

# OLT-2의 복용에 의한 인간 혈중 유전자 발현 변화

차민호 · 문진석 · 전병훈<sup>1</sup> · 윤용갑<sup>1</sup> · 윤유식\*

한국한의학연구원 의료연구부, 1: 원광대학교 한의과대학

## Different Gene Expression on Human Blood by Administration of OLT-2

Min Ho Cha, Jin Seok Moon, Byung Hun Jeon<sup>1</sup>, Yong Gab Yun<sup>1</sup>, Yoo Sik Yoon\*

Department of Medical Research, KIOM, 1: College of Oriental Medicine, Wonkwang University

This study was performed to investigate genes which are differently expressed in human blood by administrating of OLT-2. OLT-2 was medical precipitation composed of three medicinal herbs, Ginseng Radix, Astragali Radix, Glycyrrhizae Radix, and anti-leukemia effect of it was evaluated from Byung Hun Jeon of Wonkwang University. this study was approved by Institutional Review Board of Korea Institute of Oriental Medicine (Taejeon, Korea) and four male subjects participated in this study. Gene expressions were evaluated by cDNA chip, in which 24,000 genes were spotted. Hierarchical cluster and biological process against the genes, which expression changes were more than 1.6 fold, were constructed by cluster 3.0 providing Stanford University and EASE(<http://apps1.niaid.nih.gov/DAVID>). Five groups were clustered according to their expression patterns. Group A contained gene decreased by OLT-2 and increased genes by OLT-2 were involved in Group B, C, D. In biological process, expression of genes involved in cytokine or cell calcium signaling, such as interleukin 18 and G-protein beta 4 were increased, but protein tyrosine phosphatase receptor type c, which function is cell adhesion between antigen-presenting cell and T or B-cell, was decreased by OLT-2. This study provides the most comprehensive available survey of gene expression changes in response to anti-leukemia effect of OLT-2 in human blood.

Key words : Microarray assay, Ginseng Radix, Astragali Radix, Glycyrrhizae Radix, human blood, OLT-2, Leukemia

### 서 론

백혈병(leukemia)은 골수에서 생산되는 백혈구가 악성종양 성 증식을 하는 질환을 말한다. 현재 국내에서는 백혈병으로 많은 사람이 고생하고 있으며, 2004년 기준 한국인의 백혈병으로 인한 사망률은 인구 10만명당 남성 3명, 여성 2.1명으로 1998년 이후 매년 증가하고 있는 추세이다<sup>1)</sup>. 특히 소아암중 백혈병으로 인한 사망은 전체 373건으로 소아암 중 가장 많은 비율 (31.4%)을 차지하고 있다. 이를 성비로 살펴보면 남아대 여아의 비율이 1.5로 남아의 비율이 높고, 종류별로는 림프양 백혈병 244건 (65.4%), 급성 비립프구성 백혈병 95건(25.5%), 만성 골수양 백혈병 16건(4.3%)의 순으로 나타났다<sup>2)</sup>.

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

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

· 접수 : 2006/07/03 · 수정 : 2006/07/28 · 채택 : 2006/08/14

현재까지 백혈병 치료를 위한 많은 연구가 시행되고 있으며, 많은 백혈병 치료제들이 개발되었으며 또한 현재 개발중에 있다. 이들 중에는 노바티스사에서 개발한 글리벡, 최근 미국 FDA의 승인을 받은 BMS(Bristol-Myers Squibb)사가 개발한 백혈병 치료제 '스프리셀(Sprycel)' 등이 있으며, 국내에서는 일양약품에 의해 Y-5511의 물질이 백혈병 치료 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 현재까지 개발된 백혈병 치료제들은 많은 부작용을 내포하고 있는 것으로 알려져 있다. 일례로 Kerkela 등은 (2006) gleevec이 백혈병 환자에게서 심근경색을 발전시켜 심각한 심부전증(heart failure)을 야기시킬 수 있다고 보고하였다<sup>3)</sup>.

OLT-2는 인삼(Ginseng Radix), 황기(Astragali Radix), 감초(Glycyrrhizae Radix)의 3가지 한약재로 구성된 복합한방제이며, 원광대학교 방제학교실의 연구에서 세포독성이 없이 항백혈병 효과가 있는 것으로 확인되었다. 인삼에 대한 항암효과는 많은 연구에서 확인되었으며<sup>4-13)</sup>, 특히 인삼 성분 중 하나인

compound K의 경우 promyelocytic leukemia cells인 HL-60의 proliferation을 억제하고 apoptosis를 유도하는 것으로 보고되었다<sup>14)</sup>. 황기(Astragali Radix)는 DNA합성을 억제함으로써 위암세포의 증식을 억제시키는 것으로 보고되었으며<sup>15)</sup>, Kurashige 등 (1999)은 황기가 cytokine의 생성을 촉진시켜 발암물질 효과를 억제시킨다고 보고하였다<sup>16)</sup>. 감초 추출물에 대한 연구에서는 유방암, 전립선암의 성장을 억제시키는 것이 보고되었으며<sup>17-18)</sup>, 종양 발달에 중요한 역할을 담당하는 혈관형성(angiogenesis)를 억제하는 것이 보고되었다<sup>19)</sup>.

본 연구에서는 항암효과가 있는 것으로 알려진 인삼, 황기, 감초를 이용한 복합한약재제인 OLT-2를 정상인에 복용시킨 후 혈중내 유전자 발현 양상을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 검사대상자

본 연구는 한의학연구원에 내원한 남성 4인을 대상으로 실시하였으며, 한국한의학연구원 기관생명윤리심의위원회 승인을 득하였다. 연구에 참여한 검사대상자의 나이는 26세이며, 이들의 평균 체중 및 BMI는 각각 78.75 kg과 25.2 kg/m<sup>2</sup> 이었다. 연구 수행 3일전부터 검사대상자의 alcohol 섭취를 금하였으며, 수행 전날 저녁부터 식사와 흡연을 금지하였다. OLT-2의 섭취는 각 검사대상자가 2.5g을 한차례 섭취하였으며, 채혈은 OLT-2 섭취 전, 섭취 후 2시간, 4시간, 6시간에 각각 5ml 씩 채혈하였다. 채혈된 혈액은 total RNA 분리에 사용하였다.

### 2. OLT-2의 제조

본 연구에 사용된 OLT-2 추출물은 원광대학교 방재학교실의 전병훈 교수님으로부터 제공받았다. OLT-2 추출에 대하여 간략히 언급하면 다음과 같다. 인삼(Ginseng Radix), 황기(Astragali Radix), 감초(Glycyrrhizae Radix)를 동 비율 혼합시킨 후, 증류수에 3시간 중탕시킨 다음, 동결건조하여 OLT-2 추출물을 제작하였다.

### 3. RNA 분리

채혈된 혈액 5ml를 2000× g 에서 10분간 원심분리하여 buffy coat 층을 분리하였다. 분리된 buffy coat에 1ml의 TriZol(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)을 부가한 후, 14000× g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액에 동량의 phenol/chloroform(1:1)을 부가하여 원심분리 후, 상층액에 0.6배의 isopropanol을 부가하여 RNA를 침전시켜 시료로 사용하였다.

### 4. Microarray probing 및 hybridization

사람의 혈중 유전자 발현 변화를 분석하기 위하여 Illumina Expression chip(Illumina, Inc., San Diego, CA)을 사용하였다. 먼저 total RNA 100ng을 이용하여 Illumina RNA Amplification kit (ambion Inc., austin, TX)를 사용하여 Biotin으로 labeling된 cRNA를 제조사의 지침에 따라 제작하였다. 이후, 제조된 biotinylated cRNA를 RNeasy kit(Qiagen, Valencia, CA)로 정제한 후 Sentrix HumanRef-8 Expression BeadChip(Illumina, Inc., San Diego,

CA)에 hybridization 시켰다. 이후 1× High Temp washing로 5 5°C에서 10분간 세척 후 Streptavidin-Cy3가 포함된 E1 buffer로 발색시킨 다음, E1BC buffer로 세척하였다. 이를 건조시킨 후, Illumina BeadArray Reader(Illumina, Inc., San Diego, CA)로 Scanning 하여 Cy3의 fluorescence intensity를 측정하였다.

### 5. Bioinformatics data 분석

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. 유전자들의 biological process 및 pathway는 Stanford대학의 SOURCE 사이트 (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>)와 KEGG(<http://www.genome.ad.jp/kegg>)를 활용하여 분석하였다.

### 6. 통계처리

통계적 분석은 avadis prophetic 3.3 software(<http://avadis.strandgenomics.com>)를 사용하였으며, 세 그룹간의 평균 차를 비교하기 위하여 Quantile normalization 후에, One-way ANOVA를 이용하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

## 결 과

OLT-2 복용에 따른 인간 혈중 내 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여, 정상인 남성 4인에게 동결건조된 2.5g의 OLT-2 추출물을 1회 복용시킨 후 복용전, 복용 후 2시간, 4시간, 6시간에 각각 혈액을 채혈하였다. 채혈된 혈액으로부터 각각 total RNA를 분리하고 DNA chip을 이용하여 유전자 발현을 관찰하였다.

실험에는 인간유전자 24,000개가 집적된 24K human DNA chip을 사용하였고, 24,000여개 유전자 spot 중 average intensity가 9 이하의 불량 spot들을 제거하고 lowess smoothing normalization하여 약 14600 여개 유전자를 data에 활용하였다. 각 개체간의 변이를 확인하기 위하여 각 시간대별 개체간 상관계수를 조사한 결과, 상관계수 0.981-0.990으로 개체간 변이가 미미한 것을 확인하였으며(Table 1), 14600 여개 유전자들 중 적어도 1개 이상의 시간대에서 1.5배 이상 발현이 증감하는 것을 data에 활용하였다.

#### 1. OLT-2 복용 후 시간대별 유전자 증감 pattern

정상인 남성 4인을 대상으로 OLT-2 복용 전을 대조군으로 하여 복용 후 2, 4, 6 시간 경과 후의 혈중 유전자 발현 변화를 Microarray assay를 이용하여 분석하였다. 2시간 경과 후 대조군에 비해 1.5배 이상 증가하는 유전자는 Ferritin heavy chain 만이 1.52배 발현이 증가하는 것으로 확인되었다. 4시간 경과 후 chemokine (C-C motif) ligand 5, protein tyrosine phosphatase, receptor type, C (PTPRC), transcript variant 4, killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1 등의 발현이 1.5배 이

Table 1. Correlation of each of subjects

sample	LKS 0H	CJH 0H	CSK 0H	LJP 0H	LKS 2H	CJH 2H	CSK 2H	LJP 2H	LKS 4H	CJH 4H	CSK 4H	LJP 4H	LKS 6H	CJH 6H	CSK 6H	LJP 6H
LKS 0H		0.987	0.983	0.987	0.991	0.986	0.986	0.985	0.985	0.98	0.98	0.98	0.98	0.981	0.986	0.982
CJH 0H			0.983	0.989	0.985	0.993	0.984	0.982	0.979	0.99	0.981	0.979	0.984	0.978	0.982	0.973
CSK 0H				0.981	0.975	0.982	0.978	0.983	0.979	0.977	0.983	0.977	0.981	0.976	0.98	0.975
LJP 0H					0.985	0.987	0.986	0.985	0.976	0.984	0.981	0.984	0.977	0.981	0.987	0.97
LKS 2H						0.989	0.99	0.986	0.985	0.981	0.98	0.981	0.98	0.98	0.985	0.982
CJH 2H							0.988	0.984	0.98	0.988	0.981	0.979	0.987	0.98	0.985	0.975
CSK 2H								0.983	0.977	0.981	0.984	0.98	0.979	0.987	0.985	0.975
LJP 2H									0.987	0.977	0.984	0.989	0.985	0.978	0.99	0.985
LKS 4H										0.981	0.988	0.987	0.987	0.978	0.986	0.99
CJH 4H											0.986	0.983	0.985	0.982	0.984	0.972
CSK 4H												0.990	0.986	0.987	0.988	0.981
LJP 4H													0.984	0.982	0.991	0.98
LKS 6H															0.987	0.985
CJH 6H																0.977
CSK 6H																

Table 2. Genes mRNA expression of which were increased or decreased more than 1.5 fold in blood at 2h, 4h and 6h after administrating of OLT-2

Time	Gene list	fold	Time	Gene list	fold
2h	similar to Ferritin heavy chain	1.52	4h	preylcysteine oxidase 1	1.72
	chemokine (C-C motif) ligand 5	0.61		leucine-rich repeat-containing 2	1.75
	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C, transcript variant 4	0.62		BTB (POZ) domain containing 5	1.76
	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1 transcript variant 1	0.64		DMC1 dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific homologous recombination	1.79
	solute carrier family 16, member 3 (SLC16A3)	1.50		similar to large subunit ribosomal protein L36a	1.79
	similar to NADH dehydrogenase subunit 5	1.50		eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2, transcript variant 2	1.86
	similar to L21 ribosomal protein	1.53		similar to ribosomal protein L5: 60S ribosomal protein L5	1.89
	similar to hepatocellular carcinoma-associated antigen HCA557b	1.54		alkaline phosphatase, placental	1.92
	similar to 60S ribosomal protein L11	1.55		transcriptional adaptor 3-like, transcript variant 2	2.00
	nuclear prelamin A recognition factor, transcript variant 2	1.55		similar to Ferritin heavy chain	2.01
	similar to Laminin receptor 1	1.55		similar to hypothetical protein FLJ36144	2.07
	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	1.55		B7 homolog 3	2.09
	zinc finger protein 454	1.56		similar to ribosomal protein L5: 60S ribosomal protein L5	2.13
	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 5	1.56		small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1, 43kDa	2.31
	ras-related C3 botulinum toxin substrate family member 4	1.56		protein tyrosine phosphatase, receptor type, C, transcript variant 4	0.52
	zinc finger protein 14	1.57		retinoblastoma binding protein 1-like 1, transcript variant 1	0.55
	KIAA0186 gene product	1.57		PAI-1 mRNA-binding protein	0.56
similar to 60S ribosomal protein L10	1.58	CD3G antigen, gamma polypeptide	0.59		
interleukin 18	1.59	immune associated nucleotide	0.59		
4h	similar to Translationally controlled tumor protein	1.59	splicing factor, arginine/serine-rich 11	0.64	
	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2, 14.5kDa	1.59	chemokine (C-C motif) ligand 5	0.65	
	similar to alpha tubulin	1.60	similar to Nucleophosmin 1	1.50	
	syntaxin binding protein 4	1.60	ribosomal protein L9	1.53	
	guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 4	1.61	RNA polymerase B transcription factor 3	1.53	
	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	1.61	similar to Laminin receptor 1	1.53	
	ecotropic viral integration site 5	1.62	6h	similar to NADH dehydrogenase subunit 5	1.53
	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	1.64		similar to L21 ribosomal protein	1.54
	viperin	1.65		similar to 60S ribosomal protein L10	1.57
	methyltransferase like 2	1.65		acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	1.61
	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1	1.66		solute carrier family 16, member 3	1.61
	protocadherin beta 9	1.67		similar to Translationally controlled tumor protein	1.63
	polymerase (DNA directed), eta	1.67		leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A, member 2	1.70
	chromosome 10 open reading frame 6	1.67		similar to large subunit ribosomal protein L36a	1.76
	makorin, ring finger protein, 4	1.68		ras-related C3 botulinum toxin substrate family member 4	1.79
	similar to Nucleophosmin 1	1.69		similar to ribosomal protein L5: 60S ribosomal protein L5	1.79
	polymerase (DNA directed) kappa	1.69		similar to ribosomal protein L5: 60S ribosomal protein L5	1.90
islet cell autoantigen 1, 69kDa transcript variant 3	1.69	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2, transcript variant 2		2.04	
tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme transcript variant 2	1.70	similar to Ferritin heavy chain (Ferritin H subunit)		2.38	
ubiquitin specific protease 14	1.71	B7 homolog 3		3.17	

상 감소하였으며, KIAA0186 gene product (KIAA0186), interleukin 18, protocadherin beta 9 (PCDHB9)를 포함한 80개의 유전자들이 1.5배 이상 발현이 증가하는 것으로 확인되었다. 6시

간 후의 유전자 발현 변화를 관찰한 결과에서는 retinoblastoma binding protein 1-like 1 (RBP1L1), transcript variant 1, CD3G antigen, gamma polypeptide (TiT3 complex)를 포함한 8개의 유

Table 3. Classification of functional group and gene expression ratio (fold change).

Group	Definition	Biological process	2H	4H	6H	P-Value
Group A	chemokine (C-C motif) ligand 5	Immunity and defense	0.72	0.61	0.65	0.017
	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1, transcript variant 1	Cell adhesion	0.75	0.65	0.75	0.039
	CD3G antigen, gamma polypeptide	Immunity and defense	0.78	0.72	0.59	0.031
	retinoblastoma binding protein 1-like 1, transcript variant 1	metabolism	0.92	0.79	0.55	0.009
	immune associated nucleotide	Immunity and defense	0.96	0.75	0.59	0.002
	protein tyrosine phosphatase, receptor type C transcript variant 4	Cell proliferation and differentiation	1.02	0.62	0.52	0.001
	PAI-1 mRNA-binding protein		0.79	0.68	0.56	0.012
splicing factor, arginine/serine-rich 11		0.83	0.84	0.64	0.005	
Group B	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A, member 2	Signal transduction	1.31	1.47	1.70	0.036
	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3	Transport	1.21	1.50	1.61	0.014
	B7 homolog 3 (B7H3)	Immunity and defense	1.06	2.09	3.17	0.027
	similar to Translationally controlled tumor protein	Immunity and defense	1.02	1.59	1.63	0.015
	similar to 60S ribosomal protein L10	metabolism	1.00	1.58	1.57	0.016
	ribosomal protein L9	metabolism	0.82	1.37	1.53	0.043
	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A		1.20	1.56	1.61	0.034
	similar to Ferritin heavy chain (Ferritin H subunit)		1.23	2.01	2.38	0.000
	ras-related C3 botulinum toxin substrate family member 4		1.05	1.56	1.79	0.023
	similar to large subunit ribosomal protein L36a		0.99	1.79	1.76	0.002
	similar to Laminin receptor 1		0.98	1.55	1.53	0.015
	similar to ribosomal protein L5: 60S ribosomal protein L5		0.96	1.89	1.79	0.000
	similar to Nucleophosmin 1		0.91	1.69	1.50	0.002
	similar to ribosomal protein L5: 60S ribosomal protein L5		0.83	2.13	1.90	0.000
	similar to NADH dehydrogenase subunit 5		0.91	1.50	1.53	0.003
	similar to L21 ribosomal protein		0.84	1.53	1.54	0.002
	similar to Transcription factor BTF3		0.90	1.32	1.53	0.042
similar to Laminin receptor 1		0.98	1.55	1.53	0.015	
similar to ribosomal protein L5: 60S ribosomal protein L5		0.96	1.89	1.79	0.000	
similar to Nucleophosmin 1		0.91	1.69	1.50	0.002	
similar to ribosomal protein L5: 60S ribosomal protein L5		0.83	2.13	1.90	0.000	
similar to NADH dehydrogenase subunit 5		0.91	1.50	1.53	0.003	
Group C	KIAA0186 gene product	cell cycle	0.95	1.57	1.13	0.000
	interleukin 18	Immunity and defense	0.98	1.59	1.22	0.002
	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	Immunity and defense	0.94	1.64	1.14	0.012
	ubiquitin specific protease 14	metabolism	0.96	1.71	1.25	0.001
	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	metabolism	0.94	1.62	1.29	0.012
	DMC1 dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific homologous recombination	metabolism	0.86	1.79	1.29	0.005
	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1	metabolism	0.94	1.66	1.17	0.001
	polymerase (DNA directed) kappa	metabolism	0.96	1.69	1.13	0.010
	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 5-methyltransferase like 2	Signal transduction	0.96	1.56	1.16	0.004
	viperin		0.90	1.66	1.20	0.008
	FKSG17		0.98	1.65	1.26	0.005
	BTB (POZ) domain containing 5		0.89	2.09	1.43	0.004
	similar to hepatocellular carcinoma-associated antigen HCA557b		0.92	1.76	1.28	0.001
	zinc finger protein 454		0.87	1.54	1.11	0.049
	zinc finger protein 454		0.89	1.56	1.10	0.021
prenylcysteine oxidase 1		0.93	1.72	1.16	0.031	
zinc finger protein 14		0.98	1.57	1.10	0.008	
nuclear prelamin A recognition factor, transcript variant 2		0.96	1.55	1.10	0.002	
Group D	protocadherin beta 9	Cell adhesion	1.01	1.67	1.29	0.001
	alkaline phosphatase, placental	Developmental processes	1.01	1.92	1.25	0.000
	leucine-rich repeat-containing 2	Immunity and defense	1.00	1.75	1.19	0.001
	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1,	metabolism	1.01	2.31	1.48	0.001
	polymerase (DNA directed), eta	metabolism	1.01	1.67	1.20	0.001
	islet cell autoantigen 1, 69kDa, transcript variant 3	Neuronal activities	1.08	1.69	1.27	0.001
	guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 4	Signal transduction	1.00	1.61	1.24	0.012
	NADH dehydrogenase 1, subcomplex unknown, 2, 14.5kDa	Transport	1.00	1.59	1.24	0.001
	transcriptional adaptor 3-like, transcript variant 2		1.07	2.00	1.36	0.001
	makorin, ring finger protein, 4		1.08	1.69	1.26	0.002
	ecotropic viral integration site 5		1.09	1.63	1.29	0.000
	chromosome 10 open reading frame 6		1.03	1.68	1.28	0.001
	similar to 60S ribosomal protein L11		1.01	1.55	1.37	0.035
	syntaxin binding protein 4		0.99	1.60	1.18	0.000
similar to alpha tubulin		1.05	1.60	1.17	0.004	
Group E	similar to Ferritin heavy chain		1.52	0.97	1.08	0.023

전자 발현이 1.5배 감소하였으며, leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A와 B7 homolog 3 (B7H3)를 포함하는 15개의 유전자 발현이 1.5배 이상 증가하는 것으로 확인되었다. 각 시간대 별로 발현이 변화되는 유전자들은 Table 2에 표기하였다.

2. OLT-2 복용에 의한 유전자 발현 pattern 분석

정상인 남성에게 OLT-2를 복용시킨 후 시간에 따른 혈중 유전자의 발현 pattern을 hierarachical clustering 한 결과 총 5개의 cluster를 결정하였다(Fig. 1). Cluster A는 OLT-2 복용 이후 시간에 따라 감소하는 유전자들로 chemokine ligand 5, CD3 antigen 그리고 protein tyrosine phosphatase receptor C 등 8개의 유전자가 이 군에 포함된다. Cluster B에는 Leukocyte immunoglobulin-like receptor, B7 homolog 3, RAC4 등 22개의 유전자들이 포함되며, OLT-2 복용 이후 지속적으로 증가하는 유전자들로 구성되어 있다. Cluster C와 D는 OLT-2 복용 4시간에 급격히 증가한 후 감소하는 유전자군으로 KIAA0186, Interleukin 18, protocadherin beta 9 그리고 Leucine-rich repeat containing 2등 42개의 유전자가 이 군에 포함된다. Cluster E는 복용 후 2시간에 발현이 증가한 후 감소하는 유전자로 Ferritin heavy chain (Ferritin H subunit)가 이 군에 포함된다. 각 군에 포함된 유전자들의 발현 변화는 Table 3에 표기하였다.

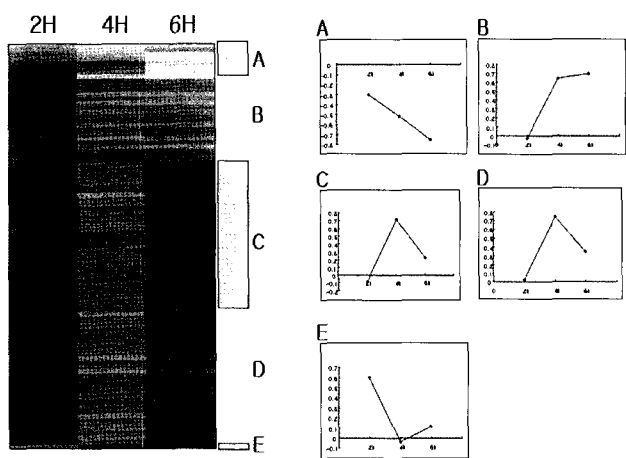


Fig. 1. Hierarchical cluster analysis of genes at different time. left, 92 genes were clustered 5 groups according their expression profile. Right, the normalized K-mean expression level was shown for each cluster of genes in graphical form.

3. OLT-2 복용에 의한 기능별 유전자 발현 비교 분석

OLT-2에 의해 변화되는 유전자들의 biological process를 조사한 결과, eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 등 13개의 유전자가 metabolism에 관여하는 것으로 확인되었으며, interleukin 18 등 8개의 유전자는 면역작용에 관여하는 것으로 확인되었다. 각 biological process에 속하는 유전자 수는 Fig. 2에서 표기하였다. 이들 유전자 중 KEGG database를 이용하여 작용기전을 확인한 결과, antigen presenting cell과 T-cell 간의 cell communication에 관여하여 T-cell 분화를 유도하는 것으로 알려진 PTPRC의 경우 OLT-2에 의해 발현이 감소되는 것으로 확

인되었으며, cytokine의 한 종류로 B-cell의 분화를 촉진하는 것으로 알려진 IL18와 cell 내 signal transduction에 관여하는 GNB4의 발현은 OLT-2에 의해 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

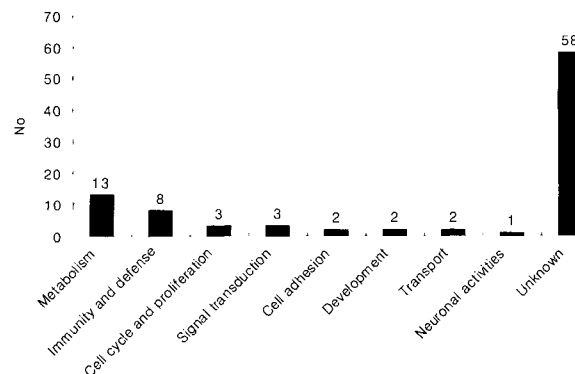


Fig. 2. Number of regulated genes differentially expressed in human blood by OLT-2 according to biological process.

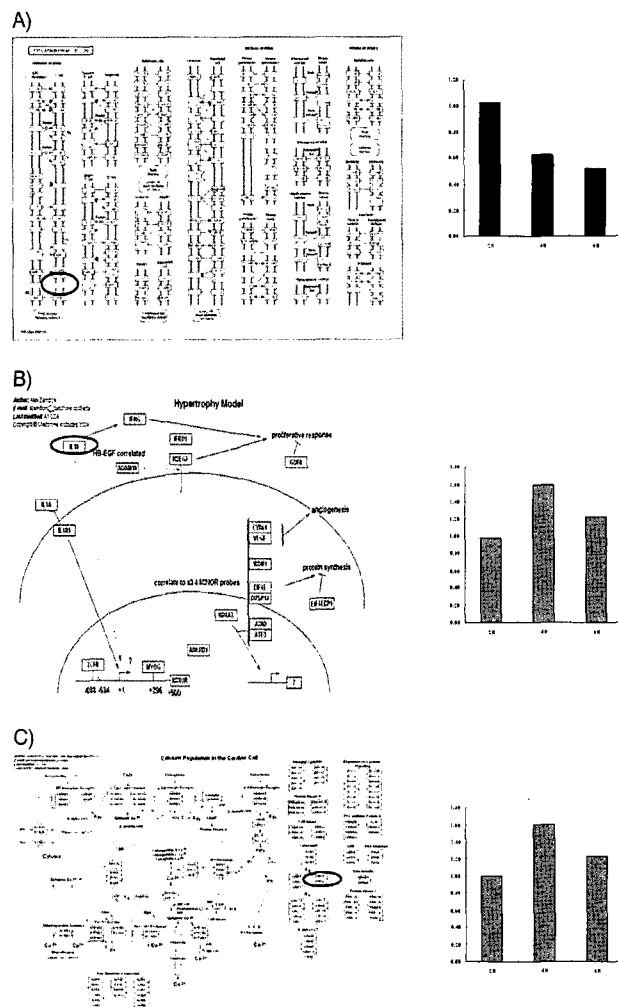


Fig. 3. Pathway analysis (cell adhesion, hypertrophy and calcium signaling pathway) using genechip pathway profiler that is a computer application designed to visualize gene expression data on screen representing biological pathways and groupings of genes.

## 고 찰

본 연구에서는 정상인 4인을 대상으로 microarray assay를 이용하여 OLT-2 복용에 따른 혈중 유전자 발현 변화를 관찰하였다. OLT-2는 인삼, 황기, 감초로 구성되어 있는 복합한방제제로 원광대학교 방제학교실에서 항백혈병 효과를 확인하였으며, 기존의 보고에 의하면 각각의 한약재에 대한 항암효과가 확인되었으며, 특히 인삼의 주요성분 중 하나인 compound K는 promyelocytic leukemia cells인 HL-60의 proliferation을 억제하고 apoptosis를 유도하는 것이 알려졌다.<sup>14)</sup>

Microarray 결과, OLT-2 복용 2시간까지 변화되는 유전자는 거의 없는 것으로 확인되었으며, protein tyrosine phosphatase, receptor type, C (PTPRC), transcript variant 4, protocadherin beta 9 등 83개의 유전자 발현이 4시간 이후에 1.5배 이상 변화하는 것으로 확인되었다. 6시간 후의 유전자 발현 변화를 관찰한 결과에서는 retinoblastoma binding protein 1-like 1을 포함한 23개의 유전자 발현이 1.5배 감소 또는 증가하였다(Table 1). 이들 유전자들의 발현 양상을 조사한 결과 metabolism, cell cycle, immuno response에 관여하는 유전자들의 발현이 포함되었으며 (Fig. 2), 이들 유전자들이 포함되는 pathway를 분석한 결과, OLT-2 복용에 의해 감소되는 유전자인 PTPRC의 경우 antigen presenting cell(APC)와 T, B-cell의 결합에 관여하는 단백질이며, OLT-2에 의해 증가하는 유전자로 확인된 IL-18은 면역작용에 관여하는 cytokine이며, GNB4는 cell signaling에 관여하는 것으로 확인되었다. PTPRC는 tyrosine phosphatase 활성을 가지고 있는 glycoprotein으로 cell proliferation, signaling 및 분화에 밀접한 연관이 있으며 특히 B-cell의 신호전달과정과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>20)</sup> Nakamura 등(2001)은 PTPRC의 발현 정도가 소아의 급성림프종백혈병 특징 및 예측과 밀접한 연관이 있다고 보고하였으며,<sup>21)</sup> Taetle 등은 HL60 leukemia cell의 granulocyte 또는 monocyte로의 분화가 CD45 antigen 발현의 증가와 밀접한 연관이 있다고 보고하였다.<sup>22)</sup> 이는 PTPRC의 증가가 백혈병의 발병 또는 발병확장과 밀접한 연관이 있음을 의미한다. 본 연구 결과에서는 OLT-2가 혈액내 백혈구에서 발현되는 PTPRC의 발현을 감소시키는 것으로 확인되었으며(Table 3), 따라서, OLT-2의 항백혈병 효과 중 하나가 PTPRC의 발현 감소에 의한 백혈병 억제와 연관이 있음을 의미한다.

Interleukin 18은 cytokine의 한 종류로 Natural killer cell의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있으며, NK, B 그리고 T-cell에서 interferon gamma의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있으며,<sup>23-28)</sup> 본 연구 결과 IL-2의 발현이 OLT-2 복용이후 지속적으로 증가하는 것으로 확인되었다(Table 3, Fig. 3B). IL-18의 항백혈병 효과에 대해 Akamatsu 등(2002)은 IL-18이 murine T-cell leukemia의 성장을 억제한다고 보고하였으며, 이러한 항암효과는 기본적으로 NK cell에 의해 매개되며 또한 T-cell의 작용이 요구된다고 보고하였으며,<sup>29)</sup> 또한 Salesse 등은 IL-18에 의해 증가되는 것으로 알려진 nterferon gamma의 발현을 증가시킨 결과 chronic myeloid leukemia인 K-562 cell의 성장이 억제된다고 보

고하였다.<sup>30)</sup> Microarray 결과 Guanine nucleotide binding protein beta 4(GNB4)의 발현은 OLT-2의 복용 이후 증가하는 것으로 확인되었다(Table 3). GNB4는 G protein beta의 한 종류로 폐와 태반에서는 강하게 발현되나 뇌와 심장에서는 약하게 발현되는 것으로 알려져 있다.<sup>31)</sup> GNB4와 백혈병과의 상관성에 대해서는 현재까지 알려진 바는 없으나, Kue와 Daaka(2002)의 보고에 의하면 G beta가 prostate cancer cells의 성장 및 분열을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>32)</sup>

OLT-2는 인삼, 황기, 감초로 구성된 복합한방제재로 각각의 한약재에 대한 항암효과는 기존의 많은 연구에서 보고되어있으며, OLT-2의 항백혈병 효과는 in vitro 실험에서 확인되었다. 본 연구에서 정상인을 대상으로 OLT-2의 복용 이후 발현이 변화되는 혈중 유전자들을 관찰한 결과, 백혈병의 성장을 억제하는 것으로 알려진 IL-18과 암세포 증식의 억제에 관여하는 것으로 보고된 GNB4의 발현은 증가한 반면, leukemia cell의 분화에 관여하는 것으로 알려진 PTPRC의 발현은 감소하는 것으로 확인되었다. 또한 이들 유전자 이외에 약 90여 유전자들의 발현이 OLT-2에 의해 변화되는 것을 확인하였다. 따라서 OLT-2의 항백혈병 효과는 단일 기작이 아닌 항암기작에 관여하는 여러 유전자들의 발현을 조절에 의해 이루어진다 할 수 있다. 그러나 위 연구 결과는 일부 한계점을 내포하고 있다. 첫째는 백혈병 환자가 아닌 정상인을 대상으로 하였기 때문에 OLT-2의 직접적인 항백혈병 효과를 확인하지 못하였으며, 둘째는 정상인에서 OLT-2에 의해 변화되는 유전자들이 환자에서도 동일하게 변화되는가는 의문으로 남아 있는 실정이다.

## 결 론

본 연구는 인삼, 황기, 감초로 구성된 복합한방제재인 OLT-2의 항백혈병 효과를 관찰하기 위하여 정상인을 대상으로 OLT-2 복용 후 변화되는 혈중 유전자를 microarray assay를 이용하여 관찰하였다. 그 결과 14600여 유전자 중 92개의 유전자 발현이 OLT-2에 의해 변화되었으며, 백혈병의 성장에 관여하는 PTPRC의 발현은 감소시키고, 항백혈병 효과를 가진 interleukin 18의 발현은 증가하는 것을 확인하였다. 본 연구는 OLT-2 복용 후인간 혈액에서 변화되는 유전자들을 관찰함으로써, OLT-2의 항백혈병 효과에 대한 인체내 반응기작을 이해하는데 도움을 줄 것으로 사료된다.

## 감사의 글

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

## 참고문헌

1. 비호지킨 림프종(C82-C85)의 사망률 추이, 1983-2004년, 통계청 사망원인통계, 통계청, 2006.

2. 한국중양암등록본부·보건복지부, 한국중양암등록 사업 연례 보고서(2002. 1. - 2002. 12.), 2003.
3. Kerkela, R., Grazette, L., Yacobi, R., Iliescu, C., Patten, R., Beahm, C., Walters, B., Shevtsov, S., Pesant, S., Clubb, F.J., Rosenzweig, A., Salomon, R.N., Van Etten, R.A., Alroy, J., Durand, J.B., Force, T. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med.* 23, 2006. (in press)
4. Wargovich, M.J. Colon cancer chemoprevention with ginseng and other botanicals. *J Korean Med Sci.* 16, S81-S86, 2001.
5. Fukushima, S., Wanibuchi, H., Li, W. Inhibition by ginseng of colon carcinogenesis in rats. *J Korean Med Sci.* 16, S75-S80, 2001.
6. Matsunaga, H., Katano, M., Yamamoto, H., Fujito, H., Mori, M., Takata, K. Cytotoxic activity of polyacetylene compounds in *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Chem Pharm Bull.* 38, 3480-3482, 1990.
7. Matsunaga, H., Katano, M., Saita, T., Yamamoto, H., Mori, M. Potentiation of cytotoxicity of mitomycin C by a polyacetylenic alcohol, panaxytriol. *Cancer Chemother Pharmacol.* 33, 291-297, 1994.
8. Lee, S.J., Sung, J.H., Lee, S.J., Moon, C.K., Lee, B.H. Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. *Cancer Lett.* 144, 39-43, 1999.
9. Wu, X.G., Zhu, D.H., Li, X. Anticarcinogenic effect of red ginseng on the development of liver cancer induced by diethylnitrosamine in rats. *J Korean Med Sci.* 16, S61-S65, 2001.
10. Han, H.J., Yoon, B.C., Lee, S.H., Park, S.H., Park, J.Y., Oh, Y.J., Lee, Y.J. Ginsenosides inhibit EGF-induced proliferation of renal proximal tubule cells via decrease of c-fos and c-jun gene expression in vitro. *Planta Med.* 68, 971-974, 2002.
11. Nakata, H., Kikuchi, Y., Tode, T., Hirata, J., Kita, T., Ishii, K., Kudoh, K., Nagata, I., Shinomiya, N. Inhibitory effects of ginsenoside Rh2 on tumor growth in nude mice bearing human ovarian cancer cells. *Jpn J Cancer Res.* 89, 733-740, 1998.
12. Liu, W.K., Xu, S.X., Che, C.T. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sci.* 67, 1297-1306, 2000.
13. Wakabayashi, C., Murakami, K., Hasegawa, H., Murata, J., Saiki, I. An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 246, 725-730, 1998.
14. Lee, S.J., Ko, W.G., Kim, J.H., Sung, J.H., Moon, C.K., Lee, B.H. Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease. *Biochem Pharmacol.* 60, 677-685, 2000.
15. Lin, J., Dong, H.F., Oppenheim, J.J., Howard, O.M. Effects of astragali radix on the growth of different cancer cell lines. *World J Gastroenterol.* 9, 670-673, 2003.
16. Kurashige, S., Akuzawa, Y., Endo, F. Effects of astragali radix extract on carcinogenesis, cytokine production, and cytotoxicity in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N'-butanolnitrosoamine. *Cancer Invest.* 17, 30-35, 1999.
17. Jo, E.H., Kim, S.H., Ra, J.C., Kim, S.R., Cho, S.D., Jung, J.W., Yang, S.R., Park, J.S., Hwang, J.W., Aruoma, O.I., Kim, T.Y., Lee, Y.S., Kang, K.S. Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 230, 239-247, 2005.
18. Kanazawa, M., Satomi, Y., Mizutani, Y., Ukimura, O., Kawauchi, A., Sakai, T., Baba, M., Okuyama, T., Nishino, H., Miki, T. Isoliquiritigenin inhibits the growth of prostate cancer. *Eur Urol.* 43, 580-586, 2003.
19. Sheela, M.L., Ramakrishna, M.K., Salimath, B.P. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *Int Immunopharmacol.* 6, 494-498, 2006.
20. Dang, A.M., Phillips, J.A., Lin, T., Raveche, E.S. Altered CD45 expression in malignant B-1 cells. *Cell Immunol.* 169, 196-207, 1996.
21. Nakamura, A., Tsurusawa, M., Kato, A., Taga, T., Hatae, Y., Miyake, M., Mimaya, J., Onodera, N., Watanabe, A., Watanabe, T., Kanegane, H., Matsushita, T., Iwai, A., Hyakuna, N., Gushi, K., Kawakami, T., Sekine, I., Izuchi, O., Asami, K., Kikuta, A., Tanaka, A., Fujimoto, T. Prognostic impact of CD45 antigen expression in high-risk, childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 42, 393-398, 2001.
22. Taetle, R., Ostergaard, H., Smedsrud, M., Trowbridge, I. Regulation of CD45 expression in human leukemia cells. *Leukemia.* 5, 309-14, 1991.
23. Fukao, T., Matsuda, S., Koyasu, S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN $\gamma$  production by dendritic cells. *J Immunol.* 164, 64-71, 2000.
24. Schindler, H., Lutz, M.B., Rollinghoff, M., Bogdan, C. The production of IFN- $\gamma$  by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol.* 166, 3075-3082, 2001.
25. Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., Modolell, M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18, a novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med.* 187, 2103-2108, 1998.
26. Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K.,

- Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., Nakanishi, K. IL-12 upregulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells, synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol.* 161, 3400-3407, 1998.
27. Yang, J., Zhu, H., Murphy, T.L., Ouyang, W., Murphy, K.M. IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. *Nat Immunol.* 2, 157-164, 2001.
28. Yu, J.J., Tripp, C.S., Russell, J.H. Regulation and phenotype of an innate Th1 cell: role of cytokines and the p38 kinase pathway. *J Immunol.* 171, 6112-6118, 2003.
29. Akamatsu, S., Arai, N., Hanaya, T., Arai, S., Tanimoto, T., Fujii, M., Kohno, K., Micallef, M.J., Ikeda, M., Kurimoto, M. Antitumor activity of interleukin-18 against the murine T-cell leukemia/lymphoma EL-4 in syngeneic mice. *J Immunother.* 25, S28-34, 2002.
30. Salesse, S., Lagarde, V., Ged, C., de Verneuil, H., Reiffers, J., Mahon, F.X. Retroviral coexpression of IFN-alpha and IFN-gamma genes and inhibitory effects in chronic myeloid leukemia cells. *J Interferon Cytokine Res.* 20, 577-587, 2000.
31. Ruiz-Velasco, V., Ikeda, S.R., Puhl, H.L. Cloning, tissue distribution, and functional expression of the human G protein beta 4-subunit. *Physiol Genomics.* 8, 41-50, 2002.
32. Kue, P.F., Daaka, Y. Essential role for G proteins in prostate cancer cell growth and signaling. *J Urol.* 164, 2162-2167, 2000.