

천궁이 Phase II 효소 유도과 Ornithine Decarboxylase 활성화에 미치는 영향

손윤희 · 김미경 · 조현정 · 남경수^{1*}

동국대학교 난치병한양방치료연구센터, 1: 동국대학교 의과대학 약리학교실

Effect of Cnidii Rhizoma on Phase II Enzyme and Ornithine Decarboxylase Activities

Yun Hee Shon, Mee Kyung Kim, Hyun Jung Cho, Kyung Soo Nam^{1*}

Intractable Disease Research Center, Dongguk University, 1: Department of Pharmacology, College of Medicine, Dongguk University

Water extract from Cnidii Rhizoma (CRW) was tested for colon cancer chemopreventive activity by measuring the induction of phase II detoxification enzyme activity [quinone reductase (QR) and glutathione S-transferase (GST)] and glutathione (GSH) levels and ornithine decarboxylase (ODC) activity in cultured human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells. CRW inhibited cell proliferation in cultured HT-29 cells. CRW induced QR activity in a dose-dependent manner in a concentration range of 0.1~5.0 mg/ml. GST activity was also induced with the treatment of CRW in HT-29 cells. In addition GSH levels was increased with CRW. CRW inhibited ODC activity, a key enzyme of polyamine biosynthesis, which is enhanced in tumor promotion. These results suggest that CRW has colon cancer chemopreventive activity by increasing phase II enzyme activity and GSH levels and inhibiting ODC activity in vitro.

Key words : Cnidii Rhizoma, quinone reductase, glutathione S-transferase, glutathione, ornithine decarboxylase

서 론

우리나라에서 최근 각종 암의 발생률이 증가하여 암으로 인한 사망이 한국인의 사망원인 중 1위를 차지하고 있으며, 특히 대장암은 우리나라에서 발생률과 사망률이 위암, 폐암, 간암 다음으로 4위를 차지하고 있다¹⁾. 대장암은 서구에서 많이 발생되어 왔으나, 최근 우리나라에서도 경제 발전으로 인해 식생활이 서구화됨에 따라 그 발생률이 높게 증가하는 추세를 보이고 있다²⁾. 이러한 급격한 증가율과 함께 대장암은 발병연령이 서구보다 10년 정도 앞당겨 나타나고 있어 대장암을 예방하기 위한 연구가 시급한 실정이다.

Quinone reductase (QR)이나 glutathione S-transferase (GST)와 같은 phase II 효소의 유도는 화학적인 스트레스와 암 발생과정 중의 개시 (initiation) 단계에서 돌연변이물질, 발암물질로부터 세포를 보호하는 주요대사이다³⁾. Glutathione (GSH)는 다단계 발암과정 중 개시 (initiation)와 촉진 (promotion) 단계에서 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다. 즉, 개시단계에서는 발암물질 분자

의 전자친화적 부위와 작용하여 독성이 강한 물질에 의한 DNA의 공격을 저해하는 역할을 하며, 촉진단계에서는 산화적 유리 라디칼의 공격을 제한함으로써 세포를 보호하는 역할을 한다⁴⁾.

Polyamines 생합성을 위한 효소도 암발생과정의 촉진단계와 세포의 hyperplasia에 중요한 역할을 한다. 특히 polyamine (putrescine, spermidine과 spermine)은 종양형성시 비정상적으로 생합성되며 polyamine 생합성과정에서 중요한 효소인 ornithine decarboxylase (ODC)는 정상세포와 종양세포의 증식에 필수적이다. 생쥐의 여러 조직을 이용한 암촉진 실험에서 ODC 활성 유도와 발암물질의 암촉진 능력간의 밀접한 관계가 보고되었다⁵⁾. 특히 ODC 활성 유도가 직장암 발생과정에서도 관찰되어졌다⁶⁾.

천궁 (Cnidii Rhizoma)은 뿌리줄기를 이용하는 약용자원식물로 미나리과 (Umbelliferae)에 속하는 다년생 초본인 천궁 (Cnidium officinale Makino)의 근경이며, 근경을 그대로 말리거나, 혹은 썬서 말린 후 주로 생약재로 이용한다⁷⁾. 진경, 진정, 강장, 진통, 보혈, 등의 효능을 가지며, 혈압강하, 혈관확장, 항균 그리고 항진균작용 등의 약리작용이 있으며 두통, 어지러움, 고혈압, 협심증, 근육마비, 신경통 및 수족냉증 등에 좋은 약으로 이용되고 있다⁸⁾.

본 연구에서는 천궁불추출물이 직장암 세포에서의 QR과

* 교신저자 : 남경수, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 의과대학

· E-mail : namks@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2412

· 접수 : 2006/09/23 · 수정 : 2006/10/19 · 채택 : 2006/11/25

GST 활성, GSH 함량 및 ODC 활성에 미치는 영향을 측정하여 천궁의 직장암 예방 효능을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약

RPMI 1640 medium, antibiotics, flavin adenine dinucleotide (FAD), 3,4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADP), glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, menadione, sodium dodecyl sulfate, dicoumarol, crystal violet, NADP⁺, chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), glutathione reductase, Na-EDTA, bovine serum albumin (BSA), tween-20, 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Tris-HCl, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 JBI사 (Daegu, Korea)제품을 사용하였다. 기타 세포 배양용 시약 및 추출용 유기용매는 특급시약을 사용하였다.

2. 천궁 물추출액의 제조

본 실험에서 사용한 천궁 (Cnidii Rhizoma)은 동국대학교 부속한방병원에서 구입하였다. Voucher specimens은 동국대학교 난치병한양방치료연구소에 보관되어 있다. 천궁 물추출액 (Cnidii Rhizoma water extract, CRW)은 천궁 60 g을 조말하여 3차 증류수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator (BÜCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과하였다. 여액을 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 200 ml 이 되도록 감압농축하고 pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membran filter (0.22 μ m, Whatman, Germany)로 여과하였다. 여과된 시료는 freeze-dryer를 이용하여 완전 건조시킨 후 건조중량 (34.4 mg/ml)을 측정하였다. 그리고 실험조건에 사용되는 배지 및 증류수에 희석시켜 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

HT-29 세포 (KCLB 30038)를 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 을 배양액으로 하여 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 37°C)에서 배양하였다. 세포는 액체질소의 기체상태 (-150°C)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 실험에 사용하였다.

4. 직장암세포 증식에 미치는 영향

HT-29 세포를 96-well plate의 well당 0.5 × 10⁴ cells을 접종시키고 24시간 후에 농도별 시료를 처리하여 6일 동안 배양하였다. 그리고 세포 성장은 MTT assay로 측정하였다.

5. Quinone reductase (QR) 활성 측정

HT-29 세포의 QR 활성은 Prochaska와 Santamarina의 방법⁹⁾으로 측정하였다. QR specific activity 계산은 분당 환원된 MTT의 흡광도와 crystal violet의 흡광도에 의해 산출하였고, QR의 활성유도는 대조군의 활성과 시료에 의한 활성의 비로 계산하였다.

6. 세포내 glutathione S-transferase (GST) 활성 측정

Habig 등¹⁰⁾의 방법을 변형하여 GST 활성을 측정하였다. 즉, HT-29 세포에 천궁물추출물 (0.1, 0.5, 1.0, 및 5.0 mg/ml)을 처리하여 48시간 동안 배양한 후 세포를 용해시켰다. 세포내에서 유도된 GST 활성 측정을 위해 반응혼합물 용액 [0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)에 2.5 mM GSH, 1 mM CDNB]을 가하고 450 nm에서 3분간 흡광도의 증가를 측정하였다.

7. 세포내 glutathione (GSH) 생성 측정

Griffith¹¹⁾의 방법을 변형하여 세포내 총 GSH 생성량을 측정하였다. GST와 동일한 조건으로 HT-29에 천궁물추출물을 농도별로 처리하고 세포를 용해시킨 후, 40 μ l stock buffer (125 mM Na-phosphate, 6.3 mM Na-EDTA, pH 7.4)를 가하고 170 μ l 반응혼합물 [6 mM 5,5'-dithiois-(2-nitrobenzoic acid), glutathione reductase solution (5 units/ μ l), NADPH⁺ generation system {0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM glucose-6-phosphate, 50mM NADP⁺, 100 units glucose-6-phosphate dehydrogenase}]과 반응시켰다. 상온에서 5분간 교반하면서 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. GSH 함량은 GSH 표준곡선으로 계산하였고, GSH 함량의 비는 대조군에 의한 GSH 양과 천궁물추출물에 의해 생성된 GSH 양의 비율로 측정하였다.

8. Ornithine decarboxylase (ODC) 활성 측정

직장암세포 HT-29를 24-well tissue culture plate에 well 당 2 × 10⁵ cells/ml 세포를 접종시키고, 18시간 후에 TPA와 시료 또는 양성대조군인 0.01 mM difluoromethylornithine (DFMO)을 처리하여 6시간 동안 배양하여 세척한 후 용해시키고 cell extract의 ODC 활성은 L-[1-¹⁴C]ornithine에서 [¹⁴C]CO₂ 방출에 의하여 측정하였다⁵⁾. ODC 활성 억제제는 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)만 처리한 조절군에 대한 각 시료들의 저해도 정도를 percentage로 나타내었다.

9. 세포내 총 단백질 검량

세포내 총 단백질 양은 bicinchoninic acid (BCA) protein kit를 사용하여 BSA를 표준 단백질 용액으로 이용한 표준검량선을 구하여 그 양을 산출하였다.

10. 통계학적 처리

실험결과는 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정을 위해 student's t-test를 수행하여 결과는 p 값이 0.05 미만을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 직장암세포의 증식에 미치는 영향

천궁물추출물이 직장암세포 HT-29의 증식에 미치는 영향을 살펴본 결과, 천궁물추출물 농도 0.1~5.0 mg/ml 에 의하여 HT-29 세포의 증식이 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 1).

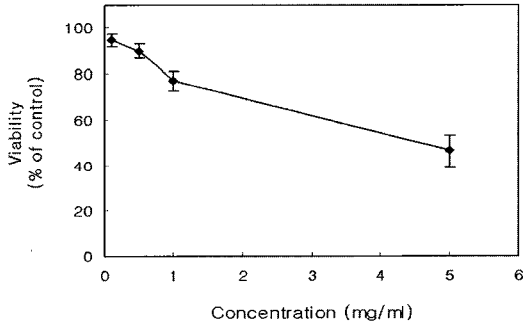


Fig. 1. Effect of varying concentrations of water extract from *Cnidii Rhizoma* on HT-29 cells growth measured after 6 days of treatment. Indicated values represent mean±SD (n=3).

2. Quinone reductase (QR)활성 유도 효과

천궁물추출물에 의한 QR 활성 유도효과를 HT-29 세포에서 살펴본 결과, 천궁물추출물 0.5, 1.0 및 5.0 mg/ml의 각 농도에서 1.2, 1.3 및 1.4배의 유도율을 각각 나타내었다 (Fig. 2). 특히 천궁물추출물 1.0 mg/ml (p<0.01)과 5.0 mg/ml (p<0.005)의 농도에서 통계적으로 유의성 있는 활성 유도율을 나타내었으므로 천궁은 quinone에 의한 세포내 독성 및 세포내 DNA 손상을 제거할 것으로 추측된다.

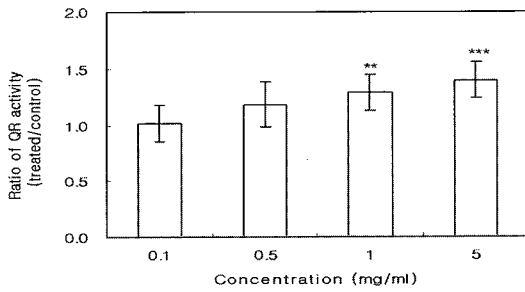


Fig. 2. Induction of quinone reductase (QR) activity in HT-29 cells by water extract from *Cnidii Rhizoma*. Indicated values represent mean±SD (n=3). Values statistically significant compared with the control are marked as asterisks (** p<0.01, *** p<0.005).

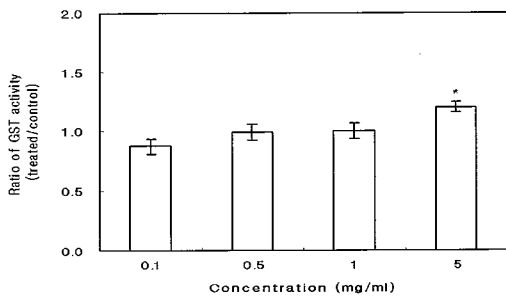


Fig. 3. Induction of glutathione S-transferase (GST) activity in HT-29 cells by water extract from *Cnidii Rhizoma*. Indicated values represent mean±SD (n=3). Values statistically significant compared with the control are marked as asterisks (* p<0.05).

3. 세포내 glutathione S-transfetrase (GST)활성 유도 효과

천궁물추출물에 의한 GST 활성도를 관찰한 결과, 천궁물추출물 0.1~5.0 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해 1.0~1.2배의 활성유도가 나타났으며, 5.0 mg/ml (p<0.05)에서는 통계적으로 유의성 있는 유도율을 나타내었다 (Fig. 3). 따라서 천궁물추출물은 발암물질에 의한

세포내 DNA, RAN, protein의 손상을 막아주고 세포내에 생성된 산화물질과 기타의 독성물질을 무독화 할 수 있을 것으로 보인다.

4. 세포내 glutathione (GSH) 함량

HT-29 세포에 천궁물추출물을 농도별로 처리한 결과, GSH의 함량은 천궁물추출물의 농도의존적으로 증가하였으며, 0.1, 0.5, 1.0 및 5.0 mg/ml의 농도로 처리한 세포 모두에서 통계적으로 유의성 있는 GSH 생성의 증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

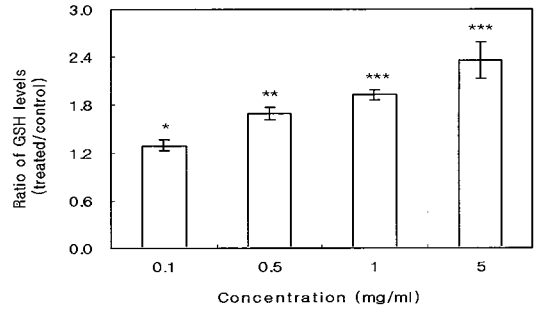


Fig. 4. Increase of glutathione (GSH) levels in HT-29 cells by water extract from *Cnidii Rhizoma*. Indicated values represent mean±SD (n=3). Values statistically significant compared with the control are marked as asterisks (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005).

5. Ornithine decarboxylase (ODC) 활성

HT-29 세포 현탁액에서 천궁물추출물이 TPA에 의해서 유도된 ODC 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 천궁물추출물 농도 1.0 (p<0.05) 과 5.0 mg/ml (p<0.005) 에서는 통계적으로 유의성 있는 억제효과를 측정할 수 있었다(Fig. 5).

또한 천궁물추출물 5.0 mg/ml 농도에서는 ODC 활성 저해의 대표적 물질인 difluoromethylornithine (DFMO)보다 더 높은 저해효과를 측정할 수 있었다(Fig. 5).

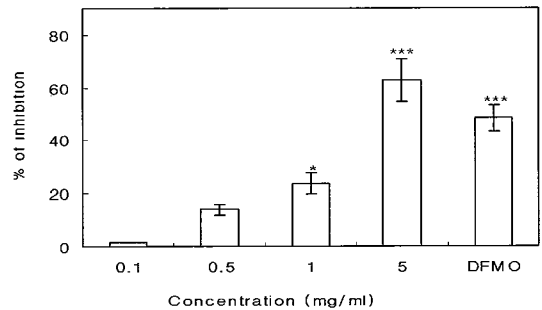


Fig. 5. Effect of water extract from *Cnidii Rhizoma* on TPA-induced ODC activity in human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells. DFMO, 0.01 mM difluoromethylornithine. Indicated values represent mean±SD (n=3). Values statistically significant compared with the control are marked as asterisks (* p<0.05, *** p<0.005).

고찰

Phase II 대사효소들의 유도는 chemical stress나 발암과정의 개시단계에 대한 중요한 방어기작이다. Phase II 효소의 한 종류인 QR은 quinone을 환원시켜 무독하게 만들고, 발암물질에 의해 일

어는 돌연변이와 종양화 효과를 막아주는 역할을 한다. GST는 외부 이물질의 대사과정 중 생성된 친전자성 대사산물을 GSH와 결합시켜 용해되기 쉬운 수용성 물질로 만들어 배설시키는 효소로서¹²⁾, 세포질내에 다량으로 존재하며 여러 종류의 isoenzyme이 밝혀져 있다¹³⁾. 또한 이 효소는 생체내의 GSH를 기질로 이용하여 발암의 직접적인 원인이 되는 활성 중간대사산물을 제거함은 물론 항산화활성의 역할도 한다. 따라서 GST는 phase II enzyme 중의 하나로서 암 개시단계의 biomarker로 이용되고 있다.

본 실험에서는 천궁물추출물을 이용한 phase II 대사효소들인 QR과 GST의 활성 유도율에 미치는 영향을 측정된 결과, HT-29세포에서 천궁물추출물은 농도의존적으로 발암물질을 무독화시키는 QR의 활성 유도를 증가시켰다. 그리고 유리기를 파괴하여 반응성이 높은 산소들로부터 세포를 보호하는 기능을 가진 GST의 활성 유도는 천궁물추출물 3 mg/ml 에서 통계적으로 유의성 있는 증가를 나타내었다.

GSH는 외부의 독성물질이 세포내 침입했을때 직접 반응하거나 GST에 의해 독성물질과 결합하여 무독하게 하는 기능을 가지고 있다. 세포내 GSH가 고갈되면 독성이 강한 대사산물이 생성되어 세포내 손상과 암의 발생이 일어난다⁴⁾. Sulfur를 포함한 화합물 등은 체내 GSH 함량을 증가시켜 GST나 QR과 같은 독성 억제효소의 활성을 증가시켜 발암물질의 생성을 억제시키는 것으로 보고되었다¹⁴⁾. 본 실험에서 GSH의 생성이 천궁물추출물의 농도에 의존적으로 증가하는 경향을 보였다.

발표된 연구결과들에 의하면 직장암세포의 성장과 성장인자와 종양 촉진자에 대한 직장암세포의 생물학적 반응에 polyamine과 ODC 활성이 매우 중요한 요소임이 증명되었다¹⁵⁾. 그러므로 ODC 활성 저해제로 작용하여 polyamine 함량을 변화시킬 수 있는 물질은 직장암 치료에 사용할 수 있을 것이다. 또한 ODC 활성 증가는 종양발생의 촉진(promotion)단계를 자극하므로, 천궁물추출물의 ODC 활성 억제 결과에 의하면 천궁이 직장암 발생과정의 anti-promoting 작용에 의해 암예방 효과가 있을 것으로 보인다.

결 론

천궁으로 열수물추출물을 조제하여 HT-29 세포에서 세포의 증식에 미치는 영향, phase II 대사효소인 QR과 GST의 활성 및 GSH의 생성 유도율을 측정된 결과, 천궁물추출물은 농도의존적으로 직장암세포의 증식을 억제하였다. 그리고 QR과 GST의 활성 및 GSH의 생성을 증가시켰다. 또한 직장암 발생과정의 촉진 단계에 관여하는 ODC 활성도 저해하였으므로 천궁물추출물은 직장암 발생의 개시단계와 촉진단계에 저해효과가 있으며 직장암 예방 제재로서 개발 가능성이 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초과학연구센터 육성사업의 지원 (R13-2005- 013-01003-0)을 받아 수행된 연구과제이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Korea Central Cancer Registry, Ministry of Health and Welfare, R.O.K. Annual report of Korea central cancer registry (2002). Ministry of Health and Welfare, 2003.
2. Kim, H.Y., Yang, E.J. A study on dietary factors related to the incidence of stomach cancer and colon cancer in Korean. *Kor. J. Nutr.* 26:603-615, 1993.
3. Prochaska, H.J., Talalay, P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.* 48:4776-4782, 1988.
4. Mitchell, J.R., Hinson, J.A., Nelson, S.D. Glutathione and drug induced tissue lesions: metabolism and function, In Arias, I. M. and W.B. Jakoby (eds.), *Glutathiones*, Raven Press. New York, USA, pp 357-367, 1976.
5. Li, L., Carol, T., Susan, K.G. Inhibition of ornithine decarboxylase (ODC) decreases tumor vascularization and reverse spontaneous tumors in ODC/Ras transgenic mice. *Cancer Res.* 60:5696-5730, 2000.
6. Tanako, T., Kojima, T., Suzuki, M., Mori, H. Chemoprevention of colon carcinogenesis by the natural product of a simple phenolic compound protocatechuic acid: suppressing effects on tumor development and biomarkers expression of colon. *Cancer Res.* 53:3908-3913, 1993.
7. 최국주. 생약학. pp 170-171, 1994.
8. 김대근. 생약학. 서울, 동명사, pp 454-456, 2001.
9. Prochaska, H.J., Santamarina, A.B. Direct measurement of NAD(P)H:Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducer. *Anal. Biochem.* 169:328-336, 1988.
10. Habig, W.H., Pabst, M.H., Jacoby, W.B. Glutathione S-transferase : The first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130-7139, 1974.
11. Griffith, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106:207-212, 1980.
12. Bora, P.S., Spilburg, C.A., Lange, L.G. Metabolism of ethanol and carcinogens by glutathione transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:4470-4473, 1989.
13. Wattenberg, L.W., Bueding, E. Inhibitory effect of 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (oltipraz) on carcinogenesis induced by benzo(a)-pyrene, diethylnitrosamine, and uracil mustard. *Carcinogenesis* 7:1379-1381, 1986.
14. Benson, A.M., Barretto, P.B. Effects of disulfiram, diethyldithiocarbamate, bisethylxanthogen, and benzyl isothiocyanate on glutathione transferase activities in mouse organs. *Cancer Res.* 45:4219-4223, 1985.
15. Marton, L.J., Pegg, A.E. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35:55-91, 1995.