대부종콜포회지 제14권 제4호 2003
Vol. 14, No. 4, December, 2003

정상상피세포(HaCat)와 자궁경부 암세포(SiHa)에서 GeneFishing™ PCR technique을 이용한 유전자 발현의 변화

가톨릭대학교 의과대학 의과학연구원, *가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실, †서울대학교 약학대학
김병훈 · 배수미 · 서민제 · 김용완 · 이정웅* · 김용욱* · 이준모* · 남궁성은* · 김종국† · 안웅식*

Changes of Gene Expression between HaCat and SiHa cells using GeneFishing™ PCR

Byung Hoon Kim, M.S., Su Min Bae, M.S., Min-Jae Seo, M.S., Young Wan Kim, Ph.D.,
Jung Woong Lee, M.D.*, Young Wook Kim, M.D.*, Joon Mo Lee, M.D.*,
Sung Eun Namkoong, M.D.*, Chong Kook Kim, Ph.D.†, Woong Shick Ahn, M.D.*
*Catholic Research Institutes of Medical Science, *Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, †College of Pharmacy, Seoul National University*

Objective : The purpose of this study is investigated the differentially expressed genes between normal and cervical cancer cell line.

Methods : We used normal human keratinocyte (HaCaT) as a control and HPV-16 positive cervical cancer (SiHa) cell line. Two cell lines were studied differential expressed genes by using GeneFishing™ PCR and analyzed with BLAST search.

Results : As compared with normal, cervical cancer cell line was showed 25 up-regulated genes including the S1-2-2, S5-1 and 24 down-regulated genes.

Conclusion : GeneFish™ PCR test is very sensitive and effective method for detection of changed gene expression. We could search differentially expressed genes between normal and cervical cancer cell line. In the future, we need to research various genes function to participate in the process of tumor development and progression.

Key Words **:** HaCaT, SiHa, Cervical cancer, Differential expressed genes (DEGs), GeneFishing™ PCR

서 론

자궁경부암은 한국에서의 여성암 중에서 위암, 유방암에 이어 3위의 위치를 차지하고 있는 질환이며. 매년 약 7,000여명의 새로운 환자가 발생하고 있다.[1] 자궁경부암 환자 중 약 70-90%가 인유두종 바이러스(Human Papillomavirus, HPV)에 감염됨이 확인되었고, HPV 감염이 자궁경부암에 중요한 원인으로 알려졌다.[2-4] 최근 몇 년간 자궁경부암의 발생을 줄이기 위한 노력이 계속되고 있으며 침윤암의 치료법을 향상시키는 것도 중요한 일이나 무엇보다 더 중요한 것은 암전 단계에서 효과적인 방법으로 조기진단을 하여 침윤암의 발전을 미리 차단하고 예방하여 이 질환으로 인하여 불필요하게 사망하는 경우를 최대한으로 줄이는 것이 중요한 것이다. 자궁경부암으로 인한 사망률을 감소시키기 위하여 과거 20여년 동안 자궁경부암의 조기 진단과 수술 요법, 방사선요법, 면역요법, 그리고 최근에는 유전자 치료법에 이르기까지 다양한 치료법이 개발되고 있는 실정이다.[5] 그 중 유전자 치료법은 자궁경부암 발생에 관여하는 분자생물학적인

책임저자 : 안웅식 * 본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 02-PJ1-PG3-20801-0010의 지원에 의해 이루어진 것임.

발생경로와 암화과정에 관여하는 유전자들의 정보를 알아보기 위해서 자궁경부 정상조직과 암조직, 정상세포와 암세포간의 유전자 발현 변화에 관련 연구가 활발히 진행 중이다. 현재까지 유전자 발현 변화를 비교하는 방법으로는, differential display reverse transcription PCR (DDRT PCR), DNA chip, expressed sequence tag (EST) analysis, serial analysis gene expression (SAGE) 등이 있으며, 새로운 유전자와 발현 변화를 연구하는데 각각의 장점을 지니고 있다.[5,6]

본 연구는 자궁경부암에 관여하는 유전자와 발현 변화를 확인하기 위해서 정상세포(HaCaT)와 자궁경부 암세포(SiHa)에서 mRNA를 추출하여 GeneFishing DEG PCR (See-gene, Korea)를 이용하여 유전자 발현 변화를 비교하여 자궁경부암 발생에 관여하는 유전자와 발현 변화를 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

정상상피세포주인 HaCaT과 자궁경부 암세포주인 SiHa을 사용하였다. 10% Fetal Bovin Serum (Gibco-BRL, Grand Island, NY, US), 100 Unit/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin (Sigma, Chemical Co. St Louis, Mo)이 포함된 Dulbecco's minimum eagles medium (DMEM) (Gibco, Rockville, MD) 배양배지에 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 배양하였다.

2. RNA 추출 및 cDNA 합성

배양된 자궁경부 세포의 total RNA는 TRI regent (MRC, Cincineti, OH)을 이용 추출하였다. 1 ml의 Trizol로 세포를 균질화한 후 200 ul의 chloroform (Sigma)을 넣고 15초간 잘 섞어주었다. 원심분리 후 상등액 만을 취하고 isopropanol (Sigma)을 첨가하여 RNA를 침전시켰다. 다시 원심분리 하여 상등액을 버리고 75% ethanol로 침전된 RNA를 세척하고 건조시켰다. 37℃에서 DNase I을 처리하여 30분간 반응시킨 후 phenol/$CHCl_3$을 이용하여 침전시키고, 다시 diethylpyrocarbonate (DEPC, Sigma)로 처리된 멸균 증류수에 녹여 사용하였다. RNA의 순도와 농도는 분광광도계 (UltroSpec 3000, Amersharm Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 확인하였다. 3 ug의 total RNA에 oligo-dT ACP1 (2 ul), 2.5 mM dNTP 5 ul, 5X buffer, RTase (Mo-MLV) 1 ul를 섞은 후 37℃에서 50분간 반응시켜 cDNA를 합성하였고, RTase를 불활성화시키기 위해 70℃에서 15분간 반응하였다.

3. GeneFishing™ PCR

Oligo-dT ACP1에 의해 합성된 cDNA를 20개의 arbitrary ACPs (Annealing Control Primer), dT-ACP2과 함께 94℃에서 40초, 65℃에서 40초, 72℃에서 40초 동안 40 cycle 반응하였다.

4. 아가로즈 젤 elution과 Sequencing 분석

Arbitrary ACP와 dT-ACP2 조합에 의해 반응시킨 PCR 생산물을 2% 아가로즈 젤에 전기영동하여 발현 차이가 있는 band를 잘라내어 재증폭한 후, TA cloning vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, US)를 이용하여 클로닝하였으며, ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA)로 automatic sequencing을 수행하였고, BLAST software를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 정상세포주와 자궁경부 암세포주에서 차별 발현 유전자 확인

자궁경부암과 관련이 있는 유전자와 유전자 발현 변화를 일으키는 유전자를 찾고자, 정상상피세포인 HaCaT과 Cervical cancer SiHa cell line을 동일한 조건에서 실험을 실시하였다. GeneFishing™ PCR을 통해 약 100여 개의 유전자를 확인할 수 있었고, 그 중에서 발현 차이를 보이는 49개의 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 아가로스 겔 상에서 확인된 49개의 band 중 정상세포(HaCaT)와 암세포(SiHa)를 비교 분석했을 때, 두 세포간이 발현 변화를 보이는 유전자 중 25개는 발현이 증가하였으며, 24개의 유전자가 감소하였다. 발현 정도를 확인하고 재증폭 된 bands의 염기서열을 분석하였다. 서열정보는 BLAST search를 통해 발현이 증가한 25개 중 11개, 발현이 감소한 24개 중 9개의 유전자 정보를 확인하였다. 이들 중 13개의 유전자가 unigene 정보를 가지고 있었다.

고 찰

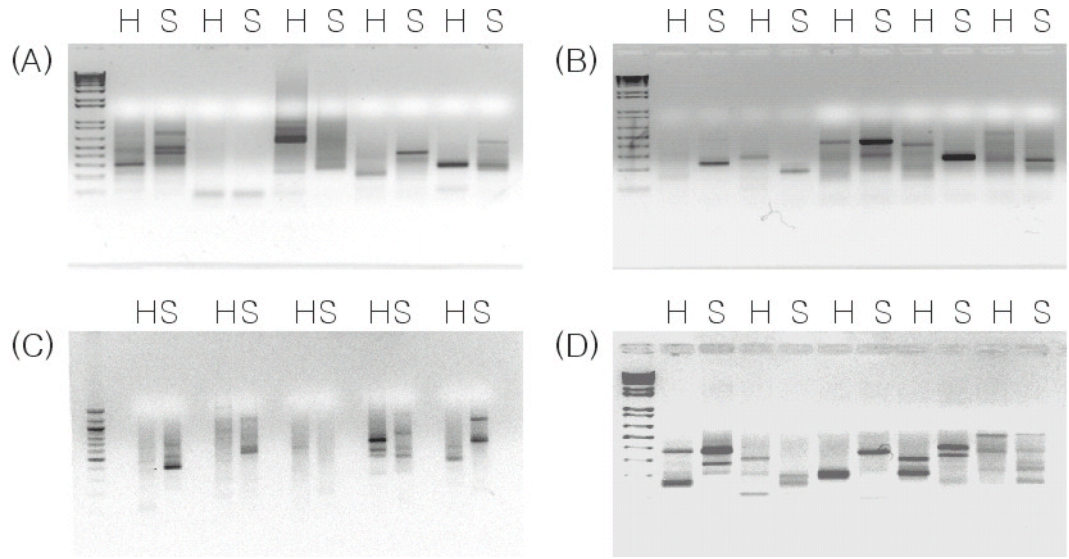

Fig. 1. Differentially expressed genes between normal and cancer cell line. (A) GeneFishing™ DEG A1-5; (B) GeneFishing™ DEG A6-10; (C) GeneFishing™ DEG A 11-15; (D) GeneFishing™ DEG A16-20 (H; HaCaT, S; SiHa).

자궁경부암은 처음 성행위를 가진 연령이 낮은 경우, 성행위 상대자가 여러 명인 경우, 성병에 감염된 병력이 있는 경우에 높은 발생률을 보여 성행위와 밀접한 관계가 있으며 사회경제적 여건이 낮은 계층이나 흡연을 하는 여성에서도 많이 발생한다. 최근에는 이러한 위험인자들과 더불어 성행위로 인하여 전파될 수 있는 인유두종 바이러스(human papillomavirus)의 감염이 자궁경부암의 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.[7,8] 현재까지 수많은 생물학적, 역학적 연구를 통하여 자궁경 부암의 발생에 인유두종 바이러스(HPV)의 감염이 주된 원인으로 밝혀지고 있으며, 특히 HPV-16과 HPV-18은 실제로 자궁경부암 조직의 70% 이상에서 발견되는 고위험 바이러스이다.[9] 고위험 HPV의 E7 단백질의 발현은 종양억제인자 단백질인 pRb를 불활성화시키며, E6 단백질은 p53 단백질과 결합하여 p53의 빠른 분해를 일으켜서 이들을 불활성화시킨다. HPV-16과 HPV-18의 E6와 E7 유전자의 발현은 이를 조절하는 부위(promoter)를 포함하고 있는 HPV upstream regulatory region (URR) 부분의 전사 활성 조절에 의해 이루어진다.[10,11]

HPV의 감염을 진단할 수 있는 검사법이 활발히 진행되고 있으며, Southern blot hybridization, Soluble hybridization (Hybrid Capture System), 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR) 등과 같이 여러 가지 분자생물학적 방법이 이용되고 있는데, 그 중 PCR법이 민감도가 높아 활용이 용이하다고 알려져 있다.[6] 그리고 최근에는 많이 이용되고 있는 DNA Chip 경우, 유전자 발현 차이를 통계학적으로 분석하여 발현 변화를 확인하는 반면에(Sharon et al., 1998),[12] PCR법을 기본으로 한 기술은 발현된 유전자를 젤상에서 육안으로 확인하는 다른 점을 가지고 있다.

본 연구에 사용된 GeneFishing™ PCR은 2가지 이상의 시료(nucleic acid) 사이에서 서로 다르게 발현되는 유전자(DEGs: Differentially Expressed Genes)를 탐색하는데 목적이 있다. 여기에서 DEGs란, 비교대상 시료간의 mRNA 발현차이를 보이는 유전자들을 일컫는 것이다. ACP (Annealing Control Primer)를 이용하여 first-stage PCR (Annealing Temperature, Ta=50℃)에서는 target region만이 primer 기능을 하게 하고 non-target region은 기능을 차단하게 한다. Second-stage PCR (Ta=65℃)에서는 non-target region 만이 specific annealing하여 많은 DNA를 얻을 수 있다(Fig. 2). 우리는 이러한 ACP를 이용하여 다량의 DNA를 확보할 수 있었다. 기존의 DD-PCR (Differential Display-PCR)과 다른 점은, 3개의 이상의 anchor dT (A anchored dT, G anchored dT, C anchored dT)를 사용하여 cDNA를 3개 이상의 sub-population으로 구성되어 있다는 점이다. Arbitary ACP와 oligo-dT ACT 조합으로 PCR을 행하여

Table 1. Data base information of cDNA clones

a. Up regulated gene

Clone	Genebank Database (%: Identity)	Length (bp)	Accession No.	Unigene No.
S1-2-2	Homo sapiens S100 calcium binding protein A6 (calcyclin) (89%)	470	NM_014624	Hs.275243
S1-3-3	Homo sapiens hypothetical protein FLJ11259 (100%)	2835	NM_018370	Hs.416393
S5-1	Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9 kDa (NDUFA4) (84%)	518	NM_002489	Hs.50098
S6-3	DTNB dystrobrevin, beta (93%)	2133	NM_021907	Hs.406073
S7-3	Homo sapiens collagen, type VI, alpha 3 (COL6A3) (100%)	9940	NM_057167	Hs.233240
S8-1	Rattus norvegicus similar to ribosomal protein S18, cytosolic (93%)	516	XM_215328	-
S9-2	Homo sapiens ribosomal protein L6 (RPL6) (86%)	950	NM_000970	Hs.416566
S10-1	Homo sapiens KIAA0483 protein (KIAA0483) (100%)	2923	NM_015176	Hs.64691
S17-1-1	Human nucleolin (NCL) (100%)	2518	NM_005381	Hs.79110
S19-2-3	Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-589M4 of library (100%)	190648	AL139317	-
S20-1-1	Homo sapiens OK/SW-cl.29 mRNA for thymidylate synthetase, complete cds (89%)	1567	AB062290	Hs.87491

b. Down regulated gene

Clone	Genebank Database (%: Identity)	Length (bp)	Accession No.	Unigene No.
H1-1	Human ribosomal protein S21 (RPS21) mRNA (98%)	343	L04483	Hs.372960
H5-3	Human ribosomal protein L27a mRNA, complete cds (95%)	507	HSU14968	-
H7-1	Homo sapiens mRNA for ETEA, complete cds (100%)	4503	AB088120	Hs.76591
H7-2	Epichloe bromicola strain ATCC201559 actin (act1) gene (100%)	635	AF240092	-
H9-1	Homo sapiens chromosome 8, clone RP11-263C20 (100%)	123995	AC026248	-
H9-2	Homo sapiens mRNA for ribosomal protein L37, complete cds (98%)	369	D23661	Hs.80545
H10-3	Homo sapiens chromosome 1 clone RP11-86H7 (98%)	200426	AC093117	-
H19-1-3	Homo sapiens poly(A) polymerase alpha (PAPOLA) (100%)	1064	BC000927	Hs.201085
H20-2-3	Homo sapiens cosmid 223D9 from Xq28 (100%)	37581	AF061032	-

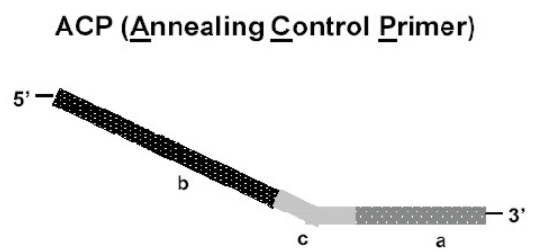

Fig. 2. ACP™ Structure. APC™ technology provides a primer with annealing specificity to the temple and allows only real products to be amplifies, such that it enables the researchers to find only real products as a result.
a. Core sequence ····· Annealing at the 1st stage of PCR (targeting).
b. Universal sequence ····· Annealing at the 2nd stage of PCR.
c. Regulator ····· Regulating the functions of a and b.

real PCR product 만을 얻을 수 있으며, product를 아가로즈 젤상에서 편리하게 확인할 수 있다는 장점이 있다. 질병관련 유전자, 발생단계에서의 유전자, drug이나 hormone 등을 처리한 sample에서의 유전자, 생물학적인 변화에 따른 유전자, 항생제 내정 유전자 연구 등과 같이 비교하고자 하는 시료들로부터 발현차이가 있는 유전자를 탐색하는 연구에 많은 도움이 되리라 사료된다.

본 연구에서 확인된 유전자 중 S5-1 (NADH dehydrogenase submit 4)은 mitochondrial enzyme으로 악성 전의 전이나 초기 종양 기간에 발생하는 유전자로 알려져 있으며,[13] Yamaoto *et al.*[14]은 NADH dehydrogenase submits이 colon adenomas 전의에서 발현이 증가한다고 하였고, Lu *et al.*[15]과 Mills *et al.*[16]은 tumor cells의 종양형성이 파괴되었을 때, NADH dehydrogenase submit 4가 감소한다고 보고하였다. 이러한 증거로 NADH dehydrogenase submit 4 (S5-1)는 carcinogenase에서 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다.[17] S1-2-2 (sapiens S100

calcium binding protein A6)는 colon carcinoma 과정에 관여한다고 보고되어 있으며,[18-20] Komatsu *et al.*[21]은 S100 A6의 발현은 human colorectal carcinoma 과정과 침해 과정에 관련이 있고, 그 결과로 S100 protein은 종양 전개 과정에 관여한다고 보고하였다. S9-2 (Homo sapiens ribosomal protein L6)의 경우, Du JP *et al.*[22]은 위 암 세포인 SGC7901에서 발현이 증가했다고 하였다.

본 연구에서는 자궁경부 정상세포와 암세포의 mRNA를 이용하여 PCR기법을 기본으로 한 GeneFishing™ PCR를 사용하여 두 세포 간에 유전자 발현 차이를 보이는 100여 개의 유전자를 확인할 수 있었으며, 발현 차이가 뚜렷한 49개의 유전자를 찾아, 그 중 20개의 유전자 정보를 조사하였으며, 향후 더 많은 phase를 가지고 정상조직과 암조직에서의 차이점을 확인하는데 GeneFishing™ PCR technique이 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

참고논문

1. 보건복지부. 한국중앙암등록사업 연례 보고서. 2002.
2. Munmoz N. Human papillomavirus and cener: the epidemiological evidence. J Clin Virol 2000; 19: 1-5.
3. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jasen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a wordwide perpective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Caner Inst 1995; 87: 796-802.
4. Eisenkop SM, Friedman RL, Wang HJ. Complete cytoreductive surgery is feasible and maximizes survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer, a prospective study. Gynecol Oncol 1998; 69: 103-8.
5. Godfroid E, Heinderyckx M, Mansy F, Fayt I, Noel JC, Thiry L, et al. Detection and identification of human papilloma viral DNA, types 16, 18 and 33, by a combination of polymerase chain reaction and a colorimetric solid phase capture hybridization assay. J Virol Methods 1998; 75: 69-81.
6. Lorinz AT. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. Obstet Gynecl Clin North Am 1996; 23: 707-30.
7. Darin PK, Holmes KK, Hughes JP, Koutsky LA. Determinates of cervical cancer rates in developing countries. Int J Cancer 2002; 100: 199-205.
8. Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 1365-71.
9. Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, Paavonen J. Human papillomavirus DNA in uterine cervical squamous cell carcinoma and adeno carcinoma detected by polymerases chain reaction. Cancer 1996; 77: 2275-9.
10. Dyson N, Howley PM, Munger K. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 1989; 243: 943-7.
11. Wemess BA, Levine A, Howely PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 protein with p53. Science 1990; 248: 76-9.
12. Shalon D. Gene expression micro arrays: a new tool for genomic research Pathol Biol (Paris) 1998; 46: 107-9.
13. Costello LC, Franklin RB. Bioenergetic theory of prostate malignancy. Prostate 1994; 25: 162-6.
14. Yamamoto A, Horai S, Yuasa Y. Increased level of mitochondrial gene in polyps of familial polyposis coli patients. Biochem Biophys Res. Commun 1989; 159; 1100-6.
15. Lu X, Walker T, MacManus JP, Seligy VL. Differentiation of HT-29 humans colonic adenocarcinoma cells correlates with increased expression of mitochondrial RNA: effects of trehalose on cell growth and maturation. Cancer Res. 1992; 52: 3718-25.
16. Mills KI, Woodgate LJ, Gilkes AF, Walsh V, Sweeney MC, Brown G, et al. Inhibition of mitochondrial function in HL60 cells is as associated with an increased apoptosis and expression of CD14. Biochem Biophys Res. Commun 1999; 263: 294-300.
17. Qing Cheng, Wen Min Lau, Tay SK, Chew SH, Ho TH, Kam M Hui. Identification and characterize of genes involved in the carcinogenesis of human squamous cell cervical carcinoma. Int. J Cancer 1998; 419-26.
18. Bronckart Y, Decaestecker C, Nagy N, Harper L, Schafer BW, Salmon I, et al. Development and progression of malignancy in human colon tissues are correlated with expression of specific Ca(2+)-binding S100 proteins. Histol Histopathol 2001; 16: 707-12.
19. Stulik J, Osterreicher J, Koupilova K, Knizek J, Bures J, Jandik P, et al. Differential expression of the Ca2+ binding S100A6 protein in normal, preneoplastic and neoplastic colon mucosa. Eur J Cancer 2000; 36(8): 1050-9.
20. Komatsu K, Murata K, Kameyama M, Ayaki M, Mukai M, Ishiguro S, et al. Expression of S100A6 and S100A4 in matched samples of human colorectal mucosa, primary colorectal adenocarcinomas and liver metastases. Oncology 2002; 63(2): 192-200.
21. Komatsu K, Kobune-Fujiwara Y, Andoh A, Ishiguro S, Hunai H, Suzuki N, et al. Increased expression of

S100A6 at the invading fronts of the primary lesion and liver metastasis in patients with colorectal adenocarcinoma. Br J Cancer 2000; 83(6): 769-74.
22. Du JP, Jin XH, Shi YQ, Cao YX, Zhao YQ, Liu CJ, et al. Differential expression of RPL6/Taxreb107 in drug resistant gastric cancer cell line SGC7901/ADR and its correlation with multiple-drug resistance. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 2003; 25: 21-5.

국문초록

목적: 본 실험의 목적은 정상상피 세포와 자궁경부 암세포 사이에서 유전자의 발현 차이를 조사하였다.
연구 방법: 정상상피 세포(HaCat)와 자궁암 세포(SiHa)를 사용하였으며, 두 세포 간에 유전자 발현 차이를 GeneFish™ PCR을 이용하여 알아보았으며, BLAST serach를 통해 분석하였다.
결과: 정상상피 세포와 자궁암 세포 비교 결과, 자궁암 세포에서 S1-2-2와 S5-1을 포함한 25개의 유전자가 발현이 증가하였고, 24개의 유전자가 감소하였다.
결론: GeneFishing™ PCR 기법은 유전자의 발현 변화를 확인하는데 있어서 아주 민감하고 효과적인 방법이다. 우리는 정상상피 세포와 자궁경부 암세포에서 다르게 발현하는 유전자를 찾을 수 있었고, 앞으로는, 종양의 발생과 진행과정에 관여하는 유전자를 더 탐지하고 해당 유전자의 기능을 연구할 필요가 있다고 생각된다.

중심단어 : HaCaT, SiHa, 자궁암, Differential expressed genes (DEGs), Genefish™ PCR