

사염화탄소로 유발된 간손상에 대한 구기자 추출물의 치료효과

충북대학교 수의과대학 · 충북대학교병원 병리과¹ · 충북대학교병원 진단검사의학과²

조정희 · 신지순 · 이광주¹ · 김운배 · 강종구 · 황석연²

Therapeutic Effect of *Lycii fructus* Extract in Hepatotoxicity Induced by Carbon Tetrachloride

Cho, Jung Hee., Sin, Ji Soon., Lee, Kwang Joo¹., Kim, Yun Bae.,
Kang, Jong Koo., Hwang, Seock Yeon²

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

Department of Pathology, Chungbuk National University, Cheongju, Korea¹

Department of Clinical Laboratory Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea²

The hepatotherapeutic effect of the extract of *Lycii fructus* has been studied in rats against CCl₄ induced liver toxicity. The rats were orally treated with CCl₄ (corn oil/CCl₄ 1:1, 1ml/kg) and then CCl₄ (0.5ml/kg) administered four times for 2 weeks. The extracts of *L. fructus* have been administered every day for 2 weeks after the last CCl₄ injection. The experimental groups consisted of negative control (G1), positive control (CCl₄ alone; G2), extract of *L. fructus* (50 mg/kg; G3, 100 mg/kg; G4, 200 mg/kg; G5), respectively. There was a significant decrement to G2 on the serum level of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and alkaline phosphatase in G5. Also, the content of thiobarbituric acid reactive substance, and phosphatidylcholine hydroperoxidase, a marker of lipid peroxidation, in the liver were decreased significantly G5 and G4 compared with G2. Although, catalase or superoxide dismutase, antioxidant enzyme, in the liver were decreased significantly too, it would not be a good sign for the liver. In histopathological findings, such a hepatocellular vacuolar degeneration, lobular restructure, cellular infiltration, necrosis, and so on were shown severely in G2. However, G4 and G5 was shown a mild cytoplasmic vacuolation and inflammatory cell. In conclusion, as a protection against cell damage, lipid peroxidation and serum level, it suggested that the extract of *Lycii fructus* would have been a therapeutic effect of liver injury directly.

Key Words: *Lycii fructus*, Carbon tetrachloride, Hepatotoxicity

I. 서 론

사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl₄)는 간에서 단백

질 합성의 저해, K⁺축적의 저해, 간세포의 괴사, microsomal enzymes의 억제 등을 통해 독성을 나타내는 대표적인 물질로서(Thomas와 Mariani, 1989), 투여방법, 경로 및 횟수에 따라 급성간염, 지방간, 간경변 등의 간질환의 유발이 가능하기 때문에 초기에 투여 물질의 효과를 밝히는데 있어서 실험적으로 많이 이용되고 있다. 사염화탄소는 간의 형질내세망에서 CCl₃ free radical로 대사 되어

교신저자 : 황석연, (우)360-240, 충북 청주시 흥덕구 개신동 62
충북대학교병원 진단검사의학과
Tel. 043-269-6257
E-mail : syhwang@cbnuh.or.kr

지질과산화물을 일으켜 간독성을 나타내며, hepatic lipid의 alkyl기 또는 간세포 핵의 DNA와 공유결합을 하여 괴사를 일으킨다고 보고되었다(Hruszkewycz 등, 1987; Gomez와 Castro, 1980).

실험에 사용된 구기자(*Lycii fructus*)는 가지과(Solanaceae)에 속하는 낙엽성 소관목인 구기자나무의 성숙한 과실로 한방에서 약용으로 사용하며, 건강 증진의 목적으로 차로도 다량 음용 되고 있다(김 등, 1998). 구기자에는 과당과 소량의 단백질, 지방, 섬유소, 탄닌 성분을 포함하고 있으며(이, 1995; Lee와 Sheo, 1986; Oh 등, 1990), 무기질과 비타민도 골고루 함유되어 있다(Akiyoshi 등, 1982; Akiyoshi 등, 1984; 장, 1993).

구기자의 효능에 관해서는 구기자의 성분이 지방간의 저해작용과 간세포 신생의 촉진작용이 있으며(육, 1982; 손, 1993), 구기자의 pyrrole 유도체가 간에 대한 보호 작용을 가지거나(Chin 등, 2003), 구기자의 cerebroside가 galactosamine에 노출된 랫드의 초대배양 세포에서 보호 작용을 보이며(Kim 등, 2000), 구기자에서의 zeaxantin dipalmitate가 간의 콜라겐합성과 Ito cell의 증식을 억제하고, Kuffer cell의 생화학적 기능을 억제하며, 항산화적인 활성을 가지고 있어, 간에 대한 보호 효과가 있다는 연구 결과가 있다(Kim 등, 2002; Kim 등, 1997). 한편, 구기자의 간장 보호에 대한 효능의 연구에서 in vitro의 결과가 많이 알려져 있지만, 아직은 in vivo의 실험은 부족한 편이다. 따라서, 본 연구에서는 구기자의 추출물을 간질환이 유발된 랫드에게 투여하여 그 치료적인 효과를 검색해 보기 위해 본 연구를 실시하였으며, 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험설계

Rat (male, 250±20, Sprague-Dawley)는 한국 썬타코(경기도 오산)로부터 구입하였으며 구입 후 7일간 계류시킴으로써 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육은 온도; 23±1℃, 습도; 40-60%, 명암 주기; 12시간 조건에서 실시하였다. 사료는 실험동물용 펠릿사료(썬타코, 경기도)를 매일 자유 급식하였고, 식수는 수돗물을 정수하여 제한 없이 공급하였다. 실험군은 총 30 마리의 동물을

을 각 군 6마리씩, 5개 군으로 구성하였다. 즉, 정상대조군(G1), CCl₄ 단독투여군(G2) 및 구기자추출물 투여군으로 50 mg/kg(G3), 100 mg/kg(G4), 200 mg/kg(G5)을 설정하였다. 한편 사염화탄소는 corn oil에 50% (v/v)로 희석하여 1 ml (kg.b.w)로 단회투여한 후 3~4일 간격으로 0.5 ml (kg.b.w)로 2주 동안 4회 경구로 투여하였다. 즉, 사염화탄소는 실험 개시일로부터 0, 3, 7, 10 및 14일에 각각 경구로 투여하였다. 한편, 구기자 추출물은 사염화탄소 마지막 투여 후부터 2주간 투여하여 총 4주간 실험하였다.

2. 구기자 추출물의 조제

본 실험에 사용한 구기자(*L. fructus*)는 충남 청양군 운곡면에 소재한 청양구기자시험장에서 공급받았으며, 구기자의 일반 성분은 당질 47%, 단백질 14.6%, 지방 10.7%로 보고되었으며(장, 1993), 구기자 추출물은 구기자를 round flask에 넣고 증류수 3,000 ml을 넣은 후 약 3시간 3회 환류 추출한 후 여과한 여액을 rotary evaporator로 감압 농축, 동결 건조함으로써 건조 구기자 추출물을 얻었다(건조 추출물로부터의 수율: 20%).

3. 지질과산화 및 항산화효소 활성도 측정의 방법

3.1 각 분획물의 조제

Bansal 등(1983)의 방법에 따라 적절한 랫드의 간을 잘게 썰고 150 mM KCl을 함유한 30 mM HEPES 완충액(pH 7.4)으로 5배 희석하여 균질화한 다음 ×700 g로 20분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 그 상등액을 ×11,000g로 30분간 고속원심분리하여 pellet을 제거하였다. 그 상등액을 다시 ×105,000 g로 60분간 초원심분리하여 세포질 분획을 얻었으며, pellet은 130 mM KCl 함유 HEPES 완충액으로 씻어낸 다음 같은 완충액으로 재균질하여 마이크로솜 분획을 얻었다. 마이크로솜과 세포질 분획을 분리하는 전 과정은 0~4℃ 저온실에서 수행하였으며, 조제한 분획을 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3.2 단백질 정량

Bovine serum albumine (BSA)을 표준물질로 사용하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 측정하였다.

3.3 Catalase 활성도 측정

간 cytosol에서 catalase의 활성도는 Aebi (1984)의 방법을 이용하여 측정하였다. Lowry 등 (1951)의 방법에 의해 단백질을 정량한 후 sample 1 ml 당 0.02 mg protein으로 조제하였다. 이 과정이 끝나면 5 mM EDTA가 함유된 1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 150 μ l와 10 mM H₂O₂ 2.7ml, 그리고 증류수 90 μ l를 첨가한 후 30초 동안 vortex mixer로 혼합시켰다. 혼합액을 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 다음 여기에 1 ml 당 0.02 mg protein으로 조제한 sample 60 μ l를 첨가하여 pipetting한 후 240 nm에서 1분간 optical density의 변화량을 측정하였다.

3.4 Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정

간 cytosol에서 SOD의 활성도는 Lee와 Yu (1990) 등의 방법을 이용하여 측정하였다. Lowry (1951) 등의 방법에 의하여 단백질을 정량한 후에 시료 1ml당 2 mg protein으로 조제하였다. 미리 조제하여 놓은 0.76 mg의 xanthine 시약에 0.01N NaOH 10 ml을 첨가하여 용해시킨 후 여기에 24.8 mg의 cytochrome C를 첨가한 다음 50mM phosphate buffered saline (PBS) buffer (pH 7.8)로 total volume를 110 ml로 만든 solution A 2.9ml에 1ml당 2mg protein으로 조제한 sample 50 μ l를 넣고 30초 동안 vortex mixer로 혼합시켰다. 여기에 0.1 mM EDTA가 함유된 2M ammonium sulfate solution에 xanthine oxidase를 첨가한 solution B (단 xanthine oxidase의 양은 solution A와 test sample 대신 증류수 50 μ l를 첨가한 후 solution B를 첨가하였을 때 1분간 optical density의 변화량이 0.025인 양으로 정한다) 50 μ l를 첨가한 다음 균일하게 혼합되도록 피펫팅한 후 550nm에서 1분간 optical density의 변화량을 측정하였다. 모든 지질과산화물과 효소활성의 측정은 4 $^{\circ}$ C의 저온상태에서 수행하였다.

3.5 Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)

함량

간 조직의 TBARS 함량은 Buege와 Aust(1978)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 간 1g을 50 nM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 4ml를 넣어 균질화 한 다음 균질화된 20% homogenate 1ml에 thiobarbituric acid (TBA) solution (15g의 trichloroacetic acid (TCA)시약에 증류수 50 ml을 첨가하여 용해시킨 후, 0.375g의 TCA 시약과 25 ml의 1N HCl을, 그리고 40 mg의 BHT가 함유된 2 ml의 ethanol 용액을 첨가한 후 증류수로 total volume을 100

ml로 만들었다) 2 ml을 첨가하여 30초 동안 vortex mixer로 혼합시킨 후 100 $^{\circ}$ C 물에서 15분간 중탕시켜 반응시킨 후 실온에서 냉각시켰다. 냉각시킨 후 \times 3000 g에서 10분 동안 원심 분리하여 그 상층액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액은 tetraoxypropane을 methanol에 녹여 사용하였다.

3.6 Phosphatidylcholine hydroperoxidase (PCOOH)의 함량

간 조직의 PCOOH 함량은 Blight와 Dyer(1959)의 방법으로 총 지질을 추출한 후 Miyazawa (1992)의 방법으로 측정하였다. 간 조직 1g을 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 4 ml을 넣어 균질화시켰다. 균질화된 20% homogenate 1ml에 chloroform:methanol (2:1, by vol.) 3ml을 넣고 30초 동안 vortex mixer로 혼합시킨 후 chloroform: DW (1:1, by vol.) 2 ml을 넣고 다시 vortex mixer로 잘 혼합시켰다. 그 후 \times 3000 g에서 10분 동안 원심분리하여 하층액을 분리하였다. 남은 상층액에 chloroform 1.5ml 넣고 30초 동안 vortex mixer로 혼합시킨 후 \times 3000 g에서 10분 동안 원심분리하여 하층액을 분리하여 처음 원심분리하여 얻은 하층액과 합쳤다. 질소가스로 용매를 제거한 뒤 chloroform:methanol (1:1, by vol.)에 다시 용해시켜 그 중에서 20 μ l를 취해 chemiluminescence-HPLC (Gilson, France. column: Finepak SIL NH 2-5, 4.61DX250mm, Jasko Corporation, Japan. column temperature : 40 $^{\circ}$ C detector : CLD-110, Tohoku Electric Company, Japan)에 injection하여 분석하였다.

4. 혈액학적 및 조직학적 방법

실험 종료시 각 동물을 ether 마취 하에 개복하여 복대 동맥에서 주사기로 10 ml을 채혈하여, 1 ml을 혈액학적 성상을 검사하기 위해 EDTA bottle에 2.7 ml을 나머지 혈액은 SST tube에 넣어 3000rpm에서 15분간 원심 분리한 후, 이를 -20 $^{\circ}$ C에 즉시 보관하여 분석에 사용하였다. 혈액학적인 검사를 위해서는 혈액자동 분석기인 SE-9000 (TOA Medical Co., LTD, Japan)과 생화학적인 검사를 위해서는 생화학자동분석기 Hitachi-747(Hitachi Medical Co. LTD., Tokyo, Japan)을 이용하여 측정하였다. 그리고, 병리조직학적 검사를 위해 tissue embedding center (Shandon Co., Ins), Rotary microtome (Reichert- Jung)을 각각 사용하였으며, 모든 실험은 통상의 임상병리 및 병

리조직학적 실험 방법에 준하여 시행하였다.

5. 통계처리

실험 결과는 group test를 수행하여 평균±표준편차 (mean±SD)로 표기하였다. 또한, 음성대조군 및 CCl₄ 단독투여군과 구기자 추출물 투여군 간의 통계분석은 one way ANOVA에서 유의한 점이 인정되는 경우 Student's t-test를 통해 95% 수준에서 통계적 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. 혈액학적 변화에 미치는 효과

사염화탄소 단독투여군의 랫드에서 대조군에 비하여 적혈구는 68%가 Hb은 83%로 유의한 감소($p<0.01$)를 나타낸 반면, 백혈구는 대조군에 비하여 168%의 유의한 증가를 보였다($p<0.01$). 그러나, 구기자 추출물 투여군과 사염화탄소 단독 투여군을 비교하였을 때 적혈구는

26.2%의 증가가 나타났으며($p<0.05$), 백혈구는 84 %로 유의하게 감소하였다($p<0.01$). 혈액학적 검사결과에서 다른 투여군에서는 유의한 변화는 관찰되지 않았으며, 백혈구에 있어서 사염화탄소 투여군은 대조군과 비교하여 증가된 결과를 보였다(Table 1).

반면, 혈청 내 크레아티닌과 노산 등에서는 사염화탄소에 의해 크게 영향을 받은 변화는 나타나지 않았다(Table 2).

혈청내 간 손상의 지표인 AST는 대조군에 비하여 2, 3, 4, 5군이 각각 872%, 826%, 727%, 596%의 유의한 증가를 보였으며($p<0.01$), 구기자 추출물 고농도인 200 mg/kg 투여군은 사염화탄소 단독투여군인 2군과 비교하였을 때 68.4%정도로 유의하게 감소하였다($p<0.01$). 또한 ALT의 경우에는 대조군에 비해 2, 3, 4, 5군이 각각 810%, 681%, 643%, 51%정도의 유의성 있게 증가된 결과를 보였으며($p<0.01$), 구기자 추출물 고농도인 200 mg/kg 투여군에서 사염화탄소 단독투여군에 비해 62.8%로 유의하게 감소하였다($p<0.01$). 2군의 ALP는 대조군에 비하여 245%의 유의한 증가를 보였으며($p<0.01$), G3와 G4는 각각 183%, 171%로 대조군에 비교해 유의성 있는 증

Table 1. Change of the blood cell treated with *Lycii fructus* extract after induction of hepatotoxicity by carbon tetrachloride

Group	Parameter	RBC (×106)	WBC (×103)	Hb (g/dl)	Hct (%)	Plt (×106)
G1		8.45±0.43	5.34±0.63	15.4±0.4	46.8±0.4	754±121
G2		5.81±0.57‡	9.01±0.46‡	12.9±0.9‡	39.9±2.7	767±122
G3		6.54±0.81	9.45±0.81	13.4±0.8	41.5±1.1	712±139
G4		6.97±0.43	8.52±0.64	14.1±0.4	43.7±1.3	743±106
G5		7.33±0.55*	7.55±0.48**	14.9±0.2	44.6±1.2	765±89

Data were obtained from 6 animals for each group and expressed in mean ± SD. ‡ was $p<0.01$, respectively when compared with G1. * and ** were $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively when compared with G2. These numbers were analyzed by student's t-test. Abbreviation: RBC, red blood cell; WBC, white blood cell; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; Plt, platelet.

Table 2. Biochemical effects of the *Lycii fructus* extract on serum level after induction of hepatotoxicity by carbon tetrachloride

Group	parameter	Cre (mg/dl)	BUN (mg/dl)	UA (mg/dl)
G1		0.6±0.2	21±3.1	4.0±0.3
G2		0.7±0.1	34±4.4	3.5±0.2
G3		0.6±0.1	28±2.1	4.1±0.3
G4		0.7±0.2	29±3.6	4.3±0.2
G5		0.6±0.2	25±3.1	4.4±0.4

Data were obtained from 6 animals for each group and expressed in mean ± SD. Abbreviation: Cre, creatinine; BUN, blood urea nitrogen; UA, uric acid.

Table 3. Biochemical effects of the *Lycii fructus* extract on serum level after induction of hepatotoxicity by carbon tetrachloride

Group	TP (g/dℓ)	Alb (g/dℓ)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)
G1	6.3±0.2	3.2±0.2	113±23	67±10	243±43
G2	5.3±0.5	2.9±0.3	986±123‡	543±113‡	597±57‡
G3	5.4±0.3	3.0±0.4	934±167‡	456±101‡	445±86‡
G4	5.5±0.2	3.2±0.2	822±183‡	431±97‡	417±67‡
G5	5.6±0.2	3.1±0.3	674±165‡ **	341±56‡ **	334±76**

Data were obtained from 6 animals for each group and expressed in mean ± SD. † and ‡ were p<0.05 and p<0.01, respectively when compared with G1. * * was p<0.01, respectively when compared with G2 group. These numbers were analyzed by student's t-test.

Abbreviation: TP, total protein; Alb, albumin; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase.

Table 4. Effects of the *Lycii fructus* extract on antioxidant enzyme level after induction of hepatotoxicity by carbon tetrachloride

Group	Catalase (IU/mg protein)	SOD (μg/mg protein)	TBARS (nmole/mg protein)	PCOOH (pmole/mg protein)
G1	7.12±0.21	4.26±0.92	2.11±0.23	19.34±1.52
G2	9.54±0.52†	6.97±0.86†	3.93±0.66‡	36.33±6.13‡
G3	8.22±0.31	5.91±0.54	3.46±0.326‡	31.51±4.62‡
G4	8.61±0.26	5.38±0.75	3.37±0.92†	28.67±3.97‡ *
G5	7.58±0.20**	4.65±0.77**	2.94±0.39† *	33.51±6.56‡

Data were obtained from 6 animals for each group and expressed in mean ± SD. † and ‡ were p<0.05 and p<0.01, respectively when compared with G1; * and ** were p<0.05 and p<0.01, respectively when compared with G2 group.

Abbreviation: SOD, superoxide dismutase; TBARS, Thiobarbituric acid reactive substance; PCOOH, phosphatidylcholine hydroperoxidase.

가를 보였다 ($p<0.05$). 또한, 5군은 대조군에 비해 137%로 다소 증가된 수치를 나타냈으나, 유의한 변화는 보이지 않았다. 하지만, 사염화탄소 단독 투여군과 비교하였을 때 55.9%로 유의적인 감소를 나타내었다 ($p<0.01$). 한편, TP는 전체적으로 대조군에 비해 대략 85% 정도의 감소가 있었으며, 알부민은 약 90%까지 감소하는 경향을 보였지만 통계적 유의성은 없었다 (Table 3).

2. 지질과산화물 및 항산화효소의 활성도에 미치는 영향

측정된 카탈라제의 경우 대조군에 비해 2군은 134%의 유의한 증가가 있었으며 ($p<0.05$), G3, G4, G5는 각각 115%, 121%, 106%로 약간 증가된 경향을 보였다. 그렇지만, G5는 G2와 비교하여 약 79.5%의 유의한 감소를 나타냈다 ($p<0.01$). SOD에 있어서는 G2가 대조군에 비해 164%의 유의한 증가를 보였으며 ($p<0.05$), 다른 G3, G4,

G5는 139%, 126%, 109%로 증가하는 경향을 보였지만, G5는 G2에 비해 66.7% 정도로 유의하게 감소하였다 ($p<0.01$).

TBARS에서는 G2는 186%, G3는 164%로 유의성 있는 증가를 보였고 ($p<0.01$), G4, G5도 160%, 139%의 유의한 증가가 나타났다 ($p<0.05$). 하지만, G5는 G2와 비교하여 74.8%의 유의한 감소가 있었다 ($p<0.05$). PCOOH의 경우에는 G2 188%, G3 163%, G4 148%, G5 173%로 모두 유의한 증가가 나타났으며 ($p<0.01$), 그 중에서 G4는 G2와 비교하였을 때 78.9%가 유의성 있게 감소하였다 (Table 4).

3. 간조직의 변화에 미치는 영향

정상군에서는 간소엽, sinusoid 구조의 변성이나 중심 정맥성주위성 변화, 담관 및 문맥주위의 특이적인 변화는 관찰되지 않은 즉, 간세포들이 간소엽의 가장 자리를 향

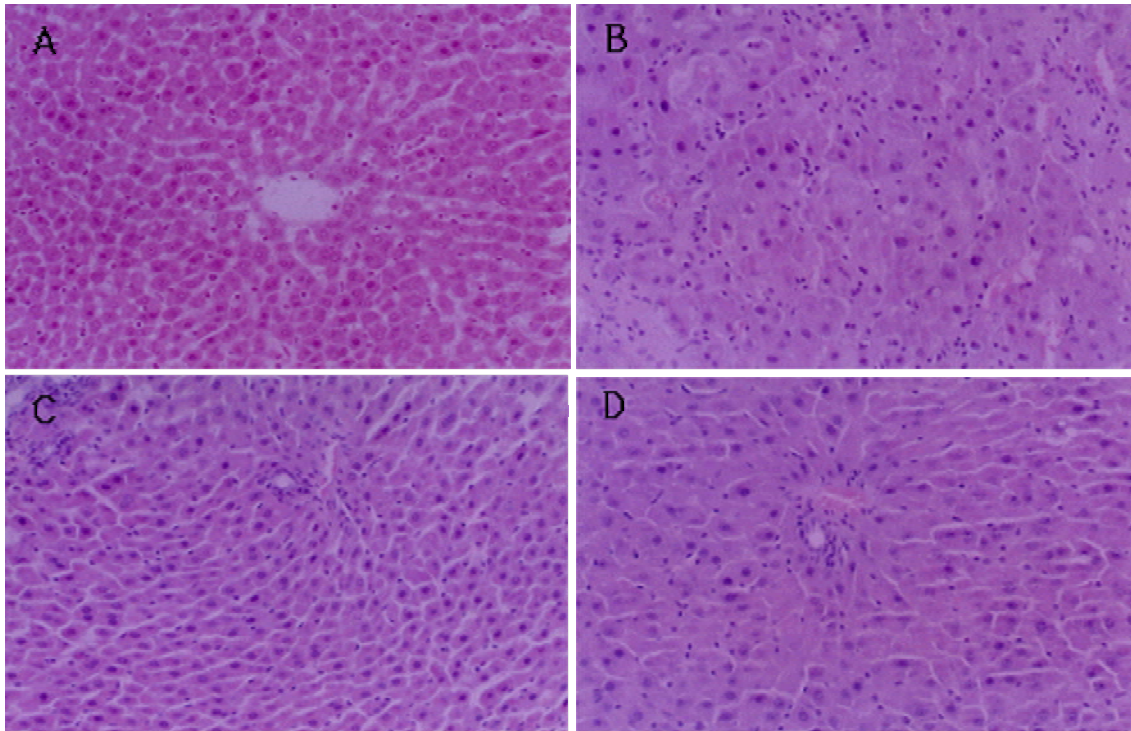


Fig. 1. Histopathological findings of liver in rats treated with (A)vehicle, (B)carbon tetrachloride alone, (C)*Lycii fructus* extract 200 mg/kg and (D)50 mg/kg. After inducing hepatotoxicity by carbon tetrachloride, severe ballooning degeneration, fatty metamorphosis, necrosis of hepatocyte and multinuclear cells, in addition to restructure of liver fibrosis were observed in B. Only mild hepatocytic vacuolation are induced in C. Some cells were showed nearby periportal area, ballooning degeneration and hepatocytotic vacuolation in D. H&E $\times 200$.

해 방사형으로 코드 모양의 배열을 보이는 반면 사염화 탄소 양성 대조군의 경우 간세포가 팽윤되어 있었으며, 간세포의 괴사와 cytoplasmic vacuolation 및 fatty metamorphosis가 관찰되었다. 또한, 다핵을 가진 세포의 출현과 염증세포의 침윤이 나타났으며, sinusoid 구조의 소실과 간세포의 수복에 의한 섬유화 된 간의 구조가 관찰되었다. 한편 치료효과를 보기 위한 구기자 추출물 투여군에서는 50 mg군에서는 CCl_4 투여군에서와 같이 세포의 일부가 팽윤되어 있었고 일부에서 hepatic cell necrosis, cytoplasmic vacuolation 및 disse space의 cell infiltration을 관찰할 수 있었다. 그러나 100 mg과 200 mg 투여군에서는 약간의 cytoplasmic vacuolation 및 염증세포의 침윤을 관찰하였다(Fig. 1).

IV. 고 찰

간장은 생체내에서 가장 큰 장기로서 외부로부터 유입된 다양한 화학물질과 음식물에 대하여 각종 소화 및 해

독에 관련된 효소들을 생산하여 일차적인 대사를 담당하며, 생명유지에 있어서 중요한 역할을 수행한다. 따라서 간장은 여러 가지 손상에 대하여 직접 반응함으로써 취약하게 된다(Plaa, 1991). 이에, 사염화탄소를 사용한 간장의 손상모델에서 체내의 혈액학적 성상 및 생화학적 성상변화, 항산화 효소의 영향 및 병리조직학적 검사를 수행하여 구기자의 추출물의 간에 대한 치료효과를 확인해 보고자 하였다.

사염화탄소의 투여에 의하여 간세포는 손상을 입게 되며, 이에 따라 간장의 기능은 저하가 된다. 따라서 적혈구의 생성과 분해에 영향을 받으며, 이에 간손상의 정도에 따라 적혈구와 헤모글로빈의 양적인 감소가 나타나게 된다. 또한 간세포의 손상에 의해 면역세포의 활성화가 있으며, 이에 따라 백혈구의 수가 전체적으로 대조군에 비하여 증가되는 결과를 가져오게 된다.

간기능 부전 시에 BUN과 크레아티닌이 감소하며, 요산은 간에서 uricase에 의해 allantoin으로 변환되는데 간세포 손상 때는 요산이 allantoin으로 전환되는 것이 불완전하여 뇨와 혈액내의 뇨산량이 증가한다. 실험 결과에서

는 대조군에 비하여 2군의 BUN이 대략 60% 정도 증가하였는데, 이는 사염화탄소에 의한 세포손상에 의해 일부 간세포손상을 받아 간기능이 저하된 것으로 사료되며, 크레아티닌은 거의 변화가 없었으며, 요산에서는 2군에서 대조군에 비해 약간 감소하였으나, 정상적인 범위 내에서의 변동이며, 감소는 혈액학적 의미를 두지 않는다.

Total protein의 경우 간질환시에 생산이 부족하여 감소를 하게 되며, 또한 간질환 시 면역 글로블린 혈중에서 증가하는데, 본 실험에서는 알부민의 수치가 거의 변화가 없는 것으로 확인되어 일부 감소는 간질환 시 기능부전의 영향일 가능성이 크다고 사료가 된다.

한편, 사염화탄소에 의한 간 손상을 확인하고자 하는 지표로 사용하는 효소는 AST, ALT, alanine transamidase, lactate dehydrogenase, ornitine carbonyl transferase 등으로 그 수치가 증가하는 것으로 판단을 하는데 (Sipes 등, 1997), 특히 AST, ALT의 활성은 간손상의 정도를 예측하는 지표로서 임상실험에서 널리 이용되고 있다. AST와 ALT의 증가는 간세포성의 질환에서 발생하는 현상이며, ALP는 종양, 간염, 간경화등에 의한 간내성 폐쇄 등에 의해 증가가 되는데, 본 실험에서는 사염화탄소의 투여에 의해서 AST, ALT 및 ALP가 유의하게 증가되었지만, 구기자 추출물의 투여군의 G3, G4에서는 사염화탄소의 단독투여군에 비해 다소 감소되었으며, 고농도의 구기자 추출물의 투여군인 G5에서는 유의한 감소를 나타내어 구기자 추출물이 간세포의 손상을 복구하는데 큰 역할을 하는 것으로 사료되어진다.

생체막 지질에서 free radical 반응의 결과로 지질과산화물이 생성되는데 NADPH oxidaser P에 의한 O₂·와 H₂O₂의 발생 및 phospholipase A2의 활성 증가로 유리 arachidonic acid 조성이 높아지고 이에 lipoxigenase와 cyclooxygenase 활성이 증가되어 endoperoxide가 생성되고 이의 대사과정에서 free radical이 발생된다고 알려져 있다 (이와 최, 1997). 또한, 사염화탄소에 의해 간세포가 손상을 받으면 근섬유모세포와 유사한 세포에서 DNA의 합성이 2-3배 증가하게 되고, 산화적 스트레스에 대한 요소가 분비된다. 담도 폐쇄에서 TBARS의 농도가 증가되면 몇몇의 항산화 방어가 되는 것이 감소되는데, 이는 산화적 스트레스의 존재와 함께 지질 과산화쪽으로 균형이 전환된다고 보고되었다 (Kim 등, 2002).

구기자의 효능 중 장수에 관한 언급이 많은데 이는 노화방지 효능인 항산화 개념으로 이해할 수 있다. 구기자의 항산화 효과에 관해 일부 연구에서 free radical의 소거

작용, linoleic acid를 기질로한 지질산화 억제효과 및 이에 따른 경시적인 MDA 생성억제 효과와 노화방지 효소인 SOD, POD 및 카탈라제의 활성과 negative gel 전기영동에 의한 효소의 분리양상을 비교한 결과 우선 DPPH에 의한 free radical의 소거작용은 radical의 50%를 소거시키는 능력 즉, RC50 값을 측정한 결과 구기자가 1.14 μ g, 구기엽은 268 μ g 및 지골피는 15 μ g의 농도로 지골피가 가장 활성이 높은 것으로 이는 합성 항산화제인 BHT의 RC50 값이 13 μ g에 거의 동등한 항산화 효과가 있음을 의미한다고 하겠다. 또한 구기자 추출물의 과산화물가를 측정한 결과 과산화물 생성 억제율이 최고 53%까지 나타나 항산화 효과가 강한 것으로 나타났으며, 또한, 랫드에서의 본 연구에서 시행하였던 마이크로솜 분획 즉, 동물 간세포 중의 지질을 대상으로 한 지질산화 억제율을 측정한 결과 구기자 추출물은 64%, 구기엽은 42% 및 지골피는 84%로 노화방지에 있어서 효과가 우수한 것으로 보고되었다. 한편, 항산화 효소의 활성은 SOD는 구기엽>구기자>지골피의 순으로 나타났으며, POD는 지골피>구기엽>구기자의 순으로 증가한다고 보고하여 (라, 2000), 이는 본 연구결과에서 나타난 일부 결과들을 뒷받침한다고 할 수 있겠다.

따라서 본 연구에서는 사염화탄소에 의해서 발생한 지질과산화의 방어효과를 파악하기 위해 항산화효소인 카탈라제 및 SOD를 확인하였으며, 생체막 지질의 과산화물 생성과 산화적 손상의 정도의 지표로 알려져 있는 TBARS와 PCOOH의 양적인 분석을 통하여 구기자 추출물의 효과를 확인하였다. 실험결과 TBARS의 수치는 사염화탄소를 투여한 군에서 증가하였는데, 그중 단독으로 투여한 G2군이 86%의 증가를 보였으며, 구기자 추출물의 투여한 G3 및 G4는 대략 60%, G5는 약 40%의 증가를 나타내어, 생체막 지질의 과산화물 생성의 정도를 확인할 수 있었으며, 산화적 손상의 지표인 PCOOH에서 사염화탄소 투여군으로는 모두 그 수치가 대조군에 비해 G2는 88%, G3는 63%, G4는 48%, G5는 73%로 다량 증가하였다. 마찬가지로 항산화와 관련된 효소도 같이 증가하였는데 손상의 지표보다는 적은 양으로 증가되었다. 한편 지질과산화와 산화적 손상은 구기자 추출물의 농도에 의존하여 적게 증가하는 경향을 보였지만 손상을 방어하는 항산화 효소는 오히려 구기자 추출물의 농도에 따라 감소하였다. 이는 구기자 추출물의 성분이 산화적 손상에 대하여 직접 방어하는 작용이 있을 가능성을 포함하고 있으며, 항산화 효소에 관련된 영향은 없을 것으

로 사료되며, 여기서 증가된 항산화 효소는 산화적 손상의 증가에 따른 보상적인 증가로 유추된다고 할 수 있겠다.

V. 결 론

사염화탄소로 간질환을 일으킨 랫드에서 구기자 추출물의 투여에 의한 간손상의 치료효과를 확인해본 결과 혈액학적 정상에서는 적혈구와 헤모글로빈은 사염화탄소의 투여에 의해 감소되는 경향이 나타났으며, 특히 G2에서 적혈구 및 혈색소의 유의한 감소를 보였다. 백혈구는 전체적으로 모든 군이 대조군에 비해 증가되었으며, 그중 G2에서 유의성 있는 증가가 나타났다. 한편 G5군은 G2군과 비교하였을 때 적혈구는 유의한 증가를 보인 반면 백혈구는 유의한 감소를 보였다.

간세포손상에 가장 중요한 AST, ALT를 포함한 ALP의 경우 사염화탄소 투여군에서는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 보인 반면 G5는 G2와 비교하였을 때 유의한 감소를 보여 이는 구기자 추출물이 간세포 손상에 대한 치료의 효과를 반영한다고 하겠다.

지질과산화 관련 효소에서는 TBARS 및 PCOOH는 사염화탄소 투여군에서 유의성 있는 다량의 증가를 보여 간의 산화적인 손상을 보인 반면 TBARS의 G5 및 PCOOH의 G4의 경우에는 G2에 비해 유의한 감소를 보여 구기자 추출물에 의해서 감소된 영향을 볼 수 있었으며, 항산화 관련 효소인 카탈라제 및 SOD의 경우에는 있어서는 G5군에서 유의한 억제효과를 보여 구기자 추출물의 농도 의존적인 양상을 보였다. 이러한 현상은 조직학적 연구에서도 같은 현상을 보였다. 즉, 사염화탄소의 단독 투여군인 G2는 음성대조군인 G1과는 대조적으로 간의 구조적 소실 및 섬유화, 간세포의 괴사와 공포형성, 지방변성 및 세포의 침윤을 관찰하였으며, G3에서는 일부 팽윤된 간세포와 세포의 괴사, 세포질의 공포형성, 염증세포의 침윤이 관찰되었으나, G4 및 G5에서는 일부에서 미약한 세포질의 공포형성과 세포의 침윤이 관찰되었다.

이상의 결과를 통하여 구기자 추출물이 사염화탄소로 유도된 간 손상에 대하여 회복시키는 것으로 판단되며, 나아가 예방효과를 포함한 기전에 대한 좀더 폭넓은 연구가 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Aebi H. Catalase *in vitro*. In *Method in Enzymology*, Colowick SP, Kaplan NO. eds, p121-126, Academic Press, New York, 1984
2. Akiyoshi S, Takane F, Kunio K. Isolation of 1,2-dehydro-alpha-cyperone and solavetivone from *Lycium chinese*. *Phytochemistry* 21:2986-2995, 1982
3. Akiyoshi S, Takane F, Reiko U, Toshiko A. Isolation of 3-hydroxy-7,8-dehydro-beta-Ionone from *Lycium chinese*. *Agric Biol Chem* 48:1629, 1984
4. Bansal SK, Love J, Gurtoo HL. High pressure liquid chromatographic separation of multiple forms of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* 117:268-274, 1983
5. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917, 1959
6. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-310, 1978
7. Chin YW, Lim SW, Kim SH, Shin DY, Suh YG, Kim YB, Kim YC, Kim J. Hepatoprotective pyrrole derivatives of *Lycium chinense* fruits. *Bioorg Med Chem Lett* 13 (1):79-81, 2003
8. Gomez MI, Castro JA. Covalent binding of carbon tetrachloride metabolite to liver nuclear DNA Proteins and lipid. *Toxicol Appl Pharmacol* 56:199-266, 1980
9. Hruszkewycz AM, Glende EA, Reckangel RO. Destruction of microsomal cytochrome P-450 and glucose-6-phosphate by lipids extracted from peroxidized microsomes. *Toxicol Appl Pjarmacol* 46:695-702, 1987
10. Kim SY, Lee EJ, Kim HP, Lee HS, Kim YC. LCC, a cerebroside from *Lycium chinense*, protects primary cultured rat hepatocytes exposed to galactosamine. *Phytother Res* 14 (6):448-451, 2000
11. Kim HP, Lee EJ, Kim YC, Kim J, Kim HK, Park JH, Kim SY, Kim YC. Zeaxanthin dipalmitate from *Lycium chinense* fruit reduces experimentally induced hepatic fibrosis in rats. *Biol Pharm Bull* 25 (3):390-392, 2002

12. Kim HP, Kim SY, Lee EJ, Kim YC, Kim YC. Zeaxanthin dipalitate from *Lycium chinense* has hepatoprotective activity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 97 (3):301-314, 1997
13. Lee DW, Yu BP. Modulation of free radicals and superoxide dismutase by age and dietary restriction. *Aging Clin Exp Res* 2:357-362, 1990
14. Lee MY, Sheo HJ. Quantitative Analysis of Total Amino Acid and Free Sugars in *Lycii Fructus*. *J Korean Soc Food Nutr* 15:249-252, 1986
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the foin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
16. Miyazawa T, Suzuke T, Fujimoto K, Yasuda K. Chemiluminescent simultaneous determination of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide in the liver and brain of the rat. *J Lipid Res* 33 : 1051-1058, 1992
17. Oh SL, Kim SS, Min BY, Chung DH. Composition of free sugars, free amino acids, non-volatile organic acids and tannins in the extracts of *L. Chinensis*. *M, A Acutiloba K, S Chinensis B and A Sessiliflorum S. Korean J Food Sci Technol* 22:76-81, 1990
18. Plaa GL. Toxic responses of the liver in Casarett and Doull's Toxicology. p334-353, Pergamin Press, New York, 1991
19. Sipes IG, McQueen CA, Gandolfi AJ. Hepatic and gastrointestinal toxicology vol.9 In *Comprehensive Toxicology*, p251-271, Pergamon, Didcot, 1997
20. Thomas BD, Mariani ME. Comparison of metabolic effects of carbon tetrachloride and 1,2-dichrooethane added in vitro to slice of rat liver. *Toxicol in vitro* 3:159-168, 1989
21. 김희선, 박영숙, 김창임. 구기자 섭취에 의한 고지방 식이를 하는 흰쥐의 혈중 지질상태 변화, *한국영양학회지* 31 (3):263-270, 1998
22. 라상욱. 구기자. p18-19, 충청남도 농업기술원 청양구기자 시험장, 충남 청양군, 2000
23. 손예진. 구기자·구기엽·지골피가 고혈압 고지혈증 및 고혈당에 미치는 영향. *경희대학교 대학원 석사학위논문*, 1993
24. 육창수. 한약의 약리·성분·임상응용. p746-748, 계축문화사, 서울, 1982
25. 이상덕. 구기자의 성분 및 추출물의 제조에 관한 연구. *충남대학교 대학원 석사학위논문*, 1995
26. 이순재, 최정화. 당뇨쥐의 간 microsome에서 phospholipase A2의 활성과 지질과산화. *한국식품영양과학회지* 26 (5):908-913, 1997
27. 장학길. 차와 건강 - 구기자·감잎·결명자. *국민영양* 93 (4):18-20, 1993