

## SiHa 세포주에서 비소화합물 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) 투여 후 cDNA microarray를 이용한 유전자 발현의 변화

\*가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실, †서울대학교 약학대학,  
†연세대학교 보건대학  
서미영\* · 박은경\* · 팽기영\* · 김종국† · 박용석†  
안웅식\* · 이준모\* · 남궁성은\* · 김도강\*

=ABSTRACT=

### The Gene Expression Profile Using cDNA microarray after treatment Arsenic Compound (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) in SiHa Cell

Seo Mi Young, M.D.\* , Park Eun Kyung, M.D.\* , Pang Gi Young, M.D.\*  
Kim Chong Kook, Ph.D.† , Park Yong Serk, Ph.D.† , Ahn Woong Shick, M.D.\* ,  
Lee Jun Mo, M.D.\* , Namkoong Sung Eun, M.D.\* , Kim Do Gang, M.D.\*

\*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine,  
The Catholic University of Korea, †College of Pharmacy, Seoul National University and  
†Department of Medical Technology, College of Health Science, Yonsei University

**Objective :** To obtain information on the growth inhibition effect of arsenic compounds and gene expression profiles using cDNA microarray technique in SiHa cell lines.

**Methods :** We cultured 10<sup>3</sup> SiHa cell in 96 well plate and we investigated growth inhibition effects using MTT assay and also we performed gene expression profile experiment using 384 cDNA chip in SiHa cell after exposure of arsenics (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub> - 1 μM) for 48 hrs.

**Results :** Arsenics (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) inhibit the growth of SiHa cells (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 μM - 9.2, 56, 89, 93, 96, 96%, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 μM- 54, 84, 84, 85, 85, 87%) in 4 days culture. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and As<sub>4</sub>O<sub>6</sub> induced apoptosis in SiHa cells. After exposure of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 47 genes were changed more than 2 times (eg, *thymidylate synthetase*, *cyclin B1*, *CDC 20*). In case of As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, 78 genes were changed more than 2 times (eg, *CDC 20*, *cyclin B1*, *primase*, *proliferating cell nuclear antigen*).

**Conclusion :** we observed arsenic compound (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) inhibit the growth of SiHa cell. In gene expression profiling experiment, 78 genes was changed the expression level 2 times more than that of reference RNA after treatment of As<sub>4</sub>O<sub>6</sub> and 47 genes after treatment of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Through these result, we thought more study need in functional genomics after arsenic treated cervical cancer cells.

**Key Words :** Arsenic compound (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>), Cervical cancer cell line (SiHa), cDNA chip

자궁경부암으로 인한 사망률을 감소시키기 위하여 과거 20여년 동안 자궁경부암의 조기 진단과 아울러 수술요법, 방사선요법, 면역요법, 그리고 최근에는 유전자 치료법에 이르기까지 다양한 치료 항암요법이 개발, 사용되고 있으나, 치료 후에 재발을 방지하는 것이 자궁경부암 치료에 있어서 아직 숙제로 남아 있다.<sup>1</sup>

인유두종 바이러스 (human papilloma virus)는 자궁경부암 조직에서 흔히 발견되는 발암원인성 바이러스로 알려져 있다.<sup>2</sup> 이 바이러스는 인체 세포 내에 감염 후 자신이 가지고 있는 발암성 유전자인 E6와 E7의 발현이 유도되어 암 억제 단백질인 p53과 pRB와 각각 복합체를 형성하여, p53과 pRB 인자를 불 활성화하고, 유비키티친 경로

접수일 : 2002. 5. 3.  
주관책임자 : 김도강

\* 본 과제는 한국학술진흥재단 연구비 (KRF-2000-015-FP0047)에 의해 수행하였음.

를 통하여 그 분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다.<sup>3</sup> 이를 바탕으로 하여 최근에는 세포내의 암 억제 인자인 p53 농도를 증가시키기 위하여, 인위적인 유전자 도입에 의한 p53 단백질의 고 발현을 유도함으로써 p53에 의한 자궁경부암 세포의 세포사 (apoptosis)를 유도하는 유전자 치료법이 시도되고 있다.<sup>4</sup>

일반적으로 비소는 무색, 무미, 무취의 치명적인 독극 물질로써 자연계에서는 As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>, KAsO<sub>2</sub>로 산재하며, 특히 삼산화비소 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 유화비소 (As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>)는 오래 전부터 중국에서 백혈병치료를 위해 사용되어 왔으며, 우리나라에서도 한방에서 사용되어졌다고 보고되고 있고, 서양에서도 오랫동안 백혈병의 치료에 사용되어진 고대의 전통적 의약으로서, 최근 1996년 11월 상해 제 2 의과대학 상해 혈액학 연구소의 陳賽綱과 陳竺 교수가 연구한 삼산화비소 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)로 백혈병환자를 치료할 수 있다는 내용을 발표한 이래, 비소화합물에 대한 관심이 높아지고 있으며 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>2,5</sup>

최근에는 As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>가 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>와 같이 암세포에 선택적으로 작용하여 암세포의 세포사를 유도함으로써 항암작용을 나타낸다고 보고되고 있고, NB4 세포에서는 낮은 농도에서도 세포사를 유도하는 것으로 알려져 있다.<sup>6</sup> As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>의 경우 세포의 종류에 따라 저농도 (0.1-0.5 μM)에서는 세포분열을 촉진하며, 고농도 (0.5-2 μM)에서는 세포사를 유도하는 등의 이중작용에 대한 보고도 있다.<sup>2</sup> 또한 HPV16 전이 암세포에 대하여서도 세포사를 유도하고, 발암성 유전자인 E6, E7의 발현을 저해하는 작용기전 등도 보고되고는 있으나, 아직 그 기전은 명확하지 않다.<sup>7</sup> 이와 같이 산화비소화합물은 그 구조가 간단하면서도 발암성 유전자 혹은 그 발현산물에 선택적으로 작용함으로써, 부작용이 적은 우수한 항암 치료제로서의 가능성을 시사하고 있으나, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>의 높은 독성과 이의 취급이 어려운 것이 문제로 지적되고 있다.<sup>8</sup>

본 연구는 비소화합물 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)의 항암성을 이용하여, 인유두종 바이러스가 원인인 자궁경부암의 치료에 임상적으로 보다 안정성과 효용성이 보장되는 새로운 치료법을 개발하기 위하여, 인유두종 바이러스 야형 16 양성인 SiHa 세포주에서 비소화합물 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)에 의한 성장 억제 기전 및 유전자 발현을 검색하고자 하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용한 자궁경부암 세포주는 야생형 p53 유전자를 가지고 있으며 HPV 16 양성인 SiHa 세포를 사용하였다. 세포배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM, Gibco-BRL, Rockville, MD)에 5% fetal bovine

serum (FBS, Gibco-BRL), 0.37% sodium bicarbonate (Amresco, Solon, Ohio), 30 mM HEPES (Amresco) 그리고 streptomycin/penicillin (Gibco-BRL)을 첨가하여 사용하였다. 이들 세포주는 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 2. 연구 및 분석방법

#### 1) 세포성장 억제 측정-MTT assay

MTT assay를 위해서는 SiHa 세포를 96 well plate에 각각 1×10<sup>3</sup> cells/well이 되도록 접종한 후 24시간 후에 비소화합물을 각각 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 μM이 되도록 처리한 후 4일 동안 관찰하였다. Well에 MTT solution (Sigma, St. Louis, MO)을 20 μl씩 첨가한 후 CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 이후 상층액을 모두 제거한 후 DMSO (Sigma)를 100 μl/well로 첨가하여 shaker에서 10초간 흔들어준 후 ELISA-Reader (Spectromax 250, Molecular Devices)로 570 nm에서 흡광도를 측정한다. 흡광도 측정은 세 번씩 반복하였고 그 평균값을 취하였다.

#### 2) DNA fragmentation 형성 측정

100 mm dish에 5×10<sup>5</sup>의 SiHa 세포를 접종한 후 24시간 후에 비소화합물 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)을 0, 0.5, 1, 2 μM을 처리하였다. 48시간 후에 세포를 모아서 lysis buffer [0.8% SDS, 0.1 M NaCl, 0.1 M EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH8.0)]로 용해시키고 proteinase K (Sigma)를 20 μg/ml이 되도록 처리하여 56°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후에 Phenol/Chloroform을 처리하여 단백질을 제거하고, genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA 5 μg을 2% 아가로스 겔에서 50 V, 2시간 동안 전기 영동 하였다. 전기영동이 종료된 아가로스 겔은 EtBr solution (1 ug/ml, Sigma)으로 염색한 후, UV illuminator에서 DNA ladder를 확인하였다.

#### 3) RNA 추출

100 mm dish에 SiHa 세포주를 5×10<sup>5</sup>으로 접종한 후, 24시간 후에, 2 μM의 비소화합물 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후에 상층액은 모두 제거하고, PBS buffer로 한번 씻어준 후에 TRI reagent (MRC. chincineti Ohio)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 1/500으로 희석한 후 spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, UK)의 260 nm와 280 nm의 파장에서 O.D.를 측정하여 RNA의 순도와 양을 확인하였다.

#### 4) DNA chip analysis

##### 4-1) DNA chip

본 실험에 사용된 384 DNA chip은 Macrogen Inc. (Seoul, Korea)에서 만들어진 것을 사용하였다.

4-2) 384 개의 cDNA list

1	Hs.240534 "1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (lysophosphatidic acid acyltransferase, alpha)"	40	Hs.26655 "glucose-6-phosphatase, transport (glucose-6-phosphate) protein 1"
2	Hs.87417 cathepsin L2	41	Hs.111577 integral membrane protein 2C
3	Hs.144058 DKFZP564C103 protein	42	Hs.31463 KIAA0281 gene product
4	Hs.7301 G protein pathway suppressor 2	43	Hs.172825 KIAA1037 protein
5	Hs.186711 hypothetical protein FLJ20070	44	Hs.155462 "minichromosome maintenance deficient (mis5, S. pombe) 6"
6	Hs.15087 KIAA0250 gene product	45	Hs.77274 "plasminogen activator, urokinase"
7	Hs.52081 KIAA0867 protein	46	Hs.274494 RBP1-like protein
8	Hs.285754 met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	47	Hs.32935 "TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase III, C, 90kD"
9	Hs.51 "phosphatidylinositol glycan, class A (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)"	48	tubulin
10	Hs.77028 protein translocation complex beta	49	Hs.180952 "actin, beta"
11	Hs.153022 "TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, C, 110kD"	50	Hs.172405 cell division cycle 27
12	actin	51	Hs.16492 DKFZP564G2022 protein
13	Hs.264981 2'-5'oligoadenylate synthetase 2	52	Hs.172153 glutathione peroxidase 3 (plasma)
14	Hs.85963 "CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)-like 2	53	Hs.271986 "integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)"
15	Hs.134200 DKFZP564C186 protein	54	Hs.96485 KIAA0290 protein
16	Hs.79222 "galactosidase, beta 1"	55	Hs.227835 KIAA1049 protein
17	Hs.225767 IDN3 protein	56	Hs.47007 mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
18	Hs.118978 KIAA0256 gene product	57	Hs.1050 "pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coiled domains 1 (cytohesin 1)"
19	Hs.104305 KIAA0926 protein	58	Hs.79372 "retinoid X receptor, beta"
20	Hs.101448 metastasis associated 1	59	Hs.115256 telomerase reverse transcriptase
21	Hs.283006 "phospholipase C, beta 4"	60	lambda 564
22	Hs.108969 PTD008 protein	61	Hs.10247 activated leucocyte cell adhesion molecule
23	Hs.155188 "TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase II, F, 55kD"	62	Hs.77204 "centromere protein F (350/400kD, mitotin)"
24	actin	63	Hs.72157 DKFZP564I1922 protein
25	Hs.67896 7-60 protein	64	Hs.5233 glutathione S-transferase M4
26	Hs.79197 "CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)"	65	Hs.83968 "integrin, beta 2 (antigen CD18 (p95), lymphocyte function-associated antigen 1"
27	Hs.3804 DKFZP564C1940 protein	66	Hs.155979 KIAA0295 protein
28	Hs.76392 "gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolyglutamylyl hydrolase)"	67	Hs.126084 KIAA1055 protein
29	Hs.7089 insulin induced protein 2	68	Hs.7510 mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
30	Hs.74579 KIAA0263 gene product	69	Hs.44 "pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)"
31	Hs.173656 KIAA0941 protein	70	Hs.75879 ribosomal protein L19
32	Hs.154672 "methylene tetrahydrofolate dehydrogenase (NAD+ dependent)	71	Hs.7733 tetratricopeptide repeat domain 1
33	Hs.54941 "phosphorylase kinase, alpha 2 (liver)"	72	lambda 564
34	Hs.75082 "ras homolog gene family, member G (rho G)"	73	Hs.28914 adenine phosphoribosyltransferase
35	Hs.60679 "TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase II, G, 32kD"	74	Hs.1708 "chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)"
36	tubulin	75	Hs.165998 DKFZP564M2423 protein
37	Hs.1211 "acid phosphatase 5, tartrate resistant"	76	Hs.226795 glutathione S-transferase pi
38	Hs.82906 "CDC20 (cell division cycle 20, S. cerevisiae, homolog)"	77	Hs.99995 intercellular adhesion molecule 3
39	Hs.24766 DKFZP564E1962 protein	78	Hs.5716 KIAA0310 gene product
		79	Hs.285211 KIAA1067 protein
		80	Hs.86575 mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
		81	Hs.99890 "polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit (125kD)"

- 82 Hs.275865 ribosomal protein S18
- 83 Hs.125359 Thy-1 cell surface antigen
- 84 lambda 1.0k
- 85 Hs.75081 adenomatosis polyposis coli
- 86 Hs.20295 "CHK1 (checkpoint, S.pombe) homolog"
- 87 Hs.107747 DKFZP566C243 protein
- 88 Hs.180577 granulin
- 89 Hs.86958 "interferon (alpha, beta and omega) receptor 2"
- 90 Hs.7911 KIAA0323 protein
- 91 Hs.106711 KIAA1085 protein
- 92 Hs.227400 mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
- 93 Hs.74598 "polymerase (DNA directed), delta 2, regulatory subunit (50kD)"
- 94 Hs.169407 "SAC2 (suppressor of actin mutations 2, yeast, homolog)-like"
- 95 Hs.82962 thymidylate synthetase
- 96 lambda 1.0k
- 97 Hs.1217 adenosine deaminase
- 98 Hs.79018 "chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)"
- 99 Hs.224137 DKFZP566D143 protein
- 100 Hs.79000 growth associated protein 43
- 101 Hs.5337 "isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial"
- 102 Hs.103915 KIAA0346 protein
- 103 Hs.278442 KIAA1090 protein
- 104 Hs.82979 mitogen-activating protein kinase kinase kinase 2
- 105 Hs.46964 "polymerase (DNA-directed), mu"
- 106 Hs.278431 "SCO (cytochrome oxidase deficient, yeast) homolog 2"
- 107 Hs.5831 "tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)"
- 108 actin
- 109 Hs.8402 adenylate cyclase 3
- 110 Hs.19554 chromosome 1 open reading frame 2
- 111 Hs.98693 DKFZP586J0917 protein
- 112 Hs.73172 growth factor independent 1
- 113 itag6
- 114 Hs.23263 KIAA0350 protein
- 115 Hs.72172 KIAA1115 protein
- 116 Hs.170027 "mouse double minute 2, human homolog of; p53-binding protein"
- 117 Hs.127007 "potassium channel, subfamily K, member 5 (TASK-2)"
- 118 Hs.313 "secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)"
- 119 tp53
- 120 actin
- 121 Hs.1239 "alanyl (membrane) aminopeptidase"
- 122 cldn7
- 123 Hs.22981 DKFZP586M1523 protein
- 124 Hs.115352 growth hormone 1
- 125 Hs.23119 ITBA1 gene
- 126 Hs.168052 KIAA0421 protein
- 127 Hs.131728 KIAA1140 protein
- 128 Hs.172210 MUF1 protein
- 129 Hs.30743 preferentially expressed antigen in melanoma
- 130 sempl
- 131 Hs.80598 "transcription elongation factor A (SII), 2"
- 132 tubulin
- 133 Hs.105445 "aldolase A, fructose-bisphosphate"
- 134 Hs.157113 "coenzyme Q, 7 (rat, yeast) homolog"
- 135 Hs.4766 DKFZP586O0120 protein
- 136 Hs.65149 growth hormone 2
- 137 Hs.2340 junction plakoglobin
- 138 Hs.214646 KIAA0447 gene product
- 139 Hs.26229 KIAA1366 protein
- 140 Hs.24297 multiple endocrine neoplasia I
- 141 Hs.173609 pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1
- 142 Hs.153003 serine/threonine kinase 16
- 143 Hs.155202 "transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (110kD, elongin A)"
- 144 tubulin
- 145 Hs.234726 alpha-1-antichymotrypsin
- 146 Hs.179573 "collagen, type I, alpha 2"
- 147 Hs.6285 DKFZP586P0123 protein
- 148 Hs.273457 "guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2"
- 149 Hs.65114 keratin 18
- 150 Hs.29956 KIAA0460 protein
- 151 Hs.128867 KIAA1372 protein
- 152 Hs.170120 muscle specific gene
- 153 Hs.225932 pregnancy specific beta-1-glycoprotein 7
- 154 Hs.48915 serine/threonine kinase 6
- 155 Hs.125156 "transcriptional adaptor 2 (ADA2, yeast, homolog)-like"
- 156 lambda 564
- 157 Hs.74561 alpha-2-macroglobulin
- 158 Hs.75617 "collagen, type IV, alpha 2"
- 159 Hs.151696 DKFZP727G051 protein
- 160 her2
- 161 Hs.182265 keratin 19
- 162 Hs.239686 KIAA0462 protein
- 163 Hs.86392 KIAA1402 protein
- 164 Hs.1345 mutated in colorectal cancers
- 165 Hs.82741 "primase, polypeptide 1 (49kD)"
- 166 Hs.112049 SET binding factor 1
- 167 Hs.27299 transcriptional regulator protein
- 168 lambda 564

- 169 Hs.3763 "amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 (Fe65)"  
 170 Hs.108885 "collagen, type VI, alpha 1"  
 171 Hs.171695 dual specificity phosphatase 1  
 172 Hs.51043 hexosaminidase B (beta polypeptide)  
 173 Hs.195850 "keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)"  
 174 Hs.158095 KIAA0484 protein  
 175 Hs.109315 KIAA1415 protein  
 176 Hs.78934 "mutS (E. coli) homolog 2 (colon cancer, nonpolyposis type 1)"  
 177 Hs.279558 PRO0478 protein  
 178 Hs.74564 "signal sequence receptor, beta (translocon-associated protein beta)"  
 179 Hs#S1972073 "transducer of ERBB2, 2"  
 180 lambda 1.0k  
 181 Hs.120 "anti-oxidant protein 2 (non-selenium glutathione peroxidase, acidic calcium-independent )"  
 182 Hs.151242 "complement component 1 inhibitor (angioedema, hereditary)"  
 183 Hs.183 Duffy blood group  
 184 Hs.88556 histone deacetylase 1  
 185 Hs.278441 KIAA0015 gene product

- 186 Hs.200595 KIAA0562 gene product  
 187 Hs.274396 KIAA1423 protein  
 188 Hs.11000 MY047 protein  
 189 Hs.6451 PRO0659 protein  
 190 Hs.50002 "small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 19"  
 191 Hs.74137 transmembrane trafficking protein  
 192 lambda 1.0k

## 결 과

1.  $As_2O_3$ 와  $As_4O_6$ 에 의한 SiHa 세포주의 성장 억제  
 $As_2O_3$ 와  $As_4O_6$ 에 의한 자궁경부암 세포주에 대한 항암효과를 확인하기 위해 야생형 p53 유전자를 가지며 HPV 16 양성인 SiHa 세포주를 사용하였다. 비소화합물  $As_2O_3$ 와  $As_4O_6$ 를 SiHa 세포에 각각 0.5, 1, 2, 3, 4, 5  $\mu M$ 의 농도를 처리한 후, 4일 동안 세포 성장 억제율을 비교하였다. 그 결과 비소화합물 처리 후 4일째에  $As_2O_3$ 의 경우 대조군에 비해 각각 9.2, 56, 89, 93, 96, 96%  $As_4O_6$ 의 경우는 54, 84, 84, 85, 75, 87%로 각각 감소하였다 (Fig. 1).

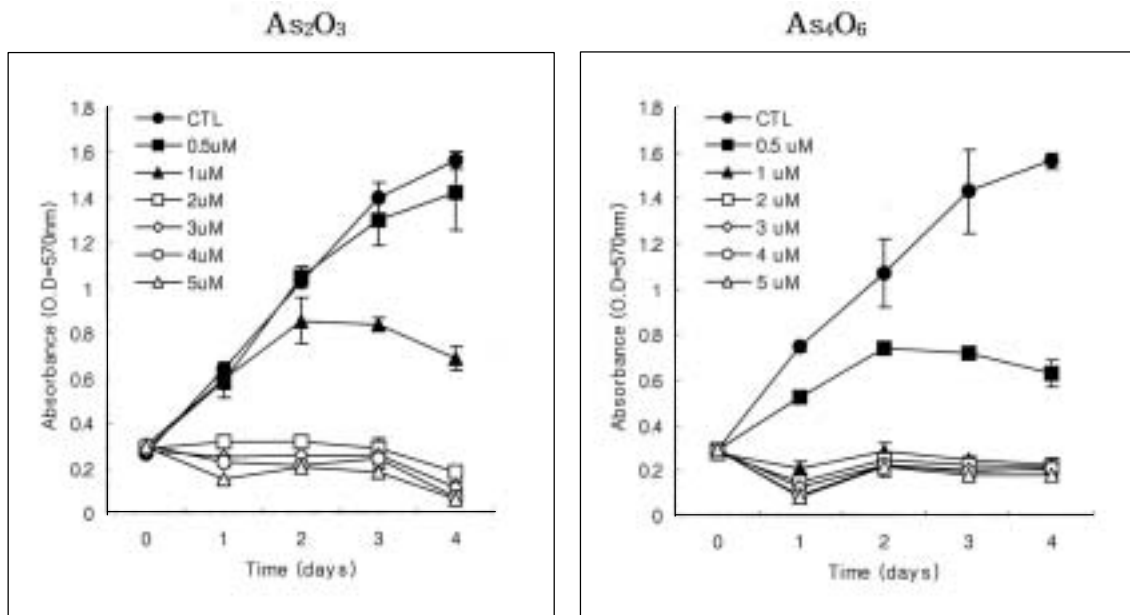


Fig. 1. The growth of human cervical cancer cell line was suppressed by  $As_2O_3$ ,  $As_4O_6$

2. 자궁경부암 세포주에서  $As_2O_3$ 와  $As_4O_6$ 에 의한 apoptosis 유도

$As_2O_3$ 와  $As_4O_6$ 에 의한 자궁경부암 세포의 세포성장억제 효과가 세포독성 (cytotoxicity)에 의한 것인지 apoptosis에 의한 것인지를 확인하기 위해 DNA fragmentation assay를 실시하였다. SiHa 세포주에 0, 0.5, 1, 2  $\mu M$ 의  $As_2O_3$ 나  $As_4O_6$ 를 처리한 모든 경우에서 DNA ladder가 관찰되었다 (Fig. 2).

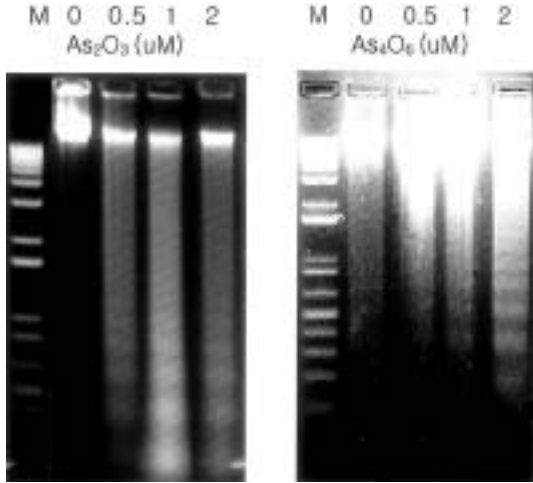


Fig. 2. Induction of apoptosis by arsenic compound ( $As_2O_3$ ,  $As_4O_6$ ) treatment was checked by DNA fragmentation assay

3. DNA chip을 이용한  $As_2O_3$ 와  $As_4O_6$ 처리에 따른 유전자 발현의 비교

$As_2O_3$ 와  $As_4O_6$ 에 의한 유전자 발현 변화를 비교 분석하기 위해 384 DNA chip을 사용하였다. SiHa 세포주에 1  $\mu M$ 의  $As_2O_3$ 와  $As_4O_6$ 를 48시간 동안 처리한 후 total RNA를 추출하여 384 DNA chip에 혼성화 (hybridization) 한 후 스캐닝을 하여 유전자 발현 변화를 분석하였다 (Fig. 3, 4). 그 결과  $As_2O_3$ 의 경우, 대조군에 의해 2배 이상 변화한 유전자는 thymidylate synthetase, cyclin B1, CDC 20 (cell division cycle 20) 등 약 47여개 정도였으며 (Table 1),  $As_4O_6$ 의 경우, 대조군과 비교하여 2배 이상 변화한 유전자는 CDC20 (cell division cycle 20), cyclin B1, primase, proliferating cell nuclear antigen 등 약 78여개의 유전자가 변화한 것으로 나타났다 (Table 2). 두 종류의 비소화합물에 의해서 공통적으로는 UDP-glucose dehydrogenase, tumor differentially expressed 1 등 32개 유전자가 변화한 것으로 나타났다 (Table 3).

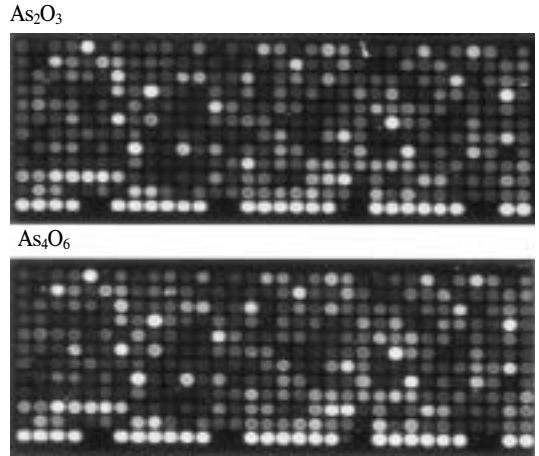


Fig. 3. Overlaid image of cDNA filter hybridized with non-treated (red) and 1  $\mu g$  arsenic compounds ( $As_2O_3$ ,  $As_4O_6$ ) treated (green) in SiHa cells after 48 hrs. Down-regulated genes in red, up-regulated genes in green.

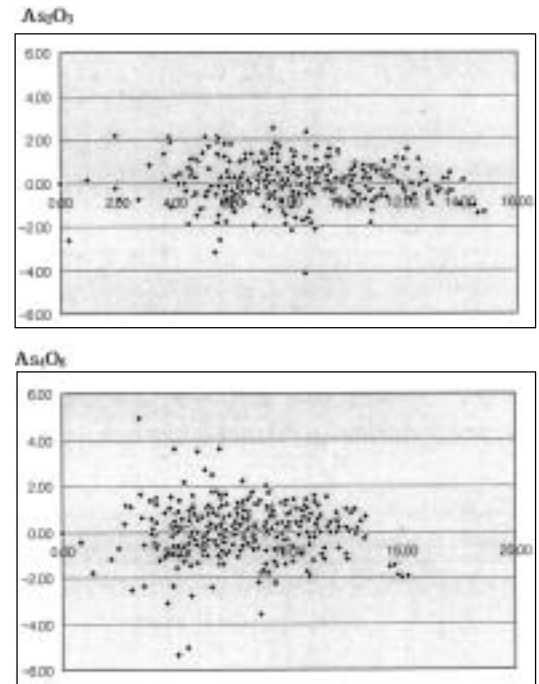


Fig. 4. Comparison of gene expression profile between untreated (-cy3) and arsenic compounds ( $As_2O_3$ ,  $As_4O_6$ ) treated SiHa cell (cy5). Y axis value is normalized with  $2\log(3D/5D)$ . Above 2 means  $2^2$ , 4 time higher expression in control, and below -2 means  $2^2$ , 4 times lower in arsenic compounds treated SiHa cell.

- The Gene Expression Profile Using cDNA microarray after treatment Arsenic Compound ( $As_2O_3$ ,  $As_4O_6$ ) in SiHa Cell -

Table 1. Forty seven genes and ESTs (out of total 384) whose expression was changed at least two-fold of exposure of  $As_2O_3$  (1  $\mu$ M) for 48 hrs in SiHa cell

Gene/Protein	cDNA array results			
	2log (3F)	2log (5F)	2log (3F/5F)	$2^{2\log(3F/5F)}$
<b>Up-regulated gene</b>				
snuportin-1	4.43	8.56	-4.13	17.5
Hs. 134200 DKFZP562C186 protein	6.32	10.30	-3.98	15.8
tumor differentially expressed 1	9.04	10.86	-1.82	3.5
Hs.85963 "CD36 antigen"	5.40	7.21	-1.81	3.5
her2	7.07	8.67	-1.58	3.0
integral membrane protein 2C	6.65	8.23	-1.60	3.0
membrane protein, palmitoylated 1 (55 kD)	6.44	7.91	-1.47	2.8
tp53	7.39	8.73	-1.34	2.5
UDP-glucose dehydrogenase	9.70	10.94	-1.24	2.4
Hs.171695 dual specificity phosphatase 1	11.23	12.41	-1.17	2.3
TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase III, C, 90 kD	6.04	7.12	-1.08	2.1
cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	9.04	10.09	-1.05	2.1
<b>Down-regulated gene</b>				
Hs.106794 KIAA0584 protein	8.85	5.96	2.88	7.4
thymidylate synthetase	9.96	7.47	2.49	5.6
Hs.268530 G protein pathway suppressor 1	12.83	10.45	2.38	5.2
Hs.74561 alpha-2-macroglobulin	9.66	8.65	1.01	2.0
cyclin B1	10.93	8.61	2.33	5.0
DKFZP586J0619 protein	4.09	1.92	2.17	4.5
CHK1 (checkpoint, S.pombe) homolog	7.65	5.48	2.17	4.5
alanyl (membrane) aminopeptidase	7.21	5.09	2.12	4.3
collagen, type IV, alpha 2	5.92	3.80	2.12	4.3
ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal (vacuolar proton pump)	7.42	5.52	1.90	3.7
mutated I colorectal cancers	9.38	7.54	1.83	3.6
bladder cancer overexpressed protein	7.53	5.76	1.77	3.4
centromere protein F (350/400 kD, mitotin)	7.73	5.96	1.77	3.4
CDC20 (cell division cycle 20, S. cerevisiae, homolog)	10.64	8.96	1.68	3.2
DKFZp434A0131 protein	6.87	5.18	1.68	3.2
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1	9.34	7.67	1.66	3.2
Hs.79241 B-cell CLL/lymphoma 2	13.07	11.38	1.69	3.2
proliferating cell nuclear antigen	10.98	9.44	1.54	2.9
splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor)	13.71	12.18	1.53	2.9
primase, polypeptide 1 (49 kD)	9.60	8.13	1.48	2.8
collagen, type I, alpha 2	8.84	7.37	1.47	2.8
CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	11.10	9.68	1.42	2.7
mutS (E. coli) homolog 2 (colon cancer, nonpolyposis type 1)	8.75	7.42	1.33	2.5
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	8.91	7.59	1.33	2.5
adenosine deaminase	8.03	6.71	1.32	2.5
cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1	7.81	6.50	1.31	2.5
methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent)	10.69	9.47	1.22	2.3
minichromosome maintenance deficient (mis5, S. pombe) 6	10.55	9.33	1.22	2.3
cell division cycle 27	9.40	8.21	1.18	2.3
protein phosphatase 1G (formerly 2 G), magnesium-dependent, gamma isoform	12.95	11.78	1.17	2.2
cell division cycle 27	8.39	7.26	1.13	2.2
serine/threonine kinase 2	8.32	7.22	1.11	2.2
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9)	13.12	12.03	1.09	2.1
IDN3 protein	10.03	8.97	1.06	2.1
Hs.74561 alpha-2-macroglobulin	9.66	8.65	1.01	2.0

Table 2. Seventy eight genes and ESTs (out of total 384) whose expression was changed at least two-fold of exposure of As<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (1 μM) for 48 hrs in SiHa cell

Gene/Protein	cDNA array results			
	2log (3F)	2log (5F)	2log (3F/5F)	2 <sup>2log(3F/5F)</sup>
<b>Up-regulated gene</b>				
Hs.171695dual specificity phosphatase1	11.75	14.79	-3.04	8.2
Hs.77274 "plasminogen activator, urokinase"	5.21	7.37	-2.17	4.5
DKFZP434J154 protein	7.29	9.43	-2.14	4.4
UDP-glucose dehydrogenase	8.97	10.90	-1.93	3.8
Hs.69855 NRAS-related gene	11.15	13.06	-1.91	3.8
Hs.85963 CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)-like 2 (lysosoma)	6.82	8.61	-1.79	3.5
tumor differentially expressed 1	9.06	10.80	-1.74	3.3
Hs.52081 KIAA0867 protein	7.01	8.64	1.63	3.1
growth hormone 2	3.47	5.05	-1.58	3.0
cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	8.43	9.82	-1.40	2.6
transcriptional regulator protein	7.57	8.96	-1.39	2.6
her2	8.07	9.38	-1.31	2.5
vav 1 oncogene	8.88	10.18	-1.30	2.5
SEC24 (S. oerevisiae) related gene family, member B	9.84	11.09	-1.25	2.4
spinocerebellar ataxia 2 (divopontocerebellar ataxia 2, autosomal dominant, ataxin 2)	11.36	12.56	-1.20	2.3
sudD (suppressor of bimD6, Aspergillus nidulans) homdog	10.38	11.57	-1.18	2.3
caoherin 5, VE-cadherin (vascular epithelium)	5.79	6.94	-1.15	2.2
Machaob-Joseph disease (spinocerebellar ataxia 3, divopontocerebellar ataxia 3, autosoma)	6.63	7.73	-1.10	2.1
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4	10.43	11.44	-1.01	2.0
<b>Down-regulated gene</b>				
CDC20 (cell division cycle 20, S. cerevisiae, homolog)	8.33	3.37	4.96	31.1
cyclin B1	10.51	6.91	3.59	12.1
primase, polypeptide 1 (49 kD)	8.51	4.93	3.58	12.0
thymidylate synthetase	9.48	5.96	3.52	11.5
mutated in colorectal cancers	9.89	6.29	2.69	6.4
ADP-ribosyltransferase (NAD+: poly (ADP-ribose) polymerase)	9.06	6.61	2.45	5.5
methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclo	10.17	7.94	2.23	4.7
mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinsae kinase 1	7.50	5.36	2.14	4.4
proliferating cell nuclear antigen	10.96	8.97	1.99	4.0
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 1	10.89	9.12	1.77	3.4
collagen, type I, alpha 2	8.37	6.62	1.75	3.4
DKFZP586K0919 protein	10.16	8.41	1.74	3.3
periodontal ligament fibroblast protein	8.56	6.84	1.71	3.3
minichromosome maintenance deficient (mis5, S. pombe) 6	10.76	9.07	1.69	3.2
melanoma adhesio molecule	10.69	9.07	1.62	3.1
proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)	8.80	7.18	1.62	3.1
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5 (13 kD, B13)	8.54	6.94	1.61	3.0



- The Gene Expression Profile Using cDNA microarray after treatment Arsenic Compound ( $As_2O_3$ ,  $As_4O_6$ ) in SiHa Cell -

CHK1 (checkpoint, <i>S.pombe</i> ) homolog	7.36	5.77	1.59	3.0
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2	12.68	11.13	1.55	2.9
CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	9.82	8.28	1.55	2.9
splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor)	13.14	11.64	1.50	2.8
mutS ( <i>E. coli</i> ) homolog 2 (colon cancer, nonpolyposis type 1)	8.43	6.97	1.46	2.8
protein phosphatase 1 G (formerly 2 C), magnesium-dependent, gamma isoform	12.18	10.75	1.44	2.7
HSPC133 protein	9.57	8.17	1.30	2.6
SAC2 (suppressor of actin mutation 2, yeast, homolog)-like	11.60	10.21	1.39	2.6
protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), gamma isoform	11.27	9.89	1.38	2.6
dynactin 1 (p150, Glued ( <i>Drosophila</i> ) homolog)	6.55	5.18	1.37	2.6
IDN3 protein	10.07	8.72	1.35	2.6
Hs. 79732 FIBULIN 1	10.15	8.83	1.32	2.5
DKFZP564M2423 protein	12.43	11.12	1.31	2.5
NPD002 protein	9.25	7.95	1.30	2.5
creatine kinase, brain	10.97	9.70	1.27	2.4
Down-regulated gene				
SET binding factor 1	8.99	7.74	1.25	2.4
capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1	11.03	9.82	1.21	2.3
collagen, type VI, alpha 2	8.48	7.27	1.21	2.3
chorionic gonadotropin, beta polypeptide	9.70	8.49	1.21	2.3
palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)	9.96	5.77	1.19	2.3
trinucleotide repeat containing 5	9.80	8.62	1.18	2.3
serine/threonine kinase 2	7.62	6.45	1.17	2.3
NRAS-related gene	11.86	10.69	1.17	2.2
proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)	9.12	7.96	1.16	2.2
Hs.74561 alpha-2-macroglobulin	8.60	7.45	1.15	2.2
electron-transfer flavoprotein, alpha polypeptide (glutaric aciduria II)	10.39	9.24	1.15	2.2
secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	12.41	11.27	1.14	2.2
Hs.209100 DKFZP434C171 protein	11.69	10.55	1.14	2.2
RAB6 interacting, kinesin-like (rakinesin6)	8.14	7.02	1.12	2.2
plasminogen activator, urokinase	6.82	5.71	1.11	2.2
farnesyl diphosphate synthase (farnesyl pyrophosphate synthetase, dimethylallyltransferase)	10.13	9.03	1.10	2.1
huntingtin (Huntington disease)	5.77	4.71	1.06	2.1
prolactin regulatory element binding	7.97	6.93	1.04	2.1
v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog	6.78	5.74	1.03	2.0
pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	7.36	6.34	1.02	2.0
RBPI-like protein	11.83	10.81	1.02	2.0
site-1 protease (subtilisin-like, sterol-regulated, cleaves sterol regulatory element binding protein)	10.27	9.26	1.01	2.0
nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatin)	13.54	12.54	1.01	2.0
c-src tyrosine kinase	8.90	7.89	1.00	2.0
vimentin	13.92	12.92	1.00	2.0
Hs.274275 hypothetical protein FLJ10254	13.65	12.65	1.00	2.0
cyclin-dependent kinase 4	11.12	10.13	1.00	2.0

Table 3. Thirty two genes and ESTs (out of total 384) whose expression was commonly changed after exposure of arsenic compounds (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, 1 μM) for 48 hrs in SiHa cell

Gene/Protein	cDNA array results <math>2^{2\log(3F/5F)}</math>	
	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	As <sub>4</sub> O <sub>6</sub>
<b>Up-regulated gene</b>		
UDP-glucose dehydrogenase	2.40	3.80
tumor differentially expressed 1	3.50	3.30
Hs.85963 "CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)-like 2"	3.50	3.50
Hs.171695 dual specificity phosphatase 1	2.30	8.20
her2	3.00	2.50
cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	2.10	2.60
<b>Down-regulated gene</b>		
ADP-ribosyltransferase (NAD+; poly (ADP-ribose) polymerase)	2.6	5.5
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2	2.1	2.9
CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	2.7	2.9
CDC20 (cell division cycle 20, S. cerevisiae, homolog)	3.2	31.1
CHK1 (checkpoint, S.pombe) homolog	4.5	3.0
chorionic gonadotropin, beta polypeptide	2.3	2.3
collagen, type I, alpha 2	2.8	3.4
collagen, type IV, alpha 2	4.3	2.3
creatine kinase, brain	2.5	2.4
cyclin B1	5.0	12.1
Hs.74561 alpha-2-macroglobulin	2.0	2.2
IDN3 protein	2.1	2.6
melanoma adhesion molecule	2.8	3.1
methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent)	2.3	4.7
minichromosome maintenance deficient (mis5, S. pombe) 6	2.3	3.2
mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1	2.5	4.4
mutated in colorctal cancers	3.6	6.4
mutS (E. coli) homolog 2 (colon cancer, nonpolyposis type 1)	2.5	2.8
nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	2.1	2.0
primase, polypeptide 1 (49 kD)	2.8	12.0
proliferating cell nuclear antigen	2.9	4.0
protein phosphatase 1 G (formerly 2 C), magnesium-dependent, gamma isoform	2.2	2.7
RAB6 interacting, kinesin-like (rebkinesin 6)	2.6	2.2
serine/threonine kinase 2	2.2	2.3
splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor)	2.9	2.8
thymidylate synthetase	5.6	11.5

### 고 찰

비소 (arsenics)는 무색, 무미, 무취의 치명적인 독극물로써 자연계에서는 As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>와 As<sub>2</sub>S<sub>5</sub>, KAsO<sub>2</sub>로 산재하며 특히 삼산화비소 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 유화비소 (As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>)는 오래 전부터 중국에서 백혈병치료를 위해 사용되어 왔다.<sup>9</sup> 1820년대 비소화합물이 피부암을 일으킨다는 사실을 처음 알게 된 이후로 비소화합물은 환경발암물질로 받아들여

기 시작하여 인간의 피부와 폐에 있어서 co-mutagen, co-carcinogen으로서 여겨져 왔다.<sup>10-12</sup> 최근 삼산화비소 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)로 백혈병환자를 치료할 수 있다는 내용이 알려진 이래, 비소화합물에 대한 관심이 높아지고 있으며 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>13</sup> As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 등 arsenic disulfide를 포함하는 비소화합물은 급성 전골수성 백혈병 (Acute promyelocytic leukemia, APL) 환자의 치료에 효과적으로 보고되어지고 있다.<sup>14</sup> As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>을 치료

제로 사용했을 경우, 많은 환자에서 골수억제소견을 관찰되지 않았으며, 급성 전골수성 백혈병환자 15명의 연구에서 Arsenic으로 치료받은 어떤 사람도 주목할 만한 혈소판감소나 빈혈소견은 나타나지 않았다. 또한 급성 전골수성 백혈병에서  $As_2O_3$ 의 임상적인 유용성은 일반적인 항암 요법에 저항성이 있는 환자에서도 확인되었다. 급성 전골수성 백혈병세포에서  $As_2O_3$ 의 분자생물학 기전에 대한 생체 외 실험에서 항암효과는 bcl-2 발현의 down-regulation과 PML/RAR  $\alpha$ /PML protein의 조절을 통한 세포사의 직접유도 때문으로 보인다.<sup>10,15</sup> 또한  $As_2O_3$ 에 의한 caspase 활성화는 급성 전골수성 백혈병세포에서  $As_2O_3$ -induced apoptosis에 관여한다.  $As_2O_3$ 와 organic arsenical인 melarsoprol이 HL-60, U937, KG-1과 같은 myeloid leukemia 세포주에서 Bcl-2 protein 발현을 저해 (down regulation)함으로써 세포사가 유도되며,<sup>3,15</sup> 또한 B-cell leukemia cell line에서 caspase활성을 통해서 세포사를 유발한다고 보고하였다. 이러한 보고를 기초로 식도암, 신경세포아종, 두경부종양, 자궁경부암과 같은 다른 종양세포에서 비소 화합물에 의한 세포사가 보고되었다.<sup>6</sup> 방광암, 백혈병, 위장관계 종양 (인체위암 세포주, human gastric cancer cell line, MGC 803), 식도암, 신경세포아종, 두경부종양 뿐만 아니라 자궁경부암 세포주에서도 세포사를 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>14,16</sup> 본 실험에서는  $As_4O_6$ 는 분자 구조는 밝혀져 있으며,  $As_2O_3$ 에 비해 독성이 적고, 항암효과도 뛰어난 물질로 추측되고 있을 뿐 아직 이 물질에 대한 연구가 활발하지는 않다. 따라서 본 실험에서는  $As_4O_6$ 가 자궁경부암 세포주인 SiHa 세포의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 다른 연구에서와 마찬가지로 낮은 농도의 비소화합물을 처리했을 때도 세포성장이 억제됨을 알 수 있었으며, 2  $\mu$ M 을 기준으로 세포성장이 현저하게 저해되는 현상은 다른 연구자들의 결과와 비슷하였다. 그러나  $As_4O_6$ 의 경우 0.5  $\mu$ g 농도부터 세포 증식 억제 효과가 뚜렷하게 드러나  $As_2O_3$ 와 비교하여 강한 종양세포 성장 억제 작용을 보였다.

또한 cDNA microarray, cDNA chip technology와 유전자발현을 모니터링하는 high-throughput method가 최근 발달하면서 수 천개의 유전자 발현을 동시에 분석하는 것이 가능하게 되었다. 이와 같은 결과로 암 조직에서 다양한 유전자 발현이 변화되는 것을 기초로 하여, 암 분류의 새로운 지표를 세울 수 있게 되었다. 이에 부가적으로, 유전자 발현 양상 (gene expression profile)이 암세포의 약물 민감도 (drug sensitivity)를 반영한다는 증거가 제시되었다.<sup>17</sup> 본 연구에서 DNA 칩의 이용은 임상적으로 환자를 치료하면서 직면하는 개개인의 암 환자에서 항암제의 반응을 예측할 수 없다는 매우 심각한 딜레마 중의 하나를 해결하는데 있어 매우 중요한 실마리가 되

었다.<sup>18</sup>

DNA 칩 기술을 바탕으로 방사선민감도에 관련된 분자유전연구가 가능하게 되었고, 치료과정에서 세포 저항성과 관련되는 유전자와 유전자 조절 과정 (gene regulatory pathway)을 규명할 수 있게 되었다. 이러한 technology를 이용하는 목적중의 하나는 방사선 조사에 민감한 암들을 규명하여 방사선 치료만으로 암을 치료하는 것이다. 또 다른 목적은 복합치료 (항암, 방사선)에 의해 조절되지 않는 암들을 규명하여 치료단계의 발전을 유도하는 것이다.

DNA 칩을 통한 자궁경부 편평상피암세포와 관련된 연구로는, 다음의 특정유전자의 발현이 방사선 민감 세포 (radiosensitive cell)와 비교하여 방사선 저항 세포 (radioresistant cells)에서 최고 4.1배까지 높게 발현된다고 보고되었다. 방사선 저항세포주에서 과다 발현되는 유전자는 metal-regulatory transcription factor-1, cytochrome P450 CYP1B1, adenomatosis polyposis coli, translation elongation factor-1, cytochrome-c oxidase 등이 있고 방사선 민감세포주에서 과다 발현되는 유전자는 transcription factor NF-kappa-B, metalloprotease inhibitor-1 precursor, superoxide dismutase-2, insulin-like growth factor binding protein-3, guanine nucleotide-binding protein and transforming growth factor beta induced protein이 보고 되었다.<sup>19</sup>

본 실험에서는  $As_2O_3$ 와  $As_4O_6$ 을 SiHa 세포주에 투여하여 비교하였을 때 동시에 발현이 증가한 유전자는 UDP-glucose dehydrogenase, CD36 antigen (collagen type I receptor), thrombospondin receptor, dual specificity phosphatase 1, cathepsin D (lysosomal aspartyl protease) 등이 있는데 신호전달계 (signal transduction)에 관여하는 dual specificity phosphatase 1 유전자의 경우는  $As_2O_3$ 를 처리했을 경우에는 2.3,  $As_4O_6$ 의 경우는 8.2배 증가하였다. 또한 동시에 발현이 저하된 유전자는 CDC20 (cell division cycle 20, S. cerevisiae, homolog), cyclin B1, Primase, polypeptide 1 (49 Kd), thymidylate synthetase, proliferating cell nuclear antigen 등 26개의 유전자가 있으며, 세포주기 (cell cycle)에 관여하는 CDC20, cyclin B1, thymidylate synthetase, proliferating cell nuclear antigen의 유전자는  $As_2O_3$ 를 처리한 경우 각각 3.2, 5.0, 5.6, 2.9배,  $As_4O_6$ 의 경우는 31.3, 12.1, 11.5, 4.0배 감소하였다.

이와 같이 같은 유전자라 할지라도 서로 다른 비소 화합물을 처리함에 따라 발현된 정도는 다르게 나타났으며, 이외의 상당수의 유전자가 각각의 비소화합물에 서로 다르게 발현되는 것으로 나타났다. 이러한 발현 정도의 차이에 대한 의미에 대해서는 차후 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

이와 같은 연구를 통해서 자궁경부암 세포주에서 비소화합물을 투여한 후에 세포성장억제 여부 및 이에 대

한 기전을 확인하였고, 이러한 세포사는 카스파아제 활성 (caspase activity)과 관련이 있으며, DNA 칩을 이용하여 증가 혹은 감소되는 유전자 발현을 살펴보았다. 실제로 자궁경부암과 관련된 특정유전자 약 500-1,000개를 지정하여 이들의 변화를 살펴보면 항암제나 방사선 치료 전 환자의 예후 및 항암제 등 치료 방침 선정에 많은 도움을 줄 것으로 사료된다.

이와 같이 외부에서 도입된 약제나 유전자에 의한 연쇄적인 반응으로 인해 수많은 유전자의 변화가 동시다발적을 일어나는 것으로 사료되며, 이에 대해서는 계속적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

- 참고문헌 -

1. Chikashi Kihara, Tatsuhiko Tsunoda, Toshihiro Tanaka, Hideaki Yamana, Yoichi Furukawa, Kenji Ono, et al. Prediction of sensitivity esophageal tumors to adjuvant chemotherapy by cDNA microarray analysis of gene-expression profiles. *Cancer research* 2001; 61: 6474-9.
2. Zheng J, Deng YP, Lin C, Fu M, Xiao PG, Wu M. Arsenic trioxide induces apoptosis of HPV16 DNA-immortalized human cervical epithelial cells and selectively inhibits viral gene expression. *Int J Cancer* 1999; 82: 286-92.
3. Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, Bagchi S. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* 2001; 20: 4740-9.
4. Xiao-Hua Jiang, Benjamin Chun-Yu Wong, Siu-Tsan Yuen, Sh-Hu Jiang, Chi-Hin Cho, Kam-Chuen Lai, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in Human gastric cancer cells through up-regulation of P53 and activation of capsase-3. *Int Cancer* 2001; 91: 173-9.
5. Zhu XH, Shen YL, Jing YK, Cai X, Jia PM, Huang Y. et al. Apoptosis and growth inhibition in malignant lymphocytes after treatment with arsenic trioxide at clinically achievable concentrations. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 772-8.
6. Gurr JR, Bau DT, Liu F, Lynn S, Jan KT. Dithiothreitol enhances arsenic trioxide-induced apoptosis in NB4 cells. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 102-9.
7. Mattias Nees, Joel M. Geograpagan, Tehila Hyman, Stephan Frank, Lance Miller, Craig D. Wood Worth. Papillomavirus Type 16 Oncogenes downregulate expression of Interferon-responsive gene and upregulate proliferation associated and NF-kB-responsive genes in cervical keratinocytes. *Journal of virology* 2001; 4283-96.
8. Buzard GS, Kasprzak KS. Possible roles of nitric oxide and redox cell signaling in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19: 179-99.
9. Murgo AJ, McBee WL, Cheson BD. Clinical trials referral resource. *Clinical trials with arsenic trioxide. Oncology(Huntingt)* 2000; 14: 206, 211, 215-6.
10. Boonchai W, Walsh M, Cummings M, Chenevix-Trench G. Expression of p53 in arsenic-related and sporadic basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2000; 136: 195-8.
11. Buzard GS, Kasprzak KS. Possible roles of nitric oxide and redox cell signaling in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19: 179-99.
12. Ding M, Shi X, Castranova V, Vallyathan V. Predisposing factors in occupational lung cancer: inorganic minerals and chromium. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19: 129-38.
13. Simeonova PP, Wang S, Toriuna W, Komminen V, Matheson J, Unimye N, et al. Arsenic mediates cell proliferation and gene expression in the bladder epithelium: association with activating protein-1 transactivation. *Cancer Res* 2000; 60: 3445-531.
14. Lu T, Liu J, LeCluyse EL, Zhou YS, Cheng ML, Waalkes MP. Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol Sci* 2001; 59: 185-92.
15. Perkins C, Kim CN, Fang G, Bhalla KN. Arsenic induces apoptosis of multi drug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L). *Blood* 2000; 95: 1014-22.
16. Jiang XH, Chun-Yu Wong B, Yuen ST, Jiang SH, Cho CH, Lai KC, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in human gastric cancer cells through up-regulation of p53 and activation of caspase-3. *Int J Cancer* 2001; 91: 173-9.
17. Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY. et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood* 1996; 88: 1052-61.
18. Lu M, Levin J, Sulpice E, Sequeira-La Grand A, Alemany M, Caen JP, et al. Effect of arsenic trioxide on viability, proliferation, and apoptosis in human megakaryocytic leukemia cell lines. *Exp Hematol* 1999; 27: 845-52.
19. Shen L, Chen TX, Wang YP, Lin Z, Zhao HJ, Zu YZ, et al. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induces apoptosis of the human B lymphoma cell line MBC-1. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000; 14: 116-9.

=국문초록=

**목적 :** SiHa 세포주에서 비소 화합물에 의한 세포성장 억제 효과와 유전자 발현 변화를 cDNA microarray 기술을 이용하여 확인하고자 한다.

**연구 방법 :** 자궁경부암 세포주인 SiHa의 성장억제에 관한 연구를 위하여 96 well plate에  $10^3$ 의 SiHa cell 을 분주한 후, 비소화합물을 처리하여 세포 성장억제를 MTT assay 방법을 이용하여 확인하였다. 한편 384개의 유전자로 제작된 DNA chip을 이용하여 자궁경부암 SiHa 세포주에 비소화합물 1  $\mu$ M을 처리하고 48시간 후의 total RNA를 추출하여 gene expression profile을 관찰하였다.

**결과 :** 자궁경부암 세포주인 SiHa cell의 성장억제에 관한 연구에서 비소화합물을 각각 0.5, 1, 2, 3, 4, 5  $\mu$ M로 처리하여 4일간 관찰한 결과 4일째에  $As_2O_3$ 의 경우 각각 9.2, 56, 89, 93, 96, 96%,  $As_4O_6$ 의 경우 54, 84, 84, 85, 87%의 세포증식억제가 관찰되었다. DNA 칩의 유전자 발현에 있어서  $As_2O_3$ 의 경우, 2배 이상 변화한 유전자는 *thymidylate synthetase*, *cyclin B1*, *CDC 20* 등 약 47여개 정도였으며,  $As_4O_6$ 의 경우, 대조군과 비교하여 2 배 이상 변화한 유전자는 *CDC 20*, *cyclin B1*, *primase*, *proliferating cell nuclear antigen* 등 약 78여 개의 유전자가 변화한 것으로 나타났다.

**결론 :** SiHa cell에서 비소화합물에 의한 세포성장억제를 확인할 수 있었으며 유전자 발현의 변화에 있어서는  $As_2O_3$ 보다는 (47 genes)  $As_4O_6$ 가 더 많은 변동을 일으켰으며 (78 genes) 이중 공통적으로 증가한 유전자는 6개이고 공통적으로 감소한 유전자는 26개로서 이에 대한 기능적인 면은 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

**중심단어 :** 비소화합물 ( $As_2O_3$ ,  $As_4O_6$ ), 자궁경부암 세포주 (SiHa), cDNA 칩