

천궁 물추출물이 간암예방효소계에 미치는 영향

손윤희 · 김한규 · 남경수*

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구소

Effect of Cnidii Rhizoma Water Extract on Chemopreventive Enzymes for Hepatocarcinoma

Yun-Hee Shon, Han-Gyu Kim, and Kyung-Soo Nam*

Department of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Disease Research Center,
Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

Abstract – Cnidii Rhizoma water extract (CRW) was tested for liver cancer chemopreventive potential by measuring the inhibition of phase I enzyme and benzo[a]pyrene-DNA adduct formation and induction of phase II detoxification enzymes. There was 17.0% inhibition in the activity of cytochrome P450 1A1 enzyme with the treatment of 150 mg/ml CRW. At concentration of 30 mg/ml CRW, the binding of [³H]B[a]P metabolites to DNA of NCTC-clone 1469 cell was inhibited by 33.3%. CRW was potent inducer of quinone reductase (QR) and glutathione S-transferase (GST) activities in cultured murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. However, hepatic glutathione (GSH) level was not influenced by CRW. These findings suggest that CRW has chemopreventive potential of liver cancer by inhibiting cytochrome P450 1A1 activity and benzo[a]pyrene-DNA adduct formation and inducing QR and GST activities.

Key words – Cnidii Rhizoma, cytochrome P450 1A1, benzo[a]pyrene-DNA adduct, quinone reductase, glutathione S-transferase, glutathione

간암은 한국인의 남성 암발생을 중 2위를 차지하는 암으로 한해 간암으로 인한 사망자가 연간 약 12,000명으로 치사율도 매우 높은 암이다. 간암을 일으키는 물질로는 아직 그 원인이 규명되어 있지는 않으나 B형 및 C형 간염 virus 그리고 환경성 혹은 화학성 발암물질로 인한 가능성이 높다고 판단된다. 특히 한국인의 경우 B형 간염(hepatitis B virus)의 발병율이 매우 높아 이로 인한 간암 발병과의 연관성이 보고되어지고 있으며¹⁾ 또한 다양한 경로에 의한 간암의 발병증가가 지속되고 있다.

간세포는 형질내망(endoplasmic reticulum)의 친지성막에 존재하는 약물대사효소를 포함하는 효소의 집합체이며 이중 cytochrome P450은 외부 xenobiotics의 대사를 담당하며 phase I 및 phase II의 과정을 거치게 한다. 특히 환경성발암물질인 polyaromatic hydrocarbons (PAHs)류의 화합물의 일종인 benzo[a]pyrene(B[a]P)는 세포독성, 발암성 및 돌연변

이원성이 있는 물질로서 이는 phase I 효소인 cytochrome P450 1A1(CYP1A1)에 의해 대사되어 불안정한 반응중간체인 7,8-dihydro-9,10-epoxybenzo[a]pyrene을 생성하게 되는데 이 중간체는 반응성이 매우 높아 그 구조중 C10의 carbonium ion의 상태의 것이 세포내 고분자와 반응을 하여 발암을 나타낸다고 알려져 있다.²⁾ 따라서 B[a]P에 의한 CYP1A1 대사계 및 이들의 해독에 관련된 효소의 변화는 간암의 유발 및 해독과 관련된 중요한 효소지표로 응용될 수 있다고 판단된다.

천궁(川芎, Cnidii Rhizoma)은 미나리과(Umbelliferae)에 속한 다년생 초본으로 천궁의 뿌리 줄기를 그대로 또는 열탕에 데친 것을 사용한다. 또한 성질은 온화무독(溫無毒)하고 맛은 신고(辛苦)하며 진정, 진통, 보혈강장에 효능이 있어 월경불순 및 산후복통등 주로 부인과 질환에 사용되고 있다.³⁻⁵⁾

본 연구에서는 천궁물추출액이 CYP1A1 활성화, quinone reductase (QR), glutathione S-transferase (GST) 효소활성과 glutathione (GSH)함량에 미치는 영향을 측정하며 정상 간세

*교신저자(E-mail) : namks@dongguk.ac.kr
(FAX) : 054-770-2477

포에서 benzo[a]pyrene-DNA 결합에 미치는 억제효과를 측정하여 간암유발에 대한 예방활성을 측정하고자 한다.

재료 및 방법

시약 - Minimal essential medium eagle's (MEM), NCTC-135 medium, antibiotics, dimethylsulfoxide (DMSO), 3,4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), ethyl alcohol anhydrous, Tris-HCl, bovine serum albumin (BSA), Tween-20, flavin adenine dinucleotide (FAD), glucose-6-phosphate, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADP), yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, menadione, dicoumarol, crystal violet, NADP⁺, Na-EDTA, triton X-100, 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), glutathione reductase, ethoxyresorufin, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal calf serum (FBS)은 JBI사(대구, 한국)에서 구입하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 분석용 특급시약을 사용하였다.

천궁 물추출액의 제조 - 본 실험에서 사용한 천궁(Cnidii Rhizoma)은 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 강원도산 천궁을 정선하여 사용하였다. Voucher specimen은 동국대학교 난치병한양방치료연구소에 보관되어 있다. 천궁물추출액(Cnidii Rhizoma water-extract, CRW)은 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 감압농축하여 pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μ m, Whatman, Germany)로 여과하고 동결건조하였다. 이때 100 ml 당 3.44 g에 해당하는 천궁물추출물을 얻을 수 있었다.

마이크로솜의 분리 - Sprague-Dawley계 흰쥐의 간 조직으로부터 마이크로솜의 분리는 Pho과 Fouts⁶⁾의 방법을 참고하여 실시하였고, 관류법으로 DMBA (30 mg/마리)를 처리하였다. 24시간 뒤 흰쥐를 diethyl ether로 질식시킨 다음, 복피를 절개하여 1.15% KCl 완충용액으로 간을 perfusion 시킨 후 적출하였다. 적출된 간은 다시 여러번 세척 후, 흡습지로 수분을 완전히 제거시켰다. 수분이 제거된 간은 마쇄(Teflon Plotter Elvehjem Homogenizer, Glas-Col, USA)한 후, 1.15% KCl 완충용액을 첨가하여 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄 균질액을 7,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 다시 77,000 \times g에서 60분간 원심분리하였다. 형성된 침전물은 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 재현탁하여

microsome 분획으로 실험에 사용하였다. 이상의 모든 과정은 4°C에서 실시하였다. 정량된 분획은 일정량씩 나누어 실험에 사용할 때까지 -70°C에서 냉동보관하였다.

Cytochrome P4501A1의 활성 저해 측정 - CYP1A1는 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 활성으로 측정하였다.⁷⁾ 즉, 흰쥐로부터 분리한 microsomal protein (2 mg/ml) 200 μ l에 640 μ l의 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), 100 μ l의 BSA (10 mg/ml in Tris-HCl buffer), 20 μ l의 0.25 M MgCl₂, 40 μ l의 cofactor solution, 2.5 unit의 glucose-6-phosphate dehydrogenase, 10 μ l의 기질(1 mg of ethoxyresorufin in 10 ml of methanol), 10 μ l의 천궁물추출액을 농도별로 첨가하였다. 모든 시약들을 잘 섞은 후, 37°C에서 4분간 반응시키고, 2 ml의 methanol로 반응을 종결시켰다. 2,000 \times g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하고, 형광분광광도계(BIO-TEK SFM25, USA)로 측정(550 nm excitation and 585 nm emission) 하였다. 양성대조군은 β -naphthoflavone을 사용하였고, 음성대조군으로는 증류수를 사용하였다. 이 실험은 3회 반복 실험으로 수행하였으며, 각각의 결과는 control에 대한 각 시료들의 저해도 정도를 percentage로 나타내었다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[1 - \frac{(\text{tested sample} - \text{blank})}{(\text{solvent} - \text{blank})} \right] \times 100$$

Benzo[a]pyrene-DNA binding 저해 효과 측정 - 1 \times 10⁶개의 마우스 정상 간세포(NCTC clone-1469)를 5 ml의 NCTC 136 배지에 부유시켜 6-well plate에 접종시키고 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 18시간 경과 후, 배지를 교환하여 천궁물추출액을 처리하고, 10 μ M [³H]B[a]P을 처리하여 12시간동안 배양하였다. DNA 추출은 Sharma 등⁸⁾에 의한 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. [³H]B[a]P에 처리된 세포는 PBS로 세척하고, proteinase K (100 μ g/ml)가 함유된 0.2 M Tris-0.1 M EDTA (pH 8.5) buffer 0.5 ml을 well에 처리하였다. 효소의 반응을 활성화시키기 위해 10분동안 배양한 뒤, well로부터 세포를 떼어내어 회수하였다. 회수된 세포를 10% SDS 용액을 첨가하여 55°C에서 3시간 동안 배양하여 단백질을 제거하였으며, 5 M potassium acetate 용액을 첨가하여 30분동안 4°C에서 세포를 방치시킨 뒤, 13,000 \times g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액만을 취한 뒤, cold ethanol을 상층액 2배의 양이 되도록 첨가하였고, DNA를 침전시키기 위하여 -20°C에 12시간 이상 방치하였다. 13,000 \times g에서 15분동안 원심분리한 뒤 상층액을 제거하여 DNA를 회수하였다. DNA pellet은 70% ethanol에 세척한 뒤 500 μ l of 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 8.0) buffer로 현탁하였으며, RNA를 제거하기 위하여 RNase A와 RNase

TI를 각각 5 μ l씩 첨가하여 37°C에서 1시간동안 처리하였다. DNA 함유량은 260 nm (1 A₂₆₀ nm unit=50 μ g)에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 흡광도를 측정한 뒤 잔량의 DNA는 radioactivity 측정에 사용하였다. 천궁물추출액에 의한 carcinogen-DNA binding 저해효과는 다음 공식으로 계산하였다.

Inhibition (%) =

$$\left[1 - \frac{\text{cpm per } \mu\text{g DNA (sample-treated cells)}}{\text{cpm per } \mu\text{g DNA (control cells)}} \right] \times 100$$

NAD(P)H: quinone oxidoreductase 생성 측정 - QR 생성 유도효과는 Prochaska와 Santamaria⁹⁾의 방법을 수정하여 사용하였다. 1×10⁴개의 Hepa1c1c7 세포(mouse hepatoma)를 200 μ l의 MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종하였다. CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 새 배양액 190 μ l와 물추출액을 10 μ l씩 각 well에 가하였다. 48시간 배양 후, 배양액을 제거하고 freeze-thaw cycle을 3회 반복하여 세포를 용해시켰다. 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 100 mg bovine serum albumin, 1.5% Tween-20, 7.5 mM FAD, 150 mM glucose-6-phosphate, 50 mM NADP, 300 U glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45 mg MTT, 50 mM menadione을 혼합한 반응액을 200 μ l씩 각 well에 넣고 5분간 반응시켰다. 5 mM potassium phosphate buffer와 0.5% DMSO에 녹인 0.3 mM dicumarol를 첨가한 용액 50 μ l를 각 well에 가하여 반응을 중지시킨 후, microplate reader를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 세포수에 대한 QR 생성량을 측정하기 위하여 앞에서와 동일한 방법으로 96-well plate에 세포를 접종시키고, 천궁물추출액을 처리하였다. 48시간 배양한 후, 배지를 제거하고, 0.2% ethanol에 녹아 있는 0.2% crystal violet 용액에 10분간 담근 후, 세포가 떨어지지 않게 주의하여 2분간 흐르는 물에 세척하였다. 0.5% SDS를 50% ethanol에 녹여 각 well에 200 μ l씩 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤, 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. QR specific activity 계산은 분당 환원된 MTT의 흡광도와 crystal violet의 흡광도에 의해 산출하였고, QR의 활성유도는 대조군의 활성과 시료에 의한 활성의 비로 계산하였다.

Specific activity =

$$\frac{\text{Absorbance change of MTT/min}}{\text{Absorbance of crystal violet}} \times 247 \text{ nmol mg}$$

세포내 glutathione S-transferase 생성량 측정 - Habig 등¹⁰⁾의 방법을 변형하여 GST 활성을 측정하였다. 1×10⁴개의 Hepa1c1c7 세포를 10% heating inactivated FBS가 포함

된 MEM 배지 200 μ l에 부유시켜 96-well plate에 접종하여 배양하였다. 24시간 배양 후, 새 배양액 190 μ l와 천궁물추출액을 10 μ l씩 각 well에 처리하였다. 세포를 물추출액이 처리된 배양액에서 48시간 배양 후, PBS로 3회 세척하고 3회의 freeze-thaw cycles에 의해 세포를 용해시켰다. 배양된 세포 내에서 유도된 GST 활성 측정을 위해 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)에 2.5 mM GSH, 1 mM CDNB를 첨가한 반응혼합물 용액을 100 μ l씩 각 well에 가하고 1분간 교반한 후, 3분간 흡광도의 증가를 microplate reader, 405 nm에서 측정하였다.

세포내 glutathione 함량 측정 - Griffith 등¹¹⁾의 방법을 변형하여 세포내 총 glutathione 함량을 측정하였다. 즉, 1×10⁴개의 Hepa 1c1c7 세포를 200 μ l MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종하였다. 24시간 배양 후, 배양액을 제거하고 새 배양액 190 μ l에 천궁물추출액을 10 μ l씩 각 well에 가하였다. 48시간 뒤, PBS로 세척하고 freeze-thaw cycle을 3회 반복하여 세포를 용해시킨 후, 각 well에 40 μ l stock buffer (125 mM Na-phosphate, 6.3 mM Na-EDTA, pH 7.4)를 가하고 6 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), glutathione reductase solution (5 units/1 ml), NADPH-generating system {0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM glucose-6-phosphate, 50 mM NADP⁺, 100 units glucose-6-phosphate dehydrogenase}을 혼합한 반응혼합물 170 μ l와 반응시켰다. 상온에서 5분간 교반하면서 반응시킨 후, microplate reader, 450 nm에서 흡광도를 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 단백질 검량 - 세포내 총 단백질 및 마이크로 줌내 단백질은 bicinchnomic acid protein kit를 사용하여 BSA를 표준 단백질 용액으로 이용한 표준검량선을 구하고 그 양을 산출하였다.

결 과

Cytochrome P4501A1의 활성 저해 효과 - Phase I 효소 중 하나인 cytochrome P4501A1은 발암을 유도하므로 시료에 의한 이 효소의 활성 억제는 암예방 효과의 기작으로 간주할 수 있다. 따라서 천궁물추출액에 의한 cytochrome P4501A1 효소활성에 미치는 영향을 각 농도별로 측정하였다. 천궁물추출액은 3, 15, 30, 90과 150 mg/ml 농도에서 각각 6.0%, 5.0%, 11.3%, 15.1%과 17.0%의 저해율이 나타났으므로 (Fig. 1), 천궁물추출물이 cytochrome P4501A1 활성을 저해시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

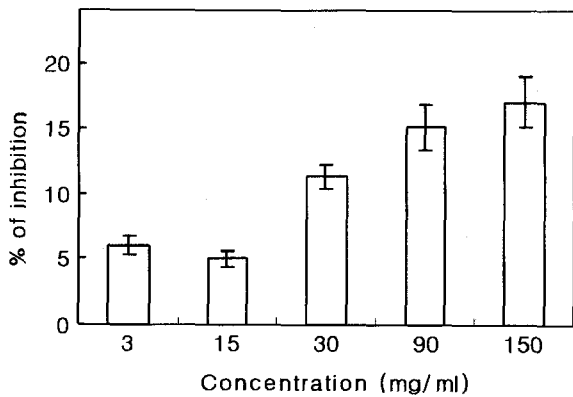


Fig. 1. Effect of CRW on DMBA-induced cytochrome P4501A1 activity. Experimental details are described in Material and Methods. Values represent mean±SD (n=3).

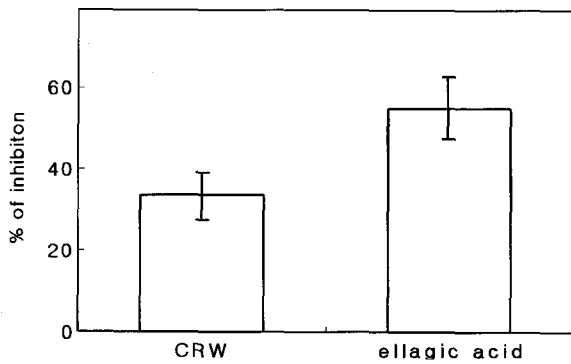


Fig. 2. Inhibition of the binding of B[a]P metabolites to DNA of NCTC-clone 1469 cells. B[a]P-DNA binding was determined in the presence of CRW. Experimental details are described in Material and Methods. Values represent mean±SD (n=3).

Benzo[a]pyrene-DNA binding 저해효과 - 발암물질의 친전자적 성질로 인하여 세포의 정보전달 물질인 DNA에 구조적 손상을 주어 돌연변이를 유발하는 과정은 비가역적으로 진행되는 것으로 알려져 있다. 일단 손상된 DNA가 수복되지 않으면 돌연변이를 일으킨 DNA의 세포분화 과정에서 복제되어 세포가 암세포로 전환하게 되는 것이다. 따라서 발암물질이 DNA와 결합하여 손상을 주게 되는 과정을 저해한다면 암억제 효과가 있을 것이다. 따라서 천궁물추출액에 의한 benzo[a]pyrene-DNA binding inhibition 효과를 알아보기 위해 NCTC-clone 1469 세포를 이용하여 실험한 결과, 3 mg/ml에서 33.3%의 저해 효과를 나타내었으며(Fig. 2), 양성대조군인 ellagic acid는 54.7%의 억제효과가 있었다.

NAD(P)H:quinone oxidoreductase 생성 유도 효과 - 천궁물추출액의 QR 생성의 유도율을 측정된 결과, 3, 15, 30과 90 mg/ml에서 각각 1.2배, 2.0배, 2.5배, 1.9배의 유의성있는 증가를 나타내었다(Fig. 3). 이 결과에 의하면 천궁물추출액은 quinone에 의한 세포내 독성 및 세포내 DNA손

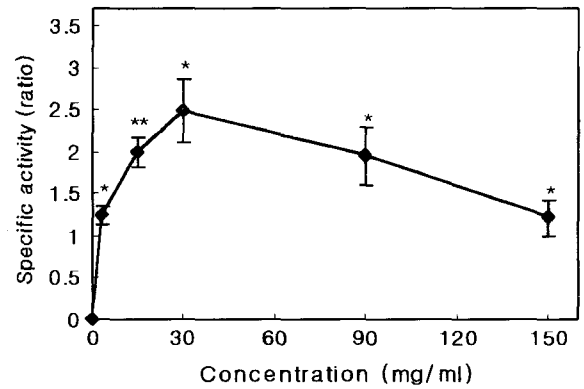


Fig. 3. Induction of quinone reductase (QR) in murine hepatoma Hepalcl7 cells by CRW. Experimental details are described in Material and Methods. The values are mean±SD (n=3). The value of each group statistically significant as compared with control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

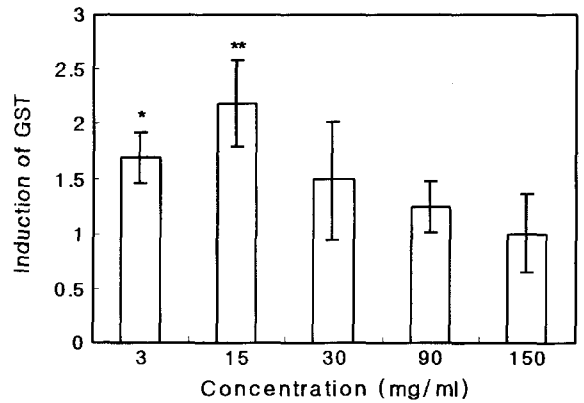


Fig. 4. Induction of glutathione S-transferase by CRW in murine hepatoma Hepalcl7 cells. Experimental details are described in Material and Methods. The values are mean±SD (n=3). The value of each group statistically significant as compared with control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

상을 제거 할 것으로 추측된다.

세포내 glutathione S-transferase 활성 유도 효과 - 천궁물추출액에 의한 GST 활성도를 관찰한 결과, 3, 15, 30과 90 mg/ml 농도에서 control에 비해 각각 1.7배, 2.1배, 1.5배, 1.3배의 GST 활성이 나타났으며, 15 mg/ml 농도에서 최대의 효소활성 유도효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 한편 천궁물추출액에 의한 GSH의 유도효과에는 별다른 영향을 나타내지 못했다.

고 찰

본 연구에서는 천궁물추출액을 이용하여 간암예방 활성 중 발암개시과정의 저해물질(inhibitor of tumor initiation)의 활성검정을 위하여 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)-

induced CYP1A1 activity와 B[a]P-DNA binding 억제효과 그리고 quinone reductase (QR), glutathione S-transferase (GST), glutathione (GSH) 유도작용으로 실험에 착수하였다.

PAHs은 B[a]P과 같이 잘 알려진 발암물질을 포함한 화학물질로 직업적으로나 혹은 흡연, 숯불에 그을린 음식등을 통해 사람들에게 노출된다.¹²⁾ 그런데 많은 포유동물 세포는 phase I 효소인 CYP1A1에 의해 PAHs을 polycyclic phenols, dihydrools, epoxides, quinones, 그리고 water-soluble conjugates로 대사시킨다. 이들중 반응성이 높은 중간대사물은 DNA, RNA와 결합하며 그 결합의 강도는 hydrocarbons의 발암의 유효성과 관계가 있다.¹³⁾ Uno 등¹⁴⁾은 CYP1A1이 결여된 knockout 마우스[CYP1A1(-/-)]를 사용하여 B[a]P의 독성을 관찰한 결과 간에서 B[a]P-DNA adduct 증가가 억제됨을 알았다. B[a]P-DNA adducts는 폐암환자의 폐조직에서도 발견되었으며 음식물에 포함된 여러 식물에서 phenols 성분이 발암과정을 억제하는 것으로 알려져 있고 그 중에서 ellagic acid가 B[a]P와 DNA의 결합을 저해하는 것으로 알려져 있으며, 이들의 암예방활성은 B[a]P epoxide와 adducts를 형성하여 무독화한다고 보고하고 있다.¹⁵⁾ 본 연구 결과 천궁물추출액을 이용하여 DMBA에 의해 유도된 cytochrome P4501A1 효소의 억제율을 측정된 결과, 이 효소의 활성을 저해함을 관찰할 수 있었다. 또한 천궁물추출액의 B[a]P 대사물과 DNA의 adduct 형성 저해효과를 측정된 결과 양성대조군인 ellagic acid보다는 낮으나 3 mg/ml에서 33.3%의 높은 저해효과를 나타내었다(Fig. 2). 현재, cytochrome P4501A1을 억제시키는 물질로 vitamin A, phosphorothioate oligonucleotide 등이 알려져 있다.^{16,17)}

QR은 간세포에서 주로 생성되는 phase II enzyme의 한 종류로 quinone을 환원시켜 무독하게 만들고, 발암물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화 효과를 막아주는 역할을 한다. QR이나 GST와 같이 phase II 약물대사효소들의 유도는 chemical stress나 carcinogenesis의 개시(initiation)에 대한 중요한 방어기작이다. 효소의 유도 패턴에 의하면 약물대사효소를 유도하는 물질은 phase I과 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)가 있다. Phase I 효소유도는 발암물질을 활성화된 발암물질(ultimate carcinogens)로 바꾸기 때문에 암 유발 위험인자이다. 그러므로 이상적인 암예방물질은 암예방활성을 가진 monofunctional 효소 유도제이다. 천궁물추출액은 마우스 liver carcinoma인 HepalC1c7 세포를 이용한 *in vitro* 상에서의 QR 생성 유도효과를 측정된 결과, 30 mg/ml 농도에서 2.5배의 QR 생성 유도율을 보였다. 양성대조군인 β -

naphthoflavone(3 μ M)과 ellagic acid(50 μ M)는 각각 3.2배 및 2.1배의 생성 유도율을 나타내었다. 따라서 천궁물추출액은 돌연변이원성, 발암물질의 대사과정시 생성된 quinone에 의한 독성 및 DNA 손상을 완화시켜줄 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. 보고에 따르면 aflatoxin에 의한 간종양을 가진 쥐에 많은 양의 GSH를 투여하였을 때, 종양이 감소하였고, butylated hydroxyanisole은 GSH 함량을 증가시켜서 발암과정을 저해하였다.¹⁸⁾ 이러한 연구는 GSH가 reactive oxygen intermediates 감소를 가져오는 free radical을 제거한다는 강한 증거를 제공한다. 또한 GSH는 외부의 독성물질이 세포내 침입했을 때 직접 반응하거나 glutathione S-transferase (GST)에 의해 독성물질과 결합하여 무독하게 하는 기능을 가지고 있다. GST는 유리기(free radical)를 파괴하여 반응성이 높은 산소들로부터 세포를 보호한다. 본 실험결과 천궁물추출액은 마우스 간암세포에서 GST의 활성을 증가시켰으나 GSH 생성에는 별다른 영향을 나타내지 못했다. 이것은 곧 생체에서 발생한 산화물질과 기타의 독성물질을 무독화시킬 것으로 추측할 수 있다.

QR, GST 효소유도 및 GSH의 생성은 여러 형태의 compound를 투여함으로써 일어날 수 있으며, 이러한 물질로 인해 발암이나 독성효과에 대하여 동물들을 보호할 수 있는 것이다.¹⁹⁾ Kim 등²⁰⁾은 암을 방어할 수 있는 능력을 지닌 한국산 채소를 세포배양과 *in vivo* 모델 시스템에서 QR 활성을 측정하였다. Singh 등²¹⁾은 클로로필린 간에서 GST 활성과 GSH 생성을 크게 증가시키는 것으로 보고하였다. 또, 일부 compound의 chemopreventive mechanism이 발암물질의 활성시스템을 억제하고 독성을 억제하는 효소의 유도와 관련이 있다고 보고하였다. Spencer 등²²⁾은 마우스와 랫트의 식이에 0.2~0.5% 농도의 dimethyl fumarate를 투여한 결과, 간, 신장 등의 각 조직에서 GST와 QR의 활성이 증가하였다고 주장하였다. 따라서, 천궁물추출액에 의해 마우스의 간 세포에서 암예방 효소의 활성이 증가된 것으로 보아 천궁물추출액은 외부물질이나 대사산물에 의해 일어날 수 있는 암발생중 간암발생에 억제효과가 있는 것으로 사료된다.

결 론

천궁물로 물추출액을 조제하여 *in vitro*에서 암예방 효과

를 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 천궁물추출액은 농도의존적으로 B[a]P의 대사와 관련된 cytochrome P4501A1의 저해효과가 있었으며 B[a]P과 세포의 DNA 결합을 매우 강하게 억제하였다. 또한 발암물질을 무독성화시키는 quinone reductase 생성 유도를 마우스의 간암세포인 Hepa1c1c7에서 측정할 결과 QR 생성이 유도되었다. 또한 천궁물추출액은 Hepa1c1c7 세포에서 GST 활성을 증가시키는 효과가 있었으나 GSH 함량변화에는 큰 영향을 미치지 못했다.

감사의 말씀

본 연구는 한국학술진흥재단의 2002년 선도연구자지원사업(041-E00279)에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Chung, T.W., Lee, Y.C., Ko, J.H., and Kim, C.H. (2003) Virus X protein modulates the expression of PTEN by inhibiting the Hepatitis B function of p53, a transcriptional activator in liver cells. *Cancer Res.* **63**: 3453-3458.
- Jollow, D. J. and Smith, C. (1977) In Jollow K. J., Kocsis J. J., Snyder R. and Vainio H. (eds.) *Biologically Reactive Intermediates*. 42-59. Plenum Press, New York.
- 申佶求(1973) 申氏本草學, 600-602, 壽文社, 서울.
- 김창민(1994) 本草學, 545-547, 대한약사회, 서울.
- 김대근(2001) 生藥學, 454-456, 동명사, 서울.
- Pohl, R. J. and Fouts, J. R. (1980) A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal. Biochem.* **107**: 150-155.
- Rodrigues, A. D. and Prough, R. A. (1991) Induction of cytochromes P450IA1 and P450IA2 and measurement of catalytic activities. *Methods Enzymol.* **206**: 423-431.
- Sharma, S., Jill, D. S., Kelloff, G. J., and Vernon, E. S. (1994) Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* **54**: 5848-5855.
- Prochaska, H. J. and Santamaria, A. B. (1988) Direct measurement of NAD(P)H : Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* **169**: 328-336.
- 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**: 7130-7139.
- Griffith, O.W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**: 207-212.
- Perera, F. P., Poirier, M. C., Yuspa, S. H., Nakayama, J., Jaretzki, A., Curnen, M. M., Knowies, D. M., and Weinstein, B. A. (1982) A pilot project in molecular cancer epidemiology: determination of benzo[a]pyrene-DNA adducts in animal and human tissues by immunoassays. *Carcinogenesis (Lond.)* **3**: 1405-1410.
- Sims, P. and Grover, P.L. (1974) Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* **20**: 165-274.
- Uno, S., Dalton, T. P., Shertzer, H. G., Genter, M. B., Warshawsky, D., Talaska, G., and Nebert, D.W. (2001) Benzo[a]pyrene-induced toxicity: Paradoxical protection in Cyp1a1(-/-) knockout mice having increased hepatic BaP-DNA adduct levels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **289**: 1049-1056.
- Teel, R. W., Babcock, M. S., Dixit, R., and Stoner, G. D. (1986) Ellagic acid toxicity and interaction with benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol in human bronchial epithelial cells. *Cell. Biol. Toxicol.* **2**: 53-62.
- Sindhu, R. K., Masato, M., and Yutaka, K. (1996) Inhibition of cytochrome P450IA1 by antisense phosphorothioate oligonucleotide in Hepa1c1c7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**: 673-680.
- Kuniyo, I., Toshio, M., Shunya, K., and Hideo, O. (1999) Inhibitory effects of vitamin A and vitamin K on rat cytochrome P450IA1-dependent monooxygenase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**: 565-569.
- Meister, A. and Anderson, M. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 711-760.
- Talalay, P., De Long, M. J., and Prochaska, H. J. (1987) Molecular mechanisms in protection against carcinogenesis. In Cory J. G. and Szentivani A. (eds.), *Cancer Biology and Therapeutics*, 197-216. Plenum Publishing Corp., New York.
- Kim, S. M., Ryu, S. H., Cho, H. D., Kim, S. S., Kim, J. H., and Kim, J. S. (1998) Screening for Korean vegetables with anticarcinogenic enzyme inducing activity using cell culture system. *Kor. J. Food Sci. Nutr.* **3**: 277-281.
- Singh, A. S., Singh, P., and Bameza, R. I. (1996) Modulatory influence of chlorophyllin on the mouse skin papillomagenesis and xenobiotic detoxification system. *Carcinogenesis*, **17**: 1459-1463.
- Spencer, S. R., Wilczak, C. A., and Talalay, P. (1990) Induction of glutathione transferase and NAD(P)H: quinone reductase by fumaric acid derivatives in rodent cells and tissues. *Cancer Res.* **50**: 7871-7875.

(2003년 9월 26일 접수)