

에탄올 및 사염화탄소의 간 손상에 미치는 흰점박이꽃무지 추출물의 영향

이형철* · 황상구 · 강영국¹ · 손영옥¹ · 문지영² · 임흥빈³ · 전병훈 · 이동욱¹

원광대학교 한의과대학 병리학교실,
¹한국인삼연초연구원 화학부 생화학연구실
²창원대학교 자연과학대학 보건생화학과
³충북대학교 농과대학 연초학과

Influence of *Protaetia brevitarsis* Extract on Liver Damage Induced by Carbon Tetrachloride and Ethanol in Rats

Hyung Chul Lee*, Sang-Gu Hwang, Young-Kook Kang¹, Hyung-Ok Sohn¹, Ja-Young Moon²,
Heung-Bin Lim³, Byung Hun Jeon and Dong-Wook Lee¹

Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

¹Lab. of Biochemistry, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

²Dept. Biochemistry and Health Sciences, College of Natural Sciences,

Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

³Dept. Tobacco Science, College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract

Protaetia brevitarsis has been utilized as an ingredient of the description for the treatment of patients with chronic hepatic diseases in oriental medicine. This study was attempted to investigate whether *Protaetia brevitarsis* extract (PBE) protects or modulates the liver injuries induced by carbon tetrachloride or ethanol in Sprague-Dawley rats. The liver injuries of rats induced by the treatment of carbon tetrachloride or ethanol were manifested by the observation of the significant changes in liver weight, serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities, serum thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and microsomal detoxification enzymes (cytochrome P-450, cytochrome b₅, and cytochrome b₅ reductase). The effect of PBE on the liver damage induced by the chemicals was evaluated with the extent modulated in change of biochemical parameters above.

Exposure to ethanol alone resulted a significant change in the ratio of liver per body weight, ALT activity, and microsomal detoxification enzymes (cytochrome P-450, cytochrome b₅, and cytochrome b₅ reductase), but did not significantly changes in the levels of serum AST activity and TBARS. Pretreatment coith PBE did not modulate the alteration of the ratio of liver to body weighth, and the activities of serum aminotransferascs (AST, ALT), TBARS, and micro somal detoxification enzymes (cytochrome P-450, cytochrome b₅, and cytochrome b₅ reductase). These results suggested that PBE has not appreciable therapeutic effect on carbon tetrachloride or ethanol induced hepatotoxicity.

Key words – *Protaetia brevitarsis* extract (PBE), liver damage, carbon tetrachloride, ethanol, microsomal detoxification enzyme

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 063-850-6835, Fax : 063-850-6843

E-mail : phdleehc@hanmail.net

서 론

현재 우리 나라에서 간암을 포함한 간 질환의 발생율은 외국에 비해 상당히 높은 편이며, 이로 인해 간을 보호하기 위하여 건강식품에 대한 선호도가 무척 높다. 간 질환에 대한 일반인과 의학계의 관심이 고조되고 있고 또한 대체의학계에서는 천연자원으로부터 간 기능 향상 및 간 질환 치료제의 개발을 위한 연구가 시도되어 왔으며, 이들 중 glycyrrhizin, gomisin 및 silymarin 등은 현재 간 질환 치료제로 이용되고 있다.

간 기능 향상 또는 간 보호작용을 나타내는 것은 *Ocimum* 속의 식물로부터 추출한 Eugenol (4-allyl-1-hydroxy-2-methoxybenzene)[21], 중국 전통한약재로 쓰이는 *Fructus Schisandrae* (FS) 추출물[12], *Hymenaea martiana*로부터 추출한 flavonoid인 astilbin[6], *Picrorhiza kurroa*로부터 분리한 picroliv[30] 등이 있다. 국내에서는 담자균류인 영지(*Ganoderma lucidum*)가 간 독성 유발물질에 대한 보호효과가 있으며, 영지 자실체로부터 추출한 G009도 간세포 보호효과가 있다고 보고되었다[16,17]. 또한 한방에서 자양 및 강장제로 널리 사용되는 구기자(*Lycii fructus*)도 간세포 독성을 현저히 완화시켰으며, 특히 물분획물의 주요 성분인 비테인이 사염화탄소로 인하여 저하된 대사능력을 회복시킴으로서 간 보호효과가 있는 것으로 보고되었다[11].

한편 굼벵이로 알려져 있는 제조(蠨螋)는 한방에서 오래 전부터 만성 간 질환을 비롯하여 다양한 인체질환의 치료를 위한 복합처방제의 하나로 사용되어 왔다. 제조(蠨螋)는 참검정풍뎅이(*Holotrichia dimorphalia*)와 같이 일반적으로 등으로 가는 유충에 사용되는 명칭으로서, 큰검정풍뎅이(*H. morosa*)와 홀쭉검정풍뎅이(*H. parallela*) 등의 근연종들도 제조에 포함되며 한방에서 치료제로 사용된다[37,38]. 이러한 제조(蠨螋)는 파혈행어(破血行瘀), 산결소종(散結消腫), 청혈해독(淸血解毒) 등의 효능이 있어 통풍, 파상풍, 어혈, 그리고 단독 등의 여러 질병에 대한 한방 치료처방제로 사용되어 왔고[38-40], 현재에는 민간요법에서도 간암을 비롯한 다양한 간 질환의 치료목적으로 널리 이용되고 있다.

현재 농가에서 사육되어 한방 및 민간요법으로 널리 이용하고 있는 제조(蠨螋)는 딱정벌레목(Coleoptera), 꽃무지과(Cetoniinae) 곤충인 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)

가 주종을 이루고 있다. 그런데 건강에 대한 일반적인 관심이 최근에 증가하고 있으나 효능과 안전성이 검증되지 않은 많은 천연물 또는 생약재들이 무분별하게 사용되고 있으며 이들의 수요도 급증하고 있는 실정이다. 제조도 이 범주에 속하는 천연물 약재 중의 하나로서 수요가 증가하고 있고 중국에서 채집, 건조된 불명의 종들이 대량으로 수입, 유통되고 있어 이들의 오용 또는 남용으로 자칫 건강을 해칠 우려가 있다. 박 등[26]은 참검정풍뎅이(*Holotrichia diomphalia*)는 사염화탄소로 유발된 간 손상을 개선시키는 효과가 있다고 보고하였으며, 강 등[10]은 점박이꽃무지(*Protaetia orientalis*)가 에탄올로 간 손상이 유도된 흰쥐에서 triglyceride와 cholesterol과 같은 물질의 유의적인 감소를 나타낸다고 보고한 바 있다. 그러나 지금까지의 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)와 관련된 간 기능에 대한 효능연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 흰점박이꽃무지의 추출물이 간 기능 향상효과가 있는지를 알아보기 위하여 흰점박이꽃무지 추출물이 포함된 먹이로 흰쥐를 사육한 후 사염화탄소 혹은 에탄올로 독성을 유발시켜 간에 대한 기능 회복을 연구하였다.

재료 및 방법

실험동물의 사육조건

생후 4주 경과한 100~110 g의 Sprague-Dawley (SD)계 흰쥐 수컷만을 선별하여 온도 23±1℃, 습도 55±5%, 배기 10-18회/hr, 형광등 명암 12hr cycle, 조도 300-500 Lux의 사육환경에서 랫드용 폴리카보네이트 사육상자(240 W×400 L×180 H mm)에 2마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 삼양사의 고품사료를 사용하였으며 음수는 멸균된 수도물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시험물질의 조제 및 식이

시험물질인 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)는 종령 유충[25]을 채취하여 충체를 음건한 후 한방처방시 사용되는 용량을 기준으로 0.04%, 0.2%, 1%에 해당하는 충체를 잘게 절단하여 균질화하였다. 고품사료(삼양사)를 분말화한 후 시험물질의 균질액(*Protaetia brevitarsis* extract, PBE)을 농도별로 각각 혼합하여 다시 고품사료를 만들고 건조

시킨 다음 공급하였다. 대조군은 일반 고형사료를 사용하였다.

간독성 유발

PBE첨가사료(0.04, 0.2, 1%)로 3개월 동안 사육한 흰쥐에 사염화탄소(CCl_4)와 에탄올을 투여하여 간 손상을 유도하였다. 즉 사염화탄소는 corn oil에 1:1(V/V)의 비율로 혼합하여 체중 kg 당 1 ml의 용량을 복강주사로 투여하였으며, 에탄올은 아치사농도인[15] 체중 kg당 5 g의 용량을 50% 에탄올로 경구투여하여 간독성을 유발시켰다.

실험군

정상군은 독성물질 투여나 시험물질의 균질액을 급여하지 않고 삼양사의 고형사료를 정상적으로 공급하여 사육하였으며 CCl_4 단독 투여군(CCl_4)은 표준사료로 사육하면서 독성물질인 사염화탄소만을 단독 투여하였다. 0.04%(CCl_4 +Low PBE), 0.2%(CCl_4 +Middle PBE), 그리고 1%의 PBE 식이군(CCl_4 +High PBE)은 0.04%, 0.2%, 1%에 해당하는 PBE 첨가사료로 각각 사육한 후 사염화탄소를 투여한 실험군이다. 에탄올 단독 투여군(EtOH)은 표준사료로 사육하면서 독성물질인 에탄올만을 단독 투여한 실험군이며, 0.04%(EtOH+Low PBE), 0.2%(EtOH+Middle PBE), 그리고 1%의 PBE 식이군(EtOH+High PBE)은 0.04%, 0.2%, 1%에 해당하는 PBE 첨가사료로 각각 사육한 후 에탄올을 투여한 실험군이다. 각 실험군의 동물 수는 10마리씩 사용하였다.

체중 및 간 무게 측정

체중은 매일 측정하였으며 시험종료 후 심장천자로 채혈하였다. 채혈 후 해부한 다음, 간을 적출하여 무게를 측정하였으며 적출한 간은 사용할 때까지 $-70^{\circ}C$ 에 냉동보관하였다.

혈청의 AST와 ALT 활성도 측정

채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청의 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)의 활성도는 자동분석기(Hitachi-7150, Hitach Medical Co.)로 측정하였다.

혈청의 TBA 반응성물질의 함량측정

Thiobarbituric산 반응성물질(Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)의 함량은 Suematsu 등[34]의 방법에 따라 532 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

간의 microsome 분리

Bansal 등의 방법[1]에 따라 적출한 흰쥐의 간을 잘게 썰고 5배의 150 mM KCl을 함유한 30 mM Hepes 완충액(pH 7.4)으로 희석하여 균질화 한 다음 원심분리하여 microsome 분획을 얻었다.

단백질 정량

Bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 사용하여 Lowry 등의 방법[18]에 따라 단백질 농도를 측정하였다.

간의 이물질대사효소 활성측정

Cytochrome P-450과 cytochrome b_5 함량은 Omura와 Sato의 방법[23]으로 측정하였으며, NADPH cytochrome P-450 reductase의 활성도는 William와 Kamin의 방법[36]에 따라 550 nm에서 3분간 흡광도 변화를 측정하여 환산하였다. NADH cytochrome b_5 reductase의 활성도는 Mihara와 Sato의 방법[19]에 따라 420 nm에서 potassium ferricyanide의 환원속도로 3분간 흡광도의 차이 측정으로 환산하였다.

통계학적 분석

실험결과와 각 군의 평균±표준편차로 표기하였으며, 정상군 및 대조군과 PBE 식이군과의 상호비교는 Student's t-test로 유의성을 검정하여 $P<0.05$ 이하의 경우 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

체중 및 간의 중량변화

사염화탄소 단독 투여군인 대조군 및 모든 PBE 식이군에서는 정상군에 비해 간무게 및 체중 당 간 무게의 비가 모두 증가하였으나 모든 PBE 식이군은 대조군(CCl_4)에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table 1). 또한 에탄올 단독 투여한 대조군 및 세 농도(0.04, 0.2, 1%)의 PBE 식이

Table 1. Effect of PBE on body and liver weights of rats treated with CCl₄

Experimental Groups	Weights		
	Liver (g)	Body (g)	Liver/Body (%)
Normal	11.6±1.4	501±36	2.30±0.12
CCl ₄	15.9±1.8*	536±38	2.97±0.15*
CCl ₄ +Low PBE	15.3±1.2*	505±22	3.02±0.12*
CCl ₄ +Middle PBE	15.9±1.6*	512±52	3.12±0.10*
CCl ₄ +High PBE	14.5±2.0*	490±47	2.96±0.13*

Extracts of *P. brevitarsis* (Low PBE, 0.04% PBE; Middle PBE, 0.2% PBE; High PBE, 1.0% PBE) mixed in commercial diet were administered for 3 months. Normal animals were fed on standard diet. All animals were fasted overnight after CCl₄ treatment. After 24 hr administration of CCl₄, all animals were sacrificed, and liver was quickly removed and weighted. The values are expressed as mean±SD of ten rats in each group. Statistically different from the normal (*), P<0.05.

군은 대조군에 비해 간 무게는 유의한 차이가 관찰되지 않았으나 체중 당 간 무게의 비는 증가하였다(Table 2).

혈청 aminotransferase (AST, ALT)의 활성도 변화

간기능 지표인 혈액의 AST와 ALT의 활성도를 측정할 결과 CCl₄ 단독 투여군은 정상군에 비해 AST와 ALT의 활성도가 각각 4.3배와 5.9배로 뚜렷하게 증가하였다(Table

Table 2. Effect of PBE on body and liver weights in the ethanol treated rats

Experimental Groups	Weights		
	Liver (g)	Body (g)	Liver/Body (%)
Normal	11.6±1.4	501±35	2.30±0.12
EtOH	13.2±1.5	519±42	2.53±0.14*
EtOH+Low PBE	12.3±1.7	506±52	2.42±0.13*
EtOH+Middle PBE	12.7±1.6	511±48	2.48±0.09*
EtOH+High PBE	12.4±1.3	494±39	2.50±0.11*

Extracts of *P. brevitarsis* (Low PBE, 0.04% PBE; Middle PBE, 0.2% PBE; High PBE, 1.0% PBE) mixed in commercial diet were administered for 3 months. Normal animals were fed on standard diet. All animals were fasted overnight before ethanol treatment. Alcohol was administered intragastrically by gastric tubes as a 50% ethanol solution. After 6 hr administration of ethanol, all animals were sacrificed, and liver was quickly removed and weighted. The values are expressed as mean±SD of ten rats in each group. Statistically different from the normal (*), P<0.05.

3). 그러나 이 두 효소의 활성도는 0.04%와 0.2% PBE 식이군에서 대조군에 비해 다소 감소되는 경향을 보였으나 유의성은 없었으며 1% PBE 식이군에서는 대조군과 유사한 수준을 나타내었다. 에탄올을 단독 투여한 대조군의 AST 활성도는 에탄올을 투여하지 않은 정상군에 비해 차이를 보이지 않았으며 모든 PBE 식이군의 활성도도 정상군과 유사하였다. 그러나 에탄올 단독 투여군인 대조군의 ALT 활성도는 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었으며 0.04%와 1.0%의 PBE 식이군만이 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었다. 0.2%의 PBE 식이군에서는 정상군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았으며, 모든 PBE 식이군은 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 4).

혈청 TBA 반응성 물질의 함량변화

혈청의 지질과산화의 지표로서 TBA반응성 물질의 함량을 비교 측정하였다. 시염화탄소 단독 투여군과 0.2% PBE 식이군만이 정상군에 비해 TBA반응성 물질 함량의 유의한 증가를 나타내었을 뿐 다른 PBE 식이군들에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그리고 모든 PBE 식이군들은 CCl₄만을 투여한 대조군에 비해 혈청의 TBA 반응성 물질의 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table 5). 에탄올 투여군들에서는 모든 PBE 식이군들이 정상군 혹은 대조군에 비해 TBA 반응성 물질의 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 6).

Table 3. Effect of PBE on AST and ALT in serum of the CCl₄ treated rats

Experimental Groups	Activity of Serum Enzymes (IU/L)	
	AST	ALT
Normal	145±11	47±9
CCl ₄	625±133*	278±71*
CCl ₄ +Low PBE	463±169*	332±227*
CCl ₄ +Middle PBE	463±45*	504±225*
CCl ₄ +High PBE	556±215*	308±134*

Extracts of *P. brevitarsis* (Low PBE, 0.04% PBE; Middle PBE, 0.2% PBE; High PBE, 1.0% PBE) mixed in commercial diet were administered for 3 months. Normal animals were fed on standard diet. All animals were fasted overnight after CCl₄ treatment. After 24 hr administration of CCl₄, all animals were sacrificed, and bloods were obtained by cardiac puncture. Activity of AST and ALT was determined using a blood chemical autoanalyzer (Hitachi-7150). The values are expressed as mean±SD of ten rats in each group. Statistically different from the normal (*), P<0.05.

Table 4. Effect of PBE on AST and ALT in serum of the ethanol treated rats

Experimental Groups	Activity of Serum Enzymes (IU/L)	
	AST	ALT
Normal	145 ± 11	47 ± 9
EtOH	137 ± 29	33 ± 7*
EtOH+Low PBE	135 ± 47	28 ± 15*
EtOH+Middle PBE	136 ± 61	40 ± 15
EtOH+High PBE	146 ± 12	26 ± 13*

Extracts of *P. brevitarsis* (Low PBE, 0.04% PBE; Middle PBE, 0.2% PBE; High PBE, 1.0% PBE) mixed in commercial diet were administered for 3 months. Normal animals were fed on standard diet. All animals were fasted overnight before ethanol treatment. Alcohol was administered intragastrically by gastric tubes as a 50% ethanol solution. After 6 hr administration of ethanol, all animals were sacrificed, and bloods were obtained by cardiac puncture. Activity of AST and ALT was analyzed using a blood chemical autoanalyzer (Hitachi-7150). The values are expressed as mean ± SD of ten rats in each group. Statistically different from the normal (*), P<0.05.

Table 5. Effect of PBE on TBARS content in serum of the CCl₄ treated rats

Experimental Groups	TBARS Content (unit)	% of	
		Normal	Control
Normal	0.22 ± 0.01	-	-
CCl ₄	0.24 ± 0.01*	109	-
CCl ₄ +Low PBE	0.23 ± 0.01	104	96
CCl ₄ +Middle PBE	0.24 ± 0.01*	108	100
CCl ₄ +High PBE	0.24 ± 0.02	106	98

Extracts of *P. brevitarsis* (Low PBE, 0.04% PBE; Middle PBE, 0.2% PBE; High PBE, 1.0% PBE) mixed in commercial diet were administered for 3 months. Normal animals were fed on standard diet. All animals were fasted overnight after CCl₄ treatment. After 24 hr administration of CCl₄, all animals were sacrificed, and bloods were obtained by cardiac puncture. One unit of TBARS was defined as the increment of one absorbance at 532 nm. The values are expressed as mean ± SD of ten rats in each group. Statistically different from the normal (*), P<0.05.

간의 이물질대사효소의 변화

사염화탄소를 단독 투여한 대조군 및 모든 PBE 식이군은 정상군에 비해 마이크로솜의 cytochrome P-450과 b₅ reductase의 활성도가 유의적인 증감을 나타내었으나 농도별 PBE 식이군들에서는 대조군의 결과와 비교하여 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 대조군의 P-450 reductase는 정상

Table 6. Effect of PBE on the TBARS content in serum of the ethanol treated rats

Experimental Groups	TBARS Content (unit)	% of	
		Normal	Control
Normal	0.22 ± 0.01	-	-
EtOH	0.22 ± 0.02	100	-
EtOH+Low PBE	0.23 ± 0.01	102	103
EtOH+Middle PBE	0.23 ± 0.02	103	103
EtOH+High PBE	0.24 ± 0.02	105	106

Extracts of *P. brevitarsis* (Low PBE, 0.04% PBE; Middle PBE, 0.2% PBE; High PBE, 1.0% PBE) mixed in commercial diet were administered for 3 months. Normal animals were fed on standard diet. All animals were fasted overnight before ethanol treatment. Alcohol was administered intragastrically by gastric tubes as a 50% ethanol solution. After 6 hr administration of ethanol, all animals were sacrificed, and bloods were obtained by cardiac puncture. One unit of TBARS was defined as the increment of one absorbance at 532 nm. The values are expressed as mean ± SD of ten rats in each group. Statistically different from the normal and control (P<0.05).

군에 비해 유의한 변화가 관찰되지 않았으나 오히려 0.2%와 1.0%의 PBE 식이군에서는 정상군 및 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었고 투여농도에 비례하여 감소하는 경향을 나타내었다. cytochrome b₅의 활성도는 정상군에 비해 대조군과 PBE 식이군들 모두 유의한 감소를 보였고 대조군에 비해 0.04% PBE 식이군만이 유의적으로 낮은 수준을 나타내었다(Table 7).

에탄올 투여시 cytochrome P-450, b₅, 그리고 b₅ reductase의 활성도는 정상군에 비해 대조군 및 PBE 식이군 모두가 유의한 증감을 보였으며, 0.04%와 0.2% PBE 식이군의 cytochrome P-450은 대조군에 비해 유의한 감소를, 그리고 b₅ reductase는 0.2% PBE 식이군만이 유의한 증가를 나타내었다. P-450 reductase의 활성도에서 대조군은 정상군에 비해 큰 변화를 나타내지 않았으나 1.0% PBE 식이군에서는 정상군에 비해 유의한 증가를 나타내었고 PBE 식이군들 중 0.04% PBE 식이군만이 정상군 및 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다(Table 8).

고 찰

사염화탄소와 에탄올은 free radical mechanism에 의해 간 손상이 유발되므로[9] 간 질환 연구에 많이 이용되고 있

Table 7. Effect of PBE on microsomal cytochrome P-450 and its related enzymes in liver of the CCl₄ treated rats

Experimental Groups	Enzyme Activity			
	P-450 ^a	P-450 reductase ^b	b5 ^a	b5 reductase ^c
Normal	0.99±0.12	64±7	0.18±0.01	2.74±0.14
CCl ₄	0.54±0.08*	62±7	0.13±0.03*	3.19±0.29*
CCl ₄ +Low PBE	0.67±0.22*	58±14	0.09±0.03**	3.44±0.44*
CCl ₄ +Middle PBE	0.47±0.13*	47±9**	0.12±0.06*	3.30±0.34*
CCl ₄ +High PBE	0.55±0.12*	44±4*	0.10±0.06*	3.38±0.21*

Extracts of *P. brevitarsis* (Low PBE, 0.04% PBE; Middle PBE, 0.2% PBE; High PBE, 1.0% PBE) mixed in commercial diet were administered for 3 months. Normal animals were fed on standard diet. All animals were fasted overnight after CCl₄ treatment. After 24 hr administration of CCl₄, all animals were sacrificed, and liver was quickly removed. The values are expressed as mean±SD of ten rats in each group. Statistically different from the normal (*) and control (**), P<0.05. a, nmoles/mg of protein; b, nmoles/mg of protein/min; c, μ moles/mg of protein/min

Table 8. Effect of PBE on liver microsomal cytochrome P-450 and its related enzymes in the ethanol treated rats

Experimental Groups	Enzyme Activity			
	P-450 ^a	P-450 reductase ^b	b5 ^a	b5 reductase ^c
Normal	0.99±0.12	64±7	0.18±0.01	2.74±0.14
EtOH	1.56±0.11*	66±14	0.11±0.04*	3.54±0.26*
EtOH+Low PBE	1.43±0.09*	81±13**	0.13±0.03*	3.67±0.08*
EtOH+Middle PBE	1.42±0.09**	61±18	0.11±0.04*	3.11±0.50**
EtOH+High PBE	1.52±0.15*	70±6*	0.11±0.02*	3.43±0.17*

Extracts of *P. brevitarsis* (Low PBE, 0.04% PBE; Middle PBE, 0.2% PBE; High PBE, 1.0% PBE) mixed in commercial diet were administered for 3 months. Normal animals were fed on standard diet. Alcohol was administered intragastrically by gastric tubes as a 50% ethanol solution. All animals were fasted overnight after ethanol treatment. After 6 hr administration of ethanol, all animals were sacrificed, and liver was quickly removed. The values are expressed as mean±SD of ten rats in each group. Statistically different from the normal (*) and control (**), P<0.05. a, nmoles/mg of protein; b, nmoles/mg of protein/min; c, μ moles/mg of protein/min

다. 사염화탄소(CCl₄)는 간 독성 유발물질로 잘 알려진 화학물질이며 물질대사 과정 초기에 세포 소기관인 소포체의 mixed function oxidase (MFO) system에 의해 trichloromethyl (CCl₃·) free radical로 전환되며 독성 중간대사산물인 trichloromethyl (CCl₃·), trichloromethylperoxy (CCl₃O₂·), chlorine (Cl·)과 같은 free radical들은 지질 또는 단백질과 공유결합을 형성하여 막손상이나 간 괴사와 같은 2차적인 간 손상을 초래한다[4,33]. 반면 에탄올은 영양소 흡수 및 대사장애에 기인된 저 영양 상태를 유도할 뿐만 아니라 지질과산화, 고지혈증, necrosis, inflammation, 지방간, 간 경화 등의 간 손상을 유발시키는 것으로 알려져 있다[22,29]. 그러므로 본 연구에서는 간독성물질로 잘 알려진 사염화탄소와 에탄올로 간 손상을 유도하여 흰점박이꽃무지 추출물의 간 기능 회복에 미치는 영향을 조사하

였다.

사염화탄소의 복강주사시 간장비대[31]와 더불어 중량증가[2] 현상이 있음을 보고하였는 바, 본 연구에서 사염화탄소와 에탄올의 투여시 흰쥐의 간 독성으로 인해 정상군에 비해 체중 당 간 무게 비의 증가를 나타내어 앞의 연구결과와 일치함을 보여주었다. 그러나 대조군인 단독 투여군들(CCl₄ 및 EtOH)에 비해 PBE 식이군들에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 1,2). 또한 사염화탄소의 단독 투여군에서는 정상군에 비해 혈청 중 간기능의 지표인 AST와 ALT의 활성도가 각각 4.3배와 5.9배로 증가되었으나 PBE 식이군들에서는 사염화탄소로 증가된 AST와 ALT의 활성도를 감소시키지 못하였다(Table 3).

또한 에탄올 투여군에서도 AST의 활성도는 정상군 및 대조군에 비해 PBE 식이에 따른 차이가 나타나지 않았다.

ALT의 활성도는 정상군에 비해 에탄올 단독 투여군인 대조군 및 PBE 식이시 다소 감소되었으나 유의한 차이는 없었으며 모든 PBE 식이군은 대조군에 비해 유의한 변화가 없었다(Table 4). 일반적으로 사염화탄소를 실험동물에 투여하면 혈청내 효소들(AST, ALT, ALP 등)의 활성도가 급격히 증가하고[2,20], 간 기능 향상효과가 있는 것으로 알려진 중국 전통한약재 *Fructus schisandrae*[12], *Teucrium stocksianum*[28] 그리고 *Swertia chirata*[20]는 증가된 효소들의 활성이 감소되어 간기능이 회복되는 결과를 보여주었다. 반면 에탄올의 경우 혈청내 AST와 ALT 활성도 수준은 다양한 결과를 나타내고 있는데, 에탄올 단독투여시 AST, ALT 그리고 sorbitol dehydrogenase(SDH)에는 변화양상이 관찰되지 않았으며[32], 수컷 Fischer 344 rat에서도 혈청내 AST, ALT 그리고 ALP의 변화가 관찰되지 않았다[2]. 반면 수컷 Wistar rats에서 체중 kg 당 2 g과 체중 kg 당 5 g의 ethanol을 경구투여한 경우 ALT는 각각 50 ± 8.4 와 61 ± 5.2 UI/L로 대조군(45 UI/L)에 비해 5 g 투여군에서만 유의적인 변화가 관찰되었으며 AST도 대조군(71 ± 10 UI/L)에 비해 85 ± 7.5 와 123 ± 14.3 UI/L으로 5 g 투여군에서만 유의한 변화를 나타내었다. 본 연구에서는 체중 kg 당 5 g의 에탄올 단독 투여한 실험군에서 AST의 유의적인 변화가 관찰되지 않아 Fischer 344 rat에서의 실험결과와는 일치하지만 Wistar rats에서의 결과와는 다른 양상을 나타내었는데, 이는 투여농도에 따라 활성도의 차이 뿐만 아니라 실험동물에 따라서 다르게 나타남을 알 수 있었다[2,5]. 한 방에서 제조(鱗鱗)로 사용되는 참검정풍뎡이(*H. diomphalia*) 수침액을 흰쥐의 체중 200 g 당 300 mg을 9일 동안 투여한 경우에는 사염화탄소의 투여로 증가된 AST, ALT, LDH, ALP의 활성도 수준이 유의적으로 감소되었다[26]. 또한 강과 공동연구자들[10]은 흰점박이꽃무지와 유사종인 점박이꽃무지(*Protoetia orientalis*)를 흰쥐의 식이재료에 5% 첨가하여 식이한 경우 에탄올에 의해 증가된 triglyceride와 총 cholesterol의 수치를 감소시켰으며 GOT와 GPT의 활성이 유의적으로 감소된다고 보고하였다. 그러나 사염화탄소에 의해 현저히 증가된 AST와 ALT 활성도가 흰점박이꽃무지로 식이한 본 연구에서는 회복효과가 관찰되지 않았으며, 에탄올 단독 투여군에 비해 흰점박이꽃무지 추출물을 식이한 본 연구에서도 AST와 ALT의 활성도에 유의

적인 변화가 관찰되지 않았다. 참검정풍뎡이(*H. diomphalia*)와 점박이꽃무지(*Protoetia orientalis*)가 손상된 간 기능의 회복에 효과가 있는 것으로 보고된 결과[10,26]와는 달리 그 유사종인 흰점박이꽃무지에서 AST와 ALT의 회복효과가 관찰되지 않았다. 이는 종(strain)의 차이, 추출방법, 그리고 투여용량의 차이에서 기인되는 것으로 판단된다.

사염화탄소와 에탄올은 지질과산화의 지표인 MDA 수준을 일반적으로 증가시키며, *Schisandra chinensis*의 추출물[12]이나 α -tocopherol[24]은 증가된 MDA 수준을 감소시키는 효과가 있었다. 본 연구에서는 지질과산화의 지표로써 사용된 혈청내의 TBA반응성 물질의 변화를 측정된 결과, 사염화탄소를 단독 투여한 대조군은 정상군에 비해 TBA반응성 물질이 증가되었으나 0.2% PBE 식이군을 제외하고 다른 PBE 식이군들에서는 사염화탄소로 인해 증가된 수준이 정상적인 수준으로 회복되는 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다. 또한 모든 에탄올 투여군들에서도 정상군에 비해 유의한 변화가 관찰되지 않아 사염화탄소나 에탄올의 투여시 증가된 혈청내 TBA반응성 물질의 수준에는 PBE 식이가 영향이 없는 것으로 생각된다(Table 5,6).

간 조직의 microsome에 존재하는 heme protein인 cytochrome P-450 효소계는 독성물질의 해독에 가장 중요한 역할을 하는 해독효소 군으로서 흡수, 침투된 다양한 종류의 이물질 뿐만 아니라 소수성인 여러 생체물질들의 대사에 관여하는 microsome 전자전달계의 최종 산화효소로 친유성 기질을 산화시켜 외부물질을 불활성화 물질로 무독화시킨다[3,27]. 수컷 Wistar rat에서 사염화탄소를 투여한 경우 cytochrome P-450과 cytochrome b₅가 모두 감소되었으나 eugenol을 처리한 경우 이들 phase I component의 감소를 유의하게 억제하였고 사염화탄소에 의해 유도된 microsome의 막에 존재하는 lipid에 대한 손상 및 TBARS의 축적에 의한 peroxidative damage에 대해 보호효과를 나타내었다[13]. 본 연구에서는 이물질대사효소인 cytochrome P-450과 cytochrome b₅ reductase의 활성도가 사염화탄소의 단독 투여시 유의적인 변화를 나타내었으나 PBE 식이에 따른 영향은 관찰되지 않았다. P-450 reductase와 cytochrome b₅의 활성도에서는 일부 PBE 식이군이 대조군에 비해 유의적인 변화가 관찰되지 않았으나 PBE가 이물질대사효소에 영향을 미친다고 판단하기에는 어려운 것으로 보

인다(Table 7). 에탄올을 급성적 혹은 만성적으로 투여한 경우 간의 lipid peroxidation이 각각 3.5배와 2배 증가되었으며[8,35], 알코올에 의한 간 질환에 cytochrome P-450 2E1이 밀접히 연관되어 있고 lipid peroxidation도 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다[7]. 본 연구에서는 에탄올을 단독 투여한 대조군의 경우 cytochrome P-450과 cytochrome b₅ reductase 활성도가 정상군에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. 0.2% PBE 식이시 cytochrome P-450과 cytochrome b₅ reductase의 활성도는 정상군 및 대조군에 비해 유의적인 변화를 나타내었으며, P-450 reductase는 0.04% PBE 식이군만이 유의적인 증가를 나타내었으나 현격한 수준은 아니었다(Table 8). 이상으로 간의 이물질대사효소의 측정결과를 비교해 볼 때 일부 실험군에서 유의적인 변화가 관찰되나 손상된 간 기능을 회복시킬 정도로 기대할 만한 수준은 아니다. 본 연구결과는 참검정풍뎌이와 점박이꽃무지의 실험결과에서 간 기능 향상에 다소 효과가 있는 것으로 보고한 결과와 다소 차이를 나타내고 있는데 [10,26], 이는 사용한 시료의 종 또는 실험방법의 차이에서 기인된 것으로 생각되나 정확한 이유를 규명하기 위해서는 더 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다. 또한 Lee와 Ha[15]는 물추출 알코올 침전법으로 제조한 제조(鱗鱗) 약침(藥針) 및 약침액이 항암작용이 있다고 보고하였다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 제조(鱗鱗)는 전보에서 보고된 바와 같이 독성은 없으나[14], 손상된 간 기능 회복에 효능은 있는 것으로는 보여지지 않는다. 그러나 이 연구는 실험동물에서 행해진 것이므로 사람에게 있어서 간암이나 virus성 감염질환 등에 효과가 있는지는 앞으로 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)는 간 질환의 치료를 위해 민간요법 뿐만 아니라 한방에서 이용하는 전통약물로 알려져 있다. 본 연구는 사염화탄소와 에탄올로 간 손상을 유도한 흰쥐에서 흰점박이꽃무지 추출물(PBE)의 영향을 조사하였다. 사염화탄소는 이물질대사효소(cytochrome P-450, cytochrome b₅, cytochrome b₅ reductase), TBARS, 혈청 AST와 ALT, 간 무게비에서 유의한 변화가 확인되는 간

독성이 유발하였으며, 에탄올은 혈청 AST와 TBARS의 변화는 유도하지 않았으나 이물질대사효소, ALT, 체중 당 간 무게비가 유의한 변화를 나타내었다. PBE로 전 처리한 실험군은 이물질대사효소(cytochrome P-450, cytochrome b₅, cytochrome b₅ reductase), 혈청 TBARS, AST와 ALT, 간 무게비에서 어떠한 유의적인 변화도 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 적어도 이 실험조건에서는 PBE가 사염화탄소 혹은 에탄올로 유도한 간 독성에 대하여 보호 또는 회복효과가 없다고 판단된다.

참 고 문 헌

1. Bansal, S.K., J. Love and H.L. Gurtoo. 1983. High pressure liquid chromatographic separation of multiple forms of cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 268-274.
2. Berman, E., D.E. House, J.W. Allis and J.E. Simmons. 1992. Hepatotoxic interactions of ethanol with allyl alcohol or carbon tetrachloride in rats. *J. Toxicol. Environ. Health* **37(1)**, 161-176.
3. Black, S.D. and M.J. Coon. 1986. *Cytochrome P-450*. (P. Ortiz de Montellano, eds.), Plenum, New York.
4. Brattin, W.J., E.A. Glendo and R.O. Recknagel. 1985. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J. Free Rad. Biol. Med.* **1**, 27-28.
5. Calabrese, V., M. Renis, A. Calderone, A. Russo, L. Barcellona and V. Rizza. 1996. Stress proteins and SH-groups in oxidatant-induced cell damage after acute ethanol administration in rat. *Free Rad. Biol. Med.* **20(3)**, 391-397.
6. Closa, D., M. Torres, G. Hotter, G. Bioque, O.S. Leon, E. Gelpi and J. Rosello-Catafau. 1997. Prostanoids and free radicals in CCl₄-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **56(4)**, 331-334.
7. Ekstrom, G. and M. Ingelman-Sundberg. 1989. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducibile cytochrome P450(PIIE1). *Biochem. Pharmacol.* **38**, 1313-1319.
8. Gutierrez-Ruiz, M.C., L. Bucio, V. Souza and A. Carabez. 1995. The effect of chronic and acute ethanol treatment on morphology, lipid peroxidation, enzyme activities and Na⁺ transport systems on WRL-68 cells.

- Human Exp. Toxicol.* **14**, 324-334.
9. Horvath, T., E. Karge, T. Javor and W. Klinger. 1987. Effects allopurinol, (+)-cyanidanol-3 and dihydroquinoline-type antioxidants on rat hepatic microsomal cytochrome P-450 and monooxygenases. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **25(4)**, 201-203.
 10. Kang, I-J., H-K. Kim, C-K. Chung, S-J. Kim and D. Oh. 2000. Effect of *Protaetia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29(3)**, 479-484.
 11. Kim, S.Y., H.P. Kim, M.K. Lee, S.H. Kim, H.M. Han, A. Moon, H. Huh and Y.C. Kim. 1993. Effects of betaine on the CCl₄-induced toxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Yakhak Hoeji* **37(5)**, 499-503.
 12. Ko, K.M., S.P. IP, M.K.T. Poon, S.S. Wu, C.T. Che, K.H. Ng and Y.C. Kong. 1995. Effect of a lignan-enriched fructus *Schisandrae* extract on hepatic glutathione status in rats: Protection against carbon tetrachloride toxicity. *Planta Med.* **61**, 134-137.
 13. Kumaravelu, P., D.P. Dakshinamoorthy, S. Subramaniam, H. Devaraj and N.S. Devaraj. 1995. Effect of eugenol on drug-metabolizing enzymes of carbon tetrachloride-intoxicated rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **49(11)**, 1703-1707.
 14. Lee, H.C., S.Y. Hwang, S-G. Hwang, B.H. Jeon and D.W. Lee. 2001. Acute oral toxicity of *Protaetia brevitarsis* homogenate in rats. *Korean J. Oriental Med. Physiol. Pathol.* **15(4)**, 543-547.
 15. Lee, J.M. and J.Y. Ha. 2000. Antitumor effects of acupuncture with *Holotrichia* on various tumor-occured model. *Korean J. Oriental Med. Pathol.* **14(2)**, 132-143.
 16. Lee, J-W., H. Jeong, M-D. Han, S-J. Baek, Y-S. Kim and S-M. Kang. 1996. Effect of G009 on CCl₄-induced hepatic injury and lipid peroxidation in rats. *Korean. J. Pharmacogn.* **27(3)**, 159-166.
 17. Lee, J.Y., K.S. Park, J.H. Chung, M.J. Cho, K.H. Ko, J.W. Lee, H. Jeong and S.Y. Lee. 1994. Effects of G009 on chemical induced liver damage in rats. *J. Appl. Pharmacol.* **2**, 206-212.
 18. Lowry, O.H., H.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 19. Mihara, K. and R. Sato. 1975. Partial purification of NADH cytochrome b₅ reductase from rabbit liver microsomes with detergents and its properties. *J. Biochem(Tokyo).* **71**, 725-735.
 20. Mukherjee, S., A. Sur and B.R. Maiti. 1997. Hepatoprotective effect of *Swertia chirata* on rat. *Indian J. Exp. Biol.* **35(4)**, 384-388.
 21. Nagababu, E. and N. Lakshmaiah. 1992. Inhibitory effect of eugenol on non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 2393-2400.
 22. Nordmann, R., C. Ribiere and H. Rouach. 1990. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcohol.* **25**, 231-237.
 23. Omura, T. and R. Sato. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378.
 24. Padron, A.G., E.G.D. De Toranzo and J.A. Castro. 1996. Depression of liver microsomal glucose 6-phosphatase activity in carbon tetrachloride-poisoned rats. Potential aynergistic effects of lipid peroxidation and of covalent binding of haloalkane-derived free radicals to cellular components in the process. *Free Rad. Biol. Med.* **21(1)**, 81-87.
 25. Park, H.Y., S.S. Park, H.W. Oh and J.I. Kim. 1994. General characteristics of the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis* reared in the laboratory. *Korean J. Entomol.* **24(1)**, 1-5.
 26. Park, S-R., S-H. Yoon, S-E. Cha, B-H. Kim and J-S. Choi. 1998. Effect of *Holotrichia diomphalia* bates on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *J. Korean Soc. Hygienic Sci.* **4(2)**, 27-37.
 27. Portor, T.D. and M.J. Coon. 1991. Cytochrome P450: multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulation mechanisms. *J. Biol. Chem.* **266**, 13469-13472.
 28. Rasheed, R.A., B.H. Ali and A.K. Bashir. 1995. Effect of *Teucrium stocksianum* on paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *Gen. Pharmacol.* **26(2)**, 297-301.
 29. Sankaran, H., Z.C. Larkin. and G.A. Rao. 1994. Unsaturated fat and low energy intake induce fatty liver whereas as increasement in energy intake ameliorates fatty liver during prolonged alcohol consumption by rat. *J. Nutr.* **124**, 110-116.
 30. Saraswat, B., P.K. Visen, G.K. Patnaik and B.N. Dhawan. 1997. Protective effect of picroliv, active constituent of *Picrorhiza kurrooa*, against oxytetracycline induced hepatic damage. *Indian J. Exp. Biol.* **35(12)**, 1302-1305.
 31. Siger, S.P., V. Pauli, G. Korb and M. Younes. 1986. Hepatoprotection by malotilate against carbon tetrachloride-alcohol induced liver fibrosis. *Agents Action.*

- 18, 5-6.
32. Simmons, J.E. 1997. The Hepatic Interaction of Aliphatic Alcohols with Halogenated Hydrocarbons, pp. 123-136, In Carlo, F.J. (eds.), *Drug Metabolism Reviews* Vol. 29(1-2), Marcel Dekker, New York.
33. Slater, T.F. 1984. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* 222, 1-15.
34. Suematsu, T., T. Kamada, H. Abe, S. Kikuchi and K. Yagi. 1977. Serum lipoperoxide levels in patients suppering from liver disease. *Clin. Chim. Acta* 79, 267-770.
35. Videla, L.A., C.G. Fraga, O.R. Koch and A. Boveris. 1983. Chemiluminescence of the in situ rat liver after acute ethanol intoxication-effect of (+)-cyanidanol-3. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2822-2825.
36. William, C.H.Jr. and M. Kamin. 1962. Microsomal NADPH cytochrome c reductase of liver. *J. Biol. Chem.* 237, 578-595.
37. 동의보감국역위원회. 1986. 동의보감. 남산당, p. 1149.
38. 신민교. 1991. 원색임상본초학. 영림원, p. 482.
39. 이상인. 1975. 본초학. 수서원, p. 475.
40. 지형준, 이상인. 1988. 대한약전외 한약(생약)규격집. 한국메디칼인덱스사, p. 336.

(Received June 27, 2001; Accepted August 20, 2001)