

원저

전침이 자연살해세포 활성화에 미치는 유전자 발현 profile에 대한 연구

최기순* · 노삼웅** · 오상덕* · 배현수**
안현중*** · 하윤문*** · 김강호**** · 민병일*^{*****}†

*경희대학교 대학원 동서의학과 ·

경희대학교 한의과대학 생리학교실 · *경희대학교 의과대학 미생물학교실

****경희대학교 한의과대학 예방의학교실 · *****경희대학교 의과대학 생리학교실

Abstract

Genes profile related to modulation of natural killer cell activity induced by electroacupuncture

Choi Gi-soon^{*}, No Sam-woong^{**}, Oh Sang-deog^{*}, Bae Hyun-su^{**},
Ahn Hyun-jong^{***}, Ha Yoon-mun^{***}, Kim Kwang-ho^{****} and Min Byung-il^{*^{*****}}†

^{*}Department of East-West Medicine, Graduate School

^{**}Department of Physiology, College of Oriental Medicine

^{***}Department of Microbiology, College of Medicine

^{****}Department of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine

^{*****}Department of Physiology, College of Medicine, Kyung-Hee University

† All correspondence to Dr. Byung-Il Min, Department of Physiology, College of Medicine, Kyung Hee University

* 본 연구는 한국과학재단 목적기초(No. R01-2000-000-00170-0) 지원으로 수행되었음.

· 접수 : 2002년 10월 14일 · 수정 : 2002년 10월 25일 · 채택 : 2002년 11월 23일

· 교신저자 : 민병일, 서울 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 의과대학 생리학교실

Tel. 02-961-0286 E-mail : mbi@khu.ac.kr

A line of study reported that electroacupuncture(EA) modulate natural killer cell(NK cell) activities. One report suggested that EA enhanced splenic interferon-gamma(IFN- γ), interleukin-2(IL-2), and NK cell activity in Sprague-Dawley rats. Another study suggested that IFN- γ mediates the up-regulation of NK cell activity, and endogenous β -endorphin secretion also play a role in the up-regulation of NK cell activity induced by EA stimulation.

In order to better understand the molecular regulation underlying the activation of NK cell induced by EA, we have utilized cDNA microarray to elucidate how EA alters program of gene expression of spleen in rats. First, we divided three groups, group I was EA group treated with EA in restriction holder, group II was sham group with only holder stress, and last group III was control group with no treatment. We measured NK cell activity after EA stimulation three times for 2 days using ^{51}Cr release assay. Second, Biotin-labeled cDNA probes synthesized from EA group and sham group, were competitively hybridized to the microarray that contained variable genes. Such high-throughput screening has identified a number of EA-responsive gene candidates. Of these, we found that EA induced a subset of genes that functionally could modulatory effects on NK cell activity. Genes(vascular cell adhesion molecule-1, protein-tyrosine kinase, CD94 mRNA) related to boost NK cell activity, were increased by EA. And, genes(protein-tyrosine-phosphatase mRNA, protein-tyrosine phosphatase(SHP-1) mRNA) related to inhibit NK cell activity, were decreased by EA. These EA-responsive genes may provide key insights from which to understand mechanisms of activation of NK cell induced by EA.

Key words : Electroacupuncture, natural killer cell, microarray

I. 서론

1997년 NIH consensus에서 침을 주제로 해서 다음과 같은 글을 발표하였다. "침은 한의학의 중요한 치료수단이며, 2500년 전부터 동아시아에서는 널리 사용되어져 왔다. 최근에는 동양 뿐만 아니라 서양에서도 인기를 얻게 되었으며 침의 효과에 대해서는 많은 과학자들에 의해 연구되어지고 있다. 침은 성인에서 수술 후 또는 화학요법 후의 오심과 구토 그리고 치과수술 후에 나타나는 통증에 대한 효과는 상당하며 납득할만한 통증조절 프로그램이며 대체의학의 큰 줄기이다. 침의 유용한 효과는 중풍 후유증이나 두통, 생리통, 테니스 엘보, 근막통증, 근섬유통, 관절염, 요통, 수근관 터널 증후군 그리고 천식에 적용되고 있다²⁴⁾." 물론 이외에도 최근

근의 잇따른 연구에서 침자극이 면역 반응을 조절한다고 보고하고 있다.^{12),28),29),30),31),32)} Yu Y 등은 침이 면역조절에 영향을 미친다고 보고하였는데 전침이 흰쥐에서 비장의 interferon-gamma(IFN- γ), interleukin-2(IL-2) 그리고 NK cell activity를 증강시킨다고 하였다³²⁾. 이들의 다른 연구에서는 전침이 β -endorphin의 분비를 증강시켜 NK cell activity를 상위조절 한다고 하였다.³¹⁾

오 등은 또한 침자극이 자연살해세포 활성화에 영향을 미치는 기전에 좌측 시상하부가 중요한 역할을 한다고 하였다¹⁾. 또한 전침자극 후에 β -endorphin이 T lymphocyte subgroup의 ratio를 변화시켜 면역기능을 조절한다고 보고도 있었으며¹²⁾, 침자극은 악성종양 환자의 면역기능을 증강시키며³⁶⁾, 수술과 스트레스로 인한 면역저하에 치료 효과가 있다는 보고도 있었다.^{28),29)}

그러나, 지금까지 침자극 후에 NK cell activity

에 영향을 미치는 유전자에 대하여 연구된 바가 없었다. 이에 저자는 동시에 수천가지의 유전자 발현을 확인할 수 있는 microarray 기법을 이용하여 침 자극이 NK cell activity에 미치는 영향에 관한 유전자 분석을 시도하였다.

먼저 ^{51}Cr release assay를 시행하여 전침자극군과 sham군의 NK cell activity를 측정함으로써 전침이 NK cell activity에 어떠한 영향을 미치는가를 살펴본 연후에 어떠한 특이 유전자가 전침에 의해 발현되는가를 확인하기 위하여 Oligonucleotide chip microarray를 실시하였다.

그 결과 전침군의 NK cell activity는 sham군에 비해 유의하게 높았다. 또한, microarray를 시행한 결과 전침군에서 NK cell activity를 증가시키는 mRNA for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), calcium-dependent tyrosine kinase mRNA, Rat mRNA for protein-tyrosine kinase, CD 94(Cd 94) mRNA 등이 sham군에 비하여 증가하였으며, NK cell activity를 억제하는 protein-tyrosine-phosphatase mRNA, protein-tyrosine phosphatase(SHP-1) mRNA 등이 sham군에 비하여 감소하였다. 이 결과는 침자극에 의한 NK cell activity의 변조의 기전을 이해하는데 중요한 단서가 될 것으로 사료된다.

II. 재료 및 방법

1. 동물

Sprague-Dawley계 웅성쥐를 Charles River Korea에서 6~8주령으로 무게는 220~250g를 구입했으며 온도와 습도 그리고 충분한 물과 먹이를 주면서 실험에 사용하였다(12h dark/12h light cy-

cle, $25\pm 2^\circ\text{C}$, $55\pm 10\%$ 습도).

2. 취혈

흰쥐의 우측다리에서 인체의 족양명위경 족삼리(ST 36)²⁾에 상응하는 부위를 취혈하였다.

3. 전침 자극

두 개의 멸균 스텐인레스 침(Length:30mm, diameter:0.25mm, Dong Bang acupuncture Co, Seoul, Korea)을 우측 족삼리에 자침하였다. 전기 자극은 전침 자극기에 의해 시행하였으며(Voltage: 1~5V, frequency 1.5Hz, duration 0.25ms) 전침의 세기는 전압으로서 조절했는데 근육의 수축이 일어나는 최소한의 세기로 잡았다. 실험군은 전침군, sham군, 대조군으로 나누어 전침군은 2일 동안 30분씩 3회 아크릴 홀더에 넣고 전침자극을 주었으며, sham군은 같은 시간동안 홀더에 넣어 홀더스트레스만을 주었으며, 대조군은 아무런 처치를 하지 않았다.

4. NK cell activity 측정 방법

비장의 NK cell activity는 표준 4h- ^{51}Cr release 분석법으로 측정하였다. 간략하게 요약하면 비장을 멸균 방법으로 적출하여 10ml의 배지에 single cell 현탁액을 만들었다. 적혈구를 분리하여 없앤 후에 effector cell의 현탁액을 phosphate-buffered saline(PBS)로 2번 더 씻는다. 적절한 농도로 배지에다 다시 부유시켰다. 방사선 표지를 단 YAC-1 세포인 쥐의 림프종양세포는 target cell로 사용하였다. 적당한 농도로 섞은 100 μl 의 effector cell과 ^{51}Cr 을 표지한 50 μl (2×10^5 cells/ml)의 target cell을 96-well의 U-형 바닥의 microtiter plate에서 배양시켰다. 이때 effector와 target cell을 10:1, 30:1 그리고 100:1로 다양한 비율로 사용하였다. Plate는 4시간 동안 37°C 로 5% CO_2

에 배양한 후 각각의 well에서 수집한 100 μ l의 상청액을 나눠서 5분간 원심분리를 하였다(400 \times g). 51 Cr 방출은 감마 카운터 계측기를 사용하여 측정한다. 또한 이 상청액을 나눠서 배지나 1N HCl에서 배양하여 자발방출과 최고 방출량을 결정하였다. 자발방출은 보통 최고 방출의 8에서 18%에 해당한다. Percent specific lysis는 다음 공식에 의해 얻었다.

Percent specific lysis = [(experimental 51 Cr release-spontaneous 51 Cr release) / (maximum 51 Cr release-spontaneous 51 Cr release \times 100)] NK cell activity는 또한 Lytic Unit(LU)으로 표시하였다. 1LU10는 10%의 specific lysis에 필요한 effector 세포의 숫자인데 결과적으로 total LU10은 effector 세포 10⁶개가 1LU10의 몇 배에 해당하는지를 나타낸다.

5. Oligonucleotide Chip Microarray

1) Total RNA 분리

각 군별로 모아진 spleen cell은 RNaeasy mini kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)을 사용하여 제조사의 protocol에 따라 Total RNA를 분리하였다. 分離된 total RNA는 spectrophotometer(DU 500, Beckman, Inc., USA)로 定量한 후 DEPC 처리 증류수를 이용하여 농도가 2 μ g/ μ l가 되도록 하였다.

2) cDNA 합성

18 μ g의 total RNA가 ds cDNA 합성에 사용되었다. cDNA 합성은 Superscript Choice System for cDNA Synthesis(Invitrogen Life Technologies, USA)를 사용하여 제조사의 protocol대로 시행하였다. 다만 ss cDNA 합성에 사용된 primer는 100 μ M T7-(dT)24 primer(Genotech, Korea)를 1 μ l를 사용하였고, ss cDNA 합성을 위한 배양 온도는 제조사 protocol의 37 $^{\circ}$ C에서 42 $^{\circ}$ C로

바꾸어 사용하였다. 합성된 ds cDNA는 최종적으로 12 μ l의 증류수에 녹였다.

3) Biotin-labeled cRNA 합성

12 μ l의 ds cDNA 중 3.3 μ l가 biotin-labeled cRNA 합성에 사용되었다. Biotin-labeled cRNA 합성은 ENZO BioArray Highyield RNA reanscript Labeling Kit(Affymetrix, USA)를 사용하여 제조사의 protocol에 따라 시행하였다. 합성된 biotin-labeled cRNA은 RNaeasy mini kit을 사용하여 제조사의 protocol대로 cleanup한 후 spectrophotometer로 定量하여 1 μ g/ μ l의 농도가 되도록 하였다.

4) Fragmentation of cRNA

합성된 20 μ g cRNA는 2 μ l의 5X Fragmentation buffer(200mM Tris acetate pH 8.1, 500mM KOAc, 150mM MgOAc)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수로 40 μ l가 되게 하였다. 40 μ l의 반응액은 94 $^{\circ}$ C에서 35분간 배양하여 30~200 base의 조각으로 만들었다.

5) Oligonucleotide Chip Hybridization

cRNA fragment 15 μ g을 12,000 이상의 Rat 유전자와 EST clusters가 탑재되어 있는 GeneChip[®] Rat Genome U64 array(Affymetrix, USA)에 적용하여 hybridization하였다. 일련의 과정은 제조사의 추천대로 standrad format protocol를 따랐다. 150 μ l 2 \times hybridization buffer(200mM MES, 2M [Na⁺], 40mM EDTA, 0.02% Tween 20), 5 μ l 3nM control oligonucleotide B2(Affymetrix, USA), 15 μ l 20 \times eukaryotic hybridization controls (bio B, bio C, bio D, cre 30pM each) (Affymetrix, USA), 3 μ l 10mg/ml herring sperm DNA(Promega, UK), 3 μ l 50mg/ml acetylated BSA(Invitrogen Life Technologies, USA), 30 μ l 0.5 μ g/ μ l fr-

augmented cRNA 혼합액에 DEPC 처리 증류수를 첨가하여 300 μ l의 반응액을 만들었다.

반응액은 99 $^{\circ}$ C 5분, 45 $^{\circ}$ C 5분간 반응 후 15,000 \times g에서 5분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거하였다. Array chip은 septa를 통하여 200 μ l의 1 \times hybridization buffer를 채운 후 rotisserie hybridization oven(Affymetrix, USA)에서 60 rpm, 45 $^{\circ}$ C, 10분간 incubation하였다.

Array chip에서 hybridization buffer를 제거한 후 200 μ l의 반응액을 채우고 Rotisserie hybridization oven에서 60 rpm, 45 $^{\circ}$ C, 16시간 동안 반응시켰다.

6) Oligonucleotide Chip의 staining과 scanning

반응이 종료된 array chip은 GeneChip Fluidics Station(Affymetrix, USA)의 EukGE-WS1 protocol에 따라 진행하였으며 econdary antibody amplification도 수행하였다. washing 및 staining한 후 GeneChip System confocal scanner(Hewlett-Packard, USA)를 이용하여 3 μ m resolution으로 두 번 scan하였다.

7) Sample의 Quality 평가

각 군의 total RNA와 cDNA 및 fragment cRNA는 1 μ g을 1% agarose gel에 전기영동하여 size를 평가하였다. β -actin 및 GAPDH의 3' oligo와 5' oligo의 average Differential expression ratio는 제조사의 권장대로 3 미만인가를 확인하였다.

6. Data 처리

NK cell activity 측정 결과 data는 mean \pm SEM (standard error mean)로 표시하였고 결과의 유의성 평가는 SPSS 10.0 for windows(SPSS, Inc.)를 이용하여 Mann Whitney U-test를 實施하였다.

Array chip의 scan data는 GeneChip 3.1 software(Affymetrix, USA)를 이용하여 분석하였다. Hybridization의 완전성은 control oligonucleotide B2, bio B, bio C, bio D, cre의 signal을 비교함으로써 평가하였다. 사용된 array chip에는 모든 probe oligonucleotide에 대하여 mismatch probe가 인접해서 탑재되어 있어 positive match에 대하여 상대적으로 mismatch가 큰 경우는 data에서 제거하였다.

각 유전자의 발현량은 signal intensity의 평균값으로 normalization하여 average differential expression(AD)를 구한 후 GAPDH, β -actin 등 housekeep gene로 구성된 internal control과 spike control들의 AD value에 대한 상대치를 이용하여 비교함으로써 발현량의 차이가 있는 유전자를 구분하였다.

발현량의 비교는 전침군을 기준으로 sham군에서의 발현량의 비교를 실시하였다. 하나의 유전자당 여러 개의 oligonucleotide가 적용되어 있으므로 각 oligonucleotide의 hybridization intensity의 평균값으로 비교를 하였으며 발현량의 차이를 확인하는 기준은 기본적으로 제조사의 추천대로 ± 2 이상으로 하였다. Oligomucloetide microarray의 각 군의 signal value간의 선형회귀 분석에는 GraphicPad Prizm 3.02(GraphicPad software, Inc.)를 이용하였다.

III. 결 과

1. 전침 자극 후 NK cell activity의 변화

2일간 총 3회 전침자극 후 NK cell activity는 정상대조군이 5.59 \pm 0.59이었고, sham 자극군 9.21

± 0.57 이었으며 전침자극군은 13.21 ± 0.52 이었다. Sham 자극군은 정상대조군과 비교해 통계적으로 유의성이 있었으며 전침자극군은 나머지 두 군과 비교해 모두 통계적인 유의성을 보였다<Fig 1>.

2. Oligonucleotide chip microarray

1) 발현량의 차이를 보인 유전자

각 유전자의 발현량을 signal intensity의 평균값으로 normalization하여 average differential expression(AD)를 구한 후 GAPDH 등 housekeeping gene로 구성된 internal control과 spike control들의 AD value에 대한 상대치를 이용하여 비교하였다. GAPDH의 전침군이나 sham군에서 일정하였다.

외곽의 하얀 점으로 이루어진 사각형 경계선과 중앙의 흰색 십자가 문양은 control oligonucleotide B2가 hybridization되어서 만들어낸 positive

control로 hybridization의 완전성을 확인하기 위한 것이다. 두 개의 이미지 모두에서 선명한 표식을 확인할 수 있었다<Fig 2, 3>.

Microarray scan 결과를 log-log scale의 scatter plot으로 표시하면 <Fig 4>과 같다.

Fig. 2. Scan image of each oligonucleotide chip.

Blur square image shows hybridization of spike control added to check the efficiency of hybridization. All array chip was passed in positive and negative control test.

Fig. 1. NK cell activity after EA in normal rats.

All parameters are expressed as Lytic Unit, which are represented by the LU10. Symbols represent the following :

- normal control group,
- ▨ sham group,
- ⊗ electroacupuncture(EA)-group.

A star above the parameter means the significance of difference between normal control group and sham group($p < 0.05$).

Two stars mean the significance of differences between EA group and other groups($p < 0.05$).

Fig. 3. Scan image of each oligonucleotide chip.

Blur square image shows hybridization of spike control added to check the efficiency of hybridization. All array chip was passed in positive and negative control test.

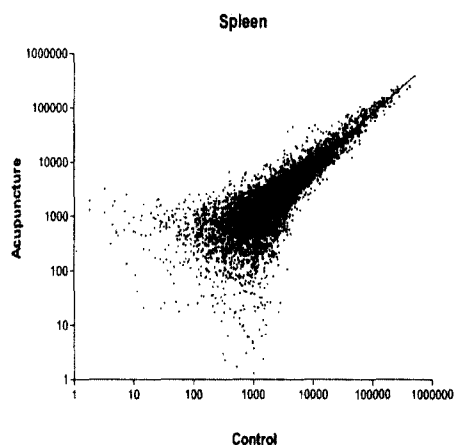


Fig. 4. Scatter plot of signal value means hybridization intensity in log-log scale

(A) Comparison between EA and sham group

All signal value means AD, which was normalized with average signal value.

전침군에서 sham군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 총 154종으로 이중 30종의 유전자는 발현이 감소하였고, 124종의 유전자는 발현이 증가하였다.

NK cell activity와 관련된 유전자를 검색한 결과는 <Table 1>과 같다. 전침군에서 NK cell activity를 증가시키는 mRNA for vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), calcium-dependent tyrosine kinase mRNA, Rat mRNA for protein-tyrosine kinase, CD 94 mRNA 등이 전침군에서 증가하였으며, NK cell activity을 억제하는 protein-tyrosine-phosphatase mRNA, protein-tyrosine phosphatase(SHP-1) mRNA 등이 감소하였다.

항산화 효과를 나타내는 Cu, Zn superoxide dismutase mRNA, glutathione S-transferase Yc1 subunit, heme oxygenase gene이 전침군에 의하여 증가하였다<Table 2>.

ADP-ribosylation factor 1 mRNA, ADP-ribosylation factor 4 mRNA가 전침군에서 증가하

Table 1. The genes which significantly differentially expressed in sham and EA Group(NK cell activity related genes)

Gene Name	Fold*	ID#
Rattus norvegicus protein-tyrosine-phosphatase mRNA	-2	M33962
Rattus norvegicus protein-tyrosine phosphatase (SHP-1) mRNA	-1.6	U77038
R.norvegicus mRNA for vascular cell adhesion molecule(VCAM-1)	3.1	X63722
Rat mRNA for protein-tyrosine kinase	2.1	X58631
Rattus norvegicus CD 94 mRNA	2.0	AF009133

* Fold means ratio of hybridization intensity. The genes with negative value are abundant in sham group, while positive value are abundant in EA group.

ID indicates the accession number of GenBank (NCBI).

Table 2. The genes which significantly differentially expressed in sham and EA Group(antioxidant enzyme related genes)

Gene Name	Fold*	ID#
ADP-ribosylation factor 1 mRNA	3.1	L12380
ADP-ribosylation factor 4 mRNA	2.1	L12383

* Fold means ratio of hybridization intensity. The genes with negative value are abundant in sham group, while positive value are abundant in EA group.

ID indicates the accession number of GenBank (NCBI).

였다<Table 3>. ADP-ribosylation factors (ARFs)는 20 kDa의 GTP-binding proteins이며 the.ras

Table 3. The genes which significantly differentially expressed in sham and EA Group (membrane traffic related genes)

Gene Name	Fold*	ID#
RATSODCZL Rat Cu, Zn superoxide dismutase mRNA, complete cds	2.6	M25157
glutathione S-transferase Yc1 subunit [rats, fetal liver, mRNA, 1052 nt]	2.6	S72505
Rat heme oxygenase gene, complete cds	2.0	J02722

* Fold means ratio of hybridization intensity. The genes with negative value are abundant in sham group, while positive value are abundant in EA group.
ID indicates the accession number of GenBank (NCBI).

superfamily의 subgroup이다. ARFs는 신호전달체 계와 phospholipase D을 activation시키는 것으로 알려져 있다.

IV. 고 찰

2일간의 3번의 전침자극은 sham군에 비하여 NK cell activity의 증가를 보였다. 이것은 Yu Y, 오 등의 결과와 일치함을 나타냈다.^{1),31),32)} Yu Y 등은 이러한 전침의 NK cell activity에 영향을 미치는 것에는 INF- γ , IL-2, 그리고 β -endorphin 등이 관여한다고 보고하였다.³²⁾

전침자극은 전침군의 비장 cell을 모아서 total RNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후 다시 biotin으로 labeling하면서 cRNA를 합성하여 oligonucleotide chip microarray에 hybridization한 결과 전침군에서 sham군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자

는 총 154종으로 이중 30종의 유전자는 발현이 감소하였고, 124종의 유전자는 발현이 증가하였다. 각각의 Oligonucleotide chip microarray를 scan하여 얻은 signal value 즉 hybridization intensity를 scatter plot으로 표현하고 선형회귀 분석을 시행한 결과 대조군과 억제군, 대조군과 실험군, 억제군과 대조군의 r^2 score는 모두 0.95 ± 0.05 이내를 만족시킴으로써 data의 유용성은 충분한 것으로 사료된다.

전침군에서 sham군에 비하여 발현량의 변화를 보인 유전자들을 살펴보면, NK cell activity에 관하여서는 protein-tyrosine-phosphatase mRNA, protein-tyrosine phosphatase(SHP-1) mRNA는 전침군에서 sham군에 비하여 감소하였으며, VCAM-1, Rat mRNA for protein-tyrosine kinase, CD 94 mRNA이 전침군에서 sham군에 비하여 증가하였다.

자연살해세포는 receptors에 의해 positive and negative signals을 받아 cytotoxic activity를 보인다. NK cell receptor는 target cell의 histocompatibility complex(MHC) class I의 inhibitory or activatory molecules와 결합한다. 그리하여 human killer inhibitory receptors 중 immunoglobulin superfamily나 another family of related Ig-like receptors는 특이하게 다른 human leukocyte antigen(HLA) class I allotypes와 결합하여 NK cell mediated cytotoxicity를 억제한다.²¹⁾²³⁾ 반대로 자연살해세포 inhibitory receptors와 유사한 molecule들은 NK cell activity를 촉진시키는 역할을 하기도한다.¹⁴⁾²⁶⁾ CD 94는 70 kD의 disulfide bonded dimeric protein으로 자연살해세포와 일부 T 세포에서 나타나는 것으로³⁾, CD 94 C-type lectin NK cell receptor는 특이한 members of the NKG 2 family와 공유하여 다른 역할을 수행한다⁵⁾. CD 94 / NKG 2A는 SHP tyrosine phosphatases와 결합하여 tyrosine-based inhi-

bitory motifs(ITIM)을 가진 NKG2A subunit을 통하여 inhibitory receptor로 작용한다.^{9),10,25)} 이와는 반대로 CD94가 NKG2A는 유사하지만 ITIMs를 가지지 않은 NKG2C protein과 결합하면 DAP-12와 연결되어 triggering receptor로 작용한다.^{8),20)} CD94가 cell mediated cytotoxicity를 증가시키는 경우는 activation signaling pathway에 의해 세포내 protein tyrosine kinases(PTK), phospholipase C, and phosphatidylinositol 3-kinase를 활성화시킨다고 알려져 있다.⁵⁾ 전침자극에 의하여 microarray 결과 CD94 mRNA가 증가하였으며, ⁵¹Cr release assay를 통하여 NK cell activity이 증가한 것을 보아 전침자극으로 CD94/NKG2C receptor에 의해 NK cell activity이 증가한 것으로 여겨진다.

세포내에서는 두 종류의 PTKs(the Src and Syk/Zap-70 families)가 immunoreceptor-mediated signal transduction에 관여하는 것을 알려져 있다.¹¹⁾¹⁵⁾ 여러 연구에 의하면 Src-related enzymes이 immunoreceptor tyrosine-based activation motif(ITAMs)에 있는 two conserved tyrosine을 인산화함으로써 immunoreceptor signaling을 개시하는 것으로 알려져 있다. 이러한 인산화는 Syk/Zap-70-related PTKs를 결합하고 증폭하는 작용을 한다. Src and Syk/Zap family kinases는 같이 downstream effectors(phospholipase C(PLC)-, the guanine nucleotide exchange factor Vav, phosphatidylinositol (PI) 3' kinase, and Ras)를 활성화시킨다. 이러한 downstream effectors는 세포내 구조물을 재배치하고, 전사를 활성화시켜 마지막으로 면역반응을 유도하게 된다.²⁷⁾

이와는 반대로 negative regulators로는 SHP-1, SHP-2, PEP, CD45 and HePTP, the Src homology 2 domain-containing inositol 5'-ph-

osphatase(SHIP), and the protein tyrosine kinase Csk같은 protein tyrosine phosphatases (PTPs)들이 있다. 아직 완전히 이들에 대한 기전이 규명되지는 않았지만, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs(ITIMs)을 가지고 있는 killer inhibitory receptors(KIRs) and FcRIIB 같은 inhibitory receptors 통하여 SHP-1, SHP-2, and SHIP이 모이는 것으로 알려져 있다.^{4),17),19)}

Protein tyrosine phosphatase 중 SHP-1은 killer cell Ig-like receptors(KIRs)를 통하여 자연살해세포의 활성을 억제하는 것으로 밝혀졌다.^{6),7)}

본 연구진의 실험 결과 전침자극에 의해 protein-tyrosine kinase가 증가하고, protein-tyrosine-phosphatase, SHP-1이 감소한 것으로 나타났다.

이것은 전침에 의해 protein-tyrosine kinase가 증가하고, NK cell activity을 억제하는 protein-tyrosine-phosphatase 중 SHP-1 감소한 것으로 보아 activation signaling pathway가 이루어진 것을 알 수 있으며, <Fig 1>에서 나타난 것과 같이 전침에 의해 NK cell activity이 sham군에 비하여 증가한 것을 뒷받침 하는 증거로 여겨진다.

또한, VCAM-1은 내피세포의 표면에 cytokine에 의해 발현되는 물질로 림프구가 모이는데 중요한 역할을 하는 물질이다, VCAM-1은 Interferon에 의해 증가하는 것으로 알려져 있는데, INF- γ 은 자연살해세포에서 분비하는 중요한 cytokine으로 INF- γ 는 TNF로 유도된 VCAM-1의 전사와 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다.^{18),22)} VCAM-1의 증가는 활성화된 자연살해세포에서 분비되는 INF- γ 와 관련된 것으로 추정된다. 전침에 의한 자연살해세포의 활성의 변조에 관하여 추정되는 기전은 <Fig 5>와 같다.

이외에도 전침에 의하여 항산화 작용과 관련되어 Cu/Zn superoxide dismutase, glutathione S-

transferases(GST) YC1의 발현이 증가하였다. Cu/Zn superoxide dismutase(SOD)는 catalase와 함께 중요한 antioxidant enzyme(AOE)으로 노화가 진행될수록 AOE가 줄어드는 것으로 나타나고 있다.

SOD는 superoxide ion(O⁻)를 NO와 결합함으로써 peroxynitrite로 바꾸는 것을 촉진하여, 산화작용에 의하여 세포가 상처를 입는 것을 막는 것으로 알려져 있다.³⁴⁾

또한, 전침 자극에 의하여 GST YC1도 증가하였는데, GST는 glutathione과 세포 내외적으로 독소를 발생하는 carcinogenic compound와 결합함으로써 세포방어를 담당하는 isoenzyme으로 YC1은 GST의 subunit의 하나이다.³⁵⁾

Heme oxygenase는 skin fibroblasts에서 UVA(320~380nm) radiation, hydrogen peroxide와 sodium arsenite로 유도되는 32 kDa의 protein이다. Heme oxygenase는 oxidant stress에 대하여 중요한 cellular defense mechanism을 구성하는 역할을 하는 것을 알려져 있다.⁴⁰⁾ 이러한 유전자들의 발현은 전침을 항산화 작용에 응용할 수 있는 좋은 근거가 될 것으로 생각된다.

ADP-ribosylation factors(ARFs)는 20 kDa의 GTP-binding proteins이며 the ras superfamily의 subgroup이다. 처음으로 발견된 것은 Initially identified through in vitro studies as the heterotrimeric G proteins the cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation의 cofactors로 알려졌다. ARFs는 신호전달체제와 phospholipase D을 activation시키는 것으로 알려져 있다.³⁶⁾

ARFs는 모든 eukaryotic cells에서 발견되며, mammalian cells에서는, 여섯개의 다른 ARF proteins가 발견되었으며, 사람에게서는 단지 다섯개의 transcripts(ARF1, 3, 4, 5, 6)가 발견되었다.^{36),37)} Amino acid sequence, protein size, phyloge-

netic analysis을 기준으로 세 그룹으로 나눈다: class I(ARF 1, ARF 2, ARF 3), class II(ARF 4, ARF 5), class III(ARF 6)³⁷⁾. Class I ARF gene 들은 gene structure에서 많은 유사점을 갖고 있다.³⁸⁾ Class I gene들은 guanine-nucleotide binding이 같은 위치에 있다.

이전의 연구에서 the class II ARFs은 class I ARFs와는 introns에 의해 다른 구조를 갖고 있다.³⁹⁾ 전침자극에 의해 ARF genes의 발현이 증가한 것은 전침이 자연살해세포 이외에도 다른 림프구의 활성화에도 관여하는 것을 시사하는 것으로 여겨진다.

본 연구에서는 전침자극 sham자극에 비하여 NK cell activity의 증가를 나타내었으며, microarray 결과 NK cell activity의 증가와 관련하여서는 CD 94, protein-tyrosine kinase, VCAM-1 mRNA가 전침에 의해 증가되었으며, NK cell activity의 억제와 관련된 protein tyrosine phosphatase, SH P-1 mRNA가 감소되었다.

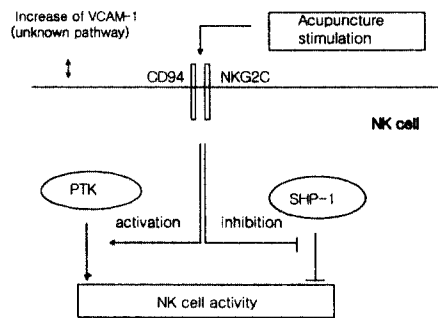


Fig. 5. Schematic diagram of modulation of NK cell activity induced by EA

PTK : protein tyrosine kinase, SHP-1 : the Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase -1, → : activation, ⊥ : inhibition

V. 결 론

최근에 잇달아 침자극은 면역작용을 조절한다는 보고가 있었다. 침자극은 NK cell activity에 영향을 미치며, INF- γ 와 β -endorphin이 관여한다고 하였다. 그러나, 침자극에 의한 NK cell activity의 변조에 관한 유전자의 발현상을 규명한 연구는 없었다. 따라서 본 연구진은 ^{51}Cr release assay를 실시하여 NK cell activity를 측정 한 후, microarray기법을 이용하여 유전자 분석을 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 2일간 3번의 전침 자극은 홀더스트레스만을 준 sham 자극에 비하여 NK cell activity의 유의한 증가를 보였다.

2. Oligonucleotide chip microarray 결과 전침 자극은 NK cell activity의 증가와 관련된 CD 94, protein-tyrosine kinase, VCAM-1 mRNA를 증가시켰으며, NK cell activity의 억제와 관련된 protein tyrosine phosphatase, SHP-1을 감소시켰다.

이상의 결과는 전침자극에 의한 NK cell activity의 변조의 기전을 규명하는데 중요한 단서를 제공한 것을 사료된다.

VI. 참고문헌

1. 오상덕, 최기순, 한재복, 배현수, 조영욱, 윤연숙, 이원규, 안현중, 민병일. 외측 시상하부 파괴가 전침 유도 NK cell activity에 미치는 영향.

- 대한침구학회지 2002 ; 19(2) : 221-230.
2. 전국한의과대학교 침구경혈학교실, 침구학(상), 서울 : 집문당, 1988 ; 382-383.
 3. Aramburu J, Balboa MA, Izquierdo M, Lopez-Botet MJ. A novel functional cell surface dimer(Kp43) expressed by natural killer cells and gamma/delta TCR+ T lymphocytes. II. Modulation of natural killer cytotoxicity by anti-Kp 43 monoclonal antibody. Immunol 1991 ; 147(2) : 714-721.
 4. Bolland S, Ravetch JV. Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors. Adv. Immunol. 1999 ; 72 : 149-177.
 5. Brumbaugh KM, Perez-Villar JJ, Dick CJ, Schoon RA, Lopez-Botet M, Leibson PJ. Clonotypic differences in signaling from CD 94(kp43) on NK cells lead to divergent cellular responses. J Immunol 1996 ; 157(7) : 2804-2812.
 6. Burshtyn DN, Scharenberg AM, Wagtmann N, Rajagopalan S, Berrada K, Yi T, Kinet JP, Long EO. Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. Immunity 1996 ; 4(1) : 77-85.
 7. Burshtyn DN, Yang W, Yi T, Long EO. A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1. J Biol Chem 1997 ; 272(20) : 13066-13072.
 8. Cantoni C, Biassoni R, Pende D, Sivori S, Accame L, Pareti L, Semenzato G, Moretta L, Moretta A, Bottino C. The activating form of CD 94 receptor complex : CD 94 covalently associates with the Kp39 pro-

- tein that represents the product of the NKG-2C gene. *Eur. J. Immunol.* 1998 ; 28 : 327-338.
9. Carretero M, Cantoni C, Bellon T., Bottino C, Biassoni R, Rodriguez, A, Perez-Villar JJ, Moretta L, Moretta A, Lopez-Botet M. The CD94 and NKG2 -A C type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 1997 ; 27 : 563-567
 10. Carretero M, Palmieri G, Llano M, Tulio V, Santoni A, Geraghty DE, Lopez-Botet M. Specific engagement of the CD94/NKG2A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2A : evidence for receptor function in heterologous transfectants. *Eur. J. Immunol.* 1998 ; 28 : 1280-1291.
 11. Chan AC, Shaw AS. Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr. Opin. Immunol.* 1996 ; 8 : 394-401.
 12. Chen WF, Chen L, Lu XW, Chen JJ. Effect of beta-endorphin on plasma sialic acid level in rats and the relationship with the immune function. *Sheng Li Xue Bao* 1999 ; 51 : 253-257.
 14. Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, Hsu ML. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997 ; 7 : 273-282.
 15. Chow, L. M., and A. Veillette. The Src and Csk families of tyrosine protein kinases in hemopoietic cells. *Semin Immunol* 1995 ; 7 : 207-226.
 16. Daeron, M. Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* 1997 ; 15 : 203-234.
 17. Daeron, M. Building up the family of IT IM-bearing negative coreceptors. *Immunol. Lett* 1996 ; 54 : 73-76.
 18. De Caterina R, Bourcier T, Laufs U, La Fata V, Lazzerini G, Neish AS, Libby P, Liao JK. Induction of endothelial-leukocyte interaction by interferon-gamma requires coactivation of nuclear factor-kappa B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 ; 21 (2) : 227-232.
 19. Denu JM, Stuckey JA, Saper MA, Dixon JE. Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* 1996 ; 87(3) : 361-364.
 20. Houchins JP, Lanier LL, Niemi EC, Phillips JH, Ryan JC. Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2A and activated by NKG2-C. *J Immunol* 1997 ; 158 (8) : 3603-3609.
 21. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998 ; 16 : 359-393.
 22. Lechleitner S, Gille J, Johnson DR, Petzelbauer P.J. Interferon enhances tumor necrosis factor-induced vascular cell adhesion molecule 1(CD106) expression in human endothelial cells by an interferon-related factor 1-dependent pathway. *Exp Med* 1998 ; 187(12) : 2023-2030.
 23. Moretta, A., Moretta, L. HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 1997 ; 9 : 694-701.

24. NIH consensus statement, 1997.
25. Perez-Villar JJ, Melero I, Rodriguez A, Carretero M, Aramburu J, Sivori S, Orengo AM, Moretta A, Lopez-Botet M.J. Functional ambivalence of the Kp43(CD94) NK cell-associated surface antigen. *Immunol* 1995 ; 154 (11) : 5779-5788.
26. Samaridis, J., Colonna, M. Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells : structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur. J. Immunol.* 1997 ; 27 : 660-665.
27. Sancho D, Nieto M, Llano M, Rodriguez-Fernandez JL, Tejedor R, Avraham S, Cabanas C, Lopez-Botet M, Sanchez-Madrid F. The tyrosine kinase PYK-2/RAFTK regulates natural killer(NK) cell cytotoxic response, and is translocated and activated upon specific target cell recognition and killing. *J Cell Biol* 2000 ; 149(6) : 1249-1262.
28. Vasilenko AM, Derevnina NA, Ponomarenko TM, Veskova TK, Ukrainets AM. Electroacupuncture in the prevention of the immunosuppressive action of surgical stress. *Anesteziol Reanimatol* 1989 ; 3 : 56-59.
29. Vasilenko AM, Kirilina EA, Sarybaeva DV. Prevention and correction of stress-induced immunodeficiency by atrial electroacupuncture. *Patol Fiziol Eksp Ter* 1989 ; 3 : 21-24.
30. Wu B, Zhou RX, Zhou MS. Effect of acupuncture on interleukin-2 level and NK cell immunoactivity of peripheral blood of malignant tumor patients. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1994 ; 14(9) : 537-539.
31. Yu Y, Kasahara T, Sato T, Asano K, Yu G, Fang J, Guo S, Sahara M, Hisamitsu T. Role of endogenous interferon-gamma on the enhancement of splenic NK cell activity by electroacupuncture stimulation in mice. *J Neuroimmunol* 1998 ; 1(90) : 176-186.
32. Yu Y, Kasahara T, Sato T, Guo SY, Liu Ya, Asano K, Hisamitsu T. Enhancement of splenic interferon-gamma, interleukin-2, and NK cyto-toxicity by S36 acupoint acupuncture in F344 rats. *Jpn J Physiol* 1997 ; 47 : 173-178.
33. Wu B, Zhou RX, Zhou MS. Effect of acupuncture on interleukin-2 level and NK cell immunoactivity of peripheral blood of malignant tumor patients. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1994 ; 14(9) : 537-539.
34. Sohal RS, Agarwal A, Agarwal S, Orr WC. Simultaneous over-expression of copper- and zinc-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 1995 ; 270 (26) : 15671-15677.
35. Salinas AE, Wong MG, Glutathione S-transferases-a review, *Current Medicinal Chemistry*, 1999 ; 6(4) : 279-309.
36. Boman AL, Kahn RA. Arf proteins : the membrane traffic police? *Trends Biochem. Sci.* 1995 ; 20 : 147-150.
37. Tsuchiya M, Price SR, Tsai SC, Moss J,

- Vaulhan M. Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 1991 ; 266 : 2772-2777.
38. Lee CM, Haun RS, Tsai S-C, Moss J, Vaughan M. Characterization of the human gene encoding ADP-ribosylation factor 1, a guanine nucleotidebinding activator of cholera toxin. *J. Biol. Chem.* 1992 ; 267 : 9028-9034.
39. Haun RS, Serventi IM, Tsai S-C, Lee CM, Cavanaugh E, Moss J, Vaughan M, Characterization of the family of mammalian genes encoding ADP-ribosylation factors. In : Poirier GG, Moreau P. Editors, ADP-ribosylation reactions Springer, New York, 1992 ; 393-396.
40. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 ; 86(1) : 99-103.