

원저

## Oligonucleotide chip을 이용한 紅花子藥鍼液이 肝癌細胞柱의 遺傳子 發顯에 미치는 影響

이경민 · 임성철 · 정태영 · 서정철 · 한상원

대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

### Abstract

#### Effect of Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture Solution(CTF-HAS) on Gene Expression in HepG2 carcinomar cells

Lee Kyung-min, Lim Seong-chul, Jung Tae-young, Seo Jung-chul and Han Sang-won

Department of Acupuncture & Moxibustion,  
College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

**Objective** : It has long been known about the osteogenic effect of CTF-HAS on bone tissues. However, it has not been determined the effect of CTF-HAS on cancer cells. The purpose of this study is to screen the CTF-HAS mediated differentially expressed genes in cancer cells such as HepG2 hepatoma cells lines. Oligonucleotide microarray approach were employed to screen the differential expression genes.

**Methods** : CTF-HAS was prepared by boiling and stored at -70°C until use. Cells were treated with various concentrations of CTF-HAS(0.1, 0.5, 1.5, 10, 20mg/ml) for 24 h. Cytotoxicity was tested by MTT assay. To screen the differentially expressed genes in cancer cells, cells were treated with 1.5mg/ml of CTF-HAS. For oligonucleotide microarray assay, total RNA was used for gene expression analysis using oligonucleotide genechip (Human genome U133 Plus 2.0., Affimatrix Co.).

**Results** : It has no cytotoxic effects on HepG2 cells in all concentrations (0.1, 0.5, 1.5, 10, 20mg/ml). More than twofold up-regulated genes were 19 genes. The number of more than twofold down-regulated genes was 13.

- 접수 : 2005년 5월 9일 · 수정 : 2005년 5월 14일 · 채택 : 2005년 5월 14일  
· 교신저자 : 한상원, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대부속대구한방병원 침구과  
Tel. 053-770-2236 E-mail : hansw@dhu.ac.kr

**Discussion** : This study showed the screening of CTF-HAS mediated differentially regulated genes using combined approaches of oligonucleotide microarray. The screened genes will be used for the better understanding in therapeutic effect of CTF-HAS on cancer field.

**Key words** : oligonucleotide microarray, CTF-HAS, gene expression, HepG2

## I. 緒 論

현대인에게 ‘죽음에 이르는 병’으로 인식되고 있는 癌은 현재 한국인의 疾病死因 중 1위를 차지하고 있으며, 최근 20년 간 지속적인 증가를 보이고 있다<sup>1-2)</sup>.

癌에 대해 西洋醫學에서 연구가 많은 발전을 거듭하고 治療法에서도 手術療法, 放射線療法, 化學療法, 免疫療法 등의 方法이 알려져 있으나 어느 療法도 癌의 완전한 治療法이 되지 못하고 있는 실정이다<sup>2-3)</sup>.

최근 의학계에서 인간게놈계획이 研究, 進行됨에 따라 癌細胞의 發生으로부터 增殖, 進展, 轉移에 이르는 과정에서 發癌機轉의 각 단계마다 關聯된 다양한 遺傳子들 및 그 變化를 찾아낼 수 있는 기회가 많아졌다<sup>4)</sup>. 또한, 遺傳子 發顯에 관한 情報를 研究하는 方法으로서 기존의 개별 遺傳子 發顯을 관찰하던 方法에서 탈피하여 DNA chip을 利用함으로써 大量의 遺傳子 發顯 情報를 한꺼번에 평가하는 方法이 시도되었다<sup>5-6)</sup>. 이로 인해 보다 많은 量의 遺傳 發顯情報를 한 번에 파악할 수 있게 됨에 따라 遺傳子 자체의 情報 뿐 아니라 각종 治療法 이행 후의 變化를 폭넓게 파악할 수 있게 되어 研究 發展에 획기적인 전기를 마련할 수 있게 되었다<sup>7)</sup>.

현재 한의학계에서는 單味 藥材와 韓方 處方으로부터 抗癌劑를 개발하려는 많은 연구가 시행되고 있으며, 다양한 실험을 통하여 우수한 治療 效果가 報告되고 있다<sup>8-9)</sup>. 특히 藥鍼療法을 이용한 抗癌효과에 대한 연구가 활발히 진행되어 임 등<sup>10)</sup>, 김 등<sup>11)</sup>은 각각 人蔘藥鍼, 金銀花藥鍼, 蟾蜍藥鍼 등의 抗癌 效果를 報告한 바는 있다. 그러나 大量의 遺傳子 發顯 分析 技法을 이

용하여 韓醫學에 근거를 두고 藥材 檢索을 한다면 매우 有用할 것으로 생각되나, 최근 韓 등<sup>12)</sup>의 cDNA chip 遺傳子 發顯 分析에 대한 報告 외에는 연구가 매우 不足한 실정이다.

이에 著者는 活血行瘀, 消腫散結, 解癥毒, 解毒하는 效能<sup>13)</sup>이 있는 紅花子 (Carthami Tinctorii Fructus ; CTF)로 藥鍼液을 調製하여, 抗癌 效能을 밝히고자 肝癌 細胞株에 최신 oligonucleotide chip assay법을 이용하여 遺傳子 發顯을 分析한 結果 有意性이 있어 報告하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 藥材

本 實驗에서 사용된 紅花子 (Carthami Tinctorii Fructus ; CTF) (경북, 의성)는 대구한의대학교 부속 대구한방병원 藥劑科에서 300g을 購入한 후 精選하여 使用하였다.

### 2. 方法

#### 1) 藥鍼液의 調製

紅花子를 破碎하여 25g의 분말을 500ml의 蒸溜水에 넣어 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 紅花子와 혼합된 蒸溜水를 13,000rpm으로 1시간 동안 원심 분리하여 上淸液만을 회수하였다. 上淸液을 멸균된 필터기를 사용하여 얻은 다음 -70℃에서 48시간 동안 냉동 건조시켜 10g의 건조된 분말을 얻었다.

## 2) 細胞 培養

본 실험에 사용된 細胞柱는 肝癌 細胞에서 유래한 HepG2 (hepatic cancer cell)는 ATCC (U.S.A.)에서 구입 확보하였다. 細胞 培養에 사용된 미디어는 DMEM/F12k (50:50) (GibcoBRL, U.S.A.)에 FBS (fetal bovine serum) (GibcoBRL, U.S.A.) 10%를 첨가하여 사용하였다. 배양기의 약 70% 정도 細胞가 자라면 ( $2.5 \times 10^5$ ) 계대 培養한 후 사용하였다. 시료를 처리하기 12시간 전에 培養液을 serum이 없는 상태로 만들어서 serum 내의 cytokine 및 단백질의 영향을 배제하였다. 紅花子藥鉞液의 농도를 0.1, 0.5, 1.5, 10 및 20mg/ml되게 HepG2에 24시간 처리하였다. 細胞를 trypsin-EDTA 1ml을 첨가하여 PBS로 세척 후 원심 분리하여 회수하였다.

## 3) RNA 抽出

細胞 培養液을 제거하고 PBS로 세척하였다. Trypsin-EDTA buffer를 1ml씩 첨가하여 37°C에서 5분 정도 방치한 후 PBS 10ml를 첨가하여 15ml 튜브에 모은 다음 1,000rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 細胞만을 모았다. Total RNA를 분리하기 위하여, tri-Reagent kit (molecular research center inc., U.S.A.)를 사용하였다. Tri-Reagent buffer로 1ml의 細胞에 첨가한 후 실온에서 10분간 방치하고 12,000rpm으로 15분 동안 원심 분리한 후 上淸液만을 취하고 0.2ml chloroform을 넣고 1분 동안 혼합한 뒤 실온에서 10분간 방치한 후, 12,000rpm으로 15분 동안 원심 분리하였다. 무색층인 上淸液을 새로운 tube에 넣고 0.5ml의 isopropanol과 천천히 혼합하였다. 12,000rpm으로 5분 동안 원심 분리한 후 上淸液을 버리고 RNA pellet를 얻었다. Diethyl pyrocarbonate 처리된 75% 에탄올 (DEPC-75%ethanol)로 2번 세척한 후에 RNA pellet를 건조한 후 DEPC-3차 蒸溜水를 사용하여 녹였다. Total RNA는 분광광도계 (Ultraspec 2000UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, U.S.A.)를 사용하여 정량하였다.

## 4) MTT (tetrazolium-based colorimetric) assay

여러 농도(0.1, 0.5, 1.5, 10, 20mg/ml)의 紅花子藥鉞液을 처리한 細胞를 1,000rpm에서 5분 정도 원심 분리한 후 남은 細胞에 10ml의 細胞 培養 溶液을 넣고 멸균 피펫을 통한 반복 흡입으로 단일 細胞 부유액을 얻었다. 부착성 細胞의 경우에는 trypsin을 처리하여 細胞를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 細胞 培養 溶液으로 중화시켜 1,000rpm으로 다시 5분 정도 원심 분리한 후 10ml의 細胞 培養 溶液으로 멸균피펫을 통한 반복 흡입으로 단일 細胞 부유액을 얻었다.

예비 실험에서 결정된 적정 농도를 기준으로 細胞의 數를 결정한 후 준비된 단일 細胞 부유액을 넓은 Cane에서 잘 혼합한 뒤 multichannel 피펫을 이용하여 각 well에 180 $\mu$ l의 細胞 부유액을 접종하였다. 측정하고자 하는 시료를 PBS에 녹인 후 농도별로 20 $\mu$ l씩 각 well에 첨가하였다.

腫瘍細胞柱와 檢體가 접종된 plate를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 미리 정해진 시간 동안 培養한 후 plate의 각 well에 0.1mg (50 $\mu$ l의 2mg/ml)의 MTT를 가해주고 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 4시간 더 培養하여 MTT가 환원되도록 하였다. 培養 종료 시 plate를 450g $\times$ 5분간 원심 분리하여 생성된 formazan 결정을 가라앉힌 후 각 well에 형성된 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 배지를 30 $\mu$ l 정도만 남기고 multidispenser를 이용하여 모두 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 생성된 formazan 결정을 용해시키기 위하여 DMSO를 150 $\mu$ l 씩 가한 후 formazan결정이 녹을 수 있도록 약 15분간 가볍게 진탕해 주고 96-well plate용 광도계 (ELISA reader)로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 細胞에 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 細胞數와 비례한다. 통계처리는 student t-test로 처리하였으며, 유의수준은  $p < 0.05$ 로 하였다.

## 5) Oligonucleotide chip 分析

Total RNA를 한 등<sup>13)</sup>의 방법과 같이 분리하였다. cDNA 합성은 total RNA 10 $\mu$ g을 기저로

하여 superscript reagent (Invitrogen, U.S.A.)를 사용하여 수행하였다. 만들어진 cDNA를 알코올 침전법으로 분리 농축하였고 biotin-labeled cRNA는 BioArray HighYield RNA transcription labeling kit (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY, U.S.A.)를 사용하여 in vitro 전사법으로 만들었다. 만든 biotinylated cRNA는 RNeasy minikit (Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.)으로 clean하고 양을 측정하였다. Biotinylated cRNA 20 $\mu$ g를 94°C 완충액 (200mM tris-acetate (pH 8.1), 500KOAc, and 150 MgOAc) 속에 35분간 두어 약 50nucleotides 크기로 만들었다. Hybrid 혼합물은 15 $\mu$ g의 분절 조정된 cRNA와 Eukaryotic Hybridization controls (표준 cRNA와 oligonucleotide B2 포함)로 되어 있으며 이는 前處理한 Human Affymetrix chip (Human genome U133 Plus 2.0)에 45°C에서 16시간 동안 Genechip Hybridization Oven 640 (Affymetrix, U.S.A.)을 이용하여 hybridization시켰다. 그 후에 chip을 Genechip Fluidics Station 400 (Affymetrix, U.S.A.)으로 low-stringency buffer (6 $\times$ standard saline phosphate 및 EDTA, 0.01% Tween 20, 0.005% antifoam)에서 10cycle (two mixes per cycle)로 세척 후 high-stringency buffer (100N-morpholinoethanesulfonic acid, 0.1 NaCl, 및 0.01% Tween 20)에서 4cycle로 세척하고 streptavidin phycoerythrin으로 염색하였다. 이 과정에 이어서 normal goat IgG와 biotinylated mouse antistreptavidin antibody로 반응시키고 다시 streptavidin phycoerythrin으로 염색하였다. Chip은 Hewlett Packard Gene Array Scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA, U.S.A.)로 스캔하였다. 신호강도는 150의 표적치에 맞추어 조정하였다. MAS (MicroArray Suite) version 5.0을 이용하여 分析값이 수치화되면 가공되지 않은 데이터인 "Signal"값은 전사체의 유무에 따라 "Detection" calls로 바뀌게 되며, 부재의 의미는 "발현되지 않음"을 의미한다. "Detection" calls는 존재(P), 결여(A) 및 경계(M)로 구분되고 각각의 분류는 "Detection p-value"로 제시되며, 각 조직에서의 발현은 MAS version 5.0 프로그램

을 이용하였고, 比較分析을 통하여 "Signal Log-Ratio"가 생성된다. 이는 增加(I), 미약한 增加(MI), 減少(D) 미약한 減少(MD) 및 변화 없음(NC)으로 분류된다. 각각의 구분에는 "Change p-value"도 제시되며, 이러한 모든 통계적인 데이터는 microarray data를 分析하는데 사용하였다. 分析은 Affymetrix社에서 나온 MAS version 5.0 software를 이용하였다.

### III. 成 績

#### 1. MTT assay

紅花子藥鉞液 처리 후 24시간 뒤 細胞 增殖을 보면, 肝癌 細胞柱의 경우 0.1, 0.5mg/ml에서는 對照群과 比較하여 거의 차이가 나지 않았으나, 1.5, 10, 20mg/ml(약 24%)에서 細胞 數의 有意한 減少를 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

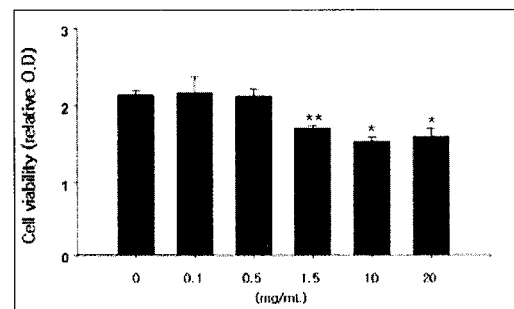


Fig. 1. Effects of CTF-HAS on HepG2 Cell Proliferation

\* : Statistically significant value compared with control data(\* : P <0.05, \*\* : P <0.01)  
CTF-HAS : Carthami Tinctorii Fructus Herbal

#### 2. Oligonucleotide chip 分析

본 실험에 사용된 遺傳子 chip은 Human Genome U133 Plus 2.0으로 chip 위에 총 probe 數가 54,676개이고 遺傳子 數로는 40,000개가 집적되어 있다. 細胞 毒性 실험에서 비교적 毒性이 적고 紅花子藥鉞液의 약효를 충분히 나타낼 수 있는 실험군(1.5mg/ml)과 대조군으로 나누어 分析하였다.

1) 發顯이 增加된 遺傳子

肝癌 細胞柱에서 發顯이 2배 이상 增加된 遺傳子들로는 UCIA (upregulated during camptothecin-induced apoptosis of U937 cells) (GB (genebank) No. BG389787), PMLRARA fusion protein (GB No. AJ417079.1), metastasis related protein 2 (GB No. AF100640.1) 등 19개 였다. 이 중 가장 높은 增加를 보이는 遺傳子는 아직 기능이 알려져 있지 않은 UCIA라는 遺傳子로 거의 8배의 增加를 보였다. 그 외 腫瘍과 연관되는 遺傳子로는 PMARARA(GB No. AJ417079.1), MB2 (GB No. AF100640.1), centromere protein F, human oral cancer candidate gene mRNA (GB No. U55185.1), retinoblastoma-like 1 (GB No. AL365505) 등이 있었다. 이 외에도 EPPIN (epididymal protease inhibitor)-3 (GB No. NM\_020398.1), transgelin (GB No. NM\_003186.2), tomoregulin (GB No. AB004064.1) 등이 있었다 (Table 1, Fig. 2-1).

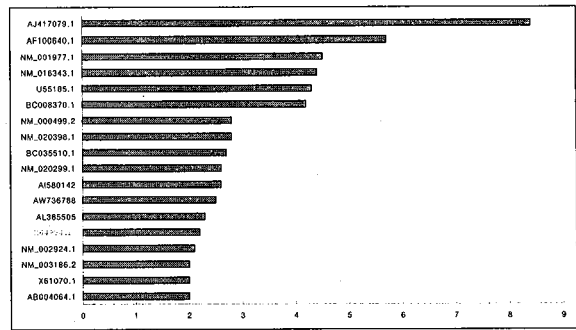


Fig. 2-1. CTF-HAS increased their gene expression in HepG2

Each bar indicates fold increase as shown in Table 1. X-axis indicates fold increase of CTF-HAS compared to control and Y-axis indicates genebank numbers.

CTF-HAS ; Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture Solution

2) 發顯이 減少된 遺傳子

肝癌 細胞柱에서 發顯이 2배 이상 減少된 遺傳子로는 BTF (basic transcription factor)3 (GB No. M90356), regulatory factor X-associated protein

Table 1. Increased Genes after Treatment with CTF-HAS in HepG2

Signal	Log Ratio	Descriptions
8.4	BG389789	upregulated during camptothecin-induced apoptosis of U937 cells.
5.7	AJ417079.1	PMLRARA fusion protein
4.5	AF100640.1	metastasis related protein (MB2)
4.4	NM_001977.1	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A) (ENPEP)
4.4	NM_016343.1	centromere protein F (350400kD, mitosin) (CENPF)
4.3	U55185.1	human oral cancer candidate gene mRNA
4.2	BC008370.1	staufen (Drosophila, RNA-binding protein)homolog 2
2.8	NM_000499.2	cytochrome P450, subfamily I
2.8	NM_020398.1	eppin-3 (EPPIN3)
2.7	BC035510.1	similar to neuronal thread protein
2.6	NM_020299.1	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10)
2.6	AI580142	Williams-Beuren syndrome chromosome region 14
2.5	AW736788	uncharacterized gastric protein YC12P
2.3	AL365505	retinoblastoma-like 1 (p107)
2.2	X64984.1	olfactory receptor, family 5, subfamily K, member 1
2.1	NM_002924.1	regulator of G-protein signalling 7 (RGS7)
2	NM_003186.2	transgelin (TAGLN)
2	X61070.1	T cell receptor
2	AB004064.1	tomoregulin

Table 2. Decreased Genes after Treatment with CTF-HAS in HepG2

Signal Ratio	Log	Descriptions
-4	M90356	basic transcription factor 3, like 3
-3.9	NM_000538.1	regulatory factor X-associated protein (RFXAP)
-3.8	AJ245377.1	2B4 NK receptor homologue (h2B4 gene)
-3.4	BF511170	paxillin
-3.3	NM_000349.1	steroidogenic acute regulatory protein (STAR)
-2.9	BF663141	villin 2 (ezrin)
-2.7	NM_005940.2	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3) (MMP11)
-2.7	NM_000221.1	ketoheokinase, isoform a
-2.7	AF182273.1	cytochrome P450-3A4 (CYP3A4)
-2.5	NM_018399.1	vanin3 (HSA238982)
-2.5	AI479168	EST
-2.2	NM_000298.1	pyruvate kinase, liver and RBC
-2.2	AF230095.1	kidney-specific protein 32

CTF-HAS ; Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture Solution

(GB No. NM\_000538.1), 2B4 NK receptor homologue (GB No. AJ245377.1) Paxillin (GB No. BF511170), STAR (steroidogenic acute regulatory protein) (GB No. NM\_000349.1), villin2 (GB No. BF663141), MMP11 (matrix metalloproteinase 11) (GB No. NM\_005940.2), Ketoheokinase (GB No. NM\_000221.1), CYP3A4 (cytochrome P450-3A4) (GB No. AF182273.1), EST (GB No. AI479168), pyruvate kinase (GB No. NM\_000298.1), kidney-specific protein 32 (GB No. AF230095.1) 등 13개였다. 이 중 비교적 기능

알려져 있는 BTF3, paxillin, STAR, MMP11, pyruvate kinase 등의 遺傳子들도 있으나 나머지 遺傳子들의 기능은 아직 밝혀지지 않았다(Table 2, Fig. 2-2).

#### IV. 考 察

癌은 우리 몸을 구성하는 기본 단위인 細胞가 그 정상적인 調節機能의 範疇과 주위 臟器의 정상적인 영향력을 벗어나 自律成을 지나고 非可逆的으로 過剩 增殖을 하는 것으로, 臨床 및 病理 形態的인 소견에 의하여 良性 腫瘍과 惡性 腫瘍으로 구분된다<sup>14)</sup>.

이 중 일반적으로 癌이라고 하는 모든 惡性 腫瘍은 빠른 成長, 浸潤, 체내 각 부위로의 擴散 및 轉移 등과 같은 특성이 있어 생명에 위험을 초래한다. 우리나라에서도 癌에 의한 死亡率이 최근 20년 간 꾸준한 상승을 보여 전체 死亡原因 1위를 차지하면서 국민보건을 위협하는 가장 큰 요인이 되고 있다<sup>1,3,14)</sup>.

韓醫學에서는 癌에 대하여 殷墟의 甲骨文에서 ‘瘤’라 한 것에서 처음으로 나타나며, 이후 『內經』<sup>15)</sup>에서 積聚, 腸覃, 石瘕, 癰, 五臟之積 등에 대하여 구체적으로 언급한 이래로 癌은 腫瘍, 腸

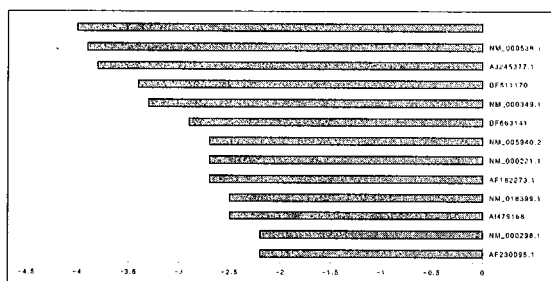


Fig. 2-2. CTF-HAS decreased their gene expression in HepG2.

Each bar indicates fold decrease as shown in Table 2. X-axis indicates fold decrease of CTF-HAS compared to control and Y-axis indicates genebank numbers.

CTF-HAS ; Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture Solution

覃, 癭瘤, 癭贅, 贅疣, 癥瘕, 積聚, 噎膈, 反胃, 惡瘡, 岩 등의 範疇에서 취급하고 있다<sup>16)</sup>. 癌의 발생 원인은 外感邪氣, 七情의 변화, 飲食失調 및 正氣虛弱 등으로 인하여 氣滯血瘀가 되거나 臟腑의 機能이 失調되어 발생하는 것으로 볼 수 있다<sup>17)</sup>.

최근 韓醫學에서 痛에 대해 여러 가지 연구<sup>8-9)</sup> 진행되고 있는데, 이 중에서 經絡學說의 原理에 의거하여 韓藥材를 선택하여 有關한 穴位, 壓痛點 및 陽性反應點에 注入하여 刺鍼과 藥物作用을 통하여 生體의 機能을 조정하고 病理狀態를 개선시켜 질병을 치료하는 新鍼療法인 藥鍼療法<sup>18)</sup>으로 다양한 약침을 이용한 抗癌 연구가 활발히 진행되고 있다. 임 등<sup>10)</sup>이 皮膚痛이 誘發된 ICR계 생쥐의 足三里에 人蔘藥鍼을 주입한 후 腫瘍의 體積, B細胞와 T細胞의 含量, 림프구 增殖反應, 大食細胞의 貪食能, IL-2와 interferon의 生産能을 측정하고 比較群에 비해 有意한 效果가 있음을, 김 등<sup>11)</sup>은 全蝎藥鍼을 中脘에 주입했을 때 발암물질이 誘發하는 突然變異原성과 遺傳 毒性을 抑制한다는 結果를 報告하였다. 이 등<sup>19)</sup>은 膽癌 생쥐에게 蟾蜍藥鍼을 中脘과 足三里에 주입한 結果 腫瘍抑制能, 細胞毒性能, 生存率 延長 效果에 有意한 效果가 있음을 報告하였다. 그리고 이 등<sup>20)</sup>, 배 등<sup>21)</sup>은 각각 菟絲子藥鍼과 魚腥草藥鍼을 腫瘍을 誘發한 생쥐에 주입하여 抗癌과 免疫機能 增進에 有意한 效果가 있음을, 박 등<sup>22)</sup>은 B16-F10과 HT-1080 및 S-180 癌細胞柱로 腫瘍을 誘發시킨 생쥐의 中脘에 益智仁藥鍼을 주입한 結果 抗腫瘍 및 免疫效果가 있음을 報告하였다.

紅花子 (*Carthami Tinctorii Fructus* ; CTF)는 國花科에 속하는 잇꽃의 종자<sup>23)</sup>로, 성분<sup>24)</sup>은 linoleic acid와 oleic acid의 glyceride가 주성분인 20-30%의 脂肪油와 serotonin, serotonin conjugate, serotobenin 등으로 밝혀져 있다. 性은 溫하고 味는 苦하며 心脾 二經에 歸經하여 活血祛瘀, 解毒, 通絡止痛의 效能이 있어 瘀血腹痛, 動脈硬化症, 産後瘀血腹痛, 腦血栓 등에 활용하며<sup>13,23)</sup>, 최근에는 민간에서 紅花子가 뼈질환에 좋다하여 일반인들이 많이 복용하고 있는 實情이다.

그 일환으로 學界에서는 紅花子를 이용한 연

구가 많이 報告되고 있는데 岳 등<sup>25)</sup>은 喃소적출로 誘發된 estrgen 결핍성 骨多孔症에 紅花子·鹿茸·紫河車藥鍼을 주입한 結果 일정한 效果가 나타났으며, 김 등<sup>26)</sup>은 흰쥐의 關元 相應部에 桃仁 및 紅花藥鍼을 주입하여 醋酸法과 熱板法에 대한 鎮痛作用과 endotoxin으로 誘發된 혈관내 혈전증후군에 대해 有意한 效果를 연구하였으며, 김 등<sup>27)</sup>은 MSU (microcrystalline sodium urate)로 急性 痛風을 誘發시킨 흰쥐에게 紅花油藥鍼을 처리한 結果를 報告하였다. 특히 안 등<sup>28)</sup>과 윤<sup>29)</sup>은 Sarcoma-180 細胞를 주입한 생쥐에게 각각 紅花子藥鍼과 紅花子·巴豆混合藥鍼을 주입한 結果, 抗腫瘍 效果 및 免疫增強效果가 있음을 발표하는 등 骨多孔症, 關節炎, 抗癌 등에 대한 많은 연구가 報告되고 있으나 紅花子藥鍼液에 대해 大量的 遺傳子 分析을 통한 抗癌에 관한 研究는 거의 없는 實情이다.

이에 紅花子藥鍼液의 臨床的 作用機轉을 보다 깊이 이해하고 臨床的 應用의 폭을 넓히는 데에 도움이 되는 기초 자료를 마련하고, 抗癌 效能을 밝히고자 肝癌細胞柱에 최신 oligonucleotide chip assay법을 통한 大量的 遺傳子 發顯 情報를 한꺼번에 獲得하여 分析하게 되었다.

최근 수많은 遺傳子를 찾고 그 機能을 알아내는데 종래의 Southern이나 Northern blotting, PCR을 기본으로 한 SSH (substractive suppressive hybridization)<sup>30)</sup>, RDA (representational difference analysis)<sup>31)</sup> 그리고 difference display<sup>32)</sup> 方法들이 있지만 많은 양의 RNA를 必要로 하며 僞陽性率이 높아 수많은 인간의 遺傳子를 比較하는데 한계가 있다<sup>33)</sup>. 그러나 최근 DNA chip 기술의 도입으로 이 분야 研究에 획기적인 전기가 마련되었다<sup>5-7)</sup>. 이러한 分子生物學的 발전은 빠르게 발전하는 전자·기계공학의 발달과 밀접한 연관을 갖는데 이러한 노력으로 성인 엄지손톱 정도의 적은 공간에 수천에서 수만 가지의 적은 양의 유전물질을 한꺼번에 고밀도로 심어 놓을 수 있는 DNA chip기술은 수많은 遺傳子를 한꺼번에 解讀하거나 比較할 수 있게 되었다. 여기에는 두 가지의 대표적인 方法이 있는데, 그 중 하나는 1995년 스텐포드 대학에서 개발한 cDNA를 작은 유리판 위에 고밀도로 심는 cDNA

microarray chip 방법이고<sup>5)</sup>, 다른 하나는 Affymetrix社에서 개발한 20-25개의 염기들로 이루어진 수 만 개의 oligonucleotide를 심은 oligonucleotide chip 方法<sup>6)</sup>이다.

현재 다량의 유전자 분석 방법 중 점차적으로 oligonucleotide chip을 많이 사용하는 추세이다. 이는 cDNA chip의 여러 가지 단점들을 극복할 수 있기 때문이다. 一례로 oligonucleotide chip은 같은 크기의 유리판에 훨씬 집적도를 높여 다량의 유전자를 한꺼번에 검색할 수 있다. Affymetrix社<sup>34)</sup>는 computer chip을 만들 때 사용되는 photolithography라는 기술을 응용하여 하나의 유리판 위에 수 만개의 다른 nucleotide들을 직접 합성하였다. Affymetrix社<sup>34)</sup>는 이 기술을 사용하여 초기에 1.28cm<sup>2</sup> 안에 65,000개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들었고, 지금은 400,000개 이상의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들 수 있게 되었다. 각각의 oligonucleotide들은 15-25개의 염기로 이루어져 있으며, oligonucleotide가 합성되는 유리의 표면은 각각의 염기들이 합성할 수 있게 보조체가 붙어 있다. 하지만 이들 보조체는 평소에 빛에 민감한 화학 물질로 덮여 있어 염기들이 합성될 수 없다. 이러한 성질을 이용하여 특별히 설계된 photomask를 위에 놓고 빛을 쏘이면 구멍이 나 있는 곳으로 빛이 들어가 그곳에 있는 보조체의 화학물질들을 제거한다. 이렇게 화학물질이 제거된 보조체들을 가진 chip을 한가지 염기가 있는 곳에 넣으면 모든 활성화된 보조체들에 염기가 가서 합성된다. cDNA microarray chip과 oligonucleotide chip의 다른 점은 chip에 완전한 유전자 대신에 25mer를 심은 것이다. 이와 같은 차이점 때문에 유전자 발현을 검색하는데 쓰이는 oligonucleotide chip을 만들 때 유전자의 어떤 부분을 선택하여 합성하는지가 아주 중요하다. 평균 20개의 25mer들이 하나의 유전자를 대표하여 선택된다. 또한 각각의 결합 온도 (annealing temperature)가 서로 비슷해야 한다. oligonucleotide chip도 cDNA microarray chip과 같은 환경에만 발현하는 유전자를 찾을 수 있을 뿐만 아니라 발현 정도까지도 알 수 있다. 또한 Affymetrix oligonucleotide chip은 하나의 염기

서열만 틀려도 결합을 하지 않는 성질을 이용하여 한 염기에 생긴 돌연변이까지도 찾아낼 수 있다. 따라서 oligonucleotide chip의 장점<sup>34)</sup>은 첫째로 유전자 발현을 검색할 수 있고, 둘째로 많은 수의 유전자들을 한 번에 검색 가능하다. 셋째로 돌연변이를 검색할 수 있고, 넷째로 병의 진단, 유전자 발현 청사진을 만드는데 이용 가능하다. 다섯째로 인체 유전자의 기능분석 연구에 이용 가능하며, 여섯째로 산업용 유전자 재조합 동식물 및 미생물 연구에 이용 가능하고, 일곱째로 실험용 동식물 모델 연구, 암 및 질병관련 유전자 진단, 유전자 치료 및 임상 병리학, 동식물 검역 및 환경변화에 따른 생태학 연구에 이용 가능하다. 이외에도 식품 안전성 검사, 신약 개발, 약제내성 검색 진단 및 DNA염기서열 분석에 이용 가능하다.

본 실험에서는 먼저 紅花子藥鉞液의 癌細胞增殖抑制效能 및 적정 농도를 알아보기 위해 MTT-assay 分析을 하였다. 紅花子藥鉞液 처리 후 24시간 경과의 細胞增殖을 보면, 0.1, 0.5mg/ml에서는 對照群과 비교하여 거의 차이가 나지 않았으나 1.5, 10, 20mg/ml(약 24%)에서 細胞數의 有意한 減少를 관찰할 수 있었다.

紅花子藥鉞液에 의한 細胞增殖抑制를 分子生物學的 기전으로 설명하기 위하여 cDNA microarray 分析을 시행하였다.

紅花子藥鉞液을 처리한 경우 肝癌 細胞株에서 發顯이 2배 이상 增加된 遺傳子들로는 UCIA (GB (genebank) No. BG389787), PMLRARA fusion protein (GB No. AJ417079.1), metastasis related protein 2 (GB No. AF100640.1) 등 19개였다. 이 중 가장 높은 增加를 보이는 遺傳子是 아직 기능이 알려져 있지 않은 UCIA라는 遺傳子로 거의 8배의 增加를 보였다. 그 외 腫瘍과 연관되는 遺傳子로는 PMARARA (GB No. AJ417079.1), metastasis related protein 2 (GB No. AF100640.1), centromere protein F, human oral cancer candidate gene mRNA (GB No. U55185.1), retinoblastoma-like 1 (GB No. AL365505) 등이 있었다. 이 외에도 EPPIN-3 (GB No. NM\_020398.1), transgelin (GB No. NM\_003186.2), tomoregulin (GB No.



AB004064.1) 등이 있었다.

EPPIN은 사람 염색체 20번에 위치한 단백질로 3가지 형태의 mRNA로 전사되는 protease inhibitor이다<sup>35)</sup>. 紅花子藥鉞液을 처리한 경우 EPPIN의 發顯이 증가되는 것은 MMP와 같은 protease의 활성을 억제할 가능성을 보이는 것으로 이는 腫瘍細胞의 轉移를 막는 효과를 기대하게 한다.

Actin cytoskeleton는 細胞死滅과 壽命을 모두 조절하는 단백질로서 actin dynamics의 減少는 미토콘드리아 막의 탈분극을 초래하여 활성산소의 생산을 증가시키고 이는 細胞死滅에 이르게 한다. Actin과 결합하는 단백질인 Scplp을 遺傳子 缺損시키는 경우 細胞의 수명이 65%이상 증가되는데 이는 활성산소의 생산량 減少에 의한 것이며 사람에서는 이와 같은 단백질이 transgelin이다<sup>36)</sup>. 따라서 紅花子藥鉞液에 의한 transgelin의 生産 增加는 癌細胞의 細胞 死滅을 促進할 것으로 思料되며 이는 細胞 增殖의 減少로 나타났다.

紅花子藥鉞液을 처리한 경우 肝癌 細胞柱에서 發顯이 2배 이상 減少된 遺傳子로는 BTF3 (GB No. M90356), regulatory factor X-associated protein (GB No. NM\_000538.1), 2B4 NK receptor homologue (GB No. AJ245377.1) paxillin (GB No. BF511170), STAR (GB No. NM\_000349.1), villin2 (GB No. BF663141), MMP11 (GB No. NM\_005940.2), Ketohexokinase (GB No. NM\_000221.1), CYP3A4 (GB No. AF182273.1), EST (GB No. AI479168), pyruvate kinase (GB No. NM\_000298.1), kidney-specific protein 32 (GB No. AF230095.1) 등 13개였다. 이 중 비교적 기능이 알려져 있는 BTF3, Paxillin, STAR, MMP11, pyruvate kinase 등의 遺傳子들도 있으나 나머지 遺傳子들의 기능은 아직 밝혀지지 않았다.

Src family nonreceptor protein tyrosine kinases는 細胞 增殖이나 附着, 移動에 대한 것을 조절한다. 正常 細胞에서는 src는 비활성 상태이나 腫瘍 細胞에서는 활성화된다. 따라서 src와 integrin signaling은 腫瘍 細胞에서는 正常

細胞와 다른 양상을 보이게 되는 데, 특히 integrin-mediated signaling pathways가 細胞 運動이나 細胞 死滅에 핵심적인 역할을 담당하고 이에 속하는 것으로는 FAK, paxillin 및 p130 (CAS)이 있다<sup>37)</sup>. 따라서 紅花子藥鉞液을 처리한 경우 paxillin의 發顯이 減少되는 것은 어떻게 紅花子藥鉞液이 肝癌細胞柱의 增殖을 억제하였는지를 설명할 수 있게 한다.

Hepatocyte growth factor receptor의 활성화는 上皮細胞에서 細胞 移動을 促進하며 이는 mitogen-activated protein kinase activation과 관련이 있는데 paxillin을 돌연변이 시킨 細胞에서는 Hepatocyte growth factor에 의하여 활성화되는 細胞移動 作用이 소실된다<sup>38)</sup>. 따라서 紅花子藥鉞液은 癌細胞의 運動성을 減少시켜 癌의 轉移를 막는 데에도 효과가 있으리라 생각된다.

細胞의 移動에 관여하는 또 다른 중요한 단백질로 villin이 있는데, 이것이 過發顯되는 경우 HeLa cells에서 細胞 移動이 增加된다<sup>39)</sup>. 따라서 紅花子藥鉞液에 의한 villin의 發顯 減少는 paxillin의 경우에서와 마찬가지로 癌細胞의 轉移를 막아주는 효과를 가지는 것으로 思料된다.

本 實驗의 結果 肝癌細胞柱에 紅花子藥鉞液 處理時 癌關聯 遺傳子가 다양하게 發顯된 점으로 미루어 보아 紅花子藥鉞液이 抗癌劑로서의 가능성을 어느 정도 시사하는 것으로 보이나 자세한 機轉을 糾明하기 위해서는 더 많은 研究가 進行되어야 할 것으로 思慮된다.

## V. 結 論

紅花子藥鉞液의 抗癌效能을 밝히고자 肝癌 細胞柱에 최신 oligonucleotide chip assay 법을 통하여 大量의 遺傳子 發顯을 分析한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MTT 分析에서 肝癌 및 胃痛細胞柱는 紅花子藥鉞液 1.5, 10, 20mg/ml에서 對照群에 비해 有意한 細胞活性 減少를 보였다.

2. 肝癌細胞柱에 紅花子藥鍼液 處置 時 對照群에 비해 發顯이 2배 이상 增加된 遺傳子는 UCLA, PMARARA fusion protein, human oral cancer candidate gene mRNA, EPPIN-3 등 19개였다.
3. 肝癌細胞柱에 紅花子藥鍼液 處置 時 對照群에 비해 遺傳子の 發顯이 2배 이상 減少된 것은 BTF3, MMP11, paxillin, villin 등 13개였다.

이상과 같이 紅花子藥鍼液에 대한 肝癌細胞柱의 遺傳子 發顯을 oligonucleotide 分析으로 大量檢索할 수 있었고, 심한 發顯 差異를 나타내는 각 遺傳子는 癌化 過程이나, 紅花子藥鍼液에 반응하는 遺傳子로 치료제 개발을 위한 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 思料된다.

## VI. 參考文獻

1. 통계청. 2003년 사망원인통계연보. 대전:통계청. 2004:22-4.
2. 박재갑. 인간생명과학. 서울:서울대학교출판부. 1993:662-73.
3. 서울대학교 의과대학. 종양학. 서울:서울대학교출판부. 1992:1-3, 137-43, 225-34.
4. Correa P. Human gastric carcinogenesis:a multistep and multifactorial process. Cancer Res. 1992;52(24):6735-40.
5. Guimaraes MJ, Lee F, Zlotnik A, McClanahan T. Differential display by PCR:novel findings and applications. Nucleic Acids Res. 1995;23(10):1832-3.
6. Kurian K, Watson CJ, Wyllie AH. DNA chip technology. J Pathos. 1999; 187(3):267-71.
7. DeRisi JL, Penland L, Brown PO. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. Nature Genet. 1996;14(4): 457-60.
8. 朴成濠. 白花蛇舌草藥鍼이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 影響. 大田大學校 碩士學位論文. 2003.
9. 李潤熙. 補中益氣合大七氣湯가 Doxorubicin의 併用이 抗癌效果에 미치는 影響. 大邱한의대학교 博士學位論文. 2004.
10. 임사비나, 한상원, 변부형. 人蔘藥鍼과 Lidocaine을 添加한 人蔘藥鍼이 腫瘍 및 免疫機能에 미치는 影響. 東西醫學. 1995;20(3): 21-40.
11. 김소형, 김갑성. 全蝎 藥鍼液의 抗突然變異 및 抗癌 效果. 大韓鍼灸學會誌. 2000;17 (3):151-67.
12. 한상원, 서정철, 이운호, 최제용. 鹿茸藥鍼液의 DNA chip을 이용한 遺傳子 發顯 分析. 大韓鍼灸學會誌. 2003;20(3):34-44.
13. 張貴君. 常用中藥鑑定大全. 北京:黑龍江科學技術出版社. 1993: 383-4.
14. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울:杏林出版. 1995:1 3-5, 245-55.
15. 楊維傑 編. 黃帝內經素門靈樞錫解. 서울:成輔社. 1980:41, 45, 97, 168, 243, 295-6, 407, 447, 469, 473, 577.
16. 許俊. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1988: 486-496, 720.
17. 賈堃. 癌瘤防治研究. 서울:成輔社. 1984:25-7.
18. 全國韓醫科大學 鍼灸·經穴學教室 編. 鍼灸學 <下>. 서울:集文堂. 1994:1457-67.
19. 李俊茂, 河智容. 蟾蜍藥鍼의 抗癌作用에 관한 研究. 大韓東醫病理學會誌. 2000;14(2):132-43.
20. 이재복, 이병렬. 菟絲子藥鍼이 抗癌作用 및 免疫效果에 對한 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2001;18(3):94-104.
21. 배원영, 고흥균, 김창환. 魚腥草藥鍼이 B16黑色腫 瘤모델에 대한 抗腫瘍效果 및 免疫反應에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2001; 18(1):186-201.
22. 박상용, 이병렬. 益智仁藥鍼이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2001;18(3):79-93.
23. 李時珍. 本草綱目(上冊). 北京:人民衛生出版社. 1982:967-8.

24. 金昌玟. 完譯 中藥大辭典. 서울:도서출판 정담.1998:6364-5.
25. 육태한, 이창현, 이학인. 紅花子·鹿茸·紫河車 藥鍼이 骨多孔症에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2001;18(1):61-75.
26. 金東煥, 李京燮, 宋炳基. 桃仁 및 紅花藥鍼의 鎮痛·抗血栓 효능에 관한 研究. 大韓韓方婦人科學會誌. 2000;13(2):60-73.
27. 金善赫, 李俊茂. 紅花油藥鍼이 Microcrystalline Sodium Urate로 誘發된 흰쥐의 痛風에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1998;15(1): 483-91.
28. 안창석, 권기록, 이선구. 紅花子藥鍼의 急性·亞急性 毒性實驗 및 Sarcoma-180 抗癌效果에 관한 實驗的 研究. 大韓藥鍼學會誌. 2000;5(1):7-26.
29. 尹弘老. 紅花子·巴豆 混合藥鍼液의 抗腫瘍效果에 대한 研究. 慶熙大學校 大學院 博士學位論文. 2003.
30. Schuler GD, Bonguski MS, Stewart EA, Stein LP, Gyapay G, Rice K, et al. A gene map of the human genome. Science. 1996;274(5287): 540-6.
31. Hedric SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM. Isolation of cDNA clones encoding T-cell specific membrane associated proteins. Nature. 1984;308(5955):149-53.
32. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. Science. 1992;257(5072): 967-71.
33. Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R, Pardee AB. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. Cancer Res. 1992;52(24):6966-8.
34. <http://www.affymetrix.com>.
35. Richardson RT, Sivashanmugam P, Hall SH, Hamil KG, Moore PA, Ruben SM et al. Cloning and sequencing of human Eppin: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis Gene. 2001;270(1-2):93-102.
36. Gourlay CW, Carpp LN, Timpson P, Winder SJ, Ayscough KR. A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. J Cell Biol. 2004;164(6):803-9.
37. Playford MP, Schaller MD. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. Oncogene. 2004;23(48): 7928-46.
38. Ishibe S, Joly D, Liu ZX, Cantley LG. Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. Mol Cell. 2004;16(2):257- 67.
39. Tomar A, Wang Y, Kumar N, George S, Ceacareanu B, Hassid A et al. Regulation of cell motility by tyrosine phosphorylated villin. Mol Biol Cell. 2004;15(11):4807-17.