

## 石菖蒲 藥鍼液의 癌 豫防 관련 효소 유도 효과

盧 東 一<sup>1</sup> · 林 鍾 國<sup>1</sup>

<sup>1</sup>동국대학교 한의과대학 경혈학교실

### Effects of *Acori Graminei* Rhizoma Aqua-acupuncture Solution(AGRAS) on Induction of Cancer Chemopreventive Enzymes

Dong-Il Roh<sup>1</sup>, Jong-Kook Lim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Dongguk University

#### Abstract

Induction of phase II enzymes such as quinone reductase (QR) and glutathione S-transferase (GST) is considered a major mechanism of protection against initiation of carcinogenesis. The present study was performed to evaluate the chemopreventive activity of *Acori Graminei* Rhizoma aqua-acupuncture solution (AGRAS) and *Acori Graminei* Rhizoma water-extracted solution (AGRWS) by measuring the induction of phase II enzymes. AGRAS and AGRWS are potent inducers of quinone reductase activity in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. The levels of GSH and GST was increased slightly with AGRAS and AGRWS. These results suggest that AGRAS and AGRWS may act as blocking agents against carcinogenesis by induction of phase II enzymes.

**Key words :** *Acori Graminei* Rhizoma, phase II enzyme, Quinone Reductase, Glutathione S-transferase, Glutathione

#### I. 서 론

惡性腫瘍 *malignant neoplasia*에 대하여 病理學的으로 癌이라 規定하고 있으며 빠른 浸潤性 成長과 體內 各 部位로의 擴散 및 轉移와 같은 特異性을 지니고 있어 生命의 危險을 招來할 뿐만 아니라 最近 人類에게 있어서 가장 큰 危險性 있는 全身性 疾患으로 認識하게 되었고 癌은 細胞分裂을 支配하는 調節機能의 缺陷이나 惡性腫瘍 遺傳子를 抑制하는 能力이 喪失되므로서 發生하는 非正常的인 細胞의 增殖

을 말한다<sup>1)</sup>. 東洋醫學에서 腫瘍의 發生機轉은 辨證論證의 原則과 審證求因에 根據하여 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 病理機轉으로 主張하고 있다<sup>2)</sup>. 癌에 해당하는 疾病名은 腫瘍 癰疽 腫毒 積聚 嚴肺癰 肝癰 噎膈 癥瘕 瘰癧等에 屬하며 良性腫瘍과 惡性腫瘍이 包含되었다고 하였다<sup>3-4)</sup>. 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의 一種으로 藥鍼療法, 水鍼療法, 穴位藥物注射療法이라고도

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

한다<sup>5)</sup>.

한편 암에 관련된 제재 개발연구는 발병된 암을 치료할 수 있는 항암제 개발과 암의 진행 과정을 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 물질의 개발이 중점적으로 이루어지고 있다<sup>6,7)</sup>. 암 예방 물질은 발암 물질의 대사과정에 변화를 가져오거나 암화 과정(carcinogenesis)시 생성되는 대사물질 또는 대사과정 시 생성되는 부산물과 반응하여 상호작용을 일으키거나 특정 효소의 발현 및 기능을 변화시키므로 이러한 특징을 이용하여 암 예방 물질을 개발, 조사할 수 있다<sup>8)</sup>. 대표적인 것으로 QR, GST 활성유도, glutathione생성 등의 측정이 있다<sup>6)</sup>.

QR은 간세포에서 주로 생성되는 phase II enzyme [glutathione S-transferase (GST), UDP-glucuronosyl transferase]의 한 종류로 quinone을 환원시켜 무독(detoxify)하게 만들고 세포내에 유도되어 발암물질에 의해 일어나는 돌연변이(mutation)와 종양효과(neoplastic effect)를 막아주고 발암 물질을 무독하게 하는 역할을 한다<sup>9)</sup>.

Glutathione은 세포 내에서 다양한 기능을 가지고 있으며 외부의 독성물질이 세포내 침입했을 때 직접 반응하거나 glutathione S-transferase에 의해 독성물질과 결합하여 무독하게 하는 기능을 가지고 있다. 또한 glutathione은 자연적인 항산화제로 발암과정시 세포를 보호한다. glutathione의 전자친화적인 성질은 외부물질이 DNA와 결합하여 암을 유발하는 것을 막아주며 GST는 유리기(free radical)를 파괴하여 반응성이 높은 산소들로부터 세포를 보호한다고 보고되고 있다<sup>10)</sup>.

石菖蒲 *Acori Graminei* Rhizoma 는 菖蒲科에 속한 常綠多年生 草本인 根莖으로 本草綱目에 收錄된 이후 性은 溫하고 味는 辛 無毒하고 歸經은 心 脾 胃 肝經에 작용하는 藥物로 癰疽 瘡疥 崩血 心腹痛 補五臟 散癰腫 前粒腺肥大症 痴呆 濕阻腫滿 大風瘡 消腫 散積 行瘀 化膿性

癰瘍 解巴豆大戟毒 등의 應用되고 開竅寧神 化濕和胃의 效能이 있다고 하였다<sup>11-13)</sup>. 劉等<sup>14)</sup>은 石菖蒲가 胸部腫瘤 癰疽腫毒 癰瘡 惡瘡疥癩 散癰腫 除痰消積 皮膚癌 鼻咽癌 內腫癌 甲狀腺 腫瘤 食管癌 諸食積 氣積 血積 鼓脹 子宮頸癌 陰疽 腫瘤 敗毒抗癌 化濕消腫 腦腫瘤 腦轉移癌 胃癌 肺癌 등에 대하여 經口 投與의 臨床效能을 報告한바 있으나 아직은 石菖蒲 藥鍼液의 抗癌 效能에 대하여 實驗報告가 없어 本實驗에 着想하게 되었다.

본 논문에서는 석창포 약침액과 열수추출액을 조제하고 이것을 이용하여 quinone reductase(QR) 유도효과, glutathione S-transferase (GST) 생성을 및 세포내 glutathione(GSH) 함량등을 측정하여 석창포의 암 예방 효과를 검정하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 시약및 시료

Minimum essential medium eagle's (MEM), antibiotics, flavin adenine dinucleotide (FAD), 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), glucose-6-phosphate,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $\beta$ -NADP), glucose-6-phosphate dehydrogenase, menadione, laury sulfate (sodium dodecyl sulfate), dicoumarol, crystal violet, 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 Sigma사 (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco사 (Grand Island, NY, U.S.A) 제품을 사용하였다. 기타시약은 세포배양용 및 특급 시약을 구입, 사용하였다.

본 실험에 사용된 석창포는 동국대학교 부속 병원 한방병원에서 구입한 뒤 약침액은 수제

알콜침법<sup>15)</sup>에 의하여 조제하였으며, 3×, 5× 약침액은 1×을 감압농축하여 사용하였다. 그리고 0.1×, 0.5× 농도는 증류수로 희석하여 조제하였다. 열수추출액 또한 김<sup>16)</sup> 등이 보고한 바와 같이 조제하여 본 실험에 사용하였다.

## 2. 세포배양

계대 보존 중인 생쥐의 간암세포인 Hepalclc 7 cell을 10% fetal bovine serum이 포함된 MEM을 배양액으로 하여 CO<sub>2</sub> 배양기 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 배양하였고, 이들 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

## 3. NAD(P)H:quinone oxidoreductase (QR) 생성 측정

세포수에 대한 QR 생성 및 유도효과는 한<sup>17)</sup> 등의 방법으로 실시하였다. NAD(P)H:quinone-oxidoreductase 활성은 분당 환원된 MTT의 흡광도와 crystal violet의 흡광도에 의해 산출하였고, QR의 활성 유도는 석창포 약침액이나 열수추출액을 처리하지 않은 대조군의 QR 활성에 대한 시료에 의한 활성의 비로 계산하였다.

## 4. 세포내 glutathione 함량 측정

세포 내의 총 glutathione 함량은 윤<sup>18)</sup> 등의 방법으로 측정하였다. GSH 함량은 GSH 표준곡선으로 계산하였고, nmol/mg protein으로 표시하였으며, GSH 함량의 비는 대조군에 의한 GSH 양과 시료에 의해 생성된 GSH 양의 비율로 측정하였다. 세포내 총 단백질은 bincinchonic acid protein kit를 사용하여 BSA를 표준 단백질 용액으로 이용한 표준 검량선을 구하고 그 양을 산출하였다<sup>19)</sup>.

## 5. 세포내 glutathione S-transferase 생성량 측정

GST 활성 측정은 윤<sup>18)</sup> 등의 방법으로 실시하여 3분간 흡광도의 증가를 405 nm에서 측정하였다. GST 활성은 slop/min/mg protein으로 계산하여 석창포 약침액을 처리하지 않은 대조군의 GST 활성에 대한 시료를 처리한 GST 활성의 비로 나타내었으며, 세포내 총 단백질은 위와 동일한 방법으로 측정하여 그 양을 산출하였다.

## 6. 통계학적 처리

실험결과는 평균±표준편차 (Standard deviation, SD)로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정을 위해 Student's t-test를 수행하여 결과치는 p값이 0.05 미만을 통계학적으로 의미 있는 것으로 간주하였다.

# Ⅲ. 실험결과

## 1. QR 생성에 미치는 영향

석창포 약침액의 QR 생성의 유도율을 측정 한 결과, 0.1×, 0.5×, 1×, 3×농도에서 대조군에 비하여 1.1배, 1.6배, 1.8배, 2.4배의 증가를 보였으며, 열수추출액의 경우, 0.1×, 0.5×, 1×, 3×에서 각각 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배의 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이 결과에서 석창포 약침액과 열수추출액은 QR은 생성에 효과가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1).

## 2. GSH 생성에 미치는 영향

석창포 약침액과 열수추출액에 의한 glutathione 생성을 살펴본 결과, 약침액에서는 3×에서 1.24배의 GSH 유도를 관찰할 수 있었으며, 열수추출액에서는 3×농도에서 1.1배의 양이 생성되었다 (Fig. 2).

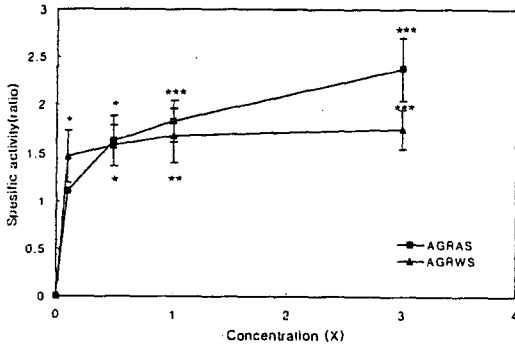


Figure 1. Effect of *Acori Graminei* Rhizoma aqua-acupuncture solution (AGRAS) and *Acori Graminei* Rhizoma water-extracted solution (AGRWS) on induction of quinone reductase activity in murine hepatoma Hepalcl7 cells. Values are mean  $\pm$ SD (n=3). \* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.005 as compared to control.

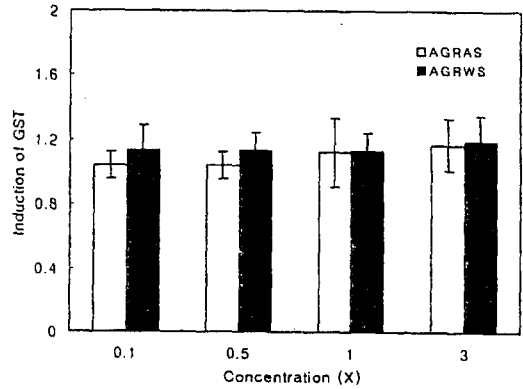


Figure 3. Induction of glutathione S-transferase by *Acori Graminei* Rhizoma aqua-acupuncture solution (AGRAS) and *Acori Graminei* Rhizoma water-extracted solution (AGRWS) in murine hepatoma Hepalcl7 cells. Values are mean  $\pm$ SD (n=3).

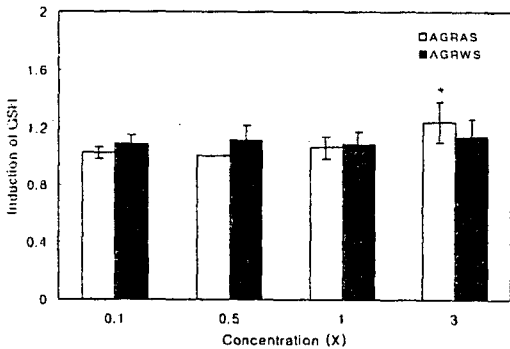


Figure 2. Induction of glutathione level by *Acori Graminei* Rhizoma aqua-acupuncture solution (AGRAS) and *Acori Graminei* Rhizoma water-extracted solution (AGRWS) in murine hepatoma Hepalcl7 cells. Values are mean  $\pm$ SD (n=3). \* : p<0.05 as compared to control.

### 3. GST 생성에 미치는 영향

석창포 약침액과 열수추출액에 의한 GST 활성도를 관찰한 결과, 약침액 3x와 열수추출액 3x 농도에서 1.2배의 GST 활성 유도효과가 나타났다 (Fig. 3).

## IV. 고찰

본 연구에서는 석창포 약침액을 이용한 암예방 활성 중 발암과정의 blocking agents (inhibitor of tumor initiation)로서의 활성 검정을 위하여 quinone reductase (QR), glutathione S-transferase (GST), glutathione (GSH) 유도작용을 살펴보았다. QR은 간세포에서 주로 생성되는 phase II enzyme (GST, UDP-glucuronosyl transferase)의 한 종류로, quinone을 환원시켜 무독하게 만들고, 발암물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화 효과를 막아주는 역할을 한다. QR 이나 GST와 같이 phase II drug-metabolizing enzymes의 유도는 chemical stress나 carcinogenesis의 initiation에 대한 중요한 방어기작이다. 효소의 유도 패턴에 의하면 drug-metabolizing 효소를 유도하는 물질은 phase I 과 phase II 효소를 모두 증가시키는 bifunctional inducers (planar aromatic compounds)와 phase II 효소만을 증가시키는 monofunctional inducers (diphenols, thiocarbamates, isothiocyanates, 1,2-dithiol-3-thiones)이 있다. Phase I 효소

유도는 발암물질을 활성화된 발암물질(ultimate carcinogens)로 바꾸기 때문에 암 유발 위험인자이다. 그러므로 이상적인 암예방물질은 암예방활성을 가진 monofunctional 효소 유도체이다. 석창포 약침액은 Hepalcl7 세포를 이용한 *in vitro*상에서의 QR 생성 유도효과를 측정 한 결과, 3.0× 농도에서 2.4배의 QR 생성 유도율을 보였다. 그러므로 석창포 약침액은 돌연변이원성, 발암물질의 대사과정 시 생성된 quinone에 의한 독성 및 DNA 손상을 없애줄 것으로 기대된다.

환원형 glutathione (GSH) 또한 암예방물질의 스크린에 사용된다. GSH는 반응성이 있는 대사중간물로부터 세포를 보호한다. 발암과정의 개시단계에서는 glutathione의 전자친화적인 성질로 인해 외부물질이 DNA와 결합하여 암을 유발하는 것을 막아준다. 진행·촉진의 단계에서는 oxidative free radical의 공격을 제한함으로써 발암과정을 저해할 수 있다. GST는 유리기 (free radical)를 파괴하여 반응성이 높은 산소들로부터 세포를 보호한다. 석창포 약침액 및 열수추출액은 세포내에서의 QR의 생성율을 증가시켰다. 그리고 GST의 생성율을 증가 시켰는데 이것은 세포내 glutathione 생성을 촉진하여 세포내 발생한 산화물질과 기타의 독성물질을 무독하게 한 것으로 추측된다.

## V. 요 약

발암물질을 무독화시키는 QR 생성 유도를 살펴보기 위하여 석창포 약침액 및 열수추출액을 생쥐의 간암세포인 Hepalcl7에 처리하여 측정 한 결과, 석창포 약침액의 농도를 증가시킬수록 높은 QR 생성율을 보였으며, QR 활성화 유도효과 보다는 낮았지만 GSH와 GST 생성도 증가하였다.

## 참고문헌

1. 錢伯文. 腫瘤의辨證施治. 上海: 上海技術出版社. 1980 : 1-10.
2. 金重完, 林鍾國. 金銀花藥鍼液이 抗癌 및 癌豫防 效果에 미치는 影響. 韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16(2) : 281-4.
3. 林紅生. 歷代中醫腫瘤論選粹. 北京: 北京出版社. 1988 : 1, 35, 45, 162, 258, 295, 478.
4. 趙鍾寬. 消積白朮散的 抗癌 免疫增強 效果 및 Cisplatin의 腎臟毒性抑制에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1993 ; 14(2) : 282-83.
5. 南相千. 經絡原論. 서울: 實踐醫學社. 1994 : 19-39.
6. Sharma S, Jill DS, Kelloff GJ, Vernon ES. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. Cancer Res. 1994 ; 54 : 5848-55.
7. Sporn MB. Chemoprevention of cancer. Lancet. 1993 ; 342 : 1211-3.
8. Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. Cancer Res. 1992 ; 52 (Suppl.) : S2085-91.
9. Chesis PL, Levin DE, Smith MT, Ernster L, Ames BN. Mutagenicity of quinones pathways of metabolic activation and detoxification. Proc. Natl. Acad. Sci. 1981 : 1696-1700.
10. Boyland E, Chasseud CF. The role of glutathione and glutathione-S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. Adv. Cancer Res. 1979 ; 29 : 175-274.
11. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울: 大星文化社. 1991 : 201, 221.
12. 김호철. 한약약리학. 서울: 集文堂. 2001 : 411-12.
13. 徐樹楠. 中藥臨床應用大全. 中國: 河北科學技術出版社. 1999 : 571-72.
14. 陳敬章. 抗癌治驗本草. 中國: 新華書店 1994 : 230-32.
15. 錢百炎. 中草藥主射劑. 上海: 上海科學技術出版社. 1981 : 71-132.
16. 김중완, 최혜경, 손윤희, 임종국, 남경수. 금은

- 화 약침액의 암예방효과. 한국생약학회지. 1999 ; 30(3) : 261-68.
17. 한상훈, 조경희, 최혜경, 임종국, 손윤희, 이임태, 남경수. 감두약침액의 암예방효과. 생명과학학회지. 1999 ; 9(6) ; 684-91.
18. 윤성목, 조경희, 손윤희, 남경수, 임종국. 생약약침액에 의한 phase II 효소 활성화유도. 대한경락경혈학회지. 2001 ; 18(1) : 1-9.
19. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 1985 ; 150 : 76-85.