

## 당귀 약침액의 암예방 효과

김영기 · 조경희 · 손윤희\* · 최혜경 · 김소연\*\* · 임종국 · 남경수\*\*  
동국대학교 한의과대학, 의과대학 및 난치병한양방치료연구센터\*, 영남대학교 자연자원대학\*\*  
(Received November 11, 1999)

### Chemopreventive Potential of *Angelicae gigantis Radix* Aqua-acupuncture Solution

Young-Ki Kim, Kyoung-Hee Cho, Yun-Hee Shon\*, Hey-Kyung Choi,  
So-Yeun Kim\*\*, Jong-Kook Lim and Kyung-Soo Nam\*\*

College of Oriental Medicine and

\*College of Medicine and Intractable Disease Research Center,  
Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

\*\*College of Natural Resources, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

**Abstract** — *Angelicae gigantis Radix* aqua-acupuncture solution (AGRAS) and *Angelicae gigantis Radix* water-extracted solution (AGRWS) were prepared and tested for their organ toxicities and chemopreventive potentials. The organ-toxicity of AGRAS to male ICR mice was studied by the measurements of glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvate transaminase (GPT), lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (ALP-s) activities after injection of AGRAS for 7 days. The activities of GOT, GPT and LDH were decreased, but the activity of ALP-s was not changed with AGRAS. When AGRAS was administered once daily for 10 days before the tumor implantation, AGRAS exerted antitumor activity by inhibiting the growth of Ehrlich ascites tumor cells (EATC) *in vivo*. The inductions of quinone reductase (QR), glutathione (GSH) and glutathione S-transferase (GST) and inhibition of polyamine metabolism were tested for the chemopreventive potentials of AGRAS and AGRWS. AGRAS was potent inducer of QR activity in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. In cultured rat Ac2F cells, AGRAS was also significantly induced QR activity. GSH levels were increased about 1.3 fold with AGRAS. In addition the activity of GST was increased about 2.5 fold with AGRAS at the concentration of  $0.1 \times$ . The effects of AGRAS and AGRWS were tested on the growth of *Acanthamoeba castellanii*. Proliferation of *Acanthamoeba castellanii* in a broth medium was inhibited by AGRAS and AGRWS at the concentration of  $1 \times$  and  $5 \times$ , respectively. These results suggest that AGRAS has chemopreventive potential by inducing QR activity, increasing GSH and GST levels and inhibition of polyamine metabolism.

**Keywords** □ *Angelicae gigantis Radix*, organ toxicity, chemopreventive potential, quinone reductase, glutathione, glutathione-S-transferase, polyamine metabolism.

암예방 물질은 발암 물질의 대사과정에 변화를 가져 오거나, 암화 과정(carcinogenesis)시 생성되는 대사물질 또는 대사과정시 생성되는 부산물과 반응하거나 특정 효소의 발현 및 기능을 변화시켜 무독화 시키므로 이러한 특징을 이용하여 암예방 물질을 개발, 조사할

수 있다. 대표적인 것으로 QR 생성, GSH, GST 생성, polyamine metabolism 저해효과 등의 특징이 있다.<sup>1)</sup> QR은 간세포에서 주로 생성되는 Phase II enzyme의 한 종류로 quinone을 환원시켜 무독(detoxify)하게 만들고 세포내에 유도되어 mutagens에 의해 일어나는 돌연변이와 종양효과(neoplastic effect)를 막아주고 발암 물질을 무독하게 하는 역할을 한다.<sup>2,3)</sup> GSH는 세포 내에서 다양한 기능을 가지고 있으며 외부의

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0561-770-2412 (팩스) 0561-770-2447

독성물질이 세포내 침입했을 때 직접 반응하거나 GST에 의해 독성물질과 결합하여 무독하게 하는 기능을 가지고 있다. 또한 GSH는 자연적인 항산화제로 발암과정시 세포를 보호한다. GSH의 전자친화적인 성질은 외부물질이 DNA와 결합하여 암을 유발하는 것을 막아주며 GST는 유리기(free radical)를 파괴하여 반응성이 높은 산소들로부터 세포를 보호한다고 보고되고 있다.<sup>4)</sup> 세포내 polyamine 함량은 세포의 증식능력과 종양형성에 관계가 있으며 polyamine 합성경로에서 중요한 효소가 ornithine decarboxylase(ODC)이다. ODC에 의해 생성되어지는 polyamine은 세포의 증식과 분화에 중요한 물질로써 세포내 polyamine의 합성억제는 종양 세포의 성장을 억제하고 다른 항암제제의 효과를 강화시켜주는 것으로 보고되었다.<sup>5,6)</sup>

당귀(*Angelicae gigantis Radix*)는 미나리과에 속한 다년생 참당귀(*Angelica gigas Nakai*)의 뿌리로서<sup>7)</sup> 신농본초경<sup>8)</sup>에 최초로 수록된 이후로 혈증 치료 약물로 응용되어져 오고 있다. 약침요법은 본초학적으로 유효한 약물이나 처방을 선택하여 증류 또는 알코올 추출등의 방법을 이용하여 주사액으로 만들어 경락학적으로 유효한 경혈이나 아시혈 또는 피부양성반응점에 주입함으로써 생리기능을 강화시키고 병리적인 상태를 개선시키는 침요법의 일종으로 수침요법, 혈위약물주사요법이라고도 한다.<sup>9,10)</sup> 당귀의 약리작용으로는 자궁기능조절, 면역기능활성화, 항염, 진통, Vitamin E 결핍 보충, 항균, 진정 및 심혈관계통에 대한 효능이 있는 것으로 보고되었다.<sup>11,12)</sup> 안 등<sup>13)</sup>은 당귀약침액의 항산화 효능을 보고한 바 있으며, 황 등<sup>14)</sup>은 당귀 약침액의 면역기능의 활성화 효과를 보고하였다.

그러나 아직은 당귀 약침액의 항암 효능에 대하여 보고된 바 없어 당귀 약침액의 항암실험에 착상하게 되었다. 따라서 본 연구에서는 미나리과에 속하는 당귀를 약침액으로 제조하여 약침액이 생체 장기에 미치는 영향과 약침액의 암예방 효과를 살펴보았다. 즉, 당귀가 생체 장기에 미치는 영향을 생쥐 혈청 중의 GOT, GPT, LDH 및 ALP-s의 활성을 측정하여 살펴 보았고, 생쥐의 복수암에 대한 암예방효과를 *in vivo* 실험으로 관찰하였다. 그리고 당귀 약침액의 암예방효과를 기전을 살펴보기 위하여 QR 생성 유도, GSH, GST의 활성, polyamine metabolism 저해를 측정하였다.

## 실험방법

### 시약

Minimum essential medium eagle's(MEM), dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), NCTC-135 medium, antibiotics, dimethyl sulfoxide(DMSO), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-di-phenyltetrazolium bromide(MTT), 99% ethyl alcohol anhydrous, bovine serum albumin(BSA), tween-20, flavin adenine dinucleotide(FAD), glucose-6-phosphate,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate( $\beta$ -NADP), yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, menadione, dicoumarol, potassium phosphate, crystal violet, glucose, thiamine HCl, biotin, vitamin B12, ferric citrate, yeast extract, proteose peptone, triton X-100, 5,5'-dithiobis-(2-nitro-benzoic acid)(DTNB), glutathione reductase, NADP<sup>+</sup>, bicinchoninic acid solution protein kit는 Sigma chemical Co.(U.S.A)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco(U.S.A)에서, GOT, GPT, LDH, ALP-s kits는 아산제약 주식회사에서 구입하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 1급 시약을 사용하였다.

### 시료제조

**당귀 약침액의 제조** - 본 실험에서 당귀(*Angelicae gigantis Radix*) 약침액을 제조하기 위하여 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 당귀를 정선하여 사용하였고, 추출용매인 물은 이온교환수지를 통과시킨 증류수를 사용하였다. 약침액은 앞서 보고된 문 등<sup>15)</sup>과 김 등<sup>16)</sup>의 방법에 의하여 수제 알콜침법으로 조제하였다. 즉, 당귀 60 g에 증류수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator(BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 ml을 감압농축하였다. 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  $\mu$ m, 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 첨가하

여 0.1×, 0.5× 농도를 조제하였다.

**당귀 열수추출액의 제조** - 당귀 60 g에 증류수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator(BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 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 감압 농축하여 사용하였고, 증류수나 PBS를 첨가하여 0.1×, 0.5× 농도를 조제하였다.

#### 실험동물

대한실험동물센터에서 구입한 6주령 수컷 ICR 마우스를 사용하였다. 7~10 일간 안정화시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험 기간 중 사료와 물은 자유로 먹게 하였다.

#### 당귀가 생체 장기에 미치는 영향

수컷 ICR 마우스를 각 군당 6마리로 하여 당귀 약침액을 맞지 않은 대조군, 당귀 약침액을 7일간 비경혈인 임의혈에 놓은 실험군(AGARS-BL) 및 중완혈(CV<sub>12</sub>)과 간수혈(BL<sub>18</sub>)에 놓은 실험군(AGARS-CV<sub>12</sub>, AGARS-BL<sub>18</sub>)들에서 혈액을 안외정맥총 부위로 채혈하여 혈청을 분리한 후 장기에 미치는 영향을 측정하였다.

**GOT, GPT 활성도 측정** - GOT 및 GPT의 활성도는 혈청 중 transaminase 측정용 kit(아산제약주식회사, 한국)를 사용하여 Reitman-Frankel법에 의하여 측정하였다. 그리고 GOT, GPT의 활성도는 표준곡선에 의해 활성치를 계산하여, 혈청 1 ml당 Karman unit로 표기하였다.

**LDH 활성도의 측정** - 혈청 중 LDH의 활성도는 LDH 측정용 kit(아산제약주식회사, 한국)를 사용하여 효소법(젓산기질법)에 의하여 측정하였다. 그리고 LDH 활성도는 표준혈청으로 작성한 표준검량곡선에 의해 계산하여 Wroblewski unit로 표기하였다.

**ALP-s 활성도의 측정** - 혈청 중 ALP-s의 활성도는 ALP-s 측정용 kit(아산제약주식회사, 한국)를 사용하여 Kind-king법에 의하여 측정하였다. 그리고 ALP-s 활성도는 표준혈청으로 작성한 표준검량곡선에 의해 계산

하여 K-A unit로 표기하였다.

#### 생쥐의 복수암 (EATC)에 대한 암예방 효과

EATC 복수암에 대한 당귀 약침액의 전투여에 의한 항암 효과 측정을 위하여 수컷 ICR 마우스를 각 군당 10마리로 하여 비처리한 정상군, 약침을 맞지 않고 EATC만을 이식한 대조군, 당귀 약침액을 비경혈인 임의혈(AGARS-BL)에 취혈한 실험군 및 약침액을 중완혈(AGARS-CV<sub>12</sub>)과 간수혈(AGARS-BL<sub>18</sub>)에 놓은 실험군으로 나누어 복강내 암세포 이식 및 당귀 약침액의 처리를 하였다. 당귀 약침액 1×, 5×를 10회 투여한 후, 1×10<sup>6</sup> EATC를 실험동물의 복강내에 이식하고 6일 후 각각의 실험군의 마우스 spleen 무게를 측정하고, 각 실험군 마우스의 복강내 암세포의 수를 측정하여 당귀 약침액의 전투여에 의한 암예방 효과를 살펴 보았다.

#### 암예방에 미치는 영향

**QR 생성 측정** - QR 생성 유도 효과는 Prochaska<sup>17)</sup> 등의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 1×10<sup>4</sup>개의 Hepal1c7 세포와 Ac2F 세포를 200 µl의 MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양 후, 새 배양액 190 µl와 당귀 약침액(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 열수추출액이 첨가된 배양액에서 48시간 배양 후 배양액을 버리고 세포를 용해시켰다. 200 µl reaction mixture {7.5 ml of 0.5 M Tris-HCl(pH 7.4), 100 mg of bovine serum albumin, 1 µl of 1.5% Tween-20, 0.1 ml of 7.5 mM FAD, 1 ml of 150 mM glucose-6-phosphate, 90 µl of 50 mM NADP, 300 U of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45 mg MTT, 150 µl of 50 mM menadione in 150 µl H<sub>2</sub>O}를 각 well에 넣고 5분간 반응 후 0.3 mM dicumarol (in 0.5% DMSO)과 5 mM potassium phosphate가 들어있는 용액 50 µl를 첨가하여 반응을 중단시킨 후 microplate reader를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**세포내 GSH 생성량 측정** - 세포내 총 GSH 함량은 Griffith<sup>18)</sup>의 방법을 96-well microtiter plate에서 사용할 수 있게 변형하여 측정하였다. Hepal1c7를 배

양하여 당귀 약침액 및 열수추출액에 의한 세포내 GSH의 양을 측정하였다.  $1 \times 10^4$ 의 세포를 200  $\mu$ l MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양 후 10  $\mu$ l 당귀 약침액(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  $\mu$ l stock buffer {125 mM sodium phosphate, 6.3 mM ethylenediaminetetraacetic acid(Na-EDTA), pH 7.4}를 가하고 170  $\mu$ l의 reaction mixture {20  $\mu$ l 6 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) in stock buffer, 10  $\mu$ l glutathione reductase solution(50 units in 10 ml stock buffer), 140  $\mu$ l of the NADPH-generating system {2.5 ml 0.5 M Tris-HCl(pH 7.4), 330  $\mu$ l 150 mM glucose-6-phosphate, 30  $\mu$ l 50 mM NADP<sup>+</sup>, 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 binchinchonic acid solution protein kit를 사용하여 측정하였다.

**세포내 GST 생성량 측정<sup>19)</sup>** - GST  $\alpha$ , GST  $\mu$ 를 발현하는 Hepa1c1c7 cell을 사용하여 GST 활성 측정을 하였다. Hepa1c1c7 cell을 96-well microtiter plate의 각 well에  $1 \times 10^4$  cells을 접종시키고 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양 후 새 배양액 190  $\mu$ l와 당귀 약침액(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  $\mu$ l씩 각 well에 처리하였다. 세포를 약침액 또는 열수추출액이 처리된 배양액에서 48시간 배양 후 PBS로 3회 씻고, 3회의 freeze-thaw cycles에 의해 세포를 용해시켰다. GST 활성 측정을 위해 100  $\mu$ l reaction mixture(2.5 mM GSH, 1 mM CDNB in 0.1 M

potassium phosphate buffer, pH 6.5)을 첨가하고 1분간 plate shaker에서 shaking한 후 405 nm에서 3분간 흡광도의 증가를 microplate reader에서 측정하였다. 단백질 함량은 GST 활성 측정을 한 plate와 같이 처리한 plate에서 binchinchonic acid solution protein kit를 사용하여 측정하였다.

**Polyamine metabolism 측정<sup>20)</sup>** - *Acanthamoeba castellanii*의 증식을 측정하여 polyamine metabolism을 측정하였다.  $2 \times 10^5$  cells의 *Acanthamoeba castellanii*을 3 ml OGM {3 N KOH, 30% glucose, 2,000  $\times$  vitamins(0.2 g thiamine HCl, 40 mg biotin, 200  $\mu$ g vitamin B<sub>12</sub>/100 ml 95% ethanol), 100 $\times$  salt I (0.4 g ferric citrate, 0.1 g CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, 3.1 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O in 250 ml dH<sub>2</sub>O), 100 $\times$  KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(13.6 g/l, pH 7.0), yeast extract-proteose peptone(7.5 g/l)}에 부유시켜 T-25 tissue culture flask에서 당귀 약침액(1 $\times$ , 5 $\times$ ) 또는 열수추출액(1 $\times$ , 5 $\times$ ) 150  $\mu$ 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 P 값이 0.05 또는 0.01미만을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 당귀 약침액의 생체 장기에 대한 영향

**혈청 중 GOT, GPT 활성의 측정** - 생약 추출물에서는 생약 특유의 여러 배당체가 용출되어 나오므로, 본 실험에서 사용한 당귀 약침액을 mouse에 7일간 임의혈, 중완혈, 간수혈에 주사한 실험군과 약침액을 주사하지 않은 대조군의 혈청으로 간세포 이상의 지표로 사용하고 있는 GOT, GPT를 측정하여 당귀

Table I - Effect of AGRAS on serum GOT, GPT, LDH and ALP-s activities

Group	GOT (Karmen unit)	GPT (Karmen unit)	LDH (Wroblewski unit)	ALP-s (K-A unit)
Control	132.5 $\pm$ 20.3	23.7 $\pm$ 2.9	485.1 $\pm$ 63.0	22.2 $\pm$ 2.7
AGARS-BL 1 $\times$	77.5 $\pm$ 8.1	22.5 $\pm$ 4.7	536.8 $\pm$ 71.1	27.6 $\pm$ 1.9
AGARS-CV <sub>12</sub> 1 $\times$	112.3 $\pm$ 10.3	15.0 $\pm$ 2.7	446.9 $\pm$ 45.3	19.9 $\pm$ 2.1
AGARS-BL <sub>18</sub> 1 $\times$	62.5 $\pm$ 7.3	10.0 $\pm$ 1.5	515.5 $\pm$ 63.1	20.0 $\pm$ 2.4

Each value represents the mean  $\pm$  SD (standard deviation).

**Table II** – The effect of AGRAS-pretreatment on the weight of spleen and antitumor activity against EATC in the ICR mice

AGRAS injection	Concentration	Spleen weight (mg)	No. of EATC recovered (10 <sup>6</sup> )	% Inhibition
Control		125.7 ± 24.3	123.9 ± 34.1	
AGARS-BL	1 ×	131.1 ± 14.7	96.3 ± 12.3	22.3
	5 ×	134.6 ± 20.4	65.8 ± 11.2	46.9
AGARS-CV <sub>12</sub>	1 ×	133.2 ± 12.5	73.5 ± 9.4	40.7
	5 ×	143.2 ± 17.4	51.7 ± 8.2	58.3
AGARS-BL <sub>18</sub>	1 ×	137.6 ± 19.8	58.2 ± 9.8	53.0
	5 ×	197.7 ± 13.4	37.5 ± 7.9	69.7

Each value represents the mean ± SD (standard deviation)

약침액이 간세포에 미치는 영향을 알아 보았다. Table I의 결과에서와 같이 당귀 약침액을 주사한 실험군에서는 약침액을 투여하지 않은 대조군(132.5 unit)에 비해 GOT 활성이 임의혈, 중완혈, 간수혈에서 각각 77.5 unit, 112.3 unit, 62.5 unit로 42%, 15%, 53%씩 각각 감소하였으며, 임의혈과 간수혈 사이에는 GOT 활성에 큰 차이가 없었다. GPT 활성은 임의혈, 중완혈, 간수혈 실험군이 대조군(23.7 unit)에 비해 각각 22.5 unit, 15.0 unit, 10.0 unit로 감소하였으며, 비경혈인 임의혈에 비해 경혈이 높은 감소율을 보였다.

**LDH 활성도의 측정** – LDH는 동물에서 5종의 isozyme이 있으며 그 종류에 따라 장기 특이성이 있으나 본 실험에서는 혈청 중의 total enzyme을 측정하여 심폐기관, 혈액, 간세포에 대한 영향을 알아내는 지표로 사용하였다. Table I에 그 결과를 나타낸 바와 같이 약침액을 투여하지 않은 대조군(485.1 unit)에 비하여 당귀 약침액을 임의혈에 주사한 실험군은 536.8 unit로 증가하였고, 중완혈은 446.9 unit로 약 8% 감소하였으며, 간수혈에 주사한 실험군은 515.5 unit로 증가하였다.

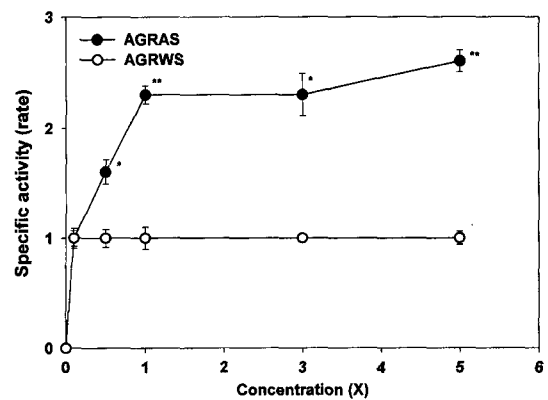
**혈청 중 ALP-s 활성도의 측정** – 간세포와 골세포에 대한 독성 효과를 알아보기 위하여 ALP-s를 생쥐의 혈청에서 측정하여 당귀 약침액을 주사한 실험군과 주사하지 않은 대조군을 살펴 본 결과, Table I에서와 같이 임의혈에서는 27.6 unit로 증가하였고, 중완혈, 간수혈은 19.9 unit, 20.0 unit로 각각 10% 감소하여 비경혈인 임의혈에 비해 경혈인 실험군에서 ALP-s 활성도가 현저히 감소하였다.

**항암작용**

**spleen 증량에 대한 효과** – 생체내에서 당귀 약침액의 전투여에 의한 spleen의 증량 변화를 살펴보기 위

하여 당귀 약침액을 10회 투여한 뒤 EATC 1×10<sup>6</sup> cells을 복강에 이식하여 암을 유발시킨 쥐에게서 spleen을 취하여 무게를 측정하였다(Table II). 시료를 처리하지 않은 대조군이 125.7 mg인데 비해 임의혈, 중완혈, 간수혈의 실험군에서 spleen의 증량 증가를 보였고, 특히, 간수혈 5×에서는 197.7 mg으로 대조군에 비해서 높게 증가되었다. 또한 약침액의 농도가 높아질수록 spleen의 증량 증가는 뚜렷하게 나타났다.

**암세포의 성장 저해 효과** – 생체내에서 당귀 약침액의 전투여에 의한 Ehrlich ascites tumor cell (EATC)에 대한 암억제 효과를 알아보기 위해 당귀 약침액을 10회 투여한 뒤 EATC 1×10<sup>6</sup>을 복강에 이식하여 암을 유발시킨 생쥐에게서 암세포 성장 저해 효과를 살



**Fig. 1** – Effect of AGRAS and AGRWS on induction of quinone reductase activity in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. Cells were treated with AGRAS or AGRWS for 48 hours, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean ± SD (standard deviation) of three separate experiments. Mean significantly different from control \*P<0.05, \*\*P<0.01 using student's t-test with n=3.

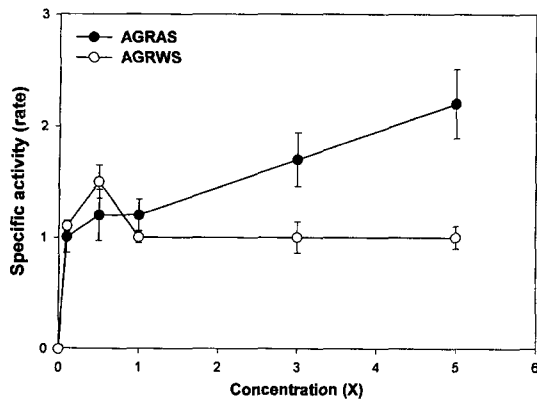


Fig. 2 - Effect of AGRAS and AGRWS on induction of quinone reductase activity in rat Ac2F cells. Cells were treated with AGRAS or AGRWS for 48 hours, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean  $\pm$  SD (standard deviation) of three separate experiments.

펴보았다(Table II). 약침을 투여하지 않은 대조군에 비해 임의혈, 중완혈, 간수혈에 약침을 투여한 경우 높은 암세포 성장 억제율을 보였다. 특히 간수혈의 경우 1 $\times$ , 5 $\times$ 에서 각각 53.0%, 69.7%의 억제율을 보였다.

#### 암예방효과

**QR 생성에 미치는 영향** - 당귀의 암예방 효과를 살펴보기 위하여 발암물질을 무독성화시키는 Phase II enzyme, QR 생성의 유도 효과를 측정하였다. Hepa1c1c7세포에 대한 실험에서 5 $\times$  농도에서 가장 높은 수치인 2.6배의 높은 생성 유도율을 보였다. 열수추출액에서는 농도 차이에 따른 QR 생성 유도율의 변화가 없으며 대조군과 같은 1.0배의 생성 유도율을 보였다. 따라서 생쥐의 간암세포인 Hepa1c1c7에서 약침액이 QR 생성을 유도하였으며 최고 2.6배의 유도율을 보였으나 열수추출액은 1.0의 유도율로 대조군과 같은 효과를 보였다(Fig. 1).

Ac2F 세포에 대한 당귀의 QR 유도율을 측정해 본 결과, 약침액의 경우 농도 0.1 $\times$ 에서 1.0인 수치를 보이다가 농도 5 $\times$ 에서는 유도율 2.1로 현저히 많은 QR 생성이 유도되었다. 열수추출액을 Ac2F에 처리했을 때에는 농도 0.5 $\times$ 에서 1.5배로 QR의 생성량이 증가하였으며, 농도 5 $\times$ 에서는 1.0으로 감소하였다. Ac2F에서도 약침액이 열수추출액보다 각각의 농도에서 더 높은 QR 생성 유도율을 보여 주었다(Fig. 2).

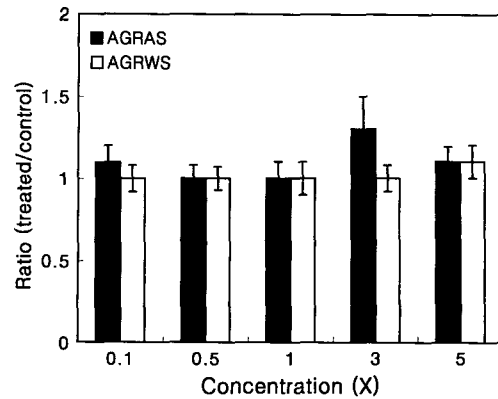


Fig. 3 - Induction of glutathione levels by AGRAS or AGRWS in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. Cells were treated with AGRAS or AGRWS in a concentration range of 0.1 $\times$ ~5 $\times$  for 48 hrs. Glutathione level of sample-treated cells was analyzed and compared with the level of solvent-treated cells to calculate the ratio of GSH induction. Each point represents the mean  $\pm$  SD (standard deviation) of three separate experiments.

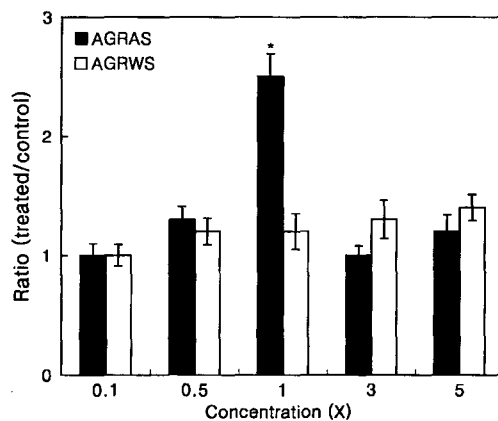


Fig. 4 - Effect of AGRAS or AGRWS on induction of glutathione S-transferase in Hepa1c1c7 cells. Cells were treated with AGRAS or AGRWS at a concentration ranging from 0.1 $\times$ ~5 $\times$  for 48 hrs. Glutathione S-transferase level of sample-treated cells was analyzed and compared with the level of solvent-treated cells to calculate the ratio of GST induction. Each point represents the mean  $\pm$  SD (standard deviation) of three separate experiments. Mean significantly different from control \*P<0.05 using student's t-test with n=3.

**세포내 GSH 생성에 미치는 영향** - 약침액에 의한 GSH 생성을 Hepa1c1c7 세포에서 살펴보았다. 0.1 $\times$  농도의 약침액을 처리한 세포에서 대조군보다 GSH

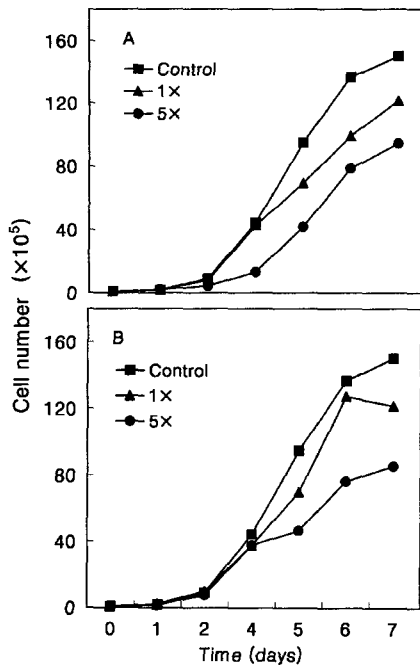


Fig. 5-Inhibition of the growth of the *Acanthamoeba castellanii* by AGRAS (A) or AGRWS (B). *Acanthamoeba castellanii* were incubated with AGRAS or AGRWS for each time.

level이 1.1배의 증가를 보이다가 3×에서 1.3배를 보였다. 열수추출액에서는 각각의 시료 농도에서 1.0~1.1배의 수치를 보여 농도 차이에 따른 큰 변화가 없었다(Fig. 3). 생쥐에서 유래된 Hepa1c1c7 세포내의 GSH는 약침액 농도 3×에서 가장 많이 생성되었다.

**세포내 GST 생성에 미치는 영향** - 약침액의 경우 1×에서 2.5배의 GST 활성이 유도되었으며, 열수추출액의 경우 1.0~1.4로 농도에 따른 큰 변화가 없었다(Fig. 4).

**Polyamine metabolism에 미치는 영향** - polyamine은 아메바 증식에 필수적이므로 당귀 약침액이 아메바의 polyamine 대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 아메바의 증식을 측정하였다(Fig. 5). 2×10<sup>5</sup> cells의 *Acanthamoeba castellanii*에 150 μl 3차 증류수만을 처리한 후 24시간, 48시간, 96시간, 120시간, 144시간, 168시간을 관찰했을 때, Fig. 6에서와 같이 아메바의 세포수는 1.8×10<sup>5</sup>, 9.0×10<sup>5</sup>, 44.0×10<sup>5</sup>으로 96시간까지 서서히 증가하다가 120시간 이후 급격히 세포수의 증가를 보여 168시간에는 15.0×10<sup>6</sup> 까지 증가하였다. 각 처리시간에서 당귀 약침액 1×, 5× 농도를

처리했을 때 농도 5× 당귀 약침액에서는 168시간이 지난 후, 9.4×10<sup>6</sup>로 대조군에 비해서 37% 정도의 억제 효과가 나타났다. 또한, 1×의 약침액 농도에서도 대조군에 비해 20%의 아메바의 증식 억제 효과를 보였다.

열수추출액에 의한 아메바 증식 억제능을 살펴보기 위해 약침액 실험과 같이 2×10<sup>5</sup> cells의 *Acanthamoeba castellanii*에 150 μl의 증류수 및 당귀 열수추출액 1×, 5×를 처리하였다. 168시간 후에 대조군, 1×, 5×에 대해 세포수를 측정해 보았을 때 15×10<sup>6</sup>, 12.2×10<sup>6</sup>, 8.6×10<sup>6</sup>의 세포수를 보여 대조군에 비해서 열수추출액 1×, 5×에서 20%, 43%의 아메바 증식 억제 효과가 나타났다.

이와 같이 당귀 약침액과 열수추출액은 농도 의존적으로 아메바 증식을 억제하였고 약침액과 열수추출액은 비슷하게 아메바 증식을 억제하였다.

## 고 찰

일반적으로 물추출 생약에서는 각 생약 특유의 배당체가 용출되므로 이러한 생약을 장기간 주사했을 때 추출된 배당체에 의한 생체 장기 손상이 우려된다. 당귀 약침액을 사용한 본 실험에서는 GOT, GPT, LDH와 ALP-s의 활성도 측정으로 장기 독성유무를 알아보았다. 그 결과, 당귀 약침액을 임의혈, 중완혈, 간수혈에 주사했을 때 GOT, GPT 활성도 측정에 의하면 당귀 약침액은 간세포에 나쁜 영향이 없으며 오히려 간세포 기능을 증가시키는 효과가 있었다. 또한 LDH 활성도 측정에 의하면 심폐기능, 간세포 기능을 증가시키는 효과가 있었다. ALP-s 활성도 측정에서도 당귀 약침액은 생체의 간세포나 골세포의 기능에 영향을 미치지 않았다. 따라서 반복된 당귀 약침액의 투여가 간세포, 골세포, 심폐기관 등에 유해작용이 없었으며 오히려 각 기능을 증가시키는 효과가 있었다.

EATC를 사용하여 생쥐를 대상으로 복수암을 유발시킨 후 생체(*in vivo*)에서의 당귀 약침액의 전처리에 의한 암억제 효과를 측정하였다. 생체내에서 당귀 약침액이 EATC에 미치는 효과를 살펴본 결과, 종양세포만을 이식한 생쥐에 비해 임의혈, 중완혈과 간수혈에 취혈한 쥐들에게서 spleen의 중량 증가를 보였고, 높은 암세포 성장 억제율을 보였다.

암예방(chemoprevention)은 암화 과정(carcinoge-

nesis)을 연장, 억제시키거나 암화된 것을 전환(reversion)시키는 작용이다. 현재 암예방 물질에 대한 많이 연구가 진행되고 있으며, 효과적인 암예방물질(chemopreventive agents)의 연구를 위해 생화학적 표식자(biochemical markers)를 사용하고 있다.<sup>1)</sup> 이 표식자들은 암화과정시 발암물질의 대사물질과 그의 부산물과도 반응하며 다양하고 많은 발암기전을 저해할수록 효과적인 암예방물질로 간주된다. 이러한 표식자들에는 QR, GSH, GST 등이 사용되고 있다. QR은 세포질에 주로 분포되어 있으며, quinones 과 quinoneimines를 환원시켜서 세포에 대한 독성을 제거한다. QR은 GST와 UDP-glucuronosyl transferase와 같이 Phase II enzyme으로 외부의 독성이 있는 물질과 돌연변이물질(mutagen), 발암물질(carcinogen)로부터 세포를 보호한다. Phase II enzyme 생성의 유도는, 곧 항암활성(anticarcinogenic activity)으로 여겨진다.<sup>2,3)</sup>

당귀 약침액을 생쥐의 간암세포 Hepal1c7에 처리하였을 때 5×농도에서 2.6배의 QR 생성 유도율을 보였고 당귀 약침액의 농도가 높아짐에 따라 QR 유도율도 증가되었다. Rat의 Ac2F 세포에서의 당귀 약침액의 QR 생성유도는 생쥐의 간암세포에서와 마찬가지로 높은 QR생성율을 나타낸 바 당귀 약침액은 Phase II enzyme인 QR의 생성을 유도하였다. 그러므로 당귀 약침액은 돌연변이원성, 발암물질의 대사과정시 생성된 quinone에 의한 세포내 독성 및 세포내 DNA 손상을 없애주며, 발암물질의 종양효과(neoplastic effect)를 막아줄 것으로 추측된다.

Glutathione(GSH)은 세포내 다양한 기능을 가지고 있으며 특히 독성이 강한 물질을 제거해준다.<sup>5)</sup> 대부분의 외부의 화학물질은 cytochrome p-450-dependent monooxygenase system에서 대사되어져 전자친화적물질(electrophilic product), epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질이 된다.<sup>21)</sup> 이 물질들은 GSH와 직접적으로 결합하거나 GST에 의해 촉매되는 과정을 거쳐 결합하기도 한다. 이 반응들은 무독성과정(detoxification pathway)으로 세포내 GSH가 고갈되면 독성이 강한 대사물질들이 만들어져 세포내 손상을 유발시켜 mutagenesis, carcinogenesis를 일으킨다.<sup>22)</sup> Hepal1c7에서 GSH, GST는 당귀 약침액의 농도에 의존적으로 생성율이 증가하였다. 위의 결과로 당귀 약침액은 세포내 glutathione 생성을 촉진하

여 세포내 발생한 산화물질과 기타의 독성물질을 무독하게 할것으로 추측된다.

Aflatoxin에 의해 유도된 간암에 걸린 쥐에 다량의 GSH를 주었을 때 종양저해작용이 있었으며, butylated hydroxyanisole은 GSH level을 증가시켜 화학물질에 의한 발암을 저해한다고 보고되었다.<sup>23)</sup> 이에 당귀 약침액에 의해 증가한 GSH는 산화적인 유리기의 공격(oxidative free radical attack)으로부터 세포를 보호하고 DNA에 결합하는 것을 막아주어 mutagenesis 또는 carcinogenesis를 저해할 것으로 여겨지며 세포내 GSH 생성을 촉진하여 세포내 발생한 산화물질과 기타의 독성물질을 무독하게 할 것으로 추측된다.

Polyamine은 발암과정시 비정상적으로 생합성되어 발암과정에 밀접한 관계가 있으며,<sup>24,25)</sup> 원생동물 세포의 성장 및 분화에도 관여한다. 원생동물 세포 배양에서 돌연변이 또는 억제제를 사용하여 polyamine의 합성을 막으면 세포성장도 중단된다. 그러므로 원생동물의 polyamine 생합성 억제제는 암세포의 성장을 저해할 수 있다.<sup>26)</sup> 당귀 약침액과 열수추출액은 농도 의존적으로 아메바의 성장을 억제하였다. 당귀 약침액과 열수추출액에 의해 아메바의 수가 감소하는 것이 아니라 증식속도가 지연되었으므로 독성에 의한 수의 감소가 아니라 아메바 성장에 필요한 polyamine의 고갈에 따른 증식속도의 지연으로 보인다. 당귀 약침액 및 열수추출액이 polyamine 생성을 저해시키고 이에 당귀 약침액 및 열수추출액에서 배양한 아메바의 세포 성장이 저해된 것으로 보인다. Polyamine 대사 저해제의 대표적인 예인 difluoromethylornithine(DFMO)는 polyamine 대사 경로에서 중요한 효소인 ornithine decarboxylase의 활성을 저해함이 증명되었으며 DFMO는 많은 종류의 발암물질에 의해 유도된 tumorigenesis를 저해하는 효과가 있었다.<sup>27,28)</sup> 본 실험에서의 아메바 성장억제는 polyamine 대사의 저해로 인한 것으로 여겨지며 이로 인해 종양발생을 억제할 것으로 예측되므로 앞으로 radioactivity를 이용하여 ODC활성을 직접 측정하는 것은 매우 의미있는 실험이라 하겠다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 당귀 약침액은 효과적으로 세포내 QR의 농도를 높혀주고 polyamine metabolism을 저해할 뿐 아니라 GSH와 GST의 양을 증가시켜 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료된다.



결 론

한방에서 염증, 종양 억제등에 사용되는 당귀로 약 침액을 조제하여 생체 장기에 미치는 영향과 암 억제 효과를 살펴 본 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 당귀 약침액이 장기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 약침액을 7일간 투여한 mouse 혈청 중의 효소 GOT, GPT, LDH 및 ALP-s의 활성변화를 측정 한 결과, GPT는 변화가 없었고 GOT, LDH와 ALP-s의 활성은 감소하였으므로 약침액이 간세포, 골세포, 심폐 기관에 유해작용이 없으며 오히려 각 기능을 증가시키는 효과가 있었다.

2. 당귀 약침을 10일간 전투여한 후 Ehrlich ascites tumor cell을 이식하여 복수암이 유발된 생쥐의 비장 무게 증가률을 살펴본 결과 약침액을 주사한 생쥐의 비장 무게 증가율이 대조군에 비해서 높았다.

3. 당귀 약침을 10일간 투여한 후 Ehrlich ascites tumor cell을 이식하여 복수암이 유발된 생쥐의 EATC 성장을 살펴 본 결과 약침액을 주사한 쥐의 EATC의 성장이 크게 억제되었다.

4. 당귀 약침액의 암 억제 효과를 살펴보기 위하여 quinone reductase(QR)생성 유도를 측정한 결과 당귀 약침액, 열수추출액을 처리한 간암세포인 Hepa1c1c7 과 rat의 Ac2F에서 QR생성이 유도되었으며 약침액에 의한 유도율이 더 높았다.

5. Hepa1c1c7에서 glutathione(GSH) 생성을 살펴 본 결과 당귀 약침액과 열수추출액에 의한 GSH 생성이 증가하였다.

6. Hepa1c1c7에서 glutathione S-transferase(GST) 활성은 당귀 약침액에 의해 활성이 증가되었다.

7. 농도별 당귀 약침액과 열수추출액에 의한 *Acanthamoeba castellanii* 증식을 살펴 본 결과, 약 침액과 열수추출액이 *Acanthamoeba castellanii*의 polyamine metabolism을 억제하여 농도 의존적으로 *Acanthamoeba castellanii*의 증식을 저해하는 효과가 있었다.

문 헌

1) Sharma, S., Stutzman, J. D., Kelloff, G. J. and Steele, V. E. : Screening of potential chemopreventive agents

using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* **54**, 5848 (1994).

2) Wattenberg, L. W. : Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* **45**, 1 (1985).

3) Talalay, P., DeLong, M. J. and Prochaska, H. J. : in *Cancer Biology and Therapeutics* Cory. J. G., and Szentivani, A., eds, Plenum, New York, p.197 (1987).

4) Boyland, E. and Chasseud, C. F. : The role of glutathione and glutathione-S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Cancer Res.* **29**, 175 (1979).

5) Nakadate, T., Aizu, E., Yamamoto, S., Fujiki, H., Sugimura, T. and Kato, R. : Inhibition of teleocidin-caused epidermal ornithine decarboxylase induction by phospholipase A<sub>2</sub>, cyclooxygenase- and lipoxygenase-inhibitors. *Jpn. J. Pharmacol.* **37**, 253 (1985).

6) Cerutti, P. A. : Prooxidant states and tumor promotion, *Science* **227**, 375 (1985).

7) 李尙仁 : 本草學, 修書院, 서울, p. 101 (1998).

8) 吳善等 : 神農本草經, 人民衛生出版社, 北京, p. 64 (1982).

9) 金廷彦 : 奇蹟의 藥鍼療法, 金剛出版社, 서울, p. 53 (1987).

10) 南相千 : 經絡. 世明文化社, 서울, p. 445 (1993).

11) 王浴生 : 中藥藥理與應用, 人民衛生出版社, 北京, p. 424 (1983).

12) 李時珍 : 本草綱目, 高文社, 서울, p. 484 (1983).

13) 安峻徹 文振榮 林鍾國 : 當歸 藥鍼液의 抗酸化 效能에 관한 研究 I. 大韓鍼灸學會誌 **13**, 254 (1996).

14) 黃 安秉哲 朴東錫 : 濃度別 當歸藥鍼이 放射線 被曝에 의한 免疫機能 低下에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌 **11**, 113 (1994).

15) 문진영, 임중국, 최혜경, 이임태, 이항우, 남경수 : 시호 약침제제가 생쥐의 면역활성 에 미치는 영향, 생약학회지 **30**, 115 (1999)

16) 김중완, 최혜경, 손윤희, 임중국, 이항우, 남경수 : 금은화 약침액의 암예방 효과, 생약학회지 **30**, 261 (1999)

17) Prochaska, H. J. and Sanamaria, A. B. : 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 (1988)

18) Griffith, O. W. : Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207 (1980).

- 19) Habig, W. H., Pabst, M. H. and Jacoby, W. B. : Glutathione S-transferase : the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130 (1974).
- 20) Kim, B. G., McCann, P. P. and Byers, T. J. : Inhibition of multiplication in *Acanthamoeba castellanii* by specific inhibition of ornithine decarboxylase. *J. Protozool* **34**, 264 (1987)
- 21) Jollow, D. J. and Smith, C.: Biochemical aspects of toxic metabolites formation, detoxification and covalent binding. in *Biologically Reactive Intermediates*, Jollow, K. J., Kocsis, J. J., Snyder R. and Vainio, H., eds, Plenum Press, New York, p. 42 (1977).
- 22) Mitchell, J. R., Hinson, J. A. and Nelson, S. D. : Glutathione and drug induced tissue lesions. in *Glutathione : Metabolism and Function* Arias, I. M. and Jakoby, W. B., eds, Raven Press, New York, p. 357 (1976).
- 23) Molders, P. and Jernestiom, B. : Interaction of glutathione with reactive intermediates. in *Functions of Glutathione : Biochemical, Physiological, Toxicological, and Clinical Aspects* Larson, A., Orrenius, S., Holgren, A. and Mannervik, B., eds, Raven Press, New York, p. 99 (1983).
- 24) Porter, C. W. and Sufrin, J. R. : Interference with polyamine biosynthesis and/or function by analogs of polymines or methionine as a potential anticancer chemotherapeutic strategy. *Anticancer Res.* **6**, 525 (1986).
- 25) Tabor, C. W. and Tabor, H. : Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* **49**, 81 (1985).
- 26) Pegg, A. E. and McCann, P. P. : Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* **243**, C212 (1982).
- 27) Rozhin, J., Wilson, P. S., Bull, A. W. and Nigro, N. D. : Ornithine Decarboxylase activity in the rat and human colon. *Cancer Res.* **44**, 3226 (1984).
- 28) Takigawa, M., Verma, A. K., Sinsiman, R. C. and Boutwell, R. K. : Polyamine biosynthesis and skin tumor promotion: inhibition of 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-promoted mouse skin tumor formation by the irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase-difluoromethylornithine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**, 969 (1982).