



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0123996
(43) 공개일자 2010년11월26일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/01* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0043015

(22) 출원일자 2009년05월18일

심사청구일자 2009년05월18일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

서영록

서울특별시 성북구 안암동 12-31번지 303호

김종석

전주시 완산구 중화산동 코오롱 하늘채아파트 110동 101호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 8 항

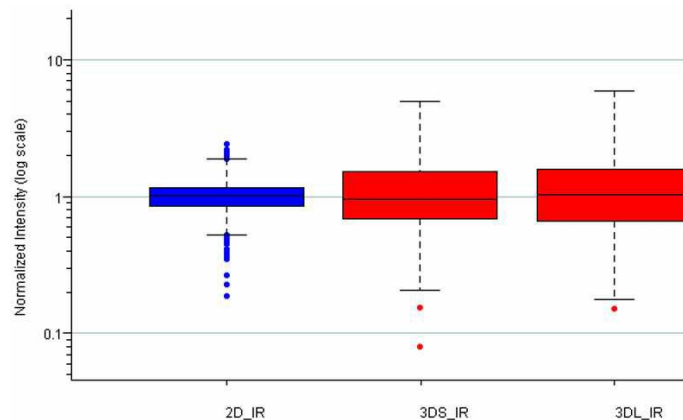
(54) 암 특이적인 유전자의 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 3차원적으로 배양된 암 세포주에 방사선을 조사하여 상기 암 세포주에서 유전자의 발현 변화를 분석함으로써 암 특이적인 유전자를 검출하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 3차원적으로 배양된 암 세포주에 방사선을 조사하여 유전자의 발현 변화를 분석하여 암 특이적인 유전자를 검출하는 방법은 실제 인체와 유사한 암 세포의 미세 환경이 구현되어져 있어서 기존의 2차원적인 세포 배양 시스템에서는 검출하지 못한 암과 관련된 타겟 유전자, 즉 종양 형성 또는 종양 억제 유전자의 검출이 가능하다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

김정민

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 107동
1607호

강진오

서울특별시 서초구 잠원동 한신그린아파트 1501호

현진원

제주시 오등동 진평 반석주택 다동 102호

정석원

서울특별시 동대문구 회기동 109-96번지 101호

권지영

서울특별시 성북구 돈암1동 동부센트레빌 108동
304호

정화진

서울특별시 동대문구 회기동 109-105호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2007-01431

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 원자력연구기반확충사업

연구과제명 3-dimensional tissue culture engineering system에서 중성자 조사에 의해 유발되는
p53 돌연변이 암세포 사멸 관련 작용 메커니즘 연구 및 새로운 target molecules 발굴

기여율

주관기관 경희대학교

연구기간 2007년 04월 01일 ~ 2008년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 암 세포를 3차원적으로 배양하는 단계;
- (b) 상기 3차원적으로 배양된 암 세포주에 방사선을 조사하는 단계; 및
- (c) 상기 암 세포주에서 유전자의 발현 변화를 분석하는 단계를 포함하는 암 특이적인 유전자의 검출 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

단계 (c)는 2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 과발현 또는 저발현된 유전자를 분석하는 것을 특징으로 하는 암 특이적인 유전자의 검출 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

유전자의 발현 변화를 보인 유전자 중에서 종양 형성 유전자 또는 종양 억제 유전자를 선별하는 단계를 추가로 포함하는 암 특이적인 유전자의 검출 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 암 세포는 폐암, 위암, 간암, 갑상선암, 유방암, 피부암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 자궁암, 자궁경부암, 방광암 또는 난소암 세포인 암 특이적인 유전자의 검출 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 암 세포는 폐암 세포인 암 특이적인 유전자의 검출 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 과발현된 유전자는 adenylate cyclase activating polypeptide, caspase recruitment domain family member 10, mitogen-activated protein kinase 14, estrogen receptor 1, protein kinase C beta 1, phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1 alpha, CDC cell division cycle 7, ligase IV DNA ATP-dependent gene, actin gamma 1, actin beta, INAD-like gene, Cysteine-rich angiogenic inducer 61, Connective tissue growth factor; Glucosamine-6-phosphate deaminase 1, Mitogen-activated protein kinase 3 및 E2F transcription factor 4 p107/p130-binding 유전자인 암 특이적인 유전자의 검출 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 저발현된 유전자는 occludin, von hippel-lindau tumor suppressor, tousel-like kinase 1, integrin alpha 2, inhibitor of DNA binding 1, Vav 2 oncogene, Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog, integrin alpha 2(CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor), actin alpha 1, syndecan binding protein(syntenin), 5'-nucleotide ecto (CD73) 및 Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 유전자인 암 특이적인 유전자의 검출 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 방사선은 감마선, X-선, 전자선, 양성자선 또는 중성자선인 암 특이적인 유전자의 검출

방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 3차원적으로 배양된 암 세포주에 방사선을 조사하여 상기 암 세포주에서 유전자의 발현 변화를 분석함으로써 암 특이적인 유전자를 검출하는 방법에만한 것이다.

배경 기술

[0002] 종래의 전통적인 세포 배양 시스템인 2차원적인 단층 배양 방법은 세포를 생성하고 관찰하고 연구함에 있어서 편리하고 신속한 세포증식이 가능하다는 장점이 있는 반면, 실제 인체 내에서의 복잡한 미세 환경 조건과 세포-세포간 상호작용을 충분히 반영하지 못하는 문제점이 있었다. 즉, 2 차원적인 평면 기질에서 자란 세포는 그 형태학적인 측면, 세포-세포간 상호작용, 세포-기질간 상호작용 그리고 분화에 있어서 3차원적인 환경에서 자란 세포와는 상당히 다를 수 있다.

[0003] 암 연구에 있어서도 2차원적인 세포 배양 시스템을 이용한 연구들이 대부분이며, 특히 암 세포주에 대한 방사선의 영향과 관련하여 3차원적인 세포 배양 시스템을 이용한 연구는 보고된 바가 없다. 다양한 항암치료 방법 중에서 방사선을 이용하여 암의 크기를 줄이고 암세포의 사멸을 유도하는 방사선 요법이 많이 사용되고 있다. 하지만 그 치료율은 낮은 편이며 보다 높은 치료효과를 얻기 위해서는 암의 방사선 유도 분자적 기전을 바탕으로 하는 치료법의 개발이 필요하다. 암세포에 대한 방사선 유도 분자적 기전에 대한 연구는 2차원적인 배양 시스템 상에서 광범위하게 연구되어 왔지만 그럼에도 불구하고 2차원적인 배양 시스템에 기초한 연구들은 임상적인 적용에 있어서 한계가 있었고, 암과 관련된 타겟 유전자, 즉 종양 형성 또는 종양 억제 유전자의 발굴에 있어서도 2차원적인 세포 배양 시스템을 사용한 것 뿐이어서 임상적인 적용 효율이 높지 않았다. 따라서 실제 인체와 유사한 미세 환경을 구현하여 임상적으로 유효성 있는 타겟 유전자를 발굴함으로써 암세포에 대한 방사선 유도 분자적 기전을 마련하기 위한 기술의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0004] 본 발명은 인체와 유사한 미세 환경 조건을 갖도록 3차원적으로 배양된 암 세포주에 방사선을 조사하여 방사선 노출에 의해 유도되는 유전자의 발현 변화를 분석하여 암 특이적인 유전자를 검출하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0005] 상기 과제의 해결을 위해 본 발명은 암 세포를 3차원적으로 배양하여 3차원적으로 배양된 암 세포주에 방사선을 조사하고 상기 암 세포주에서 유전자의 발현 변화를 분석하여 암 특이적인 유전자를 검출하는 방법을 제공한다.

효과

[0006] 본 발명에 따른 3차원적으로 배양된 암 세포주에 방사선을 조사하여 유전자의 발현 변화를 분석하여 암 특이적인 유전자를 검출하는 방법은 실제 인체와 유사한 암 세포의 미세 환경이 구현되어져 있어서 기존의 2차원적인 세포 배양 시스템을 이용한 연구에서는 밝혀지지 않은 암과 관련된 타겟 유전자, 즉 종양 형성 또는 종양 억제 유전자의 검출이 가능하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0007] 본 발명은 3차원적으로 배양된 암 세포주에 방사선을 조사하여 유전자의 발현 변화를 분석함으로써 암 특이적인 유전자를 검출하는 방법을 제공한다. 구체적인 암 특이적인 유전자의 검출 방법은 (a) 암 세포를 3차원적으로 배양하는 단계; (b) 상기 3차원적으로 배양된 암 세포주에 방사선을 조사하는 단계; 및 (c) 상기 암 세포주에서 유전자의 발현 변화를 분석하는 단계를 포함한다.

- [0008] 단계 (a)의 암 세포를 3차원적으로 배양하는 방법은 특정한 방법에 한정되지 않으며 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있다. 하기의 실시예에 따르면 본 발명에서는 온도 가역적인 젤라틴 폴리머(TGP)와 RPMI 배지를 사용하여 H1299 인간 폐암 세포를 3차원적으로 배양하였다.
- [0009] 단계 (b)의 "암 세포주"란 유전자 구성이 같은 세포 집단을 의미하는 것으로서, 하나의 암 세포로부터 분열 증식을 한 결과로 생긴 세포 집단을 말한다.
- [0010] 단계 (c)의 유전자의 발현 변화를 분석하는 방법은, 방사선 조사 전의 암 세포주에 비해 방사선 조사 후의 암 세포주에서 과발현 또는 저발현된 유전자를 마이크로어레이에 의해 검출한 후, 유전자의 상동성 검색을 통해 상기 과발현 또는 저발현된 유전자의 정체를 밝혀내는 것을 특징으로 한다. 마이크로어레이 분석은 하기 실시예에서 자세히 설명하고 있으며, 유전자의 상동성 검색은 하기 실시예에서 BioCarta (<http://www.biocarta.com/>), GenMAPP (<http://www.genmapp.org/>), DAVID (<http://apps1.niaid.nih.gov/david/>), 그리고 Medline databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해 실시하였으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0011] 본 발명에서 사용하는 "3차원적인 배양"은 세포가 한 개의 층 이상으로 성장하여 3차원의 입체적인 세포주를 형성하는 것을 의미한다.
- [0012] 본 발명에서 사용하는 "2차원적인 배양"은 세포가 매트릭스 상에서 한 개의 단일층으로 성장하여 평면적인 세포주를 형성하는 것을 의미한다.
- [0013] 본 발명에서 사용하는 "암 특이적인 유전자"란 방사선을 조사하기 전의 암 세포와 비교하여 방사선을 조사한 후의 암 세포에서 차별적으로 과발현 또는 저발현되는 유전자를 지칭한다. 즉 암 세포에서 방사선 자극에 의해 발현 패턴의 변화가 유도되는 유전자를 의미하며, 특정한 암과 관련이 있는 타겟 유전자, 즉 종양 형성 유전자 또는 종양 억제 유전자일 수 있다. 이러한 암 특이적인 유전자를 검출해냄으로써 암 환자에 대한 방사선 치료의 분자적 기전을 확립하여 방사선 치료 효과 증대에 기여할 수 있을 뿐만 아니라, 새로운 종양 형성 또는 종양 억제 유전자를 발굴하여 이들의 발현을 조절함으로써 분자생물학적 수준에서의 암 치료제 또는 치료 방법의 개발을 위한 기반을 마련할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 단계 (c)의 유전자의 발현 변화의 분석은 2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 과발현 또는 저발현된 유전자를 분석하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명자들은 H1299 폐암 세포를 이용해 본 발명에 따라 암 특이적인 유전자를 검출하였다. 폐암 중에서도 가장 흔하게 발생하는 암의 종류인 Non-small cell lung cancer(NSCLC)에서 유래한 p53 종양 억제제의 발현이 결여된 H1299 폐암 세포를 3차원적으로 배양한 후 여기에 감마선을 조사하여, 2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 저발현 또는 과발현된 유전자를 마이크로어레이를 이용해 검출하고 유전자의 상동성 검색을 통해 분석하였다. 그 결과 지금까지 2차원적으로 배양된 암 세포주를 이용한 연구를 통해서서는 밝혀지지 않았던 새로운 암 특이적인 유전자를 발굴할 수 있었다.
- [0016] 2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 과발현된 유전자로는 adenylate cyclase activating polypeptide, caspase recruitment domain family member 10, mitogen-activated protein kinase 14, estrogen receptor 1, protein kinase C beta 1, phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1 alpha, CDC cell division cycle 7, ligase IV DNA ATP-dependent gene, actin gamma 1, actin beta, INAD-like gene, Cysteine-rich angiogenic inducer 61, Connective tissue growth factor; Glucosamine-6-phosphate deaminase 1, Mitogen-activated protein kinase 3 및 E2F transcription factor 4 p107/p130-binding 유전자가 있었다.
- [0017] 2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 저발현된 유전자로는 occludin, von hippel-lindau tumor suppressor, tousel-like kinase 1, integrin alpha 2, inhibitor of DNA binding 1, Vav 2 oncogene, Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog, integrin alpha 2(CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor), actin alpha 1, syndecan binding protein(syntenin), 5'-nucleotide ecto (CD73) 및 Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 유전자가 있었다.
- [0018] 본 발명의 다른 구체예에서, 암 특이적인 유전자의 검출 방법은 유전자의 발현 변화를 보인 유전자 중에서 종양 형성 유전자 또는 종양 억제 유전자를 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 종양 형성 유전자 또는

종양 억제 유전자를 선별하는 방법은 특정한 방법에 한정되지 않으며 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 3차원적으로 배양된 세포주에 방사선을 조사하였을 때 발현 변화를 보인 유전자로부터 단백질을 과발현 시킨 후 상기 단백질을 암 세포주에 처리하여 세포 생존율을 측정함으로써 상기 발현 변화를 보인 유전자가 종양 형성 유전자인지 또는 종양 억제 유전자인지를 선별할 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구체예에서 상기 암 세포는 폐암, 위암, 간암, 갑상선암, 유방암, 피부암, 식도암, 췌장암, 전립선암, 자궁암, 자궁경부암, 방광암 또는 난소암 세포 동일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구체예에서 상기 방사선은 감마선, X-선, 전자선, 양성자선 또는 중성자선 동일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

실시예

[0021] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0022] <실시예 1> H1299 인간 폐암 세포의 3차원 스페로이드 세포주 배양

[0023] 온도 가역적인 젤라틴 폴리머(TGP)는 Melbio(도쿄, 일본)로부터 구입하였다. TGP 제조를 위해, 사용 48시간 전에 10ml의 RPMI 배지를 T25 플라스크 내의 TGP에 첨가하여 4℃로 보관하였다. 세포는 TGP의 $2.4 \sim 5 \times 10^3$ 세포/ml (3차원 배양) 밀도로 뿌렸으며 배양기간은 3주였다. 3차원 배양의 세포배양배지는 최대 성장까지 3~5일마다 교체하였다. 도 1은 3차원 스페로이드 세포주의 성장 패턴을 나타낸다. 첫날에는 단일 세포들만이 관찰되었고, 6일째 세포들은 덩어리를 형성하였다. 9일째 세포들은 100 - 120 μm 폭의 작은 스페로이드를 만들기 시작하였으며, 14일 이후에는 400 μm 폭의 큰 스페로이드가 관찰되었다.

[0024] 도 2는 3차원 스페로이드 세포주의 구조를 나타낸다. (A)는 스페로이드의 구조를 나타내며(charton, D.E., 2000), (B)는 아크리딘 오렌지로 염색한 H1299 스페로이드의 역상형광현미경 사진을 나타내고, (C)는 스페로이드의 내부 구조를 나타낸다. 스페로이드의 외층 세포들은 2차원 배양에서처럼 충분한 산소와 영양분을 얻는다. 스페로이드의 중층 세포들은 산소와 영양분을 불충분하게 공급받아 저산소(hypoxia) 상태가 된다. 스페로이드의 핵 부분은 산소와 영양분을 완전히 빼앗겨 괴사(necrosis) 상태가 된다.

[0025] 대조군으로 사용한 H1299 인간 폐암 세포의 2차원 세포 배양은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. H1299 인간 폐암 세포주는 America Type Culture (Manassas, VA, 미국)로부터 얻었다. H1299 세포는 RPMI-1640 배지(Gibco)에 배양하였고, 37℃, 5% CO₂ 를 포함하는 습한 대기 하에서 10% 우태혈청(fetal bovine serum, Gibco) 과 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)을 첨가하였다.

[0026] <실시예 2> 방사선 조사 및 아크리딘 오렌지 염색을 이용한 고사성 표현형 관찰

[0027] 배양된 3차원 스페로이드 세포주에 감마선 Co-radiation beam (Theratron 780C cobalt unit; Theratronics International Ltd., Kanata, Ontario, Canada)를 10 Gy로 조사하였다.

[0028] 3차원 스페로이드에서 고사성 표현형(apoptotic phenotype)을 아크리딘 오렌지 염색을 이용하여 관찰하였다. 감마선 조사 후에, 각 플레이트의 배지를 0.01M PBS (Gibco)로 세척한 후 PBS는 제거하였다. 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (6.76 μM) 또는 1000 μM 로 가용화된 100 μL 의 미리 준비한 아크리딘 오렌지를 각 슬라이드에 첨가하고, 뚜껑을 교체하기 전 얇은 커버를 세포에 덮고 30분을 기다렸다. 생물체에서의 불필요한 신호를 없애기 위해 15mL PBS를 사용하여 아크리딘 오렌지를 제거하기 위한 마지막 세척을 하였다. 고사성 표현형을 관찰하기 위해 역상형광현미경을 사용하였다.

[0029] 도 3은 방사선 처리하지 않은 대조군과 방사선 처리한 H1299 세포의 3차원 스페로이드의 형광 마이크로그래프를

나타낸다. 방사선에 노출된 지 1일 후에 apoptotic body가 관찰되었다.

[0030] <실시예 3> 마이크로어레이 및 유전자 분석

[0031] 마이크로어레이 실험에 앞서 전체 RNA를 RNAeasy 키트(Quiagen, Valencia, CA, 미국)를 사용하여 정제하였다. RNA를 조절하고 시험하기 위하여 Agilent's Low RNA Input Linear Amplification 키트(Agilent Technology, 미국)을 사용하여 타겟 cRNA 프로브의 합성과 혼성화(hybridization)를 수행하였다. 각 1 μ g의 전체 RNA와 T7 프로모터 프라이머를 혼합하여 65 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 배양하였다. cDNA 마스터 믹스(5X First strand buffer, 0.1M DTT, 10mM dNTP mix, RNase-Out, and MMLV-RT)를 제조하여 반응 혼합기에 넣었다. 샘플은 40 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양하였고, RT와 dsDNA 합성은 65 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 배양하여 종료하였다. 전사 마스터 믹스는 제조자의 프로토콜에 따라 제조하였다(4X 전사 버퍼, 0.1M DTT, NTP mix, 50% PEG, RNase-Out, 무기 피로포스파타아제, T7-RNA 폴리머라아제, 그리고 사이아닌 3/5-CTP). dsDNA의 전사는 dsDNA 반응 샘플에 전사 마스터 믹스를 첨가하여 40 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양함으로써 수행하였다. 증폭되어 표지된 cRNA는 cRNA Cleanup Module (Agilent Technology)에서 정제하였다. 표지된 cRNA 타겟은 ND-1000 분광광도계(NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE)를 사용하여 정량하였다. 표지 효율을 확인한 후에, 10X 차단제와 25X 분열 버퍼를 사용하여 cRNA 분절화(fragmentation)를 수행하였고 60 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 분절된 cRNA는 2X 혼성화 버퍼로 재현탁 하였고 직접 피펫으로 assembled Human Oligo Microarray 8.0K (Digital Genomics Co., Ltd, Seoul, Korea)로 옮겼다. 42 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 가벼운 교반과 함께 혼성화 챔버를 배양함으로써 마이크로어레이에서 표지된 프로브와 타겟 사이에 경쟁적인 혼성화 반응이 일어났다. 비특이적인 결합을 제거하기 위해 혼성화된 마이크로어레이를 다 음과 같이 세척하였다; 2xSSC와 0.1% SDS에서 실온에서 5분, 1xSSC에서 30 $^{\circ}$ C에서 5분, 0.1xSSC에서 30 $^{\circ}$ C에서 5분. 마이크로어레이가 원심탈수되어 스캔될 때까지 암실에서 보관하였다.

[0032] 혼성화 이미지는 GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments, CA)로 분석하였다. 각 지점의 평균 형광 강도를 계산하였고 로컬 백그라운드는 제외하였다. 모든 데이터 표준화와 배수 변화된(fold-changed) 유전자의 선택은 GeneSpring 7.3 (Agilent Technologies, 미국)에 의해 수행하였다. 표준화율의 평균은 표준화된 컨트롤 채널 강도의 평균에 의해 표준화된 신호 채널 강도의 평균을 나눔으로써 계산하였다. 유전자의 상동성 검색 및 분류는 BioCarta (<http://www.biocarta.com/>), GenMAPP (<http://www.genmapp.org/>), DAVID (<http://apps1.niaid.nih.gov/david/>), 그리고 Medline databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 의해 수행된 조사를 기초로 하였다.

[0033] 도 4는 방사선 조사 후 나타나는 유전자 발현 패턴의 상자 그래프(box plot)를 나타낸다. 2차원적으로 배양된 세포(2D_IR)에 비해 3차원적으로 배양된 작은 스페로이드(3DS_IR)와 큰 스페로이드(3DL_IR)의 상자 폭이 더 넓다. 이는 방사선에 의한 유전자 발현 변화 효과가 2차원적인 배양 시스템보다 3차원적인 배양 시스템에서 더 강력함을 보여준다.

[0034] 도 5 내지 도 7은 방사선 조사 후 2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 과발현 또는 저발현된 유전자를 생물학적인 기능에 따라 분류하여 나타낸다.

[0035] 도 5는 focal adhesion에 관여하는 유전자들의 발현 패턴을 나타낸 그림이다. Vav 2 oncogene(VAV2), Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog(RRAS) 및 인테그린 알파 2(ITGA2) 유전자들이 2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 저발현 되었음을 알 수 있다.

[0036] 도 6은 adhesion junction에 관여하는 유전자들의 발현 패턴을 나타낸 그림이다. 액틴 감마 1(ACTG1), 액틴 베타(ACTB) 및 INAD-like(INADL) 유전자들은 2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 과발현 되었으며, 액틴 알파 1(ACTA1) 및 신데칸 결합 단백질(SDCBP) 유전자들은 2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 저발현 되었음을 알 수 있다.

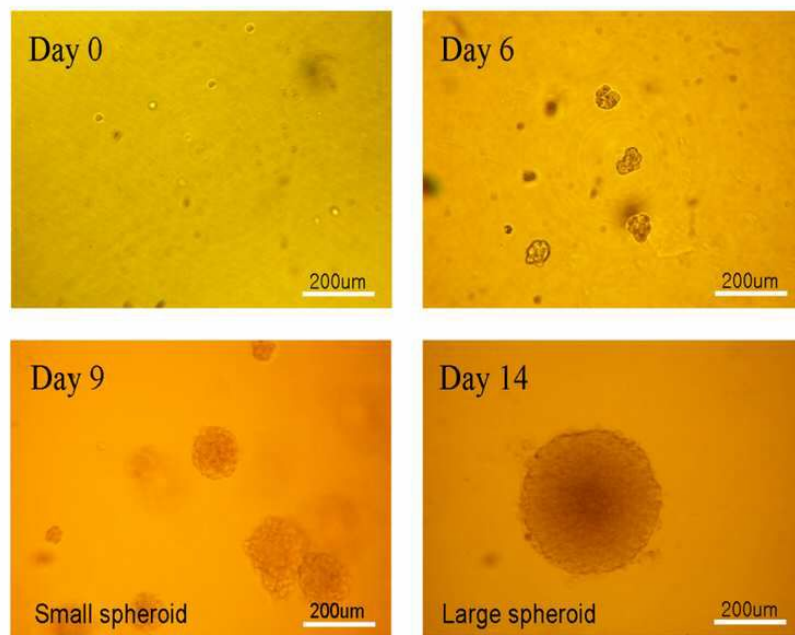
[0037] 도 7은 저산소증(hypoxia)과 관련된 유전자들의 발현 패턴을 나타낸 그림이다. 시스테인-풍부 혈관형성 유도인자 61(CYR61), 결합 조직 성장 인자(CTGF); 글루코사민-6-포스페이트 디아미나제 1(GNPDA1)), 미토겐-활성 단백질 키나아제 3(MAP2K3) 및 E2F 전사 인자 4 p107/p130-바인딩(E2F4) 유전자들은 2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 과발현 되었으며, 5'-뉴클레오타이드 엑토 (NT5E) 및 향신 경성 티로신 키나아제 수용체 타입 2(NTRK2) 유전자들은 2차원적으로 배양된 암 세포주에 비해 3차원적으로 배양된 암 세포주에서 특이적으로 저발현 되었음을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

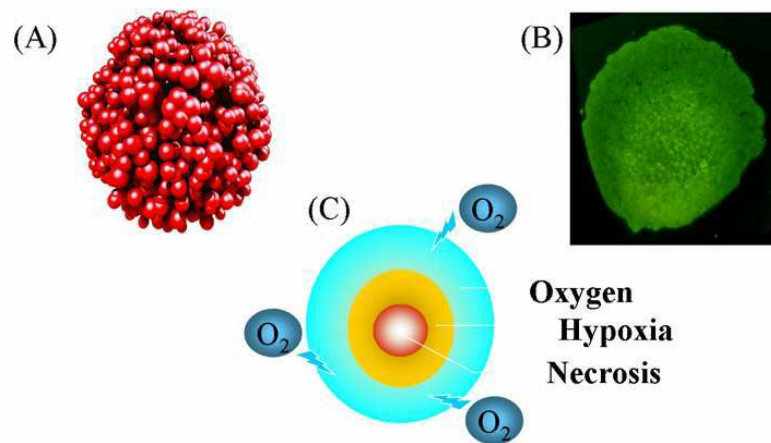
- [0038] 1. 도 1은 인간 폐암 세포 H1299의 3차원 스페로이드 성장 패턴을 나타낸다.
- [0039] 2. 도 2는 3차원 스페로이드 세포주의 구조를 나타낸다. (A)는 스페로이드 구조(charton, D.E., 2000), (B)는 아크리딘 오렌지로 염색한 H1299 스페로이드의 역상형광현미경 사진, (C)는 스페로이드의 내부 구조를 나타낸다.
- [0040] 3. 도 3은 방사선 처리하지 않은 대조군과 방사선 처리한 H1299 세포의 3차원 스페로이드의 형광 마이크로그래프를 나타낸다.
- [0041] 4. 도 4는 도 4는 방사선 조사 후 나타나는 유전자 발현 패턴의 상자그림(box plot)을 나타낸다.
- [0042] 5. 도 5 는 국소 부착(focal adhesion)에 관여하는 유전자들의 방사선 조사에 의한 발현 패턴을 나타낸 그림이다.
- [0043] 6. 도 6은 이음부 부착(adhesion junction)에 관여하는 유전자들의 방사선 조사에 의한 발현 패턴을 나타낸 그림이다.
- [0044] 7. 도 7은 저산소증(hypoxia)과 관련된 유전자들의 방사선 조사에 의한 발현 패턴을 나타낸 그림이다.

도면

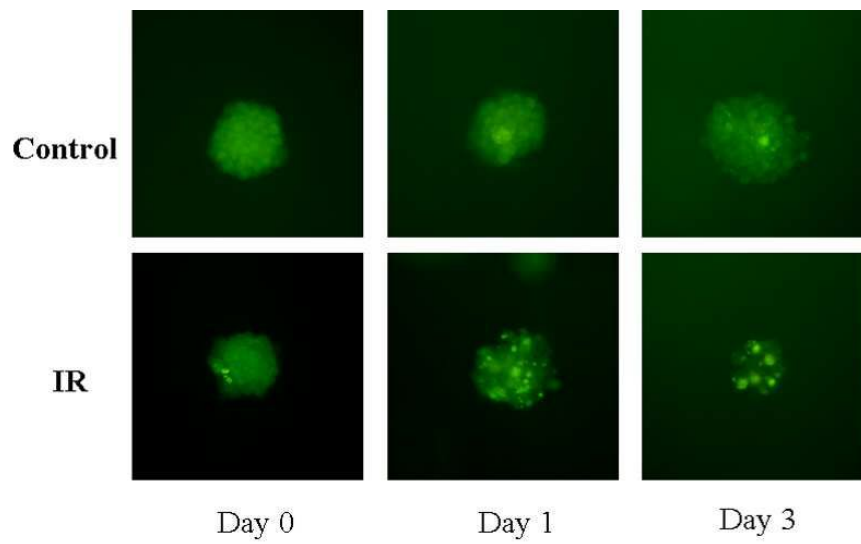
도면1



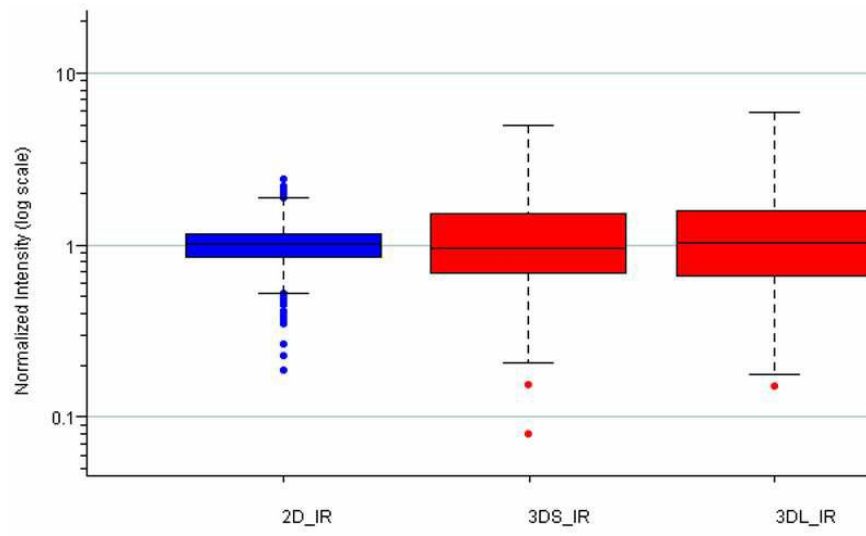
도면2



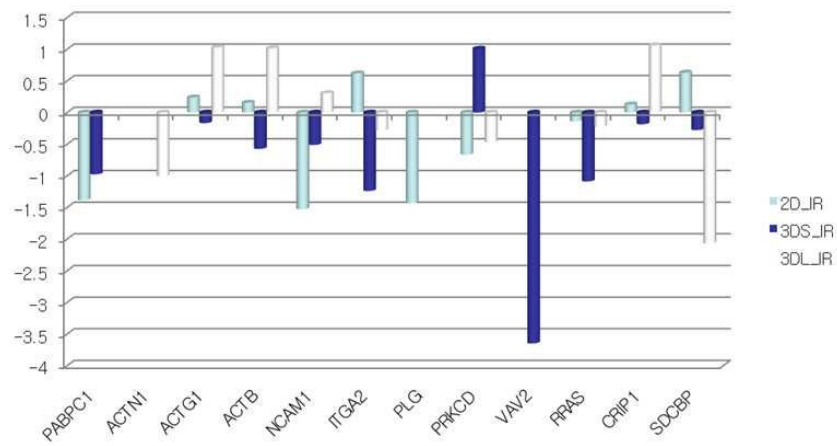
도면3



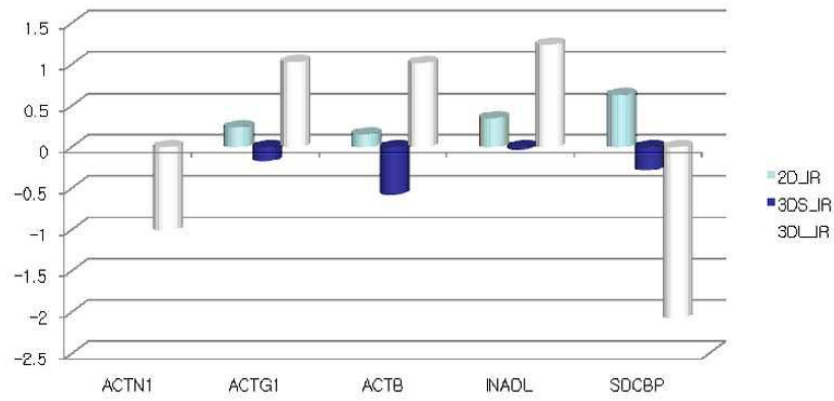
도면4



도면5



도면6



도면7

