

## 간 손상으로 유도된 랫드에서 MSE가 활성 변화와 분자생물학에 미치는 영향

예춘정<sup>1\*</sup>, 이태종<sup>2</sup>

<sup>1</sup>계명문화대학교 보건학부, <sup>2</sup>대구파티마병원

### Effect of MSE on Activity and Molecular Biology in Rat Induced Liver Injury

Chun-Jung Yea<sup>1\*</sup>, Tae-Jong Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Public Health, Keimyung college

<sup>2</sup>Department of Pathology, Daegu Fatima Hospital

**요 약** 본 실험은 건강기능식품의 원료로 이용되고 있는 식품들을 혼합하여 열수 추출한 추출물(시료추출물, MSE)이 간 손상의 예방 및 치료와 관련된 건강기능성 영양식품으로서의 활용 가능성을 확인하고자 사염화탄소에 의한 랫드의 간 손상을 간경화 수준의 60%로 유발시켜 추출 물질의 투여에 따른 간 질환 개선에 미치는 영향을 분석하였다. 혼합수추출물(MSE)의 용량은 군별 다르게 투여 하여(0.50ml, 0.75ml), 간 손상된 랫드에 미치는 생리활성 기능과 생화학적 기능 및 분자생물학적 TGF- $\beta$ , P53을 측정하여 혼합추출물의 투여 후 기능 변화를 분석 하였다. 실험은 정상군, 대조군, 양성대조군, 실험군1, 실험군2 군으로 하여 군당 6마리씩 총 30마리를 이용하였고, 지정된 용량으로 1일 1회 일정한 시간대에 주 6회씩 6주간 적용 후 처치하였으며, 실험 결과는 정상군과 양성대조군에 비하여 대조군에서는 통계적으로 유의성 있게 높았으며, 실험군(1, 2)에서는 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 낮아졌으며, 정상군과 양성대조군 비교에서도 실험군과 유사한 결과가 나타났다. 실험군(1, 2) 간 비교에서 유의한 차이는 일부 있었으나 유의성 있는 많은 변화가 나타나지 않았다. 이상의 실험결과를 종합해 보면 기능성 식품으로 활용 가능성이 있을 것으로 판단되고 생리활성 변동과 간 분자생물학적 발현 정도를 동일 분야 연구에 활용이 될 것으로 사료 된다.

**Abstract** The purpose of this experiment is to investigate the feasibility of extracts (sample extract, MSE) mixed with hot - water extracts as health functional nutritional foods for prevention and treatment of liver damage. The experimental method was to investigate the effects of carbon tetrachloride on liver damage in rats by 60% of liver cirrhosis level. The effect of mixed extracts (MSE) was investigated by measuring the physiological functions, biochemical functions, and molecular biologic TGF -  $\beta$  and P53 levels in liver - injured rats. with MSE doses administered differently(0.50ml, 0.75ml). A total of 30 rats were used for normal group, control group, positive control group, experimental group 1, and experimental group 2. The rats were given 6 times a week for 6 weeks at a fixed time once a day. The results of the experiment were statistically significantly higher in the control group than in the normal group and the positive control group, and statistically significantly lower in the experimental group (1 and 2) than the control group. There were some significant differences in the comparison between the experimental groups (1 and 2), but no significant changes were found. In conclusion, the results of this study are expected to be useful as functional food, and the variation of physiological activity and the degree of liver molecular biotechnology will be used for the research of the same field.

**Keywords** : liver, physiologically, tetrachlorid, biochemical, molecular biology

본 논문은 2018학년도 계명문화대학교 교내연구비 지원으로 이루어졌음.

\*Corresponding Author : Chun-Jung Yea(Public Health, Keimyung college)

Tel: +82-53-589-7591 email: yeal023@hanmail.net

Received October 31, 2018

Revised (1st January 3, 2019, 2nd January 22, 2019)

Accepted February 1, 2019

Published February 28, 2019

## 1. 서론

사회적으로 경제와 의학이 발달함으로 삶의 질에 대한 인식이 높아지고 건강한 식이 영양에 대한 관심과 섭취량도 증가하고 있는 실정이다. 이로 인한 영양섭취의 불균형으로 간 대사의 부작용으로 고지혈증, 지방간, 당뇨질환 및 성인 합병증 또한 증가하는 추세이며[1,20] 이와 더불어 좋은 식이에 대한 기대와 삶의 만족도에 대한 기대치가 매우 커지고 있다[2]. 흔히 접하는 식이의 종류 성분에 따라서 생체에 여러 기능을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 담당하고 있다. 균형 있는 좋은 영양식은 인체에 도움이 되지만 과도한 식이로 인해 성인병 및 지방간과 섬유화로 이어지면서 질병으로 건강을 해치고[3] 이로 인해 인체의 장기는 여러 경로를 통하여 질병을 유도하게 되므로[2,4], 이러한 질병을 감지한 후 세포들이 면역작용을 발생시킴으로 인체에 도움이 될 수 있는 좋은 식이가 매우 중요한 역할을 한다[5]. 면역분열 활성을 증가시키는 작용을 하게 되면 교감신경계를 활성화시키게 되고 이것에 의해 부신수질에서 아드레날린과 노르아드레날린을 방출하게 되고 이런 물질들은 혈액을 타고 전신에 퍼져서 각장기와 뇌에 영향을 미치게 된다[2,6]. 간성 장애의 기능 저하의 원인으로 비만, 성인병[7], 만성염증성 질환[8] 등의 다양한 원인으로 발생되며 주 증상은 사회생활의 기능적 장애를 초래하여 사망한다. 기능장애를 일으킨 질병에 따라 비수술적 치료를 하는 경우도 많지만 여러 가지 수술적 치료 후에도 식이 부분이 많이 차지하는 실정이다[9]. 요즘은 좋은 식이가 수술적 치료와 재활치료에도 효능이 있는 것으로 밝혀지면서 많은 연구가 활발히 이뤄지고 있다[7,10,21]. 간은 인체장기의 가장 큰 부분으로 주로 독성해독과 분비작용을 담당한다. 사염화탄소는 유지 및 고무 등의 용제에 이용되는 xenobiotics의 일종으로 microsomal mixed function oxidase에 의해 생성되는 trichloromethyl radical의 막이 지질과산화 반응 촉진 및 막 구조와 기능 파괴 등을 초래하여 간 손상을 시키는 대표적인 간 손상 유발 물질로 알려져 있으며 투여회수 및 용량에 따라 지방간 및 간 손상 정도가 달라지며, 유발 시킨 후 투여 물질의 효능 연구에도 많이 이용되고 있다[11,12,14,20]. 본 연구에 이용한 종합 추출시료(꾸지뽕, 마늘, 아로니아, 사과, 검은콩 및 와송)들은 무 농약 재배된 국내산 농산품으로 그 주요성분들이 강한 항산화 및 항염증[8] 작용이 있어 비만[13], 고지혈, 동맥경화증 및 고혈압과 당뇨병 등과 같은 성인병 뿐만 아니라 간

질환의 급성, 만성 염증[14] 및 암의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이에 본 실험은 건강기능식품의 원료로 이용되고 있는 식품들을 혼합하여 열수 추출한 추출물(6종의 혼합 시료추출물, MSE)이 간 손상의 예방 및 치료와 관련된 건강기능성 식품으로서의 활용 가능성을 확인하고자 사염화탄소에 의한 랫드의 간 손상을 유도하여 생리활성 기능 변화와 분자생물학적 발현 정도를 측정함으로써 동일 분야 연구에도 활용될 수 있을 것으로 사료 되어 간 질환 개선에 미치는 영향을 분석하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 기기 및 시약

실험기기로는 homogenizer(IKA, T25 basic, Malaysia), mini centrifuge(Hitachi, MIKRO 200R, Japan), electronic balance(Sartorius, CP224S, Germany), Microtome(Leica, RM2235, Germany)을 사용하였다. 그 외 일반시약들은 특급품을 사용하였다. 시료추출은 초고속 감압 저온 추출기(COSMOS-660, Korea)를 사용하였다.

조직의 분자학적실험의 관찰은 Olympus BX61 light microscope(Olympus, Japan), ProgRes C14 plus digital camera system(Olympus, Japan)을 사용하였다.

### 2.2 혼합 시료추출물 (Mixed sample extract, MSE) 조제

오동농원 (경북 영천)에서 구입한 꾸지뽕 (*Cudrania tricuspidata*), 마늘 (*Allium sativum*), 아로니아 (*Aronia unifolia*), 사과, 검은콩 (*Black soybean*), 와송 (*Orostachys japonica*) 등 6종의 시료(MSE)를 세척하고 건조한 다음 혼합 시료 각 200g씩 혼합시료 총 1.2kg에 물 10 l를 가하여 초고속 감압 저온추출기로 60분간 열수 추출한 후 1.0 l로 농축하여 26°C에서 일주일간 발효 숙성 후 동결건조 하여 1일 투여량씩 진공 파우치 포장하여 냉장보관 하였다. 수율(yield rate)은 11.10%였다.

### 2.3 실험동물 및 시료처치

간 손상 모델의 제작에 사용하는 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>, Sigma Co.)의 투여량은 본 실험 개시 전 5주령(180~200 g)된 수컷 랫드를 대한바이오링크(주)에서 30마리를 구입하여, 간 손상 60%로 설정하여 체중 kg당 0.50

ml(0.23 g/kg/day), 1.0 ml(0.46 g/kg/day), 1.25ml(0.69 g/kg/day) 예비실험을 실시하여 투여용량을 사염화탄소를 mineral oil 에 1 : 1의 비율로 희석하여 체중 kg당 1.0 ml(0.46 g/kg/day)로 선택하여 대조군, 양성대조군, 실험군 E1, E2군에는 1일 1회 격일간격으로 5회 복강내 주사하여 간 손상을 유발하였고 정상군은 Saline을 투여하였다.

혼합추출물(MSE)은 예비실험에서 g/kg/day를 기초하여 간 손상이 유발된 랫드의 실험군(1, 0.50ml), 실험군(2, 0.75ml) 지정된 용량으로 1일 1회 일정한 시간대에 주 6회씩 6주간 경구투여용 주사기를 사용하여 경구 투여하였다. 정상군 및 대조군은 동량의 생리식염수 (0.25ml/kg BW/day)를 경구 투여하였다.

양성대조군에는 간 치료제로 널리 사용되는 Silymarin(SM, Madans AG, Germany)을 Ferenci의 실험[16] 표준용법 g/kg에 맞추어 0.50 ml(0.60 g/kg /day)의 용량으로 sonde를 이용하여 경구 투여하였다. 실험동물은 정상군, 대조군, 양성대조군, 실험군 E1, E2, 5개 군으로 나누어 각 군마다 SD 랫드 6마리씩을 임의로 배치하여 본 실험에서는 총 30마리를 사용하였다.

#### <실험군의 분류>

정상군(Normal, N): saline(0.25 ml/kg /day).

대조군(Control, C): CCl<sub>4</sub> 투여 후 + saline 0.25 ml(g/kg BW/day).

양성대조군(Positive. PC: CCl<sub>4</sub> 투여 후 + SM 0.50 ml(0.60 g/kg BW/day)

실험군 1(Experimental 1, E1): CCl<sub>4</sub> 투여 후 + MSE 0.50 ml(0.60 g/kg BW/day).

실험군 2(Experimental 2, E2): CCl<sub>4</sub> 투여 후 + MSE 0.75 ml(0.90 g/kg BW/day).

실험동물의 처치는 12시간 절식시킨 후, ether 마취 하에서 개복하여 채혈한 다음 간문맥을 통하여 생리식염수를 관류시킨 후 각 장기를 적출하여 무게 측정하였고, 장기의 일부는 조직학적 변화를 관찰하기 위해 10% 포르말린 용액에 고정하였다. 나머지 각 장기들은 -80℃에 보관하여 분자생물학적 분석에 사용하였다.

## 2.4 체중, 음수량 및 식이량, 식이효율 측정

체중, 음수량 및 식이량, 식이효율 을 매주 1회 오전

의 일정한 시간대에 측정하였다.

## 2.5 생화학적 기능 분석

채혈된 혈액을 vacuum tube(Greiner, Austria)에 담아 1시간 실온에 방치하고 3,000rpm으로 10분간 원심분리 (Hanil. Co., HRT-60IV, Korea) 후 얻은 혈청을 자동생 화학분석기(UniCel™ DxI 800, BECKMAN COULTER, USA)를 이용하여 AST, ALT, ALP, TG, Total cholesterol, LDH를 측정 하였다.

## 2.6 간 조직의 분자생물학적 관찰

### 2.6.1 RNA 추출

-80℃에서 냉동 보관하였던 간 조직을 액화질소에 담 아 이송한 후 얼음으로 저온을 유지시키며 조직 50mg당 1ml의 Trizol(Invitrogen, New Zealand)을 첨가하여 조직을 마쇄하고 실온에서 5분간 incubation시킨 후 chloroform 200μl를 첨가하여 실온에서 3분간 방치 후 15,000rpm, 4℃, 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 취한 후 isopropyl alcohol을 500μl 첨가한 다음 15,000rpm, 4℃, 15분간 원심분리 후 상층액은 제거하고 70% ethanol 1ml을 첨가하여 RNA pellet을 washing 하고 15,000rpm, 4℃, 2분간 원심분리 하여 나온 상층액은 제거하고 남은 RNA pellet을 건조 후 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 희석하여 260nm에서 OD값을 측정하여 RNA를 정량하였다. 280nm에서 OD 값을 측정하고 absorbance ratio(A260/A280)가 1.8~2.0 사이인 지 확인하였다.

### 2.6.2 cDNA 합성

BioNEER사의 CycleScript RT PreMix(dT20) kit에서 제공하는 protocol에 따라 total RNA 양이 0.1~1μg/μl가 되도록 RNA sample을 넣고 DEPC를 20μl까지 채운 후 30℃에서 1분간, 50℃에서 4분간 12 cycle 반응시키고 95℃에서 5분간 가열하여 반응을 종결시켰다.

### 2.6.3 Real-time RT-PCR

Roche사의 AccuPower™ PCR PreMix kit를 구입하여 사용하였다. Template 2μl, forward primer와 reverse primer(10pmole/ℓ, BioNEER, Korea)를 각각 1.4μl, 멸균된 증류수 15.2μl를 섞고 PCR 반응(Bio-RAD, Mycycler™ thermal cycler, USA)을 실시하였다. Primer

는 대조군으로 GAPDH(57°C, 35 cycle), 실험군으로 TGF-β(60°C, 35 cycle), P53(60°C 35 cycle)를 사용하였으며 사용된 primer들의 염기서열은 Table 1과 같다.

Table 1. Nucleotide sequence of the primers

Items	Primers		Expected size(bp) <sup>3)</sup>
GAPDH <sup>1)</sup>	Forward (5'→3')	GCCACTAACATCAAATGG GG	487
	Reverse (5'→3')	TCACATTGGGGGTAGGAA CA	
TGF-β <sup>2)</sup>	Forward (5'→3')	CATGGACCTGCTGGTCCT C	367
	Reverse (5'→3')	CTGCATCTCTCACCTTGT TCG	
P53	Forward (5'→3')	TCGAAGCGAGATCTTCAA GAAGA	387
	Reverse (5'→3')	ATTCTGACGGTGACAGA GC	

<sup>1)</sup>GAPDH: Glycerinaldehyde-3-phosphate dehyd rogenase

<sup>2)</sup>TGF-β: Transforming growth factor\_beta

<sup>3)</sup>bp: basepair

## 2.6 통계처리

SPSS 20.0 for windows(SPSS Inc. USA)를 이용하여 정상군(N), 대조군(C), 양성대조군(PC), 실험군(E1, E2)간의 차이를 비교하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 각 그룹 간의 차이를 검정하기 위해 Duncan's multiple range test를 이용하여 a, b, c, d로 사후분석을 하였다. 통계학적 유의 수준은 p<0.05로 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 체중, 음수량 및 식이량, 식이효율 측정

기초대사율을 보기위한 체중, 식이량, 음수량 및 식이효율을 측정된 결과는 Table 2와 같다.

음수량은 대조군이 정상군에 비하여 낮았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p<0.05), 식이량, 체중증가량, 식이효율은 대조군이 정상군, 양성대조군, 실험군(E1, 20.7, 28.2, 10.0) %, 실험군(E2, 20.2, 25.0, 11.0) %에 비해 유의성 있게 낮았으며(p<0.05), 실험군간 비교에서는 체중, 식이량, 음수량 및 식이효율이 유의한 차이가 없었다. 정상군과 비교에서는 유의한 차이가 없었으나 대조군에 비해서 통계적으로 유의한 차이가 있었다

(p<0.05), 본 실험의 생리활성 결과를 볼 때 Abdullah 등은 성장기 랫드에서 마늘추출물을 체중 kg당 100 mg을 3개월간 투여하여 체중의 증가가 억제됨을 보고한 사례와[18], 본 실험의 대조군의 결과와 유사하였고, Vimal와 Sheela는 alloxan으로 유도된 당뇨병 랫드에서 식품을 매일 200mg/kg의 용량으로 3개월간 투여하여 체중 감소현상이 있는 것으로 보고하였다[6.19]. 그러나 종합추출물의 섭취량에 따라 랫드에서 체중의 증가가 있었다는 보고와[10], 랫드에 구지뽕, 검은콩, 호박 추출물을 3주간 투여하여 유의하게 기능이 증가되었다는 보고도 있다[11.12]. 이를 볼 때 간 손상 시 체중증가를, 식이효율이 낮게 나타난 점은 사멸화탄소에 의하여 중심장기인 간세포의 직접적인 손상으로 인하여 생리활성 대사산물의 억제와 조직기능 합성 등이 영향을 받았기 때문으로 사료된다.

### 3.2 혈청의 생화학적 분석

적출한 간 조직의 생화학적 실험의 측정 결과는 Table 3와 같다. 간세포 손상 지표인 AST, ALT, ALP, LDH, TG, cholesterol 결과는 대조군에서는 정상군에 비해 AST, ALT, ALP, LDH, TG가 유의하게 증가하여 간독성을 보였으며(p<0.05), 양성대조군에 비해 유의하게 회복을 보였다. Cholesterol은 모든 군에서 유의성이 없었다. 실험군(E1, E2)은 대조군에 비하여 AST(15.5, 15.1), ALT(44.2, 47.5), ALP(30.0, 27.0), TG(34.5, 34.4), LDH(24.0, 25.1) %가 정상군 수준으로 유의하게 감소하여 간 독성 회복을 보였다. 실험군(E1, E2) 별 비교에서는 AST, ALT, ALP 모두 E1>E2 순으로 회복을 보였다. TG, LDH는 실험군별 유의성이 없었다. 생화학적 실험을 볼 때 추출물을 투여한 실험군(E1, E2)이 대조군에 비해 간 손상 회복이 빠르게 나타남을 확인 하였다. 선행 연구를 볼 때 랫드에서 아로니아 분말 투여로 만성 염증성 질병, AST, ALT의 감소하였다는 보고와[8.11], 간경화로 유도된 쥐 실험에서 호박 추출물이 AST, ALT을 낮추어 간독성을 저하 시킨다는 보고[12]와 급성과 만성 염증성 지방간에서 건강한 식생활의 삶을 유지 할 때 ALT 및 지방이 줄어들었다는 보고와[15] 중성지방과 콜레스테롤은 환경과 여건에 따라 변 할 수 있다는 보고도[17] 있으며 선행 연구를 볼 때 일부는 일치하고 일부는 불일치하는 결과로 보아 종합추출물의 용량과 투여량이 중요한 인자임을 통계적으로 알 수 있었

Table 2. Water intake, food intake, body weight gain food and efficiency ratio of CCl<sub>4</sub> in rats treated with mixed sample extract (MSE).

Group	Normal	Control		Experimental	
	N	C	PC	E1	E2
Water intake (ml/day)	50.21±1.47 <sup>a</sup>	46.72±2.03 <sup>a</sup>	50.34±1.63 <sup>a</sup>	49.53±4.15 <sup>a</sup>	49.36±2.41 <sup>a</sup>
Food intake (g/day)	29.83±0.51 <sup>b</sup>	24.92±1.31 <sup>a</sup>	30.35±1.22 <sup>b</sup>	30.29±2.08 <sup>b</sup>	30.11±1.52 <sup>b</sup>
Body weight gain(g/day)	6.75±0.31 <sup>b</sup>	5.44±0.64 <sup>a</sup>	6.27±1.26 <sup>b</sup>	6.73±0.14 <sup>b</sup>	6.51±0.38 <sup>b</sup>
Food efficiency ratio <sup>1)</sup> (%)	24.27±1.21 <sup>b</sup>	21.35±1.22 <sup>a</sup>	24.63±1.38 <sup>b</sup>	23.99±1.80 <sup>b</sup>	24.15±0.62 <sup>b</sup>

Values are mean±S.D of 6 rats.

<sup>1)</sup>Feed efficiency ratio(%) = (Body weight gain / Feed intake) × 100

Values with different superscripts are significantly different (p<0.05) compared to the C group by ANOVA and Duncan's multiple range test.

Table 3. Effect of MSE extracts on the serum levels of AST, ALT, ALP, TG, CHOL and LDH activity of CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats.

Group	Normal	Control		Experimental	
	N	C	PC	E1	E2
AST	167.3±5.6 <sup>a</sup>	205.2±2.1 <sup>d</sup>	167.8±7.0 <sup>ab</sup>	175.3±2.6 <sup>bc</sup>	174.5±2.4 <sup>bc</sup>
ALT	42.7±17 <sup>a</sup>	79.3±5.13 <sup>d</sup>	41.6±4.29 <sup>a</sup>	45.9±3.5 <sup>c</sup>	44.1±1.8 <sup>ab</sup>
ALP	231.4±16.4 <sup>a</sup>	352.2±56.3 <sup>d</sup>	243.6±26.3 <sup>a</sup>	252.1±41.7 <sup>a</sup>	276.8±13.3 <sup>b</sup>
TG	41.2±4.1 <sup>a</sup>	62.3±6.5 <sup>b</sup>	39.9±6.1 <sup>a</sup>	40.3±5.21 <sup>a</sup>	40.1±3.4 <sup>a</sup>
CHOL	34.5±2.5 <sup>a</sup>	35.0±1.1 <sup>a</sup>	35.1±4.0 <sup>a</sup>	34.3±8.2 <sup>a</sup>	34.2±3.5 <sup>a</sup>
LDH	5782.7±321.7 <sup>a</sup>	7868.4±426.5 <sup>b</sup>	5715.1±359.1 <sup>a</sup>	5982.7±428.2 <sup>a</sup>	6032.3±271.4 <sup>a</sup>

Values are mean±SD of 6 rats, unit: IU.

Values with different superscripts are significantly different (p<0.05) compared to the C group by ANOVA and Duncan's multiple range test.

Table 4. Effect of MSE extracts on hepatic TGF-β, P53 activity of CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats.

Area	N	C	PC	E1	E2
Total (μm <sup>2</sup> )	6,651.3±230.5	7,599.4±512.4	6,596.8±351.2	7,135.1±421.2	7,152.5±310.8
TGF-β protein (μm <sup>2</sup> )	154.4±36.2	463.2±52.7	187.4±22.5	274.7±35.2	259.6±12.3
% of TGF-β protein	2.4±0.3 <sup>b</sup>	6.1±0.2 <sup>c</sup>	1.9±1.3 <sup>a</sup>	2.5±3.2 <sup>b</sup>	2.6±0.2 <sup>b</sup>
P53 protein (μm <sup>2</sup> )	114.4±31.4	411.2±32.6	101.9±12.6	120.1±30.4	119.7±25.4
% of P53 protein	2.1±0.2 <sup>b</sup>	5.7±0.2 <sup>c</sup>	1.5±3.8 <sup>a</sup>	2.3±1.1 <sup>b</sup>	2.2±4.3 <sup>b</sup>

Values are the means±SD of 6 samples.

Groups are the same as described in Table 1.

Values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

다. 또한, Bai 등은 담관 손상으로 담즙분비 억제로 유도된 랫드에서 전통적으로 많이 사용되는 마늘추출물을 투여하여 AST, ALT, LDH가 현저하게 회복되었음을 보고한 사례들과도 유사하였다[5.14]. 이러한 보고들의 유사함을 볼 때 종합추출물은 간 손상의 회복과 생리활성의 기능 작용 등의 효과에 영향이 미칠 것으로 판단되어 진다.

### 3.3 간 조직의 분자생물학적 관찰

본 실험에서 적절한 간 조직의 분자생물학적 유전자 발현량의 측정 결과는 Table 4와 같다. *real-time RT-PCR*을 이용하여 평가한 결과 TGF- $\beta$ , P53의 mRNA 발현량은 대조군에서는 정상군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 발현량을 확인하였다( $p < 0.05$ ). 실험군(E1, E2)은 대조군에 비하여 TGF- $\beta$ (141.0, 134.0) %, P53(136.0, 137.1) %가 각각 낮았으며( $p < 0.05$ ), 실험군(E1, E2) 비교에서는 TGF- $\beta$ , P53의 mRNA 발현량은 통계적으로 유의한 차이는 없었다. Abdallah[18] 등에 따르면 thioacetamide로 장기 및 간 손상 유도된 랫드의 DREB, P53의 mRNA 발현량 측정에서 hepatocyte growth factor formation에 따라서 발현량이 다르게 나타난다는 보고와, Sheela 등[19]은 당뇨질환으로 유도된 동물 실험에서 마늘추출물이 DREB, P53 및 TGF- $\beta$  1, 의 발현량이 투여 시간이나 조건에 따라 다르게 발현된다는 보고와, 간의 급성, 만성염증 반응 일 때 TGF- $\beta$ , IL-6 및 TNF $\alpha$  인자는 부착 단백질 신호전달체계를 관여하는 중요한 전사조절인자로 알려져 있다[7.19]. 사업화탄소로 유도된 실험에서 TGF- $\beta$ 가 증가되어 단백질 침착이 일정하게 발현되었다는 보고가 있고[3.13], 또한 Choi[2] 등은 TGF- $\beta$ , P53 단백질이 위치한 간세포에서는 서로 밀착되어 강하게 발현되는데 이는 간세포가 많이 부서졌다는 것을 나타낸다고 하였다.

McCay 등의 실험을 볼 때[11], 본 실험에서 혼합 추출물의 용량에 따라서 다르게 발현되는 부분이 유사하였다. 이는 추출물의 성분, 용량에 따른 발현량이 차이가 난다는 선행 연구와도 유사 하였으며[1.19], 간 조직의 염증 유발 시에 성분에 따라서 분비촉진, 결합조직의 기능유지 등에 많은 영향이 미친다는[14] 선행 사례로 볼 때, 본 실험의 혼합추출물이 간 조직의 기능 회복에도 영향이 있음을 분자생물학 발현 실험으로 확인 할 수 있었다.

## 4. 결 론

본 연구는 간 손상의 예방 및 치료와 관련된 건강 기능성 영양식품으로서의 활용 가능성을 확인하고자 강한 항산화 및 항염증 작용이 있어 비만 고지혈, 동맥경화증 및 고혈압과 당뇨병 등과 같은 성인병 뿐만 아니라 간 질환의 급성, 만성 염증 및 암의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 알려진 추출물을 이용하여 사업화탄소에 의한 랫드의 간 손상을 간경화 수준의 60%로 유발시켜 생리적 활성 기능과 생화학적 측정 및 분자생물학적 *Real-time RT-PCR*을 이용하여 TGF- $\beta$ , P53의 변화를 분석하여 실험동물에서 나타나는 간 기능회복과 효과에 미치는 변화를 보았다. 실험은 정상군, 대조군, 양성대조군, 실험군(1, 2)으로 하여 군당 6마리씩 총 30마리를 이용하여 지정된 용량으로 1일 1회 일정한 시간대에 주 6회씩 5주간 경구투여 후 처치하여 실험 하였다. 결과는 정상군에 비하여 대조군에서는 통계적으로 유의성 있게 높았으며, 실험군에서는 대조군에 비해 통계적 유의성 있게 낮아졌다. 분자생물학적 실험에서도 대조군에 비해 실험군에서 유의하게 간 회복에 대한 변화를 확인하였다. 이상의 실험결과를 종합해 보면 기능성 식품으로 활용 가능성이 있을 것으로 판단되고 생리활성 변동과 간 손상에 따른 분자생물학적 발현 정도를 동일 분야 연구에도 활용이 될 것으로 사료 된다.

## References

- [1] Lee, S. G., Kim, J. S., Lee, H. S., Lim, Y. M., So, J. H., and Nam, J. O., "Bioconverted *Orostachys japonicas* Extracts Suppress Angiogenic Activity of Ms-1 Endothelial Cells." *Int J Mol Sci.* 18(12): 2615, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18122615>
- [2] Choi, Y. H., and Kim, J. W., "Quantitative analysis of eleutherosides B and E using HPLC-ESI/MS," *Korean J Pharmacogn.* 33(2), 88-91, 2002. DOI : [http://dx.doi.org/33\(2\)](http://dx.doi.org/33(2))
- [3] Chen, W. Zhang, Z. Yao, Z. Wang, L. Zhang, F. Shao, J. Chen, A. and Zheng, S."Activation of autophagy is required for Oroxylin A to alleviate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation, *International Immunopharmacology,*" vol. 56: 148 - 155, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/1406726>
- [4] Jain R. C., and Konar, D. B. "Effect of garlic oil in experimental cholesterol atherosclerosis." *Lancet,* Vol 29(2): 125-129, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(78\)90002-3](https://doi.org/10.1016/0021-9150(78)90002-3)

- [5] He, J. Bai, K. Hong, B. Zhang, F. and Zheng, S. "Docosahexaenoic acid attenuates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats." *International Immunopharmacology*, vol. 53, pp. 56 - 62, 2017.  
DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/1406726>
- [6] Vimal V, Devaki T. "Hepatoprotective effect of allicin on tissue defensesystem in galactosamine/endotoxin challenged rats." *J Ethnopharmacol*, Vol 90, pp.151-154, 2004.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.027>
- [7] Ilker D, Mustafa K, Bilal A, Aslihan A. "Effects of garlic extract consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters in humans with high blood cholesterol." *J Nutritional Biochem*, Vol 15, pp.373-377, 2004.  
<http://www.hindawi.com/journals/ism/2012/167979/>
- [8] Urikova, T. Mlcek, J. Skrovankova, S. Sumczynski, D. Sochor, J. and Orsavova, J. "Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases." *Journal of Biochemical*. 22(6): 944, 2017.  
DOI: <http://doi.org/10.3390/molecules22060944>
- [9] Martin, J. P., Dailey, M., and E., "Sugarman. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 255, 329-336, 1987.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0003-9861\(87\)90400-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0003-9861(87)90400-0)
- [10] Aebi, H., "Catalase in vitro," *Methods in Enzymology*, 105, 121-126, 1984.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- [11] McCay, P. B., E. K.Lai, J. L., Poyer, C. M. Dubose, and E. G. Janzen. "Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism". *J Biol. Chem*, 259: 2135-2139, 1984.  
DOI: [http://doi.org/10.1016/s0091-679X\(84\)60185-5](http://doi.org/10.1016/s0091-679X(84)60185-5)
- [12] Kim, H. B., and Ha, B. J., "Protective effects of succinic acid succinter against liver toxicity." *J Life Science*. Vol 27(8): 896-901, 2017.  
DOI: <http://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.8.896>
- [13] Vimal, V, Devaki, T. "Hepatoprotective effect of allicin on tissue defensesystem in galactosamine/endotoxin challenged rats." *J Ethnopharmacology*, Vol 90, pp.151-154, 2004.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.027>
- [14] Pritchard, M, T. Cohen, J. I. Roychowdhury, S. Pratt, B. T. and L, E. "Early growth response-1 attenuates liver injury and promotes hepatoprotection after carbon tetrachloride exposure in mice," *Journal of Hepatology*, vol. 53, no. 4, pp. 655 - 662, 2010.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.04.017>
- [15] Huber, Y. Boyle, M. Hallsworth, K. Tiniakos, D. Straub, B, K. and Labenz, C. "Health-related Quality of Life in Non-alcoholic Fatty Liver Disease Associates With Hepatic Inflammation." *J Gastroenterol Hepato*, S1542-3565: (18)31389-2, 2018.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.12.016>
- [16] Ferenci P, Dragosics B, Dittrich H, Benda H, Lochs L, Base S, Scheider W. "Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver." *J Pathology*, Vol 9, pp.105-113, 2005.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26711116>
- [17] Sharma, A. Joseph, D, A. and Bennie, Z. "A method for the sequential colorimetric determination of serum triglycerides and cholesterol." *Clini Biochemistry*. vol. 20(3): 167-172, 1987.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(87\)80115-7](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(87)80115-7)
- [18] Abdaullah, M. Al-Bekairi, Arif, H. "Effect of *Allium sativum* on epididymal spermatozoa, estradiol-treated mice and general toxicity." *J Ethnopharmacol*, Vol 29, pp.117-125, 1990.  
DOI: [http://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90049-Y](http://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90049-Y)
- [19] Sheela C. G, Augusti K. T. "Antidiabetic effects of S-allylcysteine sulphoxide isolated from garlic *Allium sativum* Linn." *Indian J Exp Biol*. 1992 Jun;30(6):523-6, 1992.  
DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7665195>
- [20] Chon, J. W., Kweon, H. Y., and Lee, H. S. "Protective effects of extracts of protactia brevitarsis on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the mice." *J Seric, Entomol. Sci*. 50: 93-100, 2012.  
DOI: <http://elsevier.com/locate/toxrep/10.1016>
- [21] Park, Y. M., Lim, J. H., Lee, J. E. and Seo, E. W. "Protective effects of semisulcospira libertina extract on induced hepatitis in rats." *J Life Sci*. 25, 539-547, 2015.  
DOI : <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2015.25.5.539>

**예 춘 정 (Chun-Jung, Yea)**

[정회원]



- 2002년 2월 : 대구한의대학교 보건대학원 보건학과(보건학석사)
- 2005년 2월 : 대구한의대학교 보건대학원 보건학과(보건학박사)
- 2004년 3월 ~ 현재 : 계명문화대학교 보건학부 부교수

<관심분야>

보건독성학, 생명공학

**이 태 종 (Tae-Jong Lee)**

[정회원]



- 2003년 2월 : 계명대학교 계명대학원 의료경영학과(의료관리학석사)
- 2010년 2월 : 계명대학교 계명대학원 공중보건학과 (보건학박사)
- 2019년 1월 ~ 현재 : 대구파티마병원 병리과

<관심분야>

분자병리, 병리조직