

인삼 사포닌 대사체인 Compound K의 사람 백혈암에 대한 세포 독성 효과

강경아, 임희경, 현진원*
제주대학교 의과대학 생화학 교실

Cytotoxic effect of Compound K, metabolite of ginseng saponin on human leukemia cells

Kyoung-Ah Kang, Hee-Kyoung Lim, Jin-Won Hyun*

Department of Biochemistry, College of Medicine, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

초록: 인삼 사포닌의 활성 본체가 그 대사체임을 밝히기 위해 *in vitro* 상에서 항암 작용을 사람 백혈암 세포인 U937에 대하여 살펴본 결과 crude 인삼 대사체 (일명 Crude K)와 분리 정제된 인삼 대사체인 Compound K는 용량 의존적으로 유의성 있게 세포가 죽는 반면에 인삼 사포닌 (Crude ginsenoside)는 별 효과를 나타내지 않았다. IC₅₀ 값은 Crude ginsenoside, Crude K 및 Compound K 각각 90 g/ml, 32 g/ml, 그리고 20 g/ml이었다 또한 Compound K는 여러 종류의 백혈암 세포에 대해서도 효과를 나타냈다. 이상의 결과로부터 인삼 사포닌의 항암 작용은 대사체인 Compound K가 인삼 사포닌의 활성 본체로서 작용하였다.

Key words: *Panax ginseng*, ginsenoside, compound K

서론

인삼 (*Panax ginseng*의 뿌리)은 예로부터 널리 사용된 대표적인 보기 약물로 항암, 항 당뇨, 항고혈압 등의 작용이 있다고 알려졌다 (1). 이러한 인삼의 대표적인 성분으로는 사포닌, 산성 다당체 등이 있는데 (2, 3) 특히 인삼의 여러 생리 활성은 주로 사포닌 (일명 ginsenoside)에 기인한다고 보고 되었다 (4). 인삼의 주요

성분은 triterpene계 saponine로서 tetracyclic dammarane 골격구조를 지니고 있는 것이 특징적인데 일명 ginsenoside라 불리우며 여러 생리활성을 가지고 있다 (4). 이러한 ginsenoside는 크게 protopanaxadiol과 protopanaxatriol 두 가지 그룹으로 대별하고 있다. Protopanaxadiol계로는 주로 ginsenoside Ra, Rb1, Rb2, Rc 그리고 Rd가 속하며, Protopanaxatriol계로는 ginsenoside Rg1, Re, Rf 그리고 Rg2가 이에 속한다. 이들 그룹들은 항암작용, 항당뇨병, 항고혈압 및 항 스트레스의 작용을 나타내지만 (5-7) 한편으로는 일부 서로 길항작용을 나타내기

*Corresponding author: jinwonh@cheju.ac.kr

도 한다. 즉, protopanaxadiol계는 진정, 항 경련, 진통, 해열, 항염증 작용을 나타내는 반면에 protopanaxatriol은 흥분 및 항 피로 작용을 나타낸다 (8). 과거부터 한국, 중국, 일본 등에서 인삼은 전통적인 약재로서 투여방법으로서 인삼을 열수 추출하여 그 엑기스를 흔히 경구투여 하여왔다. 그러나 이들 성분들은 장내 세균에 의해 대사 되지 않고서는 흡수되지 않는 것으로 밝혀져 있다 (9, 10). 그러므로 이러한 ginsenoside의 약리학적 그리고 생화학적인 작용 및 그 기전을 이해하기 위해서는 섭취한 후에 장내 세균에 의해 대사되는 대사체들을 연구하여야 한다.

그러므로 본 연구에서는 Protopanaxadiol계 ginsenoside가 장내세균에 의해 대사되는 20-O-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol (일명 Compound K, Fig. 1) 대사체의 생리활성을 사람 백혈병 암세포주에 대한 세포독성 연구에 초점을 맞추어 연구하고자 한다.

재료 및 방법

Ginsenoside의 분리

인삼 (*Panax ginseng*의 뿌리)을 5일 동안 실온에서 메탄올 추출한 후 농축하였다. 농축 시킨 메탄올 엑기스를 물에 용해 시킨 후 차례로 petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol로 용매 분획한 후 농축 시켰다. 여기서 얻은 n-BuOH 분획 (crude ginsenoside)를 대사체의 원료로 사용하였다.

인간의 장내세균에 의한 ginsenoside의 대사 및 그 대사체인 K compound의 분리

인간의 장내 세균인 *Bifidobacterium K103*과 *Fusobacterium K-60*을 soy broth (0.01% sodium thioglycolate와 0.1% ascorbic acid 함유)에서 배양한 후 5000 g에서 30 분간 원심분리 시킨 후 PBS로 두 번 세척하였다. 각각 모은 장내 세균 pellet을 10 mM PBS (pH 6.5)에 현탁시켜 crude enzyme 액으로 사용하였다. 5g ginseng BuOH extract와 3 L의 세균 효소액을 포함하는 반응액을 soy

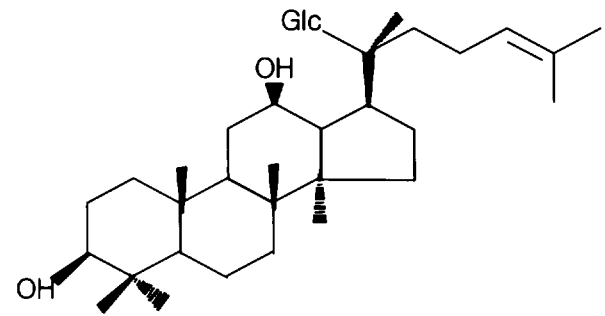


Fig. 1. Chemical structure of Compound K.

broth (0.01% sodium thioglycolate와 0.1% ascorbic acid 함유)에서 37°C에서 5일간 배양하였다. 배양 후 차례로 ethyl acetate, n-butanol로 용매 분획한 후 농축 시켰다. 이렇게 얻은 crude 인삼 대사체 (일명 Crude K)를 CHCl_3 -MeOH (10:1, v/v)를 용매로 하여 silica gel column chromatography를 실시하여 얻은 분획 들은 각각 TLC로 분석하여 Rf 값 (0.74)으로부터 Compound K를 분리하였다.

백혈병 암 세포주 확보 및 배양

U937 (사람 급성 단핵성 백혈암 세포주), Molt-4, H9, Jurkat, CEM-CM3 (사람 T 임파아구성 백혈암 세포주) 등의 여러 백혈암 세포주들을 서울대학교 암 연구소 세포주 은행에서 분양 받아 RPMI 1640 (10% 우태아 혈청 첨가, 1% 항생제 포함) 배지에 현탁하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양한다. 이때 대수기에서 성장하는 세포를 주로 실험에 사용하였다.

세포증식 분석

세포증식 분석은 MTT 방법 또는 hemacytometre를 이용한 방법에 준하여 실시하였다 (22). 대수기에서 성장하는 세포들을 수확하여 PBS (phosphate buffered saline)로 세척 후 well당 10^4 - 10^5 세포 수가 되도록 96 well에 각각 접종한 후에 각 시료를 50 g/ml 처리한 후에 4일 동안 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양한다. 배양 4 일째 되는 날, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 각각 well에 가지고 4 시간 동안 배양한 후에 원심분리하고 남아있는

formazan crystal을 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 가해 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값으로부터 50% 세포 성장률을 억제하였을 때의 농도, 즉 IC₅₀ (50% concentration of growth inhibition) 값을 구하였다.

결과 및 고찰

사람 백혈암 세포인 U937에 대하여 Crude ginsenoside, crude 인삼 대사체 (일명 Crude K) 및 분리 정제된 인삼 대사체인 Compound K를 여러 용량으로 세포에 처리하여 4 일간 배양 후 MTT 방법으로 세포 증식 정도를 관찰한 결과 Crude K와 분리 정제된 인삼 대사체인 Compound K는 용량 의존적으로 유의성 있게 세포가 죽는 반면에 crude ginsenoside는 별 효과를 나타내지 않았다 (Fig. 2). 이때 50% 세포 성장률을 억제하였을 때의 농도, 즉 IC₅₀ (50% concentration of growth inhibition) 값을 구하였을 때 crude ginsenoside, Crude K 및 Compound K의 IC₅₀ 값은 각각 90 g/ml, 32 g/ml, 그리고 20 g/ml이었다 (Table 1). 그리고 이들 화합물의 IC₅₀ 농도로 시간에 따른 세포 생존율을 시간 별로 측정하였을 때 시간 의존적으로 Compound K가 유의적으로 세포 생존율을 억제하였다 (Fig. 3). 그러므로 인삼의 경우 인삼 대사체가 대사 되기 전의 물질보다 암세포에 대한 생리활성이 증가됨을 알 수 있었다. 또한

Compound K가 여러 종류의 백혈암 세포에 대해 세포 독성 실험을 살펴본 결과 U937, Molt-4, H9, Jurkat, CEM-CM3 모두에 대해 효과가 나타났으며 이때 특히 U937세포에 대해 민감성을 더 나타냈다 (Fig. 4). 이상의 결과로부터 인삼 사포닌의 항암 작용은 대사체인 Compound K가 인삼 사포닌의 활성 본체임을 시사하며 그 기전을 앞으로 apoptosis와 cell cycle 측면 및 그 신호 전달 측면에서 연구하고자 한다.

Table 1. IC₅₀ values of *Panax* ginsenosides and its metabolites on U937 human leukemia cells

	IC ₅₀ values on U937 cells [μ g/ml]
Crude ginsenoside	90
Crude K	32
Compound K	20

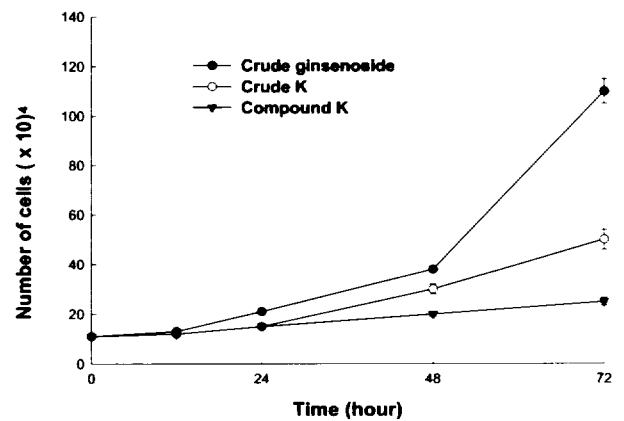


Fig. 3. Kinetics of *Panax* ginsenoside and its metabolite on U937 human leukemia cells.

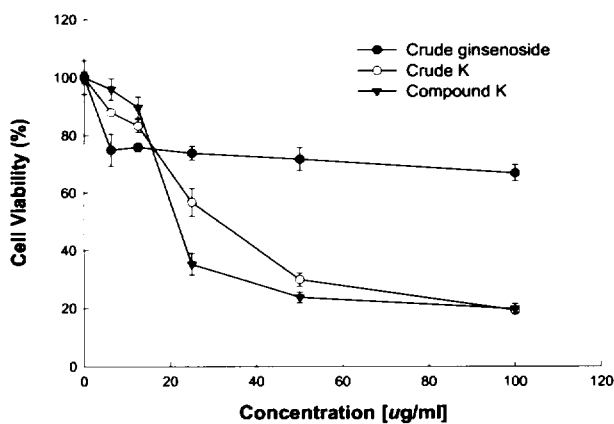


Fig. 2. Cell viability of *Panax* ginsenoside and its metabolite on U937 human leukemia cells.

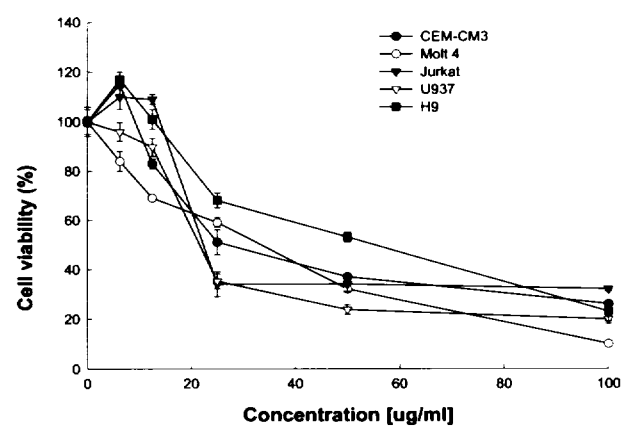


Fig. 4. Cell viability of Compound K on various human leukemia cells.

참고문헌

1. Wiklund I, Karberg J, Lund BA. Doubleblind comparison of the effect on quality of life of a combination of vital substance including standardized ginseng G115 and placebo. *Curr Ther Res* 1994;55:32.
2. Shibata S, Tanaka O, Sado M, Tsushima S. Genuine saponin of ginseng. *Tetrahedron Lett* 1963;12: 795-794.
3. Shibata S, Fujita M, Itokawa H, et al. Panaxadiol, a saponin of ginseng roots. *Chem Pharm Bull* 1963;11: 759-763.
4. Tanaka O. Recent studies on glycosides from plant drugs of Himalaya and southwestern China: chemo-geographic correlation of Panax species. *Pure & Appl Chem* 1990;62: 1281-1284.
5. Okuda H, Lee SD. Biological activities of non-saponin compounds isolated from Korean red ginseng. *Proc Intl Sym on Korean ginseng* 1990:15.
6. Yun TK. Experimental and epidemiologic evidence of cancer preventive effects of *Panax ginseng* C.A. Meyer, *Nutr Rev* 1996;54: 71-81.
7. Yun TK. *Panax ginseng*-a non organ specific cancer preventive? *Lancet Oncol* 2001;2:49-54.
8. Shibata S, Tanaka O, Shoji J, Saito H in Wagner H, Farnsworth NR, Hikino H (Eds.) *Economic and medicinal plant research*, 1, Academic Press, London, 1985; 217-283.
9. Wakabayashi C, Murakami K, Hasegawa H, Murata J, Saiki I. An intestinal bacterial metabolite of ginseng pro-topanaxadiol saponin has the ability to induce apoptosis in tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:725-730.
10. Kim DH, Yu KW, Bae EA, Park HJ, Choi JW. Metabolism of kalopanaxsaponin B and H by human intestinal bacteris and antidiabetic activity of their metabolites *Biol Pharm Bull* 1998;21:360-365.
11. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemisensitivity testing. *Cancer Res* 1987;47:936-941.