

고본양정방 투여가 TCDD 유도 랫드의 항산화 변화에 미치는 영향

양동현¹, 오지혜¹, 박윤규¹, 조충식², 황석연^{1*}
¹대전대학교 임상병리학과, ²대전대학교 한의과대학

The Effects of Gobonyangjeonbang Administration on Antioxidative of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) induced Rats.

Dong Hyun Yang¹, Ji Hye OH¹, Un kyu Park¹, Chung Sik Cho², Seock Yeon Hwang^{1*}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, Daejeon University, Daejeon, Korea

²Department of Korean Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

요약 본 연구의 목적은 TCDD로 인해 발생하는 산화적 스트레스에 대한 GYB의 내분비 기능 및 항산화 효능에 미치는 영향을 평가하기 위한 것이다. 2017년도에, 산화적 스트레스에 대한 GYB의 효능을 평가하기 위해 35마리의 수컷 SD 랫드를 5개의 그룹으로 나누어 실험하였다. 정상 대조군은 vehicle 및 saline을 투여하였으며, TCDD 단독투여그룹은 TCDD(2 µg/kg, weeks) 및 생리식염수를 복강 내 투여하였으며, 시험 군은 6주 동안 GYB (75, 150, 300 mg/kg)를 3가지 농도로 나누어 경구로 투여하였다. 체중은 NC 그룹의 랫드와 비교하였을 때 TCDD 노출 후 6주 후에 유의하게 감소하였다($p < 0.001$). 그러나 TCDD에 의한 체중 감소는 GYB 300 mg/kg 투여에 의해 현저하게 보호되었다($p < 0.01$). TCDD로 유도된 랫드의 간은 세포질의 공포 변성이 나타났으며, 간의 동양 혈관과 중량의 증가를 나타냈다. MDA, SOD를 측정된 결과, TCDD 투여에 의하여 두 항목 모두 감소하는 경향이 나타났다. 반면, GYB 투여에 의한 변화는 나타나지 않았고, SOD 결과에서 GYB 300군에서 NC군 대비 유의성이 관찰($p < 0.05$) 되었다. 이러한 발견은 GYB가 랫드에서 TCDD 유도 간 독성에 대해 보호 효과를 가질 수 있음을 증명하였다.

Abstract The purpose of this study was to evaluate the effects of gobonyangjeonbang (GYB) on the endocrine function and the antioxidant efficacy of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced oxidative stress in rats. In 2017, to evaluate the efficacy of GYB on oxidative stress, 35 male SD rats were divided into five groups and tested. The normal control group was administered saline as a vehicle, while the TCDD-alone group was administered TCDD (2 µg/kg per week) intraperitoneally and with physiological saline, and the test group was administered GYB orally by dividing it into three concentrations (75, 150, and 300 mg/kg) for six weeks. Bodyweight decreased significantly after six weeks of TCDD exposure, when compared to rats in the NC group ($p < 0.001$). However, weight loss from TCDD was significantly protected by administration of GYB at 300 mg/kg ($p < 0.01$). The rat liver induced by TCDD showed cytoplasmic vacuole degeneration, and the hepatic sinusoid and weight increased. As a result of measuring MDA and SOD, both items tended to decrease under TCDD administration. On the other hand, there was no change due to GYB administration, and significance was observed in the GYB 300 mg/kg group compared to the NC group in the SOD result ($p < 0.05$). These findings demonstrated that GYB may have a protective effect against TCDD-induced liver toxicity in rats.

Keywords : Antioxidant, Gobonyangjeonbang (GYB), Hepatotoxicity, SOD, TCDD

This research was supported by the Daejeon University Research Grants(2017)

*Corresponding Author : Seock Yeon Hwang(Daejeon Univ.)

email: syhwang@dju.kr

Received July 3, 2020

Accepted October 5, 2020

Revised September 23, 2020

Published October 31, 2020

1. 서론

내분비 장애 물질은 직접 노출된 동물의 다음 세대에 까지 독성을 나타내며, 내분비 작용을 방해하는 외인성 물질로서 호르몬에 민감한 조직과 생식기에 암과 같은 퇴행성 질환을 일으킨다는 점에서 사회적인 문제점을 야기하고 있다[1]. 환경호르몬인 다이옥신계 화합물 중에서 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)는 대표적인 내분비계 장애 물질로서 면역, 내분비계, 생식기계 기능을 파괴하고, 간 기능과 지질대사에 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다[1].

또한, TCDD는 세포 내 단백질인 aryl hydrocarbon receptor에 붙어 핵 속에 침투하여 DNA의 특정 부위에 결합하여 독성을 일으키고, 간에서 심각한 문제를 야기한다고 알려져 있다[2, 3]. 이러한 현상은 TCDD가 간의 대사과정 중 생체 내 활성산소 생성의 주요 급원인 cytochrome *p*-450 효소계에 영향을 줌으로 독성이 유발되는 것으로 추정되고 있다[4, 5, 6].

이처럼, TCDD에 의해 유발되는 각종 현상에 대하여 최근까지의 연구 결과 대부분은 단일약물로서 투여하여 실험한 논문이 대부분이었으며[7], 한약 처방 중에는 새로운 효능에 대한 연구의 타당성에 대한 현대의학적인 검토가 미흡한 실정이다.

구기자(*Lycium chinense Mill.*)는 간독성에 대한 효과를 보기 위해 간 장애 모델에서 AST, ALT 값의 상승 억제 효과가 나타났다고 보고되어 진다[8, 9].

인삼(*Panax ginseng C. A. Meyer*)은 건강을 개선하는 동시에 간 기능, 신장 기능을 개선한다고 알려져 있다 [10]. 토사자(*Cuscutae Semen*)는 산화적 스트레스의 저해 효과, 급성 간독성에 대해 보호하는 효과도 나타낸다고 알려져 있다[11]. 오미자(*Schisandra chinensis*)는 산화적 스트레스를 감소시키는 Reactive oxygen species (ROS)과 관련된 결과 보고도 있다[12, 13]. 복분자(*Rubus coreanus MIQ.*)는 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), prostaglandin F2 (PGF2), nitric oxide (NO) 등의 생성을 억제한다고 보고되어 있다[14]. 구자 (*Allii tuberosi semen*)는 생식능력이 상승하며 테스토스테론의 활성도에도 효과가 있다고 연구되었다[15].

따라서, 본 연구에서는 TCDD로 인해 발생하는 산화적스트레스에 대한 문제를 해결하기 위하여 항산화 효능을 가지고 있으며 간 장애 모델 실험이 많이 이루어졌던, 기존 처방의 대체 물질로써 고본양정방(GYB:

Gobonyangjeonbang) 이라는 구기자, 인삼, 토사자, 오미자, 복분자, 가구자로 6가지의 한방재료를 선정하여 TCDD-유도 독성을 유발한 랫드에서 내분비 기능 및 항산화 활성 관련 지표에 미치는 영향을 조사하고자 본 연구를 시행하였다.

2. 본론

2.1 실험 재료

2.1.1 실험동물 및 사육 환경

체중 200 ± 20 g의 수컷 SD rat (Sprague-Dawley 계)를 (주) 라온바이오(경기 용인시)로부터 구입하여 1주간의 동물실의 사육환경에 적응, 1주간 존데 적응훈련을 한 뒤, 실험에 이용하였다. 실험동물의 사육은 온도 23 ± 1 °C, 습도 50 ± 10 %, 명암주기 12시간으로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 사육하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(퓨리나 쥐 사료, Purina)를 충분히 공급하였으며, 식수는 제한 없이 공급하였다.

2.1.2 연구 설계 및 동물군의 분리

2주간의 순화 기간을 거쳐 평균 체중과 근접한 개체들을 선발하였다. 선발한 동물들은 무작위 법을 이용하여 실험군과 대조군을 7마리씩 5군으로 나누었다. 연구대상 변수의 거의 완벽한 통제가 가능한 실험실 환경에서 수행함으로써 정확한 측정 및 내적 타당성을 가질 수 있게 설정하였다. 실험군은 정상 대조군 (N.C: Normal Control), TCDD 단독투여군(TA: TCDD alone), TCDD-GYB의 병행 투여군 GYB75 (75 mg/kg b.w.), GYB150 (150 mg/kg b.w.), GYB300 (300 mg/kg b.w.)으로 총 5개의 군으로 설정하였다. 실험동물은 일정 시간(오전 11:00~오후 14:00) 내에서 처치하였다. 본 연구의 동물실험은 2017년도에, 대전대학교 동물실험윤리위원회의 심의를 거쳐 승인서를 받은 후 실시하였다 (DJUAR2017-011).

2.2 실험 방법

2.2.1 TCDD 용액 조제

TCDD는 AccuStandard Inc. (New Haven, CT, USA)로부터 순도 99.1 % 이상의 화합물을 구입하였다. TCDD (1 mg)를 소량의 아세톤($900 \mu\text{L}$)과 미량의 DMSO ($100 \mu\text{L}$)를 사용하여 녹여 초음파 처리 후, 옥

수수기름(corn oil 500 mL, Sigma-aldrich, USA)을 이용하여 1:9 비율로 희석하여 실험에 사용하였다. TCDD의 투여 농도는 Beytur 등, Ciftci 등의 방법에 따라 2 µg/kg b.w.의 농도로 주 1회 복강(intraperitoneal, *i.p*)으로 총 6주간 투여하였다(Figure 1).

2.2.2 고본양정방(GYB)의 조제

실험에 사용되는 GYB는 대전대학교 둔산 한방병원에 서 난임을 겪는 성인 남성에게 투약하는 한약 처방으로 구기자, 토사자, 복분자, 인삼, 가구자, 오미자로 구성되었고, 비율은 성인 1회 섭취량을 고려하여 설정한 임상에서 사용되는 처방 비율인 9:7:5:5:3:1이다. GYB를 구성하는 한약 처방은 난임뿐만 아니라 각각의 성분이 우수한 항산화 효능을 가지고 있다고 알려져 있다. 이에 한국 신텍스제약에 의뢰하여 개별 추출하고 동결 건조하여 처방 비율에 따라 저(75 mg/kg b.w.), 중(150 mg/kg b.w.), 고(300 mg/kg b.w.)용량으로 혼합하여 총 6주간 1일 1회 경구투여(*per oral, p.o*)하였다(Figure 1).

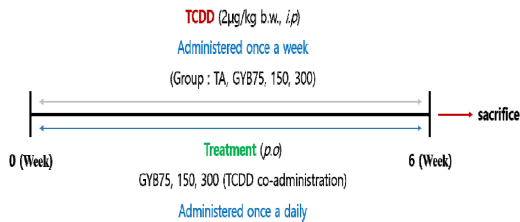


Fig. 1. Experimental Protocol for the Effect of GYB on TCDD

Abbreviation : NC, Normal control group male SD rats received vehicle (corn oil and trace amount of DMSO and acetone) and saline ; TA, TCDD alone group received TCDD (2 µg/kg b.w. weeks) and saline; GYB, group received TCDD (2 µg/kg b.w. weeks) and GYB (75, 150, 300 mg/kg b.w.) in male SD rats.

2.2.3 일반혈액학 검사

일반혈액학적 검사를 위하여 복대동맥으로부터 ethylenediaminetetraaceticacid tube (EDTA tube, BD, USA)에 채혈 후 clinical and laboratory standards institute (CLSI, USA, 2017) 기준에 따라 6~8회 위아래로 섞은 후 자동혈액 분석기(Advia 2120i, SIEMENS, Germany)를 이용하여 적혈구 지수, 백혈구, 백혈구 백분율, 혈소판 수를 분석하였다.

2.2.4 혈액 생화학 검사

혈액 생화학 검사를 위하여 복대동맥으로부터 serum separation tube (SST tube, BD, USA)에 채혈 후

CLSI 기준에 따라 6~8회 위아래로 섞은 후 혈액이 완전히 응고되면 원심분리기(의료용 원심분리기, LABOGENE, Korea)를 이용하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 그 후 분리된 상층의 혈청을 사용하여 자동생화학 분석기(AU680, Beckman Coulter, Germany)를 이용해 간 기능 지표를 분석하였다.

2.2.5 항산화 및 면역기능 지표 검사

항산화 및 면역기능 지표 검사를 위하여 동결된 간 조직을 ice tray 위에 올려놓고 1 mm 크기로 절단하여 잘게 분쇄 후 0.01 M PBS (phosphate buffer saline 1x) 용액으로 세척하여 조직 사이의 적혈구들을 제거하여 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 정량(BCA Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC, USA)하여, IL-3 (Interleukin 3 ELISA kit MBS264646, MyBiosource, USA), IL-6 (Interleukin 6 ELISA kit MBS269892, MyBiosource, USA), TNF-alpha (Rat TNF-alpha ELISA kit MBS2507393, MyBiosource, USA), MDA (Rat Melondialdehyde ELISA kit MBS268427, MyBiosource, USA), SOD (Rat Superoxide Dismutases ELISA kit MBS266897, MyBiosource, USA), ROS (Reactive oxygen species Assay kit MBS2540517, MyBiosource, USA)을 사용하여 실험하였으며, ELISA reader (Multiscan Go, Thermo SCIENTIFIC, USA)에서 450nm의 흡광도로 측정하였다.

2.2.6 조직병리학적 평가

조직병리학적 검사를 위하여 적출된 장기들을 대한병리학회 가이드라인에 의하여 10 % NBF (neutral buffered formalin)에 24시간 고정하였으며, 조직처리기(tissue Processor, Thermo shandon, USA)에서 탈수, 투명, 침투 과정을 거쳐 조직 포매 장치를 이용하여 조직 block을 제작하였다. 제작된 block을 박절기(RM 2245, LEICA BIOSYSTEMS, Germany)를 이용하여 3 µm로 박절하여 간 조직에 대하여 hematoxylin and eosin staining (H&E) 염색을 한 후, 광학현미경(microscope, ZEISS, Germany)으로 조직의 변화 및 이상 유무 등 조직병리학적 소견을 관찰하였다.

2.2.7 통계 처리

각 실험군 간 유의성 검정은 IBM SPSS Statistics version 20 통계 package를 이용하였으며, 유의수준

$p < 0.05$ 에서 통계적 유의성을 검정하였다. TCDD 투여와 GYB의 투여에 따른 변화에 대한 통계적 유의성을 일원배치 분산분석(One way ANOVA)의 사페의 사후검정(Scheffe test)을 실시하여 평균 간의 유의성을 검정하고, 독립표본 T 검정(Student *t*-test)을 이용하여 분석하였다.

3. 연구 결과

3.1 실험동물의 체중 변화에 미치는 영향

TCDD의 투여와 GYB의 투여에 따른 체중 변화를 알아보기 위하여 GYB 투여 전 무게를 측정된 후 평균 체중 362 ± 2 g에서 실험을 진행하였으며 실험 종료 당일 최종 체중을 측정하였다(Table 1). TA군의 체중은 투여 후 2주에서 NC군보다 체중의 증가 폭이 현저히 감소하였으며, 최종 체중은 NC군 대비 88% 수준으로 유의성이 나타났다($p < 0.001$). 한편 GYB 300군에서 TA군 대비 회복하는 통계적 유의성이 나타났다($p < 0.01$).

Table 1. Changes of body weight in TCDD induced and GYB administration in male SD rats. Unit (g)

| Group | Body weight | | Body weight gain |
|---------|--------------|------------------------------|------------------------|
| | Initial | Final | |
| NC | 363.27±13.26 | 491.09±35.18 | 129.5±25.5 |
| TA | 362.66±20.48 | 433.09±39.08 ^{***} | 81.6±41.9 [*] |
| GYB 75 | 362.46±12.38 | 430.82±47.51 ^{***} | 66.1±44.3 [*] |
| GYB 150 | 361.17±22.04 | 449.72±39.17 ^{**} | 88.7±27.1 [*] |
| GYB 300 | 364.14±27.08 | 468.14±34.57 ^{##,†} | 101.5±25.6 |

Mean ± Standard deviation.
^{*} Data are shown as mean±SD of (n=6) ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ vs. NC, ^{##} $p < 0.01$ vs. TA as determined by one way ANOVA.
 Abbreviation : See Figure 1.

3.2 간의 절대 및 상대 장기중량의 변화

간의 절대 및 상대 중량은 NC군 각각 13.98 ± 0.97 g, 2.93 ± 0.07 g인 데 비해 모든 군에서 유의성이 관찰 ($p < 0.001$) 되었으며, 특히 TA 군의 경우 NC군 대비 각각 45 %, 61 % 증가하는 결과가 나타났다. 한편 절대 장

기중량의 변화에서 GYB를 투여한 군은 TA군 대비 GYB 75, 150군에서는 간의 장기중량이 각각 5 % 증가, GYB 300군에서는 3 % 감소하였고, 유의성은 나타나지 않았다. 한편, 상대 장기중량의 변화에서 GYB 투여군은 TA군 대비 GYB 75군과 GYB 300군은 각각 99 %, 94 % 수준으로 감소하였으며, GYB 150군은 103 % 수준으로 증가한 결과가 나타났다(Table 2).

Table 2. Absolute and Relative Liver weight of Major organ in TCDD induced and GYB administration in male SD rats.

| Group | Liver weight | |
|---------|---------------------------|--------------------------|
| | Absolute organ weight | Relative organ weight |
| NC | 13.98±0.97 | 2.93±0.07 |
| TA | 20.33±2.12 ^{***} | 4.72±0.75 ^{***} |
| GYB 75 | 21.25±2.79 ^{***} | 4.72±0.73 ^{***} |
| GYB 150 | 21.41±2.02 ^{***} | 4.87±0.28 ^{***} |
| GYB 300 | 19.62±1.18 ^{***} | 4.42±0.14 ^{***} |

Mean ± Standard deviation.
^{*} Data are shown as mean±SD of (n=6) ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ vs. NC, ^{##} $p < 0.01$ vs. TA as determined by one way ANOVA.
 Abbreviation : See Figure 1.

3.3 일반혈액검사 및 혈액 생화학검사에 미치는 영향

적혈구 수(Red blood cell, RBC)의 경우 NC군 $9.08 \pm 0.17 \times 10^6 / \mu\text{L}$ 에 비해 TA군에서 $7.89 \pm 0.28 \times 10^6 / \mu\text{L}$ 로 87 % 수준의 결과를 나타냈고, 모든 군에서 유의성이 관찰되었다($p < 0.01$, $p < 0.001$). 한편 GYB 투여군에서 TA군 대비 회복 효과는 보였으나 유의성은 보이지 않았다. 헤모글로빈, 헤마토크릿 수치의 경우 NC군에 비해 TA군에서 각각 82 %, 80 % 수준의 결과를 나타냈고, 모든 군에서 유의성이($p < 0.001$) 관찰되었으며, GYB 투여에 의해 회복되는 경향을 나타냈으나 유의성은 없었다(Table 3).

간 기능의 변화를 알아보기 위해 측정된 혈청 생화학적 수치를 볼 때 아스파르트산 아미노기전달효소(aspartate aminotransferase, AST) 수치는 NC군 대비 TA군에서 49 % 증가한 수치를 나타냈으며, 간 기능의 장애가 유도되었다. 한편 GYB 투여군에서는 TA군 대비 GYB 300군에서 79 % 수준으로 감소하였다. 알칼리성 인산 가수분해효소(alkaline phosphatase, ALP)의 수치는 NC군 대비 TA군에서 56 % 상승하였으며, GYB 300군에서는

TA군 대비 78 % 수준으로 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 보이지 않았다.

Table 3. The effects of GYB administration on red blood cell and White blood cell index in TCDD induced male SD rats.

| Group | RBC (10 ⁶ /uL) | HGB (g/dL) | HCT (%) | WBC (10 ³ /uL) |
|--------|---------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| NC | 9.08 ± 0.17 | 15.43 ± 0.42 | 49.10 ± 1.82 | 6.24 ± 1.16 |
| TA | 7.89*** ± 0.28 | 12.58*** ± 0.55 | 39.33*** ± 2.01 | 6.35 ± 2.18 |
| GYB75 | 8.06** ± 0.49 | 13.22*** ± 0.57 | 41.05*** ± 1.43 | 5.38 ± 1.40 |
| GYB150 | 7.95*** ± 0.38 | 12.90*** ± 0.56 | 40.25*** ± 2.02 | 5.33 ± 1.65 |
| GYB300 | 8.11** ± 0.40 | 13.17*** ± 0.47 | 40.62*** ± 1.45 | 7.58 ± 2.51 |

Mean ± Standard deviation.

* Data are shown as mean±SD of (n=6) ** p<0.01, *** p<0.001 vs. NC as determined by one way ANOVA.

Abbreviations: See Figure 1; RBC, red blood cell; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; WBC: white blood cell

3.4 간 조직에서 항산화 지표에 미치는 영향

TCDD와 GYB 투여에 의한 간 조직의 항산화 지표에 미치는 영향을 평가하기 위하여 말론디알데하이드 (MDA: Malondialdehyde), 슈퍼옥사이드 디뮤타제 (SOD: Superoxide dismutase)를 측정된 결과, TCDD 투여에 의하여 두 항목 모두 감소하는 경향이 나타났다. 반면, GYB 75, 150군에서 TA군과 비교하였을 때, SOD와 MDA가 증가하는 것을 나타냈으나 유의성은 관찰되지 않았다(Table 4).

Table 4. The effects of GYB administration on antioxidant parameter in TCDD induced male SD rats.

| Group | MDA (nmol/mL) | SOD (U/mL) |
|--------|---------------|--------------|
| NC | 4.22±2.23 | 221.64±94.86 |
| TA | 2.18±1.40 | 104.11±54.33 |
| GYB75 | 2.28±1.18 | 106.74±48.19 |
| GYB150 | 2.59±1.56 | 116.02±38.59 |
| GYB300 | 2.06±0.42 | 86.74±23.68 |

Mean ± Standard deviation.

* Data are shown as mean±SD of (n=6) ** p<0.01, *** p<0.001 vs. NC as determined by one way ANOVA. Notes on group designation are the same as in Table 1.

Abbreviations: See Figure 1; MDA: malondialdehyde, SOD: superoxide dismutases.

3.5 간 조직에서 면역기능지표에 미치는 영향

TCDD와 GYB 투여에 의한 간 조직의 면역기능 지표에 미치는 영향을 평가하기 위하여 인터루킨 3(IL-3: Interleukin-3), 인터루킨 6(IL-6, Interleukin-6), 종양괴사인자 알파(TNF-α: Tumor Necrosis Factor alpha)를 측정된 결과, GYB 150군을 제외하고 유의성이 관찰되었다(p<0.05~0.001). IL-3 치는 NC 군 대비 TA군에서 55 % 수준으로 감소하였으며, IL-6 수치 역시 55 % 수준으로 감소하였다. 한편 GYB 투여군에서 GYB 75의 경우 TA군 보다 감소하는 결과가 나타났다(Table 5).

Table 5. The effects of GYB administration on interleukin and tumor necrosis-alpha in TCDD induced male SD rats.

| Group | IL-3 (pg/mL) | IL-6 (pg/mL) | TNF-α (pg/mL) |
|--------|-----------------|----------------|---------------|
| NC | 305.74±78.48 | 257.83±69.61 | 443.50±91.20 |
| TA | 168.95±44.22* | 141.64±63.43* | 301.02±124.08 |
| GYB75 | 101.65±34.99*** | 82.45±34.10*** | 114.05±94.77* |
| GYB150 | 207.14±77.41 | 155.06±67.81 | 206.27±136.99 |
| GYB300 | 164.19±51.22** | 170.72±32.77 | 251.02±132.23 |

Mean ± Standard deviation.

* Data are shown as mean±SD of (n=6) ** p<0.01, *** p<0.001 vs. NC as determined by one way ANOVA. Notes on group designation are the same as in Table 1.

Abbreviations: See Figure 1; IL-3, interleukin-3; IL-6, interleukin-6; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha.

3.6 조직병리학적 변화에 미치는 영향

간 조직의 현미경적 관찰에서 NC군의 경우 간소엽구조의 중앙에 중심 정맥이 위치하고 가장자리를 향해 방사형으로 코드 모양의 배열을 보였으며, 간문맥과 간소엽구조의 경계가 잘 이루어진 정상적인 구조를 보였으나 (Fig. 2), TCDD의 투여에 의하여 간세포 세포의 핵이 과염색상으로 관찰되었으며 cytoplasmic vacuolation, 중심엽 지역의 sinusoid가 증가되어 TCDD의 투여 시 나타나는 전형적인 조직학적 변화가 대부분의 개체들에서 관찰되었다(Fig. 2). 한편 GYB 투여군에서는 sinusoid가 증가된 현상과 세포의 핵의 염색성 등 간세포의 손상 정도가 완화되었지만, cytoplasmic vacuolation은 국소적으로 관찰되었다(Fig. 2).

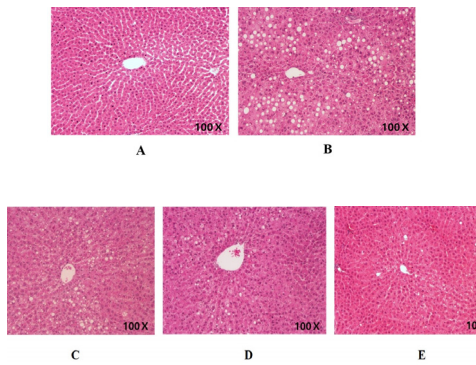


Fig. 2. Hepatic histopathologic changes of central vein in the TCDD-induced sinusoid and vacuolation change liver of rats.
 (a) Normal control (b) TCDD alone group
 (c) GYB 75mg/kg (d) GYB 150mg/kg.
 (e) GYB 300mg/kg.

4. 고찰 및 결론

최근 항산화에 관한 연구들이 많이 시행되고 있는데 이와 관련하여 실험적 산화적 손상 유발은 폴리클로린화 디벤조-*p*-다이옥신으로 이 계열 중 가장 약효가 강력한 화합물인 TCDD로 유도하여 산화적 스트레스 및 세포 손상, 질병을 유발하는 ROS를 생성하여 유발하는 방법이 있다. 이에 본 실험에서는 TCDD에 의한 산화적 손상 유발 흰쥐에 대한 항산화 효과가 있는 것으로 알려진 GYB를 통해 항산화 효과를 평가하고자 하였다.

본 연구에서 GYB 투여 용량설정에 있어 TCDD를 이용해, 독성을 유발한 후, GYB를 125, 250, 500 mg/kg.bw.로 투여하여 예비 실험한 결과, 농도 의존적인 효과가 나타났다. 이중 가장 효능이 있다고 판단되는 저농도 수준의 농도를 본 실험의 중간 농도로 설정 후 단계별로 저농도, 고농도로 설정하여 실험에 사용하였다.

실험동물로 수컷을 사용한 이유는 암컷은 배란 주기를 가지고 있어 호르몬 차이에 의해 실험의 변동이 생길 수 있기 때문에 수컷을 우선하여 선택해 실험하였다[16].

체중에 미치는 영향을 확인한 결과 NC군을 제외한 모든 군에서 체중이 유의적으로 감소하였다($p < 0.001$). TCDD에 노출이 되면 식욕감퇴, 체중감소 등의 효과가 나타나는데 그 원인으로는 glucose transport의 저하 [17], 지방세포에 존재하는 lipoprotein lipase 활성의 저하 등이 알려져 있다[18]. 반면, GYB 투여에 의해 용량 의존적으로 체중감소 억제 효과를 나타낸 것으로 보아, 이는 다른 한약재에서 필수 영양분을 공급하여 농도

의존적으로 체중감소의 억제 효과가 나타났다고 생각된다.

일반 혈액 검사에서 TCDD 투여로 적혈구 수가 감소하였으며, 이로 인해 산소 운반능력이 떨어지게 되면서 조혈 기능 이상이 일어났으며, 이는 Hinkle 등[19]이 보고한 30일 동안 매일 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w의 TCDD를 랫드에 경구투여한 결과 혈소판 수, 헤마토크리트, 헤모글로빈 농도 등이 감소하였다는 결과와 일치하였다. 한편, GYB 투여에 의해 TCDD에 의하여 감소된 수치들이 회복되는 것으로 보아 GYB가 적혈구의 조혈 기능을 항진하였다고 생각된다.

실험동물의 간에 독성반응이 나타났는지 확인하기 위하여 절대 및 상대 장기 무게를 측정하였다. 간 조직의 무게는 NC군 대비 모든 군에서 중량이 상승하는 효과와 함께 유의성이 나타났으며 ($p < 0.001$), 독성이 발현되었다고 판단된다[20, 21]. 이는 TCDD가 cytochrome *p*-450 효소계에 영향을 미쳐 유발되는 무과립 세포질세포망의 비대에 따른 간실질세포의 증가 내지 비대에 기인하는 것으로 알려져 있다[6]. 한편 GYB 300군에서는 TA군에 비하여 감소되는 결과를 나타내었다.

간 조직의 지질 과산화 반응의 변화를 규명하기 위해 생체 내 생성 정도를 알 수 있는 반응 산물인 MDA와 SOD 함량을 측정하였다. 생체의 각 세포는 독성 물질을 제거하는 작용을 하며 세포의 효소가 처리할 수 없는 양이거나 충분한 효소가 없을 시 세포는 암세포로 변성될 위험성이 있다. 특히, SOD는 생체의 가장 치명적인 자유라디칼 독소 중의 하나인 초과산화물을 찾고 분해시킨다고 알려져 있다. 이러한 기전으로 라디칼이 생성되면 SOD를 포함한 세포의 효소가 독소가 세포에 손상을 일으키기 전에 미리 제거한다. 연구 결과 TCDD 투여군의 간 조직에서 MDA, SOD의 함량이 감소됨을 확인하였고, GYB에 의해 증가됨을 확인하였다. MDA가 TA군에서 감소하는 경향을 보였는데, 이는 MDA는 고환절제 동물에서 정상군보다 MDA가 감소한 것으로 보아, testosterone의 생체 농도와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있어 [22], TCDD 투여로 인한 성호르몬의 변화로 나타났을 것으로 생각되며, GYB투여로 인해 회복되면서 증가하였을 것으로 판단된다. SOD는 GYB 투여군에서 증가되었는데, 이는 GYB 구성 성분 중 하나인 오미자 투여에 의하여 단백질 중 SOD 함량을 분석 결과 유의적으로 감소시키지 않았다는 결과와 일치하였으며[23], 복분자의 잎 및 줄기에 함유된 폴리페놀 및 플라보노이드 함량으로 인해 SOD 활성이 높게 나타난다는 보고와 일치하였다[24]. 반면, TA군과 비교하였을 때, GYB 300군에서 SOD가

오히려 더욱 감소하였는데, 이는 개체의 소인이나 면역 등에 의해 차이가 발생된 것으로 생각된다.

조직병리학적 실험을 통해 TCDD에 의해 간 조직 내 과염색성과, 공포와, sinusoid 증가가 유의하게 관찰되었다. TCDD에 대한 노출은 조직학적으로 간 조직 내 necrotic centrilobular lesion의 변화와 간세포의 팽윤, 세포핵 과염색상, 세포질의 공포 및 지방성 병변이 발생하며 이러한 병변은 TCDD 노출로 lipid peroxidation의 증가와 parenchymal cell의 hyperplasia 및 hypertrophy와 같은 현상에서 비롯된다고 보고되고 있다[25]. 반면 시험물질인 GYB 투여군에서는 TCDD 단독투여군에서 관찰되었던 간 조직의 국소적인 공포만 일부 조직에서 관찰되었을 뿐 그 외 소견들은 유의하게 개선되었다.

최근 홍삼 추출물이 TCDD 투여로 인하여 나타나는 고환 독성을 크게 완하시켰고, 간독성에 있어서도 다소 억제 효과가 있다고 보고하였으나, 지금까지 TCDD로 인해 유발되는 간독성에 대하여 효과적으로 방어할 수 있는 물질들은 거의 보고된 바 없다. 본 연구 결과, TCDD를 통해 유발된 동물모델에서 GYB에 의한 간 독성 개선 및 항산화 효소의 활성화에 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 앞으로 TCDD와 같이 간독성을 일으킬 수 있는 다양한 화학물질에 대해서도 응용될 수 있을 것으로 기대되며, 활성 성분에 대해서 좀 더 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 이를 위해 본 연구에서 평가한 항산화 지표에 더하여 다양한 인자들에 대한 추가적인 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 생각된다. 특히, 본 연구에서 TCDD 투여로 인한 MDA의 감소가 간 독성만으로 일어난 변화라고 판단하는 데 한계가 있어, 추후 TCDD 투여로 인해 나타날 수 있는 생식독성 여부 및 남성 호르몬에 미치는 영향과 연관된 MDA의 변화에 대한 연구를 진행하여 GYB의 추가적인 효능 탐색이 필요할 것으로 보인다.

References

- [1] S.Y Hwang, J.J Wee, S.K Kim, N.Y Youn, Protective Effect of Panax ginseng on TCDD-induced Liver Toxicity in Male Guinea Pigs, *J. Biomed. Lab. Sci.*, 9, 51-58, 2003.
- [2] Poland Alan, C.K Joyce. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Pharmacol toxicol.* 22, 514-554, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.22.040182.002505>
- [3] Y.B Lee, S.J Bae, D.K Lee, J.S Park, J.W Park. The Effect of Mulberry Leaf Extract on Blood biochemical parameters in White Rats Exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Journal of Digital Convergence.* 11, 1, 299-308, 2013. DOI: <http://doi.org/10.14400/JDPM.2013.11.1.299>
- [4] G.E Hook, J.K Haseman, G.W Lucier. Induction and suppression of hepatic and extrahepatic microsomal foreign-compound-metabolizing enzyme systems by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Chem Biol Interact.* 10, 199-214, 1975. DOI: [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(75\)90113-1](https://doi.org/10.1016/0009-2797(75)90113-1)
- [5] K.B Kwon, B.R Kim, I.J Hwang, E.K kim, G.H Kim. Effects of Gamimajeonjahwan Extract on the Sexual Function in Male Rats. *JPPKM.* 18, 5, 1410-1417, 2004.
- [6] J.H Lee, H.S Kim, S.Y Hwang, Effects of Green Tea Powder on the Disorders of Lipid Metabolism and Hepatic Functions in Rats treated by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 18, 5, 1185~1193, 2006. DOI: <http://doi.org/10.3746/jkfn.2006.35.9.1185>
- [7] S.E Bae, H.J Kim, S.Y Lee, C.S Kim, I.H Ha, Analysis of Experimental Study Tendency on Oriental Herbal Medicines for Male Infertility -Focusing on Domestic Theses for a Degree -, *J Korean Obset Gynecol.* 27, 1, 120-139, 2014. DOI: <http://doi.org/10/15204/jkobgy2014.27.1.120>
- [8] B.W Kim, K.S Rho. Study on the Activity of GOT and GPT in the Hepatotoxic Rat Treated Lycium chinense Mill. *Korean J. Biomed. Lab. Sci.* 6, 3, 187-192, 2000.
- [9] T Ramesh, S.W Sim, S.Y Hwang, S.H Sohn, S.K Yoo. Panax ginseng reduces oxidative stress and restores antioxidant capacity in aged rats. *Nutrition Research.* 32, 9, 718-726, 2012. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.08.005>
- [10] M.Y Lee, S.J Jun. Effect of Cuscutae extract on experimentally induced liver damage in rabbits. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 18, 3, 333-337, 1989.
- [11] E.Y Kim, E.K Kim, H.S Lee, Y.S Sohn, Protective effects of Cuscutae semen against dimethylnitrosamine-induced acute liver injury in Sprague-Dawley rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 30, 8, 1427-1431, 2007. DOI: <http://doi.org/10.1248/bpb.30.1427>
- [12] K.J Shim. Antioxidant effect of Schizandrae Fructus on male reproductive cells. Kyung Hee University, 2009.
- [13] Agarwal Ashok, A Ramadan, A Mohamed. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility.* 79, 4, 829-843, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)
- [14] H.M Yang, S.M Oh, SS Lim, H.K Shin, Y.S Oh, Antiinflammatory activities of Rubus coreanus depend on the degree of fruit ripening. *Phytotherapy*

Research. 22, 1, 102-107. 2008.

DOI: <http://doi.org/10.1002/pr.2274>

- [15] S.W Jee. Effects of Allii tuberosi Semen on the Expression of CREM Gene and Sperm Motility in Male Mice. Kyung Hee University, 2012.
- [16] Y.J Kim, S.G Wang, U.K Park, J.H Oh, S.Y Hwang. Antidiabetic and Antioxidative Effects of Bitter Melon on Streptozotocin-induced Diabetic Rats, *Korean J Clin Lab Sci*, 51(4), 504-513, 2019.
- [17] E Enan, P.C Liu, F Matsumura. TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) causes reduction in glucose uptake through glucose transporters on the plasma membrane of the guinea pig adipocyte. *J Environ Sci Health B*, Part B. 27, 5, 495-510, 1992.
DOI: <https://doi.org/10.1080/03601239209372797>
- [18] D.W Brewster, D.W Bombick, Matsumura. Rabbit serum hyperglycemia after administration of 2,3,7,8-tetrachlorodi-benzo-p-dioxin (TCDD). *J. Toxicol. Environ. Health*. 25, 495-507, 1988.
DOI : <https://doi.org/10.1080/15287398809531227>
- [19] J.H Lee, C.L Jhang, S.C Bi, S.Y Hwang. Effects of Artemisia capillaris extract on disorders of hepatic functions and lipid metabolism in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *J Nutr Health*, 46, 3, 207~217, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4163/jnh.2013.46.3.207>
- [20] J.H Lee, C.L Zhang, S.C Bi, S.Y Hwang. Effects of Artemisia capillaris extract on disorders of hepatic functions and lipid metabolism in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *J Nutr Health*. 46, 3, 207-217, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4163/jnh.2013.46.3.207>
- [21] S.Y Hwang, H.S Jeong, J.J Wee N.H Seong, S.K Kim, Histopathological Study on the Protective Effect of Korean Red Ginseng on TCDD-induced Acute Toxicity in Male Guinea Pig. *J. Ginseng Res*. 23, 4, 222-229, 1999.
- [22] K. Huh, U.S Shin, J.M Park, Effect of Testosterone on Free Radical Generating Enzyme and Lipid Peroxidative, *Yakhak Hoeji*, 38, 2, 166~173, 1994.
- [23] K.J Shin, Antioxidant effect of Schizandrae Fructus on male reproductive cells, Kyung Hee University, 2009.
- [24] A.S Um, S.H Kwak, Y.N Song, E.Y Jung. Antioxidant or anti-aging composition containing leaf and stem extract of Bokbunja strawberry as an active ingredient, Konzession, Industry-University cooperation foundation, Korea, 1-20.
- [25] N.J Lee, J.B Park, D.K Kim, C.Y Yun, H.J Bae, J.H Cho, Preventive Effects of Cricket Extracts, *Gryllus bimaculatus*, against Toxicity Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Rat, *Korean J Clin Lab Sci*, 36, 2, 258-268, 2004.

양 동 현(Dong Hyun Yang)

[정회원]



- 2018년 2월 : 대전대학교 일반대학원 임상병리학전공 (이학석사)
- 2019년 2월 : 셀리버리 전임연구원
- 2019년 4월 ~ 2019년 12월 : 차병원 종합연구원 주임연구원
- 2020년 3월 ~ 현재 : 국립암센터 과제연구원

<관심분야>

자연과학, 신약개발

오 지 혜(Ji Hye Oh)

[정회원]



- 2018년 2월 : 대전대학교 임상병리학과(학사)
- 2020년 2월 : 대전대학교 일반대학원 임상병리학전공 (이학석사)
- 2020년 3월 ~ 현재 : 대전대학교 일반대학원 임상병리학 전공(박사과정 재학 중)

<관심분야>

임상병리, 혈액학, 독성학

박 운 규(Un Kyu Park)

[정회원]



- 2008년 3월 ~ 현재 : 대전선병원 근무
- 2016년 8월 : 대전대학교 일반대학원 임상병리학전공 (이학석사)
- 2017년 3월 ~ 현재 : 대전대학교 일반대학원 임상병리학 전공(박사 수료)

<관심분야>

조직병리, 실험동물학, 독성학

조 충 식(Chung Sik Cho)

[정회원]



- 1994년 2월 : 대전대학교 한의학과(학사)
- 1998년 2월 : 대전대학교 일반대학원 내과 (내과 석사)
- 2001년 2월 : 대전대학교 일반대학원 내과 (내과 박사)
- 2020년 2월 : 대한 한방내과학회 기획총무이사
- 2020년 3월 ~ 현재 : 대한한방내과학회 부회장

<관심분야>

한의학, 한방내과, 건강증진

황 석 연(Seock Yeon Hwang)

[정회원]



- 1994년 2월 : 한남대학교 생물학 동물생리(이학석사)
- 1999년 2월 : 한남대학교 생물학 독성학 (이학박사)
- 2009년 3월 ~ 현재 : 대전대학교 보건의료과학대학 임상병리학과 (교수)
- 2017년 5월 ~ 현재 : 대전대학교 산학협력단 단장

<관심분야>

혈액학, 수혈의학, 독성학