

# 인삼 다당체 경구 투여 전·후 혈장의 proteome 분석 - 무작위배정, 이중 맹검, 위약비교시험

이선구 · 조영호 · 강태규 · 양하영 · 유병철<sup>1</sup> · 조종관<sup>2</sup> · 유화승<sup>2\*</sup>

상지대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 국립암센터 연구소, 2: 대전대학교 둔산한방병원 동서암센터

## Analysis of Plasma Proteome before and after Oral Administration of Acidic Polysaccharide from Panax Ginseng, Double-blind, Placebo-controlled, Randomised Trial

Seon Goo Lee, Young Ho Cho, Tae Gyu Kang, Ha Young Yang, Byong Chul Yoo<sup>1</sup>,  
Chong Kwan Cho<sup>2</sup>, Hwa Seung Yoo<sup>2\*</sup>

*Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Sangji University,*

*1: Research Institute, National Cancer Center, 2: East-West Cancer Center, College of Oriental Medicine, Daejeon University*

Ginsing polysaccharide, known to have an immune regulating effect, was administered to 23 randomly selected healthy male subjects with a mean age of 23 years in accordance with an IRB approval. Then, these subjects underwent physico-chemical tests and serum proteome was analyzed from the blood sample taken from these subjects. Analyses of proteome involved image analysis, protein sections and protein identification in sequence after two-dimensional electrophoresis was carried out. During the physico-chemical test, 4 subjects were excluded from the study. In the proteome analysis, identified were 5 spots such as SP40, 40, Cytokeratin 9, hypothetical protein LOC544932, Apolipoprotein E, similar to Human albumin, which showed differences in the amount of protein expression. In conclusion, changes of 5 proteins were remarkable before and after administration of ginsing polysaccharides. In certain cases, hepatic and renal slight injury occurred. Thus, further clinical study on dosage regimen would be necessary for securing the basis for concentration-dependent effectiveness and safety.

**Key words :** Panax Ginseng, Proteome, Double-blind, Placebo-controlled, Randomised Trial

### 서 론

인삼은 예부터 보기혈 및 자양강장의 목적으로 널리 사용되고 있는 생약으로 주로 사포닌 성분을 중심으로 많은 연구결과가 보고되어 있다. 항암작용은 주로 저분자물질인 polyacetylene계 화합물에 의한 직접적인 세포독성효과와 고분자 물질인 다당체에 의한 간접적인 면역조절효과로 대별할 수 있다<sup>1)</sup>.

인삼의 다당체 성분에 대한 최근 인삼 다당체의 항암효능 및 방사선이나 항암제의 부작용 감소 등에 대한 많은 실험적 연구가 이루어졌다. 대표적인 몇몇 연구를 살펴보면 대식세포 및

자연살해 세포의 암세포 살해능을 증강시키는 기전으로 B16-F10 흑색종이 이식된 쥐에 복강 내 주사시 암의 전이를 억제하였으며, C57BL/C 쥐에 이식된 LLC 폐암세포주의 성장을 60% 억제하였고, 또 골수세포를 증식시키는 기전으로 γ선의 반치사량을 7.46Gy에서 10.64Gy로 증가시켰으며, 항암제 Cyclophosphamide 와 병용한 경우 대조군에 비해 실험군의 생존률을 약 2배 증가시킨다는 보고가 있었다<sup>2-12)</sup>.

국내에서 인삼류를 이용한 임상시험으로는 서<sup>13)</sup> 등이 고려삼과 화기삼의 체표온도에 미치는 영향에 대해, 강<sup>14)</sup> 등이 자연산 산삼증유약침의 혈액주입 전, 후 나타나는 혈장의 Proteome 분석 등에 대해 각각 보고한 바 있다. 또 국외에서 α tocopherol을 정상인에게 투여 시 Proteome 분석을 이용해 혈장 내 apolipoprotein A1 isoforms을 증가시킨다는 보고를 찾아볼 수 있었다<sup>15)</sup>.

\* 교신저자 : 유화승, 대전시 둔산동 1136, 대전대 둔산한방병원 동서암센터

· E-mail : altyhs@dju.ac.kr, · Tel : 042-470-9132

· 접수 : 2007/08/15 · 채택 : 2007/09/19

이에 연구자는 암 질환에 대한 예비임상연구 단계로 인삼 다당체 투여가 혈장 내 proteome 발현에 미치는 약리 역동적 영향 및 안전성 등을 건강한 성인 남자 군을 통해 관찰해보고자 인삼다당체 투여 군과 위약군의 두 개의 군으로 나누어 각각 채혈한 뒤 혈장에 대한 이차원전기영동을 시행하고 2D-gel 분석을 통하여 차이가 나는 spot들을 찾아 질량분석과 단백질을 동정하여 분석하여 기대할 수 있는 효과 및 기전을 추적해보고, 또 기본적인 이학적 검사 및 병리검사를 통해 안전성 등에 대한 정보를 취득해보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구대상 및 연구방법

본 연구는 평균연령 23세( $23.14 \pm 2.03$ )의 건강한 피험자(23명, 남자)가 인삼 다당체 투여 연구를 위해 모집되었다. 여성의 경우 생리기간 중의 프로테옴 변화 등이 예상되어 본 임상시험에서 제외하였다. 대전대학교 둔산 한방병원의 임상시험 윤리위원회(Institutional review board, IRB)에서 2006년 9월 13일 당 임상시험에 대한 승인이 있었으며 모든 참여자들(volunteers)로부터 자발적 동의서(Written informed consent)를 취득하였다. 피험자 수 결정 근거는 유사선행연구<sup>13)</sup>에 근거하여 20명으로 설정하였고 이에 탈락률 20%를 감안하여 총 23명의 피험자를 모집하였다. 임상시험은 2006년 9월 16일부터 10월 16일까지 31일 간 진행되었다.

#### 1) 포함군과 배제군의 기준은 다음과 같다.

##### ● 선정기준(Eligible criteria)

비흡연, 비음주 남자(임상시험 전 1주일 이상부터 임상시험 종료시점까지)

일반 검사(이학검사, 병리검사)상 이상이 없는 건강한 남자(만 20세 이상 30세 이하)로 임상 시험 동의서에 서명한 자

##### ● 제외기준 (Exclusive criteria)

고혈압, 당뇨 등의 성인병을 앓고 있거나, 장기간 약(의약품, 한약 및 건강보조식품 포함)을 복용하고 있는 자, 특이한 알러지 반응자(인삼포함), 약물이나 알콜 중독자, 여자, 기타 주관 책임 시험자가 시험이 불가하다고 판정된 자는 제외함

#### 2) 시험약물

각각의 피험자에게 인삼 다당체 또는 위약이 14일간 무작위 이중맹검 방식으로 투여되었다. 사용된 인삼 다당체는 (주) 코인텍에서 제공된 것으로 식약청의 건강기능식품(제 2004-0226호) 승인을 받은 제품으로 250 mg 정제 8알(2,000 mg)을 1회 복용량으로 정하였고, 위약(주) 대전한방약품은 전분을 사용하여 맛과 성상이 같은 제품을 사용하였다. 임상시험용량은 1일 2회 2 g씩 총 4 g을 경구 투여하였다. 투여용량의 결정은 현재 시판 중인 인삼 다당체 포함제품의 1일 평균 권장투여량(6 g) 중 인삼 다당체량(4 g)을 계산, 산정하였다. 투여기간은 유사선행연구<sup>14)</sup>에 근거하여 14일로 결정하였다. 인삼 다당체의 제조공정 및 특징을 요약하면 다음과 같다.

인삼 Panax ginseng C. A. Meyer의 뿌리 분말을 메탄올로

추출하여 메탄올 불용성 잔사를 음건한 후, 증류수 추출하여 얻은 수 가용성 분획을 동결 건조시키고, 상기 수득물에 에탄올을 가해 40% 에탄올 불용성 분획을 수득한 후 이를 셀룰로오스 투석 막으로 투석하여 다당체를 획득한 후, 세파크릴 S-500 column chromatography하여 6개의 분획을 얻었으며 이들을 각각 DEAE-셀룰로오스 컬럼 크로마토그래피하여 순수하게 분리 정제한 결과, 1,800,000-2,200,000, 1,350,000-1,650,000, 620,000-780,000, 105,000-130,000, 23,000-27,000 및 5,000-6,000 달톤의 다당체가 각각 11.4-13.4 : 3.6 - 4.2 : 4.5 - 5.1 : 0.7-0.9 : 40.1-48.1 : 31.0 - 37.0 으로 존재하며 글루코파라노스가  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ 으로 결합한 주사슬에 글루코파라노스와  $\beta(2 \rightarrow 6)$  프락토파라노스 결합을 주체로 하는 고분자 다당류의 복합체이다. 이는 정량 시 글루코오스를 기준으로 하여 환산한 건조물에 대해 50-60%를 함유하고 있다.

#### 3) 검사항목 및 관찰시기

임상시험기간 중 검사항목 및 관찰시기를 요약하면 다음과 같다. 특히 시험시행은 투약 전 후를 비교하는 혈장 내 프로테옴 분석과 투약 후 병리 및 이학검사를 실시하였다.

Table 1. Flow chart

검사항목	관찰시기	시험시행	
		screening	투약전
피험자 동의서 취득	v		
인구학적 조사	v		
병력조사	v		
병리검사	v		v
이학적 검사	v		v
선정/제외기준 판정	v		
무작위배정	v		
혈액채취		v	v
혈장내 프로테옴 분석	v	v	
이상반응기록			v
순응도검사			v

### 2. 유효성 평가기준, 평가방법

#### 1) 평가기준

시험 군 전체에서 반복시험에 상관성이 있는 프로테옴 변화 중 대조군과의 유의성 있는 차이가 있는 프로테옴의 발현을 주 평가지수로 하였다. 즉 혈장 내 프로테옴 분석을 통하여 얻은 시험군과 대조군의 각 spot들을 정량적으로 분석하여 통계적(paired t-test)으로 유의성 있는 차이( $p < 0.05$ )가 나타나는 것을 유의한 것으로 정의하였다. 또한 시험군과 대조군 각각에 있어서 약물투여 전후에 변화되는 spot들에 대하여도 정량적 분석을 실시하여 발현의 차이에 유의성이 있는지 확인하였다.

#### 2) Proteome 분석방법

이미지 분석은 "Phoretix 2D Evolution Software"를 사용하여 각 spot의 농도를 측정하여 각각의 평균과 표준편차를 구했다. 구해진 spot에 대한 단백질 동정 및 기능은 Profound 검색엔진을 통하여 얻어진 자료를 근거로 작성하였다.

### 3. 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준

#### 1) 평가대상

시험에 참여한 전례(Intention-to-Treat (ITT))에 대하여 평가하였다.

#### 2) 평가기준

본 시험에서 이상반응은 임상시험 시작 전에 관찰되지 않은 증상이 발생하는 모든 바람직하지 않은 의학적 소견을 이상반응으로 분류하였다.

#### 3) 평가방법

이화학적 검사의 이상소견 발현, 이상반응 및 중대한 이상반응을 관측하였다.

### 4. 시험 군 및 대조군으로의 무작위 배정 방법

균형블록무작위배정(balanced block randomization) 방법을 사용하였다. 무작위 배정 표는 SAS system의 randomized program으로 발생된 난수(A 또는 B의 random number)의 순열을 피험자번호 1번부터 순차적으로 적용시킨 표이다(예 1번 =A= 시험군, 2번=B=대조군). Block size를 4로 한다면 다음은 block size = 4 배정의 구체적인 예로써 경우의 수를 나열하며 : 1=AABB, 2=ABAB, 3=ABBA, 4=BAAB, 5=BABA, 6=BBAA 등 6 가지의 경우의 수가 나타난다. 피험자가 최종 선정되면 배정 표에 따라 시험군 또는 대조군에 피험자를 무작위 배정하고 배정 표에 피험자 식별코드를 기록하였다.

### 5. Proteome 분석 재료 및 방법

#### 1) 채혈

지원자의 동의를 얻은 후 인삼다당체 및 위약을 복용 전과 복용 후 각각 5 ml의 혈액을 채취하여 EDTA가 들어 있는 Vacutainer(BD, NJ)에 넣었다가 원심 분리한 후 혈장(plasma)만을 1.5 ml 튜브에 옮겨 -70°C에 보관하였다가 다음 실험에 사용하였다.

#### 2) 재료

Urea, Thiourea, CHAPS, DTT, Benzamidine, Bradford solution, Acrylamide, Iodoacetamide, Bis-acrylamide, SDS, acetonitrile, trifluoroacetic acid 및  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid은 Sigma-Aldrich(Electrophoresis grade or ACS reagents, Ultrapure) 사의 제품을 사용하였고, Pharmalyte(pH3.5-10)는 Amersham Biosciences 사의 제품을 사용하였다. IPG DryStrips(pH4-10 NL, 24 cm)은 Genomine Inc.에서 제작된 제품을 사용하였으며, Modified porcine trypsin(sequencing grade)은 Promega사의 제품을 사용하였다.

#### 3) 방법

##### (1) 단백질 추출

단백질 추출은 아세톤 침전법을 이용하였다. 배양액의 다섯 배 부피의 아세톤을 가하여 -20°C에서 두 시간 침전시킨 다음, 원심분리하여 침전된 단백질을 회수하였다. 침전된 단백질은 7 M urea, 2 M Thiourea, 4%(w/v) 3-[3-cholamidopropyl]dimethylammonio-1-propanesulfonate(CHAPS), 1%(w/v) dithiothreitol(DTT), 2%(v/v)

pharmalyte, 1 mM benzamidine로 구성된 시료용액으로 녹여서 이 차원전기영동의 시료로 사용하였다. 단백질의 농도 측정은 Bradford 법으로 수행하였다<sup>[16]</sup>.

##### (2) 이차원전기영동(2-Dimensional electrophoresis)

일차 Isoelectric focusing(IEF)를 위하여 IPG strips은 7 M urea, 2 M thiourea, 2% 3-[3-cholamidopropyl]dimethylammonio-1-propanesulfonate(CHAPS), 1% dithiothreitol(DTT), 1% pharmalyte로 구성된 reswelling 용액으로 상온에서 12-16시간 정도 reswelling 되었다. Strip 당 시료는 각각 200 ug 을 사용하였으며, Amersham Biosciences 사의 Multiphore II system을 이용하여 제조회사의 사용메뉴얼을 준수하여 20°C에서 IEF를 수행하였다. IEF 조건은 150V에서 3,500V까지의 도달시간을 3시간 되게 하였으며, 3,500V에서 26시간 지속되도록 하여 최종적으로 96kVh 가 되도록 설정하였다.

이차적으로 SDS-PAGE를 수행하기 전에 IPG Strips을 1% DTT를 함유한 equilibration buffer(50 mM Tris-Cl, pH6.8, 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol)로 10분간 incubation 하였으며, 곧바로 2.5% iodoacetamide를 함유한 equilibration buffer로 10분간 더 incubation 하였다. Equilibration이 완료된 strips을 SDS-PAGE gels(20 x 24 cm, 10-16%) 위에 배열시키고, Hoefer DALT 2D system(Amersham Biosciences)을 이용하여 20°C에서 최종적으로 1.7kVh가 되게 전개하였다. 이차원전기영동이 완료된 이차원젤의 단백질은 Oakley<sup>[17]</sup>의 방법에 따라 은 염색으로 시각화되었으며, 질량분석기에 의한 단백질 동정을 위하여 glutaraldehyde 처리 단계는 생략되었다. 은 염색된 이차원 젤은 AGFA 사의 Duoscan T1200 스캐너로 스캐닝 하여 확장자가 TIFF 인 파일의 형태로 컴퓨터에 저장하였다.

##### (3) 이미지분석

스캐닝된 이미지로부터 단백질 spots의 발현변화 확인을 위한 정량적인 분석은 Phoretix 2D Evolution Software(version 2003.02, nonlinear dynamics, UK)를 이용하여 수행하였다. 각 spot의 quantity는 total valid spots의 intensity로 평준화(normalization)되었으며, 대조군에 비해 두 배 이상의 유의한 발현변화를 보여주는 단백질 spots을 선정하였다.

##### (4) 질량분석을 위한 단백질 절편화

단백질 spots은 Shevchenko<sup>[18]</sup>의 방법에 따라 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편으로 효소적으로 분해되었다. 절 조각으로부터 SDS, 유기용매, 염색시약 등의 불순물을 제거하기 위하여 50% acetonitrile로 세척하였다. 그 다음, trypsin(8-10 ng/ $\mu$ l)으로 reswelling 하고 8-10시간동안 37°C에서 incubation 하였다. 단백질 분해반응은 5  $\mu$ l 0.5% trifluoroacetic acid의 첨가에 의해 종결되었다. Trypsin에 의해 칠려진 단백질 단편들은 수용액 상태로 회수되었고, C18ZipTips(Millipore)을 이용하여 1-5  $\mu$ l 부피로 탈염 및 농축되었다. 이 농축액은 동량의 50% aqueous acetonitrile에 포함된  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid와 혼합되었고, 질량분석을 위하여 target plate 위에 적하하였다.

##### (5) 단백질 동정

질량분석기는 Ettan MALDI-TOF(Amersham Biosciences)를 사용하였다. Target plate 상에 적혀되어 있는 단백질 단편들은 337 nm의 N2 laser 조사에 의해 기화된 다음, 20 Kv injection pulse에 의해 가속되었다. 300 laser shots의 누적 peaks에 의해 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다. Mass spectrum의 분석을 위해서 trypsin의 자가분해에 의해 생성된 펩타이드의 ion peak m/z(842.510, 2211.1046)를 표준 peaks로 이용하였다. 분석이 완료된 mass spectrum으로부터 단백질 동정을 위하여 Rockefeller 대학에서 개발한 ProFound 검색엔진 ([http://129.85.19.192/profound\\_bin/](http://129.85.19.192/profound_bin/) WebProFound.exe)을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 이차원전기영동에 의한 이미지 분석

Fig. 1에서는 19명의 지원자로 부터 얻은 샘플을 이차원전기영동을 시행하였고, 전체적인 proteome composition은 지원자 모두 일반적인 plasma pattern과 큰 차이가 없었다(Fig. 1, 2).

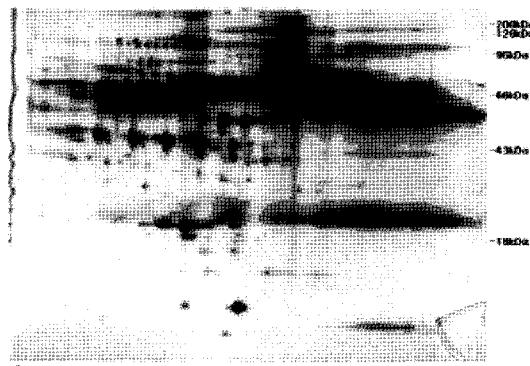


Fig. 1. 2-Dimensional electrophoresis of plasma from the pl and molecular weight.

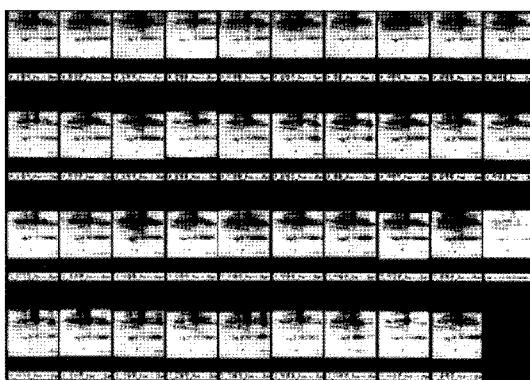


Fig. 2. 2-Dimensional electrophoresis of total volunteer.

### 2. spot의 발현정도 변화

대조군과 시험군의 임상시험 후 이차원 전기영동을 통하여 얻은 이미지를 분석하여 발현된 spot 중 공통적으로 유의성 있는 차이를 나타내는 spot은 7101 밖에 없었다. 시험군의 전, 후 비교

에서 spot 발현량의 차이가 보인 것은 11개였고, 이 중 유의적 ( $p<0.05$ )인 차이가 있는 것을 5개를 찾았으며 이미지 분석상의 등전점(pi)과 분자량(M.W.)을 Table 2에 표시하였다. 대조군의 복용 전, 후 spot 발현량의 차이가 보인 것은 없었다. spot의 발현정도를 비교하면 4201, 7101은 증가하였고, 나머지는 감소하였다. 특히, 3205는 2배 이상 감소하였다.

Table 2. spot의 발현정도 변화

spot 번호(SSP)	분자량(kDa)	pi	발현정도
1204	38.43	4.61	감소
1206	38.81	4.72	감소
1303	50.97	4.38	감소
2103	39.75	4.92	감소
2505	73.83	4.95	감소
2506	73.22	4.98	감소
3205	40.37	5.04	감소
3501	73.40	5.01	감소
4201	44.63	5.23	증가
5109	32.77	5.66	감소
7101	29.67	6.48	증가

### 3. 단백질 동정

5개의 spot이 대조군과 비교해 복용 전후의 유의성 있는 변화를 나타내어 이 spot을 대상으로 단백질 동정을 실시하였다 (Fig. 3, 4).

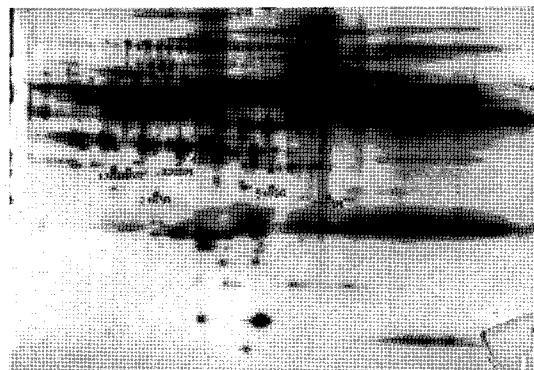


Fig. 3. 2-Dimensional electrophoresis pattern of the human serum 9 protein Spots

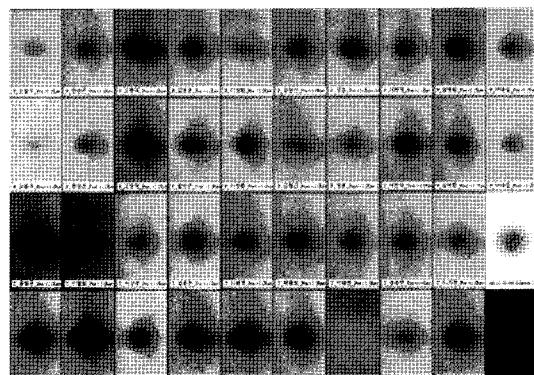


Fig. 4-1. Each Spot image of 9 proteins(SSP 7101).

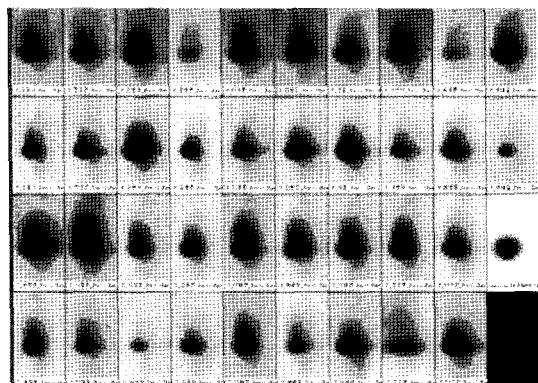


Fig. 4-2. Each Spot image of 9 proteins(SSP 1204,Continue).

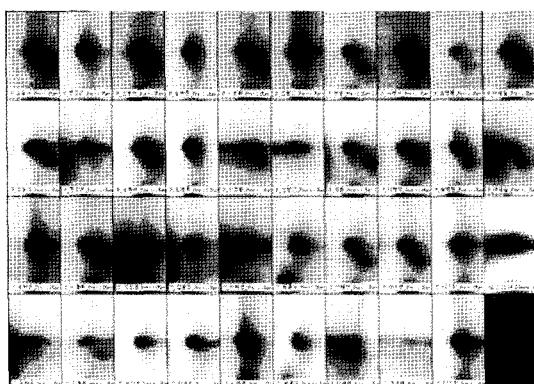


Fig. 4-3. Each Spot image of 9 proteins(SSP 1303,Continue).

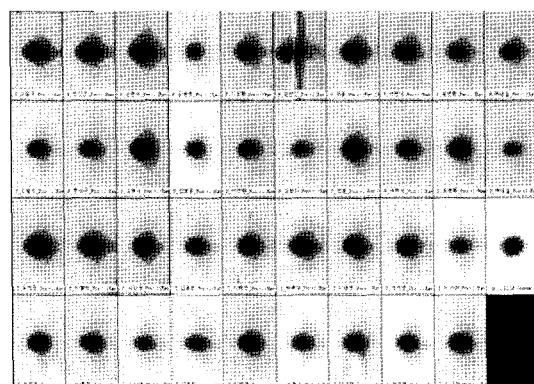


Fig. 4-4. Each Spot image of 9 proteins(SSP 2103,Continue).

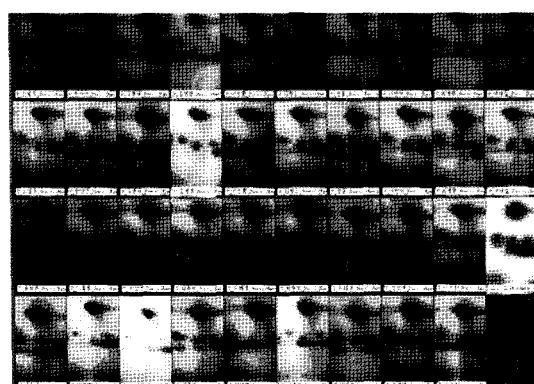


Fig. 4-5. Each Spot image of 9 proteins(SSP 2505, 2506, 3501 , Continue).

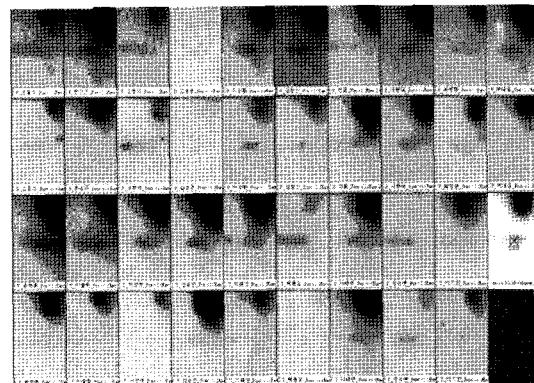


Fig. 4-6. Each Spot image of 9 proteins(SSP 3205, Continue).

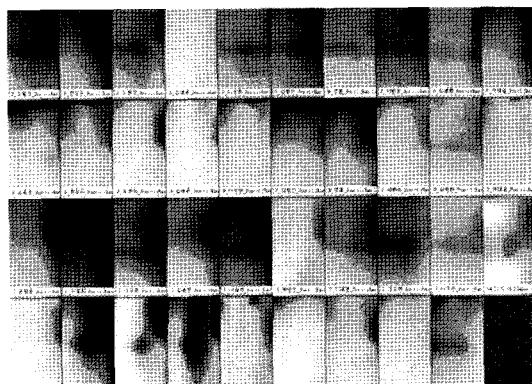


Fig 4-7. Each Spot image of 9 proteins(SSP 4201, Continue).

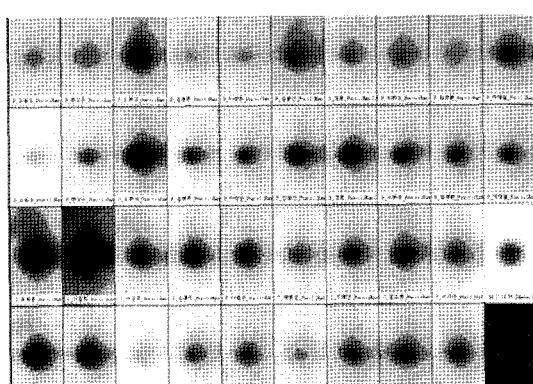


Fig. 4-8. Each Spot image of 9 proteins(SSP 5109, Continue).

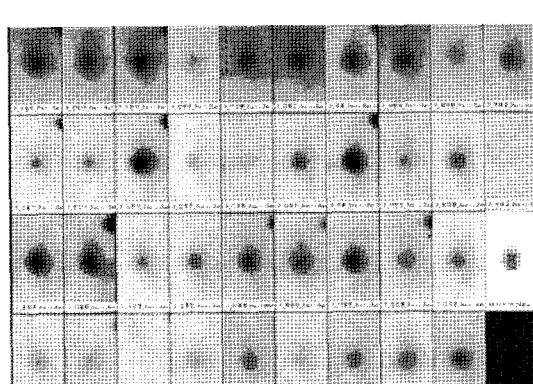


Fig. 4-9. Each Spot image of 9 proteins(SSP 1206, Continue).

#### 4. 질량분석을 통한 단백질 분석

2D-gel 분석을 통한 spot을 질량분석기를 통하여 단백질동정을 하였고, 1206, 3205, 3501, 5109, 7101을 확인하였다. 1206은 SP 40, 40, 3205은 Cytokeratin 9, 3501은 hypothetical protein LOC 54932, 5109는 apolipoprotein E, 7101은 human albumin의 일종으로 확인되었다(Table 3).

**Table 3. The detected proteins by 2-Dimensional electrophoresis**

Spot No.	Gi No.	Peptide sequenced	Protein name	MW(kDa)	pI
1206	338305	RPHFFPK ASSIDELFODR QQTHMLDMQDHFSR QQTHMLDMQDHFSR EPQDTYHYLPFLSPLHR	SP40,40	37.00	5.7
3205	345476	GGSGGSYGR SGGGGGGGGLGSGGSIR SSYSRFSSSGGR IGLGGRRGCGGSYGR FSSSGGYGGGSSPVCGR GCSSGSYGGGGSGGGYGGGSGSR SGGGGGGGGLGSGGSIRSSYSR HGVOELEIEIQLSQLSK TLNDMRQEYEQLIAK	Cytokeratin 9	62.34	5.2
3501	31377746	SRDMMK LRAQVGAGR LPAVAVAVELR YVAGFPDLQR LGTSCPALAHIVEK MDPGDPAGDPAAGER CLSVDCSLKAQQQAK SCLLAHVHLHHEGR DPPLLLQALQTLWSTR	hypothetical protein LOC54932	85.27	9.8
5109	178849	WELALGR FWDYLR LAVYQAGAR LGPLVEQGR LQAEAFQAR RLAVYQAGAR LQAEAFQARLK AKLEEQQQIR AATVGSLAGQPLQER SWFEPVLVEDMQR SWFEPVLVEDMQR VQAAGTSAAPVPSDNH GEVQAMLGGSTEELR GEVQAMLGGSTEELR AYKSELEEQLTPVAEETR	apolipoprot ein E	36.31	5.6
7101	763431	LYEYIAR SLHTLFGDK KYLYEYIAR LVNEVTEFAK DAHKSEVAHR FKDLGEENFK VHTECCHGDLLECADDRADLAK	similar to human albumin	53.43	5.7

#### 5. 이화학적 검사결과(안전성 평가)

총 23명의 지원자 중 4명이 탈락하였다. Screening 과정 중 1차 병리검사에서 1례는 ALT 수치가 50 u/l(<40)으로 확인되었고, 1례는 WBC가 3,320/mm<sup>3</sup>(4,500-11,000)으로 확인되어 투약 전 탈락되었고, 2례는 순응도 검사시 임상시험 기간 중 음주의 경력을 보고하여 탈락되었다.

임상시험이 완료된 19명 중 이화학적 검사에 있어서 문제가 발생한 경우는 3례였다. 1례는 BUN 수치의 상승(26.9 mg/dl (<25)), 1례는 Urine 중 leukocyte(+)의 관측, 1례는 ALT 수치의 상승(56 u/l(<40))이 관찰되었다. 이들은 맹검해제 후 모두 인삼 다당체 투여군으로 밝혀졌다. 기타 이상반응이나 심각한 이상반응은 보고되지 않았다.

#### 고 칠

현재 프로테오믹스는 제노믹스와 함께 bioinformatics의 중요한 분야로 발전해오고 있다. 현재 인삼류에 대한 proteome 분석에 관한 연구로는 인삼 자체의 성분을 규명하기 위한 연구가 진행된 바 있다. 그 결과로는 comparative proteome analysis를 이용하여 인삼체부와 뿌리부위의 ginseng major protein (GMP) 함유물의 차이, peptide finger printing, internal amino acid sequencing를 이용한 주근, 잎과 뿌리의 차이 등을 검색해 볼 수 있다<sup>19,22</sup>. 최근 산양산삼을 이용해 건강한 성인 군에 산양산삼 약침 액을 정맥 내 주사를 한 뒤 혈장 내 프로테옴의 전·후 비교를 한 연구 또한 시도된 바 있는데 이 연구에서는 분석된 약 30 여종의 변화된 프로테옴의 분석을 통해 산양산삼의 인체에 미치는 효능을 추측할 수 있는 결과를 내놓기도 하였다<sup>14</sup>. 결과를 살펴보면 CR2-C3d, antitrypsin(단백질의 항 산화작용에 관여), proapolipoprotein 및 apolipoprotein(동맥경화의 예방과 개선에 중요한 역할 담당), Vitamin D binding protein(염증반응에서 폐를 보호하는 역할 담당), Ras-related protein Ral-A(phospholipid 대사과정의 조절, 세포골격형성을 조절 및 세포내 외 운동이나 막의 물질교통(membrane traffic)에 관여), testis-specific protein Y(성 결정에 관여), transferrin, T-State Human Hemoglobin, 및 Human Hemoglobin(체내 철 평형에 관여) 등은 증가하였고, transthyretin(가족성 아밀로이드 다연신경장애(familial amyloid polyneuropathy, FAP)를 일으키는 주요 단백질)은 감소하였다. 연구자는 이에 근거하여 인삼 다당체도 유사한 효과를 가지고 있을 것으로 기대하였다.

기타 인삼제품은 아니지만 알파 토코페롤을 정상 성인 군에게 투여한 결과 혈장 내 apolipoprotein A1 isoforms를 증가시켰다는 연구 또한 찾아볼 수 있었다<sup>15</sup>.

이에 연구자는 전 임상시험을 통해 항암효과, 면역증진효과, 항암제 및 방사선치료 부작용 감소효과 등을 보인 인삼 다당체가 암환자의 인체에 미치는 영향을 알아보고자 연구초기 단계로써 우선적으로 정상 성인 남자 군에 대해 어떠한 proteome의 변화가 나타나는지를 연구해보고자 하였다. 본 임상시험은 인삼 다당체의 경구투여가 혈장내 proteome 발현에 미치는 영향을 건강한 성인 남자군을 통해 알아보기 위한 연구로써, 2주간 인삼 다당체 투여의 유효성 및 안전성을 평가하는데 그 목표가 있다.

인삼 다당체의 투여 전후의 변화를 알아보기 위하여 21명의 지원자에게 무작위로 인삼 다당체 및 위약을 투여한 후 이 중 탈락한 2명을 제외한 19명의 지원자에게 인삼 다당체 및 위약 투여 전후에 혈액을 채취한 후 혈장을 분리하여 2D-gel 분석을 실시하였다. 주평가지수로 정의했던 프로테옴 변화 중 대조군과의 유의성 있는 차이가 있는 프로테옴의 발현을 기준으로 1개의 spot이 유의성 있는 증가( $p<0.05$ )를 보였다. 이는 Similar human albumin으로 밝혀졌으며 임상적으로 효과를 기대하기는 어려운 프로테옴이었다. 시험군과 대조군 각각에 있어서 약물투여 전후에 변화되는 spot들에 대하여도 정량적 분석을 실시한 결과 대조군에서는 발현의 차이에 유의성이 있는 spot이 발견되지 않았다.

시험 군에서는 단백질의 발현에 변화를 보인 11개의 spot을 찾아낸 후, 이 중 투여 전, 후 유의성 있는 변화( $p<0.05$ )를 보인 5개의 단백질을 단백질 동정을 통하여 확인하였다.

이 단백질은 SP 40, 40, Cytokeratin 9, hypothetical protein LOC 54932, apolipoprotein E, human albumin의 일종으로 확인되었으며, SP 40, 40, Cytokeratin 9, hypothetical protein LOC 54932, apolipoprotein E은 감소하였고, human albumin은 증가하였다.

SP 40, 40은 면역계 중 보체와 관계된 단백질이다<sup>23)</sup>. 최근의 연구에서는 glioma환자나 알츠하이머 환자의 뇌조직에서 clusterin의 일종으로 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다<sup>24,25)</sup>. 본 연구에서는 감소되는 결과를 보였다.

Cytokeratin 9은 상피세포의 cytoskeleton의 intermediate filament protein 군에 속해있으며, 손바닥이나 발바닥의 표피에서 뚜렷하게 나타나는 것으로 알려져 있다<sup>26)</sup>. 또한, 간암이나 난소암 같은 종양에서 발현이 증가되는 연구보고도 있다<sup>27,28)</sup>. 본 연구에서는 감소되는 결과를 보였다.

Hypothetical protein LOC54932는 정확한 기능이 없거나 적은 단백질로서 향후 많은 연구가 필요한 단백질의 일종이다<sup>29)</sup>. 본 연구에서는 감소되는 결과를 보였다.

Apolipoprotein E는 체내에서 다양한 기능을 담당하며, VLDL의 형태로 간에서 합성되며 지질대사에 관여하는 것으로 알려져 있고, 대략 20여개의 종류가 있으며, LDL oxidation, anti-inflammatory activity, inhibition of platelet aggregation에 관여하고, 여러 조절자에 의하여 억제와 활성에 조절되는데, 억제 조절자는 cAMP, interleukin-1, insulin, Lipoprotein lipase등이 있다<sup>30)</sup>. 또한, Apolipoprotein은 혈장과 중추신경계에서 lipid transport의 중요한 역할을 한다<sup>31)</sup>. 본 연구에서는 감소되는 결과를 보였다.

Similar human albumin은 세포의 구성 물질 중 하나로 수용성을 가지며 세포 및 조직에 존재하는 것으로 알려져 있다. 정상적인 경우 35-50 mg/ml가 존재하며, 21일의 반감기를 가지고 있으며, plasma 분석시 가장 많은 양이 존재한다. 본 연구에서는 증가되는 결과를 보였다.

안전성 검사에 있어서 시험군과 대조군 모두에 있어서 이화학적 검사 상 이상이 발생한 경우는 3례였다. 1례는 BUN 수치의 정상범주 이상 상승, 1례는 Urine 상 leukocyte 발생, 1례는 GPT 수치의 정상범주 이상 상승이 관찰되었고 이들은 모두 인삼 다당체 투여 군으로 맹검 해제 후 밝혀졌다. Leukocyte의 발생은 경도(1 positive)로 임상적으로 큰 문제가 되지 않고 또 요로감염 등 여러 상관인자의 관여를 의심할 수 있다. 각 1례씩의 BUN 및 ALT 수치의 정상범주 이상의 상승은 간장과 신장에 대한 독성을 고려해 볼 수 있으므로 향후 인삼 다당체의 투여 권장용량은 1일 4 g 미만으로 제한하는 것이 요구되어진다.

본 임상시험에 있어서의 한계는 전임상연구가 대부분 암 질환을 중심으로 이루어진데 반해 약리 역동적 영향 및 안전성에 대한 정보를 수집하기 위한 일환으로 질환 군을 대상으로 하지 않고 정상 성인 남자 군을 대상으로 한 점이다. 따라서 인삼 다당체의 투여가 질환 군에서 본 임상시험에서 보인 것과 같은 양상으로 나타날지는 미지수이다.

결론적으로 인삼 다당체의 투여는 대조군에 비해 혈장 내의 human albumin 1종의 단백질에 대한 유의한 증가를 보였다. 대조군에 있어서 복용 전과 후에 차이를 보인 spot의 발현은 보이지 않았으나, 인삼 다당체 투여군에 있어서 복용 전과 후에 pSP 40, 40, Cytokeratin 9, hypothetical protein LOC 54932, apolipoprotein E의 4종의 단백질에 대한 유의한 감소 및 human albumin 1종의 단백질에 대한 유의한 증가효과를 나타냈다. 또 안전성 검사에 있어서 일부 증례에서 간장과 신장의 손상이 발생하였다. 따라서 농도 의존적 유효성 및 안전성에 대한 근거화립을 위한 추가적인 dosage finding 임상시험이 뒤따라야 할 것으로 사료되며, 동시에 암환자에게 사용하기 위한 근거화보를 위해서는 향후 암환자에 대한 탐색 형 및 확증형 II상 임상시험이 요구되어지는 바이다.

## 참고문헌

- 송지영, 이세운, 정인성, 윤연숙. 인삼 다당체가 생쥐의 조혈 과정에 미치는 영향. 고려인삼학회지 25(2):63-27, 2001.
- Ahn, J.Y., Song, J.Y., Yun, Y.S., Jeong, G., Choi, I.S. Protection of Staphylococcus aureus-infected septic mice by suppression of early acute inflammation and enhanced antimicrobial activity by ginsan. FEMS Immunol Med Microbiol. 46(2):187-197, 2006.
- Ahn, J.Y., Choi, I.S., Shim, J.Y., Yun, E.K., Yun, Y.S., Jeong, G., Song, J.Y. The immunomodulator ginsan induces resistance to experimental sepsis by inhibiting Toll-like receptor-mediated inflammatory signals. Eur J Immunol. 36(1):37-45, 2006.
- Han, Y., Son, S.J., Akhalaia, M., Platonov, A., Son, H.J., Lee, K.H., Yun, Y.S., Song, J.Y. Modulation of radiation-induced disturbances of antioxidant defense systems by ginsan. Evid Based Complement Alternat Med. 2(4):529-536, 2005.
- Ivanova, T., Han, Y., Son, H.J., Yun, Y.S., Song, J.Y. Antimutagenic effect of polysaccharide ginsan extracted from Panax ginseng. Food Chem Toxicol. 44(4):517-521, 2006.
- Han, S.K., Song, J.Y., Yun, Y.S., Yi, S.Y. Ginsan improved Th1 immune response inhibited by gamma radiation. Arch Pharm Res. 28(3):343-350, 2005.
- Song, J.Y., Akhalaia, M., Platonov, A., Kim, H.D., Jung, I.S., Han, Y.S., Yun, Y.S. Effects of polysaccharide ginsan from Panax ginseng on liver function. Arch Pharm Res. 27(5):531-538, 2004.
- Song, J.Y., Han, S.K., Bae, K.G., Lim, D.S., Son, S.J., Jung, I.S., Yi, S.Y., Yun, Y.S. Radioprotective effects of ginsan, an immunomodulator. Radiat Res. 159(6):768-774, 2003.
- Shin, J.Y., Song, J.Y., Yun, Y.S., Yang, H.O., Rhee, D.K., Pyo, S. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of Panax ginseng on macrophage function.

- Immunopharmacol Immunotoxicol 24(3):469-482, 2002.
10. Song, J.Y., Han, S.K., Son, E.H., Pyo, S.N., Yun, Y.S., Yi, S.Y. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. Int Immunopharmacol 2(7):857-865, 2002.
  11. Kim, K.H., Lee, Y.S., Jung, I.S., Park, S.Y., Chung, H.Y., Lee, I.R., Yun, Y.S. Acidic polysaccharide from Panax ginseng, ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytokines and generates LAK cells in synergy with rIL-2. Planta Med. 64(2):110-115, 1998.
  12. Lee, Y.S., Chung, I.S., Lee, I.R., Kim, K.H., Hong, W.S., Yun, Y.S. Activation of multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunostimulator acidic polysaccharide ginsan isolated from Panax ginseng. Anticancer Res. 17(1A):323-331, 1997.
  13. 서정철, 이경립, 변준석, 김명수, 하일도, 허정걸, 임강현, 한상원. 한국인과 중국인에서 고려삼과 화기삼의 체표온도에 대한 이중맹검-무작위배점 임상시험. 대한본초학회지 18(2):71-86, 2003.
  14. 강태식. 자연산 산삼증유약침의 혈액주입 전,후 나타나는 혈장의 Proteom분석. 상지대 대학원 박사학위논문, 2005.
  15. Sarah Aldred, Tommaso Sozzi, Ian Mudway, Melissa M. Grant, Hendrik Neubert, Frank J. Kelly and Helen R. Griffiths. Alpha tocopherol supplementation elevates plasma apolipoprotein A1 isoforms in normal healthy subjects. Proteomics 1695: 1703, 2006.
  16. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 7: 248-254, 1976.
  17. Oakley, B.R., Kirsch, D.R., Morris, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 1: 361-363, 1980.
  18. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem. 1: 850-858, 1996.
  19. Kim, S.I., Kweon, S.M., Kim, E.A., Kim, J.Y., Kim, S., Yoo, J.S., Park, Y.M. Characterization of RNase-like major storage protein from the ginseng root by proteomic approach. Plant Physiol. 161(7):837-845, 2004.
  20. Kim, S.I., Kim, J.Y., Kim, E.A., Kwon, K.H., Kim, K.W., Cho, K., Lee, J.H., Nam, M.H., Yang, D.C., Yoo, J.S., Park, Y.M. Proteome analysis of hairy root from Panax ginseng C.A. Meyer using peptide fingerprinting, internal sequencing and expressed sequence tag data. Proteomics. 3(12):2379-2392, 2003.
  21. Nam, M.H., Heo, E.J., Kim, J.Y., Kim, S.I., Kwon, K.H., Seo, J.B., Kwon, O., Yoo, J.S., Park, Y.M. Proteome analysis of the responses of Panax ginseng C. A. Meyer leaves to high light: use of electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry and expressed sequence tag data. Proteomics. 3(12):2351-2367, 2003.
  22. Lum, J.H., Fung, K.L., Cheung, P.Y., Wong, M.S., Lee, C.H., Kwok, F.S., Leung, M.C., Hui, P.K. Hong Kong, China. Proteome of Oriental ginseng Panax ginseng C. A. Meyer and the potential to use it as an identification tool. Proteomics. 2(9):1123-1130, 2003.
  23. Louis Kirsbaum, Jennifer A. Sharpe, Brendan Murphy, Anthony J. F. d'Apice, Brendan Classon, Peter Hudson and Ian D. Walker, Molecular cloning and characterization of the novel,human complement-associated protein, SP-40, 40: a link between the complement and reproductive systems. The EMBO Journal. 8(3):711-718, 1989.
  24. Rudolf Schmits, bjorn cochlovius, gerhard treitz, evi regitz, ralf ketter, klaus-dieter preuss, bernd f.m. romeike and michael pereundschu. analysis of the antibody pepertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas, int. J. Cancer. 98: 73-77, 2002.
  25. McGeer, P.L., Kawamata, T., Walker, D.G. Distribution of clusterin in Alzheimer brain tissue. Brain Res. 579(2):337-341, 1992.
  26. Langbein, L., Heid, H.W., Moll, I., Franke, W.W. Molecular characterization of the body site-specific human epidermal cytokeratin 9: cDNA cloning, amino acid sequence, and tissue specificity of gene expression. Differentiation. 55(2):164, 1994.
  27. He, X.S., Zhang, S., Zhu, X.F., Ji, Y., Zeng, J.X., Ma, Y., Wang, D.P., Ju, W.Q., Wu, L.W., Li, Z., Huang, J.F. Zhonghua Wai Ke Za Zhi. Combined total hepatectomy, orthotopic liver transplantation and panreatoduodenectomy for resectable hilar bile duct carcinoma. Zhonghua Wai Ke Za Zhi. 44(5):302-305, 2006.
  28. Liu, B., Yang, J.L., Song, X., Huang, X., Kan, B., Qin, H., Wen, Y.J., Zhao, X., Wei, Y.Q. Screening tumor antigens of ovarian carcinoma by Western blot, immunoprecipitation, and mass spectrometry. Ai Zheng. 24(7):890-892, 2005.
  29. Saikatendu, K.S., Zhang, X., Kinch, L., Leybourne, M., Grishin, N.V., Zhang, H. Structure of a conserved hypothetical protein SA1388 from *S. aureus* reveals a capped hexameric toroid with two PII domain lids and a dinuclear metal center. BMC Struct Biol. 6: 27, 2006.
  30. Kirsty Greenow, Nigel, J., Pearce Dipak, P. Ramji. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis, J Mol Med. 83: 329-342, 2005.
  31. Hatters, D.M., Peters-Libeu, C.A., Weisgraber, K.H. Links Apolipoprotein E structure: insights into function.Trends

- Biochem Sci. 31(8):445-454, 2006.
32. N. Leigh Anderson and Norman G. Anderson, The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. Mol Cell Proteomics. 1(11):845-867, 2002.