

Saponin-SOD가 SNUC-4 Cell에 의해 유발된 대장암 Nude Mice의 암 성장 억제 효과

박수진·강명화[†]

호서대학교 자연과학부 식품영양전공

Tumor-Suppressing Effects of Saponin-SOD in Nude Mice

Soo-Jin Park and Myung-Hwa Kang[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

Abstract

This study was performed to measure the antioxidant effects of red ginseng extracts which antioxidation had been promoted through enzyme hydrolysis. In order to observe their tumor-suppressing effects, an anti-cancer medicine and Saponin-SOD, which was a highly antioxidant beverage made from red ginseng saponin adding SOD-like rice (with embryo buds) extracts, were administered to nude mice with large intestine cancer induced. There was a significant increase in the content of phenolic compounds as the enzyme was added. The red ginseng extracts showed a high electron-donating ability with the passage of time. The electron-donating ability was particularly high in the enzyme-treated red ginseng extract, and also observed as high in Saponin-SOD. The lipid-peroxide generation was inhibited depending on the concentration of Saponin-SOD added; the addition of 0.625% Saponin-SOD served to decrease the inhibition level up to 65% compared with the case of no addition (100%). As a result, it could be assumed that Saponin-SOD would strongly inhibit the oxidation of ghost membrane. After the cancer was induced in nude mice through the injection of SNUC-4 cell, there was a significant inhibition in the growth of tumors in nude mice into which Saponin-SOD were injected; the growth of tumors was gradually decreasing with the passage of time after the cancer induction. In particular, when Saponin-SOD was administered together with an anti-cancer medicine, the synergic effect was observed. In conclusion, Saponin-SOD, when used with an anti-cancer medicine, is expected to reduce the amount of free radical and lipid peroxide, which are known to cause harmful effects occurring from the internal application of medicine.

Key words : Nude mice, red ginseng, saponin, SOD, tumor.

서론

최근 각종 성인병 발병의 주요 원인이 식생활임이 밝혀지고, 의약품의 오남용에 따른 부작용이 널리 인식됨에 따라 건강증진 내지 질병예방을 위한 새로운 접근 방법의 하나로 기능성 식품에 대한 관심이 고조되고 있다. 농산물에 함유되어 있는 항산화 성분은 색소류(Yoon et al 1995), 폴리페놀(Hsu et al 2001, Martin et al 2002) 및 리그난 배당체(Kang et al 1999, Kang et al 2000) 등 다양한 형태로 종자껍질이나 색소 및 식물 표면에 왁스 형태로 분포하는데 이들 성분들이 항산화 활성을 나타냄에 따라 약용으로 이용되는 등 매우 중

요한 자원으로 인정되고 있어 소비 확대와 고부가가치 창출을 위해 기술상의 경쟁력을 키워야 할 때라는 인식이 날로 고조되고 있는 실정이다. 암 발병률은 선진국은 물론 국내에서도 지속적인 증가추세를 보이며, 초기에 발견하여 지속적인 치료를 받지 않으면 완치율이 매우 낮은 무서운 질병이다. 최근 천연물을 중심으로 한 물질을 이용하여 다단계 발암 과정을 차단하는 화학적 예방요법(cancer chemoprevention)과 (Murakami et al 1993, Nakamura et al 1996), 천연물질 또는 생약성분(natural/medicinal herbs)을 장기간 복용하여 암 발생을 억제 또는 지연시키려는 과학적 시도가 일고 있다(Lee et al 2001, Lee et al 1988). 이와 더불어, 항암 부작용 완화약품이 개발되고 있으나 부작용의 종류가 다양하고, 치료제 자체의 부작용도 간과할 수 없을 뿐 아니라 가격 또한 상당한 고가이기 때문에 부작용 없는 저렴한 기능성 식품의 개발이 절실히 요구되고 있다.

인삼은 그가 갖는 성분과 약효에 대한 많은 연구결과가 보

본 연구는 (주)수진 바이오텍의 연구비 지원에 의해 이루어진 결과임.

[†] Corresponding author : Myung-Hwa Kang, Tel: 041-540-5973
E-mail: mhkang@office.hoseo.ac.kr

고 되었고, 현재까지 인삼의 면역증강 효과(Ahn et al 1987, Yokozawa & Oura 1990, Yun et al 1983) 등에 관한 연구가 진행되어 왔으나(Yoon et al 1995, Martin et al 2002), 홍삼을 가공하여 홍삼 사포닌의 항산화 작용 또는 역할 및 효능에 관한 연구는 매우 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 홍삼추출물에 효소처리를 통하여 항산화성이 높은 추출물을 제조하여 SOD(superoxide dismutase) 유사활성이 강한 쌀미배아 발효 추출물을 첨가하여 항산화성이 더 높은 음료(Saponin-SOD)를 개발하였다. 이 음료가 항암요법 부작용 완화에 효과가 있는지 검토하고자 대장암 세포인 SNUC-4 cell을 nude mice에 이식하여 암을 유발시켜 항암제와 함께 Saponin-SOD를 투여하여 암세포 성장에 미치는 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 홍삼추출물 제조

6년근 홍삼 500 g을 1 L의 에탄올에 넣어 70°C에서 초음파장치로 5시간 추출하여 여과시키는 방법을 3회 반복하였다. 2.5 L정도의 홍삼추출물을 vacuum rotary evaporator로 1.5 L까지 감압 농축하였고, 각각의 농도로 dearland cellulase (Dearland Co, USA)를 첨가하여 60°C의 incubator에서 6시간 반응 후 100°C 항온수조에서 10분간 열처리하여 효소를 불활성화 한 다음 3,500 rpm에서 20분간 원심분리하고 상층액을 취하여 각종 분석에 사용한다.

2. 홍삼추출물 함유 음료 제조

효소로 처리된 홍삼 추출물에 쌀 미배아를 발효시켜 만든 SOD-liked 추출물(Toyo Hakko Co, Ltd, Japan)을 혼합하여 80°C에서 완전히 용해시킨 후 95°C에서 30분간 살균한 후 밀봉하여 18시간 방냉하였다. 방냉시킨 용액을 10마이크로 필터로 여러 차례 반복 여과하여 다갈색의 맑은 액상을 얻은 후 일정량씩 용기에 충전 밀봉하였다. 이 액상을 95~100°C에서 30분간 살균하였고 시료의 이름을 Saponin-SOD로 하여 각종 분석에 사용하였다.

3. Ghost membrane 분리

토끼 혈액을 10 mM phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가하여 1,500 g에서 20분 동안 원심분리 한 후 상층액을 버리고 다시 10 mM phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 같은 조건에서 원심분리 하였으며, 3회 반복하였다. 그 후 10 mM phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 20,000×g에서 40분간 원심분리 하여 침전물이 흰색이 될 때까지 7회 반복하여 세정하여 ghost membrane를 분리하였다. 그 후 10 mM PBS buffer를 첨가하

여 단백질 농도가 2 mg/mL로 되도록 희석하였다.

4. 단백질 농도 측정

Ghost membrane을 차가운 PBS buffer(pH 7.4)에 녹여 Lower(Lowry et al 1951)의 방법에 따라 단백질 농도를 측정하였다.

5. 과산화 지질 생성 억제능 측정

분리된 ghost membrane(2 mg protein/mL)에 Saponin-SOD를 0%(Control), 0.0125%, 0.125%, 0.625%와 *t*-BuOH를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응한 후 TBARS 법(Tsuda et al 1995)을 사용하여 과산화지질 생성에 미치는 효과를 측정하였고 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{TBARS Inhibition Rate (\%)} = (A - B)/A \times 100$$

A: 시료 무첨가군의 흡광도(대조군)

B: 시료 첨가군의 흡광도

6. 페놀성 화합물의 정량 분석

AOAC의 Folin-Denis법(AOAC 1980)을 약간 변형하여 비색 정량하였다. 각 추출물 0.2 mL에 2% Na₂CO₃를 2.0 mL 가하여 실온에서 2분간 방치 후 50% Folin-Denis 시약 0.2 mL 혼합하여 실온에서 30분간 정치한 다음 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0.025~0.25 mg/mL tannic acid를 통해 표준 곡선을 적정하여 계산하였고 모든 처리는 3회 반복 측정하였다.

7. 추출물의 전자 공여능 측정

각 시료의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)에 대한 전자 공여능(electron donating ability)을 측정하였다. 각 추출물 0.5 mL에 DPPH 용액 3 mL를 가하고 30초간 잘 섞은 다음 517 nm에서 50분 동안 흡광도의 변화를 측정하였다.

8. SNUC-4 cell의 배양

SNUC-4 cell은 heat-inactivated fetal bovine serum 10%를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 배양 유지하였다. 세포들은 3일마다 계대 배양하였고 5% CO₂ 조건하의 37°C humidified incubator에서 배양하였다.

9. 실험동물 및 식이조건

가톨릭대학교 의과대학 실험동물연구실에서 5주령의 nude mice 수컷을 각 군당 10마리씩 4군으로 나누었다. 암세포를 이식하지 않은 군을 대조군으로 하고, 기타 3군에게 SNUC-4

cell를 5×10^6 cell/mL 주입하여 실험군으로 하였다. 암세포를 이식하고 14일 후 실험군 모두에게 암이 발생되었고, 각각의 실험군에 saponin-SOD, 증류수, Saponin-SOD와 항암제(Eloxatin)를 일주일에 2번 1 mL 씩 4주 동안 경구 투여하였다.

10. 종양 발생과 크기의 변화

각 실험군 피하에 SNUC-4 cell의 세포를 주입하여 종양 생성과정을 매일 관찰하였고 종양의 크기는 자체 개발한 종양 크기 측정기를 이용하여 mm 단위로 크기와 깊이를 측정하였다(Lee et al 2001).

11. 통계처리

각 평균치의 차이는 SAS program을 사용한 Duncan's multiple range test에 의해 $\alpha=0.05$ 의 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 홍삼 추출물의 페놀함량

효소 첨가 농도를 달리하여 처리한 각 홍삼 추출물의 페놀성 화합물 함량 측정 결과는 Fig. 1과 같다. 페놀 함량은 효소 무첨가(0%), 0.01%, 0.05%, 0.1% 첨가 시 각각 0.54 ± 0.11 mg/mL, 9.63 ± 0.19 mg/mL, 10.27 ± 0.16 mg/mL, 11.07 ± 0.15 mg/mL로 첨가량이 증가할수록 유의적으로 증가하였다. 이는 홍삼에 함유되어 있는 다량의 배당체 성분이 가수분해 효소에 의해 가수분해되어 증가된 것으로 판단된다.

2. 전자 공여능

전자 공여능이란 산화성 free radical에 전자를 제공하는 능력으로 전자를 free radical에 제공함으로써 지질과산화의

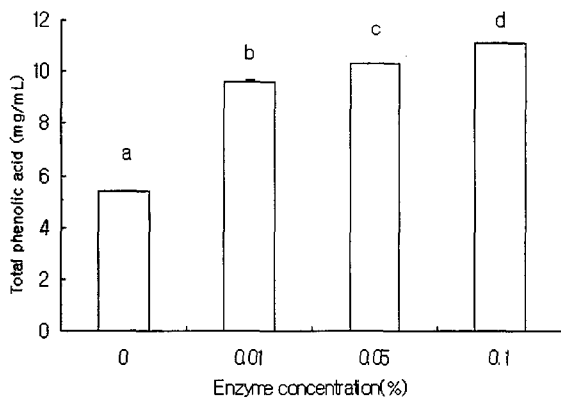


Fig. 1. Phenolic contents of extract prepared according to dearland cellulase concentration in red ginseng.

연쇄 반응을 정지시켜 산화억제를 억제시키는 역할을 해주므로 산화 억제제의 척도가 된다. 산화성 free radical은 인체 내에서 지질 및 단백질 등과 반응하여 각종 질병을 유발하고노화를 촉진시키므로, 이를 제거할 수 있는 항산화성이 높은 물질을 찾으려는 시도가 있다(Yu 1994). 효소 농도를 달리하여 가수분해 한 추출물들의 전자 공여능을 측정한 결과, 각 농도별로 대조군에 비해 높은 전자 공여능을 나타냈으며, 효소 농도 및 시간의 경과에 무관하게 높은 전자 공여능을 나타냈다(Fig. 2) Saponin-SOD의 전자 공여능 측정 결과 (Fig. 3) 반응초기뿐 아니라 시간이 경과하여도 높은 항산화 효과를 나타냈다. 따라서, 효소 처리 한 홍삼 추출물과 쌀 미배아를 발효시켜 제조한 SOD를 혼합하여 항산화능이 강한 Saponin-SOD음료를 개발하였다.

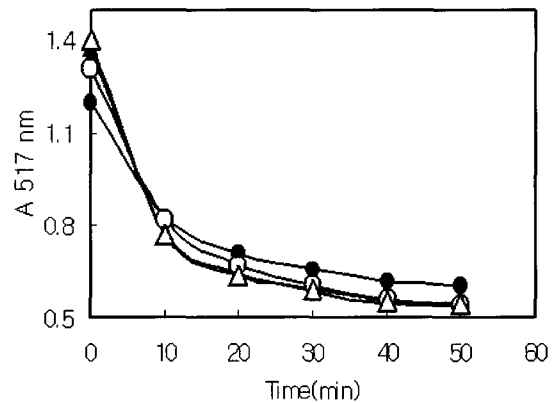


Fig. 2. Electron donating ability of extract prepared by enzyme concentration-dependent in red ginseng. Red ginseng was incubated for 6 hr at 60°C on the absence (○) or presence (● 0.01% added, ▲ 0.05% added, △ 0.1% added) of dearland cellulase.

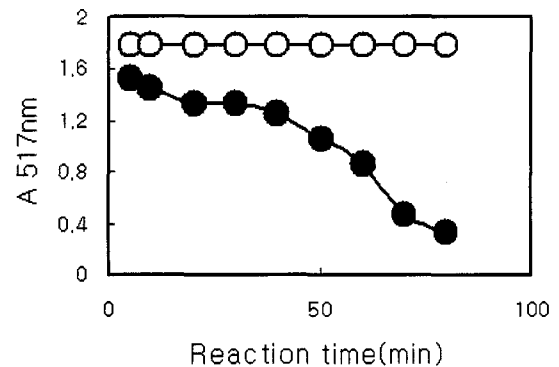


Fig. 3. Electron donating ability of extract prepared by enzyme concentration-dependent in red ginseng. Changes of absorbance(A) was determined for 60 minute at 517 nm of spectrophotometer on the absence(○) or presence of saponin-SOD (●).

3. Ghost membrane의 산화에 Saponin-SOD의 효과

과산화지질은 유지식품 산화의 원인일 뿐 아니라, 생체 내 뇌와 세포막의 중요한 구성성분인 불포화 지방산이 산소 라디칼에 의해 산화적 장애를 받으면 세포기능의 저하 또는 동맥경화, 간장병, 노화 및 각종 발암 등과 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Artman 1996, Sajidh et al 1991, Taylor et al 1983). 본 실험에서 과산화 지질의 생성 억제도를 ghost membrane의 생체 반응계를 통해 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 각각 다른 농도의 Saponin-SOD를 첨가하여 반응 후 측정된 결과 지질 생성도는 첨가 농도에 의존적으로 감소하였다. 특히 0.625% 첨가 시 무첨가군(100%) 대비 65%까지 감소하는 것으로 나타나 Saponin-SOD가 ghost membrane의 산화를 강하게 억제한 것으로 나타났다.

4. SNUC-4 cell 세포 주입 후 체중변화

SNUC-4 cell 주입 후 누드마우스의 성장에 따른 체중 변화는 Fig. 5와 같다. 암세포를 주입하지 않은 대조군은 체중이 점점 증가하였고, 암세포를 주입한 실험군에서는 체중이 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 본 연구결과 Saponin-SOD 투여는 체중변화에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 Sprague Dawley계 rat에 항암제인 아드리아 마이신과 홍삼 추출물, SOD를 투여하면서 체중을 측정된 Cho et al(1996)는 대조군에 비해 아드리아 마이신, 아드리아 마이신과 함께 홍삼 추출물, 아드리아 마이신과 SOD를 병행하여 투여 시 현저한 체중 감소를 보였으나, 홍삼 추출물과 SOD의 단독 투여 시에는 유의적으로 체중이 증가한다고 보고하여 본 연구와 일치하지 않는 결과였다.

5. SNUC-4 cell 세포 주입 후 종양크기

세포 주입 후 암 발생이 관찰되고 7일이 경과한 다음 조사한 기초 암 종괴 크기(Base-line tumor size)는 실험 군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나(Fig. 6), 시간이 경과하

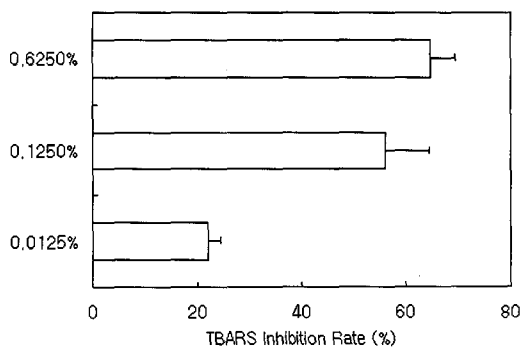


Fig. 4. Antioxidative effects of saponin-SOD on the ghost membrane oxidation system.

면서 Eloxatin과 Saponin-SOD를 투여한 누드 마우스의 종괴 크기는 유의적으로 감소하였고, Saponin-SOD만 투여한 누드 마우스의 종괴 크기 또한 대조군에 비교해 유의적으로 감소하였다. 이 결과 Saponin-SOD가 암세포 성장을 지연시키는 것으로 나타나 자세한 작용기전에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. Eloxatin은 상피세포 암에 효과적인 항암제로 임상분야에서 널리 사용되는 약물 중 하나이나, 약물이 갖는 독성으로 인한 부작용으로 사용에 많은 제한을 받고 있는 실정이며 이 약물과 함께 복용하였을 때 독성 및 부작용을 감소시킬 수 있는 해독물질 탐색에 대한 시도는 매우 유의 있는 일이라 하겠다.

본 연구결과 홍삼 Saponin에 미배아 추출물인 SOD-like를 첨가하여 제조한 Saponin-SOD를 항암제와 함께 복용 시

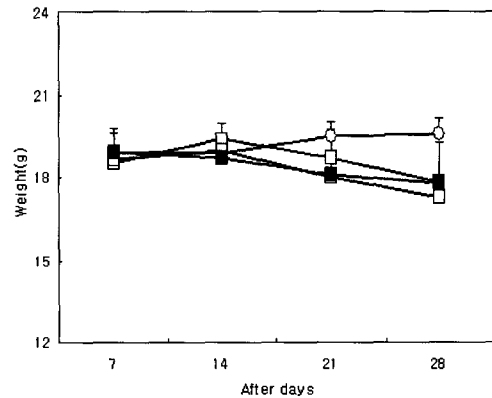


Fig. 5. Changes of body weights of experimental nude mice during feeding periods. Experimental groups were injected with saline (○) and SNUC-4 cells. After 14 days were intubated with saponin-SOD (□) or saponin-SOD with eloxatin (◇) or with water(■), respectively.

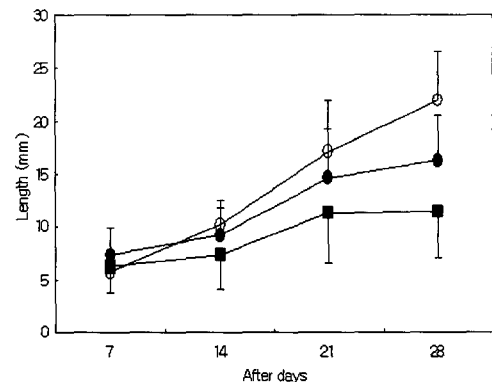


Fig. 6. Changes of tumor cell length (mm) of experimental mice during feeding periods. Experimental groups were injected with SNUC-4 cells (5×10^6 cell/mL). After 14 days were intubated with saponin-SOD (□) or saponin-SOD with Eloxatin (◇) or with water (■), respectively.

약물로 인해 발생하는 각종 부작용의 원인 물질인 free radical 과 lipid peroxidation을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Cho et al(1996)은 아드리아 마이신의 간독성에서 홍삼 추출물의 영향을 검토한 결과 홍삼 Saponin의 병용처치로 배지 내 방출된 LDH 활성 감소 및 lipid peroxidation의 감소가 관찰되어 본 연구와 유사한 결과를 나타냈으며, 이로 인해 신장과 간에서 Saponin과 SOD가 독성 경감 효과를 나타내었다. 따라서 누드 마우스에서 Saponin-SOD가 eloxatin의 독성을 감소시켜 암세포의 성장을 억제시킬 수 있음이 시사되었다.

문헌

- Ahn YK, Kim JY, Chung JG, Kim JH, Goo JD (1987) The effect of Korean ginseng on the immunotoxicity of mitomycin C. *Yakhak Hoeji* 31: 355-360.
- Artman NR (1996) The chemical and biological properties of heated and oxidized fats. *Adv Lipid Res* 245-330.
- AOAC (1990) *Official Methods of Analysis*. 14th ed. Washington DC. p 876
- Cho DH, Park SW, Kim JG, Lee YS, Jang BJ, Kim JG, Moon HH (1996) Effects of red ginseng total saponin and superoxide dismutase on anticancer-induced toxicity. *The Annual Report of KFDA* 1: 350-361.
- Hsu S, Lewis JB, Borke JL, Singh B, Dickinson DP, Caughman GB, Athor M, Drake L, Aiken AC, Huynh G, Das BR, Osakie T, Schuster GS (2001) Chemopreventive effects of green tea polyphenols correlate with reversible induction of p57 expression. *Anticancer Res* 21: 3743-3748.
- Kang MH, Naito M, Kawai Y, Osawa T (1999) Antioxidative effects of dietary defatted sesame flour : In hypercholesterolemia rabbits. *J Nutr* 129: 1111-1119.
- Kang MH, Naito M, Sakai K, Uchida K, Osawa T (2000) Action of mode sesame lignans in protecting low-density lipoprotein against oxidative damage *in vitro*. *Life Sciences* 66: 161-171.
- Lee H, Lin JY (1988) Antimutagenic activity of extracts from anticancer drug in Chinese medicine. *Mutat Res* 204: 229-234.
- Lee SY, Lee C, Kim IH, Ryu JO, Lim JK, Kim SW, Chio SK, Kim SH, Oh YY, Kim SJ (2001) Tumor suppress effects of extracts from *Ulmus pumila*, *Eriobotrya japonica*, and *Artemisia capillaris* Thunb in Nude mice. *J Kor Assoc Cancer Prevention* 6: 19-25.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265.
- Murakami A, Kondo A, Nakamura Y, Ohigashi H, Koshimizu K (1993) Possible antitumor promoting properties of edible plants from Thailand, and identification of an active constituent, Cardamonin, of *Boesenbergia pandurata*. *Biosci Biotech Biochem* 57: 1971-1973.
- Martin S, Andriambelason E, Takeda K, Andriantsitohaina R (2002) Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *Br J Pharmacol* 135: 1579-1587.
- Nakamura Y, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H (1996) Inhibitory effect of pheophorbide a, a chlorophyll-related compound, on skin tumor promotion in ICR mice. *Cancer Lett* 118: 247-255.
- 박건영 (1995 a) 김치의 영양학적 평가와 항돌연변이 및 항암 효과. *한국영양학회지* 24: 169-182.
- Park KY, Baek KA, Rhee SH, Cheigh HS (1995b) Antimutagenic effect of kimchi. *Food Biotech* 4: 141-145.
- Sajidh H, Sastry GRS, Prasada RN (1991) Molecular weight averages as criteria for quality assessment of heated oils and fats. *J Am Oil Chem Soc* 681: 822-826.
- Taylor SL, Berg CM, Shoptaugh NH, Traisman E (1983) Mutagen formation in deep fat fried foods as a function of frying conditions. *J Am Oil Chem Soc* 60: 576-580.
- Tsuda T, Yoshinari F, Katsumi O, Yamamoto A, Kawakishi S, Osawa T (1995) Antioxidative activity of tamarined extract prepared from the seed coat. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi* 42: 430-435.
- Yokozawa T, Oura H (1990) Facilitation of protein biosynthesis by ginsenoside-Rb2 administration in diabetic rats. *J Natural Pro* 53: 1514-1518.
- Yoon HH, Paik YS, Kim JB, Hahn TR (1995) Identification of anthocyanins from Korean pigmented rice. *Agri Chem Biotech* 38: 581-583.
- Yu PB. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 134-162.
- Yun TK, Yun YS, Han IH (1983) Anticarcinogenic effect of long-term oral administration of red ginseng on newborn mice exposed to various chemical carcinogens. *Cancer Detec Prev* 6: 515-525.

(2004년 5월 12일 접수, 2004년 7월 9일 채택)