

랫드의 간암발생과정에서 홍삼의 항암효과와 자연살해세포의 활성증강효과와의 연관성에 관한 연구

강경선 · 이영순

서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

Involvement of the Enhancement of Natural Killer Cell Activity on the Anti-Cancer Effect of Red Ginseng during Rat Hepatocarcinogenesis

Kyung-Sun Kang, Yong-Soon Lee

Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University
Suwon 441-744, Korea.

(Received February 26, 1997)

(Accepted March 25, 1997)

ABSTRACT : This study was performed to examine the anti-cancer effect of Red Ginseng in the DEN-GalN-PH-induced hepatic tumor model system in rats. One hundred of male SPF Sprague-Dawley rats(6-weeks old) were randomly divided into five groups. Rats in groups 1, 2, 3, and 4 were administered to diethylnitrosamine intraperitoneally 200 mg/kg body weight for the cancer initiation. Rats in group 5 were given to saline as a control. On two weeks after cancer initiation, rats in groups 1 and 3 were fed on diet containing 0.01% of acetylaminofluorene(AAF) which is strong cancer-promotor for 6 weeks, while rats in groups 2 and 4 were fed on water containing 0.05% of phenobarbital which is weak cancer-promotor for 6 weeks. Rats in groups 1 and 2 were treated with diet containing 3% of Red Ginseng for six weeks(from 9th week till 15th week after cancer initiation). Rats in all groups were necropsied time-sequentially at 8, 15, and 36 weeks. The hepatic lesions of rat treated with carcinogens expressed glutathione S-transferase placental form(GST-P) at 8 week. The GST-P positive foci of rats treated with AAF were larger than that of any other rats, while the GST-P positive foci of rats treated with AAF and red ginseng were significantly decreased. This anti-cancer effect of Red ginseng might be involved in the enhancement of natural killer cell activity. To know whether there is direct relationship between Red Ginseng and natural killer cell activity, the activity of natural killer cell was examined after treatment AAF, AAF+Red ginseng and Red ginseng only, respectively. Comparing with natural killer cell activity in AAF-treated group, natural killer cell activity was significantly activated in AAF+ Red ginseng-treated group. This indicated that Red ginseng might enhance natural killer activity after treatment carcinogen in rats. These results suggested that Red ginseng might have a cancer prevention ability by promoting natural killer cell activity during hepatocarcinogenesis.

Key Words : Red ginseng, Natural killer cell, Anticancer effect, Rat, Liver, Tumor

I. 서 론

암은 독자적으로 성장할 수 있으며, 정상조직과는 달리 다른조직으로 침윤되거나 전이하여 거의 무제한적으로 증식하는 특성을 가지고 있는데, 바이러스, 진균독소, 의약품, 농약, 첨가물, 호르몬, 화학약품 및 산

업폐기물등의 여러 요인에 의해 유발 된다고 알려져 있다(Ames, 1983; Gelderblom 등, 1988, 임 등, 1990). 이러한 내적 또는 외적 물질들이 암을 발병하는 기전에 대해서는 최근 DNA의 손상에 의하여 발암이 1차적으로 유발된다는 것이 밝혀진 이래로 *c-myc*, *H-ras* 등의 발암유전자(oncogene)들과 암의 발생과의 상관관계를 밝히려는 시도들이 있었다(Hayashi 등, 1984; Makino 등, 1984; Beer 등, 1986). 그러나 아직도 발암

*이 논문의 일부는 한국인삼연초연구소의 지원으로 이루어졌음.

의 기전 및 특성에 관하여 많은 부분이 아직 밝혀져 있지 않다.

암에 대한 치료법으로는 외과적처치, 방사선요법, 화학요법, 및 면역요법 등이 활용 되고 있는데 그 중에서도 항암제에 의한 화학요법은 암중에 대한 감수성의 차, 치료후의 부작용, 재발, 합병증등의 문제점 때문에 항암제나 방사선요법에 의한 부작용을 감소 시키면서도 암세포에 대하여는 특이적으로 항암효과를 증대시키는 연구가 진행 되고 있다. 최근 국내에서는 새로운 항암제의 합성보다는 이미 자연계에 존재하면서 그 효과가 어느정도 인정되고 있는 전통적인 생약제제중에서 항암제를 개발하려는 노력이 시도되고있다(김과이, 1989; 강 등, 1992a).

이들 여러 생약제제중에서 가장 널리 사용 되고 있는 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 식물분류학상 오과과(*Araliaceae*)에 속하는 다년생 초본(草本)인 삼의 근경으로, 한방에서 보기강장제(補氣強壯劑)로 널리 사용되고 있다(이, 1975). 인삼은 그 가공처리 방법에 따라 수삼, 백삼, 홍삼 3가지로 분류하는데 그중에서도 홍삼은 백삼과 성분 및 효능면에서 거의 동일하나 처리과정중 saponin의 조성 변화와 그 분해산물의 생성 및 갈색색소물질이 증가된 것이라고 알려져 있다(한국인삼연초연구소, 1992).

인삼의 항암효과에 관한 연구로는, Ota등은 배양종양세포주에 인삼을 투여시 reverse transformation의 발생을, Yamamoto등은 인삼 saponin성분인 panaxitriol의 종양세포 성장억제 및 세포살생효과를, 윤 등은 DMBA를 투여하여 유발한 폐선종마우스에 있어서 홍삼의 종양증식억제효과 및 aflatoxin B1투여 마우스에 있어서 홍삼의 폐선종 및 간암증식억제효과를 관찰하였다. 또한, 김 등(1988)은 랫드에 있어서 간발암 촉진 물질인 AAF와 홍삼을 병용투여시 전암지표효소인 GST-P양성병소(foci)를 감소시킨다는 것을 관찰하였고, 임 등(1989)은 랫드의 위암발생과정중 위발암 촉진 물질인 ENNG와 홍삼을 병용투여시 위암에 관한 전암지표효소인 PAPG 를 유의하게 감소시켜 위암의 발현이 억제 되는 것을 보고하였다. 그러나 이러한 연구들은 조직병리학적 측면에서만 다루었을뿐 그 기전에 관한 연구는 아니었다.

인삼의 성분중 항암성을 나타내는 성분으로는, 수용성 성분인 인삼 saponin(Park과 Park, 1992; Yamamoto 등, 1990)과 지용성 성분 중에서 항암성을 발휘하는 것으로 보고되고 있다(황, 1992). 그러나 인삼의 항암효과는 어느 특정성분 보다는 여러 복합성분들의 상호작용으로 생각되며, 인삼의 항암작용은 일반적으로 면역

증진과 관계가 있는것으로 보고되고 있으나 아직 확실치는 않다(오 등, 1987; 최 등 1990; 전 등, 1991; 김 등, 1991).

최근들어 생체내에서 암, 바이러스, 세균등에 대한 방어기구중 특히 세포성 면역와 관련하여 T 림파구가 면역감시기능(immune surveillance)을 담당하는 것으로 생각되었으나 60년대말 70년대초부터 비특이적으로 생체의 이물질을 파괴하는데 NK 세포가 또한 면역기구를 담당하는 것으로 밝혀졌다(Herberman과 Holden, 1978; Herberman과 Ortaldo, 1981).

이러한 연구보고들을 기초로 Yun 등(1985) 및 김과정(1989)은 인삼이 natural killer(NK) 세포활성을 높여준다 것을 보고하였다. 한편, Leu등은 화학적 간암발생 모델인 DEN-AAF-PH모델계에서 DEN-AAF, DEN-PH, AAF-PH처치는 NK활성을 억제시키지 못한 반면, 완전한 간발암유도 처치인 DEN-AAF-PH에서 NK활성이 억제되었다는 것을 보고하여, 화학적 발암처치와 NK활성과의 상관관계를 밝혀냈다.

현재까지의 대부분의 연구는 시험관내에서 인삼의 항암성을 알아보는 시험이 주를 이루어 왔고, 동물실험에서도 발암물질과 인삼을 병용투여하여 항암효과를 알아보는 시험들로, 인삼투여를 중지하고 긴 기간 동안 인삼의 항암효과가 지속되는지를 알아보는 연구는 지금까지 수행되지 않았다.

따라서 본시험은 랫드의 간에 암 유발 및 축진을 완전하게 시킨 후에 인삼을 비교적 짧은기간 투여하여 홍삼이 암의 진행과정속에서 항암효과가 있는지와 홍삼투여를 중지한 후에도 홍삼의 효과가 지속되는 지를 조직병리학적으로 알아보았다. 또한, 생체면역기구중의 하나인 NK세포의 활성화와 홍삼의 항암성과의 관련 여부를 알아보기 위하여 본시험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 화학적으로 유도한 랫드의 간암에 대한 홍삼의 효과에 관한 병리학적 관찰

1) 실험동물 및 사육환경

한국화학연구소에서 생후 5주령의 수컷 specific pathogen free(SPF) Sprague-Dawley 랫드 100 마리를 분양받아 1주일간 사육실 환경에 순응 시키면서 동물의 건강유무를 확인 후 6주령에 실험에 이용하였다.

본 시험은 온도 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기회수 10-12회/hr, 조명시간 12시간(07:00-19:00), 조도 150-300 Lux로 설정된 서울대학교 수의과대학 소동물

실험실(1동 본관 1호실)에서 실시하였다. 순화기간 및 시험기간중에 랫드를 polycarbonate 상자(26×42×18 cm, 명진기계제작)에 3마리/사육상자로 사육하였다.

또한, 사료는 실험동물용 가루사료(제일사료 주식회사)를 자유섭취 시켰으며, 음수는 상수도를 자유 섭취 시켰다.

2) 시험물질

발암유발 물질로 체중 kg당 200 mg으로 diethylnitrosamine(DEN)을 1회 복강내 투여하였으며, 발암촉진 물질로 2-acetylaminofluorene(AAF)과 phenobarbital (PB)을 각각 사료와 물에 0.01%, 0.05%로 첨가하여 급여하였다.

간의 증식촉진을 위하여 D-galactosamine을 체중 kg당 300 mg을 복강내 투여 하였다. 고려홍삼 정분을 한국인삼연초연구소로부터 공급받아 사료에 3%로 혼합하여 급여하였다.

3) 실험설계 및 약물투여

실험군은 SD수컷 랫드 100마리를 각 군당 20마리씩 총 5개군으로 나누었으며, 모든군의 랫드는 시험개시일에 간암유발물질인 DEN을 생리식염수에 용해시켜 체중 kg당 200 mg씩 복강내로 1회 투여하였으며, 2주 후에 제1군과 제3군에는 사료에 간암촉진물질인 AAF를 0.01%의 농도로 사료에 첨가하여 시험개시후 8주까지 6주간 투여하였으며, 같은 기간에 제2군과 제4군에는 PB를 음수에 0.05%되게 투여하였다. 또한, 제1군과 제2군에는 시험개시 제9주부터 제15주까지 홍삼정분을 3%의 농도로 사료에 첨가 공급하였다. 간변화의 증폭을 위하여 시험개시후 제2주에 D-galactosamine을 체중 kg당 300 mg되게 1회 복강내로 투여하였으며, 시험개시후 제 5주에 간의 좌우 중심엽과 좌측외엽을 부분절제하는 수술을 전 시험동물에 대하여 실시 하였다 (Ito 등, 1988a; Ito 등, 1988b; 임 등, 1990). 부검은 경시적변화를 보기 위하여 시험개시후 8주, 15주, 36주에 부검하였다(Fig. 1).

4) 광학 현미경적 관찰

랫드를 ether로 마취후 방혈치사 시킨 다음 각 장기를 10% 중성 포르말린에 고정후, 자동조직 처리기 (Fisher 166A)로 조직을 처리하여 파라핀 포매 한후 4 μm의 절편을 제작한후 hematoxylin과 eosin염색을 하여 광학현미경하에서 관찰 하였다.

면역조직 화학적 염색을 위해 간의 미상엽, 내측우엽, 외측우엽을 일부잘라내어 냉 아세톤에 고정후 파

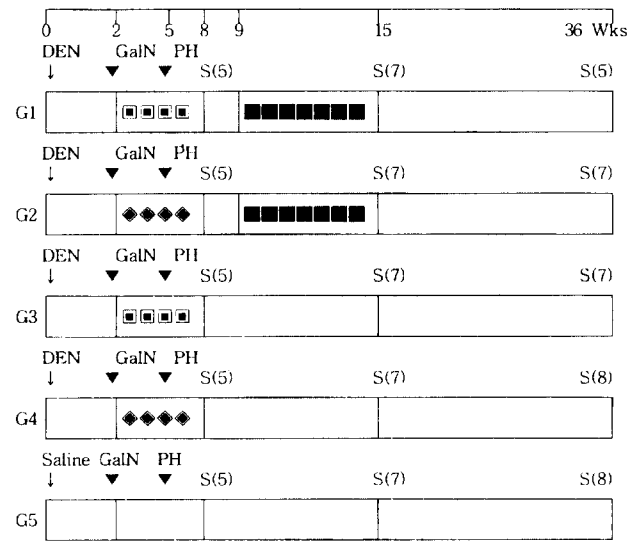


Fig. 1. Schematic Representation of the Experimental Protocol for Hepatocarcinogenesis in Rats.

- ↓ : diethylnitrosamine(DEN) 200 mg/kg, i.p.
- ▼ : D-galactosamine(GalN) 300 mg/kg, i.p.
- PH : 2/3 partial hepatectomy.
- : diet containing 3% red ginseng.
- ▣ : diet containing 0.01% 2-acetylaminofluorene.
- ◆ : water containing 0.05% phenobarbital sodium.
- S() : sacrifice number.

라핀포매 한후, 5 μm의 파라핀절편을 만들고, 전암병변의 지표효소로 유용한 것으로 알려진 glutathione S-transferase placental form(GST-P)양성 foci와 nodules에 대한 면역조직화학적 염색을 하였다(kang 등, 1991). Color video image analyzer(Cam-bridge, U.K.)를 이용하여 GST-P양성 foci와 nodule의 수와 면적을 계산하였다.

5) 투과전자현미경적 관찰

육안적으로 확인된 증식결절(hyperplastic nodules)부위로 부터 조직을 채취하여 5% glutaraldehyde(4°C, Sörensens buffer, pH 7.2)로 90분간 전고정후 1% osmium tetroxide(4°C, Sörensens buffer, pH 7.2)로 90분간 후고정 하였다. 에탄올 및 propylene oxide로 탈수하고, epon 침투과정을 거쳐서 epoxy resin embedding media에 포매 시킨후, semithin section으로 1 μm절편을 만들어 toluidine blue로 염색하여 광학현미경하에서 병변을 확인후 ultramicrotome(Sorvall MT 5000)으로 70 nm의 초박절편을 만들었다. 2% uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여, JEM 1200-CX II(JEOL) 투과전자현미경으로 80 KV에서 관찰하였다.

6) GST-P에 대한 면역조직화학적 염색

간 조직내의 GST-P 양성병소의 분포를 확인하기 위해 avidin biotin peroxidase complex(ABC)법을 이용하여 염색을 하였다. rabbit-anti-GST-P antibody(1차 항체)는 나고야 시립대학교 의과대학으로부터 공급받았으며, 0.01M phosphate buffered saline(PBS)으로 항체를 10배 희석한 다음 bovine serum albumin이 1%가 되도록 첨가하여 냉장보관하면서 사용하였다. biotin-labeled goat anti-rabbit IgG(2차 항체)와 avidin-biotin-peroxidase complex(Vectastain Elite ABC kit, PK 6101)는 Vector laboratories에서 구입해 사용하였다. 파라핀 조직절편은 xylene에서 파라핀을 녹여내고, 농도하강순의 단계적 알콜과정을 거쳐, moisture chamber에서 비특이 반응을 줄이기 위해 정상 goat 혈청(1:5 희석; 0.01M PBS, pH 7.4)으로 처리하였고, rabbit anti-GST-P antibody(1:6000 희석), biotin labeled goat anti-rabbit IgG(1:4000 희석), avidin biotin peroxidase complex(ABC)를 각각 moisture chamber에서 반응시킨 후, H₂O₂ 0.02% diaminobenzidine(DAB; 0.2M Tris buffer, pH 7.6)에 넣어 정색반응을 일으킨 다음 hematoxylin으로 대조염색(counterstain)하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7) 자료의 통계학적 처리

통계 package program인 Statistical Analysis System (SAS) version 6.30을 이용하여, 각 군간의 관찰값에 대해 one-way ANOVA에서 유의성 있는 F값이 관찰되었을 때 Duncan's t-test를 실시하고, 현미경상에서 관찰된 병변의 빈도는 Chi-square(X²) 검정을 통해 분석하였으며, 체중에 대한 간의 상대장기 무게는 Student's t-test를 실시하였다.

2. Natural Killer 세포 활성화 측정

1) 종양표적세포(target cell)

연세대학교 의과대학 미생물학교실로부터 분양받은 mouse YAC-1 lymphoma cell을 10% 소태아혈청(fetal calf serum, GIBCO)을 첨가한 RPMI 1640배지(GIBCO, USA)에 부유시켜 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 유지, 계대배양하였으며, 일부는 -70°C deep freezer에 8% DMSO (dimethylsulfoxide)를 첨가한 배지에 넣어 동결보존하였다.

2) 림프구의 준비

헤파린(100 I.U./ml blood) 처리된 10 ml 주사기를 이용하여 복대정맥으로부터 말초혈액을 4 ml씩 채취하

여 PBS(-)(Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free)로 동량 희석한 다음 Ficoll-hypaque(Pharmacia LKB)위에 희석된 혈액을 중층하고, 1550 rpm으로 20분간 원심하여 림프구를 분리하였다. 이렇게 분리된 림프구는 HBSS(Hanks' balanced salt solution, GIBCO)으로 2회 씻어낸후, 100 unit penicillin, 100 µg streptomycin, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate와 10 mM HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid, GIBCO)를 첨가한 10% 소태아혈청이 들어있는 RPMI 1640 배지에 다시 부유시켰다. 분리된 세포는 랫드 5마리로부터 분리한 세포를 pooling하여 시험에 이용하였다.

3) 부착세포 및 탐식세포의 제거

탐식세포(단핵구, monocyte)의 제거를 위하여 plastic culture dish(Corning Glass Works, N.Y)에 세포부유액을 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양하여 plastic에 부착하는 세포를 제거하였다.

B 임파구의 제거를 위하여 5 × 10⁷/ml의 세포를 nylon wool column에 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 45-60분간 배양한 다음 nylon wool(Wako, Japan)에 부착되지 않은 미부착세포를 따뜻한 배지 50 ml로 씻어내어 회수하였다.

4) 생존세포수 확인

위에서 회수된 세포를 세포수와 생존률을 확인하기 위하여 10 µl 세포부유액과 0.4% trypan blue(GIBCO, USA) 10 µl를 endorf tube에 넣어 잘 섞은후 혈구계산판(hemocytometer)를 이용하여 현미경하에서 100배율로 관찰하였으며, trypan blue에 염색되지 않은 세포를 살아있는 세포로 간주하여 세포생존율이 95%이상인 되는 것만을 실험에 이용하였다.

5) natural killer 세포의 분리

Percoll(비중 1.130 g/ml, Pharmacia) 9 part에 10배 농축배지 1 part를 가하여 등장화하고 이것을 100% Percoll(1.122 g/ml, 290mOs)로 하였다(Gutierrez등, 1979).

100% Percoll액을 66.7%, 55.0%, 50.8%, 44.2%로 혈청이 첨가된 배지로 만든후, 15 ml cornical test tube(Costar, USA)에 밀도가 높은순으로 불연속 밀도분배를 만든후 세포수 5 × 10⁷되는 세포부유액 1.5 ml을 맨 위에 중층하였다.

이 시험관을 30분간 실온에서 3000 rpm으로 원심한 후, Pasteur pipett으로 분획 2(44.2%와 50.8%사이)의 주효세포(effector cell)를 분리하여 배지로 2회 세척하

여, Percoll을 제거하였다.

6) 세포형태의 관찰

2 × 10⁵/ml 세포를 1000 rpm으로 5분간 원심하여 pellet으로 만든후 상청액을 버리고, pellet를 pasteur pipett으로 3-4회 분산시켰다. 이렇게 분산된 세포를 slide 유리판에 도말하여 건조시킨 다음, Wright 액에 7분간 염색후 10% Giemsa액에 20분간 넣어 세포를 염색하여 oil immersion 현미경하에서 관찰하였다.

7) ⁵¹Cr 유리법

⁵¹Cr(Dupont, Boston, MA)로 표지한 1 × 10⁴/100 μl/well의 표적세포가 들어 있는 U형의 96 well microplate(Costar, USA)에 5 × 10⁵의 주효세포(effector cell)를 100 μl넣어 주효세포 : 표적세포의 비율을 50:1이 되게 조정하여 배양하였다(Kang 과 Lee, 1992). 이들 plate는 37°C, 5% CO₂ 배양기내에서 4시간동안 배양한후 이 plate를 1500 rpm으로 10분간 원심후 상청액 100 μl를 취하여 γ-counter(Packard Auto-Gamma 5650)로 3분간 측정하였다. 이때 최대 방출을 위하여 ⁵¹Cr로 표지한 표적세포가 들어 있는 well에 0.25% Triton X-100(Sigma)을 가하였고, 자연방출을 위하여 ⁵¹Cr이 표지된 표적세포만을 넣었다. % cytotoxicity는 아래 공식에 따라 각 실험값의 cpm값을 3회 반복 시험한 평균값으로 하였다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{Test release (cpm)} - \text{Spontaneous release (cpm)}}{\text{Maximum release (cpm)} - \text{Spontaneous release (cpm)}} \times 100$$

III. 결 과

1. 화학적으로 유도한 랫드의 간암에 대한 홍삼의 효과에 관한 병리학적 관찰

1) 체중의 변화

모든군에서 diethylnitrosamine(DEN)을 투여한 후

1주일간은 체중의 증가가 둔화되었으나 1주후에 급격하게 증가 하기 시작하다가 D-galactosamine(GalN)을 투여한 제2주에 체중의 증가가 다시 둔화하기 시작하였으며, 실험 개시 제5주에 2/3의 간 부분절제술을 해주었을때 체중이 급격하게 감소하다 1주일 만에 다시 증가하였다. 한편, 제2주에 GalN을 1회 투여함과 동시에 발암촉진물질인 2-acetylaminofluorene(AAF)을 투여한 기간동안 6주간 투여군들의 체중이 거의 증가하지 않다가 AAF의 투여를 중단한 시기인 8주 이후부터 체중이 현저하게 증가하였다. 그러나 시험종료시까지 대조군 및 phenobarbital(PB) 투여군의 체중만큼 회복되지 않았다(Fig. 2).

2) 간 및 각 장기의 상대중량비 변화

시험개시후 8주에 부검시 각군의 간의 체중에 대한 상대장기 중량비는 Table 1과 같다.

AAF를 투여한 제1군과 제3군의 간의 상대중량비가 기초사료만을 투여한 제5군에 비하여 현저하게 증가하였으며(p<0.01), PB를 투여한 제2군과 제4군은 제5군에 비하여 간의 상대중량비가 유의하게 증가 하였다(p<0.05).

시험개시후 15주에 부검시 대조군인 제5군에 비하여 AAF를 투여한 군인 제1군과 제3군의 간의 상대중량은 유의하게 높았으나(p<0.05), PB를 투여한 군인

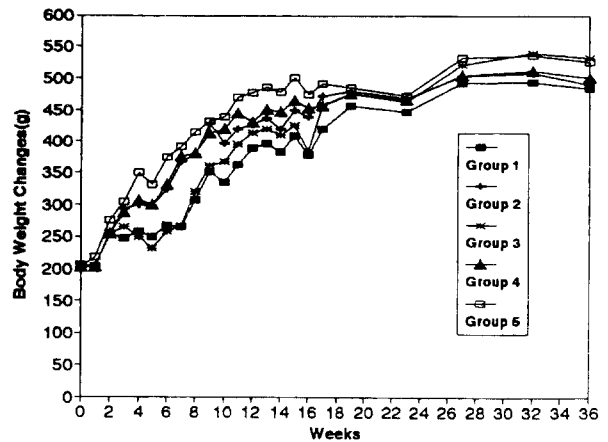


Fig. 2. Mean body weight changes for 36weeks

Table 1. Body weight and relative liver weight ratio(%) of rats on 8 weeks after beginning of experiment

Group	Treatment	No. of animals	Body weight	Liver weight	Liver/Body weight ratio(%)
1	DEN→AAF→PH	5	224.11±33.64	9.38±1.68	4.16±0.14 ^{b)}
2	DEN→PB→PH	5	282.00±38.16	11.36±3.55	3.98±0.75 ^{a)}
3	DEN→AAF→PH	5	230.12±40.15	10.24±2.35	4.32±0.37 ^{b)}
4	DEN→PB→PH	5	288.35±29.43	11.36±3.51	4.00±0.53 ^{a)}
5	Saline→BD*→PH	5	357.00±35.30	10.51±1.29	2.96±0.35

*Basal diets, ^{a)}Significantly different from group 5(p<0.05), ^{b)}Significantly different from group 5(p<0.01)

Table 2. Body weight and relative liver weight ratio(%) of rats on 15 weeks after beginning of experiment

Group	Treatment	No. of animals	Body weight	Liver weight	Liver/Body weight ratio(%)
1	DEN→AAF→RG*	7	397.50±38.49	16.51±2.28	4.16±0.53 ^{a,b)}
2	DEN→PB→RG	7	428.33±20.95	11.87±0.98	2.77±0.14
3	DEN→AAF	7	380.83±37.46	12.54±1.77	3.29±0.34 ^{b)}
4	DEN→PB	7	432.50±60.95	12.04±1.97	2.78±0.17
5	Saline→BD**	7	484.17±33.96	13.84±1.32	2.86±0.20

*Red ginseng extracts, **Basal Diets, ^{a)}Significantly different from group 3(p<0.05), ^{b)}Significantly different from group 5(p<0.01)

Table 3. Final body weights and relative organ weights(%) of rats on 36 weeks after beginning of experiment

Organs\Groups No. of animal	Control 7	AAF* 7	AAF+RG** 7
Body weight	526.70±28.19	532.91±51.89	483.70±45.72
Liver	2.60±0.23	3.94±0.90 ^{a)}	4.22±0.87 ^{a)}
Spleen	0.18±0.04	0.20±0.02	0.18±0.03
Kidney(left)	0.32±0.06	0.36±0.06	0.37±0.06
Kidney(right)	0.33±0.06	0.35±0.06	0.34±0.04
Heart	0.31±0.04	0.31±0.04	0.32±0.02
Lung	0.62±0.16	0.66±0.13	0.81±0.16
Thymus	0.042±0.021	0.041±0.019 ^{a)}	0.062±0.017 ^{a,b)}

*Group treated with 0.01% 2-acetylaminofluorene, **Group treated with 0.01% 2-acetylaminofluorene and 3% red ginseng extracts, ^{a)}Significantly different from control group(p<0.05), ^{b)}Significantly different from AAF group(p<0.05)

Table 4. Final body weights and relative organ weights(%) of rats on 36 weeks after beginning of experiment

Organs\Groups No. of animal	Control 7	PB* 7	PB+RG** 8
Body weight	526.70±28.19	501.57±71.98	490.08±52.29
Liver	2.60±0.23	2.99±0.23	2.83±0.22
Spleen	0.18±0.04	0.16±0.02	0.33±0.01
Kidney(left)	0.32±0.06	0.35±0.03	0.33±0.02
Kidney(right)	0.33±0.06	0.34±0.04	0.31±0.03
Heart	0.31±0.04	0.29±0.02	0.79±0.23
Lung	0.62±0.16	0.69±0.15	0.039±0.013
Thymus	0.042±0.021	0.049±0.006	

*Group treated with 0.05% phenobarbital sodium, **Group treated with 0.05% phenobarbital sodium and 3% red ginseng extracts

제2군과 제4군의 상대장기 중량은 유의하지 않았다. 또한 AAF투여후 홍삼을 투여한 군인 제1군의 간의 상대장기 중량이 홍삼을 투여하지 않은 제3군의 간에 비하여 유의하게 높았다(p<0.05)(Table 2).

시험개시후 36주인 시험종료 부검시, 간의 상대장기 무게는 AAF만을 투여한 군과 AAF투여후 홍삼을 투여한 군 모두다 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며(p<0.05), 홍삼을 투여한 군과 홍삼을 투여하지 않은 군사이에는 통계적으로 유의하지 않았지만 홍삼을 투여한 군의 간의 상대중량이 약간 높았다(Table 3). 또한, 흉선의 상대장기무게는 AAF만을 투여한군이 대조군에 비하여 유의하게 감소한 반면에 AAF투여후 홍삼을 투여한 군에서는 대조군 및 AAF만을 투여한 군에 비하여 유의하게 높았다(p<0.05).

그 밖의 다른 장기에서는 유의한 변화를 관찰하지 못하였다. 한편, 대조군과 PB를 투여한군들 사이에서

간, 비장, 신장, 심장, 폐장, 흉선의 상대장기 무게들이 유의한 차이를 관찰하지 못하였다(Table 4).

3) 육안적 소견

시험개시후 8주에 부검시, 제 1, 2, 3, 4군 모두 간의 변연부는 대조군인 제5군의 간에 비하여 둔탁하며 종창된 감이 있었으나, AAF를 투여한 군인 제1군과 제3군은 간의 표면은 약간 요철이 되어 있었으며, 유백색의 반점이 관찰 되는 개체도 있었다.

시험개시후 15주에 부검시, 대조군 및 PB를 투여한 군인 제2군과 제4군의 간은 육안적으로 이상을 관찰할 수 없었다. 그러나 AAF만을 투여한군은 유백색의 결절이 간의 표면에 여러군데 관찰된 반면, AAF를 투여후 홍삼을 먹인 랫드의 간표면이 약간 요철되어 있었으며, 종창된 감이 있었다.

시험개시후 36주에 부검시, 유백색의 결절이 간표

면에 돌출되어 요철되어 있는 것이 AAF를 투여한 군에서 2마리 관찰되었으며, AAF투여후 홍삼을 투여한 군의 간에서는 1마리가 관찰되었다. 이들군의 그 밖의 간은 암적색의 작은 함몰부위가 몇군데 관찰되었다. 한편, PB만을 투여한군과 PB투여후 홍삼을 투여한 군들은 대조군에 비하여 육안적 이상을 관찰하지 못하였다.

4) 광학현미경적 소견

시험개시후 8주에 부검시, AAF를 투여한 군의 간을 H & E 염색을 하여 관찰한 결과, 증식성 결절들은 주위의 실직 조직들을 압박하고, 수포성 핵과 세포질이 공포를 형성하고 있는 세포들이 다수 관찰되었으며, 이러한 병변들은 호산성을 강하게 나타내는 것도 있었다(Fig. 3-1), 또한 이 병소에 대한 조직면역화학적 염색에서 glutathione S-transferase placental form 양성(GST-P⁺)을 나타내어 더욱 선명하게 주위정상조직과 구별할 수 있었다(Fig. 3-2). 한편, PB를 투여한군의 병변은 주위조직을 압박하지 않았으며, 주위의 정상조직과 한계가 명료하지는 않았다. 그러나 병변은 AAF 투여군의 병변처럼 크지 않았고 작은 병소를 이루고 있었으며, 이들 병소의 세포들은 공포를 형성하고 있었으나, 결절은 관찰되지 않았다. 이들 작은 증식소들도 GST-P⁺를 나타내었다.

시험개시후 15주에 부검시(Table 5), PB만을 투여한 군과 PB투여후 홍삼을 투여한군의 랫드의 간에서 GST-P 양성 전암병변은 주위의 조직과 한계가 불분명하였다. 이들 간세포들은 공포를 형성하고 있었으며, 짙은 호산성을 나타내기도 하였다. AAF만을 투여한군은 소엽간 결합조직이 잘 발달하여 섬유화가 진행되고 있었으며(Fig. 3-3), 이러한 섬유화는 문맥역을 중심으로 발달하여 인접한 문맥역과 연결되어 간소엽간의 구

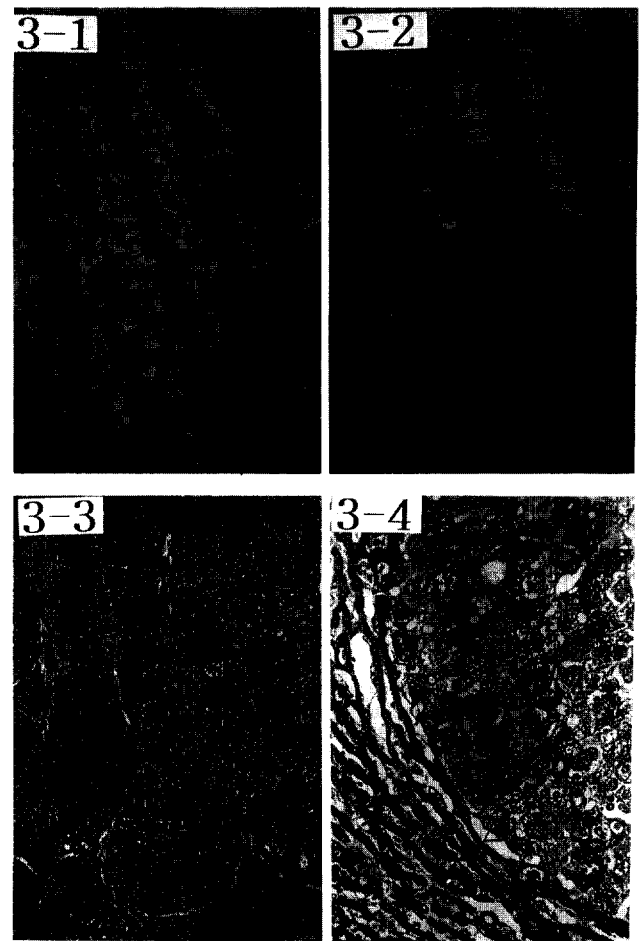


Fig. 3. Histopathological and immunohistochemical findings after treatment with carcinogen and Red ginseng. Panel 1, the hyperplastic nodule in rat liver treated with 2-acetylaminofluorene (AAF) for 6 weeks, H & E staining, X 100; Panel 2, Immunohistochemical staining of figure 1 for GST-P positive nodule, X100; Panel 3, Hepatocellular adenoma induced by AAF in rat sacrificed at 15 week after cancer initiation, mixed population of large acidophilic, intermediated and slightly basophilic cells surrounded by connective tissue(arrow head), H & E staining, X 40; Panel 4, Hepatocellular adenoma induced by AAF in rat sacrificed at 15 week after cancer initiation Slight compression of adjacent parenchyma(open arrow), H & E staining, X 250.

Table 5. Effects of Red Ginseng extracts on incidence of hepatocellular lesions in Sprague-Dawley rats

Lesions	Weeks after beginning of experiment									
	15 weeks					36 weeks				
	G1	G2	G3	G4	G5	G1	G2	G3	G4	G5
Cystic cholangioma	± ^{a)}	-	±	-	-	+	-	++	+	-
Spongiosis hepatis	1/6	0/6	1/6	1/6	0/6	4/5*	2/7	6/7*	2/8	0.8
Hepatocellular foci ^{c)}	5/6	6/6	3/6	6/6	0/6	1/5	7/7	2/7	6/8	0.8
Hepatocellular adenoma ^{d)}	1/6	0/6	3/6	0/6	0/6	3/5	0/7	4/7	1/8	0.8
Hepatocellular carcinoma ^{e)}	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/5	0/7	1/7	0/8	0.8
Hepatic fibrosis	+ ^{b)}	-	+++	-	-	+	-	++	-	-
Metastasis to others	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^{a)} -, No lesion; ±, very weak; +, weak; ++, moderate; +++, severe. ^{b)} -, No lesion; +, mild; ++, moderate; +++, severe. ^{c)} There is no distinction from surrounding tissues, ^{d)} Lesions which were compressing surrounding tissues or were surrounded by connective tissue, ^{e)} Most of lesions were glandular type, *Significantly different from group 5(p<0.05 and p<0.01), analysed by Chi-square test

분이 확실하였고, 유동내에서도 결합조직의 증식이 관찰되었다. 또한 세담관의 증식이 현저한 개체도 관찰되었다. 이 군에서 관찰된 결절내의 간세포는 핵의 크기가 일정하지 않으며, 세포질은 공포를 함유하고 있거나, 강한 호산성을 나타내기도 하였다. 그리고 공포를 함유한 세포와 호산성을 나타내는 세포들이 혼재하고 있었으며, 증식성으로 주위조직을 압박하는 결절도 관찰되었다(Fig. 3-4). 그러나 AAF투여후 홍삼을 투여한 군의 랫드의 간에서의 섬유화는 아주 미약하였으며, AAF만을 투여한 군에 비하여 결절이 불확실하고 주위의 정상조직을 거의 압박하고 있지 않았으며, 한계도 명확하지 않았다(Fig. 4-1). 또한, AAF투여군들(제1군과 제3군)에서 각 1개체가 spongiosis hepatitis가

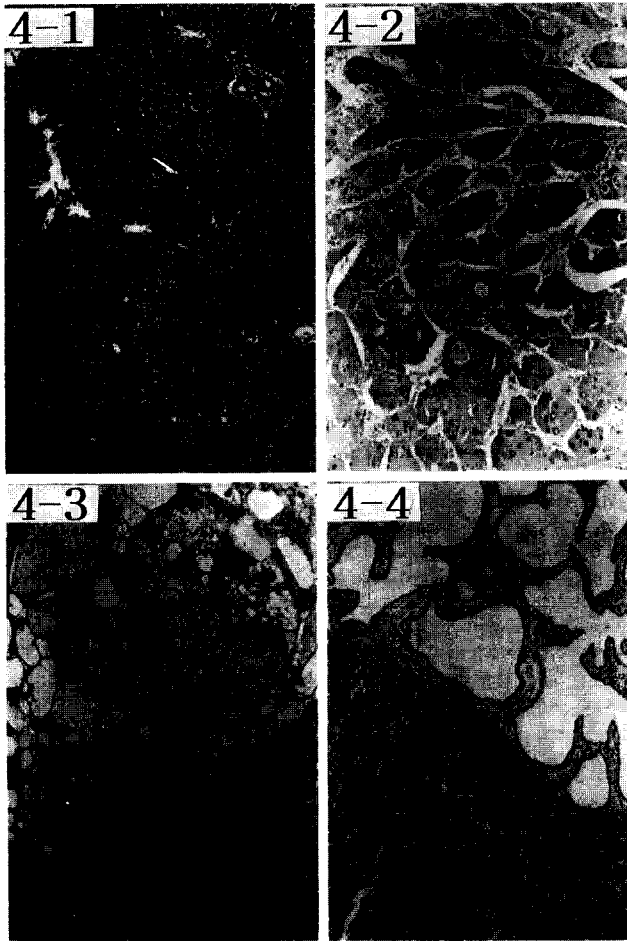


Fig. 4. Histopathological findings in rats treated with carcinogen and Red ginseng. Panel 1, Preneoplastic focus(arrow) induced by combined treatment with AAF and Red ginseng in rat sacrificed at 15 week($\times 100$); panel 2, Hepatocellular carcinoma induced by AAF in rat sacrificed at 36 week(Trabecular pattern)($\times 100$); panel 3, Spongiosis hepatitis induced by AAF in rat sacrificed at 36 week($\times 100$). panel 4, Cystic cholangioma induced by combined treatment with AAF and Red ginseng in rat sacrificed at 36 week ($\times 100$).

관찰되었으며, PB만을 투여한 군(제4군)에서도 1개체가 관찰되었다.

시험개시후 36주에 부검시(Table 5), AAF투여후 홍삼을 투여한 군의 간의 병소(hepatocellular foci)는 5마리중 1마리에서 관찰되었으며, AAF만을 투여한군에서는 7마리중 4마리가 관찰되었다. 간세포 선종(hepatocellular adenoma)은 AAF투여후 홍삼을 투여한 군에서 5마리 중 3마리의 랫드에서 관찰되었으며, AAF만을 투여한군에서는 7마리중 4마리에서 관찰되었고, 두군간에 통계적 유의차는 없었다. 간세포암종(hepatocellular carcinoma)은 AAF만을 투여한군이나 AAF투여후 홍삼을 투여한 군 모두 각각 1개체씩 관찰되었는데, 거의 대부분이 위선형 간세포암종(glandular type)이었으며, 육주형(trabecular type)은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 4-2). 이러한 간세포암종을 가지고 있는 랫드에서 다른 장기로의 전이가 관찰되지는 않았으며, AAF만을 투여한군에서 15주에 부검시 관찰되었던 간의 섬유화는 다소 완화되었으나 중등도로 유지된 반면에 AAF투여후 홍삼을 투여한군에서의 섬유화는 극히 미약하였다.

조직학적 관찰에서 특이적인 것은 랫드에서만 관찰되는 것으로 보고되고 있는 spongiosis hepatitis가 AAF만을 투여한군과 AAF를 투여한 후 홍삼을 투여한 군에서 발생율이 대조군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Table 5). spongiosis hepatitis는 전암병소내에서 뿐만아니라 전암병소가 아닌부위에서도 관찰되었다(Fig. 4-3). 한편, 대조군에 비하여 유의하지는 않았지만, PB 투여군들이 모두 대조군에 비하여 spongiosis hepatitis의 발현이 높았다. 또한, cystic cholangioma는 36주에 부검시 AAF만을 투여한 군에서 중등도로 발달하였으며(Fig. 4-4), AAF투여후 홍삼을 투여한 군과 PB를 투여한 군에서 각각 미약하게 발달하였다.

5) 투과 전자현미경 소견

시험개시후 15주에 AAF만을 투여한 군의 전자현미경적 소견은 세포질내에 조면소포체(RER)가 풍부하였으며, 복잡하게 얽혀 있는 것이 관찰되고 당원(glycogen) particle과 밀접하게 관련지어져 있는 것이 관찰되었다(Fig. 5). 한편, AAF를 투여하고 홍삼을 투여한 군의 전자현미경적 소견은 림프양세포(lymphoid cell)들이 종양세포에 밀접하게 접촉하고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 6).

시험개시후 36주에 AAF만을 투여한 군과 AAF 투여후 홍삼을 투여한 군 중 간종양을 나타낸 간의 전자

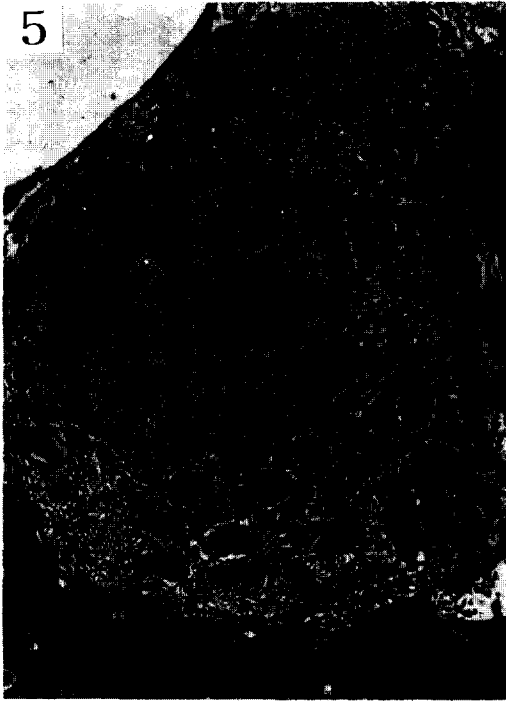


Fig. 5. Electron micrograph of intermediate cell induced by AAF in rat sacrificed at 15 week after cancer initiation. Abundant rough endoplasmic reticulum(RER) arranged in a complex network which is at some places smooth and closely associated with glycogen particles. Mitochondria(M) and nuclei(N). Uranyl acetate and lead citrate staining ($\times 5300$).

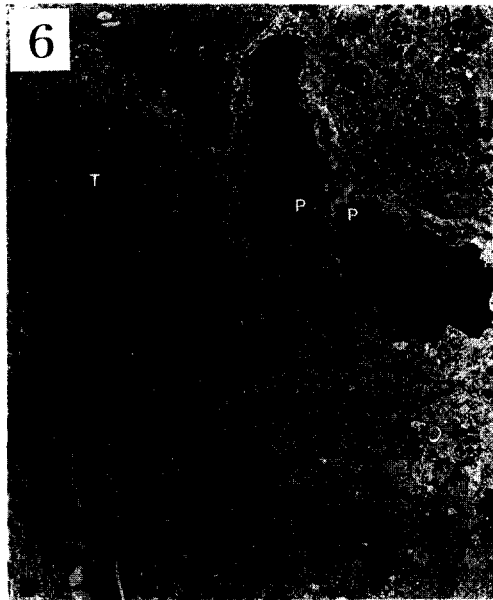


Fig. 6. Electron micrograph of neoplastic hepatocyte by combined treatment with AAF and Red ginseng in rat sacrificed at 15 week after cancer initiation. Neoplastic cell(T) contact with lymphoid cell (P). Uranyl acetate and lead citrate staining ($\times 5300$).

현미경적 소견에서 핵막은 쭈굴쭈굴한 모양을 하고 있었다(Fig. 7). 또한 세포질내의 미토콘드리아는 불규

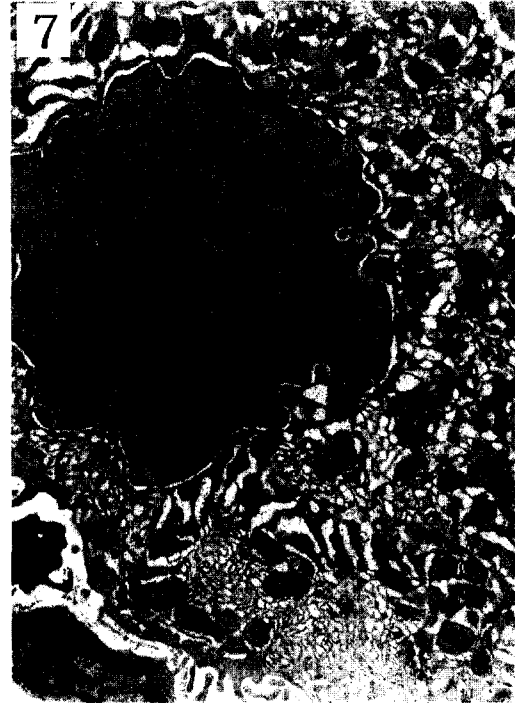


Fig. 7. Electron micrograph of neoplastic hepatocyte induced by 2-acetylaminofluorene in rat sacrificed at 36 week. The nuclear(N) membrane of neoplastic hepatocyte may have a corrugated appearance. Uranyl acetate and lead citrate staining ($\times 10000$).

칙하게 분포하고 있었으며, 세포막이 세포질내로 깊게 함몰되어 있는 것이 관찰되었다.

6) GST-P⁺ 증식결절 및 증식소의 수와 면적

시험개시후 8주에 부검시 각 실험군의 간조직 1 cm² 당 증식결절 및 증식소의 수와 면적(mm²)은 Table 6과 같다. AAF와 PB를 투여한 제1군 및 제3군과 제2군 및 제4군의 간에서는 주위조직과 한계가 명료한 GST-P⁺ 증식성 결절과 병소를 관찰할 수 있었으나 기초자료만을 투여한 제5군은 어떠한 GST-P⁺ 증식성 결절 및 병소를 관찰할 수 없었다. 또한, AAF를 투여한 군과 PB를 투여한 군간의 비교에서 AAF를 투여한 군의 GST-P⁺ 병변의 수와 면적이 PB투여군에 비하여 현저하게 높았다. 따라서 본 시험에서 이용한 DEN-GalN-PH 모델이 간에 발암을 잘 유도하였음을 확인 하였다(Ito 등, 1988).

시험개시후 15주에 부검시 각 실험군의 간조직 1 cm² 당 증식결절 및 증식소의 수와 면적(mm²)은 Table 7과 같다. AAF만을 투여한군에 비하여 AAF를 투여한 후 홍삼을 투여한군의 GST-P 양성병변의 면적이 유의하게 감소하였다(p<0.05). 반면 PB만을 투여한 군과 PB를 투여한 후 홍삼을 투여한 군 사이에는 유의한 차이를 관찰하지 못하였다.

Table 6. Number and total area of glutathione S-transferase placental form positive(GST-P⁺) foci and nodules of rats on 8 weeks after beginning of experiment

Group	Treatment	No. of animals	Total number of GST-P ⁺ foci and nodules/total liver area(cm ²)	Total area of GST-P ⁺ foci and nodules(mm ²)/total liver area(cm ²)
1	DEN→AAF→PH	5	25.55±5.95	15.55±5.36
2	DEN→PB→PH	5	9.82±0.26	0.80±0.19
3	DEN→AAF→PH	5	23.33±6.87	16.68±6.14
4	DEN→PB→PH	5	9.82±0.26	0.93±0.22
5	Saline→BD ^{a)} →PH	5	-	-

^{a)}Basal diets

Table 7. Number and total area of glutathione S-transferase placental form positive(GST-P⁺) foci and nodules of rats on 15 weeks after beginning of experiment

Group	Treatment	No. of animals	Total number of GST-P ⁺ foci and nodules/total liver area(cm ²)	Total area of GST-P ⁺ foci and nodules(mm ²)/total liver area(cm ²)
1	DEN→AAF→RG*	7	12.83±10.19	6.94±5.38
2	DEN→PB→RG	7	4.54±3.13	0.40±0.28
3	DEN→AAF	7	11.24±3.82	13.34±6.39
4	DEN→PB	7	4.89±2.15	0.42±0.24
5	Saline→BD**	7	-	-

*Red ginseng extracts, **Basal diets, ³⁾Significant different from group 3(p<0.05)

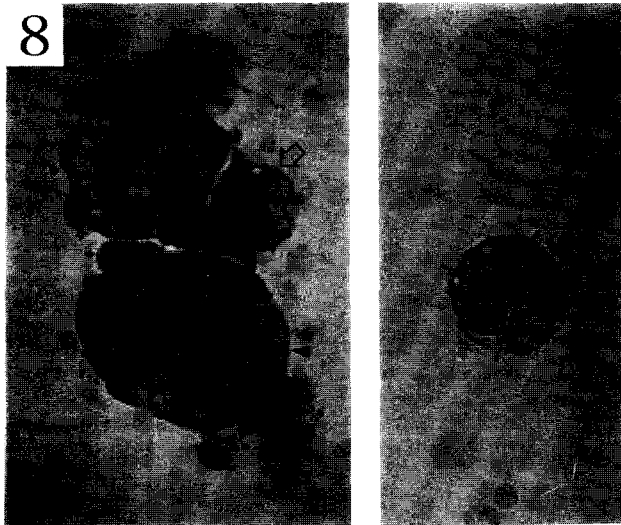


Fig 8. Natural Killer cell(open arrow) from rat peripheral blood intimately contacts with YAC-1 lymphoma cell(arrow head). Wright-Giemsa staining(×1000).

2. Natural Killer(NK) 세포 활성화 측정

1) NK 세포활성도 측정

(1) NK 세포의 형태적 특징

랫드의 NK세포는 사람이나 마우스에서 주로 자연 살생능(Natural killing Activity)을 보이는 LGL(Large Granular Lymphocyte)로 관찰되는데, 세포질 대 핵의 비율이 높고, azurophilic과립을 세포질내에 함유하고 있으며, 일반적으로 신장형태의 핵을 가지고 있었다

Table 8. Lysis of YAC-1 lymphoma target cell by natural killer cell isolated from Sprague-Dawley rats sacrificed at 15 and 36 weeks after beginning of experiment

Group	Treatemt	% lysis of YAC-1 target cell after 4 hr ^{a)}	
		15 weeks	36 weeks
1	DEN→AAF→RG ³⁾	7.72±5.04 ^{b)}	3.62±1.19
2	DEN→PB→RG 12.13	12.13±1.34	10.51±1.11
3	DEN→AAF	3.21±0.22	1.01±0.43
4	DEN→PB	11.62±2.33	9.89±0.55
5	Saline→BD ^{**}	17.21±0.06	14.69±3.78

*Red Ginseng extracts, **Basal diets, ^{a)}Data are expressed as percent cytotoxicity at an effector target ratio of 50:1 for PBL; Pooled lymphoid cells from 5 SD rats, ^{b)}Values represent the mean±SD from triplicated wells

(Fig. 8). 또한 세포의 크기는 소 림프구(small lymphocyte)와 큰 포식세포(macrophage)의 중간 크기였다.

(2) NK세포의 활성화도

시험개시후 15주에 부검시, ⁵¹Cr로 표지한 표적세포인 마우스 림프종세포를 죽이는 NK세포를 각 군의 랫드의 말초혈액으로부터 분리하여 ⁵¹cromium유리법을 실시하여 γ-counting한 결과는 Table 8과 같다.

정상대조군인 제5군의 랫드로부터 분리한 NK세포 활성화도(% cytotoxicity)에 비하여 모든 투여군의 NK세포활성도는 현저하게 낮았다. 그러나 AAF를 투여한 후 홍삼을 투여한군의 랫드로부터 분리한 NK세포의 활성화도는 7.72±5.04로 AAF만을 투여한 군의 NK활성도인 3.21±0.22보다 훨씬 높았다(Table 8).

시험종료 부검시 분리한 NK활성도는 15주에서와 마찬가지로 대조군에 비하여 모든 투여군에서 현저하게 낮았다. AAF투여군들의 NK활성도는 PB투여군들의 NK활성도보다 약간 낮았으며, 각 투여군에서 홍삼 투여군과 비 투여군 사이에 차이는 거의 없었으나 홍삼의 투여군들의 NK활성도가 약간 높았다.

IV. 고 찰

국내에서 1992년도에 통계청이 발간한 '1991년 사망원인특별조사보고서'에 의하면 우리나라 3대 사망원인 중 암에 의한 사망이 19.2%로 가장 높았으며, 특히 간암에 의한 사망율은 세계 1위라고 보고된 바 있다. 따라서 암의 원인을 밝혀내어 암을 예방하는 일이 국민 보건상 중요한 과제로 대두 되었다. 그러나 현대를 살아가는 거의 모든 사람들은 항상 수많은 발암원에 노출되어 이미 자신도 모르는 사이에 암이 진행 될수 있기 때문에 발암이 진행되는 과정을 차단할 수 방법에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 이미 발병한 암에 대한 치료법으로는 외과적처치, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법등이 활용 되고 있으나 가장 빈번히 사용되고 있는 치료법은 Cisplatin(Rosenberg 등, 1969), Bleomycin, Adriamycin, Mitomycin C, 5-fluorouracil 등의 항암제를 이용한 화학요법이다. 그러나 이러한 항암제는 비교적 비특이성으로 종양세포뿐만이 아니라 정상세포에도 독성을 나타낼 뿐만이 아니라 약제의 내성증가로 인한 재발, 합병증 외에 탈모, 소화기장해, 신장장해, 피부변화, 지방간, Cushing syndrome, 면역억제작용의 부작용 때문에 새로운 약제를 개발 하려는 연구가 진행 되고 있다.

특히 최근 암치료에 관한 한방처방 및 각 생약성분에 관한 연구가 활발히 진행 되고 있는데 이들 생약제제중 항암성이 어느정도 인정이 되고 있는 것으로는 인삼, 마늘, 영지 및 운지버섯등 극히 일부분에 지나지 않는다. 이들 중 국내외적으로 그 항암성 및 약리효과에 대해서 많은 부분이 밝혀지고 있는 것은 인삼이지만 아직까지 과학적 자료가 상당히 부족한 실정이다 (황 등, 1989; Yamamoto 등, 1990).

본 연구에서는 홍삼의 항암성과 관련 된 병리조직학적 소견과 함께, 홍삼투여를 중지후 홍삼의 항암효과 지속여부, 항암효과 기전중 NK세포활성과 *c-myc* 종양단백 발현과의 상관관계를 알아보았다.

본 시험의 광학현미경 소견에 있어서 제 8주에 부검시 H & E 조직염색과 GST-P양성병변의 면적으로부터 판단해 볼때, AAF 를 사료에 0.02%로 투여할 때보다

는 병변이 덜하였지만 확실하게 전암병변이 나타나 발암의 유도가 잘 되어진 것으로 판단되었다(Table 6 and Text-fig. 6).

본 실험에서는 AAF를 0.02%로 투여 하지 않고 0.01%로 투여 하였는데 만약 0.02%로 AAF를 투여할 때에는 너무 강력한 발암이 유도되어 홍삼의 항암효과가 약화될 수 있기 때문이었다. 제15주에 부검시 AAF로 발암촉진후 홍삼을 투여한 군의 전암병변이 AAF만을 투여한 군의 전암병변보다 많이 완화되었고, GST-P양성 병변의 면적이 홍삼을 투여함으로써 현저하게 감소하였다($p < 0.05$)(Table 7 & Text-fig. 7). 따라서 홍삼은 랫드의 간에서 발암이 진행되는 과정중에서 암으로의 진행을 억제하는 것으로 사료되었다. 또한, 이러한 홍삼의 항암효과가 홍삼투여를 중지후 11주후인 36주에도 유지되는지를 살펴보았는데, Table 5에 나타낸 것처럼 AAF만을 투여한 군과 AAF투여후 홍삼을 투여한 군간에는 병변의 발생정도가 유의하지 않았다. 따라서 홍삼의 계속적인 투여는 전암병변이 암화하는 것을 막는데 도움을 주지만 투여를 중지하면 그 항암효과가 지속되지 못하는 것으로 판단되며, 이러한 결과로 부터 홍삼의 항암효과기전이 유전자 수준에서 종양을 억제한다기 보다는 면역증강에 의한 간접적 항암효과와 관련이 깊은 것으로 사료되었다. 또한 제 15주에 부검시 특징적인 조직학적소견으로서는 PB투여군에서는 관찰되지 않았던 간 섬유화가 AAF로 발암을 촉진한 군, 특히 AAF만을 단독투여한 군에서 뚜렷하게 관찰되었다. 그러나 AAF 투여후 홍삼을 투여한군의 간의 섬유화는 아주 미약하게 관찰 되어 홍삼은 발암성뿐만 아니라 간섬유화를 억제하는 작용이 있는것으로 사료되었다. 한편 AAF만을 투여한 군에서 관찰된 중등도의 간섬유화는 시험개시후 제 2주에 AAF투여와 동시에 D-galactosamine(GalN)을 복강내 1회 투여해 준 결과인 것으로 생각된다. 즉 GalN의 투여는 동양내피세포의 하나인 fat storing cell(FSC, Ito cell)의 수적증가를 유발시키며, 이러한 FSC의 증가는 collagen분비를 촉진함과 동시에 fibroblast의 증식을 촉진하여 간섬유화를 유발한다는 Jonker등의 보고와 같이 본 시험에서 관찰 된 AAF투여군들에서의 간섬유화는 간의 증식을 촉진하기 위하여 투여한 GalN에 의한 것이라고 생각되었다. 그러나 단순히 GalN투여에 의해 간섬유화가 유발 된다면 PB투여군에서 또한 간 섬유화가 15주 부검시 관찰되었어야 하는데 섬유화는 이들 군에서는 관찰되지 않았다. 이러한 결과로부터 간의 섬유화는 GalN투여에 의해서 반드시 유발 되는것이 아니라 AAF투여와의 어떤 상관관계에 의해 유발 되는것으로

사료 되어 이것에 관하여는 좀더 연구를 해 보아야 할 것이다. 한편, 이러한 GalN-AAF투여에 의한 간섬유화는 홍삼투여로 인하여 현저하게 감소하는 경향이 있었는데, 이러한 홍삼의 간섬유화 억제효과는 면역증강과 관련지어 생각해 볼 수 있다. 즉, T림프구들중 특히 T helper세포들은 fibrogenetic과정의 modulator들을 산생하는데(Kuncio, 1991), 이러한 T림프구를 홍삼이 증강시켜, 이들세포들이 간 섬유화를 억제하는 것으로 생각된다.

또한, 조직학적 관찰에서 특이적인 것은 랫드에서만 화학적 발암제에 의하여 발생하는 것으로 알려진 spongiosis hepatitis(SH)인데, 이것의 발생을 보면 15주에 부검시 AAF 투여군들(제1군과 제3군)에서 각각 1예씩 관찰되었고, PB만을 투여한 군(제4군)에서도 1예가 관찰된 반면에 36주부검시에는 AAF만을 투여한 군에서 7마리중 6마리의 랫드의 간에서 SH가 관찰되었고, AAF투여후 홍삼을 투여한 군의 5마리중 4마리에서 SH가 발생하였으며 두군간에 통계적인 유의차는 관찰되지 않았다(Table 5). 또한 PB를 투여한 군들(제2군과 제4군)에서는 36주에 부검시 SH가 각 2마리씩 관찰되었으나 대조군의 랫드에서는 이러한 병변이 관찰되지 않았다.

이러한 결과로부터 SH의 발생은 홍삼의 투여와는 무관하며, GalN투여와 발암물질 투여에 기인되는 것으로 생각된다. 그 이유는 전술한 바와 같이 GalN투여는 FSC의 증가를 가져오게 되고, 이렇게 증가된 FSC은 발암물질에 의하여 대사이상을 일으켜 FSC의 세포형태의 변화를 야기하여 특이적인 형태의 SH를 유발한 것으로 생각된다(Bannasch 등, 1981). 또한, 본 시험에서 SH는 대조군에서는 관찰 되지 않고, 발암물질투여군에서만 관찰된 것으로 부터 판단해 볼때, SH도 전암병변일뿐만 아니라 종양병변의 범주에 넣어야 한다는 몇몇 학자들의 주장을 뒷바침하고 있는 결과(Turusov 와 Mohr, 1990)로 사료 되었다.

홍삼의 항암효과가 면역증강효과 및 *c-myc*종양단백의 발현에 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 홍삼의 항암효과를 면역증강효과와 관련하여 본 시험에서는 특히 종양세포 성장의 억제, IL-2 등의 cytokines분비 등에 관여하는등 광범위하게 작용하고 있는 NK세포와의 관련에 초점을 맞추었다(Reynolds와 Ortaldo, 1987).

NK세포는 T세포와는 달리 전감작 없이 표적세포와 결합하며, 표적세포를 인지하는데 있어서도 주요조직합성 복합체(major histocompatibility complex)항원과 관련이 없는 것으로 보고되고 있다(Lanier 등, 1986;

Fitzgerald-Bocarsly 등, 1988; Frey 등, 1991). 또한, T세포가 홍선의존성 즉, 홍선에서 분화하는 것과는 달리 NK세포는 독특하게 골수에서 분화하는 것으로 알려져 있으며(Lanier 등, 1986), 조직분포와 순환도 T세포와 다르게 혈액과 림프절사이에 재순환(recirculation)하지 않으며, 비장내에서도 T세포 지역에 분포하지 않고, 적수에 주로 존재한다(Reynolds 등, 1984; Rolstad 등, 1986). 랫드의 NK세포는 사람이나 마우스에서와 마찬가지로 형태적으로 azurophilic한 과립을 함유한 large granular lymphocyte(LGL)이며, 신장모양의 핵(Kidney-like nucleus)을 가지고 있고(Reynold 등, 1981a; Kang 과 Lee, 1992), 표면항원은 OX-8⁺, OX-19⁻로 사람과 마우스의 NK 표면항원과는 약간 상이하다(Reynolds 등, 1981b; Woda 등, 1984; Storkus와 Dawson, 1991)고 알려져 있다.

본 연구에서는 주로 NK cytotoxicity를 나타내는 분획은 4단계 Percoll불연속 밀도분배에 의하면, 분획 2임을 알 수 있었으며, 이 분획을 주로 구성하고 있는 세포는 주로 LGL임을 알 수 있었다(Saksela, 1979). 그러나 NK세포는 형태적인 특징 보다는 기능적인 특징에 의하여 구분되기 때문에 모든 NK세포가 LGL이라고 할 수는 있어도, 모든 LGL이 NK세포라고는 할 수 없다고 알려져 있다.

일반적으로 화학적 발암화 과정에서 NK세포활성이 현저하게 떨어진다(Brodth와 Lala, 1983; Leu 등, 1985)고 알려져 있다. 그러나 최근 Yun등은 전처리 없이 AAF만을 장기간 마우스에 투여하여 발암을 유도하여 홍삼을 투여해본 결과 홍삼이 NK활성에 영향을 미치지 못하였다고 하였으나 Leu등은 F344랫드를 이용하여 완전한 발암유도 모델계인 DEN-AAF-PH계에서만 NK활성의 억제가 관찰 되었고, DEN, AAF, PH 각각 단독처리 또는 2종류의 혼합계에서는 NK활성의 억제가 관찰 되지 않았다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 완전한 화학적 발암처리인 DEN-GalN-PH-AAF처리와 DEN-GalN-PH-PB처리로 랫드의 간에 발암을 유도한 후 홍삼을 투여하였을때와 투여하지 않았을때 NK 활성을 알아보았다. 미약한 발암촉진 물질인 PB투여군들 사이에서 홍삼의 투여와 투여하지 않은 군간에는 병리조직학적 유의차는 관찰 되지 않았다. 그러나 강력한 발암촉진 물질인 AAF투여군들에서는 홍삼을 투여한 군이 홍삼을 투여하지 않은 군에 비하여 NK활성이 현저하게 높았다(Table 8). 따라서 홍삼이 화학적으로 유도한 발암과정에서 떨어졌던 NK활성을 회복시켜 주는 것으로 생각된다. 그러나 홍삼의 투여를 중지후 11주뒤인 36주에 부검시에는

홍삼투여군과 투여하지 않은 군간에 NK활성의 차는 관찰 되지 않고, 대조군에 비하여 모두 낮았다(Table 8). 이러한 현상은 홍삼의 항암성이 유전적인 측면이나 종양세포에 직접작용하여 발암을 억제하는 것보다는 면역과 관련하여 발암을 억제하는 것임을 강력하게 시사해 주고 있는 것이다.

NK세포가 종양세포를 인식하고 결합하여 표적세포를 죽이는 기전은 크게 두가지 단계로 볼 수 있다. 그 첫단계는 NK세포가 종양표적세포를 인식하여 결합하는 것인데, 최근보고에 의하면 T세포가 TCR(CD3, T cell receptor)에 의하여 종양표적세포를 인식하고 결합하는 것과는 달리 NK세포는 p105 분자에 의하여 표적세포를 인식하고 결합하며, 이 분자는 ADCC와 상관없이 표적세포를 용해하는데 관여한다(Frey, 1991). 또한 종양표적세포를 인식하는데 있어서 종양세포표면에 표출된 Laminin은 NK세포가 종양세포를 인식하는 것을 방해하는 것으로 밝혀졌다(Hiserodt 등, 1985). 그리고 NK세포가 종양세포를 인식하는데 있어서 IgG의 Fc portion을 인식하여 항체에 coating된 종양표적세포를 인식하기도 하지만 절대적으로 작용하는 것은 아니다. 둘째단계로 NK세포가 종양세포에 결합한 후 발생하는 결합후 반응(post-binding reaction)이다. NK세포가 종양세포를 인식하여 결합되었을지라도 종양표적세포를 죽이는 데에는 결합후 반응이 필수적으로 필요하다(Storkus 와 Dawson, 1991). 즉, 종양세포에 NK세포가 결합한후 NK세포의 activation이 있어야 하며, 세포질내의 과립이 종양세포쪽으로 재배열하여 cytolytic이나 NKCF(NK cytotoxic factor)의 방출로 세포를 분해(lysis)한다(Herberman, 1986). 또한 결합후 반응에서 중요하게 작용하는 것이 ECM(extracellular matrix)인데, 이 중 큰 당단백인 Fibronectin(FN)은 실질적으로 모든 신체조직과 조직액에서 발견된다. 이것은 랫드의 NK세포에서도 합성되고 또한 분비한다. NK세포가 합성해서 분비한 FN은 결합후반응에서 종양세포를 죽이는데 관여한다(Santoni 등, 1989).

NK세포가 종양세포억제에 있어서 중요한 또다른 역할은 순환하는 종양 색전(emboli)를 파괴하거나(Hanna와 Fidler, 1980) 실험적으로 유발한 종양세포의 전이를 억제한다(Hanna와 Burton, 1981; Warner와 Dennert, 1982; Barlozzari 등, 1985). 또한, NK세포는 종양의 자연적인 전이에 대하여 cytokine중의 하나인 IFN- γ 와 IL-2의 항종양효과 및 항전이(anti-metastatic) 효과를 증대한다. 즉, IFN- γ 와 IL-2의 항종양 효과 및 항전이 효과는 NK세포활성을 증강시킴으로써 나타나는 현상이다(Markovic과 Murasko, 1991).

참고문헌

- Ames B.N. (1983); Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* **221**:1256-1264.
- Bannasch P., Bloch M. and Zerban H. (1981); Spongiosis hepatitis Specific changes of the perisinusoidal liver cells induced in rats by n-nitrosomorpholine. *Laboratory Investigation* **44**:252-264.
- Barlozzari T., Leonhardt J., Wiltrout R.H., Herberman R.B. and Reynolds C.W. (1985); Direct evidence for the role of LGL in the inhibition of experimental tumor metastases. *J. of Immunology* **134**:2783-2789.
- Beer D.G., Schwarz M., Sawada N. and Pitot H.C. (1986); Expression of H-ras and c-myc protooncogenes in isolated r-glutamyl transpeptidase-positive rat hepatocytes and in hepatocellular carcinomas induced by diethylnitrosamine. *Cancer Research* **46**:2435-2441.
- Brodth P. and Lala P.K. (1983); Change in the host lymphocyte subsets during chemical carcinogenesis. *Cancer Research* **43**:4315-4322.
- Choi S.U., Jung N.P. and Kim S.C. (1990); Effects ginseng saponin fractions and lipopolisaccharide on the tumoricidal activity of mouse macrophage. *Korean J. Ginseng Sci.* **14**:364-372.
- Fitzgerald-Bocarsly P., Herberman R., Hercend T., Hiserodt J., Kumar V. and Wigzell H. (1988); A definition of natural killer cells. *Immunology Today* **9**:292-295.
- Frey J.L., Bino T., Kantor R.R.S., Segal D.M. and Giardina S.L. (1991); Mechanism of target cell recognition by natural killer cells: Characterization of a novel triggering molecule restricted to CD3-large granular lymphocytes. *J. of Experimental Medicine* **174**:1527-1536.
- Gelderblom W.C.A., Marasas W.F.O., Jaskiewicz K., Combrinck S. and van Schalkwyk D.J. (1988); Cancer promoting potential of different strains of *Fusarium moniliforme* in a short-term cancer initiation/promotion assay. *Carcinogenesis* **9**:1405-1409.
- Gutierrez C., Bernabe R.R., Vega J. and Kreisler M. (1979); Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of percoll. *J. of Immunological Methods* **29**:57-63.
- Hanna N. and Burton R.C. (1981); Definitive evidence that natural killer(NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. *J. of Immunology* **127**:1754-175819.
- Hanra N. and Fidler L.J. (1980); Role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor

- emboli. *JNCI* **65**:801-809.
- Hwang W.I., Son H.S., Ji R.H. and Baik N.G. (1989); Effects of panax ginseng and sodium ascorbate (Vitamin C) treatment on cancer cell growth. *Korean J. Ginseng Sci.* **13**:242-247.
- Hayashi K., Reiko M. and Sugimura T. (1984); Amplification and over-expression of the c-myc gene in morris hepatomas. *Gann* **75**:475-478.
- Herbaman R.B., Reynolds C.W. and Ortaldo J.R. (1986); Mechanism of cytotoxicity by natural killer(NK) cells. *Ann. Rev. Immunol* **4**:651-680.
- Herberman R.B. and Holden H.T. (1978); Natural cell-mediated immunity. *Advances in Cancer Research* **27**:305-370.
- Herberman R.B. and Ortaldo J.R. (1981); Natural killer cells: Their role in defenses against disease. *Science* **214**:24-30.
- Hiserodt J.C., Laybourn K.A. and Varani J. (1985); Laminin inhibits the recognition of tumor target cells by murine natural killer(NK) and natural cytotoxic(NC) lymphocytes. *AJP* **121**:148-155.
- Hwang W.I. (1992); *Korean J. Ginseng Sci.* **16**:170-171.
- Jonker A.M., Dijkhuis F.W.J., Boes A., Hardonk M.J. and Grond J. (1992); Immunohistochemical study of extracellular matrix in acute galactosamine hepatitis in rats. *Hepatology* **15**:423-431.
- Ito N., Tsuda H., Hasegawa R., Tatematsu M., Imaida K. and Asamoto M. (1988); Medium-term bioassay models for environmental carcinogens - Two-step liver and multi-organ carcinogenesis protocols. *Korean J. of Lab. Ani. Sci* **4**:65-68.
- Jeon H.K., Kim S.C. and Jung N.P. (1991); Effects of ginseng saponin fraction and cyclophosphamide on the tumoricidal activity of mouse macrophage and the antitumor effect. *Korean J. Ginseng Sci.* **15**:99-105.
- Kang K.S. and Lee Y.S. (1992); Isolation and morphological characterization of natural killer cell in the Sprague-dawley(SD) rats. *Korean Vet. Res.* **32**:245-250.
- Kang K.S., Cho J.J., Kim B.H., Kim H.O., Shin D.J., Lee Y.S. and Lim Y.K. (1992); The study on carcinogenicity of coptis rhizome and croton tiglium L. *Korean J. Toxicol.* **8**:131-137.
- Kang K.S., Kim H.C. and Lee Y.S. (1991); The comparison of efficacy of glutathione S-transferase placental form positive and iron-resistant lesions in the detection of hepatocarcinogens. *Kor. J. Food Hygiene* **6**:1-12.
- Kim J.S. and Lee Y.S. (1989); Effects of Ganoderma Lucidum extract on the development of rat liver preneoplastic lesions. *Korean J. Toxicol.* **5**:135-149.
- Kim M.N. and Jung N.P. (1989); The effect of ginseng saponin fractions on NK activity in mice. *Korean J. Ginseng Sci.* **13**:223-228.
- Kim Y.B. and Lee Y.S. (1988); Inhibitory effects of red ginseng extract on preneoplastic nodule formation in the rat liver observed by rapid bioassay of carcinogenesis. *Korean J. Toxicol.* **4**:159-179.
- Kim Y.S., Kang K.S. and Kim S.I. (1991); Effects of ginseng components on immunotoxicity of cyclophosphamide. *Korean J. Ginseng Sci.* **15**:13-20.
- Korea Ginseng & Tobacco Research institute (1991); Proceedings of the 2nd life science symposium on biomedical research in red ginseng. Taejon, Korea:69-98.
- Korea Ginseng & Tobacco Research institute (1992); Proceedings of the 3rd life science symposium on biomedical research in red ginseng. Taejon, Korea.
- Lanier L.L., Phillips J.H., Hackett J. JR., Tutt M. and Kimmur V. (1986); Natural killer cells: Definition of a cell type rather than a function. *J. of Immunology* **137**:2735-2739.
- Leu R.W., Norton T.R., Herriott M.J., Ringer D.P. and Kearns R.J. (1985); Suppression of natural killer and lymphocyte functions associated with carcinogen-induced premalignant hyperplastic nodules in rat liver. *Cancer Research* **45**:3282-3287.
- Lim C.H., Hur G.H. and Lee Y.S. (1989); Inhibitory effects of red ginseng extract on development of pepsinogen 1 decreased pyloric glands in rat stomach. *Korean J. Toxicol.* **5**:151-166.
- Lim Y.K., Kang K.S. and Lee Y.S. (1990); Promotive Effects of Several Synthetic Hormones Using Short-Term Carcinogen Screening Method. *Kor. J. Food Hygiene* **5**(4):179-186.
- Makino R., Hayashi K., Sato S. and Sugimura T. (1984); Expressions of the c-Ha-ras and c-myc genes in rat liver tumors. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **119**:1096-1102.
- National Statistical Office Republic of Korea (1992); Report on the 1991 special survey for cause of death. Seoul, Korea:18-19.
- Oh O.S., Ko B.H. and Song I.B. (1987); An experimental study on the effect of raw ginseng, white ginseng and red ginseng on immune response in mice. *K. H. M.* **3**:83-90.
- Ota T., Yamamoto K.F., Kohno H. and Odashima S. (1990); Induction of phenotypic reverse transformation by ginsenosides in cultured cancer cells.

Korean J. Ginseng Sci. **14**:238-243.

- Park J.K. and Park K.H. (1992); Effects of ginseng saponin on DNA strand breaks and replication inhibition by benzo(a)pyrene in CHO-K1 cells. *Korean J. Ginseng Sci.* **16**:210-216.
- Reynolds C.W. and Ortaldo J.R. (1987); Natural killer activity: the definition of a function rather than a cell type. *Immunology Today* **8**:172-174.
- Reynolds C.W., Sharrow S.O., Ortaldo J.R. and Herberman R.B. (1981); Natural killer activity in the rat II. Analysis of surface antigens on LGL by flow cytometry. *J. of Immunology* **127**:2204-2208.
- Reynolds C.W., Timonen T. and Herberman R.B. (1981); Natural killer(NK) cell activity in the rat I. Isolation and characterization of the effector cells. *J. of Immunology* **127**:282-287.
- Rolstad B., Herberman R.B. and Reynolds C.W. (1986); Natural killer cell activity in the rat V. The circulation patterns and tissue localization of peripheral blood large granular lymphocytes(LGL). *J. of Immunology* **136**:2800-2808.
- Rosenberg B., Van Camp L., Trasko J.E. and Mansour V.H. (1988); Platinum compounds, a new class of potent anti-tumor agents. *Nature* **222**:385.
- Saksela E., Timonen T., Ranki A. and Hayry (1979); Morphological and functional characterization of isolated effector cells responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and to cultured cell line targets. *Immuological Rev.* **44**:70123.
- Santoni A., Gismondi A., Morrone S., Procopio A., Modesti A., Scarpa S. and Frati L. (1989); Rat natural killer cells synthesize fibronectin. Possible involvement in the cytotoxic function. *J. of Immunology* **143**:2415-2421.
- Storkus W.J. and Dawson J.R. (1991); Target structures involved in natural killing(NK): Characteristics, Distribution, and Candidate molecules. *Immunology* **10**:393-416.
- Trinchieri G. (1989); Biology of natural killer cells. *Advance in Immunology* **47**:187-377.
- Turusov V.S. and Mohr U. (1990); Pathology of tumours in laboratory animals **1**:213-214.
- Warner J.F. and Gunther D. (1982); Effects of a cloned cell line with NK activity on bone marrow transplants, tumour development and metastasis in vivo. *Nature* **300**:31-34.
- Woda B.A., Mcfadden M.L., Welsh R.M. and Bain K. M. (1984); Separation and isolation of rat natural killer(NK) cells from T cells with monoclonal antibodies. *J. of Immunology* **132**:2183-2184.
- Yamamoto H., Katano M. and Matsunaga H. (1990); Anti-tumor substance from Panax ginseng roots. *Korean J. Ginseng Sci.* **14**:244-252.
- Yun T.K., Yun Y.S. and Han I.H. (1983); Anticarcinogenic effect of longterm oral administration of red ginseng on new-born mice exposed to various chemical carcinogens. *Cancer Detection Prev.* **6**:515-525.
- Yun T.K. and Choi S.Y. (1990); Preventive effect of ginseng intake on various human cancers: A case-control study. *Korean J. Ginseng Sci.* **14**:237.
- Yun Y.S., Jo S.K., Moon H.S., Kim Y.J., Oh Y.R. and Yun T.K. (1985); Effect of red ginseng on natural killer cell activity in mice with lung adenoma induced by urethan and benzo(a)pyrene. *Korean Biochem. J.* **18**:31-37.