

# 상황을 이용한 한의학적 보건기능개선제에 대한 연구

강경화 · 이준혁<sup>1</sup> · 최영현<sup>2</sup> · 최병태<sup>1</sup> · 이용태 \*

동의대학교 한의과대학 생리학교실 · 한의학연구소, 1: 해부학교실, 2: 생화학교실

## The Effects of Healthful Decoction Utilizing *Phellinus linteus* in Carbon Tetrachloride-injected Rats

Kyung Hwa Kang, Jun Hyuk Lee<sup>1</sup>, Yung Hyun Choi<sup>2</sup>, Byung Tae Choi<sup>1</sup>, Yong Tae Lee\*

Department of Physiology, 1: Department of Anatomy, 2: Department of Biochemistry, College of Oriental medicine, Research Institute of Oriental medicine, Dongeui University

We investigated the effects of healthful decoction utilizing *Phellinus linteus*(HDPL) for suppression in the process of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced inflammation(50% CCl<sub>4</sub> : olive oil=1:1, 1 ml/Kg · B.W.) of rat using biochemical, Western, histological and immunohistochemical analysis. Biochemical analysis of serum showed that the level of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, lactate Dehydrogenase, alkaline phosphatase and triglyceride were significantly decreased by pretreatment of HDPL, but albumin and nitric oxide were increased. Immunoblot analysis of the liver showed that CCl<sub>4</sub>-induced expression of interleukin-1β(IL-1β) and inducible nitric oxide synthase(iNOS) was inhibited by pretreatment of HDPL. More severe histopathological changes of the liver such as Kupffer cell reaction, inflammatory cell infiltration and focal necrosis were demonstrated in the rats challenged with CCl<sub>4</sub> compared with normal. Fewer scores of these changes were observed in the HDPL pretreated rats. Immunohistochemical analysis of the liver showed that while the expression of IL-1β, iNOS, tumor necrosis factor-α, COX(cyclooxygenase)-1 and COX-2 tended to increase, a decline of these immunoreaction of HDPL pre-treated groups were observed in the hepatocytes, especially in the focal necrotic sites. These results suggest that HDPL may act as a therapeutic agent for liver disease through a regulation of inflammation-related proteins.

Key words : carbon tetrachloride, serum analysis, liver, inflammation, *Phellinus linteus*

### 서 론

한의학에서는 버섯을 식용뿐만 아니라 약으로 취급해왔으며, 주로 약으로 사용하고 있는 버섯은 복령, 저령, 영지, 동충하초가 있고, 상황버섯은 희귀성과 고가로 인하여 사용이 제한되어 있었으나 근래 들어 다량 수입과 재배로 인하여 이를 이용한 보건기능 개선제 또는 신약 개발로 관심의 대상이 되고 있다.

상황버섯은 동의보감에 상목이(桑木耳)라 하여 탕액편에 소개되었고<sup>1)</sup>, 본초강목에서는 木耳, 桑耳, 桑黃 등 여러 이름으로 언급하고, 효능을 黑桑黃과 金桑黃으로 나누어 설명하고 있으나, 대체적으로 여성 자궁, 남성 생식기, 소화기 계통의 어혈, 혈병,

종양 및 염증성 질환을 치료하는 효능이 있음을 시사하고 있다<sup>2)</sup>. 또한 상황버섯은 기원이 다양하고 종류가 많으나, 가장 효능이 탁월하고, 예로부터 인정하고 있는 것은 *Phellinus linteus*로부터 분리한 단백질다당체로서 뽕나무에 이의 균사를 이식하여 재배한 것을 말하며 여성의 자궁 질환 특히 자궁의 종양이나, 장의 염증, 종양 질환 및 숙취 등에 효능이 있으니 이는 인체의 면역 증강 및 항암 효능이 뛰어 남을 의미한다<sup>3,4)</sup>. 아쿠아리스 버섯은 들버섯속 송이과에 속하는 버섯으로 식용은 물론 면역 증강 활성 물질이 함유되어 있으며<sup>5)</sup>, 대표적인 약리 작용으로 항종양효과, 제암효과, 암의 예방효과, 혈당, 혈압강하, 콜레스테롤 저하 등을 들 수 있다<sup>6)</sup>. 한편 십전대보탕은 氣血을 보하는 팔물탕에 황기, 육계를 가미하여, 氣血이 俱衰하고 陰陽이 并弱한 것을 至極하게 補養시키는 처방으로, 인체 기의 운행, 면역 조절 위주로 사용되었고 수술 후 합창이 더디게 되는 경우와 면역력이 약화되어 염증

\* 교신저자 : 이용태, 부산시 진구 양정2동 산45-1, 동의대학교 한의과대학  
· E-mail : ytleee@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8635  
· 접수 : 2003/11/03 · 수정 : 2003/12/16 · 채택 : 2004/01/12

성 질환이 장기간 지속되거나, 압과 같은 종양 질환이 발생할 때 면역 능력을 향상시켜 질병을 이겨나갈 수 있도록 하기 위하여 십전대보탕과 생맥산을 합하여 사용한다<sup>9,10</sup>. 따라서 이와 같은 버섯과 함께 인체의 면역 증강에 활용할 수 있는 한의학의 처방 중 대표적인 처방이 십전대보탕이다. 상황버섯에 대한 실험적 연구는 주로 항암과 관련된 연구가 주를 이루고 있으며, 면역 증강과 관련된 연구도 상황버섯 단일 추출물질에 국한된 보고이며, 수종의 한약재와 혼합, 추출한 물질에 대한 연구는 없는 실정이다<sup>11-14</sup>. 한의학에서 간은 인체 면역의 중추로 인식되고 있는 장기이며, 동물의 간에 대하여 인간에서와 가장 유사한 간염을 일으켜 가장 보편적으로 사용하고 있는 대표적인 간독성 물질로, 가역적이며 급성 간손상을 유발하는 물질이 사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)이고, 이의 투여는 간소염증중심구역의 괴사와 뒤따르는 간세포 재생 및 조직 치유 등의 현상을 동반한다<sup>15-16</sup>.

이에 본 실험에서는 사염화탄소 투여에 의한 간손상에 상황을 이용한 보전기능 개선제의 완화효과를 알아보기 위해 혈청의 생화학적 검사와 더불어 간의 조직병리학적 그리고 염증에 연관된 단백질에 대한 Western blot 분석 및 면역조직화학적 검사를 통해 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 검액의 제조

약재 10첩 분량을 증류수 4000 ml로 가열 추출한 후, 여과해서 여과액을 rotary evaporator로 농축한 다음, 농축액 1000 ml을 얻었다(이하 HDPL 이라 함). 본 처방 1첩의 처방구성 내용은 Table 1과 같다.

Table 1. The Composition of healthful decoction utilizing *Phellinus linteus* (HDPL)

한약명	생약명	용량(g)
상황버섯	<i>Phellinus linteus</i>	4
아가리쿠스 버섯	<i>Agaricus blazei</i> Murill	4
인삼	<i>Ginseng Radix</i>	4
백출	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	4
백복령	<i>Poria</i>	4
감초	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
숙지황	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	4
백작약	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	4
천궁	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4
당귀	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
황기	<i>Astragali Radix</i>	4
육계	<i>Ciniamomi Cortex</i>	4
오미자	<i>Schizandrae Fructus</i>	4
맥문동	<i>Liriope Tuber</i>	8
생강	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4
대추	<i>Zizyphi Jujubae Fructus</i>	4
총량		68g

### 2. 동물 및 검액 투여

동물은 체중 180-200 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐(대한실험동물센터)를 사용하였으며 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경(온도: 20±2 °C, 습도: 40~60 %, 명암: 12 시간) 하에서 10일 간 적응 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 정상군, CCl<sub>4</sub>만을 주사한 대조군, 검액을 투여한 HDPL1군, CCl<sub>4</sub> 주사전 HDPL을 0.5 ml/100 g로 전처리한 HDPL2군, CCl<sub>4</sub> 주사전

HDPL을 1 ml/100 g로 전처리한 HDPL3군, CCl<sub>4</sub> 주사전 HDPL을 1.5 ml/100 g로 전처리한 HDPL4군 등 6군으로 나누고 각 군에 10마리씩 배치하였다. 약물투여군은 CCl<sub>4</sub>를 통한 간손상 유발 4일 전부터 검액을 1일 1회 경구 투여하였으며, 대조군은 동량의 생리식염수를 투여하였다.

### 3. 간손상 유발 및 혈청분리

최종 약물 경구투여 후 2시간 경과 후에 50% CCl<sub>4</sub>(CCl<sub>4</sub> : olive oil=1:1)를 1 ml/Kg 복강 주사하여 간 손상을 유발하였으며, 간 손상 유발 후 24시간 동안 절식시킨 다음 에테르로 가볍게 마취시켜 심장채혈 및 간 조직을 채취하였다. 채혈한 혈액은 상온에서 방치한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다.

### 4. 전기영동 및 Western blot

채취한 간조직을 phosphate-buffered saline(PBS)으로 세척하고, lysis buffer(40mM Tris-Cl pH8.0, 120 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2 mg/ml aprotinin, 2 mg/ml leupeptin and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 넣어 분쇄하여 단백질 추출물을 얻어내었다. BioRad사의 Protein assay kit를 이용하여 단백질 추출액의 농도를 정량하고 Laemmli's sample buffer를 가하여 100°C에서 3분간 가열한 후 전기영동하였다. 겔상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer하여, 10% skim milk를 이용하여 blocking하고, Santa Cruz Biotechnology의 interleukin-1β(IL-1β), inducible nitric oxide synthase(iNOS), tumor necrosis factor-α(TNF-α), cyclooxygenase(COX)-1에 대한 항체와 HRP-conjugated anti-rabbit IgG 항체를 연속적으로 처리하였다. Amersham의 ECL 방법을 이용하여 특정 단백질의 변화를 검출하였다.

### 5. 조직병리학적 및 면역조직화학적 검색

간을 절취하여 4% paraformaldehyde에 4°C 12시간 고정하여 30% sucrose에 48시간 침지한 후 OCT compound에 포매한 후 10 μm 동결절편을 얻었다. 간의 조직병리학적 관찰을 위하여 periodic acid Schiff염색을 실시하였다. 면역조직화학적 관찰을 위해 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하였다. PBS로 세척한 후 goat normal serum (Vector Lab.)으로 실온에서 30분간 처리하였으며 IL-1β, iNOS, TNF-α, COX-1 및 COX-2 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 200:1로 희석하여 4°C 습실에 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Lab.)를 실온에서 30분 동안 반응시켰으며 PBS로 세척 후 ABC kit(Vector Lab.)에 실온에서 60분간 반응시켰다. DAB substrate kit(Vector Lab.)로 실온에서 5분간 발색시켰으며 상기 실험 방법 중 일차항체대신 10% BSA/PBS를 처리하고 동일한 과정으로 염색한 것을 대조군으로 삼았다.

### 6. 혈청 중 aspartate aminotransferase(AST) 활성도 측정

혈청 중 AST측정은 자동 분석기기(COBAS MIRA, Roche, Germany)로 Reitman-Frankel법을 통하여 발생하는 적갈색의 흡

광도 측정하고 표준혈청에 있어서도 같은 방법으로 반응시켜 작성한 검량선으로부터 검체 중의 AST를 측정하였다.

7. 혈청 중 alanine aminotransferase(ALT) 활성도 측정

혈청 중 ALT측정은 자동 분석기기(COBAS MIRA, Roche, Germany)로 Reitman-Frankel법을 통하여 발생하는 적갈색의 흡광도 측정하고 표준혈청에 있어서도 같은 방법으로 반응시켜 작성한 검량선으로부터 검체 중의 ALT를 측정하였다.

8. 혈청 중 lactate dehydrogenase(LDH) 활성도 측정

혈청 중 LDH측정은 자동 분석기기(COBAS MIRA, Roche, Germany)로 LDH가 젖산을 산화, 피루빈산을 생성하고, 조효소인 NAD는 NADH로 환원되면서, 340 nm에서의 흡광도가 증가하는데 이 흡광도 변화속도를 측정하는 것에 의하여 LDH의 활성치를 구하고 표준혈청에 있어서도 같은 방법으로 반응시켜 작성한 검량선으로부터 검체 중의 LDH농도를 측정하였다.

9. 혈청 중 alkaline phosphatase(AP)활성도 측정

혈청 중 AP 측정은 자동 분석기기(COBAS MIRA, Roche, Germany)로 혈청중의 AP가 알카리 용액중에서 기질인 p-니트로페닐산을 p-니트로페놀과 인산으로 유리시키는 것을 이용, p-니트로페놀의 흡광도의 증가속도를 측정하여 AP의 활성치를 구하고 표준혈청에 있어서도 같은 방법으로 반응시켜 작성한 검량선으로부터 검체 중의 AP농도를 측정하였다.

10. 혈청 중 albumin 함량 측정

혈청 중 albumin 측정은 자동 분석기기(COBAS MIRA, Roche, Germany)로 혈청 중 albumin이 브롬크레졸그린과 결합하여 나타나는 청록색의 흡광도를 측정하고 표준혈청에 있어서도 같은 방법으로 반응시켜 작성한 검량선으로부터 검체 중의 albumin량을 구하였다.

11. 혈청 중 triglyceride(TG) 함량 측정

혈청 중 triglyceride 측정은 자동 분석기기(COBAS MIRA, Roche, Germany)로 유리 Glycerol 소거법(GPO with Glycerol blank)을 통하여 반응물의 탁도를 광학적으로 측정하고 표준혈청에 있어서도 같은 방법으로 반응시켜 작성한 검량선으로부터 검체 중의 triglyceride농도를 측정하였다.

12. 혈청 중 nitric oxide(NO) 함량 측정

NO 함량을 측정하기 위하여 Griess 시약의 용액 A(0.2% Naphthylethylene diamine dihydrochloride in DDW)와 용액 B(2% Sulfonamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 각각 제조하여 냉암소에 보관하였다가, 사용직전에 두 용액을 1:1로 혼합하여 혼합용액을 사용하였다. 혈청 100 μl를 96well plate에 분주하고 다시 혼합용액 100 μl를 분주한 뒤 ELISA leader(VERSA max, U.S.A.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 미리 작성한 NaNO<sub>2</sub>의 표준 검량곡선에 의해 NO의 양을 산정하였다.

13. 통계처리

실험적정은 평균±표준편차로 표시하였고, 실험군간의 통계적 유의성 검정은 STATISTICA for Windows Release 4.5(Statsoft INC., 1993)를 이용하여 Student's t-test로서 검정하였다. 유의성은 p<0.05 수준인 경우 인정하였다.

결 과

1. 혈청 중 AST, ALT활성도 변화율에 미치는 영향

AST의 변화는 정상군은 83±2.55(U/I)이며, 정상군에 비하여 대조군은 657±32.12(U/I)로 유의하게(P<0.005) 증가하였으며, 정상군에 비하여 HDPL1은 96±2.17(U/I)로 유의한(P,0.05) 증가하였다. HDPL2, HDPL3는 각각 308±24.9(U/I), 464±20.56(U/I)로 대조군에 비하여 현저하게 유의한(p,0.005) 감소를 보였고, HDPL4는 571±22.54(U/I)로 대조군에 비하여 모두 유의한(p,0.05) 감소를 보였다.

한편 ALT의 변화는 정상군은 39±1.14(U/I)이며, 정상군에 비하여 대조군은 249±13.28(U/I)로 유의하게(p,0.005) 증가하였으며, 정상군에 비하여 HDPL1은 34±1.43(U/I)로 유의한(p,0.05) 감소를 하였다. HDPL2는 150±15.95(U/I)로 Control에 비하여 현저하게 유의한(p,0.005) 감소를 보였고, HDPL3와 HDPL4는 각각 464±20.56(U/I), 571±22.54(U/I)로 Control에 비하여 모두 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 2).

Table 2. Effect of HDPL on the serum AST and ALT activity in CCl<sub>4</sub>-injected rats

Group	No. of animal	AST(U/I)	ALT(U/I)
Normal		83±2.55 <sup>a</sup>	39±1.14
Control		657±32.12 <sup>###</sup>	249±13.28 <sup>###</sup>
HDPL1	6	96±2.17 <sup>a</sup>	34±1.43 <sup>#</sup>
HDPL2		308±24.9 <sup>###</sup>	150±15.95 <sup>###</sup>
HDPL3		464±20.56 <sup>###</sup>	211±19.36
HDPL4		571±22.54 <sup>a</sup>	227±16.52

Abbreviations : HDPL, healthful decoction utilizing *Phellinus linteus*; HDPL1, pretreated only with 1 ml of HDPL per 100 g body weight; HDPL2, pretreated with 0.5 ml of HDPL per 100 g body weight before CCl<sub>4</sub>-injection; HDPL3, pretreated with 1 ml of HDPL per 100 g body weight before CCl<sub>4</sub>-injection; HDPL4, pretreated with 1.5 ml of HDPL per 100 g body weight before CCl<sub>4</sub>-injection. a, Mean±Standard Error; #, Statistically significant as compared with data of control. \*, Statistically significant as compared with data of normal. # and \*, p < 0.05; ###, p < 0.005.

2. 혈청중 LDH, AP 활성도 변화율에 미치는 영향

LDH의 변화는 정상군은 557±42.13(U/I)이며, 정상군에 비하여 대조군은 1708±99.83(U/I)로 유의하게(p<0.005) 증가하였으며, 정상군에 비하여 HDPL1에서는 896±74.97(U/I)로 유의한(p,0.005) 증가를 하였다. HDPL2, HDPL3 및 HDPL4는 각각 1263±59.16(U/I), 1215±41.14(U/I), 1312±49.72(U/I)로 대조군에 비하여 모두 현저하게 유의한(p<0.005) 감소를 보였다.

한편 AP의 변화는 정상군은 273±12.26(U/I)이며, 정상군에 비하여 대조군은 336±23.09(U/I)로 유의하게(p<0.025) 증가하였으며, 정상군에 비하여 HDPL1에서는 279±11.28(U/I)로 유의한 증가를 보이지 않았다. HDPL2는 295±9.61(U/I)로 대조군에 비하여 유의한 감소를 보이지 않았고, HDPL3와 HDPL4는 각각

282±5.56(U/I), 287±8.06(U/I)로 대조군에 비하여 모두 유의한 ( $p<0.025$ ,  $p<0.05$ ) 감소를 보였다(Table 3).

**Table 3. Effect of HDPL on the serum LDH and AP activity in CCl<sub>4</sub>-injected rats**

Group	No. of animal	LDH (U/I)	AP (U/I)
Normal		557±42.13 <sup>a</sup>	273±12.26
Control		1708±99.83 <sup>***</sup>	336±23.09 <sup>**</sup>
HDPL1	6	696±74.97 <sup>*</sup>	279±11.28
HDPL2		1263±59.16 <sup>***</sup>	295±9.61
HDPL3		1215±41.14 <sup>***</sup>	282±5.56 <sup>**</sup>
HDPL4		1312±49.72 <sup>***</sup>	287±8.06 <sup>*</sup>

##:  $p<0.025$ . Other abbreviations are given in Table 2.

**3. 혈청 중 Albumin, TG 함량 변화율에 미치는 영향**

Albumin의 변화는 정상군은 3.33±0.03(g/dl)이며, 정상군에 비하여 대조군은 3.20±0.06(g/dl)로 유의하게( $p<0.05$ ) 감소하였다. HDPL2, HDPL4는 각각 3.27±0.01(g/dl), 3.29±0.02(g/dl)로 대조군에 비하여 유의한( $p<0.05$ ) 증가를 보였고, HDPL3는 3.25±0.01(g/dl)로 Control에 비하여 유의한 증가 보이지 않았다.

한편 Triglyceride의 변화는 정상군은 40.5±1.61(mg/dl)이며, 정상군에 비하여 대조군은 55.8±4.20(mg/dl)로 유의하게 ( $p<0.005$ ) 증가하였다. HDPL2와 HDPL3는 45.4±3.78(mg/dl), 46.2±1.54(mg/dl)로 대조군에 비하여 유의한( $p<0.05$ ) 감소를 보였고, HDPL4는 54.1±1.39(mg/dl)로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의한 감소를 보이지 않았다(Table 4).

**Table 4. Effect of HDPL on the albumin and TG contents in CCl<sub>4</sub>-injected rats**

Group	No. of animal	ALB (g/dl)	TG (mg/dl)
Normal		3.33±0.03a	40.5±1.61
Control		3.20±0.06 <sup>*</sup>	55.8±4.20 <sup>***</sup>
HDPL1	6	3.36±0.03	44.4±2.77
HDPL2		3.27±0.01 <sup>*</sup>	45.4±3.78 <sup>*</sup>
HDPL3		3.25±0.01	46.2±1.54 <sup>*</sup>
HDPL4		3.29±0.02 <sup>*</sup>	54.1±1.39

Abbreviations are given in Table 2.

**4. 혈청 중 NO 함량 변화율에 미치는 영향**

**Table 5. Effect of HDPL on the serum NO contents in CCl<sub>4</sub>-injected rats**

Group	No. of animal	NO (ug/ml)
Normal		0.39±0.04 <sup>a</sup>
Control		0.20±0.01 <sup>***</sup>
HDPL1	6	0.35±0.02
HDPL2		0.32±0.01 <sup>***</sup>
HDPL3		0.24±1.54 <sup>*</sup>
HDPL4		0.23±1.39 <sup>*</sup>

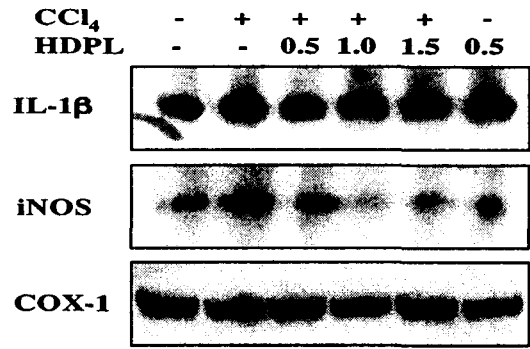
Abbreviations are given in Table 2.

NO의 변화는 정상군은 0.39±0.04(ug/ml)이며, 정상군에 비하여 대조군은 0.20±0.01(ug/ml)로 유의하게( $p<0.005$ ) 감소하였으며, 정상군에 비하여 HDPL1에서는 0.35±0.02(ug/ml)로 유의한 감소를 보이지 않았다. HDPL2, HDPL3, HDPL4는 각각 0.32±0.01(ug/ml), 0.24±1.54(ug/ml), 0.23±1.39(ug/ml)로 대조군

에 비하여 모두 유의한( $p<0.005$ ,  $p<0.05$ ) 증가를 보였다(Table 5).

**5. Western blot 분석**

사염화탄소 처리후 염증관련 단백질에 대해 10% SDS-PAGE로 전기영동한 결과 대조군의 IL-1 $\beta$ 은 정상군에 비해 높은 발현을 보여 주나 HDPL를 전처리하였을 때 모든 농도에서 감소하였다. 이러한 억제는 iNOS에서 보다 두드러져 정상군에 비해 증가한 대조군의 발현은 HDPL 전처리에 의해 현저히 억제되었다. 그러나 TNF- $\alpha$ , COX-1 및 COX-2는 정상군과 대조군 사이에 차이를 보여 주지 않았으나 TNF- $\alpha$ 는 상대적으로 높은 농도의 HDPL를 전처리하였을 경우 발현이 다소 감소하였다 (자료 미제시). 그리고 HDPL를 단독처리하였을 때 정상군, 대조군 및 HDPL처리군에서 차이를 보여 주지 않았다(Fig. 1).



**Fig. 1. Inhibitory effect of HDPL on the induction of IL-1 $\beta$  and iNOS in the livers of CCl<sub>4</sub>-injected rat.** Rats were pretreated with HDPL for 4 consecutive days before CCl<sub>4</sub> treatment, and then injected with CCl<sub>4</sub>. Liver samples were taken from the rats and were subjected to SDS-PAGE followed by the Western blot analysis using an IL-1 $\beta$ , iNOS and COX-1 antibody. Results represent two independent experiments that gave essentially identical results.

**6. 조직병리학적 관찰**

정상군의 간은 정연한 간소엽 형태를 갖추고 있으며 약한 Kupffer세포반응만이 관찰되나 사염화탄소를 처리한 대조군은 혼탁종창, 수포성변성과 더불어 심한 Kupper세포반응, 염증세포 침윤과 더불어 국소적 괴사를 보여 주었다. HDPL를 전처리한 군에서는 대조군의 혼탁종창, 수포성변성등의 유사한 조직병리적 변화를 나타내고 있으나 염증세포침윤, Kupper세포반응, 국소적 괴사의 감소를 관찰할 수 있었다(Table 6).

**Table 6. Histological findings for the anti-inflammatory effect of HDPL in the liver of CCl<sub>4</sub>-injected rats**

Group\HC	CS	HD	ICI	KR	LN
Normal	0+	0+	0	+	0
Control	++	++	+++	+++	+++
HDPL1	0+	0+	0	+	0
HDPL2	++	++	++	++	++
HDPL3	++	++	++	++	++
HDPL4	++	++	++	++	++

HC, histological changes; CS, cloudy swelling; HD, hydropic degeneration; ICI, inflammatory cells infiltration; KR, Kupffer cell reaction; LN, local necrosis. Other abbreviations are given Table 2. 0-+++ indicate the relative changes of the histological finding: 0, faint and negligible; +, weak; ++, moderate; +++, severe.

**7. 면역조직화학적 분석**

염증관련 단백질에 대한 면역조직화학적 반응을 살펴보면

IL-1 $\beta$ , iNOS, TNF- $\alpha$ , COX-1 및 COX-2 모두 일부 간세포에서만 흔적적 반응을 보여 주었으나 사염화탄소를 처리한 대조군에서 이들 반응은 증가하며 주로 문맥주변구역과 간소엽중심구역에서 관찰되었다. 특히 IL-1 $\beta$ , iNOS 및 TNF- $\alpha$ 은 과사를 나타내는 부위의 간세포에서 현저히 증가하며, iNOS는 염증세포나 Kupper 세포에서 강한 반응을 나타내었다. HDPL를 전처리한 흰쥐의 간세포에서도 이와 유사한 반응을 보이거나 국소적과사 부위의 IL-1 $\beta$ , iNOS, TNF- $\alpha$  그리고 염증세포와 Kupper세포의 iNOS반응이 감소하였다(Table 7).

Table 7. Immunoreactive reaction of inflammation-related proteins for the anti-inflammatory effect of HDPL in hepatocytes of the liver of CCl<sub>4</sub>-injected rats

Group	IL-1 $\beta$	iNOS	TNF- $\alpha$	COX-1	COX-2
Normal	0+	0+	0+	0+	0+
Control	0+ / ++	0+ / +++	0+ / ++	0+ / ++	0+ / ++
HDPL1	0+	0+	0+	0+	0+
HDPL2	0+ / ++	0+ / ++	0+ / ++	0+ / ++	0+ / ++
HDPL3	0+ / ++	0+ / ++	0+ / ++	0+ / ++	0+ / ++
HDPL4	0+ / ++	0+ / ++	0+ / ++	0+ / ++	0+ / ++

\*. These immunoreactions were mainly observed in the local necrotic sites. Other abbreviations are given in Table 2. 0+ / +++ indicate the relative intensity of immunoreaction: 0, faint and negligible; +, weak; ++, moderate; +++, intense.

## 논 의

면역이란 인체 내에서 어떤 요인으로 인해서든지 이물질의 침입이나 변이 세포가 발생하면 생체 방어 기능이 관여하여 이 물질은 물론 새로이 발생된 변이세포를 처리하는 능력을 발휘하여 개체의 항상성을 유지하려는 현상으로 체액성 면역과 세포성 면역로 분류된다. 한의학에서는 이러한 면역 기능을 正氣라고 하였고, 항원 또는 변이 세포를 邪氣로 인식하여 질병의 발생을 正氣不足이나 邪氣所勝의 관계로 파악하였다.

버섯은 진균류에 속하는 담자균과 자낭균 중 자실체를 형성하는 고등균류로 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질 및 비타민 등 영양소를 골고루 함유하고 있어 예로부터 식용 및 약용으로 이용되어 왔으며, 특히 항암작용, 생체기능 조절 및 뇌졸중, 심장병 등에 효과가 있음이 알려지면서 더욱 관심이 높아지게 되었다<sup>17</sup>. 목질진흠버섯은 주로 항암활성에 관한 연구가 주를 이루는데, 대표적인 연구는 Chang<sup>18</sup>의 연구로서, 약 17종의 담자균류 가운데 월등히 높은 항암력을 지닌 버섯은 목질진흠버섯, 송이, 맛버섯, 팽이, 표고버섯 5종이었으며, 이중 상황버섯은 가장 항암력을 지니고 있는 것으로 보고되었으며, 면역활성도 입증되었다<sup>19,20</sup>. 이와 같이 버섯 다당류들은 숙주의 면역계에 작용하여 생체방어력 증가를 높이는 것으로 알려져 있어<sup>21</sup>, 상황버섯은 약초로서 항암 효과는 물론 소화기계통도 튼튼하게 해주며 면역 증강에도 효과가 탁월한 식품이라 할 수 있다. 십전대보탕은 氣血을 보하는 팔물탕에 황기, 육계를 가미하여, 氣血이 俱衰하고 陰陽이 并弱한 것을 至極하게 補養시키는 처방으로, 인체 기의 운행, 면역 조절 위주로 사용되었고, 수술 후 합창이 더디게 되는 경우와 면역력이 약화되어 염증성 질환이 장기간 지속되거나, 압과 같은 증상 질환이 발생할 때 면역 능력을 향상시켜 질병을 이겨내갈 수 있

도록 하기 위하여 십전대보탕과 생맥산을 합해서 사용한다<sup>9,10</sup>. 따라서 이와 같은 버섯과 함께 사용하여 인체의 면역 증강에 활용 할 수 있는 한의학의 처방 중 대표적인 처방이 십전대보탕이다.

한편 한의학에서 간은 인체 면역의 중추로 인식되고 있는 장기이며, 동물의 간에 대하여 인간에서와 가장 유사한 간염을 일으켜 가장 보편적으로 사용하고 있는 대표적인 간 독성 물질로, 가역적이며 급성 간 손상을 유발하는 물질이 사염화탄소이고, 이의 투여는 간소엽중심구역의 과사와 뒤따르는 간세포 재생 및 조직 치유 등의 현상을 동반한다<sup>15,16</sup>. 사염화탄소는 노출초기 간세포의 P450 효소계에 의해 trichloromethyl radical로 전환되며 이는 간세포막의 고도불포화 지방산의 lipid peroxidation을 일으켜 세포막의 파괴와 과사를 유도하며 필수 고분자물질과 공유 결합하여 기능을 억제한다<sup>22</sup>. 이차적인 손상은 Kupffer세포 활성화로 인한 염증반응에 의해 일어나며, Kupffer세포의 중성 호구 활성인자와 화학적 주성인자 분비한다. TNF- $\alpha$ 와 여러 cytokines분비는 사염화탄소에 의한 간 손상과 치유과정에 매우 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다<sup>23,24</sup>.

이에 본 실험에서는 사염화탄소 투여에 의한 간 손상에 상황을 이용한 보건기능 개선제의 간 손상 완화효과를 알아보고자 생화학적으로 간 손상의 지표로 삼는 AST, ALT, LDH 및 AP의 변화와, albumin, TG의 변화 그리고 인체의 면역에 관계되는 NO를 관찰하였고, 간의 조직병리학적 변화를 살펴보았으며 염증에 연관된 단백질에 대한 Western blot 분석과 면역조직화학적 검색을 통해 그 효능을 살펴보았다. AST는 간과 심장에 고농도로 존재하고 세포 장애 정도와 비교적 상관성이 좋을 뿐 아니라 다른 혈중 효소에 비하여 예민하게 변동하고 간염, 간 경변 등의 지표로 널리 사용되며, ALT는 여러 조직에 광범위하게 존재하고 특히 간에 가장 높은 활성도를 가지며 통상적으로 간염과 간 과사 간경변 등으로 인한 간의 손상으로 활성이 증가하는 성질이 있다. 또한 AP는 간담도에 질한 골질한 등에서 증가하며, 특히 담관계에 병변이 파급될 경우 간담도 질환에서 증가하고, LDH는 급성 간염에서 현저하게 활성이 증가하여 이들은 모두 간 기능의 지표 효소로 사용하고 있다.

본 실험에서 사염화탄소로 유발된 급성 간 손상으로 흰쥐의 혈중 AST, ALT의 활성이 정상군에 비하여 현저하게 증가되었으며, 상황을 이용한 보건기능 개선제의 전처리로 대조군에 비하여 현저하게 유의한 감소를 보였다(Table 2). 또한 실험적 간 손상으로 정상군에 비하여 활성이 증가한 AP와 LDH에 대하여도 HDPL 전처리로 정상군에는 미치지 못하지만 대조군에 비하여 현저하게 유의한 감소를 보였다(Table 3). 이러한 결과는 십전대보탕이 혈중 AST, ALT 및 AP의 활성을 감소시킨다는 보고<sup>25,26</sup>와 사염화탄소에 의한 간 손상에서 상황버섯 추출물이 증가된 AST, ALT, LDH 및 AP의 활성을 감소시킨다는 보고<sup>12</sup>와 유사하였다. 따라서 HDPL의 구성 물질인 상황버섯과 십전대보탕의 복합 처방이 간 손상의 예방 및 치유에 활용이 가능함을 시사한다. 단지 HDPL의 단독 투여로 AST, ALT 및 LDH의 활성이 미약하지만 유의하게 증가함을 보여주고 있어, 한약재의 특성이 종종 상반된 결과를 나타내므로 HDPL도 또 다른 작용기전이 있을

것으로 유추되지만 이에 대한 자세한 기전은 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

한편 albumin은 교질삼투압과 pH의 유지 및 각종 물질의 수송 등에 관계하며, 간질환의 중증도를 파악하기 위해서 검사되어지는데 간에서 혈장단백이 주로 합성되므로 간기능의 이상이 지속되면 albumin이 저하되며 또한 간에서 형성되는 혈장단백이 저하된다<sup>27)</sup>. 또 TG는 중성지질의 90-95%를 차지하므로 일반적으로 같은 의미로 사용하며, 사염화탄소의 투여는 내형질세망의 과산화지질을 형성함으로써 그 기능을 감퇴시키고 중성지질의 축적을 유발한다<sup>28)</sup>. 사염화탄소로 유발된 급성 간 손상으로 흰쥐의 혈중 albumin은 정상군에 비하여 유의한 감소를 나타내었고, 혈중 TG는 정상군에 비하여 현저하게 유의한 증가를 나타내었다. 한편 HDPL전처리로 혈중 albumin은 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으며, 혈중 TG는 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Table 4). 이러한 결과는 상황추출물을 이용한 Jung 등<sup>12)</sup>의 연구 결과와 버섯 추출물을 이용한 Kim 등<sup>29)</sup>의 결과 즉 사염화탄소로 손상되어 혈중에 증가된 중성지질의 함량 변화에 영향을 미치지 못했다는 보고와는 다르지만, 버섯 추출물이 혈중에 증가된 중성지질의 함량을 감소시켰다는 Kim 등<sup>17)</sup>의 보고와는 유사하다. 이를 근거로, 본 실험의 결과만으로 속단하기는 어렵지만, 간 기능의 향상과 기능 유지 및 지질 대사의 촉진에 일반 버섯이나 상황버섯 단일 종 추출물의 효능보다는 상황버섯과 십전대보탕 복합 추출물의 효능이 더욱 뛰어난 것을 보여주는 결과로 생각된다.

NO는 인체 내에서 가장 중요한 전달물질로 NO를 생성하는 NOS에는 내피세포에 존재하는 endothelial NOS와 뇌에서 신경 전달 역할에 관여하는 neuronal NOS, 면역학적 자극이나 염증성 자극에 의하여 합성되는 inducible NOS의 3가지 유형이 존재하며, NO가 낮은 농도에서는 신호로 작용하고, 높은 농도로 존재하면 독성을 나타내는데, 적게 만들어지면 고혈압, 동맥경화 등의 증상과 균에 쉽게 감염되고, 과다 생성되면 자가면역성 당뇨병, 류마티즘, 암 등의 증상을 유발한다<sup>30,31)</sup>. 사염화탄소로 유발된 급성 간 손상으로 흰쥐의 혈중 NO함량은 정상군에 비하여 현저히 유의한 감소를 보였으며, HDPL 전처리로 혈중 NO함량은 대조군에 비하여 유의한 또는 현저히 유의한 증가를 보였다(Table 5). 이러한 결과는 본 실험에서 수행한 iNOS의 발현 결과와 관련이 있는 것으로 생각된다. IL-1 $\beta$ 는 사염화탄소에 의해 발현되고 분비가 증가하는 cytokine으로 알려져 있으며 노화가 진행중인 쥐보다 상대적으로 어린 쥐에서 더욱 두드러진 것으로 보고되어 있다<sup>32)</sup>. 본 실험에서 HDPL를 전처리 했을 때 사염화탄소에 의한 IL-1 $\beta$  단백질의 발현이 정상군과 유사한 정도로 나타내고 있다. 이를 조직병리학적 및 면역조직화학적 관찰과 연관시켜 볼 때 HDPL에 의해 염증세포침윤과 국소적 괴사가 완화되는 것과 이들 세포에서 나타나는 IL-1 $\beta$  면역반응 감소와 연관 있음을 알 수 있다. iNOS는 신호전달 물질인 NO를 생산하는 중요한 효소로 사염화탄소에 의한 간 손상과 임상적으로 섬유화로 인한 간 경화와 간암에서 높은 발현을 보인다<sup>33,34)</sup>. 간에서 소량의 사염화탄소에 의해서는 Kupffer세포에서만 발현을 보이나 다량 투여

에 의해서 내피세포에서도 확인되는 것으로 알려져 있다<sup>35)</sup>. 본 실험에서 HDPL전처리에 의해 iNOS의 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 IL-1 $\beta$ 에서 서술한 바와 같이 병리학적 조직변화 이들 세포의 면역반응과 연관을 가지는데 특히 iNOS면역반응이 사염화탄소에 의해 활성화된 Kupper세포에서 강한 반응을 보여 이들 세포반응 저와 발현억제와 관련이 있음을 알 수 있다. IL-1 $\beta$ 는 NF- $\kappa$ B를 통한 염증 반응을 유발함으로써 HDPL 투여가 IL-1 $\beta$ 와 NF- $\kappa$ B, 그리고 inflammatory genes의 발현으로 이어지는 이차적인 염증반응을 억제할 가능성이 있음을 제시한다. 최근 연구결과에 의하면 IL-1 $\beta$ 는 stress-activated protein kinase p38과 p21-activated kinase, apoptosis stimulating kinase 1 등의 활성화를 가져와 apoptosis를 유발 할 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>36-38)</sup>. 사염화탄소에 의해 형성되는 직접적인 lipid peroxidation을 동반하는 간세포 괴사와 더불어 IL-1 $\beta$ 에 의한 이차적인 간세포의 apoptosis는 사염화탄소에 의한 간 손상 기전에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. NO는 reactive oxygen species의 하나로 작용하여 간 손상의 다른 기전을 이루는 축이라 가정할 때, 앞서 보여주었던 IL-1 $\beta$  발현 억제와 동일한 억제효과를 보여줌으로써 사염화탄소에 의한 간 손상 기전의 또 다른 경로를 억제하는 것으로 추측된다. 사염화탄소에 의해 Kupffer세포에서 발현될 것으로 추측되었던 COX-2와 TNF- $\alpha$ 는 면역조직화학적 반응에서 유의한 결과를 보이거나 Western분석에서 사염화탄소에 의한 발현 증가를 보이지 않았다. 이는 사염화탄소에 의한 COX-2 발현이 주입 후 1주에서 7주 경과 후 보인다는 보고에 의해 확인할 수 있다. COX-2 발현증가는 간의 섬유화가 진행됨에 따라 나타나며, 사염화탄소 투여 7주 후에 가장 높은 발현을 보이고 있다<sup>39)</sup>. TNF- $\alpha$ 도 상대적으로 높은 농도의 HDPL를 전처리했을 때와 HDPL 단독으로 처리한 경우에 그 발현이 감소되는 것은 더 조사해 볼 필요성을 제기하고 있다.

결과적으로 생화학적 관찰에서 사염화탄소에 의한 간 손상에서 HDPL 전처리는 간 손상 완화 및 지질대사에 생리적인 활성효과를 가지고 있으며 NO활성을 통한 면역기능 강화를 나타내며, 조직병리학적 관찰에서 HDPL전처리는 Kupper세포반응, 염증세포침윤 및 국소적 괴사의 완화를 보여 주고 있다. 그러나 본 실험에서 관찰한 간세포의 면역반응보다 침윤된 염증관련 세포에 더 강한 반응을 보여 주고 있어 HDPL는 염증관련세포의 활성화와 침윤에 연관된 간 손상 저해를 나타냄을 유추할 수 있다.

## 감사의 글

본 연구는 웨이블텍(주)의 연구비 지원(2003FC011)에 의해 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 허준, 동의보감, 남산당, 서울, p719, 1993.
2. 이시진, 본초강목, 고문사, 서울, p980, 1975.
3. Yamada, S, Mycelial culture method of *Phellinus linteus*.

- Korean patent, pp92-1194, 1994.
4. Choi, J. H., Ha, T. M., Kim, Y. H. and Rho, Y. D., Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.*, 24, 214-222, 1996.
  5. Maron, D. M. and Ames, B. N., Revises methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113:173-215, 1983.
  6. Ji, J. H., Kim, M. N., Chung, C. K. and Ham, S. S., Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 29(2): 322-328, 2000.
  7. 성재모, 유영복, 차동열, 버섯학, 교학사, 서울, pp3-10, 1998.
  8. Fujimiya, Y., Koboli, H., Oshiman, K., Soda, R. and Ebina, T., Tumoricidal activity of high molecular weight polysaccharides derived from *Agaricus blazei* via oral administration in the mouse tumor model, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 45(4): 246-252, 1998.
  9. 박태숙, 김경화, 김경철, 이용태, 십전대보탕에 대한 형상의학적 고찰, *동의생리병리학회지*, 15(4):513-519, 2001.
  10. 정영섭, 김경화, 김경철, 이용태, 장부 응저의 형상의학적 고찰, *동의생리병리학회지*, 15(5):637-644, 2001.
  11. Ji, J.H., Kim, M.N., Chung, C.K., Ham, S.S., Antigenotoxic effects of *Phellinus linteus* and *Agaricus blazei* Murill extracts, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 29(3): 513-517, 2000.
  12. Jung, M. E., Ham, S. S., Nam, S. M., Kang, I. J., Kim, S. J. and Chung, C. K., Biochemical and histological effects of *Phellinus linteus* methanol extract on liver lipid metabolism of rat fed CCl<sub>4</sub> and high fat, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 30(2): 331-337, 2001.
  13. Lee, H. J., Lee, H. J., Park, J. M., Song, G. Y., Kang, K. S. and Kim, S. H., Study on antitumor and immunomodulatory effects of Cambodian *Phellinus linteus*, *Kor. J. Oriental Physiology and Pathology*, 16(2): 332-337, 2002.
  14. Kim, J. S., Kim, J. H., Lee, H. J., Khil, J. H., Kim, S. H. and Kim, D. H., A study on cytokine modulating effect of three origins of *Phellinus linteus*, *Kor. J. Oriental Physiology and Pathology*, 17(4): 898-904, 2003.
  15. Kim, Y. H. and Park, H. S., Effects of *Bupleuri radix* aqua-acupuncture on the liver injury in CCl<sub>4</sub>-intoxicated rats, *The J. of Kor. Acupuncture & Mox. Soc.*, 15(1): 343-356, 1998.
  16. Girotti, A. W., Tomas, J. P., Jordan, J. E., Inhibitory effect of Zinc(II) on free radical lipid peroxidation in erythrocyte membrane, *J Free Rad. Bio. & Med.*, 1, 335-344, 1985.
  17. Kim, G. H. and Han, H. K., The effect of mushroom extracts on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 27: 326-332, 1998.
  18. Chang, S. T., John, A., Buswell, Siu-Wei Chiu, *Mushroom biology and mushroom products*, World scientific, Washington, D. C., p1-20, 1993.
  19. Lee, J. H., Cho, S. M., Song, K. S., Han, S. B., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, I. D., Immunostimulating activity and characterization of polysaccharide from mycelium of *Phellinus linteus*, *J. of Microbiology and Biotechnology*, 6(3):213-218, 1996.
  20. Oh, G. T., Han, S. B., Kim, H. M., Han, M. W. and Yoo, I. D., Immunostimulating activity of *Phellinus linteus* extracts to B-lymphocyte. *Arch. Pharm. Res.*, 15(4):379-381, 1992.
  21. Kweon, M. H., Lim, E. J., Sung, H. J., Studies on biological polysaccharides isolated from *Agaricus bisporus*(in Korean), *J. Kor. Agric. Chem. Biotechnol.*, 41(1):60-66, 1998.
  22. Farber, J. L. *Xenobiotics, drug metabolism, and liver injury.* *Monogr Pathol.* 28, 43-53, 1987.
  23. DeCicco, L.A., Rikans, L.E., Tutor, C.G., Hornbrook, K.R.. Serum and liver concentrations of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta following administration of carbon tetrachloride to male rats. *Toxicol. Lett.* 98:115-121, 1998.
  24. Yamada, Y., Fausto, N. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am. J. Pathol.* 152, 1577-1589, 1998.
  25. Heo, J. Y., Kim, B. S. and Kang, J. S., Study on antioxidant action of *Sibjeondaebo-tang*. *Kor. J. Oriental Physiology and Pathology*, 17(2): 356-362, 2003.
  26. 하재원, 정지환이 노화에 미치는 영향. 대전, 대전대학교 대학원, 1996.
  27. 의학교육연수원, 증상별 임상검사, 서울, 서울대학교 출판부, pp 390-395, 1991.
  28. Han, E. G., Effect of *Codonopsis lanceolata* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Ph. D. Thesis, Yeungnam University, 1996.
  29. Kim, G. J., Kim, H. S. and Chung S. Y., Effects of varied mushroom on lipid compositions in dietary hypercholesterolemic rats. *J. Kor. Soc. Food Sci.*, 21, 131-139, 1992.
  30. Masden, P.A. and Ballermann, B. J., Tumor necrosis factor- $\alpha$  activates a soluble guanylate cyclase in bovine glomerular mesangial cells via an L-arginine -dependent mechanism. *J. Exp. Med.*, 172:1843-1852, 1990.
  31. 김태규 외, *면역생물학*, 라이프사이언스, 서울, pp. 31, 40, 81, 493, 520, 2000.
  32. Rikans, L. E., DeCicco, L. A., Hornbrook, K. R., Yamano, T. Effect of age and carbon tetrachloride on cytokine concentrations in rat liver. *Mech. Ageing Dev.* 108, 173-182, 1999.
  33. Mizumoto, M., Arii, S., Furutani, M., Nakamura, T., Ishigami, S., Monden, K., Ishiguro, S., Fujita, S., Imamura, M. NO as an indicator of portal hemodynamics and the role of iNOS in increased NO production in CCl<sub>4</sub>-induced

- liver cirrhosis. *J. Surg. Res.* 70, 124-133, 1997.
34. Tabernero, A., Schneider, F., Potenza, M. A., Fidi-Soa Randriamboavonjy, V., Chasserot, S., Wolf, P., Mitolo-Chieppa, D., Stoclet, J. C. and Andriantsitohaina, R. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in omental arteries harvested from patients with severe liver diseases: Immuno-localization and influence on vascular tone. *Intensive Care Med.* 29, 262-270, 2003.
35. Rockey, D. C., Chung, J. J. Regulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide during hepatic injury and fibrogenesis. *Am. J. Physiol.* 273, G124-G130, 1997.
36. Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R. J., Cerione, R. A. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 270, 27995-27998, 1995.
37. Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E., Hagiwara, M. A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.* 271, 13675-13679, 1996.
38. Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., Gotoh, Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, 275, 90-94, 1997.
39. Kim, S. H., Chu, H. J., Kang, D. H., Song, G. A., Cho, M., Yang, U. S., Kim, H. J., Chung, H. Y. NF-kappa B binding activity and cyclooxygenase-2 expression in persistent CCL<sub>4</sub>-treated rat liver injury. *J. Korean Med. Sci.* 17, 193-200, 2002.