

하고초와 황기 약침액이 발암 진행과정에 미치는 영향

손윤희 · 박신화¹ · 류준선¹ · 조경희¹ · 임종국¹ · 남경수*

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터
¹동국대학교 한의과대학 경혈학교실

Effect of *Thesium Chinese Turczaninow* Aqua-acupuncture Solution and *Astragali Radix* Aqua-acupuncture Solution on Promotion/progression of Carcinogenesis

Yun-Hee Shon, Sin-Hwa Park¹, Jun-Seon Ryu¹, Kyoung-Hee Cho¹, Jong-Kook Lim¹ and Kyung-Soo Nam^{1*}

Department of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Disease Research Center

¹Department of AM-Pointology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

Abstract

Cancer chemoprevention refers to the use of natural or synthetic substances to prevent initiational and promotional events that occur during the process of carcinogenesis. *Thesium Chinese Turczaninow* aqua-acupuncture solution (TCTAS) and *Astragali Radix* aqua-acupuncture solution (ARAS) were tested as the cancer chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. The effects on the inhibition of phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)-induced free radical formation in HL-60 cells and the inhibition of polyamine metabolism were measured. There is significant inhibition of TPA-induced free radical formation in human leukemic cells with ARAS. Proliferation of *Acanthamoeba castellanii* was inhibited by TCTAS and ARAS. TCTAS and ARAS positive in these assays may inhibit the carcinogenesis process and is considered promising cancer-preventing agents.

Key words – cancer chemoprevention, *Thesium Chinese Turczaninow*, *Astragali Radix*, free radical, polyamine

서 론

암예방(Chemoprevention)은 기존의 항암제를 이용한 암 세포의 치료라는 개념과는 전혀 다른 것으로 미국이나 일본에서도 최근에 시작된 연구분야이며, 암을 연구하는 데 있어 가장 유망한 영역의 하나가 바로 암예방이다. 암은 정상세포가 외부의 발암물질원에 의해 다단계로 진행되며 크게 개시(initiation), 촉진(promotion), 그리고 진행(progres-

sion)의 세 과정으로 진행된다[2]. 이러한 다단계 과정으로 일어나는 암 발생과정은 여러 가지 천연 또는 화학적 화합물에 의해 억제되거나 지연될 수 있다. 효과적인 암발생 억제물질을 연구하는 데 있어 biomarker를 이용하고 있으며[11], biomarker란 다단계 발암과정에서 특이적으로 생성되는 물질 뿐 만 아니라 비정상적인 생화학적 변화로 발암과정의 다단계와 관련하여 각 단계별로 분류된다. 이러한 biomarker들은 blocking agents에 대한 암 개시 (initiation) 단계의 biomarker로서 cytochrome P450 효소의 억제, phase II enzyme의 유도, DNA repair 유도, scavenging electropile 등이 있고, 암의 촉진(promotion)단계와 진행(progression)

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : (054) 770-2412, Fax : (054) 770-2477
E-mail : namks@mail.dongguk.ac.kr

단계의 biomarker를 이용한 suppressing agents로는 free radical inhibition, polyamine 대사 억제, differentiation 유도, oncogene 발현 억제, protein kinase C (PKC) 활성 억제 등이 있다[12].

하고초는 kaempferol, astragalín, d-mannitol, 무기물인 Na, Ca, Mg, Al 및 Fe 등이 주성분인데 kaempferol, astragalín, d-mannitol은 항균작용을 Na, Ca, Mg, Al 및 Fe 등의 무기물들은 이노작용이 있다고 알려져 있다[15]. 황기의 주성분은 알칼로이드, β -sitosterol, linolic acid, linolenic acid, choline, 플라보노이드, 다수의 아미노산 등이 있음이 밝혀졌으며, 약리작용으로는 혈관확장으로 혈압을 강하시키고, 용혈성 연쇄구균과 폐렴쌍구균 및 황색포도상구균 등에 대해 항균작용이 있고, 항종양작용 및 면역증강 등이 있음이 밝혀져 있다[14].

본 실험실에서는 앞서 여러 생약제재 약침액의 암예방 효과(금은화[5], 감두탕[3], 당귀[6], 애엽[13]) 및 면역 증강 효과(시호[7], 감초[8]) 등을 연구한 바, 본 논문에서는 하고초와 황기를 약침액으로 조제하고, 이것을 이용하여 free radical 소거효과 및 polyamine 대사에 미치는 영향을 측정하여 발암과정의 진행단계 억제에 의한 암예방 효과를 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

시료제조

하고초(夏枯草)와 6년근 정선산 황기(黃耆)는 동국대학교 부속한방병원에서 구입하여 사용하였다. 약침액은 수제 알콜침법[5]에 의하여 조제하였다. 3×, 5× 약침액은 1×을 감압농축하여 사용하였고, 0.1×, 0.5× 농도는 증류수로 희석하여 조제하였다.

세포배양

HL-60 (human leukemic cell) 세포는 한국세포주은행(KCLB)로부터 분양받아 사용하였다. 배양용 배지는 RPMI-1640에 20% heat-inactivated FBS를 첨가하여 사용하였으며, 이들 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

Free radical inhibition 측정

Free radical 소거효과는 Cerruti[1]의 방법을 참고하여 실시하였다. 1×10^6 개의 HL-60 세포를 HBSS에 부유시켜 96-well plate에 접종한 후, 8 μ M TPA를 처리하여 1 시간 동안 반응시킨 뒤, 하고초 및 황기 약침액을 농도별로 각각 처리하고 양성대조군으로 0.2 μ g의 ascorbic acid도 TPA를 처리한 세포에 첨가한 후 160 μ M cytochrome C와 20분 동안 반응시켰다. Cytochrome C의 환원은 550 nm에서 측정하였으며, TPA에 의한 유도를 최대 free radical 형성의 측정으로 하고 TPA와 시료처리에 의한 free radical 형성의 비율을 결정하였다.

Polyamine metabolism 측정

Acanthamoeba castellanii (아메바)의 증식을 측정하기 위해 3×10^4 cells의 아메바를 OGM [3 N KOH, 30% glucose, 0.2 g thiamine HCl, 40 mg biotin, 200 μ g vitamin B₁₂/100 ml 95% ethanol이 포함된 2,000× vitamins, 0.4 g ferric citrate, 0.1 g CaCl₂·H₂O, 3.1 g MgSO₄·7H₂O를 혼합한 100× salt I, 100× KH₂PO₄ (pH 7.0), yeast extract-proteose peptone] 3 ml에 부유시켜 30℃에서 배양하였다. 24시간 후 하고초 및 황기 약침액 150 μ l를 각각 처리하였으며, 세포수는 hemocytometer를 이용하여 시간별로 계수하였다[5].

결과 및 고찰

Free radical 소거효과

체내에서 지질과산화물 유발하여 독성을 일으키는 과정에서 일반적으로 free radical이 관여한다고 알려져 있고, free radical을 생성하는 효소계는 non-microsomal oxidizing system인 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 등이 알려져 있다. 내부 및 외부의 요인에 의해 과도한 유리 라디칼 체인(free radical chain)의 작용과 그 대사과정에서 생성되는 세포내의 활성 산소종은 DNA 손상, 노화와 관련된 세포의 퇴화 및 암의 발생을 일으키게 된다. Free radicals와 관련된 활성 산소들은 산소의 대사동안 생화학적 반응에 의해 생성되며, tumor promotion에 중요한 작용을 한다[4]. 나아가 tumor promotion을 저해하는 것으로 알려진 protease inhibitors가 free radical 형성을 저해할 수 있고, vitamin A 유도체가 tumor promotion을 억제하고 여러

retinoid 화합물은 phagocyte O_2^- 생성의 저해제이다. 그러므로 free radical scavengers의 섭취에 의해 free radical에 의한 손상에서 정상조직을 보호할 수 있을 것이다. TPA에 의해서 유도된 free radical을 소거시키는 효과를 살펴 본 결과, 하고초 약침액 0.1 \times , 0.5 \times 와 1 \times 의 농도에서 각각 36.2%, 26.9%, 22.3%로 free radical 형성을 억제시켰다(Fig. 1). 황기 약침액의 경우 0.1 \times 에서 45.5%의 소거효과가 있었고, 0.5 \times , 1 \times 및 3 \times 의 농도에서 35~37%로 free radical 형성을 차단시켰다 (Fig. 2). 황기약침액이 하고초보다 TPA에 의해 유도된 free radical 소거효과가 더 높았다.

Polyamine metabolism에 미치는 영향

Polyamine은 발암과정시 비정상적으로 생합성되어 발암 과정에 밀접한 관계가 있으며, 원생동물의 성장 및 분화에도 관여한다. 원생동물 배양에서 polyamine의 합성을 억제하면 원생동물의 증식도 중단된다. 그러므로 원생동물의 polyamine 생합성 억제제는 암세포의 성장을 저해할 수 있다[9]. 본 논문에서는 원생동물 중 아메바의 증식을 이용하여 polyamine metabolism의 억제에 의한 암 발생 억제 효과를 측정하였다. 1 \times 의 하고초 약침액을 처리했을 때 대수증식기에서 약 26%의 억제효과가 나타났으며, 3 \times 의 약침액 농도에서는 대수증식기에서 52%의 억제효과를 보이다가 98시간이 지난 후, 18%의 아메바 증식 억제 효과를

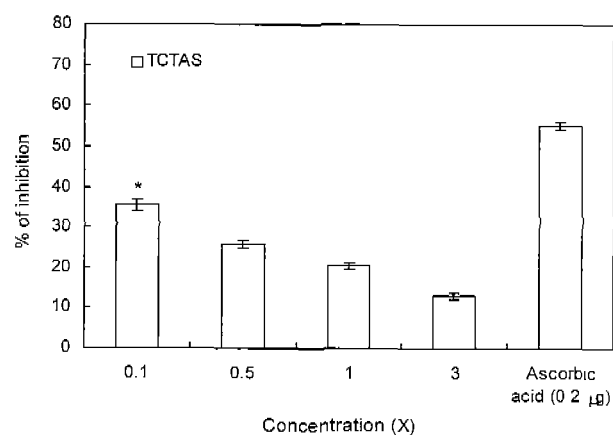


Fig. 1. Effect of TCTAS on TPA-induced free radical formation in HL-60 cells. Experimental details are described in Material and Methods. Values are mean \pm SD (n=3). Mean significantly different from control * (P<0.05) using student's t-test with n=3.

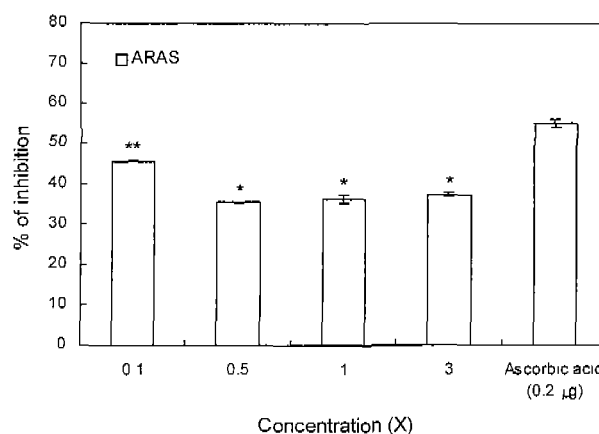


Fig. 2. Effect of ARAS on TPA-induced free radical formation in HL-60 cells. Experimental details are described in Material and Methods. Values are mean \pm SD (n=3). Mean significantly different from control * (P<0.05), ** (P<0.01) using student's t-test with n=3.

보였다(Fig. 3). 1 \times 의 황기 약침액을 처리했을 때 대수증식기에서 약 15%의 억제 효과가 나타났으며 120시간 이후부터는 대조군과 큰 차이가 나타나지 않았다. 5 \times 의 약침액 농도에서는 대수증식기에서 31%의 억제효과를 보이다가 120시간이 지난 후 9%의 아메바 증식 억제 효과를 보였다 (Fig. 4). 이러한 세포의 증식억제는 시료 독성에 의한 세포수의 감소가 아니라 하고초 약침액에 의한 아메바 성장에

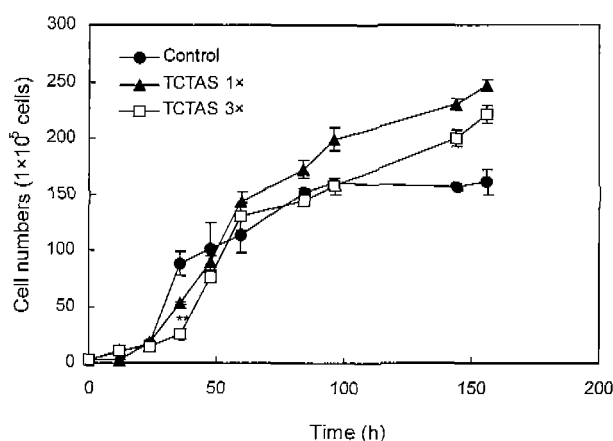


Fig. 3. Inhibition of growth of *Acanthamoeba castellanii* by TCTAS. Experimental details are described in Material and Methods. Values are mean \pm SD (n=3). Mean significantly different from control ** (P<0.01) using student's t-test with n=3.

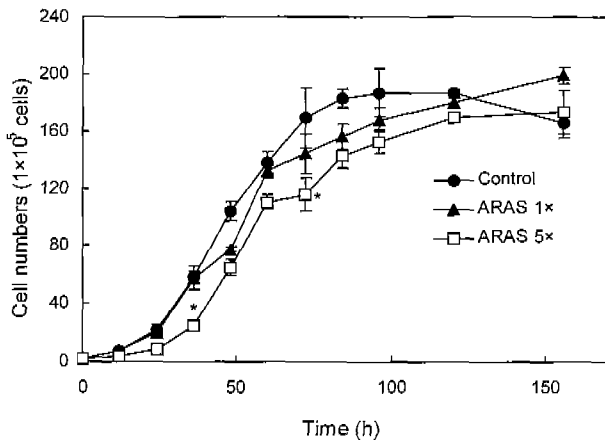


Fig. 4. Inhibition of growth of *Acanthamoeba castellanii* by ARAS. Experimental details are described in Material and Methods.

Values are mean±SD (n=3). Mean significantly different from control ($P<0.05$) using student's t-test with n=3.

필요한 polyamine의 고갈에 따른 증식속도의 지연으로 보인다. Polyamine 생합성과정에서 중요한 효소는 putrescine의 생성에 관여하는 ornithine decarboxylase (ODC)이며 정상세포와 종양세포의 증식에 필수적이다. 또한 ODC의 유도는 암촉진단계 (promotion)에도 중요한 기능을 담당하고 있어 생쥐의 여러 조직을 이용한 암 촉진 실험에서 ODC 활성 유도와 발암 물질의 암 촉진 능력간의 밀접한 관계가 보고되었으며, difluoromethylornithine (DFMO)과 같은 ODC의 저해제는 발암과정을 저해시킬 수 있다[10]. 즉, 하고초 약침액은 ODC 활성에 영향을 주어 polyamine 생성을 저해시키고, 이에 아메바의 성장이 저해된 것으로 보이므로, 앞으로 시료가 ODC 활성에 미치는 영향을 직접 측정하여 발암과정의 촉진단계를 억제할수 있는 물질임을 확인하는 것은 매우 의미있는 실험이라 하겠다.

요 약

하고초와 황기를 약침액으로 조제하고, 이것을 이용하여 free radical 소거효과 및 polyamine 대사에 미치는 영향을 측정하여 발암과정의 진행단계 억제에 의한 암예방 효과를 검증하였다. TPA에 의해서 유도된 free radical을 소거시키는 효과를 살펴본 결과, 하고초 약침액은 0.1× 농도에서 최대 억제효과로 36.2% free radical 형성 억제를 측정하였

으며 황기 약침액의 경우 0.1×에서 45.5%의 소거효과가 있었고, 0.5×, 1× 및 3×의 농도에서 35~37%로 free radical 형성을 차단시켰다. 원생동물 중 아메바의 증식을 이용하여 polyamine metabolism의 억제에 의한 암억제효과를 측정하였다. 3× 농도의 하고초 약침액을 처리한 후 36시간에서는 유의성 ($p<0.01$) 있는 아메바 증식 억제효과를 관찰할 수 있었으며, 황기 약침액 5× 농도 처리에서는 36시간과 72시간에서 유의성 ($p<0.05$) 있는 억제효과가 나타났으나 120시간 이후부터는 대조군과 큰 차이가 없었다. 이러한 아메바의 증식 억제효과는 시료의 독성에 의한 아메바의 감소가 아니라 약침액에 의한 아메바 성장에 필요한 polyamine의 고갈에 따른 증식속도의 지연으로 보인다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 하고초와 황기는 효과적으로 free radical을 소거하고 polyamine을 저해함으로써 외부물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Cerutti, P. A. 1985. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* **227**, 357-381.
2. Farber, E. 1987. Possible etiologic mechanism in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **75**, 65-70.
3. Han, S. H., K. H. Cho, H. K. Choi, J. K. Lim, Y. H. Shon, Y. T. Lee and K. S. Nam. 1999. Chemopreventive effect of Gamdutang aqua-acupuncture solution. *Kor. J. Life Sci.* **9**, 684-691.
4. Kennedy, A. R., W. Troll and J. B. Little. 1984. Role of free radicals in the inhibition and promotion of radiation transformation *in vitro*. *Carcinogenesis* **5**, 1213-1218.
5. Kim, J. W., H. K. Choi, Y. H. Shon, J. K. Lim, H. W. Lee and K. S. Nam. 1999. Chemopreventive potential of *Lonicerae flos* aqua-acupuncture solution. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**, 261-268.
6. Kim, Y. K., K. H. Cho, Y. H. Shon, H. K. Choi, S. Y. Kim, J. K. Lim and K. S. Nam. 2000. Chemopreventive potential of *Angelicae gigantis Radix* aqua-acupuncture solution. *Yakhak Hoeji* **44**, 283-292.
7. Moon, J. Y., J. K. Lim, H. K. Choi, Y. T. Lee, H. W. Lee and K. S. Nam. 1999. Effect of *Bupleuri Radix* aqua-acupuncture solution on immune response in

- mice. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**, 115-122.
8. Park, G. M., K. H. Cho, Y. H. Shon, J. K. Lim and K. S. Nam. 2000. Antitumor and immunomodulatory effects of Glycyrrhizae Radix aqua-acupuncture solution. *Kor. J. Pharmacogn.* **31**, 7-15.
9. Pegg, A. E. 1988. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.* **48**, 759-774.
10. Rozhin, J., P. S. Wilson, A. W. Bull and N. D. Nigro. 1984. Ornithine decarboxylase activity in the rat and human colon. *Cancer Res.* **44**, 3226-3230.
11. Sharma, S., J. D. Stutzman, G. J. Kelloff and V. E. Steele. 1994. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* **54**, 5848-5855.
12. Wattenberg, L. W. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* **45**, 1-8.
13. Yoon, S. M., K. H. Cho, Y. H. Shon, K. S. Nam and J. K. Lim. 2001. Induction of phase II enzyme activity by *Artemisia asiatica Nakai* aqua-acupuncture solution. *J. Kor. AM-Meridian and Pointology.* **18**, 1-9.
14. 락화생. 1992. *면역과 한방*, pp.146-156, 열린책들. 서울.
15. 이정행. 1995. *原色最新醫藥大百科事典*, pp.146-147, 신태양사. 서울.

(Received June 19, 2001; Accepted July 19, 2001)