

## HepG2 세포주를 이식한 BALB/c Nude Mice에서 흑삼의 고형암 개선효과

강신정 · 한정순\* · †김애정\*

중부대학교 한방제약과학과, \*경기대학교 대체의학대학원

### Ameliorate Effect of Black Ginseng on HepG2 Cell transplanted in BALB/c Nude Mice

Shin-Jyung Kang, Jung-Soon Han\* and †Ae-Jung Kim\*

Dept. of Oriental Pharmaceutical Science, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

\*Dept. of Alternative Medicine, Kyonggi University, Seoul 120-837, Korea

#### Abstract

The aim of this study was to examine the ameliorating effect of black ginseng on the growth of the HepG2 cell transplanted tumor in BALB/c nude mice. 27 male BALB/c nude mice (all six weeks old) were randomly divided into three groups: the control group, the first treatment group (HepG2300RG, using 300 mg/kg red ginseng), and the second treatment group (HepG2300BG, using 300 mg/kg black ginseng). The HepG2300BG in the HePG2 cells showed increased mean survival time than that of red ginseng group. The size and volume of the tumor in the 300BG group showed significant reduction compared to those of the HepG2300RG group ( $p < 0.05$ ). The body weight and liver weight of the HepG2300RG group was not significantly different with control and HepG2300BG group. The serum levels of ALT and AST in the HepG2300RG and HepG2300BG group were significantly lower than those of the control group. In conclusion, these results suggest that the black ginseng may have possible anti-tumor activities.

Key words: black ginseng, HepG2 cell, BALB/c nude mice

#### 서 론

암은 현재 세계적으로 뿐만 아니라, 우리나라에서 사망원인의 1위를 차지하는 질병으로 향후 환경문제, 수명연장, 식문화의 서구화 등으로 암환자의 발생은 더욱 증가될 것으로 예상된다. 그 가운데 간암은 우리나라 주요 암 발생율의 7.3%로 7위를 차지하고 있다(KCCR 2014).

암은 정상조직과는 다르게 독자적으로 성장할 수 있으며, 다른 조직으로 침윤되거나 전이하여 무제한적으로 증식하는 특성을 가지는 악성종양으로 바이러스, 진균 독소, 방사선, 호르몬, 화학약품, 오염물질, 자외선 및 산업폐기물 등의 여러 요인에 의해 유발된다고 알려져 있다(Yue 등 2007). 암은

DNA 손상에 의해 유발되는데, 암을 유발시키는 발암 유전자들에는 c-myc, H-ras 등이 알려져 있으며, 아직까지 암 발생의 기전과 전이 등에 대해서는 아직도 정확하게 알려져 있지 않다(Ponder BAJ 2001). 암은 발생 부위 형질에 따라 고형암과 혈액암으로 구분되며, 고형암은 혈액암과는 구별되는 특징을 지닌다. 고형암이란 골수에서 생기는 혈액암을 제외한 우리 몸의 장기에서 발생한 모든 덩어리로 이루어진 암을 의미한다. 정상 조직과 달리, 이런 고형암 조직의 혈관은 내피세포(endothelial cell) 사이의 간격이 넓고 누출(leaky)이 있다. 이 혈관은 또한 뒤틀리고 낭상(saccular)을 이루며, 불규칙적으로 연결되어 있어 혈관의 기능적 이상을 가져온다. 또 증식한 암 세포는 혈관에 고형 압(solid pressure)을 가해 혈류(blood flow)

† Corresponding author: Ae-Jung Kim, Dept. of Alternative Medicine, Kyonggi University, Seoul 120-837, Korea. Tel: +82-2-390-5044, Fax: +82-2-390-5078, E-mail: aj5249@naver.com

를 약하게 한다(Jain RK 2005).

암에 대한 치료법으로는 외과적 처치, 방사선 요법, 화학요법 및 면역요법 등이 있으나(Park SC 2010), 치료 후의 부작용과 재발 및 합병증 등의 문제점 등이 있다. 따라서 이러한 부작용을 감소시키면서 암세포에 대해서는 특이적으로 항암 효과를 나타내는 천연물 소재에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다(Singhal 등 2012).

이러한 천연물 가운데 가장 널리 사용되고 있는 것으로 대표적인 것이 인삼이다. 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 식물분류학상 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 다년생 초본인 삼의 근경으로 한방에서는 강장제로 가장 보편적으로 널리 사용되고 있다(Lee 등 2003b). 인삼의 성분과 화학적 및 약리학적 특성에 관한 연구는 1960년대부터 시작되어 ginsenoside, phenolic compounds, polyacethylene, polysaccharide 등과 같은 다양한 성분이 함유되어 있는 것으로 밝혀져 있다(Namba 등 1974; Ding 등 2011). 특히, 인삼의 사포닌인 ginsenosides 성분은 면역기능(Kenarova 등 1990; Kim 등 2002), 항암 작용(Mochizuki 등 1995; Wakabayashi 등 1998), 항산화 활성(Kim 등 2004) 및 각종 성인병의 예방과 증상 개선 혹은 치료 등에 유용한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Cha 등 2004).

최근 들어 인삼의 사포닌 성분을 더욱 강화시키고자 홍삼에 이어 흑삼이 개발되었는데, 흑삼은 인삼을 건조시킨 후 9회 찌고 말리는 과정을 반복하는 과정을 통해 고분자 물질인 사포닌 성분이 저분자 물질인 ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub>로 전환된다(Jeong YH 2010). 특히 Rg<sub>3</sub>의 증가로 흑삼은 인삼이나 홍삼에 비해 기능성 효과가 강화될 것으로 기대된다고 보고하고 있다(Sun 등 2009).

이에 본 연구에서는 흑삼의 간암 개선 효과를 알아보기로 하여 인간의 간암세포주(HepG2)를 BALB/c nude mice에 이식하여 고형암 모델을 만들고, 흑삼을 투여하여 고형암에 미친 영향을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

흑삼과 홍삼 농축 시료(70 brix)는 주식회사 비엘(Gumsan, Korea)로부터 제공 받아 동결건조(Freeze Dryer FDU-2100, Sunil Eyela Co., Gyeonggi, Korea) 시킨 후 분말화하여 냉장보관하면서 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)에 녹여 실험에 사용하였다.

### 2. 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 함량 분석

흑삼과 홍삼 시료의 진세노사이드 함량은 HPLC(Waters Co., Milford, USA)를 사용하여 측정하였다. 분석용 컬럼은 XterraMS

C18(3.5  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  2.1 mm, Waters, Dublin, Ireland), 유속은 0.25 mL/min으로 하였다. 이동상 용매로는 18% 아세트니트릴과 0.1% 초산, 80% 아세트니트릴과 0.1% 초산을 사용하였다.

### 3. 세포 배양

인간 간암세포(HepG2 cells)는 한국세포은행(Korean Cell Line bank, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. HepG2 cells를 DMEM((Sigma, Louis, MO, USA)에 L-glutamic acid(Sigma, Louis, MO, USA)를 포함하는 10% FBS(Sigma, Louis, MO, USA), 100 U/mL penicillin((Sigma, Louis, MO, USA))과 100 U/mL streptomycin((Sigma, Louis, MO, USA)을 넣고 5% CO<sub>2</sub> incubator(MCO-20AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

### 4. 암세포주

이식할 인간 간암세포(HepG2 cells)는 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin, 10% heating된 fetal calf serum이 들어 있는 DMEM(Gibco BRL, NY, USA)을 260 mL tissue flask에 담아 95% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator(MCO-20AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다. Cell이 유착되면 Hanks balanced salt solution (HBSS)(Gibco BRL, NY, USA)로 2회 washing하고, HBSS에 녹인 0.2% trypsin(Sigma, Louis, MO, USA)로 washing하여 사용하였다.

### 5. 실험동물

실험동물은 6주된 BALB/c계 nude mice를 27마리 구입(SLC Inc., Shizuoka, Japan)하여 온도 23 $\pm$ 2°C, 상대습도 55 $\pm$ 10%, 환기 횟수 10~15회/h, 인공조명(12시간 점등, 12시간 소등), 조도 150~300 lux 조건에서 사육하였다. 사료(Agribrands Purina Korea Inc., Pyeongtaek, Korea)를 급여하였고, 물은 정제수를 자유로이 섭취하도록 하였다. 6주 동안 홍삼과 흑삼 시료를 실험기간 동안 각각 300 mg/kg을 saline에 녹여 sonde를 사용하여 경구 투여하였다.

### 6. 종양이식모델

Human liver cancer cell(HepG2 cells)은 1 $\times$ 10<sup>7</sup> cells/nude mouse/500  $\mu$ L를 26 gauge needle을 사용하여 피하로 주사하였다. 종양주를 획득한 후 계대군에 계대하였다. 3회에 걸친 반복 계대로 원래의 고형암의 성질을 회복한 종양괴를 얻은 후 이 종양괴를 9마리의 계대군에 이식하였다. 종양의 중심괴사(central necrosis)가 일어나기 전에 충분한 혈액공급으로 급속히 자라는 단계의 종양을 함유한 nude mouse를 희생시켜 급속한 분열이 일어난 외곽 부위를 일정한 크기(3 $\times$ 3 cm)로 잘라 종양절편을 만들었다. 투관침(trocar)의 끝에 종양편(tumor

**Table 1. Experimental groups**

Groups	Injection dose (mg/kg)	N
HePG2 <sup>1)</sup>	0	9
HePG2RG300 <sup>2)</sup>	300	9
HePG2BG300 <sup>3)</sup>	300	9

<sup>1)</sup> Control: HePG2 cell alone

<sup>2)</sup> RG300: HePG2 cell + red ginseng (300 mg/kg)

<sup>3)</sup> BG300: HePG2 cell + black ginseng (300 mg/kg)

fragment)을 올리고, nude mouse의 좌측후지 전측방을 약 4 mm 가량 절제하여 이곳을 통하여 준비한 투관침을 삽입, 좌측전지의 후방의 제간 측면부에 끝이 이르도록 하였다. 투관침을 가볍고 빠르게 360도 회전시키면서 빼서 종양편이 목표한 위치에 자리 잡도록 해주고 절제부위를 소독하였다. 피부위를 먼저 종양편의 위치를 확인하고, 1주일에 2회 성장을 관찰하였다. 이식 후 개별 종양 체적이 100 mm<sup>2</sup>에 이르면 종양 크기를 측정하였고, 무작위법으로 Table 1과 같이 군을 분리하였다(CBNUA-025-0901-1).

### 7. 적출 고행암의 중량 및 부피 측정

6주의 실험기간 종료 후 실험동물을 희생시킨 후 고행암을 적출하여 중량을 측정하였고, digital plethysmometer(Panlab, Barcelona, Spain)를 사용하여 실부피를 측정하였다.

### 8. 평균 생존시간 및 생존 증가율 측정

시험 기간 중 시험군의 일일 증상 관찰을 통해 고행암 중심괴사가 나타나는 개체와 고행암 크기 측정일의 결과에서 고행암 부피를 1,000 mm<sup>2</sup> 이상이 되는 개체를 확인하였고, 두 조건 중 한 가지에 해당되는 개체를 사망개체로 간주하고, 생존증가율을 다음의 공식으로 계산하였다.

$$\% \text{ ILS}(\text{Percent increase life span}) = [(T - C)/C] \times 100$$

C: Mean survival days of mice in control group

T: Mean survival days of mice in treatment group

### 9. 체중 및 체중에 대한 상대적 간 무게 측정

부검 시 육안 검사를 통해 간의 이상 유무를 확인하고, 적출하여 체중에 대한 상대적 간 무게를 계산하였다.

### 10. 혈청 AST와 ALT 함량 측정

부검 시 복부 대동맥에서 혈액을 채혈하여 300 rpm에서 20 분간 원심분리(Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany)하여 혈청을 얻은 후 -70°C 냉동고에 보관하였다. 혈액생화학자동

분석기(Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하여 AST와 ALT 함량을 측정하였다.

### 11. 통계처리

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하였으며, 처리 간의 차이 유무를 one-way ANOVA(analysis of variation)로 분석한 뒤 Duncan's multiple range test와 Student's *T*-test를 이용하여 유의성을 검정하였다. Rg<sub>3</sub>와 실험동물의 평균 생존시간, 고행암 중량 및 고행암 부피와의 상관관계는 Pearson's correlation으로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Ginsenoside Rg<sub>3</sub> 함량

흑삼의 진세노사이드 함량 분석 결과를 홍삼과 비교하여 Table 2에 제시하였다. 구중구포에 의해 흑삼은 홍삼에 비해 저분자 물질 함량이 증가되었는데, 특히 항암 활성을 포함하여 다양한 활성을 나타낸다고 알려져 있는 Rg<sub>3</sub>(Kim SM 2010) 함량이 뚜렷하게 증가되었다. 본 연구 결과에서 홍삼 추출물에는 Rg<sub>3</sub>가 0.667±0.022 mg/g인데 반해, 흑삼 추출물에는 4.162±0.099 mg/g이 함유되어 있어 약 6.5배 가량 높은 수준을 보여 주었다. 흑삼에서 Rg<sub>3</sub> 함량이 다량으로 존재하는 이유는 백삼에 존재하는 고분자 물질인 사포닌의 aglycon에 결합되어 있는 sugar 부분이 증숙 과정 중에 열에 의해 분해 및 탈수반응이 일어나기 때문이다(Kim 등 2008). 그 결과, 본 연구에서도 Rg<sub>3</sub> 함량이 증가된 것으로 생각된다.

### 2. 평균 생존시간 및 생존 증가율

실험동물의 평균 생존시간과 생존 증가율은 Table 3에 제시한 바와 같다. HePG2 군(대조군)의 평균 생존시간과 생존 증가율(%ILS)은 각각 28.13±3.17 day, 0%, 홍삼 시료 투여군의 평균 생존시간과 생존 증가율은 각각 29.11±1.79 day, 3.48%로 나타났으며, 흑삼 시료 투여군인 HePG2BG300 군의 평균 생존시간과 생존 증가율은 각각 31.78±1.91 day, 12.98%로 대조군과 홍삼 시료 투여군에 비해서 유의적으로 생존기간과 생

**Table 2. Ginsenoside Rg<sub>3</sub> content of red and black ginseng**

Ginsenosides (mg/g)	Red ginseng	Black ginseng
Rg <sub>3</sub>	0.667±0.022 <sup>1)</sup>	4.162±0.099** <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Mean±S.D., N=3

<sup>2)</sup> Student's *T*-test at \*\**p*<0.01

**Table 3. Mean survival time in HePG2 cells-bearing mice treated with red or black ginseng**

Groups	Mean survival time (day)	% ILS
HePG2 <sup>1)</sup>	28.13±3.17 <sup>4)bs)</sup>	0.00 <sup>c</sup>
HePG2RG300 <sup>2)</sup>	29.11±1.79 <sup>ab</sup>	3.48 <sup>b</sup>
HePG2BG300 <sup>3)</sup>	31.78±1.91 <sup>a</sup>	12.98 <sup>a</sup>

1) Control: HePG2 cell alone  
 2) RG300: HePG2 cell + red ginseng (300 mg/kg)  
 3) BG300: HePG2 cell + black ginseng (300 mg/kg)  
 4) Mean±S.D.  
 5) Means with different letters in the same column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test  
 6) % ILS (Percent increase life span) =  $[(T - C)/C] \times 100$  (where C and T are mean survival days of mice in control and treatment group)

존 증가율이 높았다. 본 연구를 통해 흑삼 투여에 의해 평균 생존기간이나 생존 증가율이 연장된 기전은 밝혀내지는 못하였지만, ginsenoside Rg<sub>3</sub>가 암 증식과 전이를 억제함으로써 생존기간이나 생존 증가율을 연장시킨 것(Yue 등 2006; Jung 등 2006)으로 추정된다.

**3. 고형암의 중량 및 부피**

시험 종료일에 적출한 고형암 무게 및 부피 측정 결과는 Table 4에 제시된 바와 같다.

흑삼 시료 투여군(HePG2BG300 군: 0.405±0.239 g)의 고형암의 중량은 대조군(HePG2 군: 0.925±0.136 g)에 비해 유의적으로 감소하였고, 홍삼 시료 처리군(HePG2RG300 군: 0.626±0.215 g)에 비해서도 감소량이 더 많았다. 또한 고형암의 부피도 고형암 중량과 마찬가지로 대조군(0.843±0.186 mm<sup>2</sup>)에 비해 HePG2RG300 군(0.536±0.233 mm<sup>2</sup>)과 HePG2BG300 군(0.315±0.256 mm<sup>2</sup>)에서 유의적으로 적게 나타났다. 인간 유방암 세포(MCF-7), 인간 섬유육종 세포(HT-1080) 및 쥐 간암세포(Hepa 1C1C7)에 대

**Table 4. Tumor weight and volume in HePG2 cells-bearing mice treated with red or black ginseng on the final day**

Groups	Tumor weight (g)	Tumor volume (mm <sup>2</sup> )
HePG2 <sup>1)</sup>	0.925±0.136 <sup>4)as)</sup>	0.843±0.186 <sup>a</sup>
HePG2RG300 <sup>2)</sup>	0.626±0.215 <sup>b</sup>	0.536±0.233 <sup>b</sup>
HePG2BG300 <sup>3)</sup>	0.451±0.239 <sup>c</sup>	0.315±0.256 <sup>c</sup>

1) Control: HePG2 cell alone  
 2) RG300: HePG2 cell + red ginseng (300 mg/kg)  
 3) BG300: HePG2 cell + black ginseng (300 mg/kg)  
 4) Mean±S.D.  
 5) Means with different letters in the same column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

한 항암 효과 연구에서 흑삼 시료가 홍삼 시료에 비해 3~5배 암세포 증식을 억제하였다(Kim 등 2000)고 하여 본 연구결과와 일치하였다.

**4. Rg<sub>3</sub>와 실험동물의 평균 생존시간, 고형암 중량 및 고형암 부피와의 상관관계**

홍삼과 흑삼 시료의 진세노사이드 Rg<sub>3</sub> 함량(Table 2)과 실험동물의 평균 생존시간, 고형암의 중량 및 고형암 부피와의 상관관계를 구해서 Table 5에 제시하였다. Rg<sub>3</sub> 함량과 실험동물의 생존기간과는 유의성까지는 나타나지 않았지만, Rg<sub>3</sub> 함량이 높을수록 실험동물의 생존기간이 연장되는 정의 상관을 나타내었다. 그리고 Rg<sub>3</sub> 함량이 높을수록 고형암의 크기와 부피는 유의적으로 감소되어, 대장암과 전립선암 세포에서 Rg<sub>3</sub>가 암세포의 저항력을 증가시켜서 항암 작용을 나타내었다는 보고(Kim SM 2010)와 일치하는 결과를 보였다.

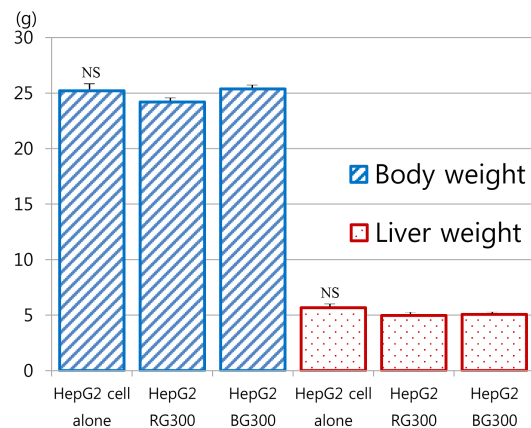
**5. 체중 및 체중에 대한 상대적 간 무게**

체중 및 체중에 대한 상대적 간 무게는 Fig. 1에 제시된 바와 같다. 부검 시 육안 검사를 통해 간의 이상 유무를 확인한 결과, 이상 현상은 나타나지 않았으며, 체중의 경우 대조군(25.20±1.35 g), 흑삼 추출물 투여군(25.37±1.87 g)과 홍삼 추출물 투여군(24.59±2.01 g) 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 체중에 대한 상대적 간 무게의 경우도 체중과 마찬가지로 대

**Table 5. Correlation coefficients ginsenoside Rg<sub>3</sub> content with mean survival time, tumor weight and tumor volume**

	Mean survival time (day)	Tumor weight (g)	Tumor volume (mm <sup>2</sup> )
Ginsenoside Rg <sub>3</sub>	0.520	-0.732*	-0.675*

\* Coefficient of correlation is significantly different at  $*p < 0.05$



**Fig. 1. Body weight and relative liver weight.**

조군(5.66±0.44 g), 흑삼 추출물 투여군(5.06±0.17 g)과 홍삼 추출물 투여군(4.96±0.26 g) 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이는 인삼을 섭취시켰을 때 간세포 암화과정 억제효과 관찰연구 결과에서 체중, 간 무게, 체중에 대한 상대적인 간 무게의 백분율이 발암 인자를 처리했을 때와 유의적인 차이를 보이지 않았다는 결과와 일치하였다(Kim HM 2006).

## 6. 혈청 AST와 ALT 함량

혈청 ALT, AST 활성은 간 손상으로 인한 간세포 파괴와 조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로, 간손상 지표의 중요한 단서로 사용되고 있다(Kim SH 1999). 본 연구에서도 AST, ALT 활성 측정을 통해 흑삼 추출물의 간 기능 보호 효과를 홍삼(Kim SH 1999)과 비교하여 Fig. 2에 제시하였다.

흑삼 추출물 투여군의 혈청 ALT 함량(81.66±8.51 IU/L)과 AST 함량(40.06±2.94 IU/L)은 대조군의 ALT 함량(103.39±37.22 IU/L)과 AST 함량(67.24±2.26)에 비해서는 유의적으로 낮았다. 그러나 홍삼 추출물 투여군의 ALT 함량(88.38±7.74 IU/L)과 AST 함량(48.72±2.50 IU/L)과는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

이 결과로 보아 흑삼 추출물 투여군의 평균 혈청 ALT 함량과 AST 함량이 홍삼 추출물 투여군에 비해 낮았지만 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나, 간 기능 손상 회복력은 홍삼과 흑삼이 유사한 것으로 보여진다.

## 요약 및 결론

본 연구에서는 인간 간암 세포주(HepG2)를 이식한 BALB/c nude mice 고형암 모델에서 고형암의 크기와 부피에 미치는 흑삼의 효과를 알아보고자 3군(대조군, 홍삼 시료 투여군: 300 mg/kg RG, 흑삼 시료 투여군: 300 mg/kg BG)으로 나누어 실험

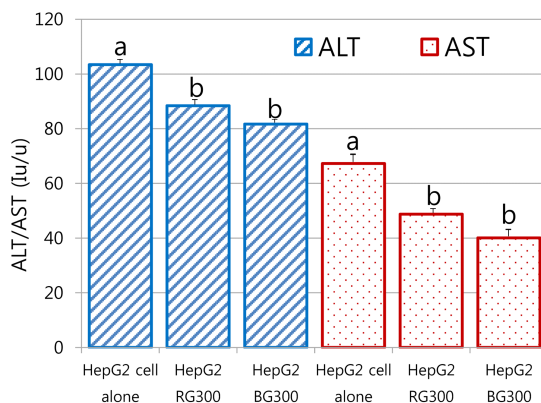


Fig. 2. The serum level of ALT and AST.

험을 수행하였다. 흑삼 시료 투여군의 생존률이 대조군은 물론 홍삼 시료 투여군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 고형암의 중량과 부피의 경우도 고형암 생존률과 마찬가지로 홍삼 시료 투여군에 비해 흑삼 시료 투여군에서 유의적으로 감소하였다. 체중과 체중에 대한 상대적 간 무게의 경우, 대조군, 흑삼 시료 투여군과 홍삼 시료 투여군 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 흑삼 시료 투여군의 혈청 ALT와 AST 함량의 경우, 대조군에 비해서는 유의적으로 낮았으나, 홍삼 시료 투여군과는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이상의 결과로 보아 흑삼의 경우 구증구포에 의해 홍삼보다 증가된 ginsenoside Rg<sub>3</sub>로 인해 고형암 저해 효과가 더 높게 나타난 것으로 생각된다.

## References

- Cha JY, Jun BS and Cho YS. 2003. Effect of Korean red ginseng powder on the lipid concentrations and tissues lipid peroxidation in therats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sc Nutr* 32:124-130
- Ding FT, Dhavalkumar NPI, Eric CY, Chan AT, Soe KY, Neo HK. 2011. Anti-proliferative effects of raw and steamed extracts of *Panax ginseng* and its ginsenoside constituents on human liver cancer cells. *Chin Med* 6:4-10
- Jain RK. 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307:58-62
- Jeong YH 2010. Study on immunomodulating and anti-diabetic activity of the extract of black ginseng. MS thesis, Konyang Univ. Nonsan. Korea
- Jung SH, Woo MS, Kim SY, Kim WK, Hyun JW, Kim EJ, Kim DH, Kim HS. 2006. Ginseng saponin metabolite suppresses phorbol ster-induced matrix metalloproteinase-9 expression through inhibition of activator protein-1 and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in human astrogloma cells. *Int J Cancer* 118:490-497
- KCCR. 2014. Ministry of Health & Welfare. Annual Report of Cancer Statistics in Korea in 2012, Korean Central Cancer Registry, Ministry of Health & Welfare
- Kenarova B, Neychev H, Hadjiivanova C, Petkov VD. 1990. Immunomodulating activity of ginsenoside Rg<sub>1</sub> from *Panax ginseng*. *Jpn Pharmacol* 54:447-454
- Kim EK, Lee JH, Cho SH, Shen GN, Jin LG, Myung CS, Oh HJ, Kim DH, Yun JD, Roh SS, Park YJ, Seo YB, Song GY 2008. Preparation of black *Panax ginseng* by new methods and its antitumor activity. *Kor J Herbology* 23:85-92

- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36:333-338
- Kim HM. 2006. Effects of *Panax ginseng* intake to diethylnitrosamine induced rat hepatocarcinogenesis. Ph.D. Thesis, Seoul National Univ. Seoul. Korea
- Kim SH. 1999. Studies on protective effect of *Panax ginseng* on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induced acute toxicity in male guinea pigs. MS thesis, Chungnam National Univ. Daejeon. Korea
- Kim SM. 2010. Ginsenoside Rg<sub>3</sub> enhances the susceptibility of colon and prostate cancer cells to docetaxel. Ph.D. Thesis, Chungbuk National Univ. Cheongju. Korea
- Kim WY, Kim JM, Han SB, Lee SK, Kim ND, Park MK, Kim CK, Park JH 2000. Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *J Nat Prod* 63:1702-1704
- Kim YK, Guo Q, Packer L. 2002. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology* 172:149-156
- Lee CK, Kim NY, Han YN, Choi JW. 2003b. Effects of pre-treated Korean red ginseng on carbontetrachloride and galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *J Ginseng Res* 27:1-10
- Mochizuki M, Yoo CY, Matsuzawa K, Sato K, Saiki I, Tono-oka S, Samukawa K, Azuma I. 1995. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb<sub>2</sub>, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg<sub>3</sub>, of red ginseng. *Biol Pharm Bull* 18: 1197-1202
- Namba T, Yoshizaki M, Tomimori T, Kobshi K, Mitsui K. 1974. Chemical and biochemical evaluation of ginseng and related crude drugs. *Yakugaku Zasshi* 94:252-260
- Park SC. 2010. Silibinin enhances the growth inhibitory effects of EGFR-TKIs or sorafenib in hepatocellular carcinoma. Ph.D. Thesis, Kangwon National Univ. Kangwon. Korea
- Ponder BAJ. 2001. Cancer genetics. *Nature* 411:336-341
- Singhal A, Jayaraman M, Dhanasekaran DN, Kohli V. 2012. Molecular and serum markers in hepatocellular carcinoma: Predictive tools for prognosis and recurrence. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 82:116-140
- Son SH. 2010. Inhibition by the black ginseng extract on the growth of HepG2 cells in xenograft tumor regression model. MS Thesis, Chungbuk National Univ. Cheongju. Korea.
- Sun BS, Gu LJ, Fang ZM, Wang CY, Wang Z, Sung CK. 2009. Determination of 11 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by high performance liquid chromatography. *Food Science and Biotechnology* 18:561-564
- Wakabayashi C, Hasegawa H, Murata J, Saiki I. 1998. *In vivo* antimetastatic action of ginseng protopanaxadiol saponins is based on their intestinal bacterial metabolites after oral administration. *Oncol Res* 9:411-417
- Yue PY, Mak NK, Cheng YK, Leung KW, Ng TB, Fan DT, Yeung HW, Wong RN. 2007. Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: Anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides. *Clin Med* 2:6
- Yue PY, Wong DY, Wu PK, Leung PY, Mak NK, Yeung HW, Liu L, Cai Z, Jiang ZH, Fan TP, Wong RN. 2006. The angiosuppressive effects of 20(R)-ginsenoside Rg<sub>3</sub>. *Biochem Pharmacol* 72:437-445

---

Received 29 January, 2015

Revised 6 April, 2015

Accepted 8 April, 2015