알려졌다(Kafalas 등, 1989). 그러므로 지질 과산화와 간세포 독성간의 상관성을 알아보기 위하여, 흰쥐의 간내 지질 과산화를 증가시키는 것으로 알려진 ascorbic acid와 Fe²⁺(Kimuya 등, 1981)를 투여한 후, 지질 과산화를 유발시켰다. Ascorbic acid 176 mg/kg과 65.8 mg/kg의 FeSO₄·7H₂O를 투여한 경우, 간 homogenate와 혈청내의 지질 과산화는 정상군에 비해 약 1.3배 및 2배 증가하였다. Ascorbic acid와 Fe²⁺및 효소적 지질 과산화 유발에 사용되는 adenosine 5-diphosphate를 5 mg/kg 첨가 투여시는 정상군에 비해 각각 약 1.8배 및 2.5배 증가함으로써, 생체내에서도

비효소적 및 효소적인 지질 과산화가 촉진됨을 알 수 있었다. 그리고 지질 과산화와 간독성과의 관계를 알아보기 위해, plotting한 결과, 간 homogenate의 MDA 생성량은 GOT보다는 GPT에서 비교적 높은 상관성을 나타냈으며 (Fig. 1, $r=0.8243$), 혈청에서도 GPT와 상관성이 높게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 2, $r=0.9326$). 이와 같은 결과로부터 지질 과산화와 간독성과는 어느 정도 상관성이 있었고 생체내 지질 과산화 유발계를 이용한 방법은 간보호 물질의 검색을 위한 보조적인 방법, 간장질환 치료제 개발 및 기전 규명을 위한 방법으로 유효한 것으로 사료된다.

Ascorbic acid- Fe^{2+} -ADP로 지질 과산화가 유발된 흰쥐에 G009를 투여하고 억제능을 측정한 결과, 간 homogenate에서는 농도 의존적으로 효과를 나타내었으며, 혈청에서도 유사한 경향을 나타내었다.

세포 소기관에서의 지질 과산화 억제능을 측정하기 위하여 정상 흰쥐의 간으로부터 분리한 microsome에서의 지질 과산화 억제능을 측정한 결과, ascorbate와 Fe^{2+} 로 지질 과산화를 유발시킨 경우 G009는 tocopherol과 유사한 효과를 나타내었다(자료는 제시하지 않았음). 또한 ADP와 Fe^{3+} 로 지질 과산화 유발시킨 경우에는 G009와 tocopherol 1.0 mg/ml의 첨가 농도에서 각각 77.4%와 94.1%의 저해율을 나타내었다(자료는 제시하지 않았음). 이와 같이 G009는 생체내 및 생체의 지질 과산화를 억제하는 것으로 나타났으므로 지질 과산화 유발 및 억제와 관련된 효소들의 활성 변화를 측정할 필요가 있다.

지질 과산화 유발물질들에 의해 생성된 다양한 라디칼들은 간세포 등의 세포막에 불포화 지방산과 반응하여 지질 과산화를 일으키거나(Kapalas and Stacey, 1989), 세포내의 단백질 또는 지질 등과 같은 거대분자들과 결합하여 간세포의 괴사를 야기시켜(Villarruel 등, 1975), 세포내의 효소가 방출되어 혈중의 GOT 및 GPT의 활성이 높아진다(Long and More, 1988).

지질 과산화가 유발된 흰쥐에 대한 G009의 간보호능을 측정하기 위해, ascorbic acid- Fe^{2+} -ADP로 지질 과산화를 유발시킨 후 GOT 및 GPT를 측정한 결과, 경구투여시에는 20.4~53.5%, 복강 투여시의 GOT와 GPT는 23.6~59.3% 내외의 간 보호 효과를 나타내었다. Tocopherol의 경우는 복강투여시 GOT와 GPT치를 저하시키는 것으로 나타났으나 반면, 경구투여시에는 오히려 증가시키는 것으로 나타났다.

이상의 결과들로부터 G009는 ascorbic acid- Fe^{2+} -ADP로 유도된 지질 과산화를 억제시키는 것으로 나타났으며, 그리고 지질 과산화 억제능과 간보호능간에는 어느 정도 상관성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 향후 G009의 간보호 효과의 기전 규명을 위해서는 지질 과산화 억제능과 관련 있는 cytochrome P-450계 효소들의 활성 변화, SOD와 catalase 및 glutathione의 농도 변화, 그리고 간 약물대사에 관

여하는 효소활성에 관한 연구가 수반되어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Chung, M. H. (1987). Effects of young-ji on hepatic damage and hyperlipidemia in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **18**, 62.
- Hong, W. B., Chung, K. S., Woo, M. S. and Kim, B. K. (1982). Studies on constituents of higher fungi of Korea (XXXIII). *Kor. J. Mycol.* **10**, 147-154.
- Lec, J. W., Han, M. D. and Lee, K. H. (1992). Screening of hepatoprotective substances from higher fungi by primary cultured rat hepatocytes intoxicated with carbon tetrachloride. *The Korean J. Mycol.* **20**, 10-17.
- Lippi, U. and Guidi, G. (1970). *Clin. Chim. Acta.* **28**, 431.
- Liu, G. T., Wang, G. F., Wei, H. L., Bao, T. T. and Sung, Z. Y. (1979). *Yao Hseueh Hseueh Pao.* **14**, 598.
- Long, R. M., and More L. (1988). Biochemical evaluation of rat hepatocyte primary cultures as a model for carbon tetrachloride hepatotoxicity: Comparative studies *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **92**, 295.
- Kafalas, V and Stacey, N. H. (1989). Potentiation of carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation by trichloroethylene in isolated rat hepatocytes (No role in enhanced toxicity). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **101**, 158-169.
- Kimuya, Y., Kubo, M., Tani, T., Arichi, S. and Okuda, H. (1981). Studies on Scutellariae Radix IV. Effects on lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 2610-2617.
- Kubo, M., Matsuda, H., Tanaka, M., Kimura, Y., Tani, T., Arichi, S., Okuda, H. and Kirigiya, M. (1980). 靈芝 (*Ganoderma lucidum*, 子實體)의 연구-マンネン タケ熱水抽出エキスの實驗的高脂血症に對する作用. 基礎と臨床. **14**, 2455.
- Park, Y. M., Yoon, S. K., Park, S. H., Baeg, N. J. and Kim, B. S. (1993). Efficacy and safety of *Coriolus versicolor* polysaccharide (Licovck) in the treatment of chronic type B hepatitis. *Kor. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **1**, 45-54.
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, N. and Misaki, A. (1985). Structure and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2641-2643.
- Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. (1974). Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.* **65**, 557-558.
- Yoden, K., Iio, T. and Tabata, T. (1980). Measurement of thiobarbituric acid value in tissue homogenate solubilized with sodium dodecylsulphate. *Yakugaku Zasshi* **100**, 553-559.
- 金田 尚志, 植田 伸夫. (1983). 過酸化脂質 試験法. 生体内過酸化脂質の測定. 醫齒藥 出版株式會社 pp 82-83.
- 金井 泉, 金井 正光. (1983). 臨床検査法提要, pp. 453-463, 金原出版, 東京

- 岡部和彦, 藤井 守. (1980). *Medical technology* **8**, 1068.
- 박은전, 김기영, 김재백, 김수용, 이승룡, 손동환. (1994). 영지로부터 추출한 다당체의 실험적 간경화에 대한 섬유화 억제효과, *Yakhak Hoeji* **38**, 338-344.
- 이문주, 정명현. (1985). 영지 엑기스가 rats의 실험적 간장중독 및 고지혈증에 미치는 영향. 제 34회 대한약학회 학술 발표초록. 116.
- 이상찬. (1990). Methotrexate의 단독 및 영지(*Ganoderma lucidum*)병용 투여가 백서 간에 미치는 영향에 관한 연구. 부산대학교 박사학위 논문.
- 李時珍. (1977). 本草綱目, 國立中國醫藥研究所. **28**. 42.
- 이주영, 박기숙, 정진호, 조미정, 고광호, 이준우, 정훈, 이승룡. (1994). G009의 간보호작용에 관한 연구. *한국응용약물학회지*, **2**, 206-212.
- 平澤燒. (1982). 慢性肝炎におけるHBe 抗原の seroconversion(藥劑による 影響). *肝臟*. **23**, 699.
- 허재두, 이또 히로시. (1989). 간 기능 개선제의 제조방법. 대한민국 특허공보. 공고 번호 89-1290.
- 허재두. (1990). 균주 배양에 의한 단백다당체의 제조방법. 대한민국 특허공보. 공고 번호 90-5859.