

Original Articles

膈下逐瘀湯이 Diethylnitrosamine과 CCl₄로 유발된 흰쥐의 肝癌 形成과 肝 損傷에 미치는 영향

허래경, 성기문, 김소연, 제준태, 권소연, 문구, 이종덕*, 원진희

원광대학교 한의과대학 내과학교실, *원광대학교 광주병원 영상의학과

The Effect of the Keughachukeo-tang Extract on the Hepatocellular Carcinogenesis and Acute Liver Damage Induced by Diethylnitrosamine and CCl₄ in Rats

Rae-Kyong Heo, Kee-Moon Seung, So-yeon Kim, Jun-tae Je, So-yeon Kwon, Goo Moon, Jong-Deok Lee*, Jin-Hee Won

Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Won-kwang University, *Department of Radiology, Won-kwang University Hospital, GwangJu

Received : 09. 10. 19

Accepted : 09. 11. 02

Key Words:

Keughachukeo-tang, Hepatocellular Carcinogenesis, DENA, CCl₄, p53

ABSTRACT

This study was performed to observe the effect of Keughachukeo-tang(KH) extract on the hepatocellular carcinogenesis and acute liver damage induced by Diethylnitrosamine(DENA) and CCl₄ in Rats. Experimental groups were divided into four; normal group(Nor), acute liver damage and hepatocellular cancer inducing control group(Con), KH extract 350mg/kg/day(KHA), and 700mg/kg/day(KHB) administered groups to Con.

The results obtained are as follows:

The body weight increased in KHA and KHB than Con from 7th week to the 8th week.

The activities of Alanine aminotransferase(ALT) were the most increased in the Con among experimental group.

The activities of aspartate aminotransferase(AST), alkaline phosphatase(ALP), and lactate dehydrogenase(LDH) were significantly decreased(p<0.05) in the KHA and KHB compared with Con.

Alpha fetoprotein(AFP) were the most increased in the Con among experimental groups.

The activities of superoxide dismutase(SOD) were the most increased in the Con among experimental groups.

The activities of catalase were significantly increased(p<0.05) in the KHA and KHB compared with Con.

The results of light microscopical observation, a number of hepatocytes were damaged in the Con compared with Nor and KH extract administered groups.

The number of hepatic p53 positive cells was reduced in the KH extract administered groups compared with Con.

These results suggest that administration of KH extract suppress or retard on the Hepatocellular Carcinogenesis and acute liver damage induced by DENA and CCl₄ in Rats.

I. 서론

정상적인 細胞는 細胞內 調節機能에 의해 分裂하며 成長하고 死滅하여 細胞數의 均衡을 유지한다. 그러나 여러

가지 이유로 增殖과 抑制가 調節되지 않는 비정상적인 細胞들이 통제되지 못하고 過다하게 增殖할 뿐만 아니라 주

※Corresponding author : Won, Jin-Hee Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 543-8, Juwol-dong, Nam-gu, GwangJu-Si. South Korea. TEL: +82-62-670-6416 E-mail : wonjh@wonkwang.ac.kr

※This research was supported by the Wonkwang University.

위 組織 및 臟器에 침입하여 腫塊 形成 및 정상 組織의 破壞를 초래하는 상태를 癌이라 정의한다¹⁾.

肝癌은 肝 組織에서 기원하는 原發性 肝癌과, 다른 부위의 癌에서 떨어져 나온 癌細胞가 血管이나 림프관을 통해서 또는 직접적으로 肝에 도달하여 肝 組織에 癌을 만드는 轉移性 肝癌으로 나눌 수 있다. 이와 같이 肝에 발생하는 惡性腫瘍을 모두 肝癌이라 말할 수 있으나, 一般的으로는 原發性 肝癌을 일컫는다²⁾.

특히 肝癌은 우리나라 40-50대 남자의 주요한 사망 원인이며 인구 10만명 당 남자는 33.9명, 여자는 10.9명이 간암으로 사망하고 있다.³⁾

최근에는 抗癌劑의 부작용을 줄이면서 抗腫瘍效果를 극대화하기 위하여 한약을 併用한 實驗的 研究가 행해지고 있는데, No et al⁴⁾는 消積保中丸의 抗腫瘍效果에 대한 研究를, Jeong et al⁵⁾은 內托羌活湯이 腫瘍 및 免疫調節機能에 미치는 研究를, Yu et al⁶⁾는 四物湯이 항암제를 투여한 마우스의 면역세포에 미치는 影響을, Baek⁷⁾은 八珍抗癌丹의 급성 골수성 백혈병 세포에서 抗腫瘍 效果를, Baek⁸⁾은 인간 肝癌 세포주에서 八珍抗癌丹과 Adriamycin의 병용치리에 의한 抗腫瘍 效果를 報告하였다.

膈下逐瘀湯은 王⁹⁾의 《醫林改錯》에 처음 收錄된 處方으로 積塊, 小兒痞塊, 痛不移處, 臥即腹墮, 腎瀉, 久瀉를 治療하는 效能이 있다 하였다. 또 余¹⁰⁾는 이 處方이 行血逐瘀藥으로 구성되어 있어 下焦氣滯瘀停疾患에 有效하다고 하였으며, Lee¹¹⁾는 이 處方이 活血 祛瘀 理氣 止痛의 效能이 있어 積證, 急腹證, 胃, 十二指腸潰瘍, 胃癌, 肝硬化, 急性 脾臟炎, 膽石症, 慢性白血病, 消化管出血 등의 疾患에 應用한다고 하였다.

이에 著者는 膈下逐瘀湯이 肝 損傷 및 肝癌에 미치는 影響을 규명하고자 Diethylnitrosamine(DENA)과 CCl₄를 併用 投與하여 肝 損傷 및 肝癌을 유발 시킨 후, 膈下逐瘀湯을 투여하였으며 체중의 변화, aspartate aminotransferase(AST)의 활성, alanine aminotransferase(ALT)의 활성, alkaline phosphatase(ALP)의 활성, lactate dehydrogenase(LDH)의 활성, serum AFP의 변화, superoxide dismutase(SOD)의 활성, catalase의 활성, 광학현미경 관찰, p53 면역조직화학 관찰을 통하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 약재

실험에 사용한 약재는 원광대학교 광주 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 膈下逐瘀湯(Keughachukeo-tang, 이하 KH)의 구성은 《醫林改錯》⁹⁾에 準하였으며 한첩의 분량은 다음과 같다(Table. 1).

2) 동물

체중 200 ± 10g 내외의 7주령 흰쥐(Sprague Dawley)를 샘타고(주, 오산)로부터 구입하였다. 실험동물은 동신대학교 한의과대학 동물 사육실에서 일정한 조건(온도 : 21 ± 2°C, 습도 : 50-60%, 12시간 명/암 주기)하에서 일반 고형사료(샘타고, 흰쥐 용)와 물을 충분히 공급하면서 1주 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약물 추출

膈下逐瘀湯 4첩을 물 1200mL에 넣고 약탕기로 3시간 동안 가열한 다음 농축한 후 저온순환수조(COOL ACE CA-1500)에서 1차 동결한 다음 동결건조기(Samwon, SFDSMO06, 한국)로 동결 건조하여 42.0g의 분말을 얻었다.

2. 방법

1) 간 손상 및 간암 유발

정상군을 제외한 모든 실험동물은 Diethylnitrosamine(DENA, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 200mg/kg을 0.9% 식염수 1mL에 용해하여 1주 간격으로 2회 복강투여 하였다. DENA를 2회 투여한 다음 1주 후 부터 Carbon tetrachloride(CCl₄, SigmaChemical Co., St Louis, MO)와 corn oil을 1:1로 희석한 약물 1mL을 1주 간격으로 3회 복강 투여하여 간암을 유발하였다.

2) 실험군 설정 및 약물 투여

정상군은 통상적인 사료와 물을 공급하였으며, 대조군 흰쥐는 간암과 간손상 약물 투여가 완료된 다음 24시간 후 부터 식염수 0.5mL를 실험기간 동안 매일 구강 투여하였으며, 실험군은 膈下逐瘀湯 抽出液 건조분말을 생리 식염수 0.5mL에 용해하여 체중 60kg인 사람의 1일 투약

량인 350mg/kg(이하 KHA군)과 2배에 해당하는 700mg/kg 투여군(이하 KHB군)으로 구분하여 8주 동안 구강 투여 하였다.

3. 관찰방법

1) 체중 측정

대조군과 실험군의 체중은 1주 간격으로 실험기간 동안 측정하였으며, 체중 측정 12시간 전부터 금식시켰다.

2) 혈청 Transaminase 활성 측정

혈중 중 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)의 활성 측정은 Reitman-Frankel의 방법¹²⁾에 따라 kit 시약(아산제약)을 사용하여 측정하였다. AST와 ALT 기질액 1.0mL를 시험관에 넣고 37℃에서 5분간 방치한 다음 혈청 0.2mL를 넣어 잘 혼합한 다음 37℃에서 AST는 60분, ALT는 30분간 반응시킨 다음 정색시액 1.0mL를 첨가하여 잘 혼합하여 실온에서 20분간 방치하여 반응을 종료시키고, 0.4N NaOH 용액 10mL를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 약 10분간 방치하였다가 505nm에서 흡광도(photometer 5010, Germany)의 변화를 측정하였다.

3) Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

ALP 활성도 측정은 Reitman-Frankel¹²⁾ 방법에 의한 kit 시약(아산제약, 한국)을 사용하여 405nm (DRI CHEM-4000i, Japan)에서 측정하였다.

4) Lactate dehydrogenase (LDH) 활성 측정

LDH 활성도 측정은 Reitman-Frankel¹²⁾ 방법에 의한 kit 시약(아산제약, 한국)을 사용하여 340nm(DRI CHEM-4000i, Japan)에서 측정하였다.

5) Serum AFP 측정

심장 채혈하여 획득한 혈액(10 μ L)을 증류수 40 μ L에 희석하였다. 혈액 샘플은 AFP를 측정하기 전까지 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 그다음 AFP ELISA kit (Sierra Resources International, Inc., Valrico, FL)를 이용하여 완충액에 희석된 혈액 샘플 10 μ L에서 혈청내 AFP 농도를 측정(SpectraMax M2, USA)하였다¹³⁻¹⁴⁾.

6) Superoxide dismutase(SOD) 추출 및 활성도 측정
대조군과 실험군 흰쥐로부터 EDTA(K3) 처리된 vacutainer에 전혈을 수집한 후, 전혈 1.0mL에 0.85% NaCl을 혼합한 다음 3000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상층액 제거 후 pellet을 3회 반복 실시한 다음, 증류수를 첨가하여 total volume을 4mL로 맞춘 후 ethanol 1mL와 chloroform 0.6mL를 넣고 vortex한 다음 4℃에서 3000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 증류수로 희석하여 검체로 사용하였다. SOD 활성도는 SOD assay kit(Dojindo, Japan)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정 후 SOD 활성도를 계산하였다.

7) Catalase의 추출 및 활성도 분석

Catalase 활성도 측정은 Beers and Sizer(1952)의 방법¹⁵⁾에 준하여 50mM 인산칼슘 완충액(pH 7.2)에 기질인 10mM H₂O₂에 효소액을 가하여 최종 반응액이 3.0ml가 되게 한 다음 25℃에서 30초간 반응시키면서 240nm 파장에서 소실되는 H₂O₂의 양을 측정하였다. 효소 활성도의 단위는 15초간에 1mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 μ mole로 나타내었다.

8) 광학현미경 관찰

생쥐의 간 조직을 적출하고 Bouin 용액을 사용하여 24시간 동안 고정시킨 다음, 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100 I, 100 II 와 같이 알코올 농도를 상승시켜 탈수한 다음 xylene으로 투명화 과정을 거친 후 paraffin으로 포매하였고, 포매된 조직을 microtome을 사용하여 6 μ m 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시키고 xylene으로 paraffin을 제거한 다음 100%, 90%, 80% ethanol과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담구어 함수과정을 거치게 하였다. Hematoxylin과 Eosin으로 이중염색을 한 다음 탈수하였다. Canada balsam으로 봉합한 후 카메라 부착 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

9) p53 면역조직화학

흰쥐의 간 조직을 적출하여 Bouin 용액을 사용하여 24시간 동안 고정시킨 다음, paraffin으로 포매한 후 microtome을 사용하여 조직을 6 μ m 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 이를 xylene에서 paraffin을 제거한 다음 100%, 90%, 80% ethanol과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담구어 함수과정

을 거치게 하였다. 12시간 후 pH 7.2, 0.1M의 phosphate buffer saline(PBS, 0.9% NaCl) 용액에 24시간 동안 배양시킨 다음 15분간 PBS로 세척한 뒤 10% horse serum을 함유한 blocking solution을 사용하여 20분 동안 배양시키고 다시 PBS용액으로 15분간 세척하였다. 세척한 각각의 조직위에 polyclonal anti mouse COX-2 항체(Cayman Chemical Co.)를 각각 처리하고 습도가 높은 상온의 배양접시에서 2시간 동안 배양시킨 뒤 15분간 PBS용액으로 세척하였다. 그리고 2차 항체 biotinylated anti-mouse IgG를 처리하여 60분간 배양시킨 후 15분간 PBS용액으로 세척하였다. 이를 다시 3차 항체 avidin-biotinylated enzyme complex(ABC) reagent(Vector Lab, CA, USA)를 조직에 처리 30분간 반응시키고 다시 PBS용액에서 15분간 세척하였다.

DAB(3, 3'-diaminobenzide) 발색시약을 조직에 떨어뜨려 2분간 발색시키고 난 후 흐르는 물에 과량의 염색시약을 제거하였다. 물기를 제거한 후 여과시킨 hematoxylin에 20초간 대조염색을 한 다음 통상적인 방법에 따라 표본을 제작하여 카메라 부착 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

10) 통계분석

실험 결과에 대한 통계분석은 SAS (statistical analysis system) program의 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 별로 평균치와 표준오차를 계산하였고, p-value가 최소한 0.05이하의 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 실험결과

1. 체중의 변화

DENA와 CCl₄를 복강 투여하여 간암 및 간 손상을 유발하는 과정에서 8주 동안 체중의 변화를 측정하였다. 정상군에 비하여 대조군은 4주까지 뚜렷한 체중의 변화는 관찰할 수 없었으나, 5주부터 감소하기 시작하여 6주에서부터 8주까지는 통계적으로 유의성(*p<0.05) 있게 감소하였다. 실험군인 KHA군과 KHB군은 대조군에 비하여 7주와 8주에서는 유의성(*p<0.05)있게 체중이 증가하였다(Fig. 1).

2. Aspartate aminotransferase (AST)의 활성

간 손상 및 간암을 유발시킨 후 8주 동안 膈下逐瘀湯을 투여한 다음 간 기능을 확인하기 위하여 혈청 AST의 활성을 관찰한 결과, 정상군(100±7.02 U/L)에 비하여 대조군(169±11.04 U/L)에서 AST의 활성이 증가하여 통계적으로 유의성(*p<0.05)이 있었다. 실험군 KHA군(98±13.03 U/L)과 KHB군(87±12.40 U/L)은 정상군과 유사한 소견을 보여줄 뿐만 아니라 대조군에 비하여 유의성(*p<0.05)있게 AST의 활성이 감소하였다(Fig. 2).

3. Alanine aminotransferase (ALT)의 활성

간 손상 및 간암을 유발시킨 후 8주 동안 膈下逐瘀湯을 투여한 다음 간 기능을 확인하기 위하여 혈청 ALT의 활성을 관찰한 결과, 정상군(60±5.32 U/L)에 비하여 대조군(81±3.48 U/L)과 실험군에서 모두 증가하였다. 실험군 KHA군(68±3.81 U/L)과 KHB군(72±5.45 U/L)은 대조군에 비하여 ALT 활성이 낮았다(Fig. 3).

4. Alkaline phosphatase (ALP)의 활성

간 손상 및 간암을 유발시킨 후 8주 동안 膈下逐瘀湯을 투여한 다음 간 기능을 확인하기 위하여 혈청 ALP의 활성을 관찰한 결과, 정상군(238±13.73 U/L)에 비하여 대조군(340±24.96 U/L)에서 뚜렷이 증가하여 통계적으로 유의성(*p<0.05)이 있었다. 실험군 KHA군(283±17.06 U/L)은 정상군에 비하여 활성이 증가하였으나 대조군에 비하여 활성이 낮았으며, 특히 KHB군(225±17.55 U/L)은 대조군에 비하여 통계적으로 유의성(*p<0.05)있게 활성이 감소하였다(Fig. 4).

5. Lactate dehydrogenase (LDH)의 활성

간 손상 및 간암을 유발시킨 후 8주 동안 膈下逐瘀湯을 투여한 다음 LDH의 활성을 관찰한 결과, 정상군(2913±706.17 U/L)에 비하여 대조군(5,566±187.72 U/L)에서 통계적으로 유의성(*p<0.05)있게 증가하였다. 실험군 KHA군(2975±377.05 U/L)과 KHB군(2490±506.06 U/L)에서는 정상군과 유사한 활성을 보여주었을 뿐만 아니라 대조군에 비하여 통계적으로 유의성(*p<0.05)있게 감소하였다(Fig. 5).

6. Serum AFP의 활성

간 손상 및 간암을 유발시킨 후 8주 동안 膈下逐瘀湯을 투여한 다음 혈청 내 AFP의 변화를 관찰한 결과, 정상군(2.78 ± 0.29 ng/mL)에 비하여 대조군(5.51 ± 0.86 ng/mL)에서 통계적으로 유의성(*p < 0.05)있게 증가하였으며, 실험군 KHA군(3.40 ± 0.53 ng/mL)과 KHB군(2.95 ± 0.19 ng/mL)은 대조군에 비하여 AFP의 활성이 낮았다(Fig. 6).

7. Superoxide dismutase (SOD)의 활성

간 손상 및 간암을 유발시킨 후 8주 동안 膈下逐瘀湯을 투여한 다음 간 조직에서 SOD의 활성을 측정된 결과, 정상군(102 ± 2.04%)에 비하여 대조군(133 ± 3.70%)과 실험군에서 모두 증가하였다. 실험군 KHB군(116 ± 2.61%)과 KHA군(111 ± 4.64%)은 대조군에 비하여 SOD 활성이 낮았으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 7).

8. Catalase의 활성

간 손상 및 간암을 유발시킨 후 8주 동안 膈下逐瘀湯을 투여한 다음 Catalase의 활성을 측정된 결과, 정상군(221 ± 5.44 U/mL)에 비하여 대조군(192 ± 11.21 U/mL)에서는 감소하였으나, 실험군 KHA군(264 ± 17.34 U/mL)과 KHB군(266 ± 13.11 U/mL)은 대조군에 비하여 통계적으로 유의성(*p < 0.05)있게 증가하였다(Fig. 8).

9. 광학현미경 관찰

간 조직의 변화를 알아보기 위해 흰 쥐에게 DENA와 CCl₄ 처리 후 膈下逐瘀湯을 8주 동안 구강 투여한 다음 간 조직을 적출하여 hematoxylin과 eosin으로 이중 염색한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

정상군의 간세포는 핵이 둥글고 핵질은 eosin에 염색성이 고르게 나타났다. 동굴모세혈관 속에서는 혈액이 있어 eosin에 강한 염색성을 보였으며, 다수의 Kupffer 세포들이 관찰되었다(Fig. 9a). 간 손상 및 간암을 유발시킨 대조군의 간 조직은 중심정맥이 매우 위축되어 있었으며, 동굴모세혈관은 거의 관찰되지 않았다. 핵은 매우 손상되어 있었으며, 세포의 형태가 매우 불규칙하였다. 핵은 비교적 크면서 염기성이 높고, 세포질은 호산성을 강하게 띠는 세포들이 다수 관찰되었다(Fig. 9b). KHA군에서는 대조군

에서처럼 손상된 간 조직은 관찰되지 않았지만, 중심정맥 주변에서 세포질의 염색성이 비교적 낮은 세포집단과 백혈구의 침착을 확인할 수 있었다. 대조군에서처럼 핵은 비교적 크면서 염기성이 높고, 세포질은 높은 호산성을 띠는 세포들이 관찰되었다(Fig. 9c). KHB군은 중심정맥은 비교적 등극에 관찰되었으나 동굴모세혈관은 뚜렷하지 않았으며, 소수의 대핵세포들이 있었다. 간 조직은 전반적 염색성이 고르게 나타났으나, 핵의 밀도는 정상군에 비하여 비교적 높았다(Fig. 9d).

10. p53 면역조직화학

p53의 면역조직화학적 변화를 알아보기 위해 흰 쥐에게 DENA와 CCl₄ 처리 후 膈下逐瘀湯을 8주 동안 구강 투여한 다음 간 조직을 적출하여 p53 항체 처리하고 광학 현미경으로 관찰하였다.

정상군의 간 조직은 p53에 대한 면역반응성이 거의 없었으며, 동굴모세혈관에서 미약한 반응이 나타났다(Fig. 10a). 대조군의 간세포에서는 p53에 강한 면역반응성을 보이는 세포들이 중심정맥 주변의 세포들에서 집중적으로 관찰되었으며, 간 조직 전반에 걸쳐 p53에 대한 높은 면역반응성을 보였다(Fig. 10b). KHA군에서는 대조군에서처럼 p53에 면역반응성을 보이는 세포들이 집단으로 관찰되었으나 면역반응성은 다소 낮았다. 또한 이들은 섬유성으로 보이는 물질에 의하여 둘러싸여 있었다(Fig. 10c). KHB군은 p53에 대하여 면역반응성을 보이는 세포가 산발적으로 나타났다. p53에 면역반응성을 보이는 세포와 면역반응성이 없는 세포가 뚜렷이 구분되었다(Fig. 10d).

IV. 고찰

腫瘍이란 生體組織의 일부가 끊임없이 非正常的이고 持續的으로 過剩發育하는 것으로 人體를 構成하는 正常細胞가 刺戟에 의하여 遺傳子 形質 轉換이 發生하고, 그 結果 細胞의 形態學, 生物學, 化學, 物理學, 免疫學的 行動이 變化的인 變形細胞가 遺傳的으로 代를 이어 無節制한 增殖을 함으로써 形成된 變形細胞의 집단으로 몸에서 새롭게 생겨나는 新生物을 말한다⁶⁾. 腫瘍은 臨床 및 病理形態學的으로 良性腫瘍과 惡性腫瘍으로 區分하며 一般적으로 惡性腫瘍을 癌이라 總稱한다¹⁷⁾.

韓醫學에서는 腫瘍과 일치하는 용어는 없지만 腫瘍에

대한 인식은 일찍부터 있었던 것으로 보인다. 腫瘍에 대한 표현은 殷墟의 甲骨文에서 瘤라 하여 처음 나타나며, 이후《內經》에서 積聚, 腸覃, 石瘕, 溜(瘤), 五臟之積 등에 대해 구체적으로 언급되어 있다¹⁸⁾.

癌은 全身의인 狀態와 局所의인 病症變化에 따라 辨證 施治하여 治療에 응용하는데 疏肝理氣, 活血化瘀, 清熱利濕, 解毒破結, 養陰清熱, 解毒祛瘀, 清熱解毒法, 軟堅化瘀, 疏肝散結, 活血止痛, 利濕行氣, 開竅逐水法 등의 치법이 사용되고 있으며, 그 중에서도 益氣補脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎 하여 인체 抗癌능력을 증진시키는 扶正固本法과 攻邪하되 人體의 正氣를 보약하여 정기를 손상시키지 않는 扶正祛邪法이 널리 활용 되고 있다¹⁹⁾.

본 연구에 사용된 膈下逐瘀湯은 《醫林改錯》⁹⁾에 수록된 처방으로서, 구성 藥物들의 效能을 살펴보면 當歸는 補血和血·調經止痛하는 效能이 있어 血虛經閉 및 創傷, 癰腫 등에 이용되며, 甘草는 下氣通經 및 消腫紅의 效能을 지니고 있고, 桃仁은 破血祛瘀하면서 潤燥滑腸하는 效能이 있어 瘀血腹痛이나 癥瘕積聚 및 肺癰, 腸癰 등에 이용된다. 紅花는 活血潤燥·散種通經하는 效能이 있어 腹內惡血絞痛에 應用되며, 赤芍藥은 消癰散腫하는 效能이 있어 癰腫疼痛 등에 이용되고, 五靈脂는 婦人의 經水過多나 赤帶下일 때 사용하고, 川芎은 活血行氣 및 祛風止痛하는 效能이 있어 經閉, 腹痛, 風濕痺에 사용되고, 牡丹皮는 清熱涼血, 活血行瘀하는 效能이 있어 惡血積聚作痛 및 打撲傷瘀血疼痛에 이용된다. 烏藥은 寒疝腹痛 및 腎膀胱의 虛寒으로 인한 疾患 등에 이용하며, 香附子는 癰疽瘡瘍, 消飲食積聚 및 浮腫腹脹 등에 活用되고, 枳殼은 堅積을 攻下하는 藥物로 脘腹痞悶 및 脹滿등에 응용하고, 玄胡索은 活血祛瘀, 理氣止痛하는 效能이 있어 通經, 疝痛, 四肢血滯疼痛 등을 治療하는데, 이러한 效能으로 인하여 膈下逐瘀湯은 人體의 正氣 및 免疫機能을 強化시켜 抗癌效果를 나타내게 된다²⁰⁻²²⁾.

간암 환자의 50-80%에서 영양불량 및 흡수장애로 인한 만성적인 체중감소가 발생하며 극심한 영양불량 상태인 惡液質로 인한 사망률이 많게는 23%에 달하고 종양으로 인한 에너지 손실 혹은 요구량의 증가, 에너지 대사의 변화 뿐만 아니라 항암제로 인한 체중감소가 암환자의 예후에 나쁜 영향을 미친다²³⁾. DENA와 CCl₄를 복강 투여하여 간암을 유발시키는 과정에서 8주 동안 체중의 변화를 측정한 결과 정상군에 비하여 대조군은 5주부터 감소하기 시작하여 6주에서부터 8주까지는 통계적으로 유의성 있게 감소하였다. 실험군인 KHA군과 KHB군은 7주

와 8주에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 1). 이러한 결과로 보아 간 손상 및 간암의 발생이 진행되는 과정에서 膈下逐瘀湯의 투여는 체중 감소를 억제하는데 효과적으로 작용함을 알 수 있다.

AST와 ALT의 활성치 증가는 세포 장애 정도와 상관성이 좋을 뿐만 아니라 다른 혈중 유출 효소에 비하여 예민하게 변동하며 간세포의 변성 및 괴사의 지표로 이용되고 있다. AST와 ALT는 모든 장기에 존재하나 AST의 경우 간, 심장, 골격근에 많이 존재하는 반면 ALT는 간세포 특이성이 높은 것이 특징이다²⁴⁻²⁵⁾. 본 연구에 사용된 DENA와 CCl₄는 사람에게 치명적인 간 손상 및 간암을 발생시키는 독성 물질로 독성작용에 대한 많은 경우들이 이미 보고된 바 있으며²⁶⁾, 간 기능이 손상되면 총 단백질 또는 albumin 수치가 감소하고 AST, ALT 및 ALP가 상승하며, bilirubin 및 r-GTP 활성이 증가한다고 알려져 있다²⁷⁾. 본 實驗에서도 간 기능을 확인하기 위하여 혈청 AST의 활성을 측정하고, 정상군에 비하여 대조군에서 AST의 활성이 매우 증가하여 통계적으로 유의성이 있었으며, 膈下逐瘀湯을 투여한 실험군인 KHA군과 KHB군은 정상군과 유사한 소견을 보여줄 뿐만 아니라 대조군에 비하여 유의성 있게 AST의 활성이 감소하였다(Fig. 2). 반면에 혈청 ALT의 활성은 대조군은 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으나, 실험군인 KHA군과 KHB군은 대조군에 비하여 ALT 활성이 다소 감소하였다(Fig. 3). ALP는 종양과 농양과 같은 공간 점유성 병변, 수동성 간 울혈, 황달을 일으키는 간 손상에서 증가를 보이는데^{25,28)}, 본 實驗에서도 역시 ALP의 활성은 정상군에 비하여 대조군에서 뚜렷이 증가하여 통계적으로 유의성이 있었으며, 실험군 KHA군은 정상군에 비하여 활성이 증가하였으나, 대조군에 비하여 활성이 낮았으며, 특히 KHB군은 대조군에 비하여 통계적으로 유의성 있게 활성이 감소하였다 (Fig. 4). 이러한 결과로 보아 膈下逐瘀湯은 DENA와 CCl₄의 독성에 의해 증가된 이들의 활성을 감소시킴으로써 손상된 간에 방어적으로 작용함을 알 수 있다.

LDH는 인체의 모든 조직에 분포되어 있는데, 어떤 원인에 의해 세포가 손상을 받으면 세포내 LDH가 세포 외로 유출되어 혈중 LDH가 증가 된다^{24,29)}. 본 實驗에서도 DENA와 CCl₄를 투여하여 치명적인 간 손상 및 간암이 유발된 대조군의 LDH 활성은 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, 膈下逐瘀湯을 8주동안 투여한 실험군인 KHA군과 KHB군에서는 정상군과 유사한 활성을 보여주었을 뿐만 아니라 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하

였다(Fig. 5). 이로 보아 膈下逐瘀湯은 간세포의 손상 및 파괴를 억제하는데 효과가 있음을 시사하고 있다.

Serum AFP는 1956년 Bergstrand 등에 의해 전기영동상 albumin과 α_1 -globulin 중간으로 영동되는 태아성 단백질로 처음 보고되었으며, 그 후 1963년 Abelev, 1964년 Tatarinov 등이 간 세포암 환자 혈청에서 이 물질이 증가한다는 사실을 보고한 이래로 많은 연구가 진행되고 있다²⁴. 간암환자에서는 태생성 단백 등의 선조환원 현상을 나타내어 AFP의 수치가上昇하게 되며, 임상적으로 혈청 AFP의 함량은 간암의 크기와 상관관계를 가진다고 보고되고 있다³⁰. 간암을 유발시킨 후 8주 동안 膈下逐瘀湯을 투여하고 혈청내 AFP의 변화를 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서는 유의성 있게 증가하였으며, 실험군인 KHA군과 KHB군은 대조군에 비하여 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 6).

활성산소는 산소의 대사과정에서 부산물로 발생하며 환경적인 요인에 의해서도 발생한다. 활성산소는 자체적으로 반응성이 매우 강하기 때문에 유전자에 돌연변이를 발생시켜 oncogene을 과량 발현시키거나 tumor suppressor gene을 불활성화 시켜 암을 일으키는 유발인자로 작용하고 있다³¹. SOD는 인체 내 항산화 효소 중의 하나로서²⁴, superoxide radical의 독성을 감소시켜 세포 생존율을 증가시킨다³². Catalase는 동식물 조직 중에 널리 분포하며 인체의 적혈구, 간, 신장 등에 풍부하다²⁴. 생체 내 호흡의 유해산물인 H₂O₂를 제거하기 위한 효소로 암환자의 肝에서 catalase의 활성이 정상인에 비해 감소한다³³. 본 實驗에서는 간 조직에서의 SOD 활성을 측정한 결과 정상군에 비하여 대조군과 실험군에서 모두 증가하였다. 특히, 실험군 KHB군과 KHA군은 대조군에 비하여 SOD 활성이 낮았으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 7). Catalase의 활성은 정상군에 비하여 대조군에서는 감소하였으나, 膈下逐瘀湯 추출액을 8주 동안 투여한 실험군 KHA군과 KHB군은 대조군에 비하여 통계적으로 유의성 있게 증가하였다(Fig. 8). SOD의 활성도에 있어서 유의성이 명확하게 나타나지 않은 점은 보완이 필요할 것으로 사료되나, 실험군에 있어서 Catalase의 활성이 증가한 것으로 보아 膈下逐瘀湯 투여가 산소자유기의 산화적 간 손상에 대해 유효함을 提示하고 있다.

간암이 유발되는 과정에서 공통적인 조직학적 특징으로는 정상 세포로 보이는 일부 간세포가 분화 또는 개조되면서 결절을 형성하며³⁴, 투명한 호산성 세포와 혼합된 형태의 세포들이 함유된 변형된 증식성 소결절이 다수 출현한

다. 또한 소결절을 형성하는 세포들은 핵의 크기가 커지게 되고 증식하며, 미세구조적인 외형적 변화가 생긴다³⁵. CCl₄에 의한 간세포의 손상은 지질과산화와 함께 세포막의 투과성 변화로 세포종창, 원형질막 및 사립체 막의 손상 결과 괴사를 나타낸다³⁶. 본 實驗에서도 대조군에서는 핵의 밀도 및 크기가 증가하였으며 내부 변화에서도 상기한 변화들이 발생하였으나, 실험군인 KHA군과 KHB군에서는 대조군에 비하여 핵의 크기 및 양적 변화가 감소되어 있었으며 손상된 간 조직도 관찰 되지 않았다(Fig. 9). 이로 보아 膈下逐瘀湯은 간암의 분화, 진행을 억제한 것으로 사료된다.

p53유전자는 세포주기에 작용하는 종양억제 유전자의 하나로서 53kDa의 크기를 가지는 단백질이라 하여 명명되었으며, 세포가 손상 받으면 p53유전자가 핵 내에 축적되어 손상 받은 세포의 G1/S 주기를 정지시키고 세포 고사를 유도시켜 손상 받은 세포의 증식을 억제하는 기능을 한다³⁷. 따라서 p53유전자의 변이가 발생하면 DNA가 손상되더라도 세포고사가 일어나지 않으며, 다수의 악성질환에서 돌연변이나 이중 접합성 소실 등에 따른 유전자의 변형으로 p53유전자의 과 발현이 흔히 관찰 된다³⁸. 변이된 p53 유전자는 정상형 p53유전자에 비해 반감기가 현저히 증가되어 핵 내에 장기간 머무르기 때문에 면역 조직화학 방법으로 검출이 가능하나 정상형 p53유전자는 반감기가 짧기 때문에 면역 조직화학 검사로 검출이 되지 않는다³⁹. 본 실험에서도 정상군의 간세포에서는 p53에 면역 반응성이 거의 없었으나 대조군의 간세포에서는 p53에 강한 면역반응성을 보이는 세포들이 다수 관찰 되었다. 실험군 KHA군에서는 p53에 면역반응성을 보이는 세포들이 집단으로 관찰 되었으나 대조군 보다는 그 밀집도가 감소하였다. 실험군 KHB군은 p53에 대하여 면역반응성을 보이는 세포가 산발적으로 나타났으며, p53에 면역반응성을 보이는 세포와 면역반응성이 없는 세포가 뚜렷이 구분되었다(Fig. 10). 이로보아 膈下逐瘀湯은 간암의 진행을 억제하는데 작용했음을 알 수 있다.

이상의 실험 결과를 요약하여 보면 AST의 활성, ALP의 활성, LDH의 활성, Catalase의 활성, 광학현미경 관찰, p53 면역조직화학에 있어 대조군에 비해 실험군에서는 간의 손상 및 간암의 발생, 진행이 뚜렷하게 억제된 것으로 사료된다. 하지만 체중의 변화에 있어 7주에서 8주까지는 실험군이 대조군에 비하여 체중이 증가하였으나 1주에서 6주까지는 유의성이 명확하지 않은 점, ALT와 AFP의 활성에 있어 대조군에 비해 실험군에서 활성이 감

소하였으나 통계적 유의성이 명확하지 않은 점, SOD의 활성도를 측정하였으나 유의성이 없었던 것은 더욱 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

膈下逐瘀湯이 DENA와 CCl₄로 유발된 흰쥐의 肝 損傷 및 肝癌에 미치는 영향을 확인하고자 흰 쥐에 DENA와 CCl₄ 처리 후 膈下逐瘀湯을 350mg/kg(KHA군)과 700mg/kg(KHB군)을 8주 동안 구강 투여하여 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체중의 변화를 측정한 결과 7주와 8주에서 실험군 KHA군과 KHB군은 대조군에 비하여 체중이 유의성 있게 증가하였다.

2. 혈청 AST의 활성을 측정한 결과 실험군 KHA군과 KHB군은 대조군에 비하여 유의성 있게 AST의 활성이 감소하였다.

3. 혈청 ALT의 활성을 측정한 결과 실험군 KHA군과 KHB군은 대조군에 비하여 ALT 활성이 감소하였으나 통계적 유의성이 없었다.

4. ALP의 활성을 측정한 결과 실험군 KHA군은 대조군에 비하여 활성이 낮았으며 특히, 실험군 KHB군은 유의성 있게 활성이 감소하였다.

5. LDH의 활성은 실험군 KHA군과 KHB군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

6. Serum AFP의 변화를 관찰한 결과 실험군 KHA군과 KHB군은 대조군에 비하여 Serum AFP가 낮았으나 통계적인 유의성은 없었다.

7. SOD의 활성을 측정한 결과 실험군 KHA군과 KHB군은 대조군에 비하여 SOD 활성이 낮았으나 통계적인 유의성은 없었다.

8. Catalase의 활성을 측정한 결과 실험군 KHA군과 KHB군은 대조군에 비하여 통계적으로 유의성 있게 증가

하였다.

9. 실험군 KHA군과 KHB군에서는 대조군에 비하여 핵의 크기 및 양적 변화가 감소되어 있었으며 손상된 간 조직도 관찰 되지 않았다.

10. 실험군 KHA군에서는 p53에 면역반응성을 보이는 세포들이 관찰 되었으나 대조군 보다는 그 밀집도가 감소하였으며, 실험군 KHB군은 p53에 대하여 면역반응성을 보이는 세포가 산발적으로 나타났다.

이상의 결과로부터 膈下逐瘀湯은 肝 損傷 및 肝癌유발에 대해 抑制 效果가 있음이 확인 되었으며, 尙後 臨床에서도 肝損傷 및 肝癌 疾患에 다양하게 응용될 수 있을 것이라 사료된다.

VI. 참고문헌

- Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA, Cancer. Principles and Practice of Oncology. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 2004;7:17.
- 의학교육연구원 편. 가정의학. 서울대학교 출판부. 1995:266.
- 통계청 편집부. 사망원인통계연보 전국편(2006). 2007.
- No HJ, Jeon BH, Moon G, Moon SJ. Experimental Syudies on the Antitumor Effects of Soj-eokbojungwhan Extract. J of Korean Oriental Oncology. 1996;2(1):43-56.
- Jeong HW, Jeon BH, Jeong WY. Experimental Study of NaetakKanghwal-Tang against tumor and immunologic control function. Korean J of oriental medical pathology. 1997;11(2):81-91.
- Yu DH, Eun JS, Kwon J, Oh CH. Effects of Sa-Mul-Tang on Immunocytes of L1210 Cell-transplanted or Antitumor Drugs-administered Mice. Korean J of Pharmacognosy. 1998;29(2):110-9.
- Baek DG. Anticancer Effect of Paljinhang-ahm-dan on Human Acute Myeloid Leukemia.

- J of Wonkwang Uni. 2002.
8. Baek EG. Anticancer Effect of Combination with Paljinhangaham-dan and adriamycin on HepG2 Human Malignant Hepatoma Cell Line. J of Wonkwang Uni. 2003.
 9. 王清任. 醫林改錯. 서울. 一中社. 1992:66-8.
 10. 余桂清. 歷代中醫腫類案論選粹. 北京. 北京出版社. 1988:1-49.
 11. Lee KH. A Study on the Effect of Keughachu-keo-tang on Thrombosis and elevated Blood Viscosity. J of Kyunghee Uni. 1992:15-22.
 12. Reitman S, Frankel AS. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. Am J Clin Pathol. 1987;28:56-63.
 13. Lee HS, Chung YH, Kim CY. Specificities of serum alpha-fetoprotein in HBsAg+ and HBsAg- patients in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. Hepatology. 1991;14:68-72.
 14. Sato Y, Nakata K, Kato Y, et al. Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. N Engl J Med. 1993;328:1802-6.
 15. Beers RF Jr, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem. 1992;195(1):133-40.
 16. 이문호. 내과학. 서울. 금강출판사. 1970:2458-82.
 17. 서정선. 20세기말의 의·생물학의 새로운 비전 apoptosis·몸의 효율적 생존을 위한 세포의 능동적 사망기전. 서울. 의학연구의 최신동향. 1998: 30-32.
 18. 王氷. 黃帝內經. 서울. 高文社. 1977:素問 91, 166, 229, 326 靈樞 76, 88.
 19. 上海中醫學院. 實用中醫內科學. 上海. 上海科學技術出版社. 1986: 621-35.
 20. 신민교. 臨床本草學. 서울. 남산당. 2000:172-5, 236-9, 242-4, 385-7, 466-8, 477-8, 483-4, 530-2, 534-5, 540-2, 728-9, 731-2.
 21. 李時珍. 本草綱目. 서울. 高文社. 1983:401, 467, 485, 488, 497, 517, 564, 996, 1116, 1189, 1466.
 22. 許浚. 東醫寶鑑. 서울. 南山堂. 1986:731.
 23. Kim HS, Kang JH, Kim CH, Bae GB, Kim JS, Park SJ, Yoon HJ, Kim SY, Gwac SH. The Effect of Nutritional Support with Nuicare[®] in Cancer Patients Receiving Chemotherapy. Chungnam medical J. 1997;24(2):181-9.
 24. 이귀녕, 권오현. 임상병리파일. 서울. 의학문화사. 2003:334-7, 345-6, 373-6, 399-404, 872-6.
 25. Takeda, Y, A Ichihara, H Taruoka and H Inove. The biochemistry of animal cells the effect of corticosteroids on leakage of enzyme from dispersed rat liver cell. J Biol Chem. 1964;239:3590-6.
 26. Brucker, JV, MF Mackenzie and S muralidhara. Oral toxicity of carbon tetrachloride Acute, subacute, and subchronic studies in rats. Fund Appl Toxicol. 1986:616-34.
 27. Dinman, BD, EA Hamdin, CF Fox, WJ Frajola WJ. CCl₄ Toxicity III. Hepatostructural and enzyme change Arch Environ Health. 1963;7:630-46.
 28. 대한임상병리학회, 임상병리학, 고려의학, 1996:67-76.
 29. Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW. Clinical chemistry principles and techniques. New York. Harper and Row. 1974;2:829.
 30. Lee JH, Song IS, Kim YT, Chung YH, Lee HS, Kim CY, Jung HC, Yun YB. Relationship Between the Size of Hepatocellular Carcinoma and Serum Alpha-Fetoprotein Level and Ultrasonographic Echogenicity. Korean J Gastroenterol. 1988;20(3):679-84.
 31. Fieg D.I., Reid T.M., and L.A. Reactive oxygen species in tumorigenesis. Cancer Res. 1994:1890-94.
 32. Diguisseppi. J, and Fridovich I. Oxygen toxicity in streptococcus sanguis. J. biol. Chem. 1982;257:4046-51.
 33. Bellisola G, Casaril M, Gabrielli GB, Caraffi M, Corrocher R. Catalase activity in human

- hepatocellular carcinoma(HCC). Italy. Clin Biochem. 1987;20(6):415-7.
34. Strobel P, K limea F, Zerban H, K opp-Schneider A, BaNKasch P. Xenomorphic hepatocellular precursor and neoplastic progression of tigroid cell foci induced in rats with low doses of N-nitrosomorpholine. Carcinogenesis. 1998;19:2069-80.
35. Steinberg P, Klingelhofer A, Schafer A, Wust G, Weibe G, Oesch F, Eigenbrodt. Expression of pyruvate kinase M2 in preneoplastic hepatic foci of N-nitrosomorpholine-treated rats. Virchows Arch. 1999; 434:213-220.
36. Yu E, Lee I, Lee MJ, Jang JJ. Progressive changes of the nuclear matrix protein composition in diethylnitrosamine induced rat hepatocarcinogenesis. Cancer Lett. 1999;138:151-7.
37. Pruschy M, Rocha S. Key targets for the execution of radiation induced tumor cell apoptosis : the role of p53 and caspases. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2001;49(2):561-7.
38. Jessup JM, Loda M. Prognostic markers in rectal carcinoma. Semin Surg Oncol. 1998;15:131-40.
39. Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, Benter T, Luck HJ, Wolff G, Dorken B, Daniel PT. Impaired BAX proteins expression in breast cancer:mutational analysis of the Bax and the p53 gene. Int J Cancer. 2000;87:517-21.

Table. 1. Prescription of *Keughachukeo-tang* Per Pack

Oriental drug name	Crude drug name	Dose(g)
當歸	RADIX ANGELICAE SINENS	12
甘草	RADIX GLYCYRRHIZAE	12
桃仁	SEMEN PERSICAE	12
紅花	FLOS CARTHAMI	12
赤芍藥	RADIX PAEONIAE RUBRA	8
五靈脂	FAECES TROGOPTERORI	8
川芎	RHIZOMA CHUANXIONG	8
牡丹皮	CORTEX MOUTAN RADICIS	8
烏藥	RADIX LINDERAE	6
香附子	RHIZOMA CYPERI	6
枳殼	FRUCTUS PONCIRI SEU AURANTII	6
玄胡索	RHIZOMA CORYDALIS	4
	total amount	102

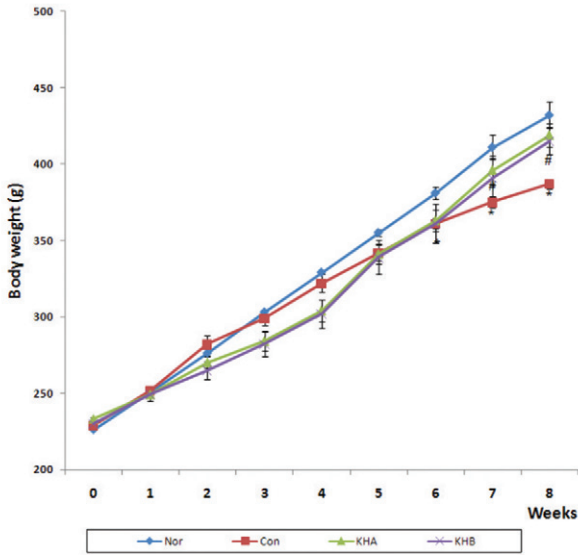


Fig. 1. The changes of body weight in the DENA and CCl₄ induced liver injury during 8 weeks.

Nor, normal group administrated saline; Con, control group administrated saline after DENA and CCl₄ treatment; KHA group administrated KH 350mg/kg/day or KHB group administrated KH 700mg/kg/day during 8 weeks after DENA and CCl₄ treatment. Significant differences were compared with normal(*p < 0.05) or control(#p < 0.05).

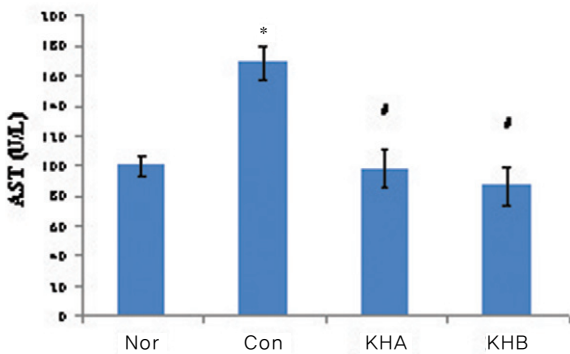


Fig. 2. The changes of AST activities in rats administered KH for 8 weeks.

Nor, normal group administrated saline; Con, control group administrated saline after DENA and CCl₄ treatment; KHA group administrated KH 350mg/kg/day or KHB group administrated KH 700mg/kg/day during 8 weeks after DENA and CCl₄ treatment. All values are mean ± S.E. (n=6). Significant differences were compared with normal(*p < 0.05) or control(#p < 0.05).

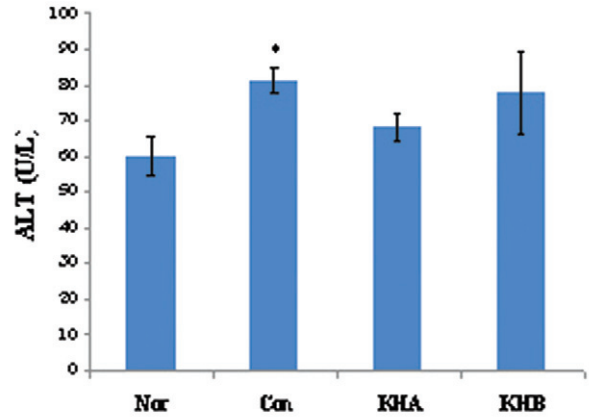


Fig. 3. The changes of ALT activities in rats administered KH for 8 weeks.

Nor, normal group administrated saline; Con, control group administrated saline after DENA and CCl₄ treatment; KHA group administrated KH 350mg/kg/day or KHB group administrated KH 700mg/kg/day during 8 weeks after DENA and CCl₄ treatment. All values are mean ± S.E. (n=6). Significant differences were compared with normal(*p < 0.05) or control(#p < 0.05).

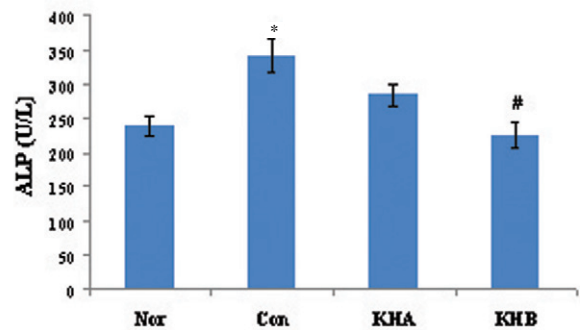


Fig. 4. The changes of ALP activities in rats administered KH for 8 weeks.

Nor, normal group administrated saline; Con, control group administrated saline after DENA and CCl₄ treatment; KHA group administrated KH 350 mg/kg/day or KHB group administrated KH 700mg/kg/day during 8 weeks after DENA and CCl₄ treatment. All values are mean ± S.E. (n=6). Significant differences were compared with normal(*p < 0.05) or control(#p < 0.05).

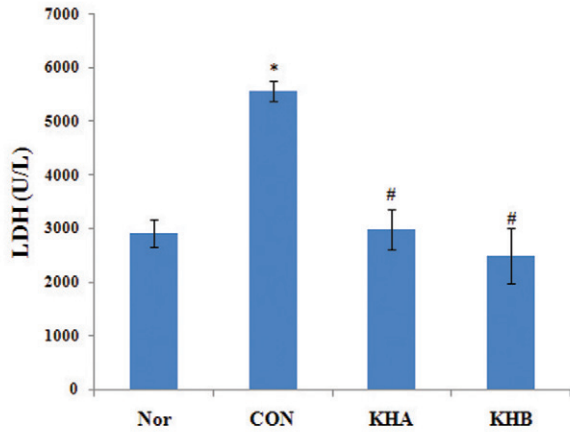


Fig. 5. The changes of LDH activities in rats administered KH for 8 weeks.

Nor, normal group administrated saline; Con, control group administrated saline after DENA and CCl₄ treatment; KHA group administrated KH 350 mg/kg/day or KHB group administrated KH 700mg/kg/day during 8 weeks after DENA and CCl₄ treatment. All values are mean ± S.E. (n=6). Significant differences were compared with normal(*p<0.05) or control(#p<0.05.).

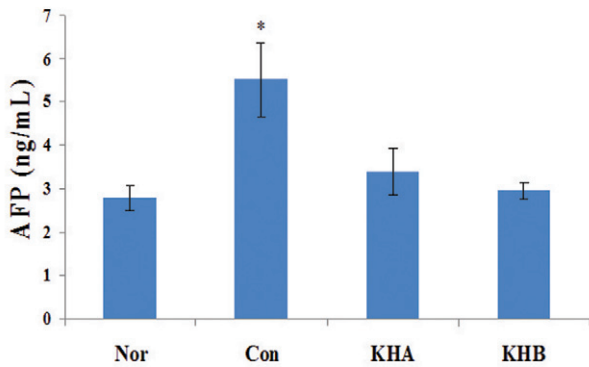


Fig. 6. The changes of α -fetoprotein in rats administered KH for 8 weeks.

Nor, normal group administrated saline; Con, control group administrated saline after DENA and CCl₄ treatment; KHA group administrated KH 350mg/kg/day or KHB group administrated KH 700mg/kg/day during 8 weeks after DENA and CCl₄ treatment. All values are mean ± S.E. (n=6). Significant differences were compared with normal(*p<0.05) or control(#p<0.05.).

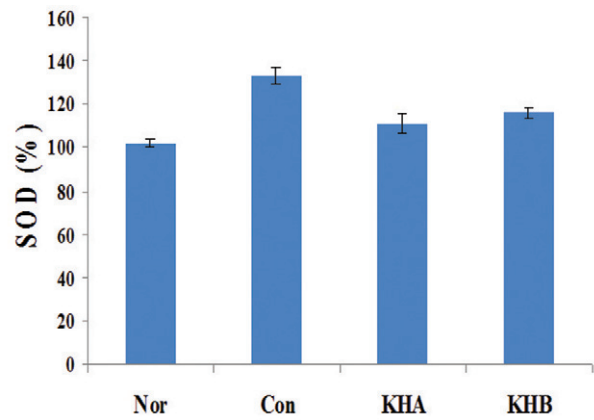


Fig. 7. The changes of SOD activities in rats administered KH for 8 weeks.

Nor, normal group administrated saline; Con, control group administrated saline after DENA and CCl₄ treatment; KHA group administrated KH 350mg/kg/day or KHB group administrated KH 700mg/kg/day during 8 weeks after DENA and CCl₄ treatment. All values are mean ± S.E. (n=6).

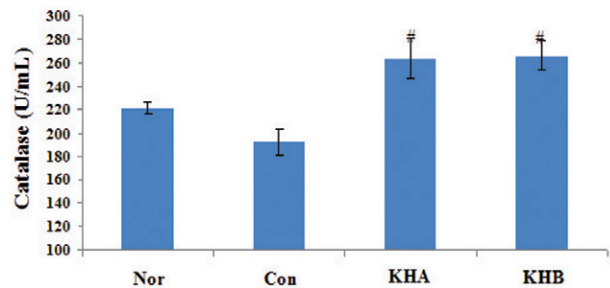


Fig. 8. The changes of Catalase activities in rats administered KH for 8 weeks.

Nor, normal group administrated saline; Con, control group administrated saline after DENA and CCl₄ treatment; KHA group administrated KH 350mg/kg/day or KHB group administrated KH 700mg/kg/day during 8 weeks after DENA and CCl₄ treatment. All values are mean ± S.E. (n=6). Significant differences were compared with normal(*p<0.05) or control(#p<0.05.).

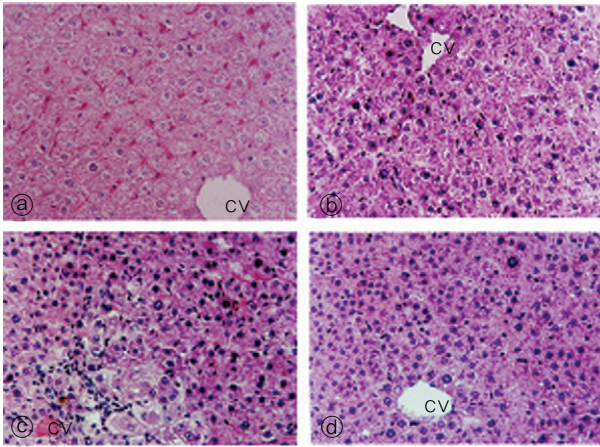


Fig. 9. Histological sections of liver of rats in response to KH extracts administered following DENA and CCl₄ treatment.

Ⓐ, Normal group administrated saline. Ⓑ, Control group administrated saline after DENA and CCl₄ treatment. Ⓒ, KHA group administrated KH 350mg/kg/day during 8 weeks after DENA and CCl₄ treatment. Ⓓ, KHB group administrated KH 700mg/kg/day during 8 weeks after DENA and CCl₄ treatment. CV, central vein. Original magnification × 200

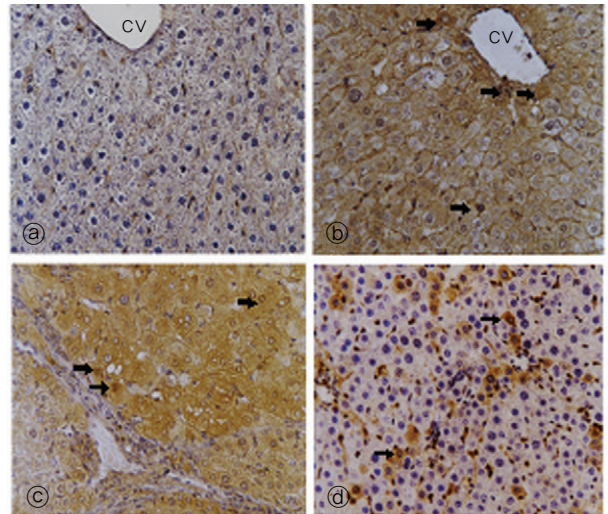


Fig. 10. Immunohistochemical localization of p53 in hepatocytes.

A lot p53 immunoreactive cells are observed in the Control group. Arrows indicate p53 immunoreactive cells. Ⓐ, Normal group administrated saline. Ⓑ, Control group administrated saline after DENA and CCl₄ treatment. Ⓒ, KHA group administrated KH 350mg/kg/day during 8 weeks after DENA and CCl₄ treatment. Ⓓ, KHB group administrated KH 700mg/kg/day during 8 weeks after DENA and CCl₄ treatment. CV, central vein. Original magnification × 200

