

## 두충잎 물추출물이 사염화탄소를 투여한 흰쥐의 간손상에 미치는 영향

전정례 · 박정릉<sup>†</sup>

영남대학교 식품영양학과

### Effect of *Eucommia ulmoides* Leaf Water Extract on Hepatotoxicity of Carbon Tetrachloride-Induced Rats

Jeong Ryaee Jeon and Jyung Rewng Park<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

#### Abstract

The present study was carried out to investigate the pretreatment of effects of water extract obtained from *Eucommia ulmoides* leaf (ELE) on hepatotoxicity of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-treated rats. Thirty two healthy male Sprague-Dawley rats were divided into four groups, i.e. normal group (N), CCl<sub>4</sub>-treated group (T), ELE-treated group (E), and ELE-treated group after injection of CCl<sub>4</sub> (TE). The administration of CCl<sub>4</sub> increased the activities of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and lactate dehydrogenase in serum, but their activities were significantly decreased by the addition of ELE. Alkaline phosphatase activity in serum was significantly decreased in CCl<sub>4</sub>-treated group, while the activity was not decreased by the extracts. Higher levels of HDL cholesterol was found in E and TE group which showed lower levels of total and LDL-cholesterol. Histopathologic findings by light microscopic examination showed fatty change, ballooning degeneration, acidophilic degeneration, spotty necrosis and zonal necrosis in CCl<sub>4</sub> treated liver tissue. But the degree of liver damage was not identified in liver tissue of the TE group. These results indicated that *Eucommia ulmoides* leaf water extracts led mitigation of liver damage induced with CCl<sub>4</sub>.

Key words: *Eucommia ulmoides* leaf, carbon tetrachloride, hepatotoxicity

#### 서 론

두충(*Eucommia ulmoides*)나무는 두충과(Eucommiaceae)에 속하는 낙엽교목으로 나무껍질인 두충나무의 수피는 한방의 생약재로, 그리고 두충 잎은 일반 대중에게 차로 많이 이용되고 있다(1). 두충피는 원산지인 중국에서는 약효가 널리 인정되어 강장, 이노, 안태(安胎)의 효능으로 혈압강하, 증풍, 고혈압, 허복통 등의 치료에 광범위하게 이용되어 왔다(2,3). 이에 관한 연구로 1957년 簡東(4)이 두충의 수용성 추출물이 가토 혈압을 강하하였다고 보고한 이래, 국내에서 Chung과 Park(5)이 국산 생약재 개발의 일환으로 국산 두충의 물추출물에서 현저한 혈압강하 효과와 가토에 대량 투여시에도 치사율이 발견되지 않았고 Hong 등(6)은 두충의 혈당상승 억제효과에 대해 각각 보고하였다. 그러나 15년 이상된 나무의 수피를 사용하는 것은 자원개발측면에서 제한적이며, 최근에는 두충피와 유사한 생리활성 성분이 잎에도 함유되어 있다고 보고되었다(7). 두충 잎은 해마다 많은 양이 낙엽으로 떨어지고 있으나 그 이용성이 현저하게 낮아 이에 대한 연구

개발이 요구되고 있다. 두충잎에 관한 연구로서 Lee(8)는 *in vitro* 실험에서 두충잎의 수증 추출물이 L1210암세포의 증식을 억제하는 효과가 있으며, Park과 Kim(9)은 두충잎으로부터 생리활성 물질로 astragalin 등의 3가지 flavonoid 성분들을 분리하였고, Kim(10)은 성장 시기별 주요 성분의 함량 및 각 용매 분획별 생리활성 작용을 각각 보고하였다.

사염화탄소는 실험적 간장해를 일으키는 약물로서 공업용으로는 수지, 고무 등의 용제로 사용되어 산업현장에서 노출되어(11), 간에서 단백질 합성을 저해하고 glycogen량을 감소시키며, 혈중으로 aspartate aminotransferase(AST) 및 alanine aminotransferase(ALT)의 이탈을 일으키는 것으로 알려져 있다(12).

본 연구는 *in vitro* 실험에서 항산화 및 생리활성 작용이 우수한 것으로 보고되고 있는 두충잎의 이용성을 증진시키고자, 사염화탄소를 투여하여 간손상을 유발시킨 흰쥐에서 두충잎 물추출물을 투여한 후 이들의 혈청 및 간에서의 지질 함량과 효소 활성도를 살펴보고 간조직 세포의 형태학적 변화를 관찰함으로써 간기능 회복 정도를 검토하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: jrpark@yu.ac.kr  
Phone: 82-53-810-2873. Fax: 82-53-818-3813

재료 및 방법

시료의 추출

실험에 사용된 두중일은 경북 영천에서 채취한 것을 음건하여 마쇄한 후 추출기에 넣고 10배의 증류수를 가해 80°C에서 10시간 이상 추출한 다음 여과하여 회전 감압농축기로 농축시켜 두중일 물추출물을 제조하였다. 농축정도는 건시료 100 g당 물추출물이 100 mL되게 농축하였으며 4°C에서 보관하여 시료로 사용하였다.

실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 Sprague-Dawley 종의 평균 체중이 110±10 g 인 웅성 흰쥐를 1주일간 고형사료로 적응시킨 후, 정상군(N), 사염화탄소 투여군(T), 두중일 물추출물 투여군(E), 사염화탄소 투여 1주일 후 두중일 물추출물을 투여한 군(TE)으로 나누어 난괴법에 의하여 각 군당 8마리씩 4군으로 분리하여 총 사육기간을 6주간 하였다. 사육실의 온도는 25±1°C, 습도 50%, 명암은 12시간 주기로 조절하였으며 정상 식이는 고형사료(삼양사)를 사용하였다. 두중일 물추출물은 체중 100 g당 0.5 mL를 1일 1회 경구 투여하였다.

급성 간손상을 유도한 T군은 사염화탄소를 올리브유에 1:1의 비율로 녹여 체중 kg당 1 mL씩 3일 간격으로 복강 내로 2회 투여 후 정상 식이를 하였으며, 각군의 대조군에는 동량의 올리브유를 위와 동일한 방법으로 투여하였다. TE군은 사염화탄소를 위와 동일하게 1주간 투여한 후 두중일 물추출물을 4주 투여하였고, 사육기간 동안 고형사료와 물은 자유롭게 섭취하게 하였다.

실험동물은 희생전 12시간 동안 물만 주고 절식시킨 뒤 에테르로 마취한 후 개복하여 복부대동맥으로부터 혈액을 채취하여 30분 동안 방치한 다음 3,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다.

체중과 간의 중량

체중은 측정 10시간 전에 식이 급여를 중단하여 매일 일정 시각에 측정하였고, 흰쥐의 간장 중량은 채혈직후 빙냉의 0.85~0.9% 생리식염수 용액으로 간을 관류하여 간조직 내에 남아있는 혈액을 제거하였고 생리식염수로 씻어내고 여과지로 수분을 제거한 후 칭량하여 체중 100 g당의 장기중량으로 환산하였다.

혈청과 간조직의 효소활성도 측정

AST와 ALT활성도 측정은 Reitman과 Frankel(13)의 방법에 따라 각각의 기질액 1.0 mL에 혈청 0.2 mL를 첨가하고 37°C에서 ALT는 30분, AST는 60분간 반응시킨 다음 발색시약 1.0 mL를 가해 발색시키고 0.4 N NaOH 10.0 mL를 가해 10분간 방치 후 505 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선에 준해 활성도를 환산하였으며 혈청 리터당 Karmen 단위(14)로 나타내었다.

Lactate dehydrogenase(LDH) 활성 측정은 Berga와 Broida(15)의 방법에 준하여 조제된 kit(Eiken Co.)를 사용하였으며, 기질액 0.50 mL에 발색정 1정을 잘 녹인 다음 3분간 전향 온처리하고 혈청 0.05 mL를 첨가한 후 37°C에서 10분간 반응시켰다. 여기에 0.1 N HCl 5.00 mL를 가하여 반응을 종료시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하고 검량선에 준해 활성도를 산정하여 Wroblewski 단위로 나타내었다.

Alkaline phosphatase(ALP) 활성은 Kind-King(16)방법에 준하여 측정용 kit(Eiken Co.)를 사용하였으며, 기질액 2.0 mL를 취하여 혈청 0.05 mL를 첨가한 후 37°C에서 15분간 반응시켰다. 여기에 발색액 2.0 mL를 가해 혼합하고 10분간 방치 후 1시간내에 570 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선에 준해 활성도를 산정하였다. 활성도는 혈청 1 mL가 37°C에서 30분간 1 nmole의 p-nitrophenol을 생성시키는 King-Armstrong unit(17)로 나타내었다.

혈청과 간조직의 지질 함량 분석

**혈청중의 지질함량**: 혈청 중의 총 지질 함량은 Frings와 Dunn(18)의 방법에 준하여 혈청 0.1 mL에 진한황산 2.0 mL를 넣고 잘 혼합한 후 5~10분간 냉각하고, 그 혼합액 0.1 mL를 취하여 phosphovanillin 용액 5.0 mL를 넣어 잘 혼합한 다음, 37°C에서 15분간 가온하고 실온에서 5분간 냉각시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

중성지질의 함량은 Muller(19)의 방법에 준한 효소법으로, 중성지질 측정용 kit(Eiken Co.)로 측정하였다. 즉 혈청 0.02 mL에 효소시액 3.00 mL를 가하여 잘 혼합한 다음 37°C에서 5분간 반응시킨 후 505 nm에서 흡광도를 측정하여 그 함량을 구하였다.

콜레스테롤 함량은 Richmond(20)의 방법으로 조제된 kit(Eiken Co.)를 사용하여 측정하였다. 총 콜레스테롤은 혈청 0.2 mL에 효소시액 3.0 mL를 가하여 잘 혼합하여 방치한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하여 그 함량을 구하였으며, HDL-콜레스테롤은 혈청 0.3 mL에 침전시약 0.3 mL를 가하여 잘 혼합하고 실온에서 5분간 정치한 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상정액을 0.1 mL 취해 효소시액 3.0 mL와 잘 혼합하고 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 구하였다.

**간조직의 지질함량**: 간조직의 지질 함량은 간조직을 균질기를 사용하여 0.15 M NaCl 용액으로 10% 조직마쇄액을 만든 후 Folch 등(21)의 방법에 준하여 chloroform: methanol(2:1, v/v) 혼합액으로써 지질을 추출하여 각종 지질성분을 정량하였다. 중성지질 함량은 위의 추출액 0.5 mL를 휘발시킨 후, 혈청 총 지질과 동일한 방법으로 측정하여 그 함량을 구하였다.

콜레스테롤 함량은 위 추출액 2.0 mL를 휘발시킨 후 Zak-Dickman(22)법으로 측정하였다. 즉 건조된 시료를 초산에 용해시켜 ferric chloride 용액 2.0 mL를 넣어 혼합한 다음 황산 1.3 mL를 가하여 560 nm에서 흡광도를 측정하여 함량

을 구하였다.

#### 간조직의 전기영동

간조직의 단백질 정량은 bicinchoninic acid protein assay kit를 이용하였으며, 표준 단백질은 bovine serum albumin을 사용하여 Automatic Elisa reader(Flow Laboratories Co., USA)로 570 nm에서 측정하였다. 또한 Western blotting은 Laemmli(23)의 방법에 의한 SDS-PAGE를 이용하여 정량한 간조직에 5배의 loading dye를 첨가하고 100°C에서 4분간 처리 후 각 well당 20/10 µg으로 loading하여 tris-glycine buffer로 120 volt에서 4시간 전기영동하였다. Standard marker는 Bio-Rad Co.의 myosin(206 K), β-galactosidase(117 K), bovine serum albumin(79 K), ovalbumin(48.3 K) carbonic anhydrase(34.7), soybean trypsin inhibitor(28.8 K)를 사용하였다. 또한 각 단백질의 band는 Bio-Capt. 프로그램과 Bio ID 프로그램을 이용하여 분석하였다.

#### 병리조직학적 검사

적출한 간조직을 10% 중성 포르말린액에 고정하고 탈수한 후 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매하고 4 µm의 박절편을 만들어 hematoxylin-eosin염색하여 광학현미경(Nikon Co., Japan)으로 관찰하였다.

#### 통계처리

실험 성적은 평균±표준편차로 표시하였고 실험군간의 통계적 유의성 검정은 SPSS package program을 이용하여 one way ANOVA(분산분석)의 Duncan's multiple test(24)에 의해 유의확률  $\alpha = 0.05$ 에서 검증하였다.

**Table 1. Body weight gain and liver weight/body weight ratio of rats**

Group <sup>1)</sup>	Body weight gain (g/day)	Liver wt./Body wt. ratio (%)
N	5.46±0.43 <sup>2)cd)</sup>	2.71±0.12 <sup>a</sup>
T	3.82±0.30 <sup>a</sup>	4.00±0.85 <sup>c</sup>
E	5.43±0.43 <sup>c</sup>	2.77±0.11 <sup>ab</sup>
TE	4.89±0.50 <sup>b</sup>	3.24±0.31 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>N: Normal, T: N+CCl<sub>4</sub>, E: N+ELE, TE: CCl<sub>4</sub>+ELE.

<sup>2)</sup>Means±SD (n=8).

<sup>3)</sup>Means followed by the same letter in the column are not significantly different (p<0.05).

## 결과 및 고찰

#### 체중 증가량 및 간 중량비

6주 동안 실험 식이로 사육한 흰쥐의 체중 증가량과 체중에 대한 간 중량 백분율을 Table 1에 나타낸 바와 같다. 체중 증가량은 정상군(N)과 두충잎 물추출물군(E)이 가장 높았고, 사염화탄소 투여한 T군에 비해 사염화탄소 투여 후 두충잎 물추출물을 투여한 TE군의 체중 증가량이 유의적으로 높게 나타났다.

체중에 대한 간 중량 백분율은 정상군에 비해 사염화탄소군에서 48%의 유의한 증가를 나타내었으나(p<0.05) 사염화탄소에 의해 간조직의 손상이 유발되었음을 알 수 있었으며, Bae 등(25)은 사염화탄소에 의해 간 독성이 유발된 흰쥐군은 정상군에 비해 간 중량 백분율이 유의적으로 증가하였다고 발표하였다.

#### 두충잎 물추출물이 혈청 효소 활성도에 미치는 영향

두충잎 물추출물 투여에 따른 혈청중의 효소 활성 변화는 Table 2에 나타낸 바와 같다. 사염화탄소 투여로(T군) 흰쥐의 혈청 AST와 ALT 활성은 정상군(N군)에 비해 4.1배와 2.9배 증가하였으나, 두충잎을 투여함으로 약 61%와 70%가 각각 감소되었다. Mun 등(26)은 사염화탄소 투여에 의해 마우스의 혈청의 AST 활성이 33.2배 증가하였으나, 기본 식이와 산초 종피 메탄올 추출물의 급이를 해오면서 사염화탄소를 투여한 군은 기본 식이에 사염화탄소를 투여한 군에 비해 혈청 AST활성이 60.3% 감소하였다고 각각 보고하였다.

Aminotransferase는 CCl<sub>4</sub>와 같은 간독성 물질은 간세포의 괴사와 간조직의 파괴를 유도하여 AST와 ALT를 혈중으로 유출을 증가시키는데, Yoon 등(27)은 사염화탄소에 의한 간 독성에 대한 보고에서 저단백과 고단백 식이를 한 흰쥐의 혈청 ALT의 활성도가 각각 5.4배, 8.9배의 현저한 증가를 나타내었으며, Lee와 Jun(28)은 사염화탄소를 투여한 가토의 ALT활성 증가를 토사자 추출물을 투여함으로 유의적인 감소 효과를 가져왔다고 보고하여 본 결과와 유사하게 나타났다.

혈청중의 LDH 활성도는 사염화탄소 투여로 정상군에 비해 현저히 증가하였으나 두충잎 추출물의 투여로 유의적인 감소를 나타내었으며 특히 정상군이나 사염화탄소군보다 두충잎 투여군(E, TE)에서 유의적으로 낮게 나타났는데, Chung

**Table 2. Effects of *Eucommia ulmoides* leaf water extracts on the serum enzymes activities of CCl<sub>4</sub>-treated rats**

Group <sup>1)</sup>	AST	ALT	LDH	ALP
	(Karmen unit/L of serum)		(Wroblewski unit)	
N	112.25±16.45 <sup>2)a3)</sup>	34.95± 4.85 <sup>ab</sup>	112.25±16.45 <sup>a</sup>	111.08±7.26 <sup>c</sup>
T	455.38±67.89 <sup>c</sup>	101.88±13.24 <sup>c</sup>	455.38±67.89 <sup>c</sup>	116.00±2.83 <sup>b</sup>
E	122.50±13.18 <sup>a</sup>	41.13± 4.02 <sup>b</sup>	122.50±13.18 <sup>a</sup>	93.95±3.95 <sup>a</sup>
TE	178.25±52.48 <sup>b</sup>	31.50± 3.55 <sup>a</sup>	178.25±52.48 <sup>b</sup>	91.26±1.79 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>N: Normal, T: N+CCl<sub>4</sub>, E: N+ELE, TE: CCl<sub>4</sub>+ELE.

<sup>2)</sup>Means±SD (n=8).

<sup>3)</sup>Means followed by the same letter in the column are not significantly different (p<0.05).

등(29)은 사염화탄소에 중독된 흰쥐의 혈청 LDH 활성도는 대조군에 비해 65% 증가하였으나 제조 액기스를 체중 kg당 300 mg 투여한 결과 정상군 수준으로 회복되었다고 보고하여 본 실험과 비슷하였다.

ALP는 간담도계 효소로서 간세포의 모세관담맥 응모, 담관상피 등에 존재하며, 담도계 질환시 혈액에서의 활성이 증가되어 담도계 질환의 대표적 인자로 알려져 있다. Table 2에서 T군의 ALP활성도가 다른 군보다 유의적으로 높게 나타나 사염화탄소에 의해 간손상이 일어났음을 알 수 있었으나, 두충잎 물추출물의 투여에 의해 약간의 감소는 있었으나 유의성은 관찰되지 않았다. Han(30)은 더덕추출물이 사염화탄소 투여로 증가된 흰쥐의 혈청중 ALP 활성도를 유의적으로 감소시켰다고 보고하였다.

**혈청중 중성지질 및 총콜레스테롤의 농도**

Table 3은 두충잎 열수 추출물이 사염화탄소를 투여한 흰쥐의 혈청중의 중성지질과 콜레스테롤의 함량에 미치는 영향을 관찰한 것으로서 사염화탄소의 투여는 내형질세포막에 영향을 미쳐 내형질세포의 다불포화지방산을 산화시켜 과산화지질을 형성함으로써 그 기능을 감퇴시키고 중성지질의 축적을 유발하는 보고(30)에서처럼 사염화탄소가 간의 실질 세포에 지방, 특히 중성지질을 비정상적으로 축적시키는 것을 관찰할 수 있었다(Table 4). 한편 두충잎 열수추출물의 투여에 의해 중성지질의 함량이 유의적으로 감소되어 Kim과 Han(31)이 보고한 버섯추출물은 사염화탄소에 의해 증가된 중성지질의 함량을 감소시켰다는 보고와 유사하게 나타났다.

사염화탄소 투여에 의해 증가된 총 콜레스테롤 함량은 두충잎 물추출물 투여에 의해 정상군 수준까지 유의적인 감소를 나타내었으며, LDL콜레스테롤의 함량도 같은 경향을 나타내었다. 혈청 중 총 cholesterol 함량 측정은 체내 지질 대사 이상의 지표로서 중요하며 관상 동맥 질환, 지방대사 이상, 체장, 간장질환 등의 경우 농도가 증가하는 것으로 알려져 있다.

한편 두충잎 투여군의 혈청 HDL 콜레스테롤의 양은 23.45 ± 5.31 mg/dL로 정상군의 14.93 ± 1.25 mg/dL에 비해 57%나 높게 나타났으며, 정상군(N)의 경우 사염화탄소군(T)에 비해 약간의 감소는 나타났으나 유의성은 관찰되지 않았는데,

Kim과 Han(31)은 흰쥐에서 사염화탄소를 투여함으로 혈청내 HDL 콜레스테롤의 양은 식이내 지방함량의 차이와 관계없이 모두 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. 특히 두충잎 열수추출물 투여한 군(E군, TE군)에서 총콜레스테롤에 대한 HDL 콜레스테롤의 백분율이 유의적으로 높게 나타났으며, 동맥경화증을 일으킬 수 있는 위험인자의 지표인 동맥경화지수(A.I.)의 비율은 낮게 나타나 두충잎 열수추출물이 흰쥐의 사염화탄소에 의해 증가된 혈청내 콜레스테롤의 함량을 감소시키는데 상당한 영향을 미칠 것으로 생각된다.

Grundy(32)에 의하면 다가 불포화 지방산은 혈청 콜레스테롤의 주된 운반형으로 동맥벽에 콜레스테롤을 축적시켜 동맥경화 유발을 촉진하는 LDL-콜레스테롤, VLDL-콜레스테롤의 농도를 저하시킨다고 보고하였는데, Kim(10)은 두충잎의 다가 불포화 지방산의 함량은 성숙시기에 따라 총 지방산 함량 가운데서 62~68% 정도이며, 이중 linolenic acid 함량이 59~65%를 차지한다고 보고하여 혈중내 콜레스테롤의 함량에 이들 지방산이 관여한 것으로 생각된다.

**간조직 중의 총 콜레스테롤, 총지질, 중성지질의 함량**

간조직의 총콜레스테롤 함량, 총지질, 중성지질의 함량은 Table 4에 나타난 바와 같이 두충잎 투여군에서 총콜레스테롤 함량이 7.06 ± 1.11 mg/g, 총지질 함량이 52.00 ± 9.21 mg/g으로 정상군에서보다 유의적으로 낮게 나타났으며, 이들의 함량은 사염화탄소 투여에 의해 증가하였으나 두충잎의 물추출물의 투여에 의해 유의성 있는 감소는 나타나지 않았다(Table 4). 또한 사염화탄소 투여는 간조직의 중성지질 함량

**Table 4. The effect of *Eucommia ulmoides* leaf water extracts on total cholesterol, total lipid and triglyceride of liver of CCl<sub>4</sub>-treated rats (mg/g of tissue)**

Group <sup>1)</sup>	Total cholesterol	Total lipid	Triglyceride
N	8.50 ± 0.58 <sup>2)3)</sup>	67.38 ± 3.78 <sup>b</sup>	10.64 ± 0.50 <sup>a</sup>
T	9.71 ± 0.85 <sup>c</sup>	77.88 ± 4.97 <sup>c</sup>	13.14 ± 1.51 <sup>c</sup>
E	7.06 ± 1.11 <sup>a</sup>	52.00 ± 9.21 <sup>a</sup>	11.18 ± 1.00 <sup>ab</sup>
TE	9.25 ± 0.82 <sup>bc</sup>	72.88 ± 6.15 <sup>bc</sup>	12.08 ± 1.30 <sup>bc</sup>

<sup>1)</sup>N: Normal, T: N+CCl<sub>4</sub>, E: N+ELE, TE: CCl<sub>4</sub>+ELE.

<sup>2)</sup>Means ± SD (n=8).

<sup>3)</sup>Means followed by the same letter in the column are not significantly different (p<0.05).

**Table 3. The effect of *Eucommia ulmoides* leaf water extracts on triglyceride and cholesterol in serum of CCl<sub>4</sub>-treated rats (mg/dL)**

Group <sup>1)</sup>	Triglyceride	Total cholesterol (A)	HDL-cholesterol (B)	LDL-cholesterol	(B)/(A) × 100 (%)	A.I. <sup>2)</sup>
N	79.00 ± 3.13 <sup>3)4)</sup>	83.75 ± 7.23 <sup>a</sup>	14.93 ± 1.25 <sup>a</sup>	53.01 ± 7.33 <sup>a</sup>	17.83	4.61
T	111.13 ± 13.83 <sup>b</sup>	115.13 ± 8.43 <sup>b</sup>	11.91 ± 1.71 <sup>a</sup>	88.50 ± 13.46 <sup>b</sup>	10.34	8.67
E	87.50 ± 6.14 <sup>a</sup>	87.38 ± 5.50 <sup>a</sup>	23.45 ± 5.31 <sup>b</sup>	47.26 ± 4.99 <sup>a</sup>	26.84	2.73
TE	101.13 ± 10.63 <sup>c</sup>	92.13 ± 10.92 <sup>a</sup>	23.30 ± 2.06 <sup>b</sup>	53.03 ± 10.47 <sup>a</sup>	25.29	2.95

<sup>1)</sup>N: Normal, T: N+CCl<sub>4</sub>, E: N+ELE, TE: CCl<sub>4</sub>+ELE.

<sup>2)</sup>Atherosclerotic index = (Total cholesterol - HDL-cholesterol) / HDL-cholesterol.

<sup>3)</sup>Means ± SD (n=8).

<sup>4)</sup>Means followed by the same letter in the column are not significantly different (p<0.05).

을 유의적으로 증가시켰으나 두충잎 물추출물의 투여에 의해서 유의성 있는 감소가 관찰되지 않았다.

간조직 단백질의 전기영동 pattern

Fig. 1은 적출한 간조직을 Western blotting한 것으로 사염화탄소군의 경우 분자량이 48.3 kD 인근의 band 1에서 단백질의 양이 상당히 증가하였으나 사염화탄소 투여 후 두충잎 투여군에서는 상당히 감소함을 관찰할 수 있으며, band 2에서는 사염화탄소 탄소를 투여한 T군이 오히려 N, E, TE군에 비해 단백질이 감소함을 관찰할 수 있는데, 이는 간해독에 관련하는 효소량의 변화로 추측할 수 있다. Joo(33)는 wounded avocado의 ripening root에서 cytochrome p-450 antigen이 48 kD에서 발현되었으며 Bae(34)는 cytochrome 1A1 isozyme의 immunoblot분석에서 cytochrome p450 1A1 단백질 함량은 benzopyrene 투여 마우스에서 증가하였으나 항버섯 메탄올 추출물의 투여군에서는 감소하였다고 보고하여 band 1이 cytochrome p450일 것으로 추측할 수 있었다.

조직화적인 관찰

적출한 간조직의 광학현미경에 의한 관찰 결과는 Fig. 2와 Table 5에 나타난 바와 같이 정상군은 간소엽의 구조가 잘

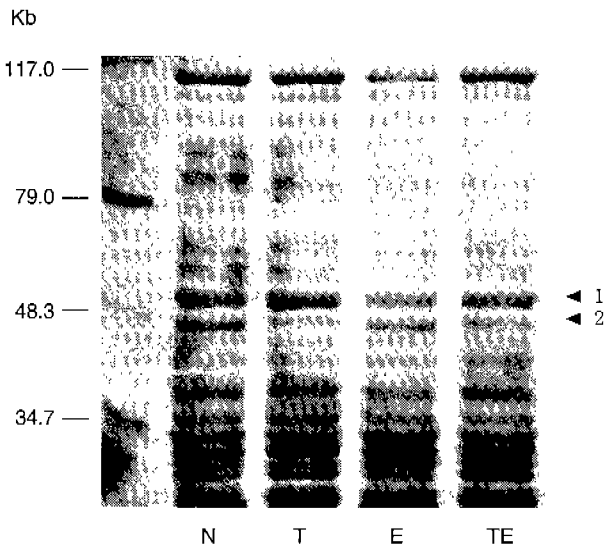


Fig. 1. Western-blot analysis for the effect of *Eucommia ulmoides* leaf water extracts on liver of CCl<sub>4</sub>-treated rats. N: Normal, T: N+CCl<sub>4</sub>, E: N+ELE, TE: CCl<sub>4</sub>+ELE.

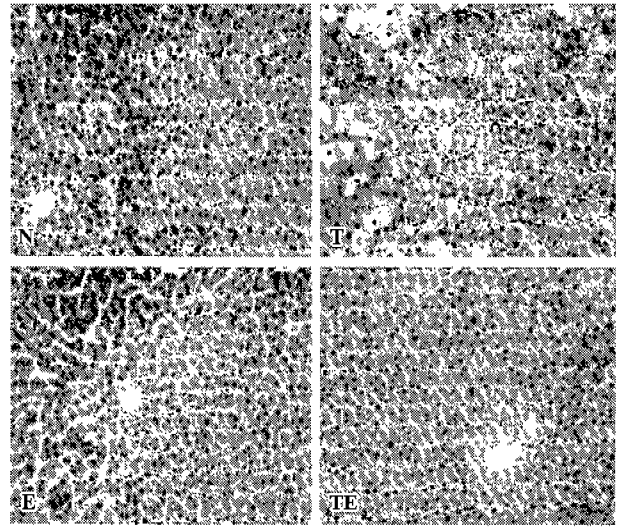


Fig. 2. The histopathologic examination by light microscopy. N: Normal, T: N+CCl<sub>4</sub>, E: N+ELE, TE: CCl<sub>4</sub>+ELE. N: Hepatic lobules shows regular plate-like arrangement of uniform hepatocytes (H&E stain, ×200). T: Ballooning degeneration of hepatocytes, necrosis, and inflammatory cells infiltration composed of mainly lymphocytes are found in the centrilobular area. Microvesicular fatty change is noted (H&E stain, ×200). E: Hepatic lobular structure is relatively well preserved. Focal congestion is noted in hepatic sinusoids (H&E stain, ×200). TE: Hepatocytes show normal appearance (H&E stain, ×200).

유지되었으며 간세포들은 풍부한 호산성 세포질과 등근핵을 가지고 있었으며 간세포판은 대부분 한층으로 잘 유지되어 있었다. T군의 경우 간세포의 풍선양 변성, 피사 및 림프구 등의 염증세포 침윤, 소포성 지방 변성이 소엽 중심대에 주로 나타나 사염화탄소에 의한 손상이 관찰되었다. 두충잎 투여군(E군)에서는 간소엽의 구조가 비교적 잘 유지되었으며 간혹 등모양 혈관이나 문맥정맥에 울혈이 관찰되었다. 사염화탄소 유도후 두충잎 물추출물을 투여한 TE군에서는 간소엽을 구성하고 있는 간세포들이 전반적으로 균일하게 배열되어 있어 정상적인 간 소견을 닮았으며, 간혹 2개의 핵을 가진 간세포들이 관찰되어 사염화탄소 투여에 의해 손상된 간세포들의 재생을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 두충잎 물추출물이 사염화탄소에 의해 손상된 간기능의 회복정도를 간세포의 형태학적인 관찰을 통해 명확히 뒷받침해 주고 있으며 두충잎은 손상된 간기능의 회복에 아주 효과적인 신소재로서의 개발가능성을 시사해 주고 있다.

Table 5. The effect of *Eucommia ulmoides* leaf water extracts on histopathologic findings of liver tissue in CCl<sub>4</sub>-treated rats

Group <sup>1)</sup>	Fatty change	Ballooning degeneration	Acidophilic degeneration	Spotty necrosis	Confluent necrosis	Zonal necrosis	Bridging necrosis
N	- <sup>2)</sup>	-	-	-	-	-	-
T	++	+	+	++	-	+	-
E	-	-	-	-	-	-	-
TE	-	-	-	+	-	-	-

<sup>1)</sup>N: Normal, T: N+CCl<sub>4</sub>, E: N+ELE, TE: CCl<sub>4</sub>+ELE.

<sup>2)</sup>-: none, +: mild, ++: moderate.

요 약

두충잎의 생약 및 식품 자원으로서의 이용성을 증진시킬 목적으로 두충잎의 물추출물을 사염화탄소를 투여한 흰쥐의 간손상에 미치는 영향을 검토하기 위해, 정상군, 사염화탄소군, 두충잎 물추출액 투여군, 사염화탄소 처리 후 두충잎 물추출액을 투여한 군의 4개군으로 나누어 6주간 사육하여 얻은 결과는 다음과 같다. 혈청 중의 AST, ALT, LDH 활성은 사염화탄소 투여에 의해 현저히 증가하였으나 두충잎 물추출물을 함께 투여함으로써 정상군과 비슷한 수준으로 회복되었다. 한편 사염화탄소에 의해 증가된 혈청중의 ALP 활성은 두충잎 투여에 의해 유의성 있게 감소하지 않았다. 혈청 중의 중성지질, 총 콜레스테롤 함량과 LDL콜레스테롤의 함량은 사염화탄소군에서만 유의적인 증가를 나타내었을 뿐 나머지 각군간의 유의적인 차이는 없었다. 한편 혈청 중의 HDL콜레스테롤의 함량은 두충 단독 투여군 및 사염화탄소 투여 후 두충잎 투여군이 정상군 및 사염화탄소 단독 투여군들보다 유의적으로 높게 나타났다. 간조직 중의 총콜레스테롤, 총지질, 중성지질의 함량은 사염화탄소에 의해 유의적인 증가를 나타내었으나 두충잎 물추출액의 투여로 인해 이들의 함량이 유의성 있는 감소는 관찰되지 않았다. 광학현미경에 의한 간조직 세포의 병리학적인 검사에서는 사염화탄소군에서 간손상시 나타나는 간조직의 지방변화, 풍선양 변성, 호산성 변성, 국소성 괴사, 부위별 괴사가 관찰되었으나 그 후 두충잎 투여에서 변화가 나타나지 않아 간 손상이 회복되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 두충잎 열수 추출물은 CCl<sub>4</sub>에 의해 손상된 간기능을 회복시키는데 효과가 있었으며, 특히 혈청지질 개선에 탁월한 효과가 있음을 알 수 있었다.

문 헌

1. 小學館：中藥大辭典Ⅲ. 上海, 上海科學技術出版社, p.1031-1032 (1964)
2. 橋木敬次郎, 木村正麻, 原田正敏, 大土家公男：和漢藥物學. 東京, 南山堂, p.159 (1982)
3. 中國衛生部藥典委員會：中國藥典(中草及其製品). 上海, 人民衛生出版社, p.285 (1978)
4. 簡東緒：家兔血壓. 山阜醫記, Vol. 5, p.480 (1957)
5. Chung, M.H. and Park, C.W. : Studies on the development of antihypertensive agents from Korean crude drug. I, II, III, *Kor. J. Pharmacol.*, **6**, 29-42 (1975)
6. Hong, N.D., Rho, Y.S., Won, D.H., Kim, N.J. and Cho, B. S. : Studies on the anti-diabetic activity of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Kor. J. Pharmacol.*, **18**, 112-117 (1987)
7. Hong, N.D., Rho, Y.S., Kim, J.W., Won, D.H., Kim, N.J. and Cho, B.S. : Studies on the general pharmacological activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Kor. J. Pharmacol.*, **19**, 102-110 (1988)
8. Lee, M.H. : Extraction and purification of anticancer components in *Eucommia ulmoides* leaves. *M.S. Thesis*, Korea University (1988)
9. Park, J.C. and Kim, S.H. : Flavonoid analysis from the leaves of *Eucommia ulmoides*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*,

- 24, 901-905 (1995)
10. Kim, J.B. : Changes of major components during growth and physiological functionality of *Eucommia ulmoides* leaves. *Ph.D. Thesis*, Yeungnam University (1999)
11. Anita, K.C. and James, R.T. : Interaction of hypoxia and carbon tetrachloride toxicity in hepatocyte monolayer. *Experimental and Molecular Pathology*, **50**, 183-189 (1989)
12. Amdur, M.O., Doull, J. and Klaassen, C.D. : *Toxicology*. 4th ed., Pergamon Press, p.338 (1991)
13. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Path.*, **28**, 58-63 (1954)
14. Karmen, A. : A note on the spectrometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 131-139 (1955)
15. Berga, L. and Broida, D. : *Sigma Tech. Bull.* Sigma Co., Vol. 500. No. 8, p.60-61 (1960)
16. Kind, R.N. and King, E.T. : Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolyzed with antipyrine. *J. Clin. Pathol.*, **7**, 332-338 (1954)
17. Tietz, N.W. : *Fundamentals of Clinical Chemistry*. 2nd ed., W. B. Saunder, Philadelphia, p.606-609 (1959)
18. Frings, C.S. and Dunn, R.T. : A colorimetric method for determination of total serum lipid based on the sulfophosphovanillin reaction. *Am. J. Clin. Path.*, **53**, 89-91 (1970)
19. Muller, P.H. : A fully enzymatic triglyceride determination. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **15**, 457-464 (1977)
20. Richmond, W. : Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous flow analysis. *Clin. Chem.*, **22**, 1579-1588 (1976)
21. Folch, J., Lee, M. and Stanley, G.H. : A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-502 (1975)
22. Zak, B. and Dickman, R.C. : Rapid estimation of free and total cholesterol. *Am. J. Clin. Pathol.*, **24**, 1307-1314 (1954)
23. Laemmli, U.K. : Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
24. Lee, K.H., Park, H.C. and Her, E.S. : *Statistics and data analysis method*. Hyoil Press, Seoul, p.253-296 (1998)
25. Bae, S.J., Kim, N.H., Ha, B.J., Jung, B.M. and Roh, S.B. : Effect of Godulbaegi leaf extracts on CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 137-143 (1997)
26. Mun, S.I., Ryu, H.S. and Choi, J.S. : Inhibition effects of *Zanthoxylum schinifolium* and its active principle on lipid peroxidation and liver damage in carbon tetrachloride treated mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 943-951 (1997)
27. Yoon, C.G., Lee, S.I. and Shin, J.K. : Effect of carbon tetrachloride on the changes of xanthine oxidase activity in rats previously fed low or high protein diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **20**, 527-537 (1991)
28. Lee, M.Y. and Jun, S.J. : Effect of *Cuscuta* extract on experimentally induced liver damage in rabbits. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **18**, 333-337 (1989)
29. Chung, M.H., Kang, S.C. and Kim, K.W. : The acute toxicity of *Liocolae vermiculus* extract in mice and its effect on hepatic damage induced by CCl<sub>4</sub> in rats. *Kor. J. Pharmacogn.*, **22**, 36-44 (1991)
30. Han, E.G. : Effect of *Codonopsis lanceolata* extracts on carbontetrachloride-induced hepatotoxicity. *Ph.D. Thesis*, Yeungnam University (1996)
31. Kim, G.H. and Han, H.K. : The effect of mushroom extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 326-332 (1998)

32. Grundy, S.M. : Monounsaturated fatty acids, plasma cholesterol and coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 1168-1174 (1987)
33. Joo, E.Y. : Induction of cytochrome p450 protein in wounded avocado roots (*Persea americana*, Mill). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 2, 328-332 (1997)
34. Bae, J.T. : Studies on the cancer chemoprevention of *Sarcodon aspratus* extracts. *Ph.D. Thesis*, Yeungnam University (1999)

(2000년 8월 7일 접수; 2001년 12월 11일 채택)