

담도결찰 흰쥐에서 영지배양 균사체 유래 다당체의 항섬유화 효과 검색 및 용량의존성시험

박은전 · 고건일 · 김재백 · 손동환*

원광대학교 약학대학, 의학자원연구소

(Received December 7, 1996)

Dose-dependent Antifibrotic Effect of Polysaccharide from Mycelium of *Ganoderma Lucidum* on Liver Biliary Cirrhosis in Rats

Eun-Jeon Park, Geon Il Ko, Jae Baek Kim and Dong Hwan Sohn*

Medicinal Resources Research Center, College of Pharmacy,
Wonkwang University, Iksan, Geonbuk 570-749 Korea

Abstract—This study was carried out to investigate the dose dependent antifibrotic effects of polysaccharide from mycelium of *Ganoderma lucidum*. The experimental hepatic cirrhosis was induced by bile duct ligation/scission (BDL/S) in rats. BDL/S rats in each group were dosed 0.5 mg, 2.0 mg, 5.0 mg or 10.0 mg/rat/day orally for 4 weeks after the operation. Antifibrotic effects were evaluated by serum biochemical values, hydroxyproline contents, and light microscopical histology. The results obtained were as follows: 1) Hydroxyproline contents in liver of 5.0 and 10.0 mg polysaccharide-treated BDL/S rats were significantly reduced 2) In serum test, ALT, AST, ALP values in polysaccharide from *Ganoderma lucidum*-treated group were lower than BDL/S control group 3) The hepatic damage such as hepatocellular necrosis, inflammation, bile duct proliferation and fibrosis was less severe in the livers of 2.0 mg and 5.0 mg polysaccharide-treated rats. These results suggest that polysaccharide from mycelium of *Ganoderma lucidum* to be a promising agent for the inhibition of hepatic cirrhosis.

Keywords □ Bile duct ligation and scission, *Ganoderma lucidum*, Hepatic cirrhosis, Antifibrotic agent.

영지(*Ganoderma lucidum*)는 다공균과(polyporaceae)에 속하는 담자균류(basidiomycetes)로서 신농본초경에 불로장생의 영약이라 수재되어 있으며 예로부터 심장병, 강장, 진정, 이뇨, 정장, 뇌졸중 등에 사용되어 왔다. 중약대사전에는 혈압조절, 진해거담, 진통진정, 혈당강하, 항암작용 및 간보호작용 등이 있다고 보고되었으며 영지의 간보호작용으로는 사염화탄소에 의한 급성독성 유발시 병리손상 및 간 해독기능의 손상을 경감시키고 간세포의 재생을 촉진한다고 보고되었으며 영지의 경우 독성은 거의 없는 것으로 알려져 있다.¹⁾

간 질환의 대표격이라 할 수 있는 간경화(hepatic

cirrhosis)는 그 원인과 발생기전 및 형태가 다양하고 복잡하며 사망율이 높은 간 질환 중 하나이다. 간경화는 간세포가 지속적인 손상을 입어 간조직중 결합단백이 과다 생성되고 정상적인 간소엽 구조가 파괴되며 전반적인 간기능이 저하되는 질환이라 정의될 수 있다. 그 원인으로는 알콜, 약물, 독성물질, 바이러스성 감염, 대사성 질환, 자가면역성 질환 등이 알려져 있다.^{2,3)} 간은 완충능력이 큰 기관으로 질환의 초기단계에서는 통증이나 자각증상이 잘 나타나지 않고 상당히 악화되어서야 발견되는 경우가 종종 있어 그 치료가 쉽지 않다.

간 섬유화(경화) 억제약물에 대한 연구는 많이 진행되고 있으나, 실제 임상에서 항섬유화 효과를 나타내는 치료제는 현재 없는 실정이며 효과가 있다하더라도 그 부작용이 심하여 사용되지 못하는 경우도 많다.^{3,4)} 영지

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0653-50-6815 (팩스) 0653-54-7311

의 경우 인체 독작용은 없고 간세포 보호작용이 있다고 보고된 바 있으며 저자 등에 의해 영지수침액이 사염화탄소에 의한 간독성을 억제하며 담도결찰에 의한 간섬유화시 섬유화를 저지시키는 작용이 있다고 보고된 바 있다.^{5,6)} 이에 본 연구에서는 영지균사체(IY009)로부터 알칼리 추출후 한외여과를 통해 얻은 영지 다당체의 간섬유화 억제효과 및 용량의존성시험을 검토하였다.

실험방법

영지다당체는 다음과 같이 제조하였다. 영지균사체(IY009) 배양물을 2N NaOH로 알칼리 추출후 3,000×g로 원심분리한 다음 그 상정액을 한외여과막(M.W. 10,000)을 이용하여 10kD 이상의 다당류를 얻은 후 동결건조한 것을 시료로 하였다.

삼컷의 Sprague-Dawley계열 흰쥐(190~250 g, 삼육실험동물, 경기도)를 일주일 이상 실험실 환경에 충분히 적응시킨 후 sham군과 담도결찰군(bile duct ligation/scission : BDL/S)으로 분류한 다음 각 군을 다시 대조군(생리식염수 처치군)과 약물투약군(흰쥐당 영지다당체 0.5 mg, 2.0 mg, 5.0 mg 및 10.0 mg 처치군)으로 나누어 총 10군으로 하였다. 실험기간 동안 사료(신촌사료)와 물은 충분히 공급하였으며 사육실 온도는 20~23°C, 습도는 50~60%를 유지하였다.

담도결찰군의 경우 흰쥐를 Rompun과 Ketalar로 마취한 다음 개복하여 원위담도와 근위담도를 묶고 그 사이를 자른 후 생리식염수 2ml을 주입한 다음 봉합하였다. Sham군의 경우 마취하 개복한 후 생리식염수 2ml을 주입한 다음 봉합하였다. 수술 4주 동안 흰쥐의 체중을 1주일 간격으로 측정하면서 간경화를 유도하였다.

약물투약군에는 수술한 날부터 4주간 영지 다당체를 생리식염수에 용해시켜 sonde로 0.5 mg, 2.0 mg, 5.0 mg, 10.0 mg/rat/day 경구투여하였고, 담도결찰군에는 동량의 생리식염수를 경구투여하였다. 4주후 흰쥐를 마취하 개복한 후 심장천자하여 혈액을 취하고, 즉시 간을 적출하여 그 습중량을 측정하였다. 혈청과 hydroxyproline 정량용 간조직은 -20°C에 보관하였다.

간조직중 hydroxyproline양은 Jamall 등의 방법에 따라 측정하였다.⁷⁾ 즉 6N HCl의 5% 간 homogenate를 110°C에서 가수분해시킨 다음 chloramine-T로 산화시키고 Ehrlich's reagent 용액으로 발색시켜 558 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈청중 alanine transa-

minase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin, cholesterol, creatinine치는 kit (Ciba-Corning)를 사용하여 clinical chemistry analyzer(Gilford 400E)로 측정하였다. 수술 4주후 간조직 일부를 채취하여 10%중성 포르말린 용액에 넣어 고정한 다음 hematoxylin-eosin염색을 하여 광학현미경으로 조직학적인 변화를 관찰하였다.

통계처리는 ANOVA 및 Tukey's multiple comparison test에 의했으며, p 수치가 최소 0.05 이하인 경우를 유의한 차로 판정하였다.

결 과

수술후 4주동안 대조군과 약물투약군의 sham군은 모두 건강상태가 양호하였다. 대조군과 약물투약군의 BDL/S군은 수술 3일 후부터 귀, 발바닥 등에 황달을 나타냈으며 뇨 역시 진한 노란색을 띠었다. 체중의 경우 수술직전 무게에 대한 수술 4주후 무게의 비로 계산시 대조군의 sham 군은 8.7%, 담도결찰군은 8.2% 증가하였고, 0.5 mg 약물투약군의 경우 sham군은 8.2%, 담도결찰군은 12.4 %, 2.0 mg 투약군은 sham군이 10.3%, BDL/S군이 9.0% 정도 증가하였으며, 5.0 mg 투약군에서는 sham군이 10.4%, BDL/S군이 12.7%, 10.0 mg투약군에서는 sham군이 8.7%, 담도결찰군이 13.9 % 증가하였다 (Table I). 담도결찰군은 대조군과 투약군 모두에서 수술후 1주일동안 체중감소를 보인 후 체중 증가를 보였으며 이러한 체중감소는 수술로 인한 것으로 사료된다.

간의 무게는 체중 100 g당의 습중량으로 비교시 대조군과 약물투약군 모두에서 sham군에 비해 담도결찰군이 약 250%정도 증가하였다. 0.5 mg, 2.0 mg 및 5.0 mg의 약물을 투약한 담도결찰군의 경우 담도결찰 대조군보다 체중100 g당 간의 습중량이 약간씩 감소하였다 (Table I).

간조직중 hydroxyproline양은 담도결찰한 2.0 mg, 5.0 mg, 10.0 mg투약군은 담도결찰 대조군에 비해 각각 8%, 17%, 18% 정도 감소하였으나 0.5 mg투약군은 대조군보다 약 2% 정도 증가하였다 (Fig. 1). 또한 간조직중 hydroxyproline함량은 5.0 및 10.0 mg에서 유의성 있게 감소하였다 (p<0.001).

대조군과 약물투약군의 혈청 parameter변화는

Table II와 같다. 담도결찰 대조군의 ALT, AST, ALP치가 sham군보다 각각 200%, 460%, 180%씩 증가하였다. 0.5 mg, 2.0 mg, 5.0 mg 투약한 sham 군에서의 ALT, AST, ALP치는 대조군의 sham군보다 낮은 수치를 나타내었다. 10.0 mg 투약한 sham군에서는 AST가 대조군보다 유의성있게 증가하였고($p < 0.05$) ALP치는 대조군보다 증가하였으나 유의성은 없었다. 영지다당체를 투약한 담도결찰군의 혈청검사 결과는 다음과 같다. ALT치는 담도결찰 대조군에 비해 5.0 mg 투약군에서 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$). Total-bilirubin의 경우 담도결찰 대조군에 비해 0.5 mg 투약군은 13%, 2.0 mg은 22%, 5.0 mg은 투약군만 유의성이 있으며($p < 0.005$), 10.0 mg은 29% 감소하였으며

5.0 mg 투약군만 유의성이 있으며($p < 0.05$), 10.0 mg에서는 약 3%정도 낮은 수치를 나타내었다

수술 4주후 부검시 담도결찰군의 경우 모세혈관이 확장되어 있었으며, 간은 경화되어 있었고, 신장은 bilirubin의 침착으로 인해 암갈색을 띠었으며, 비장이 비대해져 있었다. 또한 팽대한 담도에 약 4~8 ml의 담즙이 차있었다. 간의 조직검사 결과, 담도결찰 대조군에서 중등도의 간세포 괴사, 염증 및 심한 담관증식을 수반하는 섬유화가 관찰되었다 (Fig. 2B). 영지다당체 0.5 mg을 투약한 담도결찰군은 담도결찰 대조군과 유사한

Table I—Body weight and liver weight changes in the polysaccharide from *Ganoderma lucidum* treated groups

Group	n	Body weight		liver wt. 100 g body wt.
		0 wk	4 wk	
Control-Sham	12	228±21	248±19	3.6±0.3
0.5 mg-Sham	3	182±5	197±14	3.2±0.1
2.0 mg-Sham	7	203±12	224±22	3.4±0.3
5.0 mg-Sham	8	230±26	254±26	3.6±0.3
10.0 mg-Sham	4	229±19	249±31	3.7±0.3
Control-BDL/S	16	231±23	250±32	8.3±1.2
0.5 mg-BDL/S	5	218±9	245±10	8.2±1.0
2.0 mg-BDL/S	10	222±10	243±21	7.9±0.4
5.0 mg-BDL/S	13	230±15	259±24	7.7±1.0
10.0 mg-BDL/S	8	231±11	264±9	8.4±0.9

Results show means S.D.

Table II—Serum biochemical values of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* treated BDL/S rats

Group	n	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ALP (IU/L)	Albumin (mg/dL)	Crea (mg/dL)	Total-bil (mg/dL)
Sham							
Ctrl	12	68±12	154±20	200±84	3.7±2.1	0.8±0.3	0.4±0.2
0.5 mg	3	42±19	130±50	139±40	2.2±0.3	0.5±0.0	0.4±0.4
2.0 mg	7	43±11	140±69	117±46	2.8±0.5	0.7±0.2	0.3±0.2
5.0 mg	8	66±13	136±23	166±34	3.2±1.8	0.6±0.3	0.3±0.2
10.0 mg	4	85±23	220±61*	246±86	2.5±2.1	1.0±0.5	0.5±0.1
BDL/S							
Ctrl	16	136±41	715±126	359±113	2.8±0.6	0.9±0.3	13.2±3.2
0.5 mg	5	107±26	391±55***	288±63	2.6±0.2	0.7±0.4	11.5±1.3
2.0 mg	10	101±25	487±121***	231±55*	2.2±0.9	0.7±0.3	10.3±3.0
5.0 mg	13	101±34*	434±148***	301±151	2.6±0.3	0.6±0.3	9.4±2.0*
10.0 mg	8	101±12	542±111	282±53	2.5±0.7	0.8±0.2	12.8±1.6

Results show means±S.D.

* Significantly different from control BDL/S group ($p < 0.05$).

** Significantly different from control BDL/S group ($p < 0.01$).

*** Significantly different from control BDL/S group ($p < 0.001$).

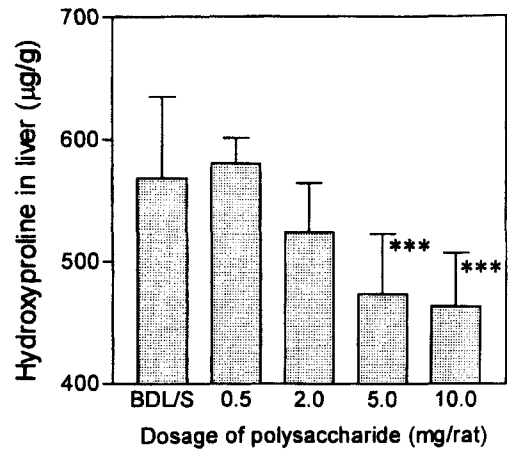


Fig. 1—Hydroxyproline content in liver of cirrhotic rats treated with polysaccharide from mycelium of *Ganoderma lucidum* for 4 weeks.

*** : significantly different from BDL/S control group ($p < 0.001$).

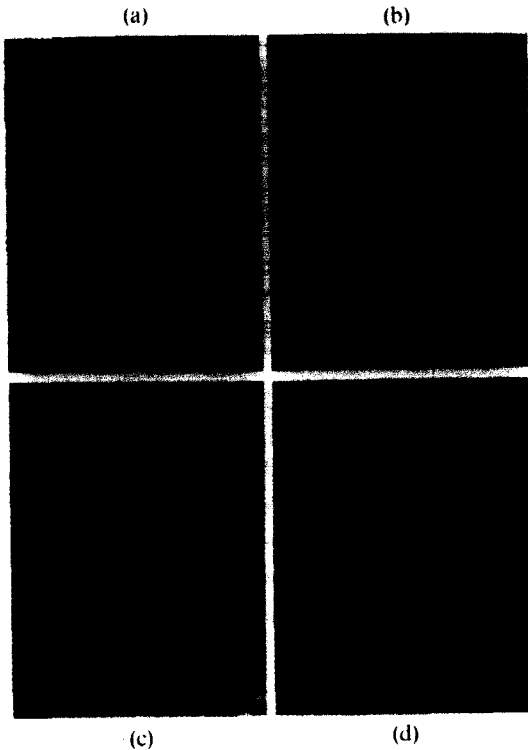


Fig. 2 — Light microspical appearance of the liver of the rats 4 weeks after bile duct ligation/scission operation (magnification $\times 80$).

- A: Normal group.
 B: control BDL/S group.
 C: BDL/S group treated with polysaccharide from *Ganoderma lucidum* (5.0 mg/rat/day).
 D: BDL/S group treated with polysaccharide from *Ganoderma lucidum* (10.0 mg/rat/day).

상태를 나타내었으나(data not shown) 2.0 mg투약군은 조직손상정도가 담도결찰 대조군보다 약간 개선되었으며(data not shown), 5.0 및 10.0 mg투약한 담도결찰군에서는 간세포괴사 및 염증정도가 약한 것으로 관찰되었으며 담관증식은 대조군보다 적었으며 섬유화 정도 역시 대조군보다 양호하였다(Fig. 2 C, D). 약물을 투약한 sham군의 간조직검사 결과 정상이었다(data not shown).

고 찰

간장약 개발을 위해 그동안 주로 사용된 사염화탄소 간장해 실험동물모델의 경우 사염화탄소를 1~2회 투여하여 혈청중 aspartate transaminase(AST), al-

anine transaminase (ALT)값을 상승시킨 후 AST, ALT값을 강하시키는 약물을 검색하는 방법을 사용해 왔다. 그러나, 이러한 방법은 손상된 간세포의 기능을 회복시킨다는 의미는 있을지 모르나 간 섬유화 또는 섬유화 치료제에 요구되는 약효검색으로는 적절치 못하다. 사염화탄소의 1~2회 투여로는 간 섬유화가 유도되지 않으며 또한 AST와 ALT 등의 혈청 parameter로는 간의 섬유화(경화) 진행정도를 진단하기 어렵기 때문이다. 이에 간 섬유화 또는 경화 실험동물 모델에서 혈청 clinical parameter와 더불어 간조직중의 결합조직인 콜라겐 양을 대변할 수 있는 hydroxyproline양을 측정하는 방법이 간 섬유화(경화)치료제의 약효검색을 하는데 유효한 것으로 사료되고 있다.^{8,9)} 간 섬유화 실험동물 모델로는 사염화탄소에 의한 모델이 가장 많이 사용되고 있으나 그 소견이 사람과는 다르고 치사율이 50% 이상이며, 간 섬유화 유발정도의 개체차가 크고 8주이상의 장기간이 소요된다는 단점이 있다.¹⁰⁾ 이에 비해 담도결찰 모델은 사람의 담도질환에 의한 간경화와 소견이 유사하며 치사율이 낮으며 섬유화 유발정도에 대한 개체차도 적고 4주에 간 섬유화 및 경화가 유발된다는 장점이 있다.¹¹⁾

간 섬유화는 그 원인에는 관계없이 간에 염증이 유발되고 그 부위로 각종 염증세포가 밀집되면서 유리되는 각종 cytokine을 매개로 fibroblast의 콜라겐 합성이 촉진되고 또한 콜라겐의 분해가 억제되어 간 섬유화가 유발된다고 보고되고 있으며 이 과정을 억제하는 약물을 간 섬유화 억제약물 개발하기 위하여 많은 연구가 진행되어 왔다.⁴⁾ 그간 섬유화 억제제로 연구되어온 약물로는 colchicine¹²⁾ penicillamine¹³⁾, glucocorticoid¹⁴⁾, malotilate¹⁵⁾, pyridine-2,4-dicarboxylic-diethylamide(S0885)와 pyridine-2,4-dicarboxylic-di(2-methoxyethyl)amide (HOE 077)¹⁶⁾ 및 interferon- γ ¹⁷⁾ 등이 있으나 이들을 임상에 적용하였을 경우 섬유화 억제작용이 미약하거나 그 부작용이 심하여 항섬유화 효과를 나타내는 치료제는 아직 없는 실정이다.

본 실험 결과 영지버섯 자실체로부터 분리한 균사체(*Ganoderma lucidum* IY 009)로부터 얻어진 영지다당체를 흰쥐당 5 mg 및 10 mg 투약시 간조직중 hydroxyproline양이 감소되었으며 조직검사 결과 간손상 정도가 상당히 호전되어 담도결찰한 흰쥐에서 항섬유화 효과가 있음이 밝혀졌다. 그러나 이러한 영지 다당체의 간 섬유화 억제기전에 대해서는 더욱 구체적인 연구가

요구된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 의약자원연구센터 1996년도 연구비에 의해 지원되었기에 이에 감사드립니다. 영지다당체를 공급해준 일양약품(주)에도 감사드립니다.

문헌

- 1) 上海科學技術出版社 小學館·中藥大事典, 上海科學技術出版社, 東京, p.5583 (1985).
- 2) Anthony, P. P., Ishak, K. G., Nayak, N. C., Poulsen, H. E., Schener, P. J. and Sobin, L. H. : The morphology of cirrhosis. *J. Clin. Pathol.* **31**, 395 (1978).
- 3) Sherlock, S. : Disease of the liver and biliary system 8th ed., Blackwell Scientific Publication, London, p.410 (1989).
- 4) Chojkier, M. and Brenner, D. A. : Therapeutic strategies for hepatic fibrosis. *Hepatology*, **8**, 176 (1988).
- 5) 한상수, 손동환, 김재백 : 실험적 간장해에 대한 WY-91제제의 영향. *한국임상약학회지*, **3**, 157-162 (1993).
- 6) 김기영, 한상수, 김재백 : Biliary liver fibrosis 실험동물에서 인삼, 영지, 오미자의 항섬유화 약효검색. *원광대학교 약품연구소보*, **7**, 1 (1991).
- 7) Jamall, I. S., Finelli, V. N. and Que Hee, S. S. : A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissue. *Anal. Biochem.* **112**, 70 (1981).
- 8) Schuppan, D. : Connective tissue polypeptides in serum as parameters to monitor antifibrotic treatment in hepatic fibrogenesis. *J. Hepatology*, **13**, s17 (1991).
- 9) 김기영, Schuppan, D., 김재백 : 담도손상 수술방법을 이용한 랫드에서 간섬유화(경화) 실험동물 모델의 확립. *한국실험동물학회지*, **9**, 39 (1993).
- 10) Tamayo, R. P. : Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄, an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*, **3**, 112 (1983).
- 11) Kountouras, J., Billing, B. H. and Scheuder, P. J. : Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Path.* **65**, 305 (1984).
- 12) Kershenobich, H. D., Vargas, F., Garcia-Tsao, G., Perez-Tamayo, R. and Rojkind, M. : Effectiveness of colchicine in patients with cirrhosis [abstract]. *Hepatology*, **7**, 1104 (1987).
- 13) Sherlock, S. : Disease of the liver and biliary system 8th ed., Blackwell Scientific Publication, London, p.421 (1989).
- 14) Guzelian, D. S., Lindblad, W. J. and Diegelmann, R. F. : Glucocorticoids suppress formation of collagen by the hepatocyte: Studies in primary monolayer cultures of parenchymal cells prepared from adult rat liver. *Gastroenterol.* **86**, 897 (1984).
- 15) Ala-Kokko, L., Stenback, F. and Ryhanen, L. : Preventive effect of malotilate on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* **113**, 177 (1989).
- 16) Boker, K., Schwarting, G., Kaule, G., Gunzler, V and Schmidt, E. : Fibrosis of the liver in rats induced by bile duct ligation: Effects of inhibition of prolyl 4-hydroxylase. *J. Hepatology*, **13**, s 35 (1991).
- 17) Svegliati Beroni, G., Curto, P., Recchioni, A., Mancini, R., Benedetti, A., Jezequel, A. M. and Orlandi, F. : Interferon-gamma reduces liver injury and collagen deposition in dimethylnitrosamine-induced cirrhosis [abstract]. *Hepatology*, **18**, 209A (1993).