pISSN 1225-4339 eISSN 2287-4992
Korean J. Food Nutr. Vol. 31. No. 6, 828~835 (2018)
https://doi.org/10.9799/ksfan.2018.31.6.828

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

6종 식품의 혼합추출물이 사염화탄소로 유도된 흰쥐 간 손상에 미치는 보호효과

†황보 미 향 · 예 춘 정*
계명문화대학교 식품영양조리학부 조교수, *계명문화대학교 보건학부 부교수

Protective Effect of 6 Food Mixed-Extract on the CCl_4-Induced Hepatic Damage in Rats

†Mi-Hyang Hwangbo and Chun-Jung Yea*
Assistant Professor, Dept. of Food, Nutrition and Cookery, Keimyung College University, Daegu 42601, Korea
**Associate Professor, Dept. of Health, Keimyung College University, Daegu 42601, Korea*

Abstract

The objective of this study was to examine the biochemical parameters of hepatic function such as serum level of ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase), LDH (lactate dehydrogenase), and content of TG (triglyceride) and cholesterol, and tissue immunological changes of the CCl_4-treated rats with administration of the mixed sample extract (MSE). The liver weight in CCl_4-administered experimental control group (EC) was slightly higher than that of normal control (NC) group. Hepatic damage parameters (ALT, AST, ALP, LDH & TG) in serum of the EC group were significantly higher than those in serum of the NC and silymarin-treated positive control (PC) group. On the other hand, these hepatic damage parameters of MSE-treated experimental (E1 & E2) groups were significantly lower than those of EC group. The number of WBC, neutrophils, lymphocytes and platelets, and the contents of hemoglobin, and hematocrit in EC group were significantly higher than those of NC group. However, the number of WBC and lymphocytes in E1 and E2 groups were significantly lower than those of EC group. Also, the collagen developmental areas in the liver of NC and PC groups by hepatic immuno-histological findings were found slightly positive. Whereas, hepatic fibrous developmental tissue of EC group was strongly positive brown color band, those of E1 & E2 groups were decreased. Therefore, it was concluded that the induction of hepatic fibrous tissue activation had a preventive effect of MSE against the CCl_4-induced hepatic damage in rats. However, further study is needed in this filed.

Key words: liver, hematological, tetrachlorid, biochemical, hepatic damage, immunological

서 론

경제발전에 따른 소득의 성장과 의학의 발달로 국민의 기대 수명은 현저히 증가되며, 노화를 지연시키거나 암, 심장질환을 억제하는 기능성 생리활성 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Sadaki O 1996). 노화 및 질병 예방, 치료를 위해 free radical 생성을 억제하는 식용 및 약용식물에 대한 실험들이 보고되고 있다(Lee 등 2011).

한편, 세포의 독성을 일으키는 물질 중 지방족 할로겐 탄화수소인 사염화탄소(CCl_4)는 생체막의 불포화 지방산을 공격하여 지질의 산화, 단백질의 변성 등을 일으켜 생체막의 손상을 초래하여 간과 신장에 독성작용을 일으키는(Gilman AG 1985; Bruckner 등 1986) 대표적인 물질이다. 따라서 투여방법 및 횟수에 따라 급성간염, 지방간 및 간경변 등의 간질환 유발이 가능하기 때문에 인위적으로 간 손상을 유발시킨 후 투여 물질의 효능을 밝히기 위한 연구방법으로 많이 이용되고

† Corresponding author: Mi-Hyang Hwangbo, Assistant Professor, Dept. of Food, Nutrition and Cookery, Keimyung College University, Daegu 42601, Korea. Tel: +82-53-589-7822, Fax: +82-53-589-7821, E-mail: mhhwangbo@kmcu.ac.kr

있다(Park 등 2011).

식용 및 약용식물의 성분은 비타민 C, 카로티노이드, 식이섬유, 페놀화합물, 플라보노이드 등은 항산화, 항종양, 항암, 항염, 콜레스테롤 저하, 정장작용 등 다양한 생리적 기능을 나타내고 있다(Lee 등 2005).

그 중 꾸지뽕 나무(*Cudrania tricuspidata* Bureau)는 동의보감에 자양, 강장 효능과 음위, 신체허약증, 불면증 등에 좋고, 줄기와 뿌리는 여성 질환에 좋다는 기록이 있으며(Choi 등 2009), 우리나라 민간에서는 꾸지뽕나무를 물로 달여 섭취하면 간암 치료에 효과적이라고 알려져 있다(Kim 등 2000). 또한 마늘은 항균작용(Ankri & Mirelman 1999), 항고혈압 작용(Ruffin & Hutter 1983), 항암 및 세포의 항돌연변이효과(Belman S 1983; Shin & Kim 2004), 항산화 작용(Corzo-Martinez 등 2007) 등이 밝혀져 있다.

아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 안토시아닌, 폴리페놀, 플라보노이드 함량이 풍부하여 항산화, 암예방, 면역증진 등에 대한 기능성을 지니고 있으며(Kulling & Rawel 2008; Jekobek 등 2012; Nam 등 2015: Lim & Lee 2017), 사과는 폴리페놀, 플라보노이드 등 파이토케미컬이 다량 함유되어 있고(Alvarez-Parrilla 등 2005; Stracke 등 2010; Heras-Ramirez 등 2012; Kim & Park 2013), 사과 추출물은 항산화, 항암, 항당뇨 및 항바이러스, 염증 완화, 심혈관계 질환 개선(Bortolotto & Piangiolino 2013; Ravn-Haren 등 2013; Jiang 등 2006; Kim 등 2009) 등이 밝혀졌다. 또한, 검은콩에는 다량의 단백질 외에도 lecithin, phytoestrogen, 불포화지방산, anthocyanins 등이 함유되어 있어, 항산화 작용, 항암 작용, 항비만 작용, estrogenic 활성 작용, 면역조절 작용 등 다양한 약리 작용을 나타낸다(Maeda 등 1992; Liao 등 2001; Takahashi 등 2005; Zhao & Lou 2006; Kim 등 2007)고 보고되었고, 와송(*Orostachys japonicus*)은 항산화 효과, 항균 효과(Yoon 등 2009), 암세포의 apoptosis 유도 효과(Kwon & Han 2004), 항염증 효과(Lee 등 2012), 항암 효과(Kim 등 2003) 등의 다양한 생리 활성을 나타내는 것으로 보고되었다. 한편, Lee 등(2011)은 전통적으로 생약제를 질병의 치유에 사용함에 있어 그들의 효능을 증진시키고, 독성이나 부작용을 줄이기 위하여 복합물의 형태로 많이 사용되고 있으며, 최근에는 생약 복합제가 건강기능식품의 기능성 원료로 인정된 바 있다. 이와 같이 혼합 추출물이 약물 간의 상호작용을 통해 더욱 유효한 효과를 발휘할 수 있어, 본 실험에서도 혼합추출물을 제조하여 이들의 상승효과를 살펴보고자 하였다. 이에 본 실험에서는 6종의 생리기능성을 가진 시료를 열수 추출하여 추출물(혼합 시료추출물)을 제조하여, 사염화탄소로 간 손상을 유발시킨 실험동물에 투여한 다음 여러 parameter들의 변동과 더불어 간 면역조직학적 발현 정도를 측정하여, 간 손상의 예방이나 치료, 나아가 건강기능성 식품 소재로서의 기초자료로 활용 가능성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

실험기기는 BenchMark XT automated immunostainer(Ventana Medical Systems, USA, auto hematology analyzer(Hemavet, HV-950FS, USA), auto biochemistry analyzer(Thermo, Konelab 20XT, Finland), refrigerated centrifuge(Beckman Coulter Inc., AVANTI J-E, USA), mini centrifuge(Hitachi, MIKRO 200R, Japan), electronic balance(Sartorius, CP224S, Germany), Microtome(Leica, RM2235, Germany)을 사용하였다. 그 외 일반시약들은 특급품을 사용하였다. 시료추출은 초고속 감압 저온 추출기(COSMOS-660, Korea)를 사용하였다.

2. 혼합 시료추출물(Mixed sample extract: MSE) 조제

본 실험에 사용된 시료는 현재 한방 및 민간처방에서 약리적으로 항산화나 항염증, 항암작용 등이 있는 시료를 선정하였으며, 오동농원(경북 영천)에서 구입한 꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*), 마늘(*Allium sativum*), 아로니아(*Aronia prunifolia*), 사과, 검은콩(Black soybean), 와송(*Orostachys japonica*) 등 6종의 시료를 세척하고 건조한 다음 적당한 크기로 마쇄하였다. 이 마쇄한 시료를 각 시료별로 200 g씩 동량 혼합하여 10배량의 증류수를 가하여 100℃에서 60분간 초고속 감압 저온 추출기로 열수 추출하여 동결건조한 후 시료로 사용하였으며, 혼합물 1.2 kg에 추출물 168 g을 얻어, 수율은 14% 이었다.

3. 실험동물

실험동물은 바이오링크㈜에서 구입한 SD계 수컷 흰쥐(5주령, 180~200 g)를 각각 6마리씩으로 정상대조군(Normal Control: NC), 실험대조군(Experimental Control: EC), 양성대조군(Positive Control: PC), 실험군 1(Experimental 1: E1), 실험군 2(Experimental 2: E2) 등 5군으로 분류한 다음, mineral oil과 동량 혼합한 사염화탄소(CCl_4, Sigma Co.)를 Lee 등(1993)의 방법과 예비실험을 통해 간 손상 60%로 설정하여 체중 kg당 0.50 mL(0.23 g/kg/day), 1.0 mL(0.46 g/kg/day), 1.25 mL(0.69 g/kg/day) 예비실험을 실시하여 사염화탄소 투여용량을 mineral oil에 1:1의 비율로 희석하여 체중 kg당 1.0 mL(0.46 g/kg/day)로 선택하여 EC군, PC군, 실험군 E1, E2군에는 1일 1회 격일 간격으로 5회 복강 내 주사하여 간 손상을 유발하였고, NC군은 Saline을 투여하였다. 혼합추출물(MSE)은 예비실험에서 g/kg/day를 기초로 하여 간 손상이 유발된 흰쥐에 지정된 용량으로 1일 1회 일정한 시간대에 주 6회씩 6주간 경

구투여용 주사기를 사용하여 경구 투여하였다. NC군 및 EC군은 동량의 생리식염수를 체중 kg당(0.25 mL/kg/day)을 경구 투여하였다. PC군에는 간 치료제로 널리 사용되는 Silymarin (SM, Madans AG, Germany)을 표준용법 g/kg에 맞추어 0.50 mL(0.60 g/kg/day)의 용량으로 sonde를 이용하여 경구 투여하였다. 또한, 혼합시료추출물(Mixed Sample Extracts: MSE)의 투여는 간 손상이 유발된 E1군에는 체중 kg당 0.50 mL(0.60 g/kg/day), E2군에는 체중 kg당 0.75 mL(0.90 g/kg/day)를 투여하였다. 실험동물은 표준사육 환경에서 사육하였고, 실험기간 동안 물과 사료(삼양사, 한국)의 양은 제한 없이 공급하였다.

실험동물의 처치는 12시간 절식시킨 후, ether 마취 하에서 개복하여 채혈한 다음 각 장기를 적출하여 생리식염수로 씻고, 여분의 수분을 여과지로 제거한 후 무게를 측정하였고, 장기의 일부는 조직학적 변화를 관찰하기 위해 10% 포르말린 용액에 고정하였다. 나머지 각 장기들은 −80℃에 보관하였다. 이상의 동물실험은 파티마의학연구소 윤리위원회의 승인(IRB 2017-06)을 받아 실시하였다.

4. 혈액학적 및 생화학적 분석

채혈한 일부 혈액은 EDTA가 들어 있는 채혈병에 담아, coulter mixer기 위에서 10분 이상 혼합한 후 자동혈구분석기(Sysmex VE-2100, Japan)를 이용하여 백혈구수(white blood cell count, WBC), 호중구수(neutrophil count), 림프구수(lymphocyte count), 단핵구수(monocyte count), 호산구수(eosinophil count), 호염기구수(basophil count), 적혈구수(Red Blood Cell Count: RBC), 혈색소농도(Hemoglobin Concentration: Hb), 적혈구용적(Hematocrit: HCT), 혈소판수(platelet count)를 측정하였다. 또한 채혈된 혈액의 일부를 실온에서 방치하여 3,000 rpm으로 10분간 원심분리(Hanil. Co., HRT-60IV, Korea) 후 얻은 혈청을 자동생화학분석기(UniCel^{TM} DxI 800, Beckman Coulter, USA)를 이용하여 ALT(alanine aminotransferase), AST(aspartate aminotransferase), ALP(alkaline phosphatase), LDH (lactate dehydrogenase)의 활성과 TG(triglyceride), CHOL(total cholesterol)의 함량을 측정하였다.

5. 면역조직화학적 간 조직의 관찰

적출한 간 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 12시간 고정하고 흐르는 물에 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거쳐 포매하고, microtome을 이용하여 4 μm 두께의 절편을 제작하여 coating slide에 부착 탈파라핀 함수 후 BenchMark XT automated immunostainer(Ventana Medical Systems, USA)를 사용하여 염색하였다. 자동화 과정은 reaction buffer로 2분간 세척하고 Cell conditioning의 standard ccl 60분 반응 후 일차항체 SMA (smooth muscle actin, Ventana, USA)을 32분 반응시키고 reaction buffer로 자동 세척하였다. 이후 biotin과 streptavidin에 각각 25분 반응시키고, DAB(Ventana Detection kit, USA)에 발색 후 대조염색, 봉입하여 광학현미경으로 관찰한 다음, 영상분석 소프트웨어(image analysis)를 이용하여 간 세포내 단백질 발현 정도를 수치화하여 분석하였다.

6. 통계처리

통계처리 분석은 SPSS 20.0(SPSS Inc. USA)을 이용하여 정상군, 대조군, 양성대조군, 실험군(E1, E2) 간의 차이를 비교하기 위하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)으로 검증하였다. 각 그룹 간의 차이를 검증하기 위하여 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 실시하였고, 통계학적 유의수준은 $p<0.05$로 하였다.

결과 및 고찰

1. 식이 및 음용수 섭취량, 식이효율, 체중변화

식이 및 음용수섭취량, 식이효율, 체중변화를 측정한 결과는 Table 1과 같다. 음용수량은 실험대조군(EC)이 정상대조군(NC)에 비해 감소하는 양상을 보였으나, 통계적으로 유의

Table 1. Water intake, food intake, body weight gain food and efficiency ratio of CCl_4 in rats treated with mixed sample extract (MSE)

Group	Normal	Control		Experimental	
	NC	EC	PC	E1	E2
Water intake (mL/day)	51.12±2.71^{a}	45.24±3.02^{a}	50.08±2.74^{a}	49.62±5.14^{a}	49.21±2.33^{a}
Food intake (g/day)	29.62±0.81^{b}	25.95±1.21^{a}	30.11±1.02^{b}	30.18±1.29^{b}	30.62±0.69^{b}
Body weight gain (g/day)	6.89±0.45^{b}	5.65±0.42^{a}	6.55±1.27^{b}	7.01±0.34^{b}	7.08±0.48^{b}
Food efficiency ratio[1)] (%)	23.45±1.21^{b}	20.17±1.42^{a}	23.53±1.33^{b}	23.33±1.40^{b}	23.27±1.98^{b}

Values are mean±S.D. of 6 rats.

[1)] Feed efficiency ratio (%)=(Body weight gain/Feed intake)×100.

Values with different superscripts are significantly different ($p<0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

성은 없었고, 실험군(E1, E2)은 실험대조군(EC)에 비해 증가하는 양상은 보였으나, 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 식이량은 EC군이 실험군(E1, E2)과 NC군과 PC군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하는 경향을 나타내었고, 체중과 식이섭취율은 EC군에 비해 실험군(E1, E2)과 NC군과 PC군은 통계적으로 유의하게 증가하는 경향으로 나타났다.

2. 장기무게

혼합 시료추출물(MSE)이 장기 무게에 미치는 영향을 관찰하기 위해 적출한 간, 비장 및 흉선의 무게를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 간의 무게는 실험대조군(EC)에서 정상대조군(NC)과 양성대조군(PC)에 비하여 무게가 증가하는 양상을 보였으나, 통계적 유의성은 없었고, 혼합 시료추출물(MSE)을 투여한 실험군(E1, E2)에서는 NC군 및 PC군과 비슷하게 감소하는 경향을 나타내었다. 비장 및 흉선의 절대무게와 상대무게에 있어서 모든 군에서 다소간의 증감작용은 있었으나, 유의한 차이가 없었다(Choi 등 2001). Jin 등(2008)과 Jeon 등(2002)은 사염화탄소에 의한 간 손상 시간 중량이 증가한다고 하였으며, AL-Bekairi 등(1990)은 흰쥐에서 장기 손상 시 마늘추출물의 투여에 의해 폐와 신장의 무게는 변동이 없었으나, 간과 비장에서는 약간의 감소를 보였다는 결과와 유사하였다.

3. 생화학적 parameter 변동

간 기능 손상과 관련된 혈청 생화학적 parameter의 변동은 Table 3과 같다. EC군이 NC군에 비하여 혈청 ALT, AST, ALP, LDH의 활성과 triglyceride(TG)의 함량이 모두 유의하게 증가하였으나, cholesterol(CHOL)의 함량은 모든 군에서 유의한 변동은 관찰되지 않았다. PC군은 EC군에 비하여 ALT, AST, ALP와 LDH의 활성 및 TG의 함량이 모두 유의하게 저하되어 간 기능이 개선되었음을 알 수가 있다. 한편, PC군과 유사하게 혼합 시료추출물(MSE)을 투여한 실험군(E1, E2)에서도 EC

Table 2. Effect of mixed sample extract (MSE) on the organ weight of the CCl_4-induced hepatic damage in rats

Group	NC	EC	PC	E1	E2
Liver	11.89±1.69^{ab}	12.42±0.77^{b}	12.19±1.13^{ab}	12.84±0.77^{a}	11.82±1.22^{ab}
	2.76±0.22^{b}	2.92±0.15^{b}	2.84±0.12^{b}	2.58±0.15^{a}	2.73±0.28^{ab}
Spleen	0.91±0.28^{a}	0.92±0.23^{a}	0.90±0.23^{a}	0.91±0.22^{a}	0.91±0.36^{a}
	0.22±0.13^{a}	0.20±0.14^{a}	0.18±0.92^{a}	0.21±0.12^{a}	0.20±0.21^{a}
Thymus	0.51±0.14^{a}	0.50±0.27^{a}	0.50±0.44^{a}	0.53±0.01^{a}	0.54±0.01^{a}
	0.12±0.12^{a}	0.12±0.21^{a}	0.12±0.15^{a}	0.13±0.11^{a}	0.13±0.10^{a}

Values are mean±S.D. of 6 rats, unit: g.
1) Absolute weight: g.
2) Relative weight: g/100 g body weight.
NC: isovolume of saline.
EC: CCl_4+isovolume of saline.
PC: CCl_4+SM (600 mg/kg BW/day).
E1: CCl_4+MSE (600 mg/kg BW/day).
E2: CCl_4+MSE (900 mg/kg BW/day).
Values with different superscripts are significantly different (p<0.05) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

Table 3. Effect of mixed sample extract (MSE) on the serum levels of ALT, AST, ALP, LDH and the contents of triglyceride (TG) and cholesterol (CHOL) of the CCl_4-induced hepatic damage in rats

Group	NC	EC	PC	E1	E2
ALT	40.7±2.7^{a}	87.4±5.13^{d}	46.2±5.5^{c}	40.1±2.69^{a}	44.1±3.8^{ab}
AST	164.5±4.6^{a}	199.7±5.1^{d}	174.3±2.6^{bc}	167.1±6.0^{ab}	173.5±4.4^{bc}
ALP	235.1±36.4^{a}	339.1±26.4^{d}	259.4±35.9^{a}	255.8±16.6^{a}	283.5±29.3^{b}
LDH	5,685.0±461.8^{a}	7,458.5±498.5^{b}	6,226.7±537.8^{a}	5,845.5±479.0^{a}	6,344.5±491.6^{a}
TG	39.7±1.6^{a}	62.6±6.7^{b}	40.9±3.8^{a}	37.6±4.1^{a}	38.8±2.9^{a}
CHOL	35.4±4.5^{a}	37.0±4.1^{a}	33.8±6.2^{a}	34.8±5.0^{a}	33.2±4.7^{a}

Values are mean±S.D. of 6 rats, unit: IU.
Values with different superscripts are significantly different (p<0.05) compared to the C group by ANOVA and Duncan's multiple range test.

군에 비하여 ALT, AST, ALP와 LDH의 활성 및 TG의 함량이 유의하게 감소하였다. 그러나 각 실험군(E1, E2)간에는 측정한 모든 parameter들의 활성과 함량이 유사하게 관찰되었다. 이러한 결과는 Tsukamoto 등(1993), Lim 등(2000)의 보고와도 유사하였으며, Choi 등(2001)은 TG, CHOL의 변화에서 유의한 차이가 없었다고 보고하였으며, AL-Bekairi 등(1990)은 장기 손상 시 마늘추출물의 투여에 의해 혈청 생화학적 parameter들이 개선되었다는 결과와 유사하였다. 그러므로 이러한 결과들과 간 무게 변동을 종합해 볼 때, 혼합 시료추출물(MSE)을 투여한 실험군에서 간의 기능이 개선되었음을 시사하고 있다.

4. 혈액학적 변동

혈액학적 분석 결과는 Table 4와 같다. 백혈구, 호중구, 림프구, 혈색소, 혈소판 수치 모두 EC군이 NC군에 비해 유의하게 높았으며, 실리마린을 투여한 PC군에서는 EC군에 비해 유의하게 낮았다. 혼합 시료추출물(MSE)을 투여한 실험군인 E1, E2군에서는 실험대조군인 EC군에 비해 백혈구와 림프구가 유의하게 낮았으며, E1과 E2 각 실험군 간에는 약간의 차이는 있었으나, 통계적 유의성은 나타내지 않았다. 급성염증의 parameter인 호중구는 EC군이 NC군에 비해 높은 특이성을 보였으며, 이는 Habu 등(2004)의 결과와도 유사하였다. 그리고 양성대조군(PC)인 SM 섭취군과 혼합 시료추출물(MSE) 섭취군인 E1군 모두에서 호중구의 수가 EC군에 비해 유의하게 낮았으며, E2군에서는 약간 감소하였으나, 유의성은 없었다. 한편, 적혈구 용적(MCV)은 모든 실험군에서 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 혈색소(Hb) 함량과 혈구혈장비율(Hct)은 EC군에서 NC군에 비해 유의하게 저하되었으나, 실리마린 투여군인 PC군과 혼합 시료추출물(MSE) 투여군인 E1, E2군 모두 NC군 수준으로 나타났다. 그러나 EC군에서 감소되었던 혈소판의 수는 PC 및 E1과 E2 실험군 모두에서 NC군 수준으로 회복되었다. 그리고 단핵구의 수는 모든 실험군에서 유의한 변동은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 Enzinger(1986) 등의 간암으로 인해 섬유화가 진행된 장기에서 혈액학적 염증 수치의 변동과도 일치하였으며, 사염화탄소에 의한 간 독성실험의 혈액학적 검사에서 생리기능이 개선됨을 보였다는 결과와도 유사하였다(Song 등 1992; Lim 등 2000).

5. 간 조직의 면역조직화학적 발현 관찰

실험동물의 간 조직의 면역조직화학 염색한 결과는 Table 5와 같다. NC군 및 PC군의 간 조직에서 SMA(smooth muscle actin) 항체에 대한 교원섬유 발현 부분이 미세한 양성으로 관찰되었다. 그리고 EC군에서는 간 섬유조직 발현 부분에서 얇은 띠를 형성한 강 양성의 갈색으로 관찰되어 통계적으로 유의성 있게 나타났으며, 혼합 시료추출물(MSE)을 투여한 실험군인 E1, E2군에서는 간 섬유조직 발현 부분에서 미세하게 갈색으로 염색되어 실험대조군(EC)에 비해 유의성이 있었으며, NC군과 PC군의 발현정도에는 큰 차이가 없었다. 이러한 결과는 간 문맥역의(Song 등 1992) 담관 및 간정맥 부분에서 미세한 양성으로 관찰되었다(Choi 등 2001)는 결과와 유사성이 있으며, Enzinger 등(1986)은 간독성 실험에서 조직이 손상되면 면역조직학적 발현에서 결합조직 섬유가 손상된 부분이 강 양성으로 발현이 된다는 보고와도 일치하였다. 그러므로 혼합 시료추출물(MSE)의 투여가 손상된 간 조직을 일정부분 회복시켰다는 것을 실험군의 간 문맥역의 담관 및 간정

Table 4. Changes of hematological parameters in CCl_4-induced hepatic damage of rats treated with mixed sample extract (MSE)

Group	NC	EC	PC	E1	E2
WBC (k/μL)	6,833±17.3^{a}	10,416±47.7^{e}	8,355±4.9^{b}	7,890±3.5^{b}	8,562±5.8^{bc}
Neutrophil (k/μL)	0.68±0.13^{a}	1.93±0.52^{c}	1.25±0.37^{b}	1.35±0.27^{ab}	1.41±0.26^{bc}
Lymphocyte (k/μL)	6.06±0.97^{a}	8.08±0.41^{d}	6.99±0.84^{abc}	6.72±0.77^{ab}	7.48±0.89^{bcd}
Monocyte (k/μL)	0.09±0.03^{a}	0.12±0.10^{a}	0.11±0.10^{a}	0.07±0.02^{a}	0.12±0.09^{a}
Eosinophil (k/μL)	0.03±0.02^{a}	0.05±0.03^{a}	0.04±0.06^{a}	0.03±0.01^{a}	0.05±0.04^{a}
Basophil (k/μL)	0.01±0.03^{a}	0.02±0.03^{a}	0.01±0.01^{a}	0.03±0.08^{a}	0.01±0.01^{a}
RBC (M/μL)	757.1±47.2^{a}	778.1±62.9^{a}	785.8±33.8^{a}	745.0±26.1^{a}	796.5±49.1^{a}
HB (g/dL)	14.84±0.51^{b}	12.62±0.87^{a}	14.96±0.42^{b}	14.84±0.47^{b}	14.77±0.52^{b}
HCT (%)	44.98±0.88^{b}	42.01±1.28^{a}	45.04±0.36^{b}	44.35±0.42^{b}	44.25±0.82^{b}
Platelet (k/μL)	1,038.5±68.6^{a}	827.2±73.2^{b}	1,184.0±322^{a}	1,055.0±25.6^{a}	1,058.4±52.4^{a}

Values are mean±S.D. of 6 rats.

Values with different superscripts are significantly different ($p<0.05$) compared to the C group by ANOVA and Duncan's multiple range test.

Table 5. Comparison of SMA protein expression in rat live tissue treated with mixed sample extract (MSE)

Area	NC	EC	PC	E1	E2
Total (μm^2)	6,455.6±430.1	7,399.4±512.4	6,478.8±512.4	7,262.2±327.4	7,231.9±262.8
SMA protein (μm^2)	224.9±58.7	883.2±62.5	227.5±16.4	432.7±50.6	448.6±40.7
% of SMA protein	2.4±0.4[a]	11.0±1.2[c]	2.49.2±0.5[a]	4.4±0.5[b]	4.5±0.6[b]

Values are the means±S.D. of 6 samples.
Values with different superscripts in the same row are significantly different ($p<0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test

맥 줄기 부분의 발현정도로 확인할 수 있으며, 또한 정상대조군(NC)의 염색정도와도 큰 차이가 없다는 것이 혈청 생화학적 검사와도 일치하였다.

이상의 실험결과들과 문헌상의 의견들을 종합해 볼 때, 본 실험에서 사용한 혼합 시료추출물(MSE)은 간 섬유조직의 활성화를 유도하여 간 손상을 회복시키는 것으로 사료되며, 이러한 결과는 간 손상 환자의 기능성 식품으로의 가능성을 시사하고 있다. 그러나 본 실험에 이용된 혼합 시료추출물의 어떠한 성분이 간 손상을 예방 혹은 경감이나 치료 작용에 관여하는지에 대한 작용기전은 본 실험의 결과만으로는 판단할 수 없으며, 이와 관련된 추후 계속적인 실험을 계획하고 있다.

요약 및 결론

본 연구는 5주령(180~200 g)의 SD계 흰쥐에 사염화탄소로 간 손상을 유발시킨 후 혼합 시료추출물(MSE)을 투여한 다음 혈액학적 및 생화학적인 parameter의 변동과 더불어 간 조직의 면역화학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 실험동물의 식이량을 측정한 결과, 실험대조군(EC)군이 실험군(E1, E2)과 정상대조군(NC)과 양성대조군(PC)에 비해 통계적으로 유의하게 감소하는 경향을 나타내었고, 체중과 식이 섭취율은 실험대조군(EC)에 비해 실험군(E1, E2)과 정상대조군(NC)과 양성대조군(PC)은 통계적으로 유의하게 증가하는 간, 비장 및 흉선의 무게를 측정한 결과, 간의 무게는 실험 대조군(EC)이 정상대조군(NC)과 양성대조군(PC)에 비하여 약간 증가하였으나, 통계적으로 유의한 차이는 없었으며, 혼합 시료추출물(MSE)을 투여한 실험군(E1, E2)은 NC군 및 PC군과 유의한 차이가 없었다. 비장 및 흉선의 절대무게와 상대무게에 있어서도 모든 군에서 유의한 차이가 없었다. 실험대조군(EC)이 정상대조군(NC)에 비하여 혈청 ALT, AST, ALP와 LDH의 활성과 triglyceride(TG)의 함량이 모두 유의하게 증가하였고, 혈청 cholesterol(CHOL)의 함량은 모든 군에서 유의한 변동을 관찰할 수 없었다. 실리마린을 투여한 양성대조군(PC)은 실험 대조군(EC)에 비하여 혈청 ALT, AST, ALP와 LDH의 활성 및 TG의 함량 모두 유의하게 감소하였다. 그리고 혼합 시료추출물(MSE)을 투여한 실험군(E1, E2)은 실험대조군(EC)에 비하여 혈청 ALT, AST, ALP와 LDH의 활성과 TG의 함량 모두 유의하게 감소하였다. 백혈구, 호중구, 림프구, 혈소판 수치와 혈색소의 함량 모두 실험대조군(EC)이 정상대조군(NC)에 비해 유의하게 높았고, 실험대조군(EC)에 비해 양성대조군(PC)인 실리마린 투여군이 유의하게 낮았다. 혼합 시료추출물(MSE)을 투여한 실험군 E1, E2군에서는 실험대조군(EC)에 비해 백혈구와 림프구가 유의하게 낮았고, 각 실험군(E1, E2) 간에는 약간의 차이는 있었으나, 유의성은 나타나지 않았다. 간조직의 면역조직화학적 발현 결과는 정상군대조군(NC) 및 양성대조군(PC)의 간 조직에서 SMA(smooth muscle actin) 항체에 대한 교원섬유 발현 부분이 미세한 양성으로 관찰되었다. 실험대조군(EC)에서는 간 섬유조직 발현 부분에서 얇은 띠를 형성한 강 양성의 갈색으로 관찰되어 통계적으로 유의성 있게 나타났으며, 혼합 시료추출물(MSE) 투여군인 E1과 E2군에서는 간 섬유조직 발현 부분에서 미세하게 갈색으로 염색되어 실험대조군(EC)에 비해 유의하게 낮게 나타났으며, 정상대조군(NC)과 양성대조군(PC)의 발현정도와 큰 차이가 없었다. 이상의 실험결과를 종합해 볼 때, 본 실험의 결과는 간 손상 예방과 치료, 더 나아가 건강기능성 식품 소재로서 혼합 시료추출물의 활용 가능성에 대한 기초자료로 이용할 수 있을 것으로 생각되며, 이와 관련된 추가적인 연구를 계획하고 있다.

Reference

AL-Bekairi AM, Shah AH, Qureshi S. 1990. Effect of *Allium sativum* on epididymal spermatozoa, estradiol-treated mice and general toxicity. *J Ethnopharmacol* 29:117-125

Alvarez-Parrilla E, De La Rosa LA, Torres-Rivas F, Rodrigo-arcia J, Gonzalez-Aguilar GA. 2005. Complexation of apple antioxidants: Chlorogenic acid, quercetin and rutin by β-cydodextrin (*β*-CD). *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 53: 121-129

Ankri S, Mirelman D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect* 1:125-129

Belman S. 1983. Onion and garlic oils inhibit tumor promotion. *Carcinogenesis* 4:1063-1065

Bortolotto V, Piangiolino C. 2013. Apple biophenol synergistic complex and its potential benefits for cardiovascular health. *Nutrafoods* 12:71-79

Bruckner JV, Mackenzie WF, Muralidhara S, Luthra R, Kyle GM, Acosta D. 1986. Oral toxicity of carbon tetrachloride: Acute, subacute and subchronic studies in rats. *Fundam Appl Toxicol* 6:16-34

Choi HS, Cha SS, Na MS, Shin KM, Lee MY. 2001. Effect of the ethanol extract of *Cassia tora* L. on antioxidative compounds and lipid metabolism in hepatotoxicity of ratsinduced by ethanol. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30:1177-1183

Choi SR. You DH, Kim JY, Park CB, Kim DH, Ryu J. 2009. Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudtania tricuspidata* Bureau according to harvesting parts and time Korean. *J Med Corp Sci* 17:115-120

Corzo-Martinez M, Corzo N, Villamiel M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci Tech* 18: 609-625

Enzinger FM. 1986. Malignant fibrous histocytoma 20 years after stout. *Am J Surg Pathol* 10:43-53

Gilman AG. 1985. Carbon tetrachloride. *Pharmacol Basis Ther* 7:1635-1636

Habu D, Shiomi S, Tamori A, Takeda T, Tanaka T, Kubo S, Nishiguchi S. 2004. Role of vitamin K_2 in the development of hepatocellular carcinoma in women with viral cirrhosis of the liver. *JAMA* 292:358-361

Heras-Ramirez ME, Quintero-Ramos A, Camacho-Davila AA, Barnard J, Talamas-Abbud R, Torres-Munoz JV, Salas-Munoz E. 2012. Effect of blanching and drying temperature on polyphenolic compound stability and antioxidant capacity of apple pomace. *Food Bioprocess Technol* 5:2201-2210

Jekobek L, Drenjancevic M, Jukic V, Seruga M. 2012. Phenolic acids, flavonoids, anthocyanins and antiradical activity of “Nero”, “Viking”, “Galicianka” and wild chokebrries. *Sci Hortic* 147:56-63

Jeon JR, Park JR. 2002. Effect of *Eucommia ulmoides* leaf water extract on hepatotoxicity of carbon tetrachloride - induced rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31:124-130

Jiang H, Ji B, Liang J, Zhou F, Yang Z, Zhang G. 2006. Changes of contents and antioxidant activities of polyphenols during fruit development of four apple cultivars. *Eur Food Res Technol* 223:743-748

Jin YX, Yoo YS, Han EK, Kang IJ, Chung CK. 2008. *Artemisia capillaris* and *Paecilomyces japonica* stimulate lipid metabolism and reduce hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:548-554

Kim CH, Park JH, Lim JK, Lee KJ, Chung GY, Jeong HJ. 2003. The activity of antioxidants of *Orostachys jaonicus* A. Berger. *Korean J Med Corp Sci* 11:31-39

Kim HJ, Bae IY, Ahn CW, Lee S, Lee HG. 2007. Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysate. *Peptides* 28:2098-2103

Kim HJ, Cha JY, Choi MR, Cho YS. 2000. Antioxidative activities by water-soluble extracts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43:148-152

Kim SH, Park I. 2013. Comparison of antioxidant activities of various meat broths served with oriental noodles. *Korean J Food Nutr* 26:150-153

Kim SI, Sim KH, Ju SY, Han YS. 2009. A study of antioxidative and hypoglycemic activities of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extract under variable extract conditions. *Korean J Food Nutr* 22:41-47

Kulling SE, Rawel HM. 2008. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med* 74:1625-1634

Kwon J, Han KS. 2004. Effects of *Orostachys japonicus* A. Berger in the immune system. *Korean J Med Crop Sci* 12:315-320

Lee SL, Park YS, Cho SY. 1993. Protective *Oenanthe javanica* extract on the carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *J. Korean Soc Food Nutr* 22:392-397

Lee HS, Ryu DS, Lee GS, Lee DS. 2012. Anti-inflammatory effects of dichloromethane fraction from *Orostachys japonicus* in RAW 264.7 cells: Suppression of NF-kB activation and MAPK signaling. *J Ethnopharmacol* 140:271-276

Lee SG, Jeong HJ, Lee EJ, Kim JB, Choi SW. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from medicinal herb mixtures. *Korean J Food Sci Tech* 43:200-205

Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extractsfrom vegetables produced in Ullung island. *Korean J Food Sci Technol* 37:233-240

Liao HF, Chou C, Wu SH, Khoo KH, Chen CF, Wang SY. 2001. Isolation and characterization of an active compound

from black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and its effect on proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Anti-cancer Drug* 12:841-846

Lim EJ, Lee YH. 2017. Quality characteristics and antioxidant activities of pound cake with *Aronia melanocarpa* powder. *Korean J Food Nutr* 30:1087-1095

Lim JK, Seo YB, Kim DH, Seol IC. 2000. The experimental studies on the reinforcemental effects of *Acanthopanax radicis* Cortex about immunity hematogenic action. *Korean J Herbol* 15:1

Maeda H, Katsuki T, Akaike T, Yasutake R. 1992. High correlation between lipid peroxide radical and tumor-promoter effect: Suppression of tumor promotion in the Epstein-Barr virus/B-lymphocyte system and scavenging of alkyl peroxide radicals by various vegetable extracts. *Jpn J Cancer Res* 83:923-928

Nam JS, Han YJ, Yeo SM. 2015. Antioxidant and antimicrobial activities of various berry juices. *Korean J Food Nutr* 28: 328-334

Park YS, Park MR, Jeon MH, Hwang HJ, Kang MS, Kim BK, Kim SG, Lee SH, Kim MH. 2011. Effect of pine (*Pinus densiflora*) needle hot water extract on antioxidant activity in rats treated with carbon tetrachloride. *J Life Sci* 21: 604-609

Ravn-Haren G, Dragsted LO, Buch-Andersen T, Jensen EN, Jensen RI, Németh-Balogh M, Paulovicsová B, Bergström A, Wilcks A, Licht TR, Markowski J, Bügel S. 2013. Intake of whole apples or clear apple juice has contrasting effects on plasma lipids in healthy volunteers. *Eur J Nutr* 52: 1875-1889

Ruffin J, Hutter SA. 1983. An evaluation of the side effects of garlic as an antihypertensive agent. *Cytobios* 37:85-89

Sadaki O. 1996. The development of functional and materials. *Bioindustry* 13:44-50

Shin SH, Kim MK. 2004. Effect of dried powders or ethanol extracts of garlic flesh and peel on antioxidative capacity in 16-mouth-old rats. *Korean J Nutr* 37:515-524

Song IH, Kim BH, Kim YK, Dong SH, Kim HJ, Lee JI, Chang YW, Chang R. 1992. Carbon tetrachloride (CCl_4)-induced hepatic fibrosis in the rat. *Korean J Gastroenterol* 24:1330-1339

Stracke BA, Rufer CE, Bub A, Seifert S, Weibel FP, Kunz C, Watzl B. 2010. No effect of the farming system (organic/conventional) on the bioavailability of apple (*Malus domestica* Bork., cultivar Golden Delicious) polyphenols in healthy men: A comparative study. *Eur J Nutr* 49:301-310

Takahashi R, Ohmori R, Kiyose C, Momiyama Y, Ohsuzu F, Kondo K. 2005. Antioxidant activities of black and yellow soybeans against low density lipoprotein oxidation. *J Agr Food Chem* 53:4578-4582

Tsukamoto S, Kanegae T, Uchigasaki S, Kitazawa M, Fujioka T, Fujioka S, Imamura Y, Nagoya T, Shimamra M, Mieda Y. 1993. Changes in free and bound alcohol metabolites in the urine during ethanol oxidation. *Arukoru Kenkyu to Yakubutsu Ison* 28:441-452

Yoon SY, Lee SY, Kim KBWR, Song EJ, Kim SJ, Lee SJ, Lee CH, Ahn DH. 2009. Antimicrobial activity of the solvent extract from different parts of *Orostachys japonicus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:14-18

Zhao QW, Lou YJ. 2006. Estrogenic activity and its mechanism of ethanol extract from black soybean. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31:825-828

Received 10 October, 2018
Revised 29 October, 2018
Accepted 08 November, 2018