

茵陳三物湯이 DENA로 유발된 흰쥐의 간암에 미치는 영향

정태산, 최은희, 강성순, 김인수, 이영수, 최창원
동신대학교 한의과대학 내과학교실

The Effect of *Injinsammul-tang*(IJS) on the Hepatocellular Carcinogenesis Induced by Diethylnitrosamine(DENA) in Rats

Tae-san Jung, Eun-hee Choi, Seong-sun Kang, In-soo Kim, Young-soo Lee, Chang-won Choi
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Shin University

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to investigate the effect of *Injinsammul-tang* (IJS) on hepatocellular carcinogenesis in rats.

Methods : Sprague Dawley (SD) rats of control and treatment groups received intraperitoneal injection of 50 mg/kg/day diethylnitrosamine (DENA) weekly for 8 weeks. Experimental rats were classified into 3 groups; normal group (Nor), hepatic cancer induced control group (Con), and IJS extract 250 mg/kg administered group (IST) after being injected with DENA. Thereafter the changes of body weight, liver weight and weight of liver/100g body weight, the activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), and superoxide dismutase (SOD) were measured. Gross anatomy and optical microscopy were also observed.

Results : The body weight decreased in Con and IST compared with the Nor. The weight of liver and the weight of liver/100g body weight increased significantly in Con and IST compared with the Nor. The activities of AST, ALT, ALP, LDH increased in the Con compared with Nor, but decreased in IST compared with Con. The activities of SOD increased in the Con and IST compared with Nor. Upon naked eye and light microscopic examination, IJS improved the morphological and histopathological changes of liver caused by DENA-induced hepatic neoplasm. The number of hepatic p53 positive cells decreased in the IST compared with Con.

Conclusions : Most of the results did not show a significant effect, but some of the results showed a significant effect. It can be estimated that IJS has some effects on hepatocellular carcinogenesis induced by DENA in rats, and further studies will be needed.

Key words : *Injinsammul-tang*, DENA, hepatocellular carcinogenesis

1. 서론

간암은 국내에서 2007년 현재 위암, 갑상샘암, 대장암, 폐암에 이어 다섯 번째로 발생률이 높고¹,

2009년 현재 폐암에 이어 두 번째로 높은 사망율을 보이며, 2009년 현재 인구 10만 명당 남자는 33.9명, 여자는 11.3명이 간암으로 사망하고 있다². 간암은 대부분 B형, C형의 바이러스 및 만성 간염, 간경변 등의 만성 질환이 원인이 되며 임상 증상으로는 피로, 식욕부진, 체중감소로부터 시작하여 진행함에 따라 황달, 복수 및 전신쇠약 증세가 나타난다³. 다양한 약물과 수술 요법이 간손상의 예방 및 치

· 교신저자: 최창원 전남 순천시 조례동 1722-9번지
동신대학교 순천한방병원 1내과 5진료실
TEL: 061-729-7177
E-mail: medtjun@paran.com

료에 응용하고 있으나 간암의 형태 및 원인이 다양하고 복잡하여 간암에 대한 효과적인 치료법이 제시되지 않아 치료에 어려움을 겪고 있다.

한의학적으로 간암은 黃疸, 積聚, 脇痛, 鼓脹, 蟲門 등의 범주에서 취급할 수 있으며, 변증으로는 氣滯虛寒, 氣滯濕阻, 熱鬱血瘀 등에 해당되어 活血化瘀, 清熱解毒 등의 방법으로 치료해왔다⁴. 국내 간암에 대한 실험적 연구는 손⁵등은 柴胡, 茵蔞이, 강⁶은 蟾蜍가, 김⁷등은 生肝健脾湯이, 이⁸등은 茵蔞蒿湯이 간암세포에 항암효과가 있음을 보고하였다.

茵蔞三物湯은 茵蔞蒿湯에서 大黃을 去하고 黃蓮을 加한 처방으로 《醫學入門》⁹에 최초로 收載되었다. 茵蔞은 清熱利濕¹⁰하는 효능이 있고 梔子는 清熱瀉火 涼血解毒¹⁰하고, 黃蓮은 清熱燥濕 清心除煩 瀉火解毒¹⁰ 작용이 있어 茵蔞三物湯은 황달 및 간 질환에 사용되어 왔다.

茵蔞三物湯에 대한 실험적 연구로 최¹¹등이 茵蔞三物湯 약침을 실험동물에 투여하여 CCl₄로 유발된 간손상의 회복을 관찰했다는 보고가 있었으나 경구투여를 통한 실험적 연구모델은 없었으며 임상 연구로 국내에서 茵蔞三物湯과 간암과 관련된 연구는 미비한 실정이다.

이제 저자는 diethylnitrosamine(DENA)을 흰쥐의 복강에 투여하여 간암을 유발시킨 후, 茵蔞三物湯의 간암 및 간손상에 미치는 영향을 규명하기 위하여 체중과 간 중량의 변화, 혈액학적 변화, 혈청 transaminase(AST, ALT)의 활성, alkaline phosphatase(ALP)와 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성, 항산화효소(SOD)의 활성, 육안적 관찰, 면역조직화학, 광학현미경 관찰 등을 통해 그 결과를 보고하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재 료

1) 동 물

체중 200±10 g 내외의 5주령 흰쥐(Sprague Dawley)

를 선택고(주, 오산)로부터 구입하였다. 실험동물은 동신대학교 한의과대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도 : 21±2 ℃, 습도 : 50-60% 12시간 주기 명/암)하에서 일반 고형사료(샘타코, 흰쥐용)와 물을 충분히 공급하면서 1주일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험 중 사망한 실험동물은 없었다.

2) 약재의 구성

본 실험에 사용한 茵蔞三物湯은 《東醫寶鑑》²³에 準하였다. 약재는 동신대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Medicinal Herbs

Herbal Name	Scientific Name	Weight (g)
茵蔞	<i>Artemisiae capillaris Herba</i>	12
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	8
黃蓮	<i>Coptidis Rhizoma</i>	8
Total amount		28

3) 약물추출

茵蔞三物湯(*Injinsammul-tang*, IJS) 2첩을 증류수 800 mL를 가한 후 대용 약탕기(DWP-1800 T, 한국)로 3시간 동안 진탕한 다음 여과하여 상층액을 150 mL로 농축하였다. 농축한 다음 저온순환수조(CA-1500, EYELA, Japan)에서 1차 동결한 다음 동결건조기(Samwon, SFDSMO06, Korea)로 동결건조하여 15.2 g를 얻었다.

2. 방 법

1) 간암 유발

정상군을 제외한 모든 실험동물에 diethylnitrosamine(DENA, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 50 mg/kg을 0.9% 식염수 1 mL에 용해하여 1주 간격으로 12회 복강투여 하였다. (매주 1회씩 12회 투여)

2) 실험군 분류와 처치

실험군은 간암을 유발시키지 않은 정상군(Nor),

DENA를 12회 복강투여하여 간암을 유발시킨 다음 음용수만 공급한 대조군(Con), 대조군에서처럼 간암을 유발시킨 다음 음용수에 茵陳三物湯 추출액(250 mg/kg)을 혼합하여 투여한 실험군(IST)으로 구분하였다. (茵陳三物湯 추출액은 음용수에 혼합하여 수시로 자유롭게 복용하게 하였다.)

3. 관찰방법

1) 체중 측정

정상군, 대조군, 실험군으로 구분하여 12주의 양육기간 및 8주의 실험기간 동안 1주 간격으로 체중 변화를 측정하였으며, 체중 측정 12 시간 전부터 금식시켰다.

2) 간 중량 측정

흰쥐의 간 중량 측정을 위하여 urethane(0.75 mg/kg)을 복강 투여하여 마취하였다. 흉곽을 열고 심장 채혈한 다음 간을 적출하였고, 생리식염수로 세척한 다음 수분을 제거하고서 chemical balance (Saturous, USA)를 이용하여 측정하였다. 간의 무게는 실험동물 체중 100 g 당 무게로 환산하였다.

3) 혈액학적 변화

혈액은 urethane(0.75 mg/kg)을 복강 투여하여 마취한 다음 흉곽을 열고 심장 채혈을 하였다. 채혈된 혈액은 EDTA bottle에 넣은 다음 곧바로 혈구측정기(HEMAVRT 950FS, Japan)를 사용하여 호중구와 림프구를 측정하였다¹².

4) 혈청 Transaminase 측정

혈중 aspartate aminotransferase(AST)와 alanine aminotransferase(ALT)의 활성 측정은 Reitman-Frankel의 방법¹²⁾에 따라 kit 시약(아산제약)을 사용하여 측정하였다. AST와 ALT 기질액 1.0 mL을 시험관에 넣고 37 °C에서 5분간 방치한 다음 혈청 0.2 mL을 넣어 잘 혼합한 다음 37°C에서 AST는 60분, ALT는 30분간 반응시킨 다음 정색 시액 1.0 mL을 첨가하여 잘 혼합하여 실온에서 20분간 방치하여 반응을 종료시키고, 0.4 N NaOH 용액 10 mL을 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 약 10분간

방치하였다가 505 nm에서 흡광도(photometer 5010, Germany)의 변화를 측정하였다.

5) Alkaline phosphatase(ALP) 측정

ALP 활성도 측정은 Reitman-Frankel 방법에 의한 kit 시약(아산제약, 한국)을 사용하여 405 nm에서 측정하였다.

6) Lactate dehydrogenase(LDH) 측정

LDH 활성도 측정은 Reitman-Frankel 방법에 의한 kit 시약(아산제약, 한국)을 사용하여 340 nm에서 측정하였다.

7) Superoxide Dismutase(SOD) 측정

실험동물에서 얻은 간조직을 증류수로 세척한 후, 0.25 M Sucrose를 시료의 4배량으로 첨가하여 세척한 다음 homogenizer(JANKE & KUNKEL, ultra-turax T25, Germany)를 이용하여 균질화하였다. 이 균질액으로부터 핵을 제거하기 위해 4 °C에서 2,000 xg로 5분 동안 원심분리하고 다시 4 °C의 22,000 xg에서 30분동안 원심분리하여 세포질 분획과 미토콘드리아 분획으로 분리하였다. 분리된 분획 중 세포질 분획은 SOD 활성 측정용 조효소로, 미토콘드리아 분획은 catalase 활성 측정용 조효소로 이용하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad assay를 이용하였으며, -70 °C의 deep freezer에 보관하면서 실험에 이용하였다. SOD 활성도는 SOD assay kit(Dojindo, Japan)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정 후 SOD 활성도를 계산하였다.

8) 육안적 관찰

Urethane(0.75 mg/kg)을 복강 투여하여 마취한 다음 흉곽을 열고, 심장채혈한 다음 흰쥐의 간을 디지털카메라로 촬영하였다.

9) 광학현미경 관찰

흰쥐의 간 조직을 적출하고 Bouin 용액을 사용하여 6시간 동안 고정시킨 다음, 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100 I, 100II와 같이 알코올 농도를 상승시켜 탈수한 다음 xylene으로 투명화 과정을 거친 후 paraffin으로 포매하였고, 포매된 조직을 microtome을 사용하여 5 μm 두께로 절편하였다. 절편한 조

직을 slide glass 위에 부착시키고 xylene으로 paraffin을 제거한 다음 100%, 90%, 80% ethanol 과 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.

10) 면역조직화학

흰쥐의 간 조직을 적출하여 Bouin 용액을 사용하여 6시간 동안 고정시킨 다음, paraffin으로 포매한 후 microtome을 사용하여 조직을 5 μm 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 이를 xylene에서 paraffin을 제거한 다음 100%, 90%, 80% ethanol 과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담구어 함수과정을 거치게 하였다. 12시간 후 pH 7.2, 0.1 M의 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 p53 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 3차항체 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.

11) 통계처리

통계처리는 SAS(statistical analysis system) program에 의하여 각 실험군 별로 평균치와 표준오차를 계산하였고, p-value가 최소한 0.05 이하의 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 실험결과

1. 체중의 변화

12주의 양육 후 흰쥐의 체중을 측정한 결과 정상군(432±8.63 g)이 가장 높았으며, 대조군(402±6.24 g)과 실험군(398±7.57 g) 순이었다.茵蔯三物湯을 투여한 5주후부터 대조군(430±7.54 g)에 비하여 실험군(444±1.59 g)의 체중이 증가하기 시작하였으며, 8주후 정상군(482±8.79 g), 실험군(471±8.02 g), 대조군(458±6.40 g) 순으로 나타났다(Fig. 1 & Table 2).

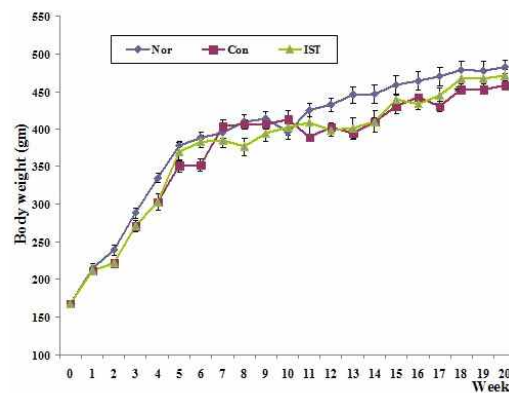


Fig. 1. The Changes of Body Weight during 20 Weeks.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean ± S.E. (n=4).

Table 2. Changes of Body Weight for 8 Weeks

Group	0 week	1 week	2 weeks	3 weeks	4weeks	5 weeks	6weeks	7 weeks	8 weeks
Nor	432±8.63	445±10.46	447±12.14	459±12.11	464±12.17	470±12.17	479±12.21	477±13.56	482±8.79
Con	402±6.24	394±7.77	410±4.33	430±8.65	442±4.33	430±7.54	453±6.39	453±6.98	458±6.40
IST	398±7.57	401±14.18	410±14.88	439±6.36	433±7.51	444±1.59	467±13.04	467±1.02	471±8.02

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean ± S.E. (n=4).

2. 간 중량 및 체중 100g 당 간 중량의 변화

1) 간 중량

간 중량을 측정한 결과 정상군(14.5±0.28 g)이 가장 낮고 대조군(25.6±4.19 g)이 가장 높았으며, 실험군(23.0±1.72 g)은 대조군 비해 다소 낮았으나 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 2A & Table 3).

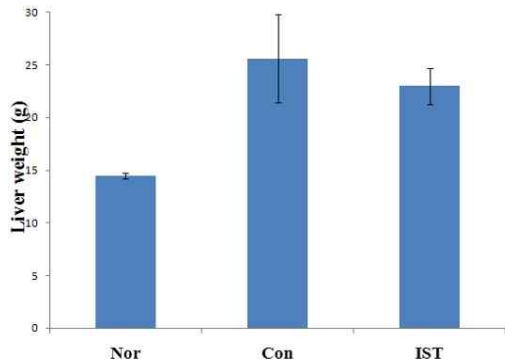


Fig. 2A. The comparison of liver weight.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean ± S.E. (n=4).

2) 체중 100 g 당 간 중량

간의 중량을 흰쥐의 체중 100 g 당으로 환산한 결과 정상군(3.01±0.07%)이 가장 낮고 대조군(5.6±0.86%)이 가장 높았으며, 실험군(5.0±0.36%)은 대조군에 비하여 다소 낮았으나 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 2B & Table 3).

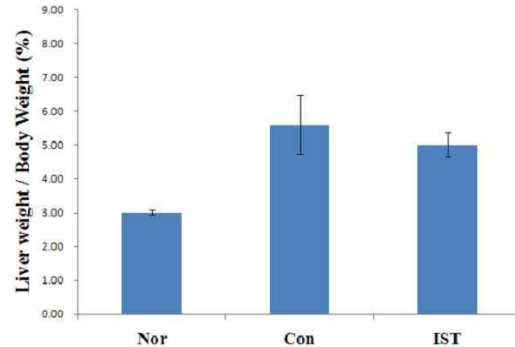


Fig. 2B. Comparison of liver weight per 100g body weight.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean ± S.E. (n=4).

Table 3. Changes of Liver Weight and the Liver Weight per 100g Body Weight (g)

Group	liver weight	liver weight/100g body weight
Nor	14.5±0.28	3.01±0.07
Con	25.6±4.19	5.6±0.86
IST	23.0±1.72	5.0±0.36

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean ± S.E. (n=4).

3. 혈액학적 변화

1) 백혈구

백혈구 수를 측정한 결과 정상군(4.9±1.62 K/ μ L)

에 비하여 대조군(12.3 ± 3.92 K/ μ L)은 약 151% 증가하였으며, 실험군(8.89 ± 1.05 K/ μ L)은 약 81% 증가하였으나 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 3A & Table 4).

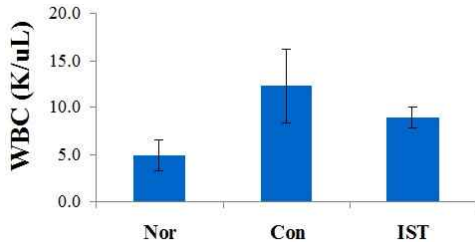


Fig. 3A. The changes of WBC content.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean \pm S.E. (n=4).

2) 호중구 수의 변화

호중구의 수는 정상군(1.2 ± 0.35 K/ μ L)에 비하여 대조군(4.2 ± 1.80 K/ μ L)에서 약 250% 증가하였으며, 실험군(1.81 ± 0.38 K/ μ L)은 약 51% 증가하였다. 이와 같이 호중구의 수는 정상군에 비하여 대조군과 실험군에서 증가하였으나 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 3B & Table 4).

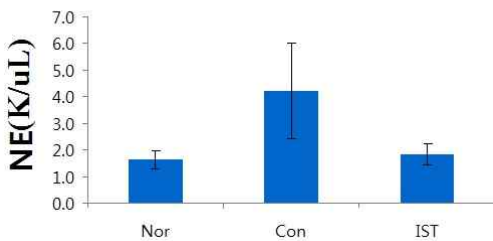


Fig. 3B. The changes of neutrophil content.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean \pm S.E. (n=4).

3) 림프구 수의 변화

림프구의 수는 정상군(3.4 ± 1.12 K/ μ L)에 비하여 대조군(7.2 ± 1.69 K/ μ L)에서 약 112% 증가하였으며, 실험군(6.2 ± 0.48 K/ μ L)에서는 약 82% 증가하였다. 이와 같이 정상군에 비하여 대조군과 실험군에서 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 3C & Table 4).

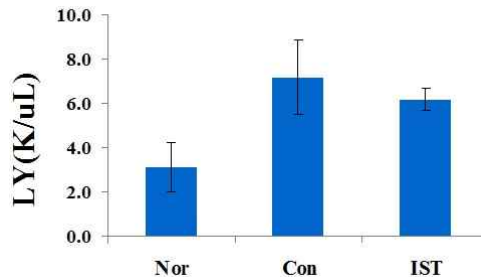


Fig. 3C. The changes of lymphocyte content.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean \pm S.E. (n=4).

Table. 4. The Changes of WBC, Neutrophil and Lymphocyte from 8 Weeks Groups

Group	WBC (K/ μ L)	NE (K/ μ L)	LY (K/ μ L)
Nor	4.9 \pm 1.62	1.2 \pm 0.35	3.4 \pm 1.12
Con	12.3 \pm 3.92	4.2 \pm 1.80	7.2 \pm 1.69
IST	8.89 \pm 1.05	1.81 \pm 0.38	6.2 \pm 0.48

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean \pm S.E. (n=4).

4. 혈청 Transaminase의 활성

1) Aspartate aminotransferase(AST)의 활성

AST의 활성은 정상군에(113 ± 8.05 U/L) 비하여 대조군(196 ± 31.54 U/L)에서 활성이 가장 높게 나타났으며, 실험군(134 ± 8.69 U/L)은 대조군보다 낮았지만 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 4A &

Table 5).

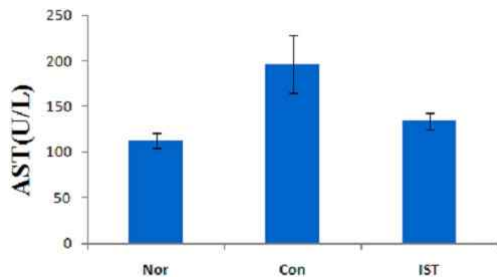


Fig. 4A. The changes of Aspartate aminotransferase (AST) activities.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean ± S.E. (n=4).

2) Alanine aminotransferase(ALT)의 활성

ALT의 활성은 정상군에(54±7.63 U/L) 비하여 대조군(71±7.64 U/L)에서 활성이 가장 높게 나타났으며, 실험군(60±6.36 U/L)의 활성은 대조군보다 낮았지만 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 4B & Table 5).

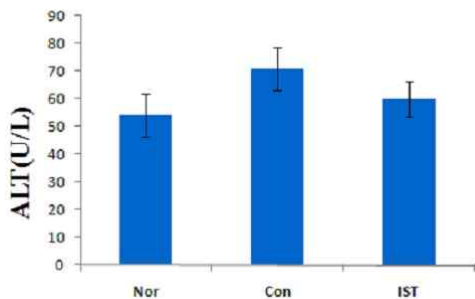


Fig. 4B. The changes of Alanine aminotransferase (ALT) activities.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean ± S.E. (n=4).

Table 5. The Changes of Transaminase from 8 Weeks Groups

Group	AST (U/L)	ALT (U/L)
Nor	113±8.05	54±7.63
Con	196±31.54	71±7.64
IST	134±8.69	60±6.36

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean ± S.E. (n=4).

5. Alkaline phosphatase(ALP)의 활성

ALP의 활성은 정상군에(1013±20.28 U/L) 비하여 대조군(1270±80.94 U/L)에서 활성이 가장 높았으며 통계적으로 유의성(p<0.05)있게 증가하였다, 실험군(1114±122.06 U/L)은 대조군에 비해 낮았지만 통계적 유의성은 없었다(Fig. 5 & Table 6).

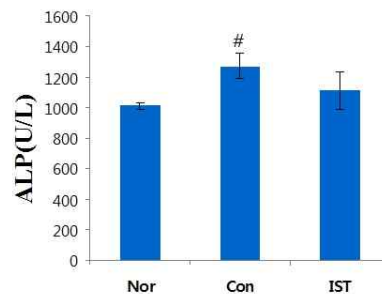


Fig. 5. The changes of Alkaline Phosphatase(ALP) Activities.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. Significant differences were compared with normal at [#]p<0.05. All values are mean ± S.E. (n=4).

6. Lactate dehydrogenase(LDH)의 활성

LDH의 활성은 정상군(856±40.48 U/L)에 비하여 대조군(1152±82.98 U/L)에 가장 높았으며 통계적으로 유의성(p<0.05)있게 증가하였다. 실험군(884±126.58 U/L)에서 LDH의 활성은 정상군에 비하여 다소 높게 나타났다(Fig. 6 & Table 6).

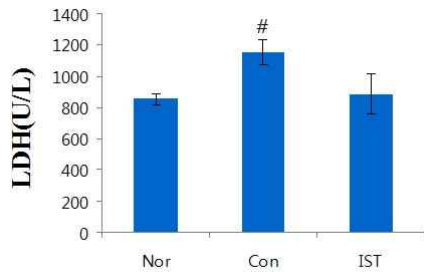


Fig. 6. The changes of Lactate dehydrogenase (LDH) activities.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. Significant differences were compared with normal at [#]p<0.05. All values are mean ± S.E. (n=4).

Table 6. The Changes of Alkaline Phosphatase (ALP) and Lactate dehydrogenase(LDH) from 8 Weeks Groups

Group	ALP (U/L)	LDH (U/L)
Nor	1013±20.28	856±40.48
Con	1270±80.94 [#]	1152±82.98 [#]
IST	1114±122.06	884±126.58

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. Significant differences were compared with normal at [#]p<0.05. All values are mean ± S.E. (n=4).

7. Superoxide Dismutase (SOD)의 활성

간조직을 적출하여 SOD의 활성을 측정한 결과 정상군(96±0.13 %)에 비하여 대조군(100±1.38 %), 실험군(102±2.13 %) 순으로 그 활성이 조금 높게 나타났으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 7).

8. 육안해부

정상군 흰쥐의 간은 표면이 매끄럽고 선홍색을 띠고 있었다(Fig. 8a). 대조군의 간에서는 커다란 종양이 관찰될 뿐만 아니라 간의 표면에서는 다수의 하얀 결절들이 나타났으며, 전반적으로 다소 검붉은 빛을 보였다. 정상군에 비하여 비대해 졌으며,

표면은 매우 불규칙하였다(Fig. 8b). 실험군의 간은 표면이 거칠고 다수의 작은 결절이 관찰되었으나 대조군에서 보였던 커다란 종양은 관찰되지 않았으며, 간의 표면에서 관찰되었던 결절의 크기는 대조군에 비하여 작았다(Fig. 8c & 8d).

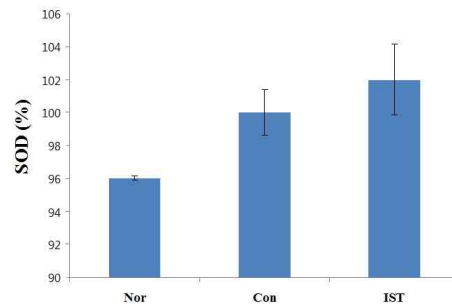


Fig. 7. The effects of IST water extract on Superoxide Dismutase (SOD) activities.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after diethylnitrosamine treatment; IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. All values are mean ± S.E. (n=4).

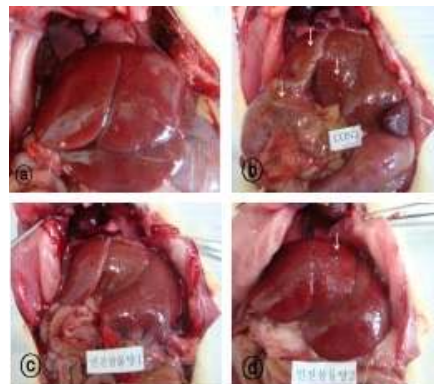


Fig. 8. Gross features of rat livers.

① normal rat; ② control rat, administered tap water after diethylnitrosamine treatment; ③ & ④, IST group administered IST water extract during 8 weeks after diethylnitrosamine treatment. The rat of control group showing a macroscopic malignant nodule and multi-nodular hepatocellular carcinoma(arrows), and experimental groups showing small multi-nodular hepatocellular carcinoma. Arrows indicate nodules of hepatocarcinoma.

9. 간의 조직병리학적 변화

정상군의 흰쥐의 중심정맥은 대부분 타원형으로 관찰되었다. 간세포는 등근 핵을 갖고 있었으며 세포질은 거의 일정하게 eosin에 대한 염색성을 보였다. 동굴모세혈관에는 혈액이 충만되어 있었으며, Kupffer 세포들이 다수 관찰되었다(Fig. 9a). 대조군 간조직의 중심정맥 형태는 매우 불규칙하고 정상군에서는 중심정맥을 중심으로 방사형으로 관찰되었던 동굴모세혈관의 구조는 거의 관찰되지 않았다. 많은 간세포들에서 염색성이 매우 낮은 커다란 핵포들이 관찰되었다(Fig. 9b). 또한, 대조군에서는 크고 투명한 핵포를 갖는 간세포로 구성된 간세포암이 관찰되었다(Fig. 9c). 실험군에서는 다수의 간세포들에서 염색성이 낮은 핵포들이 관찰되었으나 그 빈도는 대조군에 비하여 낮았고, 간세포의 일부는 eosin에 염색성이 매우 강하게 나타났으며(Fig. 9d). 동굴모세혈관에서는 Kupffer 세포들이 다수 관찰되었다(Fig. 9e).

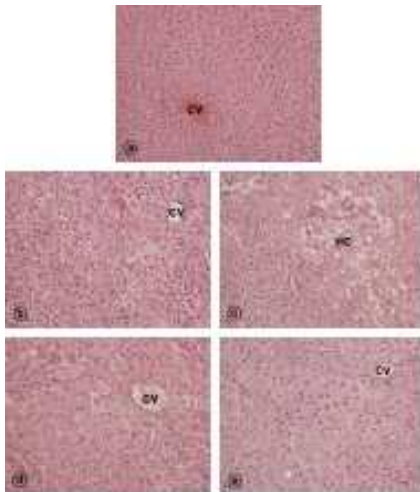


Fig. 9. Histopathologic findings of rat livers.

(a) normal rat; (b) & (c), control group; (c) light micrographs of liver from control rat showing a hyperplastic nodule composed of large, clear, vacuolated hepatocytes. A number of eosinophilic hepatocytes were observed on the left upper side. (d) & (e) A, experimental group, A number of eosinophilic hepatocytes

were decreased compared with control group. HC, hepatocarcinoma. Hematoxylin-Eosin stain. Original magnification $\times 200$.

10. p53 면역조직화학

정상군 간조직의 중심정맥과 동굴모세혈관에서 미약하게 p53 면역반응성을 보였다(Fig. 10a). 대조군의 간조직에서는 중심정맥은 물론 대부분의 간세포들에서 p53에 대하여 강한 면역반응성을 보였다. 그러나 H-E 염색에서 커다란 핵포들이 관찰되었던 세포질이 밝은 간암세포들에서는 면역반응성이 나타나지 않았다(Fig. 10(b) & (c)). 실험군의 중심정맥에서는 대조군에 비하여 p53에 대하여 낮은 면역반응성을 보였다. 그러나 p53 면역반응성이 높은 세포들이 다수의 간세포들에서 나타났으며, 면역반응성이 매우 약한 세포질을 갖는 다수의 세포가 관찰되었다(Fig. 10(d) & (e)).

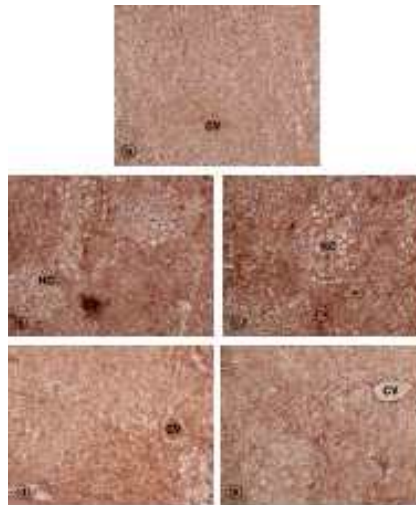


Fig. 10. Immunohistochemical localization of p53 in hepatocytes from rat livers.

(a) normal rat; (b) & (c), control group, light micrographs of liver from control rat showing a lot of p53 immunohistochemical reactive hepatocytes; (d) & (e) A, experimental group, a number of immunohistochemical reactive hepatocytes were observed on the lower side. p53 immunohistochemistry. HC, hepatocarcinoma. Original p53 magnification $\times 200$.

IV. 고찰

간에 발생하는 암은 거의 대부분 간세포암이며 지역간에 발생 수준의 차이가 가장 많은 암의 하나이다. 지금까지 밝혀진 간암의 주요한 발병요인으로는 간염바이러스 (B형 및 C형), 아플라톡신의 식품 감염, 간기생충 등이다. 간세포암의 발병 수준과 간염 바이러스 보유율과는 양의 상관 관계를 보이는데, 특히 B형 간염 바이러스 보유율과의 관련성이 높게 나타난다. 간세포암이란 종양억제인자와 종양유발인자 사이에 균형이 깨어진 일종의 간세포 유전자 병변이라고 할 수 있다. 간세포암의 통제되지 않는 자가증식은 세포사멸기전과 세포수명 조절기전의 왜곡 및 신생혈관형성기전과 세포기전의 활성화 등을 필연적으로 동반한다. 간세포암의 세포생물학적 특징들은 궁극적으로 간암관련 유전자들의 비정상적인 발현으로부터 비롯되는데, 유전자 조절기전의 이상, 유전자 자체의 손상, 외부요인에 의한 이차적 이상조건 등이 있다¹⁴.

간손상의 치료 효과를 검증하기 위한 연구들로는 일반적으로 CCl₄¹⁵, diethylnitrosamine(DENA)¹⁶, thioacetamide(TAA)¹⁷ 등을 이용한 모델이 제시되어 왔다. 이중 DENA를 이용한 실험적 간암 모델은 간암의 전구병변으로 간주되고 있는 비정상형성 증식, 샘종의 발생 및 인간 간암 세포와의 형태학적 유사성으로 인해 다용되고 있으며¹⁸, DENA는 그 자체가 암발생의 개시인자 및 촉진인자의 성질을 가지고 있고, 저농도의 양을 흰쥐에 음용시키기만 하여도 암종으로 진행되어 암화 과정의 연속적인 생화학적 및 병리학적 연구를 하는데 유용하게 사용되고 있다¹⁹.

한의학에서 肝癌은 歷代 諸文獻에서 脇痛, 鼓脹, 蟲門, 積聚, 黃疸등의 개념에 대응되는 데, 《內經》²⁰에 “肝病者, 兩脇下痛引少腹, 令人善怒”라 하여 肝의 痛症 部位가 脇下라는 것을 提示하였고, 《難經》²¹에 “脾之積, 名曰痞氣, 在胃脘, 覆大女盤, 久不愈, 令人四肢不收, 發黃疸, 飲食不爲肌膚”라 하여

肝癌의 臨床 症狀과 類似한 病症을 記載하였다.

《諸病源候論》²²에서 肝癌의 症狀과 病因을 記述하였고, 《外臺秘要》²³에서는 肝癌末期에 나타나는 症狀과 類似한 症狀을 記述하였다.

茵陳三物湯은 《醫學入門》⁹ 類傷寒에서 “茵陳梔子皆三物 大便利而發黃 茵陳三錢 山梔黃蓮 各二錢 水煎溫服”한다고 하였고, 《東醫寶鑑》²⁴ 黃疸門에서 “治黃疸, 小便不利”라고 하였다. 茵陳三物湯은 茵陳蒿湯에서 大黃을 去하고 黃蓮을 加한 처방으로 茵陳은 清熱利濕¹⁰하는 효능이 있고 梔子是 清熱瀉火 涼血解毒¹⁰하고, 黃蓮은 清熱燥濕 清心除煩 瀉火解毒¹⁰ 작용이 있어 茵陳三物湯은 황달 및 간질환에 사용되어 왔다.

기존의 한약을 이용한 항암 및 면역학적 연구는 많이 이루어 졌으나, 간 손상과 간암에 대한 茵陳三物湯의 효과에 대한 실험적 연구는 최¹¹ 등이 茵陳三物湯 약침을 실험동물에 투여하여 CCl₄로 유발된 간손상의 회복에 효과가 있다고 보고하였으나 구강복용으로 인한 효과는 접하지 못하였다. 또한 임상 연구로 국내에서 茵陳三物湯과 간암과 관련된 연구는 미비한 실정이다. 이를 실험적으로 규명하고자 DENA으로 흰쥐의 간 손상과 간암을 유발시킨 후 8주 동안 관찰한 실험군을 통하여 체중과 간 중량의 변화, 혈액학적 변화, transaminase (AST, ALT)의 활성, alkaline phosphatase(ALP)와 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성, superoxide Dismutase(SOD)의 활성, 육안적 해부, 면역조직화학, 간조직의 광학현미경관찰을 시행하였다.

일반적으로 종양 환자의 경우 현저한 식욕부진과 함께 탈수증상이 수반되며, 이로 인한 만성적인 체중감소가 초래되는데²⁵, 체중측정 결과 간암이 유발되는 과정에서 대조군과 실험군의 체중은 정상군에 비하여 감소하였고, 茵陳三物湯이 투여된 실험군은 미약하게나마 대조군보다 체중이 높았지만 통계적 유의성은 없었다.

간암 발생 시 간의 무게 및 체중에 대한 간무게는 체중과 반비례하여 증가하는 경향이 있다²⁶. 간

중량 및 체중 100g 당 간 중량 측정 결과, 대조군이 가장 높게 나타났고, 정상군이 가장 낮았으나 통계적인 유의성은 없었다.

혈액학적 변화에서 백혈구, 호중구, 림프구는 간 손상 시 수치가 증가하는데 정상군에 비해 대조군과 실험군이 모두 증가 하였으나 통계적 유의성은 없었다. 혈액 검사상에서는 유의성 있는 결과는 나오지 않았는데, 일반혈액 검사 수치에 영향을 미치는 요인이 광범위하여 특이성이 떨어지는 것으로 생각되며 이와 관련해서는 추후 연구가 필요하다고 사료된다.

간세포의 손상을 검사하기 위하여 임상적으로 흔히 혈청내의 AST, ALT, ALP, LDH와 같은 효소의 활성도를 검사하는데²⁷, 혈청내에서의 AST, ALT 활성치 증가는 간세포의 장애 정도와 비교적 상관성이 높고, 간에서 혈액으로 유출되는 다른 효소에 비해 예민하게 변동된다²⁸. ALP는 간염, 간경변, 폐쇄성 황달, 기타 간담도계질환 등이 있을 때 증가하고²⁹, 종양조직에서는 당분해 활성도가 정상 조직에 비해 증가되므로 당분해효소인 LDH의 활성도가 증가하게 된다³⁰.

본 실험에서는 간손상의 정도를 알아보기 위해 흰쥐에 DENA 처리 후 위의 효소 활성도를 측정하였는데, 대조군의 활성도가 정상군에 비하여 유의성 있는 상승을 보여 DENA 처리가 간독성을 유발함을 알 수 있었다. 실험군에서 AST와 ALT의 활성도는 대조군에 비하여 상승 억제효과가 있었으나 통계적인 유의성은 없었다. ALP, LDH의 활성도가 실험군에서 대조군에 비해 활성이 다소 감소하였으나 통계적인 유의성이 없었다. 상기 결과에서茵陳三物湯의 간손상에 따른 효소활성 억제의 효과를 기대할 수 있었으나 통계적인 유의성이 없어 추가적인 실험이 필요하다고 사료된다.

SOD는 활성산소를 제거시키는 효소로 몸 안에 필요 이상의 활성산소가 생겼을 때 이것을 제거하는 작용을 함으로써, 활성산소의 산화반응으로 말미암아 발생하는 질병을 예방하거나 치료하는 역

할을 한다³¹. SOD를 측정함으로써 체내활성산소와 간암과의 연관성을 유추해볼 수 있는데, 간조직을 절취하여 SOD의 활성을 측정한 결과 정상군에 비해 대조군, 실험군에서 모두 증가하였고 유의성 있는 변화는 없었다. 이는茵陳三物湯이 체내활성산소를 제거하여 간세포의 사멸을 억제하는 부분에서는 SOD의 활성 유의성이 없어 활성산소에 관련하여 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다.

육안적 관찰에서 정상군 흰쥐의 간은 외형이 손상되지 않고 표면이 매끄럽고 선홍색의 색조를 띠고 있는 반면, 대조군의 간은 다소 검붉은 색을 띠고 있었으며 커다란 종양이 관찰될 뿐만 아니라 간의 표면에서 다수의 하얀 결절들이 나타났다. 실험군에서는 정상군의 간보다 표면이 거칠고 다수의 작은 결절이 관찰되었으나 대조군에서 보였던 커다란 종양은 관찰되지 않았으며, 간의 표면에서 관찰되었던 결절의 크기가 대조군에 비해 작았다. 이는 DENA에 의해 발현된 암종이茵陳三物湯으로 면역작용이 발현되어 증식이 억제된 것으로 사료된다.

간세포의 변화를 광학현미경으로 관찰한 결과 정상군에서 흰쥐의 중심정맥은 대부분 타원형으로 관찰되었고 간세포는 둥근 핵을 갖고 있었으며 세포질은 거의 일정하게 eosin에 대한 염색성을 보였다. 동굴모세혈관에는 혈액이 충만되어 있었으며, Kupffer 세포들이 다수 관찰되었다. 대조군의 간조직은 중심정맥의 형태가 불규칙하고 동굴모세혈관의 구조가 거의 관찰되지 않았으며, 크고 투명한 액포를 갖는 간세포암이 관찰되었다.茵陳三物湯을 투여한 실험군에서는 다수의 액포를 갖는 간세포암이 관찰되었으나 그 빈도는 대조군에 비해 낮았으며 동굴모세혈관에서 Kupffer 세포를 다수 관찰할 수 있었다. 이는 대조군보다 실험군이茵陳三物湯에 의해 간암세포의 증식이 억제되었고, 면역작용이 발현되었으리라 사료된다.

p53 유전자는 종양 억제 인자로 세포주기의 조절, DNA 복구 및 합성, 세포사멸에 중요한 역할을

하여 세포가 암세포로 형질전환되는 것을 막는다³². 본 실험에서 p53에 대한茵陳三物湯의 효과를 알아보기 위해 흰쥐의 간조직을 적출하여 p53항체를 처리한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 간조직을 관찰 결과, 대조군의 간세포에서는 p53에 강한 면역반응성을 보이는 세포가 다수 관찰되었고 실험군에서는 대조군에 비해 면역반응성을 보이는 세포수와 면역반응성 또한 낮게 나타났다. 이는茵陳三物湯이 p53의 간암세포사멸을 촉진시키고 간암세포의 발생이나 증식에 대한 억제 조절기능을 하는 것으로 사료된다.

이상의 실험결과를 요약하여 보면 체중 측정 및 간 중량의 경우 통계적인 유의성은 없었으나 대조군에 비해 낮게 측정되었음은 간손상 및 간암 진행에 대한 억제 반응이 이루어지는 단계였음을 유추할 수 있다. 검사의 전 항목에 있어서 통계적인 유의성을 보이지는 않았으나 전반적인 결과 역시 대조군에 비해 실험군이 정상군에 좀 더 가까운 수치를 보여茵陳三物湯이 간암모델에 있어서 간손상, 간암의 발생 및 진행에 대해 어느 정도 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 육안적 해부, 간조직의 광학현미경 관찰, p53 면역조직화학반응 결과는 간암의 증식 억제효과와 면역 효과가 있는 것으로 나타났다.

흰쥐의 간암모델에 대한 다른 실험에 비해 본 실험은 실험군과 대조군의 개체수의 부족으로 인해 육안적 해부, 간조직의 광학현미경 관찰, p53 면역조직화학반응 이외에 통계적으로 유의성 있는 반응은 확인할 수 없었다. 향후 개체수를 증가하여 실험하거나 투여농도의 차이에 따른 연구와 투여기간에 따른 차이를 비교하는 등의 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결론

茵陳三物湯이 diethylnitrosamine로 유발된 흰쥐의 간암에 미치는 영향을 확인하기 위해, 간암을

유발시킨 후 8주동안茵陳三物湯을 투여하고 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체중 측정된 결과 정상군에 비해 대조군, 실험군 모두 감소하였으나, 5주부터 실험군이 대조군에 비해 증가하였다.
2. 간중량 및 체중 100 g 당 간 중량은 정상군에 비하여 대조군, 실험군 모두 증가하였고 실험군이 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다.
3. 혈액학적 변화에서 백혈구, 호중구, 림프구는 정상군에 비하여 대조군과 실험군에서 모두 증가하였으나 유의성은 없었다.
4. 혈청 transaminase의 활성은 실험군의 활성도가 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다.
5. ALP 활성은 실험군의 활동도가 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다.
6. LDH 활성은 실험군의 활성도가 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.
7. SOD의 활성을 측정된 결과 대조군과 실험군에서 활성도가 모두 증가하였고 유의성 있는 변화는 없었다.
8. 육안적 해부의 결과 대조군의 간은 다소 검붉은 색을 띄고 다수의 결절들이 나타났으며 커다란 종양이 관찰되었다. 실험군에서는 정상군에 비해 표면이 거칠고 다수의 작은 결절이 관찰되었으나 대조군에 비해 결절의 크기가 작았으며, 커다란 종양은 관찰되지 않았다.
9. 광학현미경으로 관찰한 결과 대조군에서는 중심 정맥의 형태가 불규칙하고 동굴모세혈관의 구조가 거의 관찰되지 않았으며, 크고 투명한 액포를 갖는 간세포암이 관찰되었다. 실험군에서는 다수의 액포를 갖는 간세포암이 관찰되었으나 대조군에 비해 수가 적었으며 동굴모세혈관에서 Kupffer 세포를 다수 관찰할 수 있었다.
10. p53 면역조직화학 관찰 결과 실험군은 대조군에 비해 p53에 면역반응성이 낮게 나타났다.

참고문헌

1. 보건복지가족부 중앙암등록본부. 국가암등록사업 연례 보고서(2007년 암발생, 2007년 암유병, 1993-2007년 암생존 현황) [internet]. 보건복지부; 2009. [2010.10.25 검색]. Available from: http://e-welfare.go.kr/wp/data/sta/viewSta04Info.laf?content_id=212450&path=/wfisc/wp/inf/sta/04/html&rm=3.
2. 통계청 사회통계국 인구동향과. 2009년 사망원인통계 결과 [internet]. 통계청; 2010. [2010.10.25 검색]. Available from: http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/2/6/2/index.board?bmode=read&aSeq=179505.
3. Kasper DL, Gauci AS, Braunwald E, Haase SL, Longo DL, James JL, et al. 해리슨내과학 편찬위원회 편. HARRISON'S 내과학 제 1권. 서울: 도서출판 MIP; 2003, p. 599-602.
4. 全國韓醫科大學 肝系內科學教授 共著. 肝系內科學. 서울: 東洋醫學研究院; 2001, p. 351-67.
5. 손갑호, 김성훈. 柴胡, 茵陳의 간암세포에 대한 항암활성 및 항암제와의 상승작용. 대한한의학회지 1995;16(2):414-32.
6. 강아미, 김보람, 김승욱, 임성우. 蟾蜍가 肝癌 세포주 Hep G2에 미치는 효과. 대한한의학회지 2008;29(4):171-9.
7. 김재용, 김영철, 이장훈, 우홍정. 생간건비탕이 HepG2 cell의 증식, 세포사멸 및 활성조절 신호전달계에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2006;27(1):149-65.
8. 이종범, 허래경, 성기문, 문구, 이종덕, 원진희. 茵陳蒿湯 추출액이 Diethylnitrosamine과 CCl₄로 유발된 흰쥐의 간암 형성과 간경변에 미치는 영향. 대한약침학회지 2009;12(3):5-24.
9. 李梴. 編註醫學入門(傷寒門). 서울: 大星文化社; 1982, p. 175.
10. 韓醫科大學 本草學 編纂委員會. 本草學. 서울: 永林社; 2004, p. 210, 220, 372.
11. 최성훈, 박희수. 茵陳三物湯 藥針處理가 白鼠의 肝損傷 回復에 미치는 影響. 대한약침학회지 1999;2(1):111-33.
12. Condo SG, Giardina B, Barra D, Gill SG, Brunori M. Purification and functional properties of the nemoglobin components from the rat(Wistar). *Eur J Biochem* 1981;116(2):243-7.
13. Reitman S, Frankel AS. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 1957;28:56-63.
14. 대한소화기학회. 간암. 서울: 군자출판사; 2001, p. 1-5, 17-38.
15. 김정열, 신미란, 허운영, 김달래, 전종원. 청폐사 간당이 CCl₄로 유발된 흰쥐의 간손상에 미치는 영향. 사상체질의학회지 2005;17(1):130-41.
16. 김순혜. Diethylnitrosamine으로 유발된 흰쥐 간암 발생 및 진행과정에서 혈관신생인자(VEGF와 bFGF)와 사이토카인(IL-6, IL-8, 그리고 IL-10)의 변화. 학위논문(박사). 중앙대학교 대학원; 2005.
17. 박창국, 이상일. 三七根이 TAA 중독 백서의 간손상에 미치는 영향. 동서의학 1989;14(1):35-53.
18. 심우정, 김용석, 최유신, 김범규, 차성재, 임현목, 박연섭. Diethylnitrosamine으로 유도된 쥐의 간암화 과정에서 세포주기 및 세포사멸사 관련 단백질 발현. 대한외과학회지 2008;75(6):359-67.
19. Pitot HC, Goldsworthy TL, Campbell HA, Poland A. Quantitative Evaluation of the Promotion by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenz o-p-dioxin of Hepatocarcinogenesis from Diethylnitrosamine. *Cancer Res* 1980;40:3616-20.
20. 윤창렬, 이남구, 김선호. 黃帝內經素問 玉冰註. 대전: 주민출판사; 2003, p. 446.

21. 최승훈. 難經入門. 서울: 법인문화사; 2004, p. 266.
22. 南京中醫學院. 諸病源候論校釋. 北京: 人民衛生出版社; 1983, p. 393, 583.
23. 王燾. 外臺秘要. 서울: 成輔社; 1975, p. 324.
24. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 법인문화사; 1999. p. 1347.
25. Sodikoff CH. Laboratory profiles of small animal disease. A Guide to laboratory diagnosis. 2nd ed. St. Louis. Mosby-Year Book Inc. 1995.
26. 최호열, 강명재, 문우성, 박철규. Fumonisin B1으로 유도한 간세포 고사에 대한 Cholesteryl hemisuccinate의 억제효과에 대한 연구. 대한간학회지 1999;5(3):227-40.
27. Chenoweth MB, Hake CL. The smaller halogenated alicyclic hydrocarbons. *Ann. Rev. Pharmac* 1962;2:363-98.
28. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 1957;28(1):58-63.
29. Melen K, Hultberg B, Hagerstrand I, Isaksson A, Joelsson B, Bengmark S. Lysosomal enzymes in plasma, liver and spleen from rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Enzyme* 1985;33(2):84-8.
30. Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW. Clinical chemistry: principles and techniques. 2nd edition. New York: Harper and Row; 1974, p. 829.
31. 이윤미, 이소은, 이재문, 김태영, 최승욱. 운동강도에 따른 MDA와 SOD의 변화. 운동영양학회지 2008;12(2):83-8.
32. Lane DP. Cancer. p53 guardian of genome. *Nature* 1992;358:15-6.