

인체 흑색종세포에서 Ginsenoside Rc에 의한 Apoptosis의 유도

최수라 · 명평근 · 정승일¹ · 천현자¹ · 백승화^{2*}

충남대학교 약학대학, 1:원광대학교자연과학 기술학부, 2:원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

Induction of Apoptosis by Ginsenoside Rc on SK-MEL-28 Cell Lines

Su La Choi, Pyung Keun Myung, Seung Il Jeong¹, Hyun Ja Chun¹, Seung Hwa Baek^{2*}

Department of Pharmacy, Chungnam National University, 1:Division of natural Science & Technology, 2:Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine and Wonkwang University

A wide variety of cancer chemotherapeutic agents have been shown to induce programmed cell death (PCD, apoptosis) in various tumor cell lines in vitro. This study was performed to know how ginsenoside Rc affect on SK-MEL-28 cell line, and how they induce the apoptosis. SK-MEL-28 cell lines were treated with various concentrations of ginsenoside Rc and cultured for various times. At cell cycle analysis, cells arrested at G2/M phase by ginsenoside Rc and apoptosis percentage increased along with increasing concentration and time. TUNEL assay was performed to know whether SK-MEL-28 cell line die as apoptosis or necrosis by ginsenoside Rc. As a result, fluorescence increased along with increasing time and concentration. Fas expressed on SK-MEL-28 cell lines membrane by ginsenoside Rc was identified using flow cytometer. Ginsenoside Rc induced apoptosis against SK-MEL-28 cell lines, and the apoptosis mechanism was identified as Fas-mediated apoptosis.

Key words : Ginsenoside Rc, SK-MEL-28 cell lines, apoptosis

서 론

현재 항암제로 이용되는 화학요법 약제로는 알킬화제, 대사길 항제, 항생물질, 호르몬제 및 효소제재등이 알려져 있으며, 이들은 각기 다른 활성기전을 갖고 있으므로 다양한 약물들이 암의 적절한 치료를 위하여 사용되고 있다¹⁾. 그러나 이들 화학요법은 독성이 강하여 간장과 신장기능의 장애, 약물의 축적에 의한 중대한 독성작용, 조혈현상 장애등 부작용의 문제점이 있다. 그러므로 정상세포의 과도한 파괴없이 암세포를 파괴하거나 감소시키는 항암제의 개발이 절실이 요구되고 있다. 약물을 투여하여 암세포를 죽이는 방법은 암세포로부터 세포사멸(apoptosis)을 유도해 내는 것이다^{2,3)}. 세포는 세포주기의 정체에 의해 세포내에서의 거대분자(DNA, RNA, protein)나 포도당, 아미노산, nucleotide의 흡수가 억제되어 죽게된다^{4,5)}. 즉 세포주기가 정체되면 세포의 성장이 멈추게 되고 더 이상 증식할 수 없게 되어 세포는 죽게되며 이런 세포주기 정체로 apoptosis를 유도할 수 있게된다. 인삼은 예전부터 한국을 비롯하여 동양권과 일부 서양에서 약재로 많이 사용되어

져 왔다. 특히 최근 들어 인삼 사포닌류의 효능과 그 mechanism의 연구가 활발히 진행되었으며, 효과있는 화합물들이 대량으로 분리, 추출되었다⁶⁻¹⁰⁾. 그 화합물들 중 Ginsenoside Rc는 진통작용, 코티코스테론 분비 촉진작용, PGI2 생성 촉진작용, 간, 혈청 콜레스테롤, RNA 합성 촉진작용, 골수세포 DNA, RNA, 단백질 및 지질합성 촉진작용 prostacylin생합성 촉진, mesenchyme세포 증식억제(신장사구체 비대 억제)에 효능이 있는 것으로 보고되어졌다¹¹⁻¹³⁾. 본 연구에서는 ginsenoside Rc의 항암효과를 연구하는데 초점을 두어 인체 피부암 세포주인 SK-MEL-28 세포주에 ginsenoside Rc를 시간과 농도에 따라 처리하여 그 결과를 알아보았으며, 수행한 실험방법으로는 ginsenoside Rc의 세포독성(cytotoxicity)을 측정하기 위한 MTT assay 방법과, Flow cytometer 을 이용한 DNA 세포주기 (cell cycle)측정, 또한 DNA 전기영동방법에 의해 DNA fragmentation을 측정하는 고전적인 방법을 탈피하여 Flow cytometer의 FL-1 level을 이용한 TUNEL(Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling)assay 실험 그리고 ginsenoside Rc가 SK-MEL-28 세포에 영향을 미치는 초기 mechanism이라 할 수 있는 Fas receptor의 membrane 상에서의 발현을 알아보기 위해 CD95를 사용한 Fas 발현 실험을 수행하였다.

* 교신저자 : 백승화, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원

E-mail : shbaek@wonkwang.ac.kr Tel :063-850-6225

· 접수 : 2002/12/06 · 수정 : 2003/01/13 · 채택 : 2003/02/07

재료 및 방법

1. 시약

실험에 사용한 ginsenoside Rc 표준품은 한국인삼연초연구원에서 생산하여 표준화된 제품을 사용하였다.

2. 세포배양

인체 흑색종 세포주 (SK-MEL-28, ATCC, HTB72)를 37℃, 5% CO₂ incubator (Forma, USA)에서 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand island, N.Y., USA)이 포함된 RPMI-1640완전배지를 사용해서 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

3. MTT assay

96 well에 SK-MEL-28 세포가 5×10³개 되게 하고, 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양액을 교체한 다음 ginsenoside Rc의 최종 농도가 각각 0, 5×10⁻⁶, 1×10⁻⁵, 5×10⁻⁵, 1×10⁻⁴ M이 되게 처리하여 66시간을 배양한 후 5 mg/ml MTT를 50 μl/well로 처리한 후 6시간을 더 배양하여 최종 72시간을 배양하였다. Well 속의 배지를 버리고 isopropanol-acidifide 용액을 100 μl/well로 넣고 5분 동안 잘 흔들어 준 후, 3% SDS를 20 μl를 넣고 microplate reader (540 nm)로 O.D값을 측정하였다.

4. DNA cell cycle 분석

2.5 × 10⁵ 세포에 ginsenoside Rc의 최종농도가 각각 0, 5×10⁻⁶, 1×10⁻⁵, 5×10⁻⁵, 1×10⁻⁴ M이 되게 처리하고 24시간 또는 48시간을 배양한 후 trypsin-EDTA용액 으로 처리하여 농도별로 세포를 모두 모은다. 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 75% EtOH로 30분간 얼음에서 고정시키고 다시 PBS로 1회 세척하였다. 20 μg/ml PI와 0.1 mg/ml RNase가 포함된 PBS 1ml를 세포 침전물에 처리하고 실온에서 30분간 방치 한 후, Fac Scan으로 cell cycle을 분석하였다.

5. TUNEL assay

Ginsenoside Rc의 농도와 시간에 따라 처리된 세포를 모아 PBS로 2회 세척하고 얼음위에서 1% paraformaldehyde로 15분간 방치한 후 PBS로 세척하고 70% EtOH로 -20℃에서 24시간동안 세포를 고정시켰다. 고정된 세포를 다시 PBS로 세척하고 0.2 M sodium cacodylate, 2.5 mM Tris-HCl, 2.5 mM CoCl₂, 0.25 mg/ml BSA, 5U terminal deoxynucleotidyl transferase, 0.5 nM of dUTP-biotin을 포함하는 용액 50 μl를 세포를 처리하고 37℃에서 30분간 배양하였다. 다시 PBS로 세척하고 1 μg streptavidin-FITC를 포함하는 PBS 100 μl를 처리한 후 실온에서 30분간 배양한 다음 PBS로 세척한 후 flow cytometer로 분석하였다.

6. Fas 발현측정

Ginsenoside Rc의 농도와 시간에 따라 처리되어진 세포를 모아 PBS로 2회 세척한 후 FACS tube로 세포를 옮긴다. 다시 원심분리 후 상층액을 버리고 세포침전물에 항체인 anti-FAS-FITC (CD95)를 처리한 후 얼음에서 30분간 반응시키고 그 후 다시 원

심분리하고 깨끗한 PBS를 채운 후 flow cytometer로 Fas의 발현을 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 세포생존율에 미치는 영향

MTT assay는 처리한 농도와 처리 후 배양시간의 변화에 따라 인체 피부암 흑색종 세포인 SK-MEL-28 세포가 어느 정도 생존하는지를 알아보기 위해 수행된 실험이다¹⁴⁾. Fig. 1에서 보는바와 같이 세포는 24, 48시간 전 농도에서 70%이상 이상의 생존율을 보였다. 24시간과 48시간 배양시에는 처리된 전 농도에서 대조군과 비슷하거나 약간 감소한 값을 나타내었으나 유의성은 없었다. MTT법에 의한 세포생존율 측정은 세포막이 견고하지 못한 세포를 염색하는 방법으로 세포의 죽음이 necrosis인지, apoptosis인지 구분할 수 없고, 또한 혈장단백질의 파괴는 비교적 늦게 일어나므로 apoptosis초기에는 세포가 염색되지 못하는 단점이 있다. 따라서 이 실험으로는 apoptosis가 일어난 세포의 대략적인 갯수만을 추정 할 수 있다.

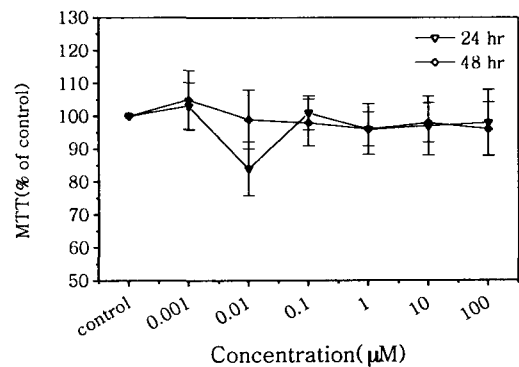


Fig. 1. Effect of ginsenoside Rc on the viability of SK-MEL-28 cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of ginsenoside Rc for 24hrs and 48 hrs. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as %control and data represent mean ± S.E. of at least five determinations.

2. DNA cell cycle 분석

림프종 (lymphoma cell line)들의 cell cycle 정체는 보통 24-72시간 정도에 이루어진다¹⁵⁾. 본 실험에서는 ginsenoside Rc가 SK-MEL-28 세포의 cell cycle에 어떠한 영향을 주는지를 알아보기 위하여 ginsenoside Rc를 농도별로 처리하고 세포를 24시간과 48시간 배양한 후 cell cycle분석을 실시한 결과 농도와 시간에 의존적으로 apoptosis로 죽어가는 세포집단이 증가하는 것을 알 수 있었다. 24시간 배양한 경우에는 ginsenoside Rc를 처리한군이 대조군보다 apoptosis부분의 값이 약간 증가를 보였으며, 1×10⁻⁵ M농도에서 10.44%로 apoptosis 유동율이 가장 높게 나타났고 G2/M기는 5×10⁻⁶ M에서 8.05%로 가장 높게 나타났고 그 이후로는 농도 증가에 따라 약간씩 감소하는 것으로 보인다. 하지만 농도 증가에 따라 S기를 약간씩 증가되는 것으로 보아 ginsenoside Rc는 S기를 arrest하는 것으로 사료된다. 세포주기에

있어 S기는 DNA가 합성되는 시기으로써, 이 부분이 arrest된다면, 세포의 DNA는 합성되지 못해 죽게된다 (Fig. 2-A). 48시간 배양한 경우에는 시료를 처리한군과 대조군의 apoptosis부분이 유사한 값을 보였으며, G2/M기 또한 농도 증가에 따라 감소하는 경향을 보이지만 S기는 농도증가에 따라 증가되는 것으로 보아 arrest됨을 알 수 있었다 (Fig. 2-B). 이 cell cycle분석법에 의해서도 세포의 죽음이 apoptosis인지 necrosis인지 정확하게 구별할 수는 없지만, 주어진 결과에 의하면 apoptosis라고 추정되는 부분의 값이 농도와 시간에 따라 약간씩 증가하고 있으며, S기는 농도증가에 따라 증가되어 arrest되는 것으로 보인다. 다만 24시간보다 48시간에서 S기의 값이 약간 적은 것은 apoptosis부분과 G2/M기의 값이 24시간보다 48시간에서 높게 나타나기 때문인 것으로 보인다.

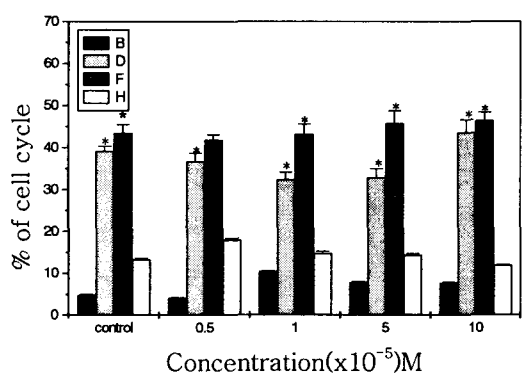


Fig. 2-A Cell cycle analysis of SK-MEL-28 cells by Ginsenoside Rc. Cells were treated with indicated concentration of Ginsenoside Rc for 24 hrs. M1 to M4 represent apoptosis, G0/G1, S, and G2/M phase, respectively (*p<0.05).

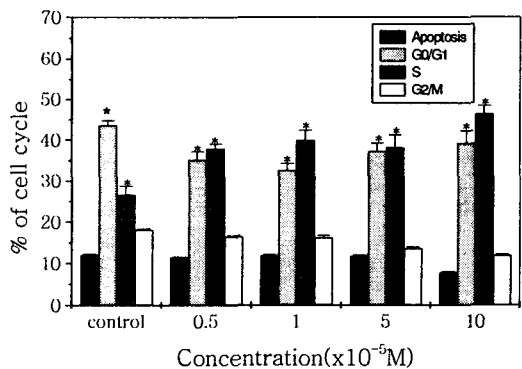


Fig. 2-B Cell cycle analysis of SK-MEL-28 cells by Ginsenoside Rc. Cells were treated with indicated concentration of Ginsenoside Rc for 48 hrs. M1 to M4 represent apoptosis, G0/G1, S, and G2/M phase, respectively (*p<0.05).

3. TUNEL assay

세포가 apoptosis로 죽는지 necrosis로 죽는지에 대한 또 한 가지의 뚜렷한 증거는 DNA가 절단되느냐 절단되지 않느냐이다. 즉, apoptosis에 의해 세포가 죽게 되면 세포의 DNA는 여러 조각으로 절단되게된다. TUNEL assay의 원리는 절단된 DNA의 3' 말단부위에 dUTP를 인위적으로 연결시킨 후, 그 끝에 다시 형광표지를 나타낼 수 있는 FITC를 결합시켜 Fas Scan으로 그 형광강도를 측정하는 방법으로 DNA의 절단된 정도가 크면 클수록 dUTP

가 더 많이 결합되며 dUTP 말단에 결합되는 FITC의 정도도 많아져서 형광의 세기가 커지게 된다¹⁶⁻¹⁸. 앞에서 실험한 Cell cycle 분석실험을 통해 Ginsenoside Rc가 apoptosis로 SK-MEL-28 세포를 죽게 하는 것을 알 수 있었다. 하지만 apoptosis와 necrosis를 구분하는 것에 대한 이 실험이 가지고 있는 단점 때문에 Ginsenoside Rc가 apoptosis로 세포를 죽이는 것을 확실하게 확인하고 또한 앞의 결과들을 더욱 확고하게 해 줄 수 있는 TUNEL assay방법으로 확인하였다. 실험결과는 Fig. 3에서 보는바와 같이 Ginsenoside Rc 처리된 농도와 시간에 따라 DNA를 절단하는 횟수가 증가했고, 더 특징적인 것은 48시간배양에서 5x10⁻⁵ M이상의 농도에서 절단된 DNA의 정도가 비슷하다는 것이다. 즉, 24시간에서보다는 48시간에서 FITC형광강도가 증가하였으며 이는 배양시간이 증가할수록 apoptosis가 더욱 증가함을 보여주는 것이다.

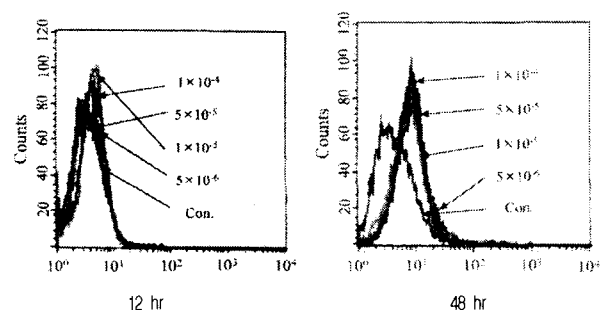


Fig. 3. TUNEL assay was performed to identify that apoptosis of SK-MEL-28 cells were induced by Ginsenoside Rc. Cells were treated with indicated concentration of Ginsenoside Rc for 24hrs and 48hrs.

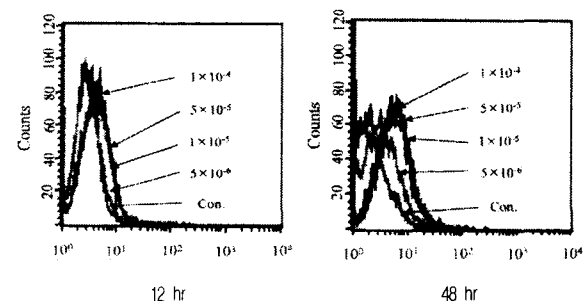


Fig. 4. Fas expression experiment was performed as described in material and methods. SK-MEL-28 cells were treated with indicated concentration of Ginsenoside Rc for 24 hrs and 48 hrs.

4. Fas 발현

Fas는 Fas ligand와 결합하여 apoptosis signal을 세포의 핵으로 전달할 수 있는 receptor로써, 세포의 표면에 발현되어 apoptosis가 일어나도록 유도한다고 보고되고있다^{19,20}. 즉 세포에서 이 Fas의 발현은 곧 apoptosis가 일어남을 의미한다. 물론 Fas receptor에서 핵까지 signal이 전달되기 위해서는 여러 가지 caspase들을 거쳐야 하겠지만, 이 실험은 단지 처리한 시료가 세포에서 apoptosis를 일으키는지 여부를 알아보기 위한 방법으로 선택하였다. 따라서 세포에 Ginsenoside Rc를 0, 10, 100, 그리고 1000 uM농도로 처리하고 24시간과 48시간 배양한 후 anti-CD95 FITC항체(anti-Fas-FITC)를 사용해 염색시킨 후 flow cytometer

로 Fas의 발현을 분석하였다. Fig. 4에서 보는바와 같이 ginsenoside Rc의 처리된 농도와 시간이 증가함에 따라 형광강도가 증가됨을 볼 수 있으며 이는 Fas의 발현이 약물의 처리농도가 증가 할 수록 그리고 약물처리 후 배양한 시간이 길어질수록 증가한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 ginsenoside Rc는 Fas 발현을 증가시킴에 의해 SK-MEL-28 세포를 apoptosis로 죽이는 기전으로 진행됨을 예견 할 수 있었다.

결 론

순수 분리, 정제된 ginsenoside Rc의 SK-MEL-28 cell line에 대한 항암효과를 확인하기 위한 실험을 수행해 본 결과, ginsenoside Rc는 세포에 대한 독성이 거의 없으며, DNA Cell Cycle상의 S phase를 억제함으로 DNA 합성경로를 막아 세포의 다음 세대로의 생성을 억제하였다. 또한 apoptosis가 일어난 세포의 대표적인 특징인 DNA fragmentation을 TUNEL assay 실험을 통해 확인해 봄으로써 ginsenoside Rc는 SK-MEL-28 cell에 대해 apoptosis를 유도하는 것으로 확인되었으나 그 정도는 미미하였다. Apoptosis가 유도된 세포의 membrane 상에는 거의 확실히 Fas receptor가 발현된다는 보고에 의해 CD95를 사용한 Fas receptor 발현 실험을 수행하여 Fas가 ginsenoside Rc의 세포에 처리된 농도와 시간에 따라 발현이 증가함을 확인할 수 있었다. 그러므로 ginsenoside Rc는 Fas receptor을 통해 세포내로 death signal을 전달하여 궁극적으로 핵내의 DNA의 합성에 영향을 주어 세포가 apoptosis로 사멸하게 하는 것으로 사료되어진다.

참고문헌

1. 이문호 : 내과학. 금광출판사, 서울, 1979.
2. Wyllie, A. H., Kerr, F. R., and Currie, A. R. : Cell death: significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306, 1980.
3. Sen, S. and Incalci, M. D. : Apoptosis. *Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy.* *FEBS Lett.* 307, 122-127, 1992.
4. Bradshaw, H. D. J. and Vedeckis, W. V. : Glucocorticoid effects on thymidine incorporation into the DNA of S49 lymphoma cells. *J. Steroid Biochem.* 18, 691-698, 1983.
5. Munck, A. : Metabolic site and the course of cortisol action on glucose uptake, lactic acid output, and glucose 6-phosphate levels of rat thymus cells in vitro. *J. Biol. Chem.* 243, 1039-1042, 1968.
6. Jeong, S. I., Kim, C. S., Lee, Y. G., Lee, H. S. and Kim, I. K. : Separation of 20(R&S) prosapogenin isomers of ginsenoside-Rg2 and Rg3 from ginseng saponins by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Anal. Sci. Technol.* 11(5), 404-408, 1998.
7. Park, Y. C., Lee, C. H., Kang, H. S. and Kim, K. W. : Ginsenoside-Rh1 and Rh2 inhibit the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages.

- Biochem. Mol. Biol. Inter.* 40(4), 751-757, 1996.
8. Fukuda, N., Tanaka, H., and Shoyama, Y. : Isolation of the pharmacologically active saponin ginsenoside Rb1 from ginseng by immunoaffinity column chromatography. *J. Nat. Prod.* 63, 283-285, 2000.
9. Hasegawa, H., Sung, J. H. and Benno, Y. : Role of human intestinal prevotella oris in hydrolyzing ginseng saponins. *Planta Medica.* 63, 436-440, 1997.
10. Byun, B. H., Shin, I. C., Yoon, Y. S., Kim, S. I. and Joe. C. O. : Modulation of protein kinase C activity in NIH3T3 cells by plant glycosides from panax ginseng. *Planta medica.* 63, 389-392, 1997.
11. Paik, N.H., Choi, M.G., Cho, K.G. ; Isolation of ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf and Rg1 from ginseng root by high performance liquid chromatography. *Arch. pharm. Res.* 6(5);1, 7-12, 1982.
12. Henderson, G. L., Harkey, M. R., Gershwin, M. E., Hackman, R. M., Stern, J. S. and Stresser, D. M. : Effects of Ginseng components on c-DNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sci.* 65(15), PL209-214, 1999.
13. Ng, T. B., Wong, C. M. and Yeung, H. W. : Effect of ginsenosides Rg1, Rc And Rb2 on hormone-induced lipoyosis and lipogenesis in rat epididymal fat cells. *J. Ethnopharmacol.* 16(2-3) : 91-99, 1986.
14. Kaltenbach, J. P., Kaltenbach, M. H., and Lyons, W. P. : Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp. Cell Res.* 15, 112-117, 1958.
15. Munck, A. and Crabtree, G. R. : Cell death in biology and Pathology, pp.329-359. Chapman & Hall, London, 1981.
16. Gorczyca, W., Gong, J., and Darzynkiewicz, Z. : Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 53. 1945-1951, 1993.
17. Gavrieli, Y. Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493-501, 1992.
18. Thomas, L. B., Gates, D. J., Richfield, E. K., O' Brien, T. F., Schweitzer, J. B. and Steindler, D. A. : End labeling (TUNEL) in Huntington's disease and other neuropathological conditions. *Exp. Neurol.* 133, 265-272, 1995.
19. Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Debatin, K. M. and Krammer, P. M. : Monoclonal antibody-mediated tumor regressin by induction of apoptosis. *Science,* 245, 301-305, 1989.
20. Yonehara, S., Ishii, A. and Yonehara, M. : A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 169, 1747-1756, 1989.