

고려홍삼복합방이 종양증식 및 전이에 미치는 영향

경희대학교 동서의학대학원 종양연구팀, ¹인삼연초연구원

윤 택 준 · 도 재 호¹ · 김 성 훈

Effect of Korea Red Ginseng-Mixed Formula on Tumor Growth and Metastasis

Taek Joon Yoon, Jae-Ho Do¹ and Sung-Hoon Kim

Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science,
Kyunghee University, Seoul 130-201, Korea

¹Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

The study was performed to evaluate the anticancer effect of Korea Red Ginseng Mixed Formula (KRGF) consisting of *Korean Red Ginseng*, *Ganoderma*, *Cinnamomi Cortex*, *Glycyrrhizae Radix*, *Laminaria*, *Oldenlandiae diffusae Herba*, *Houttuyniae Herba* and *Agrimoniae Herba* as compared with positive control, Korean red Ginseng (KRG). IC_{50s} of cytotoxicity of KRGF and KRG against tumor cells such as A549, B16-BL6, SK-OV and SK-MEL. were over 1 mg/ml. T/C% of KRG and KRGF in S-180 bearing mice were 106.3% and 134.4% respectively. KRG and KRGF showed the proliferation of spleen cells up to 141% and 264%, respectively by ³[H]-thymidine uptake assay. KRGF increased CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells in a dose dependent manner more than KRG, suggesting its close relation with cellular immunology. KRGF inhibited the adhesion of A549 to matrigel up to 82% at a concentration of 1 mg/ml. KRG and KRGF disrupted chicken chorioallantoic membrane (CAM) up to 20% and 80%, respectively at 15 µg/ml. KRGF also entered 27% inhibition of the control in lung metastasis with B16BL6 while KRG didn't. These results suggest KRGF has the stronger antitumor and antimetastatic effects than KRG.

Key Words: *Korean Red Ginseng*, KRGF, Cytotoxicity, FACS, Tumor growth, Metastasis

서 론

암은 그 발생부터 발병에 이르기까지의 시간이 길고, 그 증상에 의한 진단이 이루어지면 그 치료가 매우 어려운 질병이기에 여러 임상 및 종양학자들의 암 정복에 대한 연구에도 불구하고 현

재까지 악성종양을 완전히 극복하는 치료제는 개발되어 있지 않은 실정에 있다. 일단 발생된 종양 세포가 악성종양으로까지 발전되기 위하여 여러 가지 복잡한 발암과정의 생화학적 기전이 요구된다. 즉, 정상세포가 암세포로 전환하는 발암화 기전은 개시, 촉진 그리고 진행과 같은 경로를 거치

Corresponding author : Sung-Hoon Kim, Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee university, 1 hoegidong, Dongdaemunku, Seoul 130-701, Korea.

Tel: 031-201-2179, Fax: 031-205-1074, E-mail: sungkim7@nms.kyunghee.ac.kr

는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 발암화 과정의 첫 번째 단계인 개시시기에서는 주로 비가역적인 DNA 돌연변이가 유도됨으로 세포는 원래의 상태로 회복될 수 없게 된다. 촉진시기에서 이들 이상세포가 활발한 증식단계를 거치게 되고, 진행시기에 와서 추가적인 돌연변이에 의하여 세포의 악성화가 이루어진다. 이 시기에서 크론선택에 의해 증식속도가 빠른 돌연변이 세포가 전암조직을 형성하게 되며, 드디어 이들 세포는 보다 증가된 증식능, 침윤성 및 전이성을 가지는 악성종양으로 발전하게 된다.²⁾ 그러나 이들 각 기전에 대한 확실한 이론적 체계가 완성되지 않았기에 정상세포로부터 악성 종양으로 발전되는 기전을 극복하는 이상적인 항암제 혹은 예방제는 아직 개발되지 않은 실정에 있다. 특히 암의 치료가 어려운 점 중의 하나는 초기단계에서 면역회피로 인하여 숙주의 감시체계를 피하여 성장하기 때문으로 보고되고 있다.³⁾ 따라서 강력한 면역증강물질의 지속적인 투여는 이들의 면역회피기전을 극복할 수 있는 방법이 될 수 있다고 본다.

또한 암의 증식 및 전이에 필수적으로 요구되는 혈관의 신생에 있어서 혈관의 내피세포의 증식을 억제하는 억제제 및 암의 부착(adhesion) 및 침윤(invasion)을 억제하는 물질의 개발은 암의 치료제로서 개발 가능성이 있다.⁴⁾ 이러한 활성을 가지는 물질의 탐색에서 상대적으로 독성이 적은 천연물에서 찾고자 하는 노력이 증대되고 있는데, 특히 예로부터 한방이 발전된 우리나라의 경우 여러 생리활성을 가지며 안전성이 확립된 많은 후보물질을 보유하고 있기에 그 가능성은 매우 높다고 본다.

한방약제 중 인삼은 예로부터 한국과 중국 등 동양에서 피로회복, 보기, 강장, 강정 및 예방약으로 널리 사용되어온 신비의 영약이다.⁵⁾ 인삼 혹은 홍삼에 대한 현대적 연구는 1960년대부터 꾸준히 진행되어 심장혈관계, 내분비계, 면역계 등에 다양한 기능을 나타내는 것으로 보고되고 있다.⁶⁾ 그러나 아직도 그 활성에 대한 연구결과가 연구자에 따라 상반된 결과를 초래하여 아직까지도 많은 의문점을 내재하고 있다. 항종양 활성과 관련하여 홍삼을 경구투여할 경우 NK-세포의 활성이 증대하고 림프구의 증식이 유도되는 등 종양세포에 대항하는 비특이적 면역자극 활성은 인정되나

다른 연구자의 연구결과 홍삼만의 투여로는 *in vivo*에서 Ehrlich 암의 증식을 억제하지 못한다고 보고하였다.⁷⁾ 이러한 차이는 암세포의 종류, 추출물의 종류 또는 연근에 따른 차이에 의하여 기인되는 것으로 설명하고 있으나 이러한 항암 기전 연구에 대하여는 아직도 미흡한 실정이다.⁷⁾

본 연구는 홍삼추출물과 항암활성을 가지는 것으로 알려진 백화사설초²¹⁾ 등의 단미약제에 홍삼을 혼합하여 제조한 홍삼복합방의 경구투여에 의한 항종양 활성을 *in vivo*에서 조사하고 그 작용기전을 조사하여 홍삼복합방이 유효한 항암활성을 나타내는 항암제 혹은 항암 예방제로의 개발가능성이 있는지를 검토하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1) 공시약재

본 연구의 실험재료인 고려홍삼(Korean red Ginseng Radix; KRG)은 인삼연초연원에서 공급받았으며, 가미고려홍삼복합방(Korean Red Ginseng Radix mixed formula; KRGF; 홍삼복합방)은 동결건조된 엑기스로 홍삼(Korean Red Ginseng) : 다시마(Laminaria) : 육계피(Cinnamomi Cortex) : 감초(Glycyrrhizae Radix) : 영지(Ganoderma) : 백화사설초(Oldenlandia diffusa Herba) : 선학초(Houttuyniae Herba) : 어성초(Agrimoniae Herba)의 비율이 57 : 15 : 3 : 16 : 4 : 3 : 1 : 1의 비율로 혼합하였다. 각 시료의 조제는 각 한약재를 분쇄하여 약탕기에 넣고, 시료무게의 5배가 되는 증류수를 넣어 2시간 진탕 후 상온까지 식힌 다음 여과하였다. 이 여과액을 감압농축기를 사용하여 1차 농축 후 동결건조하고 4°C에서 보관하면서 가미고려홍삼복합방의 구성 비율에 따라 홍삼 69 mg, 다시마 18.9 mg, 육계피 3.9 mg, 감초 19.72 mg, 영지 4.3 mg, 백화사설초 3.45 mg, 선학초 1.225 mg, 어성초 1.225 mg을 Phosphate buffered saline (PBS)에 용해시킨 후 각 실험에 적용하였다.

2) 실험동물

본 실험에 사용된 마우스는 6~8주령의 암컷으로 C57BL/6, ICR 대한실험동물(주)에서 분양받아 사용하였다. 실험동물은 온도 25±1°C, 습도 55±

1%, 청정도 class 5,000, 조명 150~300 Lux, 소음 70 phone 이하의 조건이 확립된 경희대 동서의학 대학원 동물실에서 사육하였으며 사료(마우스용 실험동물 고품사료; pelleted diets; 대한실험동물)와 물(멸균된 상수도 물)은 자유급식 시켰다.

3) 세포주 및 세포배양

종양세포의 증식실험을 위한 S-180 세포주와 matrigel 부착저지실험에 사용된 A549 폐암주는 서울대학교 세포주 은행에서 분양받았고, 세포독성 및 세포부착 실험의 측정을 위한 A549 폐암주, B16-BL6 흑색종주, SK-OV-3 난소암주, SK-MEL-2 흑색종 등은 ATCC에서 분양받았다. S-180의 배양은 7.5%의 fetal bovine serum (FBS, Flow Laboratories inc., Mclen, VA)를 함유하는 DMEM 배지에서, B16-BL6 흑색종의 배양은 7.5% FBS를 함유하는 EMEM 배지에서 기타 세포주는 10%의 FBS를 함유하는 RPMI-1640 배지를 사용하였고, 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다.

4) *In vitro* 세포독성 실험

각 시료에 대한 *in vitro* 세포독성 실험은 MTT assay법⁸⁾에 의하여 수행하였다. 약술하면, 0.5-2 × 10⁴/ml의 밀도가 되도록 조정하여 96 well plate의 각 well에 100 μl씩 분주하였고, 여러 농도로 조정된 각 시료를 첨가하고 37°C, 5% CO₂의 조건에서 48시간 배양하였다. 배양종료 4시간 전에 dimethylthiazol tetrazolium bromide (MTT) 용액을 첨가하여 생존한 세포의 mitochondria내 succinate dehydrogenase에 의해 생성된 formazan을 colorimetric한 방법으로 측정(450 nm)하였다.

5) 비장세포에 대한 proliferation assay⁹⁾

Balb/c 마우스의 비장세포(splenocytes; 1 × 10⁵)에 여러농도로 조정된 각 시료를 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양종료 6시간 전에 [³H]-thymidine (0.5 μCi)를 첨가하고 배양 세포를 수집하고, cocktail 용액(ICN사) 2 ml을 가한 후 β-counter를 이용하여 방사선 활성을 측정하였다.⁹⁾

6) FACS에 의한 면역세포 변화측정¹⁰⁾

Balb/c 마우스로부터 비장을 적출하고 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지로서 세포의 밀도가 5 × 10⁶ cells/ml가 되도록 희석하였다. 비장 임파구 현탁액을 6-well culture plate에 3 ml씩 취하고 동일배지에 용해시킨 각 시료의 최종농도가 0, 50, 100, 500 μg/ml이 되게 조정 후 37°C, 5% CO₂의 조건에서 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 비장 세포를 회수하여 4°C의 PBS로 3회 세척 후 Consort 30 프로그램을 이용하여 B cell 및 T cell의 비율을 산출하였다.

7) 세포부착 저지실험

각 시료에 의한 세포부착(cell adhesion) 저지 실험은 Saiki등의 방법을 약간 수정하여 실시하였다.¹¹⁾ 약술하면, 배양된 A549 세포를 serum-free 배지에 single cell suspension의 형태로 준비하였다. Matrigel이 precoating된 plate의 각 well에 여러 농도로 준비된 각 시료와 2 × 10⁴/well로 조정된 종양세포를 넣고 30분간 배양하였다. 배양 완료 후, 부착되지 않은 세포를 제거하기 위하여 PBS로 3회 각 well을 세척하고 trypsin-EDTA의 처리로 부착된 세포를 취하여 hemocytometer로 각 well에 부착된 세포수를 측정하였다.

8) Chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay¹²⁾

CAM assay를 위한 수정란은 풀무원(주)에서 구입하였다. 수정란을 37~38°C의 incubator에서 3~4일 배양하고, 수정란의 albumin을 약 2 ml 정도 제거한 다음 다시 1일간 배양하였다. CAM의 크기가 2~5 mm 정도 성장한 것을 확인 후, 여러농도로 조절된 시료가 coating된 Thermanox coverslip (Nunc사)를 CAM위에 놓고 배양시키고, 실험개시 7일째에 intralipose(녹십자 사)를 CAM의 아래 부분에 주입하여 혈관의 형성을 육안 관찰 후 카메라로 근접촬영 하였다.

9) *In vivo* 함양효과

1 × 10⁶/마우스의 밀도로 조정된 sarcoma-180 (S-180) 세포를 6주령의 ICR 마우스의 복강에 이

식하였다. 각 시료의 항암활성은 여러 농도로 조정된 시료는 종양의 이식 1일 후부터 10일간 매일 경구투여하면서 당일 생존여부로 조사하였으며 다음의 공식을 이용하여 생명 연장률을 구하였다.

$$\text{연장률(Increase in MST over control; ILS)} = \frac{(T-C)}{C} \times 100 (\%)$$

MST (mean survival time); 평균생존일수, T; 처치군의 MST, C; 대조군의 MST

10) Experimental lung metastasis model¹³⁾

군당 5마리의 C57BL/6 마우스의 미정맥에 4×10^4 의 B16-BL6를 접종하였다. 종양의 접종 1, 4, 7, 10일 에 홍삼 및 홍삼복합방을 마우스당 각각 100 및 50 μg 을 복강투여하였다. 종양접종 14일 후에 마우스를 희생시키고 폐를 취하여 Bouin's 용액에 넣어 보관하였다. 폐에 전이된 종양의 수는 해부현미경을 이용하여 측정하였다.

결 과

1) 고려홍삼 및 고려홍삼 복합방의 *in vitro* 세포독성 효과

4가지 암세포주(A549, B16-BL6, SK-OV-3, SK-MEL-2)에 대한 세포독성 실험결과 홍삼복합방인 KRGF가 고려홍삼인 KRG에 비하여 *in vitro* 세포

독성 효과가 높은 것으로 나타났으나, 두시료의 ED₅₀값은 1 mg/ml 이상인 것으로 나타남으로서 각 시료가 종양세포에 대하여 직접적으로 작용하여 살해하는 세포독성 효과는 매우 낮은 결과를 나타냈다(Table 1).

2) 비장세포의 proliferation assay

비장세포와 고려홍삼 및 고려홍삼 복합방의 면역증강 활성을 조사하기 위하여 마우스의 비장세포에 두시료를 첨가하고 *in vitro*에서 동시배양에 의한 비장세포의 증식활성이 유도되는지 조사하였다. 홍삼 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리군에서 140% 이상의 비장세포 증식효과가 유도되었으나 그 이상의 농도에서 도리어 감소되어 증식 억제효과가 있었지만, 홍삼 복합방도 50~100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 205~264%로 비장세포의 증식활성을 나타냈다(Table 2).

3) 고려홍삼 및 고려홍삼 복합방이 면역세포 유형에 미치는 효과

FACS분석 결과, 두 시료를 처리한 비장세포의 CD23의 발현정도는 대조군에 비하여 비슷하거나 낮은 결과를 나타내 두 시료에 의한 B-세포의 증식은 유도되지 않는 것으로 나타났다. 반면, CD3의 발현 정도에 미치는 고려홍삼 및 고려홍삼복합방의 영향을 조사한 결과 두 처방을 투여한 마우스의 비장세포는 대조군에 비하여 통계적으로

Table 1. Cytotoxic effect of KRG (Korea Red Ginseng) and KRGF (Korea Red Ginseng-mixed formula)¹⁾ on various tumor cells

Group	Conc. (mg/ml)	% survival			
		A549	B16-BL6	SK-OV-3	SK-MEL-2
KRG	control	100±4.14	100±2.07	100±3.19	100±1.08
	0.2	599.1±2.46	102.5±3.11	100.9±2.94	104.13±2.09
	0.5	96.3±2.61	94.4±1.37	100.1±1.91	98.16±1.58
	1.0	89.6±1.05	82.6±2.61	92.8±2.09	92.50±2.33
KRGF	control	100±4.14	100±2.07	100±3.19	100±1.08
	0.2	594.4±2.44	92.7±3.11	94.4±2.44	97.89±1.91
	0.5	70.4±1.09	66.5±1.82	70.4±1.09	75.44±2.59
	1.0	61.1±1.61	55.4±2.49	61.1±1.61	64.58±2.49

¹⁾See the materials and methods

Table 2. The effect of KRG and KRGF on the proliferation of splenocytes by [³H]-thymidine incorporation assay

Group (µg/ml)		% of control
Control		100
KRG	50	141.6
	100	95.3
	500	83.0
KRGF	50	264.0
	100	204.9
	500	132.0

Table 3. The effects of KRG and KRGF on the expression of CD3, CD23, CD4, and CD8 in splenocytes of BALB/C Mice by FACS analysis

Group (µg/ml)	% of control			
	CD3	CD23	CD4	CD8
Control	100	100	100	100
KRG	50	141.1	100.6	114.4
	100	141.3	100.6	103.4
	500	146.0	69.8	112.7
KRGF	50	145.9	104.6	111.1
	100	150.9	70.5	116.0
	500	188.0	84.6	146.0

유의하게 증가된 결과를 나타냄으로서 홍삼 혹은 홍삼복합방은 주로 T-세포의 활성화를 유도하는 것으로 사료되었다. 두 시료의 T-세포에 미치는 활성을 자세히 검토하기 위하여 CD4⁺와 CD8⁺의 발현정도를 검토한 결과 홍삼의 경우 약 10% 내외의 상승효과를, 홍삼복합방의 경우는 100 µg/ml의 처리까지는 CD4⁺의 경우 10% 이상 CD8⁺의 경우는 약 131%의 증가된 결과를 보였다. 특히 홍삼복합방 500 µg/ml 투여의 경우 CD4⁺ 및 CD8⁺ 두 세포형태 모두 대조군에 비하여 각각 146 및 157%의 비율을 나타냈다(Table 3).

4) S-180 암주에 대한 항암효과

고려홍삼 및 고려홍삼 복합방을 S-180이 이식된 마우스에 10일간 경구 투여하면서 암의 증식

Table 4. Effect of KRG and KRGF on survival in ICR mice bearing S-180

Group	No. of animals	MST ¹⁾ (day)	T/C (%)
Control	10	13.7	100
KRG	10	14.6	106.3
KRGF	10	18.4	134.4

¹⁾MST: Mean Survival Time

에 따른 생존율을 조사한 바, 대조군에서는 암주 이식 8일 후부터 급격한 체중의 증가를 보이며 암주이식 14일째부터 폐사를 시작 암주이식 16일째에 모두 폐사하였다. 이 결과를 평균 생존일수로 환산한 바 대조군의 MST는 13.7일이었으나, 고려홍삼 투여군의 MST는 14.6일로서 T/C%는 106.3%였고, 홍삼복합방의 MST는 18.4일로서 T/C%는 134.4%로 나타나 홍삼복합방의 경우가 가장 우수한 효과를 나타냈다(Table 4).

5) 고려홍삼 및 고려홍삼복합방의 복합세포 외기질에 대한 부착저지 효과

24 well plate에서 A549 부유액에 고려홍삼 및 고려홍삼 복합방의 최종농도를 0.25, 0.5와 1.0 mg/ml이 되도록 조정하여 각 well에 처리하고, 1 시간 후 세포부착 정도를 대조군과 비교하였다. 그 결과 고려홍삼 투여군은 0.25~1.0 mg/ml 농도에서 세포부착저지 효과가 거의 없는 결과를 보였다. 반면, 고려홍삼복합방 투여군은 0.5 mg/ml의 농도에서 약 35%의 세포부착 저지 활성을, 1.0 mg/ml의 농도에서는 약 82%의 부착저지 효과를 나타냄으로 농도 의존적인 세포부착 억제활성이 있는 결과를 나타냈다(Table 5).

6) In vivo chicken chorioallantoic membrane assay

홍삼 및 홍삼복합방의 혈관형성 억제효과는 CAM assay를 이용하여 측정하였다. 실험에 적용한 각 시료의 농도는 수정란 1개당 각각 15 µg을 적용하였고 각 군당 10개의 수정란을 사용하였다. Table 6의 결과에 나타난 바와 같이 홍삼투여군에서는 20%, 홍삼복합방 투여군에서는 80%의 혈관

Table 5. Inhibitory effect of KRG and KRGF on cell adhesion of A549 to complex extracellular matrix (matrigel)

Group	Concentration (mg/ml)			
	Control	0.25	0.5	1.0
KRG	100±3.7*	104.1±1.96	103.7±1.82	91.82±1.39
KRGF	100±3.7	95.43±2.30	64.59±2.06	17.64±2.94

*, % of control value

Table 6. Antiangiogenic activity of KRG and KRGF in CAM assay

Group	Dose (µg/egg)	No. of CAM (avascular/total)
Control	0	10/10
KRG	15	2/10
KRGF	15	8/10

Table 7. Effect of KRG and KRGF on tumor metastasis produced by B16-BL6 melanoma cells

Group	Dose (µg/mouse)	No. of tumors (mean±SD)	Inhibition %
Control	0	113±24	0
KRG	50	120±15	-
KRGF	50	83±10	27

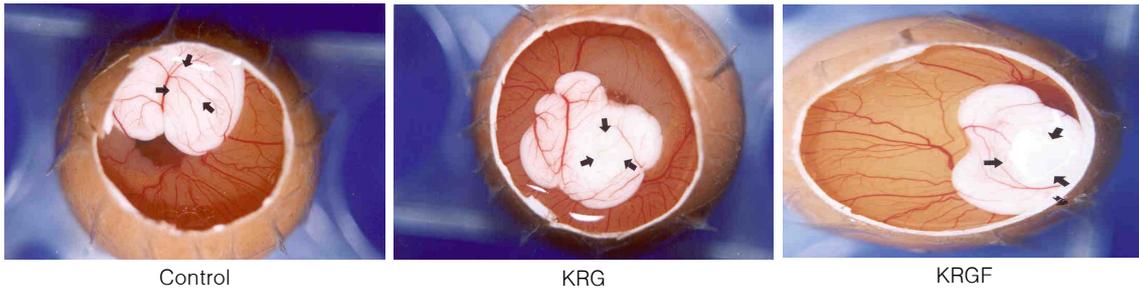


Fig. 1. Effect of KRG and KRGF on angiogenic CAM.

형성 저해작용이 있는 결과를 보였고(Table 6) 근접사진의 촬영결과는 Fig. 1에 나타났다.

성이 있는 것으로 나타났다(Table 7).

7) 홍삼 및 홍삼복합방에 의한 종양전이 억제 효과

B16-BL6 흑색종 암주를 미정맥에 주사하여 14 일째에 폐로 전이된 종양의 colony수 측정한 결과 종양대조군에는 113±24개의 전이된 종양이 관찰되었다. 그리고 50 mg의 홍삼을 투여한 군에서는 120±15개의 종양 colony가 관찰되었으나, 가미홍삼복합방의 경우는 동일한 농도의 투여군에서 83±10개의 종양 colony가 관찰됨으로서 대조군에 비하여 종양의 전이를 약 27% 정도 억제하는 활

고 찰

최근에 암의 치료보다는 그의 예방을 위한 방법에 대하여 많은 관심이 집중되고 있다. 이러한 암 예방요법은 자연적이거나 인공적인 화합물을 이용하여 암을 방지하거나 지연시키는 방법으로서는 기존의 항암제를 이용하여 암을 치료하는 개념과는 완전히 다른 예방적 차원의 의료 수단이기 때문이다.¹⁴⁾ 이 방법은 장시간 투여를 요구하고 있기에 암 예방요법에 사용되어지는 물질들은 치료제와는 달리 독성을 지니면 안되기에 한방에

서 오랫동안 사용되어 온 여러 가지 약제는 후보 물질로서 중요한 가치를 지닌다 하겠다. 본 실험에서는 홍삼 및 홍삼에 여러 가지 단미 약제를 첨가한 홍삼복합방의 항종양 효과와 그 작용기작에 대하여 검토하였다.

홍삼 및 홍삼복합방은 모두 종양세포에 대한 직접적인 독성 효과는 ED₅₀값이 1 mg/ml 이상으로서 매우 낮은 것으로 나타났다. 그러나 이들 각 시료를 마우스의 면역담당세포인 비장세포에 처리한 결과 50~500 µg/ml의 농도에서 유효한 비장세포의 증식(proliferation) 활성이 유도되었고, 주로 FACS 검색결과 두 시료에 의하여 활성화된 비장세포는 주로 T-세포인 결과를 나타냈다. 특히, 홍삼복합방의 경우 100~500 µg/ml의 농도에서 CD8⁺ T-세포를 중심으로 CD3⁺세포와 CD4⁺세포를 주로 활성화 시킴으로서 종양세포 혹은 바이러스 감염세포 등의 내인성 항원에 대하여 유효한 방어력을 유도할 가능성이 있음을 강력히 시사하였다.^{15,16)} 앞선 보고에서 윤등^{17,18)}은 홍삼으로부터의 당류가 IFN-γ 및 IL-2 등의 TH-1 type의 cytokine들을 유도하는 활성이 있다고 하였고, 이들의 결과는 본 실험에서 홍삼 및 홍삼복합방이 주로 T-세포를 활성화시킨다는 결론과 일치하였다. 특히 홍삼복합방의 경우 홍삼단독의 투여로는 유도되지 않은 강력한 CD8⁺ T-세포의 활성화가 유도됨으로서 홍삼 외에 첨가되는 단미 약제가 면역담당세포에서 종양세포에 대하여 특이적인 살해 활성을 가지는 CD8⁺ T-세포(cytotoxic T-lymphocyte, CTL)의 활성화를 유도¹⁹⁾함에 있어 상승작용(synergistic effect)을 일으킬 가능성이 있다고 볼 수 있었다. 이 사실을 근거로 하여 두 시료의 항종양 활성이 유도되는지에 대한 조사로서 S-180이 이식된 마우스에 두 시료를 경구투여하고 생존율을 조사하였다. 그 결과 홍삼단독 투여군은 대조군에 비하여 106.3%로 생명연장 활성이 없었으나, 홍삼복합방의 경우 대조군에 비하여 통계적으로 유효한 134.4%의 생명연장률이 인정되었다(Table 5). 홍삼단독의 투여로는 유도되지 않은 담암숙주의 생명연장률이 홍삼복합군에 의해 유도되는 것은 홍삼복합방에 첨가되는 다시마, 육계피, 감초, 영지, 백화사설초, 선학초, 어성초에 의한 항종양 상승작용에 기인되는 것으로 생각되

었다. 특히 영지, 백화사설초, 어성초는 이미 항암 효과가 있는 단미약제들로 보고된 바,²⁰⁻²²⁾ 앞으로 이 약제들의 첨가에 의한 항종양 활성의 상승 작용에 관한 자세한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되었다.

암의 전이과정에서 전이력을 획득한 암세포는 전이를 위하여 조직의 basement membrane에 부착을 하게 된다.²³⁾ 그 후 이들 조직을 분해하면서 혈관신생(tumor-induced angiogenesis)의 단계를 거쳐 다른 곳으로의 원격전이를 유도하게 된다.²⁴⁾ 홍삼 및 홍삼복합방의 종양전이 억제활성을 조사하기 위하여 B16-BL6 melanoma를 이용하는 종양의 전이 실험을 실시한 결과 홍삼에 의한 종양의 전이 억제는 인정되지 않았으나, 50 µg의 홍삼복합방의 복강투여는 약 27%의 종양전이 억제능이 인정되었다. 이 결과는 S-180 세포주를 이용한 담암숙주의 연명율에 미치는 활성과 일치하는 결과를 나타냈다. 이에 대한 기전의 조사로서 종양의 전이와 증식에 필수적으로 수반되는 matrigel에 대한 종양세포의 부착과 혈관신생에 대한 실험을 실시하였다. 두 시료에 의한 세포의 matrigel 부착 저지 실험에서 홍삼의 경우는 1 mg/ml의 농도까지 A549세포의 세부부착을 전혀 억제하지 못한 반면 홍삼복합방은 농도 의존적으로 유효하게 세포의 부착능을 억제하였다. 또한, 혈관형성 실험을 위한 CAM assay에서도 홍삼투여군의 경우 20%의 혈관신생을 억제한 반면 홍삼복합방의 경우는 80%의 혈관신생을 억제하는 활성을 나타냄으로서 홍삼단독에 비하여 홍삼복합방의 경우가 우수한 활성을 나타냈다. 이상의 결과로 보아 홍삼복합방에 의해 유도되는 항암활성은 주로 CD8⁺ T-세포의 활성화를 유도하는 면역조절효과와 세포의 접착 및 혈관신생 억제효과에 의하여 종양의 증식 및 전이가 억제되는 기전에 의한 것으로 생각된다. 본 연구의 결과 홍삼이 함유된 복합방은 암의 치료뿐 아니라 예방요법에도 사용 가능할 것으로 사료되는 바, 이러한 약제를 개발하기 위하여 향후 홍삼복합방을 구성하는 단미약제들에 대한 항암활성, 그들에 의하여 유도되는 상승작용 및 그의 활성물질의 탐색에 대한 보충 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 (1998)년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음.

참고 문헌

- 1) Cooper GM. Classification and development of neoplasm. Elements of human cancer. *Hoyt Publishing Service* 1992; 15-18.
- 2) Luebke L, Schenk JA, Naundorf H, Karsten U, Wunderlich V. Reverse transformation of human mammary carcinoma cells. *Anticancer Res* 1999; 19: 5119-5125.
- 3) Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997; 18: 493-497.
- 4) Hugues M, Ingrid L, Robert K, Ghanem A. Mechanism of tumor angiogenesis and therapeutic implication: angiogenesis inhibitors. *Clinical & Experimental Metastasis* 1999; 17: 1-14.
- 5) 고려인삼연초연구원. 최신고려인삼 1996; 1-3
- 6) 정노팔, 진승하. 고려인삼의 생리 및 생화학적 연구 고려인삼학회지 1996; 20: 431-471.
- 7) Kubo M, Tong CN, Matsuda H. Influence of the 70% methanolic extract from red ginseng on the lysosome of tumor cells and on the cytotoxic effect of mitomycin C. *Planta Med* 1992; 58: 424-428.
- 8) Rubinstein, LV, Paull KD, Shoemaker RH, Simmon RM, Skehan P, Boyd MR. Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 1989; 30: 2418.
- 9) van Hal PT, Wijkhuijs JM, Mulder PG, Hoogsteden HC. Proliferation of mature and immature subpopulations of bronchoalveolar monocytes/macrophages and peripheral blood monocytes. *Cell Prolif* 1995; 28: 533-543.
- 10) Gandler W, Shapiro H. Logarithmic amplifiers. *Cytometry* 1990; 11: 447-450.
- 11) Saiki I, Iida J, Murata J, Ogawa R, Nishi, Sugimura K, Tokura S, Azuma, I. Inhibition of murine malignant melanoma by synthetic polymeric peptides containing core sequence of cell-adhesive molecules. *Cancer Research* 1989; 49: 3815-3822.
- 12) Auerbach R, Kubai L, Knighton D, Forkman J. A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos. *Devl Biol* 1974; 41: 391-394.
- 13) Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I, Kim JB. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int J Immunopharmacol* 1998; 20: 163-167.
- 14) Shepherd DM, Kerkvliet NI. Disruption of CD154: CD40 blocks generation of allograft immunity without affecting APC activation. *J Immunol* 1999; 163: 2470-2477.
- 15) Babcock GJ, Decker LL, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* 1999; 190: 567-576.
- 16) Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, Smit WM, van Bergen CA, Bongaerts R, Lurvink E, van der Hoorn M, Kluck P, Landegent JE, Kluin-Nelemans HC, Fibbe WE, Willemze R. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 1999; 15: 1201-1208.
- 17) Kim KH, Lee YS, Jung IS, Park SY, Chung HY, Lee IR, Yun YS. Acidic polysaccharide from Panax ginseng, ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytokines and generates LAK cells in synergy with rIL-2. *Planta Med* 1998; 64: 110-115.
- 18) Yun YS, Lee YS, Jo SK, Jung IS. Inhibition of autochthonous tumor by ethanol insoluble fraction from Panax ginseng as an immunomodulator. *Planta Med* 1993; 59: 521-524.
- 19) Li Y, McGowan P, Hellstrom I, Hellstrom KE, Chen L. Costimulation of tumor-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes by B7, a natural ligand for CD28, can be used to treat established mouse melanoma. *J Immunol* 1994; 153: 421-428.
- 20) 정기호. 영지와 잔나비결상버섯의 원형질체 융합균주의 항암 성분에 관한 연구. 한국균학회지 1992; 63: 324-336.
- 21) 김성훈. 백화사설초로부터 분리된 항암활성물질에 관한 연구. 대전대한의학연구소논문집 1996; 8: 273-297.
- 22) 백광현, 고운채. 어성초에 관한 문헌적 고찰. 동의논집 자연과학 1997; 25: 193-205.
- 23) Saiki I. Cell adhesion molecules and cancer metastasis. *Jpn J Pharmacol* 1997; 75: 215-242.
- 24) Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, Sato K, Saiki I, Tono-oka S, Samukawa K, Azuma I. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg3, of red ginseng. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 1197-202.