

Ginsenoside Rh2와 베타 글루칸의 암세포 전이억제효과

이창환 · 원은경 · 성현제¹ · 정세영*

경희대학교 약학대학 위생약학 · 독성학교실, 1: 경기대학교 대체의학대학원

Antimetastatic and Antitumor Effect of Ginsenoside Rh2 and β -glucan in Mice

Chang Hwan Lee, Eun Kyung Won, Hyun Jea Sung¹, Se Young Choung*

Department of Hygienic Chemistry and Kyunghee East-West Pharmaceutical Research Institute, College of Pharmacy, Kyunghee University, 1: Graduate School of Alternative Medicine, Kyonggi University

We have investigated the antimetastatic and antitumor effects of Ginsenoside Rh2 and β -glucan using an experimental metastatic mouse model intravenously injected with B 16 melanoma F 10 cells. Animal groups are divided into six groups according to the dosage of drug administration and the kind of drugs. The groups are control, β -glucan with 50, 100 and 200 mg/kg, Geinsenoside Rh2 50 mg/kg, and β -glucan 50 mg/kg + Ginsenoside Rh2 50 mg/kg. Oral administration of various concentration of β -glucan(50, 100, and 200 mg/kg) were reduced the lung- metastatics induced by metastatic B16 melanoma F 10 cells injection with a dose dependent manner in the syngenic mice. At same dosage group, Ginsenoside Rh2 (50 mg/kg) has more antimetastatic effect than the B-glucan(50 mg/kg). The highest antimetastatic effects was observed in the β -glucan 50 mg/kg + Ginsenoside Rh2 50 mg/kg group and has a similar tendency in the anti-tumor effects, including decrease of the average tumor weight and increase of the average survival rate. There are no differences of the average tumor weights were apparent in the β -glucan groups, however there were little decrease of the average tumor weight in Ginsenoside 50 mg/kg group and β -glucan 50 mg/kg + Ginsenoside Rh2 50 mg/kg group than that of the control group. The rate of average survival rate in the β -glucan 50 mg/kg + Ginsenoside Rh2 50 mg/kg group, B-glucan 200 mg/kg, β -glucan 100 mg/kg and β -glucan 50 mg/kg, and Ginsenoside 50 mg/kg groups were highly in order. These data suggest that antimetastatic and antitumor effect of combination of Ginsenoside Rh2 and β -glucan be the highest in this study.

Key words : clinical analyse, cancer treatment β -glucan, Ginsenoside Rh2

서 론

암에 의한 사망은 최근 질병에 의한 사망률 중 가장 높은 비율을 차지하고 있으며 그 비율 또한 해마다 증가하는 추세에 있다. 암이 인간의 생명을 위협하는 치명적인 원인은 암의 침윤(invasion)과 전이(metastasis)현상에 있다. 악성 암세포의 주된 특징인 전이현상은 악성화된 암세포가 1차 종양으로부터 떨어져 나와 주변의 세포의 기질(extracellular matrix)을 분해하며 이동하는 현상으로 이동성을 지닌 암세포가 혈관 및 림프관으로 침투하여 체내를 순환하다가 결과적으로 2차 종양을 형성하여 암

전이 현상을 일으키게 된다²⁴⁾. 일차적으로 외부에서 침입한 이물질의 제거와 매일 신체에서 생성되는 암세포를 제거시키는 기능은 간장과 비장에 존재하는 대식세포의 탐식능력에 의하여 제거된다. 한편으로 세포고사(apoptosis)는 세포괴사(necrotic cell death)와 달리 ATP-에너지를 필요로 하는 생리적 현상으로서 embryogenesis, 세포의 분화, 노화, metamorphosis, 내분비-호르몬 결핍에 의한 특정 세포의 위축 및 정상 세포의 생리적 교체, 특히 홍선의 임파구-선별기능 등에 기여하고 있다.

Apoptosis 기전으로 암세포 증식을 억제하는 항암제는 소량으로 암세포의 유전자를 절단시키므로 바람직한 항암제가 될 수 있으며, Ginsenoside Rh2는 악성 멜라노마 육종인 A375-S2 세포에 대하여 caspase-3과 caspase-8을 활성화시켜 apoptosis를 유도함이 규명되었음이 이미 알려져 있다²¹⁾. Ginsenoside Rh2는 뇌종

* 교신저자 : 정세영, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 약학대학

· E-mail : sychoung@khu.ac.kr · Tel : 02-961-0372

· 접수 : 2007/07/05 · 채택 : 2007/07/24

양세포인 C6 세포에 대하여도 반응성 산소종(ROS) 생성유도와 caspase 활성화를 통하여 apoptosis를 유도하며, bcl-XL의 발현과는 무관함이 보고되었다²²⁾. 그와 더불어 홍삼과 인삼에는 신체의 외적인자에 대항하여 생체의 저항성을 항진시켜 생체를 정상화 시켜주는 능력인 adaptogen으로 작용하는 성분이 있다고 보고되었으며²³⁾, 실제로 홍삼에는 면역기능을 촉진시켜 각종 면역 지표가 항진되는 현상을 분자생물학 수준에서 보고되고 있다.

면역계의 자연살해세포(Natural killer cell, NK cell)를 활성화시키고 인터페론생성을 촉진시켜 항바이러스작용을 나타내는 6년군 홍삼에서 추출한 ginsenoside 계열의 사포닌이 인터페론의 분비촉진과 IL-2생성 촉진을 보여주고 있다. 이 물질은 NK 세포의 살해능력을 촉진시켜 바이러스에 감염된 세포와 종양세포를 파괴시키는 능력이 증강되는 것 또한 알 수 있다²⁴⁾. 그렇다면 홍삼과 다른 치료제의 병합에 따른 상승 또는 상반 효과를 보고자 병용 투여할 β-글루칸은 대식세포의 보체 제 3수용체(CR3, complement receptor³⁾)를 통하여 식균작용이 촉진되며, 대식세포 막에는 다양한 수용체가 있어서 병원체와 결합된 opsonin을 포식함이 밝혀졌다¹⁹⁾. 따라서 홍삼에서 유일하게 강력한 항암작용을 발현하는 홍삼의 항암성분인 ginsenoside Rh2와 더불어 소장 내에서 장내면역을 촉진하여 면역 활성을 부활시켜주는 작용을 가진 β-글루칸(Beta-glucan)을 첨가함으로써 암세포에 대하여 이 중으로 퇴치시킬 수 있는지에 대한 연구를 진행하였다. 실험동물은 면역촉진작용을 규명하기 위하여 생후 5주령의 수컷 C57BL/6Cr 마우스를 사용하였으며 경구투여를 통하여 암세포 전이와 종양무게 그리고 종양의 제거율 그리고 생존률 등을 측정하여 평가하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 시료

실험에 사용된 동물은 생후 5주령의 수컷 C57BL/6Cr 마우스를 (주) 대한바이오링크 (Chungbuk, Korea) 에서 분양 받아 실온 21±2℃, 습도 60±5%, 실내조명 12시간 주기의 실험조건에서 물과 마우스용 고형 사료((주)제일제당)를 자유 공급하며 일주일 간 적응시킨 후 6주령에 실험을 시작하였다. Ginsenoside Rh2와 β-glucan (상황버섯에서 분리)은 모두 (주)닥터즈 메디코아에서 분말형태로 공급 받아 1차 증류수에 녹여 경구 투여하였다. 각 실험군은 다음과 같이 대조군(Control, n=15), β-glucan은 각각 농도별로 50(β 50, n=15), 100(β 100, n=15), 200 mg/kg(β 200, n=15)군, Ginsenoside Rh2 50 mg/kg(G 50, n=15)군, Ginsenoside Rh2 50 mg/kg + β-glucan 50 mg/kg (β 50+G 50, n=15)군으로 나누었다. 시료의 투여는 마우스가 생존할 때까지 하였다.

2. 세포주 및 세포배양

종양 세포주는 B 16 melanoma F 10을 사용하였으며 경희대학교 약학대학 미생물학교실에서 분양받았다. 세포주는 5% CO₂와 37℃ 조건에서 배양하였다. 세포배양에 사용된 배지는 Eagle's minimum essential medium(EMEM, GIBCO, Grand

Island, NY, U.S.A.)였으며, fetal bovine serum(FBS, 멀티랩 서비스, Korea)를 10% 첨가하여 사용하였다. 그 외에 사용된 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

3. 평균 생존율, 평균 종양무게, 종양 저해율

평균 생존율은 B 16 melanoma F 10 세포를 마우스에 이식한 후 14일째 각 군에서 5마리씩 희생하고 난 후 남은 10마리를 가지고 시료를 매일 경구투여 하면서 사망하는 마우스의 수와 종양 생성여부를 측정하였다. 마우스가 사망하는 날짜를 각각 기록하였으며 생존율의 계산식은 다음과 같다.

$$\text{평균생존율}(\%ILS) = \frac{\text{시료를투여한군의살아있는mouse의수가50\%일때의숫자}}{\text{대조군의살아있는mouse의수가50\%일때의날짜}} \times 100$$

평균 종양무게는 사망한 마우스를 개복하여 복강 내에 있는 종양을 모두 적출하여 그 무게를 측정하였고, 각 마우스의 종양 무게를 평균하였다.

종양 저해율은 대조군과 시료투여군의 종양무게를 비교한 수치로 계산식은 다음과 같다.

$$\text{종양저해율}(\%) = 100(A - B) / A$$

A : 대조군의 평균 종양무게, B : 시료 투여군의 평균 종양무게

결과 및 고찰

1. 평균 종양 무게 및 종양 저해율

평균 종양무게는β-glucan 투여군이 대조군에 비하여 적게 나타났고, 투여용량별 군간의 차이는 없었으나 β-glucan 50 mg/kg군과 β-glucan 100 mg/kg군에서는 대조군에 비하여 유의적인 차이를 보였다. 또한 Ginsenoside Rh2 50 mg/kg군(0.81 ± 0.48 g)과, Ginsenoside Rh2 50 mg/kg + β-glucan 50 mg/kg군(0.33 ± 0.02 g)에서도 대조군(2.92 ± 0.79 g)에 비하여 유의적인 차이를 보였으며 β-glucan에 비해 효과적이었다(Table 1).

종양 저해율은 β-glucan군에서는 농도의존적인 결과는 아니었으나 대조군에 비하여40-50%정도의 저해율을 보였으며 Ginsenoside Rh2군에서는 72.25%, β-glucan + Ginsenoside Rh2군은 88.63%의 저해율을 보였다(Table 2).

Table 1. Inhibitory effects of oral administration of β-glucan and Ginsenoside Rh2 on the tumor weight in comparison to control group

	Control (n=10)	β50 (n=6)	β100 (n=6)	β200 (n=4)	G50 (n=5)	β50+G50 (n=2)
Average tumor weight (g)	2.92±1.79	1.51±0.40*	1.61±0.65*	1.82±0.58	0.81±0.48**	0.33±0.02***

1) Mean ± S.D. 2) The asterisks indicate the values significantly different from the control at P<0.05(*), P<0.01(**), P<0.001(***)

Table 2. Inhibition rate of tumor growth

	β 50 (n=6)	β 100 (n=6)	β 200 (n=4)	G 50 (n=5)	β 50+G 50 (n=2)
Inhibition rate (%)	48.27	45.03	37.66	72.25	88.63

2. 폐에 전이된 colony수와 전이 여부

Melanoma cell을 꼬리정맥주사 한 지 14일 쯤 폐에 생성된 colony수와 colony 생성여부를 확인한 결과 β -glucan의 투여용량이 높을수록 폐에 생성된 colony수가 감소되는 경향을 보였고 colony가 생성된 마우스의 수 또한 적었다. 같은 농도에서 β -glucan보다 Ginsenoside Rh2가 colony수나 colony가 생성된 마우스의 수가 적었고, 또한 β -glucan + Ginsenoside Rh2군이 colony가 생성된 마우스의 수와 생성된 colony수가 가장 적었다(Fig. 1).

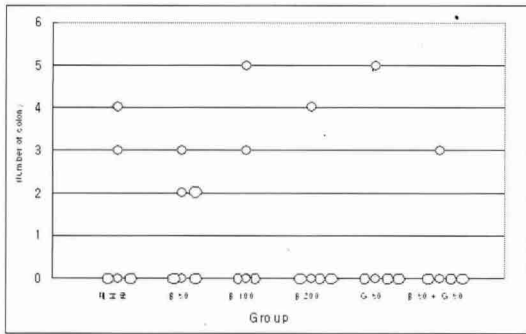


Fig 1. Prevention of pulmonary metastasis. B16 melanoma F 10 cells were injected into the tail vein of C57BL/6 mice on day 0. On day 14, the lungs were excised and metastatic colonies were enumerated

3. 평균 생존율

평균 생존율은 Median survival time¹⁵⁾으로 검정하였는데 대조군은 47.5일이었으며 대조군에 비하여 β -glucan 50은 1.52배, β -glucan 100은 1.51배, β -glucan 200은 1.71배 이상, Ginsenoside Rh2 50은 1.40배, β -glucan 50 + Ginsenoside Rh2 50은 1.71배 이상의 연장을 보였고 일반적인 천연물의 항암 활성수준인 1.25배¹⁶⁾보다 모두 높게 나타났다(Fig. 2, Table 3).

홍삼의 항암 기전으로는 박 등⁶⁾이 마우스에 있어서 산성다당체가 NK cell 및 macrophage를 활성화 시키고 nitric oxide synthase를 유도하여 면역 조절 작용을 나타냈음을 보고한 것과 유사한 생존 양상의 결과를 보여 주고 있다.

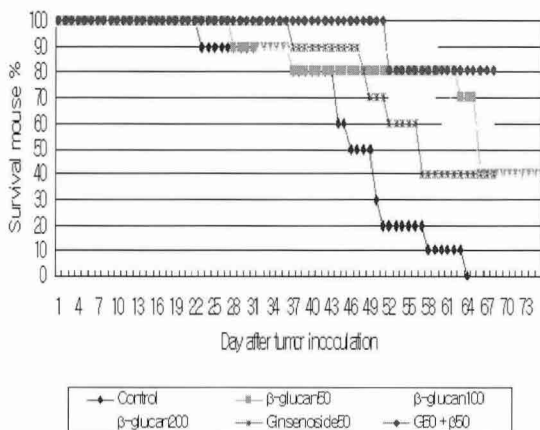


Fig. 2. Effect of daily oral administration of β -glucan and Ginsenoside Rh2 on the survival rate.

Table 3. Effect of β -glucan and Ginsenoside Rh2 on the rate of survival for tumor-bearing mice

Group	Dead Mouse (Number)	Survival Mouse (Number)	Median (T/C) ¹⁾	%LS ²⁾	Survival rate (times)
Control	10	0	47.5/47.5	100	-
β 50	6	4	72.0/47.5	152	1.52
β 100	6	4	71.5/47.5	151	1.51
β 200	4	6	>81.0/47.5	>171	>1.71
G 50	6	4	66.5/47.5	140	1.40
β 50 + G 50	2	8	>81.0/47.5	>171	>1.71

¹⁾ Median (T=Treat group, C=Control group). ²⁾ %LS = % Increase of life span.

결 론

B 16 melanoma cell은 C57BL/6 mouse에서 자연 발생된 암종으로, 숙주의 폐에 전이가 잘 되는 암종이다. 인위적 전이암의 경우 B 16 melanoma cell을 이용하는 경우가 많다. 시료의 항암 효능 검사에선 동물실험으로 폐에 전이된 B 16 melanoma F 10의 colony수, 평균 종양 무게, 평균 생존율을 측정하였다. 본 실험의 결과에서 melanoma cell의 폐 전이율과 종양의 무게, 평균 생존율에서 β -glucan 보다 Ginsenoside Rh2가 더 높은 암전이 억제 효과와 항암 효과를 가진 것으로 나타났다. Ginsenoside Rh2는 B 16 melanoma F 10 cell의 성장기에 작용하여 apoptosis를 일으키는 작용도 있으므로 이러한 부가작용에 의해 β -glucan보다 더 높은 항암활성을 가진 것으로 추측된다. 그러나 B 16 melanoma cell에 대하여 어떠한 항암 기전에 의해 암전이 억제 효과가 나타났는지에 대해서는, 면역체계 중 어떠한 면역세포 또는 cytokine의 증가에 의한 결과인지를 앞으로 계속 연구하여야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Sang, B.H., Chang, W., Lee, Y.J., Jeon, N.D., Hong, I.D., Yoo, K.H., Yang, H.M. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology* 41: 157, 1999.
- Miura, T., Ohno, N., Miura, N.N., Adachi, Y., Shimada, S., Yadomae, T. Antigen-specific response of murine immune system toward a yeast L-glucan preparation. *zymosan*, *Immunology and Medical Microbiology* 24: 131, 1999.
- Ham, Y.M., Chun, K.H., Choi, J.S., Kim, D.H., Lee, S.K. SEK1-dependent JNK1 activation prolongs cell survival during G-Rh2-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304: 358, 2003.
- Naohito, O., Tomoe, H., Yoshiyuki, A., Toshiro, Y. Conformation dependency of nitric oxide synthesis of murine peritoneal macrophages by β -glucans in vitro. *Immunology Letter* 52: 1, 1996.
- Kazuhiro, T., Naohito, O., Yoshiyuki, A., Noriko, N., Miura, T., Yadomae, T. Application of *Candida* solubilized cell wall β -glucan in antitumor immunotherapy against P815

- mastocytoma in mice. *International Immunopharmacology* 2: 59, 2002.
6. Park, J.A., Lee, K.Y., Oh, Y.J., Kim, K.W., Lee, S.K. Activation of caspase-3 protease via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2-induced apoptosis. *Cancer Letters* 121: 73, 1997.
 7. Hideyuki, N., Yoshihiro K., Takehiko T., Junko H., Tsunekazu K., Kenji I., Kazuya K., Ichiro N., Nariyoshi S. Inhibitory effects of ginsenoside Rh2 on tumor growth in nude mice bearing human ovarian cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 733, 1998.
 8. Fuzii, H.T., Travassos, L.R. Transient resistance to B16 F 10 melanoma growth and metastasis in CD432/2 mice. *Melanoma Research* 12: 9, 2002.
 9. Atsushi, O., Makoto, U., Takashi, H., Koichi, N., Keiko, K. Release of (1→3)-β -D-glucan from depth-type membrane filters and their in vitro effects on proinflammatory cytokine production. *Artificial Organs* 27(8):728, 2003.
 10. Teruaki, S., Naohito, O., Iwao, S., Toshiro, Y. Effect of soluble fungal (1→3)-β-D-glucan obtained from *Sclerotium sclerotiorum* on alveolar macrophage activation. *Immunopharmacology* 30: 157, 1995.
 11. Andrea, S.R., Aurea, E., Edson, F.S., Silvio, S.V., Maria, B., Martinelli, O. Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F 10 murine melanoma. *Melanoma Res.* 13: 465, 2003.
 12. Xu, X.M., Yixin, C., Jinguo, C., Shanmin, Y., Feng, G., Charles, B., Underhill, K.C., Lurong, Z. A Peptide with Three Hyaluronan Binding Motifs Inhibits Tumor Growth and Induces Apoptosis. *Cancer Res.* 63: 5685, 2003.
 13. Carr, A., Mazorra, Z., Alonso, D.F., Mesa, C.O., Valiente, D.E., Gomez, R., Perez and L.E. Fernandez. A purified GM3 ganglioside conjugated vaccine induces specific, adjuvant-dependent and nontransient antitumour activity against B16 mouse melanoma in vitro and in vivo. *Melanoma Research* 11: 219, 2001.
 14. Kazuhiro, T., Naohito, O., Yoshiyuki, A., Shigenori, T., Hiroshi, T., Toshiro, Y. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (1→3)-β -D-glucan, CSBG from *Candida* spp. *International Journal of Immunopharmacology* 22: 383, 2000.
 15. Hwang, H.J., Ha, J.Y. Cytotoxicity and antitumor effects of InsambaeKhaptang on C57BL/6 mice melanoma-induced lung metastasis. *Journal of Korean oriental oncology* 3(1):85, 1997.
 16. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Method* 65: 55, 1983.
 17. Tomoda, M., Hirabayashi, K., Shimizu, N., Gonda, R., Ohara, N., Takada, K. Characterization of two novel polysaccharides having immunological activities from the root of *Panax ginseng*. *Biol Pharm Bull.* 16(11): 1087, 1993.
 18. Yang, H., Mitchel, R., Lemaire, I. The effects of in vitro hyperthermia on natural killer activity from lung, blood and spleen. *J Clin Lab Immunol.* 32(3): 117, 1990.
 19. Le Cabec, V., Cols, C., Maridonneau-Parini, I. Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect Immun.* 68(8):4736, 2000.
 20. Willment, J.A., Gordon, S., Brown, G.D. Characterization of the human beta-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem.* 276(47):43818, 2001.
 21. Fei, X.F., Wang, B.X., Tashiro, S., Li, T.J., Ma, J.S., Ikejima, T. Apoptotic effects of ginsenoside Rh2 on human malignant melanoma A375-S2 cells. *Acta Pharmacol Sin.* 23(4):315, 2002.
 22. Kim, H.E., Oh, J.H., Lee, S.K., Oh, Y.J. Ginsenoside RH-2 induces apoptotic cell death in rat C6 glioma via a reactive oxygen- and caspase-dependent but Bcl-X(L)-independent pathway. *Life Sci.* 65(3):33, 1999.
 23. Brekhman, I.I., Dardymov, I.V. Pharmacological investigation of glycosides from Ginseng and *Eleutherococcus*. *Lloydia* 32(1):46, 1969.
 24. Kim, R., Lafreniere, R., Borkenhagen, K., Bryant, L.D. Induction of cytotoxicity from fresh splenocytes after in vivo administration of cyclophosphamide. Importance of long-term culture with high-dose recombinant interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 30(5):283, 1989.