

# 증폭시킨 홍삼으로부터 분리한 ginsenoside Rh2, compound K의 융복합적 항암 및 항염효과

김영호, 김종두  
동방문화대학원대학교 자연치유학과

## Anti-cancer and anti-inflammatory effects of convergence of ginsenoside Rh2, compound K isolated from amplified red ginseng

Young-Ho Kim, Jong-Du Kim  
Dept. of Naturopathic, Dongbang Culture University

요 약 본 연구에서는 증폭시킨 홍삼으로부터 분리한 ginsenoside Rh2(Rh2)와 compound K(CK)의 융복합적 항염증 및 항암효과를 연구하여 홍삼 내 유용한 기능성분에 대한 기초 자료를 제공하고자 한다. 이에 Hep3B에서의 세포독성과 IL-6 유도 STAT3 루시퍼라아제 활성, B16F10과 Hacat 세포의 생존 농도를 측정하였고 Apoptosis와 관련된 분자의 발현양상을 확인하기 위해 FAC (fluorescence activated cell sorting) 분석을 수행하였다. 실험결과 Rh2, CK mixture가 10 ug/ml일 때 Hep3B 세포에서 세포독성이 없고 IL-6 감소율이 102%로 항염증 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 Rh2, CK mixture 50 uM에서 melanoma 세포인 B16F10과 human keratinocyte인 Hacat에서 독성을 보여 사멸하는 것을 관찰하였다. FACS 분석 결과 annexin V가 발현되지 않고 흑색종 세포와 keratinocyte가 탈착되면서 사멸되는 것을 확인하였다. 이러한 현상을 통하여 사멸되는 메커니즘이 anoikis 방식의 세포사멸로 인한 것으로 추정할 수 있으며 그것에 대한 명확한 세포사 신호 체계 규명을 위하여 향후 세포부착 단백질의 변화에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

주제어 : 홍삼, Ginsenoside Rh2, Compound K, 항염, 항암, 융복합

**Abstract** This study aims to provide basic data on useful functional ingredients in red ginseng by studying the anti-inflammatory and anti-cancer effects of convergence of ginsenoside Rh2(Rh2) and compound K(CK) isolated from amplified red ginseng. Therefore we examined cytotoxicity in Hep3B, activity of IL-6 induced STAT3 luciferase and survival concentration of cells in B16F10 and HaCa T. According to the experimental results, when the Rh2 and CK mixture were 10 ug/ml, there was no cytotoxicity in Hep3B cells and the anti-inflammatory effect of IL-6 reduction ratio was 102%. In addition, Rh2 and CK mixture were observed to be toxic in melanoma cell line B16F10 and HaCa T (human keratinocyte) at 50 uM. FACS(fluorescence activated cell sorting) analysis showed that annexin V was not expressed and melanoma cells and keratinocyte were desorbed and killed. It can be assumed that the mechanism of killing through this phenomenon is due to the cell death of anoikis-type, and it is necessary to study the changes of cell adhesion proteins in the future in order to clarify the cell death signal system.

**Key Words** : Red ginseng, Ginsenoside Rh2, Compound K, Anti-inflammarory, Anti-cancer, Convergence

Received 30 August 2017, Revised 27 October 2017  
Accepted 20 November 2017, Published 28 November 2017  
Corresponding Author: Jong-Du Kim  
(Dongbang Culture University)  
Email: zhongdou@dongbang.ac.kr

ISSN: 1738-1916

© The Society of Digital Policy & Management. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. 서론

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 오가피 나무 과(Araliaceae)의 인삼속(*Panax*)에 속하는 다년생 지성속근초로써, 최근에는 건강 기능식품으로써 각광을 받고 있는 식품이다[1]. 인삼의 주요 약리활성 성분은 사포닌(Saponin) 성분으로 양파, 도라지, 마늘등 식물체에 존재하는 사포닌과는 다른 인삼에만 들어있는 독특한 화학적인 구조의 특징을 가지고 있어 인삼의 학명을 단 화합물인 진세노사이드(ginsenoside)라 불리운다[2]. 진세노사이드(ginsenoside)는 항염효과, 항산화 효과, 주름억제, 면역력강화, 미백 효과, 항암 효과, 항균 효과, 피부보호 효과를 가지고 있는 대표적인 천연물 성분이다[3,4,5,6,7,8,9,10,11,12].

국내에서 인삼의 주요 유효성분인 인삼사포닌은 그 가공방법에 따라 함량과 조성이 상당히 변화하는 것으로 드러났다. 원료인삼의 성분과 품질관리의 중요성과 관련하여 산지별 인삼의 사포닌 함량, 연근별 원료인삼 및 부위별 사포닌 함량에 대해 분석·보고되기도 했다. 그 후 원료인삼의 차이 외에도 가공방법에 따른 내부성분변화에 대해 연구가 진행되었다. 특히 주요 가공제품인 홍삼의 경우에는 연구 초기에 내백 및 내공 등의 외형적인 품질양상에 대한 연구가 많았으나 최근에는 내부 성분의 변화에 초점을 맞추고 있으며 저장조건에 따른 홍삼품질의 변화와 같이 원료삼의 품질관리가 가공품의 품질에 미치는 영향에 대해서도 연구가 진행되고 있다. 국내의 인삼 생산은 세계최고 수준이지만 효능 및 약품관련 된 연구는 담보상태이므로 인삼의 효능과 제품화에 관한 연구가 절실히 요구되고 있다.

국의 관련기술을 살펴보면 인삼성분 추출방법은 추출 효율 및 추출물의 성분 활성 유지 면에서 단점들이 존재하므로 초임계 추출법 등이 도입되고 있으나, 시설 및 투자비의 규모면에서 여전히 단점을 지니고 있다. Membrane filter를 이용하여 인삼 성분의 농도와 순도를 높이는 기술이 시도되고 있으며, 인삼을 고온에서 가열해 미량의 약효성분을 증폭시킨 삼(선삼)이 출시되고 있다. 또한 인삼의 일부조직이나 기관배양을 통해 유용성분을 대량생산기술이 연구되고 있다.

중국은 10여개의 대규모 ginsenoside관련회사를 통해 대량생산을 하고 있으나 구조변환 등의 응용기술은 한국

보다 낙후되었다. 최근 Ginsenoside의 성분 중 Rg3만을 추출해 만든 'Rg3'가 항암제로 인기를 모으며 세계 시장을 석권하고 있다. 또한 인삼을 활용한 항당뇨 약품 생산, 인삼의 특수성분을 활용한 인삼의 약품화로 수출을 증대시키고 있다.

일본은 이미 수십년 전부터 인삼의 각 성분에 대한 화학적 특성과 생리활성에 관한 연구를 활발히 진행하여 국제적으로 인삼에 관련된 연구논문을 가장 많이 발표했다.

인삼을 장내환경과 같은 혐기성 상태에서 장내 미생물을 활용하여 발효한 발효홍삼은 최종 대사산물인 G-Rh2, compound K 등의 성분을 증가시켜[13,14,15,16] 혈액순환개선효과, 암발생 억제력, 감염방어 작용 등 인삼보다 더 높은 약리활성을 나타낸다는 연구가 보고되어 있다[17,18,19,20,21]. 또한 최근 연구동향에 의하면 발효 증폭시킨 추출물에 증가된 대사산물들 중 ginsenoside Rh2, Compound K가 기억력개선 효과, 발기부전효과, 항알러지 효과, 항아토피 효과 등에 대한 홍삼의 효능들이 새롭게 보고되고 있는데, 이러한 효능은 인삼을 증폭시켜서 만든 홍삼에만 존재하는 G-Rg3, G-Rf와 G-Rh2 등의 성분에 의해서 나타나는 효과일 수 있다는 가능성이 제기되고 있다[22,23,24].

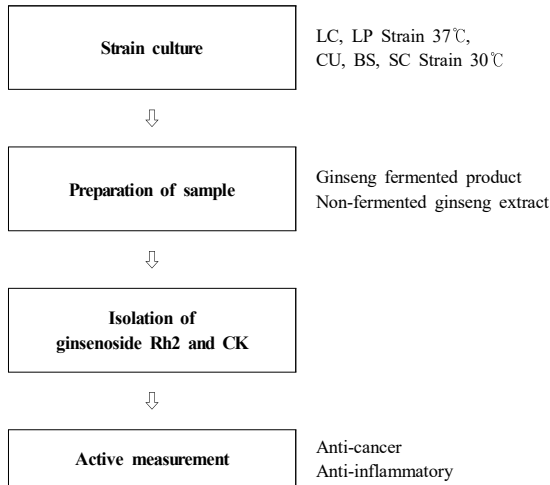
이러한 Ginsenoside의 다양한 기능이 과학적으로 밝혀지면서 다양한 연구와 ginsenoside를 활용한 응용이 활발히 진행되고 있으며, 그런 연구와 제품들에 따른 소비자들의 관심과 수요도 증가되고 있다.

한국의 우수한 인삼의 가치를 극대화할 수 있는 것이 Ginsenoside의 연구와 기술개발이다. 하지만 아직까지 Ginsenoside의 유효성분 분석 및 추출 기술이 명확하지 않고 미비하여 효용가치가 많이 떨어지고 있는 실정이다. 그 중에 항염, 항암 관련 인자에 대한 protein 발현 및 메카니즘 확인이 미흡하고 절실하다.

따라서 본 연구에서는 Ginsenoside Rh2와 CK가 증폭된 홍삼 분획물의 융복합적인 항염증 및 항암 효과를 연구함으로써 홍삼 내 기능성분을 보다 유효하고 적절하게 사용할 수 있도록 하기 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

본 연구의 목적을 달성하기 위하여 2017년 1월에 두달 간 [Fig. 1]과 같은 과정을 중심으로 실험을 진행하였다.



[Fig. 1] Procedure of treatment

### 2.1 재료

인삼은 시중에서 구매하여 실험하였다.

### 2.2 균주 배양

발효에 사용된 균주는 *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104(LP), *Bacillus subtilis* KCTC 1022(BS), *Candida utilis* KCCM 50342(CU), *Lactobacillus casei* KCTC 2180(LC), 으로 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea) 에서 분양받아 사용하였다. LP 및 LC는 *Lactobacilli* MRS broth, BS는 Nutrient broth, CU, SC는 YM broth로 배양하였다. LC, LP균주는 37°C로 CU, BS, SC 균주는 30°C에서 1일 주기로 3회 계대 배양 한 후 600 nm에서 흡광도가 0.4~0.6 ( $1 \times 10^5$  CFU/mL) 범위 안에 들게 하여 균주로 사용하였다.

### 2.3 시료의 조제

인삼 발효물의 제조는 40 g의 glucose와 10 g의 peptone을 2 L의 3차 증류수(DW)를 가하여 121°C에서 15분 가압 고온 멸균하여 식힌 후 활성화 시킨 균주를 각

각 10 mL씩 넣은 후 건조 인삼 가루 100 g을 넣고 배양하였다. 그 후 배양액을 여과시켜 여과액을 deep freezer에 12시간 두었다가 freeze dryer에 넣고 동결 건조하였다.

무발효 대조군으로, 인삼 100 g당 8배량(w/v)의 DW로 3회 추출한 후 여과하여 동결 건조하여 얻어진 물추출물(이하 무발효 추출물)을 사용하였다.

### 2.4 ginsenoside Rh2와 CK의 분리

#### 2.5 HPLC 분석 조건

CAPCELLPAK C18 UG120 (SHISEIDO) 컬럼을 사용하였고 컬럼 오븐 온도는 28°C, UV디텍터 203nm, 용매로 CH3CN을 사용하였다. injection volume은 25 $\mu$ L, flow rate는 1ml/min으로 설정하였다.

#### 2.6 항염 활성 측정

##### 2.6.1 세포독성 측정

Hep3B 세포를 2x10<sup>4</sup> cells/well이 되게 96-well 플레이트에 넣고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 교체한 후 다양한 농도의 화합물을 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 그 다음 MTT (0.5 mg/mL)를 처리하고 다시 4시간 동안 배양을 실시하였다. 세포에 생성된 formazan 색소는 200  $\mu$ L의 DMSO를 처리하여 용해시킨 후 96-well plate reader기를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

##### 2.6.2 IL-6 유도 STAT3 루시페라제 활성 측정

pStat3-Luc가 발현된 Hep3B 세포는 96-well 플레이트에 2x10<sup>4</sup> cells/well을 넣고 24시간 동안 배양한 후, 12 시간동안 DMEM (GIBCO 119950965)배지로 무혈청 배양 (serum starvation)을 실시하였다. 이 세포에 10 ng/mL IL-6 (R&D system, USA)와 화합물을 첨가하여 12시간 동안 배양한 후, 반응한 세포를 PBS로 세척하고 50  $\mu$ L 용해 완충용액 (luciferase assay system, promega, USA)을 넣고 20분간 교반한 후, 30-100  $\mu$ L의 루시페라제 기질 (luciferase assay system, promega, USA)을 넣고 발색정도를 루미노미터 (luminometer; EG&G BERTHOLD, USA)로 5분 안에 측정하였다.

2.7 항암 활성 측정

2.7.1 cytotoxic assay

세포실험을 위해 마우스 유래의 피부암 세포주인 B16F10(ATCC, USA)와 인간 유래의 keratinocyte인 Hacat (CLS, Germany)을 사용하였다. 배양 조건은 B16F10의 경우 MEM(Gibco, Korea)에 10% FBS(Gibco, Korea)와 peniciline-streptomycine(Gibco, Korea) 10000u을 혼합하여 5% 이산화탄소, 37도에서 배양하였다. Hacat의 경우 DMEM(Gibco, Korea) 배양액으로 같은 조건에서 배양하였다.

2.7.2 cytotoxic assay

B16F10과 Hacat 세포를 96웰 배양 플레이트에 한 웰 당 1만개로 분주하여 24시간 후 compound K, Rh2, 두 가지 물질이 혼합된 mixture를 B16F10은 10, 25, 50, 100, 250, 500uM로 처리하고, Hacat은 1, 2.5, 5, 10, 25, 50uM로 처리한 후 48시간 배양하였다. 세포의 생존 여부를 확인하기 위해 PBS(phosphate buffered saline)으로 세척한 후 배양액 100ul씩 주입 후 cell counting kit-8(dojindo, Japan)을 이용하여 한 웰당 10ul씩 주입 후 4시간 반응을 시켰다. 반응 후 발색된 formagan을 확인하고 Gemini(Molecular device, microplate reader)를 통해 450nm 파장에서 값을 읽어 세포의 생존 농도를 측정하였다. 현미경(optinity, Korea)를 통해 각 농도별 세포 외형의 변화를 관찰하고 촬영을 하였다.

2.7.3 fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis

Apoptosis와 관련된 분자의 발현 양상을 확인하기 위해 FACS (FACSVerse, BD Korea)를 사용하여 측정하였다. B16F10 세포주를 6웰 배양 플레이트에 각 웰당 4만개의 세포를 부착시킨 후 24시간 후에 물질 compound k, Rh2, mixture(compound k, Rh2)를 50마이크로몰로 처리하였다. 6시간 후 PBS 세척을 하고 propidium iodide(sigma, Korea)와 FITC conjugated annexin V (sigma, Korea)를 염색하여 FACS 분석을 수행하였다.

2.8 통계 처리

성분 함량 분석과 항암효과 실험결과는 SPSS 21 통계

패키지를 이용하여 각각 Independent Samples T-test, one-way ANOVA로 통계처리하였고, p<0.05 이하 수준에서 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 인삼의 추출 조건에 따른 성분 함량 분석

3.1.1 홍삼의 추출 조건에 따른 사포닌의 성분 함량 비교분석

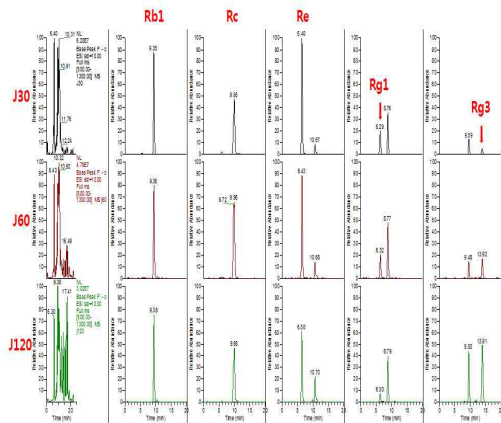
홍삼의 추출 조건에 따른 사포닌의 함량 및 분포도를 확인하기 위해 홍삼을 70%에탄올(생약의 8배수)로 시간을 달리하여 autoclave를 실행하여 사포닌의 생성 및 함량의 변화를 비교하였다. 전반적으로 사포닌 함량은 시간에 따라 Rg3나 Rh2는 유의미한 차이(p<0.05)를 보였고, Rg2나 Rh1은 유의미한 차이(p<0.05)가 나타나지 않았다<Table 1>.

구체적으로 보면 홍삼을 70% 에탄올로 30분 동안 autoclave한 것보다 120분 동안 autoclave 하였을 때 사포닌 중 홍삼을 발효하거나 흑삼을 만들었을 때 생성이 되어지는 ginsenoside Rg3나 Rh2, CK와 같은 특정 ginsenoside가 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 홍삼 사포닌의 경우 다른 화합물 보다는 열에 비교적 안정하지만 오랜 시간 가열을 하면 사포닌에 붙어있는 당들이 떨어져 또 다른 새로운 이성질체가 많이 생성되는 것을 확인할 수 있었다[Fig. 2].

<Table 1> Ginsenoside content and composition comparison by time variation

	Group	Mean	t(p)
Rg2	2 hours	.0600	-1.673(.138)
	More than 2 hours	.0943	
Rg3	2 hours	.7800	-2.922(.022)*
	More than 2 hours	9.5200	
Rh1	2 hours	.0650	-2.083(.076)
	More than 2 hours	.0971	
Rh2	2 hours	.8250	-2.689(.031)*
	More than 2 hours	13.6500	

\* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001



[Fig. 2] Analysis of component content by extraction condition

### 3.1.2 인삼 발효물의 사포닌 함량 및 성분 비교 분석

인위적인 가열보다 균주를 활용하여 홍삼에 들어있는 성분 중 함량이 작은 사포닌의 함량이 증가하는지를 확인하기 위해 실험을 진행하였다. 인삼 무발효물과 균주 발효물의 사포닌 함량의 차이가 성분별로 거의 유의미하게( $p < 0.05$  수준 이하) 나타나지 않았다<Table 2>.

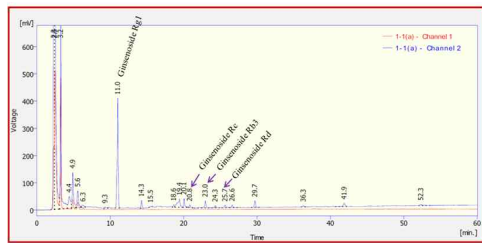
이는 [Fig. 3]과 같이 인삼 무발효 추출물과 균주별 발효물의 사포닌 함량 및 성분을 분석한 결과 균주 별로 약간의 차이는 있지만 홍삼에 함유되어있는 성분이 거의 생성되지 않거나 약하게 생성된 것을 확인하였다.

<Table 2> Ginsenoside content and composition comparison of non-fermented ginseng and fermented ginseng

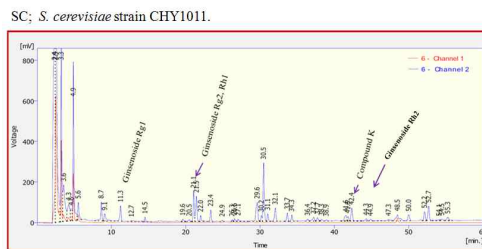
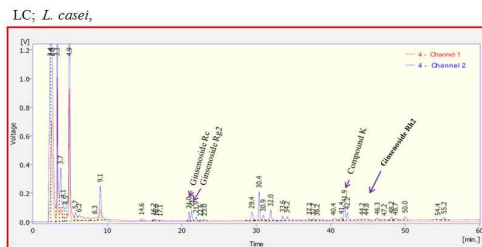
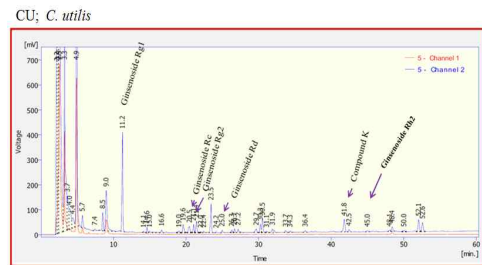
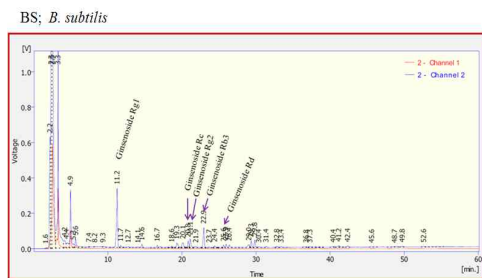
Group	Mean	t(p)
Rb3 non-fermented ginseng	.0600	.408(.704)
fermented ginseng	.0300	
Rd non-fermented ginseng	.0200	1.429(.226)
fermented ginseng	.0060	
RC non-fermented ginseng	.0200	-.582(.592)
fermented ginseng	.0360	
Rg1 non-fermented ginseng	.8400	2.761(.051)
fermented ginseng	.1820	
Rg2 non-fermented ginseng	0.0000	-1.407(.232)
fermented ginseng	.0760	
Rh1 non-fermented ginseng	0.0000	-.408(.704)
fermented ginseng	.0280	
CK non-fermented ginseng	0.0000	-1.282(.269)
fermented ginseng	.0520	

\*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

A) Non-fermented extract of Ginseng



B) Fermented extract by strain

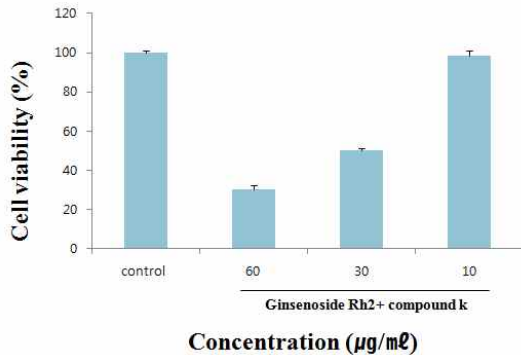


[Fig. 3] HPLC Analysis of Non-fermented extracts of Ginseng and Fermented extracts by Strain

3.2 염증억제 효과

3.2.1 세포 생존율

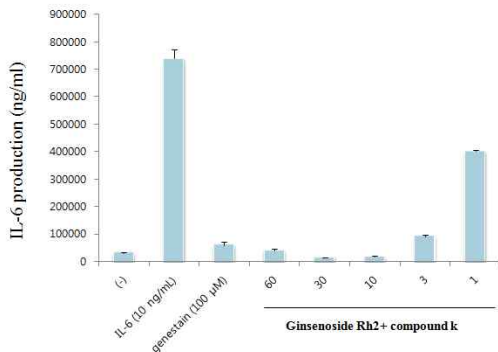
Ginsenoside Rh2와 CK가 증폭된 홍삼 분획물의 대량 생산된 추출물의 Hep3B 세포에서의 독성을 측정된 결과 10 µg/ml 농도에서는 98% 이상의 세포생존율을 나타내어 세포독성이 없는 반면, 30 µg/ml 농도에서는 55% 이하의 세포생존율을 나타냈음을 확인하였다[Fig. 4].



[Fig. 4] Measurement of survival rate in Hep3 cells stably expressing of pStat3-Luc of Ginsenoside Rh2 and CK mixture

3.2.2 IL-6 유도 STAT3 루시페라제 활성

Ginsenoside Rh2와 CK가 증폭된 홍삼 분획물의 IL-6 감소율을 측정된 결과, Ginsenoside Rh2와 CK가 증폭된 홍삼 분획물에서 농도 의존적으로 IL-6 감소를 나타내었으며, 그 중 10 µg/ml의 농도에서 각각 102%의 IL-6 감소율을 관찰할 수 있었다[Fig. 5].



[Fig. 5] IL-6 induced STAT3 luciferase activity of Ginsenoside Rh2 and CK mixture

3.3 항암 효과

3.3.1 세포 생존율 측정

Ginsenoside Rh2와 CK가 증폭된 홍삼 분획물의 항암 효과를 규명하기 위하여 일원분산분석을 실시한 결과 그룹별로 유의미한 차이가 있었다<Table 3>.

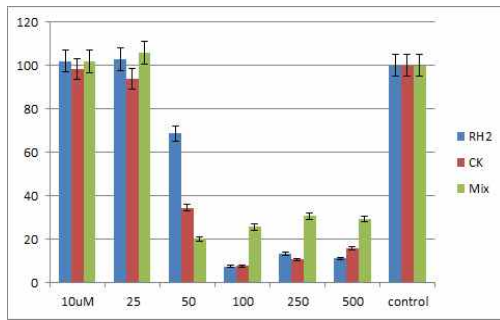
B16F10 melanom cell 안에서 각각 RH2, Compound K, Mix Compound 그룹별로 통계적 유의성(p<0.001)이 있었다.

<Table 3> Treatment of Rh2, CK, mixture by concentration in melanoma cells, B16F10

Index	Group	Mean	SD	F
B16F10 melanoma cell (µM)	RH2 10	2.9863	.02452	137.377***
	RH2 25	3.0114	.03258	
	RH2 50	2.0100	.73497	
	RH2 100	.2201	.01808	
	RH2 250	.3864	.08846	
	RH2 500	.3277	.02535	
B16F10 melanoma cell (µM)	Compound K 10	3.0229	.17231	63.567***
	Compound K 25	2.8899	.17811	
	Compound K 50	1.0626	1.00466	
	Compound K 100	.2336	.00770	
	Compound K 250	.3254	.07960	
	Compound K 500	.4919	.13231	
B16F10 melanoma cell (µM)	Mix Compound 10	2.1454	.21167	107.183***
	Mix Compound 25	.9374	.41687	
	Mix Compound 50	.3299	.01235	
	Mix Compound 100	.2396	.01820	
	Mix Compound 250	.2261	.02761	
	Mix Compound 500	.3381	.05941	

\* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

Ginsenoside Rh2와 CK가 증폭된 홍삼 분획물의 항암 효과를 확인하기 위해 실험을 진행하였다. [Fig. 6]에서 보는 바와 같이 melanoma 흑색종 세포에 증폭시킨 추출물을 처리한 결과 50 µM에서 추출물 자체의 독성으로 인해 세포가 사멸하는 것을 관찰하였다. Ginsenoside Rh2와 CK가 증폭된 홍삼 분획물의 독성이 없는 농도인 25 µM와 10 µM의 농도에서 항암효과에 대한 실험을 진행하였다.

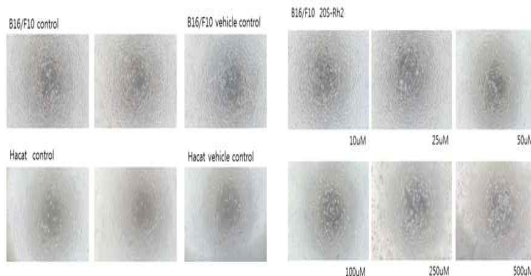


[Fig. 6] Measure the amount of viable cells by incubating for 48 hours after treatment of Rh2, CK, mixture by concentration in melanoma cells, B16F10

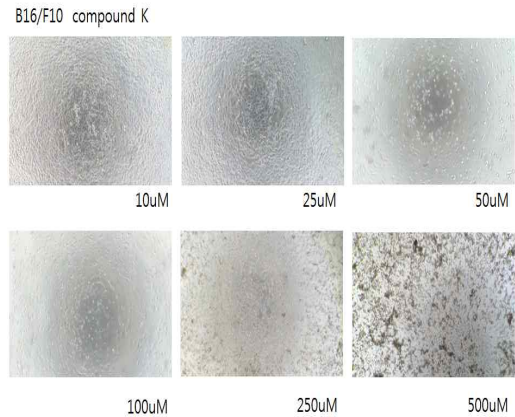
### 3.3.2 Melanomal 세포주인 B16F10

[Fig. 7]과 [Fig. 8]에서 관찰되어지는 바와 같이 각각 ginsenoside Rh2, CK을 단일 물질로 처리했을 때 저 농도에서 세포질의 양이 감소하는 것을 관찰할 수 있는데, 그 양상이 상이하게 다른 것을 확인 할 수 있었다. ginsenoside Rh2는 세포의 모양이 길고 가늘게 감소하는 경향을 보이는 반면 CK는 핵을 중심으로 수축되는 양상이 관찰되었다. 두 종류의 추출물을 고농도로 처리 시 세포막의 부착 능력이 떨어져 바닥에서 이탈되면서 사멸되는 현상이 유사하게 나타나는 것을 관찰할 수 있다. Ginsenoside Rh2와 CK가 증폭된 홍삼 분획물 처리군의 경우 세포 외형의 변화가 25 μM부터 관찰되었으며, 50 μM에서 죽는 세포들이 관찰되었다[Fig. 9].

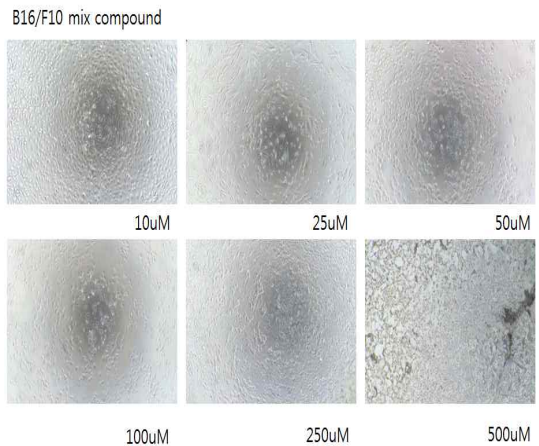
A. The melanomal cell line, B16F10, and human keratinocyte, Hacat  
 B. The melanomal cell line, B16F10



[Fig. 7] Control photograph of melanomal cell strain B16F10 and human keratinocyte Hacat, a vehicle control microscope photograph of the solute of the extract, microscopic photograph by incubating for 48 hours after treatment of the Rh2 extract by concentration in the melanoma cell strain B16F10



[Fig. 8] Microscopic photograph by incubating for 48 hours after treatment of Ck (compound k) extract by concentration in melanoma cell strain B16F10



[Fig. 9] Microscopic photograph by incubating for 48 hours after treatment of the Rh2 and Ck mixed extracts by concentration in the melanoma cell strain B16F10

### 3.3.3 human keratinocyte인 Hacat

Ginsenoside Rh2와 CK가 증폭된 홍삼 분획물의 일원 분산분석을 실시한 결과 <Table 4>와 같이 그룹별로 유의미한 차이가 나타났다.

Hacat keratinocyte 에서 각각 RH2, Compound K, Mix Compound 그룹별로 통계적 유의성( $p < 0.001$ )이 있었다.



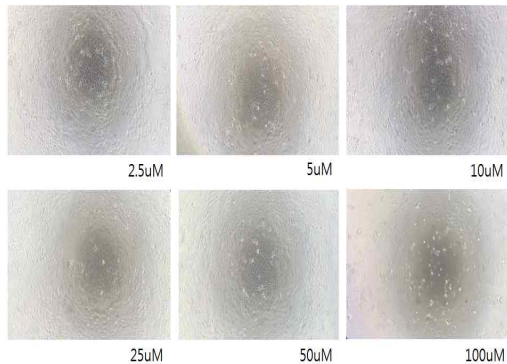
<Table 4> Treatment of Rh2, CK, mixture by concentration in human keratinocyte, Hacat

Index	Group	Mean	SD	F
Hacat keratinocyte (μM)	RH2 10	2.2263	.07874	142.519***
	RH2 25	2.2119	.06339	
	RH2 50	2.2711	.08376	
	RH2 100	2.2999	.12045	
	RH2 250	2.3369	.26751	
	RH2 500	.4746	.23561	
	Compound K 10	2.3334	.20296	96.724***
	Compound K 25	2.3206	.17587	
	Compound K 50	2.2880	.17085	
	Compound K 100	2.2863	.16755	
Compound K 250	2.1687	.34367		
Compound K 500	.3059	.18936		
Mix Compound 10	2.1649	.05142	985.907***	
Mix Compound 25	2.1523	.06212		
Mix Compound 50	2.1846	.08161		
Mix Compound 100	2.1140	.16091		
Mix Compound 250	.2681	.04920		
Mix Compound 500	.2171	.00763		

\* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

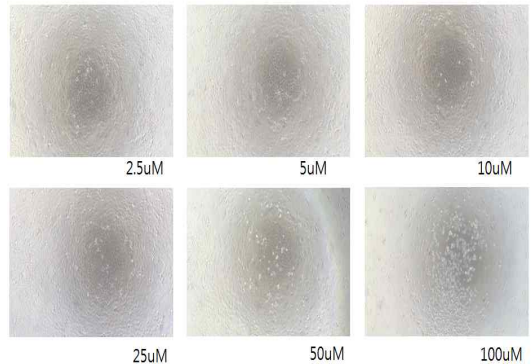
keratinocyte에 ginsenoside Rh2, CK 단일 물질을 처리 후 세포들의 외형을 관찰하면 50 μM에서 세포가 사멸되는 현상을 확인 할 수 있으며 바닥에서 떨어지면서 세포들이 사멸되는 것을 확인할 수 있었다[Fig. 10, Fig. 11].

Hacat 20S-Rh2



[Fig. 10] Microscopic photograph by incubating for 48 hours after Rh2 treatment in human keratinocyte, Hacat

Hacat compound K

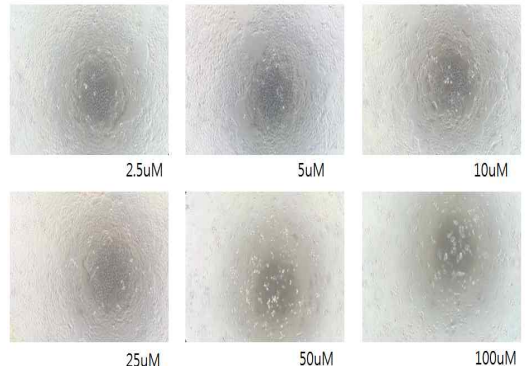


[Fig. 11] Microscopic photograph by incubating for 48 hours after treatment of Ck (compound k) extract by concentration in human keratinocyte, Hacat

Ginsenoside Rh2와 CK가 증폭된 홍삼 분획물 처리한 세포에서는 좀 더 세포의 탈착이 가중되는 현상을 관찰하였다[Fig. 12].

이런 결과들을 통하여 흑색종의 종양 세포주를 활용하여 암세포를 억제 할 수 있는 실험과 표피세포의 세포 실험을 통해 세포에 대한 독성 농도의 측정을 함으로써 Ginsenoside Rh2와 CK가 증폭된 추출물을 다른 효능이 있는 물질과 혼합하여 효능을 입증하는 자료를 얻을 때 사멸되는 농도에 대한 가이드라인에 기여할 수 있을 것이라 사려 된다.

Hacat mix compound

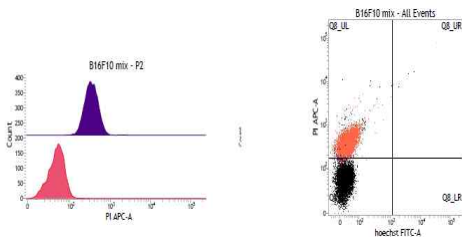


[Fig. 12] Microscopic photograph by incubating for 48 hours after treatment of the Rh2 and Ck mixed extracts by concentration in human keratinocyte, Hacat



### 3.3.4 FACS (fluorescence activated cell sorting) analysis

세포사멸에 따르는 신호의 기전에 대한 제시를 하기 위해 annexin V에 FITC가 레이블 되어 있는 항체와 propidium iodide염색을 사용하여 확인하였다. 그 결과 세포사멸(apoptosis)이 이루어질 때 발현되어지는 annexin V가 전혀 발현되지 않아 세포사멸이 apoptosis의 메카니즘에 관련된 세포사의 신호 전달 체계와는 또 다른 세포사멸 메카니즘으로 사멸되어진다는 것을 예측할 수 있었다. propidium iodide 염색을 통해 세포사멸을 통한 세포가 죽는 현상은 관찰하였다. 그 결과 세포막의 변화나 chromosome condensation, apoptotic body 등의 반응이 관찰 되지 않았기 때문에 세포사멸의 원인이 전형적인 apoptosis의 메카니즘이 아닌 다른 형태의 세포사멸 메카니즘과 연결이 있을 것으로 판단되어진다[Fig. 13].



[Fig. 13] Propidium iodide (PI) staining resulted in apoptosis by mixed extract treatment in the melanoma cell strain B16F10

흑색종 세포에 추출물 50 μM로 처리 후 관찰한 결과 세포질의 분포가 약해지며 세포가 원형으로 변하면서 표면에서 떨어지는 현상이 관찰되었다[Fig. 14].

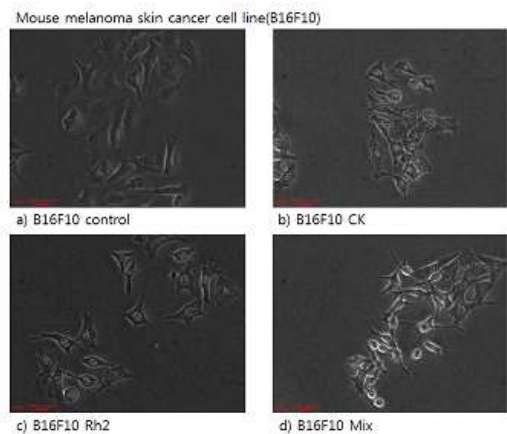
표피세포의 경우에도 세포 간 접촉 부위가 급격히 분리되면서 표면에서 탈착되어지는 것을 관찰하였다[Fig. 15].

유사한 현상이 유발되는지 확인하기 위해 다른 암세포인 MCF세포( breast cancer cell line)에 추출물을 처리한 결과 흑색종과 표피세포와 유사하게 떨어지면서 세포가 사멸되는 현상을 관찰할 수 있었다[Fig. 16].

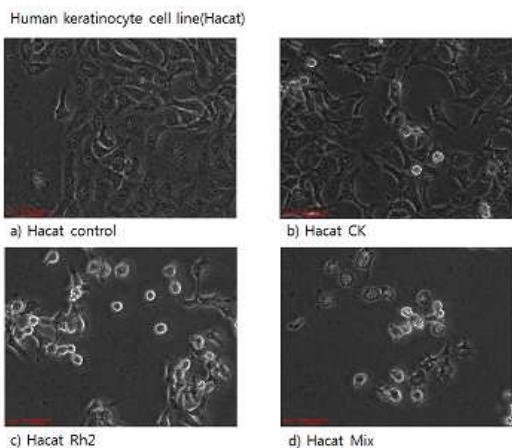
이러한 결과를 토대로 세포 사멸 메카니즘이 apoptosis가 아닌 anoikis 메카니즘에 의한 세포사멸일 수 있다는 가정을 할 수 있다. 이런 메카니즘을 규명하기 위해서는 세포막에 있는 세포부착 단백질의 변화를 연구하면 좀 더 명확한 세포사멸의 메카니즘을 규명할 수 있

을거라 예상되어진다.

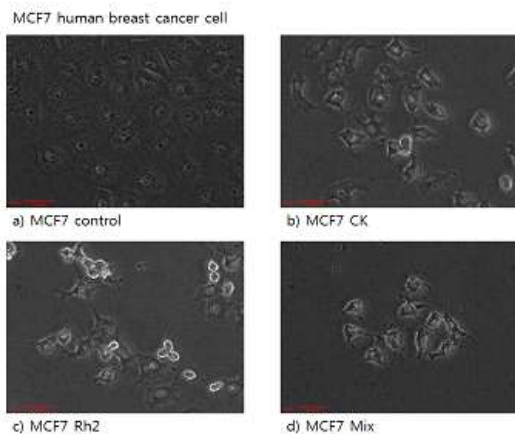
Anoikis는 programmed cell death의 한 형태로 apoptosis와 상이하며, 세포외기질에서 떨어지면서 사멸하는 현상을 말한다. 정상적인 세포는 세포외기질에서 오는 신호를 받기 위해 또는 세포간의 신호 전달을 위해 기질에서 조직에 상주하려는 경향을 갖는데, 이러한 환경에서 자라고 생존을 유지한다. 세포가 기질에서 탈착이 될 경우 종양 세포는 세포의 성격이 변형되어 탈착이 되더라도 살아서 전이를 일으키는 원인이 되기도 하지만, 정상 세포는 사멸된다[25].



[Fig. 14] Microscopic photograph by incubating for 4 hours after treatment of the melanoma extract



[Fig. 15] Microscopic photograph by incubating for 4 hours after treatment with keratinocyte (Hacat) extract



[Fig. 16] Microscopic photograph by incubating for 4 hours after treatment of the breast cancer cell strain MCF7 with the extract

## REFERENCES

- [1] W. C. Cho, "Ginsenoside Re of Panax ginseng possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats." *Eur. J. Pharmacol.* Vol. 550, No. 1, pp.173-179, 2006.
- [2] J. Y. Cho, "Ginsenosides from Panax ginseng differentially regulate lymphocyte proliferation." *Planta Med.* Vol. 68, No. 6, pp.497-500, 2002.
- [3] A-Young Jang, Yun-Chul Sueng, Joong-gu Ji, "The comparative study on physiological activity of White ginseng, Red ginseng and Black ginseng extract", *Journal of Digital Convergence*, Vol.14 No.5 pp.459-471, 2016.
- [4] Jong Rok Lee, Young Woo Kim, Sung Hui Byun, Sang Chan Kim, Sook Jahr Park, "Anti-inflammatory effects of the fermentation extracts consisting of soybean, red ginseng and Citrus Unshiu Peel", *The Korea journal of herbology*, Vol.30 No.5, pp.59-65, 2015.
- [5] Byung-Moon Jin<sup>1</sup>, Min-Kyung Lee, Jun-Seon Lee, Kyung-Yae Hyun, "Anti-inflammatory Effects of Korean red ginseng Extract in formalin-induced Orofacial Pain in Rats", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol.15 No.9, pp.5708-5715, 2014.
- [6] Seong-Hwa Oh, Soo-Yeon Choi, Nu Rim Lee, Jung No Lee, Dong-Seok Kim, Sang-Hwa Lee, and Sung-Min Park, "Cell migration and Anti-inflammatory Effect of Red Ginseng Extracts Fermented with *Laetiporus Sulphureus*", *Journal of the society of cosmetic scientists of Korea*, Vol.40 No.3, pp. 297-305, 2014.
- [7] Ji Su Shin, Jong-Myoung Kim<sup>1</sup>, Won Gun An, "Anti-inflammatory Effect of Red Ginseng through Regulation of MAPK in Lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7", *Journal of physiology & pathology in Korean Medicine*, Vol.26, No.3, pp. 293-300, 2012.
- [8] L. P. Christensen, "Ginsenosides: Chemistry, Biosynthesis, Analysis, and Potential Health Effects. *Advances in Food and Nutrition Research.*" Vol.55, pp.1-99, 2008.
- [9] Chang-Eui Hong, Su-Yun Lyu, "Anti-inflammatory and Anti-oxidative Effects of Korean Red Ginseng Extract in Human Keratinocytes", *Immune network : official journal of the Korean association of immunobiologists*, Vol.11 No.1, pp. 42-49, 2011.
- [10] Muhammad Jahangir Hossen, Yong Deog Hong, Kwang-Soo Baek, Sulgi Yoo, Yo Han Hong, Ji Hye Kim, Jeong-Oog Lee, Donghyun Kim, Junseong Park, Jae Youl Cho, "In vitro antioxidative and anti-inflammatory effects of the compound K-rich fraction BIOGF1K, prepared from Panax ginseng", *Journal of ginseng research*, Vol.41 No.1, pp. 43-51, 2017.
- [11] S. Jung, M.S. Lee, Y. Shin, C.T. Kim, I.H. Kim, Y.S. Kim, Y. Kim, "Anti-obesity and anti-inflammatory effects of high hydrostatic pressure extracts of ginseng in high-fat diet induced obese rats", *Journal of functional foods : the official journal of the International Society for Nutraceuticals & Functional Foods*, Vol.10, pp. 169-177, 2014
- [12] M Oh, Y H Choi, S Choi, H Chung, K Kim, S I Kim, D K Kim, N D Kim, "Anti-proliferating effects of ginsenoside Rh2 on MCF-7 human breast cancer cells", *International journal of oncology*,

- Vol.14, No.5, pp. 869-875, 1999.
- [13] Ae-Jung Kim, Myung-Rhun Han, Soo-Jeong Lee, "Antioxidative Capacity and Quality Characteristics of Yanggaeng using Fermented Red Ginseng for the Elderly", *The Korean journal of food and nutrition*, Vol.25, No.1, pp. 83-89, 2012.
- [14] B. M. Kong, "Physico-Chemical Characteristics of White, Fermented and Red Ginseng Extracts." *J. Ginseng Res.* Vol. 32, No. 3 pp.238-243, 2008.
- [15] Hee Kang, Yun-Gu Hwang, Taek-Guen Lee, Cheng-R Jin, Chi Heung Cho, Hee-Yeong Jeong, Dae-Ok Kim, "Use of Gold Nanoparticle Fertilizer Enhances the Ginsenoside Contents and Anti-Inflammatory Effects of Red Ginseng", *Journal of microbiology and biotechnology*, Vol.26, No.10, pp. 1668-1674, 2016.
- [16] Hyun-Joo Jung, Hojin Choi, Hye-Won Lim, Daehyun Shin, Hacksoo Kim, Bin Kwon, Jong Eun Lee, Eun-Hee Park, Chang-Jin Lim, "Enhancement of anti-inflammatory and antinociceptive actions of red ginseng extract by fermentation", *Journal of pharmacy and pharmacology*, Vol.64, No.5, pp. 756-762, 2012.
- [17] Hye-Jin Park, Da-Hye Jung, Haemi Joo, Nam-Sung Kang, Seon-A Jang, Jae Geun Lee, and Eun-Hwa Sohn, "The comparative study of anti-allergic and anti-inflammatory effects by fermented red ginseng and red ginseng", *Korean journal of plant resources*, Vol.23, No.5, pp. 415-422, 2010.
- [18] Byung-Weon Kim, Yoon-Bok Lee, Jae-Seung Park, Ji-Won Park, Seock-Yeon Hwang, "The Effect of Red Ginseng Extracts on Blood Biochemical Parameters, Bone Density and Bone Inorganic Components in Ovariectomized Rats", *The Journal of digital policy & management*, Vol.11, No.10, pp. 493-505, 2013.
- [19] Byung-Weon Kim, Yoon-Bok Lee, Jae-Seung Park, Ji-Won Park, Seock-Yeon Hwang, "Effect of Red Ginseng Saponin Fraction on the Blood Components of Male Guinea Pigs with Acute Toxicity induced by 2,3,7,8-Tetracholorodibenzo-p-dioxin (TCDD)", *The Journal of digital policy & management*, Vol.11, No.4, pp. 339-350, 2013.
- [20] K. Y. Nam, "The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs, processed ginsengs(panax ginseng C. A. Meyer)." *J. Ginseng Res*, Vol. 29, No. 1, pp.1-18, 2005.
- [21] H. Sung, "Beneficial effects of a combination of Korean red ginseng and highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected patients." *Clin. Vaccine Immunol.* Vol. 16, No. 8, pp.1127-1131, 2009.
- [22] E. A. Bae, "antiallergic and antipsoriatic effects of korean red ginseng." *J. Ginseng Res*, Vol. 29, No. 2, pp.80-85, 2005.
- [23] D. J. Jang, "Red ginseng for treating erectile dysfunction: a systematic review." *Br. J. Clin. Pharmacol.* Vol. 66, No. 4, pp.444-450, 2008.
- [24] Jongsun Park, Jae Youl Cho, "Anti-inflammatory effects of ginsenosides from Panax ginseng and their structural analogs", *African journal of biotechnology*, Vol.8, No.16, pp. 3682-3690, 2009
- [25] Frisch SM, Screaton RA, "Anoikis mechanisms", *Current Opinion in Cell Biology*, Vol.13, No.5, pp.555-562,2001,  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00251-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00251-9)

김 영 호(Kim Young Ho)



- 2013년 2월 선교청대학교 고등경영 대학원 대체의학 석사
- 2016년 8월 ~ 현재 : 동방문화대학 원대학교 자연치유학과(박사과정 수료)
- 관심분야 : 자연치유, 건강증진
- E-Mail : biopalpal@naver.com

김 중 두(Kim Jong Du)



- 2008년 6월 : 북경중의약대학교 중 의임상기초(의학박사)
- 2011년 3월 ~ 현재 : 동방문화대학 원대학교 자연치유학과 조교수
- 관심분야 : 자연치유학, 중의학, 한 의학
- E-Mail : zhongdou@dongbang.ac.kr