

香砂養胃湯이 Propylthiouracil로 유발된 Rat 갑상샘기능저하성 음성 생식기 손상에 미치는 영향

최홍식*

대구한의대학교 한의과대학 간계내과학교실

Favorable Effects of *Hyangsayangyi-tang* on the Hypothyroidism related Rat Male Reproductive Organ Damages induced by Propylthiouracil

Hong-Sik Choi*

Department of Oriental Internal Medicine of Hepatology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University,
Daegu 706-060, Republic of Korea.

ABSTRACT

Objectives : *Hyangsayangyi-tang* (香砂養胃湯) is a polyherbal formula, has been used as one of the representative So-eumin (少陰人) prescriptions in Sasang-medicine (四象醫學), a famous Korean medicinal theory. The aqueous extract of *Hyangsayangyi-tang* (HSYYT) was evaluated for its possible ameliorative effect in the regulation of hypothyroidism related reproductive organ damages in propylthiouracil (PTU)-induced rat model.

Methods : HSYYT aqueous extracts were administered, once day for 42 days from 2 weeks before start of PTU treatment as an oral dose of 500, 250 and 125 mg/kg (bodyweight), and hypothyroidism was induced by daily subcutaneous treatment of PTU 10 mg/kg for 28days.

Results : PTU induced hypothyroidism and related male reproductive organ (testis, epididymis and prostate) damages were favorably and dose-dependently inhibited by treatment of HSYYT 500 and 250 mg/kg, and they also effectively regulated the PTU-induced abnormal antioxidant defense system changes in the testis. No effective or any harmful changes on the PTU induced hypothyroidism and related male reproductive organ damages were observed in HSYYT 125 mg/kg treated rats as compared with PTU control in this experiment.

Conclusions : The results obtained in this study suggest that oral administration of 500 and 250 mg/kg of HSYYT showed favorable effects on the hypothyroidism and related reproductive organ damages through augmentation of antioxidant defense system in the testis, and it is considered that HSYYT may be help to ameliorate the hypothyroidism and related organ damages in clinics.

Key words : *Hyangsayangyi-tang*, hypothyroidism, male reproductive organ damages, propylthiouracil, antioxidant

서론

갑상샘기능저하증이란 갑상샘의 이상이나 시상하부와 뇌하수체의 기능 이상 및 갑상샘호르몬 생합성 중간단계의 장애로 인해 갑상샘호르몬이 부족한 대사 상태를 의미한다¹⁾. 갑상샘호르몬인 thyroxine (T₄)은 에너지 대사와 당, 지방 및 단백

질 대사에 관여하므로 갑상샘기능저하증에는 기초대사율 저하, 장 포도당 흡수저하, 고콜레스테롤혈증, 단백질 합성저하 및 이에 따른 점액수종 등이 발생한다. 또한 골성장과 골단 폐쇄를 돕고 정신기능을 자극하며 카테콜아민 동원 작용이 있으므로 성장지연, 지능 발달 지연, 심박출량 감소 및 심박수 저하 등이 이차적으로 초래하게 된다²⁾.

*교신저자, 제1저자 : 최홍식, 대구광역시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학 간계 내과학교실
· Tel : 010-5116-1461 · Fax : 053-770-2189 · E-mail : cheldu@unitel.co.kr
· 접수 : 2013년 10월 23일 · 수정 : 2013년 11월 08일 · 채택 : 2013년 11월 09일

갑상샘기능저하증의 치료는 부족한 갑상샘호르몬을 외부에서 공급하여 보충해주는 것으로 일생동안 약물을 복용해야 하는 문제점뿐만 아니라 주로 사용되는 Levothyroxine (LT4)³⁾는 급성 심근 경색이나, 불안정성 협심증 등, 허혈성 심질환의 위험성, 갑상샘 호르몬 요구량의 변화, LT4를 보충해도 호전 증상이 없는 등 여러 가지 문제점을 유발한다⁴⁾.

한편 근래의 연구 결과로 갑상샘기능저하증은 신체의 항산화 방어 system의 변화 또한 초래하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 즉, 일반적인 기초 대사량의 감소로 세포 호흡이 억제되고 내인성 항산화 방어 효소인 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase (CAT)의 현저한 감소에 따른 과산화 수소 (H_2O_2)의 조직내 축적 등이 유발되어 다양한 체내 손상이 발생되며, 이중 고환을 포함한 생식기 역시 갑상샘호르몬에 의해 영향을 받는 대표적인 장기이므로 갑상샘기능저하증시 현저한 고환 위축과 함께 남성 호르몬인 testosterone 및 dihydrotestosterone (DHT)의 감소와 follicular stimulating hormone (FSH)의 함량 증가가 수반된다⁶⁻⁸⁾. 따라서 이러한 갑상샘기능저하증 소견이 항산화제의 투여에 의해 현저히 감소되는 것으로 알려져 있어⁹⁾ 최근 부작용이 적고 강력한 항산화 효과를 나타내는 천연물 유래의 갑상샘기능저하증 치료제의 개발이 주목 받고 있는 실정이다¹⁰⁻¹²⁾.

香砂養胃湯은 『東醫壽世保元·辛丑本』新定少陰人病 應用要藥 二十四方的 하나로 少陰人 胃受寒裏寒病的 太陰證에 사용하는 처방으로 人蔘, 白朮, 白芍藥, 炙甘草, 半夏, 香附子, 陳皮, 乾薑, 山查肉, 砂仁, 白豆蔻, 生薑 및 大棗의 열세 가지 약재로 구성되어 있으며, 소화기계의 치료를 위해 널리 사용되어 왔고, 특히 食慾不振, 胸痛, 胃炎, 胃下垂, 胃無力症 등에 응용되어왔다¹³⁾. 현재까지 香砂養胃湯 자체의 항산화¹⁴⁾ 및 소화기계에 대한 유효한 효과¹⁵⁾가 실험적으로 알려져 있으나 갑상샘 기능 이상 및 관련 생식기 손상에 대한 효과는 아직 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 香砂養胃湯의 경구 투여가 Propylthiouracil (PTU; 6-n-propyl-2-thiouracil, MW = 170.233 g)로 유발된 rat 갑상샘기능저하증 및 관련 생식기 손상에 미치는 영향을 평가하기 위하여 500, 250 및 125 mg/kg의 香砂養胃湯 물 추출물 (HSYYT) (수율: 18.60%)을 PTU 처리 시작 2주전부터 6주간 투여하고 체중, 갑상샘, 전립샘, 부고환 및 고환 중량, 혈중 갑상샘호르몬 (TSH, T_3 및 T_4) 함량, 혈중 성 호르몬 (testosterone, DHT 및 FSH) 함량, 고환 항산화 방어 system (lipid peroxidation, H_2O_2 , SOD 및 CAT)의 변화를 갑상샘, 고환, 전립샘 및 부고환의 조직병리학적 변화와 함께 관찰하였고, 결과는 갑상샘기능저하증 치료제로 사용되고 있는 LT4 0.5 mg/kg 복강 투여군^{11,12)}과 비교하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

실험에 사용된 약재는 대원약업사 (Daegu, Korea)에서 매입한 것을 현미경하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용하였으며, 본 실험에 사용된 香砂養胃湯 1첩 분량 (52.00 g)의

조성은 Table 1과 같다. 선정된 약제 10첩 분량 (총량 520.00 g)을 취하여 정제수 6 L로 가열 추출한 후 (60°C, 3시간, 3분) 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (Eyela N-1110, Tokyo, Japan)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer (Operon FDB-5503, Kimpo, Korea)를 사용하여 동결 건조시켜 총 96.72 g (수율 18.60%)의 연갈색의 물 추출물을 얻어 실험에 사용하였으며, 일부 약제는 시료 보관 냉동고 (Lot No. HSYT2013Ku)에 보관하였다. 준비한 香砂養胃湯 물 추출물 (HSYYT)은 -20°C로 냉동 보관 후 실험에 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 용매인 증류수에 100 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었다. 또한 이전의 실험방법^{11,12)}에 따라 대조 약물로 사용한 백색 분말의 LT4 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 역시 -20°C의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 용매인 멸균 생리식염수에 0.25 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었다.

2) 실험동물 및 사양관리

132마리의 수컷 SPF/VAF Outbred CrI:CD [Sprague-Dawley] rat (6-wk old upon receipt, OrientBio, Seungnam, Korea)를 15일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도 (20-25°C)와 습도 (40-45%)가 조절된 사육실에서 polycarbonate 사육 상자에 4마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료 (Samyang, Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였다. 순화과정 후 체중 (Average: 286.29±14.35 g; ranged in 265.00~326.00 g)이 일정한 실험동물을 선별하여, 군당 8마리씩 총 6개군으로 구분하여, 실험에 사용하였다. 모든 실험동물은 HSYT 또는 용매 투여 시작일 및 최종 부검일 18시간 전 각각 절식을 실시하였으며 (이 기간에도 음수는 자유롭게 공급하였다), picric acid로 개체를 식별하였다. 본 동물실험은 동물실험윤리위원회 (IACUC)의 사전 승인을 받아 수행하였다 (승인번호: DHU2013-069).

2. 방법

1) 분리 및 약물의 투여

군당 8마리씩 6개군 (정상 대조군, PTU 대조군, LT4 투여군 및 3용량 (500, 250 및 125 mg/kg)의 HSYT 투여군)으로 구분하여 실험을 실시하였다. 500, 250 또는 125 mg/kg의 HSYT를 각각 10 ml의 멸균 증류수에 용해시켜, kg 당 5 ml/kg의 용량으로 존데 (zonde)가 부착된 5 ml 주사기를 이용하여, 매일 1회씩 PTU 투여 시작 2주전부터 42일 동안 강제 경구 투여하였다. 또한 이전의 방법^{11,12)}에 따라 2.5 mg의 LT4를 10 ml의 생리 식염수에 용해 시켜 kg 당 2 ml의 용량으로 PTU 투여 시작일로부터 28일간 매일 복강 주사하였다. 한편 정상 및 PTU 대조군에서는 동일한 용량의 멸균 증류수를 HSYT 투여군과 동일한 기간 동안 경구 투여하였다 (Fig 1).

2) 유발

이전의 방법^{11,12,16)}에 따라, 50 mg의 PTU (Sigma, St.

Louise, MO, USA)를 10 ml 생리 식염수에 용해시켜, kg 당 2 ml의 용량으로 매일 1회씩, 28일간 매일 등쪽 경부 피하에 주사하여, 갑상샘기능저하증을 유발하였다. 한편 정상 대조군에서는 PTU 대신 동일한 용량의 생리 식염수만 동일한 방법과 기간 동안 투여하였다 (Fig 1).

Table 1. Composition of HSYYT Used in This Study

Herbs	Scientific Names	Producing District	Amounts (g)
Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	Keumsan, Chungnam, Korea	4.00
Atractylodes rhizome white	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidzumi	Danyang, Chungbuk, Korea	4.00
Paeoniae Radix	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	Uiseong, Gyeongbuk, Korea	4.00
Glycyrrhizae Radix Preparata	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	Jaechun, Chungbuk, Korea	4.00
Pinelliae Rhizoma	<i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Breitenbach	Jaechun, Chungbuk, Korea	4.00
Cyperi Rhizoma	<i>Cyperus rotundus</i> L.	Youngcheon, Gyeongbuk, Korea	4.00
Citri Unshii Pericarpium	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	Namjeju, Jeju, Korea	4.00
Zingiberis Rhizoma Siccus	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Youngcheon, Gyeongbuk, Korea	4.00
Crataegi Fructus	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	Yeongwol, Gangwon, Korea	4.00
Amomi Semen	<i>Amomum villosum</i> Lour	China	4.00
Amomi Cardamomi Fructus	<i>Amomum cardamomum</i> L.	China	4.00
Zingiberis Radix	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Jaechun, Chungbuk, Korea	4.00
Zizyphi Fructus	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i> (Bunge) Rehder	Gyeongsan, Gyeongbuk, Korea	4.00
Total	13 types		52.00

HSYYT = *Hyangsayangyi-tang*

All individual herbs were purchased from Daewon Pharmacy (Daegu, Korea)

3) 측정

모든 실험동물의 체중을 HSYYT 투여 시작 1일 전, 투여 시작일, 투여 7, 14 (PTU 및 LT4 투여 시작일), 21, 28, 35, 41 및 42 (최종 희생일)일 후에 automatic electronic balance (Precisa Instrument, Zürich, Switzerland)를 이용하여 각각 측정하였으며, 사료섭취에 따른 체중 변화를 최소화하기 위해 HSYYT 투여 시작일 및 최종 희생일에 모든 실험동물은 18시간 정도 절식하였다.

4) 중량의 측정

최종 희생일에 모든 실험동물의 전립샘, 좌측 갑상샘, 고환 및 부고환을 적출·분리한 다음 중량을 측정하여 절대 중량 (absolute wet-weight)으로 하였으며, 체중의 변화에 수반된 이차적 변화를 최소화하기 위해 체중에 대한 절대중량의 비율인 상대 중량 ((Absolute organ weights / Body weights at sacrifice) × 100, % of body weight)을 각각 산출하였다.

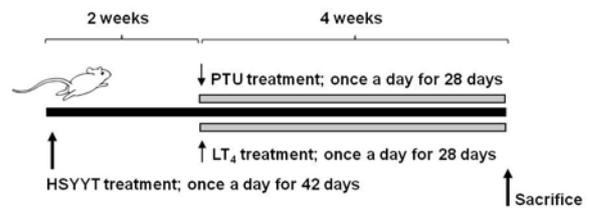


Fig. 1. Experimental designs used in this study

Six groups, each of 8 rats per group were selected after 15 days of acclimatization based on the body weights (Average: 286.29±14.35 g; ranged in 265.00~326.00 g) as intact vehicle control, PTU control, LT4, HSYYT 500, 250 and 125 mg/kg treated groups. HSYYT were administered, once day for 42 days from 2weeks before start of PTU treatment as an oral dose of 500, 250 and 125 mg/kg (*bodyweight*), and hypothyroidism was induced by daily subcutaneous treatment of PTU 10 mg/kg for 28 days. The changes on the body weight, thyroid gland, epididymis, prostate and testis weights, serum thyroid hormone (TSH, T₃ and T₄ levels), serum male sex hormone (testosterone, DHT and FSH levels), testis antioxidant defense system (lipid peroxidation, H₂O₂, SOD and CAT) were observed with histopathology of thyroid gland, epididymis, prostate and testis. Results were compared with LT4 0.5 mg/kg intraperitoneally treated rats in this experiment. HSYYT = *Hyangsayangyi-tang* aqueous extracts (Yield = 18.60%), PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil), LT4 = Levothyroxine, TSH = Thyroid-stimulating hormone, T₃ = Tri-iodothyronine, T₄ = Thyroxine, DHT = Dihydrotestosterone, FSH = follicular stimulating hormone, SOD = Superoxide dismutase, CAT = catalase.

5) 채혈 및 혈청의 분리

최종 희생일에 모든 실험동물을 18시간 이상 절식 후 후대 정맥 (vena cava)에서 각각 6 ml의 혈액을 채취하였으며, 상온에서 1시간 정도 방치한 다음 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈청을 분리하였고, 분석 전까지 -150℃의 초저온냉장고 (Deep freezer; Sanyo, Tokyo, Japan)에 보관하였다.

6) 혈청 중 호르몬 함량의 측정

Radioimmunoassay 법¹⁶에 준하여 혈청 중 TSH, T₃, T₄, testosterone, DHT 및 FSH 함량을 각각 Coat A count Total TSH, T₃, T₄, testosterone, DHT 및 FSH kit (DPC, Danville, CA, USA)를 사용하여 Gamma count Cobra II (Packard Co., Downers Grove, IL, USA)로 pg/ml, ng/ml 또는 µg/ml 단위로 각각 측정하였다.

7) 항산화 방어 system의 측정

Kavutcu 등¹⁷의 방법에 따라 적절한 고환의 일부 조직을 얼음으로 냉각 (ice-cold) 한 0.01 M Tris-HCl (pH 7.4)을 이용하여 homogenize 한 다음, 800×g으로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하고, 다시 12,000×g 으로 15분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 준비하였다. 이 후 단백질 함량은 Lowry 등¹⁸의 방법으로 bovine serum albumin을 standard로 이용하여 측정하였으며, 지질 과산화 정도 (lipid peroxidation)는 Jamall 등¹⁹의 방법으로 2-thiobarbituric acid를 이용하여 흡광도 525 nm에서 측정하여 malondialdehyde (MDA) nM/mg protein 단위로 측정하였다. 또한 H₂O₂ 함량은 Pick 등²⁰의 방법에 따라 horseradish peroxidase (Sigma, St. Louise, MO, USA)와 phenol red (Wako, Osaka, Japan)를 이용하여 nM/mg protein 단위로 spectrophotometry

로 측정하였으며, 이전의 방법²¹⁾에 따라 H_2O_2 분해능을 이용하여 catalase 함량을 흡광도 240 nm에서 측정하였다. 즉, pH 7.0, 온도 25°C 하에서 1 μ mol의 H_2O_2 를 분해하는데 필요한 catalase를 1 unit (U)로 정의하여 U/mg protein의 단위로 catalase의 활성을 평가하였고, SOD 활성은 Nishikimi 등²²⁾의 nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)-phenazine methosulphate-nitroblue-tetrazolium 억제 반응을 변형시킨 Kakkar 등²³⁾의 방법을 이용하여 평가하였다. SOD 1 unit는 상온 (25 \pm 2°C)에서 1분 동안 formazan 형성을 50% 억제하는 농도로 정의하여 U/mg protein 단위로 측정하였다.

8) 조직병리

최종 희생일에 전립샘, 좌측 갑상샘, 고환 및 부고환 조직을 적출한 다음 세로로 절단하고, 10% 중성포르말린에 18시간 이상 고정시킨 다음, 탈수를 거쳐 파라핀 포매 후 3 μ m의 조직 절편을 제작하고, Hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 실시한 후, 광학현미경 하에서 관찰하였다. 또한 좀 더 명확한 조직병리학적 변화를 관찰하기 위하여, 세로 절단한 갑상샘 전체 두께 (μ m/central regions) 및 평균 갑상샘 여포 직경 (μ m/follicle)를 각각 automated image analysis process (iSolution FL ver 9.1, IMT i-solution Inc., Quebec, Canada)를 이용하여 이전에 방법^{11,12)}에 따라 측정하였으며, 고환내 정세관의 평균 직경과 도관내 성숙한 정자를 함유한 stage I~II의 정세관이 차지하는 비율을 각각 μ m/tubule 및 %/mm²단위로 측정하였으며, 부고환 두부(head)의 평균 두께 및 정자수의 감소를 나타내는 부고환 도관(Aspermatogonia/oligospermatogonia tubules)의 비율 역시 mm/head region 및 %/mm²단위로 측정하였고, 전립샘 도관 상피의 평균 두께 (μ m/tubule) 및 위축(atrophic changes) 전립샘 도관의 비율 (%/mm²) 역시 automated image analysis process를 이용하여 각각 측정하였다.

9) 통계처리

모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test²⁴⁾를 실시하여 검증 하였다. 등분산일 경우 one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences (LSD) test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는 Mann-Whitney U test를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows (Release 14.0 K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다²⁵⁾.

결 과

1. 체중의 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 체중의 감소가 3주 후 (Day 35)부터 나타났고, LT4 및 HSYYT 500 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의

한 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 체중의 증가가 3주 후 부터 나타났으며, 250 mg/kg의 HSYYT 투여군에서도 PTU 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 체중 증가가 41 및 42일 후 각각 나타났다. 반면 125 mg/kg의 HSYYT 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의한 체중의 변화는 실험 전 기간 동안 나타나지 않았다 (Fig 2).

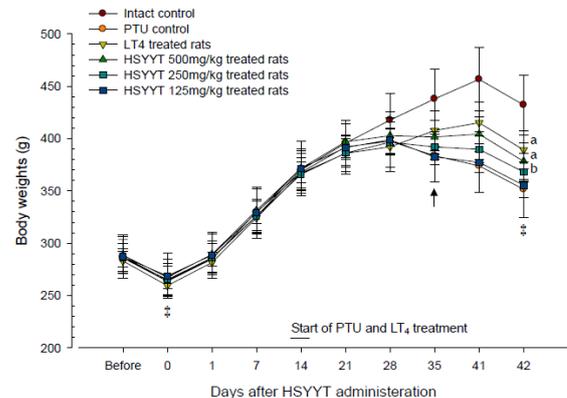


Fig. 2. Body weight changes after LT4 and HSYYT treatment in PTU-treated rats

Note that the body weights in PTU control were significantly decreased from 3 weeks after PTU treatment, at 35 days after HSYYT extract administration (arrow). However, these body weight decreases were significantly inhibited by treatment of LT4 from 3 weeks after treatment, also from 35 days after HSYYT 500 mg/kg treatment and from 41 days after HSYYT 250 mg/kg treatment as compared with PTU control, respectively. Anyway, no significant changes on the body weights were demonstrated in HSYYT 125 mg/kg treated rats as compared with PTU control rats, in this experiment.

Values are expressed as mean \pm S.D. of eight rats, g : 0 means, at start of HSYYT extracts administration : All rats were overnight fasted (†)

HSYYT = *Hyangsayangyi-tang* aqueous extracts (Yield = 18.60%), PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil), LT4 = Levothyroxine.

^a $p < 0.01$ as compared with PTU control by MW test

^b $p < 0.05$ as compared with PTU control by MW test

2. 갑상샘 중량의 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 현저한 갑상샘 중대가 나타나 유의한 ($p < 0.01$) 절대 및 상대 갑상샘 중량의 증가가 인정되었으나, LT4 및 HSYYT 500과 250 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 절대 및 상대 갑상샘 중량의 감소가 각각 나타났다. 반면에 HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군과 비교하여 의미 있는 갑상샘 절대 및 상대 중량의 변화는 나타나지 않았다 (Table 2, Fig 3).

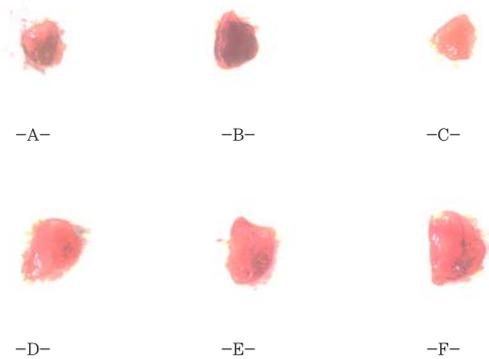


Fig. 3. Representative thyroid gland gross images, taken from intact or PTU-treated rats

Note that marked hypertrophic changes of thyroid glands were demonstrated in PTU control rats as compared with intact control rats, but they were noticeably inhibited by treatment of LT4 and also dose-dependently by treatment of HSYYT 250 and 500 mg/kg as compared with PTU control, respectively. Anyway, no meaningful changes on the thyroid glands gross findings were demonstrated in HSYYT 125 mg/kg treated rats as compared with PTU control rats, in this study.

A = Intact control, B = PTU control, C = LT4 0.5 mg/kg treated rats, D = HSYYT 500 mg/kg treated rats, E = HSYYT 250 mg/kg treated rats, F = HSYYT 125 mg/kg treated rats. HSYYT = *Hyangsayangyi-tangaqueous* extracts (Yield = 18.60%), PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil), LT4 = Levothyroxine. Scale bars = 3 mm

3. 고환 중량의 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 현저한 고환 위축이 나타나 유의한 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 절대 및 상대 고환 중량의 감소가 인정되었으나, 500 및 250 mg/kg의 HSYYT 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 유의한 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 절대 및 상대 고환 중량의 증가가 각각 나타났다. 한편 LT4 투여군에서는 PTU와 유사한 절대 고환 중량의 변화를 나타내었으나, 상대 고환 중량은 PTU 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 나타내었고, HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 의미 있는 고환 중량의 변화는 나타나지 않았다 (Table 2, Fig 4).

4. 부고환 중량의 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 부고환 절대 및 상대 중량의 감소가 각각 나타났으나, HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 유의한 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 절대 및 상대 부고환 중량의 증가가 각각 나타났다. 반면에 LT4 및 HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의한 부고환 절대 및 상대 중량의 변화는 각각 나타나지 않았다 (Table 2, Fig 4).

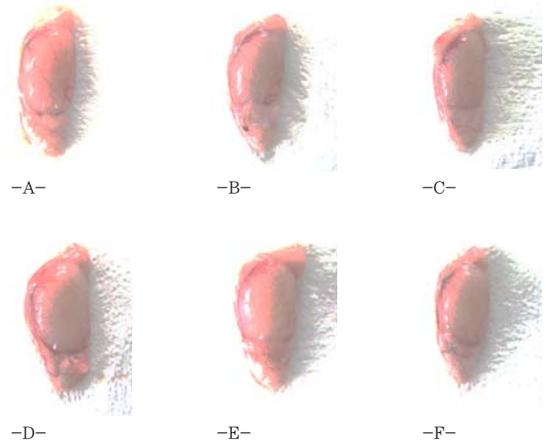


Fig. 4. Representative testis and epididymis gross images, taken from intact or PTU-treated rats

Note that marked atrophic changes of epididymis and testis were noticed in PTU control rats as compared with intact control rats, but they were dramatically and dose-dependently normalized by treatment of HSYYT 250 and 500 mg/kg as compared with PTU control, respectively. Anyway, LT4 treated rats showed similar or slightly more severe atrophic changes on the testis and epididymis as compared with PTU control rats, and HSYYT 125 mg/kg did not showed any favorable effects on the testis and epididymis at gross inspections in this experiment.

A = Intact control, B = PTUcontrol, C = LT4 0.5 mg/kg treated rats, D = HSYYT 500 mg/kg treated rats, E = HSYYT 250 mg/kg treated rats, F = HSYYT 125 mg/kg treated rats. HSYYT = *Hyangsayangyi-tangaqueous* extracts (Yield = 18.60%), PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil), LT4 = Levothyroxine. Scale bars = 10 mm

5. 전립샘 중량의 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 절대 및 상대 전립샘 중량의 감소가 나타났고, HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 유의한 ($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$) 절대 및 상대 전립샘 중량의 증가가 나타났다. 반면에 LT4 및 HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의한 전립샘 중량의 변화는 나타나지 않았다 (Table 2).

Table 2. Organ weights after LT4 and HSYYT treatment in PTU-treated rats

Groups	Controls		Reference		HSYYT treated	
	Intact	PTU	LT4 0.5 mg/kg	500 mg/kg	250 mg/kg	125 mg/kg
Absolute weights (g)						
Thyroid gland	0.010±0.003	0.043±0.004 ^a	0.011±0.004 ^f	0.024±0.005 ^{bc}	0.030±0.007 ^{bc}	0.042±0.007 ^d
Testis	1.664±0.077	1.234±0.099 ^b	1.282±0.125 ^b	1.566±0.081 ^{bc}	1.458±0.082 ^{bc}	1.318±0.088 ^d
Epididymis	0.594±0.065	0.411±0.034 ^d	0.432±0.072 ^d	0.540±0.069 ^f	0.514±0.040 ^{ef}	0.470±0.062 ^e
Prostate	1.108±0.272	0.540±0.080 ^e	0.552±0.084 ^e	0.890±0.131 ^f	0.726±0.111 ^{ef}	0.566±0.053 ^e
Relative weights (% of body weights)						
Thyroid gland	0.002±0.001	0.012±0.001 ^b	0.003±0.001 ^c	0.006±0.001 ^{bc}	0.008±0.002 ^{bc}	0.012±0.001 ^d
Testis	0.386±0.021	0.351±0.031 ^b	0.329±0.028 ^{cd}	0.415±0.035 ^c	0.396±0.025 ^d	0.374±0.046
Epididymis	0.138±0.016	0.117±0.009 ^b	0.111±0.021 ^b	0.143±0.016 ^c	0.140±0.013 ^d	0.133±0.023
Prostate	0.257±0.065	0.154±0.023 ^e	0.142±0.022 ^e	0.236±0.038 ^f	0.198±0.033 ^{ef}	0.160±0.020 ^f

Values are expressed mean ± S.D. of eight rats
 HSYYT = Hyangsayangyi-tang aqueous extracts (Yield = 18.60%),
 PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil), LT4 = Levothyroxine.
^a $p < 0.01$ and ^b $p < 0.05$ as compared with intact control by LSD test
^c $p < 0.01$ and ^d $p < 0.05$ as compared with PTU control by LSD test
^e $p < 0.01$ as compared with intact control by MW test
^f $p < 0.01$ and ^g $p < 0.05$ as compared with PTU control by MW test

6. 혈청 중 갑상샘 호르몬 함량의 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 혈청 중 TSH 함량의 증가가 T_3 및 T_4 함량의 감소와 함께 나타났으며, HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 유의한 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) TSH 함량의 감소와 함께 T_3 및 T_4 함량의 증가가 각각 나타났다. 한편 LT4 투여군에서도 PTU 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$)는 TSH 함량의 감소와 함께 T_4 함량의 증가가 나타났으나 유의한 T_3 함량의 변화는 나타나지 않았고, HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의한 혈청 중 TSH, T_3 및 T_4 함량의 변화는 나타나지 않았다 (Table 3).

Table 3. Serum thyroid hormone levels after LT4 and HSYYT treatment in PTU-treated rats

Groups	Serum hormone levels		
	TSH (ng/ml)	T_3 (ng/ml)	Thyroxine (ug/ml)
Controls			
Intact	14,36±3,19	72,54±8,39	5,68±1,10
PTU	58,25±13,13 ^a	17,14±5,08 ^a	0,95±0,18 ^a
Reference			
LT4 0.5 mg/kg	12,47±3,31 ^b	17,81±3,60 ^a	6,70±1,50 ^b
HSYYT treated			
500 mg/kg	35,47±7,05 ^{ab}	26,34±3,94 ^{ab}	2,24±0,67 ^{ab}
250 mg/kg	43,44±5,18 ^{ab}	23,70±4,04 ^{ac}	1,85±0,52 ^{ab}
125 mg/kg	54,54±11,31 ^a	19,06±5,53 ^a	1,01±0,29 ^a

Values are expressed as mean ± S.D. of eight rats
 HSYYT = *Hyangsayangyi-tangaqueous* extracts (Yield = 18.60%),
 PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil), LT4 = Levothyroxine,
 T_3 = Tri-iodothyronine, TSH = Thyroid stimulating hormone
^a $p < 0.01$ as compared with intact control by MW test
^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.05$ as compared with PTU control by MW test

7. 혈청 중 성 호르몬 함량의 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 혈청 중 FSH 함량의 증가가 testosterone 및 DHT 함량의 감소와 함께 나타났고, HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 FSH 함량의 유의한 ($p < 0.01$) 감소와 testosterone 및 DHT 함량의 유의한 ($p < 0.01$) 증가가 각각 나타났다. 한편 LT4 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) FSH 함량의 증가와 DHT 및 testosterone 함량의 감소가 각각 나타났으며, HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의한 혈청 중 성 호르몬 함량의 변화는 나타나지 않았다 (Table 4).

Table 4. Serum testicular hormone levels after LT4 and HSYYT treatment in PTU-treated rats

Groups	Serum hormone levels		
	Testosterone (ng/ml)	DHT (pg/ml)	FSH (ng/ml)
Controls			
Intact	3,23±0,45	173,38±16,55	10,66±1,70
PTU	2,01±0,28 ^a	125,88±14,59 ^a	17,80±1,80 ^a
Reference			
LT4 0.5 mg/kg	1,66±0,40 ^{ac}	102,38±17,54 ^{ab}	20,23±1,74 ^{ab}
HSYYT treated			
500 mg/kg	2,63±0,34 ^{ab}	153,13±11,89 ^{ab}	13,10±1,68 ^a
250 mg/kg	2,46±0,24 ^{ab}	145,75±8,78 ^a	14,93±0,96 ^{ab}
125 mg/kg	2,16±0,20 ^a	134,63±15,76 ^a	17,09±2,08 ^a

Values are expressed as mean ± S.D. of eight rats
 HSYYT = *Hyangsayangyi-tangaqueous* extracts (Yield = 18.60%),
 PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil), LT4 = Levothyroxine,
 DHT = Dihydrotestosterone, FSH = Follicular stimulating hormone.
^a $p < 0.01$ as compared with intact control by MW test
^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.05$ as compared with PTU control by MW test

8. 고환 항산화 방어 system의 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 없는 경미한 지질 과산화의 감소가 나타났으나, 유의한 ($p < 0.01$) H_2O_2 함량의 증가와 SOD 및 CAT 활성의 유의한 ($p < 0.01$) 감소와 함께 나타났다. HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 유의한 ($p < 0.01$) SOD 및 CAT 활성 증가가 H_2O_2 함량의 감소와 함께 나타났다. 한편 LT4 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의성은 인정되지 않았으나 CAT 활성의 감소 경향을 보였고, 유의한 ($p < 0.01$) SOD 활성의 감소가 유의한 ($p < 0.05$) H_2O_2 함량의 증가와 함께 나타났으며, HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의한 고환 지질과산화, H_2O_2 함량, SOD 및 CAT 활성의 변화는 나타나지 않았다 (Table 5).

Table 5. Testicular antioxidant defense systems after LT4 and HSYYT treatment in PTU-treated rats

Groups	Testis contents			
	MDA (nM/mg protein)	H_2O_2 (nM/mg protein)	SOD (U/mg protein)	Catalase (U/mg protein)
Controls				
Intact	5,78±1,08	25,13±5,84	30,88±1,89	26,75±7,13
PTU	5,24±1,19	53,13±11,43 ^d	14,50±2,45 ^a	13,88±2,17 ^d
Reference				
LT4 0.5 mg/kg	5,64±1,34	70,38±14,59 ^{df}	8,75±2,60 ^{ab}	11,63±3,66 ^d
HSYYT treated				
500 mg/kg	5,11±1,43	36,00±7,13 ^{bc}	21,25±2,87 ^{ab}	18,13±1,89 ^b
250 mg/kg	5,12±0,79	40,63±6,48 ^{df}	18,00±2,27 ^{ac}	17,13±2,03 ^{df}
125 mg/kg	5,33±0,63	48,75±11,41 ^d	15,38±3,89 ^a	14,88±3,04 ^d

Values are expressed as mean ± S.D. of eight rats
 HSYYT = *Hyangsayangyi-tangaqueous* extracts (Yield = 18.60%),
 PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil), LT4 = Levothyroxine,
 MDA = Malondialdehyde, SOD = Superoxide dismutase.
^a $p < 0.01$ as compared with intact control by LSD test
^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.05$ as compared with PTU control by LSD test
^d $p < 0.01$ as compared with intact control by MW test
^e $p < 0.01$ and ^f $p < 0.05$ as compared with PTU control by MW test

9. 갑상샘의 조직병리학적 관찰

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 현저한 갑상샘 여포세포의 증생에 의한 비대 소견이 여포 직경 및 여포내 colloid 물질의 감소와 함께 나타났으며, 갑상샘 전체 두께의 유의한 ($p < 0.01$) 증가가 평균 갑상샘 여포 직경의 유의한 ($p < 0.01$) 감소와 함께 나타났다. 한편 이러한 PTU 투여에 의한 갑상샘 조직의 증생 및 비대 소견이 LT4, HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여에 의해 현저히 억제되었다. 즉, LT4, HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 갑상샘 전체 두께의 감소와 평균 갑상샘 여포 직경의 증가를 각각 나타내었다. HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 의미 있는 갑상샘 조직병리학적 변화 (갑상샘 전체 두께와 평균 갑상샘 여포 직경)는 나타나지 않았다 (Table 6, Fig 5).

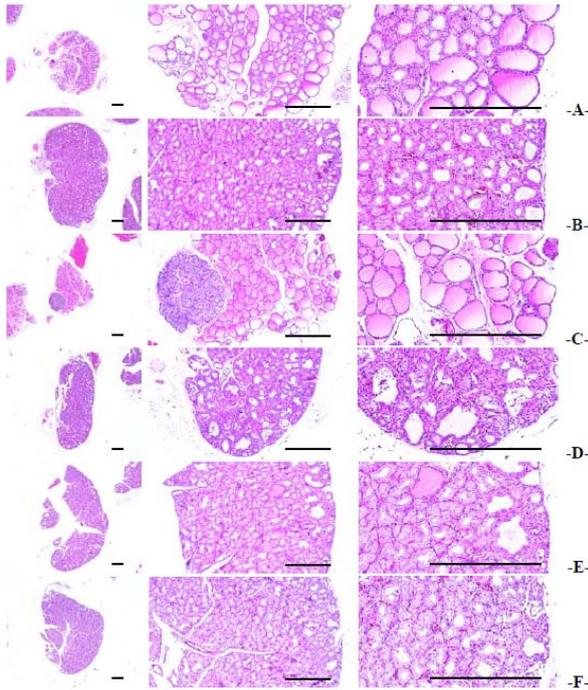


Fig. 5. Representative thyroid gland histological images, taken from intact or PTU-treated rats

Note that marked enlargement of the thyroid glands related to hyperplasia of follicular cells were demonstrated in PTU control rats at histopathological inspections with decreases of follicular colloid contents and mean diameters. However, these PTU-induced thyroid histopathological changes related to hypothyroidism were dramatically decreased by treatment of LT4, HSYYT extracts 500 and 250 mg/kg, but not in HSYYT 125 mg/kg treated rats.

A = Intact control, B = PTU control, C = LT4 0.5 mg/kg treated rats, D = HSYYT 500 mg/kg treated rats, E = HSYYT 250 mg/kg treated rats, F = HSYYT 125 mg/kg treated rats, HSYYT = *Hyangsayangyi-tangaqueous* extracts (Yield = 18.60%), PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil) LT4 = Levothyroxine. All H&E stain; Scale bars = 400 μ m

10. 고환의 조직병리학적 관찰

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 현저한 정세관 위축 및 정세관내 정자 형성이 현저히 억제되어, 정상 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 정세관 평균 직경 및 성숙 정자를 나타내는 stage I~II 정세관 비율의 감소가 나타났으나, PTU 투여에 의한 고환의 위축 및 정세관내 정자 형성 억제 소견이 500 및 250 mg/kg의 HSYYT 투여에 의해 현저히 억제되었다. 즉, HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 정세관 평균 직경 및 성숙 정자를 나타내는 stage I~II 정세관 비율의 증가를 투여 용량 의존적으로 나타내었다. 한편 LT4 투여군에서는 PTU 대조군에 비해서도 유의한 ($p < 0.05$) 평균 정세관 직경의 감소와 함께 유의한 ($p < 0.05$) stage I~II 정세관 비율의 감소를 각각 나타내었으며, HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 의미 있는 고환의 조직병리학적 변화는 나타나지 않았다 (Table 6, Fig 6).

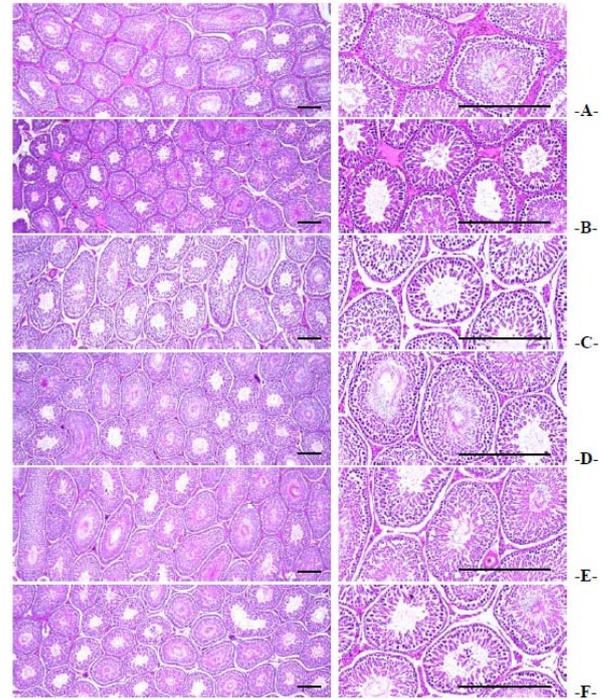


Fig. 6. Representative testis histological images, taken from intact or PTU-treated rats

Atrophic changes of seminiferous tubules and decreases of stage I ~II seminiferous tubules which have matured spermatid were detected in PTU control rats at histopathological inspections. However, these PTU-induced testis changes were dramatically and dose-dependently decreased by treatment of HSYYT 500 and 250 mg/kg, respectively. It also demonstrated that treatment of LT4 aggravated the PTU-induced testis histopathological atrophic changes, but HSYYT 125 mg/kg did not showed any favorable or harmful effects on the testis histopathological findings, in this our experiment.

A = Intact control, B = PTU control, C = LT4 0.5 mg/kg treated rats, D = HSYYT 500 mg/kg treated rats, E = HSYYT 250 mg/kg treated rats, F = HSYYT 125 mg/kg treated rats, HSYYT = *Hyangsayangyi-tangaqueous* extracts (Yield = 18.60%), PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil), LT4 = Levothyroxine. All H&E stain; Scale bars = 400 μ m

11. 부고환의 조직병리학적 관찰

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 현저한 부고환 두부의 위축과 도관내 정자수의 감소가 인정되어, 정상 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 부고환 두부의 평균 직경의 감소와 함께 정자 감소증을 나타내는 부고환 도관 비율의 증가가 나타났으나, 이러한 PTU 투여에 의한 부고환 위축 및 도관내 정자 감소 소견이 HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여에 의해 현저히 억제되었다. 즉, 500 및 250 mg/kg의 HSYYT 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 부고환 두부 평균 직경의 증가가 정자 감소증을 나타내는 부고환 도관 비율의 감소와 함께 나타났다. 한편 LT4 투여군에서는 PTU 대조군에 비해서도 유의한 ($p < 0.01$) 정자 감소증을 나타내는 부고환 도관 비율의 증가가 나타났으나, 부고환 두부의 평균 직경은 PTU 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 증가를 나타내었고, HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 의미 있는 부고환 두부의 평균 직경 및 정자 감소증을 나타내는 부고환 도관 비율의 변화는 나타나지 않았다 (Table 6, Fig 7).

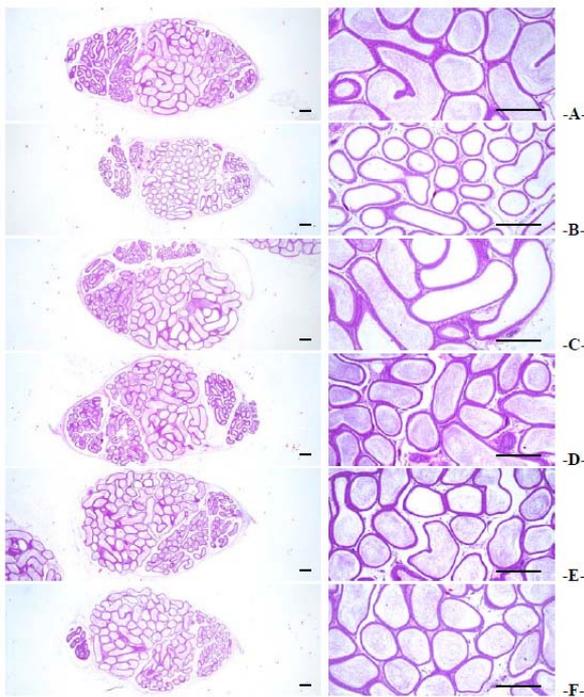


Fig. 7. Representative epididymis histological images, taken from intact or PTU-treated rats

Marked atrophic changes of epididymis head regions and increases of a/oligospermatogonia tubules were detected in PTU control rats at histopathological inspections. However, these PTU-induced epididymal changes were dramatically and dose-dependently inhibited by treatment of HSYYT 500 and 250 mg/kg, but not in HSYYT 125 mg/kg treated rats. Although treatment of LT4 inhibited the atrophic changes of epididymis heads, but aggravated PTU-induced a/oligospermatogonia in the epididymal tubules in the present study. A = Intact control, B = PTU control, C = LT4 0.5 mg/kg treated rats, D = HSYYT 500 mg/kg treated rats, E = HSYYT 250 mg/kg treated rats, F = HSYYT 125 mg/kg treated rats. HSYYT = *Hyangsayangyi-tangaqueous* extracts (Yield = 18.60%), PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil), LT4 = Levothyroxine. All H&E stain; Scale bars = 400 μ m

12. 전립샘의 조직병리학적 관찰

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 현저한 전립샘 도관의 위축이 인정되어, 정상 대조군에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 전립샘 도관 상피의 평균 두께의 감소와 함께 위축 소견을 나타내는 전립샘 도관 비율의 증가가 각각 나타났으나, 이러한 PTU 투여에 의한 전립샘 위축 소견이 500 및 250 mg/kg의 HSYYT 투여에 의해 현저히 억제되었다. 즉, 500 및 250 mg/kg의 HSYYT 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 유의한 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 전립샘 도관 상피의 평균 두께의 증가가 위축 도관 비율의 감소와 함께 나타났다. 한편 LT4 투여군에서는 PTU 대조군에 비해서도 유의한 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 전립샘 도관 상피의 평균 두께의 감소 및 위축 도관 비율의 증가가 각각 나타났고, HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 의미 있는 전립샘의 조직병리학적 변화는 나타나지 않았다 (Table 6, Fig 8).

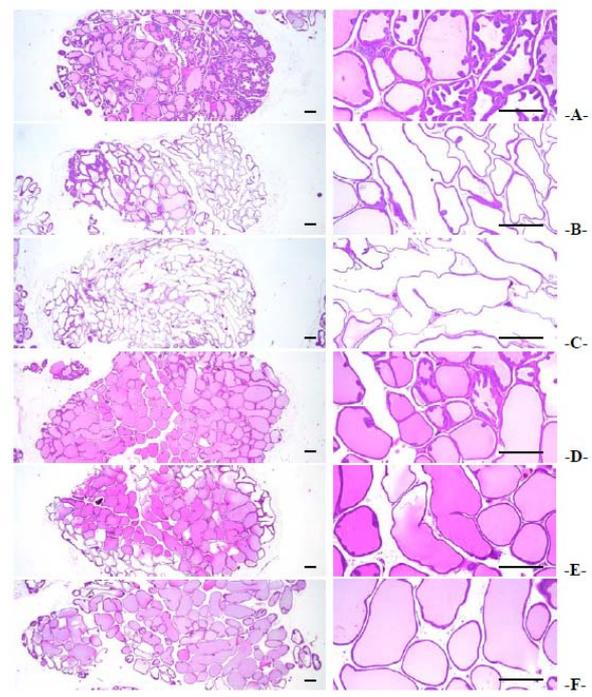


Fig. 8. Representative prostate histological images, taken from intact or PTU-treated rats

Note that marked atrophic changes of prostate tubules and related loss of luminal contents were detected in PTU control rats at histopathological inspections. However, these PTU-induced prostate tubular atrophic changes related to hypothyroidism were dramatically and dose-dependently inhibited by treatment of HSYYT 500 and 250 mg/kg, respectively. On the contrary, treatment of LT4 aggravated PTU-induced prostate tubular atrophic changes, and HSYYT 125 mg/kg did not showed any favorable effects on the prostate histopathological findings, in this our experiment.

A = Intact control, B = PTU control, C = LT4 0.5 mg/kg treated rats, D = HSYYT 500 mg/kg treated rats, E = HSYYT 250 mg/kg treated rats, F = HSYYT 125 mg/kg treated rats. HSYYT = *Hyangsayangyi-tang* aqueous extracts (Yield = 18.60%), PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil), LT4 = Levothyroxine. All H&E stain; Scale bars = 400 μ m

Table 6. Histomorphometry after LT4 and HSYYT treatment in PTU-treated rats

Groups	Controls		Reference
	Intact	PTU	LT4 0,5 mg/kg
<u>Thyroid gland</u>			
Total thickness (μ m)	1261,51 \pm 180,76	2386,57 \pm 307,98 ^a	1354,81 \pm 203,88 ^c
Follicle diameter (μ m)	120,29 \pm 21,92	40,86 \pm 11,16 ^a	95,58 \pm 21,32 ^{bc}
<u>Testis</u>			
SET diameter (μ m)	333,68 \pm 40,50	195,97 \pm 15,51 ^d	174,59 \pm 14,39 ^{df}
Stage I~II SET (%)	74,13 \pm 11,52	23,75 \pm 6,34 ^d	14,00 \pm 7,86 ^{df}
<u>Epididymis</u>			
Total diameter (μ m)	4077,06 \pm 458,94	3027,93 \pm 585,87 ^a	3738,79 \pm 399,30 ^c
AO tubules (%)	7,63 \pm 3,62	42,50 \pm 8,60 ^d	56,50 \pm 6,74 ^{bc}
<u>Prostate</u>			
Epithelial thickness (μ m)	49,74 \pm 10,43	14,27 \pm 2,17 ^d	8,91 \pm 2,41 ^{bc}
Atrophic tubules (%)	6,50 \pm 2,27	65,00 \pm 13,07 ^d	80,75 \pm 10,81 ^{df}

Groups	HSYYT treated		
	500 mg/kg	250 mg/kg	125 mg/kg
Thyroid gland			
Total thickness (µm)	1513.50±142.86 ^{bc}	1671.05±226.92 ^{bc}	2204.63±272.43 ^d
Follicle diameter (µm)	70.34±16.30 ^{bc}	64.70±14.41 ^{bc}	44.41±7.93 ^d
Testis			
SET diameter (µm)	276.18±23.93 ^{de}	239.17±17.52 ^{de}	207.86±11.66 ^d
Stage I~II SET (%)	52.25±7.78 ^{de}	40.38±3.96 ^{de}	25.25±6.54 ^d
Epididymis			
Total diameter (µm)	3822.93±323.99 ^f	3706.66±248.73 ^f	3208.48±224.39 ^f
AO tubules (%)	18.75±1.91 ^{de}	28.88±4.39 ^{de}	42.00±6.07 ^d
Prostate			
Epithelial thickness (µm)	35.11±3.35 ^{de}	20.61±1.65 ^{de}	15.14±2.54 ^d
Atrophic tubules (%)	43.75±11.00 ^{de}	51.50±6.82 ^{de}	61.88±9.76 ^d

Values are expressed mean ± S.D. of eight rats
 HSYYT = *Hyangsayangyi-tang* aqueous extracts (Yield = 18.60%),
 PTU = Propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracil), LT4 = Levothyroxine,
 SET = Seminiferous tubule, AO = Aspermatogonia/Oligospermatogonia.
^a p<0.01 and ^b p<0.05 as compared with intact control by LSD test
^c p<0.01 as compared with PTU control by LSD test
^d p<0.01 as compared with intact control by MW test
^e p<0.01 and ^f p<0.05 as compared with PTU control by MW test

고찰

갑상샘 호르몬의 절대적 결핍으로 생기는 병증을 통칭하는 갑상샘기능저하증은 주로 갑상샘 조직 자체가 소실되어 호르몬의 생합성이 불가능한 경우, 상위 조절 중추인 시상하부 또는 뇌하수체 기능 이상으로 갑상샘 자극원이 사라진 경우에 발생하며, 여성에서 호발 된다²⁶⁾. 본 질환은 지연형 질환으로 인식이 어렵고 증상의 발현 정도는 원인에 상관없이 갑상샘 호르몬의 결핍 정도에 따라 결정되며, 임상증상은 질병의 진행 정도에 따라 매우 다양하나 피로 및 쇠약감, 추위에 민감, 체중 증가, 무기력, 무력감, 기억력 감퇴, 식욕감퇴, 근육통, 관절통 및 발한감소가 전형적으로 관찰되는 것으로 알려져 있다²⁷⁾.

본 연구에서는 부작용이 적고 유효한 항산화 효과를 나타내는 천연물 유래의 갑상샘기능저하증 치료제의 개발을 위해 항산화와 소화기계에 유효한 효과가 있는 것으로 보고^{14,15)}된 香砂養胃湯의 경구 투여가 PTU로 유발된 rat 갑상샘기능저하증 및 관련 생식기 손상에 미치는 영향을 평가하기 위하여 500, 250 및 125 mg/kg의 HSYYT를 PTU 처리 시작 2주 전부터 6주간 투여하고 체중, 갑상샘, 전립샘, 부고환 및 고환 중량, 혈중 갑상샘 및 성 호르몬 함량, 고환 항산화 방어 system의 변화를 갑상샘, 고환, 전립샘 및 부고환의 조직병리학적 변화와 함께 관찰하여, 갑상샘기능저하증 치료제로 사용되고 있는 LT4 0.5 mg/kg 복강 투여군^{11,12)}과 비교하였다. 그 결과 28일간의 연속적인 PTU 10 mg/kg의 피하 투여에 의해 현저한 체중 감소, 갑상샘 중량의 증가, 고환, 전립샘 및 부고환 중량의 감소, 혈청 중 T3, T4 함량의 감소와 TSH 함량의 증가, 혈청 중 testosterone 및 DHT 함량의 감소와 FSH 함량의 증가, 고환의 항산화 방어 system의 장애가 나타났으며, 조직병리학적으로 현저한 갑상샘 여포세포의 증생에 의한 비대 소견, 부고환 위축과 정자 감소증을 나타내는 부고환 도관의 수적 증가, 고환 정세관의 위축 및 성숙 정자를 함유한 stage I~II 정세관 비율의 감소, 전립샘 도관의

현저한 위축이 나타났으나, HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여에 의해 투여 용량 의존적으로 PTU 유발 갑상샘기능저하증 소견이 억제되었으며, 관련 고환 항산화 방어 system의 변화 역시 500 및 250 mg/kg의 HSYYT 투여에 의해 매우 효과적으로 조절되는 것으로 관찰되었다. 반면 PTU 대조군과 비교하여 HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 갑상샘기능저하증 및 관련 생식기 손상에 대한 의미 있는 효과는 나타나지 않았다. 한편 LT4 투여에 의해 갑상샘기능저하증은 현저히 억제 되었으나 고환, 전립샘 및 부고환, 즉 생식기의 손상은 더욱 악화되는 것으로 관찰되었고, 특히 고환내 항산화 방어 system의 현저한 악화가 나타났다.

일반적으로 갑상샘기능저하증시 부족한 갑상샘 호르몬의 분비에 의해 대사가 지연되고 이화작용이 감소하여 조직 내 당단백질이 침착하므로 체중의 증가가 일어나는 것으로 알려져 있으나²⁸⁾, 갑상샘기능저하증에 따른 체중의 증가를 보상하기 위해 leptin의 분비가 증가되어 결과적으로 식욕 저하와 에너지 대사를 증가로 체중의 감소가 유발될 수도 있으며²⁹⁾, 또한 실험동물에서 10 mg/kg 이상의 PTU 투여 자체가 현저한 체중의 감소를 유발시키는 것으로 알려져 있어¹⁶⁾ PTU로 갑상샘 기능저하증을 유발 시킨 rat에서는 현저한 체중의 감소가 유발되는 것으로 알려져 있다^{11,12,30)}. 본 실험 결과에서도 PTU 대조군에서는 유의한 체중의 감소가 PTU 투여 2주 후부터 나타나기 시작하였다. 한편 이러한 PTU 유발 체중의 감소가 LT4 및 HSYYT 500 및 250 mg/kg투여에 의해 현저히 억제되었으나, 125 mg/kg의 HSYYT 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 유의한 체중의 변화는 실험 전 기간 동안 나타나지 않았다. 따라서 250 mg/kg 이상의 HSYYT은 PTU 투여 갑상샘기능저하증시 유발되는 체중의 감소를 매우 효과적으로 억제하는 것으로 판단된다.

PTU는 대표적인 갑상샘 억제제로서 iodine과 tyrosine의 결합을 억제하는 작용을 하여 TSH의 증가와 함께 T3 및 T4의 절대적 감소를 유발하여, 비활동성 갑상샘 종대 (simple goiter)유발 하고^{5,16)}, 조직 병리학적으로 현저한 갑상샘 여포세포의 증생에 의한 비대 소견과 여포 직경 및 여포내 colloid 물질의 감소를 특징적으로 나타낸다^{11,12,31)}. 본 실험의 결과에서도 현저한 갑상샘 중량의 증가와 함께 갑상샘 여포세포의 증생에 의한 비대, 여포 직경 및 여포내 colloid 물질의 감소 등의 조직 병리학적 변화, 즉 전형적인 비활동성 갑상샘 종대 소견이 PTU 대조군에서 나타났다. 한편 이러한 갑상샘 중량 및 비활동성 갑상샘 종대의 조직병리학적 변화가 HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여에 의해 투여 용량 의존적으로 억제되었으나, 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군과 비교하여 의미 있는 갑상샘 중량 및 조직병리학적 변화는 나타나지 않았다. 따라서 250 mg/kg 이상의 HSYYT는 PTU에 의한 갑상샘의 변화를 직접적으로 억제하는 것으로 판단된다.

갑상샘의 기능 검사로 혈청 중 TSH, T3 및 T4의 함량 변화를 주로 이용하며³²⁾, 현재 TSH의 증가, T4의 감소, T3 정상 또는 감소를 갑상샘기능저하증으로 진단한다³³⁾. 본 실험의 결과에서도 PTU 투여군에서 현저한 TSH의 증가와 함께 T3 및 T4의 절대적 감소가 초래되었다. 한편 LT4 투여에 의해 TSH의 함량 감소와 T4 함량의 증가가 나타났으나 T3 함량에는 별 다른 영향을 미치지 않았으며, HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군과 비교하여 의미 있는 혈청 중 갑상

샘 호르몬 함량의 변화는 나타나지 않은 반면, HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여군에서는 투여 용량 의존적인 TSH 함량의 감소와 T₄ 함량의 증가가 각각 나타났으며, T₃ 함량 역시 유의하게 증가 되었다. 따라서 250 mg/kg 이상의 HSYYT는 LT4와는 달리 단순히 감소된 T₄ 함량의 보충뿐만 아니라, 본 실험에서 인정된 항산화 방어 시스템의 활성을 통해 갑상샘 여포세포의 변화를 억제하여 갑상샘기능저하증에 매우 유효한 효과를 나타내는 것으로 판단되나, 정확한 기전은 앞으로 다방면의 다양한 기전 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

고환은 생리학적으로 생식호르몬의 합성 (steroidogenesis)과 정자의 생성 (spermatogenesis)과 같은 2 가지의 중요한 고에너지 요구성 활동을 수행하고 있으며, 다른 장기에 비해 polyunsaturated fatty acids의 함량이 높고 항산화 방어 system이 약해³⁴⁾ 흡연, polychlorinated biphenyls, hydrocarbons³⁵⁾ 및 ethanol³⁶⁾과 같은 과산화 인자에 특히 약한 것으로 알려져 있다. 또한 고환의 산화적 stress가 현재 남성 불임의 중요한 인자로 알려져 있으며³⁷⁾, 갑상샘의 상태에 의해 정자의 수적 변화가 초래되는 것으로 알려져 있다³⁸⁾. 따라서 신체의 갑상샘 호르몬 함량과 남성 불임은 특히 밀접한 관련이 있으며, 주로 고환 내 항산화 방어 system의 변화가 이에 관여하는 것으로 알려져 있다³⁹⁾. 고환 역시 갑상샘 호르몬에 의해 영향을 받는 대표적인 장기로 알려져 있으며, 갑상샘기능저하증시 현저한 위축과 함께 남성 호르몬인 testosterone 및 DHT의 감소와 FSH의 함량 증가가 수반된다^{7,8)}. 한편 정세관 상피는 정자발생 과정에 따라 6단계로 구분하며, stage I~II 정세관에서는 성숙한 정자가 관내강내에 존재하는 것으로 알려져 있어^{40,41)}, 본 연구에서는 정자 형성의 변화 유무를 관찰하기 위해, 정세관 관강내 성숙한 정자를 함유한 stage I~II 정세관의 비율을 측정하였다. 본 실험의 결과, 이전의 연구^{6,7,8)}에서와 유사하게 PTU 투여에 의해 고환, 부고환 및 전립샘 중량 감소, 남성 호르몬의 함량 감소와 함께 부고환 위축과 정자 감소증을 나타내는 부고환 도관의 수적 증가, 고환 정세관의 위축 및 성숙 정자를 함유한 stage I~II 정세관 비율의 감소, 전립샘 도관의 현저한 위축이 조직병리학적으로 나타났다. 한편 HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 의미 있는 갑상샘기능저하증과 관련된 생식기 장애 개선 효과가 나타나지 않았으나, PTU 유발 생식기 장애가 HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여에 의해 현저히 억제 되었으며, 특히 고환내 항산화 방어 system 변화, 고환내 SOD 및 CAT 활성 감소에 의한 H₂O₂ 함량의 증가를 현저히 억제 하였으므로 250 mg/kg 이상의 HSYYT는 고환내 항산화 효과에 의해 PTU 유발 갑상샘기능저하증시 초래되는 생식기 장애를 억제하는 것으로 판단된다. 한편 이전의 보고⁸⁾와 유사하게 LT4 투여군에서는 항산화 방어 system의 악화에 의한 생식기 장애의 악화가 나타났다.

이상에서 500 및 250 mg/kg의 HSYYT의 경구투여는 PTU 유발 갑상샘기능저하증시 초래되는 체중의 감소, 갑상샘 중량, 갑상샘 및 성 호르몬의 감소, 생식기 손상을 투여 용량 의존적으로 억제하였고, PTU 유발 갑상샘기능저하증시 초래되는 고환 항산화 방어 system의 변화 역시 투여 용량 의존적으로 억제하였으므로, 항산화 방어 system의 조절을 통해 갑상샘기능저하증 및 관련 생식기 손상에 매우 유효한 효과를 나타낼 것으로 기대되나, 금후 명확한 기전 연구가 수행되어

야 할 것으로 판단된다. 한편 HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 의미 있는 갑상샘기능저하증 및 관련 생식기 장애에 대한 개선 효과가 나타나지 않았고, LT4 투여에 의해 갑상샘기능 저하증은 현저히 억제 되었으나, 고환, 전립샘 및 부고환, 즉 생식기의 손상은 더욱 악화되는 것으로 관찰되었고, 특히 고환내 항산화 방어 system의 현저한 악화가 나타났다.

결론

香砂養胃湯의 경구 투여가 Propylthiouracil (PTU)로 유발된 rat 갑상샘기능저하증 및 관련 생식기 손상에 미치는 영향을 평가하기 위하여 500, 250 및 125 mg/kg의 香砂養胃湯물 추출물 (HSYYT)을 PTU 처리 시작 2주전부터 6주간 투여하고 체중, 갑상샘, 전립샘, 부고환 및 고환 중량, 혈중 갑상샘 호르몬 (TSH, T₃ 및 T₄) 함량, 혈중 성 호르몬 함량, 고환 항산화 방어 system의 변화를 갑상샘, 고환, 전립샘 및 부고환의 조직병리학적 변화와 함께 관찰하고, 갑상샘기능저하증 치료제로 사용되고 있는 LT4를 0.5 mg/kg 복강 투여한 군과 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PTU 투여군에서는 현저한 체중 감소, 갑상샘 중량의 증가, 고환, 전립샘 및 부고환 중량의 감소, 혈청 중 T₃, T₄ 함량의 감소와 TSH 함량의 증가, 혈청 중 testosterone 및 DHT 함량의 감소와 FSH 함량의 증가, 고환의 항산화 방어 system의 장애 (H₂O₂ 함량의 증가, SOD 및 CAT 활성 감소)가 나타났으며, 조직병리학적으로 현저한 갑상샘 여포세포의 증생에 의한 비대 소견, 부고환 위축과 정자 감소증을 나타내는 부고환 도관의 수적 증가, 고환 정세관의 위축 및 성숙 정자를 함유한 stage I~II 정세관 비율의 감소, 전립샘 도관의 현저한 위축이 나타났다.
2. HSYYT 500 및 250 mg/kg 투여군에서는 투여 용량의 의존적으로 PTU 유발 갑상샘기능저하증 소견 (체중 감소, 갑상샘 중량의 증가, 혈청 중 T₃, T₄ 함량의 감소와 TSH 함량의 증가, 혈청 중 testosterone 및 DHT 함량의 감소와 FSH 함량의 증가, 갑상샘 여포세포의 증생에 의한 비대 소견) 및 PTU 유발 생식기 장애 (고환, 전립샘 및 부고환 중량의 감소, 고환의 항산화 방어 system의 장애, 부고환 위축, 부고환 도관의 수적 증가, 고환 정세관의 위축, stage I~II 정세관 비율의 감소, 전립샘 도관의 현저한 위축)가 억제되었다.
3. HSYYT 125 mg/kg 투여군에서는 PTU 대조군과 비교하여 갑상샘기능저하증 및 관련 생식기 손상에 대한 유의한 변화는 나타나지 않았다.
4. LT4 투여군에서는 PTU 유발 갑상샘기능저하증은 현저히 억제 되었으나 고환, 전립샘 및 부고환, 즉 생식기의 손상은 더욱 악화되었고, 특히 고환내 항산화 방어 system의 현저한 악화가 나타났다.

이상의 결과로 보아 500 및 250 mg/kg의 HSYYT는 항산화 방어 system의 조절을 통해 갑상샘기능저하증 및 관련

생식기 손상에 유효한 치료효과가 있을 것으로 보여지며, 앞으로 이에 대한 명확한 기전 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

References

- Zo BY. Clinical Thyroidology. 2nd ed. Seoul : Korea Medical Book Publisher, 2001 : 409-41.
- Kim UK. Incretion · Reproduction. Seoul : Logic of Life, 1994 : 60-9.
- Ahn SY. Thyroid Clinic. Seoul : Seoungbosa, 2004 : 132-54, 248.
- Wiersinga WM. Thyroid hormone replacement therapy. Horm Res, 2001 ; 56 : 74-81.
- Subudhi U, Das K, Paital B, Bhanja S, Chainy GB. Supplementation of curcumin and vitamin E enhances oxidative stress, but restores hepatic histoarchitecture in hypothyroid rats. Life Sci, 2009 ; 84 : 372-9.
- Choudhury S, Chainy GB, Mishro MM. Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis. Andrologia, 2003 ; 35 : 131-40.
- Sahoo DK, Roy A, Bhanja S, Chainy GB. Hypothyroidism impairs antioxidant defence system and testicular physiology during development and maturation. Gen Comp Endocrinol, 2008 ; 156 : 63-70.
- Sahoo DK, Roy A, Chainy GB. Protective effects of vitamin E and curcumin on L-thyroxine-induced rat testicular oxidative stress. Chem Biol Interact, 2008 ; 176 : 121-8.
- Sarandöl E, Taş S, Dirican M, Serdar Z. Oxidative stress and serum paraoxonase activity in experimental hypothyroidism: effect of vitamin E supplementation. Cell Biochem Funct, 2005 ; 23 : 1-8.
- Bhanja S, Chainy GB. PTU-induced hypothyroidism modulates antioxidant defense status in the developing cerebellum. Int J Dev Neurosci, 2010 ; 28 : 251-62.
- Ku SK, Lee YJ. Effects of Lonicerae Flos on the 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU)-induced rat hypothyroidism. Korean J Orient Physiol Pathol, 2010 ; 24 : 630-7.
- Kim SM, Ku SK, Cho SY, Park SJ. Effects of Bupleuri Radix on the rat hypothyroidism induced by PTU (6-n-propyl-2-thiouracil). Korean J Orient Physiol Pathol, 2012 ; 26 : 714-23.
- Lee JM. Donguisusebowon (東醫壽世保元). Seoul : Eulyoo Publishing Co, 2002 : 27-278.
- Choi BC, Ahn TW. Anti-oxidant Effect of Hyangsayangyi-tang Decoction in Stomach, Spleen and Pancreas Cell of SD Rats. J Sasang Constitutional Med, 2008 ; 20 : 72-84.
- Hong ND, Chang IK, Kim NY, Lee IS. Studies on the Efficacy of Combined Preparations of Crude Drug(XXXIX). -Effect of Hyangsayangwee-Tang on the Stomach and Intestinal Disorder-. Korean J Pharmacogn, 1989 ; 20 : 188-95.
- O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS. Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyroid modulators. Toxicol Sci, 2002 ; 69 : 79-91.
- Kavutcu M, Canbolat O, Oztürk S, Olcay E, Ulutepe S, Ekinci C, Gökhan IH, Durak I. Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissues from gentamicin-treated guinea pigs: effects of vitamins E and C. Nephron, 1996 ; 72 : 269-74.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951 ; 193 : 265-75.
- Jamall IS, Smith JC. Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxidase dismutase and lipid peroxidation in the rat heart: a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol, 1985 ; 80 : 33-42.
- Pick E, Keisari Y. Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages--induction by multiple nonphagocytic stimuli. Cell Immunol, 1981 ; 59 : 301-18.
- Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU (Ed.), Methods in Enzymatic Analysis. New York : Academic Press Inc, 1974 : 673-86.
- Nishikimi M, Rao NA, Yagi K The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced PMS and molecular oxygen. Biochem Biophys Res Comm, 1972 ; 46 : 849-54.
- Kakkar P, Das B, Viswanathan PN. Modified spectrophotometric assay of SOD. Indian J Biochem Biophys, 1984 ; 2 : 130-2.
- Levene A. Pathological factors influencing excision of tumours in the head and neck. Part I. Clin Otolary. 1981 ; 6 : 145-51.
- Ludbrook J. Update: microcomputer statistics packages. A personal view. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1997 ; 24 : 294-6.
- Doo HK. Oriental Medicine of Nephrology. Seoul : The Academy of oriental Medicine, 1993 : 729, 867-74, 1042, 1059-65.
- Schmidt RF, Thews G. Human Physiology. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 1989 : 385-6.
- Roti E, Minelli R, Gardini E, Braverman LE. The use and misuse of thyroid hormone. Endocr Rev.

- 1993 ; 14 : 401–24.
29. Kim MS, Yun CA, Zo YM, Jung HS, Sin CS, Park KS, Kim SY, Zo BY, Lee HK. Changes in Plasma Leptin Levels Relating to Short-Term Thyroid Manipulation in Rats. *J Korean Soc Endocrinol*, 2002 ; 17 : 197–205.
 30. Axelstad M, Hansen PR, Boberg J, Bonnichsen M, Nellemann C, Lund SP, Hougaard KS, Hass U. Developmental neurotoxicity of propylthiouracil (PTU) in rats: relationship between transient hypothyroxinemia during development and long-lasting behavioural and functional changes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008 ; 232 : 1–13.
 31. Oner J, Kükner A, Oner H, Ozan E, Yekeler H. Effect of vitamin E on follicular cell proliferation and expression of apoptosis-associated factors in rats with 6-N-propyl-2-thiouracil-induced goitrogenesis. *Folia Histochem Cytobiol*, 2003 ; 41 : 213–7.
 32. Devdhar M, Ousman YH, Burman KD. Hypothyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2007 ; 36 : 595–615.
 33. Andreoli TE, Carpenter CJ, Plum F, Smith L. Cecil Essentials of Medicine. Philadelphia : WB Saunder' s Company, 1986 : 436–7.
 34. Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J Androl*, 1992 ; 13 : 450–5.
 35. Peltola V, Mantyla E, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the rat testis after cigarette smoke inhalation or administration of polychlorinated biphenyls or polychlorinated naphthalenes. *J Androl*, 1994 ; 15 : 353–61.
 36. Schlorff EC, Husain K, Somani SM. Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol*, 1999 ; 18 : 203–14.
 37. Sanocka D, Miesel R, Jedrzejczak P, Kurpisz MK. Oxidative stress and male infertility. *J Androl*, 1996 ; 17 : 449–54.
 38. Jannini E, Ulisse S, D' Armiento M. Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocr Rev*, 1995 ; 16 : 443–59.
 39. Mutvei A, Nelson BD. The response of individual polypeptides of the mammalian respiratory chain to thyroid hormone. *Arch Biochem Biophys*, 1989 ; 268 : 215–20.
 40. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*, 1963 ; 112 : 35–51.
 41. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 3rd ed. Philadelphia : Saunders-Elsevier, 2007 : 489–510.