

다이옥신계 TCDD (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin)에 노출된 흰쥐의 지질대사 및 간 독성물질대사에 관한 키토산의 예방효과*

이준호^{1§} · 황석연² · 이연숙³

충남대학교 생활과학대학 소비자생활정보학과,¹⁾ 충북대학교 부속병원 진단검사의학과,²⁾
서울대학교 생활과학대학 식품영양학과³⁾

Preventive Effects of Chitosan on the Disorders of Hepatic Functions and Lipid Metabolism in Rats Treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)*

Lee, Joon-Ho^{1§} · Hwang, Seok-Youn²⁾ · Lee, Yeon-Sook³⁾

Department of Consumers' Life Information,¹⁾ Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea
Department of Clinical Laboratory Medicine,²⁾ Chungbuk National University Hospital, Cheongju 361-711, Korea
Department of Food and Nutrition,³⁾ Seoul National University, Seoul 151-742 Korea

ABSTRACT

This study was conducted to fine out the preventive effects of chitosan and chitosan oligomer on the disorders of hepatic functions and lipid metabolism induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), using adult male rats (SD) for four weeks. Rats were fed chitosan (4%) or chitosan oligomer (4%) diets respectively before 3weeks of TCDD treatment (50 ug/kg BW) by intraperitoneal injection and then continually supplied these diets for one week until being sacrificed. The elevation of serum total and LDL cholesterol levels induced by TCDD treatment was significantly reduced in the rats fed chitosan diets. The increment of liver triglyceride levels caused by TCDD treatment was tended to suppress in all rats fed chitosan and chitosan oligomer diets. Fecal total lipid and cholesterol excretion were high levels in the rats fed chitosan diets. The hepatic cytosolic catalase activities significantly decreased by TCDD treatment appeared recovering trend by chitosan diets. In hepatic microsomal cytochrome p-450, NADPH cytochrome p-450 reductase, ethoxycoumarin-*o*-deethylase (ECOD) and benzphetamin N-demethylase (BPND), chitosan than chitosan oligomer diets apparently decreased the increasing levels by TCDD treatment. In histochemical observation, the fat droplets and apoptosis of hepatocytes by TCDD treatment were markedly alleviated by chitosan and chitosan oligomer diets. These results indicate that chitosan, more than chitosan oligomer can exert preventive effects on some disorders of hepatic functions and lipids accumulation by TCDD. (*Korean J Nutrition* 38(9): 689~697, 2005)

KEY WORDS : TCDD, chitosan, chitosan oligomer, lipid, catalase, ECOD, BPND.

서 론

환경호르몬이란 생체의 호르몬 분비기능에 변화를 주는

접수일 : 2005년 6월 13일

채택일 : 2005년 10월 31일

*This work was supported by grant No. (R01-2002-000-00321-0) from the Basic Research Program of the Korea Science & Engineering Foundation

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : joonho@cnu.ac.kr

외인성 내분비 교란물질로서, 세포의 호르몬 수용체와 결합하여 호르몬과 같은 역할을 하거나 정상적인 호르몬과 수용체의 결합을 방해하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 현재 환경호르몬의 작용을 하는 화합물은 약 70종으로 그 종류가 다양하며, 대표적인 물질로 최근에 세계적으로 문제시되었던 다이옥신계 화합물을 들 수 있다.²⁾ 다이옥신 (dioxins)계 화합물은 여러 개의 염소가 결합된 방향족 화합물이며 이 중에서 특히 TCDD (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin)는 가장 독성이 강한 화합물로서 LD50이 흰쥐의 경우 22~45 $\mu\text{g/kg BW}$, guinea pig가 0.6~2.1 $\mu\text{g/kg BW}$

이며 인간의 TCDD에 대한 내성 범위는 1일 0.01 pg/kg BW로 제시되고 있으나 현실적으로는 1일 1~3 pg/kg BW 정도의 양을 섭취하고 있는 실정이다.³⁾ TCDD는 화학공장에서 불순물로 생성되거나 폐기물 소각로 등에서 배출되고 산불, 번개, 화재, 화산활동 등의 자연적 연소과정에 의해 생성되어 대기, 물, 토양 등으로 유입된 후 2차 오염원인 어류, 육류, 유제품, 채소를 통해 인체로 유입된다. TCDD는 화학적으로 매우 안정된 화합물⁴⁾로 자연환경에서 거의 반영구적으로 존재하며 체내에 유입되면 지방조직에 축적되어 일부는 소변 및 담즙으로 배설^{5,6)}되나 쉽게 배설 또는 분해되지 않는 것⁷⁾으로 알려져 있다. TCDD에 의해 야기되는 대표적인 현상으로는 야생동물 및 조류에서 수컷의 성기왜소화 및 기형, 동성간의 교배행위, 암수 성비의 불균형, 남성의 정자수 감소³⁾ 등이 있다. 또한 동물실험 결과 식욕감퇴,⁸⁾ 체중 저하,⁹⁾ 고지혈증,¹⁰⁾ 고콜레스테롤혈증,¹¹⁾ 지질과산화,¹²⁾ 탄수화물대사 이상,¹³⁾ 간 손상⁴⁾ 및 면역기능 저하 등¹⁵⁾ 매우 광범위한 증상이 나타났으며, 인체에 미치는 영향으로는 염소성 여드름 (chloroacne)이 가장 민감한 폭로 지표¹⁶⁾이며 소화기계암,¹⁷⁾ 전립선암 발생의 통계적 유의성이 보고¹⁸⁾되었다. 근래 일본의 역학조사에서 도시 폐기물 소각장 노동자 95명을 대상으로 혈중 다이옥신 농도와 고지혈증, 알레르기 등의 유의한 상승을 보고하였으며,¹⁹⁾ 화학공장 노동자들에서 TCDD에 의한 고지혈증, 고콜레스테롤혈증 등 지질대사 이상 및 간 기능 장애 등이 보고되었다.²⁰⁾ TCDD의 독성작용 메커니즘은 TCDD가 세포질에서 aryl hydrocarbon (Ah)수용체와 결합한 후 세포질에서 이동 단백질 (translocating protein)과 결합하여 활성 복합체를 형성하고, 이 활성 복합체가 핵으로 들어가서 dioxin-response element (DRE)라 불리는 specific DNA sequence (GCGTG)에 결합하여 궁극적으로 cytochrome P-450 (CYP) 효소계를 유도한다고 알려져 있다.²¹⁾ 간 조직에 주로 분포된 heme protein인 CYP 효소계는 약물, 각종용매, 환경오염 물질 등을 다른 물질로 전환시킨다.²²⁾

TCDD는 rat, mouse, guinea pig, 및 chick의 간세포에서 CYP isozyme 중 CYP1A와 CYP1A1을 유도한다는 사실이 mRNA 분석 또는 ethoxycoumarin *o*-deethylase (ECOD)나 ethoxyresorufin *o*-deethylase (ERDE)와 같은 CYP isozyme specific monooxygenase의 활성도 비교를 통하여 확인되었다.^{23,24)}

이와 같이 TCDD가 체내에서 각종 질환을 야기시키고 있음에 대하여 그 예방 및 치료대책의 일환으로써 최근 기능성식품으로 알려진 키토산 (chitosan) 및 키토산 올리고머 (chitosan oligomer)를 고려해 보았다. 키토산은 새우, 게

등의 갑각류의 껍질이나 곤충류의 표피, 오징어 등 연체동물의 뼈에 함유된 키토신의 구조에서 아세틸 부분을 제거한 화합물로 2-amino-2-deoxy-D-glucose가 β -1, 4 결합을 하고 있는 동물성 식이섬유의 일종이며 키토산을 산 또는 효소로 처리하면 저분자화 된 키토산 올리고머가 생산된다. 이들 키토산 및 키토산 올리고머는 지방 결합능력이 우수하여 지방의 장내 흡수를 저해하고 혈중 콜레스테롤 수준을 저하시키고 혈중 중성지방 저하, 혈압강하효과가 있어 고콜레스테롤혈증 및 동맥경화증의 예방과 치료에 효과가 있다.^{25,26)} Bae 등²⁷⁾은 4주간의 키토산 5%식이 섭취로 흰 쥐의 간조직에서 콜레스테롤 함량이 유의적으로 저하되었고 변으로 지질과 담즙산의 배설증가를 보고하였다. 그 외에도 키토산 및 키토산 올리고머의 효과로서 항혈전성,²⁸⁾ 항균작용,²⁹⁾ 세포 면역 부활,³⁰⁾ 보습 및 유화 안정성 등³¹⁾이 보고되었다. Ryu³²⁾는 키토산을 ICR mouse에 30, 40 mg/kg 수준으로 8일간 복강내 주입했을 때 키토산 투여후 백혈구수의 증가와 총복강 세포수의 증가로 면역력증가를 확인했고, 비장과 흉선의 무게가 증가했는데 비장에는 splenic macrophage가 있어 체내의 이물질에 대하여 방어작용의 능력이 있으며 흉선에서는 T-lymphocyte의 면역작용이 있는 것으로 제안하였다.

따라서 본 연구에서는 환경호르몬인 다이옥신계 TCDD 독성에 대하여 기능성식품인 키토산 및 키토산 올리고머를 이용하여 그 예방효과를 혈액성분조성, 지질대사, 항산화계 효소 및 간 독성물질 관련대사에 대하여 과학적으로 규명하고 그 실용도를 높이고자 연구하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험설계 및 동물사육

실험용 동물로 체중 약 131 g되는 Sprague-Dawley 흰 쥐 (수컷 4주령) 32마리를 대한 바이오링크에서 구입하여 1주일 동안 상업용 고형배합사료로 환경에 적응시킨후 군당 8마리씩 분배하여 실험에 임하였다. 실험식은 AIN-93M³³⁾을 기본으로 한 표준식이 (Table 1)로 하되 키토산 (MW 300,000, (주) 키토라이프, Korea)과 키토산 올리고머 (MW 5,000 (주) 키토라이프, Korea)를 각 4%로, 식이지방을 7%로 하여 3주간 공급한 후 TCDD (50 ug/kg BW)를 복강내 주입하고 계속해서 1주간 더 공급하였다 (Fig. 1). TCDD (ACCU Standard Inc. U.S.A)는 corn oil : acetone를 9 : 1의 비율로 만든 용액에 녹여 사용하였으며 대조군은 placebo로 corn oil : acetone (9 : 1)용액만을 동일조건으로 주입하였다. 실험동물의 체중과 식이섭

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diets)

Ingredients	Basal ¹⁾	Chitosan	Chitosan oligomer
Cornstarch	600.7	600.7	600.7
Casein	140	140	140
Cellulose	40	-	-
Chitosan	-	40	-
Chitosan oligomer	-	-	40
Sucrose	100	100	100
Soybean oil	70	70	70
Vitamin mix ²⁾	10	10	10
Mineral mix ³⁾	35	35	35
L-Cystine	1.8	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
T-butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008

1) Diets based on AIN-93M pattern
 2) AIN-93-VX (ICN Biomedicals, Inc, U.S.A.)
 3) AIN-93M-M (ICN Biomedicals, Inc, U.S.A.)

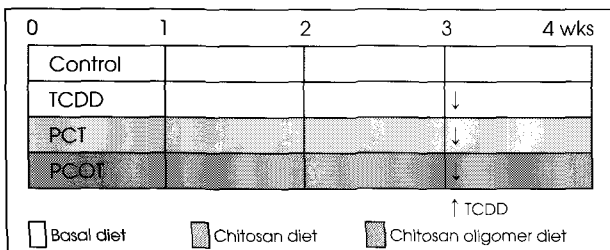


Fig. 1. Experimental Design. Control: basal diet, TCDD: basal diet and treated with TCDD, PCT: prevention with chitosan diet and treated with TCDD, PCOT: prevention with chitosan oligomer diet and treated with TCDD.

취량은 2일에 한번씩 측정하였으며 식이와 물은 자유롭게 급여하고 물은 증류수를 급여하였다. 실험종료 전 3일동안 변을 수집하였다. 실험동물 사육실 환경은 온도 22 ± 2°C, 상대습도 65 ± 5%로 유지하고 명암은 12시간 주기로 일정하게 조절하였다. 시료 수집은 실험 종료 시에 실험동물을 ether로 마취하여 복부 대동맥에서 채혈한 다음 혈액 조성의 분석과 혈청의 생화학적 성분의 분석을 위해 EDTA 처리된 tube와 처리되지 않은 tube에 나누어서 주입하고 EDTA 처리되지 않은 혈액은 3000 RPM에서 15분간 원심 분리시켜 혈청을 분리하였다. 혈액 채취 후 간, 고환, 흉선, 뇌를 적출하여 무게를 측정하고 광학현미경 촬영을 위해 각 장기를 0.5~1 mm³ 정도로 작게 잘라 10% formalin 용액에 고정시켰다. 남은 장기조직은 액체질소로 즉시 냉동시켜 -70°C에서 보관하였다.

2. 실험방법

1) 혈액조성 분석

적혈구 (red blood cells, RBC) 수, 백혈구 (white blood

cells, WBC) 수, 헤마토크리트 (hematocrits), 헤모글로빈 (hemoglobin, Hb) 농도 및 혈소판 (platelets, PLT) 수의 측정을 위해 항응고제인 EDTA가 처리된 튜브에 혈액을 채취한 다음 혈액자동분석기 (NE-8000, TOA Medical Co., LTD, Japan)를 이용하여 측정하였다.

2) 혈청, 간 및 변의 지질분석

혈청의 cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 농도는 생화학자동분석기 (Hitachi-7150, Hitachi Medical Co., LTD, Japan)를 이용하여 분석하였다. 간조직과 변 중의 총 지질함량은 Folch 등³⁴⁾의 방법으로, cholesterol 함량은 Sperry-webb³⁵⁾의 방법으로, triglyceride함량은 Fletcher³⁶⁾의 방법으로 정량하였다. 변 중의 담즙산 함량은 Tokunaga 등³⁷⁾의 방법으로 변에서 담즙산을 추출한 다음 담즙산 kit (Wako, Co)를 사용하여 측정하였다.

3) 항산화효소활성도 측정

간 cytosol에서 catalase의 활성도는 Aebi³⁸⁾의 방법을 이용하여 측정하였고, superoxide dismutase (SOD)의 활성도는 Lee와 Yu 등³⁹⁾의 방법을 이용하여 측정하였으며, 간 cytosol의 단백질함량을 Lowry 등⁴⁰⁾의 방법에 의해 Bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 사용하여 측정 후 이를 기준하여 이들 활성도를 산출하였다.

4) 간 독성물질대사 효소활성도 측정

(1) Cytochrome P-450 (CYP) 정량

Omura와 Sato⁴¹⁾의 방법에 의해 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5)로 간 마이크로솜 단백질이 1.0 mg/ml의 농도가 되도록 희석하여 분광광도계의 cuvette에 이희석액을 1 ml 주입후 Na₂S₂O₄를 1 mg 첨가하여 baseline을 정하였고 시료 cuvette에 일산화탄소를 거품이 나오도록 통과시킨 후 450 nm와 490 nm에서의 흡광도 차이를 관찰하였으며 mM 흡광계수 91 cm⁻¹mM⁻¹을 이용하여 CYP 함량을 계산하였다.

(2) NADPH Cytochrome P-450 reductase 활성도 측정

William과 Kamin⁴²⁾의 방법에 의해 0.2 uM cytochrome C 0.3 ml과 간 마이크로솜의 단백질의 농도가 0.25 mg/ml 인 희석액을 0.3 ml넣고 0.5 M phosphate buffer (pH 7.7)로 총 용량을 1.5 ml로 하여 baseline으로 설정하였다. 시료 cuvette에 0.1 umol NADPH 0.1 ml를 첨가하고 550 nm에서 3~4분간 흡광도 변화를 측정하였다. 흡광도 차이로부터 mM 흡광계수 21 cm⁻¹mM⁻¹을 이용하여 cytochrome C의 환원속도를 계산하였다.

(3) Cytochrome P-450 의존성 monooxygenases 활성도 측정

7-ethoxycoumarin *o*-deethylase (ECOD) 활성도는 Greenlee와 Poland⁴³⁾의 방법에 의해 분석하였고 excitation 370 nm와 emission 450 nm에서 형광강도를 측정하여 반응생성물인 7-hydroxycoumarin의 농도를 측정함으로써 효소활성도를 계산하였다. Benzphetamine *N*-demethylase (BPND)의 활성도는 Thomas 등⁴⁴⁾의 방법에 따라 실시하여 412 nm에서 흡광도를 측정하여 반응 생성물인 formaldehyde의 농도를 측정함으로써 효소 활성도를 계산하였다.

5) 조직학적 검사

적출한 간을 automatic tissue processor (Citable 2000)를 이용하여 탈수, 투명, paraffin 침투과정을 거친 다음, 포매, 삭정, 박절, 염색 및 봉입하여 200배율의 광학현미경으로 세포병리학적 소견을 검정하였다.

6) 통계분석

실험결과는 SAS program을 이용하여 평균과 표준편차 (mean \pm SD)로 제시하였다. 군별 유의성 검증은 ANOVA test 후, Duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 동물의 성장과 식이 섭취량

실험 4주 동안의 흰쥐의 성장과 식이섭취량 및 체중 100

g당 장기의 무게는 다음과 같다. 실험동물 중 키토산 및 키토산 올리고머 식이를 공급한 군에서 체중증가와 1일 평균 식이섭취량이 대조군과 TCDD 단독투여군보다 유의적으로 낮았는데 이것은 식이섭취량이 적어서 체중증가량이 적은 것으로 고려되었다 (Table 2). 장기무게에서는 간의 상대증량 (g/100 g BW)이 대조군에 비하여 TCDD 투여군에서 모두 유의적으로 높았고 흉선의 상대증량 (g/100 g BW)은 대조군에 비하여 TCDD 투여군에서 모두 반값 이하의 수준으로 유의적으로 낮았다 (Table 3). Harris 등⁹⁾은 TCDD가 실험동물에서 흉선을 심하게 위축시켰으며 흉선은 cell-mediated immunity의 중심적인 lymphoid 기관이라고 하였고 Vos 등⁴⁵⁾도 TCDD에 의해 흉선이 위축되었다고 했다. 고환과 뇌의 상대증량은 키토산 올리고머 군에서 다른 군에 비하여 유의적으로 높았다.

2. 혈액성분 조성

혈액성분에서 백혈구의 수는 키토산을 첨가한 식이군에서 다른 군에 비하여 가장 높은 수치를 나타내었는데 Rhu³²⁾도 키토산이 백혈구수를 증가시킨다고 하였다. 그러나 키토산 올리고머 식이군에서는 대조군수준으로 낮게 나타났다. 적혈구의 수는 대조군에 비하여 TCDD를 투여한 모든 군에서 유의적으로 높았다. 헤모글로빈함량은 키토산 올리고머 식이군에서 대조군에 비하여 유의적으로 높았다. 혈소판의 수는 TCDD투여에 의해 감소되었으며 이것은 혈소판이 생산되는 골수의 거핵구가 괴사되어 비롯된다는 보고⁴⁶⁾가 있는데 본 실험에서도 대조군보다 TCDD투여에 의해 낮은 경

Table 2. Effects of chitosan and chitosan oligomer diet on body weight, food intake, and liver weight of rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- ρ -dioxin (TCDD)

Groups	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Daily weight gain (g/day)	Daily food intake (g/day)
Control	132 \pm 4.7	306 \pm 17.3 ^a	6.22 \pm 0.57 ^a	20.2 \pm 0.6 ^a
TCDD	131 \pm 5.8	297 \pm 10.2 ^a	6.35 \pm 1.31 ^a	19.9 \pm 0.5 ^a
PCT	131 \pm 6.8	272 \pm 10.7 ^b	5.07 \pm 0.27 ^b	18.7 \pm 0.2 ^b
PCOT	132 \pm 3.4	198 \pm 33.8 ^c	2.37 \pm 1.17 ^c	12.3 \pm 1.4 ^c

Control: basal diet, TCDD: basal diet and treated with TCDD, PCT: Prevention with chitosan diet and treated with TCDD, PCOT: Prevention with chitosan oligomer diet and treated with TCDD. Values are mean \pm SD of 8 rats per group. Values in a column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3. Effects of chitosan and chitosan oligomer diet on organ weights of rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- ρ -dioxin (TCDD)

Groups	Liver weight (g/100 gBW)	Brain weight (g/100 gBW)	Testis Weight (g/100 gBW)	Thymus Weight (g/100 g BW)
Control	3.21 \pm 0.17 ^c	0.58 \pm 0.02 ^c	1.16 \pm 0.08 ^b	0.20 \pm 0.04 ^a
TCDD	4.72 \pm 0.47 ^a	0.59 \pm 0.03 ^c	1.16 \pm 0.17 ^b	0.11 \pm 0.04 ^b
PCT	4.61 \pm 0.31 ^a	0.63 \pm 0.03 ^{bc}	1.26 \pm 0.05 ^b	0.09 \pm 0.02 ^b
PCOT	4.16 \pm 0.30 ^b	0.86 \pm 0.12 ^a	1.55 \pm 0.28 ^a	0.09 \pm 0.01 ^b

Control: basal diet, TCDD: basal diet and treated with TCDD, PCT: prevention with chitosan diet and treated with TCDD, PCOT: prevention with chitosan oligomer diet and treated with TCDD. Values are mean \pm SD of 8 rats per group. Values in a column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

향이었고, 키토산 올리고머를 첨가한 식이군에서 유의적으로 낮아 키토산과 키토산 올리고머의 회복효과가 보이지 않았다 (Table 4).

3. 혈청 및 간의 지질함량

혈청 지질함량에서 혈청 총cholesterol과 HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol 함량이 TCDD 투여에 의해 대조군에 비하여 유의적으로 상승되었는데 Bombick 등⁴⁷⁾은 TCDD가 간 plasma membrane의 lipoprotein lipase receptor의 작용을 저하시켜 혈중 cholesterol 농도를 상승시킨다고 하였다. 한편 키토산 4% 첨가식을 TCDD 투여

하기 3주전부터 공급했을때 TCDD에 의한 상승이 유의적으로 저하되었고 키토산 올리고머 첨가식이군에서는 저하되지 않았다 (Fig. 2). 간의 cholesterol 수준은 키토산 올리고머 식이를 첨가한 군이 다른 군에 비해 유의적으로 낮았으며 간의 triglyceride 수준은 TCDD 투여에 의한 상승을 키토산 또는 키토산 올리고머 식이를 공급한 경우 대조군 수준으로 저하시키는 경향이였다 (Fig. 3). TCDD 투여에 의한 지질수준의 상승에 대하여 Gorski 등¹¹⁾은 TCDD에 의해 간의 중성지방 합성이 촉진되어 간에 지방축적이 된다고 하였다. 키토산 식이군에서 혈청 및 간의 지질수준이 저하된 것은 키토산이 지방결합능력이 강하여 장내 지방흡

Table 4. Effects of chitosan and chitosan oligomer diet on hematological values of rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- ρ -dioxin (TCDD)

Groups	WBC ($\times 10^3/mm^3$)	RBC ($\times 10^6/mm^3$)	Hb (g/dl)	Hct (%)	PLT ($\times 10^3/mm^3$)
Control	6.84 \pm 1.27 ^c	6.90 \pm 0.24 ^b	13.6 \pm 0.6 ^b	42.0 \pm 1.7	1063 \pm 114 ^a
TCDD	9.23 \pm 2.42 ^{ab}	7.29 \pm 0.33 ^a	13.9 \pm 0.6 ^{ab}	43.4 \pm 1.8	1049 \pm 180 ^a
PCT	10.51 \pm 2.80 ^a	7.28 \pm 0.35 ^a	13.7 \pm 0.6 ^{ab}	42.7 \pm 1.6	1042 \pm 139 ^a
PCOT	7.51 \pm 1.84 ^{bc}	7.49 \pm 0.42 ^a	14.2 \pm 0.8 ^a	43.1 \pm 2.4	724 \pm 174 ^b

Control: basal diet, TCDD: basal diet and treated with TCDD, PCT: Prevention with chitosan diet and treated with TCDD, PCOT: Prevention with chitosan oligomer diet and treated with TCDD. Values are mean \pm SD of 8 rats per group. Values in a column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). RBC: red blood cells, WBC: white blood cells, Hb: hemoglobin, Hct: hematocrits, PLT: platelets.

Fig. 2. Effects of chitosan and chitosan oligomer diets on serum lipid contents of rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- ρ -dioxin (TCDD). Cont: basal diet, TCDD: basal diet and treated with TCDD, PCT: Prevention with chitosan diet and treated with TCDD, PCOT: prevention with chitosan oligomer diet and treated with TCDD. Values are mean \pm SD of 8 rats per group. Values in a column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

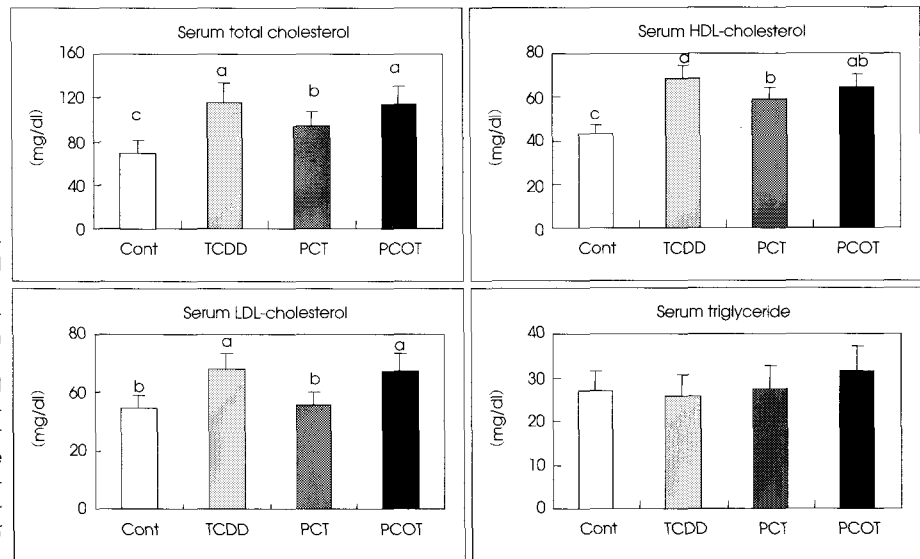
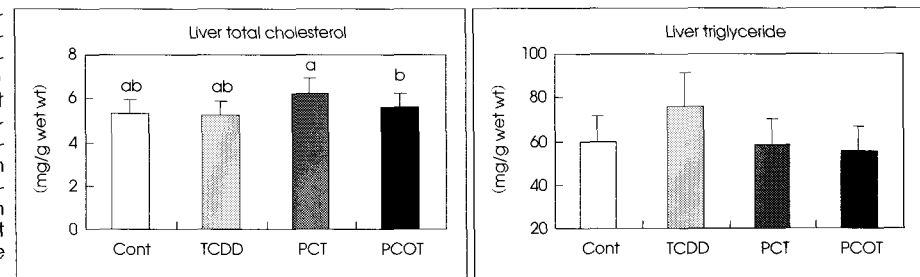


Fig. 3. Effects of chitosan and chitosan oligomer diets on liver lipid contents of rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- ρ -dioxin (TCDD). Cont: basal diet, TCDD: basal diet and treated with TCDD, PCT: prevention with chitosan diet and treated with TCDD, PCOT: prevention with chitosan oligomer diet and treated with TCDD. Values are mean \pm SD of 8 rats per group. Values not sharing a common superscripts are significantly different ($p < 0.05$).



수를 저하시키고 혈중 cholesterol 수준을 저하시켰으며 그 효과는 키토산이 키토산 올리고머보다 더 효과적이었다.

4. 변중의 지질 및 담즙산함량

변 중의 총지질 및 cholesterol 배설이 키토산 식이에 의해 다른 군에 비하여 유의적으로 상승하였다. 그러나 담즙산 배설은 키토산 또는 키토산 올리고머 식이군이 대조군과 TCDD 단독 투여군보다 유의적으로 낮았다 (Fig. 4). 특히 키토산 올리고머 식이군의 담즙산 배설이 낮은 것은 1일 식이 섭취량이 적고 그로 인해 1일 변량이 현저히 적은것에 의한 영향이 있을 것으로 짐작된다.

5. 항산화효소의 활성화

간 cytosolic catalase의 활성화도는 대조군에 비하여 TCDD 투여군에서 모두 유의적으로 감소되었으나 키토산 식이군에서 약간 회복의 경향을 보였다. 간 cytosolic superoxide dismutase (SOD)의 활성화도는 TCDD 단독 투여군이 다른 군보다 유의적으로 높았다 (Fig. 5).

6. 간의 독성물질대사 관련효소의 활성화

간의 독성물질 대사관련 효소활성에 미치는 영향을 보면 간 마이크로솜의 cytochrome P-450 (CYP), NADPH

cytochrome P-450 reductase 활성화도는 TCDD 투여에 의해 상승되었다가 키토산 식이에 의해 현저하게 저하되었다. 그효과는 키토산 올리고머 보다 키토산이 더 효과적이었다 (Fig. 6). 이들 cytochrome계 효소 활성화도는 Hakanson 등²³⁾의 연구에서도 TCDD 투여에 의해 유도 상승된 것으로 보고되어 본 연구와 일치하는 경향이였다. 유도 상승된 cytochrome 계의 isozyme의 유형을 확인하기 위해 CYP1A specific monooxygenase인 7-ethoxycoumarin *o*-deethylase (ECOD)와 CYP 2B marker enzyme의 하나인 Benzphetamine *N*-demethylase (BPND)의 활성화도를 보면 이들 모두 TCDD 단독 투여군에서 대조군에 비해 유의적으로 상승되었다가 BPND의 경우 키토산과 키토산 올리고머 식이군 모두에서 현저하게 저하되었으며 ECOD의 경우 키토산 식이에 의해서만 유의적으로 저하되었다 (Fig. 6). Okey 등⁴⁸⁾은 CYP isozyme 중 ECOD가 특히 TCDD에 의해 유도 상승된다고 하였는데 본 실험에서는 BPND가 ECOD보다 더욱 명확한 결과를 보였으며 대체로 이들 효소들은 cytochrome P-450의 활성화도와 유사한 경향이였다.

7. 간조직의 현미경적 관찰

간의 조직학적 관찰에서는 대조군에 비하여 TCDD 투여

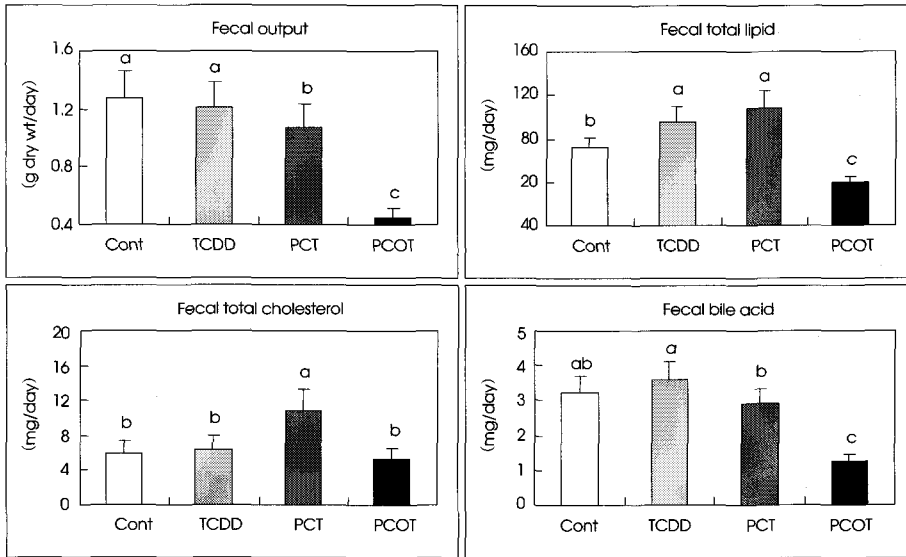


Fig. 4. Effects of chitosan and chitosan oligomer diets on fecal lipids and bile acid excretions of rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Cont: basal diet, TCDD: basal diet and treated with TCDD, PCT: prevention with chitosan diet and treated with TCDD, PCOT: prevention with chitosan oligomer diet and treated with TCDD. Values are mean \pm SD of 8 rats per group. Values not sharing a common superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

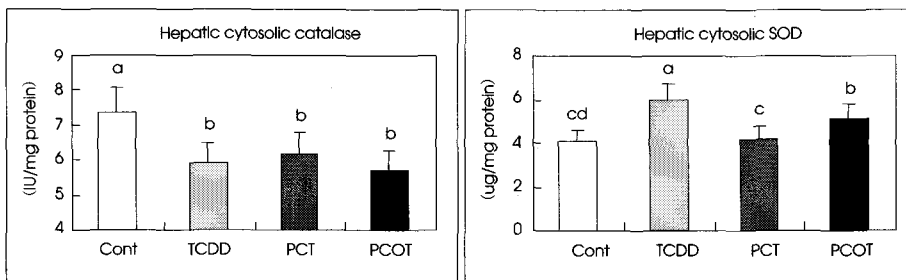


Fig. 5. Effects of chitosan and chitosan oligomer diets on hepatic cytosolic catalase and superoxide dismutase (SOD) activities of rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Cont: basal diet, TCDD: basal diet and treated with TCDD, PCT: Prevention with chitosan diet and treated with TCDD, PCOT: prevention with chitosan oligomer diet and treated with TCDD. Values are mean \pm SD of 8 rats per group. Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

군에서 간세포의 지방침윤 및 공포변성이 유의하게 증가되었고 중심엽 지역의 sinusoid가 유의하게 증가되었으며 세포크기도 불규칙하였다. 그런데 키토산 또는 키토산 올리고머를 TCDD투여하기 3주전부터 공급한 군에서는 이와 같은 현상들이 뚜렷하게 개선되었다 (Fig. 7).

요약 및 결론

다이어신계 TCDD에 노출된 흰쥐의 지질대사 및 간 독

성물질대사에 있어서 키토산 및 키토산 올리고머의 예방효과 있는지를 알아보기 위해 Sprague Dawley (수컷, 4주령)를 이용하여 키토산과 키토산 올리고머를 대조군의 cellulose 대체물로 하여 3주간 공급한 후 TCDD를 주입하고 1주간 계속해서 공급하여 4주간 실험하였다. 사육후 혈액조성과 혈청, 간 및 변의 지질을 분석하고 간조직에서 항산화 효소 활성도와 간 독성물질대사 관련효소의 활성도를 측정하였고 간조직의 현미경적 관찰을 하였다.

1) 키토산 및 키토산 올리고머 식이를 공급한 군에서 체

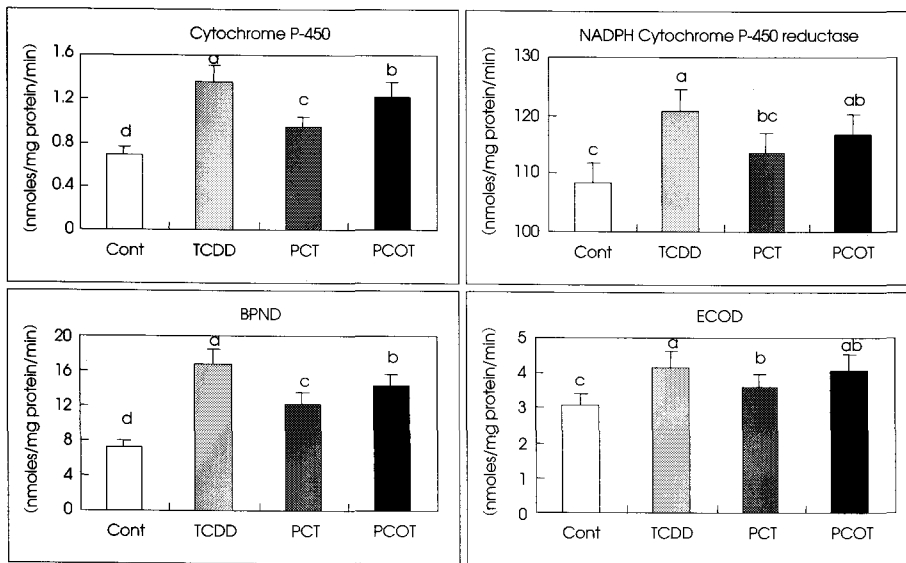


Fig. 6. Effects of chitosan diets on hepatic microsomal CYP-450, NADPH CYP-450 reductase and cytochrome dependent monooxygenase activities of rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) Cont: basal diet, TCDD: basal diet and treated with TCDD, PCT: prevention with chitosan diet and treated with TCDD, PCOT: prevention with chitosan oligomer diet and treated with TCDD. Values are mean \pm SD of 8 rats per group. Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). BPND: benzphetamine N demethylase, ECOD: 7-Ethoxycoumarin *o*-deethylase.

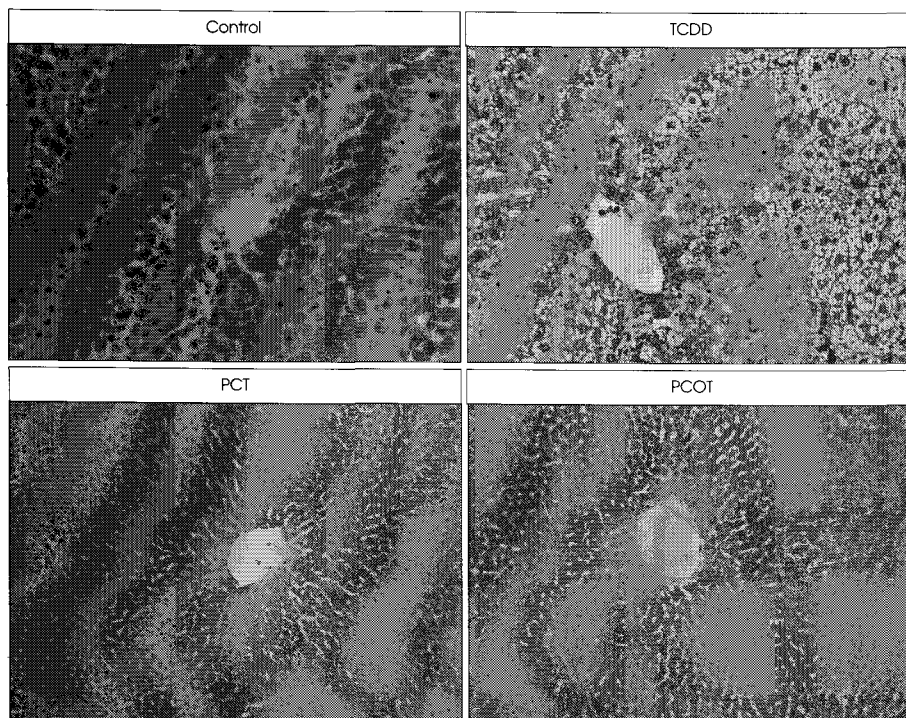


Fig. 7. Effects of chitosan and chitosan oligomer diets on light micrograph of hepatocytes of rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) ($\times 200$). Control: basal diet, TCDD: basal diet and treated with TCDD, PCT: prevention with chitosan diet and treated with TCDD, PCOT: prevention with chitosan oligomer diet and treated with TCDD.

증가와 1일 평균 식이 섭취량이 대조군에 비하여 유의적으로 낮았고 장기무게는 TCDD투여군에서 간의 상대중량이 유의적으로 높았으며 흉선의 상대중량이 대조군의 50%이하의 수준으로 유의적으로 위축되었다.

2) 혈액성분 중 백혈구의 수는 TCDD 투여에 의해 상승되었는데 키토산 올리고머 식이군에서 현저하게 저하되었고 적혈구의 수는 TCDD투여군에서 모두 대조군에 비해 유의적으로 높았다.

3) 혈청 총 cholesterol과 HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol 함량이 모두 TCDD투여에 의해 상승되었다가 키토산 첨가식에 의해 유의적으로 저하되었는데 키토산 올리고머 첨가군에서는 저하되지 않았다. 혈청 triglyceride 수준은 군간에 유의적인 차이가 없었다. 간의 cholesterol 수준은 키토산 올리고머 식이군이 다른군에 비하여 유의적으로 낮았으며 간의 triglyceride 수준은 TCDD투여에 의한 상승을 키토산 또는 키토산 올리고머 식이에 의해 대조군 수준으로 저하시키는 경향이였다.

4) 변의 총지질 및 총 cholesterol 배설이 키토산식이에 의해 다른 군보다 유의적으로 상승되었다.

5) 간 cytosolic catalase 활성도는 TCDD투여군 모두에서 대조군에 비해 유의적으로 감소되었으며 SOD 활성도는 다른군보다 TCDD 단독투여군에서 유의적으로 높았다.

6) 간의 독성물질대사 관련효소인 cytochrome p-450와 NADPH cytochrome p-450 reductase 활성도 및 cytochrome p-450 의존성 monooxygenase인 ECOD와 BPND의 활성도가 TCDD투여에 의해 상승되었는데 키토산 올리고머보다 키토산 식이군에서 현저하게 저하되었다.

7) 간의 조직학적 관찰에서 TCDD투여에 의한 간세포의 지방침윤 및 공포변성이 키토산 및 키토산 올리고머 공급에 의해 뚜렷하게 개선되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 환경호르몬인 TCDD에 의해 장기 중 간비대와 흉선의 위축이 현저하였고, 혈청 및 간의 지질축적과 간 독성물질대사 관련효소 활성도가 유의적으로 증가하였는데 이에 대하여 키토산과 키토산 올리고머의 예방효과를 비교한 결과 키토산 올리고머보다 키토산이 더 효과적이었으며 특히 지질대사이상에서 키토산은 혈청 및 간의 지질을 감소시키고 변으로 배설을 증가시키는 효과를 내었다. 간의 조직학적 관찰에서는 키토산과 키토산 올리고머가 TCDD에 의한 간조직 병변을 현저하게 개선시키는 효과를 보여 주었다. 따라서 TCDD독성 중 적어도 지질대사이상과 간독성에 관하여는 키토산의 예방효과가 있음을 확인하게 되었다.

Literature cited

- 1) Matsumura F. Mechanism of action of dioxin-type chemicals, pesticides, and other xenobiotics affecting nutritional indexes. *Am J Clin Nutr* 61: 695S-701S, 1995
- 2) Ryu BH. Effects of Endocrine Disruptors on Endocrine Function and Reproductive Function in Wildlife and Humans. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28 (5): 1180-1186, 1999
- 3) Schwetz BA, Sparchu GL, Row VK, Gehring PJ, Emerson JL. Toxicology of chlorinated dibenzo-p-dioxin. *Environ Health Perspect* 5: 87-99, 1973
- 4) Abraham K, Krowke R, Neubert D. Pharmacokinetics and biological activity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch Toxicol* 62: 359-368, 1988
- 5) Gasiewicz TA, Neal RA. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin tissue distribution, excretion, and effects of clinical chemical parameters in guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 51: 329-339, 1979
- 6) Decad GM, Birnbaum LS, Matthews HB. Distribution and excretion of TCDD in C57BL/ and DAB/2J mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 59: 564-573, 1981
- 7) Pitot HC, Coldsworthy T, Campbell HA, Poland A. Quantitative evaluation of the promotion by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from dimethyl nitrosamine. *Cancer Res* 40: 3616-3620, 1980
- 8) Brewster DW, Matsumura F. TCDD (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) reduces lipoprotein lipase activity in the adipose tissue of the guinea pig. *Biochem Biophys Res Commun* 122 (2): 810-817, 1984
- 9) Harris MW, Moore JA, Vos JG, Gupta BN. General biological effects of TCDD in laboratory animals. *Environ Health Perspect* Sept, pp.101-109, 1973
- 10) Swift LL, Gasiewicz TA, Dunn D, Soule PD, Neal RA. Characterization of the hyperlipidemia in guinea pigs induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 59: 489-499, 1981
- 11) Gorski JR, Weber LWD, Rozman K. Tissue-specific alterations of de novo fatty acid synthesis in 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-treated rats. *Arch Toxicol* 62: 146-151, 1990
- 12) Shertzer HG, Nebert DW, Puga A, Ary M, Sonntag D, Dixon K, Robinson LJ, Cianciolo E, Dalton TP. Dioxin causes a sustained oxidative stress response in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 44-48, 1998
- 13) Enan E, Liu PCC, Matsumura F. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes reduction of glucose transporting activities in the plasma membrane of adipose tissue and pancreas from the guinea pig. *J Biol Chem* 267: 19785-19791, 1992
- 14) Jones G, Butler WH. A morphological study of the liver lesion induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *J Pathol* 112: 93-97, 1974
- 15) Germolec DR, Henry EC, Maronpot R, Foley JF, Adams NH, Gasiewicz TA, Luster MI. Induction of CYP1A1 and ALDH-3 in lymphoid tissue from Fisher 344 rats exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicol Appl Pharmacol*

- 137: 57-66, 1996
- 16) May G. Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: a survey of subjects ten years after exposure. *Br J Internal Med* 38: 128-135, 1982
 - 17) Marilyn AF. Cancer mortality in workers exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin. *New Engl J Med* 324: 212-218, 1991
 - 18) Alavanja, Michael CR. Mortality among agricultural extension agents. *Am J Indus Med* 14: 167-176, 1980
 - 19) Kitamura K, Kikuchi Y, Watanabe S, Waechter G, Sakurai H, Takada T. Health effects of chronic exposure to polychlorinated dibenzo-*P*-dioxins (PCDD), dibenzo-furans (PCDF) and coplanar PCB (Co-PCB) of municipal waste incinerator workers. *J Epidemiol* 10: 262-270, 2000
 - 20) Zack JA, Suskind RR. The mortality experience of workers exposed to tetrachloro-dibenzodioxin in a trichlorophenol process accident. *J Occup Med* 22: 11-14, 1980
 - 21) Poland A, Knutson JC. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22: 517-554, 1982
 - 22) Potter TD, Coon MJ. Cytochrome P450: Multiplicity of isomers, substrates and catalytic and regulation mechanism. *J Biol Chem* 266: 13469-13472, 1991
 - 23) Hakansson H, Johansson L, Manzoor E Ahlborg UG. Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the hepatic 7-ethoxyresorufin *o*-deethylase activity in four rodent species. *Eur J Pharmacol* 270 (4) : 279-284, 1994
 - 24) Hanioka N, Jinno H, Toyooka, Ando M. Effect of 1, 2, 4-trichlorodibenzo-*p*-dioxin on drug-metabolizing enzymes in the rat liver. *Chemosphere* 29 (6) : 1313-1324, 1994
 - 25) Vahouny GV, Satchithanandam S, Cassidy MM, Lightfoot FB, Furda I Comparative effects of chitosan and cholestyramine on lymphatic absorption of lipids in the rat *Am J Clin Nutr* 38: 278-284, 1983
 - 26) Razdan A, Pettersson D, Pettersson J. Broiler chicken body weights, feed intakes, plasma lipid and small-intestinal bile acid concentrations in response to feeding of chitosan and pectin. *Br J Nutr* 78: 283-291, 1997
 - 27) Bae KH, Kim MH. Effect of chitosan and N, O-carboxymethyl chitosan of different sources and molecular weights on lipid metabolism. *Korean J Nutr* 30: 770-780, 1997
 - 28) Kim SK, Lee EH. Food industrial application of chitin and chitosan. *J Chitin and Chitosan* 2 (4) : 43-59, 1997
 - 29) Kim HK, Kim HS, Kang MI, Koh HB, Kim JR, Lee EH. Antibacterial effects of chitosan to *E. Coli* causing diarrhea of piglets. *Kor J Vet Publ Hlth* 21 (2) : 97-105, 1997
 - 30) Williams DL, Cook JA, Hoffman EO, Diluzio KNR. *J Reticulo-endothel Soc* 23: 479-490, 1978
 - 31) Weiner ML. An overview of the regulation status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients. advances in chitin and chitosan. *Elsevier Applied Science* pp.663, 1992
 - 32) Ryu BH. antitumor and immunologic activity of chitosan extracted from shell of shrimp. *J Korean Soc Food Nutr* 21 (2) : 154-162, 1992
 - 33) Reeves PG, Nielsen FH, and Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951, 1993
 - 34) Folch J, Less M, Sloaestanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-502, 1957
 - 35) Sperry WM, Webb M. A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J Biol Chem* 187: 97-106, 1950
 - 36) Fletcher MJ. A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin Chim Acta* 22: 393-397, 1968
 - 37) Tokunaga T, Oku T. and Hosoya N. Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharide (neosugar) on growth and gastrointestinal function of the rat. *J Nutr Sci Vitaminol* 32: 111-121, 1986
 - 38) Aebi H. Catalase *in vitro*. In *Method in Enzymology*, Colowick SP, Kaplan NO. eds, Academic Press, New York, pp.121-126, 1984
 - 39) Lee DW, Yu BP. Modulation of free radicals and superoxide dismutase by age and dietary restriction. *Aging Cline Exp Res* 2: 357-362, 1990
 - 40) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
 - 41) Omura T, Sato P. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature *J Biol Chem* 239: 2370-2378, 1964
 - 42) Williams C.H.Jr., Kamin M. Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome C reductase of liver. *J Biol Chem* 237: 587-595, 1962
 - 43) Greenlee WF, Poland A. An improved assay of 7-ethoxy-coumarine *o*-deethylase activity: Induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p* dioxin. *J Pharmac Exp Ther* 205: 596-605, 1978
 - 44) Thomas PE, Lu AYH, Ryant D, West SB, Kawarek J, Levin W. Multiple forms of rat liver cytochrome P-450. Immunochemical evidence with antibody against cytochrome P-448. *J Biol Chem* 251: 1385-1391, 1976
 - 45) Vos JG, Moore JA, Zinkl JG. Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the immune system of laboratory animals. *Environ. Health Perspectives* 5: 149-162, 1973
 - 46) Hwang SY. Preventive effect of Panax Ginseng on TCDD-induced toxicity in male guinea pigs. *Ph.D thesis of Hannam univ*, pp.90-91, 1999
 - 47) Bombick DW, Matsumura F, Madhukar BV. TCDD causes reduction in the low density lipoprotein (LDL) receptor activities in the hepatic plasma membrane of the guinea pig and rat. *Biochem Biophys Res Commun* 118: 548-554, 1984
 - 48) Okey AB, Riddick DS, Harper PA. The Ah receptor: Mediator of the toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol Lett* 70: 1-22, 1994