대한한방부인과학회지
THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY
VOL.22 NO.3 : 117-134 (2009)

황금추출물이 인간 유래 자궁경부암세포의 유전자발현에 미치는 영향

동신대학교 한의과대학 한방부인과교실
조현정, 구희준, 조성희, 박경미, 양승정

ABSTRACT

Effects of Scutellariae Radix on Gene Expression of Human Cervical Cancer Cells(SNU-703)

Hyun-Jung Jo, Hee-Jun Gu, Seong-Hee Cho,
Kyung-Mi Park, Seung-Jeong Yang
Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Dongshin University

Purpose: In the theory of traditional medicine, Scutellariae Radix (SR) can clear away heat and remove dampness, purge the sthenic fire and remove toxic materials, cool blood and stop bleeding to prevent miscarriage. Recently, SR is known to have anti-cancer activity. For this reason, the present author designed to investigate the effect of SR on proliferation rates of cervical cancer cell line, then effects on genetic profile by SR.

Methods: The genetic profile for the effect of SR on human derived cervical cancer cell line, SNU-703, was measured using microarray technique, and the functional analysis on these genes was conducted.

Results: Total 519 genes were up-regulated and 606 genes down-regulated in cells treated with SR. Genes induced or suppressed by SR were all mainly concerned with metabolic process, regulation of biological process and protein binding. The network of total protein interactions was measured using cytoscape program, and some key molecules, such as TNFRSF1A, AKT1, MAPK3, and STAT3 that can be used for elucidation of therapeutical mechanism of medicine in future were identified.

Conclusion: These results suggest possibility of SR as anti-cancer drug and also suggest that related mechanisms are involved in TNFRSF1A, AKT1, MAPK3, and STAT3 related signalling pathways.

Key Words: Cervical cancer, Scutellariae Radix, Gene expression, Anticancer drug, Microarray

교신저자(조성희) : 광주광역시 남구 월산동 377-12번지 동신대학교광주한방병원 부인과
전화 : 062-350-7213 이메일 : drlmp72@hanmail.net

Ⅰ. 서 론

자궁경부암은 여성 생식기에 발생하는 악성 종양 중 가장 흔한 질환으로 최근 자궁 경부 세포진 검사의 일반화로 조기 진단 비율이 높아져 사망률이 감소하고 있으나, 세계적으로는 아직도 높은 사망률을 보이는 질환이다[1-3].

자궁경부암은 전암단계인 상피내암의 상태를 거쳐 침윤성 암으로 진행되며, 조기에 시작된 성교, 배우자의 수, 남성요인, 인유두종 바이러스 (human papillomavirus, HPV)감염 등의 영향으로 발병하는 것으로 알려져 있다[2-5]. 가장 흔한 증상으로는 성교후 질출혈이 있으며, 진행된 환자에서는 악취성 질 분비물, 골반통, 요통, 폐쇄성 요로병변 등이 나타날 수 있다[5,6].

한의학적으로 자궁경부암은 '崩漏', '帶下', '癥瘕', '血枯', '五色帶下' 등의 범주에 속하며[3], 출혈이나 분비물 등의 동반 증상으로 볼 때 '帶下', '五色帶下'와 유사한 질환으로 볼 수 있다.

현재까지 자궁경부암과 관련된 여러 실험적인 연구가 이루어져 왔는데, 복합처방으로는 當歸芍藥散[7], 桂枝茯苓丸[8], 濟川煎[9] 등이 있고, 단미제로는 生地黃[10], 半枝蓮[11], 虎杖根[12] 등이 있다.

황금은 꿀풀과에 속한 다년생본초인 속썩은풀의 뿌리로 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 止血安胎 등의 효능이 있어, 濕溫, 暑溫, 胸悶嘔惡, 濕熱痞滿, 瀉痢, 黃疸, 肺熱咳嗽, 高熱煩渴, 血熱吐衄, 癰腫瘡毒, 胎動不安 등을 치료하는데 사용되고 있다. 《神農本草經》에 中品으로 처음 기재된 이후 임상에 사용되었는데, 性은 寒하고 味는 苦하며, 肺, 膽, 胃, 大腸에 귀경한다[13-15]. 최근 황금에 관한 약리학적 연구로 항종양[16,17], 항산화[18,19], 항염증[20]에 관한 효과 등이 보고되고 있으며 그 외에 천식[21], 비만세포억제[22], 간세포보호[23] 등 여러 분야에서 연구가 활발히 진행되고 있다.

DNA 칩 기술은 대규모 유전자발현 연구에 유용한 방법으로 유전자 발현을 분석하는 표준화된 분자생물학적 기법으로 인정받고 있다[24]. 최근 들어 거의 모든 종류의 종양에 대한 DNA 칩 실험이 실행되는데, 이러한 정보를 통해 진단 마커나 치료에 필요한 타겟 물질이 선정될 수 있다[25].

본 연구에서는 황금이 가지는 항암효과와 그 작용 기전을 살펴보기 위하여 자궁경부암 세포주인 SNU-703에 황금 추출물을 투여하고 세포 독성을 살펴 본 다음, RNA를 추출하여 유전자의 발현 정도를 Microarray기법으로 분석한 결과 유의한 변화가 관찰되었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 세포주

인간 유래 자궁경부암 세포주인 SNU-703 세포주는 한국 세포주 은행 (서울, 한국)으로부터 냉동상태로 구입하여 실험에 사용하였다. 분주 받은 세포주는 해동시켜 배양액 속에 분주된 후, 2주 이상 계대 배양하여 실험실 환경 및 기타 배양환경에 충분히 적응시킨 후 증식률(doubling time)이 구입처에서 제공한 자료와 거의 일치하게 되었을 때, 충분

히 적응하였다고 생각하고 실험에 사용하였다.

2) 약재의 준비

본 실험에서 황금 (Scutellariae Radix, SR)은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본인 황금 (*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주피를 벗긴 근을 절단, 건조한 것으로 동신대학교 부속한방병원에서 구입하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

Fetal bovine serum (Gibco LOT. NO. 1006842, FBS) 및 mRNA 분리를 위한 trizol reagent (Invitrogen, Cat# 15596-026)는 진성 SMR (광주, 한국)을 통하여 구입하였고, RPMI 1640 (Sigma, R4130), penicillin -streptomycin (100 units/㎖, 100 ㎍/㎕), trypsin-EDTA (Sigma) 및 기타 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)제품을 구입하여 사용하였다. 측정을 위해 micro-plate reader (Bio-rad, CA) 등이 사용되었다.

2. 방 법

1) 세포주 배양 환경

자궁경부암 세포주인 SNU-703의 생육 배지로는 RPMI 1640 (Sigma, R4130)을 사용하였고, 배지에 10% fetal bovine serum (Gibco LOT. NO. 1006842, FBS)과 penicillin-streptomycin (100 units/㎖, 100 ㎍/㎕)을 첨가하였다. 세포주의 계대 배양은 2일 간격으로 시행하였고, 부착세포의 탈착을 위해서 trypsin -EDTA (Sigma, USA)를 사용하였다. 자궁경부암 세포주는 5% CO_2가 공여되는 배양기 속에서 37℃를 유지하며 배양하였다.

2) 약물의 준비

세척되고 세절된 상태로 구입한 황금 100 g을 증류수 1,500 ㎖와 함께 전기약탕기 (대웅, 한국)로 100℃에서 2시간 동안 전탕하여 물 추출을 시행하였다. 전탕한 추출물을 부직포로 거른 다음 동결건조기 (삼원, 한국)를 이용하여 동결건조 분말을 얻었다. 최종적으로 얻어진 건조분말은 11.3 g이었다. 이렇게 하여 얻어진 분말은 실험에 사용하기 위하여 인산 완충액 (phosphate buffered saline, PBS)에 다시 녹인 후, 2,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고, 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액은 와트만 지로 거른 다음 최종적으로 0.22 ㎛ 크기의 필터 (syringe filter, Whatman)로 걸러 멸균을 대신 하였다. 이렇게 하여 얻어진 검액은 소량씩 나누어 -20℃에 보관하였다가 사용 직전 해동하여 사용하였다.

3) 세포 증식률 측정

세포 증식률은 변형된 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 방법에 의존하였는데, 모든 과정은 제조사에서 제공한 가이드라인에 의해 시행되었다[26]. 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 96-well plate (Nunc, Netherlands)에 측정하고자 하는 대상 세포주를 well당 5×10^3개의 분량으로 분주하고, 37℃, 5% CO_2가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 황금을 농도별로 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 24시간 동안 배양 하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 각 well당 10 ㎕의 cell counting kit-8 (CCK-8 sol., Dojindo, Japan) 용액을 첨가하고 37℃, 5% CO_2가 공여되

는 환경에서 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후, micro-plate reader (Bio-rad, CA)를 이용하여 450 ㎚파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군으로는 약물을 첨가하지 않은 well을 사용하였고, 결과는 정상 대조군에 대한 백분율로 환산하여 나타내었다. 또 다른 대조군으로는 임의로 선택한 강황을 사용하였다.

4) RNA 분리를 위한 약물 처리 및 실험군 분류

1×10^6개의 자궁경부암 세포를 100 Φ dish (SPL, 한국)에 분주한 후, 37℃, 5% CO_2가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 실험군은 황금을 1.25 ㎎/㎖ 농도로 투여하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 정상 대조군으로는 실험군과 동일한 조건에서 배양한 후, 동일한 용량의 인산 완충액을 투여하였다.

5) RNA 분리

Microarray 분석을 위한 RNA 분리는 Florell 등[27]의 방법을 변형하여 시행되었다. 상기한 방법으로 약물을 투여하고 24시간이 지난 후, 생육 배지를 완전히 제거한 다음, 인산 완충액을 이용하여 3번 수세 하였다. 수세 과정이 끝난 후, 각각의 dish에 2㎖의 trizol reagent (Invitrogen, Cat# 15596-026)를 넣고 pipet을 이용하여 세포를 분리수거 한 다음 바로 동결시킨 후 액체질소에 보관하였다가 RNA 분리에 사용하였다. 동결세포로부터 total RNA를 분리하였는데, 이것은 Qiagen에서 제시한 방법에 따라 이루어졌다.

6) RNA 추출 정도 관리

Total RNA를 아가로스겔 상에서 전기영동한 후 28S/18S RNA의 비율을 측정하여 정도 관리하여 분석 적합 판정을 확인한 후 실험을 진행하였다. Microarray 실험에 있어서 결과에 영향을 주는 여러 가지 factor들 중 가장 중요한 것이 RNA이며[28], 이 RNA 상태를 확인하기 위해 Agilent사의 bioanalyzer 2100을 사용하여 rRNA ratio (28S/18S ribosomal RNA)를 확인함으로써 판정하였다.

7) DNA 칩을 이용한 실험

45K oligo-chip[29]을 이용하여 실험을 수행하였다. 탐침 준비와 혼성화 반응은 3DNA array detection system을 이용하여 수행하였다 (Genisphere, PA). 형광 표지된 cDNA 제작시 20 ㎍ total RNA를 사용하였다. 어레이를 씻어낸 후 scanarray scanner (Perkin-Elmer, Boston, MA)로 스캔하였다. 정상 RNA를 레퍼런스로 사용하여 DNA 칩상의 대다수 cDNA spots (85% 이상)이 검출됨을 확인하였다.

8) 데이터분석

이미지파일에서 imagene 4.0 (Bio-discovery, Marina del Rey, CA)을 사용하여 1차 데이터를 얻은 후 locally weighted scatterplot smoothing method (lowess method)[30]를 사용하여 표준화하였다. 모든 칩상의 spot에서, 각 채널의 형광 강도가 배경의 형광 강도보다 1.5배 더 큰 경우에 한해 제대로 측정된 것으로 판단하여 선별하였고, 시료에서 제대로 측정되지 않은 것은 제외시켰다. 발현 비율은 cluster를 이용하여 순차적 클러스터링한 후 treeview[31]를 이용하여 시각화하였다.

유전자 기능분석은 fatigo algorithms (Http://babelomics.bioinfo.cipf.es)를 이용하여 수행하였다. 클래스간 비교분석을 통해 얻어진 결과는 false discovery rate (FDR) 값이 0.05 이하일 때 의미있는 것으로 판

단하였다. 단백질 결합은 BOND 데이터베이스 (http://bond.unleashedinformatics.com)에서 얻어진 흰쥐 단백질 데이터베이스로 cytoscape program (ver. 2.4)을 이용하여 분석하였다.

3. 통계 처리

세포 증식률 실험 결과에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 Sigma plot (Sigma plot for Windows, ver. 9.0, U.S.A.)을 이용하여 Student's *t*-test를 시행하였으며 실험 성적은 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 발현 증가 및 감소된 유전자 간의 유의성 검증에는 Chi-square test를 사용하여 p value 값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 성 적

1. 자궁경부암 세포의 증식률에 미치는 영향

실험 결과 황금은 1.25 ㎎/㎖ 이상 농도에서 자궁경부암 세포의 증식률을 유의하게($p<0.05$, $p<0.001$) 감소시켰다. 또 다른 대조군으로 사용한 강황 (CLR)의 경우, 10 ㎎/㎖에서도 유의한 증식률의 감소가 나타나지 않았다. 대조군의 증식률을 100%로 하였을 때, 1.25, 2.5, 5.0, 10 ㎎/㎖ 투여에 의한 증식률은 각각 96.5±1.6%, 90.8±1.8%, 86.4±4.1%, 71.8±3.4%였다(Fig. 1).

2. DNA 칩에서의 신호강도 (signal intensity) 분포의 표준화

통계학적으로 정규분포를 이루도록 표준화 과정을 거친 후에 분석하고자 하여 원천 이미지에서 얻어진 1차 데이터를 lowess 기법을 사용하여 표준화하였다. 표준화 한 후 유전자의 분포를 발현 비율 (log ratio)과 강도 (log intensity)간의 관계로 나타낸 결과 유전자의 발현 비율이 0을 기점으로 하는 일직선 형태로 변화되었다(Fig. 2).

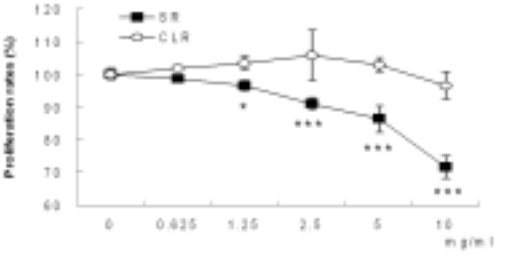

Fig. 1. Effects of SR on proliferation of tumor cells in vitro.
SNU-703 cells were attached 96-well plate, and added SR as indicated concentrations respectively. After 24 hours incubation, proliferation rates were measured using altered MTT methods. CLR used as control. SR : Scutellariae Radix treated group, CLR : Curcumae Longae Rhizoma treated group. Values are expressed as percentage of control. Results are presented as mean±SD. *P < 0.05, and ***P < 0.001 vs non-treated control (n=6).

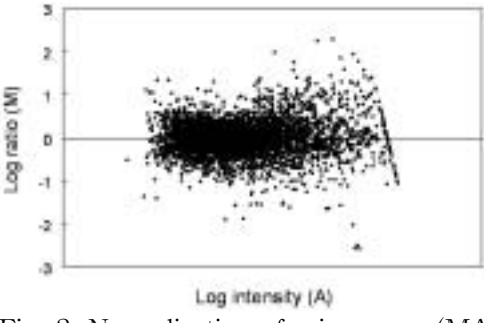

Fig. 2. Normalization of microarray (MA plot).
Primary data from raw image were normalized using lowess method. Vertical axis represents log ratio and horizontal axis represents log intensity of all spots after normalization.

3. 발현이 증가된 유전자들에 대한 기능 분석

황금 추출물의 처리에 의해 발현이 증가된 유전자의 개수는 총 519개였다. 이 유전자들의 분석 결과 생물학적 과정 항목에서는 biopolymer metabolic process, regulation of cellular process 등과 관련된 유전자가 많았고, 분자기능항목별 분석에서는 metal ion binding, cation binding, DNA binding에 관여하는 유전자가 많은 것으로 나타났다. 세포 구성요소 관련 분석에서는 intracellular에 존재하는 물질 관련한 유전자가 가장 많았고, 그 다음이 membrane 구성 물질 관련 유전자였다.

4. 발현이 감소된 유전자들에 대한 기능 분석

황금 추출물의 처리에 의해 발현이 감소된 유전자의 개수는 총 606개였다. 이 유전자들의 분석 결과 생물학적 과정 항목에서는 cellular metabolic process, primary metabolic process 등과 관련된 유전자가 많았고, 분자기능항목별 분석에서는 metal ion binding, cation binding, DNA binding에 관여하는 유전자가 많은 것으로 나타났다. 세포 구성요소 관련 분석에서는 intracellular에 존재하는 물질 관련한 유전자가 가장 많았고, 그 다음이 membrane 구성 물질 관련 유전자였다.

5. 생물학적 과정, 분자기능 및 세포 구성요소 항목에서의 기능 분포 비교

생물학적 과정의 경우 macromolecule metabolic process에 관련된 유전자가 유의한($p<0.05$) 수준으로 발현 증가했음을 알 수 있었다 (Fig. 3A). 분자기능 분포에 대한 유전자를 상호 비교 분석한 결과 transmembrane receptor activity, hydrolase activity acting on acid anhydrides와 관련된 유전자들의 발현이 유의한($p<0.05$) 차이를 보였다 (Fig. 3B). 세포성분에서의 분포도를 살펴보면 intracellular와 cell fraction에 관련된 유전자들의 발현 정도가 유의한($p<0.05$) 차이를 보였다 (Fig. 3C).

Fig. 3A. Comparison of functional distribution in Biological Process.
Both up-regulated and down-regulated genes were analyzed in Biological Process category in ontology. The horizontal bar represents the percentage of specific functional category in Biological Process. The list was arrayed in decreasing percentage of functional category. Red and Green color represent percentage of up-regulated and down-regulated genes, respectively, in each functional category. $P<0.05$ was considered significant.

Fig. 3B. Comparison of functional distribution in Molecular function.
Both up-regulated and down-regulated genes were analyzed in Molecular Function category in ontology. The horizontal bar represents the percentage of specific functional category in Molecular Function. The list was arrayed in decreasing percentage of functional category. Red and Green color represent percentage of up-regulated and down-regulated genes, respectively, in each functional category. $P<0.05$ was considered significant.

Fig. 3C. Comparison of functional distribution in Cellular component.
Both up-regulated and down-regulated genes were analyzed in Cellular component category in ontology. The horizontal bar represents the percentage of specific functional category in Cellular component. The list was arrayed in decreasing percentage of functional category. Red and Green color represent percentage of up-regulated and down-regulated genes, respectively, in each functional category. P<0.05 was considered significant.

6. 발현이 증가된 유전자들에 의하여 발현되는 단백질 상호작용 네트워크 분석

황금 추출물 처리에 의해 발현이 증가된 유전자들에 의하여 발현되는 단백질들을 인체 시스템 내에 존재하는 단백질 네트워크를 이용하여 분석한 결과 RHOA, RAC1, CTNNB1, CDC42 그리고 TNFRSF1A 등의 단백질이 단백질 상호작용 네트워크의 중심에 위치함을 알 수 있었다(Fig. 4).

7. 발현이 감소된 유전자들에 의하여 발현되는 단백질 상호작용 네트워크 분석

황금 추출물 처리에 의해 발현이 감소된 유전자들에 의하여 발현되는 단백질들을 인체 시스템 내에 존재하는 단백질 네트워크를 이용하여 분석한 결과 AKT1, MAPK3, MDFI, ABL1, 그리고 STAT3 등의 단백질이 단백질 상호작용 네트워크의 중심에 위치함을 알 수 있었다(Fig. 5).

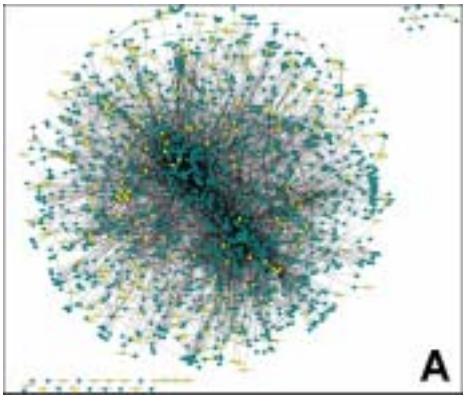

Fig. 4A. Protein interactions between up-regulated genes.
The network of total protein interactions was measured using cytoscape program. The database was obtained in BOND database (http://bond. unleashedinformatics.com). Circles represent proteins that involved in interactions with other proteins. Yellow circles represent the proteins identified in this experiment to be up-regulated by treatment with SR. Lines mean the protein-protein interactions.

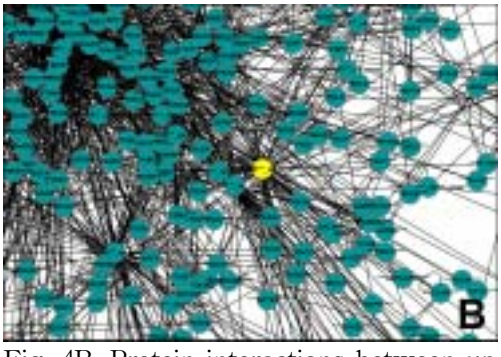

Fig. 4B. Protein interactions between up-regulated genes.
The network of total protein interactions was measured using cytoscape program. The database was obtained in BOND database (http://bond. unleashedinformatics.com). Circles represent proteins that involved in interactions with other proteins. Yellow circles represent the proteins identified in this experiment to be up-regulated by treatment with SR. Lines mean the protein-protein interactions.

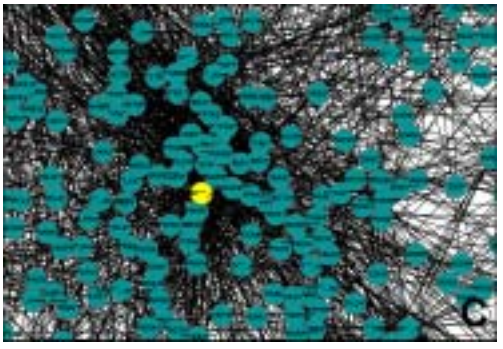

Fig. 4C. Protein interactions between up-regulated genes.
The network of total protein interactions was measured using cytoscape program. The database was obtained in BOND database (http://bond. unleashedinformatics.com). Circles represent proteins that involved in interactions with other proteins. Yellow circles represent the proteins identified in this experiment to be up-regulated by treatment with SR. Lines mean the protein-protein interactions.

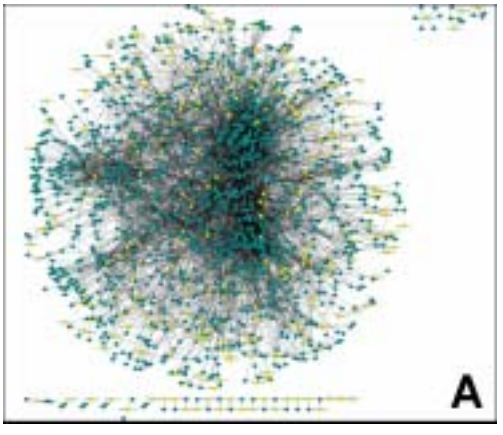

Fig. 5A. Protein interactions between down-regulated genes.
The network of total protein interactions was measured using cytoscape program. The database was obtained in BOND database (http://bond. unleashedinformatics.com). Circles represent proteins that involved in interactions with other proteins. Yellow circles represent the proteins identified in this experiment to be down-regulated by treatment with SR. Lines mean the protein-protein interactions.

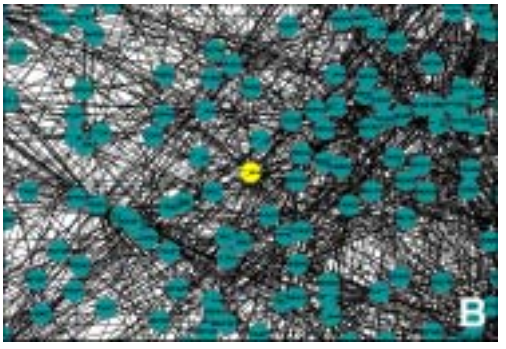

Fig. 5B. Protein interactions between down-regulated genes.
The network of total protein interactions was measured using cytoscape program. The database was obtained in BOND database (http://bond.unleashedinformatics.com). Circles represent proteins that involved in interactions with other proteins. Yellow circles represent the proteins identified in this experiment to be down-regulated by treatment with SR. Lines mean the protein-protein interactions.

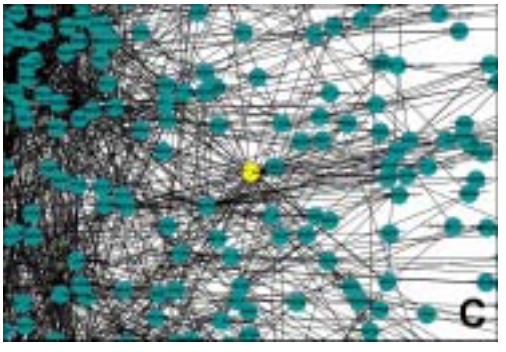

Fig. 5C. Protein interactions between down-regulated genes.
The network of total protein interactions was measured using cytoscape program. The database was obtained in BOND database (http://bond.unleashedinformatics.com). Circles represent proteins that involved in interactions with other proteins. Yellow circles represent the proteins identified in this experiment to be down-regulated by treatment with SR. Lines mean the protein-protein interactions.

Ⅳ. 고 찰

자궁경부암은 여성암 중에서 빈도가 높은 암의 하나로 최근 감소하는 경향이지만, 전체 여성암 발생의 9.1%로 5위를 차지하고 있으며, 2004년 한 해 동안 약 3,100여명 이상의 환자가 발생한 것으로 보고되었다[1,32]. 자궁경부암은 전암단계인 상피내암의 상태를 거쳐 침윤성 암으로 진행되며, 전암단계가 7~20년 정도로 비교적 길어서 이 기간에 조기 진단되면 치료율이 비교적 높다[2]. 침윤성 자궁경부암은 30세 이후부터 증가하기 시작하여 50대에 정점에 달하는 것으로 알려져 있으나, 최근에는 60세 이상의 연령에서도 증가하는 양상을 보이고 있다[1,2,3,5].

자궁경부암은 일종의 성적 접촉에 의한 질병으로 간주되는데, 20세 이전에 성교를 시작하거나, 성적 대상자가 많은 경우에 그 빈도가 증가하며, 특히 성적 접촉에 의해서 전파되는 HPV가 가장 중요한 발생인자로 주목받고 있다[2-5]. HPV는 가장 흔하게 성적으로 전파되는 감염성 질환으로 전세계적으로 생식기 감염을 일으키는 가장 흔한 원인중의 하나이며, 대부분 증상이 없고 자연적으로 소멸되지만, 일부에서는 지속적 감염을 나타내면서 생식기 사마귀, 자궁경부암으로 진행된다[2,4,5]. 자궁경부암의 가장 흔한 증상은 성교 후 질 출혈이며, 진행된 환자에서는 악취성 질 분비물, 골반통, 요통, 폐쇄성 요로병변 등이 나타날 수 있다[5,6].

자궁경부암의 양방적인 치료는 수술요법과 방사선요법, 화학요법을 선별하여 적용시킨다. 수술적 치료방법은 암의 병기, 환자의 연령, 전신적인 건강상태를 고려하여 시행하는데, 병변부위만 제거하고 생식기능을 유지시키는 자궁경부암

근치술, 더 이상 임신을 원하지 않는 경우 시행하는 자궁적출술이 있으며, 새로운 치료법으로 레이저수술이나 저온요법이 이용되고 있다[2,3,5,6]. 하지만 자궁경부암의 수술 및 방사선치료의 발달에도 불구하고 최근 수십년 동안 병기별 예후는 크게 향상되지 못하였고, 자궁경부암 치료 실패로 인한 재발률도 50%까지 보고되고 있으며[2], 환자의 수술이나 방사선요법에 대한 두려움도 큰 실정이다. 또한 최근에는 HPV 백신이 허가되어 자궁경부 상피내종양, 생식기 사마귀의 발생을 예방 할 것으로 기대되고 있으나[4], 예방접종연령이 제한되어있고, 부작용 또한 보고되고 있어서 향후 얼마동안은 자궁경부암 환자수를 크게 줄이기는 어려울 것으로 사료된다.

한의학적으로 자궁경부암은 '崩漏', '帶下', '癥瘕', '血枯', '五色帶下' 등의 범주에 속하는데[3], 출혈이나 분비물 등의 동반 증상으로 볼 때 '帶下', '五色帶下'와 유사한 질환으로 볼 수 있다. 帶下란 '從帶脈而下'의 뜻으로 여성 성기의 분비물을 총칭하며, 이 분비물이 증가하여 질 외구까지 유출되어 외음부 또는 그 부근을 濕潤, 오염하는 상태를 말한다[6,35]. 五色帶下에 대하여 宋[35]은 帶下色이 일정하지 않고 五色이 錯雜하게 교차되며 腐臭, 胸腹脹滿, 面黃脫氣, 脈遲濇이라 하였고, 《東醫寶鑑》[36]에서는 五臟이 모두 虛하면 五色의 帶下가 併合하여 나오며, 血의 병이라고 하였다. 帶下의 원인은 다양하나 임상에서는 濕熱 혹은 痰濕이 胞宮에 下注하여 나타나는 경우가 가장 많아서 淸熱燥濕, 燥濕化痰하는 治法을 이용하므로[6,35], 본 저자는 淸熱燥濕藥의 일종인 황금을 이용하여 실험하였다.

황금 (Scutellariae Radix)은 꿀풀과(Labiatae)에 속한 다년생본초인 속썩은풀의 뿌리로 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 止血安胎 등의 효능이 있어 濕溫, 暑溫, 胸悶嘔惡, 濕熱痞滿, 瀉痢, 黃疸, 肺熱咳嗽, 高熱煩渴, 血熱吐衄, 癰腫瘡毒, 胎動不安 등을 치료하는데 사용되고 있다[13-15]. 《神農本草經》에 中品으로 처음 기재된 이후 임상에 사용되었는데, 性은 寒하고 味는 苦하며, 肺, 膽, 胃, 大腸에 귀경한다[13-15]. 황금의 약리학적 주요성분은 baicalein, baicalin, wogonin 등의 flavonoid 성분으로 항염증, 항암, 항알러지, 항미생물작용과 강압·이뇨·진정작용 등을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다[17]. 황금의 항암과 관련된 연구를 살펴보면, 비교적 강한 항암활성으로 암세포와 백혈병 세포에 대한 억제작용이 있으며, 鼻咽癌, 喉癌, 中耳癌 등에 이용할 수 있고[37], 신 등[16]은 삼릉, 황금, 살송편버섯 혼합추출물이 흑색종세포의 발생 및 전이가 억제되는 효과가 있다고 하였고, 서 등[17]은 황금이 폐암세포인 melanoma B-16의 염증반응과 암전이능에 깊이 관여하고 있다고 보고하였다.

종양에 대한 韓方治法으로는 扶正祛邪法, 活血化瘀法, 淸熱解毒法, 軟堅散結法 등이 있고[3,38], 초기에는 活血化瘀, 淸熱解毒法, 중기 이후에는 扶正祛邪法, 攻補兼施의 治法을 사용하는데, 황금은 淸熱燥濕, 瀉火解毒의 효능이 있어[13] 濕熱蘊毒이 자궁을 침범하여 생긴 자궁경부암 초기나 자궁의 염증성 질환을 치료 할 수 있을 것으로 보인다.

DNA 칩 기술은 대규모 유전자발현 연구에 유용한 기술로 유전자 발현을 분

석하는데 있어 표준화된 분자생물학적 기법으로 인정받고 있다[24]. 최근 들어 한의학계에서도 하 등[39], 이 등[40], 한 등[41]에 의하여 한약의 유전자 발현을 microarray를 이용하여 분석하여 분자생물학적 발현을 통하여 새로운 임상적 활용 가능성을 넓히기 위한 여러 연구가 발표되고 있다.

본 연구에서는 황금이 자궁경부암 세포에 미치는 영향과 microarray를 시행할 적절한 농도를 알아보기 위하여, SNU-703 세포주에 농도별로 황금을 투여하고 세포 증식률의 변화를 살펴본 결과 1.25 ㎎/㎖ 이상의 농도에서 유의한 수준의 증식률 감소를 보였다 (Fig. 1). 이러한 결과로부터 황금이 자궁경부암 세포의 증식을 유의한 수준으로 억제함을 알 수 있었으며, 추후 진행될 실험에서는 1.25 ㎎/㎖ 농도의 황금 추출물을 사용하기로 결정하였다.

DNA 칩으로부터 얻어진 기초 자료는 그대로 분석에 사용 할 수 없는데, 신호강도가 약한 경우 경미한 발현 정도의 차이만으로도 유의성이 있는 것처럼 보일 수 있기 때문이다. 따라서 신호 비와 신호 강도를 정규분포가 되도록 보정하는 작업이 필요하다. 본 연구의 결과에 제시한 바와 같이 비교적 넓게 펴져 분포하던 spot이 normalization 과정을 통하여 0을 기점으로 하는 일직선 형태로 변화되어 통계 분석에 적합하게 되었다 (Fig. 2).

칩에서 얻어진 raw data를 표준화 한 후, 본격적인 분석 작업을 시행한 결과 약물처리에 의해 발현이 증가된 유전자는 519종, 발현이 감소한 유전자는 606종으로 총 1,125종의 유전자들의 발현이 변화되었다. 발현증가의 경우 2배 이상, 발현감소의 경우 1/2 이하의 발현량을 보일 때를 증가 감소의 기준으로 삼았다[42]. 발현이 증가된 519개 유전자의 기능적 분포를 살펴보면, 생물학적 과정 항목에서는 nucleotides, proteins, carbohydrates 또는 lipids와 같은 biopolymer와 관련된 대사 과정에 해당하는 biopolymer metabolic process, 그리고 전반적인 세포 내 대사 조절을 담당하는 regulation of cellular process 등과 관련된 유전자가 많았다. 분자기능항목별 분석에서는 금속이온, 양이온, DNA 결합과 관련한 기능들인 metal ion binding, cation binding, DNA binding에 관여하는 유전자가 많은 것으로 나타났다. 세포 구성요소 관련 분석에서는 intracellular에 존재하는 물질 관련한 유전자가 가장 많았고, 그 다음이 membrane 구성 물질 관련 유전자가 뒤를 이었다. 이러한 결과는 황금의 투여가 자궁경부암 세포에 독성을 발휘하여 세포 파괴 과정에서 발생하는 biopolymer를 처리하고, 손상된 DNA를 고치기 위해 나타나는 결과로 해석된다.

황금 처리에 의하여 발현이 감소된 606개의 유전자를 동일한 방법으로 분석한 결과 생물학적 과정 항목에서는 세포 내에서 정상적으로 이루어지는 대사과정과 관련한 경로인 cellular metabolic process, primary metabolic process 등과 관련된 유전자가 많았으며, 분자기능항목별 분석에서는 발현이 증가된 유전자군과 유사하게 metal ion binding, cation binding, DNA binding에 관여하는 유전자가 많은 것으로 나타났다. 세포 구성요소 관련 분석에서는 intracellular에 존재하는 물질 관련한 유전자가 가장 많았고, 그 다

음이 membrane 구성 물질 관련 유전자가 뒤를 이었다. 이러한 결과로부터 자궁경부암 세포가 황금 투여에 의하여 정상적 물질 대사, 분화와 성장 등 일반적인 기능을 상실하였음을 짐작할 수 있었다.

본 연구의 결과에서 발현이 감소되었거나 증가된 유전자들의 기능을 분류하였을 때, 비슷한 기능별 분포가 나타났다. 따라서, 이들 유전자 사이의 차이를 비교하여 살펴볼 필요가 있었는데, 생물학적 과정의 경우 nucleotides, proteins, carbohydrates 또는 lipids와 같은 biopolymer 뿐만 아니라 기타 세포 내 거대 분자들의 대사 과정인 macromolecule metabolic process에 관련된 유전자가 유의한 수준으로 발현 증가했음을 알 수 있었다(Fig. 3A). 이러한 결과는 상기한 바와 같이 세포 손상에 의해 발생하는 각종 nucleotide나 protein과 같은 물질들을 대사시키기 위해서인 것으로 해석된다. 분자기능 분포에 대한 유전자를 상호 비교 분석한 결과 세포막에 존재하여 외부로부터 신호를 세포 내로 전달하는 기능의 transmembrane receptor activity, 두 개의 acyl기가 산소분자에 부착된 형태로 생체 내에 존재하는 물질인 acid anhydride를 가수분해하는 기능과 관련된 유전자들의 발현이 유의한 차이를 보였다(Fig. 3B).

일반적으로 세포는 transmembrane receptor의 활성화로부터 외계의 신호를 받아들이고 이를 통해 성장, 분화하는 과정을 가지고 있다[43]. 본 연구의 결과에서 황금에 의하여 유발된 transmembrane receptor activity의 감소는 결국 이를 통해 일어나는 성장, 분화과정의 억제로 이어질 가능성이 높다. 반대로 hydrolase activity acting on acid anhydrides와 관련된 유전자들의 발현 증가는 세포 손상에 의하여 발생하는 각종 acid anhydride들을 대사시키기 위한 것으로 생각할 수 있다. 세포성분에서의 분포도를 살펴볼 때 intracellular와 cell fraction에 관련된 유전자들의 발현 정도가 유의한 차이를 보였다(Fig. 3C). 이러한 결과 역시 세포 손상의 회복 과정과 관련한 것이라 생각된다.

황금 투여에 의하여 발현이 증가된 519개의 유전자와 관련된 단백질을 네트워크 상에서 분석한 결과 guanosine triphosphate (GTP) 분해 효소의 일종으로 actin의 구조 형성에 관여하는 ras homolog gene family, member a (RHOA)[44], GTP 분해 효소의 일종인 ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1)[45], wnt signalling pathway의 중심에 위치해 있으며 b-Catenin이라고도 불리는 CTNNB1[46], 세포 주기 조절에 관여하는 cell division cycle 42 (CDC42)[47] 그리고 tumor necrosis factor alfa (TNF-α) 에 대한 수용기로 작용하여 암세포의 apoptosis 관련 과정에 관여하는 tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A (TNFRSF1A)[48] 등이 단백질 상호작용 네트워크의 중심에 위치함을 알 수 있었다(Fig. 7).

황금 추출물 처리에 의하여 발현이 감소된 606개 유전자들을 분석한 결과 원암유전자 (oncogene)의 일종인 V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1)[49], 외부로부터 신호를 받아 세포가 분화, 성장하는데 작용하는 주요한 경로 상에 위치하는 mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3)[50], 전사인자 중의

하나인 MyoD family inhibitor (MDFI)[51], 세포의 성장, 생존, 분화에 필수적인 경로인 signal transducers and activator of transcription familly member에 속하는 signal transducers and activator of transcription 3 (STAT3)[52] 등의 단백질이 단백질 상호작용 네트워크의 중심에 위치함을 알 수 있었다 (Fig. 8). 네트워크 중심부에 위치한다는 것은 다른 여러 단백질과 상호작용을 한다는 것을 의미하며, 따라서 이들 단백질이 약물의 세포내 작용에 매우 중요한 역할을 수행할 것으로 예측된다.

이상의 결과를 바탕으로 본 저자는 황금이 자궁경부암에 활용 될 수 있을 것이라는 가능성을 제기하는 바이며, 황금이 자궁경부암 세포의 증식률을 억제하는 증거로는 macromolecule metabolic process 관련 유전자의 발현증가와 transmembrane receptor activity관련 유전자의 발현감소가 관련될 가능성이 있음을 제기하는 바이다. 이에 부가하여, 증식률 억제 관련 기전으로는 TNFRSF1A를 통한 apoptosis, AKT1, MAPK3, 그리고 STAT3와 같은 세포 내 필수 신호 전달 경로의 저해가 관여할 가능성을 주장하는 바이다. 또한 향후 지속적인 실험 및 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

황금 추출물이 인간 유래 자궁경부암 세포의 증식률 및 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, SNU-703 세포에 황금 추출물을 처리하고 증식률을 관찰한 다음, total RNA를 추출한 후 DNA 칩을 이용하여 유전자 발현 양상을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 1.25 ㎎/㎖ 이상의 농도에서 유의하게 자궁경부암 세포의 증식을 억제하였다.
2. 발현이 증가된 유전자는 519 종, 발현이 감소한 유전자는 606 종으로 총 1,125 종의 유전자들의 발현이 변화되었다.
3. 발현이 증가된 유전자들에 대한 기능을 분석한 결과 생물학적 과정 항목에서는 biopolymer metabolic process, regulation of cellular process, 분자기능항목별 분석에서는 metal ion binding, cation binding, DNA binding, 세포 구성요소 관련 분석에서는 intracellular에 존재하는 물질 관련한 유전자가 가장 많았고, 그 다음이 membrane 구성 물질 관련 유전자가 뒤를 이었다.
4. 발현이 감소된 유전자들에 대한 기능을 분석한 결과 생물학적 과정 항목에서는 cellular metabolic process, primary metabolic process, 분자기능항목별 분석에서는 metal ion binding, cation binding, DNA binding, 세포 구성요소 관련 분석에서는 intracellular, membrane 구성 물질 관련 유전자가 많았다.
5. 생물학적 과정, 분자기능 및 세포 구성요소 항목에서의 기능 분포를 비교한 결과 생물학적 과정의 경우 macromolecule metabolic process에 관련된 유전자가 유의한 수준으로 발현 증가했고, 분자기능 분포에서는 transmembrane receptor activity, hydrolase activity acting on acid anhydrides, 세포성분 구성요소

면에서는 intracellular와 cell fraction에 관련된 유전자들의 발현 정도가 유의한 차이를 보였다.

6. 발현이 증가된 유전자들에 의하여 발현되는 단백질 상호작용 네트워크 분석 결과 RHOA, RAC1, CTNNB1, CDC42 그리고 TNFRSF1A 등의 단백질이 단백질 상호작용 네트워크의 중심에 위치함을 알 수 있었다.
7. 발현이 감소된 유전자들에 의하여 발현되는 단백질 상호작용 네트워크 분석 결과 AKT1, MAPK3, MDFI, ABL1, 그리고 STAT3 등의 단백질이 단백질 상호작용 네트워크의 중심에 위치함을 알 수 있었다.

□ 투 고 일 : 2009년 7월 29일
□ 심 사 일 : 2009년 8월 3일
□ 심사완료일 : 2009년 8월 10일

참고문헌

1. 한국중앙암등록본부, 보건복지부. 한국중앙 암 등록 사업 연례보고서(2002.1-2002.12). 보건복지부. 2003.
2. 대한부인종양・콜포스코피학회. 부인종양학. 서울:도서출판 칼빈서적. 1996:1-30, 46-95.
3. 문구, 정병학, 김병주. 암 동서의 결합치료 2. 서울:원광대학교출판국. 1999:379-406.
4. 김병기 등. 대한부인종양 ・ 콜포스코피학회의 4가 인유두종 바이러스 백신 접종 권고안. 부인종양. 2007;18(4):259-81.
5. 대한산부인과학회. 부인과학 제3판. 서울:도서출판 칼빈서적. 1997;924-5, 980-1027.
6. 韓醫婦人科學 敎材編纂委員會. 韓方婦人科學(上). 서울:도서출판 정담. 2002:260-9, 303-7, 322-9.
7. 박명원 등. 當歸芍藥散이 HeLa Cell의 增殖抑制와 死滅에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2006;19(2):34-48.
8. 金倫槿 등. 桂枝茯苓丸이 子宮癌細胞의 成長抑制와 MAP kinase 活性에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2002;15(1):31-43.
9. 박경미 등. 濟川煎이 子宮頸部癌細胞(HeLa cell)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003;16(2):161-76.
10. 김주연 등. 生地黃이 子宮頸部癌細胞(Hela cell)에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2006;19(1):69-80.
11. 하지연 등. 半枝蓮이 HeLa Cell의 增殖抑制와 死滅에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2006;19(4):47-60.
12. 최변탁 등. 虎杖根이 子宮頸部癌細胞의 成長抑制 및 細胞枯死에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 2006;19(1):1-13.
13. 신민교. 임상본초학. 서울:도서출판 영림사. 1997:400-2.
14. 馬繼興 主編. 神農本草經輯注. 北京:人民衛生出版社. 1995:215-6.
15. 新文豊出版公司. 新編 中藥大辭典(下). 壹北:新文豊出版公司. 1981:2092-7.
16. 신숙정, 이정호. 삼릉, 황금, 살송편버섯 혼합추출물의 항종양 작용. 생약학회지. 2004;35(4):324-9.
17. 서운교, 정지천. Melanoma B-16에서 IL-1β유발 GnT-Ⅲ,Ⅴ활성에 대한 과루인, 황금 추출물의 영향. 대한한방종양학회지. 1999;5(1);103-18.

18. 김석창 등. 황금으로부터 항산화 활성 성분의 분리. 한약작지. 2006;14(4):212-6.
19. 양재헌 등. 황금 및 생강복합 수용성겔 제제의 항산화 활성 및 피부염 치료효과. 약제학회지. 2006;36(4):253-62.
20. 최영광 등. 황금약침액이 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서의 항염증효과. 2003;6(3):5-14.
21. 박길병, 박양춘. 황금이 천식모델 생쥐의 폐조직내 면역세포에 미치는 영향. 대전대학교한의학연구원논문집. 2005;14(1):35-42.
22. 김명규 등. 황금이 사람 비만세포의 사이토카인 및 케모카인 분비에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007;22(4):233-8.
23. 하기태 등. 황금의 간세포 보호활성 및 cytochrome P450 발현 조절에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2008;22(1):155-61.
24. Blanchard AP, Kaiser RJ, Hood LE. High-density oligonucleotide arrays. Biosensors Bioelectron. 1996;11:687-90.
25. N. Iizuka et al. Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method. Cancer Res. 2002;62:3939-44.
26. Roslev P, King GM. Application of a Tetrazolium Salt with a Water-Soluble Formazan as an Indicator of Viability in Respiring Bacteria. Appl Environ Microbiol. 1993;59(9):2891-6.
27. Florell SR et al. Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. Mod Pathol. 2001;14(2):116-28.
28. Weis S et al. Quality control for microarray analysis of human brain samples: The impact of postmortem factors, RNA characteristics, and histopathology. J. Neurosci Methods. 2007;165(2):198-209.
29. Kwon KH et al. Analysis of gene expression profiles in cholesteatoma using oligonucleotide microarray. Acta Otolaryngol. 2006;126(7):691-7.
30. Zahurak M et al. Pre-processing Agilent microarray data. BMC Bioinformatics. 2007;8:142.
31. Pavlícek A, Hrdá S, Flegr J. Free-Tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus Frenkelia. Folia Biol (Praha). 1999;45(3):97-9.
32. 대한산부인과학회 부인종양위원회. 한국 부인암 등록 사업 조사 보고서 (2004.1.1-2004.12.31). 대한산부회지. 2007;50:28-78.
33. 傳統文化硏究所 裵秉哲 譯. 今釋黃帝內經素問. 서울:成輔社. 1994:471-2.
34. 張介賓 著 李泰均 編譯. 景岳全書 婦人規. 서울:법인문화사. 2004:251-64.
35. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울:행림출판사. 1978:230-9.
36. 許浚. 對譯 東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 1999:370-4.

37. 常敏毅編著. 抗癌本草. 湖南:湖南科學技術出版社. 1987:258-9.
38. 조종관. 한방임상종양학. 대전:주민출판사. 2001;799-818.
39. 하지영 등. 胡桃藥鍼液의 DNA chip을 이용한 유전자 발현 분석. 대한침구학회지. 2007;24(1):151-63.
40. 이응경, 강성길, 고형균. 봉독약침액이 비만세포주의 CD/cytokine 유전자 발현에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003;20(5):50-62.
41. 한상원 등. 녹용약침액의 DNA chip을 이용한 유전자 발현 분석. 대한침구학회지. 2003;20(6):34-44.
42. Hong X et al. Gene expression profiling reveals novel targets of estramustine phosphate in prostate cancer cells. Cancer Lett. 2004;209(2):187-95
43. Kistler J et al. Structure and function of an acetylcholine receptor. Biophys. J. 1982;37(1):371-83.
44. Yiu G, Zhigang H. Glial inhibition of CNS axon regeneration. Nature Reviews Neuroscience. 2006;7:617-27.
45. Ridley A. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. Trends Cell Biol 2006;16(10):522-9.
46. Thompson MD. and Monga S.P. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. Hepatology. 2007; 45(5):1298-305.
47. Ramakers GJ. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. Trends Neurosci. 2002; 25(4):191-9.
48. Rath PC, Aggarwal BB. TNF-induced signaling in apoptosis. J. Clin. Immunol. 2000;19(6):350-64.
49. Hemmings BA. Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. Science. 1997;275(5300):628-30.
50. Ruscica M et al. Modulatory actions of neuropeptide Y on prostate cancer growth: role of MAP kinase/ERK 1/2 activation. Adv. Exp. Med. Biol. 2007;604:96-100.
51. Chen CM et al. I-mf, a novel myogenic repressor, interacts with members of the MyoD family. Cell. 1996;86(5): 731-41.
52. Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, Duschl A. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. Drug News Perspect. 2005;18(4):243-9.