

Glycyrrhizin이 Mel/ret transgenic mice에서의 melanoma세포의 apoptosis에 미치는 영향

¹오 찬 호 · ²염 정 열

¹우석대학교 환경 및 생명공학부, ²우석대학교 약학과
(접수 : 1998. 9. 25., 게재승인 : 1998. 12. 3.)

Effect of Glycyrrhizin on the Apoptosis of Melanoma Cells in Mel/ret Transgenic Mice

Chan-Ho Oh^{1†} and Jung-Yul Yum²

¹Division of Biotechnology and Environmental Engineering, Woosuk University, Wanju, Chonbuk 565-701, Korea

²Dept of Pharmacy, Woosuk University, Wanju, Chonbuk 565-701, Korea

(Received : 1998. 9. 25., Accepted : 1998. 12. 3.)

The effect of glycyrrhizin on melanoma cells was investigated. DNA fragmentation in cultured melanoma cells was promoted by the addition of glycyrrhizin in a dose dependent manner. Administration(i.m.) of glycyrrhizin to Mel/ret transgenic mice resulted in apoptosis induction, reduction of mitochondrial transmembrane potential in melanoma cells. Decreased B220⁺ B cells were recovered by the treatment of glycyrrhizin in splenocytes and mesenteric lymph node cells, while Thy-1⁺ T cells were not influenced. Results suggested that glycyrrhizin acted as an inducer of apoptosis of melanoma cells and an immuno-potentiator via recovered B lymphocyte population in Mel/ret transgenic mice.

Key Words : Glycyrrhizin(GL), melanoma cells, DNA fragmentation, mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi_m$), lymphocyte subpopulation

서 론

Glycyrrhizin(GL)은 감초의 주성분으로서 항염(1), 항바이러스(2), 항종양(3), 항알레르기(4) 및 면역조절작용(5) 등의 효과와 최근에는 각종 세포의 증식 및 분화를 조절(6), 세포내의 signal전달계에 영향을 미침(7), AIDS의 치료제로서의 개발가능성(8), 세포증식 관련 효소인 PKC의 활성의 억제(9), 사람 간암세포주인 HuH-7의 증식 및 α -fetoprotein생성량 억제(10) 및 B16 melanoma 세포배양계에서의 세포증식 억제작용(11) 등이 많이 보고되고 있다. 한편, apoptosis는 개체발생시 기관형성 과정에서의 세포사 및 자기반응성의 T림파구의 배제 등과 같은 생리적인 과정에서 야기되는 불필요하게 된 세포의 자살 형태의 능동적인 세포사의 개념으로서 외적인 자극에 의한 세포괴사(necrosis)와는 구별되고 있다(12). 이러한 apoptosis는 세포질과 핵 chromatin이 농축되면서 chromatin과 세포

내 소기관을 내포한 작은 세포체인 apoptotic body로 나뉘어지고 마지막에는 주변의 macrophage 등의 탐식세포에 의해 처리되는 것이 특징이다. Apoptosis가 일어난 세포의 핵 chromatin의 농축이 일어날 때는 DNA가 180-200개의 염기로 절단되는데 이것은 핵내의 내인성 nuclease의 활성화 때문인 것으로 보고(13)되었다. 최근에는 항암제에 의한 암세포의 apoptosis유도에 관한 연구 결과가 속출(14,15)되고 있는데 이러한 연구는 항암제의 작용기구 및 악성종양의 내성화기구 등의 해명에 지견을 제공한다는 면에서 중요하며 또한 기존항암제의 부작용을 감소시키면서 치료 효과를 높이기 위하여 천연물 중에서 항암활성 분획을 찾는 연구가 매우 절실한 실정이다. 본 연구에서는 GL이 종양세포의 apoptosis에 어떠한 영향을 미치는가를 살펴보기 위하여 melanoma 세포배양계 및 Mel/ret transgenic mouse에 GL을 일정기간 동안 투여해서 생성된 melanoma 세포의 apoptosis에 미치는 효과 및 면역세포에 미치는 영향 등을 검토하였다.

† Corresponding Author : Division of Biotechnology and Environmental Engineering, Woosuk University, Wanju, Chonbuk, 565-701, Korea
Tel : 0652-290-1431, Fax : 0652-291-9312
e-mail : choh@core.woosuk.ac.kr

재료 및 방법

실험 동물

실험동물로서는 *ret* oncogene을 transfer시키는 조작으로 태

어날 때부터 lymph node 등에 melanin이 침착되어 melanogenesis를 다발하는 Mel/ret-transgenic mouse(16)를 일본 나고야대학 의학부의 Dr. Nakashima로부터 분양받아 사용하였으며, 정상대조군으로는 C57BL/6계통의 생쥐를 대한실험동물에서 구입하여 온도 $22\pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55\pm 10\%$ 의 사육실 내에서 고품사료와 물을 자유로이 섭취시키면서 실험에 사용하였다.

시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 MEM, RPMI-1640, FCS, PBS, propidium iodide(PI), agarose, ethidium bromide, triton X-100, sodium dodecyl sulfate(SDS), sodium citrate(이상, Sigma), glycyron(Minophagen), PE(phycoerythrin)/FITC(fluorescein isothiocyanate) conjugated anti-B220 및 anti-Thy1 antibody (Danippon seiyaku) 등이며, 실험기기는 deep freezer(Sanyo electrical Co.), laser flow cytometer(Coulter, EPICS-XL), clean bench, micro-centrifuge, shaking water bath, CO₂ incubator(이상 Vision 과학), autoclave(Hanil Co.), inverted microscope(Nikon Co.), electrophoresis apparatus (minigel, Mupid-II) 등을 사용하였다.

DNA fragmentation의 측정

Mel/ret transgenic mouse를 경추 탈골시켜 둔부에 형성된 melanoma를 무균적으로 적출하고 세포현탁액을 조제해서 세정(x 3회, PBS)한 후, 96well culture plate(1×10^6 세포/well)에 10% FCS-RPMI배지 조건하에서 50, 100, 200 및 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 GL을 첨가, 24시간 동안 37°C 의 CO₂배양기(5%-CO₂, 95%-air)내에서 배양한 후, 각 세포를 수집, 원심분리(250 x g, 10분)하고 침전시킨 세포분획에 PI($10\mu\text{g}/\text{ml}$)로 $20\mu\text{l}/1\times 10^6$ 세포가 되도록 염색(4°C , 30분)한 다음 flow cytometer(Coulter, EPICS XL; excitation: 488nm, emission: 620nm)를 이용해서 fragmented된 DNA의 양(sub-G1 peak)을 정량하였다. 단편화된 DNA의 확인은 동일한 검체에 $45\mu\text{l}$ 의 nuclear lysis buffer (50mM Tris-HCl, 0.5% SDS, 10mM EDTA, pH 8.0)를 가하고 $2\mu\text{l}$ 의 proteinase K($20\text{mg}/\text{ml}$)와 $2\mu\text{l}$ 의 RNase A($10\text{mg}/\text{ml}$)를 가하여 55°C 에서 90분간 배양해서 1.5% agarose gel 전기영동(minigel: Mupid-II)을 해서 ethidium bromide($10\mu\text{g}/\text{ml}$)로 염색하고 DNA의 ladder를 정성적으로 확인하였다(17).

Mitochondrial transmembrane potential($\Delta\psi\text{m}$)의 측정

세포사의 과정에는 일련의 단계적인 순서가 있는데 mitochondria의 swelling이 일어나기 전 단계에서 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\psi\text{m}$)이 감소된다는 보고(18)를 확인하기 위하여, Mel/ret transgenic mice에 7일 동안 GL을 주사한 다음 melanoma세포를 적출하고 각 세포현탁액을 조제해서 1×10^6 세포/well에 40nM의 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆)를 가하여 염색하고 37°C 에서 15분간 반응시킨 다음 flow cytometer(Coulter, EPICS-XL, excitation: 488nm; emission: 525nm)로 측정(19)했으며, negative control로는 uncoupling agent로서 carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (mCICCP, $5\mu\text{M}$)을 사용하였다

Lymphocyte 아집단 분석

Mel/ret transgenic mouse 및 C57BL/6계 mouse에 7일 동안 GL을 주사한 다음 마우스를 경추 탈골시켜 비장 및 장간막 임파절을 적출한 후, 각 세포현탁액을 조제하고 1×10^6 세포/well에 PE/FITC conjugated-anti B220 및 Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4°C 에서 30분간 반응시킨 다음 flow cytometer를 이용하여 각각의 세포중의 lymphocyte의 아집단을 측정(20)하였다.

결과 및 고찰

GL이 배양된 melanoma 세포의 apoptosis에 미치는 효과

Mel/ret transgenic mice에 생성된 melanoma 세포의 apoptosis에 미치는 GL의 효과를 검토하기 위하여 melanoma를 적출한 후 $50\text{-}400\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 GL을 첨가하고 24시간 동안 배양한 다음 세포를 수집해서 PI($10\mu\text{g}/\text{ml}$)로 염색하여 반응시킨 후, flow cytometer를 이용하여 DNA fragmentation (sub G₁ peak)을 측정된 결과를 Figure 1에 나타내었는데 melanoma 세포배양계에 GL을 첨가하여 배양한 결과, 무첨가 대조군의 fragmented된 DNA함량이 $16.9\pm 1.6\%$ 인데 비하여 각 농도(50, 100, 200, $400\mu\text{g}/\text{ml}$)의 GL첨가시에 각각 25.7 ± 2.6 , 34.5 ± 3.2 , 49.7 ± 5.3 및 $47.3\pm 4.8\%$ 로서 melanoma 세포의 apoptosis가 촉진되었다 이 결과는 GL이 *in vitro*계에서 암세포의 apoptosis를 촉진시키는 작용을 가지고 있음을 시사하는 것이다.

GL이 Mel/ret transgenic mice의 melanoma 세포 apoptosis에 미치는 효과

생체내에 생성된 종양에 대한 GL의 효과를 검토하기 위하여 Mel/ret transgenic mice에 GL($0.1\text{mg}/\text{mouse}$)을 1주일간 투여하고 마우스의 둔부에 형성된 melanoma를 적출한 후, 이 melanoma 세포의 DNA fragmentation을 측정하였다(Figure 2) GL을 투여하지 않은 대조군의 Mel/ret transgenic mouse melanoma 세포에서는 DNA fragmentation이 12.6%인데 비하여 GL을 투여하면 melanoma 세포에서는 38.9%로서 apoptosis가 크게 촉진되었다. 이러한 결과는 glycyrrhizin과 그 유도체가 B16 melanoma cell의 성장을 억제하며 생체내에서의 melanogenesis를 억제하는 효과가 있다는 보고(11)와 일치하는 결과라 할 수 있으며 GL이 생체내에서 생기는 암세포의 apoptosis를 야기하는 유도체로서의 역할을 확인해 주는 중요한 결과이다.

GL이 Mel/ret transgenic mice melanoma 세포의 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\psi\text{m}$)에 미치는 효과

Apoptosis기전에 의해 핵이 농축되어 죽음에 이르기까지에는 몇가지의 단계가 선행되는데(18), 중간단계의 과정으로 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\psi\text{m}$)의 감소가 일어나며, Mel/ret transgenic mice에 GL을 투여해서 melanoma 세포의 apoptosis가 일어날 때 세포내에서 $\Delta\psi\text{m}$ 의 감소가 선행되고 있는지를 확인하였다(Figure 3) $\Delta\psi\text{m}$ 을 측정하는 시약으로는 fluorochrome인 DiOC₆를 사용하였는데 양이온성 지질친화성 구조를 가지고 있기 때문에 mitochondria 내로

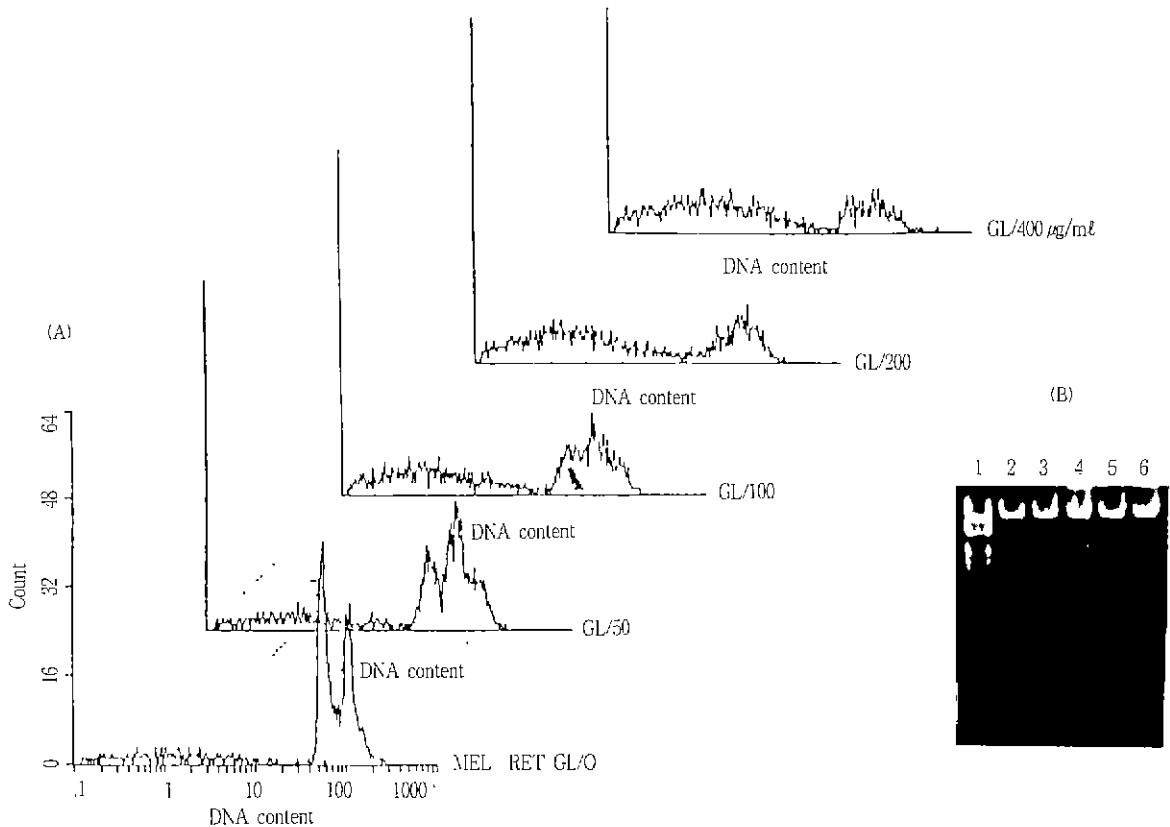


Figure 1. Effects of GL on DNA fragmentation in cultured melanoma cells from Mel/ret transgenic mice Melanoma cells obtained from Mel/ret transgenic mice were cultured for 24hours with or without addition of GL (50-400µg/ml). (A) After incubation, cells were lysed in a hypotonic cell lysis buffer containing 10µg/ml of PI, and the DNA contents of nuclei were analysed by laser flow cytometer (Coulter, EPICS-XL, excitation: 488 nm, emission: 525nm), (B) Agarose gel electrophoresis of fragmented DNA from melanoma cells, 10µg of DNA were electrophoresed in a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under UV illumination (Lane 1: molecular marker, Lane 2: 0, Lane 3; 50, Lane 4; 100, Lane 5; 200, Lane 6: 400µg/ml of GL).

쉽게 착화되는 특성을 가지고 있다 결과는 GL을 투여하지 않은 대조군의 Mel/ret transgenic mice melanoma 세포에서의 ΔΨm는 17.3%인데 비하여 동일한 mouse에 GL(0.1mg/마우스)을 1주일간 지속적으로 투여하면 40.5%로서 ΔΨm의 현저한 감소가 일어나고 있음이 관찰되었다. 이 결과는 GL이 Mel/ret transgenic mice에 형성된 melanoma 세포의 apoptosis를 분명하게 촉진하고 있음을 확인시켜 주는 결과라 할 수 있다

GL이 Mel/ret transgenic mice의 lymphocyte 아집단에 미치는 효과

GL이 Mel/ret transgenic mice의 비장 및 임파절 등의 면역계장기내의 lymphocyte 아집단(21)에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 7일간 GL을 주사한 마우스의 비장 및 임파절을 적출해서 비장 및 임파절내의 lymphocyte 아집단을 측정된 결과를 Figure 4에 나타내었는데 대조군인 정상 C57BL/6 mouse의 비장내 B세포는 32.0±2.4%, T세포는 21.5±1.8%인데 비하여 Mel/ret transgenic mouse의 비장내 B세포는 81±1.0%, T세포는 184±1.2%로서 melanoma가 생성된 마우스에

서 특히 비장내 B세포가 정상대조군에 비하여 현저하게 감소하였으며, 이 마우스에 GL을 주사하면 감소된 B세포의 population이 28.4±2.1%로서 정상수준으로 회복하였으며 T세포는 21.7±1.8%였다. 또한 장간막임파절내 B세포 및 T세포의 비율은 대조군의 14.6±1.1% 및 44.9±4.7%에 비하여 Mel/ret transgenic mouse의 임파절에서는 B세포 및 T세포의 비율이 각각 10.0±1.0% 및 79.3±8.1%로 B세포는 감소하고 T세포는 증가하였으나 GL을 주사한 결과 B세포는 16.3±1.9%로서 정상수준으로 회복하였지만 임파절내의 T세포는 68.1±6.3%로서 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 GL이 생체내에서 종양이 생성되었을 때 항체생성세포인 B세포의 감소를 정상수준으로 복구시켜 체액성면역능을 회복시키는 효과를 가짐으로써 궁극적으로 생체의 항상성을 유지시키는 중요한 작용을 하는 것으로 추정되며 이는 마우스 흉선세포를 이용한 연구에서 GL이 성숙한 T세포의 자극에 대한 응답능력을 증강시켜 IL-2생성을 촉진하여 면역조절 작용이 있다는 보고(5)와 관련이 있는 결과라 할 수 있다.

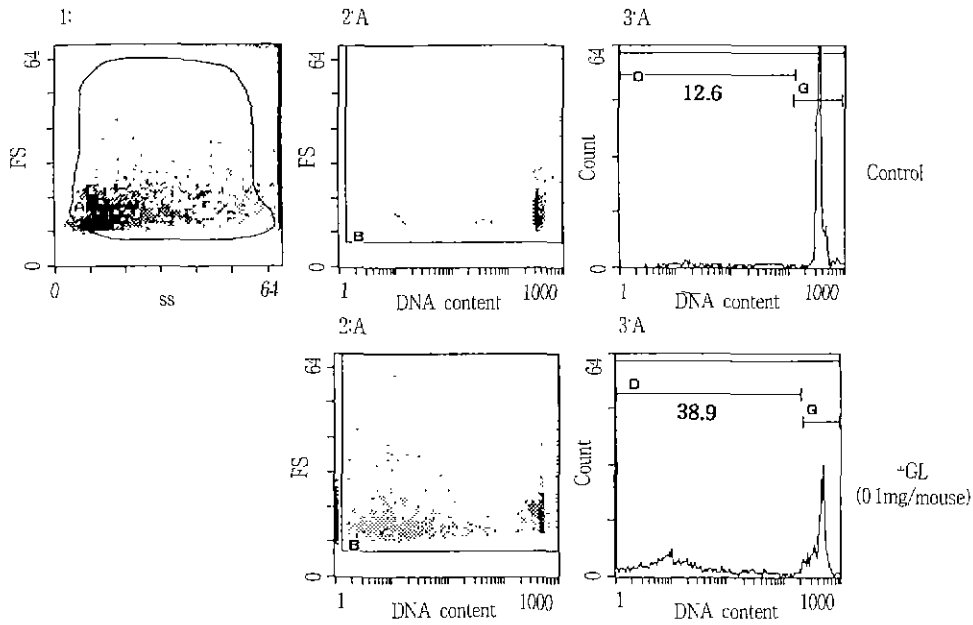


Figure 2. Effects of GL on DNA fragmentation in Mel/ret transgenic mice melanoma cells *in vivo*. Melanoma cells were obtained from GL-injected (0.1mg/mouse, for 7 days, i.m.) Mel/ret transgenic mice. Cells were sedimented by centrifugation and lysed in a hypotonic solution containing 10 μ g/ml of PI, and the fragmented DNA (Sub G₁ peak) were analysed by flow cytometer. Control: melanoma cell(non-treated mouse), -GL: melanoma cell(GL-injected mouse).

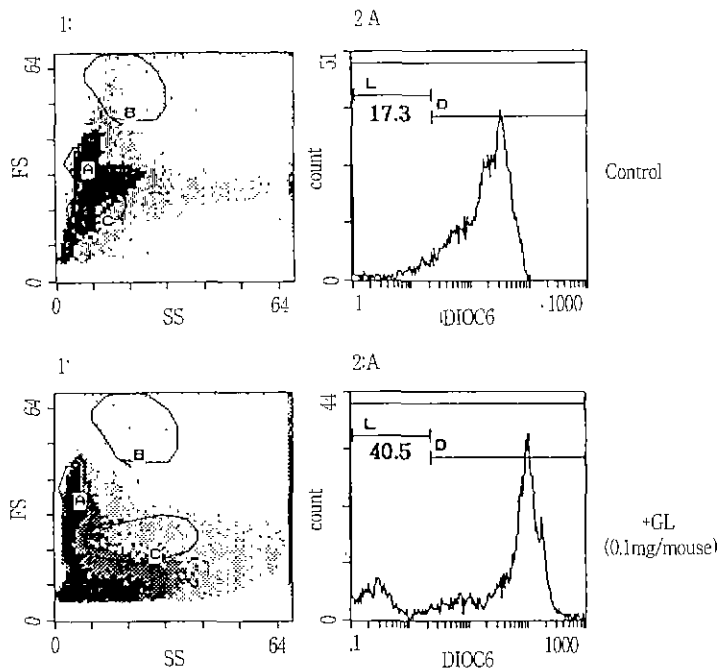


Figure 3. Effects of GL on mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi_m$) in Mel/ret transgenic mice melanoma cells. Melanoma cells were obtained from GL-injected Mel/ret transgenic mice, and were stained by incubation with DiOC₆ (40nM; 30min, 37 $^{\circ}$ C). As a negative control, cells were incubated before analysis with mClCCP (5 μ M; 15min, 37 $^{\circ}$ C) uncoupling agent that completely abolishes $\Delta\Psi_m$ and followed by analysis on a flow cytometer (excitation: 488nm; emission: 525nm).

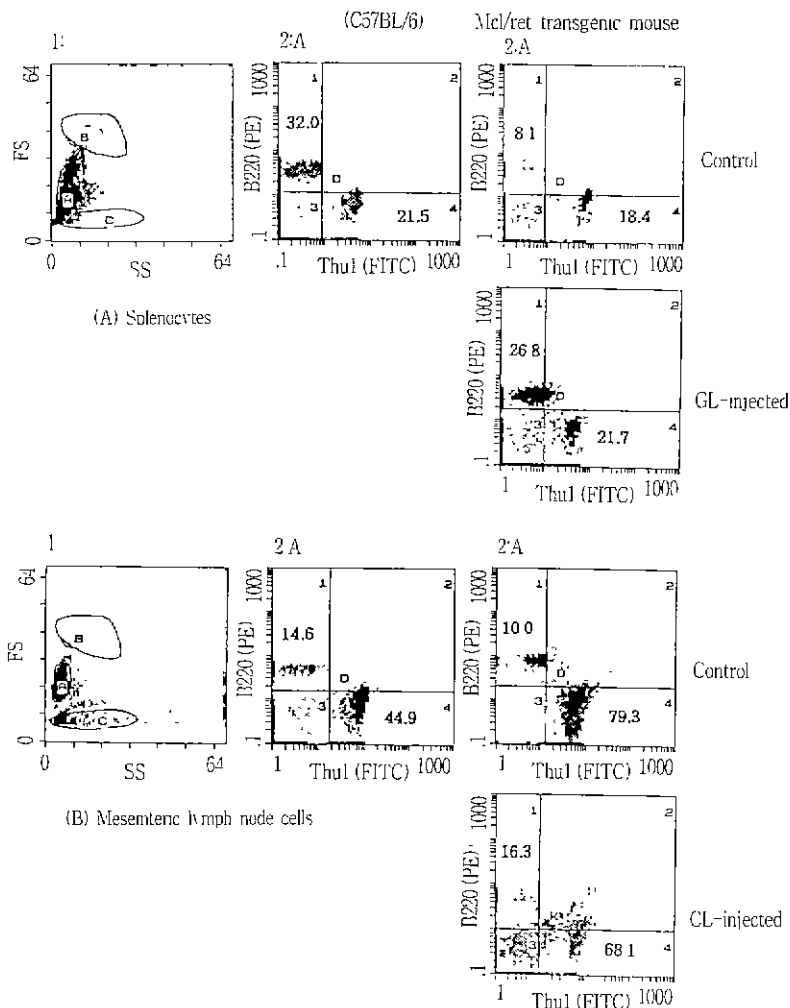


Figure 4. Effects of GL on lymphocyte subpopulations in Mel/ret transgenic mice splenocytes and mesenteric lymph node cells. Splenocytes and mesenteric lymph node cells were obtained from GL-injected Mel/ret transgenic mice. Cells (A: splenocytes, B: mesenteric lymph node cells) were stained by incubation with a mixture of PE-conjugated anti-mouse CD45R(B220) and FITC-conjugated anti-mouse Thy1 monoclonal antibody (30min, 4°C). And followed by two color analysis on a flow cytometer [excitation: 488nm; emission: 525 nm(FITC)/575nm(PE)].

요 약

감초의 주성분인 glycyrrhizin에 대한 암세포의 apoptosis에 미치는 효과를 조사하기 위하여 *ret* gene을 도입한 Mel/ret transgenic마우스를 모델로 하여 실험을 수행하였다. Glycyrrhizin은 melanoma 세포매양계에서 농도의존적으로 melanoma 세포의 apoptosis를 유도하였다. 직접 transgenic마우스에 glycyrrhizin(0.1mg/mouse)을 지속적으로 투여하면 투여하지 않은 대조군에 비하여 melanoma 세포의 apoptosis가 크게 촉진되었으며, apoptosis가 일어나기 전 단계인 mitochondrial transmembrane potential이 감소되었다 또한 glycyrrhizin의 면역세포에 미치는 효과는 저하된 B세포의 활성을 정상수준으로 회복시키는 면역증강능력이 있음이 관찰되었다. 이러한 결과는 glycyrrhizin이 암세포의 apoptosis를 촉진시키는 능력과 아울러 체액성면역능을 향진시키는 효과를 가지고 있어서 항암요법제로

서의 개발가능성을 시사하고 있다.

감 사

본 연구는 1998년도 우석대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Fujisawa, K., Y. Watanabe, and K. Kimura (1980), Therapeutic approach to chronic active hepatitis with glycyrrhizin. *Asian Med. J.*, **23**, 745-756.
2. Pompei, R., O. Flore, M. A. Marccialis, A. Panni, and B. Loddo (1979), Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature*, **281**, 689-690.
3. Suzuki, F., D. A. Schmitt, T. Utsunomiya, and R. B. Pol-

- lard. (1992), Stimulation of host resistance against tumors by glycyrrhizin, an active component of licorice roots. *In vivo*, **6**, 589-596.
4. Inoue, H., T. Mori, S. Shibata, and H. Saito (1987), Pharmacological activities of glycyrrhetic acid derivatives: Analgesic and anti-type IV allergic effects. *Chem. Pharm. Bull.(Tokyo)*, **35**, 3888-3893.
 5. Zhang, Y. H., M. Kato, K. I. Isobe, M. Hamaguchi, T. Yokochi, and I. Nakashima (1995), Dissociated control by glycyrrhizin of proliferation and IL-2 production of murine thymocytes. *Cell. Immunol.*, **162**, 97-104
 6. Kiso, Y., M. Tohkin, and H. Hikino (1985), Assay method for anti-hepatotoxic activity using ionophore A23187-induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Shoyakugaku Zasshi*, **39**, 218-222.
 7. Kondo, Y., and F. Takano (1994), Nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages enhanced with glycyrrhizin. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**(5), 759-761.
 8. 伊藤 正彦 (1989), グリチルリチンの HIV感染症に 對する臨床効果. *實驗醫學*, **7**, 858-861.
 9. Nishino, H., S. Shibata, and K. Hirabayashi (1986), Anti-tumor promoting activity of glycyrrhetic acid-related compounds. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.*, **95**, 1563-1566.
 10. 佐佐木 功典, 村上 知之, 小賀 厚徳, 高橋 學, 沖田 極 (1989), ヒト肝癌細胞 HuH-7 の増殖ならびに α -フェトプロテイン産生に及ぼすグリチルリチンの影響. *Biotherapy*, **3**(6), 1515-1518.
 11. Abe, H., N. Ohya, K. F. Yamamoto, T. Shibuya, S. Arichi, and S. Odashima (1987), Effects of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on growth and melanogenesis in cultured B16 melanoma cells. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **23**, 1549-1555.
 12. Willie, A. H., J. F. R. Kerr, and A. R. Currie (1980), 'Cell death. The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251-306
 13. Willie, A. H. (1980), Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-556
 14. Martin, S. J., and D. G. R. Green (1995), Apoptosis and cancer. The failure of control on cell death and cell survival. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **18**, 137-154.
 15. 仲増 英治, 昇 公 ; 内海 耕造 (1986), C-キナーゼ活性に對するグリチルリチンの影響. *Mino. Med. Rev.*, **17**, 89-95
 16. Iwamoto, T., M. Takahashi, M. Ohbayashi, and I. Nakashima (1992), The *ret* oncogene can induce melanogenesis and melanocyte development in W^V/W^V mice. *Exp. Cell Res.*, **200**, 410-415.
 17. Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani, and C. A. Riccardi (1991), Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, **139**, 271-279.
 18. Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, C. Zanin, J. L. Vayssiere, P. X. Petit, and G. Kroemer (1995), Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. *J. Exp. Med.*, **181**, 1661-1672.
 19. Marchetti, P., T. Hirsch, N. Zamzami, M. Castedo, D. Decaudin, S. A. Susin, B. Masse, and G. Croemer (1996), Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.*, **157**, 4830-4836.
 20. Shortman, K., and H. Backson (1974), The differentiation of T lymphocytes. I. Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulations of mouse thymus cells. *Cell. Immunol.*, **12**, 230-246.
 21. Smith, C. A., G. T. Williams, E. Kingston, J. Jenkinson, and J. J. T. Owen (1989), Antibodies to CD/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature*, **337**, 181-184.