

# K-562 백혈병 세포주에서 저근백피와 Gleevec을 처리에 의한 유전자 발현 비교 분석

차민호<sup>1,3</sup> · 안원근<sup>2</sup> · 전병훈<sup>4</sup> · 윤용갑<sup>4</sup> · 윤유식<sup>1\*</sup>

1: 한국한의학연구원, 2: 부산대학교 치의과대학, 3: 고려대학교 생명과학대학, 4: 원광대학교 한의과대학

## Analysis of Gene Expression Pattern of *Ailanthus altissima* Extract and Gleevec on K-562 Leukemia Cell Line

Min Ho Cha<sup>1,3</sup>, Won Gun An<sup>2</sup>, Byung Hun Jeon<sup>4</sup>, Yong Gab Yun<sup>4</sup>, Yoo Sik Yoon<sup>1\*</sup>

1: Department of Medical Research, Korea Institute of Oriental Medicine, 2: College of Dentistry, Pusan National University, 3: School of Lifescience and biotechnology, Korea University, 4: College of Oriental Medicine, Wonkwang University

In this study, we investigated gene expression patterns induced by *Ailanthus altissima* extract and compared it with Gleevec, a well-known anti-leukemia drug, in K562 chronic leukemia cells. *Ailanthus altissima* extract(100 ug/ml) and Gleevec(50 ug/ml) were treated to cells for 1h, 2h, 4h, and 16h and total RNA was extracted. Gene expressions were evaluated using cDNA microarray, in which 24,000 genes were spotted. Hierarchical clustering analysis showed that expression of genes included in two clusters were increased or decreased time dependently by both *Ailanthus altissima* extract and Gleevec. Genes included in another cluster were induced by *Ailanthus altissima* extract but not by Gleevec. In biological process analysis, expression of genes involved in apoptosis, growth arrest and DNA-damage were increased, but genes stimulating cell cycle were decreased. This study provides comprehensive comparison of the patterns of gene expression changes induced by *Ailanthus altissima* extract and Gleevec in K-562 leukemia cells.

Key words : *Ailanthus altissima*, Gleevec, leukemia, cDNA chip, gene expression

### 서 론

저근백피는 소태나무과(Simaroubaceae)에 속하는 가중나무(혹은 가죽나무, *Ailanthus altissima* Swingle) 및 동속 근연식물의 수피와 근피를 건조한 것으로 화피, 풍안초로도 불리며<sup>1)</sup>, 민간 및 한방에서는 이질과 대하증, 치질, 고초열, 설사를 멈추게 하는 지사제, 살충제 등의 목적으로 사용된다<sup>2)</sup>. 저근백피의 성분에 대해서는 수피, 종자, 잎으로부터 merosin, ailanthone, amarolide, quassin, ailantholide, chaparrinone, shingjuglycoside 등이 분리, 보고되었다<sup>3)</sup>. 이들 성분들의 생리활성에 관한 연구로는 tar의 항균작용<sup>4)</sup>, glaucarubinone 과 ailanthone 등의 항아메바 작용 및 항말라리아 작용<sup>5)</sup>, 메탄올 추출물의 간기능에 관한 것<sup>6)</sup>들이 있으나, 항암활성 및 그 신호기전에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

최근에 개발된 DNA chip은 유전자 발현 검색용으로서 많은 종류의 DNA를 고밀도로 붙여 놓은 것으로 여러 genome project로부터 축적된 방대한 양의 유전정보를 이용하여 시료를 효율적으로 분석할 수 있는 방법이다. 현재 DNA chip의 주 응용분야는 gene expression monitoring으로 기존 밝혀진 염기서열을 바탕으로 cell 내의 biological process와 각 유전자간의 상호 연관성을 규명하는 것이다. 본 연구에서는 저근백피의 백혈병에 대한 항백혈병 효과와 기전을 밝혀내고자, 저근백피 열수추출물을 처리한 K-562 백혈병 세포에서 변화되는 유전자를 cDNA chip을 이용하여 검색하고, 기존 백혈병 치료제로 알려진 Gleevec에 의해 변화되는 유전자들과 비교 분석하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 시료의 제조

저근백피 200g을 2L의 증류수에 넣은 후 3시간 동안 가열하

\* 교신저자 : 윤유식, 대전시 유성구 전민동 461-24, 한국한의학연구원

· E-mail : ysyoon2@kiom.re.kr, · Tel : 042-868-9482

· 접수 : 2005/05/26 · 수정 : 2005/06/28 · 채택 : 2005/07/28

여 추출하고, 추출액을 3M 여과지로 3회 여과하였다. 이 여과액을 rotary vaccum evaporator로 감압, 농축한 후, freeze dryer로 동결, 건조하여 시료로 사용하였다. Gleevec은 시중에 항백혈병 치료제로 시판되는 것을 분쇄하여 사용하였다.

## 2. 세포배양

사람 유래의 백혈병 세포주인 K-562를 사용하였고, 실험실에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 (Forma scientific, OH, USA)에서 배양했다. 부유성인 K-562세포의 배양액은 DMEM (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA) 배지에 fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA)를 10% 포함하고, 1% 항생제 (100units/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin)와 배지 1L당 NaHCO<sub>3</sub> 2g을 첨가하여 제조하였다.

## 3. 시료의 처리

K-562 세포를 100mm cell culture dish에서 배양하여 4×10<sup>6</sup> cells/ml의 세포 수를 가진 배지에 저근백피 열수 추출물과 Gleevec의 최종농도가 각각 100µg/ml, 50µg/ml이 되게 첨가한 후 1, 2, 4, 16시간동안 처리하였다.

## 4. Total RNA 분리

각 시료를 처리한 K-562 세포를 시간대별로 원심분리한 후, PBS로 2-3회 세척한 다음 total RNA 분리에 사용하였다. Total RNA 분리는 RNeasy mini kit(Quiagen Inc. Valencia CA USA)를 이용하여 제공된 방법에 따라 분리하였다.

## 5. Microarray probing과 scanning

100µg total RNA (또는 2-5µg의 mRNA)용액에 5µg의 poly(dT) oligomer를 첨가하여 70°C에서 10분간 반응시킨 후 열에 방지하였다. RNA용액에 2.5µl의 Superscript II revers transcriptase (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA), 10µl의 5× reaction buffer, 5µl의 DTT (0.1M), 5µl의 10×dNTP 5mM dATP, dCTP, dGTP, ; 2mM dTTP), 2µl의 fluorescent nucleotide (최종농도 10nM Cy3-dUTP or Cy5-dUTP)를 첨가하여 50µl의 반응액을 만들어 37°C에서 2시간 반응시켰다. 이 반응액에 6µl의 3M NaOH를 첨가하여 65°C에서 30분 반응시켜 unlabeled RNA를 변성시켰다. 이 반응액에 30 µl의 1M Tris-HCl(pH7.5)와 12µl의 1M HCl를 첨가하여 중화시켰다. Biospin 6 column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 unincorporated nucleotide와 salt로 제거하였다. Cy5 probe와 Cy3 probe를 동량씩 섞어 Microcon 30 (Waters-Milipore, Bedford, MA, USA)으로 부피를 줄였다. Hybridization solution들은 probe와 섞어 chamber에 넣어 50°C에서 16시간 hybridization 했다. 그리고 drain까지 마친 후 스캔은 GMS 418 스캐너 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)로 saturation이 안되는 범위내에서 cy3는 550-570nm에서, cy5는 650-670nm에서 적당한 PMT값으로 스캔하였다.

## 6. Bioinformatics data 분석

GMS 418 스캐너를 이용하여, Cy5와 Cy3의 fluorescent

image를 각각 스캔하여 fluorescence intensity를 측정하고, ImaGene software (BioDiscovery, El Segundo, CA, USA)를 이용하여 각각의 이미지를 합성하고 분석함으로써 각 유전자별 대조군과 실험군의 발현 비율(Cy3/Cy5비, red와 green의 intensity 비)를 결정했다. 또한 housekeeping 유전자 및 yeast 유전자에 대하여 별도로 대조군과 실험군의 발현비율을 분석하여 실험에서 얻어진 data의 타당성 부여를 위한 상관계수를 구한다.

### 1) Clustering

Hierarchical clustering은 Stanford 대학의 cluster 3.0과 Treeview프로그램을 활용하여 hierarchical clustering(average linkage)을 하여 node correlation이 0.35~0.81 값사이에서 cluster를 결정하여 각 시간대별로 발현 pattern에 따라 분류했다. k-mean clustering은 Bergen 대학의 J-express 1.1 프로그램을 사용하여 k-mean clustering하였다.

### 2) 기능별 유전자 발현 조사

발현 검색에 사용한 chip의 유전자들을 Stanford대학의 SOURCE 사이트 (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>)와 Affymatrix의 데이터베이스를 이용하여 Apoptosis, cell cycle, signal transduction, oncogenesis, cell proliferation등과 같이 cancer관련된 기능과 일반적 기능을 구분하였다. Gene ontology 분석은 EASE (<http://apps1.niaid.nih.gov/DAVID>))를 활용하여 분석하였다.

## 결 과

사람의 백혈구 세포주인 K-562에 대한 저근백피 열수추출물과 Gleevec에 의해 변화되는 유전자를 비교하기 위하여, 저근백피 열수추출물 100ug/ml을 1h, 2h, 4h, 16시간 동안 처리하였으며, Gleevec 50ug/ml을 동시간 처리하였다. 이들로부터 각각 total RNA를 분리하고 cDNA chip을 이용하여 유전자 발현을 알아보았다. 실험에는 인간유전자 24,000개가 집적된 24K human cDNA chip을 사용하였고, 24,000여개 유전자 spot 중 average intensity가 9 이하의 불량 spot들을 제거하고 lowess smoothing normalization하여 약 2400 여개 유전자를 data에 활용하였다. 그리고 이들중 적어도 1개 이상에서 1.6배 이상 발현이 증감하고 80%이상 data가 남아있는 것을 data에 활용하였다.

### 1. 저근백피 처리후 시간대별 유전자 증감 pattern.

저근백피 열수 추출물을 K-562 세포주에 1, 2, 4, 16 시간동안 처리한 후, total RNA를 분리하여 cDNA chip 으로 유전자 발현 변화를 분석하였다. 1시간 경과후 대조군에 비해 1.6배 이상 증가하는 유전자는 KIAA1102 protein를 포함하는 32개이고, 1.6배 이상 감소하는 유전자는 activating transcription factor 5를 포함한 32개 유전자이다. 저근백피 처리하여 2시간 경과후 1.6배 이상 증가하는 유전자는 v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)를 포함한 30개 유전자이며, 1.6배 이상 감소하는 유전자는 phosphoserine aminotransferase 1 외 15개 유전자가 포함되어 있다. 4시간 경과 후 1.6배 이상 증가하는 유전자는

ras homolog gene family, member B A2를 포함한 60개 유전자이며, 1.6배 감소하는 유전자는 chromosome 14 open reading frame 143 외 32개 유전자를 포함한다. 16시간 후 1.6배이상 발현이 증가하는 유전자는 histone 1, H2ac 을 포함한 65개 유전자이며, 1.6배 이상 감소하는 유전자는 phosphoserine aminotransferase 1외 69개 유전자이다(Fig. 1). 각 시간대 별로 발현이 변화되는 유전자들은 Table 1에 표기하였다.

Stanford Univ. 의 cluster 3.0을 활용하여 node correlation 이 0.35-0.81 값 사이에서 6개의 cluster를 결정하였다(Fig. 2). Cluster A는 0-1h에 발현이 증가하는 군으로 cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1 외 21개가 포함되어 있고, cluster B는 초기에는 변화가 없으나 지속적으로 발현이 증가하는 군으로 histone 1외 68개의 유전자가 포함되어 있고, cluster C는 16h에 발현이 증가하는 mitogen-activated protein kinase 3외 52개 유전자가 포함되어 있고, cluster D는 초기에는 변화가 없으나 지속적으로 발현이 감소는 군으로 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta외 30개의 유전자가 포함되어 있다. Cluster E는 2-4h사이에 발현이 증가하며 early growth response 1외 19개 유전자를 포함하고 있으며, cluster F는 0-1h에 발현이 감소하는 군으로 chemokine (C-X-C motif) ligand 13외 29개 유전자를 포함하고 있다.

2. 저근백피와 Gleevec에 의한 유전자 발현 비교 분석

기존의 항백혈병 치료제로 알려진 Gleevec과 저근백피에 의해 변화되는 유전자들을 비교하기 위하여, Gleevec과 저근백피 열수추출물을 동일 시간동안 처리한 후 이들 유전자 발현을 cDNA chip을 활용하여 분석하였다. 이들 발현 pattern을 hierarachical clustering 한 결과 총 10개의 cluster를 결정하였다(Fig. 3).

Cluster A와 C는 저근백피와 Gleevec 처리시 같은 발현 변화를 보이는 유전자들로 histone 1등을 포함하는 72개 유전자들은 저근백피와 Gleevec에 의해 지속적으로 발현이 증가한 반면, proliferating cell nuclear antigen 등을 포함하는 78개 유전자들은 발현이 감소하였다. Cluster B와 D는 저근백피에 의해 1시간 처리시 발현이 증가하였으나, 다른 시간에서는 변화가 없고 또한 Gleevec 처리군에서 변화가 없는 군으로, cluster B에는 associated molecule with the SH3 domain of STAM (AMSH) like protein 외 16개의 유전자들이 포함되며, cluster D에는 neuroligin 2, ras homolog gene family, member E 등 5개의 유전자가 포함된다. 반면에 cluster H는 저근백피에 의해 1시간 처리 군에서만 발현이 감소하는 군으로 chemokine (C-X-C motif) ligand 13, DNA-damage-inducible transcript 4를 포함한 28개 유전자가 포함된다. Cluster E는 저근백피 군에서는 변화가 없으나 Gleevec을 16시간 처리한 군에서 발현이 증가하는 군으로 heat shock 70kDa protein 1A, 1B를 포함한다. Cluster I와 J의 유전자들은 저근백피 처리시 16시간군에서 감소한 반면 Gleevec처리시에는 16시간에 증가하는 유전자들로 tubulin, beta, 5, neurite growth-promoting factor 1 등을 포함한다, cluster G는 저근백피 4시간 처리군에서만 증가하는 유전자들로 3-hydroxy-

3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2, acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 등이 포함된다. Cluster F 군은 저근백피에 의해 증가한 반면, Gleevec에 의해 감소하는 유전자들로 Rab coupling protein, thioredoxin interacting protein 등이 포함된다.

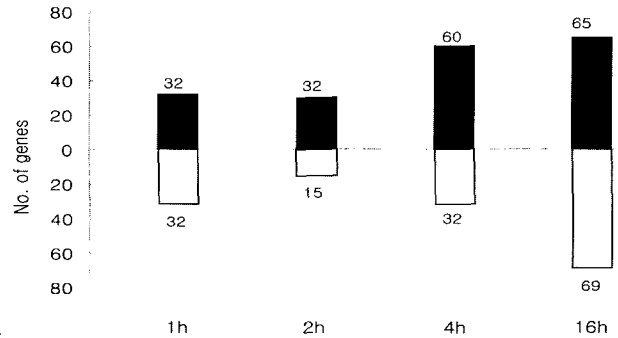


Fig. 1. Number of regulated genes at each time point by *Ailanthus altissima* water extract. The number of genes that were up-regulated(solid bar) or down-regulated(open bar) over 1.6 fold at each time point was shown.

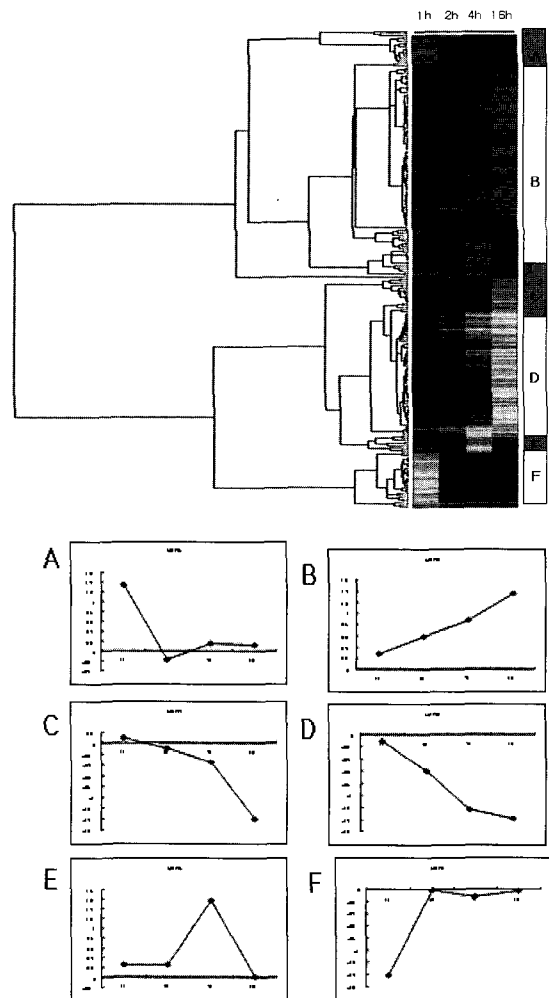


Fig. 2. Hierarchical cluster analysis of genes changing in 100 ug/ml of *Ailanthus altissima* treated K-562 cell at different time. Upper, 251 genes were clustered 6 groups according their expression profile. Lower, the normalized mean expression level was shown for each cluster of genes in graphical form.

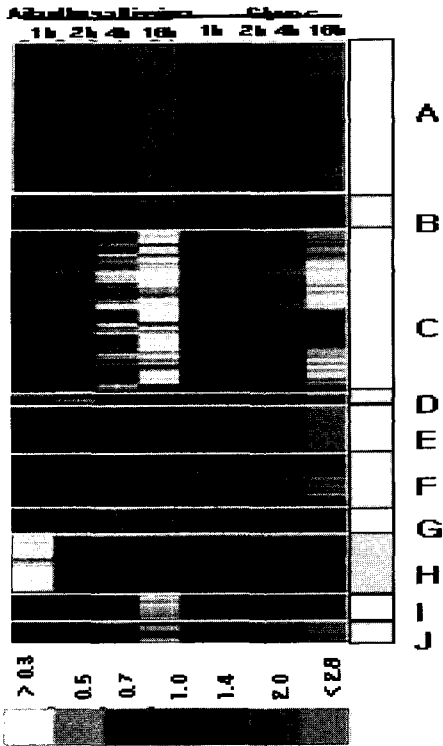


Fig. 3. Hierarchical cluster analysis of genes changing in 100ug/ml of *Ailanthus altissima* water extract treated K-562 cell compared with genes changing in 50ug/ml of Gleevec treated K-562 cell at 1h, 2h, 4h, and 16h. left, 291 genes were clustered 6 groups according their expression profile. Right, the normalized mean expression level was shown for each cluster of genes in graphical form.

3. 저근백피와 Gleevec에 의한 기능별 유전자 발현 비교 분석

저근백피와 Gleevec에 의해 변화되는 유전자들 중 발현 pattern이 동일한 유전자군인 cluster A, C 그리고 발현 pattern이 반대로 나타나는 cluster F에 포함된 유전자들을 대상으로 EASE(<http://apps1.niaid.nih.gov/DAVID>)를 활용하여 biological process 항목으로 분류하였다(Fig. 4). Cluster A 군에서는 apoptosis와 cell cycle arrest에 관여하는 것으로 알려진 growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha, KH domain containing, signal transduction associated 1 그리고 v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog (jun) 등의 발현이 증가하였고, 또한 nucleosome 형성 단백질인 histone 단백질들의 발현도 증가하는 것으로 확인되었다(Table 2) Cluster C에 속하는 유전자들 가운데 cell cycle에 관여하는 pleiotrophin 과 proliferating cell nuclear antigen, ADP-ribosyltransferase 등이 이군에 포함되었다(Table 3). 저근백피에 의해 발현이 증가한 반면 Gleevec에 의해서는 발현이 감소하는 군인 cluster C에 속하는 유전자들 중 myeloid cell leukemia sequence 1과 chromosome condensation protein G는 apoptosis와 cell cycle과 관련되었으며, transcription factor로 알려진 zinc finger 단백질 들 또한 이 군에 포함되었다(Table 4).

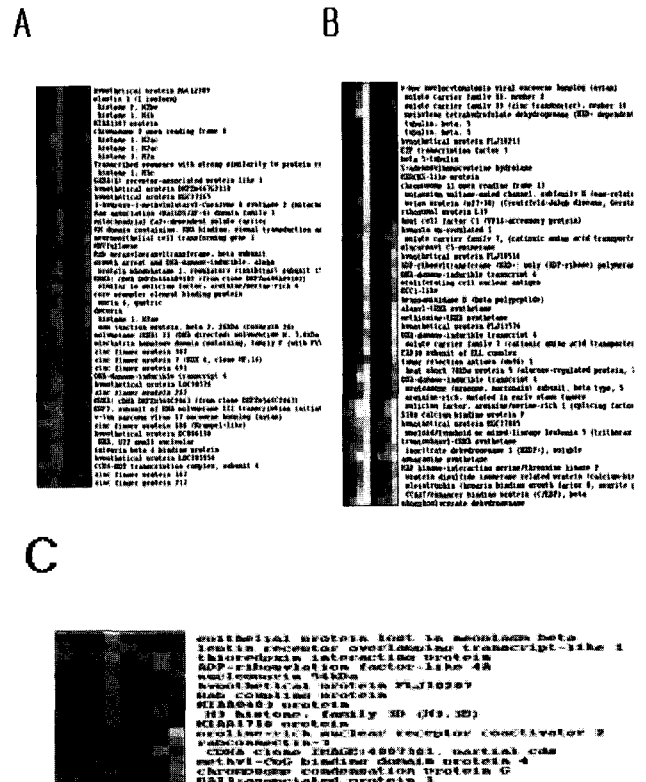
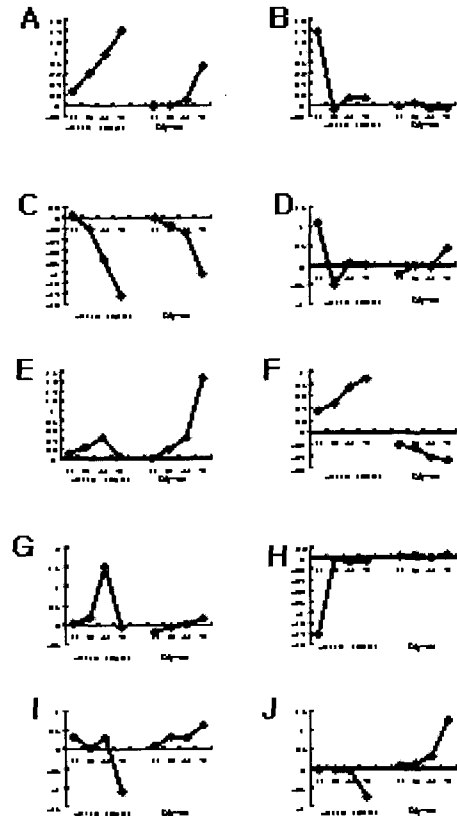


Fig. 4. Hierarchical cluster of genes changing in 100ug/ml of *Ailanthus altissima* water extract treated K-562 cell compared with genes changing in 50ug/ml of Gleevec treated K-562 cell at 1h, 2h, 4h, and 16h. A. Cluster of genes of which expression were increased in time dependent by *Ailanthus altissima* water extract and Gleevec. B. Cluster of genes of which expression were decreased in time dependent by *Ailanthus altissima* water extract and Gleevec. C. Cluster of genes of which expression were increased by *Ailanthus altissima* water extract but decreased or not changed by Gleevec

Table 1. List of gene and expression ratio on time dependent. the right-hand column gives the ratio of mRNA for *Ailanthus altissima* water extract group to control of highly up and down-regulation.

Time	up/down	Unigene number	Gene name	gene expression ratio
1 h	up	Hs.9754	activating transcription factor 5	0.23
		Hs.131041	F-box only protein 7	0.27
		Hs.5912	aggrecan 1	0.27
		Hs.2159	WD repeat and FYVE domain containing 3	0.3
		Hs.117780	potassium voltage-gated channel, subfamily S, member 1	0.31
	down	Hs.156761	KIAA1102 protein	5.68
		Hs.100527	connector enhancer of KSR2	3.58
		Hs.81071	extracellular matrix protein 1	3.21
		Hs.43125	esophageal cancer related gene 4 protein	2.93
		Hs.75914	coated vesicle membrane protein	2.57
2 h	up	Hs.286049	phosphoserine aminotransferase 1	0.4
		Hs.6838	ras homolog gene family, member E	0.4
		Hs.143434	contactin 1	0.41
		Hs.194691	retinoic acid induced 3	0.44
		Hs.8375	TNF receptor-associated factor 4	0.46
	down	Hs.78465	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	4.44
		Hs.4055	MRNA: cDNA DKFZp564C2063	3.05
		Hs.72249	par-3 partitioning defective 3 homolog	2.82
		Hs.326035	early growth response 1	2.59
		Hs.737	immediate early response 2	2.08
4 h	up	Hs.123232	chromosome 14 open reading frame 143	0.21
		Hs.286049	phosphoserine aminotransferase 1	0.27
		Hs.2962	S100 calcium binding protein P	0.3
		Hs.146393	homocysteine-inducibleubiquitin-like domain member 1	0.31
		Hs.446546	asparagine synthetase	0.31
	down	Hs.406064	ras homolog gene family, member B	11.74
		Hs.78465	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog	5.69
		Hs.59889	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	4.04
		Hs.183	Duffy blood group	3.47
		Hs.326035	early growth response 1	3.54
16 h	up	Hs.286049	phosphoserine aminotransferase 1	0.11
		Hs.446546	asparagine synthetase	0.13
		Hs.301743	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	0.25
		Hs.154672	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase	0.26
		Hs.75061	MARCKS-like protein	0.28
	down	Hs.28777	histone 1, H2ac	6.55
		Hs.78465	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	4.64
		Hs.7644	histone 1, H1c??	4.53
		Hs.156316	decorin	4.43
		Hs.26931	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1	4.24

Table 2. Classification of functional group and gene expression ratio which were increased in time dependent manner by treatment of *Ailanthus altissima* water extract and Gleevec.

Biological process	Gene name	<i>Ailanthus altissima</i>				Gleevec			
		1h	2h	4h	16h	1h	2h	4h	16h
apoptosis	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	1.71	1.75	1.93	2.53	0.96	1.03	1.13	2.60
cell cycle	KH domain containing, signal transduction associated 1	1.20	1.19	1.67	2.59	0.83	1.09	1.08	2.22
	protein phosphatase 1	1.29	1.76	2.16	3.16	0.94	0.91	1.14	3.72
	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog	2.56	4.44	5.69	4.64	1.03	0.96	1.24	1.99
chromosome organization	histone 1, H2ae	1.14	1.46	2.99	4.20	1.08	1.29	1.66	3.65
	H3 histone, family 3B	0.82	0.85	1.54	2.13	1.00	0.89	0.66	1.08
	histone 2, H2be	0.99	1.04	1.97	2.79	0.95	1.00	0.96	1.77
	histone 1, H2ac	1.30	1.68	2.69	3.21	0.98	0.97	1.03	1.53
	histone 1, H1c	1.01	1.22	2.09	5.23	1.12	1.23	1.24	1.66
	histone 3, H2a	1.10	1.12	1.92	2.92	0.98	1.12	1.25	1.71
metabolism	hypothetical protein MGC27165	0.88	0.95	1.50	2.17	0.82	0.89	1.01	1.90
	integrin beta 4 binding protein	1.37	1.73	2.45	2.87	1.09	1.06	1.03	1.45
	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	1.15	1.52	1.34	1.94	0.84	0.95	0.97	2.28
	Rab geranylgeranyl transferase, beta subunit	1.33	1.87	1.98	1.77	0.94	0.95	1.12	2.41
	connexin 26	1.72	1.91	1.90	3.69	1.14	0.94	1.04	1.95
	par-3 partitioning defective 3 homolog	1.09	2.82	0.81	0.97	1.04	1.12	1.00	1.09
regulation of transcription	zinc finger protein 267	1.50	1.48	1.95	2.37	0.95	0.86	0.82	1.21
	zinc finger protein 184	1.69	1.91	2.46	2.56	1.02	0.99	0.94	1.21
	zinc finger protein 7	1.26	1.75	2.34	2.10	0.82	0.80	0.90	1.21
	polymerase (RNA) II	1.95	1.96	1.79	2.57	1.14	0.86	1.09	1.78
signal transduction	neuroepithelial cell transforming gene 1	1.07	1.37	1.41	2.37	0.90	1.08	0.94	2.23
	GABA(A) receptor-associated protein like 1	0.99	1.19	1.58	2.82	1.01	1.09	1.08	1.33
	epithelial protein lost in neoplasm beta	1.11	1.00	1.10	2.65	1.40	1.10	1.11	0.81
immune response	CD1A antigen	1.09	1.56	1.57	1.41	0.71	0.68	1.29	2.41
transport	mitochondrial Ca <sup>2+</sup> -dependent solute carrier	1.35	1.41	1.95	3.34	0.96	0.93	1.13	2.10

Table 3. Classification of functional group and gene expression ratio which were decreased in time dependent manner by treatment of *Ailanthus altissima* water extract and Gleevec.

Biological process	gene name	<i>Ailanthus altissima</i>				Gleevec			
		1h	2h	4h	16h	1h	2h	4h	16h
cell cycle	pleiotrophin	1.10	0.78	0.55	0.35	1.04	0.75	0.68	0.42
	proliferating cell nuclear antigen	0.88	0.92	0.78	0.30	1.02	0.91	0.86	0.47
	sestrin 2	1.28	0.95	0.44	0.60	0.88	0.80	0.52	0.46
	ADP-ribosyltransferase	0.89	0.75	0.69	0.32	1.00	1.05	0.96	0.49
metabolism	isocitrate dehydrogenase 1	1.21	0.56	0.55	0.37	0.86	0.74	0.55	0.46
	a disintegrin and metalloproteinase domain 29	0.75	0.69	0.40	0.29	0.99	1.15	0.89	0.40
	isoleucine-tRNA synthetase	1.08	0.91	0.91	0.57	0.86	1.09	0.79	0.37
	glucuronyl C5-epimerase	0.88	0.97	1.12	0.41	1.00	1.03	0.93	0.56
	phosphoserine aminotransferase 1	0.76	0.40	0.27	0.11	1.00	0.65	0.55	0.27
	ribosomal protein L39	0.81	0.75	0.78	0.31	0.86	0.90	0.88	0.87
	hypothetical protein FLJ10514	1.02	0.78	0.90	0.34	0.93	1.37	0.90	0.40
regulation of transcription	E2F transcription factor 3	0.97	0.99	0.71	0.35	1.03	1.06	0.99	0.90
	chromosome 11 open reading frame 13	0.95	0.85	0.73	0.35	1.03	1.01	1.04	0.84
	host cell factor C1	0.84	1.15	0.72	0.41	1.15	1.26	1.20	0.66
	CCAAT/enhancer binding protein beta	1.21	0.82	0.44	0.30	0.87	0.74	0.67	0.44
signal transduction	retinoic acid induced 3	0.48	0.44	0.32	0.36	0.98	0.95	0.76	0.66
	semaphorin	1.87	1.09	0.49	0.71	1.02	1.02	0.90	0.98
	MARCKS-like protein	1.08	0.88	0.81	0.28	1.02	1.02	0.97	0.79
	formyl peptide receptor-like 1	0.90	0.86	0.32	0.87	1.22	1.12	1.09	1.17
	mouse membrane bound C2 domain containing protein	1.13	1.02	0.93	0.66	1.08	1.12	0.98	0.35
transport	potassium voltage-gated channel H	0.88	0.99	0.66	0.34	1.10	0.87	1.00	0.93
	nucleoporin 37kDa	0.39	0.47	0.47	0.60	0.96	1.09	0.91	0.59
	protein disulfide isomerase related protein	1.08	0.90	0.62	0.35	1.00	0.87	0.78	0.47
	tryptophanyl-tRNA synthetase	0.92	0.73	0.54	0.43	0.86	0.59	0.55	0.32
protein folding	homocysteine-inducible, ubiquitin-like domain member 1	1.28	0.65	0.31	0.42	1.02	0.84	0.60	0.44
	FK506 binding protein 4	1.06	0.71	0.38	0.90	1.09	0.72	0.94	1.05

Table 4. Classification of functional group and gene expression ratio which were increased by treatment of *Ailanthus altissima* water extract but not by Gleevec.

Biological process	gene name	Ailanthus altissima				Gleevec			
		1h	2h	4h	16h	1h	2h	4h	16h
apoptosis	myeloid cell leukemia sequence 1	0.90	1.38	1.84	1.66	0.95	0.67	0.89	0.99
cell cycle	chromosome condensation protein G	1.28	0.97	1.04	2.04	0.94	0.98	1.01	0.55
metabolism	methyl-CpG binding domain protein 4	1.01	1.10	1.68	1.87	1.20	1.01	1.00	0.60
	hypothetical protein MGC27165	1.28	2.29	3.15	1.37	0.71	0.67	0.70	0.68
regulation of transcription	zinc finger protein 217	1.83	1.88	1.89	1.60	1.08	0.85	0.78	1.15
	early growth response 1	2.52	2.59	3.54	1.04	0.72	0.83	0.70	0.74
	zinc finger protein 167	1.44	1.71	2.46	1.80	0.95	0.71	0.75	1.14
	proline-rich nuclear receptor coactivator 2	1.01	1.24	1.36	1.66	0.85	0.87	0.77	0.45
signal transduction	thioredoxin interacting protein	1.37	1.87	1.64	2.82	0.69	0.47	0.83	0.77
	thioredoxin interacting protein	1.88	1.72	1.82	2.18	0.85	0.85	0.85	0.71
	Duffy blood group	1.12	1.24	3.47	1.08	0.91	1.05	0.83	1.10
	Rab coupling protein	1.34	1.38	1.68	2.15	0.77	1.13	0.94	0.74

## 고찰

저근백피는 가중나무(혹은 가죽나무, *Ailanthus altissima* Swingle) 및 동속의 근연식물의 수피와 근피를 건조한 것으로, 한방에서는 이질과 대하증, 지사제, 살충제 등의 목적으로 사용된다<sup>12)</sup>. 또한 최근 연구결과에 의하면, 저근백피 열수 추출물은 T 세포성 유래의 급성 림프성 백혈병 세포주인 Jurkat의 apoptosis를 유발하며, apoptosis와 cell cycle에 관련된 p21, cyclin D3, CDK4 등의 단백질 수준을 감소시키는 것이 알려졌다<sup>6)</sup>.

본 연구에서는 microarray assay를 이용하여 백혈병 세포주인 K-562에서 저근백피 열수 추출물에 의해 발현이 변화되는 유전자들을 조사하였으며, 기존 항백혈병 치료제로 시판중인 Gleevec과의 유전자 발현 변화 양상을 비교 분석하였다. 또한 변화된 여러 유전자들 중 저근백피와 Gleevec에 의해 발현 양상이 유사한 유전자들, 발현양상이 상반된 유전자들을 대상으로 apoptosis와 세포주기에 관련된 유전자들을 중심으로 기능별 유전자 발현을 비교 분석하였다.

저근백피 열수 추출물에 의해 발현이 변화된 약 250여개 유전자를 확인하였으며, 이들 유전자 발현을 Gleevec에 의해 변화되는 유전자들과 비교한 결과, 약 150개 유전자들의 발현은 유사한 발현양상을 보인 반면(Fig. 3A, 3C), 약 26개의 유전자들의 발현양상은 저근백피와 Gleevec에서 서로 상반된 모양을 나타내었다(Fig. 3F).

저근백피와 Gleevec에 의해 발현이 지속적으로 증가되는 유전자들 중 Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha(GADD45a), KH domain containing, signal transduction associated 1(SAM68), v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog(JUN) 등은 apoptosis를 유도 또는 cell cycle을 억제와 밀접한 관련이 있다(Table 2). GADD45A는 DNA excision repair를 촉진하고 세포가 S phase로 진입하는 단계를 억제하는 것으로 보고되었으며<sup>7)</sup>, 또한 이 유전자 산물은 자외선 등과 같은 외부 자극에 반응하여 p38/JNK를 활성화시켜 apoptosis를 유도하는 것

이 알려졌다<sup>8)</sup>. SAM68 또한 세포주기와 밀접한 관련이 있는 유전자로 extracellular signal-regulated kinase(ERK)에 의해 활성화되어 세포의 G1/S phase 전환을 억제하는 것이 보고되었고<sup>9)</sup>, transcription factor인 JUN은 FOS 등과 이합체를 형성하여 apoptosis를 유도하는 것으로 보고되었다<sup>10-12)</sup>.

저근백피와 Gleevec에 의해 발현이 지속적으로 감소하는 유전자군에는 cell cycle에 관여하는 것으로 알려진 pleiotrophin (PTN), proliferating cell nuclear antigen(PCNA), sestrin 2 (SEST2) 그리고 poly(ADP)-ribosyltransferase(PAR)이 포함된다(Table 3). PTN은 gastrointestinal cancer와 pancreatic cancer에서 발현이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 특히 췌장암세포의 성장 인자로 알려져 있다<sup>13,14)</sup>. PCNA는 p300과 결합하여 복합체를 형성하며 DNA repair 합성에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되었다<sup>15)</sup>. PAR은 세포 분열시 형성되는 방추사(spindle)과 nucleosome의 구성성분으로 알려져 있다<sup>16,17)</sup>. SEST2는 여러 자극에 대한 세포 생존을 조절하는 단백질이며 주로 hypoxia에 의해 발현이 증가하는 것으로 보고되었다<sup>18,19)</sup>. 따라서 cell cycle에 관여하는 유전자들 중 저근백피와 Gleevec에 의해 감소하는 유전자들은 주로 세포주기 조절이나 세포 생존 유지와 밀접한 연관이 있는 것으로 생각된다.

Apoptosis와 관련이 있는 myeloid cell leukemia sequence 1(MCL1), 세포주기와 관련된 chromosome condensation protein G(CAPG)는 저근백피에서는 증가한 반면 Gleevec 처리시에는 감소하는 유전자들이다. MCL1은 ML-1 human myeloid leukemia cell의 분화 초기에 발현이 유도되며, apoptosis를 억제하는 단백질로 알려진 p53과 상반된 역할을 한다<sup>20,21)</sup>. CAPG는 SMC(structural maintenance of chromosomes)에 속하는 단백질로 chromosome 응축을 담당하는 구성성분이다<sup>22)</sup>.

최근 유전자 연구에서 cDNA chip을 이용한 대규모 유전자 발현 분석은 연구 효율의 극대성을 가지고 있어 drug의 생체내 유전자 발현 및 조절 연구에 널리 사용되고 있다. 특히 천연물 및 한약과 같은 복합물의 생리적 효과를 유추하고 이들의 작용기전

을 밝힐 수 있는 유용한 도구라고 생각된다. 본 연구에서는 K-562 세포주에 저근백피 열수추출물을 처리하여 다양한 유전자들의 발현양상을 관찰하였고, 기존의 백혈병 치료제인 Gleevec과 유전자 발현 양상을 비교함으로써 저근백피의 백혈병 치료 가능성을 유추하고자 하였다. 그 결과 저근백피에 의해 발현 변화되는 약 250여개의 유전자중 약 150개 유전자의 발현 양상이 Gleevec과 유사한 변화를 보였다. 이상의 연구결과는 저근백피에 대한 항백혈병 효과에 대한 기반을 제공함으로써 저근백피를 이용한 항백혈병 치료제 개발에 활용할 수 있으리라 생각된다.

## 결 론

본 연구는 저근백피의 항백혈병 효과와 그 기전을 파악하기 위하여 백혈병 세포주인 K-562 세포에 저근백피 열수 추출물을 처리하고 여러 시간대별로 유전자 발현을 조사하고 기존의 백혈병 치료제인 Gleevec 효과와 비교 분석하였다. 유전자 발현 조사 도구로는 대규모 유전자 발현을 검색할 수 있는 cDNA chip을 이용하였다. 그 결과 apoptosis, 세포주기를 조절하는 여러 유전자들의 발현은 저근백피와 Gleevec 처리시 유사한 변화 양상이 관찰되었다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부의 한방치료연구개발사업 (02-PJ9-PG1-CO05-003)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. 保健社會部. 大韓藥典外韓藥(生藥)規格集, 서울, 1984.
2. 江蘇新醫學院(中國). 中藥大辭典, 제 1판, 下篇, 상해과학기술출판사, 상해, 1979.
3. Tang, W. Eisenbrand G Chinese drugs of plant origin. Springer-Verlag, New York, 1992.
4. 주화균, 노영수, 김신규. 저근백피 Tar의 항균작용에 관한 연구. 경희약대는문집 vol.12. pp 57-62, 1984.
5. 김 종, 최종원, rlagPurd, 박수원, 이창규. 저근백피 성분의 생리활성에 관한 연구(I). 메탄올 추출물과 클로로포름 분획이 Epoxide 분해계에 미치는 영향. 생약학회지 vol.25 pp 47-54, 1994.
6. 향상구, 이형철, 김춘관, 김대근, 이기욱, 윤용갑, 전병훈. Jurkat T 입과구의 세포주기 기전에 미치는 저근백피 (*Ailanthus altissima*)의 효과. 약학회지. vol.46 No. pp 1,18-23, 2002.
7. Smith, M.L., Chen, I-T., Zhan, Q., Bae I, Chen, C-Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M., Fornace, A.J. Jr. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. Science 266(5189):1376-1380, 1994.
8. Tran, H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, A.J.

- Jr, DiStefano, P.S., Chiang, L.W., Greenberg, M.E. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. Science 296(5567):530-534, 2002.
9. Barlat, I., Maurier, F., Duchesne, M., Guitard, E., Tocque, B., Schweighoffer, F. A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain. J. Biol. Chem. 272(6):3129-3132, 1997.
10. Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E.F., Karin, M. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. Cell 103(6):897-907, 2000.
11. Whitfield, J., Neame, S.J., Paquet, L., Bernard, O., Ham, J. Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. Neuron 29(3):629-643, 2001.
12. Nateri, A.S., Riera-Sans, L., Da Costa, C., Behrens, A. The ubiquitin ligase SCF(Fbw7) antagonizes apoptotic JNK signaling. Science. 303(5662):1374-1378, 2004
13. Souttou, B., Juhl, H., Hackenbruck, J., Rockseisen, M., Klomp, H.J., Raulais, D., Vigny, M., Wellstein, A. Relationship between serum concentrations of the growth factor pleiotrophin and pleiotrophin-positive tumors. J. Nat. Cancer Inst. 90(19):1468-1473, 1998.
14. Weber, D., Klomp, H-J., Czabayko, F., Wellstein, A., Juhl, H. Pleiotrophin can be rate-limiting for pancreatic cancer cell growth. Cancer Res. 60(18):5284-5288, 2000.
15. Hasan, S., Hassa, P.O., Imhof, R., Hottiger, M.O. Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. Nature 410(6826):387-391, 2001.
16. Chang, P., Jacobson, M.K., Mitchison, T.J. Poly(ADP-ribose) is required for spindle assembly and structure. Nature 432(7017):645-649, 2004.
17. Kim, M.Y., Mauro, S., Gevry, N., Lis, J.T., Kraus, W.L. NAD(+)-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. Cell 119(6):803-814, 2004.
18. Budanov, A.V., Sablina, A.A., Feinstein, E., Koonin, E.V., Chumakov, P.M. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. Science 304(5670):596-600, 2004.
19. Budanov, A.V., Shoshani, T., Faerman, A., Zelin, E., Kamer, I., Kalinski, H., Gorodin, S., Fishman, A., Chajut, A., Einat, P., Skaliter, R., Gudkov, A.V., Chumakov, P.M., Feinstein, E. Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability. Oncogene 21(39):6017-6031, 2002.
20. Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., Craig,



- R.W. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90(8):3516-3520, 1993.
21. Leu, I-J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., George, D.L. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature Cell Biol.* 6(5):443-450, 2004.
22. Jager, D., Stockert, E., Jager, E., Gure, A.O., Scanlan, M.J., Knuth, A., Old, L.J., Chen, Y-T. Serological cloning of a melanocyte rab guanosine 5-prime-triphosphate-binding protein and a chromosome condensation protein from a melanoma complementary DNA library. *Cancer Res.* 60(13):3584-3591, 2000.