Korean J. Ginseng Sci.
Vol. 10, No. 2 (1986)

高麗人蔘中 Petroleum Ether 抽出物의 人體 癌細胞 增殖抑制效果

李仙熙*·黃祐翊
* 숙명여자 대학교 식품영양과
고려대학교 의과대학 생화학교실
(1986年 9月 11日 接受)

Inhibitory Effect of Petroleum Ether Extract of *Panax Giseng* Root against Growth of Human Cancer Cells

Sun Hee Lee* and Woo Ik Hwang
* *Department of Food & Nutrition, Graduate School, Sookmyung Woman's University*
Department of Biochemistry, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea
(Received Sep. 11, 1986)

Abstract

This study was attempted to screen the cytotoxic activity of petroleum ether extract from panax ginseng root against human colon cancer cells.

Two extracts of panax ginseng root, crude and partially purified, were used for this experiment.

The crude extract was prepared by extraction with petroleum ether using Soxhlet aparatus for 12 to 15 hours from panax ginseng and the extract was partially purified by silicic acid column with mixture of petroleum ether: ethyl ether (70 : 30, v/v).

Three species of human colon cancer cells, HRT-18, HCT-48 and HT-29, were maintained in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), and the cells were cultured in DMEM containing serial concentration of the crude or partially purified fraction to observe the cytotoxic activity of the both extracts.

The effects of incubation time and concentration of the both extracts in culture medium against the growth of the each cancer cell were determined.

The results obtained are summarized as follows:

1. The doubling times of the HRT-18, HCT-48 and HT-29 cells were about 20, 24 and 22 hours, respectively.
2. The inhibitory effects of the crude extract on the growth of cancer cells were increased according to the rise of concentration of the extract and incubation time.
3. The inhibitory effect of partially purified fraction on the growth of HRT-18 cell was

about 4 times stronger than that of the crude extract under same experimental condition.

4. The inhibitory effects of the crude and purified fraction on the growth of each cancer cell were shown difference by the kind of the cancer cell.

In view of the above results, it could be said that the petroleum ether extract of panax ginseng root inhibited the division of the human colon cancer cell, *in vitro*.

서 론

인삼은 동양에서 옛 부터 신비의 약제로 알려져 왔고[1] 최근에 이르러 국내외 적으로 인삼의 여러가지 약리작용에 관한 과학적 실험 보문[2-10]이 많이 나왔다. 그런데 그 약리작용은 주로 인삼중 사포닌계 성분에 의한 것으로 보고 되었다[11-15].

저자는 인삼중 비 사포닌계 성분 중에도 특이한 작용이 있으리라 예상하고 특히 항암작용에 관심을 갖고 실험하여 전보[16-19]에서 인삼중 지용성 성분중에 암세포의 증식 억제 효과가 있음을 보고 한바 있다.

이와같은 사실은 실험조건이 다르기는 하였으나 Woo[20], Yun[21], Huemer[22], odashima[23], Yamamoto[24]등이 연구에서도 인정된바 있다. 그러나 이들 연구는 동물암세포만을 대상으로 실시 하였으므로 본연구에서는 인체암 세포를 대상으로 실험 계획을 수립 하였다.

즉 인삼의 petroleum ether 추출물이 함유된 배양액에서 인체 장암 세포인 HRT—18, HT—29 및 HCT—48 등을 배양 하면서 이들 암세포의 증식억제 효과를 측정하여 흥미있는 결과를 얻었기에 보고 한다.

재료 및 방법

가. 실험재료

1) 암세포 ; 본 실험에 사용한 암세포는 1984년에 미국 샌프란시스코 소재 california 대학 Kim.Y.S. 교수로 부터 분양받아 본연구실에서 배양한 인체 직장암 세포인 HRT—18, 인체 결장암세포인 HT—29 및 HCT—48 등 3종이다.

2) 인삼 ; 1984년도 백삼 6년근 (15편, 300g) 일등품을 구입하여 가루로 만든후 성분추출용 재료로 사용 하였다.

3) 시약 및 기구 ; 암세포 배양액, 혈청 및 trypsin은 각각 GIBCO (Grand Island Biologic Co.) 제품인 분말의 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Bovin Serum 및 trypsin-EDTA (10×)를 사용 하였다.

그리고 암세포 배양용 항온기, 세포수 측정기 및 현미경 등은 각각 Napco 제의 CO_2 incubator, Coulter counter model ZB_1 및 tissue culture inverted microscope 등을 사용 하였고 millipore filter disc 및 그 부속품은 millipore Corp. 제품을, 그외 모든 초자기구는

pyrex 제품을 사용 하였다.

나. 실험방법

1) 암세포 배양

사람의 장암 세포인 HRT—18, HCT—48 및 HT—29는 5% fetal bovin serum, penicillin (100 units/ml) 및 streptomycin (100ug/ml)이 들어있는 DMEM으로 T—75 flask 또는 35㎜ petri dish에 이식 시킨후 5% CO_2와 95% 공기가 들어있는 CO_2 incubator (37℃)에서 monolayer로 배양 하였다. 그리고 이들 암세포는 일주일 간격으로 PBS (phosphate buffered saline)에 녹인 0.05% trypsin—0.02% EDTA (Ca^{++}과 Mg^{++}이 안들어 있는)용액으로 dish로 부터 분리시켜 새로운 용기에 교대 배양 하였다.

2) 암세포의 증식율 및 doubling time.

각 암세포의 증식율과 doubling time을 측정하기 위하여 암세포를 $3\sim4\times10^4$ cells/dish 되도록 이식한후 dish에 부착 증식되는 세포를 1일 간격으로 trypsin 처리하여 분리하고 coulter counter에서 그 세포수를 측정하였다. 그리고 매일 증가된 세포수를 기준으로 암세포의 증식율을 계산하고 semilogarithmic paper에 세포증식 곡선을 그린후 그 곡선으로 부터 doulbing time을 산출 하였다.

3) 인삼 성분의 추출 및 정제.

인삼 성분의 추출 및 정제는 전보[19]와 Morris 법[25]에 따랐다. 즉 실험재료 항에서 명시된 고려인삼의 분말을 3g씩 평량하여 soxhlet 장치에서 석유에텔로 12시간 내지 15시간 추출한 후 rotary evaportaor에서 질소 gas 유통하에 감압 건조 시켰다. 여기서 얻은 crude extract(이하 CGX라 약칭함)를 소량의 무수 알콜에 녹여 멸균된 millipore disc에 무균적으로 통과 시킨후 필요한 농도까지 멸균된 배양액에 희석하여 실험용으로 사용하였다.

한편 위에서 얻은 CGX를 정제하기 위하여 다음과 같이 시행 하였다. 즉 silicic acid 15g 내지 20g을 100ml 비카에 취하여 120℃에서 2시간 가열후 크로르폼 50ml에 녹여서 유리관에 부어 column을 만들고 chloroform 50ml로 씻어 내었다. 그다음 석유에텔 50ml을 통과시켜 column을 고정 시킨후 CGX 100mg 내지 200mg을 소량의 석유에텔에 녹여 column에 주입 하였다. 그리고 석유에텔 50ml, 석유에텔 : 에텔(90 : 10v/v, 50ml, 80 : 20v/v, 50ml, 70 : 30v/v, 100ml)로 순차적으로 씻어내려 각 분획을 수집 하였다.

이들 분획중 전보[19]에서 70 : 30의 분획중의 활성이 가장 강함을 확인 하였기 본실험에서는 이 분획(이하 PGX라 약칭함)을 CGX의 경우와 같이 감압건조 시켜 실험에 사용 하였다.

4) 암세포에 인삼추출물 (CGX 및 PGX)의 투여 방법.

각 암세포를 35㎜ petri dish에 이식하고 24 내지 48시간 배양하여 세포수가 약 $3\sim4\times10^4$ cells/dish 정도 부착되었을때 본래의 배양액을 버리고 (암세포는 dish에 붙어있음) 인삼 추출액(CGX 또는 PGX)이 들어 있는 새배양액으로 교체 하였다.

즉 배양액 ml 당 CGX 또는 PGX를 25㎍, 50㎍, 100㎍ 및 200㎍ 씩 들어있는 배양액

으로 암세포를 1~4일간 배양후 각 해당기간에 각군의 세포수를 측정하여 대조군의 치와 비교 하였다.

실험결과 및 고찰

1. 암세포의 증식율과 doubling time.

인삼중 petroleum ether 추출물의 암세포에 대한 증식억제 효과를 측정하기 위하여 본 실험에서는 인체암 세포인 HRT—18, HT—29 및 HCT—48 등을 사용한바 이들 암세포의 증식율과 doubling time 은 Fig. 1에서 보는바와 같다.

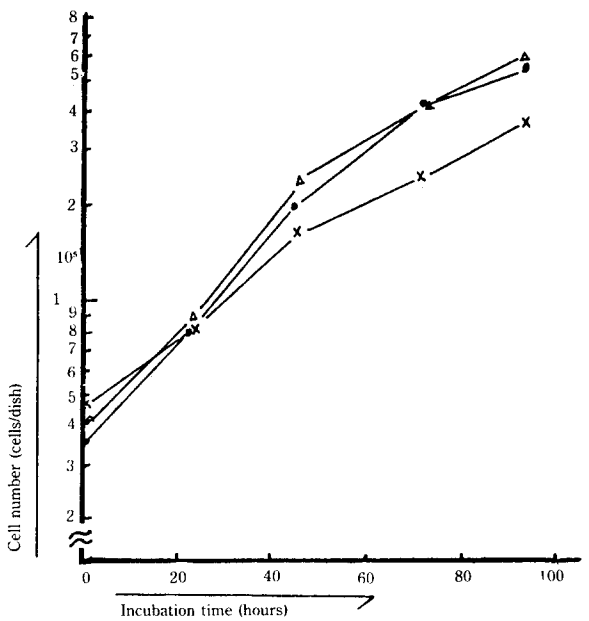

Fig. 1. Growth curves of HRT-18 (•———•), HT-29(△———△) and HCT-48 (x———x) cells.

즉 HRT—18 세포는 배양 시작때 3.5×10^4, cells/dish 이던 것이 24, 48, 72 및 96시간 배양후 각각 8×10^4, 12×10^5, 4.4×10^5 및 5.5×10^5 cells/dish 로 증식되어 그의 doubling time 은 약 20시간이 되었다.

그리고 HT—29 및 HCT—48 세포는 배양 시작시 각각 4.0×10^4 및 4.5×10^4 cells/dish 이던 것이 각 배양 시간별로 각각 8.5×10^4 및 8.0×10^4, 2.3×10^5 및 1.7×10^5, 4.2×10^5 및 2.5×10^5, 5.8×10^5 및 3.8×10^5 cells/dish 가 되어 doubling time 은 각각 22 및 24 시간이 되었다.

이들 암세포는 모두 미국 california 대학교 위장 암연구소에서 분양 받은것으로 doubling time 이 그 연구소 보고와 일치되는 점으로 보아 각 암세포가 오염 되거나 특

성의 변동 없이 정상적으로 증식된 것으로 사료 된다.

2. 암세포 증식에 대한 CGX(인삼추출물)의 농도별 영향

각 암세포를 CGX의 함량(농도)이 다른 배양액에서 72시간 배양후 암세포수를 측정한바 Fig.2와 같은 성적을 얻었다.

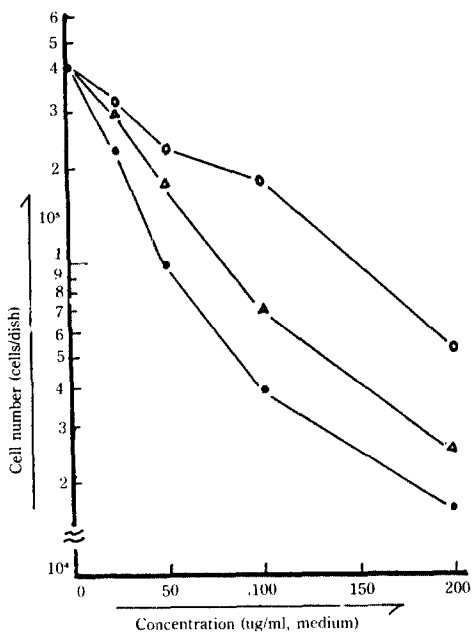

Fig. 2. Dose response curves of ginseng extract on the growth of HRT-18 (o———o), HCT-48 (△———△) and HT-29 (•———•) cells after incubation for 72 hours.

즉 72시간 배양후 각 암세포의 대조군(CGX가 안들어 있는 배양액에서 배양 한것)의 세포수는 약 4.0×10^5 cells/dish 이 었다. 그런데 배양액 ml 당 25μg, 50μg, 100μg, 및 200μg 씩 함유된 배양액에서 배양된 HRT—18의 세포수는 각각 3.3×10^5, 2.3×10^5, 1.8×10^5 및 5.2×10^4 cells/dish 로 되어 대조군에 비하여 각각 21%, 45%, 57% 및 87%가 감소 되었다.

그리고 HCT와 HT—29 세포의 경우에는 배양액중 CGX 농도 증가에 따라 각각 31%와 45%, 61% 와 75%, 84%와 90% 및 94%와 96%씩 감소 되었다.

따라서 본 성적을 종합해 보면 첫째로 각 암세포가 모두 배양액중 CGX의 농도가 증가 됨에 따라 그의 증식율은 점차 감소 되었고 둘째로 암세포의 종류에 따라 증식율의 감소가 차이가 났고 셋째로 배양액중 CGX의 농도가 아주 높으면 (200μg/ml) 배양 시작시의 세포수 보다도 더 적어져 세포의 증식이 억제 될뿐만 아니라 암세포가 사멸되는 현상까지 나타 내었다.

여기서 첫째로 지적한 CGX의 농도증가에 따라 암세포 증식율의 감소 현상은 이제까지 알려진[26] 각종 항암제 작용기전의 유형 즉 약제농도에 의존성, 작용시간에 의존성 및 약제농도와 작용시간의 동시 의존성 등과 비교 할때 약제 농도에 의존성에 해당 될 것으로 해석 된다. 그러나 본항 실험성적은 배양시간별 성적이 제외 되었으므로 다음 항에서 다시 고찰 하고저 한다.

한편 두번째로 지적한 CGX에 의한 암세포의 증식억제 효율이 암세포 종류에 따라 차이가 생겼음은 매우 흥미 있는 현상으로 이것은 CGX가 특성이 다른 어떤 암세포에 대하여는 본 실험에서 얻은 성적 보다 더 강력하고 유효한 억제작용을 나타낼 가능성, 그리고 또 다른 암세포에 대하여는 증식억제 효과가 매우 미약할 가능성 등을 암시하는 것으로 사료된다.

저자는 전보[19]에서도 CGX에 의한 leukemic cell과 Sarcoma 180 cell의 증식억제율이 차이가 있음을 밝힌바 있고 또한 정상 세포인 생쥐의 embryo cell에 대하여는 아무 영향이 없었음을 확인한 바 있어 본 실험 성적과도 관련 있는 현상일 것으로 믿는다.

따라서 CGX의 암세포 증식억제 효과에 대하여는 보다 더 광범위하게 여러 종류의 암세포 및 정상 세포를 대상으로 추구하면 CGX가 특이적으로 작용하는 암세포를 밝혀낼 가능성도 있다고 본다.

3. 암세포 증식에 대한 CGX(인삼 추출물)의 농도별 및 배양시간별 영향.

본항의 실험은 CGX를 ml당 25 μg, 50 μg, 100 μg 및 200 μg 씩 들어있는 배양액에서 24, 48, 72 및 96시간 각 암세포를 배양 하면서 각군의 암세포 수를 대조군과 비교한 것이다.

먼저 HRT—18 세포의 경우를 보면 Fig.3과 같다.

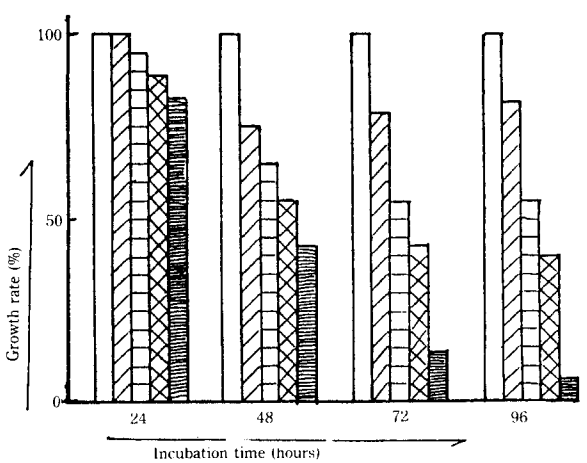

Fig. 3. Growth inhibition of HRT-18 cells by concentration of ginseng extract in medium and incubation time.
(□: Control group, ▨, ▤, ▩, ▤; are indicated the group cultured in medium containing 25, 50, 100, and 200 ug (per ml) of ginseng extract, respectively).

즉 24시간 배양군에서는 대조군에 비하여 CGX 첨가 농도별로 암세포 증식율이 현저한 차이를 보이지 않았으나 48시간, 72시간 및 96시간 배양군에서는 각각 CGX 첨가 (25μg~200μg/ml) 농도에 따라 25%~38.5%, 23%~87% 및 20%~93%까지 감소하여 CGX 첨가량의 증가와 배양시간의 연장에 따라 암세포의 증식율이 현저하게 감소 하였다.

이성적에서 세포 배양액중 CGX 농도가 다같이 25μg 내지 200μg/ml 일지라도 24시간 배양시 즉 배양시간이 짧으면 암세포 증식을 크게 억제 시키지 못하나 배양시간이 연장되어 48시간 이상 배양시에는 배양액중 CGX의 농도 증가에 따라 암세포 증식율도 점차 더 감소 됨을 알수 있다. 따라서 CGX의 암세포 증식억제 효과는 약제농도 및 작용시간에 대한 동시 의존성 임을 나타 내었다.

다음 HCT—48 세포와 HT—29세포의 경우를 보면 Fig.4 및 Fig.5와 같다.

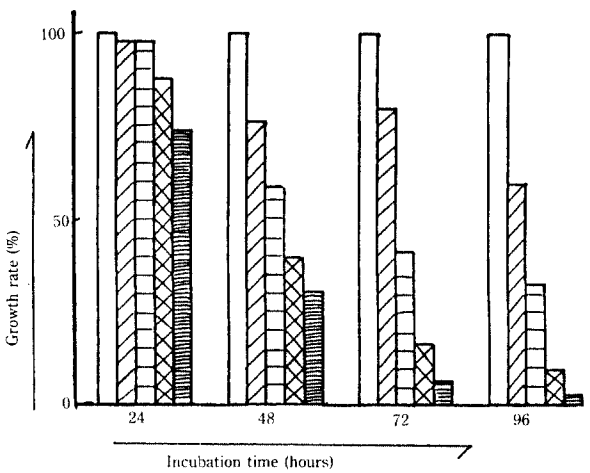

Fig. 4. Growth inhibition of HCT-48 cells by concentration of ginseng extract in medium and incubation time.
(□: Control group, ▨, ▤, ▩, ▤; are indicated the group cultured in medium containing 25, 50, 100, and 200 ug (per ml) of ginseng extract, respectively).

즉 HCT—48 세포는 HRT—18 세포의 경우와 같이 24시간 배양군에서 대조군에 비하여 CGX 첨가 농도별로 암세포 증식율이 현저한 차이를 보이지 않았으나 48시간, 72시간 및 96시간 배양군에서는 각각 CGX 첨가농도 (25μg~200μg/ml)에 따라 13.5%~69.4%, 19.2%~93.7%, 40.5%~97%까지 감소 하였다.

그리고 HT—29 세포의 증식율은 24시간, 48시간, 72시간 및 96시간 배양군에서 각각 CGX 첨가 농도에 따라 10%~41%, 40%~92.4%, 50%~96.2% 및 61%~98%까지 감소 하였다.

따라서 HCT—48 및 HT—29 세포도 CGX를 첨가한 배양액에서 배양시 CGX의 농

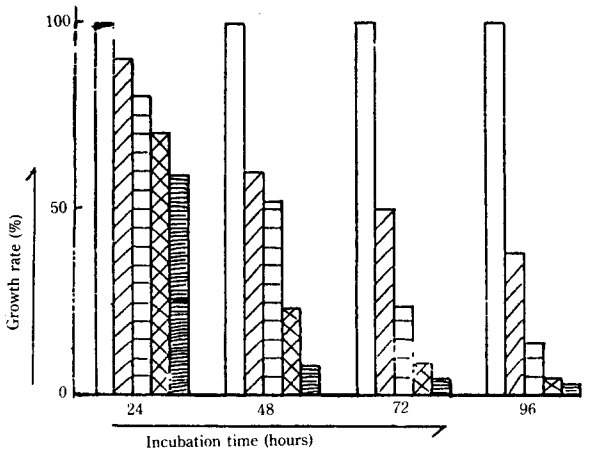

Fig. 5. Growth inhibition of HT-29 cells by concentration of ginseng extract in medium and incubation time.
(▭: Control group, ▨ , ▤ , ▩ , ▤ ; are indicated the group cultured in medium containing 25, 50, 100, and 20 ug (per ml) of ginseng extract, respectively).

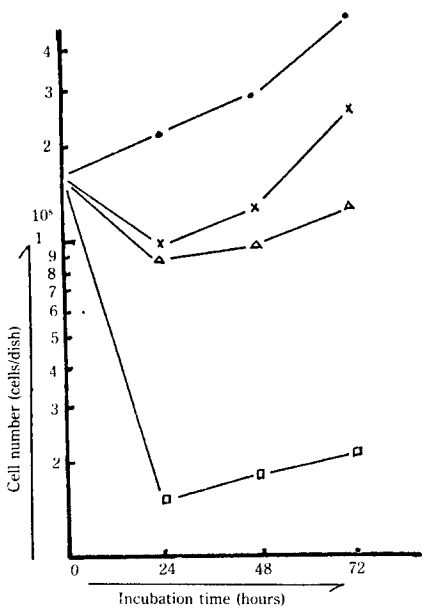

Fig. 6. Growth curves of HRT-18 cells in medium containing various amount (•——•); control, x——x; 25ug, △——△; 50ug, and □——□;100ug/ml) of partially purified ginseng extract.

도증가 및 배양시간의 연장에 따라 각 암세포의 증식율이 점차 더 감소되는 경향은 HRT—18 세포(Fig. 3 참조)의 경우와 일치 하였다. 그런데 각 암세포별 CGX에 의한 증식 억제율은 상이하여 같은 조건하에서 HT—29 세포의 증식이 가장 많이 억제 되었고 다음이 HCT—48 세포 그리고 HRT—18 세포의 순위 었다.

이와같이 암세포의 종류에 따라 CGX의 영향이 다른것은 전항에서 지적한 바와같이 각 암세포의 특성에 기인 되는 것으로 믿어진다.

한편 CGX를 silicic acid column을 통하여 부분적으로 정제한 (PGX)후 배양액 ml당 25μg 50μg 및 100μg씩 첨가하고 HRT—18를 배양하면서 그의 증식율을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다.

여기서도 CGX 첨가 배양시와 같이 HRT—18 세포의 증식율이 약제농도의 증가 및 배양시간의 연장에 따라 대조군에 비하여 점차 더 감소되는 경향은 같았으나 CGX 보다 PGX (정제된것)에 의한 증식억제 효율이 4배 더 강하였다.

따라서 CGX를 정제 하므로서 암세포 증식억제에 대한 활성을 더 증대 시킬 수 있음을 확인 하였다.

이상의 성적으로 보아 황[19]등이 보고한 인삼중 석유에텔 추출물이 *in vitro* 및 *in vivo* 에서 동물암세포의 증식억제효과 뿐만 아니라 인체장암 세포의 증식도 억제 시킨다는 새로운 사실을 확인한 셈이다.

요 약

본연구는 고려인삼중 석유에텔 추출물 (CGX)과 그의 부분 정제된 성분(PGX)이 인체장암 세포의 증식에 미치는 영향을 구명하기 위하여 실시 하였다.

인체암 세포는 직장암 세포인 HRT—18과 결장암 세포인 HCT—48 및 HT—29등을 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)으로 배양하면서 사용 하였다.

본 실험에 사용한 인삼 성분은 석유에텔 추출물 (CGX)과 CGX를 silicic acid column에서 부분 정제한 석유에텔 : 에칠에텔, 70 : 30 분획 (PGX)이었다.

본실험에서 각 암세포의 doubling time과 CGX 및 PGX의 농도별 및 배양시간별 각 암세포의 증식율에 미치는 영향을 측정한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. HRT—18, HCT—48 및 HT—29 세포의 doubling time은 각각 약 20, 24 및 22시간이었다.

2. 각 암세포의 증식율은 CGX 및 PGX의 농도증가와 배양시간의 연장에 따라 점차 더 억제 되었다.

3. 각 암세포의 증식율 억제 효과는 CGX 보다 PGX가 약 4배 강하였다.

4. CGX와 PGX의 각 암세포에 대한 증식율 억제효과는 암세포 종류에 따라 상이하였다.

이상의 결과로 보아 CGX 및 PGX는 in vitro에서 동물암 세포 뿐만 아니라 인체 장암세포의 증식도 억제 시킴을 알수 있고 정제하면 그효과가 더 상승함을 알수 있다.

인용 문헌

1. 조항영 : 생약학회지 **3**, 81(1972).
2. 문영벽 : 전남의대 잡지 **1**, 31(1964).
3. 오진섭, 박찬웅 : 대한 약리학 잡지 **5**, 23(1969).
4. 한구동, 조향원 : 서울대학교 논문집 **15**, 20(1957).
5. 주충노, 김재원 : 고려인삼학회지 **8**, 75(1984).
6. 안미라, 김태우, 조영동, 강두희 : 고려인삼학회지 **9**, 86(1985).
7. 강방희, 주충노 : 한국생화학회지 **18**, 285(1985).
8. 우원식, 조향원 : 서울대학교 논문집 **6**, 129(1957).
9. 김상달, 도재호, 이광승, 성현순 : 고려인삼학회지 **10**, 1(1986).
10. 한병훈 : 한국생화학회지 **6**, 63(1973).
11. 김봉기, 김낙두 : 서울대 약학논문집 **3**, 49(1978).
12. 서기림, 남정이, 강영태, 박인원, 이윤영 : 고려인삼학회지 **10**, 55(1986).
13. 주충노, 이희봉, 김재원 : 고려인삼학회지 **10**, 108(1986).
14. 윤항무, 신만련 : 우석의대잡지 **5**, 209(1968).
15. 남정식 : 대한생화학회지 **1**, 6(1961).
16. 황우익, 오수경 : 고려인삼학회지 **10**, 27(1986).
17. 황우익, 오수경 : 고려인삼학회지 **8**, 153(1984).
18. Hwang, Woo Ik : *Korean J. of Biochemistry* **8**, 1(1976).
19. Hwang, Woo Ik and S. Cha : Proc. of the 2nd International Ginseng symposium, Korean Ginseng Research Institute, Seoul, Korea. (1978).
20. Woo, L. K., Y. Nakamura, and L. Donati : *Arch. Ital, patol, clin, Tumori* **8**, 53(1965).
21. Yun, T. K., R. S. Yoon, and S. Y. Lee : Proceeding of the 2nd International Ginseng symposium, Korean Ginseng Research Institute, Seoul, Korea, (1978).
22. Huemer, R. R. and K. D. Lee : *Japan J. pharmacol.* **21**, 299(1971).
23. Odashima, S. and A. Shigeru : Proc. of the 2nd International Ginseng symposium. Korea Ginseng Research Institute, Seoul, Korea, (1978).
24. Yamamoto, C. : *Metabolism* **10**, 587(1973).
25. Morris, K. : *Techniques of lipidology, American Elsevier publishing Co., Inc. New York*, p. 435(1972).
26. 大星章一, 管野晴夫 : 人體癌細胞の 培養, 朝倉書店, 日本, (1975).