

TCDD를 투여한 rat의 간손상에 대한 어성초의 효과

하배진* · 하종명 · 이상현 · 이재화 · 정혜진 · 이상현 · 김희진 · 이진영¹

신라대학교 공과대학 생명공학과
¹인제대학교 의과대학 생화학 교실

Effects of *Houttuynia Cordata thunb* on the liver damage of TCDD-treated rats

Bae-Jin Ha*, Jong Myung Ha, Sang-Hyeon Lee, Jae-Hwa Lee, Hye-Jin Jung,
Sang-Hun Lee, Hee-Jin Kim and Jin Young Lee¹

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea
¹Department of Biochemistry, College of Medicine, Inje University, Busan 617-735, Korea

Abstract

Houttuynia Cordata thunb has been used as folk medicine for analgesics, beriberi, edema, hepatitis and icterus etc. We investigated, the effects of *Houttuynia Cordata thunb* administration on protective in liver of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD) treated rats. Seven days after the injection of TCDD(1 μ g/kg), *Houttuynia Cordata thunb* (200mg/kg) was administered into rats intraperitoneally for four weeks. We examined the antioxidative enzymatic activity by measuring the level of GOT, GPT in serum and MDA, GSH, GSSG, GPx, SOD and Catalase in liver tissue of rats. GOT activity of *Houttuynia Cordata thunb* and TCDD administered group(HTT) showed 49.00% of inhibitive effect compared to TCDD-treated abnormal group(TTA). GPT level of HTT group was decreased to the level of Non TCDD-treated group(NTT). MDA content in the TTA group was 1.27 times increased compared to NTT group. HTT group was inhibited by 69.53% compared to TTA group. GSH contents in HTT group was 1.91 times increased compared to TTA group. GSSG contents in HTT group was 46.72% decreased compared to TTA group. SOD and Catalase in TTA group were lower than in NTT group, but SOD and Catalase in HTT group were increased by 82% and 55.45% respectively compared to TTA group.

Key words – TCDD, *Houttuynia Cordata thunb*, Antioxidative enzyme, glutathione

서 론

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, 다이옥신)은

70년대부터 독성학적 평가가 보고 된 이후 최근까지 동물 실험 등에서 보이는 강력한 독성으로 인하여 매우 중요한 환경오염물질로 대두되고 있다. TCDD는 도시폐기물 소각 시설, 제철·제련·시멘트 가마 등의 산업시설과 제지·펄프 공장, PVC·염화용제·농약 등의 화학 공장, 자동차 배기가스 등으로 인해 배출된다[9]. TCDD가 사람의 체내에

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : +82-51-309-5466, FAX : +82-51-309-5684
E-mail : bjha@silla.ac.kr

들어오면 먼저 지방조직에 축적되어 일부는 소변 및 담즙으로 배설되기는 하나 지용성이 강하며 일단 체내에(체내 반감기: 11년) 들어오면 거의 배설되지 않는 것이 특징이다 [4,15]. 동물실험에서 TCDD에 의해 공통적으로 관찰되는 급성 독성으로는 급격한 체중 감소(wasting syndrome), 흉선의 위축(thymic atrophy), 간 독성(hepatotoxicity) 등을 들 수 있다[8,14]. 또한, TCDD는 고농도 (30ng/kg 이상)에서 지방조직 보다 간에 더 많이 축적된다.

어성초(魚腥草)는 삼백초과에 속하는 다년생 초본의 야생초로서 학명이 *Houttuynia Cordata thunb*이며, 본초강목에서는 산열, 독옹종, 치상, 탈항, 단점질, 해독, 청열, 이뇨, 소종의 효능을 보고하였다. 어성초의 이용은 전초를 약용으로 사용하며, 면역기능의 강화, 강심작용, 항산화 작용 및 간 손상에 대한 방어 효과, 항균 작용 등과 더불어 과학적으로 증명되었다.

본 연구에서는 TCDD로 유발되는 간독성에 대하여 어성초의 간 보호 효과를 알아보기 위하여 rat에 TCDD로 간독성을 유발시키고 동시에 어성초를 투여하여 간 독성 억제 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 체중 40g(four weeks old rats)인 수컷 21마리를 대한실험동물센터로부터 제공받았고 7일 동안 실험실에서 적응시켰다. 모든 동물은 cage에 각각 분리시키고 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 했다. 실험동안 동물들은 22±1℃의 온도와 60±5% 상대습도로 유지시켰으며, Table 1.과 같이 3군으로 나누어 다음과 같이 투여하였다.

NTT군은 0.9% saline을 투여 했으며 HTT군과 TTA군은 TCDD를 1μg/kg이 되게 복강 내에 투여했다. TCDD 투여한지 일주일 후부터 HTT군은 어성초를 200mg/kg이 되게 4주 동안 격일로 복강 내에 투여하였다. 나머지 군은 생리식염수를 투여하였다.

식물 재료 및 추출

어성초는 경상남도 덕유산 720m의 고랭지에서 재배한 것으로 0.2kg을 48시간 건조하고 14L water로 4시간동안 끓였다. 그리고 이 수층을 자외선으로 살균시킨 후 동결 건조하여 사용하였다.

혈액 및 간 채취

실험 종료 후 실험동물을 ether 마취 하에서 회복한 후 심장에서 채혈하여 30분 안에 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며, 간은 적출하여 0.9% 생리식염수로 세척하여 vial에 담아 -70℃ 냉동고에 보관하여 사용하였다.

간 조직 중의 Malone Dialdehyde(MDA)

간조직 1g을 취하여 0.05M phosphate buffer(pH 7.4) 5ml에 균질화시켜 test tube에 0.5ml를 취했다. TBA변법[7]으로 Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)를 가하여 95℃의 끓는 물에 50분간 가열한 후 급냉시켜 Buthanol 5ml을 가하고 원심분리한 후 상등액을 취하여 535nm에서 흡광도를 측정하였다.

간 조직 중의 단백질 정량법

단백질의 정량은 Lowry 법[12]에 의해서 실험하였으며,

Table 1. Experimental design of TCDD-treated rats

Experimental group	n ¹⁾	1st	8~36th
NTT ²⁾	7	0.9% saline	0.9% saline
TTA ³⁾	7	TCDD	
HTT ⁴⁾	7	TCDD	<i>Houttuynia cordata Thunb</i>

n¹⁾ : number of experimental animals.

NTT²⁾ : Non TCDD-treated group.

TTA³⁾ : TCDD-treated abnormal group (1 μg/kg).

HTT⁴⁾ : *Houttuynia cordata Thunb* (200mg/kg) + TCDD(1 μg/kg).

D.W.와 균질액을 A시약(Na_2CO_3 , CuSO_4 , Na-K tartrate) 5ml를 혼합한 후 15분간 방치한다. Folin 시약을 가한 후 30분간 반응시킨 뒤에 흡광도를 측정하였다. 표준단백시료는 Bovin Serum Albumin(BSA)을 사용하여 같은 방법으로 단백질량을 정량하였다.

혈청 중의 효소 활성 측정

혈청 중의 Glutamate oxaloacetate transaminase(GOT)와 Glutamate pyruvate transaminase(GPT)는 Reitman-Frankel법에 따라 조제된 kit시약(영동제약)을 사용하여 측정하였다. GOT 기질을 시험관에 취하여 37°C 수조에서 가온한 후 혈청을 가하고 60분간 반응시켰다. 여기에 발색액을 가한 후 20분간 방치하고 NaOH 10.0ml를 가하여 혼합한 후 505nm에서 흡광도를 측정하였다.

GOT와 실험방법은 동일하나, GPT의 측정은 GPT 기질 1.0ml를 사용하고 37°C 수조에서 30분간 반응시킨 후 505nm에서 흡광도를 측정하였다.

간 조직 중 GSH(glutathione reduced form), GSSG(glutathione oxidized form)의 정량

▶ GSH

균질액 100 μl 에 25% HPO_3 를 섞어 4°C, 12000rpm에서 10분간 원심분리 한 상등액 시료로 하였다. 시료 10 μl 와 phosphate buffer (1mM EDTA 함유, pH 7.4)와 OPT (o-phthalaldehyde)를 넣어 15분간 혼합한 후 360nm에서 형광측정하였다.

▶ GSSG

균질액 100 μl 에 25% HPO_3 를 섞어 4°C, 12000rpm에서 10분간 원심분리 한 상등액 시료로 하였다. 여기에 시료 50 μl 와 NEM(N-ethylmaleimide)를 섞은 후 20분간 방치하고 0.1N NaOH를 가하여 혼합한다. 혼합한 액과 시료와 OPT를 섞어 15분간 혼합한 후 360nm에서 형광측정하였다.

간 조직 중 GPX(GSH-peroxidase)의 활성 측정

0.1M phosphate buffer와 0.01M NaN_3 , 0.01M GSH, 1.5mM NADPH, H_2O 그리고 GSSG-reductase를 혼합하여 여기에 균질액을 넣어 상온에서 1분간 방치한 후 5nM H_2O_2 를 가하여 340nm에서 흡광도 감소 측정을 하였다.

간 조직 중의 SOD(superoxide Dismutase)효소활성 측정

0.2M Phosphate buffer를 1mM Xanthine, 1% Sodium Deoxychlorate(DOC), 1.5mM KCN, 0.2mM cytochrome C를 넣은 혼합액에 균질액 3 μl 를 넣고, xanthine Oxidase(XOD)원액을 넣어 혼합한 후 550nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. 시료의 효소 활성도를 알아보기 위한 표준액으로서는 Sigma사의 superoxide dismutase standard를 사용하였다.

간 조직 중 Catalase의 활성 측정

phosphate buffer(0.05M pH 7.0)에 sample (간 균질액을 3000rpm에서 20분간 원심분리한 상등액 100 μl 를 buffer로 희석)과 과산화수소 용액을 혼합하여 240nm에서 1분 30초 동안 흡광도 감소를 측정하였다

결과 및 고찰

혈청중의 효소 활성도 변화

TCDD로 간독성을 유도한 쥐로부터 GOT와 GPT의 어성초 효과를 Fig. 1에 나타내었다. GOT의 활성도는 NTT(32.00unit/ml)군에 비해서 TTA(73.55unit/ml)군이 현저히 높게 나타났다. HTT(53.30unit/ml)군은 TTA군보다 훨씬 낮게 나타났다. GOT 활성도는 HTT군이 TTA군과 비교해서 49%가 감소되었다.

반면 GPT활성도 변화는 TTA(29.70unit.ml)군과 NTT(25.97unit.ml)군이 비슷하게 나왔다. HTT군의 활성도는 27.15unit/ml로 TTA군과 약간의 차이는 있으나 유의성은 없었다.

TCDD의 생체 내 흡수는 혈청 중 bilirubin, glucose, protein, cholesterol 함량뿐만 아니라 alkaline phosphatase, SGOT, SGPT 활성이 증가한다고 Hook에 의해 보고된 바 있으며[7], TCDD 투여시 GOT와 GPT 활성이 증가하는 면에서는 본 실험결과와 일치하였다. Gerig에 의하면 TCDD 투여시 hepatic mixed function oxidase의 변화 [6]가 증가하는 것으로 보고된 바 있다. 본 연구결과에서도 TCDD가 간독성을 유발함을 알 수 있었으며 어성초가 유도된 간독성을 완화시켜주는 것으로 생각된다.

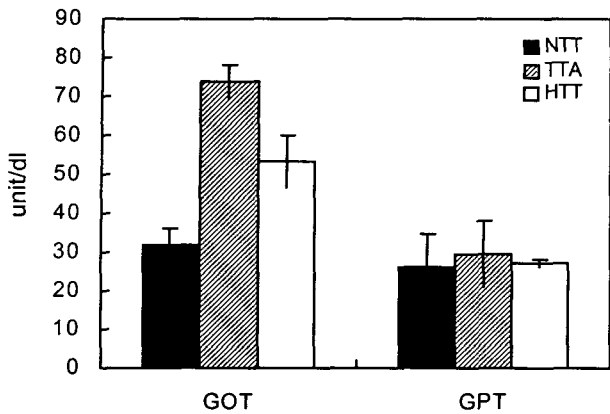


Fig. 1. Effect of HTT on GOT and GPT activities in TCDD-treated rat serum.
All values are mean±SD.
Significantly different from the value of TTA group at $p < 0.05$, respectively.
NTT: Non TCDD-treated group.
TTA: TCDD-treated abnormal group (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$).
HTT: *Houttuynia cordata* Thunb (200mg/kg) + TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

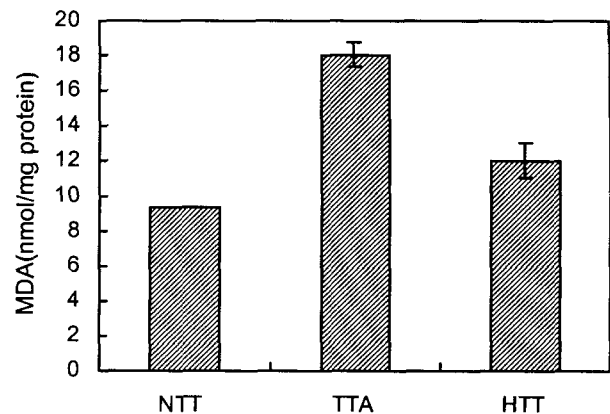


Fig. 2. Effect of HTT on lipid peroxidation values in TCDD-treated rat liver homogenates.
All values are mean±SD.
Significantly different from the value of TTA group at $p < 0.05$, respectively.
NTT: Non TCDD-treated group
TTA: TCDD-treated abnormal group (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
HTT: *Houttuynia cordata* Thunb (200mg/kg) + TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

간 조직 중의 MDA에 미치는 영향

지질과산화의 생산은 여러 가지 독성화합물이나 약물에 의한 간손상 발생의 가장 중요한 물질로써 인정되어 지고 있다. 이러한 생성의 원인으로는 세포내 산화적 스트레스의 증가 즉, free radical 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인해 야기되어진다.

체내 과산화지질의 생성정도를 알 수 있는 MDA 함량은 아래의 Fig. 2에 나타내었다. TTA군(18.02 nmol/mg protein)은 NTT군(9.42nmol/mg protein)과 비교하여 1.91 배 증가하였다. TCDD를 처리한 군에 여성초를 투여한 군 즉, HTT군은 12.04nmol/mg protein 으로 TTA군에 비하여 69.53% 억제율을 보였다.

TCDD에 의하여 생성된 free radical 생성을 억제하거나 소거하여 높아진 간조직 지질과산화물량을 감소시킴으로써 손상된 간기능을 회복시킬 수 있는 것으로 사료된다.

간 조직중 GSH, GSSG, GPx 의 활성도 측정

GSH는 cytochrome C의 환원 속도를 저하시켜 O_2 에 대하여 소거효과(scanvening effect)를 발현하며, 비교적 안정한 thiol radical(GS-)을 생성시켜서 유리기를 제거하는외에도 이물질과의 포합형성, 과산화지질 형성과정 중 생

성되는 hydroperoxide의 제거 작용을 한다[13].

Glutathione은 aerobic life에서 해로운 부산물인 hydrogen peroxide와 organic peroxide과 함께 반응함으로써 해독작용에서 중요한 역할을 수행한다.

GPx는 H_2O_2 를 제거하면서 환원형 glutathione(GSH)을 산화형 glutathione(GSSG)으로 전환시키는 효소[10]이며, 체내에서 GSH를 기질로 하여 H_2O_2 를 소거하는 효소로 catalase와 기능은 비슷하지만 생체 내 분포부위가 다르다[1].

TTA군(15.00nmol/mg protein)의 간 조직중 GSH level은 NTT군(58.68 nmol/mg protein)의 GSH level 보다 25.56% 감소하였다. HTT군의 간조직 중의 GSH level은 28.60nmol/mg protein으로 나왔다. HTT군의 GSH는 TTA군에 비해 1.91배 증가하였고 이는 물질투여군의 GSH level이 증가한다는 Yoichino의 결과와 일치한다.

TTA군(182.17 nmol/mg)은 NTT군(96.91 nmol/mg protein)의 GSSG level 보다 훨씬 높게 나왔다. HTT군의 간조직 중 GSSG level은 85.11 nmol/mg protein으로 나왔으며 TTA군에 비해 46.72% 감소하였다.

TCDD을 처리한 간조직중의 GPx 활성도는 그림에 나타내었다. TTA군(78.91 nmol/mg protein)의 GPx 활성도는 NTT군(127.85 nmol/mg protein)보다 61.72% 감소하였다. HTT군의 GPx 활성도는 161.56 nmol/mg protein이다.

이 결과는 GSH를 기질로 하여 H₂O₂를 제거하는 GPX의 활성증가로 GSH가 소모된 것으로 보여진다. HTT군의 함량이 정상군에 근접한 것은 삼백초에 들어 있는 생리활성 물질이 TCDD에 의해 생성된 H₂O₂ 등의 free radical를 소거하여 GPX의 소모가 줄어들었으므로 GSH의 소모량도 줄어들어 나타난 결과로 사료된다.

간 조직 중 SOD, Catalase 측정

SOD(Super Oxide dismutase)는 생체내의 항산화 방어 기구 중에서 효소적 방어계의 하나로 superoxide radical을 환원시켜 H₂O₂로 전환시킨다[16-18].

Catalase는 소포체에서 합성되며 골지체로 이동 부착되어 세포내 peroxisome에 존재하며, 체내에서 지방의 자동산화 및 유기물의 산화로 생성된 H₂O₂를 분해 및 소거하여 무독화시키는 효소로 H₂O₂의 농도가 높을 때 주로 작용한다. Catalase는 SOD에 비해 산화적 손상에 다소 민감한 것으로 사료되며[3], 항산화계 효소들은 대사과정 중 발생하는 활성 산소종에 의해 그 활성이 비가역적으로 불활성화 될 수 있으며, 또한 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 능력이 있는 것으로 보고 되어 있다[11].

TCDD를 처치한 간조직중의 SOD 활성도는 Fig. 3에 나타내었다. TTA군(4.50U/mh protein)의 SOD 활성도는 NTT

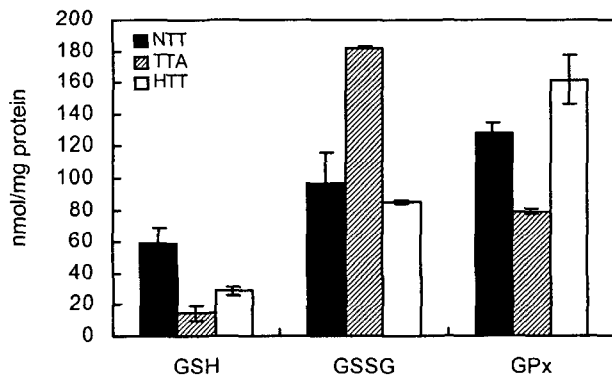


Fig. 3. Effect of HTT on GSH, GSSG, GPx values in TCDD-treated rat liver homogenates. All values are mean±SD. Significantly different from the value of TTA group at p<0.05, respectively. NTT: Non TCDD-treated group. TTA: TCDD-treated abnormal group (1 µg/kg). HTT: Houttuynia cordata Thunb (200mg/kg) + TCDD (1 µg/kg).

군(10.70U/mg protein) 보다 낮게 나타났다. HTT (7.38U/mg protein)의 SOD 활성도는 TTA군에 비해 46% 증가하여 체내에 생성된 과산화지질을 효율적으로 제거해 주었을 것으로 생각된다. SOD는 활성산소(O₂)를 H₂O₂와 O₂로 전환시켜 활성 산소에 의해 생기는 산화적 손상의 일차적 방어에 관여하며 비정상적으로 증가된 활성산소를 제거하기 위해 활성도가 높아진다는 Crapo[5]의 보고와 일치한다.

TCDD를 처치한 간조직중의 Catalase 활성도는 Fig. 4에 나타내었다. TTA군(1.12mU/mg protein)의 Catalase 효과는 NTT군(3.44mU/mg protein) 보다 훨씬 낮게 나타났다. HTT군의 간 조직중의 Catalase 활성도는 TTA 군과 비교하여 높게 나타났다. 이는 TCDD에 의해 형성된 free radical의 생성을 억제시킨 결과로 사료된다.

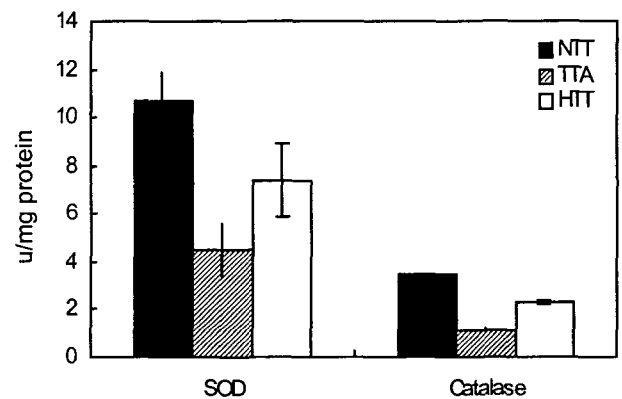


Fig. 4. Effect of HTT on SOD and Catalase values in TCDD-treated rat liver homogenates. All values are mean±SD. Significantly different from the value of TTA group at p<0.05, respectively. NTT: Non TCDD-treated group. TTA: TCDD-treated abnormal group (1 µg/kg). HTT: Houttuynia cordata Thunb (200mg/kg) + TCDD (1 µg/kg).

요 약

TCDD를 투여한지 일주일 후부터 어성초를 200mg/kg 복용 내로 4주간 격일로 투여하였다. TTA군과 NTT군은 saline을 투여하였다. 혈청에서 GOT, GPT의 활성도를 측정하였고, 간조직중에서 MDA, GSH, GSSG, GPx, SOD, Catalase의 level을 측정하였다. GOT 활성도는 HTT군이 TTA군과 비교해서 49.00%의 억제 효과를 보였다. 반면

GPT활성도는 TTA(29.70unit/ml)군에 비해 68.36%의 억제 효과를 보였다. MDA는 TTA군이 NTT군 보다 높게 나왔으며, HTT군은 NTT군에 비교하여 30.47%의 억제율을 보였다. HTT군의 GSH는 TTA군에 비해 1.91배 증가하였고, GSSG는 TTA군에 비해 46.72% 감소하였다. SOD는 TTA군이 NTT군 보다 낮게 나타났고, HTT는 TTA군에 비해 46%의 증가를 보였다. Catalase는 TTA군(1.12mU/mg protein)의 활성은 NTT(3.44mU/mg protein)군 보다 32.56% 감소하였다. HTT군의 간의 Catalase 활성도는 TTA 군과 비교하여 50.00% 증가 하였다. 이러한 결과에서 보듯이 TCDD로 인해 생성된 free radical은 항산화 효소에 의해서 감소되었으며, 그리고 어성초가 항산화 효소 대신에 노화를 저해하는 작용을 하는 것으로 사료 된다.

참 고 문 헌

1. Aylac, G. 1985. The effect of chronic ethanol indigestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, plutathione peroxidase and glutathione trnsferase in rat. *Toxicol.* **35**, 71-78.
2. Bae Jin Ha. 1987. A Study on the Antilipidperoxidative Effects of Brazilin and Hematoxylin(I), *Kor. J. Food Hygiene.* **2**, 35-40.
3. Brewster, D. W., Madhukar, B. V. and Matsumura, F. 1982. Influence of 2,3,7,8-TCDD on the protein composition of the plasma membrane of hepatic cells from the rat. *Biochem. Biophys. Res. Common.* **107**, 68-74.
4. Byard, J. L. 1987. the toxicological significance of 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin and related compounds in human adipose tissue. *J. Toxicol. Environ. Health.* **22**, 381-403.
5. Crapo, H. C., McCord, M. J. and Fridovich, I. 1978. Preparation and assay of superoxide dismutase. 382-393, In Fleischer, S. and Packer, I. (eds.), *Methods in enzymology*, **52**, Academic Press, New York.
6. Gerig, J. B., Jones, G., Butler, W. H. and Barnes, J. H., 1973, Toxic effect 2,3,7,8-trtrachlorodibenzo-p-dioxin. *Food Cosmet Toxicol.* **11**, 585-595.
7. Hook, G. E., Haseman, J. K. and Lucier, G.W. 1975. Induction and suppression of hepatic and extra-hepatic microsomal foreign-compound metabolizing enzyme systems by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Chem. Biol. Interact.* **10**, 199-214.
8. Huff J., Lucier G. and Tritscher A. 1994. Carcinogenesis of TCDD : experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**, 343-372.
9. Hutzinger O, Choudhry GG., Chittim BG. and Johnston LE. 1985. Formation of polychlorinated dibenzofurans and dioxins during combustion, electrical equipment fires and PCB incineration. *Environ. Health. Perspect.* **60**, 3-9.
10. Jones, D. P., Eklow, L., Thor, H. and Orrenius S. 1981. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes relative contribution of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch. Biochem. Biophys.* **21**, 505-516.
11. Jung, D. S. 1992. Chemical Composition of Saururus Chinensis on fatty acid and amino acids. *Cheju Univ. Jour. (Natural Sci)*, **35**, 111.
12. Lowry. O. H., Rosenbrough. N.J., Farr, A.S. and Randall, R. J. 1951. Protein Measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 256.
13. Meister, A. and Anderson, M.E. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711-716.
14. Mukerjee D. 1998. Health impact of polychloinated di-benzo-p-dioxin: a critical review. *J Air Waste Mang Assoc.* **48**, 157-165.
15. Piot, H. C., Goldworthy, T., Campbell, H.A. and Poland, A. 1980. Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. *Cancer Res.* **40**, 3616-3620.
16. Roberts, V. A., Rosenbrough. N.J., Farr, A.S. and Randall, R.J. 1951. Protein Mearusement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-259.
17. Rosen, D.R., etal. 1983. Mutations with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Naturer* **362**, 59-62.
18. Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. 1983. Structure and mechanism of Cu, Zn, superoxide dismutase. *Nature.* **306**, 274-287.

(Received May 21, 2003; Accepted August 1, 2003)