

마우스 종양세포의 세포독성에 미치는 인삼 추출액과 방사선조사의 병용 효과

전북대학교 의과대학 치료방사선과학교실 및 의과학연구소*, 우석대학교 생명공학부†

권형철* · 김진기* · 김정수* · 최동성†

목적 : 수용성 인삼 추출물의 현저한 세포독성에 관한 저자의 이전 실험결과를 토대로 하여 본 연구에서는 인삼과 방사선의 병용처리가 종양세포의 세포독성에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

대상 및 방법 : 고려인삼 50 g과 증류수 1 L를 혼합하여 100°C에서 5시간 동안 열탕 환류추출한 다음 여과하였다. 이 여액을 원심분리한 후 동결건조하여 수용성 인삼 추출물 시료로 하였다. 방사선조사는 6 MeV 선형가속기를 이용하였고, 인삼의 세포내 독성은 마우스 섬유육종세포의 생존을 감소시키는 능력으로 평가하였으며, 인삼 1 mg/mL를 방사선조사 1시간 전 종양세포에 접촉시켰다.

결과 : 환류추출과 동결건조에 의해 최종적으로 얻어진 고려인삼 50 g의 수용성 추출물은 3.13 g으로서 수율은 6.3% 이었다. 인삼 추출액의 시험관내 세포독성 지표로서 0.001, 0.01, 0.1 및 1 mg/mL에서의 생존분율은 각각 0.89 ± 0.04 , 0.86 ± 0.06 , 0.73 ± 0.1 , 0.09 ± 0.02 로 나타났다. 방사선조사 단독의 경우 2, 4, 6 및 8 Gy에서의 생존분율은 0.81 ± 0.07 , 0.42 ± 0.08 , 0.15 ± 0.02 , 0.03 ± 0.01 으로 나타났으며, 인삼 추출물(0.2 mg/mL)과 방사선조사의 병용시 동일 조사량에서의 생존분율은 각각 0.28 ± 0.01 , 0.18 ± 0.03 , 0.08 ± 0.02 , 0.006 ± 0.002 이었다($p < 0.05$).

결론 : 환류추출과 동결건조 과정을 통해 얻어진 고려인삼 수용성 추출물의 수율은 6.3%이었다. 방사선조사시 인삼을 병용한 경우, 종양세포의 세포독성이 방사선조사 단독의 경우 보다 부가적으로 증가하였다.

핵심용어 : 인삼, X-선조사, 세포독성, 병용효과

서 론

현대의학의 암 치료에서 방사선치료는 수술 및 항암 화학요법과 더불어 암 환자의 생존율을 증가시키는데 큰 역할을 해왔다. 그러나 방사선생물학적 관점에서 볼 때 저 산소를 함유한 종양의 경우 방사선 반응이 감소되어 재발의 우려가 높거나, 아예 방사선감수성이 낮은 종양의 경우도 있어 치료 반응이 낮을 수 있으며, 이와달리 방사선치료 범위내 정상조직의 감수성과 관련된 방사선 합병증의 우려가 있어 방사선 치료시 이러한 문제를 극복해야 한다고 본다. 국내에서도 이를 극복하기 위한 일부 시도¹⁻³⁾가 있지만 아직 효험있는 신약 개발의 단계까지는 오지 못했다. 이러한 배경으로 볼 때 국내에서 오래 전 부터 복용해 왔던 항종양 관련 보조식품에 관한 관심이 필요하다고 본다.

인삼은 이미 오래 전 부터 우리나라 뿐만아니라 동양에서 널리 약용으로 사용되어 왔으며, 인삼의 약리적 효능은 위장 기능 향진, 당 대사 조절, 조혈촉진, 항 콜레스테롤 등의 기능이 있고,^{4,5)} 주성분인 사포닌은 항암 효과가 있다고 보고되었다.⁶⁻⁹⁾ 이외 장기 복용 시 암 예방에 도움이 되며, 방사선방어 작용도 있다고 보고되고 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 이러한 인삼의 약리효능 중 항암효과와 방사선방어 작용은 방사선치료와 밀접한 관계가 있으므로 근래에 많은 관심을 갖게 되었다. 연구자들은 이미 한국산 인삼의 수용성 추출액의 항종양 효과를 알아보려고 인삼 추출액의 시험관내 세포독성 정도와 마우스 종양의 성장의 억제력 정도에 관한 결과를 보고하였다.¹³⁾ 본 연구에서는 실제로 방사선조사시 인삼을 복용 할 경우 종양의 방사선 반응에 어떠한 영향을 줄 수 있는가 알아보기 위해 시판되는 한국산 인삼의 수용성 추출액을 얻어 방사선조사 단독시와 인삼병용시의 세포독성 정도를 비교하여 보았다.

이 논문은 1996년 전북대학교병원 특수목적 연구비의 지원으로 시행되었음

이 논문은 2000년 3월 4일 접수하여 2000년 8월 10일 채택되었음.

책임 저자: 권형철, 전북대학교 의과대학 치료방사선과학교실

Tel: 063)250-1195, Fax: 063)250-1192

E-mail: hckwon@moak.chonbuk.ac.kr

대상 및 방법

1. 인삼 추출액의 준비

시판 제품의 고려인삼을 분쇄하여 얻어진 분말 50 g과 증류수 1 L를 혼합하여 환류냉각기에서 100°C, 5시간 동안 환류추출하였다. 이 수용성 추출액을 No. 2 여과지(Whatman, 직경 185 mm)를 사용하여 여과한 다음, 원심분리(3,000 rpm, 15min)하고, 그의 상등액을 -90°C에서 16~18시간 동안 냉동하였다. 냉동된 추출액을 동결건조기(FD2.5, Heto, Denmark)(Fig. 1)로 동결건조하여 수용성 인삼 추출물 시료로 하였다. 이 시료를 분쇄하고 일정 농도로 희석하여 인삼 추출액을 조제하였다.

2. 실험세포 및 X-선 조사

실험 세포주는 생명공학 연구소(대덕, 대전)에서 분양받은 5~6주 태생의 C3H/N 마우스를 통해 얻은 섬유육종세포(FSa II)를 사용하였다. X-선 조사는 6 MeV 에너지의 선형가속기(Mevatron, Siemens, Germany)를 사용하였으며, 방사선 발생원 부터 100 cm 거리에 배양플라스크를 놓고 조사하였다. 사용된 방사선조사량은 2, 4, 6 및 8 Gy이었다.

3. 시험관내 세포독성

인삼 추출액의 세포독성 정도를 알아보기 위하여 clonogenic assay법을 이용하였다. 200~2,000개의 섬유육종세포를 10% 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지액에 24~36시간 정도 배양하여 지수성장에 도달하게 한 다음, 0.001, 0.01, 0.1 및 1 mg/mL의 인삼추출액을 각각 배양플라스크의 바닥에서 자라

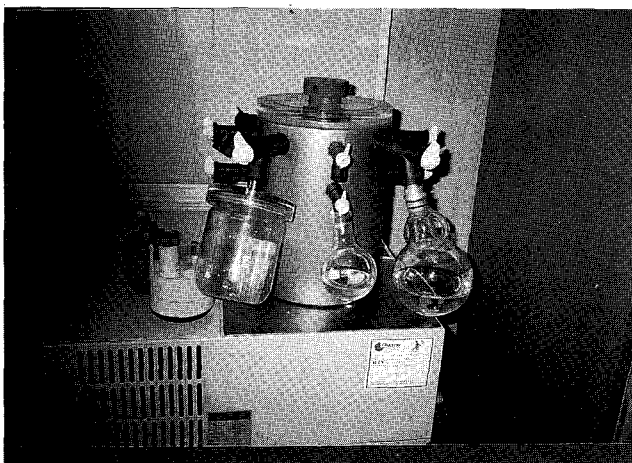


Fig. 1. The model of freeze drier which made freezing ginseng extract dried.

고 있는 종양세포주에 1시간 동안 접촉시켰다. 이후 RPMI 1640 배지로 세척하여 일주일 정도 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였으며, 생성된 콜로니를 알코올로 고정한 뒤 crystal violet으로 염색하여 콜로니 수를 계산하였다. 그리고 이를 토대로 인삼 추출액의 농도에 따른 생존분율을 구하였다. 또한 인삼추출액 및 방사선조사 병용군과 방사선조사 단독군 사이의 세포독성 비교 역시 clonogenic assay법을 이용하였다. 방사선조사 단독군의 경우 종양세포주에 2, 4, 6, 8 Gy를 조사하였고, 병용군의 경우 1 mg/mL 인삼추출액 1 mg을 RPMI 1640 배지액과 혼합하여 인삼 추출액의 최종농도를 0.2 mg/mL으로 만든 후 배양플라스크의 종양세포주에 1시간 동안 접촉시킨 다음, 동일한 방사선량을 조사하고 상기와 같은 방법으로 각각 생존분율을 구하였다. 세포독성 실험은 3회 이상 반복하였다.

결 과

1. 인삼 추출물의 수율

환류추출과 동결건조 과정을 통해 최종적으로 얻어진 고려인삼 50 g의 수용성 추출물은 3.13 g으로서 수율은 6.3%이었다.

2. 시험관내 세포독성

1) 인삼 추출액의 세포독성

세포독성 정도를 의미하는 생존분율은 인삼 추출액 농도 0.001, 0.01, 0.1 및 1 mg/mL에서 각각 0.89 ± 0.04 , 0.86 ± 0.06 , 0.73 ± 0.1 , 0.09 ± 0.02 로 나타났다(Fig. 2).

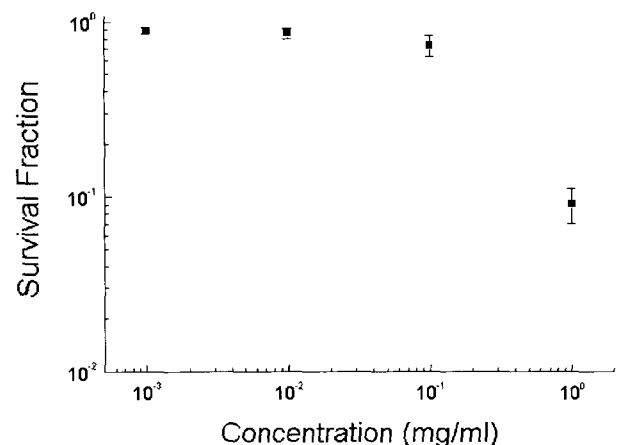


Fig. 2. The survival fraction of fibrosarcoma (FSa II) at ginseng concentration of 0.001, 0.01, 0.1 and 1 mg/mL. Each concentration of ginseng was contacted for 1 hour.

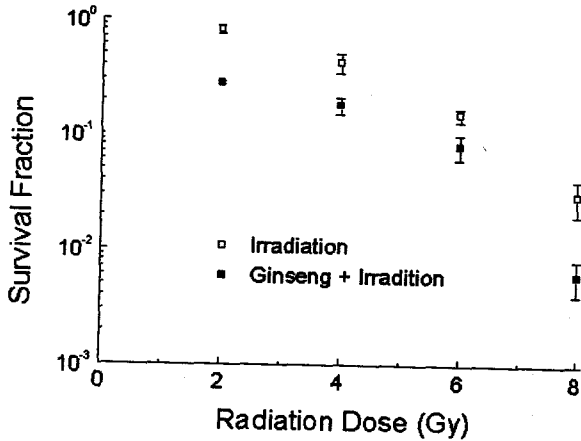


Fig. 3. The comparison of survival fraction of fibrosarcoma (F5a II) between X-irradiation of 2, 4, 6 and 8 Gy and X-irradiation of each same dose with 0.2 mg/mL of ginseng. The ginseng extract was exposed to tumor cells for 1 hour before X-irradiation.

2) 인삼 추출물과 방사선조사의 병용시 시험관내 세포독성

방사선조사 단독의 경우 2, 4, 6 및 8 Gy에서의 생존분율은 0.81±0.07, 0.42±0.08, 0.15±0.02, 0.03±0.01으로 나타났으며, 인삼 추출물(0.2 mg/mL)과 방사선조사의 병용시 동일 조사량에서의 생존분율은 각각 0.28±0.01, 0.18±0.03, 0.08±0.02, 0.006±0.002 이었다($p<0.05$)(Fig. 3).

고 안

대부분의 암 환자들은 방사선치료 중 또는 후에 어떤 식품과 약품이 암치료에 유익한가를 담당의사에 묻게 되는데 의사들은 대체적으로 이에 대한 명확한 답변을 해주지는 못하고 있는 실정이다. 이러한 배경에서 볼 때, 인삼은 기운을 돋우고, 소화흡수 기능을 높여 위장관 질병을 개선시킬 수 있으며, 특히 신체에 방사선조사로 인한 부작용을 감소시키는 작용과 항암 작용도 있다^{6-9, 11)}는 것이 알려져, 암 환자의 방사선치료 중 권장할 수 있는 매우 유익한 건강보조 식품 중의 하나라고 본다.

인삼의 항암 연구를 보면 인삼 투여 후 종양 유발 유무 또는 암 예방에 관한 실험이 주를 이루고 있다. 장 등⁶⁾은 홍삼의 항암 효과에 대한 결과를 발표하였는데 그 기전으로서 T림프구에 의한 세포매개성 면역반응과 자연살해세포의 활성도 증가를 설명하고 있으며, 종양은 홍삼을 투여한 군이나 투여하지 않은 군 모두에서 발생되었으며, 단지 홍삼투여 군에서 종양 유발에 더 많은 시간이 소요되었고 생존기간이

다소 연장된 것으로 나타났다. 이와 달리 Yamamoto 등⁸⁾은 인삼의 추출물과 인삼에서 분리한 pan-xytriol을 이용하여 각각 세포내 실험에서 인삼이 상당한 독성을 나타냈다고 보고하였다. 반면에 Nakata 등⁷⁾은 사람의 난소세포를 접종한 쥐에 인삼을 복용한 경우 종양성장의 억제력은 관찰되지 않았지만, cisplatin주사와 인삼을 병용한 경우 cisplatin 단독군의 경우보다 종양성장의 지연을 가져왔고 동시에 생존기간의 연장을 가져왔다고 보고하였다. 이러한 결과는 방사선조사와 인삼의 병용효과에 관한 실험연구의 필요성을 제기할 수 있다고 본다. 한편 Ben-Hur 등¹⁴⁾은 인삼의 사포닌과 다른 합성성분을 세포에 접촉전에 방사선조사를 한 경우 경미한 방사선방어 효과를 나타냈으며, 세포 접촉후 4~6시간에 방사선조사를 한 경우 방사선 반응이 증가되었다는 것을 발표하였다.

연구자들은 이미 인삼농도 약 30 mg/mL 정도에서 생존율을 0.1을 나타내었다는 인삼 추출액을 이용한 시험관내 세포독성 실험 결과를 보고한 바 있다.¹³⁾ 그러나 이 경우는 일반인들이 인삼을 보통 중탕하여 복용하는 것을 고려하여 단순 추출액을 얻어 실험한 것이었기에, 본 연구에서는 가능한 인삼의 모든 유효 성분을 충분히 얻기 위하여 열탕 환류추출과 동결건조에 얻어진 시료로 실험을 수행하였다. 본 연구에서는 약 1 mg/mL의 농도에서 생존율을 0.1을 얻어 과거의 실험 결과 보다 훨씬 적은 농도에서 같은 정도의 세포독성이 나타난 것을 알 수 있다. 이번 실험에서 인삼추출물(0.2 mg/mL)을 방사선조사와 병용한 경우 방사선조사의 경우보다 강한 세포독성을 보였으며, 인삼과 방사선조사 병용군의 경우 방사선조사량 범위에서 같은 정도의 세포독성 증가 경향이 나타난 것으로 보아 인삼추출물의 세포독성 효과가 방사선조사의 세포독성 효과에 부가되어 나타난 것으로 설명될 수 있다. 따라서 방사선조사시 인삼의 병용은 방사선조사 단독의 경우 보다 세포독성이 증가되어 항종양 효과를 기대할 수 있으며, 보다 적은 양의 방사선을 조사하여 소기의 치료 효과를 얻을 수 있을 것으로도 기대된다. 앞으로 방사선조사 전후에 인삼 추출물을 병용할 경우 방사선방어 또는 방사선 반응 증가의 결과도 기대될 수 있으므로 이에 관한 실험이 요구되며, 이에 따른 생체내 종양지연 실험 및 방사선 합병증 관찰 등의 실험이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Yoon SC, Park JM, Jang HS, et al. Radioprotective effect of captopril on the mouse jejunal mucosa. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994;30:873-878
2. Cho CK, Kim TH, Yoo SY et al. The effect of alkaloid

- fraction of Korean ginseng on the radition-induced DNA strand breaks. *J Korean Soc Ther Radiol* 1995;13(2):113-120
3. **Shin KH, Ha SW.** The effect of ginkgo biloba extract on radiosensitivity of mouse skin and jejunal crypt. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 1998;16(2):107-114
 4. **金一赫, 趙弼衡.** 漢方醫藥學. 초판. 서울; 東南出版社, 1984: 71-73
 5. **한국생약학교수협의회.** 本草學. 초판. 서울; 대한약사회, 1994:728-735
 6. **Jang SK, Kim JH, Jeong YS et al.** Immune activity and antitumor effect of Korean red ginseng. *Korean J Ginseng Sci* 1994; 18(3):151-159
 7. **Nakata H, Kikuchi Y, Tode T et al.** Inhibitory effects of ginsenoside Rh2 on tumor growth in nude mice bearing human ovarian cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 1998;89(7):733-40
 8. **Hiroshi Y, Mitsuo K, Hisashi M.** Antitumor substance form panax ginseng roots. *Korean J Ginseng Sci* 1990;14(2):244-252
 9. **Kim W, Jeong NP.** Effects of a ginseng saponin fraction on the tumoricidal activity of murine macrophage against k562 cells. *Korean J Ginseng Sci* 1989;13(1):24-29
 10. **Yun TK, Choi SY.** Preventive effect of ginseng intake against various human cancers: a case-control study on 1987 pairs. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 1995; 4(4):401-8
 11. **Kim SH, Jeong KS, Ryu SY, Kim TH.** Panax ginseng prevents apoptosis in hair follicles and accelerates recovery of hair medullary cells in irradiated mice. *In Vivo* 1998;12(2): 219-22
 12. **Zhang JS, Sigdestad CP, Gemmell MA, Grdina DJ.** Modification of radiation response in mice by fractionated extracts of Panax ginseng. *Radiat Res* 1987;112(1):156-63
 13. **Kwon HC, Kim JS.** Antitumor effect of Korean Ginseng : Cytotoxicity and Tumor growth delay(1) 1996;20(1):97-102
 14. **Ben-Hur E, Fulder S.** Effect of Panax ginseng saponins and Eleutherococcus senticosus on survival of cultured mammalian cells after ionizing radiation. *Am J Chin Med* 1981; 9(1):48-56

Abstract

Cytotoxic Effect of X-irradiation of Mouse Tumor Cells in the Presence of Korean Ginseng Extract

Hyoung-Cheol Kwon, M.D.*, Jin-Ki Kim, Ph.D.*, Jung-Soo Kim, M.D.* and Dong-Seong Choi, Ph.D.†

*Department of Therapeutic Radiology and Oncology, Institute for Medical Sciences,
Medical School, Chonbuk National University

†Division of Bioscience and Biotechnology, Woo Suck University

Purpose: We already reported the results that aqueous extract of Korean ginseng roots showed a marked cytotoxicity. In this study, we investigated whether combined ginseng product with X-irradiation increase the cytotoxicity of tumor cells than X-irradiation or not.

Materials and Methods: Fifty gram of Korean ginseng powder mixed with 1 L of distilled water was extracted with reflux flask under condition of 100°C for 5 hrs. This aqueous ginseng extract was filtered, centrifuged and then was frozen under condition of -90°C for 16-18 hrs. The freezing extract was dried with freeze drier, and then diluted. X-irradiation was given to tumor cells by 6 MeV linear accelerator. The cytotoxicity of ginseng in vitro was evaluated from its ability to reduce the clonogenicity of fibrosarcoma (Fsa II) cells. In X-irradiation alone group, each 2, 4, 6 and 8 Gy was given to tumor cells. In X-irradiation with ginseng group, 0.2 mg/mL of ginseng extract was exposed to tumor cells for 1 hour before X-irradiation.

Result: The yield for 50 g of ginseng extract which was treated with freezing drier was 3.13 g(6.3%). Cytotoxicity in vitro was measured as survival fraction which was judged from the curve, at ginseng concentration of 0.001, 0.01, 0.1 and 1 mg/mL were 0.89 ± 0.04 , 0.86 ± 0.06 , 0.73 ± 0.01 and 0.09 ± 0.02 , respectively. Survival fraction at X-irradiation alone of 2, 4, 6 and 8 Gy were 0.81 ± 0.07 , 0.42 ± 0.08 , 0.15 ± 0.02 , 0.03 ± 0.01 , respectively. But, survival fraction in combined group of X-irradiation and ginseng (0.2mg/mL) at each same radiation dose were 0.28 ± 0.01 , 0.18 ± 0.03 , 0.08 ± 0.02 , 0.006 ± 0.002 , respectively ($p < 0.05$).

Conclusion: The yield for ginseng extract which was treated with freezing drier was 6.3%. Cytotoxicity of Fsa II in combined ginseng with X-irradiation group was increased than that of X-irradiation alone group, and its enhancing effect seemed to be added.

Key Words: Korean ginseng, X-irradiation, Cytotoxicity, Combined effect