

## 艾葉 藥鍼液에 의한 Phase II 효소 활성화 유도

윤성목<sup>1</sup> · 조경희<sup>1</sup> · 손윤희<sup>2</sup> · 남경수<sup>2</sup> · 임종국<sup>1</sup>

동국대학교 한의과대학 경혈학교실<sup>1</sup>, 동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터<sup>2</sup>

### Induction of Phase II Enzyme Activity by *Artemisia asiatica Nakai* Aqua-acupuncture Solution

Sung-Mook Yoon<sup>1</sup> · Kyoung-Hee Cho<sup>1</sup> · Yun-Hee Shon<sup>2</sup> · Kyung-Soo Nam<sup>2</sup> · Jong-Kook Lim<sup>1</sup>

Dept. of AM-Pointology, College of Oriental Medicine<sup>1</sup>,  
Dept. of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Diseases Research Center<sup>2</sup>,  
Dongguk University

#### Abstract

*Artemisia asiatica Nakai* aqua-acupuncture solution (ANAS) was administered once daily for 10 days before the tumor implantation ( $1 \times 10^6$  cells). Body weight, spleen weight and the number of ascitic tumor cells were measured at 6 days after tumor implantation. The change of body weight and the survival rate of mice were observed for 21 days. It was used three biomarkers (quinone reductase, glutathione, glutathione S-transferase) to test chemopreventive potentials of ANAS. ANAS exerted antitumor activity by inhibiting the growth of Ehrlich ascites tumor cells *in vivo*. Mice given Ehrlich cells and ANAS at CV<sub>12</sub> and BL<sub>18</sub> had 57.1% to 42.9% survival after 21 days. Quinone reductase activity and glutathione levels were increased with ANAS. However, glutathione S-transferase level was 1.1-fold with ANAS. These results suggest that ANAS has chemopreventive potential by inducing QR activity and increasing GSH level.

**Key Words** : *Artemisia asiatica Nakai* aqua-acupuncture solution (ANAS), Quinone reductase, Glutathione, Glutathione S-transferase

## 서 론

그동안 암에 관련된 제재 개발연구는 발병된 암을 치료할 수 있는 항암제 개발이 중점적이었지만 최근에는 독성에 의한 부작용을 감소시키고 암의 진행과정을 저지할 수 있거나 암 발병을 예방할 수 있는 물질 개발 차원에서 이루어지고 있다<sup>1)</sup>. 암예방 물질은 발암 물질의 대사과정에 변화를 가져오거나 암화과정

(carcinogenesis)시 생성되는 대사물질 또는 대사과정시 생성되는 부산물과 반응하여 상호작용을 일으키거나 특정 효소의 발현 및 기능을 변화시키므로 이러한 특징을 이용하여 암예방 물질을 개발, 조사할 수 있다. 대표적인 것으로 QR (Quinone reductase), GST (Glutathione S-transferase) 활성화유도, GSH (Glutathione) 생성등의 측정이 있다<sup>2)</sup>.

QR은 간세포에서 주로 생성되는 phase II enzyme [GST, UDP-glucuronosyl transferase]의 한 종류로 quinone을 환원시켜 무독하게 만들고 발암물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화 효과를 막아주며 발암 물질을 무독하게

· 교신저자: 임종국, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 경혈학교실, Tel. 054-770-2365, Fax. 054-770-2649, E-mail : point@mail.dongguk.ac.kr

하는 역할을 한다<sup>3-5)</sup>.

GSH는 외부의 독성물질이 세포내 침입했을 때 직접 반응하거나 GST에 의해 독성물질과 결합하여 무독하게 하는 기능을 가지고 있다. 발암과정시 세포를 보호하며, 전자친화적인 성질로 인해 외부물질이 DNA와 결합하여 암을 유발하는 것을 막아준다.

GST의 체내 중요한 역할중의 하나는 친전자성 발암물질의 활성대사산물의 해독작용으로써 발암물질은 생체내에서 cytochrome P-450이나 phosphotransferase등의 각종약물 대사 효소에 의해 활성화된 대사활성 (active metabolic)에 의해 DNA 손상을 일으키지만 GST는 이들 소수성잔기를 가지는 활성대사물을 기질로 하고 여기에 glutathione을 공급결합시켜 대사활성제를 안정화된 형태로 해서 최종적으로 노중으로 배설시킴으로써 해독작용을 한다고 알려져 있다.

애엽 (*Artemisia asiatica Nakai*)은 엉거시과에 속하는 다년생초본인 사재발쑥의 잎으로서 鬼經은 간장·신장·비경에 작용하고 지혈, 해열 진통, 소염, 조경, 강장에 관여하여 능통십이경, 온중축냉, 이기혈, 온중개울, 생기육, 장양조수의 효능이 있다고 하였다. 또한 애엽의 유방암, 폐암, 위암, 자궁암, 장암, 이선암, 식도암등에 대하여 효과가 있다고 이미 보고된 바 있다. 이에 본 연구에서는 본초학적으로 유효한 약물이거나 처방을 선택하여 증유 또는 알코올 추출등의 방법을 이용하여 주사액으로 만들어 경혈이나 아시혈 또는 피부, 양성반응점에 주입하는 약침요법을 이용, 애엽 약침액을 만들어 이것의 암예방적인 차원에서의 임상적인 이용가치를 높이고자 본 연구를 착수하게 되었으며 암예방에 관여하는 효소들의 활성을 측정하여 애엽 약침액의 암예방 효과에 대해 실험적으로 증명하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약

Minimum essential medium eagle's (MEM), RPMI-1640 medium, NCTC-135 medium, antibiotics, dimethylsulfoxide (DMSO), bovine serum albumin (BSA), Tween-20, NaCl, 3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), 99% ethyl alcohol anhydrous, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Tris-HCl, FAD, glucose-6-phosphate,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $\beta$ -NADP), glucose-6-phosphate dehydrogenase, menadione, dicoumarol, lauryl sulfate (sodium dodecyl sulfate), crystal violet, NADP<sup>+</sup>, Na-EDTA, triton X-100, 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), charcoal, copper sulfate, glutathione reductase, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서, 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco사 (Grand Island, NY, USA)에서, 기타 시약은 세포 배양용 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

### 시료제조

약침액을 제조하기 위하여 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 애엽을 정선하여 사용하였고, 추출용매인 물은 이온교환수지를 통과시킨 증류수를 사용하였다.

약침액은 수제 알콜침법에 의하여 조제하였다. 애엽 60 g을 조말하여 정제수 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. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol로 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 여과하였다. 그리고 3차 증류수를 가하여 200 ml이 되게 하여 1 x의 약침액으로 사용하였으며, 증류수나

phosphate buffered saline (PBS)를 첨가하여 0.05×, 0.1×, 0.5× 농도를 조제하였다.

애엽 60 g을 조달하여 정제수 400 ml을 가한 뒤 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 filter로 여과하고 PBS를 가하여 200 ml이 되게 하여 1×의 열수추출액으로 사용하였다.

### 실험동물

6주령의 수컷 ICR 마우스를 대한실험동물센터로부터 구입하여 일주일간 안정화시켰다. 안정화기간 중 임상증상을 관찰하여 건강한 동물을 선정하여 체중범위에 따른 무작위법에 의해 군분리를 실시한 후 본실험에 사용하였으며 일정한 사육 환경 조건을 유지하였다.

### 생쥐의 복수암 (EATC)에 대한 암예방효과

EATC 복수암에 대한 예방 효과 측정을 위하여 수컷 ICR 생쥐를 5실험군으로 나누어 애엽 약침액의 주사 및 암세포 이식을 다음과 같이 실시하였다. 제 1실험군은 비처리 대조군으로, 제 2 실험군은  $1 \times 10^6$  cell의 EATC를 실험동물의 복강내에 이식하였으며, 제 3 실험군은 애엽 약침액 1×를 10일간 매일 1회 비경혈인 임의혈 (BL)에 주사하였다. 제 4 실험군은 10일동안 중완혈 (CV<sub>12</sub>)에 취혈한 뒤 24 시간 후  $1 \times 10^6$  cell을 복강내 주사하였다. 제 5 실험군은 약침액을 10일동안 매일 1회 간수혈 (BL<sub>18</sub>)에 주사한 뒤 암세포를 이식하였다. EATC는 생쥐의 복강에  $2 \times 10^7$  세포를 이식한 후 2주 후 복강에서 추출하여 사용하였으며 세포의 이식 및 추출은 무균상태에서 실시하였으며, 추출한 세포는 trypan blue exclusion법으로 99% 이상이 살아있는 세포임을 확인한 후 실험에 착수하였다. 애엽 약침액 1×를 10회 투여한 후,  $1 \times 10^6$  EATC를 실험동물의 복강내에 이식하고 6일 후 각각의 실험군에서 무작위적

으로 생쥐를 선별하여 비장 중량, 체중 변화율, 복수의 암세포수를 측정하고, 암세포 성장은 21일 동안의 체중 변화율로 측정하였으며, 각 실험군 생쥐의 수명을 측정하여 애엽 약침액의 전투여에 의한 암예방 효과를 알아보았다.

### 세포배양

계대 보존 중인 생쥐의 간암세포인 Hepalcl7 cell을 10% fetal bovine serum이 포함된 MEM (Sigma)을 배양액으로하여 CO<sub>2</sub> 배양기 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 배양하였고, 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 이 세포는 액체질소의 기체상태 (-150°C)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 사용하였다.

### Quinone reductase (QR) 생성

QR 생성 유도효과는 Prochaska 등의 방법에 따라 측정하였다<sup>6)</sup>.  $1 \times 10^4$ 개의 Hepalcl7 세포를 200  $\mu$ l의 MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양 후, 새 배양액 190  $\mu$ l와 애엽 약침액 (0.05×, 0.1×, 0.5×, 1×) 또는 열수추출액 (0.05×, 0.1×, 0.5×, 1×)을 10  $\mu$ l씩 각 well에 가하였다. 세포를 약침액 또는 열수추출액이 첨가된 배양액에서 48시간 배양 후 배양액을 버리고 세포를 lysis시켰다. 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 100 mg의 bovine serum albumin, 1.5% Tween-20, 7.5 mM FAD, 150 mM glucose-6-phosphate, 50 mM NADP, 300 U glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45 mg의 MTT, 50 mM menadione을 혼합한 reaction mixture, 200  $\mu$ l를 각 well에 넣고 5분간 반응 후 5 mM potassium phosphate buffer에 0.3 mM dicumarol과 0.5% DMSO를 첨가한 용액 50  $\mu$ l를 각 well에 가하여 반응을 중지시킨 후 microplate reader를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포수에 대한 QR 생성량을 측정하기 위해 앞 실험과 같이 96-well

plate에 Hepalclc7 cell을 접종시키고 시료를 처리하여 48시간 배양 후 배지를 버리고, 0.2% ethanol에 녹아 있는 0.2% crystal violet에 10분간 담근 후 2분간 흐르는 물에 씻어 주었다. 0.5% SDS를 50% ethanol에 녹여 각 well에 200  $\mu$ l씩 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤 630nm에서 흡광도를 측정하였다.

QR 유도율은 다음 공식에 의해 산출하였다.

$$\frac{\text{Absorbance change of MTT/min}}{\text{Absorbance of crystal violet}} \times 3247 \text{ nmol/mg}$$

### Glutathione 생성량 측정

세포내 총 glutathione 함량은 Griffith 등의 방법을 변형하여 96-well plate에서 측정하였다<sup>7)</sup>.  $1 \times 10^4$ 의 세포를 200  $\mu$ l MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양 후 10  $\mu$ l 애엽 약침액 (0.05 $\times$ , 0.1 $\times$ , 0.5 $\times$ , 1 $\times$ ) 또는 열수추출액 (0.05 $\times$ , 0.1 $\times$ , 0.5 $\times$ , 1 $\times$ )이 포함된 배지를 각 well에 가하였다. 시료처리 후 48시간 뒤 배지를 버리고 PBS로 세번 씻고 세포를 lysis시킨 후 40  $\mu$ l stock buffer (125 mM Na-phosphate, 6.3 mM Na-EDTA, pH 7.4)를 가하고 6 mM DTNB, glutathione reductase solution (50 units in 10 ml stock buffer), NADPH-generating system (0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM glucose-6-phosphate, 50 mM NADP<sup>+</sup>, 100 units glucose-6-phosphate dehydrogenase)을 혼합한 reaction mixture 170  $\mu$ l와 반응시켰다. 상온에서 5분간 shaking 후 microplate reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 단백질 함량은 binchinchoninic acid protein assay kit를 사용하여 측정하였다.

### Glutathione S-transferase 생성량 측정

GST  $\alpha$ , GST  $\mu$  를 발현하는 Hepalclc7 cell

을 사용하여 세포내 GST 활성 측정을 하였다<sup>8)</sup>. Hepalclc7 cell을 96-well plate의 각 well에  $1 \times 10^4$  cells을 접종시키고 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양 후 새 배양액 190  $\mu$ l와 애엽 약침액 (0.05 $\times$ , 0.1 $\times$ , 0.5 $\times$ , 1 $\times$ ) 또는 열수추출액 (0.05 $\times$ , 0.1 $\times$ , 0.5 $\times$ , 1 $\times$ )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 lysis시켰다. GST 활성 측정을 위해 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)에 2.5 mM GSH, 1 mM CDNB를 첨가한 reaction mixture 용액을 100  $\mu$ l씩 각 well에 가하고 1분간 plate shaker에서 shaking한 후 405 nm에서 3분간 흡광도의 증가를 microplate reader에서 측정하였다. GST 활성 측정을 위한 세포의 단백질 함량은 binchinchoninic acid protein assay kit를 사용하여 측정하였다.

### 통계학적 처리

실험결과는 통계처리를 하여 평균±표준편차로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정은 Student's t-test를 수행하여 결정하였다.

## 실험결과

### 생체에서의 복수암 예방효과

#### 1) 종양세포성장 억제효과

생체내에서 애엽 약침액의 전투여에 의한 Ehrlich ascites tumor cell (EATC) 성장 효과를 알아보기 위해 애엽 약침액을 10회 투여한 뒤  $1 \times 10^6$ 의 EATC를 복강에 이식하여 복수암이 유발된 생쥐에서 6일 뒤 암세포수를 측정해 보았다 (Fig. 1). 임의혈, 중완혈, 간수혈에 약침을 투여한 경우 각각  $97.89 \pm 2.35$ ,  $73.30 \pm 2.99$ ,  $59.54 \pm 16.48$  ( $\times 10^6$ )세포수로 약침을 투여하지 않은 대조군에 비해 20%, 40%, 51%의 암세포 성장 억제율을 보였다.

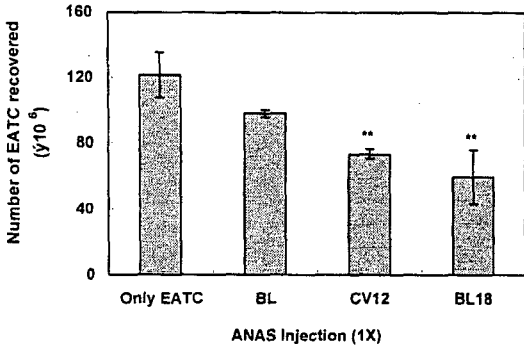


Figure 1. Antitumor effect of ANAS-pretreatment against EATC in ICR mice. The value of each group statistically significant as compared with control (\*\* : p<0.01).

### 2) Spleen 중량에 대한 효과

생체내에서 애엽 약침액의 전투여에 의한 spleen 및 생쥐의 몸무게 변화를 알아보기 위해 암세포 이식후, 6일 뒤 생쥐로부터 spleen을 적출하여 무게를 측정하였고 몸무게 변화를 알아보았다. 임의혈, 중완혈, 간수혈에서 spleen의 무게가 각각  $186 \pm 0.06$ ,  $225 \pm 0.08$ ,  $241 \pm 0.05$  (g)으로 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 21%, 33%, 38%의 중량 증가를 보였고 몸무게의 변화를 살펴본 결과, 약침을 투여하지 않고 복수암 세포만을 이식한 대조군에 비해 몸무게 증가율이 억제되었음을 알수 있었

Table 1. The effect of ANAS-pretreatment on the weight of spleen and body weight in the ICR mice

ANAS injection (X)	Spleen weight (mg)	Increase of body weight (g)
Control	$150 \pm 0.02$	9.00
BL	$186 \pm 0.06$	8.17
CV <sub>12</sub>	$225 \pm 0.08$	8.00
BL <sub>18</sub>	$241 \pm 0.05$	7.60

Table 2. Antitumor activity of ANAS against Ehrlich ascites tumor cells in ICR mice

ANAS injection (X)	Ehrlich ascites tumor cells challenge	Survival rate (% after 21 days)
-	10 <sup>6</sup> cells	0
BL	-	100
CV <sub>12</sub>	-	100
BL <sub>18</sub>	-	100
BL	10 <sup>6</sup> cells	28.6
CV <sub>12</sub>	10 <sup>6</sup> cells	57.1
BL <sub>18</sub>	10 <sup>6</sup> cells	42.9

다 (Table 1).

### 3) 체중 변화율

10일 동안 약침액을 임의혈과 중완혈, 간수혈에 처리하고 EATC세포를 이식한 실험군과 EATC 세포만을 복강 내 이식한 대조군에서 21일 동안 3일 간격으로 생쥐의 몸무게 변화를 관찰한 결과, 임의혈, 중완혈, 간수혈에서 각각  $10.32 \pm 3.86$ ,  $8.57 \pm 2.45$ ,  $8.00 \pm 4.87$  (g)으로 대조군의  $16.1 \pm 2.52$  (g)에 비해 몸무게 증가가 억제되었으며 특히 경혈인 중완혈과 간수혈에 약침을 주사한 실험군에서 47%, 50%로 높은 억제효과가 있었다 (Fig. 2).

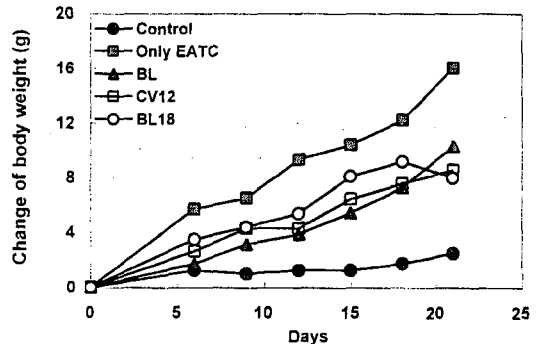


Figure 2. Change of body weight after ANAS-pretreatment against EATC in ICR mice.

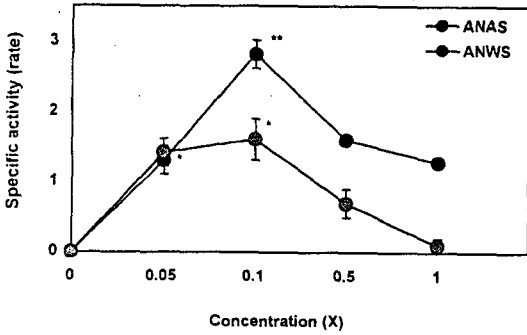


Figure 3. Effect of ANAS and ANWS on induction of quinone reductase (QR) activity in murine hepatoma Hepalcl7 cells. Cells were treated with ANAS and ANWS for 48 hours, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean of three separate experiments. The value of each group statistically significant as compared with control (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ).

#### 4) 수명 연장 효과

생체내에서 애엽 약침액이 Ehrlich ascites tumor cell (EATC)에 미치는 효과를 살펴본 결과, 애엽 약침액 처리 후 EATC 이식에 의한 생쥐의 수명 연장 효과는 Table 2와 같았다. 애엽 약침액 1×만을 각각 임의혈, 중완혈, 간수혈에 취혈하였을 때 21일 후 생존율이 100%로 나타났다. 반면, 생쥐에 EATC 만을 복강내 이식한 경우, 21일 후 복수와 암세포의 축적으로 생쥐의 생존율은 0%로 나타났으며 10일 동안 약침액을 임의혈과 중완혈, 간수혈에 처리하고 EATC세포를 이식한 실험군은 21일 후 29.0%, 57.0%, 43%로 특히 중완혈, 간수혈에서는 높은 수명 연장 효과가 있었다. 이와 같이 애엽 약침액은 생쥐의 복강내 EATC 세포의 증식을 억제하여 수명 연장 효과가 있었고, 비경혈에 비해서 경혈인 중완혈, 간수혈에서 그 효과가 높았다.

#### QR 생성에 미치는 영향

애엽 약침액의 암예방 효과를 살펴보기 위하여 발암물질을 무독성화시키는 Phase II enzyme인 QR 생성의 유도 효과를 측정된 결과, 애엽 약침액 0.05×농도에서 1.3배, 0.5×의 농도에서 1.6배, 1×에서 1.3배의 QR 활성을 나타내었고 0.1×의 애엽 약침액에서 가장 높은 수치인 2.8배의 생성 유도율을 보였다. 애엽 열수추출액에서는 0.1×에서 1.6배의 QR 유도율을 나타내었다. 각각의 농도에 있어서 열수추출액보다 약침액에서 QR의 생성유도가 높게 나타났다. 따라서 생쥐의 간암세포인 Hepalcl7에서 열수추출액, 약침액 모두 QR 생성을 유도하였으며 약침액의 경우 2.8이 최고수치인데 반해 열수추출액은 1.6의 유도율을 보여 약침액이 열수추출액보다 더 많은 QR 생성을 유도함을 알 수 있었다 (Fig. 3).

#### 세포내 GSH 생성에 미치는 영향

약침액에 의한 GSH 생성을 Hepalcl7 세포에서 살펴본 결과, 0.05×에서 1.4배, 0.1× 농도의 약침액을 처리한 세포에서 GSH level이 1.6배의 증가를 나타내었다. 열수추출액에서는 0.05×에서만 2.1배의 GSH 유도율을 보였으나 다른 농도에서는 1.0배의 수치를 보였다 (Fig. 4). 따라서 생쥐의 간암세포인 Hepalcl7 세포내의 GSH는 약침액과 열수추출액에 의해 생성이 유도되었다.

#### 세포내 GST 생성에 미치는 영향

애엽 약침액의 경우 0.5×와 1×에서 1.1배의 GST 활성이 유도되었으며, 열수추출액의 경우 1.0으로 농도에 따른 변화가 없었다 (Fig. 5).

## 고찰

암예방 (chemoprevention)은 암화 과정

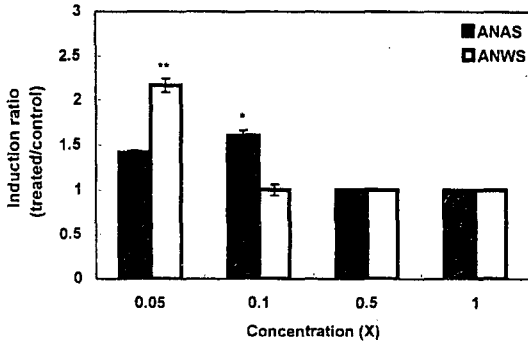


Figure 4. Induction of glutathione (GSH) levels by ANAS and ANWS in murine hepatoma Hepalcl7 cells. Cells were treated with ANAS and ANWS in a concentration range of  $0.05 \times \sim 1 \times$  for 48 hrs. Glutathione levels of sample-treated cells were analyzed and compared with a solvent control to calculate the ratio of GSH induction. The value of each group statistically significant as compared with control (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ).

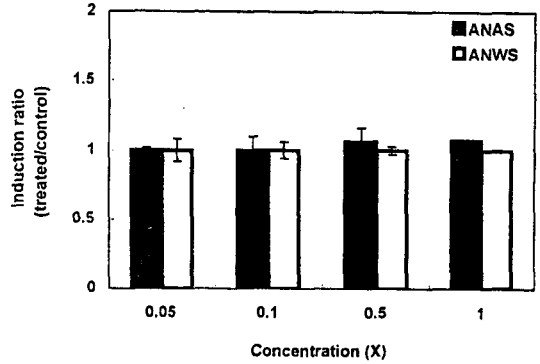


Figure 5. Induction of glutathione S-transferase (GST) levels by ANAS and ANWS in murine hepatoma Hepalcl7 cells. Cells were treated with ANAS and ANWS in a concentration range of  $0.05 \times \sim 1 \times$  for 48hrs. Glutathione S-transferase of sample-treated cells were analyzed and compared with a solvent control to calculate the ratio of GST induction.

(carcinogenesis)을 연장, 억제시키거나 암화된 것을 전환시키는 작용이다. 현재 암예방 물질에 대한 많은 연구가 진행되고 있으며, 효과적인 암예방 물질 (chemopreventive agents)의 연구를 위해 생화학적 표식자 (biochemical markers)를 사용하고 있다<sup>9)</sup>. 이 표식자들은 암화과정시 발암물질의 대사물질과 그의 부산물과도 반응하며 다양하고 많은 발암기전을 저해할수록 효과적인 암예방물질로 간주된다. QR은 GST와 UDP-glucuronosyl transferase와 같이 phase II enzyme으로 외부의 독성이 있는 물질과 돌연변이물질, 발암물질로부터 세포를 보호한다. Phase II enzyme 생성의 유도는, 곧 항암활성 (anticarcinogenic activity)으로 여겨진다<sup>10)</sup>. 본 연구에서 애엽 약침액을 생쥐에 전투여한 후, 복수암 이식에 의한 암예방 효과 측정을 위하여 비장 중량, 복수의 암세포수, 체중 변화율, 생쥐의 수명에 미치는 영향등

을 관찰해 보았을 때 비장중량의 증가, 복수의 암세포수 감소, 체중 감소, 수명 연장 효과가 있었다. 그러므로 생체에서 나타난 암예방 활성의 기전을 *in vitro*에서 분석해 보기 위하여 QR 활성 유도, GSH 함량, GST 활성 유도를 측정해 보았다.

애엽 약침액을 생쥐의 간암세포 Hepalcl7에 처리하였을 때  $0.1 \times$  농도에서 2.8배의 QR 생성 유도율을 보였고 열수추출액보다 약침액에서 QR의 생성이 더 높게 나타났다. 이는 본 실험실에서 앞서 측정된 금은화 약침액<sup>11)</sup>, 감두탕 약침액<sup>12)</sup>보다 높은 QR 활성유도를 나타내었다. 그러므로 애엽 약침액은 돌연변이원성, 발암물질의 대사과정시 생성된 quinone에 의한 세포내 독성 및 세포내 DNA손상을 없애줄 것으로 추측된다.

대부분의 외부의 화학물질은 cytochrome p-450-dependent monooxygenase system에 의해 대사되어 전자친화적물질 (electrophilic product), epoxides 또는 매우 독성이 강한 물

질이 된다<sup>13)</sup>. 이 물질들은 GSH와 직접 결합하거나 GST에 의해 촉매되는 과정을 거쳐 결합하여 무독화된다. 따라서 세포내 GSH가 고갈되면 독성이 강한 대사물질들이 만들어져 세포내 손상을 유발시켜 mutagenesis, carcinogenesis를 일으킨다<sup>14-15)</sup>. Aflatoxin에 의해 유도된 간암에 걸린 쥐의 경우에 다량의 GSH를 주었을 때 종양저해작용이 있었으며 butylated hydroxyanisole은 GSH level을 증가시켜 화학물질에 의한 발암을 저해한다고 보고된 바 있다<sup>16-17)</sup>. Hepalcl7에서 GSH는 애엽 약침액의 농도에 의존적으로 생성율이 증가하였다. 이는 금은화 약침액, 감두탕 약침액의 GSH 생성보다 높은 증가율을 보였다. 이에 애엽 약침액에 의해 증가한 GSH는 산화적인 유리기의 공격 (oxidative free radical attack)으로부터 세포를 보호하고 DNA에 결합하는 것을 막아 주어 mutagenesis 또는 carcinogenesis를 저해할 것으로 여겨지며 세포내 GSH 생성을 촉진하여 세포내 발생한 산화물질과 기타의 독성물질을 무독하게 할 것으로 추측된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 애엽 약침액은 효과적으로 세포내 QR의 농도를 높혀주고 GSH 함량을 증가시켜 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료된다.

## 요 약

애엽으로 약침액을 조제하여 암예방 효과를 살펴 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

애엽 약침액으로 10일간 전투여한 후 Ehrlich ascites tumor cell을 이식하여 복수암이 유발된 생쥐의 EATC 성장을 살펴 본 결과 약침액을 투여한 생쥐의 EATC의 성장이 크게 억제되었으며, 복수암이 유발된 생쥐의 비장 무게가 대조군에 비해 증가하였다. 또한 장기간의 관찰에 의해서도 복수암 세포의 성장 저해에 의해 생쥐의 체중변화율은 대조군에 비해 크게 억제되었으며 수명 연장 효과가 나타났다. 이와같은 생체에서의 암예방 효과를 *in vitro* 상

에서 그 기전을 살펴본 결과 애엽 약침액은 phase II detoxification 효소인 QR의 생성을 유도하고 GSH 함량을 증가시켜서 암예방 효과를 나타내었다.

## 참 고 문 헌

1. Chung YT, Park ST, Mum YJ, Kim JM, Kim JJ, Choi MK, Han DS, Kim JB. J Wonkwang Med Sci 1987; 3: 13-18.
2. Sheela SJ, Stutzman K, Kelloff GJ, Steele VE. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. Cancer Res 1994; 54: 5848-5855.
3. Chesis PL, Levin DE, Smith MT, Ames BN. Mutagenicity of quinones : pathways of metabolic activation and detoxification. Proc Natl Acad Sci 1984; 81: 1696-1700.
4. Ernster L. In : Estabrook RW, Pullman ME. eds. Methods in Enzymology. Vol 10 New York: Academic Press 1967; 309-317.
5. Lind CP, Ernster LD. T-diaphorase as a quinone reductase : a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. Arch Biochem Biophys 1982; 216: 178-185.
6. Prochaska HJ, Talalay P, Sies H. Direct protective effect of NAD(P)H : quinone reductase against menadione-induced chemiluminescence of postmitochondrial fractions of mouse liver. J Biol Chem 1987; 262: 1931-1934.
7. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal Biochem 1980; 106: 207-212.
8. Habig WH, Pabst MH, Jacoby WB.



- Glutathione S-transferase : the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7137.
9. Talalay PM, DeLo J, Prochaska HJ. In: Cory JG, Szentivani A. eds. *Cancer Biology and Therapeutics*. New York: Plenum 1987; 197-216.
  10. Talalay P, Prochaska HJ. DT-Diaphorase: A Quinone Reductase with Special Functions in Cell Metabolism and Detoxication. In: Ernster LR, Estabrook W, Hochstein P, Orrenius S. eds. *Cambridge: Cambridge Univ Press*, 1987; 61-66.
  11. Kim JW, Choi, HK, Shon YH, Lim JK, Lee HW, Nam KS. Chemopreventive potential of *Lonicerae flos* aqua-acupuncture solution. *Kor J Pharmacogn* 1999; 30(3):261-268.
  12. Han SH, Cho KH, Choi HK, Lim JK, Shon YH, Lee YT, Nam KS. Chemopreventive effect of Gamdtang aqua-acupuncture solution. *Korean J Life Science* 1999;9:684-691.
  13. Jollow DJ, Smith C. Biochemical aspects of toxic metabolites formation, detoxification and covalent binding. In: Jollow KJ, Kocsis JJ, Snyder R, Vainio H. eds. *Biologically Reactive Intermediates* New York: Plenum Press 1977; 42-59.
  14. Jollow DJ, Kocsis JJ, Snyder R, Vainio H. eds. *Biological Reactive Intermediates*. London: Plenum Press 1977.
  15. Mitchell JR, Hinson JA, Nelson SD. Glutathione and drug induced tissue lesions: metabolism and function. In: Arias IM, Jakoby WB. eds. *Glutathione*. New York: Raven Press 1976; 357-367.
  16. Cerutti PA. Preoxidant states and tumor promotion. *Science* 1985;227:375-381.
  17. Ahn SJ, Park RK, Lee SR, Chung WK, Nah BS, Nam TK, Chung HT, Moon SR, Kang HK, Park SJ. Radiation-induced apoptotic signaling pathway in HL-60 cells. *J Korean Cancer Assoc* 2000; 32: 156-167.