

Ginsenoside Rh₁ 및 Rh₂의 HT1080 세포 침윤억제 작용에 관한 연구

박문택¹ · 차희재^{1,2} · 정주원¹ · 이호영¹ · 김신일³ · 백남인³ · 김옥희⁴ · 김규원^{1*}

¹부산대학교 분자생물학과, ²암연구소, ³부산대학교 기초과학연구소,

⁴한국인삼연구소, ⁵식품의약품안전청 독성연구소 세포병리과

(1998년 7월 14일 접수)

Anti-invasive Activity of Ginsenoside Rh₁ and Rh₂ in the HT1080 Cells

Moon-Taek Park¹, Hee-Jae Cha^{1,2}, Joo-Won Jeong¹, Ho-Young Lee¹,
Shin-Il Kim³, Nam-In Baek³, Ok Hee Kim⁴ and Kyu-Won Kim^{1*}

¹Department of Molecular Biology and Pusan Cancer Research Center,

²Research Institute for Basic Sciences,

Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute³, Taejeon 305-333,

⁴Pathology Department, National Institute of Toxicological Research,

Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-020, Korea

(Received July 14, 1998)

Abstract : We examined the anti-invasive activity of ginsenosides Rh₁, Rh₂ on the highly metastatic HT1080 human fibrosarcoma cell line. *In vitro* invasion assay showed ginsenoside Rh₂ reduced tumor cell invasion through a reconstituted basement membrane in a transwell chamber more than ginsenoside Rh₁. Significant down-regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by ginsenosides Rh₁ and Rh₂ was detected by Northern blot analysis. However, the expression of MMP-2 was not affected by Rh₁ and Rh₂. The expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) was increased by Rh₁ after 0.5, 1 or 3 day-treatment but reduced after 6 day-treatment. However, the expression of TIMP-2 was not changed by treatment with Rh₂. Plasminogen activator inhibitor (PAI) and urokinase-type plasminogen activator (uPA) were not changed by treatment with Rh₁ and Rh₂ for 3 and 6 days. Quantitative gelatin-based zymography confirmed a markedly reduced expression of MMP-9 but MMP-2 after treatments with ginsenosides Rh₁ and Rh₂. These results suggest that down-regulation of MMP-9 contributes to the anti-invasive activity of ginsenosides Rh₁ and Rh₂ in the HT1080 cells.

Key words : Ginsenosides Rh₁, Rh₂, invasion, MMP-9.

서 론

암에 의한 사망은 최근 질병에 의한 사망률 증가
장 높은 비율을 차지하고 있으며 그 비율 또한 해마

다 증가하는 추세에 있다. 암이 인간의 생명을 위협
하는 치명적인 원인은 암의 침윤(invasion)과 전이
(metastasis) 현상에 있다.¹⁾ 악성 암세포의 주된 특징
인 침윤현상은 악성화된 암세포가 1차 종양으로부터

떨어져 나와 주변의 세포외 기질 (extracellular matrix)을 분해하며 이동하는 현상으로 이동성을 지닌 암세포가 혈관 및 림프관으로 침투하여 체내를 순환하다가 결과적으로 2차 종양을 형성하여 암 전이 현상을 일으킨다.^{2,4)}

전이성 암세포들은 간질 기질 (interstitial stroma)이나, 기초막과 같은 장애를 돌파하여 조직간의 경계를 관통하여야 하므로 이런 장벽의 주성분인 타입 I, II, III, IV, V-콜라젠, 파이브로넥틴, 프로테오글리칸 (proteoglycan) 등을 분해시킬 수 있는 효소들의 활성을 필요로 하며 실질적으로 이러한 효소들이 암전이 현상을 주도하는 중요한 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다.^{5,7)} 악성종양과 가장 밀접하게 관련이 되는 분해효소들은 MMP, 플라즈미노젠 활성화 인자 (plasminogen activators), 카텝신 (cathepsin), 프로테오글리카나제 (proteoglycanase) 등이 있다. 그 외에도 엘라스타제 (elastase), 젤라티나제 (gelatinase), 트랜신 (transin) 또는 스트로멜리신 (stromelysin) 등도 악성종양의 침윤에 관련이 된 것으로 알려져 있다.^{8,10)}

이러한 암 침윤 현상을 차단할 수 있다면 암의 전이를 막고 나아가서는 효과적인 암 치료제로써 사용이 가능하다.^{5,11,12)} 따라서 본 연구에서는 여러 ginsenoside들 중 Rh₁과 Rh₂가 암세포 침윤 (invasion)을 효과적으로 차단할 수 있는 것을 검색하고 그 작용 기작을 규명함으로써 이러한 ginsenoside들을 암 침윤 억제제로 개발하기 위한 기초 연구를 수행하였다.

먼저 ginsenoside Rh₁과 Rh₂를 대상으로 *in vitro* invasion assay를 실시하여 HT1080세포의 침윤을 효과적으로 억제하는 것을 검색하였으며 이들 ginsenosides를 대상으로 침윤에 중요한 역할을 담당하는 MMP-2, MMP-9 urokinase type plasminogen activator(uPA) 및 그 억제인자인 tissue inhibitor of metalloproteinase-2(TIMP-2), plasminogen activator inhibitor(PA2)의 발현을 Northern blot analysis를 통해 분석하였으며, 또한 이런 ginsenosides Rh₁, Rh₂의 MMP-2 및 MMP-9의 발현에 관한 영향을 zymogram assay를 통해 단백질 수준에서 확인하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양 및 ginsenosides Rh₁, Rh₂의 처리

HT1080 세포는 멸균 Millipore filter로 여과된

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10%의 열 변성 fetal bovine serum, penicillin(100 µg/ml), streptomycin(100 µg/ml)을 포함한 배지에서 H₂O로 포화된 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양되었다. HT1080세포에 ginsenosides Rh₁, Rh₂를 각각 50 µg/ml를 처리하여 0.5일, 1일, 3일, 6일 동안 배양후 HT1080세포와 conditioned 배지를 Northern blot analysis와 gelatin based zymogram assay를 위해 모았다.

2. *In vitro* invasion assay를 이용한 ginsenosides Rh₁, Rh₂의 항침윤 활성 조사

Transwell plate(Costar)의 polycarbonate 막의 아랫부분에 collagen gel(0.5 mg/ml)을 10 µl를 골고루 분포하여 1시간동안 말린 후 막의 윗부분에 Matrigel (0.5 mg/ml) 10 µl를 분포하여 완전히 말린다. 0.1%의 BSA를 함유한 배지 600 µl가 들어 있는 24 well plate에 transwell을 올리고 ginsenosides Rh₁, Rh₂와 5×10⁴개의 HT1080 세포가 포함된 배지 100 µl를 transwell의 윗 chamber에 넣는다. 이것을 37°C, 5% CO₂가 있는 배양기에 16시간에서 24시간 배양하여 침윤을 유도한 후 polycarbonate 막을 메탄올로 고정하여 hematoxylin/eosin 염색을 하고 400 배율의 광학현미경으로 침윤한 세포를 계수한다.

3. Northern blot analysis를 이용한 침윤 관련 유전자의 발현 조사

Ginsenosides Rh₁, Rh₂를 처리한 HT1080세포의 total cellular RNA를 acid-guanidium-phenol-chloroform 추출방법으로 분리하여 멸균 증류수에 녹인 후 260 nm 파장에서 흡광도 측정에 의해 정량한 다음 30 µg의 RNA를 1% agarose-formaldehyde gel 상에서 전기영동한 다음 nitrocellulose membrane에 transfer하여 UV-cross linking시킨다.

위에서 제작한 nitrocellulose membrane을 polyethylene백에 넣어 42°C에서 prehybridization한 다음, uPA, MMP-2, MMP-9, TIMP 유전자를 random primer 방법에 의해 ³²P로 표지한 다음 42°C에서 하룻동안 hybridization한다. 이 filter를 세척한 다음 X-ray 필름에 노출하여 유전자 발현에 대한 Northern 분석을 실시한다.

4. Zymogram assay에 의한 침윤관련 효소들의 활성조사

HT1080 세포에 ginsenosides Rh₁, Rh₂를 첨가하고,

3일, 6일 배양후 conditioned 배지를 모은다. 전기영동을 위한 gel은 1 mg/ml의 gelatin을 포함하는 10% SDS-polyacrylamide gel을 사용하고 전기영동에 적용하는 conditioned 배지의 양은 $1-2 \times 10^6$ 개의 세포에 해당하는 배지를 기준으로 한다. 배지를 gel에 loading한 후 130 volt로 약 3시간 정도 전기영동을 실시한다. 단백질의 분리가 끝나면 gel을 2.5% Triton X-100로 구성된 washing buffer로 상온에서 15분 동안 두 번 씻는다. Matrix metalloprotease의 활성을 조사하기 위하여 50 mM Tris-Cl(pH 7.5), 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃를 포함하는 배양용액에 gel을 담그고 37°C incubator에 넣어 17시간정도 반응시킨다.

그런 다음 0.1% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한다. Matrix metalloprotease가 있는 부분은 gelatin분해가 일어나서 Coomassie brilliant blue로 염색되지 않고 투명하게 보인다.

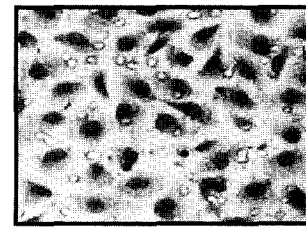
결 과

1. *In vitro* invasion assay를 이용한 Rh₁, Rh₂의 항침윤 활성 조사

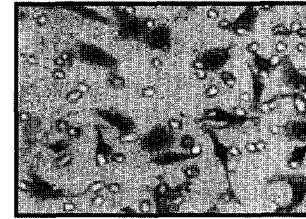
Ginsenosides Rh₁, Rh₂를 각 50 µg/ml씩 HT 1080세포에 3일과 6일 동안 각각 처리 후 *in vitro* invasion assay를 이용하여 항침윤 활성을 조사하였다. 그 결과 3일, 6일에서 Rh₁ 및 Rh₂가 항침윤 효과가 있는 것으로 관찰되었으며 Rh₁에 비해 Rh₂가 보다 높은 항침윤 효과를 나타내는 것이 관찰되었다(Fig. 1, 2).

2. Northern blot analysis를 이용한 Rh₁, Rh₂의 침윤관련 유전자 발현 조사

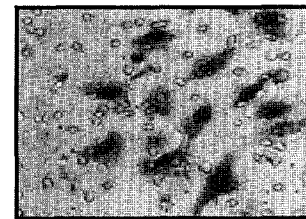
Rh₁과 Rh₂의 항침윤 효과의 작용기작을 밝히기 위해 Rh₁과 Rh₂를 0.5일, 1일, 3일, 6일 동안 처리한 HT1080 세포의 RNA를 분리하여 침윤에 중요한 역할을 하는 uPA, PAI, MMP-2, MMP-9, TIMP-2 유전자를 대상으로 Northern blot을 실시하였다. Rh₁을 처리한 세포에서는 MMP-9이 1일 처리한 것부터 Rh₂를 처리한 세포에서는 6일 동안 처리한 경우부터 MMP-9의 발현이 현저하게 감소되는 것이 관찰되었다. TIMP-2 유전자의 경우, Rh₁을 처리시 12시간, 1일, 3일 동안 TIMP-2의 유전자가 증가하다가 6일에 감소하였고, Rh₂의 경우 12시간, 1일, 3일, 6일 동안 거의 변화가 없었다. 반면에 12시간, 1일, 3일, 6일



Control



Rh₁ (50 µg/ml)



Rh₂ (50 µg/ml)

Fig. 1. Effects of ginsenosides Rh₁ and Rh₂ on the invasion of HT1080 cells. *In vitro* invasion assay was conducted with HT1080 cells treated with ginsenosides Rh₁ or Rh₂ (50 µg/ml) and untreated. Invaded cells were examined by light microscopy ($\times 200$).

동안 Rh₁과 Rh₂를 처리시 uPA, PAI, MMP-2 유전자의 발현에는 변화가 없는 것으로 나타났다(Fig. 3). 그 결과 *in vitro* invasion assay에서 나타난 Rh₁ 및 Rh₂의 항침윤 활성이 MMP-9 유전자의 특이적 감소에 의해 일어남을 추정할 수 있었다. 그러나 Rh₁의 경우 MMP-9 유전자는 Rh₂에 비해 뛰어나지만 침윤에서는 Rh₂에 비해 감소효과가 뛰어나지 못함을 알 수 있었다.

3. Zymogram assay에 의한 침윤 효소들의 활성 조사

Rh₁과 Rh₂가 MMP-9의 발현에 미치는 영향을 단백질 수준에서 조사하기 위해 Rh₁ 및 Rh₂를 각 50 µg/ml씩 3일, 6일 동안 처리후 HT1080 세포의 배지를 모아 zymogram assay를 실시한 결과, Rh₁은 6일

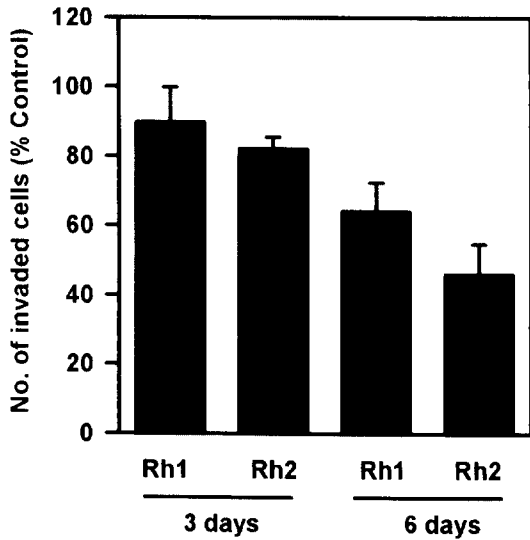


Fig. 2. Anti-invasive activity of ginsenosides Rh1 and Rh2. After treatment with 50 µg/ml ginsenosides Rh1 and Rh2 for 3 or 6 days, the cultured HT1080 cells were incubated in a transwell chamber for 16 h. The number of invaded cells was counted, and mean values were determined under ×400 light microscopy.

동안 처리한 것에서 MMP-9 효소가 감소함을 관찰할 수 있었고 Rh₂는 3일, 6일 모두에서 MMP-9이 크게 감소함을 관찰할 수 있었으며 감소 효과 역시 Rh₁에 비해 뛰어남을 확인하였다. 반면 MMP-2 효소는 Rh₁ 및 Rh₂에 의해 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, Northern blot analysis의 결과와 마찬가지로 Rh₁ 및 Rh₂는 MMP-9 효소의 활성을 감소시키는 반면 MMP-2 효소의 활성에는 영향을 미치지 못하는 것을 단백질 수준에서 확인하였다. 이러한 단백질 수준에서의 MMP-9 효소의 감소는 Rh₂가 Rh₁ 보다 높게 나타나는 것이 관찰되었으며(Fig. 4) 이 결과는 위의 Northern blot analysis의 결과와 상반되며 침윤 활동을 실제로 수행하는 단백질 수준에서의 MMP-9의 감소가 Rh₂에서 보다 높게 나타남을 알 수 있었다. 유전자 수준에서와 단백질 수준에서의 이러한 발현 양상의 차이는 mRNA 전사 이후의 단백질로 번역되기까지의 여러 조절 단계에서 그 조절 현상이 일어나기 때문으로 추정된다. 이러한 결과를 통해 실질적으로 단백질 수준에서 MMP-9 효소의 발현을 효과적으로 저해하는 Rh₂가 Rh₁에 비해 보다 뛰어난 침윤 감소효과를 나타냄을 확인하였다.

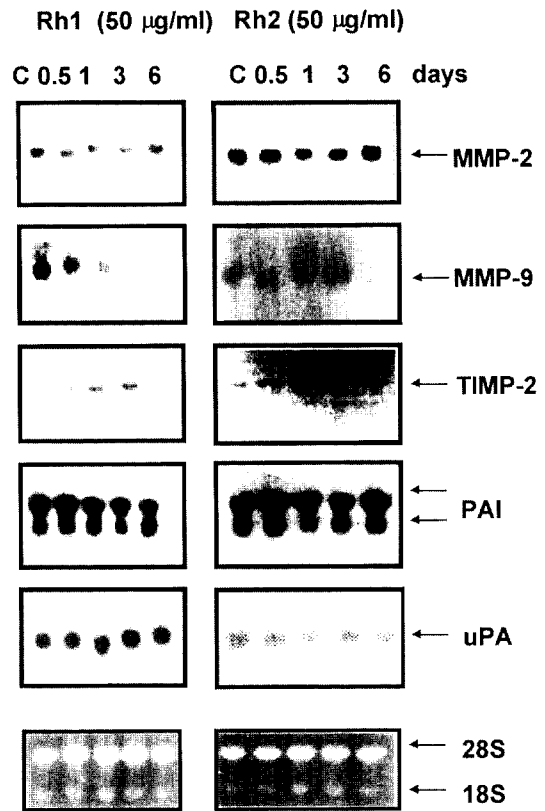


Fig. 3. Effects of ginsenosides Rh1 and Rh2 on the expression of MMPs, PAI and uPA in HT1080 cells. HT1080 cells were treated with 50 µg/ml ginsenosides Rh1 and Rh2 and cultured for 0.5, 1, 3 or 6 days. Total RNA from the cells was electrophoresis and transferred to zeta membrane.¹³⁾ Northern blots were performed by hybridizing the membrane with ³²P-labeled cDNA probes of MMP-2, MMP-9, TIMP-2, PAI and uPA. MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; PAI, plasminogen activator inhibitor; uPA, urokinase-type plasminogen activator

고 찰

악성 전이 암세포의 주된 특징인 침윤현상은 암세포가 주변의 세포의 기질(extracellular matrix)을 분해하며 이동하는 현상으로 이동성을 지닌 암세포가 혈관 및 림프관으로 침투하여 체내를 순환하다가 결과적으로 2차 종양을 형성하여 암 전이 현상의 원인이 된다." 따라서 이러한 암세포의 침윤현상은 암세포 전이의 원인이 되며 암 전이여부를 결정하는 가장

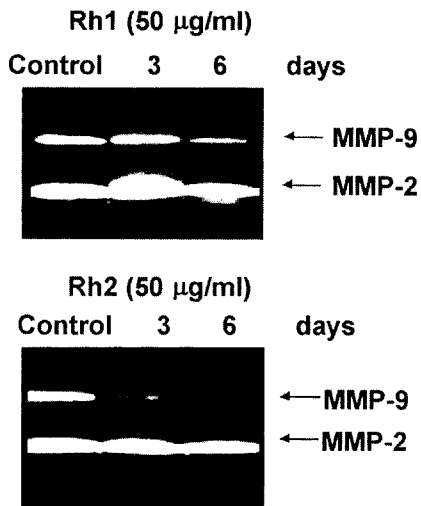


Fig. 4. Effects of ginsenosides Rh1 and Rh2 on the activity of MMPs. After treatment with 50 µg/ml ginsenosides Rh1 and Rh2 for 3 or 6 days, the cultured media were used in gelatin-based electrophoresis and stained with Coomassie brilliant blue.

중요한 단계이다.¹¹

본 연구결과, ginsenosides Rh₁ 및 Rh₂는 암세포 침윤에 중요한 역할을 담당하는 MMP-9의 유전자와 MMP-9 효소의 활성을 감소시킴으로써 해서 HT 1080세포의 침윤 현상을 억제하는 것을 관찰하였다. 먼저 ginsenosides Rh₁과 Rh₂의 항침윤활성을 관찰하기 위해 *in vitro* invasion assay를 실시한 결과, Rh₂가 3일보다 6일 동안 처리한 경우 HT1080세포의 침윤 억제효과가 높음을 확인하였고 Rh₁의 경우는 HT1080세포의 침윤의 감소 효과가 Rh₂에 비해 낮은 것을 관찰하였다.

이러한 ginsenosides Rh₁ 및 Rh₂의 침윤 감소 효과의 작용기작을 규명하기 위해 가 침윤에 중요한 역할을 담당하는 유전자들에 어떤 변화를 일으키는 지를 Northern blot analysis를 통해 조사 한 결과, ginsenosides Rh₁과 Rh₂는 여러 침윤 관련 유전자 중 MMP-9 유전자를 특이적으로 감소시킴을 확인하였다. 이러한 Rh₁ 및 Rh₂에 의한 유전자 수준에서의 MMP-9의 감소효과를 관찰시 침윤 억제 효과와는 상반되게 Rh₁에 의한 MMP-9의 감소가 Rh₂에 비해 뛰어난 것으로 관찰되었다. TIMP-2 유전자의 경우, Rh₁은 3일 동안 TIMP-2 유전자의 발현을 증가시키다가 6일에서 감소시켰으며 Rh₂는 TIMP-2 유전자의

발현에 영향이 없음을 관찰하였다. 이러한 TIMP-2의 발현 변화는 MMP-9의 변화에 의해 그 정도가 약하고 또한 침윤 억제 현상이 뛰어난 Rh₂에서는 변화가 없는 것으로 보아 실질적인 침윤 현상 억제에는 관여하지 않는 것으로 판단된다. 그 외의 침윤에 중요한 역할을 담당하는 uPA, PAI, MMP-2 유전자의 발현에는 변화가 없는 것으로 나타났다. 이런 결과를 통하여 ginsenosides Rh₂의 항침윤 활성은 MMP-9 유전자의 특이적인 감소에 의해 일어남을 추정할 수 있었다. 이러한 ginsenosides Rh₁ 및 Rh₂가 단백질 수준에서 MMP-9 효소와 MMP-2 효소의 활성에 어떤 영향을 미치는 지를 Zymogram assay를 통하여 조사하였을 때, Northern blot analysis의 결과와 마찬가지로 Rh₂는 MMP-9의 활성을 특이적으로 감소시키며 MMP-2에는 크게 영향을 못 미침을 확인하였다. Rh₁은 역시 MMP-9의 활성을 감소시키지만 Rh₂보다 MMP-9 감소 효과가 좋지 못함을 관찰하였다. 이러한 결과를 통해 실질적으로 침윤 현상을 일으키는데 중요한 역할을 담당하는 단백질 수준에서의 MMP-9 효소의 활성 저해 효과는 Rh₂가 Rh₁에 비해 뛰어난 것으로 관찰되었으며 유전자 수준에서의 발현 억제 효과와는 다소 상반된 결과를 나타내었다. 이러한 유전자 수준에서와 단백질 수준에서의 발현 양상의 차이는 전사후 단백질 번역 단계에서의 조절 작용에 기인한 것으로 추정되며 그 자세한 조절 작용에 대해서는 보다 연구되어야 할 사항으로 여겨진다.

결론적으로 ginsenoside Rh₁ 및 Rh₂는 침윤에 중요한 역할을 담당하는 MMP-9을 특이적으로 감소시킴으로써 암세포의 침윤을 억제함을 관찰하였으며 ginsenoside Rh₂는 단백질 수준에서 MMP-9의 감소현상이 Rh₂에 비해 우수함으로 실제적인 침윤의 감소 효과가 Rh₁에 비해 뛰어남을 확인하였다. 이런 결과를 통하여 ginsenoside Rh₂는 MMP-9 효소를 효과적으로 감소시킴으로써 HT1080 세포의 침윤을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 ginsenosides Rh₁, Rh₂를 대상으로 하여 항침윤 작용을 검색하였다. 먼저 *in vitro* invasion assay를 통해 조사한 결과, ginsenoside Rh₂는 ginsenoside Rh₁보다 효과적으로 HT1080 세포의 침

운을 억제하는 것으로 관찰되었다. 침윤에 관여하는 여러 유전자 발현을 Northern blot analysis를 통해 조사한 결과, ginsenosides Rh₁, Rh₂는 MMP-9 유전자의 발현을 크게 감소시키지만 그 외의 유전자들의 발현에는 크게 영향을 못 미침을 관찰 할 수 있었다. HT1080 세포의 배지를 모아 침윤효소인 MMP-9과 MMP-2의 활성을 단백질 수준에서 Zymogram으로 조사하였을 때, Northern blot analysis의 결과와 마찬가지로 ginsenosides Rh₁, Rh₂는 MMP-9 효소 활성을 감소시키는 반면, MMP-2 효소의 활성에는 영향을 미치지 못하는 것을 확인 할 수 있었다.

Ginsenoside Rh₂는 ginsenoside Rh₁보다 효과적으로 암세포 침윤 과정에서 중요한 역할을 담당하는 MMP-9 효소 발현을 특이적으로 감소시켜 침윤 작용을 억제하는 것으로 확인되었다. 그리고 이러한 ginsenoside Rh₂는 앞으로 항전이성 항암제로의 개발 가능성이 있다고 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 1995도 한국인삼연구위원회 연구용역비 및 1995년도 선도기술개발사업(G7 project, 과제번호 : 1541-211)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Liotta, L. A. : *Cancer Res.* **46**, 1-7 (1986).
2. James, C., William, G. D., Adi, F. G., John, D. M. and James, B. M. : *Cancer Res.* **47**, 936-942 (1987).
3. Garbisa, S., Pozzatti, R., Muschel, R. J., Saffiotti, U., Ballin, M., Goldfarb, R. H., Khoury, G. and Liotta, L. A. : *Cancer Res.* **47**, 1523-1528 (1987).
4. Nakajima, M., Welch, D., Belloni, P. N. and Nicolson, G. L. : *Cancer Res.* **47**, 4869-4876 (1987).
5. H. J. Cha, S. K. Bae, H. Y. Lee, O. H. Lee, H. Sato, M. Seiki, B. C. Park and K. W. Kim : *Cancer Res.* **56**, 2281-2284 (1996).
6. Herron, G. S., Werb, Z., Dwyer, K. and Banda, M. J. : *J. Biol. Chem.* **261**, 2814-2819 (1986).
7. Lyons, J. G., Birkedal-Hansen, B., Pierson, M. C., Whitelock, J. M. and Birkedal-Hansen, H. : *J. Biol. Chem.* **268**, 19143-19151 (1993).
8. Saiki, I., Fujii, H., Yoneda, J., Abe, F., Nakajima, M., Tsuruo, T. and Azuma, I. : *Int. J. Cancer* **54**, 137-143 (1993).
9. Sch nthal, A., Herrlich, P., Rahmsdurf, H. J. and Ponta, H. : *Cell* **54**, 324-334 (1988).
10. Stetler-Stevenson, W. G., Krutzch, H. C. and Liotta, L. A. : *J. Biol. Chem.* **264**, 17374-17378 (1989).
11. Mochizuki, M., Matusuzawa K., Yoo, Y. C. and Azuma I. : *Proceedings of '95 Korea-Japan Ginseng Symposium* pp. 41-44 (1995).
12. Sato, K., Mochizuki, M., Saiki, I., Yoo, Y. C., Samukawa, K. and Azuma, I. : *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 635-639 (1994).
13. Chomezynski, P. and Sacchi, N. : *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).