

포공영약침액의 발암과정 blocking agent로서의 활성

손윤희 · 김소연¹ · 임종국¹ · 남경수*

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터
¹동국대학교 한의과대학 경혈학교실

Taraxacum mongolium Hand-Mass Aqua-acupuncture Solution as the Blocking Agent of Carcinogenesis

Yun-Hee Shon, So-Yeun Kim¹, Jong-Kook Lim¹ and Kyung-Soo Nam*

Department of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Disease Research Center,
¹Department of AM-Pointology, College of Oriental Medicine, Dongguk
University, Kyongju 780-714, Korea

Abstract

Taraxacum mongolium Hand-Mass aqua-acupuncture solution (TMAS) was prepared and investigated for the effect on initiation of carcinogenesis. The following effects as a blocking agent were measured. : (a) Induction of quinone reductase, (b) Induction of glutathione S-transferase activity (c) Increase of reduced glutathione. TMAS was potent inducer of quinone reductase in Hepa 1c1c7 murine hepatoma cells. Glutathione S-transferase activity was increased with TMAS. In addition glutathione levels were increased about 1.6-fold with TMAS in cultured murine hepatoma Hepa 1c1c7 cells.

Key words – *Taraxacum mongolium* Hand-Mass aqua-acupuncture solution, quinone reductase, glutathione S-transferase, glutathione

서 론

암예방(chemoprevention)이란 초기단계에서 암발생(carcinogenesis)을 예방하거나 억제시키며, 암으로 진행된 것을 전환시키는 것을 의미한다[7,8]. 암예방 물질은 최종 발암대사물질 활성을 줄이거나 형성을 차단하고 또는 표적 조직에서 promotors의 영향을 억제하거나 발암물질의 활성을 감소시킴으로서 암화과정을 억제할 수 있다[9]. 암 발

생 억제물질들은 Wattenberg[10]에 의해 크게 세 가지의 형태로 분류되고 있다. 즉, 발암물질의 형성이나 흡수를 억제하는 암예방물질, 세포내의 target과 반응하거나 도달을 억제하는 blocking agents, 그리고 발암물질에 노출된 세포가 새로운 물질로 나타나는 과정을 억제하는 suppressing agent로 구분된다.

효과적인 암억제물질 연구에서는 생화학적 표식자(biochemical biomarker)를 이용하고 있다. 생화학적 표식자란 다단계 발암과정에서 특이적으로 생성되는 물질 뿐만 아니라 비정상적인 생화학적 parameter의 변화로 발암과정의 다단계와 관련하여 각 단계별로 분류된다. 즉,

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 054-770-2412, Fax : 054-770-2477
E-mail : namks@mail.dongguk.ac.kr

blocking agents로 암발생 개시 (initiation)단계의 biomarker로서 cytochrome P450 효소의 억제, phase II enzyme의 유도, DNA repair 유도, scavenging electropile 등이 있고, suppressing agents로서 암발생의 촉진 (promotion)단계와 진행(progression)단계의 biomarker는 polyamine 대사 억제, protease 억제, arachidonic acid 대사 억제, differentiation 유도, oncogene 발현 억제, 산화적 DNA 손상 억제, protein kinase C (PKC) 활성억제 등이 있다[7].

약침요법은 본초학적으로 유효한 약물이거나 처방을 선택하여 증류 또는 알코올 추출등의 방법을 이용하여 주사액으로 만들어 경락학적으로 유효한 경혈이나 아시혈 또는 피부 양성반응점에 주입함으로써 생리기능을 강화시키고, 병리적인 상태를 개선시키는 신침요법의 일종으로 수침요법 또는 혈위약물주사요법이라고도 한다.

본 실험에서는 유선암, 간암, 위암, 골육암, 식도암, 방광암, 비인암, 장암 등에 전탕복용의 임상효능이 보고된 바 있는 포공영(蒲公英, *Taraxacum mongolicum* Hand-Mass) 약침액을 조제하여 암 개시과정과 관련한 phase II enzyme 인 quinone reductase (QR), glutathione S-transferase (GST) 효소활성 유도효과와 glutathione (GSH)생성에 미치는 영향을 측정하여 포공영약침액의 발암과정 blocking agent로서의 효과에 대하여 검토하고자 한다.

재료 및 방법

시약

Minimum essential medium eagle (MEM), antibiotics, dimethylsulfoxide (DMSO), 99% ethyl alcohol anhydrous, NaCl, KCl, NaH₂PO₄, bovine serum albumin (BSA), tween-20, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), flavin adenine dinucleotide (FAD), dicumarol, glucose-6-phosphate, β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β-NADP), glucose-6-phosphate dehydrogenase, menadione, crystal violet, chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), glutathione reductase, triton X-100, Na-EDTA, 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), bicinchoninic acid protein kit는 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)는 Gibco

사 (Grand Island, NY, U.S.A.) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 특급시약을 사용하였다.

약침액 제법

약침액은 수제 알콜침법에 의하여 조제하였다(Fig. 1). 포공영 60 g을 조말하여 정류수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4℃, 2,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 200 ml을 감압농축하였다. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol로 가하여 75%, 85%, 95%의 ethanol 용액이 되게하여 침전물을 여과하고, pH 7.4로 적

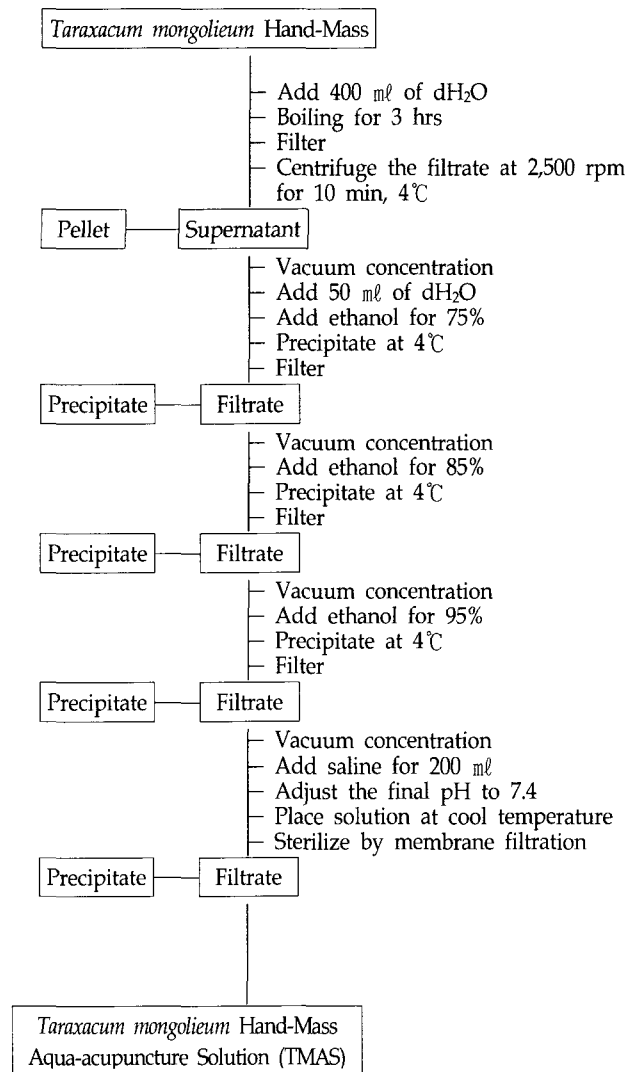


Fig. 1. Preparation of *Taraxacum mongolicum* Hand-Mass aqua-acupuncture solution (TMAS).

정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μm , Whatman, Germany)로 여과하고, 3차 증류수를 가하여 200 ml이 되게 하여 1×의 약침액(25 mg/ml)으로 사용하였으며, 3× 약침액은 1×의 약침액을 감압농축하여 사용하였고, 증류수를 첨가하여 0.1×, 0.5× 농도를 조절하였다.

세포배양

계대 보존 중인 생쥐의 간암세포인 Hepa 1c1c7 를 10% FBS가 포함된 MEM을 배양액으로 하여 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 37°C)에서 배양하였고, 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 세포는 액체질소의 기체상태 (-150°C)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 trypan blue dye exclusion 방법으로 세포의 생존을 확인한 후 사용하였다.

Quinone reductase 생성 측정

QR 생성 유도효과는 Prochaska등[6]의 방법을 수정하여 사용하였다. 1×10^4 개의 Hepa 1c1c7 세포를 200 μl 의 MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시켜 CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후, 배양액을 버리고 새 배양액 190 μl 와 포공영약침액 (0.1×, 0.5×, 1×, 3×)을 10 μl 씩 각 well에 가하였다. 48시간 배양 후, freeze-thaw cycle을 3회 반복하여 세포를 용해시켰다. 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), BSA 100 mg, 1.5% Tween-20, 7.5 mM FAD, 150 mM glucose-6-phosphate, 50 mM NADP, 300 U glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45 mg MTT, 50 mM menadione을 혼합한 반응액을 200 μl 씩 각 well에 넣고 5분간 반응시켰다. 5 mM potassium phosphate buffer와 0.5% DMSO에 녹인 0.3 mM dicoumarol를 첨가한 용액 50 μl 를 각 well에 가하여 반응을 중지시킨 후, microplate reader를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 세포수에 대한 QR 생성량을 측정하기 위하여 앞에서와 동일한 방법으로 96-well plate에 Hepa 1c1c7 세포를 접종시키고 포공영약침액을 처리하였다. 48시간 배양한 후, 배지를 버리고 0.2% ethanol에 녹아 있는 0.2% crystal violet 용액에 10분간 담근 후, 세포가 떨어지지 않게 주의하여 2분간 흐르는 물에 씻어 주었다. 0.5% SDS를 50% ethanol에 녹여 각 well에 200 μl 씩 첨가하고 37°C에서 1시간 반

응시킨 뒤 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. QR specific activity 는 분당 환원된 MTT의 흡광도와 crystal violet의 흡광도에 의해 산출하였고, QR의 활성유도는 대조군의 활성과 포공영약침액에 의한 활성의 비로 계산하였다.

세포내 glutathione S-transferase 활성 유도

GST α , GST μ 를 발현하는 Hepa 1c1c7 세포를 이용한 세포내 GST 활성측정은 Habig등[3]의 방법을 변형하여 측정하였다. Hepa 1c1c7 세포를 96-well plate에 위의 QR 생성 유도와 같은 방법으로 세포를 접종시키고 시료를 처리하였다. 세포를 약침액이 처리된 배양액에서 48시간 배양 후, PBS로 3회 세척하고, 3회의 freeze-thaw cycles에 의해 세포를 용해시켰다. 배양된 세포내에서 유도된 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 μl 씩 각 well에 가하고 1분간 plate shaker에서 교반한 후, 3분간 흡광도의 증가를 microplate reader, 405 nm에서 측정하였다. GST 활성측정을 위한 단백질 함량은 bicinchoninic acid protein assay kit를 사용하여 측정하였다.

세포내 glutathione 함량 측정

Hepa 1c1c7 세포내의 총 GSH의 함량은 Griffith등[2]의 방법을 변형하여 96-well plate에서 측정하였다. 즉, Hepa 1c1c7 cell을 96-well plate에 위의 QR 생성 유도와 같은 방법으로 세포를 접종시키고 시료를 처리하였다. 시료처리 후 48시간 뒤 배양액을 버리고 phosphate buffered saline으로 3회 세척하고 freeze-thaw cycle을 3회 반복하여 세포를 용해시킨 후, 각 well에 40 μl stock buffer (125 mM Na-phosphate, 6.3 mM Na-EDTA, pH 7.4)를 가하고 6 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (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⁺, 100 units glucose-6-phosphate dehydrogenase)을 혼합한 reaction mixture 170 μl 와 반응시켰다. 상온에서 5분간 교반하면서 반응시킨 후 microplate reader, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. GSH 함량은 GSH 표준곡선으로 계산하였고,

nmol/mg protein으로 표시하였으며, GSH 함량의 비는 대조군에 의한 GSH 양과 포공영약침액에 의해 생성된 GSH 양의 비율로 측정하였다. 세포내 총 단백질은 bicinchoninic acid protein assay kit를 사용하여 BSA를 표준 단백질 용액으로 이용한 표준 검량선을 구하고 그 양을 산출하였다.

결 과

Quinone reductase 활성 유도 효과

포공영약침액의 암세포 성장 저해효과를 살펴보기 위하여 발암물질을 무독성화시키는 phase II enzyme의 한 종류인 QR 생성의 유도효과를 생쥐의 간암세포인 Hepa 1c1c7 세포를 이용하여 측정하였다. 약침액 1×농도(25 mg/ml)에서 대조군에 비하여 3.0배 증가를 보였으며, 0.5×농도에서 가장 높은 수치인 3.6배의 생성 유도율을 보였다 (Fig. 2). 이 결과, 생쥐의 간암세포인 Hepa 1c1c7를 사용한 실험에서 포공영약침액은 QR 생성을 유도하였고, 저농도인 0.5×에서 가장 높은 유도율을 나타내었다.

세포내 glutathione S-transferase 활성 효과

GST 활성 효과를 관찰한 결과, 포공영약침액 1×농도에서 대조군에 비해 1.4배의 유도율을 보였고, 실험에 사용된 그밖의 농도에서는 높은 유도효과가 없었다 (Fig. 3).

세포내 glutathione 생성 효과

포공영약침액에 의한 glutathione 생성을 Hepa 1c1c7 세

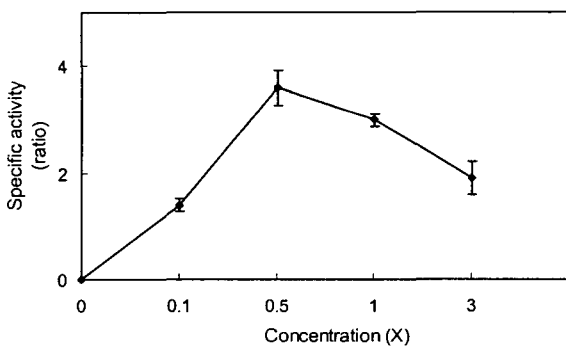


Fig. 2. Induction of quinone reductase (QR) in murine hepatoma Hepa 1c1c7 cells by TMAS. Experimental details are described in Material and Methods. The values are mean \pm SD (n=3).

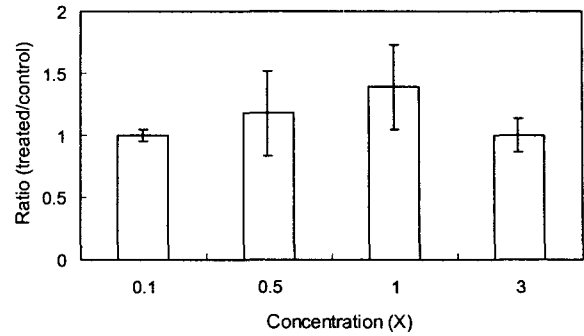


Fig. 3. Induction of glutathione S-transferase (GST) by TMAS in murine hepatoma Hepa 1c1c7 cells. Experimental details are described in Material and Methods. The values are mean \pm SD (n=3).

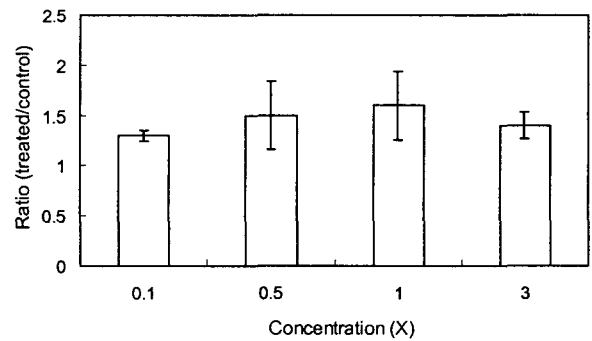


Fig. 4. Increase of glutathione (GSH) levels by TMAS in murine hepatoma Hepa 1c1c7 cells. Experimental details are described in Material and Methods. The values are mean \pm SD (n=3).

포에서 살펴본 결과, 0.5×농도에서 1.5배, 1×농도의 약침액을 처리한 세포에서 glutathione level이 1.6배의 증가를 나타내었다 (Fig. 4).

고 찰

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)가 있다[1]. Phase I 효소유도는 발암물질을 활성화된 발암물질 (ul-

timate carcinogens)로 바꾸기 때문에 암 유발 위험인자이다. 그러므로 이상적인 암예방물질은 암예방활성을 가진 monofunctional 효소 유도체이다.

포공영약침액을 생쥐의 간암세포 Hepa 1c1c7에 처리하였을 때 0.5×농도에서 3.6배의 QR 생성 유도율을 보였으므로 돌연변이원성, 발암물질의 대사과정시 생성된 quinone에 의한 세포내 독성 및 세포내 DNA손상을 없애줄 것으로 추측된다. 이에 포공영약침액에 의한 phase I enzyme들의 생성량 및 활성 변화를 측정하여 포공영약침액의 monofunctional 또는 bifunctional 효소 유도체로서의 증명은 포공영약침액의 더욱 효율적인 암예방물질로서의 규명을 위해 필요한 연구가 될 것이다.

환원형 glutathione (GSH) 또한 암예방물질의 스크린에 사용된다. GSH는 세포내에서 다양한 기능을 가지고 있으며, 특히 반응성이 있는 대사중간물로부터 세포를 보호한다. GSH는 자연적인 항산화제로 발암과정의 initiation이나 promotion단계에서 세포를 보호할 수 있으며, initiation 단계에서는 GSH의 전자친화적인 성질로 인해 외부물질이 DNA와 결합하여 암을 유발하는 것을 막아준다. Promotion 단계에서는 oxidative free radical의 공격을 제어함으로써 발암과정을 저해할 수 있다. Aflatoxin에 의한 간종양을 가진 쥐에 많은 양의 GSH를 투여하였을 때 종양이 감소하였다. 또한 butylated hydroxyanisole은 GSH 함량을 증가시켜서 발암과정을 저해하였다[4]. 이러한 연구들에 의하면 GSH가 free radical을 제거한다는 강한 증거를 제공한다. 또한 GSH는 외부의 독성물질이 세포내 침입했을 때 직접 반응하거나 GST에 의해 독성물질과 결합하여 무독하게 하는 기능을 가지고 있다. GST는 유리기 (free radical)를 파괴하여 반응성이 높은 산소들로부터 세포를 보호한다고 보고되고 있다[5]. 본 실험의 결과 포공영약침액은 Hepa 1c1c7 세포에서 GSH, GST의 생성율을 증가시켰다. 이는 세포내 GSH의 생성을 촉진하여 세포내 발생한 산화물질과 기타의 독성물질을 무독하게 할 것으로 추측된다.

요 약

포공영약침액의 암억제 효과를 살펴보기 위하여 quinone reductase (QR) 생성유도를 생쥐의 간암세포인 Hepa 1c1c7를 이용하여 측정한 결과, 포공영약침액을 처리한

Hepa 1c1c7에서 QR생성이 유도되었다. 또한 포공영약침액은 phase II detoxification 효소인 glutathione S-transferase (GST) 활성을 증가시키고 glutathione 생성도 증가시켰다. QR과 GST는 간세포에서 주로 생성되는 phase II 효소로 발암물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화 효과를 막아주고 발암물질을 무독화 시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서 포공영약침액은 QR 효소 생성 유도, glutathione 함량 증가 및 GST 효소활성 증대등 phase II detoxification의 기작을 통한 발암과정의 blocking agent로서 효과가 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Gerhauser, C., M. You, J. Liu, R. M. Moriarty, M. Hawthorne, R. G. Mehta, R. C. Moon and J. M. Pezzuto. 1997. Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase II drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.* **57**, 272-278.
2. Griffith, O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207-212.
3. Habig, W. H., M. H. Pabst and W. B. Jacoby. 1974. Glutathione S-transferase : the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.
4. Meister, A. and M. Anderson. 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 711-760.
5. Molders, P. and B. Jernstrom. 1983. Interaction of glutathione with reactive intermediates. pp. 99-108, In Larson, A., S. Orrenius, A. Holgren and B. Mannervik (eds.), *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, and Clinical Aspects*. Raven Press, New York.
6. Prochaska, H. J. and A. B. Santamaria. 1988. Direct measurement of NAD(P)H : Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* **169**, 328-336.
7. Sharma, S., J. D. Stutzman, G. J. Kelloff and V. E. Steele. 1994. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* **54**, 5848-5855.
8. Sporn, M. B. 1993. Chemoprevention of cancer.

- Lancet.* **342**, 1211-1213.
9. Tanaka, T., T. Kojima, A. Hara, H. Sawada and H. Mori. 1993. Chemoprevention of oral carcinogenesis by D,L-difluoromethylornithine, an ornithine decarboxylase inhibitor: dose-dependent reduction in 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue neoplasmas in rats. *Cancer Res.* **53**, 772-776.
10. Wattenberg, L. W. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* **45**, 1-8.

(Received July 25, 2002; Accepted August 27, 2002)