

加味清肝湯이 N-nitrosomorpholine으로 誘導된 前癌性肝病變에 미치는 영향

김동희* · 최정목¹ · 조동일

대전대학교 한의과대학 한방병리학, 1:대전보건대학

Effect of Kamicheonggan-tang on Pre-hepatocarcinogenesis Induced by N-nitrosomorpholine

Dong Hee Kim*, Jeung Mok Choi¹, Dong il Jo

Department of Pathology, college of Oriental Medicine, Daejon University, 1:Daejon Health college

The purpose of this study was to evaluate the protective effect of Kamicheonggan-tang(KCGT) on pre-hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine. The studied using blood chemistry, lipidperoxidation, antioxidant, immunohistochemistry and morphological change. The results were obtained as follows. In the pre-hepatocarcinogenesis induced by NMP, serum AST, ALT, ALP and total bilirubin were not changed in NMP and NK treated group after 1st week, but decreased in NK treated group after 4th week as compared with NMP treated 4th week group. The content of GSH was similar to in NK treated groups as compares with data of normal group. The content of MDA was increased in NK treated group after 1st and 4th week, and more increased in the NMP treated group than those of their NK treated group. The immunohistochemically, stain of GST-p, positive lesions of KCGT were significantly decreased than those of NMP treated group. The histopathologically, fat changes, nucleotic changes, oval cell and inflammatory cells in periportal were observed in NMP treated fater 4th week, but those were significantly decreased from 4th week in the NK treated group. And the enlarged nucleus was not changed in KCGT treated group, but increased in NMP treated group after 1st and 4th week. The ultrastructurally, nucleotic changes, glycogen degeneration, lipid droplet and rER fragmentation were observed in NMP treated group after 4th week, but those changes were significantly decreased from 4th week in the NK treated group. These results suggested that KCGT extracts has protective effect on prehepatocarcinogenesis by NMP, might be usefully applied for clinical treatment of hepatic disease and also it was necessary to do more studies about its mechanisms.

Key words : Kamicheonggan-tang(加味清肝湯), N-nitrosomorpholine, blood chemistry, GSH, MDA, GST-p

서 론

최근 過多한 스트레스와 飲酒, 各種 藥物의 誤濫用, 環境問題로 인한 中毒 등과 더불어 運動量의 減少로 인하여 肝癌을 비롯한 肝疾患의 發生이 날로 增加 趨勢에 있다¹⁾. 2000년 統計廳資料²⁾에 의하면 人口 10萬名 당 21名이 肝 및 肝內膽管의 惡性 新生物로 死亡하였다고 報告되었으며, 여기에 肝硬化나 肝炎 등의 기타 肝疾患으로 死亡한 數를 더하면 死因 3位를 차지할 정도

로 높다. 이는 全體 OECD 會員國중 結核과 함께 가장 높은 死亡 率을 점하고 있어 醫學界의 主要 課題로 남아 있다³⁾. 이러한 社會的 現實로 인하여 肝損傷에 대한 多樣한 研究가 進行되고 있는데, 최근에는 分子生物學의 發展과 더불어 細胞死滅 (apoptosis), 纖維化 關聯因子, 細胞 週期調節 遺傳子 및 腫瘍 抑制 遺傳子 등에 대한 研究²⁻⁶⁾가 活發하게 이루어지고 있으며, 이와 더불어 天然物에서 治療劑 開發을 위한 많은 研究와 投資가 이루어지고 있다. 韓醫學에서의 肝損傷은 肝積, 肝癰, 肥氣, 黃疸, 積聚, 鼓脹, 脇痛, 脹滿, 勞倦傷 및 酒傷 등의 範疇에서 取扱하고 있으며⁷⁻⁹⁾, <難經>¹⁰⁾의 “脾之積... 腹大如盤, 久不愈, 令人四肢

* 교신저자 : 김동희, 대전광역시 동구 용운동, 대전대학교 한의과대학
E-mail : dhkim@dju.ac.kr Tel : 042-280-2623
· 접수: 2002/06/05 · 수정: 2001/07/18 · 채택 : 2002/08/02

1) 통계청, http://www.nso.go.kr/cgi-bin/sws_999.cgi

不收, 發黃疸, 飲食不爲肌膚”, 《諸病源候論》¹¹⁾의 “診得肝積… 脇下痛引少腹 …… 身無膏澤, 喜轉筋, 爪甲枯燥”, 《聖濟總錄》¹²⁾의 “積氣在腹中, 久不差 … 致臟腑氣虛弱, 飲食不消, 按之其狀如杯盤畢結, 久不已, 令人身瘦而腹大, 至死不消”, 《肘後備急方》¹³⁾의 “…腹中有物如石 痛如刺 晝夜啼呼 不治之百日死” 등은 現在의 肝癌으로 인한 脇痛, 腹水, 黃疸 및 營養障礙 등의 病證과 類似하게 記述되어 있다. 따라서 現在 이러한 疾患 및 症狀에 사용된 藥物과 處方이 肝硬化, 肝癌 등으로 인한 肝損傷의 治療와 豫防을 위해 應用되고 있다. 本 試料인 加味清肝湯은 健脾理氣, 清熱解毒, 化痰軟堅法을 併用한 綜合 併用 投與群이 肝癌 治療에 가장 效果의이라는 理論¹⁴⁾에 準하여 虎杖根을 비롯한 清熱解毒藥에 活血化痰藥과 扶正藥을 配合하여 造成한 攻補兼用之劑이다. 本 實驗에서 使用한 N-nitrosomorpholine(NMP)은 Morpholine의 일종으로 아민 냄새를 가지며 여러 가지 染料를 녹이는 溶解濟나 부식방지제, 산화방지제, 殺蟲劑, 곰팡이 제거제, 除草劑 및 局所麻酔劑 등으로 널리 사용되고 있으며, 이들이 細菌이나 기타 작용에 의해 N-nitrosomorpholine으로 변환된다. 實驗의으로는 肝癌을 誘發할 때 "stop experimental model"에 사용되는 代表的인 發癌性 物質로, cytochrome p450(CYP2E1)계에 의해 活化되어 肝細胞內 DNA 鹽基에 作用함으로써 肝細胞癌을 誘發한다고 報告되고 있다¹⁵⁾. 따라서 本 研究에서는 肝硬化, 肝癌 등에 效果的인 治療 處方을 開發하기 위한 一環으로, NMP에 의한 初期 肝癌 誘發 過程에 加味清肝湯을 병용 投與하여 血清學的 變化를 中心으로 抗酸化, 免疫組織化學, 組織學的 및 微細構造的 變化 등을 조사한 結果 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

재료 및 방법

1. 動物 및 實驗群 選定

實驗 動物은 大韓實驗動物센터로부터 出生 5주된 Sprague-Dawley(SD)계 수컷 흰쥐를 分讓받아 溫度 (20°C ± 2°C)와 濕度 (60% ± 5%)를 維持하면서 體重 180g ± 10g 정도로 成長 飼育시켜 外觀上 活發하며 健康하다고 생각되는 個體들을 選別하여 實驗에 이용하였다. 對照群(NMP)은 리터 당 N-nitrosomorpholine (Sigma, U.S.A) 200mg/ l 濃度の 飲用水를 만들어 自由 飲用시켰고, 飼料는 一般 實驗 動物用 飼料를 食餌토록 하였다. KCGT 單獨 投與群은 製造된 藥劑를 一般 實驗 動物用 飼料에 0.5% 濃度로 混合하여 自由 食餌토록 하였다. NMP와 KCGT 併用 投與群(NK)에서는 藥劑가 添加된 同一한 飼料와 NMP가 포함된 飲用水를 自由 食餌토록 하였다. 正常群은 一般 飲用水와 飼料를 自由 食餌토록 하였다(Table 1).

Table 1. Experimental Group Design

Groups	Duration			
	1 week	2 week	4 week	Total
Normal	5	5	5	15
KCGT	6	6	6	18
NMP	6	6	8	20
NK	6	6	8	20

KCGT : Diet containing 0.5% KCGT, NMP : Drinking water containing 200mg N-nitrosomorpholine(200mg/ l water), NK : Diet containing 0.5% KCGT with drinking water containing 200mg N-nitroso morpholine

2. 試料 藥物

本 實驗에 使用한 加味清肝湯(Kamicheonggan-tang : 이하 KCGT라 칭함)의 構成 藥劑中 白花蛇舌草, 鬱金, 薑黃은 中國 上海中醫藥學院에서 直接 購入하여 使用하였고, 기타 構成 藥物은 大田大學校 附屬韓方病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였다. 處方 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다.

Table 2. Prescription of Kamicheonggan-tang

藥物名	生藥名	用量(g)
虎杖根	Polygoni Cuspidati Rhizoma	10
山豆根	Sophorae Tonkinensis Radix	10
龍膽	Gentianae Radix	3
大黃	Rhei Radix et Rhizoma	3
白花蛇舌草	Oldenlandiae Diffusae Herba	10
連翹	Forsythiae Fructus	3
黃芪	Astragali Radix	6
山楂子	Crataegii Fructus	6
赤芍藥	Paeonia Radix Rubra	6
茅根	Imperatae Rhizoma	6
鱉甲	Trionycis Carapax	3
薑黃	Curcumae Longae Rhizoma	6
鬱金	Curcumae Radix	3
當歸	Angelicae Gigantis Radix	3
紅參	Ginseng Radix	6
枸杞子	Lycii Fructus	6
五味子	Schizandrae Fructus	6
石菖蒲	Acori Graminei Rhizoma	6
柴胡	Bupleuri Radix	6
三七	Notoginseng Radix	3
牡丹皮	Moutan Cortex	4
總量		115

3. 試料의 製造

KCGT 2貼 分量(230g)에 蒸溜水 2,000ml을 添加하여 熱湯 抽出器에서 3時間 동안 抽出하여 抽出液을 얻고, 이를 吸入 濾過하여 濾液을 減壓蒸溜裝置(Rotary evaporator, Buchi 461, Switzerland)로 減壓 濃縮하고, 濃縮液을 다시 凍結 乾燥器(Freeze dryer, FDU-540, Eyela, U.S.A)를 이용하여 完全 乾燥하여 45.2g을 冷凍 保管하였으며, 實驗에 適當 溫度로 溶液을 製造하여 使用하였다.

4. 各種 血清成分 測定

血清中 total protein, total cholesterol, triglyceride, aspartate amino transferase (AST), alanine amino transferase(ALT) 및 Alkaline phosphatase(ALP) 활성치와 total bilirubin 含量은 自動生化學分析機(Express 550, Ciba-Corning Co., U.S.A)을 使用하여 測定하였다.

5. 抗酸化作用 測定

1) Reduced glutathion(GSH) 含量 測定

組織中の GSH 含量은 Ellman의 方法¹⁶⁾에 따라 測定하였다. 組織 마쇄균질액 일정량은 4% sulfosalicylic acid 0.5ml를 넣고 遠心分離한 다음 上層液 一定量을 0.1mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)를 含有한 0.1M 인산완충용액(pH 8.0)에 넣

고 반응시켜 생성된 ρ -nitrothiophenol의 흡광도를測定하였다. GSH 함량은組織 g당 μ mole로表示하였다.

2) Malondialdehyde(MDA)含量測定

組織中の過酸化脂質含量은 Ohkawa 등의方法¹⁷⁾에 따라測定하였다. 試料속의過酸化脂質은酸性條件下에서 2-thiobarbituric acid 溶液과加熱反應시켜생긴 MDA의 흡광도를 532nm에서測定하였다. MDA 함량은組織 g당 nmole로表示하였다.

6. 一般組織學的檢査

實驗動物은屠殺 12時間전에食餌를中斷시키고,空腹狀態에서 에테르吸入痲醉시킨다음腹部와胸廓을切開한뒤腹大動脈에서採血을實施하고,門靜脈을 통해冷生理食鹽水를 주사기를 이용하여適當한壓力로肝內 나머지血液을除去하였다. 摘出した肝은左,右葉一定部位를適當한크기로자른다음通常의方法에 따라 10% 中性 포르말린에 48時間 동안固定하고,組織內固定液除去를 위해 흐르는 물에水洗을 한 후, 60% 알콜濃도로부터濃度 상승순으로脫水하였다. 脫水過程 이후 toluene에透明過程을 거친 다음溶解된 파라핀에浸透 및 포매 과정을 거쳐블럭을製作하였다. 만들어진블럭은 4 μ m 두께로切片을 만들어一般的인變化를觀察하기 위해 hematoxylin과 eosin(H&E) 染色을實施하여光學顯微鏡下에서觀察 및寫眞撮影하였다.

7. 免疫組織化學的觀察

免疫組織化學的인觀察을 위해 파라핀블럭을 4 μ m 두께로切片을 만들어 silanized coating 슬라이드에附着한 다음 탈파라핀 및 합수 과정을 걸친 다음一般的인方法과同一하게 tris-buffer saline(TBS)로 5분간洗滌하였다. 免疫染色은 LSAB+kit(DAKO Co.)를 이용하였다. 먼저내재성 peroxidase의活性을抑制시키기 위해 3% H₂O₂로 5분간 방치시킨 다음 TBS로洗滌하였다. 使用한一次抗體는 전암성 병소의 지표로 (preneoplastic maker)로 사용되고 있는 태반형 glutathion S-transferase(GST-P, Rabbit polyclonal, Novocastra Lab Co.)를 1: 100으로稀釋하여室溫에서 2時間 동안反應시킨 다음 TBS로洗滌하였다. 1次 免疫反應이 끝난 다음連結抗體(link-antibody)로 biotinylated anti-mouse immunoglobulin에 15분간反應시켰다. TBS로洗滌한 다음 streptavidin conjugate에 15분간反應시킨 후 TBS로洗滌하고 DAB-chromogen에發色시킨 다음 Mayer hematoxylin에對照染色을 하여 gel/mount(Biomed, USA)에 봉입한 다음光學顯微鏡(Olympus BH-2, Japan)으로檢鏡하였다.

8. 變形된肝細胞核의數算定

變形된核의數는各實驗群과實驗期間에 따라製作된 H&E 一般染色된組織標本을 이용하여 1개의 slide 標本에서 4장씩(20~30장/실험군) 400倍率로無作為로寫眞撮影하여 4×5" 크기로인화하였다. 寫眞上에서正常群의平均核의크기(4.

5~5mm)보다直徑이 25~30% 以上(7mm이상)되는核의數를算定하여觀察되는總肝細胞核의數에서%로換算하였고,統計處理는 Student's t-test로 하였으며,有意水準은 0.05 以下로하였다.

9. 電子顯微鏡的觀察

摘出した肝組織은즉시 1×2×1.5mm 크기로細切한 다음, 2.5% glutaraldehyde (in 0.1M PBS, pH7.4)에 4℃에서 24時間固定하고,固定液除去를 위해 PBS 溶液에 약 20분씩 3회 反復洗滌하였다. 後固定으로 1% OsO₄에 2시간 동안固定하고 60% 알코올부터濃도 상승순으로탈수, 침투, 포매 및 열중합과정을 거쳐 Epon 混合物로블럭을製作하였다. 製作된블럭은초박절편기를 이용하여 1 μ m 두께로박절한 다음 0.5% toluidine blue로染色하여光學顯微鏡下에서微細觀察部位를選定하였다. 選定된組織部位는 80~90nm 두께로초박절편을 만들어 uranyl acetate 와 lead citrate 溶液에 2중電子染色을實施한 다음洗滌하고乾燥하여加速電壓 75Kv에서透過電子顯微鏡(Hitachi H-600, Japan)으로 관찰 및寫眞撮影하였다.

실험성적

1. 肉眼的 所見

各實驗動物은正常群과 KCGT 投與群에서는實驗期間 동안死亡없이健康하였고, NMP 投與群에서는實驗 2주째 1마리, 4주째에서 3마리가死亡하였고, NK 併用 投與群에서는 2주째 1마리, 4주째에 1마리씩死亡하였다. 肝의外形的 所見으로는 NMP 投與群에서만實驗 4주째에一部の肝에서正常群보다表面이 다소 거칠게觀察되었다.

2. 血清 生化學的 檢査 結果

1) AST 활성치에 미치는影響

血清中 AST의 활성치 변화는正常群은實驗 기간에 따라 약간增加하였으며, KCGT 投與群에서는正常群과比較하여 약간 낮게測定되었다. NMP 投與群에서는實驗 1주와 4주에서實驗期間에 따라顯著히增加하였고, NK 投與群에서는實驗 1주에서는 NMP 投與群과 비슷한結果値를 보였으나,實驗 4주에서는顯著히減少하였다(Table 2).

2) ALT 활성치에 미치는影響

血清 ALT 활성치 변화는正常群에서는實驗 1주에서보다實驗 4주에서 약간增加하였다. 반대로 KCGT 投與群에서는實驗 1주와 4주의實驗期間에 따라減少하였다. NMP 投與群에서는實驗 1주이 비해 4주에서實驗期間에 따라顯著히增加하였고, NK 投與群에서는實驗 1주에서는 NMP 投與群에 비해 다소 높은數値를 보였으나,實驗 4주에서는顯著히減少하였다(Table 3).

3) ALP 활성치에 미치는影響

血清 ALP 활성치 변화는正常群에서는實驗 1주와 4주에

따라 實驗 期間이 比例하여 增加하였고, KCGT 投與群에서도 비슷한 結果値와 變化 樣相을 보였다. NMP 投與群에서는 實驗 1주와 4주의 實驗 期間에 따라 顯著히 增加하였다. NK 投與群에서는 實驗 1주에서는 NMP 投與群과 비슷한 數値를 보였으나, 實驗 4주에는 NMP 投與群과 比較하여 減少하였다(Table 3).

4) Total bilirubin 含量 變化에 미치는 影響

血清中 total bilirubin 含量을 測定한 結果, 正常群은 각 實驗 기간에 따라 비슷하였고, KCGT 投與群에서도 비슷한 結果値와 變化 樣相을 보였다. NMP 投與群에서는 實驗 1주에서는 正常群과 KCGT 投與群과 比較해 높은 數値를 보였고, 實驗 4주에서도 현저히 增加하였다. NK 投與群에서는 實驗 1주에서는 NMP 投與群과 類似하였으나 實驗 4주에서는 NMP 投與群과 比較하여 顯著히 減少하였다(Table 3).

Table 3. Changes of Serum enzyme activity in KCGT and NMP treated Rats

		Normal	KCGT
AST (Karmen unit/ml)	1w	95.2 ± 10.7	96.8 ± 14.7
	2w	102.3 ± 13.4	95.0 ± 11.4
	4w	101.5 ± 11.5	91.3 ± 15.9
ALT (Karmen unit/ml)	1w	44.7 ± 5.4	51.2 ± 6.7
	2w	42.1 ± 6.7	52.5 ± 9.4
	4w	53.7 ± 8.1	37.7 ± 6.2
ALP (KA unit)	1w	258.9 ± 31.4	286.7 ± 69.4
	2w	336.7 ± 44.8	402.3 ± 89.2
	4w	384.2 ± 47.2	387.3 ± 79.6
Total bilirubin (mg/dl)	1w	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.07
	2w	0.16 ± 0.03	0.14 ± 0.05
	4w	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.05
		NMP	NK
AST (Karmen unit/ml)	1w	162.3 ± 13.4	164.3 ± 23.6
	2w	202.9 ± 23.1	187.9 ± 18.1
	4w	547.2 ± 29.2	243.9 ± 23.1
ALT (Karmen unit/ml)	1w	134.8 ± 13.1	154.2 ± 16.4
	2w	249.3 ± 13.4	168.5 ± 23.1
	4w	387.5 ± 36.8	158.8 ± 29.6
ALP (KA unit)	1w	449.7 ± 43.4	509.5 ± 49.2
	2w	964.3 ± 119.2	802.7 ± 113.4
	4w	1528.7 ± 183.4	1118.2 ± 123.7
Total bilirubin (mg/dl)	1w	0.23 ± 0.09	0.21 ± 0.08
	2w	0.41 ± 0.12	0.33 ± 0.10
	4w	1.62 ± 0.32	0.65 ± 0.05

Values are Mean±S.D.

3. GSH 含量 變化에 미치는 影響

組織內 GSH 含量을 測定한 結果, 正常群은 實驗 1주와 4주에서 各各 4.16±0.15와 4.14±0.33 μ moles/g로 實驗 期間에 따라서도 비슷하였고, KCGT 投與群에서도 비슷한 結果値와 變化 樣相을 보였다. NMP 投與群에서는 實驗 1주에서 6.71±0.15 μ moles/g로 正常群과 KCGT 投與群과 比較해 높은 數値를 보였고, 實驗 4주에서는 2.44±0.15 μ moles/g로 顯著히 減少하였다. NK 投與群에서는 實驗 1주에서는 5.88±0.15 μ moles/g로 正常群과 KCGT 投與群과 比較해 약간 높은 數値를 보였고, 實驗 4주에서는 4.28±0.15 μ moles/g로 正常群과 비슷한 結果値를 보였다(Fig. 2).

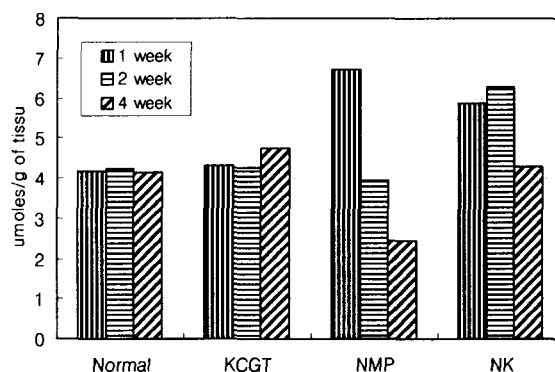


Fig 1. Effects of KCGT on GSH Activity in NMP-treated Rats

4) MDA 含量 變化에 미치는 影響

組織內 MDA 含量을 測定한 結果, 正常群은 實驗 1주와 4주에서 各各 2.13±0.15와 2.34±0.13nmol/g으로 實驗 期間에 따라서도 비슷하였고, KCGT 投與群에서도 비슷한 結果와 變化 樣相을 보였다. NMP 投與群에서는 實驗 1주와 4주에서 各各 3.13 ± 0.22와 6.48±0.35nmol/g으로 현저히 增加하였다. NK 投與群에서는 實驗 1주와 4주에서 各各 3.33±0.31과 4.47 ± 0.36nmol/g으로 약간 增加되었으나 NMP 投與群과 比較하여 增加幅은 減少하였다(Fig. 2).

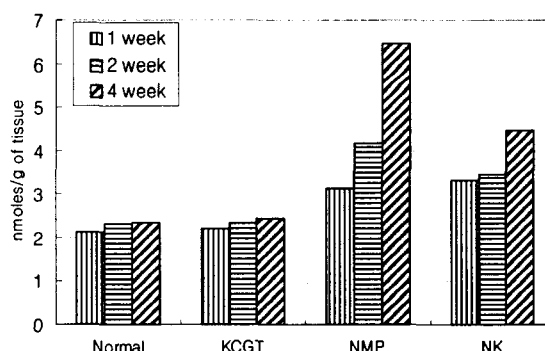


Fig. 2 Effects of KCGT on MDA Level in NMP-treated Rats

5) 一般 組織學的 觀察

正常群에서 觀察된 肝의 組織學的 所見으로는 中心 靜脈을 중심으로 肝細胞들은 放射狀으로 배열하고 있고, 門脈域을 中心으로 한 典型的인 간소엽 構造가 잘 觀察되었다(Fig. 3). KCGT 投與群 1주, 2주 및 4주(Fig. 4)에서도 正常群과 類似한 肝小葉 構造를 하고 있으며, 어떠한 損傷도 確認할 수 없었다. NMP 投與群에서는 1주에서 肝實質의 小葉 形態는 어느 정도 維持하면서 약간의 變化가 觀察되었다. 中心靜脈 周邊에서 局所 多發의 好酸性 細胞(eosinophilic cell)들이 觀察되고, 일부 肝細胞들에서는 正常 肝細胞의 核 크기 보다 다소 큰 核을 가지는 細胞들도 小數 觀察되었다. 4주에는 實質 細胞들의 크기가 대소 부동형을 가지면서 肝小葉 構造는 많은 變形을 보였다. 일부 肝細胞들에서는 好酸性 變성과 細胞質內에는 크고 작은 지방적들이 觀察되었고, 核의 變化가 심하였다. 核은 400倍率의 사진상에서 正常群과

KCGT 投與群에서는 4~5mm의 直徑을 가지고 있었으나, NMP 投與群에서는 다양한 크기로서 큰 것은 11~13mm의 大形 核들도 다수 觀察되었고, 이들 변형된 大形核을 가지는 細胞들은 實驗 期間에 비례하여 數가 增加되었다. 門脈域 周邊에서는 2주와 4주에서 時間에 따라 炎症 細胞의 양이 점차 增加됨을 觀察할 수 있었다(Fig. 5).



Fig. 3. Light micrographic observation of normal rat liver, H&E, ×100

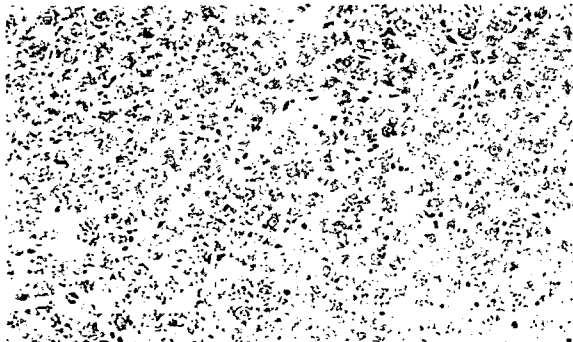


Fig. 4. Light micrographic observation of liver at 4 week after KCGT treated group, H&E, ×100

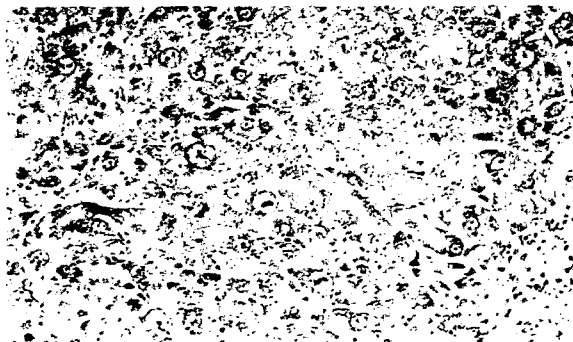


Fig. 5. Light micrographic observation of liver at 4 week after NMP treated group, H&E, ×100

NK 投與群에서는 NMP 投與群과 비슷한 所見으로 一部 細胞들에서 好酸性 細胞, clear cytoplasm을 가지는 細胞, 膨脹된 核들이 實驗기간에 비례하여 수가 增加되었으나 增加 정도는 NMP 投與群에 비해 현저히 減少되었다. 특히 實驗 4주에서는 NMP 投與 4주에서 觀察되는 細胞質內 지방質, 核의 크기 및 주변 門脈域에서 炎症 細胞들도 顯著히 減少되거나 觀察되지 않았다(Fig. 6).

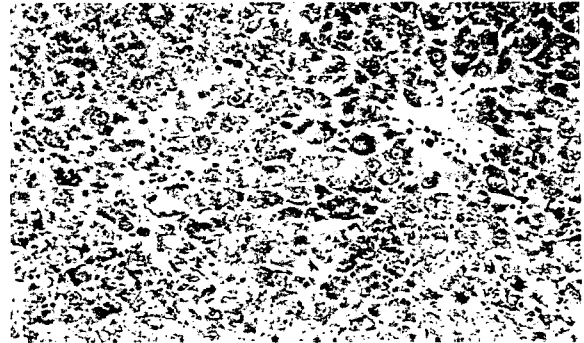


Fig. 6. Light micrographic observation of liver at 4 week after NMP with KCGT treated group, H&E, ×100

6) 免疫 組織化學的 觀察

GST-P 抗體는 흰쥐의 정상 실질 肝細胞에서는 發顯되지 않으나 化學的 肝細胞癌 誘導 過程에서 肝細胞癌의 전암성 병소에서는 현저히 높게 發現됨으로서 전암성병소(preneoplastic foci)의 指標 物質로 使用되고 있다. GST-P 免疫 染色 結果, 正常群과 KCGT 投與群에서는 肝實質 細胞에서는 陰性이고, 동양혈관(sinusoid)과 門脈域의 담소관에서만 약한 陽性 反應이 觀察되었다(Fig. 7).

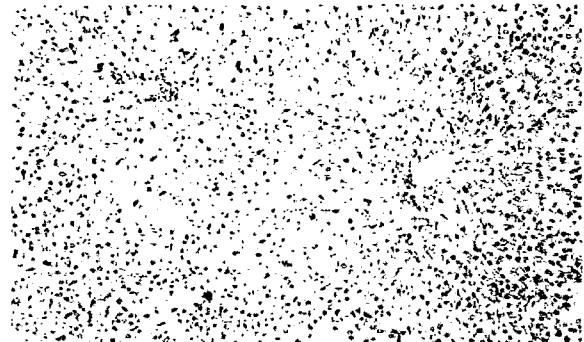


Fig. 7. Immunohistochemical staining of GST-P in the liver at 4 week after KCGT treated group, Also, GST-P was expressed in the bile ductular lining epithelial cells. LSAB-peroxidase stain, ×100

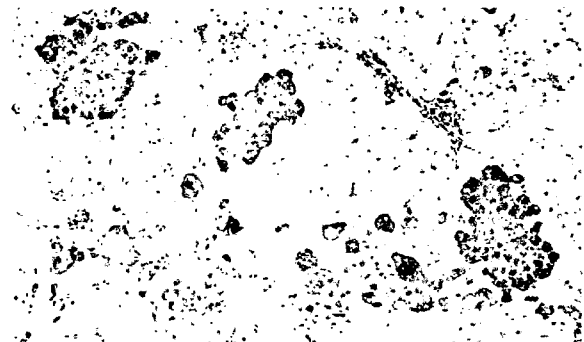


Fig. 8. Immunohistochemical staining of GST-P in the liver at 4 week after NMP treated group, GST-P was expressed in the hyperplastic nodule, LSAB-peroxidase stain, ×100

NMP 投與群에서는 實驗 1주에서는 중심 정맥과 문맥 주변에서 단독 혹은 3개 미만의 肝細胞들에서만 染色을 보이다가 實

驗 期間에 비례하여 결절소를 形成하면서 강한 陽性 反應을 보였다. 實驗 4주에서는 단독 세포 形態보다는 多樣한 크기의 군집을 形成한 集團의 陽性 反應의 出現 頻도가 많았다(Fig. 8). NK 投與群에서는 實驗 1주에서는 中心 靜脈 부근의 肝實質 細胞들에서 단독 세포 形態로만 陽性으로 보이다가 實驗기간에 비례하여 20여개의 미만의 陽性 反應 細胞들로 構成된 群集들이 觀察되며, 時間 經過에 따라 比較할 때 NMP 投與群에 비해 陽性 發顯 정도는 顯著히 減少하였다(Fig. 9).

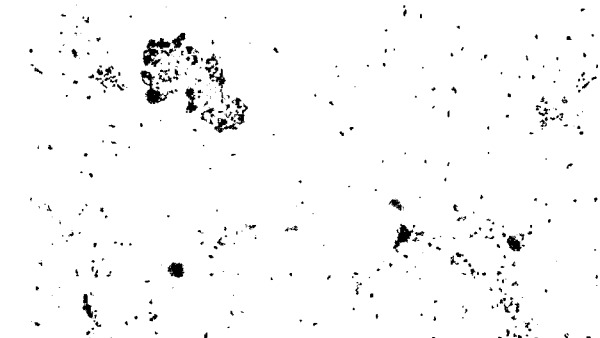


Fig. 9. Immunohistochemical staining of GST-P in the liver at 4 weeks after NMP with KCGT treated group, Positive areas were decreased compared to those of NMP treated 4 week group

7) 變形된 肝細胞 核의 數的 變化

各 實驗群에서 光學顯微鏡上 400 배율로 撮影한 후 4×5" 크기로 인화하여 사진상에서 核의 數的 變化를 觀察한 結果, 正常群과 KCGT 投與群에서는 1주 2주 및 4주에서 調査된 核의 크기는 實驗 期間에 따라서는 變化가 없었고, 平均 크기는 4.5~5mm 정도였다. 變形된 核의 增加는 正常群의 平均 核 크기보다 直徑이 약 25% 이상 增加된(7mm이상)되는 核의 수를 算定하였다(Fig. 10). NMP 投與群에서는 實驗 1주와 2주에서는 최대 크기가 10mm미만(평균 7.5~8.5mm)이었으나, 實驗 4주에서는 10~13mm 정도의 大形 核들이 다수 觀察되었다(Fig. 11). 이와는 달리 NK 投與群에서 핵 크기는 NMP 投與群과 比較하여 크기의 增加 정도는 減少하였고, 實驗 4주에서 최대 直徑이 10mm 이상 되는 核의 수는 NMP 投與群과 比較하여 顯著히 減少하였다(Fig. 12). 各 實驗群別 核 크기의 變化 정도는 Table 4와 같다.

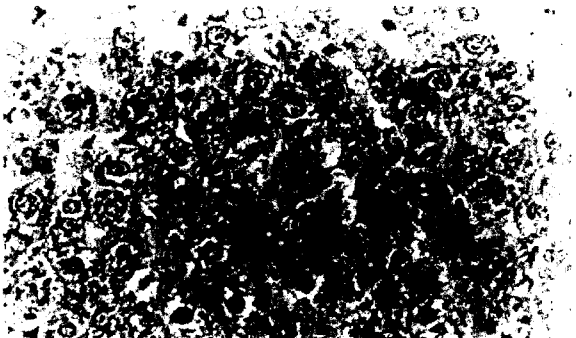


Fig. 10. Light micrographic observation of liver at 4 week after KCGT treated group, H&E, ×400, Size of nucleus were similar to normal hepatocyte nucleus.

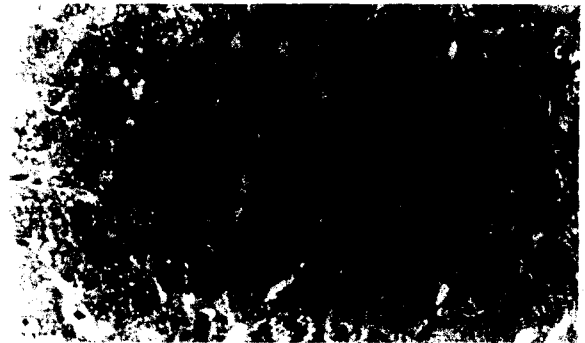


Fig. 11. Light micrographic observation of liver at 4 week after NMP treated group, H&E, ×400. Enlarged nucleus were observed

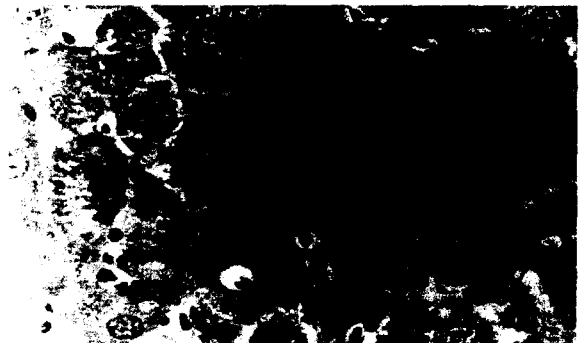


Fig. 12. Light micrographic observation of liver at 4 week after NMP with KCGT treated group, H&E, ×400 Number of enlarged nucleus were decreased compared to those of the NMP 4th week group.

Table 4. Number of Enlarged Nuclei in Liver Among the Experimental Groups

	Normal	KCGT	NMP	NK
1 week	0	0	22.5 %	12.1 %
2 week	0	0	37.7 %	26.0 %
4 week	0	0	72.7 %	47.2 %

Number of enlarged nuclei / total nuclei of hepatocyte = %

8) 電子顯微鏡의 觀察

正常 對照群에서 觀察된 肝細胞의 核은 둥글며 2종의 染色 質이 잘 관찰되고 一部에서는 核小體가 보이지 않거나 작게 觀察되었다. 細胞質에는 구형 및 난원형의 많은 사립체, 산포된 당 원과립, 비교적 規則的인 配列을 하고 있는 조면 내형질세망, 과 산화소체 및 소수의 용해소체들이 잘 觀察되었다. 담모세관의 내 강은 좁고 內部에는 많은 일정한 크기의 미소용모들이 보이고 이웃하는 세포들 사이에서는 교소체(desmosome)를 形成하고 있으며, 막에는 막함입(membrane infolding) 構造物도 觀察되었다(Fig. 13). KCGT 投與群에서는 肝細胞 核의 形態는 正常 細胞와 同一하였다. 細胞質에서도 類似한 觀察 所見을 보였으나, 實驗 期間에 따라서 細胞質內 약간의 자유 리보솜 및 지방소적이 증가하였다(Fig. 14). NMP 投與群에서는 實驗 1주에서는 일부 核은 다소 不規則한 形態를 보이기 시작하였고, 染色質은 부분적으로 심하게 濃축과 核小體(nucleoli)의 發達이 觀察되었다. 細胞質에서 特徵的 變化로 조면 내형질세망의 배열이 불규칙하고 일부는 단절되기도 하며, 주변에는 많은 자유 리보솜, 그리고 다수의 지방소체들이 觀察되었다(Fig. 15).

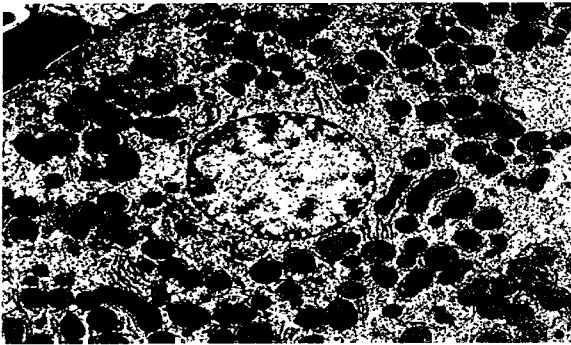


Fig. 13. Electron micrograph of the hepatocyte in normal group. Uranyl acetate and Lead citrate stain, ×6,000, The number of mitochondria and rough endoplasmic reticulum(rER) were observed.

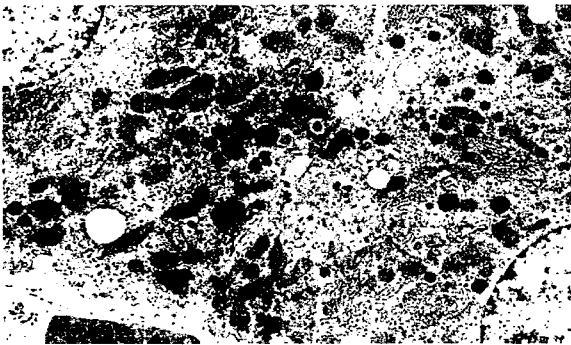


Fig. 14. Electron micrograph of the hepatocytes after 4th week treated with KCGT. Uranyl acetate and Lead citrate stain, ×6,000. Small lipid droplet was found in the cytoplasm of hepatocyte

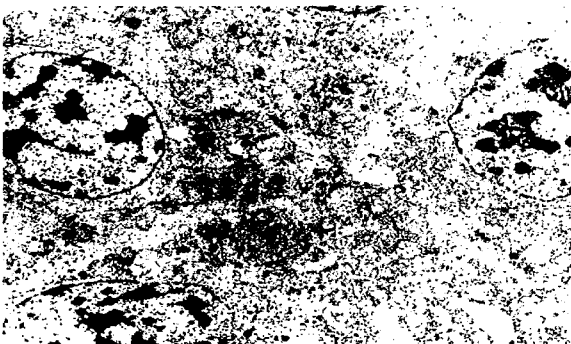


Fig. 15. Electron micrograph of the hepatocytes after 1st week treated with NMP. Uranyl acetate and Lead citrate stain, ×6,000. Arrangement of rER were fragmented and detached of ribosome, and nucleus was irregular shaped.

實驗 期間에 따라서 核과 細胞質에서는 變化가 심하였다. 實驗 4주에서는 一部 核은 심한 膨脹과 불규칙한 外形을 하고, 核 内部에는 多數의 核小體와 지방소적들도 포함하여 核의 變化가 심하였다. 細胞質에서는 一部에서는 核周邊에서 糖원과립의 蓄積과 消失로 인한 細胞 小機關들이 없는 透明한 形態를 하고 있고, 사립체 크기도 不均衡하며, 다수의 지방소적, 분절된 조면 내형질세망의 불규칙한 배열들이 특징적으로 관찰되었다(Fig. 16). NK 投與群에서는 實驗 1주와 2주에서 一部 肝細胞의 核은 크기와 핵소체수도 다소 증가되었으나 NMP 投與群과 比較하여 染色質의 濃縮과 불규칙한 정도는 심하지 않았다. 細胞質에서도 조

면 내형질세망의 배열이 다소 불규칙하나 기타 세포소기관과 지방소적의 변화는 관찰할 수 없었다. 實驗 4주에서 핵은 불규칙한 외형과 핵소체의 發達이 觀察되나 지방소적들은 포함하고 있지 않았다. 細胞質에서도 糖원과립의 변성, 지방소적의 축적 및 조면 내형질세망의 분절 등 일련의 변화는 NMP 投與群과 比較해서 경미하였다(Fig. 17).

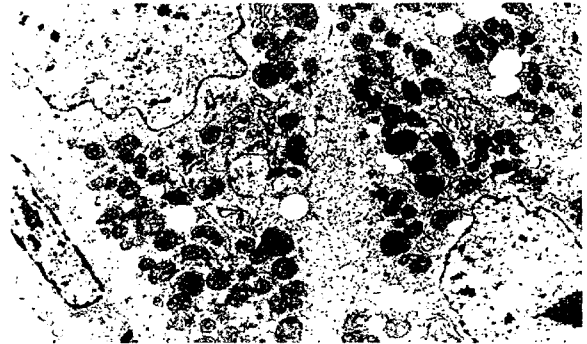


Fig. 16. Electron micrograph of the hepatocytes after 4th week treated with NMP. Uranyl acetate and Lead citrate stain, ×6,000. Nucleus of hepatocyte was more irregular shaped, and accumulation of lipid droplet like were founded in the nucleus and cytoplasm of hepatocyte.

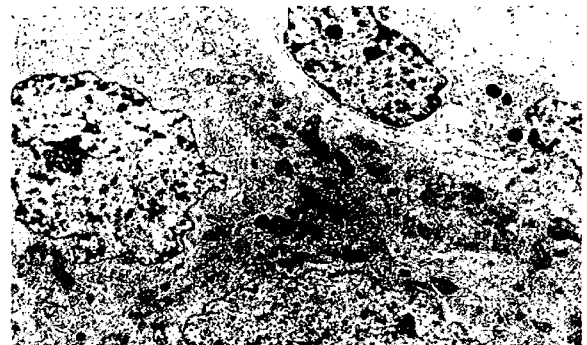


Fig. 17. Electron micrograph of the hepatocytes after 4th week treated with KCGT and NMP. Uranyl acetate and Lead citrate stain, ×6,000. Nucleus of hepatocyte was irregular shaped

고 찰

最近 現代 社會의 複雜性으로 인한 過多한 스트레스와 飲酒, 인스턴트 爲主의 食生活, 各種 藥物의 誤濫用, 環境問題로 인한 中毒 및 運動量의 減少 등으로 인해 各種 肝疾患이 增加 趨勢에 있다¹⁾. 2000년 統計廳 資料^{1>}에 의하면 肝, 肝內膽管의 惡性 新生物과 肝硬化, 肝炎 등의 肝損傷으로 인한 死亡者 數가 循環器, 新生物 疾患에 이어 死因 3위를 차지한다고 報告되었다. 이러한 數値는 全體 OECD 會員國중 結核과 함께 가장 높은 死亡率로 이에 대한 治療 對策이 國家의 關心事가 되고 있다.¹⁾ 肝損傷中 높은 死亡率을 나타내는 肝硬變은 여러가지 疾患에 의해 나타나는 慢性的인 肝損傷의 結果로서, 肝의 構造에 可逆性으로 非可逆性的인 變化를 招來하고 纖維增殖과 結節性 再生을 特徵으로 한다. 原因은 B, C型 肝炎 바이러스, 慢性 自家免疫性 肝炎, 藥物, 알콜,

1) 통계청, http://www.nso.go.kr/cgi-bin/sws_999.cgi

膽道 閉鎖性 疾患 및 혈색소증 등이 原因이 되고 있다. 특히 肝 硬變의 一部는 전구암 病變으로 알려져 있으며, B·C型 肝 炎 바 이러스에 의한 肝 硬變症에서 肝 癌의 發生率이 높다고 報告되고 있다^{2,3,18}. 男性에서 3위, 女性에서 4위의 發生率을 점하고 있는 肝 癌은 크게 肝의 實質細胞에서 起源하는 肝의 新生物을 肝細胞 癌(hepatocellular carcinoma)이라 하고 小管細胞에서 起源하는 新生物을 膽管癌(cholangio carcinoma)이라 한다¹⁸. 韓醫學에서 肝 損傷은 風·寒·濕·熱 등의 外邪의 直接的 侵入과 多樣한 內 因에 의하여 肝의 主作用인 疏泄作用과 藏血作用의 失常으로 일 어나며, 肝 炎, 肝 硬化 및 肝 癌으로 인한 肝 損傷은 주로 肝 熱, 勞 倦傷, 黃 疸, 脇 痛, 積 聚, 鼓 脹, 酒 傷 등의 範疇에서 다루어지고 있 다^{7,9}. 一例로 《靈樞》¹⁹〈論疾診尺論〉의 “身痛而色微黃 齒垢 黃 爪甲上黃 黃疸也”, 《素問》²⁰〈刺熱篇〉의 “肝熱病者 小便 先黃 腹痛 多臥 身熱” 등은 오늘날 肝 炎으로 인한 症狀과 類似하 게 表現되었으며, 《靈樞》¹⁹〈水脹篇〉의 “腹脹 腫而大…色蒼 黃 腹筋起…”, 《傷寒論》²¹의 “黑瘰其腹脹如水狀 大便必黑 時 溲腹滿者難治” 등은 黃疸와 腹水를 同伴한 肝 硬化 末期의 症狀 과 類似하게 表現되었다. 또한 《難經》¹⁰의 “脾之積… 腹大如 盤, 久不愈, 令人四肢不收, 發黃疸, 飲食不爲肌膚”, 《諸病源候論 》¹¹의 “診得肝積… 脇下痛引少腹 …… 身無膏澤, 喜轉筋, 爪甲枯 黑”, 《聖濟總錄》¹²의 “積氣在腹中, 久不差 … 致臟腑氣虛弱, 飲 食不消, 按之其狀如杯盤卑結, 久不已, 令人身瘦而腹大, 至死不 消”, 《肘後備急方》¹³의 “… 腹中有物如石 痛如刺 晝夜啼呼 不 治之百日死” 등은 現在의 肝 癌으로 인한 脇 痛, 腹 水, 黃 疸 및 營 養障礙 등의 病症과 類似하다고 볼 수 있다. 따라서 이러한 疾患 및 症狀에 사용된 藥物과 處方이 現在 肝 硬化, 肝 癌으로 인한 肝 損傷의 治療와 豫防을 위해 應用되고 있으며, 이 밖에도 禁酒鍼 을 이용한 肝機能改善에 대한 研究²²도 活發하게 이루어지고 있다. 肝 癌의 發生은 身體 다른 組織이나 臟器들과 類似하게 여 러 發癌 段階를 거쳐 形成되며, 肝 炎, 肝 纖維化, 肝 硬化 및 惡 性 腫瘍으로 發生되고 終局에는 轉移까지 일어난다^{1,18}. 大部分의 肝 癌은 늦게 發見되는 경우가 많아 극히 드문 경우에 手術의인 方 法이 施術된다. 放射線 療法이나 抗癌劑는 아직은 肝 癌에는 特別 한 效果가 없는 것으로 報告되고 있으며, 最近에는 肝動脈 塞栓 術(hepatic artery embolization)이 切除 不可能한 肝 癌 患者에서 生存率을 增加시키는 效果가 있는 것으로 알려져 있다²³. 이러한 現實의인 問題로 肝 癌에 대한 多樣한 研究가 進行되고 있는데, 最近에는 分子生物學의 發展과 더불어 細胞死滅(apoptosis), 纖 維化 關聯因子, 細胞 週期 調節遺傳子 및 腫瘍抑制 遺傳子 등에 대한 研究^{2,6}가 活發하게 이루어지고 있다. 本 實驗에서는 NMP 에 의한 發癌 動物 病態 모델을 사용하여 血清內 臨床化學指數, 抗酸化物(GSH), 脂質過酸化物(MDA) 變化, 免疫組織化學的 變化 및 組織·微細構造的 變化 등에 미치는 影響을 評價하였다. 원취 를 이용한 實驗의 肝 癌 모델은 사람과 많은 類似성을 보인다는 점에서 使用되고 있는데, 本 實驗에서 使用한 NMP에 의한 發癌 病態 모델은 Bannasch 등이 開發한 모델^{24,25}이다. 이는 試料를 數周間 投與한 다음 中斷하고 다시 發癌 物質이 없는 基礎 飼料 를 投與하는 方法(stop model)으로 肝細胞癌腫을 形成한다. 특히

肝細胞癌腫은 東部 亞細亞를 비롯해 아프리카 등에서 높은 發生 率을 보이며, 우리나라에서도 胃癌과 더불어 높은 發生 頻度를 보이고 있어, NMP에 의한 發癌 病態 모델은 肝 癌 研究에 適切 한 모델로 認識되고 있다. 各種 藥劑의 複合 處方이 NMP에 의 한 實驗의 肝 癌에 미치는 影響에 대한 先行 研究로 Tatsuta 등²⁶ 은 Xiao-Chai-hu-tang(TJ-9)이 0.5%의 濃度群에서 補助 T 립프구 比率의 顯著한 增加와 전암성 病所 指標 因子들의 顯著한 減少 를 誘發하였다고 報告하였으며, 이 밖에도 Shi quan da bu tang(TJ-48)이 태반형 GST, gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)의 陽性 病所의 數와 發顯 面積을 顯著히 減少시키고, Chai hu gui zhi tang(TJ-10)이 組織學的으로 肝의 전암성 結節의 形成과 數的 減少와 더불어 태반형 GST의 陽性 病所 面積과 細胞 增殖을 顯著히 減少시켰다고 報告²⁷한 바가 있다. 本 研究 結果 血清內 臨床化學的 指數 變化에서는 對照群에서 AST, ALT, ALP 및 total bilirubin이 實驗期間에 비례하여 높은 上升值를 나 타내어 NMP에 의한 肝 損傷이 점점 심해짐을 알 수 있었다. 이 와는 달리 NMP와 加味清肝湯 併用 投與群(NK)은 血清中 AST, ALT, total bilirubin이 實驗 4주째 顯著히 減少하였으며, ALP는 AST, ALT 結果值에 비하여 減少의 폭은 적었으나, 이 역시 實驗 4주 對照群과 比較하여 減少하여, 血清內 臨床化學的 指數 變化 는 實驗 期間이 지날수록 加味清肝湯 併用 投與群(NK)에서 效果 的인 減少가 나타남을 알 수 있다. 이 같은 結果는 正常細胞에 대한 細胞毒性 結果와 連繫하여 볼 때, 臨床에서 肝 癌 患者에 長 期的으로 投與할 수 있음을 示唆하고 있다. 一般的으로 GSH는 細胞內에서 superoxide, singlet oxygen, hydroxyl radicals과 같 은 物質의 消耗를 誘導하므로써 antioxidant 방어 기작을 하는 重要한 物質이다²⁸. 이러한 物質의 損傷은 oxygen free radicals 이 細胞內로 多量 誘入되는 結果를 招來하여 oxidative stress와 apoptosis를 誘發한다^{28,29}. 체내 형성되는 脂質 過酸化는 生體膜 에 多量 存在하는 不飽和脂肪酸는 酸素에 露出되면 脂質過酸化 가 일어난다. 이러한 脂質過酸化로 인해 脂質分子의 構造的 變化 가 넓은 範圍에 걸쳐 일어나면 生體膜 流動性的 減少, 막전압 (membrane potential)의 減少, 이온 투과성의 증가, 細胞 小機關 內容物의 漏出 등이 豫想되고 結局은 細胞機能의 低下와 細胞死 (cell death)를 초래할 수 있다³⁰. 脂質過酸化物質의 한 종류인 MDA의 경우 脂質, 蛋白質, 核酸과 같은 生體物質과 交叉反應을 일으켜 多樣한 非異狀의인 物質을 生成한다^{30,31}. 따라서 本 實驗 에서는 GSH와 MDA 含量 測定을 통해, 活性 遊離 酸素에 의한 細胞 損傷에 대한 防禦 作用을 評價하였다. 肝 癌腫(HCC)에 대한 抗酸化 效果에 대한 報告들로 Bellisola³²은 HCC에서 catalase 活 性이 顯著히 減少되었고, Huang³³은 자유기 scavenger system의 不均衡, 脂質過酸化量의 增加를, Muzio 등³⁴은 SOD, GSH, GST 活性도의 減少를 各各 報告한 바가 있다. 本 實驗에서 組織內 GSH 含量은 對照群에서 實驗 4주에 顯著히 減少하였고, 反面에 加味清肝湯 併用 投與群(NK)은 實驗 4주에 正常群과 비슷한 結 果值를 보였다. 또한 組織內 MDA 含量 變化에서도 實驗 1주와 4주에 正常群에 비하여 顯著하게 增加된 對照群과는 달리 正常 群에 비하여 增加하였으나 增加幅은 적게 나타났다. 이 같은 結

果는 先行 研究者들의 研究 結果와 同一한 結果로 化學物質로 인해 發生한 組織內 活性 酸素에 대하여 本 試料가 一定한 抗酸化 作用을 發揮함으로써 肝損傷을 防止함을 알 수 있다. 또한 KCGT 投與群에서 投與 1주에서는 各種 血清酵素 指標들과 MDA 및 GSH는 큰 差異點이 觀察되지 않았으나, 實驗 期間에 比例하여 量的 變化가 크게 好轉된 것으로 보아 發癌 進行을 抑制하는 效果가 있음을 示唆하고 있다. 化學的 肝癌 誘發의 共通되는 組織學的 特徵으로는 正常 細胞로 보이는 일부 肝細胞가 分化 또는 改造(remodeling) 되면서 纖維化와 함께 結節(nodule)을 形成하게 되며, 이러한 結節은 發癌 刺戟이 없어지면 消失되거나, 細胞增殖을 통해 增殖性 結節로 된다고 報告³⁵⁾되고 있다. NMP에 의한 發癌 病態 모델에서의 組織學的인 實驗 報告로는 Strobel 등³⁵⁾이 하루에 체중 kg당 1~3mg 濃도로 7~75주 동안 經口 投與한 結果 透明하고, 好酸性 細胞와 또는 混合된 形態의 細胞들을 包含하는 變形된 增殖性 小結節(proliferative foci of altered hepatocyte)이 다수 出現하였으며, 增殖된 小結節을 形成하는 細胞들에서 核의 파괴 增加, 豊富한 당원과 SER, 탄수화물 代謝의 여러 酵素의 活性變化, 分裂 細胞의 增加를 觀察되었다고 報告한 바가 있다. 또한 Steinberg 등³⁶⁾은 NMP 投與時 細胞들은 透明하고 好酸性細胞들이 結節을 形成하며, 일부 膽管 細胞는 肝細胞와 類似한 形態로 變化되었으며, 肝實質細胞에서 주로 觀察되는 L-pyruvate kinase(PK)가 많은 당원 과립을 包含하는 細胞들에서 주로 觀察되다가 NMP 投與로 당원 缺損 部位에서는 L-PK들이 당관 상피나 동양 혈관 및 혈관 벽세포들에서 주로 發顯되는 M2-PK로 바뀌면서 發顯된다고 報告하였다. 本 實驗에서도 組織 및 微細構造的 觀察結果 對照群에서는 1주에서 局所 多發的으로 肝實質細胞의 變成으로 好酸性細胞들과 clear cytoplasm을 가지는 細胞들이 出現하였다. 實驗 4주에서는 實質細胞들의 크기가 大小 不同形을 가지면서 小葉 構造의 심한 變化를 보였고, 纖維化와 함께 小結節들이 형성 되어 先行 研究들과 유사한 변화소견을 보였다. 上記한 對照群과는 달리 加味清肝湯 併用 投與群(NK)에서는 一部 細胞들에서 好酸性 細胞, clear cytoplasm을 가지는 細胞, 광창된 핵들이 時間이 經過함에 따라 수가 增加되었으나 增加 정도는 對照群에 비해 현저히 減少되었다. 특히 實驗 4주에서는 對照群에서 觀察되는 細胞質內 지방적, 핵의 크기 및 주변 문맥역에서 炎症 細胞들도 顯著히 減少되거나 觀察되지 않았다. 電子顯微鏡的 觀察에서도 染色質의 濃縮 및 濃縮된 核小體 등 核의 變化와 細胞質內 조면 내형질세망의 分節, 자유 리보솜의 增加 및 지방소적들이 實驗期間에 比例하여 增加된 對照群에 비하여, 加味清肝湯 併用 投與群에서 實驗期間에 따라 微細構造的 變化 程度는 훨씬 輕微하였다. 특히 本 實驗 期間 동안 NMP投與로 細胞의 뚜렷한 初期變化로 核의 變化를 들 수 있는데, 實驗 1주에서부터 뚜렷한 核의 크기 變化와 微細構造的으로 確認된 外形의 變化를 들 수 있다. Enzmann과 Bannasch³⁷⁾ 등도 흰쥐를 이용하여 NMP를 7주 동안 經口 投與하고 40주 동안 觀察 結果, 投與 後 10주 후 문맥역 주변에 核의 파괴 增加와 N/C率의 顯著한 變化를 보였고, 發癌劑의 濃도에 따라서도 10~100배 정도의 核 크기 增加가 나타났다고 報告한 바

가 있다. NMP 투여에 의한 核과 遺傳物質의 變化에 대한 研究 들로 Ashby와 Lefevre 등³⁸⁾도 NMP를 10~200mg/kg을 經口 投與한 結果 2.5~12 時間에서 非計劃된 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis)反應이 나타나고 하였으며, Korr 등³⁹⁾은 過量 投與時 mitochondrial DNA synthesis 및 細胞 增殖도 增加한다고 하였다. 따라서 發癌 初期 段階의 核 變化는 遺傳 物質의 不均衡과 核代謝와 關聯된 여러 物質의 複合的인 不均衡에 따라서 파괴와 形態學的 變化를 同伴하고 있음을 示唆하고 있다. 本 實驗에서도 核의 數 및 內部 變化에서 實驗 期間에 比例하여 뚜렷한 增加와 上記한 變化들이 發生하였으나, 加味清肝湯 併用 投與群에서는 對照群에 비하여 특히 增加된 核의 數의 變化가 훨씬 減少되었다. 또한 전암성 病變의 指標 物質로 이용되고 있는 대 반형 GSH의 變化도 本 實驗에서 實驗 初期에는 細胞 單獨 혹은 局所의 小數의 細胞들에서 觀察되었고, 實驗 期間에 比例하여 廣範圍한 部位에서 陽性 發顯 面積의 增加가 觀察되어 先行 研究들과 유사한 結果를 보였고, 이 역시 加味清肝湯 併用 投與群은 對照群에 비해 顯著히 減少하였다. 따라서 本 연구 結果들을 종합해 볼 때 加味清肝湯은 NMP 病態 모델에서 血清成分(AST, ALT, ALP, T. bilirubin)의 變化, 抗酸化物(GSH), 脂質過酸化(MDA), 전암성 病變 指標 物質(GST), 核의 變化 및 形態學的(組織 및 細胞微細救助) 變化들의 정도가 對照群에 비하여 輕微하게 나타남으로써, NMP에 의한 肝癌 發生 過程을 阻害하는 效果가 있음을 시사하고 있어, 향후 核의 변화와 함께 遺傳物質의 變化에 대한 分子生物學的인 연구 結果가 기대된다.

결론

加味清肝湯이 前癌性 病變過程에 미치는 影響을 檢索하기 위하여 NMP 투여 후 血清生化學, 脂質過酸化, 抗酸化, 免疫組織化學的 變化 및 形態學的 變化 등을 관찰한 결과, 血清中 AST, ALT, ALP 및 total bilirubin 數値는 모두 加味清肝湯 併用 投與群에서 初期에는 對照群과 비슷한 數値를 보였으나, 實驗 4주에서는 顯著히 減少하였고, GSH, MDA 含量 變化는 加味清肝湯 併用 投與群에서 實驗 4주에 對照群에 비하여 各各 有意性있는 增減을 나타내었다. 一般 組織學的 變化는 對照群 4주에서는 細胞質內 지방적, 核의 크기 및 周邊 門脈域에서 炎症 細胞들이 觀察되었고, 加味清肝湯 併用 投與群에서는 현저히 減少되거나 觀察되지 않았으며, GST-P의 免疫 組織化學的 變化는 加味清肝湯 併用 投與群에서 時間 經過에 따라 對照群에 비해 陽性 發顯 정도는 顯著히 減少하였다. 增加된 核의 數는 모든 實驗群에서 實驗 期間에 比例하여 增加하였으나, 對照群에 비해 加味清肝湯 併用 投與群에서는 顯著히 減少하였다. 電子顯微鏡的 變化는 對照群에서 핵의 변화, 당원과립의 변성, 지방소적 및 조면내형질세망의 분절 등이 觀察되었으나, 加味清肝湯 併用 投與群에서는 對照群에 비하여 이들의 變化 程度가 훨씬 輕微하였다. 以上の 結果로 보아 加味清肝湯은 NMP 投與에 의한 前癌性 病變 과정에서 肝損傷에 대한 保護 效果가 認定되어, 尙 後 臨床에서도 간암을 비롯한 多樣한 肝疾患에 應用될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- 김동준 : 肝纖維症의 藥物治療, 大韓肝學會誌, 7:6-11, 2001.
- 강윤정 : 原發性 肝細胞癌腫의 分子生物學的 解釋, Medical Postgraduates, Vol. 26, No. 6., pp.350-356, 1998.
- Feng SL, Guo Y, Factor VM, et al. The Fn14 immediately response gene is during liver regeneration and highly expressed in both human and murine hepatocellular carcinomas. *Am J Pathol*, 156:1253-1261, 2000.
- De Lange R, Burtscher H, Jarsch M, Weidle UH. Identification of metastasis-associated genes by transcriptional profiling of metastatic versus non-metastatic colon cancer cell lines. *Anticancer Res*. 2001;21(4A):2329-39.
- Hondermarck H, Vercoutter-Edouart AS, Revillion F, Lemoine J, el-Yazidi-Belkoura I, Nurcombe V, Peyrat JP. : Proteomics of breast cancer for marker discovery and signal pathway profiling. *Proteomics*, 1(10):1216-32, 2001.
- Shimo T, Nakanishi T, Nishida T, Asano M, Sasaki A, Kanyama M, Kuboki T, Matsumura T, Takigawa M. : Involvement of CTGF, a Hypertrophic Chondrocyte-Specific Gene Product, in Tumor Angiogenesis. *Oncology*, 61(4):315-22, 2001.
- 李定濟 : 東醫肝系內科學, 서울, 集文社, p.28, p.30, pp.51-53, p.85, 1983.
- 金秉雲外 : 肝系內科學, 서울, 東洋醫學研究所出版部, pp.24-30, 1992.
- 郎傳君 : 抗癌中藥一千方, 中國醫藥科技出版社, pp.270-273, 1999.
- 扁鵲 : 難經, 臺北, 旋風出版社, pp.97-99, 1974.
- 巢元方 : 諸病源候論(文淵閣四庫全書 卷2), 서울, 麗江出版社, p.576, 644, 691, 692, 1987.
- 趙佶外 : 聖濟總錄, 臺北, 新文豐出版社, p.616, 723, 1023, 1979.
- 葛洪 : 肘後備急方, 北京, 人民衛生出版社, p.102, 1983.
- 趙鍾寬 : 韓方臨床腫瘍學, 周珉出版社, pp.678, 2001.
- Wiemann C, Enzmann H, Loser E, Schluter G. : Nonlinearity of nuclear enlargement in hepatocytes induced by the carcinogen N'-nitrosomorpholine in Ovo. *Cancer Detect Prev*, 23(6):485-95, 1999.
- Eyer P, Podhradsky D. : Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 153(1):57-66, 1986.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, Jun;95(2):351-8, 1979.
- 全國醫科大學教授 : 오늘의 診斷 및 治療, 圖書出版 한우리, pp.711-737, 1999.
- 裴秉哲 : 今釋黃帝內經(靈樞), 成輔社, pp.425-428, 544-550, 1994.
- 裴秉哲 : 今釋黃帝內經(素問), 成輔社, pp.304-310, 1994.
- 張仲景 : 金匱要略, 中醫古籍出版社, p.43, 1997.
- 姜在春 : 禁酒患者 102名에 對한 臨床的 考察, 大韓韓醫學會誌 17(2), pp.251- 263, 1996.
- 김복자 : 癌患者看護症狀管理, 현문사, pp.169-181, 2000.
- Bannasch P, Enzmann H, Kuhlem C, Loser E. : Dose dependence of diethylnitrosamin-induced nuclear enlargement in embryonal turkey liver. *Carcinogenesis*, 16:1351-1355, 1995.
- Bannasch P. : The cytoplasm of hepatocyte during carcinogenesis. *Rec Res Cancer Res* 19:1-100, 1968.
- Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Nakaizumi A, Uehara H. : Inhibition by Xiao-Chai-hu-tang(TJ-9) of development of hepatic foci induced by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats. *Jpn J Cancer Res*, 82: 987-992, 1991.
- Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Narahara H, Yano H, Sakai N. : Suppression by Chai-hu-gui-zhi-tang of the development of liver lesions induced by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats, *Cancer Lett* 152:31-36, 2000.
- Lavrentiadou SN, Chan C, Kawcak T, Ravid T, Tsaba A, van Der Vliet A, Rasooly R, Goldkorn T. : Ceramide-mediated apoptosis in lung epithelial cells is regulated by glutathione. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25(6):676-84, 2001.
- Pimentel DR, Amin JK, Xiao L, Miller T, Viereck J, Oliver-Krasinski J, Baliga R, Wang J, Siwik DA, Singh K, Pagano P, Colucci WS, Sawyer DB. : Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ Res*, 89(5):453-60, 2001.
- Anuradha CD, Kanno S, Hirano S. : Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med*, 31(3):367-73, 2001.
- Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. : The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 43(5):550-7. Review, 2000.
- Bellisola G, Casaril M, Gabrielli GB, Craffi M, Corrocher R. : Catalase activity in human hepatocellular carcinoma (HCC). *Clin Biochem* 20: 415-417, 1987.
- Huang NK, Wan FJ, Tseng CJ, Tung CS. : Amphetamine induces hydroxyl radical formation in the striatum of rats. *Life Sci*, 61(22): 2219-29, 1997.
- Muzio G, Marengo B, Salvo R, Semeraro A, Canuto RA, Tessitore L. : Liver cancer is induced by subnecrogenic dose DENA when associated with fasting/refeeding : role of glutathione-transferase and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 26:1314-1320, 1999.
- Strobel P, Klimek F, Zerban H, Kopp-Schneider A,

- BaNKasch P : Xenomorphic hepatocellular precursor and neoplastic progression of tigroid cell foci induced in rats with low doses of N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis*, 19:2069-2080, 1998.
36. Steinberg P, Klingelhoffer 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*, 434:213-220, 1999.
37. Enzmann H, Bannasch P : Morphometric study of alterations of extrafocal hepatocytes of rat liver treated with N-nitrosomorpholine. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 53: 218-226, 1987.
38. Ashby J, Lefevre PA, The rat-liver carcinogen N-nitrosomorpholine initiates unscheduled DNA synthesis and induce micronuclei in the rat liver in vivo. *Mutat Res*, 225:143-147, 1989.