

감두약침액의 암예방 효과

한상훈 · 조경희 · 최혜경 · 임종국 · 손윤희* · 이임태* · 남경수*†

동국대학교 한의과대학 경혈학교실
*의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터

Chemopreventive Effect of Gamdutang Aqua-Acupuncture Solution

Sang-Hoon Han, Kyoung-Hee Cho, Hey-Kyung Choi, Jong-Kook Lim,
Yun-Hee Shon*, Yim-Tae Lee* and Kyung-Soo Nam*†

*Department of Acupuncture and Moxibustion-Pointology, College of Oriental Medicine,
*Department of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Diseases Research Center,
Dongguk University, Kyongju, 780-714, Korea*

Abstract

Gamdutang aqua-acupuncture solution (GAS), Gamdutang water-extracted solution (GWS) and Dae-Gamdutang aqua-acupuncture solution (DGAS) were prepared and tested for chemopreventive potentials. GAS was potent inducer of quinone reductase (QR) activity in Hepa1c1c7 murine hepatoma cells in culture, whereas GWS is less potent. GAS, GWS and DGAS were significantly induced QR activity in cultured rat normal liver cell, Ac2F. Glutathione (GSH) levels were increased about 1.8, 1.0 and 1.1 fold with GAS, GWS and DGAS in Hepa1c1c7 cells, respectively. In addition glutathione S-transferase (GST) activity was increased with GAS, GWS and DGAS. The effects of GAS, GWS and DGAS on the growth of *Acanthamoeba castellanii* were tested. Proliferation of *A. castellanii* was inhibited by GAS, GWS and DGAS at concentrations of 1× and 5×. These results suggest that GAS has chemopreventive potential by inducing QR and GST activities, increasing GSH levels and inhibition of polyamine metabolism.

Key words – Gamdutang aqua-acupuncture solution, Chemopreventive potential, Quinone reductase, Glutathione, Glutathione S-transferase, Polyamine metabolism

서 론

암에 관련된 제재 개발연구는 발병된 암을 치료할 수 있는 항암제 개발과 암의 진행과정을 저지할 수 있거나 암 발병을 예방할 수 있는 물질 개발 차원에서 이루어지

고 있다. 특히 항암제의 독성에 의한 부작용으로 암이 발병하기 전에 막을 수 있는 암예방 물질(chemopreventive agents)의 개발이 중점적으로 이루어지고 있다. 암예방 물질은 발암 물질의 대사과정에 변화를 가져오거나 암화 과정 (carcinogenesis)시 생성되는 대사물질 또는 대사과정시

† Corresponding author

생성되는 부산물과 반응하여 상호작용을 일으키거나 특정 효소의 발현 및 기능을 변화시키므로 이러한 특징을 이용하여 암예방 물질을 조사, 개발할 수 있다. 대표적인 것으로 QR 및 GSH, GST 생성, polyamine metabolism 저해 효과 등의 측정이 있다[24].

감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fischer)는 원산지가 내몽고로서 두과의 다년생 초본식물이며 흑두(*Glycine max* (L) Merr)는 콩과 식물의 흑대두와 흑소두의 검은 종자이다. 감초와 흑두는 둘 다 해독작용을 가지며, 특히 감초는 항암효능이 있다고 보고되어 있다[1,4-6]. 또한, 감초와 흑소두, 감초와 흑대두를 정량으로 배합한 감두탕의 해독작용에 관한 실험결과는 보고된 바가 있지만 아직 감두탕 약침액의 항암효능에 관하여 보고된 바가 없어 감두약침액의 암예방 효과에 관한 실험에 착상하게 되었다.

QR은 간세포에서 주로 생성되는 Phase II enzyme [GST, UDP-glucuronosyl transferase]의 한 종류로 quinone을 환원시켜 무독하게 만들고 돌연변이 물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화효과 (neoplastic effect)를 막아주고 발암물질을 무독하게 하는 역할을 한다[10,11,17,25,27].

GSH는 세포 내에서 다양한 기능을 가지고 있으며 외부의 독성물질이 세포내 침입했을 때 직접 반응하거나 GST에 의해 독성물질과 결합하여 무독하게 하는 기능을 가지고 있다. 또한 GSH는 자연적인 항산화제로 발암과정시 세포를 보호하며, GSH의 전자친화적인 성질로 인해 외부물질이 DNA와 결합하여 암을 유발하는 것을 막아준다. 그리고 GST는 유리기 (free radical)를 파괴하여 반응성이 높은 산소들로부터 세포를 보호한다고 보고되고 있다[7,26].

세포내 polyamine 함량은 세포의 증식능력과 종양형성에 관계가 있으며 polyamine 합성경로에서 중요한 효소가 ornithine decarboxylase (ODC)이다[18]. ODC에 의해 생성되어지는 polyamine은 세포의 증식과 분화에 중요한 물질로써 세포내 polyamine의 합성 억제는 종양 세포의 성장을 억제하고 다른 항암제제의 효과를 강화시켜 주는 것으로 보고되었다 [9].

따라서 본 연구에서는 열수추출액과 비교하여 감두약침액의 암예방 효과를 QR 생성 유도, GSH 생성 및 GST 활성 그리고, polyamine 대사저해에 관한 실험을 통하여 살펴보았다.

재료 및 방법

감두약침액 및 열수추출액의 제조

본 실험에서 감두약침액을 제조하기 위하여 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 원감초와 흑소두 및 흑대두를 정선하여 사용하였다.

약침액은 수제 알콜침법에 의하여 조제하였다[2,3]. 흑소두와 감초 60 g (1:1)을 조말하여 증류수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4℃, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 ml을 감압농축하였다. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol을 가하여 75%, 85%, 95%의 ethanol 용액이 되게 하여 침전물을 여별하고, pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μm, Whatman, Germany)로 여과한다. 그리고 3차 증류수를 가하여 200 ml이 되게 하여 1×의 약침액으로 사용하였으며 10×, 5×, 3× 약침액은 1×의 약침액을 감압농축하여 사용하였고, 증류수나 phosphate buffered saline (PBS)를 첨가하여 0.1×, 0.5× 농도로 조제하였고, 대감두약침액은 흑소두 대신 흑대두를 사용하여 감두약침액과 동일한 방법으로 조제하였다. 그리고, 흑소두와 감초 60 g (1:1)을 조말하여 증류수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4℃, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 ml을 감압농축하여 pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μm, Whatman, Germany)로 여과하고 PBS를 가하여 200 ml이 되게 하여 1×의 열수추출액으로 사용하였으며, 10×, 5×, 3× 열수추출액은 1×의 열수추출액을 감압농축하여 사용하였고, 증류수나 PBS를 첨가하여 0.1×, 0.5× 농도로 조제하였다.

QR 생성 측정

QR 생성 유도 효과는 Prochaska[20] 등의 방법에 따라 측정하였다. 1×10⁴개의 Hepa1c1c7 세포 (mouse hepatoma)와 Ac2F 세포 (rat normal liver cell)를 200 μl의 minimum essential medium eagle's (MEM) 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후, 새 배양액 190 μl와 감두약침액 (0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×) 또는 열수추출액 (0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×)을 10 μl씩 각 well에 가하였다. 세포를 약침액 또는 열수

추출액이 첨가된 배양액에서 48시간 배양 후 배양액을 버리고 세포를 용해시켰다. 200 μ l reaction mixture {7.5 ml of 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 100 mg of bovine serum albumin, 1 μ l of 1.5% tween-20, 0.1 ml of 7.5 mM flavin adenine dinucleotide, 1 ml of 150 mM glucose-6-phosphate, 90 μ l of 50 mM β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), 300 U of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45 mg 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT), 150 μ l of 50 mM menadione in 150 ml 증류수}를 각 well에 넣고 5분간 반응 후 0.3 mM dicoumarol (in 0.5% dimethyl sulfoxide)과 5 mM potassium phosphate가 들어있는 용액 50 μ l를 첨가하여 microplate reader를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

GSH 생성량 측정

세포내 총 GSH 함량은 Griffith[12]의 방법을 변형시켜서 96-well plate에서 측정하였다. Hepa1c1c7를 배양하여 감두약침액 및 열수추출액에 의한 세포내 GSH의 양을 측정하였다. 1×10^4 의 세포를 200 μ l MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후 10 μ l 감두약침액 (0.1 \times , 0.5 \times , 1 \times , 3 \times , 5 \times) 또는 열수추출액 (0.1 \times , 0.5 \times , 1 \times , 3 \times , 5 \times)이 포함된 배지를 각 well에 가하였다. 시료처리 후 48시간 뒤 배지를 버리고 PBS로 세번 씻고 세포를 용해시킨 후 40 μ l stock buffer (125 mM sodium-phosphate, 6.3 mM ethylenediamine-triacetic acid, pH 7.4)를 가하고 170 μ l의 reaction mixture {20 μ l 6mM 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) in stock buffer, 10 μ l glutathione reductase solution (50 units in 10 ml stock buffer), 140 μ l of the NADPH-generating system {2.5 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 330 μ l 150 mM glucose-6-phosphate, 30 μ l 50 mM NADP⁺, 100 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase in 50 ml distilled water}와 반응시켰다. 상온에서 5분간 shaking 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 함량은 GSH 활성 측정을 한 plate와 같이 처리한 plate에서 bicinchoninic acid solution protein kit를 사용하여 측정하였다.

GST 생성량 측정

GST α 및 GST μ 를 발현하는 Hepa1c1c7 세포를 사용

하여 GST 활성 측정을 하였다[13]. Hepa1c1c7 세포를 96-well plate의 각 well에 1×10^4 cells을 접종시키고 37°C, CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후 새 배양액 190 μ l와 감두약침액 (0.1 \times , 0.5 \times , 1 \times , 3 \times , 5 \times) 또는 열수추출액 (0.1 \times , 0.5 \times , 1 \times , 3 \times , 5 \times)을 10 μ l씩 각 well에 처리하였다. 세포를 약침액 또는 열수추출액이 처리된 배양액에서 48시간 배양 후 PBS로 3회 씻고 freeze-thaw를 3회 반복하여 세포를 용해시켰다. GST 활성 측정을 위해 100 μ l reaction mixture (2.5 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.5)를 첨가하고 1분간 shaking 한 후 405 nm에서 3분간 흡광도의 증가를 microplate reader에서 측정하였다. 단백질 함량은 GSH 활성 측정을 한 plate와 같이 처리한 plate에서 bicinchoninic acid solution protein kit를 사용하여 측정하였다.

Polyamine metabolism 활성측정

*A. castellanii*의 증식을 측정하여 polyamine metabolism을 측정하였다[15]. 2×10^5 cells의 *A. castellanii*을 3 ml OGM {3 N KOH, 30% glucose, 2,000 \times vitamins (0.2 g thiamine HCl, 40 mg biotin, 200 μ g vitamin B₁₂ /100 ml, 95% ethanol), 100 \times salt I (0.4 g ferric citrate, 0.1 g CaCl₂ · H₂O, 3.1 g MgSO₄ · 7H₂O in 250 ml 증류수), 100 \times KH₂PO₄ (13.6 g/ℓ, pH 7.0), yeast extract-proteose peptone (7.5 g/ℓ)에 부유시켜 T-25 tissue culture flask에서 감두약침액 (1 \times , 5 \times) 또는 열수추출액 (1 \times , 5 \times) 150 μ l와 배양하였다. 그리고 24, 48, 96, 120, 144, 168시간 후의 세포수를 hemocytometer를 이용하여 계수하였다.

통계처리

실험결과는 평균 \pm 표준편차(Standard deviation, SD)로 표현하였다. Student's t test를 시행하여, 결과치는 P값이 0.05 또는 0.01 미만을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

결 과

QR 생성에 미치는 영향

감두탕의 암예방 효과를 살펴보기 위하여 발암물질을 무독성화시키는 Phase II enzyme인 QR 생성의 유도 효과를 측정하였다. Hepa1c1c7세포에서의 실험에서는 약침

액 5×농도에서 가장 높은 수치인 1.8배의 생성 유도율을 보였고, 대감두약침액에서는 감두약침액과 유사한 QR 유도율을 나타냈으며, 열수추출액에서는 추출액 0.5×에서 1.1배의 유도율을 나타내었다 (Fig. 1). 각각의 농도에 있어서 열수추출액보다 약침액에서 QR의 생성유도가 높게 나타났다. 따라서 생쥐의 간암세포인 Hepa1c17에서 열수추출액, 약침액 모두 QR 생성을 유도하였으나 약침액의 경우 1.8이 최고수치인데 반해 열수추출액은 1.1의 유도율을 보여 약침액이 열수추출액보다 더 많은 QR 생성을 유도함을 알 수 있었다. Ac2F 세포에 대한 감두탕의 QR 유도율을 측정해 본 결과, 약침액의 경우 농도 0.1×에서 1.0인 수치를 보이다가 농도 5×에서는 유도율 4.1로 현저히 높은 QR 생성이 유도되었고, 대감두약침액의 경우에도 감두약침액과 유사하게 유도되어 0.1×에서 5×로 추출액의 농도가 높아짐에 따라 QR 생성량도 같이 증가하여 5×농도에서 3.9의 가장 높은 QR 생성 유도율을 나타내었으며, 감두열수추출액을 Ac2F에 처리했을 때에는 농도 3×에서 2.3배로 QR의 생성량이 증가하였으며, 농도 5×에서는 1.5로 감소하였다(Fig. 2).

Ac2F에서도 Hepa1c17의 결과와 같이 약침액이 열수

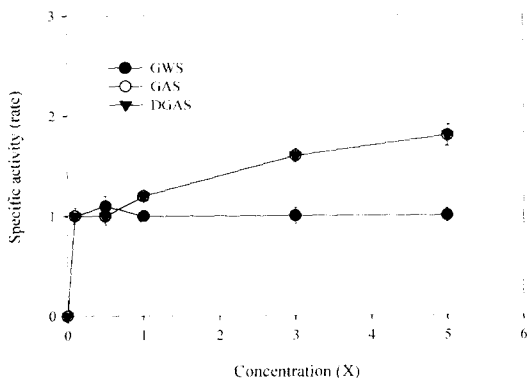


Fig. 1. Effect of Gamdutang on induction of quinone reductase activity in murine hepatoma Hepa1c17 cells.

Cells were treated with Gamdutang for 48 hours, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean of three separate experiments. GAS: Gamdutang Aqua-acupuncture Solution, GWS: Gamdutang Water-extracted Solution, DGAS: Dae-Gamdutang Aqua-acupuncture Solution

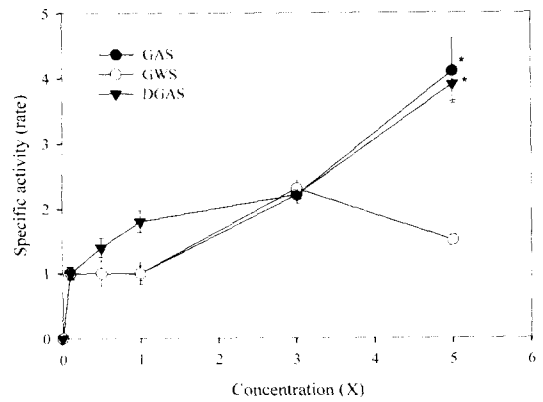


Fig. 2. Effect of Gamdutang on induction of quinone reductase activity in Ac2F cells.

Cells were treated with Gamdutang for 48 hours, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean of three separate experiments. *, mean significantly different from control (p<0.01) using Student's t test with n=3

추출액보다 각각의 농도에서 더 높은 QR 생성 유도율을 나타내었다.

세포내 GSH 생성에 미치는 영향

약침액에 의한 GSH 생성을 Hepa1c17 세포에서 살펴 보았다. 0.1×에서 1×농도의 약침액을 처리한 세포에서 대조군과 같은 GSH level을 보이다가 5×에서 1.2배로 나타났다. 열수추출액에서는 각각의 시료 농도에서 1.0~1.1배의 수치를 보였으며, 대감두약침액의 경우 각각의 농도의 GSH level이 1.0으로 일정하였다 (Fig. 3). 생쥐에서 유래된 Hepa1c17 세포내의 GSH는 약침액 농도 5×에서 가장 많이 생성되었다.

세포내 GST 생성에 미치는 영향

약침액에 의한 GST 활성도를 관찰한 결과, 감두약침액, 열수추출액 및 대감두약침액의 경우 1.0~1.3배 정도의 증가를 보였으며 열수추출액에서 보다는 약침액의 경우 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 4).

Polyamine metabolism에 미치는 영향

Polyamine은 아메바 증식에 필수적이므로 polyamine 대사에 대한 감두탕 약침액의 영향을 알아보기 위해 아메

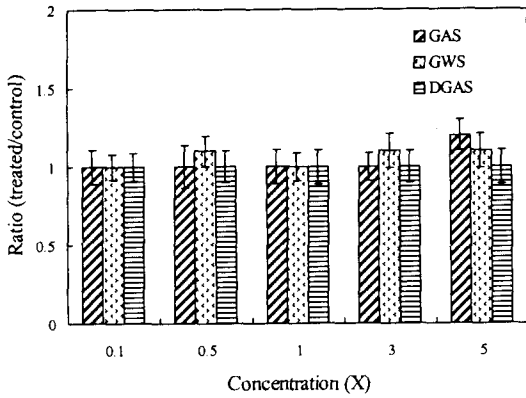


Fig. 3. Induction of glutathione levels by Gamdutang in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. Cells were treated with Gamdutang in concentration range of $0.1 \times \sim 5 \times$ for 48 hrs, glutathione level of sample-treated cells were analyzed and compared with the level of solvent-treated cells to calculate the ratio of GSH induction.

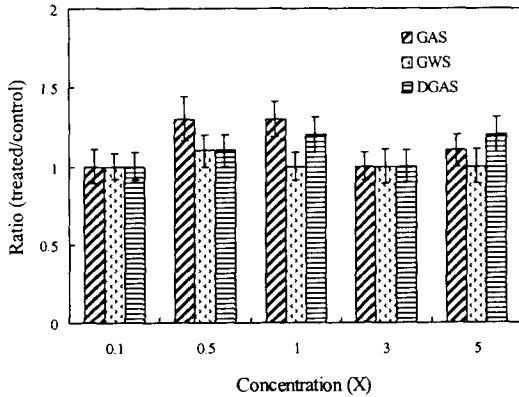


Fig. 4. Induction of glutathione S-transferase by Gamdutang in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. Cells were treated with Gamdutang in concentration range of $0.1 \times \sim 5 \times$ for 48 hrs, glutathione S-transferase level of sample-treated cells were analyzed and compared with the level of solvent-treated cells to calculate the ratio of GST induction.

바의 증식을 측정하였다. 2×10^5 cells의 *A. castellanii*에 $150 \mu\text{l}$ 3차 증류수만을 처리한 후 24시간, 48시간, 96시간, 120시간, 144시간, 168시간을 관찰했을 때, 아메바의 세포수는 2.0×10^5 , 7.7×10^5 , 44×10^5 으로 96시간까지 서서히 증가하

다가 120시간 이후 급격히 세포수의 증가를 보여 168시간에는 14.1×10^6 까지 증가하였다. 각 처리시간에서 감두약 침액의 농도 $1 \times$, $5 \times$ 를 처리했을 때 농도 $5 \times$ 감두약침액에서는 168시간이 지난 후, 6.0×10^6 으로 대조군에 비해서 57% 정도의 억제 효과가 나타났다. 또한 낮은 농도인 $1 \times$ 의 약침액 농도에서도 대조군에 비해 28%의 아메바의 증식 억제 효과를 보였다 (Fig. 5A). 이와 같이 감두약침액은 농도 의존적으로 아메바 증식을 억제하였다.

Polyamine 대사 저해에 대한 열수추출액의 아메바 증식 억제능을 살펴보기 위해 약침액 실험과 같이 2×10^5 cells의 *A. castellanii*에 $150 \mu\text{l}$ 의 증류수 및 감두열수추출액을 농도별로 처리하였다. 168시간 후에 대조군, $1 \times$, $5 \times$ 에 대해 세포수를 측정해 보았을 때 14.1×10^6 , 13.7×10^6 , 0.4×10^6 의 세포수를 보여 대조군에 비해서 열수추출액 $1 \times$, $5 \times$ 에서 3%, 97%의 아메바 증식 억제 효과가 나타났다 (Fig. 5B). 대감두의 경우에서도 대조군에 비해서 높은 억제효과를 보였다. (Fig. 5C)

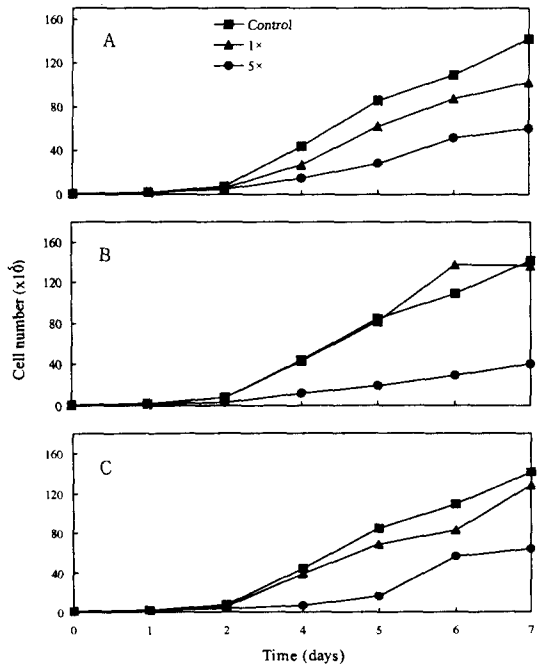


Fig. 5. Inhibition of the growth of *Acanthamoeba castellanii* by GAS(A), GWS(B) and DGAS(C).

고 찰

암예방은 암화 과정을 연장, 억제시키거나 암화된 것을 전환 (reversion)시키는 작용이다. 현재 암예방 물질에 대한 많은 연구가 진행되고 있으며, 효과적인 암예방 물질 (chemopreventive agents)의 연구를 위해 생화학적 표식자를 사용하고 있다[20]. 이 표식자들은 암화과정시 발암물질의 대사물질과 그의 부산물과도 반응하며 다양하고 많은 발암기전을 저해할 수 있는 효과적인 암예방 물질로 간주된다. 이러한 표식자들에는 QR, ODC, GSH, GST등이 사용되고 있다. QR는 세포질에 주로 분포되어 있으며[11], quinones과 quinoneimines를 환원시켜서 세포에 대한 독성을 제거한다[17]. QR은 GST와 UDP-glucuronosyl transferase와 같이 Phase II enzyme으로 외부의 독성이 있는 물질과 돌연변이원성 발암물질로부터 세포를 보호한다. Phase II enzyme 생성의 유도는, 곧 항암활성 (anticarcinogenic activity)으로 여겨진다[25,26].

감두약침액을 생쥐의 간암세포 Hepa1c1c7에 처리하였을 때 5× 농도에서 1.8배의 QR 생성 유도율을 보였고, 0.1×에서 5×사이의 농도에서 감두약침액의 농도가 높아짐에 따라 QR 유도율도 농도 의존적으로 유도되었다. Rat의 Ac2F cells에서의 감두 약침의 QR 생성유도는 생쥐의 간암세포에서 보다 더 높게 유도되어, 약침액 5×에서 4.1배의 높은 유도율을 보였고 열수추출액과 대감두약침액 또한 각각 2.3, 3.9배의 유도율을 보인 바 감두로 만든 약침액과 열수추출액은 phase II enzyme인 QR의 생성을 유도하였다. 그러므로 감두약침액은 돌연변이원성, 발암물질의 대사과정시 생성된 quinone에 의한 세포내 독성 및 세포내 DNA손상을 없애 주어 발암물질의 종양화효과 (neoplastic effect)를 막아 줄 것으로 추측된다.

암예방 물질 연구에 사용되는 표식자 중의 하나인 ODC는 polyamine 생합성 과정에서 putrescine의 생성에 관여하는 효소이며 정상세포와 종양세포 (neoplastic cell)의 증식에 필수적이다[8]. 또한 ODC의 유도는 암촉진 (tumor promotion)에도 중요한 기능을 담당하고 있어 생쥐에서 피부암 촉진 실험에서 ODC활성 유도와 발암 물질의 암촉진 능력간의 밀접한 관계가 보고되었으며 다른 조직에서도 암 촉진자 (tumor promotor)들이 ODC활성을 유도하는 것으로 보고되었다[23]. ODC의 활성저해는 발암

촉진의 저해를 발생시키며 retinoid, difluoromethylornithine (DFMO) 등은 ODC 활성을 저해시켜 종양 발생을 억제하는 것으로 알려져 있다[16]. Polyamine은 발암과정시 비정상적으로 생합성되어 발암과정에 밀접한 관계가 있으며[19], 원생동물 세포의 성장 및 분화에도 관여한다. 원생동물 세포배양에서 돌연변이 또는 억제제를 사용하여 polyamine의 합성을 막으면 세포성장도 중단된다. 그러므로 원생동물의 polyamine 생합성 억제제는 암세포의 성장을 저해할 수 있다[28].

감두약침액과 열수추출액은 농도 의존적으로 아메바의 성장을 억제하였다. 이 결과는 감두약침액과 열수추출액에 의해서 아메바의 수가 감소하는 것이 아니라 증식속도가 지연된 것이며 감두약침액, 열수추출액의 독성에 의한 세포수의 감소가 아니라 아메바 성장에 필요한 polyamine의 고갈에 따른 증식속도의 지연으로 보인다. 감두약침액 및 열수추출액이 ODC활성에 영향을 주어 polyamine 생성을 저해시키고 이에 감두약침액 및 열수추출액에서 배양한 아메바의 세포 성장이 저해된 것으로 보인다.

본 실험에서의 아메바 성장억제는 ODC 활성 저해로 인한 것으로 여겨지며 이로 인해 종양발생을 억제할 것으로 예측되므로 앞으로 ODC활성을 방사활성을 이용하여 직접 측정할 계획이다.

GSH는 세포내 다양한 기능을 가지고 있으며 특히 독성이 강한 물질을 제거해준다. 대부분의 외부의 화학물질은 cytochrome P-450-dependent monooxygenase system에서 대사되어져 전자친화적 물질, epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질이 된다[14]. 이 물질들은 GSH과 직접적으로 결합하거나 GST에 의해 촉매되는 과정을 거쳐 결합하기도 한다. 이 반응들은 무독성과정으로 세포내 GSH이 고갈되면 독성이 강한 대사물질들이 만들어져 세포내 손상을 유발시켜 mutagenesis, carcinogenesis를 일으킨다.

Hepa1c1c7에서 감두약침액은 1.2배의 GSH 생성율을, 열수추출액은 1.1배의 GSH 생성율을 나타내었고 GST의 경우 1.0-1.3배의 생성율을 보였다. 위의 결과로 감두약침액은 세포내 GSH 생성을 촉진하여 세포내 발생한 산화물질과 기타의 독성물질을 무독하게 할 것으로 추측된다. Aflatoxin에 의해 유도된 간암에 걸린 쥐에 다량의 GSH를 주었을 때 종양저해작용이 있었으며, butylated hydroxy-anisole은 GSH level을 증가시켜 화학물질에 의한 발암을

저해한다고 보고되었다[9]. 이에 감두약침액에 의해 증가한 GSH은 산화적인 유리의 공격으로부터 세포를 보호하고 DNA에 결합하는 것을 막아주어 mutagenesis 또는 carcinogenesis를 저해할 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 감두약침액은 열수추출액에 비해 효과적으로 세포내 QR 및 GST의 농도를 높혀주고 polyamine 합성 저해 효과가 있었으며 GSH의 양을 증가시켜 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 생각된다.

요 약

한방에서 염증, 종양 억제 등에 사용되는 감초와 흑소두, 감초와 흑대두를 정량으로 배합하여 조제한 약침액을 이용하여 암 억제효과를 살펴 보았다. 발암물질을 무독화시키는 QR 생성 유도를 생쥐의 간암세포인 Hepa1c1c7과 rat의 간세포 Ac2F에서 측정하였으며, 그 결과 감두약침액, 열수추출액을 처리한 Hepa1c1c7과 Ac2F에서 QR생성이 유도되었으며 약침액에 의한 유도율이 더 높았다. GSH 생성을 살펴본 결과 Hepa1c1c7 세포에서 감두약침액과 열수 추출액에 의한 GSH 생성이 증가하였고, GST 활성측정에 의하면 Hepa1c1c7 세포에서 감두약침액에 의한 GST 생성이 증가하였다. 농도별 감두약침액과 열수추출액에 의한 *A. castellanii* 증식을 살펴 본 결과, 약침액과 열수추출액이 *A. castellanii* 증식 농도 의존적으로 저해하는 효과가 있었다.

참 고 문 헌

1. 康秉秀. 1994. 臨床配合本草學. pp.94-97, 永林社. 서울.
2. 김중완, 최혜경, 손윤희, 임종국, 이항우, 남경수. 1999. 금은화 약침액의 암예방 효과. 생약학회지 30, 261-268.
3. 문진영, 임종국, 최혜경, 이임태, 이항우, 남경수. 1999. 시호 약침제제가 생쥐의 면역활성에 미치는 영향. 생약학회지 30, 115-122.
4. 申佶求. 1973. 申氏本草學. pp.16-20, 壽文社. 서울.
5. 安德均. 1998. 中藥大辭典. pp.6635-6638. 圖書出版社. 서울.
6. 許 凌. 1981. 東醫寶鑑. pp. 90, 91, 92, 118, 218, 238, 232, 332, 373, 382, 385, 396, 424, 476, 477, 576, 589, 682, 720. 大星文化社. 서울.
7. Boyland, E. and C. F. Chasseud. 1979. The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis *Adv. Cancer Res.* 29, 175-274.
8. Bull, A. W., N. D. Nigro, W. A. Golembieski, J. D. Crissman and L. J. Marnett. 1984. *In vivo* stimulation of DNA synthesis and induction of ornithine decarboxylase in rat colon by fatty acid hydroperoxides, autoxidation products of unsaturated fatty acids. *Cancer Res.* 44, 4924-4928.
9. Cerutti, P. A. Prooxidant states and tumor promotion. 1985. *Science* 227, 375-381.
10. Chesis, P. L., D. E. Levin, M. T. Smith, L. Ernster and B. N. Ames. 1984. Mutagenicity of quinones : pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 1696-1700.
11. Ernster, L. 1967. pp.309-317, In Estabrook, R. W. and M. E. Pullman(ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 10, Academic Press Inc, New York.
12. Habig, W. H., M. H. Pabst and W. B. Jacoby. 1974. Glutathione S-transferase: the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7137.
13. Griffith, O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-212
14. Jollow, D. J. and C. Smith. 1977. Biochemical aspects of toxic metabolites formation, detoxification and covalent binding, pp. 42-59, In Jollow, K. J., J. J. Kocsis, R. Snyder and H. Vainio(ed.), *Biologically Reactive Intermediates*, Plenum Press, New York.
15. Kim, B. G., P. P. McCann and T. J. Byers. 1987. Inhibition of multiplication in *Acanthamoeba castellanii* by specific inhibitors of ornithine decarboxylase. *J. Protozool.* 34, 264-266.
16. Kingsnorth, A. N., W. W. King, K. Kiekema, P. P. McCann, J. S. Ross and R. A. Malt. 1983. Inhibition of ornithine decarboxylase with 2-difluoromethyl-ornithine reduced incidence of dimethylhydrazine-induced colon tumors in mice. *Cancer Res.* 43, 2545-2549.
17. Lind, C., P. Hochstein and L. D. Ernster. 1982. T-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 216, 178-185.
18. Matsushima, M., S. Takano, E. Erturk and G. Bryan. 1982. Induction of ornithine decarboxylase activity in mouse urinary bladder by L-tryptophan and some of metabolites. *Cancer Res.* 42, 3587-3691.
19. McCann, P. P., A. E. Pegg and A. Sjoerdsma. 1987.

- Inhibition of Polymine Metabolism. Biological Significance and Basis for New Therapies* pp.1-371 Academic Press, Orlando, Florida.
20. Prochaska, H. J. and A. B. Santamaria. 1988. Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* **169**, 328-336.
 21. Prochaska, H. J., P. Talalay and H. Sies. 1987. Direct protective effect of NAD(P)H : quinone reductase against menadione-induced chemiluminescence of postmitochondrial fractions of mouse liver. *J. Biol. Chem.* **262**, 1931-1934.
 22. Pegg, A. E. 1986. The biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* **234**, 249-262.
 23. Rozhin, J., P. S. Wilson, A. W. Bull and N. D. Nigro. 1984. Ornithine decarboxylase activity in the rat and human colon. *Cancer Res.* **44**, 3226-3230.
 24. Sheela, S., J. K. Stutzman, G. J. Kelloff, and V. E. Steele. 1994. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* **54**, 5848-5855.
 25. Talalay, P., M. J. DeLo and H. J. Prochaska. 1987. pp.197-216. In Cory. J. G. and A. Szentivani(ed.), *Cancer Biology and Therapeutics*, Plenum. New York.
 26. Talalay, P. and H. J. Prochaska 1987. DT-Di-aphorase: A Quinone Reductase with Special Functions in Cell Metabolism and Detoxication. pp.61-66. In Ernster, L., R. W. Estabrook, P. Hochstein and S. Orrenius (ed.), *Cambridge Univ. Press. Cambridge.*
 27. Wattenberg, L. W. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* **45**, 1-8.
 28. Williams-Ashman, H. G. and Z. N. Canellakis. 1979. Polyamines in mammalian biology and medicine. *Perspect. Biol. Med.* **22**, 421-453.