

## 창이자 및 꿀풀하고초에 의한 NAD(P)H:quinone reductase와 glutathione S-transferase의 유도

손윤희 · 이기택<sup>1</sup> · 박신화<sup>1</sup> · 조경희<sup>1</sup> · 임종국<sup>1</sup> · 남경수\*

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터,

<sup>1</sup>한의과대학 경혈학교실

## Induction of NAD(P)H:quinone reductase and glutathione S-transferase by Xanthii Fructus and Prunellae Spica Extracts

Yun-Hee Shon, Ki-Taek Lee<sup>1</sup>, Sin-Hwa Park<sup>1</sup>, Kyoung-Hee Cho<sup>1</sup>,  
Jong-Kook Lim<sup>1</sup> and Kyung-Soo Nam\*

Department of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Disease Research Center;

<sup>1</sup>Department of AM-Pointology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

**Abstract** – Ethanol extracts from Xanthii Fructus (XFE) and Prunellae Spica (PSE) were investigated for the effects on the induction of cancer chemoprevention-associated enzymes. The following effects were measured: (a) induction of quinone reductase (QR) (b) induction of glutathione S-transferase (GST) (c) reduced glutathione (GSH) level. XFE and PSE were potent inducers of quinone reductase activity in Hepa1c1c7 murine hepatoma cells. Glutathione levels were increased with XFE and PSE. In addition, glutathione S-transferase activity was increased with XFE. However, GST activity was not increased with PSE. These results suggest that XFE and PSE have chemopreventive potentials by inducing quinone reductase and increasing GSH levels.

**Key words** – Xanthii Fructus, Prunellae Spica, cancer chemoprevention, quinone reductase, glutathione S-transferase, glutathione.

악성종양은 빠른 침윤성 성장과 체내 각 부위로의 확산 및 전이를 통해 생명의 위협을 초래할 뿐만 아니라 현재 인류에게 있어서 가장 큰 위험성을 가지는 전신성 질환으로 인식되고 있다. 이러한 악성종양을 치료하기 위하여 다양한 치료법들이 도입되고 있으나 한계성, 독성 및 부작용 등의 문제점을 가지고 있는 실정이다. 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로 암이 발병하기 전에 막을 수 있는 암예방 물질의 개발 연구가 활발히 이루어지고 있다. 암예방 물질은 발암물질의 대사과정에 변화를 가져오거나 암화과정시 생성되는 대사물질 또는 대사과정시 생성되는 부산물과

상호작용하여, 특정 효소의 발현 및 기능을 변화시킬 수 있다. 따라서 이러한 특성을 이용하여 암예방 물질을 조사, 개발할 수 있으며, 암화과정이 단단계로 진행되기 때문에 발생초기뿐만 아니라 후기단계에서도 암의 진행을 막을 수 있다. 현재, 암발생 억제물질의 효능을 연구하는데 있어서 생화학적 표식자 (biochemical marker)를 사용하고 있으며<sup>1)</sup> 이 표식자들은 암화과정시 발암과정에서 특이적으로 생성되는 대사물질뿐만 아니라 그 외 부산물과도 반응하며 다양하고 많은 발암기전을 저해할수록 효과적인 암예방 물질로 간주된다.

창이자(蒼耳子, *Xanthii Fructus*)는 국화과(Compositae)에 속하는 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L.)

\*교신저자 : Fax : 054-770-2477

열매로서 악혈, 구복장기육, 풍양, 폐위, 두창, 응종, 여양, 음퇴, 요혈종통, 간열, 나역, 골절, 악창 등의 효능이 있다고 알려져 있다.<sup>2)</sup> 하고초(夏枯草, *Prunellae Spica*)는 꿀풀과(脣形科 Labiateae)에 속하는 다년생 *Prunella vulgaris* L.의 지상부 전초인 꿀풀하고초<sup>3)</sup>와 단향과(Santalaceae)에 속한 땅싸리하고초<sup>4)</sup> (제비풀) *Thesium chinense* Turcz.의 전초를 지칭하며, 꿀풀하고초와 땅싸리하고초는 효능에 있어서 다소 차이가 있는 것으로 문헌에 보고되어 있다.<sup>5)</sup> 주성분은 triterpenoid saponin, ursolic acid, rutin, hyperoxide, tannin, caffeic acid, alkaloid, vitamin B<sub>1</sub>, vitamin C, vitamin K, 칼륨염 등이며, 이뇨작용, 수렴작용, 진해 및 지혈 등의 약리작용을 가진다. 또한 한열, 유옹, 유암, 고혈압, 구내염, 편도선염, 후두결핵, 갑상선 기능항진, 설사, 위장염, 당뇨병 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>6)</sup>

본 실험실에서는 앞서 여러 생약제제의 암예방 효과(금온화,<sup>7)</sup> 감두탕,<sup>8)</sup> 당귀,<sup>9)</sup> 애엽<sup>10)</sup> 및 면역 증강 효과(시호,<sup>11)</sup> 감초<sup>12)</sup> 등을 연구한 바, 본 논문에서는 한국산 생약인 창이자 및 꿀풀하고초 에탄올 추출물이 발암과정의 억제효과와 관련한 quinone reductase (QR), glutathione S-transferase (GST) 효소와 glutathione (GSH) 활성에 미치는 효과를 측정하여 암예방 효과에 대해 검토하고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험재료** – 본 실험에 사용한 창이자 및 꿀풀하고초는 2000년 8월 동국 대학교 부속한방병원에서 구입하고 조사하여 확인 후 사용하였다. Voucher specimen은 동국대학교 난치병한양방치료연구소에 보관하고 있다.

**시약** – Eagle's minimum essential medium(MEM), dimethylsulfoxide(DMSO), anhydrous ethyl alcohol (99%), bovine serum albumin(BSA), tween-20, antibiotics, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), flavin adenine dinucleotide (FAD), dicoumarol, glucose-6-phosphate,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $\beta$ -NADP), glucose-6-phosphate dehydrogenase, menadione, lauryl sulfate (sodium dodecyl sulfate), crystal violet, glutathione reductase, chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB), triton X-100, Na-EDTA, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic

acid) (DTNB), bicinchoninic acid protein kit는 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)은 JBI사 (Daegu, Korea) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 세포배양용 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

**에탄올 추출물의 조제** – 에탄올 추출물은 수제 알콜침법에 의하여 조제하였다.<sup>7)</sup> 창이자 및 꿀풀하고초 60 g을 정량하여 정제수 400 ml를 가한 뒤 rotary evaporator(Büchi RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 감압농축하였다. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol을 가하여 75%, 85%, 95%의 ethanol 용액이 되게 하여 침전물을 여과하고, pH 7.4로 적정하였다. 저온에서 24시간 방치하여 여과 멸균하고 동결건조하였다.

**세포배양** – 계대 보존 중인 생쥐의 간암세포인 Hepa1c1c7 세포는 10% fetal bovine serum이 포함된 MEM을 배양액으로 하여 CO<sub>2</sub> 배양기(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 배양하였고, 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 이를 세포는 액체질소의 기체상태(-150 °C)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 실험에 사용하였으며, 세포의 생존율은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

**NAD(P)H:quinone oxidoreductase (QR) 생성 측정** – QR 생성 유도효과는 김동<sup>7)</sup>의 방법을 이용하여 측정하였다. QR specific activity 계산은 분당 환원된 MTT의 흡광도와 crystal violet의 흡광도에 의해 산출하였고, QR의 활성 유도는 대조군의 활성과 시료에 의한 활성의 비로 계산하였다.

**Glutathione 함량 측정** – Hepa1c1c7 세포 내의 총 glutathione 함량은 Griffith<sup>13)</sup>의 방법을 변형하여 96-well plate에서 측정하였다. 즉, 1 × 10<sup>4</sup>개의 세포를 200 μl MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고, 24시간 배양 후, 농도별 창이자 및 꿀풀하고초 에탄올 추출물이 포함된 새 배양액 200 μl을 처리하여 48시간 배양하였다. 세포를 세척하고 freeze-thaw cycle을 실시하여 lysis시킨 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<sup>+</sup>, 100 units

glucose-6-phosphate dehydrogenase)을 혼합한 혼합액 170  $\mu\text{l}$ 와 반응시켰다. 상온에서 5분간 교반하면서 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포내 총 단백질은 bicinchoninic acid protein kit를 사용하여 BSA를 표준 단백질 용액으로 이용한 표준 검량선을 구하고 그 양을 산출하였다. GSH 함량은 GSH 표준곡선으로 계산하였고, nmol/mg protein으로 표시하였으며, GSH 함량의 비는 대조군에 의한 GSH 양과 시료에 의해 생성된 GSH 양의 비율로 측정하였다.

**Glutathione S-transferase 측정** - 세포내 GST 활성 측정은 Habig 등<sup>14)</sup>의 방법을 참고하여 측정하였다. Hepa1c1c7 cell을 96-well plate의 각 well에 1  $\times 10^4$  cells을 접종시키고 24시간 배양 후, 농도별 창이자 및 꿀풀하고초 에탄올 추출물이 포함된 새 배양 액 200  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 처리하였다. 48시간 배양 후, 세포를 세척하고 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 CNDNB를 첨가한 혼합액을 100  $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 가하고 1분간 plate shaker에서 교반한 후, 3분간 흡광도의 증가를 microplate reader, 405 nm에서 측정하였다.

**통계학적 처리** - 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정은 Student's *t*-test를 수행하여 결정하였다.

## 결 과

**NAD(P)H:quinone oxidoreductase 유도 효과** - 밸암물질을 무독성화시키는 phase II enzyme의 한 종류인 QR의 생성 유도효과를 생쥐의 간암세포인 Hepa1c1c7 세포를 이용하여 측정함으로써 창이자 및 꿀풀하고초 에탄올 추출물의 암억제 효과를 살펴보았다. 창이자 에탄올 추출물 0.15 mg/ml과 1.5 mg/ml 농도에서 대조군에 비하여 1.14배, 1.53배로 QR을 유도하였으며, 7.5 mg/ml에서는 2.6배의 유의성 있는 증가가 나타났다(Fig. 1). 꿀풀하고초 에탄올 추출물에서는 1.1 mg/ml에서 1.2배, 5.5 mg/ml 농도에서 1.4배, 11 mg/ml에서 2.0배의 유도효과를 보였다(Fig. 2). 결과적으로 생쥐의 간암세포인 Hepa1c1c7에서 창이자와 꿀풀하고초 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 QR 생성을 유도하였으며 창이자가 꿀풀하고초 보다 더 효율적으로 QR 생성을 유도하는 효과가 있었다.

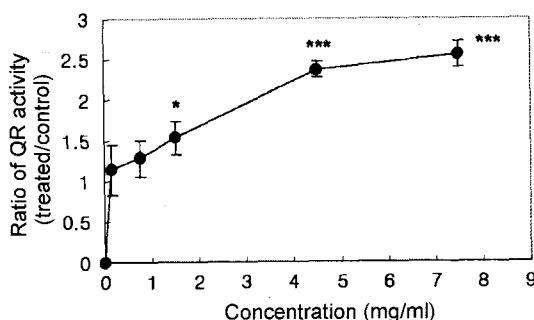


Fig. 1. Induction of quinone reductase in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells by XFE. Experimental details are described in Materials and Methods. Values are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). \*:  $p<0.05$ , \*\*\*:  $p<0.005$  as compared to control.

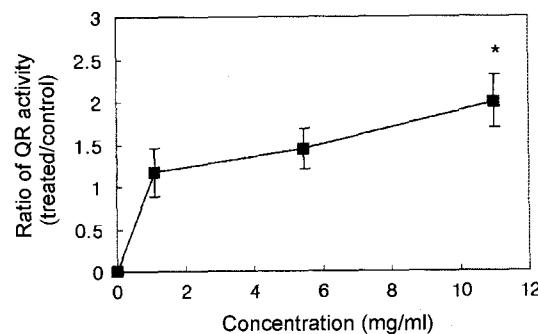


Fig. 2. Induction of quinone reductase in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells by PSE. Experimental details are described in Materials and Methods. Values are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). \*:  $p<0.05$  as compared to control.

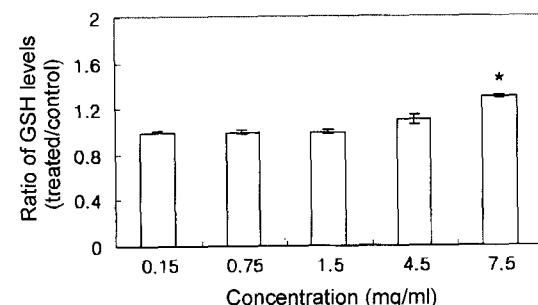
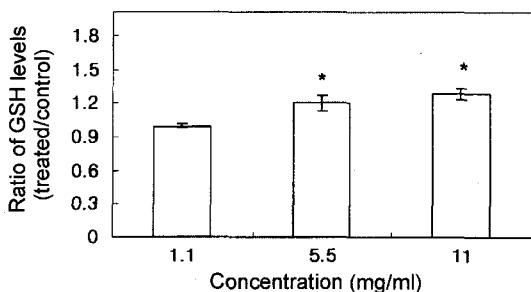
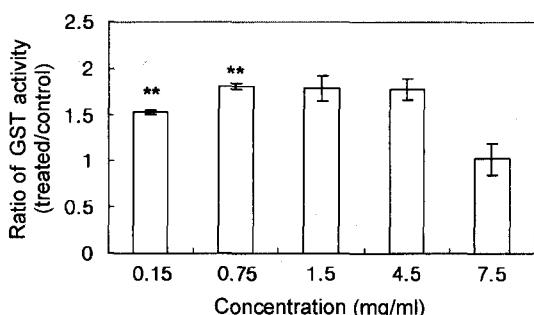


Fig. 3. Increase of glutathione levels by XFE in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. Experimental details are described in Materials and Methods. Values are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). \*:  $p<0.05$  as compared to control.

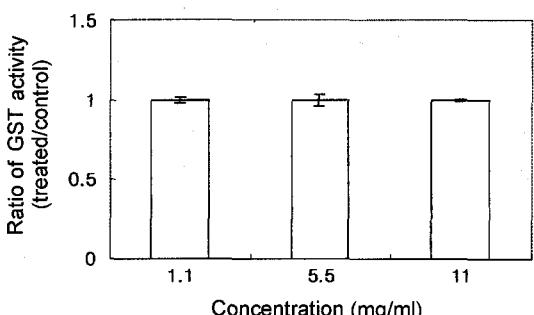
**세포내 glutathione 생성 유도 효과** - 창이자 에탄올 추출물에 의한 glutathione 생성을 Hepa1c1c7 세포에서 살펴본 결과, 저농도에서는 glutathione 함량에 변화를 보이지 않았지만 7.5 mg/ml에서 1.3배의 증가



**Fig. 4.** Increase of glutathione levels by PSE in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. Experimental details are described in Materials and Methods. Values are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). \* $p<0.05$  as compared to control.



**Fig. 5.** Induction of glutathione S-transferase by XFE in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. Experimental details are described in Materials and Methods. Values are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). \*\*:  $p<0.01$  as compared to control.



**Fig. 6.** Induction of glutathione S-transferase by PSE in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. Experimental details are described in Materials and Methods. Values are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

를 나타내었다(Fig. 3). 꿀풀하고초 에탄을 추출물에서는 5.5 mg/ml에서 1.2배, 11 mg/ml에서 1.3배의 glutathione 함량 증가효과가 있었다(Fig. 4). 이 결과에 의하면 한국산 생약 창이자와 꿀풀하고초의 에탄을 추출물은 GSH의 유의성 있는 증가 효과가 있었다.

Glutathione S-transferase 유도 효과 - GST  $\alpha$ , GST  $\mu$ 를 발현하는 Hepa1c1c7 세포를 이용하여 세포 내 glutathione S-transferase 유도 효과를 관찰한 결과, 창이자 에탄을 추출물 0.15 mg/ml에서 1.5배, 0.75 mg/ml, 1.5 mg/ml과 4.5 mg/ml에서 조절군에 비해 1.8배의 높은 유도율을 보였으나(Fig. 5), 꿀풀하고초 에탄을 추출물은 유의성 있는 GST 활성유도를 확인할 수 없었다(Fig. 6).

## 고 칠

암예방(chemoprevention)은 발암과정(carcinogenesis)을 억제시키거나 암화된 것을 전환(reversion)시키는 작용이다. 현재 암예방 물질에 대한 많이 연구가 진행되고 있으며, 효과적인 암예방 물질(chemopreventive agents)의 연구를 위해 생화학적 표식자(biochemical markers)를 사용하고 있다.<sup>15)</sup> 이 표식자들은 암화과정시 발암물질의 대사물질과 그의 부산물과도 반응하며 다양하고 많은 발암기전을 저해할수록 효과적인 암예방물질로 간주된다. QR은 GST와 UDP-glucuronosyl transferase와 같이 phase II enzyme으로 외부의 독성이 있는 물질과 돌연변이물질(mutagen), 발암물질(carcinogen)로부터 세포를 보호한다. QR은 세포질에 주로 분포되어 있으며, quinone과 quinone-imine을 환원시켜서 세포에 대한 독성을 제거한다.<sup>16,17)</sup> 그러므로 phase II enzyme 생성의 유도는 곧 항암활성(anticarcinogenic activity)으로 여겨진다.<sup>18,19)</sup> 창이자 및 꿀풀하고초 에탄을 추출물을 생쥐의 간암세포 Hepa1c1c7에 처리하였을 때 창이자 에탄을 추출물은 농도의존적으로 QR 생성을 유도하여 7.5 mg/ml 농도에서 2.6배의 QR 생성 유도율을 보였고, 꿀풀하고초 에탄을 추출물은 11 mg/ml에서 2.0배의 유도율을 나타내었다. 그러므로 창이자와 꿀풀하고초 에탄을 추출물은 돌연변이원성, 발암물질의 대사과정시 생성된 세포내 독성 및 DNA 손상을 제거할 것으로 추측된다. 이에 생약 창이자와 꿀풀하고초에 의한 다른 종류의 phase II enzyme, 즉 UDP-glucuronosyl transferase의 생성 유도 및 활성 변화의 측정은 이들 생약재의 암예방 물질로서의 가능성 연구에 도움이 될 것이다.

GSH은 세포내 다양한 기능을 가지고 있으며 특히 독성이 강한 물질을 제거해 준다. 대부분의 외부의 화학물질은 cytochrome P450-dependent monooxygenase system에서 대사되어서 전자친화적물질, epoxides 또

는 매우 독성이 강한 물질로 변화된다. 이 물질들은 glutathione과 직접적으로 결합하거나 GST에 의해 촉매되는 과정을 거쳐 결합하기도 한다. 이 반응들은 무독성화과정으로 세포내 glutathione이 고갈되면 독성이 강한 대사물질들이 만들어져 세포내 손상을 유발시켜 mutagenesis나 carcinogenesis를 일으킨다. He-palclc7에 창이자 및 꿀풀하고초 에탄을 추출물을 처리하였을때, GSH의 유의성 있는 함량증가를 확인할 수 있었으며, 창이자 에탄을 추출물은 GST 생성을 유도하였다. 위의 결과로 창이자 및 꿀풀하고초 에탄을 추출물은 세포내 GSH 생성을 촉진하여 세포내 발생한 산화물질과 기타의 독성물질을 무독하게 할 것으로 추측된다.

## 결 론

창이자 및 꿀풀하고초 에탄을 추출물의 암억제 효과를 살펴보기 위하여 QR 생성 유도를 측정한 결과, 창이자 및 꿀풀하고초 에탄을 추출물에 의하여 QR 생성이 유도되었으며, GSH 함량 변화를 살펴 본 결과, 창이자 에탄을 추출물은 4.5 mg/ml와 7.5 mg/ml에서 GSH 생성을 증가시켰으며, 꿀풀하고초 에탄을 추출물에서도 유의성 있는 GSH 증가를 확인할 수 있었다. 또한, 창이자 추출물에 의하여 phase II detoxification 효소인 GST의 생성도 유도되었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 창이자 및 꿀풀하고초 에탄을 추출물은 효과적으로 세포내 QR의 생성을 및 GSH와 GST 양을 증가시켜 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Wattenberg, L. W. (1985) Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* **45**: 1-8.
- 李時珍(1992) 本草綱目, 1102-1104, 人民衛生出版社, 北京.
- 安德均(1982) 韓藥臨床應用, 108-110, 成輔社, 서울.
- 康秉秀(1991) 本草學, 169, 永林社, 서울.
- 鄭普燮(1990) 圖解韓藥大辭典, 858-860, 永林社, 서울.
- 김동일(1991) 韓藥集成方, 152, 韶江出版社, 서울.
- 김중완, 최혜경, 손윤희, 임종국, 남경수(1999) 금은화 약침액의 암예방효과. 생약학회지 **30**: 261-268.
- 한상훈, 조경희, 최혜경, 임종국, 손윤희, 이임태, 남경수(1999) 감두 약침액의 암예방효과. 생명과학회지 **9**: 684-691.
- 김영기, 조경희, 손윤희, 최혜경, 김소연, 임종국, 남경수(2000) 당귀 약침액의 암예방효과. 약학회지 **44**: 283-292.
- 윤성복, 조경희, 손윤희, 남경수, 임종국(2001) 생약 약침액에 의한 phase II 효소 활성 유도. 대한경락경혈학회지 **18**: 1-9.
- 문진영, 임종국, 최혜경, 이임태, 이항우, 남경수(1999) 시호 약침제제가 생쥐의 면역활성에 미치는 영향. 생약학회지 **30**: 115-122.
- 박경미, 조경희, 손윤희, 임종국, 남경수(2000) 감초 약침액의 항암 및 면역활성에 미치는 영향. 생약학회지 **31**: 7-15.
- Griffith, O. W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**: 207-212.
- Habig, W. H., Pabst, M. H. and Jacoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferase; the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**: 7130-7137.
- Sheela, S., Jill, K. S., Gary, J. K. and Vernon, E. S. (1994) Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis, *Cancer Res.* **54**: 5848-5855.
- Lind, C., Hochstein, P. and Ernster, L. D. (1982) T-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**: 178-185.
- Smart, R. C. and Zannoni, V. G. (1984) DT-diaphorase and peroxidase influence the covalent binding of the metabolites of phenol, the major metabolite of benzene, *Mol. Pharmacol.* **26**: 105-111.
- Talalay, P. M., DeLo, J. and Prochaska, H. J. (1987) Cancer biology and therapeutics, In Cory J. G. and Szentivani A. (eds.), 197-216, Plenum, New York.
- Talalay, P. and Prochaska, H. J. (1987) DT-Diaphorase: A quinone reductase with special functions in cell metabolism and detoxification. In Ernster L. R., Estabrook W., Hochstein P. and Orrenius S. (eds), 61-66, Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.

(2001년 9월 13일 접수)