

## 사염화탄소-유발지방간에 대한 L-글루탐산 일나트륨의 보호작용

김형춘 · 이왕섭 · 전완주 · 최용순\* · 김수희 · 이현우 · 주왕기#

강원대학교 약학대학 및 농과대학\*

(Received January 20, 1992)

### Protective Effects of Monosodium-L-Glutamate on the Fatty Liver induced by Carbon Tetrachloride in Rat.

Hyoung-Chun Kim, Wang-Seop Lee, Wan-Jhoo Chun, Yong-Soon Choi\*,  
Soo-Hee Kim, Hyun-Woo Lee and Wang-Kee Jhoo#

College of Pharmacy and \*College of Agriculture, Kang-weon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**Abstract**—To achieve better understanding of the effects of monosodium-L-glutamate(MSG) against CCl<sub>4</sub> fatty liver in Wister male rats, 5% MSG solution was given as drinking water and CCl<sub>4</sub> 0.1 ml/kg was injected subcutaneously twice a week for four weeks. It was showed that increased hepatic phospholipid and hepatic triacylglycerol levels by CCl<sub>4</sub> challenge were significantly decreased by additionnal MSG, respectively. However, MSG had no apparent effect on the elevated hepatic cholesterol level in the presence of CCl<sub>4</sub>. Histologically, additional MSG markedly inhibited fatty degeneration, spotty necrosis, inflammation and periportal vascular proliferation manifested by CCl<sub>4</sub>, respectively. These results indicated that effects of MSG against CCl<sub>4</sub> induced-fatty liver appeared to be involved with partial restoration of altered hepatic lipid composition.

**Keywords** □ CCl<sub>4</sub>-induced fatty liver, monosodium-L-glutamate(MSG), hepatic lipid composition.

식품첨가물인 monosodium-L-glutamate(MSG)로 인한 사지감각둔화, 쇠약감, 심박수 증가 등을 주요 소견으로하는 중국음식중후군(Chinese restaurant syndrome)을 1968년 Kowk가 처음으로 보고<sup>1)</sup>한 이래 1980년 Burde 등은 신생흰쥐에 MSG를 투여하여 시상하부 궁상핵에 손상이 나타남을 밝혔다.<sup>2)</sup> 그후, MSG는 시상하부 기능이상에 대한 중추독성 유발모델용으로 사용되어오고 있다. 그러나, 대사과정을 추적한 연구중에서도 초점을 간에 맞춘 내용은 몇몇보고를 제외하고는 보고된 바 없다. 최근에 와서 MSG는 혈장에서 케톤체 생성을 감소시키고<sup>3)</sup> 신생마우스간에서 testosterone 6 $\beta$  및 2 $\beta$  hydroxylation, benzo(a) pyrene hydroxylation, propoxycoumarin O-hydroxylation 감소와 cytochrome P-450함량을 감소시키는

등 전반적인 mixed function oxidase(MFO)계를 억제시키는 것으로 알려지고 있다.<sup>4)</sup> 생체대사과정중 MFO계가 억제된다면 그 반응성도 억제될 수 있기 때문에 MSG는 반응성이 강한 성분의 활성을 억제시킬 수 있다고 생각되었으며 더우기 MSG는 흰쥐에서 혈중의 유리지방산, 중성지방, 및 인지질농도를 증가시킨다는 보고 등에 착안하게 되었다.<sup>5)</sup>

본 연구자들은 MSG가 사염화탄소중독간에서 글루타치온의존성 효소의 활성을 증가시킴을 보고하였으며<sup>6)</sup> 여기서는 계속해서 MSG가 사염화탄소유발지방간에 항지방간효과를 관찰하였기에 보고하고자 한다.

#### 실험방법

시약 및 기기—Monosodium-L-glutamate, carbon

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

tetrachloride, ammonium molybdate, ascorbic acid, silicic acid, digitonin, chloroform, methanol, absolute alcohol 등은 Sigma사에서 구입하였으며, 일반 시약들은 일급 및 특급시약을 사용하였다. 기기로는 분광광도계(550 SE, Perkin-Elmer) 및 광학현미경 (BHS-313, Olympus Optical Co.) 등이 사용되었다.

**실험동물**—강원대학교 약학대학 동물 사육실에서 10일 이상 적응시킨 체중 250g 내외의 Wister계 숫컷 흰쥐를 사용하였다. 사육 실내온도 22~24°C, 12시간 썬의 주야 주기를 유지하면서 물과 사료는 제한 하지 않았다.

**실험군**—4군으로 하였다. 즉, Cameron 등의 방법<sup>7)</sup>에 따라 사염화탄소를 올리브유에 1:1로 혼합하여 녹인 사염화탄소 용액을 0.2 ml/kg씩 주2회 4주간 피하주사한 CCl<sub>4</sub> 투여군, 5%(w/v) MSG액을 제한없이 음료수 대용으로 4주간 마시게 한 MSG투여군, 같은 방법으로 동시에 CCl<sub>4</sub> 및 MSG를 병용 투여한 군 및 용매인 올리브유를 피하 주사하고 증류수를 마시게 한 정상대조군의 4군으로 나누고, 최종 투여 18시간 후에 도살하여 얻은 간조직에서 간지질을 추

출하여 간 인지질, 간 중성지방, 간 콜레스테롤의 함량을 측정하고 별도로 조직학적 소견을 관찰하였다.

**간 지질 추출**—Folch와 Lee의 방법<sup>8)</sup>에 따라 간조직을 CHCl<sub>3</sub> 및 메탄올 혼액(2:1)을 넣고 균질화한 다음 여액을 하루 방치후 CHCl<sub>3</sub>층을 취하여 압축시켜 -20°C에서 보관하였다.

**간 인지질 함량 측정**—상기에서 얻은 간 지질추출물을 Rouser와 Siakotos의 방법<sup>9)</sup>에 따라 조직중의 인지질을 가수분해하여 얻어지는 인을 인산염을 표준물질로 하여 820 nm에서 검정하였다.

**간 중성지방 측정**—상기에서 얻은 간 지질추출물을 Fletcher방법<sup>10)</sup>에 따라 조직중의 중성지방을 검화한 후 얻어지는 NaIO<sub>4</sub>와 acetyl acetone을 가했을 때 색소가 형성되는 원리를 이용하여 triolein을 표준물질로 하여 406 nm에서 검정하였다.

**간 콜레스테롤 측정**—상기에서 얻은 간 지질추출물을 Sperry 및 Webb 등의 방법<sup>11)</sup>에 따라 지질중의 콜레스테롤을 digitonin을 가해 digitonide로 석출시켜 분리한 후 무수초산과 진한황산을 가할 때 색소가 생성되는 원리를 이용해서 620 nm에 검정하였다.

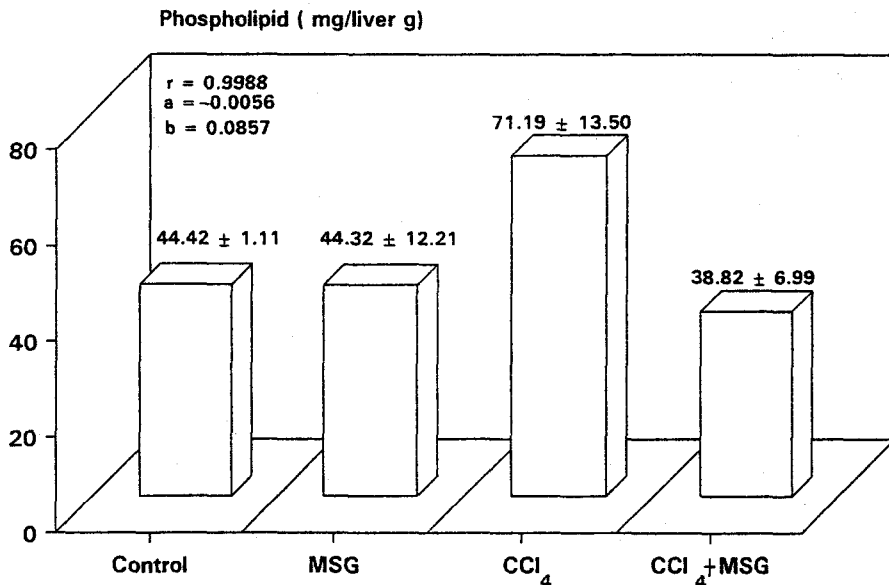


Fig. 1—Effect of MSG on hepatic phospholipid level in fatty liver induced by CCl<sub>4</sub>.

Each value shows mean ± S.E. of 5 to 9 animals. \*:  $p < 0.05$  vs. CCl<sub>4</sub>. Male Wister rats fed with commercial chow *ad libitum* were used. CCl<sub>4</sub>(0.1 mg/kg) as 1:1(v/v) mixture of oil (or olive oil as control) administered subcutaneously to the rats twice a week for 4 weeks. MSG group was given to 5% MSG solution as drinking water. Each rat was killed by ether anesthesia at 18hr after last treatment. Daily consumption of MSG in each rat was calculated as  $4.24 \pm 0.48$  g/kg body weight.

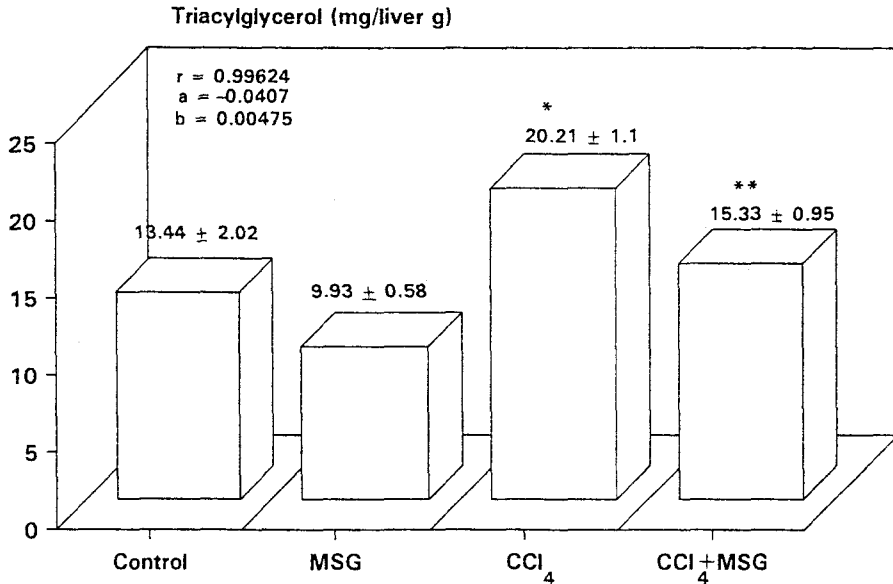


Fig. 2—Effect of MSG on hepatic triacylglycerol level in fatty liver induced by CCl<sub>4</sub>.

Each value shows mean±S.E. of 5 to 9 animals. \*: p<0.05 vs. control, \*\*: p<0.05 vs. CCl<sub>4</sub>. For details, see the legend to Fig. 1.

**간조직검사**—간조직을 10%중성포르말린으로 고정시킨 후 H&E염색을 실시하여 조직의 변화를 광학현미경으로 관찰하였다.

**통계처리**—유의성 검정은 unpaired Student's t-test에 의하였다.

**실험결과**

**간 인지질 함량에 미치는 MSG의 영향**—MSG투여군은 정상대조군과 같은 수준의 함량을 나타내었고, CCl<sub>4</sub>투여시에는 정상대조군에 비하여 그 함량이 증가하였으며, CCl<sub>4</sub> 및 MSG를 병용시킨 군에서는 CCl<sub>4</sub>투여군에 비하여 그 함량이 유의성있게 감소(p<0.05)하여 정상대조군에 접근되었다.(Fig. 1)

**간 중성지방 함량에 미치는 MSG의 영향**—MSG투여군은 정상대조군에 비하여 간 중성지방이 감소하는 경향을 나타내었다. CCl<sub>4</sub>투여시에는 정상대조군보다 그 함량이 유의성있게 증가(p<0.05)되었으나, MSG를 병용투여할 경우, 증가되었던 간 중성지방이 유의성있게 감소(p<0.05)되어 정상대조군의 함량과 유사하게 되었다.(Fig. 2)

**간 콜레스테롤 함량에 미치는 MSG의 영향**—MSG투여군이나 CCl<sub>4</sub>투여군에서는 정상대조군에 비하여 각각 간 콜레스테롤 함량이 유의성있게 증가(p<0.05)하였다. CCl<sub>4</sub>투여군에 MSG를 병용투여할때는 간 콜레스테롤함량에 현저한 영향을 미치지 못하였다.(Fig. 3)

**간조직의 병리조직소견에 미치는 MSG의 영향**—MSG투여군에서는 유의한 변화가 나타나지 않았다. CCl<sub>4</sub>투여군에서는 중등도 이상의 울혈, 지방변성, 소성괴사, 염증, 문맥혈관증식 등의 소견이 관찰되었으나 MSG를 병용투여할 경우 CCl<sub>4</sub>투여시에 보여졌던 지방변성, 염증, 소성괴사, 문맥혈관증식 등의 소견이 현저히 개선되었다.(Table I, Fig. 4-7)

**고찰**

사염화탄소와 같은 간독소는 간조직내 과산화지질을 유도하여 지방산조성을 변화시켜 궁극적으로는 세포독성을 유발시킨다.<sup>12)</sup> 화학적인 지방간을 유도하기 위하여 CCl<sub>4</sub>를 이용하는 예가 많은데, 고용량의 CCl<sub>4</sub>(2.5 ml/kg 이상)을 1회 투여하더라도 1주이내에

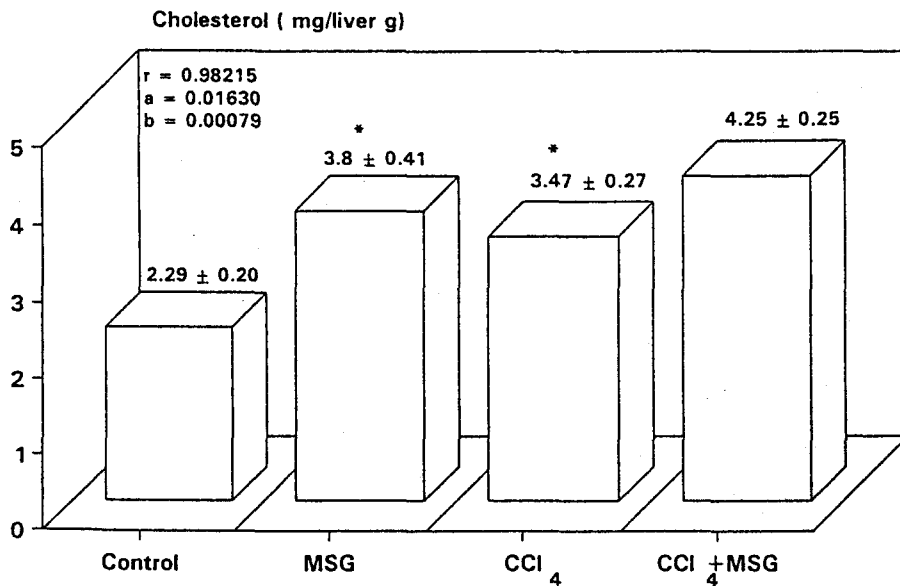


Fig. 3—Effect of MSG on hepatic cholesterol level in fatty liver induced by CCl<sub>4</sub>.

Each value shows mean ± S.E. of 5 to 9 animals. \*: p < 0.05 vs. control. For details, see the legend to Fig. 1.

Table I—Histopathological findings in rat liver

Group	Congestion			Fatty degeneration			Spotty necrosis			Inflammation			Vascular proliferation		
	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+
MSG	3	3		6			4	2		4	2		4	2	
CCl <sub>4</sub>			3	2		2	3		4	1		3	2		2
CCl <sub>4</sub> +MSG			8		4	3	1		1	3	4		4	1	3

-: normal ±: mild +: moderate ++: severe. For details, see the legend to Fig. 1.

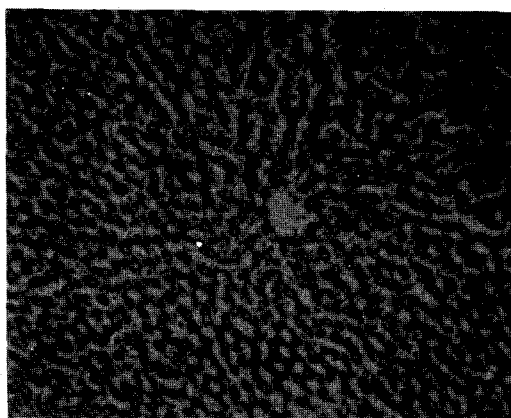


Fig. 4—Well preserved hepatic architecture in MSG treatment(H&E, ×100).

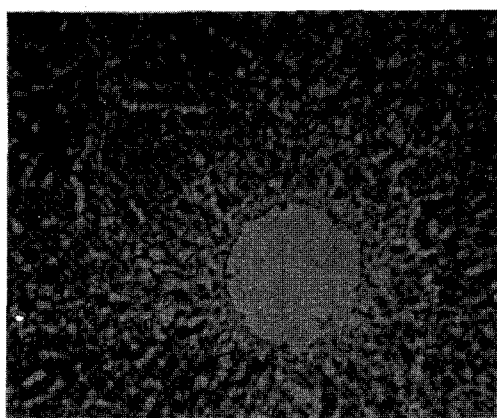


Fig. 5—Fatty degeneration of centrilobular area in CCl<sub>4</sub> treatment(H&E, ×100).

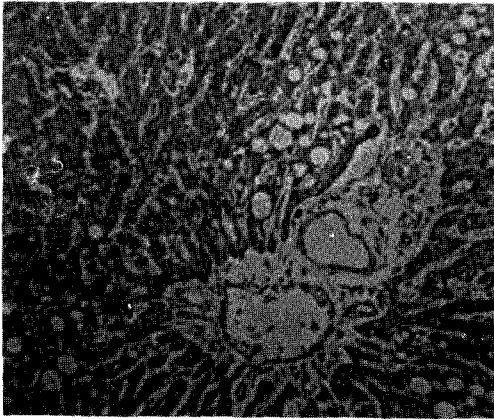


Fig. 6—Marked fatty metamorphosis and perivascular proliferation in CCl<sub>4</sub> treatment(H&E, ×100).

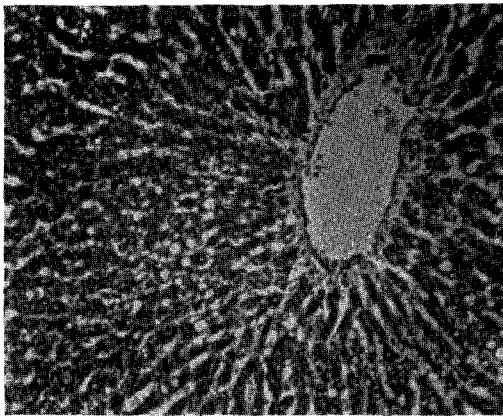


Fig. 7—Marked improved hepatic architecture in coadministration both CCl<sub>4</sub> and MSG(H&E, ×100).

회복되는 점<sup>13)</sup>을 고려하여 본연구에서는 비교적 저용량으로 민감한 반응을 일으킬 수 있는 CCl<sub>4</sub> 0.1 ml/kg의 용량으로 Cameron의 방법에 따라 지방간 병변을 유지시켰다. CCl<sub>4</sub> 투여에 의해 증가된 간 인지질을 세포막의 기질화와 안정성유지에 손상을 미칠 수 있다.<sup>14)</sup> 본 실험의 경우 MSG가 병용투여 될때는 CCl<sub>4</sub>로 인하여 증가되었던 간 인지질이 정상수준에 접근되었다. 이는 CCl<sub>4</sub>로 인해 과산화지질화 되는 동안 비정상적인 인지질인 alkylacyl 및 alkenylacyl phospholipid 등의 유도가 MSG병용으로 억제 될 수 있을 가능성을 제시한다. 그러나 MSG의 기전은 간 조직내의 인지질구성비, 합성, 대사 등에 중요한 역할을 하는 phospholipase를 추적함으로써 보다 정밀

하게 파악될 수 있을것이다.<sup>15,16)</sup>

정상 간세포내의 지질량은 합성을, 이용을, 및 분비율이 평형을 이룬 상태이다. 그런데, 지방간의 근본적인 병태생리는 특히 간세포내의 중성지방이 혈장으로 분비되는 과정이 차단되는 것인바,<sup>17,18)</sup> MSG 투여 비만 흰쥐에서 보여지는 혈장 중성지방의 현저한 증가<sup>3)</sup>는 지방간의 주류인 중성지방이 혈장으로 이행될 수 있음을 증명하는 것이며 본 실험결과에서도 CCl<sub>4</sub> 투여로 인하여 증가되었던 간 중성지방의 함량이 MSG가 병용투여됨으로써 현저히 억제됨과 동시에 조직학적인 소견에서도 현저히 지방간이 억제되어 항지방간 효과가 인정됨을 관찰할 수 있었다. 또한 지방간에서 간 중성지방이 억제되면 간 혈류량이 증가되어 조직학적으로 유효하게 작용할 수 있다는 보고도 있다.<sup>17,18)</sup>

반면에 MSG가 흰쥐간조직에서 어떤 경로를 거쳐 콜레스테롤합성을 유도하는지는 설명할 수 없으나, 추가적인 혈장 HDL-콜레스테롤 등의 분석을 통해 부분적으로 설명될 수 있을 것이다. 간 세포내 지방 변화는 이물질 반응에 대한 비표가 될 수 있고 특히 단백질 및 지질의 합성변화를 유발하는 실험조건은 약물대사에 관여하는 효소유도와의 관련성이 있다.<sup>19)</sup> CCl<sub>4</sub>는 인지질 지방산 측쇄에서 비롯된 부산물인 지방의 반응성대사물을 형성하며 이 대사물의 지방과의 공유결합에 따라 간의 조직병변이 좌우된다고 한다.<sup>20)</sup>

간의 유리 glutamate는 뇌의 1/4정도에 해당하고 과량이 섭취되어도 문맥순환을 거쳐 신속한 간대사가 이루어지는 것을 고려하고 MSG의 작용을 항지방간 효과에만 제한할 때 그 기전에는 간지질 중성지방억제 이외에도 항산화 가능유지에 중요한 글루타치온의 존생효소유도효과와 간세포내에서의 케톤체생성억제 등도 관여될 수 있을 것으로 생각된다. 그러나, 본 연구결과만으로 전반적인 간보호작용을 평가할 수 없기 때문에 추가적인 기전제시가 요구된다.

### 결 론

MSG가 CCl<sub>4</sub> 지방간에 미치는 영향을 규명하기 위하여 Wistar 숫컷 흰쥐를 대상으로 5% monosodium-L-glutamate(MSG)를 4주간 음료수대신 투여 하면서 CCl<sub>4</sub> 0.1 mg/kg을 주2회 피하주사하고 마지막 투여 18시간후에 간 지질을 추출하여 간 인지질, 중

성지방 및 콜레스테롤함량을 측정하고 별도로 조직학적 검색을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 간 인지질함량은 MSG를 투여하여도 변화되지 않았다. 정상대조군에 비하여 증가된  $\text{CCl}_4$  투여군에 MSG가 병용투여됨으로써 유의성있게 감소( $p < 0.05$ )되어 그 함량이 정상대조군에 접근되었다.

2) 간 중성지방은 MSG투여로 정상대조군에 비하여 저하되는 경향을 보였다. 반면에,  $\text{CCl}_4$ 투여시에는 정상대조군에 비하여 유의성있게 증가( $p < 0.05$ )되었으나, MSG가 병용투여되면 유의성있게 그 함량이 감소( $p < 0.05$ )되어 정상대조군에 접근되었다.

3) 간 콜레스테롤함량은 정상대조군에 비하여 MSG투여군 및  $\text{CCl}_4$ 투여군에서 각각 유의성있게 증가( $p < 0.05$ )되었다. 그러나  $\text{CCl}_4$ 와 MSG를 병용투여하여도 간 콜레스테롤함량에는 명백한 변화가 나타나지 않았다.

4) 간조직학적인 소견을 관찰할때 MSG는  $\text{CCl}_4$ 로 인한 현저한 지방변성, 소성괴사, 염증 및 문맥 혈관 증식을 억제하였다.

그러므로 본 실험조건하에서는  $\text{CCl}_4$ 지방간에 대하여 MSG는 주로 간 중성지방 및 간 인지질을 정상화시켜 항지방간 효과를 발현할 수 있음을 제시한다.

## 문 헌

- 1) Kwok, R.H.M.: Chinese-restaurant syndrome. *New Eng. J. Med.*, **278**, 796(1968).
- 2) Burde, R.M., Schainker, B. and Kayes, J.: Acute effect of oral and subcutaneous administration of monosodium glutamate on the arcuate nucleus of hypothalamus in mice and rats. *Nature* **233**, 58 (1980).
- 3) Nakai, T., Tamai, T., Takai, S., Hayashi, R., Fujiwara, R. and Miyabo, S.: Decreased ketonemia in the monosodium glutamate-induced obese rats. *Life Sci.*, **38**, 2009(1986).
- 4) Yamazoe, Y., Shimada, M., Murayama, N., Yamachi, K. and Kato, R.: Alteration of hepatic drug metabolizing activities and contents of cytochrome P-450 isozymes by neonatal monosodium glutamate treatment. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 1687(1988).
- 5) Ahluwalia, P. and Malik, V.B.K.: Effects of monosodium glutamate (MSG) on serum lipids, blood glucose and cholesterol in adult male mice. *Toxicol. Lett.*, **45**, 195(1989).
- 6) Kim, H.C., Lee, W.S., Chun, W.J., Kim, S.H. and Jhoo, W.K.: Alterations of glutathione and glutathione-dependent enzyme activities by monosodium-L-glutamate in rats with carbon tetrachloride-induced liver damage. *Yakhak Hoeji*, **35**(5), 384 (1991).
- 7) Cameron, G.R. and Karunaratne, W.A.E.: Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J. Pathol. & Bacteriol.*, **42**, 1(1936).
- 8) Folch, J., Lee, M., Stanley, S.G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497(1957).
- 9) Rouser, G., Sitakotos, A.N. and Fleischer, S.: Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids* **1**, 85(1966).
- 10) Fletcher, M.J.: A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clinica Chimica Acta*, **22**, 393(1968).
- 11) Sperry, W.M. and Webb, M.: A revision of the Scheoenheimer and Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, **187**, 97(1950).
- 12) Noll, T and Groot, H: The critical steady-state hypoxic conditions in carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **795**, 356-362(1984).
- 13) Nakata, R., Tsukamoto, T., Miyoshi, M. and Kojo, S.: Liver regeneration after  $\text{CCl}_4$  intoxication in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 586(1985).
- 14) Belina, H., Cooper, S.D., Farkas, R. and Feuer, G.: Sex difference in the phospholipid composition of rat liver microsomes. *Biochim. Pharmacol.*, **24**, 301 (1975).
- 15) Reiter, R. and Burk, R.F.: Formation of glutathione adducts of carbon tetrachloride metabolisms in rat liver microsomal incubation system. *Biochem. Pharmacol.*, **37**(2), 327-331(1988).
- 16) Diagne, A, Fauvel, J., Record, M., Chap, H. and Douste-Blayz, L.: Studies on ether phospholipid II. Comparative composition of various tissues from human, rat, and guinea pig. *Biochem. Biophys. Acta*, **793**, 221-231(1984).

- 17) Hoyumba, A.M., Jr., Greene, H.L., Dunn, G.D. and Schenker, S.: Fatty liver: biochemical and clinical considerations. *Dig. Dis.*, **20**, 1142(1975).
- 18) Lombardi, B.: Considerations on the pathogenesis of fatty liver. *Lab. Invest.*, **15**, 1(1966).
- 19) Cooper, S.D. and Feuer, G.J.: Effect of drugs and hepatotoxins on the relation between drug-metabolizing activity and phospholipids in hepatic microsomes during choline deficiency. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **25**, 7(1973).
- 20) Widger, L.A., Gandolfi, A.J. and Van Dyke, R.A.: Hypoxia and halothane metabolism *in vivo*: Release of inorganic fluoride and halothane metabolite binding to cellular constituents. *Anesthesiology* **44**, 197(1977).
- 21) Giacometti, T.: *Free and Bound Glutamate in Natural Products*. ed. by Filer L.J., Raven Press, New York, p. 25(1979).