

감두탕 약침액의 암예방 효과에 관한 연구

한상훈 · 박인규 · 문진영 · 임종국*

ABSTRACT

Antitumor activities of Gamdutang aqua-acupuncture solution

Sang-Hoon, Han · In-Kyu, Park · Jin-Young, Moon · Jong-Kook, Lim*

*Dept. of AM-Pointology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Gamdutang aqua-acupuncture solution(GAS), Gamdutang water-extracted solution(GWS) and Degamdutang aqua-acupuncture solution(DGAS) were prepared and tested for potential antitumor activities. It was used three biomarkers (quinone reductase, ornithine decarboxylase, glutathione) to test chemopreventive potentials of GAS, GWS, DGAS. GAS was potent inducer of quinone reductase activity in Hepal1c7 murine hepatoma cells in culture, whereas GWS is less potent. GAS, GWS and DGAS were significantly induced quinone reductase activity in cultured rat normal liver cell, Ac2F. Glutathione levels were increased about 1.8-fold with GAS, 1.0-1.1 fold with GWS, DGAS in cultured murine hepatoma hepal1c7 cells. In addition glutathione s-transferase levels were increased with GAS, GWS and DGAS. The effects of GAS, GWS and DGAS were tested on the growth of *Acanthamoeba castellanii*. Proliferation of *Acanthamoeba castellanii* was inhibited by GAS, GWS and DGAS at concentrations of 1× and 5×. These results suggest that GAS has chemopreventive potential by inducing quinone reductase and quinone reductase activities, inhibition of ornithine decarboxylase activity, and increasing glutathione levels.

Key Words : Gamdutang, quinone reductase, ornithine decarboxylase, glutathione s-transferase

* 동국대학교 한의과대학 경혈학교실

I. 서론

악성종양(malignant neoplasia)에 대하여 병리학적으로 암이라 규정하고 있으며 빠른 침윤성

성장과 체내 각 부위로의 확산 및 전이와 같은 특이성을 지니고 있어 생명의 위협을 초래할 뿐만 아니라 현재 인류에게 있어서 가장 큰 위협성 있는 전신성 질환으로 인식하고 있다. 바꾸어 말

하면 세포분열을 지배하는 조절기능의 결함이나 악성종양 유전자를 억제하는 능력이 상실됨으로써 발생하는 비정상적인 세포의 증식을 말한다¹⁻⁷⁾. 이러한 악성종양을 치료하기 위하여 수술요법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법과 유전자요법 등을 사용하고 있으나 수술요법과 방사선요법은 국소적인 치료법이기 때문에 한계성이 있고, 전신요법인 면역요법도 현재로서는 치료방법이 정립되어 있지 않은 상태이며 화학요법은 독성문제를 아직 해결하지 못하고 있는 실정이다⁸⁻⁹⁾. 이러한 문제를 해결하기 위한 방안은 항종양효능이 우수한 새로운 천연산물에서 안전성이 있는 약물개발이 요구되고 있다고 보여진다. 감두탕¹⁰⁻¹⁴⁾은 解百藥百物毒, 清熱解毒, 消炎, 鎮座, 止痛, 脚腫, 胎黃, 胎熱, 難産, 脚氣, 浮腫, 三焦消渴, 筋疝 등의 치료에 응용되었고 清¹⁵⁾에 의하면 감초는 和中以解毒하고 흑두는 散熱以解毒한다고 하였다. 감초는 원산지가 내몽고로서 콩과의 다년생 초본식물이며 학명은 *Glyrrhiza Fissch*의 근경을 사용하며 味甘, 性平하고, 歸經이 心, 肺, 脾 및 胃經에 作用한다¹⁶⁻¹⁷⁾. 감초의 효능¹⁸⁾은 解百藥毒, 五臟六腑의 寒熱邪氣, 堅筋骨, 溫中下氣, 養陰血, 潤肺, 補神和中, 清熱解毒, 癰疽, 瘡毒, 腫毒, 腫痛, 堅筋骨, 久服輕身延年, 通經脈, 補五勞七傷, 一切虛損, 利百脈, 益精養氣, 養陰血, 壯筋骨, 消瘡疽, 降火止痛, 諸般癰疽, 癰疽秘塞, 癰癩, 乳癰, 惡癰, 濕痒, 生瘡, 腫痛 등에 活用되었고 劉¹⁹⁻²¹⁾ 등은 舌癌, 鼻咽癌, 胃癌, 白血病, 骨髓腫瘤, 腹水癌, 肝癌, 食道癌, 乳腺癌, 髓腔腫瘤, 上皮癌 등에 항암효능이 있다고 보고하였다. 흑두는 콩과 식물의 흑대두와 흑소두의 검은 종자로서 학명은 *Glycine max (L) Merr* 이라고 하며 味는 甘鹹苦하고 性은 寒하며 歸經은 心, 脾, 腎 및 肝經에 作用한다²²⁾. 흑두의 효능²³⁻²⁶⁾은 風毒, 脚氣, 黃疸, 癰腫, 瘡毒, 散五臟結積, 能補腎, 腸痛, 中風, 癱瘓, 一切熱毒, 腹脹, 除痺去腫, 百藥之毒, 消腫, 心痛筋攣, 一切腫毒, 長肌膚, 一切下血, 發腫, 消渴, 風疽瘡疥, 癰腫, 皮膚腫滿, 惡瘡, 一切風毒, 消腫止痛, 消血結 등에 응용하였다. 金²⁷⁻²⁸⁾ 등은 감두탕의 해독작용에 관한 실험결과를 보고한 바가 있

지만 아직 감두탕 약침액의 항암효능에 관하여 보고된 바가 없어 감두탕 약침액의 항암 실험을 착상하게 되었다. 암에 관련된 제재 개발연구는 발병된 암을 치료할 수 있는 항암제 개발과 암의 진행과정을 저지할 수 있거나 암 발병을 예방할 수 있는 물질 개발 차원에서 이루어지고 있다. 특히 항암제의 독성에 의한 부작용으로 암이 발병하기 전에 막을 수 있는 암 예방 물질 (chemopreventive agents)의 개발이 중점적으로 이루어지고 있다²⁹⁻³⁰⁾. 암예방 물질은 발암 물질의 대사과정에 변화를 가져오거나 암화 과정 (carcinogenesis)시 생성되는 대사물질 또는 대사과정시 생성되는 부산물과 반응하여 상호작용을 일으키거나 특정 효소의 발현 및 기능을 변화시키므로 이러한 특징을 이용하여 암예방 물질을 개발, 조사할 수 있다. 대표적인 것으로 quinone reductase(QR)생성, ornithine decarboxylase(ODC)활성저해 효과, glutathione(GSH) 생성 등의 측정이 있다³¹⁾. 따라서 본 연구는 감두탕 약침액의 암예방 효과를 실험적으로 살펴보고자 본 약물이 quinone reductase(QR) 생성 유도, ornithine decarboxylase (ODC) inhibition, glutathione, glutathione s-transferase의 활성에 대한 영향을 관찰하였다.

II. 실험재료 및 방법

A. 실험재료

1. 시약

Minimum Essential Medium Eagle's(MEM), antibiotics, Dimethylsulfoxide (DMSO), [3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-di-phenyltetrazolium bromide(MTT), 99% ethyl alcohol anhydrous, NaCl, KCl, KH₂PO₄, NaH₂PO₄, Tris-HCl, bovine serum albumin (BSA), tween-20, flavin adenine dinucleotide(FAD), glucose-6-phosphate, β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(β-NADP), glucose-6-phosphate dehydrogenase,

menadione, dicuomamol, potassium phosphate, crystal violet, KOH, glucose, thiamine HCl, biotin, vitamin B₁₂, ferric citrate, CaCl₂ · H₂O, MgSO₄ · 7H₂O, yeast extract, proteose peptone, Na-phosphate, Na-EDTA, triton X-100, 5, 5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), glutathione reductase, NADP⁺, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco (USA)에서 구입하여 사용하였으며 기타 시약은 모두 기타 시약은 세포 배양용 및 1급 시약을 사용하였다.

2. 감두탕 약침액

본 실험에서 감두탕(Gamdutang) 약침액을 제조하기 위하여 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 원감초와 흑소두 및 흑대두를 정선하여 사용하였고, 추출용매인 물은 이온교환수지를 통과 시킨 증류수를 사용하였다.

B. 실험 방법

1. 감두탕 및 대감두탕 약침액의 제조

감두탕 약침액은 수제-알콜침법에 의하여 조제하였다(Fig. 1). 흑소두를 감초 60g(1:1)과 조말하여 정제수 400ml을 가한 뒤 rotary evaporator(BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4℃, 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 ml을 감압농축하였다. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol로 가하여 75%, 85%, 95%의 ethanol 용액이 되게 하여 침전물을 여별하고, pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μm, Whatman, Germany)로 여과하였다. 그리고 3차 증류수를 가하여 200ml이 되게 하여 1×의 약침액으로 사용하였으며 10×, 5×, 3× 약침액은 1×의 약침액을 감압농축하여 사용하였고, 증류수나 phosphate buffered saline(PBS)를 첨가하여 0.1×, 0.5× 농도로 조제하였다. 한편 대감두탕 약침액의 조제는 흑소두 대신 흑대두를 사용하여 위와 동일한 방법으로 조제하였다.

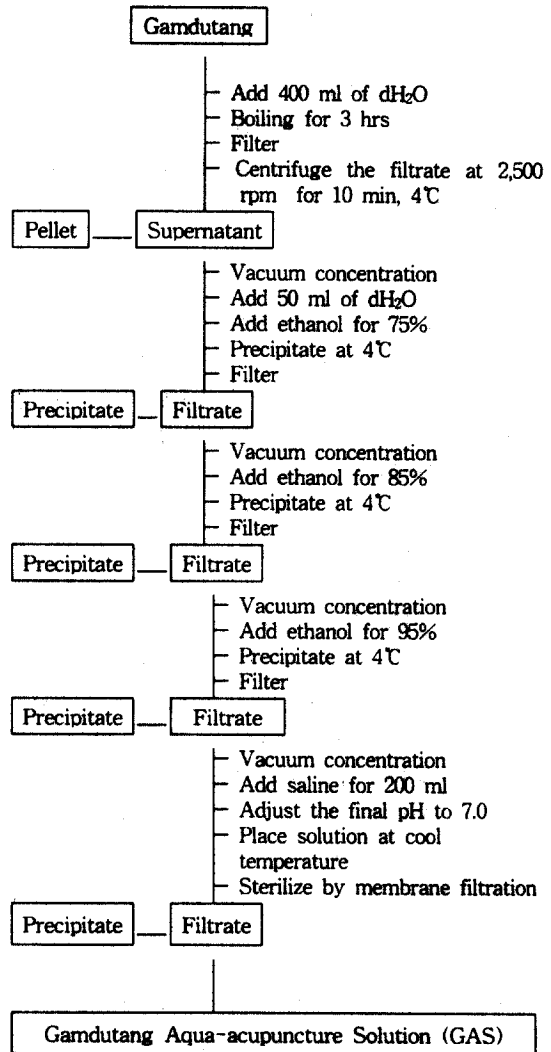


Fig. 1. Preparation of Gamdutang Aqua-acupuncture Solution (GAS)

2. 감두 열수추출액의 제조

흑소두와 감초 60g (1:1)을 조말하여 정제수 400ml을 가한 뒤 rotary evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4℃, 2,500 rpm에서 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×, 3× 열수추출액은 1×의 열수추출액을 감압농축 하여 사용하였고, 증류수나 phosphate buffered saline (PBS)를 첨가하여 0.1×, 0.5× 농도로 조 제하였다.

3. Quinone reductase (QR) 생성 측정

1×10⁴개의 Hepal1c7 세포와 Ac2F세포를 200 μ l의 MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 점 종시키고 CO₂ incubator에서 24시간 배양 후, 새 배양액 190 μ l와 농도별 감두탕 약침액(0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×) 또는 농도별 감두탕 열수 추출액(0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×)을 10 μ l씩 각 well에 가하였다. 세포를 약침액 또는 열수추출액 이 첨가된 배양액에서 48시간 배양 후 배양액을 버리고 세포를 lysis시켰다. 200 μ l reaction mixture(7.5ml of 0.5M Tris-HCl(pH 7.4), 100mg of bovine serum albumin, 1 μ l of 1.5% tween-20, 0.1ml of 7.5mM FAD, 1ml of 150mM glucose-6-phosphate, 90 μ l of 50mM NADP, 300U of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45mg MTT, 150 μ l of 50mM menadione in 150ml H₂O)를 각 well에 넣고 5분 간 반응 후 0.3mM dicoumarol(in 0.5% DMSO) 과 5mM potassium phosphate가 들어있는 용액 50 μ l를 첨가하여 microplate reader를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 세포내 glutathione 생성량 측정

Hepal1c7를 배양하여 감두 약침액 및 열수추출액에 의한 세포내 glutathione의 양을 측정하였다. 1×10⁴의 세포를 200 μ l MEM배지에 부유시켜 96-well plate에 점종시키고 CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 10 μ l 농도별 감두탕 약침액 (0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×) 또는 농도별 감두탕 열수 추출액(0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×)이 포함된 배지를 각 well에 가하였다. 시료처리 후 48 시간 뒤 배지를 버리고 PBS로 세번 씻고 세포를

lysis시킨 후 40 μ l stock buffer(125mM Na-phosphate, 6.3mM Na-EDTA, pH 7.4)를 가 하고 170 μ l의 reaction mixture (20 μ l 6mM 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) in stock buffer, 10 μ l glutathione reductase solution(50units in 10ml stock buffer), 140 μ l of the NADPH- generating system (2.5 ml 0.5M Tris-HCl(pH 7.4), 330 μ l 150mM glucose-6-phosphate, 30 μ l 50mM NADP⁺, 100units of glucose-6-phosphate dehydrogenase in 50ml distilled water))와 반응시켰다. 상온에서 5분간 shaking 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 세포내 glutathione S-transferase 생성량 측정

GST α , GST μ 를 발현하는 Hepal1c7 cell 을 사용하여 GST 활성 측정을 하였다. Hepal1c7 cell을 96-well plate의 각 well에 1× 10⁴ cells을 점종시키고 37°C, CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 새 배양액 190 μ l와 농도별 감두탕 약침액(0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×) 또는 농도별 감두탕 열수 추출액(0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×)을 10 μ l씩 각 well에 처리하였다. 세포를 약침액 또는 열수추출액이 처리된 배양액에서 48시간 배양 후 PBS로 3회 씻고, 3회의 freeze-thaw cycles에 의해 세포를 lysis시켰다. GST 활성 측정을 위해 100 μ l reaction mixture(2.5mM GSH, 1mM CDNB in 0.1M potassium phosphate buffer, pH 6.5)을 첨가하고 1분간 plate shaker에서 shaking 한 후 405nm에서 3분간 흡광도의 증가를 microplate reader에서 측정하였다. GST 활성 측정을 한 plate와 같이 처리한 plate에서의 단백질 함량은 binchinchoninic acid protein assay kit를 사용하여 측정하였다.

6. Polyamine metabolism 활성측정

*Acanthamoeba castellanii*의 증식을 측정하여 ODC활성을 측정하였다. 2×10⁵ cells의 *Acanthamoeba castellanii*을 3ml OGM (3N

KOH, 30% glucose, 2,000×vitamins(0.2g thiamine HCl, 40mg biotin, 200 μ g vitamin B₁₂ /100ml 95% ethanol), 100× salt I (0.4g ferric citrate, 0.1g CaCl₂·H₂O, 3.1g MgSO₄·7H₂O in 250ml dH₂O), 100× KH₂PO₄ (13.6g/l, pH 7.0), yeast extract-proteose peptone (7.5g/l))에 부유시켜 T-25 tissue culture flask에서 감두탕 약침액 (1×, 5×) 또는 열수 추출액 (1×, 5×) 150 μ l와 배양하였다. 그리고 24, 48, 96, 120, 144, 168시간 후의 세포수를 Hemocytometer를 이용하여 계수하였다.

III. 실험 결과

1. Quinone reductase (QR) 생성에 미치는 영향

감두탕의 암예방 효과를 살펴보기 위하여 발암 물질을 무독성화시키는 phase II enzyme, QR 생성의 유도 효과를 측정하였다. Hepalcl7세포에 대한 실험에서 약침액 5×농도에서 가장 높은 수치인 1.8배의 생성 유도율을 보였다 (Fig. 2). 열수 추출액에서는 추출액 0.5×에서 1.1배의 유도율을 나타내었다 (Fig. 3). 대감두탕 약침액에서는 감두 약침액과 QR 유도율이 비슷하였다 (Fig. 4). 각각의 농도에 있어서 열수추출액보다 약침액에서 QR의 생성유도가 높게 나타났다. 따라서 생쥐의 간암세포인 Hepalcl7에서 열수 추출액, 약침액 모두 QR 생성을 유도하였으나 약침액의 경우 1.8이 최고수치인데 반해 열수 추출액은 1.1의 유도율을 보여 약침액이 열수추출액보다 더 많은 QR 생성을 유도하였다.

한편 Ac2F 세포에 대한 감두탕의 QR 유도율을 측정해 본 결과, 약침액의 경우 농도 0.1×에서 1.0인 수치를 보이다가 농도 5×에서는 유도를 4.1로 현저히 높은 QR 생성이 유도되었다 (Fig. 5). 열수 추출액을 Ac2F에 처리했을 때에는 농도 3×에서 2.3배로 QR의 생성량이 증가하였으며, 농도 5×에서는 1.5로 감소하였다 (Fig. 6). 대감두탕 약침액의 경우, 0.1×에서 5×로 추

출액의 농도가 높아짐에 따라 QR 생성량도 같이 증가하여 5×농도에서 3.9의 가장 높은 QR 생성 유도율을 나타내었다 (Fig. 7). 이상의 결과에서 Ac2F 세포에 대해서도 Hepalcl7의 결과와 같이 감두탕 약침액이 열수 추출액보다 각각의 농도에서 더 높은 QR 생성유도율을 보여주었다.

2. 세포내 glutathione 생성에 미치는 영향

감두탕에 의한 glutathione 생성을 Hepalcl7 세포에서 살펴보았다. 0.1×에서 1×농도의 약침액을 처리한 세포에서 대조군과 같은 glutathione level을 보이다가 5×에서 1.3배를 보였다 (Fig. 8). 열수 추출액에서는 각각의 시료 농도에서 1.0~1.1배의 수치를 보였다 (Fig. 9). 대감두 약침액의 경우 각각의 농도의 glutathione level이 1.0으로 일정하였다 (Fig. 10). 생쥐에서 유래된 Hepalcl7 세포내의 glutathione은 약침액 농도 5×에서 가장 많이 생성되었다.

3. 세포내 Glutathione S-transferase 활성 측정

감두탕에 의한 glutathione S-transferase 활성도를 관찰한 결과, 감두 약침액, 열수 추출액 및 대감두탕 약침액의 경우 1.0~1.3정도의 증가를 보였으며 열수 추출액에서 보다는 약침액의 경우 높은 활성을 나타내었다 (Figs. 11, 12, 13).

4. Polyamine metabolism에 미치는 영향

ODC활성에 의해 polyamine이 생성되어지고 이 polyamine은 아메바 증식에 필수적이므로 ODC활성에 대한 감두탕 약침액의 영향을 알아보기 위해 아메바의 증식을 측정하였다. 2×10⁵cells의 *Acanthamoeba castellanii*에 150 μ l 3차 증류수만을 처리한 후 24시간, 48시간, 96시간, 120시간, 144시간, 168시간을 관찰했을 때, 아메바의 세포수는 2.0×10⁵, 7.7×10⁵, 44×10⁵으로 96시간까지 서서히 증가하다가 120시간 이후 급격히 세포수의 증가를 보여 168시간에는 14.1×10⁶

까지 증가하였다. 각 처리시간에서 감두 약침액의 농도 1×, 5×를 처리했을 때 농도 5× 감두 약침액에서는 168시간이 지난 후, 6.0×10^6 로 대조군에 비해서 57%정도의 억제 효과가 나타났다. 또한 낮은 농도인 1×의 약침액 농도에서도 대조군에 비해 28%의 아메바의 증식 억제 효과를 보였다 (Fig. 14). 이와 같이 감두 약침액은 농도의존적으로 아메바 증식을 억제하였다. ODC에 대한 감두탕 열수 추출액의 아메바 증식 억제능을 살펴보기 위해 약침액 실험과 같이 2×10^5 cells의 *Acanthamoeba castellanii*에 150 μ l의 증류수 및 감두 열수추출액을 농도별로 처리하였다. 168시간 후에 대조군, 1×, 5×에 대해 세포수를 측정해 보았을 때 14.1×10^6 , 13.7×10^6 , 0.4×10^6 의 세포수를 보여 대조군에 비해서 열수추출액 1×, 5×에서 3%, 97%의 아메바 증식 억제 효과가 나타났다 (Fig. 15). 대감두의 경우에서도 대조군에 비해서 높은 억제효과를 보였다. (Fig. 16)

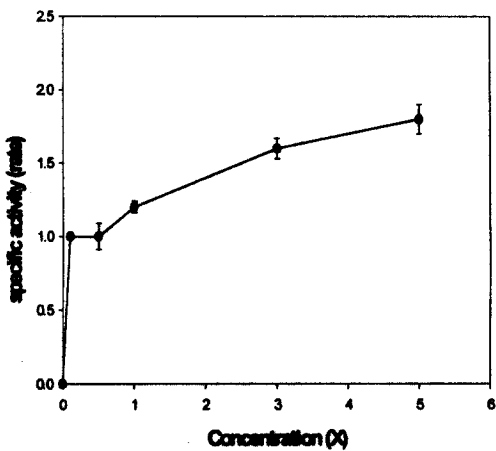


Fig. 2. Effect of GAS on induction of quinone reductase activity in murine hepatoma hepalc1c7 cells. Cells were treated with GAS for 48 hours, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean of three separate experiments.

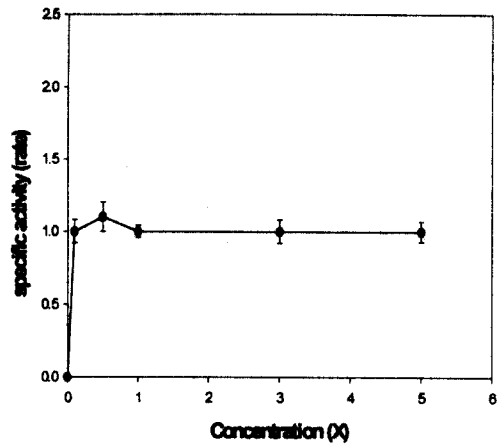


Fig. 3. Effect of GWS on induction of quinone reductase activity in murine hepatoma hepalc1c7 cells. Cells were treated with GWS for 48 hours, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean of three separate experiments.

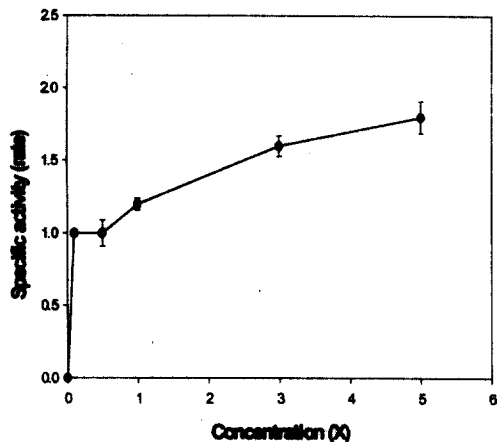


Fig. 4. Effect of DGAS on induction of quinone reductase activity in murine hepatoma hepalc1c7 cells. Cells were treated with DGAS for 48 hours, and the change in the levels of QR was measured. Each

point represents the mean of three separate experiments.

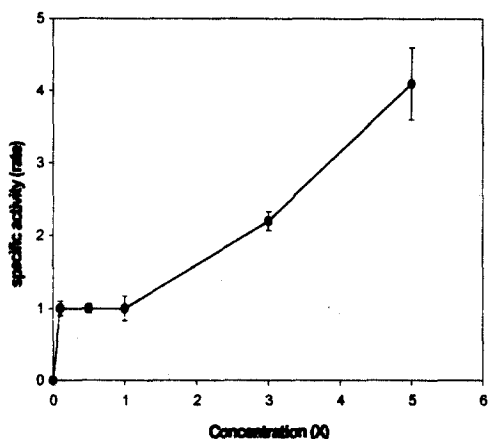


Fig. 5. Effect of GAS on induction of quinone reductase activity in rat Ac2F cells. Cells were treated with GAS for 48 hours, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean of three separate experiments.

measured. Each point represents the mean of three separate experiments.

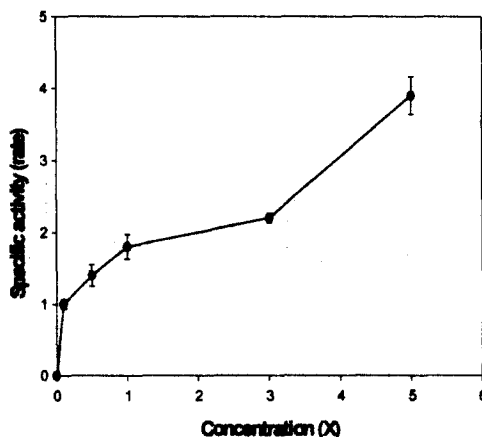


Fig. 7. Effect of DGAS on induction of quinone reductase activity in rat Ac2F cells. Cells were treated with DGAS for 48 hours, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean of three separate experiments.

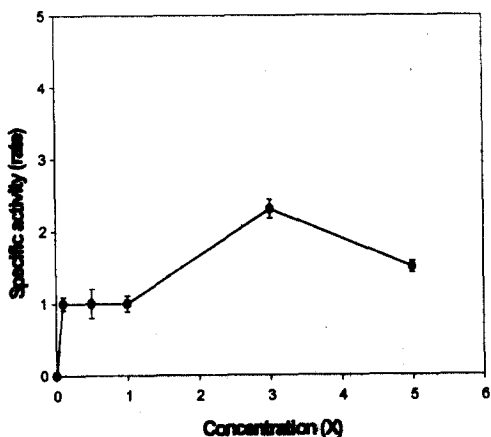


Fig. 6. Effect of GWS on induction of quinone reductase activity in rat Ac2F cells. Cells were treated with GWS for 48 hours, and the change in the levels of QR was

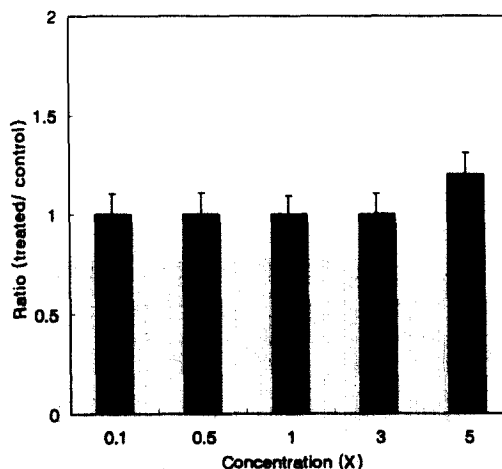


Fig. 8. Induction of glutathione levels by GAS in murine hepatoma hepalc1c7 cells. Cells were treated with GAS in concentration range of $0.1 \times - 5 \times$ for 48 hrs, glutathione

levels of sample-treated cells were analyzed and compared with a solvent control to calculate the ratio of GSH induction.

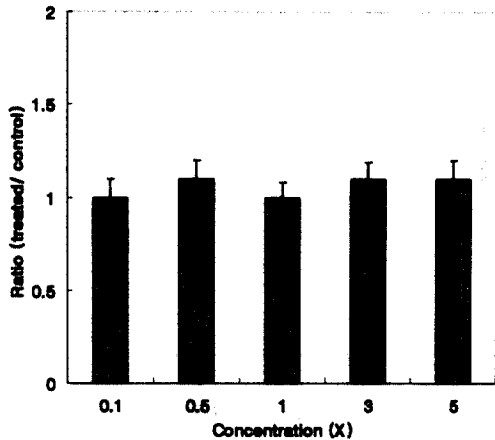


Fig. 9. Induction of glutathione levels by GWS in murine hepatoma hepalcl7 cells. Cells were treated with GWS in concentration range of $0.1 \times -5 \times$ for 48 hrs, glutathione levels of sample-treated cells were analyzed and compared with a solvent control to calculate the ratio of GSH induction.

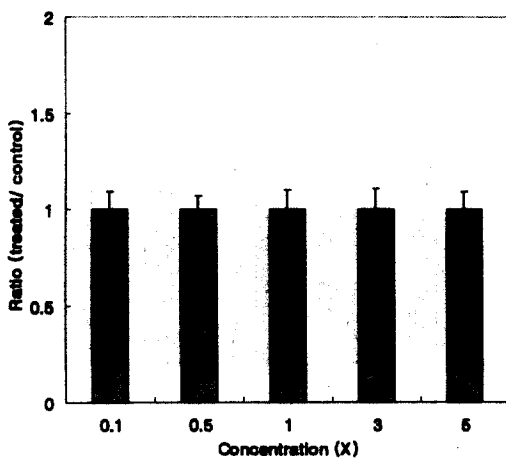


Fig. 10. Induction of glutathione levels by DGAS in murine hepatoma hepalcl7

cells. Cells were treated with DGAS in concentration range of $0.1 \times -5 \times$ for 48 hrs, glutathione levels of sample-treated cells were analyzed and compared with a solvent control to calculate the ratio of GSH induction.

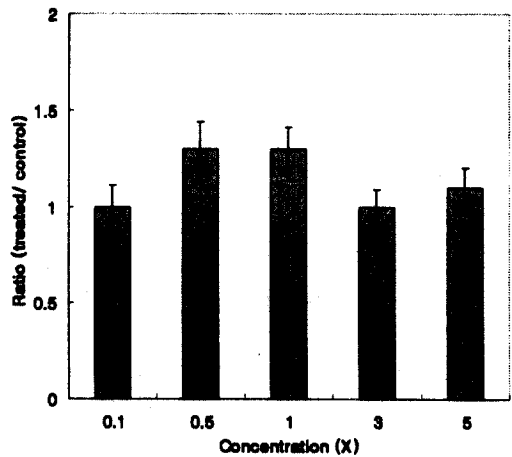


Fig. 11. Induction of glutathione S-transferase by GAS in murine hepatoma hepalcl7 cells. Cells were treated with GAS in concentration range of $0.1 \times -5 \times$ for 48 hrs, glutathione S-transferase level of sample-treated cells were analyzed and compared with a solvent control to calculate the ratio of GST induction.

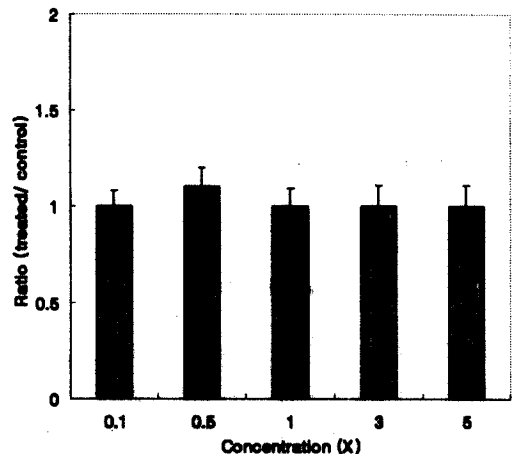


Fig. 12. Induction of glutathione S-transferase by GWS in murine hepatoma hepalcl7 cells. Cells were treated with GWS in concentration range of $0.1\times -5\times$ for 48 hrs, glutathione S-transferase level of sample-treated cells were analyzed and compared with a solvent control to calculate the ratio of GST induction.

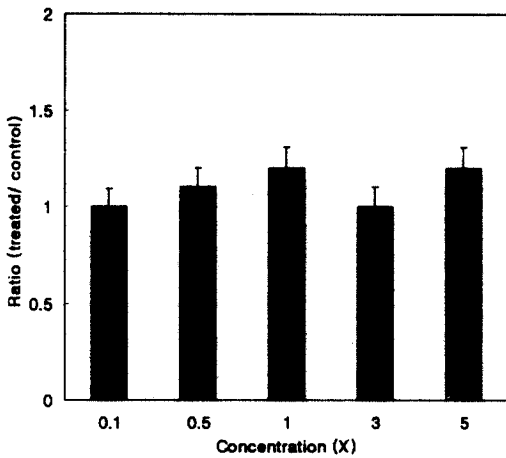


Fig. 13. Induction of glutathione S-transferase by DGAS in murine hepatoma hepalcl7 cells. Cells were treated with DGAS in concentration range of $0.1\times -5\times$ for 48 hrs, glutathione S-transferase level of sample-treated cells were analyzed and compared with a solvent control to calculate the ratio of GST induction.

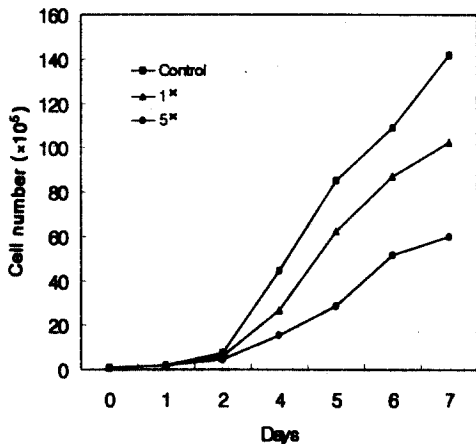


Fig. 14. Inhibition of the growth of *Acanthamoeba castellanii* by GAS.

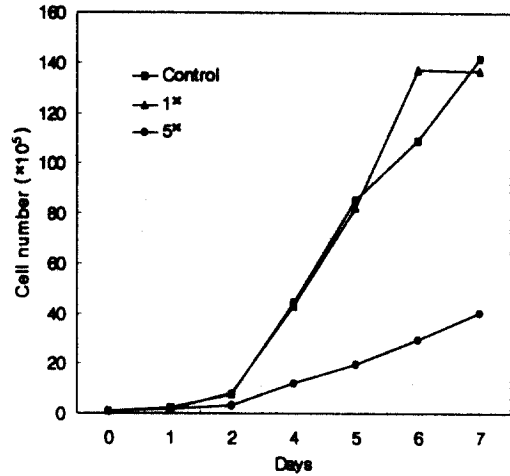


Fig. 15. Inhibition of the growth of *Acanthamoeba castellanii* by GWS.

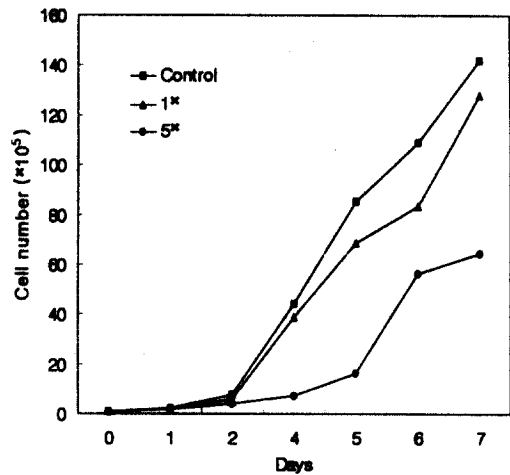


Fig. 16. Inhibition of the growth of *Acanthamoeba castellanii* by DGAS

IV.고 찰

암은 동양의학의 문헌상으로는 양성종양과 악성종양이 포함된 표현으로 종양(腫瘍), 용저(癰疽), 태독(腫毒), 적취(積聚), 음창(陰瘡), 폐옹(肺癰), 간옹(肝癰), 장옹(腸癰), 현벽(痲癬), 석옹(石癰), 석저(石疽) 등으로 명명하며 동양의학에서 종양의 발생기전은 辨證論證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 있다³²⁻³³⁾. 감두탕은 천금방에 수록된 처방으로 百藥百物의 해독을 비롯해서 清熱解毒, 消炎, 鎮痙, 止痛, 脚腫, 胎黃, 胎熱, 難産, 脚氣, 浮腫, 三焦消渴, 筋疝 등 제증상에 활용해온 대표적인 해독 처방임을 동의보감과 현재에 이르기 까지 많은 학자들에 의해 설명되고 응용되어 왔다³⁴⁻⁴⁰⁾.

암예방(chemoprevention)은 암화 과정(carcinogenesis)을 연장, 억제시키거나 암화된 것을 전환(reversion)시키는 작용이다. 현재 암예방 물질에 대한 많이 연구가 진행되고 있으며, 효과적인 암예방물질(chemopreventive agents)의 연구를 위해 생화학적 표식자(biochemical markers)를 사용하고 있다. 이 표식자들은 암화과정시 발암물질의 대사물질과 그의 부산물과도 반응하며 다양하고 많은 발암기전을 저해할수록 효과적인 암예방 물질로 간주된다. 이러한 표식자들에는 QR, ODC, glutathione (GSH), glutathione s-transferase(GST) 등이 사용되고 있다. Quinone reductase는 세포질에 주로 분포되어 있으며⁴¹⁻⁴²⁾ quinones과 quinoneimines를 환원시켜서 세포에 대한 독성을 제거한다⁴³⁻⁵⁰⁾. QR은 glutathione S-transferase와 UDP-glucuronosyl transferase와 같이 phase II enzyme으로 외부의 독성이 있는 물질과 돌연변이원성(mutagen) 발암물질(carcinogen)로부터 세포를 보호한다. phase II enzyme 생성의 유도는, 곧 항암활성(anticarcinogenic activity)으로 여겨진다⁵¹⁻⁵²⁾. 본 연구에서 감두탕 약침액을 생쥐의 간암세포 Hepalcl7에 처리하였을 때 5× 농

도에서 1.3배의 QR 생성 유도율을 보였고, 0.1×에서 5×사이의 농도에서 감두탕 약침액의 농도가 높아짐에 따라 QR 유도율도 높아져 농도의 존적으로 유도되었다. 흰쥐의 Ac2F 세포에서의 감두탕 약침액의 QR 생성유도는 생쥐의 간암세포에서 보다 더 높게 유도되어, 약침액 5×에서 4.1배의 높은 유도율을 보였고 열수 추출액과 대감두 약침액 또한 각각 2.3, 3.9배의 유도율을 보인다. 감두로 만든 약침액과 열수추출액은 phase II enzyme인 QR의 생성을 유도하였다. 그러므로 감두탕 약침액은 돌연변이원성, 발암물질의 대사과정시 생성된 quinone에 의한 세포내 독성 및 세포내 DNA손상을 없애줄 것으로 추측된다. 감두는 항암효과가 있을 뿐만 아니라 본 연구의 감두 약침의 QR 생성유도를 미루어 볼 때 감두탕 약침액은 발암물질의 종양효과(neoplastic effect)를 막아주는 phase II enzyme인 QR등을 유도하여 세포에 미치는 독성을 없애주는 것으로 추측된다.

암예방 물질 연구에 사용되는 표식자 중의 하나인 ODC는 polyamine 생합성 과정에서 putrescine의 생성에 관여하는 효소이며 정상세포와 종양세포(neoplastic cell)의 증식에 필수적이다⁵³⁻⁵⁴⁾. 또한 ODC의 유도는 암촉진(tumor promotion)에도 중요한 기능을 담당하고 있어 생쥐에서 피부암 촉진 실험에서 ODC활성 유도와 발암 물질의 암촉진 능력간의 밀접한 관계가 보고되었으며 다른 조직에서도 암 촉진자(tumor promotor)들이 ODC활성을 유도하는 것으로 보고되었다⁵⁵⁻⁵⁶⁾. Difluoromethylornithine (DFMO)과 같은 ODC의 저해제는 발암과정(carcinogenesis)을 저해시킬 수 있다⁵⁷⁾.

Polyamine은 발암과정시 비정상적으로 생합성되어 발암과정에 밀접한 관계가 있으며⁵⁸⁻⁶¹⁾ 원생동물 세포의 성장 및 분화에도 관여한다. 원생동물 세포 배양에서 돌연변이 또는 억제제를 사용하여 polyamine의 합성을 막으면 세포성장도 중단된다. 그러므로 원생동물의 polyamine 생합성 억제제는 암세포의 성장을 저해할 수 있다⁶²⁻⁶⁵⁾. 본 연구의 결과 감두탕 약침액과 열수 추출액은

농도 의존적으로 아메바의 성장을 억제하였다. 이 결과는 감두탕 약침액과 열수 추출액에 의해 아메바의 수가 감소하는 것이 아니라 증식속도가 지연되었으므로 감두탕 약침액, 열수 추출액의 독성에 의한 수의 감소가 아니라 아메바 성장에 필요한 polyamine의 고갈에 따른 증식속도의 지연으로 보인다. 즉 감두탕 약침액 및 열수 추출액이 ODC활성에 영향을 주어 polyamine 생성을 저해시키고 이에 감두 약침액 및 열수추출액에서 배양한 아메바의 세포 성장이 저해된 것으로 보인다. ODC의 활성저해는 발암촉진의 저해를 발생시키며 retinoid, DFMO 등은 ODC 활성을 저해시켜 종양 발생을 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서의 아메바 성장억제는 ODC 활성 저해로 인한 것으로 여겨지며 이로 인해 종양발생을 억제할 것으로 예측되므로 앞으로 radioactivity를 이용하여 ODC활성을 직접 측정하는 것은 매우 의미있는 실험이라 하겠다. Glutathione(GSH)은 세포내 다양한 기능을 가지고 있으며 특히 독성이 강한 물질을 제거해준다. 대부분의 외부의 화학물질은 cytochrome p-450-dependent monooxygenase system에서 대사되어져 전자친화적 물질(electrophilic product), epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질이 된다⁶⁶⁻⁶⁷⁾. 이 물질들은 glutathione과 직접적으로 결합하거나 glutathione S-transferase에 의해 촉매되는 과정을 거쳐 결합하기도 한다. 이 반응들은 무독성과정 (detoxification pathway)으로 세포내 glutathione이 고갈되면 독성이 강한 대사물질들이 만들어져 세포내 손상을 유발시켜 mutagenesis, carcinogenesis를 일으킨다⁶⁸⁾. 또한 Hepalcl7에서 감두탕 약침액은 1.3배의 GSH 생성률을, 열수추출액은 1.1배의 GSH 생성률로 증가하였고 GST의 경우, 1.0-1.3배의 생성율을 보였다. 위의 결과로 감두탕 약침액은 세포내 glutathione 생성을 촉진하여 세포내 발생한 산화물질과 기타의 독성물질을 무독하게 할 것으로 추측된다. Aflatoxin에 의해 유도된 간암에 걸린 쥐에 다량의 GSH를 주었을 때 종양저해작용이 있었으며, butylated hydroxyanisole은 GSH level

을 증가시켜 화학물질에 의한 발암을 저해한다고 보고되었다⁶⁹⁾. 이에 감두탕 약침액에 의해 증가한 glutathione은 산화적인 유리기의 공격 (oxidative free radical attack)으로부터 세포를 보호하고 DNA에 결합하는 것을 막아주어 mutagenesis 또는 carcinogenesis를 저해할 것으로 여겨진다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 감두탕 약침액은 열수 추출액에 비해 효과적으로 세포내 QR의 농도를 높혀주고 ODC 활성을 낮추어 줄 뿐 아니라 GSH의 양을 증가시켜 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료된다.

V. 결 론

감초와 흑소두(감두탕), 감초와 흑대두(대감두탕)를 정량으로 배합하여 조제한 약침액과 감초와 흑소두를 정량으로 배합하여 조제한 열수 추출액을 이용하여 암 예방효과를 살펴 본 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 발암물질을 무독성화시키는 quinone reductase 생성 유도를 생쥐의 간암세포인 hepalcl7과 rat의 간세포 Ac2F에서 측정한 결과, 감두 약침액, 열수추출액을 처리한 hepalcl7과 Ac2F에서 QR생성이 유도되었으며 약침액에 의한 유도율이 더 높았다.
2. glutathione 생성을 살펴본 결과 hepalcl7 세포에서 감두 약침액과 열수 추출액에 의한 glutathione 생성이 증가하였다.
3. glutathione S-transferase 활성측정에 의하면 hepalcl7 세포에서 감두 약침액에 의한 glutathione S-transferase 생성이 증가하였다.
4. 농도별 감두 약침액과 열수추출액에 의한 *Acanthamoeba castellanii* 증식을 살펴 본 결과, 약침액과 열수추출액이 *Acanthamoeba*

castellanii 증식을 농도 의존적으로 저해하는 효과가 있었다.

참고 문헌

1. 錢伯文. 腫瘤的辨證施治. 上海 : 上海技術出版社, 1980 : 1-10
2. 김승재. 동양삼국에서 본 종양 및 항종양에 대한 고찰. *최신의학* 1967 ; 76-92
3. 홍원식. 현대중공의 암치료. 서울 : 영문사, 1980 : 87-282
4. 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사, 1990 : 225
5. 서울의과대학. 腫瘍學. 서울 : 서울대학교 출판부, 1990 : 2-43
6. 배원식. 암의 한양방병용치료에 대한 보고. *대한한의학회지* 1986 ; 7(2) : 53-57
7. 賈瑩. 癌瘤中醫防治研究. 陝西 : 陝西科學技術出版社, 1983 : 1-3
8. Fish B. Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. *Cancer* 1984 ; 54 : 2609
9. Goodman GE, Yen YP, Cox TC, Crowly J. Effect of verapamil in vitro cytotoxicity and vinblastine in human tumor cell. *Cancer Res.* 1987 ; 47 : 2295
10. 허준. 동의보감. 서울 : 대성문화사, 1981 : 90-720
11. 原名. 中醫方劑大辭典(中醫處方大辭典). 1998 : 135-438
12. 江克明. 簡明方劑辭典. 上海 : 上海科學技術出版社, 1999 : 257
13. 신재용. 방약합편해설. 서울 : 신광문화사, 1989 : 505
14. 손사막. 천금요방. 서울 : 대성문화사, 1984 : 430
15. 清汪昂. 原本 醫方集解. 서울 : 대성문화사, 1990 : 146
16. 신길구. 신씨본초학. 서울 : 수문사, 1973 : 16-20
17. 강병수. 임상배합본초학. 서울 : 영림사, 1994 : 94-97
18. 李時珍. 本草綱目. 北京 : 人民衛生出版社 1982 : 691-1517
19. 劉春安. 抗癌中草藥大辭典. 湖北 : 湖北科學技術出版社, 1994 : 260-265
20. 潘敏求. 中華腫瘤治療大成. 河北 : 河北科學技術出版社, 1996 : 179
21. 張民床. 抗腫瘤中藥的臨床應用. 北京 : 人民衛生出版社, 1998 : 363-364
22. 안덕균. 중약대사전. 서울 : 도서출판정담, 1998 : 6635-6638
23. 高本釗. 中藥大辭典. 台北 : 新文豐出版公司, 1997 : 2160-2162
24. 黃三元. 本草備要新編 1985 : 351-352
25. 金昌謙. 本草從新. 서울 : 행림서원, 1982 : 193-194
26. 唐慎微. 經史證類大觀本草. 서울 : 송문사, 1976 : 140
27. 김정호. 감두탕으로 법제한 초오가 흰쥐의 간 신기능에 미치는 영향. *대한한의학회지* 1994 ; 15(1) : 117-129
28. 박호식. 부자독소에 의한 조직변화와 감두탕 및 황연해독탕의 중화에 관한 연구. *원광대학원 한의과 논문집* 1984 ; 6 : 3-21
29. Chung YT, Park ST, Mum YJ, Kim JM, Kim JJ, Choi MK, Han DS and Kim JB. J. *Wonkwang Med. Sci.* 1987 ; 3 : 13
30. Seo JD, Lee DK and Um IW. J. *Wonkwang Dental Research Institute* 1992 ; 2 : 55
31. Sheela Sharma, Jill K. Stutzman, Gary J. Kelloff, and Vernon E. Steele. Screening of Potential Chemopreventive Agents Using Biochemical Markers of Carcinogenesis. *cancer research* 1994 ; 54 : 5848-5855, 1994
32. 김종완, 임종국. 금은화 약침액이 항암 및 암 예방 효과에 미치는 영향. *대한침구학회지*

- 1999 ; 6(2) : 261-277
33. 최승훈. 동의종양학. 서울 : 행림서원, 1995 : 15-42
 34. 汪詡庵. 醫方集解. 臺灣 : 文光圖書會社, 1976 : 228-272
 35. 大塚恭男. 附子の 醫史學的考察. 出版科學總合研究所刊, 1979 : 6-8
 36. 西川義方. 內科診療の實際. 南山堂, 昭和41年 ; 第66版 : 347-469
 37. 김휘배. 초오독성에 미치는 감초와 흑두의 영향. 원광대학교 대학원학위논문 1982.
 38. 李時珍. 圖解本草綱目. 中華民國52年, 卷十三, 草之二 : 1-5.
 39. 王蕪. 外臺秘要. 國立中醫學研究所重刊 1940 : 866
 40. 朱震亨. 丹溪心法. 五州出版社, 民國58年 : 127
 41. Ernster L. in *Methods in Enzymology* (Estabrook, R. W., and Pullman, M. E., Eds.). Academic Press, New York. 1967 : 309-317
 42. Talalay P, Benson AM. in *Advances in Enzyme Regulation*(Weber, G., Ed.). Pergamon, Oxford. 1982 : 287-300,
 43. Iyanagi T, Yamazaki, I. One-electron-transfer reactions in biochemical system. V. Difference in the mechanism of quinon reduction by the NADH dehydrogenase (DT-diaphorase). *Biochim. Biophys. Acta.* 1970 ; 216 : 282-294
 44. Lind C., Vadi H, Ernster L. Methabolism of benzo(a)pyrene-3, 6-quinone and 3-hydroxybenzo(a) pyrene in liver microsomes from 3-methylcholanthrene-treated rats. A possible role of DT-diaphorase in the formation of glucuronyl conjugates. *Arch. Biochem. Biophys.* 1978 ; 190 : 97-108
 45. Kappus H, Sies H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism : redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* 1981 ; 37 : 1233-1241
 46. Lind C, Hochstein P, Ernster L. DT-diaphorase as a quinone reductase : a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1982 ; 216 : 178-185
 47. Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA, Orrenius S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of implications of oxidative stress in intact cells. *J. Biol. Chem.* 1982 ; 257 : 12419-12425
 48. Smart RC, Zannoni VG. DT-diaphorase and peroxidase influence the covalent binding of the metabolites of phenol, the major metabolite of benzene. *Mol. Pharmacol.* 1984 ; 26 : 105-111
 49. Chesis PL, Levin DE, Smith MT, Ernster L, Ames BN. Mutagenicity of quinones : pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984 ; 81 :1696-1700
 50. Prochaska HJ, Talalay P, Sies H. Direct protective effect of AD(P)H : quinone reductase against menadione-induced chemiluminescence of postmitochondrial fractions of mouse liver. *J. Biol. Chem.* 1987 ; 262 : 1931-1934
 51. Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* 1985 ; 45 : 1-8
 52. Talalay P, DeLong MJ, Prochaska HJ. in *Cancer Biology and Therapeutics*(Cory. J. G., and Szentivani, A., Eds.). Plenum, New York. 1987 : 97-216
 53. Bull AW, Nigro ND, Golembieski WA, Crissman JD, Marnett LJ. In viyo stimulation of DNA synthesis and induction of ornithine decarboxylase in rat

- colon by fatty acid hydroperoxides, autoxidation products of unsaturated fatty acids. *Cancer Res.* 1984 ; 44 : 4924-4928
54. Bull AW, Soullier BK, Wilson PS, Hayden M, Nigro ND. Promotion of axocymethane-induced intestinal cancer by high-fat diet in rats. *Cancer Res.* 1979 ; 39 : 4956-4959
55. Rozhin J, Wilson PS, Bull AW, Nigro ND. Ornithine Decarboxylase activity in the rat and human colon. *Cancer Res.* 1984 ; 44 : 3226-3230
56. Takigawa M, Verma AK, Simsiman RC, Boutwell RK. Polyamine biosynthesis and skin tumor promotion : inhibition of 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-promoted mouse skin tumor formation by the irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase-difluoromethylornithine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982 ; 105 : 969-976
57. Kingsnorth AN, King WWK, Kiekema K, McCann PP, Ross, J. S., and Malt, R. A. Inhibition of ornithine decarboxylase with 2-difluoromethyl-ornithine reduced incidence of dimethylhydrazine -induced colon tumors in mice. *Cancer Res.* 1983 ; 43 : 2545-2549
58. Porter CW, Sufrin JR. Interference with polyamine biosynthesis and/or function by analogs of polyamines or methionine as a potential anticancer chemotherapeutic strategy. *Anticancer Res.* 1986 ; 6 : 525-542
59. Janne J, Holttä E, Kallio A, Kopyaho K. Role of polyamines and their antimetabolites in clinical medicine. *Spec. Top. Endocrinol. Metabol.* 1983 ; 5 : 227-293
60. McCann PP, Pegg AE, Sjoerdsma A. Inhibition of Polyamine Metabolism. *Biological Significance and Basis for New Therapies.* Orlando Academic Press. 1987 : 1-371.
61. Tabor CW, Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 1985 ; 49 : 81-99
62. Williams-Ashman HG, Canellakis ZN. Polyamines in mammalian biology and medicine. *Perspect. Biol. Med.* 1979 ; 22 : 421-453
63. Pegg AE, McCann PP. Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* 1982 ; 243 : 212-221
64. Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 1984 ; 53 : 749-790
65. Pegg AE. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 1986 ; 234 : 249-262
66. Jollow DJ, Kocsis JJ, Snyder R, Vainio H. *Biological Reactive Intermediates*, Plenum Press, London 1977
67. Jollow DJ, Smith C. Biochemical aspects of toxic metabolites formation, detoxification and covalent binding. In *Biologically Reactive Intermediates*. Plenum Press, New York. 1977 : 42-59
68. Mitchell JR, Hinson JA, Nelson SD. Glutathione and drug induced tissue lesions. In *Glutathione: Metabolism and Function*, Raven Press, New York. 1976 : 357-367
69. Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion, *Science.* 1985 ; 227 : 375-381