大韓本草學會誌 제34권 제6호(2019년 11월)
Kor. J. Herbol. 2019 ; 34(6) : 71-78

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2019.34.6.71.

건칠(乾漆)을 이용한 K562 만성 골수성 백혈병 세포주에서의 MicroRNA 발현 규명

최현숙#*

경동대학교 간호학과

MicroRNA Expression in Leukemia Cell Line(K562 cell) Using Rhus Verniciflua Stokes

Hyun Sook Choi#*

Department. of Nursing, kyungdong University

ABSTRACT

Objective : The purpose of the study was to identify expression profiling of miRNAs associated with cancers after treating allergen-removed Rhus Verniciflua Stokes and allergen-removed Rhus Verniciflua Stokes fumigaed Angelica gigas on leukemia cell lines.

Methods : miRNA expression has been analyzed using miRNA array method through denaturation and hybridization after isolating the total RNA from leukemic cell line treated with 100 ㎍/㎖ of aRVS and aRVS-A each. Microarray expressions were interpreted as 'significant' on miRNAs when decreased less than 0.5 fold or increased more than 1.5 fold compared with the control group.

Results : Among 158 miRNAs in total, 32 miRNAs were significantly presented in miRNAs expression. miRNA has been activated with a variety of genes for predicted targets, and the overexpressed miRNAs were categorized according to proliferation and metastasis of cancer in this study. The findings were reported that seven miRNAs (let-7b, miR-193a-5p, 296-3p, 26a, 22, 124a, 92b) showed significant expressions on proliferation and growth, seven miRNAs (miR-193a-5p, 26a, 200c, 183, 124a, 198, 210) presented meaningful expressions on invasion and metastasis, two miRNAs (let-7b, miR-210) were highly expressed on angiogenesis, five miRNAs (let-7b, miR-26a, 181d, 181c, 296-5p) related with apoptosis, and six miRNAs (let-7b, miR-200c, 183, 370, 124a, 191) were associated with prognosis of cancer and early diagnostic factors for cancer.

Conclusion : The mechanism of miRNA takes a role in diagnosis, treatment, and prognotic factors for cancer as well. This study suggested that further detailed research on overexpression of specific miRNA should be carried out continuously in the future.

Key words : Leukemia, Allergen, Rhus Verniciflua Stokes, miRNA, Microarray

Ⅰ. 서 론

의학에서는 서주(西周)시대(BC 11~7C)에 이미 종기 및 종양에 대한 인식이 있었고[1] 한의학에서는 암을 어혈 및 적취의 범주에서 바라보고 있으며, 양정적자제(養正積自除)라는 정기를 북돋음으로써 종양을 제어하는 치료법[2]과 활혈화어법(活血化瘀法)이라는 어혈을 제거하여 혈액이 잘 흐르게 하는 치료법을 통한 암의 성장억제 및 전이에 대한 문헌 연구가 있었다[3].

이러한 어혈과 적취치료제로 옻나무를 사용하였는데 옻나무를 가공한 한약을 '건칠(乾漆)'이라 한다[4]. 최근 옻에서 알러지 반응을 일으키는 알러젠(Urushiol)을 제거하여 암환자들에게 투여함으로써 종양축소 효과 및 백혈병 환자에서 생존률 연장 등의 보고가 있었다[5]. 또한 당귀는 보혈(補血)하는 대표 약제로서 보혈활혈(補血活血)의 효능을 가지고 있다. 백혈

#*Corresponding and First author : Hyun Sook Choi, Department. of Nursing, kyungdong University, 815, Gyeonhwon-ro, Munmak-eup, Wonju-si, Gangwon-do, Republic of Korea.
· Tel : +82-33-738-1420 · E-mail : bright-choi69@kduniv.ac.kr
· Received : 07 October 2019 · Revised : 23 October 2019 · Accepted : 30 November 2019

병은 혈구의 비정상적인 생산과 파괴가 일어나게 되는데 당귀의 경우 혈(血)의 부족을 해결하면서(補血) 그로 인해 발생한 비정상적 혈액(瘀血)이 없어지도록 돕는다. 즉, 보혈과 어혈의 효능을 모두 가지고 있다. 건칠로 훈증한 당귀는 당귀가 어혈을 부드럽게 풀어서 흐르게 하는 활혈(活血) 역할을 하고, 건칠은 좀 더 강한 작용으로 어혈이 뭉쳐 덩어리진 적취를 파어(破瘀)하는 역할을 하게 된다[6]. 알러젠(Urushiol)이 제거된 옻나무 추출물(allergen-removed Rhus Verniciflua Stokes, aRVS)의 종양치료에 응용되는 측면에서의 전 임상연구결과 항산화 작용[7], iNOS, Cox-2, TNF-α의 발현억제를 통한 항염증작용[8], 돌연변이억제[9], 암세포증식억제 및 암세포에 대한 세포자멸사(Apoptosis) 유도작용[10], 혈관형성 억제효과를[11] 통한 암치료 기전 등이 알려져 있다.

최근 생물학의 발전으로 유전자의 연구가 암에서도 활발하게 이루어지고 있으며 암의 기전에서 유전자의 비정상적인 조절과 잘못된 유전자의 발현이 암의 발생과정(Tumorigenesis) 뿐만 아니라 전이와 같은 암의 진행에도 매우 중요한 역할을 하고 있다[12]. 이때 miRNA는 유전자 발현을 조절하는 중요한 역할을 하며 다양한 유전자의 예측인자(predictied factor)로 작용한다[13].

MicroRNAs(miRNA)는 주목받고 있는 연구주제 중 하나인데, 약 18-25개의 뉴클레오타이드로 이루어진 작은 단일 가닥의 비번역 RNA(non-coding RNA)로서 표적 mRNA의 3'-untranslated region(UTR)에 결합하여 해당 RNA의 번역을 억제하거나 파괴시켜 전사 후 조절(post-transcriptional gene silencing)에 관여함으로써 표적 mRNA의 발현을 조절한다. 1993년 예쁜꼬마선충(Caenorhabditis elegans)에서 발견된 이후로 현재까지 700종 이상의 miRNAs가 인간세포에 존재하고 있음이 밝혀졌다[14]. miRNAs는 인간이 지니고 있는 전체 유전자의 약 30% 이상을 조절하여 정상세포의 발생과정, 재생, 분화, 세포증식, 줄기세포 기능유지 등 세포가 기능을 유지하는데 중요한 역할을 하며 염증 및 암발생, 암진행 등의 병적 상태에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

유전자의 불안정성(genetic instability)은 암 발생 및 진행에 있어 매우 중요한 역할을 하는데, 다양한 암에서 발견되는 유전자 불안전성으로 인해 miRNA가 암세포에서 비정상적으로 발현되고 있음이 밝혀지고 있다. 또한 이들은 암발생 과정에서 miRNA의 발현이 비정상적으로 낮아져 있으며 이를 정상발현의 상태로 조절할 경우 암을 치료할 수 있을 것으로 주장하면서 암 치료의 새로운 가능성을 제시하였다. 이처럼 암세포에서 miRNAs는 세포성장을 제어함으로써 암 억제 유전자의 역할을 하는 한편 세포증식을 유도함으로써 암 유전자의 역할을 하기도 한다[15].

그러므로 본 연구에서는 K562 백혈병 세포주에 한방에서 백혈병 치료에 사용되고 있는 알러젠(Urushiol)이 제거된 옻나무 추출물(allergen-removed Rhus Verniciflua Stokes, aRVS)과 알러젠이 제거된 옻나무 추출물로 훈증 처리한 당귀(allergen-removed Rhus Verniciflua Stokes fumigated Angelica gigas, aRVS-A)를 처리한 후 암과 관련된 miRNAs 유전자 발현 레벨을 규명하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 한약추출

본 실험에서 사용한 옻은 경기도 가평산 참옻나무를 원료로 건조 후 사용하였고, 대한민국 특허 제0394089호 / 제0504160호를 이용한 방법에 의하여 열수를 이용하여 aRVS를 만들었으며 압력 1 atm 이하, 온도 90-95℃, 용매의 부피 10배수, 시간 6시간 이상, 원료의 성상은 톱밥, 사용 용매는 물을 이용하여 알러젠(Urushiol)이 제거된 옻나무 약제를 추출하였다[16].

aRVS-A는 제조 혼합보료(정제수 5 L, 당귀 0.1 kg, 위의 방법으로 만들어진 aRVS 1 kg)를 이용하여 당귀 3 kg를 부직포에 넣어서 물에 닿지 않게 한 후 압력 1.2 atm, 온도 106℃로 설정 한 후 1시간 정도 훈증 처리한다. 그 이후 9시간 이상 방치하여 냉각(압력이 빠져나가지 않게 주의)시키고 건조 후 분말을 추출하였다.

2) 세포배양

만성 골수성 백혈병 세포주(K562 cell)는 American Type Culture Collection(ATCC Rockvelle, MD)에서 구입하여 10 % fetal bovine serum(FBS, Gibco, BRL, Island, NY, USA)과 1 % 항생제(100 units/ml의 penicillin, 100 ㎎/㎖의 streptomycin)가 포함된 RPMI-1640 배양액에 37℃, 5% CO_2 항온배양기에서 계대 배양하였다. 배양된 세포주에 각각의 약물을 100 ㎍/㎖씩, 24시간 처리하였고 약제를 처리하지 않고 같은 시간 방치한 군을 대조군으로 사용하였다.

2. 방법

1) 총 RNA 추출

샘플이 포함된 1.5 ㎖ 튜브에 RNA 추출 키트인 easyBLUE™ (iNtRON, SEONGNAM, KOREA) 시약을 1 ㎖ 첨가하여 교반하여 세포를 용해한 뒤 클로로포름 200 ㎕을 첨가하여 교반한 뒤 4℃가 유지된 원심분리기에서 13000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 맑은 층과 푸른 층으로 나누어진 샘플의 맑은 층에서 400 ㎕를 취하여 새로운 튜브로 옮기고 아이소프로필 400 ㎕와 조심스럽게 혼합한 후 10분간 상온에서 배양하였다. 반응한 튜브를 4℃가 유지된 원심분리기에서 13000 rpm으로 5분간 원심분리 하여 RNA 펠릿(pellet)을 모은다. 상층액을 깨끗이 제거한 후 75 % 에탄올 1 ㎖를 넣고 2~3회 위아래로 뒤집은 후 4℃가 유지된 원심분리기에서 13000 rpm으로 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하여 세척 후 공기 중에서 5분간 펠릿을 건조시켰다. 적정부피의 디에틸피로카보네트(diethylpyrocarbonate, DEPC) 물로 펠릿을 녹여 총 RNA를 얻었다. 분리한 총 RNA는 자외선 분광기를 이용하여 농도와 순도를 측정하였다. 260/280 ratio가 1.8 이상이면서 260/230 ratio가 2 이상인 RNA 샘플을 정량하여 사용하였다.

2) miRNA 발현 패턴 분석과정

miRNA 발현 분석을 위해 PANArray™ miRNA expression

profiling kit(PANAGENE, KOREA)를 사용하였다.

(1) 샘플 준비 및 변성

추출한 총 RNA 400 ng을 15 ㎕가 되도록 디에틸피로카보네트 물로 혼합하여 95℃ 가열 블록에서 5분간 변성 반응을 하였다. 반응 후 즉시 얼음에서 식혔다.

(2) 혼성화 반응

키트에 포함되어 있는 혼성화 버퍼는 사용 전 55℃에서 10분간 미리 데워 놓았다. 변성 반응이 된 타켓 용액 15 ㎕와 혼성화 버퍼 85 ㎕를 혼합하여 2~3초 동안 교반하였다. miRNA 칩에 하이브챔버를 부착하고, 하이브챔버 구멍에 혼합한 용액을 주입한 후 버퍼가 마르지 않도록 습도를 유지하여 55℃ 항온기에서 4시간 동안 반응하였다.

(3) 세척

20X 세척 완충액를 1x로 희석하여 준비하였다. 반응이 끝난 miRNA는 세척 완충액에서 조심스럽게 하이브챔버를 제거하고 miRNA 칩을 jar에 넣어 세척 완충액으로 상온에서 5분간 세척하였다. 같은 방법으로 5분간 더 세척하였다. 슬라이드 전용 원심분리기에서 2분간 원심 분리하여 miRNA 칩을 건조시켰다.

(4) 형광 라벨링과 분석

T4 RNA 라이게이션 버퍼를 37℃에서 미리 녹여 준비하였다. 세척한 miRNA 칩에 하이브챔버를 부착하고 형광 표지를 위해 pCp-Cy3를 혼성화된 RNA에 결찰시켰다. 형광 라벨링을 위한 용액은 10X T4 RNA ligase buffer 10 ㎕, 0.1% BSA 2 ㎕, pCp-Cy3 3 ㎕, T4 RNA ligase(10U/㎕) 1 ㎕ 및 RNase-free water 84 ㎕를 혼합하여 총 100 ㎕가 되도록 하였다. miRNA칩에 하이브 챔버를 부착하고 하이브챔버 구멍에 라벨링 용액을 주입한 후 용액이 마르지 않도록 습도를 유지하여 37℃에서 2시간 동안 반응하였다. 반응이 끝난 miRNA칩은 같은 세척방법을 거쳐 원심 분리하여 miRNA칩을 건조시켰다.

칩의 형광 분석을 위하여 GenePix4000B(Axon, USA)를 사용하였으며, 레이저 파워 100%, PMT gain 700으로 설정하여 Cy3형광 파장인 532 ㎚ 파장에서 스캔하였다. 스캔 후 생성된 GenePix Results(GPR) 파일을 사용하여 miRNA 발현 패턴을 분석하였다. 각 시료의 신호값을 Internal control RNU6B의 신호값으로 샘플간 신호를 표준화하였으며, 대조군('C')의 샘플값을 기준으로 각각의 실험군 샘플에 대해서 발현 패턴 비율을 산출하여 분석하였다. 발현 레벨은 1.5배 이상, 0.5배 이하로 변한 것을 의미 있는 것으로 보았다.

Ⅲ. 결 과

1. K562 백혈병 세포주에서의 miRNA 발현 개요

암의 기전을 가진 158개의 miRNAs 중에서 miRNA 발현 증식에 의미 있게 나타난 것은 32개이며 이 중 30 이상으로 높게 발현된 miRNA은 miRNA-30d, miRNA-127-5p로 나타났다(table 1).

Table 1. The expression of miRNA and normlized ratio.

	Expression level of miRNA Average				Normalized Ratio of expression miRNA (by Control sample)			
	aRVS	aRVS/C	aRVS-A	aRVA-A/C	aRVS/C	C/C	aRVS-A/C	C/C
miR-30d	49.1	55.9	46.3	55.9	0.88	1	0.83	1
miR-23b	3	2.9	3.5	2.9	1.03	1	1.23	1
miR-197	9.2	8.2	8.7	8.2	1.12	1	1.06	1
miR-206-3	4.6	7.6	5	7.6	0.6	1	0.66	1
miR-191	3.1	2.2	3.8	2.2	1.38	1	1.7	1
miR-342-3p	1.8	1.4	1.8	1.4	1.29	1	1.29	1
miR-138	1.4	1.2	1.4	1.2	1.22	1	1.17	1
miR-210	1.2	1	1.5	1	1.25	1	1.55	1
miR-145	3.2	2.8	3.4	2.8	1.12	1	1.18	1
miR-183	1.2	0.6	1	0.6	1.82	1	1.63	1
miR-193a-5p	3.9	1.4	3.6	1.4	2.78	1	2.62	1
miR-25	1.2	0.9	1.1	0.9	1.26	1	1.25	1
miR-127-5p	71	37	56.3	37	1.92	1	1.52	1
miR-452	2.5	1.7	2.8	1.7	1.44	1	1.63	1
miR-181c	1.2	0.8	1	0.8	1.58	1	1.34	1
miR-26a	6.7	3.1	4.9	3.1	2.19	1	1.59	1
miR-371-5p	8.4	7.3	9	7.3	1.15	1	1.24	1
miR-140-3p	1.6	1.3	1.3	1.3	1.19	1	0.96	1
miR-134	2.9	2.2	2.2	2.2	1.29	1	1.01	1

	Expression level of miRNA Average				Normalized Ratio of expression miRNA (by Control sample)			
	aRVS	aRVS/C	aRVS-A	aRVA-A/C	aRVS/C	C/C	aRVS-A/C	C/C
miR-296-5p	1.1	0.7	1.1	0.7	1.54	1	1.57	1
miR-107	1.6	1.3	1.7	1.3	1.19	1	1.29	1
miR-92b	1.7	1.3	2	1.3	1.34	1	1.59	1
miR-185	4.4	3.9	4.9	3.9	1.12	1	1.26	1
miR-198	1.4	0.9	1.1	0.9	1.52	1	1.23	1
miR-181d	4.4	2.4	5	2.4	1.87	1	2.1	1
let-7b	1.5	0.6	1.4	0.6	2.32	1	2.25	1
miR-296-3p	10.6	4.2	7.9	4.2	2.55	1	1.91	1
miR-22	3.2	1.7	2.7	1.7	1.9	1	1.61	1
miR-202	1.9	1.3	1.6	1.3	1.47	1	1.23	1
miR-124a	1.2	0.7	1	0.7	1.69	1	1.33	1
miR-200c	2	1	1.6	1	1.96	1	1.52	1
miR-370	5.9	3.7	5.6	3.7	1.58	1	1.52	1

2. aRVS을 처치한 K562 백혈병 세포주에서의 miRNA 발현 레벨

aRVS를 처치한 K562 백혈병 세포주에서 0.5배 이하로 낮은 발현은 없었으며 14개의 발현이 1.5배 이상으로 높은 발현 레벨을 보였다. 과발현 정도의 범위는 1.52~2.78배였다 .그 중 miRNA-193a-5p는 2.78배로 가장 높은 발현정도를 보였다 (Table 2, Fig 1).

3. aRVS-A를 처치한 K562 백혈병 세포주에서의 miRNA 발현 레벨

aRVS-A를 처치한 K562 백혈병 세포주에서 0.5배 이하로 낮은 발현은 없었으며 15개의 miRNA 발현이 1.5배 이상으로 높은 발현 레벨을 보였다. 과발현 정도의 범위는 1.52~2.62 배였다. miRNA-193a-5p가 2.62배로 가장 높은 발현정도를 보였다(Table 2, Fig 1).

Table 2. The function of miRNAs and their predicted targets.

miRNA	Normalized Ratio			Function of miRNA	Predicted Target
	aRVS/C	aRVS-A/C	C/C		
miR-193a-5p	2.78	2.62	1.00	cell growth reduction, metastatic suppressor	E2F
miR-296-3p	2.55	1.91	1.00	inhibit cell proliferation	EAG1
let-7b	2.32	2.25	1.00	oncogene, apoptosis, anti-angiogenesis, tumor suppressor by regulating cell-proliferation.	Hmga2, RAS, c-myc
miR-26a	2.19	1.59	1.00	oncogene, inhibit cell cycle progression, apoptosis,	c-myc, EZH2, E2F7, IL-2
miR-200c	1.96	1.52	1.00	oncogene, tumor suppressor, metastatic activity	deltaEF1, ZEB1
miR-127-5p	1.92	1.52	1.00	DNA methylation	
miR-22	1.90	1.61	1.00	inhibit cell cycle progression,	PTEN, AKT
miR-181d	1.87	2.10	1.00	apoptosis, MDR	BCL2
miR-183	1.82	1.63	1.00	inhibit migration and invasion, prognotic marker	Ezrin
miR-370	1.58	1.52	1.00	cell growth arrest, tumor suppressor, prognotic marker	FoxM1
miR-296-5p	1.54	1.57	1.00	apoptosis	
miR-124a	1.69		1.00	tumor suppressor, inhibit migration and invasion	CDK6
miR-181c	1.58		1.00	apoptosis	TNF-α
miR-198	1.52		1.00	inhibit migration and invasion	HGF/c-MET
miR-452		1.63	1.00	oncogene	
miR-191		1.70	1.00	prognotic marker	
miR-92b		1.59	1.00	tumor suppressor ,inhibit cell growth and proliferation	PRMT5, RBL2
miR-210		1.55	1.00	cell cycle arrest, anti-angiogenesis, inhibit invasion and metastatic activity.	HIFs, MNT

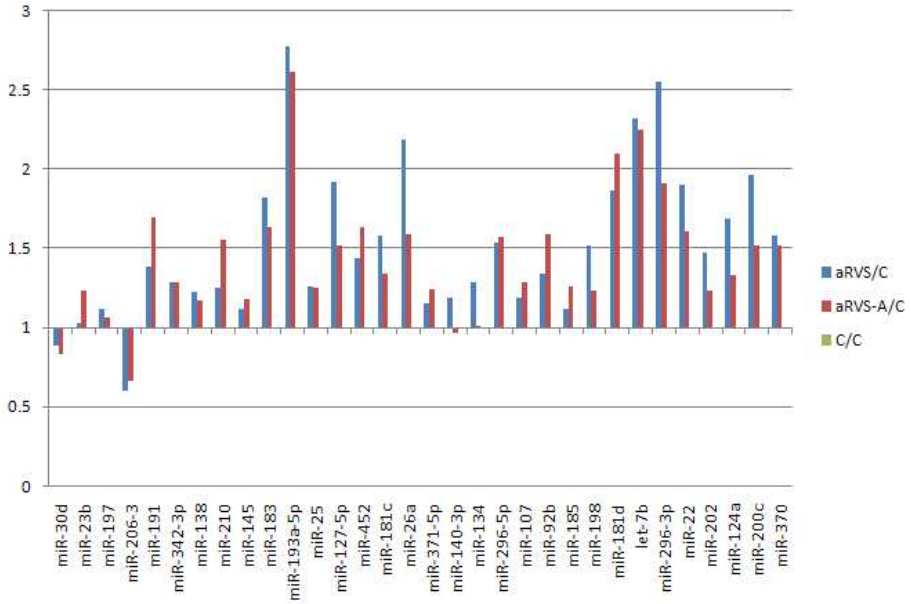

Fig 1. Expression ratio of miRNA on K562 leukemia cells.

4. 암과 관련된 기전에 따른 miRNA 분류

암세포의 증식 및 성장과 관련되어 의미 있는 발현을 나타낸 miRNA는 miRNA-193a-5p, miRNA-296-3p, let-7b 등 이였고, 암세포의 침습 및 전이와 관련되어 의미 있는 발현을 나타낸 miRNA는 miRNA-193a-5p, miRNA-26a, miRNA-200c 등 이였다. 신생혈관 생성과 관련된 miRNA는 let-7b, miRNA-210이였으며 세포자연사와 관련되어서는 let-7b, miRNA-26a, miRNA-181d 등으로 나타났다. 마지막으로 암의 예후 및 조기 진단인자로서는 let-7b, miRNA-200c, miRNA-183 등으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Classification according to the mechanism associated with cancer

	aRVS	aRVS-A
Cell growth or Proliferation	miRNA-193a-5p	miRNA-193a-5p
	miRNA-296-3p	miRNA-296-3p
	let-7b	let-7b
	miRNA-26a	miRNA-26a
	miRNA-22	miRNA-22
	miRNA-124a	miRNA-92b
Invasion or Metastasis	miRNA-193a-5p	miRNA-193a-5p
	miRNA-26a	miRNA-26a
	miRNA-200c	miRNA-200c
	miRNA-183	miRNA-183
	miRNA-124a	miRNA-210
	miRNA-198	
Angiogenesis	let-7b	let-7b
		miRNA-210
Apoptosis	let-7b	let-7b
	miRNA-26a	miRNA-26a
	miRNA-181d	miRNA-181d
	miRNA-296-5p	miRNA-296-5p
	miRNA-181c	
Diagnotic or Prognotic marker	let-7b	let-7b
	miRNA-200c	miRNA-200c
	miRNA-183	miRNA-183
	miRNA-370	miRNA-370
	miRNA-124a	miRNA-191

Ⅳ. 고 찰

알러젠(Urushiol)이 제거된 옻나무 추출물(allergen-removed Rhus Verniciflua Stokes, aRVS)는 다양한 암 치료 기전이 전 임상연구를 통해 밝혀졌으며[8-11] 유전자 발현을 조절하는 miRNA는 다양한 유전자를 예측하는 인자로 작용하는데, 본 실험에서 암세포의 증식 및 성장, 암세포의 침습 및 전이, 신생혈관 생성, 세포자연사, 암의 예후 및 조기 진단인자로서 miRNAs가 관련이 있는 것으로 나타났다.

본 연구의 결과 특징적인 miRNA에 대해서 살펴보면, miRNA-296-3p는 aRVS과 aRVS-A 처치군에서 과발현 되었다. miRNA-296-3p는 하향조절 유전자(down-regulated oncogene)로서 EAG1를 표적으로 종양의 증식을 조절하는 중요한 유전자로 교모세포종(Glioblastoma)에서 EAG1의 발현을 조절하여 세포침습능력 및 증식억제의 역할이 있다고 보고되었다[17]. K562 백혈병 세포주에서도 종양의 증식 및 성장을

억제하는 miRNA로 과발현됨으로써 세포증식을 억제하는 것으로 나타났다.

Let-7b는 aRVS과 aRVS-A 처치군에서 과발현 되었다. Let-7군은 다양한 표적 유전자와 다양한 기전을 가지고 있는데, 특히 RAS 와 HMGA2 종양 유전자의 발현을 조절하는 miRNA로 알려져 있으며 백혈병 중 급성 골수성 백혈병의 하향조절하는 miRNA로 특징지어진다[18]. Let-7b는 급성 림프구성 백혈병에서보다 급성 골수성 백혈병에서 더 높은 레벨로 의미있게 발현되었고, 반면에 종양유전자로서의 역할과 함께 aRVS-A 처치군에서만 1.55배로 과발현한 miRNA-210은 신생혈관형성을 억제하며 급성 골수성 백혈병에서보다 급성 림프구성 백혈병에서 더 높은 레벨로 의미 있다고 보고되었다[19]. 또한 유방암 세포에서는 H-RAS와 HMGA2를 표적으로[20], 대장암에서는 RAS와 MYC을 표적 유전자로 삼고 있다[21].

miRNA-26a는 aRVS과 aRVS-A 처치군에서 과발현 되었다. miRNA-26a는 세포성장과 증식에 필요한 역할을 하는 복사요소로서 급성 골수성 백혈병에서 활성화가 되는 c-Myc 단백과 급성 골수성 백혈병 세포의 단구세포로의 분화를 억제하고 세포주기 진행을 촉진하는 E2F7를 조절하여 종양억제의 역할을 하는 것으로 확인되었다[22,23]. 이와 같은 기전으로 aRVS와 aRVS-A를 처치한 K562 백혈병 세포주에서 miRNA-26a는 종양유전자로서 역할을 하고 있음을 알 수 있다.

miRNA-200c는 aRVS과 aRVS-A 처치군에서 과발현 되었다. 비소세포 폐암과 유방암 세포주에서는 E-cadherin을 통한 상피세포의 간질세포 변이(EMT)를 억제해 암세포의 전이를 방해하며[24-25], 대장암 및 방광암과 췌장암 세포주에서는 ZEB1을 억제시켜 종양의 침습 및 이동을 억제하는 것으로 보고되었다[26-28]. 백혈병에서의 miRNA-200c는 예후와 진단인자로서 역할을 하며 과발현시 종양의 전이 및 침습을 억제함을 알 수 있다.

miRNA-124a는 aRVS 처치군에서만 과발현 되었다. miRNA-124a는 여러 가지 이유로 인해서 급성 림프구성 백혈병에서 종양억제자의 역할을 가지고 있다. 그 기전은 유전자의 과메틸화에 의해서 하향 조절된다. 후생학적으로 miRNA-124a의 하향조절은 CDK6의 상향조절을 유도하고 급성 림프구성 백혈병 세포의 비정상적인 증식에 기여한다. 그러므로 CDK6의 억제는 급성 림프구성 백혈병 세포 성장을 감소시키고 miRNA-124a의 과발현은 급성 림프구성 백혈병 세포 성장을 감소시킨다. 뿐만 아니라 miRNA-124a의 과메틸화는 무질병생존율(disease free survival)과 전체생존율(overall survival)의 독립된 예후인자로 보고되었다[29]. 또한 aRVS-A 처치군에서만 과발현 된 miRNA-191는 급성 골수성 백혈병에서 하향 조절자 역할을 가지고 있는 반면에 예후인자로서 과발현시 전체 생존율이 의미 있게 더 짧아진다는 사실이 보고되었다[30]. 이와 같이 miRNA는 혈청이나 혈장뿐만 아니라 눈물, 타액, 소변 등의 세포외 액에도 존재하며 miRNA의 농도는 여러 질병을 진단하고 모니터링 하는 예후인자 및 생물학적 표지자(biomarker)로도 활용할 수 있다[31].

aRVS와 aRVS-A의 이미 밝혀진 기전은 신생혈관차단 및 MMP-2와 MMP-9를 억제하는 항침습 효과가 있음이 보고되었다[5,32].본 연구 결과에 의하면 종양과 관련된 miRNA 중 하향조절자의 역할을 하는 유전자가 과발현 되었음을 알 수 있었으며 이는 종양의 성장, 증식억제, 전이나 침습억제 등에 영향을 미쳤음을 확인할 수 있다.

aRVS와 aRVS-A는 K562 백혈병 세포주에서 miRNA의 발현 양상이 종양의 성장과 증식, 전이, 자연세포사와 관련된 miRNA에서 많은 발현을 보였으며, 신생혈관생성과 관련된 기전에도 작용하는 것으로 보였다. aRVS의 경우 암과 관련된 많은 기전에 대한 연구가 많았으나 당귀(Angelica gigas)의 경우 아직까지 단독으로 밝혀진 기전이 없어 향후 암과 관련된 기전연구가 필요할 것이며, 본 연구의 결과가 기본 데이터를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

본 연구는 K562 백혈병 세포주에 임상에서 사용되는 aRVS와 aRVS-A를 처리한 후 miRNA array법을 이용하여 miRNA의 발현 양상과 변화를 분석한 연구를 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. K562 백혈병 세포주에서 의미있는 발현을 보인 miRNA는 let-7b, miRNA-193a-5p, miRNA-296-9p 등 32개이며 aRVS와 aRVS-A의 과발현 정도는 비슷하게 나타났다.

2. aRVS 군과 aRVS-A군 모두에서 과별현된 miRNA는 11개이며, aRVS 처치군에서만 과발현된 miRNA는 miRNA-198, miRNA-181c, miRNA-124a로 3개였고, aRVS-A 처치군에서만 과발현된 miRNA는 miRNA-210, miRNA-92b, miRNA-452, miRNA-191로 4개였다.

3. 이들의 기능을 조사하여 암과 관련된 기전으로 분류하면, 암의 증식 및 성장에 관련된 miRNA는 7개(let-7b, miRNA-193a-5p, 296-3p, 26a, 22, 124a, 92b), 침습 및 전이와 관련된 miRNA는 7개(miRNA-193a-5p, 26a, 200c, 183, 124a, 198, 210), 신생혈관 생성과 관련된 miRNA는 2개(let-7b, miRNA-210), 세포자연사과 관련된 miRNA는 5개(let-7b, miRNA-26a, 181d, 181c, 296-5p), 마지막으로 진단 및 예후인자로서의 miRNA는 6개(let-7b, miRNA-200c, 183, 370, 124a, 191)로 조사되었다.

감사의 글

이 연구를 위해서 도움을 주신 고신대학교 의과대학원 병리학 교실 교수님께 진심으로 감사드립니다.

References

1. Eom SK. Disease Recognition of Tumor, Bump or Mass entil Han Dynasty. Kor J Medical Classics.

2008; 21(2): 29-37.
2. Park JH, Eum SK, Cheong GS, Kim KS, Yun SW, Choi WC. Bridf review about tumor pathology and etiology focusssed on JIJU. Kor J Oriental Oncology. 2007; 12(1): 1-13.
3. Lee SH, Jo JG. Literature review on metastasis and growth inhibition of cancer using 'the activation and the elimination of blood stasis'. Journal of Haehwa Medicine. 1998; 7(1): 699-710.
4. Professors of Herval medicine in National College of Korean Medicine. Herbology. Yonglimsa. 1991; 439.
5. Yoon SW, Park JW, Kim KS, Jung HS, Choi WC. The study on the Safety and Case Series of the Acute Lymphocytic Leukemia using Rhus Verniciflua Stokes Extract(Nexia). Kor J Oriental Oncology. 2006; 11(1): 1-21.
6. Shin MK. Clinical Transitional Herbology. Yonglimsa. 2010; 233-236.
7. Lim KT, Hu C, Kitts DD. Antioxidant activity of Rhus verniciflua stokes ethanol extract. Food Chem Toxicol. 2001; 39(3): 229-237.
8. Oh SH. Anti-inflammatory effects of Rhus Vernicifera Stokes extract in LPS-induced macrophage RAQ264.7 cells. Kyungwon University PhD Thesis. 2006; 16-25.
9. Park KY, Jung GO, Lee KT, Choi J, Choi MY, Kim GT, Jung HJ, Park HJ. Antimutagenic activity of glavonoids from the heartwood of Rhus verniciflua. J. Ethnopharmacol. 2004; 90(1): 73-79.
10. Kim JH, Kim HP, Jung CH, Hong MH, Hong MC, Lee SD, Park SY, Park JH, Ko SG. Inhibition of cell cycle progression via p27Kip1 upregulation and apoptosis induction by an ethanol extract of Rhus verniciflua stokes in AGS gastric cancer cells. Int. J. Mol. Med. 2006; 18(1): 201-208.
11. Choi WC, Lee JH, Lee EO, Yoon SW, Ahn KS, Kim SH. Study on antiangiogenic and antitumor activities of processed Rhus verniciflua stokes extract. Kor J Oriental Physiology & Pathology. 2006; 20: 825-829.
12. Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs. J Cancer. 2008; 14(1): 1-6.
13. Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. J biochemistry. 2010; 148: 381-392.
14. Lee RC, Feinbaum RL, Ambrous V. The elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993; 75: 843-854.
15. Hwang JH. Pancreatic cancer and miRNAs. Kor J Gastroenterol. 2012; 59(6): 395-400.
16. Park SJ, Kim KS, Jung HS, Choi WC, Yoon SW. The Study on the Process and Quality Control of Rhus Verniciflua Stokes Extract(Nexia). Kor J Oriental Oncology. 2006; 11(1): 31-39.
17. Bai Y, Liao H, Liu T, Zeng X, Xial F, LuoL, GuoH, Guo L. MiR-296-3p regulates cell growth and multi-drug resistance of human glioblastoma by targeting ether-a-go-go(EAG1). Eur J Cancer , 2013; 49: 710-724
18. Mojca Jongen-Lavrencic , Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJM, Löwenberg B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. The American Society of Hematology. 2008; 111(10): 5078-85.
19. Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, Wang Y, Qian Z, Jin J, Zhang Y, Bohlander SK, Le Beau MM, Larson RA, Golub TR, Rowley JD, Chen J. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myelod leukemia. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104(50): 19971-76.
20. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. Cell. 2007; 131(6): 1109-23.
21. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. Oncol Rep. 2006; 16(4): 845-850.
22. Salvatori B, Iosue I, Djodji Damas N, Mangiavacchi A, Chiaretti S, Messina M, Padula F, Guarini A, Bozzoni I, Fazi F, Fatica A. Critical Role of c-Myc in Acute Myeloid Leukemia involving Direct Regulation of miR-26a abd Histone Methyltransferase EZH2. Genes Cancer. 2011; 2(5): 585-592.
23. Salvatori B, Iosue I, Mangiavacchi A, Loddo G, Padula F, Chiaretti S, Peragine N, Bozzoni I, Fazi F, Fatica A. The micreRNA-26a target E2F7 sustains cell proliferation and inhibits monocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells. Cell Death and Disease. 2012; 25(3): 1-10.
24. Ceppi P, Mudduluru G, Kumarswamy R, Rapa I, Scagliotti GV, Papotti M, Allgayer H. Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer. Mol Cancer Res. 2010; 8(9): 1207-16.
25. Hurteau GJ, Carlson JA, Spivack SD, Brock GJ. Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. Cancer Res. 2007; 67(17): 7972-76.
26. Chen ML, Liang LS, Wang XK. miR-200c inhibits invasion and migration in human colon cancer cells SW480/620 by targeting ZEB1. Clin Exp Metastasis. 2012; 29(5): 457-469.

27. Shan Y, Zhang L, Bao Y, Li B, He C, Gao M, Feng X, Xu W, Zhang X, Wang S. Epithelial-mesenchymal transition, a novel target of sulforaphane via COX-2/MMP2, 9/Snail, ZEB1 and miR-200c/ZEB1 pathways in human bladder cancer cells. J Nutr Biochem. 2013; 1062-69.
28. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or tumor suppressor? Cancer Metastasis Rev. 2009; 28: 369-378.
29. Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jiménez-Velasco A, Martin-Subero JI, Cordeu L, Gárate L, San José-Eneriz E, Abizanda G, Rodríguez-Otero P, Fortes P, Rifón J, Bandrés E, Calasanz MJ, Martín V, Heiniger A, Torres A, Siebert R, Román-Gomez J, Prósper F. Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res. 2009; 69(10): 4443-53.
30. Garzon R, Volinia S, Liu CC, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T, Flomenberg N, Marcucci G, Calin GA, Kornblau SM, Kantarjian H, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. The American Society of Hematology. 2008; 111(6): 3183-89.
31. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. Clin Chem. 2010; 56(11): 1733-41.
32. Park JH, Go M. Effect of Allregen Remover Rhus Verniciflua Extract on Inhibition of Tumor Metastasis. Kor J Traditional Oncology. 2010; 15(1): 47-61.5(1): 47-61.