J Korean Soc Food Sci Nutr
35(10), 1349~1355(2006)

장수풍뎅이 유충 추출물이 사염화탄소에 의한 마우스의 간 손상에 미치는 영향

최용화[1] · 이기열[2] · 양경미[3] · 정윤미[4] · 서정숙[4†]

[1]상주대학교 식물자원학과, [2]충청북도 농업기술원
[3]대구한의대학교 한방식품조리영양학부, [4]영남대학교 식품영양학과

Effect of Larva Extract of *Allomyrina dichotoma* on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Mice

Yong-Hwa Choi[1], Kiyeol Lee[2], Kyung Mi Yang[3], Yun-Mi Jeong[4] and Jung-Sook Seo[4†]

[1]Dept. of Plant Resources, Sangju National University, Gyeongbuk 742-711, Korea
[2]Chungbuk Agricultural Research and Extension Services, Cheongwon 363-880, Korea
[3]Faculty of Herbal Food Cooking & Nutrition, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea
[4]Dept. of Food & Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of methanol extract of *Allomyrina dichotoma* larva (MEAL) on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced hepatotoxicity in mice. ICR mice were divided into 5 groups [Vehicle control, CCl_4 (10 μg/g) alone, CCl_4 plus a low dose (50 μg/g) of MEAL, CCl_4 plus a high dose (100 μg/g) of MEAL]. Silymarin (2 μg/g) was used as the reference in the experiment. Administration of MEAL tended to decrease the serum alanine transaminase (ALT) activity induced by CCl_4 treatment in mice. Hepatic concentration of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in a high-dose group of diet decreased to the level of silymarin-treated group. Hepatic activity of glutathione S-transferase in MEAL-treated group was lower than that of CCl_4-treated group. Serum concentration of bilirubin was significantly increased by CCl_4 treatment, but MEAL or silymarin recovered the level. These results suggest that MEAL may exert the protective effect against CCl_4-induced hepatotoxicity in mice. However, more intensive studies would be needed to elucidate the protective mechanism of the beetle on hepatotoxicity of mice.

Key words: *Allomyrina dichotoma*, larva, carbon tetrachloride, hepatotoxicity, mice

서 론

현대 산업사회에서 크게 증가되고 있는 환경 오염물질과 약물 남용은 그 대사과정에서 생성되는 독성물질로 인해 간 기능의 손상을 유발하는 주된 원인으로 지적되고 있다(1). 우리나라 사람의 사망 원인 중 만성질환인 암이 가장 높은 비율을 차지하고 있는데, 이 중 간암의 발병율도 매우 높은 것으로 나타났다(2). 또한 만성적인 간 질환과 간경변증에 의한 사망이 높은 비율을 차지한다는 사실을 감안하면 우리나라 사람들의 만성질환 유병율을 저하시키기 위해 간 질환의 예방이 매우 중요함을 알 수 있다.

간세포를 비롯하여 생체조직이 손상되는 주된 원인은 산소 유리기(oxygen free radicals)에 의한 지질과산화 반응의 결과로 생성된 물질이 단백질이나 염색체, 적혈구 등에 이상을 초래하여 세포기능을 저하시키거나 괴사를 일으키기 때문인 것으로 보고되었다(3). 이러한 유리기는 정상적인 생리조건 하에서 일어나는 생물학적 반응 이외에도 고농도의 산소 투여, 에탄올, 클로르포름, 사염화탄소 등의 xenobiotics에 의하여 생성되며, 그 결과 생체조직에 심각한 독성을 초래하게 된다(4).

그러나 생체는 유리기의 공격을 방어하는 체내 유리기 포획체계(free radical scavenging system)를 통하여 여러 가지 손상으로부터 보호를 받고 있다. 이러한 작용은 주로 superoxide dismutase, glutathione S-transferase(GST), catalase 등의 항산화효소계와 비타민 C와 E 등의 항산화영양소 그리고 polyphenol류 등의 생리활성물질에 의해서 이루어지는 것으로 알려져 왔다(5). 그러나 어떠한 원인에 의해 유리기 생성계(free radical-generating system)와 포획계 사이의 불균형이 초래될 때 생체조직은 손상을 받게 된다.

최근 신약 개발과 관련하여 천연자원의 생리기능에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 간독성을 완화시킬 수 있는 생리활성 성분의 탐색과 개발에 대한 연구가 활성화되

†Corresponding author. E-mail: jsseo@yu.ac.kr
Phone: 82-53-810-2875, Fax: 82-53-815-2874

고 있다. 예로부터 곤충은 한약재로 자주 이용되어 왔으며 주로 굼벵이, 누에, 매미허물, 동충하초, 지네 등 약 30여종이 유용한 곤충자원으로 이용되고 있다(6). 그 중 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*)의 애벌레인 굼벵이가 간 질환에 효과가 있다는 민간요법이 알려지면서 이를 건강보조용 약재로 이용하는 경향이 증가되고 있다. 또한 장수풍뎅이에서 분리한 단백질이 세균에 대해 강한 활성 억제를 보이며(7), 장수풍뎅이에서 추출한 렉틴은 강력한 사이토카인 생성능을 보여 항암효과를 기대할 수 있다고 보고되었다(8).

그러나 장수풍뎅이나 그 유충이 민간요법에서 널리 이용되는데 비해 이의 생리기능성에 대한 연구자료는 매우 미흡한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 간 손상을 완화시킬 수 있는 생리활성물질의 탐색과 개발을 위한 연구의 일환으로 장수풍뎅이 유충 메탄올추출물(methanol extract of *A. dichotoma* larva, MEAL)이 간 기능에 미치는 영향을 검토하고자 사염화탄소로 간 손상을 유발한 마우스에 있어서 간 기능 관련 효소활성도, 과산화지질 함량 및 관련 효소 활성과 간 조직의 형태학적 관찰을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 사육

본 실험에 사용된 실험동물은 체중이 30~34 g인 ICR계 수컷 마우스[(주)오리엔트바이오, 경기도 가평] 50마리로서 일반 고형사료(삼양사료, 경기도 이천)와 식수를 제한 없이 공급하면서 1주일간 사육 환경에 적응시켰다. 그런 다음 난괴법에 따라 각 군별로 10마리씩 분류하여 본 실험에 사용하였으며, 매주 일정 시간에 체중과 식이섭취량을 측정하였다. 실험동물은 온도(20~25°C), 상대습도(55±1%) 및 명암주기(08:00~20:00)가 조절되는 환경에서 사육하였다.

장수풍뎅이 유충 추출물의 조제

장수풍뎅이 유충 40마리를 -70°C의 deep freezer에서 24시간 냉동시킨 후 freeze dryer에서 3일간 건조시켜 건체중 129 g을 얻었다. 건조된 유충을 절단하여 체내에 가지고 있던 배설물, 이물질, 내장을 포함한 섭취물 분획과 유충 표피 분획으로 구분하였다. 이 중에서 유충 표피 분획만을 분쇄하여 분석시료를 조제하였다.

메탄올 추출물은 조제한 시료 25 g을 평칭하여 메탄올 250 mL를 가하여, 85°C 환류추출기에서 3시간 동안 2회 추출하고 evaporator에서 농축하여 최종시료(MEAL)를 얻었다. 장수풍뎅이 유충 추출물의 수율은 건조체중 기준으로 11.6%였다.

간 손상 유발 및 유충 추출물 투여

급성 간 손상의 유도는 Table 1에서와 같이 olive oil로 희석시킨 50% 사염화탄소 용액을 사용하였으며, 투여량은 선행연구들(9,10)을 참조하여 예비실험을 거친 후, 최종적으로 마우스 체중 g당 10 μg로 조정하여 복강 내로 투여하였다. 정상 대조군은 olive oil 용액만을 복강 내로 투여하였다. 장수풍뎅이 유충 추출물은 증류수로 1.0% 용액으로 용해시킨 다음 저용량(체중 g당 50 μg) 또는 고용량(100 μg)으로 경구투여하였다. 정상 대조군과 사염화탄소 단독투여군에는 0.9% 생리식염수를 같은 방법으로 투여하였다. 또한 장수풍뎅이 유충 추출물의 간 보호 효과를 비교하기 위한 기준으로 간 손상 치료제인 silymarin을 0.025%가 되도록 증류수로 희석시킨 후 체중 g당 2 μg을 공급하였다.

Table 1. Experimental design

Treatment (μg/g BW)	CCl_4	MEAL	Silymarin
Vehicle control	-	-	-
CCl_4 (10) alone	+	-	-
CCl_4+MEAL (50)	+	+	-
CCl_4+MEAL (100)	+	+	-
CCl_4+silymarin (2)	+	-	+

MEAL: methanol extract of *Allomyrina dichotoma* larva.

장수풍뎅이 유충 추출물의 투여는 사염화탄소를 복강 내로 주사한 3시간 후에 이루어졌으며, 사염화탄소 투여 후 24시간이 지나서 마우스를 희생시켜 분석용 시료를 준비하였다.

시료 준비

12시간 절식시킨 실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부정중선을 따라 개복한 후 하대정맥으로부터 혈액을 채취하고 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 혈청을 시료로 사용하였다. 혈청을 이용하여 간 손상지표 효소인 aspartate transaminase(AST), alanine transaminase(ALT) 활성과 빌리루빈(bilirubin) 함량을 측정하였다. 간 조직은 1.15% KCl 완충용액으로 관류시킨 다음 적출하여 KCl 완충용액으로 여러 번 씻은 후, 여지로 압박하여 간에 남아있는 혈액 및 완충용액을 제거한 후 칭량하였다. 그런 다음 간 조직 일부를 취해서 1.15% KCl 완충용액을 가하여 빙냉 하에서 조직균질기로 마쇄하였다. 이 마쇄 균질액을 600×*g*에서 10분, 10,000×*g*에서 20분 동안 원심분리하고 105,000×*g*에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 및 microsome 분획을 얻었다. Microsome 분획에서는 지질과산화물 함량을 측정하였고, cytosol 분획에서는 GST 활성도를 측정하였다. 모든 시료는 분석하기 전까지 -70°C에서 보관하였다.

혈액생화학 분석

간세포 손상의 지표로서 ALT와 AST 활성을, 담즙정체의 지표로서 bilirubin을 측정하였다. ALT와 AST 활성은 Reitman과 Frankel의 방법(11)에 준하여 조제된 kit(아산제약, 화성, 경기도)를 사용하여 측정하였으며, 활성은 Karmen unit로 나타내었다(12). 혈청 내 빌리루빈 함량은 kit(영동제약, 용인, 경기도)을 사용하여 측정하였다. 즉 빌리루빈 발색시약 3.0 mL에 디아조 시약을 가하여 혈청 0.2 mL를 잘 혼합한 다음 실온에서 20분간 방치한 후 535 nm에서 흡광도를

측정하여 그 함량을 구하였다.

간조직의 지질과산화물 함량 측정

간 microsome 내 지질과산화물 함량은 TBA와 반응하여 생성된 malondialdehyde(MDA)의 양으로 측정하였다(13). 즉, microsome 균질액 0.1 mL를 취해서 8.1% sodium dodecylsulfate(SDS) 용액 0.2 mL, 20% acetic acid 완충용액(pH 3.5) 1.5 mL, 0.8% TBA 용액 1.5 mL 그리고 증류수 0.6 mL를 가한 다음 95°C의 항온수조에서 60분간 반응하여 발색시켰다. 그런 다음 흐르는 수돗물에서 재빨리 냉각시키고 증류수 1.0 mL, butanol과 pyridine(15:1, v/v)의 혼합액 5.0 mL를 첨가하여 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 butanol 층을 취하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준액으로 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하여 시료 내의 MDA 생성량을 계산하였다.

간조직의 GST 활성 측정

간 cytosol의 GST 활성은 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)을 기질로 사용한 Habig 등의 방법(14)에 따라 측정하였다. 즉 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5)로 희석시킨 간 cytosol 부유용액을 25°C에서 2분간 방치시킨 후 1.0 mM의 CDNB과 1.0 mM의 reduced gluthionine(GSH)을 가하여 340 nm에서 15초 간격으로 60초 동안 흡광도를 측정하였다. 효소 활성도는 340 nm에서 공액된 CDNB의 millimolar extinction coefficient를 9.6으로 계산하였으며, 효소의 활성은 단백질 mg 당 1분간 공액된 CDNB의 nmole로 표기하였다.

단백질 함량 측정

단백질 함량은 Lowry 방법(15)에 따라 분석하였으며, 표준액으로 bovine serum albumin을 사용하여 만든 표준검량선을 이용하여 계산하였다.

간조직의 형태학적 관찰

마우스의 간 적출 즉시 일정한 조직을 적출하여 10% neutral buffered formalin에 담가 고정시켰다. 고정이 끝난 조직을 흐르는 물에 수세하고 알코올에 담가 순차적으로 농도를 증가시키면서 탈수시킨 후 toluene으로 투명화시킨 다음, 파라핀을 침투시키고 포매하였다. 포매된 조직을 박절기(Lipshow model-45, Diversified Equipment Com., Lockport, USA)를 이용하여 4 μm 두께로 박절한 다음 hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 광학현미경(Olympus BH-2, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

자료 처리 및 분석

모든 실험결과는 SPSS 통계 package(version 10.0)를 사용하여 분석하였으며, 평균과 표준오차로 나타내었다. 실험결과는 ANOVA 분석 후 Duncan's multiple-range test에 의해 α=0.05 수준에서 각 실험군의 평균치의 통계적 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

혈청 내 AST와 ALT 활성

혈청 내 AST 활성은 정상 대조군에 비해서 사염화탄소 단독투여군에서는 유의적으로 높은 활성을 보임으로써 사염화탄소에 의한 간 손상이 일어난 것으로 나타났다. 그러나 장수풍뎅이 유충 추출물이나 silymarin 공급에 의한 효과는 관찰되지 않았다. 혈청 ALT 활성은 사염화탄소 투여군에서 대조군에 비해 유의적으로 증가되었으나 메탄올 추출물을 고농도로 급여한 경우와 silymarin 공급에 의해 활성의 증가가 저하되는 효과가 나타났다(Table 2).

손상된 간으로부터 혈액에 방출된 간의 효소 활성은 간독성을 측정하는 매우 유용한 방법 중의 하나로서, 혈청 중 AST와 ALT 활성의 상승은 간 독성으로 인한 간세포의 파괴와 괴사가 진행됨에 따라 transaminases가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내게 되는 것이다(16,17). 따라서 사염화탄소의 처리 등 급성 간 손상이나 심한 바이러스성 감염, 독성물질에 의한 간 손상이 일어날 경우 혈중 AST와 ALT 활성은 크게 증가하게 된다.

Kang 등(6)은 만성적인 에탄올의 투여로 간 손상을 유도한 흰쥐의 혈청 GOT와 GPT 활성이 유의하게 증가하였으나 굼벵이 분말을 첨가한 식이를 급여한 흰쥐에서는 에탄올 단독투여군에 비해 이들 효소의 활성이 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. 이는 본 연구결과와 더불어 장수풍뎅이 유충 추출물의 투여가 손상된 간의 회복에 도움을 줄 수 있는 가능성을 시사하는 것이라고 여겨진다.

우리나라에서는 과거 오랫동안 약초나 생물체 등 천연자원을 경험적으로 질병 치료에 이용하여 왔으나 광범위하게 사용되어온 것에 비해 이러한 천연물의 정확한 약리작용이나 독성에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 또한 이러한 물질의 대사과정 중 생성되는 활성대사 중간체가 여러 종류의 환경오염 물질과 약물에 노출되어 있는 인체의 간에 독성을 유발할 수 있다. 따라서 장수풍뎅이 추출물의 투여량에 대한 보다 세분화된 연구가 이루어진다면 간 독성을 저하시

Table 2. Effect of MEAL on serum AST and ALT activities in CCl_4-treated mice (unit/mL)

Treatment (μg/g BW)	AST	ALT
Vehicle control	35.3±5.9[a]	11.2±2.8[a]
CCl_4 (10) alone	143.3±29.0[b]	150.6±21.3[c]
CCl_4+MEAL (50)	135.7±17.3[b]	146.3±21.6[c]
CCl_4+MEAL (100)	138.7±20.9[b]	111.0±24.0[b]
CCl_4+silymarin (2)	140.9±25.2[b]	99.4±13.4[b]

MEAL: methanol extract of *Allomyrina dichotoma* larva.
AST: aspartate transaminase. ALT: alanine transaminase.
Values are mean±SD, n=10.
Values with the same superscript letter within the column are not significantly different ($p<0.05$).

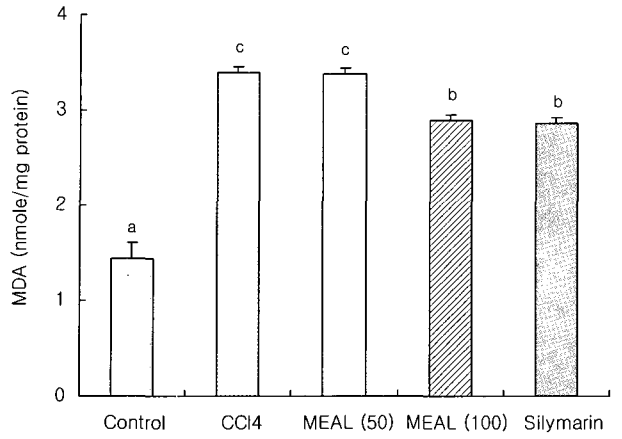

Fig. 1. Effect of MEAL on MDA concentrations in CCl_4-treated mice.
MEAL: methanol extract of *Allomyrina dichotoma* larva.
MDA: malondialdehyde.
Values are mean±SD, n=10.
Values with the same superscript letter are not significantly different ($p<0.05$).

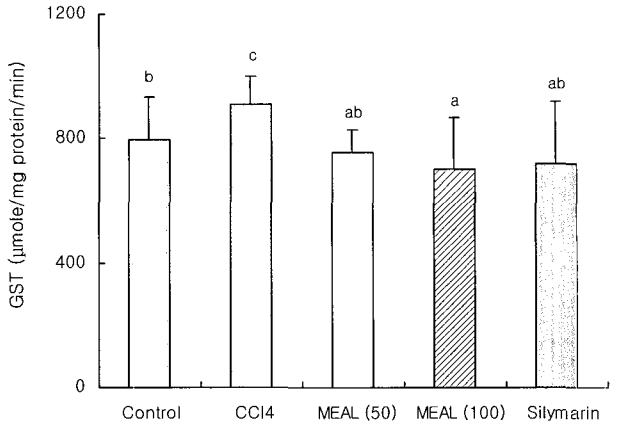

Fig. 2. Effect of MEAL on GST activity in CCl_4-treated mice.
MEAL: methanol extract of *Allomyrina dichotoma* larva.
GST: glutathione S-transferase.
Values are mean±SD, n=10.
Values with the same superscript letter are not significantly different ($p<0.05$).

킬 수 있는 천연자원의 개발에 유용한 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

간조직 내 지질과산화물 함량

장수풍뎅이 추출물이 마우스 간조직 중의 지질과산화물 함량에 미치는 영향은 Fig. 1과 같다. 지질과산화물 함량은 사염화탄소 단독투여군에서 대조군에 비해 약 2배 정도 현저하게 증가하였다. 장수풍뎅이 추출물과 silymarin을 공급시킨 군에서도 대조군에 비해서 지질과산화물 함량이 증가되었으나 사염화탄소만을 투여한 군에 비해서는 유의적으로 감소되는 경향이었다(Fig. 1).

사염화탄소는 간 손상을 유발하기 위해 널리 이용되는 실험적 모델로서(18), microsomal mixed-function oxidase에 의하여 trichloromethyl radical로 전환되어 이것이 endoplasmic reticulum 및 세포막과 같은 생체막의 과산화를 일으켜 간 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다(16). 따라서 trichloromethyl free radical 같은 사염화탄소 대사중간체는 지질과산화를 초래하고 생성된 지질과산화물이 생체막에 구조적인 변화를 일으켜 내부의 효소계가 파괴됨으로써 조직의 기능 장애를 유도하게 된다(19).

이와 같이 세포 손상을 유도하는 사염화탄소는 세포의 transaminases의 방출을 증가시키고 지질과산화물의 생성을 유도하는 것으로 알려져 있다(20). 지질과산화 반응은 손상된 간 독성 발생의 중요한 기전이므로(21) 본 실험의 결과를 통해 볼 때 장수풍뎅이 유충 추출물의 투여는 사염화탄소에 의해 유도되는 지질과산화물 생성을 완화시켜 간 손상을 억제하는 효과를 가지는 것으로 사료된다.

간조직 내 GST 활성

사염화탄소 투여군과 장수풍뎅이 유충 추출물의 급여에 의한 마우스 간조직의 glutathione S-transferase 활성 변화는 Fig. 2와 같다. Olive oil만을 투여한 정상 대조군에 비해서 사염화탄소 단독투여군은 GST 활성도가 높았으며 장수풍뎅이 추출물이나 silymarin을 투여시킨 군에서는 사염화탄소만을 투여한 군에 비해서 활성이 감소되는 것으로 나타났다.

간 cytosol 분획의 phase II 대사효소인 GST는 친전자 xenobiotics에 glutathione의 thiol기를 포함하는 반응 등 생체 내에서 다양한 기능을 가진 효소이다. GST는 독성물질의 세포 내 해독화 과정에 중요한 역할을 하므로(22), 생체 내에서는 GST의 포합작용과 수송작용에 의해 내인성 또는 외인성 독성화합물의 해독화 작용이 가능하게 된다(23). 또한 GST는 실험동물에서 사염화탄소에 의한 간 독성 초기 지표효소로 간주되었다(20). 그러므로 공격성 중간체의 해독화 과정에 관여하는 GST 효소 활성의 변화는 사염화탄소 유발 간 독성에 대한 장수풍뎅이 추출물의 효과에 대한 작용점이 될 가능성이 있으므로 그 변화는 중요한 의미를 갖는 것으로 여겨진다.

본 연구에서 사염화탄소 단독투여군에서는 GST 효소 활성이 유의적으로 증가되어 독성 유도의 변화를 나타내었으나 장수풍뎅이 유충 추출물이나 silymarin을 투여시킨 군에서는 해독화의 필요성이 상대적으로 감소되어 GST의 효소 활성 증가가 저하된 것으로 여겨진다.

간조직 내 빌리루빈 함량

사염화탄소와 장수풍뎅이 유충 추출물을 투여한 마우스의 혈청 중 빌리루빈 함량의 변화는 Table 3에서와 같다. 정상 대조군과 사염화탄소 단독투여군을 비교했을 때 사염화탄소 투여군에서 총빌리루빈, 간접빌리루빈, 직접빌리루빈의 함량이 유의적으로 높게 나타났다. 그러나 장수풍뎅이

Table 3. Effect of MEAL on hepatic contents of bilirubin (mg/dL) in CCl_4-treated mice

Treatment (μg/g BW)	Direct bilirubin	Indirect bilirubin	Total bilirubin
Vehicle control	0.30 ± 0.22^a	0.11 ± 0.19^b	0.28 ± 0.07^a
CCl_4 (10) alone	0.52 ± 0.19^b	0.29 ± 0.07^c	0.60 ± 0.04^b
CCl_4+MEAL (50)	0.30 ± 0.12^b	0.06 ± 0.04^a	0.36 ± 0.14^a
CCl_4+MEAL (100)	0.36 ± 0.09^b	0.04 ± 0.05^a	0.35 ± 0.08^a
CCl_4+silymarin (2)	0.16 ± 0.10^a	0.08 ± 0.08^a	0.33 ± 0.08^{ab}

MEAL: methanol extract of *Allomyrina dichotoma* larva.
Values are mean±SD, n=10.
Values with the same superscript letter within the column are not significantly different ($p<0.05$).

유충 추출물과 silymarin을 투여한 실험군에서는 사염화탄소만을 투여한 군에 비해 간접빌리루빈과 총빌리루빈 함량에서 감소되는 경향을 나타내었다.

혈중 빌리루빈 함량은 간 손상이나 황달, 만성 알코올 중독의 경우에 증가된다. 임상적으로 간접 빌리루빈치가 높은 황달은 용혈성 질환이나 신생아에게 주로 나타나며 직접빌리루빈치가 높은 황달은 간염, 간경변 및 담즙 울체 등에서 나타난다(1). Kim 등(24)은 acetaminophen을 간 독성을 유발한 마우스에서 혈청 총빌리루빈 함량은 대조군에 의해 증가되었으나 영계출감탕 추출물을 급여한 결과, 유의적으로 감소되었고 이는 영계출감탕 추출물의 급여로 간 보호 효과가 나타난 결과라고 보고하였다.

본 실험에서 장수풍뎅이 유충 추출물을 급여한 실험군에서 총빌리루빈의 함량이 감소한 것은 사염화탄소 투여에 의한 간 손상의 완화와 관련이 있는 것으로 생각된다.

간조직의 형태학적 관찰

마우스 간조직의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 정상 간조직의 고유 간소엽(classic lobule)은 중심정맥으로부터 방사상의 간세포삭(hepatic cell cords)과 동양혈관이 나란히 배열되어 있었다(Fig. 3A). 사염화탄소만을 투여한 군은 내피

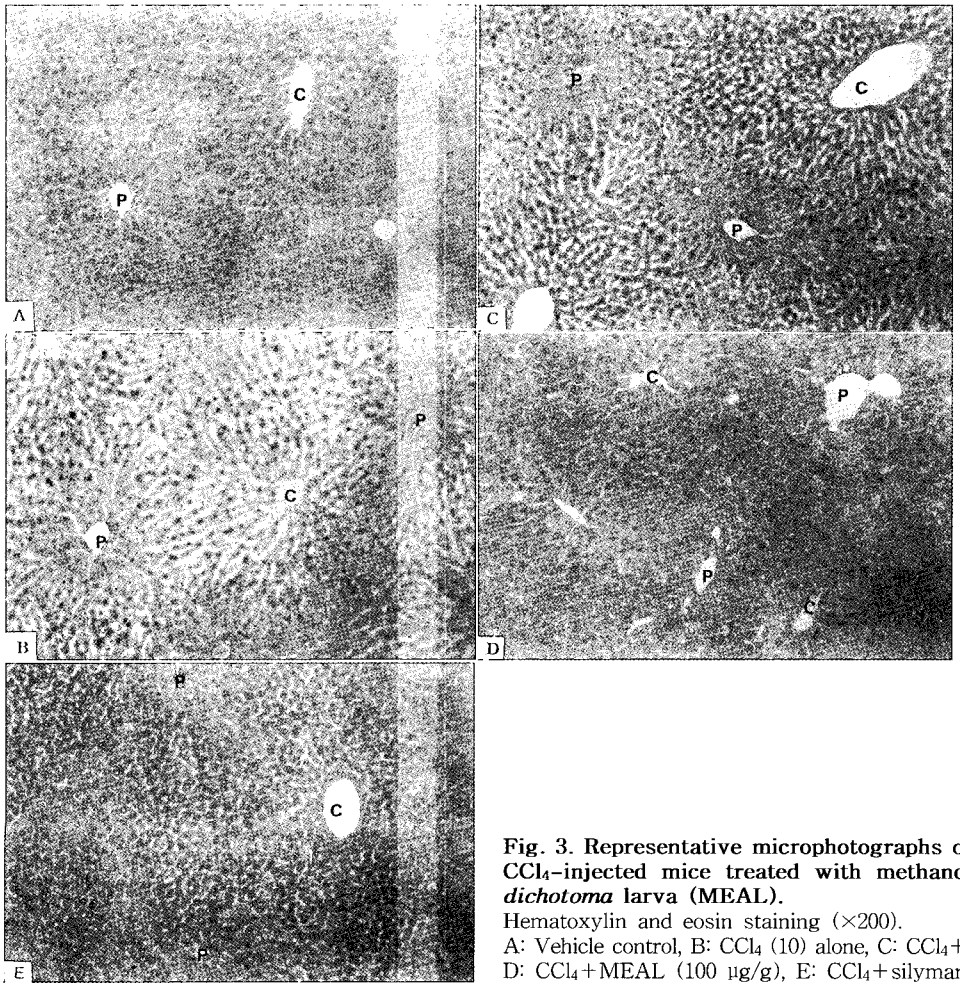

Fig. 3. Representative microphotographs of liver tissue of CCl_4-injected mice treated with methanol extract of *A. dichotoma* larva (MEAL).
Hematoxylin and eosin staining (×200).
A: Vehicle control, B: CCl_4 (10) alone, C: CCl_4+MEAL (50 μg/g), D: CCl_4+MEAL (100 μg/g), E: CCl_4+silymarin (2 μg/g).

세포(endothelial cells)의 손상이 관찰되며, 고유 간소엽의 중심정맥 주변대로 간세포의 종창현상(swelling)이 관찰되었다(Fig. 3B). 장수풍뎅이 추출물의 저농도 투여군에서는 동양혈관의 확장과 함께 간세포의 종창현상이 관찰되었다(Fig. 3C). 장수풍뎅이 추출물의 고농도 투여군에서 간세포의 체적 변화는 적었으나, 세포 내막계의 약한 종창현상이 관찰되었다(Fig. 3D). Silymarin군은 사염화탄소군에서 관찰되었던 주변대 간세포의 종창현상은 감소되었고 세포 체적은 큰 변화를 보이지 않았다.

일반적으로 조직 세포에 가해지는 손상은 세포의 체적 증가를 동반하고, 세포막을 통한 물질이동 장벽의 변화를 초래하여 세포 내 수분의 불균형을 초래하게 된다. 본 실험에서 나타난 세포의 종창현상은 주로 소포체를 비롯한 내막계의 종창현상을 초래한 것으로 사료된다. 이러한 세포의 변화는 고유 간소엽의 주변에서 발생하였다. 본 연구에서 적용한 CCl_4의 용량은 비교적 적은 양을 사용하였는데 이는 지나친 독성 유발로 인해 간세포가 심하게 손상될 때 장수풍뎅이 추출물의 효과를 관찰하기 어려운 점을 우려하여 적정한 정도의 손상을 유발하기 위함이었다. 따라서 현미경 소견에서 간세포의 손상을 뚜렷하게 보여주지는 못하는 경향이었다. Kalinichenko 등(25)은 사염화탄소 투여에 의해 마우스의 간조직에 광범위한 괴사성 병변과 괴사 부위의 적혈구 축적현상이 일어나고 중심부의 간조직 apoptosis가 관찰되었다고 보고하였다.

병리조직학적 소견들이 각 실험군마다 뚜렷한 차이를 나타내지는 않았으나 사염화탄소는 중심정맥을 중심으로 간정맥을 연결하는 다각형태의 고유 간소엽 주변 간세포의 종창현상과 동양혈관 내피세포의 손상 소견을 보였다. 사염화탄소로부터 유도된 간 손상은 silymarin군과 고농도의 추출물 투여군에서 그 효능은 미약하지만 간 손상을 억제하는 것으로 나타났고 저농도 추출물 투여군에서는 사염화탄소의 손상에 대한 변화가 나타나지 않는 것으로 관찰되었다.

요 약

본 연구는 장수풍뎅이 유충 추출물이 마우스의 간 손상에 미치는 영향을 조사하고자 간 손상 지표효소 활성, 지질과산화물 함량 및 대사 효소 활성, 빌리루빈 함량 및 간 조직의 형태학적 변화를 관찰하였다. 혈청 내 AST 활성은 정상 대조군에 비해서 사염화탄소 단독투여군에서는 유의적으로 높은 활성을 보임으로써 사염화탄소에 의한 간손상이 일어난 것으로 나타났다. 그러나 장수풍뎅이 유충 추출물이나 silymarin 공급에 의한 효과는 관찰되지 않았다. 혈청 ALT 활성은 사염화탄소 투여군에서 대조군에 비해 유의적으로 증가되었으나 메탄올 추출물을 고농도로 급여한 경우와 silymarin 공급에 의해 활성의 증가가 저하되는 효과가 나타났다. 지질과산화물 함량은 사염화탄소 단독투여군에서 대조군에 비해 약 2배 정도 현저하게 증가하였다. 장수풍뎅이 추출물과 silymarin을 공급시킨 군에서도 대조군에 비해서 지질과산화물 함량이 증가되었으나 사염화탄소만을 투여한 군에 비해서는 유의적으로 감소되는 경향이었다. GST 활성은 정상 대조군에 비해서 사염화탄소 단독투여군은 GST 활성도가 높았으며 장수풍뎅이 추출물이나 silymarin을 투여시킨 군에서는 사염화탄소만을 투여한 군에 비해서 활성이 감소되는 것으로 나타났다. 특히 장수풍뎅이 유충 추출물을 고농도로 투여한 실험군에서 지질과산화물의 생성은 크게 감소되었다. 정상 대조군과 사염화탄소 단독투여군을 비교했을 때 사염화탄소 투여군에서 총빌리루빈, 간접빌리루빈, 직접빌리루빈의 함량이 유의적으로 높게 나타났다. 그러나 장수풍뎅이 유충 추출물과 silymarin을 투여한 실험군에서는 사염화탄소만을 투여한 군에 비해 감소되었다. 병리조직학적 소견들이 각 실험군마다 뚜렷한 차이를 나타내지는 않았으나 사염화탄소는 중심정맥을 중심으로 간정맥을 잇는 다각형태의 고유간소엽 주변대 간세포의 종창현상과 동양혈관 내피세포의 손상소견을 보였다. 사염화탄소로부터 유도된 간 손상은 silymarin군과 고농도의 추출물 투여군에서 그 효능은 미약하지만 간 손상을 억제하는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서와 같이 사염화탄소를 투여시킨 군들에서 간 손상이 유발되었으며, 사염화탄소 투여 시 체중 g당 100 μg의 장수풍뎅이 유충 추출물을 공급했을 때 사염화탄소 투여 시에 나타나는 생체 내의 변화를 어느 정도 보호할 수 있는 것으로 여겨진다. 그러나 곤충추출물의 투여량의 세분화 등 보다 진전된 연구가 이루어진다면 간독성의 예방을 위한 천연물질로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 충청북도 농업기술원의 협력사업연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Kim OK. 2001. Protective effects of extracts of *Diospyrus kaki* Folium against hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 97-101.
2. Korea National Statistics Office. 2005. Annual report on the cause of death statistics.
3. Junqueira VBC, Simiz K, Videla LA, Barros SB. 1996. Dose dependent study of the effects of acute lindamce administration on rat liver superoxide anion production antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. *Toxicology* 41: 193-204.
4. Butler TC. 1990. Reduction of carbon tetrachloride in vivo and reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissues and constituents. *J Pharmacol Exp Ther* 134: 311-319.
5. Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human

disease: curiosity cause, or consequence? *Lancet* 344: 721-724.
6. Kang I, Kim H, Chung C, Kim S, Oh D. 2000. Effects of *Protaetia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 479-484.
7. Yamada M, Nakamura K, Saido-Sakanaka H, Asaoda A, Yamakawa M, Sameshima T, Motobu M, Hirota Y. 2004. Effect of modified oligopeptides from the beetle *Allomyrina dichotoma* on *Escherichia coli* infection in mice. *J Vet Med Sci* 66: 137-142.
8. Jeune KH, Jung MY, Chol SJ, Lee JW, Park WH, Cho SH, Lee SH, Chung SR. 2001. Immunomodulating effect of the lectin from *Allomyrina dichotoma*. *Kor J Pharmacogn* 32: 31-38.
9. Lee S, Park Y, Cho S. 1993. Protective effect of *Oenanthe javanica* extract on the carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 392-397.
10 Lee KJ, Jeong HG. 2002. Protective effect of *Platycodi radix* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol* 40: 517-525
11. Reitman S, Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 28: 56-63.
12. Karmen A. 1955. A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transferase in human blood serum. *J Clin Invest* 34: 131-133.
13. Ohkawwa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-360.
14. Habig WH, Pabst MJ, Jabby WB. 1974. Glutathionine S-transferase. The first enzymatic step mercapturic acid information. *J Biol Chem* 249: 9-16.
15. Lowry OH, Resebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-272.
16. Park HY, Han MJ, Choi EC, Kim DH. 1999. *Bifidobacterium breve* K-110, K-111 and B. *infantis* K-525 on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Korean J Food Sci Technol* 31: 1096-1100.
17. De Groot H, Noll T. 1986. The crucial role of low steady state oxygen partial pressures in haloalkane free-radical mediated lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 35: 15-19.
18. Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL. 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 43: 139-154.
19. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chu DS, Lin CH, Su CH, Cheu JR. 2003. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. *J Agric Food Chem* 51: 3302-3308.
20. Kim N, Lee J, Kim S, Park M, Kim S. 2005. Evaluation of the efficacy of *Kochiae fructus* extract in the alleviation of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Nutr Sci* 8: 212-218.
21. Lieber CS. 1991. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol. *Alcohol: Clin Exp Res* 15: 573-592.
22. Dwivedi S, Sharma R, Sharma A, Zimniak P, Ceci JD, Awasthi YC, Boor PJ. 2006. The course of CCl_4 induced hepatotoxicity is altered in mGSTA4-4 null(-/-) mice. *Toxicology* 218: 58-66.
23. Sheu JR, Le CR, Hsaio G, Hung WC, Lee YM, Chen YC, Yen MH. 1999. Comparison of the relative activities of α-tocopherol and PMC platelet aggregation and oxidative activity. *Life Sci* 334: 18-26.
24. Kim TH, Yang KS, Park SA. 1999. Effects of Youngkae-chulgamtang on hepatotoxicity. *Kor J Pharmacogn* 30: 12-17.
25. Kalinichenko VV, Bhattacharyya D, Zhou Y, Gusarova GA, Kim W, Shin B, Costa RH. 2003. *Foxf1* +/- mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl_4 injury. *Hepatology* 37: 107-117.

(2006년 10월 6일 접수; 2006년 12월 4일 채택)