[UCI]I804:24011-200000231581

5'-nitro-indirubinoxime을 처리한 구강 편평세포암종 KB 세포에서 유전자 발현의 변화

Gene expression profiling in the KB oral squamous cell carcinoma cells treated with 5'-nitro-indirubinoxime

2006년 2월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 식

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY
100355576 2006-09-13

5'-nitro-indirubinoxime을 처리한 구강 편평세포암종 KB 세포에서 유전자 발현의 변화

지도교수 김 수 관

이 논문을 치의학 박사학위 논문으로 제출함

2005년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 식

김 식의 박사학위 논문을 인준함

위원장 전남대학교 교수 유 선 열

위 원 조선대학교 교수 강 동 완

위 원 전 조선대학교 교수 여 환 호

위 원 조선대학교 교수 윤 정 훈

위 원 조선대학교 교수 김 수 관

2005년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT ····· iv

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 3
1. 세포배양과 약제처리 ····· 3
2. Total RNA의 분리 ····· 3
3. RT-PCR 분석 ····· 3
4. Microarray 분석 ····· 4
5. 자료 분석 ····· 4

Ⅲ. 결과 ····· 6
1. Microarray 분석 결과 ····· 6
2. RT-PCR 분석 결과 ····· 7

Ⅳ. 고찰 ····· 8

Ⅴ. 결론 ····· 10

참고문헌 ····· 19

표 목 차

Table. 1. Primers used for semiquantitative RT-PCR ····· 13

Table. 2. Genes up-regulated in the 5′-nitro-indirubinoxime treated KB cells ····· 14

Table. 3. Genes down-regulated in the 5′-nitro-indirubinoxime treated KB cells ····· 15

Table. 4. Grouping of the differentially express genes into biological functions ····· 18

도 목 차

Fig. 1. Chemical structure of indirubin and its derivative, 5′-nitro-indirubinoxime ····· 11

Fig. 2. Semiquantitative RT-PCR gene expression analysis in 5′-nitro-indirubinoxime treated KB cell ····· 12

ABSTRACT

Gene expression profiling in the KB oral squamous cell carcinoma cells treated with 5′-nitro-indirubinoxime

Kim, Sik
Advisor : Prof. Su-gwan Kim, DDS, PhD
Department of Dentistry,
Graduate School of Chosun University

A novel indirubin analog, 5′-nitro-indirubinoxime inhibits cell proliferation and induces apoptosis against various human cancer cells. In this study, the author performed the microarray analysis to identify genes differentially expressed in the KB oral squamous carcinoma cells after treated with 5′-nitro-indirubinoxime. Among the 10,800 genes analyzed, 1,701 genes (15.8%) showed statistically different expression level in the 5′-nitro-indirubinoxime treated cells with respect to untreated control cells. Among those, 263 genes (15.5%) were down-regulated and 220 genes (12.9%) were up-regulated more than 2-fold. Functionally related gene clusters include genes associated with signal transduction (18.1%), especially genes related with apoptosis (3.5%) and cell cycle regulation

(5.8%). Our application of microarray analysis on 5′-nitro-indirubinoxime treated oral cancer cells allows the identification of candidate genes for providing novel insights into the indirubin mediated antitumor activity.

Ⅰ. 서 론

Indirubin은 만성 골수구성 백혈병 (chronic myelocytic leukemia)의 치료에 사용되는 Danggui Longhui Wan 이라는 약초의 구성 성분이다 (1). Indirubin은 다양한 형태의 악성종양 치료에 적용했을 때 심각한 골수 억제 없이 항암작용을 나타낸다 (2,3). 최근 연구결과에 의하면 indirubin이 다양한 종류의 악성종양 치료에 적용이 가능하다는 사실을 보고하고 있다 (4-7).

Indirubin과 그 유도체들은 cyclin-dependent kinases (CDKs)의 활성을 저해하는 강력한 억제제이다. CDKs는 cyclin과 함께 세포주기 진행에 중요한 역할을 수행한다. 특히, 세포주기를 표적으로 하는 항암 물질들은 주로 CDKs의 활성을 억제함으로써 그 기능을 수행한다. 지금까지 많은 CDK의 억제제들이 보고되었는데 이 약물들은 주로 세포주기를 정지시키고 apoptosis를 유도함으로써 암세포의 성장을 억제한다. Indirubin은 CDK의 ATP-binding 부위에 ATP와 경쟁적으로 결합함으로써 세포증식을 억제한다 (4,5,8). Indirubin의 상세한 작용 기전이 아직 밝혀져 있지는 않지만 이상과 같은 연구결과들로 부터 indirubin의 암세포 증식 억제 효과는 세포주기 과정을 저해함으로써 일어난다고 생각되고 있다. Indirubin 유도체가 세포주기를 G2/M기에서 정지시킴으로써 폐암세포의 증식을 억제한다는 보고가 있었다(5). 다른 종류의 indirubin 유도체들은 유방암과 전립선 암세포에서 종양세포의 생존과 증식에 중요한 역할을 한다고 알려진 stat3를 억제한다 (6). 또한 indirubin-3′-monoxime은 $p27^{Kip1}$을 활성화시키고 c-Jun NH_2-terminal kinase (JNK)의 활성을 억제하여 apoptosis에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다 (10-12).

두경부 편평세포암종 (Head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)은 선진국에서 여섯 번째로 흔한 암으로 미국에서는 매년 44,000건의 새로운

환자가 발생하고 약 11,000명이 사망한다고 보고되어 있다 (13-15). 두경부 편평세포암종이 항암화학 요법과 방사선 치료에 좋은 반응을 보이기는 하지만 조절이 쉽지 않으며 예후도 좋지 않다. 따라서 두경부 편평세포암종을 표적으로 삼는 새로운 항암기능 물질의 개발이 매우 필요한 실정이다.

본 실험실에서 강력하고 안정적인 항암 효과 물질을 찾기 위하여 새로운 indirubin 유도체인 5'-nitro-indirubinoxime을 합성하여 그 효능을 다양한 암세포에서 확인하였다 (5). 따라서 이 연구에서는 5'-nitro-indirubinoxime을 구강 편평세포암종 KB 세포에 처리한 후 microarrays 분석을 통해 유전자 발현의 변화를 분석함으로써 구강암 세포의 성장억제와 관련된 유전자와 구강암 치료를 위한 새로운 표적을 찾고자 하였다. 유전자 발현에 차이를 보인 대표적인 유전자들은 RT-PCR 방법을 통해 확인하였다. 이 연구의 결과는 새로운 indirubin 유도체인 5'-nitro-indirubinoxime의 작용 기전을 이해할 뿐 아니라 구강암의 진단과 치료, 탐지를 위한 새로운 표적을 찾기 위한 중요한 자료를 제공할 수 있을 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양과 약제처치

사람 구강 편평세포암종인 KB 세포는 ATCC (Manassa, VA)로부터 구입하였고 5% bovine calf serum과 100 ㎍/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin, 1×MEM Non-Essential Amino Acid Solution이 포함된 Minimum Essential Medium(MEM)에서 37℃, 5% CO_2의 조건하에 계대 배양하였다. RNA 분리를 위해서는 세포를 10 μM 의 5'-nitro-indirubinoxime으로 24시간 동안 처리하였다.

2. Total RNA의 분리

Microarray 분석을 위하여 total RNA를 TRIzol® 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 분리하였다. RNA의 상태는 denaturing agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색함으로서 확인하였다.

3. Microarray 분석

구강 편평세포암종인 KB 세포에 indirubin 유도체인 5'-nitro-indirubinoxime을 처리한 후 microarray 분석을 수행하였다. mRNA의 증폭과 labeling, array hybridization, chemiluminescence detection, image 획득과 분석은 Applied Biosystems Chemiluminescent RT-IVT Labeling Kit, Applied Biosystems Chemiluminescence Detection Kit와 Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 수행하였다.

이를 간단히 요약하면, RT-IVT Labeling Kit를 이용하여 total RNA 1 ㎍으로부터 digoxigenin-11-UTP로 labeling한 cRNA를 만들었다. 각 microarray

는 blocking reagent가 포함된 hybridization buffer로 55℃에서 1시간동안 pre-hybridization 시켰다. Labeling된 cRNA 16 ㎍을 pre-hybridization 된 microarray와 55℃ 에서 16시간동안 hybridization 시켰다. Hybridization 후 array는 hybridization wash buffer와 chemiluminescence rinse buffer로 세척하고 anti-dioxygenin-alkaline phosphatase와 chemiluminescence 기질이 첨가된 chemiluminescenece enhancing solution에 microarray를 incubation함으로써 chemiliminescent signal을 발생시켰다. 각 signal의 강도는 Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer를 사용하여 인식하였다.

4. RT-PCR 분석

유전자 발현의 변화를 확인하기 위하여 semi-quantitative RT-PCR 방법을 수행하였다. Total RNA는 TRIzol® 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 분리하였고 RT-PCR은 SuperScript™ One-Step RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용해 수행하였다. RT-PCR에 사용한 특정 primer set은 Table 1에 나타나 있으며 RT-PCR은 다음의 조건하에서 시행하였다. 역전사 반응을 위해서는 50℃에서 30분, 변성 반응으로 94℃에서 2분을 수행하고 PCR을 위해서는 변성반응을 94℃에서 30초, 결합 반응을 60℃에서 30초, 중합반응을 72℃에서 30초간 30 주기를 반복한 후 마지막중합반응으로 72℃에서 10분간 연장하여 반응시켰다. Caspase 7과 GAPDH는 25주기를 반복하였다. RT-PCR 반응 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

5. 자료 분석

Raw data를 분석하기 위해서 Applied Biosystems Expression System

software를 사용하였다. Signal value는 Microsoft Excel (Microsoft)로 보내고 Avadis software (http:/avadis.strandgenomics.com)로 분석하였다. Hypothesis value는 각 유전자마다 array에서 계산된 Fold Change의 최대값 (또는 최소값)으로 정의하였고 minimum p-Value (0.06)를 가진 유전자를 통계적으로 유의하게 다른 발현 정도를 보인 유전자로 정의하였다.

Ⅲ. 결 과

1. Microarray 분석 결과

Indirubin 유도체인 5'-nitro-indirubinoxime으로 처리한 구강 편평세포암종인 KB 세포에서 종양 발생의 억제와 연관된 유전자의 발현을 조사하기 위하여 cDNA microarray 분석을 수행하였다. 분석된 10,800개의 유전자 중에서 1,701개의 유전자(15.8%)가 5'-nitro-indirubinoxime으로 처리한 KB 세포에서 처리하지 않은 대조군에 비해 통계적으로 유의한 발현 변화를 보였다. 1,701개의 유전자 중에서 813개의 유전자(47.8%)는 대조군에 비해 발현이 증가하였고 888개의 유전자 (52.2%)는 발현이 감소하였다. 그 중 10배 이상 발현 차이를 보이는 유전자들을 Table 2 와 3에 나타내었다.

세포 내에서의 기능에 따라 발현에 차이를 보이는 유전자들을 구분해 보면 단백질 대사 (18.12%), 핵산 대사 (17.38%), 세포 발달 (15.49%), 면역반응 (5.95%)과 세포주기 조절 (5.77%)에 관여하는 유전자들이 다수를 차지했다 (Table 4). 813개의 발현이 증가된 유전자 중에서 283개의 유전자 (16.18%)는 단백질 대사와 핵산 대사에 관여하는 단백질을 만들어내는 유전자 들이다. 또한, 141개의 유전자 (8.06%)는 세포 신호 전달과정에 관여하는 단백질, 99개의 유전자 (5.66%)는 세포 발달, 46개의 유전자 (2.63%)는 세포주기 조절, 45개의 유전자 (2.57%)는 면역반응에 관여하는 단백질을 만들어내는 유전자이다. 888개의 발현이 감소된 유전자들 중에서 341개의 유전자 (19.49%)는 단백질 대사와 핵산 대사에 관여하고 176개의 유전자 (10.6%)는 세포 신호 전달, 172개의 유전자 (9.83%) 는 세포 발달, 59개의 유전자 (3.37%)는 면역반응, 55개의 유전자 (3.11%)는 세포주기를 조절하는 단백질을 만들어내는 유전자들이었다.

이들 발현이 변화된 유전자들 중에서 특히 caspase 7, fibroblast growth

factor receptor 2 (FGFR2), fibtoblast growth factor 20 (FGF20)과 Laminin α4는 apoptosis나 혈관 형성 과정에 관여한다고 알려져 있는데 FGFR2, Laminin α4, FGF20의 발현이 각각 -1802.8배, -40.1배, -4.1배 감소하였으며 caspase 7의 발현은 5.9배 증가하였다.

2. RT-PCR 분석

RT-PCR 방법으로 유전자의 발현을 조사한 결과 microarray 분석 결과와 일치하게 5'-nitro-indirubinoxime을 처리한 KB 세포에서는 처리하지 않은 대조군에 비해 caspase 7의 발현이 크게 증가되었으며 FGFR2, Lamin α4와 FGF20의 발현은 감소되어 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

Ⅳ. 고 찰

이 연구에서는 사람 구강 편평세포암종 KB 세포에 indirubin 유도체인 5'-nitro-indirubinoxime을 처리한 후 발현이 변화되는 유전자를 조사하였다. 이는 indirubin 유도체에 의해 유도되는 구강암 세포의 성장 억제에서 조사된 첫 번째 microarray 분석 연구이다. 5'-nitro-indirubinoxime에 의해 발현이 변화된 유전자를 세포내에서의 기능에 따라 분류해 보면 세포 신호 전달, 세포 주기 조절, apoptosis에 관여하는 유전자가 각각 18.1%, 5.8%, 3.5%를 차지했다. 이 중 caspase 7, fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), fibroblast growth factor 20 (FGF20) 과 Laminin α4는 apoptosis와 혈관형성 과정에 관여하기 때문에 특히 흥미로웠다.

Caspase 7은 apoptosis 후기에 중요한 역할을 수행하는 effecter caspase이다(16-18). 세포에 apoptosis를 유발시키는 자극이 주어지면 caspase 7이 활성화되어 핵내에 축적되고 poly(ADP-ribose)-polymerase를 분해시킨다. Apoptosis는 다양한 생물계에서 세포의 항상성을 유지하는데 매우 중요한 역할을 수행하는 과정이다. Apoptotic pathway의 변화는 악성종양, 자가면역질환, 퇴행성 신경질환을 포함하는 많은 질병과 관련이 있다 (19,20). 이전의 연구에 따르면 caspase 7은 *in vivo* 상에서 granzyme B에 의해 유도되는 apoptosis 와 cytotoxic T-lymphocyte에 의해 유도되는 세포의 사망에 중요한 역할을 수행한다 (21). 5'-nitro-indirubinoxime에 의해 발현이 크게 증가한 이 연구에서의 결과를 고려하면, caspase 7이 indirubin 유도체에 의해 유도되는 apoptosis에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각된다.

Laminin α4는 기저막의 중요한 구성 성분이다. Laminin α4는 내피 세포의 증식 유지에 중요한 역할을 수행하며 혈관의 발달에도 관여한다 (22,23). Laminin α4의 antagonist는 내피세포에서 미토콘드리아에 의존적인 apoptosis

pathway를 유도한다 (23). 최근의 연구에 따르면 platelet-derived growth factor (PDGF), FGFs, angiopoietin과 같은 많은 성장 인자들, 그리고 이들의 receptor들이 복잡한 혈관 형성 과정에 관여한다고 보고되었다. FGF/FGFR signaling pathway는 형태발생, 분화, 혈관형성, 조직 remodeling, 염증반응, 종양형성 등에 중요한 역할을 수행한다 (24). FGFs는 악성종양뿐만 아니라 정상적인 세포 발달이나 생리 과정에도 관여한다 (25). Laminin α4와 FGF/FGFR signaling pathway의 기능적 결함이나 발현 부족은 apoptosis를 유도하거나 혈관형성을 억제함으로써 종양의 성장을 저해하는 것으로 보인다. 이 연구에서 언급한 유전자들은 구강암의 치료에 적용할 수 있는 유용한 후보 유전자가 될 수 있을 뿐 아니라 indirubin 유도체에 의한 세포 사망의 분자 기전을 이해할 수 있는 실마리를 제공해 줄 수 있을 것이다.

IV. 결 론

새로 합성된 indirubin 유도체인 5'-nirto-indirubinoxime은 세포의 증식을 억제하고 다양한 암세포에서 apoptosis를 유도한다. 이 연구는 5'-nirto-indirubinoxime으로 처리한 구강 편평세포암종 KB 세포에서 발현이 유도되거나 억제되는 유전자들을 조사하기 위하여 microarray 분석을 시행하였다. 분석된 10,800개의 유전자 중에서 1,701개의 유전자 (15.8%)가 5'-nirto-indirubinoxime으로 처리한 세포에서 처리하지 않은 대조군에 비해 통계적으로 유의한 발현 변화를 보였다. 그 중에서 263개의 유전자 (15.5%)는 대조군에 비하여 2배 이상 발현이 감소되었으며 220개의 유전자 (12.9%)는 2배 이상 발현이 증가하였다. 발현이 변화된 유전자들을 그 기능에 따라 분류해 보면 신호 전달 (signal transduction)과 연관된 유전자가 18.1%, apoptosis와 연관된 유전자가 3.5%, 세포 주기 조절에 연관된 유전자가 5.8%를 차지했다. RT-PCR 방법으로 유전자의 발현을 조사한 결과 microarray 분석 결과와 일치하게 5'-nitro-indirubinoxime을 처리한 KB 세포에서는 처리하지 않은 대조군에 비해 caspase 7의 발현이 크게 증가되었으며 FGFR2, Lamin α4와 FGF20의 발현은 감소되어 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 5'-nirto-indirubinoxime이 처리된 구강암 세포에서 microarray 분석은 indirubin 유도체에 의한 항암작용 기전에 대한 이해 뿐 아니라 암치료에 적용할 수 있는 새로운 후보 유전자에 대한 정보를 제공해 줄 수 있다.

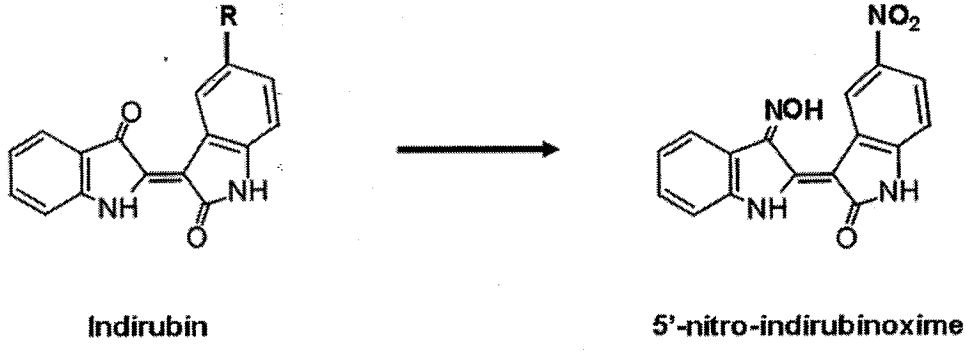

Fig. 1. Chemical structures of indirubin and its derivative, 5′-nitro-indirubinoxime. The R- group on the indirubin structureis changed by Nitro-.

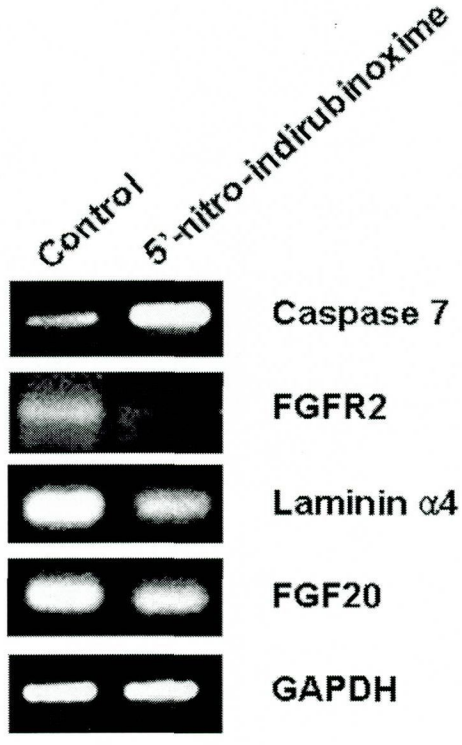

Fig. 2. Semiquantitative RT-PCR gene expression analysis in 5′-nitro-indirubinoxime treated KB cells. Cells were treated with 5′-nitro-indirubinoxime (10 μM) for 24 h. Total RNA was isolated and semiquantitative RT-PCR was performed using specific primers listed on Table 1. GAPDH was used as an internal control. PCR products were visualized by ethidium bromide staining.

Table 1. Primers used for semiquantitative RT-PCR

Gene	Primers	Sequence(5′-3′)	Size(bp)
Caspase7	Forward	CAGGGCTGTATTGAAGAGCAGGGGGTTG	170
	Reverse	GTTGTACTGATATGTAGGCACTCGGTCCCGG	
FGFR2	Forward	GGGACTGGTCAGTATTAGAGGTGTGGACAG	269
	Reverse	TCTTGGACCTGGCGCCATCTCTTGGAG	
FGF20	Forward	CCACATGGAGATATGGAAGAGGACCGGG	232
	Reverse	CATCCTTAGTCCAACTGATCACGGCGGC	
Laminin 4	Forward	ATGGCTTTGAGCTCAGCCTGGCGCTC	294
	Reverse	CACAGTATCCTGAGCCGTCCAAACACTCG	
GAPDH	Forward	CCAAGGTCATCCATGACAACTTTG	464
	Reverse	GTCATACCAGGAAATGAGCTTGACA	

Table 2. Genes up-regulated in the 5′-nitro-indirubinoxime treated KB cells. (fold change > 10)

GeneSymbol	Genebank	Gene/Protein Name	Fold Change
	S76389	pml-rarafusion{junction sequence der15}	83.29
samsn1	NM_022136	samdomain,sh3 domain and nuclear	59.84
h1f5	NM_005322	h1histonefamily, member 5	35.98
gnly	NM_006433	granulysin,isoformnkg5	34.01
hcf-2	NM_013320	hostcellfactor 2	33.45
mknk1	NM_003684	mapkinase-interactingserine/threonine kinase 1	25.39
	NM_022144	myodulinprotein	24.93
fsbp	NM_006550	fibrinogensilencerbinding protein	23.34
hba2	NM_000517	alpha2globin	21.10
sat	NM_002970	spermidinesperminen1-acetyltransferase	20.53
il11ra	NM_004512	interleukin11receptor, alpha	20.46
	L03426	xe7completealternate coding regions	20.13
magea12	NM_005367	melanomaantigenfamily a 12	20.00
	NM_015990	lymphocyteactivation-associatedprotein	19.62
mmp2	NM_004530	matrixmetalloproteinase2 preproprotein	18.64
gria3	NM_000828	glutamatereceptorprecursor isoform flop	18.53
gja10	NM_030772	connexin59	17.58
	BC018738	unknown(proteinfor mgc:31869)	16.81
mylk2	NM_033118	skeletalmyosinlight chain kinase	16.46
cacng8	XM_050231	calciumchannelvoltage-dependent gamma	15.74
eif5a2	NM_020390	eif-5a2protein	15.54
	XM_071866	similartoparaneoplastic cerebellar degeneration	15.51
tollip	NM_019009	tollipprotein	14.92
narf	NM_031968	nuclearprelamina recognition factor isoform b	14.41
tgfb2	NM_003238	transforminggrowthfactor, beta 2	14.20
nfkb2	NM_002502	nuclearfactorof kappa light polypeptide enhancer	13.97
il8	NM_000584	interleukin8	13.37
bmp8	NM_001720	bonemorphogeneticprotein 8 precursor	13.12
mapk9	NM_002752	mitogen-activatedproteinkinase 9	12.51
cldn4	NM_001305	claudin4	11.68
fshprh1	NM_006733	fshprimaryresponse (lrpr1, rat) homolog 1	11.55
ifi16b	AF208043	ifi16b	11.52
gamma-csp	AF368277	gammacysteinestring protein gamma-csp	11.03
krt3	NM_057088	keratin3	11.01
plscr1	NM_021105	phospholipidscramblase1	10.97
insig1	NM_005542	insulininduced1	10.95
pa26	NM_014454	p53regulatedpa26 nuclear protein	10.73
harsl	NM_012208	histidyl-trnasynthetase-like	10.65
	NM_052879	c-mplbindingprotein	10.13
	AF060169	as11proteinmrna upregulated in the androgen	10.10

Table 3. Genes down-regulated in the 5′-intro-indirubinoxime treated KB cells. (fold change > 10)

Gene Symbol	Genebank	Gene/Protein Name	Fold Change
fgfr2	NM_022970	fibroblastgrowthfactor receptor 2, isoform 3 precurs	-1802.77
mlana	NM_005511	melan-a	-182.40
grm6	NM_000843	glutamatereceptor,metabotropic 6 precursor	-116.40
	AF174600	f-boxproteinfbx20 contains one and sh2 domain	-59.80
ache	NM_015831	acetylcholinesterasepi-linkedform precursor	-50.53
pigr	NM_002644	polymericimmunoglobulinreceptor	-47.08
ggtla1	NM_004121	gamma-glutamyltransferase-likeactivity1	-44.05
vnn3	NM_078625_1	vanin 3 isoform 2	-42.43
col4a4	NM_000092	alpha4type iv collagen precursor	-41.07
lama4	NM_002290	laminin,alpha4 precursor	-40.14
barx2	NM_003658	barh-likehomeobox2	-38.27
crhbp	NM_001882	corticotropinreleasinghormone-binding protein	-38.21
slc25a11	NM_003562	solutecarrierfamily 25 mitochondrial carrier	-35.16
amt	NM_000481	aminomethyltransferase	-28.64
gabrb3	NM_000814	gamma-aminobutyricacid(gaba) a receptor, beta 3	-28.19
slc8a1	NM_021097	solutecarrierfamily 8 (sodium/calcium exchanger)	-27.68
stg	NM_014070	stgprotein	-25.62
loc51696	NM_016217	hhdcforhomolog of drosophila headcase	-24.25
olr1	NM_002543	oxidisedlowdensity lipoprotein (lectin-like) receptor 1	-23.20
ecm2	NM_001393	extracellularmatrixprotein 2	-22.94
ppp2r2c	XM_029744	similartoprotein phosphatase formerly 2a regulatory	-22.36
hef1	NM_006403	enhanceroffilamentation 1	-22.10
pde8b1	AF079529	camp-specificphosphodiesterase8b pde8b	-21.93
kcnk13	NM_022054	potassiumchannel,subfamily k, member 13	-21.75
gasc1	XM_034624	amplifiedinsquamous cell carcinoma 1	-21.56
atrx	NM_000489	transcriptionalregulatoratrx	-21.44
	AF293339	ornithinedecarboxylaseantizyme 4 translated	-21.17
nyd-sp21	NM_032597	testesdevelopment-relatednyd-sp21	-20.84
kcna1	NM_000217	potassiumvoltage-gatedchannel, shaker-related	-20.56
il18bp	NM_005699	interleukin18binding protein	-20.39
spink5	NM_006846	serineproteaseinhibitor, kazal type, 5	-19.07
gata3	NM_002051	gatabindingprotein 3	-18.96

cyp7a1	NM_000780	cytochromep450,subfamily viia, polypeptide 1	-18.84
cyp4f12	NM_023944	cytochromep450isoform 4f12	-17.90
pde6a	NM_000440	phosphodiesterase6a,alpha subunit	-17.67
arfd1	NM_033227	adp-ribosylationfactordomain protein 1 isoform beta	-17.61
	AB037594	ing1isoformthis cdna is composed of first 29 amino	-17.41
	XM_012405	actinalphacardiac muscle actc NCBI critical mRNA	-17.34
gap1ip4bp	NM_007368	inositol1,3,4,5-tetrakisphosphate-bindingprotein	-17.03
pfkfb1	NM_002625	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-	-16.60
tnrc1	NM_006448	trinucleotiderepeatcontaining 1	-16.43
galnt5	XM_050509	udp-n-acetyl-alpha-d-galactosamine:polypeptiden-	-16.42
cited2	NM_006079	cbpp300-interactingtransactivatorwith gluasp-rich	-15.57
secret	NM_006998	secretagoginprecursor	-15.19
	NM_018484	hoat4	-15.16
man1a2	NM_006699	mannosidasealphaclass 1a member 2	-15.15
hfh1	NM_033260	wingedhelixforkheadtranscription factor	-15.10
scg3	NM_013243	secretograniniii	-14.96
jdp1	NM_021800	jdomaincontaining protein 1	-14.84
	XM_039665	hypotheticalsupportedby af114264 loc91624	-14.56
il6	NM_000600	interleukin6(interferon, beta 2)	-14.21
add3	NM_019903	adducinisoformb	-13.99
	AF100640	metastasisrelatedprotein mb2	-13.59
ebi2	NM_004951	ebv-inducedgprotein-coupled receptor 2	-13.11
galnt8	NM_017417	polypeptiden-acetylgalactosaminyltransferase8	-12.92
lmo7	NM_015842	limdomainonly 7 isoform b	-12.65
als2	NM_020919_1	alsin	-12.58
tns	NM_022648_1	tensin	-12.40
prkg1	NM_006258	proteinkinase,cgmp-dependent, type I	-12.34
hgc6.1.1	NM_014354	hgc6.1.1protein	-12.29
kap17.1	NM_031964	keratinassociatedprotein 17.1	-12.00
s100b	NM_006272	s100calcium-bindingprotein, beta	-11.84
sart3	NM_014706	squamouscellcarcinoma antigen	-11.57
ceacam5	NM_004363	carcinoembryonicantigen-relatedcell	-11.56
ptprt	NM_007050	proteintyrosinephosphatase, receptor type	-11.42
lgals4	NM_006149	galectin4	-11.36
hbp1	NM_012257	hmg-boxcontainingprotein 1	-11.10
gabra5	NM_000810	gamma-aminobutyricacid(gaba) a receptor	-11.09
dec 1	NM_017418	deletedinesophageal cancer 1	-11.07

igfbp1	NM_000596	insulin-likegrowthfactor binding protein 1	-10.57
pcdha5	NM_031501	protocadherinalpha5, isoform 2 precursor	-10.51
loc164250	XM_092703	hypotheticalproteinxp_092703	-10.48
auh	NM_001698	aurna-bindingprotein/enoyl-coenzyme	-10.28
jup	NM_021991	junctionplakoglobinisoform 1	-10.27
dnmt3l	NM_013369	dna(cytosine-5-)-methyltransferase3-like	-10.26
ca5a	NM_001739	carbonicanhydraseva, mitochondrial precursor	-10.23
nts	NM_006183	neurotensinprecursor	-10.22
cnn1	NM_001299	calponin1,basic, smooth muscle	-10.20
gpc3	NM_004484	glypican3	-10.13
	NM_005709	pdz-73protein	-10.11
slc6a2	NM_001043	solutecarrierfamily 6	-10.03

Table 4. Grouping of the differentially expressed genes into biological functions.

Functions	Total(n)	Total(%)	Up-Regulated (n)	Up-Regulated (%)	Down-Regulated (n)	Down-Regulated (n)
Amino acid metabolism	38	2.17	16	0.91	22	1.26
Apoptosis	62	3.54	32	1.83	30	1.72
Carbohydrate metabolism	63	3.60	30	1.72	33	1.89
Cell cycle	101	5.77	46	2.63	55	3.14
Cell differentiation	53	3.03	19	1.09	34	1.94
Development	271	15.49	99	5.66	172	9.83
Immune response	104	5.95	45	2.57	59	3.37
Lipid metabolism	61	3.49	32	1.83	29	1.66
Nucleic acid metabolism	304	17.38	142	8.12	162	9.26
Protein metabolism	317	18.12	141	8.06	179	10.23
Signal transduction	317	18.12	141	8.06	176	10.06
Transport	58	3.32	39	2.23	19	1.09

참고문헌

1. Zhang, Z. N., Liu, E. K., Zheng, T. L., and Li, D. G. (1985) Treatment of chronic myelocytic leukemia (CML) by traditional Chinese medicine and Western medicine alternately. J. Tradit. Chin. Med. 5, 246-248.
2. Han, J. (1988) Traditional Chinese medicine and the search for new antineoplastic drugs. J. Ethnopharmacol. 24, 1-17.
3. Qin, G.W., and Xu, R.S. (1998) Recent advances on bioactive natural products from Chinese medicinal plants. Med. Res. Rev. 18, 375-382.
4. Marko, D., Schatzle, S., Friedel, A., Genzlinger, A., Zankl, H., Meijer, L., and Eisenbrand, G. (2001) Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. Br. J. Cancer 84, 283-289.
5. Lee, J. W., Moon, M. J., Min, H. Y., Chung, H. J., Park. E. J., Park, H. J., Hong, J. Y., Kim, Y. C., and Lee, S. K. (2005) Induction of apoptosis by a novel indirubin-5-nitro-3′-monoxime, a CDK inhibitor, in human lung cancer cells. Bioorg. Med. Chem. Lett. 15, 3948-3952.
6. Nam, S., Buettner, R., Turkson, J., Kim, D., Cheng, J. Q., Muehlbeyer, S., Hippe, F., Vatter, S., Merz, K. H., Eisenbrand, G., and Jove, R. (2005) Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102, 5998-6003.
7. Xie, Y., Liu, Y., Ma, C., Yuan, Z., Wang, W., Zhu, Z., Gao, G., Liu, X., Yuan, H., Chen, R., Huang, S., Wang, X., Zhu, X., Wang, X., Mao, Z., and Li, M. (2004) Indirubin-3′-oxime inhibits c-Jun NH2-terminal kinase: anti-apoptotic effect in cerebellar granule neurons. Neurosci. Lett. 367, 355-359.

8. Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J. A., Nobel, M. E. M., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G., and Meijer, L. (1999) Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases,Nat. Cell Biol. 1, 6067.
9. Damiens, E., Baratte, B., Marie, D., Eisenbrand, G., and Meijer. L. (2001) Anti-mitotic properties of indirubin-3′-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. Oncogene 20, 3786-3797.
10. Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller, C. A. 3rd., Kato, T., Saeki, K., and Matsuda, T. (2001) Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. J. Biol. Chem. 276, 31475-31478.
11. Knockaert, M., Blondel, M., Bach, S., Leost, M., Elbi, C., Hager, G. L., Nagy, S. R., Han, D., Denison, M., Ffrench, M., Ryan, X. P., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Greengard, P., Skaltsounis, L., and Meijer, L. (2004) Independent actions on cyclin-dependent kinases and aryl hydrocarbon receptor mediate the antiproliferative effects of indirubins. Oncogene 23, 4400-4412.
12. Xie, Y., Liu, Y., Ma, C., Yuan, Z., Wang, W., Zhu, Z., Gao, G., Liu, X., Yuan, H., Chen, R., Huang, S., Wang, X., Zhu, X., Wang, X., Mao, Z., and Li, M. (2004) Indirubin-3′-oxime inhibits c-Jun NH2-terminal kinase: anti-apoptotic effect in cerebellar granule neurons. Neurosci. Lett. 367, 355-359.
13. Landis, S. H., Murray, T., Bolden, S., and Wingo, P. A. (1999) Cancer

statistics, 1999. CA Cancer J. Clin. 49, 8-31.

14. Parkin, D. M., Pisani, P., and Ferlay, J. (1999) Global cancer statistics. CA Cancer J. Clin. 49, 33-64.
15. Raybaud-Diogene, H., Tetu,- B., Morency, R., Fortin, A., and Monteil, R. A. (1996) p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. Eur J. Cancer B. Oral Oncol. 32B, 143-149.
16. Cohen, G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem. J. 326, 1-16.
17. Duan, H., Chinnaiyan, A. M., Hudson, P. L., Wing, J. P., He, W. W., and Dixit, V. M. (1996) ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis.J. Biol. Chem. 271, 1621-1625.
18. Chandler, J. M., Alnemri, E. S., Cohen, G. M., and MacFarlane, M. Activation of CPP32 and Mch3 alpha in wild-type p53-induced apoptosis. (1997) Biochem. J. 322, 19-23.
19. Thompson, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267, 1456-1462.
20. Nicholson, D. W. (1996) ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. Nature Biotechnol. 14, 297-301.
21. Gu, Y., Sarnecki, C., Fleming, M. A., Lippke, J. A., Bleackley, R. C.,and Su, M. S. S. (1996) Processing and activation of CMH-1 by granzyme B. J. Biol. Chem. 271, 10816-10820.
22. Thyboll, J., Kortesmaa, J., Cao, R., Soininen, R., Wang, L., Iivanainen, A., Sorokin, L., Risling, M., Cao, Y., and Tryggvason, K. (2002) Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. Mol.

Cell. Biol. 22, 1194-1202.

23. DeHahn, K. C., Gonzales, M., Gonzalez, A. M., Hopkinson, S. B., Chandel, N. S., Brunelle, J. K., and Jones, J. C. (2004) The alpha4 laminin subunit regulates endothelial cell survival. Exp Cell Res. 294, 281-289.
24. Jeffers, M., Shimkets, R., Prayaga, S., Boldog, F., Yang, M., Burgess, C., Fernandes, E., Rittman, B., Shimkets, J., LaRochelle, W. J., and Lichenstein, H. S. (2001) Identification of a novel human fibroblast growth factor and characterization of its role in oncogenesis. Cancer Res. 61, 3131-3138.
25. Chamorro, M. N., Schwartz, D. R., Vonica, A., Brivanlou, A. H., Cho, K. R., and Varmus, H. E. (2005) FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. EMBO J. 24, 73-84.