

사염화탄소로 유발된 랫드의 간 손상에 대한 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*) 추출물의 예방효과

황석연 · 김윤배¹ · 이상한² · 윤치영^{3*}

충북대학교병원 진단검사의학과, 1:충북대학교 수의과대학, 2:경북대학교 생명식품공학부, 3:대전대학교 생명과학과

Preventive Effect of A Chafer, *Protaetia brevitarsis* Extract on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injuries in Rats

Seock-Yeon Hwang, Yun-Bae Kim¹, Sang-Han Lee², Chi-Young Yun^{3*}

Department of Clinical Laboratory Medicine, Chungbuk National University,

1:College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University,

2:Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, 3:Department of Biology, Daejeon University

The hepato-protective effects of the extract from *Protaetia brevitarsis* against hepatotoxicity by carbon tetrachloride (CCl₄) were studied in rats. The rats were orally treated with CCl₄ (50% in corn oil) at initial dose of 1ml/kg followed by 0.5ml/kg four times during 2-week period. The extract of *P. brevitarsis* (50, 100 or 200 mg/kg) or its vehicle was administered day after day from 1 week before CCl₄ injection during five weeks. CCl₄ induced hepato-cellular degeneration and necrosis induced to increase in serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels. In biochemical analyses, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase in hepatic tissues were remarkably increased by CCl₄ treatment. Not only increases in serum AST and ALT, but also induction of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in hepatic tissues caused by CCl₄ were significantly attenuated by the *P. brevitarsis* extract in a dose-dependent manner. Such hepato-protective effects of *P. brevitarsis* extract were confirmed by histopathological examinations, wherein only mild hepatocytic vacuolations were observed in the liver of rats treated with a high dose (100 mg/kg) of *P. brevitarsis* extract in comparison with severe hepatocytic degenerations administered with CCl₄ alone. From these results, it is suggested that the extract of *Protaetia brevitarsis* could be a promising candidate for the protection of liver injury, based on the preventive effects against morphological cellular injuries, lipid peroxidation and serum biochemical parameters.

Key words : *Protaetia brevitarsis*, Preventive effect, Hepatotoxicity, Carbon tetrachloride

서 론

현재 우리나라에서 간암을 포함한 간 질환의 발생률은 외국에 비해 매우 높은 편이다. 이에 따라 간을 보호하기 위하여 건강 기능성식품에 대한 국민적 관심과 선호도가 높을 뿐만 아니라 간기능 향상 또는 간 보호 작용을 나타내는 이들 기능성 소재 개발에 대한 연구가 많이 시도되고 있는 실정이다. 그 결과로

* 교신저자 : 윤치영, 대전시 용운동 96-3, 대전대학교 생명과학과

· E-mail : chyun@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2432

· 접수 : 2005/07/30 · 수정 : 2005/09/01 · 채택 : 2005/10/04

glycyrrhizin, gomisin 및 silymarin 등의 물질이 개발되어 현재 간질환 치료제로 이용되고 있으며, 국내에서 생약제로는 담자균류인 영지 (*Ganoderma lucidum*)가 간 독성 유발물질에 대한 보호 효과가 있으며, 영지 자실체로부터 추출한 G009도 간세포 보호 효과가 있다고 보고되었다¹⁾. 또한 한방에서 자양 및 강장제로 널리 사용되는 구기자 (*Lycii fructus*)도 간세포 독성을 현저히 완화시켰으며, 특히 물 분획물의 주요 성분인 비테인은 사염화탄소로 인하여 저하된 대사능력을 회복시킴으로서 간 보호효과가 있는 것으로 보고되었다²⁾.

체내에서 간은 생화학적 활성과 관련하여 가장 중요한 기관

으로서, 내인성 및 외인성 물질의 대사 및 해독, 독소의 여과, 담즙생성 및 분비, 단백질 합성, 영양분의 항상성 유지 등 다양한 기능을 수행한다. 그러나 간은 해독효소들을 이용하여 외부로부터 유입된 다양한 물질을 대사시키는 과정에서 독성 원인물질이나 대사적 활성화를 통해 독성을 발현하는 물질에 스스로 표적이 되기 때문에 기능 장애의 원인이 된다³⁾.

사람의 간 질환은 Hepatitis B 및 C viruses와 같은 바이러스 감염, 지속적인 alcohol 섭취, 약물이나 독성물질 중독, 담즙 정체, 중금속인 copper 등의 축적을 비롯해 galactosemia나 tyrosinemia와 같은 대사성 질환이나 자가면역질환 등 다양한 원인에 의하여 유발된다고 알려져 있다. 이러한 간 질환이 만성적으로 진행되면 황달, 복통, 출혈, 복수 등의 증상이 나타나고, fibroblasts와 Ito cells (fat-storing cells)에 의한 fibrogenesis로 간 섬유화가 진행된다⁴⁾. 또한 이러한 간섬유화는 재생되는 간세포와 얽혀 결절을 이루면서 간경화로 발전하게 된다^{5,6)}.

간독성물질인 사염화탄소 (carbon tetrachloride, CCl₄)는 간 독성의 기전을 밝히기 위한 여러 가지 실험모델에서 널리 사용되어 왔는데, 특히 랫드에서 CCl₄에 의해 실험적으로 유도된 간경화는 사람에서의 초기 간경화와 상당히 유사한 것으로 알려져 있다⁷⁾. CCl₄는 대사적 활성화를 통해 화학적인 간 손상을 유도하는 대표적인 화합물로서 간의 microsomal cytochrome P450 type 2E1 (CYP2E1)에 의해 trichloromethyl radical (CCl₃·)과 trichloromethylperoxy radical (CCl₃OO·)로 변환된다⁸⁾. 이들 독성 대사체는 glutathione (GSH)이나 cysteine 등의 sulfhydryl (-SH) groups과 반응하여 해독되기도 하지만, 과량으로 생성될 경우에는 이들 항산화 물질들을 고갈시키고 중요한 기능성 세포 단백질과 공유결합을 형성함으로써 지질과산화반응을 일으키고 결국 세포괴사를 초래한다⁹⁾.

한편 일반인들에게 공평이로 잘 알려진 제오(蟻螞)는 한방에서 오래전부터 만성 간질환을 포함하여 다양한 질환에 널리 이용되어 왔다. 蟻螞는 破血行瘀, 散結消腫, 靑血解毒 등의 효능이 있어 痛風, 破傷風, 瘀血 그리고 丹毒 등의 여러 질병에 한방의 치료 처방제로 널리 이용되어 왔고, 현재에도 민간요법으로서 간암을 포함한 다양한 간 질환의 치료목적으로 이용되고 있는 실정이다¹⁰⁾. 현재 농가에서 사육되어 한방 및 민간요법으로 널리 이용하고 있는 蟻螞는 딱정벌레목(Coleoptera), 꽃무지과(Cetoniinae) 곤충인 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)가 주종을 이루고 있다. 선행연구로는 참검정풍뎌이(*Holotichia diomphalia*)를 이용한 사염화탄소-유도 간 손상 모델에서 간 기능 회복효과¹¹⁾, 점박이꽃무지에서 에탄올로 유도된 간 손상 모델에서 간 손상 및 지질 개선효과에 유의한 효과가 보고되었으며¹²⁾, 에탄올 및 사염화탄소-유도 간 손상 모델에서 흰점박이꽃무지의 간 손상 및 항산화효과 등이 일부 보고되었다. 그러나 이러한 연구의 대부분은 한방에서 이용하는 형태의 건조된 분말을 주로 이용하여 왔으며, 그 결과 또한 서로 상반된 결과를 나타내기도 하였다.

본 연구에서는 활성성분에 대한 연구의 일환으로 음지에서 건조된 흰점박이꽃무지 종령 유충을 구매하여 에탄올 추출 분획을 시료로 사용하였다. 또한 사염화탄소를 이용하여 간 독성을

유도하였으며, 지방간 등을 유도하기 위한 일반적인 방법인 에탄올 사용과는 달리 본 연구에서는 정상 사료에 cholesterol, corn oil 및 lard를 사용하여 고지혈을 유도한 후, 추출물 분획 수준에서의 간 기능회복, 지질대사개선 및 항산화효과를 각각 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 실험 설계

수컷 Sprague-Dawley rats (체중 250±20)는 한국 샘타코(SAMTAKO, 오산)로부터 구입하였으며, 구입 후 7일간 검역, 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육은 온도; 23±1℃, 습도; 40-60%, 명암 주기; 12시간 조건에서 실시하였다. 정상군은 실험동물용 펠렛 사료(SAMTAKO, 오산)를 분쇄하여 공급하였으며, 시험군은 분말사료에 cholesterol, corn oil, (Junsei Chemical Co., Ltd. Japan), 그리고 lard(동신유지, 한국)를 각각 3%씩 배합하여 고지방 사료로 공급하였다. 식수는 수돗물을 정수하여 제한 없이 공급하였다. 실험군은 총 30 마리의 동물을 각 군 6마리씩, 5개 군으로 구성하였다. 즉, 정상대조군 (G1), CCl₄ 단독투여군 (G2), 그리고 CCl₄와 흰점박이꽃무지추출물 (*Protaetia brevitarsis* extract; PBE) 투여군으로서 시료의 용량에 따라 각각 50 mg/kg (G3), 100 mg/kg (G4) 및 200 mg/kg 투여군 (G5)으로 설정하였다. PBE는 CCl₄ 노출 1주전부터 매일 5주간 경구로 투여하였다. 한편 CCl₄는 corn oil에 50% (v/v)로 희석하여 PBE는 투여 1주 후에 1 ml/kg로 단회 투여한 다음 3-4일 간격으로 0.5 ml/kg으로 2주 동안 4회 경구로 투여하였다. 즉, CCl₄는 시험 개시일 (최초의 PBE 투여일)로부터 7, 10, 14, 17 및 21일에 각각 경구로 투여하였다.

2. 흰점박이꽃무지 추출물의 조제

본 실험에 사용한 흰점박이꽃무지는 한방에서 사용하는 음건한 상태의 종령 유충을 대구 약령시장에서 구매하였다. 이것을 70% ethanol을 이용하여 일반적인 방법에 준하여 추출한 다음, 여과한 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하고 동결 건조하여 수율 약 39%의 건조 추출물을 얻었으며, 생리식염수에 현탁하여 사용하였다.

3. 지질과산화 및 항산화효소 활성도 측정

1) 각 세포 분획물의 조제

Bansal 등¹³⁾의 방법에 따라 적출한 rat의 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 11,000 g로 30분간 고속원심분리하여 pellet을 제거하였다. 그 상등액을 다시 105,000 g로 60분간 초원심분리하여 세포질 분획을 얻었으며, pellet은 130 mM KCl을 함유하는 HEPES 완충액으로 씻어낸 다음 같은 완충액으로 재균질하여 마이크로솜 분획을 얻었다. 마이크로솜과 세포질 분획을 분리하는 전 과정은 4℃의 저온에서 수행하였으며, 조제한 분획을 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry 등의 방법¹⁴⁾에 따라 측정하였다.

3) Thiobarbituric acid-reactive substances(TBARS) 함량

간 조직의 TBARS 함량은 Buege와 Aust의 방법¹⁵⁾을 이용하여 측정하였다. 즉 간 1 g을 50 nM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 4 ml에 넣어 균질화한 다음, 균질화된 20% homogenate 1 ml에 2 ml thiobarbituric acid solution을 첨가하여 30초 동안 vortex mixer로 혼합한 후 100℃ 물에서 15분간 중탕하여 반응시킨 후 실온에서 냉각시켰다. 냉각시킨 후 3,000 g에서 10분 동안 원심 분리하여 그 상층액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액은 tetraethoxypropane을 methanol에 녹여 사용하였다.

4) Superoxide dismutase(SOD) 활성도 측정

간 세포질에서 SOD의 활성도는 Lee와 Yu의 방법¹⁶⁾을 이용하여 측정하였다. 단백질을 정량하여 시료 1 ml당 2 mg protein이 되도록 조제하였다. 미리 조제하여 놓은 0.76 mg의 xanthine 시약에 0.01 N NaOH 10 ml 을 첨가하여 용해시킨 후 여기에 24.8 mg의 cytochrome C를 첨가한 다음 50 mM phosphate-buffered saline (pH 7.8)으로 total volume을 110 ml로 만든 solution A 2.9 ml에 1 ml당 2 mg protein으로 조제한 sample 50 μl를 넣고 30초 동안 vortex mixer로 혼합하였다. 여기에 0.1 mM EDTA가 함유된 2 M ammonium sulfate 용액에 xanthine oxidase를 첨가한 solution B 50 μl를 첨가한 다음 충분히 혼합하여 1시간 동안 방치한 후, 550 nm에서 1분간 optical density의 변화량을 측정하였다. 단 xanthine oxidase의 양은 solution A와 test sample 대신 증류수 50 μl를 첨가한 후 solution B를 첨가하였을 때 1분간 optical density의 변화량이 0.025인 양으로 정한다. 모든 지질과산화물과 효소활성의 측정은 4℃의 저온에서 수행하였다.

5) Catalase 활성도 측정

간 세포질에서 catalase의 활성도는 Aebi의 방법¹⁷⁾을 이용하여 측정하였다. 단백질을 정량하여 sample 1ml 당 0.02 mg protein이 되도록 조제하였다. 이 과정이 끝나면 5 mM EDTA가 함유된 1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 150 μl와 10 mM H₂O₂ 2.7 ml, 그리고 증류수 90 μl를 첨가한 후 30초 동안 vortex mixer로 혼합하였다. 혼합액을 37℃에서 10분간 반응시킨 다음 1 ml 당 0.02 mg protein으로 조제한 sample 60 μl를 첨가하여 240 nm에서 1분간 optical density의 변화량을 측정하였다.

4. 혈청 생화학적 검사

실험 종료 시 각 동물을 ether 마취 하에 개복하여 복대동맥으로부터 10 ml의 혈액을 채취하였다. 혈액 5 ml은 혈청원심분리용 시험관에 넣고 약 15분간 실온에서 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리 하였으며, 이를 -20℃에 즉시 보관하여 분석에 사용하였다. 혈청 생화학적 검사로서 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotrasferase (ALT)를 포함한 간기능 지표와 total cholesterol을 포함한 지질대사를 각각 생화학자동분석기 Hitachi-747 (Hitachi Medical

Co., LTD, Japan)을 사용하여 분석하였다.

5. 조직병리학적 검사

1) 간세포의 형태학적 변화에 미치는 효과

간조직을 적출하여 10% 중성 formalin 용액에 고정하였다. 조직처리 과정을 거쳐 tissue embedding center를 이용하여 paraffin 포매한 다음 rotary microtome으로 4 μm의 조직 slide를 만들고 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경으로 병변의 유무를 검사하였다. 각 실험군을 보다 객관적으로 평가하기 위해 다음과 같은 조건에서 분석하여 비교하였다. 각 실험군에서의 간세포 괴사, 간소엽 파괴 및 지방변성 정도를 비교하여, 0점 (소엽에 변화가 없음), 1점 (중심정맥의 주위, 즉 소엽의 1/3 범위에 국한해서 변화가 있음), 2점 (소엽의 2/3범위에 국한해서 변화가 있음), 3점 (소엽 전체, 즉 소엽의 중심정맥에서 문맥 주변부에 걸쳐 미만성으로 변화가 관찰됨)으로 평가하였다.

2) 지방염색 (Oil Red O)을 통한 간세포의 지질대사에 미치는 효과

부검 시 적출한 간(liver)을 급속 동결한 후 동결절편기 (Cryostat, Shandon, England)를 이용하여 동결절편을 얻은 후 슬라이드 글라스에 부착한 뒤 공기 중에 약 10여분 정도 건조하였다. 100% propylene glycol 용액에 2분 동안 수세한 다음 Oil red O 용액에 1시간 동안 염색하였다. 85% propylene glycol 용액에서 1분간 감별 염색 한 다음 증류수로 두 번 세척하였다. 이어 Harris hematoxylin 용액으로 2-3초간 염색하고 증류수로 두 번 세척한 다음 5% HCl 용액에 감별 염색을 실시한 후 흐르는 물에 수세하였다. 건조한 다음 수용성 봉입제 (Fluoromount-G, CAT No. 0100-01, Southern)로 봉입한 후 검경하였다. 객관적인 평가를 위하여 다음과 같이 점수화하여 판독하였다. 1점 (간소엽 내 미세한 지방 방울이 국소적으로 있음), 2점 (간소엽내 미세한 지방 방울이 전체적으로 퍼져 있음), 3점 (간세포내에 중증도의 지방 방울이 전체에 걸쳐 퍼져 있음), 4점 (간세포내 핵의 크기보다 큰 지방 방울이 전체적으로 과다하게 퍼져 있음)으로 나누어 평가하였다.

6. 통계처리

실험 결과는 group test를 수행하여 평균±표준편차 (mean±SD)로 표기하였다. 또한, 음성대조군 및 CCl₄ 단독투여군과 PBE 추출물 투여군 간의 통계분석은 one way ANOVA에서 유의한 점이 인정되는 경우 Student's t-test를 통해 95%수준 (p<0.05)에서 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 간 기능에 미치는 효과

간 기능에 미치는 효과에서는 GOT의 경우 정상대조군인 G1군에 비하여 사염화탄소-유도군 (G2)에서 약 1.9배, G3군 (50mg/kg) 1.6배, G4군 (100 mg/kg) 1.4배, G5군 (200mg/kg)에서는 1.6배로 모두 유의하게 증가 (p<0.05~0.01) 하였으며, 반면

G2군과 시험물질 투여군 과의 비교에서는 G4군에서 약 78%의 유의한 억제효과 ($p<0.05$)를 보인 반면, 그 외 G3군과 G5군에서는 감소하는 경향은 관찰되나 통계적인 유의성은 인정되지 않았다. 한편 GPT의 경우 정상대조군인 G1군에 비하여 사염화탄소-유도군인 G2군에서 GOT에서의 같이 약 1.9배 증가한 반면 그 외 실험군에서는 증가하는 경향은 보이나 통계적 유의성은 관찰되지 않았다. 그러나 G2군과 시험물질 투여군과의 비교에서는 G4군에서만 약 64%의 유의한 억제효과 ($p<0.05$)를 보였고 저용량과 고용량군에서는 G2군에 비하여 억제되는 효과는 관찰되나 통계적 유의성은 인정되지 않았다. 그 외 ALP 효소와 총 단백 및 알부민의 모든 시험군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다 (Table 1).

Table 1. Effect of *Protaetia brevitarsis* extract on liver function in the carbon tetrachloride treated rats.

Group (N)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	TP (g/dl)	Alb (g/dl)
G1(6)	85.62±11.34	44.55±5.32	124.35±13.54	5.26±0.26	6.49±0.52
G2(6)	159.37±35.63**	87.41±11.28*	139.47±33.58	5.12±0.17	6.27±0.64
G3(6)	138.15±29.353*	69.24±21.56	133.42±11.40	5.18±0.37	6.33±0.27
G4(6)	123.54±21.48**	56.35±8.26 [#]	112.4±10.75	5.11±0.31	6.39±0.37
G5(6)	135.41±33.74*	63.47±10.2	135.6±12.65	5.16±0.29	6.34±0.74

Values are mean ± S.D.(n=6) ** Significantly different from vehicle control, $p<0.05\sim0.01$ #Significantly different from CCl_4 alone, $p<0.05$. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaline phosphatase, TP: Total protein, Alb: albumin

2. 지질대사에 미치는 효과

지질대사에 미치는 영향에서는 혈당의 경우 모든 시험군에서 유의한 변화가 관찰되지 않은 반면 총콜레스테롤을 포함하여 중성지질 그리고 LDL-콜레스테롤에 있어서 정상대조군 대비 사염화탄소-유도군 (G2)에서 1.7배, 1.9배, 1.7배로 각각 유의하게 증가 ($p<0.05\sim0.01$)하였다. 그러나 시험물질 투여군에서는 저용량군과 고용량군에서 유의한 효과가 관찰되지 않은 반면 중간용량군인 G4군에서만 각각 약 70%의 억제효과 ($p<0.05$)를 보여주었다(Table 2).

Table 2. Effect of *Protaetia brevitarsis* extract on lipid metabolism in the carbon tetrachloride treated rats.

Group(n)	Glucose (mg/dl)	T. Cho (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)
G1(6)	89.54±10.24	55.78±3.74	40.27±3.20	39.40±5.71	19.35±6.21
G2(6)	110.21±14.74	88.56±25.46*	78.15±9.47**	32.47±8.26	33.26±7.16*
G3(6)	102.34±8.75	76.34±20.43	71.42±7.17*	33.57±9.41	28.21±5.81
G4(6)	99.14±5.41	63.52±13.27 [#]	55.21±5.48 [#]	35.22±7.25	23.10±4.37 [#]
G5(6)	109.27±6.32	68.14±26.41	67.54±6.31	32.42±10.85	22.62±4.66

Values are mean ± S.D.(n=6) ** Significantly different from vehicle control, $p<0.05\sim0.01$ #Significantly different from CCl_4 alone, $p<0.05$. Abbreviations: T. Cho: total cholesterol, TG: triglyceride, HDL-C: high density lipoproteins-cholesterol, LDL: low density lipoproteins-cholesterol

3. 지질과산화에 미치는 영향

지질과산화에 미치는 효과에서는 지질과산화의 경우 정상대

조군 대비 사염화탄소-유도군 (G2)에서 약 1.6배 저용량군 (G3)에서는 1.5배 증가 ($p<0.05$)한 반면 중간용량 (G4)과 고용량군 (G5)에서는 증가하는 경향은 보이나 통계적인 유의성은 인정되지 않았다. SOD의 경우 G2군에서 약 1.5배로 유의하게 증가 ($p<0.01$)한 반면 G2군 대비 시험물질 투여군인 G3군과 G5군에서는 각각 71%, 69%로 유의하게 억제 ($p<0.05$)하였으나 G4군에서는 억제되는 경향은 보이나 통계적 유의성은 인정되지 않았다. Catalase의 경우 G1군 대비 G2군과 G3군에서 각각 1.2배 씩 유의하게 증가한 반면, G2군 대비 시험물질 투여군에서는 G4군과 G5군에서 약 88%의 유의한 억제효과 ($p<0.05$)를 보였다 (Table 3).

Table 3. Effects of *Protaetia brevitarsis* extract on the contents of TBARS and antioxidant enzymes in carbon tetrachloride treated rat liver.

Group(n)	TBARS (nmole/mg protein)	SOD (μ g/mg protein)	Catalase (IU/mg protein)
G1(6)	2.58±0.18	4.87±0.84	6.97±0.81
G2(6)	4.07±0.45*	7.42±1.17**	8.54±1.32*
G3(6)	3.87±0.52*	5.28±1.35 [#]	8.46±1.431*
G4(6)	3.46±0.62	5.97±0.97	7.07±0.97 [#]
G5(6)	3.57±0.73	5.16±0.69#	7.54±0.81 [#]

TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances; SOD, superoxide dismutase. ** Significantly different from vehicle control, $p<0.05\sim0.01$ #Significantly different from CCl_4 alone, $p<0.05$.

Table 4. Effect of *Protaetia brevitarsis* extract on the hepatic lesions, deposit and lipid droplet in carbon tetrachloride treated male rats

Groups	Cell necrosis	Destruction of lobular structure	Fatty change	Deposit, lipid droplet	Total
G1(6)	0	0	0	1	1
G2(6)	3	3	3	3	13
G3(6)	1	2	3	2	9
G4(6)	1	0	1	1	4
G5(6)	1	2	2	1	7

4. 조직의 형태학적 변화 및 지방침착에 미치는 효과

정상군에서는 간소엽, sinusoid 구조의 변성이나 중심정맥성 주위 변화, 담관 및 문맥 주위의 특이적인 변화는 관찰되지 않았다. 즉, 간세포들이 간소엽의 가장 자리를 향해 방사형으로 코드 모양의 배열을 보이는 반면 사염화탄소-유도군인 G2군의 경우 간세포가 팽윤되어 있었으며, 세포의 과염색상, 호산성 세포 징화 및 cytoplasmic vacuolation fatty metamorphosis, 세포 크기의 다양성 중심엽 지역의 sinusoid가 크게 증가되는 양상 등을 보였다. 한편 시험군인 G3군, G4군, 및 G5군에서는 G2군에서 보였던 여러 가지 유의한 소견들이 감소하는 양상을 보였다. 특히 G4군의 경우 약간의 염증성 소견과 일부 세포에서의 공포변성이 부분적으로 관찰되나 G3군과 G5군과의 비교에서는 유의하게 방어하는 것으로 관찰되었다 (Table 4, Fig. 1). 한편 지방염색의 경우 정상군에서는 간소엽에 미세한 지방방울이 국소적으로 관찰되는 반면, 사염화탄소-유도군(G2군)에서는 간세포 내 중증도의 지방방울이 전체에 걸쳐서 퍼져있는 것을 관찰할 수 있었으며,

저용량군인 G3군에서는 미세한 지방방울이 전체적으로 그리고 중간용량인 G4군과 G5군에서는 미세한 지방 방울이 국소적으로 관찰되는 것을 알 수 있었다 (Table 4, Fig. 2).

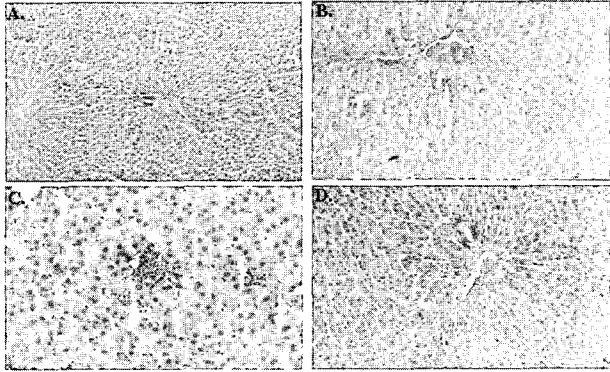


Fig. 1. Histological finding of rat liver tissues treated with carbon tetrachloride or *Protaetia brevitarsis* extract. Severe vacuolations and inflammatory cell infiltrations around sinusoid and portal triad are shown in carbon tetrachloride treated rats (G2) (B and C, x200 and x400 respectively), but these findings are reduced by *Protaetia brevitarsis* extract 100 mg/kg treatment (G4)(D). There are no lesions in the normal control (G1)(A). Hematoxylin and eosin stain, X200.

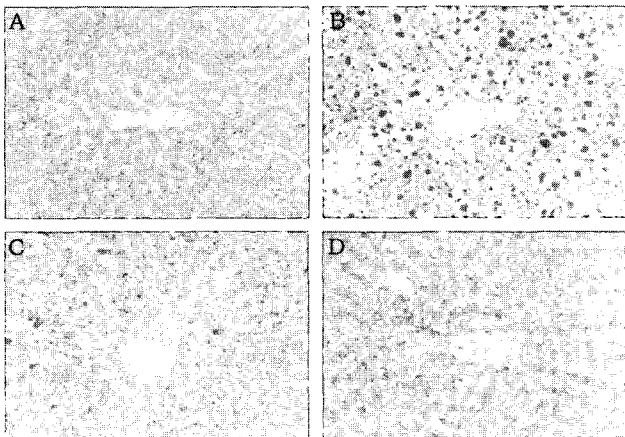


Fig. 2. Histological finding of rat liver tissues treated with carbon tetrachloride or *Protaetia brevitarsis* extract. A to D are shown mild (G1), severe (G2), moderate (G3), mild (G4) in deposits and lipid droplets of the hepatocytes, respectively. Red vesicle (black in this picture), positive: Oil red O stain, X200.

고찰

일반적으로 蠶螬는 민간요법에서 만성 간염이나 간암과 같은 각종 간 질환의 치료에 효과적인 것으로 알려져 있는데, 본 연구에서는 蠶螬의 주요 효과에 대하여 흰점박이꽃무지의 활성 성분대 대한 연구의 일환으로 에탄올 추출물 분획을 이용하여 간 기능 및 지질대사 개선효과에 대하여 조사하였다.

간 기능에 미치는 효과에서는 사염화탄소 단독투여군에서 정상군에 비해 혈청 중 간기능 지표인 AST 및 ALT에 모두 약 1.9배의 활성도를 보인 반면 시험물질인 PBE의 투여에 의하여 저용량과 고용량 투여군에서는 억제되는 경향은 보이나 통계적 유의성은 인정되지 않은 반면 중간용량 처리군인 G4군에서 각각

78%와 64%의 억제효과를 보였다. 이러한 결과는 조직학적 소견에서도 같은 양상을 보여 혈청학적 결과를 뒷받침하고 있음을 나타낸다(Fig. 1). 이러한 사실은 박 등¹¹⁾의 연구결과와 일치함을 나타낸 반면 이 등¹⁸⁾의 연구결과와는 상반된 결과를 보였다. 일반적으로 사염화탄소를 실험동물에 투여하면 혈청 내 효소들 (AST, ALT, ALP 등)의 활성도가 급격히 증가하여, 간 기능의 저하효과가 현저한 것으로 보고되고 있다¹⁹⁾. 특히 이 등¹⁸⁾의 연구결과에서는 사염화탄소 유도 시 AST와 ALT가 4.3배와 5.9배로 증가하였으나 본 연구에서는 1.2배에 그치는 결과를 보여 상당한 차이를 보였다. 이는 같은 종의 같은 주령으로 실험을 한다고 해도 사염화탄소에 의한 간 기능 지표의 활성도는 실험동물의 상태, 실험실의 환경, 투여경로 등 여러 가지 원인에 의하여 어느 정도는 차이가 있는 것으로 판단된다 (Table 1).

한편 지질대사에 미치는 효과에서 지방간을 유도하기 위해서는 사염화탄소와 에탄올을 병용 투여하는 것이 일반적인 방법이나 본 연구에서는 cholesterol, corn oil 그리고 lard를 이용하여 유도하였다. 유도 후 혈당에서는 유의한 변화가 관찰되지 않은 반면, 정상대조군 대비 사염화탄소와 고지혈사료를 병용 투여한 결과 사염화탄소 단독 투여군에서는 총콜레스테롤을 포함하여 중성지질 그리고 LDL-콜레스테롤에 있어서 1.7배, 1.9배, 1.7배로 각각 유의하게 증가한 반면 시험물질 투여군에서는 저용량군과 고용량군을 제외한 중간용량군인 G4군에서만 각각 약 70%의 억제효과 (p<0.05)를 보여 주었다 (Table 2). 이러한 결과는 조직학적 결과의 지방염색에서도 위의 혈청학적 결과를 뒷받침하고 있음을 보여 주었다 (Fig. 2).

강 등¹²⁾에 의하면 흰점박이꽃무지와 유사종인 점박이꽃무지 (*Protaetia orientalis*)를 흰쥐의 식이재료에 5%를 첨가하여 식이한 경우 에탄올에 의하여 증가된 중성지질과 총 콜레스테롤을 감소시켰으며, GOT와 GPT의 활성도 유의하게 감소시켰다고 보고하였다. 이는 에탄올에 의하여 유도된 지질관련 지수와 시험물질에 의하여 억제된 효과 또한 유사한 결과를 보여주었다¹²⁾. 반면 이 등¹⁸⁾의 연구에서는 같은 종임에도 불구하고 본 연구결과와 상반된 결과를 보였다. 이는 추출방법과 투여용량에 기인한 것으로 생각된다¹⁸⁾. 본 연구에서 처음으로 사염화탄소에 의한 간 손상 유도 시 지방간 및 고지혈의 유도방법으로 cholesterol, corn oil 그리고 lard를 사용하였는데, 혈중 지질농도와 간 조직에서의 지방의 침착 등 여러 가지 변화에서 에탄올 병용투여에 의한 결과와 큰 차이점이 없었다. 일반적으로 알코올에 의한 지방간 또는 혈중 지질대사의 변화보다는 음식물에 의한 변화의 요인이 크다고 생각된다. 앞으로 이에 대한 추가적인 연구가 요구되어 진다.

사염화탄소에 의한 간 손상 유도 시 지질과산화의 지표인 MDA 수준이 일반적으로 증가되는 것으로 알려져 있다. 지질과산화는 신체 내 산화적 스트레스로 인한 자유기의 생성증가 및 항산화적 방어능력의 감소로 일어난다²⁰⁾. 본 연구에서도 사염화탄소 단독투여군과 저용량군에서 측정된 결과 1.6배 그리고 1.5배 씩 증가하여 선행된 여러 연구들과 일치하는 결과를 보였다^{11,12,18,19)}. 반면, 시험물질에 의한 억제효과는 관찰되지 않았다. 이는 이 등¹⁸⁾의 연구결과와 일치함을 보여 주었다¹⁸⁾.

사염화탄소 단독 투여군의 SOD 활성도는 약 1.5배의 증가를 보였다. 시험물질 투여군에서는 G3군과 G5군에서 각각 71%, 69%로 유의하게 억제된 ($p < 0.05$) 반면 G4군에서는 억제되는 경향은 보이나 통계적 유의성은 인정되지 않았다. SOD는 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키는 효소로서 생체내의 해독 체계 중의 하나이다. SOD의 활성도가 사염화탄소 단독 투여군에서 증가한 것은 사염화탄소 투여로 생성된 활성산소($O_2 \cdot$)를 소거시키려는 생리적인 작용으로 여겨진다¹⁹⁾. 따라서 시험물질의 투여로 G3군과 G5군에서 71%, 69%로 각각 억제된 것은 시험물질의 투여로 인하여 활성산소의 생성이 어느 정도 억제되었기 때문인 것으로 생각된다. 또한 catalase의 경우 정상군 대비 G2군과 G3군에서 각각 1.2배 씩 유의하게 증가한 반면, 사염화탄소군 대비 시험물질 투여군에서는 G4군과 G5군에서 약 88%의 유의한 억제효과 ($p < 0.05$)를 보였다.

Catalase는 간에 가장 많이 존재하며, 체내에서의 지방의 자동산화 및 유기물의 산화로 생긴 H_2O_2 를 분해하여 무독화시키는 free radical scavenging 효소 중의 하나이다¹⁹⁾. 본 연구의 결과에서 보듯이 사염화탄소의 투여에 의하여 catalase의 활성도가 증가한 것은 H_2O_2 와 같은 free radical이 사염화탄소 투여로 인해 생성된 것으로 판단되며, 반대로 시험물질 투여에 의하여 catalase의 활성도가 억제된 것은 간의 기능이 어느 정도 회복되었다는 것으로 해석될 수 있다. 반면 G3군에서의 결과는 사염화탄소에 의하여 간 손상이 심했음을 나타내고 있다. 이는 혈청에서의 AST/ALT의 결과로 해석될 수 있는데, 혈청학적 지표와 catalase에 대한 변화는 이 효소가 수소이온 농도가 높을 때 주로 작용하므로 간 손상에 대한 차이는 catalase의 활성도에 영향을 주지 못하는 것으로 생각된다.

지금까지의 결과를 종합하여 볼 때, 박¹¹⁾과 강 등¹²⁾의 연구에서는 참점정풍뎡이와 점박이꽃무지 등에 의하여 간기능 보호효과와 지질대사의 개선효과를 주장한 반면 이 등¹⁸⁾의 연구에서는 본 연구와 동일한 흰점박이꽃무지를 이용하여 간기능 및 간의 이물질대사기능에서 유의한 효과가 없는 것으로 보고하였다. 이러한 차이는 시료 물질의 추출과 투여 방법 그리고 용량 등에 의한 것임을 시사하고 있는데, 본 연구에서는 저용량과 고용량에 비해서 중간용량인 100 mg/kg의 농도에서 가장 효과가 있는 것으로 나타났다. 한편 흰점박이꽃무지 추출물에 대한 급성경구독성²¹⁾과 아만성독성시험²²⁾에서 독성이 없음이 보고된 바 있다. 이러한 결과와 함께 오래전부터 鱗鱓가 민간요법을 포함한 한방에서 널리 이용되어져 왔고 또한 현재에도 이용되고 있음을 볼 때, 이들 효과에 대하여 시료 물질의 추출과 처리, 투여경로 및 투여용량 등에 대한 보다 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 판단된다.

결 론

사염화탄소(CCl_4)에 의해 간 손상을 유도시키고, cholesterol, corn oil 그리고 lard 등 고지혈 사료에 의해 지방간 및 고지혈증을 유도시킨 랫드에서 흰점박이꽃무지 추출물 (PBE)에 대한 간 보호기능과 지질대사 개선효과를 조사하였다. 간기능의 대표적

인 지표인 AST/ALT와 지질대사의 지표인 cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol이 증가된 실험동물군에서 시료 물질의 투여로 인하여 SOD와 catalase의 활성도가 free radical의 생성을 감소시킴으로 흰점박이꽃무지 추출물이 간 보호기능과 더불어 지질대사개선에 통계적으로 유의한 효과가 있는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 바이오그린21 사업 (과제번호 20050301-034-474-116-02-00)에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. Lee, J.W., Jeong, H., Han, M.D., Back, S.J., Kim, Y.S., Kang, S.M. Effect of G009 on CCl_4 -induced hepatic injury and lipid peroxidation in rats. Korean. J. Pharmacology., 27(3): 159-166, 1996.
2. Cho, J.H., Sin, J.S., Kim, E.J., Shin, S.h., Jang, J.Y., Shin, K. S., Kim, Y.B., Kang, J.K., Hwang, S.Y. Protective effect of Lycii fructus Extract against Hepatotoxicity induced by Carbon Tetrachloride. Korean J. of the Lab. Anim. Sci., 20(2):187-193, 2004.
3. Sherlock, S. and Dooley, J. Diseases of the Liver and Biliary System, 10th ed., Oxford, Blackwell Science Press, pp 303-384, 1997.
4. Klaassen, C.D., Casarett and Doull, Toxicology. The Basic Science of Poisons, 6th ed., New York, McGraw-Hill, pp 107-132, 471-489, 887, 2001.
5. Anthony, P.P., Ishak, K.G., Nayak, N.C., Poulsen, H.E., Scheuer, P.J. and Sobin, L.H. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature and classification. Bull. World Health Organ. 55, 521-540, 1977.
6. Anthony, P.P., Ishak, K.G., Nayak, N.C., Poulsen, H.E., Scheuer, P.J. and Sobin, L.H. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. J. Clin. Pathol. 31, 395-414, 1978.
7. Tamayo, R.P. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl_4 an adequate model of human cirrhosis?. Hepatology 3, 112-120, 1983.
8. Brattin, W.J., Glende, E.A., Jr. and Recknagel, R.O. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. Free Rad. Biol. Med. 1, 27-38, 1985.
9. Williams, A.T. and Burk, R.F. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. Sem. Liver Dis. 10, 279-284, 1990.
10. 신민교. 원색임상본초학, 서울, 영림원, p 482, 1991.

11. Park, S.R., Yoon, S.H., Cha, S.E., Kim, B.H., and J-S. Choi. Effect of *Holotrichia diomphalia* bates on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *J. of Korean Soc. Hygienic Sci.* 4(2):27-37, 1998.
12. Kang, I.J., Kim, H.K., Chung, C.K. Kim, S.J., Oh, D. Effect of *Protaetia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rat. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29(3):479-484, 2000.
13. Bansal, S.K., Love, J., Gurtoo, H.L. High pressure liquid chromatographic separation of multiple forms of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* 117, pp 268-274, 1983.
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the foim phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275, 1951.
15. Buege, J.A., Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-310, 1978.
16. Lee, D.W., Yu, B.P. Modulation of free radicals and superoxide dismutase by age and dietary restriction. *Aging Clin Exp Res.* 2, 357-362, 1990.
17. Aebi, H. Catalase in vitro. In *Method in Enzymology*, Academic Press, New York, pp 121-126, 1984.
18. Lee, H.C., Hwang, S.G., Kwang, Y.K., Sohn, H.O., Moon, J.Y., Lim, H.B., Jeon, B.H., Lee, D.W. Influence of *Protaetia brevitarsis* extract on liver damages induced by carbon tetrachloride and ethanol in rats. *Korean J. of Life Sci.* 11(5):405-414, 2001.
19. Na, H.Suk., Kim, K.S., Lee, M.Y. Effect of jujube methanol extract on the hepatotoxicity in CCl4-trated rats. *J. of Korean Soc. Food Sci. Nautr.* 25(5):839-845, 1996.
20. Howard, J.A. Absolute rate contents for reaction of oxyl radicals. *Adv. Free Chem.* 4, 49-51, 1972.
21. Lee, H.C., Hwang, S.Y., Hwang, S.K., Jeon, B.H., Lee, D.W. Acute oral toxicity of *Protaetia brevitarsis* homogenate in rats. *Korean J. Oriental medical physiology & pathology.* 15(4):543-547, 2001.
22. Hwang, S.Y., Lee, Y.G., Hwang, S.K., Lim, H.B., Kim, Y.I., Jang, K.H., Jeon, B.H., Lee, D.W., Lee, H.C. Subchronic toxicity of *Protaetia brevitarsis* in rats. *Korean J. Oriental medical physiology & pathology.* 15(5):703-707, 2001.