

DNA chip에 의한 연구에 따른 길경 수용액 추출물이 NCI-H460 인체 폐암세포의 성장 및 유전자 발현에 미치는 영향

김 훈* · 박동일**

* 동의대학교 한의학과 의사학교실

** 동의대학교 한의학과 내과학교실

Effects of an Extract from the Roots of *Platycodon grandiflorum* on the Growth and Gene Expression of Human Lung Carcinoma NCI-H460 Cells

Hoon Kim · Dong-il. Park

Objectives : We studied Effect of *Platycodon grandiflorum* on Lung carcinoma

Methods : By using cDNA microarray technique, we analyzed the effects of AEPG(aqueous extract of *Platycodon grandiflorum*) on the gene expression profile.

Results : Out of 384 genes screened associated with growth inhibition of carcinoma cell, 9 genes were founded to be affected in their expression levels by more than 1.2-fold after treatment with AEPG. And 67 genes were changed the expression level 0.5 times more than that of reference RNA after treatment of AEPG.

Conclusions: These findings suggest that *P. grandiflorum* has strong potential for development as an agent for prevention and treatment against human lung cancer.

Key words : *Platycodon grandiflorum*, Lung carcinoma, cDNA microarray, AEPG

1. 서 론

교신저자: 박동일, 부산광역시 진구 양정2동 산45-1 동의대학교 한의
과대학 내과학교실
(Tel : 051-850-8650, E-Mail: dipark@deu.ac.kr)
• 접수 2006/04/26 • 수정 2006/07/20 • 채택 2006/08/04

桔梗은 性質이 微溫하고 味가 辛苦하며 有毒하고
氣血을 昇提하는 作用이 있어 肺熱로 인해 頭·
目·鼻·咽喉 등에 병이 생긴 것과 氣血凝滯로 말

미암아 胸·脇·腹·腸管 등에 발생된 痰飲으로 유발된 肺癰·肺痿·頭目不清·鼻塞·喉痺·咽腫·胸脇痛·積塊 등을 치료한다고 하였으며¹⁻²⁾, 破癥癥血積 治噎膈嘔吐反胃의 효능이 있어 암종의 치료에도 응용이 가능하다고 하였다³⁾.

세포의 증식과 암의 발생 측면에서 세포주기 조절의 교란에 의하여 세포가 끊임없이 증식되는 것을 암세포라고 할 수 있다⁴⁻⁵⁾. 이러한 암의 발생은 정상 세포의 성장에서 유전자의 변형이 동반되는 다단계적이며·복합적인 과정이다. 발암원은 표적 세포의 유전자에 돌연변이를 일으키거나 변화를 주는데, 이 세포들의 증식으로 암세포로서의 성질을 가지게 되는 원인이 된다⁶⁾. 따라서 암 유발 가능성을 지닌 물질의 독성을 평가하는데 세포증식 자료의 이용과 유의성이 강조되고 있으며, 암세포만을 선택적으로 증식억제를 유발하거나 사멸(apoptosis) 시키는 물질의 암세포에 대한 세포독성 정도의 평가는 항암제 개발을 위한 가장 기본적인 과정 중의 하나로 많은 연구가 이뤄졌다.

한편 사람의 유전자는 현재까지 분자생물학의 발달과 human genome project 등의 노력으로 많은 유전자들이 빠른 속도로 밝혀지고 있으나 그들의 생물학적 의미의 해석은 속도가 느린 것이 사실이다. 이러한 현실에서 최근 개발된 분자생물학 연구법 중의 중요한 발전은 세포에서 많은 유전자들의 상호 발현 차이를 빠른 시간 내에 동시에 연구할 수 있는 cDNA miroarray (DNA chip) 기술의 개발이다⁷⁻²⁹⁾. cDNA miroarray 기술의 장점은 세포의 유전자 발현 변화를 한 시점에서 동시에 많은 유전자를 대상으로 연구할 수 있다는 것, 즉 매우 짧은 시간 내에 수백-수천 종류 유전자의 발현을 동시에 분석할 수 있다는 것이다. cDNA miroarray 기술은 화학 및 컴퓨터 기술과 접목되어 더욱 발전되고 자동화된 형태의 DNA chip이 개발 중에 있다²⁸⁻³⁰⁾. 따라서 항암성을 가지는 특정 물질의 처리에 의한 유전자 발현 조절 반응 및 증식억

제와 apoptosis 등에 관여하는 유전자의 발현 변화 분석은 암 질환을 비롯한 각종 질환에서 특정 물질 처리에 따른 치료의 분자생물학적 기전 및 항암제 내성에 대한 많은 이해와 지식의 축적을 이루고 나아가 이를 이용한 새로운 치료 기술 방법 개발의 바탕이 될 수 있을 것이다³⁰⁾.

길경(Platycodi radix)은 한국, 중국 및 일본 등지에 널리 자생하는 다년생 초본인 초롱꽃목 초롱꽃과(Campanulaceae)에 속하는 도라지(*Platycodon grandiflorum* A. DC)의 뿌리껍질을 벗기거나 또는 그대로 말린 것을 말하며, 전통적으로 염증성 호흡기 질환 및 식용으로 많이 사용되어져 오고 있다¹⁴⁻¹⁸⁾. 특히 한방에서는 排膿, 祛痰, 편도선염, 催乳, 鎮咳, 화농성종기, 천식 및 폐결핵의 거담제로서, 그리고 녹막염 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁹⁾. 또한 도라지의 주요 약리 성분은 triterpenoid계 사포닌으로 밝혀졌으며¹⁹⁾, 사포닌 분획성분인 platycodon이 鎮靜, 解熱, 陣痛, 鎮咳, 祛痰, 혈당강하작용, 콜레스테롤 대사개선작용, 항콜린작용, 항암작용 및 위산분배 억제 효과 등 여러 약리효과가 있는 것으로 밝혀져 있다^{15,20-22)}. 도라지의 열수 및 에탄올 추출물은 곰팡이의 독소 생성능을 감소시키며²³⁾, 메탄올 추출물, inulin 분획 및 사포닌 분획을 마우스에 투여시 식균작용을 촉진하였을 뿐만 아니라 특히 inulin 성분은 마우스 복수암에 대한 강력한 항암활성을 보임이 확인된 바도 있다²⁴⁻²⁵⁾.

그 외 길경에 함유된 다양한 약리 성분의 분석에 관한보고는 이미 다수의 연구자들에 의해 수행되었으며, 각종 생리활성의 기능 향상에 관한 연구가 꾸준히 진행되어져 오고 있다. 그중 최근에 보고 되어지는 항암 작용의 가능성은 매우 주목을 받고 있으나 대부분 현상의 관찰에 지나지 않으며, 정확한 항암기전을 제시한 예는 거의 없다^{21,25-27)}. 특히 한방처방의 형태로 섭취하는 길경의 성분이 수용성 성분인 점을 고려할 때, 항암에 관한 기전

연구는 거의 전무한 실정이었다.

길경에 관한 최근의 암에 대한 실험적 연구로 암세포에 대한 독성을 판단한 실험은 많았으나²⁸⁻³⁰⁾, cDNA miroarray 기술을 이용한 실험적 연구는 없었다.

이에 저자는 길경에 대한 cDNA miroarray 기술을 이용하여 cDNA microarray를 위한 RNA의 QC 확인 및 cDNA microarray 분석 결과를 살펴보고 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 암세포의 배양

본 실험에 사용한 NCI-H460 인체 폐암세포 (NCI-H460 human lung carcinoma cell line)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 사용하였다. 암세포의 배양을 위해서는 선행연구 방법³¹⁾에 준하여 90%의 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS), 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장 배지를 사용하여 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였으며, 성장배지의 교환은 매 48시간마다 해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포배양용 페트리 접시로 옮겨 배양하였다.

2. 길경 수용액의 추출 및 처리

본 연구에 사용된 길경은 동의대학교 한의과대학 부속 한방병원에서 공급받았으며 100 g을 1,000 ml의 증류수에 3시간 이상 끓인 후, 3,000 rpm으

로 20분간 원심 분리시켜 침전물을 제거하였다. 이를 다시 0.45 μ m의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 수용성분을 동결 건조하여 사용하였다. 길경 수용액 추출물의 처리를 위하여 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 세포배양용 페트리 접시로부터 부유시킨 다음 새로운 세포배양용 페트리 접시에 6×10^5 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화 시켰다. 길경 추출물을 세포에 처리하기 직전 적정 농도로 성장배지에 첨가하여 녹인 다음, 0.22 μ m의 pore size를 가진 주사기용 필터유닛을 사용하거나 1회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 세포의 성장배지를 갈아주면서 직접 처리하였다³¹⁾.

3. cDNA microarray 분석

1) RNA의 준비

cDNA miroarray 분석은 Digital-genomics사(서울)에서 제공하는 Human Cancer Twin Chip-8K (384개의 유전자 분석)를 사용하였으며, 제조사에서 제공하는 실험법에 따라 실험을 실시하였다. 즉 정상 및 길경 추출물(2.0 mg/ml)이 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 암세포들을 모아 전술한 것과 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 상태를 조사하기 위하여 quality check (QC)를 소량의 sample로 Agilent 사의 Bioanalyzer를 이용하여 실시하였다. 즉 RNA를 agarose gel 전기영동으로 분리한 후 18S ribosomal RNA (rRNA)에 대한 28S rRNA의 상대적인 값을 구하여 실험에 사용 가능한지의 여부를 판정하였다.

2) Fluorescence probe의 합성

준비된 RNA 100 μ g (volume, 22 μ l)을 500 μ g/ml의 oligo dT 2 μ l과 혼합하여 70°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 방치하였다. 이 반응액에 5X reaction buffer 10 μ l, 10X dNTP (즉 5

mM d(ACG)TP와 2 mM TTP) 5 μ l, fluorescent nucleotide (대조군은 1 mM Cy3-dUTP, 실험군은 1 mM Cy5-dUTP) 2 μ l, 1.5 μ l RNAsin, 2.5 μ l의 superscript II reverse transcriptase (200 U/ μ l) 등을 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 이후 이 반응액에 3 N NaOH 6 μ l을 첨가하고 65°C에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거하고, 다시 1 M TrisHCl (pH 7.5) 20 μ l, 1 N HCl 12 μ l을 첨가하여 NaOH를 중화시켰다. 이 반응액을 Biospin 6 column에 옮겨 1,000 Xg로 4분간 원심분리하고, Microcon 30 tube로 옮겨 12,000 Xg로 3분간 다시 원심분리하였다.

3) Microarray hybridization

형광물질과의 결합반응을 준비하기 위해 prehybridization buffer인 6X SSC, 0.2% SDS, 5X Denhardt's solution, 1 mg/ml salmon sperm solution 등을 microarray slide에 떨어뜨리고 22 mm X 22 mm의 cover glass로 덮어 glue로 봉합한 후 2시간 동안 상온에서 방치하였다. 이후 봉합을 열고 2X SSC, 0.2X SSC로 세척하고 50 ml tube에서 3,000 rpm으로 2분간 원심분리하였다. Fluorescence probe 28.2 μ l, poly(dA) (4 mg/ml in TE) 1 μ l, yeast tRNA (4 mg/ml) 1 μ l, human Cot I DNA (Amersham Pharmacia Biotech Inc. USA) (10 mg/ml) 1 μ l, 10% SDS 0.8 μ l, 20X SSC 8 μ l을 혼합하여 99°C에서 5분간 방치하였다. 실온에서 5분간 방치한 후 반응액은 12,000 Xg로 2분간 원심분리하고 이어서 microarray에 점적하여 microarray를 62°C에서 overnight 반응시켰다. Hybridization된 microarray는 1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 세척하였다. 0.1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 50°C에서 10분간 세척한 후 이어서 0.1X SSC 용액으로 10분간 다시 세척하였다.

4) Scanning 및 결과 분석

Hybridization이 끝난 microarray는 confocal laser-scanning microscope (Scan Array 5000)으로 scan하여 영상을 얻었다. Cy3 (GHeNe laser)는 543 nm에서, Cy5 (RHeNe laser)는 632 nm을 사용하였다. ImaGene과 ScanAnalyzer를 이용하여 각각의 spot에 대한 data를 저장한 후 median 값을 사용하여 각 spot의 pixel intensity에서 local background intensity를 감하고 microarray 상의 house-keeping gene의 intensity 값을 이용하여 녹색과 적색파장에서 두 형광영상을 normalization 한 후 길경 추출물 처리군과 대조군 사이에서 각 microarray 상의 각 gene의 발현정도에 대한 ratio를 얻었다(Fig. 1 참고).

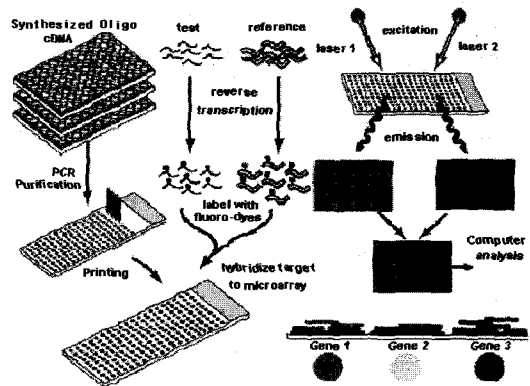


Fig. 1. A process of cDNA microarray chip assay

III. 결과 및 고찰

1. cDNA microarray를 위한 RNA의 QC 확인

정상 및 길경 추출물(2.0 mg/ml)이 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 암세포들을 모아 전수한 것과 동일한 방법으로 RNA를 추출한 후, cDNA microarray 분석을 위하여 RNA의 상태를 조사하였

다. 소량의 RNA를 취하여 전기영동으로 분리한 후, QC를 조사한 결과는 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. 정상 배지에서 자란 대조군의 QC는 1.09이었으며, 2.0 mg/ml 길경 추출물이 함유된 배지에서 배양된 암세포의 QC는 1.51로 나타나 실험에 사용하기에 적합하다고 판단되어, 이를 cDNA microarray를 위한 재료로 사용하였다.

2. cDNA microarray 분석 결과

길경 추출물이 처리된 배지에서 배양된 암세포의 유전자 발현 변화를 비교 분석하기 위하여 정상 및 길경 추출물이 함유된 배지에서 배양된 세포에서 total RNA를 분리한 후 재료 및 방법에 서술한 바와 같이 준비된 DNA chip에 hybridization을 실시하였다. Total RNA를 사용하여 cDNA를 Cy3/Cy5-dUTP로 labelling 하여 probe로 사용하였으며, hybridization 후 scanning하여 Fig. 3에 나타낸 바와 같은 결과를 얻었다. 본 자료를 분석하여 발현의 차이를 보이는 유전자들을 선별하기 위하여 scanning과 image의 data 분석은 Axon Instruments사의 GenePix Pro 3.0을 이용하였다. 영상 분석에서 IP λk 는 파장 k에서 하나의 pixel이 갖는 값이며, IB λk 는 하나의 background pixel의 파장 k에서의 값이다. 프로그램에서 자동으로 spot의 범위를 설정하여 범위 내부의 pixel 각각의 [(Ip $\lambda 1$)n] median을 계산하였으며, 내부 pixel의 3배 면적을 설정하여 background pixel의 [(IB $\lambda 1$)n] median을 계산하였다. 대조군과 길경 추출물 처리군에서의 발현의 정도는 각각의 중앙값을 비교하였다.

$$\text{Control (Cy3)} = \frac{[(Ip \lambda 1)n] \text{ median} - [(IB \lambda 1)n] \text{ median}}{\text{median}}$$

$$\text{AEPG (Cy3)} = \frac{[(Ip \lambda 2)n] \text{ median} - [(IB \lambda 2)n] \text{ median}}{\text{median}}$$

위의 결과에서 대조군과 길경 추출물 처리군의 수치가 각각 1,000 이상의 발현을 보인 자료만을 인정하였다. 본 실험에서 발현의 변화는 control (Cy3)에 대한 길경 추출물 처리군인 Aqueous extract of Platycodon grandiflorum(AEPG) (Cy5)의 변화도를 측정하게 됨으로서 Cy5/Cy3의 비율로 발현의 증가와 감소를 계산하고, Cy5와 Cy3의 양이 비슷하여 변화가 없을 경우에는 Cy5/Cy3의 값이 1에 근접하게 된다.

즉 특정 유전자에 대한 Cy5/Cy3의 비율이 “> 1” 일 경우 발현이 증가되었음을 의미하고, “< 1”의 경우는 반대로 감소하였음을 의미한다. 이는 곧 ratio of median 값으로 표시되며 발현의 변화를 보이는 유전자의 spot 만을 ratio of median (R.M.) 값을 우선적으로 정리하였다. Fold induction 값은 mean of normalized ratio 값을 기준으로 삼았으며, 계산 공식은 아래와 같다.

$$R.M. = \frac{[(Ip \lambda 1)n] \text{ median} - [(IB \lambda 1)n] \text{ median}}{[(Ip \lambda 2)n] \text{ median} - [(IB \lambda 2)n] \text{ median}}$$

상기의 식에 의하여 얻어진 값들 중 1.2배 이상 증가한 유전자들을 길경 추출물 처리에 의하여 발현이 증가한 유전자군으로 간주하였으며(Table 1), 0.5 미만의 경우를 길경 추출물 처리에 의하여 발현이 감소한 유전자 군으로 분류하였다(Table 2).

즉 NCI-H460 인체 폐암세포에서 cDNA microarray hybridization의 영상 분석을 통하여 길경 추출물 처리에 의하여 발현이 증가한 유전자 (R.M. 값이 1.2 이상)는 모두 9개였으며, 그중 폐를 포함한 중추신경계, 신장, 심장, 피부 등에서 종양 형성과 관계된 tuberous sclerosis³²⁻³³⁾가 약 2.06배 이상 증가하여 조사 대상 유전자 중 가장 발현이 증가된 유전자였다. 그리고 길경 추출물 처리에 의하여 폐암세포의 증식이 억제되는 동안 발현이 감소한 유전자(R.M. 값이 0.5 미만)는 모두

Table 1. List of up-regulated genes in NCI-H460 human lung carcinoma cells after AEPG treatment

Gene Symbol	Title	R.M.
ANXA2	annexin A2	1.422303
BID	BH3 interacting domain death agonist	1.257901
CD63	CD63 antigen (melanoma 1 antigen)	1.740473
TSC2	tuberous sclerosis 2	2.058903
ARHA	ras homolog gene family, member A	1.274663
CCNB1	cyclin B1	1.273675
IL8	interleukin 8	1.548728
IFNA2	interferon, alpha 2	1.226427
TNFSF9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	1.226037

Table 2. List of down-regulated genes in NCI-H460 human lung carcinoma cells after AEPG treatment

Gene Symbol	Title	R.M.
ARAF1	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1	0.353597
ATF2	activating transcription factor 2	0.241408
CCR6	chemokine (C-C motif) receptor 6	0.202226
CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	0.443071
DAP3	death associated protein 3	0.293020
EBAG9	estrogen receptor binding site associated, antigen, 9	0.363892
EDNRB	endothelin receptor type B	0.343599
SLC3A2	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	0.275737
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kD	0.228577
TGFA	transforming growth factor, alpha	0.402298
THBS2	thrombospondin 2	0.351116
ACTB	actin, beta	0.134245
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	0.187363
RPL13A	ribosomal protein L13a	0.271076
ABL1	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	0.127926
CSK	c-src tyrosine kinase	0.442531
CDC20	CDC20 (cell division cycle 20, S. cerevisiae, homolog)	0.165021
EDN1	endothelin 1	0.396867
IL11RA	interleukin 11 receptor, alpha	0.487882
IL18	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	0.214762
JAK3	Janus kinase 3 (a protein tyrosine kinase, leukocyte)	0.496070
CREBBP	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2	0.410177
PLAU	plasminogen activator, urokinase	0.140327
RAD9	RAD9 (S. pombe) homolog	0.093344
SSI-1	JAK binding protein	0.340561

Table 2. 계속

Gene Symbol	Title	R.M.
STAT2	signal transducer and activator of transcription 2, 113kD	0.392603
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	0.133941
RPL13A	ribosomal protein L13a	0.287843
BRCA1	breast cancer 1, early onset	0.489723
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	0.483429
COX7A2L	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like	0.385217
FIGF	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	0.419688
FLT1	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	0.448765
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	0.283296
HSPA5	heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein, 78kD)	0.215493
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta	0.370730
MCC	mutated in colorectal cancers	0.312132
MCM7	minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 7	0.215106
MLL2	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	0.211621
RELB	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3)	0.240035
SCYC1	small inducible cytokine subfamily C, member 1 (lymphotactin)	0.241057
SELPLG	selectin P ligand	0.068956
TNFSF6	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6	0.143751
WT1	Wilms tumor 1	0.175036
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	0.156640
RPL13A	ribosomal protein L13a	0.284861
CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine protease (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2)	0.483882
CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	0.136980
CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	0.298858
CCNC	cyclin C	0.434215
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	0.129734
CDC42	cell division cycle 42 (GTP-binding protein, 25kD)	0.375016
CDK3	cyclin-dependent kinase 3	0.167452
CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	0.494995
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog	0.361587
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome, Jackson-Weiss syndrome)	0.277806
FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4	0.363049
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	0.443770
SCYA1	small inducible cytokine A1 (I-309, homologous to mouse Tca-3)	0.044592
SHC1	SHC (Src homology 2 domain-containing) transforming protein 1	0.043241

67개였다. 그중 가장 발현이 감소한 유전자는 혈관 질환이나 염증 반응에 관여하며, 혈관상피세포, 백혈병, 다양한 종류의 종양 형성에서 세포간 접촉

수용체로서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 유전자인 *selectin P ligand*³⁴⁻³⁵⁾로서 R.M. 값이 약 0.07 정도였음을 알 수 있었다.

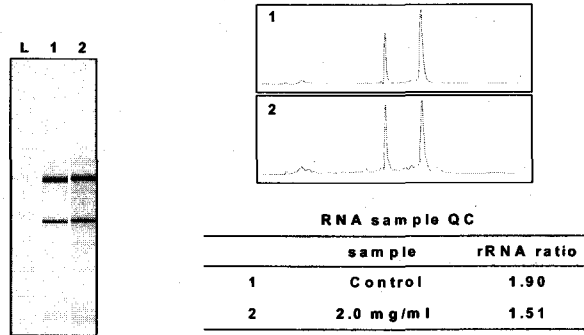


Fig. 2. Results of RNA quality check (QC) for cDNA microarray assay. NCI-H460 human lung carcinoma cells were incubated with 2.0 mg/ml AEPG for 48 h (lane 1, control cells; lane 2, AEPG treated cells) and total RNAs were isolated and separated in agarose gel electrophoresis. QC (28S rRNA/18S rRNA) was calculated using Bioanalyzer.

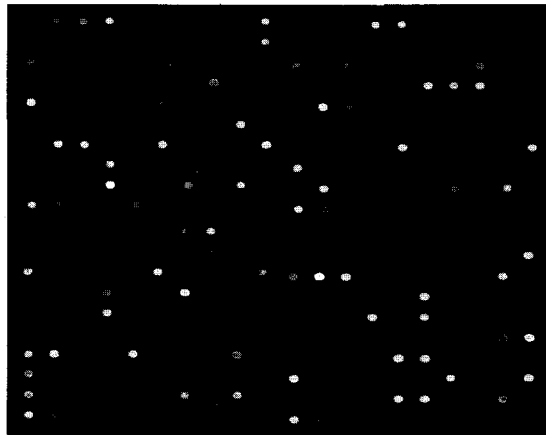


Fig. 3. Color image of microarray used to analyze transcript level in cultured NCI-H460 human lung carcinoma cells after AEPG treatment with 2.0 mg/ml. Total RNA was extracted from NCI-H460 cells immediately after AEPG treatment. Each RNA sample was used as a template for synthesis of cDNA probe, which were incorporated with either Cy3- or Cy5-dUTP. The probes were mixed and hybridized to a microarray slide. The slide was scanned in laser scanning. The control was labelled with Cy3-dUTP (green) and the AEPG treated sample was labelled with Cy5-dUTP (red).

IV. 결 론

본 연구에서는 암세포의 성장 억제 효과와 유전자 발현 변화를 cDNA microarray 방법으로 확인하였으며, 그 결과 cDNA microarray 방법으로 길경 추출물 처리에 의한 암세포 성장 억제와 연관된 384개의 유전자 발현 변화 조사에서, 발현이 증가한 유전자는 모두 9개였으며, 발현이 감소한 유전자는 모두 67개였다.

이러한 결과는 길경 추출물을 이용한 인체 암세포의 성장억제제의 개발 가능성이 매우 높음을 시사하여 준다. 따라서 이에 관한 지속적인 연구의 필요성이 있을 것으로 생각되며 유전자의 기능적 분석에 관한 더 많은 연구도 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 1999:1904.
2. 李梴. 國譯篇註醫學入門 本草 上. 서울:南山堂. 1974:323-326
3. 윤길영. 東醫臨床方劑學. 서울:成輔社. 1994: 437, 439.
4. Weinberg, R.A.. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995;81:323-330.
5. Sherr, C.J.. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 2000; 60:3689-3695.
6. Soto, A.M. and Sonnenschein, C.. The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? *Bioessays*. 2004;26:1097-1107.
7. Khan, J., Saal, L.H., Bittner, M.L., Chen, Y., Trent, J.M. and Meltzer, P.S.. Expression profiling in cancer using cDNA microarrays. *Electrophoresis*. 1999;20:223-229.
8. Blohm, D.H. and Guiseppi-Elie, A.. New developments in microarray technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001;12:41-47.
9. Stremmel, C., Wein, A., Hohenberger, W. and Reingruber, B.. DNA microarrays: a new diagnostic tool and its implications in colorectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* 2002;17:131-136.
10. Simon, R., Mirlacher, M. and Sauter, G.. Tissue microarrays. *Biotechniques*. 2004;36: 98-105.
11. Ahmed, F.E.. Molecular techniques for studying gene expression in carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2002;20:77-116.
12. Rimm, D.L., Camp, R.L., Charette, L.A., Olsen, D.A. and Provost, E.. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. *Exp. Mol. Pathol.* 2001;70: 255-264.
13. Sausville, E.A. and Holbeck, S.L.. Transcription profiling of gene expression in drug discovery and development: the NCI experience. *Eur. J. Cancer*. 2004; 40:2544-2549.
14. Takagi, K. and Lee, E.B.. Pharmacological studies on *Platycodon grandiflorum* A. DC. *Yakugaku Zasshi*. 1972;92:951-973.
15. Lee, E.B.. Pharmacological activities of crude platycodin. *J. Pharm. Soc. Korea*. 1975;19:164-176.
16. Ozaki, Y.. Studies on antiinflammatory effect of Japanese Oriental medicines (kampo medicines) used to treat inflammatory diseases. *Biol. Pharm. Bull.* 1995;18:559-562.

17. Saeki, T., Koike, K. and Nikaido, T., A comparative study on commercial, botanical gardens and wild samples of the roots of *Platycodon grandiflorum* by HPLC analysis. *Planta Med.*, 1999;65:428-431.
18. Chung, J.H., Shin, P.G., Ryu, J.C., Jang, D.S. and Cho, S.H., Pharmaceutical substances of *Platycodon grandiflorum* (jacquin) A. De Candolle. *Arg. Chem. Biotech.*, 1997;40:152-156.
19. Tada, A., Kaneiwa, Y., Shoji, J and Shibata, S., Studies on the saponins of the root of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle. I. Isolation and the structure of platycodin-D. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 1975;23: 2965-2972.
20. Kim, K.S., Ezaki, O., Ikemoto, S. and Itakura, H., Effects of *Platycodon grandiflorum* feeding on serum and liver lipid concentration in rats with diet-induced hyperlipidemia. *J. Nur. Sci. Vitaminol.*, 1995;41:485.
21. Kim, Y.S., Lee, B.E., Kim, K.J., Lee, Y.T., Gho, K.B. and Chung, Y.C., Antitumor and immunomodulatory activities of the *Platycodon grandiflorum* cultivated for more than 20 years. *Yakhak Hoeji*, 1998;42:382-387.
22. Kim, K.S., Seo, E.K., Lee, Y.C., Lee, T.L., Cho, Y.W., Ezaki, O. and Kim, C.H., Effect of dietary *Platycodon grandiflorum* on the improvement of insulin resistance in obese Zucker rats. *J. Nutr. Biochem.*, 2000;11:420-424.
23. Hitokoto, H.S., Morozumi, T., Sakai, W.S. and Veno, I., Inhibitory effects of condiments and herbal drugs on the growth and toxin production of toxigenic fungi. *Mycopathologia*, 1979;66:161-168.
24. Kubo, M., Nagao, T., Matsuda, H. and Namba, K., Immune pharmacological studies on platycodon radix I. Effect on the phagocytosis in the mouse. *Shoyagaku Zasshi*, 1986;40:367-374.
25. Nagao, T., Matsuda, H., Namba, K. and Kubo, M., Immune pharmacological studies on platycodi radix (II). Antitumor activity of inulin from platycodi radix. *Shoyakugaku Zasshi J. Pharm. Soc. Jpn.*, 1986;40: 375-380.
26. Kim, Y.P., Lee, E.B., Kim, S.Y., Li, D., Ban, H.S., Lim, S.S., Shin, K.H. and Ohuchi, K., Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of *Platycodon grandiflorum*. *Planta Med.*, 2001;67:362-364.
27. Lee, J.Y., Hwang, W.I. and Lim, S.T., Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extract on the growth of cancer cell lines. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 1998;30:13-21.
28. Lee, J.H., Kang, G.H., Kim, K.C., Kim, K.M, Park, D.I., Choi, B.T., Kang, H.S., Lee, Y.T., Choi, Y.H., Tetrandrine-induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *International journal of oncology* 2002;21:1239-1244.
29. PARK, D.I. CHOI,, H.Y., KAM, C.W., PARK, C.H., CHOI, T.H., LEE, W.H., and CHOI, Y.H., Wikungtang inhibits proliferation of A549 human lung cancer cells via inducing apoptosis and suppressing cyclooxygenase-2 activity.

- ONCOLOGY REPORT 11, 2004;853-856.
30. Park, D.I., Lee, J.H., Moon, S.K., Kim, C.H., Lee, Y.T., Cheong, J.H., Choi, B.T., and Choi, Y.H., Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by aqueous extract from *Platycodon grandiflorum* in human lung carcinoma cells. *Pharmacological Research* 2005;51:437-443.
 31. Lee, S.Y., Lee, J.H., Kim, W.I., Park, D.I., and Choi, Y.H., Apoptotic Cell Death of Human Lung Carcinoma A549 Cells by an Aqueous Extract from the Roots of *Platycodon grandiflorum*. *Kor. J. Life Sci.*, 2003;17:451-456.
 32. Mak, B.C. and Yeung, R.S., The tuberous sclerosis complex genes in tumor development. *Cancer Invest.*, 2004;22:588-603.
 33. Roach, E.S. and Sparagana, S.P., Diagnosis of tuberous sclerosis complex. *J. Child. Neurol.*, 2004;19:643-649.
 34. Wagner, D.D., P-selectin knockout: a mouse model for various human diseases. *Giba Found Symp.*, 1995;189:2-10, 10-16, 77-78.
 35. Rosen, S.D., Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004;22:129-156.