

내분비교란물질 비스페놀 A를 처리한 마우스에서 홍삼 추출물의 간 섬유화 개선

최재훈¹⁺, 박춘근¹⁺, 서경희², 김형돈¹, 윤지혜¹, 안영섭¹, 김진성^{2*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작이용팀, ²건국대학교 의료생명대학 의생명화학과

Red Ginseng Extract Improves Liver Fibrosis in Mice Treated with the Endocrine Disruptor Bisphenol A

Jehun Choi¹⁺, Chun Geon Park¹⁺, Kyoung Hee Seo², Hyung Don Kim¹,
Ji Hye Yoon¹, Young Sup Ahn¹ and Jin Seong Kim^{2*}

¹Herbal Crop Utilization Research Team, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA,
Eumseong 27709, Korea

²Department of Biomedical Chemistry, Konkuk University, Chungju 27478, Korea

Abstract - Bisphenol A (BPA), a known endocrine disruptor, induces toxicity in cells and in experimental animals. Ginseng extracts were evaluated to determine whether they can inhibit BPA-induced toxicity. The antioxidant activity of fresh ginseng extract (WGE), dried white ginseng extract (DGE), and dried red ginseng extract (RGE) was measured using the DPPH assay. WGE and RGE increased DPPH free radical scavenging activity. Cell viability was measured in HepG2 cells following treatment with BPA and ginseng extracts using the MTT assay. DGE and RGE increased HepG2 cell viability following treatment with 200 μ M BPA. RGE reduced levels of biochemical markers of liver damage, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) that increased in mice following treatment with BPA. In addition, the regeneration and proliferation of damaged liver cells were significantly increased in RGE-treated mice. Moreover, RGE inhibited hepatic fibrosis in the surrounding area and in the central vein of the liver microstructure. RGE also significantly inhibited BPA-induced cytotoxicity. In addition, RGE protected liver damage and regenerated liver tissues in BPA-treated animals. These results show that RGE may represent a potential candidate drug for the treatment and prevention of liver damage caused by environmental toxins.

Key words - *Panax ginseng* C.A. Mey., Bisphenol A, Korean red ginseng, Liver protection

서 언

내분비교란물질(endocrine disrupting chemicals)은 사람을 포함하여 내분비계를 가진 모든 생물에서 생식, 발생, 대사, 면역 등에 관여하는 각종 생체호르몬의 합성, 저장, 분비, 체내 수송, 결합 및 대사 과정에 개입할 수 있는 외인성 화학물질을 말한다(Kavlock *et al.*, 1996). 내분비교란물질이라는 용어 외에 환경호르몬이라 불리기도 하는데 이는 특정 호르몬 수용체

에 직접적으로 결합하여 호르몬과 유사한 역할을 하거나 혹은 내부호르몬이 제 역할을 하지 못하도록 하는 화학물질이기 때문이다(Kretschmer and Baldwin, 2005). 체내에서 분비되는 호르몬은 인체의 필요에 의하여 정교하게 내부적으로 조절되며, 인체에 필요한 기능을 적시적소에서 수행하며, 그 후에는 분해되어 체외로 대사되지만 내분비교란물질들은 부적절한 시점에 부적절한 용량으로 인체에 다양한 영향을 미치게 된다(Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

내분비교란물질로 널리 알려진 비스페놀A(BPA)는 에스트로겐 수용체에 결합하는 것으로 잘 알려져 있으며, 또한, 항안드로겐성 유사물질이다(Vandenberg *et al.*, 2009). 또한, 비만을

*교신저자: chiseijs@kku.ac.kr

Tel. +82-43-840-3570

[†]These authors contributed equally to this work.

야기할 수 있는 화학물질인 environmental obesogens 중 하나이다. 이 화학물질들은 지방세포로의 분화촉진, 대사항상성의 set point 변화, 식욕증추 자극, 미토콘드리아 기능저하 등 다양한 기전을 통하여 체중증가를 야기하는 것으로 알려져 있다 (Baillie-Hamilton, 2002; Grun and Blumberg, 2006). 또한, BPA는 제2형 당뇨병의 발병기전과도 관련 있는 것으로 보고되고 있다(Lee, 2012).

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 역사적으로 수천 년 동안 한국, 중국, 일본에서 각종 질병을 치료하는 데 사용된 인기 있는 허브 의약품이다. 현대의 약리학 연구에서는 진제노사이드 같은 인삼의 생리 활성 성분을 밝혀내고(Hwang *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012a; Quan *et al.*, 2012), 인삼 및 홍삼이 과도한 칼로리 섭취로 인한 체중 증가를 억제하는 효과를 가지며(Lee *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012b), 간 손상 억제 효과가 있는 것(Ki *et al.*, 2013)을 동물 모델에서 밝혀냈다. 백삼에 많이 존재하는 말로닐 진제노사이드(malonyl-ginsenoside)는 홍삼으로 가공하는 증숙과정에서 말로닐기가 분리되면서 G-Rg3, GRg2, G-Rh2, G-Rs1, G-Rs2, Rh4와 같은 특이적 사포닌으로 변하는데, 이것으로 인해 혈액순환개선효과, 암발생 억제력, 감염방어 작용 등 약리적 효능을 증가하는 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2010). 홍삼은 알코올성 간 질환의 마우스 모델에서 면역 능력에 초점을 맞추어 간 보호 효과가 있음을 보고 하였고(Bang *et al.*, 2014), 면역 질환, 신진 대사 및 신경 퇴행성 장애, 및 종양의 치료에 유익한 효과를 갖는다고 보고하였다(Heo *et al.*, 2011; Kaneko and Nakanishi, 2004; Seo and Kim, 2011). 또한, 실험용 생쥐에 홍삼 추출물의 투여는 생쥐의 비장과 흉선의 무게를 증가시키고, 비장세포내의 B 세포와 T세포를 증가 시키며, 혈청내 IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6 및 IL-12의 분비량을 증가 시킨다고 보고하였다. 이는 홍삼이 면역 반응계 전반을 활성화 시키는 것을 의미한다(Sohn *et al.*, 2012).

이번 연구에서는 내분비교란물질로 널리 알려진 BPA를 세포와 실험동물에 처리하여 독성을 유도하고 이를 수삼 추출물(WGE), 백삼 추출물(DGE), 홍삼 추출물(RGE)이 BPA로 유도된 독성에 어떠한 영향을 미칠 것인지 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

수삼, 백삼, 홍삼

본 연구에 사용한 시료는 두릅나무과에 속하는 인삼(*Panax*

ginseng C. A. Meyer)의 뿌리로 한국인삼공사와 증평농협이 보증하는 재료이다. 수삼과 백삼(각 4년근)은 증평농협(증평, 대한민국)에서, 홍삼(6년근)은 (주)한국인삼공사(정관장, 대전, 대한민국)에서 각각 구입하였다.

수삼, 백삼 및 홍삼의 에탄올 추출

수삼은 동결건조기에서 건조한 후 분쇄하고, 백삼과 홍삼은 분쇄하여 각 시료무게의 3배 부피로 70% 에탄올로 80°C, 3시간 씩 3번 환류추출 하였다. 추출이 끝난 후 실온에서 냉각 후 No. 4 filter paper를 이용하여 여과 하고, 45°C 에서 감압농축한 후 동결건조하여 얻은 분말을 사용하였다.

WGE, DGE, RGE의 DPPH 라디칼 소거 활성 측정

항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용하여 시료의 자유라디칼 소거 활성을 측정하는 Blois의 방법(Blois, 1958)을 일부 응용하여 측정하였다. WGE, DGE 및 RGE를 농도별(0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/ml)로 처리 (400 μ l)하고, 에탄올 280 μ l 와 0.4 mM DPPH 용액 800 μ l를 가하여 실온에서 20분간 반응한 후 microplate reader (Bio-Rad, Hercules, model 680, CA (USA))를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구(Ac)와 시료구(As)의 흡광도를 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = [1 - (\text{As}/\text{Ac})] \times 100$$

HepG2 세포주에 BPA 처리로 세포독성 유도

BPA에 의한 간암세포주 HepG2의 생존율을 MTT assay로 평가하였다. HepG2 세포를 96-well plate에 2×10^4 cells/well 농도로 98 well plate에 분주한 후, 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 α -DMEM 배지에 BPA를 각각 100, 200, 300, 500 μ M 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 MTT 용액 첨가하여 5% CO $_2$, 37°C incubator에서 2시간 동안 반응시킨 뒤 DMSO를 150 μ l 처리 및 실온에서 20분간 방치하여 microplate reader에서 540 nm로 흡광도를 측정하였다.

BPA를 처리한 HepG2 세포주에서 WGE, DGE, RGE에 의한 생존율 평가

HepG2 세포를 96-well plate에 2×10^4 cells/well 농도로 분주하였다. 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin 이 첨가된

α -DMEM 배지에 BPA (100, 200 μ M)와 각각의 WGE, DGE, RGE를 50, 100, 250 μ g/ml의 농도로 처리 후 24시간 반응, 그 후 MIT 첨가하여 5% CO₂, 37 °C incubator에서 2시간 동안 반응시킨 뒤 DMSO를 150 μ l 처리하고 실온에서 20분간 방치, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험동물의 사육 환경 및 식이 투여

실험동물은 특정병원체부재(specific pathogen free, SPF) 상태의 수컷 5주령 ICR 생쥐를 대한바이오링크(음성, 대한민국)에서 구입하여 1주일간 적응시켰다. 그런 다음 각 실험군마다 평균 체중이 약 34±2 g이 되도록 각 군당 7마리씩 나누어 분리 사육 하였다. 실험동물 사육실의 온도는 22±2°C, 상대습도는 50±5%로 유지하였으며 명암은 12시간 주기로 조절하였다. 사료는 실험동물용 고형사료이며 필터 및 자외선 살균기로 여과 살균된 정제수를 자유로이 섭취하도록 하였고 식이는 매일 공급하였다.

RGE에 의한 BPA로 유도된 마우스 간 독성 저해

정상군을 제외한 나머지 군에 BPA 20 mg/kg을 마우스 복강내 주사하였다. 1일 후부터 RGE 100, 300 mg/kg과 legarone 200 mg/kg을 7일간 매일 경구용 주사기를 이용하여 매일 일정한 시간대(오전 10시)에 경구 투여 하였다. 정상군과 BPA만 처리한 군에는 같은 양의 saline을 투여하였다(Fig. 4). 본 동물실험은 건국대학교 실험동물윤리위원회 승인(승인번호 KU15095)을 받고 진행하였다.

BPA를 처리한 마우스의 혈중 Immunoglobulin E (IgE), aspartate aminotrans-ferase (AST), alanine aminotrans-ferase (ALT) 측정

실험동물의 희생 후 혈청 내 IgE 측정은 Reitman-Frankel 방법을 응용한 IgE샌드위치 ELISA kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. IgE의 농도를 측정하기 위해 마이크로웰 플레이트에 anti-mouse IgE를 코팅하고 4 °C에서 하룻밤 배양하였다. anti-mouse IgE가 준비된 후 제조사의 방법에 따라 IgE를 측정하였다. 또한 혈청 분석용 kit (Asan Phar-maceutical, Seoul, Korea)를 사용하여 AST, ALT 수치를 측정하였다.

BPA를 처리한 마우스의 형태조직학적 관찰

동물실험한 마우스의 희생 후 적출된 간조직은 4% parafor-

maldehyde 용액에서 7일간 고정된 후 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매하였다. 조직 표본을 5 μ m 두께로 절삭 한 후, 절삭된 조직 절편을 매 5장마다 1장씩 무작위로 취하여 Hematoxylin-eosin (H-E)과 Goldner's masson trichrome을 시행하였다. 조직계측학적 관찰에 의한 간 조직내 중심정맥, 염증세포, 섬유성경화 등이 포함된 모든 이미지를 광학현미경(DMR, Leica, Nussloch, Germany)으로 관찰하였다.

통계학적 분석

본 연구의 모든 데이터는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계적 유의성은 일원분산분석(one-way ANOVA)의 Tukey 다중 비교에 의해 결정하였다. *p* 값이 <0.05인 것을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

WGE, DGE, GRE의 항산화능

항산화능이 높은 추출물이나 물질이 세포나 동물 실험에서 염증의 억제 효과를 가진다는 것은 많이 알려져 있다. 그러므로 인삼의 추출물들로 항산화능을 살펴보았다. 검사한 결과, WGE, DGE, GRE는 DPPH 소거능 실험에서 높은 항산화 활성을 나타내었다. 특히 RGE 그룹에서 높은 항산화능을 보였다(Fig. 1). 이는 2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)로 발생한 활성산소를 홍삼 추출물의 처리 농도에 비례하여 저해 하였으며, H₂O₂-CuSO₄를 사용하여 유도한 활성산소를 홍삼 추출물이 농도에 비례하여 저해하여, 홍삼 추출물은 항산화 활성이 우수하다는 Lee *et al.* (2008)의 결과와 동일한 경향이었

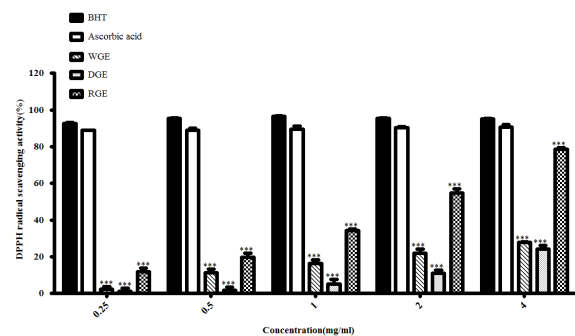


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity due to the concentration of ginseng extracts. WGE, fresh ginseng extract; DGE, white ginseng extract; RGE, red ginseng extract. ****P* < 0.001 as compared to BHT, respectively.

다. 홍삼 추출물은 폴리페놀 화합물의 함유량이 높아 항산화능을 가진다고 보고하였다(Lee *et al.*, 2008). 또한, 홍경천-홍삼 혼합 발효물에서 DPPH 소거활성이 유의적으로 증가한 보고는 GRE에 의해 DPPH 소거 활성이 좋았던 이번 실험 결과와 유사한 경향이였다(Sung *et al.*, 2013). 간 섬유화의 중요기전은 간성상세포(hepatic stellate cell)의 활성화이다. 활성화된 간성상세포는 세포질내에 지방이 감소하고, α -smooth muscle actin을 발현하며, extracellular matrix 구성 단백을 합성한다. 간성상세포의 활성화를 유도하는 자극으로는 싸이토키인, eicosanoids, 산소유도 자유 라디칼 등이다. 이 중 산화적 스트레스는 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 신호전달과정을 자극하며 c-myc과 같은 전사인자들의 발현을 증가시키며, 직접적으로 α -smooth muscle actin의 발현을 증가시키는데 이들은 모두 간섬유화에 중요한 단계이다(Di Sario *et al.*, 2002; Olaso and Friedman, 1998; Xu *et al.*, 1996). 간성상세포는 산소유도 자유 라디칼이나 산화적 스트레스에 의해 활성화된다. 더불어, 산화적 스트레스가 다양한 형태의 만성 간질환에서 간섬유화를 일으킨다는 보고들이 있다(Jenkins *et al.*, 1985; Svegliati Baroni *et al.*, 1998). 이러한 사실에 기초하여 항산화는 간성상세포 활성화를 억제하는 중요한 요소이며, 간 섬유화를 억제하는데 깊이 관여한다.

RGE가 BPA가 처리된 간암세포주 HepG2의 생존에 미치는 영향

BPA를 간암세포주 HepG2에 농도별로 처리하여 생존율을 확인하였다. BPA를 100 μ M을 처리하였을 때는 세포독성이 거의 없었으나 200 μ M를 처리한 군에서는 약 60%의 생존율을 보였고, 300 μ M를 처리한 군에서 30%의 세포 생존율을 보였다

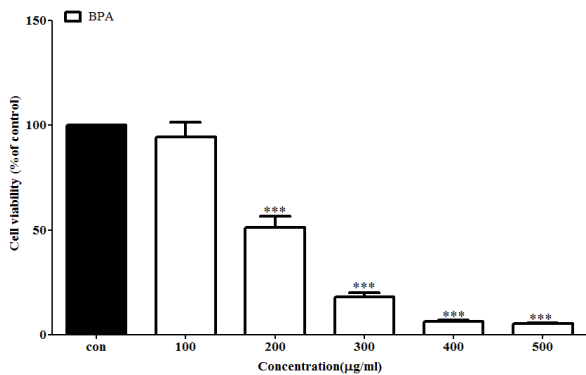


Fig. 2. Cell viability of HepG2 treated with the bisphenol A concentration. *** $P < 0.001$ as compared to Con, respectively.

(Fig. 2). 이를 기초로 간암세포주 HepG2에 BPA를 200 μ M과 함께 WGE, DGE, RGE를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 확인하였다. 그 결과, 간암세포주 HepG2에 BPA를 200 μ M을

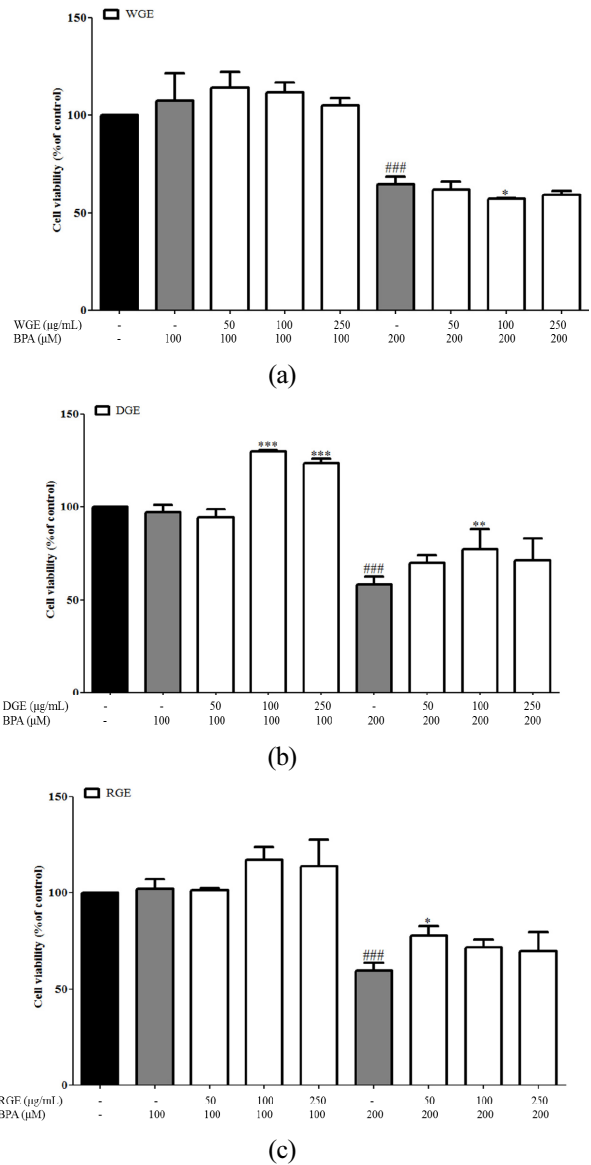


Fig. 3. Effects of cytotoxicity inhibition of ginseng extracts in the bisphenol A treated HepG2 cell. (1) Cytotoxicity inhibition of fresh ginseng extract. BPA100, bisphenol A 100 μ M treated in HepG2 cell medium; BPA200, bisphenol A 200 μ M treated in HeG2 cell medium; WGE, fresh ginseng extract. (2) Cytotoxicity inhibition of white ginseng extract. DGE, white ginseng extract. (3) Cytotoxicity inhibition of red ginseng extract. RGE, red ginseng extract. ### $P < 0.001$ as compared to Con. * $P < 0.05$ as compared to BPA 200 μ M/ml treatment.

처리한 후 RGE 처리 그룹과 DGE를 처리 그룹에서 세포 생존율을 높이고 있음을 확인하였다(Fig. 3). 이 결과는 인삼에서 분리한 진제노사이드가 BPA로 유도된 세포 사멸을 억제하며 세포의 생존과 세포 골격의 변화 증가 및 보호효과가 있다는 연구결과와 비슷하였다(Wang *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2012)은 인삼에서 분리한 물질인 진제노사이드는 ERK1/2 MAPK 신호 전달 매개 항산화 방어를 기본 메커니즘으로 BPA의 독성으로부터 세포보호 효과를 가져온다고 설명하였다.

BPA를 투여한 마우스에서 RGE에 의한 간 기능 회복

내분비교란물질로 널리 알려진 BPA에 실험동물이 노출되었을 때 독성이 나타나는지 관찰하고 이를 RGE 투여로 독성이 저해되는지 관찰 하였다. BPA를 20 mg/kg i.p.로 투여한 마우스에 7일간 RGE를 경구 투여하였다(Fig. 4). 이 실험 모델로 BPA에 실험동물이 노출 된 후 RGE에 의해 실험동물의 간 기능이 회복되는지 살펴보았다.

실험 기간 동안 실험동물의 몸무게 변화는 대조군을 제외한 모든 실험그룹에서 체중이 감소되었다. BPA의 투여로 환경호르몬에 의한 스트레스가 체내에 발생한 후 RGE와 positive control인 legarone의 처리는 조직 내의 생화학적 회복은 어느 정도 이루어졌으나 몸무게가 증가될 만큼의 회복은 이루어지지 않았다고 판단된다(Fig. 5). 혈중 IgE는 BPA만 처리한 그룹에 비해 RGE 100 mg/kg 투여군이 약 70%, RGE 300 mg/kg 투여군은 약 90% 감소되었다. 특히 RGE 100 mg/kg 투여군 대비 RGE 300 mg/kg 투여군이 약 70% 비율의 감소를 보였다(Fig. 6).

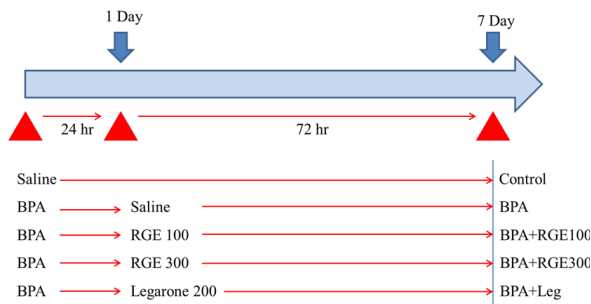


Fig. 4. Animal experimental model of liver damage by BPA. BPA, Bisphenol A 20 mg/kg ip treated group; BPA+RGE100, bisphenol A 20 mg/kg ip then red ginseng extract 100 mg/kg/day p.o. group; BPA+RGE300, bisphenol A 20 mg/kg ip then red ginseng extract 300 mg/kg/day p.o. group; BPA+Leg, bisphenol A 20 mg/kg ip then legarone 200 mg/kg/day p.o. group.

간기능 판정의 지표로 이용되는 효소로 AST, ALT가 대표적인데, 이는 혈액검사로 수치화 된다. ALT는 주로 간에 들어 있고 AST는 간 이외에 심장, 신장, 뇌, 근육 등에도 있다. 간에 염증이 생기거나 다른 이유로 간세포가 많이 파괴되면 혈액 속에 AST, ALT 수치가 올라가게 된다. 특히 급성 간 손상 시에 간세포 외로 다량 유출되어 혈액으로 유입됨으로써 이 수치가 증가된다(Hwang, 2013).

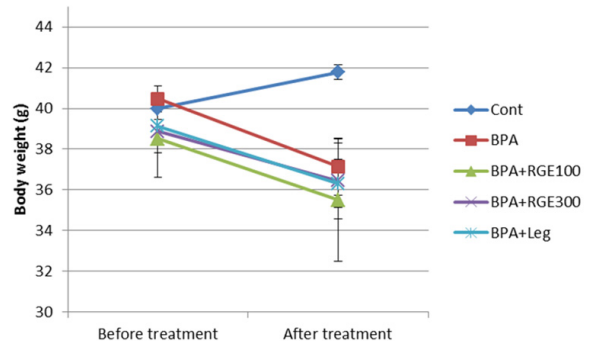


Fig. 5. Body weight changes for 7 days in experimental animals. BPA, Bisphenol A 20 mg/kg ip treated group; BPA+RGE100, bisphenol A 20 mg/kg ip then red ginseng extract 100 mg/kg/day p.o. group; BPA+RGE300, bisphenol A 20 mg/kg ip then red ginseng extract 300 mg/kg/day p.o. group; BPA+Leg, bisphenol A 20 mg/kg ip then legarone 200 mg/kg/day p.o. group.

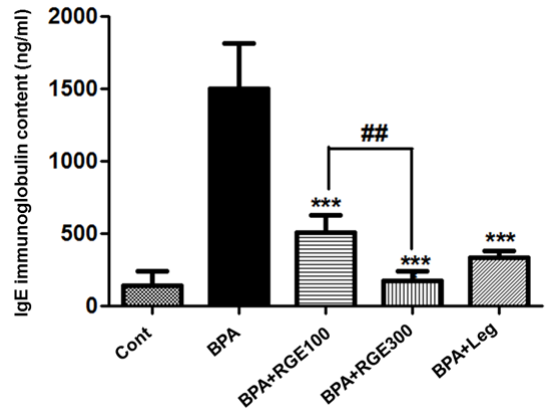


Fig. 6. IgE immunoglobulin concentrations in mice treated with BPA. BPA, Bisphenol A 20 mg/kg ip treated group; BPA+RGE100, bisphenol A 20 mg/kg ip then red ginseng extract 100 mg/kg/day p.o. group; BPA+RGE300, bisphenol A 20 mg/kg ip then red ginseng extract 300 mg/kg/day p.o. group; BPA+Leg, bisphenol A 20 mg/kg ip then legarone 200 mg/kg/day p.o. group. ****P* < 0.001 as compared to BPA, ##*P* < 0.01 as compared to BPA+GRE100, respectively.

BPA를 처리한 실험동물의 혈중 ALT는 BPA만 처리한 군에 비해 RGE 300 mg/kg 투여군이 약 45% 감소, 혈중 AST 역시 BPA만 처리한 군에 비해 RGE 100 mg/kg 투여군은 약 45%, RGE 300 mg/kg 투여군은 약 60% 감소를 보였다(Fig. 7). 간 손상 생화학적 지표가 BPA 처리군에 비하여 RGE 투여군이 유의성 있게 낮아진 것은 BPA에 대한 간세포보호 효과가 있음을 의미한다. Abdel-Wahhab *et al.* (2010)은 동물실험을 통해 RGE가 Fumonisin과 mycotoxin aflaxocin B1에 의해 유도된 간 독성을 유의적으로 낮춘다고 보고하였다. 간 독성 유도 후 RGE를 처리하여 간 독성혈청 분석지표인 ALT, AST를 유의적으로 낮추었음

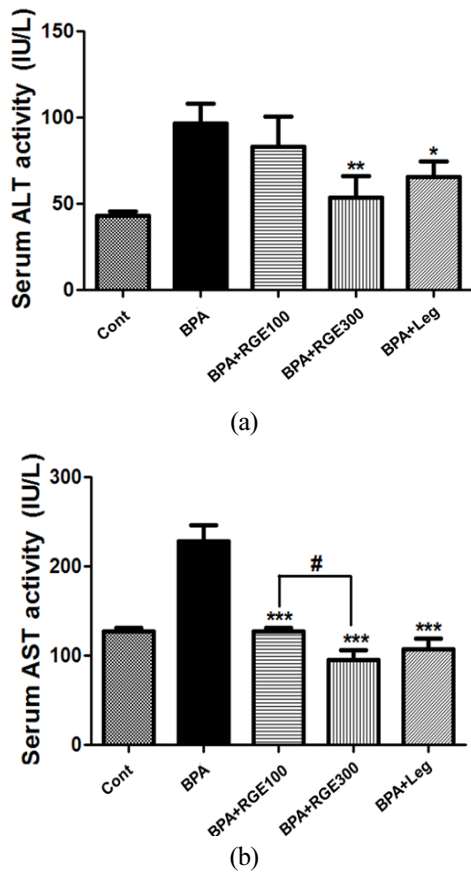


Fig. 7. Serum ALT and AST concentrations in mice treated with BPA. (1) Serum ALT concentrations. (2) Serum AST concentrations. BPA, Bisphenol A 20 mg/kg ip treated group; BPA+RGE100, bisphenol A 20 mg/kg ip then red ginseng extract 100 mg/kg/day p.o. group; BPA+RGE300, bisphenol A 20 mg/kg ip then red ginseng extract 300 mg/kg/day p.o. group; BPA+Leg, bisphenol A 20mg/kg ip then legarone 200 mg/kg/day p.o. group. * $P < 0.05$ as compared to BPA, ** $P < 0.01$ as compared to BPA, *** $P < 0.001$ as compared to BPA, # $P < 0.05$ as compared to RGE100, respectively.

을 보고하였다(Abel-Wahhab *et al.*, 2010). 이 연구결과는 RGE가 BPA에 의해 손상된 간 조직을 개선시킬 수 있음을 시사한다.

BPA를 투여한 마우스에서 RGE에 의한 간 섬유화 개선

BPA에 대한 RGE의 간 보호 효과를 확인하기 위해 실험동물 간의 조직학적 검사를 실시했다. 정상군은 간 조직 사진에 병리학적인 변화가 없었다(Fig. 8. (1), (2)A). 하지만, BPA 투여한 마우

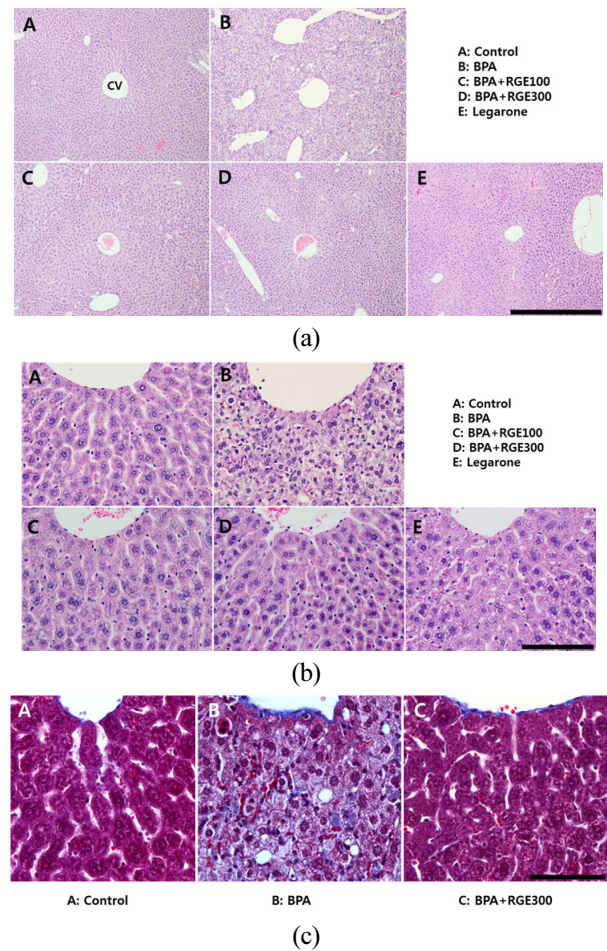


Fig. 8. The representative histological profiles of the liver sections. (1) The liver sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) in mice treated with vehicle. X100. (2) X400. (3) Accumulated collagen in liver sections was stained by Masson's trichrome staining. X100. BPA, Bisphenol A 20 mg/kg ip treated group; BPA+RGE100, bisphenol A 20 mg/kg ip then red ginseng extract 100 mg/kg/day p.o. group; BPA+RGE300, bisphenol A 20 mg/kg ip then red ginseng extract 300 mg/kg/day p.o. group; BPA+Leg, bisphenol A 20mg/kg ip then legarone 200 mg/kg/day p.o. group.

스의 간 조직은 대부분이 swollen hepatocytes를 보이고, hepatic sinusoid의 형태를 관찰이 어려웠다. 더불어, 정상조직에 비해 BPA 투여한 마우스의 간 조직에서 cytoplasmic hepatocellular vacuolization이 관찰되었다. 이것은 BPA 투여가 실험동물의 간 조직 손상을 유발하였음을 보여준다(Fig. 8.(1), (2)B). 하지만, RGE 300 mg/kg을 투여군에서 간세포 손상 후 간세포 증식이 현저하게 증가됨을 확인 할 수 있다(Fig. 8.(1), (2)D). 또한, RGE 300 mg/kg을 투여군에서 간 미세구조의 문맥공간과 중심정맥의 주위의 간 섬유화가 관찰되지 않았다(Fig. 8.(3)D). 조직학적 검사 결과를 종합하면, RGE는 BPA에 의해 유도되는 간 섬유화, 간 조직의 변성, 콜라겐 축적을 효과적으로 저해시켰으며, 더불어 간 조직의 재생을 증가 시켰다. 이 결과는 RGE가 사염화탄소에 의해 유도된 실험동물의 간 섬유화, 간세포 변성과 콜라겐 축적을 억제 한 결과(Ki *et al.*, 2013)와 동일한 경향이었다. Ki *et al.* (2013)은 RGE가 실험동물의 간 조직에서 transforming growth factor beta 1과 plasminogen activator inhibitor-1의 발현을 저해하고 hepatic stellate cells에서 alpha-smooth muscle actin을 활성화시켰기 때문이라 설명하였다.

적 요

BPA는 내분비교란물질로 널리 알려져 있다. BPA를 세포와 실험동물에 처리하여 독성을 유도하고 이를 인삼 추출물들이 BPA로 유도된 독성에 어떠한 영향을 미칠 것인지 살펴보았다. WGE, DGE, RGE에 대한 항산화능을 DPPH 분석법으로 측정하였다. DGE 및 RGE는 DPPH 소거 항산화 활성을 증가시켰다. 간암세포주 HepG2에 BPA 처리하여 세포독성을 유도하고, 이를 인삼추출물에 의해 세포생존이 증가되는지 MTT법으로 측정하였다. BPA 200 μ M 처리하여 유도된 세포독성에 DGE 및 RGE는 세포 생존 능력을 증가시켰다. 실험동물에 BPA를 처리하여 독성을 유도하고 이를 인삼추출물들이 방어하는지 살펴보았다. 혈청에서 간 손상 생화학적 마커인 AST와 ALT가 RGE 투여군에서 증가했다. 또한, 손상된 간세포 재생 및 증식이 RGE 투여군에서 현저하게 증가하였다. 또한, RGE 주변 영역 및 간 미세구조의 중심 정맥의 문맥에서 간 섬유화를 억제하였다. 이상의 결과를 종합하면 RGE가 간 세포주에서 BPA로 유도된 세포독성을 유의적으로 저해하였으며, 동물실험을 통하여 BPA에 의해 손상된 간에서 RGE가 간의 보호와 간 조직 재생이 발생하는 것을 확인하였다. 이 결과는 RGE가 외부에서 유입된 화학물질에 대한 간 손상 개선제로 사용될 수 있음을 보여준다. 그러므로,

RGE는 환경 독성 물질로 인한 질환 치료 약물에 대한 잠재적인 후보가 될 수 있을 것이라 사료된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(PJ00938501)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

References

- Abdel-Wahhab, M.A., N.S. Hassan, A.A. El-Kady, Y.A. Khadrawy, A.A. El-Nekeety, S.R. Mohamed, H.A. Sharaf and F.A. Mannaa. 2010. Red ginseng extract protects against aflatoxin B1 and fumonisins-induced hepatic pre-cancerous lesions in rats. *Food. Chem. Toxicol.* 48:733-742.
- Baillie-Hamilton, P.F. 2002. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J. Altern. Complement Med.* 8:185-192.
- Bang, C.S., S.H. Hong, K.T. Suk, J.B. Kim, S.H. Han, H. Sung, E.J. Kim, M.J. Kim, M.Y. Kim and S.K. Baik. 2014. Effects of Korean red ginseng (*Panax ginseng*), urushiol (*Rhus vernicifera* Stokes), and probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* R0011 and *Lactobacillus acidophilus* R0052) on the gut-liver axis of alcoholic liver disease. *J. Ginseng Res.* 38:167-172.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.
- Di Sario, A., E. Bendia, G.S. Baroni, F. Ridolfi, A. Casini, E. Ceni, S. Saccomanno, M. Marzoni, L. Trozzi and P. Sterpetti. 2002. Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production. *J. Hepatol.* 37:584-591.
- Diamanti-Kandarakis, E., J.-P. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, R.T. Zoeller and A.C. Gore. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30:293-342.
- Grun, F. and B. Blumberg. 2006. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147:s50-s55.
- Heo, J.H., S.T. Lee, M.J. Oh, H.J. Park, J.Y. Shim, K. Chu and M.H. Kim. 2011. Improvement of cognitive deficit in Alzheimer's disease patients by long term treatment with Korean red ginseng. *J. Ginseng Res.* 35:457-461.
- Hwang, E.K. 2013. Protective effect of rutin on carbon tetrachloride-Induced acute hepatotoxicity in rats. *J. Vet. Clin.* 30:12-16.

- Hwang, J.T., M.S. Lee, H.J. Kim, M.J. Sung, H.Y. Kim, M.S. Kim and D.Y. Kwon. 2009. Antiobesity effect of ginsenoside Rg3 involves the AMPK and PPAR- γ signal pathways. *Phytother. Res.* 23:262-266.
- Jenkins, S., A. Grandison, J. Baxter, D. Day, I. Taylor and R. Shields. 1985. A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. *J. Hepatol.* 1:489-499.
- Kaneko, H. and K. Nakanishi. 2004. Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: clinical effects of medical ginseng, Korean red ginseng: specifically, its anti-stress action for prevention of disease. *J. Pharmacol. Sci.* 95:158-162.
- Kavlock, R.J., G.P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L.E. Gray, S. Kaattari, G. Lucier, M. Luster, M.J. Mac and C. Maczka. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Persp.* 104:715.
- Ki, S.H., J.H. Yang, S.K. Ku, S.C. Kim, Y.W. Kim and I.J. Cho. 2013. Red ginseng extract protects against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *J. Ginseng Res.* 37:45-53.
- Kim, H.Y., K.S. Kang, N. Yamabe and T. Yokozawa. 2008. Comparison of the effects of Korean ginseng and heat-processed Korean ginseng on diabetic oxidative stress. *Am. J. Chin. Med.* 36:989-1004.
- Kretschmer, X.C. and W.S. Baldwin. 2005. CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters? *Chem. Biol. Interact.* 155:111-128.
- Lee, D.H. 2012. Endocrine disrupting chemicals and environmental diseases. *J. Korean Med. Assoc.* 55:243-249.
- Lee, H.J., Y.H. Lee, S.K. Park, E.S. Kang, H.J. Kim, Y.C. Lee, C.S. Choi, S.E. Park, C.W. Ahn and B.S. Cha. 2009. Korean red ginseng (*Panax ginseng*) improves insulin sensitivity and attenuates the development of diabetes in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Metabolism* 58:1170-1177.
- Lee, J.S., G.N. Kim and H.D. Jang. 2008. Effect of Red Ginseng Extract on Storage and Antioxidant Activity of Tofu. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37:1497-1509.
- Lee, S., M.S. Lee, C.T. Kim, I.H. Kim and Y. Kim. 2012a. Ginsenoside Rg3 reduces lipid accumulation with AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in HepG2 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 13:5729-5739.
- Lee, S.H., H.J. Lee, Y.H. Lee, B.W. Lee, B.S. Cha, E.S. Kang, C.W. Ahn, J.S. Park, H.J. Kim and E.Y. Lee. 2012b. Korean red ginseng (*Panax ginseng*) improves insulin sensitivity in high fat fed Sprague-Dawley rats. *Phytother. Res.* 26:142-147.
- Olaso, E. and S.L. Friedman. 1998. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J. Hepatol.* 29:836-847.
- Park, H.J., D.H. Jung, H. Joo, N.S. Kang, S.A. Jang, J.G. Lee and E.H. Sohn. 2010. The comparative study of anti-allergic and anti-inflammatory effects by fermented red ginseng and red ginseng. *Korean J. Plant Res.* 23:415-422.
- Quan, H.Y., H.D. Yuan, M.S. Jung, S.K. Ko, Y.G. Park and S.H. Chung. 2012. Ginsenoside Re lowers blood glucose and lipid levels via activation of AMP-activated protein kinase in HepG2 cells and high-fat diet fed mice. *Int. J. Mol. Med.* 29:73-80.
- Seo, E.Y. and W.K. Kim. 2011. Red ginseng extract reduced metastasis of colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Ginseng Res.* 35:315-324.
- Sohn, E.H., J.W. Yoon, H.J. Koo, D.W. Park, Y.J. Jeong, S. Namkoong, H.S. Han and S.C. Kang. 2012. Immunomodulating effects of red ginseng on the regulation of cytokine release *in vivo*. *Korean J. Plant Res.* 25:578-585.
- Sung, S.K., Y.K. Rhee, C.W. Cho, Y.C. Kim, O.H. Lee and H.D. Hong. 2013. Physicochemical properties and antioxidative activity of fermented *Rhodiola sachalinensis* and Korean red ginseng mixture by *Lactobacillus acidophilus*. *Korean J. Food Nutr.* 26:358-365.
- Svegliati Baroni, G., L. D'Ambrosio, G. Ferretti, A. Casini, A. Di Sario, R. Salzano, F. Ridolfi, S. Saccomanno, A.M. Jezequel and A. Benedetti. 1998. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 27:720-726.
- Vandenberg, L.N., M.V. Maffini, C. Sonnenschein, B.S. Rubin and A.M. Soto. 2009. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr. Rev.* 30:75-95.
- Wang, L., J. Hao, J. Hu, J. Pu, Z. Lü, L. Zhao, Q. Wang, Q. Yu, Y. Wang and G. Li. 2012. Protective effects of ginsenosides against bisphenol A-induced cytotoxicity in 15P-1 sertoli cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 signalling and antioxidant mechanisms. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 111:42-49.
- Xu, Y., M. Rojkind and M.J. Czaja. 1996. Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 by cytokines and oxygen free radicals in rat hepatic fat-storing cells. *Gastroenterology* 110:1870-1877.

(Received 25 May 2016 ; Revised 27 October 2016 ; Accepted 7 November 2016)