

Protective Effect of *Panax ginseng* on TCDD-induced Liver Toxicity in Male Guinea Pigs

Seock-Yeon Hwang¹, Jae-Joon Wee², Si-Kwan Kim[†] and Nae-Young Youn³

¹Department of Clinical Pathology, Chungbuk National University Hospital, Cheongju, Chungbuk, 361-711, Korea, ²Department of Ginseng Pharmacology Research, KT&G Central Research Institute, Yousong-ku Taejeon, 305-345, Korea, ³Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Pochon CHA University Hospital, Pochon, 487-800 Korea, Department of Life Science, College of Natural Science, Konkuk University, Chungju-city Chungbuk, 380-701, Korea

This study was carried out to investigate the preventive and therapeutic effect of *Panax ginseng* water extract (PG-WE) on the toxicity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), one of the most notorious toxic environmental pollutants belonging to the group of polyhalogenated aromatic hydrocarbons. Normal control (NC) group guinea pigs (180~200 g) received vehicle and saline, and TCDD-treated (TT) group was given TCDD and saline. P100 and P200 group animals received PG-WE for 28 days since 1 week before TCDD exposure at daily doses of 100 mg/kg b.w. and/or 200 mg/kg b.w., respectively. C100 and C200 group received PG-WE for 14 days starting 1 week after TCDD-exposure. Toxicity was induced by a single intraperitoneal injection of TCDD (1 µg/kg b.w.). Abnormal increase in AST and ALT activities in TT group was significantly improved by the administration of PG-WE. Microscopically, there were mild to moderate swelling of hepatocytes, hyperchromatism of individual cells, acidophilic cytoplasm and cytoplasmic vacuolation of some hepatocytes, slight to moderate variations of staining density, occasional single cell necrosis, variable size and shape of some hepatocytes, small groups of degenerating hepatocytes surrounded by mononuclear cells, dilated sinusoids of centrilobular zone and some loss of lobular architecture in TT group liver. From these results, we could find the protective and therapeutic role of PG-WE in TCDD-induced liver toxicity by examining the blood chemical parameters and histopathological observation.

Key Words: *Panax ginseng*, Liver toxicity, Blood chemical parameters, Histopathology antioxidant activity

서 론

내분비 장애물질은 직접 노출된 동물은 물론 노출된 동물의 다음 세대에까지 독성을 나타내며, 내분비 작용을 방해하는 외인성 물질로서 내분비 조절인자들과 작용하여 호르몬에 민감한 조직과 생식기에 암과 같은 퇴행성 질환을 일으킨다는 점에서 사회적인 문제점을 야기하고 있다. 다이옥신 중 하나인 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)는 대표적인 내분비 장애물질로서 면역, 내분비계, 생식기계 기능을 파괴하고, 간 기능과 지질대사에 이상을 초래하며, 실험동물에서

는 종간의 차이는 있지만 간장을 비롯한 여러 장기에서 암을 유발하는 것으로 알려져 있다. TCDD에 의하여 야기되는 임상 화학적 변화로는 혈청 중 glucose, protein, cholesterol 함량 뿐만 아니라 alkaline phosphatase, SGOT, SGPT 활성의 증가가 있으며¹⁾, Buu-Hoi 등²⁾은 dioxin이 독성을 야기하는 주요 장기는 간이라고 주장하기도 했다. 즉, 혈청 내 효소활성의 특이할 만한 변화와 necrotic centrilobular lesion을 포함한 간 기능의 parameter들이 변화한다는 것이다. 또한, TCDD는 rat³⁾, mouse, hamster 및 guinea pig⁴⁾을 포함한 대부분의 실험동물 또는 세포에서 cytochrome P-450을 유도하는 것으로 보고되었다. 특히, cytochrome P-450 isozyme 중 CYP 1A와 CYP 1A1 isozyme을 유도한다는 것이 mRNA 분석 또는 ethoxycoumarin O-deethylase (ECOD)나 ethoxyresorufin O-deethylase (EROD)와 같은 CYP 1A 또는 CYP 1A1 isozyme specific monooxygenase의 활성도 비교를 통하여 확인되었다. 한편, 고려인삼은 독성물질과 간의 해독작용을 포함한 다양한 약리효과 등이

*논문 접수: 2003년 2월 17일

수정재접수: 2003년 3월 5일

[†]별책 요청 저자: 김시관, (우) 380-701 충북 충주시 단월동 322번지, 건국대학교 자연과학대학, 생명과학부

Tel: 043-840-3574, Fax: 043-851-4169

e-mail: skkim@kku.edu

보고되어 왔다⁵⁾. 흥미로운 사실은 TCDD의 경우 다양한 질환을 일으키는 화합물인 반면, 고려인삼은 지금까지 연구된 결과로 볼 때 여러 질환에 대하여 예방 및 치료효과가 있다는 사실이 속속 보고되고 있다. 이러한 사실에 착안하여 본 연구는 TCDD로 독성을 야기한 동물에 홍삼 물추출물을 투여함으로써 혈액학적 지수, 독성물질 대사 관련 효소활성, 병리조직학적 소견에서 유의한 개선효과를 관찰하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물 및 사육

Guinea pig (male, 200±20, Hartley strain)는 샘타코 (경기도 오산)로부터 구입하였으며 구입 후 7일간 계류하여 새로운 환경에 적응시킨 다음 본 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육은 온도; 23±1°C, 습도; 40~60%, 명암 주기; 12시간 조건으로 하였다. 사료는 퓨리나(주)의 토끼용 고형사료에 비타민 C 대신 배추를 오전, 오후 2회에 걸쳐 4주간 매일 충분히 공급하였으며, 식수는 제한 없이 공급하였다.

실험군은 정상대조군 (NC group), TCDD-단독투여군 (TT group), 홍삼 물추출물 단독투여군 (G group), 홍삼 물추출물 전투여군 (P group; TCDD 노출 1주일 전부터 28일간 투여) 및 후투여군 (C group; TCDD-노출 1주일 후부터 14일간 투여)으로 설정하였다.

2) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 용액 조제

TCDD (2 mg)는 물에 녹지 않으므로 소량의 acetone (400 µl)과 미량의 DMSO (100 µl)를 사용하여 녹인 다음 corn oil (450 µl)을 첨가하여 충분히 vortexing하였다. 이것은 다시 corn oil로 희석하여 최종 농도가 0.5 µg/ml이 되도록 조제하였다. 한편, NC group과 G group에 투여한 운반체 (vehicle)는 TCDD를 첨가하지 않고 동일하게 제조하였다.

3) 홍삼 물추출물 조제

인삼 시료는 물추출물로 조제하여 사용하였다. 즉, 수삼 표면에 묻어 있는 흙과 이물질을 수돗물로 깨끗이 씻은 다음 98°C에서 증삼하고 75°C에서 통풍 건조함으로서 홍삼으로 제조하였다. 홍삼은 다시 10 mm 길이로 절단한 다음 홍삼 무게 10배 량의 증류수를 가하여 80°C에서 8~10시간 증류수로 추출하였다. 물추출물은 여과하여 여액을 냉장실에 보관하고 잔사에 대하여는 다시 증류수를 동일량 가하여 3회 반복 추출하였다. 여과 액에 대하여는 70~80° Brix 정도가 될 때까지 감압농축하여 시료로 사용하였다.

4) 시약 및 기기

혈액화학적 실험을 위해서는 automated chemical analyzer

(Hitachi-747, Hitachi Medical Co., LTD, Japan)를 사용하였으며, 생화학적 실험을 위하여는 분광광도계 (Unikon 941, Italy), 원심분리기 (Dupont/Sorvall RS-28S), 초원심분리기 (Sorvall OTD-65), deep freezer 및 homogenizer 등을 사용하였다. 반면, 조직병리학적 실험을 위하여 automatic tissue processor (Citable 2000, USA), tissue embedding center (Shandon, USA), microtome (Reichert-Jung, USA)을 사용하였다.

2. 실험방법

1) TCDD 및 홍삼 물추출물의 투여

정상대조군에 대하여는 TCDD의 vehicle (corn oil에 미량의 DMSO와 소량의 acetone을 첨가) 및 생리식염수를 투여하였으며, TCDD-단독투여군은 TCDD (TCDD 1 µg/kg b.w. single administration, *i.p.*)와 생리식염수를 투여하였다. 홍삼 물추출물 (PG-WE) 단독투여군인 G group에는 PG-WE를 건물량 기준으로 100, 200 mg/kg b.w. 용량으로 4주간 복강 투여하였다. 한편, PG-WE 전투여군과 후투여군에 대하여는 각각 홍삼 물추출물을 TCDD 노출 7일전 (P군) 혹은 7일 후 (C군) 부터 각각 28일 및 14일간 100, 200 mg/kg b.w. 용량으로 각각 4주간 및 2주간 복강 주사하였다.

2) 간의 이물질 대사 관련 효소활성의 측정

(1) 간세포의 분획물 조제 및 단백질 정량

Bansal 등¹⁾의 방법에 따라 적출한 guinea pig의 간을 잘게 썰고 150 mM KCl을 함유한 30 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 5배 희석하여 균질화한 다음 ×700 g로 20분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 그 상등액은 다시 ×11,000 g로 30분간 고속원심분리하여 상등액을 취하였다. 그 상등액을 다시 ×105,000 g로 60분간 초원심분리하여 세포질 분획을 얻었으며, 이때 얻어진 pellet은 130 mM KCl 함유 Hepes 완충액으로 씻어낸 다음 같은 완충액으로 재균질하여 마이크로솜 분획을 얻었다. 마이크로솜과 세포질 분획을 분리하는 전 과정은 0~4°C 저온실에서 수행하였으며, 조제한 분획은 Bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 사용하여 Lowry 등¹³⁾의 방법에 따라 단백질 함량을 측정된 다음 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

(2) 효소활성도 측정

Cytochrome P-450 정량과 cytochrome b₅의 정량은 Omura와 Sato¹⁷⁾의 방법에 의해, NADPH cytochrome P-450 reductase의 활성도 측정은 William과 Kamin²⁶⁾의 방법에 따라, NADH cytochrome b₅ reductase의 활성도 측정은 Mihara와 Sato¹⁴⁾의 방법에 따랐다. 또한, cytochrome P-450 의존성 monooxygenase의 활성도 측정 즉, ethoxycoumarin deethylase (ECDE) 활성도의 측정은 Greenlee와 Poland⁴⁾의 방법에 따라 benzphetamine demethylase (BPDM)의 활성도 측정은 Thomas 등²⁴⁾의 방법에 따라 그리고 지질과산화도 측정은 Suematsu 등²³⁾의

방법에 따라 측정하였다.

3) 조직 병리학적 실험

적출한 간 조직에 대하여는 우선 육안으로 관찰한 다음 병리조직 검사의 통상적인 방법에 준하여 Hematoxylin-Eosine 으로 염색을 하여 관찰하였다.

4) 간 조직의 비교방법

간 조직에서의 광학현미경적 소견에 미치는 영향을 객관적으로 비교하고자 다음과 같은 기준에 의하여 비교하였다. 각 실험군에 나타난 간세포의 괴사 정도, 간소엽의 파괴 정도 및 지방의 변성 정도를 각각 비교하였다. 즉, 소엽에 변화가 없으면, "0점", 소엽중앙에 위치한 중심정맥의 주위 (소엽의 1/3 범위) 국한해서 변화가 있을 때 "1점", 소엽의 2/3 범위 (mild-zonal area)에 까지 변화가 있을 때 "2점" 그리고 소엽 전체 (소엽의 중심정맥부에서 문맥주변부)에 미만성으로 변화가 관찰될 때를 "3점"으로 grading하여 비교하였다.

5) 통계학적 분석

통계 분석은 Pharmacology의 student *t*-test를 이용하여 정상대조군과 TCDD-단독투여군, TCDD-단독투여군과 인삼 물추출물 투여군간의 통계적 유의차를 분석하여 유의차가 5% 미만일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 간 기능 관련 혈액화학적 지수에 미치는 영향

Total protein의 함량과 γ -GTP (gamma-glutamyltransferase) 활성의 경우는 TCDD와 홍삼 물추출물에 의하여 심한 병변은 야기되지 않는 것으로 나타났다. Albumin 역시 유사한 경향을 나타냈으나 KRG-WE 단독투여군에서 유의한 감소가 관찰되었다 ($P<0.01$). 그러나 이들의 감소 폭은 20% 수준에 불과하였다.

한편, AST (aspartate aminotransferase)와 ALT (alanine aminotransferase)는 TCDD 투여에 의하여 각각 1.9배, 1.3배씩 증가하였다. 또한, PG-WE 단독투여군인 G200군에 있어서는 AST의 활성이 29% 증가하고 ALT의 활성은 16% 감소하는 경향을 나타냈으나, TCDD에 노출된 경우에 있어서는 PG-WE 투여가 전·후투여군 모두에서 TCDD에 의한 간 기능 장애가 유의하게 개선되었다 ($P<0.05\sim 0.01$). 한편, ALP (alkaline phosphatase)의 활성에 있어서는 TT군에서 10% 정도 증가하는 것으로 나타났으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았다.

그러나 PG-WE 투여군의 경우 P200군을 제외한 모든 군에서 TCDD 노출과 관계없이 감소하였으며 특히, C군의 감소 폭이 현저 ($P<0.01$)하였다 (Table 1).

2. 간의 독성물질 대사 관련 효소활성에 미치는 영향

TCDD 단독투여군의 cytochrome P-450 활성도 (1.203 nmole/mg protein)는 정상군 (0.419 nmole/mg protein)에 비해 약 2.9배 증가하는 것으로 나타났다. 홍삼 물추출물 전투여군들에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았으나 홍삼 물추출물 후투여군에서는 유의한 감소를 나타내었고, 홍삼 단독투여군에서는 정상군에 비해 다소 낮은 경향을 나타냈다. P-450 reductase의 활성도는 정상군에 비해 TCDD 단독투여군에서만 유의한 증가를 나타내었을 뿐 홍삼 물추출물의 단독투여군에는 변화가 관찰되지 않았으며, TCDD 단독투여군에 비해 홍삼 물추출물 투여군들에서는 모두 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 또한 cytochrome b_5 및 b_5 reductase의 활성도 정상군과 TT군 및 실험군 모두에서 유의한 변화가 관찰되지 않았다 (Table 2).

유도된 P-450 isozyme의 type을 확인하기 위하여 CYP 1A specific monooxygenase인 ethoxycoumarin O-deethylase (ECOD)와 CYP 2B marker enzyme의 하나인 benzphetamine N-de-

Table 1. Effect of PG-WE on liver function in TCDD-exposed male guinea pigs

Group	TP (g/dl)	Alb (g/dl)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GT (IU/L)
NC	5.2±0.3	3.3±0.2	74±13	78±10	247±7	07.2±3
TT	5.0±0.3	2.9±0.2	141±71 [‡]	104±34 [‡]	277±57	08.0±2
G100	5.7±0.4	2.9±0.5 [‡]	87±17	73±16	235±16 [†]	12.6±6
G200	5.3±0.4	2.6±0.1 [‡]	96±14 [‡]	66±5 [†]	194±16 [‡]	10.0±1
P100	5.2±0.4	3.0±0.2	83±18 ^{**}	80±13 [*]	227±70 [*]	13.0±7
P200	4.9±0.1	2.8±0.1	83±13 ^{**}	68±11 ^{**}	287±32	7.2±2
C100	5.4±0.2	2.7±0.2	101±15 ^{**}	73±14 [*]	183±32 ^{**}	9.5±3
C200	5.4±0.2	2.8±0.1	108±27 [*]	74±13 [*]	168±13 ^{**}	7.0±1

Data were obtained from 15 animals for each group and expressed in mean \pm SD. [†]and [‡]were $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively when compared with NC; ^{*}and ^{**}are $P<0.05$ and $P<0.01$ when compared with TT group. Analyzed by student's *t*-test. Abbreviation: TP, total protein; Alb, albumin; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; γ -GTP, gamma-glutamyl transferase

Table 2. Effect of PG-WE on liver microsomal enzyme in TCDD exposed male guinea pigs

Experimental groups	Enzymes			
	Cytochrome P-450 ^a	P-450 Reductase	Cytochrome b5 ^a	b5 Reductase ^b
NC	0.419±0.028	0.088±0.042	0.681±0.063	1.837±0.250
TT	1.203±0.320 [‡]	0.149±0.019 [†]	0.745±0.209	1.757±0.158
G100	0.283±0.152	0.085±0.018	0.676±0.051	2.066±0.378
G200	0.276±0.111 [*]	0.083±0.011	0.624±0.022	1.739±0.204
P100	1.373±0.307	0.129±0.020 [*]	0.715±0.028	1.707±0.217
P200	1.016±0.260	0.109±0.030 [*]	0.677±0.047	1.695±0.193
C100	0.792±0.292	0.121±0.019	0.655±0.080	2.080±0.264 [*]
C200	0.901±0.304	0.138±0.020	0.638±0.041	1.620±0.262

Notes as in Table 1

Table 3. Effect of PG-WE on cytochrome P-450-dependent monooxygenases activity (ethoxycoumarin deethylase, benzphetamine demethylase) in TCDD-exposed male guinea pigs

Experimental groups	ECOD ^a	BPDM ^a
NC	2.537±0.566	5.822±1.487
TT	4.417±0.740 [†]	14.643±4.558 [†]
G100	1.374±0.286 [*]	7.567±1.088
G200	1.648±0.438	9.380±2.828
P100	4.273±0.998	16.112±4.008
P200	4.347±0.997	14.051±2.162
C100	2.741±0.363 [*]	11.305±1.112
C200	3.258±0.585	10.780±0.441

Abbreviation: ECDE, ethoxycoumarin O-deethylase; BPDM, benzphetamine N-demethylase. Notes as in Table 1

methylase (BPDM)의 활성도를 측정하였다. 정상군에 비해 TCDD-단독투여군의 ECOD 활성도는 약 1.7배, 그리고 BPDM의 활성도는 약 2.5배로 P-450 함량에 비례하여 모두 유의한 증가를 나타내었다. 홍삼 물추출물의 전투여군에서는 TCDD-단독투여군과 비교하여 볼 때 유의한 변화가 관찰되지 않았으나 홍삼 물추출물 후투여군에서는 투여 농도에 비례하여 유의하게 감소하였다. 홍삼 물추출물 단독투여군에서의 ECOD는 정상군에 비해 유의한 감소를 나타낸 반면, BPDM은 약간 증가하는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었다 (Table 3).

한편, 조직 균질액 및 세포질 분획의 MDA 함량은 TCDD 단독투여군에서 다소 증가하였으나 정상군과 시험군간에 비해 모두 유의한 변화가 관찰되지 않았다 (Table 4). 또한, microsome 분획에 NADPH와 ADP-Fe를 첨가하여 지질과산화 반응을 인위적으로 유도하여 반응시간 경과에 따른 MDA 함

Table 4. Effect of PG-WE on MDA content in liver homogenate and cytosol of TCDD-exposed male guinea pigs

Experimental groups	MDA Content [*]	
	liver homogenate	liver cytosol
NC	0.473±0.047	0.568±0.032
TT	0.540±0.038	0.760±0.193
G100	0.538±0.139	0.611±0.097
G200	0.555±0.123	0.742±0.138
P100	0.565±0.036	0.648±0.119
P200	0.633±0.140	0.753±0.184
C100	0.733±0.105 [*]	0.893±0.104
C200	0.659±0.171	0.742±0.138

Notes as in Table 1

량 변화를 비교 측정한 결과 정상군은 30분 이후에 완만한 증가 양상을 나타내어 60분 경과시 약 3.7배의 증가를 보인 반면, TCDD 단독투여군에서는 정상군에 비해 반응 초기는 물론 반응시간 경과에 따라 급격히 증가하여 60분에는 약 8 배의 증가를 나타내었다. 반면, 홍삼 물추출물의 전·후처리군에서는 TCDD 단독투여군에 비해 반응 시점에서는 높게 나타났으나, 시간 경과에 따라 완전하게 증가하여 60분 경과 시점에서는 반응 시점에 비해 평균 3.3배의 증가에 그쳤으며, 이러한 결과는 물추출물의 단독투여군에서도 유사한 경향을 나타냈다 (Fig. 1).

3. 간 조직의 광학현미경적 소견에 미치는 영향

정상군의 간 조직은 간소엽 중앙에 중심정맥이 위치하고, 간세포들이 간소엽의 가장 자리를 향해 방사형으로 코드 모양의 배열을 보이며, 문맥과 간소엽의 경계가 잘 이루어진

정렬된 구조를 보인 반면, TT군의 간세포는 팽윤되어 있었으며 일부 세포핵의 과염색상, 호산성 세포질화 및 cytoplasmic vacuolation fatty metamorphosis, single cell necrosis, 세포 크기의 다양성, 변성된 세포 주위로의 단핵염증세포의 침윤, 중심엽 부분의 sinusoid가 증가되고, lobular architecture의 경미한 소실과, 세포질내 Periodic acid-Schiff 염색상 붉은 입자의

양성 과립이 세포질 내에 다수 관찰되었다. 한편, 홍삼 물추출물 전투여군인 P group에서는 TT군에서 나타났던 병변이 거의 관찰되지 않았으며, 홍삼 물추출물 후투여군인 C group에서도 역시 유사한 경향을 보였으나 약간의 염증 소견과 cytoplasmic vacuolation이 국소적으로는 관찰되었다 (Fig. 2). 또한, 간 조직의 3가지의 parameter를 가지고 등급화하여 비

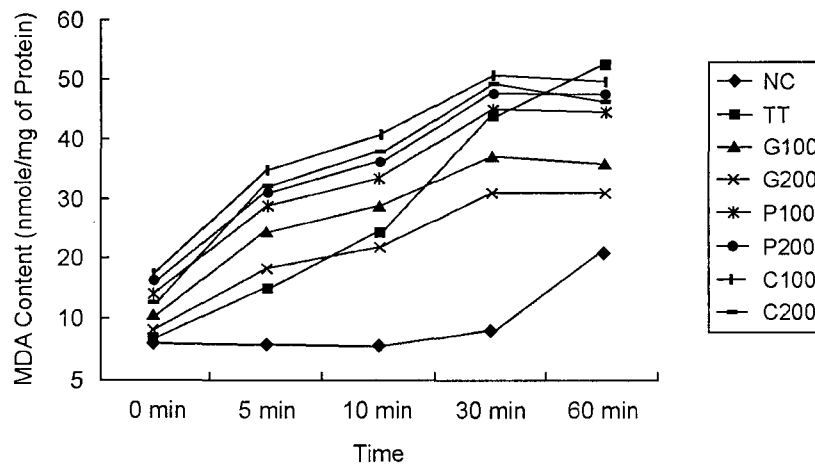


Fig. 1. Time-dependent increase in MDA content in liver microsome of TCDD-exposed male guinea pigs

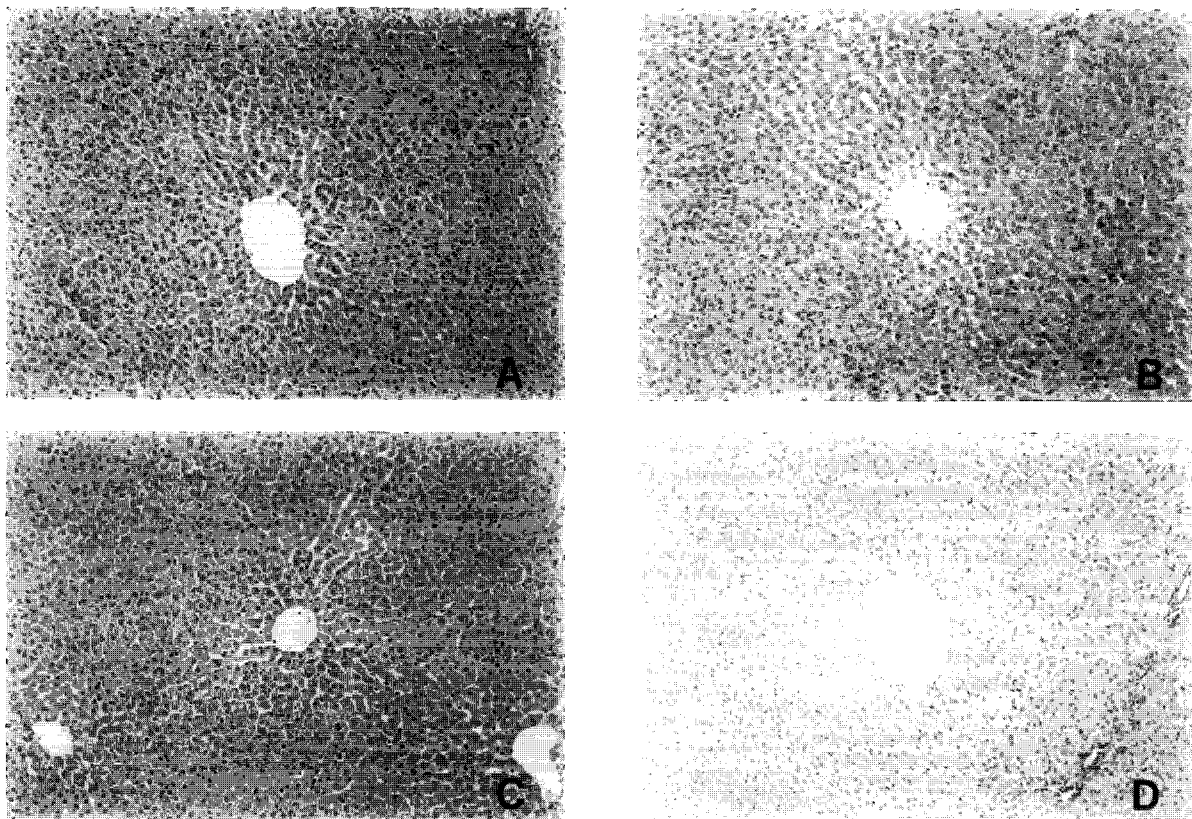


Fig. 2. Light micrograph of the hepatocyte in TCDD-exposed male guinea pigs. A (NC), B (TT), C (P200) and, D (C200) ($\times 20$, H & E)

Table 5. Effect of PG-WE on the hepatic lesions in TCDD-exposed male guinea pigs

Group	Cell necrosis	Destruction of lobular structure	Fatty change	Total
NC	0	0	0	0
TT	3	3	3	9
G100	0	0	0	0
G200	0	0	0	0
P100	0	1	1	2
P200	0	0	0	0
C100	1	1	1	3
C200	1	0	1	2

Magnitude of liver damage was graded into 4 classes on each parameter; the lower the digit the less damaged the liver is

교한 결과 Table 4에서와 같이 TT군에서는 총점이 9점을 나타낸 반면, TCDD와 인삼추출물을 함께 투여한 시험군에서는 2~3점을 나타냈다 (Table 5).

고 찰

환경호르몬 중 독성이 가장 강한 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)은 고환독성을 비롯하여 여러 장기에서 독성을 유발하여 체중감소, 고혈당, 고지혈증, 생식기능 이상, 면역기능 저하, 조혈기능 장애 등 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 한편 한국인삼은 독성물질에 대한 생체의 방어작용은 물론, 당뇨병 및 고지혈증을 예방하는 효능이 있음이 과거 수천 년에 걸친 한의학적 경험과 현대 과학적으로 규명되고 있다. 간 기능이 손상되면 총단백질 또는 알부민치가 감소하고 AST, ALT 및 ALP 활성이 상승하며, 총 bilirubin 및 direct bilirubin 함량과 γ -GTP 활성 등이 증가한다고 알려져 있다²⁾.

본 실험에서는 총 단백질과 알부민에서는 유의한 차이는 발견되지 않았으나 AST, ALT는 TT군에서 유의하게 증가하였다. 반면, 홍삼 물추출물 처리군에 있어서는 TCDD 투여로 야기되는 AST 및 ALT 활성이 현저히 개선된다는 사실을 확인하였다. 특정 지수 하나만을 가지고 볼 때 PG-WE의 간 기능에 미치는 효과를 단정짓기는 어려우나 전반적으로 볼 때 홍삼 물추출물은 TCDD-투여로 야기되는 간 상해 지표 효소활성 증가를 억제한다는 사실을 알 수 있다. Guinea pig는 다른 동물 중에 비하여 TCDD에 의한 간 독성이 비교적 경미함¹⁸⁾에도 불구하고 홍삼의 투여는 TCDD-유도 간 독성을 유의하게 방어한다는 사실을 확인하였다. Kimbrouch 등¹⁰⁾은 TCDD에 의하여 간 상해가 유발되며, 특히 SER 비대간은 parenchymal cells의 hyperplasia, hypertrophy에 기인한 것으로

보고하였다. 이러한 형태학적 변화는 microsomal monooxygenase activity의 증가와 병행하여 따라 나타나게 되며, rat liver에서 TCDD는 DNA의 합성과 DNA의 총량을 증가시킨다고 알려져 있다.

한편, 홍삼 물추출물과 사포닌은 단백질합성¹⁵⁾ 및 간세포의 분열·증식 촉진작용²¹⁾이 있다고 알려져 있으며, 간세포의 지질합성 촉진¹⁶⁾, 지방산, 콜레스테롤의 생합성과 분해대사를 촉진시켜 지질대사를 개선하는 효과가 있으며, 인삼 물추출물을 장기간 투여하여도 간의 비대나 체중증가는 관찰되지 않는 것으로 밝혀지고 있다⁸⁾. 고려인삼의 주요 사포닌 성분인 ginsenoside Rg₁은 간세포 특이적 효소인 TAT (tyrosine aminotransferase)의 활성을 증가시키고, 이는 glucocorticoid receptor와 cAMP의 상호작용에 의하여 발현되는 것으로 보고되고 있다⁹⁾. 또한 홍삼 물추출물과 사포닌 성분이 각종 간 독성물질로 유도되는 간장의 기능적 병변을 개선시키고, 독성물질 (CCl₄, galactosamine 등)의 투여로 저하된 단백질의 합성기능의 개선과 독성방어 등 간 상해 보호효과¹⁴⁾가 있는 것으로 보고되고 있다. 또한, ginsenoside Rb₁은 간 독성물질인 CCl₄처리에 의해 유발되는 간의 단백질 인산화를 억제하고 글리코젠 합성능의 저하를 개선하며, 간세포 내 Ca²⁺ 축적을 억제함으로써 간의 기능을 개선시키며¹⁷⁾, 홍삼 사포닌 분획물은 간의 독성물 대사에 관여하는 epoxide hydratase (EH)와 glutathione transferase 및 EH의 활성을 증가시켜 발암성물질 반응성 대사산물의 해독작용을 촉진하는 것으로 보고되었다⁷⁾.

TCDD는 대부분의 실험동물에서 cytochrome P-450을 유도하는 것으로 보고되고 있으며 특히 cytochrome P-450 isozyme 중 CYP 1A과 CYP 1A1 isozyme을 유도한다는 것이 확인되었다⁵⁾. 유도기전은 세포가 TCDD에 노출되면 TCDD는 cytosol에 존재하는 Ah-R에 결합하게 되는데, hsp90과 결합된 불활성화 상태로 존재하던 Ah-R은 TCDD와 같은 ligand와 결합한 후 활성화되어 hsp90이 떨어져 나가고 cytosol에 존재하는 ARNT (Ah-receptor nuclear translocator) 단백질과 결합함으로써 핵내로 이동하며, DNA와 결합할 수 있는 형태로 된다. 핵으로 이동된 Ah-R 복합체는 CYP1A1의 5'-upstream region에 존재하는 DRE (dioxin responsive element) 또는 XRE (xenobiotic response element)라고 하는 특정 enhancer element에 결합하여 CYP1A1의 발현을 증가시키게 된다¹²⁾.

본 실험에서도 이미 확인된 바와 마찬가지로 TCDD에 의하여 간의 cytochrome P-450이 유도되며 NADPH cytochrome P-450 reductase의 활성이 증가되었다. 그러나 TCDD는 microsomal MFO system의 두 번째 전자 전달계로 알려진 cytochrome b₅ system에는 유의한 영향을 미치지 않았다. 그러므로 어떤 type의 P-450 isozyme이 유도되었는지를 확인하기 위하여 CYP 1A specific monooxygenase인 ethoxycoumarin O-

deethylase (ECOD)와 CYP 2B marker enzyme의 하나인 benzphetamine N-demethylase (BPDM)의 활성도를 비교한 결과 흥미롭게도 ECOD는 물론, BPDM의 활성도도 P-450 함량과 비례하여 증가되었으나, cytochrome P-450 isozyme에 대한 specificity는 관찰되지 않았다 (Table 2). 이상의 결과가 이들 기질에 대한 P-450의 overlapping 기질 특이성에 기인한 것인지 아니면 guinea pig에서는 CYP 2B도 유도되었기 때문인지에 대하여는 현재의 결과만으로는 알 수 없다.

반면에 홍삼 물추출물 투여의 경우 단독투여군에서는 P-450의 함량이 오히려 대조군보다 감소되었으나 P-450 reductase, cytochrome b5 및 b5 reductase의 활성도는 대조군과 차이가 없었다. 또한 홍삼 물추출물과 TCDD를 병행 투여했을 때는 투여시기와 상관없이 TCDD만을 투여한 대조군에 비해 P-450 함량이 낮아지는 경향을 나타냈다. 이 결과는 홍삼 물추출물이 TCDD 투여와 무관하게 guinea pig 간에서 P-450 발현을 저해하는 것으로 생각된다. 실제로 staurosporine과 같은 protein kinase C inhibitor는 TCDD에 의해 유도되는 CYP 1A1 induction을 농도 의존적으로 저해하는 것으로 보고되었다³⁾. 본 실험에서 투여한 인삼 물추출물의 경우 단일 성분 아니고 여러 가지 성분이 함유되어 있기 때문에 그들 중의 어떤 것이 PKC inhibitor와 유사한 작용을 했을 가능성 역시 배제할 수 없다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 TCDD의 독성에 대한 인삼의 보호효과는 간의 이물질대사 효소계와 직접적인 관련은 적은 것으로 생각되나 이에 관하여는 보다 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

한편, cytochrome P-450은 생체 내에서 활성산소를 생성하는 중요한 sources의 하나이다. 이 효소계에 의한 활성산소 생성속도는 P-450의 isozyme type에 따라 다르다는 것¹⁹⁾, isozyme type과 상관없이 단지 그 함량에 비례한다는 상반된 보고가 있다¹⁰⁾. 그러나 P-450은 microsomal membrane bound enzyme이고 membrane 또한 지질과산화 반응을 일으키는데 필요한 지질원이기 때문에 막을 구성하고 있는 지질의 조성 과 P-450 주변의 microenvironment에 따라 P-450에 의한 활성산소 생성 및 지질과산화 반응속도가 크게 달라 질 수 있다. 본 실험에서 TCDD 및 인삼의 투여로 인해 간 조직의 지질과산화 반응이 어떻게 달라지는지를 구명하기 위해 조직 균질액과 세포질 분획에서 지질과산화 반응의 최종산물의 하나인 MDA 함량을 조사하였다. 그 결과 TCDD 투여군의 간 조직에서 MDA의 함량이 다소 증가되었다. 이는 TCDD의 투여로 인해 생체내의 산화적 손상이 증가되었다는 것을 암시해 준다. TCDD와 홍삼을 병행 투여했을 때는 MDA 함량이 기대했던 만큼 감소하지는 않았다 (Table 4). 이를 좀더 자세히 알아보기 위하여 microsome에 NADPH와 ADP-Fe를 가하여 지질과산화 반응을 인위적으로 유도하고 시간 경과에 따른 MDA 생성량 변화를 관찰하였다. 그 결과 대조군의 micro-

some에서는 반응시작 30분까지도 거의 반응이 진행되지 않았으나 TCDD-단독투여군의 microsomal membrane은 지질과산화 반응이 시간의 경과에 따라 급속히 증가하였다 (Fig. 1) 이는 TCDD를 투여하면 간 조직의 산화적 손상이 증가될 수 있다는 사실을 암시해 주며 TCDD에 의해 P-450 함량이 증가된 것과 상관성이 있다는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로 보아 인삼은 TCDD 노출과 무관하게 초기에는 MDA의 활성을 촉진하나 어느 정도 시간이 경과하면 안정화시키는 것으로 나타났으며, TCDD-단독투여군에 있어서는 10분 이후부터 급격히 증가하여 60분까지도 급격하게 증가하는 것으로 나타났다.

TCDD 투여에 의한 산화적 손상의 또 다른 기전으로 estrogen 대사의 활성화를 들 수 있다²⁰⁾. 즉, TCDD는 환경에서 수컷보다 암컷에서 더 potent한 hepatocarcinogenicity를 나타내는데, 그 이유는 TCDD에 의해 유도된 cytochrome P-450 효소들이 endogenous substrate의 하나인 estrogen을 catechol로의 대사를 증가시킴으로서 이때 생성되는 reactive oxygen에 의해 산화적 손상이 유도된다는 것이다. 인삼사포닌 역시 스테로이드 골격을 가지고 있으므로 estrogen과 유사한 역할로 cytochrome-P450을 증가시키고 더 나아가 활성산소 생성을 촉진할 수 있으나 TCDD와 인삼추출물 병용 투여군에서 간 조직의 병변을 유의하게 억제된다는 사실과 cytochrome-P450의 함량 증가가 억제된다는 사실을 감안할 때 인삼사포닌은 TCDD에 의하여 증가하는 혈중 estrogen 함량을 억제함으로써 cytochrome-P450의 증가를 억제할 가능성이 크다고 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Bondy SC and Naderi S (1994): Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol*, **48**: 155-159.
- 2) Buu-Hoi NP, Harris, Moore JA and Vos, JG (1972): Organism as targets of 2,3,7,8-tetrachlorodi-benzo-p-dioxin (TCDD) in toxication. *Naturwiss*, **59**: 174-182.
- 3) Chun YJ, Koh WS and Yang KH (1994): Suppression of TCDD-induced cytochrome P450 1A1 activity by staurosporine in mouse primary hepatocyte cultures and hepatoma cells. *Biochem Mol Biol Int*, **32**(6): 1023-1031.
- 4) Greenlee WF and Poland A (1978): An improved assay of 7-ethoxycoumarin 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.
- 5) Hakansson HL, Johansson E, Manzoor and Ahlberg UG

- (1994): 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.
- 6) Hanioka NH, Jinno T, Toyooka and Ando M (1994): Effect of 1,2,4-trichlorodibenzo-*p*-dioxin on drug-metabolizing enzymes in the rat liver. *Chemosphere*, **29(6)**: 1313-1324.
 - 7) Hwang SY, Kim SK, Kim SH, Kwak YS and Jeong YJ (1999): Effect of Korean red ginseng on clinical chemical parameters in male guinea pigs exposed acutely to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **28(6)**: 1349-1354.
 - 8) Huh K, Jang BS and Park JM (1988): Protective effect of ginseng on brombenzene-induced hepatotoxicity in mice. *Korea J Ginseng Sci*, **12(2)**: 114-120.
 - 9) Joo CN (1980): The preventive effect of Korean Ginseng saponins against aortic atheroma formation in rabbits on a long-term cholesterol diet, *Proc 3rd Int Ginseng Symp*, pp.27.
 - 10) Kim SK, Enan E and Matsumura F (1994): Glucose effect of TCDD action on lipoprotein lipase and protein phosphorylation in isolated adipose tissue of guinea pigs, *Toxic Substances*, **19**: 141-153.
 - 11) Kimbrough RD, Carter CD, Liddle JA, Cline RE and Phillips PE (1977): Epidemiology and pathology of a tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin poisoning episode. *Arch Environ Health*, **32**: 77-85.
 - 12) Lambert NS, Chambers J, Plumb GW and Williamson G (1996): Human cytochrome P450's are pro-oxidants in iron/ascorbate-initiated microsomal lipid peroxidation. *Free Rad Res*, **24(3)**: 177-185.
 - 13) Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr A and Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
 - 14) Machala M, Nezveda A, Irizar A, Bu-Abbas and Ioannides C (1996): Expression and inducibility of cytochrome P450 proteins in the liver of chick embryo. *Arch Toxicol*, **71(1-2)**: 57-63.
 - 15) Mihara K and Sato R (1975): Partial purification of NADH cytochrome b₅ reductase from rabbit liver microsomes with detergents and its properties. *J Biochem (Tokyo)*, **71**: 725-735.
 - 16) Mizoguchi Y (1988): 人蔘 肝細胞保護作用, 藥用人蔘研究會 業績記録集, 藥用人蔘研究會 發刊: 46-48.
 - 17) Omura T and Sato R (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, **239**: 2370-2378.
 - 18) Oura H, Nakashima S and Tusukada (1972): Effect of *Panax ginseng* extract on serum protein synthesis. *Chem Pharm Bull* **20**: 980-991.
 - 19) Oura H and Hiai S (1973): Physiological chemistry of ginseng *Metabolism & Disease* **10**: 564-575.
 - 20) Park HJ (1996): Effect of ginsenoside on the rat liver phosphorylation induced by carbon tetrachloride. *Biol Pharmacol Bull*, **19(6)**: 834-847.
 - 21) Poland A and Knutson JC (1982): 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.
 - 22) Sakai H, Park SS and Kikkawa Y (1992): Differential oxidase activity of hepatic and pulmonary microsomal cytochrome P450 isozymes after treatment with cytochrome P450 inducers. *Biochem Biophys Res Commun*, **187**: 1262-1269.
 - 23) Suematsu T, Kamada T, Abe H, Kikuchi S and Yagi K (1977): Serum lipoperoxide levels in patients suffering from liver disease. *Clin Chim Acta*, **79**: 267-770.
 - 24) Thomas PE, Lu AYH, Ryan D, West SB, Kawarek J and Levin W (1976): Multiple forms of rat liver cytochrome P450. Immunochemical evidence with antibody against cytochrome P488. *J Biol Chem*, **251(5)**: 1351-1391.
 - 25) Tritscher AM, Seacat JD, Yager JD, Groopman BD, Miller D, Bel TR, Sutter and Lucier GW (1996): Increased oxidative DNA damage in livers of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin treated intact but not ovariectomized rats. *Cancer Lett*, **98(2)**: 219-225.
 - 26) William CH Jr and Kamin M (1962): Microsomal NADPH cytochrome c reductase of liver. *J Biol Chem*, **237**: 578-595.
 - 27) Yamamoto M, Miki S, Deguchi H, Ogawa T, Uemiya M, Nakama S and Uemura T (1988): Effect of ginsenosides on liver cell proliferation in relation to its clinical applicability. *Proc Int, I Ginseng Symp*, 36-38.