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

강봉주 · 차민호 · 전병훈[1] · 윤용갑[1] · 윤유식*

한국한의학연구원, 1 : 원광대학교 한의과대학

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

Bong-Joo Kang, Min-Ho Cha, Byung Hun Jeon[1], Yong Gab Yun[1], Yoo Sik Yoon*

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

Imperatorin, a biologically active furanocoumarin from the roots of Angelica dahurica (Umbelliferae), was mutagenic and induced transformation of mouse fibroblast cell lines, whereas it provided inhibiting effects on mutagenesis and carcinogenesis induced by various carcinogens. Furthermore, it has been suggested that imperatorin may have potential anticarcinogenic effects when administered orally in the diet. In addition to its anticarcinogenic properties, imperatorin has been shown to possess anticancer activities. We investigated the macro scale gene expression analysis on the HL-60 cells treated with imperatorin. Imperatorin (10 μM) were used to treat the cells for 6h, 12h, 24h, 48h, and 72h. In a human cDNAchip study of 10,000 genes evaluated 6, 12, 24, 48, 72 hours after treated with imperatorin in HL-60 cells. Hierarchical cluster against the genes which showed expression changes by more than 2 fold. Three hundred eighty six genes were grouped into 6 clusters by a hierarchical clustering algorithm. Pathway analysis using gene microarray pathway profiler that is a computer application designed to visualize gene expression data on screen representing biological pathways and groupings of genes.

Key words : imperatorin, microarray, gene expression, pathway analysis, HL-60

서 론

백지(白芷)는 우리나라의 산에 자생하는 다년생초본인 구릿대 Angelica dahurica Bentham. et Hooker의 꽃대가 나기 전에 채취한 굵은 뿌리를 말린 것으로 한방에서 진정, 진통, 지혈 및 정혈제로 감기, 두통, 안면신경통, 치통, 산전산후의 혈뇨, 하혈등을 치료하는데 배합되는 주요 한약재이다[1]. 백지에 함유되어 있는 furanocoumarin의 일종인 imperatorin은 항암작용을 가지고 있어[2] 여러 다양한 암세포주에서 증식을 억제하고[3] 인간 백혈병 세포주에서 분화를 유도한다[4] 그리고 암세포주에 대한 세포사의 기전은 apoptosis와 관련 있는 것으로 보고되었다[5-7].

DNA chip을 이용한 유전자발현 검색기술은 많은 수의 유전자의 발현 검색을 비약적으로 발전시켜 의학분야에서 최첨단 도구로서 인체 유전자 기능분석 연구, 실험용 동식물 모델연구, 암 및 질병관련 유전자 진단, 유전자치료, 신약개발등 분야에서 활용하고자 연구되고 있다. 현재까지 한약의 효과 연구에서는 주로 생리 · 생화학적 관점에서 연구가 진행되었으나, 지금은 bioinfomatics의 발달로 수만개의 유전자를 한번에 검색할 수 있어 한약효과에 대한 세포의 유전자의 발현 양상에 대해 연구할 수 있는 조건이 확립되어 다양한 복합물질로 이루어진 한약의 효과에 대해 분자생물학적 해석을 내릴 수 있게 되었다.

본 연구에는 imperatorin의 백혈병에 대한 항암 효과와 기전을 밝혀내고자 백지로부터 분리된 imperatorin을 HL-60 백혈병 세포주에 처리하여 작용기전을 DNA chip을 통해서 밝혀보고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포배양

사람 유래의 급성백혈병 세포주인 HL-60을 사용했고, 실험

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

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

· 접수 : 2004/05/28 · 수정 : 2004/06/29 · 채택 : 2004/07/21

실에서 37 ℃, 5 % CO_2 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 ㎍/ml streptomycin)와 배지 1 L당 $NaHCO_3$ 2 g을 첨가하여 제조하였다.

2. 시료의 처리

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

3. Total RNA 분리

Imperatorin을 HL-60 세포에 처리하여 시간대별로 세포들을 원심분리하여 모아, PBS로 2-3회 세척한 후, 6 x 10^6 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 ℃, 12,000 x g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. TRIreagent 1 ml 당 0.5 ml 부피의 isopropanol을 첨가 후 상온에서 5-10 분간 방치 후 4 ℃, 12,000 xg에서 8분간 원심분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 침전물에서 약 1 ml의 75 % ethanol을 첨가하고, 4 ℃, 7,500 xg에서 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물을 건조시켜 50 ㎕의 DEPC-water에 녹여 spectrophotometer에서 RNA농도와 A260/A280 비를 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 (gaiagene, 서울) 실험에 사용했다.

4. Microarray probing과 scanning

100 ㎍ total RNA (또는 2-5 ㎍의 mRNA)용액에 5 ㎍의 dt oligomer를 첨가하여 70 ℃에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 방치하였다. RNA용액에 2.5 ㎕의 Superscript II revers transcriptase (GibcoBRL,Gaithersburg, MD, USA), 10 ㎕의 5× reaction buffer, 5 ㎕의 DTT (0.1 M), 5 ㎕의 10 × dNTP 5 mM dATP, dCTP, dGTP,; 2 mM dTTP), 2 ㎕의 fluorescent nucleotide (최종농도 10 nM Cy3-dUTP or Cy5-dUTP)를 첨가하여 50 ㎕의 반응액을 만들어 37 ℃에서 2시간 반응시켰다. 이 반응액에 6 ㎕의 3 M NaOH를 첨가하여 65 ℃에서 30분 반응시켜 unlabeled RNA를 변성시켰다. 이 반응액에 30 ㎕의 1M Tris-HCl (pH7.5)와 12 ㎕의 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 solution들은 probe와 섞어 chamber에 넣어 50 ℃에서 16시간 hybridization 했다. 그리고 drain까지 마친 후 스캔은 GMS 418 스캐너 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)로 saturation이 안되는 범위내에서 cy3는 550-570㎚에서, cy5는 650-670㎚에서 적당한 PMT값으로 스캔하였다.

5. Bioinformatics data 분석

GMS 418 스캐너를 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 발현 비율(Cy3/Cy5비, red와 green의 intensity 비를 결정했다. 또한 housekeeping 유전자 및 yeast 유전자에 대하여 별도로 대조군과 실험군의 발현비율을 분석하여 실험에서 얻어진 data의 타당성 부여를 위한 상관계수를 구한다.

1) 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. k-mean clustering은 Bergen 대학의 J-express 1.1 프로그램을 사용하여 k-mean clustering하였다.

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.

3) Pathway analysis

Gene microarray pathway profiler 프로그램 GenMAPP (ver 1.0, Gladston institute)을 이용하여 세포수준에서 biological pathway에서 유전변화를 관찰하였다.

결 과

사람의 백혈병 세포주인 HL-60에 대한 imperatorin의 세포사작용기전을 알아보기 위하여 imperatorin 10 μM을 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 sopt들은 제거하고 lowess smoothing normalization하여 496개 gene을 data에 활용하였다. 그리고 496개중 EST와 아직 annotation이 되지 않은 것은 제외하고 적어도 1개가 2배이상 증감하고 80%이상 데이터가 남아있는 것을 추려내어 데이터

에 활용하였다.

1. Imperatorin 처리후 시간대별 유전자 증감

Imperatorin을 HL-60 세포주에 처리하고 6, 12, 24, 48, 72 시간이 경과 후 total RNA를 분리하여 cDNAchip으로 분석하였다. 6시간 경과 후 대조군에 비해 발현량이 2배 이상 증가 유전자들은 TIA1 cytotoxic granule-associated RNA-binding protein, acetylcholinesterase (YT blood group), potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9 (KCNJ9) 3개이고 2배 이상 발현량이 감소한 것은 general transcription factor IIH, polypeptide 1 (62kD subunit), potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M beta member 3 (KCNMB3) 2개의 유전자들이다. Imperatorin 처리하여 12시간 후 2배이상 발현량이 증가한 유전자는 없었고 protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 4와 RAP1A, member of RAS oncogene family가 증가하는 경향을 보였고 RAD52 (S. cerevisiae) homolog (RAD52) 유전자의 발현량이 2배이상 감소하였다. Imperatorin 처리하여 24시간 후 유전자들의 RNA 발현량이 2배이상 증가하는 유전자들은 acetylcholinesterase (YT blood group)를 포함한 12개이고 2배 이상 감소한 유전자들은 cysteine-rich protein 2 (CRIP2)를 포함한 21개의 유전자들이다. 48시간 경과하여 유전자의 발현량이 2배이상 증가한 유전자는 없고 kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase) 등이 증가하는 경향을 보였고 2배 이상 감소한 유전자들은 calcineurin-binding protein calsarcin-1을 포함한 5개의 유전이다. 72 시간 경과하여 2배 이상 증가한 유전자는 neurogranin (protein kinase C substrate, RC3) (NRGN)을 포함하여 219개의 유전자이고 2배이상 감소한 유전자는 proteinase 3 (serine proteinase, neutrophil, Wegener granulomatosis autoantigen) (PRTN3)를 포함한 156개의 유전자이다(Fig. 1).

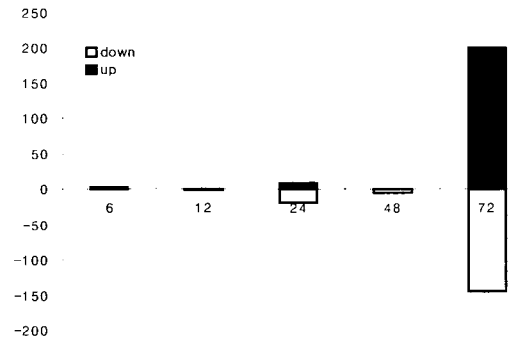


Fig. 1. Number of regulated genes at each time point. The number of genes that were up-regulated (solid bar) by at least two fold or down-regulated (open bar) by at least two fold at each time point are shown.

2. Clustering 분석

1) Hierarchical clustering 분석

Stanford 대학의 cluster 3.0과 Treeview프로그램을 활용하여 hierarchical clustering(average linkage)을 하여 node correlation 이 0.35~0.81 값사이에서 cluster를 결정하여 각 시간대별로 발현 pattern에 따른 분류로 6개의 cluster를 결정하였다 (Fig. 2).

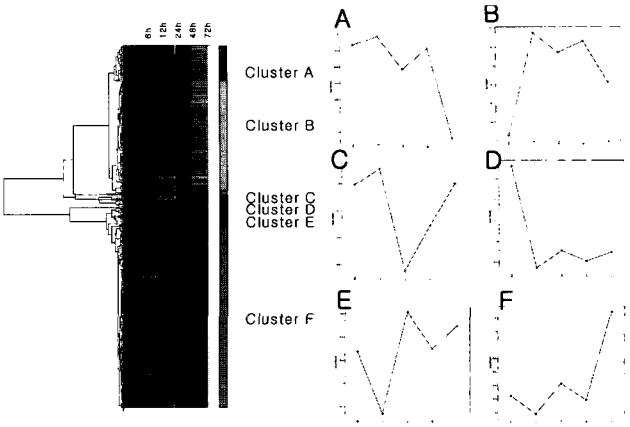


Fig. 2. Hierarchical cluster analysis of genes changing in imperatorin treated HL-60 cells. Hierarchical cluster against the genes which showed expression changes by more than 2 fold. 101 genes were grouped into 6 clusters according to their profile of expression by a hierarchical clustering algorithm.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

Cluster A는 72h에 발현이 감소하는 군으로 CUG triplet repeat, RNA-binding protein 1 (CUGBP1)외 35개 유전자가 포함되어 있고, cluster B는 H2A histone family, member Z (H2AFZ)외 116개 유전자가 포함되어 있고, cluster C는 general transcription factor IIH, polypeptide 1 (62kD subunit)외 1개 유전자가 포함되어 있고, cluster D는transcription factor NRF (NRF)외 11개의 유전자를 포함하고, cluster E는 low density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6)외 14개의 유전자를 포함하고, cluster F는 6-48h사이에 발현이 증가하는 경향을 보이며 72h에 발현량이 높고sulfotransferase- related protein (SULTX3)외 197개 유전자를 포함하고 있다 (Table 1).

Table 1. Classification of functional group and gene expression ratio (fold change).

Function	Gene name	6h	12h	24h	48h	72h
Apoptosis	programmed cell death 5 (PDCD5), mRNA	0.91	0.92	0.64	0.68	0.25
	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA-binding protein	2.04	NE	1.39	1.29	4.92
	myxovirus (influenza) resistance 1, homolog of murine	1.07	0.90	1.14	1.37	2.03
	serine	0.74	0.77	0.62	0.78	0.44
cell cycle	Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin) (NBS1), mRNA	1.02	1.24	1.00	0.76	3.61
	activator of S phase kinase (ASK), mRNA	0.79	1.02	0.69	0.86	0.40
	MAD2 (mitotic arrest deficient, yeast, homolog)-like 1	0.59	1.09	0.63	0.87	0.26
	kinesin-like 5 (mitotic kinesin-like protein 1)	0.77	0.87	0.68	0.79	0.48
	ribosomal protein S6 kinase, 70kD, polypeptide 2	1.19	1.19	0.83	1.00	2.27
	chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta)	0.87	0.88	0.68	0.67	0.49
	tumor protein p53-binding protein, 2	1.18	0.90	1.37	1.10	2.20
	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	0.69	0.98	0.65	0.79	0.38
	telomerase reverse transcriptase (TERT)	1.25	0.99	1.39	1.24	2.84

cell cycle	telomeric repeat binding factor (NIMA- interacting) 1, transcript variant 1	1.18	1.10	1.23	1.22	2.34
	cyclin T2	0.89	1.13	1.17	0.91	0.49
	centromere protein F	0.93	0.91	0.85	0.96	0.41
	general transcription factor IIH, polypeptide 2	1.28	0.97	1.74	1.33	3.26
signal transduction	guanylate cyclase 2C	1.07	1.10	1.37	1.06	2.23
	guanine nucleotide binding protein 4	1.56	0.97	1.79	1.31	5.33
	killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 1	1.59	1.09	1.75	1.33	2.40
	EEN-B2-L4	1.30	0.90	1.62	1.52	2.73
	mitogen-activated protein kinase 12	1.00	1.07	1.20	0.98	2.47
	epimorphin	1.09	1.12	1.34	1.30	2.17
	G protein, beta polypeptide 2	1.40	0.92	1.90	1.37	2.77
	dishevelled 2 (homologous to Drosophila dsh)	1.33	0.88	1.45	1.28	2.23
	tyrosine 3-monooxygenase	0.86	0.93	0.74	0.79	0.48
	Human inositol polyphosphate 5-phosphatase	1.18	1.02	1.39	1.10	3.16
	protein kinase C-like 2	0.73	0.99	0.54	0.80	0.42
	diacylglycerol kinase, delta (130kD)	0.80	1.18	0.72	0.97	0.47
	retinoic acid induced 3	1.22	0.74	1.39	0.97	3.02
	RAN binding protein 1	0.87	1.11	0.60	0.69	0.31
	GTP-binding protein ragB (RAGB), transcript variant	0.71	0.98	0.80	0.98	0.50
	TNFRSF1A modulator	1.61	0.93	0.81	0.87	2.04
	EphA7	0.84	1.30	0.42	0.95	1.31
	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 5	1.20	0.90	0.60	0.93	0.40
	gamma-aminobutyric acid A receptor, beta 1	0.98	1.06	0.76	0.92	0.38
	TEK tyrosine kinase, endothelial	1.24	0.98	1.37	1.20	2.14
	G protein-coupled receptor	1.18	1.35	1.41	1.32	2.62
oncogenesis	mouse double minute 2,	1.00	0.93	1.76	1.22	3.63
	B-cell CLL	1.13	1.00	1.89	1.40	2.83
	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	1.43	0.97	1.87	1.30	3.75
	Rho guanine nucleotide exchange factor 5	1.30	1.39	1.53	1.17	1.99
	deleted in bladder cancer chromosome region candidate 1	0.82	0.89	0.51	0.82	0.25
cell adhesion	contactin 1 (CNTN1), mRNA	1.31	1.01	1.42	1.49	2.19
	integrin, alpha M	0.89	0.95	1.19	1.18	0.48
	pancreatitis-associated protein, mRNA	0.92	1.03	0.71	0.98	0.36
	cadherin 13, H-cadherin (heart)	1.27	0.98	1.58	1.10	2.24
	zyxin (ZYX), mRNA	1.35	1.09	1.80	1.28	2.57
	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)	1.35	0.75	1.26	1.21	3.03
	nephrosis 1, congenital, Finnish type (nephrin)	1.39	0.94	1.90	1.32	2.84
	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1	1.21	0.92	1.47	1.25	3.77
	opioid-binding protein	0.93	1.02	1.37	0.97	2.51
	Rho GDP dissociation inhibitor alpha	0.86	1.00	0.64	0.69	2.81
cell motility & cytoskeleton	ryanodine receptor 1	1.20	1.19	1.41	1.20	2.07
	tubulin, gamma 1	0.98	0.89	0.66	0.93	0.50
	troponin C2, fast	0.98	1.04	0.95	0.96	0.48
	bagpipe homeobox (Drosophila) homolog 1	0.78	0.92	0.70	0.82	0.32
	proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein	0.73	1.11	0.86	0.81	0.31
	collagen, type II, alpha 1 transcript variant 1	1.25	0.89	1.74	1.06	5.34
	chromosome 21 derived BAC containing erythroblastosis virus oncogene	0.93	0.96	0.68	0.76	0.34
	distal-less homeo box 5	1.14	0.92	1.83	1.41	2.57
cell proliferation	mature T-cell proliferation 1	0.90	1.03	1.72	1.26	2.51
	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	0.93	1.02	0.71	1.14	0.48
	erythrocyte membrane protein band 4.1	1.42	1.13	1.72	1.25	3.34
	proliferating cell nuclear antigen	0.71	1.07	0.64	0.95	0.28
	faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome)	0.68	0.95	0.39	0.50	3.81
	interleukin 11	1.40	1.09	1.49	1.41	2.34
	proteinase 3	0.93	0.93	0.46	0.85	0.16
	C-terminal binding protein 2	1.26	0.88	1.70	1.45	2.25
	Human placenta mRNA for luteinizing hormone releasing hormone precursor	1.13	1.01	0.84	0.80	0.32
	CDC28 protein kinase 2	0.87	0.99	0.76	0.96	0.33
chromatin modeling	SWI	0.74	0.87	0.56	0.80	0.39
	histone deacetylase 5	0.91	1.20	0.68	0.79	0.39
	chromodomain helicase DNA binding protein 2	1.16	1.02	0.77	0.92	0.35
	DNA(cytosine-5-)-methyltransferase 1	0.90	0.92	1.00	0.93	0.46
	H-2K binding factor-2	1.23	0.95	1.57	1.16	4.32
	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog	1.18	1.01	1.74	1.21	4.10
	zinc finger protein	1.64	0.99	0.78	0.85	0.73
	enolase 1, alpha	1.05	0.90	0.84	1.02	0.38
immuno response	small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 21	0.85	0.94	0.67	0.85	0.44
	interferon consensus sequence binding protein 1	0.97	1.03	1.65	1.24	0.37
	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	1.36	1.14	1.89	1.57	3.13
	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor for (CD32)	1.17	1.00	1.50	1.39	2.67
transport	karyopherin alpha 6	1.38	1.07	1.79	1.32	3.49
	karyopherin (importin) beta 2	0.96	1.07	0.64	0.76	0.45
	chloride channel 4	1.16	1.04	1.31	1.16	3.06
	coatomer protein complex, subunit beta 2	1.07	1.03	0.73	0.85	0.45
	ATP-binding cassette, sub-family C	1.20	0.94	1.09	0.86	2.02
	syntaxin 1A	1.35	1.00	1.57	1.59	2.75
	nucleoporin 88kD	0.96	0.83	1.03	0.83	3.91
	nucleoporin 155kD	0.84	0.93	0.65	0.72	0.33
	exportin 1	0.73	0.90	0.69	0.85	0.44
	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	1.43	0.94	1.52	1.29	4.06
metabolism	transaldolase 1	0.92	0.93	1.02	1.00	2.03
	glyceronephosphate O-acyltransferase	0.90	0.94	1.13	0.96	0.38
	phosphorylase kinase, beta	1.35	1.08	1.46	1.28	2.04
	ubiquitin specific protease 11	1.16	0.92	0.85	1.04	2.15
	sterol regulatory element binding transcription factor 2	1.12	1.00	1.56	1.01	2.42
	retinol dehydrogenase	1.25	0.99	1.46	1.20	2.23
	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, type II	1.08	0.87	0.96	0.94	0.48
	phospholipase A2, group VI	1.03	0.82	1.28	1.11	2.18
	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1.01	1.36	1.16	1.15	1.40
	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	1.40	1.04	1.31	1.24	2.77
	phosphatidic acid phosphatase type 2B	0.90	1.00	0.50	0.66	0.63
	stromal cell-derived factor 2	0.73	0.92	0.49	0.62	0.55
	mannosidase, beta A, lysosomal	1.05	0.99	0.73	0.91	0.38
	ubiquitin carrier protein	0.80	0.90	0.64	0.76	0.39
	protein disulfide isomerase related protein	1.17	0.99	0.67	0.85	2.48
	tocopherol (alpha) transfer protein	1.31	1.02	1.84	1.17	2.52
	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1	0.79	1.13	0.85	1.20	0.37

	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	1.26	1.00	1.33	1.05	2.01
	neutrophil cytosolic factor 2	0.88	0.95	1.12	1.07	2.20
	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9	1.16	0.92	0.62	0.72	0.45
	pancreatic lipase	0.91	1.07	0.86	0.85	0.50
	F-box only protein 7	1.11	0.92	0.95	1.25	0.46
metabolism	fatty-acid-Coenzyme A ligase, very long-chain 1	1.32	0.89	1.40	1.44	2.24
	retinoid X receptor, alpha	0.89	0.86	0.96	0.83	2.00
	aspartyl aminopeptidase	1.58	0.88	1.41	1.25	2.44
	signal recognition particle 9kD	0.76	0.88	0.80	0.92	0.43
	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4	1.02	0.89	1.29	0.89	2.02
	translocase of inner mitochondrial membrane 17 (yeast) homolog A	0.75	0.98	0.58	0.72	0.50

2) k-mean clustering

Bergen 대학의 J-express 1.1 프로그램을 사용하여 k-mean clustering하고, 각 발현 profile이 잘 나눠지는 9 (cluster A~I)개의 cluster로 구분하였고 각 시간대별로 발현증감에 따른 유전자 cluster들을 Table 2에 구분하여 그래프로 나타내었다(Fig. 3).

Table 2. Gene list of hieraarchical clustering.

Cluster	No	Gene name
Cluster A	35	CUG triplet repeat, RNA-binding protein 1 (CUGBP1), peroxisome proliferative activated receptor, delta (PPARD), enolase 1, (alpha) (ENO1),FLN29 gene product (FLN29), etc.
Cluster B	116	H2A histone family, member Z (H2AFZ), KIAA0605 gene product (KIAA0605), transmembrane 9 superfamily member 1 (TM9SF1), activator of S phase kinase (ASK), etc.
Cluster C	2	general transcription factor IIH, polypeptide 1 (62kD subunit), potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M beta member 3 (KCNMB3)
Cluster D	11	transcription factor NRF (NRF), cysteine-rich protein 2 (CRIP2), calcineurin-binding protein calsarcin-1 mRNA, nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4, etc.
Cluster E	14	low density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6), retinoid X receptor, alpha, glycine-N-acyltransferase (GLYAT), nuclear gene encoding mitochondrial protein, etc.
Cluster F	197	sulfotransferase-related protein (SULTX3), acetylcholinesterase (YT blood group), v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS), etc.

Table 3. Gene list of k-means clustering.

Cluster	No.	Gene name
Cluster A	50	interleukin 17 receptor (IL17R), KIAA0535 gene product (KIAA0535), Human clone CE29 7.2 (CAC)n, PIBF1 gene product,, etc.
Cluster B	76	znc finger protein (LOC51042), chloride intracellular channel 4 solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 2, etc.
Cluster C	67	,FLN29 gene product (FLN29), deleted in bladder cancer chromosome region candidate 1 (DBCCR1), etc.
Cluster D	25	jun B proto-oncogene (JUNB), eosinophil peroxidase (EPX),etc.
Cluster E	82	epididymal secretory protein (19.5kD) (HE1), tumor protein p53-binding protein, 2 (TP53BP2), etc.
Cluster F	17	stromal cell-derived factor 2 (SDF2), CAAX box protein TIMAP, dihydrolipoamide branched chain transacylase, etc.
Cluster G	42	tyrosine aminotransferase (TAT), nuclear gene encoding mitochondrial protein, glyceronephosphate O-acyltransferase (GNPAT),etc.
Cluster H	73	hypothetical gene supported by AF038182; BC009203 (LOC90355), protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), etc.
Cluster I	56	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 5 (NEDD5),ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1, etc.

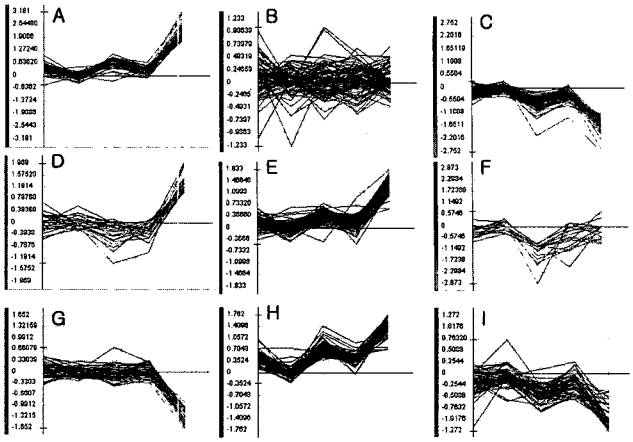


Fig. 3. K-mean clustering. Genes which were present > 50% and had absolute value >= 0.7 in at least one observation

3. 기능별 유전자 발현

발현 검색에 사용한 chip의 유전자들은 EASE(http://apps1.niaid.nih.gov/DAVID)를 활용하여 Gene ontology 분석하였다. 6,500개 유전자중에 유의성 있게 증감한 유전자는 496개이고, 각 시간대별로 2배이상 증감한 유전자들을 선택하여 기능적 분류에 따른 유전자 그룹으로 분리하였다. EASE 프로그램에서 http://apps1.niaid.nih.gov/david/ease2.asp에 접속하여 biological process항목으로 분류하였고 가장 많은 유전자들이 변화된 24시간대와 72시간대를의 유전자들을 분류하였다(Fig. 4).

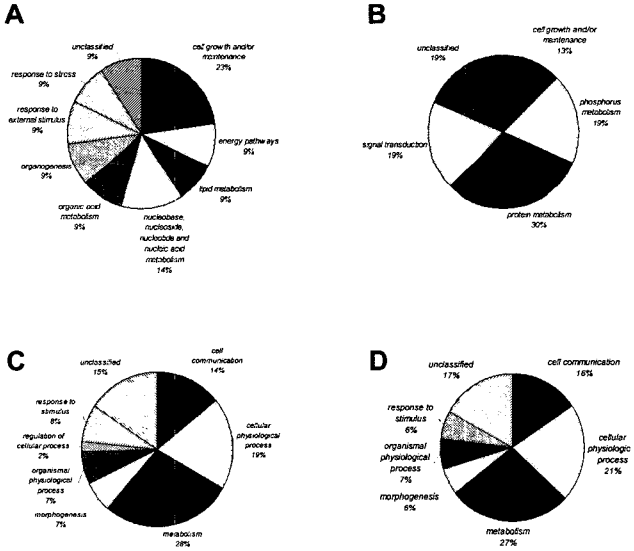
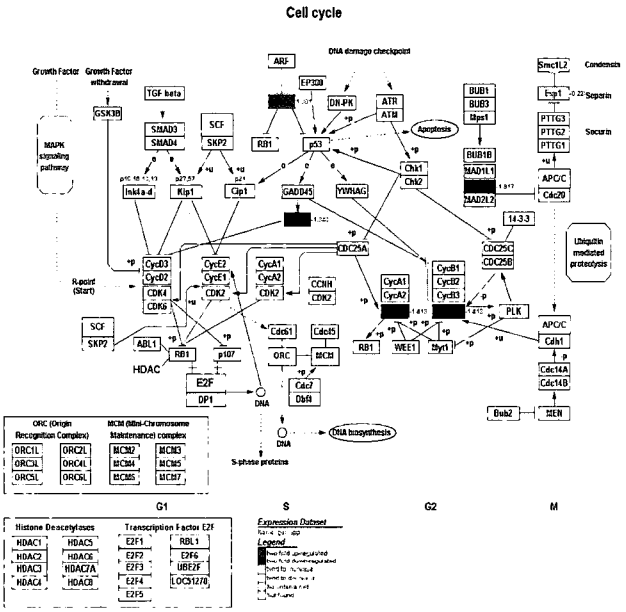


Fig. 4. Genes differentially expressed in imperatorin treated HL-60 cells. Pie charts of functional grouping of significant Gene Ontology (GO) terms. (A) upregulated cluster (24h), n=12 GO terms. (B) downregulated cluster (24h), n=21 GO terms. (C) upregulated cluster (72h), n=219 GO terms. (D) downregulated cluster (72h), n=156 GO terms.

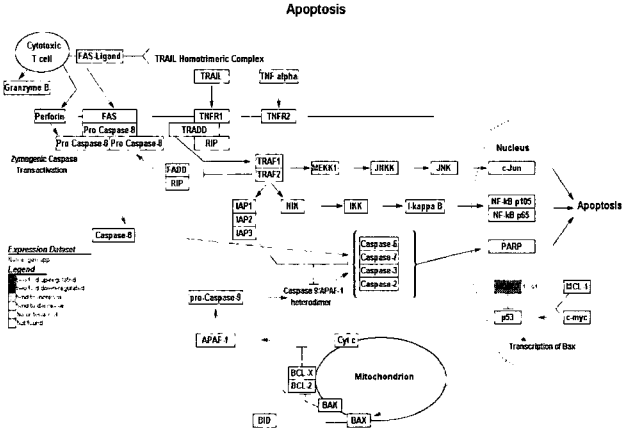
4. 경로분석 (Pathway analysis)

Gene microarray pathway profiler 프로그램 GenMAPP (ver 1.0, Gladston institute)을 이용하여 세포수준에서 biological pathway에서 유전변화를 관찰하였다. 경로 분석 (Pathway analysis) 연구에서 사람 유전자는 현재까지 밝혀진 경로가 51개

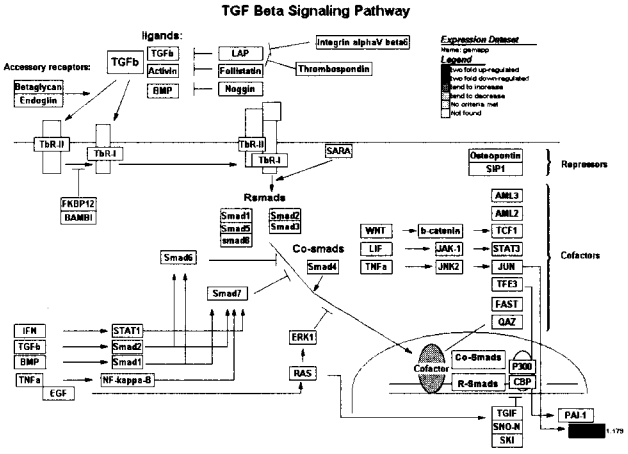
가 있으며 본 연구에서는 imperatorin에 의하여 발현이 변화되는 유전자들이 어떠한 경로로 변화되는지를 살펴보기 위하여 imperatorin을 투여한 결과를 모두 51개의 경로에 대입시켜 보았고 암과 관련된 경로들, 즉 세포 주기 (cell cycle) 경로, apoptosis 경로, TGF-beta 신호 (TGF-beta signaling) 경로를 조사하였다. Cell cycle pathway에서는 CDK1 그리고 MAD2L1 (checkpoint protein MAD2A)가 72시간에 발현이 감소되었다. Apoptosis pathway에서는 MDM2가 imperatorin 처리 후 72시간에서 발현이 증가하였다. TGF signaling pathway에서는 c-fos가 24시간과 72시간에 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5).



Gene name	time(h)	fold change (log_2 ratio)
MAD2L1	6	-0.7526
	12	0.1288
	24	-0.674
	48	-0.198
	72	-1.917
CDK1	6	-0.5449
	12	-0.03006
	24	-0.6164
	48	-0.3342
	72	-1.413



Gene name	time(h)	fold change (log_2 ratio)
MDM2	6	-0.003032
	12	-0.1055
	24	0.8121
	48	0.2846
	72	1.861



Gene name	time(h)	fold change (log_2 ratio)
c-fos	6	0.2195
	12	-0.2849
	24	1.147
	48	0.4377
	72	1.179

Fig. 5. Pathway analysis (cell cycle, apoptosis, TGF beta signaling pathway) using genechip pathway profiler that is a computer application designed to visualize gene expression data on screen representing biological pathways and groupings of genes.

고 찰

백지로부터 추출된 imperatorin은 apoptosis에 의한 항암작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있어 HL-60 사람 백혈병 세포주에서 imperatorin이 대규모 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 DNA chip을 사용하였다. 많은 유전자들 중에서 암과 관련이 있는 유전자들의 발현을 중심으로 조사하였고 전체적인 유전자 발현이 어떤식으로 이루어지는지를 살펴보았다.

Apoptosis에 관련된 유전자들 중에서 암세포에서 apoptosis가 진행중일때 발현량이 증가되는[8] TF-1 cell apoptosis related gene-19 protein이라고도 불리우는 programmed cell death 5 (PDCD5)는 72시간에서 4배 발현량이 감소했다. 그리고 RNA binding protein으로 lymphocyte의 apoptosis와 관련되어 있는[9] TIA1 cytotoxic granule-associated RNA-binding protein은 72시간에서 4.9배 발현량이 증가했다. Apoptosis에서 positive regulator 작용을 하는[10] Serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing)은 72시간에서 2.27배 감소했다. 세포주기 (cell cycle)에 관련된 유전자들인 Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin) (NBS1), ribosomal protein S6 kinase, 70kD, polypeptide 2, tumor protein p53-binding protein, 2, telomerase reverse transcriptase (TERT), telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1, general transcription

factor IIH, polypeptide 2 등이 72시간에서 발현량이 2.2배~3.6배까지 증가했고 activator of S phase kinase (ASK), MAD2 (mitotic arrest deficient, yeast, homolog)-like 1, kinesin-like 5 (mitotic kinesin-like protein 1), chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta), cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M, cyclin T2, centromere protein F 등의 유전자들이 72시간에서 2.0~3.8배 감소했다. Oncogenesis에 관련된 mouse double minute 2, B-cell CLL, myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2, Rho guanine nucleotide exchange factor 5등 대부분 oncogenesis에 관련된 유전자들이 72시간에서 발현이 증가되었다. 이는 imperatorin이 돌연변이 성질을 가지고 있어 일부 세포에서 변이를 유발하는 것[11,12]과 관련된다고 보여진다.

경로분석 (pathway analysis)을 통해서 cell cycle pathway에서는 DNA polymerase delta와 관련된 DNA replication에 관여하는 PCNA[14] 와 cell cycle S단계에서 제어기능을 담당하는 CDK1[15] 그리고 MAD2L1(checkpoint protein MAD2A)가 72시간에 발현이 감소되었다. Apoptosis pathway에서는 p53 관련된 cell cycle arrest를 억제하는[13] MDM2가 OLTs-1처리후 72시간에서 발현이 증가하였다. TGF signaling pathway에서는 G0/G1 스위칭을 조절하는[16] protooncogene인 c-fos가 24시간과 72시간에 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 3).

본 연구결과에서는 HL-60 세포주에 imperatorin을 처리하여 암과 관련된 다양하고 많은 유전자들의 발현 증감을 관찰할 수 있었고 apoptosis, cell cycle등과 같이 암세포의 증식 또는 세포사에 밀접한 관계가 있는 기전에서 중요 유전자들의 변화를 추후 연구에서는 real time PCR을 통해서 chip 데이터에 대한 확인 작업을 통해서 보다 더 확실한 기전에 대한 설명을 할 수 있으리라 생각된다.

결 론

본 연구는 백지로부터 추출된 imperatorin의 항암 효과와 그 기전을 파악하기 위하여 급성백혈병 세포주인 HL-60 세포에 imperatorin을 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 복건복지부의 한방치료연구개발사업(02-PJ9-PG1-CO05-0003)의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

1. 김현수, 지형준 Angelica속 생약의 정유성분에 관한 연구(III), 생약학회지, 21(2):121-125, 1990.
2. Kleiner HE, Vulimiri SV, Miller L, Johnson WH Jr, Whitman CP, DiGiovanni J. Oral administration of naturally occurring coumarins leads to altered phase I and II enzyme activities and reduced DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons in various tissues of SENCAR mice. Carcinogenesis. 22(1):73-82, 2001.
3. Kawaii S, Tomono Y, Ogawa K, Sugiura M, Yano M, Yoshizawa Y, Ito C, Furukawa H. Antiproliferative effect of isopentenylated coumarins on several cancer cell lines. Anticancer Res. 21(3B):1905-11, 2001.
4. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Effect of coumarins on HL-60 cell differentiation. Anticancer Res. 20(4):2505-12, 2000.
5. Pae HO, Oh H, Yun YG, Oh GS, Jang SI, Hwang KM, Kwon TO, Lee HS, Chung HT. Imperatorin, a furanocoumarin from Angelica dahurica (Umbelliferae), induces cytochrome c-dependent apoptosis in human promyelocytic leukaemia, HL-60 Cells. Pharmacol Toxicol. 91(1):40-8, 2002.
6. Yang LL, Wang MC, Chen LG, Wang CC. Cytotoxic activity of coumarins from the fruits of Cnidium monnieri on leukemia cell lines. Planta Med. 69(12):1091-5, 2003.
7. Appendino G, Bianchi F, Bader A, Campagnuolo C, Fattorusso E, Taglialatela-Scafati O, Blanco-Molina M, Macho A, Fiebich BL, Bremner P, Heinrich M, Ballero M, Munoz E. Coumarins from Opopanax chironium. New dihydrofuranocoumarins and differential induction of apoptosis by imperatorin and heraclenin. J Nat Prod. 67(4):532-6, 2004.
8. Liu H.T., Wang Y.G., Zhang Y.M., Song Q.S., Di C.H., Chen G., Tang J., Ma D.L. TFAR19, a novel apoptosis-related gene cloned from human leukemia cell line TF-1, could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor withdrawa.l Biochem. Biophys. Res. Commun. 254:203-210, 1999.
9. Tian Q., Streuli M., Saito H., Schlossman S.F., Anderson P. A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. Cell 67:629-639, 1991.
10. Sanjo H., Kawai T. and Akira S. "DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. J. Biol. Chem. 273, 29066-29071, 1998.
11. Uwaifo AO, Billings PC, Heidelberger C. Mutation of Chinese Hamster V79 cells and transformation and mutation of mouse fibroblast C3H/10T1/2 clone 8 cells by aflatoxin B1 and four other furocoumarins isolated from two Nigerian medicinal plants. Cancer Res. 43(3):1054-8, 1983.

12. Uwaifo AO. The mutagenicities of seven coumarin derivatives and a furan derivative (nimbolide) isolated from three medicinal plants. J Toxicol Environ Health. 13(4-6):521-30, 1984.
13. Oliner J.D., Kinzler K.W., Meltzer P.S., George D.L. and Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. Nature 358, 80-83, 1992.
14. Gary R., Ludwig D.L., Cornelius H.L., MacInnes M.A., Park M.S. The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. J. Biol. Chem. 272, 24522-24529, 1997.
15. Draetta G., Beach D. Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. Cell 54, 17-26, 1988.
16. Corral M, Tichonicky L, Guguen-Guillouzo C, Corcos D, Raymondjean M, Paris B, Kruh J, Defer N. Expression of c-fos oncogene during hepatocarcinogenesis, liver regeneration and in synchronized HTC cells. Exp Cell Res. 160(2):427-34, 1985.