

## 생쥐에서 종양세포의 암유전자발현에 대한 울솔산의 효과

류태형\* · 박성미\* · 박건영\*\* · 정해영\*\*\* · 하재청\* · 이정규\*\*\*\*

\*부산대학교 생물학과, \*\*식품영양학과, \*\*\*약학과, \*\*\*\*경성대학교 약학과

(Received September 3, 1992)

### Effects of Ursolic Acid on Oncogene Expression Detected by *In Situ* Hybridization in Mice

Tae-Hyong Rhew\*, Sung-Mi Park\*, Kun-Young Park\*\*,  
Hae-Young Chung\*\*\*, Jae-Chung Hah\* and Chung-Kyu Lee\*\*\*\*

\*Dept. of Biology, \*\*Food Science and Nutrition and \*\*\*Pharmacy,

Pusan National University, Pusan 607-735, Korea

\*\*\*\*College of Pharmacy, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

**Abstract**—To investigate the effect of ursolic acid on the expression of oncogenes in tumor cells of mice, sarcoma 180 ascites tumor cells were implanted into the left groin of ICR mice and the tumor bearing mice were treated with ursolic acid. The expression of oncogenes were measured by *in situ* hybridization method. Ursolic acid significantly reduced the expression of oncogenes in the tumor cells. Therefore, it can be said that the prestatated anticarcinogenic effect of ursolic acid could be partly ascribed to the mechanism included in the oncogene's transcription level.

**Keywords** □ Ursolic acid, oncogene, *in situ* hybridization, c-myc, c-fos, Ha-ras.

암의 예방과 치료를 위해서 개발된 많은 화학요법 약품들은 임상치료를 결정적인 암치료효과를 가져오지 못하거나, 생체방어에 관련된 세포들을 파괴하여 유효한 효과보다 부작용이 더 심한 경우가 많이 있었다. 또 이들 화학요법제들은 세포막을 통과하지 못하거나 통과하는 경우에는 분자가 파괴되어 약효가 감소되는 문제점을 갖기도 한다<sup>1)</sup> 또, 대부분의 합성 항암물질들은 기존의 활성물질을 근거로 그 유도체의 합성에 의존하는 방법을 채택하고 있어서 항암효과가 크며 완전히 새로운 약제개발을 기대하기는 어렵다.

이러한 화학요법제, 특히 합성물질의 부작용과 문제점들로 인한 한계점 때문에 천연물로부터의 항암 활성물질의 개발 및 활성기작 확인에 대한 연구가 활발해지고 있다. 이러한 시도에서 비파(*Eriobotrya*

*japonica* LINDLEY)의 추출물 중에서 항돌연변이 및 항암활성물질로 확인된 울솔산(ursolic acid, UA)를 사용해서 이것이 ICR계 생쥐의 근육에 발생시킨 암 조직에서 나타내는 암확산 억제효과를 확인했다. 또한 이러한 UA의 암억제효과의 기작을 확인하기 위해서 암성장에 관여하는 주요 종양유전자(oncogene)들의 발현에 관한 UA의 효과를 테스트하였다.

비파나무는 장미과에 속하는 식물로 과수 또는 관상용으로 쓰이고 있다. 잎의 주성분으로는 ursolic acid, oleanolic acid, tannin 등이 함유되어 있으며, 이 잎은 재리 한방에서 진해, 거담, 이뇨, 건위 등에 대한 치료제로 사용해 왔다.

또한 민간요법에서 이 잎을 암치료에 사용해 왔으며, Tokuda<sup>2)</sup>는 *Glehoma hederacea*에서 분리해낸 UA 및 oleanolic acid가 생쥐에 있어서 피부의 암을 억제시킨다고 보고하였고, Lee 등<sup>3)</sup>은 비파잎의 메탄올

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

추출물 및 UA가 sarcoma 180 육종에 대하여 항돌연변이 효과, 고혈압 저지 및 수명연장 효과를 나타낸다고 보고한 바 있다.

본 실험에서는 UA의 암억제 효과를 확인하면서 동시에, 이러한 UA의 항암효과가 어떤 기작에 의해서 암을 저지하는 것인가를 설명하기 위해서 쥐의 근육세포에 이식된 암세포에서 UA 처리시에 나타나는 oncogene 발현에 대한 영향을 *in situ* 방법으로 측정하였다.

## 실험방법

### 1. 실험동물

평균체중 38g의 웅성 ICR계 생쥐를 항생제가 포함되어 있지 않는 고체사료로 사육하여 실험동물로 사용하였다. 물과 사료는 자유로이 먹게하였고, 조명은 자연조명의 낮과 밤 사이클을 유지하였다. 사료 공급은 매일 오전 9시에 하였다.

### 2. 종양이식 및 시료투여

생쥐의 복강내에서 일주일간 배양된 sarcoma(S) 180 cell을 복수와 함께 취하고 여기에 0.83% NH<sub>4</sub>Cl을 가하여 잘 혼합한 후 2분간 상온에 방치하여 용혈시켰다. 그런 후에 4000×g에서 3분간 원심분리하여 종양세포를 분리하였다. 이 세포침전물을 냉각 멸균 생리식염수에 부유시킨 후 재차 원심분리하여서 적혈구를 제거해서 S180 cell만을 얻었다. 동일한 과정을 2회 반복하여 1.0×10<sup>7</sup> ml 농도의 S180 cell 현탁액을 만든 후에 이를 실험동물에 0.1 ml씩 복강 및 왼쪽 서해부에 피하주사하여 종양을 유도하였다.

**2a) 시료추출**—비파잎(*Eriobotrya japonica*) 4.5 kg을 건조 분쇄한 후 55% 메탄올로 3시간 동안 3회 추출한 후에 농축하여 620g의 유기성분 추출물을 얻었다. 이 추출물을 헥산, 클로로포름, 아세트산에틸, 부탄올 및 물로 분획하였다. 그 중 활성이 나타난 아세트산에틸과 메탄올분획 중에서 아세트산에틸분획을 이용하여 컬럼크로마토그래피로 정제해서 ursolic acid를 추출 건조시켜 시료로 사용하였다.

**2b) 시료투여**—Ursolic acid는 DMSO 용액에 10% 농도로 현탁하여 종양이식의 24시간 후부터 10일간 연속적으로 복강내로 투여하였다. 대조군은 10% DMSO만을 같은 기간에 복강내로 투여(10 mg/kg, day)하였다.

### 3. 조직표본제작

종양유도를 위한 S180 cell의 피하주사 26일 후에 ICR계 흰쥐의 왼쪽 서해부에서 조직을 채취하였다. 이 조직을 10% 중성 포르마린에 한시간 고정한 후에 0.1 M 인산염완충용액으로 수세하였다. 그런 다음, 에탄올 농도를 50, 70, 90, 95, 100%로 변화시키면서 각 농도에서 15분간씩 탈수시켰다. 탈수된 조직을 xylene으로 처리하여 투명하게 만든 후에 파라핀으로 포매시켰다. 포매된 조직을 4~7 mm두께로 박절하여서 poly-L-lysine으로 슬라이드 위에 부착시켜서 실온에 보관하였다.

### 4. Probe 준비

Oncogene들은 부산대학교 분자생물학과에서 공급 받았다. 그 중에 c-myc은 pBR 322 vector에 들어 있었고 삽입 DNA의 크기는 9 kb이었다. 350 bp인 Ha-ras는 PUC 119 vector에, 또 50 bp, 300 bp, 1 kbp인 v-fos는 pBR 322에, 그리고 1 kbp인 N-myc은 pBR 322 vector에 들어 있었다. 이들 플라스미드를 숙주세포인 *E. coli* HB 101 cell로부터 추출하여 사용하였다.

**4a) Plasmid 추출**—플라스미드는 K.R. Johnson<sup>4)</sup>의 방법을 이용하여 HB 101 cell로부터 추출하였다. LB+ampicillin(Amp) 배지로 배양한 HB 101 cell을 45초 동안 원심분리하여 모았다. 50 ml의 glucose-EDTA-Tris 혼합용액을 넣고서 잘 섞은 후에 lysozyme용액 50 ml를 첨가하여 실온에서 5분간 방치하였다. 그 후 200 ml의 NaOH-SDS 용액을 가하고, 얼음속에서 5분 동안 반응시켰다. 여기에 150 ml의 아세트산칼륨-아세트산을 처리한 후에 얼음에 15분간 방치한 후 원심분리한 후에, 상층액에 동량의 페놀-클로로포름을 첨가하여 다시 원심분리하였다. 그 상층액에 100% 에탄올 2용적을 가하고 플라스미드를 침전시킨 다음 다시 원심분리하였다. 침전물에 50 ml의 TE buffer를 취하여 녹인 후에 50 ml의 5 M 아세트산 암모늄을 첨가하여 얼음에 20분간 방치하여 RNA를 침전시켰다. 이것을 원심분리하여 그 상층액에 200 ml의 이소프로판올을 가한 후에 원심분리하여 플라스미드를 침전시켰다. 여기에 20 μl의 TE-용액을 가하여 녹인 후에 -20°C에 보관하였다.

**4b) Oncogene 분리**—c-myc과 Ha-ras는 *Hind*III와 *Eco*R1으로 digestion하여 vector로부터 분리해냈다. 그리고 v-fos는 *Pst*I으로, N-myc은 *Bam*H1과 *Eco*R1

으로 digestion하여 vector로부터 분리해냈다.

Eppendorf tube에 RNAase 1 ml, plasmid 3 ml 제한효소 2 ml, 그리고 10×restriction buffer 2 ml, BSA 2 ml를 가하고서 전체용량이 20 ml로 되도록 double-deionized(DDI) 증류수를 첨가한 후에, 37°C 배양기에서 한시간 동안 반응시켰다. Double digestion의 경우에는 해당 제한효소 2 ml와 10×restriction buffer 2 ml를 첨가한 후에 전체용량이 25 ml되게 DDI 증류수를 가하고서 37°C 배양기에서 다시 한시간 동안 반응시켰다.

이 반응용액을 이용해서 0.8% 아가로오스 겔을 사용하여 40 V, 40 mA로 5시간 동안 전기영동하여 oncogene을 분리하였다. size marker로는  $\lambda$ /Hind III를 사용하였으며, UV 조명기상에서 해당 DNA 띠를 잘라냈다. 잘라낸 띠의 겔로부터 토막 DNA는 Gene Clean 방법(BIO 101)을 사용해서 추출해냈다. 순수 분리해낸 oncogene DNA를 Nick translation 방법을 사용해서 비오틴화하였다.<sup>5)</sup>

**4c) Probe labelling**—Eppendorf tube에서 1 ml의 DNA, 2 ml의 0.05 mM 4dNTP, 25  $\mu$ M biotin-4-dUTP, 5 ml의 10×Nick translation buffer, 1 ml의 DNAase 1(2 mg/ml), 5 unit의 DNA polymerase를 잘 섞은 후에 15°C에서 90분간 반응시켰다. 표지된 DNA만을 Sephadex G-50 컬럼크로마토그래피로 분리한 후에, -20°C에 사용시까지 보관하였다.

### 5. In Situ Hybridization

**5a) 슬라이드 전처리**—*in situ* hybridization에 사용할 슬라이드들을 0.1 N HCl에 10분간 담근 후에 95% 메탄올에 24시간 동안 담그어서 닦아냈다. 이것을 DDI 증류수로 잘 수세한 후에 poly-L-lysine을 코팅하여 60°C에서 한시간 동안 말린 다음, 멸균하여서 4°C에 보관하였다.

**5b) in situ hybridization**—조직의 RNA를 probe에 hybridization하는 데에는 G. Niedobitek<sup>6)</sup>의 방법을 약간 변형시켜서 사용하였다. 조직을 슬라이드에 부착한 다음 슬라이드를 60°C에 24시간 동안 배양하였다. 그런 후에 xylene에 30분간 담그어서 파라핀을 제거한 후 100%, 95%, 65%, 35% 농도의 에탄올용액에 각각 10분씩 담그어서 탈수시켰다.

그런 다음, 0.2 N HCl에 10분 동안 담그고서, 2×SSC에 5분 동안 처리하였다. 이 슬라이드를 proteinase K 용액(20 mM Tris-HCl, pH 4; 2 mM CaCl<sub>2</sub>)에

담그어서 37°C의 incubator에서 30분 동안 저으면서 반응시켰다. 반응 후에 2×SSC용액으로 처리하고서, 200 ml의 0.1 M triethanolamine/0.5 ml의 아세트산 무수물의 혼합용액에 10분 동안 담그었다. 이것을 2×SSC용액으로 씻어서 말린 후에 hybridization을 하였다. 조직절편 위에 hybridization cocktail(2×SSC, 50% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 1000  $\mu$ g/ml herring sperm DNA, 10% Denhardt solution)을 잘 도포한 후에 37°C에서 한시간 동안 두었다. 조직을 조사하여 건조시킨 다음에, 90°C에서 5분 동안 가열하여 변성시킨 biotin-labeled probe(1.5  $\mu$ g/ml)를 hybridization cocktail에 섞어주고서, 이것을 말린 조직절편위에 도포하여 42°C의 수분조절실에 18시간 방치하여 hybridization시켰다. 이 반응 동안에 조직절편 위에는 siliconized coverslip를 덮었다. 반응 후에 2×SSC용액에 조직절편을 담그어서 coverslip를 제거하고서, 5% 포르마린/0.1×SSC 혼합용액에 담그어서 5분 동안 반응시켰다. 그런 후에 55°C 항온기에서 2×SSC 용액으로 가볍게 흔들어 주면서 씻었고, 이어서 1×SSC로 한시간, 그리고 0.1×SSC로 30분간 씻어주었다.

### 6. 신호 탐지

비오틴 신호의 탐지는 nonradioactive nucleic acid detection system(BRL Cat No.8279SA) kit를 사용하여 실시하였다. Buffer 2(3g BSA/buffer 1)속에 10분 동안 조직절편을 담근 후에, buffer 1(0.1 M Tris-HCl pH 7.4; 15 M NaCl) 1 ml당 streptavidin-alkaline phosphatase 1  $\mu$ g을 첨가해서 희석시킨 용액에 60분 동안 담근 다음에, 다시 buffer 1에 15분 동안 담근 후에 buffer 3(0.1 M Tris-HCl pH 9.5; 0.1 M NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>)에 10분 동안 담그었다. 그런 다음 7.5 ml의 buffer 3용액에 3.3  $\mu$ l의 NBT(75 mg nitro-blue tetrazolium/ml of 75% dimethyl formamide)와 25  $\mu$ l의 BCIP(50 mg bromochloroindolyl phosphate/ml of dimethylformamide)를 첨가하여 잘 섞은 혼합용액에 담그어서 암실에서 3시간 동안 방치하여 발색 반응을 시켰다. 발색반응이 끝난 다음에 DDI 증류수로 수세하고서 95%, 100% 농도의 에탄올로 각 2분씩 탈수시키고서, xylene으로 각각 2번씩 투명화시킨 후에 canadian balsam으로 봉결하였다.

관찰은 400× 배율로 광학현미경 하에서 실시하였다. negative 컨트롤로 쓰기위한 것은 prehybridiza-

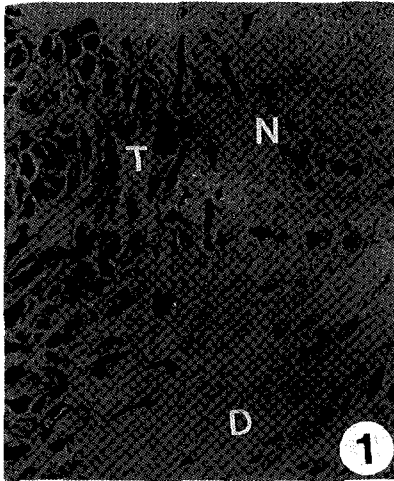


Fig. 1—Sarcoma 180 tumor at left groin of untreated mice. Note dead cell mass(D), necrotizing region(N), and tumor cell mass(T) (H&E, 400×)

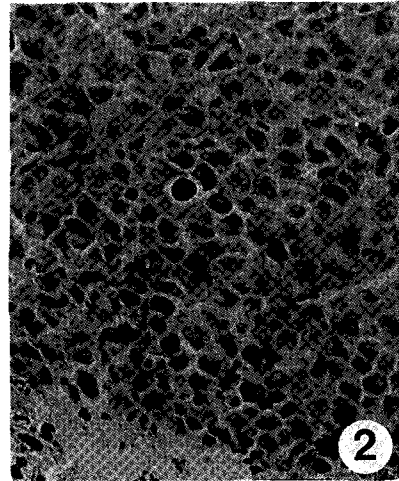


Fig. 2—Sarcoma 180 tumor at left groin of UA-treated mice. Note much improved cell-shape and regularity (H&E, 400×).

tion을 하기 전에 조직절편에 RNAase T<sub>1</sub>(10 units/ml)와 DNAase(10 unit/ml)를 처리한 다음에 hybridization시켰다.

7. 조직의 형태적 고찰

조직절편을 H&E염색으로 처리하여, 암유도군과 시료처리군 사이의 미세구조의 차이를 탐색하였다.

결 과

**미세구조의 관찰**—서혜부에 이식된 종양세포가 왕성하게 자란 곳은 주로 골격근막의 결합조직이었으며 80% 이상의 이식율을 보였다. 이들 종양세포의 특징은 다형성(pleiomorphic)을 나타낸다는 것과, 대소부동핵증(anisonucleosis)을 동시에 갖는다는 점이였다. 종양세포들에서 핵과 세포질의 비율이 커졌고, 핵융해 및 단계적인 괴사과정으로 진행하여 마침내는 무핵의 사조직괴(dead cell mass)가 커져가는 것으로 보였다 (Fig. 1).

UA 처리군에서는 유사분열 말기의 세포분열이 일어나고 있음을 볼 수 있으며 암화과정 진행이 느려진 것을 확인할 수가 있었다(Fig. 2). 또, 종양발생은 암유도군에서 80% 이상이었던 것이 35% 정도로 줄어들어 있었다. UA처리군에서도 괴사부위가 보이긴 했으나 훨씬 줄었고, 세포핵의 융해정도나 무질서도 현저하게 감소되어 있었다(Fig. 2).

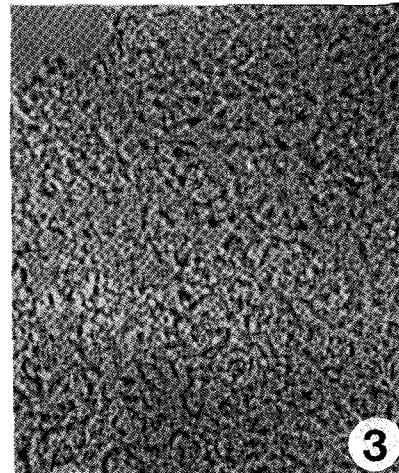
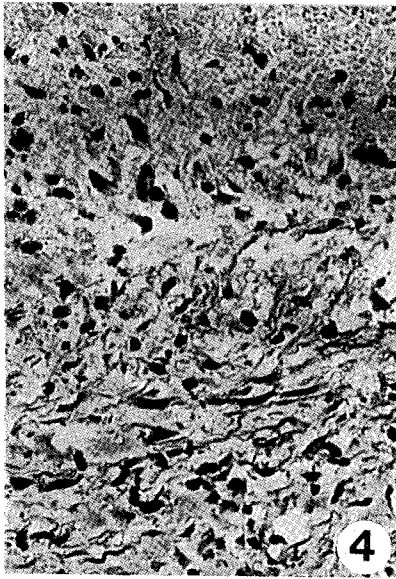
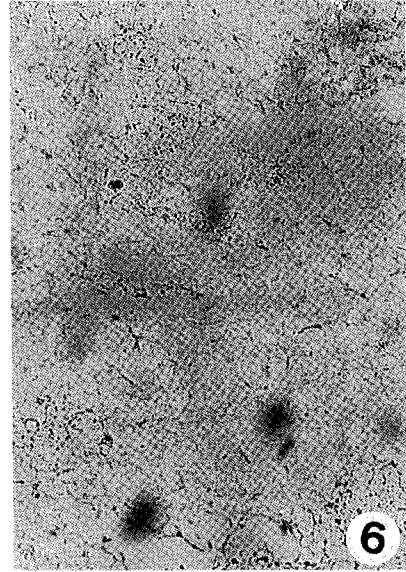


Fig. 3—Negative reference: Expression of c-myc at the left groin muscle tissue of sarcoma 180-transplanted ICR mice (400×). None of hybridized signal has been seen.

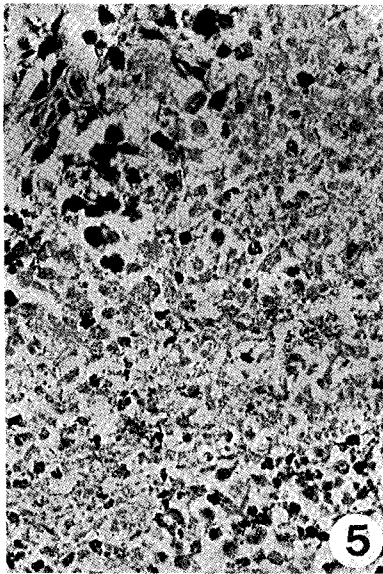
**Oncogene 발현**—ICR계 생쥐의 서혜부 근육에서의 oncogene 발현을 측정하였다. 광학현미경하에서 400× 배율하에 각 슬라이드당 무작위로 택하여, oncogene signal을 조사하였다. Oncogene 발현이 세포핵당 5~10개 정도의 groin signal로 나타날 때를 경도 발현(+)으로, 세포핵의 50% 이상이 신호로 덮혀 있을 때를 강도 발현(+++)으로 그 중간 정도일 때를 중도 발현(++)으로 표현하였다. 이 신호의 균간의



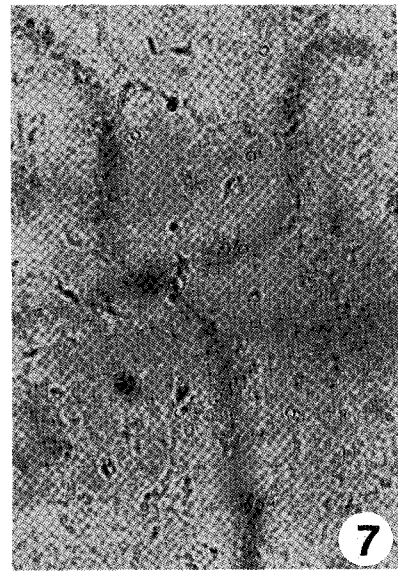
**Fig. 4**—Expression of c-myc oncogene at the left groin muscle tissue of sarcoma 180-transplanted ICR mice (400 $\times$ ). Elevated levels of high and medium expression have been detected when compared to those in the negative reference.



**Fig. 6**—Expression of v-fos oncogene at the left groin muscle tissue of sarcoma 180-transplanted ICR mice (100 $\times$ ). Elevated levels of high and medium expression has been detected when compared to those in the negative reference.



**Fig. 5**—Expression of c-myc oncogene at the left groin muscle tissue of sarcoma 180-transplanted ICR mice treated with UA (400 $\times$ ). Significantly reduced levels of high expression and elevated levels of low expression have been detected when compared to those in the untreated group.



**Fig. 7**—Expression of v-fos oncogene at the left groin muscle tissue of sarcoma 180-transplanted mice treated with UA (400 $\times$ ). Significantly reduced levels of high expression and elevated levels of low expression have been detected when compared to those in the untreated group.



Fig. 8—Expression of Ha-ras oncogene at the left groin muscle tissue of sarcoma 180-transplanted ICR mice (400×). Elevated levels of high and medium expression have been detected when compared to those in the negative reference.

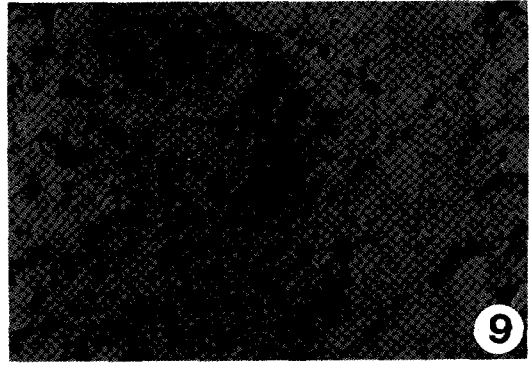


Fig. 9—Expression of Ha-ras oncogene at the left groin muscle tissue of sarcoma 180-transplanted ICR mice treated with UA (400×). Significantly reduced levels of high expression and elevated levels of low expression have been detected when compared to those in the untreated group.

차이는 Kruskal-Wallis 일원분석방법을 사용해서 그 유의성을 검정하였다.

음의 기준으로 사용하기 위해서 조직에 DNAase 1과 RNAase T<sub>1</sub>을 처리하고서 시료에 hybridization 시켰을 때에는 전혀 신호가 나타나지 않았다(Fig. 3). 반면에 종양유도군에서는 높은 c-myc, v-fos oncogene들의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 4, 6, 8). 즉, v-fos는 85%, c-myc은 80%의 중증도 이상의 발현

(+, +, +++)을 나타냈으며(Table I, II), 그에 비해서 Ha-ras만은 40%가 중간발현(++)이었고 60%는 약한 발현(+)이었다(Table III). UA처리군에서는, 첫째 v-fos발현에 있어서 중증도 발현(++)이 20%로 줄어들어서 나타났으며(85% vs 20%) 특히 강한(+++) 발현은 없었다(Table I). c-myc 발현에 있어서도, UA처리군에서는 중증도(++) 이상의 발현이 40

Table I—V-fos expression in ICR mouse muscle

Treatment group	Number of sample	Number of fields examined	v-fos expression		
			+	++	+++
tumor-induced group	3	20	3 (15%)	13 (65%)	4 (20%)
ursolic acid treated group	3	20	16 (80%)	4 (20%)	0 (0%)

There were three animals in each group.

Grading of v-fos expression: + weak, ++ intermediate, +++ strong

Table II—c-myc expression in ICR mouse muscle

Treatment group	Number of sample	Number of fields examined	c-myc expression		
			+	++	+++
tumor-induced group	3	20	4 (20%)	8 (40%)	8 (40%)
ursolic acid treated group	3	20	12 (60%)	8 (40%)	0 (0%)

There were three animals in each group.

Grading of c-myc expression: + weak, ++ intermediate, +++ strong

**Table III**—Ha-ras expression in ICR mouse muscle

Treatment group	Number of sample	Number of fields examined	c-myc expression		
			+	++	+++
tumor-induced group	2	10	6 (60%)	4 (40%)	8 (0%)
ursolic acid treated group	2	10	9 (90%)	1 (10%)	0 (0%)

There were three animals in each group

Grading of Ha-ras expression: + weak, ++ intermediate, +++ strong

%로 줄어서 나타났으며(80% vs 40%), 역시 현저히 감소되었다(Table II). Ha-ras oncogene 발현에 있어서도, UA처리군에서 10%로 나타났으며(40% vs 10%), 이는 유의성있는 감소현상이었다(Table III).

**고 찰**

Oncogene 발현은 주로 세포핵과 핵주변의 가까운 세포질에서만 나타났다. 이런 발견은 다른 보고들과도 일치하고 있다.<sup>7)</sup> 또한, 동일 표본내에서도 관찰시야에 따라 oncogene 발현정도가 다르게 나타났으며, 개체 별로도 발현정도에 차이가 있었다. 또 모든 종양세포에서 oncogene 발현이 나타난 것도 아니었다. 그 이유를 명백히 설명할 수는 없으나, Seok<sup>7)</sup>은 암세포 집단의 성장행이 비동시성(asynchronons nature)을 갖기 때문이라고 가정하고 있다.

또, 한가지 중요한 점으로서 지적할 수 있는 것은 세포증식의 조절이 세포증식을 추진하는 신호와 억압하는 신호의 조절 메카니즘에 의한 것이라고 볼때, oncogene product가 추진신호를, 그리고 암억제 유전자(oncosuppressor)가 억압신호를 주면서 암세포의 비균질성 증식에 이들 메카니즘이 관여하는 것으로 볼 수 있다는 것이다.<sup>8)</sup> 즉, 정상세포에서는 세포증식을 억압할 수 있었던 것이, 암억제유전자의 불활성화 또는 손실의 결과로, 세포증식억제 기능을 잃게되어 증식조절기능을 잃고서 비균질성 무한증식상태로 되는 현상일 수도 있다는 것이다.<sup>7)</sup> 그 외에 oncogene DNA의 특정서열이 변형되어서 비균질성 발현을 가져온다는 주장도 있다.<sup>9)</sup> 조사한 oncogene들(c-myc, Ha-ras, c-fos)의 종양세포내에서의 발현은, 기대했던 바대로 높았었고(Fig. 4, 6, 8 및 Table I, II, III), 이 oncogene들의 발현이 UA를 처리했을 때에는, 모두 유의성 있게 감소되었다. 즉, c-myc의 경우, 중증도

이상의 발현(+++, +++)이 80%에서 40%로 줄었고, v-fos는 중증도 발현(++)이 85%로부터 20%로 감소했다(Table I). 그리고 Ha-ras의 경우에도, 중증도 발현이 40%에서 10%로 줄어들었다(Table III). 이러한 감소된 oncogene이 세포증식의 억제에 관련된다는 기작은 복잡하다. 그중에 oncogene 단백질들이 signal transduction 통로를 거쳐서 세포성장을 조절하는 기작에 대해서 집중적으로 연구가 되어지고 있다. 세포성장을 주관하고 영향을 주는 요소들 중에는, 세포외의 신호운반체(growth factors)들과 그것들의 receptor, 그리고 세포내의 과녁에 이 신호를 전달해주는 전달체들이 포함된다. 이때, oncogene product에 의해서 세포의 형질전환이 있게되면 growth-stimulating factors(GSF)를 과잉생산하게 함으로써 세포의 과잉성장을 촉진하게 된다. 또, 제 2의 요소인 growth factor receptor가 변질되었을 때에도 oncogene product같은 기능을 나타내게 된다. 또, 그밖에도 세포내의 signal transduction들이 비정상, 혹은 정상적인 oncogene product들에 의해서 과잉자극을 받게되어 세포 성장을 비정상 촉진시킬 수가 있는 것이다. 종양세포에서는 실제 어떤 oncogene의 과잉발현이 흔히 일어나고 있는 것을 볼 수가 있다. 또, 세포외의 신호인 growth factor들이 receptor들에 결합했을 때에 polypeptide growth factor(PGF)/receptor complex는 세포내에서 증폭되는 transmembrane signal을 유도하는 기능을 갖는다. 결과로 세포내의 유전자 발현에 영향을 주게된다. 이 과정에 adenylyate cyclase cascade반응을 포함하는 second messenger(SM)의 기작이 포함되는 것이다. 이때에 PGF의 SM로는 phospholipase C(PLS)에 의한 phosphoinositides의 분해 산물들도 포함된다.

첫째로, ras-oncogene products는 growth factor receptor(GFR)에 결합했을 때 위와 같은 기작으로

PLC에 작용하여 암세포 성장촉진을 할 수 있게 된다.<sup>10)</sup> cellular ras oncogene이 human tumor의 진전에 관련된다는 보고는 일찍부터 되어 있었다.<sup>10)</sup> Ha-ras의 단백질은 P21로서, 이 P21은 막단백질인 G-protein과 비슷한 분자구조를 갖는다. 이 분자구조의 유사성에서 ras-product가 signal transduction 과정을 변형 혹은 관여할 수 있다는 가능성을 추측한다는 것은 무리한 일이 아닐 것이다. 이 경우에는 ras-product가 GF의 기능을 갖거나, GFR에 결합해서가 아니라 세포내의 signal transducer에 coupling함으로써 세포증식의 촉진에 참여하게 될 것이다.

Proto-oncogene들은 정상기능의 유전자이었다가 mutation 등에 의한 변화를 가질 때에 oncogene으로 된다. 즉, ras의 경우에는 염기서열의 변환, N-myc의 경우에는 유전자증폭 등의 변화를 거친다. 실제로 다양한 종양세포에서 c-myc의 증폭현상이 보고되어 있다.<sup>11)</sup> c-myc의 증폭은 그런 후에 일련의 반응과정을 거쳐서, 비정상적으로 세포의 무한증식을 유도하게 된다. c-myc oncogene 생성물은 DNA의 특정부위에서 열 특이적으로 결합하여서 DNA복제에 관여한다. c-myc oncogene 생성물은 fos-product와 결합하여서 복합체를 만들어 DNA transcription factor 중의 하나인 AT-1에 결합하게 된다. v-fos, c-myc oncogene 생성물은 세포의 mitogen stimulation에 중요한 역할을 하며 protein kinase C pathway, cAMP, prostaglandin을 포함한 여러 다른 경로를 통해 세포분열, 증식, 분화, 종양유도 등에 영향을 미치게 된다.

다음에 Proto-oncogene fos는 대단히 증폭되기 쉬운 유전자이다. 즉 mitogen이나 differentiation-specific agent가 존재할 때, 급속하게 증폭된다. V-fos-protein은 변형된 carboxy-terminus를 갖게 되면서 끊임 없이 합성되어서 세포의 형질변환을 일으키게 된다. fos-product는 일반적으로, 세포의 성장 및 분화에 대한 조절기능을 갖는다.

비파잎은 amygdalin, UA, oleanolic acid, citric acid, tannin, vitamin B 등을 주성분으로 가진 것으로서 한방에서 진해, 거담, 이뇨, 견위, 항바이러스제, 암치료 등에 사용되어 왔다. Tokuda<sup>2)</sup>는 *Glehoma hederacea*에서 분리한 UA 및 oleanolic acid가 생쥐피부의 tumor promotion을 억제한다는 보고를 했고, Lee 등<sup>3)</sup>은 비파잎의 메탄올 추출물 및 UA가 sarcoma 180육종에 대하여 항돌연변이 효과, 고형암 저지 및

수명연장효과를 발현했음을 보고한 바 있다. 또, 본 연구팀의 pilot실험에서 UA를 단독으로 투여한 실험에서도 현저한 항암작용을 나타냈었는데, 이러한 효과는 UA의 분자량이 456 Kd의 저분자물질이므로, 면역기능을 활성화시켜서 항암작용을 나타내는 것으로 보기는 어렵다고 추측된다. 따라서, 당시에는 확신이 안된채로 어떤 직접적인 세포독성에 의한 것이 다라고만 일단 가정해 놓았으나, 이번 실험에 의해서 UA의 항암작용은 oncogene 발현저지에 의한 것임을 확인하게 된 것이다. 즉, oncogene product가 위에 상설한 분화 및 증식을 촉진함으로써 세포의 무한증식을 가져온다 할 때에, UA를 처리했을 때 UA가 oncogene 발현을 억제 및 감소시킴으로써 oncogene product가 세포의 증식을 가져오는 것을 억제함으로써 암의 진전을 저지시키는 것이라고 결론지을 수 있다. 따라서, 다음의 실험에서 oncogene 발현의 변형이 실제로 암세포 진전에 작용하는 메커니즘을 밝히기 위해서 signal transduction에 oncogene product가 하는 작용에 대해서 실험할 것을 계획하고 있다.

### 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단지원 1991년 목적기초연구의 일환으로 진행된 것으로 지원해 주신 과학재단에 감사드립니다.

### 문 헌

- 1) Moon, T. E.: In *Nutrition and Cancer Prevention*. (T. E. Moon, M. S. Miczzi, eds.) Marcel Dekker Inc., New York, p. 423 (1989).
- 2) Tokuda, H., Ohigashi, H., Koshimizu, K. and Ito, Y.: Inhibitory effects of ursolic acid and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylbol-13-acetate. *Cancer Letter* 33, 279 (1988).
- 3) Lee, C. K., Park, S. W., Chung, H. Y., Suh, S. S. and Park, K. Y.: Mechanism of antitumor effect of ursolic acid from *Eriobotrya japonica*. *S. Kor. Cancer. Assoc.*, 23, 13 (1991).
- 4) Johnson, K. R.: A small-scale plasmid preparation yielding DNA suitable for double-stranded sequencing and *in vitro* transcription. *Anal. Biochem.*, 190, 170-174 (1990).



- 5) Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Bery, P.: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251 (1977).
- 6) Niedobitek, G. G., Finn, T., Herbst, H. and Stein, H.: Detection of vital genomes in the liver by *in situ* hybridization using S-bromodeoxuridine: and biotin-labelled probe. *Am. J. Pathol.*, **134**, 633-639 (1989).
- 7) Seok, S. E., Park, S. S., Lee, D. H., Lee, J. H. and Lee, J. D.: C-myc oncogene expression by *in situ* hybridization in squamous cell carcinoma of the lung. *Kor. J. Int. Med.*, **38**, 4 (1990).
- 8) Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A. and Harlow, E.: Association between an oncogene and antioncogene; The adenovirus E1A protein build to the retinoblastoma gene product. *Nature* **334**, 124 (1988).
- 9) Wright, S. and Bishop, J. M.: DNA sequences that mediate attenuation of transcription from the mouse protooncogene myc. *Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **86**, 505 (1989).
- 10) Levinson, A. D.: Normal and activated ras oncogenes and their encoded products; In *Oncogenes and Growth Factors* (Bradshaw R. A. and Prentis S. ed.), Elsevier, New York, pp. 74-83 (1987).
- 11) Rabbitts, T. H.: The c-myc proto-oncogene: Involvement in chromosomal abnormalities; In *Oncogenes and Growth Factors* (Bradshaw R. A. and Prentis S. ed.), Elsevier, New York, pp. 24-32 (1987).