J. Fd Hyg. Safety 16(3), 212-220 (2001)

랫드의 실험적 간암 발생과정과 Gap Junction을 통한 세포간 정보전달에서 *Pueraia mirifica*의 효과

강경선* · 김경배* · 이지해* · 조성대* · 조종호* · 박준석* · 안남식* · 양세란* · 정지원* · Wichai Cherdshewasart** · 손정관*** · 이영순*,†

*서울대학교 수의과대학 공중보건학교실,
**출라롱코른대학 생물학과, ***제일제당 생활화학연구소

Effects of *Pueraia mirifica* on the Experimental Hepatocarcinogenesis in Rats and Gap Junctional Intercellular Communication

Kyung-Sun Kang*, Kyung-Bae Kim*, Ji-Hae Lee*, Sung-Dae Cho*, Jong-Ho Cho*, Joon-Suk Park*, Nam-Shik Ahn*, Se-Ran Yang*, Ji-Won Jung*, Wichai Cherdshewasart, Jung-Kwan Son*** and Yong-Soon Lee*,†**

*Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seodun-Dong, Kwonsun-Ku, Suwon 441-744, Korea
**Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Bangkok 10330, Thailand
***R&D Center of Household Products & Personal Care, Shinhung-dong 3ga 51-1, Chung-gu, Inchon

ABSTRACT – To investigate the modifying effect of Kwao Kreu, *Pueraria mirifica* (PM), we performed two kind of studies which are the non-surgical medium-term carcinogenicity study and the modulation of gap junctional intercellular communication study. The first study, a non-surgical medium-term carcinogenicity bioassay was done to investigate the modifying effect of Kwao Keru, *Pueraria mirifica* (PM), a rejuvenating folk medicine from Thailand, on the male F344 rat liver. Specific pathogen free, male 6-week-old F344 rats were divided into ten groups. To induce hepatocarcinogenesis, those in all groups were given a single i.p. injection of DEN (200 mg/kg) and were received two i.p. injection of DGA (300 mg/kg) at the ends of weeks 2 and 5. Rats of group 3-6 were given sodium phenobarbital (PB 0.05 % in drink). A diet containing 10 mg/kg PM was given to group 2 during the post-initiation phase and to groups 4 and 5 during promotion and initiation phase, respectively. Group 6 was given the experimental diet alone throughout the experiment (8 weeks). Rats of group 7, 8, 9 and 10 were fed 1000 mg/kg PM in the same manner as group 2, 4, 5 and 6. All animals were sacrificed at 8 weeks after DEN administration. Result of the immunohistochemical staining of the glutathione S-transferase placental form (GST-p) indicated that the numbers and areas of the preneoplastic leisions were not significantly changed in all PM treatment group comparing to control group. Also the numbers and areas of GST-p positive foci among group 7, 8, 9 and 10 were not significantly changed in comparing to control group. To study the effect of PM on the modulation of gap junctional intercellular communication, the present study was performed scrape-loading dye transfer (SL/DT) assay in human keratinocytes. The results showed that PM could not modulate GJIC. These results indicate that *Pueraria mirifica* may have no carcinogenic effects on experimental hepatocarcinogenesis in rats and gap junctional intercellular communication in human keratinocyte.

Key words □ Kwao Keru, *Pueraria mirifica*, Hepatocarcinogenesis, Non-surgical carcinogenicity bioassay, GST-p, Gap Junctional Intercellular Communication (GJIC)

Pueraria mirifica (PM)는 태국에서 White Kwao Kreu라고 알려져 있으며, 콩과(Leguminosae, Papilionoideae) 식물에 속하며 특히 칡 (Pueraria lobota)과 매우 비슷한 식물로서, 태국 북쪽, 서쪽 지역의 해발 300-800 미터의 숲에 풍부하게 존재하며 뿌리 부분을 생약으로서 이용한다. 태국에

†Author to whom correspondence should be addressed.

서는 PM이 회춘제로서 특히 40-50대 혹은 폐경기 여성에게서 부족한 자연 에스트로겐 (에스트로겐 호르몬)을 대체하여 주름진 피부, 골다공증, 노화, 갱년기 장애 등에 상당한 효과가 있다고 하여 현재 젤이나 크림 등의 화장품과 캡슐 형태 등의 건강식품으로 상업적인 판매가 이루어지고 있다.

PM은 유효성분으로서 miroestrol, deoxymiroestrol, daidzin, genistein, puerarin과 같은 여러 가지의 phytoestrogen을 함유하고 있기 때문에 이러한 유효 성분의 단리를 통한 생리활성 연구가 이루어지고 있다. 특히, miroesterol 성분이나 deoxymiroesterol 성분의 경우, estradiol과 비슷한 높은 에스트로겐 활성을 나타낸다고 보고되어져 있다.[4,21,37] Deoxymiroestrol은 쉽게 산화가 일어나 miroesterol로 변화되기 때문에 실제 PM의 에스트로겐 활성을 나타내는 화합물이 deoxymiroesterol이라고 하는 연구결과가 최근에 발표되어 있다. 따라서 이 식물의 뿌리에는 이 두 가지 성분이 동시에 존재하는 것이 아닌지 추정되고 있다.[7]

화학적 발암 물질에 의한 암의 발생은 유발(initiation) 및 촉진(promotion) 과정을 거쳐 이루어진다는 2단계 이론의 기초로부터,[12-13,24,29], 진행과정을 거쳐 암세포를 형성한다는 다단계 발암화 과정(multistage carcinogenesis)이 정립되면서[9,27,31] 여러 가지 *in vivo* 발암성 검색법이 개발되었다.[30,35,36] 그 중에서도 Ito등이 개발한 방법은[12-13] 시험기간이 8주로 비교적 짧고 위양성이 없으며,[11] 장기 시험에의 생체 적중률이 높다는[5-6] 점등에서 여러 가지 화학, 천연 물질의 발암성을 검색하는데 유용한 방법으로 인정되고 있다.

이 방법은 발암 유발 물질인 DEN(diethylnitrosamine)을 투여한 후 촉진제(promoter)로서 2-AAF(2-acetylaminofluorene)를 사료에 0.02% 비율로 섞어 투여한 다음 간 변화의 증폭을 위해 시험개시(DEN 투여) 3주 후에 간의 2/3을 절제하는 수술을 실시한다.[10]

실험 동물에서 발암성이 확인된 65종의 물질들 중에서 52%에 해당하는 물질이 간을 표적장기로 하고 있기 때문에 대부분의 화학물질에 대한 발암성 검색은 주로 랫드의 간을 이용하여 검색한다.[11] 또한 Sato 등은 랫드의 간에서 GST-p (glutathione S-transferase placental form)가 유용한 전암 병변의 지표효소가 될 수 있다고 보고한 이후, Ito 등과 Ogiso 등은 이 지표효소를 이용한 중기 발암성 시험의 결과가 장기 발암성 생체 시험에 높은 적중률을 보였음을 보고하였다.[11,28] 그래서 GST-p를 지표효소로 이용한 화학, 천연 물질들에 대한 검색이 발암성 유무 검색에 유용하게 쓰이고 있다.

한편, 비수술적 중기 발암성 모델은 DEN-PH 모델과 같은 8주 모델로서, 간부분절제술 대신 DGA를 2주와 5주에 각각 복강 내에 투여하여 발암 촉진과정에서 DEN에 의해 간암이 유발된 세포들을 선택적으로 증식시켜 발암화 과정을 증폭시킴으로서 전암 병변의 end-point marker인 GST-p 양성 병소의 수와 면적을 평가하는 시험법으로서 간 부분절제술에 의한 심한 체중 감소나 실험동물의 폐사와 같은 실험 자료의 커다란 변화를 유발하지 않기 때문에 최근의 새로운 중기 발암성 모델로 매우 유용하게 사용되고 있다.[46,18]

Gap junctions은 connexins 6개가 모여 hexamers를 이루어 반통로(hemichannel)를 형성한 connexons이 인접세포의 connexons과 대칭적으로 접촉하여 형성된 통로로서, sugars, nucleotides, amino acids와 Ca^{2+}, cAMP, inositol triphosphate와 같은 second messengers를 포함하는 1 kDa이하의 작은 분자나 이온을 교환함으로써 세포와 세포의 신호 전달 역할을 한다. 또한 Gap junctional intercellular communication (GJIC)는 조직의 항상성 유지나 정상 세포의 성장, 분화 및 발달에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다.[22] GJIC의 이상이 발암과정에서 중요한 역할을 수행할 수도 있다는 생각은 많은 종양에서 GJIC의 결손이 보고되어지고, 종양유전자와 종양유발물질들에 의해 GJIC가 장애를 받는다는 여러 연구보고들에 의해서이다.[3,25,32,43] Budunova I.V. 등은[3] gap junction assay를 이용하여 약 300 가지의 다양한 생물학적 활성을 가진 여러 가지 물질을 조사해 본 결과 60 % 이상이 GJIC를 억제한다는 것을 밝혔다.

앞에서 언급한 *Pueraria mirifica*의 여러 효과들 중에서 *in vivo*와 *in vitro*에서 항암 및 암 발생에 미치는 PM의 독성 여부에 대한 연구는 아직까지 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 비수술적 중기 간 발암성 모델과 human keratinocyte인 HaCaT cell을 이용한 gap junction assay를 통해 *Pueraria mirifica*가 실험적 간암 발생과정과 gap junctional intercellular communication (GJIC)에 어떠한 영향을 미치는지 조사해 보았다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

제일 제당에서 *Pueraria mirifica*의 구근을 건조시킨 유백색의 분말 및 에탄올 추출물을 공급받아 사용하였다. 시약으로는 diethylnitrosamine (DEN), D-galactosamine (DGA)는 Sigma (U.S.A) 제품을, sodium phenobarbital (PB)은 원경제약(주)에서 구입하였다. 또한 rabbit anti-GST-p 항체는 (StressGen Biotechnologies Corp. BC Canada)에서 공급받았으며, biotin labeled goat anti-rabbit IgG와 ABC kit는 Vectastain (U.S.A) 제품을 이용하였다.

*Pueraria mirifica*의 조제

비수술적 중기 간 발암성 모델의 Basal diet로는 AIN-76

A diet를 사용하였으며(Table 1), 여기에 10 mg/kg과 1000 mg/kg의 두 가지 농도로 분말 상의 *Pueraria mirifica*을 첨가한 후 고속의 Hobart mixer를 사용하여 균일하게 혼합한 다음 펠렛으로 조제하여 사용하였다. human keratinocyte인 HaCaT cell을 이용한 gap junction assay 시험의 경우에는 에탄올에서 추출한 PM을 사용하였다.

실험 동물 및 사육 조건

Charles River (Japan)에서 구입한 5주령, F344 수컷 랫드 100마리를 사용하였다. 동물의 사육조건은 온도 22±3 ℃, 상대습도 55±5%, 환기횟수 10-12 회/hr, 명암주기 12시간, 조도 150-200 lux로 유지하였다. 모든 실험 동물은 사육실에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 시험기간 중에는 실험동물용 AIN-76A diet를 조제하여 섭취시켰으며, 음용수는 수돗물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

실험 설계 및 시험 물질 투여

6주령의 F344 랫드 수컷 100마리를 10개 군으로 나누어 실험 시작 시 모든 시험군의 동물에 간암 유발 물질인 DEN을 생리식염수에 용해하여 체중 kg당 200 mg씩 복강 내에 1회 주사하였고, 간세포의 증식을 위하여 2주와 5주 후에 DGA를 생리식염수에 용해하여 체중 kg당 300 mg씩 복강 내에 1회 주사한 후, 8주째에 부검을 실시하였다. 제 1군은 DEN만을 투여한 군으로서 DEN 투여 후 정상적인 AIN-76A 사료를 주었고, 제 2군은 DEN 투여 2주 후 발암 유발단계 이후에 10 mg/kg의 PM을 사료에 혼합하여 투여했다. 제 3군은 양성 대조군으로서 DEN 투여 2주 후에 발암 촉진제인 PB를 0.05% 농도로 음수에 혼합하여 투여하였다. 4, 5, 6군은 3군을 기준으로 각각 투여 시기를 달리하여 10 mg/kg의 PM을 투여한 군들로서, 4군은 발암 유발단계인 2주 동안, 5군은 발암 촉진 단계인 6주 동안, 그리고 6군은 시험 전 기간에 걸쳐 8주 동안 PM을 투여한 군이다. 7, 8, 9 그리고 10군은 PM이 1000 mg/kg 되게 사료에 급여한 군들로서, 방법은 2, 4, 5 및 6군과 각각 같게 하였다(Fig. 1).

Table 1. AIN-76A diet formula

Formula	g/kg
Casein	200.0
DL-Methionine	3.0
Sucrose	500.0
Corn Starch	150.0
Corn oil	50.0
Cellulose	50.0
Mineral Mix, AIN-76(170915)	35.0
Vitamin Mix AIN-76A(40077)	10.0
Choline Bitartrate	2.0

병리조직학적 검사 및 GST-p의 면역조직학적 검사

간을 육안으로 관찰한 후 두께 2-3 mm로 조직을 채취하여 10% 중성 포르말린으로 24시간 고정하고, 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하고, Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 또한 GST-p의 면역 조직학적 검사를 위하여 포르말린에 고정된 간 조직에 대해 avidin biotin peroxidase complex (ABC) 법을 이용하여 면역 염색을 실시하였다. 파라핀 조직 절편은 xylene으로 파라핀을 녹여내고, 알콜 농도 하강 순의 단계적 함수과정을 거쳐, moisture chamber에서 비특이적인 반응을 줄이기 위해 정상 goat의 혈청으로 blocking 시키고, rabbit anti-rabbit IgG, avidin biotin complex를 각각 moisture chamber에서 반응시킨 후 H_2O_2와 0.03% diaminobenzidine (DAB: 0.2M Tris-HCl buffer, pH 7.6)으로 발색반응을 일으켰다. 이와 같이 면역 염색된 슬라이드는 화상분석기 (Image Analyzer, Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 GST-p 양성 병소의 수와 면적을 측정하였다.

세포 배양 및 SL/DT(Scrape-loading dye transfer) assay

HaCaT human keratinocyte cell은 10% FBS가 첨가된

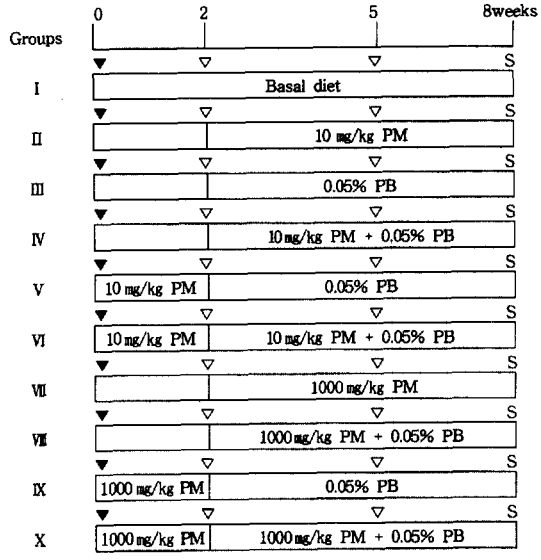

Fig. 1. Experimental design to examine the effects of the *Pueraria mirifica*. ▼ DEN (diethylnitrosamine) 200 mg/kg. i.p. ▽ DGA (D-galactosamine) 300mg/kg. i.p., PB (sodium phenobarbital), PM (*Pueraria mirifica*), S, sacrifice.

RPMI-1640 배지(Life Technologies)를 가하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. SL/DT assay는 형광염료인 Lucifer Yellow가 인위적 손상을 입은 세포로부터 주변세포로 gap junction을 통해 번져나가는 것을 측정하는 방법으로서 세포의 monolayer에 scrape line을 내어 GJIC를 관찰하는 방법이다 (El-Fouly 등 1987). HaCaT cell을 35 mm petri dish에 분주하여 80-90% 단층세포배양을 이루게 한 다음, 무 페놀/무 혈청 RPMI-1640 배지에 희석하여 제조한 *Pueraria mirifica* (125 μg/ml)를 TPA (10 ng/ml) 처치 24시간 전에 전 처치하였다. TPA 처치 1시간 후에 Ca^{2+}/Mg^{2+} PBS로 세척한 다음, 0.05%의 Lucifer Yellow (Sigma) 2 ml을 처치하고 차광 상태에서 외과용 칼날을 이용하여 scrape line을 만들어 3분 동안 실온에서 반응시켰다. PBS로 dish를 철저히 세척한 다음, 4% paraformaldehyde으로 세포를 고정시켰다. Gap junction을 통한 Lucifer Yellow의 확산 정도는 형광 현미경(Olympus IX70)을 이용하여 200배에서 관찰하였다.

자료의 통계 처리

체중, 상대 장기 무게 비, 화상 분석 결과에 대하여 Student's t-test를 사용하여 $p<0.05$ 에서 대조군과의 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

체중 변화

8주간의 시험 기간 중 랫드의 체중은 모든 군에서 동물의 성장에 따라 증가하는 양상이었으나, 1000 mg/kg의 *Pueraria mirifica*를 투여한 군에서는 유의한 ($p<0.05$) 체중 감소가 관찰되었다(Table 2).

병리조직학적 검사

각 군에서 적출하여 조직처리한 간 조직을 광학현미경으로 관찰한 결과, 발암 물질 투여에 의한 군들의 경우는 특징적인 전암 병변들이 관찰되었다. 하지만 *Pueraria mirifica*의 투여에 의한 군의 경우, 간 조직에서 특징적인 병변은 나타나지 않았다.

Table 2. Effect of *Pueraria mirifica* on body weights in male F344 rats

Experimental groups	Body weight[a] (g) at week[b]								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
DEN	137.35 ± 5.04	142.75 ± 5.21	169.86 ± 4.57	196.16 ± 3.70	218.50 ± 4.59	213.01 ± 7.28	232.07 ± 7.73	253.51 ± 6.91	263.71 ± 7.12
DEN-PM[1)]	138.15 ± 3.95	146.12 ± 5.28	166.85 ± 5.16	194.07 ± 3.70	219.96 ± 4.07	212.68 ± 4.69	231.92 ± 5.74	251.41 ± 6.73	261.74 ± 8.01
DEN-PB	136.98 ± 6.63	144.04 ± 5.97	176.96 ± 5.58	204.05 ± 8.46*	224.35 ± 10.10	222.97 ± 11.51*	245.30 ± 11.18*	263.45 ± 10.98*	273.16 ± 12.16
DEN-PB+PM[1)]	137.06 ± 4.53	143.85 ± 4.56	174.58 ± 3.76	201.43 ± 7.46	223.67 ± 9.81	225.87 ± 6.45	243.10 ± 9.29	261.21 ± 9.48	271.43 ± 6.41
DEN+PM[1)]-PB	137.52 ± 4.89	141.69 ± 4.88	173.60 ± 5.11	202.71 ± 4.71	221.93 ± 5.85	224.63 ± 4.30	243.10 ± 6.45	261.45 ± 6.36	271.17 ± 9.81
DEN+PM[1)]-PB+PM[1)]	137.12 ± 5.95	140.46 ± 3.27	174.31 ± 4.27	201.11 ± 5.63	224.05 ± 7.01	220.53 ± 6.81	241.31 ± 7.04	260.54 ± 7.65	270.57 ± 6.73
DEN-PM[2)]	137.15 ± 4.77	144.11 ± 6.82	167.71 ± 4.49	176.07 ± 4.14*	182.96 ± 5.07*	186.69 ± 5.44*	199.92 ± 6.96*	211.87 ± 7.75*	217.77 ± 9.05*
DEN-PB+PM[2)]	136.02 ± 5.26	142.17 ± 5.19	166.57 ± 4.76**	178.44 ± 4.73**	185.17 ± 5.31**	183.91 ± 3.45**	199.66 ± 4.23**	210.12 ± 4.47**	213.33 ± 5.81**
DEN+PM[2)]-PB	136.22 ± 5.74	133.69 ± 3.88**	159.25 ± 6.11**	193.71 ± 5.71**	217.94 ± 4.91	217.30 ± 6.20	235.17 ± 7.11**	250.10 ± 7.42**	259.33 ± 7.91**
DEN+PM[2)]-PB+PM[2)]	136.13 ± 4.27	133.25 ± 4.27**	155.24 ± 5.37**	177.98 ± 6.63**	189.35 ± 8.09**	194.35 ± 7.81**	205.41 ± 8.04**	219.84 ± 8.65**	226.75 ± 8.73**

[a], Values were expressed as mean ± SD.
[b], Weeks after DEN injection.
* : Significantly different from the rats treated with DEN ($p<0.05$).
** : Significantly different from the rats treated with DEN-PB ($p<0.05$).
[1)] : 10 mg/kg *Pueraria mirifica* , [2)] : 1000 mg/kg *Pueraria mirifica*

체중 대비 상대 간 무게

DEN만을 투여한 군에 비해 DEN과 PB을 투여한 군에서 상대 간 중량이 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 DEN과 PB만을 투여한 군에 비해 간암 유발 단계와 촉진 단계에서 각각 *Pueraria mirifica*를 투여한 군에서는 상대 간 중량의 유의한($p<0.05$) 감소를 관찰할 수 있었으나, 8주 전기간에 걸쳐 투여한 군에서는 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 3).

GST-p 양성 병소의 수와 면적

GST-p 면역염색 결과, 정상 간세포와 구별되는 GST-p 양성 증식소 및 증식성 결절을 관찰할 수 있었다. 각 실험군에서 GST-p 양성 병소의 수와 면적은 DEN만을 투여한 군에 비해 DEN-PB군에서 수와 면적의 유의적인($p<0.05$) 증가를 관찰할 수 있었으나 투여시기를 달리하여 *Pueraria mirifica*를 투여한 군에 있어서는 대조군과 비교시 각 군들 사이에서 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(Table 4).

Scrape-Loading Dye Transfer (SL/DT) assay

대조군에 비해 *Pueraria mirifica*를 처치한 군에서 GJIC 정도를 평가하기 위하여 SL/DT 방법을 사용하였다. Lucifer Yellow는 blade로 scraping되어 손상을 입은 세포 안으로 침투하게 되며 gap junction channel을 통하여 퍼진다. 무 처치 HaCaT cell에서는 LY가 scraped line을 기준으로 널리 퍼진 양상을 볼 수 있었고 PM만을 처치한 군에서도 GJIC capacity는 변화되지 않았다. 그러나 TPA(12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate)에 노출시킨 세포에서는 GJIC가 현저하게 억제되었음을 확인할 수 있었다. *Pueraria mirifica*을 전처치

Table 3. Final body and absolute relative liver organ weight of rats treated with *Pueraria mirifica*

Group	Treatment	No. of Rats	Final body weight (g)	Liver/body weight ratio (%)
1	DEN	10	263.71 ± 7.12[a)]	3.50 ± 0.23
2	DEN-PM[1)]	10	261.74 ± 8.01	3.58 ± 0.45
3	DEN-PB	10	273.16 ± 12.16	4.76 ± 0.24*
4	DEN-PB+PM[1)]	10	271.43 ± 6.41	4.16 ± 0.27**
5	DEN+PM[1)]-PB	10	271.17 ± 9.81	4.28 ± 0.35**
6	DEN+PM[1)]-PB+PM[1)]	10	270.57 ± 6.73	4.63 ± 0.37
7	DEN-PM[2)]	10	217.11 ± 9.05*	3.53 ± 0.25
8	DEN-PB+PM[2)]	10	213.33 ± 5.81**	4.11 ± 0.20**
9	DEN+PM[2)]-PB	10	259.33 ± 7.91**	4.48 ± 0.15**
10	DEN+PM[2)]-PB+PM[2)]	10	226.75 ± 8.73**	4.87 ± 0.31

[a)], Values were expressed as mean ± S.D.
* : Significantly different from the rats treated with DEN ($p<0.05$).
** : Significantly different from the rats treated with DEN-PB ($p<0.05$).
[1)] : 10 mg/kg *Pueraria mirifica* , [2)] : 1000 mg/kg *Pueraria mirifica*.

Table 4. Effect of *Pueraria mirifica* on the GST-p positive liver cell foci in hepatocarcinogenesis rats

Group	Treatment	No. of Rats	GST-p positive foci	
			No./cm^2	Area (mm^2/cm^2)
1	DEN	10	1.54 ± 0.32[a)]	0.03 ± 0.01
2	DEN-PM[1)]	10	1.49 ± 0.25	0.05 ± 0.03
3	DEN-PB	10	4.11 ± 1.13*	0.29 ± 0.09*
4	DEN-PB+PM[1)]	10	4.16 ± 1.17*	0.27 ± 0.05*
5	DEN+PM[1)]-PB	10	4.08 ± 1.28*	0.28 ± 0.09*
6	DEN+PM[1)]-PB+PM[1)]	10	4.12 ± 1.27*	0.27 ± 0.11*
7	DEN-PM[2)]	10	1.51 ± 0.19	0.04 ± 0.02
8	DEN-PB+PM[2)]	10	4.07 ± 1.17*	0.25 ± 0.07*
9	DEN+PM[2)]-PB	10	3.98 ± 1.37*	0.24 ± 0.08*
10	DEN+PM[2)]-PB+PM[2)]	10	4.16 ± 1.39*	0.30 ± 0.11*

[a)], Values were expressed as mean ± S.D.
* : Significantly different from the rats treated with DEN ($p<0.05$).
[1)] : 10 mg/kg *Pueraria mirifica* , [2)] : 1000 mg/k *Pueraria mirifica*.

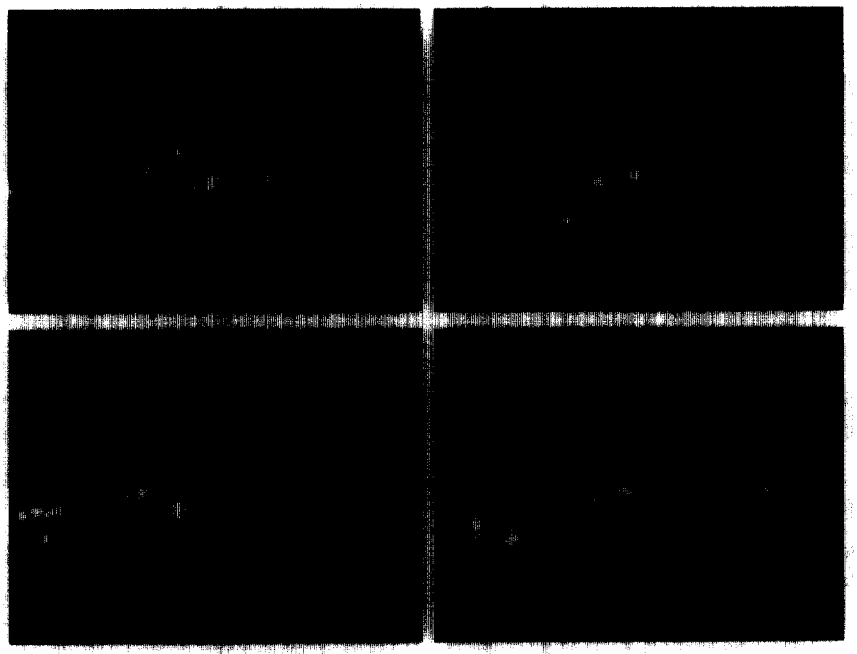

Fig. 2. Gap junctional intercellular communication capacity of HaCaT cells revealed by the scrape dye loading method. a, treated with solvent (medium) only; b, treated with *Pueraria mirifica*; c, treated with medium and TPA; d, treated with *Pueraria mirifica* and TPA. Dramatic inhibition of gap junctional intercellular communication is evident with TPA, whereas *Pueraria mirifica* appears to have no effect, with or without TPA treatment.

하고 TPA를 동시 처치한 세포에서도 TPA에 의해 억제된 GJIC와 유사한 양상을 관찰할 수 있었다. *Pueraria mirifica*은 TPA 처치와 관계없이 GJIC에 영향을 미치지 않았다(Fig 2).

고 찰

본 연구에서는 *Pueraria mirifica*의 투여가 비수술적 중기 발암성 모델을 이용한 실험적 간암 발생과정에서 어떠한 영향을 미치는지 GST-p 면역 염색을 실시한 후, 양성 병소의 면적과 수를 측정하여 조사해 보았다. PM을 투여하지 않은 대조군과 비교해 보았을 때, 투여시기를 달리하여 PM을 투여한 군들에서는 GST-p 양성 병소의 수와 면적에서 유의한 ($p<0.05$) 차이를 관찰할 수 없었다. 한편 HaCaT cell에서의 SL/DT assay에서도 *Pueraria mirifica*는 GJIC capacity에 영향을 주지 않았다.

Phytoestrogen은 식물이나 식물 생산물에서 얻어지는 isoflavones과 lignans으로 크게 구분할 수 있으며,[34] 이러한 phytoestrogen을 장기간에 걸쳐 섭취할 경우, 폐경기 장애와 골다공증 같은 에스트로겐 결핍 장애나 에스트로겐 의존성 암 등의 호르몬 관련 질환의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.[20,38] Phytoestrogen은 estrogens과 유사한 2-phenylnaphthalene 형의 구조를 가지고 있어 에스트로겐 수용체와 결합하여 에스트로겐 활성을 나타내며,[45] 에스트로겐 수용체에 대해 내생적인 17β-estradiol과 경쟁적으로 결합함으로서 항에스트로겐 활성을 나타낸다.[23] 또한 phytoestrogen은 에스트로겐 수용체를 경유하지 않고 효소와 단백질의 합성, 세포 증식, 혈관 신생, 칼슘의 이동, Na^+/K^+ adenosine triphosphatase, growth factor의 작용, lipid oxidation, 세포 분화와 같은 대사 경로를 통해 건강에 이로운 효과를 나타낸다고 보고되어 있다.[1,19]

*Pueraria mirifica*의 경우도 아직까지 그 작용 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않지만 다른 콩과식물의 작용 기전과 유사하게 에스트로겐 수용체와 결합하여 에스트로겐 활성을 나타내는 것으로 생각된다. PM의 에스트로겐 활성을 나타내는 여러 가지 phytoestrogen 성분 중 miroestrol이나 혹은 deoxymiroestrol이 가장 강한 에스트로겐 활성을 나타내며, 특히 MCF-7 유방암 세포를 이용한 성장 촉진 실험에서 miroestrol과 deoxymiroestrol은 에스트로겐 길항제인 toremifene이 존재할 때, 대조물질로 사용한 17β-estradiol보다 더 강한 성장 효과를 가지고 있다는 보고가 있다.[7]

체중 변화에 있어서는 PM을 1000 mg/kg의 고농도로 투여하였을 경우, 유의한($p<0.05$) 체중 감소가 나타났으나, 10 mg/kg의 PM을 투여한 군에서는 대조군과 유사한 체중 증가 양상을 관찰할 수 있었다. Iwase T는[14] ethinylestradiol을 수컷 쥐에게 4주 동안 반복 투여했을 경우 대조군에 비해

체중 증가량과 사료 섭취량의 억제가 관찰되었고, 남 등에[46] 의해서도 stilben계의 합성 에스트로겐인 DES를 처치하였을 경우 수컷에게서 유의하게 체중이 감소함을 관찰할 수 있었다고 한다. 따라서 PM을 1000 mg/kg으로 투여하였을 경우 나타나는 이러한 체중의 감소 현상은 고농도의 PM을 투여했을 때 나타난 PM의 독성학적 영향으로서 숫컷 랫드가 과량의 강한 에스트로겐성 물질을 섭취했을 때 발생할 수 있는 결과와 유사한 결과라고 생각된다.

비수술적 중기 발암성 모델에 대한 *Pueraria mirifica*의 간암 발생 조절효과는 대조군에 대한 각 군의 간의 상대 중량비, 병리조직학적 검사, 간 전암 병변에 대한 지표효소인 GST-p 양성 병소에 대한 분석 등의 결과로 평가하였다.

먼저 체중에 대한 간의 상대 중량비는 DEN만을 투여한 군에 비해 DEN과 PB을 투여한 군들에서 모두 유의한 증가를 보였으며 이는 phenobarbital의 투여로 인한 간의 비대화 현상에 의한 것으로 생각된다. 하지만 DEN과 PB를 투여한 군에 대해 각각 투여 시기를 달리하여 간암 유발단계와 간암 촉진단계에서 PM을 투여한 군에서는 DEN과 PB만을 투여한 양성 대조군에 비해 유의한($p<0.05$) 감소를 보였으나 시험 전 기간에 걸쳐 투여한 군에서는 대조군과의 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 이러한 결과는 8주간의 시험 전 기간에 걸쳐 PM을 투여한 군에서 간 상대 중량비의 유의한 차이를 발견할 수 없을 뿐만 아니라, GST-p 면역염색의 분석 결과와 비교해 보았을 때도 유의한 차이를 나타내지 않았으므로 의미 있는 결과라 생각되지 않는다.

병리 조직학적 검사에서는 화학적 발암 물질의 투여에 의한 특징적인 전암병변의 증식성 결절과 병소를 뚜렷하게 확인할 수 있었다. GST-p 양성 병소에 있어서는 basal diet를 투여한 1군에 대해 간암 유발 후 단계에서 PM을 투여한 군뿐만 아니라 DEN과 PB을 투여한 3군을 기준으로 각각 발암 유발단계, 발암 촉진단계 또한 전 기간에 걸쳐 PM을 투여한 군들에서 대조군과 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

독성물질에 의하여 GJIC의 변화가 일어나면 여러 조직에서 기능 이상과 급성 혹은 만성 질환을 유도하여 발암을 촉진시키는 것으로 알려져 있으며, 후성학적 기전(epigenetic mechanism)을 통해 주위의 정상적인 gap junction을 가진 세포들의 억압 작용을 저해하여 initiated cell의 clonal expansion과 같은 tumor promotion에 영향을 미친다고 한다.[39,43]

Tumor-promoter에 의한 GJIC의 억제와[44] anti-promoting agent에 의한 GJIC의 활성 증가의[26] 발견으로 인하여 GJIC의 억제에 따른 기본적인 발암 촉진 세포 기전의 설명이 가능하게 되었고 따라서 이러한 GJIC의 활성 감소를 예방하는 것이 발암 촉진과정을 방어하는데 중요하다는 가설을 뒷받침하게 된다.[33] Kang 등은 GJIC와 관련하여 WB-F344 랫드의 간 상피세포를 이용한 gap junction assay를 통해 녹차와 인삼 추출물, 게르마늄의 항암 효과를 보고한 바 있다.[16,17]

종양촉진물질이 GJIC를 억제시키는 기전은 아직 분명히 알려져 있지 않으나 Ca^{2+}의 세포내 변화와 connexins의 인산화 과정의 변화, connexin 발현과 조립의 장애 등에 의해 GJIC가 억제된다고 한다.[15,41] 대표적인 종양촉진물질인 TPA는[44] 세포에서 GJIC의 빠른 억제를 유도하는 것으로 알려져 있는데, 이는 세포질막에서 Cx43의 소멸과 protein kinase C에 의한 Cx의 인산화를 유발하여 GJIC를 억제하는 것으로 보고되었다.[3]

본 연구는 피부에서의 *Pueraria mirifica*에 대한 GJIC 평가를 알기 위하여 human keratinocyte인 HaCaT cell을 이용하여 SL/DT assay를 실시하였다. PM만을 처치한 세포에서는 배지만을 처치한 대조군과 비교해 보았을 때, GJIC의 변화를 관찰할 수 없었다. 또한 125 μg/ml의 PM을 24시간 전에 전처치하고 10 ng/ml의 TPA를 동시 처치한 세포에서도 TPA만을 투여한 세포에 비해 뚜렷한 회복 효과를 확인할 수 없었다. 따라서 사람 피부세포에서 PM은 TPA의 처치와 무관하게 GJIC에 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

이상의 결과들을 종합해 보았을 때 실험적 간암 발생과정에 투여된 *Pueraria mirifica*는 간 전암 병변의 억제나 촉진에 뚜렷한 효과를 나타내지 않았고 사람 피부 세포인 HaCaT cell을 이용한 gap junction assay에서도 GJIC에 영향을 주지 않았다. 그러나 아직까지 여러 가지 *in vivo*와 *in vitro* 실험에서 *Pueraria mirifica*에 대한 실험 결과는 부족한 실정이므로 이에 대해 종합적이고 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

국문요약

본 연구는 비수술적 중기 발암성 모델과 gap junction intercellular communication(GJIC) 수식을 이용하여 태국에서 회춘약으로 알려진 *Pueraria mirifica* (Kawo Keur)식물의 항암 및 발암성 유무의 관계를 알아보기 위해 실시했다. 비수술적 중기 발암성 모델 시험의 경우, *Pueraria mirifica* 식물이 수컷 F344 랫드에 대하여 전암 병변의 발달에 어떠한 영향을 미치는지를 알기 위한 것으로 GST-p 양성 병소의 수와 면적을 측정하여 그 수식 효과를 알아보았다.

6주령의 수컷 F344 랫드를 10 개군으로 나누어 간암을 유발하기 위하여 모든 동물에 대하여 시험 시작일에 200 mg/kg의 DEN을 투여하였고, 2주와 5주 말에 각각 300 mg/kg의 DGA를 복강 투여하였다. 3군에서 6군까지에 대해서는 sodium phenobarbital을 0.05%의 농도로 음수 투여하였으며, 2군에 대해서는 발암유발 후의 6주 동안 AIN-76A에 10 mg/kg의 농도로 PM을 혼합한 사료를 투여하였다. 또한 4군과 5군에 대해서는 발암 촉진단계와 발암 유발단계에서 각각 10 mg/kg의 PM 혼합 사료를, 6군은 시험 전 기간에 걸쳐 8주 동안 10 mg/kg의 PM 혼합사료를 급여한 군이다. 또한 7, 8, 9 및 10군은 2, 4, 5 및 6군과 같은 방법으로 1000 mg/kg의 PM을 투여한 군으로 모든 동물은 DEN 투여 후 8주 째에 부검하였다. GST-p 면역염색 결과 양성 병소의 면적과 수에서 10 mg/kg의 PM을 투여한 군들은 대조군과 비교시 유의한 차이가 나타나지 않았고, 1000 mg/kg의 PM을 투여한 7, 8, 9 및 10군에서도 GST-p 양성 병소의 수와 면적에서 대조군과 비교해 보았을 때 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 또한 PM이 gap junction intercellular communication (GJIC) 수식에 어떤 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 사람 피부세포에서 SL/DT assay를 실시해 보았으나 이러한 gap junction assay에서도 PM은 GJIC에 영향을 주지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 *Pueraria mirifica*는 랫드에서의 실험적 간암 발생과정과 human keratinocyte에서의 gap junction intercellular communication에서 수식 효과를 가지고 있지 않는 것으로 보아 항암 및 발암성 여부와 관련이 없는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Adlercreutz H, Mazur W.: (1997) Phyto-oestrogens and western diseases. Ann Med. **29**, 95-120
2. Bounds, D. G., Pope, G. S.: *J. Chem. Soc.* 1960, 3696-3705.
3. Budunova, I.V. and Williams, G.M. Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication. *Cell Biol. Toxicol.*, **10**, 71-116 (1994).
4. Cain, J. C.: *Nature* 1960, 188, 774-777.
5. Cameron, R.G., Imaida, K. and Ito, N. : Promotive effects of ethynylestradiol in hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in male rats. *Gann*, **72**, 339-340 (1981a).
6. Cameron, R. G., Imaida, K. and Ito, N. : Promotive effects of deoxycholic acids on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in male rats. *Gann*, **72**, 635-636 (1981b).
7. Chansakaow S, Ishikawa T, Seki H, Sekine (nee Yoshizawa) K, Okada M, Chaichantipyuth C.: Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of "Kwao Keur", *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. *J Nat Prod.* **63**(2), 173-5 2000.
8. El-Fouly M.H., Trosko J.E., Chang C.C. : Scrape-loading and dye transfer: A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. Exp. Cell Res., **168**, 422-430, (1987)
9. Farber, E.: The multistage nature of cancer development. *Cancer Res.*, **44**, 4217-4223 (1984).
10. Hasegawa, r., Tsuda, H., Shirai, T., Kurata, Y., Masuda, A. and Ito, N. : Effect of timing of partial hepatectomy on the induction of preneoplastic liver foci in rats given hepatocarcinogens. *Cancer lett*, **32**, 15-23 (1986).
11. Ito, N., Inoue, T., Tagawa, Y., Aoki, T. and Kagawa, M. : Developement of new rapid bioassay for carcinogens to predict the results of long term carcinogenesity test. *Toxicol. Forum*, **9**, 601-611 (1986).
12. Ito, N., Tatematsu, M., Imaida, K., Hasegawa, R. and Murasaki, G. : Effects of various promoters on induction of hyperplastic nodules in rats liver. *Gann*, **71**, 415-416 (1980a).
13. Ito, N., Tatematsu, M., Nakanish, K., Hasegawa, R., Takano, T., Imaida, K. and Ogiso, T.: The effects of various chemicals on the development of hyperplastic liver nodules in hepatectomized rats treated with N-nitroso- diethylamine or N-2-acethylaminofluorene. *Gann*, **71**, 832-842 (1980b).
14. Iwase T, Sano F, Murakami T, Inazawa K.: (1995) Male reproductive toxicity of ethinylestradiol associated with 4 weeks daily dosing prior to mating in rats. J Toxicol Sci 1995 20(3) 265-79.
15. Jongen W.M.F., Fitzgerald D.J., Asamoto M., Piccoli C., Slaga T.J., Gros D., Takeichi M. and Yamasaki H. : Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca^{2+} in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J. Cell Biol.*, **114** : 545-555 (1991).
16. Kang KS, Kang BC, Lee BJ, Che JH, Li GX, Trosko JE, Lee YS. (2000) Preventive effect of epicatechin and ginsenoside Rb(2) on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA and H_2O_2. *Cancer Lett.* **152**(1) 97-106.
17. Kang KS, Yun JW, Yoon B, Lim YK, Lee YS.: (2001) Preventive effect of germanium dioxide on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA. *Cancer Lett.* **166(2)**, 147-53.
18. Kim HC, Lee YS, Furukawa F, Nishikawa A, Takahashi M.: (1995) Enhancement of GST-P positive liver cell foci development by a medium-term carcinogenicity bioassay using repeated administration of D-galactosamine. *Cancer Lett.* **98(1)**, 71-6.
19. Knight DC, Eden JA. (1996) A review of the clinical effects

of phytoestrogens. *Obstet Gynecol.* **87**, 897-904.
20. Kuruto-Niwa R, Inoue S, Ogawa S, Muramatsu M, Nozawa R.: (2000) Effects of Tea Catechins on the ERE-Regulated Estrogenic Activity. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 6355-6361.
21. Lakshnakara, K, Suvatabandhu, K. Airy Shaw, A. K. *Kew Bull.*: 1952, **4**, 549-551.
22. Loewenstein, W.R.: (1979) Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta*, **560**, 1-65.
23. Martinex-Campos A, Amara J, Dannies P. (1986) Antiestrogens are partial estrogen agonists for prolactin production in primary pituitary cultures. Mol Cell Endocrinol. **48**, 127-133.
24. Marx, J.L.: Tumor promoters: Carcinogenesis gets more complicated. *Science,* **201**, 515-518 (1978).
25. Mesnil M. and Yamasaki H. : Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells. *Mol. Carcinogenesis*, 7, 14-17, (1993).
26. Metha, P.P., Bertram, J.S. and Loewenstein, W.R. (1989) The actions of retinoids on cellular growth correlate with their actions on gap junctional communication. *J. Cell Biol.*, **108**, 1053-1065.
27. Nowell, P.C.: Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.*, **46**, 2203-2207 (1986).
28. Ogiso, T., Tatematsu, M., Tamano, S., Tsuda, H. and Ito, N. : Comparative effects of glutathione S-transferase-positive liver nodules in a long-term assay. *Toxicol. Patho.*, **13**, 257-265 (1985).
29. Pitot, H.C.: Biological and enzymatic events in chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Med.*, **30**, 25-39 (1979).
30. Pitot, H.C., Barsness, L., Golworthy, T. and Kitagawa T.: Biochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after single dose of diethylnitrosamine. *Nature*, **271**, 456-458 (1978).
31. Pitot, H.C. and Sirica, A.E.: The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochem. Biophys. Acta*, **605**, 191-205 (1980).
32. Rose B., Mehta P.P and Loewenstein W.R.: Gap-junction protein gene supresses tumorigenicity. *Carcinogenesis*, **14**(5): 1073-1075, (1993).
33. Sai, K., Kanno, J., Hasegawa, R., Trosko, J.E. and Inoue, T.: (2000) Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. *Carcinogenesis*, **21**, 1671-1676.
34. Santell RC, Chang YC, Nair HG and Helferich WG.: (1997) Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland, and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J Nutr* **127**, 263-269.
35. Sherer, E., Hoffmann, M., Emmelot, P. and Fried-rich-Freksa, M. : Quantitative study on foci of altered liver cells induced by diethylnitrosamine and partial hepatectomy. *J. Natl. Cancer Inst.*, **49**, 93-106 (1972).
36. Solt, D. and Farber, E.: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, **263**, 701-703 (1976).
37. Taylor, N. E.; Hodgkin, D. C.; Rollett, J. S.: *J. Chem. Soc.* 1960, 3685-3695.
38. Tham DM, Christopher D, Gardner and Haskell WL.: (1998) Potential Health Benefits of dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2223-2235.
39. Trosko, J.E., Chang, C.C. and Medcalf, A.: (1983) Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication. *Cancer Invest.*, **1**, 511-526.
40. Trosko, J.E. and Chang, C.C.: (1983) Nongenotoxic mechanisms in carcinogenesis: role of inhibited intercellular communication. In Hart,R.W. and Hoerger,F.D. (eds) Banbury Report 31 : Carcinogen Risk Assessment: New Directions in the Qualitative and Quantitative Aspects. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139-170.
41. Trosko J.E., Madhukar B.V., and Chang C.C: Endogenous and exogenous modulation of gap junctional intercellular communication; toxicological and pharmacological implications. Life Sci., **53**(1), 1-19 (1993).
42. Whitten, P. L., Russel, E., and Naftolin, F.: (1992). Effects of normal, human-concentration, phytoestrogen diet on rat uterine growth. *Steroids* **57**, 98-106.
43. Yamasaki, H. (1990) Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **11**, 1051-1058.
44. Yotti, L.P., Chang, C.C. and Trosko, J.E.: (1979) Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a tumor promoter. *Science*, **206**, 1089-1091.
45. Zava DT, Duwe G.: (1997) Estrogenic and antiproliferative properties and other flavonoids in human breast cancer cells *in vivo*. *Nutr Cancer*. **27**, 31-40.
46. 남기환, 박재학, 이완규, S. Hagaki, K. Doi, 이영순. (1997): 비수술적 증기 간 발암성 시험법의 확립에 관한 연구. 한국실험동물학회지 **13(1)**, 9-24..