

인삼 비당부와 땅빈대의 뇌암세포 독성작용

차배천, 김정애,¹ 이용수,^{2,*}

상지대학교 생명자원과학대학 동물영양자원학과,
¹부산대학교 분자생물학과, ²관동대학교 의과대학 생리학교실

Cytotoxic Activities of *Panax ginseng* and *Euphorbia humifusa* in Human Brain Tumor Cells

Bae-Cheon Cha, Jung-Ae Kim¹ and Yong Soo Lee^{2,*}

Department of Animal Nutrition & Resources, Sangji University,
Wonju 220-702, Korea; ¹Department of Molecular Biology, Pusan National
University, Pusan 607-735, Korea; and ²Department of Physiology,
College of Medicine, Kwandong University, Kangnung 210-701, Korea

Abstract - The effects of acid hydrolysis product of *Panax ginseng* and MeOH extract of *Euphorbia humifusa* on the growth of human brain tumor cells were evaluated using U-373 MG human astrocytoma and SK-N-MC human neuroblastoma cells as model cellular systems. These plant extracts induced cytotoxicity in both cells in a dose-dependent manner. These cytotoxic effects were significantly inhibited by GSH, an antioxidant, in both cells. BAPTA/AM, an intracellular Ca²⁺ chelator, significantly blocked the cytotoxic effects of these extracts in U-373 cells, but enhanced these effects in SK-N-MC cells. These results suggest that the plant extracts may be a valuable choice for the studies on the treatment of human brain tumors.

Key words - *Panax ginseng*; *Euphorbia humifusa*; human brain tumors; cytotoxicity.

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer.)은 예로부터 널리 알려진 약용식물로서 한방에서도 빈용되는 생약이다. 인삼은 강장, 강정, 혈당강하작용¹⁾ 등의 주약리작용 이외에도 각종 스트레스에 대한 방어작용이 알려져 있으며,²⁾ 이들 생리활성과 관련하여 함유성분의 화학적 연구가 활발히 진행되어져 왔다.³⁾ 최근에는 암의 치료 및 예방에 미치는 인삼의 효과에 대한 연구가 주목을 받고 있는데, 특히 인삼의 지용성 성분인 panaxytriol⁴⁾과 홍삼에만 미량 존재한다고 알려진 ginsenoside-Rg와 ginsenoside-Rh의 항암효과가 보고되었다.⁵⁾ 또한 인삼의 비당부 성분인 진성 비당부와 산가수분해에 의한 비당부 성분들의 항종양 활성에 대한 연구결과도 보고되어 있다.⁶⁾

한편, 땅빈대(*Euphorbia humifusa* Willd.)는 대극과(Euphorbiaceae)에 속하는 1년생 초본으로서 전국의 전야나 노변에 야생하며 백색의 유액을 함유하고 있고, 줄기는 보통 뿌리의 상단에서 2가지로 갈라져 지면을 따라 옆으로 뻗으며 붉은 빛을 나타내는 식물로서 그의 전초를 지금초라 한다.⁷⁾ 한방에서는 맛은 맵고, 성은 평하다고 하였고 성분연구 결과 flavonoid, 몰식자산, tannin등을 함유하고 있으며,⁸⁾ 약리활성으로서는 발병성 구균과 나균에 대한 항균활성과 포도상구균, diphtheria균, 대장균, 녹농균 등에 대해 살균작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.⁹⁾

따라서, 본 연구는 인삼의 항암효과에 대한 연구가 단일성분에 국한되어 있다는 점과, 땅빈대의 항균 및 살균작용에 대한 보고는 있지만 기타의 생리

*교신저자 : Fax 0391-49-7415

활성 검토가 이루어져 있지 않아, panaxadiol과 panaxatriol이 주성분인 인삼 산가수분해 비당부¹⁰⁾와 땅빈대의 MeOH 엑기스의 뇌종양세포에 대한 독성작용을 검토하였으므로 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료 - 실험에 사용한 인삼은 시판되는 백삼 6년근을 구입하여 사용하였고, 땅빈대는 강원도 일대에서 자생하는 생약을 채취하여 감별 후 수세, 음건하여 재료로 사용하였다. 이 식물들의 표본은 상지대 동물영양자원학과 표본실에 보관중이다. 생리활성 실험에서는 사람 뇌암세포인 U-373 MG astrocytoma 및 SK-N-MC neuroblastoma 세포종을 American Type Culture Collection(ATCC) 에서 구입하여 사용하였다.

기기 및 시약 - 시료분석을 위한 박층 chromatography는 precoated TLC plate silicagel 60 F 254를 사용하였고, 세포 viability 조사를 위해 Bio-Tek사의 Elisa reader를 사용하였다. 용매는 일급시약, 분석용 시약은 특급시약을 사용하였다. 생리활성 실험에 사용한 세포배양 배지, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2e,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), sodium pyruvate, trypsin 용액 및 환원 glutathione (GSH)은 Sigma사 제품을, bis-(o-aminophenoxy)-ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid/acetoxymethyl ester (BAPTA/AM)는 Molecular Probe사 제품을, fetal bovine serum (FBS)과 항생제는 GIBCO사 제품을 사용하였다.

인삼비당부 - 백삼을 분쇄한 후 500 g을 추출 용기에 넣고 MeOH 1 liter를 가하여 3시간씩 수욕상에서 3회 환류 추출한 후 농축하여 인삼 MeOH 엑기스 85.2 g을 얻었다. 얻어진 MeOH 엑기스 40 g을 10%-HCl/MeOH 500 ml로 가열 환류하면서 3시간 산가수분해 시킨 후, 가수분해물을 EtOAc와 H₂O(1:1)로 분배시켜 얻어진 EtOAc를 탈수 후 농축시켜 인삼 산가수분해 비당부 14.3 g을 얻었다. 이 인삼비당부는 TLC 분석 결과 panaxadiol과 panaxatriol을 주성분으로 하는 산가수분해물임을 확인하였다.

땅빈대 MeOH 엑기스 - 수세 후 음건한 땅빈대를

분말화 한 후 250 g을 추출 용기에 넣고 MeOH 1 liter로 3시간씩 3회 환류 추출하여 얻어진 MeOH 용액을 감압하에 농축하여 땅빈대의 MeOH 엑기스 34 g을 얻었다.

뇌암세포의 배양 - 뇌암세포를 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 Eagle's minimum essential medium (MEM)으로 세포수가 5×10^5 cells/ml가 되도록 하여 37°C, 포화습도로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 단층배양 하였다. 배양용기는 25 mm² flask 를 사용하였고, 배지는 5-7 ml로 하여 일주일에 두 번씩 갈아주고, 세포가 confluency에 도달하면 0.05% trypsin을 사용하여 trypsinization한 후 계대배양하여 유지하였다.

MTT 분석법에 의한 세포 Viability 측정 - 세포 viability는 MTT를 이용한 분석법에 의해 측정하였다. 간단히 설명하면, 뇌암세포를 1 ml 배지에 시료 또는 시료를 녹이는데 사용한 용매만을 처리하여 24-well multiwell plate에서 48시간 동안 배양하였다. 시료를 녹이는데 사용한 용매는 인삼비당부의 경우 ethanol을, 땅빈대의 경우 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하였고, 용매의 최종농도는 각각 0.01%이었다. 시료를 처리한 후, 세포에 MTT 용액(2.5 mg/ml H₂O) 100 μ l를 첨가하여 4시간 더 배양하였다. 세포를 trypsin으로 flask 바닥으로부터 떼어낸 후, 세포현탁액을 eppendorf tube에 옮겨 원심분리(1500 rpm, 4분) 하였다. 상등액을 조심스럽게 제거하고 DMSO 100 μ l를 첨가하여 생성된 MTT-formazan 결정체를 용해시킨 후, 540 nm에서 Elisa reader로 흡광도를 측정하였다.

Data 분석 - 모든 실험은 네번 반복해서 실시하고 실험 결과는 대조실험에 대한 백분율로 나타내었다. Data는 평균값 \pm standard error of the mean (SEM)으로 표시하고 one way analysis of variance (ANOVA)로 분석하며 각각의 유의성 비교는 Student-Newman-Keul's test를 이용하여 실시하였다. P값이 0.05 이하인 경우에만 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

인삼 산가수분해 비당부는 인삼으로 부터 순수하

게 분리된 각성분의 항암효과와 비슷하게^{4,5)} SK-N-MC 및 U-373 MG 뇌종양세포에 대해서도 농도 의존적으로 세포독성을 보였다(Fig. 1). 뇌암세포에 대한 이러한 독성작용은 다른 암세포종에서 이미 보고되어 있는^{4,5)} 여러 비당부 성분들의 협동작용에 의한 것으로 생각된다. 이러한 인삼 산가수분해 비당부를 항종양 물질로 활용한다면, 순수한 물질로 정제할 때 요구되는 기술적 어려움을 피할 수 있고, 간단한 화학적 처리에 의해 다량을 얻을 수 있으므로 경제적으로도 단가를 줄일 수 있는 장점이 있다. 한편, 땅빈대의 MeOH 엑기스도 인삼 산가수분해 비

당부의 경우와 비슷하게 SK-N-MC 및 U-373 MG 뇌종양세포에 대해 농도 의존적인 세포독성을 보였다(Fig. 1).

본 연구에서 사용한 뇌암세포와 동일한 세포종에서 저자 등은 세포내 칼슘과 활성산소 조절기전이 이들 뇌암세포의 성장과 세포독성에 중요한 역할을 한다는 사실을 보고한 바 있다.¹¹⁻¹³⁾ 따라서, 본 실험에서는 이들 엑기스의 세포독성 작용에 대한 세포내 칼슘과 활성산소 조절기전의 영향을 알아보기 위해, 세포내 칼슘을 chelate하여 칼슘농도를 낮추는 작용이 있는 BAPTA/AM과 항산화제인 GSH가 이들

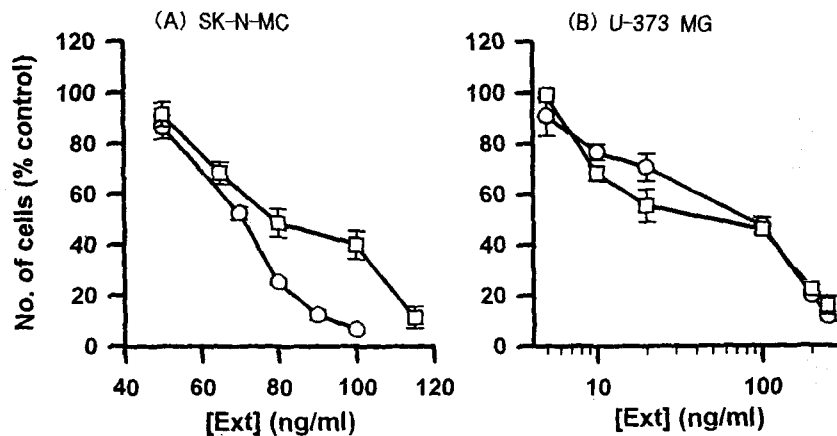


Fig. 1. Cytotoxic effects of acid hydrolysis product of *Panax ginseng* (SG Ext) and MeOH extract of *Euphorbia humifusa* W. (SD Ext) in SK-N-MC human neuroblastoma (A) and U-373 MG human astrocytoma cells (B). The results were expressed as percentage change in the number of viable cells obtained in the extract-free vehicle. Data points represent the mean values of four replicates with bars indicating SEM. —○— SG Ext; —□—SD Ext.

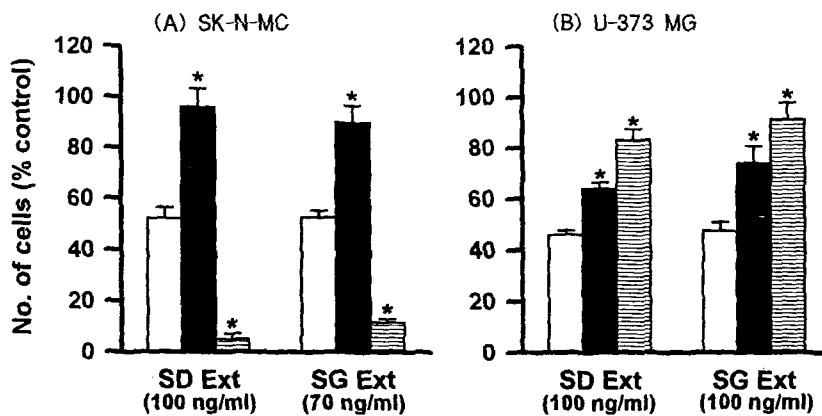


Fig. 2. Effects of GSH and BAPTA/AM on the cytotoxicity induced by acid hydrolysis product of *Panax ginseng* (SG Ext) and MeOH extract of *Euphorbia humifusa* W. (SD Ext) in SK-N-MC human neuroblastoma (A) and U-373 MG human astrocytoma cells (B). The data presentation is the same as Fig. 1. *p<0.05 compared to the control. □ Ext alone; ■+GSH(1 mM); ▨+BAPTA/AM(2 μM).

엑기스의 뇌암세포 독성작용에 미치는 영향을 조사하였다. GSH는 두 세포종에서 모두 이들 엑기스의 뇌암세포 독성작용을 유의성있게 억제하였다(Fig. 2A 및 B). 반면, BAPTA/AM은 세포종에 따라서 반대되는 결과를 나타내었는데, U-373 MG 세포종에서는 GSH와 마찬가지로 독성작용을 억제했지만(Fig. 2B), SK-N-MC 세포종에서는 오히려 독성작용을 유의성 있게 증가 시켰다(Fig. 2A). 이 결과로 미루어 보아, 이들 엑기스에 의한 뇌암세포 독성작용은 활성산소 생성기전을 직접 또는 간접적으로 촉진시켜 그 작용을 나타내는 것으로 생각된다. 적어도 U-373 MG 세포종에서는 세포내 칼슘도 이들 엑기스의 세포독성 작용에 관여하고 있다고 생각된다. 하지만, 정확한 작용기전을 밝히기 위해서는 이들 엑기스에 의한 세포내 칼슘농도 및 유리 활성산소의 변화를 측정하는 등의 연구가 필요하다. 본 연구실에서도 이와 같은 연구를 계속 수행하려 한다.

결 론

1. 인삼비당부와 땅빈대 MeOH 엑기스는 SK-N-MC 및 U-373 MG 사람 뇌종양세포에 대하여 농도 의존적으로 세포독성을 나타내었다.

2. 이러한 세포독성 작용은 항산화제인 GSH에 의해 유의성 있게 억제되었다. 또한 세포내 칼슘 chelator인 BAPTA/AM은 U-373 세포종에서는 세포독성 작용을 억제했으나, SK-N-MC 세포종에서는 오히려 증가시켰다. 이 결과는 이들 엑기스의 세포독성 작용이 세포내 유리 활성산소 생성기전 및 세포내 칼슘조절과 유기적인 관계과 있음을 시사한다. 하지만, 확실한 작용기전을 밝히기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다.

3. 따라서, 인삼비당부 및 땅빈대 엑기스는 뇌암 치료제 개발을 위한 연구에 활용가치가 큰 중요한 자원이 될 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Yokozawa, T., Kobayashi, T., Oura, H. and Kawashima, Y. (1984) Improving effects of ginsenoside-Rb₂ in streptozotocin diabetic rats with hyperglycemia and hyperlipomia. *Wakan Iyaku Gakkaishi* 1: 22-28.
2. Brekham, I. I. and Dardymov, I. V. (1969) New substances of plat origin which increase non-specific resistance. *Ann. Rev. Pharmacol.* 9: 419-430.
3. Besso, H., Kasai, R., Saruwatari, Y., Fuwa, T. and Tanaka, O. (1982) Ginsenoside-Rasub 1 and ginsenoside-Rasub 2 new dammarane-saponins of ginseng roots. *Chem. Pharm. Bull.* 30: 2380-2386.
4. Matsunaga, H., Katano, M., Yamamoto, H., Mori, M. and Takata, K. (1989) Studies on the panaxytriol of Panax ginseng C. A. MEYER. Isolation, determination and antitumor activity. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 1279-1281.
5. 大原充子, 甲野裕之, 宗志平, 小田島庸夫, 北川勳, 阿部博子, 林輝明, 有地滋 (1985) Ginsenoside의 癌細胞에對する作用. *和漢醫藥學會誌* 2: 170-171.
6. Hasegawa, H., Matsumiya, S., Uchiyama, M., Kurokawa, T., Inouye, Y., Kasai, R., Ishibashi, S. and Yamasaki, K. (1994) Inhibitory effect of some triterpenoid saponins on glucose transport in tumor cells and its application to *in vitro* cytotoxic and antiviral activities. *Planta Med.* 60: 240-243.
7. 鄭普燮, 辛民教 (1990) 圖解 鄉藥(生藥)大辭典, 760. 永林出版社, 서울.
8. 金在佶, 肖培根 (1995) 東洋傳統藥物, 346. 永林出版社, 서울.
9. 上海科學技術出版社 小學館編 (1985) 中藥大辭典 2, 1032. 小學館, 東京.
10. Ko, S. R., Choi, K. J., Kim, S. C. and Han, K. W. (1995) Content and composition of saponin compounds of panax species. *Kor. J. Ginseng Sci.* 19: 254-259.
11. Lee, Y. S. and Wurster, R. D. (1995) Intracellular Ca²⁺ mediates the cytotoxicity induced by bepridil and benzamil in human brain tumor cells. *Cancer Lett.* 88: 87-91.
12. Lee, Y. S. and Wurster, R. D. (1995) Mechanism of potentiation of LY83583-induced growth inhibition by sodium nitroprusside in human brain tumor cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 36: 341-344.
13. Lee, Y. S., Han, S. K. and Wurster, R. D. (1995) Enhancement of methylene blue-induced cytotoxicity in human brain tumor cells by an iron chelator, deferoxamine. *Arch. Pharm. Res.* 18: 159-163.

(1996년 12월 2일 접수)