

黃耆 藥鍼液의 Glutathione S-transferase 와 NAD(P)H: Quinone Reductase 유도

류 준 선¹ · 임 종 국¹

동국대학교 한의과대학 경혈학교실¹

Induction of Glutathione S-transferase and NAD(P)H:Quinone Reductase by *Astragali Radix* Aqua-acupuncture Solution

Jun-Seon Ryu¹ · Jong-Kook Lim¹

Dept. of AM-Pointology, College of Oriental Medicine, Dongguk University¹

Abstract

Induction of phase II enzymes such as quinone reductase (QR) or glutathione S-transferase (GST) is considered a major mechanism of protection against initiation of carcinogenesis. This study was designed to investigate the potential of *Astragali Radix* Aqua-acupuncture Solution (ARAS) to induce phase II enzymes and glutathione (GSH) in murine hepatoma cells grown in microtiter plate wells. ARAS was potent inducers of QR activity. ARAS was induced about 2.6-fold at concentration of 5×. In addition, GST activity was increased with ARAS. GSH levels were increased about 1.2-fold with ARAS at concentration of 0.1×. These results suggested that ARAS may act as blocking agents against carcinogenesis by induction of phase II marker enzymes.

Key Words : *Astragali Radix* Aqua-acupuncture Solution (ARAS), Phase II detoxifying enzymes

서 론

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 있다.^{1,2)} 암예방 물질은 발암 물질의 대사과정

에 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 QR, GST 활성유도, glutathione생성 등의 측정이 있다.³⁾ 이러한 암예방물질은 기존의 항암제가 가지고 있는 치료후 예후불량, 재발 및 합병증 등의 부작용을 극복할 수 있는 새로운 치료법으로 각광받고 있다.

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

黃耆 (*Radix Astragali*)는 補脾升陽 益衛固表 益氣昇陽 托瘡生氣的 效果가 있다^{4,5)}. 許 등

은⁶⁾ 黃耆가 癰疽 瘡瘍 壯筋骨長肉 治諸經之痛 癯瘦 癱瘓 腫脹 一切癌 陰疽 陰瘡 癰疽久不愈 久敗瘡 水腫積成 逐五臟惡血 癥瘕 癰癥 癭氣 腸風血崩 肺癰 吐血不止 등에 臨牀的인 效能을 報告하였다 劉등은⁷⁻⁸⁾ 黃耆의 經口投與로 肺癌 胃癌 膀胱癌 子宮頸口癌 食管癌 肝癌 鼻咽癌에 有效함을 發表하고 있다.

洪 등이⁹⁻¹¹⁾ 黃耆藥鍼의 免疫活性에 미치는 影響과 毒性에 관한 論文이 發表한 바 있으나 癌豫防 效果에 대하여는 아직 보고된 바 없어 본 연구에서는 黃耆를 藥침액으로 제조하여 암 예방실험에 착수하게 되었으며 QR 생성 유도, GSH 생성 및 GST 활성에 관한 실험을 통하여 그 효과를 살펴보았다.

실험재료 및 방법

시약

Minimum essential medium eagle's (MEM), flavin adenine dinucleotide (FAD), 3,4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dicumarol, glucose-6-phosphate, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADP), glucose-6-phosphate dehydrogenase, menadione, laury sulfate (sodium dodecyl sulfate), crystal violet, NADP⁺, chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), glutathione reductase, triton X-100, Na-EDTA, bovine serum albumin (BSA), tween-20, 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), cupric sulfate, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco사 (Grand Island, NY, U. S. A) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 특급 시약을 구입, 사용하였다.

세포배양

계대 보존 중인 생쥐의 간암세포인 Hepalclc

7 cell을 10% fetal bovine serum이 포함된 MEM을 배양액으로 하여 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 37°C)에서 배양하였고, 이들 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

생약 약침액 제조

본 실험에 사용된 황기는 강원도 정선산 6년근 황기로 동국대학교 부속병원 한방병원에서 구입하였다. 약침액은 수제 알콜침법에 의하여 조제하였다¹²⁾. 황기 60 g 정량하여 증류수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 ml을 감압농축하였다. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol을 가하여 75%, 85%, 95%의 ethanol 용액이 되게 하여 침전물을 여과하고, pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μ m, Whatman, Germany)로 여과하였다. 그리고 3차 증류수를 가하여 200 ml이 되게 하여 1×의 약침액으로 사용하였다.

QR 생성 측정

QR 생성 유도 효과는 Prochaska¹³⁾ 등의 방법에 따라 측정하였다. 1×10^4 개의 Hepalclc7 세포 (mouse hepatoma)를 200 μ l의 10% FBS가 첨가된 minimum essential medium eagle's (MEM) 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후, 새 배양액 190 μ l와 약침액 및 열수추출액 (0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×)을 10 μ l씩 각 well에 가하였다. 세포를 약침액이 첨가된 배양액에서 48시간 배양 후 배양액을 버리고 세포를 용해시켰다. 200 μ l reaction mixture (7.5 ml of 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 100 mg of bovine serum albumin, 1 μ l of 1.5% tween-20, 0.1 ml of 7.5 mM flavin adenine

dinucleotide, 1 ml of 150 mM glucose-6-phosphate, 90 μ l of 50 mM β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), 300 U of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45 mg 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT), 150 μ l of 50 mM menadione in 150 ml dH₂O를 각 well에 넣고 5분간 반응 후 0.3 mM dicoumarol (in 0.5% dimethyl sulfoxide) 과 5 mM potassium phosphate가 들어있는 용액 50 μ l를 첨가하여 microplate reader를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Crystal violet assay

세포수에 대한 QR 생성량을 측정하기 위해 앞 실험과 같이 96-well plate에 Hepalcl7 cell을 접종시키고 시료를 처리하여 48시간 배양 후 배지를 버렸다. 0.2% ethanol에 녹아 있는 0.2% crystal violet에 10분간 담근 후 2분간 흐르는 물에 씻어 준다. 0.5% SDS를 50% ethanol에 녹여 각 well에 200 μ l씩 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

GSH 생성량 측정

세포내 총 GSH 함량은 Griffith¹⁴⁾의 방법을 변형시켜서 96-well plate에서 측정하였다. 1×10^4 의 세포를 200 μ l MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후 10 μ l의 각각의 약침액 및 열수추출액이 포함된 배지 200 μ l를 각 well에 가하였다. 시료처리 후 48시간 뒤 배지를 버리고 PBS로 세번 씻고 세포를 용해시킨 후 40 μ l stock buffer (125 mM sodium-phosphate, 6.3 mM ethylenediaminetriacetic acid, pH 7.4)를 가하고 170 μ l의 reaction mixture (20 μ l의 6 mM 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) in stock buffer, 10 μ l의 glutathione reductase solution (50 units in 10 ml stock

buffer), 140 μ l의 the NADPH-generating system (2.5 ml의 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 330 μ l의 150 mM glucose-6-phosphate, 30 μ l의 50 mM NADP⁺, 100 units의 glucose-6-phosphate dehydrogenase in 50 ml distilled water)와 반응시켰다. 상온에서 5분간 shaking 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 함량은 GSH 활성 측정을 한 plate와 같이 처리한 plate에서 bicinchoninic acid solution protein kit를 사용하여 측정하였다.

GST 생성량 측정

GST α 및 GST μ 를 발현하는 Hepalcl7 세포를 사용하여 GST 활성 측정을 하였다¹⁵⁾. Hepalcl7 세포를 96-well plate의 각 well에 1×10^4 cells을 접종시키고 37°C, CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후 새 배양액 190 μ l와 각각의 약침액 및 열수추출액 (0.1 \times , 0.5 \times , 1 \times , 3 \times , 5 \times)을 10 μ l씩 각 well에 처리하였다. 세포를 시료처리한 배양액에서 48시간 배양 후 PBS로 3회 씻고 freeze-thaw를 3회 반복하여 세포를 용해시켰다. GST 활성 측정을 위해 100 μ l reaction mixture (2.5 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.5)를 첨가하고 1분간 shaking 한 후 405 nm에서 3분간 흡광도의 증가를 microplate reader에서 측정하였다. 단백질 함량은 GSH 활성 측정을 한 plate와 같이 처리한 plate에서 binchinonic acid solution protein kit를 사용하여 측정하였다.

통계학적 처리

실험결과는 통계처리를 하여 평균±표준편차로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정은 Student's t-test를 수행하여 결정하였다.

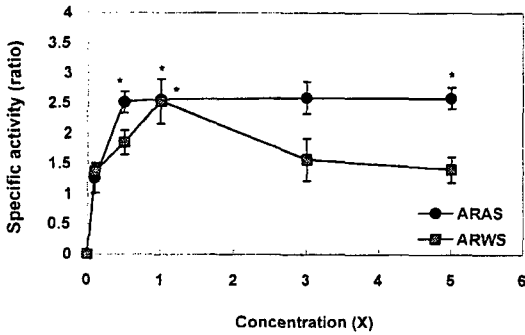


Figure 1. Effect of *Astragali radix* aqua-acupuncture solution (ARAS) and *Astragali radix* Water-extracted solution (ARWS) on induction of quinone reductase activity in murine hepatoma Hepalcl7 cells. Cells were treated with ARAS and ARWS for 48 hours and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean of three separate experiments. The value of each group statistically significant as compared with control (* : $p < 0.05$).

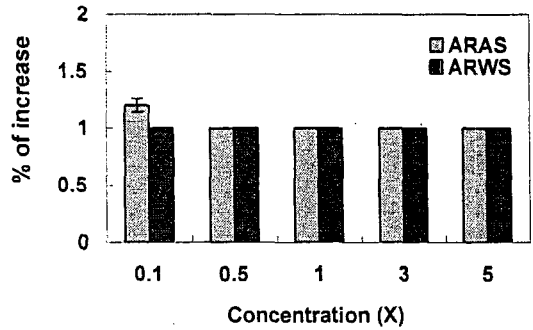


Figure 2. Induction of glutathione level by ARAS and ARWS in murine hepatoma Hepalcl7 cells. Cells were treated with ARAS and ARWS for 48 hrs, and the change in the levels of glutathione was measured. Each point represents the mean of three separate experiments.

지 않았으며, 황기 열수추출액에서는 실험에 사용된 모든 농도에서 GSH 생성이 없었다 (Fig. 2).

결 과

QR 생성에 미치는 영향

황기 약침액의 QR 생성의 유도율을 측정 한 결과, 0.1×농도에서 대조군에 비하여 1.3배 증가를 보였으며, 1×농도에서 2.56배, 5×에서 가장 높은 수치인 2.59배의 생성 유도율을 보였다. 열수추출액에서는 1×에서 2.5배로 가장 높은 유도율이 나타났으며 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 나타냈고, 약침액에서는 농도가 높아질수록 QR 생성 유도율이 증가하였다 (Fig. 1).

GSH 생성에 미치는 영향

황기 약침액에 의한 glutathione 생성을 살펴본 결과, 0.1×농도에서만 1.2배의 양이 생성되었으며 다른 농도에서는 GSH 양이 생성되

GST 생성에 미치는 영향

황기 약침액에 의한 GST 활성도를 관찰한 결과, 0.1×, 0.5×에서 각각 1.3배, 1.6배의 증가를 나타내었고, 황기 열수추출액에서는 모든 농도에서 GST 활성을 나타내지 않았다 (Fig. 3).

고 찰

암예방은 암화 과정을 연장, 억제시키거나 암화된 것을 전환 (reversion)시키는 작용이다. 현재 암예방 물질에 대한 많이 연구가 진행되고 있으며, 효과적인 암예방 물질 (chemopreventive agents)의 연구를 위해 생화학적 표식자를 사용하고 있다. 이 표식자들은 암화과정 시 발암물질의 대사물질과 그의 부산물과도 반응하며 다양하고 많은 발암기전을 저해할 수 있는 효과적인 암예방 물질로 간주된다. 이러한 표식자들에는 QR, GSH, GST등이 사용

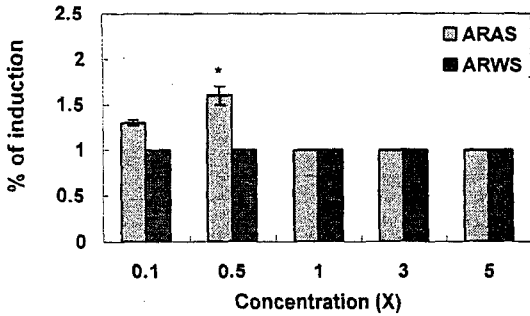


Figure 3. Induction of glutathione S-transferase by ARAS and ARWS in murine hepatoma Hepalcl7 cells. Cells were treated with ARAS and ARWS for 48 hrs, and the change in the levels of glutathione S-transferase was measured. Each point represents the mean of three separate experiments. The value of each group statistically significant as compared with control (* : $p < 0.05$).

되고 있다. QR는 세포질에 주로 분포되어 있으며, quinones과 quinoneimines를 환원시켜서 세포에 대한 독성을 제거한다¹⁶⁾. QR은 GST와 UDP-glucuronosyl transferase와 같이 Phase II enzyme으로 외부의 독성이 있는 물질과 돌연변이원성 발암물질로부터 세포를 보호한다. Phase II enzyme 생성의 유도는, 곧 항암활성 (anticarcinogenic activity)으로 여겨진다¹⁷⁾.

황기 약침액을 생쥐의 간암세포 Hepalcl7에 처리하였을 때 실험에 사용된 모든 농도에서 QR 생성 유도율을 보였고, 5X 농도에서 2.6배의 가장 높은 QR 생성 유도율을 나타내었다. 황기 약침액의 농도가 높아짐에 따라 QR 유도율이 농도 의존적으로 유도된 바 황기 약침액은 돌연변이원성, 발암물질의 대사과정시 생성된 quinone에 의한 세포내 독성 및 세포내 DNA손상을 없애 주어 발암물질의 종양화효과 (neoplastic effect)를 막아 줄 것으로 추측된다.

GSH은 세포내 다양한 기능을 가지고 있으며 특히 독성이 강한 물질을 제거해준다. 대부

분의 외부의 화학물질은 cytochrome P-450-dependent monooxygenase system에서 대사되어 전자친화적 물질, epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질이 된다¹⁸⁾. 이 물질들은 GSH과 직접적으로 결합하거나 GST에 의해 촉매되는 과정을 거쳐 결합하기도 한다. 이 반응들은 무독성과정으로 세포내 GSH이 고갈되면 독성이 강한 대사물질들이 만들어져 세포내 손상을 유발시켜 mutagenesis, carcinogenesis를 일으킨다.

황기 약침액은 저농도인 0.1X에서 1.2배의 GSH 생성율을 나타내었고, GST assay의 경우 1.6배의 GST 생성율을 보였다. 위의 결과로 황기 약침액은 세포내 GSH 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 level을 증가시켜 화학물질에 의한 발암을 저해한다고 보고되었다¹⁹⁾. 이에 각각의 약침액에 의해 증가한 GSH은 산화적인 유리의 공격으로부터 세포를 보호하고 DNA에 결합하는 것을 막아주어 mutagenesis 또는 carcinogenesis를 저해할 것으로 여겨진다.

요 약

발암물질을 무독화시키는 QR 생성 유도를 살펴보기 위하여 황기 약침액 및 열수추출액을 생쥐의 간암세포인 Hepalcl7에 처리하여 측정된 결과, 황기 약침액의 농도를 증가시킬수록 많은 QR 생성율을 보였으며, GSH 생성이 증가하였고, GST 생성 또한 증가하였다.

참고문헌

1. Chung, Y.T., Park, S.T., Mum, Y.J., Kim, J.M., Kim, J.J., Choi, M.K., Han, D.S. and Kim, J.B. *J. Wonkwang Med.*

- Sci. 1987 ; 3, 13.
2. Seo, J.D., Lee, D.K. and Um, I.W. *J. Wonkwang Dental Research Institute* 1992 ; 2, 55.
 3. Sheela, S., J. K. Stutzman, G. J. Kelloff, and V. E. Steele. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* 1994 ; 54 : 5848-5855.
 4. 錢伯文 : 腫瘤的辨證施治, 上海, 上海技術出版社, pp.1-10, 1980.
 5. 常敏毅 : 抗癌本草, 湖南省, 湖南科學技術出版社, pp.256-257, 1987.
 6. 許 浚 : 東醫寶鑑, 大星文化社, p.143, 1981.
 7. 劉春安 : 抗癌中草藥大辭典, 湖北科學技術出版社, pp.903-909, 1994.
 8. 張民床 : 抗腫瘤中草的臨床應用, 人民衛生出版社, pp.406, 407, 1998.
 9. 洪旼燁 : 신수혈의 침자극과 황기약침이 실험용 생쥐의 면역활성물질인 IL-1 α 의 遺傳子 發現에 미치는 影響, 동의병리학회지, 1999 ; 13 (2) : 33-40.
 10. 裴元永 : 黃耆水鍼이 Methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 1994 ; 15 (1) : 49-66.
 11. 崔旼燁 : 藥鍼用 黃耆抽出液의 急性毒性에 관한 研究. 大韓鍼灸學會誌, 1995 ; 16(1) : 179-187.
 12. 錢百炎 : 中草藥主射劑, 上海, 上海科學技術出版社, p 71-132, 1981.
 13. Prochaska, H. J. and A. B. Sanamaria. Direct measurment of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* 1988 ; 169 : 328-336.
 14. Griffith, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 1980 ; 106 : 207-212.
 15. Habig, W. H., M. H. Pabst and W. B. Jacoby. Glutathione S-transferase : the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974 ; 249: 7130-7137.
 16. Lind, C., P. Hochstein and L. D. Ernster. T-diaphorase as a quinone reductase : a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1982 : 216 ; 178-185.
 17. Talalay, P., M. J. DeLo and H. J. Prochaska. 1987 : 197-216. In Cory. J. G. and A. Szentivani(ed.), *Cancer Biology and Therapeutics*, Plenum. New York.
 18. Jollow, D. J. and C. Smith. Biochemical aspects of toxic metabolites formation, detoxification and covalent binding, 1977 ; 42-59, Kocsis, R. Snyder and H. Vainio(ed.), *Biologically Reactive Intermediates*, Plenum Press, New York.
 19. Cerutti, P. A. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985 ; 227: 375-381.