

## 금은화 약침액의 암예방 효과

김중완, 최혜경, 손윤희<sup>1</sup>, 임종국, 이항우<sup>2</sup>, 남경수<sup>1\*</sup>

동국대학교 한의과대학, <sup>1</sup>동국대학교 의과대학, <sup>2</sup>영남대학교 이과대학

### Chemopreventive Potential of *Lonicerae flos* Aqua-Acupuncture Solution

Joong-Wan Kim, Hey-Kyung Choi, Yun-Hee Shon<sup>1</sup>, Jong-Kook Lim,

Hang-Woo Lee<sup>2</sup> and Kyung-Soo Nam<sup>1\*</sup>

College of Oriental Medicine and <sup>1</sup>College of Medicine, Dongguk University Kyongju 780-714, Korea;

<sup>2</sup>College of Science, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

**Abstract** – *Lonicerae flos* aqua-acupuncture solution (LFAS) and *Lonicerae flos* water-extracted solution (LFWS) were prepared and tested for chemopreventive potentials. Three biomarkers [quinone reductase (QR), ornithine decarboxylase (ODC), glutathione (GSH)] were used to test chemopreventive potential of LFAS. LFAS was potent inducer of QR activity in Hepa1c1c7 murine hepatoma cells, whereas LFWS is less potent. LFAS and LFWS were also induced QR activities in cultured human hepatoma Hep3B cells. The effects of LFAS and LFWS were tested on the growth of *Acanthamoeba castellanii*. Proliferation of *Acanthamoeba castellanii* was inhibited by LFAS and LFWS at concentrations of 0.1x, 0.5x, 1x, and 3x. In addition, GSH levels were increased about 2-fold with LFAS and 1.5-fold with LFWS in cultured murine hep1c1c7 cells. LFAS and LFWS were also shown to increase GSH levels in human Hep3B cells. These results suggest that LFAS has chemopreventive potential by inducing QR activity, inhibition of ODC activity and increasing GSH levels.

**Key words** – *Lonicerae flos*; chemopreventive potential; quinone reductase; ornithine decarboxylase; glutathione.

금은화 (金銀花, *Lonicerae flos*)는 인동과에 속하는 만성등본인 인동덩굴 *Lonicerae japonica* Thunb의 화관으로 응저, 종독, 약창등에 응용하여 양간청폐, 소종폐독, 경락습열, 근골산통의 주치 약물로 한방에서 주로 사용되어 왔다.<sup>1)</sup>

금은화의 성분에 관한 연구는 심<sup>2)</sup> 등이 ginnol, sterols 및 glycoside를 보고하였고 Wong-Leung<sup>3)</sup>등이 chlorogenic acid, flavonoid 화합물 및 tannin을 보고하였다. 또한 Li<sup>4)</sup>는 isochlorogenic acid를 보고하였다.

금은화 약효에 관한 연구에 강<sup>5)</sup> 등은 금은화의

methanol 추출액은 독성이 거의 없고 수종의 그람 양성 및 그람 음성균에 항균작용이 있고, 손상된 간에 치료효과가 있으며, 항염작용이 있다고 보고하였다. 정<sup>6)</sup> 등도 금은화의 ethyl acetate 분획이 세포분열 및 세포성장에 관여하여 그 작용을 촉진시키고 동시에 항돌연변이원성을 일으킨다고 보고하였다.

특히 금은화의 항암효과에 관한 연구는 황<sup>7)</sup>이 금은화의 phenolic 성분을 분리하여 인체 암세포에 미치는 영향을 보고하였고, 한<sup>8)</sup> 등은 금은화 ethyl acetate 분획의 인체 구강유상피세포에 대한 독성효과를 살펴보았다. 김<sup>9)</sup> 등은 금은화 약침액의 항종양 작용을 보고하기도 했다.

그러나 금은화 약침액의 암억제효과에 대한 연구

\*교신저자 : Fax 0561-770-2447

는 미비하므로 본 연구에서는 암예방 물질(chemopreventive agents) 연구에 널리 이용되고 있는 QR, ODC inhibition, GSH의 활성을 측정하여 약침액의 암예방 효과를 살펴보았다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - minimum essential medium eagle's (MEM), antibiotics, dimethyl-sulfoxide (DMSO), 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 99% ethyl alcohol anhydrous, NaCl, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Tris-HCl, bovine serum albumin (BSA), tween-20, FAD, glucose-6-phosphate, NADP, yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, menadione, dicoumarol, potassium phosphate, crystal violet, KOH, glucose, thiamine HCl, biotin, vitamin B12, ferric citrate,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , yeast extract-proteose peptone, Na-phosphate, Na-EDTA, triton X-100, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), glutathione reductase, NADP<sup>+</sup>, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco (USA)에서 구입하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 1급 시약을 사용하였다.

금은화 (*Lonicerae flos*)는 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 강원도산 금은화를 정선하여 사용하였고, 추출용매인 물은 이온교환수지를 통과시킨 증류수를 사용하였다.

**금은화 약침액의 제조** - 약침액은 수제 알콜침법에 의하여 조제하였다 (Fig. 1). 금은화 60 g을 조말하여 3차증류수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 진탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 ml을 감압농축하였다. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol로 가하여 75%, 85%, 95%의 ethanol 용액이 되게 하여 침전물을 여별하고, pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22  $\mu\text{m}$ , Whatman, Germany)로 여과한다. 그리고 3차 증류수를 가하여 200 ml이 되게 하여 1x의 약침액으로 사용하였으며 10x, 5x약침액은 1x의 약침액을 감압농축하여 사용하였고, 증류수를 첨가하여 0.1x, 0.5x농도를 조제하였다.

**금은화 열수 추출액의 제조** - 금은화 60 g을 조말

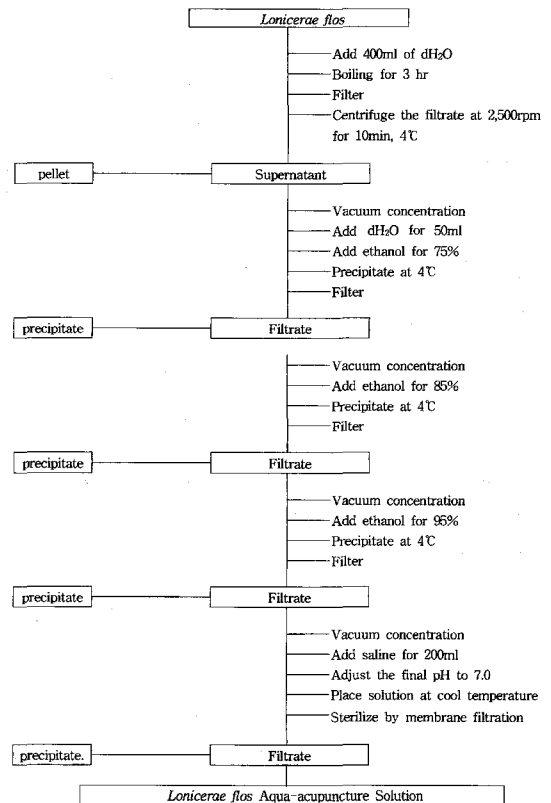


Fig. 1. Preparation of *Lonicerae flos* aqua-acupuncture solution (LFAS)

하여 3차증류수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 진탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 ml을 감압농축하여 pH 7.4로 적정한다. 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22  $\mu\text{m}$ , Whatman, Germany)로 여과하여 1x의 열수추출액으로 사용하였으며 10x, 5x 열수추출액은 1x의 열수추출액을 감압농축하여 사용하였고, 증류수를 첨가하여 0.1x, 0.5x 농도를 조제하였다.

**Quinone reductase assay** - QR 활성은 Prochaska<sup>10)</sup> 등의 방법에 따라 측정하였다. 즉,  $1 \times 10^4$ 개의 hepalc1c7 세포 또는 Hep3B 세포를 200  $\mu\text{l}$ 의 MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고  $\text{CO}_2$  incubator에서 24시간 배양 후, 새 배양액 190  $\mu\text{l}$ 와 금은화 약침액 (0.1x, 0.5x, 1x, 2x, 3x, 4x, 5x) 또는 열수 추출액 (0.1x, 0.5x, 1x, 2x, 3x, 4x, 5x)을 10  $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 가하였다. 세포를 약

침액 또는 열수추출액이 첨가된 배양액에서 48시간 배양 후 배양액을 버리고 세포를 lysis시켰다. 200  $\mu$ l reaction mixture[7.5 ml of 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 100 mg of bovine serum albumin, 1  $\mu$ l of 1.5% Tween-20, 0.1 ml of 7.5 mM FAD, 1 ml of 150 mM glucose-6-phosphate, 90  $\mu$ l of 50 mM NADP, 300U of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45 mg MTT, 150  $\mu$ l of 50 mM menadione in 150 ml H<sub>2</sub>O]를 각 well에 넣고 5분간 반응 후 0.3 mM dicumarol(in 0.5% DMSO)과 5 mM potassium phosphate가 들어 있는 용액 50  $\mu$ l를 첨가하여 microplate reader를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Crystal violet staining(cytotoxicity assay)** - 세포수에 대한 QR 생성량을 측정하기 위해 앞 실험과 같이 96-well plate에 hepa1c1c7 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  $\mu$ l씩 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시키고 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**QR 활성 유도** - 환원된 MTT와 crystal violet 흡광도에 의해 QR specific activity를 산정하였고, QR 활성 유도는 금은화에 의한 QR의 활성과 대조군의 활성의 비율로 측정하였다.

**Acanthamoeba castellanii의 증식 측정에 의한 ornithine decarboxylase (ODC) 활성 측정** - *Acanthamoeba castellanii*의 증식을 측정하여 ODC 활성을 측정하였다.<sup>11)</sup> 2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells의 *Acanthamoeba castellanii*를 3 ml OGM{3 N KOH, 30% glucose, 2,000 $\times$ vitamins(0.2 g thiamine HCl, 40 mg biotin, 200  $\mu$ g vitamin B<sub>12</sub>/100 ml 95% ethanol), 100 $\times$  salt I(0.4 g ferric citrate, 0.1 g CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, 3.1 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O in 250 ml dH<sub>2</sub>O), 100 $\times$ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (13.6 g/l, pH 7.0), yeast extract-proteose peptone (7.5 g/l)}에 부유시켜 T-25 tissue culture flask에서 금은화 약침액(3 $\times$ , 1 $\times$ , 0.5 $\times$ , 0.1 $\times$ ) 또는 열수 추출액(3 $\times$ , 1 $\times$ , 0.5 $\times$ , 0.1 $\times$ ) 150  $\mu$ l와 배양하였다. 그리고 24, 48, 72, 96, 120, 144시간 후의 세포수를 hemocytometer를 이용하여 계수하였다.

**GSH 생성량 측정** - 세포내 GSH 양은 Griffith<sup>12)</sup>의 방법을 96-well microtiter plates에서 사용할 수

있게 변형하여 측정하였다. 1 $\times$ 10<sup>4</sup>의 세포 (Hepa1c1c7 또는 Hep3B)를 200  $\mu$ l MEM 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양 후, 10  $\mu$ l 금은화약침액(0.1 $\times$ , 0.5 $\times$ , 1 $\times$ , 2 $\times$ , 3 $\times$ , 4 $\times$ , 5 $\times$ ) 또는 열수추출액(0.1 $\times$ , 0.5 $\times$ , 1 $\times$ , 2 $\times$ , 3 $\times$ , 4 $\times$ , 5 $\times$ )이 포함된 배지 200  $\mu$ l를 각 well에 가하였다. 시료처리 후 48시간 뒤 배지를 버리고 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세번 씻고 세포를 lysis시킨 후 40  $\mu$ l stock buffer(125 mM Na-phosphate, 6.3 mM Na-EDTA, pH 7.4)를 가하고 170  $\mu$ l의 reaction mixture{20  $\mu$ l 6 mM DTNB in stock buffer, 10  $\mu$ l glutathione reductase solution (50 units in 10 ml stock buffer), 140  $\mu$ l of the NADPH-generating system (2.5 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, 330  $\mu$ l 150 mM glucose-6-phosphate, 30  $\mu$ l 50 mM NADP<sup>+</sup>, 100 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase in 50 ml distilled water)}와 반응시켰다. 상온에서 5분간 shaking 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포내 GSH 함량은 GSH 표준곡선에 의해 산정하였다. 세포내 총 단백질은 bicinchoninic acid protein kit(Sigma, USA)를 이용하여 bovine serum albumin을 표준 단백질 용액으로 이용한 표준검량선을 구하고 그 양을 산출하였다. 시료는 비독성 농도 (protein content > 70% of 대조군)에서 GSH 함량을 측정하였으며, 함량은 nmol/mg protein으로 표시하였다. GSH 함량의 비는 금은화에 의해 생성된 GSH의 함량과 대조군에 의한 함량의 비율로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

암예방 (chemoprevention)은 암화 (carcinogenesis) 과정을 연장, 억제시키거나 암화된 것을 전환 (reversion)시키는 작용이다. 현재 암예방물질에 대한 많이 연구가 진행되고 있으며, 효과적인 암예방 물질(chemopreventive agents)의 연구를 위해 생화학적 표식자(biochemical markers)를 사용하고 있다.<sup>13)</sup> 이 표식자들은 암화과정시 발암물질의 대사물질과 그의 부산물과도 반응하며 다양하고 많은 발암기전을 저해할수록 효과적인 암예방물질로 간주된다. 이러한 표식자들에는 QR, ODC, GSH 등이 사용되고 있다. Quinone reductase는 세포질에 주로 분포되어 있으며,<sup>14)</sup> quinones과 quinoneimines를 환원시켜서 세포에 대한 독성을 제거한다.<sup>15)</sup> QR은 glutathione

S-transferase와 UDP-glucuronosyl transferase와 같이 phase II enzyme으로 외부의 독성이 있는 물질과 돌연변이물질(mutagen), 발암물질(carcinogen)로부터 세포를 보호한다. phase II enzyme 생성의 유도는 곧 항암활성(anticarcinogenic activity)으로 여겨진다.<sup>16)</sup>

금은화 약침액의 phase II enzyme QR 생성의 유도효과를 측정하였다. hepalc1c7 세포에 대한 실험에서 약침액 0.1x농도에서 대조군에 비하여 1.2배 증가를 보였으며 2x농도에서 가장 높은 수치인 2.8 배의 생성유도율을 보였다(Fig. 2). 열수추출액에서는 추출액 0.1x농도에서 1.1의 유도율을 나타냈으며 농도가 증가함에 따라 QR의 유도율도 조금씩 증가하여 열수추출액 4x농도에서 1.7의 가장 높은 수치를 보였다(Fig. 2). 각각의 농도에 있어서 열수 추출액보다 약침액에서 QR의 생성유도가 높게 나타났다. 생쥐의 간암세포인 hepalc1c7에서 열수추출액, 약침액 모두 QR 생성을 유도하였으나 약침액의 경우 2.8이 최고수치인데 반해 열수추출액은 1.7의 유도율을 보여 약침액이 열수추출액보다 더 많은 QR 생성을 유도하였다.

Hep3B 세포에 대한 금은화의 QR 생성유도율을 측정해 본 결과, 약침액의 경우 농도 0.1x에서 1.0

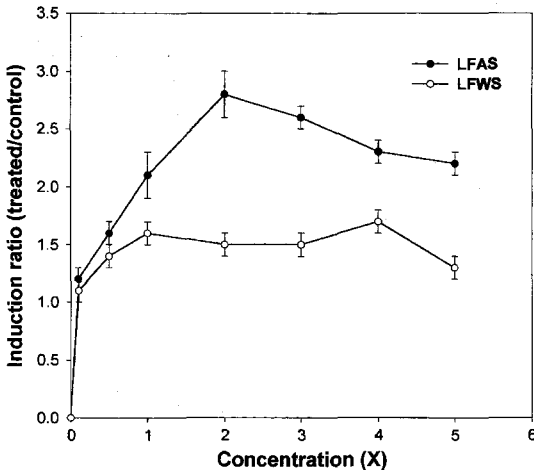


Fig. 2. Effect of *Lonicerae flos* aqua-acupuncture solution (LFAS) or *Lonicerae flos* water solution (LFWS) on induction of quinone reductase (QR) activity in mouse hepatoma hepalc1c7 cells. Cells were treated with LFAS or LFWS for 48 hrs, and the change in the levels of quinone reductase was measured. Each point represents the mean of three separate experiments.

인 수치를 보이다가 농도 3x에서는 유도율을 5.1로 현저히 많은 QR 생성이 유도되었으나 4x농도에서는 유도율이 감소하였다 (Fig. 3). 열수추출액을 Hep3B에 처리했을 때에는 농도 0.1x에서 농도 2x까지 열수 추출액의 농도가 높아짐에 따라 QR 생성량도 같이 증가하여 2x농도에서 4.7의 가장 높은 유도율을 보였고 농도 3x에서 감소하였다 (Fig. 3). 금은화 약침액은 생쥐(Hepalclc7) 및 사람의 간암세포(Hep3B)에서 효과적으로 QR 생성을 유도하였다.

한방에서는 금은화를 화농 및 종양의 치료제로 사용하였고 황<sup>7)</sup>이 금은화의 phenol성 성분이 인체 암세포 성장 저해 효과를 보고하였다. 한<sup>6,8)</sup> 등은 금은화의 ethyl acetate 분획이 인체 구강유상피세포에 독성효과를 증명하였고 항돌연변이원성이 있다고 보고하였다. 이러한 보고들에 의하면 금은화는 항암효과가 있을 뿐 아니라, 본 연구의 금은화 약침액에 의한 QR 생성유도를 미루어 볼 때 금은화 약침액은 발암물질의 종양효과(neoplastie effect)를 막아주는 phase II enzyme, 즉 QR을 유도하여 돌연변이원성 및 발암물질의 대사과정시 생성된 quinone에 의한 세포내 독성 및 세포내 DNA 손상을 제거하여 암억제 효과가 있을 것으로 추측된다.

암예방 물질 연구에 사용되는 표식자 중의 하나인 ODC는 polyamine 생합성과정에서 putrescine의 생

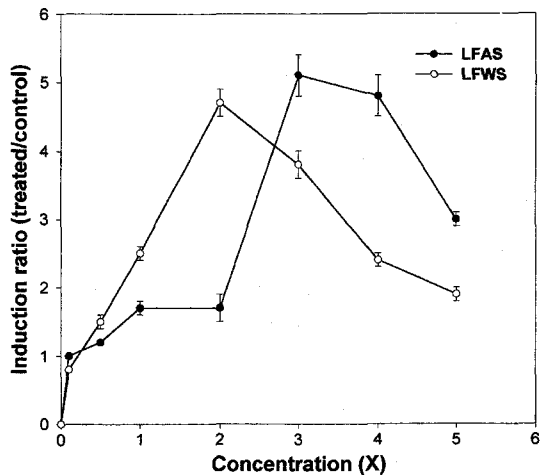


Fig. 3. Effect of LFAS or LFWS on induction of QR activity in human Hep3B cells. Cells were treated with LFAS or LFWS for 48 hrs, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean of three separate experiments.

성에 관여하는 효소이며 정상세포와 종양세포(neoplastic cell)의 증식에 필수적이다.<sup>17)</sup> 또한 ODC의 유도는 암촉진(tumor promotion)에도 중요한 기능을 담당하고 있어 생쥐에서 피부암 촉진 실험에서 ODC 활성 유도와 발암 물질의 암촉진 능력간의 밀접한 관계를 나타내었으며, 다른 조직에서도 암 촉진자(tumor promotor)들이 ODC 활성을 유도하는 것으로 보고되었다.<sup>18)</sup> Difluoromethylornithine(DFMO)과 같은 ODC의 저해제는 발암과정(carcinogenesis)을 저해시킬 수 있다.<sup>19)</sup>

Polyamine은 발암과정시 비정상적으로 생합성되어 발암과정에 밀접한 관계가 있으며, 원생동물 세포의 성장 및 분화에도 관여한다. 원생동물 세포 배양에서 돌연변이 또는 억제제를 사용하여 polyamine의 합성을 막으면 세포성장도 중단된다. 그러므로 원생동물의 polyamine 생합성 억제제는 암세포의 성장을 저해할 수 있다.<sup>20)</sup>

Polyamine 합성이 아메바 증식에 필수적이므로 금은화 약침액이 polyamine 대사 억제 기작에 의해 carcinogenesis의 suppressing(anti-promotion/anti-progression) agent로서의 기능을 살펴보기 위하여 금은화 약침액에 의한 아메바의 증식을 측정하였다(Fig. 4A).  $2 \times 10^5$ 개의 *Acanthamoeba castellanii*에 150  $\mu$ l의 증류수 및 금은화 약침액을 농도별로 처리하였다. 농도 3x 금은화 약침액에서는 시료 처리 후 24시간, 48시간에 각각  $1.9 \times 10^5$ ,  $2.1 \times 10^5$ 개의 세포로 이들 동안 거의 증식하지 않았으며 144시간이 지난 후에도  $12.8 \times 10^5$ 개의 세포수를 보여 증류수만

을 넣은 control에 비해 강한 증식억제효과를 보였다. 약침액 처리후 144시간에 0.1x, 0.5x, 1x에 따른 각각의 세포수는  $23.9 \times 10^5$ ,  $21.1 \times 10^5$ ,  $17.1 \times 10^5$ 으로 약침액 농도가 높아짐에 따라 아메바 증식이 감소되었으므로 금은화 약침액은 농도 의존적으로 아메바 증식을 억제하였다(Fig. 4A).

ODC에 대한 열수추출액의 아메바 증식 억제능을 살펴보기 위해 약침액 실험과 같이  $2 \times 10^5$ 개의 *Acanthamoeba castellanii*에 150  $\mu$ l의 증류수 및 금은화 열수추출액을 농도별로 처리하였다. 각각의 농도 즉 control, 0.1x, 0.5x, 1x, 3x에 대한 세포수를 측정해 보았을 때,  $3.4 \times 10^5$ ,  $3.3 \times 10^5$ ,  $3.2 \times 10^5$ ,  $3.1 \times 10^5$ ,  $2.7 \times 10^5$ 개의 세포수를 보여 24시간 동안 농도별 세포 증식에 큰 차이를 보이지 않았으나 96시간째에  $16.8 \times 10^5$ ,  $14.9 \times 10^5$ ,  $14.1 \times 10^5$ ,  $11.1 \times 10^5$ ,  $8.9 \times 10^5$  세포수로 열수추출액의 농도가 높을수록 아메바의 세포수가 감소하였다. 3x농도에서 약침액은  $3.2 \times 10^5$ 개의 세포수를 나타낸 것에 반해 열수추출액은  $8.9 \times 10^5$ 개로 열수추출액보다 약침액이 세포증식억제 능이 높게 나타났다(Fig. 4B). 이는 대표적인 ODC 억제제인 DFMO에 의한 아메바 증식의 억제 현상과 비슷하였다.<sup>11)</sup>

금은화 약침액과 열수추출액은 농도 의존적으로 아메바의 성장을 억제하였고 금은화 약침액과 열수추출액에 의해 아메바 세포수가 감소하는 것이 아니라 증식은 하되 성장속도를 지연시키므로 금은화 약침액, 열수추출액의 독성에 의한 수의 감소가 아니라 아메바 성장에 필요한 polyamine의 고갈에 따른 성장속도의 지연으로 보인다. 금은화 약침액 및 열수추출액이 ODC 활성에 영향을 주어 polyamine 생성을 저해시키고 이에 금은화 약침액 및 열수추출액을 처리한 배양액에서 배양된 아메바의 세포 성장이 저해된 것으로 추측된다.

ODC의 활성저해는 발암촉진의 저해를 발생시키며 retinoid, DFMO 등은 ODC 활성을 저해시켜 종양 발생을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>17,18)</sup> 본 실험에서의 아메바 성장억제는 ODC 활성 저해로 인한 것으로 여겨진다.

GSH는 세포내 다양한 기능을 가지고 있으며 특히 독성이 강한 물질을 제거해준다. 대부분의 외부의 화학물질은 cytochrome p-450-dependent monooxygenase system에서 대사되어져 전자친화적물질(electrophilic product), epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질이 된다.<sup>21)</sup> 이 물질들은 GSH와 직접적으

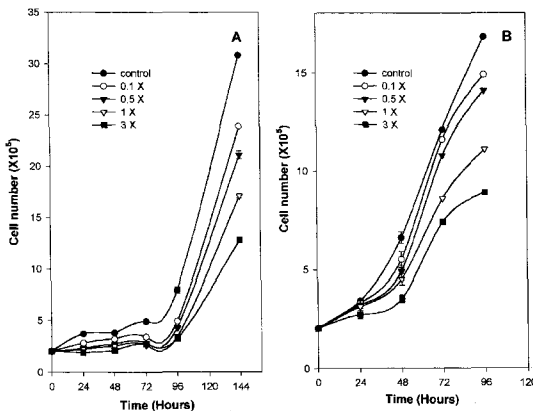


Fig. 4. Inhibition of the growth of *Acanthamoeba castellanii* by LFAS (A) and LFWS (B). *Acanthamoeba castellanii* were incubated with LFAS or LFWS for each time.

로 결합하거나 glutathione S-transferase에 의해 촉매되는 과정을 거쳐 결합하기도 한다. 이 반응들은 무독성과정(detoxification pathway)으로 세포내 GSH가 고갈되면 독성이 강한 대사물질들이 만들어져 세포내 손상을 유발시키고 mutagenesis, carcinogenesis를 일으킨다.<sup>22)</sup>

약침액에 의한 GSH 생성을 Hepal1c7 세포에서 살펴보았다. 0.1x에서 1x농도의 약침액을 처리한 세포에서 대조군보다 1.2, 1.3배의 증가를 보이다가 2x에서 가장 높은 수치인 1.8배를 보였다(Fig. 5). 농도 2x에서 농도가 높아질수록 GSH level이 서서히 낮아졌다. 열수추출액에서는 0.1x, 0.5x, 1x에서 1.4~1.5배의 수치를 보여 다른 농도에서 보다 높은 수치를 보였다(Fig. 5). 1x 이상의 농도에서부터 GSH level이 낮아져서 1.2~1.0 level을 보였다. 생쥐에서 유래된 Hepal1c7 세포내의 GSH는 약침액 농도 2x에서 가장 많이 생성되었고 열수추출액에서의 0.5x, 1x농도를 처리했을 때 가장 많이 만들어졌다.

약침액에 의한 Hep3B에서의 GSH 생성을 살펴보면 0.1x에서 대조군보다 1.6배 더 많은 GSH를 생성하고 0.5x, 1x에서 2.0, 1.9 level로 많은 GSH를 생성하였다(Fig. 6). 2x농도의 약침액을 처리했을 때 GSH level이 1.1로 낮아져서 5x에서 1.0 level을 보였다. 열수추출액을 처리한 Hep3B에서의 경우 3x 농도에서 GSH level이 2.5로 가장 높게 나타났다(Fig. 6). GSH level이 0.1x농도에서 1.5, 1x에서 1.8, 3x에서 2.5배의 유도율을 나타냈으며 4x농도에서부터 GSH level이 현저히 낮아졌다.

Hepal1c7에서 금은화 약침액은 1.8배의 GSH 생성률을, 열수추출액은 1.5배의 GSH 생성률이 증가하였으며, human Hep3B 세포에서도 대조군에 비해 각각 2.0배, 2.5배의 높은 GSH 생성률 증가를 보였다. 위의 결과로 금은화 약침액은 세포내 GSH 생성을 촉진하여 세포내 발생한 산화물질과 기타의 독성물질을 무독하게 할 것으로 추측된다.

Aflatoxin에 의해 유도된 간암에 걸린 쥐의 경우에도 다량의 GSH를 주었을 때 종양저해작용(reduction of tumors)이 있었으며, butylated hydroxyanisole은 GSH level을 증가시켜 화학물질에 의한 발암을 저해한다고 보고되었다.<sup>23)</sup> 이에 금은화 약침액에 의해 증가한 GSH는 산화적인 유리기의 공격(oxidative free radical attack)으로 부터 세포를 보호하고 DNA에 결합하는 것을 막아주어 mutagenesis 또는 carcinogenesis를 저해할 것으로 여겨진다.

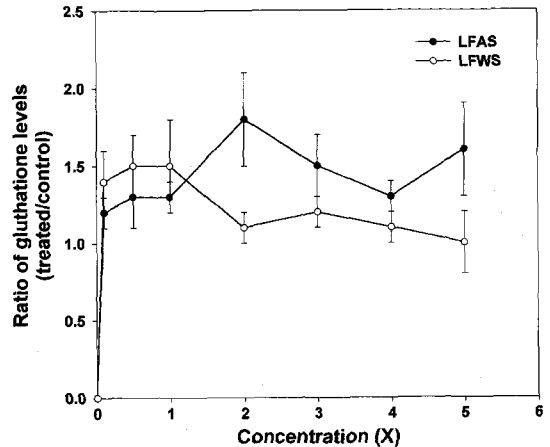


Fig. 5. Induction of glutathione levels by LFAS LFWS in murine hep1c7 cells. Cells were treated with LFAS or LFWS for 48 hrs, and the change in the levels of glutathione was measured. Each point represents the mean of three separate experiments.

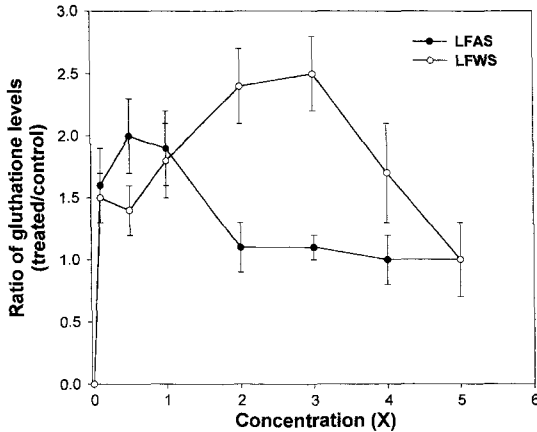
이상의 결과를 종합해 볼 때 금은화 약침액은 열수추출액에 비해 효과적으로 세포내 QR의 농도를 높여주고 ODC 활성을 낮추어 줄 뿐만 아니라 GSH의 양을 증가시켜 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료된다.

앞으로 금은화 약침액에 의해 유도될 것이라 추정되는 phase II enzyme들, 즉 glutathione S-transferase(GST), UDP-glucuronosyl transferase의 생성량 및 활성 변화를 측정하여 금은화 약침액이 phase II enzyme들에게 주는 영향 및 기전을 연구하고, radioactivity를 이용하여 ODC 활성을 직접 측정하여 금은화 약침액의 암예방 기전을 심도 있게 연구하는 것은 매우 가치있는 실험이라 하겠다.

## 결 론

한방에서 염증, 종양 억제 등에 사용되는 금은화로 약침액을 조제하여 암 예방효과를 살펴 본 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 금은화의 암예방 효과를 살펴보기 위하여 발암 물질을 무독성화시키는 quinone reductase 생성 유도를 생쥐의 간암세포인 hep1c7과 사람의 간암세포인 Hep3B에서 측정하였다. 금은화 약침액, 열수추출액을 처리한 hep1c7과 Hep3B에서 QR생성이



**Fig. 6.** Induction of glutathione levels by LFAS, LFWS in Human Hep3B cells. Cells were treated with LFAS or LFWS for 48 hrs, and the change in the levels of glutathione was measured. Each point represents the mean of three separate experiments.

유도되었으며 약침액에 의한 유도율이 더 높았다.

2. 농도별 금은화 약침액과 금은화 열수 추출액에 의한 *Acanthamoeba castellanii* 증식을 살펴 본 결과, 약침액과 열수 추출액이 농도 의존적으로 *Acanthamoeba castellanii* 증식을 저해하는 효과가 있었고 약침액에서 그 효과가 더 높았다.

3. GSH 생성을 살펴본 결과 hepa1c1c7과 Hep3B 두 세포 모두에서 금은화 약침액과 열수 추출액에 의한 GSH 생성이 증가하였다.

### 인용문헌

1. 이시진 (1990) 본초강목, 1334-1336. 인민위생출판사. 서울.
2. 심길순, 문창규, 류창규, 천인수, 정진호, 박대성 (1979) 금은화(*Lonicerae flos*)의 ginnol, sterols, glycosides 추출. 약학논문집 4: 79.
3. Wong-Leung, Y. L. (1981) Studies on the components of the flowers of *Lonicerae japonica* Thunb and their antibacterial activities. *Hsiang-kang Ch*, in *Hui Hsueh Yuan Hsueh Pao* 8: 115.
4. Li, B. (1986) Comparative analysis acid in flower and cane of *Lonicerae japonica* Thunb. *Zhonfcaoyao* 17: 10.

5. 강옥희 (1983) 금은화의 약리작용에 관한 연구. 우석대학교 석사학위논문. 원주.
6. 정규찬, 권동렬, 백석환, 김성환, 장현욱 (1988) 금은화 (*Lonicerae flos*)의 ethyl acetate 분획이 놀연변이원성에 미치는 영향. 약학회지 32: 328-333
7. 황윤정 (1994) 주엽나무잎 및 금은화의 phenol성 성분. 충북대학교 석사학위논문. 청주
8. 한두석, 한중현, 백승화, 김일광 (1993) 금은화 추출물의 세포독성에 관한 연구. 원광한의학 3: 23-32.
9. 김종완, 임종국 (1999) 금은화 약침액의 항종양 작용 및 생체장기에 대한 영향. 대한침구학회지 16: 255-267.
10. 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.
11. Kim, B. G., McCann, P. P. and Byers, T. J. (1987) Inhibition of multiplication in *Acanthamoeba castellanii* by specific inhibitors of ornithine decarboxylase. *J. Protozool.* 34: 264-266.
12. Griffith, O. W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106: 207-212.
13. Sharma, S., Stutzman, J. K., Kelloff, G. J. and Steele, V. E. (1994) Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* 54: 5848-5855.
14. Talalay, P. and Benson, A. M. (1982) In advances in enzyme regulation *In* Weber, G. (ed.), 20, 287-300. Pergamon, Oxford.
15. Prochaska, H. J., Talalay, P. and Sies, H. (1987) Direct protective effect of NAD(P)H : quinone reductase against menadione-induced chemiluminescence of postmitochondrial fractions of mouse liver. *J. Biol. Chem.* 262: 1931-1934.
16. Talalay, P. and Prochaska H. J. (1987) A quinone reductase with special functions in cell metabolism and detoxification. *In* Ernster, L., Estabrook, R. W., Hochstein, P. and Orrenius, S. (eds.), DT-Di-aphorase, 61-66. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

17. Bull, A. W., Nigro, N. D., Golembieski, W. A., Crissman, J. D. and Marnett, L. J. (1984) *In vivo* stimulation of DNA synthesis and induction of ornithine decarboxylase in rat colon by fatty acid hydroperoxides, autoxidation products of unsaturated fatty acids. *Cancer Res.* 44: 4924-4928.
18. Rozhin, J., Wilson, P. S., Bull, A. W. and Nigro, N. D. (1984) Ornithine decarboxylase activity in the rat and human colon. *Cancer Res.* 44: 3226-3230.
19. Kingsnorth, A. N., King, W. W. K., Kiekema, K., McCann, P. P., Ross, J. S. and Malt, R. A. (1983) Inhibition of ornithine decarboxylase with 2-difluoromethylornithine reduced incidence of dimethylhydrazine-induced colon tumors in mice. *Cancer Res.* 43: 2545-2549.
20. Pegg, A. E. and McCann, P. P. (1982) Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* 243: C212-C221.
21. Molders, P. and Jernestiom, B. (1983) Interaction of glutathione with reactive intermediates. *In* Larson, A., Orrenius, S., Holgren, A. and Mannervik, B. (eds.), Functions of glutathione: biochemical, physiological, toxicological, and clinical aspects. 99-108. Raven Press, New York, NY.
22. Mitchell, J. R., Hinson, J. A. and Nelson, S. D. (1976) Glutathione and drug induced tissue lesions: metabolism and function, *In* Arias, I. M. and Jakoby, W. B. (eds), Glutathione, 357-367. Raven Press, New York, NY.
23. Cerutti, P. A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-381.

(1999년 5월 7일 접수)