

다슬기와 마늘이 사염화탄소로 유발된 랫드의 간손상에 미치는 보호효과

전태원 · 이은실 · 이영선 · 한옥경 · 박무현** · 김광중* · 김효정*

(재)경북테크노파크 경산대학교 한방생명자원특화센터 효능검증원

*경산대학교 한의과대학

**한국생명과학(주)

Hepatoprotective Effects of *Semisulcospira libertina* and Garlic on the Liver Damage Induced by Carbon Tetrachloride in Rats

Tae Won Jeon, Eun Sil Lee, Young Sun Lee, Ok Kyung Han, Moo Hyun Park**,
Kwang Joong Kim* and Hyo Jung Kim*

Efficacy and Safety Research Center for Traditional Oriental Medicines, Life Resources Center of
Oriental Medicine, Kyungsan University, Kyongbuk Technopark, Daegu 706-060, Korea

*College of Oriental Medicine, Kyungsan University, Daegu 706-060, Korea

**Korea Life Science Co., Ltd., Seoul 150-890, Korea

Abstract

This study was designed to investigate the hepatoprotective effects of *Semisulcospira libertina* and garlic on the acute hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride (CCl₄) of rats. Male Sprague-Dawley rats weighing 200~220 g were pretreated with dehydrated powder of *Semisulcospira libertina* (2.1 g/kg, po; SL) and dehydrated powder mixture of *Semisulcospira libertina* and garlic (3 g/kg, 7:3 ratio, po; SG) once daily for 3 consecutive days, and then given a single dose of CCl₄ (1 g/kg in 5 ml/kg corn oil, po) and liver function was determined 24 hrs later. Liver damage was assessed by quantitating activities of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), sorbitol dehydrogenase (SDH) and alkaline phosphatase (ALP) as well as by histopathological examination. Pretreatments with SL and SG significantly decreased CCl₄-elevated ALT (48% and 61% respectively), AST (32% and 47%) and SDH (51% and 76%), but had no effect on ALP. SL and SG had revealed hepatoprotective effects against CCl₄-induced histopathological changes such as severe necrosis, inflammatory cell infiltration and congestion in the central zone of hepatic lobule. These findings demonstrate that SL and SG may have the hepatoprotective effect on CCl₄-induced liver damage.

Key words: *Semisulcospira libertina*, garlic, carbon tetrachloride, hepatoprotective effect

서 론

다슬기(*Semisulcospira libertina*(Gould); Korean freshwater snail)는 우리나라 냇물에 흔한 연체동물로서 지방에 따라 고텁이, 고동, 고디, 대사리, 올갱이 및 올뱅이 등으로 불린다. 우리나라를 비롯한 일본, 대만 및 중국 등에 널리 분포하며 맑은 연못이나 강, 개울, 호수 등의 돌 밑에서 많이 서식한다(1). 중약대사전(2)에 의하면 다슬기의 맛은 달고 짜며 성질은 냉하고 독이 없다고 한다. 약효로는 열을 내리고 황달, 소변불통, 각기, 소갈증, 변혈 및 목적종통(目赤腫痛) 등을 치료한다고 알려져 있으며 달인 즙은 열을 치료하고 술을 깨게 하며 갈증을 해소한다고 한다. 허준의 동의보감에 따르면 다슬기의 살은 간염이나 황달을 치료하며 간기능이 나빠져서 눈이 충혈되거나 뺨뺨해지는 것도 치료한다고 기록되

어 있다(3). 또한 다슬기 껍질은 위를 조화시키고 설사를 멎게 하며 지혈하고 담을 삭이는 효능이 있으며, 변위, 토사, 위나 배의 동통, 수양성 설사 및 변혈 등을 치료한다고 한다(2).

마늘은 이미 수천년 전부터 인도, 이집트 및 중국에서 여러 대사성 질환을 조절할 수 있는 약효와 유효성분들을 함유하고 있는 것으로 알려져 중요한 약재로서 사용되어 왔으며(4-6), 동양인의 식생활에서 조미료의 하나로서 상용되고 있다. Fanelli 등(7)은 마늘 추출물이 carbon tetrachloride (CCl₄)에 의해 실험적으로 유발된 급성 간손상을 예방할 수 있으며 free radical을 해독시켜 항산화제로서 작용할 수 있다고 보고하였다.

CCl₄는 mixed function oxidase (MFO) enzyme system의 활성화에 의해 trichloromethyl free radical(\cdot CCl₃)로 활성화되어 간독성을 유발한다(8). 생성된 free radical은 인근 지질막

†Corresponding author. E-mail: hyokim@kyungsan.ac.kr
Phone: 82-53-770-2299, Fax: 82-53-762-1263

을 공격하여 지질의 과산화를 일으키거나(9), free radical이 세포내의 단백질이나 지질 등의 macromolecules와 결합하여(10) 간의 피사, fatty infiltration, microsomal enzyme 활성 저하 등의 간독성을 나타내고, endoplasmic reticulum의 Ca^{2+} pump를 억제하여 세포 내 Ca^{2+} homeostasis를 저해하여 세포의 죽음을 초래하는 것으로 알려져 있다(11-14).

한의학 및 민간에서 다슬기의 다양한 효능에 대해 오래 전부터 문헌을 통한 이론적 접근을 시도해 왔으나 객관적이며 과학적인 연구자료의 부족으로 단순한 다슬기탕 등의 식용으로만 이용되었을 뿐 특정 질환의 예방 및 치료 효능에 대한 전문적인 연구는 거의 없었다. 따라서 본 연구에서는 고문헌을 통해 간에 좋다고 알려진 다슬기와 이미 다양하게 연구되어 온 마늘의 혼합 건조 분말이 CCl_4 의 투여로 유도된 간손상 실험동물 모델에서 간보호 효능이 있는지를 확인하기 위하여, 혈청 중 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), sorbitol dehydrogenase(SDH) 및 alkaline phosphatase(ALP) 활성도 측정 및 광학현미경적 관찰을 실시하였다.

재료 및 방법

다슬기와 마늘의 혼합 건조 분말 조제

다슬기는 경남 함양 지리산 상류 개천에서 채취하여 깨끗이 세척 후 $-20^{\circ}C$ 냉동실에서 동결·보관하였다. 필요에 따라 일정량의 다슬기를 2~3일 동안 $100^{\circ}C$ 열풍건조기에서 육질의 수분이 3% 이하가 될 때까지 건조하였다. 건조된 다슬기는 roll mill을 이용하여 1차 분쇄를 실시하고 cutting mill을 이용하여 분말입자가 100 mesh 이상이 되게 완전 분쇄하였다. 마늘은 경북 의성 지역의 6쪽 마늘을 사용하였으며 박피한 통마늘을 약 $300^{\circ}C$ 가마솥에서 수분이 거의 없이 딱딱할 정도로 구워 상온에서 냉각 후 역시 100 mesh 이상의 입자로 분쇄하였다. 분쇄된 다슬기와 마늘의 분말을 일정 비율로 혼합하여 조제한 시료를 한국생명과학(주)로부터 제공받아 이하 실험에 사용하였다.

실험동물 및 처치

6주령의 체중 200~220 g 음성 Sprague-Dawley 랫드를(주)대한 바이오링크로부터 구입하여 경산대학교 한의과대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도: $22 \pm 2^{\circ}C$, 습도: $50 \pm 5\%$, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 5일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험군은 대조군, CCl_4 단독 투여군, 다슬기와 CCl_4 투여군 및 다슬기와 마늘과 CCl_4 투여의 4군으로 나누었다. 다슬기의 전처리는 체중 kg 당 2.1 g의 건조분말을 2 mL의 생리식염수에 포함시켜 1일 1회 3일간 연속적으로 경구 투여하였고, 다슬기와 마늘의 전처리는 체중 kg 당 다슬기 분말 2.1 g과 마늘분말 0.9 g을 역시 2 mL의 생리식염수에 포함시켜 1일 1회 3일간 연속적으로 경구 투여하였

다. 한편 대조군과 CCl_4 단독 투여군은 다슬기와 마늘의 전처리 대신에 2 mL의 생리식염수를 경구적으로 투여하여 실험군간의 조건을 동일하게 유지시켰다. CCl_4 는 다슬기와 마늘의 마지막 전처리 후 2시간이 경과 후, 체중 kg 당 5 mL의 corn oil에 체중 kg 당 1 g의 CCl_4 가 포함되도록 희석·혼합하여 경구투여하였다. 실험기간 동안 물은 제한 없이 공급하였으며 사료(삼양유지사료(주), 강원도 원주시)는 사료의 마지막 전처리 12시간 전부터 CCl_4 투여 후 24시간 절식시킨 후 ether 마취 하에 복부 정중선을 따라 개복하여 복부 대동맥으로부터 채혈하였으며 간은 간문맥을 통하여 생리식염수로 관류·적출한 후 표면의 이물질을 제거한 뒤 무게를 측정하고 곧바로 $-80^{\circ}C$ 의 초저온냉동고에 넣어 급속 동결시켜 보관하였다. 채취한 혈액은 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 간기능의 지표효소 활성도 측정에 사용하였다.

혈청 중의 간기능 지표효소 활성도 측정

Alanine aminotransferase(ALT) 및 aspartate aminotransferase(AST) 활성도는 Reitman과 Frankel(15)의 방법에 준해 제조된 Sigma kit(#505-P and 505, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)를 이용하여 측정하였으며, 활성도 단위는 혈청 mL 당 Sigma-Frankel(SF) units로 표시하였다.

Sorbitol dehydrogenase(SDH) 활성도는 Gerlach(16)의 방법을 수정하여 측정하였다. 즉 0.1 M Trizma buffer(pH 7.5)에 혈청 0.25 mL 및 12 mM NADH 용액 25 μ L를 넣고 $25^{\circ}C$ 에서 10분간 incubation한 후 4 M fructose 용액 0.25 mL을 가하고 파장 340 nm(DU 530, Beckman, USA)에서 3~5분간 NADH의 흡광도 감소율($\Delta A/min$)을 측정하였다. SDH 활성도는 측정된 흡광도 감소율과 NADH의 흡광계수($6.22 \times 10^{-3} M \cdot cm^{-1}$)를 이용하여 계산하였다. 활성도 단위는 혈청 mL 당 mU로 표시하였다.

Alkaline phosphatase(ALP) 활성도는 Bowers와 McComb(17)의 방법에 준해 제조된 Sigma kit(#245-10, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)로 비색 정량하였다. 활성도 단위는 혈청 L 당 unit로 나타내었다.

조직 병리학적 검사

조직의 광학현미경적 변화를 관찰하기 위해 적출 즉시 일부분을 10% neutral buffered formalin 액에 고정하고, 고정이 끝난 조직을 흐르는 물에 수세한 후 순차적으로 증가되는 농도 순서에 따라 alcohol로 탈수하여 paraffin에 포매하였다. 포매된 조직을 5 μ m 두께로 절편한 다음 hematoxylin-eosin 염색하고 광학현미경으로 관찰하였다.

통계처리

실험 결과의 통계분석은 SPSS(statistical package social science, version 7.5)를 이용하였으며, 각 실험군마다 평균 \pm 표준오차로 표시하였고, 각 군간의 유의성은 $p < 0.05$ 수준

으로 ANOVA와 Duncan's test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

혈청 ALT, AST 및 SDH 활성도 변동

다슬기와 마늘 혼합 건조 분말의 투여에 의한 혈청 ALT와 AST 및 SDH 활성도 변동에 미치는 영향을 나타낸 결과는 Fig. 1 및 Fig. 2와 같다.

CCl₄에 의한 간손상 시 혈청 중 그 활성도가 증가하여 간세포의 손상 정도를 평가할 수 있는 지표로 이용되는 혈청 ALT 및 AST(18-20) 활성도는 CCl₄ 투여에 의해 대조군에 비하여 각각 19배 및 10배 정도(p<0.05)의 증가를 나타내었고, 다슬기를 전처리 함으로서 CCl₄ 단독 투여군에 비하여 각각 48% 및 32% 정도로 유의적인(p<0.05) 감소를 나타내었다. 다슬기와 마늘을 전처리한 경우, 다슬기 전처리군에 비하여 유의성은 없었지만 혈청 ALT 및 AST 활성도가 각각 25% 및 22% 정도 감소하는 경향을 나타내었고 CCl₄ 단독 투여군에 비해서 각각 61% 및 47%(p<0.05) 정도 현저한 감소를 나타내었다.

또한 경미한 간손상으로 야기된 초기 막투과성 변화에도 신속히 혈 중으로 유리되어 아주 민감한 간손상의 지표 효소로서 이용되는 혈청 SDH(21,22) 활성도는 CCl₄를 투여함으로써 대조군에 비하여 86배 정도(p<0.05) 증가를 나타내었고, 다슬기를 전처리함으로써 CCl₄ 단독 투여군에 비하여 약 51%의 통계적으로 의미 있는(p<0.05) 감소를 나타내었다. 다슬기와 마늘을 전처리한 경우, CCl₄ 단독 투여군 및 다슬기

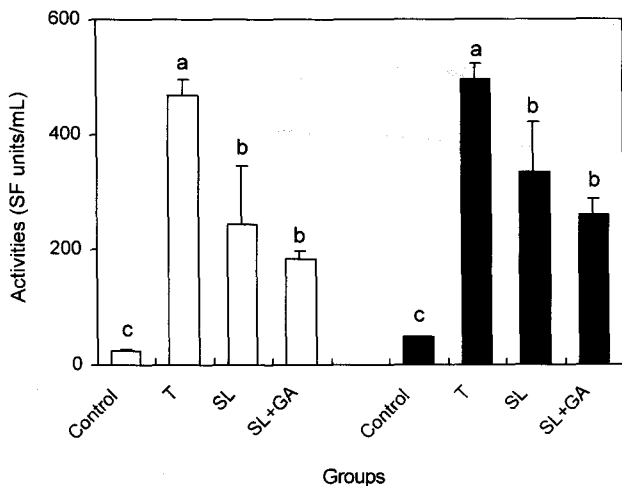


Fig. 1. Effects of dehydrated powder mixture of *Semisulcospira libertina* (SL) and garlic (GA) on serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities in carbon tetrachloride (CCl₄)-intoxicated rats.

Each bar represents the mean ± SE for groups of five rats. Control, corn oil; T, CCl₄ treated; SL, dehydrated powder of *Semisulcospira libertina* pretreated + CCl₄ treated; SL+GA, dehydrated powder mixture of *Semisulcospira libertina* and garlic pretreated + CCl₄ treated. Means which are not significantly different are followed by the same letter (p<0.05). □, ALT; ■, AST.

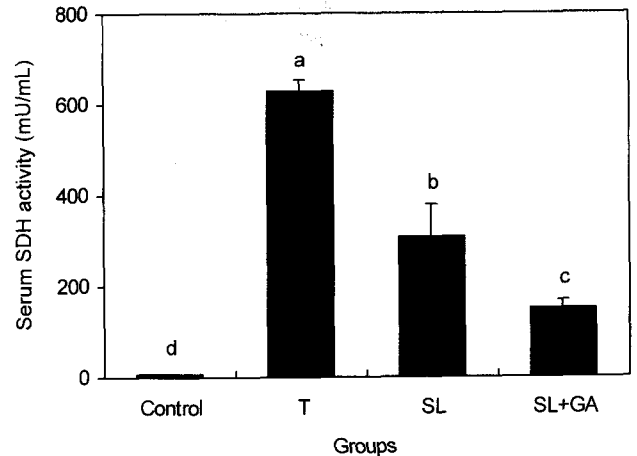


Fig. 2. Effects of dehydrated powder mixture of *Semisulcospira libertina* (SL) and garlic (GA) on serum sorbitol dehydrogenase (SDH) activity in carbon tetrachloride (CCl₄)-intoxicated rats.

Each bar represents the mean ± SE for groups of five rats. Other legends are the same as those of Fig. 1. Means which are not significantly different are followed by the same letter (p<0.05).

기 전처리군에 비해 각각 76% 및 51% 정도의 현저히 유의한 (p<0.05) 감소를 나타내었다.

본 실험에서 CCl₄ 투여에 의해 증가된 혈청 ALT, AST 및 SDH 활성도가 다슬기와 마늘의 전처리로 통계적으로 유의하게 감소되었다. 이러한 결과로부터 다슬기와 마늘의 전처리가 CCl₄에 의해 손상된 간조직 세포를 보호하는 효과가 있음을 알 수 있다.

혈청 ALP 활성도 변동

다슬기와 마늘 혼합 건조 분말의 투여에 의한 혈청 ALP 활성도 변동에 미치는 영향을 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 간세포의 손상 정도를 평가할 수 있는 지표로 역시 이용되고 있는 혈청 ALP(23) 활성도는 CCl₄ 투여 시 혈청 중 ALP 활성도가 증가한다는 보고(24,25)와 유사하게 대조군에 비해 CCl₄를 투여한 모든 실험군에서 유의적인(p<0.05) 증가를 나타내었으나 CCl₄ 단독 투여군과 다슬기 및 다슬기와 마늘 전처리군 간에는 별다른 변동을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 CCl₄ 투여로 증가된 혈청 ALP 활성을 다슬기와 마늘의 전처리로 감소시키지는 못함을 시사해준다.

광학현미경적 소견

다슬기와 마늘 혼합 건조 분말의 투여에 의한 간조직 병리 조직학적 변화를 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 광학현미경적 관찰에서 대조군은 정상적인 구조를 보였으나 CCl₄ 단독 투여군의 경우 인접한 피사 부위와 bridge를 형성하면서 서로 연결된 central necrosis가 관찰되었다. 이 피사 영역에서는 염증 세포의 침윤과 울혈현상이 나타났으며 중심정맥 내에 fibrin으로 채워져 있었다. 다슬기 전처리군의 경우 central necrosis 영역의 중심부에서는 피사를 일으킨 세포가 관찰되지 않았으며 다슬기와 마늘을 전처리한 경우 중심정맥과 접

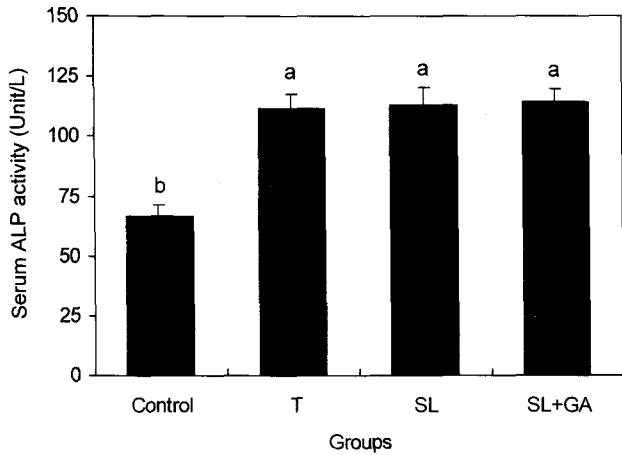


Fig. 3. Effects of dehydrated powder mixture of *Semisulcospira libertina* (SL) and garlic (GA) on serum alkaline phosphatase (ALP) activity in carbon tetrachloride (CCl₄)-intoxicated rats. Each bar represents the mean ± SE for groups of five rats. Other legends are the same as those of Fig. 1. Means which are not significantly different are followed by the same letter (p<0.05).

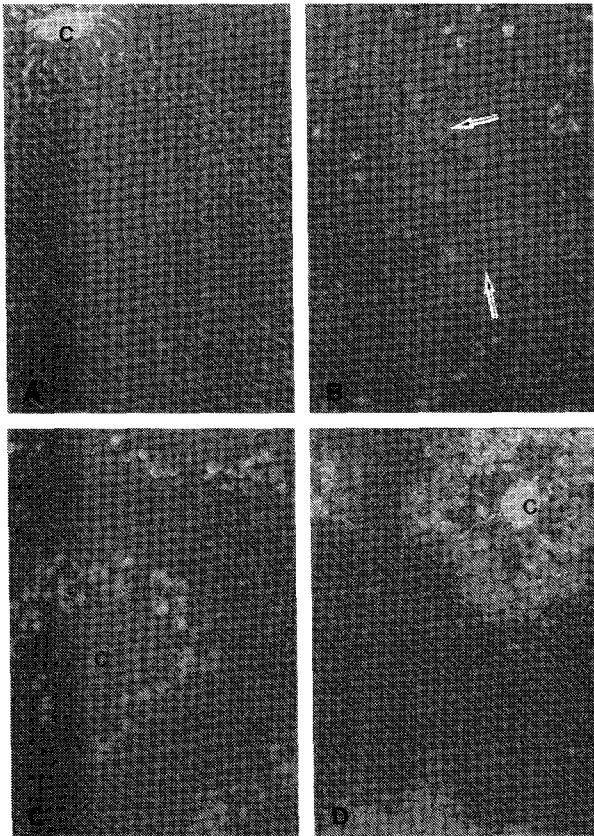


Fig. 4. Micrographs of liver tissue in rats, H&E, ×100. a) Control group: The tissue structure was intact. b) T group: Central necrosis was shown, and necrotic zones were connected one another by forming bridge with neighboring zones. In the necrotic zone, inflammatory cell infiltration and congestion were found, and central veins were filled with proteins (arrows). c) SL group: There were no necrotizing cells in the center of central necrotic zone. d) SL+GA group: Hepatocytes which ballooned with small nuclei, except to one part contact with central vein, were observed in central zone. C: central vein. Other legends are the same as those of Fig. 1.

한 일부를 제외한 중심영역에서 소핵을 갖는 부푼 형태의 간세포가 관찰되었으나 CCl₄ 단독 투여군과 같은 염증 세포의 침윤 현상은 거의 나타나지 않았다. 이러한 병리조직 검사 결과는 다슬기와 마늘의 전처리기가 간세포를 보호하는 작용이 있음을 시사해준다.

요 약

다슬기와 마늘 혼합건조분말(3 g/kg b.w. in saline, 7:3 ratio, p.o.)의 전처리가 CCl₄(1 g/kg b.w. in corn oil)의 경구 투여로 유도된 간손상 실험동물모델에 미치는 간보호 효능을 확인하기 위하여 혈청 중간기능 지표효소 활성화도 및 광학현미경적 관찰을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 간기능 지표효소인 혈청 ALT, AST 및 SDH 활성화도는 다슬기와 마늘의 전처리로 CCl₄ 단독 투여군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소하였으나 혈청 ALP 활성화도는 CCl₄ 투여로 증가된 활성을 다슬기와 마늘의 전처리로 감소시키지 못했다. 광학현미경적 관찰에서 CCl₄ 단독 투여군의 경우 인접한 괴사 부위와 bridge를 형성한 central necrosis 영역에서 염증 세포의 침윤과 울혈현상이 나타났으나, 다슬기와 마늘의 전처리군에서는 중심영역에서 소핵을 갖는 부푼 형태의 초기 가역적 손상을 입은 간세포가 관찰되었을 뿐 CCl₄ 단독 투여군과 같은 염증 세포의 침윤이나 괴사는 관찰되지 않았다. 이상의 실험 결과를 종합해 볼 때, 다슬기와 마늘의 혼합 건조 분말이 간세포의 기능을 유지시킴으로써 사염화탄소 투여에 의해 유발된 간손상을 억제하여 간조직을 보호할 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

- Davis GM. 1969. A taxonomic study of some species of *Semisulcospira* in Japan (Mesogastropoda: Pleuroceridae). *Malacologia* 7: 211-294.
- 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균 1998. 중약대사전. 도서출판 정담, 서울. p 4860-4863.
- 김세진 1999. 해독보양식품 2선. 도서출판 디딤21, 서울. p 49-85.
- Bordia A, Bansal HC. 1973. Letter: Essential oil of garlic in prevention of atherosclerosis. *Lancet* 2 (7844): 1491-1492.
- Chang ML, Johnson MA. 1980. Effect of garlic on carbohydrate metabolism and lipid synthesis in rats. *J Nutr* 110: 931-936.
- Chi MS, Koh ET, Stewart TJ. 1982. Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard. *J Nutr* 112: 241-248.
- Fanelli SL, Castro GD, de Toranzo EG, Castro JA. 1998. Mechanisms of the preventive properties of some garlic components in the carbon tetrachloride-promoted oxidative stress. Diallyl sulfide; diallyl disulfide; allyl mercaptan and allyl methyl sulfide. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 102: 163-174.
- Recknagel RO. 1967. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev* 19: 145-208.
- Recknagel RO, Glende EA. 1973. Carbon tetrachloride hep-

- atotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol* 2: 263-297.
10. Villarruel MC, Diaz Gomez MI, Castro JA. 1975. The nature of the *in vitro* irreversible binding of carbon tetrachloride to microsomal lipids. *Toxicol Appl Pharmacol* 33: 106-114.
 11. Glende EA, Pushpendran CK. 1986. Activation of phospholipase A2 by carbon tetrachloride in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 35: 3301-3307.
 12. Long RM, Moore L. 1986. Inhibition of liver endoplasmic reticulum calcium pump by CCl₄ and release of a sequestered calcium pool. *Biochem Pharmacol* 35: 4131-4137.
 13. Plaa GL, Hewitt WR. 1982. Quantative evaluation of indices of hepatotoxicity. In *Toxicology of the Liver*. Zakim D, Boyer TD, eds. Raven Press, New York. p 103-120.
 14. Recknagel RO. 1983. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sci* 33: 401-408.
 15. Reitman S, Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 28: 50-63.
 16. Gerlach U. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU, ed. Academic Press, New York. Vol 3, p 112-117.
 17. Bowers GN, McComb RB. 1966. A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin Chem* 12: 70-89.
 18. Robbins LS, Cotran RS. 1979. *Pathological basis of disease*. WB Saunder Company, London. p 1009.
 19. Plaa GL, Hewitt WR. 1989. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In *Principles and methods of toxicology*. Hayes AW, ed. 2nd ed. Raven Press, New York. p 599-628.
 20. Yamamoto H. 1990. Relation of Ca⁺⁺ accumulation and lipid peroxidation with CCl₄-induced toxicity in the rat liver. *Pharmacol Toxicol* 66: 213-216.
 21. Boyd JW. 1983. The mechanism relating to increases in plasma enzymes and isoenzymes in diseases of animals. *Vet Clin Pathol* 12: 9-24.
 22. Kosrud GO, Grice HC, McLaughlin JM. 1972. Sensitivity of several enzymes in detecting carbon tetrachloride-induced liver damage. *Toxicol Appl Pharmacol* 22: 474-483.
 23. Perrillo RP, Griffin R, Kecskemeti KD, Launder JJ, Zuckerman GR. 1978. Alcoholic liver disease presenting with marked elevation of serum alkaline phosphatase. *Digest Dis* 23: 1061-1066.
 24. Farombi EO, Nwankwo JO, Emerole GO. 1997. Possible modulatory effect of browned yam flour diet on chemically-induced toxicity in the rat. *Food Chem Toxicol* 35: 975-979.
 25. Gole MK, Dasgupta S. 2002. Role of plant metabolites in toxic liver injury. *Asia Pac J Clin Nutr* 11: 48-50.

(2001년 10월 18일 접수; 2002년 6월 3일 채택)