

홍삼추출액의 인간성체신경줄기세포 증식과 세포사 관련 세포주기의 변화에 대한 효과

김현정 · 강라미 · 안진영* · 한정순** · 김승업*** · 이광우 · 김만호#

서울대학교 의과대학 신경과, *지방공사 강남병원 신경과

**고려대학교 보건대학 식품영양학과/인제대학교부설 다이어트연구소

***아주대학교 뇌질환연구소

(2003년 12월 2일 접수, 2004년 2월 24일 수리)

The Red-ginseng Extract Alters the Cell Cycle and Viability in the Human Neuronal Stem Cells

Hyun-Jung Kim, Lami Kang, Jin Young Ahn*, Jung Soon Han**,

Seung U. Kim***, Kwang-Woo Lee and Manho Kim#

Department of Neurology, Seoul National University Hospital

*Department of Neurology, Gangnam General Hospital Public Corporation

**Department of Nutrition and Food Sciences of Junior College of Allied Health Sciences of Korea University /Diet Research Institute of Injae University

***Brain Disease Research Center, Ajou University

(Received December 2, 2003, Accepted February 24, 2004)

Abstract : The present study is to determine whether the Red-ginseng extract has a proliferative or cytotoxic effect on the human neuronal stem cells(hNSCs). The hNSCs were grown and incubated with different doses of Red-ginseng extract. We tested the proliferative or cytotoxic effects by MTT and FACS analysis. Cell viability, cell cycle analysis, DNA fragmentation, and bax or PARP expressions were evaluated. The hNSCs showed a proliferative trend with its peak concentration at 0.3 µg/ml. Beyond this point, higher doses decreased viabilities and showed a cytotoxic effect at 10 µg/ml. There was a tendency of increased S and G2/M phases during cell proliferation. In a cytotoxic condition, decreased S phase and increased G0/G1 phases were noted, suggesting cell cycle arrest. The cytotoxic effect was associated with increase DNA fragmentation in a dose-dependent manner. However, PARP cleavage or bax expression was not detected. Our results suggest that Red-ginseng extract has dual effects, the cell proliferative or cytotoxic effect, on hNSCs *in vitro* with dose-dependent manner.

Key words : Red ginseng, human neuronal stem cell, cell proliferation, cell cycle, cytotoxicity

서 론

의학의 발달로 수명이 연장되고 노화관련 질환이 증가되면서, 신경과 영역에서는 신경퇴행질환(neurodegenerative disorder)과 뇌졸중의 빈도가 증가하고 있다. 신경질환의 치료방법으로 여러 성장 인자들이나 항산화제 등을 이용한 방법들이 있으며, oxidative stress, excitotoxicity, trophic mechanism 등의 조절로 병의 진행을 저하시키려는 노력이 시도되

고 있다. 최근에는 줄기세포를 신경계질환 치료에 응용, 손상된 신경조직과 기능회복을 위한 연구가 진행되고 있다. 질환 동물모델에서 설치류,¹⁻³⁾ 인간간엽줄기세포,⁴⁾ 인간제대혈액세포⁵⁾ 등을 이용한 치료효과가 보고되고 있으며, 이식과 아울러 개체내부에 존재하고 있는 줄기세포 (endogenous stem cell)를 활성화 시키는 연구⁶⁾ 역시 주된 분야의 하나이다. 그러나 줄기세포에 의한 손상된 신경조직의 정확한 회복기전에 대해선 알려지지 않고 있다.⁷⁻⁸⁾

인삼의 신경계에 대한 연구로 실험 모델을 이용, 신경보호 효과를 보고하였고,⁹⁻¹⁵⁾ 병의 진행속도를 감소시키거나 중지, 또는 발병을 느리게 하거나 예방할 수 있는 가능성들이 제시

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-760-2193; (팩스) 02-744-1785
(E-mail) kimmanho@snu.ac.kr

되고 있다. 따라서 인삼의 신경계 기능회복의 기전의 하나로 신경줄기세포에 대한 영향을 추측할 수 있으나, 알려진 바는 없다. 본 연구에서는 홍삼추출액이 신경줄기세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여, cell culture model에서 인간 신경성체줄기세포의 증식 또는 세포독성여부를 관찰하였고, 관련된 세포주기변화를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 인간 성체 신경줄기세포배양

신경줄기세포는 태아의 뇌에서 적출한 F3 cell line(Gift from Pf. SU Kim(Univ of British Columbia)을 이용하였고 인간줄기세포사용에 대한 내용은 서울대학병원 IRB 위원회의 심의를 통과하였다. 이 실험에 사용된 인간줄기세포는 15주된 배아의 종뇌에서 분리배양된 것으로 배아 종뇌에 reporter로 lac-Z와 불명화를 위해 *v-myc gene* 을 삽입하였다. 배아 종뇌를 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM) with high glucose supplemented with 5% horse serum, 20mg/ml gentamicin(Gibco-BRL, USA), 2.5 mg/ml amphotericin B(Gibco-BRL, USA)에서 일차 배양 하였다. 7-14일 후 *v-myc* 을 포함한 amphotropic retroviral vector를 이용하여 세포를 불멸화하였으며, 여러 클론중 하나에 xenotropic retroviral vector를 이용하여 lac-Z 유전자를 주입하였다. High-glucose DMEM containing insulin(10 g/ml), transferrin(10 g/ml), sodium selenite (30 nM), hydrocortisone(50 nM), triiodothyronine(0.3 nM)를 포함한 serum-free medium(DM4)에서 배양하였다.¹⁶⁻¹⁷ 생성된 세포주를 HB1. F3으로 명명하고 실험에 사용하였다. 이 세포는 배양용기의 바닥에 붙어서 자라며 형태는 삼각 혹은 다각형 모양으로 Doubling time은 약 25시간이며 세포유전학적 검사상 46, XX로 정상인간의 염색체를 갖추었다. 미성숙 신경세포에서 발현되는 vimentin에 양성반응을 보인다.

불멸화된 세포의 subculture는 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)에 10%(v/v) Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco), 1%(v/v) penicillin-streptomycin(5000 units penicillin; 5000 units streptomycin, Sigma)에서 배양하였고, 저장에는 20~50% FBS, 10%(v/v) dimethyl sulfoxide(DMSO, Fisher Scientific)를 사용하였다.

2. 홍삼추출액 투여 및 cell viability측정(MTT assay)

Neuronal stem cell line인 F3 cell을 충분한 수가 될 때까지 계대배양한 후 96well plate에 plating하였다. 홍삼추출액을 culture media에 여러 농도로 희석해서 사용하였으며, 농도에 따른 세포의 증식 및 세포독성여부를 확인하였다. 사

용된 홍삼추출액은 고려인삼주식회사에서 판매되고 있는 상품으로(태극홍삼정; 상품코드 1072091056) 대한민국(한국산) 6년근 홍삼을 주원료로 제조되었고 홍삼 농축액의 주요 성분은 홍삼성분 70 mg/g, 미삼류 100%이다. Cell viability는 MTT 용액을 200 μ l/well씩 넣고 3시간 배양 후 DMSO 200 μ l/well을 넣고 30분간 섞어준 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. FACS analysis

Cell cycle과 nuclear DNA fragmentation을 분석하기 위하여 FACS analysis를 시행하였다. F3 cells을 60 mm dishes에 100만개를 분주하고 24시간 후에 여러 농도의 홍삼추출액을 24시간 처리하였다. 0.1% trypsin/0.01% EDTA로 세포를 취합한 후 ice-cold 70% ethanol로 fix하였다. S phase, G0-G1, G2-M phase의 proportion을 측정하였고, DNA fragmentation을 확인하기위해 DNA-binding fluorochrome propidium iodide(50 μ g/ml)로 염색을 하고 flow cytometry로 비율을 분석하였다.

4. Immunoblotting

Culture plate를 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 2회 wash한 후 0.5 ml의 PBS를 첨가하여 rubber policeman으로 scraping하였다. Eppendorf tube에 옮긴 후 3 min 6000 rpm으로 spin한 후 supernatant를 제거하고 RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris(pH 8.0))를 첨가하여 cell lysis를 하였다. 경우에 따라 DNase를 100 μ g을 첨가하였다. 진탕을 한 후 ice에서 5분간 incubation하고 Bradford 또는 BSA방법을 이용하여 protein의 농도를 측정하고 100 mM DTT를 첨가하여 5분간 boiling한 후 한 well당 20 μ g씩 loading하였다. Separating gel은 10% Acrylamide, 0.05% bis acrylamide, 0.375 M Tris(pH 8.6), 10% glycerol, 0.1% SDS, stacking gel은 2.56% Acrylamide, 0.45% DATD(pH 6.8), 10% glycerol, 0.1% SDS를 사용하였고, Running buffer(5X)는 125 mM Tris base, 0.96 M Glycine, 0.5% SDS(pH 8.3), Transfer buffer는 25 mM Tris base, 192 mM glycine, 20% v/v methanol, 0.1% SDS(pH 8.1-8.4)을 이용하여 100 V(320-450 mA)로 1.25시간동안 ice-cooling 하면서 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 5% non-fat dry milk TBST(TBS:0.1 M Tris base, 1.5 M NaCl, pH 8.0; 0.1% Tween²⁰)에 1시간동안 상온에서 blocking후 primary antibody(anti-bax, anti-PARP)를 5% non-fat dry milk TBST에 dilution하여 4도에서 overnight incubation하였

다. TBST로 15분, 5분, 5분간 wash 후 peroxidase-labeled secondary antibody(anti-mouse 또는 anti-rabbit; Pierce제)를 1:10000으로 희석하여 5% non-fat dry milk in TBST에 상온에서 1시간동안 incubation하였고 다시 TBST에 5회 wash 후 ECL(Amersham)로 develop 하였다. Band는 image analyzer로 density 를 정량화 하였다.

결 과

1. Dose 및 time에 따른 cell viability 변화분석

0.1 µg/ml에서 10 µg/ml의 Red-ginseng extract를 media에 섞은 후 24시간 incubation한 결과 0.3 µg/ml에서 peak를 보이고, 농도가 증가함에 따라 viability가 감소되는 경향을 보였다. 10 µg/ml 농도에서는 control에 비해 viability가 60%로 저하되었다(Fig. 2). Culture dish상에서도 0.3 µg/ml의 농도에서는 confluency가 증가가 되었으며 10 µg/ml에서는 정상에 비해 감소된 소견을 보였다(Fig. 1). 그러나 cell 간의 모양의 변화는 관찰할 수 없었다.

한편 5 µg/ml 이하의 농도에서 6시간 관찰하였을 경우는 absorbance의 평균이 각각 control 0.269, 1 µg/ml 0.258, 3 µg/ml 0.225, 5 µg/ml 0.287로 의미있는 차이를 보이지 않았다. 1 µg/ml 농도에서 6시간, 16시간, 20시간 배양을 한 결과 각각 absorbance의 평균이 0.273, 0.263, 0.282으로 배양시간이 길어지면서 viability가 증가되는 경향을 관찰하였다.

2. Cell proliferative 및 cytotoxic condition에서 cell cycle phase 변화분석

S phase, G2/M phase, G0/G1 phase를 각각 proliferative condition(0.3 µg/ml)과 cytotoxic condition(10 µg/ml)에서 분석한 결과, proliferative condition에서는 통계적인 유의성은 없었으나 control에 비해 S 및 G2/M phase가 증가되

는 경향을 보였고, G0/G1 phase의 감소를 관찰하였다. 반면 cytotoxic condition하에서는 반대로 S 및 G2/M phase의 감소, G0/G1 phase의 증가를 보였다 (Fig. 3)

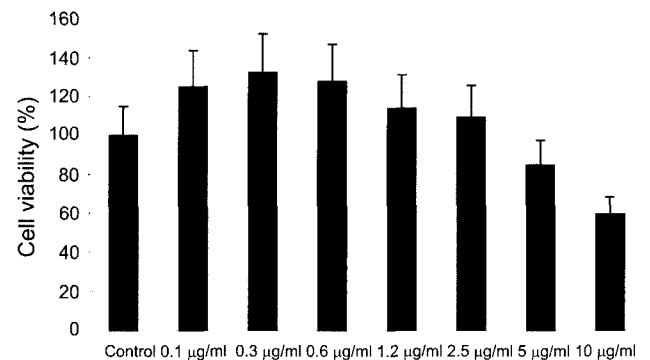


Fig. 2. Dose dependant patterns of the cell viability. The human neural stem cells were incubated with different doses ranging from 0.1 µg/ml to 10 µg/ml for 24 hours. The MTT assay showed the increase viabilities to 2.5 µg/ml but it decreased beyond this point. The X-axis denotes the concentration of ginseng extract and the Y-axis denotes the % of viability to control.

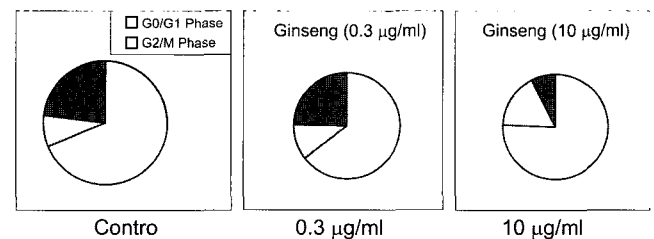


Fig. 3. The cell cycle analysis of the F3 human neural stem cells. Three different cell cycle phases(G0/G1 phase, G2/M phase, S phase) were analyzed by flow cytometry. The control cells without ginseng shows that 16.6% of cells were S phase, 73.7% of G0/G1 phase, and 9.7% in G2/M phase. At 10 µg/ml, the proportion of cells with S phase decreased to the 5.8% whereas the cells with G0/G1 phase increased to 87.0%. The cells in proliferative condition shows a tendency with more S and G2/M phase than the control.

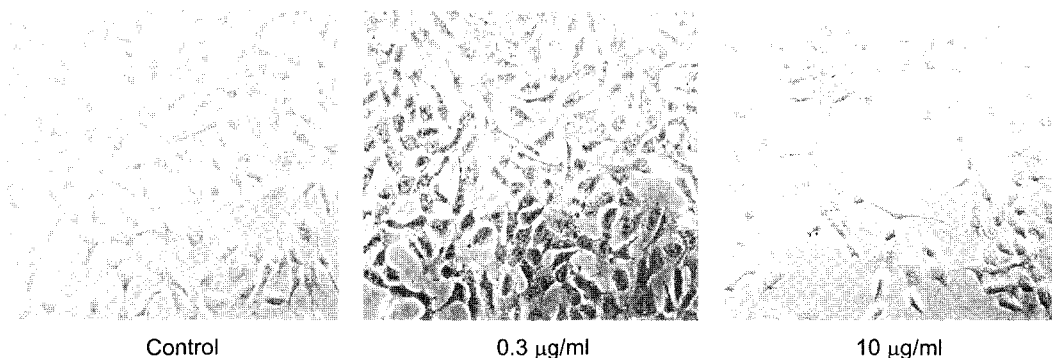


Fig. 1. The viability of the F3 cells. The confluency of the F3 human neural stem cells increases at a concentration of 0.3 µg/ml when compared to the control without ginseng extract. However, the viability decreased at 10 µg/ml. The morphology of viable cells was not different among these conditions. The cells were incubated for 24 hours.

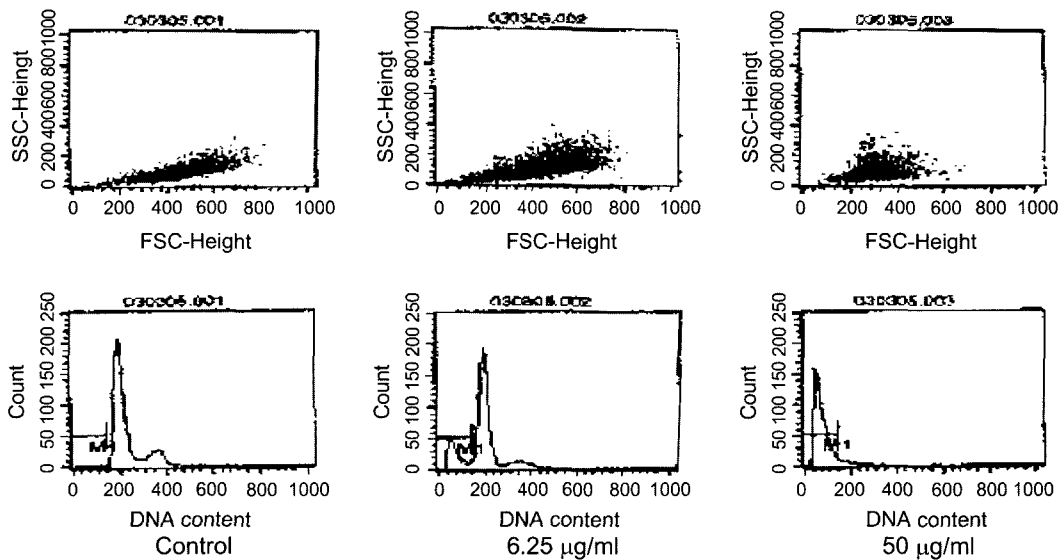


Fig. 4. FACS analysis of DNA fragmentation. Increased proportion of DNA fragmentation is correlated with the increased doses of ginseng incubation. The percentage of cells with DNA fragmentation were 19.5% at 6.25 µg/ml and 93.4% at 50 µg/ml whereas that of the control cells shows 1.3%.

3. DNA fragmentation

DNA-binding fluorochrome propidium iodide로 FACS analysis상 control에 비해 cell viability의 감소를 보이는 6.25 µg/ml과 50 µg/ml의 농도를 비교하였을 경우 DNA fragmentation이 cell viability감소에 따라 증가되는 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

4. Bax and PARP expression

Bax expression상 proliferative condition에서는 protein level이 감소되어 있으나, cytotoxic condition에서는 control과 의미 있는 차이는 없었다. PARP expression의 경우는 proliferative condition에서는 정상 control과 차이가 없었으나 cytotoxic condition에서는 full length의 발현이 저하되어 있었다. 그러나 이에 따른 PARP cleavage fragment의 증가는 관찰할 수 없었다(Fig. 5).

고 찰

본 연구에서는 홍삼추출액이 신경줄기세포에 미치는 영향을 일차적으로 cell viability에 중점을 두어 분석하고, proliferation 및 cytotoxicity를 보이는 경우 cell cycle의 변화와 DNA fragmentation, Bax, PARP등 apoptotic cell death과 관련된 현상을 관찰하고자 하였다. 홍삼추출액이 첨가하였을 경우 일정한 농도까지는 세포가 증식되는 경향을 보이나 농도가 증가될수록 cell viability를 감소시키는 현상이 관찰되었다. 즉 홍삼추출액의 농도에 따른 성체신경줄기세포의 증식

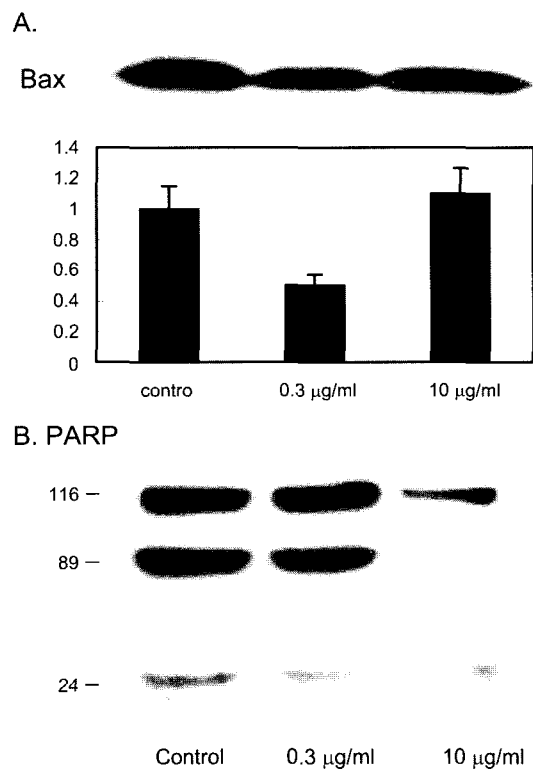


Fig. 5. Bax and PARP expression. A. The expression of bax protein(23 kd) reduced to the 50% of control level when the cells are in proliferation. However, at cytotoxic concentration, the protein levels were unchanged by densitometric measure. Y-axis denotes the ratio of signal to the control. B. The PARP expression is unchanged at a concentration of 0.3 µg/ml. At 10 µg/ml, The full-length protein level(116 kd) was decreased but the cleavage products(89 kd & 24 kd) were not increased.

및 세포독성효과의 두가지의 서로 다른 효과를 관찰하였다.

본 연구에서 cell cycle phase을 비교해본 결과 S phase의 증가경향으로 DNA의 합성이 증가되었으리라 추측할 수 있다. 그러나 0.1~2.5 µg/ml의 농도영역에서 나타나는 세포 성장 효과는 MTT assay방법에 의한 오차범위를 같이 감안해야 된다. 한편으로는 bax protein의 감소와 관련, 세포사에 증가되는 단백질 발현의 감소와 연관이 있을 것으로도 추측이 된다.¹⁸⁾ MAPK, Akt signaling등 survival signaling의 변화를 포함¹⁹⁾ 연구가 필요한 부분으로 사료된다.

S phase의 감소, G0/G1 phase의 증가로 cell cycle arrest가 동반되었음을 추측할 수 있으며 농도에 따른 DNA fragmentation 증가가 apoptosis와 관련되었을 가능성을 시사해준다. 그러나 PARP cleavage fragment의 증가가 없었던 점으로 보아 Caspase 3의 activation과는 다른 pathway를 통해 세포사가 진행됨을 고려해볼 수 있고, Bax protein 변화와는 무관한 세포사로 사료된다. PARP의 full-length protein의 감소로 인한 소견은 PARP activation에 의한 세포사를 촉진하는 현상의²⁰⁻²²⁾ 보상작용으로 추측할 수 있으나 향후 추가 연구가 필요한 부분이다.

최근 줄기세포에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 줄기세포에 의한 손상된 조직의 기능회복에 많은 연구가 이루어지고 있다. 홍삼추출액의 섭취가 생체내의 성체줄기세포에 어떠한 영향을 주는지는 아직 알려진 바가 없으며, 줄기세포에 의한 신경계 기능회복 및 작용기전역시 아직 알려진 바가 없다. 본 연구는 홍삼추출액이 F3라는 인간성체신경줄기세포의 실험관 내의 viability에 미치는 효과를 관찰한 것이며 cell proliferation 및 세포독성의 추가기전과 향후 in vivo study를 통해 재검증이 필요한 부분으로 사료된다.

요 약

홍삼추출액의 신경성체줄기세포 성장과 생존에 미치는 영향을 분석하고자 human neuronal stem cell line인 F3 cell을 배양한 후 홍삼추출액을 여러 농도로 희석하여 MTT assay로 cell viability를 측정하였고 FACS analysis로 cell cycle변화를 측정하였다. 특정한 농도에서는 세포가 증식되는 경향을 보였으며 농도가 증가되면서 viability가 감소되는 현상을 확인할 수 있었다. Cell cycle분석상 세포증식시에는 S phase 및 G2/M phase가 증가되는 경향을 보였고, viability가 감소되면서 S phase가 감소되고 G0/G1 phase가 증가되었다. 한편 DNA fragmentation이 cell viability감소에 따라 증가되었으나, Caspase 3 activation 또는 Bax expression과는 관련성이 적었다.

감사의 말씀

본 연구는 학술진흥재단의 2002년도 신진교수연구과제(KRF-2002-003-E00135)의 보조로 수행되었습니다.

인용문헌

- Chen, J., Li, Y., Wang, L., Lu, M., Zhang, X. and Chopp, M. : Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci.* **189**, 49-57 (2001).
- Chen, J., Li, Y., Wang, L., Zhang, Z., Lu, D. and Lu, M. *et al.* : Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke.* **32**, 1005-1011 (2001).
- Li, Y., Chen, J., Wang, L., Lu, M. and Chopp, M. : Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology.* **56**, 1666-167 (2001).
- Zhao, L.R., Duan, W.M., Reyes, M., Keene, C.D., Verfaillie, C.M. and Low, W.C. : Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol.* **174**, 11-20 (2002).
- Chen, J., Sanberg, P.R., Li, Y., Wang, L., Lu, M. and Willing, A.E. *et al.* : Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke.* **32**, 2682-2688 (2001).
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. and Lindvall, O. : Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.* **8**, 963-970 (2002).
- Takahashi, J., Palmer, T.D. and Gage, F.H. : Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol.* **38**, 65-81 (1999).
- Li, Y., Chen, J., Chen, X.G., Wang, L., Gautam, S. C. and Xu, Y. X. *et al.* : Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology.* **59**, 514-523 (2002).
- Jiang, F., DeSilva, S. and Turnbull, J. : Beneficial effect of ginseng root in SOD-1 (G93A) transgenic mice. *J Neurol Sci.* **180**, 52-54 (2000).
- Hahn, J., Nah, S.Y., Nah, J.J., Uhm, D.Y. and Chung, S. : Ginsenosides inhibit capsaicin-activated channel in rat sensory neurons. *Neurosci Lett.* **287**, 45-48 (2000).
- Kim, Y. C., Kim, S. R., Markelonis, G. J. and Oh, T. H. : Ginsenosides Rb1 and Rg3 protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration. *J Neurosci Res.* **53**, 426-432 (1998).

12. Lim, J. H., Wen, T. C., Matsuda, S., Tanaka, J., Maeda, N., Peng, H., Aburaya, J., Ishihara, K. and Sakanaka, M. : Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb1, a main ingredient of ginseng root. *Neurosci Res.* **28**, 191-200 (1997).
13. Wen, T. C., Yoshimura, H., Matsuda, S., Lim, J. H. and Sakanaka, M. : Ginseng root prevents learning disability and neuronal loss in gerbils with 5-minute forebrain ischemia. *Acta Neuropathol (Berl).* **91**, 15-22 (1996).
14. Liu, M. and Zhang, J. T. : Protective effects of ginsenoside Rb1 and Rg1 on cultured hippocampal neurons. *Yao Xue Xue Bao.* **30**, 674-678 (1995).
15. Himi, T., Saito, H. and Nishiyama, N. : Effect of ginseng saponins on the survival of cerebral cortex neurons in cell cultures. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* **37**, 481-484 (1989).
16. Flax, J. D., Aurora, S., Yang, C., Simonin, C., Wills, A. M. and Billingham, L. L. *et al.* : Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol.* **16**, 1033-1039 (1998).
17. Ourednik, V., Ourednik, J., Flax, J.D., Zawada, W.M., Hutt, C. and Yang, C. *et al.* : Segregation of human neural stem cells in the developing primate forebrain. *Science.* **293**, 1820-1824 (2001).
18. Vekrellis, K., McCarthy, M. J., Watson, A., Whitfield, J., Rubin, L. L. and Ham, J. : Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development.* **124**, 1239-1249 (1997).
19. Morrison, R. S., Kinoshita, Y., Johnson, M. D., Ghatan, S., Ho, J. T. and Garden, G. : Neuronal survival and cell death signaling pathways. *Adv Exp Med Biol.* **513**, 41-86(2002).
20. Mongan, P. D., Karaian, J., Van Der Schuur, B. M., Via, D. K. and Sharma, P. : Pyruvate prevents poly-ADP ribose polymerase (PARP) activation, oxidative damage, and pyruvate dehydrogenase deactivation during hemorrhagic shock in swine. *J Surg Res.* **112**, 180-188 (2003).
21. Weise, J., Isenmann, S. and Bahr, M. : Increased expression and activation of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) contribute to retinal ganglion cell death following rat optic nerve transection. *Cell Death Differ.* **8**, 801-807(2001).
22. Lee, Y. W., Ha, M. S. and Kim, Y. K. : H₂O₂-induced cell death in human glioma cells: role of lipid peroxidation and PARP activation. *Neurochem Res.* **26**, 337-343 (2001).