

## G009가 CCl<sub>4</sub>로 유발된 간손상 및 지질 과산화에 미치는 영향

이준우,\* 정 훈, 한만덕, 백성진, 김용석, 강상모<sup>1</sup>

일양약품(주) 중앙연구소 생물공학연구실, <sup>1</sup>건국대학교 공과대학 미생물공학과

### Effect of G009 on CCl<sub>4</sub>-Induced Hepatic Injury and Lipid Peroxidation in Rats

June-Woo Lee,\* Hoon Jeong, Man-Deuk Han, Sung-Jin Baek,  
Yong-Seok Kim and Sang-Mo Kang<sup>1</sup>

Biotechnology Lab., Central Research Institute, Il Yang Pharmaceutical Co. Ltd.,  
Yongin 449-900, Korea; and <sup>1</sup>Department of Microbiological Engineering, College of  
Engineering, Kon Kuk University, Seoul 110-750, Korea

**Abstract** - To evaluate hepatoprotective effects of G009, an hepatoprotective agent which was extracted from the mycelia of *Ganoderma lucidum* Y009, we were studied using CCl<sub>4</sub>- and galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. The ratio of liver weight to body weight, the value of glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) activities, the change of a lipids in serum, and the inhibitory activity of malondialdehyde (MDA) formation in serum and liver homogenate were determined in rats. G009 was not significantly changed of the ratio of liver weight to body weight and the content of lipids in serum, but reduced the serum GOT and GPT values in CCl<sub>4</sub>- and galactosamine-induced hepatotoxicity in rat. Especially, protective effect of G009 on rat hepatic injuries induced by galactosamine was significantly appeared. CCl<sub>4</sub> increased markedly the formation of lipid peroxides in the liver homogenate and serum. The increase of lipid peroxides by CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity was markedly reduced by the treatment with G009. These results suggest that the hepatoprotective effects of G009 may be correlated with its anti-lipid-peroxidative activity, therefore, it may be potential agent for hepatic disease.

**Key words** - G009: Galactosamine: Malondialdehyde: Hepatoprotective effect: *Ganoderma lucidum* Y009: Anti-lipidperoxidative activity.

지금까지 천연자원으로부터 간장질환 치료제의 개발을 위한 많은 연구가 시도되어 왔으며, 이들중 생약으로부터 분리된 glycyrrhizin, gomisin 및 silymarin 등은 현재 급·만성간염 치료제로서 이용되고 있다. 최근에는 미생물로부터 간염 치료제의 물질의 발효 및 분리에 관한 연구보고도 있었고,<sup>1)</sup>

*Coriolus versicolor*로부터 분리한 다당류가 간 기능을 개선시키고,<sup>2)</sup> *Saccharomyces cerevisia*로부터 분리한 glucan이 murine viral hepatitis에 효과가 있다고 보고한 이래 다당류에 의한 간장질환 치료제의 개발이 관심의 대상이 되고 있다.<sup>3)</sup>

특히, 담자균류 가운데 영지(*Ganoderma lucidum*)는 예로부터 간염, 강장, 강심, 해열, 진정, 이뇨, 건위, 정장, 고혈압, 뇌졸중 및 암 등과 같은

\*교신저자 : Fax 0331-284-1010

질병을 치료하기 위한 전통약으로 이용되어 왔으며, 중국의 약물서인 신농본초경에는 보간, 이노, 정신 안정작용, 관절염, 해소 및 기관지염 등의 치료약으로 이용되어 왔다고 알려졌다.<sup>4)</sup> 영지의 약리활성에 대한 연구는 자실체의 양산과 더불어 1980년대 중반부터 과학적인 연구가 활발히 진행되었는데, 항종양과 면역증강 작용,<sup>5)</sup> 고지혈증개선,<sup>6)</sup> 혈소판응집저해작용<sup>7)</sup> 및 간질환 보호작용<sup>8)</sup> 등에 관한 보고가 주를 이루고 있다.

영지로부터 분리한 다당류에 의한 간장질환 치료는 간독성 유발물질에 대한 보호능,<sup>9)</sup> 초대배양 간세포 보호능<sup>10)</sup> 및 간섬유화 억제능<sup>11)</sup> 등이 보고되었으나, 이들에 대한 정확한 작용기전은 밝혀지지 않았다.

현재 간장질환치료제 개발을 위한 model로서는 급·만성 간염 동물(간독성 물질 또는 바이러스 감염), 초대배양 간세포, 면역기능의 증진에 의한 간염 치료효과, 만성질환 model을 위한 bile duct ligation에 의한 방법 등이 많이 이용되고 있으며, 작용 약물의 특성에 따라 실험 model이 선택되어 활용되고 있다. 급·만성 간염 model로 사용되고 있는  $CCl_4$ 는 간세포내 소포체의 cytochrome P-450의 mixed function oxidase(MFO)에 의해 1차적으로 대사 되어 free radical로 전환되며, 이들은 생체막의 불포화 지방산을 공격하여 지질 과산화물을 생성시키고 결국 간세포 파괴에 이른다.<sup>12-14)</sup> 이와 같이 생체내에서 생성된 지질 과산화물이 혈전증, 심장병, 미숙아 망막증의 질병과 노화 및 암 등의 원인 물질로 규명되었고, 간장질환의 원인 물질로 알려짐에 따라 많은 관심을 받고 있다.<sup>15)</sup> Sawaki 등<sup>16)</sup>에 의하면 과산화 지질 생성의 지표인 malondialdehyde(MDA) 치는 급성간염, 약물에 의해 유발된 간염, 지방간, 간경화 등에서 증가한다고 보고하였다. 호기성 생물들은 산화제의 생성과 지질 과산화를 막고 산화에 의한 손상을 복구하기 위한 보호 기구를 갖고 있다고 알려졌다. 이 보호 기구에는 superoxide dismutase(SOD), Se-glutathione peroxidase와 같은 효소와  $\alpha$ -tocopherol 및 glutathione 등의 항산화제 또는 radical 소거제들이 포함된다. 그러나 이와 같은 항산화물질들의 생성이 특정 질병이나 독성물질의 노출에 의해 균형을 잃게 되면 생체내의 산화적 손상이 유발된다고 알려져 있다. 그러므로 지질 과산화 반응은 생체

의 산화적 손상에 대한 지표가 될 수 있으며, 항산화제들에 대한 상대적인 potential의 비교시 널리 이용되고 있다.

따라서 본 연구는 국내 자생 영지(IY009) 자실체로부터 분리한 균사를 액체배양하여 얻어진 균사체를 알칼리 추출에 의해 얻은 G009의 간장질환치료 작용기전 규명을 위해,  $CCl_4$ 로 독성이 유발된 쥐에 대한 G009의 간보호효과와 과산화 지질 생성억제능에 대한 관계를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험재료 및 시약**-본 실험에 사용한 용성의 S-D계 흰쥐(200~250 g)는 삼육축산,  $CCl_4$ 와 glycyrrhizin은 Wako Chemical 사(Japan), D-galactosamine는 Sigma 사(USA)에서 구입하여 사용하였다. 혈청내의 transaminase의 측정용 Iatron 사(일본, 동경), triglyceride, total cholesterol 및 phospholipid 등의 측정을 위한 Kit는 아산제약(주), thiobarbituric acid(TBA), sodium lauryl sulfate, pyridine, butanol 등은 Sigma 사, 이외의 모든 시약은 특급의 것을 사용하였다.

**G009의 조제**-201 발효조(Marubishi, MSJ-N<sub>2</sub>)에 배양용 배지 14l를 넣고 고압 멸균후, 10%의 종균을 접종하고, 27.5°C에서 5일간 배양하여 균사체 배양물을 얻었다. 균사체 배양물에 NaOH를 가해 최종 농도가 2N이 되게 조정한다 다음 실온에서 24시간 방치한 후, 빙초산으로 중화(pH 7.0)시켜 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액은 한외여과장치(membrane, cut off MW 10,000)를 이용하여 10 kD 이상의 다당류를 얻었으며, 이후 3차 증류수를 사용하여 수세 및 한외여과를 반복한 후, 동결건조하여 G009를 얻었다.

**간 독성 및 지질과산화 유발**- $CCl_4$ 에 의한 간독성 유발은 G009를 1일 1회씩 5일 연속 경구투여하고 마지막 시료 투여 2시간 후  $CCl_4$  (0.1 ml/kg, in corn oil)를 투여하고 24시간 동안 절식을 시켰다.

Galactosamine에 의한 독성유발은 G009를 1일 1회씩 연속 4일간 경구투여하고 마지막 4일째 시료 투여 2시간전에 galactosamine(400 mg/kg, in saline)을 1회 복강내 투여함으로써 유도하였으며,

이때 투여 3, 4일째에는 절식을 시켰다.

**혈청 및 간 homogenate의 분리** - 간독성이 유발된 흰쥐는 ether로 마취시킨 후, 복부를 열어 하대동맥으로부터 채혈하고 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 간 homogenate는 다음과 같은 방법으로 얻었다. 마취된 흰쥐를 개복하여 50 ml용 주사기로 50 mM Tris-Cl buffer(pH 7.4) 30 ml를 portal vein에서 하대정맥으로 혈액이 흘러나오도록 관류를 행하였다. 이후 간을 적출하여 50 mM Tris-Cl과 150 mM KCl이 함유된 buffer(pH 7.4)로 세척하고 잘게 썰어, Homogenizer(Polytrone®, PT 10/35, Switzerland)를 이용하여 병냉하에서 균질화를 실시하였다. 균질화물은 8,000×에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 얻었다.

*In vitro* 실험을 위한 microsomes의 분리는 상기와 같은 방법으로 얻은 간 homogenate를 105,000×에서 60분 동안 초원심분리를 실시한 후, 침전부분을 완충액으로 현탁시켜 단백질의 농도가 20 mg/ml되게 조정하였다. 상기와 같이 조제된 혈청, 간 homogenate 및 microsomes은 -70 °C에 보존하면서 실험목적에 따라 사용하였다.

**혈청 및 간 homogenate의 지질과산화 측정** - 혈청내의 지질과산화는 内藤 등<sup>17)</sup>의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 즉, cap tube에 시료혈청 0.3 ml, 0.05 N HCl 3 ml 및 0.67% TBA 1 ml를 가하고 혼합하여 95 °C에서 30분간 반응시킨 다음 흐르는 물에 냉각시켰다.

간 homogenate 내의 지질과산화 정도는 Yoden 등<sup>18)</sup>의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 간략하면, cap tube에 0.5 ml의 간 homogenate (0.2 g equivalent of liver), 0.1 N HCl 0.5 ml, 4% SDS 0.5 ml, 증류수 0.5 ml 및 0.5% TBA 2 ml를 가하여 95 °C에서 30분간 반응시킨 다음 흐르는 물에 냉각시켰다.

냉각시킨 반응액은 butanol : pyridine(15:1, v/v)혼합액 4 ml를 가하여 3200 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 spectrophotometer(Shimadzu, UV-160A)을 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로서 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)를 이용하여 시료내의 MDA량을 정량하였으며, 저해율은 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{\text{MDA of control} - \text{MDA of sample}}{\text{MDA of control} - \text{MDA of normal}} \times 100 (\%)$$

***In vitro*에서의 지질 과산화 유발 및 측정** - Microsomes를 이용한 *in vitro* 지질 과산화 반응의 유도는 Kiso 등<sup>19)</sup>의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 즉, 10 mM의 CCl<sub>4</sub>, 2 mM의 NADPH 및 microsomes (2 mg/ml) 등을 83.5 mM의 KCl과 37.2 mM의 Tris-Cl(pH 8.0)이 함유되게 한 후, 37 °C에서 20분간 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 지질 과산화 정도는 Ohkawa 등<sup>20)</sup>의 방법을 이용하여 생성된 MDA 양을 측정하였으며, 저해율은 상기와 동일한 방법을 이용하였다.

**간보호 효과의 측정** - CCl<sub>4</sub>에 대한 G009의 간장질환 보호효과는 혈청내의 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)와 glutamic pyruvic transaminase(GPT)의 활성을 Lippi와 Guidi 방법<sup>21)</sup>에 의해 측정하였으며, 간보호효과는 아래식에 의해 계산하였다.

$$\text{Protective potency(\%)} = \frac{\text{Value of control} - \text{Value of sample}}{\text{Value of control} - \text{Value of normal}} \times 100 (\%)$$

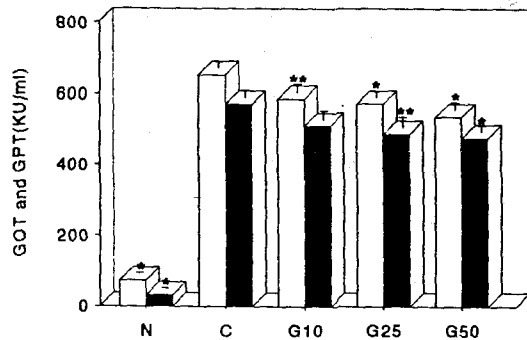
**통계처리** - 본 실험에서의 통계처리는 평균치±표준오차로 나타내었으며, 유의성 검정은 Student's t-test로 확인하였다.

## 결 과

### CCl<sub>4</sub> 독성유발에 대한 G009의 영향(*in vivo*) -

#### (1) 혈액의 생화학적 분석

G009의 간장질환 치료효과를 알아보기 위하여, 흰쥐에 CCl<sub>4</sub>로 독성을 유발시키고 혈청의 GOT와 GPT 및 체중변화를 측정.한 결과는 Fig. 1 및 Table I 과 같다. G009를 10, 25 및 50 mg/kg의 농도로 경구 투여한 결과, GOT의 경우 대조군과 비교하여 각각 11.7, 14.0 및 20.3%의 간보호력을 보였으며, GPT의 경우에 있어서는 11.5, 15.7 및 17.7%의 보호효과 양상을 나타내었다. 간 무게의 변화 정도를 측정.한 결과, CCl<sub>4</sub>처리군이 정상군보다 간의 중량이 커짐을 알수 있었고, G009 처리군에서는



**Fig. 1.** Effects of G009 on the serum transaminase in  $\text{CCl}_4$ -treated rats. G009 was treated with *p.o.* Each value represents mean  $\pm$  S.E. of six rats. \*\*\*Statistical significance from the control at  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively. N: Normal, C: Control ( $\text{CCl}_4$ ), G10:  $\text{CCl}_4$ +G009 10 mg/kg, G25:  $\text{CCl}_4$ +G009 25 mg/kg, G50:  $\text{CCl}_4$ +G009 50 mg/kg. Symbols:  $\square$ : GOT,  $\blacksquare$ : GPT

**Table I.** Effect of G009 on lipids and body weight, liver weight and liver/body in  $\text{CCl}_4$ -treated rats

Sample	Dose (mg/kg)	BW (g)	LW (g)	LW/BW $\times 100\%$
Normal	-	260.2 $\pm$ 7.0	7.13 $\pm$ 0.34	2.74
Control	-	256.7 $\pm$ 4.8	10.13 $\pm$ 0.32	3.95
G009	10	254.6 $\pm$ 7.7	9.97 $\pm$ 0.36	3.92
G009	25	246.3 $\pm$ 5.9	9.67 $\pm$ 0.48	3.93
G009	50	249.9 $\pm$ 4.9	9.95 $\pm$ 0.33	3.99

Each value represents mean  $\pm$  S.E. of six rats. BW: Body weight. LW: Liver weight.

$\text{CCl}_4$ 처리군과 비교하여 큰 차이는 볼 수가 없었다.

(2) 간 homogenate에서의 지질과산화 억제능  
지질 과산화를 유도하기 위해  $\text{CCl}_4$ 를 투여한 다음 간 homogenate의 MDA값을 측정된 결과, Table II에서 처럼  $\text{CCl}_4$  투여군의 MDA 생성량은 간의 1 g 당 108.5 nM로써 정상군의 61.0 nM에 비하여 약 1.8 배 증가하였다. G009를 투여한 경우는 50 mg/kg의 농도에서 48.6%의 지질 과산화 저해능을 나타내었으며, 10 및 25 mg/kg의 농도에서는 각각 36.4%와 47.2%의 저해능을 나타내었다.

(3) 혈청에서의 지질과산화 억제능

혈청내의 지질 과산화 생성 억제능을 조사한 결과,  $\text{CCl}_4$ 를 처리한 군의 MDA치는 혈청 1 ml당 4.84 nM로써 정상군의 2.8배가 증가되었다(Table III). G009 투여군의 경우는 25 mg/kg의 농도에서 59.3

**Table II.** Effects of G009 on lipid peroxides formation of the liver homogenate in  $\text{CCl}_4$ -treated rats

Sample	Dose (mg/kg)	Malondialdehyde (MDA, nM/g liver)	Percent Inhibition (%)
Normal	-	61.0 $\pm$ 1.4*	-
Control	-	108.5 $\pm$ 3.8	-
G009	10	91.2 $\pm$ 4.1**	36.4
G009	25	86.1 $\pm$ 3.3*	47.2
G009	50	85.4 $\pm$ 4.0*	48.6

G009 was treated with *p.o.* Each value represents mean  $\pm$  S.E. of six rats. \*\*\*Statistical significance from the control at  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively.

**Table III.** Effects of G009 on lipid peroxides formation of the serum in  $\text{CCl}_4$ -treated rats

Sample	Dose (mg/kg)	Malondialdehyde (MDA, nM/ml)	Percent Inhibition (%)
Normal	-	1.72 $\pm$ 0.09*	-
Control	-	4.84 $\pm$ 0.28	-
G009	10	3.31 $\pm$ 0.20*	49.0
G009	25	2.99 $\pm$ 0.29*	59.3
G009	50	3.54 $\pm$ 0.19*	41.7

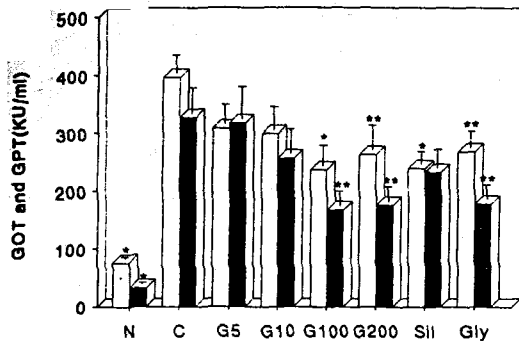
G009 was treated with *p.o.* Each value represents mean  $\pm$  S.E. of six rats. \*Statistical significance from the control at  $P < 0.01$ .

의 지질 과산화 억제능을 나타내었으며, 10 및 50 mg/kg에서는 각각 49.0%와 41.7%의 억제능을 나타내었다.

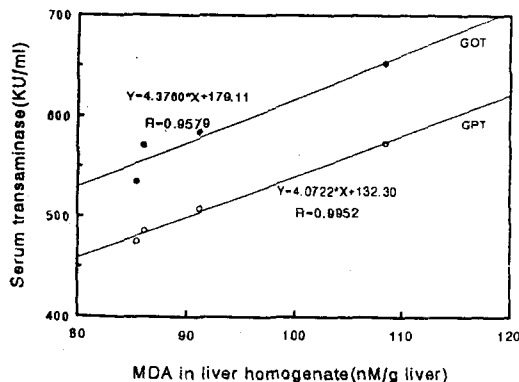
(4) 지질 과산화 억제능과 간보호능의 관계

$\text{CCl}_4$ 로 독성유발에 의한 간보호와 지질 과산화 억제능의 상관성을 검토하기 위해 이들에 대해 각각 plotting한 결과는 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. G009 투여시 GOT와 GPT치가 낮아질수록 간 homogenate의 지질 과산화 정도는 낮아지는 경향을 나타내었으며, 이때 이들에 대한 r 값은 각각 0.9579과 0.9952로써 높은 상관성을 나타내었다. 혈청내 지질과산화 정도는 GOT와 GPT치가 떨어질수록 낮아지는 경향을 나타내었으나, 간의 homogenate에서보다 낮은 상관성을 나타냈다(GOT, 0.7930; GPT, 0.8916).

$\text{CCl}_4$ -NADPH로 유도된 지질 과산화에 대한 G009의 영향(*in vitro*) - G009의 지질과산화 억제활

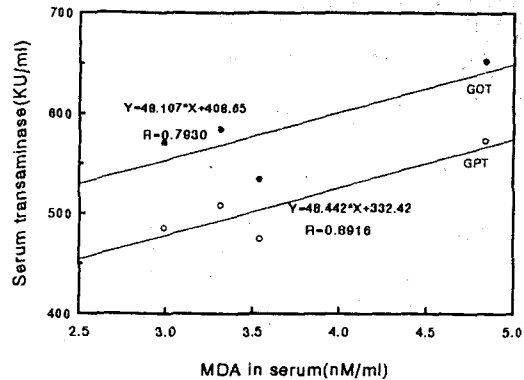


**Fig. 2.** Effects of G009 on the serum transaminase in galactosamine-treated rats. G009 was treated with *p.o.* Each value represents mean  $\pm$  S.E. of six rats. \*\*\*Statistical significance from the control at P(0.01 and P(0.05, respectively. N: Normal, C: Control(Galactosamine), G5: Galactosamine+G009 5 mg/kg, G10: Galactosamine+G009 10 mg/kg, G100: Galactosamine+G009 100 mg/kg, G200: Galactosamine+G009 200 mg/kg, Sil: Galactosamine+Silymarin 100 mg/kg, Gly: Galactosamine+glycyrrhizin 100 mg/kg. Symbols:  $\square$ : GOT,  $\blacksquare$ : GPT



**Fig. 3.** The correlation between transaminase activities of serum and lipid peroxidation of the liver homogenate in  $CCl_4$ -treated rat.

성을 조사하기 위하여 *in vitro*에서 간 micrososome에 시료를 가한 후, 생성된 MDA의 양을 측정 한 결과는 Table IV와 같다. 정상적인 흰쥐는 혈청 ml당 4.5 nM의 MDA를 함유하고 있었고,  $CCl_4$ 로 지질 과산화물 유발시킨 대조군의 경우의 MDA는 25.1 nM 이었다. 시료를 1 mg/ml의 농도로 처리시 MDA 생성량은 G009는 17.2 nM/ml, glycyrrhizin은 22.3 nM/ml을 생성시켰으며, 이들의 저해율은 각각 38.3%와 13.6%로 나타났다.



**Fig. 4.** The correlation between transaminase activities and lipid peroxidation of serum in  $CCl_4$ -treated rat.

**Table IV.** Effects of G009 on  $CCl_4$ -induced lipid peroxidation in rat liver microsome

Sample	Dose (mg/ml)	Malondialdehyde (MDA, nM/ml)	Inhibition (%)
Normal	-	45.0 $\pm$ 0.2*	-
Control	-	25.1 $\pm$ 1.2	-
G009	1.0	17.2 $\pm$ 1.1*	38.3
Glycyrrhizin	1.0	22.3 $\pm$ 2.0	13.6

Each value represents mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments. \*Statistical significance from the control at P(0.01.

**Table V.** Effect of G009 on body weight, liver weight and liver/body weight in galactosamine-treated rats

Sample	Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Liver weight (g)	LW/BW $\times$ 100(%)
Normal	-	227.5 $\pm$ 4.1	6.98 $\pm$ 0.29	3.07
Control	-	233.2 $\pm$ 3.5	8.22 $\pm$ 0.20	3.52
G009	5	219.3 $\pm$ 2.8	7.00 $\pm$ 0.18	3.19
G009	10	236.5 $\pm$ 3.2	8.07 $\pm$ 0.25	3.41
G009	100	225.0 $\pm$ 3.0	7.30 $\pm$ 0.16	3.24
G009	200	232.7 $\pm$ 3.7	6.97 $\pm$ 0.09	3.00
Silymarin	100	227.5 $\pm$ 3.7	6.95 $\pm$ 0.16	3.05
Glycyrrhizin	100	232.6 $\pm$ 3.4	7.90 $\pm$ 0.12	3.40

Each value represents mean  $\pm$  S.E. of six rats.

**D-Galactosamine 독성유발에 대한 G009의 영향**-간 독성유발 물질, D-galactosamine으로 유도된 실험 model에서 G009의 효과를 알아보기 위하여 10, 100 및 200 mg/kg의 용량으로 흰쥐에 경

구 투여한 결과를 Fig. 2 및 Table V에 표시하였다. 이의 결과에 따르면, GOT의 경우 10, 100 및 200 mg/kg에서 각각 30.4, 50.0 및 41.4%의 간 보호력을 나타내었다. 한편 GPT의 경우에 있어서는 10, 100 및 200 mg/kg에서 각각 23.7%, 54.2% 및 51.6%의 높은 간보호력을 나타내었다. 또한 현재 간장질환 치료제로 이용되고 있는 silymarin의 경우 100 mg/kg의 농도에서 GOT 및 GPT가 각각 48.9%와 31.9%의 간 보호력을 보였다. 따라서 G009는 D-galactosamine 독성유발시에서도 간장 보호 효과를 나타낸 것으로 보아 virus성 간염질환에도 유효할 것으로 사료된다.

## 고 찰

생체내에서는 정상적 또는 외부의 물리적 자극이나 독성 물질의 생체내 대사과정중에 생성된 활성화 산소 유리기들이 radical, 과산화물, aldehyde, epoxide 등의 다양한 활성종을 발생시키고, 이들은 DNA, RNA, 단백질, 세포 및 세포소기관의 막구조를 형성하는 불포화 지방산 구조를 와해시켜 세포막 또는 세포구조에 손상을 입힌다. 이와 같이 독성 물질들에 의한 간 상해기전이 간세포막의 지질과산화와 밀접한 관련이 있으리라는 보고에 근거하여 실험을 실시하였다.

본 실험에서는 *G. lucidum* G009로부터 분리한 다당류 G009의 간장보호기전 규명을 위해, 급성 간염 model인  $\text{CCl}_4$ 로 독성이 유발된 쥐에 G009를 투여한 후, 간 homogenate 및 혈청내의 과산화 지질 생성 억제능을 검토하였다.  $\text{CCl}_4$ 로 독성유발시킨 후 간기능 지표인자중 하나인 GOT와 GPT치를 측정 한 결과는 G009의 투여농도에 의존적으로 감소하는 경향을 관찰할 수 있었으며, G009를 50 mg/kg의 농도로 투여한 군에서의 간 보호력은 GOT와 GPT가 각각 20.3% 및 17.7%로 나타났다(Fig. 1).

$\text{CCl}_4$ 는 간장내에서 cytochrome P-450에 의해 대사되어 활성이 강한 중간 대사물질( $\cdot\text{CCl}_3$ ,  $\cdot\text{OOCl}_2$ )로 전환되고, 이 radical들은 polyunsaturated fatty acid와 반응하여 간 세포막에 지질 과산화를 유발하거나<sup>22)</sup>, 세포내의 단백질 또는 지질 등과 같은 거대분자들과 결합하여 간세포의 피사를 야기시켜<sup>23)</sup>, 결국 간세포막을 통하여 GOT, GPT, ALP

(alkaline phosphatase), latic dehydrogenase(LDH) 및 isocitric dehydrogenase(ICDH) 등과 같은 효소를 혈중으로 유리시킨다. G009의 간보호효과는  $\text{CCl}_4$ 에 의해 야기되는 지질 과산화를 억제시킬 수 있는 것에 기인하는 것으로 추정된다. 실제로 Sawaki 등<sup>16)</sup>이 간염, 지방간 및 간경화증 환자들은 지질 과산화의 지표인 혈청내 MDA치가 상승하는 것을 보고함으로써, G009가 나타내는 지질 과산화 억제능은 간보호 효과를 나타내는데 어떠한 역할을 하는 것으로 사료된다.

간 homogenate내의 MDA 생성량도 농도에 의존적으로 감소하여 50 mg/kg의 농도에서 48.6%의 지질 과산화 저해능을 나타내었다. 한편, 혈청내의 MDA 생성량은 G009를 25 mg/kg의 농도로 투여시 59.3% 지질 과산화 저해능을 나타내었다(Table II 및 Table III). 이와 같은 결과로 보아 G009는 일차적으로 혈청의 지질과산화를 더욱 저하시킴을 알 수 있었다. 또한 간세포내 지방함량의 변화는 유의한 결과를 보이지는 않았으나(data는 제시하지 않았음), 이 등<sup>9)</sup>의 보고에 의하면 ethanol에 의해 유도된 지방간 형성의 경우 G009를 25 mg/kg의 농도로 투여시 대조군에 비하여 60% 이하로 감소되었음을 보고하였다. 이와 같이 G009는 간세포 파괴에 의해 야기되는  $\text{Ca}^{2+}$ 의 변화에 따른 phospholipase 활성화 및 중성지질 축적을 저해하여 간보호 효과에 참여할 것으로 추정된다.

G009의 간보호 효과와 지질 과산화의 상관성을 알아보기 위하여, GOT와 GPT 및 간 homogenate와 혈청내의 MDA치를 plot하여 본 결과, G009 투여시 GOT와 GPT치가 낮아질수록 간 homogenate내의 지질 과산화를 억제시켰으며, 이들의 상관 관계는 높은 것으로 조사되었다(r 값: GOT, 0.9579; GPT, 0.9952). 혈청내에 있어서도 GOT와 GPT치가 떨어질수록 과산화 지질의 생성은 낮아지는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 G009의 간장질환 치료효과의 일부는 지질 과산화 억제를 통하여 일어나고 있는 것으로 사료된다.

Virus성 간염 모델과 유사한 병변을 일으키는 것으로 알려진 galactosamine의 경우, 100 mg/kg의 G009 투여군은 대조군보다 GOT는 50.0%, GPT는 54.2%의 간보호력을 나타내었다. 또한 현재 간장질환 치료제로 이용되고 있는 silymarin의 경

우에 있어서는 100 mg/kg의 농도에서 GOT 및 GPT가 각각 48.9%와 31.9%의 간 보호력을 보였다. 이와 같은 결과를 볼 때, G009는 D-galactosamine 독성유발 모델에서 silymarin과 유사하거나 약간 우수한 간보호 효과를 나타내고 있었다 (Fig. 2).

이상의 결과들로부터 G009는 CCl<sub>4</sub>에 의해 야기되는 간세포의 파괴를 보호하는 성분이 존재하며, G009의 항산화력은 간장질환 보호에 어떠한 역할을 수행하고 있는 것으로 추정된다.

### 인용문헌

- Itoh, Y., Shimura, H., Ito, M., Watanabe, N., Yamagishi, M., Tamai, M. and Hanada, K. (1991) A novel hepatoprotective  $\gamma$ -lactone, MH-031. I. Discovery, isolation, physico-chemical properties and structural elucidation. *The J. Antibiot.* 44: 832-837.
- Park, Y. M., Yoon, S. K., Park, S. H., Baeg, N. J. and Kim, B. S. (1993) Efficacy and safety of *Coriolus versicolor* polysaccharide(Licovek) in the treatment of chronic type B hepatitis. *Kor. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1: 45-54.
- Williams, D. L. and DiLuzio, N. R. (1980) Glucan-induced modification of murine viral hepatitis. *Science* 208: 67-69.
- 李時珍 (1977) 本草綱目, 28, 42. 國立中國醫藥研究所.
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, N. and Misaki, A. (1985) Structure and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* 49: 2641-2643.
- Kubo, M., Matsuda, H., Tanaka, M., Kimura, Y., Tani, T., Arichi, S., Okuda, H. and Kirigiya, M. (1980) 靈芝(*Ganoderma lucidum*, 子實體)の研究-マンネンタケ熱水抽出エキスの實驗的高脂血症に對する作用. 基礎と臨床 14: 2455-2460.
- Shimizu, A., Yano, T., Saito, Y. and Inada, Y. (1985) Isolation of an inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 3012-3015.
- Liu, G. T., Wang, G. F., Wei, H. L., Bao, T. T. and Sung, Z. Y. (1979) Comparison of the protective actions of dimethylbiphenyldicarboxylate, trans-stilbene, alcoholic extracts of *Polyporus japonicus* and *Ganoderma* towards experimental liver injury in mice. *Yao Hseueh Hseueh Pao* 14: 598.
- 이주영, 박기숙, 정진호, 조미정, 고헌호, 이준우, 정훈, 이승룡 (1994) G009의 간보호작용에 관한 연구. 한국응용약물학회지 2: 206-212.
- Lee, J. W., Han, M. D. and Lee, K. H. (1992) Screening of hepatoprotective substances from higher fungi by primary cultured rat hepatocytes intoxicated with carbon tetrachloride. *Kor. J. Mycology* 20: 10-17.
- 박은전, 김기영, 김재백, 김수용, 이승룡, 손동환 (1994) 영지로부터 추출한 다당체의 실험적 간경화에 대한 섬유화 억제효과. *Yakhak Hoeji* 38: 338-344.
- Albano, E., Lott, K. A., Slater, T. F., Stier, A., Symons, M. C. R. and Tomasi, A. (1982) Spin-trapping studies on the free-radical products formed by metabolic activation of carbon tetrachloride in rat liver microsomal fractions isolated hepatocytes and *in vivo* in the rat. *Biochem. J.* 204: 593-603.
- Slater, T. F., and Sayer, B. C. (1971) The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenalkanes on peroxidative reaction in rat liver fraction *in vitro*. *J. Biochem.* 123: 805-814.
- Recknagel, R. O. (1973) Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 19: 145-208.
- Mihara, M. and Uchiyama, M. (1981) Evaluation of thiobarbituric acid (TBA) value as an index of lipid peroxidation in CCl<sub>4</sub>-intoxicated rat liver. *Yakugaku Zasshi* 101: 221-226.
- Sawaki, S., Inagaki, T., Kato, K., Ito, R., Koike, Masato, Takiya, S. and Matsuura, M., Sugiura, M., Ito, Y. and Hirano, K. (1982) Biological and immunological activities of superoxide dismutase in human serum with various hepatic diseases. *醫學のあゆみ* 122: 1136-1137.
- 金田 尚志, 植田伸夫 (1983) 過酸化脂質試験法, 82-83. 醫齒藥出版株式會社, 東京.
- Yoden, K., Iio, T. and Tabata, T. (1980) Measurement of thiobarbituric acid value in tissue homogenate solubilized with sodium dodecylsulphate. *Yakugaku Zasshi* 100: 553-559.
- Kiso, Y., Tohkin, M., Hikino, H., Hattory, M., Sakamoto, T. and Namba, T. (1984) Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin. I: Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta Med.* 50: 298-303.

20. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
21. Lippi, U. and Guidi, G. (1970) A new colorimetric ultramicro method for glutamic oxaloacetic and glutamic-pyruvic transaminase determination. *Clin. Chim. Acta* 28: 431-437.
22. Kafalas, V and Stacey, N. H. (1989). Potentiation of carbon tetrachloride induced lipid peroxidation by trichloroethylene in isolated rat hepatocytes (No role in enhanced toxicity). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 101: 158-169.
23. Long, R. M., and More, L. (1988) Biochemical evaluation of rat hepatocyte primary cultures as a model for carbon tetrachloride hepatotoxicity: Comparative studies *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92: 295.

(1996년 6월 10일 접수)