

감공탕 처방 중 천궁의 생체에서 Phase II 효소 유도 효과

한상훈¹ · 손윤희² · 김혁¹ · 이희순² · 박인경⁴ · 남경수² · 김철호³ · 임종국¹

동국대학교 ¹한의과대학 경혈학교실 · ²의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터 ·
³한의과대학 생화학교실 · ⁴대구카톨릭대학교 식품산업학부

The Potential of *Cnidium officinale* Makino as the Component of Gangungtang to Induce the Phase II Enzyme *in vivo*

Sang-Hun Han¹ · Yun-Hee Shon² · Hyuck Kim¹ · Hee-Soon Lee² · In-Kyung Park⁴ ·
Kyung-Soo Nam² · Cheorl-Ho Kim³ · Jong-Kook Lim¹

¹Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine,
²Dept. of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Disease Research Center,
³Dept. of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dongguk University;
⁴Faculty of Food Science and Industrial Technology, Catholic University of Deagu

Abstract

The activity of phase II enzyme in the liver of mice was examined following the application of *Cnidium officinale* Makino aqua-acupuncture solution (COMAS). The application of COMAS CV₁₂ to mice for 7 days increased quinone reductase(QR) activity. The glutathione S-transferase(GST) activity was also increased with COMAS. A greater increase was observed in the glutathione(GSH) levels than in the QR and GST activities.

Key words : *Cnidium officinale* Makino, Quinone reductase(QR), Glutathione S-transferase(GST), Glutathione (GSH).

I. 서 론

발암과정은 외부의 발암물질원에 의해 다단계로 진행되며 크게 개시 (initiation), 촉진 (promotion), 그리고 진행 (progression)의 세 과정으로 진행된다¹⁾. 개시단계에서는 발암물질이 세포의 정보전달물질인 DNA에 구조적 손상을 주어 돌연변이를 유발하는 과정으로 비가역적으

로 진행되는 것으로 알려져 있다. 일단 손상된 DNA가 수복되지 않으면 돌연변이 (mutation)를 일으킨 DNA가 세포분화 과정에서 복제되어 종양 세포화 된다. 촉진단계는 유전자에 돌연변이를 일으킨 정상세포의 손상이 점차적으로 확대되고 세포증식이 증가되어 전암세포로 전환된 후 양성암으로 발전하는 과정을 말한다. 이후 양성암이 더욱 분화하여 악성으로 변형되는 최종 단계를 진행이라고 한다. 이러한 다단계 과정으로 일어나는 암 발생과정은 여러 가지 천연 또는 화학적 화합물에 의해 억제되거나 지연될 수

· 교신저자: 임종국, 경상북도 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-PJ9-PG1-01C004-0002)에 의하여 이루어졌습니다.

있다.

최근 암을 연구하는 데 있어 가장 유망한 영역이 암예방이다. 암예방이란 초기단계에서 암 발생 (carcinogenesis)을 예방하거나 억제시키며, 암으로 진행된 것을 전환시키는 것을 의미한다²⁾. 또한, 발암물질로부터 노출을 막거나 개시 단계를 억제함으로써 사람의 암을 감소시키는데 이용되는 예방적인 방법이다^{3,4)}. 최근에 와서 암예방 물질에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 암예방 물질은 최종 발암대사물질 활성을 줄이거나 형성을 차단하고 또는 표적조직에서 promotors의 영향을 억제하거나 발암물질의 활성을 감소시킴으로써 암화과정을 억제할 수 있다. 암화과정이 다단계로 진행되기 때문에 암이 발생하는 초기뿐 만 아니라 후기 단계에서도 암의 진행을 막을 수가 있다.

川芎의 기원은 미나리과 Umbelliferae Makino에 속한 다년생 초본인 궁궁의 根莖으로 학명은 *Cnidium officinale Makino (Lygusticum officinale)*로 性은 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 癥結癭癧 瘰癧 瘰癧 癥積痞塊 등에 活用하고 肝·脾·心·膽·三焦經絡에 作用하는 歸經藥物로 報告하고 있다⁵⁻⁶⁾. 許 등은⁷⁻⁹⁾ 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 臨床應用대상의 蓄積된 經驗資料로 調査되었다. 最近 연구되고 있는 川芎의 藥理作用으로는 血液系統的作用 心血官系統的作用 抑菌作用 平滑肌的作用 中樞神經系統의作

用 強壓作用 抗輻射及抗癌作用 腎炎的治療作用 肝炎 腦血官 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 進行되고 있다¹⁰⁻¹¹⁾.

한편 藥鍼療法은 本草學的으로 有效한 藥物이나 處方을 選擇하여 蒸溜 또는 알코올 抽出등의 方法을 利用하여 注射液으로 만들어 經絡學的으로 有效한 經穴이나 阿是穴 또는 皮膚 陽性反應點에 注入함으로써 生理機能을 強化시키고 病理的인 狀態를 改善시키는 新鍼療法的 一種으로 水鍼療法, 穴位藥物注射療法이라고도 한다¹²⁻¹³⁾.

본 논문에서는 川芎을 藥鍼液으로 제조하여 *in vivo*상에서 藥鍼液의 癌豫防 效果을 살펴보았다. 특히 본 실험에서는 抗癌의 辨證論治的 病理機轉의 側面에서 經絡瘀阻 臟腑失調 氣滯瘀血 痰結濕聚 氣血虧虛를 機轉으로하여 中腕(CV12), 肝俞(BL18)를 실험에 선택하고 생쥐에서 quinone reductase 유도효과, glutathione S-transferase 생성을 및 glutathione 함량 등을 측정하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 천궁 약침액

본 실험에서 사용할 천궁(*Cnidium officinale Makino*) 약침액을 제조하기 위하여 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 강원도산 천궁을 정선하여 사용하였다. Voucher specimen은 동국대학교 한의과대학 경혈학교실에 보관되어 있다. 천궁약침액 (*Cnidium officinale Makino aqua-acupuncture solution, COMAS*)은 수제 알콜침법¹⁴⁾에 의하여 조제하였다.

2. 동물 실험군

실험 동물은 각 군당 마우스를 7마리로 하여

감공탕 처방 중 천궁의 생체에서 Phase II 효소 유도 효과

천궁약침액을 7일간 중완혈(CV12)과 간수혈(BL18)에 놓은 실험군, 비경혈인 임의혈(Blank Locus, BL)에 놓은 실험군 및 약침을 맞지 않은 대조군으로 분류하였다(Table 1.).

3. 마우스 조직으로부터 사이토졸 분리

약침처리가 완료되고 24시간이 지난 후 마우스를 질식시킨 다음 복피를 절개하여 간조직을 취하였다. 간은 무균상태에서 0.15 M KCl buffer (pH 7.0)로 perfusion시킨 후 적출하고, 다시 여러번 세척한 다음 흡습지로 수분을 제거하였다. Cytosol 부유액 분리는 Benson 등의 방법¹⁵⁾에 따라 4℃에서 행하였다. 간 조직은 0.25 M sucrose 용액 (조직 g당 5.0 ml)으로 빙냉상태에서 조직균질기를 사용하여 마쇄하였다. 이 마쇄액을 원심분리 (9,000×g, 20분)시킨 후 침전물은 제거하였으며, 상층액은 1 ml당 0.25 M sucrose 용액에 녹인 0.1 M CaCl₂를 0.2 ml의 부피로 첨가하여 빙냉상태에서 30분간 방치하였다. 다시 2차 원심분리 (2,700×g, 20분)시켜 Cytosol 부유액을 실험에 사용하였다.

4. 단백질 정량

간 조직에서 얻은 cytosol의 단백질 정량은 bicinchoninic acid protein assay kit를 이용하여 bovine serum albumin을 표준단백질 용액으로 이용한 표준점량선을 구하고 그 양을 산출하였다.

5. Quinone reductase 활성 측정

QR 활성 측정은 Prochaska와 Santamaria (1988)의 방법¹⁶⁾을 수정하여 사용하였다. 즉 0.25 M sucrose로 희석한 간조직 사이토졸 부유액 50 μ l에 reaction mixture인 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. 그리고 5 mM potassium phosphate buffer와 0.5% DMSO에 녹인 0.3 mM dicoumarol를 첨가한 용액 50 μ l를 각 well에 가하여 반응을 중지시킨 후, microplate reader를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. QR 활성유도는 약침액을 주사하지 않은 대조군에 대한 약침액을 시침한 마우스 조직의 효소 활성의 비로 나타내었다.

6. Glutathione S-transferase 활성 측정

GST 활성은 Habig 등의 방법¹⁷⁾을 변형하여 측정하였다. 즉 GST 활성 측정을 위해 0.25 M sucrose로 희석시킨 조직 사이토졸 부유액 20 μ l에 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 유도는 약침액을 주사하지 않은 대조군에 대한 약침액을 시침한 마우스 조직의 효소 활성의 비로 나타내었다.

7. Glutathione 생성량 측정

GSH 생성량 측정은 Griffith 등의 방법¹⁸⁾을 변형하여 실시하였다. 간의 homogenate 40 μ l에 각 well 마다 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. GSH 함량은 GSH 표준 곡선에 의하여 산출하였고, GSH 생성량은 약침액을 주사하지 않은 대조군에 대한 약침액을 시침한 마우스 조직의 GSH 생성량의 비로 나타내었다.

III. 실험결과

1. QR 생성에 미치는 영향

생체내에서 천궁약침액의 QR 활성은 약침액 1 \times 를 0.2 ml 주사한 경우 중완혈, 간수혈과 임의혈은 대조군과 비교하여 각각 1.3배, 1.1배, 1.1배의 유도로 중완혈은 유의성(p<0.005)있는 유도효과가 있었다 (Fig. 1).

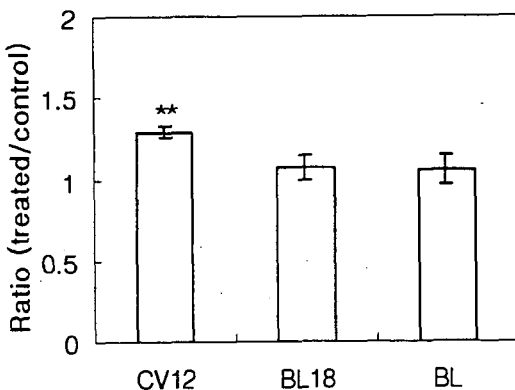


Fig. 1. Effect of COMAS on induction of quinone reductase activity in mice. Experimental details are described in Material and Methods. The values are mean \pm SD (n=3). ** p<0.01 as compared to control.

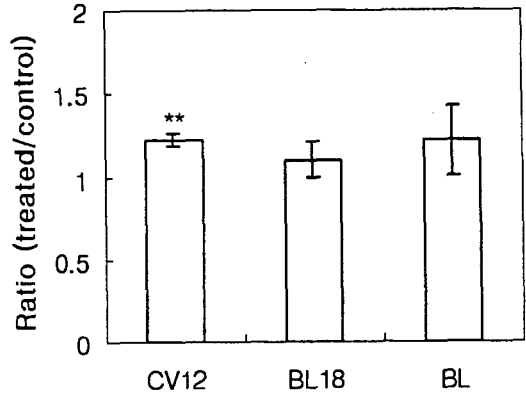


Fig. 2. Effect of COMAS on the induction of glutathione S-transferase activity in mice. Experimental details are described in Material and Methods. The values are mean \pm SD (n=3). ** p<0.01 as compared to control.

2. GST 생성에 미치는 영향

간에서의 GST 활성은 대조군과 비교하여 중완혈, 간수혈과 임의혈은 1.2, 1.1과 1.2배의 활성 증가가 있었으며 GST도 중완혈에서 유의성 있는 효소활성 유도효과를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

3. GSH 생성에 미치는 영향

마우스에 7일간 임의혈, 중완혈, 간수혈에 주사한 실험군과 약침액을 주사하지 않은 대조군의 간 homogenate에서의 GSH 생성량을 측정 한 결과, GSH 생성이 중완혈, 간수혈과 임의혈은 대조군과 비교하여 각각 1.5, 1.3, 1.3배의 증가로 모두 유의성있는 GSH 생성을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

IV. 고 찰

中腕은 臍上 4寸에 位置하는 任脈의 12번째 經穴로서 素問·氣穴論에 “背與心相控而痛 上紀者 胃脘也”라 하여 胃脘 혹은 上紀라는 穴名으

감궁탕 처방 중 천궁의 생체에서 Phase II 효소 유도 효과

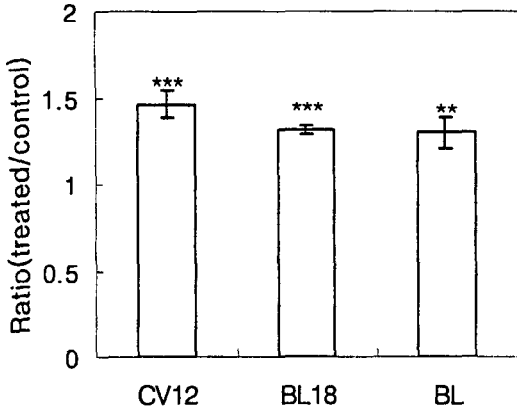


Fig. 3. Effect of COMAS on the induction of glutathione (GSH) levels in mice. Experimental details are described in Material and Methods. The values are mean \pm SD (n=3).
 : p<0.01, *: p<0.005 as compared to control.

로 最初로 言及되었으며 靈樞·根結篇에 “太陰根于隱白 結于太倉”이라 하여 太倉이라는 穴名으로 記載하고 있다. 中腕은 胃의 腹募穴이며 八會穴 中 腑會로 六腑疾患에 代表的인 治療穴이며 手太陽小腸經 手少陽三焦經 足陽明胃經 任脈經이 交會하고 諸陰脈을 總括하는 任脈의 中腕穴은 和理氣 化濕滯 理中焦 調升降 하는 穴性으로 肝膽疾患 中焦諸病 胃疾患 胃內停水 糖尿病 翻胃 霍亂氣積 黃疸 奔豚 伏梁 脾胃疾患 등에 대한 主治에 應用된다¹⁹⁻²⁰⁾.

마우스에서의 中腕혈과 간수혈 시침에 의한 QR의 활성을 측정한 결과, 中腕혈의 시침에 의해서는 유의성있는 QR의 활성 유도효과 (p<0.01)를 관찰할 수 있었다. 이는 돌연변이원성, 발암물질의 대사과정시 생성된 quinone에 의한 독성 및 DNA 손상을 없애줄 것으로 기대된다.

천궁약침액은 마우스에서 경혈 시침에 의하여 GSH 함량증가 및 GST의 활성을 증가시켰다. GST는 유리기 (free radical)를 파괴하여 반응성이 높은 산소들로부터 세포를 보호하고, 환원형 GSH는 반응성이 있는 대사중간물질로부터 세포

를 보호하는데, 따라서 천궁약침액은 생체에서 발생한 산화물질과 기타의 독성물질을 무독시킬 것으로 추측할 수 있다.

V. 요 약

천궁약침액을 7일간 中腕혈, 간수혈 및 임의 혈에 투여한 후 마우스의 간에서 유도되는 phase II enzyme 유도 효과를 살펴본 결과 마우스의 간 조직에서 Phase II 효소의 활성이 증가된 것으로 보아 천궁약침액은 외부물질이나 대사산물에 의해 일어날 수 있는 암발생 억제 효과가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Farber E. Possible etiologic mechanism in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 1987 ; 75 : 65-70.
2. Sharma S, Jill DS, and Kelloff GJ, Vernon ES. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* 1994 ; 54 : 5848-55.
3. Sporn MB. Chemoprevention of cancer. *Lancet.* 1993 ; 342 : 1211-13.
4. Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res.* 1992 ; 52 (Suppl.) : S2085-91.
5. 南相千. 經絡. 서울: 世明文化社. 1993: 445-56.
6. 申佶求. 申氏本草學. 서울: 壽文社. 1973 : 600-2.
7. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂. 1991 : 114, 162, 208, 240, 418, 723.
8. 張廷模. 中華臨床中藥學. 1998 : 1048-55.
9. 汪 昂. 本草畧要. 天津科學技術出版社. 1999

- : 49.
10. 徐村楠. 中藥臨床應用大全. 1999 : 413-5.
 11. 顏正華. 中藥學. 人民衛生出版社. 1991 : 528-32.
 12. 金廷彥. 奇蹟의 藥鍼療法. 서울 : 金剛出版社. 1987 : 53-106.
 13. 李尙仁. 本草學. 서울 : 修書院. 1998 : 407-9.
 14. 錢百炎. 中草藥注射劑. 上海 : 上海科學技術出版社. 1981 : 71-132.
 15. Benson AM, Hunkeler M, and Talalay P. Increase of NAD(P)H : quinone reductase by dietary antioxidants: Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)* 1980 ; 77 : 5216-20.
 16. Prochaska HJ and 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 : 328-36.
 17. Habig WH, Pabst MH. and Jacoby WB. Glutathione S-transferase : the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974 ; 249 : 7130-9.
 18. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 1980 ; 106 : 207-12.
 19. 王德深. 中國鍼灸穴位通鑿. 清道 : 青島出版社. 1994 : 41-50, 95-108, 1066-73, 1094-102.
 20. 王執中. 針灸資生經. 旋風出版社. 1980 : 29, 53.