

<원 저>

마우스 비장세포에서 Ginsenoside Rp1의 세포자멸사 유도

오영균 · 주홍구*

제주대학교 수의과대학 수의약리학실험실

(접수: 2013년 3월 11일, 수정: 2013년 7월 1일, 게재승인: 2013년 7월 18일)

Induction of apoptosis in mouse spleen cells by Ginsenoside Rp1

Young-kyun Oh, Hong-Gu Joo*

Laboratory of Veterinary Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

(Received: March 11, 2013; Revised: July 1, 2013; Accepted: July 18, 2013)

Abstract : Ginsenoside Rp1 is one of ginseng saponins with chemotherapeutic activity. In this study, we investigated the effects of Rp1 on spleen cells. Spleen is a major immune organ consisted of crucial immune cells, such as T lymphocytes, B lymphocytes, natural killer cells, and some antigen-presenting cells. Although the anti-tumor potential of Rp1 was studied, the effects of Rp1 on immune cells have not investigated yet. A viability assay using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), flow cytometric analysis, Western blot analysis were used to detect cellular changes on Rp1-treated spleen cells. MTT assay showed that Rp1 decreased the viability of spleen cells. To further investigate the effects of Rp1 on activated spleen cells, we treated lipopolysaccharide (LPS) as a representative inflammatory agent and Rp1 on spleen cells in a combination. The surface expression levels of activation markers for lymphocytes, CD25 and CD69 were measured. Apoptotic analysis revealed the cytotoxic effects of Rp1 on both naïve and activated cells, and the expression pattern of some apoptosis-related proteins was correlated to apoptotic events of cells. Taken together, ginsenoside Rp1 increases the cellular death of spleen cells and also inhibits the LPS-induced activation of spleen cells.

Keywords : apoptosis, cellular toxicity, ginsenoside, Rp1, spleen cells

서 론

비장은 혈액에서 유래된 항원에 대해 면역반응을 하며, 혈액의 주요한 여과장치로 작용하여 노화되거나 손상된 세포를 제거하는 주요한 면역기관이다 [1]. 비장은 적혈구를 저장하고 항원을 처리하는 적색질과 림프구가 풍부하고 면역반응이 활발한 백색질로 구성되어 있으며, 림프구, 대식세포, 수지상세포 등으로 이루어져 있다 [2]. 혈액에서 유래된 항원이 항원제시세포에 의해 탐식, 소화된 후 항원성 펩타이드가 림프구에 제시되면서 면역반응이 일어나게 된다.

Ginseng에서 추출한 saponin인 ginsenoside들은 상대적으로 작은 독성을 보이면서도 수많은 약리작용을 보여왔다. Rg1은 T-helper cell의 수와 비장의 자연살해세포(NK cell)의 활성을 증가시키고 [6], Rg3는 암세포 활성화에 관여하는 NF-kappaB를 억제하여 암세포의 성장을 억제하였다 [10]. 또한 Rb1은 nitric oxide의 생산을 억제하여 채장 β세포의 세포자멸사를 억제하는 것으로 알려졌다 [3].

Ginsenoside Rp1은 항암활성을 갖는 ginsenoside의 한 종

류로서 암세포의 생존율과 전이과정을 억제한다 [14]. 또한 RAW264.7 세포에서 NF-kappaB pathway의 억제를 통해 LPS-induced IL-1β production을 차단하는 효과가 있으며 [8], β1-integrins(CD29)에 의해 매개된 세포부착을 감소시키는 작용을 하였다 [7]. 그러나 Rp1에 대한 다양한 연구에도 불구하고 주요 면역반응이 일어나는 비장세포에 대해 Rp1이 미치는 영향에 관한 연구가 이뤄지지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 ginsenoside Rp1을 naïve 상태의 비장세포와 대표적인 염증유발물질인 lipopolysaccharide(LPS)로 활성화된 비장세포에 투여하여 어떤 세포변화가 일어나는지 알아보고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 및 시약

모든 실험에는 ORIENT BIO에서 구입하여 제주대학교 수의약리학실험실에서 유지된 8~12주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원

*Corresponding author

Tel: +82-64-754-3379, Fax: +82-64-756-3354

E-mail: joooh@jejunu.ac.kr

회의 승인을 받아 시행되었으며 제주대학교 동물실험윤리 지침을 준수하였다. Rp1은 Ambo Institute(서울)에서 제공받았으며 phosphate-buffered saline(PBS)에 녹여 사용하였다.

비장세포의 준비와 실험

8~12주령 마우스의 비장을 외과적으로 적출한 뒤, Hanks balanced salt solution으로 비장을 세척하고 분쇄하여 비장세포를 얻는다 [9]. 이 세포들을 실온에서 10분간 ACK lysis buffer와 반응시켜 적혈구를 용혈 시킨 후 flask에서 15분간 배양하여 부착세포를 제거하고 부유세포만 실험에 사용하였다. 세포는 96-well 또는 6-well 배양용기에 1×10^6 cells/mL의 농도로 배양하였다.

세포생존율 시험

세포생존율 측정을 위해 비장세포에 Rp1과 LPS(Sigma, USA)를 처리하고 배양하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma)를 0.5 mg/mL 농도로 넣고, CO₂ 배양기에서 4시간 배양한 후 0.01 N HCl이 포함된 10% sodium dodecyl sulfate(SDS) (Sigma, USA) 용액을 100 μ L/well 농도로 넣었다. 2시간 후에 흡광도를 측정하였다. 생존율 측정을 위해 LPS 1 μ g/mL, Rp1 10 μ g/mL 을 처리하고 배양한 다음, trypan blue 염색으로 live cell, dead cell의 수를 세었다.

유세포분석

비장세포에 Rp1 10 μ g/mL, LPS 1 μ g/mL을 처리하고 배양한 후에 유세포분석을 위한 염색에 이용하였다. 염색 및 세척완충액으로 5% fetal bovine serum과 0.1% sodium azide가 첨가된 PBS를 사용하였다. 1차 항체로 biotinylated anti-mouse CD25, 2차 항체로 streptavidin-phycoerythrin(PE)을 처리하거나, PE-labeled anti-mouse CD69 (BD Biosciences, USA)를 처리하였다. 항체를 넣은 샘플은 4°C에서 30분간 반응시켰고 1% paraformaldehyde를 이용해 분석 시까지 보관했다. 세포자멸사와 세포괴사를 포함하는 cell death를 알아보기 위해 물질이 처리된 비장세포를 2일간 배양한 뒤에 annexin V-fluorescein isothiocyanate(FITC)/propidium iodide(PI) kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 염색하였다. 또한 세포 내 미토콘드리아의 막전위 수준을 알아보기 위하여 10 μ g/ml Rhodamine 123(Sigma)를 처리하여 30분간 배양하였다. 염색된 세포들은 FACSCalibur and CellQuest(BD, USA)을 이용해 분석하였다.

Western blot analysis

실험방법은 일반적으로 알려지고 실험실에서 확립된 방법을 사용하였다 [5]. 간략히 설명하면 다음과 같다. 물질이 처리된 비장세포를 PBS로 세척한 후 WB lysis buffer로 녹여 cell lysate을 얻었다. Bradford's method에 따라 단백질을 정량하여 동일한 양의 단백질을 분석하였다. 12% SDS-PAGE gel을 이용하였고 nitrocellulose membrane에 blotting

하였다. 1차 항체로 anti-Bcl-2, anti-Bcl-xL(Santa Cruz Biotech, USA), anti-cIAP-1, anti-cIAP-2 항체(Cell Signaling Tech, USA)를 사용하였고 2차 항체로 horseradish peroxidase (HRP, Santa Cruz Biotech, USA)가 결합된 적절한 항체를 사용하였다.

유의성분석

각 실험은 2회 이상 실시하였으며 대표적인 결과를 제시하였다. 모든 data는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, Student's *t* test를 통해 분석하였다. 0.05미만의 *p* value를 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

Rp1에 의한 비장세포 생존율 저하

비장세포의 생존율에 대한 Rp1의 효과를 알아보기 위해 LPS를 처리하지 않은 naïve 비장세포와 LPS에 의해 활성화된 비장세포에 Rp1을 처리하였다. 이때 LPS는 대표적인 염

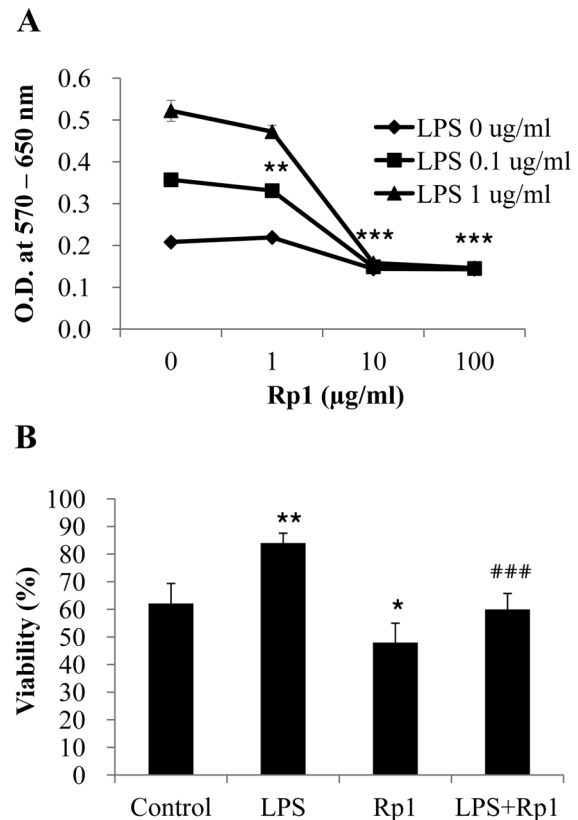


Fig. 1. Effects of Rp1 on the viability of spleen cells. The spleen cells were seeded at a concentration of 1×10^6 cells/mL in 96-well culture plates and treated with 0~100 μ g/mL Rp1, 0~1 μ g/mL LPS. After 2 days, (A) A viability assay using MTT solution was performed. For trypan blue exclusion test (B), spleen cells were cultured in 6-well culture plates and treated with 1 μ g/mL LPS, 10 μ g/mL Rp1. *, **, *** indicate *p* < 0.05, 0.01, 0.001 respectively compared to control group. ## indicates *p* < 0.01 compared to LPS group.

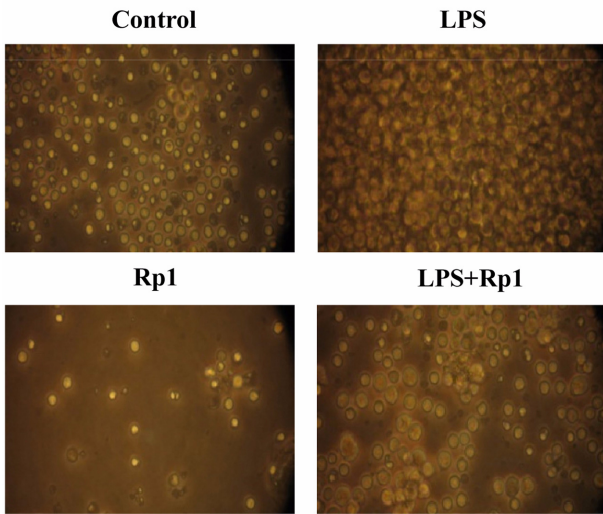


Fig. 2. Morphology of Rp1-treated spleen cells. Cell morphology was observed using an inverted microscope and the image was obtained by a digital camera.

증성 물질로 선택되어 사용되었다. 비장세포에 Rp1을 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS를 0~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리하여 2일간 배양한 후 MTT assay를 실시한 결과, LPS에 의한 세포생존율이 Rp1에 의해 고농도에서 유의하게 감소하였고, Rp1 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 현저히 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1A). 이후 실험에서는 LPS의 염증성 반응을 나타내는 농도로 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 생존을 저하 효과가 뚜렷한 Rp1의 농도로 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 선정하여 사용하였다. 비장세포의 생존율 변화를 알아보기 위한 다른 방법으로 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Rp1 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하여 2일간 배양한 후 trypan blue exclusion test를 실시하였다. LPS를 처리한 군이 생존율이 가장 높았으며 Rp1을 처리한 군은 생존율이 낮았다. LPS와 Rp1을 같이 처리한 군은 LPS를 처리한 군에 비해 Rp1에 의해 유의하게 생존율이 감소하였다(Fig. 1B).

세포형태분석

비장세포에 Rp1 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하고 2일간 배양 후 사진을 촬영하였다. Control군에 비해 Rp1군에

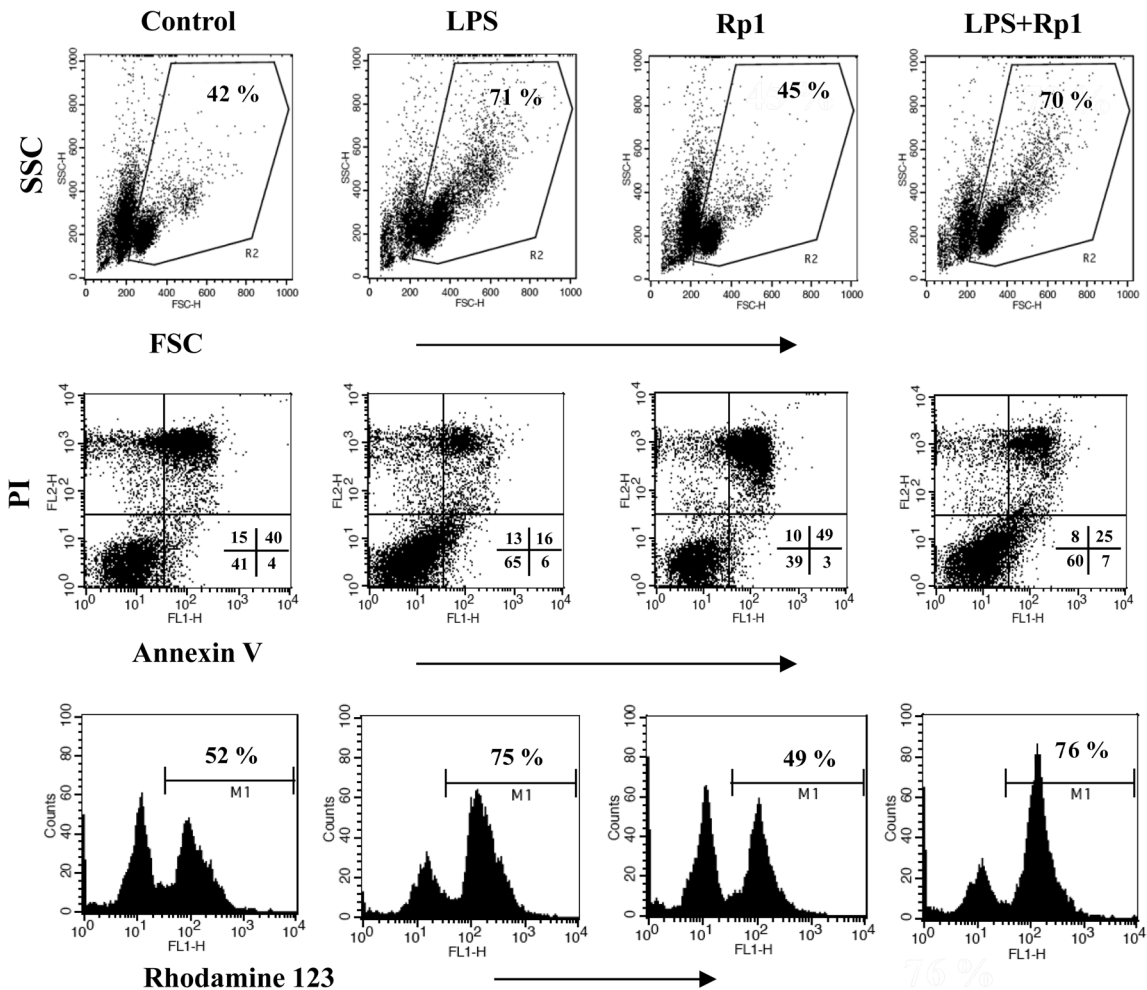


Fig. 3. Apoptotic analysis of Rp1-treated spleen cells. Spleen cells were cultured and treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rp1. The cells were stained with annexin V-FITC/PI, rhodamine 123 and analyzed by FACS Calibur and CellQuest.

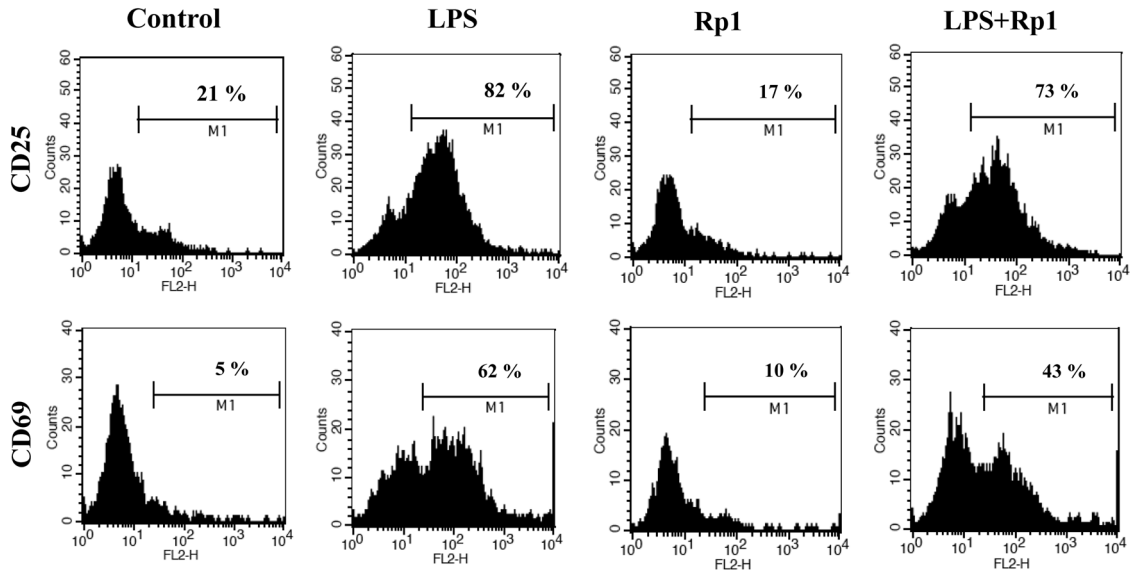


Fig. 4. Rp1 treatment decreases the expression of activation markers on LPS-treated spleen cells. Spleen cells were cultured and treated with 1 µg/mL LPS, 10 µg/mL Rp1. The treated spleen cells were stained for CD25 or CD69, lymphocyte activation markers. The percentage on each histogram indicates the ratio of highly expressed cells.

서는 세포의 수가 적고, 죽은 세포가 보였다. LPS군에서는 cluster가 많이 보였으며 세포가 많이 자란 상태였고, Rp1과 LPS를 함께 처리한 군에서는 LPS만 처리한 군에 비해 cluster의 생성이 적음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Rp1에 의한 후기 세포자멸사(apoptosis) 증가

Flow cytometry를 이용하여 세포 크기 변화를 관찰하였다(Fig. 3). 살아있는 비장세포의 구역을 gate한 결과(%로 표시), LPS군과 LPS + Rp1처리군은 control군에 비해 세포의 수가 현저히 증가하였으며 우측 상방의 커진 세포의 수가 증가하였다. Rp1군은 control군에 비해 큰 변화를 보이지 않았다. 전반적으로 Rp1이 비장세포의 크기에는 영향을 보이지 않는 것으로 판단된다. Cell death에 대한 Rp1의 효과를 알아보기 위해 annexin V-FITC/PI 염색을 실시하였다(Fig. 3). 사분면의 lower-left는 살아있는 세포, lower-right는 early apoptosis, upper-right는 late apoptosis와 upper-left는 necrosis를 포함하는 세포를 나타낸다. LPS처리군의 경우 lower-left가 증가하여 살아있는 세포수가 증가한 반면, Rp1처리군은 control군 및 LPS처리군에 비해 upper-right가 높아서 late apoptosis가 많이 일어났음을 알 수 있었다. 또한 rhodamine 123 염색을 통해 미토콘드리아의 membrane potential을 알아보았다(Fig. 3). Control군에 비해 LPS처리군은 증가한 반면 Rp1군은 약간 감소하였다. 또한 LPS처리군에 비해 LPS + Rp1처리군은 변화가 없었다.

Rp1에 의한 림프구 활성화 마커 발현 변화

림프구의 활성화 마커인 CD25와 CD69의 변화를 알아보았다(Fig. 4). LPS에 의한 CD25와 CD69의 발현이 현저하게 증가하였고, LPS에 의한 발현 증가가 Rp1에 의해서

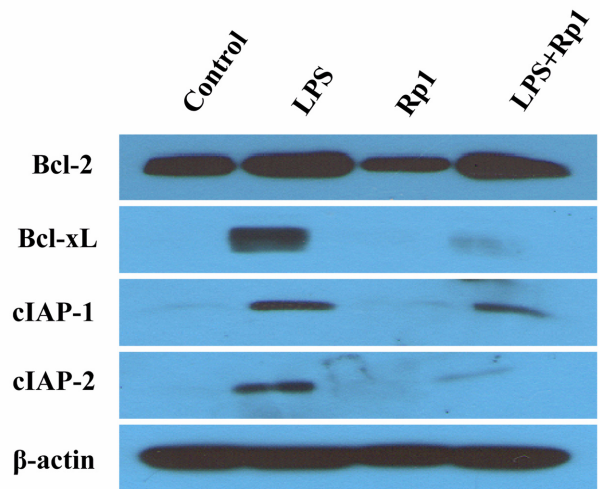


Fig. 5. Altered expression of the apoptosis-related molecules in treated cells. Spleen cells were treated with 1 µg/mL LPS, 10 µg/mL Rp1 and cell lysates were prepared. Western blot analysis was performed.

CD25와 CD69 모두 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

Rp1에 의한 세포자멸사 관련 단백질의 발현 변화

Bcl-2의 경우 control군보다 Rp1처리군의 경우 발현이 다소 약한 반면, 나머지 샘플은 약하게 증가했다. Bcl-xL, cIAP-1, cIAP-2의 경우 LPS처리군에서 발현이 증가된 반면, LPS + Rp1처리군에서는 발현이 현저히 저하되어, Bcl-2의 경우는 전혀 다른 양상을 보였다(Fig. 5). LPS에 의한 특정 anti-apoptotic 단백질들의 발현 증가는 Rp1에 의해 억제되는 사실을 확인하였다.

고 찰

이번 실험에서는 ginsenoside Rp1이 비장세포에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. MTT assay 결과 Rp1은 LPS를 처리하지 않았을 때와 처리하였을 때 모두 비장세포의 생존율을 감소시켰다. 또한 Rp1을 처리한 후 현미경으로 세포의 형태를 관찰했을 때 비장세포의 수가 감소한 것을 확인하였다. LPS에 의해 증가된 cluster의 수는 Rp1 처리에 의해 감소되었다. 비장세포에 Rp1을 처리한 결과 세포의 생존율이 감소하는 사실을 확인했다.

Rp1이 cell death에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시한 annexin V-FITC/PI 염색 결과를 보면 Rp1은 비장세포의 세포자멸사를 촉진하였다. 또한 Rp1 단독처리군은 대조군에 비해 미토콘드리아 막전위가 저하되었으나, LPS + Rp1처리군은 LPS처리군에 비해 거의 변화가 없었다. 이는 Rp1에 의한 세포자멸사가 미토콘드리아 막전위와 관련성이 적은 경로를 통했거나 일시적인 변화로 한정되었을 가능성이 있을 것으로 추정된다.

림프구가 활성화되면 성장과 관련된 cytokine인 IL-2의 수용체 중 α 사슬인 CD25가 세포 표면에 다수 발현하여, IL-2에 대한 림프구의 감수성이 증가하면서 면역반응에 필수적인 림프구의 clonal expansion이 일어난다 [4]. 그리고 CD69 역시 림프구의 activation시 초기에 발현되는 활성화 marker이다 [15]. CD25와 CD69의 발현을 분석한 결과 LPS에 의한 두 분자의 발현증가를 Rp1이 억제하였다. 이는 LPS가 그람음성균의 표면물질이면서 대표적인 염증성 원인 물질임을 감안할 때, Rp1이 LPS에 의한 림프구의 과도한 활성화를 억제할 수 있는 가능성을 보여준 결과로 판단된다.

Western blot을 통하여 세포자멸사를 억제하는데 작용하는 단백질들인 Bcl-2, Bcl-xL, cIAP-1, cIAP-2의 발현을 확인해보았다. 그 결과 Bcl-2와 나머지 단백질의 발현양상이 달랐다. Bcl-2는 모든 처리군에서 발현되었으며 Rp1처리에 의해 발현변화가 적었다. 그러나 나머지 단백질은 주로 LPS에 의해 강하게 발현하였고 Rp1에 의해 현저히 감소하는 양상을 보였다. 이는 Rp1에 의한 세포자멸사가 Bcl-2에 덜 의존적이고 다른 단백질들의 발현에 영향을 받는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 Rp1 처리에 의한 비장세포의 세포자멸사 증가(Fig. 3)와 다른 세포에서의 Rp1에 의한 세포자멸사 증가를 지지해 줄 수 있을 것으로 판단된다 [12]. 향후 일반적인 Bcl-2 의존적인 세포자멸사와 Rp1에 의한 세포자멸사를 비교하는 세부연구가 필요한 것으로 사료된다.

위의 실험결과를 종합해 볼 때, Rp1은 비장세포의 생존율을 억제하고, LPS에 의한 과도한 면역반응 시 세포사멸과정을 통해 면역과정을 조절할 수 있는 사실을 확인하였다. 현재 항암제로서 Rp1의 효과가 연구를 통해 입증되었지만 [11], 면역세포에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다. 본 연구를 통해 항암제로 Rp1을 사용했을 때 면역세포에 잠재적인 독성을 줄 수 있는 사실을 알 수 있었다. 또한 최근 다른 ginsenoside의 일종인 Rh1이 항알레

르기 및 항염증 효과가 있는 것으로 알려진 사실에 비추어 볼 때 [13], Rp1 또한 단독으로 과도한 면역반응을 조절할 수 있는 효과적인 면역억제제로서의 가능성이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업에 의해 이루어진 것임.

References

1. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. pp. 31-32, Saunders, Philadelphia, 2003.
2. Cesta MF. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. Toxicol Pathol 2006, **34**, 455-465.
3. Chen F, Chen Y, Kang X, Zhou Z, Zhang Z, Liu D. Anti-apoptotic function and mechanism of ginseng saponins in Rattus pancreatic β -cells. Biol Pharm Bull 2012, **35**, 1568-1573.
4. Fearon DT. The expansion and maintenance of antigen-selected CD8⁺ T cell clones. Adv Immunol 2007, **96**, 103-139.
5. Jeong BE, Ko EJ, Joo HG. Cytoprotective effects of fucoidan, an algae-derived polysaccharide on 5-fluorouracil-treated dendritic cells. Food Chem Toxicol 2012, **50**, 1480-1484.
6. Kenarova B, Neychev H, Hadjiivanova C, Petkov VD. Immunomodulating activity of ginsenoside Rg1 from *Panax ginseng*. Jpn J Pharmacol 1990, **54**, 447-454.
7. Kim BH, Cho JY. Regulatory role of ginsenoside Rp1, a novel ginsenoside derivative, on CD29-mediated cell adhesion. Planta Med 2009, **75**, 316-320.
8. Kim BH, Lee YG, Park TY, Kim HB, Rhee MH, Cho JY. Ginsenoside Rp1, a ginsenoside derivative, blocks lipopolysaccharide-induced interleukin-1 β production via suppression of the NF- κ B pathway. Planta Med 2009, **75**, 321-326.
9. Kim JM, Joo HG. Immunostimulatory effects of β -glucan purified from *Paenibacillus polymyxa* JB115 on mouse splenocytes. Korean J Physiol Pharmacol 2012, **16**, 225-230.
10. Kim SM, Lee SY, Yuk DY, Moon DC, Choi SS, Kim Y, Han SB, Oh KW, Hong JT. Inhibition of NF- κ B by ginsenoside Rg3 enhances the susceptibility of colon cancer cells to docetaxel. Arch Pharm Res 2009, **32**, 755-765.
11. Kumar A, Kumar M, Panwar M, Samarth RM, Park TY, Park MH, Kimura H. Evaluation of chemopreventive action of Ginsenoside Rp1. Biofactors 2006, **26**, 29-43.
12. Kumar A, Kumar M, Park TY, Park MH, Takemoto T, Terado T, Kitano M, Kimura H. Molecular mechanisms of ginsenoside Rp1-mediated growth arrest and apoptosis. Int J Mol Med 2009, **24**, 381-386.
13. Park EK, Choo MK, Han MJ, Kim DH. Ginsenoside Rh1 possesses antiallergic and anti-inflammatory activities. Int Arch Allergy Immunol 2004, **133**, 113-120.
14. Park TY, Park MH, Shin WC, Rhee MH, Seo DW, Cho JY, Kim HM. Anti-metastatic potential of ginsenoside Rp1, a novel ginsenoside derivative. Biol Pharm Bull 2008, **31**, 1802-1805.
15. Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. Trends Immunol 2005, **26**, 136-140.