Saos-2 세포에서 Doxorubicin에 의한 세포사멸 유도과정에서의 유전자 발현 변화*

임정숙·배민재·백석환·김재룡·김정희·김성용 영남대학교 의과대학 생화학·분자생물학교실

Profile of Gene Expression Changes During Doxorubicin Induced Apoptosis of Saos-2

Jeong Sook Lim, Min Jae Bae, Suk Hwan Baek, Jae Ryong Kim, Jung Hye Kim, Seong Yong Kim

> Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

-Abstract-

Background: Doxorubicin has proved to be a useful chemotherapeutic agent especially for osteogenic sarcoma. It induces cancer cell death via apoptosis.

Materials and Methods: To explore and analyze the changes of gene expression during doxorubicin induced apoptosis on human osteogenic sarcoma, Saos-2 cell, cDNA microarray was performed. After treatment with doxorubicin, total RNA was purified and expressed genes were investigated with a 17k human cDNA microarray.

Results: For analysis of the cDNA microarray, the genes were filtered using the sum of the median value of Cy3 and Cy5 signal intensity of greater than 800. Expression of 264 genes was changed by more than 2 fold, and the expression of 35 genes was changed more than 3 fold after treatment with doxorubicin. The genes were primarily related to cell death, cell growth and maintenance, signal transduction, cellular component, transport, and metabolism.

Conclusion: Treatment with doxorubicin induced expressional change of many genes. Some of the genes might be related with apoptosis directly or indirectly. Further study is now

책임저자 : 김성용, 대구시 남구 대명동 317-1, 영남대학교 의과대학 생화학 · 분자생물학교실,

Tel. 053-620-4343, Fax. 053-654-6651, Email: seongyong@med.yu.ac.kr

[※] 이 논문은 2005학년도 재단법인 천마의학연구재단 지원에 의하여 이루어졌음.

needed to characterize these genes.

Key Words: Doxorubicin, Apoptosis, Osteogenic sarcoma, cDNA microarray

서 론

대부분의 항암제들은 세포사멸을 유도하여 암 을 치료한다.^{1, 2)} 이들 항암제들은 death inducing ligands의 생성 증가³⁾와 caspases의 활성 증가⁴⁾ 등과 같은 세포예정사에 관여하는 여러 가지 인자들을 자극하여 세포 사멸을 일으키게 된 다. Doxorubicin (adriamycin)은 quinone을 가 진 anthracycline 계열의 항암제로서 유방암과 전립선암, 악성 골종양 등과 같은 다양한 악성 종양의 치료에 많이 사용된다.

Doxorubicin의 세포사멸에 관하여는 많은 보고가 있다. 세포사멸의 신호전달 과정에 관 한 연구결과에 의하면 유방암과 폐암, Burkitt's lymphoma 등의 세포주들에서 mitogen-activated protein kinases (MAPKs; JNK, p38, ERK) 또 는 phosphatidyl inositol-3 kinase (PI-3K)/ Akt 들이 doxorubicin에 의해 인산화 됨으로서 세포 신호전달과정이 활성화되어 세포사멸이 유도된다고 한다.5-7) 세포사멸이 유도되면 여러 가지 유전자들의 발현변화 등에 의해서 세포예 정사가 진행되게 되는데, 내피세포의 경우 doxorubicin에 의하여 caspase3를 매개한 세포 사멸이 이루어 진다.⁸⁾ 또한 Massart 등⁹⁾은 사 람 갑상선암 세포주에서는 doxorubicin에 의한 세포사멸이 FAS의 발현 증가에 기인한다고 보고하였다. 그 외에도 H2O2와 ceramide의 증 가 또는 p53, NFkB, Bax들의 발현 증가가 doxorubicin에 의한 세포 사멸에 관여한다는 보고들이 있다.¹⁰⁻¹³⁾

항암제의 효과를 증대하거나 약제 내성을 예방 또는 극복하기 위하여 methotrexate, doxorubicin, cisplatin, taxol 등과 같은 항암제를 병용하여 사용하거나 Apo2L/TRAIL, voacamine, Type I interferon, 2-deoxy-D- glucose 등을 항암제 와 같이 투여하여 하기도 한다.¹⁴⁻¹⁷⁾ 항암제와 병용하여 사용하는 약제들은 p-glycoprotein, death receptor, FasL, p53 등과 같은 유전자들 의 발현을 조절 또는 억제하여 항암제의 효과 를 향상시킨다.¹⁸⁻²¹⁾ 이와 같이 항암제의 치료 효과를 향상시키거나 약제내성을 억제하고 또 는 부작용을 줄이기 위해서는 항암제의 세포 내 작용, 특히 유전자 발현에 미치는 영향들을 밝혀내어 필요에 따라 변화되는 각 유전자의 발현을 억제 또는 증가시키는 약제를 동시에 투여함으로써 가능하다고 할 수 있다. 그러나 항암제를 암세포에 투여하여 유전자들의 발현 변화를 관찰하거나 세포사멸과의 연관성에 관 한 연구들은 일부 유전자를 대상으로 한 연구 들이 대부분이며 다량의 유전자를 대상으로 한 연구는 아직 미흡하다.

본 연구에서는 cDNA microarray를 이용하 여 사람의 악성 골종양 세포주인 Saos-2에서 doxorubicin에 의한 세포사멸 과정 동안 유전 자들의 발현 변화를 종합적으로 확인하고자 하 였다.

재료 및 방법

재료

악성 골종양 세포주인 Saos-2를 ATCC (USA)

Table	1.	Primers	for	PCR

Symbol	Gene name	GeneBank Access Num.	Primers	DNA size (bp)
RAMP	RA-regulated nuclear matrix-associated protein	W90164	F : TCTGACAGCCAAATGTATCCC R :CTCACTTGCTTTGAAAGCCC	143
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	AI963014	F: GCTTTGTGGTTGCTGTCATA R: GGAAAAACTTAGGGGGGCTC	194
DAPK1	death-associated protein kinase 1	AA025275	F: GCAACGAGCAACAGTTTATT R: GGAAGCAAGTTTTCTTCCAT	240
ATP7A	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide (Menkes syndrome)	AA236141	F: GACACAGCATTCATGATGTTACC R: TGTTGTAAACCTCACTGCTCTACC	221
SLC1A3	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3	AA453742	F: CTCCCCACAGGACCTTTC R: GTCGAGGCTCTATTTCGGA	162
PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	AA482287	F: AAAAGCAAATTTCATCACATCG R: TATTGAGAGAGAGGATGTGCCA	163
IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	AI968672	F: AAGGTCAAAGCAAGTTTCATC R: CATCAGTCGCAGCCTC	200
BMP2	bone morphogenetic protein 2	AI569017	F: GGAATGACTGGATTGTGGCT R: TGAGTTCTGTCGGGACACAG	171
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	AA488075	F: GTATGCAGTGCCACGGAAAGC R: TGGGTTTGACAAGGTTCTTCC	216
RIG-I	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide	AA126958	F: GGGTACAAGCGATCCATGAT R: TTTGATCCAGCAGAAATGTCC	120
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	T95052	F: TTCATTTGAGCAGCCAGATG R: CCAAAAACCTTTTACAGAACGA	157
CCNF	cyclin F	AA676797	F: CTTCCTCCCTCAGCCTCC R: AATCCCAGCACTTTGGGAG	166
CCND1	cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)	AA487486	F: TTTTGTCTTCTGCTGGAAAC R: CAAGTCTGAGGGTCTGGG	109
ARHE	ras homolog gene family, member E	AA443302	F: TACTGCGGAAACATTGACCA R: AGCATTATGCTTTGGGCAGT	166
IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	N63988	F: GCACCCTGATGACCTCAAAT R: GGAAAATGTTTGCCTGTTGG	186
MBNL2	muscleblind-like 2 (Drosophila)	W16832	F: ATCGGTTGAATGTTTGGC R: CATGCCAGGAAAAGAAAT	183
ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	AI031571	F: GACAAACATTTGTAGCACTCCC R: CATTTGCTGTTTCAAAGTGTGA	131
CLIC4	chloride intracellular channel 4	AA917861	F: ACAGTCCAGCGAGCAGCAC R: GCCAGCCTTGACGAAGAGC	186
DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	AI738499	F: GTCCTTCCTGTGCTCTCCAG R: AATGATCACCTAGACACCCCC	148
GBP1	Guanylate binding protein 1	AA280279	F: ATGATTTTGATCATTGTACCACAT R: AAGACCAGAGCCTTCCTGTC	150
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	AA476272	F: TTGAAATGCTGCCCTAGAAG R: TCTCTCAGGAGAACACTGTGG	243
KTN1	kinectin 1 (kinesin receptor)	AA459106	F: CCTTTGGGCCTCTAGAACTGTTT R: CGTTTAAGGCTTCACTAAGGGGT	282

로부터 구입하였다. Fetal calf serum (FCS)은 Hyclone (Australia), penicillin/streptomycin과 RPMI1640, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배양액은 Life Technologies (USA)로부터 구입하여 사용하였다.

Doxorubicin은 임상에서 사용되는 일동제약 제품을 사용하였으며 3-(4,5- dimethyl-thiazol -2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Tri-reagent RNA extraction solution은 Sigma (USA), BCA 단백질 정량시약은 Pierce (USA) 로부터 구입하여 사용하였다.

Reverse transcriptase (RT) polymerase chain reaction (PCR)에 사용한 primer들은 바 이오니어 (한국)에 주문 제작하였다 (Table 1).

방법

세포배양

악성 골종양 세포주 Saos-2는 10% FCS와 1% penicillin/streptomycin 용액이 섞인 RPMI 1640 배양액을 사용하여 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다.

MTT assay

Saos-2 세포들을 96 well plate에 well마다 5000개가 되도록 분주한 후 24시간 배양하였 다. Doxorubicin을 200, 20, 2 µg/ml, 200, 20, 2 ng/ml, 200, 20, 2 pg/ml 등의 농도가 되도록 처리한 후 72시간 배양하고 50 mg/ml MTT용 액 (in phosphate buffered saline) 50 µl를 각 well에 첨가한 후 이산화탄소 배양기에서 3시 간 반응시켰다. 상청액을 조심스럽게 제거하고 DMSO 200 µl를 첨가한 후 microplate reader (Biorad, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광 도를 측정하였다. RNA 정제

Saos-2 세포들을 직경 100 mm 배양접시에 1×10⁶개가 되도록 분주한 후 24시간 배양하였 다. 새로운 배양액으로 교환하고 doxorubicin 을 200 ng/ml 농도가 되도록 처리한 후 0, 6, 24시간에 세포를 수확하여 RNA를 추출하였다.

RNA는 Tri-reagent (Sigma, USA)를 이용 하여 정제하였다. 세포배양액을 제거하고 배양 접시에 1 ml의 Tri-reagent를 첨가하여 세포 를 용해시켰다. 용액을 원심관으로 옮기고 실 온에서 10분 동안 방치하였다. Chloroform 2 ml를 첨가하여 30초간 진탕한 다음 실온에서 10분 동안 방치하였다. 4℃, 13000 rpm에서 10 분간 원침한 후, 상부의 수용액층을 새로운 원 심관에 옮겼다. Isopropanol 0.5 ml를 첨가하고 잘 섞은 다음 실온에 10 분간 방치하였다. 4℃, 13000 rpm에서 10분간 원침하여 RNA를 침전 시켰다. 침전된 RNA를 에탄올 0.5 ml로 세척 한 후 RNAse-free 증류수 50 비에 녹였다. RNA는 UV-spectrophotometer (Shimazu, 일 본)를 사용하여 260 nm에서의 흡광도를 측정 하여 농도를 결정하였다.

cDNA microarray

추출한 RNA를 지노믹트리사 (한국)에 보내 어 cDNA microarray 실험과 분석을 의뢰하였 다. RNA 100 μ g을 RNase-free 증류수 13.4 μ l 에 녹이고 2 μ l Oligo-dT (2 μ g/ μ l) 첨가하여 65℃에서 10분간 가열한 후 얼음위에서 2분간 방치한 후 원침 하였다. Pre-reaction mixture 9.6 μ l를 첨가하고 대조군(0시간)에는 Cy3-dUTP (1 mM) 3 μ l를, 6시간 또는 24시간 처리군에 는 Cy5-dUTP (1 mM) 3 μ l를 첨가한 후 2 μ l (200U/ μ l)의 reverse transcriptase (Superscript II)를 첨가하여 42℃에서 2시간 동안 역전사 반응을 시켜 cDNA를 합성하였다. Cy3 또는 Cy5가 표지된 cDNA 를 QIA quick PCR purification kit (Qiagen, USA)로 분리 정제한 후 microarray chip에 hybridization시킨다. array 한 image를 scanning한후 데이터분석은 분석 프로그램인 GeneSpring 6.1 (Silicon Genetics, USA)을 이용하였다.

RT-PCR에 의한 유전자 발현조사

Complementary DNA (cDNA)는 total RNA 으로부터 oligo(dT) priming 방법으로 M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA)를 사용 하여 합성하였다. Total RNA 1-2 μg, 100 μM oligo(dT), 100 nM dNTPs를 섞은 후 증류수 로 5 µl가 되게 하였다. 65℃에서 5분간 반응 시킨 후 얼음위에서 식혔다. 5× RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 30 mM MgCl₂), 2 U RNase inhibitor, 100 U M-MLV reverse transcriptase를 혼합하여 최 종 10 µl가 되도록 한 후 42℃에서 2 시간동안 반응시켰다. 72℃에서 10분간 반응시킨 후 증 류수 90 μl를 첨가하였다. PCR은 10× buffer 와 2.5 U supertherm Tag, 25 mM dNTPs, cDNA 1 μ , 2 μ M primer, 증류수로 총 10 μ 가 되도록 만들어 반응시켰다. 반응조건은 초기 반응으로 95℃에서 5분간 denaturation 시키고, 94℃에서 15초, 55℃에서 15초, 72℃ 30초를 30 cycle을 반응시킨 후, 마지막 반 응으로 72℃에서 10분간 더 반응시켰다. 이 PCR 산물은 Ethidium Bromide를 포함하는 2% agarose gel 상에 전기영동하여 확인하 였다.



Fig. 1. Effect of doxorubicin on Saos-2 cell viability. Cells were treated with various concentrations of doxorubicin for 72 h. Cell viability was measured by MTT assay. Values are mean±SD of three independent experiments.

성 적

Doxorubicin에 의한 Saos-2의 세포생존율의 변화

Saos-2세포에서 doxorubicin에 의한 유전자 발현 변화를 조사하기 위해 먼저 어느 농도의 doxorubicin 처리에 의해 세포사가 유도되는지 MTT assay를 시행하였다. 5000개의 세포들을 96 well plate의 각 well에 분주하고 24시간 배 양한 후 doxorubicin을 200, 20, 2, µg/ml, 200, 20, 2 ng/ml, 200, 20, 2 pg/ml 로 처리하였다. 72 시간 후, 세포 생존율은 20 ng/ml의 doxorubicin 을 처리한 경우 약 80%, 200 ng/ml에서는 약 15% 정도이었고, 2 µg/ml에서는 거의 모든 세 포가 죽었다 (Fig. 1). 따라서 Saos-2 세포의 유전자 발현 변화를 관찰하기위한doxorubicin 의 최적 농도를 200 ng/ml로 하였다.

Saos-2에서 doxorubicin에 의한 유전자의 발 현 변화

Saos-2에서 doxorubicin에 의한 세포사 과

- 임정숙 · 배민재 · 백석환 · 김재룡 · 김정희 · 김성용-



6 hrs.



Fig. 2. Microarray images of doxorubicin treated Saos-2 cell. RNAs were extracted from Saos-2 at 0 (control), 6 hr and 24 hr after treatment of doxorubicin. The control RNA was labled with Cy3 (green color) and doxorubicin treated RNAs were labled with Cy5 (red color).

정에서 유전자 발현 변화를 cDNA microarry 를 이용하여 조사하였다. Microarry image에서 doxorubicin에 의하여 발현이 증가하는 유전자 는 빨간색, 감소하는 유전자는 녹색, 발현변화 가 없을 때는 노란색으로 나타난다 (Fig. 2). cDNA microarray 분석 결과, 전체 16343개 유 전자 중에서 Cy3과 Cy5의 형광 강도의 합이 800이상인 유전자를 선별하였다. Fig. 3은 이들 각 유전자의 형광 강도를 산포도로 표시한 것 이다. 이들 유전자들 중에서 대조군에 비하여



Cy3 signal intensity

Fig. 3. Image of scatter plot: Good genes were filtered by sum of median value more than 800. The scatter plot analyzed on the basis of these good genes. X-axis is Cy3 signal intensity and Y-axis is Cy5 signal intensity.

-Saos-2 세포에서 Doxorubicin에 의한 세포사멸 유도과정에서의 유전자 발현 변화-



Fig. 4. Genetree for genes which were changed in expression more than 2-fold (A) and 3 fold (B) after treatment of doxorubicin on Saos-2 cells.

doxorubicin처리 후 시간대 별로 발현 변화를 보이는 유전자를 선별한 결과, 두 배 이상의 발현 변화를 보이는 유전자는 264개이었으며 세 배 이상 발현 변화를 보이는 유전자는 35개 였다. Fig. 4에는 doxorubicin 처리 후 6시간과 24시간에서의 이들 유전자의 발현 변화를 계층 구조분석을 하여 나타내었으며 녹색을 나타내 는 부분은 유전자의 발현이 감소하는 것을 의 미하며 빨간색은 증가함을, 검은색은 발현변화 가 없는 것을 의미한다.

대조군에 비하여 두 배 이상 발현 변화를 보이는 유전자 264개를 doxorubicin 처리 후 시간대 별로 발현변화가 비슷한 유전자들을 K-mean clustering으로 분석하여 5가지의 군 (A, B, C, D, E)으로 분류할 수 있었다. A군은 doxorubicin 처리 후 6시간에 발현이 증가하 며 24시간 까지 계속 발현이 증가하는 유전자 들로 67개가 여기에 속하였다 (Fig. 5A). B군 은 doxorubicin 처리 후 6시간까지는 큰 변화 가 없다가 24시간에는 감소하는 경향을 보이는 유전자들로 108개가 여기에 속하였다 (Fig. 5B). C군은 doxorubicin 처리 후 6시간에 발현 이 감소하였으며 24시간까지 발현 감소가 계속 되는 33개 유전자가 여기에 속하였다 (Fig. 5C). D군은 doxorubicin 처리 후 6시간에 발현 이 감소하였으나 24시간에는 다시 발현이 회복 되는 경향을 보이는 유전자들로 5개가 여기에 속하였다 (Fig. 5D). E군은 doxorubicin 처리



Fig. 5. K-mean clustering of 264 genes which were changed in expression more than 2-fold after treatment of doxorubicin on Saos-2 cells.

후 6시간까지는 발현의 변화가 거의 없다가 24시간에 발현이 증가하는 경향을 보이는 것 으로 51개 유전자가 여기에 속하였다 (Fig. 5E). 그리고 각 군에 속하는 유전자들은 Symbol, 유전자 이름, GeneBank accession number, doxorubicin 처리 후 시간에 따른 유전자의 발 현 변화 등을 Table 2에서 Table 6에 요약하 였다.

RT-PCR

cDNA microarry의 결과에서 가끔씩 나타나 는 위양성을 확인하기 위하여 발현 변화가 현 저한 유전자들 중에서 발현증가를 보이는 13개 와 발현감소를 보이는 9개의 유전자를 RT-PCR 을 이용하여 발현정도를 cDNA microarry 결 과와 비교 하였다 (Fig. 6). cDNA microarry의 결과에서 발현증가를 보이는 13개 유전자 중에 서 RT-PCR 결과 RA-regulated nuclear matrixassociated protein (RAMP), tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3), death-associated protein kinase 1 (DAPK1), guanylate binding protein 1 (GBP1), solute carrier family 1 member 3 (SLC1A3), bone morphogenetic protein 2 (BMP2), signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), cyclin D1, ras homolog gene

Table 2. Genes in g	roup A
---------------------	--------

Symbol	Gene name	GeneBank	Normalized ratio (cy5/Cy3)	
··· y		Acc. No.	6hr	24hr
MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	AA286908	1.5	5.4
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	AI963014	1.5	6.9
DUSP4	dual specificity phosphatase 4	AA444049	1.6	4.5
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	AI285199	1.5	4.7
	ok70e12.s1	AA902449	1.4	3.7
C18B11	C18B11 homolog	R32439	1.2	3.1
MITF	microphthalmia-associated transcription factor	N66177	1.2	2.1
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	AA878880	1.2	2.0
TNFAIP3	tumor necrosis factor	AA476272	1.6	6.6
SP110	SP110 nuclear body protein	AA504832	1.2	2.7
RPC155	polymerase (RNA) III (DNA directed)	AI671146	1.1	2.0
SSA1	Sjogren syndrome antigen A1	N45131	1.4	2.9
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	AI984244	1.7	4.9
	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp667N1113	AA864770	1.3	2.1
PTDSS2	phosphatidylserine synthase 2	AI359562	2.2	0.9
HMG2L1	high-mobility group protein 2-like 1	AA857342	1.3	2.0
VCY	variable charge, Y-linked	AA406064	1.5	2.1
SNARK	likely ortholog of rat SNF1/AMP-activated protein kinase	AA931872	1.4	2.3
PRSS21	protease, serine, 21 (testisin)	AA620757	1.7	2.9
ZNF317	zinc finger protein 317	AA872480	1.2	2.4
DAPK1	death-associated protein kinase 1	AA025275	1.3	2.1
USP18	ubiquitin specific protease 18	AA626356	1.7	2.9
BDKRB1	bradykinin receptor B1	AA989497	1.7	3.2
ADM	adrenomedullin	AA446120	1.2	2.9
APOL3	apolipoprotein L, 3	AA971543	1.3	2.3
	yv31b06.s1	N54794	1.6	2.1
IFI35	interferon-induced protein 35	AA827287	1.4	2.0
WTAP	Wilms tumor 1 associated protein	AI268580	1.3	2.1
FHL2	four and a half LIM domains 2	AA995282	1.3	2.4
	zb85e08.s1	N98591	1.4	4.0
LOC116238	hypothetical protein BC014072	AI473237	1.3	2.1
NTRK2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	R60301	1.4	2.9
EHD4	EH-domain containing 4	AA412509	1.1	2.2
Clorf29	chromosome 1 open reading frame 29	AA410188	1.5	4.7
KIAA0082	KIAA0082	AA504460	1.4	2.1
NR1D1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	AA454168	1.2	2.1
SLC1A3	solute carrier family 1	AA453742	1.1	2.7
CEB1	cyclin-E binding protein 1	AI336946	1.2	2.1
CCND1	cyclin D1	AA487486	1.7	2.0
	ym40a12.s1	H17398	1.3	2.4
PSME3	proteasome activator subunit 3	AW006512	1.2	2.1
UPP1	uridine phosphorylase 1	AA099568	1.2	2.3
G1P3	interferon, alpha-inducible protein	AA448478	1.6	2.9

Symbol	Gene name	GeneBank	Normalized ratio (cy5/Cy3)	
		Acc. No.	6hr	24hr
IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	N63988	1.4	4.4
ZNF259	zinc finger protein 259	AI343293	1.2	2.2
	qp55d08.x1	AI347124	1.2	4.4
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	AA777187	1.2	2.2
NK4	natural killer cell transcript 4	AA458965	1.5	2.1
NPR1	natriuretic peptide receptor A	AA598841	1.3	3.3
GPR44	G protein-coupled receptor 44	AA464202	1.3	2.9
RNF39	ring finger protein 39	AA485347	1.2	2.2
IER5	immediate early response 5	AI096800	1.4	3.0
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	AI014487	1.2	2.2
PI3	protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	AI582329	1.3	2.5
ISGF3G	interferon-stimulated transcription factor 3	AA291389	1.2	2.1
MCM7	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7	AI688220	1.3	2.4
APEX2	APEX nuclease (apurinic/apyrimidinic endonuclease) 2	AW028935	1.3	2.1
SF1	splicing factor 1	AA454673	1.3	2.0
TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	T64483	1.4	2.0
OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	AI357590	1.5	3.8
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	AA419251	1.4	2.3
PSME3	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3	AA486324	1.2	2.2
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	AA146773	1.8	4.3
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1	AA488075	1.2	2.1
RBM8A	RNA binding motif protein 8A	AA448402	1.1	2.1
MCM7	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7	AA496025	1.2	2.7
G1P2	interferon, alpha-inducible protein	AA406020	1.6	4.5

Table 2. Genes in group A (continue)

Table 3. Genes in group B

Symbol	Gene name	GeneBank	Normalized ratio (cy5/Cy3)	
		Acc. No.	6hr	24hr
PRKCL1	protein kinase C-like 1	H18068	2.4	0.6
ATP7A	ATPase	AA236141	0.9	0.4
FLJ32203	hypothetical protein FLJ32203	AA490985	0.9	0.4
	qz29d06.x1	AI262992	0.8	0.5
SARM1	sterile alpha and TIR motif containing 1	AI300055	0.9	0.4
	ESTs	AI076928	1.0	0.5
	hypothetical protein FLJ20378	AA865640	2.4	0.4
	Homo sapiens, clone IMAGE:5302137, mRNA	AI309841	0.8	0.5
DHRS2	dehydrogenase/reductase member 2	AI738499	0.6	0.2
	lens epithelium-derived growth factor	AI611428	0.7	0.5
	splicing coactivator subunit SRm300	AI568777	0.8	0.5
	qr34h09.x1	AI206624	0.9	0.3
FLJ14431	hypothetical protein	AI242625	0.7	0.5
	om78f01.s1	AA934769	1.1	0.5
	Homo sapiens transcribed sequences	AI122689	1.0	0.5
	qk10f12.x1	AI261813	1.1	0.5

Symbol	Gene name	GeneBank	Normalized ratio (cy5/Cy3)	
		Acc. No.	6hr	24hr
LY6E	lymphocyte antigen 6 complex	AA865464	2.0	0.7
	qu43h05.x1	AI368359	1.1	0.4
PRSS2	protease, serine, 2 (trypsin 2)	AA284528	1.1	0.5
FLJ10884	hypothetical protein FLJ10884	AI341793	1.2	0.4
	hypothetical protein FLJ20489	AI309321	0.9	0.5
	hypothetical protein FLJ22344	AI341827	1.0	0.4
TLE4	transducin-like enhancer of split 4	AA704492	1.1	0.4
	Homo sapiens transcribed sequences	AI342904	0.6	0.3
GPR115	G protein-coupled receptor 115	AI299961	1.1	0.5
GRIN2C	glutamate receptor	H50114	0.6	0.3
		AI364539	1.0	0.5
MTH2	likely ortholog of mouse MutT homolog 2	AI431768	0.6	0.3
	EST	AI094575	0.9	0.5
	on01c03.s1	AA975183	0.8	0.4
	Homo sapiens transcribed sequences	AA279015	1.0	0.5
	MUC_HUMAN Ig MU chain C region	AI366996	0.9	0.5
SFTPB	surfactant, pulmonary-associated protein B	AA972350	1.0	0.5
	Homo sapiens transcribed sequences	AI301973	1.1	0.4
SPIB	Spi-B transcription factor	N71628	1.0	0.5
	qp13b12.x1	AI344419	1.0	0.4
	gz33c12.x1	AI262070	1.0	0.5
	hypothetical protein RMSA-1	AI401044	0.9	0.5
	IRKA_HUMAN ATP	AI160757	1.1	0.4
AGPAT2	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2	AA938623	2.1	0.5
LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	AI925455	0.9	0.5
	oi60a09.s1	AA928215	1.1	0.5
	qn29g12.x1	AI266711	1.1	0.4
C14orf72	chromosome 14 open reading frame 72	AI304659	1.0	0.4
GPR92	G protein-coupled receptor 92	AI492234	1.0	0.5
	tf97g06.x1	AI380755	1.2	0.5
	qi62a10.x1	AI198340	1.2	0.4
	Homo sapiens transcribed sequences	AI206175	0.8	0.5
	gr32g10.x1	AI203081	1.0	0.4
	Homo sapiens transcribed sequences	AI097258	1.0	0.4
	qy58f07.x1	AI362659	1.0	0.5
TOLLIP	toll interacting protein	AI434615	1.0	0.5
	Homo sapiens LOC378138	AI300832	1.0	0.5
NEK6	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6	AI335255	1.0	0.5
	clone 23636 mRNA sequence	AI631015	1.1	0.5
	ws10b03.x1	AI991418	1.0	0.5
	tb28c03.x1	AI307795	1.0	0.5
H1F0	H1 histone family, member 0	AI949511	0.8	0.4
	tc89b06.x1	AI438958	0.9	0.5
	cytokine receptor-like factor 2	AI262966	1.0	0.5
SLC22A6	solute carrier family 22	AI017670	1.0	0.5
MGC20700	hypothetical protein MGC20700	AA971738	2.2	0.6

Table 3. Genes in group B (continue)

Sumbol	Cono nomo	GeneBank	Normalized ratio	
Symbol	Gene hame	Acc. No.	6hr	24hr
CYBA	cytochrome b-245	AA054546	2.3	0.4
	ar24b10.x1	AI203272	0.9	0.4
	gv81c10.x1	AI362919	0.9	0.4
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	AA669055	1.0	0.5
	ESTs	AI363313	1.0	0.5
XTP2	HBxAg transactivated protein 2	AA972345	1.0	0.5
TJP4	tight junction protein 4	AI652959	1.0	0.5
SSBP3	single stranded DNA binding protein 3	AA775212	1.0	0.5
FGFR1OP	FGFR1 oncogene partner	AI292342	0.9	0.5
	clone REC05955	AA931221	1.0	0.5
CYP17A1	cytochrome P450, family 17	AI492406	0.9	0.4
CRBPIV	retinoid binding protein 7	AI400840	1.0	0.4
	qr26f11.x1	AI206296	0.9	0.4
CLC	Charot-Leyden crystal protein	AA454104	0.9	0.4
CYBA	cytochrome b-245	AA876021	2.4	0.4
CPNE1	copine I	AA931822	1.0	0.5
AKR1A1	aldo-keto reductase family 1	AW078972	1.2	0.5
	qz51e04.x1	AI493835	1.1	0.5
	qn62g01.x1	AI302216	1.0	0.5
PFKP	phosphofructokinase, platelet	AI340203	0.9	0.4
ARHT1	ras homolog gene family, member T1	AI674943	0.9	0.5
FLJ12800	hypothetical protein FLJ12800	AI350524	1.1	0.5
LPPR2	lipid phosphate phosphatase-related protein type 2	AI341987	0.9	0.4
SYN2	synapsin II	AI362949	1.0	0.4
	purinoceptor 6 (ATP receptor)	AI337413	0.9	0.5
	qo83f11.x1	AI371376	0.8	0.4
PKP4	plakophilin 4	AA864873	1.0	0.5
	tb89e09.x1	AI377147	0.6	0.3
	qt17g02.x1	AI350489	1.0	0.5
	om81d11.s1	AA962460	0.8	0.5
	Homo sapiens transcribed sequences	AI400838	0.9	0.4
	D21S2090E mRNA sequence	AI291174	0.9	0.4
	EST	AI261207	0.9	0.4
PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA	AA482287	1.1	0.4
	FLJ22050 fis, clone H	AI262151	0.9	0.5
	ta74d10.x2	AI349233	1.0	0.5
DPF2	D4, zinc and double PHD fingers family 2	AI381588	0.8	0.4
HKR2	GLI-Kruppel family member HKR2	AA936133	0.8	0.4
MUC4	mucin 4, tracheobronchial	AI311395	0.8	0.4
	qz34g05.x1	AI263023	0.8	0.5
CBLC	Cas-Br-M ecotropic retroviral transforming sequence c	AI344947	0.8	0.4
	qo78g07.x1	AI310519	0.9	0.5
HIST1H1C	histone 1, H1c	T66815	0.9	0.4
	qt03e04.x1	AI351737	0.8	0.5
	tf77c10.x1	AI394539	0.7	0.5
	qo94e06.x1	AI309037	0.7	0.4

Table 3. Genes in group B (continue)

Symbol	Gene name	GeneBank	Normalized ratio (cy5/Cy3)	
		Acc. No.	6hr	24hr
IL6ST	interleukin 6 signal transducer	AI968672	0.3	0.4
DDA3	differential display and activated by p53	AA278630	0.6	0.4
GNAS	GNAS complex locus	W88587	0.6	0.5
CCNF	cyclin F	AA676797	0.6	0.4
ABCB10	ATP-binding cassette	R83876	0.6	0.5
LOC91526	hypothetical protein DKFZp434D2328	AA521012	0.4	0.5
MBNL2	muscleblind-like 2	W16832	0.3	0.6
DLG1	discs, large homolog 1	AA521155	0.4	0.9
MEF2A	MADS box transcription enhancer factor 2	AA283744	0.4	0.4
	Homo sapiens transcribed sequences	AI244299	0.4	0.6
ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	AI031571	0.3	0.6
RNF138	ring finger protein 138	AA461508	0.5	0.9
TPMT	thiopurine S-methyltransferase	AA677257	0.4	0.7
DOK2	docking protein 2	AA133189	0.7	0.5
SPIN	spindlin	AA428181	0.5	0.7
TCTE1L	t-complex-associated-testis-expressed 1-like	AA398011	0.5	0.5
LANCL1	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (bacterial)	R59621	0.5	0.8
	yg38b02.s1	R45056	0.4	0.7
TMOD3	tropomodulin 3	AA151125	0.5	0.6
GYPC	glycophorin C	N77392	0.5	0.6
	oi49e11.s1	AA912032	0.4	0.3
ATF1	activating transcription factor 1	AI241388	0.6	0.5
	qi41f06.x1	AI201652	0.6	0.5
	cDNA DKFZp586B1024	AA486278	0.5	0.8
	cDNA DKFZp686L01105	AA400234	0.5	0.5
RDX	radixin	AA479781	0.4	0.6
LUC7A	cisplatin resistance-associated overexpressed protein	AA598599	0.5	0.8
KTN1	kinectin 1	AA878527	0.6	0.4
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha	AI990075	0.6	0.5
CLIC4	chloride intracellular channel 4	AA917861	0.3	0.6
KTN1	kinectin 1	AA459106	0.4	0.3
SCN8A	sodium channel	W96187	0.3	0.3
	tb98h03.x1	AI337434	0.6	0.4

Table 4. Genes in group C

Table 5. Genes in group D

Symbol	Gene name	GeneBank	Normalized ratio (cy5/Cy3)	
		Acc. Ino.	6hr	24hr
ATP6V1A	ATPase	AA504160	0.4	1.7
M11S1	membrane component	AI381454	0.5	1.3
NR1D2	nuclear receptor subfamily 1	AA425685	0.4	1.0
GNS	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase	AI358910	0.5	1.1
STOM	stomatin	R62817	0.6	2.2

Symbol	Gene name	GeneBank	Normalized ratio (cy5/Cy3)	
0,711,001		Acc. No.	6hr	24hr
	Homo sapiens transcribed sequences	AA280279	1.2	5.3
LAIR1	leukocyte-associated Ig-like receptor 1	AA991196	1.1	2.8
DIO2	deiodinase	AA018182	0.8	2.5
TRIM22	tripartite motif-containing 22	AA083478	1.0	2.4
	tf99c11.x1	AI391658	0.9	2.0
TAF1A	RNA polymerase I	AI493402	1.0	2.4
DIO2	deiodinase	AW029226	0.8	2.5
RAB38	member RAS oncogene family	AA994825	1.0	2.2
	hypothetical protein FLJ20489	AI341163	0.9	2.1
POLQ	polymerase (DNA directed), theta	AI057325	0.9	2.3
	clone BRACE3007472	AA281505	1.0	2.3
SNK	serum-inducible kinase	AA460152	1.0	3.7
	yj40h02.s1	H02333	0.9	2.1
FLJ12960	hypothetical protein FLJ12960	AI261689	1.1	2.1
LOC56902	putatative 28 kDa protein	AI671250	0.7	2.1
	hypothetical protein FLJ20073	AA988857	0.9	2.5
PINX1	PIN2-interacting protein 1	AA490319	1.1	2.3
	hypothetical protein FLJ20073	AA996042	1.0	2.6
APOBEC3B	apolipoprotein B mRNA editing enzyme	AI826909	1.1	2.6
	clone IMAGE:4523945	AA481059	0.7	2.6
TFPT	TCF3 fusion partner	AA995904	0.9	2.6
DNAJA2	DnaJ homolog	AA677397	0.9	2.1
DPH2L2	diptheria toxin resistance protein required for diphthamide biosynthesis-like 2	AI018643	1.1	2.4
	yr04d07.s1	H59260	1.1	2.5
ATP1A3	Na+/K+ transporting	AA775957	0.8	2.1
DKK1	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	AA253464	1.0	8.1
NSPC1	likely ortholog of mouse nervous system polycomb 1	AA991579	1.0	2.4
ZNF313	zinc finger protein 313	AA504825	1.1	2.2
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease	T95052	1.1	2.0
FLJ12439	hypothetical protein FLJ12439	AI380282	0.7	2.1
	zb67e10.s1	N95462	1.1	2.2
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	AA644211	1.0	2.5
	mitochondrial DEAD-box polypeptide 28	AI360732	1.0	2.2
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	AA489640	1.1	3.5
RIG-I	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide	AA126958	1.0	4.0
ARHE	ras homolog gene family	AA443302	0.9	5.4
RAMP	RA-regulated nuclear matrix-associated protein	W90164	0.8	3.3
OLR1	oxidised low density lipoprotein receptor 1	AA682386	1.1	4.6
TRIM26	tripartite motif-containing 26	AA421953	1.0	2.3
PRO1855	hypothetical protein PRO1855	AI261681	0.9	2.6
MFAP1	microfibrillar-associated protein 1	R01211	1.1	2.1
CGI-147	CGI-147 protein	AI339248	1.0	2.5
PLSCR1	phospholipid scramblase 1	AI245550	1.1	2.1
RAB32	member RAS oncogene family	AA057378	1.0	2.0
CDC6	CDC6 cell division cycle 6 homolog	H59204	0.7	2.4

Table 6. Genes in group E

Symbol	Gene name	GeneBank	Normali (cy5,	Normalized ratio (cy5/Cy3)	
		Acc. No.	6hr	24hr	
BMP2	bone morphogenetic protein 2	AI569017	1.0	2.6	
MRPS30	mitochondrial ribosomal protein S30	N33236	1.0	2.1	
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	AI953299	1.1	2.9	
EIF3S7	eukaryotic translation initiation factor 3	AW057866	0.9	2.3	
HSPC111	hypothetical protein HSPC111	AA504814	1.0	2.0	
IFI16	interferon	AA490996	0.9	2.2	

Table 6. Genes in group E (continue)



Fig. 6A. Amplified products of genes with RT-PCR in agarose gels. RNAs were extracted from Saos-2 cells treated with or without doxorubicin for 24 hr.

family member E (ARHE), interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (IFIT2), DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide (RIG-I) 등 11개의 유전자에서 발현 증가를 관 찰할 수 있었다. cDNA microarry의 결과에서 발현감소를 보이는 9개 유전자 중에서 RT-PCR 결과에서 감소를 보이는 것은 dehydrogenase/ reductase member 2 (DHRS2)와 ATPase (Cu⁺⁺ transporting) alpha polypeptide (ATP7A)의 두 유전자뿐이었고, protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 (PTP4A1), interleukin 6 signal transducer (IL6ST), epithelial cell transforming sequence 2 oncogene (ECT2),



Fig. 6B. Amplified products of genes with RT-PCR in agarose gels. RNAs were extracted from Saos-2 cells treated with or without doxorubicin for 24 hr.

chloride intracellular channel 4 (CLIC4), muscleblind-like 2 (MBNL2) 등의 유전자 발 현은 변화가 없었다. 반면 kinectin 1 (KTN1) 의 발현은 오히려 증가 양상을 보였다. Caspase 1과 cyclin F는 원하는 크기의 RT-PCR 생성 물을 얻지 못하였다.

고 찰

본 연구에서는 보편적으로 가장 널리 쓰이 는 항암제인 doxorubicin을 악성 골종양 세포 주인 Saos-2에 처리한 후 6시간과 24시간에 일 어나는 유전자들의 변화를 cDNA microarray 로 분석하고자 하였다. 두 배 이상의 발현 변 화를 보이는 264개의 유전자들은 세포사멸과 세포성장, 세포신호전달, 세포골격, 세포주기, 운반, 대사 등에 관여하는 것으로 확인하였다.

세포사에 관계하는 tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3)와 deathassociated protein kinase 1 (DAPK1) 유전자 는 6시간부터 24시간 까지 지속적으로 발현이 증가하는 A군에 속하였고 세포사멸을 조절하 는 cysteine protease인 caspase 1은 6시간 까 지는 발현변화가 거의 없다가 24시간에 증가하 는 E군에 속였다. 이는 doxorubicin에 의한 세 포사멸에서 TNFAIP3과 DAPK1는 비교적 빠 른 시간에 작용하여 세포사멸을 유도한 후 계 속 작용이 지속 되는 것으로 생각되고, caspase 1은 그 작용이 뒤늦게 나타나서 세포사멸에 직 접적으로 관여하는 것으로 여겨진다.

세포주기 조절에 관여하는 유전자들 중에서 cyclin D와 cyclin E 결합단백질은 6시간 이후 발현이 증가하여 24시간 까지 지속적으로 발현 이 증가하는 A군에 속하였고 cyclin F는 6시 간에 발현이 감소하여 24시간 까지 감소가 유 지되는 경향을 보이는 C군에 속하였다. Cyclin F가 세포주기 중 G₂ 에 가장 발현이 많이 되 며²²⁾ cyclin B1의 핵내 위치를 조절하는 역할 을 한다는 보고²³⁾들은 cyclin F은 세포증식에 유도하는 유전자에 속하므로 doxorubicin에 의 하여 유도되는 세포사멸에는 발현이 감소되는 본 연구결과는 당연한 것이라 여겨진다. 그러 나 암세포에서 doxorubicin에 의하여 cvclin D1의 발현이 감소한다는 Shao 등의 보고²⁴⁾와 는 달리 본 실험의 Saos-2 세포에서는 발현이 증가하였다. 이러한 차이점은 Shao 등은 사람 직장결장 암세포주를 사용하였으므로 서로 다 른 세포들 간의 차이점 또는 cDNA microarray 의 위양성의 결과일 수도 있으므로 좀 더 자세 한 연구가 필요하다.

암유전자들 중에서 epithelial cell transforming sequence 2와 RAS 계열인 RAB38과 RAB32 등은 6시간에 발현이 감소하여 24시간까지 발 현감소가 지속되는 E군에 속하고, fibroblast growth factor receptors 1 (FGFR1) 암유전자 는 6시간까지는 발현변화를 보이지 않다가 24 시간에 발현감소를 보이는 B군에 속하였다. 이 들 암유전자들은 암세포에서 지속적으로 발현 이 되어 세포증식을 주도하는 것으로 여겨지며 본 연구의 결과에서 보이는 doxorubicin에 의 한 발현 감소가 세포증식이 억제 또는 세포사 멸의 유도로 이어질 것으로 생각된다. Volm 등의 보고²⁵⁾에 의하면 FGFR1의 발현 정도가 doxorubicin의 효과와 상관관계를 보인다고 하 였다. 이와 같은 보고와 본 연구의 결과를 연 계하여 보면 FGFR1의 발현이 많은 암세포일 경우 doxorubicin에 의하여 발현이 많이 억제 됨으로 해서 세포의 증식이 억제되거나 세포사 멸이 유도되는 것으로 유추할 수 있다.

세포 내의 여러 가지 효소들도 doxorubicin 에 의하여 발현이 변하였다. Serine protease 21 (testisin), ubiquitin specific protease 18, caspase 1 등은 발현이 증가하는데 이들의 증 가는 세포 사멸과정에서의 단백질의 분해에 관 여하는 것으로 생각된다. Protein kinase C (PKC)-like 1과 dehydrogenase/reductase (SDR family)-2, ATPase, phosphofructokinase, DNA topoisomerase II alpha, protein tyrosine phosphatase type IVA-1 등은 발현이 감소하 였다. 이들 중 dehydrogenase/reductase (SDR family)-2, ATPase, phosphofructokinase, DNA topoisomerase II alpha 등이 감소함으로써 세 포 내의 합성반응 또는 에너지 대사의 감소가 유도되어 세포 사멸을 더욱 촉진 하는 것으로 생각된다. PKC는 세포의 증식과 분화에 관련 된 세포신호전달에 관여한다.²⁶⁾ Huigsloot 등의 보고²⁷⁾에 따르면 PKC alpha를 억제하면 세포 사멸을 막는 기전을 저해하여 항암제의 효능을 높여준다고 한다. 그러므로 본 연구에서 보이 는 doxorubicin에 의한 PKC-like 1 유전자의 발현감소도 Saos-2 세포의 증식을 억제함으로 써 세포사멸에 기여하는 것으로 여겨진다.

Bone morphogenetic proteins (BMPs)은 골 모세포의 분화와 골 재형성에 중요한 분비 인 자이다. BMP-2는 Runx2/Cbfal, Sp7/osterix, Dlx5 등의 여러 가지 전사 인자의 발현을 유도 하여 골형성 분화를 촉진하는 유전자로 잘 알 려져 있다.²⁸⁻³¹⁾ 그러나 BMP-2가 배아암종³²⁾, 사람 전립선암³³⁾, 소뇌 원시신경외배엽종양 세 포주³⁴⁾, 사람 골수종³⁵⁾ 등의 암세포와 골모세 포³⁶⁾ 등의 세포사멸에도 관여 한다. 본 연구에 서 Saos-2에서 doxorubicin에 의하여 BMP-2 의 유전자의 발현은 6시간까지는 발현의 변화 를 보이지 않다가 24시간에 발현이 증가하는 E군에 속한다. 이는 BMP-2가 직접 또는 간접 적으로 세포사멸에 관여할 것으로 추정할 수 있으며 특히 caspasel과 같이 세포사멸에 초기 보다는 후기에 작용할 것으로 생각된다.

cDNA microarry의 결과의 위양성을 확인하 기 위한 RT-PCR을 이용한 증폭결과에서 cDNA microarry에서 발현 증가를 보이는 13 개 유전자 중에서 원하는 증폭 크기를 얻지 못 한 2개를 제외한 11개 모두 발현 증가를 보이 므로 그 결과는 매우 신뢰성이 있다. cDNA microarry에서 발현 감소를 보이는 9개 중 RT-PCR 결과에서 발현 감소를 보이는 2개 유전자 외에 6개에서는 발현변화를 관찰할 수 없었고, 상반된 결과를 보이는 유전자는 한 가 지뿐이라는 결과는 발현이 감소하는 유전자는 발현 증가를 보이는 유전자들에 비해 상대적으 로 발현의 변화 확인이 쉽지 않다고 생각된다.

이상의 결과로 부터 Saos-2 세포에서 doxorubicin 에 의해 세포사멸과 세포성장, 세포신호전달, 세포골격, 세포주기, 운반, 대사 등에 관여하는 많은 유전자들의 발현이 변함을 확인할 수 있 었으며, 이러한 많은 변화들이 세포사멸에 직 접 또는 간접적으로 관여함을 알 수 있었다. 그러나 많은 유전자들이 세포 사멸에 어떻게 관여하는지, 그리고 이러한 유전자들의 변화를 다른 약제를 투여하거나 자극을 주어서 증가 또는 감소하였을 때 세포사멸에 어떤 영향을 미치는지, 항암제의 부작용이나 약제 내성을 극복할 수 있는지를 알기 위해서는 아직 더 많 은 연구가 필요할 것이며 본 연구가 이러한 연 구의 기초자료가 될 것으로 생각된다.

요 약

사람의 악성 골종양 세포주 Saos-2 를 이용 하여 doxorubicin에 의해 발현이 증가 또는 감 소하는 유전자들의 변화를 cDNA microarray 를 이용하여 확인하였다.

그 결과 대조군에 비하여 2배 이상 증가 또 는 감소하는 유전자 264개, 3배 이상 증가 또 는 감소하는 유전자 35개를 선별할 수 있었다. Doxorubicin 처리 후 시간대 별로 발현변화가 비슷한 유전자들을 k-mean clustering으로 분 석하여 5가지의 군으로 분류할 수 있었다. A 군은 24시간 까지 계속 발현이 증가하는 67개 유전자, B군은 6시간까지는 변화가 없다가 24 시간에는 감소하는 108개 유전자, C군은 6시간 에 발현의 감소하고 24시간까지 지속되는 33개 유전자, D군은 6시간에 발현의 감소하였으나 24시간에는 다시 발현이 회복되는 5개 유전자, 그리고 E군은 6시간까지는 발현의 변화가 없 다가 24시간에 발현이 증가하는 경향을 보이는 51개 유전자로 구분하였다.

cDNA microarry 결과 발현차이가 현저한 22개의 유전자들을 대상으로 RT-PCR을 시행 하여 발현정도를 비교하였다. cDNA microarry 에서 발현증가를 보이는 13개 유전자 중에서, RT-PCR 결과 11개가 그 발현이 증가하였으 며, cDNA microarry의 결과에서 발현감소를 보이는 9개 유전자 중에서 RT-PCR 결과에서 2개 유전자만 감소하였다.

이상의 결과 Saos-2 세포에서 doxorubicin 에 의해 세포사멸과 세포성장, 세포신호전달, 세포골격, 세포주기, 운반, 대사 등에 관여하는 많은 유전자들의 발현이 변함을 확인할 수 있 었다.

참 고 문 헌

- Hickman JA, Potten CS, Merritt AJ, Fisher TC. Apoptosis and cancer chemotherapy. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1994 Aug 30;345(1313):319–25.
- Rowan S, Fisher DE. Mechanisms of apoptotic cell death. Leukemia 1997 Apr;11(4):457–65.
- Friesen C, Herr I, Krammer PH. Debatin KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor /ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. Nat Med 1996 May;2(5):574-7.
- 4. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y,

Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res 1993 Sep 1;53(17):3976-85.

- Kim J, Freeman MR. JNK/SAPK mediates doxorubicin-induced differentiation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat 2003 Jun;79(3):321–8.
- Shlapatska LM, Berdova GG, Kovalevska LM, Kulyk GI, Klein G, Sidorenko SP et al. Signal transduction pathways in Burkitt's lymphoma BL41 and DG75 with different sensitivity to doxorubicin. Exp Oncol 2004 Sep;26(3):210–6.
- Zhao Y, You H, Yang Y, Wei L, Zhang X, Yao L et al. Distinctive regulation and function of PI3K/Akt and MAPKs in doxorubicin-induced apoptosis of human lung adenocarcinoma cells. J Cell Biochem 2004 Feb 15:91(3):621–32.
- Green PS, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicininduced apoptosis. Biochim Biophys Acta 2002 Oct 9;1588(1):94–101.
- Massart C, Barbet R, Genetet N, Gibassier J. Doxorubicin induces Fas-mediated apoptosis in human thyroid carcinoma cells. Thyroid 2004 Apr;14(4):263–70.
- Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B. Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicininduced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. Biochem 2002 Nov 1;367(Pt 3):729-40.
- Liu X, Chua CC, Gao J, Chen Z, Landy CL, Hamdy R et al. Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004 Mar;286(3):H933-9.
- Uchida Y, Itoh M, Taguchi Y, Yamaoka S, Umehara H, Ichikawa S et al. Ceramide reduction and transcriptional up-regulation of

glucosylceramide synthase through doxorubicinactivated Sp1 in drug-resistant HL-60/ADR cells. Cancer Res 2004 Sep 1;64(17):6271-9.

- Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways. J Biol Chem 2004 Jun 11;279(24):25535-43.
- Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Federici E, Galeffi C, Arancia G. Voacamine, a bisindolic alkaloid from Peschiera fuchsiaefolia, enhances the cytotoxic effect of doxorubicin on multidrugresistant tumor cells. Int J Oncol 2003 Dec; 23(6):1505–13.
- Bouralexis S, Clayer M, Atkins GJ, Labrinidis A, Hay S, Graves S et al. Sensitivity of fresh isolates of soft tissue sarcoma, osteosarcoma and giant cell tumour cells to Apo2L/TRAIL and doxorubicin. Int J Oncol. 2004 May;24(5): 1263–70.
- Manara MC, Serra M, Benini S, Picci P, Scotlandi K. Effectiveness of Type I interferons in the treatment of multidrug resistant osteosarcoma cells. Int J Oncol 2004 Feb; 24(2):365–72.
- Maschek G, Savaraj N, Priebe W, Braunschweiger P, Hamilton K, Tidmarsh GF, et al. Lampidis TJ. 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. Cancer Res 2004 Jan 1;64(1): 31-4.
- Shnyder SD, Hayes AJ, Pringle J, Archer CW. P-glycoprotein and metallothionein expression and resistance to chemotherapy in osteosarcoma. Br J Cancer 1998 Sep;78(6):757–9.
- Poulaki V, Mitsiades CS, Mitsiades N. The role of Fas and FasL as mediators of anticancer chemotherapy. Drug Resist Updat 2001 Aug;

4(4):233-42.

- Tang HJ, Qian D, Sondak VK, Stachura S, Lin J. A modified p53 enhances apoptosis in sarcoma cell lines mediated by doxorubicin. Br J Cancer 2004 Mar 22;90(6):1285–92.
- 21. Watanabe K, Okamoto K, Yonehara S. Sensitization of osteosarcoma cells to death receptor-mediated apoptosis by HDAC inhibitors through downregulation of cellular FLIP. Cell Death Differ 2005 Jan;12(1):10–8.
- Bai C, Richman R, Elledge SJ. Human cyclin F. EMBO J 1994 Dec 15;13(24):6087–98.
- Kong M, Barnes EA, Ollendorff V, Donoghue DJ. Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. EMBO J 2000 Mar 15;19(6):1378–88.
- 24. Shao J, Teraishi F, Katsuda K, Tanaka N, Fujiwara T. p53 inhibits adriamycin-induced down-regulation of cyclin D1 expression in human cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2002 Jan 25;290(3):1101–7.
- 25. Volm M, Koomagi R, Mattern J, Stammler G. Angiogenic growth factors and their receptors in non-small cell lung carcinomas and their relationships to drug response in vitro. Anticancer Res 1997 Jan-Feb;17(1A):99–103.
- Caponigro F, French RC, Kaye SB. Protein kinase C: a worthwhile target for anticancer drugs? Anticancer Drugs 1997 Jan;8(1):26–33.
- 27. Huigsloot M, Tijdens RB, van de Water B. Inhibition of protein kinase Calpha enhances anticancer agent-induced loss of anchorageindependent growth regardless of protection against apoptosis by Bcl-2. Mol Pharmacol 2003 Oct;64(4):965-73.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell 1997 May 30;89(5):747–54.
- 29. Xu SC, Harris MA, Rubenstein JL, Mundy

- 임정숙 · 배민재 · 백석환 · 김재룡 · 김정희 · 김성용-

GR, Harris SE. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) signaling to the Col2alpha1 gene in chondroblasts requires the homeobox gene Dlx-2. DNA Cell Biol 2001 Jun;20(6):359-65.

- 30. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell 2002 Jan 11;108(1):17–29.
- Milona MA, Gough JE, Edgar AJ. Expression of alternatively spliced isoforms of human Sp7 in osteoblast-like cells. BMC Genomics 2003 Nov 7;4(1):43.
- Glozak MA, Rogers MB. Specific induction of apoptosis in P19 embryonal carcinoma cells by retinoic acid and BMP2 or BMP4. Dev Biol. 1996 Nov 1;179(2):458–70.
- 33. Ide H, Yoshida T, Matsumoto N, Aoki K,

Osada Y, Sugimura T et al. Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2. Cancer Res 1997 Nov 15;57(22):5022-7.

- 34. Iantosca MR, McPherson CE, Ho SY, Maxwell GD. Bone morphogenetic proteins-2 and -4 attenuate apoptosis in a cerebellar primitive neuroectodermal tumor cell line. J Neurosci Res 1999 May 1;56(3):248–58.
- Kawamura C, Kizaki M, Ikeda Y. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 induces apoptosis in human myeloma cells. Leuk Lymphoma 2002 Mar;43(3):635-9.
- 36. Hay E, Lemonnier J, Fromigue O, Marie PJ. Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a Smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway. J Biol Chem 2001 Aug 3;276(31):29028–36.