

편평세포암 동물 모델에서 고려인삼잎-다당체(MB40)의 항암치료효과

고려대학교 의과대학 이비인후과학교실
주은정 · 최 준 · 정은재 · 홍석진 · 조재구
백승국 · 우정수 · 정광윤 · 권순영

= Abstract =

The Anti-tumor Effect of Polysaccharide from the Leaves of Panax Ginseng C.A. Meyer(MB40) in a Murine Squamous Cell Carcinoma Model

Eun Jung Joo, MD, Jun Choi, MD, Eun Jae Chung, MD, Seok Jin Hong, MD,
Jae Gu Cho, MD, Seung Kuk Baek, MD, Jeong Soo Woo, MD,
Kwang Yoon Jung, MD, Soon Young Kwon, MD

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Korea University College of Medicine., Seoul, Korea

Background and Objectives : Panax ginseng C.A. Meyer is a medical plant that has been widely utilized as a tonic and nutritional agent since ancient times in Korea. Ginseng has anti-metastatic property of cancer and immunomodulating activity. The novel acidic polysaccharide compound (MB40) was isolated from the leaves of Panax ginseng C.A. Meyer. To determine immunomodulating activities of MB40, we evaluate anti-cancer and anti-metastatic effects of MB40 in tumor bearing immune competent mice.

Material and Methods : C3H mice were divided into three equal groups (Cisplatin treatment group, MB40 treatment group, Cisplatin and MB40 treatment group) and were transplanted SCC (Squamous Cell Carcinoma) cells (2×10^6) to the lateral side of abdomen. From day 4 after transplantation, MB40 was administrated at dose of 10mg/kg, respectively, every other day by intratumoral injection. Cisplatin was systemically administrated at doses of 1mg/kg, respectively, every week by intraperitoneal injection.

Results : 5 days after administration, tumors can be palpated in every mice group. After 13 days of administration, the mice group to which MB40 were administrated exhibited reduction in tumor size respectively, compared to cisplatin group. Overall status of mice such as body weight and activity were superior in MB40 group than cisplatin group.

Conclusion : The result of this study indicates MB40 may have significant therapeutic effect and decreases complications induced by systemic chemotherapy. MB40 may be developed as a novel and potent immunotropics to improve the cell immune system and anti-cancer drug for the treatment of cancer patients in head and neck squamous cell carcinoma.

KEY WORDS : Polysaccharide · Leaves · Panax ginseng · Squamous cell carcinoma.

서 론

고려인삼은 한국에서 고대로부터 자양강장제로 널리 사용

교신저자 : 권순영, 425-707 경기도 안산시 단원구 고잔1동 516

고려대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (031) 412-5170 · 전송 : (031) 412-5174

E-mail : entkwon@chol.com

해운 약초로서, 노화억제, 항동맥경화 및 고지혈증의 개선,¹⁾ 방사선장애제거,²⁾ 고혈압과 악성종양의 위험성을 낮추는 등의 여러가지 치료효과가 보고되어져 왔다. 고려인삼은 또한 악성종양의 전이를 억제하며 면역체계의 조절에 관여한다고 알려져 왔는데,³⁻⁵⁾ 이러한 효과는 주로 고려인삼의 뿌리에서 추출하고 정제해낸 사포닌 계열의 산성 다당체에서 기인하

며,^{6,7)} 그 약리학적 특성은 현재에도 연구 중이다.

그러나 인삼에 대한 현재까지의 연구는 대부분 인삼의 뿌리에만 집중되어져 왔고 인삼 잎에 대한 연구는 확립되어 있지 않았다. 고려인삼잎-다당체(MB40)는 건조된 고려인삼 잎을 고도로 정제하고 발열성물질 및 내성독소 제거공정을 거쳐서 세계최초로 분리해낸 99.8% 이상의 순수 다당체로 이루어진 신물질로서 125,000Da의 분자량을 가지며, rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, glucose, galactose, galacturonic acid, glucuronic acid, 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid(KDO), docosahexaenoic acid(DHA) 등의 당으로 구성되어 있다.

인삼잎으로부터 추출된 MB40는 타다당류에는 존재하지 않는 희귀다당류를 다양하게 함유하고 있으며 기존 인삼 뿌리에서 추출된 다당체와는 다른 당 구성성분과 미세구조를 가지고 있어,⁷⁾ 인삼 뿌리와는 다른 기전의 면역학적 효과를 나타낼 것으로 생각되어져 왔다. 특히 MB40를 구성하는 KDO와 DHA는 그람음성균의 외층벽에서 발견되는 lipopolysaccharide(LPS)를 구성하는 당으로서,⁸⁾ LPS가 다양한 면역세포의 면역활성을 조절하는 강력한 인자임을 고려할 때 특이할 만한 사실이다. 세균에서 분리한 LPS는 일반적으로 강력한 면역활성을 유도하지만 생체 내에서 pyrogen으로 작용하여 매우 높은 독성을 보이기 때문에 인체 내에서의 사용은 불가능했다.⁹⁾ 그러나 MB40는 본 실험에 앞서 동물에서의 반복적인 기초 실험결과, 동물체내에서 전신적인 독성작용 없이 면역조절기능을 발휘하였고 이러한 특성은 MB40가 LPS의 비독성 등가물(non-toxic equivalent)임을 보여주며, 따라서 MB40가 기존의 면역항진제에 비교하여 인체에 독성작용 없이 우수한 약리작용을 나타낼 것으로 기대할 수 있다.

두경부 편평세포암 환자는 전신적인 또는 국소적인 면역기능이 저하되어 있으며, 암의 진행과 면역기능의 저하는 직접적인 상관관계가 있음이 밝혀져 있다.¹⁰⁾ 두경부 편평세포암종에 관련한 면역치료의 시도나 연구가 아직은 부족한 실정이지만, 다양한 생물학적 접근을 통하여 저하된 두경부암 환자의 면역기능을 자극할 수 있고 항진된 면역감시기능을 통하여 항암효과를 거둘 수 있을 또한 꾸준히 보고되고 있어 면역치료의 가능성을 짐작할 수 있다. 이에 저자들은 MB40의 항암작용을 확인하기 위하여 편평세포암 동물모델을 사용하여 MB40의 항암치료효과와 부작용을 알아보려 하였고, 또한 cisplatin 항암화학요법과의 상승작용에 대하여도 연구하고자 하였다. 이러한 연구를 통하여 새로운 항암면역치료제의 개발가능성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물과 편평세포암종 세포주

편평세포암종을 만들기 위하여 본 실험에 사용된 SCC 세

포주는 C3H/HeJ mouse에서 자연 발생한 편평세포암종으로부터 얻어진 세포주이다.¹²⁾ 편평상피암 세포는 RPMI(Rosewell Park Memorial Institute) 1640 배양액에 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 100 µg/ml penicillin과 streptomycin을 첨가한 뒤, 5% 이산화탄소가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포주는 trypsin/EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)를 이용하여 flask 바닥에서 떼어낸 뒤, trypsin blue dye 염색을 이용하여 생존해 있는 세포를 계수한 뒤 이후 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 동물은 암컷, 생후 5~6주령의 SPF(Specific Pathogen Free), syngeneic C3H/He 쥐(mouse)를 이용하였다.

2. 편평세포암종에 대한 항암작용과 항암화학요법과의 치료상승효과

C3H mouse 30마리를 3군(cisplatin 단독투여군, MB40 단독투여군, cisplatin과 MB40의 병합투여군)으로 분류하여 준비된 2×10^6 개의 SCC세포주를 mouse의 측복부에 피하주입한 후, 항암화학요법제인 cisplatin(Cisplan®, Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd., Korea)은 매주 1mg/kg의 농도로 3주간 복강 내 주사하였고, MB40은 10mg/kg의 농도로 암세포 이식 후 2일 간격으로 3주간 종양 내 주사하였다.

치료효과를 확인하기 위하여 종양의 크기 변화를 측정하였으며, 종양의 소멸이나 크기 감소는 주당 3회씩 caliper를 이용하여 종양의 직경 중 최장경과 그에 수직되는 직경을 측정하고 곱하여 종양의 단면적(mm^2)을 구하고, 이에 종양의 최장 높이를 곱하여 종양의 부피를 구하였다.

약물의 독성을 평가하기 위하여 개체의 체중과 운동성 변화 등의 전신상태를 관찰하였다. 체중의 측정은 세포주 주입 이후 2일 마다 시행하였으며 3군으로 나누어 그 차이를 비교하였다.

3. 자료분석 및 통계처리 방법

SPSS 11.0 프로그램을 사용하여 실험 자료를 분석하였다. Student t-test를 통하여 3군 간의 종양의 부피와 체중에 유의한 차이가 있는지 알아보았으며 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

SCC세포주 주입 5일째부터 모든 쥐에서 종양이 촉진되었다. 세포주입 13일째부터 MB40을 단독 혹은 병합 투여한 군이 cisplatin 단독투여 군에 비해 종양의 크기가 유의하게 감소하였다($p < 0.05$) (Fig. 1). 그러나 MB40을 단독투여한 군과 cisplatin 병합 투여한 군과의 유의한 차이는 보이지 않았다.

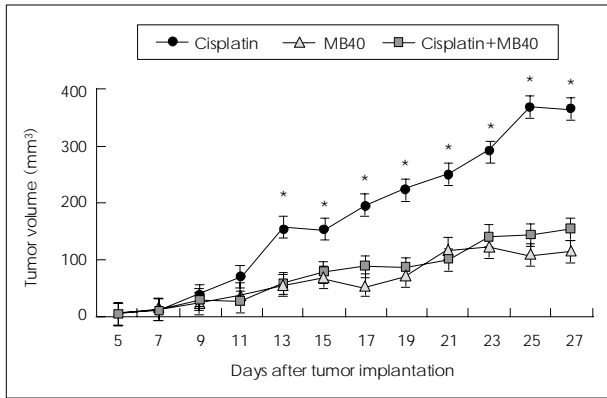


Fig. 1. Comparison of mean tumor volume between three groups. * : A significant difference statistically after day 13.

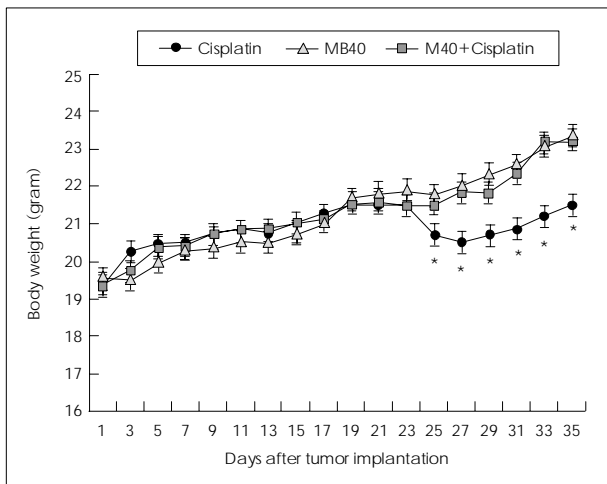


Fig. 2. Comparison of mean body weight between three groups. * : A significant difference statistically after day 25.

MB40을 단독 혹은 병합투여한 군에서는 세포주입 이후에 지속적인 개체의 체중 증가를 관찰할 수 있었으나, cisplatin 단독투여 군에서는 세포주입 25일째부터 개체의 체중이 다른 군과 비교하여 유의하게 감소함을 알 수 있었다($p < 0.05$) (Fig. 2). 즉 MB40을 단독 혹은 병합투여한 군에서는 cisplatin 단독투여 군에서 보였던 실험동물의 체중감소나 운동성 저하와 같은 전신성 부작용 없이 정상적인 운동성과 정상 쥐 정도의 체중을 회복하는 등 전신상태가 양호했다.

Cisplatin 단독투여 군의 개체 체중은 세포주입 25일째 이후부터 다른 군과 일정한 차이를 보이며 체중 증가양상이 둔화되며, 점차 양군의 차이가 증가하는 양상을 나타내었다. 또한 체중의 감소를 보임과 동시에 개체의 운동성 감소소견을 나타내었다.

고 찰

수술 술기의 많은 발전과 새로운 화학치료 약제의 개발, 새로이 개발된 여러 방사선 치료기법에도 불구하고 지난 30년 간 두경부암 환자의 치료 성공율이나 생존율의 향상이

미미한 것이 현실의 실정이다. 치료의 실패는 이차 중복암 또는 일차 치료 이후의 국소재발, 전신전이 등에 기인하며, 대부분의 국소재발이나 전신전이는 현재의 기술로서는 발견하기 어려운 미세잔존암 때문으로 해석할 수 있다. 기존 치료의 한계를 극복하기 위한 여러 새로운 시도 중 하나인 항암면역치료는 정상조직에는 해를 미치지 않고 선택적으로 암세포만을 공격할 수 있다. 또한 마지막 남은 하나의 암세포까지도 제거할 수 있으며 면역기억반응에 의하여 암의 재발을 방지할 수 있다는 이론적인 장점을 기대할 수 있다.

두경부영역의 악성종양은 대부분 편평세포암종이므로 편평세포암 동물모델은 이비인후과 영역에서는 특히 중요하다 할 수 있다. 본 실험에 사용된 쥐(C3H mouse)는 동종(syngeneic)이면서 면역기능이 유지(immunocompetent)되어 있어 면역치료의 가능성을 검증하기 위한 적절한 실험 동물이라 생각된다.¹¹⁾

저자들은 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 잎에서 분리하고 정제하는데 성공한 다당체 신물질(MB40)을 이용하여 쥐의 편평상피암 모델에서 항암치료효과를 확인해보려 하였다. MB40과 같이 고려인삼에서 추출한 다당체(polysaccharide)들은 자연살해(natural killer) T세포, 큰포식세포(macrophage)와 같은 면역세포의 항진작용과 인터페론, 인터류킨, GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)와 같은 항암 사이토카인의 발현을 통하여 선천면역(innate immunity)기능 향진을 유도하는 것으로 알려져 있는데,^{3-5,12,13)} 이러한 선천면역 항진작용을 이용한 새로운 항암치료제로서의 가능성을 밝히기 위한 연구가 다양한 암종과 육종을 대상으로 동물실험을 진행 중이며, 그 가능성이 보고되고 있는 실정이다.

그동안의 연구 결과에 따르면 MB40과 같이 고려인삼에서 추출한 다당체(polysaccharide)들의 항암작용은 직접적인 암세포의 파괴에 의한 것이 아니라, 다당체에 의한 지속적인 암세포 억제인자의 발현에 의한 것으로 생각되어 진다.

MB40을 포함하여 고려인삼에서 추출한 물질들은 생체내 면역세포를 활성화 시키는데, 면역활성의 조절에 중요한 역할을 하는 자연살해 T세포가 T세포 중에서 우선 활성화되며, 이후에 자연살해세포, 수지상세포(dendritic cell), 큰포식세포가 활성화된다.^{12,13)} 이러한 면역세포 활성화에 대한 가장 직접적인 지표로서 자연살해세포와 자연살해 T세포의 경우에 초기 활성화 표식자이며, 림프구 활성화의 지표인 CD69의 세포 표면 발현의 증가를 관찰할 수 있다. MB40을 투여한 실험군의 장기에서 CD69와 함께 MHC classII의 발현이 또한 증가되어 있는 것이 보고되어지고 있으며, 이러한 실험결과는 MB40이 가지는 다양한 약리현상들이 생체내 면역세포의 활성화에 의해 직접적으로 유도되는 것임을 시

사한다. 이러한 약리작용으로 MB40는 자연살해 T세포와 자연살해세포에 작용하고 또한 궁극적으로 큰포식세포와 수지상세포에까지 영향을 준다는 연구가 진행되고 있다.

이러한 면역활성화 기전을 통해 MB40는 편평세포암세포에서도 효과적으로 암종의 성장을 억제할 수 있음을 본 실험에서도 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 자연살해 T세포가 mouse에서 암의 간과 폐전이를 억제하는데 중요한 작용세포임을 확인한 Hashimoto 등¹⁴⁾과 Anzai 등¹⁵⁾의 실험결과와 일치하며, 또한 자연살해세포, 큰포식세포와 같은 면역세포의 활성화를 통하여 암세포의 성장과 암세포 전이를 효과적으로 억제할 수 있음을 보고한 Herberman 등¹⁶⁾의 실험결과와도 일치하는 사실을 보여준다.

지금까지의 MB40의 작용기전에 대한 연구결과를 정리하면, MB40는 면역력이 정상인 생체내에서는 단독적인 면역세포 활성화를 통하여 활성화된 자연살해 T세포를 포함하는 각각의 면역세포에서 분비된 IFN- γ (interferon- γ), TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-1 (interleukin-1)과 같은 사이토카인들이 항암효과를 나타내는 것으로 정리할 수 있다.

본 실험에서 MB40를 주입한 군에서는 cisplatin의 투여여부와 관계없이 통계적으로 유의하게 종양의 부피가 감소함을 알 수 있어 MB40제제의 항암작용을 확인할 수 있었으나, cisplatin과의 병합요법에 따른 치료효과 상승작용은 기대와 달리 얻을 수가 없었다. 따라서 MB40 제제와 cisplatin을 비롯한 기존의 항암화학요법제제와의 상승작용에 대하여는 추후에 좀더 연구가 필요할 것으로 생각된다.

또한 MB40를 주입한 군에서는 cisplatin을 주입한 군에서 관찰되는 개체의 체중감소와 운동성 감소를 관찰할 수 없었고, 또한 cisplatin을 주입한 군의 체중감소 효과를 감소시켜주어서 MB40를 단독으로 주입한 군에서와 통계적으로 차이가 없는 체중의 증가양상을 나타내었다. 이는 MB40제제가 그 자체로 전신독성이 없음을 보여주는 결과일 뿐만 아니라, MB40의 cisplatin 독성을 감소 효과를 보여주는 것으로 이 결과에 대하여도 향후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서 신물질인 MB40는 편평세포암에 대해 우수한 항암효과를 보였으며 기존의 항암화학제제인 cisplatin과의 병합요법에 의한 치료효과의 상승작용은 없는 것으로 생각된다. 또한 MB40는 최소한의 전신 부작용을 나타내며 cisplatin에 의한 전신 부작용을 완화시켜 주는 것으로 생각된다.

중심 단어 : 다당체 · 잎 · 고려인삼 · 편평세포암.

References

- 1) Li J, Huang M, Teoh H, Man RY. *Panax quinquefolium saponins protects low density lipoproteins from oxidation. Life Sci.* 1999; 64:53-62.
- 2) Xie FY, Zeng ZF, Huang HY. *Clinical observation on nasopharyngeal carcinoma treated with combined therapy of radiotherapy and ginseng polysaccharide injection. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2001;21:332-334.
- 3) Smolina TP, Solov'eva TF, Besednova NN. *Immunotropic activity of panaxans-bioglycans isolated from ginseng. Antibiot Khimioter.* 2001;46:19-22.
- 4) Popov AM, Atopkina LN, Uvarova NI, Elyakov GB. *The antitastatic and immunomodulating activities of ginseng minor glycosides. Dokl Biochem Biophys.* 2001;380:309-312.
- 5) Sung H, Kang SM, Lee MS, Kim TG, Cho YK. *Korean red ginseng slows depletion of CD4 T cells in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12: 497-501.
- 6) Yoshikawa M, Morikawa T, Kashima Y, Ninomiya K, Matsuda H. *Structures of new dammarane-type Triterpene Saponins from the flower buds of Panax notoginseng and hepatoprotective effects of principal Ginseng Saponins. J Nat Prod.* 2003;66:922-927.
- 7) Yoshikawa M, Morikawa T, Yashiro K, Murakami T, Matsuda H. *Bioactive saponins and glycosides. XIX. Notoginseng (3): Immunological adjuvant activity of notoginsenosides and related saponins: Structures of notoginsenosides-L, -M, and -N from the roots of Panax notoginseng (Burk.) F.H. Chen. Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2001;49:1452-1456.
- 8) Vinogradov EV, Muller-Loennies S, Petersen BO, Meshkov S, Thomas-Oates JE, Holst O, et al. *Structural investigation of the lipopolysaccharide from Acinetobacter haemolyticus strain NCTC 10305 (ATCC 17906, DNA group 4). Eur J Biochem.* 1997;247: 82-90.
- 9) Louis JA, Chiller JM, Weigle WO. *The ability of bacterial lipopolysaccharide to modulate the induction of unresponsiveness to a state of immunity. Cellular parameters. J Exp Med.* 1973;138: 1481-1495.
- 10) Letessier EM, Sacchi M, Johnson JT, Herberman RB, Whiteside TL. *The absence of lymphoid suppressor cells in tumor-involved lymph nodes of patients with head and neck cancer. Cell Immunol.* 1990;130:446-458.
- 11) O'Malley BW Jr, Cope KA, Johnson CS, Schwartz MR. *A new immunocompetent murine model for oral cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;123:20-24.
- 12) Lee YS, Chung IS, Lee IR, Kim KH, Hong WS, Yun YS. *Activation of multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunostimulator acidic polysaccharide ginsan isolated from Panax ginseng. Anticancer Res.* 1997;17:323-331
- 13) Attele AS, Wu JA, Yuan CS. *Ginseng pharmacology: Multiple constituents and multiple actions. Biochem Pharmacol.* 1999;58: 1685-1693.

- 14) Hashimoto W, Takeda K, Anzai R, Ogasawara K, Sakihara H, Sugiura K. Cytotoxic NK1.1 Ag+ alpha beta T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. *J Immunol.* 1995; 154:4333-4340.
- 15) Anzai R, Hashimoto W, Sugiura K, Takahashi M, Satoh M, Kumagai K. Liver NK1.1+ CD4+ alpha beta T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. *J Immunol.* 1996;156:3366-3373.
- 16) Herberman RB. Possible role of natural killer cells and other effector cells in immune surveillance against cancer. *J Invest Dermatol.* 1984;83 (Suppl):137-140