

인진호탕 추출액의 투여가 흰쥐의 간암 발생에 미치는 효과

윤 중 식, 김 정 상*

동신대학교 한의과대학 해부학교실

The Effect of the Injinhotang Extract on Hepatocarcinogenesis in Rats

Jung Sik Yoon and Jeong Sang Kim*

Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

(Received July 27, 2009; Accepted October 23, 2009)

ABSTRACT

In order to examine the effect of Injinhotang extract on the liver cancer induced by *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) and carbon tetrachloride (CCl₄) in Rats. The animals were divided into three groups. The normal (Nor) group were fed basal diet. Control (Con) group were administered with NDEA (200 mg/kgb.w., i.p.) and CCl₄. Injinhotang extract (IJH) group treated with Injinhotang extract (260 mg/kg/day) for 8 weeks after NDEA+CCl₄. Enzymic antioxidants, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase levels were determined in all the groups of animals. The activities of SOD were significantly increased in the Con, but the activities of catalase were decreased in the Con, but the anti-oxidative enzyme activities of superoxide dismutase and catalase were increased in the IJH. In the immunohistochemistry observation, treatment of Injinhotang extract reduced the rates of p53 immunoreactivity. According to the electron microscopical observation, in the liver cancer cells were increased the smooth endoplasmic reticulum and dilated the rough endoplasmic reticulum in the Con compared with IJH. These results suggest that administration of Injinhotang extract suppress or retard NDEA and CCl₄-induced liver cancer.

Keywords : Injinhotang extract, Liver cancer, *N*-nitrosodiethylamine, Antioxidants, p53

서 론

인진호탕은 항염증제, 해열제, 이뇨제로서 담즙분비를 촉진시키는 동시에 담낭 수축작용이 있고 아울러 간염에 대한 간 보호 작용이 있다고 알려져 있다(Yamahara et al., 1982; Tan et al., 1998; Seol et al., 2003). 인진호탕을 구성하는 세 가지 성분 중 하나인 인진은 capillarisin, capillien, capillin, capillarin과 scoparone 등이 함유되어 있고, 이 성분들은 담즙분비를 촉진시켜 간 기능 개선 효과, 항암, 항균, 항바이러스

스 작용, 혈압 강하 등의 활성을 갖는 것으로 알려져 있다(Kiso et al., 1984; Mori et al., 1988; Yamahara et al., 1989). 치자의 주성분인 genipin, gardeniside, crosin, crocetin과 gardenin 등은 항균, 항바이러스 작용, 소염작용, 해열작용, 이담 작용이 있으며, 또한 geniposide는 간, 신장과 심장에 항종양 인자로서의 기능을 할 수 있는 것으로 보고되었다(Kimura et al., 1982; Peng et al., 2005). 대황은 sennosides A-F, rhatannin, rhein 그리고 lindleyin 등이 있으며 주로 항균, 이담, 지혈, 항암, 간 기능 보호, 면역조절, 소화효소분비억제 등의 기능이 있는 것으로 알려져 있다(Matsuda et al., 2001; Jin et

* Correspondence should be addressed to Jeong Sang Kim, College of Oriental Medicine, Dongshin University, Naju 520-714, Korea. Ph.: (061) 330-3512, Fax: (061) 330-3499, E-mail: jskim@dsu.ac.kr

al., 2005). 국내외의 인진호탕에 대한 연구를 보면 항고지혈증(Lee et al., 2008), 간 기능개선 효과(Han et al., 2006), 항균효과(Luo et al., 2007), 항산화 효과(Chu et al., 1999) 등을 보고하였고, 현재까지 인진호탕의 직접적 또는 간접적인 항암 효과에 관한 보고는 있으나(Hu et al., 2000), 직접적인 간암에 대한 연구는 거의 진행되지 않고 있는 실정이다.

실험적으로 동물에서 간암을 유발하는 방법으로는 nitrosamine계열의 *N*-nitrosodiethylamine (이하 NDEA)이나 aflatoxin B1 등을 투여하는 방법이 가장 널리 사용되고 있는데, NDEA를 이용한 실험적 간암 모델은 간암의 전구병변으로 간주되고 있는 비정형적 증식, 샘종의 발생에 이어 인체에서 발생하는 간암과 형태학적으로 유사한 병변이 초래되어 이상적 모델로 이용되고 있다(Scherer et al., 1975). 근래에는 NDEA의 투여로 개시기 동안 DNA에 변이를 보이는 저항성 간세포를 유발하고, 이차적으로 사염화탄소(CCl₄), 2-acetylaminofluorene (2-AAF), phenobarbital, 간 부분 절제술 등을 병행하여 많은 간암 유발 연구에 활용되고 있다(Faber, 1984; Kovalszky et al., 1992; Tessitore, 1992; Tamano et al., 1994).

p53 유전자는 세포의 성장과 형질변화를 억제하는 중요한 역할을 하며, 세포자멸사를 억제하는 작용을 한다. 이러한 p53이 변이 등에 의해 비활성화되면 세포주기 및 DNA 복제의 조절기능이 상실되고 정상세포의 형질변화를 초래하는데 중요한 역할을 하며, 실제적으로 인체 암의 50% 이상에서 p53의 비활성화가 보고되고 있다(Greenblatt et al., 1994).

따라서, 본 연구에서는 간암에 대한 인진호탕 추출액의 항암 효과를 규명하기 위하여 항산화효소인 Superoxide dismutase (이하 SOD)와 catalase 활성 측정, 면역조직화학적 및 미세구조적 관찰을 실시하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물은 체중 210±10g 내외의 Sprague Dawley계 웅성 흰쥐((주)샘타코, 한국)를 구입하였다. 실험동물은 동신대학교 한의과대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도: 21±2°C, 습도: 50~60%, 명암: 12시간 주기)하에서 일반 고형사료((주)샘타코, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 1주 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 인진호탕(Injinhotang, 茵陳蒿湯)의 구성과 용량은 아래와 같다(Table 1). 인진호탕 4침을 물 600 mL에 넣고 약탕기로 3시간 동안 가열한 다음 농축한 후 저온순환수조(CA-1500, EYELA, Japan)에서 1차 동결한 다음 동결건조기(Samwon, SFDSMO06, 한국)로 동결 건조

Table 1. Prescription of Injinhotang

Herbal name	Scientific name	Weight (g)
인진(茵陳)	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	30
치자(梔子)	<i>Gardeniae fructus</i>	20
대황(大黃)	<i>Rhei Undulati Rhizoma</i>	10
Total		60

하여 31.8g의 분말을 얻었다.

2. 간암 유발 및 약물 투여

정상군은 통상적인 사료와 물을 공급하였으며, 정상군을 제외한 모든 실험동물은 *N*-nitrosodiethylamine (Sigma Chemical Co., USA) 200 mg/kg을 0.9% 식염수 1 mL에 용해하여 1주 간격으로 2회 복강 투여하였다. NDEA 투여 1주 후부터 사염화탄소(CCl₄, Sigma Chemical Co., USA)와 corn oil을 1:1로 희석한 약물 1 mL을 1주 간격으로 3회 복강 투여하여 간암을 유발 후, 정상군(이하 Nor군)과 대조군(이하 Con군) 흰쥐는 간암이 유발된 후부터 식염수 0.5 mL을 실험기간 동안 매일 구강 투여하였으며 실험군은 8주 동안 인진호탕 추출액 건조분말을 생리식염수에 0.5 mL에 용해하여 체중 60 kg인 사람의 1일 투약량인 260 mg/kg(이하 IJH군)을 구강 투여하였다.

3. 분석시료 제조

간 조직을 적출하여 차가운 생리식염수로 세척한 다음 무게를 측정하였다. 간 조직은 얼음 결정상태의 생리식염수에 넣어 세척하고 3회 수세하여 혈액을 제거하였으며, sucrose/EDTA (0.25 M/1 mM) 용액을 넣고 마쇄기(glass teflon homogenizer)로 분쇄하여 10% 균질액을 만들었다. 이 균질액을 원심분리(900×g, 15분)하여 상층액을 취하고, 이 상층액을 2차 원심분리(10,000×g, 15분)하였다. 얻어진 상층액을 SOD와 Catalase 활성 측정 시료로 사용하였다. 효소단백질 정량은 Bio-Rad assay를 이용하였으며, -70°C의 deep freezer에 보관하면서 실험에 이용하였다.

4. SOD 활성도 측정

SOD 활성도는 SOD assay kit (Dojindo, Japan)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정 후 SOD 활성도를 계산하였다.

5. Catalase 활성도 분석

균질기(JANKE & KUNKEL, ULTRA-TURRAX T25, Germany)를 이용하여 조직 250 mg을 0.25 M sucrose 1 mL을 넣고 2,300 rpm에서 10분간 4°C에서 원심분리시킨 후

상층액만 분리하여 다시 9,000 rpm에서 10분간 4°C에서 원심분리시켜 pellet을 기질인 10 mM H₂O₂와 50 mM 인산칼슘 완충액(pH 7.2)에 담근 후, 최종 반응액이 3.0 mL되게 하여 spectrophotometer (Kontron, Italy)를 사용해 25°C에서 30초간 반응시키면서 240 nm 파장에서 30초간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂을 측정하였다.

6. 면역조직화학

흰쥐의 간 조직을 적출하여 4%의 paraformaldehyde를 사용하여 24시간 동안 고정시킨 다음, 파라핀으로 포매한 후 microtome을 사용하여 조직을 5 µm 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 이를 xylene에서 파라핀을 제거한 다음 100%, 90%, 80% ethanol과 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 하룻밤 동안 배양시킨 다음 15분간 PBS로 세척한 뒤 10% horse serum을 함유한 blocking solution을 사용하여 20분 동안 배양시키고 다시 PBS용액으로 15분간 세척하였다. 세척한 각각의 조직위에 p53-antibody (Cell signaling, Co.)를 처리하고 습도가 높은 상온의 배양접시에서 2시간 동안 배양시킨 뒤 15분간 PBS용액으로 세척하였다. 그리고 biotinylated universal secondary antibody solution를 처리하여 30분간 배양시킨 후 15분간 PBS 용액으로 세척하였다. 이를 다시 streptavidin/peroxidase complex (Vector Lab, CA, USA)를 조직에 처리 30분간 반응시키고 다시 PBS용액에서 15분간 세척하였다. DAB 발색 시약을 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.

7. 전자현미경 관찰

전자현미경 관찰을 위하여 광학현미경 시료와 동일한 부위의 조직을 절취하여 전고정액 속에서 1 mm³ 크기로 세절한 후 2.5% glutaraldehyde (phosphate buffer, pH 7.4)로 2시간 동안 전고정하였다. 전고정이 끝난 조직은 동일 완충액을 사용 10분 간격으로 3회 세척한 다음 1% osmium tetroxide (OsO₄)로 2시간 후 고정한 다음 동일 완충액으로 3회 세척하였다. 세척 후 시료들은 상승농도 순의 에탄올로 탈수하여 propylene oxide로 치환한 다음 Epon-Araldite 혼합액으로 포매하였고 60°C 오븐에서 30시간 중합시켰다. 포매된 조직들을 LKB-V형 ultramicrotome을 사용 1 µm 두께로 절편을 제작하여 1% toluidine blue로 hot plate (60°C)상에서 염색하였다. 염색된 시료를 광학현미경으로 관찰하여 조직

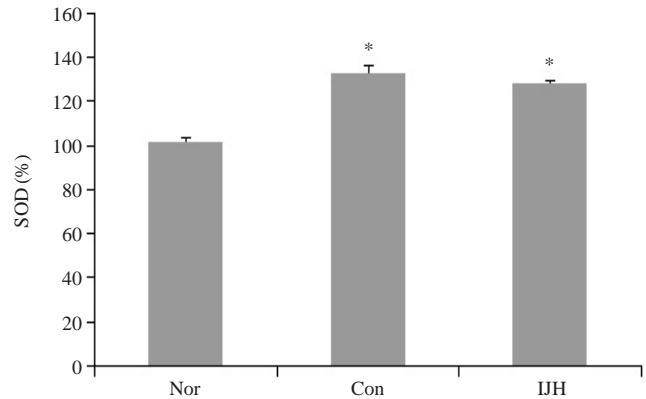


Fig. 1. The effects of Injinhotang extract on SOD activities in the NDEA and CCl₄-induced liver injury. Nor, administered saline; Con, control group administered saline after NDEA treatment; IJH, Injinhotang extract 260 mg/kg/day administered group during 8 weeks after NDEA treatment. Significant differences were compared with normal at *p<0.05. All values are mean ± S.E.

을 확인한 다음 동일한 부위에서 60 nm 두께로 초박절편을 제작하여 silver grid에 부착하였고, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 다음 JEM 100 CX-II 투과형 전자현미경 (80 KV)으로 관찰하였다.

8. 통계처리

결과에 대한 통계처리는 SAS (statistical analysis system) program에 의하여 각 실험군별로 평균과 표준편차를 계산하였고, p-value가 최소한 0.05 이하의 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. SOD의 활성변화

SOD는 체내의 대표적인 scavenging enzyme으로 두 분자의 superoxide anion을 hydrogen peroxide와 oxygen molecule로 환원시키는 작용을 가지고 있는 효소이다(Baud & Ardalliou, 1986). SOD 활성도는 Nor군(102±2.04%)에 비하여 NDEA를 단독투여한 Con군(133±3.70%)과 인진호탕 추출액을 투여한 IJH군(128±1.98%)에서 증가하였으며 통계적으로 유의성(p<0.05)이 있었다(Fig. 1). 본 실험에서 IJH군의 SOD 활성이 Con군에 비해 다소 낮게 나타나는 것은 사염화탄소의 대사가 감소되어 free radicals의 생성이 감소하여 유도하지 않은 것으로 사료된다.

2. Catalase의 활성변화

생체 내 생명현상에 필수적인 산화환원반응의 일종으로

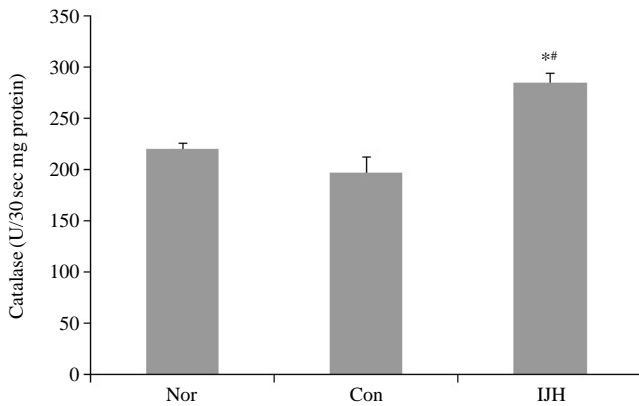


Fig. 2. The effects of Injinhotang extract on catalase activities in the NDEA and CCl_4 -induced liver injury. Nor, administered saline; Con, control group administered saline after NDEA treatment; IJH, Injinhotang extract 260 mg/kg/day administered group during 8 weeks after NDEA treatment. Significant differences were compared with normal/control at * $p < 0.05$ /# $p < 0.05$. All values are mean \pm S.E.

생성되는 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 분해하는 효소 중 하나가 catalase이다. 이것은 다수의 H_2O_2 생성효소들과 복합체를 형성하여 peroxisome에 주로 분포하고 H_2O_2 증가에 따른 조직손상을 방어하는 효능이 있다고 알려져 있다(Gutteridge et al., 1983; Yoshikawa et al., 1983). 본 실험에서 catalase의 활성을 측정된 결과 Nor군(221 ± 5.44 U/30 sec mg protein)에 비하여 Con군(198 ± 15.50 U/30 sec mg protein)에서 낮게 나타났으나, IJH군(285 ± 9.84 U/30 sec mg protein)에서는 Nor군과 Con군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있게 증가하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 SOD의 작용에 의해 생성된 과산화수소를 분해하기 위해 catalase의 활성이 증가한다(Deng & Zhang, 1991)는 보고와 연관이 있다. 위의 결과를 종합하여 볼 때 인진호탕 추출액 투여로 catalase 활성이 증가하여 과산화수소의 양적 감소로 간세포의 손상을 억제하였을 것으로 사료된다.

3. p53의 면역조직화학적 분포양상

암 억제 유전자인 p53은 정상세포 및 종양세포의 성장 조절에 중요한 역할을 수행하는 전사 조절 인자로서 다른 유전자들의 전사를 유도 혹은 억제시킴으로써 세포주기를 조절한다(levine et al., 1991). p53 유전자 변이는 인체 종양에서 발견되는데 간세포암에서는 9~45%에서 관찰된다(Collier et al., 1994; Volkmann et al., 1994). Wild type p53 유전자의 발현은 반감기가 20~30분으로 매우 짧은 반면에 변이형 p53 유전자는 반감기가 1.5~7시간까지 길어져 면역조직화학 염색으로 조직내에서 관찰할 수 있다(Eliyahu et al., 1984; Hinds et al., 1990). 이러한 변이형 p53은 형태학적 변화가 일어나 종양세포핵에 축적되어진다(Legros et al.,

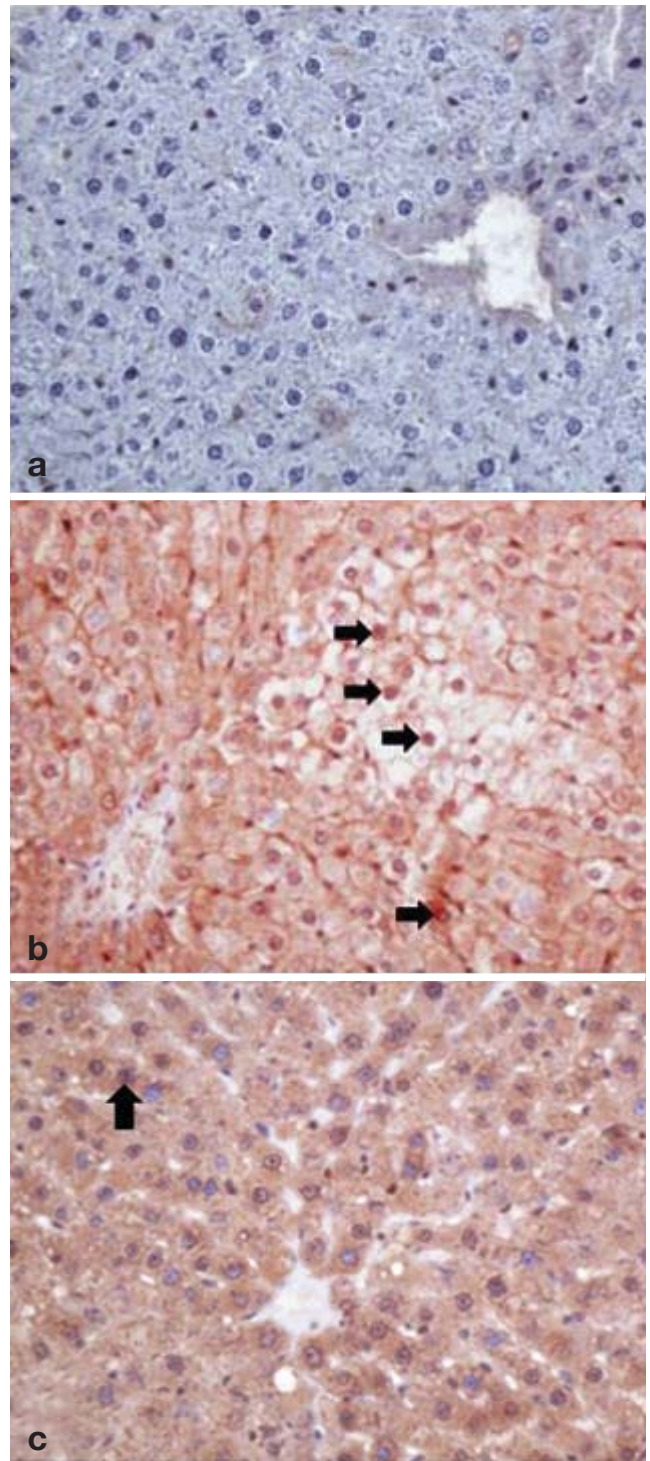


Fig. 3. Immunohistochemical localization of p53 in hepatocytes. Many p53-positive hepatocytes (brown nuclei) are seen in the Con (b). a: Normal group; b: Control group, c: IJH group. $\times 400$.

1994; Bourdon et al., 1995).

본 실험의 결과, Nor군 간세포에서는 p53에 대한 면역반응성을 보이는 핵이 관찰되지 않았다(Fig. 3a). 그러나 NDEA

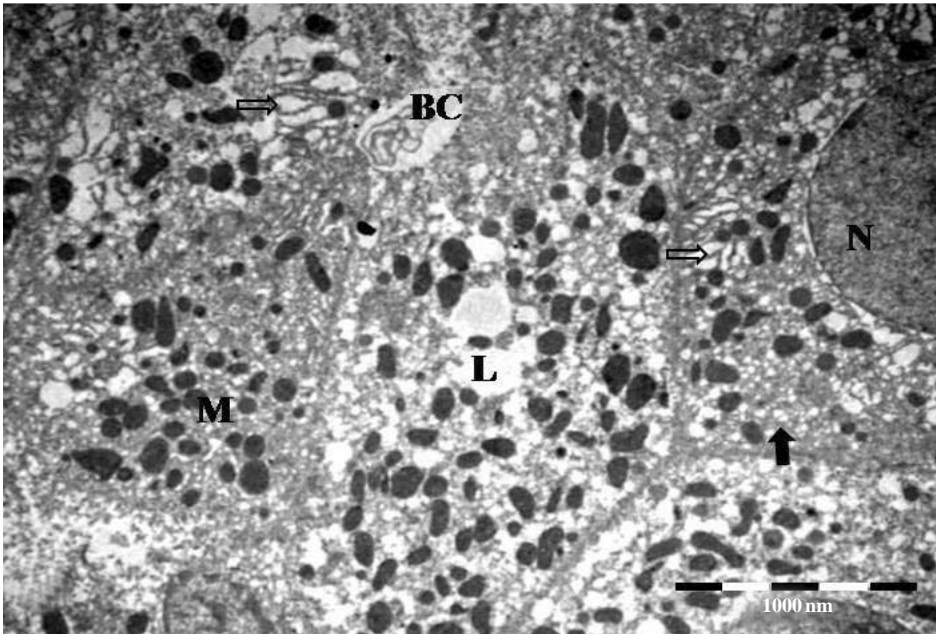


Fig. 4. Electron micrograph of hepatocytes from the control group. Dilated rough endoplasmic reticulum (hollow arrow) are observed. Hepatocytes shows markedly increased smooth endoplasmic reticulum (arrow). N: nucleus, M: mitochondria, L: lipid droplets.

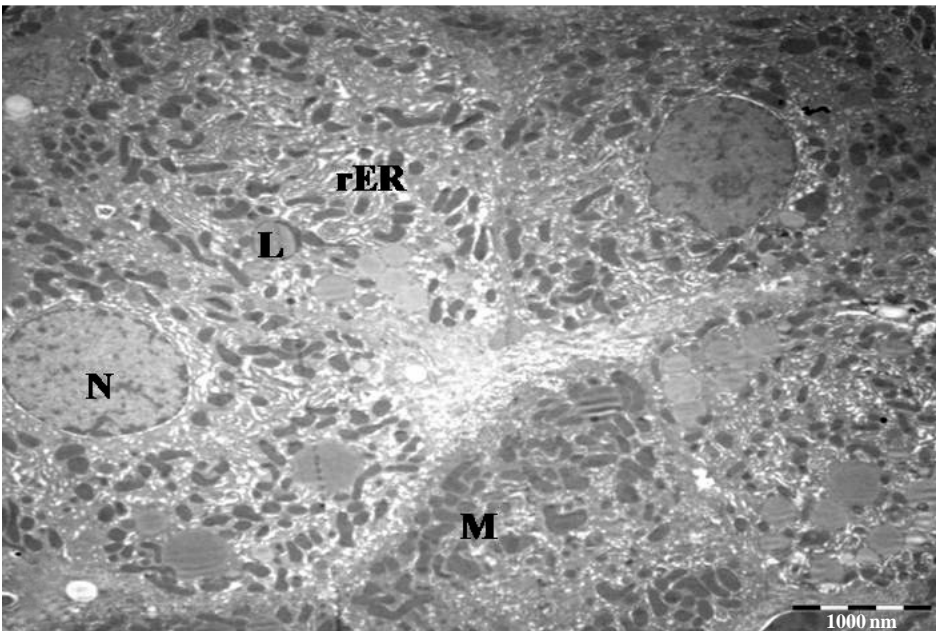


Fig. 5. Electron micrograph of hepatocytes from the IJH group. The cisternae of rough endoplasmic reticulum (rER) are less dilated compared with control group, and forms aggregates of parallel. N: nucleus, M: mitochondria, L: lipid droplets.

를 단독투여한 Con군의 간세포에서는 전체적으로 p53에 강한 면역반응성을 보이는 핵들이 다수 관찰되었다(Fig. 3b). 인진호탕 추출액을 투여한 IJH군의 간세포에서는 p53에 대하여 약한 면역반응성을 보이는 핵들이 일부에서만 관찰되었다(Fig. 3c).

4. 미세구조의 변화

NDEA는 다른 dialkylnitrosamine들과 같이, 많은 세월동

안 연구되어져온 잘 알려진 간 발암물질이다(Watanabe et al., 2005). Li et al. (2005)은 NDEA가 인간에서 양성종양의 여러 가지 모양들을 모방하는 병변을 유도한다고 하였다. NDEA는 free radicals의 과잉 생산을 유도하여 암 발생을 개시한다(Mulcahy & Gans, 1983). 또한 NDEA는 세포질세망의 기능적 변화를 야기하는 돌연변이원이다(Onishi et al., 2007). 이와 같이, 산화적 스트레스는 간암 발생과정에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며 여러 간 병리학적 보고서에서는 세포 구조의 주요한 변형이 관찰되었다

(Kus et al., 2005). 본 실험의 결과에서도 NDEA를 단독투여한 Con군의 핵에서 핵소체가 관찰되었고, 세포질에서 미토콘드리아와 무과립세포질세망 증가 및 지방적을 관찰하였다. 또한 핵 주변에 과립세포질세망은 층판구조를 이루지 않았으며 내강이 심하게 팽대한 채로 불규칙하게 흩어져 있었다. 그리고 담즙세관 주변에서는 분비세포들이 관찰되었다(Fig. 4). 그러나 인진호탕 추출액을 투여한 IJH군의 과립세포질세망은 내강이 다소 팽창되어 있었으나 층판구조의 배열을 형성하고 있었다. 세포질에서는 일부 지방적들이 관찰되기도 하였다(Fig. 5).

참 고 문 헌

- Bourdon JC, D'Errico A, Paterlini P, Grigioni W, May E, Debuire B: p53 protein accumulation in European hepatocellular carcinoma is not always dependent on p53 gene mutation. *Gastroenterology* 108 : 1176-1182, 1995.
- Chu CY, Tseng TH, Hwang JM, Chou FP, Wang CJ: Protective effects of capillarisin on tertbutylhydro-peroxide-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Arch Toxicol* 73 : 263-268, 1999.
- Collier JD, Carpenter M, Burt AD, Bassendine MF: Expression of mutant p53 protein in hepatocellular carcinoma. *Gut* 35 : 98-100, 1994.
- Deng HL, Zhang JT: Anti-lipid peroxidative effect of ginsenoside Rb1 and Rg1. *Chin Med J* 104(5) : 395-398, 1991.
- Dragan YP, Hully JR, Nakamura J, Mass MJ, Swenberg JA, Pitot HC: Biochemical events during initiation of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 15 : 1451-1458, 1994.
- Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M: Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312 : 646-649, 1984.
- Farber E: The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* 44 : 4217-4223, 1984.
- Greenblatt MS, Hollstein M, Harris CC: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54 : 4855-4878, 1994.
- Gutteridge JM, Beard AP, Quinlan GJ: Superoxide-dependent lipid peroxidation. Problems with the use of catalase as a specific probe for fenton-derived hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 117 : 901-907, 1983.
- Han KH, Jeon YJ, Athukorala Y, Choi KD, Kim CJ, Cho JK, Sekikawa M, Fukushima M, Lee CH: A water extract of *Artemisia capillaris* prevents 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced liver damage in rats. *J Med Food* 9 : 342-347, 2006.
- Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS, Baker SJ, Fearon ER, Vogelstein B, Levine AJ: Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Differ* 1 : 571-580, 1990.
- 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* 91 : 113-117, 2000.
- Jin H, Sakaida I, Tsuchiya M, Okita K: Herbal medicine Rhei rhizome prevents liver fibrosis in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Life Sci* 76 : 2805-2816, 2005.
- Kimura Y, Okuda H, Arichi S: Effects of geniposide isolated from *Gardenia jasminoides* on metabolic alterations in high sugar diet-fed rats. *Chem Pharm Bull* 30 : 4444-4447, 1982.
- Kiso Y, Ogasawara S, Hirota K, Watanabe N, Oshima Y, Konno C, Hikino H: Antihepatotoxic principles of *Artemisia capillaris* buds. *Planta Med* 50 : 81-85, 1984.
- Kovalszky I, Szeberenyi S, Zalutnai A, Vincze I, Lapis K, Jeney A: Modification of DENA-induced hepatocarcinogenesis by CCl₄ cirrhosis. Comparison of the marker enzyme patterns. *Carcinogenesis* 13(5) : 773-778, 1992.
- Kus I, Ogeturk M, Oner H, Sahin S, Yekeler H, Sarsilmaz M: Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. *Cell Biochem Funct* 23 : 169-174, 2005.
- Lee J, Chae K, Ha J, Park BY, Lee HS, Jeong S, Kim MY, Yoon M: Regulation of obesity and lipid disorders by herbal extracts from *Morus alba*, *Melissa officinalis*, and *Artemisia capillaris* in high-fat diet-induced obese mice. *J Ethnopharmacol* 115 : 263-270, 2008.
- Legros Y, Meyer A, Ory K, Soussi T: Mutations in p53 produce a common conformational effect that can be detected with a panel of monoclonal antibodies directed toward the central part of the p53 protein. *Oncogene* 9 : 3689-3694, 1994.
- Li X, Zhou XP, Guan YS, Wang YX: Magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in Sprague-Dawley rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 4 : 427-432, 2005.
- Luo H, Lin S, Ren F, Wu L, Chen L, Sun Y: Antioxidant and antimicrobial capacity of Chinese medicinal herb extracts in raw sheep meat. *J Food Prot* 70 : 1440-1445, 2007.
- Matsuda H, Tomohiro N, Hiraba K, Harima S, Ko S, Matsuo K, Yoshikawa M, Kubo M: Study on anti-Oketsu activity of rhu-barb II. Anti-allergic effects of stilbene components from *Rhei undulati* Rhizoma. *Biol Pharm Bull* 24 : 264-267, 2001.
- Mori H, Xu QA, Sakamoto O, Uesugi Y, Ono Y, Koda A, Nishioka I: Immunological mechanisms of antitumor activity of some kinds of Chinese herbs: Meth A-induced delayed type hypersensitivity. *Jpn J Pharmacol* 48 : 37-46, 1988.
- Mulcahy LS, Gans JH: The fidelity of mouse liver mitochondrial DNA polymerase following long-term administration of carbon tetrachloride, diethylnitrosamine, or phenobarbital. *Mol Pharmacol* 24 : 329-335, 1983.
- Onishi M, Sokuza Y, Nishikawa T, Mori C, Uwataki K, Honoki K,

- Tsujiuchi T: Different mutation patterns of mitochondrial DNA displacement-loop in hepatocellular carcinomas induced by N-nitrosodiethylamine and a choline-deficient l-amino acid-defined diet in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 362 : 183-187, 2007.
- Peng CH, Huang CN, Wang CJ: The anti-tumor effect and mechanisms of action of penta-acetyl geniposide. *Curr Cancer Drug Targets* 5 : 299-305, 2005.
- Scherer E, Emmelot P: Kinetics of induction and growth of precancerous liver-cell foci, and liver tumor formation by diethylnitrosamine in the rat. *Eur J Cancer* 11 : 689-696, 1975.
- Seol HC, Suzuki M, Ohnishi-Kameyama M, Oh MJ, Kim HR, Kim JH, Nagata T: Extraction and identification of antioxidant components from *Artemisia capillaris herba*. *Plant Foods for Human Nutrition* 58 : 1-12, 2003.
- Tamano S, Merlino GT, Ward JM: Rapid development of hepatic tumors in transforming growth factor alpha transgenic mice associated with increased cell proliferation in precancerous hepatocellular lesions initiated by N-nitrosodiethylamine and promoted by phenobarbital. *Carcinogenesis* 15(9) : 1791-1798, 1994.
- Tan RX, Zheng WF, Tang HQ: Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Planta Med* 64 : 295-302, 1998.
- Tessitore L, Pani P, Dianzani MU: Mechanisms of the enhanced liver carcinogenesis by choline in female rats: delay in liver growth after partial hepatectomy and stimulation of 2-AAF mitoinhibition. *Carcinogenesis* 13(10) : 1929-1932, 1992.
- Volkman M, Hofmann WJ, Müller M, Räh U, Otto G, Zentgraf H, Galle PR: p53 overexpression is frequent in European hepatocellular carcinoma and largely independent of the codon 249 hot spot mutation. *Oncogene* 9(1) : 195-204, 1994.
- Watanabe S, Horie Y, Suzuki A: Hepatocyte-specific Pten-deficient mice as a novel model for nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 33 : 161-166, 2005.
- Yamahara J, Kobayashi G, Matsuda H, Katayama T, Fujimura H: The effect of scoparone, a coumarin derivative isolated from the Chinese crude drug *Artemisiae capillaris flos*, on the heart. *Chem Pharm Bull* 37 : 1297-1299, 1989.
- Yamahara J, Yamada T, Kimura H, Sawada T, Fujimura H: Biologically active principles of crude drugs. II. Anti-allergic principles in "Shoseiryu-To" anti-inflammatory properties of paeoniflorin and its derivatives. *J Pharmacobiodyn* 5 : 921-929, 1982.
- Yoshikawa T, Murakami M, Yoshida N, Seto O, Kondo M: Effects of superoxide dismutase and catalase on disseminated intravascular coagulation in rats. *Thromb Haemost* 50 : 869-872, 1983.

< 국문초록 >

본 실험은 N-nitrosodiethylamine (NDEA)와 사염화탄소(CCl₄)로 유발된 흰쥐의 간암에 대한 인진호탕의 효과를 알아보고자 하였다. 먼저 실험군 설정은 세 군으로 분류하였다. 정상군(Nor)에는 일반적인 식이를 공급하였고, 대조군(Con)에는 NDEA(200 mg/kgb.w., i.p.)와 CCl₄를 투여하였고, 인진호탕 추출액 투여군(IJH)에는 인진호탕 추출액(260 mg/kg/day)을 8주 동안 투여하였다. Superoxide dismutase (SOD)와 catalase와 같은 항산화계 효소를 측정된 결과, SOD의 활성은 Con군에서 증가하였으나, catalase의 활성은 Con군에서 감소하였다. 면역조직화학적 관찰에서, 인진호탕 추출액의 투여로 인해 Con군에서보다 p53 면역반응을 감소시켰다. 전자현미경 관찰의 경우, 간암 세포들은 Con군에서 과립세포질세망의 팽대와 무과립세포질세망의 증가가 뚜렷하게 관찰되었다. 이상의 결과로 보아 인진호탕 추출액 투여가 NDEA와 사염화탄소로 유도된 흰쥐의 간암을 억제 또는 지연하는 것으로 사료된다.