

원 저

# 鹿茸藥鍼液의 肝癌細胞柱에 대한 DNA 및 단백질 發顯

류성현 · 이경민 · 이봉효 · 임성철 · 정태영 · 서정철

대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

## DNA and Proteomic Expression of Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution (CPC-HAS) in HepG2 carcinomar cells

Ryu Sung-hyun · Lee Kyung-min · Lee Bong-hyo · Lim Seong-chul · Jung Tae-young · Seo Jung-chul

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

### Abstract

**Objective :** It has long been known about the osteogenic effect of CPC-HAS on bone tissues. However, it has not been determined the effect of CPC-HAS on cancer cells. The purpose of this study is to screen the CPC-HAS mediated differentially expressed genes in cancer cells such as HepG2 hepatoma cells. Oligonucleotide microarray and proteomics approaches were employed to screen the differential expression genes.

**Methods :** CPC-HAS was prepared by boiling and stored at -70°C until use. Cells were treated with various concentrations of CPC-HAS (0.1, 0.5, 1.5, 10, 20mg/ml) for 24 h. Cell toxicity was tested by MTT assay. To screen the differentially expressed genes in cancer cells, cells were treated with 1.5mg/ml of CPC-HAS. For oligonucleotide microarray assay, total RNA was used for gene expression analysis using oligonucleotide Genechip(Human genome U133 Plus 2.0., Affimatrix Co.). For proteomic analysis, total protein was analyzed by 2D gel electrophoresis and Q-TOF mass spectrometer.

**Results :** It has no cytotoxic effects on both HepG2 cell in all concentrations(0.1, 0.5, 1.5, 10, 20mg/ml). In oligonucleotide microarray assay, the number of more than twofold differentially regulated known genes was 23 with 5 up-regulated and 18 down-regulated genes in HepG2 cells. In proteomic analysis, three spots were identified by 2D-gel electrophoresis and Q-TOF analysis. Two down-regulated proteins were aldehyde dehydrogenase 1 and enolase 1, and up-regulated protein was fatty acid binding protein 1 by 1.5mg/ml of CPC-HAS.

**Discussion :** This study showed the screening of CPC-HAS mediated differentially regulated genes using combined approaches of oligonucleotide microarray and proteomic analysis. The screened genes will be used for the better understanding of the therapeutic effects of CPC-HAS on cancer fields.

**Key words :** oligonucleotide microarray, CPC-HAS, gene expression, HepG2

## 1. 緒 論

과학기술의 발전에 따른 생활 및 의료수준의 향상에  
도 불구하고 산업 발전에 따른 환경오염, 스트레스 등  
으로 인하여, 전 세계적으로 癌으로 인한 사망률이 증  
가하고 있으며, 우리나라의 경우도 癌으로 인한 死亡率

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

이 해마다 높아지는 추세로 2003년에도 死亡原因 중 1위로 報告되었다<sup>2)</sup>.

癌에 대한 西洋醫學的 治療는 手術療法, 放射線療法, 抗癌化學療法, 免疫療法이 발전하였는데, 각자의 治療方式을 단독 혹은 복합적으로 적용하여 일부의 癌에서는 현저한 治療成果의 향상을 가져온 것은 사실이나, 어느 療法도 癌의 완전한 治療法이 되지 못하고 있는 실정이다<sup>3)</sup>.

최근에는 癌의 病態生理에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 遺傳子 變換狀態를 遺傳子 수준에서 교정하고자 하는 遺傳子 治療가 주목받고 있다<sup>4)</sup>. 遺傳子 發顯에 관한 情報를 研究하는 方法으로서 기존의 개별 遺傳子 發顯을 관찰하던 方法에서 탈피하여 microarray chip을 利用함으로써 大量的 遺傳子 發顯 情報를 한꺼번에 평가하는 方法이 개발되어 보다 많은 量의 遺傳子 發顯情報를 한 번에 파악할 수 있게 되었다. 따라서 遺傳子 자체의 情報 뿐 아니라 治療 후의 變化를 폭넓게 파악할 수 있게 되어 研究 發展에 획기적인 전기를 마련할 수 있게 되었다<sup>5,6)</sup>. 따라서 human genome project<sup>7)</sup>가 끝나면 여러 가지 遺傳子들의 조절을 이용한 약물 개발이 활발히 진행될 것으로 예상되며, 韓醫學的 知識을 바탕으로 각종 질환에 대한 治療 가능한 물질의 체계적인 검색은 미래의 生命科學 分野에 중요한 연구 전략으로 생각된다<sup>8)</sup>. 이를 위하여 각종 질환 또는 약재 개발에 필요한 실험 모델을 개발하고, 나아가 그 모델로 찾고자 하는 물질들을 검색할 수 있는 방법을 알아내어, 최종적으로 검색된 물질의 效能을 分析·評價할 수 있는 체계를 갖추는 것이 필수적이다.

韓醫學界에서도 여러 韓藥材를 이용하여 癌에 대한 免疫機能 改善<sup>9)</sup> 및 抗癌<sup>10)</sup>에 관한 많은 研究가 활발히 진행 중이다. 그 중 壯腎陽, 補氣血, 益精髓, 強筋骨, 調衝任 등의 效能이 있어 일체 虛損症狀에 널리 사용되는 鹿茸<sup>11)</sup>에 관하여, 김 등<sup>12)</sup>이 鹿茸 추출물과 抗癌劑의 병용 투여에 의한 抗癌劑 부작용 輕減 效果를 報告한 바는 있으나, oligonucleotide chip을 이용한 遺傳子 分析을 통한 抗癌 研究는 이루어진 바가 없었다.

이에 著者는 壯腎陽, 補氣血, 益精髓, 強筋骨 效能이 있는 鹿茸<sup>13)</sup>(antler, Cervi parvum cornu ; CPC)으로 藥鍼液을 調製하여, 抗癌效能을 밝히고자 肝癌細胞柱에 최신 oligonucleotide chip assay법과 proteomic analysis기법을 이용하여 遺傳子 發顯을 分析한 結果 有意性을 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 藥材

本 實驗에서 사용된 鹿茸(antler, Cervi parvum cornu ; CPC)(러시아産)은 대구한의대학교 부속 대구한방병원 藥劑科에서 300g을 購入한 후 精選하여 使用하였다.

### 2. 方法

#### 1) 藥鍼液의 調製

鹿茸을 破碎하여 25g의 분말을 500ml의 蒸溜水에 넣어 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 鹿茸과 혼합된 蒸溜水を 13,000rpm으로 1시간 동안 원심 분리하여 上清液만을 회수하였다. 上清液을 멸균된 필터기를 사용하여 얻은 다음 -70℃에서 48시간 동안 냉동 건조시켜 10g의 건조된 분말을 얻었다.

#### 2) 細胞 培養

本 실험에 사용된 細胞柱는 肝癌 細胞에서 유래한 HepG2(hepatic cancer cell)는 ATCC (U.S.A.)에서 구입 확보하였다. 細胞 培養에 사용된 미디어는 DMEM/F12k (50:50) (GibcoBRL, U.S.A.)에 FBS(fetal bovine serum) (GibcoBRL, U.S.A.) 10%를 첨가하여 사용하였다. 배양기의 약 70% 정도 細胞가 자라면 (2.5×10<sup>6</sup>)계대 培養한 후 사용하였다. 시료를 처리하기 12시간 전에 培養液을 serum이 없는 상태로 만들어서 serum 내의 cytokine 및 단백질의 영향을 배제하였다. 鹿茸藥鍼液의 농도를 0.1, 0.5, 1.5, 10 및 20mg/ml 되게 HepG2 細胞에 24시간 처리하였다. 細胞를 trypsin-EDTA 1ml을 첨가하여 PBS로 씻은 후 원심 분리하여 회수하였다.

#### 3) RNA 추출

細胞 培養液을 제거하고 PBS로 세척하였다. Trypsin-EDTA buffer를 1ml씩 첨가하여 37℃에서 5분 정도 방치한 후 PBS 10ml를 첨가하여 15ml 튜브에 모은 다음 1,000rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 細胞만을 모았

다. Total RNA를 분리하기 위하여, tri-Reagent kit (molecular research center inc., U.S.A.)를 사용하였다. Tri-Reagent buffer로 1 ml의 細胞에 첨가한 후 실온에서 10분간 방치하고 12,000rpm으로 15분 동안 원심 분리한 후 上清液만을 취하고 0.2 ml chloroform을 넣고 1분 동안 혼합한 뒤 실온에서 10분간 방치한 후, 12,000rpm으로 15분 동안 원심 분리하였다. 무색층인 上清液을 새로운 tube에 넣고 0.5 ml의 isopropanol과 천천히 혼합하였다. 12,000rpm으로 5분 동안 원심 분리한 후 上清液을 버리고 RNA pellet를 얻었다. Diethyl pyrocarbonate 처리된 75% 에탄올 (DEPC-75%ethanol)로 2번 세척한 후에 RNA pellet를 건조한 후 DEPC-3차 蒸溜水를 사용하여 녹였다. Total RNA는 분광광도계 (Ultraspec 2000UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, U.S.A.)를 사용하여 정량하였다.

#### 4) MTT(tetrazolium-based colorimetric) assay

여러 농도(0.1, 0.5, 1.5, 10, 20mg/ml)의 鹿茸藥鍼液을 처리한 細胞를 1,000rpm에서 5분 정도 원심 분리한 후 남은 細胞에 10 ml의 細胞 培養 溶液을 넣고 멸균 피펫을 통한 반복 흡입으로 단일 細胞 부유액을 얻었다. 부착성 細胞의 경우에는 trypsin을 처리하여 細胞를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 細胞 培養 溶液으로 중화시켜 1,000rpm으로 다시 5분 정도 원심 분리한 후 10 ml의 細胞 培養 溶液으로 멸균피펫을 통한 반복 흡입으로 단일 細胞 부유액을 얻었다.

예비 실험에서 결정된 적정 농도를 기준으로 細胞의 數를 결정한 후 준비된 단일 細胞 부유액을 넓은 Cane에서 잘 혼합한 뒤 multichannel 피펫을 이용하여 각 well에 180 µl의 細胞 부유액을 접종하였다. 측정하고자 하는 시료를 PBS에 녹인 후 농도별로 20 µl씩 각 well에 첨가하였다.

腫瘍細胞柱와 檢體가 접종된 plate를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 미리 정해진 시간 동안 培養한 후 plate의 각 well에 0.1mg(50 µl의 2mg/ml)의 MTT를 가해주고 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 4시간 더 培養하여 MTT가 환원되도록 하였다. 培養 종료 시 plate를 450g×5분간 원심 분리하여 생성된 formazan 결정을 가라앉힌 후 각 well에 형성된 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 배지를 30 µl 정도만 남기고 multidispenser를 이용하여 모두 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 생성된 formazan 결정을

용해시키기 위하여 DMSO를 150 µl 씩 가한 후 formazan결정이 녹을 수 있도록 약 15분간 가볍게 진탕해 주고 96-well plate용 광도계(ELISA reader)로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 細胞에 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 細胞數와 비례한다. 통계처리는 student t-test로 처리하였으며, 유의수준은 p<0.05로 하였다.

#### 5) Oligonucleotide chip 分析

Total RNA를 한 등<sup>14)</sup>의 방법과 같이 분리하였다. Complement DNA(cDNA) 합성은 total RNA 10 µg을 기저로 하여 superscript reagent(Invitrogen, U.S.A.)를 사용하여 수행하였다. 만들어진 cDNA를 알코올 침전법으로 분리 농축하였고 biotin-labeled cRNA는 BioArray HighYield RNA transcription labeling kit(Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY, U.S.A.)를 사용하여 in vitro 전사법으로 만들었다. 만든 biotinylated cRNA는 RNeasy minikit(Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.)으로 clean하고 양을 측정하였다. Biotinylated cRNA 20 µg를 94°C 완충액(200mM tris-acetate(pH 8.1), 500K0Ac, and 150 MgOAc) 속에 35분간 두어 약 50 nucleotides 크기로 만들었다. Hybrid 혼합물은 15 µg의 분질 조정된 cRNA와 Eukaryotic Hybridization controls(표준 cRNA와 oligonucleotide B2 포함)로 되어 있으며 이는 前處理한 Human Affymetrix chip(Human genome U133 Plus 2.0)에 45°C에서 16시간 동안 Genechip Hybridization Oven 640(Affymetrix, U.S.A.)을 이용하여 hybridization시켰다. 그 후에 chip을 Genechip Fluidics Station 400(Affymetrix, U.S.A.)으로 low-stringency buffer (6×standard saline phosphate 및 EDTA, 0.01% Tween 20, 0.005% antifoam)에서 10cycle(two mixes per cycle)로 세척 후 high-stringency buffer(100N-morpholinoethanesulfonic acid, 0.1 NaCl, 및 0.01% Tween 20)에서 4cycle로 세척하고 streptavidin phycoerythrin으로 염색하였다. 이 과정에 이어서 normal goat IgG와 biotinylated mouse antistreptavidin antibody로 반응시키고 다시 streptavidin phycoerythrin으로 염색하였다. Chip은 Hewlett Packard Gene Array Scanner(Affymetrix, Santa Clara, CA, U.S.A.)로 스캔하였다. 신호강도는 150의 표적치에 맞추어 조정하였다. MAS (MicroArray Suite) version 5.0을 이용하여 分析값이 수치화되면 가공되지 않은 데이터인 "Signal" 값은 전사체의 유무에 따라

“Detection” calls로 바뀌게 되며 부재의 의미는 “발현되지 않음”을 의미한다. “Detection” calls는 존재(P), 결여(A) 및 경계(M)로 구분되고, 각각의 분류는 “Detection p-value”로 제시되며 각 조직에서의 발현은 MAS version 5.0 프로그램을 이용하였으며, 比較分析을 통하여 “Signal Log-Ratio”가 생성된다. 이는 增加(I), 미약한 增加(MI), 減少(D) 미약한 減少(MD) 및 변화 없음(NC)으로 분류된다. 각각의 구분에는 “Change p-value”도 제시되며, 이러한 모든 통계적인 데이터는 microarray data를 分析하는데 사용하였다. 分析은 Affymetrix社에서 나온 MAS version 5.0 software를 이용하였다(Fig. 1).

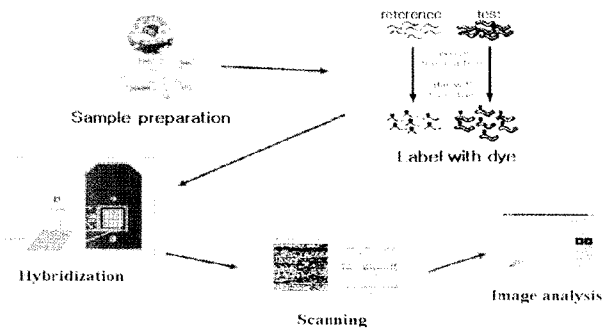


Fig. 1 Procedure of oligonucleotide chip assay.

6) Proteomic analysis

鹿茸藥鍼液을 이용한 proteomic analysis는 다음과 같은 순서로 시행하였다(Fig. 2).

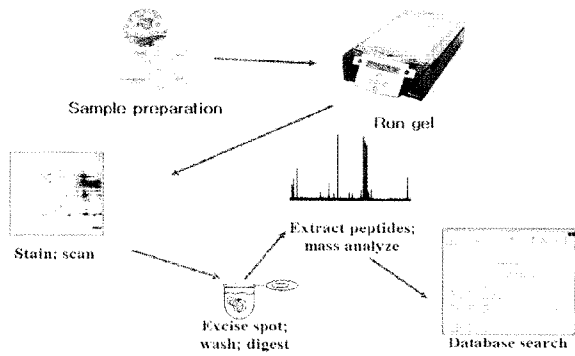


Fig. 2 Procedure of proteomic analysis

(1) Analytical two dimensional (2D) gel electrophoresis

腫瘍 細胞柱에 鹿茸藥鍼液을 1.5mg/ml로 처리한 후 24시간 동안 반응시켜 얻어진 細胞에 8M urea, 2% Nonidet P-40 (NP-40), 2% ampholytes (Ampholine pH 3.5 and pH 5.8; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden, 5% polyvinylpyrrolidone)가 포함된 시약을 사용하여 일차적으로 細胞를 破碎 시킨 다음 15,000rpm (Kubota, Tokyo, Japan)에서 5분 동안 원심 분리를 2회 실시한 후 上清液을 2D PAGE에 사용하였다. 단백질은 IEF (Isoelectric focusing)에 의한 pH gradient (pH 6-10, Daici-Kagaku, Tokyo, Japan)에 따라서 첫 번째 분리를 시도하였다. 그런 다음 분자량에 따라서 분리를 실시하기 위하여, 8M urea, 3.5% acrylamide, 2% NP-40, 동량의 2% Ampholines를 준비하였다. 전기영동은 200V에서 30분간 실시한 후, 400V에서 1시간, 1,000V에서 16시간, 2,000V에서 1시간 동안 실시하였다. SDS-PAGE 전기영동은 12.5% polyacrylamide gel을 사용하였고, 5% stacking gel에서 35mA로 실시하였다.

(2) Gel scanning, image analysis, in-gel proteolytic digestion

2D 전기영동 결과 얻어진 spot에 대한 상호 비교 데이터를 소프트웨어 (Bio-Rad, U.S.A.)를 사용하여 정량적인 데이터를 얻었다. 鹿茸藥鍼液에 대하여 단백질 發顯의 양적 차이를 보이는 spot을 다음과 같이 동정하였다. 먼저 spot을 3조각으로 자른 후 30mM potassium fericyanide와 100mM sodium thiosulfate를 1:1로 섞어 염색약이 빠질 때까지 혼합하고 蒸溜水로 3번 이상 세척하였다. 염색약이 제거된 gel에 200mM ammonium bicarbonate 50µl를 20분 동안 혼합한 후 蒸溜水를 5분 동안 혼합한 다음, 100% Acetonitrile 50µl를 혼합하여 탈수한 후 trypsin과 50mm NH<sub>4</sub>Cl를 혼합한 다음 37°C에서 18시간 반응시켰다.

(3) Q-TOF 分析

이온화 방법(MALDI)으로 생성된 이온을 mass analyzer인 Q-TOF에서 질량/하전량과의 비에 따라 분리 검출된 질량스펙트럼을 分析, 해석하여 분석물질의 질량을 확인하였다. Q-TOF 分析으로 얻어진 단백질 조각들의 분자량은 ProID Database 프로그램 (MDS Sciex, U.S.A.)을 이용하여 검색한 후 각 단백질을 동정하였다.

### III. 成績

#### 1. MTT assay

鹿茸藥鍼液 처리 후 24시간 뒤 細胞 增殖을 살펴보면, 0.5, 1.0mg/ml에서는 오히려 細胞 增殖이 增加되었고, 1.5, 10, 20mg/ml(약 15%)에서는 對照群과 비교하여 細胞 數가 減少하였으나 有意한 차이는 없었다(Fig. 3).

#### 2. Oligonucleotide chip 分析

본 실험에 사용된 遺傳子 chip은 Human Genome U133 Plus 2.0으로 chip 위에 총 probe 數가 54,676개이고 遺傳子 數로는 40,000개가 集積되어 있다. 細胞 毒性 실험에서 비교적 毒性이 적고 鹿茸藥鍼液의 藥效를 충분히 나타낼 수 있는 실험군(1.5mg/ml)과 對照군으로 나누어 分析하였다.

#### 1) 發顯이 增加된 遺傳子

發顯이 2배 이상 增加된 遺傳子는 human mRNA UCIA(upregulated during camptothecin-induced apoptosis of U937 cells)(GB (Genebank) No. BG389789), regulator of G protein signaling RGS12(GB No. AF030110.1), MAPK(mitogen-activated protein kinase)8 interacting protein 3(GB No. BF445013), PP1650 unknown mRNA(GB No. AF217988.1) 등 5개였다(Table 1, Fig. 4-1).

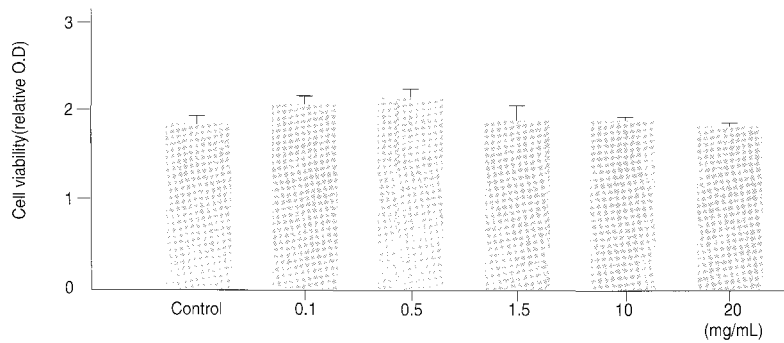


Fig. 3 Effects of CPC-HAS on HepG2 cell proliferation  
\* : Statistically significant value compared with control data. (\* : P<0.05)  
CPC-HAS ; Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution

Table 1. Increased Genes after Treatment with CPC-HAS in HepG2

| Signal Log Ratio | Descriptions |  |
|------------------|--------------|--|
| 3.7              | BG389789     | human mRNA upregulated during camptothecin-induced apoptosis of U937 cells |
| 3.3              | AF030110.1   | regulator of G protein signaling RGS12                                     |
| 3.3              | BF445013     | mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3                   |
| 2.7              | AF317887.1   | monoclonal antibody 3H11 antigen   |
| 2.7              | AF217988.1   | PP1650 unknown mRNA  |
| 1.7              | M10098.1     | 8S rRNA gene   |
| 1.6              | L32662.1     | prostaglandin E2 receptor  |
| 1.6              | AJ001306.1   | PDZ domain protein   |
| 1.6              | AW736788     | gastric protein YC12P  |
| 1.5              | BG391060     | coilin   |
| 1.5              | W80468       | histone deacetylase 3  |

CPC-HAS ; Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution

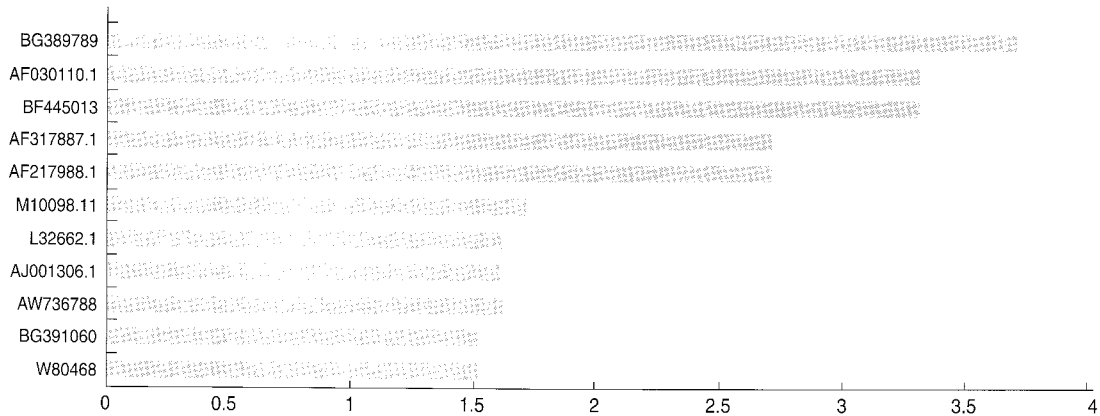


Fig. 4-1 CPC-HAS increased their gene expression in HepG2. Each bar indicates fold increase as shown in Table 1. X-axis indicates fold increase of CPC-HAS compared to control and Y-axis indicates genebank numbers. CPC-HAS ; Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution

2) 發顯이 減少된 遺傳子

發顯이 2배 이상 減少된 遺傳子는 olfactory receptor family2(GB No. N54813), TR2(GB No. M21985.1), crystalline,  $\gamma$ A(GB No. NM\_014617.2), CA11(GB No. NM\_

019617.1), type II Golgi membrane protein(GB No. AI811298) 등 18개였으며, 이 외에도 lactate dehydrogenase A(GB No. AY 009108.1) 등의 發顯이 減少되었다(Table 2, Fig. 4-2).

Table 2. Decreased Genes after Treatment with CPC-HAS in HepG2

| Signal Log Ratio |             | Descriptions   |
|------------------|-------------|--|
| -4.3             | N54813      | olfactory receptor, family 2, subfamily W, member 3 pseudogene |
| -4               | AF239723.1  | AKAP-associated sperm protein                                  |
| -3.7             | M21985.1    | TR2  |
| -3.7             | NM_152711.1 | MGC43033   |
| -3.5             | AF130106.1  | PRO1107  |
| -3.4             | NM_014617.2 | crystallin, gamma A  |
| -3.3             | AW166711    | KIAA0403   |
| -3.2             | BG200397    | lipoma Li-294 ectopic sequence from HMGI-C fusion              |
| -3.1             | NM_019617.1 | CA11   |
| -3               | AA736604    | KIAA1189   |
| -2.9             | AI811298    | type II Golgi membrane protein                                 |
| -2.9             | R93946      | bHLH protein DEC2  |
| -2.8             | NM_023067.1 | FOXL2  |
| -2.8             | AF222345.1  | suppressor of fused variant 3                                  |
| -2.8             | BC034348.1  | hypothetical protein LOC284837                                 |
| -2.8             | AF009266.1  | clone FBA12 Cri-du-chat region                                 |
| -2.7             | AL031588    | ortholog of mouse transmembrane receptor Celsr1                |
| -2.1             | NM_152539.1 | hypothetical protein FLJ32859                                  |
| -1.6             | AY009108.1  | lactate dehydrogenase A  |
| -1.5             | AF251054.1  | NDR3   |

CPC-HAS ; Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution

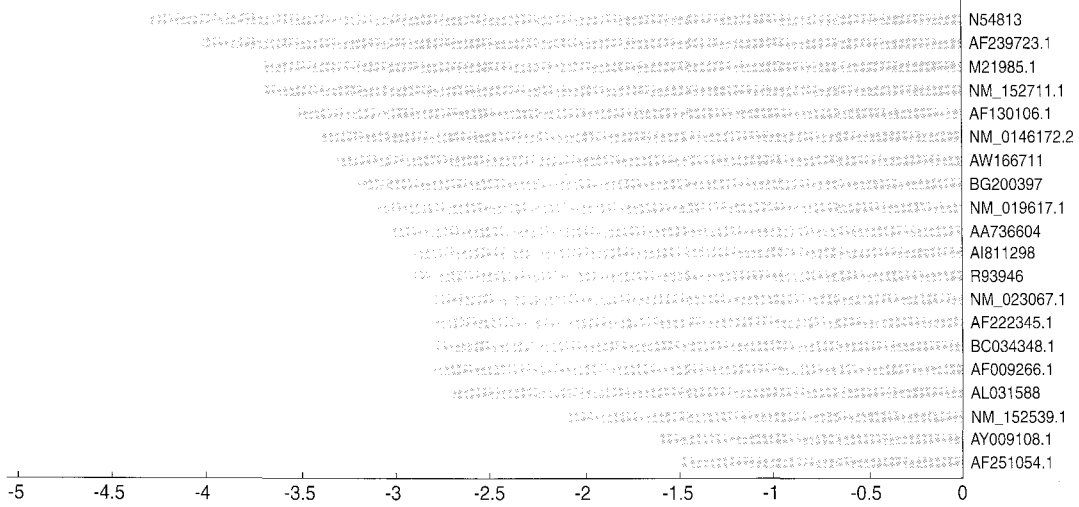


Fig. 4-2 CPC-HAS decreased their gene expression in HepG2. Each bar indicates fold decrease as shown in Table 2. X-axis indicates fold decrease of CPC-HAS compared to control and Y-axis indicates genebank numbers. CPC-HAS ; Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution

### 3. Q-TOF 分析

鹿茸藥鍼液 처리에 發顯 增減을 나타내는 단백질들을 찾기 위하여 2D-gel 전기영동과 Q-TOF 分析을 시행하였다. HepG2 細胞에 鹿茸藥鍼液을 처리 한 후 發顯 단백질들의 양적 차이를 비교하였다. 비교 후 增加나 減少를 나타내는 단백질들 중 발현차이가 뚜렷한 것들을 선정하여 동정하였다. 2D-gel 전기영동 후 나타나는 단백질들의

사진으로 치료처치 후 減少된 단백질을 spot 1과 spot 2라 명명하였다. Spot 1 단백질을 Q-TOF 分析으로 동정한 결과 ldehyde dehydrogenase 1(GB No. gil2183299)이었고 spot 2는 enolase 1(GB No. gil30583767)이었다(Fig. 5-a).

鹿茸藥鍼液 처리 후 增加되는 단백질 중 일부를 spot 3라 명명하고 같은 방법으로 동정하였다. Spot 3은 fatty acid binding protein 1 (GB No. gil4557577)로 밝혀졌고 發顯이 增加되었다(Fig. 5-b).

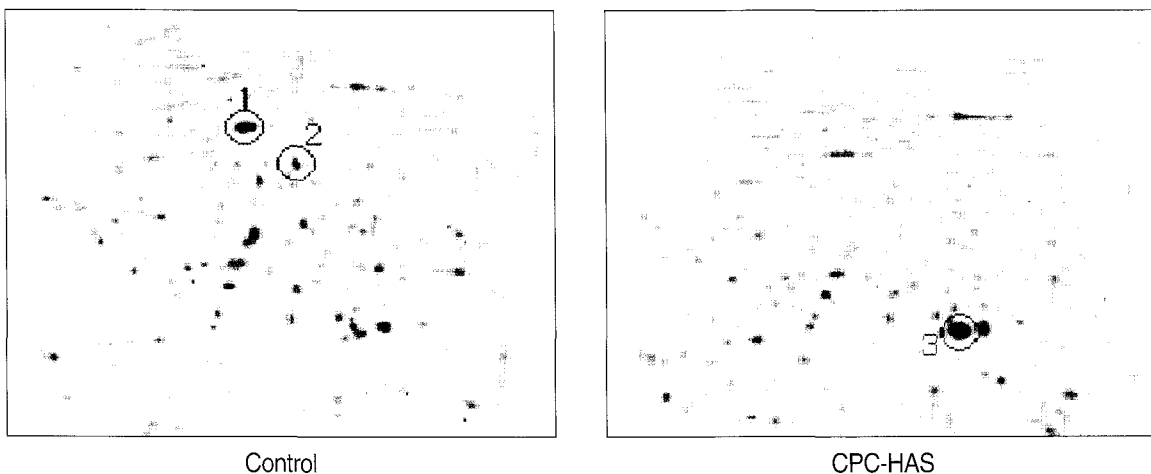


Fig. 5 Proteomic analysis of HepG2 cells after CPC-HAS treatment. Confluent HepG2 cells were treated with 1.5mg/ml of CPC-HAS for 24hrs and total proteins were obtained and analyzed as described in materials and methods. Control was no treatment with CPC-HAS. Spot 1 is a single circle in control. Spot 2 and spot 3 are upper and lower circle in CPC-HAS(1.5mg/ml), respectively. CPC-HAS ; Cervi parvum cornu Herbal-acupuncture Solution

#### IV. 考 察

癌이란 惡性 腫瘍을 총칭하는 용어로 개체를 구성하는 正常 細胞가 각종 자극에 의하여 遺傳子의 形질 轉환이 발생하고 그 결과 變形 細胞가 유전적으로 무절제한 增殖을 함으로써 형성된 變形 細胞 집단을 뜻하며 빠른 成長, 浸潤, 체내 각 부위로의 擴散 및 轉移 등과 같은 특성이 있어 생명의 위협을 초래한다<sup>1)</sup>.

과학기술의 발전에 따른 생활 및 의료수준의 향상에도 불구하고 산업발전에 따른 환경오염, 스트레스 등으로 인해 전 세계적으로 癌으로 인한 死亡率이 增加하고 있으며<sup>2)</sup>, 우리나라의 경우도 癌으로 인한 死亡率이 최근 20년 간 꾸준한 상승을 보여 전체 死亡原因 1위를 차지하면서 국민보건을 위협하는 가장 큰 요인이 되고 있다<sup>3)</sup>.

癌에 대한 西洋醫學的 治療는 1950년대까지는 手術 療法이, 1960년대에는 放射線療法이, 1970년대에는 抗癌 化學療法이, 1980년대에는 免疫療法이 발전하였는데 각자의 治療方式을 단독 혹은 복합적으로 적용하여 일부의 癌에서는 현저한 治療成果의 향상을 가져온 것은 사실이나, 각각의 한계나 부작용들이 있으므로 어느 療法도 癌의 완전한 治療法이 되지 못하고 있다<sup>4)</sup>.

癌에 대한 韓醫學的인 인식은 『內經』<sup>5)</sup>에서 積聚, 腸覃, 石瘕, 癭, 五臟之積 등에 대하여 구체적으로 언급한 이래로 癌은 腫瘍, 腸覃, 癭瘕, 癭贅, 贅贅, 癥瘕, 積聚, 噎膈, 反胃, 惡瘡, 岩 등의 범주에서 취급하고 있다<sup>6)</sup>. 癌의 발생 원인은 外感邪氣, 七情의 변화, 飲食失調 및 正氣虛弱 등으로 인하여 氣滯血瘀가 되거나 臟腑의 機能이 失調되어 발생하는 것으로 볼 수 있으며, 治法으로 益氣健脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎 등의 扶正法과 清熱解鬱, 祛濕解毒, 行氣理氣, 活血化瘀, 軟堅散結 등의 祛邪法 및 扶正祛邪의 方法이 제시되고 있다<sup>7)</sup>.

藥鍼療法은 經絡學說의 原理에 의거하여 韓藥材를 선택하여 有關한 穴位, 壓痛點 및 陽性反應點에 주입하여 刺鍼과 藥物作用을 통하여 생체의 機能을 조정하고 병리상태를 개선시켜 疾病을 治療하는 新鍼療法<sup>8)</sup>으로 다양한 藥鍼을 이용한 抗癌 연구가 활발히 진행되고 있다. 임 등<sup>9)</sup>은 皮膚癌이 誘發된 ICR계 생쥐의 足三里에 人蔘藥鍼을 시술한 후 腫瘍의 體積, B細胞와 T細胞의 含量, 림프구증식반응, 大食細胞의 貪食能, IL-2와 interferon의 生産能을 측정한 결과 比較群에 비해 有意한 效果가 있음을, 김 등<sup>20)</sup>은 全蝎藥鍼을 中腕에 시술했

을 때 發癌물질이 誘發하는 突然變異原性과 遺傳毒性을 抑制한다는 결과를 報告하였다.

鹿茸(antler, *Cervi parvum cornu*; CPC)은 『神農本草經』<sup>13)</sup>에 수록된 이래로 壯腎陽, 補氣血, 益精血, 強筋骨, 調衝任 등의 效能으로 虛勞羸瘦, 血虛眩暈, 腰膝酸軟, 耳鳴 등 일체 虛損 症狀에 널리 사용되어 왔으며, 함유된 성분<sup>21-23)</sup> 중 지금까지 밝혀진 것으로는 leucine, methionine, lycine, glycine, proline, glutamic acid 등 17종의 amino acid, galactose, hexose, glucose, pentose 등 당류 및 Ca, Mg, Al, Si, P 등 13종의 무기원소가 확인되었다.

최근 鹿茸의 效能에 관한 연구로 김 등<sup>24)</sup>은 성장 촉진과 지능발달에 대한 效果를, 李 등<sup>25)</sup>은 鹿茸의 造血效果를, 禹<sup>26)</sup>은 혈청 콜레스테롤 저하작용을 報告하였다. 특히 김 등<sup>23)</sup>은 鹿茸 추출물과 抗癌劑의 병용투여에 의한 抗癌劑 부작용 輕減 效果를 報告한 바 있으나, 抗癌에 관한 鹿茸藥鍼液의 分子生物學的인 研究는 한 등<sup>14)</sup>의 연구보고 외에는 거의 없는 실정이다.

이에 臨床的 作用機轉을 보다 깊이 이해하고 臨床的 應用의 폭을 넓히는 데에 도움이 되는 기초 자료로 쓰일 수 있도록, 鹿茸으로 藥鍼液을 조제하여 抗癌效能을 밝히고자, 肝癌細胞柱에 최신 oligonucleotide chip assay 법과 proteomic analysis 기법을 통해 大量의 遺傳子 發顯을 分析하였다.

최근 수많은 遺傳子를 찾고 그 機能을 알아내는데 종래의 Southern이나 Northern blotting, PCR을 기본으로 한 SSH(subtractive suppressive hybridization)<sup>26)</sup>, RDA (representational difference analysis)<sup>27)</sup> 그리고 difference display<sup>28-29)</sup> 方法들이 있지만 많은 양의 RNA를 必要로 하며 僞陽性率이 높아 수많은 인간의 遺傳子를 비교하는데 한계가 있다<sup>30)</sup>. 그러나 최근 DNA chip 기술의 도입으로 이 분야 研究에 획기적인 전기가 마련되었다<sup>5,6,8)</sup>. 이러한 分子生物學的 발전은 빠르게 발전하는 전자·기계공학의 발달과 밀접한 연관을 갖는데 이러한 노력으로 성인 엄지손톱 정도의 적은 공간에 수천에서 수만 가지의 적은 양의 유전물질을 한꺼번에 고밀도로 심어 놓을 수 있는 DNA chip 기술은 수많은 遺傳子를 한꺼번에 解讀하거나 비교할 수 있게 되었다. 현재 다량의 遺傳子 分析 方法 중 점차적으로 oligonucleotide chip을 많이 사용하고 있다. 이는 cDNA chip의 여러 가지 단점들을 극복할 수 있기 때문이다. 一例로 oligonucleotide chip은 같은 크기의 유리판에 훨씬 집적도를 높여 다량의 遺傳子를 한꺼번에 검색할 수 있다. Affymetrix社<sup>31)</sup>는



computer chip을 만들 때 사용되는 photolithography라는 기술을 응용하여 하나의 유리판 위에 수 만개의 다른 nucleotide들을 직접 합성하였다. Affymetrix社<sup>31)</sup>는 이 기술을 사용하여 초기에 1.28cm<sup>2</sup> 안에 65,000개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들었고, 지금은 400,000개 이상의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들 수 있게 되었다. 각각의 oligonucleotide들은 15-25개의 염기로 이루어져 있으며, oligonucleotide가 합성되는 유리의 표면은 각각의 염기들이 합성할 수 있게 보조체가 붙어 있다. 하지만 이들 보조체는 빛에 민감한 화학 물질로 덮여 있어 염기들이 합성될 수 없다. 이러한 성질을 이용하여 특별히 설계된 photomask를 위에 놓고 빛을 쏘이면 구멍이 나있는 곳으로 빛이 들어가 그곳에 있는 보조체의 화학물질들을 제거한다. 이렇게 화학물질이 제거된 보조체들을 가진 chip을 한가지 염기가 있는 곳에 놓으면 모든 활성화된 보조체들에 염기가 가서 합성된다. cDNA microarray chip과 oligonucleotide chip의 다른 점은 chip에 완전한 遺傳子 대신에 25mer를 심은 것이다. 이와 같은 차이점 때문에 遺傳子 發顯을 검색하는데 쓰이는 oligonucleotide chip을 만들 때 遺傳子의 어떤 부분을 선택하여 합성하는 지가 아주 중요하다. 평균 20개의 25mer들이 하나의 遺傳子를 대표하여 선택된다. 또한 각각의 결합 온도가 서로 비슷해야 한다. 이 oligonucleotide chip도 cDNA microarray chip과 마찬가지로 한 환경에만 發顯하는 遺傳子를 찾을 수 있을 뿐만 아니라 發顯 정도까지도 알 수 있다. 또한 Affymetrix oligonucleotide chip은 하나의 염기서열만 틀려도 결합을 하지 않는 성질을 이용하여 한 염기에 생긴 돌연변이까지도 찾아낼 수 있다. 따라서 oligonucleotide chip의 장점<sup>32)</sup>은 첫째로 遺傳子 發顯을 검색할 수 있고, 둘째로 많은 수의 遺傳子들을 한 번에 검색 가능하다. 셋째로 돌연변이를 검색할 수 있고, 넷째로 병의 진단, 遺傳子 發顯 청사진을 만드는데 이용 가능하다. 다섯째로 인체 遺傳子의 機能分析 연구에 이용 가능하며, 여섯째로 산업용 遺傳子 제조용 동식물 및 미생물 연구에 이용 가능하고, 일곱째로 실험용 동식물 모델 연구, 癌 및 질병 관련 遺傳子 진단, 遺傳子 治療 및 임상 병리학, 동식물 검역 및 환경변화에 따른 생태학 연구에 이용 가능하다. 이외에도 식품 안전성 검사, 신약 개발, 약제내성 검색 진단 및 DNA염기서열 분석에 이용 가능하다.

본 실험에서는 먼저 鹿茸藥鍼液의 癌細胞 增殖 抑制 效能 및 적정 농도를 알아보기 위해 MTT-assay 분석을

하였다. 鹿茸藥鍼液 처리 후 24시간 뒤 細胞 增殖을 살펴보면, 胃癌 細胞柱의 경우 0.5mg/ml에서는 오히려 增殖이 增加된 것을 보여주고 있으나, 1.5, 10, 20mg/ml에서는 對照群에 비하여 有意한 차이가 없었다.

鹿茸藥鍼液에 의한 細胞 增殖 抑制를 分子生物學的 기전으로 설명하기 위하여 cDNA microarray 분석을 시행하였다.

鹿茸藥鍼液을 처리한 경우 發顯이 增加되는 遺傳子-는 human mRNA UCIA(GB No. BG389789), regulator of G protein signaling RGS12(GB No. AF030110.1), MAPK 8 interacting protein 3(GB No. BF445013)이 있었다. 이 외에도 PP1650 unknown mRNA(GB No. AF217988.1), prostaglandin E2 receptor(GB No. L32662.1), coilin(GB No. BG391060) 등이 있었다.

MAPK family members는 외부환경의 스트레스에 대하여 細胞의 생존을 유지하는데 필수적인 요소로 세 부류로 나뉘어 있는데, ERKs(extracellular signal-regulated kinases), JNKs(c-Jun N-terminal kinases)와 p38-MAPKs이다. ERKs는 細胞의 생존에, JNKs와 p38-MAPKs는 細胞 死滅과 관련이 있다<sup>33)</sup>. 따라서 鹿茸에 의하여 MAPK 8 interacting protein 3의 發顯이 增加되는 것은 鹿茸의 抗癌 作用이 癌細胞의 細胞死滅 기전을 활성화시킴에 의한 것일 수 있음을 의미한다.

TGF(transforming growth factor)-β는 대개 사람의 上皮 細胞 增殖을 抑制하나 癌腫에서는 관찰되지 않는데, 肝癌 細胞柱에서 prostaglandin E2 receptor나 COX-2(cyclooxygenase-2)의 發顯이 활성화되면 TGF-β에 의한 細胞 增殖 抑制效果가 회복되는 것으로 나타났다<sup>34)</sup>. 따라서 鹿茸에 의한 prostaglandin E2 receptor의 發顯 增加는 TGF-β에 의한 細胞 增殖 抑制效果를 회복시켜 肝癌細胞의 增殖을 抑制하는 것으로 思料된다.

CBs(Cajal bodies)는 nuclear suborganelles로 작은 핵의 RNA나 핵인의 RNA가 전사 후 성숙 단계에 있음을 의미한다. 많은 수의 CBs가 다양한 형태의 細胞柱에서 발견이 되는데, 어떤 인자가 그 수를 조절하는지 아직 모르나 coilin의 카복시 말단이 그 수를 결정하는데 중요한 역할을 담당한다고 한다<sup>35)</sup>. 그런데 coilin이 癌腫에서 어떠한 역할을 수행하는지에 대하여는 알려진 바가 거의 없으므로 이 부분에 대하여는 추가적인 연구가 필요할 것으로 思料된다.

鹿茸藥鍼液을 처리한 경우 肝癌 細胞柱에서 發顯이 減少된 遺傳子-는 olfactory receptor family2(GB No.

N54813), TR2(GB No. M21985.1), crystalline,  $\gamma$ A(GB No. NM\_014617.2)가 있었다. 이 외에도 CA11(GB No. NM\_019617.1), type II Golgi membrane protein(GB No. AI811298), lactate dehydrogenase A(GB No. AY009108.1) 등의 遺傳子의 發顯이 減少되었다.

TR은 세포내 활성 산소의 생산과 관련된 thioredoxin의 활성을 조절하며, 활성산소의 생산 增加는 사람의 癌腫 細胞柱에서 흔히 관찰되는 현상의 하나로 이들에서는 TR isozyme (TR1, 2, 3)의 활성이 增加되어 있다<sup>35)</sup>. 鹿茸에 의하여 TR2의 發顯이 減少된 것은 鹿茸이 활성 산소의 생산을 抑制하는 效果가 있음을 의미한다.

CA11은 정상 자궁경부 조직에서는 發顯이 되나 자궁경부 癌腫이나 자궁 경부 癌腫의 細胞柱에서는 發顯이 되지 않는 것이며<sup>36)</sup>, 82%의 胃癌에서도 CA11 gene의 發顯이 減少된 것으로 報告되었으나, 腫瘍의 크기나 임파선 전이와 같은 임상적인 변수와의 연관관계는 없는 것으로 報告되었다<sup>37)</sup>. CA11은 鹿茸에 의하여 發顯이 減少되는 것으로 나타났으나, 아직 CA11이 癌腫에서 어떠한 역할을 하는 지에 대하여는 불명확한 상태이며, 이 부분에 대하여는 추가적인 연구가 필요할 것으로 思料된다. 흥미있는 것은 Q-TOF 分析에서 發顯이 減少된 것으로 나타난 dehydrogenase와 비슷한 효소가 microarray에서도 減少된다는 사실이다. 이는 鹿茸이 抗癌劑와 함께 사용되는 경우 癌腫에 대한 抗癌劑 감수성을 좋게 할 것임을 의미한다.

Q-TOF 分析은 이온화 방법으로 생성된 이온을 질량/하전량과의 비에 따라 분리 검출된 질량스펙트럼을 分析 해석하여 分析물질의 질량 및 그 구조를 확인할 수 있다. Q-TOF는 혼합물에 존재하는 특정 물질의 선택 기능이 우수할 뿐만 아니라 CID를 이용한 fragment를 높은 감도로 측정할 수 있다. 따라서 鹿茸藥鍼液 처리에 發顯 增減을 나타내는 단백질들을 찾기 위하여 2D-gel 전기영동과 Q-TOF 分析을 시행하였고, HepG2 細胞에 鹿茸藥鍼液을 처리한 후 發顯 단백질들의 양적 차이를 비교 후 增加나 減少를 나타내는 단백질들 중 발현 차이가 뚜렷한 것들을 선정하여 동정하였다.

肝癌 細胞柱에서 鹿茸藥鍼液을 처리하고 증감된 단백질을 Q-TOF를 통하여 分析한 결과, aldehyde dehydrogenase 1(GB No. gil2183299), enolase 1(GB No. gil30583767)의 發顯이 減少되었고 fatty acid binding protein 1(GB No. gil4557577)의 發顯이 增加되었다.

Aldehyde dehydrogenase는 ethanol detoxification 및 신

경진달 물질의 대사와 retinoic acid의 합성 작용을 한다<sup>38)</sup>. 또한, 癌腫에서 다발성 약제 내성은 抗癌治療가 실패하게 되는 원인이고 이전의 胃癌細胞柱에서 행한 연구에서 hsp27, rcl, aldehyde dehydrogenase 1, vimentin의 發顯 增加를 관찰할 수 있었으며 이들은 抗癌劑 내성과 연관이 있는 것으로 보여 진다<sup>39)</sup>. 따라서, aldehyde dehydrogenase 1의 發顯을 減少는 鹿茸이 抗癌劑 내성과 관련이 있는 효소의 發顯을 抑制함으로써 癌腫에 대한 抗癌劑 감수성을 增加시킬 수 있을 것임을 의미한다. Fatty acid binding protein 1의 發顯 增加는 鹿茸에 포함되어 있을 것으로 믿어지는 지방성분과 결합하기 위하여 增加된 것으로 思料된다.

本 實驗의 結果 肝癌細胞柱에 鹿茸藥鍼液 處理 時 癌細胞의 成長에 관련되는 遺傳子 뿐 아니라 轉移에 관련되는 遺傳子의 發顯도 抑制하였으며, 특히 抗癌劑 감수성을 높일 수 있다는 가능성을 보인 것은 抗癌劑 治療를 받는 환자에서 鹿茸을 같이 처방하는 경우 그 效果가 增加될 수 있음을 의미하나, 자세한 機轉을 糾明하기 위해서는 더 많은 研究가 進行되어야 할 것으로 思慮된다.

## V. 結 論

鹿茸藥鍼液의 抗癌效能을 밝히고자 肝癌細胞柱에 최신 oligonucleotide chip assay법과 proteomic analysis기법을 통하여 大量의 遺傳子 發顯을 分析한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MTT 分析에서 肝癌細胞柱는 0.5, 1.0mg/ml에서 細胞增殖이 增加되었으며, 다른 농도에서는 對照群에 비해 有意한 細胞 數의 變化를 보이지 않았다.
2. 鹿茸藥鍼液 處置 時 對照群에 비해 發顯이 2배 이상 增加된 遺傳子는 human mRNA UCIA, regulator of G protein signaling RGS12, MAPK 8 interacting protein 3 등 5개였다.
3. 鹿茸藥鍼液 處置 時 對照群에 비해 遺傳子의 發顯이 2배 이상 減少된 것은 olfactory receptor family2, TR2, crystalline,  $\gamma$ A, CA11 등 18개였다.

4. Q-TOF 分析에서 aldehyde dehydrogenase 1, enolase 1 의 發顯이 減少되었고 fatty acid binding protein 1 의 發顯이 增加되었다.

이상과 같이 鹿茸藥鍼液에 대한 肝癌細胞柱의 遺傳子 發顯을 oligonucleotide分析과 proteomic analysis기법으로 大量 檢索할 수 있었고, 심한 發顯 差異를 나타내는 각 遺傳子는 癌化 過程이나, 鹿茸藥鍼液에 반응하는 遺傳子로 치료제 개발을 위한 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 思料된다.

### 參考文獻

1. 서울대학교 의과대학. 종양학. 서울:서울대학교 출판부. 1992 : 1, 3, 27, 36, 91, 99, 137-192.
2. 통계청. 2003년 사망원인통계연보. 대전: 통계청. 2004 : 22-4.
3. 박재갑. 인간생명과학. 서울:서울대학교출판부. 1993:662-73.
4. El-Aneed A. Current strategies in cancer gene therapy. European Journal of Pharmacology. 2004 ; 498(1-3) : 1-8.
5. Guimaraes MJ, Lee F, Zlotnik A, McClanahan T. Differential display by PCR:novel findings and applications. Nucleic Acids Res. 1995 ; 23(10) : 1832-3.
6. Kurian K, Watson CJ, Wyllie AH. DNA chip technology. J Pathos. 1999 ; 187(3) : 267-71.
7. DeRisi JL, Penland L, Brovn PO. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. Nature Genet. 1996 ; 14(4) : 457-60.
8. Sapolsky RJ, Lipshultz RJ. Mapping genomic library clones using oligonucleotide arrays. Genomics. 1996 ; 33(3) : 445-56.
9. Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L. New goals for the U.S. human genome project: 1998-2003. Science, 1998 ; 282(5389) : 682-746.
10. 김정숙. 생약을 이용한 골다공증 치료제 개발연구. 제 1 회 골다공증 연구회 심포지움 proceeding. 1998 ; 1 : 32-6.
11. 강성길, 김대수. 녹용 , 인삼 및 영지수침이 면역반응에 미치는 영향. 경희의학. 1988 ; 8(2) : 138-54.
12. 김남재, 심상범, 김재근, 원도희, 홍남두. 녹용 물 추출물과 항암제의 병용투여에 관한 연구. 생약학회지. 1998 ; 29(2) : 93-104.
13. 中國醫藥院編. 申農本草經. 集文書局. 臺北. 1976 : 27.
14. 한상원, 서정철, 이운호, 최제용. 鹿茸藥鍼液의 DNA chip을 利用한 遺傳子 發顯 分析. 大韓鍼灸學會誌. 2003 ; 20(3) : 34-44.
15. 楊維傑 編. 黃帝內經素門靈樞錫解. 성보사. 서울. 1980 : 41, 45, 97, 168, 243, 295-296, 407, 447, 469, 473, 577.
16. 許俊. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1988 : 486-96, 720.
17. 賈堃. 癌瘤防治研究. 서울 : 成輔社. 1984 : 25-7.
18. 全國韓醫科大學 鍼灸·經穴學教室 編. 鍼灸學 <下>. 4. 서울 : 集文堂. 1994 : 1457-67
19. 임사비나, 한상원, 변부형. 人蔘藥鍼과 Lidocaine을 添加한 人蔘藥鍼이 腫瘍 및 免疫機能에 미치는 影響. 東西醫學. 1995 ; 20(3) : 21-40.
20. 김소형, 김갑성. 牟蝸 藥鍼液의 抗突然變異 및 抗癌 效果. 大韓鍼灸學會誌. 2000 ; 17(3) : 151-67.
21. 全國韓醫科大學 本草學教室 編. 本草學. 서울 : 永林社. 1991 : 545-6.
22. 보건사회부. 대한약전 외 한약(생약)규격집. 서울 : 보건사회부. 1987 : 98.
23. 한상원, 김영태, 손양선, 진수희, 심인섭, 임사비나 외. 鹿茸 및 鹿茸藥鍼이 動物의 成長과 知能發達에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2001 ; 18(5) : 122-35.
24. 李敏炯, 徐榮培. 鹿茸의 造血作用에 對한 實驗的 研究. 大韓本草學會誌. 2001 ; 16(1) : 91-110.
25. 용재익. Cholesterol 投與 家兔의 血清 中 cholesterol 에 미치는 鹿茸의 影響. 약제학회지. 1976 ; 6(3) : 314-20.
26. Schuler GD, Bonguski MS, Stewart EA, Stein LP, Gyapay G, Rice K, et al. A gene map of the human genome. Science. 1996 ; 274(5287) : 540-6.
27. Hedric SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM. Isolation of cDNA clones encoding T-cell specific membrane associated proteins. Nature. 1984 ; 308 (5955) : 149-53.

28. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science* 1992 ; 257(5072) : 967-71.
29. Mason IJ, Taylor A, Williams JG, Sage H, Hagan BLM. Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryoparietal endoderm is related to an endothelial cell culture shock glycoprotein of Mr. 43000. *EMBO J.* 1986 ; 5(9) : 1465-72.
30. Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R, Pardee AB. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 1992 ; 52(24) : 6966-8.
31. <http://www.affymetrix.com>
32. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene.* 2004 ; 23(16) : 2838-49
33. Han C, Demetris AJ, Liu Y, Shelhamer JH, Wu T. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) activates cytosolic phospholipase A2alpha (cPLA2alpha)-mediated prostaglandin E2 (PGE)2/EP1 and peroxisomeproliferator -activated receptor-gamma (PPAR-gamma)/Smad signaling pathways in human liver cancer cells. A novel mechanism for subversion of TGF-beta-induced mitoinhibition. *J Biol Chem.* 2004 ; 279(43) : 44344-54
34. Shpargel KB, Ospina JK, Tucker KE, Matera AG, Hebert MD. Control of Cajal body number is mediated by the coilin C-terminus. *J Cell Sci.* 2003 ; 116(Pt 2) : 303-12
35. Sun QA, Wu Y, Zappacosta F, Jeang KT, Lee BJ, Hatfield DL, Gladyshev VN. Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem.* 1999 ; 274(35) : 24522-30
36. Ko J, Ryu KS, Lee YH, Na DS, Kim YS, Oh YM, Kim IS, Kim JW. Human secreted frizzled-related protein is down-regulated and induces apoptosis in human cervical cancer. *Exp Cell Res.* 2002 ; 280(2) : 280-7
37. Spence JP, Liang T, Eriksson CJ, Taylor RE, Wall TL, Ehlers CL, Carr LG. Evaluation of aldehyde dehydrogenase 1 promoter polymorphisms identified in human populations. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003 ; 27(9) : 1389-94
38. Ludwig A, Dietel M, Lage H. Identification of differentially expressed genes in classical and atypical multidrug-resistant gastric carcinoma cells. *Anticancer Res.* 2002 ; 22(6A) : 3213-21.