

## Clonogenic Assay에 의한 홍삼 소수성단백질 분획의 항암효과

김창한\* · 이명섭 · 이경호

전국대학교 동물자원연구센터 분자세포생물학교실  
(1995년 3월 23일 접수)

### Anticancer Effect of Hydrophobic Protein Fraction from Red Ginseng by Clonogenic Assay

Chang Han Kim\*, Myung Sub Lee and Kyung Ho Lee

Molecular & Cellular Bioscience Laboratory, Animal Resources Research Center,  
Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

(Received March 23, 1995)

**Abstract** We established the model of clonogenic assay with cancer cell lines such as SW-156(kidney), SNU-5(stomach), Hep G2(liver), and WiDr(colon), and we investigated anticancer effect of hydrophobic protein fraction(N-fraction) from Korea red ginseng by using this model. The results of clonogenic assay showed that N-fraction had anticancer activity against SNU-5 above 100 µg/ml concentration, and did not exhibit anticancer activity against cell lines such as SW-156, WiDr, and Hep G2 up to 1,000 µg/ml concentration. This result suggests that N-fraction has specially anti-stomach cancerous effect.

**Key words** Korean red ginseng, hydrophobic protein fraction, clonogenic assay, stomach cancer cell.

### 서 론

인삼의 지질 성분이 항암성이 있고<sup>1)</sup> 또 인삼 중에는 항암성이 있는 산성다당체가 함유되어 있음이 보고된 바 있다.<sup>2,3)</sup> 최근 홍삼으로부터 추출한 소수성단백질은 tumor promoter인 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)에 의하여 유도된 protein kinase C의 활성을 억제시키고,<sup>4)</sup> 인체 혈소판에서 PMA의 protein kinase C의 활성화에 의한 단백질인산화 반응을 억제시킨다고 보고되었다.<sup>5)</sup> 그러나 이러한 것은 *in vitro* 실험 결과이기 때문에 항암성물질의 세포특이성을 고려한 인체 암세포에 대한 효과를 검토할 필요성이 있다. 항암성물질을 개발함에 있어서 기본적으로 중요한 것은 항암활성의 screening법이며, 현재 널리 사용되고 있는 *in vitro* 항암활성 screening법은 clonogenic

assay,<sup>6~10)</sup> dye exclusion method,<sup>11)</sup> tritiated thymidine uptake assay,<sup>12)</sup> radiolabeled glucose utilization,<sup>13)</sup> MTT 및 XTT tetrazolium assay,<sup>14,15)</sup> 및 sulforhodamine B assay<sup>16)</sup> 등이 알려져 있다. 이들 assay 방법들은 나름대로의 장·단점을 가지고 있으며, 특히 clonogenic assay는 *in vitro*에서의 항암효과와 *in vivo*에서의 항암효과와의 상관관계가 매우 높기 때문에 우수한 항암활성 검색법으로 알려져 있다.<sup>17~20)</sup> 본 연구에서는 홍삼 소수성단백질 분획의 항암활성을 검토하기 위하여 clonogenic assay에 의하여 홍삼 소수성단백질 분획의 항암활성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 홍삼 재료

홍삼의 소수성단백질 분획은 한국인삼연초연구원에서 분양받아 N-fraction으로 명명하여 본 실험에

\*To whom correspondence should be addressed.

사용하였다.

## 2. 암세포

본 실험에 사용한 암세포는 미국 Texas San Antonio소재 Texas대학 Health Science의 D. D. Van Hoff교수의 암학 연구실로부터 분양받은 SW-156(human kidney cancer)와 서울대학교 암연구센터에서 분양받은 SNU-5(human stomach cancer), 전국대학교 축산대학 생화학 연구실에서 분양받은 WiDr(human colon adenocarcinoma)과 Hep G2(human liver cancer) 등의 인체유래 암세포주를 사용하였다.

## 3. 암세포의 배양

SNU-5와 SW-156은 RPMI 1640(Gibco, USA)배지에 fetal bovine serum(FBS) (Gibco, USA)를 10% 되게 첨가한 배지, WiDr은 Eagle's MEM(Gibco, USA)에 FBS와 non essential amino acid(Gibco, USA)를 각각 10%와 1%가 되게 첨가한 배지를 Hep G2는 Dulbecco's MEM(Gibco, USA)에 FBS와 sodium pyruvate(Sigma, USA)를 각각 10%와 1%가 되게 첨가한 배지를 사용하였다.<sup>21)</sup>

모든 암세포는 25 cm<sup>2</sup> 조직배양용 플라스크(Corning사, N.Y., USA)에 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는 습한 공기 조건하에서 배양하였다. 매주 2회씩 배지를 갈아주면서 암세포가 증식하여 confluence가 되는 시점에서 계대하였다. 플라스크 바닥에 monolayer를 형성하는 세포는 0.25% trypsin/1 mM EDTA 용액으로 단세포로 만들었으며 총세포수와 생존세포수는 trypan blue dye를 사용하여 Neubauer type hemocytometer(Seprior, USA)에서 계수하였다.

## 4. Clonogenic assay

직경 35 mm tissue culture dish에 agar를 0.5% 함유하는 하층배지(enriched McCoy' 5A 40 ml, 3% tryptic soy broth 10 ml, 6.6 mg/ml asparagine 0.6 ml, 50 mg/ml DEAE-dextran 0.3 ml)를 1 ml 주입하여 고정시킨 다음 agar를 0.3% 함유하는 상층배지(double-enriched CMRL 1066 2.0 ml, 약제(혹은 멸균증류수) 0.3 ml, 세포현탁액 0.5 ml) 1 ml를 주입하여 중층으로 평판을 만들어 고정시킨 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는 습한 공기로 포화된 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 배양 14일째의 평판에서 50 μm 이상의 크기를 나타내는 colony를 도립현미경(Model CK, Olympus사, Japan)을 사용하여 계수하였다. 항암물질의 탐색을 위한 가장 적절한 colony 수가 형성되는 평

판을 만들기 위하여 각 암세포를 각 평판당 5,000, 10,000, 20,000 및 40,000 cells의 농도로 하여 형성되는 colony수를 계수하여 각각의 암세포에 대한 적정 plating 농도를 결정하였으며, 항암성물질의 처리는 평판을 조제하기 전에 암세포 현탁액에 항암성물질을 첨가하는 연속 노출법을 이용하였다. 항암성물질에 대한 감수성은 항암성물질 처리 평판과 비처리 평판에 나타난 colony수를 비교하여 %로 나타내어 생존율 %로 결정하였으며, 감수성은 colony 형성수에 있어서 항암성물질 처리 평판에서 항암성물질 비처리 평판에서 보다 70% 이상 감소한 경우를 감수성이 있는 것으로 하였다. Clonogenic assay 모델 확립에 사용한 항암성 항생물질은 adriamycin, bleomycin과 mitomycin C(Sigma Co., USA) 등이며 각 항생물질의 농도는 보통 환자에게 사용되는 양을 사용하였을 때의 혈중 최고 농도 값(adriamycin 0.04 μg/ml, bleomycin 0.2 μg/ml과 mitomycin C 0.1 μg/ml)과 그 농도의 1/10 및 1/100 농도로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Soft agar 평판에서의 암세포의 colony 형성

Clonogenic assay를 위하여 실험에 사용한 암세포들의 soft agar 평판에서의 colony 형성능을 조사한 결과는 Table 1과 같았다. 결장암 세포인 WiDr과 간암 세포인 Hep G2의 경우에는 비교적 많은 colony를 형성하였으며, 위암 세포인 SNU-5의 경우 낮은 colony 형성을 보였다. 한편 항암성물질의 감수성 판단의 오차를 줄이기 위하여 평판당 50~500 colony가 되게 암세포의 초기 접종농도를 조절하고, 현재 항암제로 사용하고 있는 항생물질들을 대상으로 항암활성을 조사한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이

**Table 1.** Clonogeneity of human cancer cell lines in soft agar plate

Cell line	No. of colonies per cells plated			
	5,000 cells	10,000 cells	20,000 cells	40,000 cells
SW-156	128	180	217	349
SNU-5	33	65	67	9
WiDr	692	1,135	1,674	3,000
Hep G2	508	760	904	1,092

**Table 2.** Optimum concentration of cells plated and percent survival of antibiotics treated plate

Cell line	Concn of cells plated	Antibiotics concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )								
		Adriamycin			Bleomycin			Mitomycin C		
		0.04	0.004	0.0004	0.2	0.02	0.002	0.1	0.01	0.001
SW-156	5,000	87	91	97	71	78	88	51	65	94
SNU-5	10,000	11*	64	88	57	62	100	36	43	83
WiDr	3,000	66	72	76	67	69	73	50	51	67
Hep G2	3,000	45	54	66	56	58	70	46	66	89

\*Sensitive, i.e., % survival  $\leq 30\%$  compared to untreated control.

**Table 3.** Anticancer effect of N-fraction from Korea red ginseng by clonogenic assay

Concn. of N-fraction ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Cell line			
	SW-156	SNU-5	Hep G2	WiDr
10	89	36	61	100
100	81	29*	55	100
1,000	81	25*	35	83

\*Sensitive, i.e., % survival  $\leq 30\%$  compared to untreated control.

각각의 암세포는 각 항생물질에 대하여 heterogeneous한 감수성을 나타내었다.

이 결과는 모델화한 clonogenic assay법에 사용한 암세포들이 항암제에 대하여 각각 다른 생존율을 나타낸 것으로 항암성물질의 screening에 사용하여도 좋다는 것을 의미하고 있다.

## 2. 홍삼 소수성단백질 분획의 항암효과

인체암 세포주 4주를 이용하여 확립한 clonogenic assay를 이용하여 홍삼 N-fraction의 항암성을 검토한 결과, SW-156 및 WiDr은 N-fraction에 대하여 강한 내성을 보였으며, SNU-5와 Hep G2는 N-fraction에 대하여 내성이 약해져 colony 형성이 N-fraction의 농도에 의존하여 억제되었다(Table 3). 그러나 clonogenic assay에 있어서 일반적으로 항암성물질의 처리시 colony 형성율이 대조구와 비교하여 30% 이하일 때 *in vivo*에서의 항암성이 발현될 확율이 높게 나타나는 것으로 보고되고 있다.<sup>22)</sup>

N-fraction 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 위암세포주인 SNU-5에서 특이적으로 30% 미만의 colony 형성을 나타내고 있어 N-fraction은 위암세포에만 특이성을 가지고 *in vivo*에서도 항암활성을 발현할 확율이 높을

것으로 추론된다.

N-fraction에는 당과 단백질이 함유되어 있었기 때문에(data not shown) 어느 성분이 어떻게 암세포의 성장을 억제시키고 있는지 현재로서는 알 수 없고, 또한 N-fraction은 상술한 바와 같이 당과 단백질의 혼합물이므로 항암활성이 나타나는 농도(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상)가 높은 것으로 나타났다. 이것을 보다 정제하면 낮은 농도에서 항암활성이 나타날 것으로 예측된다. 앞으로 암세포의 성장, 분화 및 증식에 관련하는 protein kinase C<sup>23)</sup>의 활성 등 분자 level에서의 연구와 순수하게 분리, 정제한 성분에 대한 암세포의 감수성 또는 내성을 검토할 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 요약

홍삼으로부터 추출한 소수성단백질 분획의 항암활성을 clonogenic assay방법으로 측정하기 위하여, 암세포주인 SW-156(신장암 세포주), SNU-5(위암 세포주), WiDr(결장암 세포주) 및 Hep G2(간암 세포주) 등을 사용하여 clonogenic assay의 모델을 확립하였다. 모델화한 clonogenic assay법으로 홍삼 소수성단백질 분획의 항암효과를 검토한 결과 위암 세포주인 SNU-5에서만 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 홍삼 소수성단백질 분획을 투여한 경우 항암활성이 나타났으며 다른 3 가지 암세포주에서는 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도까지 항암활성을 나타내지 않았다. 이것은 홍삼 소수성단백질 분획이 위암세포주인 SNU-5에만 특이적으로 작용하여 항위암 활성을 나타내고 있음을 의미한다.

## 인용 문헌

1. Hwang, W. I. and Cha, S. : *Fed. Proc.*, **34**, 3806

- (1975).
2. 이성동, 오구다 히로미찌 : 고려인삼학회지 **14**, 67 (1990).
  3. Lee, S. D., Kameda, K., Takaku, T., Sekiya, K., Horose, K., Ohtani, K., Tanaka, O. and Okuda, H. : *WAKAN YAKU*, **6**, 141 (1989).
  4. Park, H. J., No, Y. H., Rhee, M. J., Park, K. M. and Park, K. H. : *Korean Biochem. J.*, **27**, 280 (1994).
  5. Park, H. J., Park, K. M., Rhee, M. H. and Park, K. H. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **17**, 135 (1993).
  6. Hamburger, A. W. and Salmon, S. E. : *Science* **197**, 461 (1977).
  7. Courtenay, V. D., Selby, P. J., Smith, I. E., Mills, J. and Peckham, M. J. : *Br. J. Cancer* **38**, 77 (1978).
  8. Tanigawa, N., Kern, D. H., Hikasa, Y. and Morton, D. L. : *Cancer Res.*, **42**, 2159 (1982).
  9. Shoemaker, R. H., Wolpert-DeFilippes, M. K., Kern, D. H., Lieber, M. M., Makuch, R. W., Melnick, N. R., Tiller, W. T., Salmon, S. E., Simon, R. M., Venditti, J. M. and Von Hoff, D. D. : *Cancer Res.*, **45**, 2145 (1985).
  10. Ali-Osman, F. and Beltz, P. A. : *Cancer Res.*, **48**, 715 (1988).
  11. Weisenthal, L. M., Marsden, J. A., Dill, P. L. and Macaluso, C. K. : *Cancer Res.*, **43**, 749 (1983).
  12. Twentyman, P. R., Walls, G. A. and Wright, K. A. : *Br. J. Cancer*, **50**, 625 (1984).
  13. Von Hoff, D. D., Forseth, B. and Warfel, L. E. : *Cancer Res.*, **45**, 4032 (1985).
  14. Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R. : *Cancer Res.*, **48**, 4827 (1988).
  15. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. : *Cancer Res.*, **48**, 589 (1988).
  16. Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks, A. and Boyd, M. R. : *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 113 (1990).
  17. Alberts, D. S., Salmon, S. E., George Chen, H. S., Surwit, E. A., Soehnlen, B., Young, L. and Moon, T. E. : *The Lancet*, **16**, 340 (1980).
  18. Bertelsen, C. A., Sondak, V. K., Mann, B. D., Korn, E. L. and Kern, D. H. : *Cancer* **53**, 1240 (1984).
  19. Friedman, H. S., Schold, S. C. Jr., Muhlbauer, L. H., Bjornsson, T. D. and Bigner, D. D. : *Cancer Res.*, **44**, 5145 (1984).
  20. Von Hoff, D. D., Cowan, J., Harris, G. and Reisdorf, G. : *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **6**, 265 (1981).
  21. Robert, H., Macy, M., McClintock, P., Chen, T. R. and Reid, Y. : *American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*, 6th edition, American Type Culture Collection (USA), p. 117, 179 (1988).
  22. Venditti, J. M. : *Cancer Treat. Rep.*, **67**, 767 (1983).
  23. Miyamoto, E. and Nishizuka, Y. : *Protein, Nucleic acid and Enzyme*, Gong-Rib Press(Japan), p. 1818 (1986).