

인삼과 계피 혼합물에 의한 *in vitro*에서 암세포 증식억제의 상승 효과

정화령* · 이지영** · 김동철** · 황우익* · ** · #

*고려대학교 의과대학 생화학교실, **고려대학교 부설 한국영양문제연구소
(1999년 3월 17일 접수)

Synergistic Effect of *Panax ginseng* and *Cinnamoum Blume* Mixture on the Inhibition of Cancer Cell Growth *in vitro*

Hwa Ryung Chung*, Ji Young Lee**, Dong Chung Kim** and Woo Ik Hwang*,**, #

*Department of Biochemistry, College of Medicine, Korea University, Seoul 136-701, Korea

**Korea Nutrition Research Institute, Korea University, Seoul 136-701, Korea

(Received March 17, 1999)

Abstract : The effects of ginseng and cinnamon extract alone or mixture on the various cancer cell lines *in vitro* have been examined. Human colon cancer cell line (HT-29), human rectal cancer cell line (HRT-18) and human hepatoma cell line (HepG2) were used for the experiment. When given separately, the proliferation of all cancer cell lines was inhibited in proportion to the concentration of ginseng or cinnamon extract, respectively. Based on the cytotoxic activity, mixture of ginseng and cinnamon extract demonstrated a synergistic inhibition of cancer cell growth. The progression of cell cycle from G1 to S phase was significantly inhibited by ginseng and cinnamon mixture in the HT-29 and HRT-18 cell lines.

Key words : ginseng extract, cinnamon extract, HT-29, HRT-18, HepG2, synergistic inhibition.

서 론

인삼은 동양에서 예로부터 신비의 영약으로 알려져 왔는데,¹⁾ 그 약리작용은 주로 인삼 중의 사포닌계 성분
에 의한 것으로 보고되고 있다²⁻⁵⁾ 또한, 인삼의 지용성
성분이 *in vitro*와 *in vivo*에서 모두 암세포 증식을 현
저히 억제하거나 사멸시키는 작용이 있다고 보고된 바
있으며,⁶⁻¹¹⁾ 정상세포인 Vero 76 세포에 미치는 영향은
미약한 것으로 보고되었다.¹²⁾ 한편, 계피는 한방에서 건
위, 온비위, 통혈맥, 두통, 감기 등에 사용되어져 왔고,¹³⁾
그밖에도 향신료와 방향제로서 우리 식생활에 흔히 이
용되고 있으며 계피의 정유성분으로 cinnamic aldehyde

가 80%를 차지하는 것으로 알려져 있다. 고와 황¹⁴⁾은
식이성 기름성분의 항암성 연구에서 계피의 지용성 성분
인 cinnamon oil을 대상으로 항암성을 screen하여 일반
생약제보다 강한 항암 활성이 있음을 보고한 바 있다.

이와 같은 여러 보고들을 참고로 하여, 암세포의 *in vitro*
배양에서 항암 효과를 나타내는 인삼의 지용성 성
분에 계피유를 첨가함으로써 상호 보강에 의해 암세포
증식억제에 현저한 상승 효과를 확인하고, 동시에 항암
제로서 이용 가능성 여부에 대한 과학적 기초자료를 얻
고자 본 실험을 시도하였다.

실험방법

1. 재료 및 시약

인삼은 백삼 6 년근 건삼 일등급을, 계피는 국내산을

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-920-6184; (팩스) 02-923-0480
(E-mail) biochem@kucncx.korea.ac.kr

경동시장에서 구입하였다. DMEM(Dulbecco's modified eagle medium), fetal bovine serum 및 trypsin-EDTA는 모두 GIBCO(Grand Island Biological Co.) 제품을 사용하였다. RNase, propidium iodide, penicillin 및 streptomycin은 모두 Sigma(Sigma Chemical Co.) 제품을 사용하였다.

2. 인삼과 계피의 유효성분 추출

유효 성분 추출을 위해 계피와 인삼을 분말화한 뒤 각각 삼각 플라스크에 일정량을 넣고 petroleum ether를 용매로 실온에서 3일간 추출하여 상층액만 취하였다. 그리고 0.22 µm membrane filter로 여과한 후 회전진공농축기로 농축시키고 질소 가스로 용매를 완전히 날린 뒤 건조 중량을 측정하고 실험시에는 소량의 무수 에탄올에 녹여 필요한 농도로 배지에 희석하여 사용하였다.

3. 암세포의 선정 및 배양

본 실험에 사용한 암세포는 인체 결장암세포인 HT-29, 직장암세포인 HRT-18 및 간암세포인 HepG2로 고려대학교 의과대학 생화학교실에서 *in vitro*로 배양해 오던 것을 사용하였다. HT-29, HRT-18 및 HepG2는 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin이 함유된 DMEM 배지가 들어있는 T-75 플라스크에 이식한 후 5% CO₂가 유지되는 37 °C 항온기에서 monolayer로 배양하면서 플라스크에 암세포가 5×10⁴ cells/ml 정도로 증식되면 phosphate-buffered saline(PBS)로 세척하고 0.05% trypsin-EDTA로 분리시켜 계대 배양하였다.

4. 암세포증식에 미치는 인삼, 계피 및 인삼과 계피혼합성분의 효과 측정

암세포의 doubling time 측정은 황과 오⁷⁾의 방법에 따랐다. 위 항의 암세포 배양방법에 따라 각 암세포를 배양하면서 일정 시간별로 각 세포수를 coulter counter로 세어 증가되는 세포수를 semilogarithmic paper에 도시하고, 암세포의 증식 곡선으로부터 세포수가 2 배로 소요되는 시간, 즉 doubling time을 산출하였다. 인삼, 계피 및 인삼과 계피혼합성분의 암세포 증식억제 측정은 황 등¹⁵⁾의 방법에 따라 시행하였다. 암세포를 24시간 배양한 후, 배지를 시료가 농도별로 함유된 배지와 함유되지 않은 대조군으로 교체하였다. 그리고 24시간마다 증식된 세포 수를 coulter counter에서 측정하였다. 그리고 인삼, 계피 및 인삼과 계피혼합성분의 효과는 대조군의 세포 수를 기준으로 다음 식에 의하여 세포증

식억제 또는 사멸율을 계산하여 측정하였다.

증식율(%) =

$$\frac{\text{실험군의 배양시간별 증식세포 수} - \text{출발시 세포 수}}{\text{대조군의 배양시간별 증식세포 수} - \text{출발시 세포 수}} \times 100$$

사멸율(%) =

$$\frac{\text{실험군의 배양시간별 증식세포 수} - \text{출발시 세포 수}}{\text{출발시 세포 수}} \times 100$$

5. 인삼과 계피혼합성분이 세포주기에 미치는 영향

인삼과 계피혼합성분이 30 내지 50 µg/ml 첨가된 배양액에서 72시간 배양한 각 암세포를 trypsin 처리하여 수집한 후 세포주기를 분석하였다. 세포 현탁액 200 µl(2.5×10⁶ cells/ml)에 1.8 ml trypsin 용액을 넣고 실온에서 10분간 방치한 후 RNase와 trypsin inhibitor가 포함된 용액을 0.1 mg/ml로 첨가하여 다시 10분간 상온에서 반응시켰다. 그리고 propidium iodide 염색용액을 50 µg/ml로 처리하여 암실에서 10분간 반응시키고 cell cycle analyzer(미국 Becton Dickison사 제품)로 세포당 DNA 함량을 585 nm에서 형광을 측정하여 세포주기 각 단계의 분포를 분석하였다.

6. 인삼추출물, 계피추출물 및 혼합성분의 독성실험

실험동물은 체중 25 g 내외의 mouse 28 마리를 대상으로 인삼추출물 투여군(9 마리), 계피추출물 투여군(9 마리) 및 혼합성분(1:1) 투여군(10 마리)으로 나누고 각 시료를 각각 동물 마리당 125.0 mg, 62.5 mg 및 125.0 mg을 1 회 경구투여하여 15일간 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 암세포증식에 미치는 영향

HT-29, HRT-18 및 HepG2의 doubling time은 각각 22, 22 및 40 시간이었다. 각 doubling time이 Morita 등¹⁶⁾의 보고와 일치하여 정상적으로 증식되고 있음을 알 수 있었다.

HT-29 세포증식에 미치는 영향은 Fig. 1에 나타내었다. 대조군은 출발시 세포수 1.3×10⁵ cells/dish에서 24, 48 및 72시간 배양 후에 각각 2.2×10⁵, 4.3×10⁵ 및 8.2×10⁵ cells/dish로 배양시간 경과에 따라 비

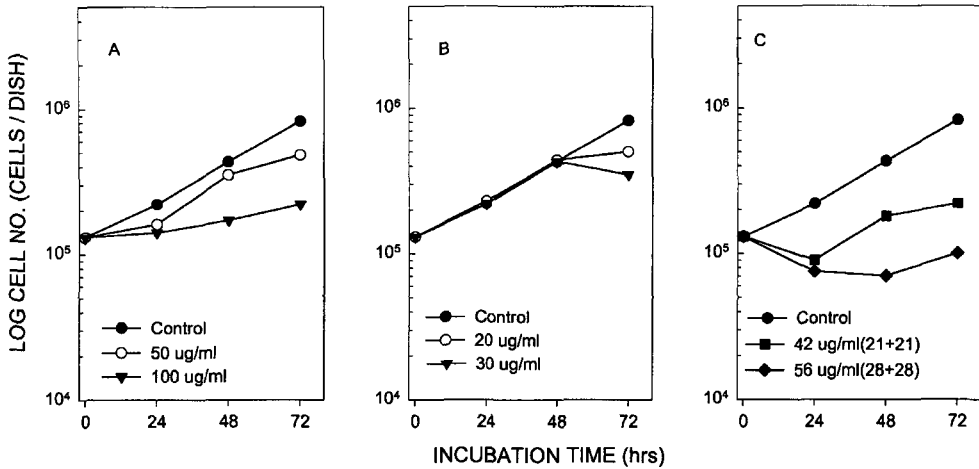


Fig. 1. Growth curves of HT-29 cells in the culture medium containing the ginseng extract (A), cinnamon extract (B), and mixture (1:1) of ginseng and cinnamon extract (C), respectively. Data are presented as means (n=3).

례적으로 첨가 증식되었다. 인삼성분을 50 µg/ml 첨가한 배양군은 72 시간의 증식율이 대조군에 비해 49% 감소되었고 100 µg/ml 첨가 배양군은 세포증식이 89% 억제되었다(Fig. 1A). 계피성분을 20 µg/ml 첨가한 배양군은 72 시간에 대조군에 비해 47% 증식이 억제되었고 30 µg/ml 첨가 배양군은 증식이 69% 억제되었다(Fig. 1B). Fig. 1의 성장곡선으로부터 인삼성분 20 µg/ml는 HT-29의 세포증식에 미치는 영향이 매우 미미한 농도로 볼 수 있고, 20 µg/ml의 농도로 계피성분의 단독 첨가는 HT-29의 세포증식을 다소 억제시키나 크게 효과적이지 못하였다. 이와 유사한 농도로 인삼과

계피성분을 혼합하여 HT-29 배양액에 투여시, 혼합성분 42 µg/ml(21 µg+21 µg) 첨가 배양군은 24 시간에 출발시 세포수보다 30% 감소되는 사멸현상을 보였고 48 및 72 시간에는 대조군의 증식율에 비해 각각 83% 및 87%가 억제되었다(Fig. 1C). 한편 혼합성분 56 µg/ml(28 µg+28 µg) 첨가 배양군은 전혀 증식되지 않았고 오히려 24, 48 및 72 시간에 각각 출발시 세포수의 42%, 46% 및 24%가 사멸되었다(Fig. 1C). 72 시간 배양 후의 증식율을 비교하였을 때, 인삼성분을 100 µg/ml의 농도로 단독첨가한 배양군과 혼합성분 42 µg/ml(21 µg+21 µg) 첨가 배양군에서 비슷한 세포증식 억

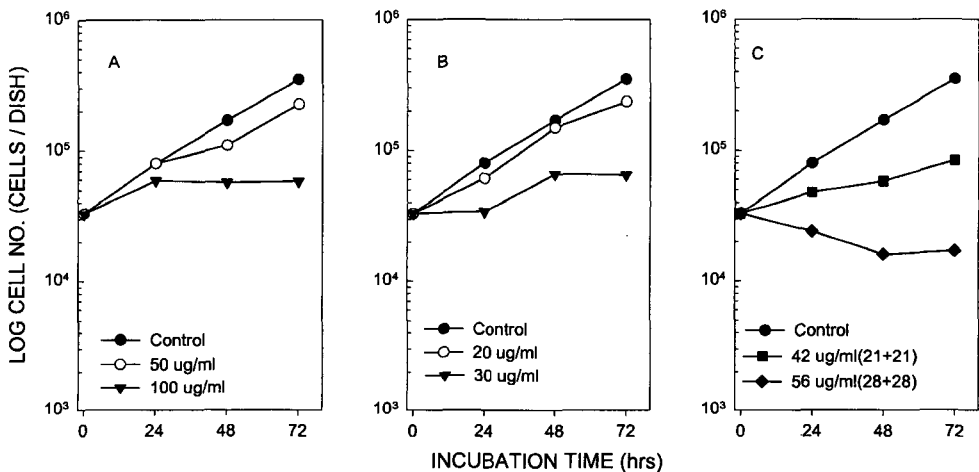


Fig. 2. Growth curves of HepG2 cells in the culture medium containing the ginseng extract (A), cinnamon extract (B), and mixture (1:1) of ginseng and cinnamon extract (C), respectively. Data are presented as means (n=3).

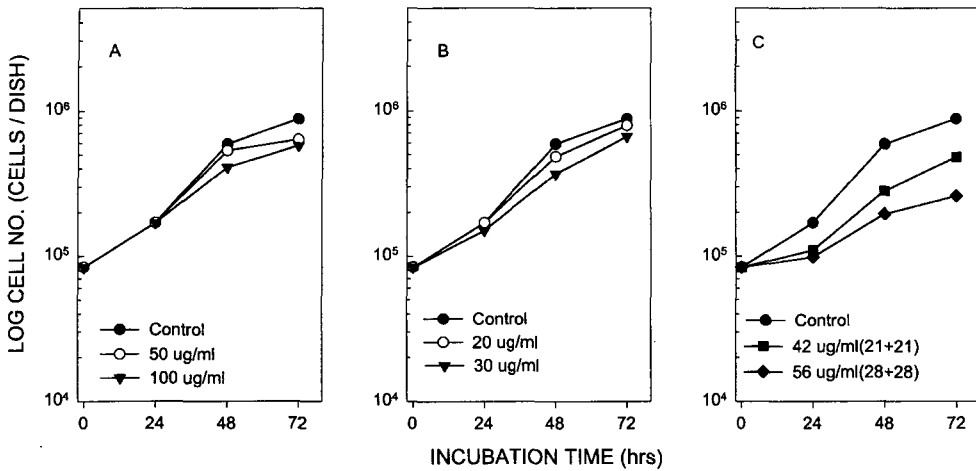


Fig. 3. Growth curves of HRT-18 cells in the culture medium containing the ginseng extract (A), cinnamon extract (B), and mixture (1:1) of ginseng and cinnamon extract (C), respectively. Data are presented as means (n=3).

제율을 보였다. 즉, 인삼성분과 계피성분을 1:1로 첨가 시 소량의 인삼으로 5 배의 암세포 증식억제 효과가 있음을 의미한다. 이와 같은 결과는 인삼 또는 계피 성분을 단독으로 첨가할 때보다 1:1의 혼합물의 투여시 인체 결장암 세포의 증식을 억제시키는 효과가 현저히 상승됨을 보여준 것이라 하겠다.

HepG2의 세포증식에 미치는 영향은 Fig. 2에 나타내었다. 대조군의 세포수는 3.3×10^4 cells/dish에서 24, 48 및 72 시간 배양 후에 각각 8.0×10^4 , 1.7×10^5 및 3.5×10^5 cells/dish로 HT-29와 마찬가지로 배양시간에 따라 비례적으로 증식되었다. 인삼성분을 50 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 배양군은 72 시간의 증식율이 대조군에 비해 39% 감소되었고 100 $\mu\text{g/ml}$ 첨가 배양군은 세포증식이 87% 억제되었다(Fig. 2A). 계피성분을 20 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 배양군은 72 시간에 대조군에 비해 36% 증식이 억제되었고 30 $\mu\text{g/ml}$ 첨가 배양군은 증식이 84% 억제되었다(Fig. 2B). Fig. 2의 성장곡선으로부터 인삼성분 20 $\mu\text{g/ml}$ 는 HepG2의 세포증식에 거의 영향을 미치지 않는 농도이며, 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 계피성분의 단독 첨가는 HepG2의 세포증식을 다소 억제시키지만 효과적이지는 못하였다. 이와 유사한 농도로 인삼과 계피성분을 혼합하여 HepG2 배양액에 투여한 결과, 혼합성분 42 $\mu\text{g/ml}$ (21 $\mu\text{g}+21 \mu\text{g}$) 첨가 배양군은 24, 48 및 72 시간에 증식이 각각 68%, 82% 및 84% 억제되었다(Fig. 2C). 한편, 혼합성분 56 $\mu\text{g/ml}$ (28 $\mu\text{g}+28 \mu\text{g}$) 첨가 배양군은 전혀 증식되지 않았고 오히려 24, 48 및 72 시간에 각각 출발시 세포수의 27%, 52% 및 48%가 사멸되었다

(Fig. 2C). 72 시간 배양 후의 증식율을 비교하였을 때, HT-29의 경우와 마찬가지로 인삼성분을 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 단독첨가한 배양군과 혼합성분 42 $\mu\text{g/ml}$ (21 $\mu\text{g}+21 \mu\text{g}$) 첨가 배양군이 비슷한 세포증식 억제율을 보였다. 역시 HepG2에서도 인체 결장암 세포인 HT-29처럼 인삼성분에 계피성분을 1:1로 첨가시 약 5 배 적은 인삼량으로도 동일한 암세포 증식억제 효과를 얻을 수 있음을 보여주었다.

HRT-18는 HT-29와 HepG2보다 인삼 및 계피 성분에 덜 민감한 것으로 나타났으며, 세포증식에 미치는 영향은 Fig. 3에 나타내었다. 대조군은 배양시간에 따라 비례적으로 증식되었다. 인삼성분을 50 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 배양군은 72 시간의 증식율이 31% 감소되었고 100 $\mu\text{g/ml}$ 첨가군은 세포증식이 38% 억제되었다(Fig. 3A). 계피성분을 20 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 배양군은 72 시간에 대조군에 비해 11% 증식이 억제되었고 30 $\mu\text{g/ml}$ 첨가군은 증식이 27% 억제되었다(Fig. 3B). 단독 사용으로는 암세포의 증식억제 효과가 미미한 농도인 20 $\mu\text{g/ml}$ 수준으로 인삼과 계피 성분을 1:1로 혼합하여 HRT-18 배양액에 투여시, 42 $\mu\text{g/ml}$ (21 $\mu\text{g}+21 \mu\text{g}$) 첨가군은 24, 48 및 72 시간에 증식이 각각 70%, 61% 및 50% 억제되었다(Fig. 3C). 한편, 혼합성분 56 $\mu\text{g/ml}$ (28 $\mu\text{g}+28 \mu\text{g}$) 첨가 배양군은 증식이 83%, 78% 및 78% 억제되었다 (Fig. 3C). 72 시간 배양 후의 증식율을 비교하였을 때, 인삼성분 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리보다 혼합성분 42 $\mu\text{g/ml}$ (21 $\mu\text{g}+21 \mu\text{g}$)의 처리가 HRT-18 세포증식 억제에 더 효과적이었다. 즉, 인삼성분에 계피성분을 1:1

Table 1. Effects of the mixture of ginseng and cinnamon on the cycle distribution of cells in different stages of cycle

Cell line	Mixture* ($\mu\text{g/ml}$)	Cell cycle distribution (%)		G1/S
		G1	S	
HT-29	0	57.5	31.8	1.8
	42	61.3	23.7	2.6
	56	63.7	23.3	2.7
HRT-18	0	62.3	27.0	2.3
	42	67.5	15.0	4.5
	56	74.2	15.8	4.7

* The mixture was composed of ginseng and cinnamon extract at same amount.

로 첨가시에 5 배보다 더 적은 량의 인삼성분으로도 더 높은 증식억제 효과를 나타내었다.

이상의 결과들은 *in vitro*에서 인삼과 계피 혼합물의 병용 첨가가 단독 첨가보다 인체 결장암, 간암 및 직장암 세포증식을 억제시키는 효과가 현저히 상승됨을 보여주었다.

2. 세포주기에 미치는 영향

인체 결장암세포인 HT-29를 인삼과 계피추출물의 1:1 혼합성분을 42 $\mu\text{g/ml}$ (21 μg +21 μg)과 56 $\mu\text{g/ml}$ (28 μg +28 μg)씩 각각 첨가한 배양액에서 72 시간 배양시 세포주기의 변화는 Table 1에 나타내었다. 혼합성분 (1:1)을 56 $\mu\text{g/ml}$ 첨가 배양시 G1 단계 세포는 대조군의 57.5%에서 63.7%로 증가하였고, S 단계 세포는 31.8%에서 23.3%로 현저히 감소하였으며 G1:S 비는 대조군의 1.8에서 2.7로 증가하였다. 인체 직장암세포인 HRT-18에서도 HT-29의 경우와 같은 결과를 얻었다 (Table 1). G1 단계세포는 62.3%에서 혼합성분 56 $\mu\text{g/ml}$ 첨가시 74.2%로 증가하였고, S 단계 세포는 27.0%에서 15.8%로 현저히 감소하였으며, G1:S 비는 약 2 배 증가하였다. 인삼과 계피혼합물은 세포주기 중 G1 단계에서 S 단계로 진행을 지체시킴으로써 HT-29 및 HRT-18 암세포 증식억제 효과를 나타내는 것으로 여겨진다.

3. 인삼추출물, 계피추출물 및 혼합성분의 독성실험

세 실험군을 투여 후 15 일간 관찰한 결과 사망한 mouse는 없었으며, 체중의 변화, 활동성, 기타 겉모양(털) 등에서 변화없이 외견상 모두 건강하여 급성독성이 나타나지않았다. 따라서 인삼과 계피 추출물 및 그 혼합성분이 정상세포에 미치는 독성은 미미할 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아, 인삼과 계피의 지용성 성분의 항암 효과를 확인할 수 있었고, 인삼 또는 계피의 단독 첨가군보다 병용 첨가군에서 현저한 항암 상승효과를 나타내어 낮은 인삼 농도에서도 HT-29, HepG2 및 HRT-18 암세포의 증식이 효과적으로 억제됨을 알 수 있었다. 그 작용기전은 세포주기의 진행중 G1 단계에서 S 단계로의 진행을 지체시킴으로써 세포증식이 억제되는 것으로 여겨진다. 앞으로 세포증식 억제의 작용기전에 대한 생화학적 분자수준의 연구는 더 추구할 과제라 할 것이다.

요 약

인삼과 계피 추출물의 인체 직장암 세포(HT-29), 인체 간암 세포(HepG2) 및 인체 결장암 세포(HRT-18)의 증식에 미치는 영향을 *in vitro*에서 확인하였다. 암세포의 배양액에서 인삼 추출물 또는 계피 추출물의 효과는 농도에 비례하여 암세포의 증식을 억제하였다. 세포증식의 억제 정도는 인삼과 계피 추출물을 단독으로 첨가한 것보다 병용하여 첨가한 경우 현저한 상승 효과를 나타내어, 낮은 인삼 농도에서도 HT-29, HepG2 및 HRT-18 암세포의 증식을 효과적으로 억제하였으며 심지어는 사멸시켰다. 인삼과 계피의 혼합물은 세포주기 중 G1 단계에서 S 단계로의 진행을 지체시킴으로써 암세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다.

인 용 문 헌

1. 홍사악, 임정규, 박찬용, 차인준 : 고려인삼학회지 **3**, 66 (1979).
2. 김학성, 오기완, 박우규, Ho, I. K. : 고려인삼학회지 **16**, 13 (1992).
3. Joo, C. N. : *Korean J. Ginseng Sci.* **14**, 143 (1990).
4. Kasai, R., Besso, H., Tanaka, O., Saruwatari, Y. and Fuwa, T. : *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 2120 (1983).
5. Kikuchi, Y., Sasa, H., Kita, T., Hirata, J. and Tobe, T. : *Anticancer Drugs* **2**, 63 (1991).
6. 황우익, 오수경 : 고려인삼학회지 **8**, 153 (1984).
7. 황우익, 오수경 : 고려인삼학회지 **10**, 1 (1986).
8. Hwang, W. I. : *Korean J. Ginseng Sci.* **17**, 52 (1993).
9. Matsunaga, H., Katano, M., Yamamoto, H., Fujito, H., Mori, M. and Takata, K. : *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 3480 (1990).
10. Matsunaga, H., Katano, M., Saita, M., Yamamoto, H. and

- Mori, M. : *Cancer Chemother. Pharmacol.* **33**, 291 (1994).
11. Shim, S. C., Koh, H. Y. and Han, B. H. : *Bulletin of Korean Chemical Society* **4**, 183 (1983).
 12. 김인환, 황우익 : *고의대논집* 30, 35 (1993).
 13. 육창수 : *한국 약용 식물도감*, 아카데미 서적, 서울, p. 590 (1990).
 14. 고헌섭, 황우익 : *고의대논집* 34, 1 (1997).
 15. 황윤경, 김동청, 황우익, 한용봉 : *한국영양학회지* 31, 799 (1998).
 16. Morita, A., Tsao, D. and Kim, Y. S. : *Cancer Res.* **42**, 4540 (1982).