

## Polyacetylene 화합물들의 투여량에 따른 독성

박진규 · 진승하

한국인삼연구초연구소

(1989년 4월 19일 접수)

### The Toxicological Parameter Assessment in Experimental Animals for Various Dosages of Polyacetylene Compounds

Jin Kyu Park and Sung Ha Jin

Department of Pharmacology, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejeon 302-345, Korea

(Received April 19, 1989)

**Abstract** □ The change in bodyweight, organ weight and the amount of water intake were investigated to assess the effect on a range of toxicological parameters of varying dosages of polyacetylene compounds. Concerning inhibition of solid tumor growth induced by Sarcoma-180 cells in the ICR mouse strain, relationships between the dosage of polyacetylene compounds used and several toxicological parameters were observed. When 40  $\mu$ moles/kg b.w. of panaxydol was administered for 3 consecutive days, the suppression of body weight growth in Wistar rats was about 17% that of the control group, however, the body weight gain was normalized 4 days after stopping administration of the polyacetylene compounds.

When the dosage of polyacetylenes was reduced to 20  $\mu$ moles/kg b.w., the change in body weight gain was alleviated to within 10% of the control and the suppression of the body weight gain increased in order for panaxydol, panaxynol, and panaxytriol. The organ weight did not show any significant change between the control and the polyacetylene administered groups. Electron micrographs of the liver tissues of ICR mice injected with 40  $\mu$ moles/kg b.w. of panaxydol gave no further significant information about toxicological changes.

**Keywords** □ Polyacetylenes, toxicological parameters, body weight, panaxydol, organ weight, electron micrographs.

### 서 론

최근 인삼의 석유 에텔 추출물로부터 부분정제된 일부 분획이 항암작용을 나타낸다고 보고<sup>1)</sup>된 이래 암세포 성장을 저지하는 활성성분을 이 석유 에텔 추출물로부터 분리하려는 노력이 행해져 왔다. 황<sup>2)</sup> 등은 인삼의 석유 에텔 추출물의 부분정제된 분획 PGX 가 L1210, L5178, Hela, Sarcoma-180 과 같은 동물 암세포 증식을 억제하며, 인체의 장암 세포인 HRT-18, HCT-48 과 HT-29 세포의 증식도 억제한다고 보고하였으며, 윤<sup>3)</sup> 등도 인삼의 석유 에텔 분획이 L5178Y 와 S180 세포에 세포독성이 있음을

발견하고 세포독성과 DNA, RNA, protein 등의 고분자의 합성 억제작용과의 관련성을 검토하였다. 또 임<sup>4)</sup> 등은 암세포와 정상세포의 일부 핵산대사에 관여하는 효소인 NDPase 의 활성을 지표로 인삼의 지용성 성분과 세포증식 억제작용과의 관계를 보고한 바 있다. 이와 같은 결과들에 근거하여 Ahn<sup>5)</sup> 등은 인삼의 지용성 성분중에서 항암성이 있는 polyacetylene 성분들을 분리, 그 구조를 밝히고 *in vitro* 실험결과 L1210 세포에 대해 뚜렷한 세포독성을 나타냈음을 보고하였다.

그러나 이들 polyacetylene 화합물들의 정상동물 세포에 대한 세포독성이나, 발암물질에 의한 암 유

발의 억제에 관한 메카니즘 등에 관해서는 아직까지 검토된 바 없다.

Lee<sup>6)</sup> 등은 화학 발암물질인 benzo(a)pyrene 의 생체내 대사에 관여하는 효소들의 선택적인 유도에 인삼의 에텔 추출물 분획<sup>14)</sup>이 관여함을 관찰하였고, Park<sup>9)</sup> 등은 benzo(a)pyrene 의 반응성 대사물질 생성 및 DNA 에 대한 benzo(a)pyrene 대사물질들의 결합형성에 대한 이들 polyacetylene 화합물들의 영향을 조사<sup>15)</sup>한 바 있다. 본 논문에서는 이들 실험에 사용된 polyacetylene 화합물들의 투여량 (20~40  $\mu$  moles/kg b.w.)에 대한 독성여부를 관찰하기 위하여 정상 wistar rat strain 에서 polyacetylene 화합물들의 투여에 따른 체중, 장기무게 및 식이섭취량 등의 변화와, ICR mouse strain 에서 polyacetylene 투여후 target organ 으로서의 간세포의 미세구조에 미치는 영향을 electron micrograph 로 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

Polyacetylene 화합물인 panaxydol, panaxynol 및 panaxytriol 은 김<sup>7)</sup> 등의 방법에 따라 인삼의 석유 에텔 추출물로부터 순수하게 분리 확인하여 실험에 사용하였다.

### 2. 실험방법

독성변수 (toxicological parameter) 의 측정은 Wistar rat (수컷, ~200g 체중) 를 사용하였다. Polyacetylene 화합물을 투여하기 전 6일 동안 정상 사육조건 (온도 23°C, 습도 약 50% 내외 유지) 하에서 체중증가의 정상 정도를 관찰한 후, 일정한 체중증가를 나타내는 개체만을 선별하여 3일간 오전 9-10시 사이에 각 polyacetylene 화합물을 corn oil 에 녹여 복강주사 (0.5 ml/rat) 하고 체중변화를 관찰하였다.

사료 및 물 섭취량의 측정은 체중 관찰의 경우와는 달리 각 개체를 대사케이지 (metabolism cage) 내에서 3, 4일간 적응시키면서 측정하였다. 장기무게의 측정은 3일간 polyacetylene 을 연속 투여하고 24시간 경과 후에 수행하였다.

ICR mouse 에 대한 survival test 는 Sarcoma-180 세포를 복수와 함께 취하여 세척한 뒤

hemacytometer 로 세어서  $1.0 \times 10^6$  cell/ml 가 되도록 부유액을 만들고 0.1 ml 씩 복강내에 이식하였다. 암세포를 이식시킨 24시간 후부터 대조군에는 50% PEG 400, 시험군에는 50% PEG 400 에 용해시킨 panaxydol, panaxynol, panaxytriol 을 각각 10 mg, 20 mg/kg 의 농도로 각군 10마리로 하여 7일간 연속 투여하고 30일까지 수명을 관찰하였다.

생존비 (T/C %) 는 다음식에 따라 계산하였다.<sup>16)</sup>

생존비 = 시험군의 평균 생존일수 / 대조군의 생존일수  $\times 100$

고형암에 대한 성장 억제실험<sup>17)</sup>은 대조군, panaxynol (10, 20, 30 mg/kg), panaxydol (10, 20, 30 mg/kg), panaxytriol (10, 20, 30 mg/kg) 등의 각군을 8~10마리씩으로 하여  $1.0 \times 10^6$  cell/mouse 씩을 실험동물의 왼쪽 서해부에 피하 이식한 뒤 24시간 후부터 7일간 연속으로 시료용액을 투여하고 암세포 투여 21일째되는 날 치사시켜 고형암을 적출 그 중량을 얻고 이로부터 종양저지 백분율을 구하였다.

$I.R(\text{inhibition ratio})\% = \frac{CW - TW}{CW} \times 100$

CW : Tumor weight of control group

TW : Tumor weight of treated proup

### Electron micrographs (E.M.) 관찰

간조직의 전자현미경 표본은 적출한 간조직을 생리식염수로 세척후 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) 로 조제한 2.5% glutaraldehyde 와 1% OsO<sub>4</sub> 로 고정하였으며 acetone 을 사용하여 탈수시킨 후 EPON 812 로 포매하여 block 을 제작하였다. 제작된 block 은 ultramicrotome (Reichert-Jung) 으로 초박편을 만들었으며 uranyl acetate 와 lead citrate 로 염색한 후 전자현미경 (Hitachi H-500) 으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

Heywood<sup>8)</sup> 는 표준 독성변수 (standard toxicological parameter) 들을 결정하기 위해 Sprague Dawley 또는 Wistar strain 을 사용해서 50여가지 화합물들에 대한 체중, 사료섭취량, 물 소비량 등의 증·감 및 장기무게 변화와 조직병리학적 관찰, 간과 신장 기능에 관한 혈액화학적 조사 등을

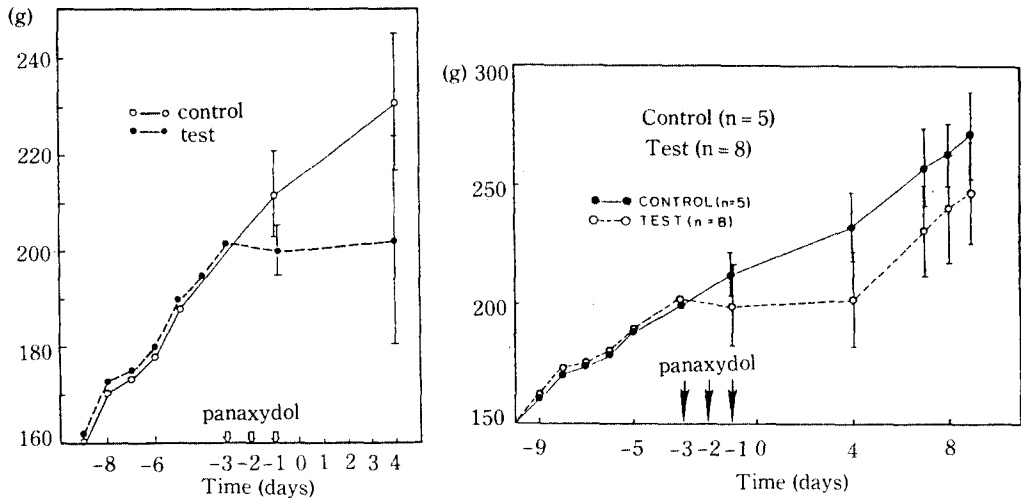


Fig. 1. Effect of panaxydol on the change of body weight in Wistar rats Panaxydol was administered at 40  $\mu$ moles/kg b.w. for 3 days i.p..

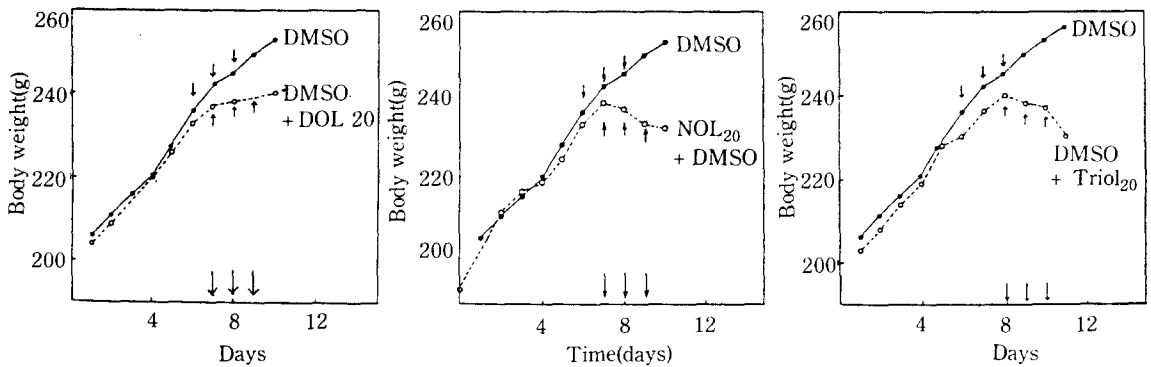
실시하였는데 이 중에서 체중 및 장기무게의 변화를 나타내는 화합물이 82%로 가장 민감하게 나타났으며 사료섭취량 및 조직병리학적 변화 보이는 화합물들은 약 63%로 두번째로 민감하게 나타났다. Fig.1은 polyacetylene 화합물인 panaxydol에 의해 체중증가가 억제되나 polyacetylene의 투여를 중지하면 약 4일 경과 이후부터 체중증가율이 정상으로 회복됨을 보여주고 있다. 이 때의 polyacetylene 투여량은 40  $\mu$ moles/kg b.w.로서 Park<sup>9)</sup> 등의 실험결과에 따르면, benzo(a)pyrene의 대사효소 활성도 및 그 반응성 대사물질들의 확인실험에서 mouse species에 투여된 양이다. 이 투여량은 간 microsome에 의한 benzo(a)pyrene의 epoxide hydratase 활성도를 적어도 4배 이상 증가시키고 benzo(a)pyrene의 대사물질의 생성 pattern을 뚜렷이 변화시켰다.

그러나 이 polyacetylene 화합물들의 투여수준은 성인(60 kg b.w.)의 복용량으로 환산해 볼 때, 한방(방약합편, 동의보감)의 상용 처방량(인삼 5g중에 약 42  $\mu$ g, 0.83% 포함)의 약 260배에 해당하는 양이다. 40  $\mu$ moles/kg b.w.의 panaxydol 투여 1일 후에 wistar rat species의 체중변화는 대조군보다 약 17% 감소하였으나 투여량을 20  $\mu$ moles/kg b.w로 줄였을 때 그 차이는 10% 정도로 의미있게 완화된 것을 관찰하였다(Fig.2-A). 따라서, 20  $\mu$ moles/kg b.w.로 panaxynol(Fig.2-B)과 panaxytriol

(Fig.2-C)을 투여한 후 각각의 체중증가가 억제도를 비교하여 보았다. 그 결과는 대체로 panaxydol, panaxynol, panaxytriol의 순서로 체중감소효과를 적게 나타내었다.

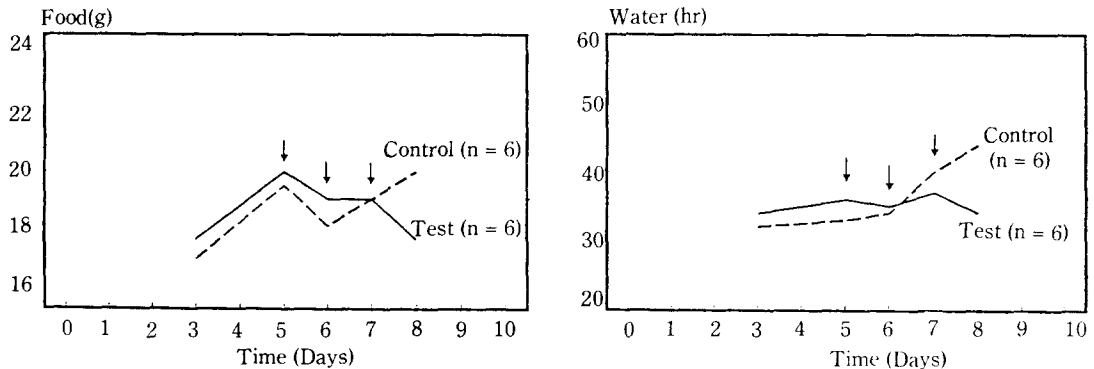
이 순서는 Kim<sup>18)</sup> 등의 *in vitro* 적혈구 용혈(erythrocyte hemolysis) 실험이나 Ahn<sup>5)</sup> 등의 L1210 세포에 대한 *in vitro* 세포독성 실험과 상반되는 결과로서 이러한 *in vitro*와 *in vivo* 메커니즘의 차이는 polyacetylene 화합물들의 구조적인 성질의 차이에 기인할 수도 있다고 생각된다.

한편, Fig.3의 A, B와 같이 panaxydol 20  $\mu$ moles/kg b.w. 투여시 물 섭취량과 사료섭취량을 대조군과 비교해 보면, polyacetylene 투여군에서 물 섭취량의 감소(약 10 ml)가 비교적 의미있게 나타남을 관찰할 수 있었다. Table 1은 장기무게 변화에 대한 polyacetylene 성분들의 영향을 관찰한 결과이다. Heywood<sup>10)</sup> 등의 보고에 따르면 체중증가의 억제시 rat species에서는 간 무게가 암·수가 서로 다르게 나타났다. 즉, 수컷의 경우는 간 무게가 감소하는 반면에 암컷은 간무게가 증가하였다. 신장(kidney) 무게의 경우에는 수컷이 암컷보다 감소 정도가 크게 나타났다. 그밖에 비장(spleen)은 immuno suppressive 한 약물일 경우에 영향을 받는다고 일반적으로 알려져 있다. 그러나 Table 1의 장기무게 관찰 결과는 대조군과 polyacetylene 투여군 사이에 어떤 의미있는 차이가 없음을 보여주



**Fig. 2.** Effect of polyacetylenes on the change of body weight in Wistar rats The arrows indicate the treatment of polyacetylenes.

DOL: panaxydol, NOL: panaxynol, Triol: panaxytriol



**Fig. 3.** Effect of panaxydol on the change of food and water intake in Wistar rats.

**Table 1.** Antitumor activity of polyacetylene compounds on food and water intake in Wistar rats

Control	Dol 20	Nol 20	Triol 20	
Body weight	254 ± 50	234 ± 3	232 ± 11	230 ± 4
Liver	9.4 ± 0.40	10.9 ± 0.27	10.0 ± 0.70	9.58 ± 0.63
Kidney	2.45 ± 0.16	2.26 ± 0.13	2.40 ± 0.2	2.25 ± 0.09
Spleen	0.79 ± 0.11	0.82 ± 0.05	0.91 ± 0.01	0.72 ± 0.07
Heart	0.96 ± 0.07	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.07	0.93 ± 0.03
Lung	2 ± 0.83	1.66 ± 0.45	1.83 ± 0.23	1.79 ± 0.17
Spleen/B.W.(%)	0.31	0.35	0.39	0.31
Liver//B.W.(%)	3.7	4.2	4.3	4.2

Data are expressed as the mean ± S.D of 5 to 8 rats per group.

고 있다. Rat 에 있어서 체중증가의 억제제는 흔히 사료섭취량의 감소와 연관되어 있다.<sup>10)</sup> 또한 체중증가의 억제제는 다른 생물학적인 parameter 들에 상당히 영향을 줄 수 있으며 체중증가의 억제제는 장기무게에도 영향을 미친다.<sup>11-13)</sup> 그러나 동물의 대사연구가 체내로 compound 의 흡수, 분포 및 축적 등을 해

석하기 위해 사용될 경우에 투여량이 높으면 receptor site 들의 과잉포화(oversaturation)로, 유도되는 toxicological effect 가 단순한 현상으로 나타날 가능성도 있다. 한편, species 간의 차이가 있을지도 모르나 ICR mice 를 이용하여 Sarcoma-180 cell 을 복강내에 이식후 생존시험(sur-

vival test)을 실시한 결과는 Table 2와 같았다. 여기서 panaxynol(m.w. 244), panaxydol(m.w. 260) 그리고 panaxytriol(m.w. 278) 각각의 투여량 10 mg/kg b.w.는 약 40  $\mu$ moles/kg b.w.에 해당하는 양으로서 대조군과 비교할 때 그 life span에는 아무 영향도 미치지 않았음을 알 수 있다. 이 투여량을 S-180 세포의 고형암 억제에 사용된 투여량과 비교하였다. 또한 Table 3에서 관찰할 수 있는 바와 같이 Sarcoma-180 cell로 고형암을 일으킨 후의 polyacetylene 계 화합물에 의한 tumor inhibition 효과는 40  $\mu$ moles/kg b.w.에 해당하는 10 mg/kg b.w. 투여시 panaxynol, panaxydol, panaxytriol 대하여 각각 6, 9, 10%였다. 따라서 약 5 mg dose에 해당하는 20  $\mu$ moles/kg b.w.의 투여량에서는 Sarcoma-180 cell에 의한 고형 암세

포의 증식이 거의 영향을 받지 않음을 예측할 수 있다. 따라서 본 실험에서 사용된 polyacetylene의 투여량은 20  $\mu$ moles/kg b.w.일 경우 정상 rat의 체중감소와 관련해서 일어나는 장기무게의 변화가 없는 것으로 보아 독성변수(toxicological parameter)의 범위에 미치지 못하는 양으로 사료된다.

Panaxydol 40  $\mu$ moles/kg b.w.을 3일간 연속 투여한 후 mouse liver cell의 전자현미경 관찰 결과(Fig.4)에서도 볼 수 있듯이 benzo(a)pyrene 투여 4시간, 24시간후에 적출한 간의 미세구조는 소포체(ER)가 잘 발달되어 있고 많은 수의 mitochondria가 관찰되어 정상 간세포의 제 특징들을 잘 나타내고 있으며 대조군과 panaxydol 투여군간에 차이를 발견할 수 없었다.

Panaxydol이 *in vitro*에서 L1210 cell의 membrane bound organelle에 영향을 준다는 보고<sup>19)</sup>가 있으며 polyacetylene 화합물의 일종인 faltarindiol이 피부 사상균(dermatopytes)의 원형질막에 상해를 준다<sup>20)</sup>는 보고가 있으나, ICR mice의 *in vivo* 실험결과 사용된 투여 용량범위에서는 전혀 막계에 영향을 미치지 않았다.

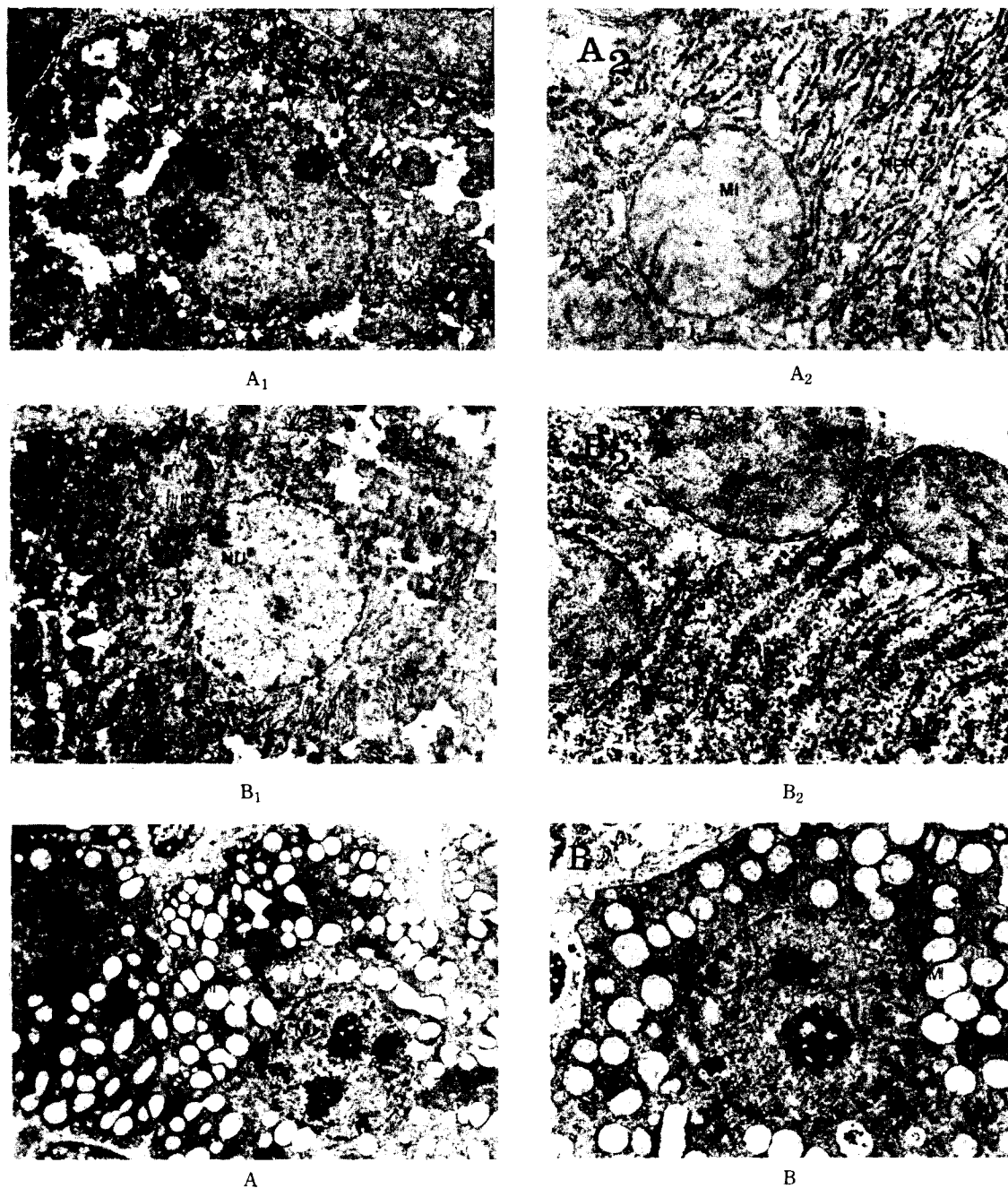
인삼 polyacetylene 성분들의 benzo(a)pyrene에 의한 돌연변이 및 암 발생에 대한 억제효과를 결정할 때 중요한 문제의 하나는 표적조직이나 장기에 대해 polyacetylene 화합물들의 투여량(exposure dose)중 어느 정도의 양이 실제로 작용하는가(actual dose)를 정하는 것일 것이다. 따라서 po-

Table 2. Effect of polyacetylenes on survival of mice bearing with Sarcoma 180 ascites

Compound	Dose	Number of mice	Life span	T/C (%)
Control		12	22.5	
Panaxynol	10 mg/kg	10	22.3	99.1
	20 mg/kg	10	20.9	92.9
Panaxydol	10 mg/kg	9	23.8	105.7
	20 mg/kg	8	19.5	86.7
Panaxytriol	10 mg/kg	10	23.6	104.8
	20 mg/kg	9	23.4	104.6

Table 3. Antitumor activity of polyacetylene compounds on ICR mice bearing Sarcoma 180 solid tumor

Compound	Dose (mg/kg)	Number of mice	Tumor weight (g)	T/C	Inhibition ratio (%)
Panaxynol	0	17	3.13 $\pm$ 0.74	—	—
	10	10	2.94 $\pm$ 0.51	0.94	6
	20	9	2.82 $\pm$ 0.68	0.90	10
	30	8	2.66 $\pm$ 0.59	0.85	15
Panaxydol	0	19	3.21 $\pm$ 0.72	—	—
	10	8	2.92 $\pm$ 0.75	0.91	9
	20	10	2.12 $\pm$ 0.80	0.66	34
	30	9	1.64 $\pm$ 0.32	0.51	49
Panaxytriol	0	14	3.59 $\pm$ 1.10	—	—
	10	9	3.23 $\pm$ 0.95	0.90	10
	20	10	2.66 $\pm$ 0.60	0.74	26
	30	8	1.58 $\pm$ 0.44	0.44	56



**Fig. 4.** Electron microphotographs of mouse hepatic parenchyma cell

After  $[^3\text{H}]$ benzo(a)pyrene (S.A. 0.43mCi/0.67 mmoles/20g b.w.) was injected into tail vein at the 3rd day of experiment, mice were killed and then the livers were prepared for E.M. (A-1: 4hr. control,  $\times 6,250$ , A-2: 4 hr. control,  $\times 42,500$ , B-1: 4hr. after the last treatment of panaxydol,  $\times 6,250$ , B-2: 4 hr. after the last treatment of panaxydol,  $\times 50,000$ , A: 24 hr. control,  $\times 5,000$ , B: 24 hr. after the last treatment panaxydol,  $\times 7,500$ ).

lyacetylene 화합물들의 흡수, 분포, 배설(excretion) 등과 같은 여러 변수들을 제거시킬 수 있는 internal docimeter 가 필요할 것이다.

## 요 약

정상 wistar rat strain 의 체중 및 장기무게 변화 그리고 사료, 물 섭취량의 변화 등을 조사함으로써 polyacetylene 화합물들의 투여량에 따른 독성변수(toxicological parameter)의 범위를 추정하고자 하였다. 또한, ICR mouse strain 의 Sarcoma-180 으로 유도되는 고형암의 억제와 관련하여 polyacetylene 화합물들의 투여량에 따른 독성변수(toxicological parameter)와의 관계를 관찰하고자 하였다. Panaxydol 40  $\mu$ moles/kg b.w.을 3일간 연속 복용투여했을 때 wistar rat 의 체중증가율은 대조군보다 약 17% 감소하였으나, polyacetylene 의 투여를 중지하면 약 4일 경과후부터 체중증가율이 정상으로 회복되었다. 이 투여량을 20  $\mu$ moles/kg b.w.로 줄이면 대조군과의 체중증가율의 차이는 약 10% 정도로 완화되며 그 체중감소율은 panaxydol, panaxynol, panaxytriol 의 순으로 증가하였다. 이때 장기무게의 관찰 결과는 대조군과 polyacetylene 화합물들 투여군 사이에 의미 있는 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 정상 mice 의 간세포에 대한 electron micrograph 관찰 결과, panaxydol 40  $\mu$ moles/kg b.w./day 투여시에도 대조군에 비하여 별다른 미세조직의 변화가 관찰되지 않았다.

## 인용문헌

1. Hwang, W.I. and Cha, S.M.: *Proc. 2nd Int. Ginseng Symp.* 43 (1978).
2. 이선희, 황우익: *고려인삼학회지*, **10**(2),

- 141(1986).
3. 윤연숙, 이세영, 김병수, 윤택구: *한국생화학회지*, **13**(4), 203(1980).
4. 임미재, 민인숙, 임경희, 황우익: *인간과학*, **3**(2), 164(1979).
5. Ahn, B.Z. and Kim, S.I.: *Arch. Pharm.* **321**, 61 (1988).
6. Lee, F.C., Park, J.H., Ko, J.H., Lee, J.S., Kim, K.Y. and Kim, E.K.: *Drug and Chemical Toxicology* **10**, 227 (1987).
7. 김신일: 인삼의 항암성분에 관한 연구(박사학위논문), 12(1988).
8. Heywood, R.L.: *Toxicology Letters* **8**, 349 (1981).
9. Park, J. K., Kim, S. I. and Lee, C. B.: *Korean J. Biochem.*, **21**(5), (in press) (1988).
10. Heywood, R.L.: *Animals and Alternatives in Toxicity Testing*, AP, 82 (1983).
11. Scharer, K.: *Toxicology* **7**, 45 (1977).
12. Schwartz, E., Tornaben, J.A. and Boxill, G.C.: *Toxicology & Appl. Pharmacol.* **25**, 515 (1973).
13. Oishi, S., Oishi, H. and Hiraga, K.: *Toxicology & Applied Pharmacol.* **47**, 15 (1979).
14. 이재열, 박진규, 이정숙, 고지훈, 경중수: *인삼연구보고서*, 20(1985).
15. 박진규, 김신일: *인삼연구보고서(효능분야)*, 81(1988).
16. Protocol 3LE31 in the 3rd ed. of screening protocols, NIH publication. No. 84-2635, 15 (1984).
17. Kato, I., Kibayashi, S., Yokokura, T. and Mutai, M.: *Gann* **72**, 517 (1981).
18. Kim, H.Y., Lee, Y.H. and Kim, S.I.: *Korean J. Toxicol.* **4**, 95 (1988).
19. 김영숙: 인삼 polyacetylene 화합물의 암세포 증식 억제 기전에 관한 연구(박사학위논문), 50(1988).
20. Muir, A.D., Cole, J.L. and Walker, J.R.L.: *Planta Med.* **44**, 129 (1982).