

고본양정방 투여가 TCDD 유도 랫드의 생식독성에 미치는 영향

오지혜¹, 양동현¹, 박운규¹, 조충식², 황석연^{1*}
¹대전대학교 임상병리학과, ²대전대학교 한의과대학

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

Ji Hye OH¹, Dong Hyun Yang¹, 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 TCDD로 유발할 수 있는 남성 난임 원인 중 가장 큰 비율을 차지하는 것은 정자형성 장애와 정자의 질적 저하가 있다. 이를 해결하기 위해 GYB의 한의학적 처방을 이용하여 TCDD-유도 생식독성을 유발한 랫드에서 내분비기능 및 생식독성 관련 지표에 미치는 영향을 조사하고자 본 연구를 시행하였다. 수컷 SD 랫드를 5개의 그룹으로 7마리씩 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. TCDD를 투여한 모든 군에서 체중 감소가 나타났으며, 호르몬 변화에서 GYB 300 mg/kg 투여군에서 free testosterone의 유의한(p<0.01) 감소가 나타났다. 또한 GYB 투여군의 고환조직에서 생식세포 일부 파괴, 정세관 위축 그리고 정자 수의 감소가 농도 의존적으로 개선되는 것이 관찰되었다. 또한 Johnsen's score, serotoli cell index (SCI)에서도 농도 의존적으로 개선되었다(p<0.05). 이러한 발견은 향후 남성 난임의 해결방안으로 의학적 시술이 아닌 약물요법을 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

Abstract Sperm formation disorders and sperm quality degradation comprises the largest proportion of male infertility caused by TCDD. To solve this problem, this study examined the effects of Gobonyangjeonbang oriental medicine prescription on the endocrine function and reproductive toxicity-related indicators in rat-induced TCDD-induced reproductive. Male SD rats were divided into five groups of seven animals and tested. The normal control group was administered the vehicle and saline, the TCDD alone group was administered intraperitoneally with TCDD (2 µg/kg, weeks) and physiological saline, and the test group was administered orally by dividing GYB (75, 150, and 300 mg/kg) into three concentrations for six weeks. Weight loss was observed in all groups administered TCDD. Regarding the hormonal changes, a significant decrease in free testosterone was observed in the GYB 300 mg/kg group (p<0.01). In addition, some of the germ cell destruction, seminiferous tubular atrophy, and decrease in sperm count was improved in a concentration-dependent manner in the testicular tissue of the GYB-treated group. In addition, Johnsen's score and serotoli cell index (SCI) were improved in a concentration-dependent manner (p<0.05). Overall, GYB can be used in drug therapy rather than medical procedures to solve male infertility in the future.

Keywords : Gobonyangjeonbang (GYB), Reproductive toxicity, Serotoli cell, TCDD, Testosterone

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

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

email: syhwang@dju.kr

Received January 4, 2021

Revised February 24, 2021

Accepted April 2, 2021

Published April 30, 2021

1. 서론

서구화된 식생활에 의한 비만, 흡연 등에 의하여 성기능의 이상, 생식기관의 손상, 환경오염물질의 노출에 의한 난임을 증가 등 이에 대한 원인 분석 및 치료방법에 대한 연구가 진행되고 있다[1]. 난임의 남성 측 원인으로 정자 형성 장애가 약 80~90% 해당되고 정계정맥류, 고환손상 및 수술, 염색체 이상, 잠복고환, 폐쇄성 무정자증 등이 있다[2]. 남성 불임률의 가장 큰 주요 원인은 정자 형성 장애로써 남성에게서 생식기능을 저해 시킬 수 있는 물질 중 세계적으로 광범위하게 알려진 생식기능을 교란시키는 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)을 이용하여 실험하고자 하였다[3]. TCDD는 poly-chlorinated aromatic hydrocarbon group에 속하는 다이옥신 계열의 화합물로서 동물과 식물의 내분비계를 교란시킨다고 하여 최근에는 내분비 교란성 화합물, 일명 환경호르몬으로 널리 알려져 있다[4]. 체내에 유입되면 지방조직에 축적되어 일부는 소변 및 담즙으로 배설되나 쉽게 배설 또는 분해되지 않아 체내 반감기가 11년으로 일단 들어오면 거의 배설되지 않는 것이 특징이다[5]. 인간의 TCDD에 대한 허용치는 1일 기준 0.01 pg/kg.bw로 설정되고 있는데 일상생활 중 1일 1~3 pg/kg.bw 정도로 기준치보다 100배 이상 상회하는 양을 흡수하고 있는 것으로 알려져 있다[6]. 남성 생식기관에 여러가지 변화 중 특징적으로 TCDD는 정자의 생성능을 감소시키고 고환의 형태학적 변화, 생식기관의 중량이 감소하며, 테스토스테론과 에스트로겐, 황체 형성 호르몬까지도 감소시킨다고 알려져 있다[3]. TCDD로 인한 독성 작용 기전은 aryl hydrocarbon 수용체에 의해 중재되는 것으로 알려져 있다[7]. 이 수용체는 간, 고환, 흉선에 많이 있고, TCDD와 강한 친화성을 보이는 것으로 밝혀져 있다[7]. 이와 같이 TCDD에 의해 유발되는 각종 현상에 대하여 최근까지의 연구결과 대부분은 단일 약물로써 투여하여 실험한 논문이 대부분이었으며[8], 한약 처방 중에는 예전부터 성기능 개선의 목적으로 사용되어 왔던 비방들이 많이 있으나 새로운 효능에 대한 연구의 타당성에 대한 검토가 미흡하여[9], 정자의 질을 향상시킬 수 있고 기존 처방의 대체물질로써 고본양정방(GYB: Gobonyangjeonbang)이라는 구기자, 인삼, 토사자, 오미자, 복분자, 가꾸자로 6가지의 한방재료를 선정하여 실험하고자 하였다. 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 두릅나무과로서 TCDD에 유도된 랫드에서 인삼을 투여하였을 시 생존율, 정자의 운동성에 도움을 준다고 하였

고 열에 의한 고환의 수축, 정자 운동성의 감소를 개선한다고 연구되었다[10]. 토사자(*Cuscutae Semen*)는 메꽃과(*Convolvulaceae*)에 속하며, 고환독성을 유발할 실험에서 정자의 수의 감소가 억제되고 생존율이 유의적으로 증가한다고 알려져 있다[11]. 오미자(*Schisandra chinensis*)는 목련과에 속하며, 정자의 수 및 운동성, 테스토스테론 농도에 효과가 있다고 알려져 있다[12]. 구자(*Allii tuberosi semen*)는 백합과로 투약 농도 별 생식능력이 상승되며 정자수, 정자의 활동성 및 테스토스테론의 활성도에 효과가 있다고 연구되었다[13]. 따라서 본 연구에서 TCDD로 인해 발생하는 난임 원인 중 가장 큰 비율을 차지하는 정자형성 장애와 정자의 질적 저하에 대한 문제를 해결하기 위하여 고본양정방이라는 한의학적 처방을 이용하여 TCDD-유도 독성을 유발한 랫드에서 회복효과가 있는지 검증하고, 내분비 기능, 생식독성 관련 지표에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 실험 재료

2.1.1 실험동물 및 사육 환경

실험동물은 Sprague-Dawley계 수컷(평균 체중 200±20g)을 ㈜라온바이로부터 구입하여 2주일간 적응 후 실험에 이용하였다. 실험동물의 사육은 온도 23±1℃, 습도 50±10%, 명암주기 12시간으로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 사육하였다. 사료는 고휘사료(퓨리나 쥐 사료, Purina)를 충분히 공급하였으며, 식수는 제한 없이 공급하였다.

2.1.2 연구 설계 및 동물군의 분리

2주간의 순화 기간을 거친 후 평균 체중과 근접한 개체들을 선발하였으며, 무작위 법을 이용하여 7마리씩 5군으로 나누었다. 연구대상 변수의 거의 완벽한 통제가 가능한 실험실 환경에서 수행함으로써 정확한 측정 및 내적 타당성을 가질 수 있게 설정하였다. 실험군은 정상대조군 (N.C: Normal Control), TCDD 단독투여군 (TA: TCDD alone), TCDD-GYB의 병행 투여군 GYB 75 (75 mg/kg.bw), GYB 150 (150 mg/kg.bw), GYB 300 (300 mg/kg.bw)으로 총 5개의 군으로 설정하였다. 본 동물 실험에 관련된 모든 실험 과정과 절차는 대전대학교 동물실험윤리위원회의 사전심의와 윤리 규정을 준수하여 실시하였다(DJUARB2017-011).

2.2 실험 방법

2.2.1 TCDD 용액 조제

TCDD(New Haven, CT, USA)는 순도 99.1 % 이상의 화합물을 구입하였다. TCDD (1 mg)를 소량의 아세톤(900 μ L)과 미량의 DMSO (100 μ L))를 사용하여 초음파 처리 후, 옥수수기름(corn oil, Sigma-aldrich, USA)을 이용하여 1:9로 희석하여 실험에 사용하였다. TCDD의 투여 농도는 Beytur 등의 방법에 따라 주 1회 복강(intraperitoneal, *i.p*)으로 2 μ g/kg.bw의 농도로 총 6주간 투여하였다(Figure 1).

2.2.2 고분양정방(GYB)의 조제

고분양정방(GYB)는 대전대학교 둔산 한방병원에서 난임을 겪는 성인 남성에게 투약하는 한약처방으로 구기자, 토사자, 복분자, 인삼, 가꾸자, 오미자로 구성되었고, 비율은 성인 1회 섭취량을 고려하여 설정한 임상에서 사용되는 처방 비율인 9:7:5:5:3:1로 설정하였다. 한국신텍스제약에 의뢰하여 구기자 360 g(수율 : 110.75 g, 30.8%), 토사자 280 g(수율 : 14.62 g, 5.2 %), 인삼 200 g(수율 : 56.43 g, 28.2 %), 복분자 200 g(수율 : 8.88 g, 4.4 %), 가꾸자 120 g(수율 : 3.58 g, 3.0 %) 오미자 40 g(수율 :10.82 g, 27.1 %)를 개별 추출하고 동결 건조하여 처방 비율에 따라 혼합하였다. GYB는 대전대학교 둔산 한방병원에서 난임을 겪는 성인 남성에게 투약하는 한약 처방으로 정자의 질을 향상시키는 효능을 가지고 있다고 알려져 있다. 이에 선행연구 결과를 바탕으로 가장 효능이 있다고 판단되는 저농도 수준의 농도를 본 실험의 중간 농도로 설정 후 단계별로 저(75

mg/kg.bw), 중(150 mg/kg.bw), 고(300 mg/kg.bw)용량으로 혼합하여 총 6주간 1일 1회 경구투여(per oral, *p.o*)를 시행하였다(Figure 1).

2.2.3 호르몬 검사

호르몬 검사를 위하여 복대동맥으로부터 SST tube에 채혈 후 CLSI 기준에 따라 tube를 6~8회 혼합하였으며, 혈액이 완전히 응고되면 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층의 혈청을 분리하였다. 이후 분리된 혈청을 자동분석기(Immunit 1000, SIEMENS, Germany)를 이용하여 테스토스테론(testosterone, TES), 에스트라디올(E2-estradiol, E2)을 분석하였다. 유리형 테스토스테론(free testosterone, F-TES)은 ELISA kit (F-TESTO ELISA kit MBS704301, Mybiosource, USA)을 이용하여 분석하였다.

2.2.4 고환의 질 평가

병리조직학적 검사를 위하여 적출된 고환, 부고환 을 10 % NBF (neutral buffered formalin)에 24시간 고정하였으며, 통상적인 방법으로 조직처리기(tissue Processor, Thermo shandon, USA)에서 탈수, 투명, 침투 과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 조직 block을 제작하였다. 제작된 block을 박절기(RM 2245, LEICA BIOSYSTEMS, Germany)를 이용하여 3 μ m로 박절하여 hematoxylin and eosin staining (H&E) 염색을 실시하였다. 모든 실험 과정은 진단병리학적 표준 작업지침서에 준하여 실험하였으며, 광학현미경(microscope, ZEISS, Germany)으로 400배로 관찰하여, 정세관 100개 중 정세관 하나당 정자의 수, 정세관의 직경, Johnsen's score, Serotoli cell index (SCI)를 분석하였다.

(1) Johnsen's score

Johnsen은 고환의 질 평가를 위하여 고환의 정자 생성능을 단계별로 나누어 평가하는 도구를 개발하였다 [18]. Johnsen's score 분석을 위하여 H&E 염색된 슬라이드를 광학현미경 400배로 관찰하여 정자생성이 왕성한 상태(10점)부터 정세관 상피가 없는 상태 즉, 정자생성이 완전히 멈춘 상태(1점)까지 점수를 매겨 평가하였다.

(2) Sertoli cell index (SCI)

Latchoumycandane의 방법에 따라 Sertoli cell index (SCI)분석을 위하여 H&E 염색된 슬라이드를 광학현미경 400배로 관찰하여 총 정세포에 대한 Sertoli

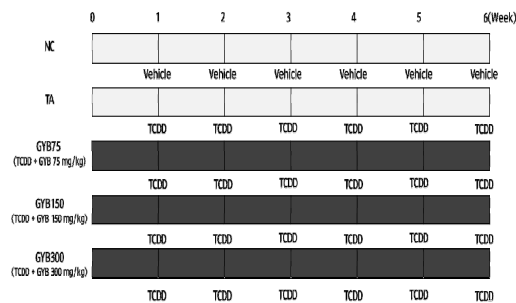


Fig. 1. Experimental Protocol for the Effect of GYB on

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 μ g/kg.bw weeks) and saline; GYB, group received TCDD (2 μ g/kg.bw weeks) and GYB (75, 150, 300 mg/kg.bw) in male SD rats.

cell의 비율을 계산하였다[19].

2.2.5 Periodic acid Schiff(PAS) 염색

대한병리학회가이드라인에 따라 탈 파라핀과 합수과정을 거친 후 0.5% periodic acid에서 5분간 반응시킨 후 schiff's reagent에 15분 동안 처리하였다. 그런 다음 흐르는 수돗물에서 10분 동안 수세 후 Hematoxylin에서 2분 동안 대조염색한 후 광학현미경(microscope, ZEISS, Germany)으로 관찰하였다.

2.2.6 통계처리

각 실험 군으로부터 얻은 결과를 Mean±SD으로 나타내었고 각 구간 유의성 검정은 IBM SPSS Statistics version 20 통계 package를 이용하였으며, 유의수준 p<0.05에서 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 T검정 (Student t-test)을 이용하여 분석하였다.

3. 연구 결과

3.1 고환, 부고환의 절대 및 상대 장기중량의 변화

고환, 부고환의 절대중량은 TCDD를 투여한 군에서 모두 감소하는 경향이 나타났다. 한편 GYB 투여군은 감소된 부고환의 중량이 GYB150, GYB300군에서 TA군 대비 회복되는 효과를 나타냈지만 유의한 차이는 없는

Table 1. Absolute and Relative Testis and Epididymis weight of Major organ in TCDD induced and GYB administration in male SD rats.

Group	Testis weight(g)		Epididymis weight(g)	
	Absolute organ weight	Relative organ weight	Absolute organ weight	Relative organ weight
NC	2.01 ± 0.12	0.42 ± 0.03	0.71 ± 0.04	0.14 ± 0.01
TA	1.99 ± 0.19	0.46 ± 0.04	0.67 ± 0.06	0.16 ± 0.02
GYB 75	1.81 ± 0.10	0.44 ± 0.04	0.63 ± 0.03	0.15 ± 0.02
GYB 150	1.96 ± 0.13	0.45 ± 0.6	0.68 ± 0.03	0.16 ± 0.01
GYB 300	1.83 ± 0.09	0.42 ± 0.03	0.68 ± 0.05	0.15 ± 0.01

Mean ± Standard deviation.

Abbreviation : See Figure 1.

것으로 나타났다. 고환과 부고환의 상대중량은 NC군 대비 TA군에서 증가하는 경향을 나타내었지만 유의성을 보이지는 않았다. 한편, GYB 투여군은 GYB75, GYB300군에서 TA군에 비하여 감소하는 결과가 나타났으나. 유의성은 나타나지 않았다(Table 1).

3.2 호르몬 농도에 미치는 영향

테스토스테론 수치의 경우 NC군 대비 TA 군에서 51 % 수준으로 감소한 수치를 나타냈으며, GYB 투여군은 GYB75 군에서 상승하는 결과가 나타났으나 유의성은 나타나지 않았다. Hormone의 경우 표준편차 폭이 너무 넓어 통계적 유의성을 도출하기에 어려웠다. 유리형 테스토스테론 수치는 NC군 대비 TA 군에서 44 % 상승하는 결과가 나타났고 반면, GYB 투여군에서는 TA 군에 비해 82 %, 71 %, 57 % 수준으로 농도의존성을 보이며 감소한 결과를 보였다. 특히, GYB300 투여군에서는 TA군 대비 유의성이(p<0.01) 나타났다(Table 2).

Table 2. The effect of GYB administration on hormones in TCDD induced male SD rats.

Group	TES (ng/dL)	F-TES (pg/mL)
NC	104.268 ± 58.17	40.26 ± 9.95
TA	51.04 ± 27.97	52.36 ± 3.51 ⁺
GYB75	64.08 ± 45.81	42.72 ± 2.34
GYB150	41.46 ± 22.67	37.25 ± 10.17 [†]
GYB300	43.28 ± 21.35	25.32 ± 8.89 ^{##,†}

Mean ± Standard deviation.

* Data are shown as mean±SD of (n=6) ⁺ p<0.05 vs. NC, [†] p<0.05 vs. TA as determined by student t-test.

Abbreviations: See Figure 1; TES, testosterone; F-TES, free testosterone.

3.3 고환조직의 현미경적 소견

고환 조직의 현미경적 관찰에서 NC군은 정세관, Leydig cell 등이 잘 정돈되어 존재하고 있었으며, 정세관 내 각 단계별 미성숙 정모세포층과 그 위에 다소 성숙한 spermatids, 그리고 그 위에 완전히 성숙한 정자세포가 존재하였다(Figure 2). 그러나 TA군의 경우 관 바깥쪽에 존재하는 세포의 수가 극심하게 감소하였을 뿐만 아니라 정세관이 수축되어 있었고, 모양도 일정하지 않았으며 관 내는 미성숙 정모세포로 채워져 있었고 성숙된 정자도 드물게 나타났다(Figure 2). 한편 GYB 투여군에서 농도가 상승할수록 수축된 정세관의 모양이 회복되는 경향을 나타냈으며 특히 GYB 300 군에서는 개체간

혹은 정세관별 편차가 나타나, NC군에 비하여 정세관의 크기는 작지만 모든 개체에서 각 세포층이 뚜렷이 구분되고 정세관 내의 세포수도 NC군에 비하여 비슷한 결과가 나타났다(Figure 3).

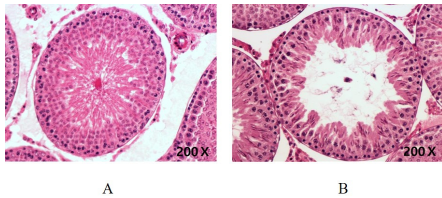


Fig. 2. Changes in testicular tissue in a rat model of reproductive toxicity induced by TCDD. (a) normal control (b) TCDD alone group

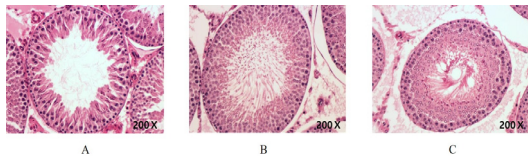


Fig. 3. Changes in testicular tissue in a rat model of reproductive toxicity induced by TCDD. (a) GYB 75 mg/kg (b) GYB 150 mg/kg. (c) GYB 300 mg/kg.

3.4 고환의 질 평가

현미경으로 고환의 정세관 100개 관찰 결과 정세관 직경에서 NC군 대비 TA군 91 % 수준으로 정세관이 수축되어 있고 함유된 정자 수도 75 % 수준으로 적었으며 유의성이 나타났다($p < 0.01$). 한편 GYB 투여군은 정세관의 직경은 TA군 대비 농도 의존적으로 증가하였으며 GYB 150, GYB 300 군에서 유의성이 관찰되었다 ($p < 0.01$). 정자의 수도 같은 결과가 나왔으며 특히, GYB

Table 3. The effects of GYB administration on testis quality in TCDD induced male SD rats.

Group	Tubular diameter (μm)	sperm count in seminiferous tubule
NC	107.56 \pm 3.26	177.67 \pm 24.49
TA	98.02 \pm 4.67**	133.62 \pm 11.82**
GYB75	103.94 \pm 3.14 [†]	148.05 \pm 21.05
GYB150	106.77 \pm 4.12**	152.18 \pm 18.54
GYB300	106.80 \pm 2.86**	162.56 \pm 9.59 ^{†††}

Mean \pm Standard deviation.

* Data are shown as mean \pm SD of (n=6) ** $p < 0.01$ vs. NC, ** $p < 0.01$ vs TA. as determined by one way ANOVA. [†] $p < 0.05$ ^{†††} $p < 0.001$ vs TA as determined by student *t*-test. Notes on group designation are the same as in Table 1.

Abbreviations: See Figure 1

300군은 NC군 대비 정세관 직경 99 %, 함유된 정자 수가 92 % 수준으로 회복되는 효과가 나타났다(Table 3).

3.5 Johnsen's score

정자생성 수준을 평가하기 위하여 현미경으로 고환 정세관 100개의 Johnsen's score 분석 결과, NC군 대비 모든 군에서 유의성이($p < 0.01 \sim 0.001$) 관찰되었다 (Table 4). TA군은 NC군 대비 62 % 감소된 점수가 나타났고, GYB 투여군에서는 농도가 상승할수록 감소된 점수가 상승하는 결과가 관찰되었다. 특히 GYB 300 군에서는 다른 군에 비하여 회복되는 효과가 강하게 나타났으며, GYB 75 군에 비해 유의성도($p < 0.05$) 나타났다 (Table 4).

Table 4. The effects of GYB administration on Johnsen's score in TCDD induced male SD rats.

Group	Johnsen's score (score)
NC	9.94 \pm 0.06
TA	6.19 \pm 1.27***
GYB75	6.33 \pm 0.81***
GYB150	6.99 \pm 0.70***
GYB300	8.01 \pm 0.68**.# [†]

Mean \pm Standard deviation.

* Data are shown as mean \pm SD of (n=6) Data are shown as mean \pm SD of (n=6) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. NC, # $p < 0.05$ vs. TA. [†] $p < 0.05$ vs. GYB75 as determined by one way ANOVA. Notes on group designation are the same as in Table 1.

Abbreviations: See Figure 1.

3.6 Sertoli cell index (SCI)

현미경을 이용해 정세관 100개 중 고환 구조를 지지하고 정자의 영양분을 공급하는 Sertoli cell을 계산 후 비율을 나타낸 결과, TA 군에서 63 % 수준으로 급격하게 감소된 결과가 나타나 유의성이($p < 0.001$) 관찰되었다. 한편 GYB 투여 군에서 농도 의존적으로 상승효과를 나타내었고, 특히 GYB 300군은 NC군 대비 81% 수준으로 회복되는 결과를 나타내 TCDD에 의하여 감소된 점수가 유의적으로($p < 0.05$) 회복되었다(Table 5).

현대사회가 서구화된 식생활에 의한 비만, 흡연 등 성기능의 이상, 생식기관의 손상, 환경오염물질의 노출에 의한 의학적 및 사회적 문제로서 대두되고 있는 난임을 예방하기 위한 방법 중 남성 난임의 가장 큰 원인 중 정자형성장애에 대하여 정자의 질 개선을 도와줄 수 있는 물질로서 고본양정방(GYB)을 선택하고 이에 대한 효능을 평가하였다.

Table 5. The effects of GYB administration on Sertoli cell index (SCI) in TCDD induced male SD rats.

Group	Sertoli cell index (score)
NC	14.20 ± 2.52
TA	8.87 ± 1.45***
GYB75	9.45 ± 1.12**
GYB150	10.73 ± 1.77
GYB300	11.52 ± 1.98†

Mean ± Standard deviation.

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

† p<0.05 vs TA. as determined by student t-test. Notes on group designation are the same as in Table 1.

Abbreviations: See Figure 1.

실험동물의 경우 암컷은 배란 주기를 가지고 있어 호르몬 차이에 의해 실험의 오차가 생길 수 있기 때문에 수컷을 우선하여 선택해 실험하였다[7].

실험동물의 고환에 독성 반응이 나타났는지 확인하기 위하여 장기 무게를 측정하였다. 동물 간 체중 차이가 있으므로 전체 체중의 장기 무게 비율, 즉 상대 장기무게를 측정하였다. 고환의 상대 장기 중량은 NC군 대비 TA군에서 증가하는 경향을 나타냈지만 유의성은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 Beyture 등의 선행연구와 일치하였으며, GYB에 의해 감소하는 것을 확인하였다[14].

남성 생식계통의 지표와 함께 정자의 생성능에 관여하는 테스토스테론, 유리형 테스토스테론을 측정하였다. 우리 몸에 순환하는 테스토스테론의 66~78 %는 sex hormone binding globulin (SHBG)에 결합한 상태로 비활성상태를 가진다. SHBG에 결합하지 않은 혈청 테스토스테론의 대부분은 알부민과 약한 결합을 하고 있으며 (20~32 %), 최종적으로 매우 작은 양인 1~2 % 정도의 테스토스테론만이 유리상 상태(free testosterone)로 생물학적 활성을 갖게 된다. SHBG에서 분리되어 유리되는 테스토스테론의 양은 SHBG의 농도와 역비례하며, 이는 유리테스토스테론의 양이 많다는 것은 SHBG의 양이 적다는 것을 의미한다[3]. 측정 결과, NC군 대비 TA군에서 테스토스테론 수치가 감소하고, 유리형 테스토스테론의 수치가 상승함으로 보아 손상된 고환에 의하여 테스토스테론의 수치가 감소하였으며 그 결과, 유리형 테스토스테론의 수치가 증가한 것이라고 생각된다. GYB의 경우 테스토스테론 농도에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 유리형 테스토스테론 농도에는 효과가 있는 것으로 나타났다.

고환조직에서는 NC군에서는 정세관, Leydig cell이 기저막에 잘 정돈된 상태로 존재하고 있으며 정세관 내 정모세포부터 성숙된 정자까지 각 층이 잘 구분되었으나, TA군에서 정세관 내 주로 미성숙세포로 채워져있었으며 손상된 Leydig cell, Sertoli cell, 정세관의 수축이 관찰되었다. 또한 TA군에서 TCDD에 의한 기저막 두께의 변화, 관내의 정자수 감소가 나타나 고환 독성 및 정자 생성능에 영향을 미쳤다고 판단된다. 또한 이러한 세포 파괴는 정자 성숙 시 베타세포로부터의 testosterone 및 단백질과 같은 각종 영양분 공급 저하에 기인한 것으로 추측된다[17]. 또한, TA군에서 세포사이의 간격이 넓어져 베타세포 및 생식세포가 심하게 손상된 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 TCDD가 blood-testis barrier를 통과하여 정세관 내 세포를 파괴하며 이로 인해 종자세포에 변형이 일어난 것으로 생각된다[7]. 한편, GYB 투여군에서 TA 군에 비하여 조직 병변 역제는 물론 정자의 생성도 NC군에 가까운 정도로 회복이 되어 있음을 알 수 있었다. 이는 구기자를 마우스에게 0.3 mg/kg b.w 농도로 30, 60, 90, 120일간 투여하였을 때 정자의 수, 활동성, 형태를 개선시킨다는 결과와 일치하였으며[15, 16], 인삼의 투여가 TCDD 독성에 의한 변화를 효과적으로 억제시킨다는 연구결과도 있어, GYB 구성 중 인삼과 구기자의 투여에 의한 효능이 발현되었다고 생각된다.

고환 조직의 현미경 소견을 뒷받침하기 위하여 정세관의 직경, 정세관 하나당 함유한 정자 수, SCI, Johnsen's score을 검사하였다. Johnsen's score는 널리 사용하고 있는 고환조직의 평가방법으로, 적어도 100개의 정세관에서 정자 성숙 수준을 1점에서 10점까지 평가하는 방법이다[17]. 고환 조직의 H&E 염색에서 평가한 결과 모두 NC군 대비 TA군에서 통계적 유의성이 나타났으며, 감소하는 결과로 정자생성능이 저하된 것을 알 수 있다. 이는 TCDD가 고환독성을 야기해 정자 생성능을 감소시켜 Johnsen's score의 감소 현상이 일어난다는 결과와 일치하였다[18].

정자의 생성은 뇌하수체 전엽(Anterior pituitary)에서 황체형성호르몬(Luteinizing hormone, LH), 난포자극호르몬(Follicle stimulating hormone, FSH)분비를 촉진하고, FSH는 고환의 Sertoli cell을 자극하며, LH는 고환의 Leydig cell을 자극하여 테스토스테론의 분비를 촉진시켜 정자생성을 왕성하게 하는 기전을 가지고 있다. 한편 GYB 투여에 의해 유의성이 관찰되었으며, 농도의 존성을 나타내며 회복되는 현상이 관찰되었다. 구기자를 100, 500, 1000 mg/kg b.w 농도로 5주간 투여하였을

때, 농도의존적으로 정자의 수, 활동성이 대조군 대비 상승한다는 결과와 일치하며[16], 오미자를 250, 500, 1000 mg/kg b.w 농도로 투여 시 정자의 수가 유의적으로 상승한다는 결과와 일치한다[12], 본 연구에서도 GYB의 구성 중 구기자, 오미자의 효능이 효과적으로 발현되었다고 생각되어진다. 조직병리학적 검사와 비교하여 볼 때, TA군에서는 정자의 생성이 확연히 감소할 것이고, GYB 투여에 의하여 정자의 생성능이 회복될 것이라고 판단하였다. 실제로 GYB300 군에서는 NC 군과 비슷한 결과를 나타내었음을 확인하였으며, 이는 GYB 구성 중 TCDD에 의해 유도된 독성들을 선택적으로 방어한다는 사실을 의미하며 특히 고환독성에 대하여 효과적으로 치료할 수 있다고 할 수 있다.

최근에 TCDD에 의한 생식능력 저하가 항산화계의 혼란으로 야기된다는 보고들도 있는데, 이는 TCDD가 고환과 정자의 미토콘드리아와 microsomal fraction에서 superoxide dismutase, catalase, glutathion reductatase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소의 활성을 저하시키고, hydrogen peroxide 생성과 지질과산화물을 증가시킴으로써 oxidative stress를 야기하여 남성 생식능력을 저하시킨다는 것이다[7, 19, 20]. 추후 TCDD로 인한 생식능력 저하에 대한 조직병리학적 평가의 결과를 뒷받침할 수 있는 항산화계의 변화를 확인해보는 과정이 필요할 것으로 생각된다.

References

- [1] Y S Kwak, Y J Moon, J S Kyung, T-H Kim, M H Rhee, Effect of Saponin Fraction from Platycodon grandiflorum on Clinical Chemical Changes in TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin)-induced Rat Toxicity, *Biomedical Science Letters*, 26(2), 66~74, 2020. DOI : <http://doi.org/10.15616/BSL.2020.26.2.66>
- [2] 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), *Journal of Nutrition and Health (J Nutr Health)*, 46(3): 207 ~ 217, 2013. DOI : <http://dx.doi.org/10.4163/jnh.2013.46.3.207>
- [3] D H Yang, *The Effects of Gobonyangjeongbang Administration on Reproductive Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin Induced Rats*, Master's thesis, Daejeon university, Korea, pp.5. DOI: <http://doi.org/10.14400/IDPM.2013.11.1.299>
- [4] Y.S Kwak, Y.J Moon, J.S Kyung, M.H Rhee, Effect of Saponin Fraction from Platycodon grandiflorum on Clinical Chemical Changes in TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin)-induced Rat Toxicity, *Biomed Sci Letters*, 26, 66-74, 2020. DOI : <http://doi.org/10.15616/BSL.2020.26.2.66>
- [5] 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://doi.org/10.4163/jnh.2013.46.3.207>
- [6] J.D Hanson, Dioxin toxicity: New studies prompt debate, regulatory action, *Journal of chemical and engineering*, 12, 7-14, 1991. DOI : <http://doi.org/10.1021/cen-v069n032.p007>
- [7] D.Y Kang, M.I Park, S.Y Na, J.J Wee, Pathologic Comparative Studies on the Protective Effects by panax Ginseng and Panax Quinquefolium for Treating 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-*p*-dioxin-induced Toxicity in Male Rats, *The Korean Journal of Pathology*, 40, 118-27, 2006.
- [8] S.E Bae, H.J Kim, S.Y Lee, H.S Kim, C.S Kim, I.H Ha, J.H Lee, Analysis of Experimental Study Tendency on Oriental Herbal Medicines for Male Infertility-Focusing on Domestic Theses for a Degree-, *The Society of Korean Medicine Obstetrics and Gynecology*, 27(1), 120-139, 2014.
- [9] 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, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 18(5), 1410-1417, 2004.
- [10] S.R Kopalli, K.M Cha, S.H Lee, J.H Ryu, S.Y Hwang, Petinase-treated Panax ginseng protects against chronic intermittent heat stress-induced testicular damage by modulating hormonal and spermatogenesis-related molecular expression in rat, *Journal of Ginseng Research*, 41(4), 578-588, 2017. DOI : <http://doi.org/10.1016/j.igr.2016.12.001>
- [11] S.H Kim, J.W Choi, Protective Effects of Water Extract from Cuscutae Semen on Ketoconazole-Induced Oxidative Stress in Testicular Damage Male Rats, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 25(3), 417-424, 2011.
- [12] T.W Yu, *Effects of Schisandrae Fructus on Sperm Parameters and Male Reproductive System in Mouse Testes*, Ph.D dissertation, Kyung Hee University, Seoul, Korea, 28.
- [13] S.W Jee, *Effects of Allii tuberosi Semen on the Expression of GREM Gene and Sperm Motility in Male Mice*, Ph.D dissertation, Kyung Hee University, Seoul, Korea, 28.
- [14] A Beytur, O Ciftci, O Cakir, M Aydin, N Timurkaan, F Yilmaz, Protocatechuic acid prevents reproductive damage caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD) in male rat, *Andrologia*, 44, 454-461, 2012.

DOI : <http://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01204.x> Epub

- [15] D.S Park, J.M Lee, C.H Lee, J.H Cho, J.B Jang, K.S Lee, Administration Term-dependent Effects of Allii Tuberosi Semen Extract Solution on the Reproductive Capacities in the Mice, *The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology*, 20(2), 71-82, 2007.
- [16] S.W Jee, *Effects of Allii tuberosi Semen on the Expression of CREM Gene and Sperm Motility in Male Mice*, Ph.D dissertation, Kyung Hee University, Seoul, Korea, 19-28.
- [17] S.G Johnsen, Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males, *Hormones*, 1(1), 2-25, 1970.
DOI : <http://doi.org/10.1159/000178170>
- [18] K.Y Choi, S.Y Hwang, S.K Kim, Ethanol Extract of Antler Velvet Attenuates Testicular Toxicity Induced by 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD) in rat, *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 34(8), 1169-1174, 2005.
DOI : <http://doi.org/10.3746/JKFN.2005.34.8.1169>
- [19] C Latchoumycandane, K.C Chitra, P.P Mathur, The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the antioxidant system in mitochondrial and microsomal fractions of rat testis, *Toxicology*, 171(2-3), 127-35, 2002.
DOI : [http://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00563-7](http://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00563-7)
- [20] C Latchoumycandane, C Chitra, P Mathur, Induction of oxidative stress in rat epididymal sperm after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Arch Toxicol*, 76, 113-8, 2002.
DOI : <http://doi.org/10.1007/s00204-001-0308-4>

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(박사 과정 재학 중)

<관심분야>

임상병리, 혈액학, 독성학

양 동 현(Dong Hyun Yang)

[정회원]



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

<관심분야>

자연과학, 신약개발

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