

5. 韓國產 더덕과 만삼의 抗腫瘍性 Screening

Screening Test for Antitumor Activity of *Codonopsis lanceolata* and *C. pilosula*

緒 言

더덕은 Campanulaceae에 屬하며 學名을 *Codonopsis lanceolata* Bentham et Hooker라고 한다. 韓國, 日本, 中國, Amur地方에 分布하는 蔓性 多年生草로서 韓國에서는 옛적부터 珍味の 食品, 또는 沙蔘이란 藥으로 利用되어 오고 있는¹⁾ 貴重한 資源植物의 하나이다. 成分은 Saponin이 含有되어 있음을 알게 되었고,^{2,3)} 赤血球, Hemoglobin의 增加, 抗疲勞血壓降下, 消腫, 解毒, 排膿, 去痰, 肺癰, 乳腺炎, 鎮咳, 腸癰, 腫毒, 瘰癧, 扁桃炎, 乳汁不足, 白帶를 治한다고 되어 있다.^{4,5,6)}

韓國에서는 더덕구이, 더덕장아지, 더덕酒 등의 健康食品⁷⁾으로 利用價値가 높이 評價되고 있다.

특히 清熱解毒, 去痰排膿, 養陰潤肺, 抗癌作用이 있어 韓國에서는 이의 需要度가 急速度로 增加되고 있어서 그 栽培面積이 約 1,000ha에 이르고 있으나 栽培技術의 不足등으로 需要에 못 따르고 있는 實情이다. 尹⁸⁾, 金木⁹⁾등에 의해 더덕의 Isozyme에 관한 연구와 李¹⁰⁾의 무기물함량에 관한 연구 李¹¹⁾의 항암에 대한 Screening 연구 등이 보고되어 있다.

더욱이 요사이 급속히 활발히 연구되어지고 있는 항암자원 식물에 관한 연구^{11,12)}의 일환으로 더덕의 재배온도별 및 부위에 따른 항종양성에 관한 몇가지의 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 實驗栽培

韓國의 重要한 더덕의 產地인 智異山, 德積島, 平昌등에서 5年生 自生種의 乾燥根과 더덕종자로 搾油한 種子油와 더덕의 類似植物인 蔓蔘(錦山種)의 乾燥根 그리고 biotron에서 溫度試驗을 15°C, 20°C, 25°C, 30°C에서 實施하여 生産된 乾燥根과 잎 줄기를 Ethanol 및 물로서 各各 別途로 加熱抽出해서 얻은 것을 利用하였다.

- 野生더덕 5年生 乾燥根
 - ① 智異山 ② 德積島 ③ 平昌
- 溫度別 栽培種의 根, 葉, 蔓의 乾燥品
 - 產地: 茂朱
- 더덕種子油
 - 種子產地: 江原道에서 栽培된 것
- 蔓蔘根-3年生(錦山 栽培)

2. 試料抽出

被檢生藥은 必要에 따라서 刃物 또는 藥研으로 切斷 分碎해서 抽出하기에 알맞게 만들었다.

이것을 精製水 및 ethanol로서 別個로 抽出하였다. 즉 生藥에 適量의 溶媒를 加하여 2時間동안 加熱還流해서 抽出하여 抽出液은 濾紙 또는 Gase로 濾過시켜서 生藥殘渣와 分離했다. 여기서 얻은 抽出液은 減壓下에서 溜去해서 乾燥시켜 試料로 使用하였다.

3. 抗腫瘍活性試驗에 關한 實驗方法

(1) Sarcoma 180A에 의한 Total Packed Cell Volume Method(總細胞容積法)

Animals : ICR mice, male, 5 weeks, about 22~25g

Tumor : Sarcoma 180 Ascites

Screening Schedule :

day 0 : Sarcoma 180A is implanted i. p. (1×10^6 cells/0.05ml)

day 1-5 : Sample is given daily at indicated dose(i.p.)

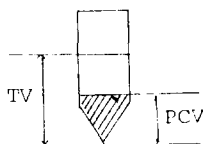
day 7 : Evaluation Growth Ration(%) = $\frac{PVC_{treat}}{PCV_{control}} \times 100$

GR 0-10% (+++)

11-40% (++)

41-65% (+)

66% - (-)



〈操作〉

生藥抽出物の 抗腫瘍活性 Screening은 腹水刑腫瘍의 Sarcoma 180을 使用하는 Total Packed Cell Volume Method(總細胞容積法)에 의해서 하였다.

本生物檢定法은 5週齡의 ICR系 mouse, 1群 6區로 해서 腫瘍移植後(1×10^6 Cells, i.p.), 1日 1回 5日間, 試料를 腹腔內에 連續投與 했다. 7日次에 mouse腹腔內 腹水を 採水해서 이것을 3,000rpm, 5分間 遠沈하여 腫瘍細胞를 分離시켜 그 腫瘍細胞容積(PVC : Packed Cell Volume)과 腹水全容積(TV : total volume)을 測定했다.

또한 試料의 毒性의 눈금대중으로서 體重變化量(BWC : body weight Change)을 腫瘍 移植後 7日次의 mouse體重에서 腫瘍移植日의 體重과 TV를 差引해서 求하였다.

腫瘍成長率(GR : Growth ration)은 試料無投與 對照群의 PCV의 平均에 對한 試料投與群의 PCV의 平均 比率의 百分率로 表示하고, GR : 0~10% (+++), 10~40%

++, 41~65% +, 66% < -로 해서 試料의 抗腫瘍活性을 判定했다.

投與試料의 調製는 Sodium Carboxymethyl Cellulose(CMC)를 0.5~1.0% 添加한 生理食鹽液을 利用해서 實施하였다. 또한 懸濁하기 어려운 試料에 對해서는 1.0% CMC, 生理食鹽額 20ml에 對해서 2~3摺의 Tween 80을 加해서 投與했다.

(2) V-79細胞에 依한 細胞毒性試驗

Screening方法(Screening on v-79 Cell) Chinese hamster肺由來의 V-79細胞는 10% 牛胎仔血清(三菱化成工業株式會社) 및 Kanamycin(10mg/ml)이 含有된 RPMI-1640培地에서 繼代培養하였다. Coning社의 6穴 Plate로 各穴에 1.92ml의 上記培地와 50 μ l의 細胞液(6×10^3 Cells/ml)를 넣고 CO₂ Incubator內에서 37°C, 5% Co₂ 條件下에서 培養하여 播種後 1日次에 各種濃度의 試料液을 培養液中에 10 μ l를 加했다.

또한 對照群은 培養液만으로 試驗하였다. 播種培養後 5日次에 培地를 버리고 PBS(-)로 水洗後, 各穴에 10% 中性 Formalin液 1.5ml를 加해서 細胞를 固定시키고, 30分 以上 放置하였다. 그 後 0.05% Crystal-biored液을 0.75ml 加해서 染色하여, 그 細胞 Colony數를 測定했다. 細胞毒性은 試料無投與對照群의 Colony數에 對한 試料投與群의 Colony數를 百分率(T/C%)로서 表示하여 評價하였다.

다음은 이의 實驗 과정이다.

(Schedule)



(day)

〈操作〉

1) 細胞를 播種

- ① 細胞를 顯微鏡으로, 使用可能한가 檢討
- ② 오래된 培地를 버리고, PBS(-) 5ml로서 씻음.
- ③ Trypsin液 1ml를 加해서 細胞를 壁에서 벗긴다.
- ④ 새로운 培地를 4ml 加해서 구부러진 pipette를 利用해서 잘 pipeting해서 細胞液을 試驗管에 옮긴다.
- ⑤ 〈繼代〉 새로운 培地를 5ml 넣은 25cm²의 培養 Frasco 2個에 細胞液을 各各 100 μl, 200 μl 加하고 뚜껑을 느슨하게 하여 CO₂ Incubator에 넣는다.
- ⑥ 細胞液中の 細胞數를 血球計算에서 測定한다.
- ⑦ 細胞數가 6 × 10³ Cells/ml 되도록 稀釋한다.
(稀釋 途中에 細胞數를 세서 確認한다.)
- ⑧ 各穴에 培地 1.95ml + 細胞液(6 × 10³ Cells/ml) 50 μl 를 넣은후 CO₂ Incubator 에 넣는다.

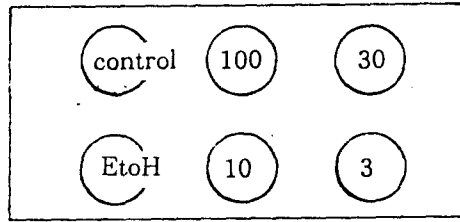
2) Sample 接種

- ① Sample은 20mg/ml 되도록 調製해 둔다.

②

最終濃度(μg/ml)	希 釋
100	20mg/ml
30	20mg/ml을 0.3ml + 培地 0.7ml (6mg/ml)
10	20mg/ml을 0.1ml + 培地 0.9ml (2mg/ml)
3	6mg/ml을 0.1ml + 培地 0.9ml (0.6mg/ml)

- ③ 濃度の 篤한 順으로 10 μl 씩 可함 → CO₂ Incubator에 넣는다.



3) 染色

- ① 培地를 버리고 PBS(-)로서 씻음
- ② 10% 中性 Formalin液 1.5ml로서 細胞를 固定함.
- ③ 30分以上 放置함(너무 짧으면 細胞가 벗겨떨어져 버림.)
- ④ 0.05% Crystalviolet液 0.75ml를 加해서 染色함.
- ⑤ 固定液과 染色液을 버리고 물을 넣은 대야에서 가볍게 水洗함.
- ⑥ Drier로서 乾燥시켜 Colony의 數를 계산한다.
- ⑦ T/C(%)求한다.....30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50% 以下=(+)

$$T/C(\%) = \frac{\text{Treat의 Colony數}}{\text{Control의 Colony數}} \times 100$$

4) 繼代

培地를 5ml를 넣은 培養 frasco 2個에 細胞液을 各各 10 μl , 200 μl 加함 → 뚜껑을 늦추어서, CO₂ incubator에 넣는다.

※ 100 μl → 3日後의 繼代用, 細胞成長度는 3日後가 가장 알맞다.

200 μl → 失敗했을때의 豫備, 細胞成長은 2日後가 가장 알맞다.

○ 큰 培養 frasco... 培地 15ml + 細胞液 50 μl → 1週間 繼代: PBS(-) 10ml로
서 씻음, trypsin 1ml, 培地 10ml

〈培地〉

RPMI 1,640 + Kanamysin(KM) + 小胎子血清(FCS) = 10%

結 果

1. 產地 및 部位別 抗腫瘍 Screening

1) 總細胞容積法 : Total packed cell Volume Method

野生더덕 5年生乾燥根과 種子油 및 蔓蔘根의 抗腫瘍 Screening 결과는 Table 1.과 같다.

Table 1. Antitumor activity of *Codonopsis lanceolata* and *C. pilosula* with Sarcoma 180 ascites Mice

Original Plant	Geographical Zone	Part used	Dose (mg/kg/day)	BWC (g)	PCV TV	GR (%)
<i>Codonopsis lanceolata</i>	Chirisan	root	100	+ 4.1	0.32	47.6 +
"	Dukjukdo	root	100	+ 2.7	0.33	81.22 -
"	Pyong Chang	root	100	+ 0.5	0.35	87.8 -
"	Pyong Chang	seed	100	+ 3.0	0.40	148.8 -
<i>Codonopsis pilosula</i>	Keum san	root	100	+ 3.6	0.32	84.1 -

2) 細胞毒性 Screening

野生더덕 5年生 乾燥根과 種子油 및 蔓蔘根의 細胞毒性實驗結果는 Table 2와 같다.

Table 2. Cytotoxic of *Codonopsis lanceolata* and *C. pilosula* with V-79 Cells.

Original Plant	Geographical Zone	Part Used	Concentration ($\mu\text{g/ml}$) / T/C (%)			
<i>Codonopsis lanceolata</i>	Chirisan	root	100/104	30/99	10/96	3/107
	Dukjukdo	root	100/100	30/104	10/112	3/104
	Pyong Chang	root	100/101	30/110	10/107	3/109
	Pyong Chang	seed	100/109	30/131	10/127	3/129
<i>C. pilosula</i>	Keum san	root	100/105	30/98	10/102	3/99

2. 溫度別 더덕의 細胞毒性法에 의한 Screening

무주산 더덕의 재배온도에 따른 더덕의 세포毒性實驗 結果는 table 3과 같다.

Table 3. Cytotoxic of *Codonopsis lanceolata moo-joo*

Part used	Temperature	Dose	抽出物 extract	收 率 (%)	Concentration ($\mu g / ml$),			/ T/C (%)	
					100	30	10	3	1
Stem	15 °C	66g	10.7 g	16.2	97	125	111	97	101
	15 °C	91g	11.5 g	12.6	86	95	109	96	124
	20 °C	100g	17.6 g	17.6	119	110	117	127	116
	20 °C	93g	10.2 g	11.0	88	83	94	101	91
	25 °C	41g	4.0 g	9.8	73*	91	95	103	90
	25 °C	45g	4.3 g	9.6	85	77	86	110	78
	30 °C	37g	4.8 g	13.0	93	94	93	96	99
	30 °C	29g	3.0 g	10.3	70	78	75	80	81
	30 °C	35g	3.7 g	10.6	78	89	93	81	92
leaf	15 °C	68g	21.7 g	31.9	98	103	110	92	102
	15 °C	77g	26.2 g	34.0	105	98	122	92	117
	20 °C	82g	21.2 g	25.9	105	98	95	117	112
	20 °C	69g	12.6 g	18.3	86*	98	98	94	100
	25 °C	97g	15.3 g	15.8	28*	60*	86	93	109
	25 °C	65g	15.1 g	23.2	90*	93	90	101	100
	30 °C	65g	18.2 g	28.0	54*	53*	90	81	87
	30 °C	79g	20.3 g	25.7	89*	102	95	85	88
root	15 °C	117g	41.2 g	35.2	102	103	111	113	113
	20 °C	121g	55.9 g	46.2	97	101	101	112	95
	25 °C	76g	27.3 g	35.9	92	94	96	102	95

考 察

本 研究에서 韓國產 더덕 3地方自生種 ①智異山, ②德積島 ③平昌, 蔓蓼(錦山栽培種), 더덕 種子油 1種(江原道 栽培種) 計 5種에 대한 總 細胞容積法과 細胞毒性檢定法에 依해서 抗腫瘍活性의 檢定을 實施했다. 總細胞容積法에 의한 檢定에 의하면, +以上의 活性을 認定할 수 있는 것은 智異山 더덕1種(GR 47.6%)이며 他의 3種은

GR 81.22~87.8% 内外이며, 種子油는 148.8%로 나타났다. 그리고 細胞毒性的의 결과는 T/C가 99~129%로 나타났다. 今後 여러가지 角度에서 檢討해야 할 것으로 思料되어지나, 이번의 試驗에서는 더덕의 抗腫瘍性은 豫防과 免疫的 效果를 認定할 수 있는 結果를 얻었다고 볼 수 있다.

그리고 biotron에서 溫度別로 재배한 더덕의 뿌리, 줄기, 잎의 收穫物을 細胞 毒性法에 의해 Screening한 結果, 뿌리는 T/C(%)가 95~113%, 줄기는 T/C(%)가 81~124%, 잎은 87~117%로 나타났다.

뿌리는 T/C(%)는 25°C에서의 것이 95% 20°C가 95% 15°C의 것은 113%로 나타났다.

줄기의 T/C(%)는 30°C에서 81~99%, 25°C에서 78~90%, 20°C에서 91~116%, 15°C에서 101~124%로 나타났다.

잎의 T/C(%)는 30°C의 것 87~88%, 25°C에서 100~109%, 20°C에서 100~112%, 15°C에서 102~117%로 나타났다.

溫度別 더덕의 細胞毒性法에 의한 Screening 結果를 考察할 때, 뿌리, 줄기, 잎 등 모두 生育狀態가 좋고 收量이 비교적 많은 15°C, 20°C, 25°C에서의 것보다 30°C와 같이 生育狀態와 收量조건이 좋지 못한 곳에서 生産된 것이 T/C(%)가 낮게 나타나고 있음을 알 수 있다.

더덕은 現在까지 根部만 利用해 왔으나 줄기와 잎도 알맞게 收穫 調製하여 이용 함으로서 좋은 資源이 될 것으로 인정되어, 이들의 抗腫瘍性 Screening도 여러각도로 檢討研究해 나가야 할 것으로 생각된다.

摘 要

- 1) 더덕의 3地方 自生種의 總細胞容積法(Total Packed Cell Volume method)에 의한 결과는 智異山種이 +, 기타종은 81.22~87.8로 그리고 種子油는 148.80, 蔓蔘은

84.1로 나타났다.

- 2) 細胞毒素法(Screening on V-79 Cell)에 의한 결과는 3種이 모두 T/C(%)가 104~109, 蔓蔘이 95%, 더덕種子油 129%로 나타났다.
- 3) 溫度別 栽培한 細胞毒性法の 결과는 뿌리, 줄기, 잎 모두 比較的 높은 溫度에서 재배된 것이 T/C(%)가 낮게 나타났다.

參 考 文 獻

1. 金在佶, 1984. 原色天然物大事典 上卷, 서울, 南山堂, 39
2. 梁漢錫, 1975, 沙蔘의 生藥學的 研究, 부산대학교 대학원 博士學位 論文
3. 崔秉淑, 1975, 더덕(*Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook.)의 Sapoqenin에 관한 연구, 梨花女子大學校 大學院
4. 許 浚, 1988, 東醫寶鑑, 學力開發社
5. 相賀徹未, 1985, 中藥大辭典 2卷, 小學館
6. 平原宗軒, 1942, 鄉藥集成方 下, 杏林書院
7. 木川康一, 1978, 藥用植物學總論, 東京, 慶川書店, 39
8. 尹義洙, 李相來, 李良洙, 1988, 韓國과 日本에 自生하는 더덕에 있어서의 Isozymes의 地域間 차이, 동양자원 식물학회지, 1 : 34~41
9. 金木良三, 朴相龍, 種村淳, 李相來, 李良洙, 1989, 韓國과 日本에 自生하는 더덕의 Isozyme변이에 관한 기초적 연구, 동양자원식물학회지, 2 : 243~251
10. 李相來, 尹義洙, 李洪宰, 李根洙, 李鍾一, 1989, 韓國에 自生하는 抗癌植物開發에 관한 기초적 연구, 2 : 1~214
11. 系川秀治, 渡邊謹三, 三原和彦, 竹谷孝一, 1982, 生藥의 抗腫瘍性 스크리닝 테스트(第2報), 生藥學雜誌, 36 : 145~149
12. 系川秀治, 平山總良, 鶴岡俊志, 水野謙治, 竹谷孝一, 新田あや, 1990, 生藥의 抗腫瘍性 스크리닝테스트(第3報), イントネシア産 藥用植物의 抗腫瘍活性について, 生藥學雜誌, 44 : 58~62.