

포공영 에탄올추출물이 발암개시에 미치는 영향

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구소

손 윤 희 · 남 경 수

Effect of *Taraxacum mongolium* Hand-Mass Ethanol Extract on Initiation of Carcinogenesis

Yun-Hee Shon and Kyung-Soo Nam

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

Ethanol extract of *Taraxacum mongolium* Hand-Mass (TMEE) was investigated for the effect on the phase I enzyme and carcinogen-DNA adduct formation. At 2.5, 12.5, and 25 mg/ml of TMEE, the binding of [³H]B[a]P metabolites to DNA of NCTC-clone 1469 cells was inhibited by 38.0%, 77.8%, and 68.5%, respectively. There was slight inhibition in the activity of cytochrome P450 1A1 enzyme with the treatment of TMEE. These results suggest that TMEE has chemopreventive potential by inhibiting cytochrome P450 1A1 activity and benzo[a]pyrene-DNA adduct formation.

Key Words: *Taraxacum mongolium* Hand-Mass, Cytochrome P450 1A1, Carcinogen-DNA adduct

서 론

암예방(chemoprevention)은 발암과정의 초기단계에서 암발생을 예방하거나 억제시키며, 암으로 진행된 것을 전환시키는 것을 의미한다.^{1,2)} 기존의 항암제를 이용한 “암세포의 치료”라는 개념과는 전혀 다른 것으로 미국이나 일본에서도 최근에 시작된 연구분야이며, 암을 연구하는 데 있어 가장 유망한 영역이다. 특히 최근에는 암이 발병하기 전에 막을 수 있는 암예방 물질(chemopreventive agents)의 개발 연구가 활발히 이루어지고 있다. 암예방 물질은 발암 물질의 대사과정에 변화를 가져오거나 암화과정(carcinogenesis) 시 생성되

는 대사물질 또는 대사과정 시 생성되는 부산물과 상호작용 하여, 특정 효소의 발현 및 기능을 변화시킬 수 있다. 따라서 이러한 특성을 이용하여 암예방 물질을 조사, 개발할 수 있으며, 암화 과정이 다단계로 진행되기 때문에 발생초기뿐만 아니라 후기단계에서도 암의 진행을 막을 수 있다.

암발생 억제물질의 효능을 연구하는데 있어서 생화학적 표식자(biochemical marker)를 사용하고 있다. 이 표식자들은 발암과정에서 특이적으로 생성되는 대사물질뿐만 아니라 그 외 부산물과도 반응하며 다양하고 많은 발암기전을 저해할수록 효과적인 암예방물질로 간주된다. 발암 개시(initiation)단계에 이용되는 biomarker로서 cytochrome

책임저자 : 남경수, ☎ 780-714, 경북 경주시 석장동 707, 동국대학교 의과대학 약리학교실

Tel: 054-770-2412, Fax: 054-770-2477, E-mail: namks@dongguk.ac.kr

접수일 : 2002년 2월 5일, 게재승인일 : 2002년 3월 15일

P450 효소의 억제, phase II enzyme의 유도 및 DNA repair 유도, scavenging electrophile 등이 있고, 암의 촉진(promotion) 단계와 진행(progression) 단계의 biomarker로는 polyamine 대사 억제, protease 억제, arachidonic acid 대사 억제, differentiation 유도, oncogene 발현 억제, 산화적 DNA 손상억제, protein kinase (PKC), tyrosine kinase (TK) 등이 있다.³⁾

포공영 (蒲公英)은 원식물 국화과 Compositae에 속하는 다년생 초본인 약물로 학명이 *Taraxacum mongolium* Hand-Mass로味甘平無毒한 포공영의 전초로서 진통 및 항염증 효능이 알려져 왔다. 따라서 본 연구에서는 포공영 에탄올추출물의 암 개시 과정과 관련한 phase I 효소의 하나인 cytochrome P450 1A1의 억제효과 및 carcinogen-DNA binding inhibition을 측정하여 포공영 에탄올추출물의 암예방 효과에 대해 살펴보았다.

재료 및 방법

1) 시약

Cytochrome P450 1A1 활성 측정에 사용된 시약인 Tris-HCl, bovine serum albumin (BSA), 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), NADP⁺, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, ethoxyresorufin과 carcinogen-DNA binding inhibition 측정에 사용된 시약인 NCTC-135 medium, ribonuclease A, ribonuclease T₁, potassium acetate, proteinase K, ellagic acid, laury sulfate (sodium dodecyl sulfate), antibiotics, dimethylsulfoxide (DMSO)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 JBI사(Daegu, Korea), [³H]Benzo[a]pyrene ([³H]B[a]P)은 Amersham pharmacia biotech사(Piscataway, NJ, USA)제품을 사용하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 분석용 특급 시약을 사용하였다.

2) 포공영 에탄올추출물의 제조

포공영은 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 뒤 정선하여 사용하였고, 포공영 에탄올추출물은 알코올수제침법에 의하여 조제하였다.⁴⁾ Voucher specimen은 동국대학교 난치병한양방치료연구소

에 보관되어 있다. 포공영 60 g을 조말하여 정제수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 ml을 감압농축하였다. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol을 가하여 75%, 85%, 95%의 ethanol 용액이 되게 하여 침전물을 여과하고, pH 7.4로 적정하였다. 저온에서 24시간 방치하여 여과 멸균하고 동결건조하였다.

3) 세포배양

계대 보존 중인 NCTC-clone 1469 (normal mouse liver) 세포는 10% FBS가 포함된 NCTC 135로 배양하였으며, 이들 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 세포는 액체질소의 기체상태(-150°C)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 실험에 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

4) 흰쥐의 간 조직으로부터 마이크로솜의 분리

흰쥐의 간 조직으로부터의 마이크로솜의 분리는 Pohl과 Fouts의 방법⁵⁾을 참고하여 실시하였다 (Fig. 1). 관류법을 통한 시료처리 (DMBA 15 mg/마리)가 완료되고 24시간 뒤 흰쥐를 diethyl ether

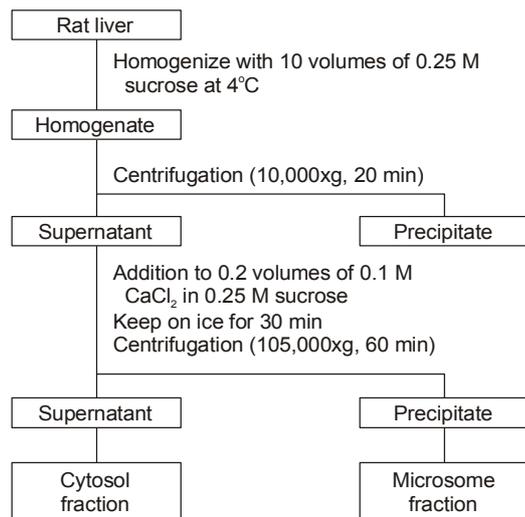


Fig. 1. Preparation of microsomal fraction from rat liver. 로 질식시킨 다음, 복피를 절개하여 1.15% KCl

완충용액으로 간을 perfusion 시킨 후 적출하였다. 적출된 간은 다시 여러 번 세척 후, 흡습지로 수분을 완전히 제거시켰고, 수분이 제거된 간은 조직균질기(Teflon Plotter Elvehjem Homogenizer, Glas-Col, USA)를 이용하여 마쇄한 후, 1.15% 완충용액을 첨가하여 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄균질액을 7,000×g에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 다시 77,000×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. Microsomal protein 농도는 bincinchonic acid protein kit를 사용하여 BSA를 표준 단백질 용액으로 이용한 표준 검량선을 구하고 그 양을 산출하였다. 정량된 분획은 일정량씩 나누어 실험에 사용할 때까지 -70°C에서 냉동보관하였다.

5) MTT assay

실험에 사용한 NCTC-clone 1469 세포의 적정세포수는 1×10^4 cells/well로서 세포 농도에 따른 지수 곡선에서 흡광도가 0.6~0.7인 부분의 세포농도가 적정세포의 수로 하여 본 실험에 사용하였다. 적정수의 세포를 190 μ l의 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고, CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후, 포공영 에탄올추출물 각각의 농도를 10 μ l씩 각 well에 가하였다. 세포를 상기와 동일한 조건하에서 24시간 배양한 후, PBS에 녹인 20 μ l MTT 용액(5 mg/ml PBS)을 각각의 well에 넣고 다시 4시간 배양하여 MTT가 환원되게 하였다. 배양액을 원심분리(450×g, 10 min)한 후, 상층액을 버리고 DMSO와 ethanol을 1 : 1 혼합하여 만든 용액 150 μ l씩 각각의 well에 넣어 20분간 formazan 결정을 용해하여 ELISA microplate reader (Molecular Device, USA) 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 포공영 에탄올추출물에 의한 세포의 생존율은 아래의 식을 이용하여 계산하였고, 실험은 3회 반복 수행하였다.

$$\text{세포의 생존율(\%)} = \frac{\text{시린 처리한 세포의 흡광도}}{\text{대조군의 세포의 흡광도}} \times 100$$

6) Cytochrome P450 1A1의 활성 저해 측정

Cytochrome P450 1A1은 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 활성으로 측정하였다.⁶⁾ 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 substrate (1 mg of ethoxyresorufin in 10 ml of methanol), 10 μ l의 포공영 에탄올추출물을 농도별로 첨가하였다. 모든 시약들을 잘 섞은 후, 37°C에서 4분간 반응시키고, 2 ml의 methanol로 반응을 종결시켰다. 2,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하고, 형광분광광도계(BIO-TEK SFM25, USA)로 측정(550 nm excitation and 585 nm emission)하였다. Positive control로는 β -naphthoflavone을 사용하였고, negative control로서는 증류수를 사용하였다. 이 실험은 3회 반복 실험으로 수행하였으며, 각각의 결과는 control에 대한 각 sample들의 저해도 정도를 percentage로 나타내었다.

% Inhibition =

$$\left[1 - \frac{(\text{treated sample} - \text{blank})}{(\text{solvent} - \text{blank})} \right] \times 100$$

7) Carcinogen-DNA binding 저해 효과 측정

1×10^6 의 NCTC clone-1469 (normal mouse liver) 세포를 5 ml의 NCTC 139 배지에 부유시켜 6-well plate에 접종시키고 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하고 새 배지로 교환한 뒤, 포공영 에탄올추출물을 처리하고 2시간 배양하였다. 10 μ M [³H]-B[a]P을 처리하여 24시간 동안 배양한 뒤 Sharma 등³⁾에 의한 방법을 변형하여 다음과 같이 DNA를 추출하였다. [³H]B[a]P에 처리된 세포는 PBS로 3번을 세척하였고, 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 10분 동안 배양한 뒤, well로부터 세포를 떼어내어 회수하였다. 회수된 세포를 10% SDS 용액을 첨가하여 55°C에서 3시간 동안 배양하여

단백질을 제거하였으며, 5 M의 potassium acetate 용액을 첨가하여 30분 동안 4°C에서 세포를 방치시킨 뒤, 13,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 취한 뒤, cold ethanol을 상층액 2배의 양이 되도록 하여 첨가하였고, DNA를 침전시키기 위하여 -20°C에 12시간 이상 방치하였다. 13,000×g에서 15분 동안 원심분리한 뒤 상층액을 제거하여 DNA를 회수하였다. DNA pellet은 70% ethanol에 세척한 뒤 500µl of 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 8.0) buffer로 현탁하였으며, RNA를 제거하기 위하여 RNase A와 RNase T1을 각각 5µl 첨가하여 37°C, 1시간 동안 처리하였다. DNA 함량은 260 nm ($1 A_{260 \text{ nm}} \text{ unit} = 50 \mu\text{g}$)에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 흡광도를 측정한 뒤 잔량의 DNA는 radioactivity 측정에 사용되었다. 모든 실험은 3회 반복실험으로 수행하였으며, 포공영 에탄올추출물에 의한 carcinogen-DNA binding 저해 효과는 다음과 같은 공식으로 계산되었다.

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - \text{dpm per } \mu\text{g DNA test cells} / \text{dpm per } \mu\text{g control cells}] \times 100$$

8) 통계학적 처리

실험결과는 통계처리를 하여 평균±표준편차로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정은 Student's

t-test를 수행하여 결정하였다.

결 과

1) MTT assay

포공영 에탄올추출물을 본 실험에 사용하기 앞서 세포에 대한 독성유무를 확인하기 위하여 NCTC-clone 1469 세포에 처리하여 세포 생존율을 측정하였다. Mouse liver 세포에 대해 포공영 에탄올추출물을 처리했을 때, 2.5, 12.5와 25 mg/ml에서 생존율 100%, 75와 125 mg/ml에서 95%, 88.9%의 생존효과가 있었다(Fig. 2). 그러므로 NCTC-clone 1469 세포를 이용한 실험은 포공영 에탄올추출물을 2.5, 12.5, 25.0와 125 mg/ml 농도까지 사용하여 본 실험에 착수하였다.

2) Cytochrome P450 1A1의 활성 저해 효과

Cytochrome P450 1A1은 phase I 효소로 발암을 유도하기 때문에 이 효소의 작용을 억제하는 것은 암예방효과 기작의 하나이다. 따라서 포공영 에탄올추출물에 의한 cytochrome P450 1A1 효소 활성 억제효과를 조사하기 위하여 각 농도에 대한 저해도를 측정하였다. 포공영 에탄올추출물은 2.5, 12.5와 25.0 mg/ml에서 각각 5.3%, 18.3%, 14.8%의 저해율이 나타났(Fig. 3). 이 결과로 포공영 에탄올추출물은 cytochrome P450 1A1 활성

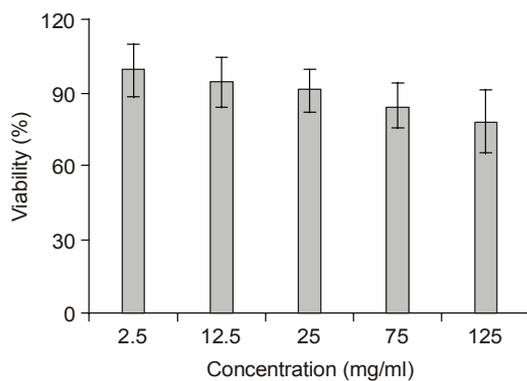


Fig. 2. Toxicity of TMEE on NCTC-clone 1469 (mouse liver) cells. Experimental details are described in Material and Methods. The values are mean±SD (n=3).

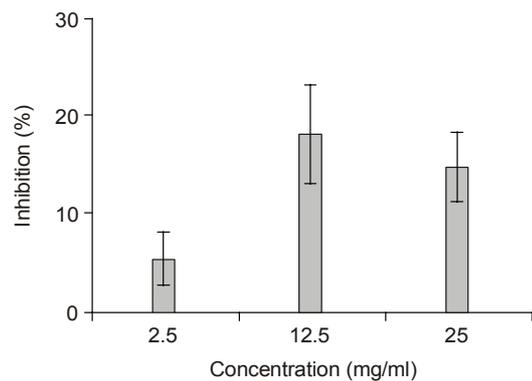


Fig. 3. Effect of TMEE on DMBA-induced cytochrome P450 1A1 activity. Experimental details are described in Material and Methods. Values represent mean ± SD (n=3).

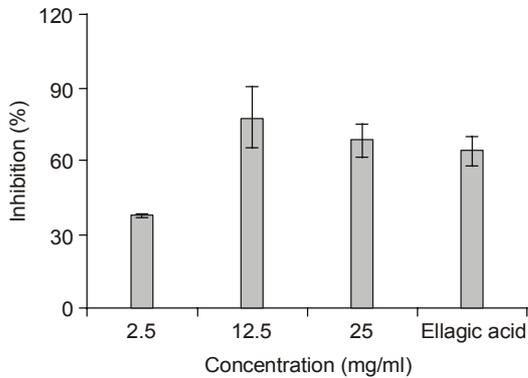


Fig. 4. Inhibition of the binding of B[a]P metabolites to DNA of NCTC-clone 1469 cells. B[a]P-DNA binding was determined in the presence of the indicated concentrations of TMEE. Experimental details are described in Material and Methods. Values represent mean±SD.

저해에 효과가 있음을 알 수 있었다.

3) Carcinogen-DNA binding 저해효과

발암물질의 친전자적 성질로 인하여 세포의 정보 전달 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 포공영 에탄올추출물에 의한 carcinogen-DNA binding inhibition 효과를 알아보기 위해 NCTC-clone 1469 세포를 이용하여 실험한 결과, 2.5 mg/ml의 에탄올추출물 농도에서 38.0%, 12.5 mg/ml에서 77.8%, 25 mg/ml에서 68.5%의 저해 효과를 나타내었다(Fig. 4). Positive control로서 ellagic acid를 사용하였을 때, 64.6%의 억제율이 나타난 것을 감안할 때, 포공영 에탄올추출물은 12.5 mg/ml에서 상당한 저해 효과가 있음을 알 수 있었다.

고 찰

악성종양을 치료하기 위하여 수술요법, 방사선

요법, 화학요법 및 면역요법과 유전자요법 등을 사용하고 있으나, 수술요법과 방사선요법은 국소적인 치료법이기 때문에 한계성이 있고, 전신요법인 면역요법도 현재로서는 치료방법이 정립되어 있지 않은 상태이며 화학요법은 독성문제를 아직 해결하지 못하고 있는 실정이다. 이러한 문제를 해결하기 위한 방안은 항종양 효능이 우수한 새로운 천연약물에서 안전성이 있는 약물개발이 요구되고 있다고 보여진다.^{7,8)}

본 연구에서는 진통, 항염작용, 간암, 위암, 유암, 유용소산 및 화열독 등의 목적으로 사용되고 있는 포공영의 에탄올추출물을 조제하고 이것의 암억제효과 검정을 위하여 DMBA-induced cytochrome P450 1A1 활성 저해효과, carcinogen-DNA 결합 저해효과 등을 측정함으로써 발암과정의 initiation 억제(blocking agents)에 미치는 영향을 살펴보았다. 포공영 에탄올추출물의 농도 결정을 위해 MTT 검색법으로 세포의 생존 능력을 측정하였고, 결정된 농도로 *in vitro*에서의 본 실험을 착수하였다.

외부의 발암물질은 cytochrome P-450-dependent monooxygenase system에 의해 대사되어 전자친화적물질(electrophilic product), epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질이 된다.⁹⁾ 따라서 cytochrome P450 효소의 활성을 억제시킬 수 있다면 암예방의 효과가 있을 것이므로 포공영 에탄올추출물을 이용하여 DMBA에 의해 유도된 cytochrome P450 1A1 효소의 억제율을 측정한 결과, 포공영 에탄올추출물은 cytochrome P450 1A1 효소의 활성을 저해함을 관찰할 수 있었다. 현재, Cytochrome P450 1A1을 억제시키는 물질로 vitamin A, phosphorothioate oligonucleotide 등의 물질이 알려져 있다.¹⁰⁾

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)은 B[a]P와 같이 잘 알려진 발암물질을 포함한 화학물질로 직업적으로나, 흡연, 숯불에 그을린 음식 등에 의해 사람들은 이러한 화학물질에 노출된다.¹¹⁾ 많은 포유동물 세포는 carcinogen-metabolizing enzymes에 의해 polycyclic aromatic hydrocarbons을 polycyclic phenols, dihydrols, epoxides, quinones, 그리고 water-soluble conjugates로 대사시킨다. 이러한 반응성이 높은 중간대사물은 DNA, RNA와 결합하고 이 결합의 강도는 hydrocarbons의 발암의

유효성과 관계가 있다.¹²⁾ B[a]P-DNA adducts는 폐암환자의 폐조직에서 발견되었으며 음식물에 포함된 여러 식물 phenols 성분이 발암과정을 억제하는 것으로 알려져 있고 그 중에서 ellagic acid가 B[a]P와 DNA의 결합을 저해하는 것으로 알려져 있으며 암예방 활성은 B[a]P epoxide와 adducts를 형성하여 무독화한다.¹³⁾ 이러한 사실들에 의하여 포공영 에탄올추출물이 활성효소의 억제, 무독화효소의 유도과 같이 DNA-carcinogen 복합체의 형성을 2.5, 12.5와 25 mg/ml의 에탄올추출물 농도에서 38.0%, 77.8%, 68.5%의 저해효과가 있었으므로 암억제 효과가 있을 것으로 추측되어진다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 포공영은 효과적으로 세포내 cytochrome P450 1A1 효소의 활성을 저해시키고, 발암물질과 DNA의 결합을 저해시킴으로서 외부물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료된다.

결 론

포공영 에탄올추출물의 발암 개시 억제 효과에 대한 실험에서 cytochrome P450 1A1 효소활성의 억제효과가 있었으며, 발암물질과 세포의 DNA 결합을 유의적으로 억제시켰다. 그러므로, 포공영 에탄올추출물은 외부물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 돌연변이와 암 발생을 억제할 것으로 사료된다.

참고 문헌

1) Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* 1985; 45: 1-8.

2) Sporn MB. Chemoprevention of cancer. *Lancet* 1993; 342: 1211-1213.

3) Sharma S, Jill DS, Kelloff GJ, Vernon ES. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 5848-5855.

4) 錢百炎. 中草藥主射劑. 上海, 上海科學技術出版社. 1981; pp 71-132.

5) Pohl RJ, Fouts JR. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal Biochem* 1980; 107: 150-155.

6) Rodrigues AD, Prough RA. Induction of cytochromes P450 1A1 and P450 1A2 and measurement of catalytic activities. *Methods Enzymol* 1991; 206: 423-431.

7) Fish B. Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. *Cancer* 1984; 54: 2609-2617.

8) Goodman GE, Yen YP, Cox TC, Crowley J. Effect of verapamil on *in vitro* cytotoxicity and vinblastine in human tumor cell. *Cancer Res* 1987; 47: 2295.

9) Jollow DJ, Smith C. Biologically Reactive Intermediates. New York, Plenum Press, 1977; pp 42-59.

10) Inoue K, Mae T, Kondo S, Ohkawa H. Inhibitory effects of vitamin A and vitamin K on rat cytochrome P450 1A1-dependent monooxygenase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 565-569.

11) Perera FP, Poirier MC, Yuspa SH, Nakayama J, Jaretski A, Curnen MM, Knowies DM, Weinstein BA. A pilot project in molecular cancer epidemiology: determination of benzo[a]pyrene--DNA adducts in animal and human tissues by immunoassays. *Carcinogenesis (Lond.)* 1982; 3: 1405-1410.

12) Sims P, Grover PL. Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 1974; 20: 165-174.

13) Teel RW, Babcock MS, Dixit R, Stoner GD. Ellagic acid toxicity and interaction with benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol in human bronchial epithelial cells. *Cell Biol Toxicol* 1986; 2: 53-62.