



Anti-hepatofibrogenic Effect of Turnip Water Extract on Thioacetamide-induced Liver Fibrosis

Lan Li^{1#}, Dae-Hun Park^{2#}, Yong-Chun Li¹, Seung-Kee Park³, Yun-Lyul Lee⁴, Hyon-Min Choi¹, Dae-Sup Han¹, Hyuck-Joo Yang¹, Eun-Hye Lee¹, Hyung-Kwan Jang⁴, Young-Jin Kim⁵, Ja-June Jang⁶ and Min-Jae Lee^{1*}

¹Department of Laboratory Animal Medicine, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

²College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

³Department of Microbiology, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon, Korea

⁴Department of Physiology, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon, Korea

⁵Department of Veterinary Infectious Diseases and Avian Disease, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Cheongju, Korea

⁶Traditional Food Research Group, Korea Food Research Institute, Seoul, Korea

⁷Department of Pathology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Liver fibrosis is a chronic liver disease and lots of people in Korea are suffered. There are many efforts to find candidates to suppress liver fibrogenesis and several chemical-induced model or bile duct ligation model have been used to research and develop hepatic fibrogenic suppressor. From the previous study about functional effects of turnip which cultivated in Kangha Island, we got the feasibility which turnip might be able to inhibit hepatic fibrogenesis. TAA is a representative hepatic fibrosis inducer, repeated 7-weeks i.p. injection of it results in hepatic fibrosis. We compared the level of hepatic fibrosis in TAA-turnip group, TAA group, and vehicle control group. Nodules-formed by TAA were observed; they were rarely shown in vehicle control group, observed in most area in TAA group, but only shown in periportal regions in TAA-turnip group. These results were confirmed through Masson's trichrom stain; fibrous structures increased in TAA group (fibrosis score: 4) but significantly decreased in TAA-turnip group (fibrosis score: 2-3). In conclusion, we got the result that turnip water extract has a potency to protect TAA-induced hepatic fibrogenesis but it is necessary further study to find its mechanism.

Key words: Turnip water extract, thioacetamide (TAA), hepatofibrogenic animal model, nodular formation

(Received 16 September 2009; Revised version received 2 February 2010; Accepted 10 March 2010)

만성 간질환은 간섬유화, 간경변, 간암으로 구분되며 간 섬유화가 고도로 진행된 경우 간경변, 간암으로 발전된다 (Zhou and Lu, 2009). 간섬유화는 정상적인 간 조직이 탈락하여 섬유조직으로 대체되면 흉터형성(scarring)이라는 현상을 통해서 발생되며, 전 세계의 사망원인 가운데 16 번째를 차지하고 있는 것으로 알려져 있다(Hillebrandt et al., 2005).

현재 간섬유화의 발생 원인에 대한 여러 연구결과가 보고되고 있는데, 예를 들면 간세포 손상에 의해서 각종 사이토카인 및 발생기산소 등이 생성되어, 세포외기질

(extracellular matrix)의 손상을 유도하고 결국 세포외기질이 이상 증식되어 간섬유화로 진행된다는 연구결과가 있다(Friedman et al., 2008). 그러나 간섬유화에 대한 발생 기전은 명확하지 않고 간섬유증 환자를 이용해서 직접적으로 발생기전 등을 연구하는 것은 매우 어렵기 때문에 다양한 화학물질, dimethylnitrosamine (DEN) (Chang et al., 2008), carbon tetrachloride (CCl₄) (Young et al., 2007), ethanol (Hu et al. 2009) 및 thioacetamide (TAA) (An et al., 2006)을 이용한 방법과 담도 결찰법의 외과적 기법(Krahenbuhl et al., 2000)을 이용한 연구가 진행되고 있다. 특히 TAA로 인한 간섬유화 동물모델은 사람의 간섬유증과 형태학적, 생화학적 특징이 유사하기 때문에 본 연구에서는 TAA를 이용한 동물모델을 이용하였다.

지금까지 간섬유화를 억제하는 물질로는 curcumin (Shapiro et al., 2006), Inchin-ko-to (TJ-135) (Inao et al., 2004), polyenylphosphatidylcholine (PPC) (Ma et

*These authors equally contributed to this study

*Corresponding author: Min-Jae Lee, School of Veterinary Medicine, Kangwon University, Chuncheon, Kangwon-do 200-701, Korea

Tel: +82-33-250-8678

Fax: +82-33-244-8678

E-mail: mjlee@kangwon.ac.kr

al., 1996) 등이 알려져 있는데 본 연구에 사용된 순무는 강화도 특산물로 주로 김치의 재료로 활용되고 있으며, 뿌리 추출물이 포도당과 지질대사 조절에 의해 제2형 당뇨병을 억제하고(Jung *et al.*, 2008), 알코올을 분해하고(Kim *et al.*, 2006), 에탄올 추출물이 간섬유화를 억제하며(Shin *et al.*, 2006), 분획물이 간경변증을 억제하는(Shin *et al.*, 2006-1) 등의 효과가 알려져 있으며, 또한 에탄올 추출물이 혈청 transaminase (AST & ALT) 및 lactic dehydrogenase 상승 억제효과와 superoxide dismutase 및 catalase 활성개선 효과(Choi *et al.*, 2006)가 있음이 보고되었다.

본 연구에서는 순무를 물로 추출하여 배합한 사료를 통해 TAA로 유도되는 랫드의 간섬유화에 대한 영향을 관찰함으로써, 순무 물 추출물의 간섬유화 억제에 대한 효능을 규명하여 간섬유화 억제제로 가능한지 여부를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

순무 물 추출물 사료의 제조

순무 물 추출물은 한국식품연구원에서 제조하였으며, 그 제조법은 다음과 같다. 순무를 압착하여 순무즙과 순무잔사로 분리한 후, 순무잔사를 수증기로 3시간 가열하고, 알파-아밀라제와 셀룰라제를 각각 1% 첨가하고 65°C에서 22시간 물로 추출하고 여과하여 얻은 순무잔사 추출물과 순무즙을 합하여 60°C에서 감압 농축하여 제조하였다. 우리는 순무 물 추출물을 포함한 AIN76 분말사료를 Table 1과 같은 조성으로 농도가 1% 되도록 혼합하여 제조하여 본 연구의 동물실험에 사용하였다.

Table 1. Composition of turnip feed

Feed Ingredients	Content (%)
Turnip water extracts	1.0
Corn Starch	49.0
Casein	20.0
Sucrose	15.0
Cellulose	5.0
Mineral Mixture	3.5
Vitamin Mixture	1.0
DL-methionine	0.3
Choline Chloride	0.2
Corn Oil	5.0
Total	100.0

동물실험

실험동물은 체중이 약 120 g인 6주령 수컷 F344 랫드를 사용하여 Figure 1과 같이 TAA 투여군과 TAA 비투여군을 설정하였다. 간경변증을 유발하기 위하여 thioacetamide (TAA, Sigma, USA)를 saline에 녹여 체중 kg 당 200 mg을 일주일에 3회씩 7주 동안 복강 주사하였다. 동시에 TAA 투여군에 순무 물 추출물 사료를 섞이하게 하였다. 실험기간동안 주 1회씩 체중 측정을 실시하였고 실험이 끝난 후 부검 시 간조직의 중량을 측정하여 실험동물의 체중 증가 및 상대적 간 중량에 미치는 영향을 관찰하였다. 모든 동물실험 및 관리는 강원대학교 동물실험 윤리위원회 윤리적 기준에 의거하여 시행되었다(동물실험 허가번호: KIACUC-09-0004).

혈청학적 분석

실험동물은 에테르(Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)로

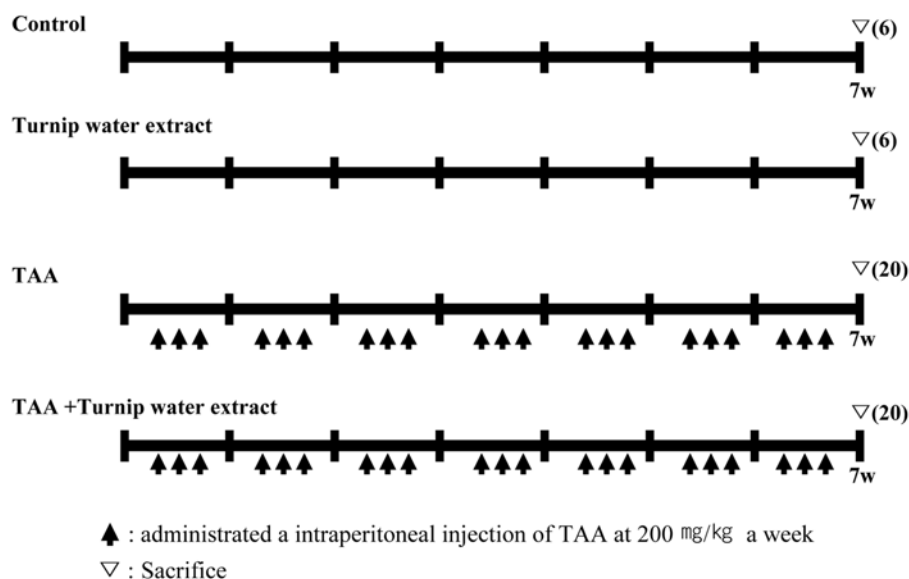


Figure 1. The protocol of TAA-induced hepatic fibrogenetic animal model. Arrows mean administrated a intraperitoneal injection of TAA at 200 mg/kg a week.

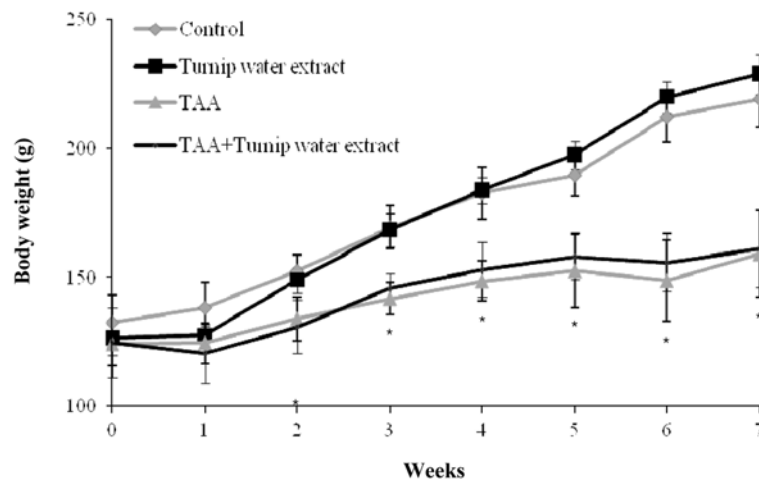


Figure 2. TAA treated groups showed lower body weight gain compared to TAA non-treated group during the experiment. All values are expressed as mean±SD. * $P < 0.05$, TAA untreated groups vs. TAA treated groups.

마취 후 개복하여 복대동맥에서 채혈하였다. 건식 생화학 분석기(FUJI DRI-CHEM 3500i, Japan)를 이용하여, 채혈된 혈액을 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 혈청을 통해 aspartic acid transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), total bilirubin (T-Bil)을 측정하였다.

병리조직학적 분석

부검을 통하여 간의 좌 우엽에서 각각 2개의 절편을 떼어내고 10% 포르말린에 고정을 한 후 함수-탈수 처리를 거쳐 파라핀 블록을 제작하여 4 μ m 두께의 미세절편을 만들어 슬라이드글라스에 부착시켰다. 제작된 슬라이드는 hematoxylin and eosin (H&E) 염색과 Masson's trichrome (MT) 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다. 간섬유화 정도를 정량적으로 나타내기 위하여 병리학적 score 채점 방식을 이용하였는데 이는 score 0: 전혀 없음(no), score 1: 문맥 섬유화(portal fibrosis), score 2: 문맥주변 섬유화(periportal fibrosis), score 3: 격벽 섬유화(septal fibrosis), score 4: 간경변증(cirrhosis)로 판독하였다.

통계 처리

모든 결과는 SAS 프로그램에서 분산분석(ANOVA)을 사용하여 통계적 유의성($P < 0.05$)을 판단하였다.

결과 및 고찰

체중변화

TAA 투여와 순무 물 추출물 사료섭이가 동물 성장에 미치는 영향을 확인한 결과 TAA 투여가 체중을 저하시킨다는 것을 확인할 수 있었다($P < 0.05$). 한편 순무 물 추출물 사료를 섭취하였을 때 체중의 저하를 다소 회복시키는 것을 확인하였다(Figure 2).

간 무게 변화 및 혈청학적 분석

체중에 대한 백분율로 나타낸 간 무게는 TAA 투여군에서 TAA 비투여군보다 유의적으로 높게 나타났으나 TAA 투여군에서 순무 물 추출물 사료섭이가 영향을 미치지 않았다. 순무 물 추출물 사료만 섭취한 군에서는 대조군보다 간중량이 증가하였는데 이는 일반적으로 천연물에서 나타나는 결과(Cha et al., 2009)로, 간 기능의 보상에 따른 결과로 추정된다(Figure 3A).

혈청 내 AST와 ALT는 간세포에 존재하는 효소인데, 간세포가 파괴되면 혈중으로 나와 그 혈중치가 높아지게 되므로 간세포 손상 정도를 측정하는데 활용된다(Yang and Leow, 2006). Total bilirubin은 적혈구가 손상되어 만들어지는 내인성 노폐물로 수치가 높을수록 간에 이상이 있음을 의미한다. Figure 3B에서 보듯이 TAA 비투여군에 비해 TAA 투여군에서 AST, ALT, Total bilirubin의 수치가 유의하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 순무 물 추출물 사료만 섭취한 군과 대조군에서 별다른 차이가 관찰되지 않은 것을 보아, 순무 물 추출물 사료 자체가 간에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 그러나 TAA 투여로 인한 혈청 효소의 변화에 순무 물 추출물은 큰 효과가 없는 것으로 보이지만, 간섬유화를 판단함에 있어서 병리조직학적인 소견이 가장 중요하고 이것은 혈청 효소의 변화보다 우선하므로 혈청 효소의 변화가 간섬유화를 좌우한다고 판단하기는 어렵다.

순무 물 추출물 사료 섭취에 따른 간조직의 형태학적 변화 및 간섬유화 측정

간을 적출하여 육안으로 관찰한 결과 TAA 비투여군은 표면의 변화가 없었으나 TAA 투여군은 간 전체에 작은 결절들이 관찰되는 전형적인 간섬유화의 소견을 보였다(data not shown). H&E 염색과 콜라겐 침착 정도를 확인하

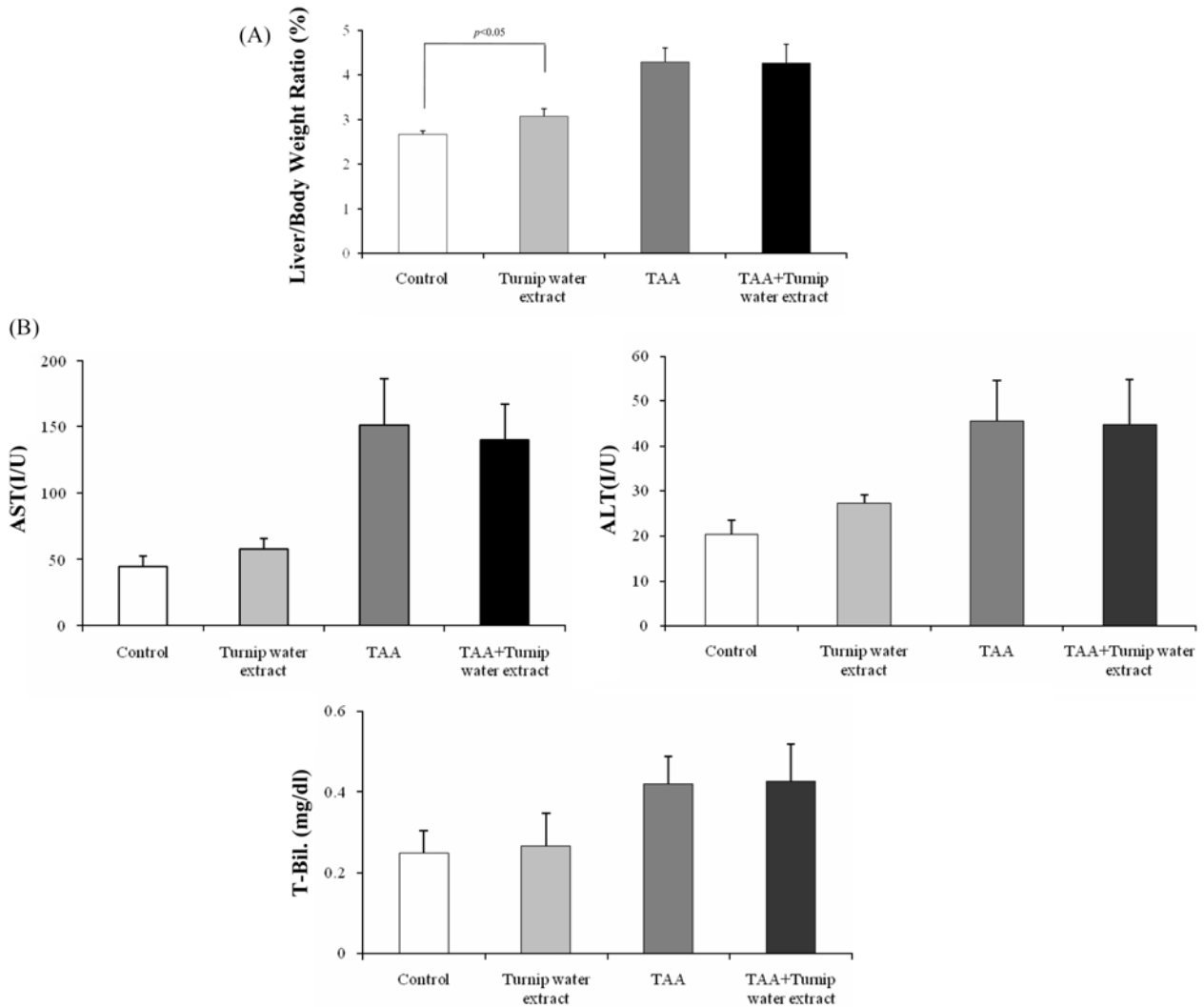


Figure 3. Physiological changes by TAA treatment or untreatment (A) Relative liver weight of experimental animals. TAA treated groups is larger than that in TAA untreated groups. All values are expressed as mean \pm SD. $P < 0.05$, TAA untreated groups vs. TAA treated groups. (B) Serological analysis of liver enzymes in TAA treated rat liver with turnip water extract. It is not different from activities of serum enzymes of control and those of turnip water extract treatment group. All values are expressed as mean \pm SD. $P < 0.05$, TAA untreated groups vs. TAA treated groups.

기 위하여 MT 염색을 실시하였다(Figure 4A). TAA 비투여군은 일부 문맥에 경도의 림프구 침윤이 관찰되지만 간 문맥과 실질이 정상적인 구조를 유지하고 있었으며, 간섬유화의 소견은 확인되지 않았다. 반면 TAA 투여군은 간 문맥과 중심정맥 혹은 문맥과 문맥을 잇는 섬유띠가 생성되었고 MT 염색 결과에서 보듯이 콜라겐 침착이 심하였으며 완전한 섬유성 격막을 형성(nodular formation)하면서 결절이 형성된 전형적인 간경변이 관찰되었다. TAA 투여와 순무 물 추출물 사료를 섭취한 군에서는 간문맥을 연결하는 섬유띠의 형태는 관찰되지 않고, 문맥 주변에 부분적인 선상의 섬유화와 림프구의 침윤이 관찰되었으며 간경변에서 관찰되는 팽창성 재생 결절은 관찰되지

않았다. 이러한 간섬유화의 정도를 정량적으로 분석한 결과, TAA 비투여군은 fibrosis score가 0으로 확인되었으며, TAA 투여군은 fibrosis score가 4로 확인되었고 TAA 투여와 순무 물 추출물 사료를 섭취한 군은 fibrosis score가 2-3으로 판정되었다(Figure 4B). 이런 결과를 통해 순무 물 추출물 사료를 섭취함으로써 염증반응이 완화되며, 간섬유화 진행이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 강원대학교 학술연구조성비로 수행하였습니다.

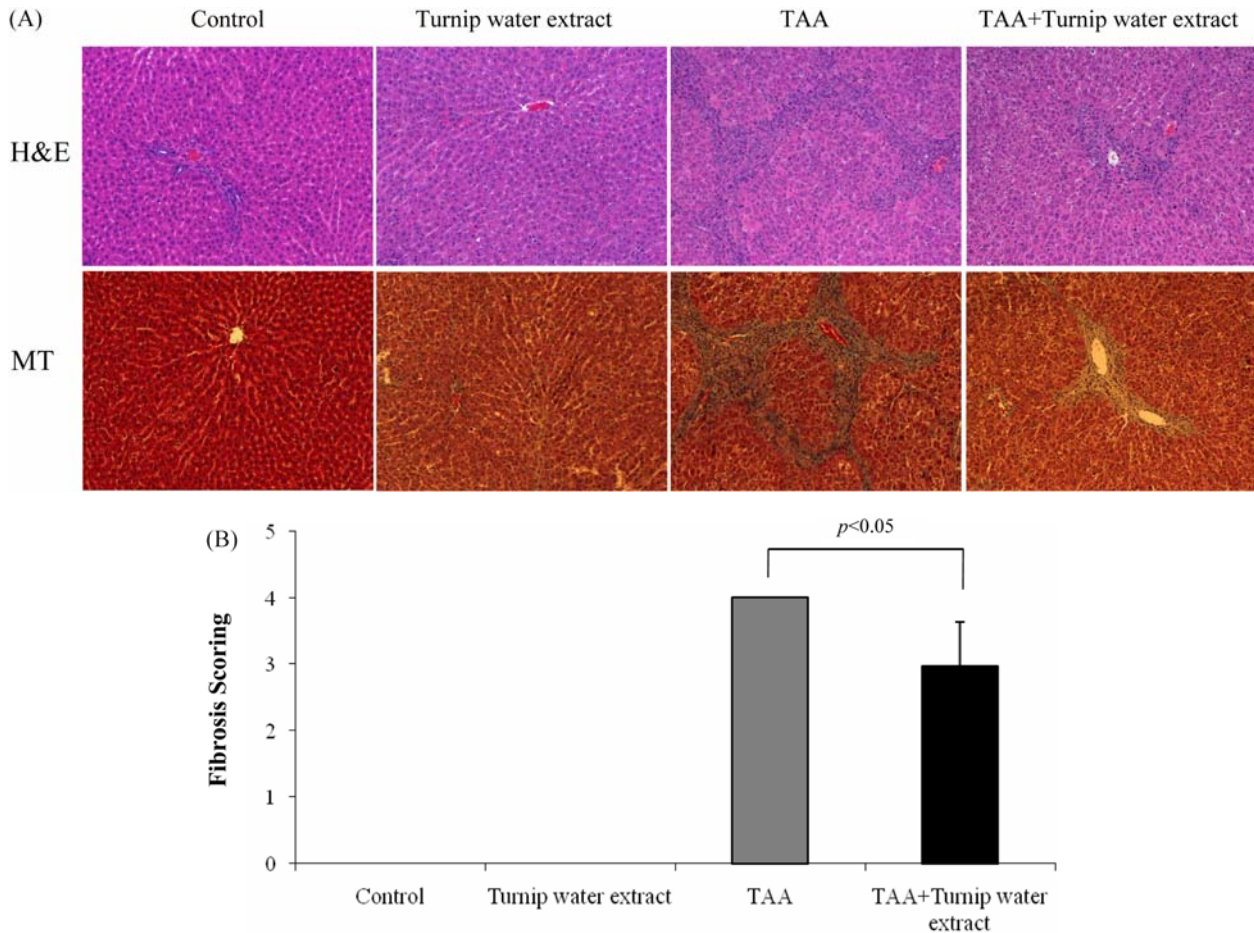


Figure 4. Anti-hepatofibrogenic effects of turnip water extract (A) Photos of livers in control and turnip water extract treatment group are normal but that in TAA treatment is shown typical hepatic fibrosis. Turnip water extract almost inhibits TAA-induced nodular formation and fibrosis. (B) Fibrosis scores in each group. Semi-quantitative scoring system is adopted to evaluate the degree of liver fibrosis (0: no, score 1: portal fibrosis, score 2: periportal fibrosis, score 3: septal fibrosis, score 4: cirrhosis). Mean of fibrosis scores in TAA treatment group is 4 but turnip water extract decreases mean of fibrosis scores by 2-3. All values are expressed as mean±SD. $P < 0.05$, TAA untreated groups vs. TAA treated groups.

참고문헌

- An, J.H., Seong, J., Oh, H., Kim, W., Han, K.H. and Paik, Y.H. (2006) Protein expression profiles in a rat cirrhotic model induced by thioacetamide. *Kor. J. Hepatol.* 12(1), 93-102.
- Cha, J.Y., Park, J.C., Ahn, H.Y., Eom, K.E., Park, B.K., Jun, B.S., Lee, C.H. and Cho, Y.S. (2009) Effect of *Monascus purpureus*-fermented Korean red ginseng powder on the serum lipid levels and antioxidative activity in rats. *J. Kor Soc Food Sic Nutr.* 38(9), 1153-1160.
- Chang, J.J., Jeon, S.Y., Song, J.Y., Kim, J.H., Li, L., Park, D.H., Lee, Y.L., Park, J.J., Woo, D.W., Kim, G.J. and Lee, M.J. (2008) Alteration of X-linked inhibitors of apoptosis (XIAP) expression in rat model with DEN-induced hepatocellular carcinogenesis. *Mol. Cell. Toxicol.* 4(4), 278-284.
- Choi, H.J., Han, M.J., Baek, N.I., Kim, D.H., Jung, H.G. and Kim, N.J. (2006) Hepatoprotective Effects of *Brassica rapa* (Turnip) on d-Galactosamine Induced Liver Injured Rats. *Kor. J. Pharmacogn.* 37(4), 258-265.
- Friedman, S.L. (2008) Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* 314, 1655-1669.
- Hillebrandt, S. (2005) Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nature Genetics* 37, 835-843.
- Hu, S.L., Yin, S., Jiang, X.D., Huang, D.B. and Shen, G. (2009) Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *Europ. J. Pharm.* 616, 287-292.
- Inao, M., Mochida, S., Matsui, A., Eguchi, Y., Yulutuz, Y., Wang, Y., Naiki, K., Kakinuma, T., Fujimori, K., Nagoshi, S. and Fujiwara, K. (2004) Japanese herbal medicine inchi-ko-to as a therapeutic drug for liver fibrosis. *J. Hepatol.* 41, 584-591.
- Jung, U.J., Baek, N.I., Chung, H.G., Bang, M.H., Jeong, T.S., Lee, K.T., Kang, Y.J., Lee, M.K., Kim, H.J., Yeo, J. and Choi, M.S. (2008) Effects of the ethanol extract of the roots of *Brassica rapa* on glucose and lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice. *Clinical. Nutrition* 27, 158-167.
- Kim, D.H., Kim, J.H., Kim, C.H., Kwon, M.C., Kim, H.S., Chung, H.G., Kang, H.Y., Lee, H.J. and Lee, H.Y. (2008) Effects of alcohol oxidation of *Brassicarapa* L. extraction process in Kang-Hwa. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 14(1), 45-48.
- Krahenbuhl, S., Brass, E.P. and Hoppel, C.L. (2000) Decreased carnitine biosynthesis in rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology* 3(1), 1217-1223.
- Ma, X., Zhao, J. and Lieber, C.S. (1996) Polyenylphosphatidylcholine Attenuates non-alcoholic hepatic fibrosis and

- accelerates its regression. *J. Hepatol.* 24, 604-613.
- Shapiro, H., Ashkenazi, M., Weizman, N., Shakhmurov, M., Aeed, H. and Bruck, R. (2006) Curcumin ameliorates acute thioacetamide-induced hepatotoxicity. *J. Gastroenterology & Hepatology* 21(2), 358-366.
- Shin, H.W., Park, S.Y., Lee, K.B., Shin, E., Lee, M.J., Kim, Y.J. and Jang, J.J. (2006) Inhibitory effect of turnip extract on thioacetamide-induced rat hepatic fibrogenesis. *Cancer Prevention Research* 11, 265-272.
- Shin, H.W., Park, S.Y., Lee, K.B., Shin, E., Ryu, H.S., Kim, M.S., Ahn, J.B., Kim, Y.J. and Jang, J.J. (2006-1) Inhibitory Effect of Turnip extract fractions on Hepatic Fibrogenesis. *Lab. Anim. Res.* 22(3), 279-288.
- Yang, S. and Leow, C.K.. (2006) Expression patterns of cytokine, growth factor and cell cycle-related genes after partial hepatectomy in rats with thioacetamide-induced cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* 12, 1063-1070.
- Young, S.C., Wang, C.J., Lin, J.J., Peng, P.L., Hsu, J.L. and Chou, F.P. (2007) Protection effect of piper betel leaf extract against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Arch Toxicol.* 81, 45-55.
- Zhou, K. and Lu, G. (2009) Assessment of fibrosis in chronic liver diseases. *J. Digestive Diseases* 10, 7-14.