

원저

곽향정기산 약침액이 유해산소로 손상된 Glioblastoma 세포주의 유전자발현에 미치는 영향

이홍석* · 인창식** · 고흥균*

*경희대학교 한의과대학 침구학교실
**포천중문의과대학 차바이오메디컬센터 침구과

Abstract

Microarray Analysis of Gene Expression in Glioblastoma Cells Treated with *Gwakhyangjeonggis* Herbal Acupuncture Solution

Lee Hong-seok*, Yin Chang-shik** and Koh Hyeong-gyun*

*Department of Acupuncture, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University
**Department of Acupuncture, CHA Biomedical Center, College of Medicine, Pochon CHA University

Objectives : Neurological disorders have been one of main therapeutic targets of acupuncture. The present study investigated the protective effects of Gwakhyangjeonggis herbal acupuncture solution (GHAS).

Methods : We performed 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in glioblastoma cells, and did microarray analysis with cells exposed to reactive oxygen species (ROS) of hydrogen peroxide by 8.0 k Human cDNA, with cut-off level of 2-fold changes in gene expression.

Results : MTT assay showed protective effect of GHAS on the glioblastoma cells exposed to hydrogen peroxide. When glioblastoma cells were exposed to hydrogen peroxide, 16 genes were upregulated. When the cells were pretreated with GHAS before exposure to hydrogen peroxide, 22 genes were upregulated. Most of the genes upregulated by hydrogen peroxide stimulation were reversed to downregulation by GHAS.

· 접수 : 2005년 10월 13일 · 수정 : 2005년 11월 18일 · 채택 : 2005년 11월 18일
· 교신저자 : 고흥균, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한방병원 침구과
Tel. 02-958-9194 E-mail : koh5795@chollian.net

Conclusion : The gene expression changes observed in the present study are supposed to be related to the protective molecular mechanism of GHAS in the glioblastoma cells exposed to ROS stress.

Key words : Gwakhyangjeonggisang herbal acupuncture solution (GHAS), Glioblastoma, Reactive oxygen species, Microarray, Gene expression

I. 緒 論

약침요법은 최근 그 임상적 적용 범위가 더욱 넓어지고 있으며 여러 한약물의 약침제제가 적극적으로 연구되고 있다. 곽향정기산은 본래 ‘傷寒陰證如不分表裏證’에 사용하는 처방으로 먼저 ‘導引經絡’함으로써 ‘不致變動’하게 하는 용도로 사용하게 되는데¹⁾, 중풍 초기에도 이와 같은 맥락에서 먼저 調氣하여 變證이 생기지 않도록 經絡을 導引하려는 목적으로 많이 응용되고 있다. 곽향정기산과 관련하여 기존에는 위장관기능 및 알레르기과 관련한 보고²⁾, 위장관기능에 관한 실험연구³⁾, 위장관 기능과 관련한 소음인방과의 비교연구⁴⁾, 가미방의 비만관련 연구⁵⁾ 등이 보고된 바 있다.

수퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical, O₂⁻) 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical, HO·), 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂), 일중항산소(singlet oxygen, ¹O₂)와 같은 활성산소(reactive oxygen)는 생체에 산소독성을 일으킬 수 있다. 이들 유해산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 호흡기질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.⁶⁻⁷⁾

신경계의 병증은 평균수명의 증가와 함께 그 발병이 더욱 증가하고 있으며 또한 회복된 후에도 비가역적 신경학적 결손을 남기는 경우가 많아 환자 본인뿐만 아니라 가족에게도 경제적으로 부담을 주고 있다. 중풍을 비롯한 만성 신경병증의 한방치료에 대한 기대가 점차 높아지고 있으며 효과적인 중풍치료법의 개발은 사회적으로 많은 관심의 대상이 되고 있고 특히 현재 한방병원 입원환자의 거의 대부분을 차지하고 있다⁸⁾. 최근의 연구에 의하면 유해산소 손상이 신경계의 병증의 중요한 원인의 하나로 제시되고 있다⁹⁾.

Glial cell 중 astroglia는 뇌에 감염과 손상 등이 발생했을 때 조직의 생리적 평형을 유지시키는 데에 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 glial cell line은 뇌질환에 있어서의 세포손상 모델에 대한 실험연구에 많이 채용된다¹⁰⁾.

최근에는 유전자 발현에 관한 정보를 연구하는 방법으로서 기존의 개별 유전자 발현을 몇몇씩 관찰하던 방법에 비해 microarray를 이용함으로써 대량의 유전자 발현 정보를 한꺼번에 평가하는 방법이 시도되고 있다¹¹⁾.

이에 저자는 중풍 초기의 기본적인 투약으로 導引經絡하기 위해 사용되어 온 곽향정기산에 대해 약침액으로서 신경계 손상에서의 활용가능성을 살펴보고 응용범위를 넓히기 위해 곽향정기산 약침액(Gwakhyangjeonggisang herbal acupuncture solution, 이하 GHAS로 약칭)을 처리하였을 때 유해산소 환경에 노출된 glial cell에 대한 보호효과를 확인하고 그 때의 유전자발현의 변화를 관찰하고자 하였다. 특히 microarray를 통해 대량의 유전자 발현 정보를 한꺼번에 획득하여 관찰함으로써 GHAS의 glial cell 보호효과를 분자생물학적으로 이해하는 데에 유용한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험 방법

1. 시약 및 재료

1) 藿香正氣散 藥鍼液

GHAS는 藿香正氣散 처방인 藿香, 紫蘇葉, 白芷, 大腹皮, 白茯苓, 厚朴, 白朮, 陳皮, 半夏, 桔梗, 甘草, 生薑, 大棗 등의 약재를 원방의 비율대로(Table 1)⁵⁾ 전탕하고 증류냉각액을 모아 1차로 0.45 um 여과막, 2차로 0.1 um 여과막으로 여과시킨 후 pH 7로 조절하여 고압멸균 후 사용하였다.

Table 1. Composition and Dosage of Ingredients in Gwakhyangjeonggisgan

Herb	Scientific Name	Dose(g)
藿香	Agastache rugosa	6
紫蘇葉	Perilla frutescens var. acuta Kudo	4
白芷	Angelica dahurica Bentham et Hooker	2
大腹皮	Areca cateche L.	2
白茯苓	Poria cocos (Schw.) Wolf	2
厚朴	Magnolia officinalis Rehder et Wilson	2
白朮	Atractylodes japonica Koidz.	2
陳皮	Citrus unshiu Markovich	2
半夏製	Pinellia ternata (Thunb.) Breitenbach	2
桔梗	Platycodon grandiflorum A. (Jacq) DC.	2
甘草灸	Glycyrrhiza glabra L.	2
生薑	Zingiber officinale Roscoe	4
大棗	Zizyphus jujuba Mill. var. inermis Rehder	4
Total amount		36

구체적으로 實驗에 사용한 藿香正氣散 藥鍼液은 藿香正氣散 360g을 取해 粗末하여 圓底 flask에 넣고, 蒸溜水 2,000ml를 加한 後, 3時間 煎湯하여 抽出하고 濾過하였다. 濾液은 rotary evaporator로 減壓濃縮하고 濃縮液에 蒸溜水를 加하여 全量을 200ml이 되도록 한 다음, 室溫까지 冷却하고 ethanol을 加하여 75% ethanol 溶液으로 되게 한 다음, 攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮한 濃縮液에 蒸溜水 100ml를 加하고 溶解시킨 後, ethanol을 加하여 85% ethanol 溶液으로 되게 한 다음 攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮한 濃縮液에 蒸溜水 100ml를 加하고 溶解시킨 後, ethanol을 加하여 95% ethanol 溶液으로 되게 한 다음 攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮하여 生成된 濃縮液에 生理食鹽水를 加하고 3% NaOH로 pH 6~7로 調節하여 全量이 1,000ml가 되게 한 다음, 低溫에서 24時間 放置한 後 nuclepore filter (0.45 μ m, 직경 25mm, Millipore Corp, Pleasanton, California, USA)로 濾過하고 加壓滅菌하여 試料의 원액으로 使用하였다.

2) 세포주

본 실험에 사용한 세포주는 A172 Human glioblastoma cell line(ATCC #CRL-1620)이며, American Type Culture Collection(USA)에서 구입하였다.

3) 시약

배양액으로서 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin은 GibcoBRL(USA)에서, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Roche (Germany)에서 구입하였다.

RNA추출과 reverse transcription, microarray hybridization을 위한 RNazol B는 Tel-Test(USA)를 사용하였다. Superscript II reverse transcriptase 등은 GibcoBRL(USA)에서 구입하였다. Microarray는 8170개의 Human gene의 cDNA로 구성된 GenePloer™ TwinChip™ Human-8K(Digital-Genomics, Korea)를 사용했으며(full gene list, URL: http://digital-genomics.co.kr/BBS/View.html?B_id=kor_Gene_list&rowid=1305&Keyword=&searchOption=), hybridization cassette은 Telechem(USA)에서 구입하고 Cy3 혹은 Cy5 RT primer, dNTP mix, Superase-In RNase inhibitor, 3DNA capture reagent 등은 Genisphere(USA)를 사용하였다. 그 외 일반 시약은 Sigma(USA) 제품을

사용하였다.

2. 세포 배양

실험에 사용한 astroglial cell line은 DMEM 용액에 10% FBS를 첨가하여 배양하였다. 5% CO₂, 95% 공기, 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하고, 배양액은 3일마다 교환하였다.

3. MTT 시험

GHAS을 전처리하고 H₂O₂로 유해자극을 가했을 때 생존하는 세포의 수를 측정하기 위해 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 작용을 이용한 MTT 시험을 하였다. ELISA reader로 595nm에서 측정된 흡광도(optical density)의 값은 살아있는 세포의 수를 반영하며 세포 독성의 판정은 다음의 산출식에 따라 % viability로 나타냈다.

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

먼저 glial cell을 96 well plate(Corning, USA)에 well당 배양액 100ul에 5×10⁴개의 세포수가 되도록 serum free 배양액에 분주하고 검액으로서 종류수에 희석한 GHAS를 최종 농도가 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 및 1000 ug/ml이 되도록 전처리하여 12시간 incubation하고, vehicle을 처리하지 않은 세포군을 대조군으로 하였다. H₂O₂ 100 uM로 유해산소 자극을 주어¹²⁾ 3시간 incubation하였다. 각 well에 MTT labeling reagent 용액을 10ul씩 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 solubilization solution을 각 well에 100ul씩 첨가하여 배양기에 20시간 유지시키고 ELISA reader(Bio-Tek, USA)로 690 nm를 참고치로 하여 595 nm에서 측정하였다.

모든 실험값은 평균값±표준편차(mean±standard deviation)로 하고, 통계학적 분석은 SAS(Statistic Analysis System) program을 이용하였다. Student's t-test를 실시하여 각 군간의 통계학적 유의성을 검정하였다(α=0.05).

4. RNA 추출

배양된 세포에 유해산소 자극으로서 100 uM/ml H₂O₂를 3시간 처리하거나 혹은 대조군으로서 vehicle을 처리하고 RNA를 추출하였다. 아울러 독성시험을 통해 결정한 농도와 시간에 따라 처리군에는 GHAS를 처리하고 대조군에는 vehicle을 처리하여 12시간 경과 후 유해자극으로서 100 uM/ml H₂O₂를 3시간 처리하여 RNA를 추출하였다.

처리군과 대조군 각각에서 세포를 harvest하여 상층액을 제거하고 다시 세포를 suspension하였다. 세포 10⁷개당 2 ml의 RNazol을 사용하여 lysis시키고 상온에서 10분간 방치하였다. 0.2 ml chloroform을 첨가하여 15초간 흔들어 잘 섞어준 후 5분간 상온에서 방치하였다. 4°C에서 12000g로 15분간 원심분리하고 상층액을 새로운 tube로 옮겨 동량의 isopropanol을 첨가하고 10분간 상온에서 방치하였다. 4°C에서 12000g로 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 80% 에탄올 1ml를 첨가하여 원심분리하였다. 에탄올을 제거하고 적당량의 DEPC-DDW를 첨가하여 total RNA를 준비하였다.

5. cDNA 준비

Microtube에 1~17ul (10~20ug)의 total RNA와 3ul의 RT primer를 넣고 nuclease free water로 최종 20ul가 되도록 섞었다. 80°C에서 10분간 incubation 후 얼음에 방치하였다. 이 혼합액에 Suprase-In RNase inhibitor 1ul를 첨가하였다. 별도의 tube에 5X Superscript II first strand buffer 8ul, dNTP mix 2ul, 0.1M DTT 4ul, Superscript II enzyme 2ul(400 units), RNase free water 3ul를 혼합하였다. 이 enzyme 혼합액을 RNA가 포함된 상기의 혼합액과 잘 섞어 42°C에서 2시간 반응시켰다. 0.5M NaOH/50 mM EDTA 7ul를 첨가하여 반응을 중지시키고 65°C에 10분 유지시켜 DNA/RNA hybrids를 변성시켰다. 1 M Tris-HCl, pH 7.5를 10ul 첨가하여 반응을 중화시켰다. 실험군의 cDNA와 대조군의 cDNA 혼합액을 한 tube로 합치고 10 mM Tris, pH 8.0 16ul로 실험군과 대조군 cDNA의 원래 tube를 세척한 후 실험군과 대조군 cDNA 혼합액에 넣어 총 130ul가 되도록 하였다.

5 mg/ml linear acrylamide 3ul를 상기한 혼합액에 넣고 5M NaCl 6ul 첨가하고 95~100% EtOH

540ul 넣고 섞어 -20°C에 30분 방치하였다가 10000g 이상으로 15분 원심분리하였다. 상층액을 덜어내고 cDNA pellet에 70% EtOH 300ul 넣어 섞고 10000g 이상으로 5분 원심분리하여 상층액을 덜어내고 65°C에 10분~30분 방치해 pellet을 말렸다. Nuclease free water를 넣어 10ul가 되게 하여 concentrated cDNA를 녹였다.

6. Microarray 시험 protocol

Microarray 시험은 다음의 세 단계로 진행하였다.

첫째, 유해산소 자극으로 발현 항진 또는 억제된 유전자의 관찰

둘째, 곽향정기산 약침액 전처치로 발현 항진 또는 억제된 유전자의 관찰

셋째, 곽향정기산 약침액 전처치시 유해산소 자극으로 발현이 항진 또는 억제되었던 유전자의 변화 관찰

7. Microarray Hybridization

2X formamide based buffer를 55°C 10분간 가열을 반복하여 완전히 녹인 것 15ul, dT blocker 2ul, nuclease free water 3ul를 섞고 여기에 위에서 준비한 concentrated cDNA 10ul를 넣어 총 30ul로 맞추었다. 이 혼합액을 75~80°C 10분, 45~50°C 15~20분간 incubation하고 pre-warmed(hybridization 온도에서) microarray에 뿌려 coverslip 덮고 overnight 반응시켰다.

Microarray slide를 55~65°C의 2X SSC, 0.2% SDS로 10~15분 세척하고 2X SSC로 상온에서 세척하고 0.2X SSC에 상온에서 10~15분 세척하고 상온에서 95% EtOH로 씻어 cDNA를 고정시켰다. Microarray slide를 뚜껑이 열린 튜브에 담아 800~1000 RPM으로 2분 원심분리하여 건조시켰다. Microarray 반응은 duplicate로 실시하여 평균값을 구하여 분석하였다.

8. Scanning and Data Analysis

Slide를 stage에 밀어 넣은 후 scan parameter를 기입하고 focus와 laser power를 조정된 후 red와 green의 파장에서 각각 scanning하고, ImaGene과 ScanAlyze를 이용하여 각각의 spot에 대한 data를

저장하였다. Normalization 과정을 거친 후 대조군에 비해 2배 이상 발현이 항진되거나 1/2 이하로 발현이 저하된 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 하여¹³⁾ 유해산소 자극시, GHAS로 전처치한 후 유해산소 자극시의 유전자 발현양상의 변화를 평가하고 종합하여 유해산소 자극시의 변화와 GHAS 전처치시 변화를 비교하였다.

III. 결 과

1. MTT 시험

GHAS을 12시간 전처치하고 H₂O₂ 100 uM로 3시간 동안 유해자극을 가했을 때의 세포 생존율을 MTT 시험으로 측정한 결과 vehicle을 처치했을 때의 생존율은 대조군에 비해 65.7±1.2%였으며, GHAS를 처치한 경우 곽향정기산의 농도가 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 및 1000 ug/ml일 때의 생존율은 vehicle을 처치했을 때의 대조군에 비해 77.2±2.5, 82.0±1.9, 83.4±0.5, 85.8±2.5, 86.2±1.7, 87.0±1.1, 85.6±1.7 및 82.3±0.5%였다(Fig. 1). 5, 10, 50, 100 및 500 ug/ml의 농도에서는 H₂O₂를 처리했을 때에 비해 t-test상 유의한 차이가 있었다(p<0.01). GHAS의 전처치 농도는 100 ug/ml으로 결정하였다.

2. Microarray 반응

배양된 세포에 유해산소 자극으로서 H₂O₂ 100 uM로 3시간 처치한 경우와 대조군에서의 mRNA를 추출하여 microarray에 반응시켰으며 또한 MTT 시험을 통해 결정된 농도인 GHAS 100 ug/ml로 12시간 동안 전처치하고 유해자극으로서 H₂O₂ 100 uM을 3시간 처치한 경우와 곽향정기산을 전처치하지 않은 대조군에서의 mRNA를 추출하여 microarray에 반응시켰다(Fig. 2). 그 결과 red spot으로 발현이 항진된 유전자와 green spot으로 발현이 저하된 유전자가 다양하게 나타났다.

각 cDNA spot intensity는 normalization 과정을 거쳐 log₂ ratio 값으로 계산되었다(Fig. 3, 4). 그 결과 2배 이상으로 발현이 항진된 유전자와 2배 이하로 발현이 저하된 유전자를 구분할 수 있었다.

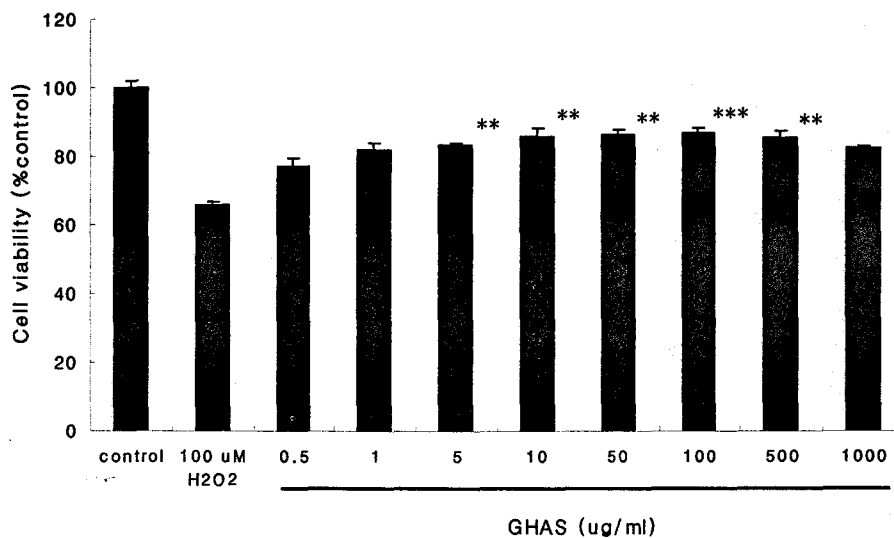


Fig. 1. The viability of human glioblastoma cell by MTT cytotoxicity assay
 Cell viability (%) after 12 h incubation of GHAS (Gwakhyangjeonggisang Herbal Acupuncture Solution) at the respective concentrations. Percent viabilities of the treatment groups were calculated by MTT colorimetric assay compared with that of the control group. Values are given as percent (mean±S.D.). Asterisk (*) indicates statistical difference from the control group. ** P < 0.01, *** P < 0.00

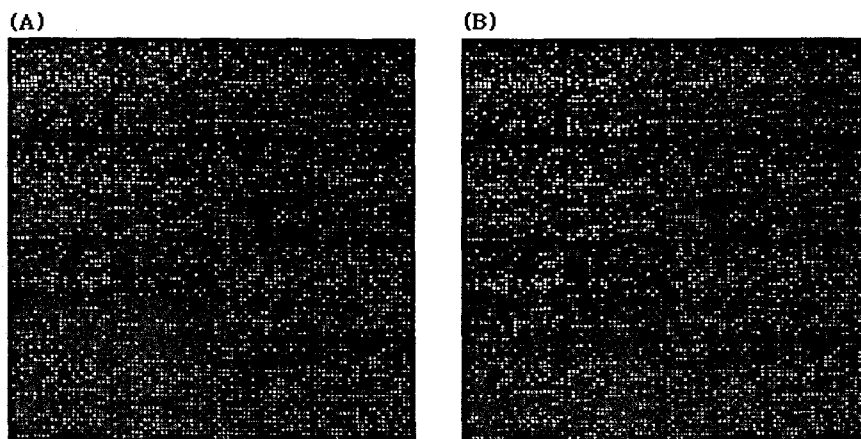


Fig. 2. 8.0k human cDNA microarray image of gene expression in A172 human glioblastoma cells treated with GHAS for 12 h

(A) The green spots represent genes of A172 control labeled with Cy3-captured reagent that is over expressed compared to that of H₂O₂-exposed A172. The red spots represent genes of H₂O₂-exposed A172 labeled with Cy5-captured reagent that is over expressed compared to that of A172 control.

(B) The green spots represent genes of H₂O₂-exposed A172 labeled with Cy3-captured reagent that is over expressed compared to that of GHAS pre-treated A172. The red spots represent genes of GHAS pre-treated A172 labeled with Cy5-captured reagent that is over expressed compared to that of H₂O₂-exposed A172. The yellow spots represent genes which showed no difference in expression level between two groups.

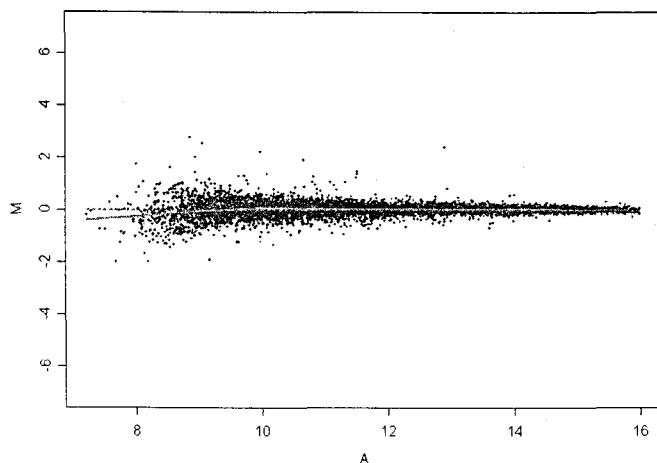


Fig. 3. Scattered plot of the normalization results by global M method in H_2O_2 -exposed and control A172 cells

The primary data was normalized by the total spots of intensity between two groups, and then normalized by the intensity ratio of reference genes such as housekeeping genes in both groups. The expression ratio of H_2O_2 -exposed and control A172 cells was converted to \log_2 ratio.

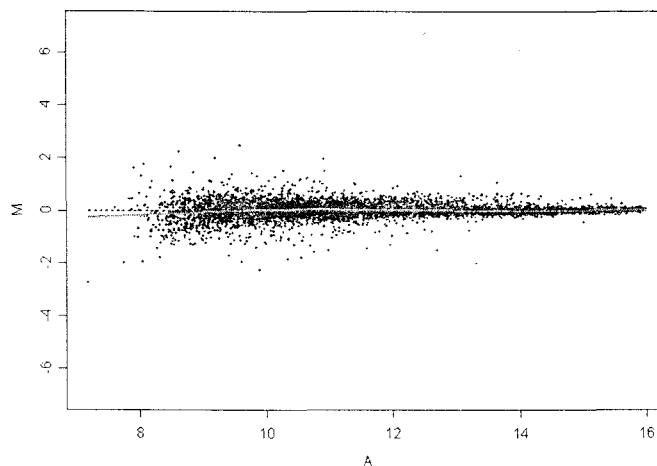


Fig. 4. Scattered plot of the normalization results by global M method in GHAS pre-treated and control A172 cells

The primary data was normalized by the total spots of intensity between two groups, and then normalized by the intensity ratio of reference genes such as housekeeping genes in both groups. The expression ratio of GHAS pre-treated and control A172 cells was converted to \log_2 ratio.

3. 유해산소 자극시 발현이 향진된 유전자

유해자극으로서 100 $\mu M/ml$ H_2O_2 를 3시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 발현이 향진된 유전자는 phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1), activating transcription factor 3, manic fringe homolog (Drosophila), metal-regulatory

transcription factor 1, KIAA0703 gene product, thyroid hormone receptor beta (erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog 2, avian), ras homolog gene family member E, chitobiase, di-N-acetyl-, N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) beta, Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein, early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila), block of proliferation 1,

methylene tetrahydrofolate dehydrogenase (NAD⁺ dependent) methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, tumor necrosis factor receptor superfamily member 6으로 16종이 있었다(Table 2).

4. 광항정기산 약침액 전처치시 발현 향진 유전자

GHAS 100 ug/ml을 12시간 전처치하고 대조군에는 vehicle을 전처치한 후 유해자극으로서 100 uM/ml H₂O₂를 3시간 처치했을 때 대조군에 비해 발현이 향진된 유전자는 interferon induced transmembrane protein 1 (9-27), interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, lysosomal-associated membrane protein 1, glucuronidase beta, TXK tyrosine kinase, membrane protein, palmitoylated 6

(MAGUK p55 subfamily member 6), signal transducer and activator of transcription 1 91kDa, interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U), zinc finger protein 174, KIAA0056 protein, adenosylmethionine decarboxylase 1, acyl-Coenzyme A dehydrogenase long chain, cystatin A (stefin A), ATPase H⁺ transporting lysosomal 34kDa V1 subunit D, cyclin H, calponin 1 basic smooth muscle, interferon alpha-inducible protein 27, mal T-cell differentiation protein, discoidin CUB and LCCL domain containing 2, inhibitor of DNA binding 1 dominant negative helix-loop-helix protein, complement component 1 r subcomponent, transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)으로 22종이 있었다(Table 3).

Table 2. List of Genes Up-regulated by Exposure to H₂O₂

Gene name	Abbreviation	M	GenBank#
phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	PMAIP1	2.60	D90070
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CDKN1A	2.22	AA481712
activating transcription factor 3	ATF3	2.06	N39944
manic fringe homolog (Drosophila)	MFNG	2.01	AI347507
metal-regulatory transcription factor 1	MTF1	1.96	X78710
KIAA0703 gene product	KIAA0703	1.67	AB014603
thyroid hormone receptor, beta(erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog 2, avian)	THRB	1.40	X04707
ras homolog gene family, member E	ARHE	1.35	W03441
chitinase, di-N-acetyl-	CTBS	1.34	AI148751
N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)	NAT1	1.31	R79401
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	1.29	AA557306
Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein	WASPIP	1.22	X86019
early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)	EGR2	1.14	J04076
block of proliferation 1	BOP1	1.13	D50914
methylene tetrahydrofolate dehydrogenase (NAD ⁺ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	MTHFD2	1.04	X16396
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	TNFRSF6	1.04	X63717

Gene expression was profiled with TwinChipe (Digital Genomics) microarray. A cut-off level of 2-fold change was used.

Table 3. List of Genes Up-regulated by Pre-treatment of GHAS

Gene name	Abbreviation	M	GenBank#
interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	IFITM1	1.92	AA428847
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1	1.87	M24594
lysosomal-associated membrane protein 1	LAMP1	1.69	J04182
glucuronidase, beta	GUSB	1.63	AI436391
TXK tyrosine kinase	TXK	1.53	L27071
membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily member 6)	MPP6	1.43	AI979249
signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	STAT1	1.40	AA418640
interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	IFITM3	1.28	X57352
zinc finger protein 174	ZNF174	1.24	U31248
KIAA0056 protein	KIAA0056	1.22	D29954
adenosylmethionine decarboxylase 1	AMD1	1.22	R78089
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain	ACADL	1.21	M74096
cystatin A (stefin A)	CSTA	1.19	AI680589
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 34kDa, V1 subunit D	ATP6V1D	1.17	AA001277
cyclin H	CCNH	1.16	AA451817
calponin 1, basic, smooth muscle	CNN1	1.09	D17408
interferon, alpha-inducible protein 27	IFI27	1.09	AA302123
mal, T-cell differentiation protein	MAL	1.06	NM_002371
discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	DCBLD2	1.06	D29810
inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	ID1	1.03	S78825
complement component 1, r subcomponent	C1R	1.02	M14058
transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)	TLE1	1.01	M99435

Gene expression was profiled with TwinChipe (Digital Genomics) microarray. A cut-off level of 2-fold change was used.

5. 곽향정기산 약침액 전처치시 유해 산소 자극으로 발현이 향진되었던 유전자의 변화

유해자극으로서 H₂O₂를 처치했을 때 발현이 향진되었던 16종의 유전자 중에서 GHAS으로 전처치 했을 때에는 phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1), activating transcription factor 3, manic fringe homolog (Drosophila), metal-regulatory transcription factor 1, chitobiase, di-N-acetyl-, CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) beta,

Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein, early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila) 등 9종이 유의하게 발현이 감소하였고 KIAA0703 gene product, ras homolog gene family, member E, block of proliferation 1, tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 등 4종이 발현이 감소하는 경향을 보였으며 thyroid hormone receptor, beta (erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog 2, avian), methylene tetrahydrofolate dehydrogenase (NAD⁺ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase 등 2종이 여전히 발현이 향진된 상태를 보였다(Table 4).

Table 4. Changes of Up-regulated Gene Expression Following with Exposure to H₂O₂ When GHAS was Pretreated

Gene name	Abbreviation	M1*	M2*
phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	PMAIP1	2.60	-1.41
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CDKN1A	2.22	-2.14
activating transcription factor 3	ATF3	2.06	-3.27
manic fringe homolog (Drosophila)	MFNG	2.01	-1.36
metal-regulatory transcription factor 1	MTF1	1.96	-1.57
KIAA0703 gene product	KIAA0703	1.67	-0.05
thyroid hormone receptor, beta (erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog 2, avian)	THRB	1.40	1.53
ras homolog gene family, member E	ARHE	1.35	-0.98
chitinase, di-N-acetyl-	CTBS	1.34	-1.03
N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)	NAT1	1.31	
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	1.29	-1.43
Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein	WASPIP	1.22	-1.23
early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)	EGR2	1.14	-1.04
block of proliferation 1	BOP1	1.13	-0.87
methylene tetrahydrofolate dehydrogenase (NAD ⁺ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	MTHFD2	1.04	1.21
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	TNFRSF6	1.04	-0.77

* M1 is global M when glioblastoma cells were exposed to H₂O₂ and M2 is global M when glioblastoma cells were pretreated with GHAS before exposure to H₂O₂.

IV. 고찰

신경계는 세포의 신생이 적고 외상, 경색, 출혈, 감염 등의 급성손상이나 근위축성 측삭경화증, 치매, 파킨슨병을 비롯한 운동장애 등의 만성손상에서 주로 과도한 세포사가 문제가 되며, 특히 신경계의 만성퇴행성 장애에서는 apoptosis가 중요한 역할을 한다¹⁴⁾. 중풍을 비롯한 신경계의 병증은 평균수명의 증가와 함께 그 발병이 더욱 증가하고 있으며 회복된 후에도 비가역적 신경학적 결손을 남기는 경우가 많아, 효과적인 중풍치료법의 개발은 사회적으로 많은 관심이 집중되고 있다. 허혈성 중풍의 경우에도 신경계의 염증이나 재관류 손상을 중요한 문제로 고려해야 하며¹⁵⁾ 경색이나 외상은 발생원인은 다르지만 excitotoxicity, 유리기, 염증, apoptosis 등 유사한 기전이 작용하고 있으며 인체의 방어기전으로 공통

적으로 heat shock protein, 항염증 cytokine, 항산화제 기능이 활성화된다¹⁶⁾. Astroglia는 뇌에 감염과 손상 등이 발생했을 때 조직의 생리적 평형을 유지시키는 데에 중요한 역할을 하고 있기 때문에 glial cell line은 뇌질환에 있어서의 세포손상 모델에 대한 실험연구에 많이 채용된다¹⁰⁾.

약침은 水鍼 혹은 穴位注射療法이라고도 하는데, 침자극과 약물의 주입을 결합시킨 요법으로, 경락학설의 원리에 의거하여 약물을 유관 혈위, 압통점 혹은 반응점에 주입함으로써 침자극으로서의 작용과 약물의 효능이 상승효과를 나타내어 질병을 치료하는 요법이다¹⁷⁾. 광항정기산은 본래 '傷寒陰證如不分表裏證'에 사용하는 처방으로 먼저 '導引經絡'함으로써 '不致變動'하게 하는 용도로 사용하게 되는데⁵⁾, 아직 실험연구보고가 활발하지는 않지만^{8,18)} 임상현장에서는 중풍 초기에 먼저 調氣하여 變證이 생기지 않도록 經絡을 導引하려는 목적으로 응용빈도가 높

은 처방이다. 따라서 광항정기산에 대한 실험적 관찰과 임상적 유용성에 대한 연구가 뒷받침된다면 앞으로 약침제제로서 광항정기산의 임상응용영역을 확대하면서 보다 정확하고 효과적으로 활용할 수 있게 될 것으로 기대된다.

Microarray 기술은 DNA sequencing, 변이 분석, 새로운 유전자 발견¹⁹⁾, 유전자 발현 분석 등의 분야에 활용되어 왔다. 유전자 발현의 연구에 있어서 microarray를 이용하면 수많은 유전자를 동시에 정량적으로 평가함으로써 생리적인 혹은 병리적인 과정에 대해 보다 다각도로 정확한 정보를 얻을 수 있게 되어 전통적인 '단일 유전자' 연구방법과 비교할 수 없는 매우 큰 장점을 지니고 있고²⁰⁻²¹⁾ 신경학 분야에서도 생리기전, 병리기전, 치료기전을 연구하는데에 유용한 정보를 제공하는 기술로 응용되고 있다²²⁾. 본 연구에서는 signal transduction, cell cycle, cell growth and maintenance, cell death, response to stress, transcription, immune response, apoptosis 등의 기능에 관여하는 8170종 유전자의 동시적 발현 양상 profile을 측정할 수 있는 microarray를 가지고 유해산소 환경에 노출된 glial cell에 대한 GHAS의 보호효과에 관하여 분자생물학적으로 관찰해 보고자 하였다.

먼저 MTT 시험을 통해 GHAS이 glial cell에 대한 보호효과가 있는지 확인해 보았는데, H₂O₂로 활성산소의 유해자극을 주었을 때 생존율이 65.7±1.2%로 감소되었으나 GHAS 5, 10, 50, 100, 500 ug/ml을 전처치하면 유의한 보호효과가 있음이 관찰되었다. 이어서 GHAS의 glial cell에 대한 보호효과에 대해 분자생물학적으로 관찰하고자 mRNA를 추출하여 microarray에 반응시켜 발현양상을 확인해 본 결과 유해자극시 발현이 항진되었던 16종의 유전자는 GHAS으로 전처치하면 대부분의 유전자가 발현이 오히려 억제되는 양상으로 관찰되었다. 이러한 유전자발현의 변화가 GHAS의 glial cell에 대한 보호효과와 관련이 있을 것으로 추정할 수 있었다. 발현이 변화된 주요 유전자를 기능별로 개괄하면 아래와 같다.

세포주기, apoptosis에 관여하는 유전자인 CDKN1A 즉 cyclin-dependent kinase inhibitor는 과산화수소로 자극시 발현이 항진되었다가 GHAS으로 전처치시 오히려 발현이 억제되었다. CDKN1A는 p21 혹은 wildtype p53-activated fragment 1(WAF1)이라고도 하는데, p53에 의해 긴밀히 조절되며 tumor cell

growth를 억제한다²³⁾. DNA 손상 후에 세포주기가 G1이나 G2 단계에서 arrest되는 데에 중요한 역할을 하며 p21의 발현이 억제되어야 DNA의 효율적인 합성이 다시 시작되고 세포주기의 다음단계로 이행될 수 있을 것으로 생각되고 있다²⁴⁾. TNFRSF6 즉 tumor necrosis factor receptor superfamily member 6은 과산화수소 자극시 발현이 항진되었으나 GHAS으로 전처치시 발현의 억제경향을 보였다. TNFRSF6는 Fas antigen, APO1 antigen이라고도 하는데 Fas 계통이 활성화되면 neuronal nitric oxide synthase(NOS)의 발현이 항진되고 motoneuron의 세포사가 유도되며 superoxide dismutase 1의 변이가 있을 때 Fas와 세포내 nitric oxide 신호계통의 민감성이 상승되는 것으로 보고된 바 있다²⁵⁾. Cell death에 관여하는 유전자로 WASPIP 즉 Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein 역시 유해자극시 발현이 항진되었다가 GHAS으로 전처치시 오히려 발현이 억제되는 양상을 보였다. WASPIP는 actin cytoskeleton에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다²⁶⁾.

면역반응에 관여하는 유전자인 CEBPB 즉 CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP), beta는 유해자극에 의해 발현이 항진되었으나 GHAS 전처치를 하면 발현이 억제되는 것으로 나타났다. CEBPB는 IL6DBP 즉 Interleukin 6-dependent DNA-binding protein이라고도 하는데, interleukin 6 뿐만 아니라 급성반응, 염증, 조혈과 관련된 여러 유전자의 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있다²⁷⁾.

DNA 전사와 관련해서는 ATF3 즉 activating transcription factor 3이 유해자극시 항진되었다가 GHAS의 전처치시 억제되었다. ATF3은 immediate early response gene의 하나로 seizure, 독성 화학물질, 허혈-재관류 등 다양한 자극에 유도되어 스트레스 반응에 관여하며²⁸⁾ 심근세포의 손상으로부터 보호해주는 기능도 보고된 바 있다²⁹⁾. EGR2 즉 early growth response 2(Krox-20 homolog, Drosophila)와 MTF1 즉 metal-regulatory transcription factor 1도 유해자극시 항진되었다가 GHAS의 전처치시 억제되었다. EGR2는 Cys₂/His₂ zinc-finger transcription factor로 myelin sheath의 형성과 유지에 중요한 역할을 담당하고 있으며 변이시 신경병증의 원인이 될 수 있다³⁰⁻³¹⁾. MTF1은 metallothionein의 전사인자로, metal homeostasis와 cellular redox 상태를 조절하는 기능에 관여하고 있을 것으로 생각되고 있다³²⁾.

본 연구에서는 광항정기산 약침액이 유해산소환

경의 중추신경계 세포에 미치는 영향을 유전자 발현 수준에서 관찰하였다. 특히 microarray를 이용해 대량의 유전자의 동시 발현 양상에 관한 자료를 획득하고 그 결과 발현에 상당한 변화가 있는 유전자를 관찰할 수 있었는데 이들 유전자 발현의 변화는 광항정기산 약침액의 중추신경세포 보호와 관련이 있는 분자생물학적 변화에 깊이 연관돼 있을 것으로 추정된다. 본 연구는 이후 광항정기산 약침액의 작용기전과 효능에 대한 후속연구의 기초가 되고 또한 향후 신경계 질환에서의 광항정기산 약침액의 활용범위를 넓히는 데에 도움이 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

유해산소로 손상된 중추신경계 세포에 대한 광항정기산 약침액의 보호효과와 유전자 발현의 변화를 관찰하기 위해 human cDNA microarray chip으로 glioblastoma cell에서 분석한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. MTT 시험 결과 광항정기산 약침액이 보호효과가 있는 것이 관찰되었다.
2. 유해산소 환경에 노출시켰을 때 발현이 항진되는 유전자는 phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1), activating transcription factor 3, manic fringe homolog (Drosophila) 등 16종이 있었다.
3. 광항정기산 약침액으로 전처치하고 유해산소 환경에 노출시켰을 때 발현이 항진되는 유전자는 interferon induced transmembrane protein 1 (9-27) 등 22종이 있었다.
4. 유해산소 환경에 노출시켰을 때 발현이 항진되었던 16종의 유전자는 광항정기산 약침액으로 전처치하고 유해산소 환경에 노출시킨 경우에는 대부분의 유전자가 발현이 억제되는 양상을 보였다.

VI. 참고문헌

1. 허준(조선). 원본동의보감. 서울: 남산당, 1998. 386쪽.
2. 김윤범. 광항정기산과 가미방의 위장관기능 및 항알레르기에 미치는 영향. 서울: 경희대학교대학원논문. 1993.
3. 안정란. 가미광정탕의 효능에 관한 실험적연구. 서울: 경희대학교대학원논문. 1993.
4. 윤희식, 유봉하, 박동원, 유기원. 광항정기산과 소음인광항정기산의 효능에 관한 실험적 비교연구. 경희한의대논문집. 1998; 21(1) : 197-211.
5. 이훈. 광항정기산가미방이 고지방식으로 유도된 흰쥐의 체지방에 미치는 영향. 서울: 경희대학교대학원논문. 2003.
6. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch Biochem Biophys. 1986; 246(2) : 501-514.
7. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol. 1993; 23(1) : 21-48.
8. 박숙자, 권정남, 김영균. 중풍환자의 초발균과 재발균에 관한 임상적 고찰. 대한한의학회지. 2002; 23(3) : 119-133.
9. Smith WS. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. J Vasc Interv Radiol. 2004; 15(1 Pt 2) : S3-12.
10. Aschner M. Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. Neurotoxicology. 1998; 19(2) : 269-281.
11. 이웅경, 강성길, 고희균. 봉독약침액이 비만세포주의 CD/cytokine 유전자 발현에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003; 20(5) : 50-62.
12. Lee JN, Ye J. Proteolytic Activation of Sterol Regulatory Element-binding Protein Induced by Cellular Stress through Depletion of Insig-1. J. Biol. Chem. 2004; 279(43) : 45257-45265.
13. Hong X, Li Y, Hussain M, Sarkar FH. Gene expression profiling reveals novel targets of estramustine phosphate in prostate cancer cells. Cancer Lett. 2004; 209(2) : 187-195.
14. Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. Am J Med. 2000; 108(4) : 317-330.

15. Harris NR, Rumbaut RE. Age-related responses of the microcirculation to ischemia-reperfusion and inflammation. *Pathophysiology*. 2001 ; 8(1) : 1-10.
16. Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms : neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev*. 2002 ; 39(1) : 55-73.
17. 백승일, 이용태, 장경전. 폐수·격수의 호도약 침 자극이 알레르기 반응에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 2003 ; 20(4) : 180-191.
18. 신동길, 김덕근, 이진용. 비만아 9례에 대한 꺁향정기산 가미방의 치료효과에 대한 임상적 고찰. *대한한방소아과학회지*. 2001 ; 15(1) : 183-194.
19. Stuhlmüller B, Ungethüm U, Scholze S, Martinez L, Backhaus M, Kraetsch H-G, Kinne RW, Burmester G-R. Identification of known and novel genes in activated monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000 ; 43 : 775-790.
20. 유대열, 송창우, 유영춘, 박승용. 계놈기능연구 프로토콜. 서울 : 월드사이언스. 2001 : 25, 35.
21. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001 : A10.2.
22. Luo Z, Geschwind DH. Microarray applications in neuroscience. *Neurobiol Dis*. 2001 ; 8(2) : 183-193.
23. Zakut R, Givol D. The tumor suppression function of p21Waf is contained in its N-terminal half ('half-WAF'). *Oncogene*. 1995 ; 11 : 393-395.
24. Gottifredi V, McKinney K, Poyurovsky MV, Prives C. Decreased p21 levels are required for efficient restart of DNA synthesis after S phase block. *J Biol Chem*. 2004 ; 279(7) : 5802-5810.
25. Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron*. 2002 ; 35(6) : 1067-1083.
26. Ramesh N, Anton IM, Hartwig JH, Geha RS. WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 ; 94(26) : 14671-14676.
27. Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J*. 1990 ; 9(6) : 1897-1906.
28. Hashimoto Y, Zhang C, Kawauchi J, Imoto I, Adachi MT, Inazawa J, Amagasa T, Hai T, Kitajima S. An alternatively spliced isoform of transcriptional repressor ATF3 and its induction by stress stimuli. *Nucleic Acids Res*. 2002 ; 30(11) : 2398-2406.
29. Nobori K, Ito H, Tamamori-Adachi M, Adachi S, Ono Y, Kawauchi J, Kitajima S, Marumo F, Isobe M. ATF3 inhibits doxorubicin-induced apoptosis in cardiac myocytes: a novel cardioprotective role of ATF3. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 ; 34(10) : 1387-1397.
30. Boerkoel CF, Takashima H, Bacino CA, Daentl D, Lupski JR. EGR2 mutation R359W causes a spectrum of Dejerine-Sottas neuropathy. *Neurogenetics*. 2001 ; 3(3) : 153-157.
31. Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J. EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron*. 2001 ; 30(2) : 355-368.
32. Gunes C, Heuchel R, Georgiev O, Muller KH, Lichtlen P, Bluthmann H, Marino S, Aguzzi A, Schaffner W. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO J*. 1998 ; 17(10) : 2846-2854.