

EFFECTS OF *GANODERMA LUCIDUM* EXTRACT ON THE DEVELOPMENT OF RAT LIVER PRENEOPLASTIC LESIONS

Jong-Soo Kim and Yong-Soon Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University Suwon, 440-744, Korea

(Received November 15, 1989)

(Revised received December 5, 1989)

(Accepted December 10, 1989)

ABSTRACT: The effect of *Ganoderma lucidum* (Polyporaceae) extract on initiation and promotion of liver preneoplastic lesions in chemical carcinogenesis were examined in male rats. Male Fisher 344 rats, 8 weeks old, were injected i.p. with diethylnitrosamine (DENA: 200 mg/kg) as an initiator and were fed on diet containing 0.02% 2-acetaminofluorene (2-AAF) as a promoter for 2 weeks (group 1, 2: 2-4 week) and were fed on basal diet (group 3 and 4). The rats in test groups (group 1 and 3) were fed on diet containing 0.1% of *Ganoderma lucidum* extract for 6 weeks (2~8 week). All animals were subjected to partial hepatectomy on 3 weeks after DENA administration. All animals were killed at the end of week 8 and examined histopathologically. Glutathione S-transferase placental form (GST-P) was used as a marker enzyme for rat liver preneoplastic lesions in chemical carcinogenesis. For quantitative analysis, the numbers and areas of GST-P positive foci and hyperplastic nodules in the livers were measured with a Color Video Image Analyzer. The results were summarized as follows: The mean body weight gain and daily food intake of the rats fed on 0.1% of *Ganoderma lucidum* extract and 0.02% of 2-AAF (group 1) were significantly higher ($P < 0.01$) than those of rats fed on 2-AAF alone (group 2) after DENA administration. *Ganoderma lucidum* extract (0.1%) did not inhibit the promotion of the development of hyperplastic nodules by 2-AAF (0.02%) during chemical hepatocarcinogenesis in hepatectomized rats. *Ganoderma lucidum* extract did not inhibit the induction (or initiation) of preneoplastic foci by DENA (200 mg/kg). *Ganoderma lucidum* extract did not enhance the average total numbers and areas (mm^2) of preneoplastic foci per 1 cm^2 of liver tissue. The results indicate that *Ganoderma lucidum* (0.1%) extract showed neither anticarcinogenicity nor carcinogenicity in this anticarcinogenicity screening test.

Keywords: DENA, 2-AAF, *Ganoderma lucidum*, GST-P, Partial hepatectomy, Hyperplastic nodule, Preneoplastic lesion.

서 론

발암성 화학물질을 비롯한 여러가지 요인들의 발암성 여부를 정확히 검색하는 것은 매우 중요한 과제라고 생각된다. 그러나, 실제로 발암성 여부를 실험동물을 사용하여 판단하는데는 2년 이상의 긴 시간과 많은 비용이 소요됨에 따라, 시간과 비용을 절약할 목적으로 *in vitro* 시험인 미이원성시험(Ames' test, umu-test, SOS-chromosome test) 등으로 발암성을 추정하고 있으나(Ames, 1979; Bridges, 1976; Venit, 1980; Williams 등, 1986), 장기 생체시험 성적에 비하여 착중률이 낮고 위양성(false positive)율이 높아(Ashby와 Styles, 1978; Rinkus와 Legator, 1979) 실제 적용에는 어려움이 많아서, 안전성 평가에서의 시험항목으로는 요구되고 있으나 어디까지나 참고사항으로밖에 보지 않는다. 따라서, *in vitro* 시험법과 장기 생체시험법의 교량역할을 할 수 있는 단기 생체시험법의 개발이 요구되었다.

화학적 발암물질에 의한 암의 발생은 유발(initiation) 및 촉진(promotion)과정을 거친 후(2-step theory: Ito 등, 1980a; Marx, 1978; Miller, 1978; Pitot, 1979; Tsuda 등, 1984a, Tsuda 등, 1984b) 진행(progression)과정을 거쳐 암세포를 형성한다는 다단계 발암화작용(multistage carcinogenesis)의 개념을 토대로(Farber, 1984; Nowell, 1986; Pitot와 Sirica, 1980), 여러가지 initiator와 promoter의 표적장기(target organ)가 밝혀짐에 따라(Coombs, 1986; Nakanishi 등, 1982; Tsuda 등, 1983), 여러가지 *in vivo* 발암성 검색법이 개발되었는데(Ito 등, 1980b; Pitot 등, 1978; Scherer 등, 1972; Solt와 Farber, 1976; Tatematsu 등, 1979), 그 중에서도 Ito 등(1980b)이 개발한 방법은 시험기간이 짧고(8주), 높은 적중률을 나타내며(Cameron 등, 1982), 위양성(false positive)이 없다는 점(Ito 등, 1986)에서 화학물질의 발암성 여부를 검색하는 매우 유용한 방법으로 사용되고 있다. 본 연구에서 사용한 항암성 시험법은 Ito의 방법과 Solt-Faber 모델(1976)을 개량한 방법으로, 그 원리는 발암물질에 의한 전암병변(preneoplastic lesions)의 유발을 억제하는 물질은 항암물질(anticarcinogen)로 작용할 수 있다는 사실(Ito 등, 1983; Masui 등, 1986; Narita 등, 1980; Williams, 1987)에 근거하며, 표적장기는 간이다. 항암성 여부 분석의 기준은 랫트 간에서의 전암병변(preneoplastic lesion)의 지표효소(marker enzyme)인 glutathione S-transferase placental form(GST-P) 양성의 증식소(foci)와 증식결절(hyperplastic nodules)의 수와 면적에 대한 대조군과의 통계학적 유의성이다(Ogiso 등, 1985; Thamavit 등, 1985).

불로초, 만년버섯, 지초 등으로 불리우기도 하는 영지는, 민주름 버섯목(Aphyllophorales), 구멍장이 버섯과(Polyporaceae), 불로초속(Ganoderma)에 속하는데, 중국의 옛 고전 「신농본초경」에도 보간, 강장, 성신 안정작용 및 관절염, 해소, 기관지염 등의 치료약으로서의 효과가 기록되어 있으며, 한방에서도 동맥경화증, 고혈압증, 뇌졸중, 협심증, 각종 암, 중증 근무력증, 불면을 수반하는 신경쇠약, 위궤양, 소화불량 등에 다른 한방약과 배합하여 사용되어 왔다(Lee 등, 1986). 특히, 최근에는 영지의 sarcoma-180 육종세포에 대한 항암효과(Kim 등, 1980; Miyazaki와 Nishijima, 1981)와 그 기전(Kang 등, 1981) 등이 보고되고 있다. 그러나, 숙주 자체에서 발생한 암세포에 대한 항암성 여부에 대한 보고는 아직 없다. 따라서, 본 연구에서는 위에서 말한 개량된 검색법을 이용하여 영지 추출물의 항암성에 있어서 지금까지 연구되어온 *in vitro* 시험성과 *in vivo* 시험성을 비교하였다.

재료 및 방법

실험동물

한국 화학연구소에서 분양받은 6주령의 Fischer 344 계 수컷 랫트 44마리를 사용하였다. 2주 동안 예비사육으로 분말사료와 실험실 환경에 적응시킨 후 8주령(체중 195-205g)에 실험에 사용하였다. 사육 및 실험기간 동안의 사육실 환경은 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $60\pm 10\%$ 를 유지하였고, 자연채광하에서 랫트용 케이지(polycarbonate, $26\times 24\times 18\text{ cm}$, 명진기계제작)에 2마리씩 넣어서 사육하였다. 사료(실험동물용 사료, 세일사료)와 식수는 충분히 급여하였다.

시험물질(영지 추출물)조제

건조한 영지의 자실체 100g을 1l의 증류수로 $95\pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 8시간씩 3회에 걸쳐 열수추출하고 여과하여, 여액을 감압 농축하고 5°C 에서 7일 동안 투석시킨 후 $6000\times\text{g}$ 에서 40분간 원심분리하여 얻은 침전물을 냉동건조하여 실험에 사용하였다.

실험설계 및 시험물질 투여

실험동물은 각 군 11마리씩 4군으로 나누어 배치하였으며(Fig.1), 각 실험군 모두에 시험개시일에 간암 유발물질(initiator)인 diethylnitrosamine(DENA, Sigma Chemical Co., USA)을 생리식염수에 용해시켜 체중 kg 당 200 mg 씩 복강 내로 투여하였다(Solt 와 Farber, 1976 ; Solt

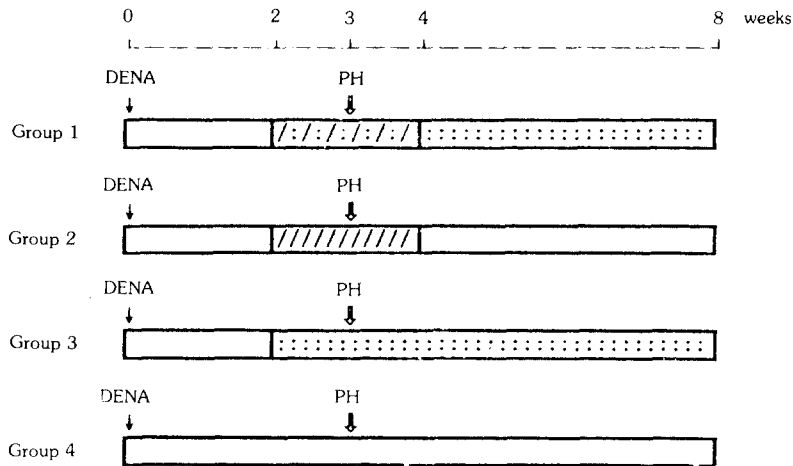


Fig. 1. Dose and schedule.

↓ DENA : Diethylnitrosamine 200 mg/kg body weight, I.P.

↓ PH : 2/3 Partial hepatectomy

////// : Diet containing 0.02% 2-acetaminofluorene

..... : Diet containing 0.1% *Ganoderma lucidum* extract

/:/:/: : Diet containing 0.02% 2-acetaminofluorene and 0.1% *Ganoderma lucidum* extract

등, 1977; Ito 등, 1980b).

제 1군에는 시험개시 제 2주부터 제 4주까지 2주일 동안 간암발생 촉진물질(promoter)인 2-acetaminofluorene(2-AAF, Sigma Chemical Co., USA)이 0.02%가 되도록 사료에 혼합하여 투여하고(Solt와 Farber, 1976), 영지 추출물은 0.1%가 되도록 사료에 혼합하여, 6주(2~8주) 동안 투여하였다. 제 2군에서는 시험개시 제 2주부터 제 4주까지 2주일 동안 2-AAF가 0.02%가 되도록 사료에 혼합하여 투여하고, 그 후 시험종료일까지 basal diet 만 급여하여 제 1군의 대조군으로 하였다. 제 3군에는 시험개시 제 2주부터 시험종료일까지 6주일 동안 영지 추출물이 0.1%가 되도록 사료에 혼합하여 투여하였다. 제 4군에는 시험종료일까지 전 기간 동안 basal diet 만을 급여하여 제 3군의 대조군으로 하였다. 시험개시(DENA 투여) 3주 후에 간변화의 증폭을 위하여 모든 랫트에서 간의 2/3(67%, 좌우 중심엽 및 좌측외엽)를 절제하였다(Higgins와 Anderson, 1931; Waynforth, 1980). 시험개시 8주 후에 모든 랫트를 부검하였다.

체중 및 사료섭취량 측정

체중변화의 추이를 알기 위해 시험개시일과 이후 매주 1회 랫트의 체중을 측정하였다. 랫트의 체중 kg 당 1일 사료섭취량을 계산하기 위해 체중 측정과 병행해서 매주 1회 사료섭취량을 측정하였다.

장기의 처리

시험종료 하루 전에 모든 군의 동물을 절식시켰으며, 체중을 측정할 후 부검하여 간을 적출하고, 간의 무게를 측정하여 체중에 대한 간의 무게비를 계산하였다.

광학현미경 관찰

간 부분절제 후 남은 우측외엽(right lateral lobe) 및 미상엽(caudate lobe)에서 2~3 mm 부께로 긴조직을 채취하여 일부는 10% phosphate buffered formalin에 고정한 후, 일반적인 paraffin 절편을 만들고, hematoxylin 및 eosin 염색을 하여 병변을 관찰하였다. 간 조직의 일부는 냉 아세톤(cold acetone)에 고정하여 6 μ m 두께의 paraffin 절편을 만들고, 전암병변(preneoplastic lesions)의 marker enzyme 인 glutathione S-transferase placental form (GST-P) 양성 foci와 nodules에 대한 면역 조직화학염색을 하였다(Ogiso 등, 1985; Thamavit 등, 1985). Color Video Image Analyzer(TAS plus, Leitz, Germany)를 이용하여 적정 2 mm 이상의 GST-P 양성 foci와 nodules의 수와 면적을 계산하였다(Tatematsu 등, 1979).

전자현미경 관찰

육안적으로 확인된 증식결절(hyperplastic nodules) 부위에서 조직을 채취하여 5% glutaraldehyde(4°C, Sørensen buffer, pH 7.2) 및 1% osmium tetroxide(4°C, Sørensen buffer, pH 7.2)에 각각 90분씩 고정하였다. 에탄올 및 propylene oxide로 탈수하고, epon 침투과정을 거쳐 epoxy resin embedding media에 포매시킨 후, ultramicrotome(Sorvall MT 5000)으로 60

~90 nm 의 초박절편을 만들었다. Uranyl acetate 와 lead citrate 로 이중염색하여, JEM 120-CXII(JEOL) 전자현미경으로 80 kV 에서 관찰하였다.

면역 조직화학적 염색

간 조직내의 GST-P 양성 foci 와 nodules 의 분포를 확인하기 위해 Avidin Biotin Peroxidase Complex (ABC)법을 이용하여 염색을 하였다(Hsu 등, 1981 ; Ogiso 등, 1985). Rabbit anti GST-P antibody (1차 항체)는 나고야 시립대학교 의과대학의 Ito Nobuyuki 교수로부터 공급받았으며, 0.01 M phosphate buffered saline (PBS)으로 10배 희석한 후 bovine serum albumin 이 1%가 되도록 첨가하여 냉장보관하면서 사용하였다. Biotin-labeled goat anti-rabbit IgG (2차 항체)와 ABC는 Vectastain ABC kit, PK 4001 (Vector Lab. Inc., Burlingame, USA)을 사용하였다. Paraffin 조직절편은 xylene 에서 paraffin 을 녹여내고 농도 하강 순의 단계적 알콜과정을 거쳐, moisture chamber 에서 정상 goat serum (1 : 5 희석 ; 0.01 M PBS, pH 7.4), rabbit anti-GST-P antibody (1 : 6000 희석), biotin labeled anti-rabbit IgG (1 : 4000 희석), ABC 처리과정을 거쳐 H₂O₂ 0.02%가 첨가된 0.1% diaminobenzidine (DAB ; 0.2 M Tris buffer, pH 7.6)에 incubation 시켜 정색반응을 일으킨 후 hematoxylin 으로 핵을 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

자료의 통계처리

시험결과치는 2-tailed t-test 를 이용하여 대조값과 비교, 분석하였다. 전 항목에 대하여 모두 5% ($p < 0.05$), 1% ($p < 0.01$) 및 0.1% ($p < 0.001$)의 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

체중변화 및 사료섭취량

모든 군에서 간암 유발물질인 DENA 를 투여한 후 급격한 체중감소를 보이다가 1주 후 부터 회복하기 시작하였다 (Fig.2, 3). 시험 전 기간 동안의 평균체중은 DENA 투여 후 2-AAF 투여와 함께 영지 추출물 0.1%를 투여한 제 1군 (220.1g)이, DENA 투여 후 2-AAF 만 투여한 제 2군 (213.3g)에 비해 현저하게 ($p < 0.01$) 높았다 (Fig.2). 하루 사료섭취량도 제 1군이 대조군인 제 2군 보다 현저하게 ($p < 0.01$) 많았다 (Table 1). 그러나, DENA 투여 후 영지 추출물 0.1%를 투여한 제 3군은 DENA 만 단독 투여한 제 4군에 비해 평균 체중에 있어서 유의성이 인정되지 않았다 (Fig.3). DENA 투여 후 promoter 인 2-AAF 를 투여한 제 1군과 제 2군은 2-AAF 투여와 더불어 체중의 감소를 보였다 (Fig.2). 그러나, 2-AAF 를 투여하지 않은 제 3군 및 제 4군은 같은 기간 동안에 체중감소를 확인할 수 없었다 (Fig.3). 모든 군에서 2/3 partial hepatectomy 를 실시한 시험개시 제 3주 후부터 급격한 체중감소를 보이다가 4주째부터 회복하였다 (Fig.2, 3). 하루 사료섭취량은 DENA 투여 후 영지 추출물만 투여한 제 3군이 대조군인 제 4군에 비해 비교적 많은 편이었으나 유의성은 인정되지 않았다.

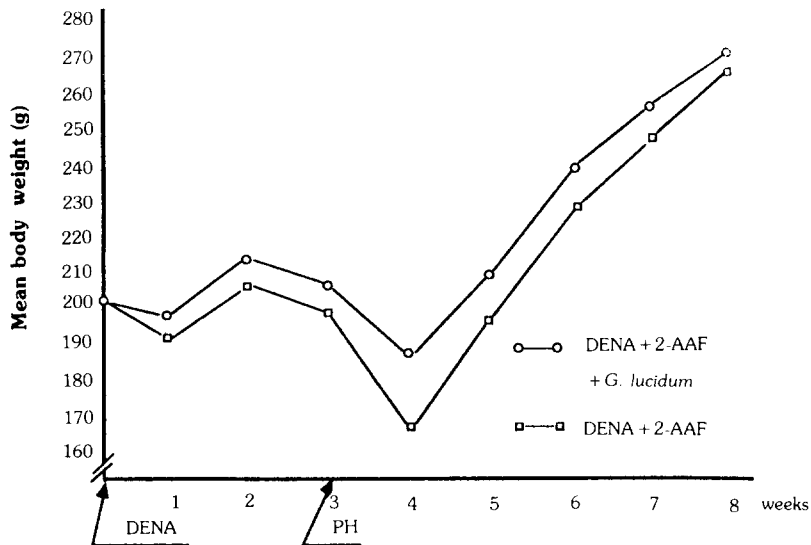


Fig. 2. Effect of *Ganoderma lucidum* on body weight change of rats treated with DENA and 2-AAF.

- * : Significantly different ($P < 0.01$) from group 2.
- PH : 2/3 partial hepatectomy
- DENA : Diethylnitrosamine (200 mg/kg body weight)

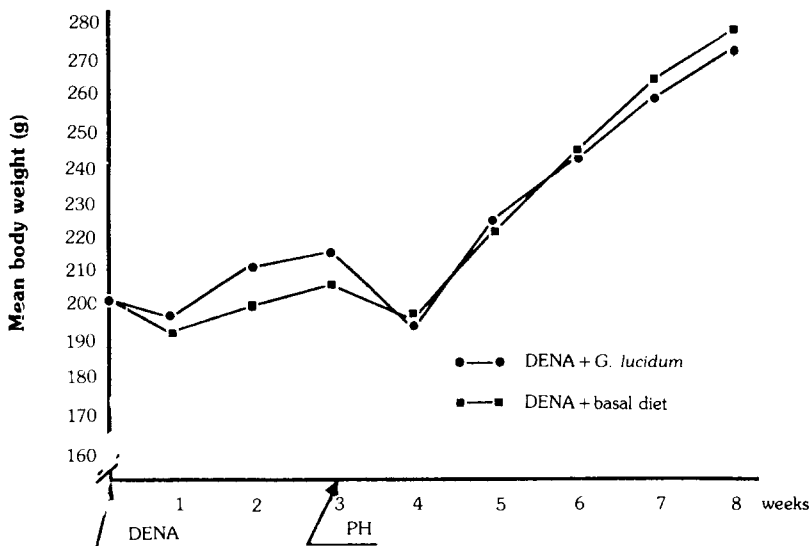


Fig. 3. Effect of *Ganoderma lucidum* on body weight change of rats treated with DENA.

- PH : 2/3 partial hepatectomy
- DENA : Diethylnitrosamine (200 mg/kg body weight)

Table 1. Liver weight-to-body weight ratio and daily food intakes.

Treatment (% in diet)	No. of rats	Final B.W.	Liver/B.W (%)	Daily food intakes(g/kg B.W)
Group 1				
DENA → 2-AAF(0.02) + <i>G. lucidum</i> (0.1)	11	273.8 ± 12.9	4.37 ± 0.62 ^{a)}	80.34 ± 24.80 ^{c)}
Group 2				
DENA → 2-AAF(0.02)	11	272.0 ± 27.2	3.98 ± 0.73 ^{b)}	71.76 ± 27.95
Group 3				
DENA → <i>G. lucidum</i> (0.1)	11	265.3 ± 19.7	2.54 ± 0.09	79.01 ± 17.49
Group 4				
DENA → basal diet	11	271.9 ± 20.8	2.47 ± 0.14	73.92 ± 15.21

Each value is the Mean ± SD

^{a)}Significantly different ($P < 0.001$) from group 3.

^{b)}Significantly different ($P < 0.001$) from group 4.

^{c)}Significantly different ($P < 0.01$) from group 2.

간의 무게비

체중에 대한 간의 무게비에 있어서 영지 추출물을 급여한 제 1군 및 제 3군과 대조군인 제 2군 및 제 4군간의 유의성은 인정되지 않았다(Table 1). Promoter 인 2-AAF를 급여한 제 1군 및 제 2군이 2-AAF를 급여하지 않은 제 3군 및 제 4군에 비해 현저하게 ($p < 0.001$) 높았다(Table 1).

육안 및 광학현미경 소견

간암 유발물질인 DENA를 투여한 후 2-AAF를 투여한 제 1군과 제 2군의 전 개체의 간 표면에서 많은 수의 회백색의 증식결절(hyperplastic nodules)을 육안적으로 확인할 수 있었다. 그러나, 2-AAF를 투여하지 않은 제 3군 및 제 4군에서는 육안적으로 아무런 증식소견도 확인할 수 없었고, 간 표면은 평활하였다. 전 개체의 간엽의 변연부는 둔탁하였고, 전체적으로 종창된 감을 보였다. 제 1군과 제 2군에서 확인된 증식결절의 광학현미경 소견은, 주위의 정상 간조직과 경계가 뚜렷하고, 주위의 실질조직을 압박하고 있었으며, 증식결절내 세포들의 염색성은 약간의 호산성(eosinophilic) 또는 호염기성(basophilic)이었다(Fig.4, 5). 증식결절은 다양한 크기의 세포들로 구성되어 있었으며, 수포성의 확대된 핵 또는 원형의 작은 핵과 선명한 핵소체를 가지고 있었다(Fig.6). 일부의 증식결절 내에서는 공포성 변화를 보이는 괴사소견도 관찰할 수 있었는데, 괴사부위의 일부에서는 낭포(cysts)도 관찰되었다(Fig.4). 증식결절의 주위를 섬유아세포(fibroblasts)가 둘러싸고 있는 소견도 관찰되었다. 제 3군 및 제 4군에서는 주위의 실질조직을 압박하지 않는, 크기가 작은 증식소(foci)를 확인할 수 있었으며, 증식결절은 관찰되지 않았다. 대부분의 증식소는 호산성의 세포들로 구성되어 있었으며, 주위의 실질조직과의 경계가 뚜렷하지 않았다(Fig.7). 증식결절 및 증식소는 GST-P에 대한 면역조직화학적 염색으로 주위의 정상 간조직과 확실하게 구분할 수 있었다(Fig.8, 9).

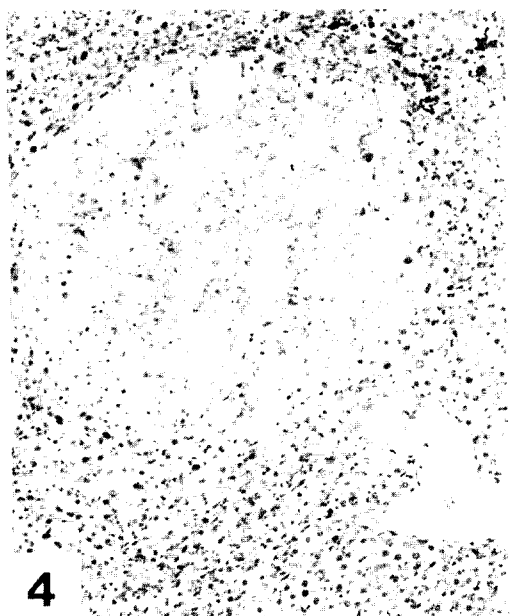


Fig. 4. A eosinophilic hyperplastic nodule induced with DENA as an initiator and promoted by a diet containing 2-AAF for 2 weeks in a hepatectomized rat. The central portion of the nodule has undergone cystic change. H&E $\times 40$.

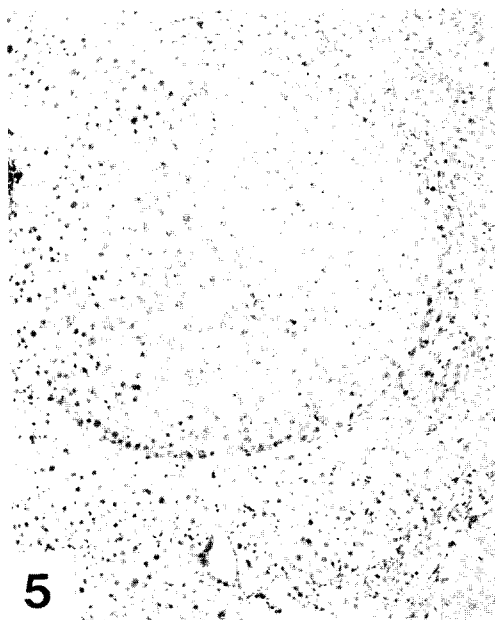


Fig. 5. A basophilic hyperplastic nodule. The nodule cells are discontinuous with the compressed surrounding hepatic cells. H&E $\times 40$.

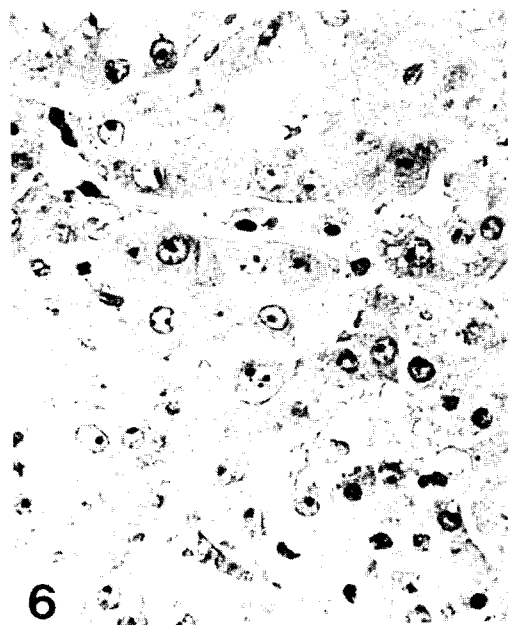


Fig. 6. Magnification of cells within the hyperplastic nodule showing prominent and somewhat pleomorphic nucleoli. H&E $\times 40$.

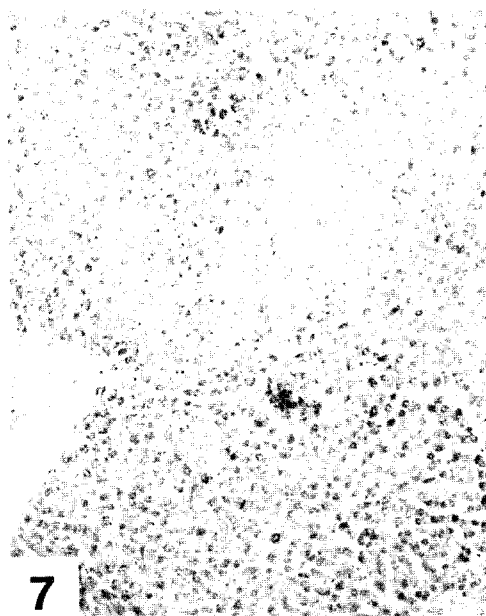
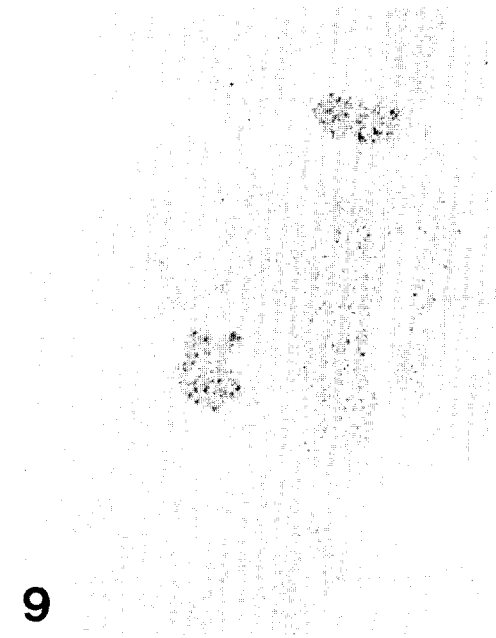


Fig. 7. A eosinophilic focus induced by DENA in hepatectomized rat. H&E $\times 40$.



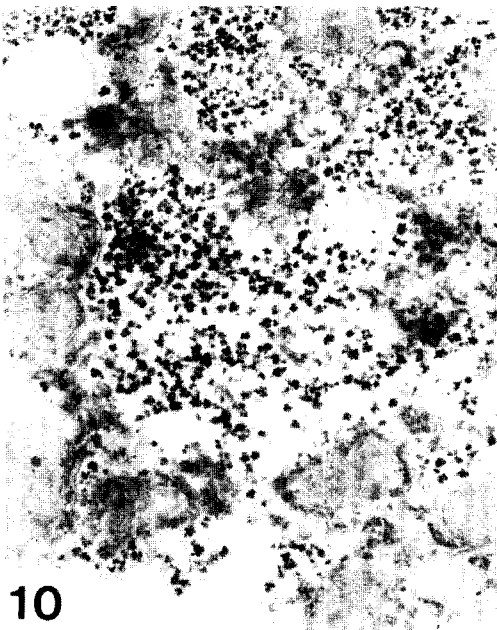
8

Fig. 8. A GST-P positive hyperplastic nodule induced with DENA and promoted by 2-AAF in hepatectomized rat. ABC $\times 40$.



9

Fig. 9. GST-P positive foci induced by DENA in hepatectomized rat. ABC $\times 40$.



10

Fig. 10. Electron micrograph of a cytoplasmic area of a cell in hyperplastic nodule showing aggregates of glycogen particles, elongated rough endoplasmic reticulum(RER). $\times 25,600$.

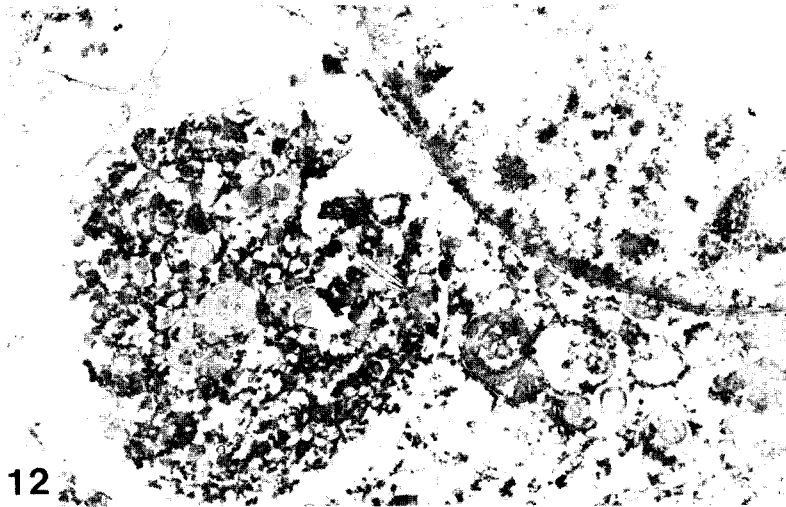


11

Fig. 11. Electron micrograph of hyperplastic nodule showing myelin figure. $\times 7,500$.

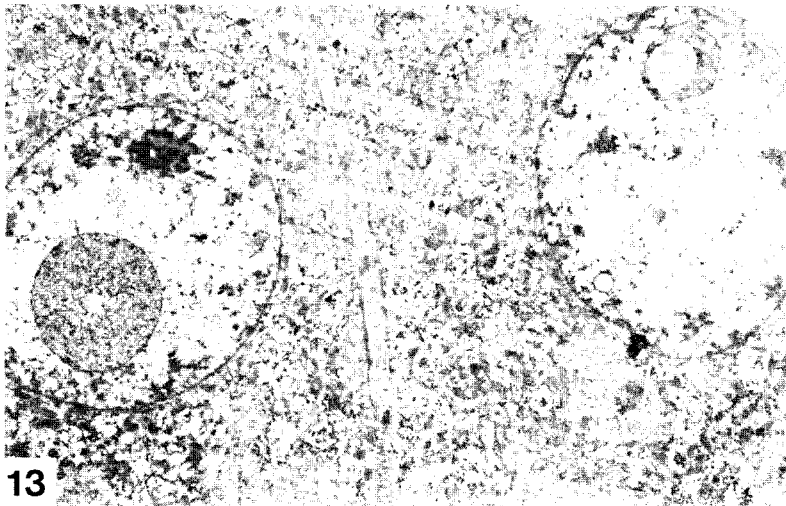
전자현미경 소견

잘 발달된 증식결절 내 세포들은 절식에도 불구하고 세포질내에 glycogen 과립들이 심하게 축적되어 있었으며, 과립 내형질세망(rough endoplasmic reticulum, RER)의 확장 소견도 관찰되었다(Fig.10). RER로부터 ribosomes의 탈락이 현저했으며, RER과 연속된 myelin figure도 관찰되었는데, 그 내부에는 glycogen 과립들과 붕괴된 세포소기관들이 포함되어 있었다(Fig. 11). 결절내의 일부 세포에서는 mitochondria 등 붕괴된 세포소기관들을 포함하고 있는,



12

Fig. 12. Electron micrograph of hyperplastic nodule showing autophagosome type intracytoplasmic inclusion body containing cytoplasmic components. $\times 9,500$.



13

Fig. 13. Electron micrograph of hyperplastic nodule showing intranuclear inclusion bodies composed of homogenous matrix and lipid droplets. $\times 3,700$.

Table 2. Number and total area of glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive foci and nodules in the liver of rats.

Treatment (% in diet)	No. of rats	No. of GST-P foci and nodules/cm ²	Total area of GST-P foci and nodules (mm ² /cm ²)
Group 1			
DENA → 2-AAF(0.02) + <i>G. lucidum</i> (0.1)	11	10.42 ± 4.27 ^{a)}	22.9 ± 11.3 ^{a)}
Group 2			
DENA → 2-AAF(0.02)	11	7.57 ± 4.03 ^{b)}	24.7 ± 17.7 ^{c)}
Group 3			
DENA → <i>G. lucidum</i> (0.1)	11	3.55 ± 2.71	0.53 ± 0.38
Group 4			
DENA → basal diet	11	4.51 ± 2.48	0.55 ± 0.24

Each value is the Mean ± SD

^{a)}Significantly different ($P < 0.001$) from group 3.

^{b)}Significantly different ($P < 0.05$) from group 4.

^{c)}Significantly different ($P < 0.001$) from group 4.

autophagosome type 의 커다란 세포질내 봉입체 (intracellular inclusion body)도 확인되었다 (Fig.12). 증식결절내 세포들은 대체로 핵의 모양이 불규칙하였으며, 핵소체는 비대되어 있었다. 일부의 세포에서는 경계가 뚜렷하고, homogenous matrix 로 구성된 핵내 봉입체 (intranuclear inclusion bodies)도 관찰할 수 있었는데, 봉입체 내부에는 지방적 (lipid droplets) 으로 보이는 물질을 포함하고 있었다. 핵내 봉입체가 관찰된 세포의 일부 핵에서는 섬유소성 구조물도 관찰되었다 (Fig.13).

증식결절 및 증식소의 수 및 면적

각 실험군의 간조직 1 cm²당 증식결절 및 증식소의 수와 면적 (mm²)은 Table 2 와 같다. DENA 투여 후 2-AAF 및 영지 추출물 (0.1%)을 투여한 제 1군과 대조군인 2-AAF 만을 투여한 제 2군간에는 증식결절의 수 및 면적에 있어서 유의성이 인정되지 않았다. 즉, 영지 추출물 (0.1%)이 랫트의 간암 발생과정 중 2-AAF 에 의한 promotion 에 별다른 영향을 미치지 못하였다. DENA 투여 후 영지 추출물을 투여한 제 3군과 대조군인 basal diet 만을 급여한 제 4군간에도 증식소의 수와 면적에 있어서 유의성이 인정되지 않았다. 즉, 영지 추출물 (0.1%)이 DENA 투여에 의한 initiation 에도 별다른 영향을 미치지 못하였으며, 또한 영지 추출물 자체의 promotion 작용도 없었다.

고 찰

랫트의 간에서 화학적 발암물질에 의해 유발된 간세포의 증식병변은, 주위의 실질조직을 압박하지 않으며 간소엽보다 크기가 작은 증식소 (foci)와 주위의 실질조직을 압박하며 크기가 간소엽보다 큰 증식결절 (hyperplastic nodules), 그리고 간암 (hepatocellular carcinomas)으로 크게 분류되는데, 증식소와 증식결절은 간암의 전암병변 (preneoplastic lesions)으로 알려져 있다

(Farber, 1984 ; Ito 등, 1980b ; Scherer 등, 1972). 그러나 발암물질에 의해 유발된 증식소는 reversible 하기 때문에 암으로 발전하기 위해서는 promoter 에 노출이 되어야만 가능할 것으로 생각된다. 랫트 간에서 화학적 발암물질에 의해 유발된 간암병변의 초기변화의 지표효소 (marker enzymes)로서 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) 및 glutathione S-transferase placental form (GST-P)이 잘 알려져 있는데, 이들 효소는 발암물질에 의해 특이적으로 활성이 유도된다(Kitahara 등, 1984 ; Sato 등, 1984 ; Satoh 등, 1985). 특히, glutathione S-transferase placental form (GST-P)은 간에서 해독작용에 관여하는 glutathione S-transferases group 의 한 효소로서, 정상 랫트의 간에서는 거의 검출할 수 없는데, 화학적 발암물질에 의해 유발된 간의 전암병변 (hepatic preneoplastic lesions)에서는 특이적으로 level 이 증가되며 (Kitahara 등, 1980 ; Thamavit 등, 1985), 발암물질을 투여해도 전암병변을 형성하기 전에는 거의 그 level 이 증가되지 않는다(Sato, 1987 ; Satoh 등, 1985). 또한, GST-P는 Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC)법을 이용한 면역조직화학적 검출이 용이하고, γ -GT 에 비해서 전암병변에 대한 특이성이 높아서, 랫트 간에서의 화학적 발암물질에 의한 전암병변의 가장 특이적인 지표효소로 평가되고 있다(Sato 등, 1984 ; Satoh 등, 1985 ; Ogiso 등, 1985 ; Tsuda 등, 1984a).

본 연구에서는 GST-P 를 지표효소로 삼아 ABC 법을 이용하여 전암병변을 확인하였으며, 간 조직 단위면적 (1 cm^2)당 전암병변의 수와 면적 (mm^2)을 대조군과 비교 분석함으로써, 암 발생과정에 미치는 영지 추출물 (0.1%)의 영향에 대해서 알아보았다. Initiator 인 DENA (200 mg/kg) 투여 후 promoter 인 2-AAF (0.02%)와 함께 영지 추출물 (0.1%)을 투여한 제 1군이 DENA 투여 후 2-AAF 만 투여한 제 2군에 비해 시험 전기간 동안의 평균체중이 유의성 있게 높은 이유는 사료 섭취량이 많았기 때문으로 생각된다. 2-AAF 를 투여한 제 1군과 제 2군에서만 시험개시 2 주째부터 3 주까지 체중이 감소한 이유는 promoter 투여로 인한 사료섭취량의 감소 때문으로 생각된다. Initiator 와 promoter 를 모두 투여한 제 1군과 제 2군이 각각 initiator 만 투여하고 promoter 는 투여하지 않은 제 3군과 제 4군에 비해 체중에 대한 간의 무게비가 높은 이유는 Sato (1987)와 Thamavit (1985)가 주장한 바와 같이, promoter 투여로 인한 전암병변의 크기 증가와 더불어 γ -GT, GSTs, Epoxide hydrolase 등의 해독효소들의 증가 때문으로 생각된다. 증식결절 중 염색성이 호염기성을 나타낸 것은 Karasaki (1976)가 주장한 바와 같이 결절내 세포들의 RNase 활성의 감소로 RNA 를 함유하는 세포 소기관들의 염색성이 증가했기 때문으로 생각된다. Daoust 와 Calamai (1971)는 랫트의 간에서 화학적 발암물질에 의해 유발된 호염기성 병변은 hyperplasia 가 neoplasia 로 발전되고 있음을 나타내는 지표라고 주장하였다. 일부의 증식결절 내부가 괴사된 이유는 Solt 등 (1977)이 주장한 바와 같이 증식결절 내부로의 문맥혈류의 공급부족 때문인 것으로 생각된다. 증식결절내 세포들의 세포질내에 glycogen 과립들이 심하게 축적된 이유는 Williams (1987)가 주장한 바와 같이 glucose-6-phosphatase 의 결핍 때문으로 생각된다.

본 연구에서 저자들은, 개량된 단기 검색법을 이용하여 영지 추출물 (0.1%)이 랫트의 간암 발생과정에 유의할 만한 영향을 미치지 못한 것으로 밝혔다.

참고문헌

- Ames, B.N. (1979): Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer, *Science*, **204**, 587-593.
- Ashby, J. and Styles, J.A. (1978): Factors influencing mutagenic potency *in vitro*,

- Nature*, **274**, 20-22.
- Bridges, B.A. (1976): Short-term screening tests for carcinogens, *Nature*, **261**, 195-200.
- Cameron, R.G., Imaida, K., Tsuda, H. and Ito, N. (1982): Promotie effects of steroids and bile acids on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine, *Cancer Res.*, **42**, 2426-2428.
- Coombs, M.M. (1986): Organ specificity in tumor initiation and complete carcinogenesis(including species variation) in Target Organ Toxicity. Vol. II. (Cohen, G.M. (Ed.), CRC Press Inc., Boca Raton), p. 181-208.
- Daoust, R. and Calamai, R. (1971): Hyperbasophilic foci as sites of neoplastic transformation in hepatic parenchyma, *Cancer Res.*, **31**, 1290-1296.
- Farber, E. (1984): The multistep nature of cancer development, *Cancer Res.*, **44**, 4217-4223.
- Higgins, G.M. and Anderson, R.M. (1931): Experimental pathology of the liver; I. Restoration of the white rat following partial surgical removal, *Arch. Pathol.*, **12**, 186-202.
- Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. (1981): Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techiques; A comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures, *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 577-580.
- Ito, N. Inoue, T., Tagawa, Y., Aoki, T. and Kagawa, M. (1986): Development of new rapid bioassay for carcinogens to predict the results of long term carcinogenicity test, *Toxicol. Forum.*, **9**, 601-611.
- Ito, N., Tatematsu, M., Imaida, K., Hasegawa, R. and Murasaki, G. (1980a): Effects of various promoters on the induction of hyperplastic nodules in rat liver, *Gann*, **71**, 415-416.
- Ito, N., Tatematsu, M., Nakanishi, K., Hasegawa, R., Takano, T., Imaida, K. and Ogiso, T. (1980b): The effects of various chemicals on the development of hyperplastic liver nodules in hepatectomized rats treated with N-nitrosodiethylamine or N-2-acetaminofluorene, *Gann*, **71**, 832-842.
- Ito, N., Tsuda, H., Sakata, T., Hasegawa, R. and Tamano, S. (1983): Inhibitory effect of butylated hydroxyanisole and ethoxyquin on the induction of neoplastic lesions in rat liver after an initial treatment with N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine, *Gann*, **74**, 466-468.
- Kang, C.Y., Shim, M.J., Choi, E.C., Lee, Y.N. and Kim, B.K. (1981): Studies on antineoplastic components of Korean basidiomycetes. Mycelial culture and an antineoplastic components of *Ganoderma lucidum*, *Kor. Biochem. J.*, **14**, 101-112.
- Karasaki, S. (1976): Ultrastructural and cytochemical studies on hyperbasophilic foci with special reference to the demonstration of cell surface alterations in hepatocarcinogenesis, *Cancer Res.*, **36**, 2567-2572.
- Kim, B.K., Chung, K.S. and Yang, M.S. (1980): Studies on the antineoplastic components of Korean basidiomycetes, *Kor. J. Mycol.*, **8**, 107-113.
- Kitahara, A., Satoh, K., Nishimura, K., Ishikawa, T., Ruike, K., Sato, K., Tsuda, H. and Ito, N. (1980): Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione S-trans-

- ferase during chemical hepatocarcinogenesis, *Cancer Res.*, **44**, 2698-2703.
- Lee, M.H., Kim, W.H., Shim, M.J., toh, E.C. and Kim, B.K. (1986): Studies on constituents of higher fungi of Korea(LVI), General constituents and immunostimulation of *Ganoderma lucidum*, *Kor. J. Mycol.*, **14**, 149-163.
- Marx, J.L. (1978): Tumor promoters: Carcinogenesis gets more complicated, *Science*, **201**, 515-518.
- Masui, T., Tsuda, H., Inoue, K., Ogiso, T. and Ito, N. (1986): Inhibitory effects of ethoxyquin, 4,4'-diaminodiphenylmethane and acetaminophen on rat hepatocarcinogenesis, *Gann*, **77**, 231-237.
- Miller, E.C. (1978): Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: Presidential address, *Cancer Res.*, **38**, 1479-1496.
- Miyazaki, T. and Nishijima, M. (1981): Studies on fungal polysaccharides. XVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3611-3616.
- Nakanishi, K., Fukushima, S., Hagiwara, A., Seiko, T. and Ito, N. (1982): Organ-specific promoting effects of phenobarbital sodium and sodium saccharin in the induction of liver and urinary bladdered tumors in male F344 rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, **68**, 497-500.
- Narita, T., Watanabe, R. and Kitagawa, T. (1980): Mechanisms of inhibition by simultaneously administered phenobarbital of 3'-methyl 4-(dimethylamino) azobenzene induced hepatocarcinogenesis in rat, *Gann*, **71**, 755-758.
- Nowell, P.C. (1986): Mechanisms of tumor progression, *Cancer Res.*, **46**, 2203-2207.
- Ogiso, T., Tatematsu, M., Tamano, S., Tsuda, H. and Ito, N. (1985): Comparative effects of glutathione S-transferase-positive liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinomas in a long-term assay, *Toxicol. Pathol.*, **13**, 257-265.
- Pitot, H.C. (1979): Biological and enzymatic events in chemical carcinogenesis, *Ann. Rev. Med.*, **30**, 25-39.
- Pitot, H.C. Barsness, L., Golworthy, T. and Kitagawa, T. (1978): Biochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after of single dose of diethylnitrosamine, *Nature*, **271**, 456-458.
- Pitot, H. C. and Sirica, A. E. (1980): The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **605**, 191-215.
- Rinkus, S.J. and Legator, M.S. (1979): Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system, *Cancer Res.*, **39**, 3289-3318.
- Sato, K. (1987): Tumor markers with special reference to marker enzymes for chemical hepatocarcinogenesis, *Toxicol. Forum.*, **10**, 55-64.
- Sato, K., Kitahara, A., Satoh, K., Ishigawa, T., Tatematsu, M. and Ito, N. (1984): The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis, *Gann*, **75**, 199-202.
- Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., Inaba, Y., Hatayama, I. and Sato, K. (1985): Purification, induction and distribution of placental glutathione transferase; A new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis,

- Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **82**, 3964-3968.
- Scherer, E., Hoffmann, M., Emmelot, P. and Friedrich-Frekxa, M. (1972): quantitative study on foci of altered liver cells induced by diethylnitrosamine and partial hepatectomy, *J. Natl. Cancer Inst.*, **49**, 93-106.
- Solt, D. and Farber, E. (1976): New principle for the analysis of chemical carcinogenesis, *Nature*, **263**, 701-703.
- Solt, D.B., Hay, J.B. and Farber, E. (1977): Comparison of the blood supply to diethylnitrosamine-induced hyperplastic nodules and hepatomas and to the surrounding liver, *Cancer Res.*, **37**, 1686-1691.
- Thamavit, W., Tatematsu, M., Ogiso, T., Mera, Y., Tsuda, H. and Ito, N. (1985): Dose-dependent effects of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and ethoxyquin in induction of foci of rat liver cells containing the placental form of glutathione S-transferase, *Cancer Lett.*, **27**, 295-303.
- Tatematsu, M., Murasaki, G., Nakanishi, K., Miyata, Y., Shinihara, Y. and Ito, N. (1979): Sequential quantitative studies on hyperplastic nodules in the liver of rats treated with carcinogenic chemicals, *Gann.*, **70**, 125-130.
- Tsuda, H., Fukushima, S., Imaida, K., Kurata, Y. and Ito, N. (1983): Organ specific promoting effect of phenobarbital and saccharin in induction of thyroid, liver and urinary bladdered tumors in rats after initiation with N-nitrosomethylurea, *Cancer Res.*, **43**, 3292-3296.
- Tsuda, H., Masui, T., Imaida, K., Fukushima, S. and Ito, N. (1984a): Promotive effect of primary and secondary bile acids on the induction of γ -glutamyl transpeptidase positive liver cell foci as a possible endogenous factor for hepatocarcinogenesis in rats, *Cann*, **75**, 871-875.
- Tsuda, H., Sakata, T., Shirai, T., Kurata, Y., Tamano, S. and Ito, N. (1984b): Modification of N-methyl-N-nitrosourea initiated carcinogenesis in the rat by subsequent treatment with antioxidants, phenobarbital and ethinyl estradiol, *Cancer Lett.*, **24**, 19-27.
- Venitt, S. (1980): Bacterial mutation as an indicator of carcinogenicity. *Br. Med. Bull.*, **36**, 57-62.
- Waynforth, H.B. (1980); *Hepatectomy in Experimental and Surgical Technique in the Rat (Academi Press Inc. London)*, pp. 136-139.
- Williams, G.M. (1987): The significance of preneoplastic liver lesion in experimental animals, *Adv. Vet. Sci. Comparat. Med.*, **32**, 21-44.
- Williams, G.M. and Weisburger, J.H. (1986): Chemical carcinogens. in Casarett and Doull's Toxicology. 3rd ed. (Klassen, C.D., Amdur, M.O. and Doull, J. (Ed.), Macmillan, New York) p. 99-173.