

옷추출물 처리에 의한 U937 세포에서의 특정 RNA 발현 양상

정미영¹ · 오세욱*

한국식품연구원 안전성연구단, ¹고려대학교 생명공학원

Isolation and Elucidation of Specific RNAs by Treatment of *Rhus verniciflua* Stokes Extract to U937 Cell

Mi-Young Jeong¹ and Se-Wook Oh*

Food Safety Research Division, Korea Food Research Institute

¹School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

Abstracts Differential display RT-PCR was used for screening the differentially expressed specific genes by *Rhus verniciflua* extract treatment to U937 cell, human leukemic monocyte. As a result, 19 clones differentially expressed were detected. Among the detected clones, one clone was confirmed to be over-expressed by *R. verniciflua* extract treatment in Northern blot analysis. Nucleotide sequence of the clone showed 100% homology with H2A histone family member Z gene. Therefore, it is concluded that the treatment of *R. verniciflua* extract to U937 cell specifically induces the expression of H2A.Z gene but its role should be elucidated by future works.

Key words: specific RNA, differential display, H2A.Z gene, *Rhus verniciflua*, extract

서 론

옷나무는 동북아시아에서 자라는 낙엽활엽 소교목으로 옷수액은 옷칠이라 하여 도료 및 공업용으로 사용되었으며 한방에서는 구충, 복통, 통경, 변비, 빈혈 등의 약용 약재로 이용되어 왔다(1). 주요성분으로는 urushiol(55-70%), 고무질(4-8%), 질소함유물(2-3%), 효소와 수분(10-40%)과 플라보노이드(1-2%)로 구성되어 있다(2).

옷 성분의 대부분을 차지하는 물질인 urushiol은 피부를 통하여 세포내부까지 이행되고 면역체계에 의해 대식세포를 활성화시켜 접촉성 피부염을 일으키며 구강을 통한 섭취 시에도 혈류로 이행하여 전신에 피부염을 유발할 수 있다. 그럼에도 불구하고 옷은 항산화작용, 항암작용, 면역력 증진 작용 등이 알려져 있어 한방과 민간에서 해열, 구충, 소염, 통경, 어혈, 폐결핵, 관절염 등 광범위한 치료제로 사용되어 왔다(3). 특히, 옷에 존재하는 플라보노이드 성분들은 항산화 효과 뿐 아니라 항암, 간 보호, 항균작용까지 알려져 있어 민간요법으로 이용되어지고 있다(4).

플라보노이드는 식물이 생산하는 색소체로서 동물에 섭취된 경우, 항알레르기, 항염증생성, 항균작용 및 항암작용 관련된 기능을 하는 것으로 많은 연구를 통해 보고되어지고 있다. 옷은 약 1%의 플라보노이드 성분을 함유하고 있으며, 앞서 언급한 옷의 치료제로서의 기능과 작용기작을 설명하기 위해 이들 성분

과 활성에 관한 연구가 비교적 활발하게 진행되고 있다. Lee 등(5)은 옷나무 에탄올 추출물은 항산화 활성을 가지고 있으며, 이 성분은 플라보노이드 유도체인 fustin, quercetin, butein, sulfuretin이라고 보고하였다. Lim 등(6)은 옷나무 에탄올 추출물의 쥐 뇌 세포에 대한 항산화효과를 측정하였으며 당단백질이 항산화효과를 나타낸다고 하였다. Kim 등(7)은 옷나무 에탄올 추출물로부터 항산화 활성 물질의 구조 동정을 실시하여 gallic acid, butin과 butein이 항산화 활성을 나타낸다고 하였다. Kim(8)은 옷나무 껍질에서 분리한 항산화물질을 gallic acid로 동정하였으며 자궁암 세포인 HeLa 세포에 대하여 세포독성이 있다고 하였다. 또한, Lee 등(9)은 옷나무 에탄올 추출액을 인간의 림프종의 일종인 BJAB와 Jurkat 세포에 처리하였을 때 apoptosis를 통한 세포 사멸을 유도하는 것을 발견하였고, 이후의 연구(10)를 통해서 이 추출물 내의 세포사멸 유도 물질을 protocatechuic acid, fustin, fisetin, sulfuretin 및 butein 등의 플라보노이드 유도체로 동정하였다.

식품산업적인 측면에서는 이러한 우수한 천연물질의 추출물을 식품에 첨가하여 식품의 기능성과 소비를 높이려는 시도가 활발히 진행되고 있다. Liang 등(11)은 옷을 급여한 한우육의 해동 후 냉장과정 중 품질에 미치는 영향을 조사하여 감량, 육색, TBARS, 표면육색소의 변화가 현저히 지연되어 품질이 향상되었다고 하였다. Lee 등(5)은 옷 급여 돈육과 추출물로 제조한 유화형 소시지의 품질비교 결과 옷 급여 돈육에 물을 첨가하여 제조한 소시지가 저장 중 색깔이 가장 밝고 지방산화 및 단백질의 부패가 억제되었으며 조직감이 단단하여 품질이 우수하였다고 하였다. Kim 등(12)은 무독화된 옷을 강정에 첨가하여 가온 저장시 품질 특성을 조사한 결과, 식품의 지방산화를 억제할 수 있었다고 하였다.

단핵구 U937 세포는 림프종이며, 다양한 요인에 대식세포로 발전하고, 이후에 다시 거품세포로 전환되어 혈관벽에 흡착되고 혈관 내벽으로 침투하여 동맥경화를 일으키는 것으로 알려져 있다.

*Corresponding author: Se-Wook Oh, Food Safety Research Division, Korea Food Research Institute, Seongnam, Kyunggi-do 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9299
Fax: 82-31-709-9876
E-mail: swoh@kfri.re.kr
Received June 7, 2008; revised September 8, 2008;
accepted September 11, 2008

또한 단핵구 세포로부터 유래한 성장인자들이 평활근세포의 이동과 증식을 촉진시킴으로 동맥경화를 촉진시키기도 한다(13-16). 많은 연구에서 U937세포는 체외 단핵구 및 대식세포의 모델로 항암제 및 식품첨가물질들의 세포독성 효과를 검증하는 세포주로 사용되고 있다(17-19).

따라서 본 연구에서는 항산화 및 항암 효과가 뛰어난 옷의 추출물을 단핵구 U937 세포에 처리하여, 실험 처리구와 대조구 간의 유전자 발현 양상을 differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction(DDRT-PCR)을 통하여 비교 분석하였다. 이를 통해 선별된 유전자의 기능을 고찰함으로써 옷 성분이 가지는 혈전생성 억제와 관련된 분자생물학적인 작용기작을 유추해 보고자 하였다.

재료 및 방법

세포 배양방법

초순수 증류수에 RPMI-1640(Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)를 녹이고, 10 mL/L penicillium, 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 세포배양액으로 사용하였다. 세포의 배양은 5% CO₂로 조정된 배양기 내에서 1×10⁶ cells/mL와 1×10⁶ cells/mL 사이의 농도를 유지하여 37°C에서 배양하였다.

옷추출물 처리

증류수와 에탄올로 상온에서 3일간 추출한 각각의 옷 추출액은 거름종이로 걸러낸 후, 계대배양 후 24시간이 지난 세포에 0.1%(v/v)의 농도로 배지에 희석하여 처리하였다. 대조구에는 동일 부피의 배지를 첨가하였다. 24시간 동안 처리한 세포를 RNA 추출에 사용하였다.

RNA 분리

옷추출물을 처리한 후 24시간 동안 배양한 세포는 원심분리하여 배지와 분리하고, RNAzolB(Tel-TEST, Friendswood, TX, USA)를 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA의 염색체 DNA를 제거하기 위하여 RNase-free DNase(Promega, Madison, WI, USA)로 처리하고 이때 RNase 저해제인 RNasin(Promega, Madison, WI, USA)을 첨가하여 RNA의 손상을 최소화하였다. 즉, 전체 100 L의 반응 부피에 50 µg의 RNA, 10 units의 RNase-free DNase, 10 L의 10⁶DNase 완충액을 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 70°C에서 10 분간 방치하여 RNase-free DNase의 활성을 실행시킨 후, 역전사(reverse transcription) 반응에 사용하였다.

mRNA differential display

mRNA differential display는 Zhao 등(16)이 제시한 방법을 변

형하여 수행하였다. 기존의 DDRT-PCR 방법에서는 유리 α-³²S-dATP를 PCR 반응에 첨가하여 labelling하는 반면 본 실험에서는 임의의 프라이머의 5' 말단을 T4 polynucleotide kinase(Promega, Madison, WI, USA)와 γ-³²P-ATP(3000 Ci/mmmole, Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 표지하였으며 이를 PCR 반응의 프라이머로 사용하였다. 프라이머의 표지 과정에서 사용된 T4 polynucleotide kinase는 65°C에서 20분간 처리하여 효소의 활성을 불활성화시킨 후, 최종적으로 프라이머의 농도가 2 M가 되게 희석하여 다음 반응에 첨가하였다.

프라이머

본 실험에 사용된 프라이머들은 Bioneer사(Daejeon, Korea)에서 합성하였으며, Table 1에서와 같이 기존의 방법(11)과는 다르게 mRNA의 3' 말단과 5' 말단에 결합하는 각 E1T₁₂VN과 임의의 프라이머들에 제한효소 자리를 포함하는 10 bp를 덧붙여 20-mer(E2AP)가 되게 합성하였다(20).

First-strand 상보 DNA 합성

추출한 전체 RNA로부터의 첫 번째 상보 DNA 사슬은 다음의 역전사 반응을 통해 합성하였다. 분리한 전체 RNA를 3' anchored 프라이머와 Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 42°C에서 반응시켰다. 70°C에서 10분간 열처리하여 역전사효소를 불활성화 시킨 후 TE 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 희석하여 PCR 수행 시에 주형으로 사용하였다.

상보 DNA 증폭

상보 DNA의 증폭은 역전사 반응에서 사용한 3' anchored 프라이머와 한 종류의 5' 임의의 프라이머를 조합하여 각각의 PCR을 수행하였다. PCR은 PCR용 튜브에 2 µL의 ³²P로 표지된 임의의 프라이머(2 M), 2 µL의 3' anchored 프라이머(2 µM), 2 µL의 first strand 상보 DNA 주형을 먼저 넣고, 14 µL의 혼합용액[2 µL의 10×PCR 완충액, 2 µL의 dNTP(20 µM), 0.2 µL의 Han-Taq DNA 중합효소(Genemmed, Seoul, Korea), 9.8 µL의 2차 증류수]를 혼합하여 20 µL의 반응부피가 되게 하였다. 반응은 유전자 증폭기(Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)에서 94°C에서 12분간 Han-Taq DNA 중합효소를 활성화시킨 후, 첫 cycle은 94°C 30초, 40°C 2분, 72°C 30초, 그리고 나머지 34 cycle은 94°C 30초, 60°C 2분, 72°C 30초의 순서로 PCR을 수행하고, 72°C에서 10분간 신장 반응을 실시하였다.

옷추출물 처리에 의한 발현 차이를 나타내는 상보 DNA 선별

증폭된 상보 DNA 용액은 12 µL의 formaldehyde/EDTA/XC(xylene cyanol FF)/BPB(bromophenol blue) 젤 로딩 완충액을 첨가하고 75°C에서 5분간 증탕하여 PCR 반응액을 불활성화 시켰

Table 1. Primers used in DDRT-PCR

	Primer	Designed primers	Restriction
3' anchored primer	E1T ₁₂ MA	CGGAATTCGGTTTTTTTTTTTMA	<i>EcoRI</i>
	E1T ₁₂ MG	CGGAATTCGGTTTTTTTTTTTMMG	<i>EcoRI</i>
5' arbitrary primer	E2AP2	CGTGAATTCGGACCGCTTGT	<i>EcoRI</i>
	E2AP3	CGTGAATTCGAGGTGACCGT	<i>EcoRI</i>
	E2AP4	CGTGAATTCGCTGATCCATG	<i>EcoRI</i>
	E2AP5	CGTGAATTCGCTTGATTGCC	<i>EcoRI</i>

으며, 이를 6% 변성 폴리아크릴아마이드 겔에 3 μ L을 로딩하여 70 watt(= 1500 volts)에서 3시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동을 완료한 겔은 겔 건조기를 사용하여 2시간 동안 말린 후 -70°C에서 X-ray 필름에 감광시켰다. 방사성 동위원소로 표지되어 증폭된 상보 DNA들은 대조구와 시료 처리구의 밴드 양상을 상호 비교하여 강도에 차이를 나타내는 밴드를 선별하였다.

DDRT-PCR product 재증폭

옷 추출액 처리에 대하여 발현 차이를 보이는 상보 DNA에 대한 밴드를 X-ray 필름을 통해 비교, 선별하고 DDRT-PCR 반응에서 사용한 각각의 3' anchored 프라이머와 5' 임의의 프라이머 쌍을 사용하여 해당 상보 DNA 단편들을 재증폭하였다.

먼저, 선별한 밴드에 해당하는 상보 DNA 단편들을 DNA sequencing 겔로부터 용출하기 위하여, X-ray 필름을 gel 상의 autoradiogram 표지와 정확히 일치시키고 날카로운 칼을 사용하여 밴드부분의 아크릴아마이드 겔을 잘라내어 튜브로 옮긴 후, 100 μ L의 물로 1시간 이상 재수화하여 15분간 끓였다.

상보 DNA를 재증폭하고 획득하기 위하여 다음과 같이 PCR 반응을 수행하였다. PCR 튜브에 5 μ L의 3' anchored 프라이머 (2 μ M), 5 μ L의 5' 임의의 프라이머(2 μ M), 10 μ L의 상보 DNA 용출액을 먼저 넣고 30 μ L의 혼합용액[5 μ L의 10 \times PCR 완충액, 1 μ L의 α -³⁵P-dCTP, 5 μ L의 dNTP(400 μ M), 0.5 μ L의 Han-Taq DNA 중합효소(10 units/L), 19.5 μ L의 ddH₂O]을 혼합한 후, 50 μ L의 최종 반응 부피에서 94°C에서 12분간 Han-Taq DNA 중합효소를 활성화시킨 후, 94°C 30초, 60°C 2분, 72°C 1분으로 30 cycle을 진행시키고 72°C에서 10분간 최종 신장 반응을 실시하였다. 증폭된 상보 DNA는 1.5% 아가로스 겔 상에서 전기영동으로 확인하였다.

Reverse northern blot analysis

상기 전술한 바와 같이 발현 차이를 보여 재증폭한 상보 DNA에 대한 유전자의 발현 차이를 재확인하기 위하여 reverse northern blot 분석을 실시하였다. 일정량의 상보 DNA를 3개의 1.5% 아가로스 겔 상에 동일하게 전기영동하여 이 겔을 변성 용액(0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)으로 2회에 걸쳐 20분간 처리하고 증류수로 세척한 후, 20 \times SSC(3 M NaCl, 0.46 M sodium citrate, pH 7.0)로 20분간 처리하고 N⁺-nylon membrane(Amersham Bioscience)에 이동시켰다. 이 한 쌍의 membrane들을 6 \times SSC로 한번 씻어주고 3 MM 종이 위에서 5분간 건조시킨 후, UV 고정기를 이용하여 120 mJ/cm²의 에너지를 가해 상보 DNA를 membrane에 더욱 고정시켰다. 건조시킨 membrane을 Express-Hyb(Clontech, Mountain View, CA, USA) 용액으로 60°C에서 2시간 이상 전처리하고 아래와 같이 준비한 ³²P-표지된 프로브를 12시간 동안 접촉하였다. 접촉 후, membrane 세척은 2 \times SSC, 0.1 % SDS로 상온에서 20분간 2회, 그리고 0.2 \times SSC, 0.1% SDS로 50°C에서 20분간 2회에 걸쳐 수행하였다.

Reverse northern blot 분석을 위한 프로브는 대조군과 시료 처리군에서 추출한 전체 RNA를 역전사 반응을 이용하여 first strand 상보 DNA를 합성한 후, 이중가닥 상보 DNA를 제조할 때 second strand를 α -³⁵P-dCTP로 표지하여 사용하였다. 전술한 바와 같이, 역전사 반응을 이용한 first strand 상보 DNA 합성에서 전체 RNA는 10 μ g으로, 3' 프라이머로는 1 μ L의 oligo(dT)₁₂₋₁₈(500 μ g/mL)를 사용하고 다른 반응 조건은 동일하게 하여 first strand 상보 DNA를 합성하였다. 이 반응액 20 μ L에 6 μ L의 High prime DNA labeling kit(Boehringer Mannheim, Ingelheim, Germany)과 4 μ L의 α -³⁵P-dCTP를 혼합하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 반

응물을 Sephadex G-50 컬럼에 적용시켜 free α -³⁵P-dCTP를 제거하고 동일한 방사능량의 프로브로 접촉을 수행하였다.

Sequence analysis of 3-3 clone

3-3 클론을 PCR 생성물 클로닝 벡터인 pGEM-T easy vector (Promega)에 클로닝하여 염기서열을 분석하였다.

결과 및 고찰

옷추출물 처리에 의한 발현 차이를 나타내는 상보 DNA 선별

옷은 옷나무에서 추출한 수액을 가르키는 말이며, 공예품에 사용되거나 식품 또는 한약 재료로 사용되는 등 그 쓰임새가 다양한 것으로 알려져 있다. 특히 옷나무 또는 옷의 수액을 식품이나 약품에 첨가하여 복용하는 등의 민간요법이 현재까지도 전해져 내려오고 있다. 본 연구에서는 특히 옷이 가지는 질병치료의 기능에 초점을 맞추고, 이를 위해서 혈액으로부터 유래한 단핵구인 U937을 옷 추출물을 처리할 세포주로 선택하였는데, 이 세포는 림프종이며, 다양한 요인에 대식세포(macrophage)로 발전하고, 이후에 다시 거품세포로 전환되어 혈관벽에 흡착되고 혈관 내벽으로 침투하여 동맥경화를 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 단핵구 세포로부터 유래한 성장인자들이 평활근세포의 이동과 증식을 촉진시킴으로 동맥경화를 촉진시키기도 한다(13-16). 많은 연구에서 U937세포는 체외 단핵구 및 대식세포의 모델로 항암제 및 식품첨가물질들의 세포독성 효과를 검증하는 세포주로 사용되고 있다(17-19). 따라서 본 단핵구의 옷 추출액 처리에 대한 유전자 발현양상을 분석한다면, 옷 추출물 처리에 의한 단핵구 세포 사멸, 혹은 세포 전환을 일으키는 작용기작에 대한 유추를 가능하게 할 것으로 생각되어 진다. 세포에 처리할 옷 추출물은 두 가지 다른 방법, 즉 열수추출과 에탄올 추출을 통하여 준비하였다. 각 옷 추출물은 용매를 대조구로 하여 세포주인 U937에 세포독성을 일으키지 않을 정도의 농도를 정하고, 이에 맞게 희석하여 세포에 처리한 후 24시간 배양하였고, 이후 세포를 회수하여 전체 RNA를 추출하여 DDRT-PCR을 실시하였다. 우선 각 샘플로부터 옷 추출물에 의해서 다르게 발현되어진 mRNA를 선별하기 위한 DDRT-PCR을 수행하기 위해, Table 1에 표시한 동위원소로 표지된 두 가지 다른 3' anchored 프라이머를 이용하여 주형으로 쓰일 상보 DNA를 합성한 후, 다시 Table 1에 나타난 두 가지 3' anchored 프라이머와 5' 임의의 프라이머를 각기 다르게 조합해 PCR을 수행하였다. 이후에 얻은 PCR 결과물은 6% 변성 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동하고 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

각 패널 (A), (B), (C) 그리고 (D) 는 E2AP2, E2AP3, E2AP4, E2AP5을 5' 임의의 프라이머로 사용하고, 그림의 위에 표시된 대로 왼쪽은 EIT₁₂MA을 오른쪽은 EIT₁₂MG을 3' anchored 프라이머로 이용하여 PCR한 것을 겔에 전개한 결과이다.

옷추출물 처리에 의한 발현 차이를 나타내는 상보 DNA 선별

Fig. 1에 나타낸 PCR 생산물의 전개된 양상을 대조구와 비교하고, 서로 다른 발현 양상을 보이는 PCR 결과물을 4-5개씩 선별하여 모두 19개의 밴드를 선별하였다. 이 선별된 상보 DNA를 확보하고 염기서열을 분석하기 위해, 각 선별된 상보 DNA 밴드를 건조한 겔로부터 오려내어 수화시켜 상보 DNA를 회수하고 이를 다시 최초 PCR 반응에 사용했던 3' 및 5' 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 회수된 샘플은 5' 임의의 프라이머의 이름 끝에 오는 숫자에 따

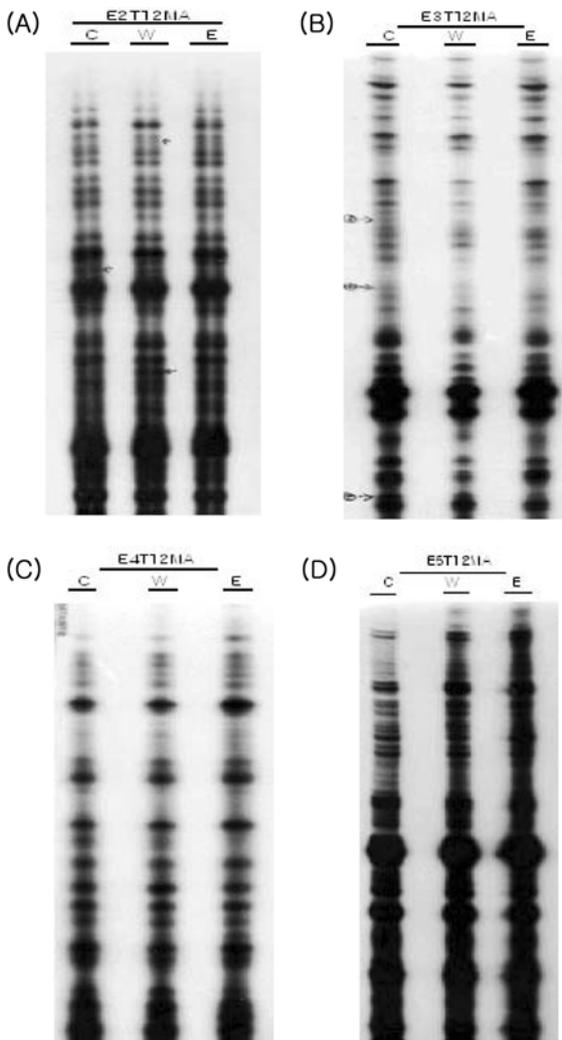


Fig. 1. Differential display of mRNA from U937 treated with *Rhus verniciflus* extract. Total RNA were extracted from U937 cells treated with or without *Rhus verniciflus* extract for 24 hours. cDNA prepared by reverse transcription were used as template amplified in DDRT-PCR with 5'-arbitrary primer and 3'-anchored primer. PCR product were loaded on 6% denaturing polyacrylamide gel, dried, and exposed to X-ray film. (A)-(D) were the results of DDRT-PCR using E2AP2, E2AP3, E2AP4, and E2AP5 as 5'-arbitrary primer, respectively. C, control; W, U937 treated with water extract of *Rhus verniciflus*; E, U937 treated with EtOH extract of *Rhus verniciflus*

라 각각 2-, 3-, 4- 혹은 5-로 명명하였다. 각 PCR 결과물은 최초 회수된 상보 DNA의 양에 따라 증폭량의 양적인 차이를 나타내기는 하지만, 각 밴드들의 상대적인 크기 등을 비교해 볼 때, 실제로 건조된 겔로부터 목적한 상보 DNA들이 회수되어 증폭되었음을 확인할 수 있었다.

Reverse northern blot 분석

본 연구에서 사용된 DDRT-PCR 방법은 실험 처리구 사이의 유전자 발현 양상을 비교하여 다른 양상을 나타내는 밴드를 선별하고 직접 회수하여 그 유전자를 확인할 수 있다는 장점을 가지나, 그 결과의 정확성을 더하기 위해서는 다음과 같은 검증과정이 필수적이다. 따라서 이상의 실험을 통해 선별된 19개의 유전자들이 실제로 옷 추출물에 의해서 선행 실험과 동일한 발현

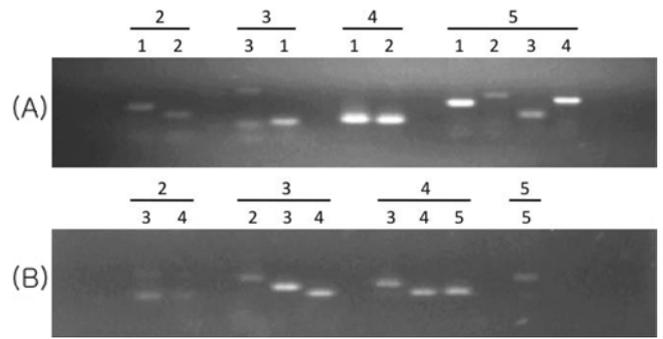


Fig. 2. Reamplification of the clones which are selected in DDRT-PCR. A is the results of reamplified DDRT-PCR product with EIT₁₂MA as 3' primer and 5'-arbitrary primer using cDNA prepared by rehydration of gel fragment as template. B is the results of reamplified DDRT-PCR product with EIT₁₂MG as 3' primer and 5'-arbitrary primer using cDNA prepared by rehydration of gel fragment as template.

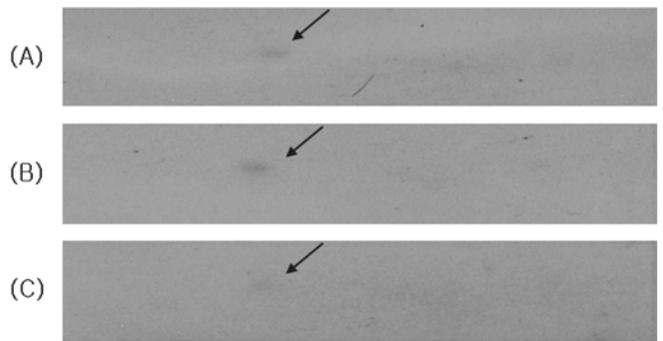


Fig. 3. Reverse northern blot analysis. Total RNA were extracted from U937 cells treated with or without *Rhus verniciflus* extract for 24 hours and labeled with radio-isotope as described in Materials and Methods and used as probe in reverse northern blot analysis. A is the results of reverse northern blot analysis using RNA extracted from control U937 cell as probe. B is the results of reverse northern blot analysis using RNA extracted from control U937 cell treated with EtOH extract of *Rhus verniciflus* as probe. C is the results of reverse northern blot analysis using RNA extracted from control U937 cell treated with water extract of *Rhus verniciflus* as probe.

양상을 보이는지 확인하기 위해서 reverse northern blot을 실시하였다. 이는 선별된 유전자를 젤에 전개하고, 옷 추출물을 처리한 세포주로부터 추출한 RNA를 표지 프로브로 이용하여 목적 유전자의 발현양상을 재확인하는 방법이다. 각 선별된 유전자를 전개한 동일한 3개의 membrane을 준비하여 각각 대조구와 옷의 열수추출액 및 에탄올 추출액을 처리한 세포주로부터 분리한 RNA를 실험 및 방법에 기술한 바와 같이 동위원소로 표지하여 reverse northern blot을 실시하였다. 그 결과, 19개의 선별된 상보 DNA들 중 3-3에서만 가능성을 확인하여 이를 이전의 실험과 비교, 분석하였다(Fig. 3). 3-3 클론은 EIT₁₂MG를 3' anchored 프라이머로 E5AP2를 5' 임의의 프라이머로 하여 DDRT-PCR을 수행한 결과로 얻은 샘플을 젤에 전기 영동했을 때 옷의 열수추출물을 처리한 세포에서 대조구와 비교해 볼 때, 발현이 감소되는 양상을 보여 선택되었으며, reverse northern blot 결과도 대조구 및 옷의 에탄올 추출물 처리구보다 옷의 열수추출물 처리구에서 약간 밴드의 강도가 약해지는 양상을 나타내었다.

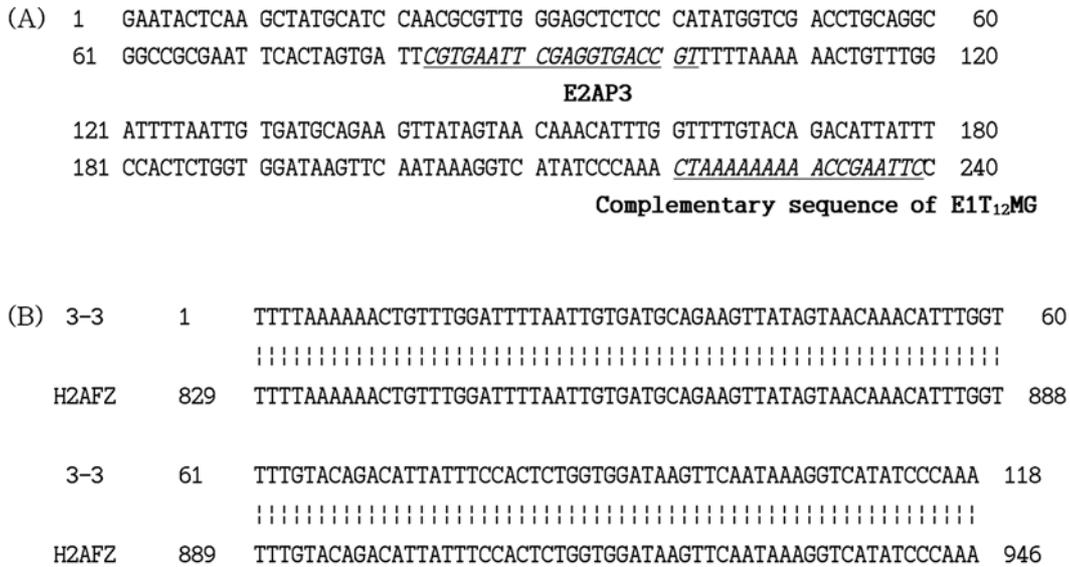


Fig. 4. Result of nucleotide sequence analysis and BLAST search of clone 3-3. (A) Result of nucleotide sequence of clone 3-3. Primers used in amplification were underlined. (B) BLAST search result of clone 3-3 in NCBI database.

3-3 clone의 서열분석

이상의 DDRT-PCR과 reverse northern blot 실험을 통해 단핵구 U937 세포에서 옷의 열수추출물 처리에 의해 발현이 감소되는 3-3 클론을 확보하였으며, 이 유전자의 염기서열을 분석하고, 세포 내에서의 기능을 알아보기 위해 해당 유전자의 산물을 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 염기서열을 분석, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 분석된 3-3 유전자의 염기서열은 NCBI에서 제공하는 blast program을 이용해 분석하였다. 그 결과, 3-3 유전자는 사람의 histone family에 속하는 H2A의 member Z와 100%의 동일성을 나타내었다. H2A.Z는 4종의 core histone(H2A, H2B, H3 and H4) 중 H2A에 속해있는 단백질로서 효모에서는 세포 주기를 조절하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다(21).

사람에서 H2A.Z은 RNA 중합효소 II와 TATA-결합 단백질이 GAL1-10 프로모터에 결합되는 것에 관여하는데 이는 이 유전자의 산물이 일련의 유전자들의 발현을 조절한다는 것을 의미할 뿐만 아니라(22), 외부의 자극에 의해서 활성이 조절되는 발현조절 인자들의 목적 유전자로의 결합을 조절하여 외부 자극이나 세포 주기에 따른 유전자 발현을 조절하는 중요한 역할을 수행하고 있는 것을 의미한다(23). 따라서 옷의 열수추출물의 어떤 성분이 단핵구인 U937의 H2A.Z의 발현을 억제함으로써 관련 유전자의 발현, 세포 주기, 분화 및 사멸을 조절하는 등의 역할을 할 수 있을 것으로 생각되어진다. 차후 본 연구를 바탕으로 옷의 열수추출물 특정 물질에 대한 탐구 및 발견된 유전자 발현 조절에 의한 세포사멸 기작에 대한 연구가 필요하다고 판단되었다.

요 약

사람의 혈액 내의 단핵구 U937을 모델시스템으로 이용하여 옷추출물 처리에 의해 발현이 조절되는 특정 유전자를 탐색하였다. DDRT-PCR을 이용하여 옷추출물 처리 시 발현이 감소되는 클론을 하나 얻을 수 있었으며 이를 클로닝하고 염기서열 분석을 실시하였다. 그 결과 얻어진 유전자는 H2A histone family의 member Z와 100% 유사성이 있는 것으로 나타났다. 이 단백질은 특정 조건 하에서 특정한 유전자 발현을 증가시키는 역할을 하

는 것으로 보고되고 있으나, 보다 정확한 작용기작을 알아내기 위해서는 유전자 관계 파악을 위하여 향후 계속적인 연구가 필요함을 알 수 있었다.

문 헌

1. Shin MK. Coloured Kimsangbonchobak. Namsandang, Seoul, Korea. pp. 165-718 (1986)
2. Jung NC. Biological activity of urushiol and flavonoids from lac tree (*Rhus verniciflua* Stokes). PhD thesis, Chonnam National University, Gwangju, Korea (1998)
3. Lee SK, Kang SM, Kim YS, Kang CG. Quality composition of emulsion-type sausages made from *Rhus verniciflua* stokes fed pork and extract. Korean J. Food Sci. Anim. Resour. 25: 210-217 (2005)
4. Buckingham J. Dictionary of Natural Products. Chapman and Hal I. London, England p. 761 (1994)
5. Lee JC, Lim KT, Jang YS. Identification of *Rhus verniciflua* Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and antiapoptotic properties. Biochim. Bioph. Acta 1570: 181-191 (2002)
6. Lim KT, Shim JH. Antioxidative effects of ethanol extracts from *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) on mouse whole brain cells. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 1248-1254 (1997)
7. Kim IW, Shin DH, Baek NI. Identification of antioxidative components from ethanol extract of *Rhus verniciflua* STOKES. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1654-1660 (1999)
8. Kim JB. Identification of antioxidative component from stem bark of *Rhus verniciflua*. Korean J. Food Nutr. 16: 60-65 (2003)
9. Lee JC, Lee KY, Kim J, Na CS, Jung NC, Chung GH, Jang YS. Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. Food Chem. Toxicol. 42: 1383-1388 (2004)
10. Lee JC, Kim J, YS Jang. Ethanol-eluted extract of *Rhus verniciflua* Stokes inhibits cell growth and induces apoptosis in human lymphoma cells. J. Biochem. Mol. Biol. 36: 337-343 (2003)
11. Liang CY, Kang SM, Kim YS, Lee SK. Effect of dietary *Rhus verniciflua* Stokes on the quality of *hamwoo* (Korean cattle) beef during cold storage after thawing. Korean J. Food Sci. Anim. Resour. 25: 196-202 (2005)
12. Kim KM, Kim TY, Kim MK, Kim HR. Quality properties of *Gangjung* added with detoxified stem bark of *Rhus verniciflua* (RVSB) extract during acceleration storage. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 425-431 (2007)

13. Christoph FA, Vogel Eric Sciuillo, Fumio Matsumura. Activation of inflammatory mediators and potential role of Ah-receptor ligands in foam cell formation. *Cardiovasc. Toxicol.* 4: 363-373 (2004)
14. Paul E. DiCorleto, Carol A. de la Motte. Characterization of the adhesion of the Human Monocytic cell line U937 to cultured endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 75: 1153-1161 (1985)
15. Roy L. Silverstein, Adam S. Asch, Ralph L. Nachman. Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J. Clin. Invest.* 84: 546-552 (1989)
16. Johan F, Jan N, Anders H, Anders H, Hans W, Magnus G. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 904-908 (1990)
17. Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I. Molecular mechanism of cell death induced by the antioxidant *tert*-butylhydroxyanisole in human monocytic leukemia U937 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 295-302 (2004)
18. Yokoyama Y, Okubo T, Ozawa S, Nagai F, Ushiyama K, Kano I, Shioda M, Kubo H, Takemura M, Namiki H, Yasugi E, Oshima M, Seyama Y, Kano K. CPP32 activation during dolichyl phosphate-induced apoptosis in U937 leukemia cells. *FEBS Lett.* 412: 153-156 (1997)
19. Troyano A, Fernandez C, Sancho P, de Blas E, Aller P. Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation. *J. Biol. Chem.* 276: 47107-47115 (2001)
20. Zhao S, Ooi, SL, Pardee AB. New primer strategy improves precision of differential display. *Biotechniques* 18: 842-850 (1995)
21. Namrita D, Masaya O, Shawn JS, Oscar MA, Rohinton TK. H2A.Z functions to regulate progression through the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 26: 489-501 (2006)
22. Maryse A, Francois R, Marc L, Luc G. H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol. Cell. Biol.* 21: 6270-6279 (2001)
23. Marc L, Luc G. H2A.Z has a function reminiscent of and activator required for preferential binding to intergenic DNA. *EMBO J.* 22: 4512-4522 (2003)