



藥學博士學位論文

간암 세포주에서 진세노사이드의 자가포식 작용 유도

Induction of Autophagy in Hepatoma G2 Cells

by Ginsenosides

2014年 8月

서울大學校 大學院

藥學科 生藥學專攻

鄭鍾惠

간암 세포주에서 진세노사이드의 자가포식 작용 유도

Induction of Autophagy in Hepatoma G2 Cells by Ginsenosides

指導教授 金 鎭 雄

이 論文을 藥學博士 學位論文으로 提出함 2014年 7月

> 서울大學校 大學院 藥學科 生藥學專攻 鄭 鍾 惠

鄭鍾惠의 藥學博士 學位論文을 認准함 2014年 7月

委員	長	성	상	현	(ED)
副委	員長	오	원	근	(印)
委	員	김	ই	표	(印)
委	員	진	형	원	(印)
委	員	김	진	운	(印)

국문초록

자가포식 (autophagy)은 유전적으로 잘 보존된 세포 내 이화 작용으로 세포질 내의 구성 물질을 이중막 구조의 소포체인 자가포식소체 (autophagosome)을 경유하여 lysosome에 의해 분해시키는 과정이다. 이는 불필요한 구성 물질이나 노후한 세포 내 소기관 등을 분해하여 새로운 에너지원으로 이용할 수 있게 하는 일종의 재활용 시스템의 역할을 하며, 대부분의 세포에서 항상성을 유지시키고, 영양소의 결핍이나, 산화적 스트레스, 항암치료제 등의 요인에 의해 상향 조절 (up-regulation) 된다. 암의 형성단계에 있어서 자가포식은 유전자의 안정성을 해칠 수 있는 손상된 미토콘드리아 등을 제거함으로써 암의 형성을 억제하는 작용을 한다. 그러나 암세포에서 자가포식은 두 가지 상반된 역할을 하는데, 항암치료로 인해 유도된 세포자멸 (apoptosis)로부터 생존률을 높이는 세포 보호 작용 (protective action)을 하거나, 혹은 자가포식의 지속적이거나 과도한 진행으로 인해 세포의 사멸을 일으키는 세포계획사의 한 형태로서도 작용한다.

전통적으로 인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer, 오갈피나무과 Araliaceae)은 아시아 국가에서 강장의 목적으로 널리 이용되어 왔으며, 인삼의 주된 활성 성분인 진세노사이드는 dammarane 골격을 갖는 triterpene 계 사포닌으로 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 진세노사이드는 그 비당부 모핵의 골격에 따라 protopanaxatriol (PPT) 계와 protopanaxadiol (PPD) 계 진세노사이드로 분류되고 또한 20번 탄소에 붙어있는 수산기의 입체화학 구조에 따라 20(S) 혹은 20(R)-epimer의 두 가지 형태로 존재하는데, 이 두 가지 이성질체 간 활성이 다르다는 연구 결과들이 계속 보고되고 있다.

본 연구에서는 간암의 유래 세포인 HepG2 세포주를 이용하여, 인삼 추출물로부터 분리된 수 종의 진세노사이드 중에서 autophagy를 유도하는 화합물을 검색하였고, autophagy 유도 활성과 동시에 세포사멸 효과 또한 나타내는 10 종의 진세노사이드를 대상으로 그 구조 별 autophagy 유도 효과와 세포사멸 효과 간의 상관 관계를 탐색해 보았다.

PPD 계열의 진세노사이드인 ginsenoside Rg3, Rh2와 그 대사체인 20(S)protopanaxadiol (PPD)의 20(S)-epimer를 HepG2 세포에 처리했을 때 농도에 비례하여 세포 사멸 효과가 나타났으며, 20(R)-epimer 의 효과는 거의 없었다. PPT 계열의 화합물 중에서는 ginsenoside Rh4와 그 대사체인 aglycone of Rh4, 20(R)-ginsenoside Rh1가 앞선 세 가지 PPD 계열 화합물보다는 높은 농도에서 HepG2 세포의 성장을 억제했으며 20(S)-ginsenoside Rh1의 효과는 거의 없었다. 화합물의 autophagy 유도 활성을 검색하기 위해 autophagy 과정 중 세포 내에서 형성되는 산성의 소포체를 감지할 수 있는 monodansylcadaverine (MDC) 염색법과 LC3 I 단백질에서 LC3 II 단백질로 변화하는 정도를 western blot으로 측정하였다. 그 결과 HepG2 세포 사멸 효과와 마찬가지로 ginsenoside Rh2와 Rg3, PPD의 경우는 20(S)-epimer만이 반대로 ginsenoside Rh1은 20(R)epimer만이 autophagy를 효과적으로 유도하는 것으로 나타났다. 그리고 20번 탄소에 이성질체가 존재하지 않는 ginsenoside Rh4와 그것의 aglycone 역시 autophagy를 유도하는 활성을 나타냈다.

또한 autophagy 유도 및 세포사멸 효과를 보이는 진세노사이드에 autophagy 저해제인 클로로퀸 (chloroquine)을 처리하고 세포의 생존률과 세포사멸 양상의 변화를 MTT assay와 유세포 분석 (flow cytometry)을 이용하여 비교 분석하였다. 20(S)-gisenoside Rg3, Rh2, PPD의 경우 HepG2 세포에 대하여 apoptosis를 일으키며 클로로퀸을 동시에 처리했을 때 세포사멸 효과가 더 증가하였다. 반대로 PPT 계열의 20(R)-ginsenoside Rh1과 ginsenoside Rh4는 저해제를 처리한 군에서 세포사멸 효과가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

탐색한 진세노사이드 중 PPD 계열의 Rg3와 Rh2를 대상으로 그 작용 기전에 대해 더 자세히 실험을 진행하였다. 세포사멸 효과를 나타내는 20(S)-Rg3및 Rh2는 PARP cleavage 및 Fas 발현을 증가시키며 Bcl-2 발현을 감소시키는 전형적인 apoptotic 세포사멸의 양상을 보였으나 20(R)-epimer는 변화가 없었다. 또한 전자현미경 및 western blot의 결과 20(S)-epimer만이 HepG2 세포의 미토콘드리아의 기능 및 형태에 손상을 미쳤으며, 그 중 20(S)-Rg3와 20(S)-Rh2 는 미토콘드리아 관련 인자인 OPA-1, UCP-2 및 ATPIF-1의 발현 정도에 서로 다른 영향을 주었다. 더불어 autophagy 저해제인 클로로퀸을 20(S)-Rg3 및 20(S)-Rh2에 동시에 처리한 경우 세포사멸 효과가 더욱 커지는 현상은 세포 내 칼슘 이온의 활성과 관련이 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과 인삼 추출물에서 얻은 dammarane계 사포닌 중 ginsenosoide Rg3,

Rh2의 20(S)-epimer와 ginsenoside Rh1의 20(R)-epimer 그리고 ginsenoside Rh4가 HepG2 간암 세포주에 대하여 autophagy 유도 활성과 동시에 세포 사멸 효과를 갖는 것을 확인하였다. 그 중 PPD계 사포닌인 20(S)-ginsenoside Rg3 및 Rh2 는 HepG2 세포에 대한 apoptotic 세포사멸 효과와 동시에 세포 생존을 향한 protective autophagy를 일으키며, 반대로 PPT계 사포닌인 20(R)-ginsenoside Rh1 및 Rh4의 경우는 세포사멸 효과와 동시에 autophagic cell death를 일으키는 것으로 나타나 진세노사이드의 구조-활성간 특이성을 또한 볼 수 있었다. 이로써 인삼의 진세노사이드가 화학구조적 특징에 따라 보다 특이적, 전략적으로 간세포암의 치료제 혹은 보조적 치료제로 개발될 가능성이 있는 것으로 기대된다.

주요어 : autophagy, 간세포암, 인삼, 진세노사이드, epimer, HepG2 학 번 : 2002-22360

목차

List of Figures	iv
List of Abbreviations	vii
I. Introduction	1
1. 자가포식의 정의와 기능	4
1.1. 자가포식 (Autophagy) 이란?	4
1.2. 자가포식의 과정과 기전	7
1.3. 자가포식과 암	12
1.4. 자가포식의 측정방법	14
2. 세포의 죽음과 자가포식	18
2.1. 미토콘드리아와 세포사멸	18
2.2. 칼슘 이온과 세포사멸	22
3. 인삼의 식물화학적 성분과 생리활성	25
3.1. 진세노사이드의 구조-활성간 관계	26
3.2. Autophagy에 영향을 미치는 진세노사이드	29
${\rm I\hspace{-1.5pt}I}$. Materials and Methods ––––––––––––––––––––––––––––––––––––	30
1. Materials	30
1.1. Equipments	30
1.2. Reagents	31

	2. Methods	34
	2.1. Cell culture	34
	2.2. Cell viability test	34
	2.3. Fluorescence microscopy (MDC staining)	35
	2.4. Western blot analysis	36
	2.5. Flow cytometry	37
	2.6. Transmission electron microscopy (TEM)	38
	2.7. Statistical analysis	39
Π	II. Results	40
	1. Screening of autophagy-inducing ginsenosides in HepG2 cell	40
	2. Ginsenoside Rg3, Rh2, PPD의 protective autophagy 활성	42
	2.1. Ginsenoside Rg3, Rh2, PPD의 세포사멸 효과	43
	2.2. Ginsenoside Rg3, Rh2, PPD의 autophagy 유도 활성	45
	2.3. Autophagy inhibitor가 20(<i>S</i>)-ginsenoside Rg3, Rh2의 세포사멸	
	효과에 미치는 영향	49
	3. Ginsenoside Rh1, Rh4에 의한 autophagic cell death 작용	57
	3.1. Ginsenoside Rh1, Rh4의 세포사멸 효과	58
	3.2. Ginsenoside Rh1, Rh4의 autophagy 유도 활성	60
	3.3. Autophagy inhibitor가 ginsenoside Rh4, 20(<i>R</i>)-Rh1의 세포사멸	
	효과에 미치는 영향	63
	4.20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2의 세포사멸 효과 및 autophagy 유도	

활성에 대한 기전 연구 ===============================	69
4.1. 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2의 apoptosis 유도	70
4.2. 20(<i>S</i>)-ginsenoside Rg3, Rh2에 의한 미토콘드리아 손상	76
4.3. Autophagy inhibition으로 인한 세포사멸 증가 효과와 칼슘이온	
활성과의 연관성	79
IV. Discussion	83
V. Conclusion	90
VI. References	92
Abstract	111

List of Figures

- Figure 1. Autophagy as a recycling system
- Figure 2. The pathways of macroautophagy in mammalian cells
- Figure 3. Key proteins in autophagosome formation
- Figure 4. Multiple stages of autophagy flow and the molecular regulators
- Figure 5. MDC-staining for detecting autophagy
- Figure 6. Autophagy inhibitors
- Figure 7. How to interpret LC3 immunoblotting data
- Figure 8. Oxidative phosphorylation and mitochondrial uncoupling
- Figure 9. Schematic model of the role of the mitochondrial permeability transition in autophagy

and cell death

- Figure 10. The regulation of intracellular Ca²⁺ compartmentalization
- Figure 11. Crosstalk between calpain and caspases during apoptosis
- Figure 12. Chemical structure of PPT/PPD ginsenoside
- Figure 13. Autophagy-inducing ginsenosides (PPT type)
- Figure 14. Autophagy-inducing ginsenosides (PPD type)
- Figure 15. Metabolic cascade of PPD-type ginsenoside Rg3 and Rh2
- Figure 16. Cytotoxicity of ginsenoside Rg3, Rh2 and PPD in HepG2 cell
- Figure 17. Induction of autophagy by ginsenoside Rg3, Rh2 and PPD in HepG2 cell (MDC staining)

- Figure 18. Induction of autophagy by ginsenoside Rg3, Rh2 and PPD in HepG2 cell (Western blot)
- Figure 19. Effects of autophagy inhibition on ginsenoside Rg3 and Rh2 inducing cytotoxicity in HepG2 cells (MTT assay)
- Figure 20. Effects of autophagy inhibition on ginsenoside Rg3 inducing cytotoxicity in HepG2 cells (Flow cytometry)
- Figure 21. Effects of autophagy inhibition on ginsenoside Rh2 inducing cytotoxicity in HepG2 cells (Flow cytometry)
- Figure 22. Transformation of PPT-type ginsenoside Rh1 and Rh4
- Figure 23. Cytotoxicity of ginsenoside Rh1 and Rh4 in HepG2 cell
- Figure 24. Induction of autophagy by ginsenoside Rh1, Rh4, aglycon of Rh4 in HepG2 cell (MDC stining)
- Figure 25. Induction of autophagy by ginsenoside Rh1, Rh4, aglycon of Rh4 in HepG2 cell (Western blot)
- Figure 26. Effects of autophagy inhibition on ginsenoside Rh4 and 20(*R*)-Rh1 inducing cytotoxicity in HepG2 cells (MTT assay)
- Figure 27. Effects of autophagy inhibition on ginsenoside Rh4 inducing cytotoxicity in HepG2 cells (Flow cytometry)
- Figure 28. Effects of autophagy inhibition on ginsenoside 20(S)-Rh1 inducing cytotoxicity in HepG2 cells (Flow cytometry)
- Figure 29. Microscopic and TEM images after ginsenoside Rg3 and Rh2 treatment.
- Figure 30. Expression levels of TFEB after ginsenoside Rg3 and Rh2 treatment.

- Figure 31. Expression levels of bcl-2, Fas, HO-1 and cleaved PARP after ginsenoside Rg3 and Rh2 treatment.
- Figure 32. Magnified TEM images after ginsenoside Rg3 and Rh2 treatment. Cells were treated with 50 µM Rg3 and 20 µM Rh2 for 16 h in serum free media.
- Figure 33. Expression levels of OPA-1, UCP-2 and ATPIF-1 after ginsenoside Rg3 and Rh2 treatment.
- Figure 34. Changes of bcl-2, Fas and cleaved PARP expression level by autophagy inhibition
- Figure 35. Predicted calpain cleavage site in Fas receptor (software, GPS-CCD 1.0).
- Figure 36. Effects of Ca²⁺ chelator on HepG2 cell co-treated with 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2 and autopahgy inhibitor.

List of Abbreviations

- ATG : Autophagy-related genes
- ATP : adenosine triphosphate
- ATPIF-1 : ATPase inhibitory factor 1
- AVO : acidic vesicle organelle

BAPTA-AM : 1,2-Bis(2-aminophenoxy) ethane-N,N,N' ,N' -tetraacetic acid tetrakis

(acetoxymethyl ester)

- Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO : Dimethyl sulfoxide
- EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
- EtOH : Ethyl alcohol
- FACS : Fluorescence activated cell sorting
- FBS : Fetal bovine serum
- GFP : green fluorescine protein
- HepG2 : human liver-derived Hepatoma G2
- HO-1 : heme oxygenase-1
- LC3 : Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3)
- MeOH : Methyl alcohol
- MPT : mitochondrial permeability transition

- MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
- NH₄Cl : Ammonium Chloride
- NMR : Nuclear magnetic resonance
- OPA-1 : optic atrophy 1
- PARP : Poly (ADP-ribose) polymerase
- PBS : Phosphate buffered saline
- PCD : programmed cell death
- PI: Propidium iodide
- PPD : protopanaxadiol
- PPT : protopanaxatriol
- PVDF : Polyvinylidene difluoride
- RIPA : Radioimmunoprecipitation assay
- SAR : structure-activity relationship
- SDS : Sodium dodecyl sulfate
- SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
- TBST : Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20
- TEM : Transmission electron microscopy
- TEMED : Tetramethylethylenediamine
- TFEB : Transcription factor EB
- UCP-2 : Uncoupling protein-2

I. Introduction

간세포암 (Hepatocellular carcinoma, HCC)이란 간세포 자체에서 발생하는 암을 말하며 흔히 간암이라고 하기도 한다. 간암은 간에서 발생하는 원발성 간암 (primary liver cancer)과 신체의 다른 부위에서 암이 발생하여 간으로 전이 되는 전이성 간암 (metastatic liver cancer)으로 나눌 수 있는데 일반적으로 간암이라 하면 원발성 간암을 말한다. 간암은 전 세계적으로 여섯 번째로 발병빈도가 높으며 고액 암 관련 사망의 세 번째 요인이 되는 고형 악성 종양이다. 우리나라에서는 성 인 남성에게 있어 위암 다음으로 흔한 암이며 2006년 인구 10만 명 당 33.9 명이 간암으로 인하여 사망하였다 (Cho et al., 2009). 일반적인 간암의 원인으로는 간경 변 등의 만성 간질환, B형 및 C형 간염 바이러스, 알코올 등이 알려지고 있다. 간세포암은 치료하기 어려운 암의 종류 중 하나로 현재까지 방사선 치료, 수술적 절제술 (surgical resection), 경피적 에탄올 주입 요법 (percutaneous ethanol infusion therapy, PEIT), 간동맥 화학색전술 (transarterial chemo-embolism, TACE), 간이식 (liver transplantation)등이 복합적으로 사용되고 있으나 일반적인 화학요법 (classical chemotherapy)으로 잘 치료되지 않는다 (Carr et al., 2004; Llovet et al., 2008). 최근 사용하기 시작한 분자 표적 치료 약물 (targeted therapy)로 경구 투여 용제인 sorafenib (Nexavar[®], Bayer) 성분만이 간세포암 환자의 생존률을 높이는 데 유효할 뿐이다. Sorafenib은 multikinase inhibitor로

1

암세포 내의 신호 전달을 선택적으로 차단하여 (Raf kinase inhibitor) 종양 세포의 증식과 혈관 신생을 억제한다 (Di Maio *et al.*, 2009). 간세포암의 치료 후 재발률 은 70 % 이상이며, stage II 환자의 5-year survival rate은 약 50 % 정도인 점에 서 미루어 볼 때 수술적 치료 전후에 병용할 새로운 치료제의 개발이 매우 필요한 실정이다 (Lee *et al.*, 2013).

세포사멸은 크게 괴사 (necrosis)와 세포계획사 (programmed cell death)의 두 가지 형태로 분류될 수 있다. 일반적으로 대표적인 programmed cell death (PCD) 로서 apoptosis (세포자멸, type I PCD)가 주로 연구되어 왔는데 이는 기능이 손상 되거나 더 이상 불필요하게 된 세포를 스스로 제거하여 조직의 항상성을 유지하게 한다. Apoptosis는 세포의 수축 (shrinkage), 핵의 응축 (condensation & fragmentation), 핵의 분해 (karyorrhexis) 같은 형태학적 특징을 갖는다. 최근 들어 새로운 세포사멸의 다른 한 종류로 autophagy (자가포식, autophagocytosis, type II PCD)라는 형태가 보고되어 학계에서 관심을 받고 있다 (Boya *et al.*, 2005). Autophagy는 리소좀 (lysosome)을 통하여 노후하거나 제 기능을 하지 못 하는 세포 내 구성물질이나 소기관 (organelle)을 스스로 분해하는 세포 내 대표적 인 이화작용의 하나이다. 이 현상은 대부분의 세포에서 기본적으로 일어나고 있으 며, apoptosis와 달리 과정 중 수많은 자가포식소체 (autophagosome)가 세포 내 에서 관찰되고 세포핵 및 cytoskeleton이 손상되지 않고 보존되며 autophagy를 유도하는 인자가 사라졌을 경우 down-regulation되는 가역적인 현상이다 (Kroemer *et al.*, 2005). Apoptosis와 마찬가지로 세포의 autophagy 기능 이상이 다양한 질환과 연결되어 있다는 것이 밝혀지고 있는데, 이는 autophagy가 개체의 발생에서부터 세포 분화, 조직 재형성, 항상성 유지 등에 모두 관련되어 있기 때문 이다. 실제로 각종 감염성 질환, 퇴행성 질환, 종양, 염증반응 및 대사성 질환 등 다양한 질환에서 autophagy가 중간 매개자의 역할을 하는 것으로 알려지면서 새로 운 병인 혹은 치료 목표로 점차 주목 받고 있다 (Levine *et al.*, 2008; Sridhar *et al.*, 2012). Autophagy와 apoptosis는 완전히 독립적으로 존재하는 메커니즘이 아 니라 세포 내 신호전달 체계를 통하여 서로 연관되어 있다. 하지만 apoptosis와는 달리 autophagy는 세포의 사멸뿐 아니라 세포의 생존에 기여하는 양면적 기능을 한다는 점에서 차이가 있다 (Levine *et al.*, 2004; Lum *et al.*, 2005).

1. 자가포식 (autophagy)의 정의와 기능

1.1. 자가포식이란?

자가포식 (autophagy)이란 스스로 (auto) 먹는다 (phagein) 라는 뜻의 단어로 세포 내 다양한 스트레스에 대한 항상성을 유지하기 위하여 세포 내에서 필수적으 로 일어나는 자가 단백질 분해 과정이다. 대부분의 진핵 세포는 영양 결핍이 일어 나면 autophagy가 유도되는데, 이는 세포질 내의 노폐물이나 미토콘드리아 (mitochondria) 등 노후된 소기관 (organelles) 등을 분해하여 에너지원으로 혹은 새로운 기관을 형성하는 데 다시 이용하도록 하는 재활용 시스템이라 할 수 있다. 생체 내 대부분의 조직에서 항시 일어나고 있으며 (basal autophagy) 세포 기관과 구성물질의 합성과 분해 사이에서 균형을 이루도록 하여 개체의 발생 및 분화 또는 조직 재형성에 관여한다. 자가포식은 단백질이 리소좀에 도달하게 하는 방식에 따 라 microautophagy, chaperone-mediated autophagy, macroautophagy의 세 종 류로 구분할 수 있지만 통상적으로 autophagy라 함은 노후된 단백질을 대상으로 하며 autophagosome을 형성하는 특징을 갖는 macroautophagy를 지칭한다 (Maria Cuervo *et al.*, 2004; Klionsky *et al.*, 2007).

Autophagy는 1960년대에 최초로 보고된 이래로 1990년대 말에 일본의 오수미 (Ohsumi)박사 연구팀이 autophagy에 관여하는 많은 유전자들을 동정해 내면서 연 구가 활성화되기 시작했으며, 2000년대 중반 이후에 autophagy가 많은 인체의 질 병과 밀접한 관계가 있다는 것이 알려지면서 주목 받기 시작하여 최근 관련 연구가

4

폭발적으로 증가하고 있다. 그 동안의 연구 결과를 보면 autophagy가 단순히 영양 결핍뿐 아니라 저산소증, 산화적 스트레스, 화학 치료제의 사용 등 세포 내 다양한 스트레스에 반응하여 일어날 수 있으며, 이의 결핍이 비만이나 당뇨병과 같은 대사 장애, 노화 및 각종 암과 알츠하이머와 같은 신경퇴행성 질환들을 일으키는 원인이 될 수 있다. 또한 autophagy가 세포내부에 기생하는 박테리아, 바이러스와 원생동 물을 숙주로부터 제거하는 과정에도 관여되어 있으며 또한 항원 제시, 림프구 발달 과 면역 반응이 세포에 의한 사이토카인(cytokine) 분비를 포함하는 다양한 면역 시스템 기능에 영향을 주는 것으로 밝혀졌다 (Kundu *et al.*, 2008; Morselli *et al.*, 2009).



Figure 1. Autophagy as a recycling system

Macroautophagy contributes to the delivery of proteins, lipid stores, and glycogen for breakdown into lysosomes. The constituent components of these macromolecules exit the lysosome and become available for production of energy. In the case of protein breakdown, the resulting amino acids may have less energetic value and be preferentially utilized for the synthesis of new proteins. Levels of amino acids, free fatty acids, and sugars circulating in blood or in the extracellular media have a direct impact on intracellular macroautophagy (Singh *et al.*, 2011).

1.2. 자가포식의 과정과 기전

자가포식은 진화적으로 잘 보존된 막 이동 (membrane trafficking) 과정으로 autophagy가 일어나면 세포 내에 이중막 구조 (isolation membrane)가 형성되면 서 세포질내의 분해할 물질을 둘러싸는 소낭 (double-membraned vesicle)을 이 루게 되는데 이를 자가포식소체 (autophagosome)이라 한다. 이렇게 형성된 autophagosome은 세포 내 분해기관인 리소좀과 합쳐져 자가포식용해소체 (autolysosome)을 이루고 리소좀 내 산성의 가수분해 효소에 의해 이화작용이 이 루어지게 된다 (Mizushima, 2007). 이와 같은 autophagy 과정에 단계마다 관여하 는 약 30 여 개의 유전자 (autophagy-related gene, Atg)가 효모 (yeast)로부터 밝혀졌으며 이 중 16 좋은 human에서도 확인되었다.



Figure 2. The pathways of macroautophagy in mammalian cells (Ryan, 2011).

Table 1. Key Proteins in Mammalian Autophagosome Formation				
Nucleation Step	Mammalian Protein	Yeast Ortholog	Feature	
ULK/Atg1 complex ^a	ULK1, ULK2	Atg1	Protein kinase, phosphorylated by mTORC1	
	Atg13	Atg13	Phosphorylated by mTORC1	
	FIP200	-	Scaffold for ULK1/2 and Atg13	
	Atg101	-	Interacts with Atg13	
	-	Atg17, 29, 31	Interacts with Atg13	
Class III PI3-kinase complex ^b	Vps34	Vps34	PI3-kinase	
	p150	Vps15	Myristoylated	
	Beclin 1	Vps30/Atg6	BH3-only protein, interacts with Bcl-2	
	Atg14	Atg14	Autophagy-specific subunit	
	Ambra1	-	Interacts with Beclin 1	
Others ^c	Atg2	Atg2	Interacts with Atg18 in yeast	
	Atg9	Atg9	Transmembrane protein	
	WIPI1-4	Atg18	PI(3)P-binding proteins	
	DFCP1	-	PI(3)P-binding ER protein	
	VMP1	-	Transmembrane protein	
Elongation Step				
Atg12-conjugation system ^d	Atg12	Atg12	Ubiquitin-like, conjugates to Atg5	
	Atg7	Atg7	E1-like enzyme	
	Atg10	Atg10	E2-like enzyme	
	Atg5	Atg5	Conjugated by Atg12	
	Atg16L1	Atg16	Homodimer, interacts with Atg5	
LC3/Atg8-conjugation systeme	LC3 (GATE-16, GABARAP)	Atg8	Ubiquitin-like, conjugates to PE	
	Atg4A-D	Atg4	LC3/Atg8 C-terminal hydrolase, deconjugating enzyme	
	Atg7	Atg7	E1-like enzyme	
	Atg3	Atg3	E2-like enzyme	

Figure 3. Key proteins in autophagosome formation (Mizushima et al. 2010)

세포에서 starvation에 의해 mammalian target of rapamycin (mTOR)의 활성이 억제되어 Atg130] 탈인산화 (dephosphorylation)되면, ULK1와 ULK2 (uncoordinatedfamily member-51-like kinase)와 결합하여 FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kD)와 활성 복합체를 형성한 다. ULKs-Atg13-FIP200 complex 외에도 PI3K (beclin-1 class III phosphoinositide 3-kinase) complex, Atg12-Atg5/Atg16 및 LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3-phosphatidyl ethanolamine) conjugation system이 autophagosome이 형성되는데에 있어 필수적인 과정이며, 이후 LC3-II의 생성 및 자가포식소체막 (autophagosomal membrane)에 대한 부 착이 필요하다. LC3 (또는 Atg8)은 유비퀴틴형 (ubiquitination-like) 단백질이며 신생 단백질 LC3는 단백질 분해효소 Atg4에 의해 C-termination 인접부위가 절 단되어 LC3-I이 되고 이로 인해 C-termination의 글리신 잔기 (glycineresidue)가 노출되며 여기에 phosphatidylethanolamine (PE)이 결합하여 LC3-II 로 변형된다. 이러한 LC3 system은 autophagosome의 운반 및 성숙에 중요한 역 할을 담당하게 되며, isolation membrane이 연장되는 동안 membrane에 부착되어 있다가 autophagosome을 이루면 떨어져 나가는 Atg12-Atg5/Atg16 complex와 달리 LC3 II는 autolysosome에서 분해작용이 일어날 때까지 소포체의 membrane 에 부착되어 있어 autopahgosome membrane의 marker로 이용된다. p62 (SQSTM1, sequestosome 1) 단백질은 유비퀴틴 결합부위(ubiquitin-associated domain, UBA)를 가지고 있으며 이를 통해 유비퀴틴화된 단백질 (ubiquitinated

9

protein)과 결합할 수 있다. Ubiquitinated protein-p62 complex는 autophagosome에 부착되어 있는 LC3 II와 결합하여 최종적으로 p62를 포함하는 autophagosome 내의 단백질과 세포기관은 리소좀에 의해 분해된다 (Pankiv *et al*, 2007; Hale *et al.*, 2013).



Figure 4. Multiple stages of autophagy flow and the molecular regulators (Liu et al., 2010).

1.3. 자가포식과 암

암에 있어서 autophagy는 두 가지 상반된 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 우선 종양 형성 단계에 있어서 autophagy는 발암 억제의 기능을 한다. 손상을 입은 peroxisome이나 미토콘드리아를 제거함으로써 유전자 혹은 염색체의 안정성을 유 지할 수 있기 때문이다. Autophagy 관련 유전자로 잘 알려진 Beclin-1 (ortholog of Atg 6)의 경우 다양한 암세포에서 결손되어 있으며, Beclin^{+/-} 돌연변이 마우스 에서는 높은 빈도의 암 발생이 나타났다. 그 외 일부의 Atg 유전자 돌연변이가 다 양한 암에서 발견되기도 하였다. 이는 autophagy 유발성 유전자의 억제가 암발생 을 촉진하며 이들이 종양억제 유전자의 기능을 하는 것을 나타내는 연구 결과이다 (Kondo *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010; kung *et al.*, 2011).

이미 종양으로 진행된 세포에 있어서 autophagy는 양면성을 보인다 (Hippert *et al.*, 2006; Matthew *et al.*, 2006; Apel *et al.*, 2009). Autophagy는 영양 공급이 부 족한 상태에 있는 전이성 암세포나 방사성 치료, 화학 요법제의 처치 등 극한 상황 에서 오히려 세포의 생존을 도와 암의 치료에 있어 불리한 작용을 한다. 그러나 암세포에서도 autophagy가 지속적으로 진행되어 과잉의 분해작용이 일어나면 곧 암세포의 사멸을 일으키기도 한다. 이렇게 autophagy는 암의 단계와 autophagy의 진행 정도에 따라 암의 치료에 있어 긍정적 혹은 부정적 역할을 하는 것으로 암에 대한 autophagy의 복잡한 작용에 대해 아직까지 불분명하거나 논란의 여지가 있지 만 암의 치료와 예방에 있어 autophagy가 지닌 연구 가치는 기대해 볼 만 하다.

12

실제로 항암치료 방법 중 다수가 autophagy를 유도하는 작용을 하는데, 유방암 세포에 대해 tamoxifen이나 다른 antiestrogen agent를, 유방암, 대장암, 전립선 암에 대해 ionizing radiation을, 악성뇌교종 (malignant glioma)에 대해 arsenic trioxide, temozolomide, rapamycin을, 난소암에 대해 resveratrol을, 자궁 경부암 에 대해 histone deacetylase (HDAC) 억제제를 처방하고 있는 등의 예가 있다 (Kondo et al., 2006). 또한 autophagy가 항암치료에 대한 스트레스에서 오히려 암세포의 생존을 돕는다는 점에 착안해서 autopohagy inhibitor를 기존의 항암제나 항암 치료 요법에 병용하여 사용하는 방법 또한 연구되고 있는데, 다양한 악성 종 양에서 세포사멸 요법 (cvtotoxic therapy)과 autophagy 억제제인 hydroxychloroquine을 병용하는 것이 현재 임상 phase I/II 진행 중이기도 하다 (Solomon et al., 2009; Amaravadi et al., 2011; Swampillai et al., 2012).

1.4. 자가포식의 측정방법 (Monitoring of autophagy)

Autophagy가 세포의 생존과 발달에 중요한 역할을 하며 또한 새로운 세포사멸 기전으로 주목 받으면서 세포 혹은 조직 내에서 autophagy가 up-regulation 혹은 down-regulation 되었는지를 측정 (monitoring or detecting)하는 여러 가지 방 법들이 개발되었다 (Eskelinen *et al.*, 2011; Klionsky *et al.*, 2012).

대표적으로 autophagy 과정 중 형성되는 acidic vesicle organelle (AVO)를 탐지 하는 방법이 있는데, lysosomal marker인 monodansylcadaverine (MDC)의 경우 acidic한 환경의 autolysosome과 autophagosome을 효과적으로 염색하여 형광현 미경 (ex. 365 nm, em. 525 nm)에서 녹색의 염색된 dot 형태의 AVO를 관찰 할 수 있다 (Martinet *et al.*, 2006; Vazquez *et al.*, 2009). 흔하게 세포에서 autophagy를 유발시키는 아미노산 결핍이나 라파마이신 (rapamycin) 처리에 의해 MDC-stained dot의 크기나 세포당 존재하는 개수가 증가하는 것을 볼 수 있으며 (Fig. 5), 일반적으로 화합물을 처리한 세포에서 세포 당 MDC-stained dot의 개 수 혹은 MDC-stained dot을 포함하는 세포의 개수를 세어 control에 비해 현저히 증가하였을 때, autophagy가 유도된 것으로 판정한다. MDC 외에 acridine orange, LysoTracker 등이 비슷한 원리에 의해 autopohagic vesicle을 염색하는 marker 로 사용되기도 한다.



Figure 5. MDC-staining for detecting autophagy (Vazquez et al., 2009).

두 번째로 autophagosome이 형성되는데 필수적인 LC3 (Atg 8의 mammalian homolog) 단백질의 발현을 western blot 등으로 측정하는 방법이 있다 (Fig. 6). Unconjugated LC3 I와 conjugated form인 LC3 II는 SDS-PAGE에 의해 쉽게 분 리되는데, 증가된 LC3 II의 양이 곧 생성된 autophagosome의 수와 비례하므로 autophagy의 가장 보편적인 탐색 방법이 된다. 하지만 LC3 II 단백질 자체도 autophagy가 일어나는 동안 계속해서 분해되기 때문에 어떤 한 시점의 LC3 II 양 만으로 autophagy flux 여부를 정확히 판단할 수는 없다. 따라서 리소좀의 분해 활 성을 억제하는 lysosomotropic agent인 bafilmycin A1, NH4Cl, chloroquine등을 사용하여 (Fig. 7) autolysosome membrane 내부에 부착되어 있는 LC3 II의 분해 를 막아 보다 정확하게 증가한 LC3 II의 양을 측정할 수 있는 LC3 turnover assay 또한 사용되고 있다 (Mizushima *et al.*, 2007).



Figure 6. Autophagy inhibitors (Mizushima et al., 2010).

이 밖에도 전자 현미경으로 이중막 구조의 autophagosome의 존재를 관찰하거나 green fluorescent protein (GFP) 를 이용하여 LC3의 위치 (localization)을 찾는 방법과 LC3 외에 autophagy 관련 인자인 Beclin-1, p62, Atg4 등의 세포 내 양 을 western blot으로 측정하는 방법이 사용되고 있다.



Figure 7. How to interpret LC3 immunoblotting data (Mizushima et al., 2007).

2. 세포의 죽음과 자가포식

2.1. 미토콘드리아와 세포사멸

정상 세포 및 암세포에서 미토콘드리아는 에너지 생성, 산화-환원 (redox) 균형 및 칼슘 관련 신호 (signaling) 조절 등의 기능을 하며 세포 사멸의 시작과 생존 여부를 결정하는 역할을 한다. 미토콘드리아 내부에서 전자 전달계 (electronic transport chain, ETC)를 거치는 일련의 산화적 인산화 (oxidative phosphorylation) 과정에 의해 ATP (adenosine 5'-triphosphate)가 생성되며, 이 때 전자 전달계를 경유하지 않은 일부의 전자는 미토콘드리아 내에서 활성 산소 종 (reactive oxygen species, ROS)을 생성하게 된다. 전자 전달계 및 ATP synthase와 마찬가지로 미토콘드리아의 내막 (inner mitochondrial membrane)에 존재하는 uncoupling protein (UCP)에 의해 수소 이온의 matrix 안쪽으로의 투과 도가 높아지면서 열을 발생하게 되는데, 이로 인해 미토콘드리아 내부 막전위 (mitochondrial membrane potential)가 탈분극되어 ATP synthase에 의한 ATP 합성으로 연결되지 못하게 된다 (Baffy *et al.*, 2011, Brondani *et al.*, 2012).





Figure 8. Oxidative phosphorylation and mitochondrial uncoupling (Baffy *et al.*, 2011, Brondani *et al.*, 2012).

미토콘드리아에서의 ATP 생성이 외부의 독성 물질 등에 의해 그 기능을 잃게 되 면 세포 내 ATP 생성은 세포질 내의 해당 작용 (glycolysis)에 의해 대체되어야 하는데, glycolysis의 기질 (substrate)로 쓰이는 물질로 glucose, fructose, glycogen 등이 있다. Glycolysis에 의해 충당될 수 있는 ATP 양은 미토콘드리아 에 의한 ATP 생성량의 일부분에 불과하지만, ATP 부족에 의한 세포사멸을 막으려 면 평상시의 약 15-20% 정도의 ATP 양이 필요하므로, 적당한 양의 glycolytic substrate를 공급하는 것이 미토콘드리아 ATP 생성 억제를 목표로 한 세포독성 물질부터 세포를 보호하는데 필요하다.

대표적인 세포사멸 기전인 apoptosis는 그 과정 중 ATP를 소비하는 능동적 작용 이며, 반대로 necrosis와 autophagy는 세포 내 ATP가 고갈되었을 때 그 결과물 로 일어나곤 한다. 미토콘드리아 matrix 내부의 칼슘 이온의 농도 및 ROS 농도가 높아지면 permeability transition pore가 열리는 '막 투과성 변화' (mitochondrial permeability transition, MPT) 현상이 일어난다. 갑작스러운 MPT로 인해 미토콘 드리아는 탈분극되거나 uncoupling 및 ATPase 의 활성화가 일어나게 되어 ATP 가 급격히 고갈되고 이로 인해 necrosis가 시작된다. 그러나 MPT는 막에서 불균 일하게 점진적으로 일어나기 때문에 ATP 고갈이 완전히 되지 않고, glycolysis등 에 의해 ATP가 다시 보충될 경우 apoptosis로 전환될 수 있다. 반대로 apoptotic cell에서 미토콘드리아 손상이 많이 일어나 ATP 가 정상 세포의 10-15%까지 떨 어질 경우 2차적인 necrosis가 일어날 수 있다. MPT에 의한 미토콘드리아 이상은 또한 autophagy에 의한 미토콘드리아의 선택적 제거 (mitophagy)가 일어나는 첫

20

단계가 되기도 하는데, 영양소 결핍 등 세포의 autophagy가 일어나는 환경에서 MPT로 인해 미토콘드리아가 탈분극되고 탈분극 된 미토콘드리아가 산성의 autophagosome 내부로 함입된다. 여기서 보다 과도한 MPT가 일어나면 autophagy보다는 apoptosis가 유도되기 시작하는데, autophagy를 유도하는 물질 중 다수가 동시에 apoptosis를 일으키는 현상을 뒷받침해준다 (Lemasters *et al.*, 1998, 2002; Rodriguez-Enriquez *et al.*, 2004).



Figure 9. Schematic model of the role of the mitochondrial permeability transition in autophagy and cell death (Lemasters *et al.*, 2002; Rodriguez-Enriquez *et al.*, 2004).
2.2. 칼슘 이온과 세포사멸

칼슘 이온은 세포 내에서 여러 종류의 Ca²⁺-binding 그리고 Ca²⁺-regulatory 단백질의 형태와 활성을 조절하는 2차 전달물질 (secondary messenger)의 역할 을 한다. 세포 내부의 칼슘 이온 농도는 Ca²⁺-ATPase 같은 세포막의 translocase나 Ca²⁺-binding protein 그리고 미토콘드리아, 소포체 (endoplasmic reticulum), 핵과 같은 소기관 (Ca²⁺-sequestering organelle)의 작용으로 일정하 게 유지된다. 이러한 칼슘 이온의 세포 내 항상성 (intracellular homeostasis)의 균형이 깨어지는 것이 세포로 하여금 독성을 비롯한 다양한 병리학적 상태에 이르 게 하며, 특히 세포 내 칼슘 이온 농도가 지속적으로 높을 때 apoptosis나 necrosis등 비가역적인 세포 손상 (injury) 및 사멸 (cytotoxic) 이 흔하게 일어난 다. Ca²⁺-dependent protease가 활성화 되면 세포 골격 (cytoskeleton)이 손상되 어 표면에 돌출된 이상 구조 (bleb)를 형성하게 되고, Ca²⁺-mediated phospholipase가 활성화 되면 미토콘드리아 기능 저하로 막 전위 (membrane potential)가 붕괴되고 ATP 생성이 중단되며, Ca²⁺-dependent nuclear endonuclease의 활성화는 chromatin cleavage와 관련하여 apoptosis에 필수적인 역할을 한다 (Orrenius et al., 1992). 또한 세포질 내 높아진 칼슘 농도 (free cytosolic calcium, [Ca²⁺]_C)로 인해 macroautphagy가 유도될 수 있다 (Høyer-Hansen et al., 2006).



Figure 10. The regulation of intracellular Ca^{2+} compartmentalization (Orrenius *et al.*, 2003).

대표적인 Ca²⁺-dependent protease인 calpain도 활성화 되었을 때에 세포사멸에 서 결정적인 기능을 할 수 있다. 예를 들어, 세포사멸 과정에서 중요한 cystein protease인 calpain과 caspase는 서로 간 영향을 미치며 apoptosis 과정을 조절해 가는 것으로 알려져 있으며 (Orrenius *et al.*, 2003), HeLa cell에서 calpain에 의 해 autophagy-related gene (Atg) 5 의 cleavage가 일어나고 이렇게 잘려진 Atg5 (truncated Atg5)가 세포질로부터 미토콘드리아로 이동하여 Bcl-x_L, cytochrome C release, caspase activation에 영향을 미쳐 apoptotic death에 이 르게 한다는 연구 결과도 있었다 (Yousefi *et al.*, 2006).

칼슘 이온의 세포 내 과축적 (overload)이 세포사멸에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 extracellular Ca²⁺를 제거하거나, intracellular Ca²⁺ chelator를 이용한 실 험이 고안되어왔다. Quin-2 혹은 BAPTA 등 Ca²⁺ chelator를 세포와 함께 처리 하여 어떤 외부 요인에 의해 높아진 세포 내 칼슘 이온 농도를 중화 (buffering)시 켜 다양한 독성 물질로부터 세포 사멸을 막거나 지연시키는 방법이 많이 이용되고 있다.



Figure 11. Crosstalk between calpain and caspases during apoptosis.

Cleavage of the endogenous calpain inhibitor calpastatin by caspase-3 (or by calpain itself) is essential for activation of the Ca^{2+} -dependent protease calpain. This can lead to cleavage of several pro-caspases, which can either activate or inactivate their function (Orrenius *et al.*, 2003).

3. 인삼의 식물화학적 성분과 생리활성

인삼(人蔘, *Panax ginseng* C. A. *Meyer*) 은 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 여러해살이풀로 주로 가는 뿌리와 코르크층을 제거한 뿌리 부위를 사용하며 예로부 터 강장·강심·건위보정·진정약으로 널리 상용되고, 위장기능 쇠약에 의한 신진 대사기능의 저하에 진흥약으로 사용되며, 병약자의 위부정체감·소화불량·구토· 흉통·식욕부진 등에도 응용된다. 인삼은 전세계적으로 북반구에서만 발견되는데, 북부 아메리카와 한국, 중국과 일본 등 동아시아, 부탄, 동 시베리아 등 주로 서늘 한 기후에서 자란다.

인삼은 주요성분인 dammarane 계 사포닌과 그 외에 ginsenoside Ro등 oleanane 계 사포닌 그리고 panaxynol, panaxytriol 등 폴리아세틸렌 (polyacetylene)류 및 polysaccharide 등 다양한 성분을 함유하고 있으며, 이러한 성분들은 단일로 혹은 복합적으로 뇌를 포함한 중추신경계 항진 및 면역 기능 조절작용, 간장, 신장 및 심 혈관계 기능 개선, 항스트레스, 항암, 항당뇨, 항산화 및 방사선 장해 방어 작용 등 의 매우 다양한 약리작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 이러한 인삼의 약리학 적 활성을 나타내는 대표적인 물질로서 배당체 saponin 성분인 진세노사이드 (ginsenoside)를 꼽을 수 있는데, 이는 인삼의 2차 대사 산물로서 인삼 중에 3-6% 의 함량으로 존재하는 인삼 특이 성분이다. 현재까지 Panax 속 식물로부터 90 종 이상의 saponin 성분이 분리 보고되었으며, 이 saponin 성분은 인삼의 주요한 유 효성분으로 인정되어 품질관리의 지표성분으로도 활용되고 있다.

3.1. 진세노사이드의 구조-활성간 관계

인삼 사포닌은 다른 식물에서 발견되는 사포닌과는 다른 특이한 화학구조를 가지 고 있으며 약리효능도 특이하여 인삼 (ginseng) 배당체 (glycoside)란 의미로 진 세노사이트 (ginsenoside)라 불린다. 진세노사이드는 인삼의 종류와 생산지, 수확 하기 전 재배기간 뿐 아니라 열과 압력에 기인한 물리화학적 가공과정에 의하여 구 조적, 함량적으로 차이가 생기는데, 예를 들어 인삼의 뿌리를 쪄서 (steaming) 사 용하는 홍삼에는 가공 전의 인삼에서는 발견되지 않는 20(*R*)-ginsenoside Rh1, ginsenoside Rh2, 20(*S*)-ginsenoside Rg3 등 성분들이 분리된다 (Yoon *et al.*, 2010).

Dammarane계 triterpene 구조의 진세노사이드는 당의 종류와 개수와 연결 위치 (linkage position), 수산기의 개수와 위치, 모핵의 20번 탄소에서의 stereoisomerism과 side chain에 따라 그 구조가 매우 다양하게 존재하며 그 비당 부 (aglycone)의 구조에 따라 크게 프로토파낙사다이올 (protopanaxadiol, PPD) 과 프로토파낙사트리올 (protopanaxatriol, PPT)의 두 가지로 나눌 수 있다. PPD 계열 진세노사이드는 3번과 20번 탄소의 β-OH에, PPT 계열 진세노사이드는 6번 탄소의 α-OH와 20번 탄소의 β-OH에 당이 붙어있다.

이 두 가지 진세노사이드는 인삼 내에 일정한 비율로 존재하는데, 20(S)protopanaxadiol과 20(S)-protopanaxatriol의 비율은 약 3:1이며 뿌리의 몸통 부 위보다 잔가지 쪽으로 갈수록 그 비율이 높은 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*,

2009). PPT와 PPD 진세노사이드는 서로 상보적이거나 반대의 기능을 하는 것으 로 알려져 있는데 PPD 계열 진세노사이드는 주로 중추기능 진정작용을, PPT 계열 진세노사이드는 중추기능 흥분작용을 나타낸다. 항암효과에 대해서도 PPD/PPT 계 열간 차이가 나타나는데, 암세포에 대한 세포사멸 효과는 주로 PPD 진세노사이드 에서, 암세포의 전이를 억제하는 활성이나 항 angiogenesis 활성은 PPD에 비해 PPT 진세노사이드에서 주로 보고되고 있다 (Christensen *et al.*, 2008). 항비만 효 과효과에 있어서는 PPD 계열이 PPT에 비해 좋은 활성을 보인다고 하며 (Kim *et al.*, 2009), 이 밖에도 면역 반응, 혈관 신생에 관한 작용 및 기억력 관련 활성에서 도 PPD와 PPT의 활성간 차이 혹은 PPD/PPT 비율의 영향에 관한 연구가 활발하 게 이루어지고 있다 (Jin *et al.*, 1999; Leung *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2007).



Figure 12. Chemical structure of PPT/PPD ginsenoside

전세노사이드는 또한 그 20번 탄소의 chirality에 따라 20(S)와 20(R) 두 가지 종류의 epimer로 존재하기도 한다. 20번 탄소의 수산기 (hydroxyl group)는 20(R)보다 20(S)-epimer 구조에서 공간적으로 12번 탄소의 수산기와 거리가 가 까우며, 이 epimer는 서로 다른 생리 활성을 갖곤 한다 (Qi *et al.*, 2010). 20(S)ginsenoside Rg3는 dose- and voltage-dependant 하게 Ca²⁺, K⁺, Na⁺ channel current를 저해하지만 20(R)-Rg3는 그런 효과를 나타내지 않으며 (Jeong *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005), hydroxyl radical scavenging 효과 또한 20(S)-Rg3에 서만 일어난다 (Kang *et al.*, 2006). Human fecal flora에 의해 20(S)ginsenoside Rg3가 20(S)-ginsenoside Rh2로 대사되는 속도는 20(R)-epimer 가 변하는 속도에 비해 19배나 빠르며 (Bae *et al.*, 2002), 암세포주의 성장 억제 혹은 세포사멸 효과를 가지는 PPD계 진세노사이드 중 대부분은 20(S)-epimer 뿐인 경우가 많다 (Popovich *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2009). Ginsenoside-Rh2의 경우 위장관 흡수율에 관련된 인자에 관해서도 서로 다른 membrane permeability를 가져 20(*R*)-epimer가 20(*S*)-epimer에 비해 현저히 낮은 흡수율을 보인다 (Gu *et al.*, 2010).

그 밖에도 화합물 구조 내의 당의 종류와 개수, 6번 탄소에서의 당의 연결 형태, 수산기의 개수와 위치 또한 진세노사이드의 생리활성에 영향을 미친다 (Qi *et al.*, 2010).

3.2. Autophagy에 영향을 미치는 진세노사이드

현재까지 autophagy에 대하여 유도 혹은 억제의 활성을 보이는 진세노사이드에 대한 연구는 많이 이루어지지 않고 있다. HepG2 cell에 대하여 ginsenoside Rk1이 (Ko *et al.*, 2009), glutamate-induced neuron에서 Rb1이 (Chen *et al.*, 2010), breast cancer stem cell에서 F2가 (Mai *et al.*, 2012), H9c2 cardiomyocyte에서 Re가 (Zhang *et al.*, 2012), A549 cell에서 Rh2가 (Gao *et al.*, 2013), Sprague Dawley (SD) rats의 cardiac muscle tissue에서 Rg3가 (Sun *et al.*, 2013), HCT-116 colon cancer cells 에 대하여 진세노사이드의 대사체인 compound K가 (Kim *et al.*, 2013) autophagy 유도 활성을 나타내며, CD4 T⁺ cells에서 ginsenoside Re가 (Son *et al.*, 2010), H9c2 cardiomyocyte에서 Rg1이 (Zhang *et al.*, 2012) autophagy를 억제한다고 보고된 바 있다.

II. Materials and Methods

1. Materials

1.1. Equipments

Autoclave (Sanyo MLS 3000, Japan)

Bio image analyzer (GE Healthcare, ImageQuant LAS 4000, Sweden)

Centrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810R, Germany)

Clean bench (Hanbaek scientific Co. HB-402, Korea)

CO₂ incubator (SANYO CO2 incubator MCO-15AC, Japan)

ELISA microplate reader (Molecular Devices Spectra Max 340PC, USA)

Flow cytometer (BD Bioscience, BD FACSCaliburTM, USA)

Fluorescence Microscope (Olympus IX-70; U-RFL-T, Japan)

Microbalance (Mettler AE 50, Switzerland)

Microcentrifuge (Gyrogen GyroSpin, Korea)

Microscope (Olympus CK-2, Tokyo, Japan)

Transmission electron microscope (JEM-1010, JEOL, Tokyo, Japan)

Twister shaker (BioFree BF-300, Korea)

Water bath (EYELA SBC-16, Japan)

Western blot system (BIO-RAD Mini-PROTEIN® Tetra system, USA; BIO-RAD PowerPacTM

HC, USA; BIO-RAD TRANS-BLOTTM Semi-Dry transfer, USA)

1.2. Reagents

Ammonium persulfate (Bio-Rad, USA)

ATPIF-1 antibody (rabbit, Santa Cruz, USA)

BAPTA-AM (1,2-Bis(2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis

(acetoxymethyl ester)), (\geq 95%, Sigma-Aldrich)

Bcl-2 antibody (rabbit, Santa Cruz, USA)

 β -actin antibody (rabbit, Abfrontier, Korea)

Bovine Serum Albumin (Santa Cruz, USA)

Chloroquine diphosphate salt (Sigma-Aldrich, USA)

Cleaved-PARP antibody (Cell Signaling, USA)

Dansylcadaverine (Sigma-Aldrich, USA)

DMEM/high glucose medium (ThermoScientific HyClone, USA)

DMSO (≥99.9%, Sigma-Aldrich, USA)

Donkey anti-goat peroxidase-conjugated IgG secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology,

USA)

ECL solution (SuperSignal® West Femto Maximum sensitivity substrate, ThermoScientific,

USA)

ECL solution (WestSave UpTM, AbFrontier, Korea)

EtOH (≥99.9%, Duksan, Korea)

Fas antibody (rabbit, Santa Cruz, USA)

FBS (ThermoScientific HyClone, USA)

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, USA)

Glycine for electrophresis (Sigma-Aldrich, USA)

Goat anti-rabbit peroxidase-conjugated IgG secondary antibody (ImmunoPure®,

ThermoScientific, USA)

HO-1 antibody (rabbit, Santa Cruz, USA)

HP-20 resin (Diaion HP-20 resin, Mitsubishi Chemical, Japan)

Krebs-Henseleit Buffer Modified (Sigma-Aldrich, USA)

LC3B antibody (rabbit, Sigma, USA)

MeOH (99.85%, Hayman, England)

Mounting medium (Fluoroshield, ImmunoBioScience, Korea)

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol–2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (thiazol Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich, USA)

N,N'-methylene-bis-acrylamide (30% Acrylamide/Bis solution, 29:1, Bio-Rad, USA)

NH₄Cl (Sigma-Aldrich, USA)

PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore, USA)

Nonfat dry milk (DifcoTM Skim Milk, BD, France)

PBS (ThermoScientific HyClone, USA)

Penicillin (100units/mL) streptomycin (100µg/mL) (Pen Strep, Gibco, USA)

PI/Rnase Staining Buffer (BD Pharmingen, USA)

Polyacrylamide

Protease inhibitor cocktail (HaltTM protease & phosphatase inhibitor Single use cocktail,

EDTA-free, ThermoScientific, USA)

Protein assay reagent (Pierce[®] 660nm Protein assay, ThermoScientific, USA)

Protein marker (PageRulerTM Plus Presteined Protein Ladder, ThermoScientific, USA)

Rapamycin (Sigma-Aldrich, USA)

RIPA Buffer (ThermoScientific, USA)

Rubicon antibody (rabbit, Cell Signaling, USA)

5X SDS PAGE loading buffer (GelPilot DNA Loading Dye, Qiagen, German)

SDS solution (10%, Bio-Rad, USA)

Sodium Azide (Sigma-Aldrich, USA)

Tamoxifen citrate (Chromadex, USA)

TBS containing 0.1 % Tween 20 (BioRad, USA)

TEMED (Bio-Rad, USA)

0.25% trypsin-EDTA (Gibco, USA)

TFEB antibody (rabbit, Santa Cruz, USA)

Tris/Glycine/SDS buffer (Bio-Rad, USA)

Tris-HCl buffer (pH 8.8, Bio-Rad, USA)

Tris base (Trizma[®] base, Sigma-Aldrich, USA)

UCP-2 antibody (goat, Santa Cruz, USA)

2. Methods

2.1. Cell culture

HepG2 간암세포주 (Human hepatocellular carcinoma cell line)는 한국 세포주 은행 (KCLB, #88065, Seoul, Korea)로부터 구입하여 10% FBS, 100 units/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin 을 포함한 DMEM을 배양액으로 하여 37 °C 에서 5% CO₂ 가 지속적으로 공급되는 배양기에서 배양하였다. 세포가 배양 용기의 바닥에 80-90% confluent 하게 되면 trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양 하였 다.

2.2. Cell viability test

HepG2 cell에 대한 진세노사이드의 증식억제 (growth inhibition) 활성은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay 를 이용하여 측정하였다. HepG2 cell을 48-well 배양판에 5 x 10⁴ cells/mL 농도로 분주하여 24 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하고 serum-free media로 갈아준 후 화합물을 농도별로 처리하여 24, 48 시간 동안 배양하였다. 이 때 vehicle control로는 ginsenoside 처리군과 동일 농도의 DMSO 을 처리하였으며, 필요에 따라 칼슘 이온 킬레이터인 10 μM BAPTA-AM ((1,2-Bis(2-aminophenoxy) ethane-N,N,N,N-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl ester)을 1 시간 전처리 하거나, autophagy inhibitor인 chloroquine (20 µM chloroquine diphosphate salt, ≥ 98 %, Sigma-Aldrich)을 동시에 처리하였다. 화합물과 일정 시간 배양한 후 각각의 well에 MTT 용액을 가 하여 (최종 농도 0.5 mg/mL) 다시 37 °C에서 4 시간 동안 반응시키고 배양액을 모두 제거한 후 생성된 MTT formazan을 DMSO를 가하여 충분히 흔들어 녹인 후 ELISA microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험 에 대해 3회에 걸쳐 측정하여 그 평균값과 표준오차를 최종값으로 사용하였으며, 세포생존률 (cell viability)은 다음의 계산식 1을 이용하여 계산하였다.

[계산식 1]

Cell viability (%) = A_{540nm} (sample) / A_{540nm} (control) X 100

2.3. Fluorescence microscopy (MDC staining)

화합물의 자가포식 유도 여부를 측정하기 위하여, 자가포식 작용의 단계 중 생성 되는 acidic autophagic vacuole (AVO)에 염색되는 autofluorescent marker인 MDC (monodansylcadaverine)을 이용하였다 (Munafó *et al.*, 2001; Mizushima, 2004; Vazquez *et al.*, 2009).

HepG2 cell을 6-well 배양판에 5 x 10⁴ cells/mL 농도로 분주하여 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후 진세노사이드를 10-50 μM 농도로 처리하여 24 시 간 동안 배양하였다. 이 때 vehicle control로는 화합물 처리군과 동일 농도의 DMSO을 처리하였다. 화합물 배양한 후 배양액을 제거하고 50 μM 농도로 PBS에 녹인 MDC solution을 가하여 다시 37 °C에서 30 분간 두어 염색시킨 후, PBS로 3회 씻어내고 mounting solution을 한 방울 떨어뜨려 형광현미경으로 관찰하였다. Image는 400 배율로 관찰하였으며 excitation = 330-385 nm, emission = 420 nm 파장의 fliter를 이용하였다. 세포 100개당 MDC에 의해 green color로 보이는 MDC-stained dot의 개수를 세었으며 각 실험에 대해 3회에 걸쳐 측정하여 그 평 균값과 표준오차를 최종값으로 사용하였다.

2.4. Western blot analysis

HepG2 cell에 10-50 μM 농도의 진세노사이드를 단독으로 혹은 autophagy inhibitor인 ammonium chloride (NH₄Cl, 10mM), 클로로퀸 (chloroquine diphosphate salt, 20 μM)와 함께 처리하여 (Mizushima *et al.*, 2007) 24 시간 동 안 배양한 후 차가운 PBS를 이용하여 세척하고 수집하였다. 수집한 cell을 protease inhibitor cocktail을 포함한 SDS lysis buffer (RIPA buffer)을 이용하여 용해시키고 원심분리 (13,000 rpm, 10 min)하여 상청액을 취하고, 추출액의 단백 질 농도를 BSA를 기준으로 한 Bradford protein assay에 따라 (Kruger *et al.*, 1994) 정량하였다. 정량 후 해당량의 단백질 추출액 (20 μg) 에 5X SDS PAGE loading buffer과 증류수를 가하여 95 °C에서 5 분간 반응시킨 후 식혀 원심분리 (13,000 rpm, 1 min)한 sample을 대상으로 western blot analysis를 실시하였다.

단백질 sample을 12% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 SDS-PAGE를 시행 한 후 PVDF membrane으로 옮겨 5% 탈지분유 (5% skim milk in TBST buffer) 로 blocking시켰다. Blocking이 끝난 membrane을 TBST buffer로 세척한 후 1차 항체로 4 °C에서 12 시간 동안 반응시키고 TBST buffer로 3회 세척한 후 다시 실온에서 2차 항체에 2 시간 동안 반응시켰다. 2차 항체까지 부착시킨 membrane 을 다시 TBST buffer로 3회 세척 후 ECL solution을 가하여 bio-image analyzer (LAS 4000)로 측정하였다.

2.5. Flow cytometry

진세노사이드에 의한 HepG2 cell의 세포사멸 및 세포주기에 미치는 영향을 보기 위해 FACS를 이용하였다. HepG2 cell을 60 mm dish에 5 x 10⁴ cells/mL 농도로 분주하여 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후 ginsenoside을 20-100 μM 농도로 처리하여 24-48 시간 동안 배양하였다. 이 때 vehicle control로는 화합물 처리군과 동일 농도의 DMSO을 처리하였으며 autophagy inhibitor인 chloroquine (chloroquine diphosphate, 20 μM)을 ginsenoside와 동시에 처리하기도 했다.

2.5.1. Analysis of cell cycle

화합물 처리가 끝 난 후 PBS를 이용하여 cell을 세척하고 trypsin EDTA를 이용 하여 cell을 떼어낸 후 -20 ℃에서 80 % EtOH에 12 시간 동안 두어 세포를 고정 시켰다. 세포 고정 후 다시 PBS로 EtOH을 씻어내고 암상태에서 30분간 PI (PI/RNase Staining Buffer)로 염색하여 flow cytometer를 이용하여 세포주기 (cell cycle)을 분석하였다.

2.5.2. Measurement of cell apoptosis

화합물 처리가 끝 난 후 PBS를 이용하여 cell을 세척하고 trypsin EDTA를 이용 하여 cell을 떼어낸 후 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, USA) protocol에 따라 cell을 PI 및 Annexin V dye로 염색하고 flow cytometer를 이용하여 세포사멸 양상을 분석하였다.

2.6. Transmission electron microscopy (TEM)

진세노사이드 처리에 의한 HepG2 세포 성상의 변화를 보다 세밀히 관찰하기 위 하여 TEM을 사용하여 관찰하였다. HepG2 cell을 100 mm dish에 5 x 10⁴ cells/mL 농도로 분주하여 24 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후 ginsenoside을 20-100 μM 농도로 처리하여 16 시간 동안 배양하였다. 차가운 PBS로 세척 후 trypsin-EDTA를 처리하여 dish에서 떼어내고, Karnovsky's fixation reagent를 이용하여 2시간 primary fixation하였다. 0.05M sodium cacodylate buffer로 3회 세척 후 다시 0.1M cacodylate-buffered 0.2% osmium tetroxide로 2시간 post fixation하고 증류수로 세척 후 0.5% uranyl acetate를 이 용하여 전자 염색하였다. 이후 30 → 100% EtOH로 탈수 과정을 거친 후

propylene oxide로 transition하고, spurr's resin 으로 embedding 후 박편화하여 JEM-1010 (JEOL, Japan) 전자현미경으로 관찰하였다.

2.7. Statistical analysis

통계적 유의성의 검토는 측정값에 대한 대조값으로부터의 변동을 "one-way ANOVA"에 의해 판정하였으며, P 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

III. Results

1. Screening of autophagy-inducing ginsenosides in HepG2 cell

진세노사이드의 autophagy유도 활성을 검색하기 위하여 6쌍의 epimer를 비롯하 여 총 26 종의 진세노사이드를 대상으로 HepG2 세포에 각 성분을 50 μM의 농도 로 24시간 동안 처리하여 MDC 염색 및 LC3 단백질의 western blot을 실시하였 다. 두 가지 검색법 모두에서 autophagy를 유도하는 반응을 보인 진세노사이드는 protopanaxatriol (PPT) 계열 ginsenoside Rh4 와 그 aglycone, Rg6, 20(*R*) – Rh1, 20(*R*) – F1였고 (Fig. 13), protopanaxadiol (PPD) 계열 ginsenoside Rk1, 20(*S*) – Rg3, 20(*S*) – Rh2, 20(*S*) – PPD 였으며 (Fig. 14), 이 중 ginsenoside Rk1 만이 HepG2 세포에서 autophagy를 유도하는 것으로 이미 보고된 바 있고 (Ko *et al.*, 2009), 나머지 성분들은 liver cancer cell에서 autophagy 관련 활성에 관해 보고된 바가 아직 없다.

Autophagy 유도 활성을 갖는 진세노사이드 중 양이 확보되며 epimer를 이루거 나 구조적으로 상관관계가 있는 PPD 계열의 ginsenoside Rg3, Rh2와 PPT 계열 의 Rh1, Rh4를 대상으로 HepG2 세포에 대하여 autophagy 및 이와 관련한 항암 효과를 살펴보기 위해 MTT assay, flow cytometry등 다른 실험을 진행하였다.



Figure 13. Autophagy-inducing ginsenosides (PPT type).



Figure 14. Autophagy-inducing ginsenosides (PPD type).

2. Ginsenoside Rg3, Rh2, PPD의 protective autophagy 활성

Protopanaxadiol (PPD) type 진세노사이드인 Rg3와 Rh2는 인삼에는 존재하지 않으며 홍삼 특유의 성분으로 잘 알려져 있다. Ginsenoside Rh2는 Rg3에서 당이 하나 제거된 형태의 구조이며, 여기서 steaming이나 위장관 내 박테리아에 의해 당이 하나 더 제거되면 Rh2를 비롯한 PPD 계열 진세노사이드의 최종 대사체인 PPD가 된다 (Fig. 15). Ginsenoside Rg3와 Rh2 그리고 PPD의 20(*R*)-epimer에 비해 20(*S*)-epimer가 HepG2를 비롯한 다수의 암 세포주에서 강한 세포사멸 효 과를 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Liu et al., 2010; Dong *et al.*, 2011).



Figure 15. Metabolic cascade of PPD-type ginsenoside Rg3 and Rh2.

2.1. Ginsenoside Rg3, Rh2, PPD의 세포사멸 효과

진세노사이드의 HepG2 세포에 대한 세포사멸 효과를 알아보기 위하여 ginsenoside Rg3, Rh2와 대사체인 PPD 세 가지 epimer들을 24시간 동안 처리한 후 MTT assay를 실시한 결과 이전의 보고들과 일치하는 결과를 얻을 수 있었다. 세 가지 화합물 모두 20(S)-epimer에서는 농도 의존적으로 세포의 생존률이 억제 되었지만 20(R)-epimer들은 유의성 있는 효과를 나타내지 않았으며 (Fig. 16) 그 중 화합물 구조의 당의 개수가 상대적으로 적은 PPD와 20(S)-ginsenoside Rh2 (LD₅₀ < 10 μM)가 Rg3 (LD₅₀ > 40 μM) 에 비해 적은 농도에서도 효과적으로 HepG2의 성장을 억제하였다.



Figure 16. Cytotoxicity of ginsenoside Rg3, Rh2 and PPD in HepG2 cell. Cells were treated with ginsenosides for 24 h in serum free media, and the cell viability was analyzed by MTT assay. Values represent the mean \pm SD of three independent experiments.

2.2. Ginsenoside Rg3, Rh2, PPD의 autophagy 유도 활성

진세노사이드의 HepG2 세포에 대한 autophagy 유도 활성 검색을 위해 ginsenoside Rg3, Rh2 그리고 PPD의 두 가지 epimer들을 24 시간 동안 처리하 고 MDC 염색하여 형광현미경으로 관찰하였을 때, 세 가지 화합물 모두 20(*S*)epimer에서는 MDC-stained dot의 개수가 control에 비해 현저하게 증가한 반면 20(*R*)-epimer들은 유의성 있는 효과를 나타내지 않았다 (Fig. 17A, B).



Figure 17A. Autophagy-inducing effect of ginsenoside Rg3, Rh2 and PPD in HepG2 cell. Cells were treated with 25 μM ginsenosides for 24 h in serum free media, stained with MDC and observed under fluorescence microscope. The numbers of MDC-labeled autophagic vacuoles per 100 cells compared with DMSO control were presented in the histogram. Values represent the mean ± SD of three independent experiments.



Figure 17B. Autophagy-inducing effect of ginsenoside Rg3, Rh2 and PPD in HepG2 cell. Tamoxifen 10 μ M was used as a positive control in MDC staining.

LC3 단백질의 발현을 측정한 western blot에서도 20(*S*)-ginsenoside Rg3, Rh2 그리고 PPD 는 LC3 II의 양이 control에 비해 증가하였지만, 20(*R*)-epimer 에서는 변화가 거의 없었으며, lysosomotripic agent인 NH₄Cl을 진세노사이드와 동시에 처리하여 라이소좀 활성을 억제하여 LC3 II가 분해되는 것을 막아 LC3 turnover assay를 실시하였을 때에도 결과가 동일하게 나타났다 (Fig. 18).



Figure 18. Autophagy-inducing effect of ginsenoside Rg3, Rh2 and PPD in HepG2 cell. LC3 and expression levels were analyzed by Western blotting. Cells were treated with 25 μ M ginsenoside for 24h in serum free media with or without 10 mM NH₄Cl then harvested. β -actin was used as the internal control.

2.3. Autophagy inhibitor가 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2의

세포사멸 효과에 미치는 영향

간암 세포주인 HepG2 세포에 대해 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2가 세포 사멸 효과와 동시에 autophagy 유도 활성을 보이므로, 이 두 가지 진세노사이드의 세포 사멸 효과에 autophagy가 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 autophagy inhibitor인 chloroquine (CQ)을 진세노사이드와 동시에 처리한 후 MTT assay로 cell viability를 측정하였다.

그 결과 두 가지 화합물의 20(*S*)-epimer 모두에서 chloroquine을 처리하였을 때 그 세포사멸 효과가 더 증가함을 관찰할 수 있었으며, 20(*R*)-epimer에서는 chloroquine 처리 여부에 의해 유의적인 변화가 일어나지 않았다 (Fig. 19). 다시 말해, PPD 계열인 20(*S*)-ginsenoside Rg3, Rh2로부터 유발되는 autophagy는 화 합물의 세포사멸 효과로부터 세포의 생존률을 높이는 protective (혹은 defensive) autophagy임을 알 수 있었다.



Figure 19. Effects of autophagy inhibitor on ginsenoside Rg3 and Rh2 inducing cytotoxicity in HepG2 cells. Cells were exposed to $10-50 \mu$ M of ginsenoside alone or combined with chloroquine (CQ), the autophagy inhibitor, in serum-free DMEM media (CQ: 20 μ M of chloroquine, control: 0.05 % DMSO). After 24 h of incubation, the viability of cells was measured by MTT. Values represent the mean \pm SD of three independent experiments

20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2에 의한 HepG2 세포사멸이 어떤 종류의 cell death type을 경유하며 autophagy에 의해 어떤 영향을 받는지 더 자세히 알아보 기 위하여 flow cytometry를 실시하였다. 위의 MTT assay와 마찬가지로 진세노 사이드와 동시에 chloroquine을 처리하여 진세노사이드 단독으로 처리한 세포군과 세포사멸 양상을 비교하였다.

화합물 처리 후 세포주기의 변화를 관찰하기 위하여 세포 고정 후 PI staining 하였을 때, 20(S)-ginsenoside Rg3를 처리한 군에서는 control에 비해 죽은 세포 에 해당하는 sub-G1 기에 분포한 세포의 비율이 증가 (4.6 → 14.0 %) 하였으며, 20(S)-Rg3와 chloroquine을 동시에 처리한 군에서는 그 비율이 더 크게 증가 (73.8 %) 하였다. Sub-G1 기 외에 다른 세포주기에 대해서는 cell cycle arrest를 일으키지 않았다 (Fig. 20A).

세포 사멸 양상을 관찰하기 위하여 annexin V와 PI로 double-staining 하였을 때, 20(S)-Rg3를 처리한 군에서는 control에 비해 apoptotic (lower/right side) region은 13 % 증가하였고 20(S)-Rg3와 동시에 chloroquine을 처리하였을 때엔 necrotic (upper/left side) region으로 세포사멸이 이전보다 더 진행된 것을 볼 수 있었다 (Fig. 20B). 즉, 이전에 보고된 바와 같이 20(S)-Rg3는 HepG2 세포에서 apoptotic cell death를 일으키며 (Jiang *et al.*, 2011), 이 세포사멸 효과는 protective autophagy에 의해 감소된다는 것을 알 수 있었다.



Fiqure 20A. Effects of autophagy inhibitor on ginsenoside Rg3 inducing cytotoxicity in HepG2 cells. Cells were treated in 50 μ M of 20(*S*)-Rg3 with or without 20 μ M CQ in serum free media for 24 h, then cell cycle distribution was measured by flow cytometry after cell fixation and PI staining.



Fiqure 20B. Effects of autophagy inhibitor on ginsenoside Rg3 inducing cytotoxicity in HepG2 cells. Cells were treated in 50 μ M of 20(*S*)-Rg3 with or without 20 μ M CQ in serum free media for 24 h, then harvested and double-stained with annexin V and PI followed by analyzing with flow cytometer (FL1 : annexin V, FL2 : PI).

20(S)-ginsenoside Rh2의 경우 PI staining으로 세포주기를 분석한 결과, 20(S)-Rh2를 처리한 군에서는 control에 비해 죽은 세포에 해당하는 sub-G1 기 에 분포한 세포의 비율이 증가 (7.2 → 38.4 %) 하였으며, 20(S)-Rh2와 chloroquine을 동시에 처리한 군에서는 그 비율이 매우 크게 증가 (85.6 %) 하였 다. Sub-G1 기 외에 다른 세포주기에 대해서는 cell cycle arrest를 일으키지 않았 다 (Fig. 21A).

세포 사멸 양상을 관찰하기 위하여 annexin V와 PI로 double-staining 하였을 때, 20(S)-Rh2를 처리한 군에서는 control에 비해 necrotic (upper/left side) region의 cell이 14.95 % 증가하였으나 apoptotic (lower/right side) region의 세 포 비율은 거의 변화가 없었으며, 20(S)-Rh2와 동시에 chloroquine을 처리하였을 때엔 necrotic region과 apoptotic region의 세포 분포가 각각 약 5 % 씩 증가하였 다 (Fig. 21B).

이러한 데이터를 종합해 볼 때, 20(*S*)-Rh2에 의한 세포사멸은 20(*S*)-Rg3에 비해 보다 necrotic 한 양상을 띄며, 20(*S*)-Rh2 또한 autophagy로 인해 apoptotic cell death가 감소되는 protective autophagy를 유도함을 알 수 있었다.



Fiqure 21A. Effects of autophagy inhibitor on ginsenoside Rh2 inducing cytotoxicity in HepG2 cells. Cells were treated in 20 μ M of 20(*S*)-Rh2 with or without 20 μ M CQ in serum free media for 24 h, then cell cycle distribution was measured by flow cytometry after cell fixation and PI staining.



Fiqure 21B. Effects of autophagy inhibitor on ginsenoside Rh2 inducing cytotoxicity in HepG2 cells. Cells were treated in 20 μ M of 20(*S*)-Rh2 with or without 20 μ M CQ in serum free media for 24 h, then harvested and double-stained with annexin V and PI followed by analyzing with flow cytometer (FL1 : annexin V, FL2 : PI).

3. Ginsenoside Rh1, Rh4에 의한 autophagic cell death 작용

Protopanaxatriol (PPT) type 진세노사이드인 Rh1의 20(*R*) - epimer와 Rh4 또 한 인삼에는 존재하지 않으며 steaming의 가공과정을 거친 후에 생성되는 성분이 다. Ginsenoside Rh1은 그 자체로 많은 PPT 계열 진세노사이드의 대사체이기도 하며, 장내 세균에 의해 최종 산물인 PPT로 대사된다. Ginsenoside Rh4는 20번 탄소에 이중결합을 이루고 있어 chirality를 갖고 있지 않는 구조이다 (Fig. 22). 20(*R*) - Rh1이 HepG2 세포에 고농도로 장시간 처리하였을 경우 세포성장 억제 효 과를 보인다는 연구 결과가 있었으며 (Toh *et al.*, 2011), Rh4에 관하여서는 현재 까지 HepG2 세포에 대한 viability test나 autophagy 관련 활성이 보고된 바가 없 다.



Figure 22. Transformation of PPT-type ginsenoside Rh1 and Rh4.
3.1. Ginsenoside Rh1, Rh4의 세포사멸 효과

세포사멸 효과를 알아보기 위하여 ginsenoside Rh4와 Rh1의 두 가지 epimer들 을 24시간 동안 처리한 후 MTT assay를 실시한 결과 20(*R*)-Rh1과 Rh4에서 세 포의 생존률을 낮추는 효과를 보였으며, 앞에서 언급한 PPD 계열 진세노사이드 20(*S*)-Rg3나 Rh2에 비해서는 높은 농도에서 (LD₅₀ > 50 μM) 효과를 나타냈다 (Fig. 23). 이는 약 400 μM의 농도로 72시간 처리했을 때에 20(*R*)-Rh1만이 HepG2 세포에 대해 50% 정도의 성장 억제 효과를 보이며 20(*S*)-Rh1은 별다른 효과가 없다고 한 이전의 보고 (Toh *et al.*, 2011) 와 동일한 맥락의 결과이며, Rh4의 HepG2 세포에 관한 성장억제 효과는 아직까지 보고된 바가 없다.



Figure 23. Cytotoxicity of ginsenoside Rh1 and Rh4 in HepG2 cell. Cells were treated with ginsenosides for 24 h in serum free media, and the cell viability was analyzed by MTT assay. Values represent the mean \pm SD of three independent experiments.

3.2. Ginsenoside Rh1, Rh4의 autophagy 유도 활성

진세노사이드의 HepG2 세포에 대한 autophagy 유도 활성 검색을 위해 ginsenoside Rh1의 두 가지 epimer, Rh4, aglycon of Rh4를 24시간 동안 처리하 고 MDC 염색하여 형광현미경으로 관찰하였을 때, 20(*S*)-Rh1을 제외한 모두에서 MDC-stained dot의 개수가 control에 비해 현저히 증가함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 24A, B).



Figure 24A. Autophagy-inducing effect of ginsenoside Rh1, Rh4, aglycon of Rh4 in HepG2 cell. Cells were treated with 25 μ M ginsenosides for 24 h in serum free media, stained with MDC and observed under fluorescence microscope. The numbers of MDC-labeled autophagic vacuoles per 100 cells compared with DMSO control were presented in the histogram. Values represent the mean \pm SD of three independent experiments.



Figure 24B. Autophagy-inducing effect of ginsenoside Rh1, Rh4, aglycon of Rh4 in HepG2 cell. Tamoxifen 10 μM was used as a positive control in MDC staining.

LC3 단백질의 발현을 측정한 western blot에서도 ginsenoside 20(S)-Rh1을 제외한 20(R)-Rh1, Rh4, aglycone of Rh4 처리군에서 모두 LC3 II의 양이 control에 비해 증가하였으며, lysosomotripic agent인 NH₄Cl을 진세노사이드와 동시에 처리하여 라이소좀 활성을 억제하여 LC3 II가 분해되는 것을 막아 LC3 turnover assay를 실시하였을 때에도 결과는 동일했다(Fig. 25).



Figure 25. Autophagy-inducing effect of ginsenoside Rh1, Rh4, aglycon of Rh4 in HepG2 cell. LC3 and expression levels were analyzed by Western blotting. Cells were treated with 25 μ M ginsenoside for 24h in serum free media with or without 10 mM NH₄Cl (autophagy inhibitor) then harvested. β -actin was used as the internal control.

3.3. Autophagy inhibitor가 ginsenoside Rh4 및 20(R) - Rh1의 세포사멸 효과에 미치는 영향

간암 세포주인 HepG2 세포에 대해 ginsenoside Rh4 및 20(*R*)-Rh1이 세포 사 멸효과와 동시에 autophagy 유도 활성을 보이므로, 이 두 가지 진세노사이드의 세 포사멸 효과에 autophagy가 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 autophagy inhibitor인 chloroquine (CQ)을 진세노사이드와 동시에 처리한 후 MTT assay로 cell viability를 측정하였다.

그 결과 ginsenoside Rh4 및 20(*R*)-Rh1 두 가지 화합물 모두에서 chloroquine을 처리하였을 때 그 세포사멸 효과가 더 감소하여 HepG2의 생존률이 높아짐을 관찰할 수 있었으며, 20(*S*)-Rh1에서는 chloroquine 처리 여부에 의해 유의적인 변화가 일어나지 않았다 (Fig. 26). 다시 말해, PPT 계열인 ginsenoside Rh4 및 20(*R*)-Rh1로부터 유발되는 autophagy는 화합물의 세포사멸 효과에 대해 상승 효과를 일으키는 autophagic cell death를 유발함을 알 수 있었다.



Figure 26. Effects of autophagy inhibitor on ginsenoside Rh4 and 20(R)-Rh1 inducing cytotoxicity in HepG2 cells. Cells were exposed to $50-200 \mu$ M of ginsenoside alone or combined with chloroquine (CQ), the autophagy inhibitor, in serum-free DMEM media (CQ: 20 μ M of chloroquine, control: 0.05 % DMSO). After 24 h of incubation, the viability of cells was measured by MTT. Values represent the mean \pm SD of three independent experiments.

Ginsenoside Rh4 및 20(R)-Rh1에 의한 HepG2 세포사멸이 어떤 종류의 cell death type을 경유하며 autophagy에 의해 어떤 영향을 받는지 더 자세히 알아보 기 위하여 flow cytometry를 실시하였다. 위의 MTT assay와 마찬가지로 진세노 사이드와 동시에 chloroquine을 처리하여 진세노사이드 단독으로 처리한 세포군과 세포사멸 양상을 비교하였다.

세포 사멸 양상을 관찰하기 위하여 annexin V와 PI로 double-staining 하였을 때, Rh4를 처리한 군에서는 control에 비해 apoptotic (lower/right side) region의 cell이 15.8% 증가하였고, Rh4와 동시에 chloroquine을 처리하였을 때엔 Rh4만 처리한 군보다 8.6 % 감소하였다 (Fig. 27). 데이터를 종합해 볼 때, Rh4는 HepG2 세포에서 apoptotic cell death를 일으키며, autophagy에 의해 이 효과를 상승시키는 autophaic cell death 작용을 또한 일으키는 것을 알 수 있었다.



Fiqure 27. Effects of autophagy inhibitor on ginsenoside Rh4 inducing cytotoxicity in HepG2 cells. Cells were treated in 100 μ M of Rh4 with or without 20 μ M CQ in serum free media for 24 h, then harvested and double-stained with annexin V and PI followed by analyzing with flow cytometer (FL1 : annexin V, FL2 : PI).

세포 사멸 양상을 관찰하기 위하여 annexin V와 PI로 double-staining 하였을 때, 20(*R*)-Rh1을 처리한 군에서는 control에 비해 apoptotic (lower/right side) region은 22.4 % 증가하였고, 20(*R*)-Rh1와 동시에 chloroquine을 처리하였을 때 엔 20(*R*)-Rh1만 처리한 군보다 apoptotic region의 세포분포가 13.2 % 감소하였 다 (Fig. 28). 데이터를 종합해 볼 때, 20(*R*)-Rh1는 Rh4와 마찬가지로 HepG2 세포에서 apoptotic cell death를 일으키며, autophagy에 의해 이 효과를 상승시키 는 autophaic cell death를 일으키는 것을 알 수 있었다.



Fiqure 28. Effects of autophagy inhibitor on ginsenoside 20(R)-Rh1 inducing cytotoxicity in HepG2 cells. Cells were treated in 200 μ M of 20(R)-Rh1 with or without 20 μ M CQ in serum free media for 24 h, then harvested and double-stained with annexin V and PI followed by analyzing with flow cytometer (FL1 : annexin V, FL2 : PI).

4. 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2의 세포사멸 효과 및 autophagy 유도 활성에 대한 기전 연구

앞의 실험에서 ginsenoside Rg3 및 Rh2의 20(S)-epimer가 세포사멸 효과와 동시에 HepG2 세포의 생존에 protective한 역할을 하는 autophagy를 유도한다는 결과를 얻었다. 이러한 효과가 ginsenoside Rg3, Rh2의 20(R)-epimer의 결과와 다르다는 현상에 대해 보다 구체적으로 그 기전의 차이를 탐색해보았다.

4.1. 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2의 apoptosis 유도

HepG2 세포 사멸 효과를 알아본 MTT assay 에서 세포 생존률 50% 이하이면 서 autophagy를 뚜렷이 나타내는 대표 농도를 ginsenoside Rg3의 경우 50 μM 로 Rh2의 경우 20 μM로 설정하여, 해당 농도로 처리했을 때의 세포 성상을 광학 현미경 및 전자현미경 (TEM)으로 관찰하고, apoptosis 관련 인자의 발현 정도를 western blot으로 비교해보았다.

광학 및 전자 현미경으로 관찰했을 때에도 앞서 보았던 MTT assay 및 flow cytometry와 동일하게 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2만이 control군에 비해 세포 사멸로의 변화를 보였고 세포 내 lysosome의 개수 및 크기가 현저히 늘어난 것을 관찰 할 수 있었다. 특히 20(S)-ginsenoside Rg3의 경우 핵이 두 조각 이상으로 갈라지는 전형적인 apoptosis의 모습을 보이는 세포들을 볼 수 있었으며, 20(S)-Rg3에 비해 저농도를 처리했음에도 20(S)-ginsenoside Rh2 처리군에서 세포 사 멸 효과가 더 뚜렷하고 또한 다수의 lysosome이 전체 세포에 그물망과 같이 존재 함을 확인할 수 있었다 (Fig. 29A and B). 또한 lysosomal biogenesis의 주된 인 자인 TFEB 단백질도 20(S)-ginsenoside Rg3는 8 h 처리군에서, 20(S)-ginsenoside Rh2은 16 h 처리군에서 증가되어 모두 24시간 이내에 autolysosome 이 증가하는 앞선 MDC 결과와 일치하였다 (Fig. 30)



Figure 29A. Microscopic images after ginsenoside Rg3 and Rh2 treatment. Cells were treated with 50 μ M Rg3 and 20 μ M Rh2 for 16 h in serum free media, then observed in magnification X400.



Figure 29B. TEM images after ginsenoside Rg3 and Rh2 treatment. Cells were treated with 50 μM Rg3 and 20 μM Rh2 for 16 h in serum free media.



Figure 30. Expression levels of TFEB after ginsenoside Rg3 and Rh2 treatment. Cells were treated with 50 μ M Rg3 and 20 μ M Rh2 for 8 or 16 h in serum free media then harvested. β -actin was used as the internal control.

대표적인 apoptosis 관련 단백질 인자인 PARP, Fas, HO-1 및 Blc-2의 발현에 대한 네 가지 진세노사이드 epimer의 영향을 western blot으로 살펴본 결과 (Fig. 31), 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2 처리군에서만 PARP cleavage및 death receptor인 Fas의 발현이 증가하였고, anti-apoptotic oncogene인 Bcl-2는 감소 하였다. 20(R)-ginsenoside Rg3, Rh2 처리군에서는 모두 control과 유의한 차이 가 없었으며, cytoprotective enzyme인 HO-1은 네 가지 진세노사이드 모두에서 유의한 변화를 일으키지 않았다. 이상의 결과에서 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2은 HepG2 세포에서 stereoisomer-selective하게 apoptosis를 유도하는 것으로 확인 할 수 있었다.



Figure 31. Expression levels of bcl-2, Fas, HO-1 and cleaved PARP after ginsenoside Rg3 and Rh2 treatment. Cells were treated with 50 μ M Rg3 and 20 μ M Rh2 for 16 h in serum free media then harvested. β -actin was used as the internal control.

4.2. 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2에 의한 미토콘드리아 손상

확대된 전자현미경 데이터에서, 20(*R*)-epimer 처리군은 control과 같이 정상적 인double-membrane의 미토콘드리아를 보였지만, 20(*S*)-ginsenoside Rg3 처리 군의 경우 lysosome 내로 미토콘드리아가 함몰되어가는 mitophagy와 같은 모습 을 관찰할 수 있었으며 20(*S*)-ginsenoside Rh2의 경우 대부분의 미토콘드리아가 작게 쪼개진 형태로 (fragmented or petit mitochondria)로 관찰되었다 (Fig. 32)



Figure 32A. Magnified TEM images after ginsenoside Rg3 and Rh2 treatment. Cells were treated with 50 μ M Rg3 and 20 μ M Rh2 for 16 h in serum free media. Mitochondrial abnormality by 20(*S*)-ginsenoside Rg3 and Rh2 treatment are indicated with black arrows.



Figure 32B. Numbers of mitochondria in HepG2 cell assorted by size.

미토콘드리아 기능에 관련한 단백질 발현에서, 20(S)-ginsenoside Rh2 처리군 에서는 미토콘드리아 fusion관련 protein인 OPA-1의 발현이 현저히 감소하였으며 mitochondrial uncoupling protein인 UCP-2 및 ATPIF-1은 증가하였고, 반대로 20(S)-ginsenoside Rg3 처리군에서는 미토콘드리아에서 생성된 ATP의 분해를 억제하는 인자인 ATPIF-1이 눈에 띄게 감소하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 33). 이로써, 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2로 인한 HepG2 세포사멸 효과는 미토콘드 리아의 구조 및 fusion/fission 균형, ATP 대사 등의 기능을 변형시키는 것을 경유 하여 일어나는 것으로 추측할 수 있었다.



Figure 33. Expression levels of OPA-1, UCP-2 and ATPIF-1 after ginsenoside Rg3 and Rh2 treatment. Cells were treated with 50 μ M Rg3 and 20 μ M Rh2 for 16 h in serum free media then harvested. β -actin was used as the internal control.

4.3. Autophagy inhibition으로 인한 세포사멸 증가 효과와 칼슘 이온 활성과의 연관성

20(S)-ginsenoside Rg3 및 Rh2로 인해 동시에 유도되는 apoptosis와 autophagy의 상관관계를 더 구체적으로 밝히기 위해 autophagy 억제 여부에 따른 apoptosis 관련 단백질의 발현 변화를 western blot으로 측정한 결과, PARP cleavage가 더욱 증가하고, Fas 단백질은 깨져서 (post-translational modification) 약 2~3 kD 정도 down-sized된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 34).



Figure 34. Changes of bcl-2, Fas and cleaved PARP expression level by autophagy inhibition were estimated by immunoblotting. Cells were treated in 50 μ M Rg3(S) and 20 μ M Rh2(S) with and without 20 μ M CQ in serum-free DMEM media for 16 h then harvested. β -actin was used as the internal control.

세포 막에 존재하는 다수의 receptor들과 마찬가지로 death receptor인 Fas 또 한 endosome을 경유하여 세포 내로 유입되어 분해되는 등의 post-tramslational modification 과정을 거치는 것으로 알려져 있다 (Tollefson et al., 1998). 따라서 Ca²⁺-dependent cysteine protease인 calpain에 의해 Fas 단백질이 끊어지는 지 점을 GPS-CCD (calpain cleavage detector) program을 이용하여 예측해 본 결 과 가장 깨어지기 쉬운 위치는 Fas 단백질의 아미노산 서열 중 24번째인 Asn (24N) 바로 뒤의 위치였다 (Fig. 35). 아미노산 1개의 평균적인 분자량이 약 110 dalton인 사실을 고려해 보았을 때, calpain에 의해 끊어진 이후 예상되는 Fas 단 백질의 size의 차이는 약 2.3 kD으로 위 실험의 western blot 데이터와 일치하였 다. 앞서 보았던 미토콘드리아 내 UCP-2 단백질 또한 20(S)-ginsenoside Rh2 에 의해 그 발현이 증가되는 동시에 mobility shift가 약간 변하는 것을 볼 수 있었 는데 (Fig. 33) 이는 일반적인 단백질의 phosphorylation 의 양상과 유사하다. 미 토콘드리아 내의 칼슘 이온의 축적이 UCP-2를 비롯한 미토콘드리아 내 단백질의 phosphorylation에 중요한 역할을 할 것이라는 보고가 있었는데 (Graier et al., 2009) 이런 점들을 모두 감안했을 때, autophagy 억제가 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2에 의한 apoptosis를 강화하는 현상 또한 칼슘 이온과 관련되어 있을 거라는 가설을 세울 수 있었다.

Position	Peptide	Score	Cutoff
19	LVLTSVARLS/ SKSV	0.837	0.654
22	TSVARLSSKS/ VNAQ	0.747	0.654
24	VARLSSKSVN/ AQVT	1.299*	0.654
25	ARLSSKSVNA/ QVTD	0.731	0.654
39	INSKGLELRK/TVTT	0.698	0.654
45	ELRKTVTTVE / TQNL	0.851	0.654
46	LRKTVTTVET/QNLE	0.66	0.654
199	VKRKEVQKTC/RKHR	0.837	0.654
243	TTIAGVMTLS/ QVKG	0.761	0.654
271	IKNDNVQDTA/ EQKV	0.766	0.654
276	VQDTAEQKVQ/LLRN	0.655	0.654
328	TSDSENSNFR/ NEIQ	0.668	0.654

Figure 35. Predicted calpain cleavage site in Fas receptor (software, GPS-CCD 1.0).

따라서 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2 및 autophagy 저해제인 클로로퀸을 처리 하기 전, 칼슘 이온 킬레이터인 BAPTA-AM을 전처리 하여 세포 사멸 효과에 어 떠한 영향을 미치는지 MTT assay로 측정하였다 (Fig. 36). 그 결과, autophagy 억제로 인해 더욱 감소되었던 세포 생존률이 BAPTA-AM으로 인해 칼슘 이온 활 성이 저해된 경우 이전에 비해 약 50% 정도 회복되었으며, 이를 통해 20(S)ginsenoside Rg3, Rh2에 의한 apoptosis와 autophagy의 상호 작용이 칼슘 이온의 활성과 관련이 있음을 알 수 있었다.



Figure 36. Effects of Ca2+ chelator on HepG2 cell co-treated with 20(S)ginsenoside Rg3, Rh2 and autopahgy inhibitr. Cells were pre-incubated with 10μ M BAPTA-AM for 1h, then exposed to 20μ M Rg3(S) and 10μ M Rh2(S) with or without 20 μ M chloroquine in serum-free DMEM media (control: 0.02% DMSO). After 24 h of incubation, the viability of cells was measured by MTT. Values represent the mean ± SD of three independent experiments (*p < 0.05).

IV. Discussion

인체의 항상성 유지 및 비만이나 당뇨병과 같은 대사 장애, 노화 및 각종 암과 알츠하이머와 같은 신경퇴행성 질환 등에 대한 autophagy의 다양하고 폭넓은 역할 이 밝혀지면서 autophagy를 활성화하여 건강의 유지 및 질병 치료에 이용하고자 하는 시도가 그 어느 때보다 많아지고 있다. 그리고 기존의 질병 모델에서 활성을 보이던 약물들의 새로운 주요 기전으로서 autophagy가 다시 제시되고 있다. 이 뿐 만 아니라 이미 알려진 '세포자멸 (apoptosis)'이나 '괴사 (necrosis)' 등 세 포 전체의 사멸에만 관여하는 기전들에 반해, autophagy는 세포내 소기관의 사멸 및 재생을 통해 세포 전체를 사멸에서 보호할 수도 혹은 세포전체 사멸로 유도하기 도 한다는 점에서 주목 받고 있다. 특히 현재 방사능 치료 또는 치료용 항암 항체 및 항암제의 세포사멸 기전은 대부분 apoptosis를 경유한 것인데, 다양한 암들이 apoptotic 세포사멸에 대한 내성을 보이고 있어 악성종양을 포함한 다양한 암세포 에서 autophagic 세포사멸은, 기존의 치료방법에 내성을 보이는 암을 치료할 수 있 는 대체 혹은 보조적 치료 경로가 될 수 있을 것으로 보인다.

인삼은 전통적으로 여러 적응증에 폭넓게 이용되어 오고 있으며, 그 주요 활성성 분인 진세노사이드는 다른 어떤 천연물 유래 화합물보다 다양한 인체의 질병 모델 에서 효과를 나타낸다는 점이 autopohagy와 유사한 맥락을 보인다. 따라서 본 연 구에서는 진세노사이드가 autuphagy에도 영향을 미칠 것으로 가정하고, 모핵의 구 조 및 sugar moiety, hydroxyl group, stereoselectivity 가 서로 다른 진세노사이

드를 대상으로 autophagy에 대해 갖는 활성 여부와 그 발현 기전을 비교 연구하고, 특히 세포사멸에 영향을 미치는 인자로서 autophagy의 역할 또한 밝히고자 하였다.

실험 결과 autophagy를 유도하는 활성을 보이는 ginsenoside Rh4 와 그 aglycone, 20(S)-Rg3, Rh2, PPD 및 20(R)-Rh1은 동시에 세포사멸 효과도 나타 냈으며 autophagy 유도 활성이 없는 20(R)-Rg3, Rh2, PPD 및 20(S)-Rh1은 진 세노사이드는 세포사멸 효과 또한 보이지 않았다. 또한 autophagy와 세포사멸을 일으키는 진세노사이드에 autophagy inhibitor를 동시에 처리하여 autophagy를 억 제하였을 때, 세포사멸 효과가 억제 혹은 강화되는 변화가 일어났다. 이는 암세포에 서 어떤 요인에 의해 up-regulation된 autophagy가 종종 apoptosis와 동반하여 나타나며, autophagy와 apoptosis를 조절하는 주요 regulator들이 서로 직접적으 로 positive 혹은 negative하게 영향을 주고받아 autophagy, apoptosis 그리고 necrosis 등 세포사멸 기전이 각각 완전히 독립적이지 않다는 최근의 연구 동향과 (Edinger et al., 2004; Fimia et al., 2010; Shen et al., 2011) 일치하는 결과이다. 실제로 천연물 유래 화합물이 autophagy 활성에 미치는 영향을 연구한 다수의 결과들이 보고되고 있다. 이 중 많은 경우에 autophagy를 유도하는 화합물이 동시 에 암세포에 대해 세포사멸 효과를 나타내는데, 이 화합물의 autophagy 활성을 억 제하였을 때 그 세포사멸 효과가 상승되거나 억제되는 두 가지 결과로 나뉘어진다. Evodiamine이 LLC (Lewis lung carcinoma) cell에서, EGCG (epigallocatechin-3-gallate)가 mesothelioma cell에서, timosaponin A-III가 Hela cell에서,

quercetin이 gastric cancer cell에서, β-elemene이 A549 lung cancer cell에서, caffeic acid phenethyl ester가 C6 glioma cell에서 전자의 결과를 나타내며 통상 이러한 경우 세포사멸에 대항하여 protective autophagy가 유발되었다고 지칭한다 (Liu *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2013; Sy *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011). 또한 β-lapachone이 U87 MG cell에서, areca nut extract가 CMT 415 cell에서, berberine이 liver cancer cell에서, α-mangostin이 glioblastoma cell에서, curcumin이 HepG2 cell에서, silibinin이 HT1080 cell에서, oridonin이 MCF-7 cell에서, bufalin이 HepG2 cell에서 autophagy를 억제하였을 때 세포사멸 효과가 감소하여 암세포의 생존이 높아지는 후자의 경우에 해당하는 결과를 모였다. 이런 경우 autophaic cell death가 유발되었다고 하거나 apoptosis 의 up-regulation에 영향을 미치는 proapoptotic activity를 갖는다고 설명한다 (Chao *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010; Miao *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010).

진세노사이드 중에서 지금까지 암세포에 대해 세포사멸 효과와 동시에 autophagy유도 활성을 갖는 화합물을 대상으로 autophagy 억제를 시켜본 연구로 는 breast cancer cell에서 ginsenoside F2가 그리고 HepG2 cell에서 ginsenoside Rk1이 protective autophagy를 나타낸 두 가지 경우가 있다 (Ko *et al.*, 2009; Mai *et al.*, 2012). 본 연구에서 실험한 결과 PPD 계열 진세노사이드인 20(*S*)-Rg3, Rh2 그리고 PPD 모두 protective autophagy를, PPT 계열 진세노사 이드인 Rh4와 20(*R*)-Rh1은 autophagic cell death를 일으키는 것으로 나타났는

데, 기존의 연구에서 protective autophagy 활성을 보였던 ginsenoside Rk1과 F2 가 역시 PPD 계열의 진세노사이드라는 점이 매우 흥미롭다. 그리고 protective autophagy와 세포사멸을 동시에 일으키는 화합물의 경우 chloroquine과 같은 autophagy inhibitor를 병용 투여하는 것이 그 항암 효과를 극대화할 수 있는 방법 이라 할 수 있을 것이다.

실험 결과에서 볼 수 있는 또 한가지 특징적인 사실은 진세노사이드의 20(*R*)-그리고 20(*S*)-epimer의 활성이 서로 확연히 다르다는 점이다. Epimer 쌍을 이루 는 ginsenoside Rh1, Rg3, Rh2 그리고 PPD 모두 한 가지 epimer에서만 HepG2 세포에 대한 세포사멸 및 autophagy 유도 활성이 나타나고 다른 형태의 epimer에 서는 그 활성이 없거나 훨씬 적은 것을 볼 수 있었는데 이는 기존의 진세노사이드 epimer가 서로 다른 활성을 보인다는 많은 사례들과 그 맥락을 같이 한다고 할 수 있다.

진세노사이드 epimer의 활성이 다른 이유를 설명 할 수 있는 몇몇 연구 결과들 이 있는데, ginsenoside Rg3의 경우 human fecal microflora에 의해 Rh2 혹은 PPD로 대사되는 속도가 20(S)-epimer가 20(R)-epimer에 비해 약 19배나 빨랐 으며 (Bae *et al.*, 2002), 20(S)-Rh2의 Caco-2 cell에 대한 cellular uptake 속도 는 20(R)-Rh2에 비해 월등히 높다 (Gu *et al.*, 2010). 즉, 진세노사이드 epimer 의 세포막에 대한 permeability가 서로 다르다는 것을 의미한다. 또한 진세노사이 드 모핵의 20번 탄소의 수산기가 12번 탄소의 수산기와 공간적으로 이루는 거리가 20(R)-epimer 보다 20(S)-epimer의 경우에 더 가까운데, 이로 인해 lipid

membrane과 stereoselective하게 상호 작용 할 것이라는 견해가 있다 (Qi et al., 2010). 또 세포 내 대표적인 약물 수송체 (drug transporter)인 P-glycoprotein 은 stereoselectivity에 따라 ligand를 구별할 수 있다고 알려져 있다. 20(S)ginsenoside Rg3, Rh2, PPD 모두 다제내성 (MDR, multi-drug resistant) 암세포 에서 P-glycoprotein을 억제하는 것으로 보고된 바 있으며, 그 중 ginsenoside Rh2가 P-glycoprotein에 stereoselective하게 작용한다는 발표도 있었다 (Zhang *et al.*, 2012). Ginsenoside Rg3의 20(S)-epimer가 20(R)-epimer에 비해 세포 막의 Ca²⁺ 및 K⁺ channel을 통한 이온의 유입을 에 더 강하게 억제하며 이것은 진 세노사이드의 3차원적 화학구조상 chiral center 부근에서 20(S)-epimer가 보다 hydrophobic packing 구조를 이루기 때문일 것이라는 보고 또한 매우 설득력 있게 진세노사이드 생리활성의 stereoselectivity를 뒷받침해준다 (Jeong *et al.*, 2004). 정량적인 비교가 가능했던 HepG2 세포에 대한 세포사멸 효과에서 PPD 계열 진 세노사이드의 경우 20(S)-Rg3에 비해 20(S)-PPD, Rh2 가, 20(R)-Rh1에 비해 PPT가, Rh4에 비해 Rh4 aglycon과 PPT가 보다 적은 농도에서 강한 활성을 보였 다. 이러한 결과는 당의 개수가 적고 지용성이 높은 구조일수록 암세포에 대한 사 멸 효과가 크다고 한 기존의 연구와 일치한다 (Christensen, 2008). 이 또한 B16 cell에 대한 uptake가 Rh2보다 PPD에서 더 빠르게 일어난다는 사실 (Ota et al., 1991) 등에 의해 설명 될 수 있을 것이다.

미토콘드리아 내부는 tubular network를 형성하며 fusion-fission machinery에 의해 그 형태와 세포 내 개수가 계속해서 조절되는 역동적인 소기관이다. 세포질

내 칼슘의 미토콘드리아 내부로의 이동 및 fusion의 감소, fission의 증가에 따른 미토콘드리아의 fragmentation은 apoptosis의 대표적인 현상 중 하나이며 (Lee *et al.*, 2004), 미토콘드리아의 fission은 mitophagy 즉 미토콘드리아의 autophagy에 positive regulator인 것으로 알려져 있다 (Twig *et al.*, 2008). 본 실험에서 진행 한 기전 연구 및 전자현미경 데이터에서, 20(*S*)-ginsenoside Rh2을 처리한 HepG2 세포에서는 미토콘드리아의 fragmentation 및 autophagy가 동시에 유도된 것을 볼 수 있었는데, OPA-1의 down-regulation으로 미토콘드리아 fusionfission 균형이 fission쪽으로 기울고, UCP-2가 up-regulation 되면서 미토콘드리 아 내부에서 정상적으로 ATP를 생성할 수 없게 됨으로 ATP의 양을 유지하기 위 한 보완책으로 ATP 분해를 막는 ATPIF-1이 up-regulation 된 것으로 추측해볼 수 있다. 그리고 이 모든 데이터를 종합해 볼 때, 칼슘이온이 HepG2 세포 내에서 20(*S*)-ginsenoside Rg3, Rh2에 의해 일어나는 mitochondrial damage, apoptosis 및 autophagy 현상의 주요한 cross-talking regulator의 역할을 할 것으로 보인다.

Apoptosis에 의한 암 세포사멸을 유도하는 기존 치료 방법에 내성을 보이는 악 성종양을 치료하기 위해 대체 경로인 autophagy 경로에 의한 암세포 치료방법 연 구는 이제 연구가 시작되는 단계에 있으며 아직까지 autophagic cell death를 통한 항암 치료제는 제시된 바가 없다. 따라서 암세포에서 apoptosis 등 세포사멸 효과 와 동시에 autophagy 유도 활성을 갖는 화합물을 찾아내어 그 사멸 기전의 특이성 및 상관관계를 분석하는 것이 암을 조절하는 데 있어서 양면성의 역할을 하는

(White *et al.*, 2009) autophagy 활성을 이용한 항암 치료제 혹은 보조적 치료제를 개발하거나 처방을 구성하는 데에 있어 그 효율성을 극대화 할 수 있을 것이다.

또한 진세노사이드와 생리활성에 대한 구조-효과 상관관계 (structure-activity relationship) 연구가 cytotoxicity, 항angiogenesis, 항염증, 세포주기 조절, 다제 내성 발현 등 항암작용에 관련해서는 이루어졌으나 아직까지 autophagy에 관련한 연구 결과는 없었다. 이러한 점에 착안하여, 인체의 대부분의 조직과 세포에서 일어 나면서 각종 질병의 단계나 건강 유지에 관련한 인자들에 대해 극단적이지 않으면 서 넓은 스펙트럼의 영향을 미치는 autophagy의 특징과 일맥상통하게 다양한 활성 및 화학적 구조를 갖는 진세노사이드에 대한 구조-효과 상관관계를 밝히는 것이 다양한 기원과 가공과정, 가공형태를 지닌 인삼 관련 제품 및 치료제에 대한 품질 관리의 새로운 지표와 기준을 제공할 수 있을 것으로 보인다.

V. Conclusion

- 1. 6쌍의 epimer를 포함한 총 26 종의 다양한 진세노사이드를 검색한 결과, PPT 계열의 ginsenoside Rh4 와 그 aglycone, Rg6, 20(R)-Rh1, 20(R)-F1 및 PPD 계열의 ginsenoside Rk1, 20(S)-Rg3, 20(S)-Rh2, 20(S)-PPD 등 총 9 종의 진세노사이드가 간암 세포주인 HepG2 세포에서 autophagy를 유도하였다. (이 중 Rk1만이 이미 HepG2 세포에 대해 autophagy 유도 활성을 갖고 있는 것으로 보고된 바 있고 나머지는 HepG2 세포에 대한 autophagy 유도 활성 에 대해 보고된 바가 없다.)
- 2. HepG2 세포에 대해서 ginsenoside Rh4 와 aglycone, 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2, PPD 및 20(R)-Rh1이 세포사멸 효과와 동반하는 autophagy 유도 활성을 나타냈으며, 그 다른 epimer인 20(R)-Rg3, Rh2, PPD 및 20(S)-Rh1 은 진세노사이드에서는 세포사멸 효과와 autophagy 유도 활성 모두 보이지 않았다.
- HepG2 세포에 대해서 세포사멸 활성을 보이는 진세노사이드 중 ginsenoside
 Rh4의 apoptotic cell death 유도 활성은 현재까지 연구된 바가 없다.

- 4. HepG2 세포에 대해 세포사멸 효과와 autophagy 유도 활성을 갖는 진세노사 이드와 autophagy inhibitor를 병용 처리 한 결과, PPD 계열의 20(S)ginsenoside Rg3, Rh2, PPD 처리군은 세포사멸 효과가 더 증가하여 protective autophagy 효과를, PPT 계열의 ginsenoside Rh4 및 20(R)-Rh1 은 세포의 생존률이 늘어남으로 autophagic cell death의 양상을 나타냈다.
- 5. 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2 는 20(R)-epimer와 달리 HepG2 세포에서 PARP cleavage 및 Fas의 발현을 증가시키고, Bcl-2의 발현을 감소시키는 전 형적인 apoptotic 세포사멸의 기전을 나타냈으며, 대조군에 비해 미토콘드리아 의 구조 및 기능을 변형시키고 OPA-1, UCP-2, ATPIF-1 같은 미토콘드리아 조절 단백질의 발현 정도에 변화를 가져왔다.
- 6. 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2에 의한 세포사멸 효과는 autophagy 억제 시 더욱 증가되었으나, 동시에 칼슘 이온 활성을 또한 저해시켰을 때 세포 생존률 이 다시 높아졌는데 이로써 20(S)-Rg3, Rh2에 의한 apoptosis 및 autophagy 의 상호작용은 세포 내 칼슘 이온과 관련이 있음을 알 수 있었다.
- 진세노사이드의 화학 구조적 특징에 따라 HepG2 세포에 대한 세포사멸과 autophagy를 유도하는 활성이 달라지며, 세포사멸 기전 간 미치는 영향 또한 차이가 있었다.

IV. References

Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, DiPaola RS, Lotze MT, White E. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. Clin Cancer Res 2011; 17: 654-666

Apel A, Zentgraf H, Büchler MW, Herr I. Autophagy-A double-edged sword in oncology. Int J Cancer 2009; 125: 991-995

Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. Mol Cell Biol 2005; 25: 1025-1040

Carr BI. Hepatocellular carcinoma: current management and future trends. Gastroenterology 2004; 127: S218-S224

Chao AC, Hsu YL, Liu CK, Kuo PL. α-Mangostin, a dietary xanthone, induces autophagic cell death by activating the AMP-activated protein kinase pathway in glioblastoma cells. J Agric Food Chem 2011; 59: 2086-2096 Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. FEBS Lett 2010; 584: 1427-1435

Chen Z, Lu T, Yue X, Wei N, Jiang Y, Chen M, Ni G, Liu X, Xu G. Neuroprotective effect of ginsenoside Rb1 on glutamate-induced neurotoxicity: with emphasis on autophagy. Neurosci Lett 2010; 482: 264-268

Cho MS, Kwon IG, Kim HS, Kim K, Ryu E. Identification and Validation of Symptom Clusters in Patients with Hepatocellular Carcinoma. J Korean Acad Nurs 2009; 39: 683-692

Christensen LP. Ginsenosides: chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects. Adv Food Nutr Res 2008; 55: 1-99

Cui Q, Tashiro S, Onodera S, Minami M, Ikejima T. Autophagy preceded apoptosis in oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells. Biol Pharm Bull 2007; 30: 859-864
Di Maio M, Daniele B, Perrone F. Targeted therapies: role of sorafenib in HCC patients with compromised liver function. Nat Rev Clin Oncol 2009; 6: 505-506

Dong H, Bai LP, Wong VKW, Zhou H, Wang JR, Liu Y, Jiang ZH, Liu L. The in vitro structure-related anti-cancer activity of ginsenosides and their derivatives. Molecules 2011; 16: 10619-10630

Duan W, Jin X, Li Q, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Silibinin induced autophagic and apoptotic cell death in HT1080 cells through a reactive oxygen species pathway. J Pharmacol Sci 2010; 113: 48-56

Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. Curr Opin Cell Biol 2004; 16: 663-669

Eskelinen EL, Reggiori F, Baba M, Kovács AL, Seglen PO. Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. Autophagy 2011; 7: 935-956

Fimia GM, Piacentini M. Regulation of autophagy in mammals and its interplay

with apoptosis. Cell Mol Life Sci 2010; 67: 1581-1588

Gao H, Sun Y, Yu HT, Zhang CJ. Mechanism of ginsenoside Rh2 inhibit nonsmall cell lung cancer. Adv Mat Res 2013; 749: 167-171

Graier WF, Malli R, Kostner GM. Mitochondrial protein phosphorylation: instigator or target of lipotoxicity? Trends Endocrinol Metab 2009; 20(4): 186-193

Hale A, Ledbetter D, Gawriluk T, Rucker E. Autophagy: Regulation and role in development. Autophagy 2013; 9: 951-971

Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? Cancer Res 2006; 66: 9349-9351

Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski B, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, Bianchi K, Fehrenbacher N, Elling F, Rizzuto R, Mathiasen IS, Jaattela M. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase- β , and Bcl-2. Mol Cell 2007; 25: 193-205 Jeong SM, Lee JH, Kim JH, Lee BH, Yoon IS, Lee JH, Kim DH, Rhim H, Kim Y, Nah SY. Stereospecificity of ginsenoside Rg3 action on ion channels. Mol Cell 2004; 18: 383-389

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics 2008. CA Cancer J Clin 2008; 58: 71-96

Jiang JW, Chen XM, Chen XH, Zheng S. Ginsenoside Rg3 inhibit hepatocellular carcinoma growth via intrinsic apoptotic pathway. World J Gastroenterol 2011; 17: 3605-3613

Jin SH, Park JK, Nam KY, Park SN, Jung NP. Korean red ginseng saponins with low ratios of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponin improve scopolamine-induced learning disability and spatial working memory in mice. J Ethnopharmacol 1999; 66: 123-129

Kang KS, Kim HY, Yamabe N, Yokozawa T. Stereospecificity in hydroxyl radical scavenging activities of four ginsenosides produced by heat processing. Bioorg Med Chem Lett 2006; 16: 5028-5031 Kim AD, Kang KA, Kim HS, Kim DH, Choi YH, Lee SJ, Hyun JW. A ginseng metabolite, compound K, induces autophagy and apoptosis via generation of reactive oxygen species and activation of JNK in human colon cancer cells. Cell Death Dis 2013; 4: e750

Kim JH, Kang SA, Han SM, Shim I. Comparison of the antiobesity effects of the protopanaxadiol-and protopanaxatriol-type saponins of red ginseng. Phytother Res 2009; 23: 78-85

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy 2012; 8: 445-544

Klionsky DJ, Cuervo AM, Dunn Jr WA, Levine B, van der Klei IJ, Seglen PO. How shall I eat thee? Autophagy 2007; 3: 413-416

Ko H, Kim YJ, Park JS, Park JH, Yang HO. Autophagy inhibition enhances apoptosis induced by ginsenoside Rk1 in hepatocellular carcinoma cells. Biosci Biotechnol Biochem 2007; 73: 2183-2189 Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. Nat Rev Cancer 2005; 5: 726-734

Kondo Y, Kondo S. Autophagy and cancer therapy. Autophagy 2006; 2: 85-90

Kroemer G, El-Deiry W, Golstein P, Peter M, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny M, Malorni W, Knight R. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ 2005; 12: 1463-1467

Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. Basic protein and peptide protocols. Springer 1994; 9–15

Kundu M, Thompson CB. Autophagy: basic principles and relevance to disease. Annu Rev Pathol 2008; 3; 427-455

Kung CP, Budina A, Balaburski G, Bergenstock MK, Murphy M. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2011; 21: 71-100 Lee JY, Jung KH, Morgan MJ, Kang YR, Lee HS, Koo GB, Hong SS, Kwon SW, Kim YS. Sensitization of TRAIL-Induced Cell Death by 20 (*S*)-Ginsenoside Rg3 via CHOP-Mediated DR5 Upregulation in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. Mol Cancer Ther 2013; 12: 274-285

Lee M, Sorn S, Baek S, Jang S, Kim S. Antioxidant and apoptotic effects of korean white ginseng extracted with the same ratio of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins in human hepatoma HepG2 cells. Ann N Y Acad Sci 2009; 1171: 217-227

Lee YJ, Jeong SY, Karbowski MC, Smith LR, Youle J. Roles of mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. Mol Biol Cell 2004; 15: 5001-5011

Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. Acta Biochim Biophys Sin 1998; 1366: 177-196 Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Benner DA. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. Antioxid Redox Signal 2002; 4(5): 769-781

Leung KW, Leung FP, Mak NK, Tombran-Tink J, Huang Y, Wong RN. Protopanaxadiol and protopanaxatriol bind to glucocorticoid and oestrogen receptors in endothelial cells. Br J Pharmacol 2009; 156: 626-637

Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev Cell 2004; 6: 463-477

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell 2008; 132: 27-42

Lin MH, Hsieh WF, Chiang WF, Hong WZ, Hsu YR, Cheng YC, Chen TC, Hsu K C, Lina PY, Liu SY. Autophagy induction by the 30–100kDa fraction of areca nut in both normal and malignant cells through reactive oxygen species. Oral Oncol 2010; 46: 822-828 Liu B, Cheng Y, Liu Q, Bao JK, Yang JM. Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. Acta Pharmacol Sin 2010; 31: 1154-1164

Liu J, Hu XJ, Jin B, Qu XJ, Hou KZ, Liu YP. β-Elemene induces apoptosis as well as protective autophagy in human non-small-cell lung cancer A549 cells. J Pharm Pharmacol 2012; 64: 146-153

Liu J, Shimizu K, Yu H, Zhang C, Jin F, Kondo R. Stereospecificity of hydroxyl group at C-20 in antiproliferative action of ginsenoside Rh2 on prostate cancer cells. Fitoterapia 2010; 81: 902-905

Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, Sherman M, Schwartz M, Lotze M, Talwalkar J. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. J Natl Cancer Inst 2008; 100: 698-711

Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. Cell 2005; 120: 237-248

Mai TT, Moon J, Song Y, Viet PQ, Phuc PV, Lee JM, Yi TH, Cho M, Cho SK.

Ginsenoside F2 induces apoptosis accompanied by protective autophagy in breast cancer stem cells. Cancer Lett 2012; 321: 144-153

Maria Cuervo A. Autophagy: in sickness and in health. Trends Cell Biol 2004; 14: 70-77

Martinet W, De Meyer GR, Andries L, Herman AG, Kockx MM. In situ detection of starvation-induced autophagy. J Histochem Cytochem 2006; 54: 85-96

Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. Nat Rev Cancer 2007; 7: 961-967

Miao Q, Bi LL, Li X, Miao S, Zhang J, Zhang S, Yang Q, Xie YH, Zhang J, Wang SW. Anticancer Effects of Bufalin on Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells: Roles of Apoptosis and Autophagy. Int J Mol Sci 2013; 14: 1370-1382

Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36: 2491-2502 Mizushima N. Autophagy: process and function. Genes Dev 2007; 21: 2861-2873

Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. Autophagy 2007; 3: 542-545

Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. Cell 2010; 140: 313-326

Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Criollo A, Maiuri MC, Tavernarakis N, Madeo F, Kroemer G. Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol. Aging (Albany NY) 2009; 1: 961.

Munafó DB, Colombo MI. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. J Cell Sci 2001; 114: 3619-3629

Orrenius S, McCabe MJ, Nicotera P. Ca^{2+} -dependent mechanism of cytotoxicity and programmed cell death. Toxicol Lett 1992; 64/65: 357-364.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calciumapoptosis link. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4: 552-565

Ota T, Maeda M, Odashima S. Mechanism of action of ginsenoside Rh2: uptake and metabolism of ginsenoside Rh2 by cultured B16 melanoma cells. J Pharm Sci 1991; 80: 1141-1146

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J Biol Chem 2007; 282: 24131-24145

Park EJ, Choi KS, Kwon TK. β-Lapachone-induced reactive oxygen species (ROS) generation mediates autophagic cell death in glioma U87 MG cells. Chem Biol Interact 2011; 189: 37-44

Popovich DG, Kitts DD. Structure-function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and inducing apoptosis in the human leukemia (THP-1) cell line. Arch Biochem Biophys 2002; 406: 1-8 Pyo JO, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun JI, Woo HN, Cho DH, Choi BY, Lee H, Kim JH, Mizushima N, Oshumi Y, Jung YK. Essential Roles of Atg5 and FADD in Autophagic Cell Death. J Biol Chem 2005; 280(21): 20722-20729

Qi LW, Wang CZ, Yuan CS. American ginseng: potential structure-function relationship in cancer chemoprevention. Biochem Pharmacol 2010; 80: 947-954

Qian H, Yang Y, Wang X. Curcumin enhanced adriamycin-induced human liver-derived Hepatoma G2 cell death through activation of mitochondriamediated apoptosis and autophagy. Eur J Pharm Sci 2011; 43: 125-131

Rodriguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36: 2463-2472

Ryan KM. p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome. Eur J Cancer 2011; 47: 44-50

Satoh M, Takemura Y, Hamada H, Sekido Y, Kubota S. EGCG induces human

mesothelioma cell death by inducing reactive oxygen species and autophagy. Cancer Cell Int 2013; 13: 19

Seo JY, Lee JH, Kim NW, Her E, Chang SH, Ko NY, Yoo YH, Kim JW, Seo DW, Han JW. Effect of a fermented ginseng extract, BST204, on the expression of cyclooxygenase-2 in murine macrophages. Int Immunopharmacol 2005; 5: 929-936

Shen S, Kepp O, Michaud M, Martins I, Minoux H, Metivier D, Maiuri M, Kroemer R, Kroemer G. Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. Oncogene 2011; 30: 4544-4556

Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. Cell Metab 2011; 13: 495-504

Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. Eur J Pharmacol 2009; 625: 220-233

Son YM, Kwak CW, Lee YJ, Yang DC, Park BC, Lee WK, Han SH, Yun CH. Ginsenoside Re enhances survival of human CD4⁺ T cells through regulation of autophagy. Int Immunopharmacol 2010; 10: 626-631

Sridhar S, Botbol Y, Macian F, Cuervo AM. Autophagy and disease: always two sides to a problem. J Pathol 2012; 226: 255-273

Sun J, Hu S, Song X. Adjuvant effects of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins from ginseng roots on the immune responses to ovalbumin in mice. Vaccine 2007; 25: 1114-1120

Sun M, Huang C, Wang C, Zheng J, Zhang P, Xu Y, Chen H, Shen W. Ginsenoside Rg3 improves cardiac mitochondrial population quality: mimetic exercise training. Biochem Biophys Res Commun 2013; 441: 169-174

Swampillai A, Salomoni P, Short S. The role of autophagy in clinical practice. Clin Oncol 2012; 24: 387-395

Sy LK, Yan SC, Lok CN, Man RY, Che CM. Timosaponin A-III induces autophagy preceding mitochondria-mediated apoptosis in HeLa cancer cells. Cancer Res 2008; 68: 10229-10237 Toh DF, Patel DN, Chan ECY, Teo A, Neo SY, Koh HL. Anti-proliferative effects of raw and steamed extracts of Panax notoginseng and its ginsenoside constituents on human liver cancer cells. Chin Med 2011; 6: 4

Tollefson AE, Hermiston TW, Lichtenstein DL, Colle CF, Tripp RA, Dimitrov T, Toth K, Wells CE, Doherty PC, Wold WSM. Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. Nature 1998; 392(16): 721-729

Tu YJ, Fan X, Yang X, Zhang C, Liang HP. Evodiamine activates autophagy as a cytoprotective response in murine Lewis lung carcinoma cells. Oncol Rep 2013; 29: 481-490

Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view. Biochim Biophys Acta 2008; 1777: 1092-1097

Vazquez CL, Colombo MI. Assays to Assess Autophagy Induction and Fusion of Autophagic Vacuoles with a Degradative Compartment, Using Monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. Methods Enzymol 2009; 452: 85-95 Wang K, Liu R, Li J, Mao J, Lei Y, Wu J, Zeng J, Zhang T, Wu H, Chen L. Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt-mTOR-and hypoxia-induced factor 1α-mediated signaling. Autophagy 2011; 7: 966-978

Wang N, Feng Y, Zhu M, Tsang CM, Man K, Tong Y, Tsao SW. Berberine induces autophagic cell death and mitochondrial apoptosis in liver cancer cells: the cellular mechanism. J Cell Biochem 2010; 111: 1426-1436

White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. Clin Cancer Res 2009; 15: 5308-5316

Yoon SR, Lee GD, Park JH, Lee IS, Kwon JH. Ginsenoside composition and antiproliferative activities of explosively puffed ginseng (*Panax gins*eng CA Meyer). J Food Sci 2010; 75: C378-C382

Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. Nat Cell Biol 2006; 8(10): 1124-1132

Yu SH, Kao YT, Wu JY, Huang SH, Huang ST, Lee CM, Cheng KT, Lin CM. Inhibition of AMPK-Associated Autophagy Enhances Caffeic Acid Phenethyl Ester-Induced Cell Death in C6 Glioma Cells. Planta Med 2011; 77: 907-914

Zhang J, Zhou F, Niu F, Lu M, Wu X, Sun J, Wang G. Stereoselective regulations of P-glycoprotein by ginsenoside Rh2 epimers and the potential mechanisms from the view of pharmacokinetics. PLoS One 2012; 7: e35768

Zhang ZL, Fan Y, Liu ML. Ginsenoside re-enhances the survival of H9C2 cardiac muscle cells through regulation of autophagy. Heart 2012; 98: E54-E54

Zhang ZL, Fan Y, Liu ML. Ginsenoside Rg1 inhibits autophagy in H9c2 cardiomyocytes exposed to hypoxia/reoxygenation. Mol Cell Biochem 2012; 365: 243-250

Abstract

Autophagy is an evolutionarily conserved intracellular degradation system that delivers cytoplasmic constituents to lysosomes *via* double-membrane vesicles termed autophagosomes. It contributes to the turnover of long-lived proteins and organelles to maintain cell homeostasis, and is also up-regulated under cellular stressful conditions such as nutrient deprivation, hypoxia, oxidative damage and anticancer treatment. In tumorigenesis, autophagy suppresses the progression of normal cell to tumor cell by disposal of damaged mitochondria which is threatening to maintain the chromosomal stability. However, autophagy shows dual roles in tumor cells. It can promote survival of cancer cell by protective action to apoptotic death from cancer therapy or can induce cell death when excessively triggered.

Ginseng is the root of *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae), and has been widely used in Asian countries as a tonic medicine. Its major bioactive components, ginsenosides, are saponins with dammarane skeleton showed diverse biological activities. Depending on their aglycone content, ginsenosides are divided into protopanaxadiol (PPD)-type and protopanaxatriol (PPT)-type ginsenoside. And also, it is well known that stereoisomerism at C-20 influences biological activity of each ginsenoside.

In this study, I screened diverse type of ginsenosides from ginseng extract which

showed autophagy-inducing effect accompanied by cytotoxicity and compared the activities depending upon the chemical structure of ginsenosides.

Among PPD-type ginsenosides, 20(S)-Rg3, Rh2 and their metabolite 20(S)-PPD increased HepG2 cell death in a dose-dependent manner, but their 20(R)-epimers showed no cytotoxic effect. PPT-type ginsenoside Rh4 and its aglycone, 20(R)-Rh1 also decreased the cell viability and the 20(S)-epimer of Rh1 had no cytotoxic activity.

Autophay-inducing effect was evaluated using MDC (monodansylcadaverine) which stains acidic autophagic vacuole and western blotting of autophagy marker protein LC3. 20(S)-Rg3, Rh2, PPD and 20(R)-Rh1 increased the number of MDC-stained dot and amount of LC3 II protein, but their other type of epimers showed no effect. PPT-type ginsenoside Rh4 and its aglycon also induced autophagy in HepG2 cell.

In order to further investigate the effect of autophagy onto the cytotoxicity, autophagy inhibitor, chloroquine was co-treated with ginsenosides and then analyzed the alteration of cell death extent by MTT assay and flow cytometry method. Inhibition of autophagy with chloroquine enhanced the cytotoxic effect of PPD-type 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2 and PPD, whereas autophagy inhibition increased cell survival against to apoptotic death of PPT-type 20(R)-Rh1 and Rh4.

In molecular study, 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2 decreased the expression level of Bcl-2 and up-regulated PARP cleavage and Fas accompanied with mitochondrial damage, in that typical apoptotic cell death were occurred by only their 20(S)-epimers. Moreover, blocking intracellular calcium by BAPTA-AM restored the enforced cell death induced by autophagy inhibition, which means that the interaction between the cytotoxicity and autophagy induced by 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2 is related with intracellular Ca²⁺ activity.

Taken together, 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2 and ginsenoside Rh4, 20(R)-Rh1 triggered autophagy and cytotoxicity simultaneously in HepG2 hepatocarcinoma cell. Among them, PPD-type 20(S)-ginsenoside Rg3, Rh2 induced cytotoxicity accompanied by protective autophagy, while PPT-type ginsenoside Rh4 and 20(R)-Rh1 showed apoptotic and autophagic cell death.

Therefore, in the aspects of the usage of ginsenoside as a biologically active agent against HepG2 liver cancer cell, it might be useful to investigate the structure-activity relationship of cytotoxicity and autophagy-inducing ginsenosides.

keywords : autophagy, liver cancer, *Panax ginseng*, ginsenoside, epimer, HepG2 Student ID : 2002-22360