

“쥐에서의 홍삼제조물질의 SW480대장암 세포주의 성장억제효과”

초 록

홍삼물질의 항암효능과 cytolase처리한 홍삼(발효홍삼)제품에 세포독성 분석실험 및 인체 결장 선암세포(SW480)를 이식한 누드 쥐에 대해 연구하였다. 물질의 면역력 향상 효과 또한 탄소청소시험을 이용해 평가하였다. Rb1을 함유한 Protopanaxadiols와 Rg3를 함유한 Protopanaxatriols의 농도는 RGP보다 Cytolase-RGP에서 1.42-3.43배 훨씬 높았다. RGP와 Cytolase-RGP는 투약의존성 SW480에 대한 실험에서 독성이 있었고, IC₅₀을 각각 255 µg/ml정도와 1,090µg/ml억제하였다. 동물실험에서 4주간 300 mg/kg RGP or Cytolase-RGP의 적용은 암을 가지고 있는 쥐의 암성장을 억제했고, 암의 중량과 크기를 각각 15.6-19.3%와 24.4-27.1%감소하였다. 탄소청소분석에서 300 mg/kg양의 RGP or Cytolase-RGP로 7일 동안 치료에서 대식세포계의 식세포지수는 각각 307%와 402% 수준으로 높아졌다. 결과적으로 Cytolase-RGP는 RGP보다 SW480암억제 효능이 우수하였고, Cytolase-RGP의 증가된 항암활성은 독성 활성이 아무리 증가될지라도 면역제어 활성을 향상시킴이 분명하다.

서 론

Ginsenosides는 항암효과를 포함한 다양한 약리활성을 가지고 있어 동양의학에서 폭 넓게 사용되어 왔던 인삼뿌리의 잘 알려진 사포닌 성분이다. Ginsenosides의 다양한 종류 중에 Rb1,Rb2,Rd,Rh2 그리고, 특히 Rg3는 항암 활성을 가지고 있다고 보고되었다. 특히, Protopanaxadiols(Rb포함)와 Protopanaxatriols(Rg포함)은 장내세균으로부터 β-glucosidase 같은 효소에 의해 각각 Compound-K와 Rh1으로 주로 변화되고, 그 원래 형태에서 최소 부분의 장내흡수를 시킨다. 이러한 발견은 Ginsenosides의 독성실험과 항암 가능성 동물실험 사이에 차이로 인하여 논쟁을 야기시켰다.

Ginsenosides의 구성물 중에 특히 Rh1,Rh2와 Rg3는 보통 원료삼의 증숙과정에서 홍삼으로 만들어지는 동안 증가되고, 생물학적 활성을 증대시킨다. 특히, β-glucosidase또는 Cytolase를 통한 인삼추출물의 발효는 확연히 원료삼에서 매우 적은 Rh2와 Rg3를 증가시킨다. 최근 우리는 Cytolase로 RGP를 처리하여 Rb1,Rh1,Rh2와 Rg3를 포함한 고농도의 Ginsenosides가 담긴 물질을 얻었고, 이 Cytolase-RGP는 면역조절작용과 H460폐암을 자지고 있는 쥐에 암억제 효과를 나타냈다.

대장암은 서양에서 두 번째로 가장 흔한 치명적인 암이다. 최근 한국을 포함한 발전하는 아시아 국가들의 음식 소비 패턴의 변화가 더욱 서구 생활습관을 따라가 대장암의 비율을 상당히 증가시키고 있다. HT29 대장암세포에 Rg3의 항증식, 항침습 및 세포사멸 활성 뿐만 아니라 Rg3처리에 따른 도세탁셀에 대장암세포의 민감성을 높임에 따라 인체 대장 선종 세포계인 SW480으로 이식한 누드쥐에서 더욱이 세포독성실험과 면역항상활성 동물실험에서 RGP와 Cytolase-RGP의 암억제 효능의 현존하는 상대적인 평가를 유발시킨다.

재료와 방법

테스트 물질 : RGP는 6년근 한국인삼을 90°C에서 8시간 동안 진공농축으로 증숙하여 준비했다. Cytolase-RGP를 얻기 위하여, RGP는 Cytolase PCL5, 펙티나아제를 담고 있는 펙틴저하효소 혼합물, 펙틴 리아제와 Polygalacturonase를 섞어 40°C에서 8시간동안 PH4.2-4.5로 조정하고 증발시킨 후 처리하였다. Cytolase로 발효시키는 동안 Rg3를 포함한 주요 Ginsenosides의 물질들이 Cytolase-RGP와 원래의 RGP의 비교에서 현저하게 1.42-3.43배 증가하였다.

항암활성 동물실험 : RGP와 Cytolase-RGP의 암억제 효능이 암회귀 모델로 평가되었다. Matrigel-mixed SW480세포는 누드쥐의 옆구리에 피하에 주사하였다. 암의 면적이 800mm³에 도달했을때, 암세포를 이식한 쥐는 4주동안 매일 RGP또는 Cytolase-RGP(300 mg/kg)를 구강 투여했다. 암크기의 진행은 디지털 캘리퍼로 4주동안 1주에 2회씩 측정하고 공식을 사용하여 분석했다. 최종 처리후에 쥐를 죽여 실제 암의 무게와 면적을 측정하였다.

결과와 고찰

RGP와 Cytolase-RGP는 농도 의존성법에서 SW480세포에 대한 즉각적인 세포독성을 가졌다. RGP와 Cytolase-RGP의 50% 저지농도(IC₅₀)는 각각 255와 1,090µg/ml이었다.(Fig.1) RGP는 SW480암세포에 대한 세포독성에서 Cytolase-RGP보다 4.3배 더 효과적이었다.

7일간 RGP혹은 Cytolase-RGP의 100mg/kg으로 구강 투여한 쥐에서 혈청 대식세포계의 식세포지수가 각각 118%와 372% 증가하였다(Table 2). 더욱이 RGP와 Cytolase-RGP의 많은 양(300mg/kg)은 식세포 포텐셜을 307%와 402%로 훨씬 더 향상시켰고, Cytolase-RGP는 RGP보다 더 높은 효과를 보여준다.

그다음 이식에서, 대조군의 표면적으로 캘리퍼를 사용하여 측정한 암의 크기는 4주 동안 길이가 증가하여 크기가 6,380mm³에 도달함을 보였다.(Fig.2). RGP(300mg/kg)는 처음 치료후10일부터 암성장을 감소시켰고, 최종 암의 면적은 5,020mm³으로 되었다. 그에 비해, 더 높은 암억제 효과는 Cytolase-RGP(300mg/kg)에서 나타났고, 암의 면적이 4,030mm³로 감소하였다.

암덩어리의 실제 면적과 중량은 vehicle-treated 쥐에서 각각 4.24ml와 4.75g이었다(Fig. 3). RGP(300mg/kg)는 현저하게 암성장을 억제하였고, 면적(3.42ml)와 중량(4.01g)으로 15.6%-19.3% 줄어들었다. 특히 Cytolase-RGP(300mg/kg)는 암의 면적과 중량 모두 각각 3.09ml(27.1%)와 3.59g(24.4%) 크게 감소하여 RGP보다 더 높은 효과를 나타냈다.

현 연구에서 Cytolase-RGP가 RGP보다 이식모델 동물실험에서 SW480항암세포억제 포텐셜이 더 뛰어나다고 확인되었다. 흥미로운 점은 Cytolase-RGP가 SW480세포에 대한 세포독성은 RGP와 비교해서 훨씬 더 약하였고, Rg3를 포함한 Ginsenosides는 암을 죽이는 활성에 기여하지 않는 것을 보여준다. 이러한 발견은 그 대사산물인 혼합물-K와 Rh1뿐만 아니라 Ginsenosides Rb1, Rd, Rg1, Rh2와 Rg3의 세포소멸과 항증식성 활성을 보여주는 선행연구결과와 맞지 않는다. 의외로, 현행 연구에서 보여준 RGP와 Cytolase-RGP사이의 상반된 관계일지라도 Ginsenosides와 같은 약리학적 활성 요소를 가진 두 천연 산물의 세포독성실험과 암억제 활성 동물실험 사이에 연관성에 대한 비교 연구가 없었다. 이와같이 table1에서 Ginsenosides외에 구성요소들은 RGP에서 SW480세포독성에 원인으로 설명되어질 것으로 남아있다. 상대적으로 SW480세포독성 포텐셜에도 불구하고 Cytolase-RGP는 말초혈액 대식세포계의 식세포능력 동물실험에서 크게 향상되었다. 우리는 미리 Cytolase-RGP가 림프구 급증을 용이하게 하고 H460폐암의 성장을 억제하도록 만들었다. 따라서 Cytolase-RGP는 세포독성 외에 면역강화 활성을 통한 SW480과 H460암에 항암 활성을 하도록 할 것이다.

SW480을 포함한 대장암세포는 감소하는 FAS식을 통한 면역 감시와 죽임을 벗어날 수 있고 증가하는 FAS 리간드식을 통한 면역체계를 역습당한다.

따라서, interferon- γ 와 interleukin-2와 같은 cytokines가 증가하는 FAS 또는 caspase-3식은 SW480세포 고사에 중요한 역할을 할 수 있다. 뿐만 아니라, befidobacterium adoloescentis의 부탄올 추출물이 대식세포활성으로 대장암 세포의 증식을 억제하고, Cytolase-RGP의 식세포를 증대하는 동일한 메카니즘은 대장암 치료에 대한다수 면역기능의 중요성을 연상시킨다.

Protopanaxadiol과 protopanaxatriol Ginsenosides의 큰 부분은 박테리아에 의해 장내에서 각각 compound-K와 Rh1으로 전화를 겪은 이래로 세포독성유도 실험에서 Ginsenosides의 본래형태로 동물실험에서 항암력을 나타낼 것 같지는 않다. Ginsenosides의 최소 부분은(Rb1의 0.1%와 Rg1의 1.9%) 본래 형태로 흡수되었다는 것은 흥미가 있을 것이다. 우리는 장내에서 박테리아 대사에 인할 것이라 생각하여 홍삼추출물을 2,000mg/kg까지 구강 투여한 후에 쥐의 혈청에서 주요 Ginsenosides Rb1, Rg1 및 Re를 발견할 수 없었다. 이러한 발견은 왜 실험에서 Ginsenosides의 세포독성력이 동물실험에서 항암효과에 기여하지 않는 지를 설명할 수 있다.

Table 1. Mean concentration (ppm) of ginsenosides in red ginseng preparation and cytolase-treated red ginseng preparation.

Ingredient	RGP	Cytolase-RGP	Increase (fold)
Rb1	4,313.2	9,238.4	2.14
Rb2	2,971.4	7,633.2	2.57
Rb3	920.6	1,477.9	1.61
Rc	3,983.8	8,891.8	2.23
Rd	3,020.3	7,763.4	2.57
Re	1,989.3	3,198.7	1.61
Rg1	1,392.0	1,979.3	1.42
Rg2	850.0	2,912.3	3.43
Rg3	2,334.4	7,283.3	3.12
Rh1	442.0	1,349.3	3.05
Rh2	10.1	28.7	2.84

RGP, red ginseng preparation; Cytolase-RGP, cytolase-treated RGP.

전반적으로, 30여종 이상의 Ginsenosides를 함유하고 있는 인삼은 서로 다른 약리학적 활성을 가지고 Ginsenosides의 내용물은 가공법에 따라 크게 달라진다. 우리는 RGP의 일련의 열가공에 뒤이어 Cytolase PCL5로 처리를 통해 Protopanaxadiol와 Protopanaxatriol Ginsenosides에서 뚜렷한 증가를 하게 하는 특히, 본래 홍삼추출물에 비교할 때 Rg3를 3배 이상 증가시키는 Cytolase-RGP를 준비했다. 특히, 크게 증가된(3.05배) 장내미생물에 의한 Rg3, Rh1, Protopanaxatriol Ginsenosides의 대사산물 중에서 면역 향상 활성을 가지고 Cytolase-RGP의 면역조절 효과에 Rh1의 가능성 역할이 나타난다고 보고되었다.

Rg3는 유방, 전립선 피부암에 대한 강한 항증식, 항전이 활성을 가지고 있다. 이전과 현재 모두 동물실험에서 대장과 폐암에 대한 Cytolase-RGP의 면역조절과 항암효과가 입증되었다. 더욱이, Cytolase-RGP는 어느 누가봐도 알 수 있는 부정적인 효과를 만들지 않았다. 따라서, Cytolase-RGP의 면역조절 활성은 항암 효과에 대한 부가적 메카니즘이라 사료되고, Cytolase-RGP는 대장과 폐암의 억제에 대한 가능한 후보임에 틀림없다고 생각된다.

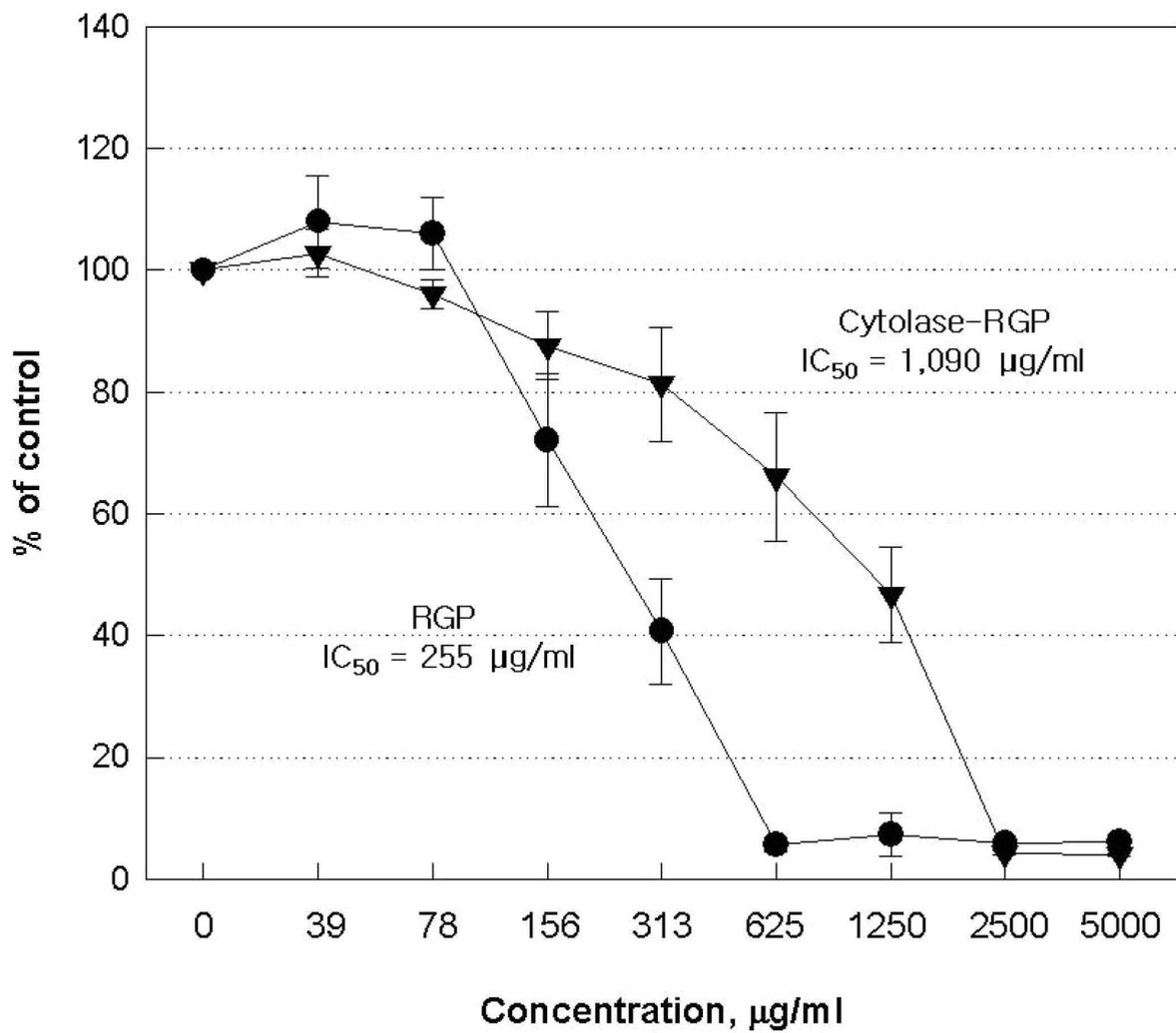


Fig. 1 Fig. 1. Cytotoxicity effects of red ginseng preparation (RGP; ●) and cytolase-treated RGP (Cytolase-RGP; ▼) on SW480 cells. SW480 cells (1×10^5 cells/well) in a 96-well plate were treated with RGP or Cytolase-RGP for 24 h, and the cell viability was measured by the MTT assay.

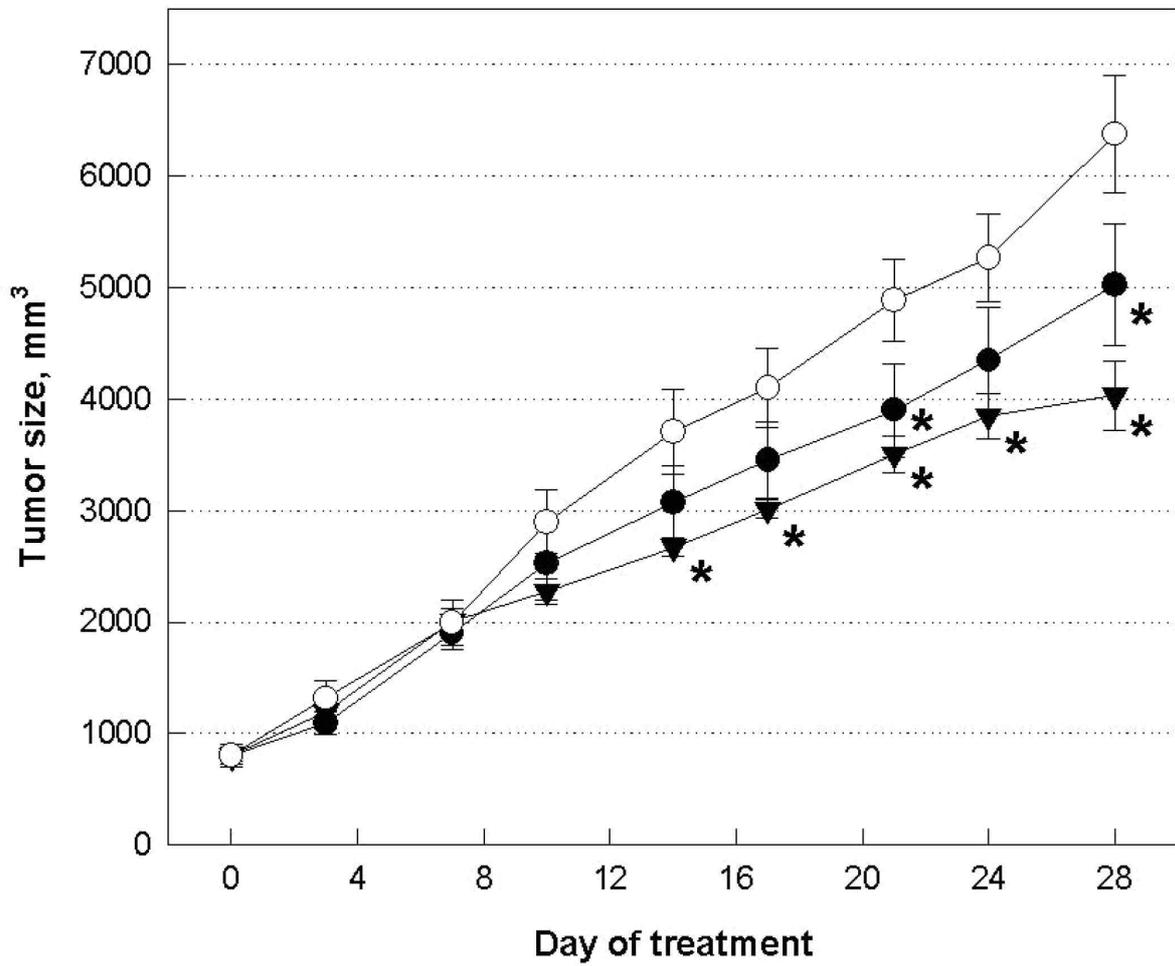


Fig. 2 Time-course of the change in tumor size (SW480) in nude mice treated with red ginseng preparation (RGP; ●), cytolase-treated RGP (Cytolase-RGP; ▼) or their vehicle (○) for 4 weeks. The preparations were treated when the tumor size reached 800 mm³ after xenografting. *Significantly different from vehicle control (P<0.05).

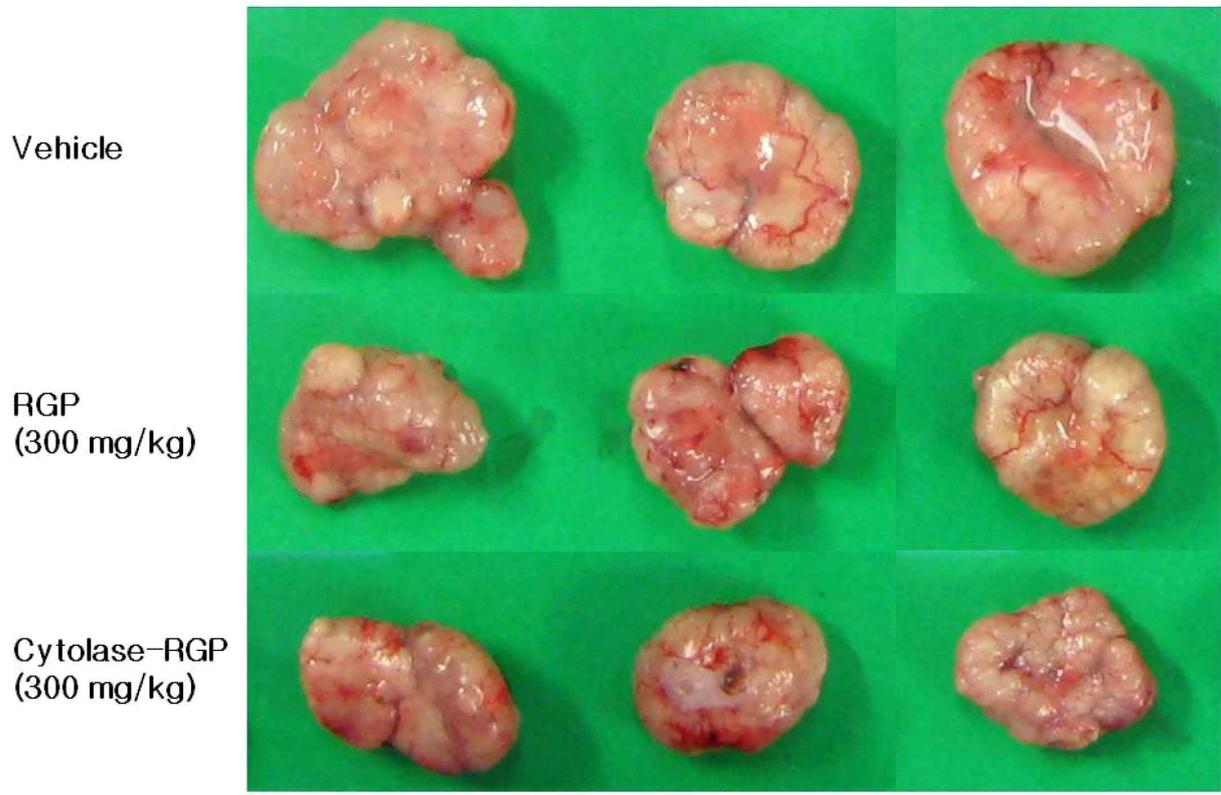


Fig. 3 Representative findings of SW480 tumor masses removed from nude mice that were treated with vehicle, red ginseng preparation (RGP) or cytolase-treated RGP (Cytolase-RGP) for 4 weeks.