

## Ginsenoside Panaxadiol 및 Panaxatriol의 혈관 신생 억제 작용에 관한 연구

부산대학교 분자생물학과, <sup>1</sup>한국인삼연초연구소

정주원 · 문은정 · 김신일<sup>1</sup> · 백남인<sup>1</sup> · 김규원

### Anti-Angiogenic Effects of Ginsenoside Panaxadiol and Panaxatriol in Bovine Aortic Endothelial Cells

Joo-Won Jeong, Eun-Jeung Moon, Shin-Il Kim<sup>1</sup>, Nam-In Baek<sup>1</sup>  
and Kyu-Won Kim

*Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea*

*<sup>1</sup>Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon 305-333, Korea*

It is generally accepted that ginsenoside Panaxadiol (PD), Panaxatriol (PT) have the anti-invasive and anti-metastatic activities. Angiogenesis is an essential process for metastasis of solid tumors. We examined the anti-angiogenic activity of PD and PT on the chorioallantoic membrane (CAM). *In vivo* CAM assay showed that PD and PT significantly reduced neovascularization. To investigate the roles of the PD, PT in the remodeling of endothelial cells, we performed MTT assay, tube formation assay and wounding migration assay using bovine aortic endothelial cells; PD and PT inhibited the proliferation, tube formation and migration. However, the expression of VEGF was not changed by treatment with PD and PT. These results suggest that inhibition of endothelial cell proliferation and migration by ginsenoside PD and PT contributes to the anti-angiogenic activities.

**Key Words:** Ginsenoside, PD, PT, Angiogenesis

### 서 론

인체 조직을 구성하고 있는 모든 세포들의 생존에는 혈관에 의한 산소와 영양분 공급이 필수적이다. 따라서 혈관조직에 의한 산소와 영양분 공급은 인체의 각 기관과 조직의 정상적인 기능과 대사활동에 절대적으로 필요하다. 특히 혈관신생기전에 이상이 발생하여 비정상적인 혈관신생 과다에 의해 일어나는 질병으로

악성암, 당뇨병성 망막증, 류마티스 관절염, 건선, 만성염증 등이 알려져 있으며,<sup>1-3)</sup> 이 질환들의 효과적인 치료방법이 아직 개발되지 않은 상태이다. 그리고 암 조직의 혈관은 암세포의 증식에 필요한 산소와 영양분의 공급과 암세포가 다른 조직으로 전이하는 통로를 제공한다.<sup>4)</sup> 특히 기존의 혈관은 주변에 pericyte 등에 의해 견고한 혈관벽을 구성하여 물질의 선택적 투과성을 보이며, 세포의 이동이 엄격히 조절되는데 비해, 암

세포에 의해 유도된 신생혈관은 pericyte 등의 혈관 주변 조직이 형성되지 않아 물질의 투과성이 높고, 전이성 암세포의 투과가 용이한 상태이다.<sup>3-6)</sup> 따라서 혈관의 신생을 억제함으로써 암세포 전이를 차단하는 방법은 암전이 억제제 개발의 새로운 전략이 될 것이다. 그리고 과다한 혈관신생에 의한 질병의 치료법 개발에도 혈관신생 억제제의 응용이 가능할 것으로 생각된다.

인삼 추출물을 이용한 항암효과에 관한 연구는 항전이<sup>7)</sup> 및 암세포 사멸<sup>8,9)</sup>의 관점에서는 본 연구팀과 국외의 소수 그룹에서 진행되고 있으나, 혈관신생에 관련한 연구는 미진한 상태이다. 본 연구팀에서는 인삼성분인 PD, PT의 항침윤 활성을 *in vitro* invasion assay 방법을 이용하여 조사하였고,<sup>10)</sup> 그 작용기작을 밝히기 위해 침윤 현상에 중요한 역할을 담당하는 matrix metalloproteinase (MMP), urokinase type plasminogen activator (uPA), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 효소들의 발현 및 활성을 조사하여 수편의 논문으로 발표하였다.<sup>6,10)</sup> 또한 PD, PT가 GR의 활성증가 및 핵내 이동을 촉진시켜 MMP-2, 9의 발현을 감소시키는 사실을 확인한 바 있다.<sup>10)</sup> 그리고 ginsenoside를 이용한 항침윤 효과에 대해서는 일본의 연구그룹에서 활발히 진행되고 있으며 특히 ginsenoside-Rb2와 Rg3에서 항전이 효과가 있다고 보고하고 있다.<sup>11,12)</sup>

본 연구는 항침윤 효과가 뛰어나다고 이미 보고된 인삼 추출물 panaxadiol (PD)와 panaxatriol (PT)를 대상으로 하여 이들의 혈관신생 억제효과를 *in vivo*와 *in vitro* 실험모델에서 검색하였다. 이와 더불어 그 작용기작을 *in vitro* 상에서 혈관내피세포를 이용하여 규명함으로써 혈관신생 억제에 의한 암세포전이 차단방법의 개발을 위한 기초 연구를 수행하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 세포주와 세포배양

(1) HepG2 세포의 배양: 인간 간암세포주인 HepG2 cell은 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 minimum essential medium (MEM)에 1% Penicillin-Streptomycin (P-S)을 첨가한 배지에서 단층 배양되며, 2일에서 3일에 한번씩 trypsinization으로 subculture하여 유지하고 세포배양 환경은 37°C 포화 습도로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 시행되었다.

(2) 혈관내피세포의 배양: 혈관내피세포인 bovine aortic endothelial cell (BAEC)은 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 Dulbesco's modified eagle media (DMEM)에 1% Penicillin-Streptomycin (P-S)을 첨가한 배지에서 단층 배양되며, 2일에서 3일에 한번씩 trypsinization으로 subculture하여 유지하고 세포배양 환경은 37°C 포화 습도로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 시행되었다. passage 10~12의 세포를 실험에 사용하였다.

### 2) CAM assay

수정란을 구입하여 45시간 동안 18°C에 놓아둔 다음 90% 습도가 유지되는 37°C 배양기에 넣어 이를 0일배로 하여 배양하였다. 3일배가 되면 계란의 끝부분에 구멍을 내어 주사기로 알부민을 3 ml 뽑아낸 뒤, 계란의 공기주머니가 있는 쪽을 70% 알코올로 소독한 후 메스를 이용하여 지름 3 cm 크기의 원형 창문을 만들었다. 공기주머니 아래에 있는 막은 핀셋으로 제거한 후 유리테이프로 구멍을 막았다. 혈관형성 억제제의 검색을 위하여 이것을 계속 배양기에서 키워 4일배가 되면 thermanox coverslip에 혈관형성을 억제할 것이라 여겨지는 PD와 PT를 도포한 후 이를 40분 동안 말린 후, 다 마른 것을 확인하고 4일배의 유리테이프를 떼어낸 후, 이 coverslip을 발생 중의 embryo CAM 표면에 놓고 다시 유리테이프로 창문을 막았다. 이를 배양기에서 3일동안 배양시킨 후 10% fat emulsion (Intralipid, 녹십자)을 CAM막 안쪽에 주입하여 해부현미경 (magnification × 8)으로 혈관신생 억제효과를 관찰하고 CAM의 사진을 찍었다.

### 3) MTT assay

혈관내피세포 생존율을 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay로 조사하였다. 혈관내피세포를 24-well culture plate에 1×10<sup>5</sup>개가 되도록 심어준 후 PD, PT를 농도별로 1, 3, 6일 처리한 후 MTT를 최종농도 0.25 mg/ml로 넣어 4시간 배양하였다. 이 후 배지를 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 1 ml 가하여 생성된 formazan crystal을 녹여낸 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 혈관 내피세포의 증식에 대한 영향을 조사하였다.

4) *In vitro* tube formation assay

10 mg/ml 농도의 Matrigel 300  $\mu$ l를 24 well plate에 떨어뜨려 겔화되도록 37°C에서 30분간 두었다. 겔이 형성된 후 바닥이 보이지 않는 정도로 배양된 혈관내피세포를 trypsinization하여  $4 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 PD, PT를 처리한 뒤, 위상차 현미경으로 겔속을 파고 들어가 혈관과 유사한 모양을 형성하는지를 시간대 별로 관찰하였다.

5) Wounding migration assay<sup>13)</sup>

혈관내피세포를 60 mm 배양접시에 바닥이 보이지 않는 정도가 될 때까지 배양한 후 면도날로 세포에 상처를 내어 reference line을 긋고 일부를 긁어내었다. Serum free medium으로 3번 씻어내고 10% FBS가 포함된 M199 배지를 3 ml을 첨가하고 동시에 1 mM thymidin과 PD, PT를 첨가하여 24시간동안 37°C, 포화 습도로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

배지를 버리고 PBS로 씻어내고 메탄올로 1분간 고정시키고 Giemsa로 5분간 염색한 후 물로 씻어내었다. 위상차 현미경을 이용하여 40배로 관찰하여 reference line을 넘어 이동한 세포 수를 세었다.

6) Northern blot analysis

PD, PT에 의해 혈관생성인자의 발현의 변화를 조사하기 위하여 PD, PT가 처리된 조건에서 배양된 HepG2 세포로부터 전체 RNA를 분리하고 Northern hybridization 분석을 수행하였다. HepG2 세포를 T-75 배양용기에 70% 정도 빽빽하게 키운 후 각 농도의 PD, PT를 3일간 처리 또는 처리하지 않은 채 total RNA를 분리하여 30  $\mu$ g의 RNA를 260 nm에서 흡광도 측정으로 정량한 다음, 1% agarose-formaldehyde gel 상에서 전기영동하였다. 이것을 nitrocellulose membrane에 transfer하여 UV-cross linking 시킨 후 42°C에서 prehybridization하고 VEGF probe를 <sup>32</sup>P로 labelling 후 hybridization하였다. 이 filter를 세척한 후

B

Compound	Dose ( $\mu$ g/egg)	No. positive/No. tested in CAM assay	% positive
Control	Empty	3/10	30
Retinoic acid	0.1	11/12	92
PD	20	1/10	10
	40	3/9	33
	80	5/10	50
PT	20	1/8	13
	40	4/10	40
	80	9/12	75

그림 1. CAM assay를 통한 PD와 PT의 혈관신생 억제작용 확인. A, 해부현미경을 이용한 관찰 결과. B, 관찰결과의 통계적 분석.

X-ray film에 노출시켜 유전자 발현에 대한 northern 분석을 실시하였다.

### 결 과

#### 1) CAM assay를 이용한 PD, PT의 혈관신생 억제 작용 검색

PD, PT에 의한 혈관신생 억제현상을 관찰하기 위하

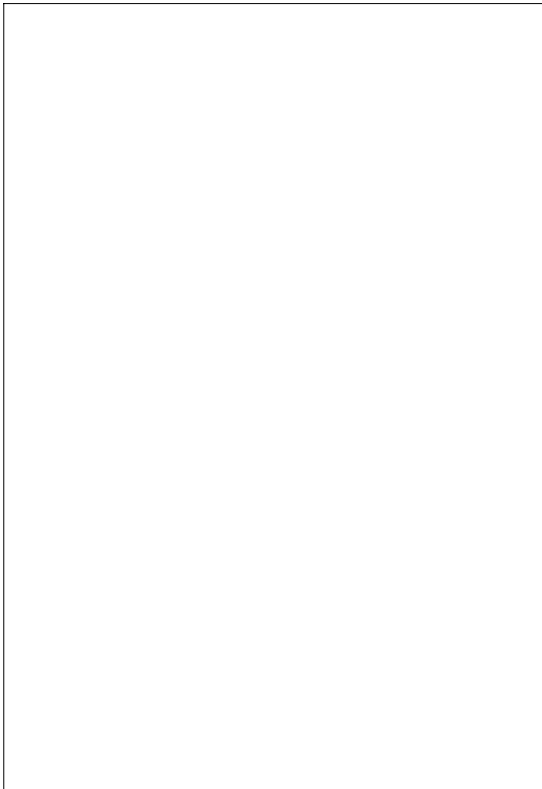


그림 2. MTT assay를 통한 PD (A)와 PT (B)의 혈관내피 세포에 대한 증식 조사.

여 PD, PT 각각 20  $\mu\text{g}$ , 40  $\mu\text{g}$ , 80  $\mu\text{g}$  씩을 사용하여 CAM assay를 실시하였다. 혈관신생을 억제하는 양성 대조군으로 retinoic acid를 사용하였다. 그림 1(A)에서 확인할 수 있듯이 PD, PT 둘다 사용한 모든 농도에서 혈관신생이 억제되었다. 그중 각각 80  $\mu\text{g}/\text{egg}$ 의 농도에서 현저한 혈관신생 억제현상을 확인할 수 있었다. 이를 도표화하면 그림 1(B)와 같다. 위의 결과로 PD, PT가 혈관신생 억제능력을 가지는 것으로 사료된다.

#### 2) PD, PT의 혈관내피세포 증식에 미치는 영향조사

PD와 PT를 10 ~ 50  $\mu\text{M}$ 의 농도로 1일, 3일 혹은 6일 동안 각각 처리한 후 MTT assay를 이용하여 혈관내피 세포인 BAECs의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. PD의 경우 사용한 모든 농도에서 세포의 증식이 감소되는 것을 확인할 수 있으나 40  $\mu\text{M}$ 과 50  $\mu\text{M}$ 의 경우는 증식의 감소가 아닌 세포독성이 있는 것으로 사료된다. 이 사실로 미루어 보아 PD의 경우 40  $\mu\text{M}$  이상의 농도에서는 cytotoxicity를 가지는 것으로 보여지고 이 보다 낮은 농도인 10 ~ 30  $\mu\text{M}$ 에서는 세포의 증식을 감소시키는 것으로 확인되었다(그림 2(A)). PT의 경우 역시 실험에 사용한 10 ~ 50  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 세포의 증식이 감소하는 것을 관찰할 수 있었고(그림 2(B)), PD와는 다르게 세포독성은 가지지 않는 것을 확인하였다.

#### 3) 혈관내피세포의 tube 형성에 대한 PD, PT의 영향조사

PD, PT의 *in vitro* 상에서 혈관신생 억제정도를 관찰하기 위해 BAECs를 이용하여 *in vitro* tube formation assay를 실시하였다. PD 30  $\mu\text{M}$ 을 혈관내피세포에 처리한 경우 대조군에 비해 tube를 형성하는 속도가 느

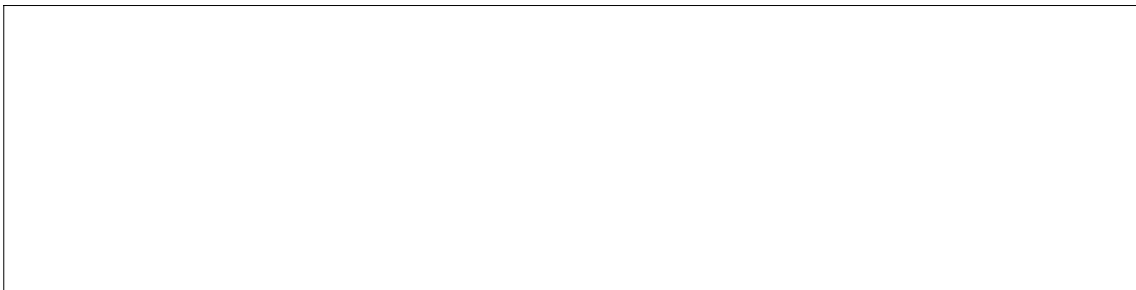


그림 3. 30  $\mu\text{M}$  PD와 40  $\mu\text{M}$  PT를 처리한 BAECs의 tube formation assay 결과.



그림 4. PD와 PT를 처리한 BAECs의 wounding migration assay 결과. A, 위상차 현미경( $\times 100$ )을 이용한 관찰 결과. B, 이동한 세포수의 정량적 결과.

린 것을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 형성된 tube의 지속시간도 짧은 것으로 관찰되었다. PT 40  $\mu$ M으로

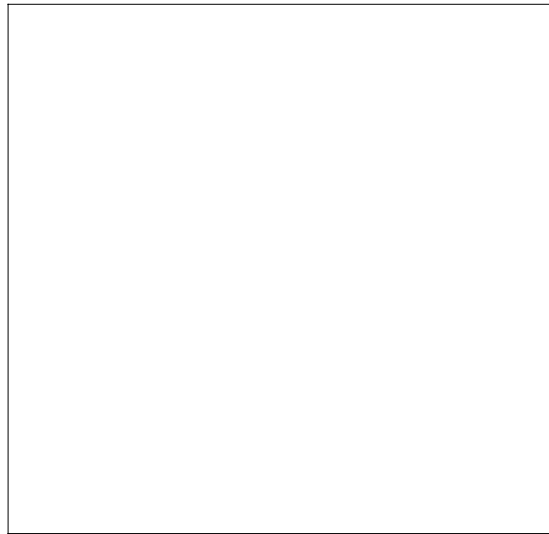


그림 5. PD와 PT에 의한 HepG2세포(A)와 BAECs (B)에서의 VEGF 유전자의 발현 조사.

실험한 경우 역시 tube 형성이 느리게 일어났는데 PD를 처리하였을 때 보다 tube 형성을 억제하는 능력이 더욱 뛰어난 것을 관찰할 수 있었다. 이것으로 PD, PT가 *in vivo*와 마찬가지로 *in vitro* 상에서도 혈관신생을 억제하는 것을 알 수 있다.

#### 4) 혈관내피세포의 이동에 대한 PD, PT의 영향조사

혈관신생 과정에 있어서 중요한 단계중의 하나인 혈관내피세포의 이동에 PD, PT가 어떠한 영향을 미치는지를 BAECs를 이용한 wounding migration assay를 통하여 조사하였다. 그 결과 PD 30  $\mu$ M의 경우 대조군에 비해 약 40% 정도 혈관내피세포의 이동능력을 저해시켰다. PT 40  $\mu$ M의 경우는 대조군에 비해 약 55% 정도로 이동성을 억제시켰다(그림 4). 혈관내피세포의 이동을 억제시키는 효과면에서 CAM assay, MTT assay, tube formation assay 결과들과 마찬가지로 PT가 PD보다 더욱 우세한 것을 알 수 있다.

#### 5) VEGF 유전자 발현에 대한 PD, PT의 영향조사

PD, PT가 혈관신생 억제효과를 나타낼 때의 작용기전을 연구하기 위해, PD와 PT를 처리한 HepG2 세포와 BAECs에서 total RNA를 분리하여 혈관신생에 중요한 역할을 하는 유전자인 vascular endothelial growth

factor (VEGF)를 대상으로 Northern blot을 실시하였다. 그 결과 혈관신생 억제능력이 있는 것으로 확인된 PD, PT가 간암세포와 혈관내피세포의 VEGF 발현에는 영향을 미치지 못함을 확인할 수 있었다(그림 5). 이러한 사실로 PD, PT가 혈관신생을 억제시킬 때에는 VEGF가 아닌 다른 혈관신생 유도 유전자의 발현을 억제시키거나, 혈관신생 억제유전자의 발현을 촉진시킬 것으로 사료된다.

## 고 찰

혈관신생의 촉진 및 억제기전에 관한 연구는 세계적으로 활발하게 진행되고 있다. 특히 혈관신생 억제에 관한 연구는 암세포의 증식과 전이현상을 억제할 것으로 예상되며, 이러한 물질의 검색은 조기에 암의 성장을 차단할 수 있을 뿐만 아니라 암의 전이를 억제하여 2차 전이성 암의 발생을 예방할 수도 있다는 측면에서 새로운 암예방 및 치료법의 하나로 관심이 모아지고 있다. 특히 최근에는 암세포에서 생성, 분비되는 endostatin의 경우 탁월한 혈관신생 억제 효과와 암치료 효과가 동물실험에서 증명되어 발표된바 있다.<sup>14,15)</sup> 본 연구팀은 이미 PD와 PT의 항침윤 및 항전이 효과를 확인하였고,<sup>10)</sup> 이러한 항침윤 효과가 있는 인삼성분이 혈관신생 억제에도 관여할 것으로 생각되어 PD, PT의 혈관신생 억제효과를 조사하였다.

본 연구 결과 인삼성분인 PD와 PT가 *in vivo* CAM assay에서 혈관신생 억제효과를 나타냄을 확인하였으며(그림 1), PT가 PD에 비해 억제효과가 더욱 뛰어난 것을 알 수 있었다. 이러한 혈관신생 억제효과의 작용기전을 연구하기 위해, 먼저 MTT assay를 통하여 PD, PT가 혈관내피세포의 증식능력에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 PD의 경우 40  $\mu$ M 이상의 고농도에서는 세포독성을 가지지만 그보다 낮은 농도에서는 혈관내피세포의 증식을 억제시키는 것을 확인하였다. PT의 경우는 PD와는 다르게 고농도에서도 세포독성을 가지지 않으면서 혈관내피세포의 증식을 억제시켰다(그림 2). *in vitro*상에서 tube를 형성하는 능력과 혈관내피세포의 이동성을 각각 조사하였을 때, PD와 PT 모두 이러한 능력을 억제시켰으며 그 능력이 PT가 더욱 뛰어나는 것을 알 수 있었다(그림 3, 4). 이러한 결과들로 미루어 보아 항침윤성이 뛰어난 인삼추출물인 PD와 PT가 혈관내피세포의 증식과 이동을 억제시킴으로써 뛰어난

혈관신생 억제효과를 나타낸다고 판단된다. 그러나 PD와 PT가 대표적인 혈관신생 유도유전자인 VEGF의 발현에는 아무런 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다(그림 5). 이것으로 미루어 보아 PD와 PT는 VEGF외의 다른 혈관신생 유도 및 억제유전자의 발현을 조절하여 혈관신생을 억제할 것으로 예상된다.

인간 섬유육종암세포인 HT1080세포의 경우 PD와 PT가 세포외기질의 분해효소인 MMP-2와 MMP-9의 유전자 발현 및 단백질의 활성화를 차단시키고 그의 활성억제 유전자인 TIMP의 발현을 증가시킴으로써 항침윤 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>10)</sup> 이러한 관점에서 볼 때, 혈관내피세포에서의 경우 역시 HT1080 세포와 동일한 작용기전으로 혈관신생을 억제시키리라 추정되며 그 자세한 조절작용에 대해서는 보다 연구되어야 할 사항으로 여겨진다.

결론적으로 본 연구에서는 악성암의 증식 및 전이에 필수적으로 요구되는 혈관신생에 대한 PD와 PT의 혈관신생 억제효과를 확인하였으며 이들의 혈관신생 억제효능을 이용한 악성암의 증식억제 및 전이억제 효과를 이용한 새로운 항암제로의 개발 가능성을 제시하였다고 사료된다.

## 결 론

본 연구에서는 PD와 PT가 *in vivo* CAM assay와 *in vitro* tube formation assay에서 각각 혈관신생을 억제시키는 활성이 있음을 확인하였다. 또한 PD, PT가 혈관내피세포의 증식과 이동성을 감소시킨다는 것을 확인하였다. 이러한 사실로 볼 때, 혈관신생의 여러과정 중 PD와 PT는 혈관내피세포의 증식과 이동에 영향을 미치는 것으로 보인다. 더불어 유전자 수준에서는 VEGF가 아닌 다른 혈관신생 유도 유전자나 억제유전자의 발현을 조절할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 1998년도 한국인삼연초연구원 연구용역비의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- 1) Herron GS, Werb G, Dwyer K, Banda MJ. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogeneous inhibitors. *J Biol Chem* 1986; 261: 2814-2819.
- 2) Frater-Schroder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Bohlen P. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth *in vitro*, is angiogenic *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5277-5281.
- 3) Gimbrone MA, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy *in vivo* by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1992; 136: 261-276.
- 4) Crum R, Szabo S, Folkman J. A new class of steroid inhibits angiogenesis in the presence of heparin or heparin fragment. *Science* 1985; 230: 1375-1378.
- 5) Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, Vallee BL. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 1985; 24: 5480-5486.
- 6) Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res* 1986; 46: 467-473.
- 7) Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 1980; 283: 139-146.
- 8) Oh M, Choi YH, Coij SH, Chung HY, Kim KW, Kim SI, Kim DK, Kim ND. Anti-proliferating effects of ginsenoside Rh2 on MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Oncology* 1999; 14: 869-875.
- 9) Park JA, Lee KY, Oh YL, Kim KW, Lee SK. Activation caspase-3 and proteases via a Bcl-2 insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2 induced apoptosis. *Cancer Letters* 1997; 121(1) 73-81.
- 10) Park MT, Cha HJ, Jeong JW, Kim SI, Chung HY, Kim ND, Kim OH, Kim KW. Glucocorticoid receptor-induced down-regulation of metalloproteinase-9 (MMP-9) by ginseng components, panaxadiol (PD) and panaxatriol (PT), contributes to inhibition of the invasive capacity of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Mol Cells* 1999; 9(5): in press.
- 11) Mochizuki M, Matusuzawa K, Yoo YC, Azuma I. Inhibitory effect of tumor metastasis by saponins, 20(R) - and 20(S) - ginsenoside-Rg3, of red ginseng. *Proceedings of '95 Korea-Japan Ginseng Symposium*, 1995; pp 41-44.
- 12) Sato K, Mochizuki M, Saiki I, Yoo YC, Samukawa K, Azuma I. Inhibition of tumor angiogenesis and metastasis by a saponin of panax ginseng, ginsenoside-Rb2. *Biol Pharm Bull* 1994; 17: 635-639.
- 13) Shinji Y, Peter RN, Kent KC. Role of protein kinase C in attachment, spreading, and migration of human endothelial cells. *J Surg Res* 1996; 63: 349-354.
- 14) O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-285.
- 15) Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997; 390: 404-407.