

## 발암과정 생화학적 표식자를 이용한 하고초 약침액의 암예방 활성 측정

박신화 · 조경희 · 손윤희<sup>1</sup> · 임종국 · 남경수<sup>1,\*</sup>

동국대학교 한의과대학 경혈학교실,

<sup>1</sup>의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터

## Testing of Cancer Chemopreventive Potential of *Prunella vulgaris* L. Aqua-acupuncture Solution Using Biochemical Markers of Carcinogenesis

Sin-Hwa Park, Kyoung-Hee Cho, Yun-Hee Shon<sup>1</sup>,

Jong-Kook Lim and Kyung-Soo Nam<sup>1,\*</sup>

Department of AM-Pointology, College of Oriental Medicine, <sup>1</sup>Department of Pharmacology  
College of Medicine and Intractable Diseases Research Center, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

**Abstract** – *Prunella vulgaris* L. aqua-acupuncture solution (PVAS) was tested for cancer chemopreventive activity using chemoprevention-associated biochemical end points. The following effects were measured. : (a) inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced cytochrome P4501A1 activity (b) inhibition of [<sup>3</sup>H]B[a]P-DNA binding (c) inhibition of phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)-induced free radical formation in HL-60 cells (d) inhibition of polyamine metabolism. PVAS inhibited cytochrome P4501A1-mediated ethoxyresorufin-O-deethylase activity. The binding of [<sup>3</sup>H] B[a]P metabolites to DNA of NCTC-clone 1469 cells was inhibited significantly by PVAS. There is 22% inhibition of TPA-induced free radical formation in human leukemic cells with 5 mg/ml PVAS. Proliferation of *Acanthamoeba castellanii* was inhibited by PVAS at concentration of 30 mg/ml. PVAS positive in these assays may inhibit the carcinogenesis process and is considered very promising cancer-preventing agent because of its multiple activities.

**Key words** – *Prunella vulgaris* L., cytochrome P4501A1, carcinogen-DNA binding, free radical formation, polyamine metabolism

암의 발생기전이나 치료에 대한 연구를 위해 여러 선진국에서 막대한 연구비를 투자해 왔으나, 아직도 암은 난치성 질병으로 남아 있으며, 여러 가지 치료법들은 부작용을 초래하고 있다.<sup>1)</sup> 따라서, 최근에는 미국과 일본 등에서 기존의 불완전한 암치료 보다는 예방분야 연구에 비중을 두고 암 예방 효과와 관련한 새로운 약물연구 및 제재개발에 많은 노력을 기울이고 있으며 최근에는 부작용이 적은 천연물에서의 암

예방 물질 개발에 관한 연구가 관심을 모으고 있다. 암 예방이란 발암과정의 초기단계에서 암 발생을 예방하거나 억제시키며, 암으로 진행된 것을 전환시키는 것을 의미한다.<sup>2)</sup> 효과적인 암 발생 억제물질을 연구하는데 있어 이용되고 있는 생화학적 표식자(biochemical markers)란 다단계 발암과정에서 특이적으로 생성되는 물질 뿐만 아니라 비정상적인 생화학적 요소의 변화로 발암과정의 다단계와 관련하여 각 단계별로 분류된다.<sup>3)</sup> 이러한 생화학적 표식자들은 발암과정의 개시단계를 억제하는 기전인 cytochrome P450 효

\*교신저자 : Fax : 054-770-2477

소의 억제, carcinogen-DNA adduct 형성 저해, phase II enzyme의 유도, GSH 생성 유도 등이 있고, 암의 촉진단계와 진행단계의 생화학적 표식자로는 polyamine 대사억제제와 free radical 형성 억제 등이 있다.

하고초(夏枯草)는 꿀풀과(脣形科, Labiatae)에 속한 다년생 草本인 꿀풀(*Prunella vulgaris* L. var. *lilacina* Nakai)의 지상부 줄초를 일컫는다.<sup>4)</sup> 하고초의 주성분은 triterpenoid, saponin, ursolic acid, rutin, hyperoxide, tannin, caffeic acid, alkaloid, vitamin B<sub>1</sub>, vitamin C, vitamin K, 칼륨염 등이며, 그 약리작용을 살펴보면 칼륨염, triterpenoid, ursolic acid 등은 이노 작용, tannin은 수렴작용, alkaloid는 진해 지혈작용을 한다.<sup>5)</sup> 한편 약침요법은 혈자리를 통한 침의 자극과 함께 주입한 약물의 효능이 발휘되어 질병을 치료하는 요법이다. 본 실험실에서는 앞서 여러 생약제제 약침액의 암 예방효과(금은화,<sup>6)</sup> 감두탕,<sup>7)</sup> 당귀,<sup>8)</sup> 애엽<sup>9)</sup> 및 면역 증강 효과(시호,<sup>10)</sup> 감초<sup>11)</sup>) 등을 연구한 바, 본 논문에서는 하고초를 약침액으로 조제하고, 이것을 이용하여 cytochrome P4501A1 효소의 억제효과, carcinogen-DNA binding 저해효과, free radical 소거 효과 및 polyamine 대사에 미치는 영향 등을 측정하여 암 예방 효과를 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**시약** - RPMI-1640 medium, NCTC-135 medium, antibiotics, dimethylsulfoxide (DMSO), Hanks' balanced salt solution (HBSS), ribonuclease A, ribonuclease T<sub>1</sub>, cytochrome C, potassium acetate, proteinase K, ellagic acid, bovine serum albumin (BSA), glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, laury sulfate (sodium dodecyl sulfate), 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), NADP<sup>+</sup>, phorbol 12-myristate-13-acetate (TPA), ferric citrate, ethoxyresorufin, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 JBI사 (Daegu, Korea), [<sup>3</sup>H]benzo[a]pyrene ([<sup>3</sup>H]B[a]P)은 Amersham Pharmacia Biotech사 제품을 사용하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

**시료제조** - 하고초는 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 뒤 정선하여 사용하였고, 약침액의 추출용매인 물은 이온교환수지를 통과시킨 증류수를 사용하였다.

약침액은 김<sup>6)</sup> 등이 보고한 바와 같이 수제 알코올침법에 의하여 조제하였으며, 30 mg/ml, 50 mg/ml 약침액은 10 mg/ml을 감압농축하여 사용하였고, 1 mg/ml, 5 mg/ml 농도는 증류수로 희석하여 조제하였다.

**세포배양** - NCTC-clone 1469 (mouse liver cell) 세포는 10% FBS가 포함된 NCTC 135를 배양액으로 사용하였으며, 3 또는 4일 간격으로 배지를 교환해 주었다. 또한 HL-60 (human leukemic cell) 세포는 한국세포주은행(KCLB)로부터 분양받아 RPMI-1640에 20% heat-inactivated FBS를 첨가하여 사용하였다. 이들 세포는 액체질소에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

**마이크로솜의 분리** - Sprague-Dawley계 흰쥐의 간으로부터 마이크로솜의 분리는 Pohl과 Fouts<sup>12)</sup>의 방법을 참고하여 실시하였다. 관류법을 통하여 DMBA를 처리하고, 24시간 뒤 diethyl ether로 질식시킨 다음, 복피를 절개하여 1.15% KCl 완충용액으로 간을 perfusion 시킨 후 적출하였다. 적출된 간은 1.15% KCl 완충용액을 첨가하여 조직균질기에서 마쇄하고 7,000×g에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 다시 77,000×g에서 60분간 원심분리하였다. 형성된 침전물은 0.05 M Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 재현탁하여 microsome 분획으로 실험에 사용하였으며, 이상의 모든 과정은 4°C에서 실시하였다. Microsomal protein 농도를 결정하기 위하여 standard로서 BSA를 사용하여 bicinchoninic acid protein kit로 실시하였다. 정량된 분획은 일정량씩 나누어 실험에 사용할 때까지 -70°C에서 냉동보관하였다.

**Cytochrome P4501A1의 활성 저해 측정** - Cytochrome P4501A1는 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 활성으로 측정하였다.<sup>13)</sup> 즉, microsomal protein (2 mg/ml) 200 μl에 640 μl의 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), 100 μl의 BSA (10 mg/ml), 20 μl의 0.25 M MgCl<sub>2</sub>, 40 μl의 cofactor solution, 2.5 unit의 glucose-6-phosphate dehydrogenase, 10 μl의 substrate (1 mg of ethoxyresorufin in 10 ml of methanol), 10 μl의 하고초 약침액을 농도별로 첨가하였다. 모든 시약들을 잘 섞은 후, 37°C에서 4분간 반응시키고, 2 μl의 methanol로 반응을 종결시켰다. 2,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하고, 형광분광도계(Shimadzu RF-5000, Japan)로 측정(550

nm excitation, 585 nm emission) 하였다.  $\beta$ -naphthoflavone과 정제수를 각각 양성 대조군과 음성 대조군으로 사용하여 실시하였다. 각각의 결과는 대조군에 대한 각 시료들의 저해도를 percentage로 나타내었다.

**Carcinogen-DNA binding 저해효과 측정** -  $1 \times 10^6$ 개의 NCTC-clone 1469 세포를 6-well plate에 접종시켜 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 18시간 배양한 후, 하고초 약침액(1 mg/ml 또는 10 mg/ml)과 10  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]B[a]P을 처리하여 Sharma<sup>2)</sup> 등의 방법에 따라 DNA를 추출하였다. [<sup>3</sup>H]B[a]P로 처리한 세포는 PBS로 세척하고, proteinase K(100  $\mu$ g/ml)가 함유된 0.2 M Tris-0.1 M EDTA(pH 8.5) buffer 0.5 ml를 well에 처리하였다. 10분 동안 반응시켜 세포를 회수한 뒤, 10% SDS 용액을 첨가하여 55°C에서 3시간 동안 반응시켰으며, 5 M의 potassium acetate 용액을 첨가하여 30분 동안 4°C에서 세포를 방치시킨 뒤, 13,000 $\times$ g에서 15분간 원심분리하였다. Cold ethanol을 상층액 2배의 양이 되도록 첨가하여 -20°C에 12시간 이상 방치하고, 13,000 $\times$ g에서 15분 동안 원심분리한 뒤 DNA를 회수하였다. DNA pellet은 70% ethanol로 세척한 뒤 500  $\mu$ l의 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 8.0) buffer로 현탁하였으며, RNase A와 RNase T<sub>1</sub>을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 처리하였다. DNA 함유량은 260 nm에서 측정하여 결정하였다. 잔량의 DNA는 radioactivity를 scintillation counter (Beckman LS-6500, USA)로 측정하였다.

**Free radical inhibition 측정** - Free radical 소거 효과는 Cerruti<sup>14)</sup>의 방법을 참고하여 실시하였다.  $1 \times 10^6$ 개의 HL-60 세포를 HBSS에 부유시켜 96-well plate에 접종한 후, 8  $\mu$ M TPA를 처리하여 1시간 동안 반응시킨 뒤, 하고초 약침액을 농도별로 각각 처리하고 160  $\mu$ M cytochrome C를 첨가하여 20분 동안 반응시켰다. Cytochrome C의 환원은 550 nm에서 측정하였으며, TPA에 의한 유도를 최대 free radical 형성의 측정으로 하고 TPA와 시료처리에 의한 free radical 형성의 비율을 결정하였다.

**Polyamine metabolism 측정** - *Acanthamoeba castellanii*(아메바)의 증식을 측정하기 위해  $3 \times 10^4$  cells의 아메바를 OGM {3 N KOH, 30% glucose, 0.2 g thiamine HCl, 40 mg biotin, 200  $\mu$ g vitamin B<sub>12</sub>/100 ml 95% ethanol이 포함된 2,000 $\times$ vitamins, 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>O를 혼합한 100 $\times$  salt I, 100 $\times$  KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH

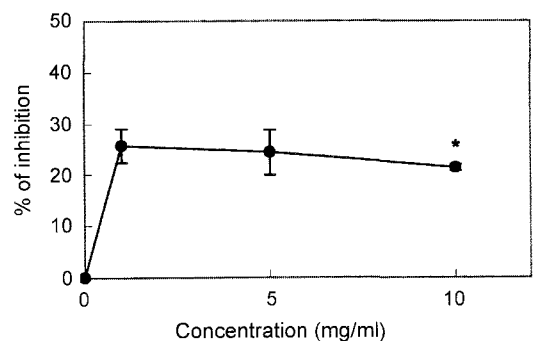
7.0), yeast extract-proteose peptone} 3 ml에 부유시켜 30°C에서 배양하였다. 24시간 후 하고초 약침액 150  $\mu$ l를 각각 처리하였으며, 세포수는 hemocytometer를 이용하여 시간별로 계수하였다.<sup>8)</sup>

**통계학적 처리** - 실험결과는 평균 $\pm$ 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정을 위해 student's *t*-test를 수행하여 결과치는 p 값이 0.05 미만을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

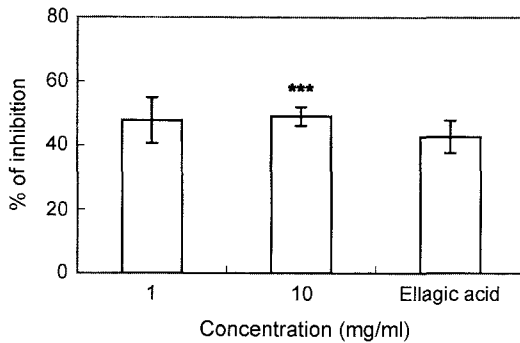
**Cytochrome P450 1A1의 활성 저해효과** - 외부의 발암물질은 phase I 효소의 한 종류인 cytochrome p-450-dependent monooxygenase system에 의해 대사되어 전자친화적물질(electrophilic product), epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질이 된다. Cytochrome P450 효소의 활성을 억제시킬 수 있다면 암 예방의 효과가 있을 것이므로 하고초 약침액을 이용하여 DMBA에 의해 유도된 cytochrome P4501A1 효소 활성의 억제율을 측정된 결과, 하고초 약침액에서는 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml에서 각각 25.7%, 24.4%, 21.3%의 저해율을 보였다(Fig. 1).

**Carcinogen-DNA binding 저해효과** - B[a]P는 polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)에 속하는 발암물질로서 사람들은 흡연, 숯불에 그을린 음식 등에 의해 이런 화학물질에 쉽게 노출된다. 많은 포유동물 세포는 carcinogen-metabolizing enzymes에 의해 polycyclic aromatic hydrocarbons을 polycyclic phenols, dihydrols, epoxides와 quinones으로 대사시킨다. 이리



**Fig. 1.** Effect of PVAS on DMBA-induced cytochrome P4501A1 activity. Experimental details are described in Material and Methods. Values are mean $\pm$ SD (n=3).

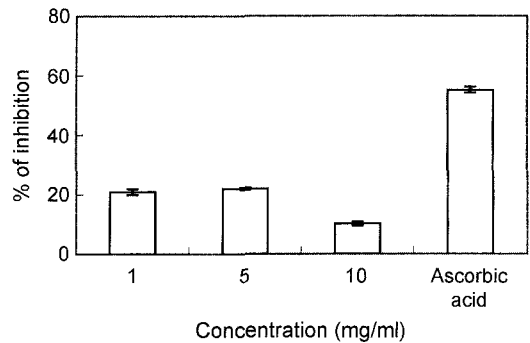
\*p<0.05 as compared to control.



**Fig. 2.** Inhibition of PVAS for the binding of B[a]P metabolites to DNA of NCTC-clone1469 cells. Experimental details are described in Material and Methods. Values are mean  $\pm$  SD (n=3). \*p<0.05, \*\*p<0.01 as compared to control.

한 반응성이 높은 중간대사물은 DNA, RNA와 결합하고 이 결합의 강도는 hydrocarbons 발암의 유효성과 관계가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>15)</sup> 그러므로 DNA-carcinogen 복합체의 형성을 억제 시키는 능력에 의해 암 억제 활성물질을 스크리닝할 수 있다. B[a]P-DNA adduct 합성은 음식물에 포함된 여러 식물 phenols 성분이 억제하는 것으로 알려져 있고, 그 중에서 ellagic acid가 B[a]P와 DNA의 결합을 저해하는 것으로 알려져 있다.<sup>16)</sup> 하고초 약침액 1 mg/ml, 10 mg/ml의 농도에서 각각 47.8%, 49.0%의 저해효과가 있었다(Fig. 2). Carcinogen과 DNA와의 결합을 억제하는 억제제로 알려진 ellagic acid를 양성대조군으로서 사용하였을 때, 약 45.0%의 억제율이 나타난 것을 감안할 때, 하고초 약침액은 발암물질과 DNA의 결합에 상당한 저해효과가 있음을 알 수 있었다.

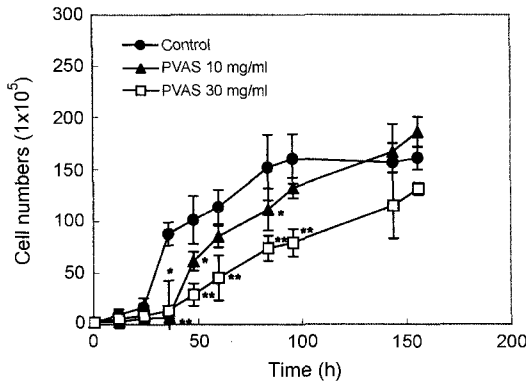
**Free radical 소거효과** - 체내에서 지질과산화물을 유발하여 독성을 일으키는 과정에서 일반적으로 free radical이 관여한다고 알려져 있고, free radical을 생성하는 효소계는 non-microsomal oxidizing system인 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase들이 알려져 있다. 내부 및 외부의 요인에 의해 과도한 유리 라디칼 체인(free radical chain)의 작용과 그 대사과정에서 생성되는 세포내의 활성 산소종은 DNA 손상, 노화와 관련된 세포의 퇴화 및 암의 발생을 일으키게 된다. Free radicals과 관련된 활성 산소들은 산소의 대사동안 생화학적 반응에 의해 생성되며, tumor promotion에 중요한 작용을 한다.<sup>17)</sup> 나아가 tumor promotion을 저해하는 것으로 알려진 protease inhibitors가 free radical 형성을 저해할 수 있고, vitamin A 유도체가



**Fig. 3.** Effect of PVAS on TPA-induced free radical formation in HL-60 cells. Experimental details are described in Material and Methods. Values are mean  $\pm$  SD (n=3).

tumor promotion을 억제하고 여러 retinoid 화합물은 phagocyte  $O_2^-$  생성의 저해제이다. 그러므로 free radical scavengers의 섭취에 의해 free radical에 의한 손상에서 정상조직을 보호할 수 있을 것이다. TPA에 의해서 유도된 free radical을 소거시키는 효과를 살펴본 결과, 하고초 약침액 1 mg/ml, 5 mg/ml과 10 mg/ml의 농도에서 각각 20.8%, 21.9%, 10.0%로 free radical 형성을 억제시켰으나 통계학적으로 유의성 있는 억제는 아니었다(Fig. 3).

**Polyamine metabolism에 미치는 영향** - Polyamine은 발암과정시 비정상적으로 생합성되어 발암과정에 밀접한 관계가 있으며, 원생동물의 성장 및 분화에도 관여한다. 원생동물 배양에서 돌연변이 또는 억제제를 사용하여 polyamine의 합성을 억제하면 세포성장도 중단된다. 그러므로 원생동물의 polyamine 생합성 억제제는 암세포의 성장을 저해할 수 있다.<sup>18)</sup> 본 논문에서는 원생동물 중 아메바의 증식을 이용하여 polyamine metabolism의 억제에 의한 암 발생 억제효과를 측정하였다. 10 mg/ml의 하고초 약침액을 처리했을 때 대수증식기에서 약 26%의 억제효과가 나타났으며, 30 mg/ml의 약침액 농도에서는 대수증식기에서 52%의 억제효과를 보이다가 156시간이 지난 후, 18%의 아메바 증식 억제 효과를 보였다(Fig. 4). 이러한 세포의 증식억제는 시료 독성에 의한 세포수의 감소가 아니라 하고초 약침액에 의한 아메바 성장에 필요한 polyamine의 고갈에 따른 증식속도의 지연으로 보인다. Polyamine 생합성과정에서 중요한 효소는 putrescine의 생성에 관여하는 ornithine decarboxylase(ODC)이며 정상세포와 종양세포의 증식에 필수적이다. 또한 ODC의 유도는 암촉진단계(promotion)에



**Fig. 4.** Inhibition of PVAS for the binding of B[a]P metabolites to DNA of NCTC-clone1469 cells. Experimental details are described in Material and Methods. Values are mean  $\pm$  SD (n=3). \*\*\*p<0.005 as compared to control.

도 중요한 기능을 담당하고 있어 생쥐의 여러 조직을 이용한 암 촉진 실험에서 ODC 활성 유도과 발암물질의 암 촉진 능력간의 밀접한 관계가 보고되었으며, difluoromethylornithine(DFMO)과 같은 ODC의 저해제는 발암과정을 저해시킬 수 있다.<sup>19)</sup> 즉, 하고초 약침액은 ODC 활성에 영향을 주어 polyamine 생성을 저해시키고, 이에 아메바의 성장이 저해된 것으로 관찰되었으므로, 앞으로 하고초 약침액이 ODC 활성에 미치는 영향을 직접 측정하여 발암과정의 촉진단계를 억제할수 있는 물질임을 확인하는 것은 매우 의미있는 실험이라 하겠다.

이상의 결과에 의하면 하고초는 효과적으로 cytochrome P4501A1 효소의 활성을 저해시키고, 발암물질과 DNA의 결합을 저해시킬 뿐만 아니라 free radical을 소거하고 polyamine의 대사를 저해함으로써 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료된다.

### 인용문헌

1. Goodman, G. E., Yen, Y. P., Cox, T. C. and Crowley, J. (1987) Effect of verapamil on *in vitro* cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cells. *Cancer Res.* **47**(9): 2295-2304.
2. Sharma, S., Jill, D. S., Kelloff, G. J. and Vernon, E. S. (1994) Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* **54**(22): 5848-5855.
3. Wattenberg, L. W. (1985) Chemoprevention of cancer.

*Cancer Res.* **45**(1): 1-8.

4. 吳 普(1990) 神農本草經, 19-20, 臺灣中華書局, 台北.
5. 김주선, 강삼식, 이경순, 장승엽, 원도희(2000) 하고초(夏枯草, *Prunellae Herba*)로부터 Ursolic acid의 함량분석. *생약학회지* **31**(4): 416-420.
6. 김종완, 최혜경, 손윤희, 임종국, 남경수(1999) 금은화 약침액의 암예방효과. *생약학회지* **30**(3): 261-268.
7. 한상훈, 조경희, 최혜경, 임종국, 손윤희, 이임태, 남경수(1999) 감두 약침액의 암예방효과. *생명과학회지* **9**(6): 684-691.
8. 김영기, 조경희, 손윤희, 최혜경, 김소연, 임종국, 남경수(2000) 당귀 약침액의 암예방효과. *약학회지* **44**(3): 283-292.
9. 윤성득, 조경희, 손윤희, 남경수, 임종국(2001) 생약 약침액에 의한 phase II 효소 활성 유도. *대한경락경혈학회지* **18**(1): 1-9.
10. 문진영, 임종국, 최혜경, 이임태, 이항우, 남경수(1999) 시호 약침제제가 생쥐의 면역활성에 미치는 영향. *생약학회지* **30**(2): 115-122.
11. 박경미, 조경희, 손윤희, 임종국, 남경수(2000) 감초 약침액의 항암 및 면역활성에 미치는 영향. *생약학회지* **31**(1): 7-15.
12. Pohl, R. J. and Fouts, J. R. (1980) A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal. Biochem.* **107**(1): 150-155.
13. Rodrigues, A. D. and Prough, R. A. (1991) Induction of cytochromes P4501A1 and P4501A2 and measurement of catalytic activities. *Methods Enzymol.* **206**: 423-431.
14. Cerutti, P. A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* **227**(4685): 357-381.
15. Sims, P. and Grover, P. L. (1974) Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* **20**: 165-274.
16. Teel, R. W., Babcock, M. S., Dixit, R. and Stoner, G. D. (1986) Ellagic acid toxicity and interaction with benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol in human bronchial epithelial cells. *Cell. Biol. Toxicol.* **2**(1): 53-62.
17. Kennedy, A. R., Troll, W. and Little, J. B. (1984) Role of free radicals in the inhibition and promotion of radiation transformation *in vitro*. *Carcinogenesis* **5**(10): 1213-1218.
18. Pegg, A. E. (1988) Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.* **48**(4): 759-774.
19. Rozhin, J., Wilson, P. S., Bull, A. W. and Nigro, N. D. (1984) Ornithine decarboxylase activity in the rat and human colon. *Cancer Res.* **44**(8): 3226-3230.