

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2019.5.2.113>

Enhanced macrophage uptake of radiolabeled liposome triggered by ginseng extracts

Woonghee Lee¹, Man Hee Rhee², Jeongsoo Yoo^{1,*}

¹ Department of Molecular Medicine, BK21 Plus KNU Biomedical Convergence Program, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea;

² College of Veterinary Medicine and Stem Cell Research Therapeutic Institute, Kyungpook National University, Daegu, Korea

ABSTRACT

During tumor progression various immunosuppressive cells are recruited to a tumor microenvironment (TME). Tumor-associated macrophages (TAMs) are particularly abundant in TME. Based on their function, macrophages are categorized into two phenotypes: tumoricidal M1 and tumor-supportive M2. Generally, TAMs closely resemble M2-macrophages and lead to tumor growth. However, their phenotype can be changed by immune activator from M2 to M1 and thus promote tumor immunotherapy. Ginseng extracts are well known for its anti-tumor and anti-inflammatory effects from numerous reported studies. However, the mechanism of their effects is still not clear. Recently, some studies suggested that ginseng extracts induced immune activation as well as anti-tumor activities by a repolarization of activated macrophage from M2 phenotype to M1 phenotype. But, further verification about the mechanism as to how ginseng extracts can stimulate the immune response is still needed. In this study, we investigated whether ginseng extracts can alter the phenotype from M2 macrophages to M1 macrophages in mice by using a radiolabeled liposome. And we also evaluated the potential of radiolabeled liposome as a nuclear imaging agent to monitor the transition of phenotype of TAMs. In conclusion, the ginseng extracts seem to change the phenotype of macrophages from M2 to M1 like as lipopolysaccharide (LPS) in mice.

Key Word: Ginseng extracts, Tumor-associated macrophages, M1 phenotype, Liposome

Introduction

종양 미세환경 (Tumor microenvironment, TME)에는 암세포뿐만 아니라 다양한 종류의 세포들이 함께 공존하는 복잡한 세포 생태계로 구성되어있다(1,2). TME에서는 암세포와 여러 세포들간에 직접적인 접촉 혹은 사이토카인, 성장인자 등을 통한 신호전달과정에 의해 암세포 성장이 용이한 환경이 조성되고 종양이 악성 종양으로 변환되는 특성을 보인다(1-4). 종양 관련 대식세포 (Tumor-associated macrophages,

TAMs)는 TME에서 쉽게 관찰되는 면역 세포들 중 한 종류이며, 여러 연구 결과들을 통해서 종양의 형성과 성장을 돕는 특징을 지니고 있음을 확인할 수 있다(5-9). 특히 TAMs는 혈관 신생성, 암세포 침윤, 이동능 및 혈관 내 침윤 등 종양의 진행에 관련된 중요 과정들에 관여할 뿐만 아니라 암의 전이에서 암 세포의 혈관 외 탈출 및 성장 촉진에도 관여한다고 보고되었다(5-7).

대식세포는 M1 과 M2로 분극화 (Polarization) 될 수 있는데, M1 대식세포는 염증발생 과정에서 아직 악성 종양이 되지 않은 변종 세포들을 죽임으로써 종양의

Received: December 12, 2019 / Revised: December 26, 2019 / Accepted: December 28, 2019

Corresponding Author : Jeongsoo Yoo, Department of Molecular Medicine, BK21 Plus KNU Biomedical Convergence Program, School of Medicine, Kyungpook National University, 680 Gukchaebosang-ro, Joon-gu, Daegu 41944, Korea
Tel: +82-53-420-4947, Fax: +82-53-426-4944, E-mail: yooj@knu.ac.kr

Copyright©2019 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

성장을 막는 역할을 하고 M2 대식세포는 종양의 형성 및 성장을 돕는 역할을 한다(5-8). 대식세포는 재분극화 (Repolarization)를 통해 표현형 전환이 가능하고, TAMs에서 높은 비중을 차지하는 M2 대식세포를 M1 대식세포로 재분극화할 수 있는 화합물, 성장인자, 전사인자, 리간드, 효소 등에 대한 스크리닝 연구와 함께 M1 대식세포 재분극화 유발물질을 TAMs에 효과적으로 전달하기 위한 새로운 방법들에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다(10-16).

기존에 이미 널리 약물전달체로 활용되는 리포솜과 같은 나노입자들을 M1 대식세포 재분극화 유발물질을 TAMs에 전달하는데 활용할 수 있으나, 나노입자들은 일반적으로 M1 대식세포에 더 높게 축적되는 특성을 나타낸다(17). 나노입자를 M1 대식세포가 아닌 M2 대식세포에 선택적으로 전달하고자 mannose, M2pep, anti-MMR nanobody 등 M2 대식세포에 대한 특정한 타겟팅 리간드를 나노입자 표면에 결합하는 방법이 활용되고 있다(10,12,18,19). 이처럼 종양의 암세포뿐만 아니라 종양 주변 면역세포 TAMs를 종양의 치료의 표적으로 여기며 TME 자체를 변화시키는 일종의 새로운 면역 치료법에 대한 연구들이 현재 수행되고 있다(18-20).

인삼은 항암활성, 면역증진 등의 효능을 보이며 현재 면역조절 기능성 식품으로 큰 관심을 받고 있으며, 인삼에는 주요 약효성분으로 알려진 사포닌 이외에도 단백질, 아미노산, 다당류, 알칼로이드, 지방산, 펩티드 화합물, 비타민, 미네랄 등 다양한 성분들이 존재한다(21,22). 여러 연구들을 통하여 약리 효능을 띠는 인삼 추출물의 주요한 성분들을 검증해오고 있으나 아직 각 성분들에 대한 효능 및 정확한 작용기전에 관한 연구는 부족한 실정이다(21-24). 그러나 최근 일부 연구에서 인삼추출물이 대식세포의 표현형을 M2에서 M1으로 효과적으로 재분극화할 수 있는 특성을 지녔고(25,26), TAMs에서 M1 대식세포의 비중을 증가하여 궁극적으로 종양의 성장을 저해한다는 새로운 작용기전을 제시한 연구결과들이 발표되었다(27,28). 따라서 새롭게 제시된 인삼추출물의 종양 성장 저해에 관한 작용기전을 검증할 필요가 있다.

본 연구팀에서는 지난 연구에서 방사성추적자

(Radiotracer)가 표지된 리포솜 (Liposome)을 사용하여 마우스 대장암 모델에서 positron emission tomography (PET) 영상 기법으로 리포솜의 장기들에 대한 축적 정도를 영상화하는 연구를 수행하였고, 활용한 방사성추적자가 표지된 리포솜이 종양에 대하여 높게 축적되며 오랜 시간 잔류하는 특성을 확인하였다(29).

지난 연구에서 사용한 마우스 대장암 모델은 고형암으로 TME에 TAMs가 많이 분포하는 특징을 지녔기에 TAMs 연구에서 종양 모델로 많이 활용되고 있으며(14,23,30), 방사성추적자가 표지된 리포솜 역시 종양에서 과발현되는 특정한 수용체에 대한 타겟팅 리간드가 결합되지 않았으며 순전히 enhanced permeability and retention (EPR) 효과에 의해 상대적으로 혈관벽에 형성된 신생혈관을 빠져나가 종양조직으로 전달되어 TAMs에 축적되어 잔류되는 특징을 확인하였다(29,31).

따라서 방사성추적자가 표지된 리포솜을 종양의 TAMs의 분포 수준을 영상화하는 방사성 진단 조영제로 충분히 활용할 수 있다고 판단되나 이번 연구에서는 종양모델을 이용한 연구에 앞서 먼저 정상 마우스를 활용한 연구를 진행하였고, 방사성추적자가 표지된 리포솜이 마우스 체내 M1 대식세포에 높게 축적되는 특성을 활용하여 인삼추출물이 M2 대식세포를 M1 대식세포로 재분극화 하는 작용기전을 생체분포확인 실험으로 확인하였다. 또한 대식세포의 표현형을 M1으로 재분극화한다고 알려진 lipopolysaccharide (LPS) 처리 그룹을 비교군으로 두고 결과를 비교검증하였다.

Materials and Methods

1. 기기 및 재료

방사성동위원소 ¹³¹I 용액을 Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI, Daejeon, Korea)으로부터 구입하였으며, 인삼추출물은 이만휘 교수가 분말 형태로 친절히 제공하였다.

2. 방사성 표지

방사성추적자로 사용한 hexadecyl-4-iodobenzoate (HIB)는 지난 연구에서와 동일한 방법을 사용하여 합성 및 방사성표지를 진행하였다(29). 간략히 HIB의 합성은 1-hexadecanol, 4-iodobenzoyl chloride, triethyl-amine과 CH_2Cl_2 의 혼합물을 상온에서 반응한 후 용매는 감압하에서 제거하고 잔여물을 hexane/ CH_2Cl_2 로 추출하여 흰색의 결정형태로 얻었다. 방사성요오드로 HIB를 표지하기 위해 전구체인 hexadecyl-4-tributylstannylbenzoate를 합성하였는데 그 과정은 hexabutyliditin과 tetrakis(triphenylphosphine) palladium을 toluene 용매하의 HIB에 첨가한 후, 혼합물 용액의 색이 검은색이 될 때까지 reflux시켜 준 후 잔여물을 column chromatography (silica, hexane:ethyl acetate = 20:1)를 통하여 무색의 오일형태로 얻었다. 방사성표지도 동일하게 진행되었고, hexadecyl-4-tributylstannylbenzoate에 HCl, 방사성요오드 (^{131}I), 그리고 H_2O_2 를 넣은 후 30분간 반응하였다. 표지 수율은 방사선 얇은 막 크로마토그래피 (radio-TLC; silica, hexane:ethyl acetate = 20:1)를 이미지 스캐너 (AR-2000, Bioscan, USA)로 확인하였다.

3. 방사성요오드화 리포솜 합성

방사성추적자 표지 리포솜 역시 지난 연구에서와 동일한 방법을 사용하여 합성하였다(29). 리포솜의 조성은 Gd이온 표지 지질 1종을 제외한 것 이외에는 지난 연구와 동일한 조성비로 구성되었고, 간략히 방사성요오드

표지 HIB (^{131}I HIB)와 함께 2 종류의 지질과 콜레스테롤, 폴리에틸렌글리콜을 CHCl_3 용매하에 혼합하여 thin film - hydration - extrusion 방법으로 균일한 크기의 방사성요오드화 리포솜을 합성하였다(Figure 1).

4. 생체분포확인 실험

생체분포확인 실험은 먼저 인삼추출물이 마우스 체내 대식세포의 활성을 변화시킬 수 있는지 확인해보기 위해 진행하였고, 2 mg의 인삼추출물을 BALB/c 마우스 복강에 주사하였다. 1시간 이후 방사성요오드화 리포솜 200 μL (0.74 MBq)를 마우스 꼬리정맥으로 투여하고, 24시간 후에 생체분포확인 실험을 진행하였다. 이때 대조군으로 인삼추출물을 주사하지 않은 그룹과 함께 리포솜 주사 6시간 전부터 2시간 간격으로 총 4번 LPS (100 μg each)를 마우스 복강에 주사한 그룹을 두고 각 그룹들에서 체내 장기들에 대한 분포를 비교해보며 대식세포의 표현형이 M2에서 M1으로 재분극화되는 작용기전을 검증해보았다 (n = 2 each). 생체분포확인 실험은 먼저 마우스를 경추 탈골시켜 희생시킨 후 심장으로부터 혈액을 채취하고 다른 중요 장기조직들을 적출하여 혈액을 잘 제거한 후 무게를 측정하고 감마카운터 (1480 Wizard, Wallach, Finland)를 이용해 방사능을 측정하는 방식으로 진행하였다. 조직에 축적된 방사성동위원소의 양은 조직의 무게당 넣어준 방사성동위원소의 퍼센트 (%ID/g)로 계산하였다.

이와 같은 실험에는 생후 6~8주령의 암컷 BALB/c 마우스를 Hyochang Science (Daegu, Korea)로 부터 구매하여 사용하였고, 이때 동물에 관련된 모든 절차 및

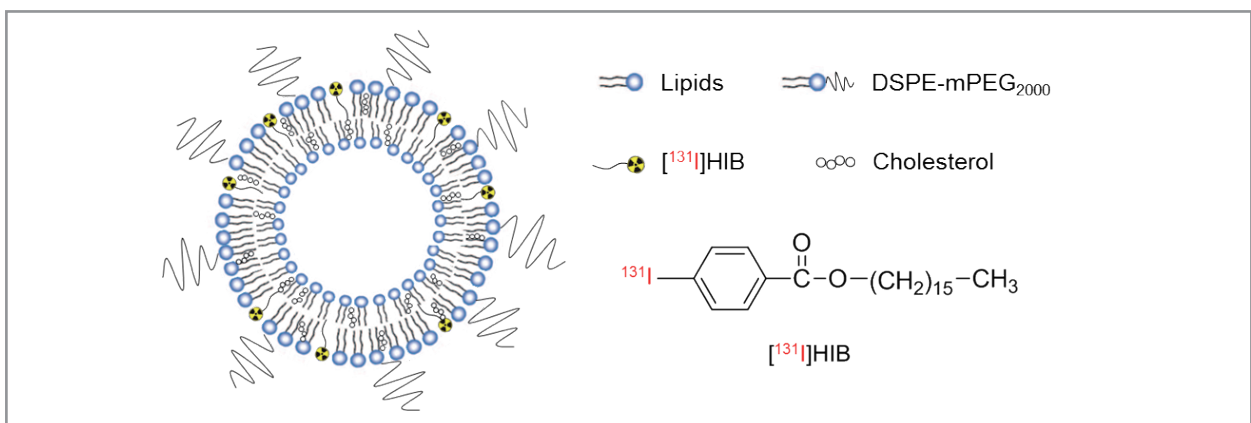


Figure 1. Schematic illustration of ^{131}I HIB-liposome and chemical structure of ^{131}I HIB.

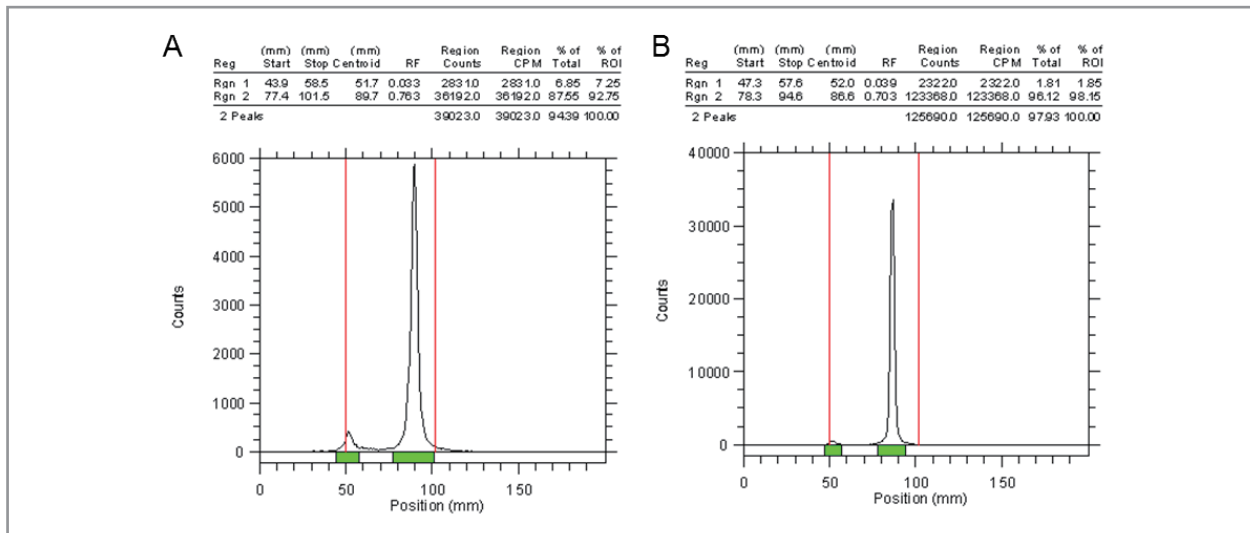


Figure 2. Radio-TLC chromatogram of $[^{131}\text{I}]\text{HIB}$. (A) Radiolabeling mixture; (B) Purified sample.

실험은 경북대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인을 받아 지침에 따라 수행하였다 (승인번호: 2016-0024).

Results and Discussion

1. 방사성요오드화 리포솜 합성

인삼추출물이 종양 관련 대식세포를 재분극하는데 주요 인자로 관여함으로써 궁극적으로 종양 성장 저해를 일으키는 작용기작을 확인하기 위하여 지난 연구에서 활용된 방사성요오드로 표지된 리포솜을 이번 연구에서도 동일한 과정으로 준비하였다(Figure 1). 먼저 방사성 추적자를 준비하였고 HIB전구체를 사용하여 방사성요

오드 ^{131}I 로 표지반응을 진행하였다. $[^{131}\text{I}]\text{HIB}$ 표지수율은 약 93%였으며(Figure 2A), 정제 후에는 98% 이상의 매우 우수한 방사화학적 순도를 보여주었다(Figure 2B). 그런 다음 지난 연구에서와 동일한 조성비로 방사성 추적자 $[^{131}\text{I}]\text{HIB}$ 를 포함한 이외의 리포솜의 구성 성분들을 모두 혼합하여 thin film - hydration - extrusion 과정을 통하여 2시간 이내에 손쉽게 방사성 요오드화 리포솜을 합성할 수 있었다.

2. 생체분포확인 실험

먼저 마우스에 인삼추출물 처리 유무에 따른 마우스 체내 대식세포의 활성을 확인하기 위한 생체분포확인 실험을 진행하였고, 그 결과 인삼추출물의 처리로 인하여 방사성요오드화 리포솜의 섭취가 혈액, 비장,

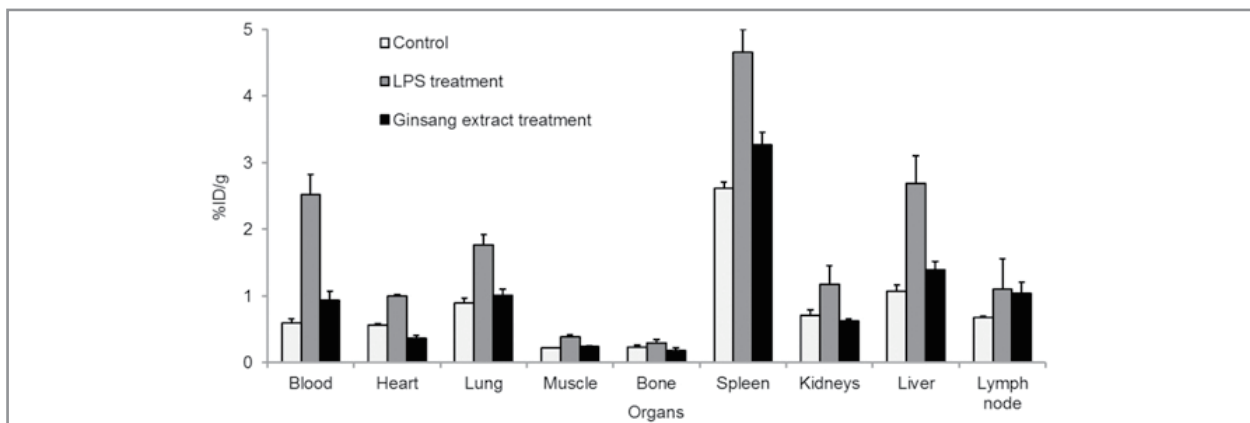


Figure 3. Biodistribution data of $[^{131}\text{I}]\text{HIB}$ -liposome in normal BALB/c mice intraperitoneal (i.p.) injected with LPS or ginseng extracts obtained 24 h post injection (n = 2 each).

간, 림프절에서 대조군 대비 대략 30 % 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 3). 이러한 증가가 실제로 마우스 체내 대식세포의 활성이 변화함에 기인하는 것인지 검증하기 위하여 마우스 체내 대식세포 염증 단백질(Macrophage inflammatory protein, MIP)을 급격히 증가시키며 대식세포의 표현형을 M1으로 재분극화를 유도하여 대식세포의 대식작용에 대한 활성을 증가시킨다고 알려진 LPS를 마우스 복강에 반복적으로 처리한 그룹을 비교군으로 두어 장기들에 대한 방사성요오드화 리포솜의 섭취를 확인해보았다(14, 17, 26, 32). 그 결과 LPS를 처리한 그룹에서는 처리하지 않은 대조군 대비 모든 장기에서 급격하게 섭취가 증가하였고, 특히 그 증가 비율이 혈액에서는 4.2배, 간 2.5배, 비장 1.8배, 림프절 1.6배로 면역세포들이 많이 존재하는 것으로 알려진 장기들에서 그 증가 비율은 더욱 높았다(7, 11, 16). 따라서 LPS만큼 M1 대식세포로의 재분극화 및 대식세포의 활성을 급격하게 유도하지는 않았으나 인삼 추출물도 LPS처리군에 대한 결과와 대부분의 장기들에서 동일한 경향성을 확인할 수 있었기에 M1 대식세포로 재분극화를 유도함을 확인하였고, 체내 대식세포의 활성을 변화시킬 수 있음은 뚜렷하게 확인할 수 있었으며 방사성요오드화 리포솜이 마우스 체내의 대식세포의 활성변화와 재분극화에 반응함을 확인하였다.

Conclusion

인삼추출물이 대식세포의 활성을 변화시켜 M1 대식세포로 재분극화를 유도함을 확인하였고, 방사성요오드화 리포솜이 변화된 마우스 체내 대식세포의 활성과 재분극화에 효과적으로 반응함을 확인하였다. 따라서 아직 추가적으로 진행해야 할 연구들이 남겨진 상황이지만 방사성요오드화 리포솜이 대식세포의 M1, M2표현형의 분포 수준을 평가할 수 있는 방사성 진단 조영제로 활용될 수 있다는 가능성은 확인해볼 수 있었다. 추가로 보다 명확한 검증을 위해 먼저 인삼추출물의 성분들에 대한 정보를 확인해보고자 하며, 인삼추출물의 처리 유무에 따른 대식세포의 활성과 TAMs의 재분극화에 대한 변화를 종양모델에서 직접 생체분포확인 실험을 통해 확인해보고자 한다. 또한 그와 같은 변화들을

PET 을 이용해 직접 영상으로 모니터링 하는 연구를 함께 진행해보고자 한다.

Acknowledgments

본 연구는 한국연구재단 방사선융합기술개발사업(2017M2A2A6A02018506), 중견연구자지원사업(2019R1A2C2084313)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 다른 이해관계는 없음을 밝힙니다.

References

1. Mbeunkui F, Johann DJ, Jr. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;63:571-582.
2. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013;19:1423-1437.
3. Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2005;7:513-520.
4. Hembruff SL, Cheng N. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. *Cancer Ther* 2009;7:254-267.
5. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014;41:49-61.
6. Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H, Zou Z. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci* 2019;26:78.
7. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers* 2014;6:1670-1690.
8. Brune B, Weigert A, Dehne N. Macrophage Polarization In The Tumor Microenvironment. *Redox Biol* 2015;5:419.
9. Dehne N, Mora J, Namgaladze D, Weigert A, Brune

- B. Cancer cell and macrophage cross-talk in the tumor microenvironment. *Curr Opin Pharmacol* 2017;35:12-19.
10. Ngambenjawong C, Gustafson HH, Pun SH. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. *Adv Drug Deliver Rev* 2017;114:206-221.
 11. Vasievich EA, Huang L. The Suppressive Tumor Microenvironment: A Challenge in Cancer Immunotherapy. *Mol Pharmaceut* 2011;8:635-641.
 12. Muraoka D, Seo N, Hayashi T, Tahara Y, Fujii K, Tawara I, et al. Antigen delivery targeted to tumor-associated macrophages overcomes tumor immune resistance. *J Clin Invest* 2019;129:1278-1294.
 13. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol* 2016;17:34-40.
 14. Green CE, Liu T, Montel V, Hsiao G, Lester RD, Subramaniam S, et al. Chemoattractant Signaling between Tumor Cells and Macrophages Regulates Cancer Cell Migration, Metastasis and Neovascularization. *Plos One*. 2009;4:e6713.
 15. Zhang F, Parayath NN, Ene CI, Stephan SB, Koehne AL, Coon ME, et al. Genetic programming of macrophages to perform anti-tumor functions using targeted mRNA nanocarriers. *Nat Commun* 2019;10:3974.
 16. Galluzzi L, Chan TA, Kroemer G, Wolchok JD, Lopez-Soto A. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Sci Transl Med* 2018;10:459.
 17. Qie Y, Yuan H, von Roemeling CA, Chen Y, Liu X, Shih KD, et al. Surface modification of nanoparticles enables selective evasion of phagocytic clearance by distinct macrophage phenotypes. *Sci Rep* 2016;6:26269.
 18. Han S, Wang W, Wang S, Wang S, Ju R, Pan Z, et al. Multifunctional biomimetic nanoparticles loading baicalin for polarizing tumor-associated macrophages. *Nanoscale* 2019;11:20206-20220.
 19. Hu GR, Guo MF, Xu JJ, Wul F, Fan JS, Huang Q, et al. Nanoparticles Targeting Macrophages as Potential Clinical Therapeutic Agents Against Cancer and Inflammation. *Front Immunol* 2019;10:1998.
 20. Cully M. CANCER Re-educating tumour-associated macrophages with nanoparticles. *Nat Rev Drug Discov* 2018;17:468.
 21. Ahuja A, Kim JH, Kim JH, Yi YS, Cho JY. Functional role of ginseng-derived compounds in cancer. *J Ginseng Res* 2018;42:248-254.
 22. Lee SM, Bae BS, Park HW, Ahn NG, Cho BG, Cho YL, et al. Characterization of Korean Red Ginseng (Panax ginseng Meyer): History, preparation method, and chemical composition. *J Ginseng Res* 2015;39:384-391.
 23. Baek KS, Yi YS, Son YJ, Jeong D, Sung NY, Aravinthan A, et al. Comparison of anticancer activities of Korean Red Ginseng-derived fractions. *J Ginseng Res* 2017;41:386-391.
 24. Byeon SE, Lee J, Kim JH, Yang WS, Kwak YS, Kim SY, et al. Molecular mechanism of macrophage activation by red ginseng acidic polysaccharide from Korean red ginseng. *Mediators Inflamm* 2012;2012:732860.
 25. Paul S, Shin HS, Kang SC. Inhibition of inflammations and macrophage activation by ginsenoside-Re isolated from Korean ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer). *Food Chem Toxicol* 2012;50:1354-1361.
 26. Yayeh T, Jung KH, Jeong HY, Park JH, Song YB, Kwak YS, et al. Korean Red Ginseng Saponin Fraction Downregulates Proinflammatory Mediators in LPS Stimulated RAW264.7 Cells and Protects Mice against Endotoxic Shock. *J Ginseng Res* 2012;36:263-269.
 27. Zhang YF, Qiu ZD, Qiu Y, Su T, Qu P, Jia AL. Functional Regulation of Ginsenosides on Myeloid Immunosuppressive Cells in the Tumor Microenvironment. *Integr Cancer Ther* 2019;18:1534735419886655.
 28. Cao M, Yan H, Han X, Weng L, Wei Q, Sun X, et al. Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth. *J Immunother Cancer* 2019;7:326.
 29. Kim J, Pandya DN, Lee W, Park JW, Kim YJ, Kwak W, et al. Vivid tumor imaging utilizing liposome-carried bimodal radiotracer. *ACS Med Chem Lett* 2014;5:390-394.

30. Sun P, Wang H, He Z, Chen X, Wu Q, Chen W, et al. Fasting inhibits colorectal cancer growth by reducing M2 polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget* 2017;8:74649-74660.
31. Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* 2017;17:20-37.
32. Yi PF, Bi WY, Shen HQ, Wei Q, Zhang LY, Dong HB, et al. Inhibitory effects of sulfated 20(S)-ginsenoside Rh2 on the release of pro-inflammatory mediators in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Eur J Pharmacol* 2013;712:60-66.