홍삼유래 ginsenosides Rh1의 단핵구 U937 세포 유착조절 효과

김병훈 · 조재열*

강원대학교 BT학부대학 생명공학부 분자의생명공학전공
(2009년 9월 16일 접수; 2009년 11월 5일 수정; 2009년 11월 9일 수리)

Regulatory Effect of Ginsenosides Rh1 on Monocytic U937 Cell Adhesion

Byung Hun Kim and Jae Youl Cho*

School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
(Received September 16, 2009; Revised November 5, 2009; Accepted November 9, 2009)

Abstract : Cell-cell adhesion managed by various adhesion molecules is known to be one of pathophysiological phenomena found in numerous immunological diseases such as rheumatoid arthritis and allergic diseases. In this study, we examined the regulatory role of ginsenosides (G)- Rh1, reported to display anti-inflammatory and anti-allergic effects, on CD29-mediated cell adhesion. G-Rh1 significantly suppressed U937 cell-cell adhesion mediated by CD29 but not CD43. It also blocked U937 cell-fibronectin adhesion, mediated by activated CD29, up to 30%. In agreement, this compound also significantly decreased the surface level of CD29 but not CD43 as well as other costimulatory molecules such as CD69, CD80, and CD86. Therefore, these results suggest that G-Rh1 may have inhibitory function on CD29-mediated cell adhesion events, probably contributing to its anti-inflammatory and anti-allergic activities.

Key words : ginsenoside Rh1, cell-cell adhesion, CD29, monocytic cell, U937 cell

서 론

항원제시 세포(antigen-presenting cell: APC)와 T 세포간의 상호작용은 costimulatory molecule (예, CD80 및 CD86 등)들 간의 상호작용 이외에도, β 1-integrins (CD29) 혹은 β 2-integrins(CD18), CD43 및 CD98 등과 같은 세포 유착단백질 (adhesion molecule)의 긴밀한 분자간 상호작용을 요구한다.^{1,2)} 실제로, β 1-integrins (CD29) 혹은 β 2-integrins(CD18)의 기능억제 항체 (function blocking antibody)를 처리할 경우 APC/T 세포간의 상호작용은 거의 90% 이상 저해된다는 보고³⁾를 통해 이들 분자의 기능적 중요성이 확인되어졌다. 이들 과정에서 리간드에 의해 활성화된 수용체 adhesion molecule은 관련 단백질들의 추가적인 활성화 유도를 위한 여러가지 다양한 신호전달과정 (outside-in 혹은 inside-out signaling)을 동반하게 된다.⁴⁾

면역반응적 측면 이외에도, 세포유착단백질의 활성화는 암세

포의 이동성 및 전이시 매우 중요한 영향을 나타내는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 대부분의 암세포들은 adhesion molecule의 높은 활성을 유지하고 있으며, 이에 따라 fibronectin이나 collagen 및 laminin 등과 같은 extracellular matrix protein에 쉽게 유착되어 주 종양 조직에서 이탈된 암세포들이 새로운 클론 형성을 이루는데 결정적인 역할을 수행하게 된다.

이와 같은 배경으로, 최근 세포유착단백질의 활성 억제는 급성 혹은 만성염증 과정을 동반한 관절염, 천식 등과 같은 다양한 질병이나 암세포의 전이시 요구되는 운동성의 저해약물 개발을 위한 새로운 표적으로 인식되고 있다.⁶⁾ 그럼에도 불구하고 현재까지 adhesion molecule의 기능을 효과적으로 저해하는 약물은 아직 개발되어 있지 않다.

인삼 사포닌인 ginsenosides(G) 류는 항당뇨, 항동맥경화증, 항암, 항스트레스, 항염, 인지능력 개선 및 면역증강능 등 다양한 인삼의 약리작용을 나타내는 주요 성분으로 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾ 이중 G-Rh1은 기억력 개선효과, 산화적 스트레스로부터 적혈구 세포막 보호효과, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) 및 oxazolone 유도성 피부염 치료효과, 그리고 항알러지 및 항염효과 등을 나타내는 것으로 보고되어져 있

*Corresponding author. E-mail: jaecho@kangwon.ac.kr
Phone: 033-250-6488, Fax: 033-241-6480

다.¹⁰⁻¹⁴ 특별히 암 및 염증과 같은 면역질환에서 세포유착과정 이 매우 중요한 병리작용 중 하나이므로, 본 연구에서는 G-Rh1 이 갖는 단핵구 세포주인 U937 세포의 유착반응 조절효능을 조사하여 보았다. 이를 통해 본 화합물이 갖는 면역질환 치료 효능에 관한 세포수준에서의 치료기전을 이해하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

Lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 인간 단핵구 세포주인 U937 세포 및 murine macrophage-like 세포주인 RAW264.7세포는 ATCC 에서 분양받아 사용하였다. 세포배양을 위한 배양용 배지 RPMI1640 media, fetal bovine serum (FBS) 그리고 항생제 (penicillin/streptomycin)는 Hyclone (Hyclone, South Logan, UT, USA)사 제품을 사용하였다. 항체들 (CD29 및 CD43)은 각각 V. Horejssi (Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague) 와 R Villela (Centre of Immunology, Barcelona, Spain) 박사로부터 제공받아 사용하였다. CD69, CD80 및 CD86 항체는 Immunotech (Marseilles, France)로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양

U937 및 RAW264.7 세포들은 5% CO₂, 37°C incubator 에서 배양하였다. 배지는 penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml)과 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용하였다.

세포-세포간 유착반응 분석

G-Rh1이 처리된 U937 세포 (1×10⁶ cells/ml) 용액을 80 µl를 처리하여 37°C에서 30분간 배양하였다.¹⁵ 다시 여기에 10 µl의 유착 유도항체 (MEM101A 및 161-46, 각 1 µg/ml)를 분주하여 시간 별로 사진을 촬영하였다. 유착 반응 정량은 round-bottom형태의 96 well plate에 2×10⁶ cells/ml 농도로 조제된 U937 세포용액 20 µl와 10 µl의 약물 그리고 10 µl의 유착유도 물질을 첨가한 후 각 시간 동안 배양하였다. 이후 조심스럽게 배양용액을 부유시킨 후, 10 µl을 hemocytometer에 처리하고 single 세포와 clustered 세포의 수를 측정하였다. Cho 등의 보고에 따라, 얻어진 데이터로부터 % of aggregation 및 % of control 값을 계산하였다.¹⁵

세포-fibronectin간 유착반응 분석

G-Rh1이 처리된 U937 세포 (5×10⁶ cells/well) 용액을

50 µg/ml의 fibronectin이 처리된 96 well plate에 처리하고 37°C에서 3 시간 동안 배양하였다.¹⁶ 이후 인산완충액으로 유착되지 않은 세포들을 제거하고 0.1%의 crystal violet을 15분간 처리한 후 흡광도를 540 nm에서 스펙트로메터를 이용하여 측정하였다.

Adhesion molecule의 발현 정량

U937 or LPS (1 µg/ml)-treated RAW264.7 세포 (1×10⁶ cells/ml)를 12-well plate에 1 ml/well씩 분주 후 3시간 동안 전배양하였다. 이 후 3.5시간 동안 G-Rh1을 처리하고 이들 세포를 회수하여 96 well round plate에 일정하게 분주 하였다. FACS buffer (2% FBS in PBS)로 세척한 후, 10% rabbit serum (in PBS)으로 blocking하고, 각종 항체 (CD29, CD43, CD69, CD80 및 CD86)를 처리하여 45 분간 배양하였다. 이후 FACS buffer로 세척한 후 3.7% formaldehyde로 고정하고 flow cytometry로 형광정도를 측정하였다.

통계처리

각 data는 얻어진 결과는 평균 ± 표준편차로 나타낸 것이며, 통계적 유의성은 Student *t*-test를 이용하여 P<0.05 수준에서 분석하였다.

결과 및 고찰

세포간 유착과정은 만성 혹은 급성염증, 및 암질환의 발생 시 필수적인 현상으로 알려지면서, 이들 과정의 제어는 관련 질병을 치료할 수 있는 주요 질병 표적으로 간주되고 있다.⁶ 본 연구팀은 adhesion molecule들 (CD18, CD29, CD43 및 CD98)의 활성을 유도할 수 있는 합성유도제인 PMA (CD18발현 및 활성 자극원) 혹은 adhesion-inducing 특이 단일클로날 항체 (CD29항체: MEM101A, CD43항체: 161-46, CD98항체: ANH-1)를 수시간 동안 처리하여 유착과정을 유도할 수 있는 실험 모델을 정립하여, 이들 모델을 이용한 치료제 개방 가능성을 제시한 바 있다.¹⁷⁻¹⁹ 이에 본 연구에서는 U937 세포 유착과정 연구 조건을 이용하여 대표적인 항염증 효능성 진세노사이드인 G-Rh1의 CD29-매개성 세포 유착현상 조절능을 분석하고자 하였다.

CD29은 β1-integrin인 fibronectin 수용체로 알려진 대표적인 adhesion molecule로서 백혈구가 endothelial cell에 유착되는 반응에서 후반부 과정을 조절하는 당단백질이다.²⁰ CD29의 활성형은 α-integrin (VLA-4)과 heterodimeric complex를 형성하여, 리간드인 vascular cell adhesion molecule-I (VCAM-1)과 분자적 결합을 통해 각 세포내로 다양

Fig. 1. Chemical structure of G-Rh1.

한 활성 유도 경로를 전달하는 것으로 보고되어져 있다.⁴⁾ 이들 활성은 특별히 염증 및 암 전이시 매우 중요한 병리적 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다.^{6,21)} 따라서, 효과적인 CD29의 활성저해는 암 및 염증 등과 같은 면역질환 치료제 개발을 위한 신규 표적으로 제기되고 있다.

흥미롭게도, Fig. 2에서 확인할 수 있듯이, G-Rh1은 25 μ M 처리시 CD29 매개 항체인 MEM101A에 의해 유도된 유착과정을 유의적으로 억제하였다. 그러나, G-Rh1은 leukosialin 혹은 sialophorin으로 알려져 있는²²⁾ CD43 매개 유착과정을 억제하지 않았다 (Fig. 2). 이는 G-Rh1에 의한 CD29 매개 유착과정의 억제는 G-Rh1의 비특이적 약리작용에서 기인된 것이 아니라는 것을 시사한다고 하겠다. 실제로 5 μ M의 G-Rh1은 U937 세포 생존율에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다 (Data not shown). 한편 ERK

Fig. 2. Effect of G-Rh1 on U937 cell-cell adhesion. (A, B and C) U937 cells (1×10^6 cells/ml) pretreated with G-Rh1 (25 μ M) were incubated in the presence or absence of pro-aggregative antibodies (1 μ g/ml each) to CD29 (MEM 101A) or CD43 (161-46) for 3 h. Images (A, B, and C) of the cells in culture were obtained using an inverted phase contrast microscope attached to a video camera. (D) Quantitative analysis of cell-cell clusters was assessed by quantitative cell-cell adhesion assay as described in Materials and methods. *: $p < 0.05$ compared to control.

kinase 억제제인 U0126 (40 μ M) 과 NF- κ B 저해제인 BAY 11-7082 (20 μ M)는 CD29-매개성 세포유착과정을 67% 및 73%씩 억제하였다.

G-Rh1의 CD29-매개성 유착현상 억제 효능을 더 확인하기 위해 fibronectin을 이용한 유착실험을 추가적으로 진행하였다. 이는 CD29이 fibronectin의 수용체로 작용하여 세포의 유착성을 증가시켜주는 원리를 이용한 실험으로서 CD29 기능조절성 평가시 이용되는 또다른 실험조건으로 알려져 있다.²³⁾ Fig. 3에서 확인할 수 있듯이 G-Rh1은 MEM101A 유도에 의해 진행된 U937 cell-cell adhesion과 유사한 정도로 (약 30%) 억제효과를 나타냈다. 따라서 본 결과들로 미루어 볼 때 G-Rh1은 미약하긴 하지만 유의적으로 CD29-매개성 유착현상 (cell-cell 및 cell-fibronectin간)을 억제하는 것으로 판단된다.

세포유착 조절 단백질의 발현은 이들의 세포유착 활성과 매우 관련성이 큰 것으로 알려져 있으므로, 각 유착반응 유도 자극원의 효과를 비교하기 위해 세포 표면 유착단백질의 발현 수준을 flow cytometry를 이용하여 측정하였다. Fig. 4에서 확인할 수 있듯이, G-Rh1 처리는 CD29발현을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다. 또한 이들 화합물에 의해 CD43의 발현은 억제되지 않았다. 이는 G-Rh1에 의한 CD29-매개성 유착현상의 조절 작용이 CD29의 세포 표면 발현과 매우 밀접한 관계가 있다는 것을 시사한다고 하겠다. 또한 G-Rh1의 세포표면 단백질 발현 조절현상은 LPS에 의해 유도되는

Fig. 3. Effect of G-Rh1 on cell-fibronectin adhesion. U937 cells (1×10^6 cells/ml) pretreated with G-Rh1 (25 μ M) were seeded on fibronectin (50 μ g/ml)-coated plates and further incubated for 3 hours. Attached cells were determined by crystal violet assay, as described in Materials and Methods. Data represent mean $\pm$ SEM of three independent observations performed in triplicate. *: $p < 0.05$ compared to control.

Fig. 4. Effect of G-Rh1 on the surface level of adhesion molecules. U937 cells (1×10^6 cells/ml) were treated with G-Rh1 (25 μ M) for 2 h. Surface levels of CD29 and CD43 were determined by flow cytometry as described in Materials and Methods. Results show one experiment out of three. *: $p < 0.05$ compared to control.

Fig. 5. Effect of G-Rh1 on the surface level of costimulatory molecules in LPS-treated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) pre-treated with G-Rh1 (25 μ M) for 30 min were incubated LPS (1 μ g/ml) for 12 h. Surface levels of CD69, CD80 and CD86 were determined by flow cytometry as described in Materials and Methods. Results show one experiment out of three.

costimulatory molecule들 (CD69, CD80 및 CD86)의 발현 증가를 저해하지 않았다. 이는 CD29의 발현 억제가 단순히 약물투여에 의해 발생하는 비특이적 약리작용에서 기인된 것이 아니라는 것을 증명하는 것이다. 한편 BAY 11-7082 억

시 CD29의 세포 표면 발현양을 약 18% 정도 억제한 것으로 나타났다.

요 약

G-Rh1에 의한 단핵구 세포주인 U937 세포의 유착조절 능력을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 1. G-Rh1은 CD29 항체 (MEM101A) 처리에 의해 유도된 세포-세포간 유착현상을 유의적으로 억제하였다. 2. G-Rh1은 fibronectin 처리에 의해 유도된 U937 세포-fibronectin간 유착현상을 유의적으로 억제하였다. 3. G-Rh1은 CD29의 세포표면 발현 수준을 유의적으로 감소시켰다.

최근 활발히 G-Rh1의 약리작용 연구들이 진행되고 있다. 특별히, 본 화합물은 항알러지, 피부염증질환 치료효과, 항암 효과 및 여성호르몬 유사기능 등이 있는 것으로 보고된 바 있다.¹⁰⁻¹⁴⁾ CD29-매개성 세포유착과정이 다양한 염증과정, 알러지 반응 및 암세포의 이동 및 전이성과 관련이 있다²⁴⁾ 는 관점에서 볼 때 본 연구결과는 이들 약물이 갖는 치료기전의 하나가 CD29 기능저해에서 비롯될 수 있음을 제시한다고 하겠다. 이후 G-Rh1의 억제 기능에 관한 기전 이해를 위해 세포유착 유도 신호전달 단백질의 활성을 포함한 다양한 분자적 수준에서의 추가적인 실험들을 진행하고 한다.

감사의 말씀

본 연구는 지식경제부의 재정적 도움 [지역혁신인력양성사업 (2008-2010)]으로 진행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Murtaugh MP, Foss DL. Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet Immunol Immunopathol.* 87: 109-121 (2002)
- Caulfield JJ, Fernandez MH, Sousa AR, Lane SJ, Lee TH, Hawrylowicz CM. Regulation of major histocompatibility complex class II antigens on human alveolar macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of glucocorticoids. *Immunology* 98: 104-110 (1999)
- Stonehouse TJ, Woodhead VE, Herridge PS, Ashrafian H, George M, Chain BM, Katz DR. Molecular characterization of U937-dependent T-cell co-stimulation. *Immunology* 96: 35-47 (1999)
- Woods ML, Shimizu Y. Signaling networks regulating beta1 integrin-mediated adhesion of T lymphocytes to extracellular matrix. *J Leukoc Biol.* 69: 874-880 (2001)
- Van Waes C. Cell adhesion and regulatory molecules involved in tumor formation, hemostasis, and wound healing. *Head Neck* 17: 140-147 (1995)
- Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev.* 22: 146-167 (2002)
- Yun TK, Lee YS, Lee YH, Kim SI, Yun HY. Anticarcinogenic effect of Panax ginseng C.A. Meyer and identification of active compounds. *J Korean Med Sci.* 16 Suppl: S6-18 (2001)
- Choi KT. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean Panax ginseng C A Meyer. *Acta Pharmacol Sin.* 29: 1109-1118 (2008)
- Kim BH, Lee YG, Park TY, Kim HB, Rhee MH, Cho JY. Ginsenoside Rp1, a ginsenoside derivative, blocks lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta production via suppression of the NF-kappaB pathway. *Planta Med.* 75: 321-326 (2009)
- Kim YS, Kim DS, Kim SI. Ginsenoside Rh2 and Rh3 induce differentiation of HL-60 cells into granulocytes: modulation of protein kinase C isoforms during differentiation by ginsenoside Rh2. *Int J Biochem Cell Biol.* 30: 327-338 (1998)
- Wang YZ, Chen J, Chu SF, Wang YS, Wang XY, Chen NH, Zhang JT. Improvement of memory in mice and increase of hippocampal excitability in rats by ginsenoside Rg1's metabolites ginsenoside Rh1 and protopanaxatriol. *J Pharmacol Sci.* 109: 504-510 (2009)
- Samukawa K, Suzuki Y, Ohkubo N, Aoto M, Sakanaka M, Mitsuda N. Protective effect of ginsenosides Rg(2) and Rh(1) on oxidation-induced impairment of erythrocyte membrane properties. *Biorheology* 45: 689-700 (2008)
- Shin YW, Bae EA, Kim SS, Lee YC, Lee BY, Kim DH. The effects of ginsenoside Re and its metabolite, ginsenoside Rh1, on 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate- and oxazolone-induced mouse dermatitis models. *Planta Med.* 72: 376-378 (2006)
- Park EK, Choo MK, Han MJ, Kim DH. Ginsenoside Rh1 possesses antiallergic and anti-inflammatory activities. *Int Arch Allergy Immunol.* 133: 113-120 (2004)
- Cho JY, Fox DA, Horejsi V, Sagawa K, Skubitz KM, Katz DR, Chain B. The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation. *Blood* 98: 374-382 (2001)
- Larrucea S, Gonzalez-Rubio C, Cambronero R, Ballou B, Bonay P, Lopez-Granados E, Bouvet P, Fontan G, Fresno M, Lopez-Trascasa M. Cellular adhesion mediated by factor J, a complement inhibitor. Evidence for nucleolin involvement. *J Biol Chem.* 273: 31718-31725 (1998)
- Cho JY, Katz DR, Chain BM. Staurosporine induces rapid homotypic intercellular adhesion of U937 cells via multiple kinase activation. *Br J Pharmacol.* 140: 269-276 (2003)

18. Cho JY, Chain BM, Vives J, Horejsi V, Katz DR. Regulation of CD43-induced U937 homotypic aggregation. *Exp Cell Res.* 290: 155-167 (2003)
19. Cho JY, Kim AR, Joo HG, Kim BH, Rhee MH, Yoo ES, Katz DR, Chain BM, Jung JH. Cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, as a new strong regulator of CD29 and CD98 functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 313: 954-961 (2004)
20. Cordes N, Park CC. beta1 integrin as a molecular therapeutic target. *Int J Radiat Biol.* 83: 753-760 (2007)
21. Mettouchi A, Meneguzzi G. Distinct roles of beta1 integrins during angiogenesis. *Eur J Cell Biol.* 85: 243-247 (2006)
22. Matsumoto M, Shigeta A, Miyasaka M, Hirata T. CD43 plays both antiadhesive and proadhesive roles in neutrophil rolling in a context-dependent manner. *J Immunol.* 181: 3628-3635 (2008)
23. Cho JY. Chloroquine, an anti-malarial agent, acts as a novel regulator of beta 1-integrin-mediated cell-cell adhesion. *Biol Pharm Bull.* 31: 726-730 (2008)
24. Deane JA, Hickey MJ. Molecular mechanisms of leukocyte trafficking in T-cell-mediated skin inflammation: insights from intravital imaging. *Expert Rev Mol Med.* 11: e25 (2009)