

A549 암세포 기인성 종양에 대한 18 β -Glycyrrhetic Acid의 항종양효과

김하얀 · 김송이 · 이주희 · 한용문[#]

동덕여자대학교 약학대학 면역미생물학교실

(Received September 28, 2010; Revised December 8, 2010; Accepted December 13, 2010)

Antitumor Effect of 18 β -Glycyrrhetic Acid against Human Tumor Xenografts Caused by A549 Cancer Cell

Hayan Kim, Song-Yi Kim, Jue-Hee Lee and Yongmoon Han[#]

Department of ImmunoMicrobiology, College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract — Many reports indicate that 18 β -glycyrrhetic acid (18 β -GA) from Glycyrrhizae Radix has anti-inflammatory and immunoregulatory activities, whereas reports regarding anticancer activity of the compound are few. In present study, we investigated antitumor effect of 18 β -GA on tumor caused by A549 cancer cell in mice. Data resulting from the cytotoxicity assay showed that 18 β -GA caused killing of A549 cells. LD₅₀ values of 18 β -GA were app. 180 μ M and 80 μ M, corresponding to 48 hr- and 72 hr-treatments, displaying that the killing activity was more effective as the 18 β -GA treatment was prolonged. Based on these data, antitumor effect of 18 β -GA was tested in nude mice. For induction of the tumor, A549 (3×10^6 cells/mouse) was injected subcutaneously into the lateral abdomen of nude mice (Balb/c nu/nu). To determine the antitumor effect, nude mice with tumor were given 18 β -GA (1 mg/200 μ l/mouse) intraperitoneally every three days for four times. Tumor-sizes were measured with a caliper for a period of 24 days. Results showed that the 18 β -GA treatment reduced the tumor-sizes ($P < 0.05$) as compared with negative control nude mice that received diluent (DPBS). The reduction degree was greater than reduction degree by doxorubicin (60 μ g/mouse), and the pattern of reduction was almost sustained during the entire period of the observation. In conclusion, our studies demonstrate that 18 β -GA has antitumor activity to the A549 cancer cell-caused tumor.

Keywords □ 18 β -GA, A549, antitumor effect, nude mice, doxorubicin

최근에 들어서 난치병 치료를 위해 약용식물을 적용하는 경우가 빈번해지고 있다. 이미 서지학적으로 알려진 약용식물의 효능을 임상에 응용하는 것이 매우 보편적인 것으로 간주되고 있지만, 이들 식물에서 분리된 각 단일성분의 구체적인 약물효능에 대한 체계적 연구가 시작하게 된 때는 그리 오래 전의 일이 아니다. 그래서 새로운 성분의 발견도 중요하겠으나, 이미 규명된 성분의 난치병에 대한 효과를 규명하는 연구도 이에 못지않게 중요한 것으로 인식된다. 이런 관점에서 본 연구실에서는, 동양의학에서 빈도가 높게 사용되고 있는 감초(Glycyrrhizae Radix, A Family of Leguminosae)에 대해 집중적인 연구를 진행해 오고 있다.

감초는 고대 그리스나 로마제국 시절부터 많이 사용된 약초로 기록 돼있다.¹⁾ 오늘날에는 아시아, 유럽, 중동 등에서 널리 재배

되고 있으며 식품산업 분야에서는 감미료로 사용되고 있다.²⁾ 이처럼 수세기 동안 약품과 식품으로 사용되어온 감초는 청열해독(熱解毒)의 효과가 있는 약재로서, 염증성 질환과 진해, 거담, 해독 등의 효능과³⁾ 항산화효과,⁴⁾ 간보호효과⁵⁾ 등이 알려져 있다.

감초에는 다양한 성분이 함유되어 있다. 그 중에서 지표성분으로 알려진 glycyrrhizin은 β -amyrin 계열에 속하는 pentacyclic triterpene 배당체로서 비당부분(aglycone)인 18 β -glycyrrhetic acid(Fig. 1)와 이 모핵의 C-3 위치에 2분자의 glucuronic acid로 구성 되어 있다. 18 β -GA의 주요 약물학적 효능은 항궤양, 항간독성 등의 항염증효과와 면역조절효과 등의 생리활성에 대한 보고가 있다.⁶⁻⁸⁾ 본 연구실의 기 연구에서는 18 β -GA의 항 감염성 관절염에 효과와⁹⁾ 항체생성을 증진하는 면역보조제로써의 효과를¹⁰⁾ 보고한 바 있다. 이 연구결과의 주요점은 18 β -GA의 농도 조절에 따라서 T lymphocyte의 증식억제효과가 있고, 초기 면역력 발현에 의한 CD4+T helper cell 분화에 따른 Th1과 Th2 면역반응 유도성의 조절이 가능하다는 것이다.^{9,10)} 즉, 암의 억제

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-940-4521 (팩스) 02-940-4195
(E-mail) ymhan@dongduk.ac.kr

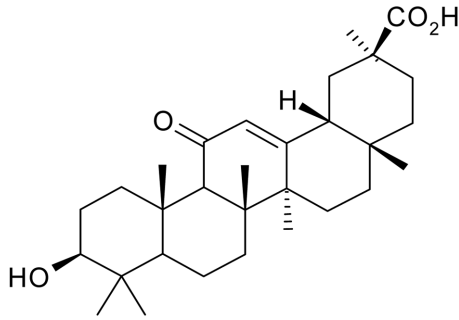


Fig. 1 – Chemical structure of 18 β -glycyrrhetic acid (18 β -GA).

에는 세포매개성 면역반응을 유도하는 Th1 성이 유리하기 때문에, 18 β -GA의 Th1/Th2의 면역반응조절의 구체적인 기전을 규명한다면 암 치료를 효과적으로 증진시킬 것으로 추정된다.^{11,12)} 이에 수반하는 연구의 일환으로 본 연구에서는 우선 18 β -GA의 암세포에 대한 효능을 조사하였다.

Glycyrrhizin의 비당부인 18 β -GA의 항암효과에 대한 연구보고는 극소수에 불과하다. 최초의 18 β -GA의 항암효과에 대한 보고에 의하면, 이 성분은 B16 melanoma 세포에 독성효과가 있다는 것이다. 이를 효시로 하여,¹³⁾ 독성 화학물질인 TPA(tetradecanoylphorbol-13-acetate)로 유발된 암세포에 대한 증식억제효과와^{14,15)} 백혈병세포인 HL60 암세포의 세포사멸(apoptosis) 유도에 의한 항암효과가 보고된바 있다.¹⁶⁾ 그러나 암세포를 생체 내에 이식하여 종양을 형성시킨 후에 18 β -GA의 치료효과에 대한 연구결과는 문헌고찰에 의하면 현재까지 없었다.

이에 본 연구에서는 A549(human lung adenocarcinoma) 암세포를 nude mice에 접종하는 소위 이종이식(xenograft transfer) 방법으로 생쥐의 생체에서 형성된 종양에 대한 18 β -GA의 항암효과를 검색하였다. 먼저, 약물(18 β -GA)과 암세포간의 상호접촉의 지속성(sustainability)에 따른 효능을 규명하기 위해서, 동일 용량에서 18 β -GA를 A549 암세포에 투여 한 후에 처리기간의 차이에 따른 이 성분의 세포독성효과의 유효성 차이점을 조사하였다. 그리고 다양한 18 β -GA 농도 하에서 생성된 이 성분의 세포독성효과를 비교 분석하여 LD₅₀을 산출하였다. 이 결과를 동일한 측정조건에서 산출된 기존의 항암제인 doxorubicin(=Adriamycin)의 세포독성효과와 비교하여 18 β -GA의 유효성 정도를 평가하였다. 이 평가결과를 바탕으로 하여 상기에 언급한 바와 같이 A549 암세포로 형성된 종양에 18 β -GA의 *in-vivo* 항종양효과(antitumor effect)를 검색하였다.

재료 및 실험방법

실험동물

본 실험에 사용된 생쥐는 대략 6~7 주령의 nude mice(Balb/

c nu/nu; Orient Inc.-Charles River Lab, Seoul)를 사용하였다. 구입된 생쥐는 멸균된 filter-top cage에서 멸균된 물과 사료를 자유롭게 먹게 하고, 온도 20±2°C, 습도 50±10%의 실험실 환경에서 1주일간 적응시킨 후 실험하였다. 모든 실험에 사용된 동물은 동덕여자대학교 동물관리규정에 따라 관리하였다.

18 β -glycyrrhetic acid (18 β -GA)

18 β -GA는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 실험에 사용하기 위해서 DPBS(Dulbecco's phosphate saline solution; Sigma)에 용해한 다음에 여과멸균(pore size=0.2 μ m; Sartorius Stedim Biotech., Germany)하여 사용하였다. 한편, 18 β -GA에 endotoxin 오염 가능성을 확인하기 위해서 LAL (Limulus Ameobocyte Lysate) 시험 Kit을 Sigma에서 구입하여 18 β -GA를 실험에 사용하기 전에 검색하였다. 이 검색결과 구입한 18 β -GA에는 endotoxin 오염은 없는 것으로 판정되었다. 또한, 18 β -GA 내의 균의 오염 가능성을 조사하기 위해 blood agar 배지를 사용하여 검색한 후에 본 실험에 사용하였다.

A549 암세포주와 배양조건

A549(Human Lung carcinoma)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul)에서 분양받아 본 실험에 사용하였다. 세포배양을 위해 RPMI1640 기본배지에 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum(FBS; welGENE Inc, Seoul), 1% penicillin/streptomycin(Sigma)을 첨가하여 사용하였으며, 세포수효 측정은 Trypan blue 용액과 혼합한 후에 hemocytometer(Mariefeld, Germany)를 사용하여 측정하였다. 본 실험에서는 95% 이상의 생존율이 있는 경우에만 사용하였다.

18 β -GA의 A549에 대한 세포독성 검색

본 연구실의 기 연구에서^{10,17-19)} 세포독성을 측정하는 방법을 사용하여, 18 β -GA의 A549 암세포에 대한 세포독성효과는 CCK-8(Cell Counting Kit-8, Dojindo Lab., Japan) assay 방법을 이용하여 측정하였다. CCK-8 reagent는 살아있는 세포의 탈수소효소의 활성에 따라 수용성의 오렌지색 fromazan이 형성되고, 이를 파장 450 nm 흡광도에서 측정하여 살아있는 세포의 생존율을 측정하는 방법이다. 이 방법을 적용하여 A549 암세포의 생사 여부를 측정하여 18 β -GA의 효과를 검색하였다. 실험방법은, 상기 언급한 배양조건에서 배양한 A-549(human lung carcinoma cell line)를 원심분리방법으로 세척하고 적정한 수효의 세포수가 되도록 serum free RPMI culture medium(welGENE Inc)로 희석하여 준비하였다. 준비된 A549 암세포를 96-well flat bottom plate(Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)에 각각 1×10⁴ cells/well이 되도록 분주한 후에 37°C, 5%-CO₂ 배양기에서 48시간 또는 72시간 배양하였다. 배양한 A549 암세포에 다양한 농도(12.5,

25, 50, 100, 150, 200, 및 250 μM)의 18β-GA를 첨가하고 37°C-5% CO₂ 배양기에서 48시간 추가 배양한 다음에 CCK-8 용액을 각 well에 10 μl씩 넣고 동일한 배양조건에서 3시간 추가 배양하였다. 추가배양 후에 ELISA microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. A549에 대한 18β-GA의 효과는 음성대조군(18β-GA로 처리되지 않은 A549)의 흡광도를 100%로 기준하여 상대적인 세포생존율(%)로 평가하였다.

타 실험에서는 18β-GA의 농도를 20 μM씩 세분하여 이때의 A549에 대한 세포독성효과를 1 μM의 doxorubicin 농도로 처리된 A549 증식억제효과와 비교하여, 현재 임상에서 사용하는 항암제인 doxorubicin과의 효능정도를 분석평가 하였다. 이를 위한 실험방법 및 분석은 상기에 기술한 동일한 방법을 사용하였으며 이때의 약물의 처리기간은 72시간을 선택하였다.

18β-GA의 항종양효과 검색

18β-GA의 항종양효과를 확인하기 위하여 타 연구자가 제시한 방법을^{20,21)} 사용하여 조사하였다. 실험조작 과정은 다음과 같다. 10% heat-inactivated FBS와 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 RPMI 1640 배지에 배양한 A549 암세포를 수집해서 serum-free RPMI로 세척하고, 이어서 DPBS로 2번 더 세척하였다. Trypan blue exclusion 방법으로 세포생존율이 90% 이상임을 확인하고, 8주령의 암컷 nude mice(Balb/c nu/nu)의 복부 측면(lateral abdomen) 부위에 A549 암세포를(3×10^6 cells/200 μl/mouse) 피하로 주사하였다(Day 0). 이와 같이 A549 암세포를 이 종이식하고 24시간 후에 18β-GA(1 mg/mouse)를 복강으로 주사하였다. 18β-GA 치료는 3일 간격으로 총 4회 투여하였다(Day 1, 4, 7, 10). 동일한 투여경로 및 투여회수에 따라 음성대조군 생쥐그룹에는 DPBS를 주입하였고 양성대조군 생쥐그룹에는 doxorubicin(Sigma)을 60 μg/mouse 농도로 투여하였다. 이 doxorubicin의 용량은 타 연구자의 연구결과를 근거로 하였다.²²⁾ 종양의 크기는 caliper(Mitutoyo, Japan)를 사용하여 길이(Length, L)와 너비(Width, W)를 3일에 한 번씩 측정하였고, 종양의 부피(mm³)는 $L \times W^2 / 2$ 으로 계산하여 각 실험군 별로 평균을 내었다.

통계 처리

실험결과는 평균±표준오차(Mean±S.E.)로 계산하였다. 각 군간의 유의성 검증은 Student's *t*-test를 사용하였고 값이 5% 미만일 때에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

18β-GA의 세포독성효과

감초의 주성분인 glycyrrhizin의 비당부인 18β-GA의 A549 암

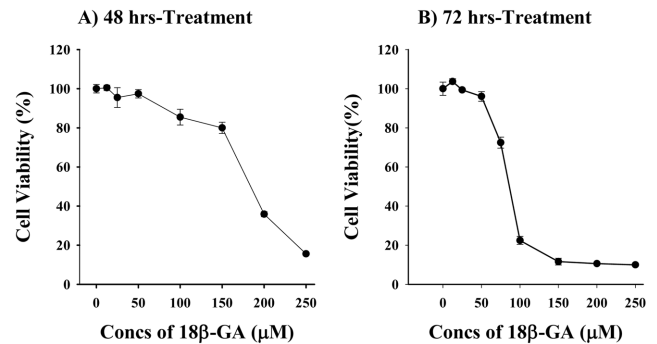


Fig. 2 – 18β-GA causes killing of A549 cancer cells by dose-dependent manner. The cancer cells mixed with 18β-GA were incubated for 48 or 72 hrs. Results showed that the compound inhibited proliferation of the cancer cells, and that the inhibitory activity appeared to be more efficient when the 18β-GA treatment was prolonged. For instance, at a dose of 18β-GA at 100 μM, there was app. 65% inhibitory difference between 48 hr- and 72 hr-incubations ($P < 0.05$). Over all, resulting LD₅₀ values from this experiment were app. 180 μM and 80 μM corresponding to 48 hr- and 72 hr-treatments, respectively ($P < 0.05$). Thus, these data suggest that longer contact of the compound to the cancer cells may be an important factor to control the proliferation. Bar indicates SE.

세포 증식에 대한 효과를 먼저 검색하였다. 사용한 18β-GA 농도는 12.5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 μM 이었고, A549 증식억제효과는 이 성분으로 48시간 또는 72시간 처리한 다음에 CCK-8 용액을 사용하여 측정하였다. 실험결과에서 18β-GA로 48시간 처리한 경우, 50 μM까지의 저농도에서는 거의 세포독성효과가 없는 반면에 100 μM에서 150 μM의 범주에서는 약 20% 정도의 세포독성효과가 있었고 200 μM과 250 μM의 농도에서는 각각 63%와 82%의 세포독성효과가 검색되었다(Fig. 2A). 이 결과를 분석하면 LD₅₀은 약 180 μM로 측정되었다. 그러나 24시간 더 처리한 경우(총 72시간 처리)에서는, 50 μM 이후에 급격한 세포독성이 유발되어서 100 μM 이상의 18β-GA 농도에서 거의 90%에 근접하는 증식억제효과가 검색되었다. 이때의 LD₅₀은 약 80 μM로 측정되었다(Fig. 2B). 이 결과를 고찰해볼 때, 18β-GA의 세포독성효과는 48시간 처리(48 hrs-treatment) 보다는 72시간 처리 시 월등하게 효과적임을 알 수가 있다. 각 경우의 LD₅₀을 비교해보면 거의 100 μM 정도의 차이가 있어서 A549 암세포와 18β-GA간의 상호작용기간이 길수록 세포독성효과가 증진됨을 알 수가 있다. 일례로, 두 경우에서 200 μM의 18β-GA를 기준으로 하여 음성대조군 18β-GA로 처리되지 않은 그룹과 비교하면 통계적으로도 유의성($P < 0.05$)이 있음을 알 수 있었다.

18β-GA와 doxorubicin의 A549 세포독성효과 비교

18β-GA의 A549 암세포에 대한 세포독성효과를 비교하기 위해서 임상에서 사용되는 기존의 항암제인 doxorubicin을 선택하여

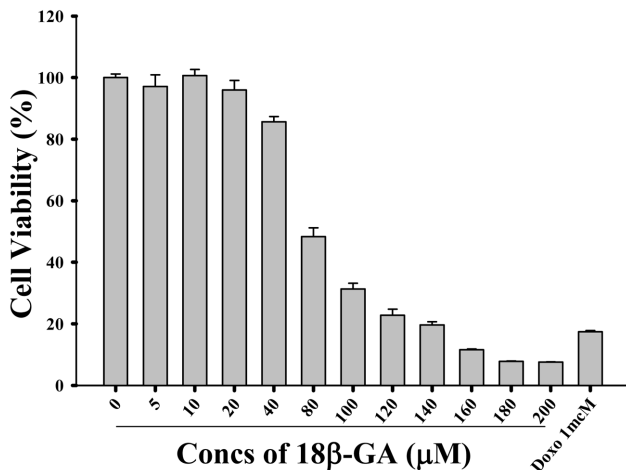


Fig. 3 – The efficacy of 18β-GA efficacy at 150 μM appears to be equivalent to efficacy of doxorubicin at 1 μM, *in vitro*. The cytotoxicity of 18β-GA at various doses was measured, which was compared with cytotoxicity of doxorubicin. The 18β-GA killed A549 cancer cells in dose-dependent manner, and there was more than 90% killing of the cancer cells as compared with 18β-GA-untreated (control) cancer cells ($P < 0.05$). However, the 18β-GA efficacy was observed to be 150 times less than A549 cancer cell. Note that the LD₅₀ values observed from this experiment were almost identical to LD₅₀ values shown in Fig. 2B. Bar indicates SE.

그 효과를 비교하였다. 이 실험에서는 Fig. 2에서 사용한 18β-GA의 농도보다 더 세분하여 doxorubicin 1 μM 농도 시의 A549에 대한 세포독성효과와 비교하였다. 이 실험결과, 기존의 항암제인 doxorubicin의 항암효과와 비교해 볼 때, 1 μM doxorubicin의 항암효과는 대략 82%의 A549 암세포의 증식을 억제하였는데, 이 억제효과는 효과는 18β-GA의 140 μM에서 160 μM 범주의 농도에 속하는 것으로 검색되었다(Fig. 3). 반복 실험에서도 유사한 결과가 검색되었다. 한편, 이 실험에서도 18β-GA의 LD₅₀은 약 80 μM로 측정되어 Fig. 2B의 결과를 재확인 할 수 있었다(Fig. 3).

18β-GA의 동물모델에서의 항종양효과

18β-GA의 동물모델에서 항종양효과를 확인하기 위하여, 암컷 nude mice(Balb/c nu/nu)에 A549 암세포를 피하로 주사한 후, 18β-GA(1 mg/time/mouse) 또는 doxorubicin(50 μg/time/mouse)을 복강으로 3일 간격으로 총 4회 투여한 다음에 종양의 크기를 음성대조군의 생쥐그룹에서 형성된 종양의 크기와 비교하였다. 분석결과, 18β-GA 또는 doxorubicin을 3회 투여하고 하루 후인 Day 8에 종양의 크기를 음성대조군의 경우와 비교해 볼 때, 각각 53%, 42%의 종양의 크기가 감소되었으며($P < 0.05$), 마지막(4회) 약물을 투여하고 7일 후인 Day 15일에도 상기의 종양 크기 감소율과 유사한 비율로 종양형성의 억제효과가 검색되었

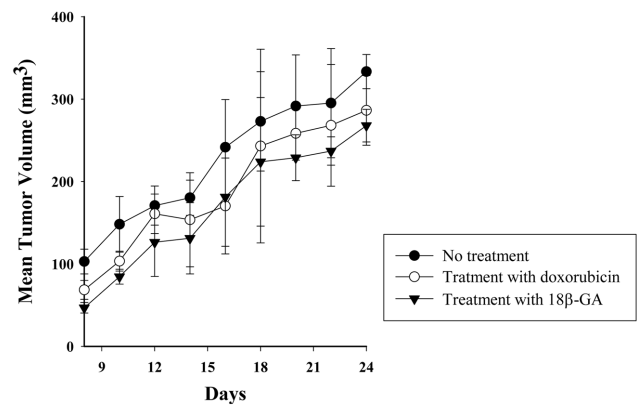


Fig. 4 – 18β-GA has antitumor activity against A549-caused tumors. The 18β-GA treatment reduced the tumor-size as compared with negative control mice groups that received no 18β-GA. Difference between the two groups is statistically significant ($P < 0.05$). The antitumor effect by 18β-GA (1 mg/time/mouse) reveals more effective than antitumor activity by doxorubicin (60 μg/time/mouse). This experiment was repeated three times. Bar indicates SE.

다. 이러한 유형은 관측 24일째까지 지속되었지만 음성대조군의 경우는 물론이고 doxorubicin을 투여 받은 생쥐그룹이나 18β-GA를 투여한 실험생쥐그룹에서 종양크기는 지속적으로 증가하였다. 이로보아 각 관찰일자에서 18β-GA는 doxorubicin에 비해서 더 높은 항종양효과 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 4). 즉, 60 μg/dose에서 doxorubicin의 항종양효과는 1 mg 18β-GA/dose의 항종양효과보다 낮은 것으로 검색되어서 용량적으로 두 약물을 비교해보면 4배 용량의 18β-GA가 doxorubicin의 항종양효과보다 다소 우세한 것으로 평가되었다.

고찰 및 결론

감초에 함유된 주요성분인 18β-GA에 대한 다양한 약물학적 효과—주로 항염증효과와 면역보조효과—가 많이 보고되고 있지만, 18β-GA의 암세포에 대해 알려진 효과는 많지 않다. 이미 서론에서 언급하였듯이, 18β-GA는 B16 melanoma 암세포 항암효과가 있다¹³⁾는 연구보고를 효시로 하여, 독성 화학물질인 TPA로 유발된 암세포에 대한 증식억제효과,^{14,15)} 그리고 백혈병세포인 HL60 암세포의 세포사멸(apoptosis) 유도에 의한 항암효과 등이 보고된바 있다.¹⁶⁾ 또한 이 성분의 암세포에 대한 연구도 대부분이 *in-vitro* 상의 연구이고, 인체에 근접할 수 있는 동물모델을 사용하여 18β-GA의 항암효과를 연구 조사한 보고는 거의 전무한 것으로 사료되었다. 더욱이 암세포의 이종이식(xenograft transfer)으로 형성된 종양에 대한 18β-GA의 효과에 관한 연구 결과는 보고된 바가 없어서, 임상적인 측면에 적용이 가능한 항암효과에 대한 연구결과는 빈약하다. 이에 본 연구에서는 폐렴

암세포인 A549를 이용하여 이종이식으로 형성된 암종양에 대한 18β-GA의 항암효과를 검색하였다. A549를 선정한 한 이유는 이 암세포에 대한 연구가 최근에 많이 집중되어 있다는 이유도 있지만, A549에 대한 18β-GA의 효능을 검색한 연구가 지금까지 없다는 이유도 있었다.

본 실험에서는 일차적으로 18β-GA의 A549에 대한 세포독성 효과를 검색하였다. 이 실험결과를 음미해보면 암세포에 대한 약물(18β-GA) 접촉기간이 연장될수록 세포독성효과, 즉 항암효과가 더 유효함을 알 수 있었다. 연구결과에서 보듯이 48시간과 72시간의 약물처리기간을 비교해보면 LD₅₀이 거의 100 μM 정도의 차이가 있어서, 암치료 시에 약물과 암세포간의 지속적 접촉이 매우 중요한 요소(factor)인 것으로 사료가 된다. 이런 측면을 좀 더 고찰해보면, 일반적으로 항암제의 세포막 투과성(cell-membrane permeability)은 매우 낮아서 약물의 흡수율이 떨어질 수가 있다. 그래서 표적부위까지 일정량의 약물이 도달하기 위해서는 실제의 약물용량보다 과량의 양(dose)을 투여가 요구된다. 이때, 과량의 약물은 신장독성 등의 문제점도 야기될 수가 있을 것이다. 그래서 가능하다면 적정 용량의 항암제가 투여 후 체내에 오래 머물도록 할 수 있다면 정상세포에 대한 세포독성도 감소시킬 수 있을 것으로 추정된다. 이런 가능성을 도모하기 위해서 18β-GA의 제형화(예: liposomal encapsulation) 등을 고려해볼 수가 있다. 본 연구에서는 이와 같은 목적을 염두에 두고 약물접촉시간의 효과를 조사하였는데, 이미 언급하였듯이 약물접촉연장이 암세포의 살해효과를 증진하므로 이를 바탕으로 하여 18β-GA를 포집한 리포솜제형에 대한 효과를 연구조사 중에 있다.

또한 본 연구에서는 18β-GA의 항암효과를 임상에서 사용하는 기존의 항암제인 doxorubicin의 항암효과와 비교하였다. 이때의 실험의 결과를 음미해보면, 본 실험이 비록 *in-vitro* 상에서의 결과이지만 대략 150 μM 용량의 18β-GA의 세포독성효과가 1 μM 용량의 doxorubicin과 유사하다. 이를 달리 표현하면 doxorubicin이 18β-GA보다 150배 정도의 효과가 있는 것으로 평가될 수도 있겠다. 하지만 이는 단순히 용량만을 산술적으로 비교한 것으로, 이 실험방법이 *in-vivo* 상에서 수행되었다는 점을 고려할 때, 이는 체내투여 시에 항상 염두에 두어야 할 약물투과성이 전혀 반영되지 않은 것이기 때문에 두 약물간의 항암효과를 비교 평가하기에는 다소 무리가 있다고 사료된다. 하지만, 적어도 doxorubicin이 18β-GA보다 항암효과가 우수하다는 점을 간과할 수는 없을 것이다.

상기와 같은 연구결과를 분석하여 본 연구의 목적인 18β-GA의 항종양효과를 동물모델을 사용하여 검색하였다. A549는 인간 세포이기 때문에 종(species)이 다른 생쥐에게 이식하여 암종양을 형성하는 소위 이종이식(xenograft transfer) 방법은 타 연구자의 연구에서 제시된 방법을 사용하였다. 기초실험에서 암종양

은 nude mice의 복부 측면에 A549 암세포를 1회 주입 하였다. 주입 후 대략 5~6일 후에 암종양이 형성되었고, 약물치료가 없는 경우에 외관으로 종양의 중심부에 혈관이 집중되며, 출혈과 함께 농(pus)이 분비되는 것을 알 수 있었다(data not shown). 이와 같은 암종양 형성의 가능성을 먼저 타진하고 본 실험을 수행하였다. 18β-GA를 A549 암세포 주입 후 24시간 이후부터 3일 간격으로 복강내로 총 4회 투여하였는데, 실험결과 음성대조군에 비교해서 종양의 크기는 감소되었다. 그러나 24일간의 관측결과, 감소비율은 유지 되었지만 전반적인 종양의 크기는 지속적으로 확대되었고, 이러한 진행은 doxorubicin의 경우도 동일 하였다. 결론적으로, 양성 및 음성 대조군그룹의 생쥐들과 18β-GA로 처리된 생쥐그룹과 상대적으로 평가해 볼 때, 이 감소 성분은 A549에 기인된 암종양에 대해서 항종양효과가 있음을 확인할 수 있었다. 한편, 18β-GA(1 mg dose)의 항종양효과는 doxorubicin(60 μg dose)보다 우세하였다. 이때의 두 약물의 비교는 대략 16배 차이인데, 이 평가를 *in-vitro* 상에서 두 약물이 동등한 효능을 발현하기 위해서 150배(주: 72시간 약물처리로 기준) 정도의 차이점(Fig. 3 참조)이 생기는 결과와 비교해보면 거의 1/10 수준으로 감소가 되어서 18β-GA의 생체내의 약물흡수율이 매우 우수한 것으로 사료된다.

끝으로, 본 연구의 결과를 종합해 보면, 한 가지 제안점은 18β-GA를 기존의 항암제와 병용하는 소위 병용요법(combination)으로 적용해 볼 수 있다는 것이다. 이는 항암제의 용량을 감소시킬 수 있으므로 그 사용에 따른 부작용을 줄이는데 매우 효과적일 것으로 사료된다. 일례로, 최근의 타 연구자의 연구에²²⁾ 의하면 doxorubicin과 효소를 병용투여 하여 doxorubicin의 용량을 줄이면서도 항암효과를 극대화 할 수 있다는 보고가 있다.²²⁻²⁴⁾ 이런 관점에서, 수세기 동안 사용되어온 감초에서 획득할 수 있는 18β-GA와 항암제를 병용하였을 때 기존 항암제의 효과(efficacy)를 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다. 그래서 이에 대한 후속 연구가 본연구실에서 진행 중에 있다.

참고문헌

- 1) Davis, E. A. and Morris, D. J. : Medicinal uses of licorice through the millennia: The good and plenty of it. *Mol. Cell. Endo.* **78**, 1 (1991).
- 2) Liut, H. M., Akiyama, T., Sugimoto, N. and Maitani, T. : Isolation and identification of main constituents in an enzymatically hydrolysed licorice extract sweetener. *Food Addit. Contam.* **18**, 281 (2001).
- 3) Moon, A. and Kim, S. H. : Effect of glycyrrhiza glabra roots and glycyrrhizin on the glucuronidation in rats. *Planta. Med.* **63**, 115 (1997).
- 4) Kiso, Y., Tohkin, M., Hikino, H., Hattori, M., Sakamoto, T.

- and Namba, T. : Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin, I: Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta. Med.* **50**, 298 (1984).
- 5) Haraguchi, H., Ishikawa, H., Mizutani, K., Tamura Y. and Kinoshita, T. : Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in glycyrrhiza inflata. *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 339 (1998).
 - 6) Teelucksingh, S., Mackie, A. D., Burt, D., McIntyre, M. A., Brett, L. and Edwards, C. R. : Potentiation of hydrocortisone activity in skin by glycyrrhetic acid. *Lancet.* **335**, 1060 (1990).
 - 7) Marandici, A. and Monder, C. : Inhibition by glycyrrhetic acid of rat tissue 11-hydroxysteroid dehydrogenase *in vivo*. *Steroids.* **58**, 153 (1993).
 - 8) Gumprich, E., Dahl, R., Devereaux, M. W. and Sokol, R. J. : Licorice compounds glycyrrhizin and 18 β -glycyrrhetic acid are potent modulators of bile acid-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 10556 (2005).
 - 9) Han, Y. : Effect of 18 β -glycyrrhetic acid on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Yakhak Hoeji* **51**, 476 (2007).
 - 10) Han, Y. : 18 β -Glycyrrhetic acid induces protective anti-*Candida albicans* antibody by its immunoadjuvant activity. *Yakhak Hoeji* **52**, 494 (2008).
 - 11) Takashi, N., Minoru, N., Marimo, S., Kenji, I., Hidemitsu, K., Masashi, S., Akio, O., Toshiaki, K. and Shinichiro, N. : The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **46**, S52 (2000).
 - 12) Baier, P. K., Wolff-Vorbeck, G., Eggstein, S., Baumgartner, U. and Hopt, U. T. : Cytokine expression in colon carcinoma. *Anticancer Res.* **25**, 2135 (2005).
 - 13) Abe, H., Ohya, N., Yamamoto, K. F., Shibuya, T., Arichi, S. and Odashimag, S. : Effect of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on growth and melanogenesis in cultured B16 melanoma cells. *Eur. J. Cancer Clin. On.* **23**, 1541 (1987).
 - 14) Agarwal, M. K., Iqbal, M. A. and Athar, M. : Inhibitory effect of 18 β -glycyrrhetic acid on 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate-induced cutaneous oxidative stress and tumor promotion in mice. *Redox Report.* **10**, 151 (2005).
 - 15) Inoue, H., Mori, T., Shibata, S. and Koshihara, Y. : Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. *Br. J. Pharmacol.* **96**, 204 (1989).
 - 16) Makino, T., Tsubouchi, R., Murakami, K., Haneda, M. and Yoshino, M. : Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis of HL60 cells by ingredients of traditional herbal medicine, Sho-saiko-to. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* **98**, 401 (2006).
 - 17) Lee, J. Y., Lee, J. H., Park, J. H., Kim, S. Y., Choi, J. Y., Lee, S. H., Kim, Y. S., Kang, S. S., Jang, E. C. and Han, Y. : Liquiritigenin, a licorice flavonoid, helps mice resist disseminated candidiasis due to *Candida albicans* by Th1 immune response, whereas liquiritin, its glycoside form, does not. *Int. Immunopharm.* **9**, 632 (2009).
 - 18) Han, Y. : Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int. Immunopharm.* **9**, 207 (2009).
 - 19) Lee, J. H., Park, J. H., Kim, Y. S. and Han, Y. : Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int. Immunopharmacol.* **10**, 1681 (2008).
 - 20) Kamran, G., Weining, Z., Monika, F. S., Thomas, S. and Hiremagalur, N. J. : Studies on the antitumor activity and biochemical actions of cyclopentenyl cytosine against human colon carcinoma HT-29 *in vitro* and *in vivo*. *Life Science* **64**, 103 (1998).
 - 21) Nishikawa, T., Ramesh, R., Munshi, A., Chada, S. and Meyn, R. E. : Adenovirus-mediated mda-7 (IL24) gene therapy suppresses angiogenesis and sensitizes NSCLC xenograft tumors to radiation. *Mol. Ther.* **9**, 818 (2004).
 - 22) Lu, H., Chen, C. S. and Waxman, D. J. : Potentiation of methoxymorpholinyl doxorubicin antitumor activity by P450 3A4 gene transfer. *Cancer Gene Ther.* **16**, 393 (2009).
 - 23) Sirotnak, F. M., Zakowski, M. F., Miller, V. A., Scher, H. I. and Kris, M. G. : Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin. Cancer Res.* **6**, 4885 (2000).
 - 24) Ma, Y., Trump, D. L. and Johnson, C. S. : Vitamin D in combination cancer treatment. *J. Cancer.* **15**, 101 (2010).