

## 사염화탄소에 의하여 유발된 흰쥐의 간 독성에 미치는 비테인의 효과

김선여 · 김홍표 · 이미경 · 변순정 · 김승희\* · 문애리\* · 한형미\* · 허 훈 · 김영중#

서울대학교 약학대학, \*국립보건안전연구원

(Received September 15, 1993)

## The Effect of Betaine on the CCl<sub>4</sub>-Induced Hepatotoxicity in Rats

Sun Yeou Kim, Hong Pyo Kim, Mi Kyeong Lee, Soon Jeong Byun,

Seung Hee Kim\*, Hyung Mi Han\*, Aree Moon\*, Hoon Huh and Young Choong Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

\*National Institute of Safety Research, 5, Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul 120-020, Korea

**Abstract** — Effects of betaine, a major component of *Lycii Fructus*, on carbon tetrachloride intoxicated rats were evaluated. Histological studies showed that betaine had improved the typical necrosis around centrilobular area in liver tissue due to the carbon tetrachloride intoxication. Betaine, whether it was administrated simultaneously or prior to carbon tetrachloride, prevented or retarded the elevation of liver-weight/body-weight ratio due to the carbon tetrachloride intoxication. Betaine also significantly elevated the reduced activities of some enzymes, cytochrome P-450, 7-ethoxycoumarin-O-deethylase and glutathione-S-transferase, involved in xenobiotic metabolism due to carbon tetrachloride intoxication. These results demonstrate a possible hepatoprotective role of betaine against fatty liver that could be easily induced by carbon tetrachloride in rat.

**Keyword** □ Liver-weight/body-weight ratio, carbon tetrachloride, cytochrome P-450, 7-ethoxycoumarin-O-deethylase, fatty liver, glutathione-S-transferase, glutamic pyruvic transaminase.

구기자, *Lycii Fructus*(Solanaceae)의 중요 성분으로 알려진 비테인은 흰쥐를 고지방식으로 사육하였을 때 지방함량을 감소시키고<sup>1)</sup> 정상상태의 흰쥐에 경구 투여하였을 때 간의 인자질을 증가시키며, 사염화탄소로 독성을 유발시켰을 때 중성지방의 증가를 어느 정도 막아주었다는 단편적인 보고가 있다.<sup>2)</sup> 그러나, 이러한 비테인의 작용이 어떠한 기전에 의한 것인지 아직까지 체계적으로 규명된 바 없다. 이에 본 연구 실에서는 일차적으로 비테인이 사염화탄소로 인한 간독성에 어떻게 작용하는지 그 기전을 일차배양 흰쥐의 간세포계를 이용하여 알아보았다. 비테인은 사염화탄소로 손상을 입은 간세포로부터 배양액 중으로 유출되는 glutamic pyruvic transaminase(GPT)값을 농도의존적으로 감소시켰으며, 중요한 간 대사효소들

인 7-ethoxycoumarin-O-deethylase 및 cytochrome P-450 활성을 유의성있게 증가시켰다. 또한, 해독작용에 관여하는 효소인 glutathione-S-transferase의 활성도 어느 정도 증가시키는 것을 밝혔다.<sup>3)</sup> 이러한 비테인의 효과가 생체내에서도 그대로 발현되는지를 규명하기 위하여 사염화탄소로 흰쥐의 간 손상을 유도하고 이에 미치는 비테인의 효과를 간조직 검사 및 체중 당 간 중량비, 혈액내로 유출된 GPT값, cytochrome P-450 함량, malondialdehyde 함량, glutathione-S-transferase 함량을 측정함으로써 알아보았다.

### 실험재료 및 방법

시약— 실험에 사용한 모든 시약은 Sigma사(St. Louis, U.S.A.) 제품을 사용하였으며 GPT정량 kit은

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

영동제약(서울, 한국) 제품을 사용하였다.

**실험 동물**—체중  $135 \pm 6$  g 정도의 웅성 Wistar 흰쥐 5 마리를 1 군으로 하여 전체를 6 군으로 무작위로 나누어 온도  $22 \pm 1$ °C, 습도 50~60%로 유지되는 실험동물 사육실에서 12 시간 주기로 명암을 바꾸어 주면서 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하면서 사육하였다.

**비테인 투여**—비테인을 생리식염수에 용해시켜 체중 Kg당 100 mg씩 복강주사로 흰쥐에 투여하였다.

**사염화탄소에 의한 간독성 유발**—사염화탄소는 olive oil에 1:4의 비율로 용해시켜 체중 Kg 당 0.5 mg의 용량을 체중  $135 \pm 6$  g의 흰쥐에 Table I 과 같이 2 번에 걸쳐 복강주사로 투여하여 간독성을 유발시켰다. 정상대조군에는 생리식염수를 복강주사하였다.

**간 중량/체중 산출**—흰쥐의 체중을 측정한 후, 채혈한 다음 간을 적출하여 간의 중량을 측정하여, 간중량/체중(g/g)의 비를 산출하였다.

**간의 조직학적 관찰**—채혈 직후 간을 적출하여 10% 중성 포르밀린으로 고정시킨 후, 헤마톡실린-에오신 용액으로 염색하여 조직병리학적 방법으로<sup>4)</sup> 간조직을 관찰하였다.

**혈청 중의 GPT 활성 측정**—채혈 하루 전부터 흰쥐를 절식시킨 후, 복부 대동맥에서 일정량의 혈액을 채취하여 20분 동안 방치한 다음 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈액중의 GPT 활성은 Reitman-Frankel 방법<sup>5)</sup>에 따라 kit을 사용하여 측정하였다.

**Cytochrome P-450 측정**—간균질액을 Omura 등의

방법<sup>6)</sup>에 의하여 제조한 다음 0.1 M tris 완충액(pH 7.4)으로 단백질 양이 2 mg/ml가 되도록 회석한 후 검액을 차등 스펙트럼(difference spectra) 측정을 위하여 동량씩 둘로 나눈 다음 즉시 sodium dithionite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) 2~3 mg을 첨가하고 잘 섞었다. 일산화탄소 가스를 30초 동안 주입시킨 후 400~500 nm 사이의 흡광도를 측정하여 기초선(baseline)을 기록하였다. 한편, 일산화탄소 가스를 주입시키지 않은 검액을 대조액으로 하여 400~500 nm 사이의 흡광도를 다시 측정하여 cytochrome P-450 함량을 산출하였다.

**과산화지질 측정**—간을 적출하여 균질화시킨 다음 차등 원심분리(differential centrifugation)하여 얻은 마이토콘드리아 상징액(post mitochondrial supernatant)의 지질 과산화 정도를 Masugi법<sup>7)</sup>에 의하여 측정하고 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 표준물질로 하여 malondialdehyde(MDA) 양을 환산하였다.

**Glutathione-S-transferase의 활성 측정**—간균질액을 차등 원심분리하여 얻은 마이토콘드리아 상징액 일정량에 30 mM glutathione, 30 mM dinitrochlorobenzene과 100 mM 인산완충액 (pH 6.5)을 각기 첨가한 후 인산완충액을 대조액으로 하여 340 nm에서 직선(linear portion)을 이루는 때의 분당 흡광도를 측정하여 활성을 측정하였다.<sup>8)</sup>

**단백질 함량**—단백질 함량은 Lowry 등의 방법<sup>9)</sup>에 준하여 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin)을 표준물질로 하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

**Table I.** Experimental schedule

| Group | Experimental period(day) |     |      |                   |     |     |     |                   |     |
|-------|--------------------------|-----|------|-------------------|-----|-----|-----|-------------------|-----|
|       | -3                       | -2  | -1   | 1                 | 2   | 3   | 4   | 5                 | 6   |
| I     | sal                      | sal | sal. | olive             | sal | sal | sal | olive             | sal |
| II    | sal                      | sal | sal  | $\text{CCl}_4$    | sal | sal | sal | $\text{CCl}_4$    | sal |
| III   | bet                      | bet | bet  | $\text{CCl}_4$    | bet | bet | bet | $\text{CCl}_4$    | sal |
| IV    | bet                      | bet | bet  | b, $\text{CCl}_4$ | bet | bet | bet | b, $\text{CCl}_4$ | sal |
| V     | sal                      | sal | sal  | b, $\text{CCl}_4$ | sal | sal | sal | b, $\text{CCl}_4$ | sal |
| VI    | sal                      | sal | sal  | bet               | sal | sal | sal | bet               | sal |

\*Abbr.: bet: betaine, sal: saline b,  $\text{CCl}_4$ : betaine and  $\text{CCl}_4$

\* $\text{CCl}_4$ : olive oil=1:4(i.p., 0.5 mg/kg)

\*Sal.: 0.9% NaCl solution

\*Betaine: betaine(100 mg/kg,i.p.)

\*Each group consists of 5 rats

사염화탄소로 독성을 유발한 일차 배양한 흰쥐의 간세포에 대한 비테인의 간세포 보호 효과가 생체내에서도 그대로 발현되는지를 일차적으로 흰쥐에 사염화탄소를 투여하여 간에 독성을 일으킨 후 간조직을 검사하여 알아보았다. 사염화탄소로 간에 독성을 유발시킨 흰쥐군의 간문맥 쪽에 염증이 나타났으며, 간세포가 괴사(hepatocyte necrosis)되었음을 조직 검사로 알 수 있었다. 즉, 중심정맥 오른쪽들이 염증이 생기고 괴사됨을 관찰할 수 있었다. 그러나 정상 흰쥐군에서는 중심 정맥과 간문맥을 중심으로 관찰하였을 때, 별다른 이상을 찾아볼 수 없었다(Fig. 1). 사염화탄소로 독성을 유발시키기 전에 미리 비테인을 투여한 다음 독성을 유발시킨 흰쥐군의 경우는 간문맥 주위에서는 염증세포가 관찰되지 않았으나 간세포는 미약한 상해를 입은 것을 관찰할 수 있었다. 사염화탄소로 독성을 유발시키면서 동시에 비테인을 투여한 흰쥐군의 경우에는 중심 정맥쪽의 간세포에 아주 경미한 혀혈성 변성이 일어났음을 관찰할 수 있었다. 더우기, 사염화탄소로 독성을 유발시키기 전에 미리 비테인을 투여한 다음 사염화탄소로 독성을 유발시키면서 동시에 다시 비테인을 투여한 흰쥐군의 경우에는 중심 정맥쪽은 거의 정상에 가깝고 간문맥쪽에 아주 미약한 혀혈성 변성을 관찰할 수 있었다.

이러한 조직 검사에 의한 비테인의 간보호 효과를 흰쥐의 체중 당 간의 중량비를 측정함으로써 독성에 의한 지방의 비정상적 축적에 비테인이 어떻게 작용하는지를 알아보았다. 이는 사염화탄소로 흰쥐에 간독성을 유발시키면 지방이 간에 비정상적으로 축적되어 간이 비대해지고 나아가서는 괴사를 일으킨다고 알려져 있기 때문이다.<sup>10,11)</sup> 사염화탄소에 의하여 간독성이 유발된 흰쥐군은 정상 흰쥐군에 비하여 체중 당 간의 중량비가 유의성 있게 증가되었다(Fig. 2). 그러나, 사염화탄소로 독성을 유발시키면서 동시에 비테인을 투여한 흰쥐군에서는 체중 당 간의 중량비가 비테인을 투여하지 않은 흰쥐군에 비하여 유의성 있게 감소되어 비테인이 사염화탄소에 의한 지방의 비정적 축적을 어느정도 막아주는 것을 알 수 있었다. 더우기 비테인을 흰쥐에 사염화탄소로 독성을 유발시키기 전에 미리 투여한 흰쥐군에서는 체중 당 간의 중량비가 거의 정상 흰쥐군과 같았다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 비테인은 사염화탄소에 의한 지방간

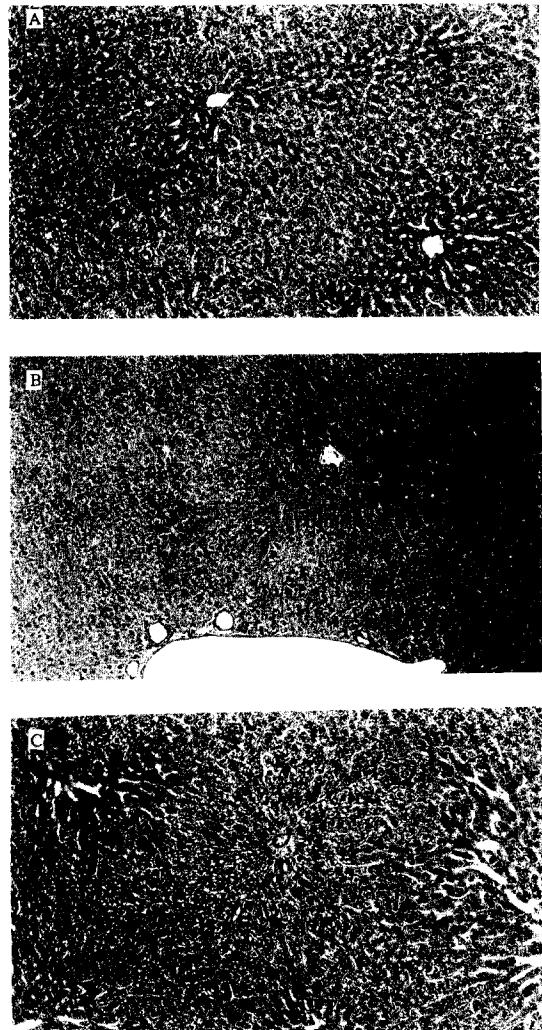


Fig. 1 - Pictures of the liver tissue.(X 100)

- A. liver tissue of normal rats.
- B. liver tissue of  $\text{CCl}_4$ -intoxicated rats.
- C. liver tissue of rats which were treated with betaine along with  $\text{CCl}_4$ -intoxication.

형성을 억제시켜 간이 비대해지는 것을 막아준다고 생각할 수 있겠다.

사염화탄소에 의하여 간독성이 유발되면 혈중 GPT값이 증가한다. 그러나 비테인을 사염화탄소로 간독성을 유발시키기 전에 투여한 흰쥐군은 비테인을 투여하지 않고 사염화탄소만으로 간독성을 유발시킨 흰쥐군에 비해 GPT값이 유의성 있게 감소되었다. 또한

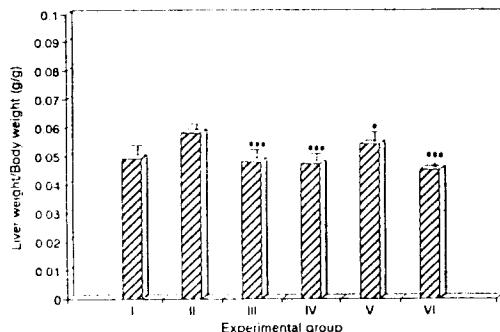


Fig. 2—The effect of betaine on the liver-weight to body-weight ratio in  $\text{CCl}_4$ -intoxicated rats.

Group I : normal rats.

Group II :  $\text{CCl}_4$ -intoxicated rats.

Group III :  $\text{CCl}_4$ -intoxicated rats which were pre-and post-treated with betaine.

Group IV :  $\text{CCl}_4$ -intoxicated rats which were pre-, simultaneously- and post-treated with betaine.

Group V : rats which were given betaine along with  $\text{CCl}_4$ -intoxication.

Group VI : rats which were treated with betaine alone.

I : standard deviation

Significantly different with respect to control :

\* :  $p < 0.05$  \*\*\* :  $p < 0.001$

비테인을 사염화탄소로 간독성을 유발시키기 전에 투여한 후, 비테인과 사염화탄소를 동시 투여하였을 경우에도 GPT값이 유의성 있게 감소되었다(Table II). 간이 사염화탄소에 의하여 손상되면 대사에 관여하는 mixed function oxidase의 활성 및 cytochrome P-450 양이 감소되는 것으로 알려져 있으므로<sup>12)</sup> 비테인의 간보호 효과가 사염화탄소로 인한 cytochrome p-450 함량 감소를 회복시킴에 의한 것 인지를 알아보았다. 사염화탄소로 흰쥐에 독성을 유발시키면 간의 cytochrome p-450 함량이 정상 흰쥐군에 비하여 급격히 감소되었다(Fig. 3). 그러나 비테인을 투여한 흰쥐군들에서는 cytochrome P-450 양이 유의성 있게 증가되었다. 주목할 만한 것은 사염화탄소로 흰쥐에 독성을 유발시키기 전에 미리 비테인을 투여한 경우 보다 사염화탄소로 독성을 유발시키면서 동시에 비테인을 투여한 경우에 간보호 효과가 더욱 뚜렷하였다.

Table II. The effect of betaine on the GPT values in rats treated with carbon tetrachloride

| Experimental group | GPT values    |
|--------------------|---------------|
| Group I            | 37.3 ± 4.5    |
| Group II           | 150.6 ± 15.0  |
| Group III          | 56.1 ± 3.4*** |
| Group IV           | 42.6 ± 3.0*** |

Mean ± S.D.

Significantly different with respect to control: \*\*\*:  $p < 0.001$

Group I: normal rats.

Group II:  $\text{CCl}_4$ -intoxicated rats.

Group III:  $\text{CCl}_4$ -intoxicated rats which were pre-and post-treated with betaine.

Group IV:  $\text{CCl}_4$ -intoxicated rats which were pre-, simultaneously- and post-treated with betaine.

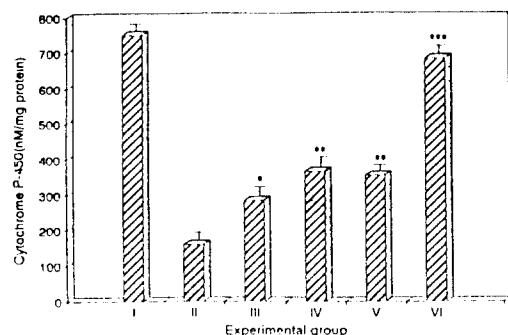


Fig. 3—The effect of betaine on total cytochrome P-450 content in rats treated with carbon tetrachloride.

Group I : normal rats.

Group II :  $\text{CCl}_4$ -intoxicated rats.

Group III :  $\text{CCl}_4$ -intoxicated rats which were pre-and post-treated with betaine.

Group IV :  $\text{CCl}_4$ -intoxicated rats which were pre-, simultaneously- and post-treated with betaine.

Group V : rats which were given betaine along with  $\text{CCl}_4$ -intoxication.

Group VI : rats which were treated with betaine alone.

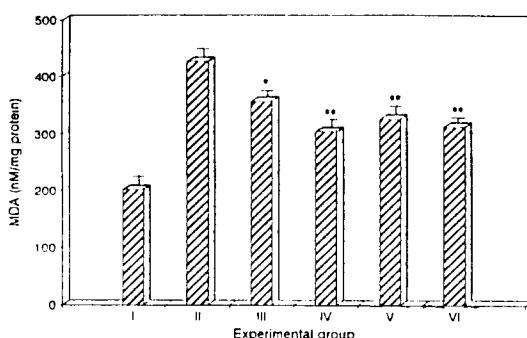
I : standard deviation

Significantly different with respect to control :

\*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$  \*\*\*:  $p < 0.001$

다.

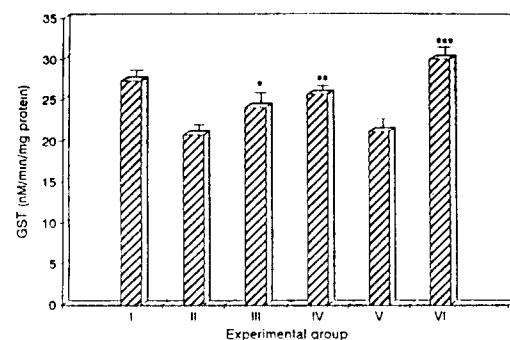
지질의 과산화는 cytochrome p-450에 관여하는 촉매반응에 부수되어 일어나는 것으로 알려져 있으므로 사염화탄소로 인하여 감소된 cytochrome p-450 양을 비테인이 유의성있게 회복시키는 사실이 지질과산화 억제에 의한 것 인지를 검토하기 위하여 사염화탄소로 간상해를 유발시킨 흰쥐 간에서의 malondialdehyde 양을 측정하여 보았다. 사염화탄소에 의하여 간독성이 유발된 흰쥐군에서는 정상 흰쥐군에 비하여 약 2배 정도 malondialdehyde 함량이 증가된 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 그러나 비테인을 사염화탄소로 흰쥐에 간독성을 유발시키기 전에 미리 투여한 흰쥐군에서는 malondialdehyde 함량이 유의성있게 감소되었다. 또한, 사염화탄소로 독성을 유발시키면서 동시에 비테인을 투여한 실험군에서도 malondialdehyde 함량이 유의성있게 감소되었으며 사염화탄소로 독성을 유발시키기 전에 미리 비테인을 투여한 다음



**Fig. 4 – The effect of betaine on malondialdehyde content in rats treated with carbon tetrachloride.**  
 Group I : normal rats.  
 Group II : CCl<sub>4</sub>-intoxicated rats.  
 Group III : CCl<sub>4</sub>-intoxicated rats which were pre-and post-treated with betaine.  
 Group IV : CCl<sub>4</sub>-intoxicated rats which were pre-, simultaneously- and post-treated with betaine.  
 Group V : rats which were given betaine along with CCl<sub>4</sub>-intoxication.  
 Group VI : rats which were treated with betaine alone.  
 I : standard deviation  
 Significantly different with respect to control : \*p<0.05 \*\* : p<0.01

다시 사염화탄소로 독성을 유발시키면서 동시에 비테인을 투여한 흰쥐군의 경우 malondialdehyde 함량이 더욱 감소되었으나 유의성은 없었다. 이상의 결과로 비테인은 사염화탄소로 인한 간손상을 예방하는 효과보다는 손상을 입을 당시에 독성을 완화시켜 주는 효과가 더 큰 것으로 유추할 수 있어 비테인은 간손상 예방효과 보다는 치료효과가 우수하다고 생각된다.

간에서 glutathione-S-transferase는 다양한 독성화합물을 해독시켜 독성 물질에 의한 간의 손상을 막아줌으로써 간보호에 필수적 역할을 하는 효소로 간에 독성이 유발되면 glutathione-S-transferase의 간세포 내의 농도는 감소한다.<sup>13)</sup> 간의 해독 능력에 미치는 비테인의 효과를 알아보기 위하여 glutathione-S-transferase의 활성을 측정하여 보았다. 사



**Fig. 5 – The effect of betaine on glutathione-S-transferase content in rats treated with carbon tetrachloride.**

Group I : normal rats.

Group II : CCl<sub>4</sub>-intoxicated rats.

Group III : CCl<sub>4</sub>-intoxicated rats which were pre-and post-treated with betaine.

Group IV : CCl<sub>4</sub>-intoxicated rats which were pre-, simultaneously- and post-treated with betaine.

Group V : rats which were given betaine along with CCl<sub>4</sub>-intoxication.

Group VI : rats which were treated with betaine alone.

I : standard deviation

Significantly different with respect to control :

\*p<0.05 \*\* : p<0.01 \*\*\* : p<0.001

염화탄소로 인한 간독성이 유발된 흰쥐군에서는 glutathione-S-transferase의 활성이 정상군에 비하여 급격히 감소됨을 알 수 있었다. 그러나 비테인을 사염화탄소로 흰쥐에 간독성을 유발시키기 전에 미리 투여한 흰쥐군에서는 glutathione-S-transferase의 활성이 유의성있게 증가되었다(Fig. 5). 더우기, 사염화탄소로 독성을 유발시키기 전에 미리 비테인을 투여한 후 다시 사염화탄소로 독성을 유발시키면서 동시에 비테인을 투여한 흰쥐군의 경우에는 독성으로 저하된 glutathione-S-transferase의 활성이 거의 정상 수준으로 증가되었다. 그러나 사염화탄소로 독성을 유발시키면서 동시에 비테인을 투여한 흰쥐군에서는 별 다른 효과를 인지할 수 없었다. 따라서 사염화탄소로 인하여 저하된 glutathione-S-transferase의 활성을 회복시키는 비테인의 효과는 사염화탄소에 의한 간 손상 유발전에 투여하는 것이 간손상 후에 투여하는 것보다 훨씬 효과적임을 알 수 있었다.

이와같이 비테인은 사염화탄소로 흰쥐에 간독성을 유발시켰을 때 뚜렷한 간보호 효과를 나타냄을 간 조직 검사로 밝힐 수 있었으며 더우기 간독성이 유발되었을 때 지표가 되는 여러 효소의 저하된 활성을 유의성있게 회복시켜 뚜렷한 간보호 효과를 나타냄을 본 연구 결과로 입증할 수 있었다.

### 감사의 말씀

이 연구의 일부는 서울대학교 신의약품 개발연구 센터의 지원에 의하여 이루어졌기에 이에 감사드리는 바입니다. 또한 간조직 검사에 도움을 주신 유한양행 중앙연구소 이종욱 소장님께 깊이 감사드립니다.

### 문 헌

- Harper, A.E., Monson, W.J., Benton, D.A. and Elve-

hem, C.A.: The influence of protein and certain amino acids, particularly threonine, on the deposition of fat in the liver of the rats. *J. Nutrition*, **50**, 383 (1953).

- 黑川省吾: *Lycium chinense* Miller(枸杞) 果實成分の藥理學的研究. *Shikoku Igaku Zasshi*, **18**, 127 (1962).
- Y.C. Kim: manuscript has been submitted.
- Uchida, I., Kao, H. and Williams, R.H.: Alcoholic foamy degeneration. *Gastroenterology*, **8**, 683 (1983).
- Reitman, S., and Frankel, S.: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *J. Clin. Pathol.*, **28**, 56 (1957).
- Omura, T., and Sato, R.: The carbon monooxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**(7), 2370 (1964).
- Smith, M.T., Thor, H., Hartzell, P. and Orrenius, S.: The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 19 (1982).
- Habig, W. H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: Glutathione-S-Transferases. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130 (1974).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- Reckinagel, R.O.: Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, **19**, 145 (1967).
- Maynard, E.H., Bittern, S. and James, R.G.: Effect of 3-methylchloanthrene induction on the  $\text{CCl}_4$ -induced changes in rat hepatic microsomal enzyme system. *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 745 (1971).
- Smuchler, E.A., Arrhenius, E and Hulting, T: *Biochem. J.*, **103**, 55 (1967).
- Neil, K., Tak, Y.A. and Murad, O.: The regulation of hepatic glutathione. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **25**, 715 (1985).