

원저

紅蔘藥鍼液의 胃癌細胞柱 遺傳子 發顯에 미치는 影響

원은주 · 이경민 · 이봉효 · 임성철 · 정태영 · 서정철

대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Effect of Ginseng Radix Rubra Herbal-acupuncture Solution(GRR-HAS) on Gene Expression in SNU484 carcinomar cells

Won Eun-ju · Lee Kyung-min · Lee Bong-hyo · Lim Seong-chul · Jung Tae-young · Seo Jung-chul

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

Abstract

Objective : It has long been known about the anticancer effect of GRR-HAS, however, it has not been systemically determined the differentially regulated genes by GRR-HAS in cancer cells. The purpose of this study is to screen the GRR-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 : GRR-HAS was prepared by boiling and stored at -70°C until use. Cells were treated with various concentrations of GRR-HAS(0.1, 0.5, 1.5, 10, 20mg/ml) for 24 h. Cell toxicity was tested by MTT assay. To screen the differentially expressed genes in cancer cells, cells were treated with 1.5mg/ml of GRR-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 both HepG2 and SNU484 cells in all concentrations(0.1, 0.5, 1.5, 10, 20mg/ml). In oligonucleotide microarray assay, in SNU484 cells, the number of more than twofold up-regulated genes was 346. The number of more than twofold down-regulated genes was 9.

Discussion : This study showed the comprehensive gene expression analysis using oligonucleotide microarray for the screening of GRR-HAS mediated differentially regulated genes. These results will provide a better application of GRR-HAS in cancer field and drug target development.

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

1. 緒 論

인간 수명의 고령화 추세와 문명의 발달로 인하여 과

거의 전염성 질환에 의한 사망보다는 癌에 의한 사망이 증가되고 있는 추세이며, 癌에 대한 西洋醫學의 治療方法은 手術療法, 放射線療法, 抗癌化學療法, 免疫療法 등이 발전하였는데, 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 못하는 실정으로, 그에 병행되는 부작용과

* 교신저자 : 서정철, 대구시 수성구 상동 165
대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실
(Tel : 054-450-7707 E-mail: acumox@hanmail.net)

한계점에 도달하고 있어 기존 抗癌劑를 대체할 수 있는 신규 抗癌 물질의 개발이 요구되고 있다¹²⁾.

韓醫學에서 癌은 체내에 發顯되는 腫塊, 質의 堅硬, 巖石과 같은 腫氣 등을 총칭하는 것인데 이는 주로 外感邪氣, 七情의 변화, 飮食失調 및 正氣虛弱 등으로 인하여 氣滯血瘀가 되거나 臟腑의 機能이 失調되어 발생하며 治法으로 保養精氣하는 扶正法과 破積, 活血, 解鬱, 行氣하는 祛邪法이 병행되고 있으며¹³⁾, 여러 韓藥材를 이용하여 활발한 연구가 진행 중이다.

紅蔘(Ginseng Radix Rubra ; GRR)은 大補元氣, 固脫生津, 安神의 效能⁹⁾이 있어, 免疫機能 개선 및 抗癌 분야에도 많은 연구가 진행되고 있는데 장 등⁶⁾, 이 등⁷⁾은 紅蔘이 T림프구에 의한 細胞 媒介性 免疫반응과 自然 殺害 細胞의 활성도를 增加시켜 免疫活性 및 抗癌效果가 있음을 보고하였고, 곽 등⁸⁾은 紅蔘이 抗癌劑와 병용투여로 抗癌劑의 效果를 높이고 抗癌劑의 免疫抑制에 대한 심각한 부작용을 경감시키는 效果 등을 보고하여 紅蔘 추출물의 우수한 抗癌作用이 있음을 보고한 바는 있으나, oligonucleotide chip을 이용한 遺傳子 分析을 통한 抗癌 研究는 이루어진 바가 없었다.

이에 著者는 紅蔘으로 藥鍼液을 調製하여, 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을 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

本 實驗에서 사용된 紅蔘(Ginseng Radix Rubra ; GRR) (KT&G, 한국)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

紅蔘을 破碎하여 25g의 분말을 500ml의 蒸溜水에 넣어 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 紅蔘과 혼합된

蒸溜水를 13,000rpm으로 1시간 동안 원심 분리하여 上清液만을 회수하였다. 上清液을 멸균된 필터기를 사용하여 얻은 다음, -70℃에서 48시간 동안 냉동 건조시켜 10g의 건조된 분말을 얻었다.

2) 細胞 培養

본 실험에 사용된 細胞柱는 胃癌 細胞에서 유래한 SNU484(gastric cancer cell)로 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(2.5×10⁶) 계대 培養한 후 사용하였다. 시료를 처리하기 12시간 전에 培養液을 serum이 없는 상태로 만들어서 serum 내의 cytokine 및 단백질의 영향을 배제하였다. 紅蔘藥鍼液의 농도를 0.1, 0.5, 1.5, 10 및 20mg/ml 되게 HepG2와 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 15ml 튜브에 모은 다음 1,000rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 細胞 만을 모았다. Total RNA를 분리하기 위하여, tri-Reagent kit (molecular research center inc., U.S.A.)를 사용하였다. Tri-Reagent buffer로 1ml의 細胞에 첨가한 후 실온에서 10분간 방치하고 12,000rpm으로 15분 동안 원심 분리한 후 上清液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 2회 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

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

예비 실험에서 결정된 적정 농도를 기준으로 세포의 수를 결정한 후 준비된 단일 세포 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 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 하에서 미리 정해진 시간 동안 培養한 후 plate의 각 well에 0.1mg(50 μ l의 2mg/ml)의 MTT를 가해주고 다시 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 하에서 4시간 더 培養하여 MTT가 환원되도록 하였다. 培養 종료 시 plate를 450g \times 5분간 원심 분리하여 생성된 formazan 결정을 가라앉힌 후 각 well에 형성된 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 배지를 30 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. 통계처리는 student t-test로 처리하였으며, 유의수준은 p<0.05로 하였다.

5) Oligonucleotide chip 分析

Total RNA를 한 등⁹⁾의 방법과 같이 분리하였다. Complement DNA(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 $^{\circ}$ C 완충액 (200mM tris-acetate(pH 8.1), 500KOAc, and 150MgOAc) 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 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 Genechip Hybridization Oven 640(Affymetrix, U.S.A.)을 이용하여 hybridization시켰다. 그 후에 chip을 Genechip Fluidics Station 400(Affymetrix, U.S.A.)으로 low-stringency buffer (6 \times standard saline phosphate 및 EDTA, 0.01% Tween 20, 0.005% antifoam)에서 10 cycle (two mixes per cycle)로 세척 후 high-stringency buffer(100N-morpholinoethanesulfonic acid, 0.1 NaCl, 및 0.01% Tween 20)에서 4 cycle로 세척하고 streptavidin phycoerythrin으로 염색하였다. 이 과정에 이어서 normal goat IgG와 biotinylated mouse antistreptavidin antibody로 반응시키고 다시 streptavidin phycoerythrin으로 염색하였다. Chip은 Hewlett Packard Gene Array Scanner(Affymetrix, Santa Clara, CA, U.S.A.)로 스캔하였다. 발현되는 데이터는 Affymetrix MAS(MicroArray Suite) version 5.0으로 分析하였다. 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 프로그램을 이용하였고, 比較分析을 통하여 "Signal Log-Ratio"가 생성된다. 이는 增加(I), 미약한 增加(MI), 減少(D) 미약한 減少(MD) 및 변화 없음(NC)으로 분류된다. 각각의 구분에는 "Change p-value"도 제시되며, 이러한 모든 통계적인 데이터는 microarray data를 分析하는데 사용하였다. 分析은 Affymetrix社에서 나온 MAS version 5.0 software를 이용하였다(Fig. 1).

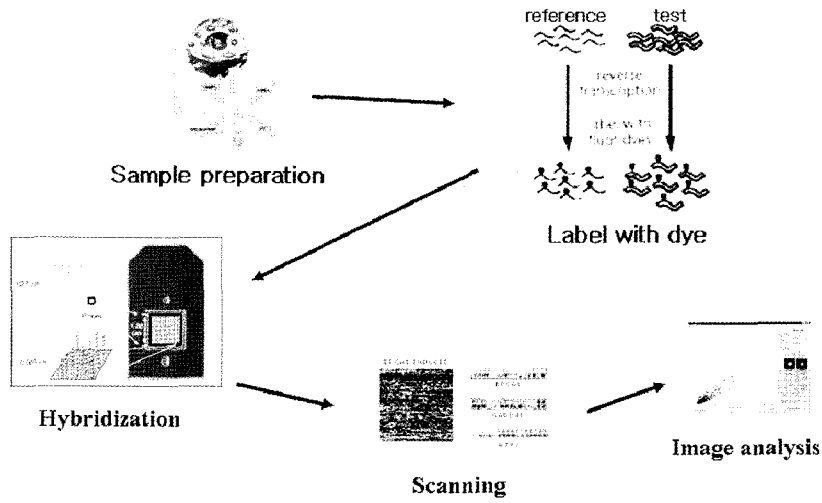


Fig. 1 Procedure of oligonucleotide chip assay.

III. 成績

1. MTT assay

胃癌 細胞柱의 경우 0.1, 0.5mg/ml에서는 오히려 增殖이 增加하였으나, 1.5, 10, 20mg/ml(약 33%)에서 有意한 細胞 增殖의 減少를 관찰할 수 있었다(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 集積되어 있다. 細胞 毒性 실험에서 비교적 毒性이 적고 紅蔘藥鍼液의 藥效를 充分히 나타낼 수 있는 실험군(1.5mg/ml)과 대조군으로 나누어 分析하였다.

1) 發顯이 增加된 遺傳子

發顯이 2배 이상 增加되는 遺傳子는 similar to 1011297A transferring receptor(GB No. N76327), similar to suppressor of Ty 6 homolog(GB No. BC033074.1) 및 myeloid cell leukemia sequence 1(GB No. BF594446) 등 346개였다(Table 1, Fig. 3-1).

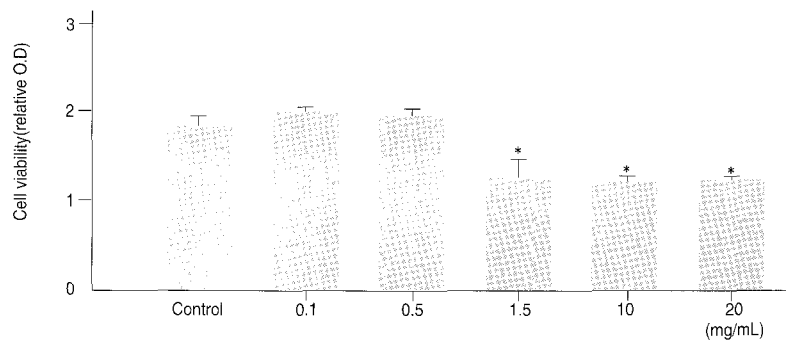


Fig. 2 Effects of GRR-HAS on SNU484 cell proliferation

: Statistically significant value compared with control data. (: P<0.05)
GRR-HAS ; Ginseng Radix Rubra Herbal-acupuncture Solution

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

Signal Log Ratio	Descriptions	
7.2	N76327	similar to 1011297A transferring receptor
7.2	BC033074.1	similar to suppressor of Ty 6 homolog
5.3	BF594446	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
5.2	BC014029.1	MGC:19944
5.1	NM_020399.1	PIST
4.9	AK024072.1	chromatin-specific transcription elongation factor, 140 kDa subunit
4.9	BC012620.1	similar to golgi SNAP receptor complex member 1
4.8	AK024189.1	KIAA1085

GRR-HAS ; Ginseng Radix Rubra Herbal-acupuncture Solution

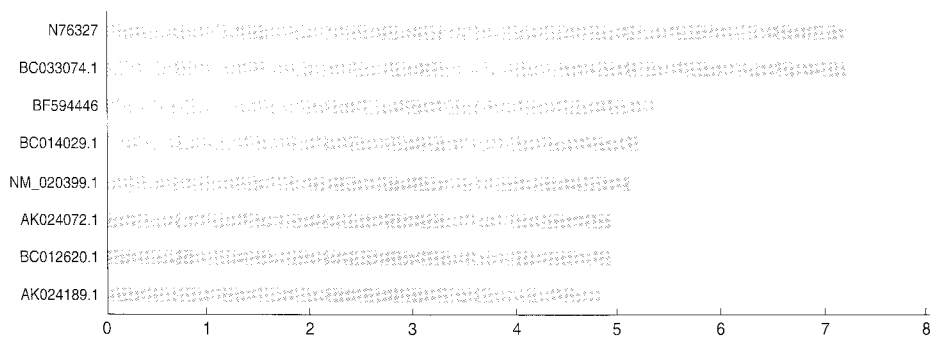


Fig. 3-1 GRR-HAS increased their gene expression in SNU484. Each bar indicates fold increase as shown in Table 3. X-axis indicates fold increase of GRR-HAS compared to control and Y-axis indicates genebank numbers. GRR-HAS ; Ginseng Radix Rubra Herbal-acupuncture Solution

2) 發顯이 減少된 遺傳子

胃癌 細胞柱에서 發顯이 2배 이상 減少된 遺傳子는 18S rRNA(ribosomal RNA) (GB No. M10098.1), 28S rRNA(GB No. M27830.1), prepro-MCH(melanin-concentrating

hormone) (GB No. S64288) 등 9개였고, 이 중 遺傳子 傳寫와 연관되어 있는 18S rRNA(GB No. M10098.1) 및 28S rRNA(GB No. M27830.1)의 發顯이 減少되었다 (Table 2, Fig. 3-2).

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

Signal Log Ratio	Descriptions	
-5.1	M10098.1	18S rRNA
-4.4	M27830.1	28S rRNA
-3.8	S64288	prepro-melanin-concentrating hormone
-3.6	BC041888.1	similar to rab6 GTPase activating protein (GAP and centrosome-associated)
-3.1	BC028594.1	similar to hypothetical protein FLJ14917
-2.5	AL529396	coactivator-associated arginine methyltransferase-1
-2.3	BC001472.1	neighbor of COX4
-2.1	NM_001673.1	asparagine synthetase (ASNS)
-2	BF058771	myo-inositol 1-phosphate synthase A1
-1.6	W72527	phosphoserine aminotransferase
-1.5	NM_024111.1	MGC4504

GRR-HAS ; Ginseng Radix Rubra Herbal-acupuncture Solution

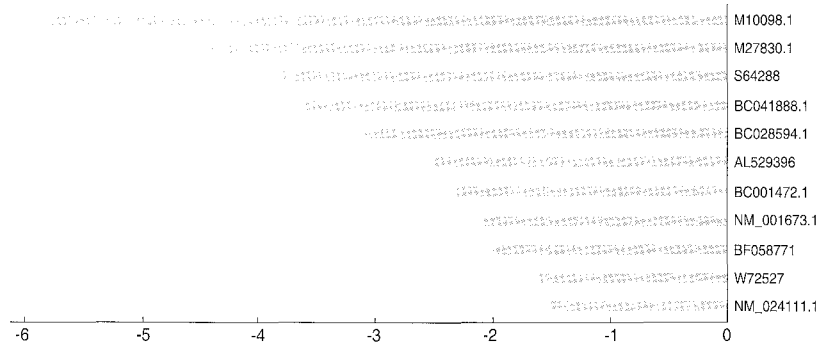


Fig. 3-2 GRR-HAS decreased their gene expression in SNU484. Each bar indicates fold decrease as shown in Table 4. X-axis indicates fold decrease of GRR-HAS compared to control and Y-axis indicates genebank numbers. GRR-HAS ; Ginseng Radix Rubra Herbal-acupuncture Solution

IV. 考 察

인류의 생명을 위협하는 질환으로 과거에는 전염성 질환이 주로 이루어졌으나, 오늘날에는 인간 수명의 고령화 추세와 문명의 발달로 인하여 高血壓, 中風 등의 循統器 疾患, 糖尿病 등의 內分泌係 疾患 및 癌 등의 難治性 疾患에 의한 사망이 주로 이루고 있는 추세이다¹⁾.

이 중 癌은 현재 조직의 자율적인 過極性 成長으로 개체에 대하여 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대하여 파괴적인 것으로 정의되고 있으나²⁾, 그 발생 원인과 기전이 명백히 알려져 있지 않고, 또 생물학적 성상이 복잡하기 때문에 현재까지도 難治性 疾患으로 인식되며 국민보건을 위협하는 가장 큰 요인이 되고 있다.

癌에 대한 韓醫學的 인식은 『內經』¹⁰⁾을 비롯한 역대 醫書에서 전적으로 新生物인 癌과 일치하지는 않지만, 유사한 병명으로 腫瘍, 腸覃, 癭瘤, 癭贅, 癥瘕, 積聚, 噎膈, 反胃, 惡瘡, 岩 등의 범주에서 취급하고 있다^{4, 11)}. 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 발생되며⁴⁾ 治療法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으로 대별된다^{3, 12)}.

藥鍼療法은 經絡學說의 원리에 의거하여 韓藥材를 선택하여 有關한 穴位, 壓痛點 및 陽性反應點에 注入하여 刺鍼과 藥物作用을 통하여 생체의 機能을 조정하고 병리상태를 개선시켜 疾病을 治療하는 新鍼療法¹³⁾으로 다양한 藥鍼을 이용한 抗癌 연구가 활발히 진행되고

있는데, 임 등¹⁴⁾이 皮膚癌이 유발된 ICR계 생쥐의 足三里에 人蔘藥鍼을 주입한 후 腫瘍의 체적, B細胞와 T細胞의 함량, 淋巴구增殖반응, 대식細胞의 탐식능, IL-2와 interferon의 생산능을 측정하고 比較群에 비해 有意한 效果가 있음을 보고하였다. 김 등¹⁵⁾은 全蝎藥鍼을 中腕에 주입했을 때 發癌물질이 유발하는 돌연변이원성과 유전독성을 抑制함을, 李 등¹⁶⁾은 膽癌 생쥐에게 제조藥鍼을 中腕과 足三里에 주입한 결과 腫瘍抑制能, 細胞毒性能, 生存率延長效果에 有意한 效果가 있음을 보고하였다.

紅蔘은 오가피과(Araliaceae)에 속한 다년생 초본인 人蔘(Panax ginseng C.A. MEY.)의 뿌리 중 鬚根을 제거하고 가열 처리하여 건조한 것으로 性은 微溫하고 味는 甘微苦하여 大補元氣, 固脫生津, 安神하여 모든 氣血津液 不足의 증상에 이용되고 있다^{5, 17)}.

紅蔘은 免疫機能 개선 및 抗癌에도 많은 연구가 진행되고 있는데 장 등⁶⁾, 이 등⁷⁾은 紅蔘이 T림프구에 의한 細胞媒介性 免疫反應과 自然殺害細胞의 활성화도를 增加시켜 免疫 활성화 및 抗癌效果가 있음을, 곽 등⁸⁾은 紅蔘이 抗癌劑와 병용투여로 抗癌劑의 效果를 높이고 抗癌劑의 免疫抑制에 대한 심각한 부작용을 경감시키는 效果가 있음을 보고하였다.

최근에는 癌의 병태생리에 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 있으며¹⁸⁾, 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 遺傳子 chip을 利用함으로써 大量의 遺傳子 發顯 情報를 한꺼

번에 평가하여 遺傳子 자체의 情報 뿐 아니라 治療 후의 變化를 폭넓게 파악할 수 있게 되었다^{19,21}). 그러나, 紅蔘에 대한 oligonucleotide chip을 이용한 遺傳子 發顯 情報를 分析을 통한 抗癌에 관한 研究는 이루어진 바가 거의 없는 실정이다.

이에 臨床的 作用機轉을 보다 깊이 이해하고 臨床的 應用的 폭을 넓히는 데에 도움이 되는 기초 자료로 쓰일 수 있도록, 紅蔘으로 藥液을 조제하여, 抗癌效能을 밝히고자 胃癌細胞柱에 최신 oligonucleotide chip assay법을 통한 大量的 遺傳子 發顯을 한꺼번에 獲得하여 分析하게 되었다.

최근 수많은 遺傳子를 찾고 그 機能을 알아내는데 종래의 Southern이나 Northern blotting, PCR을 기본으로 한 SSH(subtractive suppressive hybridization)²²), RDA (representational difference analysis)²³) 그리고 difference display^{24,25}) 方法들이 있지만 많은 양의 RNA를 必要로 하며 偽陽性率이 높아 수많은 인간의 遺傳子를 비교하는데 한계가 있다²⁶). 그러나 최근 DNA chip 기술의 도입으로 이 분야 研究에 획기적인 전기가 마련되었다^{19,21}). 이러한 分子生物學的 발전은 빠르게 발전하는 전자·기계공학의 발달과 밀접한 연관을 갖는데 이러한 노력으로 성인 엄지손톱 정도의 적은 공간에 수천에서 수만 가지의 적은 양의 유전물질들을 한꺼번에 고밀도로 심어 놓을 수 있는 DNA chip 기술은 수많은 遺傳子를 한꺼번에 解讀하거나 비교할 수 있게 되었다. 현재 다량의 遺傳子 分析 方法 중 점차적으로 oligonucleotide chip을 많이 사용하고 있다. 이는 cDNA chip의 여러 가지 단점들을 극복할 수 있기 때문이다. 일례로 oligonucleotide chip은 같은 크기의 유리판에 훨씬 집적도를 높여 다량의 遺傳子를 한꺼번에 검색할 수 있다. Affymetrix社²⁷)는 computer chip을 만들 때 사용되는 photolithography라는 기술을 응용하여 하나의 유리판 위에 수 만개의 다른 nucleotide들을 직접 합성하였다. Affymetrix社²⁷)는 이 기술을 사용하여 초기에 1.28cm² 안에 65,000개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들었고, 지금은 400,000개 이상의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들 수 있게 되었다. 각각의 oligonucleotide들은 15-25개의 염기로 이루어져 있으며, oligonucleotide가 합성되는 유리의 표면은 각각의 염기들이 합성할 수 있게 보조체가 붙어 있다. 하지만 이들 보조체는 평소에 빛에 민감한 화학 물질로 덮여 있어 염기들이 합성될 수 없다. 이러한 성질을 이용하여 특별히 설계된 photomask를 위에 놓고 빛을

쏘이면 구멍이 나있는 곳으로 빛이 들어가 그곳에 있는 보조체의 화학물질들을 제거한다. 이렇게 화학물질이 제거된 보조체들을 가진 chip을 한가지 염기가 있는 곳에 넣으면 모든 활성화된 보조체들에 염기가 가서 합성된다. cDNA microarray chip과 이 oligonucleotide chip의 다른 점은 chip에 완전한 遺傳子 대신에 25mer를 심은 것이다. 이와 같은 차이점 때문에 遺傳子 發顯을 검색하는데 쓰이는 oligonucleotide chip을 만들 때 遺傳子의 어떤 부분을 선택하여 합성하는 지가 아주 중요하다. 평균 20개의 25mer들이 하나의 遺傳子를 대표하여 선택된다. 또한 각각의 결합 온도가 서로 비슷해야 한다. 이 oligonucleotide chip도 cDNA microarray chip과 마찬가지로 한 환경에만 發顯하는 遺傳子를 찾을 수 있을 뿐만 아니라 發顯 정도까지도 알 수 있다. 또한 Affymetrix oligonucleotide chip은 하나의 염기서열만 틀려도 결합을 하지 않는 성질을 이용하여 한 염기에 생긴 돌연변이까지도 찾아낼 수 있다. 따라서 oligonucleotide chip의 장점은 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 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 질병 관련 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 가능하다²⁸). 이들의 使用 용도는 주로 두 조직 간의 遺傳子 發顯 樣相比較, 염기 서열 分析, 變異 檢索 및 특정질환의 診斷 뿐만 아니라 약물이나 방사선 治療 後의 變化 등을 추적하여 다양한 분야에서 使用되거나 研究 중이다²⁹).

본 실험에서는 먼저 紅蔘藥液의 癌細胞 增殖 抑制效能 및 적정 농도를 알아보기 위해 MTT-assay 分析하였다. 紅蔘藥液 처리 24시간 후 細胞 增殖을 살펴보면 0.1, 0.5mg/ml에서는 오히려 增殖이 增加되었으나, 1.5, 10, 20mg/ml(약 33%)에서 有意한 細胞 增殖의 減少를 관찰할 수 있었다.

紅蔘藥液에 의한 細胞 增殖 抑制를 分子生物學的 기전으로 설명하기 위하여 cDNA microarray 分析을 시행하였다.

紅蔘藥液을 처리한 경우 胃癌 細胞柱에서 發顯이

增加되는 遺傳子는 similar to 1011297A transferring receptor(GB No. N76327), similar to suppressor of Ty 6 homolog (GB No. BC033074.1) 및 myeloid cell leukemia sequence 1(GB No. BF594446) 등 346개였다.

이들 遺傳子는 腫瘍의 增殖抑制와 관련이 있는 것으로 믿어지나, 이들 遺傳子의 機能에 대한 先行 研究가 거의 없어서, 현재 시점에서 이들 遺傳子의 發顯增加가 가지는 의미를 해석하기는 어려우며, 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 思料된다.

紅蓼藥鉞液을 처리한 경우 胃癌 細胞柱에서 發顯이 減少되는 遺傳子는 18S rRNA(GB No. M10098.1), 28S rRNA(GB No. M27830.1), prepro-MCH(GB No. S64288) 등 9개였고, 이 중 遺傳子 傳寫와 연관되어 있는 18S rRNA(GB No. M10098.1) 및 28S rRNA(GB No. M27830.1)의 發顯이 減少되었다.

MCH는 신경펩티드로 어류에서 주위 환경에 대한 보호색과 관련이 있으며 진행된 癌腫을 가진 환자의 80%에서 관찰되는 cancer anorexia-cachexia syndrome은 환자의 사망률과 직접적인 연관성을 가지고 있으며, 최근의 연구에 의하면 이 증후군은 다양한 인자에 의하여 매개되는데 그 중에는 MCH도 있었다^{28,29}. 본 실험에서 MCH가 紅蓼藥鉞液에 의하여 抑制되는 것을 보면 말기 癌患者의 생존율 增加에도 紅蓼이 도움이 되리라 思料된다.

본 실험에서 紅蓼藥鉞液이 胃癌 細胞柱의 遺傳子 發顯에 미치는 影響을 cDNA microarray을 통하여 紅蓼藥鉞液의 抗癌效果를 分子生物學的 견지에서 연구한 결과, 紅蓼藥鉞液이 癌細胞의 성장에 관련되는 遺傳子 뿐만 아니라 轉移에 관련되는 遺傳子의 發顯도 抑制하였으며, 특히 抗癌 免疫 效果를 높일 수 있다는 가능성을 보인 것은 抗癌 效能 뿐만 아니라 發癌 豫防 效果도 가질 수 있음을 의미하여, 이에 대하여는 임상적인 연구가 뒤따라야 할 것이다. 또한 본 연구에서 새롭게 紅蓼藥鉞液과 연관성이 밝혀진 遺傳子들에 대하여는 향후 추가적인 연구를 통하여 그 의미를 밝혀야 할 것으로 思料된다.

V. 結 論

紅蓼 藥鉞液의 抗癌效能을 밝히고자 胃癌細胞柱에 최신 oligonucleotide chip assay법을 통하여 大量的 遺傳

子 發顯 情報를 分析한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MTT 分析에서 胃癌細胞柱는 1.5, 10, 20mg/ml에서 對照群에 비해 有意한 細胞活性 減少를 보였다.
2. 胃癌細胞柱에 紅蓼藥鉞液 處置 時 對照群에 비해 發顯이 2배 이상 增加된 遺傳子는 similar to 1011297A transferring receptor, similar to suppressor of Ty 6 homolog 및 myeloid cell leukemia sequence 1 등 346개였다.
3. 胃癌細胞柱에 紅蓼藥鉞液 處置 時 對照群에 비해 遺傳子의 發顯이 2배 이상 減少된 것은 18S rRNA, 28S rRNA, prepro-MCH 등 9개였다.

이상과 같이 紅蓼藥鉞液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는 癌化 過程이나, 紅蓼藥鉞液에 반응하는 遺傳子로 치료제 개발을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 思料된다.

參考文獻

1. 통계청. 2003년 사망원인통계연보. 대전 : 통계청. 2004 : 22-4.
2. 서울대학교 의과대학. 중앙학. 서울:서울대학교 출판부. 1992 : 1, 3, 27, 36, 91, 99, 137-192.
3. 賈堃. 癌瘤防治研究. 서울 : 成輔社. 1984 : 25-7.
4. 方藥中. 實用中醫內科學. 上海 : 上海科學技術出版社. 1986 : 621-36.
5. 全國韓醫科大學 本草學教室 編. 本草學. 서울 : 永林社. 1991 : 621-3.
6. 장성강, 김주현, 정윤신, 안동춘, 강명재, 이동근, 김상호. 한국 홍삼의 면역활성 및 항암효과에 관한 실험적 연구. 고려인삼학회지. 1994 ; 18(3) : 151-60.
7. 이혜연, 이한수. 홍삼 추출물의 임파구 증식 및 활성 촉진효과. 高麗人蔘學會誌. 1998 ; 22(1) : 60-5.
8. 광이성, 김영숙, 신한재, 송용범, 박종대. 홍삼산성당체(RGAP)와 항암제의 병용투여에
9. 한상원, 서정철, 이윤호, 최제용. 鹿茸藥鉞液의

- DNA chip을 이용한 遺傳子 發顯 分析. 大韓鍼灸學會誌. 2003 ; 20(3) : 34-44.
10. 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.
 11. 許俊. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1988 : 486-96, 720.
 12. 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.
 13. 全國韓醫科大學 鍼灸·經穴學教室 編. 鍼灸學 <下>. 서울 : 集文堂. 1994 : 1457-67
 14. 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.
 15. 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.
 16. 李俊茂, 河智容. 蟻螞藥鍼의 抗癌作用에 관한 研究. 大韓東醫病理學會誌. 2000 ; 14(2) : 132-43.
 17. 지형준. 대한약전 및 대한약전 의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인덱스사. 1998 : 681-2.
 18. El-Aneed A. Current strategies in cancer gene therapy. European Journal of Pharmacology. 2004 ; 498(1-3) : 1-8.
 19. Guimaraes MJ, Lee F, Zlotnik A, McClanahan T. Differential display by PCR : novel findings and applications. Nucleic Acids Res. 1995 ; 23(10) : 1832-3.
 20. Kurian K, Watson CJ, Wyllie AH. DNA chip technology. J Pathos. 1999 ; 187(3) : 267-71.
 21. DeRisi JL, Penland L, Brovn PO. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression pasterns in human cancer. Nature Genet. 1996 ; 14(4) : 457-60.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. Science 1992 ; 257(5072) : 967-71.
 25. 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 shockgly coprotein of Mr. 43000. EMBO J. 1986;5(7) : 1465-72.
 26. 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.
 27. <http://www.affymetrix.com>
 28. Groneveld D, Eckhardt ER, Coenen AJ, Martens GJ, Balm PH, Wendelaar Bonga SE. Expression of tilapia prepro-melanin-concentrating hormone mRNA in hypothalamic and neurohypophysial cells. J Mol Endocrinol. 1995 ; 14(2) : 199-207
 29. Ramos EJ, Suzuki S, Marks D, Inui A, Asakawa A, Meguid MM. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2004 ; 7(4) : 427-34.