

수컷 SD(rat)에 CCl₄ 처리후 지구자 추출액의 간 보호효과 연구

마진열, 김상웅*

한국한의학연구원, * 삼성정밀화학(리드제넥스)

Abstract

Effect of *Hovenia dulcis* on liver protection in SD male rats treated with CCl₄

Ma Jinyeul, Kim Sangwoong*

Korea Institute of Oriental Medicine

* Samsung Fine Chemicals Co., Ltd. R&D Center (Lead genex)

We investigated liver protection effect of the *Hovenia dulcis* Thunb extraction which has treated with carbon tetrachloride (CCl₄, 1.0 mL/kg) in SD male rat (20 weeks). We observed the amount of leukocyte, erythrocyte, hemoglobin and hematocrit are increased and the number of plaque is decreased for treatment of CCl₄. However, after treatment of *Hovenia dulcis* Thunb extraction(15 mL/kg), we have same result that of control group which has treated with CCl₄. The blood biological data showed that the value of AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase) and LDH (Lactate dehydronase) are increased significantly for the negative control group compared to that of control group. For experimental group, increased gap for AST, ALT and LDH is decreased about 50% compared to that of the negative control group, respectively. In addition, it was confirmed that the recovery effect of a mysterious death of an interstitial cell of the experimental group is to be compared to that of the negative control group for a sample of pathological tissue.

Keywords : *Hovenia dulcis* Thunb, CCl₄, Blood Biochemistry, Liver Tissue

* 접수 : 2006년 2월 13일 수정 : 2006년 4월 8일 채택 : 2006년 4월 17일
교신저자 : 마진열, 대전광역시 유성구 전민동 461-24 한국한의학연구원 한약체제연구부.
Tel: 042-868-9475, Fax: 042-868-9471, E-mail: jyama@kiom.re.kr

I. 서론

지구자(*Hovenia dulcis* Thunb)는 갈매나무과에 속하는 식물의 열매로서 한국에는 강원도, 황해도 이남, 중부지방 등지에서 드물게 군락을 형성한다. 10~11월에 대추씨를 닮은 갈색 열매를 맺으며 열매는 과당, 설탕, 포도당, 카탈라제, 페록시다제 등의 당분이 13%, 칼륨, 칼슘, 철 등의 미량원소를 함유하고 있다. 지구자의 주요 효능은 알콜성 간염, 간경화, 지방간, 황달, 당뇨, 혈압, 갈증해소 등의 주요 간장의 기능을 높여주고 간에 쌓인 독을 풀어주는 약리작용이 있다. 사염화탄소 (CCl_4 , d 1.59, liquid, m.w 153.82, m.p. -22.86 oC, b.p. 76.679 oC)는 간 독성을 유발하는 물질로서 유지류의 용제로 사용되며 발암물질인 동시에 장기간 생체에 노출시 간이나 신장, 중추신경에 손상을 입히게 된다. 본 실험에서는 먼저 지구자 추출액을 15 ml/kg 섭취한 후, 사염화탄소 1.0 ml/kg로 간에 염증을 유발하여 시험물질 지구자 추출액의 간보호 효과를 연구하였다. 분석 항목으로 혈액검사 및 간기능 검사의 대표적 지표 물질인 AST, ALT, LDH와 간조직의 변화를 형태학적으로 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 간독성 유발물질

사염화탄소(CCl_4)는 대표적인 간 독성 유발 물질로서 간에 대한 독성 연구를 하는데 널리 사용되고 있다. 사염화탄소의 간 독성 기작은 사염화탄소가 간에서 대사되어 CCl_3 와 Cl free radical을 형성하여 이 free radical이 세포막의 불포화 지방산에 작용하여 lipid peroxidation을 일으킨다.

2. 지구자 추출방법

지구자 추출은 열수추출방법을 이용하였다. 지구자 100 g에 증류수 1,200 ml를 가하여 180분간 약탕기를 이용하여 추출하였다.

3. 실험동물

흰쥐 수컷 (오리엔트, 서울시 금천구 가산동 459-24) 20주령을 사용하였다. 동물입수 시, 외관을 육안으로 검사한 후, 7일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키고 그 중 건강한 동물을 골라 실험에 사용하였다.

Table 1. Experimental groups

Group	Number of animal	Animal number	AD Volume (CCl_4 , ml/kg)	Dose (<i>Hovenia dulcis</i> Thunb, ml/kg/day)
C ¹⁾	6	1 - 6	0	0
T1 ²⁾	6	7 - 12	1.0	0
T2 ³⁾	6	13 - 18	1.0	15

1) Control group(Vehicle Administered group)

2) Negative control group(CCl_4 Administered group)

3) Treatment group(*Hovenia dulcis* Thunb and CCl_4 Administered group)

4. 간독성 치료 및 예방 효과

지구자 추출액(15 ml/kg)을 간독성 유발 30분전 투여하여 처치군으로 설정하였다. 흰쥐 수컷에 사염화탄소(1.0 ml/kg) 복강주사 후, 24 시간 후에 혈액을 채취하여 AST, ALT 및 LDH 활성도를 측정하였다.

5. 혈액(구) 검사

혈액학적 검사는 WBC, RBC, HGB, HCT, PLT를 EDTA-2K로 처리 후, 자동측정 장치(JT Counter, Coulter Co., Miami, USA)를 이용하여 측정하였다.

6. 혈액 생화학적 변화

생화학적 분석은 후대정맥에서 5 ml의 혈액을 채취하였으며 실온에서 응고시킨 후, 냉장고속원심분리기 (Avanti 30, Beckman Co., USA)를 사용하여 5000 rpm에 10분간 원심 분리하였다. 생화학 분석기(Advia 1650, Co., Japan)를 사용하여 AST, ALT, LDH의 생화학검사를 실시하였다.

7. 병리조직 검사

간 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 고정한 후, 에탄올 탈수 및 함수과정을 거쳐 파라핀 침투한 후, 포맷한다. Hematoxyline- Eosin (H&E) 염색을하

여 광학현미경으로 형태학적으로 slide를 검경하였다.

8. 통계학적 방법

대조군과 투여군 사이의 통계학적 유의차는 Dunnett test에 의하여 평균과 표준편차를 구하고 통계처리(p<0.05, p<0.01) 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 사망동물

사염화탄소(CCl₄) 1.0 ml/kg 처치 및 지구자 추출액(15 ml/kg) 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.

2. 혈액검사

사염화탄소를 실험동물 흰쥐 수컷에 처리시 음성 대조군에서는 WBC, RBC (p<0.05), HGB (p<0.01) 및 HCT (p<0.01)의 수치가 유의성 있게 증가하였으며, 시험물질 처리군은 증가된 수치의 일정 부분이 감소되는 것으로 나타났다. 혈소판 수는 음성대조군에서는 감소하였으며 시험물질 처리군의 경우에는 감소된 부분이 33 % 증가되었다 (Table 2.).

Table 2. Hematological values of male rats orally treated with *Hovenia dulcis* Thunb-administered Rat.

Tested Unit	WBC x1000	RBC x10 ⁶	HGB g/dl	HCT %	PLT x1000
Group : C (0 ml/kg/day)					
Mean	14.76	7.96	14.61	42.70	1005
SD	2.84	0.28	0.53	1.18	77.13
Group : T1 (CCl ₄ 1.0 ml/kg)					
Mean	17.61	8.505	16.03**	47.58**	691.66**
SD	4.77	0.24	0.31	1.46	216.09
Group : T2 (CCl ₄ 1.0 ml/kg) + <i>Hovenia dulcis</i> Thunb (15 ml/kg/day)					
Mean	13.23	8.28	14.98	44.58	796.66*
SD	1.35	0.75	0.85	3.40	134.41

All hematological values were measured at 1 day treatment of *Hovenia dulcis* Thunb. Statistically Significant from Control group(*P<0.05, **P<0.01)

C : Control group

T1 : Negative control group

T2 : Treatment group

3. 혈액생화학 검사

실험동물 흰쥐 수컷에 CCl₄ (1.0 ml/kg)를 복강 주사 시, AST, ALT, LDH 양은 대조군에 비해 유

의성(p<0.01) 있게 증가하였다. 이에 시험물질 지구자 처치군은 사염화 탄소에 의해 증가된 AST, ALT, LDH 양을 50 % 감소시켰다(Table 3.).

Table 3. Serum biochemical values of Rats orally Treated with *Hovenia dulcis* Thunb.

Variable	Sex	Male		
	Group	C	T1	T2
CCl ₄ (ml/kg)		0	1.0	1.0
Dose(ml/kg)		0	0	15
No. of animal		6	6	6
AST(IU/L) ^{a)}		108	2475**	1363.5
SD ^{b)}		11.08	432.1	1758.3
ALT(IU/L) ^{a)}		34.16	1584**	761*
SD		2.40	206.9	961.3
LDH(IU/L) ^{a)}		2141.33	7199.5**	3451.66
SD		401.64	1276.0	4008.56

Serum biochemical values at 1 day after treatment of *Hovenia dulcis* Thunb. Statistically Significantly different from Control group(*p<0.05)

a : Values were expressed as mean

b : ±S.D

C : Control group

T1 : Negative control group

T2 : Treatment group

4. 부검소견

부검소견은 음성대조군에서 복수 (hydrops abdominis), 간유착 (liver adhesion), 간 염증

(liver inflammation) 및 간 황갈색 (liver yellowish brown)의 이상소견이 6례 관찰되었으며, 처치군에서는 4례만 위의 증상이 관찰되었다 (Table 4.).

Table 4. Autopsy finding in *Hovenia dulcis* Thunb-administered Rats.

Sex	Male		
	C	T1	T2
Group			
Normal	6	0	2
hydrops abdominis	0	6	4
liver adhesion	0	6	4
liver inflammation	0	6	4
liver yellowish brown	0	6	4

Autopsy finding at 1 day treatment of *Hovenia dulcis* Thunb

C : Control group

T1 : Negative control group

T2 : treatment group

5. 간 조직 변화

음성 대조군에서 심한 간세포 괴사와 간세포 공포화/변성이 각각 6례씩 관찰되었다. 처치군에서는

심한 간세포 괴사가 5례, 간세포 공포화/변성이 6례 및 염증세포 침윤이 3례 관찰되었다(Table 5.) (Photo 1~4.).

Table 5. Incidence of non-neoplastic microscopic in rats orally treated with *Hovenia dulcis* Thunb.

Organ	\Sex	\Group	Male		
			C	T1	T2
		\Dose(ml/kg/day)	0	0	15
		\No. of animal	6	6	6
Liver					
Hepatocellular necrosis			0	6	5
Hepatocellular vacuolation/degeneration			0	6	6
Inflammatory cell infiltration			0	0	3

C : Control group(Vehicle Administered group)

T1 : Negative control group(CCl₄ Administered group)

T2 : Treatment group(*Hovenia dulcis* Thunb and CCl₄ Administered group)

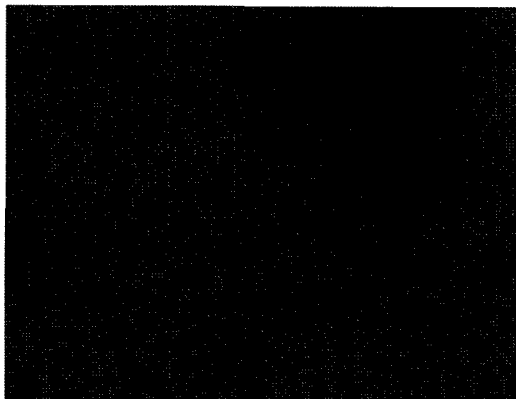


Photo. 1. Photomicrograph of Control rat liver(Normal). (H&E stain, X100)

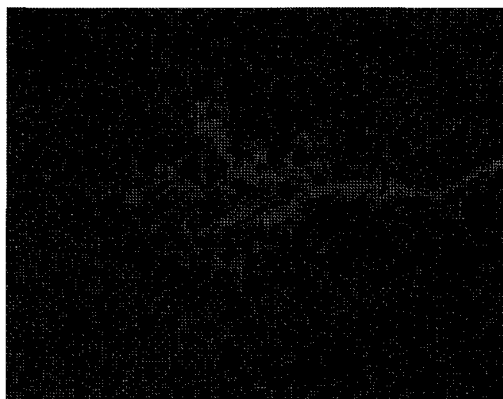


Photo. 3. Photomicrograph of rats orally treated with CCl₄(1.0ml/kg) and Hovenia dulcis Thunb (15ml/kg)–administered rat liver(hepatocellular necrosis & Hepatocellular vacuolation/ degeneration, Inflammatory cell infiltration).

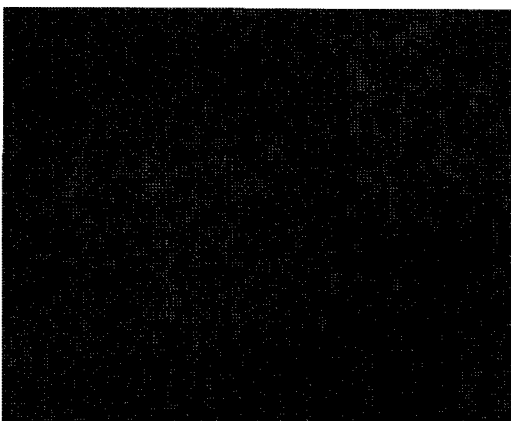


Photo. 2. Photomicrograph of rats orally treated with CCl₄(1.0ml/kg) –administered rat liver(hepatocellular necrosis & Hepatocellular vacuolation/degeneration).



Photo. 4. Photomicrograph of rats orally treated with CCl₄(1.0ml/kg) and Hovenia dulcis Thunb (15ml/kg)–administered rat liver(hepatocellular necrosis & Hepatocellular vacuolation/ degeneration).

IV. 결론 및 고찰

사염화탄소(CCl₄, 1.0 ml/kg)를 SD rat 수컷에 복강 주사시, 혈구검사는 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈, 헤마토크리트의 양은 증가하였으나 혈소판은 감소하였음을 확인하였다. 그러나 간독성 유발 30분 전 지구자 추출액 투여(15 ml/kg)시 혈액생화학적 수치가 정상에 근접하게 회복됨을 확인하였다. 혈액생화학 검사는 양성 대조군에서 AST, ALT 및 LDH의 양이 유의성있게 증가($p < 0.01$) 하였으나 실험군에서는 양성대조군과 비교하여 그 증가된 폭이 50 % 감소됨을 확인할 수 있었다. 따라서 흰쥐

수컷에서 사염화탄소에 의한 간 독성을 유발한 상태에서 지구자 추출액 15 ml/kg 투여시 혈장내 AST, ALT 및 LDH의 수치를 감소시키는 물질로 작용하여 간을 보호하는 것으로 사료된다. 또한 병리조직 소견에서 음성대조군과 처치군 비교시, 간세포의 괴사가 처치군에서 음성대조군에 비해 경미한 감소를 보였다. 또한 지구자 추출액 투여군에서 간세포내 염증세포 침윤이 3례 관찰되었으며 이는 손상된 간세포를 회복시키는 약리작용에 의해 조직에 변화를 일으킨 것으로 사료된다.

검색어 : 지구자, 사염화탄소, 혈액생화학, 간조직

of green tea catechins in cultured chinese hamster V79 cells」 『Mutation Research』 .

참고 문헌

- 1) 박철호, 『산 약초의 이해』 강원대학교 출판부, 1986:18
- 2) Lumeng L., Minter R. and Li T.K. 「Distribution of stable acetaldehyde adducts in blood under physiological condition」 『Fedu. Proc』 . 1982:41:765
- 3) Dashwood R.H., Breinholt V. and Bailey G.S. 「Chemopreventive properties of chlorophyllin」 : inhibition of aflatoxin B1 (AFB1) - DNA binding in vitro and antimutagenic assay 『Carcinogenesis』 . 1991;12:939-942
- 4) Kim, M.H., Kwon, O.H. 「Relationship of hepatic triglyceride accumulation by ethanol to activities of lipogenic enzymes in rat liver」 『Korean Biochem. J.』 . 1992;25:499
- 5) Cho Y.S. 「Antimutagenicity of prophyrin derivatives and stabilizing effect of albumin against 6-sulfooxymethylbenzo[a]pyren」 『한국과학기술원』 . 1995:116
- 6) Yukiaki Kuroda, 「Bio-antimutagenic activity 1996:361:179-186
- 7) Hase K., Ohsugi M., Xiong Q., Basnet P., Kadota S. and Namba T. 「Hepatoprotective effect of hovenia dulcis thunb on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide」 『Biol. Pharm. Bull』 . 1997:20(4) :381
- 8) Yao Xue Xue Bao. 「Study on flavonoids in seeds of Hovenia dulcis」 『Article in Chinese』 . 1997:32(8) :600-2.
- 9) Yoshikawa K, Mimura N, Arihara S. 「Isolation and absolute structures of enantiomeric 1,2-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,3-propanediol 1-O-glucosides from the bark of Hovenia trichocarpa」 『J. Nat. Prod.』 . 1998;61(9) :1137-9
- 10) Zhong Yao Cai, 「Effects of Hovenia dulcis Thunb on blood sugar and hepatic glycogen in diabetic mice」 『Article in Chinese』 . 2002:25(3) :190-1