

In vitro에서 발암물질에 의한 발암진행에 미치는 천궁약침액의 영향

한상훈¹ · 노동일¹ · 이기택¹ · 손윤희² · 백태선² · 남경수² · 임종국¹

동국대학교 ¹한의과대학 경혈학교실 · ²의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터

Effect of *Cnidium officinale* Makino Aqua-acupuncture Solution on Carcinogen-induced Carcinogenesis in *In vitro*

Sang-Hoon Han¹, Dong-Il No¹, Ki-Tek Lee¹, Yun-Hee Shon², Tae-Seon Baek², Kyung-Soo Nam²,
Jong-Kook Lim¹

¹Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine; ²Dept. of Pharmacology, College of Medicine and
Intractable Disease Research Center, Dongguk University

Abstract

The effects of *Cnidium officinale* Makino aqua-acupuncture solution (COMAS) and *Cnidium officinale* Makino water-extracted solution (COMWS) on the CYP1A1 activity and benzo[a]pyrene(B[a]P)-DNA adduct formation were examined. There were 6.8%, 12.1%, 15.1%, 18.3% and 22.6% inhibition in the activity of cytochrome P4501A1 enzyme with the treatment of 0.1×, 0.5×, 1×, 3× and 5× COMAS, respectively. At concentration of 0.1× COMAS, the binding of [³H]B[a]P metabolites to DNA of NCTC-clone 1469 cell was significantly inhibited by 56.9%. These results suggest that COMAS has chemopreventive potential by inhibiting cytochrome P4501A1 activity and benzo[a]pyrene-DNA adduct formation.

Keywords : *Cnidium officinale* Makino, cytochrome P4501A1 enzyme, benzo[a]pyrene-DNA adduct

서 론

동양의학에서 종양의 발생기전은 실제 임상 실험으로 한 辨證論治의 원칙과 審證求因에 근거하여 經絡瘀阻, 臟腑失調, 氣滯瘀血, 痰結濕聚, 熱毒內蘊, 氣血虧虛등을 병리기전으로 주장하고 있다^{1,2)}. 암에 해당하는 病證名은 腫瘍 癰疽 腫毒 積聚 癥瘕 癥瘕 瘡毒 腫瘤 巖 肺癰 肝癰 噎膈 등에 속하며 양성종양과 악성종양이

포함되었다고 하였다³⁻⁵⁾. 性腫瘍(malignant neoplasia)에 대하여 병리학적으로 암이라 규정하고 있으며 빠른 침윤성 성장과 체내 각 부위의 확산 및 전이와 같은 특이성을 지니고 있어 생명의 위협을 초래할 뿐 만 아니라 현재 인류에게 있어서 가장 큰 위험성있는 전신성질 환으로 인식하고 있다. 악성종양을 치료하기 위하여 수술요법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법과 유전자요법 등을 사용하고 있으나, 수술요법과 방사선요법은 국소적인 치료법이기에 때문에 한계성이 있고, 전신요법인 면역요법도 현재로서는 치료방법이 정립되어 있지 않은 상태이며 화학요법은 독성문제를 아직 해결하지 못하고 있는 실정이다. 이러한 문제를 해

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

* 본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원(01-P19-PG1-01C004-0002)에 의하여 이루어졌습니다.

결하기 위한 방안은 항종양 효능이 우수한 새로운 천연약물에서의 안전성이 있는 약물개발이 요구된다.

川芎의 기원은 미나리과 Umbelliferae Makino에 속한 다년생 초본인 궁궁의 根莖으로 학명이 *Cnidium officinale* Makino (*Lygusticum officinale*)로性は溫無毒하고味는辛苦하며癰疽瘡瘍痘瘡一切血症疼痛氣病一切虛損壯筋骨癩癧瘡疥腦癰消瘀血癥結癭癩瘰癧疔塊痛등에 활용하고肝·脾·心·膽·三焦經絡에 작용하는歸經藥物로 보고하고 있다^{6,8)}.

許 등은^{9,10)} 川芎이能行血一切失血崩漏腦風痛鼻多涕一切風一切勞損一切穴養新血金瘡婦人血閉無子筋縮攣腫痛痔漏瘡疥消瘀血搜肝氣半身不遂血氣瘀滯胸脇腹諸痛氣虛血瘀肝血瘀阻癥積痞塊癥瘕積聚氣虛絡瘀諸瘡腫痛冠心病心絞痛腦血栓形成和腦栓塞缺血性中風慢性肺源性心臟病功能性子宮出血新生兒硬腫症慢性腎炎乳癖등에 임상응용대상의 축적된 경험자료로 조사되었다. 최근 연구되고 있는 川芎의 약리작용으로는血液系統的作用, 心血管系統的作用, 抑菌作用, 平滑肌的作用, 中樞神經系統的作用, 強壓作用, 抗輻射及抗癌作用, 腎炎的治療作用, 肝炎, 腦血管, 心臟的作用, 鎮靜作用, 抗放射作用, 肥大性脊椎炎, 三叉神經痛으로 진행되고 있다^{11,12)}.

현재, 암발생 억제물질의 효능을 연구하는데 있어서 생화학적 표식자 (biochemical marker)를 사용하고 있으며, 이 표식자들은 다양하고 많은 발암기전을 저해할수록 효과적인 암예방물질로 간주된다¹³⁾. 암개시 (initiation) 단계에 이용되는 biomarker로서 cytochrome P450 효소의 억제, carcinogen-DNA adduct formation, phase II enzyme의 유도 및 DNA repair 유도, scavenging electrophile 등이 있고, 암의 촉진 (promotion), 진행 (progression) 단계의 biomarker로는 polyamine 대사 억제, protease 억제, arachidonic acid 대사 억제, differentiation 유도, oncogene 발현 억제, 산화적 DNA 손상억제, protein kinase (PKC),

tyrosine kinase (TK) 등이 있다.

본 연구에서는 천궁약침액과 열수추출액을 비교해서 암 개시 과정과 관련한 phase I enzyme의 하나인 cytochrome P450A1의 억제효과 및 carcinogen-DNA binding inhibition을 측정하여 천궁약침액과 열수추출액의 암예방 효과에 대해 증명하고자 한다.

실험재료 및 방법

시약

Cytochrome P450A1 활성 측정에 사용된 시약인 Tris-HCl, bovine serum albumin (BSA), 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), NADP⁺, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, ethoxyresorufin과 carcinogen-DNA binding inhibition 측정에 사용된 시약인 NCTC-135 medium, ribonuclease A, ribonuclease T₁, potassium acetate, proteinase K, ellagic acid, laury sulfate (sodium dodecyl sulfate), antibiotics, dimethylsulfoxide (DMSO)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 JBI사 (Daegu, Korea), [³H]benzo [a]pyrene ([³H]B[a]P)은 Amersham pharmacia biotech사 (Piscataway, NJ, USA) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 세포배양용 및 분석용 특급시약을 사용하였다.

천궁 및 천궁약침액의 조제

본 실험에서 사용할 천궁(*Cnidium officinale* Makino) 약침액과 열수추출액을 제조하기 위하여 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 강원도 산 천궁(정선산 6년근)를 정선하여 사용하였다. Voucher specimen은 동국대학교 한의과대학 경철학교실에 보관되어 있다. 천궁약침액(*Cnidium officinale* Makino aqua-acupuncture solution, COMAS)은 수제 알콜침법에 의하여 조제하였다¹⁴⁾. 본법에 의해 제작한 천궁약침액을 1×로 사용

하였으며 5×, 3× 약침액은 1×의 약침액을 감압농축하여 사용하였고, 증류수나 phosphate buffered saline(PBS)를 첨가하여 0.1×, 0.5× 농도로 희석 조제하였다.

천궁열수추출액의 제조

천궁열수추출액 (*Cnidium officinale* Makino water-extracted solution, COMWS)은 천궁 60g을 조말하여 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator (BUCHIRE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 ml을 감압농축하여 pH.7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μ m, Whatman, Germany)로 여과하고 PBS를 가하여 200 ml이 되게 하여 1×의 열수추출액으로 사용하였으며 10×, 5×의 농도는 1×를 감압농축하여 사용하였고, 증류수나 PBS를 첨가하여 0.1×, 0.5× 농도를 조제하였다.

세포배양

천궁약침액에 의한 Carcinogen-DNA binding 억제효과를 살펴보기 위해서 사용한 NCTC- clone 1469 세포는 10% FBS가 포함된 NCTC 135를 배양액으로 사용하였으며, 이들 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

마이크로솜의 분리

흰쥐(Sprague-Dawley계, 자성)의 간 조직으로부터 마이크로솜의 분리는 Phol과 Fouts¹⁵⁾의 방법을 참고하여 실시하였고, 관류법으로 DMBA (30 mg/마리)를 처리하였다. 24시간 뒤 흰쥐를 diethyl ether (Junsei Chem. Co., Japan)로 질식시킨 다음, 복피를 절개하여 1.15% KCl 완충용액으로 간을 perfusion 시킨 후 적출하였다. 적출된 간은 다시 여러번 세척 후, 흡습지로 수분을 완전히 제거시켰다. 수분

이 제거된 간은 마쇄 (Teflon Plotter Elvehjem Homogenizer, Glas-Col, USA)한 후, 1.15% KCl 완충용액을 첨가하여 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄 균질액을 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 사용하였다 (Fig. 1). 이상의 모든 과정은 4°C에서 실시하였다.

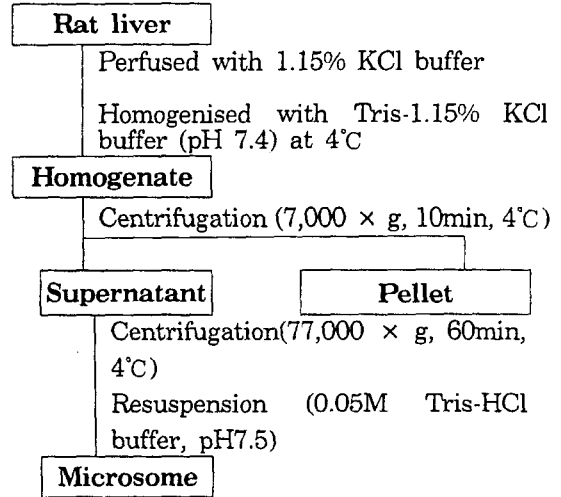


Fig. 1. Preparation of microsomal fraction from rat liver.

세포내 총 단백질 정량

세포내 총 단백질은 bincinchonic acid protein kit를 사용하여 BSA를 표준 단백질 용액으로 이용한 표준 검량선을 구하고 그 양을 산출하였다.

Cytochrome P4501A1의 활성 저해 측정

Cytochrome P4501A1는 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 활성으로 측정하였다¹⁶⁾.

즉, 흰쥐로부터 분리한 microsomal protein (2 mg/ml) 200 μ l에 640 μ l의 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), 100 μ l의 BSA (10 mg/ml in

Tris-HCl buffer), 20 μ l의 0.25 M MgCl₂, 40 μ l의 cofactor solution, 2.5 unit의 glucose-6-phosphate dehydrogenase, 10 μ l의 substrate (1 mg of ethoxyresorufin in 10 ml of methanol), 10 μ l의 천궁약침액을 농도별로 첨가하였다. 모든 시약들을 잘 섞은 후, 37°C에서 4분간 반응시키고, 2 ml의 methanol로 반응을 종결시켰다. 2,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하고, 형광분광광도계 (BIO-TEK SFM25, USA)로 측정 (550 nm excitation and 585 nm emission) 하였다. Positive control로는 β -naphthoflavone을 사용하였고, negative control로는 증류수를 사용하였다. 이 실험은 3회 반복 실험으로 수행하였으며, 각각의 결과는 control에 대한 각 시료들의 저해도 정도를 percentage로 나타내었다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[1 - \frac{(\text{tested sample} \cdot \text{blank})}{(\text{solvent} \cdot \text{blank})} \right] \times 100$$

Carcinogen-DNA binding 저해 효과 측정

1×10⁶ 개의 mouse normal liver (NCTC clone-1469) 세포를 5 ml의 NCTC 136 배지에 부유시켜 6-well plate에 접종시키고 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 18시간 경과 후, 배지를 교환하여 천궁 약침액 0.1×, 0.5×, 1×, 3×과 5×를 처리하고, 10 μ M [³H]B[a]P을 처리하여 12시간동안 배양하였다. DNA 추출은 Sharma 등¹³⁾에 의한 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. [³H]B[a]P에 처리된 세포는 PBS로 세척하고, 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 M potassium acetate 용액을 첨가하여 30분동안 4°C에서 세포를 방치시킨 뒤, 13,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액만을

취한 뒤, cold ethanol을 상층액 2배의 양이 되도록 하여 첨가하였고, DNA를 침전시키기 위하여 -20°C에 12시간 이상 방치하였다. 13,000×g에서 15분동안 원심분리한 뒤 상층액을 제거하여 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 l씩 첨가하여 37°C에서 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 사용하였다. 모든 실험은 3회 반복실험으로 수행하였으며, 천궁약침액에 의한 carcinogen-DNA binding 저해 효과는 다음 공식으로 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[1 - \frac{\text{cpm per } \mu\text{g DNA (sample-treated cells)}}{\text{cpm per } \mu\text{g DNA (control cells)}} \right] \times 100$$

통계학적 처리

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

실험결과

Cytochrome P450 1A1의 활성 저해 효과

Phase I 효소 중 하나인 cytochrome P4501A1은 발암을 유도하므로 시료에 의한 이 효소의 활성 억제는 암예방 효과의 기작으로 간주할 수 있다. 따라서 천궁 약침액 및 열수추출액에 의한 cytochrome P4501A1 효소활성을 각 농도별로 측정하였다. 천궁약침액은 0.1×, 0.5×, 1×, 3×와 5×에서 각각 6.8%, 12.1%, 15.1%, 18.3%과 22.6%의 저해율이 나타났고 (Fig. 2), 열수추출액은 0.1×, 0.5×, 1×, 3×와 5×에서 각각 6.0%, 5.0%, 11.3%, 15.1%과

17.0%의 저해율이 있었다 (Fig. 2).

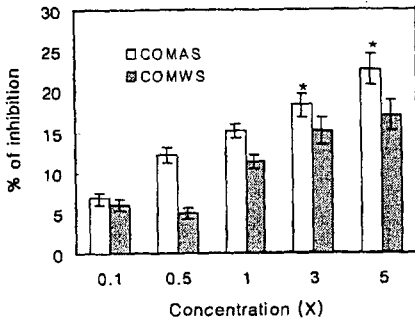


Fig. 2. Effect of COMAS and COMWS on DMBA-induced cytochrome P4501A1 activity.

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 ($\dot{}$ p<0.05).

Benzo[a]pyrene-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 암예방 효과가 있을 것이다. 따라서 천궁약침액에 의한 benzo[a]pyrene-DNA binding inhibition 효과를 알아보기 위해 NCTC-clone 1469 세포를 이용하여 실험한 결과, 0.1 X의 약침액 농도에서 56.9%, 0.1 X의 열수추출액에서 33.3%의 저해 효과를 나타내었다 (Fig. 3). 한편 positive control인 ellagic acid는 54.7%의 억제효과가 있었다.

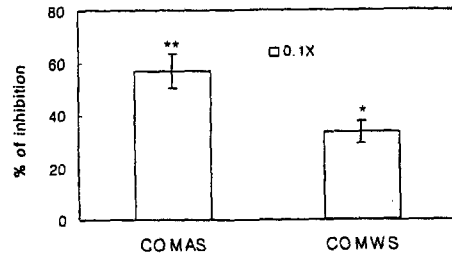


Fig. 3. Inhibition of the binding of B[a]P metabolites to DNA of NCTC-clone 1469 cells.

B[a]P-DNA binding was determined in the presence of COMAS or COMWS. 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 ($\dot{}$: p<0.05, $\dot{\dot{}}$: p<0.01).

고 찰

본 연구에서는 천궁약침액을 이용하여 암예방 활성 중 발암과정의 blocking agents (inhibitor of tumor initiation)로서의 활성 검정을 위하여 DMBA-induced cytochrome P4501A1 activity 억제효과 측정, B[a]P-DNA binding assay로 실험을 실시하였다.

외부의 발암물질은 cytochrome p-450-dependent monooxygenase system에 의해 대사되어 전자친화적물질, epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질이 된다^{17,18)}. 따라서 cytochrome P450 효소의 활성을 억제시킬 수 있다면 암예방의 효과가 있을 것이므로 천궁약침액을 이용하여 DMBA에 의해 유도된 cytochrome P4501A1 효소의 억제율을 측정한 결과, cytochrome P4501A1 효소의 활성을 저해함을 관찰할 수 있었다. 현재, cytochrome P4501A1을 억제시키는 물질로 vitamin A, phosphorothioate oligonucleotide 등의 물질도 알려져 있다¹⁹⁾.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) 은 B[a]P와 같이 잘 알려진 발암물질을 포함한 화학물질로 직업적으로나, 흡연, 숯불에 그을린 음식등에 의해 사람들은 이러한 화학물질에 노출된다²⁰⁾. 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, RNA의 purine 및 pyrimidine 염기와 결합하고 이 결합의 강도는 hydrocarbons의 발암의 유효성과 밀접한 관계가 있다²¹⁾. 이때 암예방활성물질은 B[a]P epoxide와 adducts를 형성하여 무독화한다²²⁾. 이러한 사실들에 의하여 천궁약침액은 활성효소의 억제, 무독화효소의 유도과 같이 DNA-carcinogen 복합체의 형성 억제 능력에 의하여 스크린 할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

1. 천궁약침액은 1×에서 15.1%의 cytochrome P4501A1 저해효과를 나타냈으며 그 억제효과는 약침액의 농도가 높을수록 증가하였다.
2. 천궁약침액은 benzo[a]pyrene과 세포의 DNA 결합을 유의성있게 억제시켰다.
이상의 결과를 종합해 볼 때 천궁약침액은 효과적으로 cytochrome P4501A1 효소를 저해했으며, 발암물질과 DNA의 결합을 억제시켜 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울 : 杏林書院. 1995 : 15, 19-24, 37-42.
2. 金重完, 林鍾國. 金銀花 藥鍼液이 抗癌 및 癌豫防 效果에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌.

- 1999 ; 16(2) : 281-4.
3. 申天浩. 癌阻防治研究. 서울 : 성보사. 1984 : 25-9, 31-8.
4. 林紅生. 歷代中醫腫瘤論選粹. 북경 : 北京出版社. 1988 : 1, 35, 45, 162, 258, 295, 478.
5. 許在淑. 胃癌治驗例 大韓醫學會誌. 1964 ; 2(8-9) : 35-6.
6. 南相千. 經絡. 서울 : 世明文化社. 1993 : 445-56.
7. 申佶求. 申氏本草學. 서울 : 壽文社. 1973 : 600- 2.
8. 鄭普燮. 鄉藥生藥大事典. 서울 : 永林社. 1990 : 418.
9. 許 浚. 東醫寶鑑. 南山堂. 1991 : 114, 162, 208, 240, 418, 723.
10. 張廷模. 中華臨牀中藥學. 1998 : 1048-55.
11. 徐村楠. 中藥臨牀應用大全. 1999 : 413-5.
12. 顏正華. 中藥學. 北京 : 人民衛生出版社. 1991 : 528- 32.
13. Sharma S, Jill DS, Kelloff GJ, Vernon ES. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. Cancer Res. 1994 ; 54 : 5848-55.
14. 錢百炎. 中草藥主射劑. 上海 : 上海科學技術出版社. 1981 : 71-132.
15. Pohl RJ, and Fouts JR. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. Anal. Biochem. 1980 ; 107 : 150-5.
16. Byers TJ, Akins RA, Maynard BT, Lefken RA, Martin SM. Rapid growth of *Acanthamoeba* in defined media; Induction of encystment by glucose-acetate starvation. J Protozool. 1980 ; 27 : 216-9.
17. Zhai S, Dai R, Friedman FK, Vestal RE. Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. Drug Metab. Dispos. 1998 ; 26 : 989-92.
18. Jollow DJ, Smith C. Biologically Reactive

- Intermediates. New York : Plenum Press. 1977 : 42-59.
19. Inoue K, Mae T, Kondo S, Ohkawa H. Inhibitory effects of vitamin A and vitamin K on rat cytochrome P450 1A1-dependent monooxygenase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 ; 262 : 565-9.
 20. Perera FP, Poirier MC, Yuspa SH, Nakayama J, Jaretzki A, Curnen MM, Knowies DM, Weinstein BA. A pilot project in molecular cancer epidemiology: determination of benzo[a]pyrene-DNA adducts in animal and human tissues by immunoassays. *Carcinogenesis (Lond.)*. 1982 ; 3 : 1405-10.
 21. Sims P, Grover PL. Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* 1974 ; 20 : 165-74.
 22. Teel RW, Babcock MS, Dixit R, 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 : 53-6.