

## 백삼과 홍삼의 암세포에 대한 세포독성 및 세포주기에 미치는 영향

정노팔 · 송선옥\* · 최상운\*\*\*

연세대학교 생물학과, \*목포과학대학 임상병리과, \*\*한국화학연구소  
(2000년 8월 30일 접수)

### Cytotoxicity of White and Red Ginseng against Cancer Cells and Their Effects on the Cell Cycle

Noh-Pal Jung, Sun-Ok Song\* and Sang-Un Choi\*\*

Department of Biology, Yonsei University, Shinchon-Dong 134, Seodaemun, Seoul 120-749, Korea

\*Department of Clinical Pathology, Mokpo Science College, Sang-Dong 525, Mokpo, Chunranam-Do 530-730, Korea

\*\*Korea Research Institute of Chemical Technology, #100, Jang-Dong, Yusong, Taejeon, 305-343, Korea

(Received August 30, 2000)

**Abstract :** The present study was performed to evaluate the cytotoxicity of white and red ginseng extracts against cancer cells *in vitro*. We also examined the effects of those ginseng extracts on the cell cycle by using flow cytometry. We divided each white and red ginseng into two parts, main body and rhizome, and tested the cytotoxicity of each fraction against various mouse-originated cancer cells and mouse peritoneal macrophages. The red ginseng was more cytotoxic to the cancer cells in comparison with white ginseng, and the rhizome fractions were more cytotoxic than the mainbody fractions in the both of white and red ginseng. Among the cells tested, RAW264.7 cancer cells were most sensitive to all the ginseng fractions. In cell cycle analysis, all the fractions of white and red ginseng arrested the cell cycle at G<sub>2</sub>/M phase.

**Key wold :** White ginseng, red ginseng, cancer cells, cytotoxicity, cell cycle.

## 서 론

인삼은 오가피나무과(Araliaceae)의 인삼속(Panax)에 속하는 다년생 음지성 속근초로서 한국과 중국을 비롯한 동아시아로부터 시베리아 동부 및 북미에 걸쳐 분포하고 있다. 인삼은 동양에서 오래 전부터 보혈강장제로 이용되어 왔으며 C. A. Meyer가 1843년에 만병을 치료한다는 뜻의 *Panax ginseng* C. A. Meyer로 명명하였다. 인삼은 보통 4~6년간 재배하며, 채굴된 자연 상태의 인삼을 수삼이라 한다. 수삼은 약 75%의 수분을 함유하고 있으며, 이를 자연상태에서 건조시킨 것을 백삼(white ginseng)이라 한다. 또한 백삼을 껍질을 벗기지 않은 상태로 증기로 찌서 건조시킨 것을 홍삼(red ginseng)이라 한다. 인삼은 전분 등의 탄수화물이 60~70% 들어 있으며, 이외에도 인삼의 특이

성분인 인삼사포닌(ginsenoside), polyacetylene, 방향족 화합물, 산성펩타이드(acidic peptide)등의 성분을 함유하고 있다.<sup>1)</sup>

인삼의 항종양 효과에 관한 연구로는 Park 등이 홍삼 추출물이 발암물질인 phorbol-12-myristate-13-acetate에 의한 혈소판의 40 KD 및 20KD 단백질 인산화를 억제함으로써 암 발생을 억제한다고 보고하였다.<sup>2)</sup> Yun과 Lee는 쥐를 이용한 동물 실험에서 6년근 수삼, 5, 6년근 백삼 및 4, 5, 6년근 홍삼이 benzo(a)pyrene에 의한 암 발생을 유의성 있게 억제한다고 보고하였다.<sup>3,4)</sup> 또한 Yun 등은 사람을 대상으로 한 실험에서 인삼의 복용이 인체의 암발생 위험을 유의성 있게 감소시키며, 이는 인삼복용의 기간 및 빈도와 상관관계가 있음을 보고하였다.<sup>5)</sup> 또한 인삼의 petroleum-ether 추출물이 인체기원 암세포의 증식을 억제하고 DNA 및 RNA의 합성을 억제하는 것으로 보고되었으며, 이러한 인삼의 효과는 단백질 키나아제 C의 활성을 억제함으로써 나타나며, 세포의 분열주기가 G<sub>1</sub>기에서 억제된다고 보고되

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-860-7545; (팩스) 042-861-4246  
(E-mail) suchoi@krcit.re.kr

었다.<sup>6)</sup> 또다른 연구에서 Sohn 등은 인삼의 petroleum-ether 추출물을 CURC II 세포 및 CAKI-1 세포에 처리한 결과 G<sub>1</sub>기 세포의 비율이 증가한 반면 G<sub>2</sub>/M기 세포의 비율은 감소하였다고 보고하였다.<sup>7)</sup> 한편 아직까지 인삼이 나타내는 종양 유발 억제효과 또는 종양세포 증식 억제 효과에 관한 기작은 명확히 규명되지 못하고 있다.

일반적으로 인삼을 약용으로 복용하는 경우 인삼추출물 전체를 섭취하며, 따라서 인삼의 항암활성이 단일 물질에 의한 효과라기보다는 인삼의 여러 성분들에 의한 복합작용에 의해 이루어 질 것으로 추측된다. 따라서 본 연구에서는 인삼을 전체 분획물로 구분하여 암세포독성을 측정하였다. 즉 백삼 및 홍삼을 동체와 뇌두 부분으로 구분하여 각 분획물의 세포독성을 측정하였으며, 이들 분획물들의 암세포주의 분열주기에 미치는 영향에 대하여도 실험하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. 실험 재료 및 사용 기기

#### (1) 시약 및 세포배양 용기

실험에 사용한 백삼의 동체(white ginseng body; WB) 및 뇌두(white ginseng head; WH)와 홍삼의 동체(red ginseng body; RB) 및 뇌두(red ginseng head; RH) 분획물은 한국 인삼연초연구소에서 분리한 것을 사용하였다.<sup>8)</sup>

세포배양액인 RPMI 1640 배지, fetal bovine serum(FBS) 및 trypsin은 Gibco 사(Grand Island, NY)로부터 구입하였으며, sodium bicarbonate, amphotericin 및 gentamycin, 1,2-cyclohexanediaminetetraacetic acid(CDTA) 등은 Sigma Chemical 사(St. Louis, MO) 제품을 사용하였다. 세포독성 측정 실험에 사용한 시약인 sulforhodamine B(SRB), tris base, trichloroacetic acid(TCA)등의 시약도 Sigma Chemical 사로부터 구입하였다. 세포주기 측정을 위하여 사용한 Triton X-100은 Bio-Rad 사(Hercules, CA) 제품을 사용하였으며, propidium iodide(PI), RNase 및 sodium citrate 등은 Sigma Chemical사 제품을 사용하였다.

세포배양을 위해서 사용한 T-25 및 T-75 배양용기 와 6-well, 96-well plate 및 기타 세포배양에 사용한 일회용 초차류는 모두 Falcon 사(Lincoln Park, NJ) 제품을 사용하였다.

#### (2) 사용 기기

세포독성 측정을 위한 microplate plate reader(ELISA reader)는 Molecular Devices 사(Sunnyvale, CA)의 E-max 기종을 사용하였으며, 세포주기의 측정 시에는 Becton-Dickinson 사(San Jose, CA)의 flow cytometry(FACSort)를 사용하였다.

## 2. 실험방법

### (1) 세포배양

실험에 사용하는 암세포주는 생쥐유래 암세포주로 대식세포 유사 암세포주인 L929, RAW264.7 및 피부암 세포주인 B16 세포를 이용하였다. 배양액으로는 glutamine, sodium bicarbonate, gentamycin 및 amphotericin을 첨가한 RPMI1640 용액을 5% FBS로 보강한 배지를 사용하였으며, 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 혼합 공기 및 100% 습도의 조건에서 배양하며, 3~4일에 한번씩 계대 유지하였다.

### (2) 생쥐 대식세포의 분리

생쥐(C57BL/6)의 복강으로부터 대식세포를 분리하기 위하여 생쥐의 복강에 멸균된 thioglycolate 용액 2.0 ml를 주사하고 3~4일 후 경추이탈법으로 생쥐를 도살하였다. PBS 10 ml를 복강에 주사하고 세척하여 염증성 대식세포(inflammatory macrophage)를 얻었다. 4°C에서 250XG로 10 분간 원심분리하여 세포를 2회 세척하였다. 생존을 검사를 하여 생존율이 90% 이상인 것을 확인한 후, RPMI1640 배지에서 2시간 동안 배양하여 대식세포를 배양용기의 바닥면에 부착시킨 후, 배양용기의 바닥면에 부착하지 않은 세포를 제거하여 90% 이상의 대식세포를 얻었다.<sup>9)</sup>

### (3) 세포독성 실험

세포를 96 well flat-bottom microplate에 분주하고, 세포가 바닥면에 부착하도록 24시간 동안 배양하였다. 세포가 바닥면에 부착한 후에 배양액을 제거하고, 각 농도의 실험약물을 well당 100 μl 씩 넣어 배양기에서 72시간 동안 배양하였다. 약물과의 배양이 끝난 후, 세포독성의 측정은 세포표면 단백질 염색 시약인 SRB를 이용하여 측정하였다.<sup>10,11)</sup> 즉 약물과의 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 각 well에 10% TCA 용액을 처리하고 4°C에서 1시간 동안 방치하여 세포들을 고정시켰다. 그 후 TCA를 제거하고 실온에서 건조시킨 후, 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하여 실온에서 30분 동안 방치하여 세포를 염색하였다. 세포와 결합하지 않은 여분의 SRB를 1% acetic acid 용액으로 세척하여 제거하고, 염색된 세포들에 pH 10.3~10.5의 10 mM Tris base(unbuffered)용액을 가하여 SRB를 용출시켰다. 각 well의 흡광도는 microplate reader를 이용하여 520 nm 파장에서 측정하였으며, 약물을 가하지 않은 well(C)과 약물을 가한 각 well(T) 및 약물을 처음 가할 때의 well(T<sub>z</sub>)을 비교하여, T<sub>z</sub> ≤ T인 경우에는 [(T-T<sub>z</sub>)/(C-T<sub>z</sub>)]×100의 수식으로, T<sub>z</sub> > T인 경우에는 [(T-T<sub>z</sub>)/(T<sub>z</sub>)]×100의 수식으로 약물의 세포독성을 계산하였다.

### (4) 세포주기의 측정

세포분열주기는 세포의 DNA 양을 PI 염색액으로 염색하여 이를 flow cytometry로 측정하였다. 배양된 세포에 실험

약물을 처리하고 일정시간 동안 배양한 후, 배양액을 제거하고 trypsin을 처리하여 세포를 부착면으로부터 분리하였다. 분리된 세포를 PBS로 2회 세척하고, 70% ethanol을 첨가하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 하루동안 세포를 고정시켰다. 세포의 고정이 끝난 후, 세포를 원심분리하여 ethanol을 제거하고, 세포를 다시 PBS로 2회 세척한 후 PI 염색액(2차 증류수 1 l당, 50 mg PI, 4 mM sodium citrate, 450 mg RNase A 및 1% Triton X-100)을 첨가하여 30분 동안 암소에서 방치하여 세포 내 DNA를 염색하였다. 이렇게 염색된 세포의 DNA량을 flow cytometry를 이용하여 측정하고, 이를 Cellfit™ software(Becton-Dickinson)를 이용하여 휴지기( $G_0/G_1$ ), DNA 합성단계(S기) 및 유사분열기( $G_2/M$ 기)의 세포분열주기로 구분하여 분석하였다.<sup>12)</sup>

### (5) 통계 분석

실험한 자료는 Microsoft Excel™ 프로그램을 이용하여 평균값 및 표준오차를 계산하였다.

## 결 과

### 1. 백삼 및 홍삼 분획물의 암세포독성

본 실험에서는 약용식물로 많이 이용되는 인삼의 암세포독성을 확인하기 위하여 백삼 및 홍삼을 각각 동체 및 뇌두로 나누어 각 분획물의 암세포에 대한 독성을 정상세포인 생쥐대식세포에 대한 독성과 비교 실험하였다. 백삼의 동체 분획물을 대식세포에 처리한 결과 1000  $\mu\text{g/ml}$ 까지 유의할 만한 세포성장의 억제작용을 나타내지 못하였으며, 이 분획물을 암세포에 처리한 경우에도 B16 세포에 대하여는 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서도 50%이하의 세포성장 억제 작용이 관찰되었다. 반면, L929 세포에 대하여는 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 90% 이상의 세포 성장 억제작용을 나타내었으며, RAW264.7 세포에 대하여는 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 65%의 세포성장 억제 효과가 나타났으며, 300 및 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 각각 약 30 및 60%의 세포치사 활성을 나타내었다. 백삼의 뇌두 분획물을 처리한 경우에는 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대식세포의 성장을 80% 정도 억제하였으며, 같은 농도에서 B16 및 L929 세포에 대하여는 각각 약 75% 및 50% 정도의 세포치사 활성을 나타내었다. 또한 이 분획물을 RAW264.7 세포에 처리한 경우에는 100  $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 세포치사 활성이 관찰되었다. 홍삼의 동체 분획물을 처리한 경우에 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대식세포의 성장을 65% 정도 억제하였으며, B16 세포는 약 75%의 세포성장을 억제하였다. 한편 L929 세포에 대하여는 같은 농도에서 25% 정도의 세포치사 활성을 나타내었으며, RAW264.7 세포에서는 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 100%의

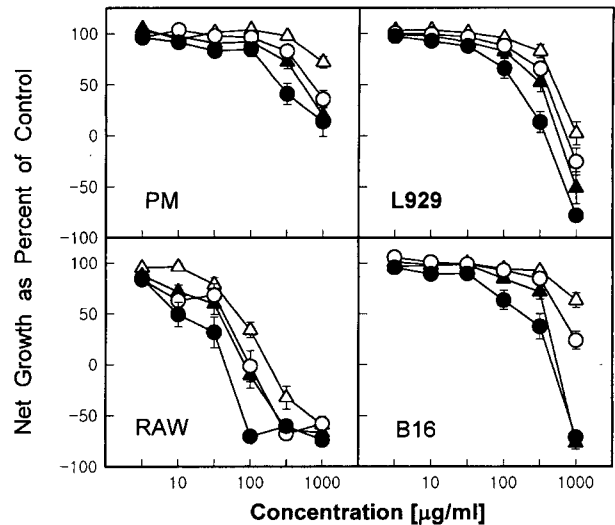
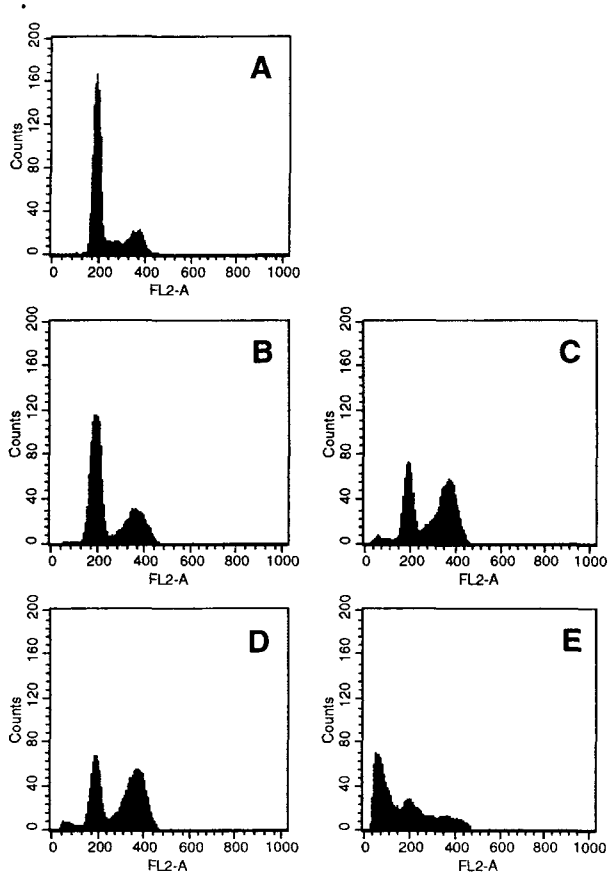


Fig. 1. Cytotoxicity of WB ( $\Delta$ ), WH ( $\blacktriangle$ ), RB ( $\circ$ ) and RH ( $\bullet$ ) to the mouse peritoneal macrophage (PM), L929, RAW264.7 (RAW) and B16 mouse cancer cells *in vitro*. The cell survival was assessed by SRB assay after continuous drug-exposure for 3 days. Each point represents the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments in triplicate.

세포성장억제 활성이 그리고 300 및 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 약 60%의 세포치사 활성이 관찰되었다. 홍삼의 뇌두 분획물을 처리한 경우에는 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대식세포의 성장을 90% 정도 억제하였으며 다른 암세포들에 대하여는 70%이상의 세포치사 활성을 나타내었다. 또한 RAW264.7 세포에서는 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 70% 정도의 세포치사 활성이 관찰되었다(Fig. 1).

### 2. 백삼 및 홍삼 분획물이 세포주기에 미치는 영향

본 실험에서는 L929 생쥐유래 암세포에 백삼 및 홍삼의 동체 및 뇌두 분획물을 처리하여, 이들 분획물이 세포주기에 미치는 영향을 측정하였다. 약물을 처리하지 않고 24시간 배양한 세포의  $G_0/G_1$ , S기 및  $G_2/M$ 기 세포의 비율은 각각 68, 14 및 18% 였으며, 백삼의 동체 분획물 1000  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여 24시간동안 배양한 후의 각 세포주기 별 비율은 52, 17 및 31%로 나타났다. 백삼의 뇌두 분획물을 같은 농도로 처리한 경우에는  $G_0/G_1$ , S기 및  $G_2/M$ 기 세포의 비율이 각각 34, 18 및 48%로 나타났다. 또한 홍삼의 동체 분획물을 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 24시간 배양한 경우에는  $G_0/G_1$ , S기 및  $G_2/M$ 기 세포의 비율이 각각 28, 15 및 67%로 나타났으며, 홍삼의 뇌두 분획물을 같은 농도로 처리한 경우에는 각 세포주기별 비율이 각각 43, 27 및 27%로 나타났으며, 약 64%의 세포가 세포 사멸기에 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 2).



**Fig. 2.** Cell cycle analysis of L929 cells in the absence (A) or presence of 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  WB (B), WH (C), RB (D) and RH (E) at . Asynchronously growing cells were incubated with each fraction for 24 h, and collected and analyzed PI-stained DNA content (FL2-A) using flow cytometry.

## 고찰

본 연구에서는 백삼 및 홍삼을 동체 및 뇌두 부분으로 나누어 각 분획물의 세포독성과 이들 분획물이 암세포의 분열주기에 미치는 영향을 관찰하였다. 홍삼은 원래 인삼의 저장성을 높이기 위해 백삼을 껍질을 벗기지 않은 채로 증기로 찌서 말린 것을 말하나, 이러한 과정에서 단순히 저장성의 개선뿐만 아니라 그 화학 조성에서도 변화가 오는 것으로 알려져 있다. 특히 인삼의 여러 가지 약리활성 물질로 알려진 인삼사포닌들 중 원래 백삼의 고유 성분이었던 malonyl-Rb1, malonyl-Rb2, malonyl-Rc 및 malonyl-Rd 등의 사포닌이 홍삼으로 되면서 사라지고, 백삼에는 존재하지 않았던 성분인 20(S)-Rg3, Rh2, Rs1, Rs2, notoginsenoside-R4, 20(S)-Rg2, 20(R)-Rh1 및 Rh4 등이 사포닌이 홍삼에서 새로이 나타나는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 따라서, 백삼과 홍삼은 같은 인삼 제품이라 하더라도 서로 다른 생리 활성을 나타낼 수 있다. 본

실험에서 세포독성은 전반적으로 백삼에 비해 홍삼의 분획물들이 강하게 나타났으며, 특히 백삼 및 홍삼 모두 뇌두 부위의 분획물이 동체 분획물에 비해 강한 세포독성을 갖는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 백삼에 비해 홍삼에 세포독성을 나타낼 수 있는 물질이 보다 많이 포함되어 있음을 의미하며, 또한 같은 백삼이나 홍삼에서도 뇌두 부위에 이러한 세포독성 물질이 많이 분포하는 것으로 추측된다. 또한 이들 분획물들 모두 생쥐의 대식세포에 대한 독성보다는 생쥐 대식세포유래 암세포인 RAW264.7 세포에 대해 강한 세포독성 작용을 나타내었다. 아직까지 왜 RAW264.7 세포가 대식세포나 다른 암세포들에 비해 강한 감수성을 나타내는지는 알 수 없으나, 이들 세포들의 생화학적 차이점을 연구한다면 인삼 분획물의 암세포 독성 기작을 밝힐 수 있을 것으로 기대된다. 또한 이들 분획물들을 L929 세포에 처리하여 세포의 분열주기에 미치는 영향에 대하여 관찰한 결과 이들 분획물 모두 암세포의  $G_0/G_1$ 기 세포의 비율은 감소시키는 반면,  $G_2/M$ 기 세포의 비율은 증가시키는 것으로 나타났다. 즉 이들 분획물이 세포의 분열주기를  $G_2/M$ 기에서 억제하는 것을 알 수 있으며, 또한 세포독성이 강한 분획물에서  $G_2/M$ 기 세포주기 억제 효과가 크게 나타나는 것으로 보아, 이들 분획물의 세포독성과 세포분열주기 억제 사이에 상관관계가 있으리라 사료된다.

## 요약

본 연구에서는 백삼 및 홍삼을 동체 및 뇌두 부분으로 나누어 각 분획물의 생쥐유래 암세포에 대한 독성을 대식세포에 대한 독성과 비교하여 관찰하였으며, 이러한 인삼분획의 세포독성이 세포의 분열주기 억제와 연관되어 있는지를 확인하기 위하여 L929 세포의 세포주기에 미치는 영향도 실험하였다. 세포독성 실험에서 홍삼이 백삼에 비해 우수한 세포독성을 나타내었으며, 백삼 및 홍삼 모두 뇌두 분획물이 동체 분획물에 비해 우수한 세포독성을 나타내었다. 또한, 실험에 사용한 세포들 중 RAW264.7 세포에 대한 인삼 분획물의 세포독성이 다른 암세포 및 대식세포에 비해 강하게 나타났다. 이들 분획물의 세포 분열주기에 미치는 영향을 관찰한 실험에서는 각 분획물 모두 L929 세포의 분열주기를  $G_2/M$ 기에서 억제하는 것으로 나타났다. 따라서, 본 실험의 결과로 백삼에 비해 홍삼에 암세포에 대한 독성을 나타낼 수 있는 물질이 보다 많이 포함되어 있음을 알 수 있으며, 같은 백삼이나 홍삼에서도 뇌두 부위에 이러한 세포독성 물질이 많이 분포하는 것으로 나타났다. 또한 본 실험의 결과, 인삼의 세포독성 기작은 세포의 분열주기 억제와 연관되어 있는 것으로 추측된다.

## 감사의 글

본 연구는 1998 년도 연세대학교 교내연구비로 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. 조재선, 한용남, 오훈일, 박훈, 성현순, 박정일 : 고려삼의 이해, 도서출판 한림원, 서울, p.12 (1995).
2. Park, H. J., Park, K. M., Rhee, M. H. and Park, K. H. : *Korean J. Ginseng. Sci.* **17**, 135 (1993).
3. Yun, T. K. and Lee, Y. S. : *Korean J. Ginseng Sci.* **18**, 89 (1994).
4. Yun, T. K. and Lee, Y. S. : *Korean J. Ginseng Sci.* **18**, 160 (1994).
5. Yun, T. K., Choi, S. Y. and Lee, Y. S. : *Korean J. Ginseng Sci.* **19**, 87 (1995).
6. Park, M. K. and Hwang, W. I. : *Korean J. Ginseng Sci.* **20**, 219 (1996).
7. Sohn, J., Lee, C. H., Chung, D. J., Park, S. H., Kim, I. and Hwang, W. I. : *Exp. Mol. Med.* **30**, 47 (1998).
8. Park, J. D., Wee, J. J., Kim, Y. S., Kim, S. K. and Park, K. H. : *Korean J. Ginseng. Sci.* **20**, 256 (1996).
9. Choi, S. U., Jung, N. P. and Kim, S. C. : *Korean J. Ginseng Sci.* **14**, 364 (1990).
10. Choi, S. U., Kim N. Y., Choi, E. J., Kim, K. H. and Lee, C. O. : *Arch. Pharm. Res.* **19**, 342 (1996).
11. Skehan, P., Sterng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. : *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).
12. Choi, S. U., Ryu, S. Y., Yoon, S. K., Jung, N. P., Park, S. H., Kim, K. H., Choi, E. J. and Lee, C. O. : *Anticancer Res.* **19**, 5229 (1999).