

## 배양 대장암 세포주에서 변이 p21 단백질이 DNA 및 단백질 합성에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 외과학교실

최 훈 · 장 석 균

= Abstract =

### The Effects of Mutant p21 Protein on DNA & Protein Synthesis in the Cultured Colon Cancer Cell Lines

Hoon Choi, M.D. and Suk Kyun Chang, M.D.

*Department of Surgery, College of Medicine  
The Catholic University of Korea, Seoul, Korea*

**Purpose:** The products of the ras oncogene are proteins of 188 or 189 amino acids and 21,000 molecular weights, termed simply p21 proteins. But the exact roles of c-ras proteins in cell proliferation and differentiation as well as in neoplastic transformation are little understood. The purpose of this study is to investigate the function of the p21 protein to the human colon cancer cell lines according to the exposure time and dosage of p21.

**Methods:** The authors divided tumor cell lines into 3 groups as follows; group 1 (control, colon cancer cell lines without administration of p21 or polyclonal antibody), group 2 (administration of p21 with labelling of  $^3\text{H}$ -thymidine and leucine), group 3 (simultaneous administration of p21 protein and polyclonal antibody with labelling of  $^3\text{H}$ -thymidine and  $^3\text{H}$ -leucine). After deciding the most effective dose of p21 protein and culture time with target cells in preliminary studies, the morphologic changes of target cells with administration of p21 protein and the p21 expression and interaction with anti-p21 polyclonal antibody were examined by phase contrast microscopy each other.

**Results:** The results were obtained as follows: 1. The most effective dose of the p21 with the colon cancer cell in increase uptake of  $^3\text{H}$ -thymidine and  $^3\text{H}$ -leucine were 50 ng but there were some differences in culture time of the  $^3\text{H}$ -leucine; 96 hours in SBA-1, 72 hours in HT-29 and 120 hours in SW-1116. 2. The increase uptakes of the  $^3\text{H}$ -thymidine by the different dosage of p21, 50 ng vs 200 ng were 131% (50 ng), 160% (200 ng) in SBA-1, 203% (50 ng), 123% (200 ng) in HT-29, and 127% (50 ng), 189% (200 ng) in SW-1116; and increase uptakes of  $^3\text{H}$ -leucine were 130% (50 ng), 159% (200 ng) in SBA-1, 113% (50 ng), 165% (200 ng), and 164% (50 ng), 169% (200 ng) in SW-1116. 3. There were some

cellular proliferation and morphological changes of the colon cancer cells such as ruffling of the cell membrane, vesicle formation or rounding of the cell after administration of the mutant p21, but such changes were not observed after simultaneous administration of the mutant p21 and anti-p21 polyclonal antibody. **Conclusions:** The role of p21 protein has not been to make manifest wholly. In our study, the p21 protein induce the cell proliferation and morphological changes.

**Key Words:** p21 protein, Anti-p21 polyclonal antibody, DNA & protein synthesis

## 서 론

대장-직장암은 선종이나 용종 등의 양성 종양에서 다단계적 유전자 변이과정에 의하여 발생된다고 알려져 있으며, 점변이, 대립 유전자의 소실, 유전자 증폭 및 암유전자 생성물의 변화 등 유전적 인자가 암발생에 중요한 역할을 한다고 한다.<sup>1,2</sup> 이 중 ras 암유전자의 p21 단백질은 세포의 증식과 분화를 조절하는데, ras 암유전자의 변이에 의한 p21 단백질은 세포막 내면에서 GTP와의 결합을 지속시켜 GTP의 가수분해를 감소시키며 GDP로의 전환을 감소시킴으로서 G 단백질과 연관되어 핵으로 신호를 전달하고, 단백질이나 소분자의 인산화를 증가시켜 세포의 성장 및 형질전환을 자극시켜 암을 유발한다고 알려져 있다.<sup>3-5</sup>

연구자들의 보고에 의하면 p21 단백질을 배양 세포에 첨가하면 DNA 합성, 세포분열, 일시적 세포의 형태학적 변형 등 일련의 세포 성장조절의 변화가 발생한다고 하였다.<sup>6,8</sup> 또한 p21 단백질의 농도가 높을수록 변화가 빨리 나타나고 오래 지속되며 항 p21 단백질 항체는 p21 단백질의 기능을 억제하여 배양세포의 변형을 최소화한다고 하였다.<sup>8</sup>

저자들은 codon 12의 GTT가 GAT로 점변이 된 p21 단백질(pan-ras aspartic acid-12, peptide-1)과 p21 단백질에 대한 다클론 항체의 대장암 배양세포에 대한 DNA 및 단백질 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 본 외과학교실에서 전이된 직장암 세포로부터 수립한 SBA 세포주와 American

Tissue Culture Center에서 구입한 HT-29, SW-1116 대장암 세포주를 사용하여 정상 p21 단백질인 pan-ras glycin-12를 첨가한 제I군(대조군), 변이 p21 단백질인 pan-ras aspartic acid-12를 첨가한 제 2군, 변이 p21 단백질 첨가 후 p21 단백질 다클론 항체를 첨가한 제3군으로 나누어 배양한 후 <sup>3</sup>H-thymidine, <sup>3</sup>H-leucin을 사용하여 DNA 및 단백질 합성을 측정하여 비교 분석하였다.

## 연구재료 및 방법

### 1) 배양세포

본 외과학교실에서 전이된 직장암 조직에서 수립한 SBA 세포주와 American Tissue Culture Center (ATCC)에서 구입한 HT-29, SW-1116 세포주를 일정기간 배양한 후 사용하였다.

### 2) 실험군

실험군은 정상 p21 단백질인 pan-ras glycin-12를 첨가 배양한 군을 제I군(대조군 n=12), 변이 p21 단백질인 pan-ras-aspartic acid-12를 첨가 배양한 군을 제II군(n=12), 변이 p21 단백질 첨가 후 p21 단백질 다클론 항체를 첨가 배양한 군을 제III군(n=12)으로 나누어 DNA와 단백질 합성을 측정하였다. 예비실험으로 3종류의 대장암 세포주에 대한 변이 p21 단백질DNA 및 단백질 합성 정도를 알아보기 위하여 변이 p21 단백질의 농도를 25 ng, 50 ng, 100 ng/100 ul/well (이하 ng으로 표시)으로 나누어 첨가하고 각각 24, 48, 72, 96, 120시간으로 구분하여 배양하여 변이 p21 단백질의 기능이 가장

높은 농도와 시간을 확인하여 실험에 이용하였다.

일정기간 배양하여 항원이나 항체의 첨가없이  $^3\text{H}$ -thymidine과  $^3\text{H}$ -leucine을 표지한 후 liquid scintillation  $\beta$  counter를 이용하여 DNA와 단백질 합성 상태를 측정된 것을 제I군(대조군), p21만을 투여한 것을 제II군, p21과 항 p21 다클론 항체를 동시에 첨가한 것을 제III군으로 나누어 관찰하였다.

### 3) 변이 p21 단백질 및 p21 다클론 항체

배양세포에 첨가하는 정상 p21 단백질은 Pan-ras-glycin 12 (Oncogene Science, USA., peptide-1)를, 변이 p21 단백질은 codon 12의 GGT가 GAT로 접변이된 Pan-ras Aspartic acid-12 (Oncogene Science, USA., peptide-1)를 사용하였으며, 항체는 anti-rabbit polyclonal IgG인 Pan-ras-aspartic acid-12 (Oncogene Science, USA., Ab-1)를 사용하였다.

### 4) DNA 및 단백질 합성의 측정

DNA 및 단백질의 합성 정도를 측정하기 위하여 DNA 합성에는 Methyl  $^3\text{H}$ -Thymidine (Amersham International Plc, England)을, 단백질 합성에는 L-4,5  $^3\text{H}$ -Leucine (Amersham International Plc, England)을 표지하여 비방사능(cpm)을 측정하였다.

배양세포는 trypsin (sigma T-2021, USA)으로 처리하여 분리수거한 다음 hematocytometer (Neubauer)로 세포수를 계산하여  $1 \times 10^5$  cell/ml되게 부유시켜 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cell/100  $\mu\text{l}$ /well이 되게 분주하였다. 동위원소를 well당 2  $\mu\text{Ci}$ /100  $\mu\text{l}$ 의 농도로 배양액에 희석하여 배양세포에 첨가 배양하여 동위원소를 표지시킨 후,  $^3\text{H}$ -thymidine은 18시간 후에,  $^3\text{H}$ -leucine은 4시간 후에 세포들을 생리적 식염수로 세척하고  $4^\circ\text{C}$ , 1,000 rpm에서 10분간 원심 침전시키는 과정을 3회 실시하여 잔여 동위원소를 세척하였다. 세척과정을 마친 세포를 counting vial에 넣고 scintillation solvent (Hydrofluor, National diagnostics, USA)를 첨가한 후 vial당 5분간 liquid scintillation  $\beta$  counter (Beckman LS 5801, USA)로 측정하였다.

### 5) 배양세포들의 위상차 현미경적(phase-contrast microscope) 변화

변이 p21 단백질을 첨가한 경우와 p21 다클론 항체를 같이 첨가한 경우의 배양세포들의 증식 정도와 형태학적인 변화를 위상차(phase contrast) 현미경하에서 관찰하였다.

### 6) 통계처리

배양세포의 p21 단백질 농도와 첨가 배양시간에 따른 변화는 통계 program인 Minitab (Minitab, USA)을 이용한 two sample t-test로 분석하였고, p21 단백질과 p21 다클론 항체의 농도 차이에 따른 변화는 Bonferroni의 t 검정으로 분석하였으며 통계적 유의수준은  $P < 0.05$ 로 하였다.

## 결 과

### 1) 변이 p21 단백질 농도와 배양시간에 따른 DNA 및 단백질 합성의 변화

배양세포에 첨가한 변이 p21 단백질의 농도는 25 ng, 50 ng, 100 ng으로 구분하고 배양시간을 24, 48, 72, 96, 120시간으로 나누어 관찰한 결과 DNA 합성의 경우는 배양한 대장암 세포주 모두에서 변이 p21 단백질 50 ng을 첨가하고 48시간 배양했을때 가장 유의하게 증가하였으며(Table 1), 단백질 합성의 경우는 SBA 세포주는 변이 p21 단백질 50 ng을 첨가하고 96시간 배양시, HT-29는 동일 농도에서 72시간 배양시, SW-1116는 동일 농도에서 120시간 배양시 유의하게 증가하였다(Table 2).

### 2) 변이 p21 단백질의 농도 차이와 p21 다클론 항체첨가에 따른 DNA 및 단백질 합성의 변화

변이 p21 단백질의 농도를 50 ng, 200 ng으로 첨가배양한 후 DNA 및 단백질 합성의 변화와 같은 농도의 p21 다클론 항체를 동시에 첨가하여 효과를 관찰한 바, 대조군의 경우 즉 정상 p21 단

**Table 1.** Uptake data of <sup>3</sup>H-thymidine on each cell lines

Cell lines	Culture time (p21 dosage)				
	24 hrs (50 ng)	48 hrs (25 ng)	48 hrs (50 ng)	72 hrs (50 ng)	72 hrs (100 ng)
SBA-1	453±98	3515±469	5885±1662 <sup>†</sup>	3340±406	4669±680
control	434±120	4051±450	2712±413	2709±183*	3563±580
HT-29	495±52	2787±1556	5250±843*	3927±281	5291±483
control	558±7	1737±39	2947±633	3903±327	4793±597
SW-1116	563±5	5150±928	7466±470 <sup>†</sup>	3779±1715*	6809±638
control	558±3	4399±579	3706±858	1993±146	4431±752

The value represents mean±standard deviation (cpm).

\*P<0.05, <sup>†</sup>P<0.001

SBA-1 = Human colorectal cancer cell line (Dept. of Surgery, College of Medicine The Catholic University of Korea)  
HT-29 and SW-1116 = Human colorectal cancer cell lines (ATCC)

**Table 2.** Uptake data of <sup>3</sup>H-leucine on each cell lines

Cell lines	Culture time (p21 dosage)							
	48 hrs (50 ng)	48 hrs (100 ng)	72 hrs (50 ng)	72 hrs (100 ng)	96 hrs (50 ng)	96 hrs (100 ng)	120 hrs (50 ng)	120 hrs (100 ng)
SBA-1	1300±74	1300±130	3435±102*	3833±121*	5288±519 <sup>†</sup>	4846±528*	5427±618	7606±509
control	1745±407	1276±111	2777±630	2775±300	4133±329	4221±381	5366±618	5921±486
HT-29	1394±442	1777±249	5292±914 <sup>†</sup>	6604±775*	10683±1420	12151±1125	6054±674	10799±447
control	1760±529	1762±142	4380±285	5502±385	10799±440	12745±716	5999±487	10683±1420
SW-1116	209±100	257±100	257±174	292±38	431±176	882±990	1270±42 <sup>†</sup>	1476±111*
control	323±64	264±83	265±183	378±130	550±165	1876±75	455±154	821±160

The value represents mean±standard deviation (cpm).

\*P<0.05, <sup>†</sup>P<0.001

백질을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 사이에는 유의한 차이가 없었다. 그러나 제II군에서는 대조군에 비하여 두 농도 모두에서 유의한 증가를 보였으며, 제III군에서는 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내지 않아 p21 다클론 항체의 효과를 보였다.

또한 제II군에서 변이 p21 단백질의 농도차이에 따른 대조군에 대한 각 세포주간의 차이를 보면 DNA 합성의 증가 비율은 50 ng시 SBA 131%, HT-29 123%, SW-1116 127%였으며 200 ng시 SBA 160%, HT-29 203%, SW-1116 189%의 증가를 보

였으나 통계학적 유의성은 없었으며, 단백질 합성 또한 50 ng시 SBA 130%, HT-29 136%, SW-1116 164%, 200 ng시 SBA 159%, HT-29 165%, SW-1116 169%의 증가율을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다(Table 3, 4).

### 3) 위상차 현미경적 변화

정상 p21 단백질을 첨가한 대조군에서는 아무 것도 첨가하지 않은 배양 세포와 비교하여 형태학적 변화가 없었으며(Fig. 1, 2), 제II군에서는 대조군에 비하여 세포막의 주름, 세포부종, 세포질

Table 3. Uptake data of <sup>3</sup>H-thymidine on each cell lines after 48 hrs cultures

Group	Cell lines	SBA-1		HT-29		SW-1116	
	Dosage	50 ng	200 ng	50 ng	200 ng	50 ng	200 ng
#		3599 ± 811	6829 ± 1600	3601 ± 756	46596 ± 5614	1602 ± 376	6734 ± 2629
I		3769 ± 603	6901 ± 727	3307 ± 454	48727 ± 4820	1884 ± 212	6922 ± 884
II		4935 ± 1043*	11054 ± 3480*	6705 ± 1218*	59874 ± 6299*	2395 ± 334*	13113 ± 6787*
III		2149 ± 597	7185 ± 477	3719 ± 615	50108 ± 5255	1540 ± 259	4968 ± 1763

The value represents mean ± standard deviation (cpm).

\*P < 0.05

# = uptake datas in basic culture status; Group I = control group (normal p21 protein treated group); Group II = mutant p21 protein treated group; Group III = simultaneous mutant p21 protein and anti-p21 polyclonal antibody treated group.

Table 4. Uptake data of <sup>3</sup>H-leucine on each cell lines

Group	Cell lines (culture time)	SBA-1 (96 hrs)		HT-29 (72 hrs)		SW-1116 (120 hrs)	
	dosage	50 ng	200 ng	50 ng	200 ng	50 ng	500 ng
#		210 ± 711	4206 ± 1578	2598 ± 400	4117 ± 1473	1499 ± 246	764 ± 89
I		2132 ± 621	4465 ± 1327	2214 ± 303	4180 ± 842	1510 ± 192	721 ± 74
II		2778 ± 571*	7082 ± 1855*	3007 ± 549*	6917 ± 979*	2479 ± 370*	1202 ± 199*
III		2342 ± 298	3783 ± 1650	2896 ± 514	5128 ± 1006	1502 ± 171	831 ± 18

The value represents mean ± standard deviation (cpm).

\*P < 0.05

내 수포 형성 및 세포 증식이 관찰되었다(Fig. 3). 제3군에서는 약간의 세포 부종 및 증식을 볼 수 있었다(Fig. 4).

## 고 안

사람의 ras 암유전자는 1번 염색체에 위치하는 N-ras, 11번 염색체의 c-H-ras, 12번 염색체의 c-K-ras 등이 있으며 188 혹은 189개의 아미노산으로 구성된 21,000 분자량의 단백질로 암호화(encode)되어 있으며 주로 codon 12, 13, 61의 점변이에 의하여 활성화 된다고 한다.<sup>9,10</sup> Ras 유전자는 사람에게 발생 가능한 모든 종류의 약 15%에서 나타나며<sup>11,12</sup> 그 빈도는 종류에 따라 차이가 있어 대장-직장암에서 40~60%로 가장 많이 나타나고 그

외 방광암, 폐암, 백혈병, 유방암 위암에서도 나타난다고 한다.<sup>13</sup>

c-ras 유전자의 활성화는 시험관 내에서는 형질 전환, 생체에서는 종양형성을 의미하지만 이 유전자의 악성 형질전환에서의 역할은 아직 확실히 규명되지 못하고 있다. 그러나 현재까지 밝혀진 p21 단백질의 주요기능은 세포외 환경에서 핵으로 어떤 신호를 전달하는 G 단백질의 조절과 관련이 있다고 알려져 있으며,<sup>16</sup> 세포막 내면에서 guanine nucleotide (GTP 또는 GDP)와 결합하는데 세포내에는 GTP가 GDP보다 약 10배 가량 많기 때문에 주로 GTP와 결합한 후 내인성 GTPase activity에 의해 GTP를 GDP로 전환시켜 세포 성장을 조절한다고 한다. 그러나 대부분의 변이 p21 단백질은 이 GTPase activity가 감소되어 GTP와

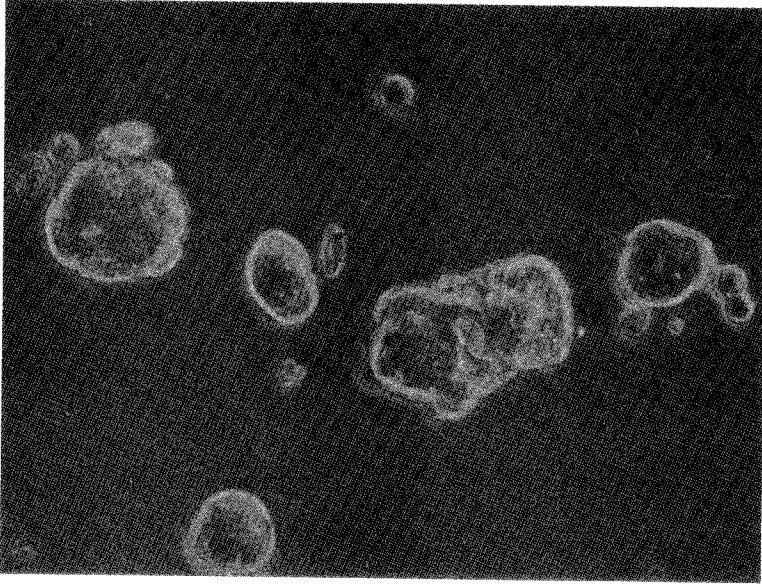


Fig. 1. Phase contrast microscopic findings of basic culture status ( $\times 400$ ).

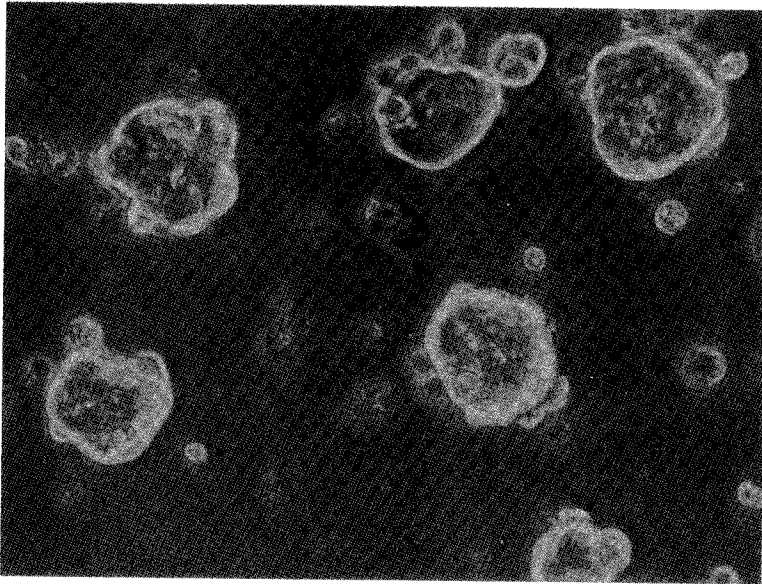
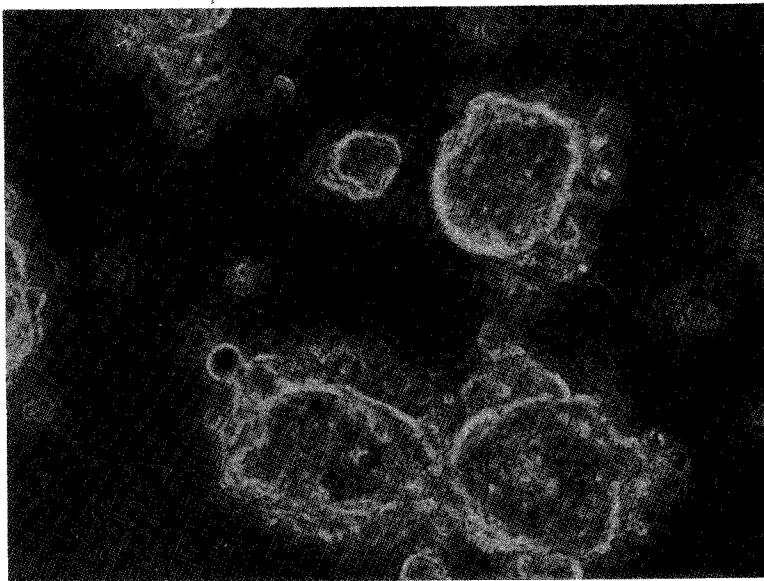


Fig. 2. Phase contrast microscopic findings of group I ( $\times 400$ ). Group I : control group (normal p21 protein treated group)



**Fig. 3.** Phase contrast microscopic findings of group II ( $\times 400$ ). The photograph of administration of mutant p21 (200 ng) showing ruffling of cell membrane and swelling of cell (arrow). Group II: mutant p21 treated group



**Fig. 4.** Phase contrast microscopic findings of group III ( $\times 400$ ). The photograph of simultaneous administration of mutant p21 and anti-p21 polyclonal antibody (200 ng) showing minimal cell swelling compared to control group. Group III: mutant p21 and anti-p21 polyclonal antibody treated group

결합한 상태인 변이 p21 단백질이 비정상적으로 높아지기 때문에 형질전환 등의 효과가 나타난다고 하였다.<sup>13</sup>

정상적인 c-ras protooncogene을 활성화시키는 데는 codon 12, 13, 61의 점변이가 필수적이며 특히 codon 12와 61이 변이 발생에 관여한다. 실제적으로 이 위치에 glycine과 proline을 제외한 어떤 다른 종류의 아미노산이 결합해도 ras 유전자를 활성화시킬 수 있으며 시험관 내에서도 활성화를 유도할 수 있다고 하였다.<sup>14,15</sup> 저자들은 본 실험에서 codon 12의 GGT가 GAT로 점변이된 Pan-ras-aspartic acid-12 (peptide-1)를 변이 p21 단백질로 사용하였고 항체로는 anti-rabbit polyclonal IgG인 Pan-ras-aspartic acid-12 (Ab-1) 다클론 항체를 사용하였다.

정상 p21 단백질에는 cytoplasmic GTPase activating protein (GAP)이 있어 GTPase activity가 증가되어 있지만 세포증식에 대한 효과는 극히 미약한 상태이다. 하지만 변이 p21 단백질은 GTP binding activity, 즉 내인성 GTPase activity가 감소되어 GTP를 효과적으로 가수분해하는 능력이 저하되기 때문에, 결국에는 조절할 수 없는 세포증식과 분열 및 형질전환을 자극하여 암이 발생된다고 하였다.<sup>6,16</sup>

Feramisco등(1984)<sup>8</sup>은 GTP에 결합된 p21 단백질은 활성화되며, 변이의 정도는 p21 단백질의 세포 내 농도가 증가할수록 높다고 하였고, 변이 p21 단백질을 설치류의 섬유모 세포에 투여하면 일시적인 세포의 형태학적인 변화와 DNA 합성 유도 및 세포분열 등 일련의 세포성장 조절의 변화가 발생되지만, 정상 p21 단백질을 투여하면 거의 변화가 없다고 하였다.

저자들의 경우 배양 대장암 세포에 정상 p21 단백질인 Pan-ras glycine-12 (peptide-1)을 첨가한 대조군의 경우 배양세포의 DNA 및 단백질 합성을 보면 peptide-1을 첨가하지 않은 경우와 유의한 차이가 없었다. 그러나 변이 p21 단백질을 50 ng의 농도로 첨가하여 48시간 혼합배양한 경우 3가지 대장암 세포주 모두에서 DNA 합성이 대조군에

비하여 유의성있게 증가하였으며 단백질 합성도 역시 변이 p21 단백질의 농도가 50 ng일 때 증가되었으나 배양시간은 각 세포주에 따라 차이를 보여 SBA-1은 96시간, HT-29는 72시간, SW-1116은 120시간 혼합배양시 그 합성이 유의하게 증가되었다. 한편 배양시간에서 변이 p21 단백질의 농도를 50 ng과 200 ng으로 차이를 두어 배양하였을 때에도 각 대조군에 비하여 DNA와 단백질 합성이 유의하게 증가되었고, 변이 p21 단백질의 농도 간 차이에 따른 DNA 및 단백질 합성은 다소 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성이 없어 반드시 농도와 비례하여 증가하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

Trahey등<sup>17</sup>의 보고에 의하면 휴지기 세포에 정상 p21 단백질과 변이 p21 단백질을 투여한 후 형태학적 변화를 관찰한 바 정상 p21 단백질의 경우는 별다른 변화가 없었으나, 변이 p21 단백질의 경우에는 p21 단백질이 세포막 내면의 지질에 강하게 결합하여 세포막이 주름지어지고 또한 세포 흡입작용으로 인해 세포의 단층이 파괴되어 탄력 있는 방추형 세포의 모양이 변하는 등의 완벽한 형태학적 변형이 있었고 p21 단백질은 주름진 세포막에 국한되어 있다고 하였다. 또한 Feramisco 등<sup>4</sup>은 변이 p21 단백질을 휴지기의 NIH 3T3와 NRK 세포에 투여한 결과 투여 6~8시간 후부터 세포의 급속한 성장과 세포막의 형질전환 즉 주름화, 수포화 및 구형화 등을 관찰하였으며 이러한 현상은 항 p21 단백질 항체의 투여로 GTP가 p21 단백질의 아미노산과 결합하는 것을 차단하여 억제할 수 있어 세포가 일시적으로 정상 모양으로 전환될 수 있다고 하였다.

저자들의 경우 p21 단백질의 농도를 50 ng으로 하여 첨가 배양시키면, 각 세포주에 따라 정도의 차이는 있으나 SBA 세포에서는 세포막이 주름지어지는 변화와 세포부종을, HT-29 세포에서는 현저한 세포 증식을, SW-1116 세포에서는 세포질내의 수포형성과 세포부종 등의 형태학적인 변화를 관찰할 수 있었다. 그러나 항 p21 다클론 항체를 변이 p21 단백질과 동시에 첨가하면 이러한 현상



들을 거의 관찰할 수 없거나 소수에서만 관찰이 가능하였다. Hattori 등은 항 p21 단백질 항체를 이용하면 p21 단백질의 기능 즉 GDP/GTP와의 결합, GTPase activity, 자가인산화, 형질전환 능력 등의 증명은 가능하지만, 어떻게 p21 단백질이 그들의 정상 기능을 수행하고 또한 악성변화를 일으키는지 그 자세한 대사과정은 아직도 밝혀지지 않고 있다.<sup>18</sup>

저자들은 변이 p21 단백질을 배양 대장암 세포에 첨가하여 혼합 배양하면 변이 p21 단백질의 농도와 배양시간 및 대장암 세포주의 종류에 따라 다소간의 차이는 있으나, 배양세포의 DNA와 단백질의 합성을 비정상적으로 증가시킬 뿐 아니라, 배양세포의 일시적인 형태학적인 변형까지 유도하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 GTP/GDP와의 결합 및 GTPase activity 이외의 여러 가지 p21 단백질의 기능들에 대하여는 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

저자들은 ras 암유전자의 변이 p21 단백질이 배양 대장암 세포의 DNA와 단백질 합성에 미치는 영향과 항 p21 단백질 다클론 항체를 변이 p21 단백질과 동시에 첨가하였을 때 변이 p21 단백질에 대한 항 p21 단백질 다클론 항체의 효과를 알아보고자, SBA, HT-29, SW-1116의 세 가지 세포주에 정상 p21 단백질을 첨가하여 배양한 것을 대조군(제I군)으로 하고, 변이 p21 단백질만을 첨가한 것을 제II군, 변이 p21 단백질과 항 p21 단백질 다클론 항체를 동시에 첨가한 것을 제III군으로 하여, 각 실험군에서 DNA와 단백질 합성 정도를 측정하기 위하여 <sup>3</sup>H-thymidine과 <sup>3</sup>H-leucine을 표지하여 측정 비교하였으며, 세 가지 대장암 세포주의 형태학적인 변화를 위상차 현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) SBA, HT-29, SW-1116의 세 가지 대장암 세포주에서 <sup>3</sup>H-thymidine과 <sup>3</sup>H-leucine이 가장 유의성 있게 증가되는 변이 p21 단백질의 농도는 50 ng

이었으며, 배양시간은 DNA 합성의 경우는 48시간이었으며, 단백질 합성의 경우는 SBA 세포주는 96시간, HT-29 세포주는 72시간, SW-1116 세포주는 120시간이었다.

2) 변이 p21 단백질의 농도를 50 ng과 200 ng으로 첨가 배양하였을 때 제II군의 경우 대조군에 비하여 두 농도에서 모두 유의하게 증가하였으나, 제III군의 경우 대조군에 비하여 유의하게 증가된 경우가 없으므로 변이 p21 단백질은 항 p21 단백질 다클론 항체에 의하여 그 기능이 차단되는 것을 알 수 있었다.

3) 형태학적 변화는 변이 p21 단백질을 첨가하지 않은 경우와 대조군 간에는 차이가 없었으나 변이 p21 단백질을 첨가한 경우 각 세포주에 따라 정도의 차이가 있어 SBA 세포에서는 세포막이 주름지어 지는 변화와 세포부종을, HT-29 세포에서는 현저한 세포 증식을, SW-1116 세포에서는 세포질내의 수포형성과 세포부종 등의 형태학적인 변화를 관찰할 수 있었다. 그러나 항 p21 다클론 항체를 변이 p21 단백질과 동시에 첨가하였을 때 SBA와 SW-1116 세포에서는 대조군에 비하여 세포증식은 없으면서 세포부종만 있었고, HT-29 세포에서는 형태학적 변화없이 세포증식만 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 ras 암유전자 생성물인 변이 p21 단백질을 배양 대장암 세포에 첨가하면 50 ng 농도에서 DNA 합성과 그에 따른 단백질의 합성이 촉진되어 세포의 증식 및 형태변화가 초래되고, 농도가 높을수록 그 효과가 증가되는 경향을 보였으며, 항 p21 단백질 다클론 항체를 동시에 첨가한 경우에는 변이 p21 단백질의 기능이 차단되어 그 효과가 감소되거나 나타나지 않았다.

## REFERENCES

1. Bishop JM. The molecular genetics of tumor. Science 1987;235:305-11.
2. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alteration during colorectal tumor development. New Engl J

- Med 1988;319:525-32.
- de Vos AM, Tong L, Milburn MV, Matias PM, Jan-carik J, Noguchi SN, et al. Three-dimensional structure of an oncogene protein, Catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science* 1988;239:888-93.
  - Feramisco JR, Clark R, Wong G, Arnheim N, Milley R, McCormick F. Transient reversion of ras oncogene-induced cell transformation by antibodies specific for amino acid 12 of ras protein. *Nature* 1985; 314:639-42.
  - Gibbs JB, EllisR W, Scolnick EM. Autophosphorylation of v-Ha-ras p21 is modulated by aminoacid residue 12. *Proc Natl Acad Sci* 1984;81:2674-8.
  - Sweet RW, Yokoyama S, Kamata T, Feramisco JR, Rosenberg M, Gross M: The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* 1984;311:273-5.
  - Lumpkin CK, Knepper JE, Butel JS, Smith JR, Pereira-Smith OM. Mitogenic effects of the protooncogene and oncogene forms of c-H-ras DNA in human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1986;6: 2990-5.
  - Feramisco JR, Gross M, Kamata T, Rosenberg M, Sweet RW. Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell* 1984;38:109-17.
  - Capon DJ, Seeburg PH, McGrath JP, Hayflick JS, Edman U, Levinson AD, Goeddel DV. Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature* 1983;304:507-13.
  - Taparowsky E, Shimizu K, Golldfarb M, Wigler M. Structure and activation of the human N-ras gene. *Cell* 1983;34:581-6.
  - Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras gene of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci* 1982;79:3637-40.
  - Sistonen L, Alitalo K. Activation of c-ras oncogenes by mutations and amplification. *Ann Clin Res* 1986;18: 297-303.
  - Bos JL. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutation Research* 1988;195:255-71.
  - Chipperfield RG, Jones SS, Lo KM, Weinberg RA. Activation of Ha-ras p21 by substitution, deletion, and insertion mutations. *Mol Cell Biol* 1985;5:1809-13.
  - Sekiya T, Prassolov VS, Fushimi M, Nishimura S. Transforming activity of the c-Ha-ras oncogene having two point mutations in codon 12 and 61. *Cancer Res* 1985;76:851-5.
  - McGrath J, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD. Comparative biochemical properties of normal and 21 activated human ras p21 protein. *Nature* 1984;310: 644-9.
  - Trahey M, Milley RJ, Cole GE, Innis M, Paterson H, Marshall CJ, et al. Biochemical and biologic properties of the human N-ras p21 protein. *Mol Cell Biol* 1987;7:541-4.
  - Hattori S, Ulsh LS, Hallyday K, Shih TY. Biochemical properties of a highly purified v-ras<sup>H</sup> p21 protein overproduced in *Escherichia coli* and inhibition of its activities by a monoclonal antibody. *Mol Cell Biol* 1985;5:1449-55.