



엽산 DDB-S가 랫드의 생식독성에 미치는 영향에 관한 연구

김현우¹ · 박진홍¹ · 문서현¹ · 유국종¹ · 김화¹ · 김준성¹ · 박종하¹ · 조현선¹ · 강가미¹
황성희¹ · 김판기² · 문전옥³ · 이치호³ · 조명행¹

¹서울대학교 수의과대학, ²용인대학교 자연과학대학, ³부산대학교 약학대학

A Teratogenicity Study on Dimethyl Dimethoxy Biphenylate Derivative (DDB-S) in Rats

Hyun Woo Kim¹, Jin Hong Park¹, Seo Hyun Moon¹, Gook Jong Eu¹, Hwa Kim¹,
Joon Seong Kim¹, Jong Ha Park¹, Hyun Sun Cho¹, Kami Kang¹, Seong Hee Hwang¹,
Pan Gyi Kim², Jeon Ok Moon³, Chi Ho Lee³ and Maing Haing Cho¹

¹Laboratory of Toxicology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²Laboratory of Environmental Health, College of Natural Science, Yongin University, Yongin 449-714, Korea

³Laboratory of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Received January 5, 2003; Accepted February 22, 2003

ABSTRACT. A teratogenic study of dimethyl dimethoxy biphenylate derivative (DDB-S) was carried out on Sprague-Dawley rats. DDB-S dissolved in saline was administered to male and female rats by intravenously injection at daily doses of 50 mg/kg, 75 mg/kg, and 100 mg/kg. A half of dams were sacrificed at 20th day of gestation to scrutinize the pregnant performances and fetal development. And the remaining dams were allowed to deliver. The growth, reflex, behaviour and reproductive function of F1 offsprings were examined. There was no treatment-related difference in body weight, food consumption and necropsy findings of dams. No gross, skeletal and visceral abnormalities was observed in F1 fetuses from dams treated with DDB-S. F1 offsprings did not show any treatment-related difference in growth, reflex, behaviour and reproductive performance. At caesarean section of F1 dams, no growth retardation and gross abnormality was observed in F2 fetuses. In conclusion, DDB-S did not show any potential teratogenic effect in rats.

Keywords: Dimethyl dimethoxy biphenylate derivative (DDB-S), Teratogenic study, Rats.

서 론

Dimethyl dimethoxy biphenylate(DDB)는 오미자 주성분의 하나인 Schizandrin C의 합성물질로서 약 200년 전부터 중국에서 진정제로 사용되어진 *Fructus shizandrae* 라는 약초에서 추출한 천연물이다(Xie 등, 1981).

*Fructus shizandrae*는 바이러스성 및 화학적 간염치료 및 높은 혈청 glutamic pyruvic transaminase(GPT)치를 낮춰주는데 효과가 있는 것으로 알려졌으며(Liu, 1983),

하루 3회 75~300 mg의 DDB 섭취는 부작용 없이 만성 B형 간염치료와 혈청 GPT와 α -fetoprotein 값을 감소시키는 기능을 가진 것으로 알려져 있다(Chang 등, 1981, 1982; Wang 등, 1982, 1984).

이러한 DDB의 효과로 인하여 현재 국내 여러 제약회사에서 경구투여제로 제조하여 시판중이나 매우 난용성이며 생체이용율이 낮은 문제점 때문에 정맥주사제로의 개발이 절실히 필요한 시점에 있다. 이에 본 실험에서는 DDB 자체가 지니고 있는 고유의 활성과 약리작용을 유지하면서 구조변경을 통해 수용성을 증진·강화시켜 정맥주사제로 개발된 새로운 간염치료제인 엽산 DDB 유도체(DDB-S)의 랫드에 대한 생식독성을 수행하여 의약품 등의 독성시험기준(식품의약품 안정청, 1999. 12. 22)에 따라 안전성

Correspondence to: Maing Haing Cho, Laboratory of Toxicology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
E-mail: mchotox@snu.ac.kr

평가에 적정을 기하고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험동물 및 사육조건

Sprague-Dawley(SD)계 랫드(체중 180~220 g)를 사용하였고, 약 1주일간 순화적응시킨후 건강한 동물을 선택하여 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 배기 10~12회, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 150~160 Lux의 환경에서 사육하였다.

시험군의 구성 및 투여

대조군 및 실험군 각 군당 암·수 각각 20마리로 하였고, 염산 DDB-S의 투여는 정맥내 투여로 하여, 수컷은 60일 전부터 투여하기 시작하여 임신 확인 후 부검 전날까지, 암컷은 교배 14일 전부터 투여하여 임신 확인 후 합사·교배하였다. 암컷은 교미 성립 후에도 임신 전기간과 분만 후 이유기까지 매일 1회 투여하였다. 투여 용량은 0, 57, 75 및 100 mg/kg/day로 실시하였다. 각 군은 교배전 투여기간 동안과 임신중 및 분만후까지 1주일 간격으로 체중과 사료 섭취량을 측정하였다.

F₀ 수컷에 대한 영향

동물의 일반상태, 중독증상 및 사망유무 등을 관찰하였다. 교배 60일 전부터 교배 시작일까지 1주일 간격으로 체중과 사료섭취량을 측정하였다. 교배가 끝난 수컷은 임신 확인 후 10일 정도 후에 부검을 실시하여 육안으로 장기의 이상유무를 관찰하였다.

F₀ 암컷에 대한 영향

동물의 일반상태, 중독증상 및 사망유무 등을 관찰하였고 분만 전후에는 분만유무 및 분만 중의 이상유무를 관찰하였다. 교배 전 14, 7일, 교배시작일, 임신 0, 4, 7, 10, 14, 17, 20일에 체중을 측정하였으며, 분만군의 경우 분만일, 분만 후 4, 7, 14, 21일에 체중을 측정하였다. 교배판정은 질진 또는 질도말에 의해 정충이 확인된 날을 임신 0일로 판정하였다.

자궁 절개군의 관찰

임신 중인 동물의 절반을 분만 하루 전인 임신 20일째에 ether로 마취시킨 후, 복부를 절개하여 임신황체수, 착상수, 착상울, 재흡수된 배자수, 태자의 사망여부, 생존태자의 체중, 성별 등을 기록하였다. 임신 모체의 장기 중 간, 비장, 폐, 심장, 신장(좌·우), 난소(좌·우) 등의 중량을 측정하였다. 태자는 적출하여 골격검사와 장기검사를 실

시하였다.

태자의 형태학적 검사

태자 장기 비교 검사: Bouin 용액에 넣어서 1주일간 37°C 에서 보관해 둔 태자를 70% ethanol로 옮겨서 고정하였고, 태자의 머리부분은 약 2 mm 두께의 절편으로 자르고, 몸통에서는 심장과 횡격막을 적출하여 해부현미경 하에서 기형유무를 관찰하고 기록하였다.

태자 골격 비교 검사: 95% ethanol에서 고정시킨 골격에 대해 alcian blue와 alizarin red S solution으로 연골과 경골을 각각 염색한 다음 기형유무를 각 항목에 따라 비교하였다.

출산자에 대한 영향: 출산일에 출산자 수를 셈하고 생사여부, 성별 및 외형이상의 유무를 관찰하고 체중을 측정하였다. 생후 0, 4, 7, 14, 21일에 체중을 측정하였다.

이개개전: 생후 4일령에 측두 피부로부터 양쪽 콧바위가 모두 떨어져 있으면 양성으로 하였다.

이개반사: 생후 7일령에 차산자 전부를 대상으로 딱딱한 털로 이개를 찢어 반사가 있으면 양성으로 기록하였다.

정항반사: 생후 9일령에 차산자의 등 부위를 평면에 닿게 누어 5초 내에 일어나 사지가 표면에 닿으면 양성으로 기록하였다.

치아맹출: 생후 10일령에 아랫니가 보이는 것을 양성으로 하였다.

안검개열: 생후 14일부터 양쪽 눈을 모두 떴으면 양성으로 하였다.

정소하강: 생후 21일령에 정소가 하강되어 음낭이 형성되었는지 관찰하여 양쪽이 모두 하강한 것을 양성으로 하였다.

각막반사: 생후 21일령에 생존자 전부를 대상으로 각막을 딱딱한 털로 접촉하여 반사가 있으면 양성으로 하였다.

질개구: 생후 33일부터 질 부위가 열려있는지 여부를 평가하여 질구가 완전히 열렸으면 양성으로 하였다.

생식능 검사: 수컷의 수정능 검사 및 암컷의 수태능 검사는 70일령 이후에 모체 당 암·수 각 1수씩 실시하였다. 형매 교배를 피하면서 교미확인, 임신확인, 임신유지 기능 검사 등을 수행하였다.

임신 중 F1에 관한 검사: 임신 0, 7, 14, 20일에 체중을 측정하였다. 임신 20일에 개복하여 황체수, 착상수, 흡수배자수, 생존태자수, 사망태자수를 확인하였다. 또한 F1 모체의 주요 장기의 이상유무를 관찰하였다.

통계처리법: 각 시험자료의 특성에 따라 ANOVA 및 Kruskal-Wallis test를 실시하였다. 모든 통계처리는 5%의 통계적 유의수준에서 검정하였다.

Table 1. Pregnant indices of dams treated with DDB-S

Dose (mg/kg)	0	57	75	100
Weight of dams	342.80±7.662	340.00±11.336	347.14±13.409	348.88±8.306
No. of corpora lutea	13.00±2.646	14.80±2.168	14.00±1.633	14.29±1.704
No. of implantation	11.60±2.702	14.40±2.608	12.00±3.109	13.71±1.496
No. of live fetuses	10.60±2.702	12.20±4.147	11.86±3.288	13.14±1.952
Weights of placenta	0.54±0.024	0.51±0.077	0.50±0.063	0.52±0.044
Weights of fetuses	5.13±0.620	5.20±0.440	5.03±0.517	5.01±0.625

Data represent mean±SD (number of dams = 5-7).

결 과

임상증상 및 체중변화에 미치는 영향

투여약물에 의한 것으로 판단되는 임상증상은 발견되지 않았다. 수컷동물의 체중변화는 Fig. 1과 같다. 암컷 동물

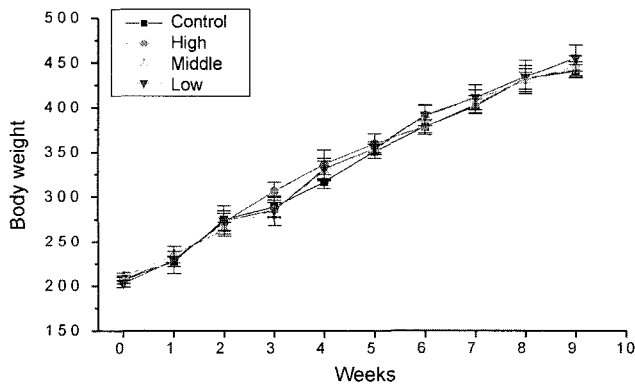


Fig. 1. Body change of male rats during administration DDB-S. Low means the group administered at the dose level of 57 mg/kg. Middle means the group administered at the dose level of 75 mg/kg. High means the group administered at the dose level of 100 mg/kg.

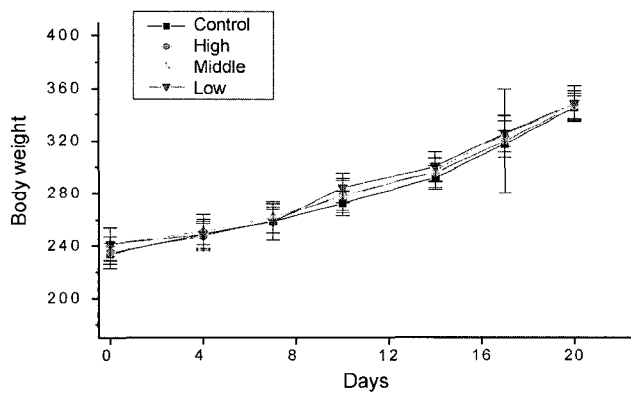


Fig. 2. Body change of female rats during administration DDB-S. Low means the group administered at the dose level of 57 mg/kg. Middle means the group administered at the dose level of 75 mg/kg. High means the group administered at the dose level of 100 mg/kg.

의 임신기간 중 측정된 체중변화는 관찰되지 않았다(Fig. 2). 염산 DDB-S에 의한 사료섭취량의 변화도 관찰되지 않았다. 차산자의 출생부터 이유까지 암수태자 모두 대조군에 비해 특이할 만한 체중변화는 나타나지 않았다. 따라서 염산 DDB-S에 의한 차산자의 체중에 미치는 영향은 인정되지 않았다.

자궁절개군의 임신지수에 미치는 영향

임신 20일째 부검군의 임신황체수, 착상수, 착상율, 재흡수된 배자수, 태자의 사망여부, 생존태자의 체중, 성별 등을 조사하였다(Table 1). 착상율, 착상수에 대한 생존태자의 비, 생존태자의 체중은 각 군간 차이가 없었다. 성비에 있어서도 대조군에 비해 특이할 만한 차이를 나타내지 않았다. 착상수에 대한 분만태자의 비, 분만태자의 한배새끼 수는 대조군과 비교하였을 때 각 군간에 특이할 만한 차이는 인정되지 않았다.

태자의 기형발생에 미치는 영향

임신 20일째 모체를 부검하여 얻은 내장 및 골격 검사 결과는 Tables 2, 3과 같다. 외형이상 검사 및 내장기형 검사 결과 이상이 발견되지 않았다. Alizarin red S와 alcian blue로 염색한 골격표본 검사 결과 기형발생은 관찰되지 않았으며 골격변이가 관찰되었으나 자연발생 수준이었다(Figs. 3~7). 따라서 DDB-S에 의한 영향은 나타나지 않았다.

Table 2. Soft tissue abnormalities of fetuses from dams treated with DDB-S

Dose (mg/kg)	0	57	75	100
Enlargement of nasal cavity	-	-	-	-
Anophthalmia	-	-	-	-
Enlargement of olfactory bulb	-	-	-	-
Single ventricle	-	-	-	-
Atrophy of ventricle wall	-	-	-	-
Absence of lateral ventricle	-	-	-	-
Absence of third ventricle	-	-	-	-
Diaphragmatic hernia	-	-	-	-

'-' means that abnormalities were not found (n = 25-42).

Table 3. Selected skeletal findings of fetuses from dams treated with DDB-S

Dose (mg/kg)		0	57	75	100
Sternebrae	mandibulum	-	-	-	-
	1st sternebrae	-	-	-	-
	2nd sternebrae	-	-	-	-
	3rd sternebrae	-	-	-	-
	4th sternebrae	0.04±0.102	0.10±0.224	0.06±0.135	0.16±0.316
Vertebrae	xiphoid	-	-	-	0.04±0.121
	cervical	-	-	-	-
	thoracic	-	-	-	-
	lumbar	-	-	-	-
	sacral	-	-	-	-
	rib	0.08±0.129	-	-	0.06±0.202
Forelimbs	metacarpals	-	-	-	-
	phalange <6 ossified	-	-	-	0.03±0.010
Hindlimbs	metatarsals	-	-	-	-
	phalange <4 ossified	-	-	-	-

Data represent mean value of frequencies±SD (n = 24-39).

'-' means that abnormalities were not found.

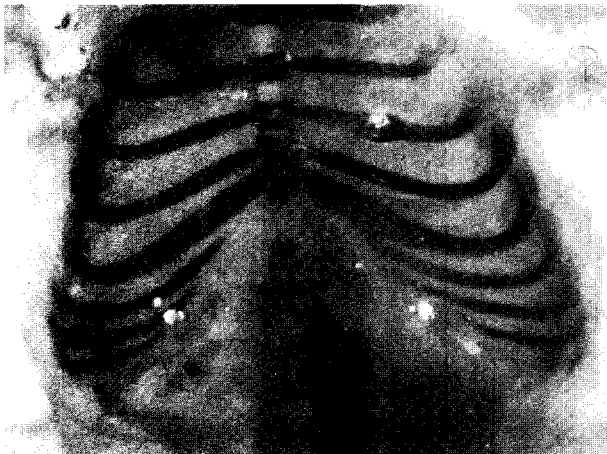


Fig. 3. Representative findings of skeletal formations. Rib of fetus from control. Fetus was fixed in 70% alcohol, followed by clearing in 1% KOH and stained with alcian blue and alizarin red S for skeletal examination. No abnormal sign was observed.



Fig. 4. Representative findings of skeletal formations. Rib of fetus from DDB-S 57 mg/kg. Fetus was fixed in 70% alcohol, followed by clearing in 1% KOH and stained with alcian blue and alizarin red S for skeletal examination. No abnormal sign was observed.

수컷 장기중량에 미치는 영향

임신 확인 후 수컷을 부검하여 각 장기를 육안으로 이상을 관찰하고 장기중량을 측정하여 상대중량을 산출하였다 (Table 4). 좌우 신장의 경우 전 농도군에서 대조군에 비해 절대 장기 중량의 유의성 있는 증가가 나타났다. 상대 중량의 경우 좌측 신장에서는 100 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 증가가, 우측 신장에서는 75, 100 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 증가하였다. 좌측 고환에서는 75 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가가 나타났다. 신장의 경우, 용량 의존적인 증가는 아니었으나 약간의 DDB-S에 의한 독성이 있는 것으로 생각된다. 그

외 장기의 절대장기중량이나 상대중량에 있어서 염산 DDB-S에 의한 영향은 없었다.

태자의 신체 발육에 미친 영향

태자의 신체 발육에 미친 영향은 Table 5와 같다. 생후 4일령에 컷바위가 두부표피로부터 분리되는 이개개전 검사, 생후 10일령에 치아맹출 검사, 생후 15일령에 안검개열 검사, 생후 21일령에 정소하강 검사, 생후 35일령에 질개구 검사를 실시한 결과, 대조군을 포함한 모든군에서 100% 양성율을 보였다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 염

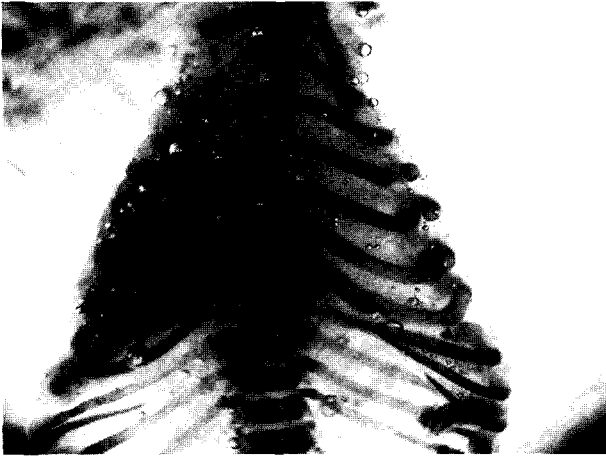


Fig. 5. Representative findings of skeletal formations. Rib of fetus from DDB-S 75 mg/kg. Fetus was fixed in 70% alcohol, followed by clearing in 1% KOH and stained with alcian blue and alizarin red S for skeletal examination. No abnormal sign was observed.

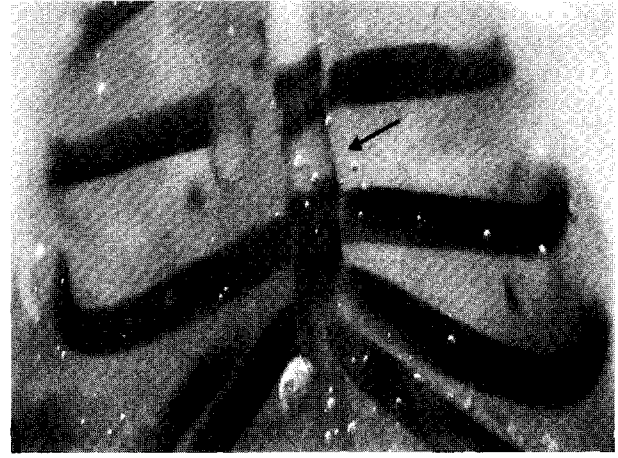


Fig. 7. Representative findings of abnormal skeletal formations. 4th sternbrae of fetus from DDB-S 100 mg/kg was ossified incompletely (arrow). Fetus was fixed in 70% alcohol, followed by clearing in 1% KOH and stained with alcian blue and alizarin red S for skeletal examination.



Fig. 6. Representative findings of abnormal skeletal formations. Rib of fetus from DDB-S 100 mg/kg. Fetus was fixed in 70% alcohol, followed by clearing in 1% KOH and stained with alcian blue and alizarin red S for skeletal examination. Rib asymmetry was observed (arrow).

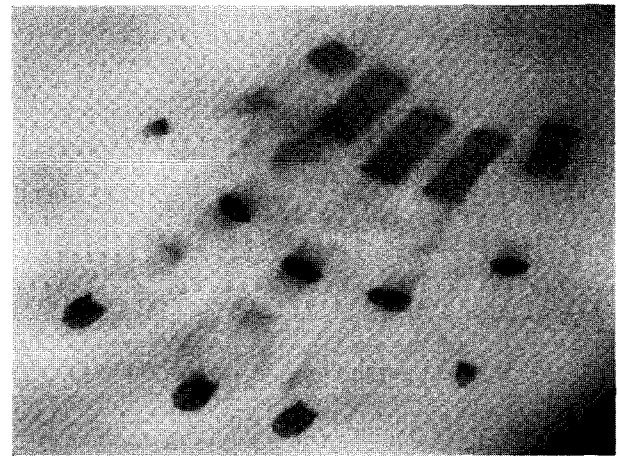


Fig. 8. Representative findings of skeletal formations. Phalanges (forelimb) of fetus from DDB-S 75 mg/kg. Fetus was fixed in 70% alcohol, followed by clearing in 1% KOH and stained with alcian blue and alizarin red S for skeletal examination. The Number of ossification was normal.

산 DDB-S가 차산자의 신체 발육에 미치는 영향은 없는 것으로 나타났다.

태자의 반사운동에 미치는 영향

태자의 반사운동에 미치는 영향에 대한 결과는 Table 6 과 같다. 생후 7일령에 이개반사, 생후 9일령에 정향반사, 생후 21일령에 각막반사를 실시한 결과, 대조군을 포함한 모든군에서 100%의 양성율을 보였다. 이상의 결과로부터 염산 DDB-S가 태자의 반사운동에 미친 영향은 없는 것으로 나타났다.

고 찰

SD 랫드를 이용하여 염산 DDB-S를 수컷에는 정자 형성기간 동안, 암컷에는 난자 형성기간 동안에 투여한 후 교배하여 교미 및 임신성립에 미치는 영향을 평가하였으며, 임신 암컷동물에는 계속하여 임신기간 동안 투여하여 임신 20일째에 임신 암컷의 1/2를 부검하여 모체의 장기 중량, 임신관련지수, 태자의 외형, 내장기형 및 골격기형 발생을 검색하였다. 나머지 임신동물은 자연 분만시켜 분만 및 수유에 미친 영향을, 분만한 태자는 신체발육, 반사

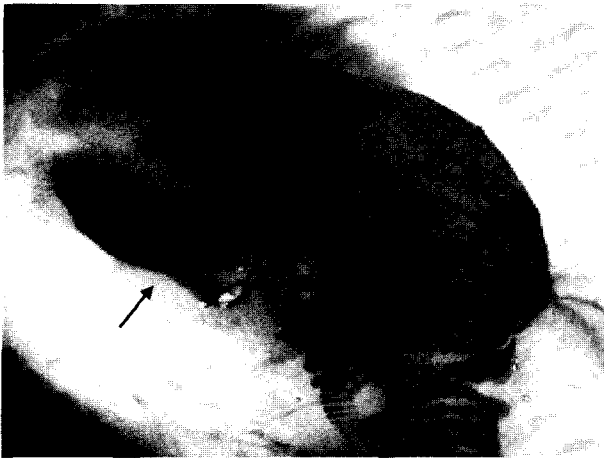


Fig. 9. Representative findings of skeletal formations. Skull of fetus from DDB-S 100 mg/kg. Fetus was fixed in 70% alcohol, followed by clearing in 1% KOH and stained with alcian blue and alizarin red S for skeletal examination. No abnormal sign of mandibulum (arrow) was observed.

기능 및 행동발달에 미치는 영향을 검색하였다.

- 암컷의 체중, 사료섭취량, 임신기간, 분만, 수유, 분만 태자의 체중에 유의한 변화가 인정되지 않았으며 특이한 임상증상도 관찰되지 않았다. 수컷의 경우, 신장의 절대 장기 무게와 상대 장기 무게에서 전 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈으며, 좌측 고환의 절대 장기 무게에서도 대조군에 비해 75 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 증가를 나타내었으나 용량 의존적으로 증가하

Table 5. Physical development of F1 rats obtained from dams administered intravenously with DDB-S

Dose (mg/kg)	0	57	75	100
Auricle detachment (+/-)	19/0	17/0	13/0	17/0
Incisor eruption (+/-)	19/0	17/0	13/0	17/0
Eye opening (+/-)	19/0	17/0	13/0	17/0
Descent of testis (+/-)	12/0	10/0	6/0	8/0
Vagina opening (+/-)	7/0	7/0	7/0	9/0

Table 6. Reflex test of F1 rats obtained from dams administered intravenously with DDB-S

Dose (mg/kg)	0	57	75	100
Surface righting reflex (+/-)	19/0	17/0	13/0	17/0
Auricle reflex (+/-)	19/0	17/0	13/0	17/0
Corneal reflex (+/-)	19/0	17/0	13/0	17/0

지는 않았으나 약간의 신장 독성이 있는 것으로 생각된다.
- 태자의 외형기형, 내장기형, 골격기형도 나타나지 않았다.

- 이개개전, 안검개열, 치아맹출, 정소하강, 질개구 등의 신체발육 분화에, 이개반사, 정향반사, 각막반사 등의 반사기능검사에 각 군간의 유의한 변화가 인정되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료과제(HMP-00-PT-21500-0006)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Table 4. Absolute and relative organ weights of male rats intravenously treated with DDB-S

Dose (mg/kg)	0	57	75	100
Liver (gm)	18.84±2.641	20.83±2.218	19.03±2.24	20.10±2.673
Rel. wt (%b.w)	4.27±0.579	4.64±0.531	4.26±0.543	4.54±0.625
Spleen (gm)	0.73±0.149	0.75±0.138	0.79±0.160	0.73±0.176
Rel. wt (%b.w)	0.17±0.034	0.65±0.110	0.18±0.035	0.16±0.040
Lung (gm)	3.26±0.562	2.93±0.485	2.95±0.436	2.82±0.258
Rel. wt (%b.w)	0.74±0.127	0.33±0.062	0.66±0.098	0.64±0.117
Heart (gm)	1.55±0.236	1.48±0.286	1.50±0.280	1.45±0.146
Rel. wt (%b.w)	0.35±0.054	0.12±0.033	0.33±0.059	0.33±0.059
Prostate (gm)	0.58±0.078	0.55±0.151	0.61±0.095	0.62±0.146
Rel. wt (%b.w)	0.13±0.018	0.42±0.046	0.14±0.021	0.14±0.033
Kidney (L) (gm)	1.68±0.301	1.87±0.182*	1.85±0.237*	1.97±0.209**
Rel. wt (%b.w)	0.38±0.068	0.41±0.057	0.41±0.054	0.44±0.049**
Kidney (R) (gm)	1.66±0.258	1.83±0.224*	1.98±0.233**	1.93±0.210**
Rel. wt (%b.w)	0.38±0.057	0.41±0.057	0.44±0.056**	0.44±0.050**
Testis (L) (gm)	1.68±0.288	1.92±0.115*	1.80±0.295	1.78±0.193
Rel. wt (%b.w)	0.38±0.067	0.43±0.029	0.40±0.066	0.40±0.046
Testis (R) (gm)	1.70±0.319	1.83±0.233	1.89±0.192	1.65±0.126
Rel. wt (%b.w)	0.39±0.074	0.41±0.051	0.42±0.041	0.37±0.030

Data represent means±SD. (n = 20).

*Significantly different from control at $p < 0.05$, **Significantly different from control at $p < 0.01$.

참고문헌

- Chang, Y.X., Yu, H.G. and Shi, J.Z. (1981): Observations on the effects of biphenyl dicarboxylate and honey-pilula of *Silybum marianum*(L), Gaertn on chronic viral hepatitis. *Chin. J. Modern Traditional Med.*, **1**, 24-26.
- Chang, Y.X., Yu, H.G., Shi, J.Z. and Yong, A.L. (1982): Therapeutic effects of DDB and traditional Chinese medicine on α -fetoprotein elevation of chronic viral hepatitis B and cirrhosis, *Beijing Med. J.*, **4**, 255-256.
- Liu, K.T. (1983): From the study of Fructus schizandrae to the discover of biphenyl dimethyl-dicarboxylate, *Chem. Biol. Interact.*, **39**, 315-330.
- Wang, C.F., Chang, Y.X., Chang, Y.L., Yu, H.Q., Shi, J.Y., Fu, J.H., Sun, F., Zhou, J.Z., Ge, W.J., Chen, H.M., Zheng, W.Y., Miao, Z.Q. and Huang, J.D. (1984): Clinical effects of DDB pillules on 209 cases of viral hepatitis and cirrhosis, *Beijing Med. J.*, **6**, 350.
- Wang, C.F., Chang, Y.X., Chang, Y.L., Yu, H.Q., Shi, J.Y., Fu, J.H., Sun, F., Zhou, J.Z., Ge, W.J., Chen, H.M., Zheng, W.Y., Miao, Z.Q. and Huang, J.D. (1982): Biphenyl dicarboxylate in the treatment of viral hepatitis: results of 382 cases, *Beijing Med. J.*, **10**, 93-96.
- Xie, J.X., Zhou, J., Zhang, C.Z., Yang, J.H., Chen, J.X., Jin, H.Q. (1981): Synthesis of Schizandrin C analogs, *Acta. Pharma. Sinica.*, **16**, 306-309.
- 의약품 등의 독성시험기준: 식품안전청 고시 제 1999-61호(1999. 12. 22).