香砂養胃湯이 PTU로 유발된 Rat의 갑상선기능저하와 간손상에 미치는 영향

주정현 · 최홍식 · 김승모*

대구한의대학교 한의과대학 간계내과학교실

Effects of Hyangsayangyi-tang Aqueous Extracts on the Hypothyroidism Related Hepatic Damages induced by PTU in Rats

Jeong-Hyun Joo, Hong-Sik Choi, Seung-Mo Kim*

Department of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

To evaluate the benefits of Hyangsayangyi-tang aqueous extracts (HSYYT) on the propylthiouracil (PTU)-induced Rat hypothyroidism. 6 groups, each consisting 8 Rats were used in the present study - Intact vehicle control, PTU control, LT_4, HSYYT 500, 250 and 125 ㎎/㎏ treated groups. HSYYT was given, once day for 42 days from 2 weeks before start of PTU treatment as an oral dose of 500, 250 and 125 ㎎/㎏(body weight), and for 28 days while the PTU 10 ㎎/㎏ by daily subcutaneous treatment induced hypothyroidism. Compared the results with LT_4 0.5 ㎎/㎏ intraperitoneally treated rats in this experiment. Results of the PTU treatment included; decreases of body weight, increase in thyroid weight, decrease in liver weight, in serum T_3, and T_4 level decrease with increase of serum TSH levels, in serum HDL increase and in TG content decrease, decrease in liver antioxidants defense system, increase of serum AST levels were observed. However, these PTU induced hypothyroidism and related hepatic damages were dose-dependently inhibited by treatment of HSYYT 500 and 250 ㎎/㎏, and they also effectively regulated the PTU-induced abnormal antioxidant defense system changes in liver. Therefore, in comparison with the PTU control group, it was effective and advantageous changes were not observed in HSYYT 125 ㎎/㎏ treated rats on the PTU induced hypothyroidism and related hepatic damages. In this experiment, HSYYT 500 and 250 ㎎/㎏ dose-dependently inhibited PTU-induced hypothyroidism and related liver damage in rats but not in HSYYT 125 ㎎/㎏.

keywords : Hyangsayangyi-tang, Hypothyroidism, Hepatic damage

서 론

갑상선기능저하증이란 흔한 내분비 질환 중 하나로 갑상선이나 시상하부, 뇌하수체의 기능 이상 및 갑상선호르몬의 생성과 합성의 중간단계 장애로 인한 말초조직의 갑상선호르몬이 부족한 대사상태를 의미하며, 피로, 부종, 무기력, 체중증가, 피부건조증과 발한감소 등의 증상이 타나타고 증상의 경도는 신체의 갑상선호르몬 양에 따라 결정된다[1,2].

갑상선기능저하증의 치료는 부족한 갑상선호르몬을 외부에서 공급하여 보충해주는 것으로, 일생동안 약물을 복용해야 하는 문제점을 갖고 있으며, 주로 사용되는 약물인 Levothyroxine(LT_4)는 급성 심근경색이나 불안정성 협심증 등 허혈성 심질환의 위험성, 갑상선호르몬 요구량의 변화, LT_4를 보충해도 증상의 호전이 없는 등 여러 가지 문제점을 유발한다[1,3,4].

근래에 들어서는 갑상선기능저하증시에도 신체의 항산화 방어 system의 변화가 초래되는 것으로 알려져 있다[5,6]. 간 역시 갑상선호르몬에 의해 영향을 받는 대표적인 장기로 알려져 있으며, 미세조직학적 변화와 함께 혈중 Asparte Aminotransferase(AST)의 증가가 초래된다[7,8]. 이러한 갑상선기능저하증 소견이 항산화제의 투여에 의해 현저히 감소되는 것으로 알려져 있어[5,9], 최근에는 부작용이 적고 강력한 항산화 효과를 나타내는 천연물 유래의 갑상선기능저하증 치료제의 개발이 주목받고 있다[10-14].

현재까지 香砂養胃湯 자체의 항산화[15] 및 소화기계에 대한 유효한 효과[16]와 갑상선기능이상과 웅성 생식에 대한 효과[14]는 실험적으로 알려져 있으나, 갑상선기능이상 및 관련 간손상에 대한 효과는 아직 알려져 있지 않다.

* Corresponding author

Seung-Mo Kim, Daegu Oriental Hospital of Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, Korea

·E-mail : heuwon@hanmail.net ·Tel : +82-53-770-2102

·Received : 2015/07/20 ·Revised : 2015/10/13 ·Accepted : 2015/10/17

ⓒ The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.10.29.5.394

Available online at http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm

본 연구에서는 香砂養胃湯의 경구 투여가 PTU로 유발된 Rat 갑상선기능저하증 및 관련 간손상에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 500, 250 및 125 ㎎/㎏의 香砂養胃湯 물 추출물(HSYYT)을 투여하여 유효한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험약물

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 아래와 같다(Table 1). 선정된 약제 10첩 분량(총량 520.00 g)을 취하여 정제수 6L로 가열 추출한 후(60℃, 3시간, 3번) 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 사용하였다. 준비한 HSYYT은 -20℃로 냉동 보관 후 실험에 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 용매인 증류수에 100 ㎎/㎖의 농도까지 비교적 잘 용해되었다. 대조약물로 사용한 백색 분말의 LT_4(Sigma, St. Louise, MO, USA) 역시 -20℃의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 용매인 멸균 생리식염수에 0.25 ㎎/㎖의 농도까지 비교적 잘 용해되었다.

Table 1. Composition of Hyangsayangyi-tang Used in This Study

Korean Name	Herbs	Scientific Names	Amounts (g)
人蔘	Ginseng Radix	*Panax ginseng* C. A. Meyer	4.00
白朮	Atractylodes rhizome white	*Atractylodes macrocephala* Koidzumi	4.00
白芍藥	Paeoniae Radix	*Paeonia lactiflora* Pallas	4.00
炙甘草	Glycyrrhizae Radix Preparata	*Glycyrrhiza uralensis* Fischer	4.00
半夏	Pinelliae Rhizoma	*Pinellia ternata* (Thunb.) Breitenbach	4.00
香附子	Cyperi Rhizoma	*Cyperus rotundus* L	4.00
陣皮	Citri Unshii Pericarpium	*Citrus unshiu* Markovich	4.00
乾薑	Zingiberis Rhizoma Siccus	*Zingiber officinale* Roscoe	4.00
山査肉	Crataegi Fructus	*Crataegus pinnatifida* Bunge	4.00
砂仁	Amomi Semen	*Amomum villosum* Lour	4.00
白豆蔻	Amomi Cardamomi Fructus	*Amomum cadamomum* L	4.00
生薑	Zingiberis Radix	*Zingiber officinale* Roscoe	4.00
大棗	Zizyphi Fructus	*Zizyphus jujuba var. inermis* (Bunge) Rehder	4.00
	Total	13 types	52.00

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

2) 실험동물 및 사양관리

총 132 마리의 수컷 SPF.VAF Outbred Crl:CD [Sprague-Dawley] Rat(6-wk old upon receipt, OrientBio, Seungnam, Korea)을 15일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도(20-25℃)와 습도(40-45%)가 조절된 사육실에서 polycarbonate 사육상자에 4마리씩 수용하여 사육하였고, 명암주기(light:dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료(Samyang, Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였다. 순화과정 후 체중(Average: 287.10±15.01 g; ranged in 265.00~322.00 g)이 일정한 실험동물을 선별하여 군당 8마리씩 총 6개 군으로 구분하여 실험에 사용하였다. 모든 실험동물은 HSYYT 또는 용매 투여 시작일 및 최종 부검일 18시간 전 각각 절식을 실시하였으며(이 기간에도 음수는 자유롭게 공급하였다), picric acid로 개체를 식별하였다. 본 동물실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회(IACUC)의 사전 승인을 받아 수행하였다(승인번호: DHU2013-067).

2. 방법

1) 실험군 분리 및 약물의 투여

실험동물은 군당 8마리씩 6그룹 - 정상 대조군, PTU 대조군, LT_4 투여군 및 세 가지 용량(500, 250 및 125 ㎎/㎏)의 HSYYT 투여군-으로 구분하여 실험을 실시하였다. 500, 250 또는 125 ㎎의 HSYYT을 각각 10 ㎖의 멸균 증류수에 용해시켜, ㎏당 5 ㎖/㎏의 용량으로 존데(zonde)가 부착된 5ml 주사기를 이용하여 매일 1회씩 PTU 투여 시작 2주 전부터 42일 동안 강제 경구 투여하였다. 2.5 ㎎의 LT_4를 10 ㎖의 생리 식염수에 용해시켜 ㎏당 2 ㎖의 용량으로 PTU 투여 시작일로부터 28일간 매일 복강 주사하였다. 정상 및 PTU 대조군에서는 동일한 용량의 멸균 증류수를 HSYYT 투여군과 동일한 기간 동안 경구 투여하였다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Experimental Groups

Group	Treatment
Intact control group	Saline treated instead of PTU and distilled water orally administered instead of the drug
PTU control group	PTU subcutaneously treated and distilled water orally administered instead of the drug
LT_4 treated group	PTU subcutaneously treated and LT_4 0.5 ㎎/㎏ intraperitoneally administered
HSYYT 500 ㎎/㎏ treated groups	PTU subcutaneously treated and HSYYT 500 ㎎/㎏ orally administered
HSYYT 250 ㎎/㎏ treated groups	PTU subcutaneously treated and HSYYT 250 ㎎/㎏ orally administered
HSYYT 125 ㎎/㎏ treated groups	PTU subcutaneously treated and HSYYT 125 ㎎/㎏ orally administered

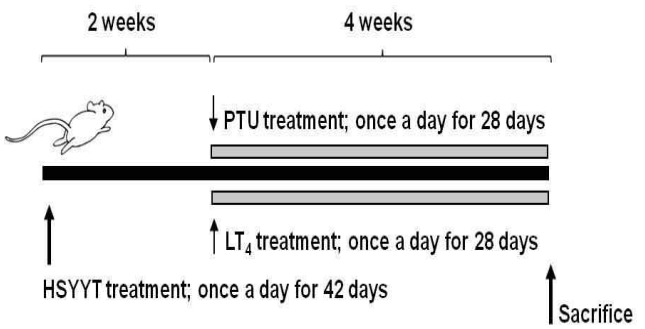


Fig. 1. Experimental Designs Used in This Study.

2) 갑상선기능저하증의 유발

50 ㎎의 PTU(Sigma, St. Louise, MO, USA)를 10 ㎖ 생리식염수에 용해시켜 ㎏당 2 ㎖의 용량으로 매일 1회씩, 28일간 매일 등쪽 경부 피하에 주사하여 갑상선기능저하증을 유발하였다. 정상 대조군에서는 PTU 대신 동일한 용량의 생리 식염수만 동일한 기간 동안 같은 방법으로 투여하였다(Fig. 1).

3) 체중 측정

모든 실험동물의 체중을 HSYYT 투여 시작 1일 전, 투여 시작일, 투여 7, 14(PTU 및 LT_4 투여 시작일), 21, 28, 35, 41 및 42(최종 희생일)일 후에 automatic electronic balance(Precisa Instrument, Zürich, Switzland)를 이용하여 각각 측정하였으며, 사료섭취에 따른 체중 변화를 최소화하기 위해 HSYYT 투여시작일 및 최종 희생일에 모든 실험동물은 18시간 정도 절식을 실시하였고, 실험 시작시의 개체 차이에 의한 체중 변화를 최소화하기 위해 2주간의 HSYYT 전 투여기간, 4주간의 PTU 투여기간 및 6주간의 실험 전 기간 동안의 체중 변화량인 증체량(body weight gains)을 각각 측정하였다.

4) 장기 중량의 측정

최종 희생일에 모든 실험동물의 간과 좌측 갑상선을 적출·분리한 다음 중량을 측정하여 절대중량(absolute wet-weight)으로 하였으며, 체중의 변화에 수반된 이차적 변화를 최소화하기 위해 체중에 대한 절대중량의 비율인 상대중량((Absolute organ weights/ Body weights at sacrifice) × 100)을 각각 산출하였다.

5) 채혈 및 혈청의 분리

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

6) 혈청 중 호르몬 함량의 측정

혈청 중 TSH, T_3 및 T_4 함량을 각각 Coat A count Total TSH, T_3 및 T_4 kit(DPC, Danville, CA, USA)를 사용하여 Gamma count Cobra II(Packard Co., Downers Grove, IL, USA)로 ng/㎖ 또는 ㎍/㎖ 단위로 각각 측정하였다.

7) 혈청 중 지질 함량의 측정

자동혈액분석장치(Toshiba 200FR, Toshiba, Tokyo, Japan)를 이용하여 혈청 중 Total Cholesterol, HDL, LDL 및 Triglyceride를 각각 ㎎/㎗ 단위로 측정하였다.

8) 항산화 방어 system의 측정

적출한 간의 일부 조직을 얼음으로 냉각(ice-cold)한 0.01M Tris-HCl(pH 7.4)을 이용하여 homogenize한 다음, 800 × g으로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하고, 다시 12,000 × g 으로 15분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 준비하였다. 단백질 함량은 bovine serum albumin을 standard로 이용하여 측정하였으며, 지질 과산화 정도(Lipid Peroxidation)는 2-thiobarbituric acid를 이용하여 흡광도 525 ㎚에서 측정하여 malondialdehyde(MDA) nM/㎎ protein 단위로 측정하였다. H_2O_2 함량은 horseradish peroxidase(Sigma, St. Louise, MO, USA)와 phenol red(Wako, Osaka, Japan)를 이용하여 nM/㎎ protein 단위로 spectrophotometry로 측정하였으며, H_2O_2 분해능을 이용하여 catalase 함량을 흡광도 240 nm에서 측정하였다. pH 7.0 온도 25℃하에서 1 ㎛㏖의 H_2O_2를 분해하는데 필요한 catalase를 1 unit(U)로 정의하여 U/mg protein의 단위로 catalase의 활성을 평가하였고, SOD 활성은 nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)-phenazine methosulphate-nitroblue-tetrazolium 억제 반응을 변형시킨 Kakkar 등[17]을 이용하여 평가하였다. SOD 1 unit는 상온(25±2℃)에서 1분 동안 formazan 형성을 50% 억제하는 농도로 정의하여 U/㎎ protein 단위로 측정하였다.

9) 혈청 중 AST 및 ALT 함량의 측정

자동혈액분석장치(Toshiba 200 FR, Japan)를 이용하여 혈청 중 AST 및 ALT를 각각 IU/L 단위로 측정하였다.

10) 조직병리

최종 희생일에 간과 좌측 갑상선 조직을 적출한 다음, 세포로 절단하고 10% 중성포르말린에 18시간 이상 고정시킨 다음, 탈수를 거쳐 파라핀 포매 후 3 ㎛의 조직 절편을 제작하여 Hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 실시한 후 광학현미경 하에서 관찰하였다. 좀 더 명확한 조직병리학적 변화를 관찰하기 위하여, 세포 절단한 갑상선 전체 두께(㎛/central regions) 및 평균 갑상선 여포 직경(㎛/follicle)을 각각 automated image analysis process (iSolution FL ver 9.1, IMT i-solution Inc., Quebec, Canada)를 이용하여 하였으며, 단위 면적당 간세포의 수는 automated image analysis process를 이용하여 nuclei numbers/㎟ 단위로 산출하였다.

11) 통계처리

모든 수치는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test[18]를 실시하여 검증하였다. 등분산일 경우 one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences(LSD) test로 사후 검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는 Mann-Whitney U test를 실시하여 군 간의 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 인정하였다[19].

PTU 유발 갑상선기능저하증에 대한 HSYYT 또는 LT_4의 유효한 효과를 좀 더 명확히 하기 위하여 HSYYT 또는 LT_4 투여군과 PTU 대조군과의 percent change(%)를 {((Data of PTU control-Data of Intact vehicle control)/Data of Intact vehicle control) × 100}을 이용하여 측정하였으며, PTU에 의한 갑상선기능저하증 및 관련 간손상의 유발 정도를 보다 명확히 하기 위해 정상(Intact) 대조군과 PTU 대조군과의 percent change(%)를 {((Data of administered groups-Data of PTU control)/ Data of PTU control) × 100}을 이용하여 각각 측정하였다.

결 과

1. 체중의 변화

PTU 대조군에서는 PTU 투여 3주 후(Day 35)부터 유의하게 체중이 감소하였으며, 4주간의 PTU 투여기간 및 6주간의 실험 전 기간 동안의 체중 증가량 역시 정상 대조군에 비해 각각 유의하게 감소하였다. LT_4 및 HSYYT 500 ㎎/㎏, 250 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 체중이 증가하였으나, 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 실험 전 기간 동안 유의한 체중의 변화는 나타나지 않았다(Fig. 2).

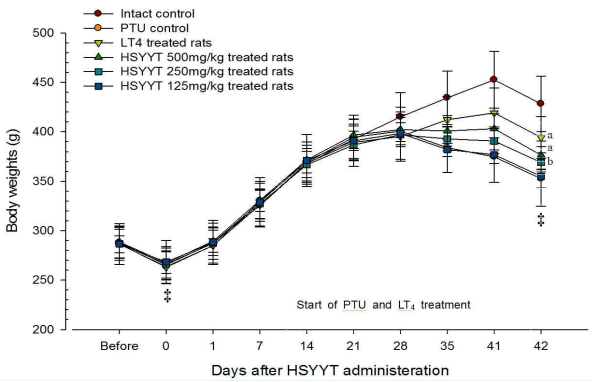


Fig. 2. Changes on the Body Weights after LT_4 and HSYYT Treatment in PTU-treated Rats. Values are expressed as mean ± S.D. of eight rats, g. 0 means, at start of HSYYT extracts administration. All rats were overnight fasted (‡). a $p<0.01$ as compared with PTU control by MW test. b $p<0.05$ as compared with PTU control by MW test.

2. 갑상선 중량의 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 현저한 갑상선 종대가 나타나 절대 및 상대 갑상선 중량이 증가하였다. LT_4 및 HSYYT 500과 250 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 절대 및 상대 갑상선 중량이 감소하였으나, 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 절대 및 상대 갑상선 중량의 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 3).

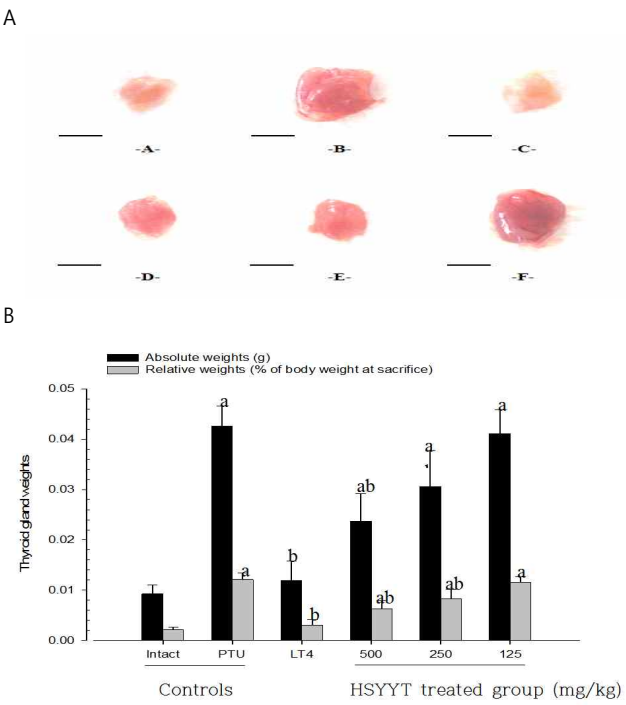


Fig. 3. A. Representative Thyroid Gland Gross Images, Taken from Intact or PTU-treated Rats. A=Intact control, B=PTU control, C=LT_4 0.5 ㎎/㎏ treated rats, D=HSYYT 500 ㎎/㎏ treated rats, E=HSYYT 250㎎/㎏ treated rats, F=HSYYT 125 ㎎/㎏ treated rats Scale bars = 3 ㎜. B. Changes on Thyroid Gland Weight after LT_4 and HSYYT Treatment in PTU-treated Rats. Values are expressed as mean ± S.D. of eight rats. a $p<0.01$ as compared with Intact control by LSD test. b $p<0.05$ as compared with PTU control by LSD test.

3. 간 중량의 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 절대 및 상대 간 중량이 감소하였다. LT_4, HSYYT 500 및 250 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 절대 및 상대 간 중량이 증가하였으나, 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 4).

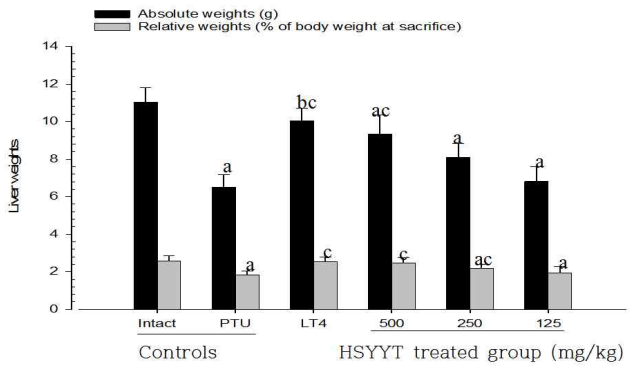


Fig. 4. Changes on Liver Weights after LT_4 and HSYYT Treatment in PTU-treated Rats. Values are expressed as mean ± S.D. of eight rats. a $p<0.01$ and b $p<0.05$ as compared with Intact control by LSD test. c $p<0.01$ as compared with PTU control by LSD test.

4. 혈청 중 갑상선 호르몬 함량의 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 혈청 중 TSH, T_3 및 T_4 감소가 나타났으며, HSYYT 500 및 250 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 투여 용량 의존적으로 TSH 감소와 함께 T_3 및 T_4 증가가 나타났으며, LT_4 투여군에서도 PTU 대조군에 비해 TSH 감소와 함께 T_4 증가가 나타났으나, T_3 변화는 유의성이 없었다. HSYYT 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 혈청 중 TSH, T_3 및 T_4의 유의한 변화는 나타나지 않았다(Table 3).

Table 3. Changes on the Serum Thyroid Hormone Levels after LT_4 and HSYYT Treatment in PTU-treated Rats

Groups	Serum hormone levels		
	TSH (ng/㎖)	Tri-iodothyronine (ng/㎖)	Thyroxine (㎍/㎖)
Controls			
Intact	14.21±3.09	72.54±8.39	5.68±1.10
PTU	57.66±12.89[a]	17.14±5.08[a]	0.95±0.18[a]
LT_4 treated group			
0.5 ㎎/㎏	12.17±3.32[b]	17.81±3.60[a]	6.70±1.50[b]
HSYYT treated groups			
500 ㎎/㎏	34.75±7.04[ab]	25.99±3.72[ac]	2.16±0.72[ab]
250 ㎎/㎏	42.60±5.66[ab]	22.89±3.05[ac]	1.74±0.53[ab]
125 ㎎/㎏	53.97±11.03[a]	18.83±5.63[a]	0.98±0.28[a]

Values are expressed as mean ± S.D. of eight rats. 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

5. 간 항산화 방어 system 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 지질 과산화(MDA 함량)은 감소하였으나 유의성은 없었고, 간 H_2O_2 및 SOD 활성은 증가하였고, CAT 활성은 감소하였다. LT_4 및 HSYYT 500 ㎎/㎏ 투여군에서는 각각 PTU 대조군에 비해 CAT 활성 증가와 H_2O_2 함량 및 SOD 활성 감소가 나타났으며, HSYYT 250 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 H_2O_2 함량 및 SOD 활성이 감소하였으며, CAT 활성은 증가하였으나 유의성은 없었다. HSYYT 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 간 지질 과산화, H_2O_2 함량, SOD 및 CAT 활성의 유의한 변화는 나타나지 않았다.

6. 혈청 중 AST 및 ALT 함량 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 혈청 중 AST는 증가하였다. LT_4 및 HSYYT 500과 250 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 투여에 의한 AST 증가가 각각 억제되는 것으로 나타났으며, 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 혈청 중 AST 변화의 유의성은 없었으며, PTU 투여에 의해 혈청 중 ALT 증가는 유의하지 않게 나타났다. PTU 대조군에 비해 혈청 중 ALT 변화는 LT_4와 세 용량의 HSYYT에서 모두 유의성이 없었다(Fig. 5).

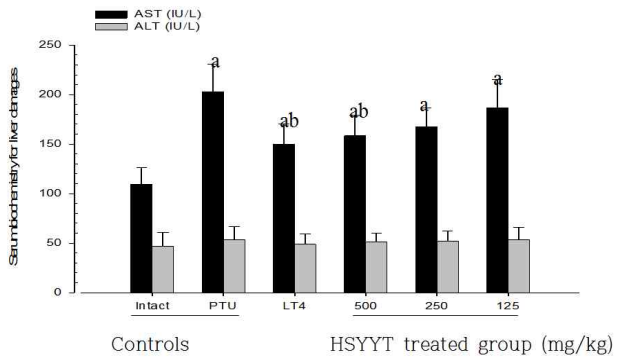


Fig. 5. Changes on Serum AST and ALT Levels after LT_4 and HSYYT Treatment in PTU-treated Rats. Values are expressed as mean ± S.D. of eight rats. a $p<0.01$ as compared with Intact control by LSD test. b $p<0.01$ as compared with PTU control by LSD test.

7. 혈청 중 지질 함량 변화

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 혈청 중 HDL은 증가하였고, Triglyceride는 감소하였다. LT_4, HSYYT 250 및 500 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 혈청 중 HDL은 감소하였고, Triglyceride 함량은 증가하였고, 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 혈청 중 HDL 및 Triglyceride 변화는 유의성이 없었다. PTU 투여에 의해 혈청 중 Total Cholesterol 및 LDL 변화는 유의성이 없었으며, PTU 대조군에 비해 혈청 중 Total Cholesterol 및 LDL 변화도 LT_4와 세 용량의 HSYYT 투여군에서 모두 유의성이 없었다.

8. 갑상선의 조직병리학적 관찰

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 현저한 갑상선 여포 세포 증식에 의한 비대 소견과 여포 직경 및 여포 내 colloid 물질의 감소가 함께 나타났으며, 갑상선 전체 두께는 증가하였고, 평균 갑상선 여포 직경은 감소하였다. PTU 투여에 의한 갑상선 조직의 증식 및 비대 소견이 LT_4, HSYYT 500 및 250 ㎎/㎏ 투여에 의해 억제되었다. LT_4, HSYYT 500 및 250 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 갑상선 전체 두께의 감소와 평균 갑상선 여포 직경 증가가 각각 유의하게 나타났고, HSYYT 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 갑상선 조직병리학적 변화(갑상선 전체 두께와 평균 갑상선 여포 직경)는 유의성이 없었다(Fig. 6).

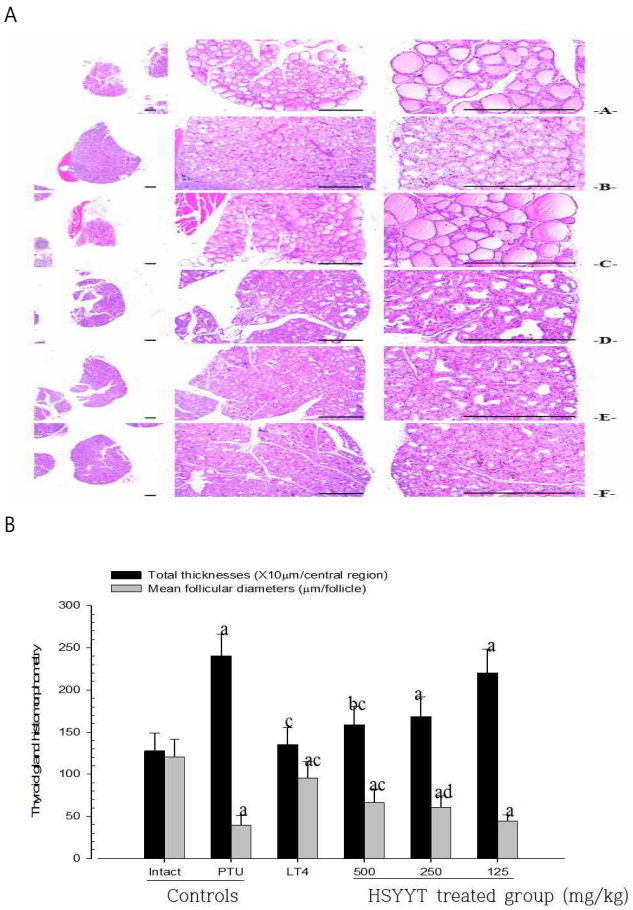
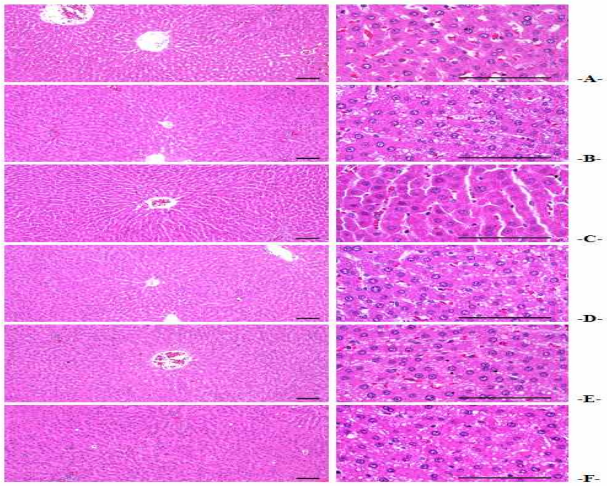


Fig. 6. A. Representative Thyroid Gland Histopathological Images, Taken from Intactor PTU-treated Rats. A=Intact control, B=PTU control, C=LT_4 0.5 ㎎/㎏ treated rats, D=HSYYT 500 ㎎/㎏ treated rats, E=HSYYT 250 ㎎/㎏ treated rats, F=HSYYT 125 ㎎/㎏ treated rats, All H&E stain. Scale bars=400㎛. B. Changes on the Histomorphometry of Thyroid Glands after LT_4 and HSYYT Treatment in PTU-treated Rats. Values are expressed as mean ± S.D. of eight rats. 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.

9. 간의 조직병리학적 관찰

PTU 대조군에서는 정상 대조군에 비해 지방 소적 침윤에 의한 간세포 종창에 의해 단위 면적당 간세포의 수적 감소가 나타났으나, PTU 투여에 의한 간세포 종창 소견이 LT_4 투여에 의해서는 억제되어 PTU 대조군에 비해 단위 면적당 간세포 수 증가가 나타났으며, HSYYT 500 및 250 ㎎/㎏ 투여군에서도 PTU 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 단위 면적당 간세포 수 증가가 각각 나타났으며, 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 유의하지 않았다(Fig. 7).

A



B

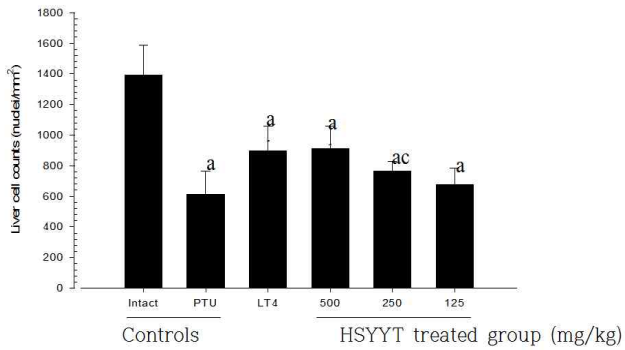


Fig. 7. A. Representative Liver Histopathological Images, Taken from Intactor PTU-treated Rats. A=Intact control, B=PTU control, C=LT_4 0.5 ㎎/kg treated rats, D=HSYYT 500 ㎎/kg treated rats, E=HSYYT 250 ㎎/kg treated rats, F=HSYYT 125㎎/kg treated rat. All H&E stain. Scale bars=80 ㎛. B. Changes on the Histomorphometry of Liver after LT_4 and HSYYT Treatment in PTU-treated Rats. Values are expressed as mean ± S.D. of eight rats. 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.

고 찰

갑상선호르몬은 에너지 호르몬으로써 열에너지의 원천이 되는데 이 호르몬이 부족한 경우 결핍 정도에 따라 임상 증상이 나타나며, 태아 및 신생아의 뇌와 골격의 성장 및 발육장애, 열 발생 저하로 체온하강, 조직 내 대사율 감소로 인한 이화작용 저하에 의해 조직 내 대사산물의 축적이 유발되고 모든 장기의 기능저하 현상이 주로 나타난다[20,21].

갑상선기능저하증의 치료 목표는 부족한 갑상선 호르몬을 외부에서 공급, 보충하여 말초에서의 갑상선호르몬 수치를 정상화시키는 것으로 주로 LT_4를 사용하나 여러 가지 문제점[1,3,4]이 유발되어, 최근 부작용이 적고 강력한 항산화 효과를 나타내는 천연물 유래의 갑상선기능저하증 치료제의 개발이 주목받고 있다[10-14]. 현재 香砂養胃湯은 자체의 항산화 효과[15], 소화기계[16]와 갑상선기능이상과 웅성 생식에 대한 효과[14]는 실험적으로 알려져 있으나, 갑상선기능이상과 관련 간 손상에 대한 효과는 아직 보고된 바 없다.

본 연구에서는 香砂養胃湯의 갑상선기능저하증에 대한 효과를 PTU 유발 갑상선기능저하증 Rat 모델을 이용하여 평가하였으며, 그 결과는 현재 갑상선기능저하증 치료제로 사용되고 있는 LT_4 0.5 ㎎/kg 복강 투여군[10,11,14]과 비교하였다.

본 실험의 결과 28일 간의 연속적인 PTU 10 ㎎/kg 피하 투여에 의해 체중 감소, 갑상선 중량의 증가, 간 중량의 감소, 혈청 중 T_3, T_4 감소와 TSH 증가, 혈청 중 HDL 증가와 Triglyceride 감소, 간 항산화 방어 system 장애, 혈청 중 AST 증가가 인정되었으며, 조직병리학적으로 갑상선 여포세포 증식에 의한 비대 소견과 간세포의 지방 소적 침윤에 의한 간 비대에 따른 단위 면적당 간세포의 수적 감소가 인정되었으나, HSYYT 500 및 250 ㎎/kg에 의해 투여 용량 의존적으로 PTU 유발 갑상선기능저하증 및 관련 간 손상 소견이 억제되었으며, 간 항산화 방어 system 변화 역시 500 및 250 ㎎/kg HSYYT 투여에 의해 효과적으로 조절되는 것으로 관찰되었다. PTU 대조군과 비교하여 HSYYT 125 ㎎/kg 투여군에서는 갑상선기능저하증 및 관련 간손상에 대한 효과는 유의하게 나타나지 않았다.

일반적으로 갑상선기능저하증일 경우, 부족한 갑상선호르몬에 의해 대사가 지연되고 이화작용이 감소하여 조직 내 당단백질이 침착하므로 체중 증가가 일어나거나[2,21], 갑상선기능저하증에 따른 체중 증가를 보상하기 위해 Leptin 분비가 증가되어 결과적으로 식욕이 저하되고 에너지 대사율이 증가되어 체중 감소가 유발될 수도 있다[22]. 실험동물에서 10 ㎎/kg 이상의 PTU 투여 자체가 현저한 체중 감소를 유발시키는 것으로 알려져 있어[23], PTU로 갑상선기능저하증을 유발시킨 Rat에서는 체중 감소가 나타나는 것으로 알려져 있다[5-11,14].

본 실험 결과에서도 PTU 대조군에서는 PTU 투여 2주 후부터 체중 감소가 나타나기 시작하여, 4주간의 PTU 투여기간 및 6주간의 실험 전 기간 동안 체중 증가량 역시 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 이러한 PTU 유발 체중 또는 체중 증가량의 감소가 LT_4 및 HSYYT 250 및 500 ㎎/kg 투여에 의해 억제되었으나, 125 ㎎/kg HSYYT 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 체중 및 체중 증가량 변화는 실험 전 기간 동안 유의하게 나타나지 않았다. 따라서 250 ㎎/kg 이상의 HSYYT 투여는 PTU 투여로 유발되는 갑상선기능저하증시 체중 감소를 효과적으로 억제하는 것으로 판단된다.

PTU는 대표적인 갑상선 억제제로 Iodine과 Tyrosine의 결합을 억제하는 작용을 하여 TSH 증가와 함께 T_3 및 T_4의 감소, 비활동성 갑상샘 종대(simple goiter)를 유발하고[5,23,24], 조직병리학적으로 갑상선 여포세포 증식에 의한 비대 소견과 여포 직경 및 여포 내 colloid 물질 감소를 특징적으로 나타낸다[10,11,23,25]. 본 실험의 결과에서도 갑상선 중량 증가와 함께 갑상선 여포 세포 증식에 의한 비대, 여포 직경 및 여포 내 colloid 물질의 감소 등의 조직병리학적 변화, 즉 전형적인 비활동성 갑상선 종대 소견이 PTU 대조군에서 나타났다. 이러한 갑상선 중량 증가 및 비활동성 갑상선 종대의 조직병리학적 변화가 HSYYT 500 및 250 ㎎/kg 투여에 의해 용량 의존적으로 억제되었으나, 125 ㎎/kg 투여군에서는 PTU 대조군과 비교하여 유의한 갑상선 중량 및 조직병리학적 변화는 인정

되지 않았다. 따라서 250 ㎎/㎏ 이상의 HSYYT 투여는 PTU에 의한 갑상선 변화를 직접적으로 억제하는 것으로 판단된다.

갑상선 기능검사로 혈청 중 TSH, T_3 및 T_4 변화를 주로 이용하며, 현재 TSH 증가, T_4 감소, T_3 정상 또는 감소를 갑상선기능저하증으로 진단한다[1,26]. 본 실험 결과에서도 PTU 투여군에서 TSH 증가와 함께 T_3 및 T_4의 감소가 초래되었다. LT_4 투여에 의해 TSH 감소와 T_4 증가가 나타났으나 T_3에는 별 다른 영향을 미치지 않았으며, HSYYT 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군과 비교하여 혈청 중 갑상선호르몬 변화는 유의하게 나타나지 않았다. HSYYT 250 및 500 ㎎/㎏ 투여군에서는 투여 용량 의존적인 TSH 감소와 T_4 증가가 각각 인정되었고, T_3 역시 유의하게 증가되었다. 따라서 250 mg/kg 이상의 HSYYT은 LT_4와는 달리 단순히 감소된 T_4 보충뿐만 아니라, 본 실험에서 인정된 항산화 방어 시스템 활성을 통해 갑상선 여포 세포 변화를 억제하여 갑상선기능저하증에 유효한 효과를 나타내는 것으로 판단되나, 정확한 기전은 본 실험에서는 알 수 없으므로 다방면의 다양한 기전 연구가 향후 수행되어야 할 것으로 판단된다.

갑상선호르몬은 간에서의 지질 대사와 콜레스테롤 합성을 억제하여, 혈청 중 지질 함량 변화를 유발한다. 일반적으로 알려진 지질 단백질 이상은 Total Cholesterol 및 LDL이 증가하여 이들로 인해 혈관계 합병증이 유발되고 LT_4 투여에 의해 이러한 합병증이 억제되는 것으로 알려져 있으나[27], 혈청 중 지질 변화는 갑상선호르몬 상태에 따라 다양하게 변화되고 특히 항산화 방어 system 변화와 직결되어 증감하는 것으로 알려져 있어, 갑상선기능저하증의 유발 정도, 시기 및 다른 합병증 유무에 따라 매우 다양한 혈청 중 지질 함량 변화가 초래된다[5,10,11,26]. 본 실험의 결과, PTU 투여에 의해 유의한 혈청 중 Total Cholesterol 및 LDL 변화는 나타나지 않았으나, HDL 증가와 Triglyceride 감소가 나타났다. PTU 대조군에 비해 혈청 중 HDL 감소와 Triglyceride 증가가 HSYYT 500 및 250 ㎎/㎏ 투여군에서 인정된 점은 갑상선호르몬 증가에 의해 간에서 지질 대사 기능이 정상화되고 이차적으로 지질 이용이 증가되어 나타난 결과로 판단된다. LT_4 투여군에서도 PTU 대조군에 비해 혈청 중 HDL 감소와 Triglyceride 증가가 각각 유의하게 나타났으나, HSYYT 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군에 비해 혈청 중 Total Cholesterol, LDL, HDL 및 Triglyceride 변화는 유의하게 나타나지 않았다.

간은 갑상선호르몬에 영향을 받는 대표적인 장기로[7,8], 갑상선기능저하증시 간손상이 수반되는 것으로 알려져 있다[28]. AST와 ALT는 간세포 내에 존재하는 효소로 이들 효소의 혈청 중 상승은 간손상 평가 지표로 활용되고 있으며, 갑상선기능저하증시에도 이들 효소의 혈청 내 상승이 관찰되고 갑상선기능저하증 환자의 30%에서도 이들 효소의 증가가 나타났다[11,29]. 일부 연구에서는 ALT 상승없이 AST 증가만 나타나는 경우도 있고, 미세 구조상 간세포 비대에 의한 단위 면적당 간세포 수적 감소가 나타난 경우도 있다[5,10,11]. 본 실험의 결과 간 중량 감소와 함께 혈중 AST 현저한 증가 및 간세포의 지방 소적 침윤에 의한 비대에 따른 단위 면적당 간세포의 수적 감소가 PTU 투여에 의해 유발되었으나 유의성 있는 ALT 증가는 나타나지 않았다. 250 및 500 ㎎/㎏ HSYYT 투여군에서는 LT_4 투여군과 유사하게 PTU 투여에 의한 간손상 소견이 억제되었으나, HSYYT 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군과 비교하여 유의한 혈중 AST 변화 및 간 조직병리학적 변화는 인정되지 않았다. 따라서 250 ㎎/㎏ 이상의 HSYYT이 갑상선기능저하증시 유발되는 간손상을 억제하는 것으로 판단된다.

최근에 들어 일반적인 기초 대사량 감소로 세포 호흡이 억제되어 지질 과산화가 억제되고, SOD 증가와 함께 CAT 감소에 따른 H_2O_2 간 조직 내 축적 등 갑상선기능저하증시에도 신체의 항산화 방어 system 변화가 초래되는 것으로 알려져 있으며, 갑상선기능저하증 소견이 항산화제의 투여에 의해 감소되는 것으로 알려져 있다[5,6,9]. 이에 따라 강력한 항산화 효과를 나타내는 천연물 유래의 갑상선기능저하증 치료제의 개발이 주목 받고 있는 실정이며 현재 HSYYT 자체의 항산화 효과는 이미 알려져 있다[14,15,30]. 본 실험의 결과도 PTU 투여에 의해 지질 과산화의 감소와 함께 대표적인 내인성 항산화 효소인 SOD 활성의 증가와 함께 CAT 감소에 따른 대표적인 세포 호흡성 산화물질인 H_2O_2의 간 mitochondria fraction 내 축적이 인정되었으나, 250 ㎎/㎏ 이상의 HSYYT은 LT_4와 유사하게 SOD 활성을 억제하였고, CAT 활성 증가에 의해 간 세포내 H_2O_2 축적을 억제시키는 것으로 관찰되었다. 혈중 AST 변화와 간 조직병리학적 변화 결과와 일치되어 HSYYT 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 PTU 대조군과 비교하여 유의한 간의 항산화 방어 시스템 변화 역시 나타나지 않았다.

이상에서 250 및 500 ㎎/㎏ HSYYT 경구투여는 PTU 유발 갑상선기능저하증시 초래되는 체중 감소, 갑상선 종대, 갑상선호르몬 변화, 혈청 중 지질 함량 변화 및 간손상을 투여 용량 의존적으로 억제하였고, PTU 유발 갑상선기능저하증시 초래되는 항산화 방어 system 변화 역시 투여 용량 의존적으로 억제하였으므로 항산화 방어 system 조절을 통해 갑상선기능저하증 및 관련 간손상에 유효한 효과를 나타낼 것으로 기대되나, 향후 명확한 기전 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

결 론

香砂養胃湯이 PTU로 유발된 Rat의 갑상선기능저하와 간손상에 미치는 영향을 평가하기 위하여 500, 250 및 125 ㎎/㎏ HSYYT 투여 후 체중 및 장기 중량, 혈중 호르몬 함량, 혈청 성분의 함량, 항산화 방어 인자, 조직병리학적 변화를 LT_4 0.5 ㎎/㎏ 복강 투여한 군과 비교하여 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

PTU 투여군에서는 체중 감소, 갑상선 중량 증가, 간 중량 감소, 혈청 중 T_3, T_4 감소와 TSH 증가, 혈청 중 HDL 증가와 Triglyceride 감소, 간 항산화 방어 system 장애, 혈청 중 AST 증가가 나타났으며, 조직병리학적으로 갑상선 여포 세포 증식에 의한 비대 소견과 간세포의 지방 소적 침윤에 의한 비대에 따른 단위 면적당 간세포의 수적 감소가 나타났다.

HSYYT 500 및 250 ㎎/㎏ 투여에 의해 PTU로 유발된 갑상선기능저하증 소견이 용량 의존적으로 억제되었으며, 관련 간 항산화 방어 system 변화 역시 효과적으로 조절되는 것으로 관찰되었다.

HSYYT 125 ㎎/㎏ 투여군에서는 대조군과 비교하여 갑상선기

능저하증 및 관련 간손상에 대한 변화는 유의하게 나타나지 않았다.

이상에서 250 및 500 ㎎/㎏ HSYYT 경구투여는 항산화 방어 system 조절을 통해 갑상선기능저하증 및 관련 간손상에 유효한 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

References

1. Zo, B.Y. Clinical Thyroidology. 3nd ed. Seoul: Korea Medical Book Publisher. pp 437-476, 2010.
2. Guyton, A.C. Textbook of Medical Physiology. Philadelphia:WB Saunder's Company. pp 906-908, 1986.
3. Ahn, S.Y. Thyroid Clinic. Seoul:Seoungbosa. pp 132-154, 248, 2004.
4. Wiersinga, W.M. Thyroid hormone replacement therapy. Horm Res. 56: 74-81, 2001.
5. Subudhi, U., Das, K., Paital, B., Bhanja, S., Chainy, G.B. Supplementation of curcumin and vitamin E enhances oxidative stress, but restores hepatic histoarchitecture in hypothyroid rats. Life Sci. 84: 372-379, 2009.
6. Das, K., Chainy, G.B. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defence system by thyroid hormone. Biochim Biophys Acta. 1537: 1-13, 2001.
7. Feng, X., Jiang, Y., Melzer, P., Yen, P.M. Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. Mol Endocrinol. 14: 947-955, 2000.
8. Simon-Giavarotti, K.A., Giavarotti, L., et al. Enhancement of lindane-induced liver oxidative stress and hepatotoxicity by thyroid hormone is reduced by gadolinium chloride. Free Radic Res. 36: 1033-1039, 2002.
9. 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. 23: 1-8, 2005.
10. Ku, S.K., Lee, Y.J. Effects of Lonicerae Flos on the 6-n-propyl-2-thiouracil(PTU)-induced rat hypothyroidism. Korean J Orient Physiol Pathol. 24: 630-637, 2010.
11. Kim, S.M., Ku, S.K., Cho, S.Y., Park, S.J. Effects of Bupleuri Radix on the rat hypothyroidism induced by PTU(6-n-propyl-2-thiouracil). Korean J Orient Physiol Pathol. 26: 714-723, 2012b.
12. Bhanja, S., Jena, S. Modulation of antioxidant enzyme expression by PTU-induced hypothyroidism in cerebral cortex of postnatal rat brain. Neurochem Res. 38: 42-49, 2013.
13. Rayman, M.P., Thompson, A.J., Bekaert, B., et al. Randomized controlled trial of the effect of selenium supplementation on thyroid function in the elderly in the United Kingdom. Am J Clin Nutr. 87: 370-378, 2008.
14. Choi, H.S. Favorable Effects of Hyangsayangyi-tang on the Hypothyroidism related Rat Male Reproductive Organ Damages induced by Propylthiouracil. Kor. J. Herbology. 28(6):59-70, 2003.
15. Choi, B.C., Ahn, T.W. Anti-oxidant Effect of Hyangsayangyi-tang Decoction in Stomach, Spleen and Pancreas Cell of SD Rats. J Sasang Constitutional Med. 20: 72-84, 2008.
16. Hong, N.D., Chang, I.K., Kim, N.Y., Lee, I.S. Studies on the Efficacy of Combined Preparations of Crude Drug(XXXIX). -Effect of Hyangsayangwee-Tang on the Stomach and Intestinal Disorder-. Korean J Pharmacogn. 20: 188-195, 1989.
17. Kakkar, P., Das, B., Viswanathan, P.N. Modified spectrophotometric assay of SOD. India J Biochem Biophys. 2: 130-132, 1984.
18. Levene, A. Pathological factors influencing excision of tumours in the head and neck. Part I. Clin Otalary. 6: 145-151, 1981.
19. Ludbrook, J. Update: microcomputer statistics packages. A personal view. Clin Exp Pharmacol Physiol. 24: 294-296, 1997.
20. Doo, H.K. Oriental Medicine of Nephrology. Seoul:The Academy of oriental Medicine. pp 729, 867-874, 1042, 1059-1065, 1993.
21. Roti, E., Minelli, R., Gardini, E., Braverman, L.E. T he use and misuse of thyroid hormone. Endocr Rev. 14: 401-424, 1993.
22. Kim, M.S., Yun, C.A., Zo, Y.M., et al. Changes in Plasma Leptin Levels Relating to Short-Term Thyroid Manipulation in Rats. J Korean Soc Endocrinol. 17: 197-205, 2002.
23. O'Connor, J.C., Frame, S.R., Ladics, G.S. Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyriod modulators. Toxicol Sci. 69: 79-91, 2002.
24. Yang, Y., Gordon, C.J. Regulated hypothermia in the hypothyroid rat induced by administration of propylthiouracil. Am J Physiol. 272: R1390-1395, 1997.
25. 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. 41: 213-217, 2003.
26. Devdhar, M., Ousman, Y.H., Burman, K.D. Hypothyroidism. Endocrinol Metab Clin North Am. 36:

595-615, 2007.
27. Teixeira, P.D.F., Reuters, V.S., Ferreira, M.M., et al. Lipid profile in different degrees of hypothyroidism and effects of levothyroxine replacement in mild thyroid failure. Transl Res. 151: 224-231, 2008.
28. Laycock, M.A., Pascuzzi, R.M. The neuromuscular effects of hyperthyrodism. Semin Neurol. 11: 288-294, 1991.
29. Williams, K.V., Nayak, S., Becker, D., Reyes, J., Burmeister, L.A. Fifty years of experience with propylthiouracil-associated hepatotoxicity: what have we learned? J Clin Endocrinol Metab. 82: 1727-1733, 1997.
30. Bhanja, S., Chainy, G.B. PTU-induced hypothyroidism modulates antioxidant defense status in the developing cerebellum. Int J Dev Neurosci. 28: 251-262, 2010.