

댁싸리夏枯草 藥鍼液의 암예방 활성

박 신 화¹ · 임 종 국¹

동국대학교 한의과대학 경혈학교실¹

Chemopreventive activity of *Prunella Herba Vulgaris* L. Aqua-acupuncture Solution

Shin-Hwa Park¹ · Jong-Kook Lim¹

Dept. of AM-Pointology, College of Oriental Medicine, Dongguk University¹

Abstract

Cancer chemoprevention refer to the use of natural or synthetic substances to prevent the initiational and promtional events that occur during the process of carcinogenesis. The effect of *Prunella Herba Vulgaris* L. Aqua-acupuncture Solution (PVAS) and *Prunella Herba Vulgaris* L. Water-extracted Solution (PVWS) on the induction of phase II detoxification enzyme (quinone reductase, Glutathione S-transferase) and inhibition of phase I enzyme (cytochrome P4501A1) and benzo[a]pyrene-DNA adduct formation was examined. PVAS is potent inducers of quinone reductase activity. Glutathione levels were increased with PVAS, in cultured murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. In addition glutathione S-transferase levels were increased with PVAS. However, there was 45.2% inhibition in the activity of cytochrome P4501A1 enzyme with the treatment of PVAS, 5×. At concentration of 1× and 3× of PVAS, the binding of [³H]B[a]P metabolites to DNA of NCTC-clone 1469 cell was inhibited by 25.3%, 45.0%, respectively. These results suggest that PVAS has chemopreventive potential by inducing quinone reductase and glutathione S-transferase activities, increasing GSH levels, inhibiting the activity of cytochrome P4501A1 and benzo[a]pyrene-DNA adduct formation.

Key Words : *Prunella Herba Vulgaris* L. Aqua-acupuncture Solution (PVAS), Phase I enzyme, Phase II enzyme, DNA adduct

서 론

암은 발생기전이나 치료에 대한 연구가 수십 년 동안 진행되어 왔으나 아직도 난치성 질병으로 남아 있으며, 이를 치료하기 위해서 수술, 방사선, 화학, 면역, 유전자를 이용한 여러 치료법들이 개발·사용되어 왔다¹⁾. 하지만 이러

한 치료법들은 여러 부작용이 발생하는 것으로 보고되고 있어 기존의 불완전한 암치료를 극복하기 위한 새로운 약물 연구 및 제재 개발이 요구되고 있다²⁾.

암예방 (chemoprevention)이란 발암과정의 초기단계에서 암발생 (carcinogenesis)을 억제시키며, 암으로 진행된 것을 전환시키는 것을 의미하며³⁾, 기존의 항암제를 이용한 암세포의 치료라는 개념과는 전혀 다른 것으로 미국이나 일본에서도 최근에 시작된 연구분야이다. 특히 암예방에 관한 연구는 암 발병으로 치료를 받

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

고 재발의 위험이 있는 환자, 유전적으로 암발생 가능성을 가진 사람, 직업적으로 발암물질에 노출된 사람, 흡연자등에 적용할 수 있으므로 암을 연구하는 데 있어 매우 유망한 영역이다. 그래서 최근에는 암이 발병하기 전에 막을 수 있는 암예방 물질 (chemopreventive agents)의 개발 연구분야에서는 부작용이 적은 천연물에서의 암예방 물질 개발에 관한 연구가 전세계적으로 많은 관심을 모으고 있다.

夏枯草는 꿀풀과 (脣形科 *Labiatae*)에 屬하는 多年生 *Prunella Herba Vulgaris L.*의 地上部 全草인 꿀풀과 夏枯草⁴⁾ 우리 나라에서는 檀香科 (*Santalaceae*)에 속한 덩싸리 夏枯草(제비꿀) *Thesium Chinese Turczaninow*의 全草를 指稱하고⁵⁾ 꿀풀과 夏枯草와 덩싸리 夏枯草는 氣味와 效能이 文獻調査에서 多少의 差異가 있다^{6,7)}. 李⁸⁾ 등은 夏枯草가 瘰癧 頭瘡 腫痺 血崩 傷瘡 乳癰 癭氣 破癥 散癥結 脚腫 鼠瘡 頸瘡 濕癬 癰腫瘡 癰疽 乳岩 腫毒등에 臨床的인 投與의 效能을 報告하고 있다. 劉⁹⁾ 등은 夏枯草의 經口 投與로 甲狀腺癌 乳腺癌 肺癌 淋巴肉瘤 癭瘤 瘰癧 乳癰 乳癌 內腫瘤 淋巴瘤 肝癌 腫瘤 軟組織腫瘤 卵巢癌 咽癌 敗毒抗癌 癌瘤積毒 血管瘤 脈管肉瘤 縱膈腫瘤 淋巴肉瘤 淋巴網狀組織肉瘤 子宮頸癌 白血病 鼻咽癌 喉癌 食管癌 胃癌 骨巨細胞瘤 顏內腫瘤 淋巴腺囊腫 癭瘤 瘰癧 癥堅 乳癰등에 有效함을 발표하였다. 夏枯草를 爲君¹⁰⁾으로 한 服用藥 處方構成의 主治는 化癥止痛 瘰癧 癰疽 無名腫毒 血崩不止 痔漏 頸項痰核 癰癤 腫毒 一切瘡瘍등에 經驗資料를 報告하였다. 林¹¹⁻¹³⁾ 등은 夏枯草의 실험결과에서 약침의 안전성과 甲狀腺機能亢進 (갑상선기능항진)과 효능에 관한 보고된바 있다.

본 연구에서 덩싸리하고초를 이용한 약침액 및 열수추출액을 조제하고, 이것을 이용하여 phase II enzymes (Quinone reductase, GST), GSH 생성, cytochrome P4501A1 효소의 억제효과, carcinogen-DNA binding 저해효과를 측정하여 암예방 효과를 규명하고자 하였다.

실험재료 및 방법

시약

Minimum essential medium eagle's (MEM), NCTC-135 medium, dimethylsulfoxide (DMSO), Tris-HCl, ribonuclease A (RNase A), ribonuclease T₁ (RNase T1), cytochrome C, potassium acetate, proteinase K, ellagic acid, 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), flavin adenine dinucleotide (FAD), dicoumarol, glucose-6-phosphate, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADP), glucose-6-phosphate dehydrogenase, menadione, laury sulfate (sodium dodecyl sulfate), crystal violet, NADP⁺, chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), glutathione reductase, triton X-100, Na-EDTA, bovine serum albumin (BSA), tween-20, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), superoxide dismutase (SOD : from bovine liver), 9,10-Dimethyl-1,2-benz-anthracene (DMBA), phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA), cupric sulfate, ethoxyresorufin, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco사 (Grand Island, NY, U. S. A), [³H]Benzo[a]pyrene ([³H]B[a]P)은 Amersham pharmacia biotech사 제품을 사용하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 특급 시약을 구입, 사용하였다.

세포배양

계대 보존 중인 Hepalcl1c 7 cell을 10% fetal bovine serum이 포함된 MEM을 배양액으로 하여 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 37°C)에서 배양하였고, NCTC-clone 1469 (from : mouse liver) 세포는 10% FBS가 포함된 NCTC 135를 배양액으로 사용하였으며, 이들 배양액은 3 또는 4

일 간격으로 교환해 주었다. 이 세포는 액체질소의 기체상태 (-150°C)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 사용하였다. 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

생약 약침액 제조

약침액은 수제 알콜침법에 의하여 조제하였다¹⁴⁾. 덥싸리하고초 60 g을 정량하여 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. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol을 가하여 75%, 85%, 95%의 ethanol 용액이 되게 하여 침전물을 여과하고, pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μ m, Whatman, Germany)로 여과하였다. 그리고 3차 증류수를 가하여 200 ml이 되게 하여 1×의 약침액으로 사용하였으며 5×, 3× 약침액은 1×의 약침액을 감압농축하여 사용하였고, 증류수나 PBS를 첨가하여 0.1×, 0.5× 농도로 조제하였다.

QR 생성 측정

QR 생성 유도 효과는 Prochaska¹⁵⁾ 등의 방법에 따라 측정하였다. 1×10^4 개의 Hepalcl7 세포 (mouse hepatoma)를 200 μ l의 10% FBS가 첨가된 minimum essential medium eagle's (MEM) 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후, 새 배양액 190 μ l와 약침액 및 열수추출액 (0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×)을 10 μ l씩 각 well에 가하였다. 세포를 약침액이 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 dH₂O)를 각 well에 넣고 5분간 반응 후 0.3 mM dicuomamol (in 0.5% dimethyl sulfoxide)과 5 mM potassium phosphate가 들어있는 용액 50 μ l를 첨가하여 microplate reader를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Crystal violet assay

세포수에 대한 QR 생성량을 측정하기 위해 앞 실험과 같이 96-well plate에 Hepalcl7 cell을 접종시키고 시료를 처리하여 48시간 배양 후 배지를 버렸다. 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 μ l씩 첨가하고, 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

GSH 생성량 측정

세포내 총 GSH 함량은 Griffith¹⁶⁾의 방법을 변형시켜서 96-well plate에서 측정하였다. 1×10^4 의 세포를 200 μ l MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후 10 μ l의 각각의 약침액이 포함된 배지 200 μ l를 각 well에 가하였다. 시료처리 후 48시간 뒤 배지를 버리고 PBS로 세번 세척하고 세포를 용해시킨 후 40 μ l stock buffer (125 mM sodium-phosphate, 6.3 mM ethylenediaminetriacetic acid, pH 7.4)를 가하고 170 μ l의 reaction mixture {20 μ l의 6mM 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) in stock buffer, 10 μ l의 glutathione reductase solution (50 units in 10 ml stock buffer),

140 μ l 의 the NADPH-generating system (2.5 ml 의 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 330 μ l 의 150 mM glucose-6-phosphate, 30 μ l 의 50 mM NADP⁺, 100 units 의 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 Hepalcl7 세포를 사용하여 GST 활성 측정을 하였다¹⁷⁾. Hepalcl7 세포를 96-well plate의 각 well에 1×10^4 cells을 접종시키고 37°C, CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후 새 배양액 190 μ l와 각각의 약침액 (0.1 \times , 0.5 \times , 1 \times , 3 \times , 5 \times)을 10 μ l씩 각 well에 처리하였다. 세포를 약침액이 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 binchinonic acid solution protein kit를 사용하여 측정하였다.

Cytochrome P4501A1의 활성 저해 측정

Cytochrome P4501A1는 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 활성으로 측정하였다¹⁸⁾. 즉, 랫으로부터 분리한 microsomal protein (2 mg/ml) 200 μ l에 640 μ l 의 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), 100 μ l 의 BSA (10 mg/ml in Tris-HCl buffer), 20 μ l 의 0.25 M dehydro-

genase), 10 μ l 의 substrate (1 mg of ethoxyresorufin in 10 ml of methanol), 10 μ l 의 각종 농도의 댄싸리하고초 약침액 및 열수추출액을 첨가했다. 모든 시약들을 잘 섞은 후, 37°C에서 4분간 반응시키고, 2 ml의 methanol로 반응을 종결시켰다. 2,000 \times g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하고, 형광분광광도계 (SHIMADZU RF-5000, spectrofluoro-photometer)로 측정 (550 nm excitation and 585 nm emission) 하였다. Positive control로는 β -naphthoflavone을 사용하였고, negative control로서는 증류수를 사용하였다. 이 실험은 3회 반복 실험으로 수행 하였으며, 각각의 결과는 control에 대한 각 sample들의 저해도 정도를 percentage로 나타내었다.

Carcinogen-DNA binding 저해 효과 측정

1×10^6 개의 mouse normal liver (NCTC clone-1469) 세포를 5 ml의 NCTC 139 배지에 부유시켜 6-well plate에 접종시켜 18시간 배양하여 새 배지로 교환한 뒤, 댄싸리하고초 약침액 1 \times , 3 \times 을 처리하고 2시간 배양하였다. 10 μ Ci [³H]B[a]P을 처리하여 12시간동안 배양한 뒤 Sharma¹⁹⁾ 등에 의한 방법을 변형하여 다음과 같이 DNA를 추출하였다. [³H]B[a]P에 처리된 세포는 PBS로 3번을 세척하였고, proteinase K (100 μ g/ml)가 함유된 0.2 M Tris-0.1 M EDTA (pH 8.5) buffer 0.5 ml을 well에 처리하였다. 효소의 반응을 활성화시키기 위해 10분동안 배양한 뒤, well로부터 세포를 떼어내어 회수하였다. 회수된 세포를 10% SDS 용액을 첨가하여 55°C에서 3시간 동안 배양하여 단백질을 제거하였으며, 5 M의 Potassium acetate 용액을 첨가하여 30분동안 4°C에서 세포를 방치시킨 뒤, 13,000 \times g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액만을 취한 뒤, cold ethanol을 상층액 2배의 양이 되도록 하여 첨가하였고, DNA를 침전시키기 위하여 -20°C에 12시간 이상 방치하였다. 13,000 \times g에서 15분동안 원심분리한 뒤 상층액을 제거하여

뎁싸리夏枯草 藥鍼液의 암예방 활성

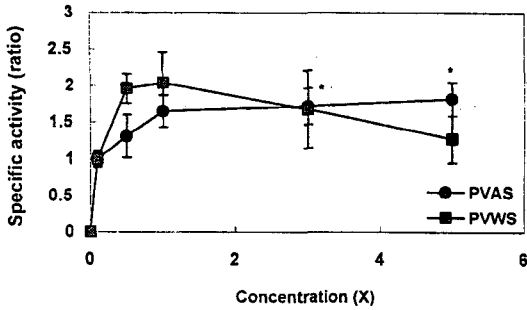


Figure 1. Effect of *Prunella Herba Vulgaris* L. Aqua-acupuncture Solution (PVAS) and *Prunella Herba Vulgaris* L. Water-extracted Solution (PVWS) on induction of quinone reductase activity in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. Cells were treated with PVAS and PVWS for 48 hours and the change in the levels 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).

DNA를 회수하였다. DNA pellet은 70% ethanol에 세척한 뒤 500 μ l of 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 8.0) buffer로 현탁하였으며, RNA를 제거하기 위하여 RNase A와 RNase T1을 각각 5 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 1 시간동안 처리하였다. DNA 함유량은 260 nm (1 A_{260} nm unit = 50 μ g)에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 흡광도를 측정한 뒤 잔량의 DNA는 radioactivity 측정에 사용되었다. 모든 실험은 3회 반복실험으로 수행하였으며, 뎁싸리하고초 약침액에 의한 carcinogen-DNA binding 저해 효과는 다음과 같은 공식으로 계산되었다.

$$\% \text{ inhibition} = [1 - \text{dpm per } \mu\text{g DNA test cells} / \text{dpm per } \mu\text{g control cells}] \times 100$$

통계학적 처리

실험결과는 통계처리를 하여 평균±표준편차

로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정은 Student's t-test를 수행하여 결정하였다.

결 과

QR 생성에 미치는 영향

뎁싸리하고초 약침액의 QR 생성 유도율을 측정 한 결과, 0.1×농도에서 대조군에 비하여 1.0 배 증가를 보였으며, 1×농도에서 1.65배, 5×에서 가장 높은 수치인 1.82배의 생성 유도율을 보였다. 열수추출액의 경우 1×에서 2.04배로 가장 높은 유도율을 나타내었으며 농도가 증가 할수록 유도율이 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 1).

세포내 GSH 생성에 미치는 영향

약침액에 의한 glutathione 생성을 살펴본 결과, 0.1×, 0.5×, 1× 농도의 약침액을 처리한 세포에서 대조군보다 1.02, 1.45배, 1.26배의 증가를 나타내었다. 열수추출액의 경우, 모든 농도에서 GSH의 level의 증가를 나타나지 않았다. 생쥐에서 유래된 Hepa1c1c7 세포내의 glutathione은 약침액의 경우 대조군 보다 많은 양이 생성되었음을 알수 있었다 (Fig. 2).

세포내 GST 생성에 미치는 영향

약침액에 의한 GST 활성도를 관찰한 결과, 0.5×, 1×에서 1.7배, 1.3배 정도의 증가율을 나타내었다. 열수추출액에서는 GST 활성이 없었다 (Fig. 3).

Cytochrome P450 1A1의 활성 저해 효과

Cytochrome P4501A1은 phase I 효소로 발암을 유도하기 때문에 이 효소의 작용을 억제하는 것은 암예방효과 기작의 하나이다. 따라서 뎁싸리하고초 약침액 및 열수추출액에 의한 cytochrome P 450 1A1 효소활성 억제효과를 조사하기 위하여 각 농도에 대한 저해도를

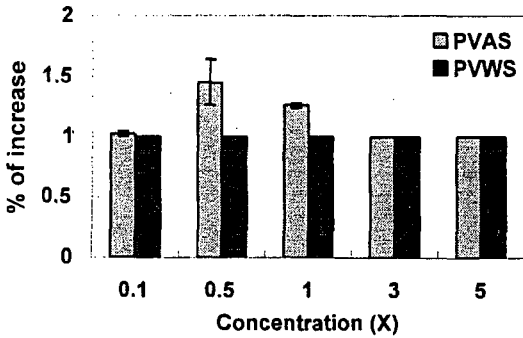


Figure 2. Induction of glutathione level by *Prunella Herba Vulgaris L.* Aqua-acupuncture Solution (PVAS) and *Prunella Herba Vulgaris L.* Water-extracted Solution (PVWS) in murine hepatoma Hepalcl7 cells. Cells were treated with PVAS and PVWS for 48 hrs, and the change in the levels of glutathione was measured. Each point represents the mean of three separate experiments.

측정하였다. 약침액은 0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×에서 각각 10.33%, 13.76%, 17.81%, 32.85%, 45.19%의 저해율이 나타났고, 열수추출액은 3.62%, 12.22%, 12.23%, 14.92%, 21.32%의 저해율을 나타냈다 (Fig. 4). 약침액의 농도가 증가할수록 cytochrome P4501A1 활성 저해도가 높게 나타났고, 열수추출액에 비해 활성저해효과가 크게 나타남을 알 수 있었다.

Carcinogen-DNA binding 저해효과

발암물질의 친전자적 성질로 인하여 세포의 정보 전달 물질인 DNA에 구조적 손상을 주어 돌연변이를 유발하는 과정은 비가역적으로 진행되는 것으로 알려져 있다. 일단 손상된 DNA가 수복되지 않으면 돌연변이를 일으킨 DNA의 세포분화 과정에서 복제되어 세포가 암세포로 전환하게 되는 것이다. 따라서 발암물질이 DNA와 결합하여 손상을 주게 되는 과정을 저해한다면 암억제 효과가 있을 것이다. 따라서

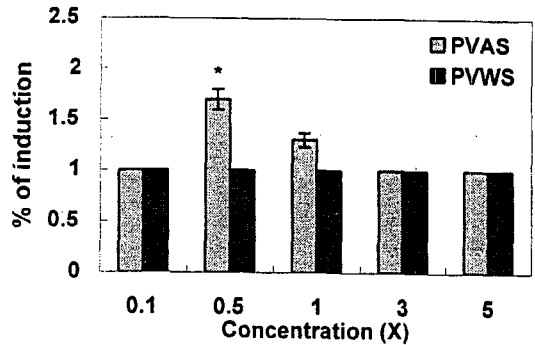


Figure 3. Induction of glutathione S-transferase by *Prunella Herba Vulgaris L.* Aqua-acupuncture Solution (PVAS) and *Prunella Herba Vulgaris L.* Water-extracted Solution (PVWS) in murine hepatoma Hepalcl7 cells. Cells were treated with PVAS and PVWS for 48 hrs, and the change in the levels of glutathione S-transferase was measured. Each point represents the mean of three separate experiments. The value of each group statistically significant as compared with control (* : $p < 0.05$).

덥싸리하고초 약침액에 의한 carcinogen-DNA binding inhibition 효과를 알아보기 위해 NCTC-clone 1469 세포를 이용하여 실험한 결과, 1×의 약침액 농도에서 25.28%, 3×에서 45.00%의 저해 효과를 나타내었다 (Fig. 5). Positive control로서 ellagic acid를 사용하였을 때, 68.43%의 억제율이 나타난 것을 감안할 때, 덥싸리하고초 약침액 3×에서 상당한 저해 효과가 있었음을 알 수 있었다.

고 찰

본연구에서는 腫痺, 血崩, 傷瘡, 乳癰, 癰氣, 破癥, 散癥結, 脚腫 등의 목적으로 사용되고 있는 덥싸리하고초를 이용, 약침액을 만들어 이것의 암억제 효과 검정을 위하여 QR 유도효과, 세포내 GSH 함유량 측정 및 GST 유도효과,

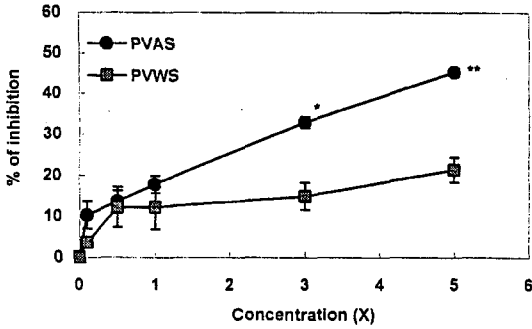


Figure 4. Effect of PVAS and PVWS on DMBA-induced cytochrome P4501A1 activity. Experimental details are described in Material and Methods. Values represent mean \pm SD (n=3). The value of each group statistically significant as compared with control (* : p<0.05, ** : p<0.01).

DMBA-induced cytochrome P4501A1 활성 저해효과, carcinogen-DNA 결합 저해효과 등을 측정함으로써 발암과정의 initiation 억제 (blocking agents)에 미치는 영향을 살펴보았다.

QR이나 GST와 같이 phase II drug-metabolizing enzymes의 유도는 chemical stress나 carcinogenesis의 initiation에 대한 중요한 방어기작이다. 효소의 유도 패턴에 의하면 drug-metabolizing 효소를 유도하는 물질은 Phase I 과 phase II 효소를 모두 증가시키는 bifunctional inducers (planar aromatic compounds)와 phase II 효소만을 증가시키는 monofunctional inducers (diphenols, thiocarbamates, isothiocyanates, 1,2-dithiol-3-thiones)이 있다²⁰⁾. Phase I 효소 유도는 발암물질을 활성화된 발암물질 (ultimate carcinogens)로 바꾸기 때문에 암 유발 위험인자이다. 그러므로 이상적인 암예방물질은 암예방활성을 가진 monofunctional 효소 유도체이다. 덥싸리하고초 약침액을 생쥐의 간암세포 Hepa-1c1c 7에 처리하였을 때 5x 농도에서 1.82배의 QR 생성 유도률을 보였고, 농도가 높아질수록

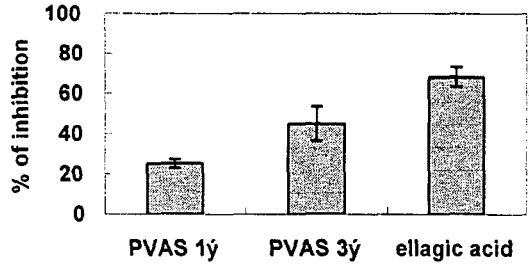


Figure 5. Inhibition of the binding of B[a]P metabolites to DNA of NCTC-clone 1469 cells. B[a]P-DNA binding was determined in the presence of the indicated concentrations of PVAS. Experimental details are described in Material and Methods. Values represent mean \pm SD.

QR 생성 유도율의 수치가 높게 나타남으로써 덥싸리하고초 약침액에 의해 일어나는 phase II enzyme들의 생성량 및 활성 변화를 측정하여 phase II enzyme들에게 주는 영향 및 기전을 심도있게 연구할 가치가 있다.

GSH는 자연적인 항산화제로 발암과정의 initiation이나 promotion 단계에서 세포를 보호할 수 있으며, initiation 단계에서는 glutathione의 전자친화적인 성질로 인해 외부물질이 DNA와 결합하여 암을 유발하는 것을 막아 주고, Promotion 단계에서는 oxidative free radical의 공격을 제한함으로써 발암과정을 저해할 수 있다. Aflatoxin에 의한 간종양을 가진 쥐에 많은 양의 GSH를 투여하였을 때, 종양이 감소하였다. 또한 butylated hydroxyanisole은 GSH 함량을 증가 시켜서 발암과정을 저해하였다²¹⁾. 이러한 연구들에 의하면, GSH가 reactive oxygen intermediates 감소를 가져오는 free radical을 제거한다는 강한 증거를 제공한다. GST는 유리기 (free radical)를 파괴하여 반응성이 높은 산소들로부터 세포를 보호한다고 보고되고 있다²²⁾. 덥싸리하고초 약침액은 Hepa1c1c7 세포에서 GSH, GST의 생성율을 증가시켰다. 이것은 세포내 glutathione 생성을 촉진하여 세포내 발생한 산화물질과 기타

의 독성물질을 무독하게 할것으로 추측된다.

외부의 발암물질은 cytochrome p-450-dependent monooxygenase system에 의해 대사되어 전자친화적물질 (electrophilic product), epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질이 된다²³⁻²⁴. 따라서 cytochrome P450 효소의 활성을 억제시킬 수 있다면 암예방의 효과가 있을 것이므로 덩싸리하고초 약침액을 이용하여 DMBA에 의해 유도된 cytochrome P4501A1 효소의 억제율을 측정 한 결과, 덩싸리하고초 약침액은 cytochrome P4501A1 효소의 활성을 저해함을 관찰할 수 있었다. 현재, Cytochrome P4501A1을 억제시키는 물질로 vitamin A, phosphorothioate oligonucleotide 등의 물질도 알려져 있다²⁵⁻²⁶.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)은 B[a]P와 같이 잘 알려진 발암물질을 포함한 화학물질로 직업적으로나, 흡연, 숯불에 그을린 음식등에 의해 사람들은 이러한 화학물질에 노출된다. 많은 포유동물 세포는 carcinogen-metabolizing enzymes에 의해 polycyclic aromatic hydrocarbons을 polycyclic phenols, dihydrools, epoxides, quinones, 그리고 water-soluble conjugates로 대사시킨다. 이러한 반응성이 높은 중간대사물은 DNA, RNA와 결합하고 이 결합의 강도는 hydrocarbons의 발암의 유효성과 관계가 있다²⁷. B[a]P-DNA adducts는 폐암 환자의 폐조직에서 발견되었으며 음식물에 포함된 여러 식물 phenols성분이 발암과정을 억제하는 것으로 알려져 있고 그 중에서 ellagic acid가 B[a]P와 DNA의 결합을 저해하는 것으로 알려져 있으며 암예방 활성은 B[a]P epoxide와 adducts를 형성하여 무독화한다²⁸. 이러한 사실들에 의하여 덩싸리하고초 약침액이 활성효소의 억제, 무독화효소의 유도와 같이 DNA-carcinogen복합체의 형성을 1×, 3×의 약침액 농도에서 25.3%, 45.0%를 저해함으로써 암억제 효과가 있을 것으로 추측되어진다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 덩싸리하고초 약침액은 효과적으로 세포내 QR 및 GSH, GST

유도및 생성량을 높여주고 cytochrome P4501A1 효소의 활성을 저해시킬 뿐 만 아니라, 발암물질과 DNA의 결합을 억제시킴으로써 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료된다.

요 약

덩싸리하고초 약침액을 이용하여 phase II detoxification 효소인 quinone reductase (QR 및 GST) 유도, GSH 생성량, phase I 효소 cytochrome P4501A1 활성억제, 발암물질 B[a]P-DNA adduct 형성의 저해효과 등을 측정하였다. QR 생성 유도를 Hepalc7로 실험한 결과, 덩싸리하고초 약침액및 열수추출액 모두에서 유도 되었으며, 농도가 높아질수록 유도율이 더 높게 나타났으며, GSH와 GST의 유도율도 약침액에서 나타났다. 덩싸리하고초 약침액 5×에서 45.2%의 cytochrome P4501A1 효소활성 저해효과를 측정할 수 있었다. 또한 B[a]P-DNA binding 저해효과를 실험한 결과, 약침액 3× 농도에서 45.0%의 저해효과가 있었다. 이상의 결과에 의하면 덩싸리하고초 약침액은 암억제 물질로서의 기능을 충분히 발휘할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Fish B. Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. *Cancer* 1984 ; 54 : 2609.
2. Nakamura T, Ueda T. Pharmacodynamics and action mechanism of antitumor agents. *Gan To Kadaku Ryoho* 1993;20:1731-1740.
3. Sharma S, Stutzman JD, Kelloff GJ, Steele VE. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer*

- Res 1994 ; 54 : 5848-5855.
4. 吳 普, 神農本草經, 台北, 臺灣中華書局, pp. 19-20, 1990.
 5. 康秉秀, 本草學, 서울, 永林社, p. 169, 1991.
 6. 문관심, 藥草의 성분과 利用, 서울 일월서각, pp. 154, 507, 1991.
 7. 張隱庵, 本草三家合註, 서울, 大星文化社, p. 74 1992.
 8. 李時珍, 本草綱目, 北京, 人民衛生出版社, pp. 957-958, 1982.
 9. 劉春安, 抗癌中草藥大辭典, 湖北, 湖北科學技術出版社, pp.820-823, 1994.
 10. 李佩文, 中西醫臨床腫瘤學, 北京, 中國中醫藥出版社, pp. 1076-1077, 1996.
 11. 林사미나, 夏枯草藥鍼의 安全性에 관한 研究, 大韓鍼灸學會誌 15(2) : 357-367, 1998.
 12. 변부형, 夏枯草藥鍼이 甲狀腺機能亢進에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌 1997 ; 14(1) : 509-511.
 13. 韓相源, 夏枯草藥鍼이 甲狀腺機能亢進에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌 1997 ; 14(1) : 494-502.
 14. 錢百炎, 中草藥主射劑, 上海, 上海科學技術出版社, p 71-132, 1981.
 15. Prochaska, H. J. and A. B. Santamaria. Direct measurment of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarci nogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* 1988 ; 169 : 328-336.
 16. Griffith, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 1980 ; 106 : 207-212.
 17. Habig, W. H., M. H. Pabst and W. B. Jacoby. Glutathione S-transferase : the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974 ; 249: 7130-7137.
 18. Song LL, Kosmeder JW, Lee SK, Gerhauser C, Lantvit D, Moon RC, Moriarty RM, Pezzuto JM : Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. *Cancer Res*, 1999 ; 59: 578-585.
 19. Sharma S, Jill DS, Kelloff GJ, and Vernon ES : Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res*, 1994 ; 54: 5848-5855.
 20. De Long MJ, Santamaria AB, and Talalay P : Role of cytochrome P1-450 in the induction of NAD(P)H:quinone reductase in a murine hepatoma cell line and its mutants. *Carcionogenesis*, 1987 ; 8: 1549-1553.
 21. Meister A, and Anderson M : Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 1983 ; 52 : 711-760.
 22. Shon YH, Lee JS, Lee HW, Kim JW, Lim JK, Kim CH, and Nam KS : Antimutagenicity of *Phellinus linteus* in *Salmonella typhimurium*. *The J Microbiology*, 1999 ; 37: 136-140.
 23. Jollow DJ, Smith C, In: Jollow KJ, Kocsis JJ, Snyder R, Vainio H, eds. Biochemical aspects of toxic metabolites formation, detoxification and covalent binding, *Biologically Reactive Intermediates*. New York, Plenum Press, p 42-59, 1977.
 24. 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.
 25. Sindhu RK, Masato M, Yutaka K :

- Inhibition of cytochrome P450 1A1 by antisense phosphorothioate oligonucleotide in Hepa 1c1c7 cells. *Biochem Biophys Res*, 1996 ; 229 : 673-680.
26. Kuniyo I, Toshio M, Shunya K, Hideo O : Inhibitory effects of vitamin A and vitamin K on rat cytochrome P4501A1-dependent monooxygenase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999 ; 262 : 565-569.
27. Sims P and Grover PL : Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. *Adv. Cancer Res*, 1974 ; 20 : 165-203.
28. Teel RW, Merrill SB, Dixit R, and Stoner GD : Ellagic acid toxicity and interaction with benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol in human bronchial epithelial cells. *Cell Biol. Toxicol.*, 1986 ; 2 : 53-62.