

곽향과 갈근 복합제제의 대장암 세포주 HT-29 증식 저해효과 및 PGE₂ 생성 억제효과

이승연 · 김희석 · 김정옥 · 황성완 · 황성연*

(주)KMSI 부설 한국의과학연구소

Inhibitory Effect of Mixture of Ethanol Extracts in *Agastachis Herba* and *Pueraria Radix* on the Proliferation and PGE₂ Production of HT-29 Human Colon Cancer Cell Line

Seung Youn Lee, Hee Seok Kim, Jeoung Ok Kim, Sung Wan Hwang, and Sung Yeoun Hwang*

Korea Medical Science Institute, Incheon 400-103, Korea

Abstract – Ethanol extracts of the whole herb of *Agastachis Herba* (A) and of *Pueraria Radix* (P) alone and of their mixture (A+P) downregulated the cell growth, cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, prostaglandin E₂ (PGE₂), and cGMP production. A, P, and A+P inhibited the cell growth of HT-29 colon cancer cells in a concentration- and time-dependent manner but not the growth of normal colon cell, CCD-112CoN. In addition, they markedly inhibited the productions of PGE₂ and cGMP as well as the mRNA expression of COX-2. These data suggest that non-toxic concentration of A, P, and A+P have a significant effect on the in vitro growth of HT-29 cells, specifically through the inhibition of the PGE₂ production via COX-2.

Key words – *Agastachis Herba*, *Pueraria radix*, HT-29, COX-2, PGE₂

곽향 (학명; *Agastache rugosa*, 생약명; *Agastachis Herba*) 은 꿀풀과의 여러해살이 풀로 전국의 산에서 자라며 추위와 건조에 강하여 널리 재배되고 있다. 어린잎은 방애잎, 중개풀, 방아풀이라 하여 추어탕 등 고기비린내 제거용으로 사용되며, 한방에서는 비위에 습이 정체되어 생긴 복부창만, 식욕부진, 메스꺼움, 구토, 설사 등을 치료한다 하였고, 소화장애를 동반한 감기, 여름철 식체로 인한 구토, 설사, 구취, 옴이나 버짐 등에도 효과가 있다 하여 민간요법으로도 사용되어 왔다.¹⁾ 곽향에 관한 연구로는 RAW264.7 세포의 nitric oxide(NO) 생산 억제효과,²⁾ RAW264.7 세포에서 과산화물 생성에 의한 세포독성 보호효과³⁾ 등이 보고되었다.

갈근 (학명; *Pueraria thunbergiana* Benth, 생약명; *Puerariae Radix*)은 일반적으로 칩이라 하여 예로부터 민간에서는 소화불량, 두통, 빈혈, 이질, 복통, 술독, 감기, 구토와 부인들의 하혈에 쓰였고, 소화를 돕는다 하여 생뿌리를 짓찧어 즙을 내어 마셨으며, 칩의 열매는 갈곡이라 하며 설사에, 칩꽃인 갈화는 술독과 장의 보호에, 칩가루인 갈분은 갈증을

해소와 대소변 조절에 쓰였으며, 어린이가 열이 나면서 멍치끝이 아픈데도 쓰여 왔다.¹⁾ 갈근의 약리작용으로는 알코올 탈수소효소 저해작용,⁴⁾ 갈근의 성분인 daidzein과 puerarin의 항염증작용⁵⁾과 갈근 열수 추출물의 항산화 작용⁶⁾ 등이 보고되어 있다.

대장암은 미국과 캐나다를 포함한 성인 남녀의 암발병률 및 사망률의 주요 원인이며, 최근 국내에서도 식생활방식의 서구화로 인하여 대장암 발병률이 급격히 증가하고 있다. 따라서 이의 조기진단과 치료에 대한 관심이 날로 높아지고 있으며, 다양한 물질에 의한 예방은 매우 중요하다. 현재까지 연구된 대표적인 대장암 화학예방 약제로는 아스피린을 포함한 비스테로이드 항염제,⁷⁻⁹⁾ eflornithine,^{10,11)} 호르몬 대치요법,^{12,13)} COX-2 선택 억제제,¹⁴⁾ ursodil,¹⁵⁾ epidermal growth factor receptor (EGFR) 억제제,¹⁶⁾ protease 억제제,¹⁷⁾ matrilysin 억제제,^{18,19)} 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 억제제^{20,21)} 등이 있는데, 이 중 비스테로이드 항염제는 여러 측면에서 가장 효과적인 약물로, COX-1과 COX-2를 억제함으로써 세포증식과 신생혈관 생성을 억제하고 세포사멸을 촉진함으로써 대장암 예방효과를 보이는 것으로 보고되어 있으며,⁹⁾ 비스테로이드 항염제로서 위장관

*교신저자(E-mail) : nexia@kmsi.co.kr
(FAX) : 032-851-2508

계 부작용을 줄일 수 있는 COX-2 선택 억제제 또한 보고된 바 있다.¹⁴⁾

곽향과 갈근은 예로부터 민간에서는 설사치료제 및 소화제로 널리 사용되어 왔지만, 이들이 위장관계에 미치는 영향 및 대장암 세포에 미치는 영향 등에 대한 과학적 근거는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 곽향과 갈근 단독, 또는 혼합물의 에탄올 추출물들이 HT-29 대장암 세포의 증식 및 COX-2 발현량, PGE₂ 및 cGMP 생성, 또한 정상세포의 증식에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료 - 본 연구에 사용된 곽향과 갈근은 대영제약에서 국내산을 구입하여 시료로 사용하였으며, 각각의 시료 50 g (혼합제제의 경우 곽향 25 g+갈근 25 g)에 70% EtOH 100 ml를 첨가하여 12시간 동안 침지 추출하였다. 추출액을 여과한 후 여과액을 감압농축하고 동결건조 하여 곽향 460 mg, 갈근 670 mg, 혼합제제 740 mg의 분말을 얻었고, 이를 200 mg/ml 농도로 DMSO에 녹인 후 실험에 사용하였다.

세포배양 - 본 연구에 사용된 대장암 HT-29 세포주 (KCLB 30038)는 Korean Cell Line Bank (KCLB)에서 구입하여 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배지에 penicillin-streptomycin을 첨가하여 사용하였으며, 약 48시간 주기로 배양액을 교체하여 주었다. 대장 정상세포인 CCD-112CoN (CRL 1541)은 American type culture collection (ATCC)에서 구입하였으며, EMEM 배지에 10% FBS, penicillin-streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포배양은 모두 37°C의 CO₂ incubator (5%)에서 실시하였다.

세포생존률 측정 - 세포의 증식률은 Mosmann²²⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 96 well plate에 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 추출물을 각각 10, 50, 100, 200 µg/ml 농도로 처리하고 12, 24, 48, 72시간 배양하였다. 배양완료 후 0.1% MTT용액을 넣어 37°C, 3시간 동안 배양한 다음 상층액을 제거하고 formazan 침전물에 DMSO를 가하여 15분간 실온에서 교반한 후 570 nm의 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 계산하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR - 세포의 RNA를 easy-spin RNA extraction kit (Intron biotechnology, Korea)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 즉, 세포를 PBS로 세척한 후 lysis buffer에 용해하고, 클로로포름을 가한 후 13,000 rpm에서 10분동안 원심분리하여 RNA가 있는 상층액을 얻고, 이를 RNA-binding column에 통과시켰다. Column을 2회 세척한 후, elution buffer를 통과시켜 RNA를 얻은 후 정량하여 total RNA가 500 ng이 되도록 각각 맞춘 후, Maxime RT-PCR Premix kit (Intron biotechnology, Korea)을 이용하

여 COX-2에 대한 semi-quantitative RT-PCR을 실시하였는데, β-actin 발현량이 일정함을 확인한 후 실시하였다. 사용된 COX-2 primer의 염기서열은 다음과 같다. 5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA AT-3' (sense strand), 5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3' (antisense strand). 온도조건은 denaturation (94°C, 30 sec.), annealing (58°C, 30 sec.), extension (72°C, 1 min.)의 조건에서 30 cycle 실시하였다.

PGE₂ 측정 - 세포내 염증성 cytokine들로 유발된 COX-2에 기인한 PGE₂의 농도변화를 assay kit (Cayman chemical, USA)를 사용하여 enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) 방법으로 제조사의 방법에 따라 정량하였다. 48 well plate에 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 추출물을 각각 50, 100, 200 µg/ml 농도로 처리하여 18시간 배양하고, 배양액을 시료로 사용하였다. Goat anti-mouse IgG가 부착되어 있는 96 well plate에 PGE₂ 표준액 또는 시료를 가한 후, PGE₂-peroxidase conjugate와 mouse anti-PGE₂를 각각 50 µl씩 가하고 실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.05% Tween 20을 함유한 buffer로 항체와 결합하지 않은 PGE₂ 혹은 PGE₂-peroxidase conjugate를 제거하였다. 항원-항체 복합체에 발색시약을 가하여 실온에서 30분간 발색시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 PGE₂와 첨가된 PGE₂-peroxidase conjugate와의 경쟁반응으로 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포배양액에 함유된 PGE₂의 함량을 계산하였다.

cGMP 측정 - 세포배양액으로 분비된 cGMP의 농도변화를 ELISA kit (R&D systems, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 정량하였다. 48 well plate에 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 추출물을 각각 50, 100, 200 µg/ml 농도로 처리하여 18시간 배양하고, 배양액을 시료로 사용하였다. Goat anti-rabbit IgG가 부착되어 있는 96 well plate에 cGMP 표준액 또는 시료를 가한 후, alkaline phosphatase conjugate와 rabbit anti-cGMP를 각각 50 µl씩 가하고 실온에서 2시간 반응시킨 후 항체와 결합하지 않은 cGMP 혹은 conjugate를 제거하였다. 항원-항체 복합체에 p-nitrophenyl phosphate가 함유된 substrate 용액을 가하여 실온에서 30분간 반응시키고, trisodium phosphate 용액으로 발색반응을 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 cGMP와 첨가된 cGMP-alkaline phosphatase conjugate와의 경쟁반응으로 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포배양액에 함유된 cGMP의 함량을 계산하였다.

통계처리 - 본 연구에서 얻은 결과는 mean±SD로 표시하였으며, 대조군과 추출물 사이의 유의성은 paired Student's t-test를 이용하여 **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001인 경우 유의성을 인정하였다.

결 과

세포증식 억제효과 - HT-29 세포에 추출물을 각각 10 µg/ml에서 200 µg/ml까지 농도별로 처리하고 6, 12, 24, 72시간 동안 배양한 후, MTT 측정방법으로 세포생존율을 관찰하였다. 광향 단독 처리군의 경우, 6시간 처리군에서는 세포 생존율이 10, 50, 100, 200 µg/ml의 농도에서 각각 대조군의 100.2, 99.7, 95.4, 95.7%로 저해효과를 보이지 않았으나, 12, 24, 72시간 처리군의 경우에는 시간, 농도에 의존적

으로 HT-29 세포의 생존율이 억제되었다 (Fig. 1A). 같은 단독 처리군의 경우는 72시간 처리군의 경우 세포생존율이 100 및 200 µg/ml의 농도에서 각각 대조군의 92.39 및 87.9%로 억제효과를 보였으나, 6, 12, 24시간 처리군 및 72시간 처리군 100 µg/ml 이하의 농도에서는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1B). 반면에, 광향과 같은 혼합제제의 경우, 6시간 처리군에서는 세포 생존율이 10, 50, 100, 200 µg/ml의 농도에서 각각 대조군의 99.72, 99.89, 97.13, 97.48%로 저해효과를 보이지 않았으나, 12, 24, 72시간 처리군의 경우에는 시간, 농도에 의존적으로 HT-29 세포의 생존율이 억제되었다 (Fig. 1C).

이와같은 광향과 같은 추출물에 의한 HT-29 세포 생존율의 감소현상이 단순히 약제의 독성에 의한 세포 손상 때문인지 조사하기 위하여 정상 대장세포인 CCD-112CoN 세포에 광향과 같은 추출물 및 혼합제제를 각 농도별로 처리하고, MTT 방법으로 세포생존율을 측정하였다. 정상세포인 CCD-112CoN의 경우, 세포 분열시간을 고려해 HT-29 세포와 차별하여 1일, 3일, 5일 후 MTT 측정을 실시하였다. 결과, 광향과 같은 추출물을 단독 처리하였을 때 세포생존율이 대조군과 동일하였으며 (Fig. 2A, B), 혼합물의 경우 세포생존율이 5일 처리군 50, 100, 200 µg/ml의 농도에서 106.08, 111.71, 117.12%로 대조군보다 증가하였다 (Fig. 2C). 이상의 결과, 광향과 같은 단독, 또는 혼합 추출물은 HT-29 세포의 증식을 농도와 시간 의존적으로 억제하였으나, CCD-112CoN 세포의 증식은 억제하지 않았다 (Fig. 1, Fig. 2).

COX-2 mRNA 발현 양상 - COX-2 경로는 종양세포 성장에 관여하는 중요한 조절인자이며, 이 경로들을 차단하면 대장종양이나 대장암의 성장을 억제할 수 있기 때문에 COX-2 유전자의 발현 양상은 대장암의 성장에 매우 중요한 요소인 것으로 보고되어 있다.⁹⁾ 따라서 추출물에 의한 COX-2 유전자의 발현 양상을 알아보기 위해 HT-29 세포에 광향, 같은 단독 및 혼합 추출물을 각각 50, 200 µg/ml 농도로 처리하고 24시간 동안 배양한 후, RT-PCR을 실시하였다. 광향, 같은 단독 처리군, 혼합 처리군 모두 농도의 증가에 따라 세포내 COX-2 mRNA 발현량이 감소하였으며, 같은 단독 처리군과 혼합물 처리군의 경우, 광향 단독 처리군보다 발현량이 감소하였음을 확인하였다 (Fig. 3).

PGE₂ 생성 억제효과 - COX-2는 arachidonic acid가 다양한 prostaglandin으로 합성되는데 촉매역할을 하여 생체내에서 여러 중요한 작용을 하도록 하는데, 그 중 PGE₂는 대장암 세포에서 많은 양이 생성되며, 대장암 세포의 고사작용 조절과 면역 불균형 등 대장암에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{23,24)} 따라서 대장암의 화학예방으로 COX-2에 의해 생성된 PGE₂ 생성 조절물질을 찾는 노력들이 행해져 왔다.²⁵⁾

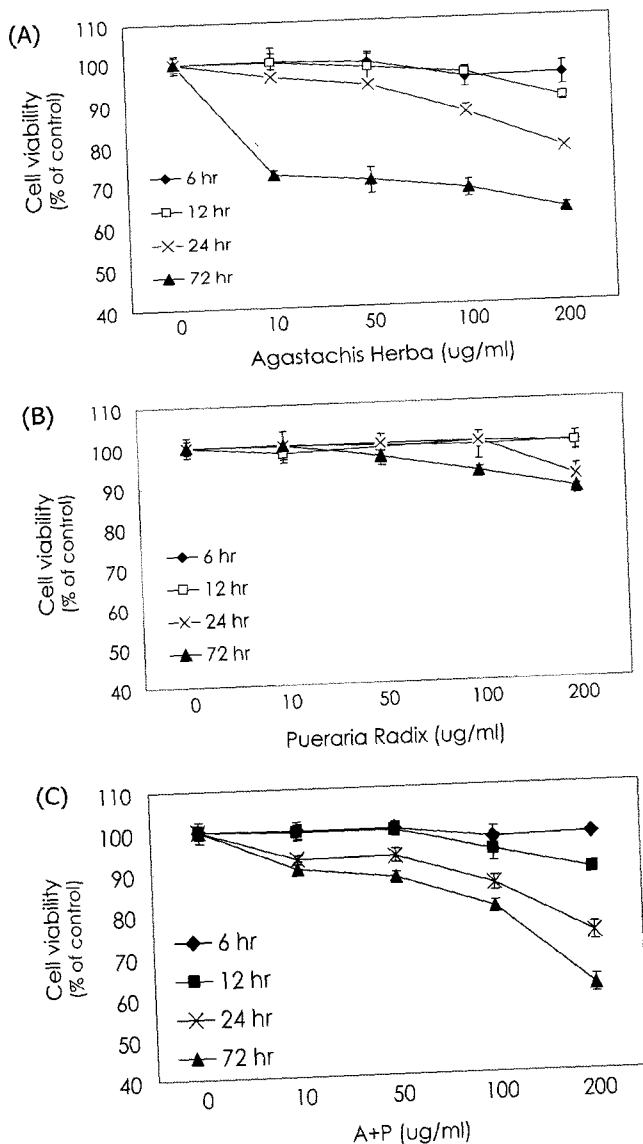


Fig. 1. Inhibitory effects of A, P, and AP on the growth of HT-29 human colon cancer cell line. HT-29 cells were plated in 96 well plates and treated with various concentrations of A, P, and AP for 6, 12, 24, 72 hrs. Data are mean±S.D. of triplicate per treatment. (A) Agastachis Herba (A). (B) Pueraria Radix (P). (C) Mixture of Agastachis Herba and Pueraria Radix (A+P).

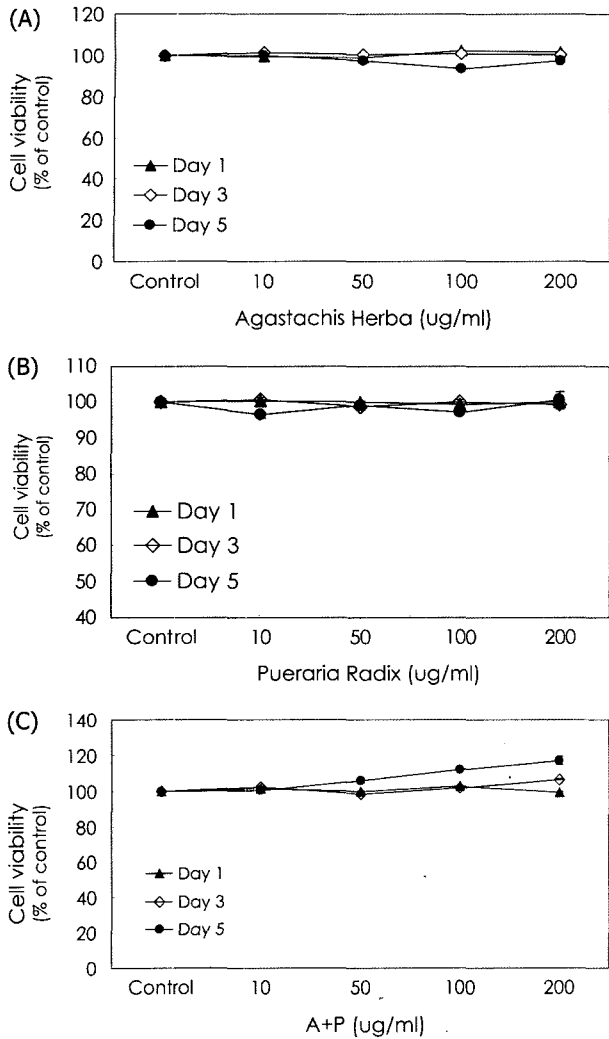


Fig. 2. Effects of A, P, and A+P on the growth of CCD-112CoN normal colon cells. Cells were plated in 96 well plates and treated with various concentrations of A, P, and A+P for 1, 3, 5 days. Data are mean±S.D. of triplicate per treatment. (A) Agastachis Herba (A). (B) Pueraria Radix (P). (C) Mixture of Agastachis Herba and Pueraria Radix (A+P).

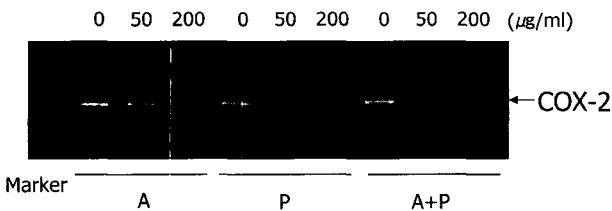


Fig. 3. Effects of A, P, and A+P on the mRNA expression of COX-2. Cells were cultured and treated for 18 hours and analyzed by RT-PCR.

따라서 HT-29 세포에 광향과 갈근 단독, 또는 혼합 추출물을 각각 50, 100, 200 µg/ml 농도로 처리하고 18시간 동

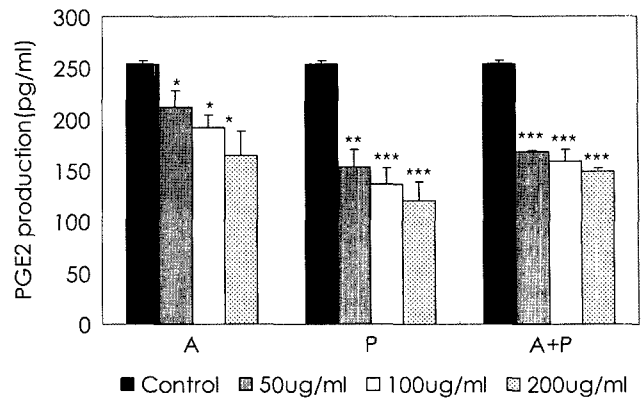


Fig. 4. Inhibitory effects of A, P, and A+P on the PGE₂ production in HT-29 cells. PGE₂ was measured after treatment with various concentrations of A, P, and A+P for 18 hours. Data are mean±S.D. of triplicate per treatment. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

안 배양한 후, PGE₂ 생성량을 관찰하였다. 대조군 (253.7±3.51 pg/ml)과 비교하여 보면 광향 추출물은 50, 100, 200 µg/ml의 농도에서 각각 16.43% (212.04±16.21 pg/ml), 24.4% (191.24±12.34 pg/ml), 35.13% (164.56±23.77 pg/ml)의 저해 효과를, 갈근 추출물은 각각 39.63% (153.15±17.68 pg/ml), 46.07% (136.81±15.76 pg/ml), 52.43% (120.67±17.68 pg/ml)의 저해 효과를 나타내었으며, 혼합제제 (A+P)의 경우 50, 100, 200 µg/ml의 농도에서 각각 33.77% (168.01±0.67 pg/ml), 37.14% (159.46±10.3 pg/ml), 41.53% (148.34±3.43 pg/ml)의 유의한 저해효과를 나타내었으며, 광향 단독 처리군에 비해 갈근 단독 처리군과 광향과 갈근 혼합제제 처리군의 경우 PGE₂ 생성 억제효과가 더욱 큰 것으로 확인되었다 (Fig. 4).

cGMP 생성 억제효과 - 광향과 갈근 추출물에 의하여 대장암 세포의 cGMP 생성량이 변화하는지 알아보기 위하여 HT-29 세포에 광향과 갈근 단독, 또는 혼합 추출물을 각각 50, 100, 200 µg/ml 농도로 처리하고 18시간 동안 배양한 후, cGMP 생성량을 관찰하였다. 대조군 (448.42±13.95 pM)과 비교하여 보면 광향 추출물은 50, 100, 200 µg/ml의 농도에서 각각 24.72% (337.55±8.02 pM), 33.55% (297.96±7.8 pM), 42.03% (259.93±16.28 pM)의 저해 효과를, 갈근 추출물은 각각 42.3% (258.72±20.83 pM), 47.65% (234.76±10.21 pM), 51.24% (218.64±8.01 pM)의 저해 효과를 나타내었으며, 혼합물의 경우 50, 100, 200 µg/ml의 농도에서 각각 40.03% (268.91±10.98 pM), 45.08% (246.24±5.79 pM), 49.99% (224.21±16.34 pM)의 유의한 저해효과를 나타내었으며, 광향 단독 처리군에 비해 갈근 단독 처리군과 광향과 갈근 혼합제제 처리군의 경우 cGMP 생성 억제효과가 더욱 큰 것으로 확인되었다 (Fig. 5).

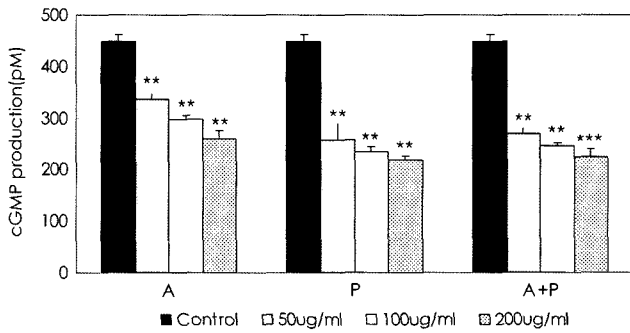


Fig. 5. Inhibitory effects of A, P, and A+P on the cGMP production in HT-29 cells. cGMP was measured after treatment with various concentrations of A, P, and A+P for 18 hours. Data are mean±S.D. of triplicate per treatment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

고찰

암 화학예방 약물 중 비스테로이드 항염제는 여러 측면에서 가장 효과적인 약물로, 대장암의 모든 임상단계 (aberrant crypt foci, 선종, 암, 암 관련 사망률)에서 예방효과를 보이며, COX-1과 COX-2를 억제함으로써 세포증식과 신생혈관 생성을 억제하고 세포사멸과 면역감시를 촉진한다고 알려져 있다.⁹⁾ 비스테로이드 항염제 중 아스피린은 대장암이나 대장선종의 과거력이 있는 위험군에서 선종재발을 감소시켰으며,^{26,27)} sulindac은 가족성 선종 용종증 환자에서 선종을 감소시켰다는 보고가 있다.²⁸⁾ Steinbach¹⁴⁾ 등은 비스테로이드 항염제의 위장관계 부작용을 줄일 수 있는 COX-2 선택 억제제의 경우 가족성 선종 용종증 환자에서 선종 수를 28% 감소시켰으나, 장기간의 투여효과와 대장암 발생 및 사망률에 대한 효과에 관한 연구가 필요하다고 하였다. 대장암의 화학예방 약제의 이상적인 조건은 중앙 예방효과와 비용의 효율성이 있고, 약물독성이나 부작용은 없어야 한다. 그러나 이러한 모든 조건을 충족하는 약제는 아직까지 없으므로, 독성이 없으면서 예방효과가 있는 약제와 식이성분에 의한 대장암 화학예방에 관한 연구가 진행되고 있다.³⁰⁻³²⁾

본 연구에서는 생약제인 광향과 갈근 단독 추출물, 또는 혼합물의 추출물이 HT-29 대장암 세포의 증식 및 COX-2 발현량, PGE₂ 및 cGMP 생성, 또한 정상세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 광향과 갈근 단독, 또는 혼합 추출물의 경우 HT-29 세포의 증식을 농도와 시간에 의존적으로 억제하였으나, CCD-112CoN 세포의 증식은 억제하지 않았으며 (Fig. 1, Fig. 2), 이러한 현상은 광향과 갈근 추출물이 대장암 세포에 선택적으로 작용하여 세포증식을 억제한 것으로 사료된다. 또한 대장암 세포의 고사작용 조절과 면역 불균형 등 대장암에 중요한 영향을 미치는 COX-2 mRNA의 발현 (Fig. 3) 및 PGE₂ 생성 억제효과 (Fig. 4)를 보였으며,

이는 결과적으로 HT-29 세포의 성장을 억제한 것으로 사료된다. 그러나 대장암 세포의 사멸 기전에는 COX-2 기전 외에도 여러 기전들이 있으므로,³³⁻³⁶⁾ 이에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

대장암 진행과정에서 COX-2 활성화와 PGE₂ 생성량은 cAMP 뿐만 아니라 cGMP 생성에 의한 영향을 받는 것으로 보고된 바 있다.²⁹⁾ 또한 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의한 cGMP 생성과 PGE₂ 생합성은 밀접하게 연관되어 있으며,³⁷⁾ 간암 및 유방암에서 또한 iNOS 활성화와 COX-2가 암세포의 신생혈관 생성과 매우 관련되어 있다는 보고들이 있다.^{38,39)}

본 실험 결과에서 광향과 갈근 단독 및 혼합 추출물은 HT-29 세포의 cGMP 생성을 억제하였고 (Fig. 5), cGMP 억제기전이 COX-2 발현 억제 및 PGE₂ 생성 억제기전과 서로 연관되어 있는지는 PGE₂ 및 cGMP/iNOS inhibitor 또는 overexpression, knockdown 등의 기법을 이용한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

결론

광향과 갈근 추출물이 대장암 세포에 미치는 영향을 HT-29 인체 결장암 세포주를 이용하여 조사하였다. 광향과 갈근 단독 추출물과 혼합 추출물은 모두 대장 정상세포인 CCD-112CoN의 성장에는 크게 영향을 미치지 않았으나, 대장암 세포인 HT-29의 성장은 농도, 시간에 의존적으로 크게 억제하였고, 대장암의 진행 과정에서 매우 중요한 COX-2 mRNA 발현량 및 PGE₂ 생성, cGMP 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 이상의 결과에서 광향과 갈근 추출물은 정상세포에는 독성 없이 대장암 세포의 COX-2 및 PGE₂, cGMP 생성을 억제함으로써 결과적으로 대장암 세포의 성장을 감소시킨 것으로 판단된다. 따라서 광향과 갈근은 부작용이 없는 대장암 예방 보조식품으로서 개발 가능성이 있으며, 암세포 성장 억제에 대한 더욱 정확한 작용기전의 규명과 활성성분의 분리 및 정제, 응용법 등의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

인용문헌

1. 장일무 (2002) 동양의학과학대전. 4-45. 학술편수관, 서울.
2. 김승현, 강미영, 남석현 (2005) 광향을 포함한 21종의 한약재가 대식세포주 RAW264.7 세포의 nitric oxide 생산 조절에 미치는 효과. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 48: 411-417.
3. Oh, H. M., Kang, Y. J., Lee, Y. S., Park, M. K., Kim, S. H., Kim, H. J., Seo, H. G., Lee, J. H. and Chang, K. C. (2006) Protein kinase G-dependent heme oxygenase-1 induction by *Agastache rugosa* leaf extract protects RAW264.7 cells from

- hydrogen peroxide-induced injury. *J. Ethnopharm.* **103**: 229-335.
4. 이현주, 오민아, 최영희, 이강관 (2001) 천연물로부터의 세포내 효소활성 조절물질의 탐색 및 기능 연구: 갈근의 알코올 탈수소효소 저해 활성 성분. *Yakhak Hoeji* **45**: 500-505.
 5. Lee, S. J., Baek, H. J., Lee, C. H. and Kim, H. P. (1994) Anti-inflammatory activity of isoflavonoids from *Pueraria radix* and Biochanin A derivatives. *Arch Pharm. Res.* **17**: 31.
 6. Lee, J. S. (2004) Supplementation of *Pueradix* water extract on changes of antioxidant enzymes and lipid profile in ethanol-treated rats. *Clini. Chim. Acta* **347**: 121-128.
 7. Chatargy, S. K., Khosrow, K. and Basil, R. (2002) Colon cancer prevention with NO-releasing NSAIDs. *Prostaglandins & Lipid Mediators* **67**: 107-120.
 8. Thun, M. J., Hrmley, S. J. and Patrono, C. (2002) Non-steroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**: 252-266.
 9. Marnett, L. J. and DuBois, R. N. (2002) COX-2: a target for colon cancer prevention. *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* **42**: 55-80.
 10. Meyskens, F. L. J. and Gerner, E. W. (1995) Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. *Clin. Cancer Res.* **5**: 945-951.
 11. Kathryn, R. L., Natalia, A. I., Gary, A. P., Hiayan, C. and Eugene, W. G. (2000) Influence of K-ras activation on the survival responses of Caco-2 cells to the chemopreventive agents sulindac and difluoromethylornithine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* **9**: 1155-1162.
 12. Grodstein, F., Martinez, M. E. and Platz, E. A. (1998) Postmenopausal hormone use and risk for colorectal cancer and adenoma. *Ann. Intern. Med.* **128**: 705-712.
 13. Borgelt, L. and Umland, E. (2004) Benefits and challenges of hormone replacement therapy. *J. Am. Pharm. Asso. Wash.* **40**: 30S-31S.
 14. Steinbach, G., Lynch, P. M. and Phillips, P. K. (2000) The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N. Eng. J. Med.* **342**: 1946-1052.
 15. Narisawa, T., Fukaura, Y., Terada, K. and Sekiguchi, H. (1999) Inhibitory effects of ursodeoxycholic acid on N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis and colonic mucosal telomerase activity in F344 rats. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **18**: 259-266.
 16. Gibson, T. B., Ranganathan, A. and Grothey, A. (2006) Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **6**: 29-31.
 17. Pettinari, A., Amici, M., Cuccioli, M., Angeletti, M., Fiori, E. and Eleuteri, A. M. (2006) Effect of polyphenolic compounds on the proteolytic activities of constitutive and immuno-proteasomes. *Antioxid Redox Signal.* **8**: 121-129.
 18. Carole, L. W., Kathleen, J. H., Patricia, A. L., Brigid, L. M. H. and Lynn, M. M. (1997) Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 1402-1407.
 19. Yamamoto, K., Higashi, S., Kioi, M., Tsunozumi, J., Honke, K. and Miyazaki, K. (2006) Binding of active matrilysin to cell surface cholesterol sulfate is essential for its membrane-associated proteolytic action and induction of homotypic cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **281**: 9170-9180.
 20. Narisawa, T., Morotomi, M., Fukahara, Y., Hasebe, M., Ito, M. and Aizawa, R. (1996) Chemoprevention by pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor, of N-methyl-N-nitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.* **87**: 798-804.
 21. Notarnicola, M., Messa, C., Pricci, M., Guerra, V., Altomare, D. F., Montemurro, S. and Caruso, M. G. (2004) Up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in left-sided human colon cancer. *Anticancer Res.* **24**: 3837-3842.
 22. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods.* **65**: 56-58.
 23. Yasuhide Morioka, Minoru Ikeda, Akihiko Saiga, Noriko Fujii, Yoshikazu Ishimoto, Hitoshi Arika, Kohji Hanasaki. (2000) Potential role of group X secretory phospholipase A₂ in cyclooxygenase-2-dependent PGE₂ formation during colon tumorigenesis. *FEBS Letters* **487**: 262-266.
 24. Patricia, A., Craven, Reisque Saito, and Frederick R. Derubertis (1983) Role of local prostaglandin synthesis in the modulation of proliferative activity of rat colonic epithelium. *J. Clin. Invest.* **72**: 1365-1375.
 25. Ikegami, T., Matsuzaki, Y., Shoda, J., Kano, M., Hirabayashi, N. and Tanaka, N. (1998) The chemopreventive role of ursodeoxycholic acid in azoxymethane-treated rats: suppressive effects on enhanced group II phospholipase A₂ expression in colonic tissue. *Cancer Lett.* **134**: 129-139.
 26. Baron, J. A., Cole, B. F. and Sandler, R. S. (2003) A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N. ENGL. J. Med.* **348**: 891-899.
 27. Benamouzig, R., Deyra, J. and Martin, A. (2003) Daily soluble aspirin and prevention of colorectal adenoma recurrence: one year results of the APACC trial. *Gastroenterology* **125**: 328-336.
 28. Hawk, E., Lubet, R. and Limburg, P. (1999) Chemoprevention in hereditary colorectal cancer syndrome. *Cancer* **86**: 2551S-2563S.
 29. Fabio, C., Camillo, C., Omella, F., Luca, M., Lacopo, S., Nadia, L., Federico, P., Valentina, F., Annamaria, D. F., Giuliano, P., Roberto, M. and Emanuela, M. (2004) Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**: 2694-

- 2704.
30. Zhao, L. P., Kushi, L. H., Klein, R. D. and Prentice, R. L. (1991) Quantitative review of studies of dietary fat and rat colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer* **15**: 169-177.
 31. Torzsas, T. L., Kendall, C. W. C., Sugano, M., Iwamoto, Y. and Rao, A. Z. (1996) The influence of high and low molecular weight chitosan on colonic cell proliferation and aberrant crypt foci development in CFI mice. *Fd Chem Toxicol.* **34**: 73-77.
 32. Pereira, M. A., Barnes, L. H., Steele, V. E., Kelloff, G. V. and Lubet, R. (1996) Piroxicam-induced aberrant crypt foci and prevention of colon cancer in rats. *Carcinogenesis* **17**: 373-376.
 33. Wang, X., Li, M., Yeung, C. M., Zhang, H., Kung, H., Jiang, B. and Lin, M. C. (2006) The BH3-only protein, PUMA, is involved in oxaliplatin-induced apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Pharm.* **71**: 1540-1550.
 34. Kim, E. J., Lee, Y. J., Shin, H. K. and Park, J. H. (2005) Induction of apoptosis by the aqueous extract of *Rubus coreanum* in HT-29 human colon cancer cells. *Nutrition* **21**: 1141-1148.
 35. Kim, M. J., Kim, Y. J., Park, H. J., Chung, J. H., Leem, K. H. and Kim, H. K. (2006) Apoptotic effect of red wine polyphenols on human colon cancer SNU-C4 cells. *Food & Chem. Toxicol.* **44**: 898-902.
 36. Yang, S. A., Paek, S. H., Nozokue, N., Lee, K. R. and Kim, J. A. (2006) α -Chaconine, a potato glycoalkaloid, induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells through caspase-3 activation and inhibition of ERK 1/2 phosphorylation. *Food & Chem. Toxicol.* **44**: 839-846.
 37. Landino, L. M., Crews, B. C., Timmons, M. D., Morrow, J. D. and Marnett, L. J. (1996) Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide antivates prostaglandin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 15069-15074.
 38. Bing, R. J., Miyataka, M. and Rich, K. A. (2001) Nitric oxide, prostanoids, cyclooxygenase, and angiogenesis in colon and breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**: 3385-3392.
 39. Rahman, M. A., Dhar, D. K. and Yamaguchi, E. (2001) Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: Possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. *Clin. Cancer* **7**: 1325-1332.

(2006년 10월 2일 접수)