

홍삼 사포닌에 의한 유선상피 및 유선암세포의 분화 유도 효과 연구

오미숙 · 백기주 · 전성실 · 김규원* · 최강주** · 김남득#

부산대학교 약학대학 약학부, *자연과학대학 분자생물학과,

부산대학교 신약개발연구소, **한국인삼연초연구원

(2000년 9월 20일 접수)

Effects of Ginseng Saponins on the Induction of Differentiation in Mammary Epithelial Cells and Mammary Tumor Cells

Meesook Oh, Kee-Joo Paik, Seong-Sill Jeon, Kyu-Won Kim*, Kang Ju Choi** and Nam Deuk Kim#

Dept. of Pharmacy, College of Pharmacy, *Dept. of Molecular Biology, College of Natural Science,

Research Institute of Drug Development, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

**Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

(Received September 20, 2000)

Abstract : Using Ginseng saponins (crude saponin and total saponin) and ginsenoside Rb1 Rb2, Rc, Rd, Re, Rh1, and Rh2 in this study, we have examined the effects of the compounds on the induction of differentiation in normal rat mammary epithelial cells and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary tumor cells in culture. When normal rat mammary organoids were cultured in 100-mm culture plates in the presence or absence of ginseng saponins, there were four different cell colonies after two weeks in culture: cobble stone, spindle, honey comb, and senescence type colonies. Ginseng saponins showed different effects on the development of each colonies. Scrape-loading dye transfer technique was performed to measure the effects of total saponin, Rh1, and Rh2 on intercellular junctional communication. Intercellular communication was not observed at short cultural time, e.g., four or seven days, but when it cultured for up to two weeks, cell to cell communication was observed in saponin-treated cells. Reconstituted basement membrane, Matrigel, supported the growth and development several different multicellular structures from normal mammary organoids (e.g., ductal, webbed, stellate, and squamous colonies) or DMBA-induced mammary tumor (e.g., alveolar unit, foamy alveolar unit, squamous metaplasia, lobulo-ductal, stellate, and webbed colony). In ginseng saponin-treated groups, webbed colonies were more and squamous colonies were less than control group. Moreover, the ductal colonies, marker structure of well-differentiated mammary epithelial cells, were developed more in saponin-treated group than in control group. In conclusion, ginseng saponins affected on the differentiation of normal rat mammary epithelial cells and DMBA-induced mammary tumor cells in culture.

Key words : Ginseng saponins, mammary epithelial cells, mammary tumor cells, differentiation, Matrigel.

서 론

홍삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 항암 작용을 가진 것으로 알려져 있다.¹⁾ 그리고 홍삼사포닌 성분과 암세포 분화 작용에 대한 연구는 F9 기형암종세포와 B16 혹색종세포에서 분화작용이 있음을 확인되었다.^{2,3)}

그리고 여러 항암 효과를 가지는 약물들이 세포 분화 유도 효과를 가지는 것으로 보고되고 있다. 즉 암세포는 정상적인

세포의 분화가 억제되어 원시세포의 상태, 즉 무한정 증식과 세포-세포의 세극결합 결손 등이 나타난다. 근래에 홍삼 사포닌이 이들 신호전달에 관여하는 connexin 단백질의 재형성에 영향을 미치는 것으로 확인되었다.⁴⁾

정상적인 유선 상피 조직 내에는 유선 조직의 지속적인 성장에 관여하는 유선간세포(mammary stem cell)들이 존재한다.⁵⁾ 유선간세포들은 유선 조직이 출생기, 사춘기, 임신기, 출산기, 수유기, 유선 퇴화기 등 일련의 유선 조직이 성장했다가 퇴화하는데 결정적인 세포들의 간세포군이 된다. 이를 세포들의 분화 및 성장에는 여러 종류의 성장인자들, 호르몬, 무기이온, 세포외 기질 단백질 등이 영향을 미치는 것으로 생

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 051-510-2801; (팩스) 051-513-6754
(E-mail) nadkim@hyowon.pusan.ac.kr

각되고 있다. 이러한 유선간세포들은 유선암 발생 시 빌암 물질들의 표적이 되며 간세포의 변이에 의한 암세포 변환으로 생각되고 있다.⁶⁾ 정상 유선간세포를 세포외 기질 단백질 혼합물인 Matrigel에 입체 배양하였을 때 정상 유선조직에서 발견되는 ductal, webbed, stellate 등의 모양을 가진 다세포 구조물 외에 정상조직에서 발견되지 않는 편평상피화생 구조물이 생성되었다.^{7,8)} 편평상피화생 구조물은 정상 세포가 암세포로 변환되는 중간 단계의 구조물인데 주로 흡연, 비타민 A 부족 등의 원인으로 발생한다. 그러나 retinoic acid를 처리하였을 때 이들이 생성이 억제되었음이 보고되었다.⁸⁾ 따라서 정상 간세포, 유선암세포 등을 입체 배양하면서 생성되는 다세포구조물 중 편평상피화생의 발생 기전 연구는 매우 중요한 의미가 있다. 따라서 본 논문은 홍삼 사포닌 성분들이 가지는 ① 정상 유선 상피세포들의 증식에 미치는 영향, ② 유선 간세포 및 간세포의 세포-세포 신호 전달 체제에 미치는 영향, ③ Matrigel을 이용한 정상 유선 상피 세포들의 배양 시 생성되는 다세포 구조물의 발생에 미치는 영향, ④ Matrigel에 배양한 유선암세포의 세포 분화 촉진에 미치는 효과 등을 연구하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험 재료

Collagenase(Type III, Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA), Mammary Epithelial Cell Growth Medium (MEGM) 배지(Clontech, San Diego, CA, USA), DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium[®]) 50 µg/ml gentamicin sulfate와 0.33 mg/ml glutamine 첨가; Gibco, Grand Island, NY, USA), Matrigel(Collaborative Research Inc., Bedford, MA, USA), fetal bovine serum(Gibco, Grand Rapids, MI, U.S.A.), 17β-estradiol, cortisol, insulin, bovine prolactin(Hormone Distribution Office, National Institute of Arthritis, Digestive Disorders and Kidney Diseases, Bethesda, MD, USA), ginseng saponin(조사포닌, 총조사포닌) 및 분획(Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rh1, Rh2)(한국인삼연초연구원 제공) 등을 사용하였다.

2. 유선상피세포 배양

(1) 실험동물

자성 7~8주 F344 흰쥐(약 150 g)를 구입하여 시판 고형 사료로 예비 사육한 후 실험에 사용하였다. 사육실의 온도는 24±1°C, 습도는 50±5%, 명암은 12시간 주기로 조절하였다.

(2) 배지 조성

무혈청 배지로서 MEGM을 사용하였으며 10 ng/ml EGF,

5.0 µg/ml insulin, 0.5 µg/ml hydrocortisone, 10 µg/ml human transferrin, 50 µg/ml gentamicin 등을 혼합해서 사용했다.^{9,10)} 혈청배지(Complete Hormone Medium, CHM)는 10% fetal bovine serum(FBS)을 함유한 배지로서 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)에 10% FBS, 0.005 µg/ml 17β-estradiol, 0.5 µg/ml cortisol, 5 µg/ml insulin(이상 Sigma), 5 µg/ml bovine prolactin 등을 함유한 배지를 사용했다.¹¹⁾

3. 유선 미세절편(organoids) 배양

유선 절편 조직 배양법은 이미 본 실험실에서 보고된 방법을 사용하였다.^{10,11)} 간략히 요약하면 F344종 흰쥐에서 유선 조직을 분리하고 collagenase를 처리하여 organoids를 분리하고 이들을 무혈청 배지인 MEGM에 배양하면서 홍삼 사포닌을 처리하고 유선상피세포 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

4. 유선 모세포의 세포-세포 신호 전달 체제에 대한 영향 연구

유선상피들을 MEGM 배지에 배양하고 일정한 크기의 colony를 형성한 뒤 Scrape Loading Dye Transfer(SLDT) 방법으로 세포와 세포 사이의 신호 전달 유무를 확인하였다.¹²⁾ 이를 배양한 뒤 배지를 제거하고 PBS로 수회 세척했다. Lucifer yellow 색소를 함유한 PBS용액(0.5 mg/ml)을 세포 배양기에 주입하고 수술용 칼날을 이용하여 세포 colony들을 잘랐다. 37°C에서 3분간 방치한 뒤 lucifer yellow 색소액을 제거하고 PBS로 수회 세척한 뒤 형광 현미경하에서 손상을 입은 세포로부터 이웃 세포들이 lucifer yellow 색소를 전달 받았는지를 녹색 형광을 통해 확인했다.

5. 세포외 기질(Matrigel)에 배양할 때 생성되는 다세포 구조물의 발생에 대한 영향 연구

(1) Matrigel 내에서 정상 유선 미세절편들의 배양법

F344종 흰쥐를 상기한 방법으로 죽이고 유선 조직을 채취하고 유선 미세절편을 Matrigel에 일정량 혼합한 후 4주간 배양하면서 다세포구조물의 발생 빈도에 미치는 홍삼사포닌 영향을 조사하였다.⁹⁾

(2) Matrigel 내에서 DMBA-induced mammary tumor 배양

F344 흰쥐에 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA, 50 mg/kg/sesame oil)를 처리하여 6개월 후에 생성된 유선종양의 크기는 20×25×10(mm)였으며 종양을 절취하여 냉장 DMEM 배지 상에서 비종양성 조직을 분리하고 종양조직을 취하여 hematoxylin & eosin 염색으로 조직학적 진단을 하였다. 나머지 종양조직을 절취하여 수술용 가위로 세절한 뒤 상기한 유선 미세절편의 채취와 동일한 방법으로 종양조직

절편들을 얻었다. 약 100개의 절편을 Matrigel과 혼합한 후 전기한 방법으로 배양하였다.

Matrigel에 유선 상피세포 및 암세포들을 배양하면서 홍삼 총사포닌의 영향을 조사하기 위해 배지에 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 10배 씩 희석하여 $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 되도록 첨가했다. 2~3일 간격으로 역상 현미경하에서 세포들의 증식을 관찰하고 필요하면 사진 촬영을 했다.

6. 통계 처리

통계 처리는 Student's t test를 이용하여 대조군과 시험군을 비교하였으며 때로는 동일 시료군 내에서 비교 검토하였다. P value가 0.05 이하인 경우를 유의성 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 정상 유선 미세절편 배양

정상 흰쥐로부터 절취한 유선 미세절편들은 유선 상피세포와 도관들로 구성되어 있었다. 흰쥐(평균 체중 150 g) 한마리의 서혜부 유선에서 약 3.2 g의 조직을 얻을 수 있고 이로부터 약 8,000개(S.D.= $\pm 20\%$)의 유선 미세절편을 얻었다. 이들을 세포배양기에 분주하고 홍삼 사포닌(조사포닌, 총사포닌, ginsenoside RB1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rh1, Rh2)을 첨가한 실험군과 첨가하지 않은 대조군으로 나누어 홍삼 사포닌의 영향을 조사하였다.

하루가 경과하면서 미세절편을 중심으로 방사형태로 단일 층을 이루며 성장세포가 자라나가기 시작했다. 이러한 성장 세포는 3~4일이 경과하면서 일정한 형태의 세포집락을 형성 하며 자라나갔으며 다음과 같이 분류될 수 있다 : (a) 미세절편을 둘러싸며 자라나간 작은 입방형의 세포들은 촘촘하게 단일층을 형성하며 세포집락의 중심부를 차지하며 자라나가고 있었다. (b) 작은 입방형의 세포의 외곽을 한겹 또는 여러 겹으로 둘러싸고 있는 모양의 큰 상피화된 세포는 모두 막대 모양으로 늘어서 있었다. (c) 마지막의 한 형태는 세포집락의 사이를 연결하듯이 길게 뻗은 막대 모양의 세포였다. 배양 1 일째에 등근 모양의 미세절편에서 자란 성장세포는 대부분이 조약돌 모양이었다. 배양 7일째에 세포집락의 내부는 cobble stone 형태의 세포들이 빽빽하게 모여있고 가장자리에는 spindle 모양의 세포들이 세포집락을 둘러싸고 있었다.

배양 14일째에 세포집락의 형태가 다양하게 형성되었는데 이들을 (a) cobble, (b) spindle, (c) honey comb, (d) senescence 등 4종류로 분류하고 이들의 발생 빈도를 조사하였다 (Fig. 1). 100배의 시야에서 24 well을 4구역으로 나누고 각 구역에 나타나는 각각의 세포집락 빈도를 조사하여 통계 처

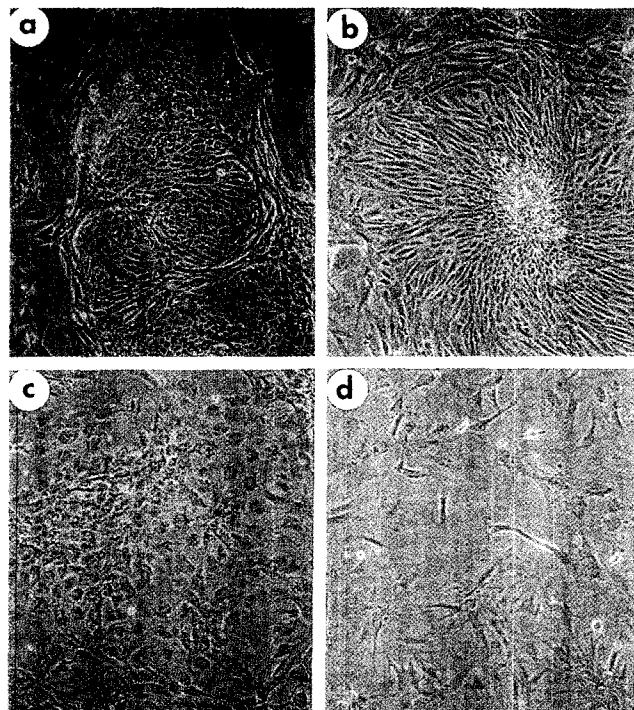


Fig. 1. Morphologies of cultured mammary organoids in the presence or absence of ginseng saponins. Cobble (a), spindle (b), honey comb (c), and senescence (d) types of colonies were developed after culture. The normal mammary organoids were cultured in 60-mm petri dishes which contained a third inguinal fat pad equivalent of mammary tissue each.

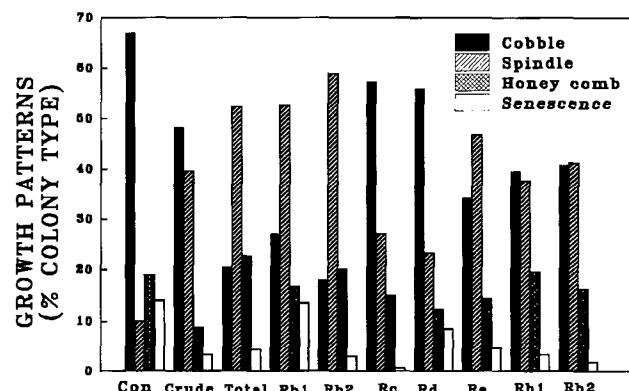


Fig. 2. The effects of ginseng saponins on morphological differentiation of normal rat mammary organoids grown in MEGM. Morphology was quantified on days 7 of culture. Cobble, spindle, honey comb, and senescence colonies.

리하였다(Fig. 2). 홍삼 사포닌을 첨가하지 않은 대조군에서는 cobble stone 형태의 세포집락이 대부분이었고 spindle, honey comb, senescence 형태의 세포집락은 소수로 존재하였다. 수종의 홍삼 사포닌 중 대조군과 유사한 세포 배양 형태를 보인 것은 조사포닌, Rc, Rd, Re 사포닌 분획들이었다.

그리고 총사포닌, Rb1, Rb2, Rh1, Rh2는 cobble, spindle, honey comb 및 senence의 세포집락 발생 빈도가 다른 홍삼 사포닌들에 비해 세포의 증식과 분화에 미치는 영향이 유사하였다. 그러나 본 실험 상태에서 어떤 특정 사포닌 분획이 유선 상피세포의 분화에 어떠한 특이한 영향을 미친다고 하는 것을 판단하기 어려우나 홍삼 사포닌의 분획 종류에 따라 생성되는 세포집락의 구성이 달라진다는 사실만으로도 홍삼 사포닌이 유선상피세포의 분화에 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

2. 세포간 신호전달에 대한 홍삼 총사포닌의 영향

홍삼 사포닌(총사포닌, Rh1, Rh2)을 첨가하지 않은 대조군의 배양한 세포는 SLDT 시행 결과 4, 7, 14일째 모두 음성을 나타내었으나 총사포닌, Rh1, Rh2를 첨가한 배지에서 배

양한 세포는 14일째에 양성을 나타내었다(Fig. 3). 요약된 자료를 Table 1에 제시하였다.

3. Matrigel에서의 미세절편 배양

(1) 정상 유선 미세절편 배양

먼저 홍삼 사포닌이 정상 유선상피세포들의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해 100개의 미세절편을 각 well에 분주한 뒤 총사포닌을 0.01~10 µg/ml 농도로 하여 MEGM 배지에서 4주간 배양한 결과 a) stellate, b) ductal, c) webbed, d) squamous colony 등 4종의 다세포 구조물이 생성되었다(Fig. 4). 이들의 생성 빈도 조사를 위해 4주간 배양한 후 현미경 하에서 각 농도당 3 well씩 총 다세포 구조물 발생 빈도를 조사한 결과 대조군, 0.01, 0.1, 1.0, 10 µg/ml의 농도에서 각 well 당 평균 83.0 ± 1.0 , 84 ± 5.19 , 80.33 ± 3.21 , 78.0 ± 5.29 , 78.33 ± 2.89 개의 발생 빈도를 보였으며 각 실험군간의 통계학적 유의성은 없었다. 이 결과로 미루어 보아 총사포닌은 정상 유선상피세포의 성장과 다세포구조물 생성을 억제하지 않음을 알 수 있었다.

그리고 다세포 구조물의 발생에 대한 총사포닌 농도 차이의 영향을 조사하기 위해 대조군, 총사포닌 0.01, 0.1, 1.0, 10 µg/ml의 농도에서 각각의 다세포 구조물 상대적 발생 빈도를 조사한 결과 전반적으로 총사포닌의 농도가 증가할수록 정상세포에서 암세포로 변환되는 과정 중 나타나는 편평상피화생(squamous metaplasia) 구조물들의 발생빈도는 감소한 반면, webbed 및 stellate 구조물들의 발생 빈도는 증가하였고 ductal 구조물의 발생빈도는 큰 차이가 없이 소수로 존재하였다(Fig. 5). 특히 비정상적인 구조물인 편평상피화생 구조물이 총사포닌 농도가 증가할수록 유의성 있게 감소한 것

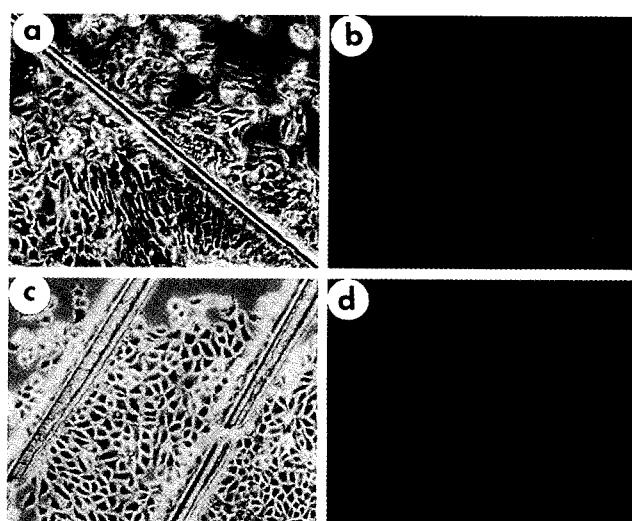


Fig. 3. Scrape loading and dye transfer test among cells cultured in MEGM without ginseng saponin (a, b) or with ginseng saponin (c, d) for 14 days ($\times 100$). Photomicrograph b is negative and d is positive for intercellular exchange of lucifer yellow dye.

Table 1. Results of scrape loading and dye transfer tests of colonies cultured for 4, 7, or 14 days as primary in MEGM with total ginseng sapoin, Rh1, and Rh2. 4-D, 4 days; 7-D, 7 days; 14-D, 14 days in culture; -: no cell-cell communication; + presence of cell-cell communication

Group	4-D	7-D	14-D
Control	-	-	-
0.01 ^a	-	-	+
0.1	-	-	+
1.0	-	-	+
10	-	-	+

^aConcentration of ginseng saponin (µg/ml)

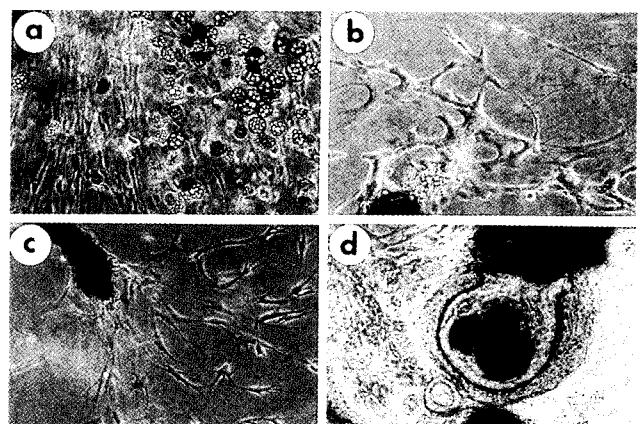


Fig. 4. Morphological appearance of mammary organoids cultured in Matrigel under MEGM. The resulting colonies were classified into one of four types: stellate colonies with lipid-laden cells (a), ductal colonies (b), webbed colonies (c), and squamous colonies (d).

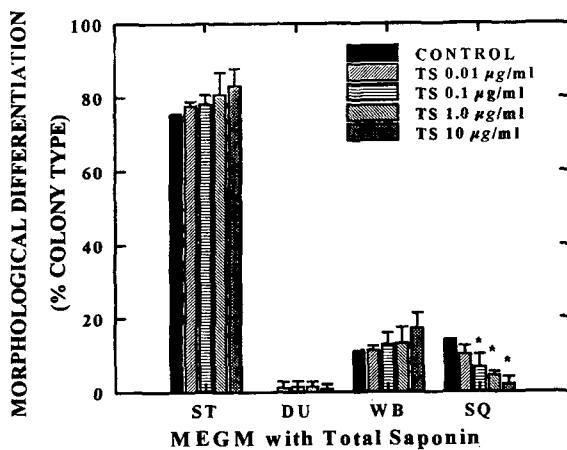


Fig. 5. Fractions of each multicellular colony developed from mammary organoids cultured in MEGM with or without total saponins. Each well of 24 multiwell plate contained ~100 organoids. Bars represent the mean \pm SD. ST, stellate; DU, ductal; WB, webbed; and SQ, squamous colony.

은 매우 의미있는 것으로 사료된다($p<0.05$).

따라서 홍삼의 총사포닌이 정상 유선 상피세포들의 성장과 분화에 어떠한 독성을 보이지 않는 것을 확인하였고 또 농도 변화에 따라 다세포 구조물의 발생 빈도가 유의성 있게 변화한 것을 관찰한 후 각각 분획들(조사포닌, 총사포닌, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rh1, Rh2)에 대한 영향을 조사하였다. 이때는 각 농도의 차이를 보지 않고 조사포닌과 총사포닌의 경우 최종 농도를 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$, 나머지 분획의 경우에는 10^{-6}M 농도로 조정하였으며 이들을 MEGM 배지에서 첨가하여 4주간 배양하였다. 이때 홍삼 사포닌을 첨가하지 않은 대조군과 조

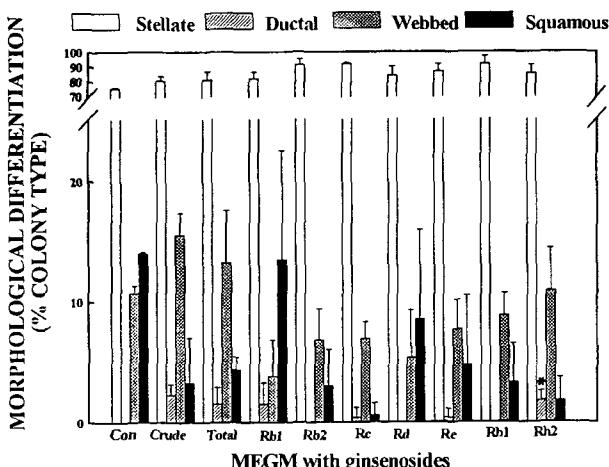


Fig. 6. Fractions of each multicellular colony developed from mammary organoids cultured in MEGM with or without ginseng saponins, such as crude, total, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rh1, and Rh2. Each well of 24 multiwell plate contained ~100 organoids. Bars represent the mean \pm SD.

사포닌, 총사포닌 및 사포닌 각 분획들을 첨가한 군에서 다세포 구조물들의 발생 빈도를 조사하였더니 stellate colony들이 대부분을 차지하였고(70~80%) 나머지의 경우, webbed, squamous, ductal colony의 순으로 발생 빈도를 보였다(Fig. 6). 그러나 홍삼 사포닌의 분획에 따라 아주 다양한 형태의 발생 빈도를 보였는데 전반적으로 유선 조직의 특성을 잘 반영하는 ductal colony의 발생 빈도는 대부분의 홍삼 사포닌 분획에서 저조하였으나 Rh2 분획에서는 Rb2, Rc, Rd, Re, Rh1에 비해 유의성 있게 많이 발생하였다($p<0.05$). 그리고 유선조직에서 발견이 되지 않는 특이적 구조물인 squamous colony는 대조군(control), Rb1, Rd 분획에서 비슷하게 발생한 반면 나머지 분획에서는 다소 낮은 발생 빈도를 보였다.

(2) Matrikel 내에서 DMBA-induced mammary tumor 미세절편 배양

7~8주 된 흰쥐에 DMBA를 처리하여 6개월 후에 생성된 유선암의 크기는 $20\times 25\times 10(\text{mm})$ 였으며 종양을 절취하여 냉장 DMEM 배지 상에서 비종양성 조직을 분리하였다. 일부 조직을 취하여 조직학적 진단을 한 결과 전형적인 선암종(adenocarcinoma)의 소견을 보였다.

종양 미세절편의 배양에서도 정상유선조직과 유사한 다세포 구조물의 생성을 보였고 약 4주 후에는 수종의 다세포 구조물이 생성되었는데 정상유선조직절편에서 관찰되지 않은 또 다른 foamy alveolar unit(AU-F)와 alveolar unit(AU) 세포구조물이 발생한 것 외에는 매우 유사한 소견을 보였다(Fig. 7). 그리고 lobulo-ductal colony들은 정상 유선간세포에서 생성된 ductal colony와 매우 유사하였으나 duct 내에 분비과립을 가지는 것이 특징이었다. 이들 다세포 구조물들을 alveolar unit(AU), foamy alveolar unit(AU-F), squamous metaplasia(SQ), lobulo-ductal(L-D), stellate(ST), webbed(WB) colony로 분류하고 이들의 발생 빈도에 미치는 총사포닌의 영향을 조사하였다(Fig. 8). 그 결과 정상 유선상피세포들에 미치는 영향과 매우 유사한 형태의 영향을 보였는데 특히 alveolar unit와 SQ의 발생빈도는 총사포닌의 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며 foamy alveolar unit과 webbed colony의 경우에는 농도가 증가할수록 증가하는 경

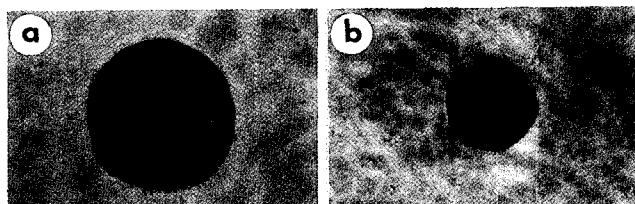


Fig. 7. Morphological appearance of foamy alveolar unit (a) and alveolar unit (b) from mammary tumor cells cultured in Matrigel under CHM.

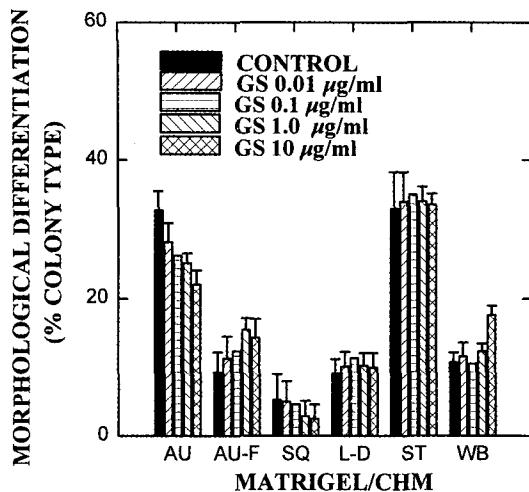


Fig. 8. Fractions of each multicellular colony developed from mammary tumor cells cultured in CHM with or without total saponins. Each well of 24 multiwell plate contained ~100 tumor organoids per well. Bars represent the mean \pm SD. AU, alveolar unit; AU-F, foamy alveolar unit; SQ, squamous; L-D, lobulo-ductal; ST, stellate; and WB, webbed colony.

향을 보였다. 그리고 lobulo-ductal colony와 stellate colony의 경우 총사포닌의 영향을 두드러지게 받는 것 같지는 않았다. 이러한 결과 중 총사포닌이 정상 유선상피세포의 증식과 분화의 결과 생성되는 비특이적 구조물인 SQ의 생성을 억제했던 것과 매우 유사한 결과를 보이는 것으로 보아 유선암세포로부터 SQ 생성을 억제하는 것으로 사료된다.

고 찰

홍삼사포닌 및 분획들이 정상 유선 상피세포 및 유선암세포들의 분화에 미치는 영향을 조사하였는데 총사포닌 및 분획 Rh1, Rh2 등이 이들 세포들의 증식과 분화에 다양한 형태의 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

세포가 성장하고 분화하는데는 크게 두 가지의 요소가 작용한다. 첫째는 유전자 수준에서 조절되는 기전인데 이것은 모세포(stem cell)에서 비대칭성 세포분열(asymmetric cell division)로 인해 각각 다른 기능을 가진 세포가 만들어지거나, 각 세포에 예정된 어떤 임무에 따라 DNA와 RNA들의 합성과 전사 단계에서 이들이 필요에 맞게 조절되어 형질이 발현된다.⁵⁾ 둘째는 생성된 세포가 위치한 환경의 영향을 받는데 이를 환경적 요소를 요약하면 다섯가지가 된다. 1) 조직이 성장할 때의 세포가 위치한 곳(positional effect)과 세포의 극성(cell polarity), 2) 세포들을 둘러싼 세포와 기질 단백질들과의 상호 작용, 3) 세포 간극(cellular gap junction)을 통한 직접적인 세포간의 접촉, 4) 산소, 영양분, 이온

(칼슘 등)들의 농도 구배, 5) 세포 성장 인자나 분화 유도 인자들의 존재 등이 해당된다. 이를 다섯 가지 모두가 세포 성장과 분화에 중대한 영향을 미치는데 최근 세포와 기질 단백질의 영향에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

세포간극을 통한 세포간 정보전달은 세포의 정상적인 성장과 분화를 조절하고 세포의 적응반응에 관여한다고 한다. 따라서 이것이 그 기능을 상실할 경우 종양생성 가능성이 있는 세포는 조절범위를 벗어나 신생물을 생성하기 쉽다. 세포간 정보전달은 종양생성 촉진제로 알려져 있는 12-O-tetradecanophorbol-13-acetate에 의해 감소되고 oncogene의 활성화로 지속적으로 이상 조절된다고 한다.^{12,13)} Clifton과 Gould 등⁶⁾은 수명이 영구적인 종양세포는 정상적인 세포보다 세포간 정보전달이 감소하고 특히 악성종양세포주의 경우 정보전달이 원활하지 않다. 또한 Trosko 등¹⁴⁾은 정상세포가 암세포로 전이하는 과정은 최종 분화하는 능력상실, 세포접촉성장 저지능 상실, 간극을 통한 세포간 정보 전달 이상 등에 의해서 일어난다고 하였다. 즉, 분화가 잘 될수록 세포간 정보전달이 활동적으로 일어남을 알 수 있다. 세포간 정보전달체계에서 adenylyl cyclase 매개 수용체계를 통해 작용되는 호르몬은 아직 알려진 것이 없고 glucocorticoids는 간극 단백질인 connexin 32, connexin 26은 상향 조절하지만 주요한 역할을 하는 것으로 알려진 connexin 43은 상향 조절하지 않는다고 한다.¹³⁾ 세포간 정보전달체계를 조절하는 단백질을 유도하는 다른 인자가 있는 것으로 보여진다. 현재 carotenoids, retinoic acid, tumor growth factor $\beta 1$ 등이 connexin 43을 유도한다고 알려져 있다.¹²⁾

그리고 세포-세포 신호전달체계에 대해서도 홍삼 사포닌이 배양 2주째에 신호전달을 가능하게 하는 것은 세포 분화가 유도된 세포와 세포간에 communication이 시작된 것으로 사료되며 이러한 특징은 정상세포와 암세포의 분화 유무를 측정하는데 매우 유용한 지표로 인정된다.¹⁴⁾ 그러나 암세포의 경우 정상 세포들과 달리 배양 중 세포 접촉이 매우 긴밀하지 않았기 때문에 SLDT 방법에 의해서는 cell-cell communication 유무를 조사할 수 없었다. 그러나 정상유선상피세포 중 stem cell로 알려진 cobble stone 세포들의 분화를 촉진시켜 cell-cell communication을 유도한 것으로 미루어 보아 이에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

본 실험에 사용한 세포와 기질 단백질체인 Matrigel은 수종의 생체 세포들을 *ex vivo* 상태에서 배양한 결과 생체 내에서 매우 유사한 형태의 분화 구조물을 생성하는 것으로 확인되었다. 세포와 기질은 흔히 collagens(I, VI, V형), proteoglycan, anchorage proteins(laminin, fibronectin, chondronectin), elastin, entactin 등이 있다.¹⁵⁾ 이들은 실질 장기를 구성하는 세포들의 기저막과 접촉하고 있기 때문에 세포

의 성장과 분화에 많은 영향을 미치리라 생각된다.

정상 유선 미세절편이나 단일 상피세포들을 Matrigel에 배양하였을 때 다양한 다세포 구조물이 생성됨이 보고되었다.⁷⁾ 본 실험에서도 유선 미세절편을 혈청 배지 혹은 무혈청 배지에서 배양했을 경우 다양한 형태의 다세포 구조물들이 생성되었는데 이것은 a) stellate, b) duct, c) web, d) squamous 구조물들이었다. 그러나 유선암세포들을 배양하였을 때는 정상 유선상피세포에서 유래하는 다세포구조물과는 다소 다른 alveolar unit(AU), foamy alveolar unit(AU-F), squamous metaplasia(SQ), lobulo-ductal(L-D), stellate(ST), webbed(WB) colony들이 나타났었다. 그리고 이들 다세포 구조물들의 조직학적 소견을 살펴본 결과 stellate 구조물은 지방소적을 많이 함유한 미세관상 구조물이었다.⁷⁾ Duct 구조물은 내강을 가지며 단일 상피세포들에 의해 관상 구조를 이루나 상피세포 내에는 casein 단백질이 함유되지 않았다. Web 구조물도 미세관상 구조물의 형상을 보였으나 유선상피세포의 배열을 보이지 않았다. Squamous 구조물은 가장자리에 편평상피세포들이 여러층 배열하고 중앙에 케라틴총(keratin pearl)을 가진 전형적인 편평상피화생 구조물이었다. duct 구조물은 단일 상피세포들에 의해 이루어진 관상 구조를 이루고 이들 상피세포의 세포질과 관상 구조의 내강에는 casein 단백질을 함유한 분비관립들이 충만하였다.⁷⁾

이러한 다세포구조물 중 정상 유선조직에서는 볼 수 없는 편평상피화생의 발생 기전에 대해서는 명확하게 알려진 것이 없고 또 이것의 발생에 관여하는 인자들에 대한 명확한 보고가 많지 않다. 단지 비타민 A가 결핍되었을 때 생성이 증가된다고 알려져 있을 뿐이다. 그리고 최근에 흡연을 많이 하는 여성의 subareolar breast에서 편평상피화생이 발생한 것을 보고하였다.¹⁶⁾ 이것은 흡연과 유방 조직에서 편평상피화생 생성과 관련이 있다는 보고로 여성 흡연 인구가 증가하는 우리의 현실로 볼 때 매우 주의해야 할 내용이라 사료된다.

그리고 편평상피세포의 분화가 진행될 때 a) type I trans-glutaminase의 활성과 효소 단백질, mRNA의 증가,¹⁷⁾ b) cholesterol sulfotransferase activity 및 cholesterol sulfate level의 증가,¹⁸⁾ c) Keratin 13,¹⁹⁾ d) SQ10, SQ37(편평상피세포 특이적 mRNA),²⁰⁾ e) rSQ20²¹⁾의 발현이 증가된다는 보고 등이 있으나 결정적인 기전이나 marker들은 아직 알려진 것이 없다. 그렇기에 앞으로 편평상피화생의 생성에 관련된 인자들 및 작용 기전을 이해하기 위한 연구가 필요하리라 사료되며 이것을 알게 될 때 유선 상피 세포들의 분화에 관련된 조절 기구들의 작용 기전을 알수 있으리라 생각된다. 그리고 특히 홍삼 사포닌에 의해 이들 편평상피화생의 생성이 다소 억제될 수 있다는 것을 미루어 보아 홍삼 사포닌이 생체에서 이러한 비특이적인 구조물의 생성을 억제하거나 최소

한 예방할 수 있음을 제시하는 것으로 사료된다. 그리고 최근 ginsenoside Rh2의 경우 인체 유선암세포인 MCF-7 세포의 증식을 억제하는 것이 보고되었다.²²⁾

이상의 결과로써 홍삼 사포닌들이 다세포 구조물 생성에 관련된 정상적인 유선 상피간세포 및 유선암세포들의 성장과 분화에 영향을 미치는 것이 확인되었다. 본 실험 결과에서도 정상 유선 미세절편 및 유선암세포들을 세포외 기질 단백질 내에 배양하였을 때 여러 종류의 정상적인 구조물들이 생성됨으로 본 세포 배양법이 *in vitro* 상에서의 세포 분화 및 증식 연구에 유용하게 이용되리라 생각된다.

요 약

정상 흰쥐 유선상피세포 및 DMBA로 유도한 흰쥐 유선암세포를 *in vitro* 상태에서 배양시키며 이들의 성장과 증식에 대한 홍삼 사포닌(조사포닌, 총사포닌, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rh1, Rh2)의 영향을 관찰하였다. 홍삼 사포닌들의 세포 배양 중 발생하는 4종의 세포집락의 형태(cobble stone, spindle, honey comb, senescence)에 영향을 미쳤다. 배양한 세포 집락에 lucifer yellow 용액을 이용하여 SLDT 결과 홍삼 사포닌을 첨가하고 배양한 세포군에서 배양 2주째 세포 간극을 통한 세포간 정보전달체계가 양성을 나타내었다. 이것으로 홍삼사포닌이 분화가 덜된 상피 간세포의 분화를 촉진시켜 분화의 지표 중 하나인 세포-세포신호전달을 유도한 것으로 사료된다. 그리고 정상 유선 및 유선암 미세절편들을 Matrigel에 배양한 결과 분화의 최종 지표인 수종의 다세포구조물이 생성됨을 확인하였는데 정상 조직과 유선암세포로부터 생성된 구조물 ductal, webbed, stellate, squamous colony들이 생성되었는데 유선암세포로부터는 alveolar unit, foamy alveolar unit, squamous, lobulo-ductal, stellate, webbed colony들이 생성되어 다소 상이함을 확인하였다. 그러나 홍삼 사포닌을 첨가하여 배양하였을 때 수종의 다세포 구조물 발생 빈도가 변하는 것으로 미루어 보아 홍삼 사포닌이 이들 다세포 구조물의 발생에도 영향을 미치는 것으로 생각된다. 편평상피암의 전암병소라 일컬어지는 편평상피화생의 경우 홍삼 사포닌의 존재 하에 이들의 생성이 억제되고 분화가 된 ductal colony들의 수가 증가된 것으로 보아 암예방 효과의 기전을 이해하는데 중요한 단서를 제공할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 1996년도 한국담배인삼공사의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Yun, T.-K. and Choi, S.-Y. : *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **4**, 401-408 (1995).
2. Lee, Y. N., Lee, H. Y., Chung, H. Y., Kim, S. I., Lee, S. K., Park, B. C. and Kim, K. W. : *Eur. J. Cancer* **32**, 1420-1428 (1996).
3. Odashima, S., Ohta, T. and Kohno, H. : *Cancer Res.* **45**, 2781-2784 (1985).
4. Hong, E. J., Huh, K., and Rhee, S. K. : *Arch. Pharm. Res.* **19**, 264-268 (1996).
5. Kim, N. D. : *Life Science*, **3**, 72-78 (1993).
6. Clifton, K. H. and Gould, M. N. : *Cancer Res.* **49**, 4326-4330 (1991).
7. Kim, N. D., Oberley, T. D. and Clifton, K. H. : *Exp. Cell Res.* **209**, 6-20 (1993).
8. Kim, N. D., Paik, K. J. and Clifton, K. H. : *Cancer Letters* **110**, 217-223 (1996).
9. Kim, D. Y., Jhun, B. H., Lee, K. H., Hong, S. C., Clifton, K. H. and Kim, N. D. : *Arch. Pharm. Res.* **20**, 297-305 (1997).
10. Paik, K. J., Jeon, S. S., Chung, H. Y., Lee, K. H., Kim, K. W., Chung, J. K. and Kim, N. D. : *Arch. Pharm. Res.* **21**, 398-405 (1998).
11. Kim, N. D. and Clifton, K. H. : *Exp. Cell Res.* **207**, 74-85 (1993).
12. Trosko, J. E., Madhukar, K. G. and Chang, C. C. : *Life Sciences* **53**, 1-7 (1993).
13. Chiba, H., Sawada, N., Oyamada, M., Kojima, T., Iba, K. and Ishii, S. : *Cell Structure Function* **19**, 173-177 (1994).
14. Trosko, J. E. and Chang, C. C. : *Toxicol. Lett.* **49**, 283-295 (1989).
15. Kim, N. D. and Paik, K. J. : *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 470-486 (1995).
16. Meguid, M. M., Oler, A., Numann, P. J. and Khan, S. : *Surgery* **118**, 775-782 (1995).
17. Floyd, E. E. and Jetten, A. M. : *Mol. Cell Biol.* **9**, 4846-4849 (1989).
18. Rearick, J. I., Albro, P. W. and Jetten, A. M. : *J. Biol. Chem.* **262**, 13069-13073 (1987).
19. Jetten, A. M., George, M. A., Smits, H. L. and Vollberg, T. M. : *Exp. Cell Res.* **182**, 622-628 (1989).
20. Smits, H. L., Floyd, E. E. and Jetten, A. M. : *Mol. Cell Biol.* **7**, 4017-4022 (1987).
21. Lotan, R., Pieniazek, J., George, M. D. and Jetten, A. M. : *J. Cell. Physiol.* **151**, 94-98 (1992).
22. Oh, M., Choi, Y. H., Choi, S. H., Chung, H. Y., Kim, K. W., Kim, D. K. and Kim, N. D. : *Int. J. Oncol.* **14**, 869-875 (1999).