생명과학회지
Korean J. Life Science, 8(2), 162-166, 1998

HL-60 세포에 대한 Triterpent Acids와 Ginsenosides의 분화 효과

강창모 · 이호영* · 김신일** · 김규원*†

부산대학교 자연과학대학 생물학과
*분자생물학과, **한국인삼연초연구원

Effects of Triterpene Acids and Ginsenosides on Differentiation of HL-60 Promyelocytic Leukemia Cells

Chang-Mo Kang, Ho-Young Lee*, Shin-Il Kim** and Kyu-Won Kim*†

*Department of Biology, *Molecular Biology, Pusan National University, Pusan, 609-735*
***Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon, 305-345, Korea*

Abstract

The acute myelogeous leukemia cell line, HL-60 is good model to examine leukemia differentiation with nitro blue tetrazolium reduction assay. We investigated that effect of triterpene acids and ginseng saponin on differentiation of HL-60 cells. Differentiation of HL-60 cells was induced in proportion to molar concentration by dibutylyl cAMP, ginseng saponin, lithocholic acid, ginsenoside Rh2, and ginsenoside Rh3.

Key words : *Differentiation, Triterpene Acids, Ginseng saponin, Ginsenosides, HL-60 Promyelocytic Leukemia Cells*

서 론

지금까지 개발된 화학요법 항암제의 성공 여부는 항암제가 정상세포에는 손상을 입히지 않고 암세포의 성장만을 저지, 소멸시키는 선택성 여하에 달려있다고 할 수 있다. 화학합성물질을 이용한 항종양 연구는 대부분 기존의 활성물질을 기본화합물로 한 유도체를 이용해 새로운 항종양 효과를 찾고 있어서 완전히 새로운 형태의 약제 개발 확률은 대단히 낮다고 할 수 있다. 이러한 근래 합성약제의 선택성과 개발 기대치의 저조로 인하여 천연물에서 항종양 활성물질을 개발하려는 많은 시도가 이루어지고 있다[1,2].

암세포는 미분화 세포이므로 여러 가지 분화 유도 물질을 이용하여 생체내에서 분화를 유도할 수 있다면 암치료에 새로운 계기를 열어 줄 것으로 생각된다. HL-60세포는 1977년 Collins등[3]이 acute promyelocytic leukemia 환자로부터 분리하여 확립한 세포주로서 동일질병의 다른 환자의 경우와 달리 in vitro상에서 사멸되지 않고, 여러 가지 분화 유도 물질에 의해 granulocyte, monocyte등으로 분화가 유도되는 세포주이기 때문에 백혈병 연구 및 조혈세포 분화 (hemopoietic cell differentiation)의 model system으로 널리 사용되고 있다. HL-60세포의 분화 유도 물질로는 interferon-gamma (INF-γ), granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) 등과 같은 세포에서 분비되는 것도 있지만 retinoic acid, actinomycin D, dimethyl sulfoxide (DMSO), hypoxanthine, vitamin D_3, sodium butyrate, phorbol ester, butyric acid등과 같은 화학물질이 알려져 있다[4,5]. HL-60세포의 분화 유도 물질중 retinoic acid, actinomycin D, DMSO, hypoxanthine등을

† Corresponding author

가하면 granulocyte로 분화가 일어나며, vitamin D_3, sodium butyrate, INF- , phorbol ester등에 의해서는 monocyte-macrophage로 분화되며, butyric acid, GM-CSF등에 의해서는 eosinophil로 분화 유도가 일어난다[4-13].

본 연구자들은 천연물유래의 분화 유도 물질을 찾으려는 연구의 일환으로 전 골수성 백혈병 세포인 HL-60 세포를 model로 하여, 한국, 일본, 중국 등지에서 민간요법으로 사용되어져 온 고려인삼의 구성 성분 중 주요성분인 ginseng (*Panax ginseng C.A. Meyer*) saponin 및 ginsenoside Rh1, Rh2, Rh3, 비파 (*Eribotrya japonica L.*) 잎의 성분들 중에서 항발암 및 항암성분으로 알려진 ursolic acid (UA) 및 지부자 (*Kochia scoporia*) 성분인 oleanolic acid (OA), 웅담중의 중요성분 성분인 lithocholic acid (Fig. 1) 등이 분화 능력이 있는 지를 조사하였다.

재료 및 방법

1) 재료

HL-60 세포주는 ATCC에서 분양받아 (ATCC CCL240) 사용하였고, RPMI-1640 media와 Fetal bovine serum

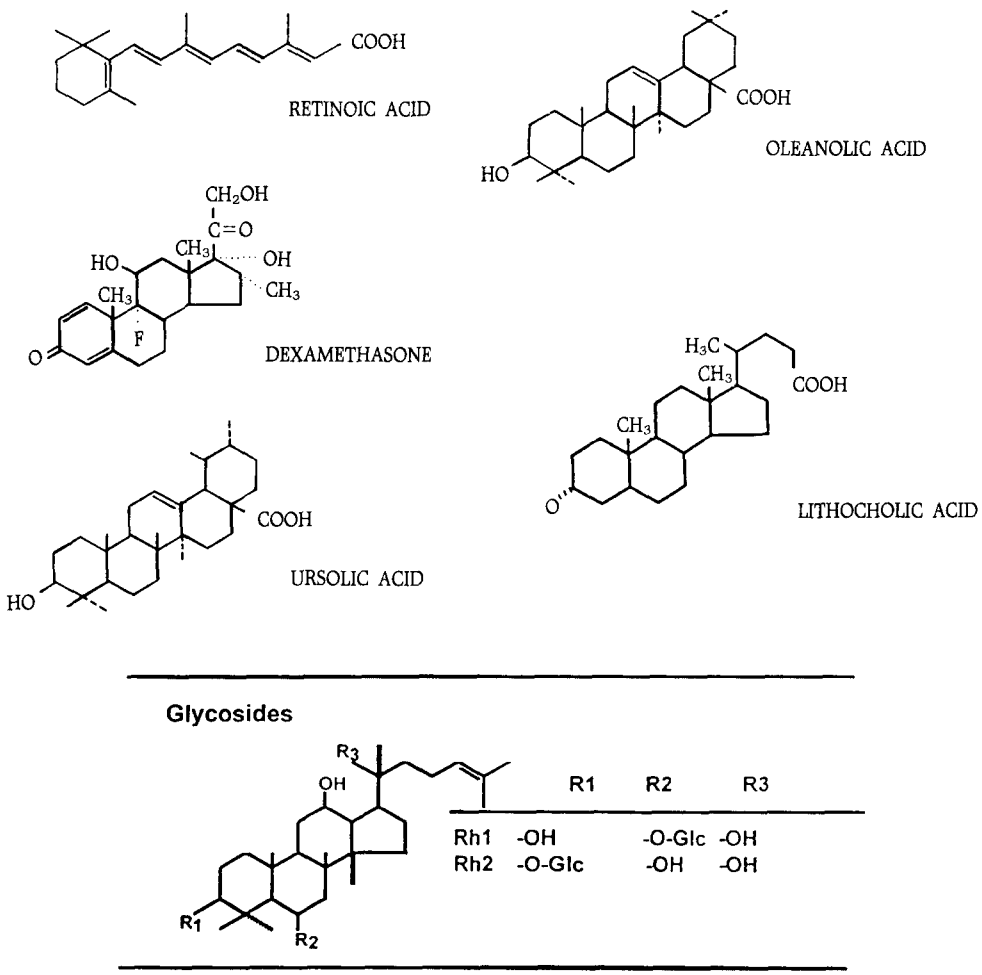

Fig. 1. The structures of retinoic acid, dexamethaxone, ursolic acid, oleanolic acid, lithocholic acid, and ginsenosides.

(FBS), glutamine, Hepes, penicillin & streptomycin은 GIBCO-BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였다. All-trans retinoic acid (RA), dibutylyl cAMP (dbcAMP), ursolic acid (UA), oleanolic acid (OA), dexamethasone (Dexa), lithocholic acid (LCA), nitro blue tetrazolium들은 Sigma chemical company (St. Louis, MO)에서 구입한 것을 사용하였다. Ginseng saponin과 ginsenoside Rh1, Rh 2 및 Rh3은 한국인삼연초연구소에서 공급받아 사용하였다.

2) 세포배양

HL-60 세포를 heat inactivated 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, Hepes등을 첨가한 RPMI-1640 medium에서 37℃, 5 % CO_2 조건하에서 배양하였다. 각 계대배양시 trypan blue dye exclusion 방법으로 세포생존율을 산정하여 생존 세포 수가 5×10^5 cells/ml 되도록 하여 배양하면서 분화를 유도하였다.

3) 세포분화 유도 및 분화능 측정

12 well plate에 10^6 cells/2ml 되게 분주하여 분화실험에 사용하였다. 대조군에는 media만 넣고, 실험군에는 dbcAMP는 media에 녹여 사용하였고, RA, UA, OA, Dexa, LCA, ginsenoside Rh1, Rh2, Rh3들은 95% ethanol에 녹여 사용하였으며, ethanol의 최종 농도가 0.05%를 넘지 않도록 하였으며, 37℃, 5% CO_2 조건하에서 4일간 배양하였다. 분화정도를 측정하기 위하여 분화 유도 전 및 유도 후의 세포를 NBT reduction assay[14]를 시행하였다. NBT reduction assay는 세포배양액 0.2ml를 취하여 0.2ml의 PMA-NBT stock solution과 섞어 37℃에 20분간 배양한 다음 hemocytometer를 이용하여 cytoplasmic blue-black precipitate인 formazan을 함유하는 세포를 계수 하였고, 각각의 sample당 250개의 세포를 계수 하였으며 각각 독립적으로 3회씩 실시하였으며, 특히 대조군은 9회 실시하였다.

결론 및 고찰

대조군 HL-60 세포의 경우 3.45%±1.95의 NBT 양성반응을 나타냈었다. (Table 1). HL-60 세포를 granulocyte로 분화시킨다고 알려진 RA를 처리하였을 경우, 농도가 1μM의 경우 54%이상이 NBT 양성반응을 보였는데, 같은 농도에서 상당한 양의 apoptosis율을 관찰할 수 있어, 4일간의 배양동안 많은 세포가 apoptosis에 의해 제거되고 apoptosis에 저항하여 증식한 세포들 중의 일부가 분화한 것으로 사료된다 (unpublished data, 이하 apoptosis에 관련된 것은 모두 unpublished data). dbcAMP의 경우도 apoptosis양상을 관찰할 수 있었는데, 1 mM의 단독 처리

Table 1. Effect of cAMP and retinoic acid on differentiation of HL-60 cells.

Treatment	Concentration	Differentiation(%)±SD* (4 days)
−	−	3.45± 1.95
dbcAMP	0.5 mM	26.13± 7.26
dbcAMP	1 mM	39.99±10.89
Retinoic acid	0.1 μM	38.09±10.28
Retinoic acid	1 μM	54.46±13.32

*Percentages of cell differentiation are mean of triplicate experiments.

Table 2. Effect of triterpene acids on differentiation of HL-60 cells.

Treatment	Concentration	Differentiation(%)±SD* (4 days)
−	−	3.45± 1.95
dexamethasone	25 μM	6.42± 1.40
dexamethasone	50 μM	5.00± 2.12
dexamethasone	100 μM	7.73± 2.63
ursolic acid	5 μM	4.23± 2.49
ursolic acid	7.5 μM	12.06± 6.61
ursolic acid	10 μM	3.17± 1.34
oleanolic acid	5 μM	3.93± 1.30
oleanolic acid	7.5 μM	10.86± 6.92
oleanolic acid	10 μM	12.23± 9.12
lithocholic acid	50 μM	9.21± 4.93
lithocholic acid	100 μM	56.00±14.84

*Percentages of cell differentiation are mean of triplicate experiments.

Table 3. Effect of ginseng saponin and ginsenosides on differentiation of HL-60 cells.

Treatment	Concentration	Differentiation(%)±SD* (4 days)
−	−	3.45± 1.95
ginseng saponin	0.0015%(w/v)	5.12± 1.29
ginseng saponin	0.0025%(w/v)	8.92± 3.34
ginseng saponin	0.00375%(w/v)	20.10± 6.61
ginsenoside Rh1	20 μM	9.61± 1.68
ginsenoside Rh1	30 μM	8.60± 3.53
ginsenoside Rh1	50 μM	9.52± 2.67
ginsenoside Rh2	20 μM	11.04± 6.30
ginsenoside Rh2	30 μM	12.67± 3.93
ginsenoside Rh2	50 μM	47.62± 9.29
ginsenoside Rh3	20 μM	15.04± 6.19
ginsenoside Rh3	30 μM	37.30± 11.93
ginsenoside Rh3	60 μM	al death

*Percentages of cell differentiation are mean of triplicate experiments.

만으로도 40%에 해당하는 상당히 높은 NBT 양성반응을 나타냈다. Dexa처리군은 100μM경우에도 apoptosis 양상을 거의 관찰할 수 없었는데, NBT 양성반응 또한 매우 낮았다 (Table 2). Dexa와 거의 유사한 구조를 갖는 triterpene acid의 일종인 UA와 OA는 약한 NBT 양성반응을 보였으나, 배양 1일 후부터 apoptosis를 일으키는 것이 관찰되므로 apoptosis에 저항하여 증식한 세포들 중의 일부가 분화한 것으로 사료된다. 그리고 LCA의 경우, HL-60에 대해서 효과적인 apoptosis 유도작용을 보였는데, apoptosis 저항성 세포의 경우에도 100μM에는 56%의 높은 NBT 양성반응을 보였다. 인삼성분들 중 특히 saponin은 인체에 좋은 약리작용을 보이며, 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 있는데, 0.00375%(w/v)의 경우 20%의 NBT 양성반응을 나타내었으며, ginsenoside 중 Rh1은 50μM의 농도까지 10%이하의 NBT 양성 반응을 나타냈으나, Rh2는 50 μM의 농도에서 47%이상의 NBT 양성 반응을 나타냈었다 (Table 3). Rh3의 경우에는 30μM의 농도에서 37%의 NBT 양성 반응을 나타냈었으나, 60μM의 경우 모든 세포가 사멸했다. Ginsenoside의 경우도 효과적인 apoptosis를 보였었는데, apoptosis 저항성 세포의 경우, Rh1은 분화에 큰 영향을 주지 못했으나, Rh2와 Rh3는 상당한 분화 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 민간요법에서 사용되어져 온 고려인삼의 구성 성분 중 주요성분인 ginseng saponin 및 ginsenoside Rh1, Rh2, Rh3, 그리고, 비파 잎의 성분들 중에서 항발암 및 항암성분으로 알려진 UA 및 OA, 또한 웅담중의 중요성분인 LCA 등이 apoptosis에 저항하는 HL-60 세포를 분화시킬 수 있음을 확인하였다.

요 약

전 골수성 백혈병 세포인 HL-60 세포를 model로 하여, 민간요법으로 사용되어져 부작용이 극히 적은 것으로 알려진 고려인삼의 구성 성분 중 주요성분인 ginseng (*Panax ginseng C.A. Meyer*) saponin 및 ginsenoside Rh1, Rh2, Rh3, 비파 (*Eriobotrya japonica L.*) 잎의 성분들 중에서 항발암 및 항암성분으로 알려진 ursolic acid 및 oleanolic acid, 웅담중의 중요성분 성분인 lithocholic acid 등이 분화능력이 있는 지를 조사하고자 본 실험을 수행하였다. Retinoic acid를 처리한 결과 타 연구자들의 연구결과들처럼 높은 분화력을 관찰할 수 있었으며, dbcAMP 단독 처리군에서도 높은 분화효과를 나타냈었다. Dexamethasone 처리군에서는 분화효과를 거의 관찰할 수 없었으나, dexamethasone과 구조적으로 유사한 ursolic acid와 oleanolic acid는 보다 높은 분화력을 보였고, 웅담성분의 중요성분인 lithocholic acid는 높은 분화력을 나타냈었다. Ginseng saponin은 0.00375% (w/v)에서 20% 이상의 분화력을 보였으며, Ginsenoside Rh2와 Rh3는 높은 분화력을 나타냈다.

감사의 말씀

본 연구는 고려인삼학회와 한국담배인삼공사의 1996년도 연구지원사업에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Son, H. S., Park, H. R., Choi, S. K., Park, W. W. : A

study on the cytotoxic activity of garlic (Allium sativum) extract against cancer cell. *Kor. J. Nutri.*, 23, 135(1990).
2. Ha, Y. L., Grimm, N. K., Pariza, M. W. : Anticarcinogens from fried ground beef ; heat altered derivatives of linoleic acid, *Cacinogenesis*, 8, 188(1987).
3. Collins, S. J., Gallo, R. C., Gallagher, R. E. : Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension cultures, *Nature(London)*, 270, 347(1977).
4. Collins, S. J. : The HL-60 promyelocytic leukemia cell line : proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression, *Blood*, 70, 1233(1987).
5. Young, C. W., Warrel, R. P. Jr. : *Cancer Principles and Practices of Oncology* (4th edit), pp. 26436-26446, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, (1933).
6. Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., Gallo, R. C. : Terminal differentiation of human promylocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compound, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 24458(1978).
7. Fischkoff, S. A., Pollak, A., Gleich, G. J., Testa, J. R., Misawa, S., Reber, T. J. : Eosinophilic differentiation of the human promyelocytic leukemia cell lines, HL-60, *J. Exp. Med.*, 160, 179(1984).
8. Huberman, E., Callaham M. F. : Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76, 1293(1979).
9. Koeffler, H. P. : Induction of differentation of human acute myelogenous leukemia cells : therapeutic implication, *Blood*, 62, 709(1983).
10. Rovera, G., O'brien, T. G., Diamond, L. : Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor promotors, *Science*, 204, 868(1979).
11. Rovera G., Santoli, D., Damsky, C. D. : Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 2779(1979).
12. Vandenbark, G. R., Kuhn, L. J., Neidel, J. E. : Possible mechanism of phorbol diester-induced maturation of human promyelocytic leukemia cells, *J. Clin. Invest.*, 73, 448(1984).
13. Walz, T. M., Malm, C., Wasteson, A. : Expression of the transforming growth factor alpha protooncogene in differentiating human promyelocytic leukemia (HL-60) cells, *Cancer Res.*, 53, 191(1993).
14. Yen, A, Guernsey, D. L. : Increased c-myc RNA levels associated with the precommitment state during HL-60 myeloid differentiation, *Cancer Res.*, 46, 4156(1986).