

## 백서의 간세포막에서 Transferrin Receptor의 발현에 미치는 인삼의 영향

임종호 · 홍장희 · 허강민 · 석정호 · 이재훈\*

충남대학교 의과대학 약리학교실  
(1999년 3월 25일 접수)

### Effect of Korean Ginseng on the Expression of Transferrin Receptor in the Liver Cell Membrane of Rat

Jong-Ho Lim, Jang-Hee Hong, Gang-Min Hur, Jeong-Ho Seok and Jae-Heun Lee\*

Department of Pharmacology, College of Medicine Chungnam National University, Daejeon 301-131, Korea

(Received March 25, 1999)

**Abstract :** To investigate the effects of korean ginseng on the expression of transferrin receptor (TfR) in the liver cell membrane, we had carried out the experiments of [<sup>3</sup>H]thymidine uptake, <sup>125</sup>I-transferrin binding, and TfR mRNA expression in the liver after partial hepatectomy of normal and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) treated rat with or without treatment of korean ginseng. [<sup>3</sup>H]Thymidine uptake was not changed in the liver of 3'-Me-DAB or ginseng treated rat compared to that of control rat, but increased in that of partial hepatectomy of normal or 3'-Me-DAB treated rat. And this increased [<sup>3</sup>H]thymidine uptake was lowered slightly by the treatment of ginseng. Transferrin binding sites in the liver plasma membrane of ginseng treated rat with or without partial hepatectomy were similar, but increased in that of 3'-Me-DAB treated rat with or without partial hepatectomy compared to those of each control rat and these increased binding sites were reduced by ginseng treatment. Transferrin binding affinity (1/kd) was not changed by ginseng treatment, but tended to decrease in the liver of 3'-Me-DAB treated rat or in those after partial hepatectomy of all groups and reverse by ginseng treatment in 3'-Me-DAB treated rat. The expression of TfR mRNA was increased in the liver of 3'-Me-DAB treated rat with partial hepatectomy (peak at 24 hours), but lowered by ginseng treatment in this rat. From these results, it is suggested that korean ginseng has no effect on the increased expression of TfR with decreased affinity in the cell membrane of regenerated liver after partial hepatectomy of rat, but could inhibit that of 3'-Me-DAB treated rat through the regulation of DNA synthesis or TfR mRNA in partial.

**Key words :** Korean ginseng, 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene, partial hepatectomy, transferrin receptor, transferrin receptor mRNA.

## 서 론

모든 세포의 생존, 성장 또는 증식에 필요한 철의 이용은 혈중 transferrin 및 세포막 transferrin receptor (TfR)를 통하여 조절된다. 즉 세포막 TfR는 transferrin

(ferrotransferrin)과 결합한 후 세포내로 이동되어 철이 유리되고, 이 세포내 TfR는 세포의 조건에 따라 세포막 표면으로 재출현하여 다시 transferrin과 결합하여 철의 세포내 유입에 관여하게 된다.<sup>1,7)</sup> 이때 세포막 TfR의 재출현 및 조절은 세포내 철의 양에 따라 조절될 수 있을 뿐만아니라, 세포의 분열, 증식 또는 분화에 따라 달라질 수 있다. 따라서 이 수용체의 세포막 출현정도는 세포증식 또는 세포분화의 척도가 될 수 있는 것으

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-580-8252; (팩스) 042-585-6627  
(E-mail) jhrhee@hambat.chungnam.ac.kr

로 알려져 있다.<sup>8-11)</sup>

세포의 증식에 있어서 간 세포는 재생능이 크기 때문에 간의 부분 절제로 재생 및 분열을 유도하여 실험에 많이 이용하고 있다. 즉 백서에서 간을 부분 절제하면 수술 후 22~24 시간내에 DNA 합성이 급격히 증가하며, 잔류간의 무게는 48시간에 약 50%, 7~10 일경에는 정상 90%이상으로 회복된다.<sup>12,13)</sup> 이때 재생 간세포막에서는 insulin이나 glucagon등의 수용체가 변동될 수 있으며, Tfr도 간의 재생 과정에 따라 증가된 후 감소됨이 보고되어 있다.<sup>13-15)</sup> 또한 많은 화학물질 또는 발암물질이 간에서 Tfr의 양을 증가시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.<sup>16-18)</sup> 그리고 이때의 세포막 Tfr는 인산화 또는 transferrin과의 친화력이 정상 조직에서의 것과 다른 것으로도 보고되어 있다.<sup>19-22)</sup> 그러나 발암물질에 의해 나타날 수 있는 세포막 Tfr의 양적 변동이 이 수용체의 유전자 발현과 관련있는지는 전혀 밝혀진 바 없다.

한편 인삼 또는 그 추출물은 핵산, 지질 및 단백질의 합성 촉진, 혈당 상승, 노화방지 또는 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>23-26)</sup> Byun 등<sup>24)</sup>은 인삼이 폐와 간에서 발암물질에 의한 종양의 발생 및 세포 증식을 억제시키는 효과가 있음을, Kim 등<sup>26)</sup>은 간에서 암 발생에 대한 억제효과가 있음을 보고하였고, 그리고 Kim 등<sup>27)</sup>은 인삼의 석유 에테르 추출물이 L5178Y cell, Hela cell 및 sarcoma 180 cell등의 세포증식을, Cha 등<sup>28)</sup>은 인삼의 폴리사세틸 성분이 암세포의 증식을 억제한다고 보고하였다. 그리고 Kim 등<sup>27)</sup>은 악성 흑색종 세포주(B16 melanoma cell line)를 생쥐에 주입하여 종양을 유도시켰을 때 인삼 투여에 의해 종양 유발이 지연되고 세포분화가 촉진됨을 보고하여, 인삼이 세포증식에 영향을 미칠 수 있음을 시사하고 있다. 그러나 현재까지 인삼의 세포증식에 대한 효과가 세포막 Tfr의 변동 및 Tfr mRNA 발현과 관련있는지는 전혀 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 인삼이 세포증식에서 중요 역할을 하는 세포막 Tfr의 출현 및 Tfr의 유전자 조절에 영향을 미칠 수 있는지 알아보기 위하여, 발암물질인 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene(3'-Me-DAB) 또는 고려인삼을 투여 한 백서에서 부분 간절제 수술을 시행한 후, 간조직에서 [<sup>3</sup>H]thymidine의 유입 및 Tfr mRNA의 발현양을 측정하고, 간세포막을 분리하여 transferrin 결합 실험을 시행하였다.

## 실험방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 Sprague-Dawley 백서는 한국 화학 연구소에서 생후 3주의 수컷을 분양받아 24±4°C로 유지시키며 사료와 물을 자의로 먹을 수 있게 하여 2-3주간 사육한후 실험에 사용하였다. 인삼 총 사포닌(korean ginseng, crude saponin)은 한국 인삼연초연구소에서 공급받았으며, [<sup>3</sup>H]Thymidine, <sup>125</sup>I-Transferrin 및 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP는 DuPont-NEN; soluene-350은 Packard; RNazol kit는 BIOTECX Lab; Tripure Isolation Reagent 및 random primed DNA labelling kit는 Boehringer Mannheim; dNTP, oligo-dT<sub>15</sub>, M-MLV reverse transcriptase, Taq DNA polymerase pBluescript SK(-) vector 및 BamHI/HindIII는 Promega; PCR을 위한 primer(transferrin 및  $\beta$ -actin)는 바이오니아사; nylon membrane은 Amersham; gel extraction kit는 Qiagen; 3'-Me-DAB는 일본 TCI 제품을 사용하였다. 그리고 이 외의 시약들은 Sigma사 제품과 일급 시약을 사용하였다.

### 2. 실험동물의 약물투여 및 부분 간절제 수술

실험동물로는 체중 150 g(5~6주 연령) 내외의 Sprague-Dawley 백서를 표준사료 또는 3'-Me-DAB 함유사료로 사육하여 사용하였다(Table 1). 즉 대조군은 10주간 표준사료로 사육하였고, 인삼투여군도 10주간 표준사료로 사육하되 마지막 2주동안은 물에 0.1%로 녹인

**Table 1.** Constituents of standard and 3'-Me-DAB contained diet

Constituents	Standard diet	3'-Me-DAB contained diet
Casein	180 g	180 g
Corn oil	50 g	50 g
Glucose	712 g	712 g
Salt mixture <sup>a</sup>	40 g	40 g
Vitamin Mixture <sup>b</sup>	18 g	18 g
3'-Me-DAB	-	0.8 g

<sup>a</sup> Mixture of calcium carbamate (2.8 g), calcium citrate (12.2 g), calcium biphosphate (4.4 g), magnesium carbamate (1.4 g), magnesium sulfate(1.5 g), potassium chloride (5 g), dibasic potassium phosphate (8.6 g) and sodium chloride (4 g).

<sup>b</sup> Mixture of corn starch (16 g), biotin (1.5 mg), choline (1.5 g), folate (1 mg), inositol (0.1 g), niacin (51 mg), pantothenate (61 mg), pyridoxine (20 mg), riboflavin (10 mg), Vitamin A (500,000 IU/g; 40mg), Vitamin B1 (20 mg), Vitamin B12 (40  $\mu$ g), Vitamin D3 (500,000 IU/g; 4mg) and Vitamin K(50 mg).

인삼(crude saponin)을 복용시켰다. 발암물질투여군은 3'-Me-DAB 함유사료(8주) 및 표준사료(2주)로, 발암물질처리후 인삼투여군은 3'-Me-DAB 함유사료(8주) 및 인삼 투여와 함께 표준사료(2주)로 사육하였다.

각 실험군의 부분 간절제 수술은 Lee등<sup>29)</sup>의 방법에 준하여 시행하였으며, 수술 후 8시간, 1일, 3일 및 5일에 잔존 간을 적출하여 실험에 사용하였다.

### 3. 조직학적 검사

적출 간조직은 증류수로 씻은 후 10% 중성 포르마린에 고정하고, 파라핀 포매를 한 후 4  $\mu$ m의 두께로 절편을 만들었다. 다음 xylene으로 파라핀을 제거하고 phosphate buffer saline으로 수세한 후 hematoxylin-eosin(H-E) 염색을 시행하여 조직학적 변화를 관찰하였다.

### 4. [<sup>3</sup>H]Thymidine uptake 실험

3'-Me-DAB 또는 인삼 투여 후 재생 간세포에서의 시간 경과에 따른 DNA 합성율의 변화를 알아보기 위하여 Codeiro-Stone등<sup>30)</sup>의 방법에 따라 세포에 유입된 [<sup>3</sup>H]thymidine의 양을 측정하였다. 즉 간 적출 2시간 전에 꼬리 정맥을 통하여 [<sup>3</sup>H]thymidine(0.1  $\mu$ Ci/g of body weight)을 투여한 후 0.5 g의 간조직을 취하여 polytron homogenizer(Kinematica Inst. Co.)로 균질화하였다. 다음 균질화된 조직에 0.5 ml의 solucene-350 용액(Packard)을 가하여 녹인 후 6 ml의 scintillation cocktail(triton X-100 300 ml, toluene 694.5 ml, 2,5-diphenyloxazole 5 g, 1,4-bis-4-methyl-5-phenyl-2-oxazolyl-benzol 0.5 g/l)을 첨가하고 12시간 후 liquid scintillation counter (Packard, Tri-Crab 300C)에서 전입된 방사능을 측정하였다.

### 5. 간세포막의 제조

간세포막에서의 TfR 변동을 관찰하기 위하여 다음과 같은 방법으로 간세포막을 제조하여 실험에 사용하였다. 먼저 간조직을 Tris buffer-A(300 mM mannitol, 5 mM EGTA, 0.1 M phenylmethyl sulfonyl fluoride, 18 mM Tris/HCl pH 7.4)에서 glass teflon homogenizer(Wheaton)로 균질화시킨 후 1,000 rpm에서 15분간 원침시켰다(Sorvall, RC-5B). 다음 상청액을 0.6 M/1.2 M sucrose 용액에 올려놓고 30,000 rpm에서 60분간 원침시킨(Sorvall, OTD-75B) 후 1.2 M sucrose 용액층 위에 있는 막분획을 얻었다. 막분획은 소량의 Tris buffer-B (10 mM Tris/HCl, pH 7.4)에 부유시켜 30분간 원침(3,000 rpm) 시킨 후 소량의 Tris buffer-B에 희석하여 실험에 사용하였다.

이상의 모든 조작은 4°C이하에서 시행하였고, 단백질의 정량은 bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 표준단백으로 하여 Bio-Rad protein assay kit로 측정하였다.

### 6. Transferrin binding assay

간세포막에 존재하는 transferrin 결합부위를 알아보기 위하여 세포막 분획(50~100 g)을 HEPES buffer(100 mM NaCl, 20 mM HEPES, 0.1% BSA, pH 7.4)에서 5분간 preincubation 시킨후, <sup>125</sup>I-transferrin(NEN products; diferric form)을 2~50  $\times 10^{-9}$  M 되도록 첨가하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 비특이성 결합을 알아보기 위해서 HEPES buffer내에 500배의 unlabelled transferrin을 첨가하여 결합 반응을 유도하였으며, unlabelled transferrin이 없을 때의 전체 결합량에서 비특이성 결합량을 뺀 값을 특이성 결합으로 간주하였다. 반응 종료 후 반응액에 차가운 HEPES buffer를 30배 첨가하고 150,000  $\times$  g로 30분간 원침시켜 상청액(유리형 <sup>125</sup>I-transferrin)을 제거하였으며, 이 과정을 2회 더 반복하였다. 원침 후 세포막에 결합된 <sup>125</sup>I-transferrin의 radioactivity를 측정하고( $\gamma$ -counter; Packard, 500-C), 그 결합량을 산출하였다. 그리고 <sup>125</sup>I-transferrin 각 농도에서의 특이성 결합량을 이용하여 Scatchard analysis 방법에 따라 최대 결합 부위(Bmax) 및 Kd 값을 구하였다.

### 7. 간조직에서의 total RNA 분리

간조직으로부터 total RNA의 분리는 RNazol kit (BIOTECX Lab)를 이용하였다. 즉 간조직 0.5 g을 1 ml의 lysis buffer(Tripure Isolation Reagent; Boehringer Mannheim)로 용해시킨 후 50~100  $\mu$ l의 chloroform을 가하여 15초간 혼합하고, 얼음위에서 15분간 방치한 후 12,000 rpm에서 20분간 원침하였다(4°C). 다음 상청액에 동량의 isopropanol을 가하고 -4°C에서 30분간 방치한 후 15분간 원침하였으며, 침사는 다시 DEPC로 처리된 ethanol(80%) 1 ml를 가하여 5분간 원침하였다(12,000 rpm, 4°C). 원침된 RNA는 vaccum dryer로 말린 다음 RNase free water(30  $\mu$ l)에 부유시키고, Spectrophotometer(DU-65, Beckman; 260 nm)를 이용하여 그 농도를 측정하였다.

### 8. 역전사 및 증합효소 연쇄 반응

역전사반응은 먼저 5  $\mu$ g의 total RNA를 5분간 가열(75°C) 및 denaturation 후 얼음에 담가 급냉시켰다. 다음 4  $\mu$ l의 10  $\times$  RT buffer(0.5M Tris-Cl, 0.5M KCl, 0.1M DTT, 0.05M MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0), 4  $\mu$ l의 10  $\times$

dNTP 용액(2.5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1  $\mu$ l 의 oligo-dT<sub>15</sub>(25 pmol/25  $\mu$ l)와 1  $\mu$ l의 M-MLV reverse transcriptase(200 U/ $\mu$ l)를 가하고(총반응액은 40  $\mu$ l가 되도록 증류수 추가), 37°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었다. cDNA 산물은 90°C에서 5분간 가열하여 역전사 효소를 불활성화 시킨 다음 얼음에 담가 급냉하였다.

중합효소 연쇄 반응은 cDNA 산물(5  $\mu$ l)에 4  $\mu$ l의 10  $\times$ PCR buffer(100 mM Tris-Cl pH 8.0, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mg/ml BSA), 4  $\mu$ l의 2.5 mM dNTP, 1  $\mu$ l의 Taq DNA polymerase(0.2 U/ $\mu$ l)와 1  $\mu$ l의 TfR specific primer(20 pmole/ $\mu$ l, 바이오니아사)를 가한 후(총반응액 40  $\mu$ l), PCR thermal cycler(MP-300, Takara, Japan)를 사용하여 33회의 cDNA 증폭반응을 실시하였다. 반응시 denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 60°C에서 1분, extension은 72°C에서 2분간 시행하였다.

중합효소 반응을 위한 백서의 TfR 및  $\beta$ -actin 유전자에 대한 특이적 primer는 GenBank data(accession number M 58040, J 00691)를 기초로 하여 만든 것을 이용하였다(바이오니아사). 즉 백서의 TfR 유전자의 sense primer는 5'ACA GCA GCA GAG GTG GCC G3', antisense primer는 5'AGA GAG GGC ATT TGC AAC TCC C3'으로써, 이 primer가 표적으로 하는 DNA의 크기는 486bp였다. 그리고 백서의  $\beta$ -actin 유전자에 대한 sense primer는 5'TGG AGA AGA GCT ATG AGC TGC CTG3', antisense primer는 5'GTG CCA CCA GAC AGC ACT GTG TTG3'이었으며, 이 primer가 표적으로 하는 DNA의 크기는 290 bp였다.

중합효소 연쇄 반응으로 증폭된 반응 산물은 20  $\mu$ l의 10 $\times$ gel loading buffer(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 50% glycerol)와 섞어, 1.5% agarose gel [ethidium bromide(1  $\mu$ g/ml)함유]에서 Tris-Acetate-EDTA(TAE) buffer로 전기영동 하였으며, 이동한 DNA band의 위치는 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)로 관찰하였다.

### 9. Southern Blot Hybridization

역전사 및 중합효소 반응에 의한 산물(TfR cDNA)의 확인 및 양적 변동을 동정하기 위하여 southern blot hybridization을 시행하였다. 즉 반응산물을 1.2% agarose gel에서 전기영동시키고, gel상의 DNA를 denaturation 용액(1.5M NaCl, 0.5N NaOH) 및 neutralization 용액(1M Tris-Cl, 1.5M NaCl, pH 7.4)에서 각각 45분간 반응시켰다. 이어 DNA를 전기영동시키고

(capillary), 10 $\times$ SSC(1 $\times$ SSC; 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH7.2)를 이용하여 gel로부터 nylon membrane에 이동시키고 baking한 다음, UV 조사(UV-crosslinker)로 membrane에 crosslinking시켰다. 건조된 DNA blot을 hybridization 용액(50% formamide, 6 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denhardt's solution, 0.5% SDS, 100  $\mu$ g/ml denatured salmon sperm DNA)에서 4시간 이상 prehybridization 한 후, probe (106 cpm/ml)가 포함된 hybridization 용액으로 24시간 hybridization 하였다(42°C). Hybridization이 끝난 membrane은 0.5% SDS가 함유된 1 $\times$ SSC 용액으로 10분간, 0.1% SDS가 함유된 0.5 $\times$ SSC 용액으로 20 분간 세척한 후, X-ray 필름에 노출시켰다(-70°C).

이때 probe는 역전사 효소중합 연쇄 반응산물을 pBluescript SK(-) vector를 이용하여 cloning한 후, BamHI/HindIII로 절단(500 bp) 및 gel extraction kit로 elution하고 random primed DNA labelling kit로 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP를 labelling하여 사용하였다.

## 결 과

### 1. 3'-Me-DAB 투여에 의한 간의 조직학적 변동

본 실험에서는 백서에 인삼을 투여하면 간조직에 큰 형태학적 변화가 없었지만, 발암물질인 3'-Me-DAB를 투여하였을 때는 현저한 변화가 동반되었다(Fig. 1). 즉 이 약물 투여시 전반적으로 간의 소엽성 형태는 유지되고 있었으나, 간 실질조직의 괴사, 담관증식, 문맥부위와 문맥부위를 연결하는 교량성 괴사(bridging necrosis), 말단 간 세정맥(terminal hepatic venule) 주위의 수포성 변성, 임파구 침윤, 지방성 변화 및 이상세포의 증식(atypical proliferation)이 관찰되었다. 그러나 이 변화는 3'-Me-DAB처리후 인삼을 투여한 백서에서도 비슷하였다.

### 2. 간조직에서의 [<sup>3</sup>H]thymidine 유입량

부분 간절제 수술을 하지 않은 대조군에서 유입된 [<sup>3</sup>H]thymidine의 양은 약 1200~1300 cpm/g liver tissue으로 나타났으며, 인삼 또는 3'-Me-DAB 투여군에서도 비슷한 양으로 유입되었다. 부분 간절제 수술후 1일째의 [<sup>3</sup>H]thymidine 유입량은 대조군에서 약 6000 cpm/g liver tissue으로 약 5배의 현저한 증가를 보였으며, 3'-Me-DAB를 투여한 백서에서는 8000 cpm/g liver tissue으로 약 7배 증가되어 3'-Me-DAB투여로 인하여

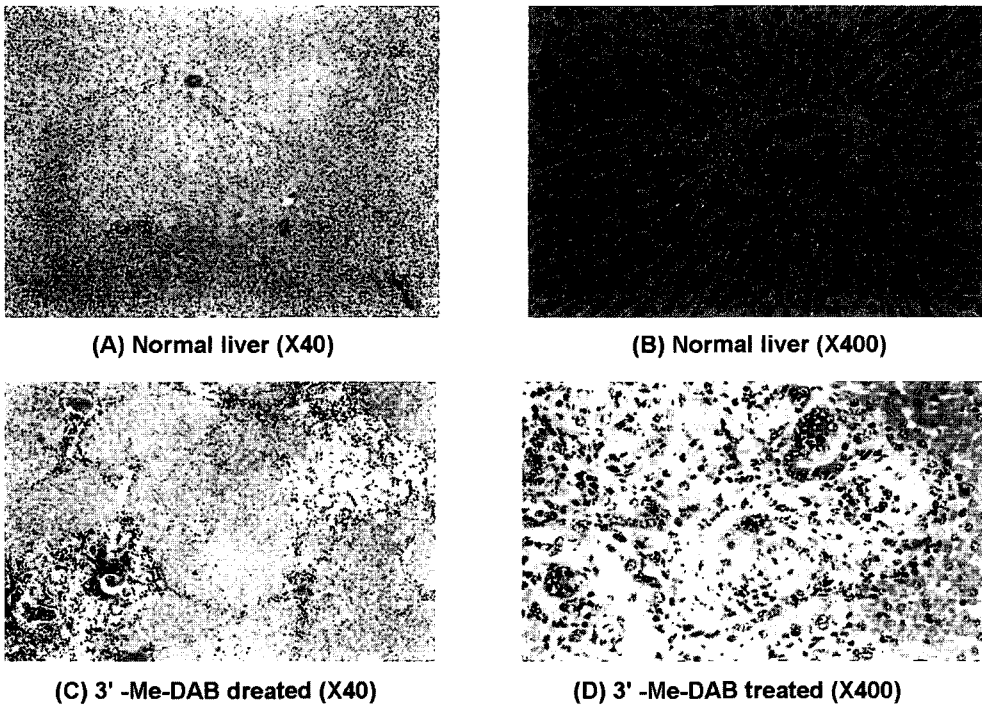


Fig. 1. Histological findings of the liver of normal or 3'-Me-DAB treated rat.

In microscopic findings of the liver of 3'-Me-DAB treated rat (C, D), there are scattered necrotic areas with advanced bridging necrosis, lymphocytic infiltration, hyperplastic nodules of hepatocytes and proliferations of bile ducts. A, B; liver of normal rat(A:  $\times 40$ , B:  $\times 00$ ). C, D; liver of 3'-Me-DAB treated rat(C:  $\times 40$ , D:  $\times 400$ ).

간세포에서의 DNA 합성율이 더욱 증가됨을 나타내었다. 그러나 인삼만 처리한 백서에서는 대조군의 수술 1일 후 간조직에서의 유입량과 비슷하였다. 그리고 3'-Me-DAB처리후 인삼을 투여한 백서의 수술후 1일째에서는 그 유입량이 약 7000 cpm/g liver tissue으로 3'-Me-DAB만 투여했을 때의 유입량에 비하여 감소된 경향을 보였다. 그리고 모든 그룹에서 부분 간절제 수술 후 3일째와 5일째는 정상으로 회복되는 경향을 보였다(Fig. 2).

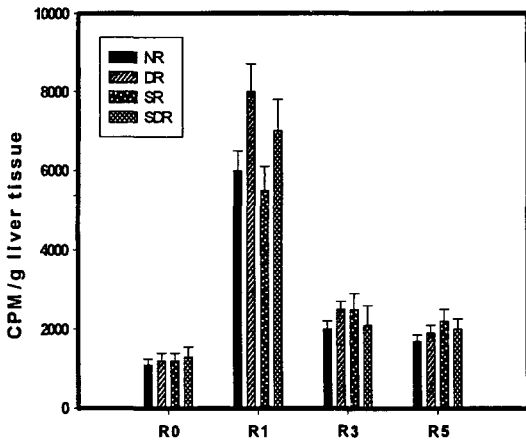
### 3. 간세포막에서 transferrin 결합에 대한 인삼 및 3'-Me-DAB의 영향

대조군, 인삼, 3'-Me-DAB 또는 3'-Me-DAB처리후 인삼투여 백서의 간세포막에서 transferrin의 결합은 반응액내 transferrin의 농도에 따라 20 nM 까지는 급격히 증가되나 이후 포화되는 양상을 나타냄으로써 간세포막에서의 transferrin에 대한 결합은 고친화성(high affinity) 형태로 이루어짐을 알 수 있었다(Fig. 3). 이때 scatchard analysis에 의해 구한 transferrin의 최대결합량은 대조군 및 인삼투여군에서 각각 6.87 및 7.09

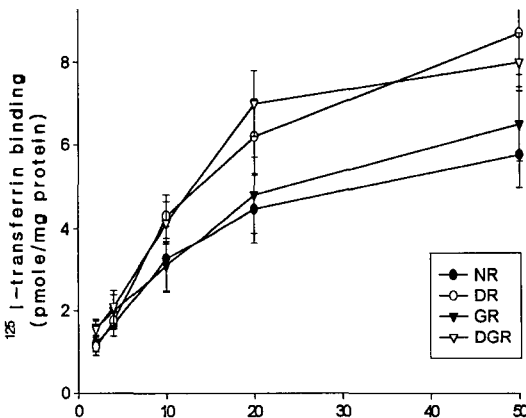
pmole/mg protein으로써 서로 차이가 없는 것으로 나타났으나, 3'-Me-DAB투여군에서는 12.87 pmole/mg protein으로 대조군에 비해 크게 증가되었다. 그리고 3'-Me-DAB처리후 인삼투여군에서의 최대결합량은 10.67 pmole/mg protein으로 3'-Me-DAB만을 투여한 그룹에 비해 감소된 경향을 보였다. 한편 transferrin 결합의 Kd는 대조군, 인삼투여군 및 3'-Me-DAB처리후 인삼투여군에서는 약 8~14 nM 이었으나, 3'-Me-DAB처리군에서는 22 nM로 증가되는 경향을 보였다(Table 2).

### 4. 재생간 세포막에서 transferrin 결합에 대한 인삼 및 3'-Me-DAB의 영향

모든 실험군에서 부분 간절제 수술을 하면 수술 후 3일째의 간세포막에서는 transferrin의 결합량 및 Kd가 증가되었고, 수술후 5일에는 회복된 양상을 나타내었다(Table 2). 이때 정상 백서 및 인삼투여군에서의 경우 간절제 수술 3일 후 간세포막 transferrin의 최대결합량은 각각 23.63 및 25.89 pmol/mg protein, Kd는 양군에서 약 30 nM로써 수술전 보다 비슷하게 증가되었다. 그러나 3'-Me-DAB 투여군에서는 수술 후 3일에



**Fig. 2.** Effects of ginseng on  $[^3\text{H}]$ thymidine uptake in to the liver of normal and 3'-Me-DAB treated rat with or without partial hepatectomy. Liver tissue (0.5 g) was removed at 2 hours after injection of  $[^3\text{H}]$  thymidine (0.1  $\mu\text{Ci/g}$  body weight) through the vein of tail of rat, and the radioactivity of  $[^3\text{H}]$ thymidine uptaked into this tissue was counted. NR; liver of normal rat, DR; liver of 3'-Me-DAB treated rat, GR; liver of ginseng treated rat, DGR; liver of 3'-Me-DAB and ginseng treated rat. R0; liver of rat before partial hepatectomy. R1, R3, or R5; liver of 1, 3, or 5 days after partial hepatectomy. Each point represent the mean  $\pm$  SE of 4 experiments.



**Fig. 3.** Effects of ginseng on the transferrin binding sites in the liver cell membrane of normal and 3'-Me-DAB treated rat. Isolated liver cell membrane (50  $\mu\text{g}$ ) was incubated at 37°C with indicated concentration of  $^{125}\text{I}$ -transferrin for 30 min, and each aliquate was centrifuged to remove the free form. To determine the specific bindings from nonspecific bindings, reaction was also induced in the presence of 500 fold unlabeled transferrin. Each point represents the mean  $\pm$  SE of 4 experiments. Legends are the same as in the Fig. 2.

**Table 2.** Effects of ginseng on the transferrin binding sites ( $B_{\text{max}}$ ) and their affinities ( $K_d$ ) in the liver cell membrane of normal and 3'-Me-DAB treated rat with or without partial hepatectomy

Liver cell membrane	$K_d$ (nM)	$B_{\text{max}}$ (pmole/mg protein)
Normal rat		
R0	10.64 $\pm$ 1.05	6.87 $\pm$ 1.23
R3	28.81 $\pm$ 1.72	23.63 $\pm$ 1.17
R5	13.67 $\pm$ 1.20	15.65 $\pm$ 1.63
Ginseng treated rat		
R0	8.80 $\pm$ 1.50	7.09 $\pm$ 1.13
R3	30.57 $\pm$ 2.12	25.89 $\pm$ 1.06
R5	19.19 $\pm$ 1.16	16.52 $\pm$ 1.83
3'-Me-DAB treated rat		
R0	22.10 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	12.87 $\pm$ 1.44 <sup>a</sup>
R3	40.14 $\pm$ 5.01 <sup>a</sup>	48.65 $\pm$ 2.77 <sup>a</sup>
R5	25.97 $\pm$ 2.88 <sup>a</sup>	24.03 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>
3'-Me-DAB+Ginseng treated rat		
R0	13.69 $\pm$ 1.18 <sup>b</sup>	10.67 $\pm$ 0.83
R3	26.68 $\pm$ 1.75 <sup>b</sup>	31.88 $\pm$ 1.57 <sup>b</sup>
R5	22.30 $\pm$ 1.50	23.03 $\pm$ 1.33

$K_d$  and  $B_{\text{max}}$  were calculated by scatchard analysis from data obtained with 4 experiments as in Fig. 3. Legends are the same as in Fig. 2. Values represent mean  $\pm$  SE of 4 experiments.

<sup>a</sup>; significantly different from normal rat ( $p < 0.01$ ).

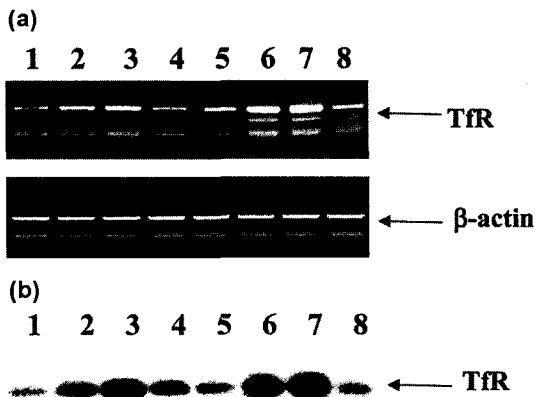
<sup>b</sup>; significantly different from 3'-Me-DAB treated rat ( $p < 0.05$ ).

transferrin의 최대결합량이 48.65 pmol/mg protein으로써 대조군 및 인삼투여군에 비해 현저한 증가를 보였으며,  $K_d$ 도 40.14 nM로 증가된 경향을 보였다.

한편 3'-Me-DAB처치후 인삼투여군의 수술 후 3일째에서는 transferrin의 최대결합량이 31.88 pmol/mg protein으로써, 3'-Me-DAB투여군의 수술 후 3일째에서의 결합량과 비교하면 약 35% 감소됨을 보였다. 그리고 transferrin 결합에 대한  $K_d$ 도 약 27 nM로써, 3'-Me-DAB 투여 후의 것에 비해 감소되었다. 따라서 인삼은 부분 간절제 후 증가되는 간세포막 TfR에는 영향을 미치지 않지만, 발암물질투여에 의해 증가되는 간세포막 TfR에는 이의 양 및 친화력에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.

**5. 간조직에서 TfR mRNA의 발현에 미치는 3'-Me-DAB 및 인삼의 영향**

앞 실험성적에서 간절제 수술 후 및 3'-Me-DAB 투여군의 간세포막에서는 transferrin 결합량이 증가되었는데, 이 변동이 TfR mRNA 변동과 관련이 있는 지 간조직의 TfR mRNA 발현을 관찰하여 보았다. 대조군에



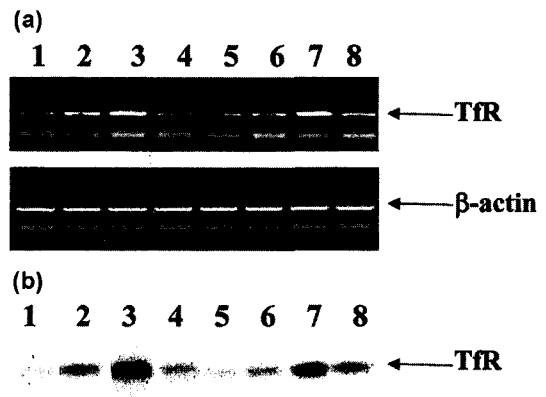
**Fig. 4.** Expressions of transferrin receptor mRNA in the liver of normal and 3'-Me-DAB treated rat. RT-PCR was conducted with RNA prepared from the liver tissue of normal or 3'-Me-DAB treated rat(a), and each PCR product was electrophoresed or subjected to southern hybridization(b) with the cDNA probe of transferrin receptor. Lane 1; liver of normal rat before partial hepatectomy, lane 2, 3, and 4; liver of 8 hours, 1 day, and 3 days after partial hepatectomy of normal rat, lane 5; liver of 3'-Me-DAB treated rat before partial hepatectomy, lane 6, 7, and 8; liver of 8 hours, 1 day, and 3 days after partial hepatectomy of 3'-Me-DAB treated rat.

서 간절제 수술전 간조직에는 Tfr mRNA가 약하게 발현되었으나, 수술 후 8시간부터 증가하기 시작하여 24시간에 최대로 증가되었고, 72시간째는 감소되는 양상을 보였다. 또한 3'-Me-DAB 투여군의 간조직에서도 Tfr mRNA 발현이 증가되었으며, 간절제 수술 후 더욱 증가되는 양상을 보였다 (Fig. 4).

그리고 정상백서의 간절제 수술 후 간세포막에서 증가된 transferrin 결합량은 인삼에 의해 영향을 받지 않았지만, 3'-Me-DAB처리 또는 3'-Me-DAB처리 후 간절제 수술에 의해 증가된 transferrin 결합량은 인삼에 의해 억제되었는 바, 이 변동도 Tfr mRNA 발현과 관련이 있는 지 관찰하여 보았다. 실험 결과 인삼은 3'-Me-DAB 투여 및 간절제 수술 8시간 및 24시간 후 간에서의 Tfr mRNA 발현을 감소시킨 것으로 나타났다(Fig. 5).

**고 찰**

간세포의 증식은 간의 부분절제 및 약물투여에 의해 유발될 수 있으며, 약물에 따라서는 즉 diethylnitro-



**Fig. 5.** Effects of ginseng on the expressions of transferrin receptor mRNA in the liver of 3'-Me-DAB treated rat with or without partial hepatectomy. RT-PCR was conducted with RNA prepared from the liver tissue of 3'-Me-DAB and/or ginseng treated rat(A), and each PCR product was electrophoresed or subjected to southern hybridization(B) with the cDNA probe of transferrin receptor. Lane 1; liver of 3'-Me-DAB treated rat before partial hepatectomy, lane 2, 3, and 4; liver of 8 hours, 1 day, and 3 days after partial hepatectomy of 3'-Me-DAB treated rat, lane 5; liver of 3'-Me-DAB and ginseng treated rat before partial hepatectomy, lane 6, 7, and 8; liver of 8 hour, 1 day, and 3 days after partial hepatectomy of 3'-Me-DAB and ginseng treated rat.

samine, dimethylnitrosamine, 2-acetylaminoflurane 또는 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene(3'-Me-DAB)등을 투여하였을 때는 전암병변으로 여겨지는 간세포의 이형성 변화, oval cell의 증식, 간세포의 과증식 결절, cholangiofibrosis등의 병변들이 나타나는 것으로 알려져 있다.<sup>20-22, 31-33</sup> 본실험에서도 8주간 0.08%의 3'-Me-DAB를 투여하였을 때 담관의 증식, 림프구 침윤, 담관의 이상 증식 및 교량성 괴사등의 현저한 간조직의 형태학적 변화가 동반되었다. 그러나 이 약물투여 후 부분간절제 수술을 하였을 때 수술후 경과에 따른 형태학적 차이는 별로 없었으며, 2주간 인삼을 추가로 투여한 백서의 간에서도 뚜렷한 형태학적 차이가 없었다.

한편 인삼은 중추신경계, 심장혈관계, 내분비계 및 면역계등에 다양한 효능을 발휘할 수 있는 것으로 보고되어 있다.<sup>23-26</sup> 또한 인삼은 생쥐의 섬유아세포에서 DNA 합성 및 세포 증식을 억제시킬 수 있는 것도 보고되어 있다.<sup>24</sup> 그리고 인삼의 세포증식에 대한 억제효과는 관련세포에 대한 직접작용 및 숙주의 방어능력 또는 면역기전의 강화와 같은 간접작용으로 이루어질 수

있다.<sup>25,34,35)</sup> 본실험에서는 인삼, 3'-Me-DAB 또는 3'-Me-DAB 및 인삼의 투여는 백서의 간조직에서 [<sup>3</sup>H]thymidine 유입에 영향을 미치지 않았지만, 부분 간절제 후 1일 간조직에서는 [<sup>3</sup>H]thymidine 유입이 현저히 증가되었으며, 이는 3'-Me-DAB의 전처리군에서 더욱 증가되었다. 또한 3'-Me-DAB 투여 후 부분 간절제에 의해 증가된 [<sup>3</sup>H]thymidine 유입은 인삼에 의해 억제되었다. 따라서 간조직에서의 핵산 합성은 간절제로 증가되지만, 이와 함께 3'-Me-DAB 등의 화학적 자극이 있을 때는 더욱 촉진될 수 있으며, 이때 인삼은 핵산 합성에 대한 직접작용으로 세포의 증식을 일부 억제시킬 수 있을 것으로 생각된다.

세포막의 TfR는 정상적인 세포분열 조직 또는 비정상적인 증식세포 또는 암세포에서 증가되어 있으며, 간절제 후의 재생간에서도 증가됨은 잘 알려져 있는 사실이다.<sup>8-11)</sup> 즉 Akiko등<sup>14,15)</sup>에 의하면 정상적인 상태의 간세포막에는 단지 적은 수의 TfR를 갖고 있지만, 부분 간절제에 의하여 세포증식이 유도되면 TfR가 증가되고 세포의 증식이 끝나면 다시 감소하여 간세포막 TfR의 변동은 간세포 증식의 중요한 기준이 될 수 있음을 시사하였다. 본 실험에서도 간세포막에서의 transferrin 결합량은 간절제 수술 후 증가되었으나, 수술 후 5일에는 감소되는 양상을 나타냄으로써 다른 보고자의 결과와 일치됨을 보였다. 그리고 3'-Me-DAB 투여 및 3'-Me-DAB 투여 후 간절제 수술에 의하여 간세포막에서의 transferrin 결합량은 현저하게 증가되었으며, 이는 인삼에 의하여 그 결합량이 유의하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 인삼 단독 투여군에서는 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 또한 transferrin의 결합에 대한 Kd도 3'-Me-DAB투여 및 간절제 수술 후 간세포막에서의 transferrin 결합량 변동과 함께 변동되는 경향을 보였다. 따라서 발암물질 투여 또는 부분 간절제 수술에 의해 간세포막에는 친화력이 저하된 TfR가 양적으로 증가될 수 있지만, 인삼은 발암물질에 의한 TfR의 증가를 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

또한 세포막 TfR는 세포내로부터의 재출현 뿐만 아니라, 최근 유전자의 발현 조절에 의해서도 변동될 수 있음이 알려져 있다.<sup>36,37)</sup> 그리고 이러한 TfR 유전자의 조절에 있어서 전사조절물질(transcriptional factor)인 철 조절 단백질 밝혀짐으로서 세포의 증식과 관련된 TfR의 발현에 관심이 집중되고 있는 실정이다.<sup>37-42)</sup> 즉

Cairo등<sup>36)</sup>의 연구에 의하면 백서의 부분 간절제 수술 후 8시간에 TfR의 유전자 발현이 증가하기 시작하여 16시간에 최대로 발현된 후 감소되며, 이 수용체의 유전자는 주로 전사후 단계에서 조절되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서도 정상 백서의 간절제 수술 후 8시간에 TfR mRNA 발현이 증가되기 시작하여 24시간에 최대로 증가된 후 72시간에는 감소됨을 관찰하여 Cairo 등<sup>36)</sup>의 연구와 일치된 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 이 결과가 thymidine 유입 실험 결과와 일치하는 점으로 보아 이 유전자는 전사단계에서도 조절될 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 3'-Me-DAB 투여군 또는 3'-Me-DAB 투여 및 간절제 수술군에서의 TfR mRNA 발현은 각각의 대조군에 비교하여 특히 수술 후 8시간 및 24시간에 크게 증가되었으며, 이때의 TfR 유전자 발현은 인삼에 의하여 억제되었다. 따라서 인삼은 세포 증식이 활발한 상태에서 더욱 증가될 수 있는 TfR 유전자의 발현을 억제시킬 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 인삼은 다양한 성분들로 조성되어 각각 다른 작용을 나타낼 수 있으므로,<sup>27,43-45)</sup> TfR의 세포막 출현 및 유전자 발현에 미치는 영향을 확실히 규명하기 위해서는 단일 조성의 화학물로 확인하여야 할 것이다.

## 요 약

본 실험은 백서의 간세포막에서 transferrin receptor(TfR)의 발현에 미치는 인삼 및 3'-methyl-4-dimethylaminobenzene(3'-Me-DAB)의 영향을 연구하기 위하여, 인삼, 3'-Me-DAB 또는 3'-Me-DAB처리후 인삼을 투여한 백서를 부분 간절제한 후 간조직에서 [<sup>3</sup>H]thymidine uptake 및 transferrin 수용체의 유전자 발현 실험, 그리고 간세포막에서 <sup>125</sup>I-transferrin 결합 실험을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 8주간 3'-Me-DAB를 투여한 백서에서 간조직의 조직학적 소견은 림프구의 침윤, 담관세포의 증식, 교량성괴사 및 이상세포의 증식 소견을 보였다. 그러나 정상 또는 3'-Me-DAB를 투여한 백서에 인삼을 투여하였을 때 간조직의 조직학적 소견은 각각의 대조군에 비해 크게 변화되지 않았다.

2. 인삼 또는 3'-Me-DAB를 투여한 백서에서의 [<sup>3</sup>H]thymidine uptake는 대조군에서와 비슷하였으나, 부분 간절제 수술 후 1일째 간에서는 수술 전보다 현저하게 증가되었다. 특히 3'-Me-DAB투여군의 간조직에서 더



증가되었으며, 이는 인삼 투여에 의해 억제되는 경향을 보였다.

3. 간세포막에서의 transferrin 결합량(Bmax) 및 Kd는 정상 백서에서 각각 6.87 pmole/mg protein 및 10.64 nM이었으며, 인삼 투여에 의해 크게 변동되지 않았다. 그러나 3'-Me-DAB를 투여한 백서에서는 Bmax 및 Kd가 증가되었고, 이 증가는 인삼투여에 의해 감소되었다. 부분 간절제 수술 후 간세포막에서의 Bmax 및 Kd는 모든 그룹에서 수술 후 3일째에는 증가, 수술 후 5일째에는 감소되는 양상을 나타냈다. 그러나 3'-Me-DAB투여 후 간절제 수술군에서의 증가가 가장 컸으며, 이 증가효과는 인삼 투여에 의하여 억제되었다.

4. 부분 간절제 수술 후 간조직에서의 TfR mRNA 발현은 수술 후 24시간에 최대로 증가되었으며, 이는 3'-Me-DAB를 투여한 백서에서 더 현저하였다. 그리고 인삼은 3'-Me-DAB투여 후 간절제 수술군에서 증가된 발현양을 약간 감소시켰다.

이상의 결과로 백서에서 부분 간절제 수술 및 발암 물질에 의해 간세포막 transferrin 수용체는 친화력이 저하된 TfR이 증가될 수 있으며, 이는 일부 이 수용체의 유전자 수준에서 조절될 수 있는 것으로 생각된다. 그리고 인삼은 발암물질 투여등으로 간세포의 증식이 촉진되었을 때, 간세포내 핵산 합성 및 TfR mRNA 발현 조절을 통하여 세포막의 TfR 출현 및 세포증식을 억제시킬 수 있을 것으로 추측된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1994년도 한국담배인삼공사의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 인 용 문 헌

- May, W. S. and Cuatrecasas, P. : *J. Memb. Biol.* **88**, 144-149 (1975).
- Bottwell, T. H., Pirzio-Biroli, G. and Finch, C. A. : *J. Lab. Clin. Med.* **51**, 24-36 (1958).
- Trowbridge, I. S. and Omary, M. B. : *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 3039-3043 (1981).
- Sutherland, R., Delia, D., Schneider, C., Newman, R., Kemshead, J. and Greaves, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 4515-4519 (1981).
- Fraizer, J. L., Caskey, J. H., Yoffe, M. and Seligman, P. A. : *J. Clin. Invest.* **69**, 853-865 (1982).
- Seligman, P. A. : *Prog. Hematol.* **13**, 29-83 (1976).
- Young, S. and Bomford, A. : *Clin. Sci.* **67**, 273-278 (1983).
- Keer, H. N., Kozlowski, J. M., Tsai, Y. C., Lee, C., McEwan, R. N. and Grayhack, J. T. : *J. Urol.* **143**, 381-385 (1990).
- Ursula, M. E., Liem, H. H., Grasso, J. A., Sussane, G. K., Defalco, M. G. and Katz, N. R. : *J. Biol. Chem.* **263**, 14573-14576 (1988).
- Girons, N. and Davis, R. J. : *Biochem. J.* **164**, 35-46 (1989).
- Lee, J. H., Ro, E. S., Hur, G. M., Lee, C. S. and Seok, J. H. : *Korean J. Pharmacol.* **29**, 85-96 (1993).
- Bucher, N. L. R. : *New Engl. J. Med.* **277**(13), 686-696 (1967).
- Pezzino, V., Vigineri, R., Cohen, D. and Goodfine, I. D. : *Endocrinol.* **108**(6), 2163-2169 (1967).
- Akiko, H. K., Sakai, H. and Akamatsu, N. : *J. Biochem.* **16**(6), 601-605 (1989).
- Akiko, H. K. and Akamatsu, N. : *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **164**(3), 1105-1122 (1989).
- Goldfarb, S. : *Cancer Res.* **33**, 1119-1128 (1973).
- Tsao, M. and Grisham, J. W. : *Am. J. pathol.* **127**, 168-181 (1987).
- Park, C. I., Kim, H. J., Jin, S. Y. and Yang, W. I. : *Kor. J. Path.* **25**(1), 21-29 (1991).
- Sorokin, L. M., Morgan, E. H. and Yeoh, G. C. T. : *J. Biol. Chem.* **263**(28), 14218-14133 (1988).
- Jing, S., Spencer, T., Miller, K., Hopkins, C. and Trowbridge, I. S. : *J. Cell Biol.* **110**(2), 283-94 (1990).
- Rothenberger, S., Iacopetta, B. J. and Kuhn, L. C. : *Cell* **49**, 423-431 (1987).
- Ishguro, K., Ho, P. T. and Sartorelli, A. C. : *Somat. Cell Mol. Genet.* **18**(1), 45-63 (1992).
- Kim, H. S., Seong, Y. H., Yang, W. Y., Jeon, B. S., Park, U. Y., Park, W. K., Oh, K. W. and Choi, K. J. : *Kor. J. Ginseng Sci.* **21**(3), 169-173 (1997).
- Byun, B. H., Shin, I., Lee, L. and Joe, C. O. : *Kor. J. Ginseng Sci.* **19**(2), 114-116 (1995).
- Suh, S. O., Jeung, C. H., Cho, M. Y. and Soon, G. S. : *Kor. J. Ginseng Sci.* **22**(1), 32-42 (1998).
- Kim, K. H., Jung, I. S., Chung, H. Y., Jo, S. K. and Yun, Y. S. : *Kor. J. Ginseng Sci.* **21**(2), 78-84 (1997).
- Kim, Y. S., Kim, D. S. and Kim, S. I. : *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**(3), 327-338 (1998).
- Cha, S. M. : *Kor. J. Pharmacognosy* **8**, 1-11 (1977).
- Lee, S., Broelsch, C. E. Flamant, Y. M., Chandler, J. G.,

- Charter, A. C. III. and Orloff, M. J. : *Surgery* **77**, 144-149 (1975).
30. Cordeiro-Stone, M. and Kaufman, D. G. : *Biochemistry* **24**, 4815-4818 (1985).
31. Cayoma, E., Tsuda, H., Sarma, D. S. R. and Farber, E. : *Nature* **257**, 60-62 (1978).
32. Solt, D. B., Medline, A. and Farber, E. : *Am. J. Pathol.* **88**, 595-607 (1977).
33. Epstein, S. M., Ito, N., Merkow, L. and Farber, E. : *Cancer Res.* **27**, 1702-1709 (1967).
34. Yuan, G. C. and Chang, R. S. : *J. Gerontol.* **24**, 82-93 (1969).
35. Lee, K. D. and Heumer, R. P. : *Japan J. Pharm.* **21**, 299-308 (1971).
36. Cairo, G. and Pietranelo, A. : *J. Biol. Chem.* **269**(9), 6405-6409 (1994).
37. Rouault, T. A., Haile, D. H. and Downey, W. E. : *Biometals* **5**, 131-140 (1992).
38. Leibold, E. A. and Guo, B. : *Ann. Rev. Nutr.* **12**, 345-368 (1992).
39. Kuhn, L. C. and Hentze, M. W. : *J. Inorg. Biochem.* **47**, 183-195 (1992).
40. Klausner, R. D., Rouault, T. A. and Harford, J. B. : *Cell* **72**, 19-28 (1993).
41. Theil, E. C. : *Biochem. J.* **304**, 1-11 (1994).
42. Iwai, K., Klausner, R. D. and Rouault, T. A. : *EMBO J.* **14**(21), 5350-5357 (1995).
43. Gillis, C. N. : *Biochem. Pharmacol.* **54**(1), 1-8 (1997).
44. Lee, Y. J., Chung, E., Lee, K. Y., Lee, Y. H., Huh, B. and Lee, S. K. : *Mol. Cell Endocrinol.* **133**(2), 135-140 (1997).
45. Kim, Y. C., Kim, S.R., Markelonis, G. J. and Oh, T. H. : *J. Neurosci. Res.* **53**(4), 426-32 (1998).