생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
38(1) : 95 ~ 99 (2007)

<속 보>

고양강 추출물의 암예방 활성

구강모 · 장영진 · 김민근 · 김길웅 · 송경식 · 강영화*
경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부

Cancer Chemopreventive Activity of the Rhizome Extract of *Alpinia officinarum*

Kang Mo Ku, Young Jin Chang, Min Gun Kim, Kil Ung Kim, Kyung Sik Song and Young-Hwa Kang*
College of Agricultural and Life Science, Kyungpook National University, 1370 Sankyuk-dong, Buk-gu, Daegu 702-701, Korea

Abstract – In order to find novel cancer chemopreventive agents, quinone reductase (QR) inductive activity of methanol extract of herbal medicines was examined using murine hepatoma, hepa1c1c7 cells. QR has been used as an anticarcinogenic marker enzyme in cancer chemoprevention study. The methanol extract of *Alpinia officinarum* (Zingiberace) showed showed significantly strong quinone reductase inductive activity compared to the control group. The methanol extract of *Alpinia officinarum* was successively fractionated with various solvents according to polarity. Hexane, ethyl acetate, buthanol and water fractions were obtained and theirs activities were assessed. The QR inductive effect was moved to the ethyl acetate fraction and was highly increased. The CD (concentration required to double the specific activity of QR) value of ethyl acetate fraction was 8.6 μg/mL. *Alpinia officinarum* also showed strong antioxidant activity. These results suggest that *Alpinia officinarum* can be developed as cancer chemopreventive agent.

Key words – Cancer chemoprevention, Quinone reductase, Antioxidant, *Alpinia officinarum*

2004년, 통계청에서 발표한 '2003년 사망 원인별 사망률'에서 암이 10만명 당 131.8명으로 가장 높은 사망 원인으로 나타났다.[1] 암은 오늘날 인류의 주요한 사망 원인으로, 암 정복을 위한 지속적인 노력에도 불구하고 여전히 암으로 인한 사망률은 감소하고 있지 않다. 최근에 암으로 인한 사망률을 감소시키기 위한 새로운 접근방법으로 화학 암 예방(Cancer Chemoprevention) 연구가 제기되었다.[2] 발암과정을 단계적으로 억제할 수 있는 표적 효소들을 제어 함으로써 암을 예방할 수 있는 물질을 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.[3,4] 특히 quinone reductase(QR), glutathione S-transferase(GST) 및 UDP-glucuronosyltransferase 등의 해독효소를 이용한 암 예방은 체내로 들어온 carcinogen과 같은 독성물질을 해독효소에 의해 무독화시켜 체외로 신속하게 배출시킴으로써 발암과정의 개시단계를 차단시키는 방법이다.[5] QR효소는 퀴논 화합물들을 환원하여 안정한 hydroquinones으로 만들어 체외로 배출시키는 flavoprotein로서 암예방 연구에 있어서 가장 널리 사용되고 있는 대표적인 해독효소이다.[6]

최근에 해독효소를 유도함으로써 화학물질에 의해서 일어나는 발암과정이 억제된다는 것을 실험동물 모델에서 보여주는 연구들이 보고되고 있다.[7] 브로콜리에서 분리된 sulforaphan은 aliphatic isothiocyanate 구조를 갖는 물질로서 dimethylbenz[α]anthracene(DMBA)에 의한 발암작용을 효과적으로 저해하였다.[8] 십자화과 채소류(cruciferous vegetables)에서 분리된 brassinin은 indole구조를 갖는 dithiocarbamate 화합물로서 실험 동물 모델에서 유도된 각종 mammary tumor에서 저해활성을 나타내었다.[9]

지금까지 천연물로부터 QR 유도활성 물질로 sulforaphane,[10] brassinin[11]을 비롯하여 flavonoids, polycyclic aromatic hydrocarbons, diphenols, thiocarbamates, isothiocyanates, 1,2-dithiol-3-thiones 등 다양한 골격을 지닌 화합물들이 분리, 보고되고 있다.[12,13]

활성 산소종은 세포, 단백질, DNA를 손상시켜 암을 비롯하여 다양한 질병과 노화의 원인이 되고 있다. 항산화제는 발암원인 물질인 활성 산소종을 제거하여 해독효소와 마찬가지로 발암 개시단계를 효과적으로 차단시킴으로써 암을

*교신저자(E-mail) : youngh@knu.ac.kr
(FAX) : 053-950-5722

예방할 수 있다.[14)]

고양강(良姜)은 생강과(Zingiberaceae)식물인 *Alpinia officinarum*의 근경으로서 예로부터 건위, 진통, 진토약으로 사용되어온 생약재이다.[15)] 주요성분으로는 정유성분이 0.5-1%로서 1,8-cineol, methyl cinnamate, α-cadinene 등이 있고, flavonoid성분으로서 kaemferol, galangin, kaemferide, alpinin, 신미성분으로서 galangol 등이 분리, 보고되고 있다.[16)] 고양강의 약리효능에 대한 연구로는 pancreatic lipase의 억제작용,[17,18)] 혈압강하 효과,[19)] 항산화 효과,[20,21,22)] DNA손상에 대한 방어효과,[23)] cyclooxigenase-2(COX-2)저해작용,[24,25)] 및 항염증 작용,[26,27)] 등이 보고되어 있다.

약용자원으로부터 발암개시단계 차단을 통한 암예방 활성을 지닌 기능성 소재를 개발하기 위한 연구의 일환으로 고양강 추출물의 quinone reductase 유도 활성과 항산화 활성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약 – 실험재료로 쓴 고양강 (*Alpinia officinarum* Hance)은 대구 약령 시장에서 건조시킨 한약재를 구입하여 사용하였고 시료의 일부는 표준품(FP-21)으로 보관하였다. 추출 및 분획 실험에 사용된 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다. 활성 측정 실험에 사용된 dimethyl sulfoxide (DMSO), crystal violet, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), tween-20, menadione, digitonin, glucose-6-phosphate, β-nicotinamide adenin dinucleotide phosphate (β-NADP), flavin adenin dinucleotide (FAD), glucose 6-phosphate dehydrogenase, sodium dodesyl sulfate, bovine serum albumin 시약은 Sigma (St Louis, MO) 제품을 사용하였다. 세포배양액(α-minimum essential medium), fetal bovine serum(FBS) 등 세포배양 관련 시약은 Gibco BRL(Gaitherburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포배양 – 쥐 간암세포인 Hepa 1c1c7 세포를 10% 우태아 혈청, 100 unit/ml 페니실린, 100 μg/ml 스트렙토마이신을 첨가한 α-MEM배지를 이용하여, 5% CO_2 및 37 °C의 조건에서 배양하였다.

추출 및 분획 – 재료 3 kg을 5 L의 MeOH과 함께 환류냉각장치가 설치된 추출기에서 3시간씩 3회 진탕추출하여 추출물을 얻었다. 추출물은 회전식 감압 농축기에서 감압 농축하였다. 농축된 고양강 메탄올 추출물의 활성을 조사한 후 순차적인 유기용매 분획을 통해 hexane, EtOAc, BuOH, H_2O층을 얻어 감압 농축한 후 시료로 사용하였다.

Quinone Reductase 활성 측정 – QR 활성은 쥐 간암세포, hepa 1c1c7세포를 이용하여 Prochaska 등의 방법[27)]을 수정하여 사용하였다.

Hepa1c1c7 세포를 1×10^4 /mL 농도로 분주하여 24시간 배양한 후 시료를 각 well에 가하고 다시 48시간 동안 배양하였다. 배양이 완료되면 배양액을 버리고 0.8% digitonin 용액을 가하여 10분 동안 37 °C에서 방치하였다. 실험 plates에 반응용액을 가하고 5분 동안 orbital shaker(100 rpm)를 이용하여 흔들어주면서 반응시켰다. Dicumarol 용액(0.3 mM/0.5% DMSO, 5 mM potassium phosphate)을 첨가하여 반응을 중단시키고 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. QR specific activity계산은 분당 환원된 4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)의 흡광도와 crystal violet의 흡광도에 의해 산출하였고 QR 활성 유도는 시료의 활성과 대조군의 활성의 비율로 측정하였다. 또한 QR 유도활성을 비교하기 위한 기준으로 CD(QR induction을 2배 증가시키는데 요구되는 시료의 농도)값을 사용하여 시료간 QR 유도활성을 비교하였다. Sulforaphan이 양성 대조군으로 사용되었다.

DPPH free radical 소거 활성 측정 – Blois의 방법을 변형하여 측정하였다.[28)] 2×10^{-4} M DPPH 용액과 시료를 96-well plates에 가한 후 5분간 shaking하였다. 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 녹차잎의 메탄올 추출액이 양성 대조군으로 사용되었다.

통계처리 – SAS 통계 프로그램에서 Duncan's multiple range test하여 p value<0.05 수준에서 시료간의 유의성을 검정하였다. 모든 실험 결과는 3번 이상 실시하여 평균치 및 표준편차를 가지고 나타내었다.

결과 및 고찰

고양강 근경 추출물의 암예방 활성 – 약용자원으로부터 발암개시단계 차단을 통한 암예방 활성을 지닌 기능성 소재를 개발하기 위하여 QR 유도활성과 DPPH radical 소거활성을 조사하였다. 그 결과 고양강 MeOH 추출물이 강한 QR 유도활성과 항산화 활성을 모두 보여 주었다. 특히 강한 QR 유도 활성을 보여 주었는데 MeOH 추출물의 농도, 20 μg/ml에서 대조군에 비해 2.9배 높은 QR 유도 활성을 보여 주었다(Fig. 1). 고양강 MeOH추출물의 CD값은 11.2 μg/ml으로 나타났다. 고양강 추출물의 항산화 효능을 알아보기 위하여 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과 SC_{50} 값이 78.7 μg/ml으로 나타났다. 고양강 메탄올 추출물의 항산화 활성관련 연구로 methyl linoleate autoxidation 억제 활성이 있다는 논문이 최근 보고되었고, methyl linoleate autoxidation 억제 성분으로 메탄올 추출물에서 phenylpropanoid 화합물들이 분리 보고되었다.[22)] 그러나 DPPH radical 소거활성 및 QR 유도활성 관련 연구 보고는 현재 아주 미비한 실정이다. 고양강은 현재 베트남, 중국 등지에서 식품 소재로 이용되고 있다. 본 연구 결과에 의하면 고양강은 해독효소 유도활성과 항산화 활성을 모두 보여주는 훌륭한 암예방 소

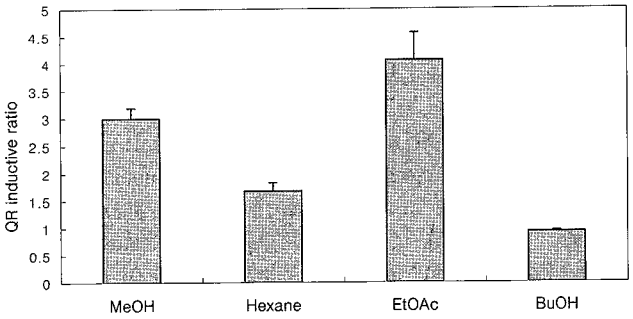

Fig. 1. QR inductive effects of MeOH extract and various solvent fractions of *Alpinia officinarum*. QR inductive ratio means the ratio of QR specific activities of sample to control. MeOH extract and various solvent fractions of *Alpinia officinarum* were tested for QR activity in cultured Hepa 1c1c7 cells. The concentrations of samples were 20 μg/ml.

재로서 앞으로 좀더 많은 연구를 통해 기능성 식품 또는 건강 소재로 개발될 수 있을 것이다.

고양강 분획물의 암예방 활성 – 통상적으로 사용되는 극성에 따라서 순차적으로 분획하는 용매 분획법에 의해 MeOH 추출물을 hexane, EtOAc, BuOH, H_2O층의 4개의 분획물로 나누었다. 각 분획물에 대하여 4개의 처리농도에서 4반복으로 3회 독립적으로 QR 유도활성과 항산화 활성을 조사하였다. QR 유도활성과 항산화 활성 모두 EtOAc분획물로 활성이 이행하였다. 이러한 실험 결과는 효과적으로 용매 분획 실험이 이루어 졌고 활성물질이 주로 EtOAc분획물에 있음을 보여 주었다. QR 유도활성의 경우 MeOH 추출물에서 대조군과 비교해서 20 μg/ml 농도에서 2.9배의 QR 유도활성을 보여주었던 것이 EtOAc분획물에서는 4.1배의 QR 유도활성을 보여주어 활성이 크게 증가하였다(Fig. 1). 고양강 EtOAc분획물은 농도 의존적으로 QR 활성을 유도하였다(Fig. 2). QR

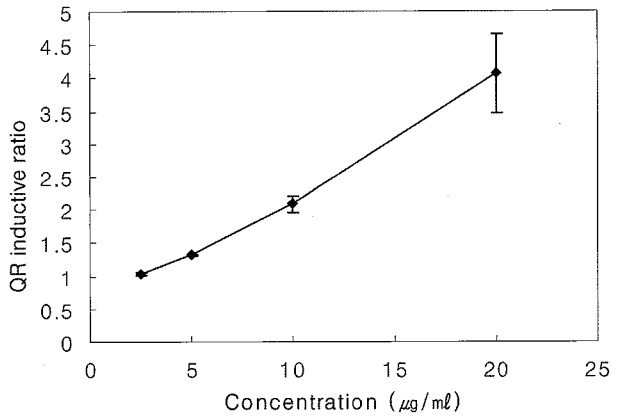

Fig. 2. Dose-dependent QR inductive effect of EtOAc fraction of *Alpinia officinarum*. EtOAc fraction showed the most potent inductive activity. Each value represents the mean±standard deviation of three independent experiments.

Table I. Cancer chemopreventive activities of the rhizome extracts of *Alpinia officinarum*

Sample	CD (μg/ml)	SC_{50} (μg/ml)
MeOH ext.	11.2	78.7
Hexane ext.	–	173
EtOAc ext.	8.6	75.6
BuOH ext.	–	90.9

The CD value is the concentration required to double the specific activity of QR. SC_{50} value is the concentration scavenging 50 percent of DPPH radical. Hexane ext. and BuOH ext. did not induce QR activity to double compared to control in the range of concentration.

활성을 두배 유도하는데 필요한 농도인 CD value는 8.6 μg/ml이었다. 그러나 hexane과 BuOH 분획물에서는 QR유도활성이 크게 감소하여 CD value를 산출할 수 없었다(Table I).

DPPH radical 소거활성을 측정한 결과 EtOAc분획물이 다른 유기 용매 분획물에 비하여 유의하게 높은 DPPH 소거활성을 보여 주었다(Fig. 3). 고양강 EtOAc분획물은 또한

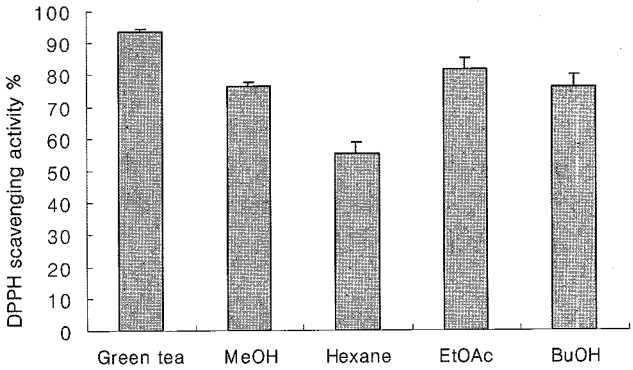

Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of MeOH extract and various solvent fractions of *Alpinia officinarum*. MeOH extract of green tea was used as a positive control. The concentrations of samples were 200 μg/ml.

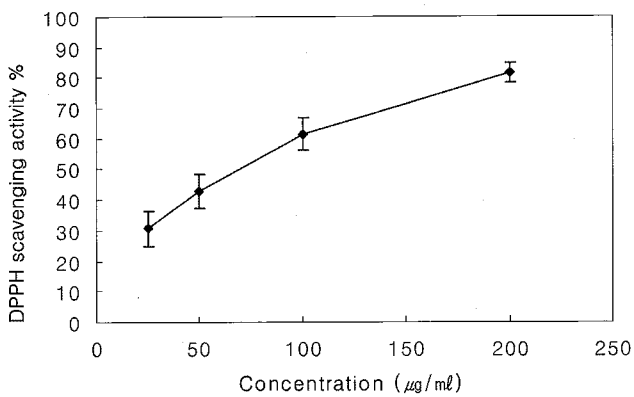

Fig. 4. Dose-dependent DPPH radical scavenging activity of EtOAc fraction of *Alpinia officinarum*. Each value represents the mean±standard deviation of three independent experiments.

농도 의존적으로 DPPH 소거 활성을 보여 주었다(Fig. 4). EtOAc분획물은 200 μg/ml의 농도에서 81% 소거 활성을 보여주었고 SC_{50} 값이 75.6 μg/ml으로 나타났다(Table I). 고양강의 EtOAc분획물은 항산화 활성과 해독효소 유도 활성을 모두 보여주어 발암원인 물질을 효과적으로 제거하여 발암 개시단계를 차단할 수 있는 암 예방 물질이 EtOAc분획물에 존재함을 확인하였다. 향후 활성을 추적하여 물질을 분리하는 activity-guided isolation법을 실시하여 QR 활성 유도물질과 DPPH radical 소거 물질을 규명하고자 한다.

결 론

약용자원으로부터 발암개시단계 차단을 통한 암예방 활성을 지닌 기능성 소재를 개발하기 위한 연구의 일환으로 해독효소 유도활성과 항산화 활성을 조사하였다. 그 결과 고양강 메탄올 추출물이 강한 QR 유도 활성과 항산화 활성을 모두 보여 주었다. 따라서 고양강을 후보식물로 선정하여 용매 분획물들에 대한 활성을 조사한 결과 EtOAc분획물에서 QR 유도활성과 항산화 활성이 모두 강하게 나타났다. EtOAc분획물 20 μg/ml의 농도에서 QR 유도활성이 대조군에 비해 4.1배 증가하였다. DPPH 소거활성의 경우 200 μg/ml의 농도에서 81% 소거 활성을 보여주었다. 고양강의 EtOAc분획물은 항산화 활성과 해독효소 유도 활성을 모두 보여주어 발암원인 물질을 효과적으로 제거함으로써 발암 개시단계를 차단하는 암 예방제로 개발할 수 있는 약용 자원임을 확인하였다.

사 사

이 논문은 2004년도 경북대학교 학술진흥연구비에 의하여 연구되었음.

인용문헌

1. 통계청 (2004) 2003년 사망원인 통계연보.
2. Wattenberg, L. W. (1997) An overview of chemoprevention: current state and future prospects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **216**(2): 133-141.
3. Manson, M. M., Farmer, P. B., Gescher, A. and Steward, W. P. (2005) Innovative agents in cancer prevention. *Recent Results Cancer Res.* **166**: 257-275.
4. Brenner, D. E. (2000) Multiagent chemopreventive agent combinations. *J Cell Biochem Suppl.* **34**: 121-124.
5. Prochaska, H. J., De Long, M.J. and Talalay, P. (1985) On the mechanism of induction of cancer protective enzymes: A unifying proposal. *Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.* **82**(23): 2832-2836.
6. Uda, Y., Price, K. R., Williamson, G. and Rhodes, M. J. (1997) Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by flavonoids. *Cancer Lett.* **120**(2): 213-216.
7. Sasaki, K., Wada, K., Tanaka, Y., Yoshimura, T., Matuoka, K. and Anno, T. (2005) Thyme (Thymus vulgaris L.) leaves and its constituents increase the activities of xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse liver. *Med Food.* **8**(2): 184-189.
8. Isbir, T., Yaylim, I., Aydin, M., Ozturk, O., Koyuncu, H., Zeybek, U., Agachan, B. and Yilmaz, H. (2000) The effects of Brassica oleraceae var capitata on epidermal glutathione and lipid peroxides in DMBA-initiated-TPA-promoted mice. *Anticancer Res.* **20**(1A): 219-224.
9. Mehta, R. G., Liu, J., Constantinou, A., Hawthorne, M., Pezzuto, J. M., Moon, R. C. and Moriarty, R. M. (1994) Structure-activity relationships of brassinin in preventing the development of carcinogen-induced mammary lesions in organ culture. *Anticancer Res.* **14**(3A): 1209-1213.
10. Gerhauser, C., You, M., Liu, J., Moriarty, R. M. and Hawthorne, M. (1997) Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.* **57**(2): 272 -278.
11. Mehta, R. G., Liu, J., Constantinou, A., Thomas, C. F., Hawthorne, M., You, M., Gerhuser, C., Pezzuto, J. M., Moon, R.C. and Moriarty, R. M. (1995) Cancer chemopreventive activity of brassinin, a phytoalexin from cabbage. *Carcinogenesis.* **16**(2): 399-404.
12. Kinghorn, A. D., Cui, B., Ito, A., Chung, H. S., Seo, E. K., Long, L. and Chang, L. C. (2000) Fractionation of plants to discover substances to combat cancer. Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals, 17-24, CRC Press, Washington D.C., USA.
13. Guyonnet, D., Belloir, C., Suschetet, M., Siess, M. H. and Le Bon, A. M. (2001) Antimutagenic activity of organosulfur compounds from Allium is associated with phase II enzyme induction. *Mutat Res.* **495**(1-2): 135-45.
14. Nagle, D. G., Ferreira, D. and Zhou, Y. D. (2006) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Pytochemistry.* **67**(17): 1849-1855.
15. 한의과대학 본초학 편찬위원회 (2004) 본초학, 388-389, 영림사.
16. 소학관편 (1985) 중약대사전 제2권, 782, 상해과학기술출판사.
17. Shin. J. E., Han, M.J. and Kim. D. H. (2003) 3-Methylethergalangin isolated from *Alpinia officinarum* inhibits pancreatic lipase. *Biol. Pharm. Bull.* **26**(6): 854-857.
18. Shin, J. E., Han, M. J., Song, M. J., Baek, N. I. and Kim, D. H. (2004) 5-Hydroxy-7-(4'-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone: a pancreatic lipase inhibitor isolated from *Alpinia officinarum*. *Biol. Pharm. Bull.* **27**(1): 138-140.
19. Kim, H. J., Yoo, M. Y., Kim, H. K., Lee, B., Oh, K. S., Seo, H. W., Yon, G. H., Gendaram, O., Kwon, D. Y., Kim, Y. S.

and Ryu, S. Y. (2006) Vasorelaxation effect of the flavonoids from the rhizome extract of *Alpinia offcinarum* on isolated rat thoracic aorta. *Kor. J. Pharmacogn.* **37**(1): 56-59.

20. Kim, J. H., Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J. S. and Jeong, H. S. (2003) Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Science.* **73**(2): 67-179.
21. Ly, T.N., Shimoyamada, M. Kato, K. and Yamauchi, R. (2004) Antioxidative compounds isolated from the rhizomes of smaller galangal (*Alpinia officinarum* Hance). *Biofactors.* **21**(1-4): 305-308.
22. Ly, T. N., Shimoyamada, M. Kato, K. and Yamauchi, R. (2003) Isolation and characterization of some antioxidative compounds from the rhizomes of smaller galanga (*Alpinia officinarum* Hance). *J. Agric. Food Chem.* **51**(17): 4924-4929.
23. Lee, S. C., Shin, K. S. and Heo, M. Y. (2002) Protection of ROS-induced cytotoxicity and DNA damage by the extract of *Alpinia offcinarum. J. Fd Hyg. Safety.* 17(2): 106-116.
24. Kang, S. S., Kim, J. S., Son, K. H., Kim, H. P. and Chang, H. W. (2000) Isolation of COX-2 inhibitors from *Alpinia offcinarum. Kor. J. Pharmacogn.* **31**(1): 52-62.
25. Kiuchi. F., Iwakami, S., Shibuya, M., Hanaoka, F. and Sankawa, U. (1992) Inhibition of prostagladin and leukortiene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chem. Pharm. Bull.* **40**(2): 387-391.
26. Shin, D., Kinoshita, K., Koyama, K. and Takahashi, K. (2002) Antiemetic principles of *Alpinia officinarum. J. Nat. Prod.* **65**(9): 1315-1318.
27. Prochaska, H. J. and Snatamaria, A. B. (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**(2): 328-336.
28. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1199-1200.

(2007년 3월 7일 접수)