

장뇌산삼이 Benzopyrene으로 유도된 간조직의 TNF-α와 COX-2의 면역조직학적 분포에 미치는 영향

안상현 · 조성준³ · 윤창환³ · 조민경² · 김진택* · 신흥묵^{1*}

동국대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 생리학교실, 2: 약리학교실, 3: 동국대학교 한의바이오혁신사업단

Immunohistochemical Study of Wild Ginseng on Benzopyrene Induced TNF-α and COX-2 Expression in Rats

Sang Hyun Ahn, Sung Jun Jo³, Chang Hwan Yoon³, Min Kyung Cho², Jin-Taek Kim*, heung Muk Shin^{1*}

Department of Anatomy, 1: Department of Physiology, 2: Department of Pharmacology, The College of Oriental medicine Dongguk University, 3: Oriental medicine-Bio R&D Center, Dongguk University

Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), such as benzo(a)pyrene (B(a)P), are toxic environmental contaminants known to enhance oxidative stress, production of pro-inflammatory and inflammatory cytokines. The present study was designed in order to determine whether wild ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) protect PAH-induced oxidative stress and inflammation. B(a)P (0.5 mg/kg, i.p.) treatment increased the distribution of immunoreactive cells for tumor necrosis factor (TNF)-α and cyclooxygenase (COX)-2 in peri-portal triad region and immunoreaction was shown in the cytoplasm of macrophage. Pre-treatment with wild ginseng significantly decreased immune responses in the rats treated with B(a)P. The rats given 50 mg/kg/day for 4 weeks before B(a)P treatment had 1.39-fold and 1.5-fold inhibition of TNF-α and COX-2 positive reaction, respectively. Wild ginseng extract alone had no effect on the distributional changes. The SOD activity as scavenger enzymes after wild ginseng administration dose-dependantly increased compared with butylated hydroxytoluene, a general radical scavenger. These data likely indicate that wild ginseng extract may act as inflammatory regulator in conjunction with inhibition of oxidant dependent metabolic activation in environmental contaminants-induced hepatic inflammation.

Key words : TNF-α, COX-2, Wild ginseng, Benzo(a)pyrene (B(a)P), Protection

서론

현대인은 불규칙한 식사와 영양섭취의 불균형, 스트레스, 과다 음주와 흡연 및 환경오염으로 인해 간 기능 손상 및 간 질환에 쉽게 노출되어 있다. 특히 화학물질의 과다 체내 유입은 산화적 스트레스를 통한 간 조직 손상을 유발하는데, 지질과산화 유발이 촉진되거나 항산화 방어체계의 기능 감소를 수반한다¹⁾. 독성물질의 해독, 간독성 방어 및 간 재생 촉진효능이 보고된 인삼(*Panax ginseng* C.A. Mayer)은 SOD와 catalase 활성 증가 등을

통한 산화적 스트레스 억제 효과를 갖는다^{2,4)}. 또 산삼 (Wild ginseng)의 잎에 존재하는 flavonoid류는 지질과산화 억제와 GSH peroxidase, catalase 그리고 SOD 활성 등의 항산화효능이 탁월하다고 보고되었다^{5,6)}.

Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)은 주된 환경오염원으로 화석연료의 연소, 자동차 배기가스, 흡연, 숯불요리, 산업폐기물 등에 발생하며^{7,8)}, 발암, 면역억제, 전염증반응 등의 다양한 독성효과를 보인다. PAH는 aryl hydrocarbon receptor (AhR) 의존성 기전을 통한 xenobiotic metabolism으로 자유라디칼의 생성 증가와 항산화 방어체계의 활성 감소를 일으켜 산화적 스트레스를 유발한다^{9,10)}. 일부 전염증효소의 발현도 AhR 의존성 기전을 통해 유도되며, 실제 PHA의 일종인 benzopyrene (B(a)P) 노출 세포에서 interleukin (IL)-1β, interferon (IFN)-γ, IL-8 발현이 증가하여 과도한 염증반응이 유발되었다¹¹⁻¹⁴⁾. 그러나 tumor necrosis factor

* 공동교신저자 : 김진택, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 신흥묵, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학

· E-mail : omakjt@dongguk.ac.kr, heungmuk@dongguk.ac.kr

· Tel : 054-770-2648, 054-770-2651

· 접수 : 2005/09/19 · 수정 : 2005/10/22 · 채택 : 2005/11/15

(TNF)- α , 염증효소인 cyclooxygenase (COX)-2의 발현과 생성은 PAH의 AhR 비의존성 기전으로 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)1/2 신호체계를 통해 유도된다^{14,15}.

본 연구는 PAH로 유발된 간 손상 즉, 산화적 스트레스와 간 조직내 염증에 대한 장뇌산삼 추출물의 방어효능을 연구하기 위하여 cytochrome P450 (CYP)에 의한 산화적 스트레스 증가와 ERK에 의한 전염증효소 TNF- α 와 염증효소 COX-2의 발현을 증가시키는 B(a)P 독성 쥐의 간 조직내에서 TNF- α 와 COX-2의 면역조직학적 분포 변화를 관찰하였다. 아울러 riboflavin을 이용한 활성산소 소거실험을 통해 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene과 장뇌산삼의 항산화 효과를 비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

오리엔탈 (Korea)에서 분양 받은 태령 7주된 Sprague-Dawley 계 수컷 생쥐 (220-250 g)를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 사용하였다. 대조군, 장뇌산삼 추출물 투여군 (WG군), Benzo(a)pyrene 처리군 (B(a)P군), 장뇌산삼 추출물 사전투여 후 Benzo(a)pyrene 처리군 (WG+B(a)P군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

2. 장뇌산삼 추출물의 제조와 투여

경북 영주시 풍기군의 소백산에서 채취한 약 10년근의 장뇌산삼 350 g를 증류수 500 ml에 넣고 5시간동안 전탕한 추출액과 다시 3시간 재탕한 추출액을 여과하였다. 그 여액을 rotatory evaporator를 이용하여 50 ml으로 감압·농축한 후 동결 건조하여 36.60 g (수득률 10.46%)의 장뇌산삼 추출물을 얻었다. 장뇌산삼 추출물은 WG군과 WG+B(a)P군에 4주 동안 50 mg/kg/day 용량으로 경구투여 하였다.

3. 간독성의 유발과 표본제작

B(a)P (Sigma, USA)를 dimethylsulfoxide (DMSO : Sigma)에 용해한 후 0.5 mg/kg량으로 B(a)P군과 WG+B(a)P군에 복강 주사하여 간독성을 유발하였다. 간 독성 유발 24시간 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 얻어진 간 조직은 실온에서 24시간 동안 NBF에 고정된 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다.

4. 면역조직화학과 영상분석

간 조직내 전염증효소 TNF- α 와 염증효소 COX-2의 분포 변화를 조사하기 위해 항 TNF- α 항체와 항 COX-2항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K (20 μ g/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 12시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 rabbit anti-TNF- α (1:100, Santa Cruz Biotech, USA)와 rabbit anti-COX-2 (1:100, Cayman, USA)에 4 $^{\circ}$ C humidified

chamber에서 7일동안 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:100, DAKO, USA)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 5일동안 link 하였고, 그런 다음 ABC kit (avidin biotin complex; Vector Lab, USA.)에 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다. 면역조직화학 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2 (Optima, USA)를 이용한 영상분석 (image analysis)을 실시하였으며, Sigma plot 2000 (Sigma)을 이용한 student T-test로 유의성을 검증하였다.

5. 장뇌산삼 추출물의 항산화효과 측정

항산화능력은 riboflavin을 이용한 활성산소 소거실험을 실시하였다. 우선 photocell에 40 mM buffer 2.6 ml, nitroblue tetrazolium 100 μ l, EDTA/cyanide 200 μ l, riboflavin 100 μ l 그리고 측정할 장뇌산삼 추출물 100 μ l을 넣고 3번 섞어준 다음 Abs 560 nm에서 autozero를 잡고 light box에서 1분동안 조사한 후 흡광도를 측정하였다. 이 작업을 7번 반복하여 평균값을 얻은 다음, 시료를 첨가하지 않은 3차증류수에 대한 결과와 비교하여 억제율을 계산하였다.

결 과

1. 전염증효소 TNF- α 분포

대조군 (72 \pm 1/200,000 pixel)과 WG군 (92 \pm 7/200,000 pixel)에서는 TNF- α 양성반응이 관찰되지 않았다. B(a)P처리군에서 TNF- α 양성반응이 증가되어, 영상분석 결과 대조군에 비하여 4492% 증가한 3283 \pm 69/200,000 pixel로 측정되었다. TNF- α 양성반응은 간삼조체 (portal triad)의 담관 (bile duct) 주변에서 관찰되었으며, 양성반응의 세포형태는 큰포식세포형으로 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 그러나 동굴모양모세혈관에 분포하는 Kupffer's 세포에서는 TNF- α 양성반응이 관찰되지 않았다. B(a)P군에 비해 WG+B(a)P군에서는 TNF- α 양성반응이 감소되어 영상분석 결과 39% 감소한 2008 \pm 47/200,000 pixel로 측정되었다 (Fig. 1, 3).

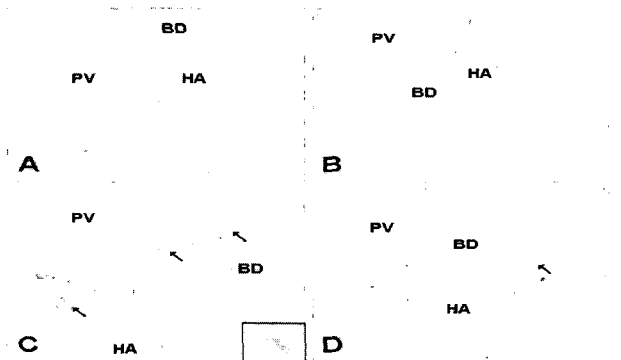


Fig. 1. Immunohistochemical staining for TNF- α distribution in the rat liver (x400). Immunoreactive cells for TNF- α were not detected in peri-portal triad region of untreated (A) and wild ginseng-treated rats (B). Immunoreactive cells (arrow) for TNF- α were shown in benzo(a)pyrene (B(a)P) treated rats (C); below square, enlargement of immunoreactive cells for TNF- α (x1000). Immunodistribution of TNF- α were decreased in wild ginseng pre-treated rats before B(a)P (D). Abbreviation. PV, portal vein; HA, hepatic artery; BD, bile duct.

2. 염증효소 COX-2 분포

대조군 (77±13/200,000 pixel)과 WG군 (120±23/200,000 pixel)에서는 COX-2 양성반응이 관찰되지 않았다. 반면 B(a)P 처치군은 COX-2 양성반응이 증가되어, 영상분석 결과 대조군에 비하여 5701% 증가한 4467±159/200,000 pixel로 측정되었다. COX-2 양성반응은 간삼조체 (portal triad)의 담관 (bile duct) 주변에서 관찰되었으며, 양성반응의 세포형태는 큰포식세포형으로 세포질에서 강한 양성반응이 관찰되었다. 그러나 동굴모양모세혈관에 분포하는 Kupffer's 세포에서 COX-2 양성반응은 관찰되지 않았다. B(a)P군에 비해 WG+B(a)P군에서는 COX-2 양성반응이 감소되었는데, 영상분석 결과 50% 감소한 2227±219/200,000 pixel로 측정되었다 (Fig. 2, 3).

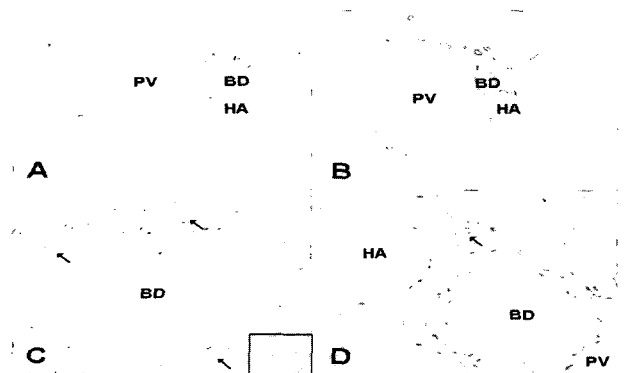


Fig. 2. Immunohistochemical staining for cyclooxygenase (COX)-2 in the hepatic tissue of rats (x400). Immunoreactive cells for COX-2 were not detected in peri-portal triad region of untreated (A) and wild ginseng-treated rats (B). Many immunoreactive cells (arrow) for COX-2 were seen in B(a)P treated rats (C); below square, enlargement of immunoreactive cells for COX-2 (x1000). Immunodistribution of COX-2 were decreased in wild ginseng pre-treated rats before B(a)P (D). Abbreviation same as Fig.1.

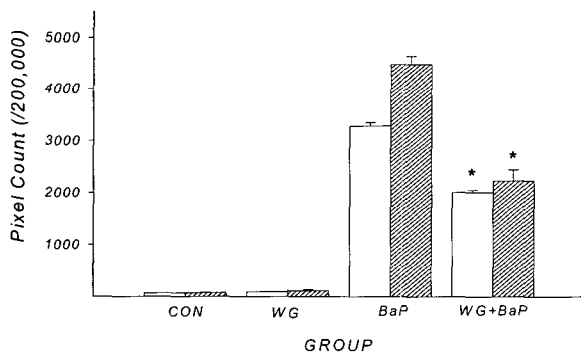


Fig. 3. Image Analysis for TNF- α and COX-2 positive reaction in the hepatic tissue. Both positive reactions in wild ginseng pre-treated rats at 24 hours after B(a)P treatment were remarkably decreased compared with B(a)P-alone treated rats. Abbreviation, □, TNF- α ; ▨, COX-2. CON, untreated rats WG, Wild-ginseng alone treated rats; B(a)P, B(a)P treated rats; WG+B(a)P, Wild-ginseng pre-treated rats before B(a)P treatment. *, P<0.05 compared with B(a)P group

3. 항산화효과

장뇌산삼 추출물의 항산화 효율은 1 mg/ml에서 60.67±2.52%, 2 mg/ml에서 71.33±2.52%, 3 mg/ml에서 81.67±2.08%, 4 mg/ml에서 89.17±0.76%, 5 mg/ml에서 91.33±1.53%, 10 mg/ml에서 93.00±1.00%로 농도-의존적으로 증가하였다. 장뇌산삼 3 mg/ml 이상 농도에서는 Butylated hydroxyanisole (BHA)보다 우수한 항산화 효능을 나타내었다 (Fig. 4).

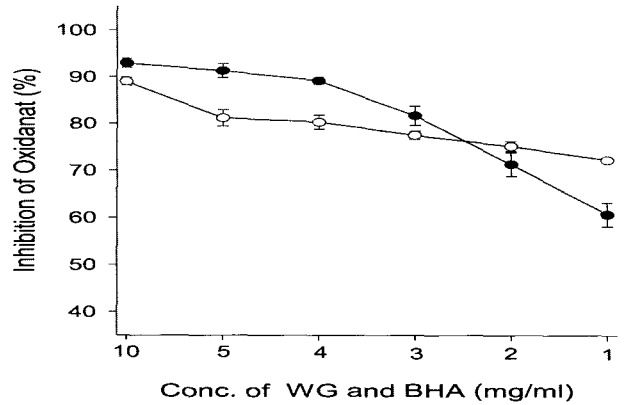


Fig. 4. The anti-oxidant effects of wild ginseng. The SOD ability of wild ginseng were dose-dependantly increased. Abbreviation, ●, wild ginseng (WG); ○, Butylated hydroxyanisole (BHA).

고 찰

Superoxide radical ($\cdot O_2^-$), hydroxyl radical ($\cdot OH$), 과산화수소 등 반응성이 강한 유리기는 생물체의 산소 대사과정 중에 생성된다. 이런 활성 산소종들은 화학물질의 체내유입, 생체 물질의 자가산화, 노화 등에 의해 생성이 촉진되어 생체내에서 단백질의 SH기나 DNA와 반응하여 화학결합의 절단이나 가교결합의 형성 등으로 생체 구성 분자의 구조적 변화를 일으킨다. 또한 세포막의 불포화지방산과 연쇄적인 반응을 통해 hydroxyepoxide, endoepoxide 및 polyepoxide 등과 같은 지질 과산화물이 생성되어 malondialdehyde (MDA)로 분해되며, MDA의 함량이 증가하면 세포의 산화적 손상이 생리적 기능을 저하시키므로 간질환, 동맥경화 및 암 등의 여러 가지 질병을 초래하여 결국 노화와 유전적 장애의 원인이 된다. 자유라디칼에 대한 지질과산화 반응은 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathion (GSH) peroxidase, GSH reductase 등의 항산화 효소와 항산화 영양소들로 이루어진 체내 방어체계에 의해서 억제된다. 산화적 스트레스의 증가는 체내의 자유 라디칼이 과다 생성되거나 혹은 항산화 방어체계의 기능이 감소되었을 때 유발된다¹⁾. 항산화제 탐색은 천연물이 함유하고 있는 2차 대사산물을 중심으로 활발하게 진행되고 있으며, 현재 tocopherol과 L-ascorbic acid가 천연 항산화제로 선호되고 있는데, 그 중 tocopherol은 안정성이 높으나¹⁶⁾, 가격이 비싸다는 단점을 가지고 있다. 화장품이나 의약품 등에 많이 사용되는 합성 항산화제로 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG), Tertiary butylhydroquinone (TBHQ) 등이 있으나 고농도 투여시 간비대증, 발암성 등의 부작용으로 사용이 제한적이다¹⁷⁾. 현재까지 알려진 천연 항산화 물질로는 tocopherol류, flavonoid류, nordihydroguaiacol, gossypol, sesamol, oryzanol 및 vitamin C와 vitamin 등을 들 수 있다. 한편 adaptogen으로 알려진 인삼은 dioxin에 의한 CYP1A1 생성 억제효과, ginsenoside Rb1와 Rc의 GSH peroxidase 활성 증가효과, 홍삼 saponin의 SOD와 catalase 활성 증가 및 malondialdehyde 함량 감소효과 등 산화적 스트레스 억제 효과가 보고되었다²⁻⁴⁾.

대표적 補氣劑인 산삼은 靈藥으로 여겨졌으며 그 모양새가 사람을 닮았다고 하여 人蔘으로 표현되어 왔다. 性은 微寒, 微溫하고 味는 甘, 微苦하며, 補五臟, 安定神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服輕身延年 등의 효능이 있다¹⁸⁾. 최근 항산화 연구 결과 산삼 잎에서 추출된 phenolics와 flavonoid가 높은 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-radical 소거를, 지질과산화와 linoleate oxidation 억제 효과가 있으며⁵⁾, streptozotocin에서 유발 당뇨에서 지질과산화 억제와 GSH peroxidase, catalase 및 SOD 등의 항산화관련 효소 활성을 증가시킨다고⁶⁾.

본 실험 결과 장뇌산삼 추출물은 농도-의존적으로 항산화효능 증가를 보였으며, BHA와 비교했을 때 3 mg/ml 이상의 농도에서는 보다 우수한 항산화효능을 보였다.

PAH인 B(a)P는 세포내로 들어와 열충격단백질90과 결합된 aryl hydrocarbon receptor (AhR)과 치환·결합하여 핵내로 전이한 다음 AhR nuclear translocator (ARNT)와 dimerization한 후 xenobiotic responsive elements (XRE)에 결합하여 PAH-regulated gene의 전사를 일으켜¹⁹⁾ xenobiotic metabolism인 cytochrome P450s (CYP) 1A1 생성을 유도한다²⁰⁾. 생성된 CYP1A1은 B(a)P를 산화시켜 7,8-diol-BaP로 전환한 다음 BaP-7,8-epoxide로 재산화되어 독성을 유발하는데^{9,10,21)}, 지질과산화 증가를 통한 조직내에서 MDA 함량 증가, diepoxide-GSH 포함체 형성 및 대사 증가에 따른 GSH 함량 감소와 glutathione S-transferase (GST) 활성도 감소²²⁾ 등의 산화적 스트레스가 일어난다. 또한 B(a)P에 의한 AhR 의존적 발현 (IL-1 β , IFN- γ , IL-8)과 ERK1/2 신호체계를 통한 발현 (TNF- α)으로 염증관련 전사 인자인 Nuclear factor (NF)- κ B 활성을 유도한다. 즉, 자극에 의해 I κ B protein이 인산화되어 분해됨으로서 유리된 NF- κ B는 핵으로 들어가 target 유전자의 NF- κ B binding site에 결합하여 염증관련유전자의 발현을 유도하고²³⁾, 그 결과 염증효소 COX-2와 iNOS 등의 생성이 증가 된다^{15,24,25)}.

본 실험에서는 B(a)P 처리 후 AhR 비의존적 발현 과정을 통해 생성되는 전염증효소 TNF- α 의 분포변화를 관찰하였다. TNF- α 는 간 조직내 염증의 초기 작동 cytokine의 하나로, 다른 cytokine과 공조하여 TNF-receptor 1 (Fas like death domain) 보유 간세포 사망 유도, 염증관여세포의 기용, 섬유화 (fibrogenesis)를 포함한 상처치유기전의 시작 등에 관여한다^{26,27)}. B(a)P 처리 후 간 조직에서 TNF- α 양성반응은 4492%나 증가하였으며, 주로 간삼조체의 담관 주변의 큰포식세포에서 강한 양성을 보였다. 이에 반해 장뇌산삼 추출물 사전 투여 후 B(a)P 처리 군에서는 39% 억제율을 나타내었다. 이러한 결과는 ERK inhibitors U0126이나 PD98056을 사용했을 때 B(a)P에 의한 TNF- α 발현과 생성이 억제된다는 기존 연구¹⁴⁾에서처럼 장뇌산삼 추출물이 B(a)P에 의한 ERK1/2 신호체계를 차단함으로써 큰 포식세포에서의 TNF- α 발현과 생성을 억제한 것으로 생각된다.

한편 B(a)P 처리 후 염증효소 COX-2의 분포 변화도 관찰되었다. COX-2는 성장인자와 mitogen에 유도되어 지속적인 PGs 분비를 통한 다양한 만성염증질환, 즉 류마티스성 관절염,

Crohn's disease, 궤양성 대장염, Helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 간경변 유발 시 혈관이완과 혈관신생성에도 관여한다^{28,29)}. B(a)P 처리 후 간조직에서 COX-2 양성반응은 5701%나 증가했으며, 주로 간삼조체의 담관 주변의 큰포식세포에서 강한 양성을 보였다. 이에 반해 장뇌산삼 추출물을 전투여한 후 B(a)P 처리하였을 때는 COX-2 양성반응이 50% 감소하였다. ERK inhibitors PD98056는 B(a)P에 의한 COX-2 발현과 생성이 억제되고, NF- κ B 활성 억제제인 Bay11-7085와 pyrrolidinedithiocarbamate에 의해 B(a)P로 유도되는 COX-2 promoter 활성과 COX-2 생성이 차단된다¹⁵⁾. 따라서 본 연구에서 장뇌산삼 추출물이 B(a)P에 의한 ERK1/2 신호체계 차단과 NF- κ B 활성 억제를 통해 큰 포식세포에서 COX-2 발현과 생성을 억제할 가능성이 제기되며, 아울러 장뇌산삼추출물의 항산화효과로 인한 산화적 스트레스 감소도 NF- κ B 활성 억제에 기여할 것으로 생각된다.

결론

장뇌산삼 추출물의 항염효능을 연구한 본 연구에서 장뇌산삼 추출물은 Benzo(a)pyrene에 의해 유도된 간 조직의 전염증효소 TNF- α 와 염증효소 COX-2의 분포를 감소시켰다. 이는 장뇌산삼 추출물의 산화적 스트레스 감소와 염증 조절에 의한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교의 2005년 한의바이오혁신사업단 연구비로 수행되었으며, 본 연구에 사용된 장뇌산삼 시료를 제공한 산하산삼연구소 (소장: 안대영)께 감사드립니다.

참고문헌

1. Park, H.H., Jang, Y.J., Choi, D.S., Namgung, M.A., Lee, Y.J., Kang, S.A. Increased oxydative stress in sciatic nerves of streptozotocin induced diabetic rat: Lack of vitamin C effect. *Diabetes* 19(3):279-286, 1995.
2. Lee, H.C., Hwang, S.G., Lee, Y.G., Sohn, H.O., Lee, D.W., Hwang, S.Y., Kwak, Y.S., Wee, J.J., Joo, W.H., Cho, Y.K., Moon, J.Y. In vivo effects of Panax ginseng extracts on the cytochrome P450-dependent monooxygenase system in the liver of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed guinea pig. *Life Sci* 71(7):759-769, 2002.
3. 성금수, 전철, 권용훈, 김경현, 장재철. 홍삼추출물 투여가 생쥐간에서 항산화 효소 활성과 지질과산화에 미치는 효과. *J Ginseng Res* 24(1):29-34, 2000.
4. 김정선, 김규원, 최강주, 광영규, 임광식, 이경희, 정해영. 홍삼 사포닌의 항산화활성 성분 Screening. *Korean J Ginseng sci* 20(2):173-178, 1996.

5. Jung, C.H., Seog, H.M., Choi, I.W., Choi, H.D., Cho, H.Y. Antioxidant activities of cultivated and wild korean ginseng leaves. *Food Chemistry* 92, 535-540, 2005.
6. Jung, C.H., Seog, H.M., Choi, I.W., Choi, H.D., Cho, H.Y. Effects of wild ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) leaves on lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 98(3):245-250, 2005.
7. Hecht, S.S. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, 1194-1210, 1999.
8. Knize, M.G., Salmon, C.P., Pais, P., Felton, J.S. Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amine and polycyclic aromatic hydrocarbon mutagens / carcinogens. *Exp Med Biol* 459, 179-193, 1999.
9. Kim, J.H., Stansbury, K.H., Walker, N.J., Trush, M.A., Strickland, P.T., Sutter, T.R. Metabolism of Benzo(a)pyrene and Benzo(a)pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* 19, 1847-1853, 1998.
10. Miller, K.P., Ramos, K.S. Impact of cellular metabolism on the biological effects of Benzo(a)pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab Rev* 33, 1-35, 2001.
11. Lyte, M., Bick, P.H. Modulation of interleukin-1 production by macrophages following benzo(a)pyrene exposure. *Int J Immunopharmacol* 8(3):377-381, 1986.
12. Vandebriel, R.J., Meredith, C., Scott, M.P., Roholl, P.J., Van Loveren, H. Effects of in vivo exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide, hexachlorobenzene, and benzo(a)pyrene on cytokine (receptor) mRNA levels in cultured rat splenocytes and on IL-2 receptor protein levels. *Toxicol Appl Pharmacol* 148(1):126-136, 1998.
13. Pei, X.H., Nakanishi, Y., Inoue, H., Takayama, K., Bai, F., Hara, N. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce IL-8 expression through nuclear factor kappaB activation in A549 cell line. *Cytokine* 19(5):236-241, 2002.
14. Lecureur, V., Ferrec, E. L., N'diaye, M., Vee, M. L., Gardyn, C., Gilot, D., and Fardel, O. ERK-dependent induction of TNF-alpha expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages. *FEBS Lett* 579(9):1904-1910, 2005.
15. Yan, Z., Subbaramaiah, K., Camilli, T., Zhang, F., Tanabe, T., McCaffrey, T.A., Dannenberg, A.J., Weksler, B.B. Benzo[a]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF-kappaB. *J Biol Chem* 275(7):4949-4955, 2000.
16. Halliwell, B., Hoult, R.J., Blake, D.R. Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. *FASEB J* 2, 2867-2870, 1988.
17. Ito, N., Fukushima, S., Hasebawa, A. Carcinogenicity of BHA in F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 70, 343-351, 1983.
18. 徐樹柵, 朱兵占. 神農本草經. 河北, 河北 科學技術出版社. p 10, 1996.
19. Hankinson, O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 307-340, 1995.
20. Andrieux, L., Langouet, S., Fautrel, A., Ezan, F., Krauser, J.A., Savouret, J.F., Guengerich, F.P., Baffet, G., Guillouzo, A. Aryl hydrocarbon receptor activation and cytochrome P450 1A induction by the mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in hepatocytes. *Mol Pharmacol* 65(4):934-943, 2004.
21. Pelkonen, O., Nebert, D.W. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol Rev* 34, 189-222, 1982.
22. 김현정, 이인선, 배준태, 김옥미, 박선희, 장종선, 박준홍, 이갑량. 벤조피렌 유발 마우스에서 싸리버섯 메탄올 추출물의 간 독성 억제효과 및 사이토크롬 P 450 1A1 isozyme의 발현에 미치는 영향. *J Korean Mycology* 31(1):34-39, 2003.
23. Baeuerle, P.A., Baltimore, D. NF-kB - Ten years after. *Cel* 187, 13-20, 1996.
24. Chen, J., Yan, Y., Li, J., Ma, Q., Stoner, G.D., Ye, J.H. Differential requirement of signal pathways for benzo[a]pyrene (B[a]P)-induced nitric oxide synthase (iNOS) in rat esophageal epithelial cells. *Carcinogenesis* 26(6):1035-1043, 2005.
25. Weng, M.W., Hsiao, Y.M., Chen, C.J., Wang, J.P., Chen W.C., Ko, J.L. Benzo[a]pyrene diol epoxide up-regulates COX-2 expression through NF-kappaB in rat astrocytes. *Toxicol Lett* 151(2):345-355, 2004.
26. Diehl, A.M. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol Rev* 174, 160-171, 2000.
27. Simpson, K.J., Lukacs, N.W., Colletti, L., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. Cytokines and the liver. *J Hepatol* 27(6):1120-1132, 1997.
28. Groszmann, R.J. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. *J Hepatol* 17(2): S38-40, 1993.
29. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93(5):705-716, 1998.