석 사 학 위 논 문

인삼 사포닌 대사체 Compound K에 의한 사람 백혈병 세포주 U937에서의 세포사멸 유도 및 그 작용기전

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

제주대학교 대학원

의 학 과

강 경 아

2004년 12월

Induction of Apoptosis by Ginseng Saponin Metabolite Compound K and Its Action Mechanism in U937 Human Monocytic Leukemia Cells

Kyoung-Ah Kang
(Supervised by professor Jin-Won Hyun)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Medicine

Written under the supervision of Professor Hyun Jin-won and approved by

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Chairperson of committee: Dookbae Park

Eunsook Yoo

Jin Won Hyun

Department of Medicine
Graduate School, Cheju national university

December 2004

인삼 사포닌 대사체 Compound K에 의한 사람 백혈병 세포주 U937에서의 세포사멸 유도 및 그 작용기전

지도교수 : 현 진 원

강 경 아

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2004년 12월

강경아의 의학 석사논문을 인준함

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

심 사 위 원 장 _____ ㊞

위 원 유 은 숙 ㊞

위 원 현 진 원 ㊞

제주대학교 대학원

2004 년 12월

목 차

ABSTRACT i
List of Table ii
List of Figures iii

I. 서 론 1

II. 재료 및 방법 4
1. 재료
2. 세포 배양
3. 세포 생존률 측정
4. 형광 현미경 측정법
5. DNA 분절(DNA Fragmentation) 분석
6. Phosphatidylserine 추출 측정
7. 미토콘드리아 막 전위 측정
8. 단백질 발현 측정
9. 통계처리

Ⅲ. 결 과 7
1. Compound K에 의해 인간 백혈암 여러 세포주 들의 성장 억제
2. U937세포에서 Compound K 에 의해 유도된 세포사멸 현상
3. Compound K 에 의한 Bax와 Caspase 의 활성화 유도
4. Compound K 에 의해 Mitochondrial Membrane Potential 탈분극

Ⅳ. 고 찰 14

Ⅴ. 참고문헌 17

VI. 요 약 23

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

ABSTRACT

We report the pro-apoptotic activity of the ginseng saponin metabolite, Compound K (20-O-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol, IH901) in various human leukemia cell lines. The pro-apoptotic effect of Compound K was most prominent in U937 cells, a human monocytic leukemia cell line among the tested cells lines. Compound K-treated U937 cells showed characteristics of apoptosis like as an exposure of phosphatidylserine from the inner cell membrane to the outer cell membrane, the formation of apoptotic bodies and DNA fragmentation. Compound K also up-regulated Bax, disrupted the mitochondrial membrane potential, and activated caspase-9 and caspase-3. Therefore, the present study suggest that Compound K inhibits U937 cell growth by inducing apoptosis through the up-regulation of Bax and caspase activation.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

List of Table

Table 1. IC_{50} values of Compound K in various leukemia cell lines and splenocytes.
Table 2. IC_{50} values of *Panax* ginsenosides Rb1 and Compound K in U937 human leukemia cells.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

List of Figures

Figure 1. Chemical Structure of Compound K (20 O-(-DGlucopyranosyl)-20(S) -Protopanaxadiol)

Figure 2. IC_{50} values of Compound K in various leukemia cell lines and normal spleen cells and the kinetics of *Panax* ginsenosides Rb1 and Compound K cell growth inhibition of U937 cells.

Figure 3. The apoptotic patterns in Compound K-treated U937 cells.

Figure 4. Up-regulation of Bax, activation of caspase-9 and caspase-3, and cleavage of PARP in Compound K-treated U937 cells.

Figure 5. Disruption of mitochondrial membrane potential in Compound K-treated U937 cells.

Figure 6. Action mechanism of Compound K-induced apoptotic cell death in U937.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅰ. 서 론

인삼(*Panax ginseng* CA Meyer)은 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 다년생 반음지성 숙근초로서 우리나라를 비롯하여 중국, 아시아 극동지역에 분포하고 있다. 인삼은 예로부터 보혈강장 및 불로장생의 영약으로 한방에서 널리 애용되어 왔으며, 많은 한방의서에 수록되어 소화기계, 신경계, 순환기계 등의 기능조절 및 체력증강, 피로회복을 위하여 단독 또는 복합처방의 구성 생약으로 활용되어 왔다(남기열 최신고려인삼 1996). 한방효능에 근거하여 인삼의 성분과 효능에 관한 많은 연구가 수행되었고, 근래에는 동양뿐만 아니라 서양에서도 강장제, 건강식품 및 대체의학 관점에서 인삼에 대한 관심이 증가하고 있다(Smith, M. *et al.* 1999). 인삼은 항산화, 항암, 항염증, 항스트레스, 항비만, 노화방지, 항알러지 효과와 (Choi, *et al.* 1985 ; Shin, *et al.* 2000) 조혈세포의 증식 및 보호, 간염예방, 뇌 손상에 대한 보호, 위 보호, 정신안정, 피로회복 등의 작용도 알려져 있다(Ga *et al.* 2003 ; Kwon *et al.* 2003 ; Lee *et al.* 2003 ; Shi *et al.* 2003).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

이러한 인삼의 대표적인 성분으로는 사포닌, 페놀성 화합물 (Wee *et al.* 1989), 단백질 (Yoon *et al.*, 2002), 산성 다당체 등이 있는데, 특히 인삼의 다양한 약리 활성은 주로 사포닌(일명 ginsenoside)에 기인한다고 보고되었다. 인삼 사포닌의 주요성분은 triterpene 계 saponine 으로서 tetracyclic dammarane 골격구조를 지니고 있는 것이 특징적이며(Karikura *et al.*1991) 이러한 ginsenoside는 크게 protopanaxadiol과 protopanaxatriol 두 가지 그룹으로 대별하고 있다. Protopanaxadiol계로는 주로 ginsenoside Ra, Rb1, Rb2, Rc 그리고 Rd가 속하며 protopanaxatriol계로는 ginsenoside Rg1, Re, Rf 그리고 Rg2가 이에 속한다. 이들 그룹들은 항암작용, 항당뇨, 항고혈압 및 항스트레스의 작용을 나타내지만 (Okuda *et al.* 1990 ; Yun *et al.* 2001), 한편으로는 서로 길항작용을 나타내기도 한다. 즉, protopanaxadiol계는 진정, 항경련, 진통, 해열, 항염증 작용을 나타내는 반면에 protopanaxatriol계는 흥분 및 항피로 작용을 나타낸다. Rb1, Rb2, Rc, Re 등과 같은 intact ginsenosides는 in vitro에서 암전이 억제 효과를 거의 보이지 않은 반면(Wakabayashi *et al.* 1997), Rh2와 Rg3같은 protopanaxadiol 사포닌들은 암세포들의 증식과 성장을 억제하는 것이 발견되었다 (Kikuchi *et al.* 1991; Tode *et al.* 1993). 그리고 암세포의 분화와 apoptosis (세포사멸)를 유도하고 (Lee *et al.* 1996; Park *et al.* 1997), *in vitro* 와 *in vivo* 에서 암세포의 침윤과 전이를 억제하였다(Shinkai *et al.* 1996; Iishi *et al.* 1997). 과거부터 한국, 중국, 일본 등에서 인삼은 전통적인 약제로 투여방법은

인삼을 열수추출하여 그 엑기스를 경구투여하여 왔다. 그러나 이들 성분들은 사람의 소화효소 등에 의해서 대사 되지 않고, 장내 세균에 의해 대사되어 흡수되는 것으로 밝혀져 있다. 최근, 장내 세균에 의한 인삼 사포닌 대사체들의 형태는 흰쥐와 사람에서 인삼 추출물을 경구 투여한 연구들에서 확인되었다 (Hasegawa *et al.* 1996). Rat에게 인삼 전체 사포닌 즉 protopanaxadiol계 ginsenoside인 Rb1, Rb2, Rc는 장내세균에 의해 20-O-(β-D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol (일명 Compound K, IH-901; Fig.1)로 전환되며 이 대사체에 의해 매개된 ginsenoside의 암전이 억제효과를 *in vivo*에서 증명하였다 (Hasegawa *et al.* 1997). Compound K 는 암세포에 의한 당 흡수를 억제하고(Hasegawa *et al.* 1995a), 암세포에서 다중약제 저항을 줄이는 것(Hasegawa *et al.* 1995a)으로 알려졌다. 그것은 또 한 화학적 발암물질, 항원독성과 항돌연변이성에 반대하는 화학 방어 활성 효과를 지녔다 (Lee *et al.* 1998).

인체의 모든 기관은 수많은 세포로 구성되어 있으며 이 세포들은 위치와 기능에 따라 여러 종류로 나누어지지만 하나의 수정란에서 기원하고 있기 때문에 동일한 유전 정보를 가지고 있으며 일정한 세포주기를 가지고 분화하고, 성장하고, 사멸한다. 예를 들어 혈액세포인 적혈구의 경우 골수에서 생성되어 약 120여일 후 비장에서 자연 소멸하게 되고, 신경세포의 경우 일생에 한 번만 생성되는데 사망과 동시에 사멸하게 된다. 그러나 이러한 자연적인 세포주기에 이상이 생겨 세포가 정상적으로 분화하지 않고, 어느 정도 분화한 후에는 성장을 멈추어야 하는데도 불구하고 계속 성장하는 것을 종양(tumor)이라 하며 종양에는 양성종양과 악성종양이 있다. 이중 악성종양을 암이라고 한다. 암은 기본적으로 세포의 조절되지 않는 과잉성장, 즉 억제되지 않는 계속적인 세포 분열에 의해 형성된 변형된 세포의 집단이다. 암의 발생은 매우 복잡한 기전에 의해 발생한다. 그러므로 발암 과정을 간단히 정의하기가 쉽지 않지만 간단히 정의하자면 인체 내 세포들의 증식과 세포사 사이의 균형에 교란이 생기기 때문이라 할 수 있다.

세포사는 크게 괴사 (Necrosis) 와 세포사멸 (apoptosis) 로 구분된다. 괴사는 직접적으로 독성이 있거나 물리적 상해 등 갑작스런 외부환경의 변화에 의해 유발되는 수동적 과정으로 이해할 수 있다. 반면, 세포사멸은 programmed cell death로서, 대부분의 다세포 구조물의 발달과 기관의 퇴화, 그리고 암을 포함한

대부분의 질병에서 필수적인 세포 증식과 세포사이에 균형을 능동적으로 조절하는 생리적인 과정이다. 특별한 유전자들이 세포죽음과 연관된 신호들에 의해 활성화 또는 억제되기 때문에 결과적으로 형태학적 그리고 생화학적인 변화가 나타난다. 세포사멸은 유전적으로 보존된 관련 유전자에 의해 이루어지며, 조절이 가능한 능동적 세포죽음 과정으로 이 과정은 형태적으로 세포의 비중감소, 세포막의 변형, 염색체의 응축, DNA 분절, caspase로 알려진 cysteine protease의 활성 등으로 특징 지워지고, 활성된 세포내부의 물질들이 사멸체 (apoptotic body)라는 포낭을 형성하면서 식세포작용을 거치는 작용과 함께 진행된다. 이러한 과정을 거친 적절한 세포의 죽음은 생체의 발생 및 항상성 유지에 매우 중요하게 작용한다. 이는 개체로 하여금 세포 숫자와 조직의 크기를 유지하며 세포내의 항상성을 위협하는 자극으로부터 자신을 보호하는 역할을 한다. 또한 부적절한 세포죽음은 치매, 허혈, 파킨슨병 등의 퇴행성 질병들과 자가면역 질환, 그리고 암의 유발과 관련되어 있다. 예를 들면, 세포사멸의 억제는 일반적으로 인간의 악성종양의 발달에 도움을 주는 것이 관찰되었다 (Que and Gores 1996). 또, 최근 화학적 암치료법에 쓰이는 약리학적 효과는 세포사멸을 유발하여 세포사를 일으키는 것으로서, 암세포에서 세포사멸의 유도는 암치료의 중요한 연구 대상(Kim *et al.* 1999; Ahmad *et al.* 1997)으로서, 이에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

세포사멸 의 유발에 종양억제 유전자 p53이나, Bcl-2밑 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 세포사멸와 연관된 분자적 기전이 많이 밝혀지고 있다 (Nagata *et al.* 1997 ; Chiarugi *et al.* 1994). 따라서 세포사멸 과정과 조절관련 기전에 대한 이해는 암 치료나 퇴행성 질환, 면역 질환들의 치료에 응용될 수 있다.

이에 본 연구는 인삼 사포닌 성분인 ginsenoside Rb1을 장내 세균을 이용하여 전환시킨 대사체 Compound K의 항암활성을 사람 단핵구 백혈암 세포주인 U937에서 관찰하고 Compound K의 세포독성 기전을 세포사멸측면에서 연구하였다.

제주대학교 중앙도서관

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

인삼 사포닌 ginsenoside Rb1과 Compound K는 경희대학교 약학대학 미생물학교실 김동현 교수로부터 제공받았다. Compound K는 DMSO에 녹여 최종 농도를 0.02 %를 넘지 않게 하였다.

2. 세포 배양

U937 (인간 단핵구 백혈병 세포주), Molt-4, H9, Jurkat 그리고 CEM-CM3 (인간 T림프구 백혈병 세포주)들은 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 분양받았고, 100 unit/ml penicillin-streptomycin 과 10 % Fetal bovine serum (FBS)이 함유된 RPMI 1640 배지 (Gibco BRL, Gaitherburg, MD)를 사용하여 37 ℃, 5 % CO_2 배양기에서 배양하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3. 세포 생존률 측정

MTT assay(Carmichael *et al.* 1987)를 통하여 다양한 백혈병 세포주의 생존률을 측정하였다. 세포들은 각 well당 10^4-10^5 cell로 조절한 후 180 ㎕씩 96 well에 각각 분주하였다. 그 후에 인삼전구체 와 그 대사체인 Compound K를 여러 dose로 처리한 후 4 일 동안 37 ℃, 5 % CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양 4일후,2㎎/㎖ 의 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 50 ㎕ 씩 각 well (0.1 mg/ well) 에 처리하였다. 4 시간동안 배양한 후, plate를 800 x g에서 5 분간 원심 분리하여 상층액은 거둬내고 남은 세포에 DMSO 150 ㎕ 씩 처리하여 녹였다. Spetrophotometer를 이용하여 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. (Molecular Device Co., Sunnyvale, CA). IC_{50} 값은 성장률을 50 %로 억제하는 농도로 결정되었다. 세포 생존율은 또한 trypan blue 염색법에 의해서도 측정할 수 있었다 (Piao *et al.* 2001). 세포 100 ㎕에 동량의 phosphate buffered saline(PBS)에 녹인 0.4 % trypan blue 시약을 넣고 상온에서 5 시간동안 배양하였다. 살아있는 세포(trypan blue에 염색되지 않은)

수를 hemocytometer를 사용하여 세었다. 모든 실험은 모두 3 번 반복하였다.

4. 형광 현미경 측정법

48 시간 동안 Compound K (20 ㎍/ ㎖)가 처리된 세포(2 x 10^5/ ㎖)를 PBS로 세척하고 5 분동안 4 % paraformaldehyde에 고정시켰다. 그리고 나서 세포들은 Hoechst dye 33258 (8 ㎍/ ㎖) 에 5 분 동안 염색시켰다. PBS로 두 번 세척한 후 밀봉하여 역형광현미경 Axiovert 100를 이용하여 핵을 관찰하였다.

5. DNA 분절(Fragmentation) 분석

48 시간 동안 Compound K (20 ㎍/ ㎖)가 처리된 세포를 (2 x 10^5cell/ ㎖) 수확하여 세포의 DNA를 genomic DNA 추출 kit (Wako junyaku, Tokyo, japan)를 이용하여 추출하였다. 배양된 세포 pellet에 1 ㎖씩 lysis buffer를 넣고 균질화시킨 후, 10,000 x g에서 20 초 동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 남은 pellet에 protease가 있는 효소반응용액을 200 ㎕를 넣어 잘 섞어 37 ℃에서 1 시간 동안 배양한 후 혼합액에 0.3 ml의 NaI 용액을 첨가하여 잘 혼합하였다. 0.5 ml의 isopropanol을 첨가하고 10,000 x g에서 10 분 동안 원심분리 하였다. DNA pellet을 3 분 동안 진공상태에서 말려 4 ㎍의 DNA양을 0.1 ㎍/ ㎖ ethidium bromide가 포함된 1.8 % agarose gel에서 전기영동하여 ultraviolet light으로 분절현상을 확인하였다.

6. Phosphatidylserine 추출 측정

6 시간 동안 Compound K (20 ㎍/ ㎖)가 처리된 세포 (2 x 10^5cell/ ㎖)에 100 ㎕의 Annexin V-binding buffer(10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$)에 넣어 잘 섞어주고, Annexin V-FITC(Boehringer Ingelheim, Vienna, Austria)와 propidium iodide(PI)를 첨가하였다. 이때 최종 농도를 5 ㎍/ ㎖ 로 맞추었다. 상온 암실에서 15 분간 배양한 후 Flow cytometric analysis를 위해 binding buffer를 300 ㎕ 넣어서 희석시켰다. Bivariate 분석은 아르곤 레이저 excitation 480 ㎚ 와 emission BP 530/30 ㎚ (FITC) and BP 585/42 ㎚ (PI)으로 갖추어진 FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA)로 측정하였다. 데이터 분석은 standard Cell Quest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 로 수행하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

7. 미토콘드리아 막 전위 측정

미토콘드리아의 막 전위를 측정하기 위해 12 시간, 24 시간, 48 시간 동안 Compound K (20 ㎍/ ㎖)가 처리된 세포 (2 x 10^5cell/ ㎖)를 30 mM의 cationic lipophilic fluorochrom인 $DiOC_6$(Molecular Probes, Eugene, OR)를 37 ℃에서 15 분간 배양하고, flow cytometry로 측정하였다(Zamzami *et al.* 1995).

8. 단백질 발현 측정

Compound K가 처리된 세포를 (2 x 10^5cell/ ㎖) 각 시간대별로 수확하여 120 mM NaCl, 0.1 % NP-40, 40mM Tris-HCl (pH 8.0)으로 구성된 lysis buffer를 500 ㎕씩 넣어 세포를 lysis하였다. 이에 얻어진 lysate를(40 ㎍ of protein) 10 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에서 전기영동하고 nitrocellulose membrane (BioRad, Hercules, CA)에 transfer시켰다. Membrane에 일차적으로 mouse monoclonal anti-human caspase-3, caspase-9, poly ADP-ribosyl polymerase(PARP), Bcl2 와 Bax (Pharmingen, San Diego, CA) 항체들을 처리하였다. 일차 항체 처리 후 세 번씩 washing과정을 거쳐 2차 항체인 horseradish peroxidase가 결합된 goat anti-mouse immunoglobulin G를 처리한 후, X-ray 필름에 노출시키고 chemiluminescence western blotting 측정 kit를 사용하여 단백질 발현을 측정하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

9. 통계처리

데이터는 means ± standard error값으로 나타내었고, 실험군 사이의 통계적유의성은 the paired Student's t-test를 사용하여 평가하였다.

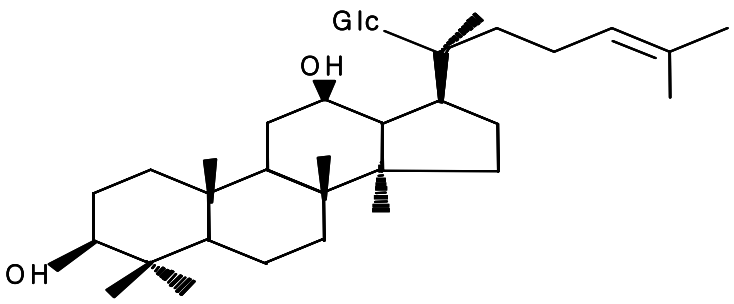


Figure 1. Chemical Structure of Compound K (20 O-(-D Glucopyranosyl) - 20 (S) -Protopanaxadiol)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅲ. 결　　과

1. Compound K에 의한 인간 백혈병 세포주들의 성장 억제

MTT실험을 이용하여 U937외에 다른 백혈병 세포주 Molt-4, H9, Jurkat, CEM-CM3 그리고 정상세포인 mouse spleen cell의 성장에 미치는 Compound K의 효과와 IC_{50}값을 측정하였다. Compound K를 4일간 처리하였을 때, IC_{50}의 범위는 세포주에 따라 다양하였는데, U937에서는 20 ㎍/㎖, Jurkat에서는 26 ㎍/㎖, CEM-CM3에서는 36 ㎍/㎖, Molt4에서는 44 ㎍/㎖, H9에서는 64 ㎍/㎖, splenocytes에서는 48 ㎍/㎖로 각각 나타내었다. (Table 1., Fig. 2A) 이상의 결과로부터 Compound K에 가장 민감한 것으로 보여진 U937세포주가 이후의 실험에 사용되었다. 다음으로 U937세포에서의 인삼 사포닌 ginsenoside Rb1 과 그 대사체인 Compound K의 대한 세포생존율을 살펴보기 위해 ginsenoside Rb1 과 Compound K를 여러 용량으로 MTT실험을 하여 세포 증식 정도를 관찰한 결과 Compound K는 용량 의존적으로 유의성 있게 죽는 반면, ginsenoside Rb1은 별 효과를 나타내지 않았다. IC_{50}값을 비교하였을 때 Compound K는 20 ㎍/㎖, ginsenoside Rb1이 90 ㎍/㎖ 이었다(Table 2, Fig. 2B). 그리고 Compound K가 U937 세포성장 억제시키는 역학(kinetics)을 측정하기 위해 trypan blue dye염색 실험을 시간대별로 실행하였다. Compound K를 처리하여 12시간 후 세포성장 억제가 증가되었다. (Fig. 2C)

Compound K 가 정상세포에서도 세포독성 효과가 있는지를 알아보기 위하여 mouse의 비장세포에 Compound K를 농도별로 처리하여 MTT실험을 이용하여 측정하였다. Compound K를 처리하여 4 일 배양 후 U937세포와 비교하였을 때 비장세포가 IC_{50}값이 훨씬 높다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2D). 위 결과들은 전구체인 ginsenoside Rb1보다는 대사체인 Compound K가 세포독성에 효과가 있고, 다양한 백혈암 세포주의 증식을 억제하였으며 특히 U937 세포에서 가장 뚜렷하였다.

2. U937세포에서 Compound K 로 유도된 세포사멸 현상

Compound K로 인한 U937 세포죽음의 원인이 세포사멸현상의 유도인지를 다양한 방법으로 조사하였다. 첫째로, 원형질막의 내막에서 외막으로의 phosphatidylserine(PS)의 이동을 FITC-Annexin V binding assay로 측정하였다. Fig. 3A에서 보여주듯이, Compound K를 처리한 U937세포에서 PS의 이동이 관찰된 세포들(Annexin V에 양성이고 propidium iodide에 음성) 의 비율은

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

대조군 보다 증가되었다.
또한 apoptotic body 형성(Fig. 3B)이 관찰되었으며, DNA fragmentation또한 관찰되었다(Fig. 3C). 이러한 결과들로부터 Compound K는 U937세포의 세포사멸을 유도한다는 사실을 확인할 수 있었다(Chau *et al.* 1998).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

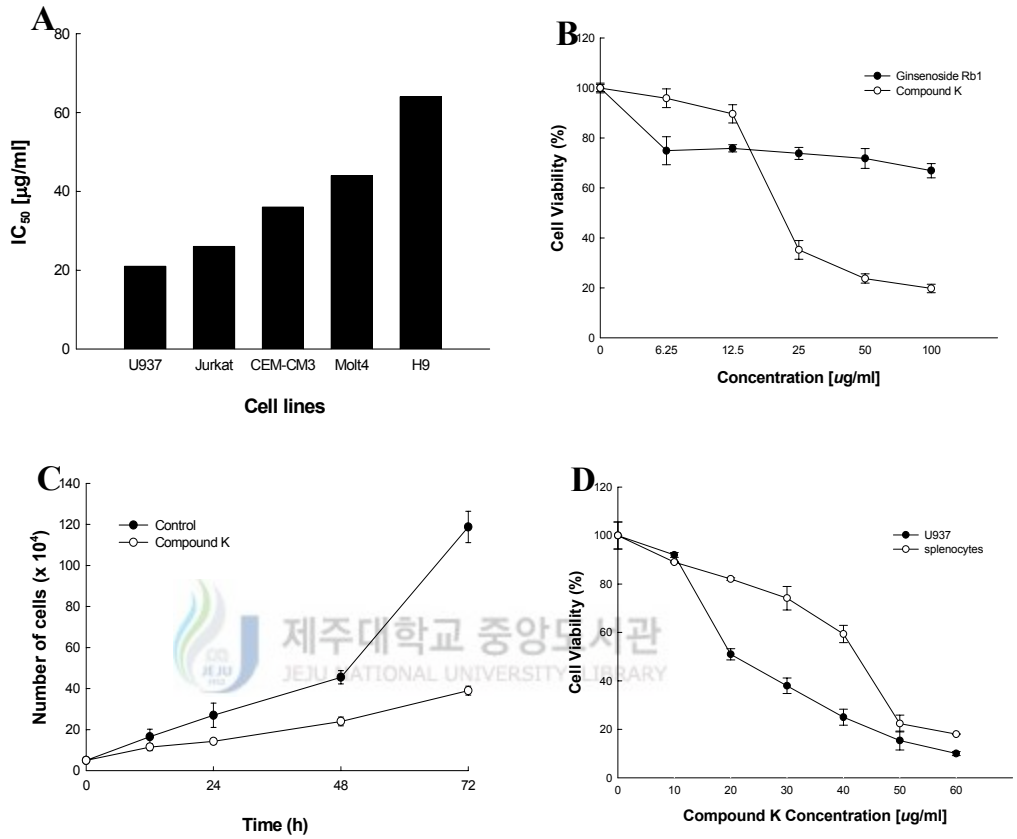
Table 1. IC_{50} values of Compound K on various leukemia cell lines and splenocytes.

Cell	IC_{50} values [ug/ml]
U937	20
Molt-4	44
H9	64
Jurkat	26
CEM-CM3	36
splenocyte	48

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 2. IC_{50} values of *Panax* ginsenosides Rb1 and Compound K on U937 human leukemia cells.

	IC_{50} values [ug/ml]
Ginsenoside Rb1	90
Compound K	20



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 2. IC_{50} values of Compound K in various leukemia cell lines and the kinetics of *Panax* ginsenosides Rb1 and Compound K cell growth inhibition of U937 cells. H9, CEM-CM3, U937, Jurkat, and Molt4 cells were incubated for 4 days in the presence of various amounts of Compound K, and their growth rates were determined by MTT test. IC_{50} values were determined at the concentration showing the 50 % inhibition of cell growth (A).Cytotoxic effect of *Panax* ginsenosides Rb1 treated U937 was lower than Compound K(B). The kinetics of the cell growth of Compound K treated (20 ㎍/㎖) U937 cells was evaluated at the indicated times using the trypan blue exclusion method(C). However, significant cytotoxic effect of Compound K treated mouse spleen cells as normal cells was not shown in normal mouse spleen cells(D).

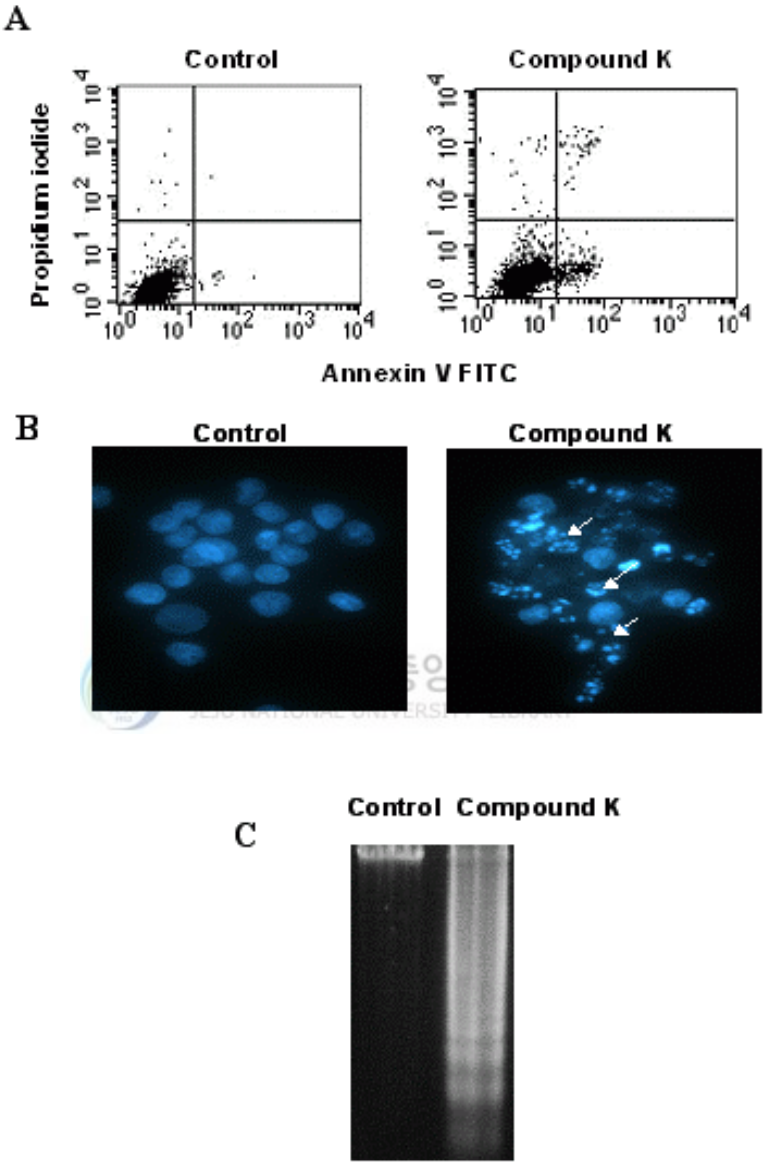


Figure 3. Apoptotic patterns in Compound K-treated U937 cells.
U937 cells cultured with Compound K at 20 ㎍/㎖ were examined for apoptosis. (A) To determine the level of phosphatidylserine exposure, Compound K treated cells were harvested at 6 h and stained with Annexin V-FITC and propidium iodide. The stained cells were analyzed using a

FACSCalibur flow cytometer. (B) Micro photograph, showing apoptotic bodies after incubating with Compound K (20 ㎍/㎖) for 48 h. Compound K-treated cells were harvested at 48 h and stained with Hoechst 33258. Nuclei were observed using an Axiovert 100 inverted fluorescence microscope. (C) Gel electrophoresis was performed to detect DNA fragmentation after incubating with Compound K for 48 h. Genomic DNA was extracted using a genomic DNA extraction kit, and DNA was electrophoresed on a 1.8 % agarose gel and visualized under ultraviolet light.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Compound K 에 의한 Bax와 Caspase의 활성화 유도

Compound K가 세포사멸을 유도하는 기전을 이해하기 위하여 첫째로 Western blot을 통하여 세포사멸 후 인자인 Bax와 세포사멸 억제인자인 Bcl-2의 발현의 변화를 조사하였다. Fig. 4에서 보여주듯이 Bax는 시간이 지남에 따라 점차 증가하였으며, Bcl-2는 변화가 없었다. 다음으로는 세포사멸의 개시자 중 하나인 caspase-9의 변화를 측정하였다(Yang *et al.* 1997). western blot을 통하여 caspase-9의 활성형(37 kDa) 이 증가하는 것을 볼 수 있었다.(Fig. 4) 또한 caspase-3의 두 가지 활성형(12 과 17 kDa)의 발현이 증가되었으며 PARP의 가수분해 또한 증가하였다.
이러한 결과들은 Compound K가 Bax의 발현을 증가시키고 caspase 활성화를 통하여 세포사멸을 유도한다는 것을 보여주었다.

4. Compound K 에 의한 Mitochondria 막전위의 손실

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

미토콘드리아 막의 탈분극은 caspase-9이 활성화되었다는 것으로 알려졌는데(Mignotte and Vayssiere 1998 ; Green and Reed 1998), Compound K는 미토콘드리아의 transmembrane 전위의 분열을 유도하여 $DiOC_6$의 형광농도를 감소시키는 결과로 나타났다(Fig. 5). 이 결과는 Compound K에 의해 유도된 세포사멸과정 동안 미토콘드리아의 transmembrane 전위의 손실이 발생한다는 것과 caspase-9 경로를 경유하여 Compound K가 apoptosis를 유도하는 것을 보여주었다.

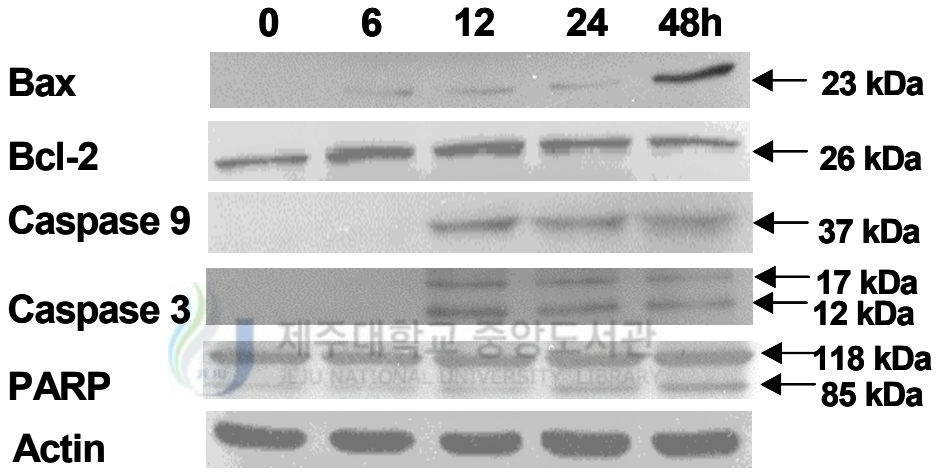
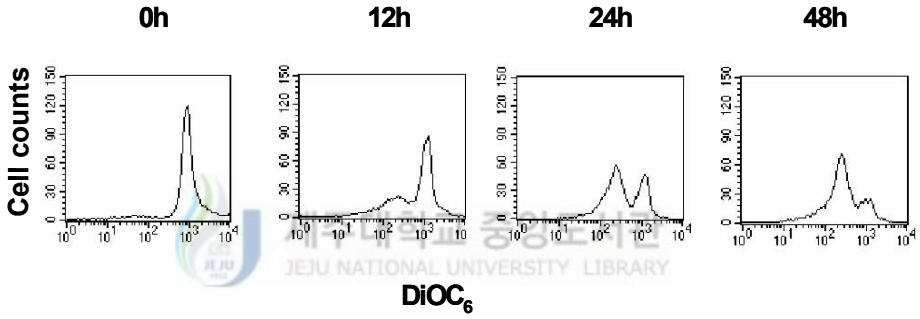


Figure 4. Up-regulation of Bax, activation of caspase-9 and caspase-3, and cleavage of PARP in Compound K treated U937 cells. U937 cells were cultured with Compound K (20 ㎍/㎖) for the indicated times. Cells were lysed with lysis buffer and protein was subjected to electrophoresis on a 10 % SDS-polyacrylamide gel. Each protein was transferred to a nitrocellulose membrane and the membrane was incubated with mouse monoclonal antibodies against Bax, Bcl-2, caspase-9, caspase-3 and PARP as primary antibodies and then with goat anti-mouse immunoglobulin G-conjugated with horse radish peroxidase for Enhanced chemiluminescent luciferase analysis(ECL).



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 5. Disruption of mitochondrial membrane potential in Compound K treated U937 cells. Compound K (20 ㎍/㎖)-treated U937 cells for the indicated times and stained with $DiOC_6$ for 15 min and the cells were analyzed with a FACSCalibur flow cytometer.

Ⅳ. 고 찰

현 연구의 목적은 장내세균에 의해 대사된 인삼 사포닌 대사체 Compound K에 의해 인간 단핵구 백혈병 U937세포의 성장이 억제하는지와, 그 기전을 밝히기 위해서이다.

Compound K (20-O-(β-D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol, IH-901)는 인삼추출성분이 장내세균에 의해 대사된 인삼 사포닌 대사체이다 (Hasegawa *et al.* 1996 ; Bae *et al.* 2000, 2002). Compound K가 ginsenoside Rb1을 경구투여한 쥐들의 혈액에서 측정된 대사체중의 하나인 것으로 밝혀진 이래 그것은 Compound K가 장에 의해 흡수되는 주요 protopanaxadiol 사포닌일 것이라고 사료되었고(Hasegawa *et al.* 1997), Compound K가 인삼 사포닌의 항암효과에 주요한 활성 대사체 라고 보고된바있다(Bae *et al.* 2002 ; Wakabayashi *et al.* 1997 ; Lee *et al.* 1999, 2000).

이상의 연구로부터 인삼 사포닌 성분인 ginsenoside Rb1을 장내 세균을 이용하여 전환시킨 Compound K 대사체의 항암활성 측면을 사람 백혈병 세포주들에서 관찰하고 Compound K에 의한 세포독성 기전을 세포사멸 측면에서 연구하였다. 사람 백혈병의 여러 세포주들이 사용되었고 특히, 그중 사람 단핵구 백혈병 세포주인 U937에서 Compound K의 세포독성 효과가 컸으며, 다른 백혈병 세포주들 보다 U937에서의 Compound K작용이 제일 민감하다는 것을 보여주었다. 그리고 사람 백혈병 세포주인 U937에서 Compound K와 그의 전구체인 ginsenoside Rb1의 항암작용을 살펴 보기위해 세포독성 효과를 비교해 본 결과 Compound K 가 더 강한 세포독성을 나타내었다. 이는 전구체인 ginsenoside Rb1보다 대사체인 Compound K가 항암 활성에 더 효과적인 것을 보여주며 인삼 사포닌의 주요 활성본체가 대사체임을 보여주었다. 또한, Compound K가 처리된 U937세포들은 세포사멸의 특징인 내막에서 외막으로의 phosphatidylserine 형의 노출과 apoptotic body 형성, DNA fragmentation을 나타내었다. Bcl-2 그룹 단백질은 알려진 세포사멸의 조절자의 하나이다. Bcl-2는 세포내 세포사멸 억제 인자이고 세포생존을 촉진하는데 공헌하는데 반하여 Bax는 세포사멸 촉진인자(*Hengartner* and *Horvitz* 1994)이다. Bcl-2는 Bax와 이형 dimer를 형성하여 작용하며 Bcl-2 대 Bax의 비율은 다양한 세포사멸 자극제에 의해 세포의 민감성 과 저항성의 상대적인 균형을 이룬다(*Oltvai* and *Korsmeyer* 1994). Compound K가 처리된 U937세포에서 Bax level이 증가되는 것을 보였으나 Bcl-2 level은 변하지 않았다. 그러므로 Compound K에 의한 세포사멸의 유도

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

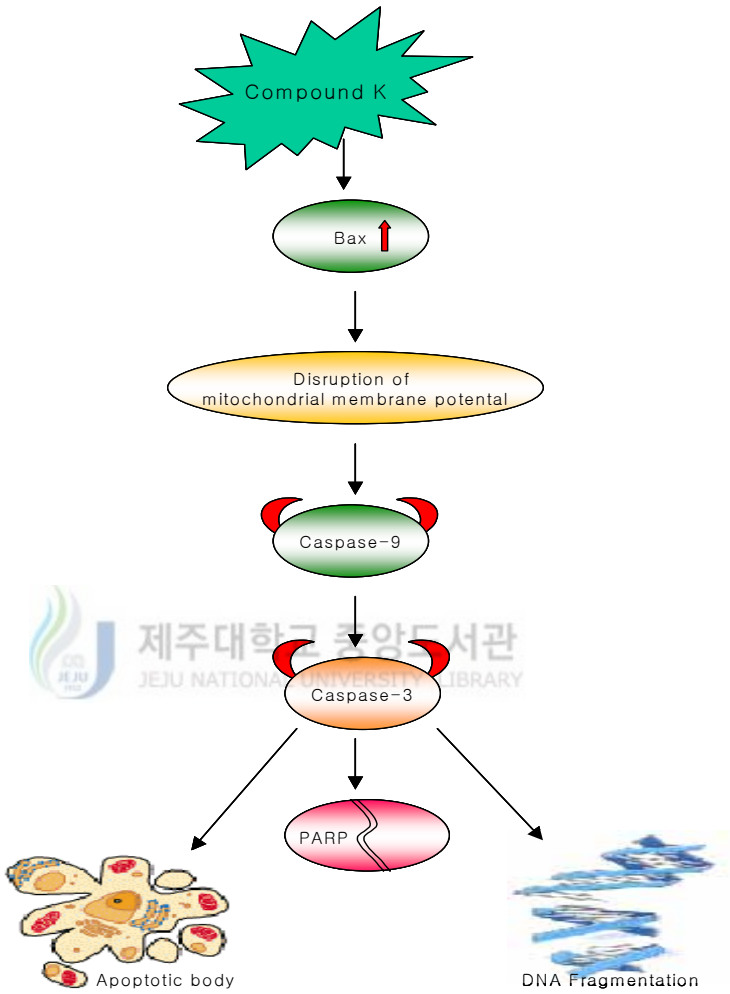
는 Bax level을 증가하는 것에 기인한다고 추측된다.

한편, 세포사멸 유발 경로에 또 다른 중요 조절인자로 작용하는 caspase protease 그룹에 속하는 많은 단백질들은 세포에서 핵과 미토콘드리아의 외막에 존재하며, 이들의 활성화는 Bax 발현 정도에 의존적이다. 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 세포사멸 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 protease로 전환되어 직, 간접으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다. 따라서 본 연구에서 세포사멸이 유도되는 다양한 경로 중 caspase-의존성 경로에 초첨을 맞추어, 세포사멸 개시자인 caspase-9과 세포사멸의 조절자인 casepase-3 및 PARP를 차례로 활성화시킴으로서 핵 내부로 세포사멸 신호를 전달하게 된다는 가정 하에 caspase-9, caspase-3 와 PARP의 변화를 관찰할 수 있었고, 이는 Compound K가 U937세포에서 caspase 단백질을 활성화함으로서 세포사멸을 유도하는 것이라 추측되어진다.

요약하면 Compound K가 처리된 U937 세포들은 다양한 세포사멸의 특징들을 보여주었다. 즉, 세포내막에서 세포외막으로 phosphatidylserine이 노출되고, apoptotic body 의 형성이 나타나며, 그리고 DNA fragmentation현상들을 나타내었다. 또한, Compound K 는 Bax의 상향 조절과 탈분극된 미토콘드리아 막의 전위에 의해, 그리고 순차적인 caspase-9과 caspase-3, PARP 의 활성화에 의해 세포사멸을 유도하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

결론적으로 인삼 사포닌 성분인 ginsenoside Rb1을 장내 세균을 이용하여 전환시킨 대사체 Compound K가 전구체인 ginsenoside Rb1보다 더 강한 세포독성 효과를 나타내었다. 특히 사람 백혈병 세포주인 U937에서 세포사멸 과정을 통한 세포독성 효과를 나타냈으며, Bax와 caspase 활성화의 up-regulation을 통한 세포사멸 유도에 의해 U937세포 성장을 억제시킨다고 사료되며, 이것은 인삼의 활성 본체가 인삼 사포닌의 대사체 임을 의미하는 것이며 이러한 결과는 그의 항암작용과 그 기전을 연구하는데 있어 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 6. Induction of apoptosis by Compound K as a ginseng saponin metabolite in U937 human monocytic leukemia cells. Compound K-treated U937 cells induce characteristics of apoptosis; an exposure of phosphatidylserine from the inner cell membrane to the outer cell membrane, the formation of apoptotic bodies and DNA fragmentation. Compound K also induce up-regulation of Bax, disruption of the mitochondrial membrane potential, and activation of caspase-9, caspase-3 and PARP.

V. 참 고 문 헌

남기열. 최신고려인삼 (성분과 효능편). pp. 56-114, 천일 인쇄소, 대전, 1996.

Ahmad, N., Feyes, D. K., Nieminen, A. L., Agarwal, R. and Mukhtar, H. 1997. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. J. Natl. Cancer Inst. 89, 1881-1886.

Bae, E. A., Han, M. J., Choo, M. K., Park, S. Y. and Kim, D. H. 2002, Metabolism of 20(S)-and 20(R)-ginsenoside Rg3 by human intestinal bacteria and its relation to in vitro biological activities. Biol. Pharm. Bull. 25, 58-63.

Bae, E. A., Park, S. Y. and Kim, D. H. 2000, Constitutive -glucosidases hydrolyzing ginsenoside Rb1 and Rb2 from human intestinal bacteria. Biol. Pharm. Bull. 23, 1481-1485.

Bishop, J. M. (1991) Molecular Themes in Oncogenesis,. Cell, 64, 235-248

Carmichael, J., Degraff, W. G. and Gazdar, A. F. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemo-sensitivity testing. Cancer Res. 47, 936-941.

Chau, Y. P., Shiah, S. G., Don, M. J. and Kuo, M. L. 1998. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor -lapachone induced apoptosis and differentiation in human leukemia cell. Free Rad. Biol. Med. 24, 660-670.

Choi, J. H. and Oh, S. K. Studies on the anti-aging action of Korean ginseng. Korean J. Food Sci. Technol. 1985, 17, 506-515.

Choi, S. S., Lee, J. K. and Suh, H. W. Effect of ginsenosides administered intrathecally on the antinociception induced by cold water swimming stress

in the mouse. Biol. Phram. Bull. 2003, 26, 858-861.

Choo, M. K., Park, E. K., Han, M. J. and Kim, D. H. Antiallergic activity of ginseng and its ginsenoside. Planta Med. 2003, 69, 518-522.

Cooper, G. (1995) Oncogenes (Jones and Barrlett)

Dey, L., Zhang, L. and Yuan, C. S. Anti-diabetic and anti-obese effects of ginseng berry extract : comparison between intraperitoneal and oral administrations. Am. J. Chin. Med. 2002, 30, 645-647.

Ga, Y., Goa, R. L. and Niu Y. P. Effect of Panax notoginsenosides on the proliferation of hematopoietic progenitor cells in mice with immune-mediated aplastic anemia. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 2003, 23, 680-683.

Green, D. R. and Reed, J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. Science 281, 1309-1312.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Hasegawa, H., Matsumiya, S., Uchiyama, M., Kurokawa, T., Inouye, Y., Kasai, R., Ishibashi, S. and Yamasaki, K. 1995a. Inhibitory effect of some triterpenoid saponins on glucose transport in tumor cells and its application to in vitro cytotoxic and antiviral ativities. Planta Med. 60, 240-243.

Hasegawa, H., Sung, J. H., Matsumiya, S., Uchiyama, M., Inoue, Y., Kasai, R. and Yamasaki, K. 1995b. Reversal of daunomycin and vinblastin resistance in multidrug resistant P388 leukemia in vitro through enhanced cytotoxicity by triterpenoids. Planta Med. 61, 409-413.

Hasegawa, H., Sung, J. H., Matsumiya, S. and Uchiyama, M. 1996. Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. Planta Med. 62, 453-457.

Hasegawa, H., Sung, J. H. and Huh, J. D. 1997. Ginseng intestinal bacteria metabolite IH901 as a new antimetastatic agent. Arch. Pharm. Res. 20, 539-544.

Hengartner, M. O. and Horvitz, H. R. 1994. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. Cell 76, 665-676.

Hunter, T. (1991) Cooperation between Oncogenes. Cell, 64, 249-270

Iishi, H., Tatsuta, M., Baba, M., Uehara, H., Nakaizume, A., Shinkai, K., Akedo, H., Funai, H., Ishiguro, S. and Kitagawa, I. 1997. Inhibition by ginsenoside Rg3 of bombesin enhanced peritoneal metastasis of intestinal adenocarcinomas induced by azoxymethane in Wistar rats. Clin. Exp. Metastasis 15, 603-611.

Karikura, M., Miyaze, T., Tanizawa, H., Taniyama, T. and Takino, Y. 1991. Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins: the decomposition products of ginsenoside Rb2 in the large intestine of rats. Chem. Pharm. Bull. 38, 2859-2861.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Kikuchi, Y., Sasa, Y. H., Kita, T., Hirata, J., Tode, T. and Nagata, I. 1991. Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation in vitroby ginsenoside Rh2 and adjuvant effects to cisplastin in vivo. Anticancer Drug 2, 63-67.

Kim, Y. S., Jin, S. H., Lee, Y. H., Kim, S. I. and Park, J. D. 1999. Ginsenoside Rh2 induces apoptosis independently of Bcl-2, Bcl-xL, or Bax in C6Bu-1 cells. Arch. Pharm. Res. 22, 448-453.

Kitts, D. D., Wijewickreme, A. N. and Hu, C. Antioxidant properties of a North American ginseng extract. Mol. Cell Biochem. 2000, 203, 1-10.

Kwon, Y. S., Jang, K. H. and Jang, I. H. The effects of Korean red ginseng (ginseng radix rubra) on liver regeneration after partial hepatectomy in dogs. J. Vet. Sci. 2003, 4, 83-92.

Lee, B. H., Lee, S. J., Hur, J. H., Lee, S., Sung, J. H., Huh, J. D. and Moon, C. K. 1998. In vitro antigenotoxic activity of novel ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. Planta Med. 64, 500-503.

Lee, J. K., Choi, S. S., Lee, H. K., Han, K. J., Han, 184 E. J. and Suh, H. W. Effects of ginsenoside Rd and decursinol on the neurotoxic responses induced by kainic acid in mice. Planta Med. 2003, 69, 230-234.

Lee, S. J., Ko, W. G., Kim, J. H., Sung, J. H., Lee, S. J., Moon, C. K. And Lee, B. H. 2000. Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c mediated activation of caspase 3 protease. Biochem. Pharm. 60, 677-685.

Lee, S. J., Sung, J. H., Lee, S. J., Moon, C. K. and Lee, B. H. 1999. Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. Cancer Letters 144, 39-43.

Lee, Y, N., Lee, H. Y., Chung, H. Y., Kim, S. I., Lee, S. K., Park, B. C. and Kim, K. W. 1996. In vitro induction of differentiation by ginsenosides inF9 teratocarcinoma cells. Eur. J. Cancer 32A, 1420-1428.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Mignotte, B. and Vayssiere, J. L. 1998. Mitochondria apoptosis. Eur. J. Biochem. 252, 1-15.

Nagata, Y. and Todokoro, K. 1999. Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress induced erythroid differentiation and apoptosis and inhibition of ERK for apoptosis. Blood 94, 853-863.

Oltvai, Z. N. and Korsmeyer, S. J. 1993. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. Cell 74, 609-619.

Oltvai, Z. N. and Korsmeyer, S. J. 1994. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 76, 665-676.

Park, J. A., Lee, K. Y., Oh, Y. J., Kim, K.W. and Lee, S. K. 1997. Activation of caspase-3 protease via a Bcl-2 insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2-induced apoptosis. Cancer Lett. 121, 73-81.

Petrach, I., Choi, M. E., Otterbein, L. E., Chin, B. Y., Mantell, L. L., Horowitz, S. and Choi, A. M. 1999. Mitogen activated protein kinase pathway mediates hyperoxia induced apoptosis in cultured macrophage cells. Am. J. Physiol. 277, 1589-1599.

Piao, W., Yoo, J., Lee, D. K., Hwang, H. J. and Kim, J. H. 2001. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a new synthetic anti-cancer agent, DW2282, in promyelocytic leukemia (HL-60) cells. Biochem. Pharm. 62, 1439-1447.

Purohit, A., Hejaz, H. A. M., Walden, L., Maccarthy-Morrogh, L., Packmam, G., Potter, B. V. L. and Reed, M. J. 2000. The effect of 2-methoxyoestrone-3-O-sulphamate on the growth of breast cancer cells and induced mammary tumors. Int. J. Cancer 85, 584-589.

Que, F. G. and Gores, G. 1996. Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist, Gastroenterology. 110, 1238-1246.

Shinkai, K., Akedo, H., Mukai, M., Imamura, F., Isoai, A., Kobayashi, M. and Kitagawa, I. 1996. Inhibition of in vitro tumor cell invasion by ginsenoside Rg3. Jpn. J. Cancer Res. 87, 357-362.

Shin, H. R., Kim, J. Y., Yun, T. K., Morgan, G. and Vainio, H. The cancer-preventive potential of Panax ginseng : a review of human and experimental evidence. Cancer Causes Control. 2000, 11, 565-576.

Shi, X., Zhao, F., Dai, X., Fang, J. and Yang, H. Effects of san qi on gastric secretion and protective factors of gastric mucosa in the rat with precancerous lesion of stomach. J. Tradit. Chin. Med. 2003, 23, 220-224.

Smith, M. and Boon, H. S. Counseling cancer patients about herbal medicine. Patient Educ. Cuns. 1999, 38, 109-120.

Talarmin, H., Rescan, C., Carious, S., Glaise, D., Zanninelli, G., Bilodeau, M., Loyer, P., Guguen-Guillouzo, C. and Baffet, G. 1999. The mitogen activated

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

protein kinase kinase extracellular signal regulated kinase cascade activation is a key signaling pathway involved in the regulation of G1 phase progression in proliferating hepatocytes. Mol. Cell. Biol. 19, 6003-6011.

Tode, T., Kikuchi, Y., Kita, T., Hirata, J., Imaizumi, E. and Nagata, I. 1993. Inhibitory effects by oral administration of ginsenoside Rh2 on the growth of human ovarian cancer cells in nude mouse. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 120, 24-26.

Wakabayashi, C., Hasegawa, H., Murata, J. and Saiki, I. 1997. In vivo antimetastatic action of ginseng protopanaxadiol saponins is based on their intestinal bacterial metabolites after oral administration. Oncol. Res. .9, 411-417.

Wakabayashi, C., Hasegawa, H., Murata, J. and Saiki, I., (1997) Oncology Research 9, 411

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Wee JJ, Park JD, Kim MW, Lee HJ (1989) Identification of phenolic antioxidant components isolated from Panax ginseng. J. Korean Agric. Chem. Soc. 32 : 50-56.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T., Jones, D. P. and Wang, X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science 275, 1129-1132.

Yoon JY, Ha BH, Woo JS, Lim YH, Kim KH (2002) Purification and characterization of 28-kDa major protein from ginseng root. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 132 : 551-557.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J. L., Petit, P. X. and Kroemer, G. 1995. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. J. Exp. Med. 181, 1661-1672.

Zhong, W. B., Wang, C. Y., Ho, K. J., Lu, F. J., Chang, T. C. and Lee, W.

S. 2003. Magnolol induces apoptosis in human leukemia cells via cytochrome c release and caspase activation. Anticancer Drugs 14(30), 211-217.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

VI. 요 약

인삼 사포닌이 나타내는 항암작용의 활성 본체가 대사체임을 밝히기 위해 사람 백혈병 세포주에 대한 항암작용을 살펴보았다. 인삼 사포닌 성분인 ginsenoside Rb1을 장내 세균을 이용하여 Compound K 대사체로 전환시킨 후 대사체가 백혈암 세포주의 생존능에 미치는 영향을 비교한 결과 인삼 사포닌보다 대사체인 Compound K가 더 백혈병 세포의 생존능을 억제하였다. 인삼 사포닌 대사체인 Compound K는 사람 백혈병 여러 세포주 들 가운데 단핵구 백혈병 세포주인 U937에서 가장 큰 세포독성 효과를 나타내었다.

Compound K가 처리된 U937 세포들은 세포사멸의 현상들인 세포내막에서 세포외막으로의 phosphatidylserine의 노출, apoptotic body의 형성, 그리고 DNA 분절화 현상을 나타내었다. 이러한 과정에는 Bax의 발현 유도 및 미토콘드리아 막전위의 탈분극, 그리고 caspase-9과 caspase-3의 활성화들이 수반되었다. 그러므로 Compound K는 Bax와 caspase 활성화를 매개로 하여 U937 세포의 사멸을 유도하는 것으로 판단되며 이러한 결과로부터 인삼 사포닌 ginsenoside Rb1보다 장내세균에 대사된 Compound K가 항암작용의 활성본체로 작용하여 apoptosis를 통해 암세포사멸을 초래함을 밝혔다.

감사의 글

2년 동안의 대학원 과정을 통해서 배우고 느낀 점이 참 많습니다.
그리고 그 과정동안 저는 훌륭하신 분들께 말로 표현할 수 없는 많은 도움을 받으며 2년 동안의 대학원 생활을 즐겁게 할 수 있었습니다.
그리고 이러한 과정들을 통해 아직 많이 부족하다는 것을 느꼈고 앞으로 더욱 더 발전해나가기 위한 과정이라고 생각하며 더 열심히 해야 하겠다는 생각을 해봅니다.

본 논문이 완성되기까지는 많은 분들의 도움과 격려가 있었습니다. 우선, 바쁘신 와중에도 많은 관심과 애정으로 격려해주시고 저의 실수에도 너그러운 마음으로 가르쳐 주신 현진원 교수님께 감사드립니다. 앞으로도 많은 조언과 가르침을 부탁드리고 늘 건강하세요. 또한 논문의 부족한 부분을 지적하여 주신 박덕배 교수님, 유은숙 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 대학원 과정 동안 늘 관심과 애정 어린 조언을 해주신 조문제 교수님, 고영상 교수님, 이봉희 교수님, 정영배 교수님, 이영기 교수님, 이상이 교수님, 홍성철 교수님, 조수현 교수님, 강현욱 교수님, 김명주 교수님, 이근화 교수님께도 감사드립니다.
저에게 학문의 길을 알려주신 생명과학과 김원택 교수님과 김세재 교수님, 그 외 생명과학과 모든 교수님들께도 감사의 말씀 올립니다.
그리고 실험의 기초도 제대로 알지 못한 저에게 많은 것을 가르쳐 주시고 조언을 아끼지 않으셨던 임희경 언니, 영미언니, 윤석 오빠께도 진심으로 감사드립니다.

여러 실험을 배우면서 많은 도움과 조언을 주신 강신해 선생님, 박수영 선생님, 윤지현 언니, 변경희 선생님, 지훈오빠, 생명과학과 분자생물학 실험실에 정형복, 진영준, 최진영 언니께도 감사의 말씀을 올립니다.
그리고 대학원 동기이자 많은 도움을 주었던 재희, 재우오빠, 최수길 선생님, 실험실 막내둥이 진영이, 형득이, 지금은 없지만 그리운 봉림이 그리고 정말 많은 조언을 해주었던 혜자 언니, 은아 언니, 수업시간 등에 많은 도움을 주셨던 은희 선생님을 비롯한 여러 실험실 선생님들께도 정말 고마운 마음을 전합니다.
나의 푸념을 모두 받아주었던 친구들 현정, 희정, 승혜, 순제, 미정, 은진, 경은, 은정, 고등학교 후배들 모두 고맙다. 모두 잘되길...

끝으로 부족한 큰딸 옆에서 늘 지켜주시는 엄마, 아빠, 할아버지, 무뚝뚝 동생에게도 고마움과 사랑의 마음을 전하며, 이 논문을 바칩니다. 열심히할께요.
모두모두 감사합니다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY