

Ginsenoside Rb1에 의한 발암유전자 *ras*의 활성화 억제

부산대학교 나노과학기술학부 나노기술학과

이 선 주 · 전 병 학

Inhibitory Effect of Ginsenoside Rb1 on Activities of Oncogenic *ras*

Sun-Ju Yi and Byung H. Jhun

Department of Nanotechnology, School of Nano Science and Technology,
Pusan National University, Busan 609-735, Korea

The *ras* genes, which have three isoforms, H-*ras*, K-*ras* and N-*ras*, were mutated up to 30% of human tumors. It is well known that components of ginseng have anticancer actions, but it is not reported that components of ginseng have any effect on *ras*-mediated cancer. In this study, we have examined the inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and Rg1 on oncogenic *ras*-mediated oncogenicity. Oncogenic H-*ras*V12, K-*ras*V12 and N-*ras*N12 were prepared as GST fusion proteins and microinjected into quiescent Rat 1 fibroblasts. The injected oncogenic *ras* proteins induced DNA synthesis and c-Jun protein expression. Pretreatment of Rb1 suppressed H-*ras*V12- and N-*ras*N12-induced DNA synthesis, but not c-Jun expression. In contrast, Rg1 had no effect. SRE promoter was activated by transient transfection of oncogenic H-, K- and N-*ras*. Pretreatment of Rb1 suppressed oncogenic N-*ras*N12-induced SRE activation but not oncogenic H-*ras*V12 and K-*ras*V12. Next, the effect of Rb1 and Rg1 on the proliferation of oncogenic H-, K- and N-*ras*-transformed Rat 2 fibroblasts was examined. The proliferation of the *ras*-transformed cells was not affected by Rb1 and Rg1. The post-translational modification of *ras* is necessary for the activation. The pretreatment of Rb1 and Rg1 on oncogenic *ras*-transformed cells did not inhibit the modification of *ras*. From these results, we found that Rb1 has an inhibitory effect on oncogenic *ras* mitogenic signaling. Particularly isoform specific pattern was observed.

Key Words: Ginsenoside, Oncogenic *ras*, Microinjection, DNA synthesis, c-Jun

서 론

발암유전자 *ras*는 분자량이 21 kDa인 단백질로써 3종류의 isoform 즉 *H-ras*, *K-ras*, *N-ras*가 있으며, 사람에서 *ras* 유전자의 변이가 암의 30% 이상 발견되고 isoform 별로 발생하는 암 종류나 빈도가 상이한데 *H-ras*의 변이는 주로 갑상샘암, 방광암이나 신장암에서 발견되며 *K-ras*의 변이는 췌장암, 폐암, 대장암에서 발견되고 *N-ras*의 변이는 골수암이나 림프암 등에서 주로 발견된다.¹⁾

세포내에서 *ras*는 세포 증식, 분화 등과 같은 다양한 기능을 수행하는데, 배양한 섬유모세포(fibroblast)에 활성화된 *ras*를 세포 내로 미세주입하였을 때 DNA 합성과 형태학적인 형질전환(morphological transformation)을 유도하였다.^{2,3)} 반면에 *ras*-neutralizing monoclonal antibody를 미세주입하면 혈청과 성장 인자에 의해 유도되는 DNA 합성을 억제하였고 세포막에 존재하는 tyrosine kinase에 의한 형질전환이 억제되었다.^{4,5)} PC12 세포주에서는 활성화된 *ras*는 성장을 정지시키고 분화를 유도하는 것을 관찰하였다.⁶⁾ 또한 발암유전자 *ras*는 대부분의 immortalized rodent cell line에서는 형질전환을 유도하지만 primary cell에서는 tumor suppressor인 p53과 p16INK4a을 활성화시켜 세포주기를 정지시킨다.⁷⁾

*ras*는 또한 유전자 발현을 유도한다고 알려져 있는데 발암유전자 *ras*의 발현에 의하여 *c-jun*과 *c-fos*의 발현이 증가된다.⁸⁾ *H-ras*나 *K-ras*을 과잉 발현시켜 형질전환시킨 섬유모세포에서 *c-jun*, *junB*, *Fra1*와 *Fra2*의 발현을 증가시킨다.⁹⁾ *ras*의 활성화는 MEKK, SEK, JNK를 거쳐 이미 존재하고 있던 *c-jun*의 인산화를 유도하여 AP-1 활성을 증가시켜 더 많은 *c-jun* 유전자의 전사를 유도한다는 것이 알려져 있다.¹⁰⁾ 이처럼 활성화된 *c-jun*은 cyclin D1의 promoter에 작용하여 세포를 S phase로 진행시킨다.

*ras*의 활성화에는 번역후 변형(post-translational modification)에 의한 세포막의 안으로의 삽입이 중요하다.¹¹⁾ 모든 *ras* isoform은 C-말단 부분에 CAAX motif를 가지는데 여기에 세 종류의 변형이 연속적으로 일어나게 된다. Cysteine 잔기에

prenylation이 일어나고, 아미노산 AAX의 proteolytic cleavage에 이어 prenylated cysteine의 methyl기 도입이 순차적으로 일어난다. 이때 첫 번째의 prenylation이 발생하여야만 다음 단계가 일어날 수 있다. 이 prenylation과정을 억제하여 항암제로 개발하는 중이며 실제 SCH66336과 같은 약물은 현재 임상 2상 시험 중에 있다.¹²⁾

인삼이 항암작용을 지닌다는 것은 잘 알려져 있다.¹³⁾ 지용성 성분(polyacetylene계)이 여러 암세포주에서 세포증식 억제효과가 있으며, Ginsenoside Rh2와 Rh3가 HL60 세포의 증식을 억제하며 또한 암세포의 분화를 유도한다는 것이 보고되었다.¹⁴⁾ 이러한 분화 유도능은 nuclear receptor인 glucocorticoid receptor와 상호작용하여 일어난다.¹⁵⁾ Rb2와 Rg3가 흑색종(melanoma)과 대장암의 전이를 억제한다고 보고가 있다.¹⁶⁾ 그러나 ginsenoside인 Rb1과 Rg1의 항암활성 등에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 Rb1과 Rg1이 *ras*에 의한 mitogenic 활성화에 대한 영향을 조사하여 이들이 *ras*에 의한 DNA 합성유도를 억제 유무를 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1) 세포배양

Rat2, Rat2-H-*ras*V12, Rat2-K-*ras*V12 및 Rat2-N-*ras*N12는 Dr. J. Pai (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ, USA)에 의해 제공받아 사용하였고, DMEM (10% FBS, 4 mM L-glutamine, 10 μ g/ml gentamicin, 1 mM non-essential amino acid, 200 μ g/ml geneticin 포함)에서 배양하였다. Rat1 세포주는 DMEM/F12 (10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 μ g/ml gentamicin, 0.5 μ M methotrexate 포함)에서 배양하였다.¹⁷⁾ 발암유전자 *ras*에 의한 영향을 살펴보기 위해 미세주입하기 전에 serum free DMEM (FBS 포함되지 않음, 4 mM L-glutamine와 100 unit/ml penicillin-100 μ g/ml streptomycin 포함)에 배양시킴으로써 세포 주기를 정지시켰다. Cos7 세포주는 DMEM (10% FBS, 4 mM L-glutamine, 10 μ g/ml gentamicin, 1 mM non-essential amino acid)에서 배양하였다.

2) 세포 미세주입(single cell microinjection)

세포 미세주입을 이용하여 *ras*의 기능에 대한 인삼성분의 영향을 검사하기 위해 GST-fusion *ras* 단백질을 분리 정제하였다. GST-fusion 단백질을 제조하기 위해 *K-rasV12* cDNA는 Dr. Cooper (Harvard Medical School, Boston)에서, *H-rasV12* cDNA는 Dr. Feramisco (UC, San Diego)에서, *N-rasN12* cDNA는 Dr. Kirchmeir (Schering-Plough Research Institute, New Jersey)에서 확보하였다. *H-rasV12*, *K-rasV12*, *N-rasN12* 등의 cDNA를 PCR 방법에 의해 pGEX vector에 삽입하고 BL21 (DE3)에 transformation시켰다. 이어 isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG)로 37°C에서 4시간 동안 배양하여 단백질 발현을 유도하고, glutathione-sepharose bead로 분리하고 injection buffer (20 mM Tris-acetate, pH7.4, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol)로 치환 농축하였다. 모든 단백질 분리과정은 4°C에서 하루에 이루어졌다. 이전에 보고된 방법을 약간 수정하여 세포 내 미세주입을 실시하였다.¹⁷⁾ 요약하면, Rat1 세포를 coverslip에서 24시간 배양한 후 serum-free DMEM에서 24시간 배양하여 세포주기를 정지시켰다. Glass capillary needle로 분리된 GST-fusion 발암원성 *ras* isoform들을 세포질에 미세주입하였다. 미세주입된 세포들을 구별하기 위해서 rabbit IgG (5 mg/ml)를 단백질과 같이 주입하였다. 모든 미세주입은 적어도 200~250개의 세포를 미세주입한 실험을 세 번 이상 실시하여 결과를 얻었다. Rb1, Rg1 및 FTI인 SCH66336이 DNA 합성이나 c-Jun 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위해서는 정해진 농도로 처리하고 1시간 후에 미세주입을 실시하였다.

3) 미세주입 후 면역 염색

DNA 합성에 대한 영향을 관찰하기 위해 미세주입을 한 후 세포들을 2시간을 안정화시키고 BrdU를 배지에 가하여 16시간 배양하였다. 그 후에 세포들을 3.7% formaldehyde로 10분 동안 고정시키고 0.3% Triton X-100을 포함하는 PBS로 10분 동안 실온에서 permeabilization하였다. 고정된 세포를 먼저 rat anti-BrdU antibody와 1시간 동

안 37°C에서 배양하고 TRITC-conjugated anti-rat antibody, FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody를 순서대로 1시간씩 배양하였다.

c-jun 발현에 대한 영향은 발암유전자 *ras*를 미세 주입하고 5시간 후에 세포를 DNA합성에서와 마찬가지로 3.7% formaldehyde로 고정시키고 0.3% Triton X-100을 포함하는 PBS로 permeabilization시켰다. 그 후에 anti-c-jun antibody와 1시간 동안 37°C에서 반응시켰고 TRITC-conjugated anti-mouse antibody, FITC-conjugated anti-rabbit antibody와 1시간씩 배양하였다.

4) Serum response element (SRE) promoter assay

12-well plate에 Cos7 세포(0.8×10^5)를 넣고 24시간 배양하였다. SRE-Luc reporter vector 100 ng과 pCGN에 삽입된 *ras* 유전자를 200 ng씩 넣고 SuperFect 7.5μl와 DMEM과 섞어 82.5μl가 되게 하여 실온에서 10분간 방치하였다. 그 후에 성장용 배지 500μl을 넣어 총 582.5μl를 세포에 가하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 3시간 배양하고 starvation용 DMEM으로 갈아주었다. Rb1, Rg1 및 SCH66336에 의한 영향을 살펴보기 위해서는 DMSO 또는 SCH66336이 포함된 starvation용 DMEM으로 배지를 갈아주었다. 20시간 후에 세포를 250μl의 reporter lysis buffer로 녹인 후 14,000 rpm에서 10분간 원심분리시켰다. 그 상등액 10μl를 luciferin 50μl (Promega, Madison, WI, USA)와 섞어서 luminometer (Tuner Designs Instruments, CA, USA)로 측정하여 luciferase의 활성을 측정하였다.

5) 세포 모양 관찰과 Western blotting

Rat2, Rat2-H-*rasV12*, Rat2-K-*rasV12* 및 Rat2-N-*rasN12* 세포의 모양을 비교하기 위하여 각각의 세포를 6-well에서 배양하였다. 하루 뒤 세포 모양을 비교하기 위해 사진을 찍었고, 이어 5일 후에 사진을 찍었다. 그 후에 세포를 ice-cold phosphate-buffered saline (PBS)로 한 번 세척한 후에 RIPA buffer 250μl에 녹였다. 단백질의 양을 측정하여 약 10μl의 cell lysate를 sample buffer에 녹여 14%의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

(SDS-PAGE)시키고 anti-pan-Ras antibody (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 2% skim milk/TTBS에 1 : 400으로 희석하여 배양시켰다. 최종적으로 형성된 면역 복합체의 존재는 horseradish peroxidase가 연결된 anti-mouse antibody와 peroxidase의 기질을 포함하고 있는 ECL kit를 이용하여 확인하였다.

6) 세포증식 조사(MTT assay)

Rat2, Rat2-H-*ras*V12, Rat2-K-*ras*V12 및 Rat2-N-*ras*N12 세포(10^3 /well)를 96-well plate에 배지의 부피가 100 μ l가 되도록 하여 24시간 배양한 후 Rb1, Rg1 및 SCH66336을 지시된 농도로 처리하였다. 5일 후에 MTT assay (Roche, Mannheim, Germany)를 제조회사의 지시에 따라 실시하였다. 간단히 설명하면, 10 μ l의 MTT labeling reagent (최종농도 0.5 mg/ml)를 각각의 well에 가한 후 37°C, 0.5% CO₂ 조건에서 4시간 배양하였다. 그 후에 각각의 well에 100 μ l의 solubilization solution을 가하여 37°C, 0.5% CO₂ 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 생성된 formazan의 흡광도를 570 nm에서 plate reader를 이용하여 측정하였다.

결 과

1) Single cell microinjection 기술을 이용하여 발암유전자 *ras*에 의한 DNA 합성 및 c-Jun 유전자 발현 유도에 대한 Rb1 및 Rg1의 억제 효과

세포주기가 정지된 세포에 발암유전자 *ras*를 과잉발현시키거나 미세주입하면 세포증식 등의 신호가 생성되어 유전자 발현 및 DNA 합성을 유도한다. 이러한 *ras*의 발암원성에 대한 인삼성분의 영향을 조사하기 위해 미세주입기술을 적용하였다. 이를 위해 먼저 *ras* 단백질을 GST-fusion 단백질로 재조합하여 정제하였다. 분리 정제된 GST-*ras* 단백질들을 SDS-PAGE로 검토한 결과 단일 Protein Band로 보여 순수하게 제조되었음을 알 수 있었다. 이 분리된 단백질을 정상 세포인 Rat-1 섬유모세포에 주입하여 DNA 합성을 유도여부를 조사하였다. 4 mg/ml의 농도로 세포에 미세주입을 하고 16시간 동안 BrdU와 배양하여 DNA 합성을 BrdU에 대한 항체를 이용하여 면역염색을 실시한 결과, 대조군으로 사용한 GST의

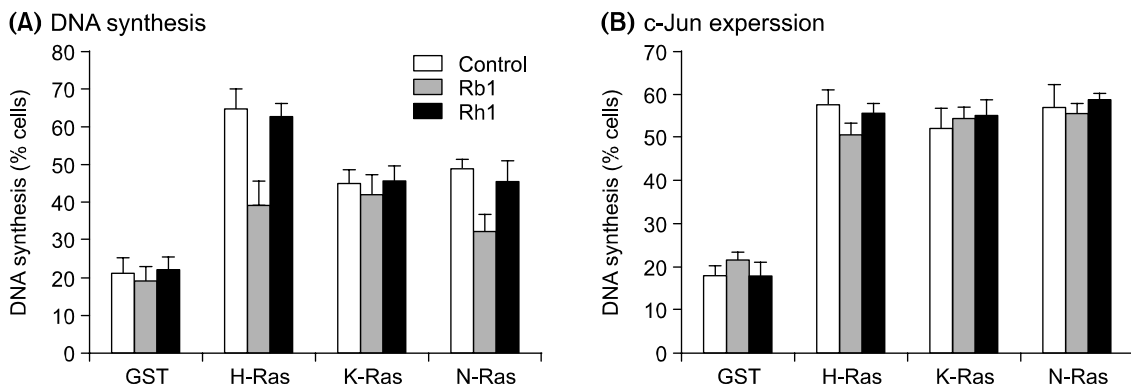


Fig. 1. Effects of Rb1 and Rg1 on the DNA synthesis (A) and c-jun expression (B) induced by microinjected oncogenic H-*ras*V12, K-*ras*V12 and N-*ras*N12 protein in Rat1 fibroblasts. Rat1 cells were grown on the coverslips and starved for 24 hr and then injected with 4 mg/ml of control GST, H-*ras*V12, K-*ras*V12 or N-*ras*N12 protein. Each contains rabbit IgG (5 mg/ml) in order to identify the injected cells. 200 uM of Rb1 and Rg1 was treated 1 hr before microinjection. After stabilization for 2 hr, cells were incubated with BrdU for 16 hr at 37°C. They were then processed for double-label indirect immunofluorescence according to the "Experimental Procedures". The injected cells were identified by cytoplasmic FITC staining, and DNA synthesis and c-jun expression were identified by nuclear TRITC staining. The results presented represent the means of two experiments and each was performed three times.

경우에 비해 발암유전자 *ras*가 형질전환된 세포에서 DNA 합성이 유도되었다(Fig. 1A). 인삼 성분인 Rb1과 Rg1을 전처리 후에 미세주입한 세포에서는 Rb1에 의해 발암원성 H-*ras*와 N-*ras*에 의해 유도되는 DNA합성이 억제되었다. 그러나 발암유전자 K-*ras*에 의한 DNA 합성은 억제되지 않았다. 그리고 Rg1은 아무런 영향이 없었다. 즉 Rb1이 isoform 특이적으로 발암유전자 *ras*에 의한 DNA 합성으로 가는 신호전달을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

발암유전자 *ras*에 의한 c-jun 단백질 발현 유도에 대한 인삼성분의 영향을 조사하기 위해 위와 같은 방법으로 미세주입을 적용하여 조사하였다. 분리된 발암원성 GST-*ras*를 정상 세포인 Rat-1 섬유모세포에 주입하여 c-jun 단백질 발현을 유도하는 지를 조사하였다. 4 mg/ml의 농도로 세포에 미세주입하고 5시간 동안 배양하여 c-jun 단백질에 대한 항체로 면역염색한 결과는 대조군으로 사용한 GST의 경우에 비해 발암유전자 *ras*가 주입된 세포에서 c-jun 단백질 발현을 유도하였다(Fig. 2B). 인삼 성분인 Rb1과 Rg1을 전처리 후

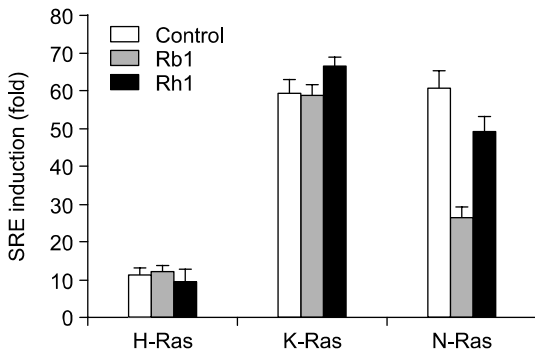


Fig. 2. Effects of Rb1 and Rg1 on activation of SRE promoter by oncogenic H-*ras*V12, K-*ras*V12 and N-*ras*N12 protein in Cos7 cells. Cos7 cells (4×10^4 cells/well) were grown on 12-well plate and cotransfected with pCGN-HA-H-*ras*V12, K-*ras*V12 or N-*ras*N12 plasmids (200 ng) along with pSRE-Luc reporter DNA (100 ng) for 3 hr. Then cells were treated with 200 μ M of Rb and Rg1 followed by serum starvation for 20 hr. Then the cells were lysed with 250 μ l of reporter lysis buffer. Luciferase activity was determined as described under "Experiment procedure".

미세주입한 세포에서 발암유전자 H-*ras*V12, K-*ras*V12 및 N-*ras*N12에 의해 유도되는 c-jun 단백질 발현에 아무런 영향이 없었다. 이는 DNA합성에 대한 영향과는 달리 이들 인삼 성분들이 발암유전자 *ras*에 의한 c-jun 단백질 발현을 유도하는 신호전달에는 관여하지 않음을 알 수 있다.

2) 발암원성 H-, K-, N-*ras* isoform에 의한 SRE promoter 활성화에 대한 Rb1 및 Rg1의 영향

Rb1의 DNA 합성 억제 기전을 알아보기 위해 세포 증식과 DNA 합성에 중요한 요소인 SRE promoter 활성화로 가는 신호에 미치는 영향을 조사하였다. 발암원성 H-*ras*V12, K-*ras*V12 및 N-*ras*N12를 mammalian expression vector인 pCGN vector에 subclone하고 이를 Cos7 세포에 transient transfection하고 이에 의한 SRE promoter 활성화를 유도하는 지를 조사하고 이에 대한 Rb1 및 Rg1의 영향을 조사하였다.

Transient transfection된 발암유전자 *ras*가 SRE-luciferase assay 시 SRE promoter를 활성화시키는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 그러나 발암유전자 H-*ras*V12에 의해 활성화되는 것보다 K-*ras*V12나 N-*ras*N12가 더욱 강하게 유도하는 것을 알 수 있었다. Rb1이나 Rg1을 전처리 후 발암유전자 *ras*에 대한 영향을 조사한 결과, 발암유전자 H-*ras*나 K-*ras*에 의한 SRE promoter 활성화에는 아무런 영향이 없으나, 발암유전자 N-*ras*에 의한 활성화는 Rb1이 억제하였다(Fig. 2). 즉 발암원성 N-*ras*에 의한 SRE 유도를 Rb1이 선택적으로 억제함을 알 수 있다. 이상의 미세주입 실험결과와 종합해보면 Rb1이 발암원성 N-*ras*N12에 의한 신호전달에는 억제효과가 있음을 알 수 있었다. 그러나 Rg1은 아무런 영향이 없었다. 즉 Rb1이 발암유전자 *ras* 작용을 isoform 특이적으로 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

3) Rat2 세포주에 oncogenic H-*ras*V12, K-*ras*V12, N-*ras*N12를 과발현시킨 세포의 특성 연구

다음으로 Rb1이 발암유전자 *ras*에 의한 세포증식을 억제하는지를 조사하였다. 이를 위해 발암

유전자 *ras*를 각각 과잉발현시킨 세포주에서 Rb1이 작용하는지를 조사하기 위해 Rat2 세포에 발암원성 H/K/N-*ras*를 각각 과량 발현시킨 세포주를 미국의 Schering-Plough 제약회사 연구소에서 획득하여 먼저 이들의 세포의 모양과 *ras* 과량 발현 여부를 조사하였다. 세포밀도가 낮을 경우

에는 정상 세포와 발암원성 *ras*를 발현하는 세포에서 섬유모세포의 모양이 보였으며(Fig. 3), 세포밀도가 높은 경우에는 대조군으로 사용한 세포에서는 contact inhibition에 의해 세포들이 밀집되어 붙어있는 모양이 관찰되었다. 그러나 발암유전자 *ras*를 발현시킨 세포에서는 암세포의 특

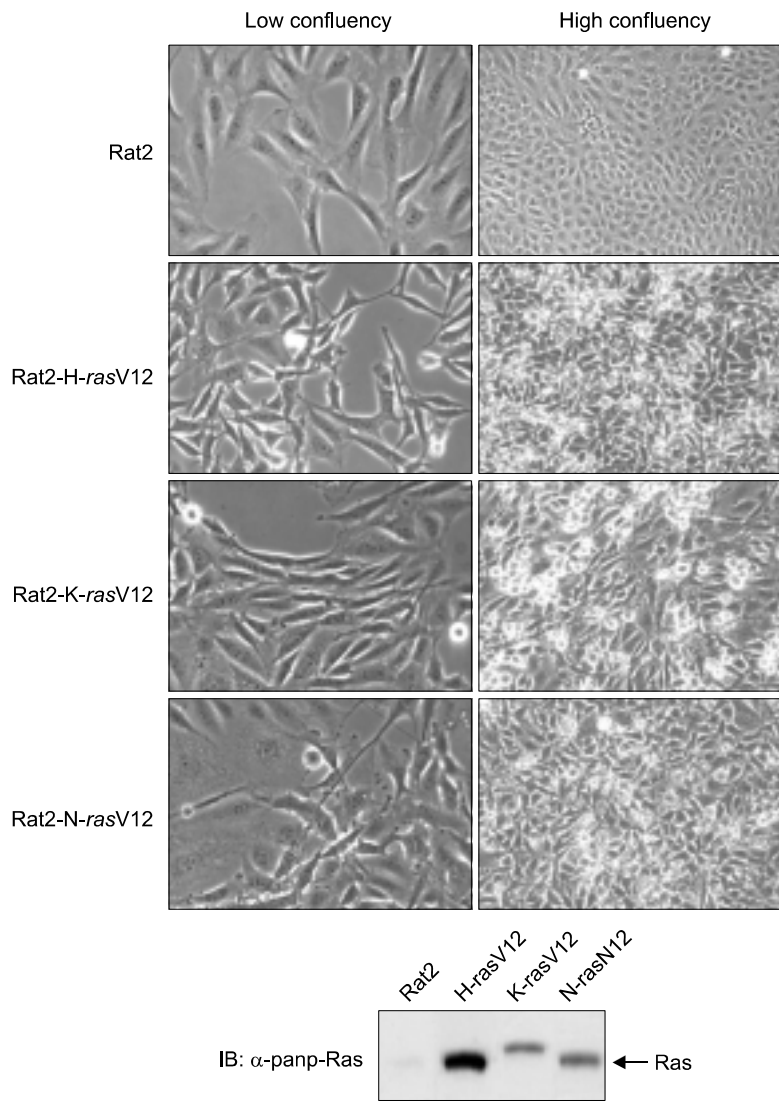


Fig. 3. Morphological characteristics of oncogenic H- *ras*V12, K-*ras*V12 and N-*ras*N12 and their expression. Rat2 fibroblasts stably expressed with H-*ras*V12, K- *ras*V12 and N-*ras*N12 (10^5 cells/well) were seeded on 6 well plate. After 1 day (low confluency) and 4 day (high confluency), morphology was examined and photographed. The high confluency cells were lysed with SDS sample buffer and the expression of *ras* protein was examined by immunoblotting with anti-pan-Ras antibody.

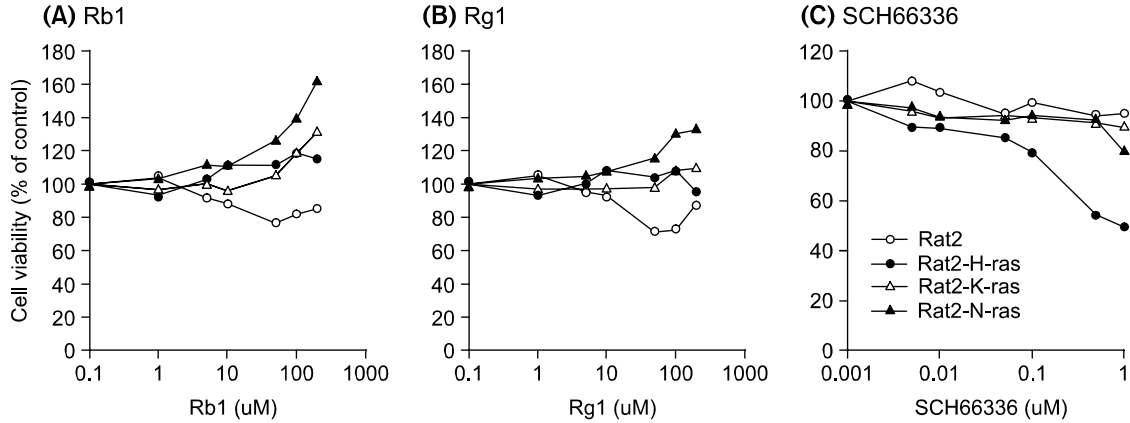


Fig. 4. Effects of Rb1 and Rg1 on the proliferation of Rat2, Rat2-H-rasV12, Rat2-K-rasV12 and Rat2-N-rasN12. Rat2 fibroblasts and Rat2 fibroblasts stably expressed with H-rasV12, K-rasV12 and N-rasN12 (4×10^3 cells/well) were seeded on 96 well plate. The indicated concentration of Rb1 (panel A) and Rg1 (panel B) was treated when cells were plated. As control, farnesyltransferase inhibitor (panel C), SCH66336, was treated. After 4 day, cell proliferation was examined with MTT assay kit (Promega) as suggested by manufacturer. The data represent the means of two independent experiments and each was performed three times.

정적인 contact inhibition을 극복하여 겹쳐서 증식하는 형태가 관찰되었다. 또한 이들 세포에서 발암유전자 *ras*들이 과량 발현되었는지를 pan-*ras* 항체를 이용하여 immunoblotting으로 확인한 결과, 과량 발현되어 있음을 알 수 있었다. 단백질의 분자량도 보고된 것과 일치하였다. 즉 이처럼 과량 발현된 발암유전자 *ras*에 의해 세포 형태 변화가 발생함을 알 수 있었다.

4) Rat2 세포주에 발암원성 H-rasV12, K-rasV12, N-rasN12를 과량발현시킨 세포증식 속도에 대한 Rb1 및 Rg1의 영향 조사

각 세포를 96 well plate에 키우고 인삼성분 (Rb1, Rg1)을 농도별(1 uM에서 200 uM)로 처리하고 5일 후에 세포의 증식속도를 Promega에서 구입한 MTT assay kit를 사용하여 측정하였다 (Fig. 4). Rb1이나 Rg1의 인삼성분은 Rat2, Rat2-H-rasV12, Rat2-K-rasV12, Rat2-N-rasN12의 세포 증식에 유의할 만한 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. 그러나 대조군으로 사용한 farnesyltransferase inhibitor인 SCH66336을 사용한 경우에는 Rat2-H-rasV12에서 특이적으로 억제하는 것을 알 수 있었다. SCH66336은 *ras* 단백질의 post-transla-

tional modification 중 첫 번째 단계인 farnesyl기의 삽입을 억제하여 발암유전자 *ras*에 의한 세포 증식을 억제한다고 알려져 있다.¹²⁾ Rb1이 발암유전자 *ras*에 의한 DNA 합성이나 SRE promoter 활성화를 억제하였기에 세포증식을 억제할 것으로 기대하였으나 특이한 억제 효과를 볼 수 없었다. 오히려 일부 조건에서는 세포 증식 속도를 증가시키기도 하였다. 따라서 Rb1이 DNA 합성 유도를 완전하게 억제하지 못하고 남은 일부 신호가 세포 증식을 유도하기에 충분한 것으로 추정된다.

5) 발암유전자 H-, K-, N-ras isoform 단백질의 post-translational modification대한 Rb1 및 Rg1의 영향

다음으로 Rb1, Rg1이 직접적으로 *ras*의 post-translational modification에 어떠한 영향을 나타나는지를 조사하였다. 세포 내에서 *ras*가 mRNA에서 단백질로 번역된 후 prenylation, proteolytic cleavage, methylation의 modification이 일어난 후, 세포막에 삽입되어 활성을 나타낸다.¹¹⁾ 발암유전자 *ras*의 경우도 이러한 modification이 발생하여야 그 특성을 나타낼 수 있다. 따라서 발암유전자 H-rasV12, K-rasV12 및 N-rasN12를 Cos7세포에

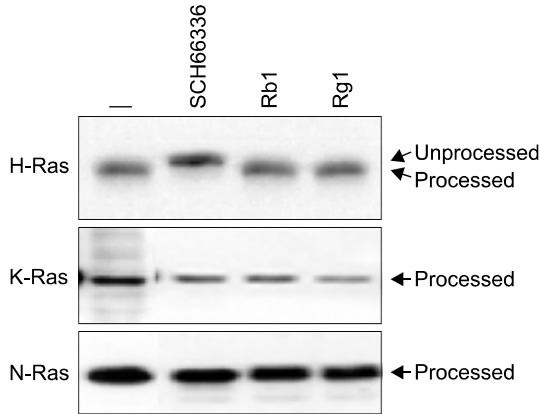


Fig. 5. Effects of Rb1 and Rg1 on the processing of oncogenic H-*ras*V12, K-*ras*V12 and N-*ras*N12. Cos7 cells (4×10^4 cells/well) were grown on 12-well plate and cotransfected with pCGN-HA-H-*ras*V12, K-*ras*V12 or N-*ras*N12 plasmids (200 ng) for 3 hr. Then cells were treated with 200 μ M of Rb and Rg1 followed by serum starvation for 20 hr. Then the cells were lysed with 250 μ l of SDS sample buffer and immunoblotted with anti-HA antibody to detect the expressed *ras* protein.

transfection하고, 이 세포에 Rb1, Rg1을 처리하고 *ras*에 대한 항체를 이용하여 immunoblotting을 수행하여 band shift를 관찰하였다(Fig. 5). H-*ras*에 선택적으로 post-translational modification을 억제하는 SCH66336의 경우에는 post-translational modification을 억제하여 band shift가 발생하였다. 그러나 SCH66336과는 달리 Rb1이나 Rg1이 발암유전자 *ras*의 post-translational modification에는 영향은 주지 않았다. 이 결과는 Rb1의 DNA 합성과 SRE 유도에 대한 억제능은 *ras*에 직접 작용하여 그 processing을 억제하여 나타나는 것이 아니라 *ras*의 downstream에 존재하는 기전에 작용할 것으로 생각되어진다.

고 찰

인삼은 2000년 이상 동양에서 건강식품으로 사용되어 왔고, 최근에는 심혈관계, 내분비계, 면역계 등에 폭넓은 약효가 있다고 알려져 있다.¹⁸⁾ 또한 인삼은 여러 활성 성분들을 포함하는데, 이들 성분들이 항암, 항스트레스, 항노화작용이 있

다고 알려져 있다.¹⁹⁾ 따라서 이들 인삼성분들의 효능에 대해서 많은 연구들이 진행되어왔다. 최근 실험동물에서 발암물질에 의한 폐암발생의 모델 시스템을 이용하여 인삼성분들의 발암예방 효과를 조사한 결과, ginsenoside류들의 유의한 예방 효과들을 보고하였다.¹³⁾ 인삼의 여러 성분 중, Rh2, Rg3 및 Rg5가 폐암 연구를 위한 실험 모델 마우스에서 항암작용 또는 암예방효과가 있는 것이 보고되었다.^{20,21)}

이러한 암예방작용의 기전으로 지방의 과산화를 약화시키며 superoxide의 제거작용으로 발생하는 것으로 여겨지며,²²⁾ cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현억제, NF- κ B, ERK, 및 MAP kinase 등의 활성화를 Rg3가 억제하여 항암작용을 나타내는 것으로 보고되었다.²³⁾ 또한 ginsenoside의 소수성적인 성질로 인해 세포 내의 스테로이드 호르몬 수용체에 결합하여 작용하는 것으로 여겨지고 있다.²⁴⁾ 특히 Rg1이 glucocorticoid 수용체의 리간드로 작용하여 dexamethasone에 의한 결합을 억제한다고 보고되었다.²⁵⁾ Rh1, Rb1, Rg1 등이 세포 내 estrogen수용체를 활성화시키는 에스트로젠 유사활성을 나타낸다고 보고되었다.²⁶⁻²⁸⁾ 그러나 이들 ginsenoside류들이 직접 estrogen 수용체와 결합하는 것은 아니라 다른 기전에 의해 에스트로젠 유사활성을 나타내는 것으로 추정되고 있다. 이러한 몇 가지의 기전 연구가 있지만 아직 ginsenoside류들의 작용에 대한 분자적 기전은 잘 모르고 있으며, 특히 발암유전자 *ras*와의 관계는 전혀 연구가 되어있지 않다.

본 연구에서 우리는 *ras* gene mutation에 의해 발생하는 암에 대한 Rb1의 항암 효과를 조사할 수 있는 시스템을 확립하였다. 이를 이용하여 인삼의 ginsenoside Rb1과 Rg1의 발암유전자 *ras*의 작용에 대한 효과를 검색한 결과, Rb1이 발암원성 *ras*에 DNA 합성이나 SRE 활성화를 억제하였는데, 이러한 효과는 흥미롭게도 모든 *ras*의 isoform에 작용하는 것이 아니라 H-*ras* 또는 N-*ras*에 특이적으로 작용하는 것을 알 수 있었다. 또한 모든 *ras*의 작용을 억제하는 것이 아니라 특이한 신호 전달 경로를 억제하여 그 효과가 나타나는 것을 알 수 있었다. 이러한 연구 결과는 인삼이 *ras*에 의해 발생하는 암의 예방과 치료에 사용될 가능성을 제공

하고 있으며, 앞으로 실험동물 등에서의 *ras*로 인한 암의 발생이나 성장에 인삼성분들이 억제작용을 나타내는지는 더욱 연구해볼 필요가 있다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 고려인삼학회의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Bos JL. *Ras* oncogenes in human cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-4689.
- 2) 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: 109-117.
- 3) Stacey DW, Kung HF. Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-*ras* p21 protein. *Nature* 1984; 310: 508-511.
- 4) Mulcahy LS, Smith MR, Stacey DW. Requirement for *ras* proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature* 1985; 313: 241-243.
- 5) Smith MR, DeGudicibus SJ, Stacey DW. Requirement for c-*ras* proteins during viral oncogene transformation. *Nature* 1986; 320: 540-543.
- 6) Bar-Sagi D, Feramisco JR. Microinjection of the *ras* oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell* 1985; 42: 841-848.
- 7) Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88: 593-602.
- 8) Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of *ras*. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 851-891.
- 9) Mehta F, Lallemand D, Pfarr CM, Yaniv M. Transformation by *ras* modifies AP1 composition and activity. *Oncogene* 1997; 14: 837-847.
- 10) Adunyah SE, Chander R, Barner VK, Cooper RS, Copper RS. Regulation of c-jun mRNA expression by hydroxyurea in human K562 cells during erythroid differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1263: 123-132.
- 11) Willumsen BM, Christensen A, Hubbert NL, Pappageorge AG, Lowy DR. The p21 *ras* C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* 1984; 310: 583-586.
- 12) Adjei AA, Erlichman C, Davis JN, Cutler DL, Sloan JA, Marks RS, Hanson LJ, Svingen PA, Atherton P, Bishop WR, Kirschmeier P, Kaufmann SH. A Phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor SCH66336: evidence for biological and clinical activity. *Cancer Res* 2000; 60: 1871-1877.
- 13) Yun TK. Experimental and epidemiological evidence on non-organ specific cancer preventive effect of Korean ginseng and identification of active compounds. *Mutat Res* 2003; 523-524: 63-74.
- 14) Kim YS, Kim DS, Kim SI. Ginsenoside Rh2 and Rh3 induce differentiation of HL-60 cells into granulocytes: modulation of protein kinase C isoforms during differentiation by ginsenoside Rh2. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 327-338.
- 15) Lee YN, Lee HY, Lee YM, Chung HY, Kim SI, Lee SK, Park BC, Kim KW. Involvement of glucocorticoid receptor in the induction of differentiation by ginsenosides in F9 teratocarcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 67: 105-111.
- 16) Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, Sato K, Saiki I, Tonooka S, Samukawa K, Azuma I. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20 (R)- and 20 (S)-ginsenoside-Rg3, of red ginseng. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 1197-1202.
- 17) Yoo MH, Woo CH, You HJ, Cho SH, Kim BC, Choi JE, Chun JS, Jhun BH, Kim TS, Kim JH. Role of the cytosolic phospholipase A2-linked cascade in signaling by an oncogenic, constitutively active Ha-*Ras* isoform. *J Bio Chem* 2001; 276: 24645-24653.
- 18) Bhattaacharya SK, Mitra SK. Anxiolytic activity of Panax ginseng roots: an experimental study. *J Ethnopharmacol* 1991; 34: 87-92.
- 19) Gillis CN. Panax ginseng pharmacology: a nitric oxide link? *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 1-8.
- 20) Yun TK, Lee YS, Lee YH, Kim SI, Yun HY. Cancer chemopreventive compounds of red ginseng produced from *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J Ginseng Res* 2001; 25: 107-111.
- 21) Yun TK. Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C.A. Meyer and identification of active Compounds. *J Korean Med Sci* 2001; 16: S6-S18.
- 22) Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H, Surh YJ. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract

- of heat-processed ginseng. *Cancer Lett* 2000; 150: 41-48.
- 23) Surh YS, Na HK, Lee JY, Keum YS. Molecular mechanisms underlying anti-tumor promoting activities of heat-processed Panax ginseng C.A. Meyer. *J Korean Med Sci* 2001; 16: S38-S41.
- 24) Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 1685-1693.
- 25) Lee YJ, Chung E, Lee KW, Lee YH, Huh B, Lee SK. Ginsenoside-Rg1, one of the major active molecules from Panax ginseng, is a functional ligand of glucocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 133: 135-140.
- 26) Lee YJ, Jin YR, Lim WC, Park WK, Cho JY, Jang S, Lee SK. Ginsenoside-Rb1 acts as a weak phytoestrogen in MCF-7 human breast cancer cells. *Arch Pharm Res* 2003; 26: 58-63.
- 27) Lee Y, Jin Y, Lim W, Ji S, Choi S, Jang S, Lee S. A ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 84: 463-468.
- 28) Chan RY, Chen WF, Dong A, Guo D, Wong MS. Estrogen-like activity of ginsenoside Rg1 derived from Panax notoginseng. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3691-3695.
-