

## 키토산올리고당을 섭취한 쥐에서 간 미세구조의 연구

김 영 호, 노 영 복\*  
조선대학교 자연과학대학 생물학과

### Ultrastructural Study of the Liver by Chitosanligosaccharide Adminstrated in Rat

Young-Ho Kim and Young-Bok Roh\*  
Dept. of Biology, College of Natural Science, Chosun University  
(Received November 18, 2001)

#### ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the histological toxicity of chitosanligosaccharide on the rat. A healthy male of Wistar rat that weighted  $250 \pm 350$  g was used for experiment. The experimental group was divided into five groups. Group 1 was control group which treated with general food. Group 2 was F<sub>1</sub> generation which was born by mating of 0.1% (1 mg/ml) chitosanligosaccharide was supplied by feeding *ad libitum* for 30 days. Group 3 was F<sub>2</sub> generation which was born by mating F<sub>1</sub> generation. Group 4 was treated with 90 days of 0.1% (1 mg/ml) chitosan oligosaccharide. Group 5 was treated with 365 days of 0.1% (1 mg/ml) chitosanligo saccharide. All experimental groups were used to 10 rat.

The results were as follow:

The RER dilation was observed Group 4. However, there were no significantly changes of ultrastructures in the other groups compared to the control.

It was concluded that chitosanligosaccharide can be used for nontoxic natural material.

**Key words** : Chitosanligosaccharide, Liver, Ultrastructures

#### 서 론

키토인(chitin)은 자연계에서 유일한 염기성 폴리머로 사상균, 효모, 오징어, 동물성플랑크톤, 게, 새우 및 곤충 등의 균류 및 갑각류에 많이 분포되어 있다. 이

키토인 성분은 이용성 분야에서 산, 염기 및 유기용매로 처리 시 안정화되어 여러 기능성 물질로 실용화하는데 한계가 있다(Kim et al., 2001). 키토산(Chitosan)은 키토인의 외골격 주요 구성 성분인 N-Acetyl-D-glucosamine이  $\beta$ -1,4로 결합한 점액다당류를 탈아세틸화 하면 생성 되어진다(Kim et al., 1998). 키토

\* 이 논문은 2000년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

\* Correspondence should be addressed to Dr. Young-Bok Roh, Department of Biology, College of Natural Science, Chosun University, 375, Seosuk-dong, Gwangju, 501-759, Korea. Ph: (062) 230-6654, FAX: (062) 234-4326.

Copyright © 2001 Korean Society of Electron Microscopy

산은 생체에 무독성이며, 생분해가 되므로 환경친화적인 천연 고분자 양이온이다(Arai et al., 1968). 키토산은 2-amino-2-deoxy-D-glucose의 단위로 금속 이온과 키토산 사이에 2당 잔기당 1개의 아미노기에 1개의 금속양이온과 2개의 음이온과 1개의 물분자가 배치된 착화모형을 나타낸다(Ogawa et al., 1984; Tong et al., 1991). 이러한 착화제 (chealtor) 특성으로 인하여 2가 양이온을 흡착하는 성질이 있어 중금속의 흡착제로서 작용한다(Skjak et al., 1980). 키토산은 방사성스트론튬 제거에 탁월한 효과가 있으며(Kim et al., 1997, 1999), Sakaguchi et al. (1981)은 키토산유도체인 인산키토산(chiitosan phosphate)를 이용하여 우라늄( $UO_2^{2+}$ )을 포함한 다양한 중금속에 대한 흡착 가능 연구를 흡착에 가능성이 제시한 바 있다. 최근 키토산은 인공피부(Hirano et al., 1991), 항암작용(Okamoto et al., 1995), 상처치료제(Tsurutani et al., 1995), 키틴분해효소 및 식물세포의 활성화제(Koga., 1993), 화장품(Skjak et al., 1988), 혈중 콜레스테롤 강화제(Sugano et al., 1988), 의약품 전달제(Tokura et al., 1992), 면역보조제 등 여러 분야에 걸쳐 활발하게 이용 혹은 연구되어지고 있다(Kim & Lee, 1997).

본 연구에서는 키토산올리고당을 섭취한 쥐에서 각 세대별, 투여 기간별 간 미세구조를 관찰하므로써 키토산올리고당의 간 독성 여부를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

본 실험에 사용한 실험동물로는 삼육축산에서 생산, 공급하고 있는 Wistar계 수컷 쥐(체중 250~350g)를 사용하였다. 쥐는  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는  $45 \pm 5\%$ 로 유지된 사육실에서 폴리카보네이트로 제작된 사육장( $40 \times 25 \times 17$  cm)에서 사육하였으며, 사료(제일제당 제품)와 급수는 자유롭게 섭취시켰다.

키토산올리고당은 수용성으로서 분자량 20,000 이하의(cps 5 이하, DAC 90% 이상) 이코바이오(한국)제품을 구입하여 생리식염수와 혼합하여 0.1% (1 mg/ml)을 제조하여 물병을 통해 자유롭게 사료와 함께 공급하였다.

실험군은 1) 일반식이를 섭취한 대조군, 2) 0.1% (1 mg/ml) 키토산올리고당 수용액을 30일간 음용수를 통해 자유자재로 섭취시킨 후 교미시켜 태어난 F<sub>1</sub> 세대, 3) F<sub>1</sub> 세대의 쥐에게 0.1% (1 mg/ml) 키토산올리고당 수용액을 30일간 음용수를 통해 자유자재로 섭취한 후 교미시켜 태어난 F<sub>2</sub> 세대, 4) 0.1% (1 mg/ml) 키토산올리고당 수용액을 90일간 음용수를 통해 자유자재로 섭취시킨 군, 5) 0.1% (1 mg/ml) 키토산올리고당 수용액을 365일간 음용수를 통해 자유자재로 섭취시킨 군의 쥐 등으로 각 실험군 당 쥐 10마리를 사용하였다.

각각의 세대별로 적출된 간조직은 신속하게 1 mm<sup>3</sup>의 크기로 잘라서 2.5% glutaraldehyde 용액(pH 7.4, 0.1 M cacodylate 완충액, 4°C)에서 2시간 전고정 하였다. 전고정 한 후, 동일 완충액을 사용하여 3회 수세하였다. 1% osmium tetroxide ( $OsO_4$ ) 용액(pH 7.4, 0.1 M cacodylate 완충액, 4°C)로 2시간 후고정한 후, 동일 완충액으로 3회 수세하였다. 저농도의 ethanol (50%)로부터 ethanol 계열하에 탈수하고, propylene oxide를 사용하여 치환시켰다. epon mixture를 만들어 propylene oxide와 1:1, 1:2로 3시간씩 침투시켰으며, epon mixture 원액에서 over night 후 포매하였다. 그리고, 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 열중합하였다. epon block을 1 μm로 박절하여 1% toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하여 특정부위를 정하고 삭정한 뒤 Diatome을 부착시킨 Ultramicrotome (MT-7000)으로 60 nm의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경(JEOL, JEM-2000FXII)으로 가속전압 80 KV 하에서 관찰하였다.

## 결 과

키토산올리고당 섭취에 따른 각 세대별, 섭취 기간별, 간 미세구조의 변화 여부를 전자현미경적 관찰을 통해 알아보았다(Figs. 1~5). 0.1% 키토산올리고당을 30일간 구강을 통해 섭취시킨 후 교미시켜 태어난 F<sub>1</sub> 세대의 경우 일반 식이만을 공급한 대조군(Fig. 1) 비교하여 정상이었다(Fig. 2). F<sub>1</sub> 세대를 교미시켜 태

어난 F<sub>2</sub> 세대의 경우에도 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3). 0.1% 키토산올리고당을 90일간 음용수를 통해 자유롭게 섭취시킨 후 간 미세구조를 관찰한 군의 경우 소포체가 약간 팽창되었으나, 미토콘드리아, 핵등이 정상임이 관찰되었다 (Fig. 4). 그리고, 0.1% 키토산올리고당을 365일간 음용수를 통해 자유롭게 섭취시킨 후 간 미세구조를 관찰한 군의 경우에는 대조군과 비교하여 핵, 미토콘드리아, 소포체 등 미세구조에 차이가 없었다 (Fig. 5).

## 고 찰

키토산은 환경친화적 물질로서 현재 건강보조 식품을 비롯한 여러 분야에 걸쳐서 이용 혹은 연구가 진행되어지고 있다. 하지만, 키토산 섭취에 따른 기간별, 각 세대별 간조직의 변화에 관한 연구는 진행된 바 없어 본 연구에서는 키토산올리고당을 섭취한 쥐에서 각 세대별, 투여 기간별 간 미세구조를 관찰하므로써 간 독성 여부를 알아보고자 하였다.

Yoon et al. (1993)은 쥐에 tungstate를 1개월간 일반 사료와 혼합하여 자유롭게 섭취시킨 후 간조직의 독성을 관찰하였는데, tungstate가 별다른 간 독성을 유발하지 않으면서 CCl<sub>4</sub>를 투여했을 때 나타나는 간손상 정도를 억제시킨다고 보고하였다. Hwang et al. (1999)도 간에 맹독성을 유발시키는 사염화탄소에 의한 급성독성을 알아보기 위하여 0.3 ml/kg 사염화탄소를 복강 투여 한 후, 0.3% (0.3 ml/kg) 키토산올리고당을 오염 전, 후에 복강주사 하였을 경우 키토산올리고당 전처치군이 사염화탄소 착화에 효과가 있어 간 독성 회복이 빠르게 진행되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 0.1% (1 mg/ml) 키토산올리고당을 물병을 통해 구강으로 섭취시켰는데, 특이할 만한 간 조직손상은 관찰할 수 없었다.

Arai et al. (1968)은 생쥐에 10 g/kg의 키토산을 섭취시켰을 때 독성이 전혀 발견되지 않았으며, 16~18 g을 매일 섭취하여도 특이한 유해 현상을 관찰하지 못하였다고 보고하였다. Donaubaer et al. (1998)은 쥐에 120~200 mg/kg을 한달간 매일 쥐에 정맥 주사하였는데, 순환 혈액 중에 고선량이 존재하면서도 특별

한 간손상 유발을 관찰하지 못하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 0.1% (1 mg/ml) 키토산올리고당을 물병을 통해 자유롭게 구강으로 섭취시킨 결과 간조직의 특이 현상을 발견하지 못하였다. 본 연구에서 사용한 키토산 함유량은 각각의 쥐 개체당 30~35 mg/kg에 해당하는 것으로 위의 두 연구자들에 비해 낮은 함유량이지만, 실제 사람에게 적용되는 함유량으로 볼때는 높다고 할 수 있다.

Okamoto et al. (1996)은 키토산, 키토산올리고당, D-glucosamine을 각각 50 mg/kg씩 개에 복강 투여한 후 매 시간별 급성 독성을 관찰하여 키토산의 경우 백혈구 수, CL값 (chemiluminescence response), CL 지수 (CL index) 등이 감소하였지만, 키토산올리고당, D-glucosamine 등은 전혀 변화가 없어 안전하다고 보고하였다. Rochelle et al. (1997) 등은 식이 TBP (tributyl phosphate)를 자유롭게 구강을 통해 성체에게 섭취시킨 후 교미하여 F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> 세대의 간 및 생식 독성에 미치는 영향을 관찰하여 성체에서 유발된 독성으로 인해 어린 새끼들에서 체중 감소, 먹이 소비 감소 및 간조직의 미세 변화 등이 유발되었다고 보고하였다.

Nishimura et al. (1995)은 쥐에 5% 키토산 사료를 450일간 섭취시킨 후 병리학적 관찰을 통해서 키토산 섭취군에서 담관증생과 간세포 증식이 확인되었는데, 이는 독성에 관련된 특이 징후는 관찰되지 않으면서 키토산 섭취가 오히려 간세포 증식을 촉진시킨다고 보고하였다. 본 연구에서는 0.1% 키토산올리고당 수용액을 F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> 세대별, 그리고, 90일, 365일간 자유롭게 섭취하도록 한 후 간 독상을 관찰하였는데, 약간의 소포체 팽대 현상이 90일간 섭취한 군에서만 관찰되었을 뿐 다른 키토산 섭취군에서는 특이한 간조직 이상 소견이 관찰되지 않았다. 소포체 팽대 현상과 같은 이상 소견이 관찰된 것에 대해 본 실험에 사용한 키토산올리고당의 농도 선정의 문제점, 실험동물 취급시의 부주의 또는 실제로 쥐에서 간 독성이 유발되었다가 점차 회복이 진행되면서 F<sub>2</sub> 세대나 365일간 섭취군에서 정상적으로 회복이 될 수도 있다고 사료되는데, 실제 이러한 부분에 관해서는 추후 다양한 보강 실험이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구를 통해서 키토산올리고당 섭취가 간조직

에 특이할만한 독성을 유발하지 않아 안전성이 있다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Arai K, Kinumaki T, Fujita T: Toxicity of chitosan. Bull Tokai Reg Fish Tes Lab 333: 89-94, 1968.
- Donaubauer HH, Fuchs H, Langer KH, Bar A: Subchronic intravenous toxicity studies with  $\gamma$ -cyclodextrin in rats. Regul Toxicol Pharmacol 27: 189-198, 1998.
- Hirano SM, Iwata K, Nakayama H, Toda H: Enhancement of serum lysozyme activity by injecting a mixture of chitosan oligosaccharides intravenously in rabbit. Agric Biol Chem 55: 2623-2625, 1991.
- Hwang KY, Yoon JS, Kim YH, Chung MJ, Roh YB: Effect of chitosan oligosaccharide on the mouse liver with toxicated by carbon tetrachloride. Kor J Electron Microscopy 29(3): 363-376, 1999.
- Kim JH, Yoo KJ, Song HC, Kim HK: Antiparasitic effects of chitosan oligo saccharides against scuticociliatids collected from japanese flounder, *Paralichthys Olivaceus*. Kor J Chitin Chitosan 6: 47-52, 2001.
- Kim YH, Bom HS, Kim KY, Kim HK, Kim JY: Inhibitory effect of chitosan on the milk transfer of radiostrontium from contaminated mice to their sucklers. Kor J Chitin Chitosan 4: 15-18, 1999.
- Kim YH, Bom HS, Kim JY, Roh YB: The effect of calcium and chitosan metabolism to the excretion of radiostrontium in mice. J Kor Asso Radiat Prot 22: 9-14, 1997.
- Koga D: Induction of chitinase for plant self-defense. Chitin/Chitosan symposium, in Japan Chitin/Chitosan research 4-26, 1993.
- Nishimura Y, Watanabe Y, Ogiu T, Nishimura M: Effect on blood and tissues in rats after long-term administration of chitosan-diet. Chitin and Chitosan Research 1(2): 86-87, 1995.
- Okamoto Y, Takayama T, Minami S, Matsubashi A, Sashima H, Morimoto M, Saimoto H, Shigemasa Y: Peritoneal administration of chitosan induces acute toxicity in dogs. Chitin and Chitosan Research 2(2): 104-105, 1996.
- Okamoto Y, Ohmi H, Minami S, Mubashi A, Shigemasa Y, Okumura M, Fujinaga T: Anti-tumor effect of chitin and chitosan on canine transmissible sarcoma. Chitin/Chitosan symposium, in Japan Chitin/Chitosan research 1: 76-77, 1995.
- Ogawa K, Oka K: X-ray study of chitosan-transition metal complexes. Chem Materials 726-728, 1993.
- Rochelle WT, James MG, Christina BM, Melissa CM, Dolores RB, John CS, Richard TH: Two-generation reproductive toxicity study of dietary tributyl phosphate in CD rats. Fundamental and Applied Toxicol 40: 90-100, 1997.
- Sakaguchi T, Horikoshi T, Nakajima A: Adsorption of uranium by chitin phosphate and chitosan phosphate. Agric Biol Chem 45: 2191-2195, 1981.
- Skjak G, Anthonsen, T, Sandford P: Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application. Elsevier Applied science 1988.
- Sugano M, Watanabe S, Kishi A, Izume Z, Ohtakara A: Hypocholesterolemic action of chitosan with different viscosity in rats. Lipid 23: 187-191, 1988.
- Tokura S, Miura Y, Kaneda Y, Uraki Y: Drug delivery system using biodegradable carrier. Chitin/Chitosan research 314-324, 1992.
- Tong P, Baba Y, Adachi Y, Kawazu K: Adsorption of metal ions on a new chelating ion-exchanges resin chemically derived from chitosan. Chemistry Letters 1529-1532, 1991.
- Tsurutani R, Yoshimura M, Tanimoto N, Hasegawa A, Kifune K: Clinical application of chitin materials to ulcers. Chitin/Chitosan symposium, in Japan Chitin/Chitosan research 1: 78-79, 1995.
- Yoon CG, Park HS, Lee SI: Effect of dietary tungstate on the liver damage in CC14-treated rats. J Kor Soc Food Nutr 22(6): 678-684, 1993.

## < 국문초록 >

본 연구의 목적은 키토산올리고당의 쥐 간조직 독성 여부를 관찰하고자 하였다. 건강한 Wistar계 쥐를 사용하였다. 실험군은 Group 1. 일반식을 섭취한 대조군, Group 2 0.1% (1 mg/ml) 키토산올리고당 수용액을 30일간 음용수를 통해 자유자재로 섭취시킨 후 교미시켜 태어난 F<sub>1</sub> 세대, Group 3 F<sub>1</sub> 세대의 쥐에게 0.1% (1 mg/ml) 키토산올리고당 수용액을 30일간 음용수를 통해 자유자재로 섭취한 후 교미시켜 태어난 F<sub>2</sub> 세대, Group 4 0.1% (1 mg/ml) 키토산올리고당 수용액을 90일간 음용수를 통

해 자유자재로 섭취시킨 군, Group 5 0.1% (1 mg/ml) 키토산올리고당 수용액을 365일간 음용수를 통해 자유자재로 섭취시킨 군의 쥐 등으로 각 실험군 당 쥐 10마리를 사용하였고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

Group 4의 경우 약간의 소포체 팽창을 관찰하였을

뿐, 다른 실험군에서는 대조군과 비교하여 특별한 간 조직의 미세구조 변화를 관찰하지 못하였다.

결론적으로 키토산올리고당은 무독성 물질로서 안전성이 있다고 사료된다.

## FIGURE LEGENDS

### Abbreviations

N: nucleus, M: mitochondria

\* Each scale bar on the figures equals 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 1.** An electron micrograph of hepatic cell of normal rat ( $\leftarrow$ : rough endoplasmic reticulum).

**Fig. 2.** An electron micrograph of hepatic cell of rat that F<sub>1</sub> generation which was born by mating of 0.1% chitosanligosaccharide was supplied by feeding *ad libitum* for 30 days.

**Fig. 3.** An electron micrograph of hepatic cell of rat that F<sub>2</sub> generation which was born by mating F<sub>1</sub> generation.

**Fig. 4.** An electron micrograph of hepatic cell of rat after treatment with 90 day of 0.1% chitosanligosaccharide.

**Fig. 5.** An electron micrograph of hepatic cell of rat after treatment with 365 day of 0.1% chitosanligosaccharide.





