

鹿茸藥鍼液의 胃癌細胞柱에 대한 Oligonucleotide Chip 분석

류성현¹ · 이경민¹ · 이봉효¹ · 임성철¹ · 정태영¹ · 서정철¹

¹대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Oligonucleotide Chip Analysis of Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution (CPC-HAS) on SNU484 carcinomars cells

Sung-Hyun Ryu¹, Kyung-Min Lee¹, Bong-Hyo Lee¹, Seong-Chul Lim¹,
Tae-Young Jung¹, Jung-Chul Seo¹

¹Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Abstract

Objectives: It has long been known about the osteogenic effect of CPC-HAS(cervi parvum cornu herbal-acupuncture solution) on bone tissues. However, it has not been determined the effect of CPC-HAS on cancer cells. The purpose of this study is to screen the CPC-HAS mediated differentially expressed genes in cancer cells such as SNU484 gastric cancer cell lines. Oligonucleotide microarray approach was employed to screen the differential expression genes.

Methods: CPC-HAS was prepared by boiling and stored at -70°C until use. Cells were treated with various concentrations of CPC-HAS (0.1, 0.5, 1.5, 10, 20 mg/ml) for 24 h. Cell toxicity was tested by MTT assay. To screen the differentially expressed genes in cancer cells, cells were treated with 1.5 mg/ml of CPC-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 SNU484 cell in all concentrations(0.1, 0.5, 1.5, 10, 20 mg/ml). In oligonucleotide microarray assay, in SNU484 cells, the number of more than twofold up-regulated genes was 5 while, the number of more than twofold down-regulated genes was 10.

Conclusions: This study showed the screening of CPC-HAS mediated differentially regulated genes using combined approaches of oligonucleotide microarray. The screened genes will be used for the better understanding of the therapeutic effects of CPC-HAS on cancer fields.

Key words: oligonucleotide microarray, CPC-HAS, gene expression, SNU484

I. 緒 論

과학기술의 발전에 따른 생활 및 의료수준의 향

· 교신저자: 임성철, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실, Tel. 053-770-2112, Fax. 053-770-2189,
E-mail: now123@dreamwiz.com

· 투고: 2006/05/10 · 심사: 2006/06/08 · 채택: 2006/06/19

상에도 불구하고 산업 발전에 따른 환경오염, 스트레스 등으로 인하여, 전 세계적으로 癌으로 인한 사망률이 증가하고 있으며, 우리나라의 경우도 癌으로 인한 死亡率이 해마다 높아지는 추세로 2003년에도 死亡原因 중 1위로 報告되었다^{1,2)}.

癌에 대한 西洋醫學의 治療는 手術療法, 放射線療法, 抗癌化學療法, 免疫療法이 발전하였는데, 각자의 治療方式을 단독 혹은 복합적으로 적용하여 일부의 癌에서는 현저한 治療成果의 향상을 가져온 것은 사실이나, 어느 療法도 癌의 완전한 治療法이 되지 못하고 있는 실정이다³⁾.

최근에는 癌의 病態生理에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 遺傳子 變換狀態를 遺傳子 수준에서 교정하고자 하는 遺傳子 治療가 주목받고 있다. 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 microarray chip을 利用함으로써 大量의 遺傳子 發顯 情報를 한꺼번에 평가하는 方法이 개발되어 보다 많은 量의 遺傳子 發顯情報를 한 번에 파악할 수 있게 되었다. 따라서 遺傳子 자체의 情報 뿐 아니라 치료 후의 變化를 폭넓게 파악할 수 있게 되어 研究 發展에 획기적인 전기를 마련할 수 있게 되었다⁴⁾. 따라서 human genome project⁵⁾가 끝나면 여러 가지 遺傳子들의 조절을 이용한 약물 개발이 활발히 진행될 것으로 예상되며, 韓醫學의 지식을 바탕으로 각종 질환에 대한 治療 가능한 물질의 체계적인 검색은 미래의 生命科學 分野에 중요한 연구 전략으로 생각된다⁶⁾. 이를 위하여 각종 질환 또는 약재 개발에 필요한 실험 모델을 개발하고, 나아가 그 모델로 찾고자 하는 물질들을 검색할 수 있는 방법을 알아내어, 최종적으로 검색된 물질의 效能을 分析評價할 수 있는 체계를 갖추는 것이 필수적이다.

韓醫學界에서도 여러 韓藥材를 이용하여 癌에 대한 免疫機能 改善⁷⁾ 및 抗癌⁸⁾에 관한 많은 研究가 활발히 진행 중이다. 그 중 壯腎陽, 補氣血, 益精髓, 強筋骨, 調衝任 등의 效能이 있어 일체 虛損症狀에 널리 사용되는 鹿茸⁹⁾에 관하여

報告한 바는 있으나, oligonucleotide chip을 이용한 遺傳子 分析을 통한 抗癌 研究는 이루어진 바가 없었다.

이에 著者는 壯腎陽, 補氣血, 益精髓, 強筋骨 效能이 있는 鹿茸⁹⁾(antler, *Cervi parvum cornu*; CPC)으로 藥鍼液을 조제하여, 抗癌效能을 밝히고자 胃癌細胞柱에 최신 oligonucleotide chip assay법을 이용하여 遺傳子 發顯을 分析한 結果 有意性を 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

本 實驗에서 사용된 鹿茸 (antler, *Cervi parvum cornu*; CPC)(러시아産)은 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

鹿茸을 破碎하여 25g의 분말을 500ml의 蒸溜水에 넣어 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 鹿茸과 혼합된 蒸溜水を 13,000 rpm으로 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

本 실험에 사용된 細胞柱는 胃癌 細胞에서 유래한 SNU484(gastric cancer cell)는 한국 細胞柱 은행(서울, 한국)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 (2.5×10^5)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. 鹿茸藥鍼液의 농도를 0.1, 0.5, 1.5, 10 및 20mg/ml 되게 SNU484 細胞에 24시간 처리하였다. 細胞를 trypsin-EDTA 1ml을 첨가하여 PBS로 씻은 후 원심 분리하여 회수하였다.

3) RNA 추출

細胞 培養液을 제거하고 PBS로 세척하였다. Trypsin-EDTA buffer를 1ml씩 첨가하여 37℃에서 5분 정도 방치한 후 PBS 10ml를 첨가하여 15 ml 튜브에 모은 다음 1,000 rpm에서 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 1 ml의 細胞에 첨가한 후 실온에서 10분간 방치하고 12,000rpm으로 15분 동안 원심 분리한 후 上清液만을 취하고 0.2ml chloroform을 넣고 1분 동안 혼합한 뒤 실온에서 10분간 방치한 후, 12,000rpm으로 15분 동안 원심 분리하였다. 무색층인 上清液을 새로운 tube에 넣고 0.5ml의 isopropanol과 천천히 혼합하였다. 12,000rpm으로 5분 동안 원심 분리한 후 上清液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(Ultrospec 2000UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, U.S.A.)를 사용하여 정량하였다.

4) MTT(tetrazolium-based colorimetric) assay

(1) 실험방법

鹿茸藥鍼液을 처리하지 않은 細胞(control군)과 여러 농도(0.1, 0.5, 1.5, 10, 20mg/ml)의 鹿茸藥鍼液을 처리한 細胞를 1,000rpm에서 5분 정도 원심 분리한 후 남은 細胞에 10ml의 細胞 培養液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 培養液으로 중화시켜 1,000rpm으로 다시 5분 정도 원심 분리한 후 10ml의 細胞 培養液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 μ l의 細胞 부유액을 접종하였다. 측정하고자 하는 시료를 PBS에 녹인 후 농도별로 20 μ l씩 각 well에 첨가하였다.

腫瘍細胞柱와 檢體가 접종된 plate를 37℃, 5% CO₂ 하에서 미리 정해진 시간 동안 培養한 후 plate의 각 well에 0.1mg(50 μ l의 2mg/ml)의 MTT를 가해주고 다시 37℃, 5% CO₂ 하에서 4시간 더 培養하여 MTT가 환원되도록 하였다. 培養 종료 시 plate를 450g×5분간 원심 분리하여 생성된 formazan 결정을 가라앉힌 후 각 well에 형성된 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 배지를 30 μ l 정도만 남기고 multidispenser를 이용하여 모두 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 생성된 formazan 결정을 용해시키기 위하여 DMSO를 150 μ 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.

(2) 통계처리

student t-test로 처리하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

5) Oligonucleotide chip 分析

(1) 실험방법

Total RNA를 한 등¹⁰⁾의 방법과 같이 분리하였다. cDNA 합성은 total RNA 10 μ 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 μ g를 94°C 완충액(200mM tris-acetate(pH 8.1), 500KOAc, and 150 MgOAc) 속에 35분간 두어 약 50 nucleotides 크기로 만들었다. Hybrid 혼합물은 15 μ 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 16 시간 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×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.

(2) 결과분석

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

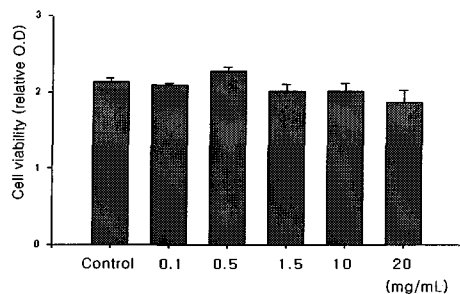


Fig. 1. Effects of CPC-HAS on SNU484 cell proliferation.

It has no cytotoxic effects on SNU484 cell in all concentrations(0.1, 0.5, 1.5, 10, 20 mg/ml).

CPC-HAS ; Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution.

Table 1. Increased Genes after Treatment with CPC-HAS in SNU484.

Signal Log Ratio	Descriptions
4.7	NM_000059.1 BRCA2
2.6	AK023376.1 polycystic kidney disease 1
2.2	AI193744 alpha-1 (VI) collagen
2	AW149492 golgi SNAP receptor complex member 2
2	BG330541 polymerase (RNA) III (DNA directed) (155kD)
1.8	AF005068.1 breast and ovarian cancer susceptibility protein splice variant (BRCA1)
1.7	AA585152 deoxynucleotidyltransferase (DNTT)
1.6	AA777793 xylulokinase (H. influenzae) homolog
1.6	AW256031 gastric protein ZA31P
1.6	BC029919.1 similar to SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 1
1.6	U55186.1 oral cancer candidate gene mRNA, clone T6
1.5	NM_016341.1 pancreas-enriched phospholipase C (LOC51196)
1.5	B014766.1 DERP12 (dermal papilla derived protein 12)

CPC-HAS ; Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution.

프로그램을 이용하였으며, 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. Affymetrix社에서 나온 MAS version 5.0 software를 이용하였다.

Ⅲ. 成 績

1. MTT assay

鹿茸藥鍼液 처리 후 24시간 뒤 細胞 增殖을 살펴보면, 0.5mg/ml에서는 오히려 增殖이 增加되었고, 1.5, 10, 20mg/ml에서는 對照群과 比較하여 細胞 數가 減少하였으나 有意한 차이는 없었다 (Fig. 2).

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 鹿茸藥鍼液의 약효를 충분히 나타낼 수 있는 실험군(1.5 mg/ml)과 대조군으로 나누어 分析하였다.

1) 發顯이 增加된 遺傳子

發顯이 2배 이상 增加된 遺傳子는 BRCA2 (GB No. NM_000059.1), PKD(polycystic kidney disease) 1(GB No. AK023376.1), α -1 (VI) collagen(GB No. AI193744) 등 5개였고, 이 외에도 BRCA1(GB No. AF005068.1), oral cancer candidate gene mRNA(GB No. U55186.1), gastric protein ZA31P(GB No. AW256031) 등의 發顯이 增加되었다.

이 중 腫瘍과 聯關되는 遺傳子로는 BRCA2 (GB No. NM_000059.1), BRCA1(GB No. AF005068.1) 및 oral cancer candidate gene mRNA(GB No. U55186.1) 등이 있었다(Table 1, Fig. 3-1).

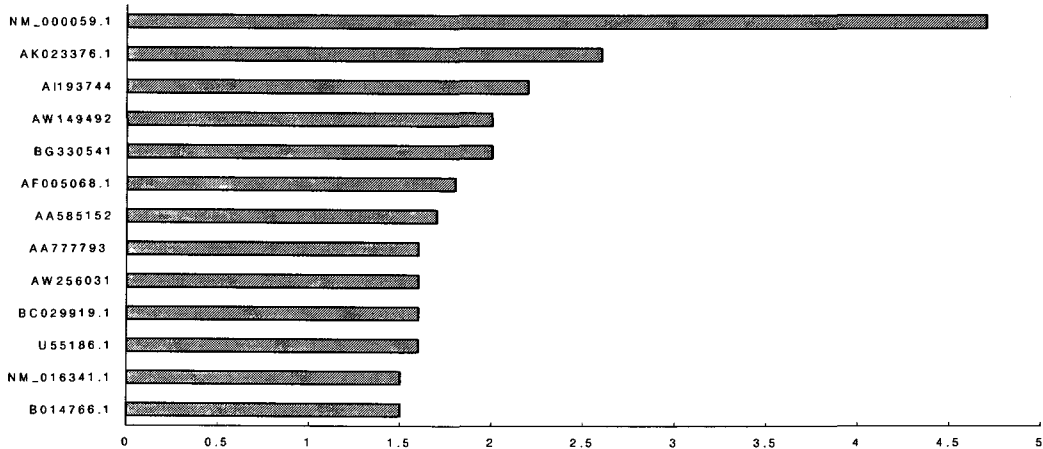


Fig. 3-1. CPC-HAS increased their gene expression in SNU484.

Each bar indicates fold increase as shown in Table 3. X-axis indicates fold increase of CPC-HAS compared to control and Y-axis indicates genebank numbers. CPC-HAS ; Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution

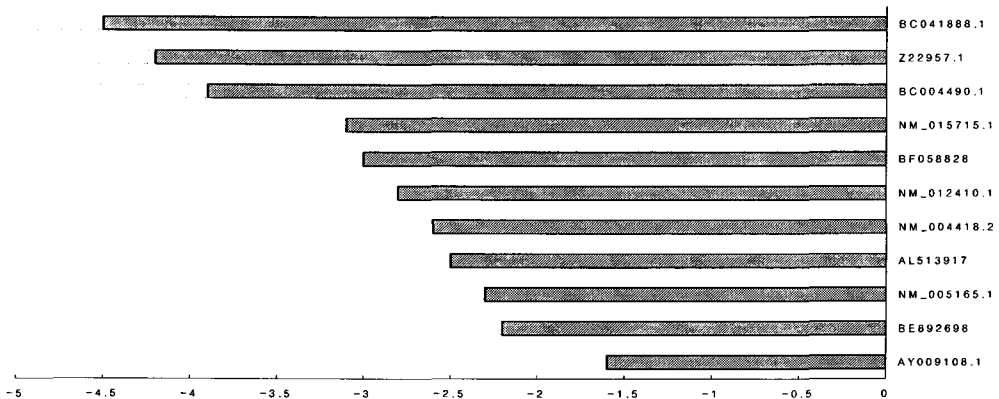


Fig. 3-2. CPC-HAS decreased their gene expression in SNU484. Each bar indicates fold decrease as shown in Table 4. X- axis indicates fold decrease of CPC-HAS compared to control and Y-axis indicates genebank numbers.

CPC-HAS ; Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution

2) 發顯이 減少된 遺傳子

發顯이 2배 이상 減少된 遺傳子는 group III secreted phospholipase A2(GB No. NM_015715.1), dual specificity phosphatase 2(GB No. NM_004418.2), aldolase C(GB No. NM_005165.1), similar to rab6 GTPase activating protein(GB

No. BC041888.1), myosin I homologue(GB No. Z22957.1), neogenin (chicken) homolog 1(GB No. BF058828) 등 10개였고, 이 중에서 酵素群에 속하는 것은 group III secreted phospholipase A2(GB No. NM_015715.1), dual specificity phosphatase 2(GB No. NM_004418.2), aldolase C(GB No.

Table 2. Decreased Genes after Treatment with CPC-HAS in SNU484.

Signal Log Ratio	Descriptions	
-4.5	BC041888.1	Similar to rab6 GTPase activating protein (GAP and centrosome-associated)
-4.2	Z22957.1	myosin I homologue
-3.9	BC004490.1	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
-3.1	NM_015715.1	Group III secreted phospholipase A2 (GIII-SPLA2)
-3	BF058828	neogenin (chicken) homolog 1
-2.8	NM_012410.1	type I transmembrane receptor (seizure-relatedprotein)
-2.6	NM_004418.2	dual specificity phosphatase 2 (DUSP2)
-2.5	AL513917	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3
-2.3	NM_005165.1	aldolase C, fructose-bisphosphate
-2.2	BE892698	Cosmid
-1.6	AY009108.1	lactate dehydrogenase A

CPC-HAS ; Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution.

NM_005165.1), lactate dehydrogenase A(GB No. AY009108.1) 등이 있었다(Table 2, Fig. 3-2).

IV. 考 察

癌이란 惡性 腫瘍을 총칭하는 용어로 개체를 구성하는 正常 細胞가 각종 자극에 의하여 遺傳子의 형질 전환이 발생하고 그 결과 變形 細胞가 유전적으로 무절제한 增殖을 함으로써 형성된 變形 細胞 집단을 뜻하며 빠른 成長, 浸潤, 체내 각 부위로의 擴散 및 轉移 등과 같은 특성이 있어 생명의 위협을 초래한다¹⁾.

과학기술의 발전에 따른 생활 및 의료수준의 향상에도 불구하고 산업발전에 따른 환경오염, 스트레스 등으로 인해 전 세계적으로 癌으로 인한 死亡率이 增加하고 있으며¹⁾, 우리나라의 경우도 癌으로 인한 死亡率이 최근 20년 간 꾸준한 상승을 보여 전체 死亡原因 1위를 차지하면서 국민보건을 위협하는 가장 큰 요인이 되고 있다²⁾.

癌에 대한 西洋醫學的 治療는 1950년대까지

는 手術療法이, 1960년대에는 放射線療法이, 1970년대에는 抗癌化學療法이, 1980년대에는 免疫療法이 발전하였는데 각자의 治療方式을 단독 혹은 복합적으로 적용하여 일부의 癌에서는 현저한 治療成果의 향상을 가져온 것은 사실이나, 각각의 한계나 부작용들이 있으므로 어느 療法도 癌의 완전한 治療法이 되지 못하고 있다³⁾.

癌에 대한 韓醫學的에 인식은 『內經』¹¹⁾에서 積聚, 腸覃, 石瘕, 瘤, 五臟之積 등에 대하여 구체적으로 언급한 이래로 癌은 腫瘍, 腸覃, 癭瘤, 癭贅, 贅贅, 癥瘕, 積聚, 噎膈, 反胃, 惡瘡, 岩 등의 범주에서 취급하고 있다^{12,13)}. 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 있으며¹⁴⁾, 治法으로 益氣健脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎 등의 扶正法과 清熱解鬱, 祛濕解毒, 行氣理氣, 活血化瘀, 軟堅散結 등의 祛邪法 및 扶正祛邪의 方法이 제시되고 있다¹⁵⁾.

藥鍼療法은 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 주입하여 刺鍼과 藥物作用을 통하여 생체의 機能을 조정하고 병리상태를 개선시켜 疾病을 治療하는 新鍼療法¹⁶⁾으로 다양한 藥鍼을 이용한 抗癌 연구가 활발히 진행되고 있다. 임 등¹⁷⁾은 皮膚癌이 誘發된 ICR계 생쥐의 足三里에 人蔘藥鍼을 시술한 후 腫瘍의 體積, B細胞와 T細胞의 含量, 림프구증식반응, 大食細胞의 食食能, IL-2와 interferon의 生産能을 측정한 결과 比較群에 비해 有意한 效果가 있음을, 김 등¹⁸⁾은 全蝸藥鍼을 中脘에 시술했을 때 發癌물질이 誘發하는 突然變異原성과 遺傳毒性을 抑制한다는 결과를 報告하였다.

鹿茸(antler, *Cervi parvum cornu*; CPC)은 『神農本草經』⁹⁾에 수록된 이래로 壯腎陽, 補氣血, 益精血, 強筋骨, 調衝任 등의 效能으로 虛勞羸瘦, 血虛眩暈, 腰膝酸軟, 耳鳴 등 일체 虛損 症狀에 널리 사용되어 왔으며, 함유된 성분 중 지금까지 밝혀진 것으로는 leucine, methionine, lysine, glycine, proline, glutamic acid 등 17종의 amino acid, galactose, hexose, glucose, pentose 등 당류 및 Ca, Mg, Al, Si, P 등 13종의 무기원소가 확인되었다^{19,20)}.

최근 鹿茸의 效能에 관한 연구로 김 등²¹⁾은 성장 촉진과 지능발달에 대한 效果를, 李 등²²⁾은 鹿茸의 造血效果를, 禹²³⁾은 혈청 콜레스테롤 저하작용을 報告한 바 있으나, 抗癌에 관한 鹿茸藥鍼液의 分子生物學的인 研究는 한 등¹⁰⁾의 연구 보고 외에는 거의 없는 실정이다.

이에 臨床的 作用機轉을 보다 깊이 이해하고 臨床的 應用의 폭을 넓히는 데에 도움이 되는 기초 자료로 쓰일 수 있도록, 鹿茸으로 藥鍼液을 조제하여 抗癌效能을 밝히고자, 胃癌細胞柱에 최신 oligonucleotide chip assay법을 통해 大量의 遺傳子 發顯을 分析하였다.

최근 수많은 遺傳子를 찾고 그 機能을 알아

내는데 종래의 Southern이나 Northern blotting, PCR을 기본으로 한 SSH(subtractive suppressive hybridization)²⁴⁾, RDA(representational difference analysis)²⁵⁾ 그리고 difference display^{26,27)} 방법들이 있지만 많은 양의 RNA를 必要로하며 偽陽性率이 높아 수많은 인간의 遺傳子를 比較하는데 한계가 있다²⁸⁾. 그러나 최근 DNA chip 기술의 도입으로 이 분야 研究에 획기적인 전기가 마련되었는데 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. 현재는 다량의 遺傳子 分析 방법 중 점차적으로 oligonucleotide chip을 많이 사용하고 있다. Affymetrix社²⁹⁾는 computer chip을 만들 때 사용되는 photolithography라는 기술을 응용하여 하나의 유리판 위에 수 만개의 다른 nucleotide들을 직접 합성하였다. 각각의 oligonucleotide들은 15-25개의 염기로 이루어져 있으며, oligonucleotide가 합성되는 유리의 표면은 각각의 염기들이 합성할 수 있게 보조체가 붙어 있다. 하지만 이들 보조체는 빛에 민감한 화학 물질로 덮여 있어 염기들이 합성될 수 없다. 이러한 성질을 이용하여 특별히 설계된 photomask를 위에 놓고 빛을 쏘이면 구멍이 나있는 곳으로 빛이 들어가 그곳에 있는 보조체의 화학물질들을 제거한다. 이렇게 화학물질이 제거된 보조체들을 가진 chip을 한가지 염기가 있는 곳에 놓으면 모든 활성화된 보조체들에 염기가 가서 합성된다. 따라서 oligonucleotide chip의 장점²⁹⁾은 첫째로 遺傳子 發顯을 검색할 수 있고, 둘째로 많은 수의 遺傳子들을 한 번에 검색 가능하다. 셋째로 돌연변이를 검색할 수 있고, 넷째로 병의

鹿茸藥鍼液의 胃癌細胞柱에 대한 Oligonucleotide Chip 분석

진단, 遺傳子 發顯 청사진을 만드는데 이용 가능하다. 다섯째로 인체 遺傳子의 機能分析 연구에 이용 가능하며, 여섯째로 산업용 遺傳子 재조합 동식물 및 미생물 연구에 이용 가능하고, 일곱째로 실험용 동식물 모델 연구, 癌 및 질병관련 遺傳子 진단, 遺傳子 治療 및 임상 병리학, 동식물 검역 및 환경변화에 따른 생태학 연구에 이용 가능하다. 이외에도 식품 안전성 검사, 신약 개발, 약제내성 검색 진단 및 DNA 염기서열 분석에 이용 가능하다.

본 실험에서는 먼저 鹿茸藥鍼液의 癌細胞 增殖 抑制 效能 및 적정 농도를 알아보기 위해 MTT-assay 分析을 하였다. 鹿茸藥鍼液 처리 후 24시간 뒤 0.5 mg/ml에서는 오히려 增殖이 增加된 것을 보여주고 있으나, 1.5, 10, 20 mg/ml에서는 對照群에 비하여 有意한 차이가 없었다.

鹿茸藥鍼液에 의한 細胞 增殖 抑制을 分子生物學的 기전으로 설명하기 위하여 cDNA microarray 分析을 시행하였다.

鹿茸藥鍼液을 처리한 경우 胃癌 細胞柱에서 發顯이 增加된 遺傳子는 BRCA2(GB No. NM_000059.1), PKD 1(GB No. AK023376.1), α -1 (VI) collagen(GB No. AI193744) 등 5개였고 腫瘍과 관련된 遺傳子는 BRCA2(GB No. NM_000059.1), BRCA1(GB No. AF005068.1) 및 oral cancer candidate gene mRNA(GB No. U55186.1) 등이 있었다. 그 외 遺傳子로는 PKD 1(GB No. AK023376.1), α -1 (VI) collagen(GB No. AI193744), 및 gastric protein ZA31P(GB No. AW256031) 등이 있었다.

BRCA1/2의 遺傳子 돌연변이를 가진 사람이 polycyclic aromatic hydrocarbons와 같은 DNA 손상을 가져올 수 있는 화합물에 노출될 때 유방암의 발생빈도가 높아진다³⁰⁾. 이는 BRCA 1/2의 정상적인 機能에 문제가 있는 경우 癌발

생 빈도가 높아짐을 의미한다. 만성취장염과 胃腸의 腺癌腫에서 BRCA1의 發顯이 減少되어 있음을 보면³¹⁾ 遺傳子 변이가 없는 BRCA1의 정상적인 수준의 發顯이 癌 抑制에 중요함을 알 수 있다.

Polycystin-1은 PKD 1 遺傳子의 단백질 산물이며 integral membrane glycoprotein이다³²⁾. 이 遺傳子의 돌연변이는 PKD를 야기하며 그 빈도는 1000명당 한 명 꼴로 알려져 있다³³⁾. 이 단백질의 정확한 機能은 잘 모르나 β 4 integrin과 laminin5가 PKD에서 過發顯되어 있음을 감안하면³⁴⁾ 細胞의 부착이나 細胞외 기질의 변형과 관련이 있는 것으로 추정된다. 鹿茸에 의하여 α -1 (VI) collagen의 發顯도 增加되는 것을 보면 鹿茸은 細胞外 기질 형성을 돕는 것으로 생각된다.

鹿茸藥鍼液을 처리한 경우 胃癌 細胞柱에서 發顯이 減少되는 遺傳子는 group III secreted phospholipase A2(GB No. NM_015715.1), dual specificity phosphatase 2(GB No. NM_004418.2), aldolase C(GB No. NM_005165.1), similar to rab6 GTPase activating protein(GB No. BC041888.1), myosin I homologue(GB No. Z22957.1), neogenin (chicken) homolog 1(GB No. BF058828) 등 10개였고, 이 중에서 酵素群에 속하는 것으로는 group III secreted phospholipase A2(GB No. NM_015715.1), dual specificity phosphatase 2(GB No. NM_004418.2), aldolase C(GB No. NM_005165.1), lactate dehydrogenase A(GB No. AY009108.1) 등이 있었다. 이 외에도 similar to rab6 GTPase activating protein(GB No. BC041888.1), myosin I homologue(GB No. Z22957.1), neogenin (chicken) homolog 1(GB No. BF058828) 등이 있었다.

鹿茸을 胃癌 細胞柱에 처리한 경우 發顯이 減

少되는 遺傳子로 lactate dehydrogenase A는 鹿茸이 다양한 종류의 癌腫에서 抗癌劑 감수성을 增加시켜서 抗癌劑와 함께 사용되는 경우 抗癌劑의 效果를 높일 것이라는 것이다.

Aldolase B의 경우 肝癌 組織에서 發顯이 減少되어 있으며 aldolase C는 zebrin이라고도 하며 소뇌 피질에서 발견된다³⁵⁾. 그러나 腫瘍에서 aldolase C가 어떠한 역할을 수행하는지에 대하여는 거의 연구가 없어 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 思料된다.

Actin과 myosin I은 endosomes과 lysosomes으로 細胞 內에서 생산된 물질을 옮기는데 參與한다³⁶⁾. 그런데 F9 embryonic carcinoma cell line에서는 약제를 통하여 분화시킨 경우 villin이 분화된 細胞에서 발견된 것에 비하여 myosin I은 미분화된 細胞에서 발견되었다. 뿐만 아니라 腫瘍細胞의 운동성을 增加시켜 腫瘍의 轉移에도 관련이 된다^{37,38)}. 따라서 鹿茸에 의한 myosin I homologue의 發顯 減少는 癌細胞의 분화를 촉진하고 암의 轉移를 막아주는 效果가 있을 것으로 기대된다.

Neogenin도 myotube의 형성을 돕는 작용을 한다는 것을 감안하면³⁹⁾, 鹿茸에 의한 neogenin의 發顯 抑制는 myosin I의 發顯 抑制와 유사한 效果를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

本 實驗의 結果 胃癌 細胞柱에 鹿茸藥鉞液 處理 時 癌細胞의 成長에 관련되는 遺傳子 뿐만 아니라 轉移에 관련되는 遺傳子の 發顯도 抑制 하였으며, 특히 抗癌劑 감수성을 높일 수 있다는 가능성을 보인 것은 抗癌劑 治療를 받는 환자에서 鹿茸을 같이 처방하는 경우 그 效果가 增加될 수 있음을 의미하나, 증감된 유전자의 기능이 모두 밝혀진 것이 아니고, 胃癌細胞柱에 대한 鹿茸藥鉞液의 遺傳子 發顯의 변화만 관찰한 결과이므로 자세한 機轉을 糾明하기 위해서는 더

많은 研究가 進行되어야 할 것으로 思慮된다.

V. 結 論

鹿茸藥鉞液의 抗癌效能을 밝히고자 胃癌細胞柱에 최신 oligonucleotide chip assay법을 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 0.5 mg/ml에서 細胞 增殖이 增加되었으며, 다른 농도에서는 對照群에 비해 有意한 細胞 數의 변화를 보이지 않았다.
2. 胃癌細胞柱에 鹿茸藥鉞液 處理 時 對照群에 비해 發顯이 2배 이상 增加된 遺傳子は BRCA2, PKD 1, α -1 (VI) collagen 등 5개였다.
3. 胃癌細胞柱에 鹿茸藥鉞液 處理 時 對照群에 비해 遺傳子の 發顯이 2배 이상 減少된 것은 group III secreted phospholipase A2, dual specificity phosphatase 2, aldolase C 등 10개였다.

이상과 같이 鹿茸藥鉞液에 대한 胃癌細胞柱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 遺傳子は 癌化 過程 糾明이나, 鹿茸藥鉞液에 반응하는 遺傳子로 治療 開發을 위한 기초 자료로 活用할 수 있을 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 서울대학교 의과대학. 종양학. 서울 : 서울대학교 출판부. 1992 : 1, 3, 27, 36, 91, 99, 137-192.
2. 통계청. 2003년 사망원인통계연보. 대전 : 통계청. 2004 : 22-4.
3. 박재갑. 인간생명과학. 서울 : 서울대학교출판

鹿茸藥鍼液의 胃癌細胞柱에 대한 Oligonucleotide Chip 분석

- 부. 1993 : 662-73.
4. Gerhold D, Rushmore T, Caskey T. DNA chips : promising toys have become powerful tools. Trends Biochem Sci. 1999 ; 24(5) : 168-73.
5. Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L. New goals for the U.S. Human genome project: 1998-2003. Science, 1998 ; 282(5389) : 682-746.
6. 김정숙. 생약을 이용한 골다공증 치료제 개발 연구. 제 1회 골다공증 연구회 심포지움 proceeding. 1998 ; 1 : 32-6.
7. 강성길, 김대수. 녹용, 인삼 및 영지수침이 면역반응에 미치는 영향. 경희의학. 1988 ; 8(2) : 138-54.
8. 오하석, 김장현. 部位別 鹿茸이 黑色腫 誘發 생쥐의 腫瘍抑制와 免疫機能에 미치는 影響. 大韓韓方小兒科學會誌. 2000 ; 14(1) : 39- 76.
9. 中國醫藥院編. 申農本草經. 臺北:集文書局. 1976 : 27.
10. 한상원, 서정철, 이운호, 최제용. 鹿茸藥鍼液의 DNA chip을 利用한 遺傳子 發顯 分析. 大韓鍼灸學會誌. 2003 ; 20(3) : 34-44.
11. 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.
12. 許俊. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1988 : 486-96, 720.
13. 金定濟. 金賢濟. 東醫臨床要鑑. 부천 : 書苑堂. 1981 : 254.
14. 賈堃. 癌瘤防治研究. 서울 : 成輔社. 1984 : 25-7.
15. 田炳旭. 癌腫의 病因病理에 대한 文獻的 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1995 ; 1(1) : 83-101.
16. 全國韓醫科大學 鍼灸·經穴學教室. 鍼灸學. 서울 : 集文堂. 1994 : 1457-67.
17. 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.
18. 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.
19. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울 : 永林社. 1991 : 545-6.
20. 보건사회부. 대한약전 외 한약(생약)규격집. 서울 : 보건사회부. 1987 : 98.
21. 한상원, 김영태, 손양선, 진수희, 심인섭, 임사비나 외. 鹿茸 및 鹿茸藥鍼이 動物의 成長과 知能發達에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2001 ; 18(5) : 122-35.
22. 李敏炯, 徐榮培. 鹿茸의 造血作用에 對한 實驗的 研究. 大韓本草學會誌. 2001 ; 16(1) : 91-110.
23. 용재익. Cholesterol 投與 家兔의 血清中 cholesterol 에 미치는 鹿茸의 影響. 약제학회지. 1976 ; 6(3) : 314-20.
24. 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.
25. 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.
26. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. Science

- 1992 ; 257(5072) : 967-71.
27. Mason IJ, Taylor A, Williams JG, Sage H, Hagan BLM. Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryoparietal endoderm is related to an endothelial cell "culture shock" glycoprotein of Mr. 43000. *EMBO J.* 1986 ; 5(9) : 1465-72.
 28. 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.
 29. <http://www.affymetrix.com>.
 30. Palli D, Masala G, Mariani-Costantini R, Zanna I, Saieva C, Sera F, Decarli A, Ottini L. A gene-environment interaction between occupation and BRCA1/BRCA2 mutations in male breast cancer? *Eur J Cancer.* 2004 ; 40(16) : 2474-9.
 31. Beger C, Ramadani M, Meyer S, Leder G, Kruger M, Welte K, Gansauge F, Beger HG. Down-regulation of BRCA1 in chronic pancreatitis and sporadic pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 ; 10(11) : 3780-7.
 32. Nims N, Vassmer D, Maser RL. Transmembrane domain analysis of polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease-1 (PKD1) gene: evidence for 11 membrane-spanning domains. *Biochemistry.* 2003 ; 42(44) : 13035-48.
 33. Pei Y. Molecular genetics of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin Invest Med.* 2003 ; 26(5) : 252-8
 34. Joly D, Morel V, Hummel A, Ruello A, Nusbaum P, Patey N, Noel LH, Rousselle P, Knebelmann B. Beta4 integrin and laminin 5 are aberrantly expressed in polycystic kidney disease: role in increased cell adhesion and migration. *Am J Pathol.* 2003 ; 163(5) : 1791-800.
 35. Sugihara I, Shinoda Y. Molecular, topographic, and functional organization of the cerebellar cortex: a study with combined aldehyde C and olivocerebellar labeling. *J Neurosci.* 2004 ; 24(40) : 8771-85.
 36. Cordonnier MN, Dauzonne D, Louvard D, Coudrier E. Actin filaments and myosin I alpha cooperate with microtubules for the movement of lysosomes. *Mol Biol Cell.* 2001 ; 12(12) : 4013-29.
 37. Ezzell RM, Leung J, Collins K, Chafel MM, Cardozo TJ, Matsudaira PT. Expression and localization of villin, fimbrin, and myosin I in differentiating mouse F9 teratocarcinoma cells. *Dev Biol.* 1992 ; 151(2) : 575-85.
 38. Maidment SL. The cytoskeleton and brain tumour cell migration. *Anticancer Res.* 1997 ; 17(6B) : 4145-9.
 39. Kang JS, Yi MJ, Zhang W, Feinleib JL, Cole F, Krauss RS. Netrins and neogenin promote myotube formation. *J Cell Biol.* 2004 ; 167(3) : 493-504.