

Clonogenic assay을 이용한 홍삼추출물의 인체종양세포에 대한 증식억제효과

김창한 · 이경호 · 변은경

건국대학교 동물자원연구센터
(1998년 5월 20일 접수)

Growth Inhibition of Red Ginseng Extracts Against Human Tumor Cell Line by Clonogenic Assay

Chang-Han Kim, Kyung-Ho Lee and Eun-Kyung Byun

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University, Seoul 143-701, Korea
(Received May 20, 1998)

Abstract : We established the model of clonogenic assay with human tumor cell line such as Calu-3 (lung carcinoma), HEC-1B (endometrial adenocarcinoma), HEP-2 (larynx carcinoma), Hs-578T (breast carcinoma), K-562 (chronic myelogenous leukemia), SF-188 (brain carcinoma), SNU-1 (stomach carcinoma) and WiDr (colon carcinoma). We investigated growth inhibition of solvent (EtOH, MeOH) and water (100°C, 121°C) extracts from Korean red ginseng by clonogenic assay. The results of clonogenic assay showed that EtOH extract had growth inhibition against Calu-3, SF-188 and SNU-1, MeOH extract had growth inhibition against Calu-3, Hs-578T, K-562, and WiDr, but water extract at 100°C and water extract at 121°C had not growth inhibition against used cell lines.

Key words : Korean red ginseng, human tumor cell line, clonogenic assay.

서 론

홍삼의 약리효능에는 순환기계, 면역조절, 중추신경계, 항산화작용 및 음경발기부전개선작용 등 많은 약리효과를 가지고 있다.^{1,2)} 이러한 다양한 약리작용으로 인하여 홍삼을 이용한 많은 연구가 현재도 진행되고 있으며, 그 중 항종양활성에 관한 연구도 있다. 지금까지 보고된 항종양활성을 나타내는 인삼성분으로는 panaxydol, ginsenoside Rb₂, Rg₂, Rh₁, Rh₂, 홍삼다당체, 홍삼소수성단백질 및 지질성분 등이 있다.³⁻¹¹⁾ 그러나 이와 같은 인삼성분에 대한 항종양활성은 종양세포의 종류나 인삼추출물의 종류에 따라 달라지는 것으로 알려져 있고, 항암기전 연구에 대해서도 확실하게 알려져 있지 않은 실정이므로, 여러종류의 종양세포에 대한 인삼추출물 및 성분의 검색과 아울러

작용기전에 대한 연구가 있어야 한다고 본다.

따라서 본 연구에서는 지금까지는 검토된 적이 없는 인체의 부위별 종양세포주 Calu-3(lung carcinoma), HEC-1B(endometrial adenocarcinoma), HEP-2(larynx carcinoma), Hs-578T(breast carcinoma), SF-188(brain carcinoma), K-562(chronic myelogenous leukemia), SNU-1(stomach carcinoma), WiDr(colon carcinoma)에 대하여, 임상효과 예측물이 좋은 clonogenic assay^{12,13)}을 이용하여 홍삼추출물의 종양세포 증식억제효과를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 홍삼시료의 조제

홍삼분말은 인삼연초연구원으로부터 공급받았으며

종양세포의 증식억제효과 측정을 위한 시료조제는 유기용매를 이용한 추출법과 물을 이용한 추출법을 사용하였다. 즉 유기용매추출법으로는 홍삼분말 20 g에 EtOH과 MeOH을 각각 60 ml씩 가하여 실온에서 2시간 교반한 후 여과하여 여과액을 홍삼 EtOH 추출물과 홍삼 MeOH 추출물로 하였다. 열수추출법의 경우는 홍삼분말 20 g에 물을 60 ml씩 하여 100°C에서 5 시간, 121°C에서 2 시간 추출한 시료를 각각 홍삼 100°C 추출물과 홍삼 121°C 추출물로 하여 종양세포 증식억제효과 측정 시료로 사용하였다.

2. 인체종양세포주

본 실험에서 사용한 인체종양세포주는 Calu-3 (lung carcinoma), HEC-1B(endometrial adenocarcinoma), HEp-2(larynx carcinoma), Hs-578T(breast carcinoma), K-562(chronic myelogenous leukemia), SF-188(brain carcinoma), SNU-1(stomach carcinoma), WiDr(colon carcinoma) 등이며, 종양세포주는 액체질소통에 보존하면서 사용하였다.

3. 인체종양세포주의 배양

HEp-2, SF-188와 HEC-1B는 MEM(minimum essential medium, Gibco, USA)에 FBS(fetal bovine serum, Gibco, USA)를 10%, sodium pyruvate를 1% 되게 첨가한 배지, SNU-1와 K-562는 RPMI 1640(Gibco, USA)에 FBS를 10% 되게 첨가한 배지, Calu-3는 MEM에 FBS를 10%, glutamin을 1%, sodium pyruvate 1%, MEM vitamine를 1%, 그리고 penicillin/streptomycin(10,000 units/ml)을 1% 되게 첨가한 배지, Hs-578T는 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium, Gibco, USA)에 FBS를 10%, insulin을 10 µg/ml이 되도록 첨가한 배지, WiDr은 DMEM에 FBS를 10%되게 첨가한 배지들을 각각 사용하였다.

모든 세포는 25 cm² 조직배양용 flask에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포수집은 0.25% trypsin/1mM EDTA 용액을 이용하여 단세포로 만들었고, 세포수는 0.4% trypan blue 용액으로 염색한 후 Neubauer type hemocytometer(Superior, USA)를 사용하여 계수하였다.

4. Clonogenic assay

Clonogenic assays는 정상세포와 종양세포의 특성 차이점을 이용한 것으로, 정상세포와는 달리 종양세포의 무절제한 분열증식 특성으로 인하여 일정농도

의 soft agar내에서 colony을 형성하는 점을 이용한 방법이다.^{12,13)} 직경 35 mm 조직배양용 petri-dish에 0.5% agar를 함유하는 하층배지(Enriched McCoy's 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 하층평판을 조제한 다음 CO₂ incubator에 보존하면서 사용하였다. 하층 위에 0.3% agar를 함유하는 일정농도의 종양세포와 시료현탁액(Double-enriched CMRL 1066 2.0 ml, 약제(혹은 멸균수) 0.3 ml, 세포현탁액 0.5 ml)을 1 ml씩 주입시켜 중층평판을 만든 후 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 10에서 14일째의 평판에서 50 µm이상의 크기를 나타내는 colony를 현미경으로 계수하였다. 시료의 처리는 세포현탁액에 시료를 각 농도별로 첨가하는 연속노출법을 이용하였으며, 시료의 감수성 판정은 미국의 National Cancer Institute에서 항암제의 항암활성 검색을 위하여 실시하는 *in vitro* 검색법의 평가기준으로, 시료처리 평판과 비처리평판에 나타난 colony의 수를 비교하여 생존률을 %로 나타내었으며, 생존률이 30% 이하일 때를 종양세포에 대한 증식억제효과가 있는 것으로 판정하였다.^{14,16)}

결과 및 고찰

1. Clonogenic assay를 위한 최적 접종 세포수 결정

Clonogenic system에서 접종 세포수 당 colony 형성률은 대체적으로 접종 세포수에 비례하여 colony가 형성되지만 어느 단계에서는 접종 세포수에 반비례하여 colony수가 감소하게 된다. 이것은 clonogenic system의 colony 성장을 위한 영양원이 외부로부터 다시 주어지지 않는 폐쇄된 체계이기 때문이다. 따라서 접종 세포수에 비례하여 colony가 형성되는 구간 안에서 접종 세포수를 결정하여야 한다. 그 이유는 항암성 시료의 농도에 따른 효과를 나타내는 데에 영향을 미치기 때문이다. 즉, 접종 세포수에 반비례하여 colony수가 감소되는 구간에서의 접종 세포수로 clonogenic assay를 실시할 경우는 낮은 농도의 약제처리시 오히려 대조구보다도 생존률이 높게 나타나, 유효한 약제에 대한 잘못된 결과를 가져와 종양세포 증식억제성 물질의 검색에 커다란 오류를 범할 수 있다.¹⁷⁾ 따라서 clonogenic system에서 접종 세

Table 1. Clonogenicity of various human tumor cell lines

Cell lines	No. of cell/ml	No. of colonies/plate	CFE**
Calu-3	5,000	138±16*	2.8±0.4
HEC-1B	1,000	244±11	24.0±1.1
HEp-2	3,000	300±2	10.0±0.1
Hs-578T	5,000	186±7	3.7±0.2
K-562	3,000	110±11	3.6±0.3
SF-188	3,000	265±21	8.8±0.7
SNU-1	3,000	312±9	10.4±0.3
WiDr	3,000	368±11	12.2±0.4

* Mean of S.D. triplicate plates

** CFE : Colony forming efficiency=(number of formed colonies/number of seeded cells)×100

포수에 따른 colony 수와 크기가 중요하다고 할 수 있다.

홍삼추출물에 대한 종양세포 증식억제효과 판정에서의 잘못된 결과를 줄이기 위하여 본 실험에서 사용한 8가지의 종양세포주의 soft-agar 평판에서 최적 colony형성능을 조사한 결과, 각종 종양세포주의 최적 접종세포수는 HEC-1B는 1,000 cells/ml, WiDr, HEp-2, K-562, SNU-1 그리고 SF-188은 각각 3,000 cells/ml, Calu-3과 Hs-578T는 5,000 cells/ml로 하는 것이 가장 적절하였으며, 이때의 colony 수와 colony 형성률은 HEC-1B는 244(24.0%), WiDr는 368 (12.2%), HEp-2는 300(10.0%), K-562는 110(3.6 %), SNU-1은 312(10.4%), SF-188은 265(8.8%), Calu-3는 138(2.8%) 그리고 Hs-578T는 186(3.7%)로 나타났다(Table 1).

2. 각종 홍삼추출물의 인체 종양세포에 대한 종양 세포 증식억제효과

홍삼 EtOH 추출물, 홍삼 MeOH 추출물, 홍삼 100°C 열수추출물과 홍삼 121°C 열수추출물 각 시료들에 대한 종양세포 증식억제효과를 검색하기 전에 각 시료에 대한 세포독성을 측정하였다. 정상세포주인 MDBK(kidney, bovine), 3T3(fibroblast, mouse)을 대상으로 MTT assay를 이용하여 측정한 결과 1,000 µg/ml에서 세포 증식억제를 15%로 세포독성이 인정되지 않았다(결과 제시하지 않음).

홍삼 EtOH 추출물, 홍삼 MeOH 추출물, 홍삼 100°C 열수추출물과 홍삼 121°C 열수추출물을 시료로하여 Calu-3, HEC-1B, HEp-2, Hs-578T, K-562, SF-188, SNU-1 및 WiDr에 대하여 종양세포 증식억

Table 2. Survival rate on various human tumor cell lines of EtOH extract from Korean red ginseng

Cell lines	% Survival		
	Concentration of EtOH extract (µg/ml)		
	1,000	100	10
Calu-3	2±2.0*	31±4.0	82±5.6
HEC-1B	45±3.5	78±6.9	91±1.7
HEp-2	61±1.0	89±1.7	100±10.0
Hs-578T	53±2.6	100±0.6	100±4.4
K-562	49±10.1	77±2.6	100±7.0
SF-188	29±4.6*	53±3.6	95±5.2
SNU-1	30±3.6*	72±12.1	79±9.1
WiDr	79±2.6	100±9.5	100±10.6

* Sensitive; % survival≤30%, Mean of S.D. triplicate plates.

Table 3. Survival rate on various human tumor cell lines of MeOH extract from Korean red ginseng

Cell lines	% Survival		
	Concentration of MeOH extract (µg/ml)		
	1,000	100	10
Calu-3	25±5.0*	41±8.1	100±4.7
HEC-1B	55±4.0	69±6.1	100±1.5
HEp-2	89±4.0	100±8.0	100±13.2
Hs-578T	13±2.1*	39±12.6	98±3.8
K-562	29±3.2*	43±6.7	100±6.4
SF-188	69±1.2	70±0.0	100±3.2
SNU-1	37±2.6	77±3.8	100±10.8
WiDr	27±3.1*	50±2.5	100±13.1

* Sensitive; % survival≤30%, Mean of S.D. triplicate plates

제효과를 clonogenic assay로 검색한 결과, 홍삼 EtOH 추출물은 1,000 µg/ml에서 Calu-3, SF-188 및 SNU-1에 대하여 각각 2%, 29% 및 30%의 생존률을 나타내었다(Table 2). 홍삼 MeOH 추출물은 1,000 µg/ml에서 Calu-3, Hs-578T, K-562 및 WiDr에 대하여 각각 25%, 13%, 29% 및 27%의 생존률을 나타내었다(Table 3). 홍삼 100°C 열수추출물과 홍삼 121°C 열수추출물은 두 시료 모두에서 8 가지의 종양 세포주 전체에 대하여 종양세포 증식억제효과가 없었다(Table 4, 5).

따라서 홍삼의 종양세포 증식억제효과를 갖는 분획은 물에 의한 추출보다는 EtOH과 MeOH에 의한 추출이 우수한 효과를 나타내었고, EtOH이 MeOH보다 종양세포 증식억제물질추출에 적합한 것으로 나타났

Table 4. Survival rate on various human tumor cell lines of water extract (100°C) from Korean red ginseng

Cell lines	% Survival		
	Concentration of water extract (100°C)($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	1,000	100	10
Calu-3	54 \pm 7.0*	100 \pm 7.5	100 \pm 10.0
HEC-1B	52 \pm 5.0	82 \pm 10.2	100 \pm 10.4
HEp-2	97 \pm 6.7	100 \pm 10.0	100 \pm 8.1
Hs-578	57 \pm 2.9	91 \pm 11.1	100 \pm 9.3
K-562	57 \pm 4.5	62 \pm 4.6	100 \pm 4.7
SF-188	60 \pm 3.1	73 \pm 3.2	100 \pm 3.5
SNU-1	42 \pm 7.2	59 \pm 1.5	100 \pm 1.5
WiDr	100 \pm 6.7	100 \pm 11.0	100 \pm 19.5

* Mean of S.D. triplicate plates

Table 5. Survival rate on various human tumor cell lines of water extract (121°C) from Korean red ginseng

Cell lines	% Survival		
	Concentration of water extract (121°C)($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	1,000	100	10
Calu-3	45 \pm 4.4*	92 \pm 2.1	100 \pm 7.6
HEC-1B	68 \pm 4.6	93 \pm 2.9	100 \pm 18.6
HEp-2	93 \pm 6.4	100 \pm 1.5	100 \pm 12.1
Hs-578T	65 \pm 4.9	100 \pm 9.5	100 \pm 7.4
K-562	70 \pm 4.2	72 \pm 8.0	100 \pm 3.1
SF-188	53 \pm 4.5	69 \pm 9.3	100 \pm 2.1
SNU-1	47 \pm 6.0	52 \pm 6.4	100 \pm 7.5
WiDr	68 \pm 4.2	100 \pm 6.9	100 \pm 4.5

* Mean of S.D. triplicate plates

다. 인삼의 물추출물의 경우는 온도에 관계없이 종양세포 증식억제효과를 나타내지 않았다. 물추출물의 경우는 본 연구에서는 보고하지 않았지만 상온부터 실시하여 단계적으로 온도를 높여 추출한 결과 온도가 높을수록 추출성분의 양은 증가하지만 종양세포 증식억제효과는 증가하지는 않았다. 인삼의 물추출물에 대한 종양세포 증식억제효과가 보고된 것은 있으나¹⁸⁻²⁰⁾ 저해성분의 구체적인 규명이 불충분하였고 종양세포 증식억제효과도 불투명한 것으로 나타났으며, 본 연구에서도 검색한 종양세포주 전체에 대하여 종양세포 증식억제효과를 나타내지 못한 것으로 보아 인삼의 물추출물의 종양세포 증식억제효과는 면역증강작용이나 기타 다른 측면으로 접근을 해야 할 것으로 사료된다. 왜냐하면 현재의 세포독성 검색법은 직접적인 세포증식억제효과를 측정하기 위한 것으로 면

역조절제 등과 같은 물질의 경우는 초기 검색부터 동물실험을 통한 검증이 있어야 할 것으로 보며, 본 연구에서도 홍삼 물추출물이 종양세포 증식억제효과를 나타내지 못한 것도 본 연구에서의 검색법으로는 종양세포 증식억제효과의 확인이 불분명한 것으로 사료된다. 그러나 유기용매추출물의 경우는 직접적인 종양세포 증식억제를 보이는 성분이 있었고,^{21,22)} 본 연구에서도 EtOH과 MeOH 추출물에서 Calu-3에 대한 종양세포 증식억제효과를 나타내어 alcohol에 의해 특이적인 폐암세포 증식억제 작용물질이 추출되는 것으로 사료된다. 또한 본 연구실에서는 홍삼 소수성단백질 성분이 특이적으로 위암세포(SNU-5)에 대해 증식억제를 나타낸 결과를 보고한 바 있다.²³⁾ 이와 같이 추출물의 종류에 따라 종양세포들에 대해 각기 다른 영향을 미치는 것으로 사료된다.

요 약

Clonogenic assay을 이용하여 인체 부위별 종양세포주 Calu-3(lung carcinoma), HEC-1B(endometrial adenocarcinoma), HEp-2(larynx carcinoma), Hs-578T (breast carcinoma), K-562(chronic myelogenous leukemia), SF-188(brain carcinoma), SNU-1 (stomach carcinoma), WiDr(colon carcinoma)에 대한 홍삼추출물의 광범위한 종양세포 증식억제효과 검색을 위하여, 각 종양세포주에 대한 clonogenic assay의 모델을 확립하기 위하여 각 종양세포주의 적정 접종세포수를 검토한 결과, HEC-1B는 1,000 cells/ml, WiDr, HEp-2, K-562, SNU-1 그리고 SF-188은 각각 3,000 cells/ml, Calu-3와 Hs-578T는 5,000 cells/ml이었다. 모델화한 clonogenic assay로 홍삼추출물의 종양세포 증식억제효과를 검색한 결과, 홍삼 EtOH추출물의 경우는 추출물 농도 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 Calu-3, SF-188 및 SNU-1, 홍삼 MeOH추출물의 경우는 Calu-3, Hs-578T, K-562 및 WiDr에 대해서 종양세포 증식억제효과를 나타내었다. 그러나 열수추출물(100°C 및 121°C)의 경우는 사용한 모든 종양세포주에 대해 종양세포 증식억제효과가 나타나지 않았다.

감사의 말씀

본 연구는 1997년도 건국대학교 학술진흥 연구비

지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Chen X., C. N. Gillis and R. Moalli : *J. Pharmacol.*, **82**, 485 (1984).
2. Lee Y. G., H. O. Sohn, H. B. Lim and D. W. Lee : *Kor. J. Ginseng Sci.*, **19**, 225 (1995).
3. Jiang Y. G. Zhong, C. Shao and G. Yue : *Chung Kuo Chung Yao Chih (China)*, **17**, 172 (1992a).
4. Matsuda H. and M. Kubo : *Yakugaku Zasshi*, **103**, 1269 (1983).
5. Choi J. H. and S. K. Oh : *Kor. Biochem. J.*, **17**, 45 (1984).
6. Jie Y. H., S. Cammisuli and N. Baggolini : *Agents Actions*, **15**, 386 (1984).
8. Odashima S., T. Ohta, H. Kohn, T. Matsuda, I. Kitagawa, H. Abe and S. Arichi : *Cancer Res.*, **45**, 2781 (1985).
9. 이성동, 오후다 히로미찌 : *고려인삼학회지* **14**, 67 (1990).
10. Dee S. D., Kameda K., Takaku T., Sekiya K., Horose K., Ohtani K., Tanaka O. and Okuda H. : *WAKAN YAKU*, **6**, 141 (1989).
11. Hwang W. I. and Cha S. : *Fed. Proc.*, **34**, 3806 (1975).
12. Von Hoff D. D., Clark G. M., Stogdill B. J., Sarosdy M. F., O'Brien M. T., Casper J. T., Mattox D. E., Page C. P., Cruz A. B., Sandbach J. F. : *Cancer Res.*, **43**, 1926 (1983).
13. Salmon S. E., Hamburger A. W., Soehlen B., Durie B. G. M., Alberts D. S., Moon T. E. : *N. Engl. J. Med.*, **298**, 1321 (1978).
14. Salmon S. E., Liu R. M. and Casazzu A. M. : *Cancer Chemother Pharmacol* **6**, 103 (1981).
15. Clark G. M. and Von Hoff D. D. : *Quality control of a multicenter human tumor cloning system : The southwest oncology group experience*. In : Salmon S. E., Trent J. M., *Human Tumor Cloning*, Grune & Stratton, Inc., New York, p. 255 (1984)
16. Shoemaker R. H., Wolpert-Defilippes M. K., Melnick N. R., Venditti J. M., Simon R. M., Kern D. H., Lieber M. M., Miller W. T., Salmon R. M. and Von Hoff D. D. : *Recent result of new drug screening trials with a human tumor colony forming assay*. In : Salmon S. E., Trent J. M., *Human Tumor Cloning*, Grune & Stratton, Inc., New York, p. 345 (1984).
17. Thomson S. P., Buckmeier J. A., Sipes N. J. and Meyskens F. L. : *Colony size, linearity of formation and drug survival curves can depend on the number of cells plated in the clonogenic assay*. In : Salmon S.E. and Trent J.M. : *Human Tumor Cloning*, Grune & Stratton, Inc., Orlando, Florida, p. 37 (1984).
18. Mironova A. I. : *Vopr. Onkol.* **9**, 42 (1963).
19. Lee K. D. and Huemer R. P. : *Jpn. J. Pharmacol.*, **21**, 299 (1971).
20. Yun T. K., Yun Y. S. and Han I. W. : *Cancer Detct. Prev.* **6**, 55 (1983).
21. 최성규, 김천호, 허문영 : *약학회지* **35**, 466 (1991).
22. 최성규, 허문영 : *약학회지* **36**, 34 (1991).
23. 김창환, 이명섭, 이경호 : *고려인삼학회지* **27**, 27 (1995).