

괴화약침액이 간세포의 Quinone reductase 와 Glutathione S-transferase 활성화에 미치는 영향

이 기 택¹ · 임 종 국¹

¹동국대학교 한의과대학 경혈학교실

Effect of Sophorae Flos Aqua-acupuncture Solution on the Quinone Reductase and Glutathione S-transferase Activities of Hepa 1c1c7 Cells.

Ki-Taek Lee¹, Jong-Kook Lim¹

¹Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Abstract

Sophorae Flos aqua-acupuncture solution(SFAS) was prepared and tested for the induction of quinone reductase and glutathione S-transferase activities and glutathione. SFAS significantly induced QR activity at the concentrations of 0.5×, 1× and 3× in cell culture. However, GST activity in murine Hepa 1c1c7 cells was slightly increased with SFAS. SFAS increased GSH levels.

Key words : Sophorae Flos, Quinone reductase(QR), Glutathione S-transferase(GST), Glutathione(GSH).

I. 서 론

암 예방 물질은 발암 물질의 대사과정에 변화를 가져오거나 암화 과정(carcinogenesis)시 생성되는 대사물질 또는 대사과정 시 생성되는 부산물과 반응하여 상호작용을 일으키거나 특정 효소의 발현 및 기능을 변화시키므로 이러한 특징을 이용하여 암 예방 물질을 개발, 조사할 수 있다¹⁾. 대표적인 것으로 quinone reductase (QR), glutathione S-transferase (GST) 활성화 유도, glutathione생성 등의 측정이 있다²⁾.

QR은 간세포에서 주로 생성되는 phase II enzyme [glutathione S-transferase (GST),

UDP-glucuronosyl transferase]의 한 종류로 quinone을 환원시켜 무독(detoxify)하게 만들고 세포내에 유도되어 발암물질에 의해 일어나는 돌연변이(mutation)와 종양효과(neoplastic effect)를 막아주고 발암 물질을 무독하게 하는 역할을 한다³⁾.

Glutathione은 세포내에서 다양한 기능을 가지고 있으며 외부의 독성물질이 세포내 침입했을 때 직접 반응하거나 glutathione S-transferase에 의해 독성물질과 결합하여 무독하게 하는 기능을 가지고 있다. 또한 glutathione은 자연적인 항산화제로 발암과정시 세포를 보호한다. glutathione의 전자친화적인 성질은 외부물질이 DNA와 결합하여 암을 유발하는 것을 막아주며 GST는 유리기(free radical)를 파괴하여

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

반응성이 높은 산소들로부터 세포를 보호한다고 보고되고 있다⁴⁾.

槐花는 회화나무 *Sophora Japonica* L.의 꽃봉오리를 말린 것으로 中國이 原產地이고 豆科에 屬하며 *Sophorae Flos*라 한다. 性은 平無毒하고 味는 苦하여 肺, 大腸, 肝, 膀胱經脈의 歸經藥物로 作用한다고 하였으며 痔瘡腫痛, 衄血崩漏, 亢炎作用, 解癭, 抗潰瘍作用, 癰疽瘡毒, 陰瘡濕痒, 疔瘡腫毒, 瘡瘍, 腸風臟毒, 皮膚瘡, 心痛, 楊梅毒瘡, 疥癬, 丁腫皮莖等に 應用되었다⁵⁻⁶⁾. 劉 등은⁷⁻⁸⁾ 槐花가 肛門癌, 直腸癌, 食管癌, 子宮癌, 大腸癌, 乳腺癌, 肺癌, 肝癌, 胃癌 등에 經口投與의 臨床의 效能등을 보고하였으나 아직은 槐花 藥鍼液이 抗癌 效能에 대하여 實驗的으로 報告된 바 없어 本 實驗을 着想하게 되었다.

본 논문에서는 过氧化침액을 調整하고 이것을 이용하여 quinone reductase(QR) 유도효과, glutathione S-transferase(GST) 생성을, glutathione(GSH) 함량을 측정하여 过氧化침액이 세포 내 Phase II enzyme의 활성에 미치는 영향을 알아보았다.

II. 실험재료 및 방법

1. 약물

본 실험에서 사용할 过氧化침액(*Sophorae Flos aqua-acupuncture solution*, SFAS)을 제조하기 위하여 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 槐花를 정선하여 사용하였다. Voucher specimen은 동국대학교 한의과대학 경혈학교실에 보관되어 있다.

2. 过氧化침액(SFAS)의 제조

过氧化침액은 수제 알콜침법에 의하여 調整하였다⁹⁾. 槐花 60 g을 조말하여 400 ml을 가한 뒤

rotary evaporator(BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 煎탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 ml을 浸압농축하였다. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol을 가하여 75%, 85%, 95%의 ethanol 용액이 되게 하여 침전물을 여별하고, pH 7.4로 調整한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μ m, Whatman, Germany)로 여과하였다. 그리고 3차 證류수를 가하여 200 ml이 되게 하여 1 \times 의 藥침액으로 사용하였으며 3 \times , 5 \times 藥침액은 1 \times 의 藥침액을 浸압농축하여 사용하였고, 證류수나 phosphate buffered saline (PBS)를 첨가하여 0.1 \times , 0.5 \times 濃도를 調整하였다.

3. NAD(P)H: quinone oxidoreductase (QR) 생성 측정

QR 생성 유도 효과는 Prochaska와 Santamaria (1988)의 방법¹⁰⁾을 수정하여 사용하였다. 0.7×10^4 개의 Hepa 1c1c7 세포를 200 μ l의 MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 接種하였다. CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 새 배양액 190 μ l와 过氧化 藥침액을 10 μ l씩 각 well에 가하였다. 48시간 배양 후, 배양액을 제거하고 freeze-thaw cycle을 3회 반복하여 세포를 lysis시켰다. 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), bovine serum albumin 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 μ l씩 각 well에 넣고 5분간 반응시켰다. 5 mM potassium phosphate buffer와 0.5% DMSO에 녹인 0.3 mM dicumarol를 첨가한 용액 50 μ l를 각 well에 가하여 반응을 中止시킨 후,

microplate reader를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 세포내 glutathione S-transferase 생성량 측정

Habig 등¹¹⁾의 방법을 변형하여 GST 활성을 측정하였다. 1×10^4 개의 Hepa 1c1c7 세포를 10% heating inactivated FBS가 포함된 MEM 배지 200 μ l에 부유시켜 96-well plate에 접종하여 배양하였다. 24시간 배양 후, 새 배양액 190 μ l와 괴화 약침액을 10 μ l씩 각 well에 처리하였다. 세포를 약침액이 처리된 배양액에서 48시간 배양 후, PBS로 3회 세척하고 3회의 freeze-thaw cycles에 의해 세포를 lysis시켰다. 배양된 세포 내에서 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 μ l씩 각 well에 가하고 1분간 교반한 후 3분간 흡광도의 증가를 microplate reader, 405 nm에서 측정하였다. GST 활성 측정을 위한 단백질 함량은 bichin-chonic acid protein assay kit를 사용하여 측정하였다.

5. 세포내 glutathione 함량 측정

Griffith 등¹²⁾의 방법을 변형하여 세포내 총 glutathione 함량을 측정하였다. 즉, 1×10^4 개의 Hepa 1c1c7 세포를 200 μ l MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종하였다. 24시간 배양 후, 배양액을 제거하고 새 배양액 190 μ l에 괴화 약침액을 10 μ l씩 각 well에 가하였다. 48시간 뒤, PBS로 세척하고 freeze-thaw cycle을 3회 반복하여 세포를 용해시킨 후, 각 well에 40 μ l 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 (5 units/1 ml), 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 μ l와 반응시켰다. 상온에서 5분간 교반하면서 반응시킨 후 microplate reader, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

III. 실험결과

1. NAD(P)H:quinone oxidoreductase (QR) 생성 유도 효과

괴화 약침액의 QR 생성의 유도율을 측정한 결과 0.1 \times , 0.5 \times , 1 \times , 3 \times 농도에서 대조군에 비하여 1.3배, 2.2배, 1.9배, 1.5배의 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 1).

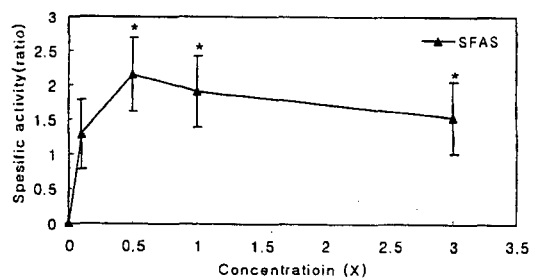


Fig. 1. Effect of Sophorae Flos aqua-acupuncture solution (SFAS) on induction of quinone reductase activity in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. Experimental details are described in Material and Methods. Values are mean \pm SD (n=3).

* p<0.05 as compared to control.

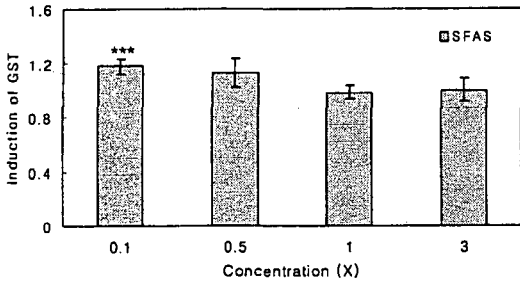


Fig. 2. Induction of glutathione S-transferase by Sophorae Flos aqua-acupuncture solution (SFAS) in murine hepatoma Hepal1c7 cells. Experimental details are described in Material and Methods. Values are mean \pm SD (n=3). *** p<0.005 as compared to control.

2. 세포내 glutathione S-transferase 활성 유도 효과

괴화 약침액에 의한 GST 활성도를 관찰한 결과, 약침액 0.1×에서 1.2배의 GST 활성이 유도되었다(Fig. 2).

3. 세포내 glutathione 함량 측정

괴화 약침액에 의한 glutathione 생성을 살펴본 결과, 0.1×, 0.5×, 1×, 3×에서 각 1.1배, 1.3배, 1.5배, 1.3배의 GSH 유도도를 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

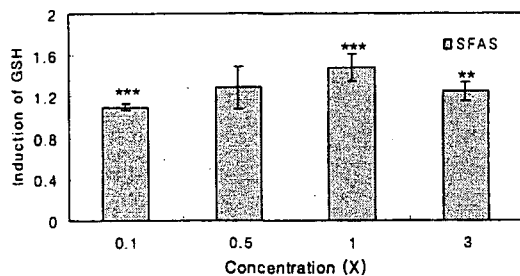


Fig. 3. Induction of glutathione level by Sophorae Flos aqua-acupuncture solution (SFAS) in murine hepatoma Hepal1c7 cells. Experimental details are described in Material and Methods. Values are mean \pm SD (n=3). ** p<0.01, *** p<0.005 as compared to control.

IV. 고찰

QR, GST 효소 유도 및 GSH의 생성은 여러 형태의 compound를 투여함으로써 일어날 수 있으며, 이러한 물질로 인한 발암이나 독성작용에 대하여 동물들을 보호할 수 있다¹³⁾. Kim 등¹⁴⁾은 암을 방어할 수 있는 능력을 지닌 한국산 채소를 세포 배양과 *in vivo* 모델 시스템에서 QR 활성을 측정하였다. Singh 등¹⁵⁾은 클로로필린 간에서 GST 활성과 GSH 생성을 크게 증가시키는 것으로 보고하였다. 또, 일부 compound의 chemopreventive mechanism이 발암물질의 활성 시스템을 억제하고 독성을 억제하는 효소의 유도와 관련이 있다고 보고하였다. Spencer 등¹⁶⁾은 마우스와 랫트의 식이에 0.2~0.5% 농도의 dimethyl fumarate를 투여한 결과, 간, 신장 등의 각 조직에서 GST와 QR의 활성이 증가하였다고 주장하였다. 따라서 괴화 약침액에 의해 QR, GST 효소 유도 및 GSH의 활성이 증가된 것으로 보아 괴화 약침액은 외부물질이나 대사산물에 의해 일어날 수 있는 암발생 억제 효과가 있는 것으로 사료된다.

V. 요약

괴화약침액이 간세포의 quinone reductase, glutathione S-transferase 와 환원형 glutathione의 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과 괴화약침액은 암예방 효소인 Phase II enzyme을 유의성 있게 증가시켰다. 따라서 괴화약침액은 암예방에 효과가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents.

- Cancer Res. 1992 ; 52 (7 Suppl) : 2085S-91S.
2. Sharma S, Stutzman JD, Kelloff GJ, Steele VE. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* 1994 ; 54(22) : 5848-55.
 3. Chesis PL, Levin DE, Smith MT, Ernster L, Ames BN. Mutagenicity of quinones pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984 ; 81(6) : 1696-700.
 4. Boyland E, Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione-S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Ralat Areas Mol Biol.* 1969 ; 32 : 173-219.
 5. 申信求. 申氏本草學. 서울 : 壽文社. 1983 : 177-8.
 6. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 大星文化社. 1981 : 376, 561.
 7. 劉春安. 抗癌中草藥大辭典. 中國 : 湖北科學技術出版社. 1994 : 1049-51.
 8. 李佩文. 中西醫臨床腫瘤學. 北京 : 中國中醫藥出版社. 1996 : 1076.
 9. 錢百炎. 中草藥注射劑. 上海 : 上海科學技術出版社. 1981 : 71-132.
 10. Prochaska HJ, Santamaria AB. Direct measurement of NAD(P)H : quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal Biochem.* 1988 ; 169(2) : 328-36.
 11. Habig WH, Pabst MH, Jacoby WB. Glutathione S-transferase The first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974 ; 249(22) : 7130-9.
 12. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.* 1980 ; 106(1) : 207-12.
 13. Talalay P, De Long MJ, Prochaska HJ : Molecular mechanisms in protection against carcinogenesis. In J. G. Cory and A. Szentivani (eds.). *Cancer Biology and Therapeutics.* New York : Plenum Publishing Corp. 1987 : 197-216.
 14. Kim SM., Ryu SH, Cho HD, Kim SS, Kim JH, Kim JS. Screening for Korean vegetables with anticarcinogenic enzyme inducing activity using cell culture system. *Korean J Food Sci Nutr.* 1998 ; 3 : 277-81.
 15. Singh AS, Singh P, Bameza Ri. Modulatory influence of chlorophyllin on the mouse skin papillomagenesis and xenobiotic detoxification system. *Carcinogenesis.* 1996 ; 17 : 1459-63.