ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
*Journal of Life Science* **2014** Vol. 24. No. 9. 1001~1005 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2014.24.9.1001

# Ginsenoside Rg3 Induces Apoptosis in B16F10 Melanoma Cells

Seul Gi Lee[1], Byung Soo Kim[1] and Ju-Ock Nam[1*]

[1]*Department of Ecological Environment, Kyungbook National University, 386 Gajang-dong, Sangju-si, Gyeongsangbuk-Do 742-711, Korea*

Received June 19, 2014 / Revised July 14, 2014 / Accepted August 6, 2014

Ginsenoside Rg3 is one of the active ingredients extracted from red ginseng, and it is an effective chemical component of the human body and well known in herbal medicine as a restorative agent. Several studies have shown that Rg3 has a potent anti-tumor effect on various cancer cell lines. However, Rg3-induced apoptosis in B16F10 melanoma cancer cells is not well understood. In the present study, we tested whether ginsenoside Rg3 could induce apoptosis in B16F10 melanoma cells. We found that Rg3 could inhibit B16F10 melanoma cell viability in a dose-dependent manner, but not normal cells, such as EA.hy.926 and NIH3T3 cells. We also found that Rg3 could induce apoptosis in B16F10 melanoma cells using tunnel-staining assay in a dose-dependent manner. Rg3 treatment induces the phosphorylation of p38 and the expression of Bax, but it inhibits the expressions of the phosphorylation of focal adhesion kinase Bcl2 and pro-caspase3. Taken together, our data suggest that Rg3 could be useful as an anti-cancer agent in B16F10 melanoma cells.

**Key words** : Anticancer, apoptosis, B16F10, ginsenoside Rg3, malignant melanoma cancer

## 서 론

인간의 평균수명이 늘어나면서 자외선 축적량이 많은 고령 인구가 증가하고 있고, 더불어 사람들의 야외활동 증가로 자외선에 대한 노출이 많아져 피부암 환자는 지속해서 증가하고 있다. 악성 흑색종은 피부암 중에서도 가장 악성도가 높은 암으로써 지난 10년간 특히 백인에게서 악성 흑색종 발병 비율이 매년 3~7% 정도 지속해서 증가해 왔다[3]. 우리나라는 기후가 변해 가면서 유해 자외선에 노출되기 쉬운 여름이 매년 일찍 찾아오고 있고 따라서 여러 피부암에 노출될 확률이 높아지고 있다. 건강보험심사평가원의 조사로는 지난 2007년부터 2011년까지 피부의 악성 흑색종으로 진료받은 인원은 2007년 1,894명에서 2011년 2,576명으로 5년간 약 682명이 증가했고, 연평균 증가율은 8.0%로 나타났다. 그 중의 50대 이상의 남성에게서 발병률이 가장 높은데 이는 고령인은 피부노화 때문에 진피층이 얇아지고, 면역반응이 저하되며, 보습기능이 떨어져 피부가 건조지기 때문이다. 악성 흑색종은 초기에 진단되면 수술의 방법으로 치료 가능하지만, 초기 이상 진행되거나 재발한 경우 현재까지 특별한 치료방법이 없는 난치성 질환이다. 악성 흑색종은 림프관과 혈관을 통해 뼈, 간, 폐 등 기관에 전이가 가능하다. 또 화학요법이나 면역요법 치료로부터 저항성을 가지기 때문에 흑색종 암세포의 완전한 소멸에 심각한 문제가 있다. 최근 과학적 발전에도 불구하고 악성 흑색종 치료는 약물에 대한 저항성 때문에 완벽하지 못한 실정이다[3]. 항암제와 같은 화합요법제들은 상대적으로 강한 독성효과와 약물에 대한 내성을 암세포로부터 갖게 하고 한번 항암제에 대한 내성이 생기면 동일 기전의 항암제에 대해서도 내성을 가지게 한다. 따라서 최근 항암제들은 동물이나 식물로부터 얻어낸 천연 화합물을 사용하여 부작용은 줄이고 항암 효과는 높이는 방향으로 이동하고 있다[14]. 악성 흑색종 발병 시 환자 스스로 몸의 면역력을 강화시켜 질병에 대한 치유능력을 향상시키는 것이 중요한데 합성 항암제의 경우 환자의 면역력을 저하시킬 수 있기 때문에 악성 흑색종 치료를 위한 천연화합물에 대한 연구가 더 많이 이루어져야 한다.

인삼은 지난 수 천 년간 아시아 국가를 중심으로 약용식물로써 사용되어 왔고 지금까지 많은 연구 결과에 의해 항상성 유지, 기억력 감퇴 개선 및 지적 작업 수행효율 향상, 암 예방 효능, AIDS 바이러스(HIV) 증식억제 등 생리학적, 생화학적, 약리학적 효능이 있다고 알려져 있다[13]. 인삼이 다양한 약리 효과를 가질 수 있게 하는 성분 들 중 하나는 ginsenoside이다. ginsenoside는 60종류가 넘게 있고 그 중 일부 ginsenosides는 강한 세포독성 효과를 가지고 있다. 따라서 세계적으로 ginsenoside의 암세포사멸 유도에 관한 많은 연구가 이루어 지고 있다[8].

그 중 ginsenoside Rg3는 인삼의 주요 활성 성분으로써 이전의 연구들은 Rg3가 피부암, 폐암, 전립선암 등의 세포사멸을 유도하여 침투뿐만 아니라 전이 억제 효과를 가지고 쥐에서 면역기능을 향상 시킨다는 것을 밝혀냈다[3]. 그러나 gin-

***Corresponding author**
Tel : +82-54-530-1363, Fax : +82-54-530-1369
E-mail : namjo@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

senoside Rg3가 악성 흑색종 세포에서 성장과 전이를 어떤 경로를 통해 억제하는지에 대한 정확한 기전과 B16F10 흑색종 세포의 세포사멸에 관련되는 단백질에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 ginsenoside Rg3가 악성 흑색종 세포증식에 미치는 영향과 관련되는 단백질에 대한 연구를 그리고 다른 정상 세포와 비교하여 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

Rg3는 sigma chemical 로 부터 구하였고, dimethyl sulfoxide (DMSO, 5mg/ml)에 용해한 뒤 -80°C 초저온 냉동고에서 보관하였다. Fig. 1은 ginsenoside Rg3의 화학분자구조이다.

### 세포배양

B16F10, NIH3T3 세포는 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받았고 EA.hy.926 세포는 University of North Carolina (UNC) 대학교로부터 분양 받았다. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), penicillin, streptomycin, fetal bovine serum (FBS), Newborn Calf Serum (NBCS)는 Gibco Life Technologies (Grand Island, NY)로부터 구입하였다. B16F10, EA.hy.926 세포는 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin 그리고 100 μg/ml streptomycin을 포함하는 DMEM-high medium 에 5% $CO_2$가 공급되는 37℃ incubator 에서 배양하였다. NIH3T3은 10% Newborn Calf Serum, 100 U/ml penicillin 그리고 100 μg/ml streptomycin을 포함하는 DMEM-high medium 에 5% $CO_2$가 공급되는 37℃ incubator 에서 배양하였다.

### Cell viability assay

B16F10 cells를 96-well plates 에 각 well 당 $4\times10^3$으로 100 μl 의 medium 과 함께 분주하고 5% $CO_2$가 공급되는 incubator 에서 배양한 뒤, 각 well 마다 Rg3를 20, 40, 80, 100 ĪμM) 농도로 처리하고 24시간, 48시간 배양하였다. control group에는 Rg3를 넣지 않고 medium만 넣었다. 배양 후 medium을 제거하고 MTT Ī3-Ī4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphnyltetrazolium bromide) 20 μl/well 넣고 incubator에서 3시간 배양한 뒤 iso-propyl alcohol 을 200 μl/well 넣고 1시간 뒤 infinite reader를 이용하여 595nm에서 세포 생존능력을 측정했다. EA,hy.926 세포와 NIH3T3 세포는 $2\times10^4$으로 100 μl 의 medium 과 함께 분주하고 나머지 과정을 동일한 방식으로 진행되었다. 측정값은 3번은 반복하여 평균값으로 얻었다.

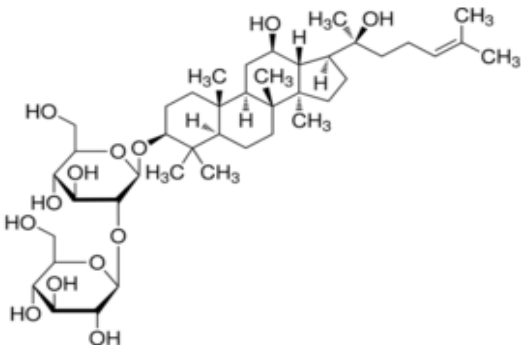

Fig. 1. Structures of ginsenosides Rg3.

### Apoptosis 검출

B16F10 cells을 chamber slide (Lab-Tak II chamber slider system, USA)에 각 well당 $4\times10^4$로 분주 한 뒤 10% fetal bovine serum을 포함하는 medium에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, Rg3를 50, 100 (μM) 농도로 처리 하고 36시간 뒤 4% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정시켜주었다. TUNEL assays는 Red in situ apoptosis Detection kit (Millipore Corporation, Billerica, MA)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. DAPI staining 은 1 μg/ml 의 DAPI가 포함되어있는 mounting solution을 떨어트리고 형광현미경을 이용하여 200배율로 무작위적으로 3개의 필드를 관찰하여 positive cell 숫자를 확인 후 평균치를 사용하였다.

### Western blot 분석

B16F10 세포를 24 시간 배양 후 Rg3를 20, 40, 80, 100 (μM) 농도 별로 처리하고 48시간 뒤 Western blot을 진행하였다. Cells을 lysis buffer에 용해 한 뒤, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 얻었다. sample은 100°C에서 10분간 가열하여 얻었고 50 μg의 단백질을 15% SDS-PAGE gel 에 의해서 크기 별로 분류하였다. Nitrocellulose membranes을 transfer 시키고 TBST에 용해시킨 5% skim milk를 이용하여 blocking 하였다. 그 뒤 β-actin (1:500), FAK (1:500) antibodies (santa cruz biotechnoloy) 와 phosho-FAK (1:1,000), Bax (1:1,000), pro-caspase (1:1,000), Bcl-2 (1:1,000), p38 (1:1,000), phosho-p38 (1:1,000) primary antibodies (Cell signaling Technology) 를 하룻동안 반응 시켰다. 그 후 anti-mouse (1:2,000) 또는 anti-rabbit (1:3,000) secondary antibodies를 이용하여 상온에서 1시간 반응 시킨 후 ECL용액 (GE Healthcare)을 이용하여 시각화 하였다.

## 결과 및 고찰

### Rg3가 B16F10 세포의 생존능력에 미치는 영향

ginsenoside Rg3가 B16F10 세포증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Rg3를 농도 별로 처리하여 MTT assay 를 실행하였다. Rg3를 농도 별로 각각 24, 48시간 처리한 결과 40 μM에서 유의적으로 세포증식이 억제 효과를 확인하였고, 100

μM 에서 24시간 처리 하였을 때는 21%, 48시간 처리 하였을 때는 50%의 세포 증식 억제 효과를 확인하였다(Fig. 2A). 그리고 Rg3를 100 μM 농도로 시간 별로 처리한 결과 12시간 처리 후 20%, 36시간 처리 후 40%, 그리고 48시간 처리 후 56%로 control 세포에 비해 시간-의존적으로 세포증식 속도가 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2B). 상기의 결과로서 Rg3가 농도, 시간 의존적으로 B16F10 세포의 세포증식 억제 효과가 있음을 확인하였다.

### Rg3가 정상 세포의 생존능력에 미치는 영향

Rg3가 B16F10 흑색종 세포의 세포증식 억제 효과를 가짐을 MTT assay를 통하여 확인하였다. 더 나아가 과연 Rg3가 흑색종 세포가 아닌 정상 세포의 세포증식에도 저해 효과가 있는 지를 알아보기 위해, HUVEC 세포로부터 분화된 인간 내피세포인 EA.hy.926 세포와 쥐 배아 섬유아세포인 NIH3T3 세포를 사용하여 실험을 진행하였다. Rg3을 EA.hy.926 세포와 NIH3T3세포에 0, 20, 40, 80, 100 (μM) 농도로 각각 24시간, 48시간 처리 후 MTT assay를 실행하였다. 그 결과, EA.hy.926 세포를 24시간 배양 했을 때, control에서의 세포 생존능력은 85%였고, Rg3를 100 μM 처리 했을 때는 75%였다. EA.hy.926 세포를 48시간 배양했을 때, control에서의 생존능력은 80%, Rg3를 100 μM 처리 했을 때는 79%였다. NIH3T3 세포를 24시간 배양 했을 때, control 에서의 세포 생존능력은 82%였고, Rg3 100 μM 에서는 84%였다. NIH3T3 세포를 48시간 배양했을 때, control에서의 생존능력은 93%, Rg3 100 μM 처리 했을 때는 85% 였다(Fig. 3A-B).

상기의 결과로서, Rg3가 B16F10세포가 아닌 정상세포인 EA.hy.926, NIH3T3의 세포증식에는 영향을 미치지 않는 다는 것을 확인할 수 있었다.

### Rg3처리에 의한 B16F10 cells의 apoptosis 효과 관찰

Rg3에 의한 B16F10 세포의 세포사멸 효과를 확인하기 위해 DAPI 와 tunnel staining을 시행하였다. Rg3를 50, 100 μM 처리한 군에서 control과 비교 시 세포의 수가 줄어 들었다는 것을 DAPI 염색결과 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 세포사멸이 일어나면, 핵의 모양이 변화하고 염색시약의 투과성이 증가한다. DAPI 염색을 통해 이러한 변화들을 비교함으로써 정상세포와 사멸세포를 구분할 수 있다. 기본적으로 세포사멸이 일어나면 세포의 대칭이 깨지고, nuclear chromatin의 compaction과 fragmentation이 일어나며, cytosol이 수축하고, DAPI 투과성이 커짐으로써 intensity가 증가한다. 세포사멸을 확인하는 방법 중 다른 하나는 Tunel assay이다. Tunel은 TdT (terminal deocynucleotidyl transferase)라는 효소를 이용해 UTP (uridine triphosphate)를 DNA 조각 말단에 붙여

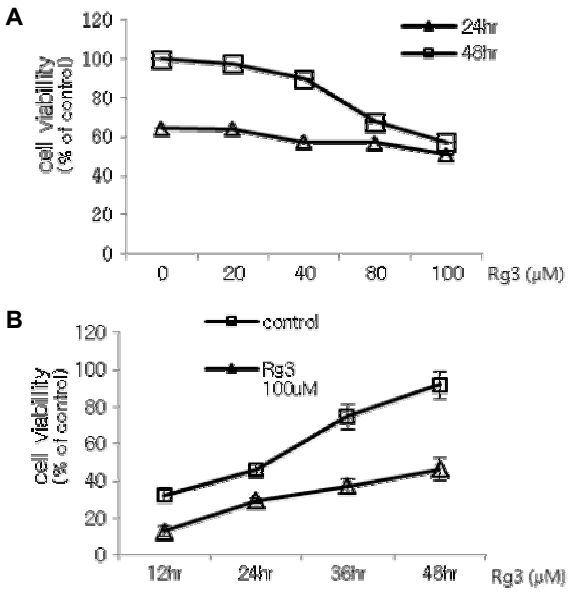


Fig. 2. Effect of the treatment of Rg3 on the cell viability in melanoma cancer cells. (A) The B16F10 cells were incubated for 24 hr, 48 hr in the presence of Rg3 (0, 20, 40, 80, 100 μM ) concentrations. (B) The B16F10 cells were incubated for 12 hr, 24 hr, 36 hr, 48 hr in Rg3 100 μM concentrations or without Rg3. Values are each the mean ± S.D. of three experiments.

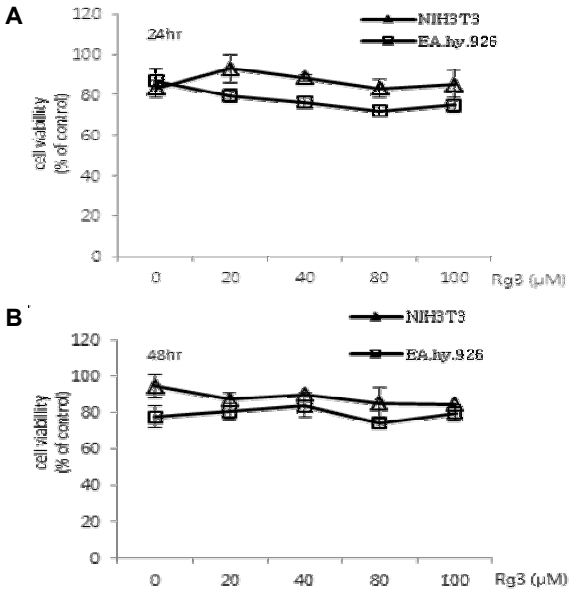


Fig. 3. Effect of the treatment of Rg3 on the cell viability in EA.hy.926 and NIH3T3 cells. (A) The EA.hy.929 and NIH3T3 cells ($2\times10^4$cells/well) were seeded in 96-well plates and treated with ginsenoside Rg3 concentrations (0, 20, 40, 80, 100 μM ) for 24 hr. (B) The EA.hy.929 and NIH3T3 cells ($2\times10^4$cells/well) were seeded in 96-well plates and treated with ginsenoside Rg3 concentrations (0, 20, 40, 80, 100 μM ) for 48 hr. Values are each the mean ± S.D. of three experiments.

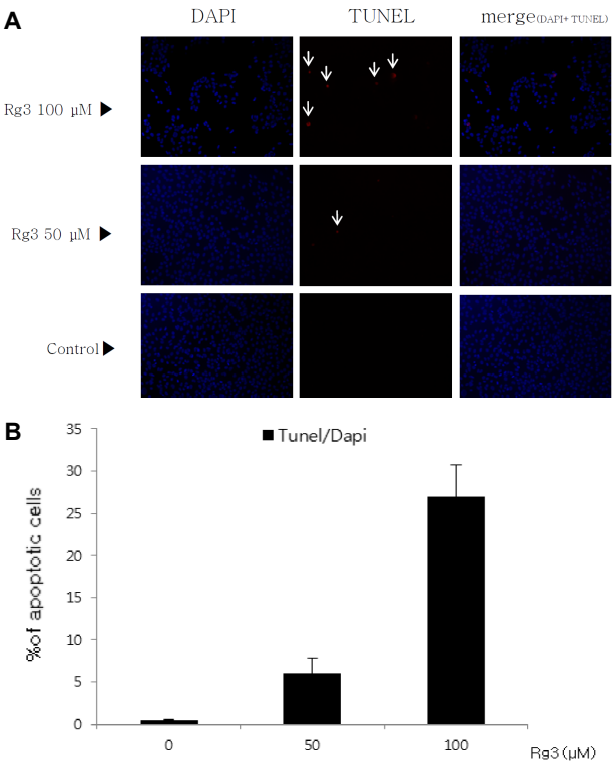


Fig. 4. Apoptotic cell death of B16F10 cells of Rg3 50, 100 μM concentrations. (A) The total number of B16F10 cells in a given area was determined by using DAPI staining. Apoptotic cells were examined by fluorescence microscopy after TUNEL staining. (B) Quantification of TUNEL-positive cell number / DAPI stained cell number. Values are mean ± S.D. of three experiments, with triplicate of each experiment.

그 DNA fragmentaion이 일어나는지 여부를 파악하는 실험 방법으로서 세포사멸에 의한 DAN fragmentation 정도를 측정할 수 있다. Tunel 염색 결과, Rg3을 처리한 군에서 control 군에 비해 Tunel positive한 이미지 결과가 많이 나타남을 확인하였고, 형광 광도 또한 Rg3를 처리한 군에서 농도에 의존적으로 강해짐을 확인하였다(Fig. 4A). Fig. 4A의 결과를 정량화 한 결과, Rg3를 50, 100 μM 처리 후 apoptotic cell이 각각 6%, 27.6% 의 비율을 보인 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4B).

상기의 결과로서 Rg3가 농도의존적으로 B16F10의 세포사멸을 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

### Rg3가 apoptosis 관련 단백질에 미치는 영향

Rg3에 의한 B16F10의 세포사멸 효과의 기전을 알아보기 위해 apoptosis 관련 단백질에 관하여 알아보았다. FAK (focal adhesion kinase)은 암세포 초기 이동에 중요한 단백질로서 FAK이 세포간의 상호작용에 의하여 활성화 되면 세포외 matrix와 접촉하는 세포 내 신호전달 경로를 유도하여 세포의 이동을 촉진하므로 암세포의 전이를 가능하게 한다.

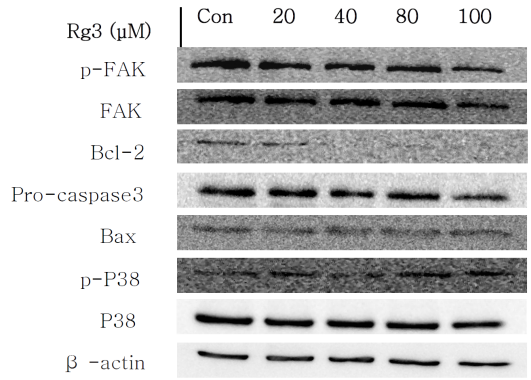


Fig. 5. Effects of ginsenoside Rg3 on protein expression related to apoptosis. After treatment with ginsenoside Rg3 (0, 20, 40, 80, 100 μM) concentrations and for 48hr, the cells were lysed and performed to western blotting. The equal amount of loading was confirmed by the quantification of β-actin.

Bax는 세포사멸을 유도하는 단백질이며 반면에 Bcl-2는 세포의 생장을 촉진하는 단백질이다. Apoptosis 과정이 일어나기 위해선 Bax와 Bcl-2사이의 비율이 중요하다[14]. p38은 발암유전자의 활성을 억제하고 세포의 이상증식 억제하는데 중요한 역할을 한다. caspase3는 apoptosis 과정에 있어서 primary effector caspase 중 하나이고 암의 진행에 있어서 중요한 역할을 한다. 세포사멸 관련 단백질들을 조사해본 결과, Rg3을 농도 별로 처리하였을 때 control에 비해 FAK의 인산화가 점진적으로 줄어드는 것을 확인하였고, Bcl2와 pro-caspase3 단백질의 발현도 줄어듬을 확인하였다. 그리고 p38단백질의 인산화와 Bax 단백질의 발현은 증가함을 확인하였다 (Fig. 5). 상기의 결과로서, Rg3는 FAK의 활성을 억제하고 anti-apoptotic proteins의 발현 및 활성을 감소시키고 pro-apoptotic proteins의 발현 및 활성을 증가시키는 것을 확인하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2012학년도 경북대학교 학술연구비와 2013년도 교육부의 재원으로 지원을 받아 수행된 기초연구 사업임 (NRF-2013R1A1A2064784).

## References

1. Cai, J., Cao, Y., Cheng, H., Ge, X., Ma, J., Sun, X., Yang, B., Yang, X., Zhang, C., Zhang, S. and Zhen, F. 2014. Ginsenoside Rg3 enhances radiosensitization of hypoxic oesophageal cancer cell lines through vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor 1α. *J Int Med Res* **42**, 628-640.
2. Chang, K. H., Jo, M. N., Kim, K. T. and Paik, H. D. 2014.

Evaluation of glucosidases of Aspergillus niger strain comparing with other glucosidases in transformation of ginsenoside Rb1 to ginsenosides Rg3. *J Ginseng Res* **38,** 47-51.
3. Chen, J., He, X., Peng, H. and Yang, X. O. 2008. Research on the antitumor effect of ginsenoside Rg3 in B16 melanoma cells. *Melanoma Res* **18,** 322-329
4. Cheong, J. H., Hong, E. Y., Kim, H. J., Park, I. H., Park, S., Peña, I. D., Ryu, J. H. and Yoon, S. Y. 2013. Effects of ginseol k-g3, an Rg3-enriched fraction, on scopolamine-induced memory impairment and learning deficit in mice. *J Ginseng Res* **38,** 1-7.
5. Cho, J. S., Choi, S. S., Han, S. B., Hong, J. T., Kim, S. M., Lee, S. Y., Oh, K. W., Son, S. M., Yoon, do. Y., Yoo, H. S. and Yun, Y. P. 2010. Combination of ginsenoside Rg3 with docetaxel enhances the susceptibility of prostate cancer cells via inhibition of NF-kappaB. *Eur J Pharmacol* **631**, 1-9.
6. Choi, K. C., Choi, W. I., Ham, J., Jang, H. J., Jeon, B. N., Kang, K. S., Kim, K., Kim, T. J., Kim, Y. J. and Ko, H. 2014. Stereospecific effects of ginsenoside 20-Rg3 inhibits TGF-β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and suppresses lung cancer migration, invasion and anoikis resistance. *Toxicology* **322,** 23-33.
7. Choi, S. Y., Eom, D. W., Ham, J. Y., Han, D. J., Jang, H. J., Kang, K. S., Kim, S. S., Kim, Y. H., Kim, Y. J., Lee, J. H., Oh, M. Y. and Wee, Y. M. 2014. Ginsenoside rg3 enhances islet cell function and attenuates apoptosis in mouse islets. *Transplant Proc* **46,** 1150-1155
8. Chun, J. M., Ha, Y. M., Han, Y., Joo, E. J., Kim, J. S., Kim, Y. S. and Lee, J. H. 2012. Induction of Apoptosis by Ginsenoside Rk1 in SK-MEL-2-Human Melanoma. *Arch Pharm Res* **35**, 717-722.
9. Dandin, V. S., Lee, E. J., Murthy, H. N. and Paek, K. Y. 2014. Efficacy of ginseng adventitious root extract on hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* **153,** 917-921.
10. Fang, J. P., Lao, C. H., Wang, J. C., Xia, T., Xu, L. H., Xu, W. and Ye, Q. X. 2014. 20S-Ginsenoside Rh2 induces apoptosis in human Leukaemia Reh cells through mitochondrial signaling pathways. *Biol Pharm Bull* **37,** 248-54.
11. Hai, Y. N., Nan, K. J., Nie, Y. L., Sun, H. F., Wang, S. H., Wang, Y. C. and Yuan, Z. L. 2013. Antiproliferative Activity of the Chinese Medicinal Compound, Delisheng, Copa-pared With Rg3 and Gemcitabine in HepG2 Cells. *Indian J Pharm Sci* **75,** 578-584
12. Jin, Y., Kim, Y. J., Quan, L. H., Wang, C. and Wang, T. R. and Yang, D. C. 2013. Isolation and characterization of novel ginsenoside-hydrolyzing glycosidase from Microbacterium esteraromaticum that transforms ginsenoside Rb2 to rare ginsenoside 20(S)-Rg3. *Antonie Van Leeuwenhoek* **104,** 129-137.
13. Jung, E. Y., Kim, J. W., Kwon, S. M., Kwon, Y. H., Lee, B. Y., Lee, J. H. and Lee, Y. M. 2012. Ginsenoside Rg3 attenuates tumor angiogenesis via inhibiting bioactivities of endothelial progenitor cells. *Cancer Bio Ther* **13,** 504-515.
14. Kang, H. S., Kim, J. S., Kim, S. J. and Park, H. M. 2012. Reactive oxygen species mediated ginsenoside Rg3 and Rh2-induced apoptosis in hepatoma cells through mitochondrial signaling pathways. *Food Chem Toxicol* **50,** 2736-2741

---

## 초록 : ginsenoside Rg3에 의한 B16F10 흑색종 세포의 세포사멸 유도

이슬기[1] · 김병수[1] · 남주옥[1]*
([1]경북대학교 생태환경전공)

Ginsenoside Rg3는 홍삼으로부터 추출한 활성 성분들 중 하나로 한방 의학에선 원기를 회복시키는 약제로 잘 알려져 있는 인체에 유효한 화학 성분이다. Rg3는 지금까지 많은 연구들에 의하여 다양한 암세포로부터 강력한 항암효과를 가진다고 알려져 있다. 그러나 Rg3가 악성 흑색종 세포에서 어떻게 세포사멸을 유도하는지에 대한 작용 기작은 명백하게 밝혀지지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 ginsenoside Rg3가 B16F10 흑색종 세포에서 세포사멸 유도 활성 및 기전에 관한 영향을 조사하였다. 세포 생존력을 MTT assay 법으로 수행한 결과, B16F10 세포에선 농도 의존적으로 세포증식 저해 효과가 나타났고 정상세포인 EA.hy.926 과 NIH3T3 에서는 나타나지 않았다. B1610 세포에 Rg3를 농도 별로 처리 후, TUNEL 염색을 한 결과 세포사멸이 농도 의존적으로 증가 하는 것을 확인 할 수 있었다. Western blot 분석을 실시한 결과, Rg3를 처리한 B16F10 세포에서 p-FAK, Bcl-2, pro-caspase3 단백질들의 발현이 감소 되었고 이와 반대로 Bax, p-p38의 발현은 증가되었다. 따라서, 본 연구에서는 Rg3가 B16F10 흑색종 세포에서 항암제의 agent로써 사용 될 수 있다는 것을 입증하였다.