大韓本草學會誌 제26권 제3호(2011년 9월)
Kor. J. Herbology 2011 ; 26(3) : 83-90

흑삼의 신생혈관 억제활성에 대한 연구

송규용[1], 정규진[1], 신영진[1], 이계원[2], 이숙영[3], 서영배[4*]

1 : 충남대학교 약학대학 약학과
2 : 건양대학교 제약공학과
3 : 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과
4 : 대전대학교 한의과대학 한의학과

Study on Antiangiogenic Effect of Black Ginseng Radix

Gyu Yong Song[1], Kyu Jin Chung[1], Young Jin Shin[1], Gye Won Lee[2], Sook-Young Lee[3], Young-Bae Seo[4*]

1 : College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
2 : Department of Pharmaceutical Engineering, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea
3 : Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
4 : Department of Herbalogy, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

ABSTRACT

Objectives : This study was performed to investigate the influence of black ginseng radix extracts (BG) and ginsenoside Rg3, Rg5 on basic fibroblast growth factor (bFGF) induced proliferation, migration and capillary tubule-like formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

Methods : HUVECs were cultured with BG and ginsenoside Rg3, Rg5 at different concentrations (60, 125, 250, 500, 1,000 ㎍/㎖) for 2 day in the presence of bFGF, respectively. XTT was used to detect the proliferation. Migration and tube formations were examined to detect the antiangiogenesis. Also, the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay was performed to detect the antiangiogenesis.

Results : BG and ginsenoside Rg3, Rg5 significantly inhibited bFGF-induced endothelial cell proliferation and migration in a dose-dependent manner. Tube formation in bFGF-induced HUVECs were suppressed by BG and ginsenoside Rg3, Rg5. Moreover, BG and ginsenoside Rg3, Rg5 (30-50 ㎍/egg) inhibited new blood vessel formation on the growing CAM.

Conclusions : Based on the present results, it can be suggested that BG has a potential chemopreventive agent via antiangiogenesis.

Key words : Black ginsneng, antiangiogesesis, ginsenoside Rg3, Rg5, CAM

서 론

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 식물로써 어원을 보면 'Pan' 은 모든 것, 'Axos' 는 의학이라는 뜻으로 만병통치라는 의미를 뜻한다. 이러한 고려인삼은 수천년 동안 고귀한 생약제로 사용되어 왔으며 역사적으로 문화적으로 그리고 산업적으로 매우 중요한 우리민족의 유산이자 자원이다[1]. 특히 고려인삼은 타국의 인삼보다 탁월한 효능을 나타낸다고 알려져 있어 각국의 소비자들에게 많은 사랑을 받아왔다. Well-Being 시대를 맞이하여 현대인들의 천연물을 선호하는 추세와 고려인삼의 다양한 효능이 실험실적 결과뿐만 아니라 임상학적으로 점차적으로 입증되어 고려인삼은 세계적인 자연건강식품으로 각광을 받게 되었고 한방 뿐만 아니라 현대의학에서도 의약품이나 건강

*교신저자 : 서영배. 대전대학교 한의과대학 본초학교실.
· Tel : +82-42-280-2625. · E-mail : genin@dju.ac.kr.
· 접수 : 2011년 8월 15일 · 수정 : 2011년 9월 7일 · 채택 : 2011년 9월 17일

기능성식품으로 그 수요가 점점 증가되고 있다. 따라서 다양한 형태로 가공인삼제품이 개발되고 있으며, 국내의 경우 기능성 인삼의 대표 제품은 지난 98년 바이오벤처기업 진생사이언스가 개발한 '선삼' 으로써 지난 2001년 선삼정으로 개발돼 국내 건강기능성식품 시장에 본격 알려진 이후 국내는 물론 전 세계적인 발명품으로도 인정받으며 기능성 인삼의 선두주자로 자리매김한 상태이다[2]. 또한 '황삼EX' , '팽화홍삼' , '바이오맥스' , '식스플러스' , '황삼' 등과 같은 여러 종류의 가공인삼이 개발되고 있다. 이와 같이 프리미엄 인삼 시대를 맞이하여 본 연구팀은 증숙법의 하나인 한약재의 가공방법 중 물과 불을 함께 사용하는 것으로 가장 대표적인 방법인 구증구포(九蒸九曝)의 원리를 이용한 새로운 가공인삼인 흑삼을 개발한 바 있다[3]. 즉, 인삼을 9번 찌고 말리는 과정을 반복하여 흑삼을 제조하였으며, 흑삼은 기존의 백삼이나 홍삼에 비해서 월등히 항암 효과 및 비만억제효과가 우수하다는 사실을 밝힌 바 있다[4]. 또한 기존의 구증구포의 방법에 비해서 제조단계를 획기적으로 개선함으로써 소량이 아닌 대량으로 품질이 우수한 표준화된 흑삼의 제조방법을 개발하여 보고한 바 있다[5].

신생혈관형성이란 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 일련의 과정으로 혈관형성의 억제제 (thrombospondin-1, angiostatin, endostatin etc.)와 활성화제 (VEGF, bFGF, EGF etc.)의 균형에 의해 조절되는 것으로, 배아발달, 생식, 상처치유 등의 과정에서 나타난다[6,7]. 암조직은 자신들의 생존을 위해 반드시 신생 혈관형성 (angiogenesis)이 필요하며, 이 혈관으로부터 산소와 영양분을 공급받지만, 혈관형성 없이 암조직은 1-2 mm이상 성장할 수 없다[7-10]. 혈관은 암세포가 다른 부위나 장기로 확산되는 과정에서의 통로로 작용하여 암치료 실패 및 암 환자 사망원인이 된다[11]. 즉 암조직의 전이와 성장은 혈관에 의존적으로 이뤄지기 때문에 혈관형성을 저해함으로써 이를 차단할 수 있으므로 혈관형성 저해제는 좋은 항암제가 될 수 있다. 또한 신생혈관형성 저해제는 기존의 항암제가 암세포를 표적으로 하는 반면 내피세포를 표적으로 하며 기존의 항암제보다 독성이 약하고 내성이 나타나지 않으므로 부작용이 적을 것으로 기대된다. 실제로 신생혈관형성 저해 작용을 통해 암세포 증식을 억제하는 angiostatin과 endostatin이 개발되어 각광을 받았으며[12], 이외에도 폴리펩타이드 류, 항생제류, 스테로이드류, 폴리양이온 및 폴리음이온류, 암억제유전자류, 폴리사카라이드류 등 여러 가지 신생혈관 억제제가 개발되고 있다. 또한 종양의 전이는 악성 종양의 대표적 특성으로 암환자에게 가장 흔한 사망원인이며 또 암 치료에도 큰 영향을 미치는 요인이다. 고형종양의 약 80%에서 전이가 일어나고, 암으로 인한 사망의 약 70%는 재발암에 의한다. 그런데 신생혈관생성은 종양의 성장에 필수적일 뿐만 아니라, 종양의 전이에도 밀접하게 관련되어 있다. 국내에서도 혈관 신생 억제와 관련하여 식물 추출물을 이용한 다양한 연구가 시행되고 있으며[13-15], 계지, 백출, 원지, 육두구, 인진, 로즈마리, 레몬밤등의 7종의 한약물에서 혈관형성을 억제하는 효과가 있다고 보고되었고[16], 울금 등 몇몇의 한약재에서는 혈관형성을 활성화하는 효과가 있다고 보고되었다[17,18].

흑삼은 이미 항암활성이 있다고 알려져 있지만 구체적인 항암활성을 나타내는 작용기전에 대한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구는 이런 흑삼의 혈관신생 억제효과를 규명하기 위하여, 혈관 내피 세포인 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)에 흑삼 및 흑삼의 주 성분인 인삼사포닌 Rg3와 Rg5을 처치하여 proliferation assay와 migration assay, tube formation assay를 실시하였고, *in vivo* 실험으로 Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM)을 이용한 assay를 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 시약 및 기기는 Gelatin (JUNSEI, Japan), PBS (GIBCO, USA), 96 well plate (SPL, KOREA), BSA (ameresco, USA), bFGF (Sigma, USA), heparin (Cambrex, USA), FBS (GIBCO, USA), XTT (Sigma, USA), 수정란 (풀무원), Intralipid 10% (Freseninus Kabi AB, Sweden), PMS (Phenazine methosulfate, Sigma, USA), EGM media (Cambrex, USA), EGM-2 singlequots (Cambrex, USA), Elisa reader (Mediators PhL, Diagnostics systems, USA), Polycarbonate membranes (8-μ m pore, Neuro Probe, USA), boyden chamber (Neuro Probe, USA), Diff Quik solution (Sysmex, Japan), matrigel (BD Biosciences, USA), 인큐베이터(SANYO, Japan), thermanox coverslip (Nunc, USA), Image Gange V. 2.54 (Fuji, Japan), OriginPro 6.1 (OriginLab Corporation, USA), microplate reader (Molecular Devices Co. USA) 등을 사용하였다.

또한 실험에 사용한 흑삼은 충남 금산지역에서 재배한 10월경에 수확한 인삼을 구입하여 세척기로 세척한 후 본 연구자가 보고한 방법[5]을 이용하여 제조하였으며, 흑삼의 주 인삼사포닌인 Rg3와 Rg5는 이미 보고한 방법[19]에 준하여 분리하여 사용하였다.

2. 세포배양

혈관 내피 세포인 HUVECs은 삼성 산부인과에서 공급받아 Jaffe 방법[20]으로 primary culture한 것을 0.1% gelatine이 coating된 plate에서 3 ng/㎖ bFGF, 5 unit/㎖ heparin, 20% FBS가 첨가된 M199배지에서 5% CO_2, 37℃조건으로 배양하였다.

3. Cytotoxicity assay

세포주를 0.1% gelatin이 코팅된 96-well 플레이트에 1×10^4 으로 깔고 24시간 후 시료를 처리하였다. 24시간 더 배양 후 PMS (sigma P-9625, 1.53 ㎎/㎖) 10 ㎕와 XTT (sigma X-4251, 1 ㎎/㎖) 1 ㎖을 혼합하여 well당 50 ㎕를 첨가한 후 2시간 후에 microplate reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군을 기준으로 세포의 생존비를 계

산하였다.

4. HUVECs proliferation

Proliferation assay는 XTT 방법[21] 을 이용하여 실시하였다. 사람의 제대로부터 분리한 혈관내피세포 (HUVECs)를 0.1% gelatin이 코팅된 96-well 플레이트에 5×10^3으로 분주하여 24시간 배양시킨 후 5% FBS만 첨가된 M199배지로 6시간 동안 starvation 시켰다. 5% FBS, 10 ng/㎖ bFGF와 5 units/㎖ heparin이 첨가된 M199배지로 시료를 농도별로 희석하여 100 ㎕씩 첨가하여 48시간 동안 배양시켰다. PMS (sigma P-9625, 1.53 ㎎/㎖) 10 ㎕와 XTT (1 ㎎/㎖) 1 ㎖을 혼합하여 well당 50 ㎕를 첨가한 후 2시간 후에 microplate reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군을 기준으로 세포의 생존비를 계산하였다.

5. HUVECs migration assay[22]

0.1% gelatin이 코팅된 6-well 플레이트에 HUVECs를 3×10^5으로 seeding 한 뒤 24시간 후에 200 ㎕ tip으로 스크래치 한 후 PBS로 세척하였다. 5% FBS, 10 ng/㎖ bFGF와 5 units/㎖ heparin이 첨가된 M199배지로 시료를 농도별로 처리한 후 15시간 배양하였다. PBS로 세척 후 Diff-Quick fixative로 세포를 고정시키고 Diff-Quick Sol.으로 세포를 염색한 후 Axiovert S 100 light microscope (Carl Zeiss, Inc., USA)에서 50배율로 사진을 찍어 이동된 세포의 수를 산출하였다.

6. HUVECs differentiation (Tube formation) assay

Differentiation assay는 Grant등의 방법[23] 을 이용하여 tube가 형성되는 것을 관찰하였다. Growth factor reduced matrigel 200 ㎕를 24-well 플레이트에 분주하여 37℃에서 30분간 코팅하였다. 5% FBS, 10 ng/㎖ bFGF와 5 units/㎖ heparin이 첨가된 M199배지로 시료와 혈관내피세포 4×10^4을 혼합하여 500 ㎕씩 분주하였다. 음성대조군에는 bFGF를 처리하지 않는다. 9시간동안 배양 후 Diff-Quick fixative로 세포를 고정시키고 Diff-Quick Sol.으로 세포를 염색한 후 Axiovert S 100 light microscope (Carl Zeiss, Inc., USA)에서 50배율로 사진을 찍어 형성된 혈관을 관찰하였다.

7. Chicken Chorioallantoic Membrane(CAM) Assay

1일째 (0일배) : 수정란을 배양기에서 부화시켰다. 이때, 배양기의 온도는 37-38℃로, 습도는 90% 이상 유지되도록 수시로 확인하였다. 여기에서 0일 배란 수정란이 산란되어 18℃에서 보관된 지 3-4일 이내의 것을 말한다.

3일째 (2일배) : 수정란의 뾰쪽한 끝부분에 칼로 흠을 냄. 이후, 수평으로 뉘어놓고 5 ㎖ 주사기로 구멍을 낸 다음 알부민을 2 ㎖ 정도 뽑아내었다. 수정란이 건조되지 않고 또 감염되지 않도록 구멍을 유리테잎으로 봉한 후 구멍이 아래로 향하도록 놓고 다시 배양시켰다.

4일째 (3일배) : 수정란의 air sac이 있는 쪽(주사기 구멍의 반대쪽)으로 직경 2-3 ㎝ 크기의 원형 window를 내고 수정란으로 확인된 것만 넓은 유리테잎으로 막고 다시 배양시켰다. 참고로, 원형 window를 내는 방법은 날카로운 칼로 수정란의 껍질 위에 원형으로 흠을 낸 뒤 핀셋으로 껍질을 뜯어내었다. 이때 껍질가루가 안쪽으로 떨어지지 않도록 주의함. 수정란이란 window를 냈을 때 십자가형의 가는 혈관이 보이는 것을 의미한다.

5일째 (4.5일배) : 이 시기가 되면 CAM이 생성되며, 그 직경이 2-5 ㎜ 정도 되었다. 시료를 이차 증류수에 녹인 다음 4 등분된 Thermanox coverslip 위에 10 ㎕씩 떨어뜨리고 clean bench 안에서 말렸다. 여기서 Thermanox coverslip은 가위로 잘라 4등분하여 clean bench의 UV 아래에서 overnight 시킨 것이다. 수정란의 유리테잎을 칼로 뜯어내고 CAM을 찾아 확인한 후, 핀셋으로 시료가 처리된 Thermanox를 뒤집어 조심스럽게 올려놓고 다시 유리테잎으로 막았다. 이때 사용하는 가위, 칼, 핀셋 등은 70% 에탄올로 소독하여 사용하고, 핀셋은 시료를 하나하나 loading할 때마다 소독하여 사용하였으며, 기타 실험기구들도 수정란이 감염되지 않도록 주의하면서 사용하였다.

7일째 (6.5일배) : 유리테잎을 칼로 뜯어내었다. 주사기로 Intralipose (fat emulsion)를 1 ㎖ 취하고, 기포를 제거한 뒤 CAM의 바로 아래 부분에 주입하였다. 이때 흰색 바탕에 뚜렷한 혈관을 관찰할 수 있었다. 주사기로 Intralipose를 주입할 때는 혈관이 다치지 않도록 주의하였으며, 관찰이 끝난 수정란을 카메라로 근접 촬영하였다.

실험결과 및 고찰

1. HUVEC proliferation 억제작용

혈관신생을 위해서는 혈관내피세포가 증식된 후 침윤성 성장을 통해 암조직을 향해 자라나고, 혈관내피세포들이 분화하여 혈관을 형성하게 된다. bFGF는 사람 혈관내피 세포인 HUVEC의 강력한 혈관형성 촉진제로서 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 다양하게 사용되어지고 있는 물질이다. 흑삼의 bFGF에 의해서 유도된 신생혈관형성의 증식억제활성을 관찰하기 위하여 먼저 60-1,000 ㎍/㎖ 농도에서 HUVEC에 대한 세포독성을 관찰한 결과 세포독성을 나타내지 않았으며, 흑삼추출물의 bFGF에 의해서 유도된 혈관내피 세포의 증식억제활성은 Fig. 1.에 나타내었다. 흑삼추출물은 bFGF에 의해서 유도된 HUVEC 의 증식을 농도 의존적으로 억제하였다. 즉, 125 ㎍/㎖ 농도에서부터 HUVEC의 증식을 억제하였으며 유의성 있게 500 ㎍/㎖ 농도에서는 58%, 1,000 ㎍/㎖ 농도에서는 67%의 증식을 억제하였다.

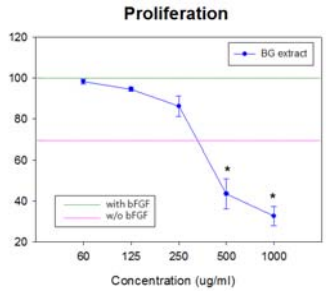

Fig. 1. Effect of Black Ginseng Radix Extract on bFGF-induced Proliferation of HUVEC
All data were expressed as the mean±the standard deviation, and statistical significance was analyzed using a one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls Multiple Comparison Test. *P* values <0.05 were considered significant. All analyses were performed using the GraphPad PRISM® version 4 statistical program (GraphPad Software Inc., San DiegoCA, U.S.A.). Values represent the mean±S.D. *P<0.05

한편, 수삼을 증기로 쪄서 익힌 후 말린 홍삼에는 수삼에 존재하는 인삼사포닌의 당 성분들이 가수분해되어 수삼에 비해서 다수의 인삼사포닌이 존재한다고 알려져 있다. 또한 흑삼은 수삼을 구증구포 방법에 의해서 제조되기 때문에 홍삼에 비해서 더 많은 수의 인삼사포닌이 존재하게 된다. 특히 수삼이나 홍삼에는 소량 존재하지만 흑삼에 특이적으로 많이 존재하는 인삼사포닌은 Rg3 및 Rg5로 알려져 있으며 항암활성을 포함하여 다양한 활성을 나타낸다고 알려져 있다.[24-26] 따라서 흑삼추출물이 HUVEC 증식억제활성을 나타내어 흑삼의 주요 성분인 Rg3와 Rg5의 HUVEC 증식억제활성을 측정하고자 하였다. Rg3 및 Rg5는 실험에 사용한 60-1,000 ㎍/㎖ 농도에서 HUVEC에 대한 세포독성을 관찰한 결과 세포독성을 나타내지 않았으며, 실험결과를 Fig. 2 및 3에 나타내었다. Fig. 2.에서와 같이 Rg3는 농도의존적으로 HUVEC 증식억제활성을 나타내었으며, 250 ㎍/㎖ 농도에서부터 유의성 있게 억제활성을 나타내어, 고농도인 500 ㎍/㎖에서는 32%, 1,000 ㎍/㎖ 농도에서는 62%의 증식억제 활성을 나타내었다. 또한 Rg5도 역시 Rg3와 마찬가지로 농도의존적으로 HUVEC 증식억제활성을 나타내었으며, 500 ㎍/㎖ 농도에서부터 유의성 있게 억제활성을 나타내어, 500 ㎍/㎖에서는 21%, 1,000 ㎍/㎖ 농도에서는 61%의 증식억제 활성을 나타내었다 (Fig. 3.).

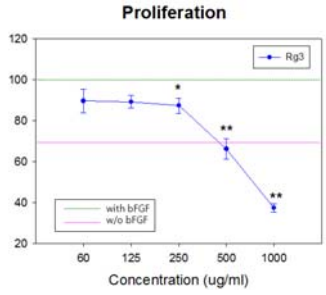

Fig. 2. Effect of Rg3 on bFGF-induced Proliferation of HUVEC
All data were expressed as the mean±the standard deviation, and statistical significance was analyzed using a one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls Multiple Comparison Test. *P* values <0.05 were considered significant. All analyses were performed using the GraphPad PRISM® version 4 statistical program (GraphPad Software Inc., San DiegoCA, U.S.A.). Values represent the mean±S.D. *P<0.01, **P<0.001

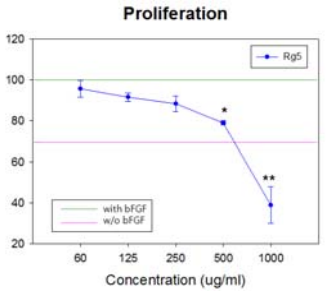

Fig. 3. Effect of Rg5 on bFGF-induced Proliferation of HUVEC
All data were expressed as the mean±the standard deviation, and statistical significance was analyzed using a one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls Multiple Comparison Test. *P* values <0.05 were considered significant. All analyses were performed using the GraphPad PRISM® version 4 statistical program (GraphPad Software Inc., San DiegoCA, U.S.A.). Values represent the mean±S.D. *P<0.01, **P<0.001

2. HUVEC migration 억제작용

흑삼추출물의 bFGF에 의해서 유도된 혈관내피세포의 이동 억제활성은 Fig. 4.에 나타내었다. 흑삼추출물은 bFGF에 의해서 유도된 HUVEC의 이동을 농도 의존적으로 억제하였다. 즉, 125 ㎍/㎖ 농도에서부터 HUVEC의 증식을 억제하였으며 250 ㎍/㎖ 농도에서는 20%, 500 ㎍/㎖ 농도에서는 35%, 1,000 ㎍/㎖ 농도에서는 66%의 유의성 있게 HUVEC 이동 억제활성을 나타내었다. 또한 앞서 설명한 바와 같이 흑삼추출물이 HUVEC 이동 억제활성을 나타내었기 때문에 흑삼의 주요 성분인 Rg3와 Rg5의 HUVEC 이동 억제활성을 측정하고자 하였다. 실험결과를 Fig. 5. 및 6.에 나타내었다. Fig. 5.에서와 같이 Rg3는 농도의존적으로 HUVEC 이동 억제활성을 나타내었으며, 250 ㎍/㎖ 농도에서는 17%의 유의성 있게 HUVEC의 이동 억제활성을 나타내었다. 고농도인 500 ㎍/㎖에서는 39%, 1,000 ㎍/㎖ 농도에서는 62%의 이동 억제활성을 나타내었다. 또한 Rg5도 역시 Rg3와 마찬가지로 농도의존적으로 HUVEC 증식억제활성을 나타내었으며, 500 ㎍/㎖ 농도에서부터 유의성 있게 억제활성을 나타내어, 500 ㎍/㎖에서는 21%, 1,000 ㎍/㎖ 농도에서는 56%의 이동 억제활성을 나타내었다.

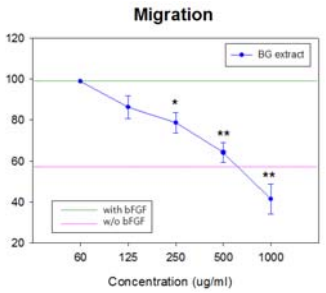

Fig. 4. Effect of Black Ginseng Radix Extract on bFGF-induced Migration of HUVEC.
All data were expressed as the mean±the standard deviation, and statistical significance was analyzed using a one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls Multiple Comparison Test. *P* values <0.05 were considered significant. All analyses were performed using the GraphPad PRISM® version 4 statistical program (GraphPad Software Inc., San DiegoCA, U.S.A.). Values represent the mean±S.D. *P<0.01, **P<0.001

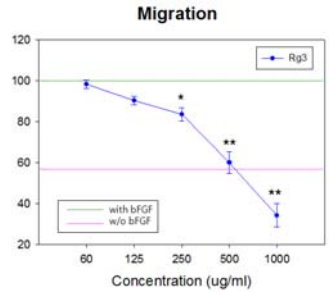

Fig. 5. Effect of Rg3 on bFGF-induced Migration of HUVEC
All data were expressed as the mean±the standard deviation, and statistical significance was analyzed using a one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls Multiple Comparison Test. *P* values <0.05 were considered significant. All analyses were performed using the GraphPad PRISM® version 4 statistical program (GraphPad Software Inc., San DiegoCA, U.S.A.). Values represent the mean±S.D. *P<0.01, **P<0.001

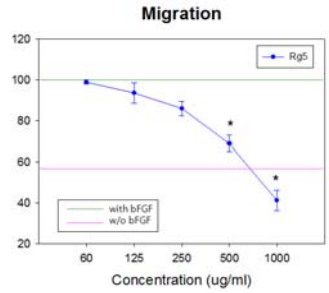

Fig. 6. Effect of Rg5 on bFGF-induced Migration of HUVEC
All data were expressed as the mean±the standard deviation, and statistical significance was analyzed using a one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls Multiple Comparison Test. *P* values <0.05 were considered significant. All analyses were performed using the GraphPad PRISM® version 4 statistical program. Values represent the mean±S.D. *P<0.01

3. HUVEC tube formation 억제작용

혈관내피세포는 증식된 후 침윤성 성장을 통해 암 조직을 향해 자라나고, 혈관내피세포들이 분화하여 최종적으로 혈관을 형성하게 된다. 따라서 혈관내피세포의 분화도에 대하여 알아보는 tube formation assay를 실시하였다. Fig. 7.에서와 같이 HUVEC 세포에 신생혈관형성 인자인 bFGF를 처리하면 tube 형성이 잘 이루어졌음을 확인 할 수 있었다. 여기에 흑삼추출물(50 ㎍/㎖)을 처리하면 HUVEC tube 형성이 저해됨을 관찰할 수 있었다.

또한 흑삼의 주요 성분인 Rg3와 Rg5의 HUVEC tube formation 억제활성을 측정하고자 하였다. 실험결과를 Fig. 8. 및 9.에 나타내었다. Fig. 8.에서와 같이 Rg3는 30 ㎍/㎖ 농도에서 HUVEC tube formation 억제활성을 나타내었다. Fig. 9.에서와 같이 Rg5도 Rg3와 마찬가지로 30 ㎍/㎖ 농도에서 HUVEC tube formation 억제활성을 나타내었다.

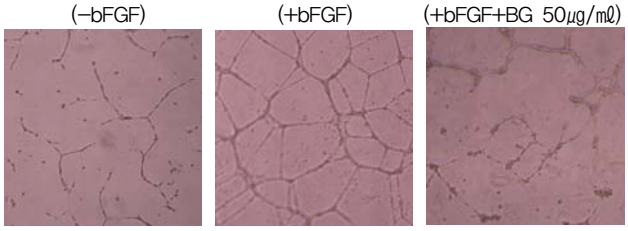

Fig. 7. Effect of Black Ginseng Radix Extract on bFGF-induced Tube Formation of HUVEC

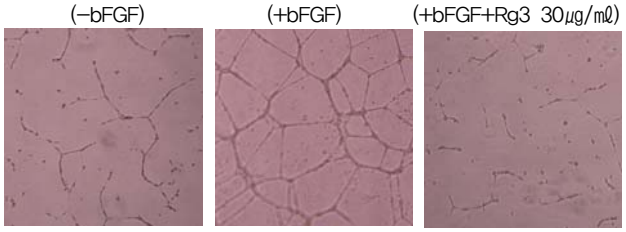

Fig. 8. Effect of Rg3 on bFGF-induced Tube Formation of HUVEC

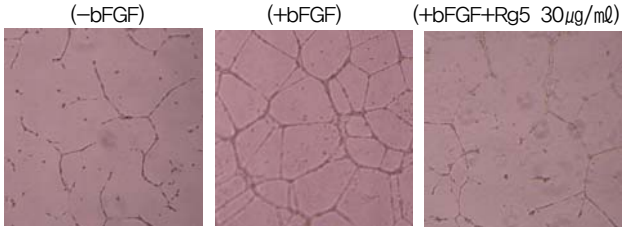

Fig. 9. Effect of Rg5 on bFGF-induced Tube Formation of HUVEC

4. *in vivo* 신생혈관 억제작용

흑삼추출물 및 흑삼의 주 성분인 Rg3와 Rg5가 HUVEC의 증식억제, 이동억제 및 tube formation 억제활성을 나타냄을 관찰하여 *in vivo* 실험을 통해서 흑삼의 신생혈관 억제활성을 관찰하고자 하였다. 본 실험에서는 수정란의 Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM)의 신생혈관 형성 여부를 알아보기 위해 bFGF를 처리하여 혈관형성을 유도한 후 흑삼추출물, Rg3, Rg5를 투여하였다.

실험결과는 Fig. 10.에 나타내었다. Fig. 10A.에서와 같이 유정란에 bFGF (100 ng)를 처리하면 혈관이 잘 형성됨을 알 수 있었다. 여기에 흑삼추출물(Fig. 10B, 0.1 ㎍/egg)을 처리하면 혈관형성이 실험에 사용한 유정란 10개 중 6개가 억제되었다 (60%). 또한 Rg3 (Fig. 10C, 0.1 ㎍/egg)를 처리하면 실험에 사용한 유정란 10개 중 7개가 억제 (70%) 되었으며, Rg5 (Fig. 10D, 0.1 ㎍/egg)를 처리하면 실험에 사용한 유정란 10개 중 5개가 억제 되었다 (50%).

흑삼은 이미 항암활성[3]을 비롯한 여러 가지 활성[27-30]을 나타내어 많은 관심을 받고 있는 가공인삼이다. 그러나 흑삼의 항암활성에 대한 구체적인 작용 메카니즘에 대한 연구가 미비한 상태이므로 흑삼의 신생혈관 억제활성을 관찰하고자 하였다. 앞서 설명한 바와 같이 신생혈관형성은 악성 종양의 성장과 전이에 밀접한 연관성이 있으며, 이를 바탕으로 외국의 경우에 항암제 및 여러 질환의 치료제로 이용하기 위한 혈관 신생 억제제 연구가 활발히 진행되고 있다. 1971년 Folkman에 의해서 원발성 종양이 존재할 경우 혈액 속에 혈관형성을 억제하는 물질이 존재한다는 가정아래 처음으로 anti-angiogenic therapy가 암치료를 위한 수단으로 등장한 이래[31], Harvard의대의 Vallee 등에 의해 혈관신생 유도단백질인 angiogenin이 사람의 腺癌細胞의 배양액으로부터 최초로 분리되었고, 1994년에는 원발성 종양을 갖고 있는 쥐의 혈청과 오줌으로부터 38kDa의 angiostatin을 분리해내어 angiogenesis 억제효과를 확인했으며, 1997년에는 20kDa의 endostatin이라는 물질을 분리해내어 혈관내피세포의 성장을 억제하는 효과를 확인하였고, 1998년에는 NCI에서 공식적으로 angiostatin과 endostatin을 동시에 투여하여 쥐에 유발된 종양의 성장을 억제함을 발표함으로써, 종양의 혈관신생억제가

새로운 종양 치료방법으로 세계적인 관심을 끌게 되었다[32]. 현재까지 알려진 angiogenesis 억제제는 angiostatin, endostatin, 2-methoxyestradiol, TNP-470 등이 있으며, 최근 미국에서 Avastin (Anti-VEGF mAb)이 2004년 FDA 허가 취득하여 시판 중에 있으며, vitaxin, EMD 121974 등이 임상 시험 중에 있다. 이와 같이 혈관신생을 조절하는 물질을 찾아내어 항암제로 개발하려는 가장 큰 이유는 암세포에 대하여 직접적으로 작용하여 암세포를 죽이기보다는 암세포가 성장하기 위해서 필수적인 혈관신생을 원천적으로 억제함으로써 부작용이 없는 이상적인 항암제를 개발할 수 있다는 점이다. 인삼의 경우 신생혈관형성에 미치는 영향에 대한 연구를 살펴보면, 수삼 및 홍삼에 많이 존재하는 인삼사포닌 Re 및 Rg1은 신생혈관형성 촉진작용을 나타낸다고 알려져 있다[33,34].

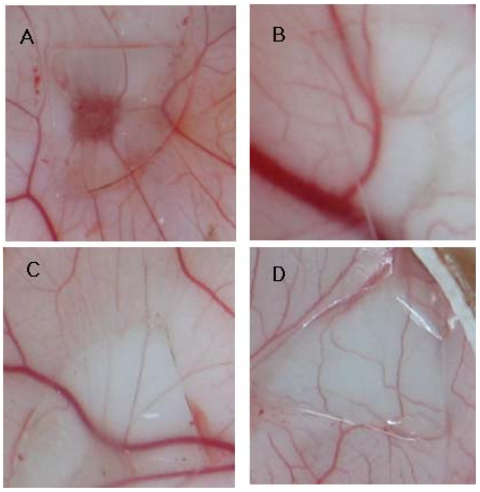

Fig. 10. Effect of Black Ginseng Radix Extract, Rg3 and Rg5 on bFGF-induced CAM
For CAM assay, 10 eggs were used per group. Saline (A, 10 ㎕/egg, negative control), black ginseng radix extract (B, 0.1 ㎍/egg), Rg3 (C, 0.1 ㎍/egg) or Rg5 (D, 0.1 ㎍/egg) containing cover slip was respectively located on CAMs of 4-5 day chicken embryos as described in material and methods. After 2 days, the number of avsacular eggs were analyzed and photographed under stereomicroscope.

본 연구에서는 흑삼의 신생혈관형성 억제활성을 규명하기 위하여 흑삼추출물을 HUVEC 에 처리하여 HUVEC 증식, 이동, tube formation 및 *in vivo* 실험에서 신생혈관형성에 미치는 영향을 살펴본 결과 Rg1 및 Re의 결과와는 반대로 농도의존적으로 억제활성을 나타냄을 확인하였다. 이러한 결과는 홍삼에 미량 존재하며 흑삼에 많이 존재하는 인삼사포닌 Rg3가 신생혈관 억제작용을 나타낸다는 기존의 연구결과[35,36]와 일치하는 것으로서 인삼에 존재하는 사포닌의 구조에 따라서 신생혈관형성에 미치는 효과가 다르다는 것을 의미한다. 즉, 인삼의 증숙과정 중에 인삼 사포닌의 OH기에 결합되어 있는 여러 가지 당 성분들이 열에 의해서 가수분해되어 다른 구조를 지닌 인삼 사포닌으로 변화되기 때문에 수삼, 홍삼 및 흑삼의 신생혈관형성에 미치는 결과가 달라진다는 것을 의미한다. 따라서 향 후 흑삼을 이용한 항암제 개발 및 Rg3, Rg5 이외에 흑삼에 존재하는 다른 인삼사포닌들에 대한 신생혈관 억제활성 및 기전연구에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

결 론

기존의 전통적인 방법인 구증구포의 방법이 아닌 새로운 고온고압을 이용한 흑삼을 제조하는 방법을 이용하여 흑삼을 제조하였으며 흑삼으로부터 흑삼에 특이적으로 많이 존재하는 인삼사포닌 Rg3, Rg5를 분리하여 혈관내피세포인 HUVEC에 bFGF를 처리하여 혈관형성을 유도한 후 proliferation, migration, tube formation에 미치는 영향을 살펴보았으며, *in vivo* 실험으로 CAM assay를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 흑삼추출물은 125 ㎍/㎖ 농도에서부터 HUVEC 증식 및 이동을 억제하였으며, 50 ㎍/㎖에서 tube formation을 억제하였다. 또한 흑삼에 특이적으로 많이 존재하는 인삼사포닌인 Rg3와 Rg5도 HUVEC 증식, 이동 및 tube formation을 억제하였다. 한편, *in vivo* 실험에서 흑삼추출물, Rg3 및 Rg5가 각각 60%, 70% 및 50%의 억제활성을 나타내었다.

이상의 결과로 보아 흑삼의 항암활성은 신생혈관 억제활성에 기인하는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술개발 연구과제(과제번호 110060-03-2-CG000)에 의해 수행되었던 바 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee SI. The history of Korean ginseng 2nd. Samhwa press. 1980 : 166.
2. Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H, Surh YJ. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. Cancer Lett. 2000;150 : 41-48.
3. Lee JH, Shen GN, Kim EK, Shin HJ, Myung CS, Oh HJ, Kim DH, Roh SS, Cho W, Seo YB, Park YJ, Kang CW, Song GY. Preparation of black ginseng and its antitumor activity. 2006;20(4) : 951-956.
4. Song GY, Ph HJ, Roh SS, Seo YB, Park YJ, Myung CS. Effect of black ginseng on body weight and lipid profiles in male rats fed normal diets. Yakhak Hoeji. 2006;50 : 381-385.
5. 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. Preparation of black panax ginseng by new methods and its antitumor activity. The Korea Journal Herbology. 2008;23(1) : 85-92.
6. Kim Y. Deoxypodophyllotoxin; the cytotoxic and antiangiogenic component from Pulsatilla koreana.

Planta Med. 2003;68(3) : 271-274.
7. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis : potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. Pharmacol. Rev. 2000;52(2) : 237-68.
8. Bergers G, Benjamin L. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat. Rev. Cancer. 2002;3 : 401-410.
9. Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. Semin. Cancer Biol. 2003;3 : 159-167.
10. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature. 2000;407 : 249-57.
11. Folkman J, Siegel Y. Angiogenesis. J Biol Chem. 1992;267 : 10931-10934.
12. Boyd D. Invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev. 2006;15(1) : 77-89.
13. Nam NH, Kim HM, Bae KH. Ahn BZ. Inhibitory effects of Vietnamese medicinal plants on tubelike formation of human umbilical venous cells. Phytother.Res. 2003;17 : 107-111.
14. Lee KH, Choi HR. Kim CH. Anti-angiogenic effect of the see extract of Benincasa hipida Cogniaux. J. Ethnophamacol. 2005;97 : 509-513.
15. Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin C, Lim CJ, Park EH. Anti-acngiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom Phellinus linteus. J. Ethnopharmacol. 2003;88 : 113-116.
16. Kim JS, Park BY, Park EK, Lee HS, Hahm JC, Bae KH, Kim MY. Screening of Anti-angiogenic Activity from Plant Extracts. Korean Journal of Pharmacognosy. 2006;37(4) : 253-257.
17. Huh JE, Baek YH, Lee JD, Choi DY, Park DS. Screening and mechanism study of angiogenesis in many herbs medicine. The journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2007;24(5) : 23-32.
18. Plate KH, Breier G, Risau W. Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. Brain Pathol. 1994;4 : 207-18.
19. Ha YW, Lim SS, Ha IJ, Na YC, Seo JJ, Shin H, Son SH, Kim YS. Preparative isolation of four ginsenosides from Korean red ginseng (steam-treated Panax ginseng C. A. Meyer), by high-speed countercurrent chromatography coupled with evaporative light scattering detection. Journal of Chromatography, A. 2007;1151(1) : 37-44.
20. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins.Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest. 1973;52 : 2745-2756.
21. Jost LM, Kirkwood JM, Whiteside TL. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. J Immunol Methods. 1992;147 : 153-165.
22. Reynolds AR, Reynolds LE, Nagel TE, Lively JC, Robinson SD, Hicklin DJ, Bodary SC, Hodivala-Dilke KM. Elevated Flk1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) Signaling Mediates Enhanced Angiogenesis in β_3-Integrin-Deficient Mice. Cancer Res. 2004;64 : 8643-8650.
23. Grant DS, Kinsella JL, Fridman R, Auerbach R, Piasecki BA, Yamada Y, Zain M, Kleinman HK. Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic behavior in vivo. J Cell Physiol. 1992;153 : 614-25.
24. Nguyen HT, Yang SY, Kim JA, Song GY, Kim YH. Dammarane-type saponins from the black ginseng. Bulletin of the Korean Chemical Society. 2010;31(11) : 3423-3426.
25. Liu L, Zhu XM, Wang QJ, Zhang DL, Fang ZM, Wang CY, Wang Z, Sun BS, Wu H, Sung CK. Enzymatic preparation of 20(S,R)-protopanaxadiol by transformation of 20(S,R)-Rg3 from black ginseng. Phytochemistry. 2010;71(13) : 1514-1520.
26. Sun BS, Gu LJ, Fang ZM, Wang CY, Wang Z, Sung CK. Determination of 11 ginsenosides in black ginseng developed from Panax ginseng by high performance liquid chromatography. Food Science and Biotechnology. 2009;18(2) : 561-564.
27. Kim HJ, Lee, JY, You BR, Kim HR, Choi JE, Nam KY et al. Antioxidant activities of ethanol extracts from black ginseng prepared by steaming-drying cycles. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2011;40(2) : 156-162.
28. Kim AJ, Kang SJ, Lee KH, Lee MS, Ha SD, Cha YS, Kim SY. The chemopreventive potential and anti-inflammatory activities of Korean black ginseng in colon26-M3.1 carcinoma cells and macrophages. J Korean Soc Appl Biol Chem. 2010;53(1) : 101-105.
29. Lee MR, Yun BS, Sun BS, Liu L, Zhang, DL, Wang CY, Wang Z, Ly SY, Mo EK, Sung CK. Change of ginsenoside Rg3 and acetylcholinesterase inhibition of black ginseng manufactured by grape juice soaking. J Gineng Res. 2009;33(4) : 349-354.
30. Lee MR, Yun BS, Liu L, Zhang DL, Wang Z, Wang CL, Gu LJ, Wang CY, Mo EK, Sung CK. Effect of black ginseng on memory improvement in the amnesic mice induced by scopolamine. J Ginseng Res. 2010;34(1) : 51-58.

31. Folkman J. Tumor angiogenesis : therapeutic implications. N. Engl. J. Med. 1971;285 : 1182-1186.
32. Kim LS, MacDonald NJ, Gubich ER. Angiostatin and Endostatin : Endogenous Inhibitors of Tumor Growth. Cancer and metastasis reviews. 2000;19(1) : 181-190.
33. Yue PY, Wong DY, Ha WY, Fung MC, Mak NK, Yeung HW, Leung HW, Chan K, Liu L, Fan TP, Wong RN. Elucidation of the mechanisms underlying the angiogenic effects of ginsenoside Rg(1) in vivo and in vitro. Angiogenesis. 2005;8(3) : 205-16.
34. Yu LC, Chen SC, Chang WC, Huang YC, Lin KM, Lai PH, Sung HW. Stability of angiogenic agents, ginsenoside Rg1 and Re, isolated from Panax ginseng : in vitro and in vivo studies. Int J Pharm. 2007;328(2) : 168-76.
35. Yue PY, Wong DY, Wu PK, Leung PY, Mak NK, Yeung HW, Liu L, Cai Z, Jiang ZH, Fan TP, Wong RN. The angiosuppressive effects of 20(R)-ginsenoside Rg3. Biochem Pharmacol. 2006;72(4) : 437-45.
36. Chen MW, Ni L, Zhao XG, Niu XY. The inhibition of 20(R)-ginsenoside Rg3 on the expressions of angiogenesis factors proteins in human lung adenocarcinoma cell line A549 and HUVEC304 cell. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2005;30(5) : 357-60.