

SK-HEP-1 사람 간세포에서 Protein kinase C 신호전달체계를 통한 인삼사포닌-Rg₁의 DNA 합성 촉진 효과

공희진 · 이광열 · 정은아 · 이유희* · 김신일* · 이승기*

서울대학교 약학대학, *한국인삼연초연구소

(Received September 12, 1995)

Protein kinase C-mediated Stimulatory Effect of Ginsenoside-Rg₁ on the Proliferation of SK-HEP-1

Hee Jin Kong, Kwang Youl Lee, Eunah Chung, You Hui Lee*,
Shin Il Kim* and Seung Ki Lee*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

Abstract—Ginsenoside-Rg₁ (G-Rg₁) has been shown to stimulate DNA synthetic activity in SK-HEP-1 cells. This study was therefore designed to determine in SK-HEP-1 cells whether the stimulatory effect of G-Rg₁ may be mediated by protein kinase C (PKC) which is known to play a key role in the signal transduction pathway leading to the cell proliferation. Using the *in situ* PKC assay method, the PKC enzyme activity was determined in SK-HEP-1 cell cultures in response to G-Rg₁ at 3×10^{-5} M or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) at 10^{-6} M which increased the enzyme activity by 1.5- and 7-fold, respectively. Furthermore, G-Rg₁ was also able to synergistically increase the enzyme activity by 11-fold in the cell cultures in the presence of PMA. These stimulatory effects of G-Rg₁ or PMA on the DNA synthetic activity and the PKC activity were abolished by a specific PKC inhibitor, GF109203X. These results suggest that the stimulatory effect of G-Rg₁ on the DNA synthetic activity may be partly due to stimulation of PKC-mediated signal transduction pathway leading to the proliferation of SK-HEP-1 cells.

Keywords □ ginsenoside-Rg₁, protein kinase C, PMA, GFX.

인삼 사포닌의 전체 분획 및 정제된 인삼 사포닌은 단백질과 핵산, 지방산의 생합성을 촉진한다고 보고된 바 있다.¹⁻³⁾ 인삼사포닌이 DNA 합성 조절에 미치는 영향에 대한 연구에 의하면 흰쥐 일차배양 간세포에서 ginsenoside-Rg₁ 등은 DNA 합성을 약 2배 증가시켰고, 또한 간세포에서 단백질과 RNA의 합성을 촉진시켰다.⁴⁾ 이와 같은 인삼 사포닌의 DNA와 RNA 합성 촉진의 정확한 작용기전은 밝혀져 있지 않다. 인삼 사포닌은 adenylate cyclase의 활성을 촉진하고 cAMP phospho-

diesterase를 억제하여 세포내의 cAMP의 농도를 증가시킨다고 보고되었다.⁵⁻⁹⁾ 또한 인삼 사포닌은 간의 유전자 발현을 촉진하여 간세포의 생리활성에 영향을 미친다는 사실이 관찰되고 있으며, 그 작용기전이 cAMP신호 전달체계나 glucocorticoid receptor를 통한 가능성이 보고되고 있다.¹⁰⁻¹²⁾ Protein kinase C (PKC)는 세포의 성장과 분화를 조절하는 중요한 인자로 신호전달체계에서의 역할, 기능 및 조절기전 등에 대하여 많은 연구가 진행되었다.^{13,14)} PKC 활성 조절 기전은 mitogen과 세포막 수용체의 결합으로 활성화된 phospholipase C (PLC)에 의해 phosphoinositide 가수분해를 촉진하고 그 결과 생성된 diacylglycerol (DAG)이 Ca²⁺에 대한

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7851 (팩스) 02-888-0649

친화력을 증가시켜서 PKC를 활성화시킨다고 밝혀졌다.

Takawa 등¹⁵⁾은 Swiss mouse 3T3에서 diacylglycerol kinase inhibitor인 1-monooleoglycerol을 처리하여 세포내의 1,2-diacylglycerol의 양을 증가시켰을 때 DNA 합성이 증가함을 입증하였고 최근 NIH-3T3 세포의 mitogen 신호전달체계에 있어서 PKC가 필요함이 알려졌다.¹⁶⁾ 이러한 보고들은 PKC 활성 조절이 세포 증식에 중요한 역할을 수행하고 있음을 시사하고 있으나, 이러한 광범위한 연구에도 불구하고 DNA 합성능을 유도하는 PKC 신호전달경로에 대한 분자적 수준의 명확한 작용기전은 아직 밝혀져 있지 않다.

최근 receptor tyrosine kinase의 신호는 ras를 거쳐 raf, MEK(MAP kinase/ERK kinase), MAP kinase 등의, 일련의 protein kinase cascade를 통해 fos/jun, myc 등의 핵내 전사인자를 인산화하여 활성화시킨다고 알려졌다.¹⁷⁾ 특히 이러한 MAP kinase cascade 초기단계에서 중요한 역할을 하는 raf를 PKC가 직접 인산화하여 그 활성이 증가된다고 보고되었다.¹⁸⁾ 이상의 사실들은 PKC가 세포 증식과 관련된 상호신호전달체계에 있어서 매우 중요한 역할을 함을 나타낸다.

본 실험에서는 이와 같은 사실들에 근거하여 인삼사포닌의 DNA 합성 촉진 작용을 규명하기 위한 연구의 일환으로서 인삼사포닌-Rg₁의 DNA 합성 유도 효과에 대하여 PKC 활성촉진 및 저해제의 영향을 분석으로 PKC 신호전달체계를 통한 작용을 검색하고, 인삼사포닌-Rg₁이 직접적 또는 간접적으로 PKC 활성에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험 방법

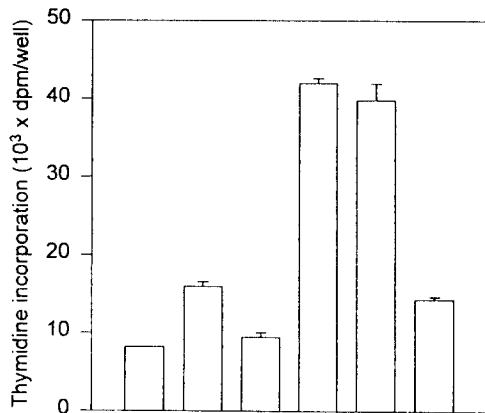
시약 및 재료 - 인삼사포닌은 한국인삼연초연구소에서 받거나 Shibata 방법으로 인삼 분말에서 분리하였다. Waymouth's MB 752/1 배지와 Ac-MBP4-14 protein kinase substrate peptide는 GIBCO BRL에서, PKC-inhibitor(GFX), [γ -³²P]-ATP (6,000 mCi/mmol)는 각각 Boehringer Mannheim, NEN에서, monoclonal anti-protein kinase C (clone MC5), [³H-methyl]-thymidine은 Amersham에서 구입하여 사용하였다. Digitonin, bicinchoninic acid protein assay kit 및 기타 시약은 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

DNA 합성능 측정 - 서울대학교 암연구소에서 분양 받은 SK-HEP-1 세포를 24-well flat bottom plate에 Waymouth's MB배지로 5×10^4 cells/well의 농도로 희석하여 seeding하고 24시간 배양한 후 인삼사포닌-Rg₁ 및 기타시약들(PMA, GFX)과 [³H-methyl]-thymidine을 1 μ Ci/well씩 가하여 18시간 더 배양하였다. 배지를 제거하고 methanol를 10분간 처리하여 세포를 고정하고 PBS로 2회 세척하였다. 10% trichloroacetic acid (TCA)로 2회 씻어주고 0.2N NaOH로 세포를 가수분해하여 DNA로 도입된 [³H-methyl]-thymidine양을 Liquid scintillation counter로 측정하였다. DNA 합성능은 dpm/well로 표시하였다.

In situ PKC activity assay - Heasley와 Johnson¹⁹⁾이 사용한 *in situ* 방법에 따라 다음과 같이 실험하였다. SK-HEP-1 세포를 96 well plate에 2×10^4 cell/well의 농도로 seeding하여 24시간 배양한 후 인삼사포닌-Rg₁과 기타 약물들을 처리하고 정해진 시간 동안 더 배양하였다. 배지를 제거한 후 PKC assay buffer (0.137 M NaCl, 5.4 mM KCl, 0.3 mM Na₂HCO₃, 0.4 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, pH 7.2)에 150 M Ac-MBP4-14 protein kinase substrate peptide(Ac-QKRPSQKSKYL)를 넣어서 각 well에 40 μ l씩 가했다. Ac-MBP4-14는 PKC 특이적인 기질로 myelin basic protein에서 얻은 합성 peptide의 n-terminal glutamine을 아세틸화해서 안정성을 높인 것이다. 37°C에서 15분간 반응시킨 후 냉각된 TCA를 최종 농도 10%가 되도록 가하여 얼음 위에 방치하였다. 1/2 volume을 취하여 P-81 phosphocellulose paper에 옮긴 후 1% 인산으로 15분씩 3회 세척해서 완전히 건조한 후 activity를 측정하였다.

결과 및 고찰

본 실험실에서는 이미 인삼사포닌이 일차배양 간세포에서 DNA 합성능을 증가시킬을 밝힌바 있다.⁴⁾ 본 연구에서는 이에 근거하여 간세포 증식에 관여하는 인삼사포닌의 기전을 밝히기 위하여 세포 성장 조절에 중요한 역할을 한다고 알려진 protein kinase C (PKC)의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 간암세포주인 SK-HEP-1을 모델로 하여 연구를 수행하였다. 인삼사포닌-Rg₁이 SK-HEP-1 간암세포에서 DNA 합성에



G-Rg ₁ (30μM)	-	+	+	+	-	-
PMA (1μM)	-	-	-	+	+	+
GFX (5μM)	-	-	+	-	-	+

Fig. 1 — Effect of ginsenoside-Rg₁ and PMA on DNA synthetic activity.

SK-HEP-1 cells were incubated for 1 h with or without PMA (1 μM) and then the medium was removed. Fresh medium was added with or without ginsenosid-Rg₁ (30 μM), and/or GFX (5 μM) in presence of 1 μCi/ml [³H]-thymidine followed by additional 18 hr incubation. The cells were harvested and analyzed for the incorporated radioactivity into trichloroacetic acid-insoluble material.

미치는 영향을 [³H] thymidine incorporation 방법으로 관찰한 결과, 인삼사포닌-Rg₁-30 μM에서 대조군의 1.9배, PKC 활성화제인 PMA (1 μM)은 4.8배 증가시켰고 인삼사포닌-Rg₁과 PMA 동시처리시에는 PMA 단독처리시와 별다른 차이가 없었다(Fig. 1). 인삼사포닌 Rg₁의 DNA 합성능 촉진 효과가 PKC에 의해 매개될 가능성을 규명하기 위하여 PKC 특이적인 저해제인 bisindolylmaleimide (GFX)를 처리하여 PKC 신호전달경로를 차단하고 DNA 합성능에 미치는 영향을 관찰하였다. PKC 저해제인 GFX 1 μM과 인삼사포닌-Rg₁, GFX 1 μM과 PMA를 동시에 처리하였을 때, 인삼사포닌-Rg₁과 PMA에 의한 DNA 합성 촉진 효과가 각각 대조군 수준 및 1.7배로 억제되었다 (Fig. 1). 이러한 실험결과는 SK-HEP-1 세포에서 인삼사포닌-Rg₁이 직접 또는 간접적으로 PKC 신호전달 경로를 통하여 DNA 합성을 조절할 가능성을 제시하고 있다.

따라서 인삼사포닌 Rg₁이 SK-HEP-1 세포에서 protein kinase C활성에 미치는 영향을 관찰하기 위

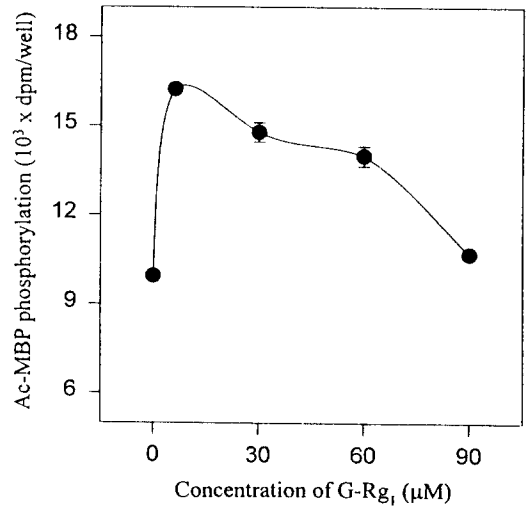


Fig. 2 — Dose dependent effect of ginsenoside-Rg₁ on protein kinase C activity in SK-HEP-1. SK-HEP-1 cells were incubated with the indicated concentrations of ginsenoside-Rg₁. After 18 h of incubation, PKC activity was measured by *in situ* PKC assay method as described in "Method and Materials".

하여 인삼사포닌-Rg₁의 농도를 변화시키며 PKC활성에 미치는 영향을 *in situ* PKC 분석방법을 이용하여 분석하였다. Digitonin으로 세포막의 투과성을 높이고 PKC의 특이적인 기질인 Ac-MBP₄₋₁₄가 세포내 존재하는 PKC활성에 의해 인산화된 정도를 측정하였다.

인삼사포닌-Rg₁은 5 μM에서 최고의 PKC 활성화 촉진 효과(대조군의 1.7배)를 나타내었고 농도가 증가하면서 PKC활성은 대조군 수준으로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 인삼사포닌에 의한 PKC 활성화 촉진 효과에 대한 PKC 활성화제인 PMA 또는 저해제인 GFX의 효과를 측정한 결과, 인삼사포닌-Rg₁은 30 μM에서 PMA는 1 μM에서 18시간 처리하였을 때 PKC 활성화는 각각 대조군의 1.5배, 7배 증가시켰고, 인삼사포닌-Rg₁과 PMA를 동시에 처리시 상승적으로 작용하여 PKC의 활성이 약 11배의 증가 효과를 나타내었다 (Fig. 3). 반면 인삼사포닌-Rg₁을 1시간 처리하였을 때 유의성 있는 PKC 활성화 촉진효과를 나타내지 않았고, PMA병행 투여시에도 아무런 PKC활성 촉진 효과를 나타내지 않았다. 이는 인삼사포닌-Rg₁의 PKC 활성화 증가 효과는 장시간 처리시 PKC의 합성 조절 및 인산화에 관여하여 나타날 가능성을 제시하고

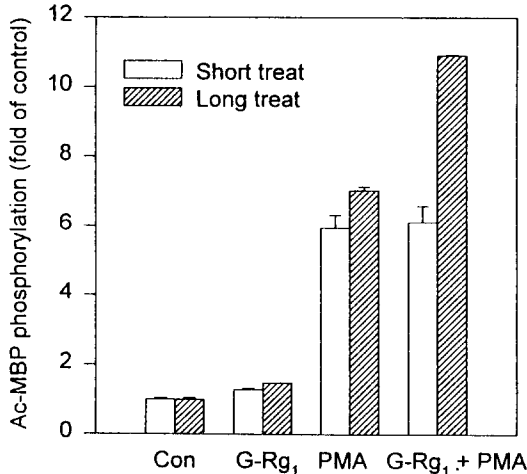


Fig. 3— Synergistic effect of PMA and ginsenoside-Rg₁ on protein kinase C activity in SK-HEP-1 cells. SK-HEP-1 cells were grown in 96 well plates in Waymouth's MB medium containing 2% FCS. The cells were incubated with or without ginsenoside-Rg₁(30 μM) for 1 hr or 18 hr and then treated for 1 hr with or without PMA (1 μM) before determining the enzyme activity of protein kinase C by *in situ* PKC assay method.

있다.

결론

인삼 사포닌 성분인 G-Rg₁에 의한 DNA 합성 촉진 효과가 protein kinase C (PKC) 신호전달체계를 통하여 작용할 가능성을 규명하고자 하였다. SK-HEP-1 세포 배양에서 G-Rg₁은 농도 의존적으로 DNA 합성능을 촉진하였으며 이 촉진 효과는 PKC 특이적인 저해제인 bisindolylmaleimide (GFX)에 의해 대조군 수준 또는 그 이하로 억제되었다. 또한 동일한 세포 배양에서 G-Rg₁에 의한 PKC활성 촉진 효과를 규명하기 위해 *in situ* PKC 활성 분석 방법에 의해 측정된 결과 G-Rg₁은 30 μM 농도에서 PKC활성을 약 1.5배 증가시켰으며 PKC activator인 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)는 1 μM의 농도에서 7배 증가시켰다. 또한 G-Rg₁과 PMA를 함께 처리시 11배 증가의 상승 효과를 나타내었으며, 이 모든 효과는 GFX에 의해 대조군 수준으로 감소되었다. 이와 같은 실험 결과로부터 G-Rg₁에 의한 DNA 합성 촉진 작용기전은 부분적으로 PKC 활성 증가에 기인할 가능성을 제시하고자 한다.

문헌

- 1) Ijima, M. and Higash, T.: Effect of ginseng saponins on RNA metabolism. II. RNA polymerase activities in rats treated with ginsenosides. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 2130 (1979).
- 2) Yokozawa, T., Yasui, T. and Oura, H.: Effects of ginsenoside-Rb₂ on RNA synthesis. *Phytotherapy Research* **7**, 68 (1993).
- 3) Yokozawa, T., Yasui, T. and Oura, H.: Stimulation of RNA polymerase activity by ginsenoside-Rb₂ in diabetic rats. *Phytotherapy Research* **7**, 240 (1993).
- 4) Yoo, K. J., Lee, K. Y. and Lee, S. K.: Inductive effects of ginseng saponins on the rat LDH A-gene and the synthetic rate of hepatocyte DNA in regenerating liver cells. *Korean J. Ginseng Sci.* **14**, 200 (1990).
- 5) Seo, K. L., Koh, M. J., Park, I. W. and Lee, S. Y.: A Study on the influence of ginseng components on cAMP-cGMP regulation mechanism. *Korean J. Ginseng Sci.* **7**, 95 (1983).
- 6) Nikaido, T., Ohmoto, T., Noguchi, H., Kinoshita, T., Saitoh, H. and Sankawa, U.: Inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase in medicinal Plants. *Planta Med.* **43**, 18 (1981).
- 7) Nikaido, T., Ohmoto, T., Snakawa, U., Takaka, O., Kasai, R., Oura, H. and Kawashima, Y.: Inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase in *Panax ginseng* C. A. Meyer and *Panax japonicus* C. A. Meyer. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1477 (1984).
- 8) Sharma, R. K. and Kalra, J.: Ginsenosides are potent and selective inhibitors of some calmodulin-dependent phosphodiesterase isozymes. *Biochemistry* **32**, 4973 (1993).
- 9) Stancheva, S. L. and Alova, L. G.: Ginsenoside-Rg₁ inhibits the brain cAMP phosphodiesterase activity in young and aged rats. *General Pharmacology* **24**, 1459 (1993).
- 10) Dekloet, E. R., Reul JMHM, Saito, H. and Vandenbosch, F. R.: *Endocrinol. Jap.* **34**, 213 (1987).
- 11) Kim, M. Y., Lee, K. Y. and Lee, S. K.: Inductive effect of ginsenoside-Rg₁ on tyrosine aminotransferase gene expression in rat primary hepatocyte cultures. *Biochem. Mol. Biol. Intl.* **34**,

- 845 (1994).
- 12) Kang, S. Y., Lee, K. Y. and Lee, S. K.: Ginsenoside-Rg₁ regulates the induction of tyrosine aminotransferase gene transcription in rat hepatocyte cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1696 (1994).
- 13) Huang, K. P.: Role of protein kinase C in cellular regulation. *Biofactors* **2**, 171 (1990).
- 14) Nishizuka, Y.: Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**, 607 (1992).
- 15) Takuwa, N., Takuwa, Y. and Rasmussen, M.: Stimulation of mitogenesis and glucose transport by 1-monooleoylglycerol in swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **263**, 9738 (1988).
- 16) Berra, E., Diaz-Pleco, M. T., Dominiguez, Z., Municio, M. M., Sanz, L., Chapkin, R. S. and Miscat, J.: Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* **74**, 555 (1993).
- 17) Pelech, S. L., Charest, D. L., Moreret, G. P., Siow, Y. L., Palaty, C., Campbell, D., Charlton, L., Samiei, M. and Sanghera, S.: Networking with mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cell. Biochem.* **127/128**, 157 (1993).
- 18) Sozeri, O., Voller, K., Liyanage, M., Frith, D., Kour, G., Mark GEIII and Stabel, S.: Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* **7**, 2259 (1992).
- 19) Heasley, L. E. and Johnson, G. L.: Regulation of protein kinase C by nerve growth factor, epidermal growth factor, and phorbol esters in PC 12 pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 8646 (1989).