

Baicalin을 처리한 HL-60 백혈병 세포주에서 대규모 유전자 분석 발현 연구

강봉주 · 차민호 · 전병훈¹ · 윤용갑¹ · 윤유식*

한국한의학연구원, 1: 원광대학교 한의과대학

Studies on Gene Expression of baicalin treated in HL-60 cell line using High-throughput Gene Expression Analysis Techniques

Bong Joo Kang, Min Ho Cha, Byung Hun Jeon¹, Yong Gab Yun¹, Yoo Sik Yoon*

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

Baicalin, a biologically active flavonoid from the roots of *Scutellaria baicalensis* (Skullcap), have been reported to not only function as anti-oxidants but also cause anticancer effect. We investigated the mechanism of baicalin-induced cytotoxicity and the macro scale gene expression analysis in leukemia cell line, HL-60 cells. Baicalin (10 μM) were used to treat the cells for 6h, 12h, 24h, 48h and 72h. In a human cDNAchip study of 65,000 genes evaluated 6, 12, 24, 48, 72 hours after treated with Baicalin in HL-60 cells. Hierarchical cluster against the genes which showed expression changes by more than two fold. One hundred one genes were grouped into 6 clusters according to their profile of expression by a hierarchical clustering algorithm. For genes differentially expressed in response to baicalin treatment, we tested functional classes based on Gene Ontology (GO) terms. This study provides the most comprehensive available survey of gene expression changes in response to baicalin treatment in HL-60 cell line.

Key words : Yukmijihwang-tang, DNA chip, gene expression, pathway analysis

서 론

황금(黃芩, *Scutellariae radix*)은 중국에서 널리 알려진 한약 재료써 꿀풀과 식물 황금의 뿌리이다. 혈중의 지질에 영향을 미치고 항염, 항알러지 작용이 있고 항미생물 작용, 해열작용, 이뇨 작용, 혈압강하 작용이 있다.

황금에 함유되어 있는 flavonoid의 일종인 baicalin (5,6-dihydroxy-4-ox-2-phenyl-4H-1benzopyran-7-ylβ-d-glucopyranosiduronic acid)은 해열작용, 이뇨작용, 항균작용, 항진균작용, 항바이러스 작용, 혈압강하작용등 약리작용을 하는 유효성분 중 하나이다¹⁾. Baicalin의 항암효과^{2,3)}와 세포사 기전에 대한 연구는 활발히 있었고³⁻⁶⁾ HL-60 세포주에 대한 세포사의 기전연구도 보고 되었다²⁾.

최근에 개발된 DNA chip은 유전자 검색용으로서 엄청나게 많은 종류의 DNA를 고밀도로 붙여 놓은 것으로서 여러 genome project로부터 축적된 방대한 양의 유전정보를 이용하여 시료를 효율적으로 분석할 수 있는 가장 주목받고 있는 방법이다.

DNA chip은 제조합 유전자기술과 PCR에 비견될 만큼 다양한 응용분야와 기존기술을 능가하는 장점을 가지고 있다. DNA chip이 대체 할 수 있는 기존의 대표적인 유전공학방법으로는 Southern과 Northern blot, 돌연변이 검색 그리고 DNA sequencing 등이 있다.

현재 DNA chip의 주 응용분야는 gene expression monitoring으로서, 이는 여러 genome project로부터 밝혀진 DNA 염기서열을 바탕으로 하여 chip을 제작하여 cell 내의 metabolism과 physiology, 그리고 각 유전자간의 상호 연관성을 규명하는 것이다.

본 연구에는 baicalin의 백혈병에 대한 항암 효과와 기전을 밝혀내고자 황금으로부터 분리된 baicalin을 HL-60 백혈병 세포주에 처리하여 작용기전을 DNA chip을 통해서 밝혀보고자 한다.

* 교신저자 : 윤유식, 대전시 유성구 전민동 461-24, 한국한의학연구원 의료연구부
· E-mail : ysyoon2@kiom.re.kr, · Tel : 042-868-9482
· 접수 : 2004/08/03 · 수정 : 2004/09/03 · 채택 : 2004/10/04

재료 및 방법

1. 세포배양

사람 유래의 급성백혈병 세포주인 HL-60을 사용했고, 실험실에서 37 °C, 5 % CO₂ 배양기(Forma scientific, OH, USA)에서 배양했다. 부유성인 HL-60세포의 배양액은 RPMI 1640 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA) 배지에 fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA)를 10 % 포함하고, 1 % 항생제 (100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, GibcoBRL)와 배지 1 L당 NaHCO₃ 2 g을 첨가하여 제조하였다.

2. 시료의 처리

황금으로부터 추출한 baicalin을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여서 최종사용 농도에서 DMSO가 0.1% 이하가 되도록 하여 사용하였다. HL-60 세포들은 cell culture flask에서 배양하여 4 × 10⁶ cells/ml의 세포 수를 가진 배지에 baicalin을 10 µM 농도로 6, 12, 24, 48, 72시간동안 처리하였다.

3. Total RNA 분리

Baicalin을 HL-60 세포에 처리하여 시간대별로 세포들을 원심분리하고 PBS로 2-3회 세척한 후, 6 × 10⁶ 세포 당 1 ml의 TRIreagent (Molecular research center, Cincinnati, OH, USA)를 넣고 상온에서 5분간 방치하였다. 여기에 0.2 volume의 chloroform을 첨가하고 15초 동안 vortexing한후 상온에 5-15분간 방치했다. 그리고 4 °C, 12,000 xg에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. TRIreagent 1 ml 당 0.5 ml 부피의 isopropanol을 첨가 후 상온에서 5-10 분간 방치 후 4 °C, 12,000 xg에서 8분간 원심분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 침전물에서 약 1 ml의 75 % ethanol을 첨가하고, 4 °C, 7,500 xg에서 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물을 건조시켜 50 µl의 DEPC-water에 녹여 spectrophotometer에서 RNA농도와 A₂₆₀/A₂₈₀비를 측정하여 A₂₆₀/A₂₈₀ 값이 1.8이상을 사용했다. 그리고 1% agarose gel로 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후 UV 빛에서 관찰하여 18S와 28S RNA 밴드모양으로 RNA의 질을 판단하였다. 분리된 total RNA를 인간유전자 6,500개가 spot된 6.5k human cDNA chip (gaigene, 서울) 실험에 사용했다.

4. Microarray probing과 scanning

100 µg total RNA (또는 2-5 µg의 mRNA)용액에 5 µg의 dt oligomer를 첨가하여 70 °C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 방치하였다. RNA용액에 2.5 µl의 Superscript II reverse transcriptase (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA), 10 µl의 5×reaction buffer, 5 µl의 DTT (0.1 M), 5 µl의 10 × dNTP 5 mM dATP, dCTP, dGTP; 2 mM dTTP), 2 µl의 fluorescent nucleotide (최종농도 10 nM Cy3-dUTP or Cy5-dUTP)를 첨가하여 50 µl의 반응액을 만들어 37 °C에서 2시간 반응시켰다. 이 반응액에 6 µl의 3 M NaOH를 첨가하여 65 °C에서 30분 반응시켜 unlabeled RNA를 변성시켰다. 이 반응액에 30 µl의 1M

Tris-HCl (pH7.5)와 12 µl의 1M HCl를 첨가하여 중화시켰다. Biospin 6 column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 unincorporated nucleotide와 salt로 제거하였다. Cy5 probe와 Cy3 probe를 동량씩 섞어 Microcon 30 (Waters-Milipore, Bedford, MA, USA)으로 부피를 줄였다. Hybridization solution 들은 probe와 섞어 chamber에 넣어 50 °C에서 16시간 hybridization 했다. 그리고 drain까지 마친 후 스캐닝은 GMS 418 스캐너 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)로 saturation이 안되는 범위내에서 cy3는 550-570 nm에서, cy5는 650-670 nm에서 적당한 PMT값으로 스캔하였다.

5. Scatter Plot

Microarray 실험을 행하여 스캔한 이미지 그림은 분석 프로그램인 Imagen (Biodiscovery Inc. El Segundo, CA, USA)에서 분석을 하게 되는데 data의 filtering은 우선은 minimal intensity (negative control)로 1차적으로 선별을 하였고, 다음으로 signal to noise ratio인 SNR을 2상의 값만을 취하였다. SNR은 다음과 같은 식으로 구할 수 있다.

$$\frac{Signal\ intensity\ mean}{Background\ intensity\ mean + SD}$$

다음으로 CV (poor spot)로 0.4이하를 선별을 하였는데 이는 다음과 같다.

$$\frac{Signal + SD}{signal\ intensity\ mean}$$

이렇게 하여 선별해진 값들은 intensity가 수치화하여 나타난다. Cy3와 cy5의 intensity의 signal 평균값을 scatter plot으로 나타낸다.

6. MA Plot

Scatter plot이 cy3와 cy5의 intensity만을 나타낸 그림이라면 MA plot은 intensity와 ratio와의 상관관계를 나타낸다. 여기에서 MA 값은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$M = \log_2 R / G, A = \log_2 R + \log_2 G / 2$$

이 plot에서 ±1이상인 값이 2배이상 발현이 증가하거나 감소한 값이다 (Fig 2).

7. Bioinformatics data 분석

GMS 418 Scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여, Cy5와 Cy3의 fluorescent image를 각각 스캔하여 fluorescence intensity를 측정하고, ImaGene software (BioDiscovery, El Segundo, CA, USA)를 이용하여 각각의 이미지를 합성하고 분석함으로써 각 유전자별 대조군과 실험군의 발

현 비율(Cy3/Cy5비, red와 green의 intensity비를 결정했다. 또한 housekeeping 유전자 및 yeast 유전자에 대하여 별도로 대조군과 실험군의 발현비율을 분석하여 실험에서 얻어진 data의 타당성 부여를 위한 상관계수를 구한다.

1) Hierarchical clustering

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.

2) 기능별 유전자 발현 조사

발현 검색에 사용한 chip의 유전자들을 Stanford대학의 SOURCE 사이트 (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>)와 Affymatrix의 데이터베이스를 이용하여 apoptosis, cell cycle, signal transduction, oncogenesis, cell proliferation등과 같이 cancer관련된 기능과 일반적 기능을 구분하였다. Gene ontology 분석은 EASE (<http://apps1.niaid.nih.gov/DAVID>)를 활용하여 분석하였다.

결 과

사람의 백혈병 세포주인 HL-60에 대한 baicalin의 작용기전을 알아보기 위하여 baicalin 10uM을 6, 12, 24, 48, 72시간동안 처리하여 세포를 배양한 후 total RNA를 분리하여 cDNAchip을 이용하여 유전자발현을 알아보았다.

실험에는 인간유전자 6,500개가 집적된 6.5k human cDNA chip을 사용했고, 6,500여개 유전자의 spot중 average intensity가 9이하의 불량 spot들은 제거하고 lowess smoothing normalization하여 573개 gene을 data에 활용하였다. 그리고 573개중 EST와 아직 annotation이 되지 않은 것은 제외하고 적어도 1개가 2배이상 증감하고 80%이상 데이터가 남아있는 것을 추려내어 데이터에 활용하였다 (Fig. 1).

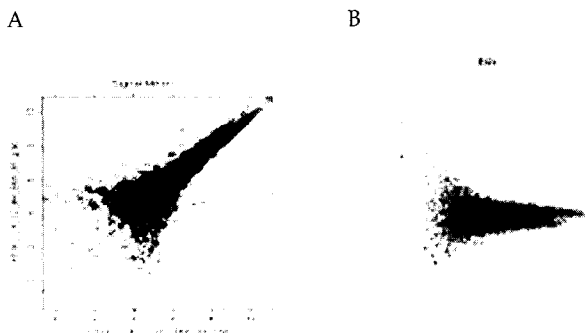


Fig. 1. Scatter plot and MA plot. (A) Correlations between the total gene expression results of DNA chips obtained from HL-60 cells which was treated baicalin compared with the normal control group. (B) MA plot analysis of log transformed expression unflagged data for two different RNA populations.

1. Baicaline 처리후 시간대별 유전자 증감 pattern

Baicalin을 HL-60 세포주에 처리하고 6, 12, 24, 48, 72 시간이 경과 후 total RNA를 분리하여 cDNAchip으로 분석하였다. 6시간 경과 후 대조군에 비해 2배이상 감소 유전자들은

interferon (alpha, beta and omega) receptor 1(IFNAR1)를 포함한 19개이고 2배이상 증가한 것은 prostaglandin- endoperoxide synthase 2를 포함한 11개의 유전자들이다. Baicalin 처리하여 12시간 후 2배이상감소 유전자들은 dihydrodiol dehydrogenase 2를 포함한 15개의 유전자들이 2배이상 증가한 유전자들은 tumor protein p53-binding protein, regenerating islet-derived 1 alpha (pancreatic stone protein, pancreatic thread protein) (REG1A), deafness, autosomal dominant 5 (DFNA5), interleukin 1 receptor, type I (IL1R1) 4개 이다. Baicalin 처리하여 24시간 후 2배이상 감소 유전자들은 apolipoprotein A-IV (APOA4)를 포함한 14개이고 2배이상증가 유전자들은 small inducible cytokine A2, putative GTP-binding protein similar to RAY등 5개의 유전자이다. 48시간 경과하여 2배이상 감소한 유전자들은 retinoblastoma-binding protein 8 (RBBP8)를 포함한 12개의 유전자이고 2배이상 증가한 유전자들은 nucleotide binding protein 1을 포함한 7개의 유전자들이다. 72 시간 경과하여 2배 이상 감소한 유전자는 catenin ,alpha 1 (102kD) (CTNNA1)를 포함하여 28개의 유전자들이고 2배이상 증가한 유전자들은 kinectin 1 (kinesin receptor) (KTN1)를 포함한 40개의 유전자이다 (Fig. 2).

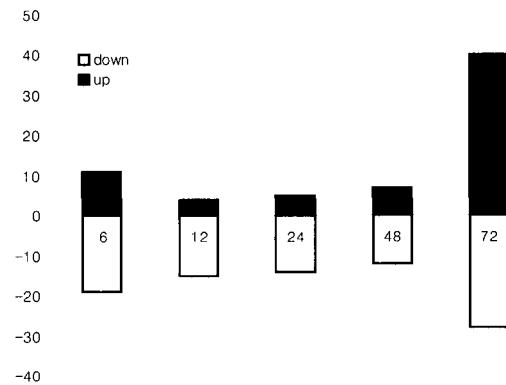


Fig. 2. Number of regulated genes at each time point. The number of genes that were up-regulated (solid bar) by at least two fold or down-regulated (open bar) by at least two fold at each time point are shown.

2. Hierarchical clustering

Stanford Univ.의 cluster 3.0 프로그램을 활용하여 hierarchical clustering을 하여 (average linkage) node correlation이 0.35~0.81 값사이에서 cluster를 결정하여 6개의 cluster를 결정했다 (Fig. 3). Cluster A는 24-48h에 발현이 증가하는 군으로 regenerating islet-derived 1 alpha (pancreatic stone protein, pancreatic thread protein) (REG1A)의 13개 유전자가 포함되어 있고, cluster B는 48-72h사이에 발현이 증가하고 coagulation factor II (thrombin) receptor (F2R)의 28개 유전자가 포함되어 있고, cluster C는 6h에 발현이 감소하고, zinc finger protein (LOC51042)의 15개 유전자가 포함되어 있고, cluster D는 apolipoprotein A-IV (APOA4)의 4개의 유전자를 포함하고, cluster E는 6h에 발현이 증가하며 replication protein A3 (14kD) (RPA3)의 8개 유전자를 포함하고 cluster F는 48-72h사이에 발현이 감소하며 retinoblastoma-binding protein 8 (RBBP8)의 25개 유전자를 포함하고 있다.

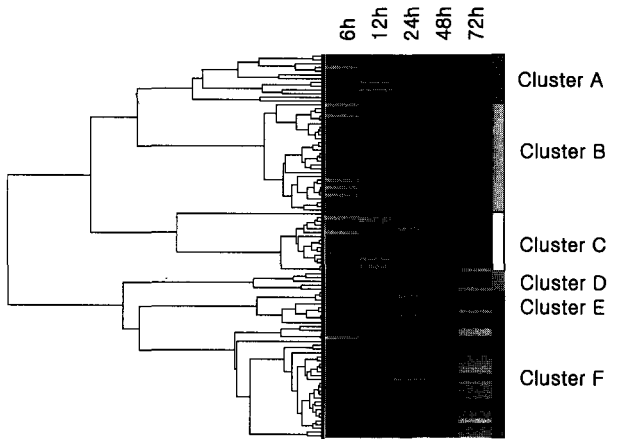


Fig. 3. Hierarchical cluster analysis of genes changing in baicalin treated HL-60 cells. Hierarchical cluster against the genes which showed expression changes by more than 2 fold. 101 genes were grouped into 6 clusters by a hierarchical clustering algorithm. Experiments are ordered along the x axis, and genes are ordered along the y axis.

3. 기능별 유전자 발현

발현 검색에 사용한 chip의 유전자들을 Gene ontology 분석은 EASE (<http://apps1.niaid.nih.gov/DAVID>)를 활용하여 분석하였다. 6,500개 유전자중에 유의성 있게 증감한 유전자는 573개이고, 각 시간대별로 2배이상 증감한 유전자들을 선택하여 기능적 분류에 따른 유전자 그룹으로 분리하였다. EASE 프로그램에서 <http://apps1.niaid.nih.gov/david/ease2.asp>에 접속하여 biological process항목으로 분류하여 각 시간대별로 2배이상 증감한 유전자들을 분류하였다 (Fig. 4). 각 시간대별로 유전자 분류형태는 비슷하지만 baicalin 처리후 6시간 지난후에는 cell communication에 관련된 유전자들의 발현이 증가되었고 24시간 지난후에는 cell death와 homeostasis에 관련된 유전자들의 발현이 증가된 것으로 나타났다 (Table 2).

고찰

황금으로부터 추출된 baicalin이 사람 암세포주의 증식을 apoptosis와 cell cycle arrest를 통해 억제한다는 많은 보고가 있고^{2,7,19,20} endothelial cell 증식, 이동, 분화를 억제하여 신혈관생성을 억제하기도 한다²¹). 백혈병을 포함한 각종 암은 다양한 발생원인과 기전의 복잡성으로 인하여 분자생물학적, 세포생물학적 연구가 필요하다고 생각되며 이러한 연구를 위해서는 다양한 유전자들의 발현을 볼 수 있는 강력한 분자생물학 도구인 microarray를 통해서 유전자 수준에서 기전을 알아보기 위해 HL-60 세포주에 baicalin을 처리하여 유전자들의 발현을 조사하였다.

여러 많은 유전자들의 발현 중에서 암과 밀접한 관련이 있는 유전자들의 발현을 중심으로 조사하였고 전체적인 유전자 발현이 어떤식으로 이루어지는지를 살펴보았다. 먼저 세포주기 checkpoint 조절과 DNA repair 그리고 전사조절에서 BRCA1에 관련된 retinoblastoma-binding protein 8 (RBBP8)이 48에서 3배로 감소하였다. 이 유전자는 Ewing's sarcoma에서는 피부, 심장, 직장등과 같은 일반 조직에 비해 발현량이 많다¹⁰⁻¹²).

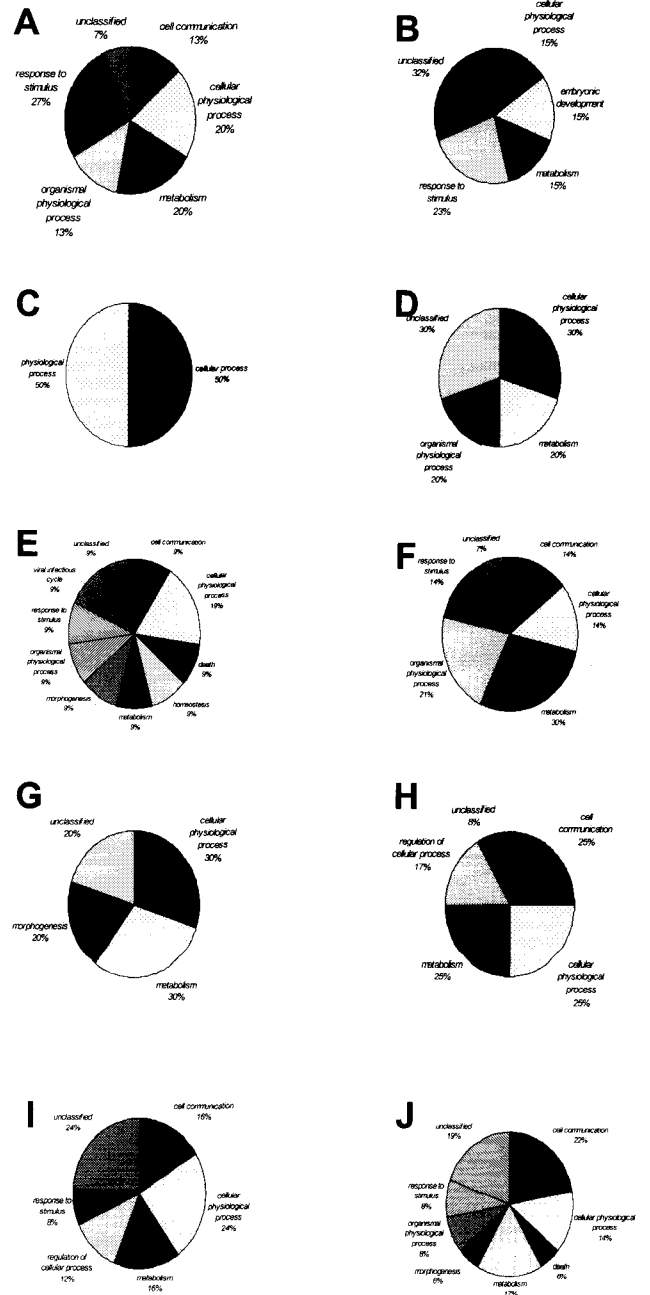


Fig. 4. Genes differentially expressed in baicalin treated HL-60 cells. Pie charts of functional grouping of significant Gene Ontology (GO) terms. (A) upregulated cluster (6h), n=11 GO terms. (B) downregulated cluster (6h), n=19 GO terms. (C) upregulated cluster (12h), n=4 GO terms. (D) downregulated cluster (12h), n=15 GO terms. (E) upregulated cluster (24h), n=5 GO terms. (F) downregulated cluster (24h), n=14 GO terms. (G) upregulated cluster (48h), n=7 GO terms. (H) downregulated cluster (48h), n=12 GO terms. (I) upregulated cluster (72h), n=40 GO terms. (J) downregulated cluster (72h), n=28 GO terms.

Centromere protein F도 세포주기와 관련되어 있고 retinoblastoma 단백질 (RB), CENP-E, BUBR-1에 상호작용하고 세포분열시 염색체 분열에서 kinetochore 기능에 필요한 단백질로 baicalin을 처리하고 48시간과 72시간에서 발현량이 2배로 감소하였다. 이 단백질은 흥선과 embryonic stem cell에서 발현량이 많다^{13,14}).

Table 1. List of gene expression on time dependent. The right-hand column gives the ratio of mRNA for baicalin group to control of highly up and down-regulation.

Time	up/down	Unigene numebr	Gene name	gene expression (log ratio)
6	up	Hs.196384	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G)	1.263
		Hs.171862	guanylate binding protein 2, interferon-inducible (GBP2), mRNA	1.092
		Hs.18212	DNA segment on chromosome X (un que) 9879 expressed sequence (DXS9879E), mRNA	1.082
		Hs.199248	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4) (PTGER4), mRNA	1.075
		Hs.1422	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog (FGR), mRNA	1.021
	down	Hs.1513	interferon (alpha, beta and omega) receptor 1 (IFNAR1), mRNA	-1.452
		Hs.46295	eosinophil peroxidase (EPX), mRNA	-1.403
		Hs.81343	collagen, type II, alpha 1 (primary osteoarthritis, spondyloepiphyseal dysplasia, congenital) (COL2A1), transcript variant 1, mRNA	-1.377
		Hs.9568	zinc finger protein 261	-1.242
		Hs.182231	thyrotropin-releasing hormone (TRH), mRNA	-1.216
12	up	Hs.13530	deafness, autosomal dominant 5 (DFNA5), mRNA	1.645
		Hs.170263	tumor protein p53-binding protein, 1	1.309
		Hs.154023	mRNA for KIAA0573 protein, partial cds	1.257
		Hs.82112	interleukin 1 receptor, type I (IL1R1), mRNA	1.143
		Hs.1032	regenerating islet-derived 1 alpha (pancreatic stone protein, pancreatic thread protein) (REG1A), mRNA	1.024
	down	Hs.201967	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III) (AKR1C2), mRNA	-2.563
		Hs.42674	mutS (E. coli) homolog 3	-1.209
		Hs.102419	zinc finger protein (LOC51042), mRNA	-1.182
		Hs.78846	heat shock 27kD protein 2 (HSP32), mRNA	-1.099
		24	up	Hs.303649
Hs.50267	putative GTP-binding protein similar to RAY			1.205
Hs.26837	mRNA: cDNA DKFZp586K1123 (from clone DKFZp586K1123)			1.128
Hs.25035	chloride intracellular channel 4			1.04
Hs.114218	frizzled (Drosophila) homolog 6 (FZD6), mRNA			1.037
down	Hs.169895		ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6 (UBE2L6), mRNA	-1.212
	Hs.1247		apopoprotein A-IV (APOA4), mRNA	-1.14
	Hs.161002		Human non-lens beta gamma-crystallin like protein (AIM1) mRNA, partial cds	-1.091
	Hs.77028		protein translocation complex beta (SEC61B), mRNA	-1.087
	Hs.42346		calcineurin-binding protein calcarscin-1 mRNA, complete cds	-1.074
48	up	Hs.81469	nucleotide binding protein 1 (E.coli MinD like) (NUBP1), mRNA	1.722
		Hs.35937	myogenic factor 6 (herculin) (MYF6), mRNA	1.36
		Hs.303649	small inducible cytokine A2 (monocyte chemotactic protein 1, homologous to mouse Sig-je) (SCYA2), mRNA	1.357
		Hs.2962	S100 calcium-binding protein P (S100P), mRNA	1.205
		Hs.250773	signal sequence receptor, alpha (translocon-associated protein alpha) (SSR1), mRNA	1.1
	down	Hs.29287	retinoblastoma-binding protein 8 (RBBP8), mRNA	-1.608
		Hs.45719	CAAX box protein TIMAP mRNA, complete cds	-1.373
		Hs.728	ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin) (RNASE2), mRNA	-1.261
		Hs.928	proteinase 3 (serine proteinase, neutrophil, Wegener granulomatosis autoantigen) (PRTN3), mRNA	-1.257
		Hs.76305	surfactant, pulmonary-associated protein B (SFTPB), mRNA	-1.255
72	up	Hs.211577	kinectin 1 (kinesin receptor) (KTN1), mRNA	1.97
		Hs.153648	protein tyrosine phosphatase, receptor type, I polypeptide (PTPRF), interacting protein (luprin), alpha 4	1.872
		Hs.49015	chromosome 21 open reading frame 35	1.76
		Hs.78601	uroporphyrinogen decarboxylase (UROD), mRNA	1.712
		Hs.252189	syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan) (SDC4), mRNA	1.679
	down	Hs.178452	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1 (102kD) (CTNNA1), mRNA	-2.477
		Hs.77028	protein translocation complex beta (SEC61B), mRNA	-2.262
		Hs.76305	surfactant, pulmonary-associated protein B (SFTPB), mRNA	-1.985
		Hs.728	ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin) (RNASE2), mRNA	-1.899
		Hs.1572	faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) (FGD1), mRNA	-1.836

Table 2. Classification of functional group and gene expression ratio (fold change).

biological process	Gene name	6h	12h	24h	48h	72h
cell cycle	cyclin T2	1.40	0.87	1.33	1.08	1.23
	kinesin-like 5	1.08	1.17	1.06	0.88	0.82
	retinoblastoma-binding protein 8	0.93	0.90	0.57	0.33	0.76
	cell division cycle 2	1.42	1.06	1.23	1.07	1.06
	centromere protein F	1.19	0.98	0.86	0.51	0.50
	MAD2 (yeast), homolog	1.27	1.09	1.06	0.92	0.90
	activator of S phase kinase	1.12	0.93	0.89	0.79	0.74
	Nijmegen breakage syndrome 1	NE	0.94	1.29	1.36	1.54
	CDC28 protein kinase 2	1.09	1.05	0.98	0.72	0.77
	cell proliferation & apoptosis	mature T-cell proliferation 1	0.90	0.82	0.77	1.11
proteinase 3		1.37	1.08	1.01	0.42	0.40
mouse double minute 2, transcript variant 2		0.62	0.69	0.89	1.05	1.25
interleukin 11		0.65	0.76	0.77	1.08	1.31
DNA fragmentation factor, 45 kD, alpha		0.81	0.76	1.00	1.09	1.23
programmed cell death 5		1.01	1.10	1.14	0.79	0.92
myxovirus resistance 1, homolog of murine		1.31	0.78	1.02	1.10	1.25
serine/threonine kinase 17a		0.93	0.92	NE	0.42	0.52
mRNA for KIAA1230 protein, partial cds		1.27	1.04	0.84	1.00	0.77
cell adhesion		contactin 1	0.98	0.91	0.95	1.01
	integrin, alpha M	0.83	0.87	1.12	0.91	1.19
	integrin, alpha 6	1.54	0.93	0.99	0.95	2.37
	pancreatitis-associated protein	1.49	1.00	1.18	0.95	0.85
	cadherin 13, E-cadherin (heart)	0.87	0.93	0.98	1.94	1.20
	zyxin	0.75	1.01	0.85	1.04	1.63
	collagen, type I, alpha 1	0.39	0.58	0.73	1.04	1.22
	selectin L	0.60	0.64	1.31	0.98	1.52
	collagen, type I, alpha 1	0.80	0.70	0.79	1.12	1.42
	connective tissue growth factor	0.83	1.03	0.88	0.94	1.25
cytoskeleton	opco-binding protein	0.63	0.72	0.81	0.88	0.81
	tubulin, gamma 1	1.06	1.05	0.66	0.87	0.79
	mRNA: cDNA DKFZp586G1721	1.23	0.64	0.87	0.93	1.38
	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1	1.23	0.82	1.04	0.79	0.73
	dihydropyrimidinase-like 4	0.74	1.06	0.84	1.25	1.68
	bagpipe homeobox (Drosophila) homolog 1	1.21	0.90	1.09	0.79	0.68
	B-cell CLL	0.51	0.63	0.52	1.10	1.37
	Sam68-like procholesterol protein, T-STAR	1.72	1.38	0.80	0.64	0.44
	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	0.67	0.62	0.93	1.25	1.42
	EphB4	1.25	1.03	0.71	0.47	NE
development	facogenital dysplasia	1.51	1.06	0.76	0.47	0.28
	nuclear localization signal deleted in velocardiofacial syndrome	1.15	0.83	0.87	0.81	0.70
	neurogranin	0.56	0.93	0.58	1.10	1.35
	BMX non-receptor tyrosine kinase	1.35	1.34	NE	0.90	1.08
	Rho guanine nucleotide exchange factor 5	0.64	0.59	0.86	1.13	2.11
	myogenic factor 6	0.62	NE	1.13	2.57	0.94
	zinc finger protein 145	1.07	1.23	0.81	1.08	1.13
	kinesin family member 3A	1.31	1.40	0.79	0.78	0.44
	proline arginine-rich and leucine-rich repeat protein	1.44	0.90	1.11	0.80	0.93
	tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains	0.83	1.16	0.77	1.82	2.22
	EEN-B2-L4	0.51	0.91	0.82	0.86	0.96
	chromosome 21 derived BAC containing erythroblastosis virus oncogene homolog 2 protein	1.16	0.89	1.06	0.84	0.78
	zinc finger protein 261	0.98	0.89	0.83	0.83	0.70
	distal-less homeobox 5	0.51	NE	0.62	1.31	1.19
	epimorphin	0.90	1.14	0.82	0.98	1.18

Baicalin을 처리한 HL-60 백혈병 세포주에서 대규모 유전자 분석 발현 연구

biological process	Gene name	6h	12h	24h	48h	72h
DNA metabolism	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	1.24	1.26	NE	0.61	0.63
	telomerase reverse transcriptase	0.72	0.82	0.87	1.03	1.07
	telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1	0.70	0.82	0.92	1.29	1.38
	proliferating cell nuclear antigen	1.35	0.98	1.10	0.73	0.71
	primase, polypeptide 1 (49kD)	0.72	0.77	0.86	1.00	1.22
	C-terminal binding protein 2, transcript variant 2	0.67	0.61	0.76	1.06	1.09
defense response	CD48 antigen	0.49	0.88	0.85	1.29	1.09
	SH3-domain GRB2-like 1	NE	1.01	0.86	0.96	0.46
	interferon consensus sequence binding protein 1	1.88	0.90	1.43	0.87	0.83
	transcription factor 7	0.57	0.62	0.67	1.06	0.95
	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	2.13	1.43	1.07	0.88	0.95
	general transcription factor IIF, polypeptide 2	0.78	0.83	0.71	0.99	1.07
	Fc fragment of IgG, low affinity IIA	0.84	0.75	0.81	1.04	0.88
metabolism	pancreatic lipase	1.03	1.36	1.00	1.02	1.08
	peroxisome proliferative activated receptor, delta	1.10	1.04	1.03	0.87	0.73
	sterol regulatory element binding transcription factor 2	0.87	NE	0.60	1.08	1.02
	fatty-acid-Coenzyme A ligase, very long-chain 1	0.74	0.84	0.87	0.98	1.11
	phospholipase A2, group VI	0.81	0.81	1.00	1.37	1.58
	glyceronephosphate O-acyltransferase	1.09	1.28	1.04	0.88	0.93
	retinol dehydrogenase	0.75	0.82	0.81	0.86	1.04
	apolipoprotein E	1.28	0.77	1.15	0.50	0.55
	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, type I	1.15	1.09	0.96	0.95	0.81
	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	1.00	0.67	1.00	0.70	NE
	Human inositol polyphosphate 5-phosphatase	0.64	0.79	0.85	1.27	1.34
	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	2.40	1.84	NE	1.12	1.19
	retinoid X receptor, alpha	0.95	0.92	1.01	1.44	1.19
	aspartyl aminopeptidase	0.76	0.78	0.87	1.06	1.11
	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4	0.91	0.85	0.93	0.95	1.03
	mRNA for KIAA1665 protein, partial cds	0.95	0.98	0.91	1.48	1.89
	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase (PTGIS), mRNA	0.51	1.09	0.92	1.30	1.28
	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1	1.36	1.07	1.18	0.83	0.77
	isocitrate dehydrogenase 2, nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.84	0.90	1.01	0.90	1.03
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9	1.18	0.83	0.99	0.76	0.72	
F-box only protein 7	1.07	1.03	0.88	1.06	0.86	
deoxycytidine kinase	0.82	0.75	0.89	NE	1.06	
ribonuclease, RNase A family, 2	1.10	0.87	0.72	0.42	0.27	
signal recognition particle 9kD	1.14	1.04	0.97	0.76	0.71	
transaldolase 1	1.03	0.92	1.00	0.89	1.06	
phosphorylase kinase, beta	0.80	0.81	0.91	1.08	0.98	
NADH dehydrogenase Fe-S protein 5	1.24	1.05	0.99	0.77	0.65	
neutrophil cytosolic factor 2	0.61	1.03	0.79	1.31	1.09	

biological process	Gene name	6h	12h	24h	48h	72h
	mRNA: cDNA DKFZp434H068	1.37	0.93	0.91	0.90	0.82
	frizzled (Drosophila) homolog 6	NE	1.29	2.05	1.62	1.37
	diacylglycerol kinase, delta	0.85	1.07	1.42	0.84	0.77
	dishevelled 2 (homologous to Drosophila dsh)	0.69	1.00	0.62	0.90	1.17
	glycoprotein hormones, alpha	0.95	0.96	1.05	0.87	2.39
	killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 1	0.62	0.82	0.83	1.13	1.36
	tumor protein p53-binding protein, 1	0.58	2.48	1.76	0.73	1.03
	prostaglandin E receptor 4	2.11	1.07	1.09	0.78	0.79
	egf-like module containing mucin-like, hormone receptor-like sequence 1	0.59	0.62	0.81	1.20	1.25
	RAV binding protein 1	1.14	0.93	1.43	0.79	0.69
signal transduction	opiate receptor-like 1	1.16	0.92	1.31	1.10	2.04
	guanine nucleotide binding protein 4	0.63	0.61	0.71	1.18	1.31
	G protein-coupled receptor	NE	1.23	1.24	1.24	2.19
	tumor protein p53-binding protein 2	0.69	0.97	0.82	0.97	1.13
	GTP-binding protein ragB, transcript variant RAGBI	1.54	0.89	1.05	0.84	0.77
	mitogen-activated protein kinase 12	0.81	1.34	1.07	1.23	1.17
	tyrosine 3-monooxygenase	1.28	1.00	1.07	0.72	0.70
	RAD52 (S. cerevisiae) homolog	NE	0.66	1.31	0.98	0.92
	TEK tyrosine kinase, endothelial	0.71	0.97	0.91	1.25	1.04
	EphA1	NE	0.72	1.21	NE	1.01
	guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 2	0.62	0.69	0.84	0.93	1.14
	guanylate cyclase 2C	0.78	0.96	0.92	1.23	1.46
	homo sapiens, clone MGC:21511, IMAGE:2958945, mRNA, complete cds	1.33	0.99	1.26	0.94	0.71
	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 5	1.25	1.10	0.91	0.72	0.83
	karyopherin (importin) beta 2	1.01	1.19	0.86	0.85	0.63
	nucleoporin 88kD	0.44	1.06	0.67	0.98	1.18
	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	0.64	0.86	0.85	1.22	1.25
	chloride channel 4	0.85	0.51	0.90	1.04	1.24
	translocase of inner mitochondrial membrane 17 (yeast) homolog A	1.33	0.85	0.79	0.65	0.61
	kinectin 1	1.28	1.06	1.07	1.06	3.92
	nucleoporin 155kD	1.29	1.18	1.31	0.81	0.80
	karyopherin alpha 6	0.70	0.83	0.86	1.29	1.46
transport	ATP-binding cassette, sub-family C	1.51	0.93	0.99	1.11	1.02
	tocopherol transfer protein	0.62	0.73	0.70	1.04	NE
	syntaxin 1A (brain)	0.49	NE	0.70	1.46	1.17
	coatamer protein complex, subunit beta 2	1.17	1.00	1.04	0.71	0.69
	surfactant, pulmonary-associated protein B	1.10	0.94	0.52	0.42	0.25
	Niemann-Pick disease, type C1	0.82	1.03	0.82	0.61	0.49
	exportin 1 (CRM1, yeast, homolog)	1.28	1.09	1.07	0.80	0.73
	ryanodine receptor 1 (skeletal)	1.00	1.01	1.00	1.02	1.23
	gamma aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 4	1.14	0.97	0.76	0.80	0.74
	hypothetical protein	0.69	0.89	0.70	1.20	1.35
	apolipoprotein A-IV	1.21	1.15	0.45	0.96	1.03

Cell proliferation에서는 elastin, fibronectin, laminin, vitronectin, collagen type I, II, IV를 분해하는 백혈구 serine protease인 proteinase 3가 48시간에서 72시간에 2.5배 감소하였다. 이 단백질은 혈액에서 높은 발현을 하고 세포증식에 관여하고 있다¹⁵⁻¹⁶. Cell proliferation을 억제하는 LHRH는 72h에서 2배 감소하였고 oncogenesis에 관여하는 Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog (FGR)는 6h에 2배 증가했다. DNA replication에서는 replication protein A3 (14kD) (RPA3)가 6h에서 2배 증가했고 origin recognition complex, subunit 3 (yeast homolog)-like (ORC3L)이 12h에서 5.2배 감소했다. Apoptosis와 관련된 유전자에서는 태반에서 높게 발현되고 심장, 폐, 근육, 신장등에서는 발현이 낮고 apoptosis를 유도하는¹⁷ serine/threonine kinase 17a가 48h에 2.3배 감소했고 72h에는 1.9배 감소했다. Signal transduction에서는 p53과 연관된 전사촉진인자인¹⁸ tumor protein p53-binding protein, 1이 12h에서 2.4배 증가했다.

최근 유전자 연구에서 대규모 유전자 발현 분석을 위한 강력한 도구로서 DNA chip (microarray)이 각광을 받고 있다. 수 천 번의 quantitative RT-PCR 또는 Northern blot을 한 것과 같은 효과를 가지고 있어 유전자 발현 연구에 시간과 효율의 극대성을 가지고 있어, drug discovery와 같이 drug의 생체내의 유전자 발현 및 조절에 대한 연구에 사용되고 있어 한약의 효능 연구에도 좋은 도구라 생각된다. 본 연구결과에서는 HL-60 세포주에 baicalin을 처리하여 다양한 유전자의 발현이 증가되고 일부는 감소되는 것으로 나타났다. Baicalin을 처리 후 암과 관련된 유전자 발현을 기능별로 관련된 여러 가지 신호기전의 발현의 증감을 관찰할 수 있어 baicalin의 항암효과를 연구할 수 있는 기반을 제공하여 동물에서의 항암효과에서도 활용할 수 있으리라 생각된다.

결 론

본 연구는 황금으로부터 추출된 baicalin의 항암 효과와 그 기전을 파악하기 위하여 급성백혈병 세포주인 HL-60 세포에 baicalin을 처리하고 여러 시간대별로 유전자 발현을 조사하였다. 유전자발현 조사 도구로 대규모 유전자 발현을 검색할 수 있는 cDNA chip을 이용하였다. 암의 억제와 관련된 유전자들의 발현이 증가하고 암세포의 증식을 활성화시키는 유전자들의 발현이 억제되는 것을 관찰 할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 한방치료연구개발사업 (02-PJ9-PG1-CO05-0003)의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

1. 양재현, 김동수, 박현구, 이남희. Baicalin 함유생약의 제제화 및 생체이용률 (제1보) : 황금 및 황련 공침물의 확인 및 물

- 리화학적 성질. J. Kor. Pham. Sci. vol.24. No. 4. 233-243, 1994.
- Ikezoe T, Chen SS, Heber D, Taguchi H, Koeffler HP. Baicalin is a major component of PC-SPEs which inhibits the proliferation of human cancer cells via apoptosis and cell cycle arrest. *Prostate* 49(4), 285-92, 2001
 - Ding XZ, Kuszynski CA, El-Metwally TH, Adrian TE. Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 266(2), 392-9, 1999.
 - Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Takabayashi A, Yamaoka Y, Yodoi J. Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. *Mol Immunol*. 38(10), 781-91, 2002.
 - Wu X, Akatsu H, Okada H. Apoptosis of HIV-infected cells following treatment with Sho-Saiko-to and its components. *Jpn J Med Sci Biol*. 48(2), 79-87, 1995.
 - Matsuda M, Masutani H, Nakamura H, Miyajima S, Yamauchi A, Yonehara S, Uchida A, Irimajiri K, Horiuchi A, Yodoi J. Protective activity of adult T cell leukemia-derived factor (ADF) against tumor necrosis factor-dependent cytotoxicity on U937 cells. *J Immunol*. 147(11), 3837-41, 1991.
 - Ciesielska E, Gwardys A, Metodiewa D. Anticancer, antiradical and antioxidative actions of novel Antoksyd S and its major components, baicalin and baicalein. *Anticancer Res*. 22(5), 2885-91, 2002.
 - Motoo Y, Sawabu N. Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines. *Cancer Lett*. 86(1), 91-5, 1994.
 - Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, Haramaki M, Ogasawara S, Momosaki S, Kojiro M. The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Res*. 54(2), 448-54, 1994.
 - Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botstein D. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(16), 9212-9217, 1999.
 - Su AI, Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, Dimitrov P, Lapp H, Schultz PG, Powell SM, Moskaluk CA, Frierson HF Jr, Hampton GM. Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res*. 61(20), 7388-93, 2001.
 - Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, Orth AP, Vega RG, Sapinoso LM, Moqrich A,

- Patapoutian A, Hampton GM, Schultz PG, Hogenesch JB. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(7), 4465-70, 2002.
13. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 403(6769), 491-2, 2000.
 14. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J Jr, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science.* 284(5421), 1775. 1999.
 15. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 286(5439), 531-7, 1999.
 16. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 24(3), 227-35, 2000.
 17. Sanjo H., Kawai T., Akira S. DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 29066-29071, 1998.
 18. Iwabuchi K., Li B., Massa H.F., Trask B.J., Date T., Fields S. Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2. *J. Biol. Chem.* 273, 26061-26068, 1998.
 19. Chan FL, Choi HL, Chen ZY, Chan PS, Huang Y. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. *Cancer Lett.* 160(2), 219-28, 2000.
 20. Chen S, Ruan Q, Bedner E, Deptala A, Wang X, Hsieh TC, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Effects of the flavonoid baicalin and its metabolite baicalein on androgen receptor expression, cell cycle progression and apoptosis of prostate cancer cell lines. *Cell Prolif.* 34(5), 293-304, 2001.
 21. Liu JJ, Huang TS, Cheng WF, Lu FJ. Baicalein and baicalin are potent inhibitors of angiogenesis: Inhibition of endothelial cell proliferation, migration and differentiation. *Int J Cancer.* 106(4), 559-65, 2003.