Regulation of Piperonaline on Biological Functions of Human Prostate Cancer Cells Based on Microarray Analysis

Sang-Hun Kim¹, Kwang-Youn Kim¹, Sun-Nyoung Yu¹, Seul-Ki Park¹, In-Seok Kwak², Moon-Soo Rhee³, Byung-Ho Bang⁴, Sung-Sik Chun⁵ and Soon-Cheol Ahn^{1*}

¹Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 626-870, Korea

²Department of Biological Sciences, Silla University Medicine, Busan 617-736, Korea

³Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

⁴Department of Food and Nutrition Science, College of Health Industry Eulji University, Seongnam 461-713, Korea

⁵Department of Food Science, International University of Korea, Jinju 660-759, Korea

Received October 30, 2012 / Revised November 22, 2012 / Accepted November 22, 2012

It has been reported that piperonaline isolated from *Piper longum* Linn. has a wide biochemical and pharmacological effect, including antitumor activity in prostate cancer PC-3 cells. However, its mechanism and expression pattern of many genes involved in biological functions are not clearly understood. To perform the gene expression study in PC-3 cells treated with piperonaline, a cDNA microarray chip composed of 44,000 human cDNA probes was used. As a result, cell cycle-related genes, apoptosis-related genes, and cell proliferation/growth-related genes have been identified in gene ontology of the DAVID database. These results suggest that piperonaline has antitumor activity by regulating the expression pattern of genes involved in biological signaling pathway in prostate cancer PC-3 cells. Further, additional analysis of these microarray data can be a useful tool to identify the mechanism and discovery of novel genes in cancer therapy.

Key words : Piperonaline, PC-3 cells, microarray, expression, cell cycle, apoptosis, proliferation

서 론

미국 암 협회의 보고에 따르면 전립선 암은 미국의 남성에게서 발병하는 암 중 가장 발병률이 높고, 암 관련 사망률 2위를 나타내고 있다[1]. 우리나라의 경우도 서구화 된 식습관과 생활습관의 변화 및 고령화로 인해 발병률이 빠르게 증가하는 추세이다. 또한, 전립선암은 유전적 요인, 노화, 고지방 식이 등에 따라 발병할 수 있다고 알려져 있으나 정확한 메커니즘은 밝혀져 있지 않다[8]. 이에 대해 최근에는 천연물을 이용한 생물학적 및 화학적 치료요법을 이용하여 전립선 암세포의 사멸을 유도하는 연구가 많이 이루어지고 있다[2,9]. 본 연구에 사용된 piperonaline은 후추나무과에 속하는 필발(*Piper longum* Linn.)에서 분리된 piperine의 유도체로서 전립선 암세포에서 세포독성 효과와 세포주기 중 G1기를 정지시킴으로써 항암효과를 나타내는 물질이다[3].

본 연구에서 사용된 microarray 분석은 동시에 수 만개 이상의 유전자 발현양상을 관찰할 수 있는 기술로서 특정 질병의 유전학적 특성과 기전 연구를 더 광범위하게 연구 할 수 있는 기술이다. 목표로 하는 세포에서 mRNA를 분리하여 형광물질을 첨가하여 단일 가닥 형태의 cDNA로 합성시켜, 여기

에 microarray chip에 내장되어있는 probe를 이용하여 발산하는 형광을 검출하여 발현 변화 양상을 파악할 수 있다[7]. Microarray 분석 후, 얻어지는 많은 정보를 처리하기 위해 새로운 생물정보학 기술과 통계학적 처리 방법이 요구되는 가운데, 일반적으로 microarray의 결과는 DAVID database에서 진핵세포의 유전자 정보를 담고 있는 gene ontology 분석을 통해 확인 할 수 있다[4,5]. Gene ontology에는 Biological Process, Molecular Function, Cellular Component 등의 ontology가 존재한다[6]. 현재까지 piperonaline이 전립선 암세포에서 일어나는 유전자 발현 변화 연구는 아직 미비한 상태이다. 본 연구에서는 전립선 암세포에 piperonaline을 처리하여 cDNA microarray를 실시한 후 DAVID database를 기반으로 하여 생물학적 과정 중에서 세포주기, 세포사멸, 세포 증식과 성장을 clustering하여 유전자의 발현 변화를 확인하여 이후, 전립선암의 치료와 예방에 기여하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 세포배양

본 실험에 사용된 piperonaline은 우리의 이전 연구에서 분리한 시료를 사용하였다[5]. RNA 분리를 위한 RiboEx_column™ kit는 GeneAll Biotechnology Co. (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 인간 전립선 암세포주인 PC-3 세포는

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8092, Fax : +82-55-382-8090

E-mail : ahnsc@pusan.ac.kr

Fig. 1. Visualization of clustered microarray data. (A) MA plot (B) Scatter plot (C) Hierarchical clustering analyses of 5,948 selected genes. The red color refers to the up-regulation of the gene expression and the green color indicated the down-regulation of the gene expression compared with the non-treated pipernonaline.

American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 분양 받아 10% fetal bovine serum (WelGene Inc., Daegu, Korea), 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (WelGene Inc.)이 첨가된 DMEM 배지 (WelGene Inc.)에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 본 연구는 cell culture dish에 세포가 70-80% confluent 되었을 때 30 µg/ml pipernonaline을 24시간 처리하여 실험을 진행하였다.

Total RNA 분리

Total RNA는 RboEx_column™ kit를 사용하여 분리하였다. 간략히, PC-3 세포를 1×10^5 되도록 6 well cell culture plate에 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, 30 µg/ml pipernonaline을 24시간 처리하여 배양한 뒤, 1 ml RiboEx reagent를 사용하여 harvest하여 이후, 제조사의 protocol에 따라 RNA를 분리하였다.

Microarray 실험 및 데이터 분석

Microarray 실험은 GenomicTree, Inc. (Daejeon, Korea)

에 위탁하여 수행하였다. 간략히, cDNA microarray chip은 Agilent Technologies Inc.의 Human whole genome 44K (Santa Clara, CA, USA) 사용하였다. 분리한 RNA는 Agilent's 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies Inc.)을 이용하여 total RNA의 quality를 측정하였고, RNA의 증폭과 labeling 과정을 위해 Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit PLUS (Agilent Technologies Inc.)를 이용하였다. Microarray hybridization을 위해 Agilent's Gene Expression Hybridization kit (Agilent Technologies Inc.)를 사용하였고, Agilent's Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent Technologies Inc.)를 이용하여 세척한 후, Agilent's DNA microarray scanner 및 Feature Extraction Software를 이용하여 영상을 스캔하고 분석하였다. Agilent's GeneSpring Software를 이용하여 normalization 및 clustering 통해 유전자의 발현 분석을 하였다. 이후 유전자의 생물학적, 분자학적 기능을 분류하기 위해서 DAVID database (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)를 이용하여 clustering하였다.

결과 및 고찰

Microarray를 통한 pipernonaline 처리에 따른 유전자의 변화 확인

사람의 유전자 44,000개를 인지할 수 있는 probe들이 포함된 Agilent Human whole genome 4 X 44K Chip을 사용하였다. Normalization 및 clustering을 위해 Agilent's GeneSpring software을 이용하여 MA plot 및 Scatter plot을 측정하여 표준화하여 각종 변이 등에 의한 오차를 최소한으로 줄였다(Fig. 1A,B). 보정된 유전자 발현 결과는 각 시료 간에 비교 분석 후, 2배 이상 유의하게 증가 혹은 감소된 값을 가지는 유전자를 분석하여 significant genes로 적용하였다. 그 결과, 2배 이상 유의성 있게 발현이 증가한 유전자의 수는 3,106개이고, 2배 이하로 유의성 있게 발현이 감소한 유전자의 수는 2,842개였다. significant genes, 총 5,948개에 대하여 hierarchical clustering을 진행한 결과, pipernonaline을 처리함에 따라 2배 이

상 증가된 유전자(red color)와 2배 이상 감소된 유전자(green color) 발현양상을 확인할 수 있었다(Fig. 1C).

Fig. 2. The number of genes common in any two or all three clustering depicted in the intersections of the circles.

Table 1. Ontological clustering of DAVID database in PC-3 cells after pipernonaline treatment

Term	Count	2-fold up	2-fold down	P-Value	Benjamini	FDR
GO:0007049~cell cycle	256	67	189	2.01E-19	1.01E-15	3.82E-16
GO:0042981~regulation of apoptosis	197	115	82	4.94E-04	0.05	0.94
GO 0008283 ll lif tiGO:0008283~cell proliferation	108	50	58	0.01	0.28	12.53
GO:0001558~regulation of cell growth	50	29	21	0.03	0.53	48.26

Table 2. Overlapping gene lists in cell proliferation/growth and apoptosis from clustered microarray data
Cell proliferation/growth and apoptosis

Gene Symbol	Description	Genbank	Flod Change	Gene Symbol	Description	Genbank	Flod Change
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	NM_001013398	13.98	ACVR1B	activin A receptor, type IB	NM_004302	2.79
TP73L	tumor protein p73-like	NM_003722	10.00	CRYAB	crystallin, alpha B	NM_001885	2.49
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	NM_000389	8.89	PSEN1	presenilin 1 (Alzheimer disease 3)	NM_000021	2.21
BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	NM_001731	6.74	IHPK2	inositol hexaphosphate kinase 2	NM_016291	-2.15
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	NM_001025366	5.55	TAF9B	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa	NM_015975	-2.16
PIM1	pim-1 oncogene	NM_002648	5.20		sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK	NM_016653	-2.19
IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	NM_005531	4.64	BAD	BCL2-antagonist of cell death	NM_004322	-2.42
APBB2	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2 (Fe65-like)	NM_173075	3.49	IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	NM_000612	-2.51
ADAM17	ADAM metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)	NM_003183	3.29	PML	promyelocytic leukemia	NM_002675	-2.54
BCL2L2	BCL2-like 2	NM_004050	3.06	HELLS	helicase, lymphoid-specific	NM_018063	-3.66
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	NM_002133	2.87	CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	NM_078626	-5.22
TNFSF14	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	NM_003807	2.83	IL7	interleukin 7	NM_000880	-5.49

DAVID database (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)를 이용한 gene clustering

2배 이상 유의하게 증가 혹은 감소된 값을 가지는 유전자를 분석하여 significant genes로 적용한 5,948개의 유전자를 대상으로 하여 추가 분석을 실시하였다. DAVID database를 이용하여 GenBank accession number를 입력하였고, 그 중 사람의 유전자 3,941개와 알려지지 않은 유전자 1,536개로 분리하여 분석하였다. 먼저 사람의 유전자 3,941개를 functional annotation tool을 이용하여 gene ontology에서 Biological Process로 clustering을 한 결과, 3,785개의 유전자를 분리하였고, 482개의 cluster를 분석하였다(data not shown). 분석한 결과, cel-

lular 및 metabolic process에 관련된 유전자들을 많이 포함하고 있었으며, 특히 세포사멸과 세포주기 관련 및 세포성장 및 증식에 관련된 유전자들을 우선적으로 분석하였다(Table 1). 세포주기에 관련되는 유전자는 256개, 세포사멸에 관련된 유전자는 197개, 세포성장 및 증식에 관련된 유전자들은 154개로 확인되었으며, 이들의 교집합을 이루는 유전자를 각각 분석하였다(Fig. 2, Table 2-4).

세포주기와 세포사멸, 세포증식 및 성장 관련 유전자 분석
Gene clustering을 한 결과, 세포주기와 관련한 cluster에서는 2배 이상 감소된 유전자가 189개로 2배 이상 증가된 유전자

Table 3. Overlapping gene lists in cell proliferation/growth and cell cycle from clustered microarray data
Cell proliferation/growth and cell cycle

Gene Symbol	Description	Genbank	Flod Change	Gene Symbol	Description	Genbank	Flod Change
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	NM_000389	8.89	MCM7	minichromosome maintenance complex component 7	NM_182776	-2.49
PIM1	pim-1 oncogene	NM_002648	5.20	NASP	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	NM_172164	-2.53
APBB2	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2 (Fe65-like)	NM_173075	3.49	PML	promyelocytic leukemia	NM_002675	-2.54
ADAM17	ADAM metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)	NM_003183	3.29	RB1	retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	NM_000321	-2.59
TACC2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	BC010219	3.16	APRIN	androgen-induced proliferation inhibitor	NM_015032	-2.83
ACVR1B	activin A receptor, type IB	NM_004302	2.79	DTYMK	deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	NM_012145	-2.84
CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta	NM_172127	2.59	PSRC1	proline/serine-rich coiled-coil 1	NM_032636	-3.03
CDK7	cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, Xenopus laevis, cdk-activating kinase)	NM_001799	2.26	TPX2	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)	NM_012112	-3.04
CCDC100	coiled-coil domain containing 100	NM_153223	2.26	UHRF1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	NM_013282	-3.12
CCND3	cyclin D3	NM_001760	-2.04	HELLS	helicase, lymphoid-specific	NM_018063	-3.66
RACGAP1P	Rac GTPase activating protein 1 pseudogene	AF334184	-2.05	ASPM	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	NM_018136	-3.72
FOXM1	forkhead box M1	NM_202002	-2.09	CUZD1	CUB and zona pellucida-like domains 1	NM_022034	-3.93
BUB1	BUB1 budding uninhibited by ben-zimidazoles 1 homolog (yeast)	NM_004336	-2.09	POLA1	polymerase (DNA directed), alpha 1	NM_016937	-4.25
	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK	NM_016653	-2.19	E2F8	E2F transcription factor 8	NM_024680	-4.34
ING1	inhibitor of growth family, member 1	NM_198219	-2.30	TACC3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	NM_006342	-4.58
CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	NM_001826	-2.37	CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (<i>S. pombe</i>)	NM_001789	-4.99
PES1	pescadillo homolog 1, containing BRCT domain (zebrafish)	NM_014303	-2.38	CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	NM_078626	-5.22
BUB1B	BUB1 budding uninhibited by ben-zimidazoles 1 homolog beta (yeast)	NM_001211	-2.41	CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)	NM_016343	-5.35
NDE1	nudE nuclear distribution gene E homolog 1 (<i>A. nidulans</i>)	NM_017668	-2.48	KIF15	kinesin family member 15	NM_020242	-5.72

67개보다 더 많이 확인되었다. 특히, 세포주기를 촉진하는 cyclins과 cyclin-dependent kinases (CDKs) 유전자 같은 경우 전체적으로 발현이 감소 되었고, 대표적인 세포주기 억제 단백질 CDK inhibitor 1A (p21)인 CDKN1A는 8배 이상 증가를 확인함으로써, pipernonaline이 세포주기를 활성화 시키는 유전자의 발현감소 또는 억제 유전자의 발현 증가를 유도함으로

써 세포주기에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 세포사멸과 관련된 cluster의 경우, 2배 이상 감소된 유전자보다 2배 이상 증가된 유전자가 더 많이 나타났으며 세포사멸과 관련된 대표적인 유전자 중, caspase family와 Bcl-2 family, tumor necrosis factor 등의 발현 변화를 확인하였다. 세포증식 및 성장에 관련된 cluster에서는 성장 인자인 insulin-like growth fac-

Table 4. Overlapping gene lists in apoptosis and cell cycle from clustered microarray data
Apoptosis and cell cycle

Gene Symbol	Description	Genbank	Fold Change	Gene Symbol	Description	Genbank	Fold Change
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	NM_000389	8.89	ABL1	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	NM_005157	-2.12
ARHGEF2	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	NM_004723	6.41	DNM2	dynammin 2	NM_001005360	-2.18
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	NM_004083	6.32		sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK	NM_016653	-2.19
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	NM_004417	5.63	BRCA1	breast cancer 1, early onset	NM_007295	-2.25
PIM1	pim-1 oncogene	NM_002648	5.20	MAEA	macrophage erythroblast attachment	NM_001017405	-2.45
APBB2	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2 (Fe65-like)	NM_173075	3.49	PML	promyelocytic leukemia	NM_002675	-2.54
ADAM17	ADAM metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)	NM_003183	3.29	PSME3	proteasome (prosome, macro-pain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)	NM_005789	-2.59
	junction-mediating and regulatory protein	NM_152405	2.87	MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (<i>E. coli</i>)	NM_000251	-3.16
ACVR1B	activin A receptor, type IB	NM_004302	2.79	HELLS	helicase, lymphoid-specific	NM_018063	-3.66
RB1CC1	RB1-inducible coiled-coil 1	NM_014781	2.70	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	NM_002758	-4.02
GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta	NM_002093	2.60	CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	NM_001786	-4.08
IFNG	interferon, gamma	NM_000619	2.12	BARD1	BRCA1 associated RING domain 1	NM_000465	-4.55
TXNIP	thioredoxin interacting protein	NM_006472	2.04	CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	NM_078626	-5.22
JAG2	jagged 2	NM_002226	-2.03				

Table 5. Total overlapping gene lists in cell proliferation/growth and cell cycle and apoptosis from clustered microarray data

Gene Symbol	Description	Genbank	Fold Change
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	NM_000389	8.89
PIM1	pim-1 oncogene	NM_002648	5.20
APBB2	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2 (Fe65-like)	NM_173075	3.49
ADAM17	ADAM metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)	NM_003183	3.29
ACVR1B	activin A receptor, type IB	NM_004302	2.79
CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	NM_078626	-5.22
HELLS	helicase, lymphoid-specific	NM_018063	-3.66
PML	promyelocytic leukemia	NM_002675	-2.54
	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK	NM_016653	-2.19

tor와 vascular endothelial growth factor 등 관련 유전자 및 성장 저해 인자인 CDK inhibitor와 androgen-induced proliferation inhibitor 등 관련 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 또한 세포주기, 세포사멸, 세포증식 및 성장에 공통적으로 발현되는 유전자를 확인한 결과, 대표적인 세포주기 억제 유전자 CDKN1A가 8배 이상 가장 많이 증가한 반면, CDK inhibitor 2C (p18)인 CDKN2C는 5배 이상 감소되었다(Table 5). 이러한 결과는 piperonaline의 처리는 전립선 암세포에 존재하는 다양한 신호전달 체계에 관여하는 것을 알 수 있으며, 본 연구에서는 CDKN2C 유전자 발현 감소보다 CDKN1A 유전자의 발현 증가가 piperonaline이 처리된 전립선 암세포에 대해 더 우선적으로 작용함으로써 세포의 성장억제를 유도함을 알 수 있었다. 이상의 이러한 결과들로부터 전립선 암세포에서 piperonaline는 세포주기, 세포사멸 그리고 세포증식 및 성장에 관련된 다양한 유전자를 조절함으로써 세포사멸의 유도, 세포증식과 성장을 저해 하는 것을 알 수 있고, 이러한 microarray의 결과를 바탕으로 *in vivo*상에서 실제로 암세포의 사멸과 관련된 새로운 유전자 탐색 및 메커니즘을 규명하는데 유용하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2010학년도 부산대학교 교수국외장기파견 지원비에 의하여 연구되었음.

References

1. ACS. 2012. Cancer facts & figures. *American cancer society*.
2. Eom, K. S., Hong, J. M., Youn, M. J., So, H. S., Park, R., Kim, J. M. and Kim, T. Y. 2008. Berberine induces G1 arrest and apoptosis in human glioblastoma T98G cells through mitochondrial/caspases pathway. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 558-562.
3. Kim, K. Y., Kim, Y. J., Lee, W., Yu, S. N., Cho, H. J., Lee, S. Y., Lee, H. S., Sohn, J. H., Oh, H. C. and Ahn, S. C. 2009. Purification and identification of apoptosis modulator piperonaline from piper longum Linn. against prostate cancer cells. *J. Life Sci.* **19**, 671-675.
4. Lammers, G., Gilissen, C., Nillesen, S. T., Uijtdewilligen, P. J., Wismans, R. G., Veltman, J. A., Daamen, W. F. and van Kuppevelt, T. H. 2010. High density gene expression microarrays and gene ontology analysis for identifying processes in implanted tissue engineering constructs. *Biomaterials* **31**, 8299-8312.
5. Li, S., Becich, M. J. and Gilbertson, J. 2004. Microarray data mining using gene ontology. *Stud Health Technol. Inform* **107**, 778-782.
6. Michael, B. and Lawrence, H. 2008. Identification of OBO nonalignments and its implications for OBO enrichment. *Bioinformatics* **24**, 1448-1455.
7. Nguyen, D. V., Arpat, A. B., Wang, N. and Carroll, R. J. 2002. DNA microarray experiments: Biological and technological aspects. *Biometrics* **58**, 701-717.
8. Park, S. K., Sakoda, L. C., Kang, D., Chokkalingam, A. P., Lee, E., Shin, H. R., Ahn, Y. O., Shin, M. H., Lee, C. W., Lee, D. H., Blair, A., Devesa, S. S. and Hsing, A. W. 2006. Rising prostate cancer rates in South Korea. *Prostate* **66**, 1285-1291.
9. Wang, M., Ruan, Y., Chen, Q., Li, S., Wang, Q. and Cai, J. 2011. Curcumin induced HepG2 cell apoptosis-associated mitochondrial membrane potential and intracellular free Ca(2+) concentration. *Eur. J. Pharmacol.* **650**, 41-47.

초록 : Microarray를 이용한 piperonaline의 인간 전립선 암세포에 대한 기능 조절 분석

김상현¹ · 김광연¹ · 유선영¹ · 박슬기¹ · 광인석² · 이문수³ · 방병호⁴ · 전성식⁵ · 안순철^{1*}

(¹부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학 교실, ²신라대학교 생물과학과, ³한국생명공학연구원 생명자원센터, ⁴을지대학교 보건산업대학 식품영양학과, ⁵한국국제대학교 식품과학과)

Piperonaline은 후추나무과에 속하는 필발(*Piper longum* Linn.)의 유도체로서 전립선 암세포에 대한 항암활성이 보고되고 있다. 하지만 실제 암세포 내에서 생물학적 정보를 가진 수 많은 유전자들에 대한 발현이 어떻게 이루어지고 있는지 알려진 바가 없다. 본 연구에 사용된 microarray 분석은 동시에 수 만개 이상의 유전자 발현 양상을 한번에 관찰할 수 있는 기술로서 특정 질병의 유전학적 특성과 기전 연구를 더 광범위하게 연구 할 수 있는 기술이다. 본 연구에서는 전립선 암세포인 PC-3 세포에 piperonaline을 처리하여 cDNA microarray를 실시하였다. 이후, DAVID database를 이용하여 gene ontology의 Biological Process를 분석하여 세포사멸과 세포주기, 세포성장 및 증식에 관련된 유전자들을 우선적으로 분석하였다. 그 결과, 세포주기관련 256개, 세포사멸관련 197개, 세포성장 및 증식관련에 154개의 유전자가 확인 되었다. 이러한 결과는 piperonaline은 전립선 암세포 내에 존재하는 생물학적 신호전달체계에 관련된 유전자 발현을 조절함으로써 항암활성을 나타내 것을 알 수 있었고, 이후 이러한 microarray의 추가적인 분석은 암세포 내 새로운 유전자의 탐색 및 메커니즘을 규명하는데 유용하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다.