

마늘에 의한 사염화탄소 간독성의 보호 효과

최병선, 이종문, 박정덕, 홍연표

중앙대학교 의과대학 예방의학교실

The Protective Effects of Garlic against Carbon tetrachloride-induced Hepatotoxicity

Byung-Sun Choi, Jong-Moon Lee, Jung-Duck Park, Yeon-Pyo Hong

Department of Preventive Medicine and Community Health, College of medicine, Chung-Ang University

Objectives : The purpose of this study was to find the protective effects of garlic on the halogenated hydrocarbon induced hepatotoxicities, and the possible protection mechanisms involved.

Methods : Male Sprague-Dawley rats received garlic (0.5 %) or regular diet, for 4 weeks. This was followed by a single dose of corn oil (the controls), carbon tetrachloride (400mg/kg body weight) and trichloroethylene (2,000mg/kg body weight) being administered to each diet group. Blood samples were collected 24 hours following the administration, and the serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities measured. The liver samples were studied for their cytochrome P450 and CYP2E1 contents, lipid peroxidation and histopathology.

Results : The results for the group receiving the 0.5 % garlic diet showed a slight decrease of CYP2E1 expression compared with the regular diet group. Carbon tetrachloride was significantly decreased the CYP2E1 contents in both the regular and garlic diet

groups, but the trichloroethylene remained unchanged. Garlic did not decrease the lipid peroxidation of the liver in the control group, but attenuated the increase of lipid peroxidation caused by carbon tetrachloride. Garlic attenuated the increase of both the serum AST and ALT activities caused by carbon tetrachloride. The histopathological observations also showed that garlic attenuated centrilobular necrosis and vacuolar degenerative changes significantly in the carbon tetrachloride treated group.

Conclusions : The results indicate that garlic attenuates the carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, through the prevention of the metabolic activation and lipid peroxidation.

Korean J Prev Med 2002;35(3):221-228

Key Words: Garlic, Carbon tetrachloride, Trichloroethylene, Liver/injuries, Protective agents

서론

사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl₄)나 트리클로로에틸렌(trichloroethylene, TCE)과 같은 할로젠화 탄화수소는 탁월한 탈지(degreasing) 효과로 인하여 자동차나 금속 산업장에서 금속기계제품의 세척제로 널리 사용되었다. 하지만 사염화탄소는 간독성 및 신장독성이 심하며 [1,2], 랫트나 마우스에서 악성 종양을 유발하는 것으로 알려져 [3] 세척제로의 사용은 제한되고 있으며, 곡물 훈증제 등에 일부 사용되고 있다. 반면 독성이 비교적 적은 것으로 알려진 트리클로로에틸렌은 아직도 산업장에서 세척제로 널리 사용되고 있어, 산업장 뿐 아니라 지

하수, 대기, 토양 등에서도 흔히 검출되고 있다 [4,5].

트리클로로에틸렌도 독성이 사염화탄소보다 약하기는 하나 중추신경 억제, 심장 기능의 장애와 간독성, 신독성 등의 급성 효과가 나타나며 [6] 랫트나 마우스의 간, 폐, 신장에서 악성 종양을 일으키는 것으로 알려져 중요한 보건문제 중의 하나로 대두되고 있다 [7].

이러한 할로젠화 탄화수소가 독성을 나타내기 위해서는 체내에서 대사되어 독성 대사산물로 활성화되는 대사활성화(metabolic activation) 단계가 필요하며, 이 단계에 이물질 대사 효소인 cytochrome P450이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [8-10].

사염화탄소는 간 마이크로솜의 cytochrome P450에 의하여 대사되어 trichloromethyl 라디칼로 되며, 이는 CHCl₃로 변형되거나, 또 다른 trichloromethyl 라디칼과 결합하여 hexachloroethane 형태로 될 수 있으며, 세포의 거대분자와 반응하여 지질 과산화물을 일으키고 세포 단백질을 변성시킨다 [11]. 이때 주로 작용하는 cytochrome P450 효소는 2E1과 2B1/2B2로 알려져 있다 [12-14].

트리클로로에틸렌도 간 마이크로솜의 P450 2E1 (CYP2E1)에 의해 대사되어 trichloroacetic acid와 dichloroacetic acid 같은 대사활성화물로 되어야 독성이 나타나는 것으로 알려져 있으며 [8,9,15], 이들 물질들은 지질 과산화와 DNA의 산화손상을 일으켜 악성종양을 유발하는 것으로 보고되고 있다 [16-18].

접수 : 2002년 5월 21일, 채택 : 2002년 8월 16일

이 논문은 2001학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임

책임저자 : 최병선 (서울시 동작구 흑석동 221, 전화 : 02-820-5692, 팩스 : 02-815-9509, e-mail : bschoi@cau.ac.kr)

한편 마늘(garlic, *Allium sativum*)은 혈청 및 간의 콜레스테롤치를 낮추며 [19,20] 혈소판의 응집을 억제하고 [21,22] 항균작용을 가지고 있어 [23], 오래 전부터 심장질환, 종양, 감염이나 두통의 치료제로 사용되었다 [24-26]. 중국이나 이탈리아에서 행해진 역학조사에서도 마늘을 많이 섭취한 사람에서 위암의 발생이 감소한다는 보고가 있으며 [27,28], 동물실험에서도 화학적으로 유발한 간암 [29,30], 피부암 [31,32], 자궁 경부암 [33], 위암 [34] 등을 억제한다고 하였다.

이 밖에도 acetoaminophene이나 bromobenzene과 같은 간독성 물질에 대해 방어 효과가 있는 것으로 알려졌으며 [35-38], 이는 이물질 대사 효소인 cytochrome P450 효소나 glutathione S-transferase(GST) 효소의 활성 변화에 의한 것으로 여겨진다 [36,38,39]. 또한 마늘은 항산화제로 작용하여 발암성 물질이나 독성 물질의 유리 라디칼을 제거하는 것으로 알려져 있다 [40-43].

할로겐화 탄화수소의 독성기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않으나, 대사산물에 의한 산화 스트레스가 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며 [44,45], 마늘은 이러한 할로겐화 탄화수소의 대사 및 대사산물에 의한 산화 스트레스에 영향을 미치리라 생각된다.

이에 본 연구에서는 랫트를 마늘 식이를 한 군과 대조 식이군으로 나누고 트리클로로에틸렌과 사염화탄소를 1회 경구 투여하여 간세포 마이크로솜의 cytochrome P450 효소와 지질 과산화를 간독성 지표 및 조직병리학적 소견과 함께 관찰하여, 할로겐화 탄화수소의 간손상 및 마늘의 방어 효과 기전을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 처치

본 연구에 사용된 실험동물은 3 주령의 APF (animal pathogen free) Sprague-Dawley계 수컷 랫트로, (주)샘타코로부터 분양 받아 1 주일 전부터 온도 23 ± 2 °C, 습도 50 ± 5 %, 채광 12 시간인 사육장에

서 사육하여 특별한 이상이 없음을 확인한 다음 실험에 사용하였다. 실험동물은 마늘 식이군과 대조 식이군으로 나누어, 마늘 식이군은 AIN(American Institute of Nutrition)-93M diet에 0.5%의 마늘을 섞어 주고, 대조 식이군은 AIN-93M diet만 4주간 식이시켰다. 각 군은 다시 대조군, 트리클로로에틸렌 투여군과 사염화탄소 투여군으로 나누어 트리클로로에틸렌 투여군은 2,000 mg/kg의 용량을 corn oil에 섞어 1회 경구 투여하였고, 사염화탄소 투여군은 400 mg/kg의 용량을 corn oil에 섞어 경구 투여하였으며, 대조군은 동일한 양의 corn oil을 경구투여하였다.

모든 실험동물은 경구 투여 후 24 시간에서 경추탈골에 의하여 희생시켰다. 각각의 실험군은 6 마리로 하였다.

2. 연구방법

1) 간세포 마이크로솜 분획의 분리

간세포 마이크로솜은 Lambert와 Freedman [46]의 방법을 다소 수정하여 분리하였다. 즉 실험동물을 희생시킨 후 즉시 간을 적출하여 4 °C이하로 냉각된 생리적 식염수로 2-3 회 씻어 혈구를 제거하고 조직을 잘게 썰은 후, 0.25 M sucrose, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂를 함유한 Tris-HCl (pH 7.5) 용액을 4 배용량 첨가하여, Potter-Elvehjem 조직분쇄기로 2 회 균질화하였다. 균질화 된 간조직은 680 ×g에서 10 분간 원심분리 (Centrikon T-124, Kontron Inst., Switzerland) 하여 그 상층액을 취하고 이를 12,000 ×g에서 10 분간 원심분리 하여 post-lysosomal 상층액을 얻은 뒤 다시 100,000 ×g에서 60 분간 초고속원심분리 (Optima XL-100K Ultracentrifuge, Beckman, U.S.A.) 하였다. 이렇게 하여 얻은 microsomal pellet는 0.15 M Tris-HCl (pH 8.0) 용액으로 균질화 한 후 다시 100,000 ×g에서 30 분간 원심분리 하여 남은 pellet를 0.25 M sucrose로 resuspension 하여 마이크로솜 분획을 얻었다. 이때 마이크로솜의 단백질 함량은 20 mg/ml 정도 되게 하였다. 분리한 마

이크로솜은 0.5 ml 씩 분주하여 -80 °C에 보관한 후 단백질 및 cytochrome P450 정량과 면역항체 실험을 수행하였다.

2) 단백질과 cytochrome P450 정량

간세포 마이크로솜의 단백질은 Lowry 등 [47]의 방법으로 의하여 정량하였으며 표준용액으로는 bovine serum albumin을 사용하였다. Cytochrome P450은 Omura와 Sato [48]의 방법에 따라 측정하였다. 0.3 ml의 마이크로솜에 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) 완충액을 5.7 ml 넣어 2 개의 cuvette에 2 등분 한 후 분광광도계 (UVKON 930, Kontron Inst., Switzerland)로 450 nm와 500 nm에서 흡광도를 측정 한 후 일산화탄소를 1 분간 bubbling (1 bubble/sec) 시키고 Na₂S₂O₄를 소량 넣어 450 nm와 500 nm에서 흡광도 차이를 측정하여 몰흡광계수 91 mM⁻¹cm⁻¹를 이용하여 계산하였다.

3) Western Immunoblot 분석

간세포 마이크로솜에 대한 전기영동은 Laemmli 등 [49]의 방법에 의해서 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE, 12 %)을 만든 후 시료 20 μg을 loading하여 실시한 후, Schleicher & Schuell사의 nitrocellulose transfer membrane (Protran®)을 마이크로솜 단백질이 분리된 gel 위에 올려 놓고 100 V에서 1 시간 30 분 동안 nitrocellulose transfer membrane으로 이적시켰다. Western immunoblot 분석은 Amersham사의 rat cytochrome P450 2E1 ECL western blotting kit를 이용하여 chemiluminescence 방법으로 실시하였고, 여기서 나온 결과는 Image analysis software (Bio-profil, France)를 이용하여 대조군에서 나타난 band를 기준으로 반정량화하였다.

4) 간 조직 내 지질 과산화 측정

간 조직 내 지질 과산화는 Ohkawa 등 [50]의 방법을 이용하여 TBARS assay를 통하여 측정하였다. 이때 시료는 간조직에 10 배 부피의 1.15 % KCl 용액을 첨가하여 Potter-Elvehjem 조직분쇄기로 2 회 균질화하여 사용하였으며, 8.1%

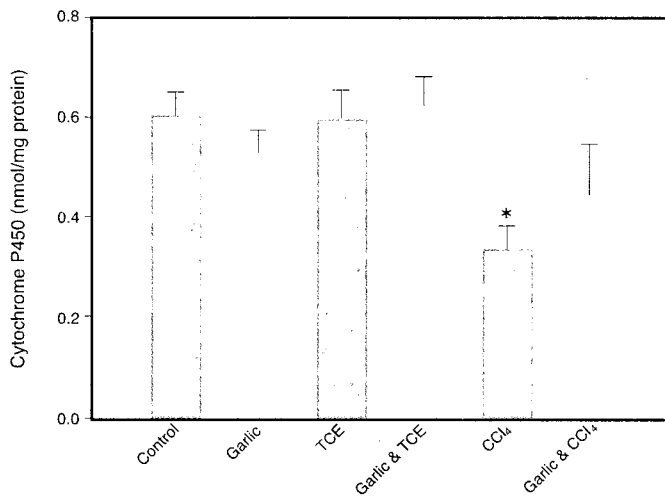


Figure 1. P450 levels in liver microsomes from control, TCE-treated and CCl₄-treated rat with or without garlic pretreatment. Values represent mean \pm SEM. The asterisk(*) denotes values significantly different from controls, $p < 0.01$

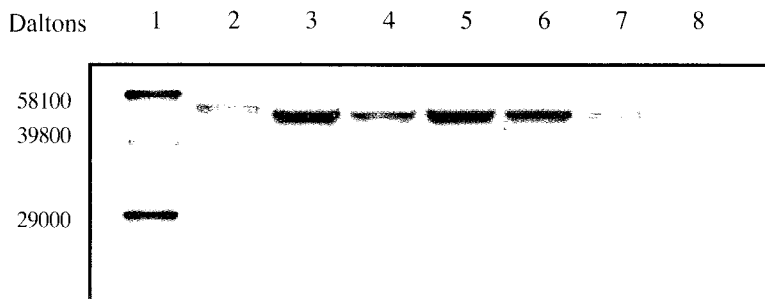


Figure 2. Western immunoblot analysis for microsomes of control, TCE-treated and CCl₄-treated rat with or without garlic.

Lane 1: ECL molecular weight markers, Lane 2: Ethanol treated rats, 5 μ g
 Lane 3: Control rats, Lane 4: Garlic-treated rats
 Lane 5: TCE-treated rats, Lane 6: Garlic & TCE-treated rats
 Lane 7: CCl₄-treated rats, Lane 8: Garlic & CCl₄-treated rats

Table 1. CYP2E1 levels in liver microsomes from control, TCE-treated and CCl₄-treated rats with or without garlic pretreatment

Regular	Control	TCE	CCl ₄
Control diet	1.00 \pm 0.00	1.02 \pm 0.04	0.34 \pm 0.07**
Garlic diet	0.77 \pm 0.09**	1.00 \pm 0.07	0.26 \pm 0.09**

Values represent mean \pm SEM
 The asterisk(**) denotes values significantly different from controls, $p < 0.01$

SDS 0.1 ml, 20 % acetic acid 0.75 ml와 0.8% thiobarbituric acid 0.75 ml를 시료 0.1 ml에 첨가하여 95 $^{\circ}$ C oil bath에서 30 분간 가열시킨 후 즉시 냉각시켜 반응을

정지시켰다. 이 용액에 0.5 ml의 증류수와 2.5 ml의 n-butanol와 pyridine 혼합액 (15:1, v/v)을 넣어 30 초간 잘 혼합한 후, 1000 \times g에서 15 분간 원심분리하여, 상

층액을 형광광도계(excitation: 515 nm; emission: 553 nm, SFM 25, Kontron Inst., Switzerland)로 측정하였다.

5) Aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 활성도 측정

혈중 AST와 ALT 활성도는 Sigma사의 diagnostic kit를 이용하여 측정하였다.

6) 조직 표본 제작

적출한 간의 일부를 10 % formalin 용액에 24 시간 동안 침적 고정한 다음, 통상적인 조직처리과정을 거쳐 paraffin 포매하였다. 이것을 5 μ m 두께로 절편을 만들어 hematoxylin-eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰 하였다.

7) 자료 분석

모든 자료는 SAS package (version 8.01)를 이용하였다. 트리클로로에틸렌과 사염화탄소 투여 및 마늘 식이군과 대조 식이간의 간세포 마이크로솜 cytochrome P450, CYP2E1 함량, 지질 과산화와 AST 및 ALT의 활성도의 차이는 비모수 검정인 Wilcoxon rank sum test를 시행하였다.

결과

1. Cytochrome P450의 변화

대조 식이와 마늘 식이를 섭취한 랫트에서 대조군, 트리클로로에틸렌 투여군과 사염화탄소 투여군의 간세포 마이크로솜의 P450의 함량은 Figure 1과 같다. 대조군에서는 마늘 식이군에서 0.53 ± 0.04 nmol/mg protein로, 대조 식이군의 0.60 ± 0.05 nmol/mg protein과 차이가 없었다($p=0.379$). 트리클로로에틸렌 투여군과 사염화탄소 투여군에서는 마늘 식이군이 각각 0.63 ± 0.06 , 0.45 ± 0.10 nmol/mg protein으로 대조 식이군의 0.60 ± 0.06 , 0.34 ± 0.05 nmol/mg protein보다 다소 증가하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다 ($p=1.000$, $p=0.471$). 대조 식이군에서 트리클로로에틸렌 투여군은 대조군과 차이가 없었으나, 사염화탄소 투여군에서는 현저하게 감소하였다 ($p=0.005$).

2. Western immunoblot 결과

랫트의 CYP2E1 단백질의 항체를 이용하여 Western immunoblot을 시행한 결과는 Figure 2와 Table 1과 같다. 대조군에서는 마늘 식이를 시킨 랫트에서 band 밀도가 0.77 ± 0.09 로 대조 식이를 시킨 랫트의 1.00 보다 감소하였다 ($p=0.008$). 하지만 트리클로로에틸렌 투여군과 사염화탄소 투여군에서는 마늘 식이에 따른 차이를 볼 수 없었다. 대조 식이군에서는 사염화탄소 투여시 CYP2E1이 현저히 감소하여 그 band 밀도가 0.34 ± 0.07 로 나타났으나 ($p=0.008$), 트리클로로에틸렌 투여에 따른 차이는 보이지 않았다($p=0.656$). 한편 마늘 식이군에서는 사염화탄소 투여시에는 CYP2E1이 감소하여 band 밀도가 0.26 ± 0.09 로 나타났으나 ($p<0.022$), 트리클로로에틸렌 투여시에는 오히려 1.00 ± 0.07 로 증가하는 경향을 보였다 ($p=0.060$).

3. 간 조직내 지질 과산화

사염화탄소의 간독성 기전으로 알려져 있는 지질 과산화에 대한 측정 결과는 Figure 3과 같다. 대조군에서 마늘 식이 여부에 따른 지질 과산화의 차이는 관찰되지 않았다. 사염화탄소 투여시 대조 식이군에서는 0.28 ± 0.05 mM/g liver wet weight로 대조군의 0.14 ± 0.01 mM/g liver wet weight보다 증가하였으며 ($p=0.027$), 이러한 사염화탄소에 의한 지질 과산화의 증가는 마늘 식이군에서는 나타나지 않아 0.15 ± 0.02 mM/g liver wet weight로 대조군과 차이가 없었다 ($p=0.689$). 트리클로로에틸렌 투여시에는 지질과산화의 증가를 관찰할 수 없었다.

4. 혈중 AST, ALT 활성도

간세포 손상의 지표로 흔히 사용되는 혈중 AST와 ALT 활성도를 측정된 결과는 Figure 4와 같다. 대조군에서 마늘 식이로 인한 AST 및 ALT의 변화는 나타나지 않았다. 사염화탄소 투여시에는 AST가 424.2 ± 56.2 IU/L로 대조군의 103.3 ± 10.3 보다 현저히 증가하였으며

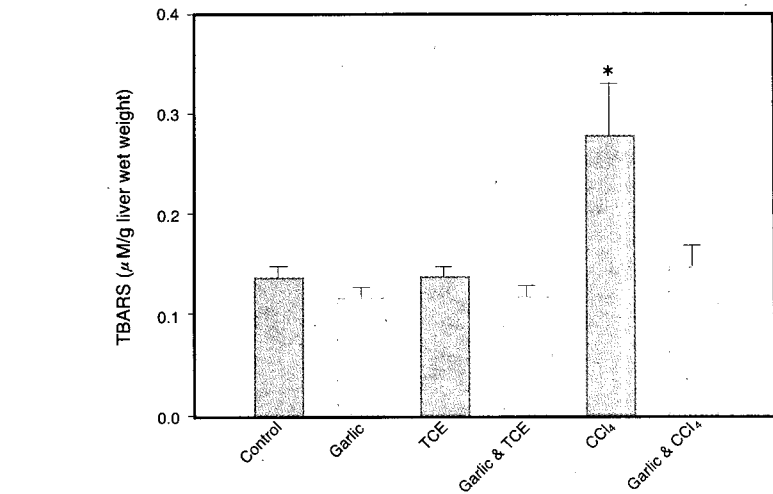


Figure 3. Lipid peroxidation level in liver tissue by thiobarbituric acid reaction. Values represent mean ± SEM. The asterisk(*) denotes values significantly different from controls, $p<0.05$.

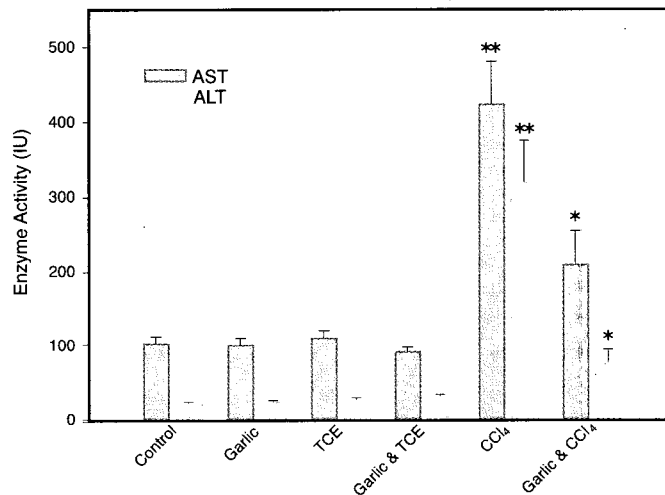


Figure 4. AST and ALT activity in plasma from control, TCE-treated and CCl₄-treated rat with or without garlic pretreatment. Values represent mean ± SEM. The asterisks(*, **) denote values significantly different from controls, respectively $p<0.05$, $p<0.01$.

($p=0.005$), 마늘 식이를 시킨 군에서는 208.3 ± 45.3 IU/L로 대조군보다는 증가하였으나 ($p=0.042$) 사염화탄소만 투여한 군보다는 감소하였다 ($p=0.043$). ALT 활성도도 사염화탄소 투여시에는 318.8 ± 55.6 IU/L로 대조군의 21.3 ± 1.1 IU/L보다 현저하게 증가하였으며 ($p=0.005$), 마늘 식이를 시킨 군에서는 72.8 ± 20.7 IU/L로 사염화탄소로 인한 간 손상을 감소시키는 것으로 나타났다

($p=0.014$). 하지만 트리클로로에틸렌 투여에 따른 AST와 ALT의 활성도 변화를 관찰할 수 없었다.

5. 조직병리학적 소견

광학현미경 소견상 대조군의 간은 종말간세포정맥과 간문맥을 포함한 간소엽이 잘 보존되어 있었다 (Figure 5-A). 마늘 식이를 시킨 랫트에서도 대조군과 뚜렷한 차이를 볼 수 없었고 (Figure 5-B), 트

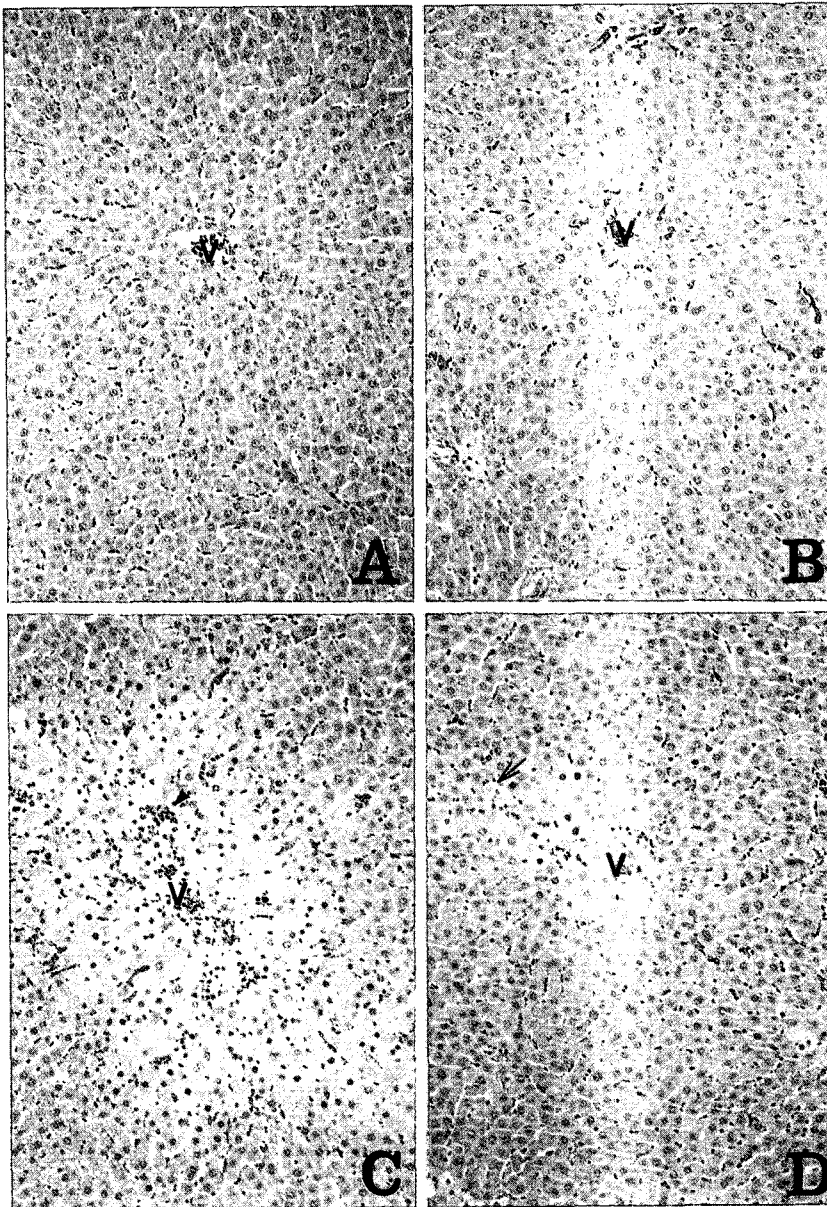


Figure 5. Photomicrographs of paraffin-embedded rat liver (Hematoxylin-eosin stain, $\times 100$). (A) Corn oil treated rat liver. Hepatic cells were arranged into lobules with a central vein (v) in the center. The histological structure of the liver appeared normal. (B) Garlic & corn oil treated rat liver. No significant change was found in the hepatic contexture. (C) CCl_4 -treated rat liver. Centrilobular necrosis (arrow head), massive vacuolar degeneration and microvesicular fatty change were observed. (D) Garlic & CCl_4 -treated rat liver. A few apoptotic body (arrow) and mild vacuolar degeneration were found in centrilobular area.

리클로로에틸렌 투여시에도 대조 식이군이나 마늘 식이군 모두에서 뚜렷한 조직병리학적 이상소견을 관찰할 수 없었다. 사염화탄소를 투여한 군에서는 종말간세포 정맥 부근의 소염중심대 간세포는 국소적인 괴사와 광범위한 공포성 변성이 관

찰되었다 (Figure 5-C). 또한 소염중심대에 있는 간세포의 세포질에는 작은 지방방울로 채워져 있는 지방변성이 관찰되었다. 마늘 식이군에서는 사염화탄소를 투여하였을 때 소염중심대에 2-3개의 간세포가 괴사되어 간세포 코오드에서 떨

어져 나온 apoptotic body와 경미한 공포성 변성이 관찰되었으나 소염중심대에 지방변성은 없었다 (Figure 5-D).

고찰

최근 녹차나 약용 식물(herb), 그리고 고추나 마늘 등의 향신료와 같은 식품이 암의 발생과정이나 화학물질에 의한 손상을 억제하는 것으로 알려져 관심이 높아지고 있다 [51-54]. 이들 식품 성분들의 화학물질에 대한 보호 효과는 이들의 항산화 작용에 의해 설명되기도 하나, 더 강력한 항산화 제제보다 더 큰 효과가 나타나는 것을 볼 때 항산화 효과만으로 설명하기에는 부족하다 [55,56].

많은 발암물질이나 화학적 손상을 일으키는 물질들은 그 독성을 나타내기 위해서 대사 활성화가 필요하며, 여기에는 주로 phase I 약물대사 효소에 해당하는 cytochrome P450이 주로 관여한다 [57]. 따라서 이들 이물질 대사 효소의 활성도를 변화시키는 물질들은 화학적 독성이나 발암성을 증가시키기도 하며 감소시키기도 한다.

마늘에는 30 여 가지의 유기황 화합물 (organosulfur compounds)이 함유되어 있으며, 생마늘에서는 allin이 주된 성분인데 이는 불안정하여 쉽게 diallyl sulfide (DAS), methyl allyl sulfide, diallyl disulfide(DADS)와 diallyl trisulfide와 같은 황화물 유도체(sulfide derivatives)로 전환된다. 마늘은 phase I 효소인 cytochrome P450 2E1과 1A 및 3A 효소를 억제시키며 [38], phase II 효소인 glutathione S-transferase를 유도한다고 알려져 있다 [58-60].

이번 연구에서도 마늘을 섭취한 랫트에서 대조 식이군보다 CYP2E1의 함량이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 간 마이크로솜 cytochrome P450은 마늘 섭취에 따른 감소를 나타내지 않았다. 트리클로로에틸렌 투여 시에는 대조 식이군이나 마늘 섭취군 모두에서 CYP2E1 함량의 대조군과 차이가 없었다. Lee 등 [61]은 트리클로로에틸렌을 경구 투여하

면, CYP2E1의 활성도는 증가하며, 투여 후 12 시간에 최고를 이룬 뒤 서서히 감소하여 24 시간에는 정상수준으로 돌아온다고 하였다. 투여 후 24 시간에서 관찰한 이번 연구 결과에서 CYP2E1이 정상 수준인 것은 트리클로로에틸렌 투여 후 증가하였다가 다시 정상 수준으로 돌아온 것으로 추정된다. CYP2E1은 aceton과 같은 기질과 결합하면 cAMP-의존 단백질 분해를 억제하여 CYP2E1이 유도되는 것으로 알려졌다 [62], 트리클로로에틸렌과 결합하였을 때도 이와 비슷한 효과가 있다고 하였다 [61]. 트리클로로에틸렌 투여군에서 마늘 식이에 의한 CYP2E1의 감소를 보이지 않은 것은 아마도 이러한 기전에 의해 CYP2E1의 분해가 억제되기 때문으로 생각된다. 대조 식이군에서 사염화탄소 투여시에는 cytochrome P450 및 CYP2E1이 현저하게 감소하여 Wang 등의 연구 [63]와 일치하였다. 사염화탄소에 의한 cytochrome P450이나 CYP2E1의 억제는, 사염화탄소의 대사산물들이 CYP2E1 효과와 결합하여 그 활성도를 떨어뜨리는 suicide metabolism으로 설명하고 있다 [63,64]. 사염화탄소 투여 시, 마늘 섭취군에서 대조 식이군보다 CYP2E1의 감소가 더 현저하지 않은 것은 아마도, 마늘 섭취로 인해 CYP2E1 활성도의 감소가 있는 상태에서 사염화탄소의 대사산물이 덜 만들어지고 이로 인해 suicide metabolism이 심하게 일어나지 않은 것으로 생각된다.

사염화탄소나 트리클로로에틸렌의 간독성 기전 중 하나로 설명되고 있는 지질 과산화물 측정된 결과 대조군에서 마늘 섭취로 인한 TBARS의 감소는 관찰할 수 없었다. Park과 Choi [54]는 0.5, 2.0, 5.0%의 마늘을 첨가한 식이를 섭취시킨 랫트를 통한 실험에서 2.0%의 마늘 첨가 식이군에서부터 지질 과산화가 억제되는 것으로 보고하였고, Sheweta 등 [65]은 800 mg/kg body weight 용량의 마늘을 12일간 경구 투여한 실험에서 TBARS의 감소가 나타나지 않을 것을 볼 때, 본 실험에서 사용한 0.5%의 마늘

용량은 항산화 효과를 나타내기에는 충분하지는 않은 것으로 생각된다.

본 실험결과 트리클로로에틸렌을 투여하였을 때에는 대조 식이군과 마늘 식이군 모두에서 TBARS는 감소하지 않았지만 사염화탄소를 투여하였을 때, 대조 식이군에서는 TBARS가 증가하였고, 마늘 식이군에서는 TBARS가 대조군과 차이를 보이지 않아, 마늘이 사염화탄소로 인한 지질 과산화에 보호 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 위의 결과는 지질 과산화에 대한 마늘의 보호효과는 마늘 자체의 항산화 작용에 의한 것이라기 보다는 사염화탄소의 대사 효소인 CYP2E1의 활성을 억제시켜 대사 활성도가 덜 일어나게 되고 따라서 산화 스트레스가 감소한 것이라는 것을 시사한다.

트리클로로에틸렌 및 사염화탄소의 간독성에 대한 마늘의 보호 효과를 확인하기 위하여 AST와 ALT의 활성도와 조직병리학적 소견을 관찰한 결과, 2,000 mg/kg body weight 용량의 트리클로로에틸렌 투여에 따른 간독성은 관찰할 수 없었으나, 400 mg/kg body weight 용량의 사염화탄소 투여 시에는 AST와 ALT의 활성도가 현저히 증가하였고, 소엽중심대 간세포에 괴사 및 광범위한 공포성 병변이 나타나, 간독성이 사염화탄소에서 훨씬 강력함을 확인할 수 있었다. 이러한 사염화탄소에 의한 간독성은 마늘 식이군에서는 현저하게 감소하여 AST 및 ALT 활성도가 대조군보다는 증가하였으나 사염화탄소를 투여한 대조 식이군보다는 유의하게 낮게 나타났고, 조직병리학적 소견상에서도 보호효과가 뚜렷하여 간세포의 괴사는 보이지 않았고, 일부 간세포에 apoptosis와 국소적인 공포성 병변만이 관찰되었다. Wong 등 [66]은 CYP2E1 knockout mice에서는 사염화탄소로 인한 AST나 ALT의 증가 및 간세포 괴사와 같은 간독성이 나타나지 않는다고 보고하였는데, 마늘 식이를 통하여 CYP2E1이 억제된 본 연구에서도 비슷한 결과가 나타나, 사염화탄소의 독성에 있어서 CYP2E1이 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다.

트리클로로에틸렌은 비교적 간독성이 작아 고농도인 2,000 mg/kg body weight 용량 투여 시, 대조 식이군에서도 간독성이 나타나지 않아 마늘에 의한 보호 효과가 있는지를 확인할 수 없었다. 하지만 CYP2E1의 발현 양상이 사염화탄소와는 다르게 나타나, 그 독성에 대한 마늘의 효과 또한 다를 수 있으리라 생각되며, 따라서 마늘이 장기간에 걸친 트리클로로에틸렌 투여로 인한 간독성 및 발암성에 보호효과가 있는지를 연구하는 것은 트리클로로에틸렌의 독성 및 발암성 기전을 연구하는데 있어 중요한 단서를 제공할 수 있으리라 생각된다. 아울러 마늘이 phase II 약물 대사효소에 미치는 영향과 이로 인한 화학물질 독성의 보호 효과에 대한 연구도 필요하리라 생각된다.

결론

산업장에서 금속 세척제로 흔히 사용되는 트리클로로에틸렌과 사염화탄소 등 할로젠화 탄화수소는 간독성과 신독성 뿐 아니라 발암성이 제기되고 있는 물질이다.

이들 물질은 cytochrome P450과 같은 이물질 대사효소에 의해 대사 활성화되어 그 독성이 나타나는 것으로 여겨지며, 여기에는 주로 CYP2E1이 관여하는 것으로 알려져 있다. 한편 마늘은 cytochrome P450 효소의 활성도를 변화시키며, 항산화 작용도 가지고 있어 화학물질로 인한 독성 및 암발생 과정을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 Sprague-Dawley계 랫트를 대조 식이군과 마늘 식이군으로 나누어 각각 트리클로로에틸렌(2,000 mg/kg body weight)과 사염화탄소(400 mg/kg body weight)를 1회 경구 투여한 후 CYP2E1, 지질 과산화 및 간손상 지표인 AST, ALT 활성도와 조직병리학적 소견을 관찰하여 이들 물질로 인한 간독성에 대한 마늘의 보호 효과를 살펴보았다.

대조군 중 마늘 식이를 섭취한 군에서는 CYP2E1이 감소하였고, 사염화탄소 투여 시 대조 식이군이나 마늘 식이군 모

두에서 CYP2E1이 현저하게 감소하였으나 트리클로로에틸렌 투여 시에는 대조군과 차이가 없었다. 지질 과산화는 대조군에서는 마늘 섭취로 인한 감소가 나타나지 않았으나, 사염화탄소 투여 시에는 대조 식이군에서 현저하게 증가한 반면 마늘 식이군에서는 대조군과 차이가 없어, 마늘이 사염화탄소에 의한 지질 과산화를 억제시키는 것으로 나타났다. AST 및 ALT 활성도는 사염화탄소 투여 시 대조 식이군에서는 현저하게 증가하였으나, 마늘 식이군에서는 대조 식이군 보다 활성도가 감소하였다. 조직병리학적 소견에서도 사염화탄소 투여시 대조 식이군에서는 소엽중심대에 괴사와 광범위한 공포성 병변이 나타났으나, 마늘 식이군에서는 세포 괴사는 관찰되지 않았고 국소적인 apoptosis와 공포성 병변만이 소엽중심대에서 나타났다. 이들 결과로부터 마늘은 CYP2E1 활성도 억제를 통하여 사염화탄소의 대사 활성화를 저해하여, 지질 과산화를 감소시켜, 사염화탄소로 인한 간독성에 보호효과를 보이는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Louria DB, Bogden JD. The dangers from limited exposure to carbon tetrachloride. *Crit Rev Toxicol* 1980; 7(2): 177-188
2. Flanagan RJ, Ruprah M, Meredith TJ, Ramsey JD. An introduction to the clinical toxicology of volatile substances. *Drug Saf* 1990; 5(5): 359-383
3. Reuber MD, Glover EL. Cirrhosis and carcinoma of the liver in male rats given subcutaneous carbon tetrachloride. *J Natl Cancer Inst* 1970; 44(2): 419-27
4. Defalque RJ. Pharmacology and toxicology of trichloroethylene: A critical review of the world literature. *Clin Pharmacol Ther* 1961; 2(5): 665-802
5. Waters EM, Gerstner HB, Huff JE. Trichloroethylene. I. An overview. *J Toxicol Environ Health* 1977; 2(3): 671-707
6. Davidson IW, Beliles RP. Consideration of the target organ toxicity of trichloroethylene in terms of metabolite toxicity and pharmacokinetics. *Drug Metab Rev* 1991; 23(5-6): 493-599
7. NCI(National Cancer Institute). Carcinoge-

8. nesis bioassay of trichloroethylene. Washington DC: US DHEW publication; 1976
8. van Duuren BL, Banerjee S. Covalent interaction of metabolites of the carcinogen trichloroethylene in rat hepatic microsomes. *Cancer Res* 1976; 36(7): 2419-2422
9. Bull RJ, Templin M, Larson JL, Stevens DK. The role of dichloroacetate in the hepatocarcinogenicity of trichloroethylene. *Toxicol Lett* 1993; 68(1-2): 203-211
10. Guengerich FP. Catalytic selectivity of human cytochrome P450 enzymes: relevance to drug metabolism and toxicity. *Toxicol Lett* 1994; 70(2): 133-138
11. McGregor D, Lang M. Carbon tetrachloride: genetic effects and other modes of action. *Mutat Res* 1996; 366(3): 181-195
12. Suarez KA, Carlson GP, Fuller GC. Effect of phenobarbital or 3-methylcholanthrene pretreatment on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 34(2): 314-319
13. Lindstrom TD, Anders MW, Remmer H. Effect of phenobarbital and diethyl maleate on carbon tetrachloride toxicity in isolated rat hepatocytes. *Exp Mol Pathol* 1978; 28(1): 48-57
14. Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on an ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Lett* 1985; 183(2): 265-269
15. Barton HA, Bull R, Schultz I, Andersen ME. Dichloroacetate (DCA) dosimetry: interpreting DCA-induced liver cancer dose response and the potential for DCA to contribute to trichloroethylene-induced liver cancer. *Toxicol Lett* 1999; 106(1): 9-21
16. Bull RJ, Sanchez IM, Nelson MA, Larson JL, Lansing AJ. Liver tumorinduction in B6C3F1 mice by dichloroacetate and trichloroacetate. *Toxicology* 1990; 63(3): 341-359
17. DeAngelo AB, Daniel FB, Stober JA, Olson GR. The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male B6C3F1 mouse. *Fundam Appl Toxicol* 1991; 16(2): 337-347
18. Volkel W, Friedewald M, Lederer E, Pahler A, Parker J, Dekant W. Biotransformation of perchloroethene: dose-dependent excretion of trichloroacetic acid, dichloroacetic acid, and N-acetyl-S-(trichlorovinyl)-L-cysteine in rats and humans after inhalation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 153(1): 20-27
19. Qureshi AA, Din ZZ, Abuirmeileh N, Burger WC, Ahmad Y, Elson CE. Suppression of avian hepatic lipid

20. metabolism by solvent extracts of garlic: impact on serum lipids. *J Nutr* 1983; 113(9): 1746-1755
20. Kamanna VS, Chandrasekhara N. Hypocholesteremic activity of different fractions of garlic. *Indian J Med Res* 1984; 79(4): 580-583
21. Ariga T, Oshiba S, Tamada T. Platelet aggregation inhibitor in garlic. *Lancet* 1981; 1(8212): 150-151
22. Apitz-Castro R, Cabrera S, Cruz MR, Ledezma E, Jain MK. Effects of garlic extract and of three pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure. *Thromb Res* 1983; 32(2): 155-169
23. Adetumbi MA, Lau BH. Allium sativum (garlic)--a natural antibiotic. *Med Hypotheses* 1983; 12(3): 227-237
24. Dausch JG, Nixon DW. Garlic: a review of its relationship to malignant disease. *Prev Med* 1990; 19(3): 346-361
25. Dorant E, van den Brandt PA, Goldbohm RA, Hermus RJ, Sturmans F. Garlic and its significance for the prevention of cancer in humans: a critical view. *Br J Cancer* 1993; 67(3): 424-429
26. Ernst E. Cardioprotection and garlic. *Lancet* 1997; 349(9045): 131
27. Buiatti E, Palli D, Bianchi S, Decarli A, Amadori D, Avellini C, Cipriani F, Cocco P, Giacosa A, Lorenzini L. A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *Int J Cancer* 1989; 44(4): 611-616
28. You WC, Blot WJ, Chang YS, Ershow A, Yang ZT, An Q, Henderson BE, Fraumeni JF Jr, Wang TG. Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81(2): 162-164
29. Matsuda T, Takada N, Yano Y, Wanibuchi H, Otani S, Fukushima S. Dose-dependent inhibition of glutathione S-transferase placental form-positive hepatocellular foci induction in the rat by methyl propyl disulfide and propylene sulfide from garlic and onions. *Cancer Lett* 1994; 86(2): 229-234
30. Samaranyake MD, Wickramasinghe SM, Angunawela P, Jayasekera S, Iwai S, Fukushima S. Inhibition of chemically induced liver carcinogenesis in Wistar rats by garlic (*Allium sativum*). *Phytother Res* 2000; 14(7): 564-567
31. Belman S. Onion and garlic oils inhibit tumor promotion. *Carcinogenesis* 1983; 4(8): 1063-1065
32. Sadhana AS, Rao AR, Kucheria K, Bijani V. Inhibitory action of garlic oil on the initiation of benzo[a]pyrene-induced skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett*

- 1988; 40(2): 193-197
33. Hussain SP, Jannu LN, Rao AR. Chemopreventive action of garlic on methylcholanthrene-induced carcinogenesis in the uterine cervix of mice. *Cancer Lett* 1990; 49(2): 175-180
 34. Sparnins VL, Barany G, Wattenberg LW. Effects of organosulfur compounds from garlic and onions on benzo[a]pyrene-induced neoplasia and glutathione S-transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis* 1988; 9(1): 131-134
 35. Hu JJ, Yoo JS, Lin M, Wang EJ, Yang CS. Protective effects of diallyl sulfide on acetaminophen-induced toxicities. *Food Chem Toxicol* 1996; 34(10): 963-969
 36. Lin MC, Wang EJ, Patten C, Lee MJ, Xiao F, Reuhl KR, Yang CS. Protective effect of diallyl sulfone against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Biochem Toxicol* 1996; 11(1): 11-20
 37. Wang BH, Zuzel KA, Rahman K, Billington D. Protective effects of aged garlic extract against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. *Toxicology* 1998; 126(3): 213-222
 38. Wang BH, Zuzel KA, Rahman K, Billington D. Treatment with aged garlic extract protects against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. *Toxicology* 1999; 132(2-3): 215-225
 39. Wang EJ, Li Y, Lin M, Chen L, Stein AP, Reuhl KR, Yang CS. Protective effects of garlic and related organosulfur compounds on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 136(1): 146-154
 40. Horie T, Murayama T, Mishima T, Itoh F, Minamide Y, Fuwa T, Awazu S. Protection of liver microsomal membranes from lipid peroxidation by garlic extract. *Planta Med* 1989; 55(6): 506-508
 41. Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 1994; 60(5): 417-420
 42. Kagawa K, Matsutaka H, Yamaguchi Y, Fukuhama C. Garlic extract inhibits the enhanced peroxidation and production of lipids in carbon tetrachloride-induced liver injury. *Jpn J Pharmacol* 1986; 42(1): 19-26
 43. Kourounakis PN, Rekkas EA. Effect on active oxygen species of alliin and *Allium sativum* (garlic) powder. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1991; 74(2): 249-252
 44. Pessayre D, Cobert B, Descatoire V, Degott C, Babany G, Funck-Brentano C, Delaforge M, Larrey D. Hepatotoxicity of trichloroethylene-carbon tetrachloride mixtures in rats. A possible consequence of the potentiation by trichloroethylene of carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and liver lesions. *Gastroenterology* 1982; 83(4): 761-772
 45. Cojocel C, Beuter W, Muller W, Mayer D. Lipid peroxidation: a possible mechanism of trichloroethylene-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 1989; 55(1-2): 131-141
 46. Lambert N, Freedman RB. The latency of rat liver microsomal protein disulphidase. *Biochem J* 1985; 228(3): 635-645
 47. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 401-404
 48. Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 1964; 239(7): 2370-2378
 49. Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 1970; 47(1): 69-85
 50. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-358
 51. Boyd JN, Babish JG, Stoewsand GS. Modification by beet and cabbage diet of aflatoxin AFB1-induced rat plasma α -foetoprotein elevation, hepatic tumorigenesis, and mutagenicity of urine. *Food Chem Toxicol* 1982; 20(1): 47-52
 52. Teel RW. Effect of capsaicin on rat liver S9-mediated metabolism and DNA binding of aflatoxin. *Nutr Cancer* 1991; 15(1): 27-32
 53. Xu Y, Ho CT, Amin SG, Han C, Chung FL. Inhibition of tobacco specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res* 1992; 52(14): 3875-3879
 54. Park K, Choi H. Modification of hepatic microsomal cytochrome P450 2E1 enzyme by garlic powder in rat hepatocarcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 1997; 30(1): 73-79
 55. Williams GM, Tanaka T, Maeura Y. Dose-related inhibition of aflatoxin AFB1 induced hepatocarcinogenesis by the phenolic antioxidants, butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Carcinogenesis* 1986; 7(7): 1043-1050
 56. Mandel HG, Manson MM, Judah DJ, Simpson JL, Green JA, Forrester LM, Wolf CR, Neal GE. Metabolic basis for the protective effect of the antioxidant ethoxyquin on aflatoxin AFB1 hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 1987; 47(19): 5218-5223
 57. Masuda Y, Nakayama N. Protective effect of diethylthiocarbamate and carbon disulfide against liver injury induced by various hepatotoxic agents. *Biochem Pharmacol* 1982; 31(17): 2713-2725
 58. Ip C, Lisk DJ. Modulation of phase I and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes by selenium-enriched garlic in rats. *Nutr Cancer* 1997; 28(2): 184-188
 59. Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavie MC, Suschetet M. Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rats treated with alkyl sulfides. *Cancer Lett* 1997; 120(2): 195-201
 60. Guyonnet D, Belloir C, Suschetet M, Siess MH. Antimutagenic activity of organosulfur compounds from *Allium* is associated with phase II enzyme induction. *Mutat Res* 2001; 495(1-2): 135-145
 61. Lee KM, Muralidhara S, White CA, Bruckner JV. Mechanisms of the dose-dependent kinetics of trichloroethylene: oral bolus dosing of rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 164(1): 55-64
 62. Song BJ, Veech RL, Park SS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *J Biol Chem* 1989; 264(6): 3568-3572
 63. Wang PY, Kaneko T, Tsukada H, Nakano M, Nakajima T, Sato A. Time courses of hepatic injuries induced by chloroform and by carbon tetrachloride: comparison of biochemical and histopathological changes. *Arch Toxicol* 1997; 71(10): 638-645
 64. Manno M, Ferrara R, Cazzaro S, Rigotti P, Ancona E. Suicidal inactivation of human cytochrome P-450 by carbon tetrachloride and halothane in vitro. *Pharmacol Toxicol* 1992; 70(1): 13-18
 65. Sheweita SA, Abd El-Gabar M, Bastawy M. Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: role of antioxidants. *Toxicology* 2001; 165(2-3): 217-224
 66. Wong FW, Chan WY, Lee SS. Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 153(1): 109-118