

생쥐에서 川芎 藥鍼液이 Cytochrome P450 효소 활성에 미치는 影響

한상훈¹ · 손윤희² · 남경수² · 임종국¹

동국대학교 ¹한의과대학 경혈학교실 · ²의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터

Effects of *Cnidium officinale* Makino Aqua-acupuncture Solution on the Activity of Cytochrome P450 Enzyme in Mice

Sang-Hun Han¹, Yun-Hee Shon², Kyung-Soo Nam², Jong-Kook Lim¹

¹Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine; ²Dept. of Pharmacology,
College of Medicine and Intractable Disease Research Center, Dongguk University

Abstract

The activities of phase I enzymes in the liver of mice were examined following the intragastric application of *Cnidium officinale* Makino aqua-acupuncture solution (COMAS). Treatment of mice with COMAS resulted in decreases of cytochrome P450 1A1-dependent ethoxyresorufin-O-deethylation and cytochrome P450 2E1-dependent p-nitrophenol and aniline hydroxylation activities. These findings suggest that COMAS has chemopreventive potential by inhibiting cytochrome P450 1A1 and cytochrome P450 2E1 activities in mice.

Key words : *Cnidium officinale* Makino, cytochrome P450 1A1, cytochrome P450 2E1

I. 서 론

암예방 (chemoprevention)은 기존의 항암제를 이용한 암세포의 치료라는 개념과는 전혀 다른 것으로 미국이나 일본에서도 최근에 시작된 연구분야이며, 암을 연구하는 데 있어 가장 유망한 영역의 하나가 바로 암예방이다. 근래에는 효과적인 암발생 억제물질을 연구하는 데 있어 생화학적 biomarkers를 이용하고 있다¹⁾. Biomarker란 다단계 발암과정에서 특이적으로 생성되는 물질 뿐만 아니라 비정상적인 생화학적 parameter의 변화로 발암과정의

다단계와 관련하여 각 단계별로 분류된다. 이러한 biomarker들은 blocking agents에 대한 암 개시 (initiation)단계의 biomarker로서 phase II enzyme의 유도, cytochrome P450 효소의 억제, DNA repair 유도, scavenging electropile 등이 있다. 암의 촉진 (promotion) 단계와 진행 (progression)단계의 biomarker를 이용한 suppressing agents로는 polyamine 대사 억제, protease 억제, arachidonic acid 대사 억제, differentiation 유도, oncogene 발현 억제, 산화적 DNA 손상 억제, protein kinase C (PKC) 등이 있다. 특히, cytochrome P450 효소 유도는 발암물질을 활성화된 발암물질 (ultimate carcinogens)로 바꾸기 때문에 암 유발 위험인자이다.

川芎의 기원은 미나리과 (*Umbelliferae* Ma-

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

kino)에 속한 다년생 초본인 궁궁의 根莖으로 학명이 *Cnidium officinale Makino (Lygusticum officinale)*로 性은 溫無毒하고 味는 辛苦하며 癰疽瘡瘍 痘瘡 一切血症 疼痛 氣病 一切虛損 壯筋骨 癩癧 瘡疥 腦癱 消瘀血 癥結癭癧 癩疽塊痛등에 活用하고 肝·脾·心·膽·三焦 經絡에 作用하는 歸經藥物로 報告하고 있다²⁾. 천궁의 성분은 ligustilide, butylidenephthalide, butylphthalide, cnidilide, neocnidilide, senkyunolide 이며, 풍냉으로 인한 두통,脇이나 腹의 동통, 추위로 인한 근육의 마비, 무월경, 난산치료에 이용되고 있으며, 당귀와 마찬가지로 온성의 구어혈, 보혈, 강정, 진정, 진통약으로 사용되며, 빈혈증, 냉증, 월경 불순, 월경통 등에 응용된다. 또한 대뇌활동 억제, 연수의 혈관운동 중추, 호흡중추, 척수 반사의 흥분작용, 혈압 강하, 심근 수축, 혈관 확장, 항균 작용, 정혈, 진정, 입냄새 제거에 효능이 있는 것으로 알려져 있다³⁻⁴⁾.

약침요법은 한의학에서 심이경맥, 기경팔맥의 경혈과 경외기혈, 아시혈 등의 특정수혈에 자침하여 경맥의 기능을 조절함으로써 정신기혈, 오장육부의 질병을 치료하는 침구·경혈학의 이론과, 한약의 기미 성상 작용을 살피 임상 치료 효율을 극대화시키고 약물을 인체의 기관이나 병소에 접근, 작용시키는 기전을 연구하는 본초학의 이론을 결합시킨 신침요법이다⁵⁾.

이에 본 연구에서는 川芎을 藥鍼液으로 제조하여 藥鍼液이 生體 臟器에 미치는 영향과 藥鍼液의 *in vivo*상에서의 癌豫防 效果를 살펴보았다. 특히 본 실험에서는 抗癌의 辨證論治의 病理機轉의 側面에서 經絡瘀阻 臟腑失調 氣滯瘀血 痰結濕聚 氣血虧虛를 機轉으로하여 川芎 藥鍼 藥物과 中脘 (CV12), 肝俞 (BL18)를 실험에 선택하였다. 생쥐에서의 암억제 현상을 중완혈과 임의혈에 취혈한 마우스들의 간에서 CYP 1A1과 CYP 2E1의 활성도를 측정하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물

대한실험동물센터(충북, 음성)에서 구입한 5주령의 수컷 ICR 마우스를 사용하였다. 본 대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도 22±2°C, 습도 40~60%)하에서 7-10 일간 안정화시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험 기간 중 사료와 물은 자유로 먹게 하였다.

2. 천궁 약침액

본 실험에서 사용할 천궁(*Cnidium officinale Makino*) 약침액을 제조하기 위하여 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 강원도산 천궁을 정선하여 사용하였다. Voucher specimen은 동국대학교 한의과대학 경혈학교실에 보관되어 있다. 천궁약침액 (*Cnidium officinale Makino aqua-acupuncture solution*, COMAS)은 수제 알콜침법에 의하여 조제하였다⁶⁾. 천궁 60 g을 조말하여 증류수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator(BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 ml을 감압농축하였다. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol을 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 여과한다. 그리고 3차 증류수를 가하여 200 ml이 되게 하여 1× (18.4 mg/ml)의 약침액으로 사용하였으며 10×, 5× 약침액은 1×의 약침액을 감압농축하여 사용하였고 또한 증류수나 phosphate buffered saline(PBS)를 첨가하여 0.1×, 0.5× 농도를 조제하였다.

3. 동물 실험군

실험 동물은 각 군당 마우스를 7마리로 하여 천궁약침액을 7일간 중완혈(CV12)과 간수혈(BL18)에 놓은 실험군, 비경혈인 임의혈(Blank Locus, BL)에 놓은 실험군 및 약침을 맞지 않은 대조군으로 분류하였다(Table 1.).

Table 1. Classification of Experimental Groups

Groups	Numbers of Treatment Animal	Treatment (days)	Acupuntual Point
대조군	7	7	-
실험군 1	7	7	중완혈 (CV12)
실험군 2	7	7	간수혈 (BL18)
실험군 3	7	7	임의혈 (Blank Locus, BL)

4. 마우스 조직으로부터 마이크로솜 분리

약침처리가 완료되고 24시간이 지난 후 마우스를 질식시킨 다음 복피를 절개하여 간조직을 취하였다. 간은 무균상태에서 0.15 M KCl buffer (pH 7.0)로 perfusion시킨 후 적출하고, 다시 여러번 세척한 다음 흡습지로 수분을 제거하였다. 마이크로솜 분리는 Benson 등의 방법⁷⁾에 따라 4°C에서 행하였다. 간 조직은 0.25 M sucrose 용액 (조직 g당 5.0 ml)으로 빙냉상태에서 조직균질기를 사용하여 마쇄하였다. 이 마쇄액을 원심분리 (9,000×g, 20분)시킨 후 침전물은 제거하였으며, 상층액은 1 ml당 0.25 M sucrose 용액에 녹인 0.1 M CaCl₂를 0.2 ml의 부피로 첨가하여 빙냉상태에서 30분간 방치하였다. 다시 2차 원심분리 (2,700×g, 20분)시켜 침전물을 마이크로솜으로 실험에 사용하였다.

5. Cytochrome P450 1A1의 활성화 측정

Cytochrome P450 (CYP) 1A1 활성화 측정은 간의 microsome을 이용하여 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 활성화로 측정하였다⁸⁾.

6. 4-Nitrophenol (NP) hydroxylase assay

4-NP hydroxylase 활성화는 Koop⁹⁾와 Kim and Novak의 방법¹⁰⁾으로 측정하였다. 실험군의 microsome 1 mg protein/ml을 0.1 M potassium phosphate buffer에 부유시킨 후 NADPH-generating system (1 mM NADP⁺, 9 mM glucose-6-phosphate dehydrogenase)과 함께 37°C에서 20분간 교반하면서 반응시

키고 0.5 ml의 0.6 N perchloric acid를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그리고 16,000×g에서 2분간 원심분리하고 1 ml의 상층액을 0.1 ml의 10 N NaOH와 섞은 후 4-nitrocatechol의 생성을 546 nm에서 측정하였다.

7. Aniline hydroxylase assay

Aniline hydroxylase 활성화는 Brodie와 Axelrod의 방법¹¹⁾을 이용하여 p-aminophenol 형성 측정으로 실험하였다. 4-nitrophenol hydroxylase assay와 같은 방법으로 실시한 후 0.5 ml의 0.6 N perchloric acid를 첨가하여 반응을 정지시킨다. 그리고 0.1 ml의 5% phenol in 2.5 M NaOH와 2.5 M sodium carbonate를 첨가하여 30분간 발색시킨 후 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. Cytochrome P450 1A1 활성화에 미치는 영향

마우스에 7일간 중완혈(CV12), 간수혈(BL18), 임의혈(BL)에 주사한 실험군과 약침액을 주사하지 않은 대조군의 간 microsome 분획에서의 CYP 1A1 활성을 측정한 결과, 중완혈, 간수혈과 임의혈 각각에서 21.3, 16.1과 16.5%의 효소활성 억제효과를 측정할 수 있었다 (Fig. 1).

2. Cytochrome P450 2E1 효소 활성화에 미치는 영향

천궁약침액의 경혈 주사에 의한 마우스의 CYP 2E1 활성을 측정하였다. p-nitrophenol hydroxylation과 aniline hydroxylation이 CYP 2E1의 활성측정을 위하여 사용되고 있으므로¹²⁾, 마우스에서 임의혈 중완혈, 간수혈에 의한 주사에 의한 CYP 2E1에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 CYP 2E1 특이적 기질

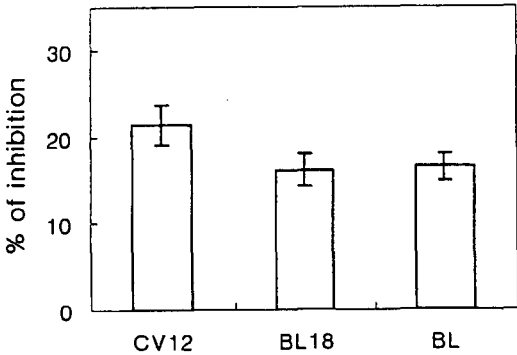


Fig. 1. Effect of COMAS on cytochrome P4501A1 activity. Experimental details are described in Material and Methods. Values represent mean±SD (n=3).

p-nitrophenol의 hydroxylation이 중완혈, 간수혈과 비경혈에 시침한 실험군의 효소활성이 약침액을 주사하지 않은 대조군에 비하여 각각 69.9, 96.1과 83.3%로 특히 중완혈에서는 유의성있는 효소활성 감소현상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 또한 CYP 2E1 특이의 aniline의 hydroxylation의 활성화도 약침액 주사에 의하여 마우스 간 microsone의 CYP 2E1 활성이 저해되어 중완에서는 약침액을 주사하지 않은 대조군의 47.1%로 유의성있는 활성 억제현상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

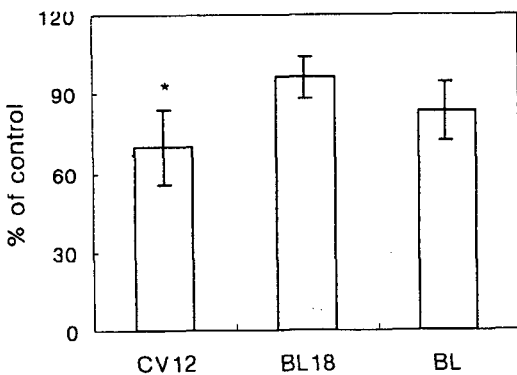


Fig. 2. Effect of COMAS on the microsomal 4-nitrophenol hydroxylation activity of mice. Experimental details are described in Material and Methods. Values represent mean±SD (n=3). The value of each group statistically significant as compared with control (* p<0.05).

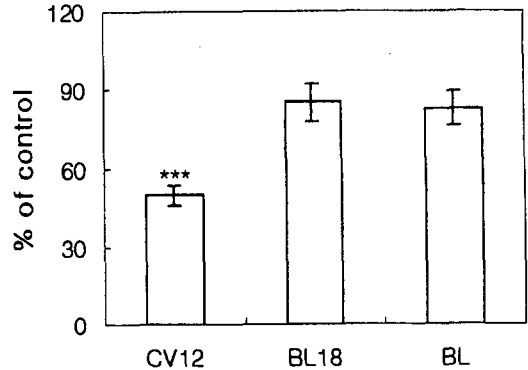


Fig. 3. Effect of COMAS on the microsomal aniline hydroxylation activity of mice. Experimental details are described in Material and Methods. Values represent mean±SD (n=3). The value of each group statistically significant as compared with control (***) p<0.005.

IV. 고 찰

외부의 발암물질은 cytochrome P450-dependent monooxygenase system에 의해 대사되어 전자친화적물질 (electrophilic product), epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질이 된다¹³⁾. 따라서 cytochrome P450 효소의 활성을 억제시킬 수 있다면 암예방의 효과가 있을 것이므로, 천궁약침액에 의한 CYP 1A1 효소의 억제율을 측정된 결과, 효소의 활성을 저해함을 관찰할 수 있었다. CYP 1A1을 억제시키는 물질로 vitamin A, phosphorothioate oligonucleotide 등의 물질이 알려져 있다¹⁴⁾. 또한 천궁약침액은 효과적으로 CYP 2E1 효소의 활성화도 저해하였으므로 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것이다.

V. 요 약

천궁약침액을 7일간 중완혈, 간수혈 및 임의 혈에 투여한 후 마우스의 간에서 유도되는 phase I enzyme 억제 효과를 살펴본 결과 천

궁 약침액은 CYP 1A1를 저해하였고, 생체의 CYP 2E1의 활성화도 억제하였으므로 천궁 약침액은 암예방 효과가 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Sharma S, Jill DS, Kelloff GJ, Vernon ES. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* 1994 ; 54: 5848-55.
2. 李尙仁. 本草學. 서울 : 修書院. 1998 : 407-09.
3. 申佶求. 申氏本草學, 서울 : 壽文社. 1973 : 600-02.
4. 鄭普燮. 鄉藥生藥大事典. 서울 : 永林社. 1990 : 418.
5. 대한약침 학회. 약침요법시술지침서. 서울 : 현성인쇄. 1999 : 13.
6. 錢百炎. 中草藥主射劑. 上海 : 上海科學技術出版社. 1981 : 71-132.
7. Benson AM, Hunkeler M, Talalay P. Increase of NAD(P)H : quinone reductase by dietary antioxidants Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)* 1980 ; 77 : 5216-20.
8. Pohl RJ, Fouts JR. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal Biochem.* 1980 ; 107 : 150-155.
9. Koop DR. Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Mol Pharmacol.* 1986 ; 29 : 399-404, .
10. Kim SG, Novak RF. The induction of cytochrome P450 2E1 by nitrogen-and sulfur-containing heterocycles: expression and molecular regulation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993 ; 120 : 257-65.
11. Brodie BB, Axelrod L. The estimation of acetanilide and its metabolic products, aniline, N-acetyl-p-aminophenol and p-aminophenol (free and conjugated) in biological fluids and tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 1948 ; 94 : 22-8.
12. Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J.* 1992 ; 6 : 724-30.
13. Jollow DJ, Smith C, Jollow KJ, Kocsis JJ, Snyder R, Vainio H, eds. *Biologically Reactive Intermediates.* New York. Plenum Press. 1977 : 42-59.
14. Kuniyo I, Toshio M, Shunya K, Hideo O. Inhibitory effects of vitamin A and vitamin K on rat cytochrome P4501A1-dependent monooxygenase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 ; 262 : 565-69.