

〈Original article〉

다슬기 추출물이 D-galactosamine에 의해 손상된 간에 미치는 효과

박 영 미¹ · 이 종 은¹ · 서 을 원^{1,2,*}

¹안동대학교 자연과학대학 생명과학과, ²안동대학교 해양바이오산업연구소

Effect of *Semisulcospira libertina* Extract on Hepatic Injury Induced by D-galactosamine

Young Mi Park¹, Jong Eun Lee¹ and Eul Won Seo^{1,2,*}

¹Department of Biological Science, Andong National University, Andong 36728, Republic of Korea

²Institute of Marine Biotechnology, Andong National University, Andong 36728, Republic of Korea

Abstract - The purpose of this study is to examine the restorative effect of *Semisulcospira libertina* extract, on damaged liver cells induced by D-galactosamine in rats. Treatment of damaged liver cells with *S. libertina* extract significantly reduced local fatty degeneration, and inflammatory cell necrosis, to levels similar with the undamaged control group. In addition, *S. libertina* extracts were found to reduce plasma levels of liver damage indicator enzymes, such as AST, ALT, LDH and ALP, to control levels. It also reduced lipid peroxides, and lipid contents within damaged liver tissues. This suggests that *S. libertina* extract has a restorative effect on liver cells, thus reducing release of damage-associated liver enzymes, and oxidative degradation of lipids. Also, *S. libertina* extracts were found to be involved in recovery of damaged cells from inflammatory response by suppressing expression of TNF- α , which leads to tissue injury and necrosis, whereas inducing expression of HO-1 that protects cells during inflammation. Thus, *S. libertina* extract restores liver tissue from necrosis and fibrosis, as well modulates expression of inflammation-related genes against liver damage. Our findings suggest that *S. libertina* extract is an effective medicinal resource, for improving and recovering liver cells from hepatic injury.

Keywords : *Semisulcospira libertina*, D-galactosamine, hepatic injury, inflammation

서 론

최근 현대사회의 급속한 개발과 산업화에 따라 화학물질의 사용이 생태계의 자연정화능력을 상회할 정도로 기하급수적으로 증가하고 있어 주변의 환경은 점차 심각하게 오염되고 있다. 산업사회의 발달과 더불어 생산활동이 활발해짐

에 따라 우리는 건강을 위협하는 각종 공해물질에 접하는 기회가 많아지게 되어 이에 따른 질병 또한 증가되고 있다 (Kim 2001). 우리 몸에서 가장 큰 장기인 간은 탄수화물, 지방, 단백질 등 주요 영양 성분의 대사와 약물 대사, 해독 작용, 면역 기능 및 담즙 분비 등 중요한 역할을 수행하고 있다. 그러나 간은 과도한 스트레스, 음주, 흡연 및 약물 등에 의하여 손상을 받게 되면 급성간염이 유발되기도 하며, 염증 반응이 반복적으로 일어나면 간섬유화, 간경변 및 간암 등으로 유도되는 만성간염으로 진행되기도 하여 결국 회복하기

* Corresponding author: Eul Won Seo, Tel. 054-820-5462,
Fax. 054-820-7705, E-mail. ewseo@andong.ac.kr

힘든 치명적인 영향을 받게 된다(Lee and Friedman 2011). 이와 같이 간질환은 인체에 심각한 영향을 미치기 때문에 간을 보호하거나 치료하기 위한 천연물 유래의 기능성 소재를 발굴하는 것은 간질환의 발병과 치료를 감소시킬 수 있다는 측면에서 매우 의의가 있다.

다슬기(*Semisulcospira libertina*)는 우리 주변 호수나 하천 및 시냇가에서 손쉽게 채취할 수 있는 패류로 오래 전부터 가식부를 식용으로 사용해 왔다. 다슬기는 한방학적으로 간염, 간경화, 지방간 등의 치료 및 개선에 사용되어 왔다(Kim *et al.* 1985), 이와 같은 다슬기의 효능에 따라 국내산 다슬기 추출물의 생리활성 및 항산화 활성에 연구가 진행된 바 있으며(Kim *et al.* 2009; Lee *et al.* 2010), 다슬기 추출물이 사업화탄소에 의해 유발된 간 손상에 대해 보호 효과가 있다고 분석된 바 있으며(Jeon *et al.* 2002), 또한 다슬기 추출물을 일정기간 섭취시키는 경우 간세포에 대한 보호 효과가 있으며, 숙취해소에도 효과가 있다는 연구가 진행된 바 있다(Park *et al.* 2015; Cho *et al.* 2017). 간질환은 인체에 심각하게 영향을 미치지만 간의 보호 및 치료를 위한 특효약이나 기능성 소재에 관해서는 많은 정보가 제시되어 있지 않은 형편이다. 현재 간 질환에 대한 치료제로서 silymarin, DDB (biphenyl dimethyl dicarboxylate), arginine, glutathione 및 UDCA (ursodeoxycholic acid) 등이 있으며, 산겨릅나무(*Acer tegmentosum*)의 세포배양을 통해 세포배양 추출물의 주요 성분인 salidroside가 간 손상에 대한 보호 효과가 있는 것으로 보고된 바 있으나(Park *et al.* 2015), 유효 용량 뿐 아니라 정확한 약리효과에 대한 기초연구는 미약한 실정이다. 간질환의 연구에 많이 사용되고 있는 D-galactosamine은 갈락토오스 대사 장애를 통해 세포막 성분 중 탄수화물의 조성과 세포 내 칼슘 이온 농도를 변화시켜 간 조직의 손상을 유발하게 된다. 따라서 D-galactosamine이 주입되면 대사 장애에 의해 간 괴사가 일어나게 되며 만성적으로 중독이 되면 간경변과 세포성 종양이 일어나게 한다(Lesch *et al.* 1969). 간 조직의 경우 galactokinase와 galactose-1-puridyl-transferase, uridine diphosphate (UDP)-glucose가 많기 때문에 D-galactosamine을 이용한 간 손상에 대한 연구 방법은 간 특이성이 매우 높으며 다른 기관에 D-galactosamine이 거의 영향을 주지 않으므로 간 손상의 지표로서 간에 작용하는 기능성 소재를 연구하는데 널리 사용되고 있다(Maley *et al.* 1968).

따라서 본 연구에서는 흰쥐에 D-galactosamine을 투여하여 간 손상을 유발한 후 다슬기 추출물을 급여하여 다슬기 추출물이 손상된 간세포에 대한 개선 및 회복에 미치는 효과를 조직학적 관찰, 혈액 내 효소의 활성 및 염증 반응 인자의 변화를 통해 조사하였다.

재료 및 방법

1. 다슬기의 채집 및 추출

본 연구의 다슬기(*Semisulcospira libertina*)는 경북 안동시 남선면 소재 갈라산에서 채집, 동정하여 사용하였다. 다슬기는 이틀간 해감 과정을 거친 뒤 가식부만을 골라내어 공시료에 증류수를 가해 3시간 동안 열을 가하여 추출하였다. 이후 추출물은 원심분리 후 상등액을 취하여 동결 건조 후 실험에 사용하였다.

2. 실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 (주)샘타코에서 4주령된 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 구입하여 사용하였으며, 사육실에서 온도 $21.4 \pm 0.05^\circ\text{C}$, 습도 61%, 명암은 12시간 주기로 사육하였다. 먹이는 물과 사료(AIN-93G purified rodent diet)를 충분히 섭취하게 하면서 1주일 동안 순치한 뒤 체중이 150 ± 10 g인 흰쥐를 선별하여 실험에 사용하였다. 모든 동물 실험 과정은 본 대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 취한 후 실시하였다(2014-3-1111-06-01). 본 연구에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)로부터 구입하였으며 기타의 시약은 별도로 표기하였다.

3. D-galactosamine에 의한 간 손상 유발

일반적으로 D-galactosamine은 기능과 형태적인 면에서 사람의 바이러스성 간독성과 유사한 간 손상 효과를 유발하고 있기 때문에 임상적으로 간의 기능 장애를 밝히고 간기능 보호 소재의 효용성을 평가하는데 주로 사용되고 있다(Lee *et al.* 2011). 대조군을 제외한 모든 실험군의 흰쥐에 간 손상을 유발하기 위하여 실험 시작 당일과 3일 경과 후 Lee *et al.* (2005)의 연구에서 제시된 바와 같이 400 mg kg^{-1} 의 D-galactosamine을 복강에 투여하였고, 이와 동시에 대조군에는 동량의 생리식염수를 경구 투여하였다. 다슬기 추출물 및 양성 대조군 시료는 최종적으로 D-galactosamine을 투여하여 간 손상을 유발시킨 후 24시간 경과 후부터 5일간 매일 일정시간에 경구 투여하였다. 본 연구에서 실험군은 생리식염수만을 처리한 대조군, D-galactosamine에 의해 간 손상이 유발된 실험군(GalN 실험군), 양성대조군으로 간 손상 유발 후 silymarin (25 mg kg^{-1})을 투여한 실험군(silymarin 실험군) 및 간 손상 유발 후 선행연구를 통해 가장 유효한 농도로 조사된 다슬기 추출물(300 mg kg^{-1})을 투여한 실험군(SL 실험군)으로 나누었다. 각 실험군은 군당 10마리씩 실험에 사용하였으며, 매일 일정한 시간에 체중을 측정하였다.

모든 시험 약물은 극소량의 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 용해 후 생리식염수와 1%의 olive oil로 희석하여 경구 투여하였다. 실험 최종일에 실험동물을 약 12시간 절식시킨 후 경동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈장만을 회수하여 혈액 효소 활성을 분석하기 전까지 -80°C 에서 보관하였다. 혈액 채취 후 실험동물로부터 간 조직을 적출하여 중량을 측정하였고 조직 관찰을 위하여 간 조직의 일부를 FAA 용액에 고정하였다. 또한 나머지 조직의 일부는 차후 실험을 위해 -80°C 에서 보관하였다.

4. 조직 관찰

대조군 및 손상된 간 조직의 미세구조를 관찰하기 위해 조직 제작 방법에 따라 절취한 간 조직을 4°C FAA 용액에서 24시간 고정하였다. Paraffin block은 $4\ \mu\text{m}$ 의 두께로 절편하였고 hematoxylin과 eosin에 이중 염색하였다. 또한 간조직의 섬유화를 확인하기 위한 Masson's trichrome 염색은 파라핀 제거 후 Bouin's 용액으로 고정한 다음 Weigert's iron hematoxylin을 통해 염색하였다. 이후 biebrich scarlet acid와 phosphomolybdic acid-phosphotungstic acid, aniline blue 및 acetic water를 반응시켰다. 조직의 관찰은 Olympus BX50 (Japan)하에서 실시하였고 Olympus DP-71 (Japan)을 사용해 촬영하였다.

5. 혈액 내 효소 활성 측정

흰쥐의 경동맥으로부터 채혈된 혈액 내 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), LDH (lactate dehydrogenase) 및 ALP (alkaline phosphatase)의 활성을 분석하였다. AST와 ALT 분석은 Reitman-Frankle (1957)의 방법에 따라 조제된 kit (Asan, Korea)를 사용하여 분석하였고, LDH의 측정은 Wroblewskin and LaDue (1955)의 방법에 따라 조제된 kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하여 측정하였다. 또한 ALP는 Kind-King (1954)의 방법에 따라 조제된 kit (Asan, Korea)를 사용하여 효소 활성을 분석하였다.

6. 총 지질 및 과산화지질 함량 분석

간 조직의 총 지질 함량은 Folch *et al.* (1957)과 Bligh and Dyer (1959)의 방법을 변형하여 추출, 지질 측정용으로 사용하였다. 간 조직의 과산화지질 함량은 Ohkawa *et al.* (1979)의 방법을 이용하여 측정하였다. 간 조직의 경우 지방층을 제거하기 위하여 N-buthanol : pyridine의 혼합액 (15 : 1) 300

μL 를 첨가한 후 2,500 rpm에서 10분간 원심 분리하였으며 532 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였다. 1,1,1,3-tetraethoxypropane을 표준용액으로 사용하였고 과산화지질물은 MDA nmol로 표기하였다.

7. TNF- α 와 HO-1 유전자와 단백질 발현을 분석

간 조직 내 TNF- α 와 HO-1 유전자의 발현을 분석하기 위하여 간 조직의 total RNA는 TRIzol Reagent (Gibco Inc., USA)을 이용하여 추출한 후 total RNA clean up kit (Ambion, USA)를 사용하여 정제하였다. 정제된 RNA를 template로 SuperScriptTM kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 single stranded cDNA를 제조하였다. 간독성에 관련된 유전자들을 특이적으로 증폭하기 위해 primer (Table 1)를 제작하였으며 각 유전자의 발현 정도를 mGAPDH 유전자의 발현과 비교하여 확인하였다. 유전자의 발현은 전기영동 후, Gel image analysis system (Core Bio iMaxTM, Korea)에서 UV illuminator로 결과를 확인하였으며, 발현 수준은 Un-SCAN-IT gel Version 5.1 (Silk Scientific, Inc.) 프로그램을 통해 분석하였다.

간 조직 내 TNF- α 와 HO-1 단백질의 발현을 분석하기 위하여 간 조직을 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM EDTA, 0.25% sucrose, 0.4 mg mL^{-1} digonin, 1.5 mM PMSF)를 이용하여 균질화한 후, 단백질은 Bradford (1976) 법에 따라 정량하였다. 간 조직 내 tumor necrosis factor alpha (TNF- α)는 간에서 추출한 단백질 40 μg 을 전기영동한 후 1차 antibody (TNF-alpha) (Cell signaling Technology, Beverly, USA)를 처리하였고, 2차 antibody (anti-rabbit IgG-HRP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)를 처리하여 확인하였고, heme oxygenase-1 (HO-1)의 인산화비는 간에서 추출한 단백질을 전기영동을 한 후 1차 antibody (Heme oxygenase-1) (Cell signaling Technology, Beverly, USA)를 처리하였고, 2차 antibody (anti-rabbit IgG-HRP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)를 처리하였다. 이후, ECL detection polaroid camera (Amersham Biosciences, USA)를 사용하여 촬영하였으며, 발현 수준은 Un-SCAN-IT gel Version 5.1 (Silk Scientific, Inc.) 프로그램을

Table 1. Selected genes related hepatic injury and primer sequences used in RT-PCR

Gene	Sequence	Temperature
TNF- α	5'-TAC TGA ACT TCG GGG TGA TTG GTC C-3' 5'-CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA ACC-3'	60 $^{\circ}\text{C}$
HO-1	5'-AAC AAG CAG AAC CCA GTC T-3' 5'-TGT CAT CTC CAG AGT CTT C-3'	50 $^{\circ}\text{C}$

통해 분석하였다.

8. 통계처리

모든 실험은 독립적으로 3회 이상 실시하였으며 각 실험에서 얻어진 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계처리는 SPSS (version 12.0)로 분석한 후 t-검정을 실시하여 분산과 평균의 동일성 여부를 검정하였으며, 분석결과는 일원 분산분석 (one way ANOVA)에 의한 Duncan 검정을 실시하여 p 값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

1. 체중과 간 조직 중량의 변화

간 손상을 유발한 후 각 약물을 경구 투여한 흰쥐의 체중을 조사하였다. 대조군의 체중은 199.5 ± 8.7 g이었으며 D-galactosamine만을 투여한 GalN 실험군의 체중은 190.5 ± 4.4 g으로 가장 낮은 것으로 조사되었다. 실험군별로는 간 손상 유발 후 silymarin 실험군에서는 196.3 ± 4.2 g, SL 실험군이 196.7 ± 6.2 g으로 다슬기 추출물을 투여한 실험군이 대조군과 가장 유사한 체중량을 유지하는 것으로 나타났다. 또한 간 조직의 중량은 GalN 실험군이 5.8 ± 0.2 g으로 가장 낮았으나, 양성대조군을 포함하여 기타 실험군에서는 간 손상에 대한 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 2). 일반적으로 약물은 간을 직접적으로 손상을 입혀 생체 대사의 이상을 초

래하고 몸 조직의 합성을 방해하기 때문에 체중과 간 조직의 중량이 낮게 나타난다고 보고된 바 있는데 (Lee and Min 2010), 본 연구에서도 실험군 중 체중과 간 조직의 중량은 galactosamine 처리 실험군에서만 약간의 영향을 받았을 뿐 기타 실험군에서는 대조군과 유사한 수준을 유지하는 것으로 조사되었다.

2. 다슬기 추출물의 처리에 의한 간조직의 변화

다슬기 추출물이 손상된 간조직의 미세구조에 미치는 영향을 살펴보았다. 대조군의 간조직은 중심에 위치한 간세포리 (hepatic acinus)의 문로 주위에서 말단간세포정맥이 관찰되고 핵소체가 두드러진 커다란 다각형의 간세포가 가장자리에 흩어져 있어 어떠한 조직학적 이상도 관찰되지 않았다 (Fig. 1A-a). 그러나 GalN 실험군에서는 간세포가 팽윤되고

Table 2. Changes in body weight and liver weight in experimental groups

Group	Weight (g)	
	Body	Liver
Control	199.5 ± 8.7	6.5 ± 0.1
GalN ¹⁾	$190.5 \pm 4.4^+$	$5.8 \pm 0.2^{++}$
Silymarin	196.3 ± 4.2	6.4 ± 0.9
SL ²⁾	196.7 ± 6.2	6.6 ± 0.5

¹⁾GalN group: D-galactosamine (400 mg kg^{-1}) only treated group

²⁾SL group: *S. libertina* (300 mg kg^{-1}) treated group after D-galactosamine injection

⁺ $p < 0.05$, ⁺⁺ $p < 0.01$ indicate a significant difference between the control group and the GalN group.

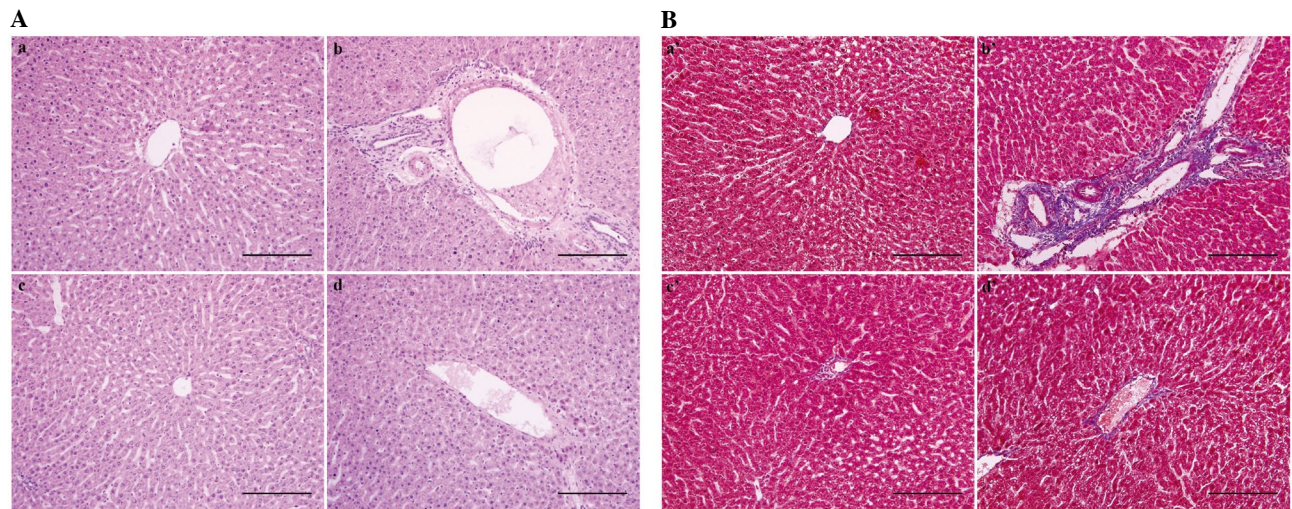


Fig. 1. Photographs of rat liver treated with *S. libertina* extracts show recovering effects against hepatic injury. Rats were treated with *S. libertina* extracts orally for 5 days after D-galactosamine injection. A: Hematoxylin-eosin stain. B: Masson trichrome stain. a, a': Control group, b, b': D-galactosamine (400 mg kg^{-1}) only treated group, c, c': silymarin (25 mg kg^{-1}) treated group after D-galactosamine injection, d, d': *S. libertina* (300 mg kg^{-1}) treated group after D-galactosamine injection. $\times 20$, Scale bar = $100 \mu\text{m}$.

있으며 지방 변성과 공포 현상을 나타냈으며 중심정맥 주변으로 세포 괴사가 관찰되었다. 또한 동모양 혈관의 구조가 소실되어 있으며 다핵세포의 출현과 염증세포의 침윤이 나타났으며 부분적으로 간세포의 수복에 의한 섬유화가 관찰되었다(Fig. 1A-b). 양성대조군으로 사용된 silymarin 실험군의 경우 국소적인 지방변성과 염증세포의 침윤이 관찰되었으나 간세포의 팽윤이나 괴사는 나타나지 않아 손상 정도는 매우 경미한 것으로 확인되었다(Fig. 1A-c). 반면 다슬기 추출물을 처리한 SL 실험군의 경우 간세포의 팽윤과 다핵세포의 출현 및 섬유화 현상이 GalN 실험군과 비교할 때 그 정도가 미미하였으며 양성 대조군에서 관찰되었던 경미한 세포 괴사와 울혈 또한 거의 발견되지 않아 대조군과 거의 유사한 상태로 회복되어 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 1A-d). 이와 더불어 D-galactosamine 투여로 인한 섬유화와 다슬기 추출물의 투여에 의한 효과를 확인하기 위하여 Masson's trichrome 염색을 실시하였다. 대조군에서는 중심정맥에서 콜라겐이 거의 관찰되지 않았으나(Fig. 1B-a'), D-galactosamine에 의해 간 손상이 유발된 GalN 실험군에서는 괴사가 일어난 중심정맥 주변부로 콜라겐이 상당량 밀집해 있으며 부분적으로 불규칙하게 콜라겐이 간세포 사이로 갈라지는 것이 관찰되어 섬유화가 진행된 것으로 확인되었다(Fig. 1B-b'). 양성대조군인 silymarin 실험군에서는 콜라겐의 분포가 대조군과 유사한 수준으로 양호한 상태를 나타내었으며(Fig. 1B-c'), 다슬기 추출물을 처리한 SL 실험군에서도 콜라겐의 분포가 대조군과 유사한 수준으로 섬유화가 완화된 것으로 확인되었다(Fig. 1B-d').

최근 연구에 따르면 민들레(*Taraxacum officinale*) 열수 추출물은 D-galactosamine의 투여로 인한 간조직의 괴사, 변성 및 세포질 공포화 현상을 감소하여 간염을 억제하는 데 효과적이었으며(Park *et al.* 2008), 구기자(*Lycii fructus*) 추출물은 사염화탄소에 의한 간세포의 팽윤, 공포화 및 괴사, 염증세포의 침윤을 감소시켜 간 손상을 예방하는데 유효하다고 보고된 바 있다(Jung *et al.* 2004). 본 연구에서 D-galactosamine은 간조직의 다핵화 현상과 국소적인 세포 괴사 및 울혈이 유발되었으나 다슬기 추출물을 처리함에 따라 현저

하게 완화되어 대조군의 간조직과 유사한 수준으로 회복되는 경향을 나타내었다.

3. 다슬기 추출물이 혈액 내 효소 활성에 미치는 효과

다슬기 추출물이 간 손상에 의한 혈액 내 효소 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈액 내 AST, ALT, LDH 및 ALP의 활성을 측정하였다. Aminotransferase는 amino기 전이반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 AST와 ALT가 가장 많이 이용되고 있다. 세포 내의 에너지 공급이 감소되면 세포 내 K^+ 이온이 세포 외로 유출되고 Na^+ , Ca^{++} 및 수분이 세포 내로 유입되어 세포는 팽창하게 되고 세포막이 늘어나게 되어 AST와 ALT는 유출된다. 따라서 알코올, 유기용매 및 기타 독소에 의해 간장애가 발생할 때 AST와 ALT는 혈중으로 유리되어 총 혈중농도가 증가하므로 간기능 검사의 독성 지표로 사용하고 있다(Cherkasov 1978). 본 연구에서 AST와 ALT의 활성은 간 손상이 유발된 GalN 실험군에서는 유의하게 증가하였으나 다슬기 추출물을 투여한 실험군에서는 대조군과 유사한 수준으로 유지되는 경향을 보였다.

LDH는 생체 내에 널리 분포하지만 transaminase와 더불어 간세포 장애 시 혈중에 증가하는 효소로서(Hong *et al.* 2004), 본 연구에서도 LDH의 수치는 GalN 실험군이 $2775.6 \pm 20.3 IU L^{-1}$ 으로 간 손상 유발 후 높은 수준을 보였으나 SL 실험군에서는 $1577.8 \pm 15.0 IU L^{-1}$ 로 감소하여 대조군 수준까지 낮아지는 것으로 확인되었다.

ALP는 담즙을 체시 간에서 생산된 ALP가 담즙으로 배설되지 못하고 대신 혈중으로 배설되어 혈중 ALP의 활성이 증가됨으로서 간기능 장애의 지표로 사용되고 있다(Zieve *et al.* 1988). 본 연구에서 ALP 활성은 대조군에서는 $530.2 \pm 10.6 IU L^{-1}$ 으로 나타났으나 GalN 실험군의 경우 $820.6 \pm 14.4 IU L^{-1}$ 로 대조군에 비해 높은 수준으로 증가되고 있다. 그러나 다슬기 추출물 투여군인 SL 실험군에서는 $589.9 \pm 16.4 IU L^{-1}$ 로 나타나 대조군과 유사한 수준으로 낮아지는 경향을 나타내었다(Table 3). Lee *et al.* (2005)은 DDB 혼합제제인 DWP-04가 D-galactosamine 투여로 인해 유도된

Table 3. Activities of AST, ALT, LDH and ALP in the rat treated with *Semisulcospira libertina* extracts after inducing hepatic injury

Group	AST (IU L ⁻¹)	ALT (IU L ⁻¹)	LDH (IU L ⁻¹)	ALP (IU L ⁻¹)
Control	60.3 ± 1.2	40.2 ± 1.3	1102.1 ± 15.3	530.2 ± 10.6
GalN	140.6 ± 2.0 ⁺⁺	101.4 ± 0.5 ⁺⁺	2675.6 ± 20.3 ⁺⁺	820.6 ± 14.4 ⁺⁺
Silymarin	88.3 ± 2.2 [*]	68.4 ± 0.2 ^{**}	1542.3 ± 15.9 ^{**}	600.2 ± 13.0 ^{**}
SL	90.2 ± 3.0 ^{**}	65.3 ± 1.5 ^{**}	1577.8 ± 15.0 ^{**}	589.9 ± 16.4 ^{**}

⁺ $p < 0.05$, ⁺⁺ $p < 0.01$ indicate a significant difference between the control group and the GalN treated group.

^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ indicate a significant difference between the GalN group and the medicine treated group.

AST, ALT 및 LDH의 활성을 효과적으로 감소시켜 간조직의 손상을 억제한다고 한 바 있으며, Lee *et al.* (2011)은 아세트아미노펜으로 간독성을 유발시킨 후 계혈등(*Spatholobicaulis*)의 물 추출물을 처리하면 현저하게 증가되었던 AST, ALT, LDH 및 ALP의 활성이 유의하게 감소되어 간 보호 효과가 있을 것이라 시사한 바 있다. 본 연구에서도 D-galactosamine로 인해 현저하게 상승된 간 손상 지표효소인 AST와 ALT, LDH 및 ALP 활성이 다슬기 추출물을 처리한 실험군에서는 대조군 수준으로 감소하고 있어 다슬기 추출물이 간 손상에 대한 개선 및 회복에 효과적으로 작용할 것으로 사료된다.

4. 지질 및 과산화지질 함량의 변화

다슬기 추출물이 간 손상에 따른 간 조직 내 지질과 과산화지질의 함량 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 대조군의

지질함량은 $31.0 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$ 로 나타났으나 GalN 실험군에서는 $55.5 \pm 0.9 \text{ mg g}^{-1}$ 로 높게 나타났다. 그러나 SL 실험군에서 $35.1 \pm 0.6 \text{ mg g}^{-1}$ 로 대조군과 유사한 수준을 보였다. 이와 더불어 과산화지질의 함량은 대조군에서는 $1.2 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ 인데 반해 GalN군은 $2.6 \pm 0.6 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ 로 대조군에 비해 높은 수준을 보였다. 반면 다슬기 추출물을 처리한 실험군에서는 $1.5 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ 로 나타나 대조군과 유사한 수준으로 회복되는 경향을 나타내 주고 있다 (Table 4).

Lee *et al.* (2006)은 모과(*Chaenomeles sinensis*) 에탄올 추출물이 알코올에 의해 초래된 간조직의 과산화지질물 함량 변화에 미치는 영향을 조사한 결과 에탄올 투여군에 비해 추출물을 처리한 실험군에서 과산화지질 함량을 저하시켜 간 손상을 억제하는 데 효과적이라고 한 바 있다. 또한 Eu *et al.* (2010)은 theanine이 아세트아미노펜에 의한 간 내 과산화지질에 미치는 영향을 조사한 결과, theanine를 처리한 실험군의 과산화지질도는 대조군과 유사한 수준을 보여 아세트아미노펜에 의한 간 손상을 감소시키는 작용을 나타낸다고 하였다. 본 연구에서도 D-galactosamine로 인해 현저하게 증가된 지질과 과산화지질 함량은 다슬기 추출물을 처리한 실험군에서는 대조군 수준으로 감소하는 양상을 보이고 있어 다슬기 추출물이 간 내 지질 축적을 대폭 완화시키고 있어 간의 지질대사 개선에 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

Table 4. Effect of *S. libertina* extracts on the concentration of liver lipids against hepatic injury

Group	Total-lipid (mg g^{-1} liver)	Malondialdehyde contents ($\mu\text{g mg}^{-1}$ protein)
Control	31.0 ± 0.2	1.2 ± 0.3
GalN ¹⁾	$55.5 \pm 0.9^{++}$	$2.6 \pm 0.6^+$
Silymarin	$40.0 \pm 1.4^*$	1.9 ± 0.5
SL ²⁾	$35.1 \pm 0.6^{**}$	$1.5 \pm 0.1^{**}$

¹⁾ GalN group: D-galactosamine (400 mg kg^{-1}) only treated group

²⁾ SL group: *S. libertina* (300 mg kg^{-1}) treated group after D-galactosamine injection

⁺ $p < 0.05$, ⁺⁺ $p < 0.01$ indicate a significant difference between the control group and the GalN treated group.

^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ indicates a significant difference between the GalN group and the medicine treated group.

5. TNF- α 와 HO-1 유전자와 단백질의 발현을 분석

다슬기 추출물이 간세포 손상에 의한 염증성 사이토카인인 실험군별 상대적 TNF- α 발현율과 독성 물질에 대한 염증을 조절하는 데 영향을 미치는 각 실험군별 상대적 HO-1의 발현율을 분석하였다. 간은 인체 주요 염증기관으로 다양

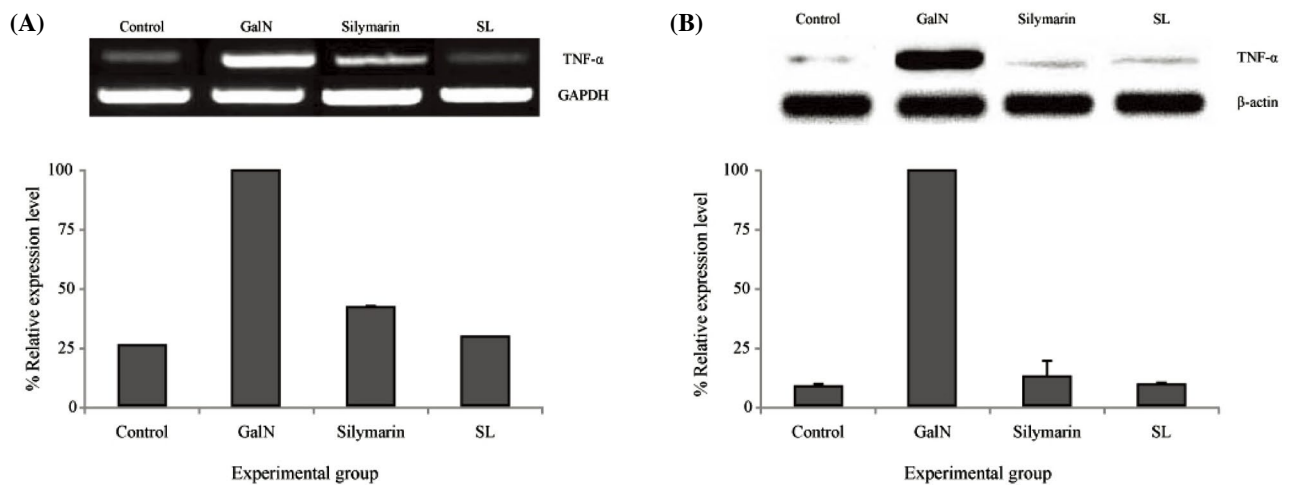


Fig. 2. The effect of *S. libertina* extracts on (A) D-galactosamine inducible TNF- α production and (B) D-galactosamine inducible TNF- α protein production.

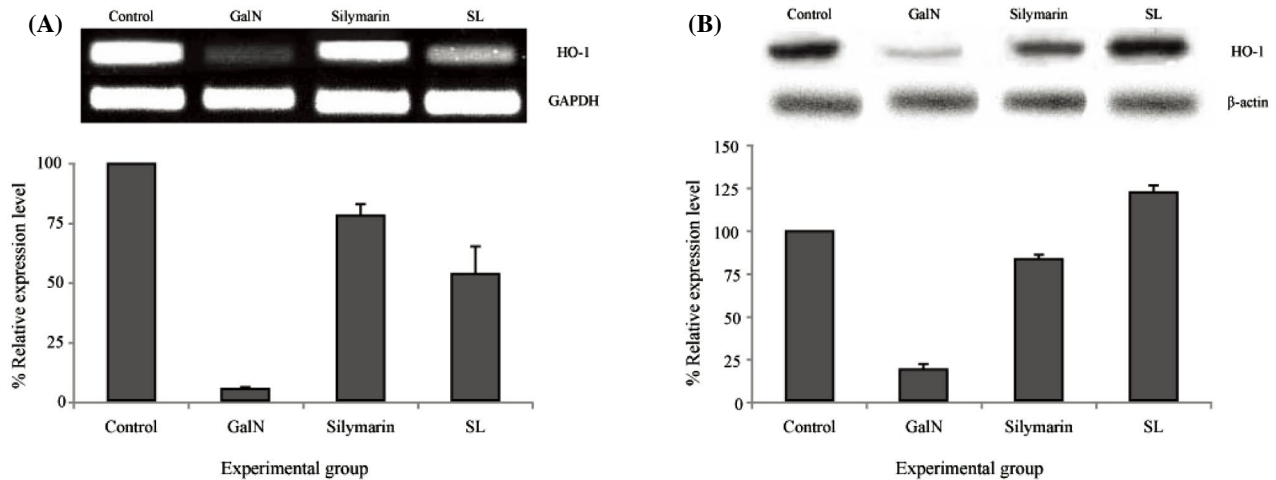


Fig. 3. The effect of *S. libertina* extracts on (A) D-galactosamine inducible HO-1 PCR production and (B) D-galactosamine inducible HO-1 protein production.

한 간독소 노출 후 염증 반응은 일련의 병리학적 변화에 관여한다. 간장 내 대식세포인 Kupffer cell은 간세포 괴사 혹은 다양한 간 독소에 반응하여 염증매개 인자를 유리하며 이는 간 손상의 악화에도 관여한다. TNF- α 는 조직 손상 시 대식세포에서 생성되는 대표적인 염증성 사이토카인으로 간 조직 괴사를 일으키는 것으로 알려져 있다 (Cubero and Nieto 2008). 본 연구에서 TNF- α 발현율은 간 손상이 유발된 GalN 실험군에 대해 대조군의 TNF- α 발현율은 25.8%로 나타났으나 양성대조군인 silymarin 실험군에서는 40.8%로 확인되었다. 그러나 본 연구의 다슬기 추출물을 투여한 실험군에서는 29.7%로 나타나 대조군에 가장 근접한 TNF- α 발현율을 보였다 (Fig. 2A). 또한 염증 반응에 의한 조직상해 및 괴사에 미치는 영향을 단백질 수준에서 분석한 결과 대조군의 TNF- α 의 단백질 발현율은 GalN 실험군에 비해 8.4%로 나타났으나 silymarin 실험군은 13.4%로 확인되었고, 다슬기 추출물 투여 실험군은 9.7%로 대조군과 유사한 발현율을 보여주고 있다 (Fig. 2B).

일반적으로 간 손상이 유발되면 활성화된 쿠퍼세포에서 유도된 TNF- α 가 염증반응을 촉진시켜 조직상해 및 괴사를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Simeonova *et al.* 2001). Lee *et al.* (2002)은 황기 (*Astragali radix*) 추출액이 acetaminophen에 의한 손상된 간세포에 미치는 영향을 조사한 결과 간 손상 시 활성화되는 TNF- α 의 발현을 현저히 억제시켜 간독성 예방 효과가 높다고 보고한 바 있다. 또한 Shin *et al.* (2010)은 사염화탄소를 투여한 실험군의 혈중 TNF- α 활성은 대조군에 비해 현저히 증가하였으나 치자 (*Gardenia jasminoides*)를 투여함에 따라 혈중 TNF- α 의 활성이 크게 감소되었으며 유전자 발현도 억제되어 간 보호 효과가 높다

고 한 바 있다. 본 연구에서도 다슬기 추출물은 손상된 간세포에서 염증을 일으키는 TNF- α 유전자와 단백질의 발현율을 효율적으로 억제시킴으로서 손상된 간조직의 개선 및 회복에 관여할 것으로 분석된다.

HO-1 유전자는 헴을 대사시키는 작용을 수행하는데, 세포 내 산화적 스트레스나 염증성 자극에 대한 반응으로 발현되고, 이들 유전자의 발현으로 인해 항염증반응이 증가되는 것으로 알려져 있다 (Immenschuh 2010). 본 연구에서 HO-1 유전자의 대조군에 대한 상대적인 발현율은 GalN 실험군에서 5.7%였으나 양성대조 실험군에서는 78.3%로 나타났으며, 다슬기 추출물 실험군에서는 53.5% 수준의 HO-1 유전자 발현율을 나타내는 것으로 조사되었다 (Fig. 3A). 이러한 결과는 다슬기 추출물이 산화적 스트레스나 염증에 미치는 영향을 단백질 수준에서 분석한 결과와도 유사하게 나타나 대조군에 대한 상대적인 HO-1 단백질의 발현율은 간 손상이 유발된 GalN 실험군에서는 19.5%, 양성대조군인 silymarin 실험군에서 80.2%로 나타났으며, 다슬기 추출물을 처리한 SL 실험군에서는 124.1%로 조사되었다 (Fig. 3B).

HO-1 (Heme oxygenase-1)은 heme를 biliverdin, carbon monoxide와 iron으로 전환시키는 중요한 효소로서 스트레스나 허혈, 염증 상황에서 유도되는 단백질로 주로 세포를 보호하는 기전에 작용하는 것으로 알려져 있다. 최근 Oh *et al.* (2011)은 마우스의 간세포에 작약 (*Paeonia lactiflora*) 열수 추출물을 처리한 결과 간 손상 실험군에 비해 HO-1의 유전자와 단백질 발현이 현저히 증가되고 있어 간 보호 효과가 높다고 한 바 있다. 본 연구에서도 다슬기 추출물은 손상된 간세포에서 HO-1 유전자와 단백질의 발현을 촉진하여 손상된 간을 효과적으로 회복시키는 것으로 나타났다. 즉 다

슬기 추출물은 손상된 간조직에서 TNF- α 의 발현을 억제하고, HO-1 발현은 촉진시킴으로써 손상된 간을 효과적으로 회복시키는 기능성 소재로서의 가능성을 제시해 주고 있다.

적 요

본 연구는 D-galactosamine에 의해 간 손상이 유도된 흰쥐에 다슬기(*Semisulcospira libertina*) 추출물이 손상된 간세포의 개선 및 회복에 미치는 효과에 관해 조사하였다. 다슬기 추출물은 간 손상에 따른 간 조직 내 국소적 지방 변성과 염증세포 침윤을 크게 감소시켜 대조군과 유사한 수준으로 회복시키는 경향을 나타내었다. 또한 다슬기 추출물은 간 손상 지표 효소인 AST와 ALT, LDH 및 ALP의 증가된 효소 활성을 대조군 수준으로 완화시키며, 간 조직 내 지질과 과산화지질의 함량을 감소시켜 간 손상으로 인한 혈중 효소 활성과 조직 내 지질 함량을 개선하는 것으로 조사되었다. 이와 더불어 다슬기 추출물은 염증반응을 촉진시켜 조직상해 및 괴사를 유도하는 TNF- α 의 발현을 억제시키며, 염증 시 세포를 보호하는 HO-1의 발현을 촉진시켜 염증 반응에서 손상된 세포를 대조군 상태의 세포로 회복시키는데 관여하는 것으로 조사되었다. 따라서 다슬기 추출물은 간조직의 괴사 및 섬유화를 회복시키고 혈액 내 효소의 활성과 조직 내 지질 함량을 개선할 뿐만 아니라 염증 반응 인자의 발현을 조절하고 있어 간 손상으로 인한 간세포의 개선 및 회복에 효과가 높은 기능성 소재로서의 가능성을 제시해 주고 있다.

사 사

이 논문은 안동대학교 기본연구지원사업에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Bligh EG and WJ Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Cherkasov VS and NS Nemchenko. 1978. Determination of the activity of blood serum alanine- and aspartate aminotransferases (ALT, AST) in various forms of hearing disorders. *Zh Ushn Nos Gorl Bolezn.* 23:220-228.
- Cho KH, HJ Choo, MG Seo, JC Kim, YJ Shin, GH Ryu, HY Cho, CY Jeong and YS Hah. 2017. Effect of *Semisulcospira libertina* extracts from different extraction processes on liver cell toxicity and ethanol metabolism. *Food Eng. Prog.* 21:158-166.
- Cubero FJ and N Nieto. 2008. Ethanol and arachidonic acid synergize to activate Kupffer cells and modulate the fibrogenic response via tumor necrosis factor alpha, reduced glutathione, and transforming growth factor beta-dependent mechanisms. *Hepatology* 48:2027-2035.
- Eu JB, SO Kim, TJ Seoung, SG Choi, SH Cho and CY Choi. 2010. Protective effect of theanine on the acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39:350-355.
- Folch J, L Mee and GSH Stanley. 1975. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- Hong SS, GT Gibney, M Esquilin, J Yu and Y Xia. 2004. Effect of protein kinase on lactate dehydrogenase activity in cortical neurons during hypoxia. *Brain res.* 1009:195-202.
- Immenschuh S, E Baumgart-Vogt and S Mueller. 2010. Heme oxygenase-1 and iron in liver inflammation: a complex alliance. *Curr. Drug Targets* 11:1541-1550.
- Jeon TW, ES Lee, YS Lee, OK Ham, MH Park, KJ Kim and HJ Kim. 2002. Hepatoprotective effects of *Semisulcospira libertina* and garlic on the liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31:516-520.
- Jung HC, JS Sin, EJ Kim, SH Shin, JY Jang, KS Shin, YB Kim, JK Kang and SY Hwang. 2004. Protective effect of *Lycii fructus* extract against Hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride. *Korean J. Lab. Ani. Sci.* 20:187-193.
- Kim OK. 2001. Protective effects of extracts of *Diospyrus kaki* folium against hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rat. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30:97-101.
- Kim YK, HS Moon, MH Lee, MJ Park, CW Lim, HY Park, JI Park, HD Yoon and DH Kim. 2009. Biological activities of seven melania snails in Korea. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* 42:434-441.
- Kim YH, TK Lee and YS Cha. 1985. Studies on the nutritive component of black snail (*Semisulcospira libertina*). *Bull. Agric. College Chonbuk Univ.* 16:101-105.
- Kind PR and EJ King. 1954. Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with amino antipyrine. *J. Clin. Pathol.* 7:322-326.
- Lee IW, HS Choi and SM Kim. 2011. Hepatoprotective activ-

- ity of *Spatholobi caulis* water extract against acetaminophen-induced toxicity in rats. *Korea J. Herbol.* 26:65–73.
- Lee JH, SC Chi, SH Kim, YH Shin and JW Choi. 2005. Protective effect of DWP-04 against hepatotoxicity induced by D-galactosamine. *J. Life Sci.* 15:461–467.
- Lee MH, YK Kim, HS Moon, YA Kim, NY Yoon, CW Lim, HY Park and DH Kim. 2010. Antioxidant activities of five melania snails of the genus *Semisulcospira* in Korea. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* 43:188–194.
- Lee TJ and KJ Min. 2010. The effect of *Allium sativum* L. extract on hepatic function in rats with CCl₄-induced (hepatic) injury. *J. Kor. Acad. Industr. Coop. Soc.* 11:1936–1942.
- Lee UE and SL Friedman. 2011. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 25:195–206.
- Lee WC, HA Jung, JS Cjoi, YS Kim and SM Lee. 2011. Protective effect of luteolin against apoptotic liver damage induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide in mice. *J. Nat. Prod.* 74:1916–1921.
- Lee YM, JJ Lee, HD Shin and MY Lee. 2006. Protective effects of *Chaenomeles sinensis* Koehne extract on ethanol-induced liver damage in rat. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35:1336–1342.
- Lee YS, OK Han, TW Jeon, ES Lee, KJ Kim, CW Park and HJ Kim. 2002. Effect of *Astragali radix* extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J. Physiol. Pathol. Korean Med.* 16:707–713.
- Lesch R, W Reutter, D Kepler and K Decker. 1969. Liver restitution after acute galactosamine hepatitis: autoradiographic and biochemical studies in rats. *Exp. Mol. Pathol.* 12:58–69.
- Maley F, AL Tarentino, JF McGarrahan and R Giacco. 1968. The metabolism of D-galactosamine and N-acetyl-D-galactosamine in rat liver. *Biochem. J.* 107:637–644.
- Oh SY, JS Lee, SH Seo, TS Kim and JY Ma. 2011. *Paeonia lactiflora* Pall prevents H₂O₂-induced hepatotoxicity by increasing HSP72 and HO-1. *J. Physiol. Pathol. Korean Med.* 25:843–848.
- Ohkawa H, N Ohishi and K Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95:351–358.
- Park JY, CM Park, JJ Kim and YS Song. 2008. Hepatoprotective activity of dandelion (*Taraxacum officinale*) water extract against D-galactosamine-induced hepatitis in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37:177–183.
- Park YM, JA Kim, CH Kim, JH Lim and EW Seo. 2015. Effect of cultured *Acer tegmentosum* cell extract against hepatic injury induced by D-galactosamine in SD-rats. *Korean J. Plant Res.* 28:551–560.
- Park YM, JH Lim, JE Lee and EW Seo. 2015. Protective effect of *Semisulcospira libertina* extract on induced hepatitis in rats. *J. Life Sci.* 25:539–547.
- Reitman S and SA Frankel. 1957. Colorimetric method for determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28:56–63.
- Shin JK, HY Kim and SM Lee. 2010. Protective effect of *Gardenia jasminoides* against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity. *Yakhak Hoeji* 54:55–61.
- Simeonova PP, RM Gallucci, T Hulderman, R Wilson, C Komineni, M Rao and MI Luster. 2001. The role of tumor necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 177:112–120.
- Wroblewski F and JS LaDue. 1955. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90:210–213.
- Zieve L, WR Anderson and R Dozeman. 1988. Hepatic regenerative enzyme activity after diffuse injury with galactosamine: relationship to histologic alteration. *J. Lab. Clin. Med.* 112:575–582.

Received: 5 September 2018

Revised: 9 November 2018

Revision accepted: 12 November 2018