

## 조직병리학 및 Histomorphometry 기법으로 관찰한 종양 유발 마우스의 주요 장기에 인진쑥 Methanol 추출물이 미치는 영향

김홍태<sup>\*1</sup> · 구세광<sup>\*\*</sup> · 김주완 · 진태원 · 임미경<sup>\*\*\*</sup> · 김지은<sup>\*\*\*\*</sup> · 장혜숙<sup>\*\*\*\*\*</sup> · 여상건 · 장광호 · 오태호 · 이근우  
경북대학교 수의과대학, \*부산광역시 보건환경연구원, \*\*대구한의대학교 한의과대학  
\*\*\*경북대학교 생활과학대학, \*\*\*\*대구대학교 생명공학과, \*\*\*\*\*부산지방식품의약품안전청

(제재승인: 2008년 6월 13일)

### Effects of *Artemisia capillaris* Methanol Extract on Organs in Tumor Cells Inoculated Mice Observed the Histopathology and Histomorphometry

Hong-Tae Kim<sup>\*1</sup>, Sae-Kwang Ku<sup>\*\*</sup>, Ju-Wan Kim, Tae-Won Jin, Mee-Kyung Lim<sup>\*\*\*</sup>, Ji-Eun Kim<sup>\*\*\*\*</sup>,  
Hye-Sook Chang<sup>\*\*\*\*\*</sup>, Sang-Geon Yeo, Kwang-Ho Jang, Tae-Ho Oh and Keun-Woo Lee

*College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*

*\*Busan Metropolitan City Institute of Health and Environment, Busan 616-810, Korea*

*\*\*College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea*

*\*\*\*College of Human Ecology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*

*\*\*\*\*Department of Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea*

*\*\*\*\*\*Busan Regional Korea Food & Drug Administration, Busan 608-080, Korea*

**Abstract :** This experiment was conducted to investigate antitumor and immunomodulatory effects of *Artemisia capillaris* extracts against Hepa-1c1c7 and Sarcoma 180 cancer cells. In *in vivo* experimental tests using 210 ICR mice, on the 28<sup>th</sup> day and the 42<sup>nd</sup> day, all animals in vehicle controled HP (Hepa-1c1c7 tumor cell inoculated vehicle control) and SP (Sarcoma 180 tumor cell inoculated vehicle control) showed tumor cells in the liver and spleen based on the histopathology. However, the incidences and the percentages of regions occupied by tumor cells were dramatically and dose-dependently decreased by mACH (*Artemisia capillaris* methanol extracts) treatment on the histomorphometry. Although the exact mechanism of inhibition of the incidences of tumor cells in the parenchyma whether inhibition of metastasis or proliferation is unclear, mACH dramatically reduce the percentages of regions occupied by tumor cells in the liver and spleen apart from the inoculation sites of Hepa-1c1c7 and Sarcoma 180. In addition, they also effectively inhibit the abnormal changes on the kidney detected in the present study. The results suggest that *Artemisia capillaris* methanol extracts have prominent antitumor effects on the cancer cell lines Hepa-1c1c7 and Sarcoma 180 in mice.

**Key words :** *Artemisia capillaris*, extract, antitumor effect, histopathology, histomorphometry.

## 서 론

인진쑥(*Artemisia capillaris* Thunb)은 우리나라 냇가나 강가의 모래땅에서 자라는 국화과에 속하는 다년생 초본으로서 높이가 약 30~100 cm 정도로 곧게 자라고 겨울철에도 죽지 않고 이듬해 줄기에서 다시 싹이 나온다하여 사철쑥 또는 애탕쑥이라 불리며 생약명으로는 인진, 인진호 또는 추호라 불린다(1). 이러한 사철쑥(*Artemisia capillaris* Thunberg)의 과

수를 단 지상부를 8~9월에 채취한 것을 인진호(*Artemisia capillaris* Herba)라 하는데 이것이 흔히 인진쑥이라 불리고 있다.

인진쑥은 일상生活中 쑥과는 달리 특히 황달, 간염, 간경화에 효과적이고 간기능 항진에 효능이 뛰어난 것으로 알려져 있고 우리나라의 전통 민간요법에서 복통, 간염, 만성 간질병, 황달, 천식 등의 치료에 사용되어진 약용 식물 중 가장 흔한 식물이다(17).

지금까지 인진쑥의 항균, 항당뇨병, 항암효과와 같은 생물학적 연구와 약리학적 연구가 주로 되어왔다.

간에 대한 연구들 중 인진쑥에 관한 연구로서는 류 등(3)이

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : vetheute@busan.go.kr

흰쥐에 사염화탄소 투여 후 인진쑥 추출물을 투여하여 간의 활성도 및 조직학적 변화를 관찰하였고, 이 외에도 인진쑥의 간 손상에 대한 효과를 보고한 연구(4,5)들은 많지만 직접적으로 간암주를 이용하여 인진쑥 추출물의 항암효과를 *in vitro*와 *in vivo*에서 관찰한 예는 아직 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 인진쑥 추출물의 항암효과(암세포 증식억제 효과)와 면역활성 효과를 알아보기 위해 앞의 연구(2)에서 보고한 인진쑥 추출물의 시험관내(*in vitro*) 항암효과 검사 결과를 참고하여 실험동물인 ICR계 마우스의 간엽에 암 종 세포주(Hepa-1c1c7)와 경부 피하에 육종 세포주(Sarcoma 180)를 접종이식한 후, 인진쑥 methanol 추출물이 암이 유발된 마우스의 주요 장기에 미치는 영향을 조직병리학적 및 histomorphometry적 기법으로 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 암세포주

실험에 사용되어진 암세포주는 Hepa-1c1c7 (KCLB 22026, 마우스 간암 세포)과 Sarcoma 180 (KCLB 40066, 마우스 육종 세포)으로 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)에서 분양받아 사용하였다.

Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포주에 대한 세포배양 배지로서 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하였으며 여기에 streptomycin (100 mg/mL)과 penicillin (100 U/mL)을 첨가하였다.

Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포주 배양은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 실시하여 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

마우스에 접종하기 위해서 Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포주를 마우스 복강 내에  $2 \times 10^7$  cells/mL 농도로 이식하여 일주일간 계대배양하였으며 이식한 마우스에서 복수액을 취하여 4°C에서 생리식염수에 혼탁하고 2000 rpm으로 원심 분리한 침전액을 2회 반복하여 세척한 후 0.4% trypan blue로 염색하여  $2 \times 10^7$  cells/mL 되도록 제조하였다.

### 실험동물

생후 5주령의 평균 체중  $25 \pm 5$  g인 ICR계 실험용 마우스 210두를 구입하여 사육하며 일주일이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육조건은 동물 사육실에서 항생제 무첨가 생쥐용 사료(슈퍼피드)와 음수접취는 자유 급식을 실시하였으며, 동물 사육실내는 항온항습 장치를 이용하여 실내온도를  $22 \pm 2$  °C, 습도를 50%로 유지하였으며 하루에 12시간씩 조명을 시행하였다.

### 인진쑥 추출물의 조제 및 농도 설정

대구광역시 약령시장의 한약 전재상에서 2004년 5월부터 2006년 5월까지 건조된 인진쑥을 구입하여 이물질을 제거하고 깨끗이 한 다음 제분기로 분쇄하여 분말을 얻었다. 이러한 인진쑥 분말 100 g에 methanol 1000 mL을 가하여 항온수조(37°C)에서 140 rpm으로 24시간 진탕한 후 저온 원심분리기

(4°C)에서 3,000 rpm으로 20분간 원침하였다. 이 후 각 상층 액을 여과한 추출물을 회전 진공 농축기(Heidolph®, Laborota 4000, Germany)에서 농축하여 완전 건조시킨 후 동결건조시켜 인진쑥 methanol 추출물을 얻었으며 농도(용량)는 3.125 mg/mL (25 mg/kg), 12.5 mg/mL (100 mg/kg)로 설정하였다.

### 실험군 설정, 종양세포 이식 및 인진쑥 추출물의 투여

- 1) 정상군: 정상 대조군(n = 30)
- 2) HP-대조군: Hepa-1c1c7 세포 이식 매체 대조군(n = 30)
- 3) SP-대조군: Sarcoma 180 세포 이식 매체 대조군(n = 30)
- 4) H1: Hepa-1c1c7 세포 이식 후 25 mg/kg의 인진쑥 추출물(mACh) 투여 군(n = 30)
- 5) H2: Hepa-1c1c7 세포 이식 후 100 mg/kg의 인진쑥 추출물 투여 군(n = 30)
- 6) S1: Sarcoma 180 세포 이식 후 25 mg/kg의 인진쑥 추출물 투여 군(n = 30)
- 7) S2: Sarcoma 180 세포 이식 후 100 mg/kg의 인진쑥 추출물 투여 군(n = 30)

실험은 ICR계 마우스 90두씩에 각각 Hepa-1c1c7 세포 부유액을 간엽에, Sarcoma 180 세포 부유액은 경부 피하에 0.2 mL( $4 \times 10^6$  cells/mouse)씩 각각 이식하고, 이식 1일 후부터 28일간 인진쑥 추출물 또는 생리식염수를 복강 투여하였다. 이 후 휴약에 따른 변화를 관찰하기 위하여 14일간 즉 42일 까지는 전 실험군에 아무런 투여를 하지 않았다.

### 조직처리 및 조직병리검사

조직병리검사를 하기 위한 부검은 각 군의 마우스 중 평균 3두 이상을 추출물 투여 시작일, 인진쑥 추출물 투여 후 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49일에 마취시킨 후 경추탈골법에 의해 희생시킨 다음 실시하였다. 본 실험 결과에서는 28일에 정상군 3두, HP-대조군 5두, H1군 4두, H2군 5두, SP-대조군 3두, S1군 3두, S2군 3두, 42일에 정상군 3두, HP-대조군 4두, H1군 3두, H2군 4두, SP-대조군 4두, S1군 3두, S2군 3두를 부검하여 실험하였다. 이 때, 간, 비장, 신장, 가슴샘, 심장 및 폐 실질조직의 일부를 채취하여, 10% 중성포르말린(neutral buffered formalin)에 24시간 이상 고정시킨 다음 일반적인 방법으로 탈수 및 파라핀 포매를 실시하고, 3~4 μm의 절편을 제작하여 Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색을 실시하고, 각각의 조직병리학적 변화를 광학현미경하에서 관찰하였다.

### Histomorphometry

간 및 비장 실질 중 종양세포가 차지하는 부위의 비율, 종양세포 출현 빈도 및 신장 실질 중 변성부위의 비율, 신장병변의 출현빈도의 변화를 자동영상분석장치(Digital CCD Image analyzer; DMI, KOREA)를 이용하여 관찰하였다. 또한 추출물의 유효성을 판단하는데 도움을 주고자, HP 및 SP 매체 대조군과 비교한 % Changes를 아래와 같은 공식으로 계산하였다.

% Changes vs vehicle controls (%) = [(Data of test groups - Data of vehicle controls) / Data of vehicle controls] × 100]

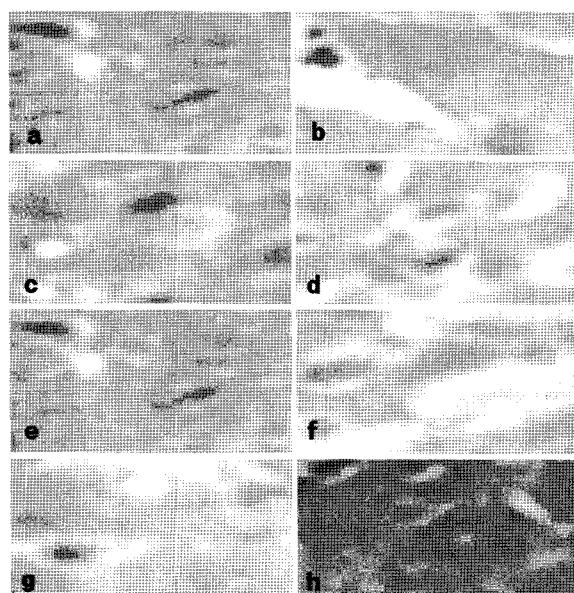
### 통계학적 처리

모든 실험결과는 평균±표준편차( $n=5$ )로 나타냈으며, 통계학적 유의성 검정은 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W test (MW test) with SPSS for Windows (Release 6.1.3., SPSS Inc., USA)에 의해 비교 검정하였다.

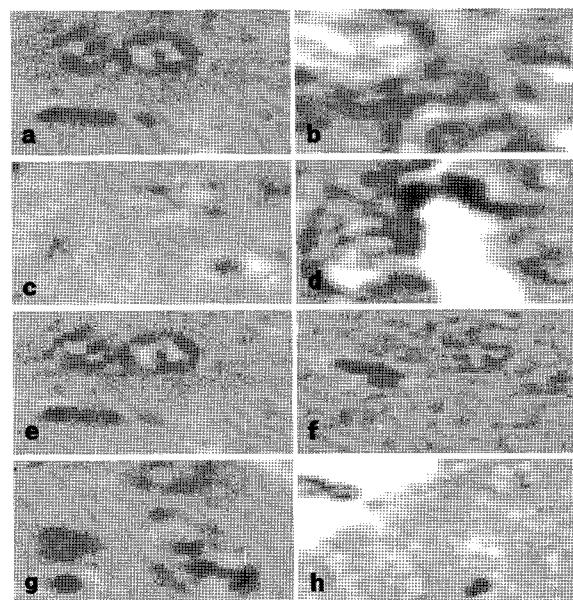
## 결 과

### 조직병리검사 소견

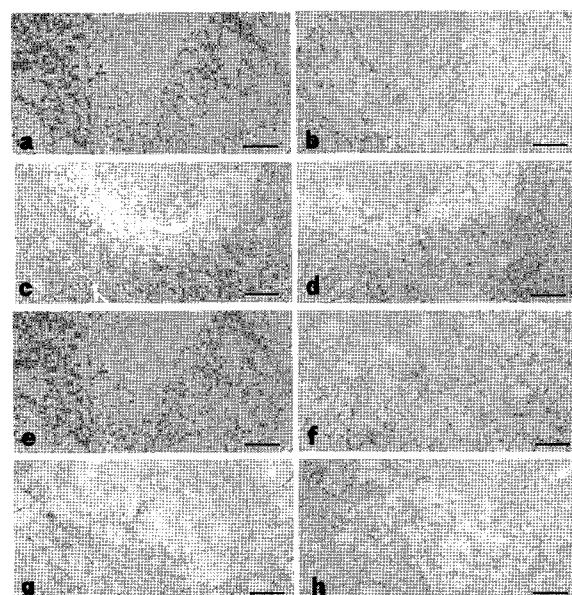
인진쑥 추출물 투여 후 7, 14, 21일까지는 실험군의 경우, HP 및 SP 매체 대조군에서 관찰한 모든 실험동물에서 간 및 비장 내 종양세포의 출현이 인정되지 않았다. 하지만, 28일에 실험군의 경우, HP 및 SP 매체 대조군에서는 관찰한 모든 실험동물에서 간 및 비장 내 종양세포의 출현이 인정되었으나, 인진쑥 추출물 투여 군에서는 각각의 매체 대조군에 비하여 종양세포의 출현빈도 및 종양세포가 차지하는 부위의 감소가 용량 의존적으로 인정되었다. 또한 42일에 실험군의 경우에는 HP 매체 대조군에서는 관찰한 모든 실험동물에서 간 및 비장 내 종양세포의 출현이 인정되었으나, SP 매체 대조군에서는 종양세포의 출현이 인정되지 않았다. Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물을 투여한 실험



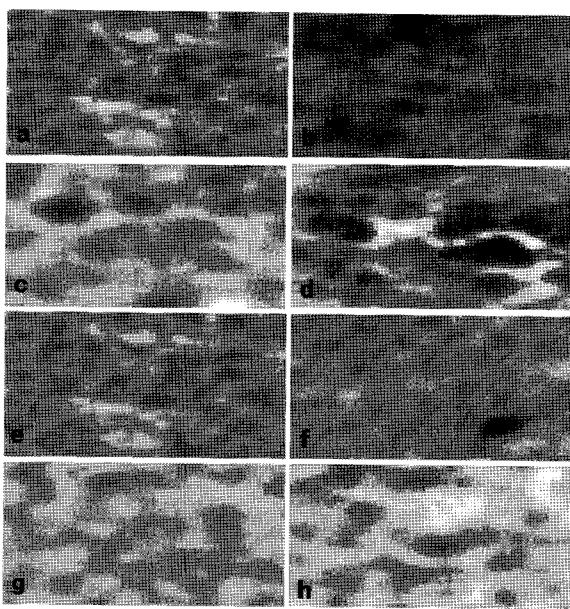
**Fig 1.** Histological profiles of the liver (Day 28) in intact control (a, e), Hepa-1c1c7 tumor cell inoculated vehicle control (b), mACH 25 (c) and 100 mg/kg (d)-dosing groups with Sarcoma 180 tumor cell inoculated vehicle control (f), mACH 25 (g) and 100 mg/kg (h)-dosing groups. Note that all animals in vehicle controls showed tumor cells (arrows) in the liver parenchyma especially in the sinusoids. All H & E stain; Scale bars = 100 µm.



**Fig 2.** Histological profiles of the liver (Day 42) in intact control (a, e), Hepa-1c1c7 tumor cell inoculated vehicle control (b), mACH 25 (c) and 100 mg/kg (d)-dosing groups with Sarcoma 180 tumor cell inoculated vehicle control (f), mACH 25 (g) and 100 mg/kg (h)-dosing groups. Note that all animals in Hepa-1c1c7 tumor cell inoculated vehicle control showed tumor cells in the hepatic parenchyma (most of hepatic parenchyma was occupied by well differentiated tumor cells) but no tumor cells were detected in all Sarcoma 180 tumor cell inoculated groups. All H & E stain; Scale bars = 100 µm.



**Fig 3.** Histological profiles of the spleen (Day 28) in intact control (a, e), Hepa-1c1c7 tumor cell inoculated vehicle control (b), mACH 25 (c) and 100 mg/kg (d)-dosing groups with Sarcoma 180 tumor cell inoculated vehicle control (f), mACH 25 (g) and 100 mg/kg (h)-dosing groups. Note that all animals in vehicle controls showed tumor cells in the splenic parenchyma especially in the red pulps. All H&E stain; Scale bars = 100 µm.



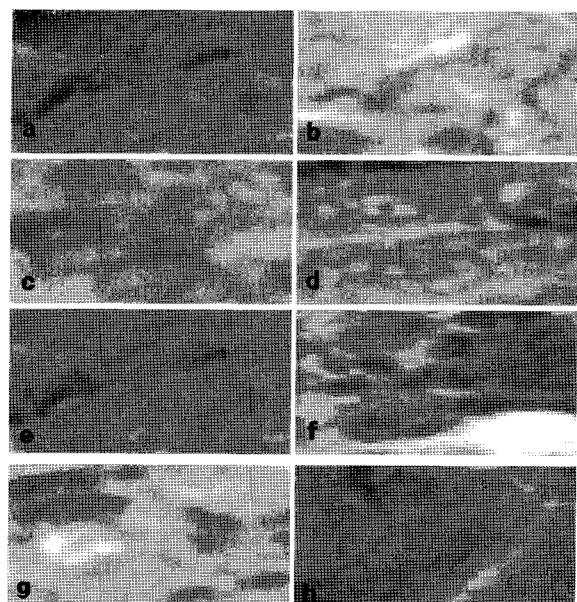
**Fig 4.** Histological profiles of the spleen (Day 42) in intact control (a, e), Hepa-1c1c7 tumor cell inoculated vehicle control (b), mACH 25 (c) and 100 mg/kg (d)-dosing groups with Sarcoma 180 tumor cell inoculated vehicle control (f), mACH 25 (g) and 100 mg/kg (h)-dosing groups. Note that all animals in Hepa-1c1c7 tumor cell inoculated vehicle control showed tumor cells in the splenic parenchyma but no tumor cells were detected in all Sarcoma 180 tumor cell inoculated groups with 100 mg/kg of mACH-dosing group after Hepa-1c1c7 tumor cell inoculation. All H & E stain; Scale bars = 100  $\mu$ m.

군에서는 HP 매체 대조군에 비하여 투여 용량 의존적인 종양세포의 출현빈도 감소와 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 종양세포가 차지하는 부위의 감소가 인정되었다(Fig 1,2,3,4). 한편 신장의 경우 28일에 실험군에서는 HP 매체 대조군에서 국소성 세뇨관 상피세포의 편평화(위축)를 주징으로 하는 변성과 SP 매체 대조군에서는 국소성 섬유화 및 세뇨관 상피세포의 편평화(위축)를 주징으로 하는 변성소견이 모든 실험동물에서 인정되었다. 그러나 이러한 신장 변성소견 역시 각각의 인진 쪽 추출물 투여 군에서 투여 용량 의존적인 감소를 나타내었다. 또한 42일에 실험군에서는 HP 매체 대조군에 국한되어 국소성 세뇨관 상피세포의 편평화(위축) 소견이 인정되었다(Fig 5,6). 그러나 가슴샘, 심장 및 폐에서는 별 다른 조직병리학적 이상 소견이 인정되지 않았다.

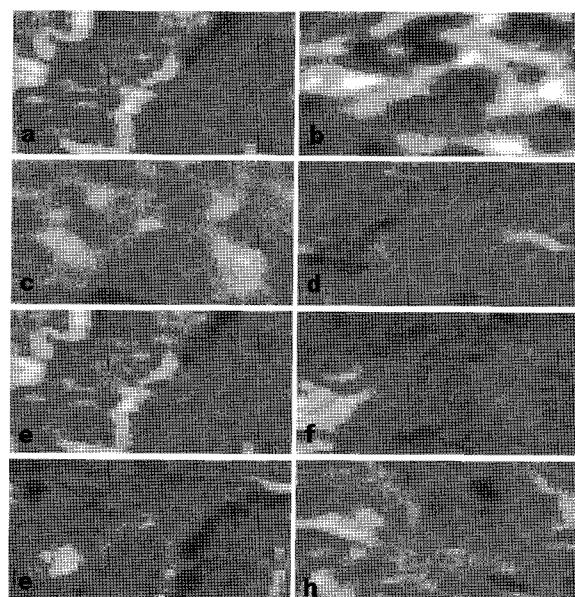
#### Histomorphometry 검사 소견

##### 1) 간 실질 내 종양세포 출현 부위의 비율 변화

28일에 실험군의 경우, 간 실질 내 종양세포가 차지하는 부위의 비율이 Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진 쪽 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 HP 매체 대조군에 비하여 -34.57 및 -60.40%의 변화를 나타내었으며, Sarcoma



**Fig 5.** Histological profiles of the kidney (Day 28) in intact control (a, e), Hepa-1c1c7 tumor cell inoculated vehicle control (b), mACH 25 (c) and 100 mg/kg (d)-dosing groups with Sarcoma 180 tumor cell inoculated vehicle control (f), mACH 25 (g) and 100 mg/kg (h)-dosing groups. Note that all animals in vehicle controls showed focal tubular atrophy (arrows) and/or fibrosis. All H & E stain; Scale bars = 100  $\mu$ m.



**Fig 6.** Histological profiles of the kidney (Day 42) in intact control (a, e), Hepa-1c1c7 tumor cell inoculated vehicle control (b), mACH 25 (c) and 100 mg/kg (d)-dosing groups with Sarcoma 180 tumor cell inoculated vehicle control (f), mACH 25 (g) and 100 mg/kg (h)-dosing groups. Note that focal tubular atrophy (arrow) was restricted to the Hepa-1c1c7 tumor cell inoculated vehicle control, only. All H&E stain; Scale bars = 100  $\mu$ m.

180 종양세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 SP 매체 대조군에 비하여 -47.39 및 -97.86%의 변화를 나타내었다.

42일에 실험군의 경우, 간 실질 내 종양세포가 차지하는 부위의 비율이 Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 HP 매체 대조군에 비하여 -61.05 및 -78.86%의 변화를 나타내었으며, Sarcoma 180 세포를 이식한 실험군에서는 간 실질 내 종양세포의 출현이 인정되지 않았다(Table 1).

### 2) 비장 실질 내 종양세포 출현 부위의 비율 변화

28일에 실험군의 경우, 비장 실질 내 종양세포가 차지하는 부위의 비율이 Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 HP 매체 대조군에 비하여 -38.46 및 -49.01%의 변화를 나타내었으며, Sarcoma 180 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 SP 매체 대조군에 비하여 -25.29 및 -43.17%의 변화를 나타내었다.

42일에 실험군의 경우, 비장 실질 내 종양세포가 차지하는 부위의 비율이 Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 mg/kg 투여 군에서는 HP 매체 대조군에 비하여 -66.09%의 변화를 나타내었으며, Sarcoma 180 세포를 이식한 모든 실험군 및 Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 100 mg/kg 투여 군에서는 비장 실질 내 종양세포의 출현이 인정되지 않았다(Table 2).

### 3) 신장 변성부위의 비율 변화

28일에 실험군의 경우, 신장 변성부위의 비율이 Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 HP 매체 대조군에 비하여 -42.79 및 -47.02%의 감소를 나타내었으며, Sarcoma 180 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 mg/kg 투여 군에서는 SP 매체 대조군에 비하여 -17.69%의 변화를 나타내었고, 인진쑥 추출물 100 mg/kg 투여 군에서는 신장 변성부위가 인정되지 않았다.

42일에 실험군의 경우에는 Hepa-1c1c7 세포를 이식한 HP 매체 대조군에 국한되어 신장변성 부위가 인정되었다(Table 3).

**Table 1.** The incidence of tumor cells and changes on the percentage of hepatic regions occupied by tumor cells

Group ID	Day 28		Day 42	
	Incidences <sup>1)</sup>	Regions <sup>2)</sup>	Incidences	Regions
Intact vehicle controls	0/3	Not detected	0/3	Not detected
Hepa-1c1c7 cell inoculation groups				
vehicle control: HP	5/5	60.95 ± 7.17	4/4	90.10 ± 6.07
25 mg/kg of mACH: H1	4/4	39.98 ± 5.56*	3/3	35.09 ± 12.39*
100 mg/kg of mACH: H2	2/5	21.70 ± 5.59*	2/4	19.04 ± 2.74*
Sarcoma 180 cell inoculation groups				
vehicle control: SP	3/3	61.59 ± 9.06	0/4	Not detected
25 mg/kg of mACH: S1	2/3	32.40 ± 8.36*	0/3	Not detected
100 mg/kg of mACH: S2	2/3	1.20 ± 0.61*	0/3	Not detected

<sup>1)</sup> Number of tumor cell detecting livers/total observed numbers of liver; <sup>2)</sup> Mean ± S.D. of 5 selective regions among tumor cell detected livers (%/1 mm<sup>2</sup> of hepatic parenchyma); \*p < 0.01 compared to those of equal tumor cell inoculated vehicle controls by MW test.

**Table 2.** The incidence of tumor cells and changes on the percentage of splenic regions occupied by tumor cells

Group ID	Day 28		Day 42	
	Incidences <sup>1)</sup>	Regions <sup>2)</sup>	Incidences	Regions
Intact vehicle controls	0/3	Not detected	0/3	Not detected
Hepa-1c1c7 cell inoculation groups				
vehicle control: HP	5/5	67.74 ± 9.93	4/4	64.46 ± 4.28
25 mg/kg of mACH: H1	4/4	41.69 ± 2.65*	2/3	21.86 ± 5.50*
100 mg/kg of mACH: H2	3/5	34.54 ± 5.17*	0/4	Not detected
Sarcoma 180 cell inoculation groups				
vehicle control: SP	3/3	87.67 ± 7.14	0/4	Not detected
25 mg/kg of mACH: S1	3/3	65.50 ± 4.00*	0/3	Not detected
100 mg/kg of mACH: S2	3/3	49.82 ± 7.64*	0/3	Not detected

<sup>1)</sup> Number of tumor cell detecting spleens/total observed numbers of spleen; <sup>2)</sup> Mean ± S.D. of 5 selective regions among tumor cell detected spleens (%/1 mm<sup>2</sup> of splenic parenchyma); \*p < 0.01 compared to those of equal tumor cell inoculated vehicle controls by MW test.

**Table 3.** The incidence of tumor cells and changes on the percentage of degenerative renal regions

Group ID	Day 28		Day 42	
	Incidences <sup>1)</sup>	Regions <sup>2)</sup>	Incidences	Regions
Intact vehicle controls	0/3	Not detected	0/3	Not detected
Hepa-1c1c7 cell inoculation groups				
vehicle control: HP	5/5	65.28 ± 5.34	4/4	32.84 ± 4.31
25 mg/kg of mACH: H1	4/4	37.35 ± 9.61*	0/3	Not detected
100 mg/kg of mACH: H2	5/5	34.59 ± 5.64*	0/4	Not detected
Sarcoma 180 cell inoculation groups				
vehicle control: SP	3/3	77.00 ± 7.70	0/4	Not detected
25 mg/kg of mACH: S1	2/3	63.37 ± 7.67**	0/3	Not detected
100 mg/kg of mACH: S2	0/3	Not detected	0/3	Not detected

<sup>1)</sup> Number of abnormal kidneys detected/total observed numbers of kidney; <sup>2)</sup> Mean ± S.D. of 5 selective regions among abnormalities detected kidneys (%/1 mm of renal parenchyma); \*p < 0.01 and \*\*p < 0.05 compared to those of equal tumor cell inoculated vehicle controls by MW test.

## 고 찰

현재까지 인진쑥 추출물의 직접적 또는 간접적인 항암 활성에 관하여 보고되어 왔으나(14), 인진쑥 추출물의 종양 전이 억제 효과에 대한 보고는 찾아볼 수 없으며, 그 가능성 역시 알 수 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 인진쑥 추출물의 항암 및 전이 억제 활성을 알아보기 위한 한 과정으로 Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포를 이식한 마우스에서 인진쑥 methanol 추출물의 투여가 간, 비장, 신장, 가슴샘, 심장, 폐 등의 장기에 미치는 영향을 조직병리학적 및 histomorphometry적 기법으로 관찰하였다.

210두의 ICR계 마우스를 이용한 동물실험에서 조직병리학적으로 관찰한 결과, 인진쑥 추출물 투여 후 7, 14, 21일까지는 실험군의 경우, HP 및 SP 매체 대조군에서 관찰한 모든 실험동물에서 간 및 비장 내 종양세포의 출현이 인정되지 않았다. 하지만 28일경부터 실험군의 경우, HP 및 SP 매체 대조군에서 관찰한 모든 실험동물에서 간 및 비장 내 종양세포의 출현이 인정되었는데 이러한 결과를 통해서 실험동물인 마우스에 Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포를 접종이식한 후 종양이 생체 내에서 유발되기까지는 일정한 시간이 걸리는 것으로 사료된다.

28일에 실험군의 경우 HP 및 SP 매체 대조군에서, 42일에 실험군의 경우 HP 매체 대조군에서 관찰한 모든 실험동물에서 간 및 비장 내 종양세포의 출현이 인정되었다.

하지만, 인진쑥 추출물 투여 군에서는 각각의 매체 대조군에 비하여 조직형태계량학적 변화를 관찰한 결과 종양세포의 출현빈도 및 종양세포가 차지하는 부위의 감소가 투여 용량의 존적으로 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 인정되었다.

이러한 결과는 인진쑥 메탄올 추출물이 Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포주에 대해 유의한 항암 효과를 가지기 때문인 것으로 사료된다.

한편 신장의 경우 28일에 실험군에서는 HP 매체 대조군에서 국소성 세뇨관 상피세포의 편평화(위축)를 주정으로 하는

변성과 SP 매체 대조군에서는 국소성 섬유화 및 세뇨관 상피세포의 편평화(위축)를 주정으로 하는 변성소견이 모든 실험동물에서 인정되었으나 이러한 신장 변성소견 역시 각각의 인진쑥 추출물 투여 군에서 투여 용량 의존적인 감소를 나타내었는데 이러한 결과 역시 인진쑥 메탄올 추출물이 Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포주에 대해 유의한 항암 효과를 가지기 때문인 것으로 사료된다.

그러나 가슴샘, 심장 및 폐에서는 종양 전이를 확인할만한 별 다른 조직병리학적 이상 소견이 인정되지 않았는데 이러한 이유는 Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포주의 특성에 따른 영향으로 종양이 유발되지 않은 것으로 추정된다. 일반적으로 종양 발생시 가슴샘에서도 병증이 나타나고 많은 종양들이 만성적으로 진행됐을 때 폐로도 전이하는 것으로 흔히 알려져 있지만 본 결과에서는 뚜렷한 전이를 보이지 않는 것이 차이점이라고 생각된다.

종양 전이는 암환자들에 있어 주요 사망 원인이 되며, 전이의 차단이 암환자들의 수명을 연장할 수 있는 하나의 방법으로 생각되어 왔으며(6), 전이 억제 활성을 갖는 유효한 물질들의 탐색이 계속되어져 왔다. 종양의 전이 과정은 매우 복잡한 다단계적 과정으로, 주위 조직들로의 종양 침입은 종양 전이에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(20). 본 연구에서, 인진쑥 methanol 추출물이 종양의 이식 부위에서 비교적 멀리 떨어진 간과 비장 내에 종양 세포의 출현을 효율적으로 억제하며, 종양 세포가 출현된 장기들에서 종양세포가 차지하는 부위의 감소가 용량 의존적으로 뚜렷하게 인정되었다. 이러한 결과가 본 연구에서는 사용한 종양세포주에 관계없이 관찰되어, 인진쑥 methanol 추출물은 종양 세포의 전이를 억제하거나 전이된 실질 내에서 종양 세포 증식을 억제하는데 직접적인 작용을 하는 것으로 판단된다. 한편 종양이식 후 추출물 투여 42일 실험군의 경우에 SP 매체 대조군에서는 모든 실험동물에서 간 및 비장 내 종양세포의 출현이 인정되지 않은 것은 자가 면역 방어에 의한 것으로 생각된다. 일반적으로 종양 침입은 3단계로 세분화되는데, 세포

외 간질 성분에 종양세포 부착 및 단백질 분해 효소들 (proteases)에 의한 세포간질의 국소성 변성(퇴화)과 단백질 분해에 의해 세포간질 부위의 변성 부위로 종양 세포의 유주가 관여한다고 알려져 있다(18). 따라서 인진쑥 methanol 추출물이 이러한 단계들 중의 하나를 억제하거나 종양 침습과 전이를 억제하는 것으로 생각되나, 수많은 천연 유래 면역 조절체가 CD4+, CD8+ T lymphocytes를 매개로 하여, 종양의 전이를 억제하는 것으로 알려져 있으므로(10,13,16), 면역증강 역시 인진쑥의 항암 및 전이 억제 효과 작용 기전으로 사료된다.

한편 신장의 국소성 세뇨관 상피세포의 위축과 섬유화는 특별성 신병증(22), 방사선 신병증(15), polyomavirus성 신병증(9), 화학물질로 유발된 신병증(23) 및 중금속 중독으로 유발된 신병증(19) 등 다양한 신장 질환에서 관찰된다고 보고된 바 있다. 이들 대부분은 비정상적인 사구체 여과 및 폐색성 세뇨관 질환과 관련이 있다고 알려져 있다(7,24). 또한, 신장에서의 세뇨관 변성은 간암에 따른 이차적인 조직병리학적 변화로 유발될 수 있다고 알려져 있다(21). 본 실험의 결과 신장 병증의 정도와 간 병증의 정도가 인진쑥 추출물의 투여에 따라 정확히 일치되는 것으로 관찰되었으므로 HP 매체 대조군에서 관찰된 국소성 세뇨관 상피세포의 편평화(위축) 및 SP 대조군에서 관찰된 국소성 신장 섬유화는 간의 종양 이식에 따른 이차적인 변화의 결과로 유발되었다고 생각된다.

또한, 인진쑥 추출물은 직접적인 간보호 효과(11)와 항산화 효과(8)가 있는 것으로 보고되어 있는데 아울러 인진쑥 methanol 추출물은 직접적인 간 보호나 신장보호 효과를 가지는 가능성이 있다고 사료된다. 일반적으로 항산화 효과 또한 다양한 신장 질병들에 대한 직접적인 신장보호 효과를 보였다고 알려져 있다(12).

이상의 동물 생체 내 실험 결과를 통하여 앞서 실시한 시험관내 실험 결과(2)와 미찬가지로 인진쑥 추출물의 항암효과를 확인할 수 있었다.

따라서 인진쑥 추출물의 항암활성 및 면역 증진을 가져오는 유효 성분들에 대한 동정, 생리활성 평가, 작용기전 규명 및 동물실험 모델에서의 면역조직화학적 소견을 통한 항암효과 확인, cytokine 함량 측정을 통한 면역활성효과 확인 등이 계속 연구되어져야 할 것으로 생각된다.

아울러, 인진쑥 메탄올 추출물의 주요한 화학적 성분(정확한 약효 성분)을 분석하고 이를 토대로 더 나아가 다른 종류의 암들에 대한 연구를 할 필요가 있다고 생각된다.

## 결 론

인진쑥은 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본으로 우리나라의 전통 민간요법에서 복통, 간염, 만성 간질병, 황달, 천식 등의 치료에 사용되어진 약용 식물 중 가장 흔한 식물이다.

본 연구에서는 인진쑥 추출물의 항암효과(암세포 증식억제 효과)와 면역활성 효과를 알아보고자 실험동물인 ICR계 마

우스의 간엽에 암종 세포주(Hepa-1c1c7)와 경부 피하에 육종 세포주(Sarcoma 180)를 접종이식하여 종양을 유발시킨 다음 인진쑥 methanol 추출물이 암이 유발된 마우스의 주요 장기에 미치는 영향을 조직병리학적 및 histomorphometry적 기법으로 관찰하였다.

21두의 ICR계 마우스를 이용한 동물실험에서 조직병리학적으로 관찰한 결과, 28일에 실험군의 경우 HP 및 SP 매체 대조군에서, 42일에 실험군의 경우 HP 매체 대조군에서 관찰한 모든 실험동물에서 간 및 비장 내 종양세포의 출현이 인정되었다. 하지만, 인진쑥 추출물 투여 군에서는 각각의 매체 대조군에 비하여 histomorphometry적 변화를 관찰한 결과 종양세포의 출현빈도 및 종양세포가 차지하는 부위의 감소가 투여 용량 의존적으로 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 인정되었다.

인진쑥 추출물이 실질 조직 내에서 직접적으로 종양 증식을 억제하는 것인지 이들 종양세포들의 전이를 차단하는 것인지는 본 실험의 결과로는 알 수 없으나, 인진쑥 추출물은 종양 이식부위가 아닌, 간 및 비장 등 실질 조직에서 종양세포의 출현을 현저히 억제시키는 것으로 관찰되었으며, 간의 종양세포 증식 등에 따른 이차적인 신장병증 역시 직간접적으로 억제하는 것으로 관찰되었다.

따라서 본 실험에서도 인진쑥 추출물의 항암 효과를 확인할 수 있었다.

결론적으로 인진쑥 메탄올 추출물이 Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포주에 대해 유의한 항암 효과를 가진다고 사료된다. 따라서 인진쑥 추출물은 수의와 인의 임상에서 생약으로 개발하여 임상적으로 적용해볼 가치가 있는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. 김태정. 한국의 자원 식물 IV. 서울: 서울대학교 출판부. 1996: 259.
2. 김홍태, 김주완, 임미경, 진태원, 여상건, 장광호, 오태호, 이근우. 인진쑥 추출물의 세포독성효과. 한국임상수의학회지 2007; 24(3): 367-371.
3. 류도곤. 백서 간손상에 대한 인진 추출물의 효과에 관한 연구. 원광한의대 논문집. 1984.
4. 박형규, 김동우, 이장훈, 우홍정, 김병운. 인진사령산이 급성 Alcohol, 고지방식 및 Galactosamine 중독 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지 1993; 14: 123-142.
5. 우홍정. 인진오령산과 인진증량한 구성방이 흰쥐 손상 간에 미치는 영향. 대한한의학회지 1992; 13: 212-240.
6. Chambers AF, Macdonald IC, Schmidt EE, Morris VL, Groom AC. Clinical targets for anti-metastasis therapy. Adv Cancer Res 2000; 79: 91-121.
7. Chevalier RL. Obstructive nephropathy: lessons from cystic kidney disease. Nephron 2000; 84: 6-12.
8. Chu CY, Tseng TH, Hwang JM, Chou FP, Wang CJ. Protective effects of capillarisin on tert-butylhydroperoxide-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. Arch Toxicol 1999; 73: 263-268.
9. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, Wali R, Crowder C, Nogueira J, Cangro CB, Mendley S, Mian A, Ramos E. Histological patterns of polyomavirus nephropathy:

- correlation with graft outcome and viral load. Am J Transplant 2004; 4: 2082-2092.
10. Hayakawa Y, Fujii H, Hase K, Ohnishi Y, Sakukawa R, Kadota S, Namba T, Saiki I. Anti-metastatic and immunomodulating properties of the water extract from *Celosia argentea* seeds. Biol Pharm Bull 1998; 21: 1154-1159.
  11. Hong SH, Seo SH, Lee JH, Choi BT. The aqueous extract from *Artemisia capillaris* Thunb. Inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through preventing NF-kappaB activation in human hepatoma cell line and rat liver. Int J Mol Med 2004; 13: 717-720.
  12. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziae T, Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus L.*) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. J Pharm Pharm Sci 2005; 8: 387-393.
  13. Hu X, Cao BN, Hu G, He J, Yang DQ, Wan YS. Attenuation of cell migration and induction of cell death by aged garlic extract in rat sarcoma cells. Int J Mol Med 2002; 9: 641-643.
  14. Hu YQ, Tan RX, Chu MY, Zhou J. Apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721 induced by water-soluble macromolecular components of *Artemisia capillaris* Thunberg. Jpn J Cancer Res 2000; 91: 113-117.
  15. Jaggi JS, Seshan SV, McDevitt MR, LaPerle K, Sgouros G, Scheinberg DA. Renal tubulointerstitial changes after internal irradiation with alpha-particle-emitting actinium daughters. J Am Soc Nephrol 2005; 16: 2677-2689.
  16. Kimura Y, Taniguchi M, Baba K. Antitumor and antimetastatic activities of 4-hydroxyderricin isolated from *Angelica keiskei* roots. Planta Med 2004; 70: 211-219.
  17. Kiso Y, Ogasawara S, Hirota K, Watanabe N, Oshima Y, Konno C, Hikino H. Antihepatotoxic principles of *Artemisia capillaris* buds. Planta Medica 1984; 50: 81-85.
  18. Liotta LA. Tumor invasion and metastases role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. Cancer Res 1986; 46: 1-7.
  19. Markowitz GS, Radhakrishnan J, Kambham N, Valeri AM, Hines WH, D'Agati VD. Lithium nephrotoxicity: a progressive combined glomerular and tubulointerstitial nephropathy. J Am Soc Nephrol 2000; 11: 1439-1448.
  20. Ogasawara M, Matsubara T, Suzuki H. Inhibitory effects of evodi- amine on in vitro invasion and experimental lung metastasis of murine colon cancer cells. Biol Pharm Bull 2001; 24: 917-920.
  21. Toyosawa K, Okimoto K, Kobayashi I, Kijima K, Kikawa E, Kohchi M, Koujiani T, Tanaka K, Matsuoka N. Di(2-ethylhexyl)phthalate induces hepatocellular adenoma in transgenic mice carrying a human prototype c-Ha-ras gene in a 26-week carcinogenicity study. Toxicol Pathol 2001; 29: 458-466.
  22. Troyanov S, Roasio L, Pandes M, Herzenberg AM, Catran DC. Renal pathology in idiopathic membranous nephropathy: a new perspective. Kidney Int 2006; 69: 1641-1648.
  23. Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC. Role of CD8(+) cells in the progression of murine adriamycin nephropathy. Kidney Int 2001; 59: 941-949.
  24. Yasuhara D, Naruo T, Taguchi S, Umekita Y, Yoshida H, Nozoe S. "End-stage kidney" in longstanding bulimia nervosa. Int J Eat Disord 2005; 38: 383-385.