

특집 : 고려흑삼의 성분과 생리활성

흑삼 추출물의 생리활성에 관한 연구

양효선¹ · 박천귀² · 유영춘^{1*}

¹건양대학교 의과대학 미생물학교실

²(주)삼광바이오

Biological Activities of the Extract of Black Ginseng

Hyo-seon Yang¹, Chun-gui Park², and Yung-choon Yoo^{1*}

¹Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Daejeon, Korea

²Three-Shine Bio Inc., Kumsan, Chung-nam, Korea

서 론

우리나라의 인삼은 고려인삼(*Panax ginseng*)으로 불리는 다년생 초본류로서 뿌리가 주로 한방에서 이용되어 온 약용식물이다. 인삼의 성분과 화학적 및 약리학적 특성에 관한 연구는 1960년대부터 시작되어, ginsenoside, phenol compounds, polyacetylene, polysaccharide 등과 같은 다양한 성분이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌으며, 이들 화합물의 생리활성에 관한 과학적 연구결과도 다수 보고되었다(1,2). 특히 인삼에는 사포닌 성분으로 대표되는 생체의 기능조절에 유효한 성분이 다량으로 함유되어 있으며, 이들 사포닌(ginsenoside) 성분은 면역기능, 항암작용, 항산화 활성, 신경장애개선 혹은 당뇨와 고혈압과 같은 성인병의 예방과 증상개선 혹은 치료 등에 유용한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(3-6). 이러한 이유로 국내에서는 오래 전부터 인삼이 대량으로 재배되어, 체질증강과 면역력 보강을 위하여 전통적인 민간요법에 많이 사용되어 왔으며, 최근에는 국내와 일본 및 중국 등지에서 인삼에서 추출한 사포닌 성분(ginsenoside)을 의약품화하거나 의약품료로 응용하기 위한 소재로서 널리 사용하고 있다.

한편 최근 국내에서는 기존의 방법과는 다른 새로운 인삼 가공법에 의해 인삼의 효능을 높이기 위한 일환으로, 수삼을 정선하여 껍질이 존재하는 상태로 증숙(찜)과 건조과정을 9회 반복하여 만드는 구증구포(九蒸九暴) 가공법이 도입되었다. 이 과정을 통해 만들어진 구증구포 삼은 검은 색을 띠게 되어 흔히 흑삼(黑參)이라 불리우며, 인체에 유용한 생리활성 물질이 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 인삼의 사포닌은 열처리 과정을 거치게 되면 홍삼의 경우와 같이 원래의 백삼에는 없었던 새로운 타입

의 사포닌이 생성되거나, 어떤 성분은 함량이 증가하는 변화를 일으키게 된다(1,2).

흑삼의 경우 9회의 열처리를 통해 생리활성을 조절하는 기능성 성분이 증가되며, 이로 인해 다양한 생물학적 활성이 상승되는 것으로 추정되고 있으나, 이러한 흑삼의 생리활성에 대한 과학적 근거는 아직 미비한 상태이다.

본 연구에서는 흑삼의 생리활성을 해명하기 위한 일환으로, 마우스를 이용한 *in vivo* 및 *in vitro* 실험모델에서 면역조절 기능과 혈당조절작용에 초점을 맞추어 효능을 해석하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 시약

실험동물은 SPF(specific pathogen free) Balb/c마우스(7주령, 암컷)는 (주)오리엔트를 통해 구입하였으며, ob/ob 마우스는 생명공학연구원에서 구입하였다. 실험동물은 건양대학교 의과대학 실험동물 사육실에서 케이지 당 5마리씩 넣어 사육하였다. 시험물질인 구증구포 흑삼 추출물(BG)은 (주)삼광바이오로부터 제공받았으며, 흑삼 추출물을 멸균 3차 증류수로 용해하여 3 mg/mouse 혹은 5 mg/mouse의 투여량으로 1일 1회씩 5일간 마우스에 경구 투여(500 mL/mouse)하였다. 특별한 기술이 없는 경우 Sigma사로부터 구입하였다.

림프구 활성화 유도실험

대조군 및 BG를 투여한 Balb/c마우스로부터 비장세포를 분리하여 96-well plate의 각 well에 5×10^5 씩 넣고, concanavalin A (Con A) 혹은 lipopolysaccharide (LPS)를 각

*Corresponding author. E-mail: yc_yoo@konyang.ac.kr
Phone: 042-600-6495, Fax: 042-600-6495

각 5 µg/mL의 농도로 첨가하고 24시간 배양하였다. 그 후 MTT assay를 통해 림프구의 증식반응을 측정하였다(7).

IL-2(interleukin-2)의 정량법

림프구 활성화 실험에서 ConA를 첨가하여 24시간 배양한 림프구 배양 상청액을 회수하여, 그 상청액 중에 분비되어 있는 IL-2사이토카인을 IL-2 determination kit (R&D Science, USA)를 이용하여 정량하였다.

암전이 억제실험

암전이 억제 효과는 colon 26-M3.1암세포에 의한 폐전이 모델을 이용하여 분석하였다. Balb/c마우스의 미정맥을 통해 3×10^4 개의 colon 26-M3.1세포를 정맥주사하고, 암세포 이식 14일 후에 폐의 표면에 형성된 암전이 수를 계측하여 평가하였다. BG투여군은 암세포를 이식한 후, 1일 1회씩 5일간 BG를 3 혹은 5 mg/mouse로 경구투여하였다(8).

혈당조절 효과 해석법

BG투여에 의한 혈당조절 작용은 BG를 3 혹은 5 mg/mouse로 1일 1회씩 5일간 투여한 후, 투여개시 7일 및 14일째의 혈액을 미정맥에서 부분 채혈하여 glucose analyzer(Glucotrend 2, Roche)를 통해 혈당치를 측정하여 대조군 혈당치와의 비교를 통해 분석하였다. 혈당조절 효과와 관련된 작용으로, 마우스의 기초 대사량을 측정하였다. 마우스의 기초 대사량은 밀폐된 통에 마우스를 넣고 마우스가 소모한 산소량을 측정하여 계산하였다.

항산화 활성 분석법

항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거활성 *in vitro* 분석법에 의해 해석하였다(9). DPPH 용액(1.5×10^{-4} M in EtOH) 1 mL와 시료 0.1 mL을 혼합하여 30분간 방치한 후 517 nm에서의 흡광도를 측정하여 계측하였다.

통계학적 분석

각 실험결과의 대조군에 대한 통계학적 유의성은 Student's two-tailed t-test를 이용하여 조사하였다.

결과 및 고찰

BG 경구투여에 의한 면역세포의 활성화 유도

BG의 면역증강 활성을 조사하기 위하여, BG를 매일 3 mg 혹은 5 mg씩 5일간 경구투여한 후에 비장세포를 회수하여 *in vitro*에서 세포 활성을 MTT법에 의해 측정하였다. 그 결과 BG를 투여한 그룹의 비장세포가 대조군

에 비해 높은 세포증식 작용을 나타내었으며(Fig. 1), 이러한 결과는 3 mg보다도 5 mg의 투여량에서 보다 현저히 관찰되었다. 또한 T세포의 mitogen인 ConA를 첨가한 경우와 B세포의 mitogen인 LPS를 첨가한 경우에도 대조군에 비해 높은 활성을 나타내었다(Fig. 2, Fig. 3). 이러한 결과는 BG 추출물이 연속적으로 경구 투여되었을 때 면역세포의 기능을 향상시키는 면역증강효과를 지니고 있는 것으로 사료되었다.

한편 활성화된 T세포는 여러 종류의 사이토카인을 분비하여 자신은 물론 대식세포나 다른 면역세포의 기능조절을 통해 숙주의 면역기능을 조절하는 중요한 역할을 수행한다. 이러한 기능을 하는 사이토카인의 대표적인 것이 IL-2인 것으로 알려져 있다. ConA는 T세포에 특이적으로 작용하여 세포의 유사분열을 촉진하는 mitogen이며, Fig. 2에서 BG의 투여에 의해 T세포의 증식반응이 상승되는 효과가 관찰된 것으로부터, 이들 T세포 배양 상청액 중에 포함되어 있는 IL-2의 양을 정량, 비교하였다. 그 결과 BG

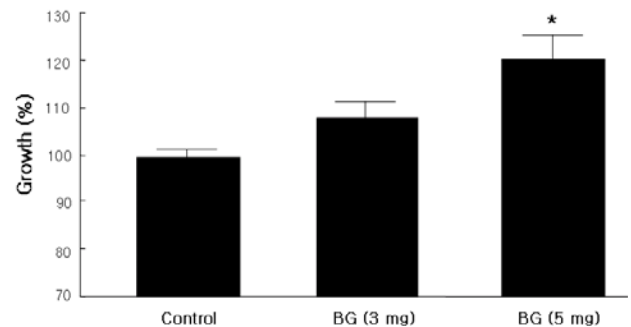


Fig. 1. BG 경구투여에 의한 비장세포의 증식작용 상승효과. 대조군 및 BG를 각각의 투여량으로 처리한 Balb/c마우스로부터 비장세포를 분리하여 96-well plate의 각 well에 5×10^5 씩 넣어 24시간 배양한 후 MTT assay를 통해 림프구의 증식반응을 측정하였다. * $p < 0.05$.

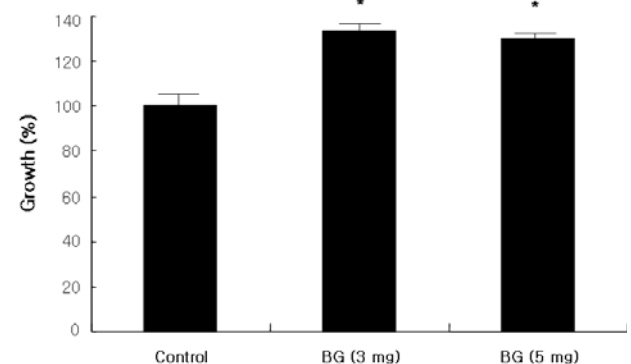


Fig. 2. BG 투여 마우스의 비장세포에서 T세포 증식반응의 증가활성. 각각의 마우스 비장세포에 T세포의 mitogen인 ConA(5 µg/mL)를 첨가하고 24시간 배양한 후 T세포의 증식반응을 측정하였다. * $p < 0.01$.

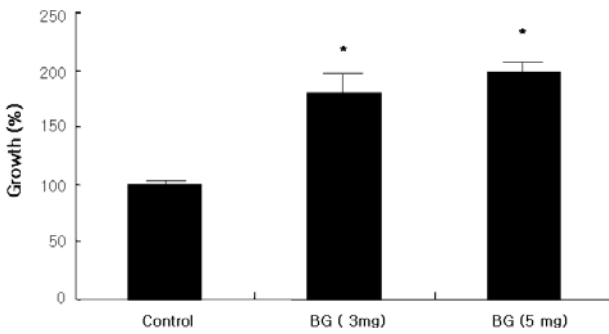


Fig. 3. BG 투여 마우스의 비장세포에서 T세포 증식반응의 증가활성.

각각의 마우스 비장세포에 B세포의 mitogen인 LPS(5 µg/ mL)를 첨가하고 24시간 배양한 후 T세포의 증식반응을 측정하였다. *p<0.01.

를 투여한 마우스의 T세포로부터 IL-2의 분비가 높아진 것으로 나타났다(Fig. 4). 즉 BG는 T세포를 자극하여 IL-2의 분비를 증가시키는 효능을 가진 것으로 추정된다.

BG투여에 의한 암전이 억제효과

일반적으로 면역기능의 상승은 숙주의 미생물 감염에 대한 저항성은 물론 종양발생과 암세포의 전이와 같은 종양세포에 의한 질병(cancer)을 억제할 수 있는 기능을 부여할 수 있다. BG의 경구투여가 면역세포의 기능을 상승시키는 효과를 가지는 것으로 확인되었으므로, 다음 실험에서는 BG의 투여에 의해 암세포의 전이를 억제할 수 있는가를 조사하였다. 고전이성 암세포인 colon 26-M3.1 carcinoma세포를 이식한 1일 후부터 BG를 매일 1회씩 3 mg 혹은 5 mg씩 경구투여하고, 암세포 이식 14일째에 이 암세포 전이 표적조직인 폐에 전이된 전이소(lung metastasis)를 계측하여 대조군과 비교하였다. 그 결과 BG를 3 mg씩 5회 경구 투여한 그룹에서는 통계학적 유의차를 인정하며 약 13% 정도 암전이를 억제하였으며, 5 mg씩 5회 투여한 경우에는 역시 유의차를 인정하며 약 23% 정

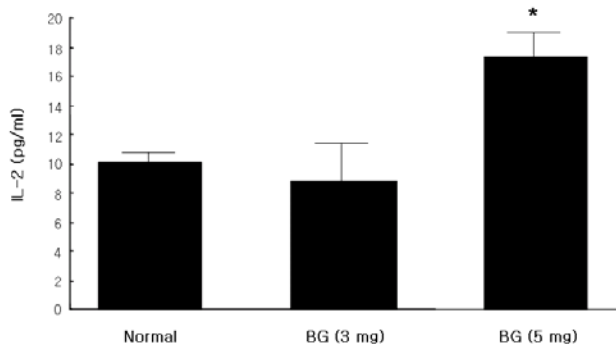


Fig. 4. BG투여에 의한 T세포로부터 IL-2분비기능의 상승효과. ConA와 함께 배양한 비장세포의 상청액을 이용하여 ELISA kit을 통해 IL-2를 정량하였다. *p<0.01.

도 억제하는 것으로 밝혀졌다(Fig. 5). 이 결과로부터 BG를 연속적으로 투여할 경우, 면역기능을 증강시켜 암세포의 전이를 억제하는 종양의 치료효과를 거둘 수 있는 가능성이 있는 것으로 시사되었다.

BG에 의한 혈당조절효과

당뇨는 최근들어 대단히 환자가 급증하는 생활습관성 질환으로, 국내에서는 당뇨병자의 증가로 인해 당뇨병의 제어와 관리에 관한 유용한 방법이 절실하게 요구되고 있는 상황이다. 본 연구에서는 흑삼 추출물이 성인병의 증상 개선 혹은 치료에 유효한 효과를 지니는가를 알아보기 위하여 ob/ob마우스를 이용한 당뇨모델을 이용하여 BG투여에 의한 혈당조절효과와 이에 관련된 기전을 조사하였다.

먼저 BG를 3 mg 혹은 5 mg씩 연속 5회 ob/ob마우스에 경구투여한 후에 7일째 및 14일째의 혈당치를 측정하였다. 그 결과 BG를 투여한 마우스에서 현저한 혈당저하가 관찰되었으며(Fig. 6), 이러한 혈당조절효과는 BG의 투여량에 의존적인 것으로 보여졌다. 특히 BG투여를 종료하고 9일째가 되는 실험개시 14일째에도 혈당치가 유의하게 억제되고 있는 것은 혈당조절효과가 대단히 지속적인 것으로 사료되었다.

또한 당뇨병과 관련하여 기초 대사량의 증가는 조직에

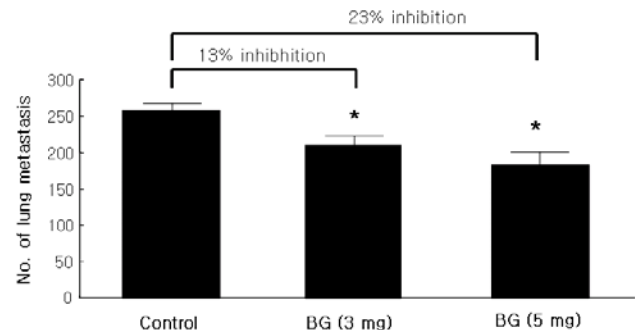


Fig. 5. BG 연속투여에 의한 암전이 억제 효과.

BG를 각각의 투여량으로 경구투여한 후 암세포 이식 14일째에 전이억제효과를 조사하였다. *p<0.05.

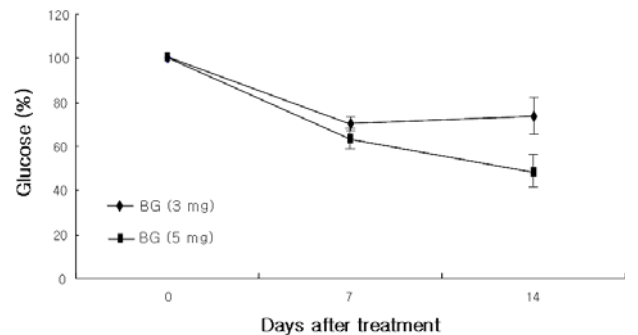


Fig. 6. BG경구투여에 의한 혈당치 저하효과.

BG는 실험개시일부터 1일 1회, 총 5일간 경구투여하였다. 각 군당 ob/ob마우스를 7마리씩 사용하였다.

서의 포도당 소모를 촉진하여 결과적으로 혈액 내 혈당치를 낮추는 효과를 초래하게 된다. 그래서 이번에는 Balb/c 마우스를 이용하여 BG의 투여가 기초 대사량에 미치는 영향을 조사하였다. Figure 7의 결과에서 보듯이 BG의 경구투여(1일 1회, 총 5일간 투여)에 의해 숙주의 기초 대사량이 크게 증가하는 것으로 나타났으며, 그 효과는 투여량에 의존하는 것으로 관찰되었다.

당뇨병을 비롯하여 많은 질병, 특히 성인병의 발생에는 숙주 체내에서의 산화작용이 관련되는 것으로 알려져 있다. 다음으로 BG의 혈당조절효과를 항산화작용의 관점에서 해석하기 위하여 *in vitro* 실험에서 항산화 효과를 측정하였다. BG를 다양한 농도로 희석하며 항산화 활성을 조사한 결과 BG는 약 60 mg/mL의 농도부터 넓은 항산화 활성을 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 8). 이러한 실험 결과를 종합해 볼 때, 흑삼 추출물은 숙주의 면역기능을 활성화시키는 작용과, 혈당을 조절해 주는 항당뇨 활성 그리고 각종 질환의 발생 및 증악에 관련하는 산화작용을 억제하는 항산화 활성을 지니는 것으로 확인되었다.

결 론

이상의 연구결과에서 보듯이 흑삼 추출물은 다양한 생

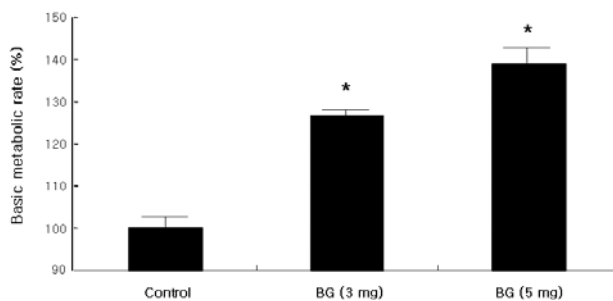


Fig. 7. BG 경구투여에 의한 기초 대사량의 상승효과. Balb/c마우스에 BG를 각각의 투여량으로 1일 1회씩 5일간 경구투여하고, 6일째에 마우스의 기초 대사량을 산소 소모량으로부터 계산하였다. * $p < 0.001$.

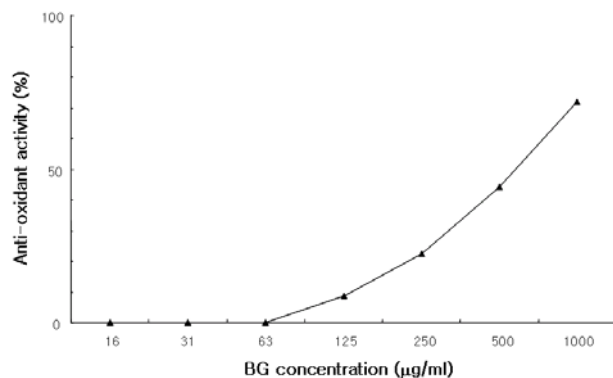


Fig. 8. BG에 의한 항산화활성.

리활성을 지니는 것이 확인되었다. 하지만 수삼을 열처리 가공하여 제조하는 또다른 형태의 삼(蔘)인 홍삼과의 화학적 및 생물학적 특성에 관한 연구가 보다 더 활발하게 이루어져야 한다고 사료된다. 앞으로 흑삼의 유효성과 안전성을 과학화해가기 위해서는 각종 질병에 대한 예방 및 치료효과를 최적화하는 연구와 더불어, 제조상의 균일화가 비교적 난해한 수삼 가공법을 표준화해 가는 노력이 필요한 것으로 사료된다. 본 연구자는 위에서 열거한 활성을 토대로, 앞으로 효능의 극대화 방안과 효과가 관련된 작용기전에 대해 심도 있게 연구해 갈 계획이다.

감사의 글

본 연구는 '07년도 중소기업 산학협력사업 산학연 공동 기술개발 컨소시엄사업(2007-01)의 연구개발비 지원에 의해 수행되었다.

참고문헌

- Park JD. 1996. Recent study on the chemical constituents of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Kor J Ginseng Sci* 20: 389-415.
- Park CK, Jeon BS, Yang JW. 2003. The chemical compounds of Korean ginseng. *Food Indust Nutr* 8: 10-23.
- Banerjee U, Izquierdo JA. 1982. Antistress and antifatigue properties of *Panax ginseng*: comparison with piracetam. *Acta Physiol Lat Am* 32: 277-285.
- Benishin CG. 1992. Action of ginsenoside Rb1 on choline uptake in central cholinergic nerve ending. *Neurochem* 32: 277-285.
- Huo Y, Chen Y. 1988. The effect of *Panax ginseng* (GS) on insulin and corticosteroid receptors. *J Tradit Chin Med* 8: 293-295.
- Zhang D, Yasuda T, Yu Y, Zheng P, Kawabata T, Ma Y, Okada S. 1996. Ginseng extract scavenges hydroxyl radical and protects unsaturated fatty acids from decomposition caused by iron-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 20: 145-150.
- Yoo YC, Kim YS, Song KS, Moon EH, Lee KB. 2002. Immunomodulating and anticoagulant activity of glycosaminoglycans derived from porcine testis. *Arch Pharm Res* 25: 669-674.
- Yoo YC, Lee J, Lee KB, Her E, Kim JB. 2006. Immunomodulating and antitumor activities of the protein fraction of Korean mistletoe in mice. *Lab Anim Res* 22: 383-387.
- Choi SY, Chung SK, Kim SK, Yoo YC, Lee KB, Kim JB, Kim JY, Song KS. 2004. An antioxidant homo-flavoyadorinin-B from Korean mistletoe (*Viscum album var. coloratum*). *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 279-282.