

## ( 특강-2 )

### L1210 세포에 대한 인삼 diacetylene의 세포독성 및 ginsenoside Rg1의 항암증강작용

안 병 준

SB제약 중앙 연구소

공주시 반포면 봉곡리 533-2

E-mail: ahnbj@cnu.ac.kr

#### 1. 서론

인삼의 화학적 약리적 연구는 주로 인삼 추출물 중 수용성 부분의 사포닌에 국한되었다. 1978년 황등<sup>1)</sup>, 이등<sup>2)</sup>, 윤등<sup>3)</sup>, 유등<sup>4)</sup> 이 인삼의 지용성 부분이 세포독성을 보인다는 보고를 하였는데, 이들 보고가 인삼의 지용부분의 암세포 독성에 대한 연구의 효시라 할 수 있다. 본인 등은 첫째로 인삼의 지용 부분에 함유되어 있는 세포독성 물질에 관심을 두고 이들을 분리하고 구조 확인과 더불어 분리된 순수 물질의 세포독성을 측정하고자 하였다.

또한 현재 임상2상 연구 단계에 있는 백두옹, 인삼, 감초로 구성된 SB항암제 중에는 인삼이 함유되어 있는데 이 제제의 항암성에 인삼이 미치는 영향을 연구하는 중 부분적이거나 결과를 얻었기에 여기에서 보고한다.

#### 2. 인삼의 세포독성 diacetylenes <sup>5,6,7,8,9)</sup>

인삼 분말을 석유에테르로 추출하여 얻은 엑기스를 silica gel column에서 hexane/ether로 ether의 비율을 높이면서 6개의 분획 (I - VI)을 얻었다. 이 분획을 다시 HPLC로 정제하여 diacetylene유도체를 얻어 그 구조와 세포독성을 도식형태로 종합하였다.

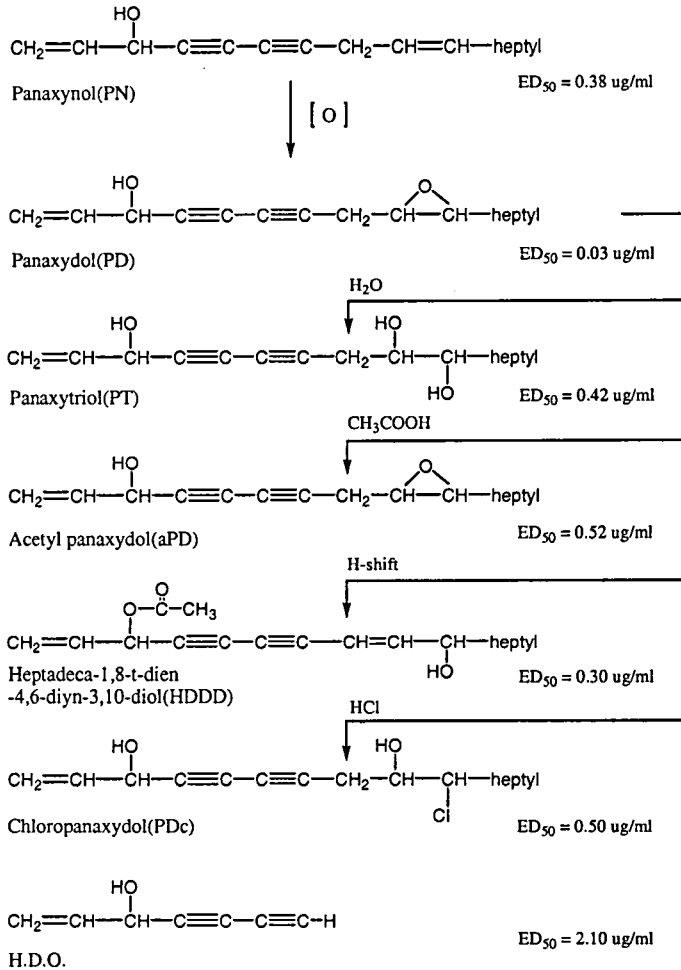
도식에서 볼 수 있는 바와 같이 인삼의 지용성 부분으로부터 6개의 diacetylene유도체를 분리하였다. 이들 중 acetylpanaxydol, panaxydol chlorohydrin은 새로운 물질이다.

이들의 구조간의 생합성적 상관관계와 L1210세포에 대한 세포독성의 변화를 설명하기로 한다. panaxydol은 panaxynol의 9번 위치의 이중결합을 biooxidation으로 epoxy화함으로써 생성된다고 생각된다. Epoxy기를 도입함으로써 세포독성은 12배 정도 증가되었다. 이 증가 효과는 epoxy기는 bionucleophile에 대하여 강력한 작용기인 것이 그 원인이라고 생각된다. Panaxydol은 다시 세포내에서 가수 분해 되어 panaxytriol로 변한다. Epoxy기가 없어지고 대신 glycol기가 생성됨으로써 세포독성은 대폭(12배) 감소한다. 이 사실은 다시금 epoxy기의 존재가 세포독성 증가에 주된 구조 부분임을 입증한다. 한편 panaxydol의 OH-3를 acetyl화하면 acetylpanaxydol이 생성되는데 이 물질도 panaxydol에 비하여 훨씬 약한 세포독성을 보인다. 이 사실은 OH-3가 세포독성에 중요한 역할을 함을 뜻한다. OH-3는 수용성의 제고는 물론 수용체와의 수소 결합을 통하여 독성작용의 발현에 중요한 역할을 한다고 가정할 수 있다. Heptadeca-1,8-t-dien-4,6-diyn-3,10-diol은 panaxydol 구조 중 산도가 높은 Panaxydol의 8번 수소는 hydrogen shift를 함으로써 생성된 것으로 ED<sub>50</sub>값은 0.30 $\mu$ g/ml이다. Panaxydol chlorohydrin은 panaxydol의 epoxy기에 HCl이 공격

하여 생성된 물질로써 세포독성은 panaxydol에 비하여 약하다.

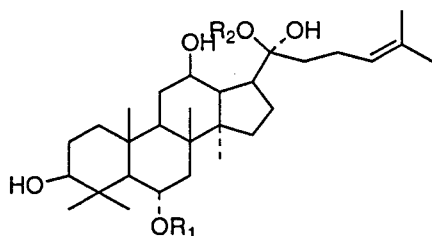
인삼의 diacetylene유도체 모두가 hept-1-en-4,6-diyn-3-ol(HDO)의 구조 부분을 함유하고 있으므로 HDO가 세포독성의 기본적 구조일 것으로 생각하고 이를 합성하였다. 그 세포독성을 측정하였던 바, ED<sub>50</sub>값은 2.1μg/ml를 보였다. 이는 항암성 물질의 세포독성 전반을 고려하면 비교적 높은 세포독성이다. 그러나 HDO보다 panaxynol의 세포독성이 월등하게 높은 것으로 보아 HDO에 결합된 다른 탄소 10개로 된 chain의 존재도 세포독성에 매우 중요함을 간과해서는 안된다.

결국 panaxynol, 즉 hepadeca-1,9-t-dien-4,6-diyn-3-ol을 기본 구조로 할 때, 탄소 9, 10사이의 epoxy기의 존재가 인삼 diacetylene들의 세포독성에 가장 중요하다고 결론 지을 수 있다. 또한 합성으로 증명된 바와 같이 panaxydol의 epoxy기는 cis형으로 이 구조부분의 configuration도 세포독성에 중요하리라 생각된다.



### 3. 백두옹을 함유하는 항암제 SB31과 ginsenoside Rg1

현재 본인 등은 원방이 백두옹, 인삼, 감초로 구성되어 있는 항암제에 관한 연구를 수행하고 있다. 항암주사제는 백두옹이나 순수 백두옹제제에 비하여 인삼의 첨가를 통하여 위 제제의 항암성이 질적으로 향상된다는 주장을 증명해보려는 것이 본인의 연구과제 중의 하나이다. 백두옹의 항암성은 세포독성 물질인 deoxypodophyllotoxin과 비세포독성 항암물질인 SB365의 작용에서 비롯된다고 생각하고 있다. 미삼을 메탄올로 추출한 후 Silica gel column에서 Chloroform/methanol/물(35:35:10)으로 분획하여 Rg1이 함유된 부분을 분취하여 fraction 1이라 하고 Rf치가 낮고 Rb1을 함유한 부분을 fraction 3이라하고 이들 양 분획의 중간 부분을 모은 것을 fraction 3이라하였다. 이들과 SB31을 조합하여 처방을 만들고 Lewis lung cell을 이식한 BDF1 마우스에 대하여 암 억제작용을 관찰하였다.



P1; O-β-D-glucopyranosyl

R2; O-β-D-glucopyranosyl

Ginsenoside Rg1

#### 처방 구성 1

처방 1; 250mg SB31 + 10mg fraction 1

처방 2; 250mg SB31 + 10mg fraction 2

처방 3; 250mg SB31 + 10mg fraction 3

처방 4; 250mg SB31 + 1mg Rg1

처방 5; 250mg SB31 + 3mg Rg1

처방 6; 250mg SB31 + 5mg Rg1

\*위 처방은 모두 4% tween 10ml에 용해하여 이 중 0.2ml/mouse씩을 암이식 24시간 후 부터 7일간 연속으로 복강 주사하였다.

표 2. 처방의 Lewis lung cancer cell을 이식한 BDF1 마우스에 대한 항암효과 단위; 성장저지율(%)

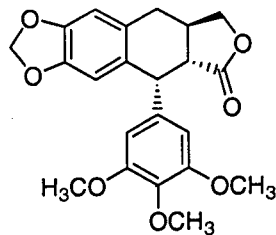
처방0(SB31)	67% at day 15	60% at day 19	52% at day 21
처방 1	80	77	73
처방 2	65	62	51
처방 3	60	59	59

처방0	51	55	56
처방 4	55	43	50
처방 5	49	53	31
처방 6	73	71	69

표2를 보면 ginsenoside Rg1을 함유한 fraction 1이 분획 중 가장 좋은 항암 증강효과를 보인다. Fraction 1의 주 물질인 순수 ginsenoside Rg1으로 실험을 하였던 바 이 물질이 백두옹계제의 항암성을 증강시켰고, 따라서 미삼 성분 중 Rg1이 항암증강 물질임을 확인할 수 있었다.

### Deoxypodophyllotoxin (DPT)에 대한 ginsenoside Rg1의 항암성 증강 효과

본 연구실에서 백두옹으로부터 처음 분리한 항암 물질이 DPT 였다. 이 물질은 Human umbelical Venous Endothelial Cell (HUVEC)에 대하여 1ng/ml에서 tube-like formation을 완전히 지지하였으며 이 농도는 A549세포에 대한 세포독성 농도 6-21 ng/ml에 비하여 매우 낮은 농도이다. 말하자면 세포독성 발현 이전에 암 조직 내 혈관 형성을 저해 하리라는



Deoxypodophyllotoxin

가정을 세울 수가 있었다<sup>10)</sup>.

여기서는 SB31에 함유되어 있는 미삼의 성분이 DPT의 항암성에 미치는 영향을 보고자 한다.

### 처방구성 2

- 처방 7; 5mg DPT + 3mg Rg1 + 3mg glycyrrhizin
- 처방 8; 10mg DPT + 3mg Rg1 + 3mg glycyrrhizin
- 처방 9; 20mg DPT + 3mg Rg1 + 3mg glycyrrhizin
- 처방 10; 10mg DPT + 5mg Rg1 + 3mg glycyrrhizin
- 처방 11; 10mg DPT + 10mg Rg1 + 3mg glycyrrhizin

위 처방은 모두 4% tween 80 10ml에 용해시켜 사용하였다.

표3. Dose dependence of deoxypodophyllotoxin under constant amount of ginsenoside Rg1 and glycyrrhizin

처방 7	52% at day 15	50% at day 19	43% at day 21
처방 8	59	55	51
처방 9	toxic(투약 2일에 모두 사망)		

표3에는 Rg1과 glycyrrhizin 각 3mg를 가하고 DPT를 5, 10, 20mg을 가한 처방을 Lewis lung cancer cell을 이식한 마우스에 0.2ml 씩 연속 7일간 주사하고 암의 크기를 측정한 결과이다. DPT 10mg을 가한 처방이 가장 우수한 항암효과를 보였으며, 20mg 투여군에서는 심한 독성을 보였다.

표4. Dose dependence of ginsenoside Rg1 under presence of 10mg deoxypodophyllotoxin

SB31	46% at day 15	51% at day 19	41% at day 21
처방 10	44	40	41
처방 11	58	56	53

표4에는 DPT 10mg과 glycyrrhizin 3mg 존재하에 Rg1 5mg과 10mg으로 구성된 처방의 항암성에 관한 내용이 기록되어있다. 이 경우 Rg1 10mg을 가한 처방에서 가장 좋은 항암효과를 보였다.

#### 인삼 첨가 처방으로부터 얻은 결론

위의 개략적인 실험으로부터 인삼 성분 중 ginsenoside Rg1이 천연 항암제인 SB31과 이 제제로부터 분리한 신생 혈관 억제 및 세포독성을 보이는 deoxypodophyllotoxin에 대하여 항암 상승작용을 보인다는 결론을 얻을 수 있었다.

## 4. 문헌

1. WI Hwang and MS Cha. A cytotoxic activity of extract of Panax ginseng root against some cancer cells. Proc. 2nd Int. Ginseng Symp. 43(1978),
2. 이선희, 황우익. 고려인삼 중 석유에테르 추출물의 인체 암 세포 증식 억제 효과. 고려인삼학회지. 10, 141(1986)
3. 윤연숙, 이세영, 김병수, 윤택구. 인삼의 세포독성 분획의 작용기작에 관한 연구. 한국생약학회지, 13, 208(1980)
4. SH Ryu, KH Moon, MY Park. Primary screening for growth inhibitors of L1210 cells from oriental herbs. Kor.J.Appl.Microbiol.Bioeng., 10, 53(1979)
5. B.Z.Ahn and S.L.Kim : Panaxydol, the cytotoxic Principle of the Panax Ginseng Root against L1210 Cell, *Arch. Pharm. Res.* 8, 283 (1985)

6. B.Z.Ahn and S.L.Kim : Beziehung zwischen Struktur und Panaxydol-Analogen gegen L1210 Zellen , *Arch. Pharm.* ( Weinheim ) 321, 61 - 63 ( 1988 )
7. B.Z.Ahn, S.L.Kim and Y.H.Lee; Acetylpanaxydol und Panaxydolchlorohydrin, zwei neue, gegen L<sub>1210</sub>-Zellen cytotoxische Polyine aus Koreanischem Ginseng, *Arch. Pharm.*(Weinheim) 322, 223-226(1989)
8. B.Z.Ahn and S.L.Kim : Heptadeca-1 , 8t-dien-4 , 6-diyn-3 , 10-diol , ein weiteres, gegen L1210 Zellen cytotoxisches Polyyn aus der Koreanischen Ginsengwurzel , *Planta Medica* 54, 183 ( 1988 )
9. Kim Shin-Il, Lee You-Hui and Ahn Byung-Zun:Synthesis of Ginseng diyne analogues and their antiproliferative activity against L1210 cells. *Arch. d. Pharmazie Med.Chem.* 332, 133-136 (1999).
10. Yong Kim, Song-Bae Kim, Byung-Zun Ahn. Deoxypodophyllotoxin; the cytotoxic and antiangiogenic component from *Pulsatilla koreana* Nakai. *Planta Medica*, 68, 271-274 (2002).