

## 인간 폐암세포 A549에서 Nrf2 및 Nrf2에 의해 조절되는 단백질에 대한 Ginsenoside Rg3의 효과

<sup>1</sup>연세대학교 대학원 응용생명과학과, <sup>2</sup>연세대학교 치과대학 구강생물학교실, 구강종양연구소,  
<sup>3</sup>서울대학교 약학대학

김현정<sup>1,2</sup> · 이창기<sup>2</sup> · 박광균<sup>1,2</sup> · 김영식<sup>3</sup> · 정원윤<sup>1,2</sup>

### Ginsenoside Rg3 Inhibits the Expressions of Nrf2-mediated Cytoprotective and Multidrug-associated Proteins in A549 Human Lung Cancer Cells

Hyun Jeong Kim<sup>1,2</sup>, Chang Ki Lee<sup>2</sup>, Kwang-Kyun Park<sup>1,2</sup>, Yeong-Sik Kim<sup>3</sup> and Won-Yoon Chung<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Life Science, Graduate School, Yonsei University, Seoul 120-752, <sup>2</sup>Department of Oral Biology, Oral Cancer Research Institute, Yonsei University College of Dentistry, Seoul 120-749,

<sup>3</sup>College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 150-742, Korea

The Nrf2 signaling plays an important role in regulating cellular defense system. Under normal cellular conditions, Nrf2 can be described as an anti-tumor molecule inducing antioxidative and cytoprotective genes which protect cells from electrophile and oxidative damage. However, in cancerous cells, Nrf2 takes on a pro-tumoral identity as the same cytoprotective genes can enhance resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs. We investigated whether Rg3 could inhibit Nrf2-mediated defense systems in A549 human lung cancer cells with constitutively overexpressed Nrf2. Rg3 decreased cell viability in a dose-dependent manner. Rg3 inhibited the expression of Nrf2 and its downstream proteins, HO-1, NQO-1,  $\gamma$ -GCS and MRP-1 in a time- and dose-dependent manner in A549 cells. In both cytoplasmic and nuclear fractions, Rg3 decreased Nrf2 and pNrf2 levels. In immunocytochemical analysis, Nrf2 showed a significantly decreased level in nucleus of A549 cells treated with Rg3 for 4 h. Furthermore, the combined treatment with Rg3 and cisplatin enhanced cytotoxicity in A549 cells compared with cisplatin or Rg3-treated cells. Taken together, Rg3 reduces Nrf2 nuclear level by inhibiting its expression and translocation into nucleus. This effect may be closely associated with the cytotoxicity of Rg3 and the increased cytotoxicity of cisplatin in Rg3-treated A549 cells. (*Cancer Prev Res* 16, 216-222, 2011)

**Key Words:** Ginsenoside Rg3, Nrf2, A549 human lung cancer cells

## 서 론

폐암은 가장 흔히 진단되는 암 중 하나이고 암 사례의 15~30%를 차지하며, 비소세포성 폐암(Non-small cell lung cancer, NSCLC)이 임상에서 진단되는 폐암의 85%이

상을 차지하는 것으로 알려져 있다. 현재 폐암은 화학요법을 시행할 경우 내인성 다제약제 내성(multidrug-resistance)으로 인해 치료가 어려운데, p53, pAKT, apoptosis-inducing factor, multidrug resistance-associated protein (MRP)과 같은 여러 단백질의 발현이 항암제 내성과 관련 있는 것으로 보고되어 있다.<sup>1)</sup> 비소세포성 폐암에 속하는 A549

책임저자 : 정원윤, ☎ 120-752, 서울시 서대문구 연세로 50  
연세대학교 치과대학 구강생물학교실  
Tel: 02-2228-3057, Fax: 02-364-7113  
E-mail: wychung@yuhs.ac

접수일 : 2011년 7월 21일, 1차 수정일 : 2011년 7월 26일,  
2차 수정일 : 2011년 7월 28일, 게재승인일 : 2011년 8월 2일

Correspondence to : Won-Yoon Chung  
Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry, 50,  
Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea  
Tel: +82-2-2228-3057, Fax: +82-2-364-7113  
E-mail: wychung@yuhs.ac

인간 폐암세포주에 cisplatin, doxorubicin과 같은 항암제들을 처리할 경우 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되어 세포독성을 나타낸다. 암환자에서는 이들 항암제에 의해 생성되는 ROS가 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 세포독성을 나타내어 간, 신장, 귀 손상과 빈혈 등의 부작용이 발생하는데 이로 인해 암환자에 대한 지속적인 치료가 어려워지는 것으로 알려져 있다.<sup>2,3)</sup> 따라서 폐암세포의 성장을 억제하는 효과가 뛰어난 한편 환자의 건강 증진에도 도움이 되는 새로운 약물 개발이 필요하다.

Erythroid NF-E2 계열의 bZIP 전사인자인 Nrf2와 Nrf2에 의해 조절되는 하위 단백질들이 세포내 산화환원 항상성의 유지와 산화적 혹은 친전자성 스트레스에 대하여 세포를 보호하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>4~6)</sup>  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase, heme oxygenase-1 (HO-1)과 같은 항산화 효소들, NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO-1), aldoketo reductase와 같은 외부물질(xenobiotics) 대사효소들, ATP 의존성 약물 흡수 펌프 등의 수많은 단백질의 발현이 Nrf2에 의해 조절된다.<sup>7)</sup> Nrf2 발현이 억제된 생쥐에서는 HO-1, NQO-1, thiol 단백질군(thioredoxin, peroxiredoxin), GSH 합성 및 유지에 중요한 glutamate-cysteine ligase 및 catalase 등의 발현이 소실하거나 반응성이 낮아진다는 사실이 증명되었다.<sup>8)</sup> 자국이 없을 때, 세포질에서 Nrf2는 Keap1과 결합하여 proteasome 시스템에 의해 분해된다.<sup>9)</sup> 하지만, 산화제나 친전자체에 의해서 Keap1의 cysteine 잔기가 변형되거나, PKC에 의해서 Nrf2가 인산화(Ser40) 되면 Nrf2가 Keap1에서 분리되어 세포질에서 핵 내로 이동한다. 결과적으로 Nrf2의 활성화로 전사가 촉진되어 하위 단백질의 발현이 증가된다.<sup>10,11)</sup> Keap1 유전자가 소실된 생쥐에서는 정상보다 많은 Nrf2가 핵 내에 축적되어 있으며 그에 따라 Nrf2에 의해 조절되는 단백질들의 발현 수준이 정상 생쥐보다 현저히 높다는 사실이 밝혀졌다.<sup>12)</sup> 최근 항암제 화학요법에 대한 암세포의 저항성과 암의 촉진(promotion)에서 Nrf2의 부정적인 역할이 많이 보고되었다.<sup>13)</sup> 피부, 유방, 전립선, 폐 등의 암 종에서 Nrf2가 과발현되어 있고,<sup>14)</sup> 특히 사람의 폐암조직 및 세포주에서 Keap1 유전자의 체세포 돌연변이의 빈도가 높다는 것이 발견되었는데 돌연변이가 일어난 Keap1 단백질은 Nrf2와 결합하지 못한다는 사실이 보고된바 있다.<sup>15)</sup> 또한, Nrf2 및 Nrf2에 의해 조절되는 단백질이 과발현된 암세포가 항암제에 대하여 높은 내성을 나타낸다는 것이 보고되었다.<sup>16)</sup> 따라서 암세포에서 Nrf2의 과발현 및 활성화를 억제한다면 암세포의 성장을 제어할 수 있을 뿐만 아니라 항암제에 대한

감수성도 높일 수 있을 것으로 생각된다.

인삼은 중국이나 아시아 국가에서, 위, 폐, 간, 난소, 대장암을 포함하는 다양한 질병의 치료와 예방에 사용되어 왔다.<sup>17)</sup> 인삼에 함유된 주요 약효성분인 ginsenoside는 현재 150여 가지가 분리 동정되었으며, 비배당체(aglycones)의 형태에 따라서 dammarane과 oleanane 형태로 분류된다.<sup>18)</sup> 항암, 항산화, 항염증 등의 여러 생리활성이 다양한 ginsenoside들에서 발견되었다.<sup>19)</sup> 본 연구에서는 폐암에 대한 ginsenosides의 항암효과를 평가하기 위해 Nrf2의 발현이 높은 인간 폐암세포주인 A549 세포에서 ginsenosides의 세포독성을 조사하였고, Nrf2와 Nrf2에 의해 조절되는 단백질의 발현에 대한 ginsenoside Rg3의 억제효과를 조사하였다. 또한, 시스플라틴(cisplatin)과 Rg3를 병용 처리하였을 때 A549 폐암세포의 생존율이 더욱 억제되는지를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

Ginsenoside Rg3는 LKT laboratory (St. Paul, MN)에서 구입하였고, Rb1, Rg5, Re, Rk1과 F4는 서울대학교 약학대학 김영식 교수로부터 받았다. 각 ginsenoside를 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 100 mM stock으로 만들어  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다가, 실험 전에 배지로 희석하여 사용하였다. RPMI1640 세포배양 배지와 fetal bovine serum (FBS)는 Gibco BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였다. 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), cisplatin,  $\beta$ -actin과 tubulin 항체는 Sigma Chemical (St. Louis, MO)에서, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)는 Vector (Burlingame, CA)에서 구입하였다. Nrf2, HO-1,  $\gamma$ -GCS (  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytic subunit), MRP1, Lamin A/C 항체와 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서, NQO1과 pNrf2 (ser40) 항체는 Abcam (Cambridge, MA)에서 구입하였다.

### 2. 세포 배양 및 MTT assay

A549인간 폐암세포를 10% FBS와 항생제 및 항균제가 포함된 RPMI1640 배지로  $37^{\circ}\text{C}$ 와 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 배양하였다. 세포배양용 96-well plate에 well 당  $1 \times 10^4$  세포를 분주하고, 24시간 동안 배양한 후 각 ginsenoside와 cisplatin을 농도별로 처리하였다. 24시간 후, MTT 용액(5 mg/ml)을  $20 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 4시간 동안  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하였다. MTT 시약이 들어있는 배지를 제거한 후에

DMSO를 200  $\mu$ l씩 넣어 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후, microplate reader (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. Western blot analysis

A549 폐암세포에 Rg3를 농도별로 처리하고 4시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후, 단백질을 추출하기 위하여 RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM Sodium EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml leupeptin] (Cell Signaling, Danvers, MA)를 첨가하였다. 2시간 동안 4°C에서 반응시킨 후, 14,000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 상등액을 취했다. Nuclear/Cytosol Fractionation Kit (Biovision, Mountain View, CA)를 이용하여 핵과 세포질 분획을 얻었고, 추출된 단백질의 농도는 BCA assay kit (Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 측정하였다. 단백질 30  $\mu$ g을 6~10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동한 후, 젤의 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Pall, Washington, NY)으로 옮기고, 5% skim milk로 blocking하였다. 각 단백질에 특이적으로 결합하는 1차항체가 포함된 3% skim milk용액에서 밤새 4°C에서 반응시킨 후, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 반응시켰다. Chemiluminescence reagents A와 B (Santa Cruz Biotechnology)를 사용하여, enhanced chemiluminescence 방법으로 각 단백질의 발현을 확인하였다.

### 4. Nrf2에 대한 면역세포화학적 염색

A549 폐암세포를 chamber slide (Nalge Nunc, Rochester, NY)의 각 well에  $5 \times 10^4$  세포씩 분주하여, 24시간 동안 배양한 후, Rg3로 4시간 동안 처리하였다. PBS로 well을 씻고, 3.7% formaldehyde 용액으로 4°C에서 10분 동안 처리하였다. PBS로 well을 씻고, 1% Triton X-100 용액을 5분

동안, 1% BSA용액을 30분 동안 처리하였다. PBS로 Nrf2 항체를 1 : 100으로 희석하여 well에 넣고 4°C에서 밤새 반응시켰다. PBS로 씻은 후, fluorescein isothiocyanate (FITC)가 결합된 2차 항체를 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 1.5  $\mu$ g/ml DAPI를 포함한 mounting 용액을 이용하여 커버슬라이드를 덮고, LSM510-meta Confocal Laser Scanning Microscopes (Carl Zeiss, Jena, Germany)를 이용해 세포를 관찰하였다.

### 5. 통계처리

실험결과들은 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였고, 각 실험 결과로부터 one-way ANOVA (analysis of variance)와 Student *t*-test를 이용하여 분석하였다.

## 결 과

### 1. A549 폐암세포에 대한 ginsenosides의 세포독성

인간 폐암세포주인 A549 세포에 ginsenoside Rb1, Rg3, Rg5, RK1, Re과 F4를 농도별로 처리한 후 MTT assay를 수행하여, 각 ginsenoside가 세포생존율을 50% 억제하는 농도(IC<sub>50</sub>)를 결정하였다(Table 1). Rg3, Rk1, F4에 대한 IC<sub>50</sub>은 각각 36.4, 14.5, 79.7  $\mu$ M이었고, Rg5, Rb1, Re에 대한 IC<sub>50</sub>은 100  $\mu$ M 이상이였다.

### 2. A549 폐암세포에서 HO-1, NQO-1, $\gamma$ -GCSc, MRP-1과 Nrf2의 발현에 대한 Rg3의 효과

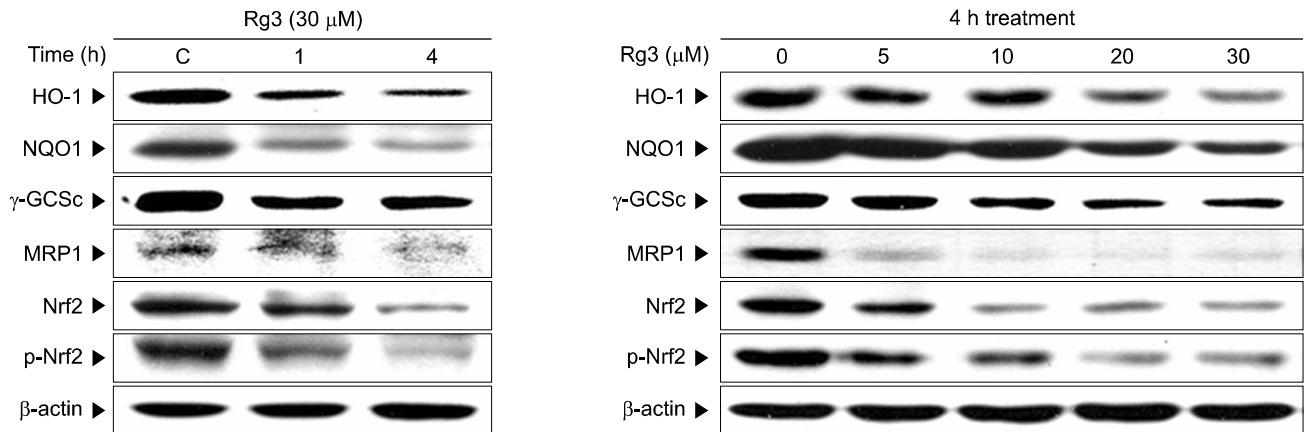
세포에서 항산화 및 세포 보호 기능을 하는 HO-1, NQO-1,  $\gamma$ -GCSc와 MRP-1의 발현에 대한 Rg3의 효과를 western blotting을 수행하여 조사하였다(Fig. 1). A549 폐암세포에서 HO-1, NQO-1,  $\gamma$ -GCSc와 MRP-1의 발현이 높게 나타났으며, Rg3 30  $\mu$ M을 1시간과 4시간 동안 처리하였을 때, 시간 의존적으로 이들 단백질의 발현이 감소되었다. 또한, Rg3를 5, 10, 20, 30  $\mu$ M로 4시간 동안 처리하였을 때 농도 의존적으로 HO-1, NQO-1,  $\gamma$ -GCSc와 MRP-1의 발현이 감소되었다. Nrf2에 의해 조절되는 것으로 알려진 HO-1, NQO-1,  $\gamma$ -GCSc와 MRP-1의 발현이 Rg3에 의해서 억제되는 것을 확인하여, A549 세포에서 Nrf2의 발현도 Rg3에 의해 억제되는지 조사하였다. 그 결과, Rg3에 의해 농도와 시간 의존적으로 Nrf2의 발현과 pNrf2 level이 감소하였다(Fig. 1).

### 3. A549 폐암세포의 세포질과 핵 내 Nrf2 level에 대한 Rg3의 효과

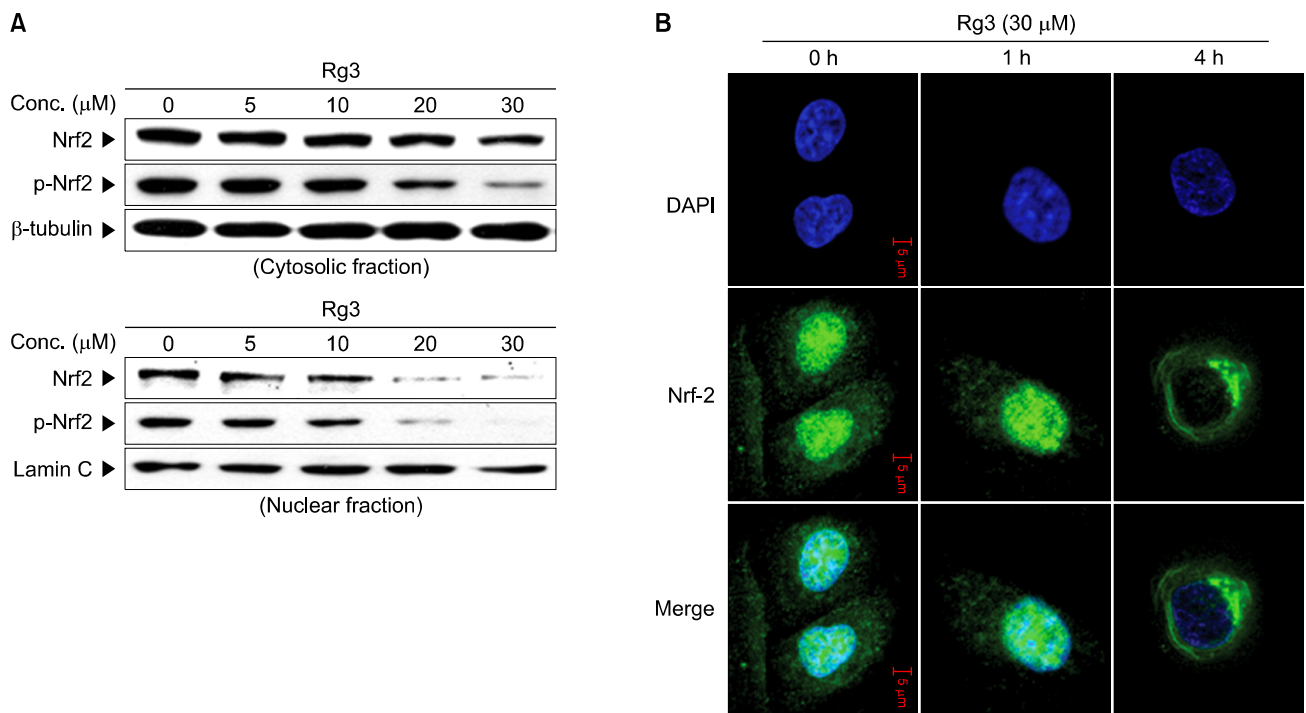
Nrf2는 세포질에서 Keap1이라는 억제 단백질에서 분

**Table 1.** IC<sub>50</sub> of ginsenosides in A549 human lung cancer cells

| Ginsenoside | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) for 24 h treatment |
|-------------|------------------------------------------------|
| Rg5         | >100                                           |
| Rb1         | >100                                           |
| Re          | >100                                           |
| Rg3         | 36.4                                           |
| F4          | 79.7                                           |
| Rk1         | 14.5                                           |



**Fig. 1.** Effect of Rg3 on the expressions of HO-1, NQO-1,  $\gamma$ -GSCc, MRP-1, Nrf2 and pNrf2 in A549 lung cancer cells. A549 lung cancer cells ( $1 \times 10^6$  cells/dish) were treated with  $30 \mu\text{M}$  Rg3 for 1 and 4 h or Rg3 at the indicated concentrations for 4 h. The expressions of HO-1, NQO-1,  $\gamma$ -GSCc, MRP-1, Nrf-2 and pNrf2 were determined by western blotting with the respective specific antibodies.



**Fig. 2.** Effect of Rg3 on the nuclear Nrf2 level in A549 lung cancer cells. (A) A549 cells ( $1 \times 10^6$  cells/dish) were treated with Rg3 at indicated concentrations for 4 h, and cytosolic and nuclear extracts were prepared as described in Materials and Methods. Cytoplasmic and nuclear levels of Nrf-2 were determined by western blot analysis. (B) Cells ( $5 \times 10^3$  cells/well) were treated with  $30 \mu\text{M}$  Rg3 for 1 and 4 h. The level of Nrf2 was determined by immunocytochemical analysis using confocal laser scanning microscopes. Data are representatives of triplicate experiments (magnification  $\times 40$ ).

리되면 핵 내로 이동하고, DNA의 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 항산화 효소인 HO-1과 NQO-1 등의 전사를 촉진하고 결과적으로 단백질의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 세포를 Rg3 5, 10, 20, 30

$\mu\text{M}$ 로 4시간 동안 처리하고 핵과 세포질로 분획한 후 western blotting을 통해 Nrf2와 pNrf2 level을 확인한 결과 (Fig. 2A), 세포질과 핵 내 모두에서 Nrf2와 pNrf2의 수준이 농도 의존적으로 감소하였다. Nrf2에 대한 Rg3의 효

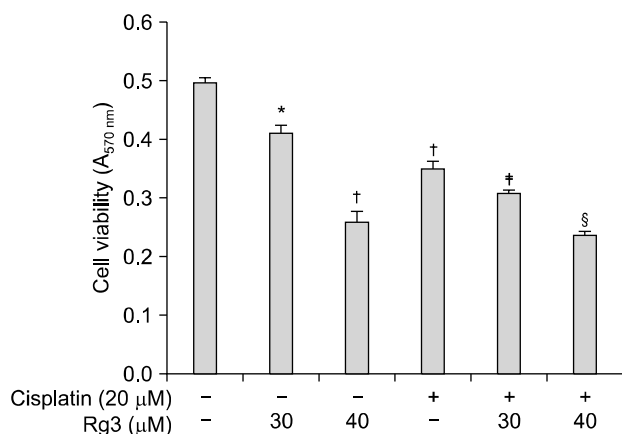


Fig. 3. Effects of Rg3 and/or cisplatin on the viability in A549 human lung cancer cells. A549 cells ( $1 \times 10^4$  cells/well) were treated with ginsenoside Rg3 in the absence or presence of cisplatin for 24 h. \* $p < 0.005$ , † $p < 0.0005$  versus control. ‡ $p < 0.05$ , § $p < 0.005$  versus cisplatin-treated cells.

과를 면역염색을 통해서 확인한 결과 (Fig. 2B), A549 폐암세포에서 대부분의 Nrf2가 핵 내에 축적되어 있는 것을 알 수 있었다. 하지만, Rg3 30  $\mu$ M을 4시간 동안 처리하였을 때, 핵 내 Nrf2 level 현저히 감소되었다.

#### 4. A549 폐암세포에 대한 Rg3와 cisplatin 병용처리 효과

A549 폐암세포에 Rg3를 30, 40  $\mu$ M로 24시간 동안 처리하였을 때, 세포 생존율이 각각 83, 52%였으며, cisplatin 20  $\mu$ M을 처리하였을 때 세포생존율은 70%였다. Rg3 30, 40  $\mu$ M과 cisplatin을 혼용하였을 때 세포 생존율은 각각 68, 48%로 Rg3나 cisplatin 단독 처리시보다 세포생존율이 유의적으로 억제되었다(Fig. 3).

## 고 찰

인삼은 다양한 약리 작용이 보고된 생약재료로, 최근에는 인삼의 뿌리 전체를 사용하는 대신에 약리 활성 성분을 규명하고, 각각의 기능과 작용기전을 밝히는데 초점을 맞추고 있다. Ginsenoside들이 혈관이완, 항산화, 항염증 및 항암을 포함한 인삼 활성의 대부분을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 가장 일반적으로 많이 연구된 ginsenoside는 Rb1, Rg1, Rg3, Rg5, Re이다. Rb1은 항암효능보다는 항염증, 항균과 항산화 효소인 superoxide dismutase와 glutathione peroxidase의 활성을 증가시키는 효과가 있는 것으로 보고 되고 있다.<sup>18)</sup> Rg3는 폐암, 대장암, 피부암 등의 다양한 암세포에서 세포의 성장 및

이동성을 억제하고, 신생혈관의 생성을 억제하며, 현재 사용되고 있는 항암제의 독성에 대한 정상세포의 보호 효과뿐만 아니라 항암제 docetaxel에 대한 감수성을 증가시키는 것이 보고되었다.<sup>20)</sup> Re는 항염증과 면역 증진에 대한 효과들이 보고되어 있고, Re와 Rg5의 대사산물인 Rh1와 Rh3도 항암 및 항염증에 효과가 좋은 것으로 보고되어 있다.<sup>21)</sup> Rk1은 간암세포의 세포사멸을 유도함으로써 항암효과를 나타내며.<sup>20)</sup> F4는 아직 생리적인 효능에 대한 연구가 진행되지 않았다. 본 연구에서는 ginsenoside Rb1, Rg3, Rg5, Re, Rk1과 F4의 A549 사람 폐암세포에 대한 세포독성을 평가하기 위해 IC<sub>50</sub>을 조사한 결과, Rk1의 IC<sub>50</sub>이 14.5  $\mu$ M로 가장 낮았고, Rg3도 IC<sub>50</sub>이 36.4  $\mu$ M로 다른 ginsenoside들 보다 낮은 농도에서 A549 폐암세포에 대해 뛰어난 세포독성을 나타냈다. Rg3는 폐암과 위암환자에게 vinorelbine, cisplatin, mitomycin과 같은 화학요법제와 함께 혼용하였을 때 약효에 대한 반응속도와 생존기간을 증가시키는 효과가 보고되어 있다.<sup>22,23)</sup> 또한, Rg3가 MDR gene의 발현을 억제하거나 p-glycoprotein level을 억제하는 것이 아니라 p-glycoprotein에 항암제가 결합하는 것을 억제하여 다제약제 내성을 감소시킨다는 것이 보고되었다.<sup>24)</sup> 본 연구에서는 암세포에서 과발현되어 암세포의 생존과 항암제에 대한 암세포의 내성을 증가시키는 것으로 알려진 Nrf2와 Nrf2에 의해 조절되는 하위 단백질의 발현에 대한 Rg3의 효과를 조사하였다.

GSH 생합성 효소의 구성효소인  $\gamma$ -GCS와 HO-1, NQO-1과 같은 phase 2효소와 함께 무독화에 관여하는 MRP-1 단백질은 Nrf-2에 의해서 조절 되는 것으로 알려져 있다.<sup>25,26)</sup>  $\gamma$ -GCS의 과발현이 환원형 GSH의 수준을 증가시켜 약물 내성을 일으키는 것으로 보고되어 있다.<sup>27)</sup> 또한, 항암제에 처음에는 잘 반응을 보이던 종양에서 획득 내성(acquired resistance)을 일으키는 다제약제 내성(multi-drug resistance, MDR)이 특히 문제가 되고 있으며,<sup>28)</sup> 대표적인 내성관련 세포막 배출펌프로 ABC (ATP-binding cassette) superfamily에 속하는 MRP-1이 알려져 있다. MRP-1은 혈액 및 고형종양에서 항암제 내성과 연관되어 있으며, 또한 항암제에 대한 반응도를 예측할 수 있는 지표로 알려져 있다.<sup>29)</sup> 본 연구의 A549 폐암세포는 HO-1, NQO-1,  $\gamma$ -GCS, MRP-1 단백질을 발현하였으며, A549 세포에 Rg3를 처리 하였을 때 이들 단백질의 발현이 농도와 시간 의존적으로 감소하였다.

HO-1, NQO-1,  $\gamma$ -GCS, MRP-1의 발현을 조절하는 전사인자인 Nrf2는 정상조직에서는 자극에 의해 Nrf2의 발현이 유도되고, 자극이 없는 경우 Nrf2의 발현이 낮게 유지 되는데 반해, 종양조직에서는 Nrf2가 항상 과발현되

어 화학요법이나 방사능요법에 대한 내성을 나타내는 것이 보고되었다.<sup>30,31)</sup> 또한, 세포독성 유발 항암제에 대해 해독화를 촉진함으로써 약물내성에 관여하는 것이 보고되었다.<sup>32)</sup> Nrf2는 산화적 스트레스에 의해서 Nrf2 (Ser40)가 인산화되면 Keap1과의 결합이 깨어져 핵으로 이동하여 하위단백질의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.<sup>33)</sup> Nrf2와 pNrf2 (Ser40) level을 조사한 결과, Rg3가 A549 폐암세포에서 Nrf2의 발현과 인산화를 억제할 뿐만 아니라, 높게 유지되는 핵 내의 Nrf2와 pNrf2 level도 현저히 억제한다는 것을 알 수 있었다.

A549 폐암세포의 Nrf2 및 하위조절 단백질들의 발현이 높게 나타나 A549 세포가 항암제에 내성을 갖고 있을 것으로 생각되었고, Nrf2를 감소시키는 Rg3와 병용 처리 시 cisplatin에 대한 암세포의 감수성을 증가시킬 것으로 예상하였다. Rg3와 항암제 cisplatin을 병용 처리 시 A549 폐암세포의 세포생존율을 조사한 결과, A549 세포의 세포성장율이 cisplatin만 처리한 세포에 비하여 유의적으로 감소되는 것으로 나타나, Rg3에 의해서 cisplatin에 대한 A549 세포의 감수성이 증가되는 것을 알 수 있었다. 따라서, ginsenoside Rg3는 그 자체도 폐암세포에 대해 세포독성을 나타내며, 항암제와 같이 사용하였을 때 그 효능을 증가시켜 줄 것으로 예상된다.

## 결 론

Ginsenoside Rg3는 Nrf2가 과발현된 A549 인간 폐암세포에서 Nrf2의 발현 및 핵 내 Nrf2 level을 감소시켜 Nrf2에 의해 조절되는 단백질의 발현을 억제한다. 이러한 Nrf2에 대한 Rg3의 효과가 A549 폐암세포에 대한 Rg3의 세포독성 및 cisplatin과 병용투여 시 cisplatin에 대한 세포의 감수성을 증가시키는데 기여할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 연구는 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2008-313-E00146).

## 참 고 문 헌

- 1) Seve P, Dumontet C. Chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5, 73-88, 2005.
- 2) Sasada T, Iwata S, Sato N, Kitaoka Y, Hirota K, Nakamura K, Nishiyama A, Taniguchi Y, Takabayashi A, Yodoi J.

- Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. *J Clin Invest* 97, 2268-2276, 1996.
- 3) Han X, Pan J, Ren D, Cheng Y, Fan P, Lou H. Naringenin-7-O-glucoside protects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol* 46, 3140-3146, 2008.
- 4) Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* 38, 769-789, 2006.
- 5) Kwak MK, Wakabayashi N, Kensler TW. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat Res* 555, 133-148, 2004.
- 6) Cho HY, Reddy SP, Kleeberger SR. Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8, 76-87, 2006.
- 7) Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 36, 1199-1207, 2004.
- 8) Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 7, 385-394, 2005.
- 9) Tang X, Wang H, Fan L, Wu X, Xin A, Ren H, Wang XJ. Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. *Free Radic Biol Med* 50, 1599-1609, 2011.
- 10) Nitire SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol* 244, 37-42, 2010.
- 11) Itoh K, Mimura J, Yamamoto M. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid Redox Signaling* 13, 1665-1678, 2010.
- 12) Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, Motohashi H, Noda S, Takahashi S, Imakado S, Kotsuji T, Otsuka F, Roop DR, Harada T, Engel JD, Yamamoto M. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet* 35, 238-245, 2003.
- 13) Zhang DD. The Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway: The regulation and dual function of Nrf2 in cancer. *Antioxid Redox Signal* 13, 1623-1626, 2010.
- 14) Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* 58, 262-270, 2008.
- 15) Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, Herman JG, Baylin SB, Sidransky D, Gabrielson E, Brock MV, Biswal S. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* 3, e420, 2006.
- 16) Ren D, Villeneuve NF, Jiang T, Wu T, Lau A, Toppin HA, Zhang DD. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *PNAS* 108, 1433-1438, 2011.
- 17) Yun TK. Experimental and epidemiological evidence on non-organ specific cancer preventive effect of Korean ginseng and identification of active compounds. *Mutat Res* 523-524,

- 63-74, 2003.
- 18) Christensen LP. Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects. *Adv Food Nutr Res* 55, 1-99, 2009.
- 19) Lü JM, Yao Q, Chen C. Ginseng compounds: an update on their molecular mechanisms and medical applications. *Curr Vasc Pharmacol* 7, 293-302, 2009.
- 20) He BC, Gao JL, Luo X, Luo J, Shen J, Wang L, Zhou Q, Wang YT, Lu HH, Haydon RC, Wang CZ, Du W, Yuan CS, He TC, Zhang BQ. Ginsenoside Rg3 inhibits colorectal tumor growth through the down-regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Int J Oncol* 38, 437-445, 2011.
- 21) Lee HJ, Jung EY, Lee HS, Kim BG, Kim JH, Yoon TJ, Oh SH, Suh HJ. Bioavailability of fermented korean red ginseng. *J Food Sci Nutr* 14, 201-207, 2009.
- 22) Sun Y, Lin H, Zhu Y, Feng J, Chen Z, Li G, Zhang X, Zhang Z, Tang J, Shi M, Hao X, Han H. A randomized, prospective, multi-centre clinical trial of NP regimen (vinorelbine + cisplatin) plus Gensing Rg3 in the treatment of advanced non-small cell lung cancer patients. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 9, 254-258, 2006.
- 23) Chen ZJ, Cheng J, Huang YP, Han SL, Liu NX, Zhu GB, Yao JG. Effect of adjuvant chemotherapy of ginsenoside Rg3 combined with mitomycin C and tegafur in advanced gastric cancer. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 10, 64-66, 2007.
- 24) Kwon HY, Kim EH, Kim SW, Kim SN, Park JD, Rhee DK. Selective toxicity of ginsenoside Rg3 on multidrug resistant cells by membrane fluidity modulation. *Arch Pharm Res* 31, 171-177, 2008.
- 25) Kimura A, Ishida Y, Hayashi T, Wada T, Yokoyama H, Sugaya T, Mukaida N, Kondo T. Interferon-gamma plays protective roles in sodium arsenite-induced renal injury by up-regulating intrarenal multidrug resistance-associated protein 1 expression. *Am J Pathol* 169, 1118-1128, 2006.
- 26) Kurokawa H, Ishida T, Nishio K, Arioka H, Sata M, Fukumoto H, Miura M, Saijo N. Gamma-glutamylcysteine synthetase gene overexpression results in increased activity of the ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump and cisplatin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 216, 258-264, 1995.
- 27) Clynes M. Cellular models for multiple drug resistance in cancer. *In Vitro Cell Dev Biol* 29A, 171-179, 1993.
- 28) Chevillard S, Pouillart P, Beldjord C, Asselain B, Beuzeboc P, Magdelénat H, Vielh P. Sequential assessment of multidrug resistance phenotype and measurement of S-phase fraction as predictive markers of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 77, 292-300, 1996.
- 29) Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y, Chen W, Yi X, Zheng W, Wondrak GT, Wong PK, Zhang DD. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 29, 1235-1243, 2008.
- 30) Singh A, Bodas M, Wakabayashi N, Bunz F, Biswal S. Gain of Nrf2 function in non-small-cell lung cancer cells confers radioresistance. *Antioxid Redox Signal* 13, 1627-1637, 2010.
- 31) Cho JM, Manandhar S, Lee HR, Park HM, Kwak MK. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance. *Cancer Lett* 260, 96-108, 2008.
- 32) Oguri T, Fujiwara Y, Isobe T, Katoh O, Watanabe H, Yamakido M. Expression of gamma-glutamylcysteine synthetase (gamma-GCS) and multidrug resistance-associated protein (MRP), but not human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT), genes correlates with exposure of human lung cancers to platinum drugs. *Br J Cancer* 77, 1089-1096, 1998.
- 33) Bloom DA, Jaiswal AK. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I $\kappa$ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem* 278, 44675-44682, 2003.