

Extracts of *Codonopsis lanceolata* Decrease CCl₄-Induced Hepatotoxicity on High Fat Diet in Rats

Eun-Gyeong Han¹, Yoon-Gyeong Lee² and Hyun Gug Cho[†]

¹Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyungsan 712-749, Korea

²Department of Oriental Medicine Resources, Asia University, Kyungsan 712-220, Korea

Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Gumi 730-852, Korea

This study was designed to investigate the effect of *Codonopsis lanceolata* extracts on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity in rats fed high, medium or low fat diet. The liver weight was increased not by the level of fat in diet but by administration of CCl₄. Activities of serum aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) were significantly increased by CCl₄, the activities of AST and alanine aminotransferase (ALT) were significantly decreased in case of CCl₄ treatment with *C. lanceolata* extracts. In high fat diet with CCl₄ administration, the content of total lipid in liver was significantly increased, which was significantly decreased by the administration of *C. lanceolata* extracts. Administration of *C. lanceolata* water extracts remarkably prevented the tissue injury such as lipid degeneration, infiltration of inflammatory cells and necrosis caused by CCl₄, but those methanol extracts did not affect histopathological changes of the liver as water extract. The data suggest that intake of *C. lanceolata* extracts would prevent lipid accumulation and hepatotoxicity induced by high fat diet and CCl₄ administration, and the water extract of *C. lanceolata* is supposed to be more effective than those methanol extract.

Key Words: Carbon tetrachloride (CCl₄), High fat diet, Hepatotoxicity, *Codonopsis lanceolata*

서 론

산업화에 따른 각종 생산활동이 활발해짐에 따라 인체의 건강을 위협하는 공해물질들에 노출되는 기회가 많아지게 되고, 이에 따른 각종 질병이 날로 증가되는 추세에 있다. 사염화탄소는 유지, 고무, 수지의 용제 등에 이용되어 산업 현장에서 쉽게 노출되는 환경공해물질의 하나로서 (Calabrese, 1980), 생체에 폭로될 경우 CCl₃·로 전환되어 세포의 손상을 일으키는 대표적인 간 독소이다 (Recknagel et al., 1973). 공해물질의 독성발현은 생체 내 영양상태가 상당한 영향을 미치는 것으로 보고되고 있어 (Campbell et al., 1948) 식생활 양상의 변화가 환경공해물질의 생체 내 독성 발현에 미치는 영향은 심대할 것으로 생각된다. 더덕은 독특한 맛과 향으로 인해 예로부터 식용되어 왔다. 더덕에는 triterpenoid계 사포닌과 당질, 섬유소 등이 함유되어 있으며, squalene, spinasterol, sti-

gmasterol, oleanolic acid, albigenic acid 등이 단리되었다 (Chung et al., 1977). 더덕은 적혈구 및 헤모글로빈을 증가시키며, 항피로작용과 혈압강하, 항균 및 항바이러스작용을 갖는 것으로 알려져 있으며 (Chung et al., 1988), *in vitro* 상태에서 더덕의 에탄올 추출물이 항산화효과를 나타내어 과산화물의 생성을 억제시킨다고 하였다 (Maeng & Park, 1991). 그리고 한방에서는 혈 중 콜레스테롤과 지질의 함량을 감소시키며, 폐열을 없애고 진해거담작용이 있다고 하였다 (Moon, 1984).

따라서 본 실험에서는 민간과 한방에서 널리 사용되고 있는 더덕이 간 손상의 예방과 치료 및 간 내 지질함량에 어떠한 영향을 미치는지 검토하기 위하여, 식이의 지방수준을 달리하여 사육한 흰쥐에 간 독소인 사염화탄소를 투여하면서 동시에 지속적으로 더덕의 추출물을 투여하여 간 손상 지표효소의 활성변동과 간 내 지질의 함량변동에 따른 조직의 변화양상을 관찰하여 상호 비교하였다.

재료 및 방법

1. 더덕추출물의 조제

실험에 사용한 더덕은 경남 울주군 소재 농가에서 구입하여 풍건·분쇄하여 시료로 사용하였다. 물 추출물은 분쇄한 더

*논문 접수: 2004년 7월 7일

수정제 접수: 2004년 11월 3일

†교신저자: 조현국, (우) 730-852 경북 구미시 산동면 인덕리 55번지, 경운대학교 안경광학과

Tel: 054-479-1333, Fax: 054-479-1333

e-mail: hgcho@ikw.ac.kr

덕분말 100 g에 10배량의 증류수를 가한 다음, 40°C 수욕상에서 24시간 진탕·추출하였다. 이 추출액을 여과하고 여액은 감압농축하여 동결건조 후 시료로 사용하였다. 메탄올 추출물은 분쇄한 더덕분말 100 g에 5배량의 메탄올을 가하여 6시간씩 3~4회 추출하고 전액을 여과한 후 40°C 수욕상에서 감압농축하였다.

2. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 Sprague-Dawley종의 수컷 흰쥐를 10일간 기본식으로 적응시킨 후, 평균체중이 110±10 g 인 것을 난괴법에 의하여 각 군당 6마리씩으로 하여 한 마리씩 분리하여 6주간 사육하였다. 사육실 온도는 18±2°C로 유지하였으며, 조명은 12시간 주기로 조절하였다. 실험에 사용한 기본식은 AIN-76 식이조성에 준하였으며 (Report of the American Institute, 1976), 단백질 급원으로는 casein (Wako Co., Japan), 탄수화물 급원으로는 옥수수 전분 (두산, 한국), 그리고 지방 급원으로는 옥수수기름 (동방유량, 한국)을 사용하였다.

고지방식이는 식이 내 전분량을 줄이고 lard를 첨가하여 식이지방이 총열량의 29.7%가 되도록 하였고, 중지방식이는 11.7%, 저지방식이는 식이 내 corn oil의 양을 줄여 식이지방이 총열량의 3.7%가 되도록 공급하였다. 각 식이의 단위 당 열량은 고지방식이의 경우 4.31 kcal/g diet, 중지방식이는 3.85 kcal/g diet, 그리고 저지방식이의 경우 3.68 kcal/g diet가 되도록 하였다.

더덕추출물은 흰쥐 체중 100 g당 더덕 0.15 g씩 매일 일정 시간에 경구투여하였고, 사염화탄소는 체중 100 g당 0.12 ml를 1회 경구투여하였으며, 사육 기간 중 총 6회 투여하였다.

3. 간 무게의 측정

6주간 사육한 흰쥐를 12시간 절식시킨 후 에테르 마취 하에 복부정중선을 따라 개복하고, 배대동맥으로부터 채혈하였다. 간 중량은 채혈 직후 병냉의 0.25 M sucrose 용액으로 관류하여 적출하고, 생리식염수로 세척한 다음 수분을 제거하고 무게를 측정하였다. 단위는 체중 100 g당 간 무게로 표시하였다.

4. 혈청 중 ALT, AST 그리고 ALP의 활성도 측정

혈청 중의 alanine aminotransferase (ALT) 및 aspartate aminotransferase (AST)의 활성도는 Reitman과 Frankel의 방법 (1957)에 준하여 조제된 kit (Eiken Co)를 사용하였다. ALT, AST 각각의 기질액 1.0 ml에 혈청 0.2 ml를 첨가하고 37°C에서 ALT는 30분, AST는 60분간 반응시킨 후, 발색시약 1.0 ml를 첨가하고 파장 505 nm에서 흡광도를 측정한 다음 그 활성을 혈청 ml당 Karmen unit (Karmen, 1955)로 나타내었다. Alkaline phosphatase (ALP)의 활성도 측정은 Kind-King의 방법 (1954)

에 준하여 조제된 kit (Eiken Co)를 사용하였다. ALP 기질 완충액 2.0 ml에 혈청 0.05 ml를 첨가하여 15분간 37°C에서 반응시키고, 정색시약 2.0 ml를 첨가한 다음 파장 570 nm에서 흡광도를 측정하고, 혈청 1 ml가 37°C에서 30분간 1 nM의 p-nitrophenol을 생성시키는 King-Amstrong unit (Tietz, 1959)로 나타내었다.

5. 간 조직 중의 지질함량 측정

간 조직 1 g을 0.15 M sodium chloride를 첨가하여 10% 조지마쇄액을 조제한 다음, Folch 등의 방법 (1975)에 준하여 chloroform:methanol (C:M=2:1) 혼합액으로 지질을 추출하여 총지질성분을 정량하였다. 총지질의 함량은 Frings와 Dunn의 방법 (1959)에 준하여 C:M 추출액 0.5 ml를 휘발시킨 후 황산 2.0 ml를 넣고 혼합하여 냉각시키고, 그 중 0.1 ml를 취하여 phosphovaniline 용액 5.0 ml를 넣어 잘 섞은 다음, 37°C에서 15분간 가온한 후 실온에서 냉각시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하고 그 함량을 산출하였다.

6. 간 조직의 병리조직학적 변화관찰

간 조직을 적당한 크기로 잘라 10% neutral buffered formalin에 고정시킨 다음 흐르는 물에 수세하고, 알코올에 담가 그 농도를 단계적으로 증가시켜 탈수시켰다. 탈수가 끝난 조직을 파라핀으로 포매한 다음, 박절기 (Lipshaw Model-45)를 이용하여 4 μm 두께의 조직절편을 제작하고, hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 광학현미경 (BH-2, Olympus)으로 관찰하였다.

7. 통계처리

실험성적은 SAS 통계프로그램을 이용하여 실험군 당 평균±표준편차로 표시하였고, 각 군간의 평균치의 통계적 유의성은 α=0.05 수준에서 Duncan's multiple test (Snedecor, 1967)에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 간 무게의 변화

실험식이에 따른 간 무게의 변동은 Fig. 1과 같다. 간 무게는 사염화탄소 투여로 인해 대조군보다 현저히 증가되었다. 사염화탄소 투여로 인해 증가된 간 무게는 더덕 물추출물과 메탄올추출물을 병행투여함으로써 식이 내 지방함량에 관계없이 모두 감소되었다. 특히 중지방식이군의 경우, 사염화탄소와 더덕 물추출물 병행투여군에서는 사염화탄소 단독 투여군과 비교하여 간 무게가 유의적으로 감소되었다.

고지방식이군에서 간 무게의 증가율은 가장 높았고 더덕

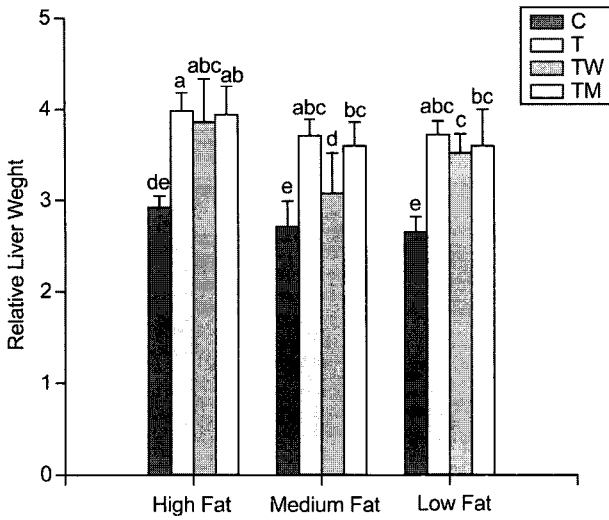


Fig. 1. Effect of *Codonopsis lanceolata* extracts on the relative liver weight in rats. Each bar is expressed as mean±SD (n=6). Values followed by the same letter are not significantly different ($P<0.05$). C: Control group. T: Carbon tetrachloride treated group. TW: Carbon tetrachloride+*Codonopsis lanceolata* water extract treated group. TM: Carbon tetrachloride+*Codonopsis lanceolata* methanol extract treated group.

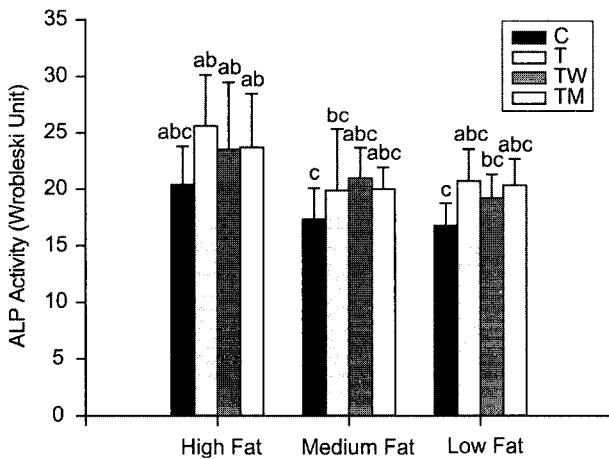


Fig. 3. Effect of *Codonopsis lanceolata* extracts on the serum ALP activity in rats. Each bar is expressed as mean±SD (n=6). Values followed by the same letter are not significantly different ($P<0.05$). C: Control group. T: Carbon tetrachloride treated group. TW: Carbon tetrachloride+*Codonopsis lanceolata* water extract treated group. TM: Carbon tetrachloride+*Codonopsis lanceolata* methanol extract treated group.

추출물에 의한 간 무게 감소효과는 가장 낮게 나타나, 과잉의 지방섭취에 의한 세포 내 지방침착뿐만 아니라 사염화탄소 독성에 의한 소포체 막의 과산화지질 형성에 따른 중성지질 축적에 의한 결과로 사료된다. (Ashworth et al., 1963; Ohta et al., 1992). 그리고 간세포 내 지방의 침착도가 증가될수록 사염화탄소에 대한 대사기능이 약해지는 것으로 판단되었다.

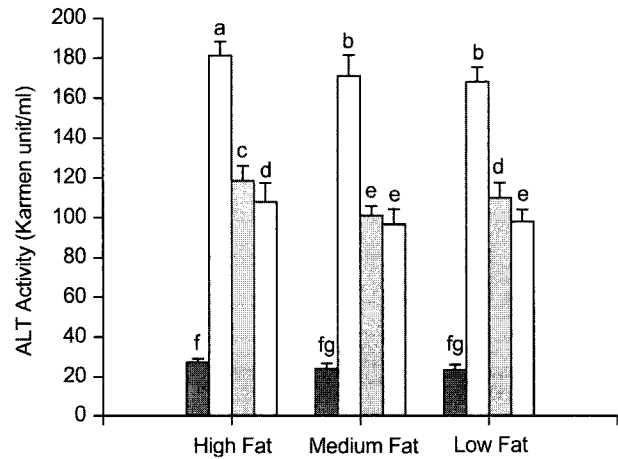
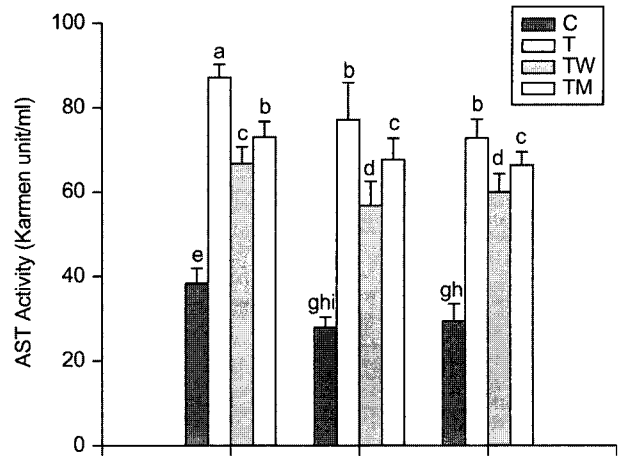


Fig. 2. Effect of *Codonopsis lanceolata* extracts on the serum AST and ALT activities in rats. Each bar is expressed as mean±SD (n=6). Values followed by the same letter are not significantly different ($P<0.05$). C: Control group. T: Carbon tetrachloride treated group. TW: Carbon tetrachloride+*Codonopsis lanceolata* water extract treated group. TM: Carbon tetrachloride+*Codonopsis lanceolata* methanol extract treated group.

2. 혈청 중 ALT, AST, 그리고 ALP의 활성화도 변화

식이 중 지방의 수준을 달리하면서 사염화탄소와 더덕 추출물을 투여하여 사육한 흰쥐의 혈청 AST와 ALT의 활성화변동을 나타낸 것은 Fig. 2와 같다. 지방수준에 따른 혈청 AST의 활성화는 고지방식이군에서 가장 높았고, 중지방식이군과 저지방식이군은 비슷한 수준을 보였다. 식이 내 지방의 수준에 관계없이 사염화탄소 단독 투여군에서 대조군과 비교하여 혈청 AST 활성이 모두 유의적으로 증가되었으며, 더덕 추출물을 사염화탄소와 병행 투여한 경우 사염화탄소 단독 투여군과 비교하여 AST 활성은 유의하게 감소되었으나, 더덕의 효과는 물추출물이 메탄올추출물보다 더 큰 것으로 나타났다.

고지방식이군의 경우 중지방식이군과 저지방식이군과 비교하여 ALT의 활성은 약간 높았다. 사염화탄소의 투여는 혈청 ALT의 활성을 현저히 증가시켰으며, 사염화탄소 투여에 의해 증가된 ALT 활성은 더덕 추출물을 병행 투여한 경우 모

두 유의적으로 감소되었다.

고지방식이군에서 AST와 ALT의 활성이 증가된 것은 lard 섭취로 인해 간에 지방이 축적되고 사염화탄소에 의한 소포체의 손상 (Pasquali-Ronchetti et al., 1980; Plaa, 1984), 그리고 세포막의 투과성 변화에 따른 세포팽창과 괴사에 의한 것으로써 (Ashworth et al., 1963; Ohta et al., 1992), 조직병리학적 변화결과가 이를 뒷받침해 주고 있다. 반면 Fig. 3에서와 같이 ALP의 활성이 유의적으로 증가되지 않은 것은 지방의 과다 섭취 조건과 사염화탄소의 투여가 간 담도계의 손상에는 크게 영향을 미치지 않은 것으로써, 조직병리학적 결과에서도 문맥 부분의 손상은 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 보아 더덕의 추출성분이 세포 내 막성기관의 지질과산화물 방지를 하는 효능이 있을 것으로 추측되었다.

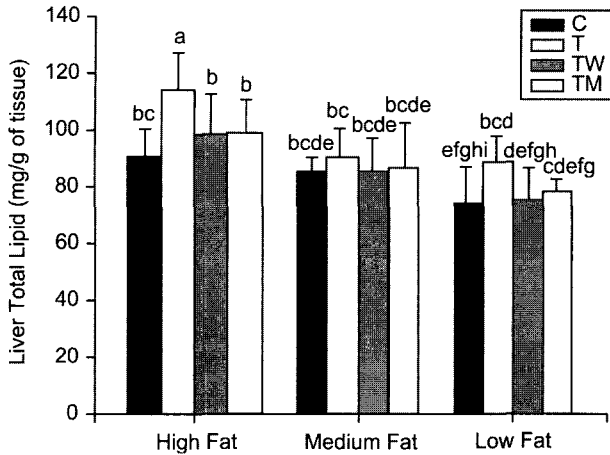


Fig. 4. Effect of *Codonopsis lanceolata* extracts on the liver total lipid in rats. Each bar is expressed as mean±SD (n=6). Values followed by the same letter are not significantly different ($P<0.05$). C: Control group. T: Carbon tetrachloride treated group. TW: Carbon tetrachloride+*Codonopsis lanceolata* water extract treated group. TM: Carbon tetrachloride+*Codonopsis lanceolata* methanol extract treated group.

3. 간 조직 중의 총지질 함량 변화

식이 내 지방의 수준을 달리하여 사육한 흰쥐의 간 총지질의 함량변동 결과는 Fig. 4와 같다. 간의 총 지질함량은 고지방식이군에서 가장 높았고, 사염화탄소 단독투여군의 경우 고지방식이군이 중지방식이군과 저지방식이군과 비교하여 총 지질함량이 유의적으로 증가되어 간세포 내 지방의 축적은 사염화탄소에 의한 손상을 가중시키는 것으로 판단되었다.

고지방식이군의 경우 사염화탄소와 더덕 추출물을 병행

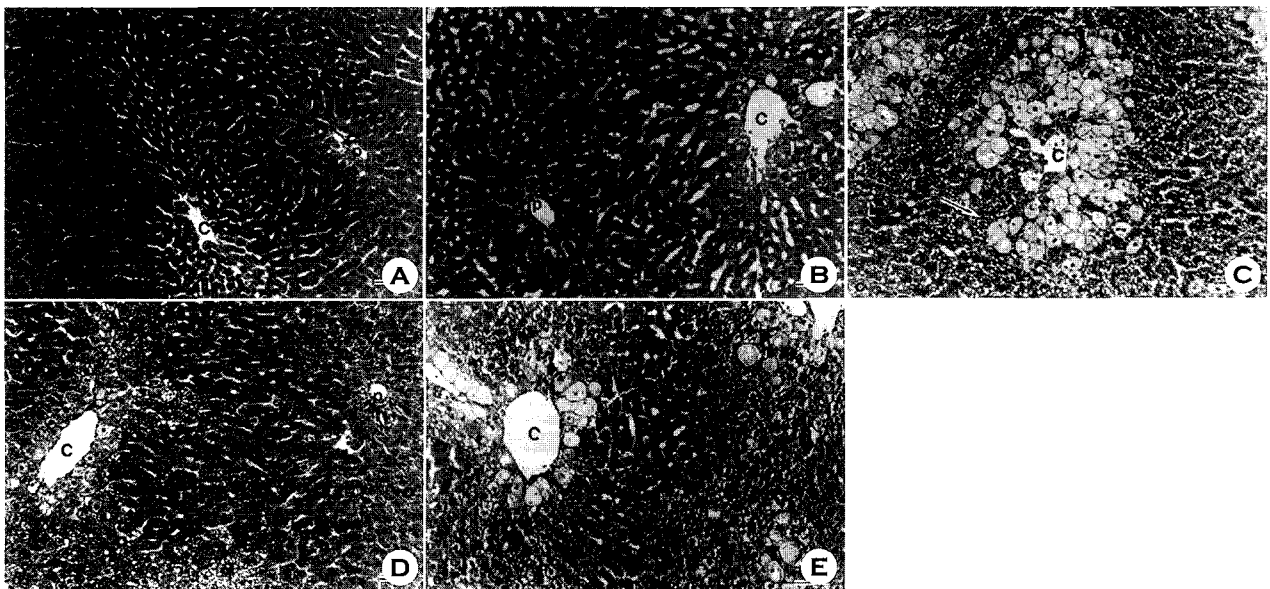


Fig. 5. Micrographs of rat liver tissues stained with H & E method. **A)** Normal: The structure of hepatic lobule was intact. **B)** High fat-fed: Some hepatocytes were swollen in central zone. **C)** CCl_4 +high fat-fed: Centrilobular necrosis was seen in central and mid zones with infiltration of inflammatory cells and fatty degeneration in peripheral zone. An arrow indicates inflammatory cell. **D)** CCl_4 +high fat-fed with *Codonopsis lanceolata* water extracts: Hepatic necrosis was rarely found in central zone, however fatty degeneration was seen in mid zone. **E)** CCl_4 +high fat-fed with *Codonopsis lanceolata* methanol extracts: Necrosis and fatty degeneration of hepatocytes was seen in central and mid zones and infiltration of inflammatory cells in necrotic area. C: central vein, P: portal vein, Scale bar in all figures is 100 μm .

투여함으로써 총 지질의 함량은 유의적으로 감소되었다. 사염화탄소를 투여하였을 경우 간의 총 지질함량이 현저히 증가된 것은 리보솜이 손상되고, 소포체 낭에 지단백이 축적됨으로 인해 트리글리세리드와 결합될 단백질 합성이 억제된 결과로 보여진다 (Pasquali-Ronchetti et al., 1980; Cheville, 1983).

그리고 사염화탄소의 투여로 증가된 간의 총 지질함량은 더덕 추출물을 병행 투여함으로써 감소되어, 더덕 추출물이 사염화탄소에 의한 간 손상으로부터 어느 정도 간을 보호하는 효능이 있을 것으로 생각되었다.

4. 간의 조직병리학적 변화

전체 실험군 중 사염화탄소에 의한 손상정도와 더덕추출물에 대한 효과가 가장 뚜렷한 고지방식이군을 대상으로 설명하였다. 사염화탄소의 투여로 발생하는 조직병리학적 소견은 중심대의 괴사와 조직 전반에 걸친 세포질 내 공포화 현상, 그리고 염증세포의 침윤으로 나타났다 (Leduc, 1973).

고지방식이 대조군은 중심정맥 주변부 세포들의 종창이 관찰되나, 간세포삭은 잘 배열되어 있었다 (Fig. 5b). 고지방식이의 사염화탄소 투여군은 중심정맥을 중심으로 중심대로부터 중간대에 이르기까지 세포괴사가 관찰되었으며, 국소적 염증세포의 침윤과 지방변성에 기인한 것으로 보이는 중간대, 주변대에 이르는 공포화 현상이 관찰되었다 (Fig. 5c). 고지방식이군의 사염화탄소와 더덕 추출물 병행투여군에서는 고지방식이의 사염화탄소 투여군과 비교하여 볼 때, 조직 손상의 정도가 현저히 감소되었다. 중심대의 괴사는 단지 중심정맥과 인접한 일부 세포에서만 발견될 뿐이며, 공포화 현상도 주변대에서는 발견되지 않았다 (Fig. 5d). 그러나 고지방식이군의 사염화탄소와 더덕 메탄올추출물 병행투여군에서는 중심대의 괴사현상이 여전히 존재하였고, 염증세포의 침윤과 간세포삭의 비후현상도 관찰되지만 중간대에 이르던 괴사현상은 가역적 손상인 세포종창으로 나타났으며, 공포화현상이 많이 감소된 형태로 관찰되었다 (Fig. 5e).

결과에 설명하지 않았으나 지방함량만 달리한 고지방식이 대조군, 중지방식이 대조군, 저지방식이 대조군간의 조직학적 차이는 없었고, 사염화탄소에 의한 간 조직의 손상정도는 고지방식이의 사염화탄소 투여군에서 괴사영역이 가장 넓게 분포되어 나타났으며, 세포 내 작은 공포가 조직 전반에 걸쳐 나타났다. 더덕 추출물과 사염화탄소를 병행투여한 군은 사염화탄소 단독투여군에서 나타났던 괴사현상과 염증세포의 침윤이 거의 관찰되지 않았으나, 메탄올추출물 병행투여군에서는 사염화탄소 단독투여군과 비교하여 손상의 범위와 정도는 감소되었지만 병리조직학적 차이는 인정되지 않아, 추출물의 효능이 메탄올 추출물보다 더 좋은 것

로 판단되었다.

REFERENCES

- Ashworth CT, Luibel FJ, Arnold SN. Hepatic cell degeneration-correlation of fine structural with chemical and histochemical changes in hepatic cell injury produced by carbon tetrachloride in rats. *Arch Pathol.* 1963. 75: 212-225.
- Calabrese EJ. Nutrition and environmental health; the influence of nutritional status on pollutant toxicity and carcinogenicity. 1980. pp. 555-557. Wiley. NY, USA.
- Campbell RM, Kosterlitz HW. The effects of short term changes in dietary proteins on the response of the liver to carbon tetrachloride. *Brit J Exp Pathol.* 1948. 29: 149-154.
- Cheville NF. Cell Pathology. 1983. p. 100. The Iowa State University Press. USA.
- Chung BS, Lah DS. Studies on the terpenoid component of the roots of *Codonopsis lanceolata*. *Natural Product Sci.* 1977. 8: 49-52.
- Chung BS, Shin MK. *Dohachyangyak Daesajeon.* 1988. p. 1086. Youngrimsa. Seoul, Korea.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J Biochem.* 1975. 226: 497-509.
- Frings CS, Dunn RT. A colorimetric method for determinations of total serum lipid based on the sulfophosphovanilin reactions. *Am J Clin Pathol.* 1970. 53: 89-91.
- Karmen A. A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest.* 1955. 34: 131-133.
- Kind RN, King ET. Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolyzed with amino antipyrine. *J Clin Pathol.* 1954. 7: 322-326.
- Leduc EH. Sulfaguanidine protection of mouse liver from carbon tetrachloride-induced necrosis. *Lab Invest.* 1970. 29: 186-191.
- Lee JJ, Han IK, Choi YJ. Effect of dietary lipid sources and meal frequency on growing performance and lipid metabolism in rats. *Kor J Nutr.* 1993. 26: 119-123.
- Maeng YS, Park HJ. Antioxidant activity of ethanol extract from Doduk (*Codonopsis lanceolata*). *Kor J Food Sci Technol.* 1991. 23: 311-316.
- Moon KS. Utilization and compounds of medical herbs. 1999. p. 697. Ilweolseogak. Seoul, Korea.
- Ohta S, Sakurai N, Kamogawa A. Protective effects of the Bark of *Myrica SIEB et Zucc.* on experimental liver injuries. *Yaku-*

- gaku Zasshi. 1992. 112: 244-252.
- Pasquali-Ronchetti I, Bini A, Botti B, De Alojsio G, Fornieri C, Vannini V. Ultrastructural and biochemical changes induced by progressive lipid peroxidation on isolated microsomes and rat liver endoplasmic reticulum. *Lab Invest.* 1980. 42: 457-463.
- Plaa GL. *Systemic toxicology.* 1984. p. 211. Raven Press. NY, USA.
- Recknagel RO, Glende EA. An example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1973. 2: 263-265.
- Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol.* 1957. 28: 56-63.
- Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr.* 1976. 107: 1340-1341.
- Sendecor GW, Cochran WG *Statistical methods.* 1967. Iowa State University Press. Iowa, USA.
- Tietz NW. *Fundamentals of clinical chemistry.* 1959. p. 606. W.B. Saunders. Philadelphia, USA.