

## THE STUDY ON CARCINOGENICITY OF COPTIS RHIZOME AND CROTON TIGLIUM L.

Kyung-Sun Kang, Jae-Jin Cho, Bae-Hwan Kim, Hyung-Ook Kim,  
Dong-Jin Shin, Yong-Soon Lee, Yoon-Kyu Lim\*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

\*College of Agriculture, Cheju National University, Cheju, Korea

(Received June 12, 1992)

(Accepted June 23, 1992)

**ABSTRACT:** Sprague-Dawley rats aged six weeks divided into four groups and group 1, 2, 3 and 4 of rats were given an intraperitoneal injection of diethylnitrosamine at 200 mg/kg body weight. Group 4 was Control. Two weeks after beginning of the experiment, group 1 of rats were begun to feed on water containing 0.05% phenobarbital sodium as a promoter for six weeks, and CP-2 were intraperitoneally given to rats of group 2(20 mg/kg) and group 3(1 mg/kg). Three weeks after beginning of the experiment, partial hepatectomy was performed in all rats. Preneoplastic foci were identified histopathologically by glutathione S-transferase placental form (GST-P) activity. In the Immunohistochemical quantitative analysis of carcinogen-induced foci, it was concluded that CP-2 was not carcinogen.

**Key words:** glutathione S-transferase placental form (GST-P), CP-2

### 서 론

최근들어 세계적인 추세는 새로이 합성해 내는 물질보다는 이미 자연계에 존재하면서 과학적으로는 증명되지 않았지만 그 효과가 입증되는 물질 즉, 한방에서 이용되는 생약 중에서 추출하여 이용하려는 경향이 두드러지게 나타나고 있다. 그러나 이러한 물질들의 효과와 안전성을 입증할 만한 자료들이 불충분하기 때문에 이들에 대한 독성의 평가는 중요하다 하겠다. 따라서 이런 물질들에 대한 독성 시험중 발암성 내지는 항암성이 있는가를 알아보는 것은 또한 중요하다. 이런 물질에 관한 연구가 국내에서도 활발하게 진행이 되고 있는데, 1989년 김과 이는 영지 추출물의 항암성에 관한 연구를 단기 발암성 스크리닝법을 이용하여 증명하려 하였으나 랫드의 간장에서 확실한 항암효과를 나타내지는 못

\*To whom correspondence should be addressed

\*\*Current Address;

하였다. 한편, 1988년 김과 이는 랫드의 간장을 이용한 단기발암성 검색법을 이용하여 홍삼이 간암발생을 억제하였음을 증명하였으며, 1989년 임 등은 랫드의 위암을 이용한 중기 발암성 검색법의 정립과 더불어 홍삼이 역시 위암의 발생을 억제시켰다고 보고 하였다.

따라서 본 연구는 한방에서 사용되고 *Coptis rhizome* 및 *Croton tiglium L.*으로 부터 추출한 CP-2가 항암제로 사용하기에 앞서, 독성시험의 일환으로 이물질 자체가 발암성이 있는지를 알아보기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시험물질

*Coptis rhizome*을 정선하여 약전통칙 분말도에 따라 조말로한 160 g과 *Croton tiglium L.*을 정선하여 껍질을 벗긴 후 조말로한 다음 핵산으로 반복처리하여 실온에서 풍건시킨 가루 160 g을 혼합한 후 증류수를 가하여 100°에서 추출 농축한 다음 여과시킨다.

이 여과액을 고압처리한 다음 하루밤 방치시킨 후 원심여과한다. 원심여과액에  $\text{CHCl}_3$ 을 넣고 3분간 진탕 추출하여 수층을 취한다. 수층에 다시 ether을 넣고 3분간 진탕 추출한 후 ether층을 버린다. 이 과정을 2회 반복한다. 수층을 취하여 잔존 ether을 완전히 제거한 다음 농축시킨다. 이 농축액을 탈크 및 membrane filter장치로 여과하여 추출액을 얻는다. 이 액을 멸균처리 후 동결건조시켜 CP-2 최종제품을 제조한후 냉암소에 보관하면서 시험에 사용하였다.

### 실험동물

5주령의 Sprague-Dawley(SD)랫드를 서울대학교 실험동물 사육장으로 부터 공급받아 동물 입수 후 약 1주일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시켰으며, 순화기간 중 일반상태를 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

본 시험은 온도  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , 상대습도  $60 \pm 10\%$ , 환기 회수 10-12회/hr, 조명시간(오전 7시-오후 7시), 조도 150-200 Lux로 설정된 서울대학교 수의과대학 공중보건학교실 동물실험실에서 실시되었다.

순화기간 및 시험기간중에 랫드용 폴리카보네이트 케이지(polycarbonate cage,  $26 \times 24 \times 18$  cm, 명진 기계제작)에 3마리씩 넣어서 수용하였다. 사육상자에는 시험번호, 동물번호 및 투여량을 기입한 tag을 붙였다.

사료는 랫드용 고형사료(제일제당 주식회사)를 자유섭취시켰으며, 음수는 상수도수를 자유 음용토록 하였다.

### 실험설계 및 시험물질 투여

본 시험물질은 1 mg/kg이 사람에서의 임상용량으로써, 저용량군은 임상용량을, 고용량군은 임상용량의 20배(20 mg/kg)로 조제하여 투여하였다.

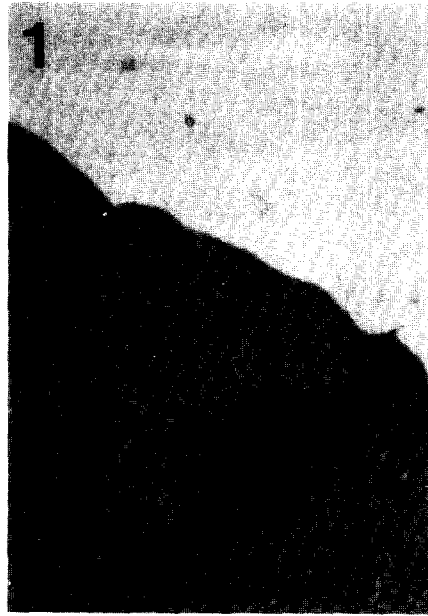
양성대조군은 시험개시 2주부터 8주까지 6주간 약한 carcinogen으로 알려진 phenobarbital sodium을 음수에 0.05% 섞어 투여하였다.

저용량군은 시험개시 2주부터 8주까지 6주간 1 mg/kg을 주 5회 복강으로 투여하였으며, 고용량군은 시험개시 2주부터 8주까지 6주간 20 mg/kg을 주 5회 복강으로 투여하였다. 음성대조군은 시험종료시까지 기초사료만을 먹었다.

모든군은 시험개시에 DEN(Diethylnitrosamine, Sigma)을 복강내로 체중 kg당 200 mg을 투여하였고, 간 변화의 증폭을 위하여 시험개시 3주에 2/3의 간염(좌우 중심엽 및 좌측 외엽)을 절제하는 수술을 실시하였다(강 등, 1990).

### 체중 및 사료섭취량 측정

체중변화의 추이를 얻기 위해 시험개시일과 이후 매주 1회 랫드의 체중을 측정하였다. 랫드의 1마리당 1일 사료섭취량을 계산하기 위해 체중측정과 병행해서 매주 1회 사료섭취량을 측정하였다. 사료통에 충



**Figure 1.** GST-P positive foci. This foci was distinguished from surrounding normal tissue. Immunohistochemical staining.  $\times 40$ .

분한 양의 사료를 채워 무게를 측정한 후 급여하고, 다음날 같은 시각에 남은 양을 측정하여 사료섭취량을 계산하였다.

#### 장기의 처리

시험종료 하루전에 모든군의 동물을 절식시키고 체중을 측정한 후 부검하여 간을 적출하였다. 그리고 간의 무게를 측정하여 체중에 대한 간의 무게비를 계산하였다.

#### 광학 현미경 관찰

간 부분절제 후 남은 우측외엽(right lateral lobe) 및 미상엽(caudate lobe)에서 2-3 mm 두께로 간 조직을 채취하여 일부는 10% phosphate buffered formalin에 고정한 후 일반적인 paraffin 절편을 만들어 Hematoxylin 및 Eosin 염색을 하여 병변을 관찰하였으며, 면역 조직 화학적 염색을 위해 간 조직의 일부는 냉 아세톤(cold acetone)에 고정하여 5  $\mu$ m paraffin 절편을 만들어, 전암병변(preneoplastic lesion)의 marker enzyme인 glutathione S-transferase placental form(GST-P)양성 foci와 nodules의 분포를 확인 하기 위해서 Avidin Biotin Peroxidase Complex(ABC)법을 이용하여 염색을 하였다. Rabbit-anti-GST-P antibody(1차 항체)는 나고야 시립대학교 의과대학으로 부터 공급받았으며, 0.01 M Phosphate buffered saline으로 10배 희석한 후 Bovine Serum Albumin(BSA, Sigma)이 1%가 되도록 첨가하여 냉장보관하면서 사용하였다(임 등, 1990).

Color Video Image Analyzer를 이용하여 직경 2 mm 이상의 GST-P 양성 foci와 nodules의 수와 면적을 계산하였다.

#### 관찰자료의 해석 및 평가

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

## 결 과

### 체중변화 및 사료섭취량

모든군에서 간암 유발물질인 DEN를 투여한 후 체중의 증가가 거의 보이지 않다가 1주후부터 현저하게 체중이 증가하다가 간 부분절제를 실시한 후 모든군에서 체중의 감소가 관찰되었으며, 1주후부터 다시 회복되었다. 사료섭취량은 유의할 만한 변화를 관찰하지 못하였다(Table 1).

### 간의 무게비

체중에 대한 간의 무게비는 대조군에 비해 시험물질 투여군 모두 유의한 변화를 나타내지 않았고, PB 투여군에서는 대조군에 비하여 유의하게 높았다( $p < 0.001$ )(Table 2).

### 육안 및 광학 현미경 소견

간암 유발물질인 DEN(200 mg/kg)를 투여한 후 기초사료만 먹인 군 및 시험물질을 저용량과 고용량으로 투여한 군 모두 육안적으로 아무런 증식소견을 관찰할 수 없었으나, PB를 투여한 군은 대체로 간의 변

**Table 1.** Feed consumption rate (unit: gm/rat)

Summary of Weekly Mean Feed Consumption (g)					
Weeks	Group	Control	CP2-High	CP2-Low	Phenobarbital
1	Intake (g)	27.70	28.00	25.00	26.7
	S. D.	0.90	1.40	5.00	2.65
2	Intake (g)	28.30	27.30	24.80	28.22
	S. D.	1.50	1.50	5.80	1.59
3	Intake (g)	12.80	13.00	8.63	15.21
	S. D.	1.40	0.00	0.63	0.66
4	Intake (g)	32.15	26.60	36.13	32.26
	S. D.	1.35	2.40	0.63	1.55
5	Intake (g)	43.90	27.55	31.30	29.22
	S. D.	3.90	7.05	0.70	0.72
6	Intake (g)	35.60	27.73	36.88	29.35
	S. D.	0.60	2.53	1.88	1.95
7	Intake (g)	32.30	30.90	30.04	29.23
	S. D.	2.30	4.90	3.29	3.32

**Table 2.** Final body weight and liver/body weight ratios at 8 weeks

Group	Treatment	Animal Number	Final body weight (gm)	Final liver weight (gm)	Liver/body weight ratio (%)
1	DEN → Basal Diet	7	338.89 ± 51.63	11.08 ± 1.83	3.27 ± 0.24
2	DEn → CP-2 (low)	6	363.00 ± 29.42	11.73 ± 1.40	3.24 ± 0.41
3	DEN → CP-2 (high)	7	350.71 ± 41.78	11.59 ± 1.60	3.35 ± 0.65
4	DEN → PB <sup>o</sup>	7	350.23 ± 20.54	15.27 ± 0.84	4.36 ± 0.57**

Each value was mean ± S.D.

\*\* : Significantly different from control ( $p < 0.01$ )

<sup>o</sup> Phenobarbital sodium



**Figure 2.** Serial section of Fig. 1. Hematoxylin & Eosin staining.  $\times 40$ .



**Figure 3.** High magnification of GST-P positive foci of Fig. 1.  $\times 100$ .

연부가 둔탁하고 종창되어 있었다. 광학현미경적 소견은 모든군에서 간엽전체에 드물게 산재한 작은 병변들이 관찰 되었는데 이러한 병변들은 주위의 정상조직과 어느정도 구분이 되지만 한계가 명료하지는 않았으며, 주위의 정상조직을 압박하는 양상을 보이지 않았다. 좀더 자세히 병변내의 세포를 살펴보면, 세포질이 거의 없이 공포를 형성하고 있었으며, 핵은 염색상이 흐리며 확장되어 있었다(Fig. 3). 이러한 병변들이 전암병변인지를 확인하기 위하여 간장의 정상조직에는 유도가 되지 않고 전암병변(preneoplastic lesion)에서만 특이적으로 유도되는 glutathion S-transferase placental form(GST-P)에 대한 면역조직화학적 염색을 해 보았을때 주위 정상조직과 구별이 되는 전암병변임을 확인하였다(Fig. 1, 3).

### 증식결절 및 증식소의 수와 면적

각 실험군의 간 조직 1 cm<sup>2</sup>당 증식결절 및 증식소의 수와 면적(mm<sup>2</sup>)을 구하였다. DEN 투여(200 mg/kg) 후 시험물질을 저용량 및 고용량으로 투여한 군 모두에서 대조군과 비교하여 유의한 변화를 관찰하지 못하였으며, 오히려 대조군에 비하여 GST-P 양성병변의 수와 면적이 감소하는 경향이 있었다. 그러나 PB 투여군은 대조군에 비하여 GST-P 양성 증식소의 수와 면적에서 유의하게 증가하였다(p<0.01)(Table 3).

## 고 찰

중기 발암성 스크리닝법 모델을 이용하여 (주) 녹십자의 CP-2의 발암성을 알아보기 위해, 랫드의 간에서 전암병변의 지표효소인 glutathion S-transferase placental form(GST-P)을 이용하여 증명하고, Color Video Image Analyzer를 이용하여 전암병변의 수와 면적을 계산한 후 이들 시험물질 투여군과 대조군을 비교분석하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 간장의 체중에 대한 상대 비율은 대조군에 비해 시험물질 투여군 모두 유의한 변화를 나타내지 않았으나, PB 투여군에서는 유의하게 높았다. 이렇게 PB 투여군의 간장이 유의하게 높은 이유는 간장에 효소의 유도가 많이 되었기 때문인 것으로 생각된다(장 등, 1991). 즉, PB의 투여는 간에서 이물질 대사효소의 유발과 간세포의 비대(Hepatocyte hypertrophy), DNA 합성의 증가, SER(smooth endoplasmic reticulum)의 증식 등을 유발시킨다고 하며(Weghorst *et al.*, 1989), 또한 단백합성, 인지질합성의 증가, cytochrome P-450 isoenzyme(Schwarz *et al.*, 1987), glutathion conjugation 및 혈류 등이 증가한다고 한다(Sipes and Gandolfi, 1986).

Table 3에서 보는 바와 같이 생약제제인 CP-2의 전암병변의 수와 면적은 음성대조군에 비교해 보았을 때 저용량군 및 고용량군에서 아무런 유의차가 없었으며, 오히려 GST-P의 수와 면적에 있어서 감소하는 경향이 있었다. 그러나 양성대조물질인 PB 투여군은 GST-P 효소의 유도가 현저하여 발암을 촉진하는 것으로 생각되어진다. 이러한 PB의 발암촉진 효과는 간장의 전암병변에 활성산소의 형성을 촉진함으로써

**Table 3.** Number and total area of glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive lesions in rat liver

Treatment	No. of Rats		No. of GST-P foci /liver (cm <sup>2</sup> )	Total area of GST-P foci /liver (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
	Initial	Final		
DEN → Basal Diet	10	7	2.74 ± 0.56	0.11 ± 0.02
DEN → CP-2 (Low)	10	6	2.08 ± 0.96	0.10 ± 0.05
DEN → CP-2 (High)	10	7	2.37 ± 0.08	0.08 ± 0.03
DEN → PB <sup>a</sup>	10	7	14.31 ± 3.64**	0.93 ± 0.24**

Each value was mean ± S.D.

<sup>a</sup>Phenobarbital sodium

\*\* : Significantly different from basal diet group(p<0.01)

간암발생을 촉진하는 것으로 되어 있다(Wener *et al.*, 1990). 본 시험물질은 Ames 시험에서 고용량 투여군이 변이원성이 있는 물질로 판정이 되었으나(자료 제시 안함), 소핵시험에서는 음성이었다. 한편, 본시험에서 랫드의 간장을 이용한 생체내 시험결과 GST-P 양성병변의 수와 면적이 대조군에 비하여 유의하지 않은 것으로 보아 발암성이 없는 것으로 사료되어진다.

### 참고문헌

- 강경선, 김형진, 이영순 (1991): 간 발암성 물질 검색에 있어서 Glutathion S-transferase Placental form 양성 병소와 철저항 병소의 유효성 비교연구, 한국식품위생학회지, **6**, 1-12.
- 임윤규, 강경선, 이영순 (1990): 단기 발암성 검색법을 이용한 축산 식품에 잔류할 수 있는 합성홀몬의 발암촉진효과에 대한 연구, 한국식품위생학회지, **5**, 179-186.
- 장민열, 김형진, 이영순 (1991): 신생랫드를 이용한 화학적 간암 발생의 조기진단에 관한 연구, 한국식품위생학회지, **6**, 13-26.
- Chang-Hyeong Lim, Gyeong-Haeng Hur and Yong-Soon Lee (1989): Inhibitory Effects of Red Ginseng Extract on Development of Pepsinogen 1 Decreased Pyloric Glands in Rat Stomach, *Korean J. Toxicol.*, **5**, 151-166.
- Jong-Soo Kim and Yong-Soon Lee (1989): Effects of Ganoderma Lucidum Extract on the Development of Rat Liver Preneoplastic Lesions, *Korean J. Toxicol.*, **3**, 135-149.
- Schwarz, M., Peres, G., Buchmann, A., Friedberg, T., Waxman, D.J. and Kuz, W. (1978): Phenobarbital Induction of cytochrome P-450 in normal and Preneoplastic Rat Liver: Comparison of Enzyme and mRNA Expression as detected by immunohistochemistry and in situ hybridization, *Carcinogenesis*, **8**, 1355-1357.
- Sipes, I.G. and Gandolfi, A.J. (1986): Biotransformation of Toxicants. In; Casarett and Doull's Toxicology, 3rd ed., Klassen, C.D., Amdur, M.O. and Doull, J.(ed), New York, Macmillan, pp. 99-173.
- Yun-Bae Kim and Yong-Soon Lee (1988): Inhibitory Effect of Red Ginseng Extract on Preneoplastic Nodule Formation in the Rat Liver Observed by Rapid Bioassay of Carcinogenesis, *Korean J. Toxicol.*, **4**, 159-179.
- Weghorst, C.M. and Klaunig, J.E. (1989): Phenobarbital Promotion in diethylnitrosamine-induced infant B6C3F1 mice: Influence of Gender, *Carcinogenesis*, **10**, 609-612.
- Wener, S., Karin, S., Wener, K. and Michael, S. (1990): Phenobarbital Enhances the Formation of Reactive Oxygen in Neoplastic Rat Liver Nodule, *Cancer Res.*, **50**, 7015-7022.