

Carbon Tetrachlorid으로 유발된 Rat의 만성 장기(간, 신장) 손상시 헛개나무열매 추출물등 6종 생약의 투여시 조직병리학적변화

임미경 · 김주원* · 김홍태** · 이병제* · 구세광*** · 강미영 · 이근우*¹

경북대학교 생활과학대학, *경북대학교 수의과대학
부산광역시 보건환경연구원, *대구한의대학교 한의학과

(게재승인: 2007년 9월 15일)

Therapeutic Effect of *Hovenia dulcis* Thunberg Extracts and 6 Types Herbal Extracts on CCl₄-induced Chronic Organ Damages in the Rats-Liver and Kidney

Mee-kyoung Lim, Joo-wan Kim* Hong-tae Kim** Byoung-je Lee* Sae-kwang Ku***
Mi- young Kang and Keun-woo Lee*¹

Department of Food Science and Nutrition, School of Human Ecology, Kyungpook National University

*Department of Internal Medicine, School of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

Busan Metropolitan City Institute of Health and Environment, *Daegu Haany University Oriental Medicine

Abstract : This study was conducted to clarify the effects of the Korean raisin (*Hovenia dulcis* Thunb) extracts and polyherbal extracts consisted of 6 types herbal extracts including HDT (HDTmix) on CCl₄ induced organ damages. Extracts were prepared by autoclave (121°C, 15 psi, 3 hours) and filtered with nylon cloth and filter paper then freezing dried. Male Sprague-Dawley rats (200±20 g) were used as experimental groups, which were divided into 5 groups; intact control group (100 mg/kg), CCl₄ dosing group (100 mg/kg), CCl₄ dosing after HDT extract dosing group (100 mg/kg), CCl₄ dosing after HDTmix dosing group (100 mg/kg), Silymarin dosing group (5 mg/kg) after all test articles were orally dosed once a day for 28 days. They were sacrificed under ether anesthesia. HDT extracts and HDTmix dramatically inhibits the CCl₄ intoxicated hepato/nephropathies with immuno-suppress changes on the spleen. They showed more dramatical protective effects on most of specific organs compared to that of Silymarin 5 mg/kg except for hepatoprotective effects in which, quite similar effects were detected. In addition, HDT extracts showed synergic effects with other types of herbal extracts because HDTmix showed more favorable protective effects on the all specific organs showing CCl₄-related histopathological changes compared to HDT extracts.

Key words : *Hovenia dulcis* Thunberg, heap-toxicity, carbon tetrachloride

서 론

헛개나무열매(*Hovenia dulcis* Thunberg, HDT)는 지구자로 불리며 한방에서는 주취, 빈혈, 구갈, 구토, 사지마비, 류마티즘, 대소변 불통의 치료(5,17)에 주로 쓰이며, 동아시아가 원산지이다.

현재까지 헛개나무열매에 관한 연구는 생물학적 기능과 조성 이외 간 보호작용, 항산화, 항미생물, 항암, 항돌연변이, 항균, 항당뇨, 저지혈증, 항고혈압, 알코올 해독작용 등이 보고되고 있다(6).

감잎(*Diospyrus kaki Folium*)은 신장 및 심장 등의 순환

기 질환에 효능이 있고 위궤양, 십이지장 및 당뇨병 등의 만성질환에 유효한 효과가 있는 것으로 알려져 있다(4).

뽕나무(*Morus alba*)가지는 상지라고도 하며 부종, 비만, 소화불량, 소변불통 등에 효과가 있으며 주성분은 betulinic acid이다. 지금까지 뽕나무에 대한 성분분석 연구에서 6,8-hydroxybezenyltaxifolin, 8-hydroxybezenyltaxifolin, 6-hydroxybezenyltaxifolin 등이 뽕나무가지에서 그 유효성분이 분리 동정되었다(21).

영실(*Rosa multiflora*)은 쌍떡잎식물 장미과의 덩굴성 활엽 관목으로 덩굴절레라고 불리며 그 열매는 신맛을 내고 성질은 서늘한 것이 특징이며 신장기능 개선, 부종, 불면증에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(1).

동유자(*Malva verticillata* Linn)는 아욱과에 속하는 1년생 초본인 아욱의 성숙한 종자이며 이뇨 및 혈류량을 증가시키

¹Corresponding author.
E-mail : kwlee@knu.ac.kr

고, 대소변 불통, 혈액에 함유된 독소제거, 비만, 임신부의 유즙 부족, 유방의 염증 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(17).

현재 간질환 치료제로 가장 널리 사용되고 있는 silymarin은 *Cardus marianus* 추출물의 성분으로서 isosilybin, silybin, silycristin 및 silidianin 등으로 구성되었고(3), silybum marianum에서 추출된 polyphenolic flavonoid로서 세포막을 안정화 시켜 간세포 보호 및 재생효과가 있는 것으로 보고되었다(12). 또한 간 해독능력의 증가 및 glutathione 보존 작용(2)과 cytochrome P-450에는 영향을 미치지 않고 또한 사염화탄소 투여로 유발되는 free radical을 제거하는 항산화 작용도 있는 것으로 보고되었다.

따라서 본 실험에서는 지금까지 보고된 헛개나무열매 추출액이 사염화탄소 투여로 유발된 간손상시 치료효과가 있다는 보고를 토대로 현재 간염치료제로서 가장 널리 사용되고 있는 silymarin과의 비교 및 헛개나무열매 추출액에 이러한 6종 생약성분을 혼합한 추출액이 지금까지 전혀 보고되어 있지 않은 만성적인 간손상시에도 동일한 치료효과를 나타내는지를 확인하고자 본 실험을 실시한다.

재료 및 방법

실험동물

생후 6주령의 평균체중 150 ± 20 g인 Sprague-Dawley계 웅성 랫트 118두(Orient Bio Inc, GyeongGi-Do)를 1주일간 환경적응 (온도 $21 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 5\%$, 채광은 12시간 <06:00-18:00> 명암조명)을 시킨 후 물과 사료는 자유급식하였다.

시료추출

시중에서 구입한 헛개나무열매(*Hovenia dulcis* Thunberg), 택사(*Alisma orientale*), 감잎(*Diospyrus kaki Folium*), 뽕나무(*Morus alba*), 영실(*Rosa multiflora*), 동규자(*Malva verticillata* Linn)등을 감압열수추출 (121°C , 15 psi, 3 hours) 후, 동결건조시켜 냉동보관 하였으며 실험전 증류수에 용해하여 사용하였다. 간염치료제로 널리 사용되고 있는 실리마린(*Cardus marianus*, 아주실리마린정, 아주약품공업(주), 한국)은 분쇄하여 체중 kg당 5 mg의 용량을 증류수 1 ml에 용해하여 sondae를 이용하여 경구투여 하였다.

실험방법

실험동물을 일주일간 적응시킨 후 정상군(I), 사염화탄소투여 대조군(II), 사염화탄소투여 후 헛개나무열매 추출물 100 mg/kg 투여군(III), 사염화탄소 투여 후 6종의 한약복합추출물(헛개나무열매 추출물 포함) 100 mg/kg 투여군(IV), 사염화탄소 투여 후 실리마린 5 mg/kg 투여군(V)으로 분류하였다. 사염화탄소(CCl_4 , Oriental Chemical Industries, Korea)는 0.1 ml/100 g로 olive oil(Olive oil, DC Chemical Co, Ltd, Korea)과 1:1 비율로 희석하여 사용하였으며 모든 추출물은

1일 1회씩 28일간 sondae를 이용하여 경구투여를 하였다.

투여방법 및 혈액채취, 조직처리

사염화탄소 4주 28회 투여 후 실험 7일, 14일, 21일 및 28일에 각 군당 6두를 개복하여 descending aorta에서 채혈한 혈액은 heparin이 12 IU 함유된 eppendorf tube에 1.5 ml 씩 분주하여 즉시 검사하였고 조직검사를 위하여 간장, 신장 및 비장을 적출하였다. 각 조직들은 PBS buffer로 세척 후 bouin solution에 고정하여, paraffin 포매 후, hematoxilin and eosin (H&E) stain을 실시하였다.

혈액학적 및 혈액화학적 분석

혈액화학적 검사는 Dry chemistry analyzer(Spotchem™ SP-4410®, Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd. Japan)를 사용하여 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP)의 활성치를 각각 측정하였다.

조직병리학적 및 조직형태량학적분석

간조직의 실질 중 변성부위의 비율, 변성 간세포의 수, 신장조직에서는 실질 중 변성부위의 비율, 변성 사구체의 수, 비장 림프소절(백색수질)의 수 및 직경의 변화를 자동영상분석장치(Analysis Image Processing; SIS, Germany)를 이용하여 관찰하였다.

통계처리

혈액생화학적 검사결과는 Student's *t*-test로, 조직학적 검사결과는 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W test(MW test) with SPSS for Windows(Release 6. 1. 3., SPSS Inc., USA) 로 유의성($p < 0.01$, $p < 0.05$)을 각각 검정하였다.

$\% \text{ Changes vs } \text{CCl}_4 (\%) = [(\text{Data of test groups} - \text{Data of } \text{CCl}_4) / \text{Data of } \text{CCl}_4] \times 100$

결 과

혈액생화학적 검사결과

추출물, 사염화탄소 및 silymarin 투여 시작일로부터 투여 후 7, 14, 21 및 28일까지의 전 실험 기간 중 평균 AST 활성치의 변화를 측정한 결과는 Table 1과 같다. 정상군의 전 실험기간동안의 AST 평균 활성치는 51.12 IU/L로 나타내었으며 CCl_4 군에서는 전 실험기간동안 대조군에 비하여 지속적인 활성치의 증가를 나타내었으나 HDT extracts, HDTmix 및 silymarin 투여군에서는 전 실험기간 동안 CCl_4 군에 비하여 현저한 감소를 나타내었으며 특히 HDTmix군은 전 실험기간동안 silymarin군에 비하여 현저한 감소효과를 나타내었다. 따라서 HDTmix군과 silymarin군에서 높은 간 손상 치료효과를 나타내었다.

추출물, 사염화탄소 및 silymarin 투여 시작일로부터 투여

Table 1. Changes of AST levels in Intact control, CCl₄, HDT extracts, HDTmix, Silymarin groups of rats

Group ID	AST(IU/L) levels			
	7 day	14 day	21 day	28 day
Intact control	60.00±2.00	51.50±0.70	49.66±5.50	43.33±3.51
CCl ₄	68.83±21.34	70.20±12.55**	79.00±27.52	79.00±27.63**
HDT extracts	61.16±15.22	65.16±25.53	60.50±22.30	56.83±11.10
HDTmix	65.50±28.66	47.00±25.20##	40.75±7.93**.#	39.60±8.56##
Silymarin	62.50±66.16	66.00±16.08	45.75±25.79	41.20±13.31#

n = 6; Mean ± S.D.; *p < 0.01 and **p < 0.05 compared to that of Intact control by students' t-test; #: p < 0.01, ##: p < 0.05 compared to that of CCl₄ group.

Table 2. Changes of ALT levels in intact control, CCl₄, HDT extracts, HDTmix, Silymarin groups of rats

Group ID	ALT(IU/L) levels			
	7 day	14 day	21 day	28 day
Intact control	32.66±3.51	25.00±4.35	23.00±10.44	20.33±2.08
CCl ₄	38.40±7.56	35.16±7.11*	34.50±12.40	26.16±3.54**
HDT extracts	33.20±6.80*	29.60±7.47##	22.80±16.18	19.40±6.76
HDTmix	30.16±10.85##	25.83±10.40	15.75±3.20##	14.83±5.38*#
Silymarin	29.20±13.25	29.16±17.24	23.00±8.03	18.00±4.33#

n = 6; Mean ± S.D.; *p < 0.01 and **p < 0.05 compared to that of Intact control by students' t-test; #: p < 0.01, ##: p < 0.05 compared to that of CCl₄ group.

Table 3. Changes of ALP levels in Intact control, CCl₄, HDT extracts, HDTmix, Silymarin groups of rats

Group ID	ALP(IU/L) levels			
	7 day	14 day	21 day	28 day
Intact control	395.00±45.39	409.00±236.86	283.66±27.59	275.00±108.30
CCl ₄	543.16±268.26	531.33±273.85**	349.50±120.11	378.00±81.44
HDT extracts	535.50±217.77	509.50±164.87	250.33±74.82	294.00±45.41
HDTmix	402.00±177.55	375.60±78.36##	238.00±25.84##	231.57±21.83#
Silymarin	434.40±99.64	364.4±78.93##	292.60±86.96*	282.33±71.42

n = 6; Mean ± S.D.; *p < 0.01 and **p < 0.05 compared to that of Intact control by students' t-test; #: p < 0.01, ##: p < 0.05 compared to that of CCl₄ group.

후 7, 14, 21 및 28일까지의 전 실험 기간 중 평균 ALT 활성치의 변화를 측정된 결과는 Table 2와 같다. CCl₄군은 전 실험기간동안 정상군에 비하여 현저한(p<0.01) 증가를 나타내었다. HDT extracts군은 실험 7일에 정상군과 비교해서 평균 33.20 IU/L로 유의성있게(p<0.01) 증가하였으나 실험 14일에는 CCl₄군에 비해서 ALT 활성치가 유의성있게 감소하는 경향을 나타내었다(p<0.05). HDTmix군은 실험 7일에 CCl₄군과 비교한 결과 유의성있는(p<0.05) 감소 경향을 나타낸 후 실험 21일부터 유의한 감소를 나타내었다(p<0.05). Silymarin군은 실험 28일에 CCl₄군과 비교한 실험 결과 유의한 감소 경향을 나타내었다(p<0.01).

추출물, 사염화탄소 및 silymarin 투여 시작일로부터 투여 후 7, 14, 21 및 28일까지의 전 실험 기간 중 평균 ALT 활성치의 변화를 측정된 결과는 Table 3과 같다. 정상군의 전 실험기간동안 평균 ALP 활성치는 340.66 IU/L로 나타났으며 CCl₄군은 정상군에 비하여 실험 14일에 평균 531.33

IU/L로 유의하게 (p<0.05) 증가된 후 실험 21일에는 349.50 IU/L로 현저한 감소 경향을 나타내었다. HDT extracts군은 실험 21일에는 250.33 IU/L로 낮은 수치를 나타낸 후 실험 28일에는 약간 증가하는 경향을 나타내었다. HDTmix군은 실험 14일에 CCl₄군에 비하여 유의한(p<0.05) 감소 경향을 나타내었고 실험 21일, 28일에도 유의한(p<0.01, p<0.05) 감소 경향을 나타내었다. Silymarin군은 실험 14일에 CCl₄군에 비하여 유의한(p<0.05) 감소 경향을 나타내었다. 모든 군에서 전 실험기간동안 평균 ALP 활성치의 변화는 실험 21일부터 감소하는 경향을 나타내었다.

Histopathology 및 Histomorphometry 소견 (조직병리학 적 및 조직형태계량학적 소견)

Liver

모든 투여군에서는 매체 대조군에 비해 현저한 간 변성 소견의 감소가 투여 7일부터 나타나기 시작하였으며, 섬유화에

의한 pseudolobulation의 감소 역시 투여 21일 후부터 현저히 감소되었다(Fig 1). 또한 투여 7일부터는 간 변성 부위 및 변성 간 세포의 수가 모든 실험군에서 매체 대조군에 비하여 유의한($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 감소를 나타내었으며

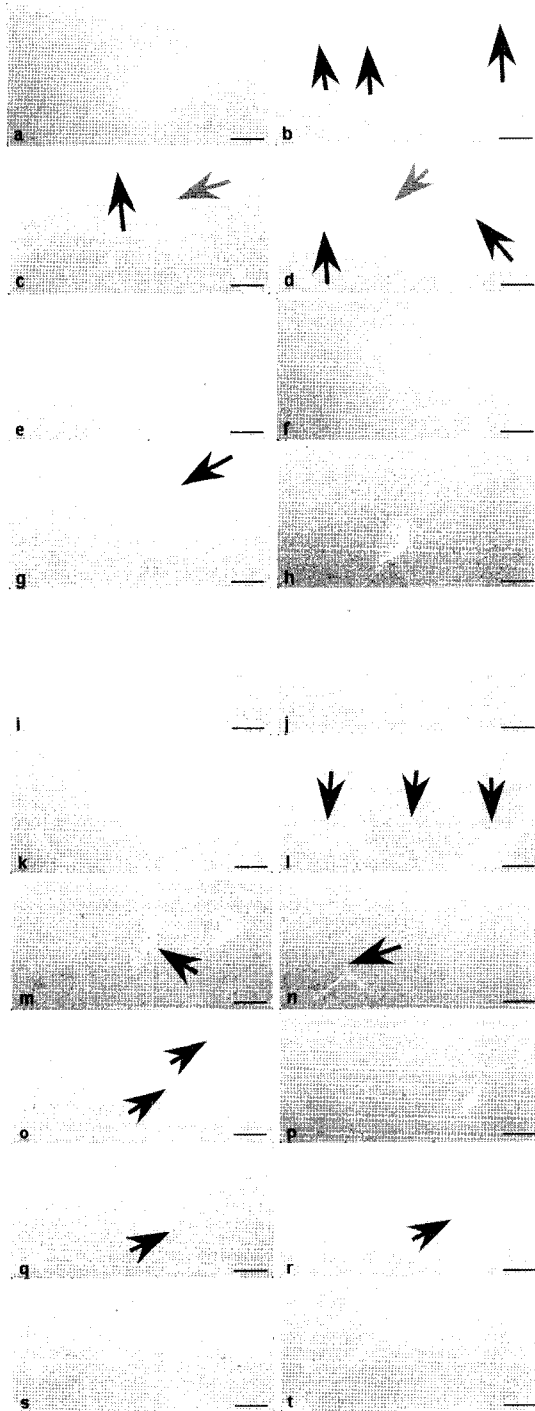


Fig. 1. Histological profiles of the liver in intact control(a, f, k, p), CCL_4 control(b, g, l, q), HDT extract(c, h, m, r), HDTmix(d, i, n, s) and Silymarin(e, j, o, t)-dosing groups at 7(a~e), 14(f~j), 21(k~o) and 28(p~t) days after-dosing. All H&E stain; Scale bars = 200 μ m.

(Table 4, 5), 특히 HDT extracts 투여군에 비하여 HDT mix 투여군이 보다 탁월한 효과를 나타내었다.

매체 대조군에서는 간 변성율이 정상군에 비해 투여 7, 14, 21 및 28일 후에 각각 3489.45, 2922.13, 989.28 및 1560.66 %의 변화를 나타낸 반면, HDT extracts 투여군에서는 매체 대조군에 비해 각각 -23.49, -17.88, -46.32 및

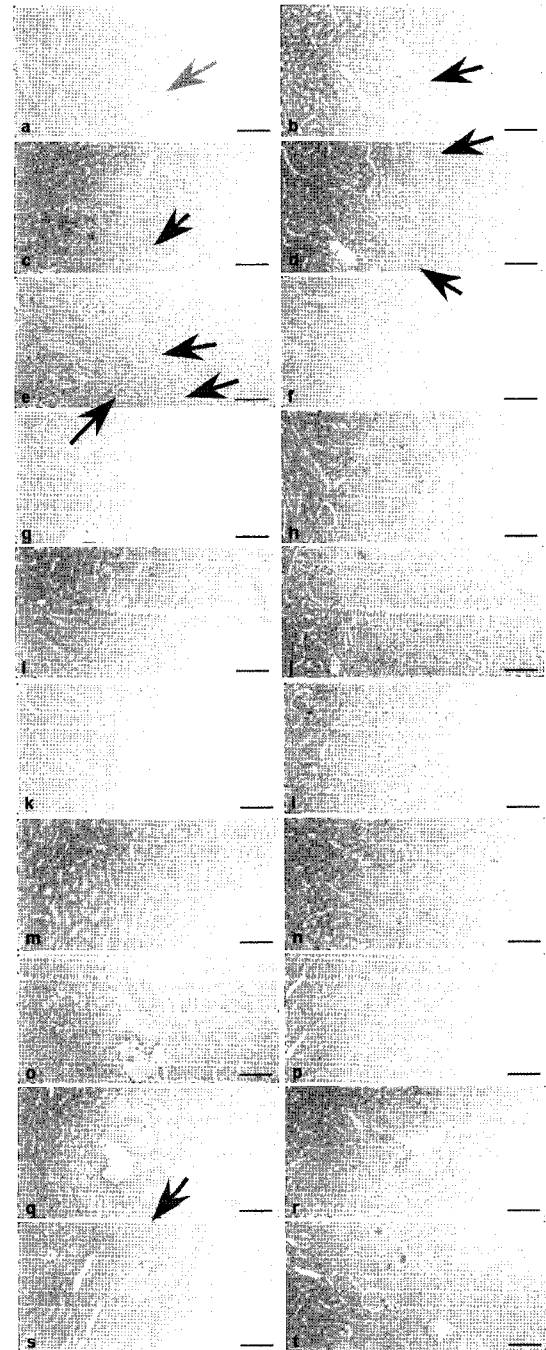


Fig. 2. Histological profiles of the kidney in intact control (a, f, k, p), CCL_4 control(b, g, l, q), HDT extract(c, h, m, r), HDTmix(d, i, n, s) and Silymarin(e, j, o, t)-dosing groups at 7(a~e), 14 (f~j), 21 (k~o) and 28 (p~t) days after-dosing. All H&E stain; Scale bars = 200 μ m.

Table 4. Changes on the percentage of hepatic degenerative regions(%/1mm² of hepatic parenchyma)

Group ID	Days after test article-dosing			
	7 days	14 days	21 days	28 days
Controls				
Intact	2.20±1.42	2.67±1.86	4.01±3.53	2.46±2.91
CCL ₄	78.85±9.53*	80.79±10.21*	43.68±4.35*	40.88±8.80*
Dosing groups				
HDT extracts	60.33±6.37*.,##	66.35±9.19*.,##	23.45±7.21*.,#	15.22±4.52*.,#
HDTmix	45.23±6.52*.,#	57.67±9.06*.,#	15.00±4.42*.,#	12.85±2.85*.,#
Silymarin	61.94±12.54*.,##	46.20±10.81*.,#	23.56±3.96*.,#	11.30±2.04*.,#

n = 6 Mean S.D. * p < 0.01 compared to that of intact control by MW test; # p < 0.01 and ## p < 0.05 compared to that of CCL₄ control by MW test

Table 5. Changes on the number of hepatocytes in the centrolobular regions (N/1000 hepatocytes)

Group ID	Days after test article-dosing			
	7 days	14 days	21 days	28 days
Controls				
Intact	8.67±4.84	11.83±6.88	11.00±10.51	6.83±3.19
CCL ₄	765.00±78.71*	782.00±104.57*	65.00±32.08*	20.33±4.23*
Dosing groups				
HDT extracts	592.00±78.87*.,##	602.17±86.11*.,##	41.33±11.43*	17.50±11.47*
HDTmix	470.33±115.79*.,#	561.67±81.02*.,##	21.83±3.49#	10.83±1.17*.,#
Silymarin	563.33±93.26*.,##	422.50±102.39*.,#	28.33±5.28**.,#	13.67±8.29**

n = 6 Mean S.D. * p < 0.01 and ** p < 0.05 compared to that of intact control by MW test; # p < 0.01 and ## p < 0.05 compared to that of CCL₄ control by MW test

Table 6. Changes on the percentage of kidney degenerative regions(%/1 mm² of kidney parenchyma)

Group ID	Days after test article-dosing			
	7 days	14 days	21 days	28 days
Controls				
Intact	7.50±4.45	5.36±4.19	9.83±3.38	4.91±4.53
CCL ₄	42.07±13.86*.,#	64.63±6.13*.,#	68.65±8.04*.,#	74.82±6.16*.,#
Dosing groups				
HDT extracts	22.81±5.75*.,##	42.12±6.77*.,#	33.69±4.46*.,#	37.17±15.65*.,#
HDTmix	22.44±6.11*.,#	33.09±6.27*.,#	27.91±6.51*.,#	20.62±10.30**.,#
Silymarin	41.77±12.19*	66.33±7.63*	55.66±8.93*.,##	50.21±12.37*.,#

n = 6 Mean S.D. * p < 0.01 and ** p < 0.05 compared to that of intact control by MW test; # p < 0.01 and ## p < 0.05 compared to that of CCL₄ control by MW test.

-62.76 %의 변화를, HDTmix 투여군에서는 각각 -42.63, -28.62, -65.67 및 -68.56%의 변화를, silymarin 투여군에서는 각각 -21.45, -42.82, -46.07 및 -72.35%의 변화를 나타내었다.

또한 매체 대조군에서는 변성 간 세포의 수가 정상군에 비해 투여 7, 14, 21 및 28일에 각각 8726.92, 6508.45, 490.91 및 197.56%의 변화를 나타낸 반면, HDT extracts 투여군에서는 매체 대조군에 비해 각각 -22.61, -23.00, -36.41 및 -13.93%의 변화를, HDTmix 투여군에서는 각각 -38.52, -28.18, -66.41 및 -46.72%의 변화를, silymarin

투여군에서는 각각 -26.36, -45.97, -56.41 및 -32.79%의 변화를 나타내었다.

Kidney

HDT extracts 및 HDTmix 투여군에서는 투여 7일 후부터 전 실험기간동안 매체 대조군에 비해 현저한 신장 조직병리학적 변화의 감소가 인정되었으나 silymarin 투여군에서는 투여 21일 부터 신장병증의 감소가 인정되었다(Fig 2). 또한 신장 변성을 및 변성 사구체 수 역시 HDT extracts 및 HDTmix 투여군에서는 투여 7일후부터, silymarin 투여군에서는 투여 21일부터 실험 전 기간에 걸쳐 매체 대조군에 비

해 유의한 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 감소를 나타내었으나 (Table 6, 7), HDT extracts군에 비하여 HDTmix 투여군이 더 우수한 신장 보호효과가 인정되어, 일부 한약 추출물과 헛개나무열매 추출물이 상승효과를 나타내는 것으로 인정되었다.

매체 대조군에서는 신장 변성율이 정상군에 비해 투여 7, 14, 21 및 28일 후에 각각 461.20, 1106.88, 598.63 및 1422.76%의 변화를 나타낸 반면, HDT extracts 투여군에서는 매체 대조군에 비해 각각 -45.78, -34.83, -50.93 및 -50.32%의 변화를, HDTmix 투여군에서는 각각 -46.67, -48.80, -59.34 및 -72.44%의 변화를, silymarin 투여군에서는 각각 -0.71, -2.63, -18.92 및 -32.89 %의 변화를 나타내었다.

매체 대조군에서는 변성 사구체 수가 정상군에 비해 투여 7, 14, 21 및 28일 후에 각각 1943.75, 3000.00, 2105.56 및 2023.81 %의 변화를 나타낸 반면, HDT extracts 투여군에서는 매체 대조군에 비해 각각 -32.72, -32.26, -44.08 및 -66.82 %의 변화를, HDTmix 투여군에서는 각각 -51.68, -39.70, -72.80 및 -79.60%의 변화를 나타낸 반면 silymarin 투여군에서는 각각 -0.92, 1.74, -27.71 및 -38.34%의 변화를 나타내었다.

Spleen

HDTmix 투여군에서는 투여 7 일후부터, HDT extracts 투여군에서 투여 14일 후 부터 실험 전 기간에 걸쳐 매체

대조군에 비해 현저한 림프소절(백색수질)의 위축을 특징으로 하는 면역억제 소견의 감소가 비장에서 인정되었으나, silymarin 투여군에서는 매체 대조군과 유사한 비장의 조직 병리학적 소견을 나타내었다. 이와 함께 백색수질의 수 및 직경 역시 HDTmix 투여군에서는 투여 7일후부터, HDT extracts 투여군에서는 투여 28 및 14일 후 부터 실험 전 기간에 걸쳐 매체 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.01$ 또는 < 0.05) 증가를 나타내었다(Table 8, 9). 또한 HDT extracts 투여군 보다 HDTmix 투여군에서 더 우수한 면역활성 효과가 인정되어, 일부 한약 추출물과 헛개나무열매 추출물에 있어서 상승효과가 나타나는 것으로 생각된다. 한편 silymarin 투여군에서는 별 다른 면역활성 효과가 인정되지 않았다.

매체 대조군에서는 림프소절의 수가 정상군에 비해 투여 7, 14, 21 및 28일 후에 각각 -43.68, -32.16, -46.02 및 -38.59%의 변화를 나타낸 반면, HDT extracts 투여군에서는 매체 대조군에 비해 각각 4.08, -3.70, 3.28 및 40.71%의 변화를 나타내었고, HDTmix 투여군에서는 각각 67.35, 68.15, 93.44 및 119.47 %의 변화를, silymarin 투여군에서는 각각 3.06, -2.22, -9.84 및 0.88 %의 변화를 나타내었다.

매체 대조군에서는 정상군에 비해 림프소절의 직경이 정상군에 비해 투여 7, 14, 21 및 28일 후에 각각 -38.23, -32.94, -39.50 및 -35.38%의 변화를 나타낸 반면, HDT extracts 투여군에서는 매체 대조군에 비해 각각 10.19,

Table 7. Changes on the number of abnormal Glomeruli showing vasodilated atrophic changes(N/100 Glomeruli)

Group ID	Days after test article-dosing			
	7 days	14 days	21 days	28 days
Controls				
Intact	2.67±2.07	2.17±0.75	3.00±1.79	3.50±2.07
CCL ₄	54.50±15.48*.#	67.17±12.66*.#	66.17±9.52*.#	74.33±8.14*.#
Dosing groups				
HDT extracts	36.67±4.68*##	45.50±11.45*##	37.00±7.10*.#	24.67±4.32*.#
HDTmix	26.33±5.47*.#	40.50±1.87*.#	18.00±3.58*.#	15.17±2.40*.#
Silymarin	54.00±9.01*	68.33±9.58*	47.83±6.59*.#	45.83±8.26*.#

n = 6 Mean S.D. * p < 0.01 compared to that of intact control by MW test; # p < 0.01 and ## p < 0.05 compared to that of CCL₄ control by MW test.

Table 8. Changes on the number of lymphoid follicles (white pulp) in spleen(N/cross histological sections)

Group ID	Days after test article-dosing			
	7 days	14 days	21 days	28 days
Controls				
Intact	29.00±6.54	33.17±5.00	37.67±5.20	30.67±6.28
CCL ₄	16.33±3.33*.#	22.50±3.94*##	20.33±2.16*.#	18.83±2.86*.#
Dosing groups				
HDT extracts	17.00±2.83*	21.67±4.89**	21.00±1.41*	26.50±5.43##
HDTmix	27.33±3.20#	37.83±5.15#	39.33±6.35#	41.33±2.80*.#
Silymarin	16.83±3.19*	22.00±3.90*	18.33±2.66*	19.00±3.03**

n = 6 Mean S.D. * p < 0.01 and ** p < 0.05 compared to that of intact control by MW test; # p < 0.01 and ## p < 0.05 compared to that of CCL₄ control by MW test

Table 9. Changes on the diameters of lymphoid follicles(white pulp) in spleen (μ m/follicles)

Group ID	Days after test article-dosing			
	7 days	14 days	21 days	28 days
Controls				
Intact	452.68 ± 40.60	439.71 ± 79.66	477.97 ± 52.96	495.76 ± 67.54
CCL ₄	279.60 ± 41.47*.#	294.85 ± 37.44*.*#	289.17 ± 45.40*.*#	320.38 ± 69.06*.*#
Dosing groups				
HDT extracts	308.08 ± 58.18*	408.73 ± 69.42*#	388.44 ± 80.17*#	438.76 ± 87.25*#
HDTmix	399.60 ± 80.27*#	439.49 ± 36.21*#	538.62 ± 54.30*#	530.74 ± 57.99*#
Silymarin	251.24 ± 50.21*	310.79 ± 21.60*.*	302.29 ± 16.88*	313.55 ± 77.96*.*

n = 6 Mean S.D. * p < 0.01 and ** p < 0.05 compared to that of intact control by MW test; # p < 0.01 and ## p < 0.05 compared to that of CCL₄ control by MW test

38.62, 34.33 및 36.95%의 변화를 나타내었고, HDTmix 투여군에서는 각각 42.92, 49.06, 86.26 및 65.66 %의 변화를, silymarin 투여군에서는 각각 -10.14, 5.41, 4.54 및 -2.13 %의 변화를 나타내었다

고 찰

본 실험에서는 헛개나무열매와 5종의 생약 열수 추출물이 랫트에서 CCL₄ 투여로 유발된 간, 신장 및 비장 손상시 그 효과 유무를 확인하고자 정상군, 사염화탄소 투여군, 사염화탄소투여 후 헛개나무열매 추출물 100 mg/kg 투여군, 사염화탄소 투여 후 6종의 한약복합 추출물(헛개나무열매 추출물 포함) 100 mg/kg 투여군, 사염화탄소 투여 후 silymarin 5 mg/kg 투여군으로 분류하여 실험물질을 1일 1회씩 28일간 경구투여 하였으며, 실험 7일, 14일, 21일 및 28일에 혈액생화학적, 조직학적, 조직형태계량학적검사를 실시하였다.

간장 치료제인 silymarin은 오미자의 성분인 schizandrin과 유사한 인공 합성물질로서 약물중독에 의한 만성간염에 예방 및 치료 효과가 있고, 임상에서는 만성간염 환자의 증상을 호전시켜 간기능을 향상시키고, 사염화탄소 유발 간독성의 경우 Kupffer cell 활성을 통한 간독성 치료효과가 있는 것으로 보고되었다(16).

간이 손상을 받으면 간특성 효소인 ALT, AST, ALP 수치가 혈중에 증가하는데 세포질에 위치한 이들 효소들은 세포 손상이 방출되는 것으로 보고되고 있다(9).

본 실험에서 ALP 수치는 HDT extracts군에서는 실험 28일에 CCL₄군에 비하여 감소되었으며, HDTmix군은 실험 14일에 유의한(p<0.05) 감소를 나타내었다. 김(18)은 랫트에 갑상선호르몬을 투여한 결과 ALT, AST활성치가 대조군에 비하여 CCL₄를 투여한 모든군에서 현저히 증가되었다고 보고하였으며 이외 여러 연구가들도 인진쑥 및 헛개나무추출액 투여군에서 유사한 결과를 보고하였다. 본 실험결과에서도 HDT extracts군 및 HDTmix군에서도 AST, ALT 활성치가 유의한 감소를 나타내나 지금까지의 보고와 일치하는 결과로 생각되며 특히 HDTmix군에서 다른군에 비하여 탁월한 효과를 나타낸 점은 지금까지 밝혀지지 않은 새로운 사실로

서 앞으로 더욱 연구되어야할 과제로 생각된다.

Park, Shukla, Valcheva 등(13,15,20)은 사염화탄소투여에 의하여 간세포의 공포화, 염증세포 침윤 및 소엽중심성 괴사 소견이 관찰되었다고 하였다. 본 실험 결과 역시 헛개나무열매추출물 투여군에서는 14일까지 간세포의 공포화, 염증세포 침윤 및 소엽중심성 괴사 소견이 관찰되었으며, 21일부터는 섬유화에 의한 pseudolobulation 현상이 인정된바 이는 지금까지의 보고와 일치하는 결과로 추측된다.

헛개나무열매 추출물 및 헛개나무열매 추출물을 포함한 6종의 생약 복합 추출물이 사염화탄소 투여로 유발된 주요 장기 손상에 미치는 영향을 조직병리학적 및 조직형태계량학적 영향에 대해 관찰한 결과 모든 투여군에서 매체 대조군에 비해 현저한 간 변성 소견의 감소가 투여 7일부터 나타나기 시작하였으며, 특히 HDT extracts 투여군에 비하여 HDTmix 투여군이 보다 탁월한 효과를 나타내었다. 헛개나무열매 및 한약 복합물 투여군에서는 실험 7일부터 전 기간 매체 대조군에 비해 신장에서 국소성 괴사, 염증세포의 침윤 및 섬유화가 인정되었으며 신장의 조직병리학적 변화가 감소되었다는 여러 보고와 일치하게 나타났고(8,19,20), 비장에서는 림프소절 (백색수질) 부위의 현저한 위축소견(10,11,14)이 인정되었다. 간의 섬유화 소견을 제외한 대부분의 조직병리학적 변화가 모든 사염화탄소 투여군에서 투여 7일부터 관찰되었고, 이들 조직병리학적 변화와 histomorphometry 변화는 비교적 잘 일치되는 경향을 나타내었다.

따라서 이러한 결과는 지금까지 보고되어 있지 않은 새로운 사실로서 6종의 한약재와 HDT가 서로 상승작용을 나타낸 것으로 사료된다.

결 론

헛개나무열매 추출물과 6종의 한약재의 혼용이 사염화탄소로 유발된 간, 신장 및 비장(면역억제) 손상에 대한 치료 효과를 알아보기 위하여 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 헛개나무열매 추출물 및 헛개나무열매 추출물을 포함한 6종의 생약 복합 추출물에서 AST, ALT 활성치가 유의한 감소를 나타내나 이러한 결과는 지금까지의 보고와 일치하는

결과로 생각되며 특히 HDTmix군이 탁월한 효과를 나타낸 점은 지금까지 밝혀지지 않은 새로운 사실로서 앞으로 좀더 연구되어야할 과제로 사료된다.

2. 조직학적 및 조직형태계량학적 결과에서 헛개나무열매 추출물 및 한약 복합물이 간을 제외한 나머지 장기에 대한 보호효과가 실리마린 5 mg/kg 투여군에 비하여 탁월한 효과를 나타낸 것으로 인정된 바 이러한 사실은 헛개나무열매 추출물의 효과가 기존의 생약 추출물과의 혼합에 의해 증가되는 것으로 판단되나 정확한 기전에 관하여서는 앞으로도 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Cha JY, Kim HJ, Cho YS. Effects of water-soluble extract from leaves of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid peroxidation in tissues of rat. J Korean Soc Food Sci Nutr 2000; 29: 531-536.
2. Dogukan A, Akpolat N, Celiker H, Ilhan N, Halil Bahcecioglu I, Gunal AI. Protective effect of interferon-alpha on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity. J Nephrol 2003; 16: 4-81.
3. Han EG. Effect of *Codonopsis lanceolata* extracts on carbontetrachloride-induced hepatotoxicity. Yeungnam university. 1996.
4. Jeong CH, Shim KH. Chemical components in leaf and fruit stalk of *Hovenia dulcis* Thunb. Korean J Postharvest Sci Technol 1999; 5: 469-471.
5. Jirova D, Sperlingova I, Halaskova M, Bendova H, Dabrowska L. Immunotoxic effects of carbon tetrachloride the effect on morphology and function of the immune system in mice. Cent Eur J Public Health 1996; 4: 16-20.
6. Jungyaksajon. Sohakkyan. Sanghae science pub. 1985: 413-415.
7. Kim DD. The therapeutic effect of *Hovenia dulcis* Thunb extract on CCl₄ induced
8. Kim OK. Protective effects of extracts of *Diospyrus kaki. Folium* against hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rat. J Korean Soc Food Sci Nutr 2001a; 30: 97-101.
9. Kim TJ. Korean resources plants. Seoul National University. 1996: 72.
10. Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, McDuffie JE, Warner RL, Hsiao C, Stapleton SR, Ward PA. Exogenous nitric oxide downregulates MIP-2 and MIP-1alpha chemokines and MAPK p44/42 after ischemia and reperfusion of the rat kidney. J Invest Surg 2002; 15: 96-287.
11. Miguez MP, Anudi I, Sainz-Pardo LA, Lindros KO. Hepatoprotective mechanism of silymarin: no evidence for involvement of cytochrome P-450 2E1. Chem Bio Interact 1994; 91: 51-63.
12. Ozturk F, Ucar M, Ozturk IC, Vardi N, Batcioglu K. Carbon tetrachloride- induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats. Urology 2003; 62: 6-353.
13. Park EJ, Jeon CH, Ko G, Kim J, Sohn DH. Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetrachloride. J Pharm Pharmacol 2000; 52: 437-40.
14. Reynolds, J.E.F, Martindale(the extra pharmacopoeia), 29th, The Pharmaceutical Press. 1989: 1613.
15. Shukla S, Bhadauria M, Jadon A. Effect of propolis extract on acute carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. Indian J Exp Biol 2004; 42: 7-993.
16. Singh KP, Zaidi SI, Raisuddin, Saxena AK, Dwivedi PD, Seth PK, Ray PK. Protection against carbon-tetrachloride-induced lymphoid organotoxicity in rats by protein A. Toxicol Lett 1990; 51: 51-339.
17. Skottova N, Krecman V. Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug. Physiol Res 1988; 47: 1-7.
18. Smialowicz RJ, Simmons JE, Luebke RW, Allis JW. Immunotoxicologic assessment of subacute exposure of rats to carbon tetrachloride with comparison to hepatotoxicity and nephrotoxicity. Fundam Appl Toxicol 1991; 17: 96-186.
19. Smith AF, Beckett GJ, Walker SW, Rae PWH. Liver Function Test. In Lecture notes on clinical biochemistry, 6th ed. Oxford: Blakwell Scientific Publications 1998: 113.
20. Valcheva-Kuzmanova S, Borisova P, Galunska B, Krasnaliev I, Belcheva A. Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. Exp Toxicol Pathol 2004a; 56: 195-201.
21. Wang XL. Clinical effect of DDB pilules on 56 cases of chronic viral hepatitis B. New Drugs Clinic 1984; 1: 13.