

# 桃紅四物湯이 광화학적 뇌경색 마우스의 유전자 발현에 미치는 영향

조권일<sup>1</sup> · 김혜윤<sup>2</sup> · 고석재<sup>2</sup> · 이성근<sup>2</sup> · 신선호<sup>2</sup> · 문병순<sup>1,2\*</sup>

1: 원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과, 2: 원광대학교 한의과대학 내과학교실

## Effects of *Dohongsamul-Tang* on the Gene Expression of Photothrombotic Ischemia Mouse Model

Kwon Il Cho<sup>1</sup>, Hye Yoon Kim<sup>2</sup>, Seok Jae Ko<sup>2</sup>, Seong Geun Lee<sup>2</sup>, Sun Ho Shin<sup>2</sup>, Byung Soon Moon<sup>1,2\*</sup>

1: Department of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine,

2: Department of Internal Medicine, School of Oriental Medicine, Wonkwang University

The water extract of *Dohongsamul-Tang*(DHSMT) has been traditionally used to stroke and brain injuries in Oriental Medicine. The present study was designed to investigate the effects of DHSMT on the gene expression profile of cerebral infarction by cDNA microarray in photothrombotic ischemia mouse model. Photothrombotic ischemia was induced in stereotactically held male BALB/c mice using rose bengal and cold light. MRI was performed 24 hours after inducing photothrombosis using 1.5 T MRI and 47 mm surface coil to obtain T2-weighted, and contrast-enhanced images. After MRI test, animal was sacrificed and the brain sections were stained for hematoxylin and eosin and immunohistochemistry. MRI and histological analysis revealed that lesion of thrombotic ischemia was well induced in the cortex with the evidence of biological courses of infarction. The target area of thrombotic infarction was 1 mm anterior to bregma and 3 mm lateral to midline with 2 mm in diameter, which were decreased by administration of DHSMT. To assess gene expression pattern of cerebral infarction, mRNA was isolated and reacted with microarray chip(Agilant's DNA Microarray 44K). Scatter and MA plot analysis were performed to clustering of each functional genes. M value [ $M=\log_2(R/G)$ ,  $A=|\log_2(R \times G)|/2$ ] was between -0.5 and +0.5 with 40% difference. After pretreatment with DHSMT, the expression levels of mRNA of many genes involved in various signaling pathway such as apoptosis, cell cycle, cell proliferation, response to oxidative stress, immune response, angiogenesis, and inflammatory cytokine were markedly inhibited in photothrombotic ischemia lesion compared to the control group. These results suggest that DHSMT prevent ischemic death of brain on photothrombotic ischemia model of mice through modulation of gene expression at the transcriptional level.

Key words : *Dohongsamul-Tang*, photothrombotic ischemia, gene expression, cerebral infarction, microarray chip

### 서 론

桃紅四物湯은 朱<sup>1)</sup>의 《丹溪心法》에 “中風 在左屬死血少血 左以四物湯加桃仁紅花... 人身諸病 多生於鬱... 血鬱 桃仁紅花...” 라고 기재된 이래 각종 瘀血性 질환 및 中風, 癱瘓 등의 질병에 사용되어 왔으며, 養血調經하는 四物湯에 活血化瘀하는 桃仁, 紅

花를 加하여 活血하면서도 養血하게하고 化瘀하면서도 新生하게 하는 方劑이다<sup>2)</sup>.

뇌혈관질환은 악성 신생물, 심혈관질환과 함께 1950년대 이후 우리나라의 3대 주요 사망원인이 되어 왔으며, 최근 사회, 경제적 여건이 변화된 현재까지도 전체 질환별 사망원인 2위에 해당될 정도의 주된 사망원인이다<sup>3,4)</sup>. 뇌혈관질환은 크게 뇌경색에 해당하는 허혈성 뇌졸중과 뇌출혈에 해당하는 출혈성 뇌졸중으로 나눌 수 있는데 과거에 비해 뇌경색의 비율이 높아지고 있는 추세이며, 전 세계적으로 모든 뇌졸중의 80%가 허혈성 뇌졸중에

\* 교신저자 : 문병순, 익산시 신용동 344-2 원광대학교 익산한방병원 2내과

· E-mail : mbs@wku.ac.kr, · Tel : 063-859-2802

· 접수 : 2009/05/01 · 수정 : 2009/05/21 · 채택 : 2009/06/08

해당되는데 긴 후유 장애를 유발하기 때문에 사회, 경제적 충격이 커서 전 세계적으로 전체 의료비 지출의 2-4%를 차지하며 그중 산업화된 국가에서는 4%에 달한다<sup>9)</sup>.

지난 수년 동안 급성 뇌경색의 병리생리학적 면에서 염증반응이 강조되어 왔으며, 대부분의 염증반응은 사이토카인에 의해 매개된다<sup>6)</sup>. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 등의 염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokine)은 뇌허혈 실험동물 모델과 급성 뇌경색 환자에서 모두 생성이 증가된다는 보고가 있으며, 특히 뇌경색환자에서 염증성 사이토카인 수치의 증가는 경색 부위의 확대 및 불량한 임상결과를 초래한다고 보고되어 있다<sup>7-9)</sup>.

실험동물에서 뇌경색을 만드는 다양한 방법들 중 광화학적 색전(photochemical thrombosis) 모델<sup>10)</sup>은 뇌경색을 만드는 과정 중 두개골과 뇌경막을 절제하지 않기 때문에 수술에 의한 인위적 뇌손상이 없고, 뇌병변의 크기나 범위, 형태가 일정하며 재연성이 있어 뇌경색의 동물실험에서 광범위하게 이용되고 있다<sup>11,12)</sup>.

DNA microarray의 가장 기본적인 원리는 염기결합(즉, DNA의 경우 A-T, G-C; RNA의 경우 A-U, G-C)이다. Array는 염기결합 법칙에 근거하여 상보적인 서열을 인지하고 선택적으로 결합하는 DNA의 성질을 활용하는 방법으로 동시에 대량의 유전자 발현과 유전자 탐색 등의 연구를 가능하게 하고, 하나의 chip을 사용하여 동시에 수천 개의 유전자에 대한 정보를 얻을 수 있다<sup>13,14)</sup>.

桃紅四物湯의 실험적 연구로는 郭<sup>15)</sup>은 항혈전 작용에 대하여, 趙<sup>16)</sup>은 항암 및 항전이 효능, 趙<sup>17)</sup>는 면역기능에 대한 효과, 柳<sup>18)</sup>는 심근세포 보호효과, 朴<sup>19)</sup>은 뇌경색환자의 혈액 내 세포활성물질의 생성 증가효과 등에 대한 보고가 있으나, 뇌경색에서 염증반응과 세포자멸사에 관련된 유전자의 발현 양상에 관련된 연구는 아직 접하지 못하였다. 또한 뇌경색의 염증반응과 세포자멸사에 대한 한약재의 보호 효과에 대한 연구는 최근 활발히 이루어지고 있으나<sup>20-25)</sup>, 이와 관련된 유전자 발현에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 마우스에서 로즈벵갈(rose bengal) 염료를 이용한 광화학적 대뇌피질경색 모델을 만들고, 이와 관련하여 cDNA microarray 분석을 수행하여 뇌경색 부위의 염증반응과 세포자멸사에 관련된 유전자의 발현 양상 및 관련 biological pathway를 분석하였다. 또한 桃紅四物湯 전처리 실험군에서 관련 유전자들의 발현 변화에 대한 영향을 확인하고 새로운 유전자를 발굴하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 실험동물 및 사육환경

실험에 사용한 동물은 생후 8주령 20-25 g의 수컷 마우스(BALB/c 샘타코, 대전) 30마리로 투명한 사육장에서 그룹 당 10마리씩 사육하였다. 모든 동물실험은 원광대학교 실험동물 관리위원회 규정에 의거하여 시행하였으며, 실험동물은 특수병원 보호시설(specific pathogen free barrier) 내에서 사육하였다. 사육

실 평균 온도는  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도는 55%로 유지하였으며, 12시간 간격으로 명암을 조절하여 07:00부터 19:00까지 조명을 제공하였고, 물(membrane filtered purified water) 섭취는 제한하지 않았다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용된 桃紅四物湯의 처방내용은 吳<sup>26)</sup>의 《醫宗金鑑》에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 익산한방병원에서 구입하여 정선한 것으로 사용하였고, 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Dohongsamul-Tang(DHSMT)

Herbal name	Scientific name	Dosage (g)
桃 仁	<i>Prunus persica</i> Batsch	7.50 g
紅 花	<i>Carthamus tinctorius</i> Linne	3.75 g
生 地 黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libschitz	7.50 g
當 歸	<i>Angelica gigas</i> Nakai	7.50 g
赤 芍 藥	<i>Paeonia lactiflora</i> var	3.75 g
川 芎	<i>Cnidium officinale</i> Makino	3.75 g
Total amount		33.75 g

### 2. 방법

#### 1) 시료의 조제

실험에 사용된 藥材는 물을 용매로 사용한 추출방법을 사용하여 본 실험에 이용하였다. 물 추출물(H<sub>2</sub>O extract)은 桃紅四物湯 3첩 분량인 101.25 g을 물 1 l와 함께 냉각기를 부착한 환저 플라스크에서 3시간 끓인 다음, 거르기로 여과하고, 3,200 rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기(rotary evaporater)로 농축한 다음, -70°C(deep freezer)에서 12시간 이상 동결시키고, freeze dryer로 동결건조시켜 17.1 g의 시료를 얻었다. 시료를 eppendorf tube에 25 mg/ml이 되도록 생수로 녹여 몸무게 1 g당 10  $\mu\text{l}$ 씩 경구 투여하였다.

#### 2) 광화학적 색전술 수술 방법

실험은 20-25 g의 수컷 마우스(BALB/c mice, 샘타코) 30마리를 대상으로 하였다. Ketamine(60 mg/kg)과 Xylazine(10 mg/kg)을 혼합하여 근육 내에 주사하여 마취하고, 보온 방석(Homeothermic Blanket®, Harvard apparatus, USA)을 이용하여 체온을  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며, 복외위에서 두부 정위 고정 장치(animal stereotactic frame, Harvard Apparatus, USA)에 두개골을 고정하였다. 병변을 유발시킬 부위의 두피를 0.5 cm 정도 절개하고, 골막을 박리하여 두개골을 노출한 후 직경 2 mm의 광섬유 광원의 중심을 bregma 전방 1 mm, 측방 3 mm 지점에 밀착하여 열발생이 없는 할로젠 광원을 조사하고, 광원조사 2분 후 로즈벵갈(rose bengal, Aldrich Chemie, Germany) 10 mg/kg을 꼬리 정맥을 통해 2분간 서서히 주사하였고, 이후 12시간 광원조사를 유지하였다. 광원조사 후 절개부위를 봉합한 다음, 일정 기간 동안 12시간 간격으로 명암을 일정하게 조절하고, 온도와 습도가 조절되며 먹이에 대한 접근이 자유로운 표준 환경에서 사육하였다.

#### 3) 실험 모델 설계

뇌경색을 만들기 위한 실험군은 로즈벵갈(10 mg/kg)을 꼬리 정맥으로 주사 후 광원을 조사(그룹명 : Rose bengal)하였고,

桃紅四物湯의 효과를 조사하기 위한 실험군은 로즈벵갈 주사와 광원을 조사하기 전에 10 mg/ml의 桃紅四物湯을 5일 동안 경구 투여(그룹명 : DHSMT + Rose bengal)하였다. 이때 대조군은 로즈벵갈 대신 동일 부피의 생리식염수를 꼬리 정맥에 주사하고 광원을 조사하여(그룹명 : Sham) 실험에 사용하였다. 실험은 그룹 당 5마리씩 독립적으로 2회 시행하였으며, 매 실험 시 그룹 당 2마리씩 자기공명영상 촬영 후 면역화학 염색을 실시하였고(그룹 당 총 4마리), 나머지 각 그룹 당 3마리는 RNA를 추출하기 위하여 육안으로 병변을 각각 확인한 후 광원조사 부위의 뇌조직만을 절단하여 통합하였다(그룹 당 총 6마리).

4) 자기공명영상 촬영

마취 후 1.5 T MRI(Intera®, Philips, Netherlands)와 직경 47 mm의 표면 코일(Philips, Netherlands)을 이용하여 병변 유발 24 시간 후 각 그룹 당 2마리씩 T1 강조영상 및 조영영상(TR 500, TE 15, FOV 49x49, matrix size 256x256), T2 강조영상(TR 2500, TE 100, FOV 49x49, matrix size 256x256)을 1 mm 두께로 촬영하였다. 조영제는 Gd-DTPA(Magnevist®, Schering, Germany)를 0.2 ml/kg로 투여하였다. 촬영한 영상은 PACS 시스템(Mediface, Korea)으로 전송되어 JPEG 파일로 전환된 후 Image J 프로그램(NIH, USA)을 이용하여 영상 분석하였다.

5) 조직학적 검사

마우스들은 생리식염수와 4% paraformaldehyde로 관류시킨 후 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌 조직은 0.1 M PBS 및 4% paraformaldehyde 용액 속에서 3일간 고정된 후 파라핀 블록 절편으로 만들어 H&E, IL-4R α 및 IL-6의 염색을 시행하였다.

6) 세포 내 총 RNA 추출

적출한 뇌조직은 1 mL의 trizol을 이용하여 세포를 용해시키고 제조사의 기술된 내용에 의거하여 total RNA를 추출하였다. 얻어진 상등액은 동일 양의 isopropanol을 첨가하여 잘 섞은 후 -20℃에서 12시간 반응시켜 14,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 얻어진 침전물은 80% 에탄올에 세척하여 자연 건조시켰다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)으로 RNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 Spectrophotometer (Beckman사)로 optical density(OD)값을 측정하여 RNA를 정량하였다. 추출된 RNA 표본의 순도는 EtBr이 포함된 1.5%의 formamide-agarose gel을 이용하여 전기영동하고, UV 시스템으로 확인하였다.

7) Microarray용 RNA 순도 측정

실험 후 적출한 뇌조직에서 얻은 총 RNA가 cDNA microarray에 사용 적합한지를 확인하기 위하여 국내의 Genomic 사에 분석 의뢰하여 다음의 결과를 얻었다(Table 2). 결과의 통과 표시는 Genomic 사의 분석 기준을 통과한 시료로 migration, peak pattern, 28s/18s ribosomal RNA의 비율 및 OD260/230비율을 고려하여 평가한 후 RIN(RNA Integrity Number) 값을 결정하였다. RNA의 quality는 통계적인 수치로 1~10의 범위를 가지며 고순도의 시료를 요구하는 DNA microarray analysis를 위한 권장 값은 7 이상이 요구된다. 본 실험에서 얻어진 RNA의 순도(RIN)는 10에 근접하여 분석에 적합

하였다.

Table 2. RNA Integrity Number(RIN) of sample

Sample	µg/µl	OD260/230	Total (µg)	Ratio(28s/18s)	RIN
Sham	8.1463	2.45	285.1205	1.4	8.3
Rose Bengal	2.9576	2.50	103.5160	1.3	7.9
DHSMT+Rose Bengal	3.5287	2.44	123.5045	1.4	8.5

8) cDNA microarray method

유전자 발현의 변화를 분석하기 위하여 Agilent's Human whole genome 4 X 44K glass slide cDNA microarrays를 이용하여 다음과 같이 표지하였다(Table 3). 실험군은 각각 Cy5로 표지하여 각각 Cy3로 표지된 대조군과 비교하여 다음의 과정을 거쳐 분석하였다.

(1) 증폭 및 라벨링 - Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit PLUS를 이용하여 증폭 및 라벨링 과정을 수행하였다.

(2) Microarray hybridization - Agilent's Gene Expression Hybridization kit를 이용하여 수행하였다.

(3) Microarray wash - Agilent's Gene Expression Wash Buffer kit를 이용하였다.

(4) Scan and image analysis - Agilent's DNA microarray scanner 및 Feature Extraction Software를 이용하였다.

Table 3. Labelling of Agilent's Human whole genome 4 X 44K glass slide cDNA microarrays

sample	Label	DNA Microarray#
sham	Cy3	Agilent's Mouse whole genome 4 X 44K
Rose Bengal	Cy5	251486820813_3
Sham	Cy3	Agilent's Mouse whole genome 4 X 44K
DHSMT+Rose Bengal	Cy5	251486820813_4

9) Data Analysis

Agilent's GeneSpring Software를 이용하여 normalization, clustering 및 filtering하여 2배 이상의 증감을 보이는 유의한 유전자를 선별하였고, 이들 유전자의 기능을 웹사이트의 DAVID's program을 이용하여 biological function을 분석하였다.

결 과

1. 桃紅四物湯이 광화학적 색전에 의한 마우스 뇌경색 병변의 MRI 신호강도에 미치는 영향

로즈벵갈 염료 주입 후 직경 2 mm 광원조사 시 유발되는 뇌경색 병변을 MRI 영상으로 확인하고자 하였다. 桃紅四物湯을 5일간 미리 경구 투여한 후 병변을 유발한 그룹(DHSMT+Rose Bengal)과 로즈벵갈 염료 대신 생리식염수를 주사하여 광원을 조사한 대조군(Sham), 그리고 로즈벵갈 염료를 주사하여 광원조사 후 병변을 유발한 실험군(Rose Bengal)에서 MRI 신호강도를 비교하였다. MRI 상 뇌경색 병변은 T2 강조영상에서 고신호강도로 조사하였다. 로즈벵갈로 병변을 유발한 실험군에서는 광원조사 부위에 T2 강조영상의 신호를 확인할 수 있었으며(Fig. 1C),

대조군에서는 발견되지 않았다(Fig. 1B). 그러나 桃紅四物湯 전처리군에서는 T2 강조영상의 신호강도와 뇌경색 병변의 체적이 감소하는 양상을 보였다(Fig. 1D).

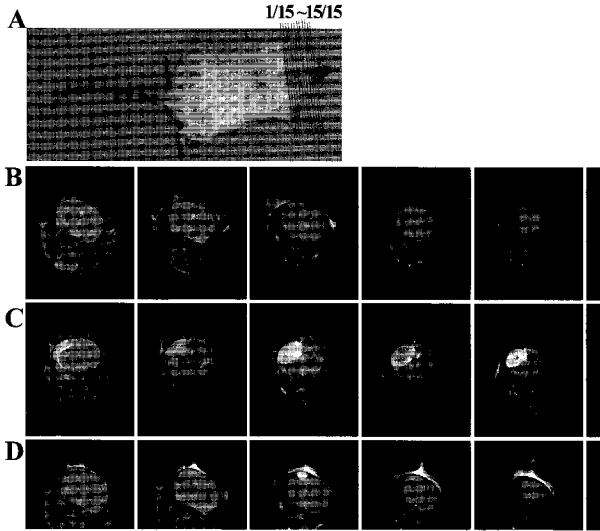


Fig. 1. MRI findings of infarction within 24 hours. Within 24 hours, in T2 weighted images, infarct lesions appeared as high signal intensity areas in cortex. (A) mouse, (B) Sham group, (C) Rose Bengal only group, (D) DHSMT+Rose Bengal group. The data was one of four independent experiments.

2. 桃紅四物湯이 광화학적 뇌경색 마우스에서 병리조직학적 변화에 미치는 영향

병리조직검사(Fig. 2)에서 병변은 로즈벵갈 염료 주사 후 24 시간제에 H&E 염색으로 관찰하였다. 로즈벵갈 염료 주사 후 광원을 조사한 병변 유발 실험군의 뇌조직은 전반적인 경색 부분의 세포-수초의 창백화로 정상 조직과 구분이 명확하게 관찰되었다. 뉴론들의 형태는 대부분 유지되어 있었으며, 병변 내 모세혈관과 소동맥들의 광범위한 색전들이 발견되었고, 세포들 사이의 부종과 소공 형성이 두드러지고, 세포질의 위축과 핵의 농축이 뚜렷하였다. 특히 변두리에는 병변 중심부와 구분되어 뉴론 핵들의 종창이 뚜렷하고 더 창백한 양상으로 차이가 나타나 보였다. 또한, 모세혈관 주위를 따라서는 호중구 백혈구들의 이동과 침윤이 관찰되기 시작하였다(Fig. 2B). 그러나 桃紅四物湯 전처리군에서는 병변 내 모세혈관과 소동맥들의 색전은 관찰되었으나 뉴론들의 형태는 대부분 유지되어 있었으며, 주변 세포들이 어느 정도 유지되고 있는 양상을 보였다(Fig. 2C). 이때 생리식염수를 로즈벵갈 염료 대신 주사한 대조군의 조직은 변화가 없었다(Fig. 2A).

3. Microarray의 스캔

본 실험에 사용한 cDNA microarray chip에는 약 44,000여 개의 마우스 유전자가 spotting 되어 있고, 대조군은 Cy3, 실험군은 Cy5 형광 dye로 labeling하고, normalize(스파이크한 control 유전자로 house keeping gene인  $\beta$ -actin과 GAPDH 포함)를 한 후 스캔하였다. 이때 분석하기 위한 시료로는 앞의 결과에서와 같이, MRI 결과에서 신호강도가 명확히 구분되는 그룹에서 적출

한 뇌조직을 대조군과 실험군으로 사용하였으며, 실험에 사용한 각 시료와 cDNA microarray에 부착되어 있는 primer와의 결합 여부는 각 chip의 오른쪽 하단에 미리 제작되어 있는  $\lambda$  DNA로 확인하였다. Image scanning을 하면서 laser power, focal depth, PMT gain 등 여러 가지 factor를 조정하여 setting하고, image processing 단계에서는 grid alignment, spot segmentation, background correlation을 통해 잘못된 spot들을 flag하였다. 각 그룹에서 적출한 뇌조직으로 부터 total RNA를 분리하여 Agilent's Mouse whole genome 4 X 44K로 분석하였다. Fig. 3에서 녹색으로 표시된 부분은 로즈벵갈 대신 생리식염수를 주사한 대조군으로 부터 분리한 뇌조직의 total RNA에 Cy3를 붙였고, 적색은 Cy5를 붙인 로즈벵갈 주사군(Fig. 3A)과 桃紅四物湯 전처리 후 로즈벵갈을 주사한 군(Fig. 3B)의 뇌조직으로 부터 각각 분리한 total RNA이다. 그림에 나타난 것은 pseudocolor이고, 실제는 흑백이미지를 스캔하여 분석 소프트웨어에서 색을 임피게 된다(Fig. 3). 이때 대조군보다 발현이 증가된 spot들은 Cy5의 형광인 적색을 보이고, 발현이 감소된 spot들은 Cy3의 녹색 형광을 보이며, 대조군(Cy3)과 실험군(Cy5)의 발현양이 동일한 경우에는 노란색 형광을 보이게 된다(Fig. 3).

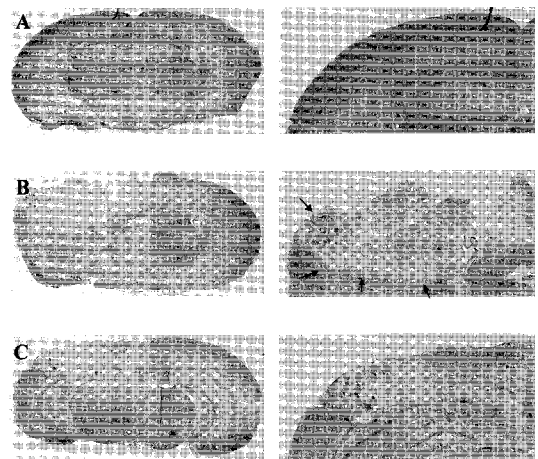


Fig. 2. Histopathological findings of infarction within 24 hours. (A) Sham group, (B) Rose Bengal only group, (C) DHSMT+Rose Bengal group. The data was one of four independent experiments.

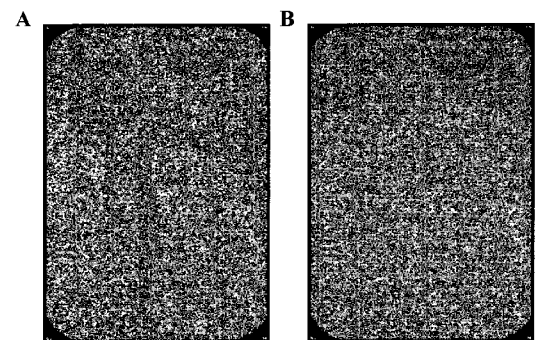
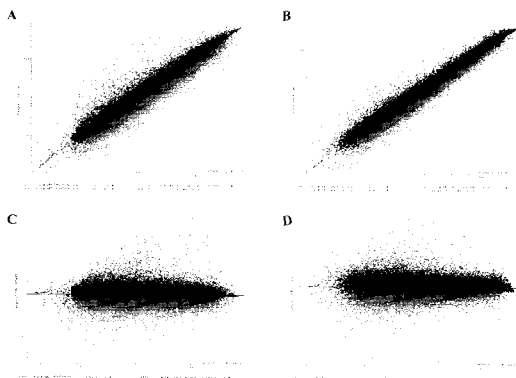


Fig. 3. cDNA microarray expression pattern. (A) Sham Vs. Rose Bengal, (B) Sham Vs. DHSMT+Rose Bengal group.

4. Scatter와 MA plot 분석

Scatter graph에서는 chip 상의 모든 spot들을 표시한 것으로 Cy3-channel(가로축)과 Cy5-channel(세로축)에서 각 signal intensity 값을 나타낸다. 가운데 사선은 각 channel에서 같은 signal intensity 값을 가진 probe들이 분포하고 있는 것을 나타낸다. 그래프 상에서 점선 밖의 spot들은 2배 이상 발현양의 증감고, 점선 안쪽은 2배 이하 발현양의 증감을 나타낸 것으로, 2배 이하 발현양의 증감을 나타낸 것은 microarray chip data에서 취하지 않고 버렸다(Fig. 4A와 B). 또한 대조군에 대한 각 실험군에 따른 유전자 발현의 변이에 대한 각 channel의 signal intensity의 평균값과 ratio(R/G: R=Cy5 signal - background/G=Cy3 signal - background) 값 사이의 상관관계를 보여주는 그림으로 가로축은  $A=(R+G/2)$ , 세로축은  $M=(R/G)$  값을 나타낸다. 가운데 선(M=1)은 R = G 선을 표시한 것이며, M=2 선은 G 값 보다 R 값이 2배 높은 값을 가진 probe들이 분포하고 있는 것을 나타낸 것이고, 그 이상의 spot들은 2배 이상 높은 signal intensity 값을 가진 probe들의 분포를 나타내고 있으며, 아래 M=0.5 선은 반대의 경우를 나타낸다(Fig. 4C, D).



**Fig. 4. Modulation of gene expression following Scatter and MA plot.** Total RNA was prepared from jurkat using trizol as described manufacture. (A),(B) Scatter plot analysis. The x and y axis represent Cy3(Sham group) and Cy5(Rose Bengal group or DHSMT+Rose Bengal group) signal intensity values, respectively. These represent Lo-regulated(upper lines: red spots) or down-regulated(under lines: green spots) genes. (C),(D) MA plot analysis. The x and y axis represent A(R+G/2) and M(R/G) signa. intensity values. The R and G represent Cy5-background and Cy3-background signal intensity, respectively. These represent up-regulated(upper lines: red spots) or down-regulated(under lines: green spots) genes. (A), (B) Scatter plot, and (C), (D) MA plot

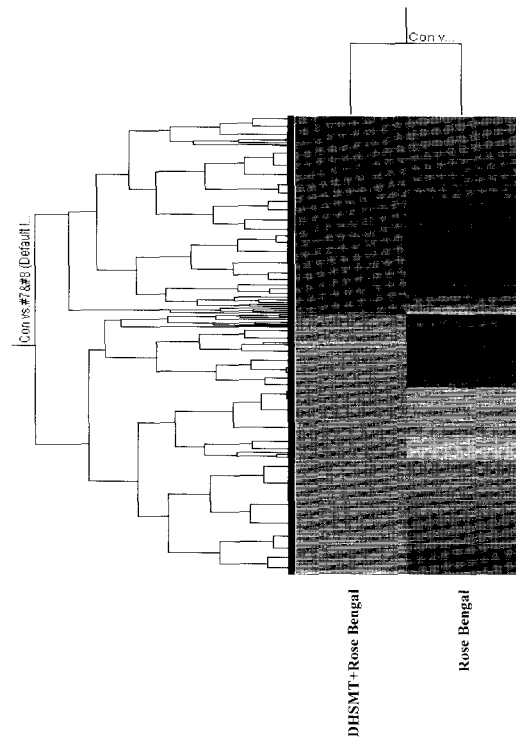
5. 발현양에 따른 데이터 분석(computer interpretation)

데이터를 분석함에 있어서 chip의 데이터들은 global normalization한 후 각 유전자들의 발현양을 분석하였다. 대조군 유전자 발현양을 1로 하여 실험군의 상대적 발현양을 나타내어 2배 이상 증감한 유전자들만 데이터로 나타내었다. 전체적으로 각 cDNA microarray에서 증가된 background의 signal을 제거한 결과 41,174의 real gene을 얻었고, chip분석 결과 값으로 이용할 수 없는 bad spot들을 제거하고 대조군과 비교하여 로즈벵갈에 의한 뇌경색 병변 그룹(Sham Vs. Rose Bengal)은 33,848개, 桃紅四物湯 전처리 병변 그룹(Sham Vs. DHSMT+Rose Bengal)은 33,668개의 유전자가 chip분석 결과 값으로 유의하게 나타났다. 이 중에서 대조군과 비교하여 2배 이상 증가 또는 감소된 유전자

를 선별하여 Table 4로 나타내었다. 또한 유전자들의 비교를 hierarchical clustering하여, treeview 프로그램으로 dendrogram을 그리고, 발현양 증가는 적색, 발현양 감소는 녹색으로 표시하였다. chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다(Fig. 5).

**Table 4. DAVID Bioinformatics Resources (2008) analysis.**

	Total Gene	Real Gene	2x Up (DAVID)(BP) Unknown	2x Down (DAVID)(BP) Unknown
Sham Vs. Rose Bengal	41,174	33,848	262 (241/213) Unknown 7 671(606/530) Unknown 31	694 (611/493) Unknown 62 885(771/621) Unknown 78
Sham Vs. DHSMT + Rose Bengal	41,174	33,668	755 (670/568) Unknown 32	33* (292/241) Unknown 28



**Fig. 5. Cluster image showing the different classes of total gene expression profiles.**

6. 桃紅四物湯이 광화학적 뇌경색 마우스에서 세포자멸사 관련 유전자의 변화에 미치는 영향

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 유전자들의 발현 비교는 hierarchical clustering하여, treeview 프로그램으로 dendrogram을 그리고, 발현양 증가는 적색, 발현양 감소는 녹색으로 표시하였다. 세포자멸사(apoptosis) 관련 유전자 중 로즈벵갈에 의한 광화학적 뇌경색 마우스에서 2배 이상 증가 또는 감소한 유전자들을 Table 5에 나타내었다. 특히 로즈벵갈에 의해 2배 이상 증가한 42개의 유전자 중 Fas의 경우 3.585배 증가하였으나 桃紅四物湯 전처리 시 1.143배의 발현증가를 보였으며, 로즈벵갈

에 의해 증가한 세포자멸사 관련 유전자의 대부분이 桃紅四物湯 전처리 시 감소되는 양상을 보였다(Table 5). 또한 로즈벵갈에 의해 2배 이상 발현이 감소한 유전자는 모두 34개였으며, 특히 세포자멸사를 억제하는 Bcl-2 단백질은 로즈벵갈에 의해 2.534배 감소하였으나 桃紅四物湯은 이를 억제하였다(Table 5).

#### 7. 桃紅四物湯이 광화학적 뇌경색 마우스에서 세포증식 관련 유전자의 변화에 미치는 영향

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 유전자들의 발현 비교는 hierarchical clustering하여, treeview 프로그램으로 dendrogram을 그리고, 발현양 증가는 적색, 발현양 감소는 녹색으로 표시하였다. 세포증식(cell proliferation) 관련 유전자 중 로즈벵갈에 의한 광화학적 뇌경색 마우스에서 2배 이상 증가 또는 감소한 유전자들을 Table 6에 나타내었다. 로즈벵갈에 의해 2배 이상 증가한 유전자는 64개였고, 2배 이상 감소한 유전자는 45개였으며, 로즈벵갈에 의해 증가하거나 감소한 세포증식 관련 유전자의 대부분은 桃紅四物湯 전처리 시 감소 혹은 증가되어 1에 가까워지는 양상을 보였다(Table 6).

#### 8. 桃紅四物湯이 광화학적 뇌경색 마우스에서 DNA repair 관련 유전자의 변화에 미치는 영향

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 유전자들의 발현 비교는 hierarchical clustering하여, treeview 프로그램으로 dendrogram을 그리고, 발현양 증가는 적색, 발현양 감소는 녹색으로 표시하였다. DNA repair 관련 유전자 중 로즈벵갈에 의한 광화학적 뇌경색 마우스에서 2배 이상 증가 또는 감소한 유전자들을 Table 7에 나타내었다. 로즈벵갈에 의해 2배 이상 증가한 유전자는 2개였고, 2배 이상 감소한 유전자는 14개였으며, 로즈벵갈에 의해 증가하거나 감소한 DNA repair 관련 유전자 중 postmeiotic segregation increased 2(Pms2)를 제외한 대부분의 모든 유전자의 발현은 桃紅四物湯 전처리 시 감소 혹은 증가되어 1에 가까워지는 양상을 보였다(Table 7).

#### 9. 桃紅四物湯이 광화학적 뇌경색 마우스에서 염증 반응 관련 유전자의 변화에 미치는 영향

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 유전자들의 발현 비교는 hierarchical clustering하여, treeview 프로그램으로 dendrogram을 그리고, 발현양 증가는 적색, 발현양 감소는 녹색으로 표시하였다. 염증 반응(inflammatory response) 관련 유전자 중 사이토카인을 제외한 로즈벵갈에 의한 광화학적 뇌경색 마우스에서 2배 이상 증가 또는 감소한 유전자들을 Table 8에 나타내었다. 로즈벵갈에 의해 2배 이상 증가한 유전자는 16개였고, 2배 이상 감소한 유전자는 6개였으며, 로즈벵갈에 의해 증가하거나 감소한 대부분의 모든 유전자의 발현은 桃紅四物湯 전처리 시 감소 혹은 증가되어 1에 가까워지는 양상을 보였다(Table 8).

#### 10. 桃紅四物湯이 광화학적 뇌경색 마우스에서 산화적 손상 관련 유전자의 변화에 미치는 영향

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 유전자들의 발현 비교는 hierarchical clustering하여, treeview 프로그램으로 dendrogram을 그리고, 발현양 증가는 적색, 발현양 감소는 녹색으로 표시하였다. 산화적 손상(response to oxidative stress)과 관련된 유전자는 로즈벵갈에 의한 광화학적 뇌경색 마우스에서 2배 이상 증가 또는 감소한 유전자들을 Table 9에 나타내었다. 로즈벵갈에 의해 2배 이상 증가한 유전자는 2개였고, 2배 이상 감소한 유전자는 6개였으며, 로즈벵갈에 의해 증가하거나 감소한 대부분의 모든 유전자의 발현은 桃紅四物湯 전처리 시 감소 혹은 증가되어 1에 가까워지는 양상을 보였다(Table 9).

#### 11. 桃紅四物湯이 광화학적 뇌경색 마우스에서 면역 반응 관련 유전자의 변화에 미치는 영향

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 유전자들의 발현 비교는 hierarchical clustering하여, treeview 프로그램으로 dendrogram을 그리고, 발현양 증가는 적색, 발현양 감소는 녹색으로 표시하였다. 면역 반응(immune response) 관련 유전자 중 로즈벵갈에 의한 광화학적 뇌경색 마우스에서 2배 이상 증가 또는 감소한 유전자들을 Table 10에 나타내었다. 로즈벵갈에 의해 2배 이상 증가한 유전자는 22개였고, 2배 이상 감소한 유전자는 11개였으며, 로즈벵갈에 의해 증가하거나 감소한 대부분의 모든 유전자의 발현은 桃紅四物湯 전처리 시 감소 혹은 증가되어 1에 가까워지는 양상을 보였다(Table 10).

#### 12. 桃紅四物湯이 광화학적 뇌경색 마우스에서 세포신호전달 관련 유전자의 변화에 미치는 영향

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 유전자들의 발현 비교는 hierarchical clustering하여, treeview 프로그램으로 dendrogram을 그리고, 발현양 증가는 적색, 발현양 감소는 녹색으로 표시하였다. 세포신호전달(cell signaling) 관련 유전자 중 로즈벵갈에 의한 광화학적 뇌경색 마우스에서 2배 이상 증가 또는 감소한 유전자들을 Table 11에 나타내었다. 로즈벵갈에 의해 2배 이상 증가한 유전자는 18개였고, 2배 이상 감소한 유전자는 28개였으며, 로즈벵갈에 의해 증가하거나 감소한 대부분의 모든 유전자의 발현은 桃紅四物湯 전처리 시 감소 혹은 증가되어 1에 가까워지는 양상을 보였다(Table 11).

#### 13. 桃紅四物湯이 광화학적 뇌경색 마우스에서 세포주기 관련 유전자의 변화에 미치는 영향

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 유전자들의 발현 비교는 hierarchical clustering하여, treeview 프로그램으로 dendrogram을 그리고, 발현양 증가는 적색, 발현양 감소는 녹색

Table 5. Highly up and Highly down-regulated gene : Apoptosis

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_007614	Ctnnb1	catenin(cadherin associated protein), beta1	2.010917	1.390805
NM_009750	Ngfrap1	nerve growth factor(TNFRSF16) associate protein1	2.019332	1.457926
AK015353	Grm2	G protein-coupled receptor, family C, group 1, member B	2.046597	1.327583
NM_013863	Bag3	Bcl2-associated athanogene 3	2.054106	-2.34933
NM_016802	Rhoa	ras homolog gene family, member A	2.056351	1.798054
NM_007540	Bdnf	brain derived neurotrophic factor	2.11851	1.096178
NR_001579	Terc	telomerase RNA component	2.15215	1.86053
AK043586	Sgpp1	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	2.173264	2.213276
AK042801	Rasa1	RAS p21 protein activator 1	2.181793	1.296216
AK088966	Stat5b	signal transducer and activator of transcription 5B	2.204049	1.348484
NM_008563	Men1	multiple endocrine neoplasia 1	2.272653	1.085661
NM_019516	Lgals12	lectin, galactose binding, soluble 12	2.338789	1.33072
NM_029760	Raf1	v-raf-leukemia viral oncogene 1	2.391596	-1.00156
AK051426	Dido1	death inducer-obliterator 1	2.418059	3.47917
NM_008841	Plk3r2	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta)	2.464008	-1.1635
AK048623	Trp63	transformation related protein 63	2.4678	-1.86891
NM_012009	Sh2d1b1	SH2 domain protein 1B1	2.475413	1.009373
NM_0197869	Irfz	interferon zeta	2.540319	1.258207
AK046479	Aven	apoptosis, caspase activation inhibitor	2.569261	1.979228
AK088215	Ptprc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	2.58666	1.84643
NM_023258	Pycard	PYD and CARD domain containing	2.6482	1.757244
NM_010153	ErbB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	2.654074	-1.04917
NM_009809	Casp14	caspase 14	2.700232	1.198647
NM_031170	Krt8	keratin 8	2.719627	1.301651
NM_009863	Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	2.729273	2.002227
NM_009096	Rps6	ribosomal protein S6	2.747477	1.226392
NM_007642	Cd28	CD28 antigen	2.953445	-1.32885
NM_025367	Sphk1	sphingosine kinase 1	3.136941	2.786276
NM_011721	Wrn	Werner syndrome homolog (human)	3.254767	1.755059
BC028285	Aip1	aryl hydrocarbon receptor-interacting protein-like 1	3.303568	1.102612
NM_010186	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I	3.46797	-1.39921
AK036160	Mnat1	menage a trois 1	3.469542	1.448529
BC079650	Bmf	Bcl2 modifying factor	3.55791	1.179047
NM_008199	H2-B1	histocompatibility 2, blastocyst	3.581049	1.217881
AK086933	Fas	as (TNF receptor superfamily member)	3.585754	1.143731
AK129214	Adnp	activity-dependent neuroprotective protein	3.68562	1.531585
NM_011721	Wrn	Werner syndrome homolog (human)	4.25078	-1.0036
NM_007639	Cd1d1	CD1d1 antigen	4.265484	-1.07682
NM_011053	Pdcd11	programmed cell death protein 11	4.530678	1.028995
NM_019573	Wwox	WW domain-containing oxidoreductase	5.508586	1.029341
AK049089	Acvr1c	activin A receptor, type IC	8.767496	1.577949
NM_053080	Aldh1a3	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A3	11.03512	1.594841
AK041224	Klre1	killer cell lectin-like receptor family E member 1	15.57543	1.471685
NM_013519	Foxc2	forkhead box C2	-5.53329	-1.17284
NM_025611	Cul7	cullin 7	-4.37064	-2.22228
AK035207	Als2cr2	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 2 (human)	-3.86387	-1.66437
AK037072	Prkra	protein kinase, interferon inducible double stranded RNA dependent activator	-3.79202	-1.84213
AK048442	Lig4	ligase IV, DNA, ATP-dependent	-3.77492	-1.40643
AK048623	Trp63	transformation related protein 63	-3.69748	1.812953
NM_012000	Cln8	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8	-3.51184	-1.12001
AK087586	Hip1	huntingtin interacting protein 1	-3.47839	-1.54945
NM_009764	Brcal	breast cancer 1	-3.33759	-1.74357
NM_011805	Dido1	death inducer-obliterator 1	-3.30892	-2.80063
AK048416	Ercc6	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6	-3.19992	-1.34833
NM_028012	Xrcc4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	-2.88459	-2.09859
NM_172858	Pak7	p21 (CDKN1A)-activated kinase 7	-2.69354	-2.27475
NM_013598	Kitl	kit ligand	-2.67501	-1.34273
NM_177322	Agtr1a	angiotensin II receptor, type 1a	-2.56556	-2.61444
NM_009741	Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	-2.53429	-2.14646
AK034147	Grik2	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 (beta 2)	-2.48673	-1.31907
NM_199476	Rrm2b	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)	-2.46816	-1.61616

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_009826	Rb1cc1	RB1-inducible coiled-coil 1	-2.42338	-1.5714
NM_019735	Apip	APAF1 interacting protein	-2.42272	1.350596
NM_011805	Dido1	death inducer-oblierator 1	-2.36795	1.222683
NM_009884	Cebpγ	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	-2.31554	-1.07993
BC060260	Eya1	eyes absent 1 homolog (Drosophila)	-2.28858	-1.34589
NM_011641	Trp63	transformation related protein 63	-2.28758	-1.38753
AK086477	Sh3glb1	SH3-domain GRB2-like B1 (endophilin)	-2.2642	-1.24643
AK050118	Igf1	insulin-like growth factor 1	-2.26186	-1.25063
NM_025539	Nudt2	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 2	-2.20897	-1.30053
NM_019789	Kcnp3	Kv channel interacting protein 3, calseinilin	-2.20463	1.185355
NM_028680	Ift57	intraflagellar transport 57 homolog (Chlamydomonas)	-2.10035	-1.54366
NM_027078	1200009F10Rik	RIKEN cDNA 1200009F10 gene	-2.07804	-1.10964
NM_007570	Btg2	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	-2.05684	-1.51714
NM_017374	Ppp2cb	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform	-2.0481	1.231124
AK220182	Hip1	huntingtin interacting protein 1	-2.04223	-1.14881
AK047252	Polb	polymerase (DNA directed), beta	-2.04144	-1.88651

**Table 6. Highly up and Highly down-regulated gene : Cell proliferation**

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_010296	Gli1	GLI-Kruppel family member GLI1	2.003089	1.266161
NM_008871	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	2.011656	2.242766
NM_145229	AY074887	cDNA sequence AY074887	2.019332	1.457926
NM_008568	Mcm7	minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	2.040649	-1.32071
NM_011057	Pdgfb	platelet derived growth factor, B polypeptide	2.062345	1.352654
NM_011374	St8sia1	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1	2.073738	1.070468
NM_028075	Tnfrsf13c	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c	2.095783	1.641422
NM_009627	Adm	adrenomedullin	2.103848	1.827532
U37029	Itgb1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	2.105715	1.130622
NM_007428	Agt	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	2.11851	1.099178
NM_010907	Nfkb1a	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	2.141287	1.260968
NM_008940	Klk8	kallikrein related-peptidase 8	2.152253	1.923576
NM_011210	Ptprc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	2.153628	-1.07312
NM_010578	Itgb1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	2.166997	2.718614
NM_010452	Hoxa3	homeo box A3	2.232382	-1.13515
NM_138942	Dbh	dopamine beta hydroxylase	2.272653	1.085661
NM_010113	Egf	epidermal growth factor	2.282324	-1.10533
NM_009008	Rac2	RAS-related C3 botulinum substrate 2	2.294966	1.19128
AK085599	Fkbp1a	FK506 binding protein 1a	2.327609	1.051839
NM_022887	Tsc1	tuberous sclerosis 1	2.367527	1.100966
NM_010810	Mmp7	matrix metalloproteinase 7	2.37407	1.236962
NM_134097	Topors	topoisomerase I binding, arginine/serine-rich	2.391596	-1.00156
NM_134092	Mtbp	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute p53 binding protein	2.415468	1.24065
AK049089	Acvr1c	activin A receptor, type IC	2.418059	3.47917
NM_008873	Plau	plasminogen activator, urokinase	2.422746	1.204213
NM_021451	Pmaip1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	2.464008	-1.1635
NM_009383	Tia1	Tia1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1	2.46705	1.30912
NM_010432	Hipk1	homeodomain interacting protein kinase 1	2.475413	1.009373
NM_008937	Prox1	prospero-related homeobox 1	2.484387	1.977264
NM_013627	Pax6	paired box gene 6	2.536084	1.282429
NM_011408	Sfn2	schlafen 2	2.542521	1.23562
NM_025466	Gkn1	gastrokeine 1	2.547255	2.616401
NM_009096	Rps6	ribosomal protein S6	2.569261	1.979228
NM_010187	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	2.633323	3.15735
NM_010094	Lefty1	left right determination factor 1	2.650552	1.199646
NM_009242	Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	2.663719	1.647819
AF546078	Setdb1	SET domain, bifurcated 1	2.696202	1.418901
NM_025367	Sphk1	sphingosine kinase 1	2.729273	2.002227
NM_024431	Morf4l1	mortality factor 4 like 1	2.753203	1.290504
XM_203796	Lama5	laminin, alpha 5	2.895083	0.391185
S92180	Rarb	retinoic acid receptor, beta	2.953445	0.752532
NM_009242	Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	3.004422	1.722719



Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
XM_109868	Tns3	tensin 3	3.086873	1.062267
NM_010329	Pdpn	podoplanin	3.144715	2.017608
AK035083	Pitx2	paired-like homeodomain transcription factor 2	3.24772	2.566879
NR_001579	Terc	telomerase RNA component	3.254767	1.755059
NM_031168	Il6	interleukin 6	3.303568	1.102612
AK003142	H19	H19 fetal liver mRNA	3.3384	3.121165
NM_009020	Rag2	recombination activating gene 2	3.382974	1.722507
NM_015790	Icosl	icos ligand	3.453844	1.340956
NM_007669	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	3.469542	1.448529
NM_028544	Rasip1	Ras interacting protein 1	3.526216	1.969601
NM_021314	Tacc2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	3.551416	1.58396
NM_011210	Ptpnc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	3.585754	1.143731
NM_007616	Cav1	caveolin, caveolae protein 1	3.639135	3.26628
NM_010329	Pdpn	podoplanin	3.885711	1.801271
NM_010730	Anxa1	annexin A1	4.37325	1.126505
NM_015760	Nox4	NADPH oxidase 4	4.48062	5.849143
NM_025376	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	6.052142	3.487644
NM_207707	Esr2	estrogen receptor 2 (beta)	6.258998	1.181811
NM_177798	Frs2	fibroblast growth factor receptor substrate 2	6.613493	2.679264
AK041480	Spn	sialophorin	8.767496	1.577949
NM_011407	Sfn1	schlafen 1	13.12569	3.31052
NM_009887	Cer1	cerberus 1 homolog (Xenopus laevis)	-11.5011	-10.7035
AK031837	Foxp1	forkhead box P1	-6.77519	-4.80355
NM_012025	Racgap1	Rac GTPase-activating protein 1	-6.14048	-1.36529
NM_013519	Foxc2	forkhead box C2	-5.53329	-1.17284
AK040662	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	-4.95574	-4.32856
AK085134	Nbn	nibrin	-4.8719	-5.46322
AK048442	Lig4	ligase IV, DNA, ATP-dependent	-3.77492	-1.40643
AK048623	Trp63	transformation related protein 63	-3.69748	-0.55159
NM_007462	Apc	adenomatosis polyposis coli	-3.60525	-1.34437
NM_009506	Vegfc	vascular endothelial growth factor C	-3.10196	-3.44576
NM_010612	Kdr	kinase insert domain protein receptor	-3.1001	-1.83986
NM_018782	Calcr1	calcitonin receptor-like	-2.93051	-1.5473
AK051140	Ccdc88a	coiled coil domain containing 88A	-2.89835	-3.01546
NM_028012	Xrcc4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	-2.88459	-2.09859
AB049605	Cav2	caveolin 2	-2.84772	-3.55743
NM_008709	Mycn	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	-2.7657	-2.24413
NM_013584	Lifr	leukemia inhibitory factor receptor	-2.76471	-2.89782
NM_199473	Col8a2	procollagen, type VIII, alpha 2	-2.71606	-1.55721
NM_013598	Kitl	kit ligand	-2.67501	-1.34273
NM_007903	Edn3	endothelin 3	-2.67415	-1.83199
NM_011577	Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	-2.63767	-1.70599
NM_013598	Kitl	kit ligand	-2.62751	-1.04662
AK034793	Nfib	nuclear factor I/B	-2.60306	-1.71518
NM_015732	Axin2	axin2	-2.57056	-1.45353
AJ294737	Igh-6	immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	-2.56692	-1.28951
NM_025866	Cdca7	cell division cycle associated 7	-2.52754	-1.43359
NM_007492	Arx	aristaless related homeobox gene (Drosophila)	-2.43478	-1.46399
NM_031166	Id4	inhibitor of DNA binding 4	-2.39256	-1.7284
AK030674	Col8a1	procollagen, type VIII, alpha 1	-2.36693	1.080124
NM_030153	Mak10	MAK10 homolog, amino-acid N-acetyltransferase subunit, (S. cerevisiae)	-2.34141	-1.25082
AK081805	Prkar2b	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta	-2.32393	-1.46544
NM_011641	Trp63	transformation related protein 63	-2.28758	-1.38753
AK050118	Igf1	insulin-like growth factor 1	-2.26186	-1.25063
AK083099	Lipa	lysosomal acid lipase A	-2.25439	-5.03307
AK088666	Igh-6	immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	-2.21925	1.10181
NM_053242	Foxp2	forkhead box P2	-2.19336	-1.60316
AK033431	Egfr	epidermal growth factor receptor	-2.1451	1.832307
NM_009820	Runx2	runt related transcription factor 2	-2.11469	1.02329
NM_015753	Zeb2	zinc finger E-box binding homeobox 2	-2.10861	-1.12594
AK037232	Gli3	GLI-Kruppel family member GLI3	-2.08917	-1.47838
NM_008701	Nkx2-9	NK2 transcription factor related, locus 9 (Drosophila)	-2.06577	-3.10079

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_010931	Uhrf1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	-2.06227	-1.3083
NM_007912	Egfr	epidermal growth factor receptor	-2.04076	-1.35679
AK039081	Arhgap5	Rho GTPase activating protein 5	-2.03637	-1.14077
NM_025923	Fancl	Fanconi anemia, complementation group L	-2.01352	-1.30404

Table 7. Highly up and Highly down-regulated gene : DNA repair

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_010479	Hspa1a	heat shock protein 1A	2.333333	1.113072
NM_133865	Dclre1b	DNA cross-link repair 1B, PSO2 homolog (S. cerevisiae)	2.841696	1.344058
AK048442	Lig4	ligase IV, DNA, ATP-dependent	-3.77492	-1.40643
AK048416	Ercc6	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6	-3.19992	-1.34833
NM_028012	Xrcc4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	-2.88459	-2.09859
NM_009632	Parp2	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 2	-2.64458	-1.71084
NM_009632	Parp2	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 2	-2.64391	-2.05969
AK220176	Atr	ataxia telangiectasia and Rad3 related	-2.56815	-1.68088
NM_199476	Rrm2b	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)	-2.46816	-1.61616
AK014190	Pms2	postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)	-2.43717	-3.68558
NM_029977	Polq	polymerase (DNA directed), theta	-2.43516	-2.13721
NM_011234	Rad51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)	-2.40967	-2.29269
NM_007415	Parp1	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	-2.37666	-1.51715
NM_009884	Cebpg	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	-2.31554	-1.07993
NM_010247	Xrcc6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	-2.09531	-1.19544
AK047252	Polb	polymerase (DNA directed), beta	-2.04144	-1.88651

Table 8. Highly up and Highly down-regulated gene : Inflammatory response

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_008324	Indo	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	-2.77164	-2.84615
NM_011577	Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	-2.63767	-1.70599
NM_009662	Alox5	arachidonate 5-lipoxygenase	-2.3639	-2.03119
AK083099	Lipa	lysosomal acid lipase A	-2.25439	-5.03307
NM_024124	Hdac9	histone deacetylase 9	-2.18344	-1.40375
NM_021359	Itgb6	integrin beta 6	-2.12476	-0.72409
NM_007587	Calca	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	2.122317	3.372583
NM_010185	Fcrlg	Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide	2.204049	1.348484
NM_024406	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	2.23342	-1.32398
AK085027	Plaa	phospholipase A2, activating protein	2.294306	1.101572
NM_024406	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	2.376828	1.705165
NM_030612	Nfkbiz	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	2.390568	1.637288
NM_010187	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	2.633323	3.15735
NM_025367	Sphk1	sphingosine kinase 1	2.729273	2.002227
NM_011756	Zfp36	zinc finger protein 36	2.9586	1.091924
NM_011756	Zfp36	zinc finger protein 36	3.800384	2.150946
NM_008771	P2rx1	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	4.25078	-1.0036
AK028981	Cd44	CD44 antigen	4.257265	7.228266
AK045226	Cd44	CD44 antigen	4.287401	8.13052
NM_011580	Thbs1	thrombospondin 1	5.492941	-1.14174
AK041480	Spn	sialophorin	8.767496	1.577949
NM_009892	Chi3l3	chitinase 3-like 3	14.05654	1.139114

Table 9. Highly up and Highly down-regulated gene : Response to oxidative stress

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_012000	Cln8	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8	-3.51184	-1.12001
AK048416	Ercc6	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6	-3.19992	-1.34833
NM_199476	Rrm2b	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)	-2.46816	-1.61616
AK036233	Mtf1	metal response element binding transcription factor 1	-2.25348	-1.36658
NM_017374	Ppp2cb	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform	-2.0481	1.231118
BC060645	Oxsr1	oxidative-stress responsive 1	2.327951	-1.00509
NM_008161	Gpx3	glutathione peroxidase 3	2.893425	-1.0225

**Table 10. Highly up and Highly down-regulated gene : Immune response**

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_011095	Lilrb3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	2.063488	1.519714
NM_007843	Defb1	defensin beta 1	2.085442	1.435702
NM_028075	Tnfrsf13c	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c	2.095783	1.641422
NM_011210	Ptprc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	2.153628	-1.07312
NM_011604	Tlr6	toll-like receptor 6	2.181945	1.516015
NM_010185	Fcgr1g	Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide	2.204049	1.348484
NM_010493	Icam1	intercellular adhesion molecule	2.271467	1.266013
NM_138942	Dbh	dopamine beta hydroxylase	2.272653	1.085661
NM_009096	Rps6	ribosomal protein S6	2.569261	1.979228
NM_010187	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	2.633323	3.15735
NM_019465	Crtam	cytotoxic and regulatory T cell molecule	2.719627	1.301651
NM_021384	Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	2.766498	1.190093
NM_007639	Cd1d1	CD1d1 antigen	3.136941	2.786276
NM_011817	Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	3.15786	1.441402
NM_031168	Il6	interleukin 6	3.303568	1.102612
NM_015790	Icosl	icos ligand	3.453844	1.340956
NM_011210	Ptprc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	3.585754	1.143731
NM_009844	Cd19	CD19 antigen	4.1973	2.38585
BC008626	Icam1	intercellular adhesion molecule	6.667006	1.457465
NM_021384	Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	7.06956	1.192839
AK041480	Spn	sialophorin	8.767496	1.577949
NM_02363E	Rab27a	RAB27A, member RAS oncogene family	15.57543	1.471685
AK031837	Foxp1	forkhead box P1	-6.77519	-4.80355
AK085134	Nbn	nibrin	-4.8719	-5.46322
AK048442	Lig4	ligase IV, DNA, ATP-dependent	-3.77492	-1.40643
NM_008372	Il7r	interleukin 7 receptor	-3.53171	-5.64681
NM_028012	Xrcc4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	-2.88459	-2.09859
NM_011577	Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	-2.63767	-1.70599
AJ294737	Igh-6	immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	-2.66692	-1.28951
AK014190	Pms2	postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)	-2.43717	-3.68558
NM_009884	Cebpg	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	-2.31554	-1.07993
AK088666	Igh-6	immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	-2.21925	1.10181
NM_007920	Efr1	E74-like factor 1	-2.04497	-1.29006

**Table 11. Highly up and Highly down-regulated gene : Cell signaling**

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_010296	Gli1	GLI-Kruppel family member GLI1	2.003089	1.266161
NM_008171	Grin2b	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2)	2.060917	2.164227
NM_010944	Musk	muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase	2.088169	1.21028
NM_008940	Klk8	kallikrein related-peptidase 8	2.152253	1.923576
AK015921	Sv2c	synaptic vesicle glycoprotein 2c	2.173884	3.000857
NM_026000	Psmc9	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9	2.185015	2.138909
NM_138942	Dbh	dopamine beta hydroxylase	2.272653	1.085661
NM_009891	Chat	choline acetyltransferase	2.326498	1.215774
AK044183	Pde3b	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	2.359561	2.338978
NM_022887	Tsc1	tuberous sclerosis 1	2.387527	1.100966
NM_011719	Wnt9b	wingless-type MMTV integration site 9B	2.425754	1.968294
NM_001013365	Osr1	oncostatin M	2.540319	1.258207
NM_008171	Grin2b	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2)	2.570089	1.050784
NM_031167	Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist	2.679214	1.464952
NM_031168	Il6	interleukin 6	3.303568	1.102612
NM_181751	Gpr119	G-protein coupled receptor 119	3.702819	4.355335
NM_031167	Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist	4.80169	2.472294
NM_177798	Frs2	fibroblast growth factor receptor substrate 2	6.613493	2.679264
AK078371	Ugt8a	UDP galactosyltransferase 8A	-7.37456	-2.50056
AK043542	Grik1	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1	-5.14877	-2.80887
NM_011674	Ugt8a	UDP galactosyltransferase 8A	-5.05123	-1.12606
NM_010113	Egr2	early growth response 2	-4.70553	-2.15014
AK045348	Grd2	glutamate receptor, ionotropic, delta 2	-4.69037	-3.26973
NM_010076	Drd1a	dopamine receptor D1A	-4.54035	-2.93288

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
AK048623	Trp63	transformation related protein 63	-3.69748	1.8129
NM_009520	Wnt2b	wingless related MMTV integration site 2b	-3.65258	-3.68412
NM_022025	Slc5a7	solute carrier family 5 (choline transporter), member 7	-3.57692	-3.21978
NM_012000	Cln8	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8	-3.51184	-1.12001
NM_016708	Npy5r	neuropeptide Y receptor Y5	-3.45568	1.07975
AK045570	Gria2	glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2)	-3.19065	-1.81028
AK048420	Fzd2	frizzled homolog 2 (Drosophila)	-3.09237	-2.23371
AK032444	Syt1	synaptotagmin I	-2.93987	-1.59777
NM_007982	Ptk2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	-2.84115	-1.37843
NM_033269	Chrm3	cholinergic receptor, muscarinic 3, cardiac	-2.71303	-2.93581
U05672	Adora2a	adenosine A2a receptor	-2.61285	-3.75835
NM_010864	Myo5a	myosin Va	-2.59206	-1.39548
AK034147	Grik2	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 (beta 2)	-2.48673	-1.31907
AK090159	Cyb5r4	cytochrome b5 reductase 4	-2.46206	-1.37885
AK036192	Grid2	glutamate receptor, ionotropic, delta 2	-2.37662	-2.42694
NM_010800	Bhlhb8	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 8	-2.35229	-3.00503
NM_009793	Camk4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	-2.29391	1.1581
NM_011641	Trp63	transformation related protein 63	-2.28758	-1.38753
AK030326	Lin7a	lin-7 homolog A (C. elegans)	-2.22652	-1.70456
NM_145129	Chrna3	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	-2.18533	-1.19891
AK053328	Trim9	tripartite motif protein 9	-2.12605	-1.27056
AK030326	Lin7a	lin-7 homolog A (C. elegans)	-2.03689	-1.78605

Table 12. Highly up and Highly down-regulated gene : Cell cycle

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_013600	Msh5	mutS homolog 5 (E. coli)	2.005891	1.179475
NM_012016	Ern2	endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 2	2.010917	1.390805
NM_145229	AY074887	cDNA sequence AY074887	2.019332	1.457926
NM_025415	Cks2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	2.041674	1.098053
AY270177	Mei1	meiosis defective 1	2.043776	0.949675
NM_019935	Ovol1	OVO homolog-like 1 (Drosophila)	2.101621	3.190456
U37029	Itgb1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	2.105715	1.130622
NM_009594	Abl1	v-abl Abelson murine leukemia oncogene 1	2.140504	1.220476
NM_011210	Ptprc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	2.153628	0.931861
NM_010578	Itgb1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	2.166997	2.718614
NM_022724	Suv39h2	suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)	2.168681	2.484941
NM_008264	Hoxa13	homeo box A13	2.338789	1.33072
AK035116	E2f6	E2F transcription factor 6	2.348814	1.4932
NM_134092	Mtbp	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute p53 binding protein	2.415468	1.24065
AK052042	Suv39h2	suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)	2.474236	0.819036
AK021406	Ubr2	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 2	2.475557	0.848407
NM_009770	Btg3	B-cell translocation gene 3	2.535801	0.903768
NM_001013365	Osm	oncostatin M	2.540319	1.258207
NM_009096	Rps6	ribosomal protein S6	2.569261	1.979228
NM_197889	Ifnz	interferon zeta	2.58666	1.84643
NM_023813	Camk2d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	2.726002	1.661719
NM_016865	Htatip2	HIV-1 tat interactive protein 2, homolog (human)	2.747477	1.226392
NM_013917	Pttg1	pituitary tumor-transforming 1	2.985406	0.619258
NM_026014	Cdt1	chromatin licensing and DNA replication factor 1	3.074456	1.362606
NM_008655	Gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	3.123995	2.334487
NM_010329	Pdpr	podoplanin	3.144715	2.017608
NM_011817	Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	3.15786	1.441402
NM_007669	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	3.469542	1.448529
NM_021314	Tacc2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	3.551416	1.58396
NM_011210	Ptprc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	3.585754	1.143731
NM_010329	Pdpr	podoplanin	3.885711	1.801271
NM_010730	Anxa1	annexin A1	4.37325	1.126505
AK050778	Kif11	kinesin family member 11	4.681269	1.009555
NM_011407	Slnf1	schlafen 1	13.12569	3.31052
AK085134	Nbn	nibrin	-4.37064	-2.22228
NM_025611	Cul7	cullin 7	-4.08475	-5.71696
NM_010892	Nek2	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	-3.74369	-1.7721

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_010021	Dazl	deleted in azoospermia-like	-3.60625	-1.34437
NM_007462	Apc	adenomatosis polyposis coli	-3.33759	-1.74357
NM_009764	Brca1	breast cancer 1	-2.68677	-1.18775
NM_022889	Pes1	pescadillo homolog 1, containing BRCT domain (zebrafish)	-2.65146	-1.56027
BC086790	Bub3	budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (S. cerevisiae)	-2.59266	-1.65403
AK036518	Myb	myeloblastosis oncogene	-2.56815	-1.68088
NM_183417	Cdk2	cyclin-dependent kinase 2	-2.53981	-1.34035
NM_033270	E2f6	E2F transcription factor 6	-2.53429	-2.14646
NM_009741	Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	-2.48409	-1.80525
NM_009829	Ccnd2	cyclin D2	-2.43717	-3.68558
AK014190	Pms2	postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)	-2.40967	-2.29269
NM_011234	Rad51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)	-2.39256	-1.7284
NM_031166	Id4	inhibitor of DNA binding 4	-2.24132	-1.43544
NM_020567	Gmnn	geminin	-2.15638	-1.7848
NM_029437	Ckap5	cytoskeleton associated protein 5	-2.09761	1.1124
AK015441	Spdyb	speedy homolog B (Drosophila)	-2.05789	1.0344

Table 13. Highly up and Highly down-regulated gene : Angiogenesis

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_008871	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	2.011656	2.242766
NM_010303	Gna13	guanine nucleotide binding protein, alpha 13	2.023892	1.018715
NM_007585	Anxa2	annexin A2	2.100621	2.130391
NM_009154	Sema5a	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A	2.480941	1.577114
NM_008737	Nrp1	neuropilin 1	2.580101	1.39358
BC006646	Klf5	Kruppel-like factor 5	2.585551	-1.03102
NM_009621	Adamts1	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	2.673142	1.490224
NM_016865	Htatip2	HIV-1 tat interactive protein 2, homolog (human)	2.747477	1.226392
AK040447	Nrp1	neuropilin 1	2.780182	1.712015
NM_009633	Adra2b	adrenergic receptor, alpha 2b	2.976806	1.355963
NM_010516	Cyr61	cysteine rich protein 61	3.146205	1.189167
NM_009821	Runx1	runx related transcription factor 1	3.163657	-1.45206
AK035083	Pitx2	paired-like homeodomain transcription factor 2	3.24772	2.566879
NM_009621	Adamts1	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	4.092259	2.245297
NM_011580	Thbs1	thrombospondin 1	5.492941	-1.14174
AK011851	Gna13	guanine nucleotide binding protein, alpha 13	5.929096	2.448322
AK086939	Co4a3	procollagen, type IV, alpha 3	13.34432	1.394643
NM_031199	Tgfa	transforming growth factor alpha	-36.4509	-21.3889
AK053336	Tek	endothelial-specific receptor tyrosine kinase	-5.74414	-8.23913
NM_013519	Foxc2	forkhead box C2	-5.53329	-1.17284
AK040662	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	-4.95574	-4.32856
NM_007982	Plk2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	-2.84115	-1.37843
NM_010228	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1	-2.76969	-1.38581
NM_010228	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1	-2.37034	-1.32123

Table 14. Up and down-regulated gene : Inflammatory cytokines

Genbank	Gene symbol	Description	Sham vs. Rose Bengal	Sham vs. DSHMT + Rose Bengal
NM_008360	Il18	interleukin 18	-1.92378	-1.58235
AB022307	Il15	interleukin 15	-1.92038	-1.7434
NM_008357	Il15	interleukin 15	-1.81309	-3.22258
NM_010548	Il10	interleukin 10	-1.74699	1.01138
NM_008371	Il7	interleukin 7	-1.46932	1.016219
NM_001009940	Il19	interleukin 19	-1.24976	1.033128
NM_021782	Il21	interleukin 21	1.028386	1.011683
NM_010556	Il3	interleukin 3	1.335114	1.383035
NM_021283	Il4	interleukin 4	1.568581	1.519721
NM_008366	Il2	interleukin 2	1.638677	1.160818
NM_031168	Il6	interleukin 6	3.303568	1.102612

으로 표시하였다. 세포주기(cell cycle) 관련 유전자 중 로즈벵갈에 의한 광화학적 뇌경색 마우스에서 2배 이상 증가 또는 감소한 유전자들을 Table 12에 나타내었다. 로즈벵갈에 의해 2배 이상 증가한 유전자는 35개였고, 2배 이상 감소한 유전자는 20개였으며, 로즈벵갈에 의해 증가하거나 감소한 대부분의 모든 유전자의 발현은 桃紅四物湯 전처리 시 감소 혹은 증가되어 1에 가까워지는 양상을 보였다(Table 12).

#### 14. 桃紅四物湯이 광화학적 뇌경색 마우스에서 신생혈관생성 관련 유전자의 변화에 미치는 영향

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 유전자들의 발현 비교는 hierarchical clustering하여, treeview 프로그램으로 dendrogram을 그리고, 발현양 증가는 적색, 발현양 감소는 녹색으로 표시하였다. 신생혈관생성(angiogenesis) 관련 유전자 중 로즈벵갈에 의한 광화학적 뇌경색 마우스에서 2배 이상 증가 또는 감소한 유전자들을 Table 13에 나타내었다. 로즈벵갈에 의해 2배 이상 증가한 유전자는 17개였고, 2배 이상 감소한 유전자는 7개였으며, 로즈벵갈에 의해 증가하거나 감소한 대부분의 모든 유전자의 발현은 桃紅四物湯 전처리 시 감소 혹은 증가되어 1에 가까워지는 양상을 보였다(Table 13).

#### 15. 桃紅四物湯이 광화학적 뇌경색 마우스에서 염증성 사이토카인 유전자의 변화에 미치는 영향

염증성 사이토카인(inflammatory cytokine) 유전자 중 로즈벵갈에 의한 광화학적 뇌경색 마우스에서 증가 혹은 감소한 유전자들을 표에 나타내었다(Table 14). IL-6 이외의 사이토카인들은 대조군에 비하여 2배 이하의 발현 증가 혹은 감소를 보였으며, 桃紅四物湯 처리 시 유의한 변화를 보였다. 특히, IL-10의 경우 로즈벵갈에 의해 1.746배 감소하였으나 桃紅四物湯 처리 시 1.011배 증가하였다.

## 고 찰

현대 사회의 사회, 경제학적 변화와 노령화로 뇌졸중은 주요 사망원인이 되고 있으며, 그 중 80%는 뇌경색이라 불리는 허혈성 뇌졸중이 차지하고 있다. 현재 뇌경색의 치료는 혈관이완이나 혈전용해제 등을 이용한 재관류 방법과 뇌졸중 발생 후 나타나는 뇌손상을 보호하는 신경보호 방법을 사용하고 있다<sup>27)</sup>. 근래에 세계 각국 연구자들은 뇌졸중 후 신경손상의 확산을 제한하는데 필요한 신경보호제를 개발하는 연구를 진행해 왔으며 뇌졸중 동물모델을 이용한 전임상 실험을 통해 그 효과를 검증했으나 아직 그 효과가 증명된 약물은 없는 실정이다<sup>28)</sup>. 이에 따라 최근 한 방제제를 이용한 다양한 연구들이 시도되고 있으며, 나아가 뇌졸중에 관한 한약제제의 치료효능 및 작용기전을 체계적으로 정리하고 과학적으로 검증함으로써 향후 치료제로 개발하는 것이 중요할 것이다.

뇌경색은 한의학적으로 中風의 범주에 속한다. 中風은 뇌혈

관의 순환장애로 인해 국소적인 신경학적 결손을 나타내는 뇌혈관질환을 포함하는 것으로 人事不省, 手足癱瘓, 口眼喎斜, 言語蹇澀, 偏身麻木 등의 임상증상을 나타내는 병증이다<sup>29)</sup>. 瘀血은 中風의 주요한 원인이 되고 있다. 瘀血은 혈액의 운행이 不暢하여 瘀積이 凝滯되거나 혹은 離經之血이 체내에 정체됨으로 말미암아 유발된 여러 종류의 병증을 총칭하는 것으로 일종의 병리적 산물이며, 氣血運行에 영향을 미쳐 장부기능을 실조시킴으로써 다양한 질병을 야기하는 중요한 속발성 발병인자 중 하나이다<sup>29)</sup>.

桃紅四物湯은 養血調經하는 四物湯에 活血化瘀하는 桃仁, 紅花를 加하여 活血, 養血, 化瘀, 新生하게 하는 처방으로 일체의 瘀血性 질환의 通治方으로 사용되어 왔으며<sup>22)</sup>, 구성약물의 本草學의 性味와 效能을 살펴보면 다음과 같다. 桃仁은 苦甘·平하며 心·肝·大腸經에 들어가고 破血祛瘀, 潤腸滑腸의 효능이 있고, 紅花는 辛·溫하며 心·肝經에 들어가고 活血通經·祛瘀止痛의 효능이 있고, 生地黄은 甘苦·寒하며 心·肝·腎經에 들어가고 清熱涼血·生津止渴의 효능이 있고, 當歸는 甘辛·溫하며 肝·心·脾經에 들어가고 補血和血·調經止痛·潤腸通便의 효능이 있고, 赤芍藥은 酸苦·涼하며 肝·脾經에 들어가고 涼血活血·消癰散腫의 효능이 있고, 川芎은 辛·溫하며 活血行氣·祛風止痛의 효능이 있다<sup>30)</sup>.

구성약물 각각의 약리학적 효과를 살펴보면 桃仁은 혈관확장작용, 항혈전 작용, 항염증작용이 있고, 紅花는 혈관확장작용, 항혈전작용, 항고지혈증작용이 있고, 生地黄은 진정, 항염증, 면역억제 등의 작용이 있고, 當歸는 항혈전, 혈관확장 및 면역기능 개선 등의 작용이 있고, 赤芍藥은 면역조절작용, 진통작용, 항혈전작용 등이 있고, 川芎은 혈관확장작용, 항혈전작용 등이 있어 주로 순환기계 및 혈액 대사 등에 약리작용이 있는 것을 알 수 있다<sup>31)</sup>. 또한 최근 桃紅四物湯의 각각의 약물들이 신경세포나 중추신경에 관한 작용들이 보고되고 있는데, 전<sup>32)</sup>은 당귀의 뇌허혈 후 회복효과에 대해 보고하였고, 신 등<sup>33)</sup>은 桃仁의 중추신경 재생효과, Li 등<sup>34)</sup>은 허혈성 뇌손상에서 生地黄의 보호효과, 柳<sup>35)</sup>는 뇌출혈에서 芍藥의 신경세포 보호효과, 金<sup>36)</sup>은 川芎의 신경세포 보호효과 등을 보고하였다.

桃紅四物湯은 “經水先期而至...若血多有塊 血紫稠粘 乃內有瘀血 用四物湯 加桃仁紅花破之 名桃紅四物湯”<sup>26)</sup> 이라 하여 瘀血로 인한 婦人疾患의 通治方 및 각종 瘀血性 질환의 治療方으로 사용되어 왔다. 또한 桃紅四物湯은 中風, 혈액 및 순환기계 질환에도 활용되고 있으며, 이에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나 桃紅四物湯이 유전자 발현 수준에서 어떤 영향을 주는가에 대한 연구는 아직 접하지 못하였으며, 다른 한약제제들이 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 연구도 아직 미미한 실정이다.

20세기 후반에 가장 큰 발전을 한 유전자 조작 기술의 발달로 암이나 질병에 유전자가 관여한다는 것은 밝혀진 지 오래되었고, 여러 부분에서 DNA와 유전자 감식 기술이 이용되고 있으며, 유전자 발현을 조사하기 위해서는 DNA sequencing, RFLP, Southern blot, Northern blot 등의 기술을 이용하였다. 그러나 어떤 세균의 감염여부를 확인하고 균 동정을 하기 위해서는 몇 주 동안 배양해야 하는 번거로움이 있었다. 또한 이러한 기술을 사용하여 한 번에 여러개의 유전자 발현변이나 돌연변이를 확인

한다는 것은 쉽지 않았다. 하지만 DNA microarray는 동시에 이러한 문제점들을 해결하였다. 또한 DNA microarray 실험의 결과를 분석하기 위해서는 많은 다른 database와 연결하여 서로의 정보를 공유해야 한다<sup>37)</sup>. 최근 연구에서 대규모 유전자 검색 방법으로 DNA chip이 각광을 받고 있다. 슬라이드 위에 수천 개의 유전자를 집적시켜 놓고 연구하고자 하는 sample의 RNA를 hybridization한 후 전용스캐너로 스캔을 하면 각 유전자별 발현량을 알 수가 있다. 이것은 수천 번의 quantitative RT-PCR 또는 northern blot을 한 것과 같은 효과를 가지고 있어 유전자 발현 연구에 시간과 효율의 극대성을 가지고 있으며, 상처의 치료와 재생연구, 세포자멸사의 대규모 유전자 발현 연구, 노화와 칼로리 관계 연구 등 DNA microarray를 이용한 논문수가 급증할 정도로 여러 방면에서 다각도로 DNA microarray가 활용되고 있다. DNA microarray란 유전자 검색용으로서 매우 많은 종류의 DNA를 고밀도로 붙여 놓은 것을 말한다. Southern blot이나 northern blot의 경우 유전물질을 붙이는 매체로 nitrocellulose 막을 사용하는데 반하여 DNA chip에서는 유리와 같은 고형체를 사용하여 DNA microarray는 아주 적은 양의 유전물질을 고밀도로 붙일 수 있게 되었고, 동시에 많은 수를 검색할 수 있게 된 것이다. DNA microarray를 붙이는 유전물질의 크기에 따라 cDNA microarray와 oligonucleotide microarray로 나누어 질 수 있다. 이들 DNA microarray의 이름에서도 알 수 있듯이 cDNA chip에는 최소한 500bp 이상의 유전자(full-length open leading frame 또는 EST)가 붙여져 있고, oligonucleotide microarray에는 약 15-25개의 염기들로 이루어진 oligonucleotide가 붙여져 있다<sup>37)</sup>.

동물의 발생 초기단계에서는 하나의 세포로 시작하나 태어날 때는 수 조개의 여러 다른 세포들로 형성된 개체로 만들어진다. 이와 같은 변화와 역할분담은 수만 개에 이르는 유전자들에 의하여 조절된다. 한 개체의 모든 세포는 똑같은 유전정보를 가지고 있지만 발생단계에서 자신의 결정된 역할들에 의하여 특정 유전자들만 발현함으로써 다른 세포들과 구별된다. 즉 몸을 형성하는 각각의 세포군들에는 각각의 독특한 유전자들이 발현된다. 이들은 서로 긴밀한 관계를 유지하고 있으며, 이들 유전자들에 돌연변이가 생기거나 변화가 일어나면 질병이 발생한다. 그러므로 DNA microarray를 이용하여 계층 차원에서의 유전자 기능과 변화를 알아내는 것은 과학 기술적인 측면뿐만 아니라 인류의 건강과 생명에 대한 연구를 하는데 매우 중요하다<sup>38)</sup>.

본 연구에서는 桃紅四物湯의 뇌경색 예방 및 치료효과 연구를 위해 화학적 약물주입<sup>39)</sup>을 통한 광화학적 동물 뇌경색 모델을 통해 병리조직학적 변화와, cDNA microarray를 이용한 DNA 발현 변화를 관찰하였다.

광화학적 뇌경색 모델<sup>10)</sup>을 만들기 위해 광과민성 화학물질인 로즈벵갈을 혈관에 주입하고 뇌의 국소 부위에 직접 빛을 조사하였다. 로즈벵갈은 빛에 반응하여 산소라디칼을 생성하고, 혈관 내피세포를 손상시켜 혈전증을 생성하여 뇌경색을 초래하며, 사람의 뇌경색 병리기전과 유사하여 작은 국소 병변을 만들기에 적합하고 재현성이 우수하다. 본 연구에서는 병변을 유발시킬 부위의 두피를 0.5 cm 정도 절개하고 골막을 박리하여 두개골을 노

출한 후 직경 2 mm의 광섬유 광원의 중심을 bregma 전방 1 mm, 측방 3 mm 지점에 밀착하여 열발생이 없는 할로겐 광원을 조사하였고, 광원조사 2분 후 로즈벵갈 염료 10 mg/kg을 꼬리 정맥을 통해 2분간 서서히 주사하였으며, 이후 12분간 광원조사를 유지하였다. 그 결과 마우스를 이용한 실험 모델<sup>40)</sup>에서의 동일하게 MRI 및 H&E 조직화학 염색을 통해 광원조사 부위에 병변이 발생된 것을 확인할 수 있었다.

그러나 桃紅四物湯을 5일간 경구 투여한 후 로즈벵갈로 병변을 유도한 실험군에서는 로즈벵갈 단독 실험군에 비하여 병변과 손상부위가 감소하였다. 이때 로즈벵갈 주사 후 광원을 조사하지 않은 심장과 신장에는 병변이 발생하지 않았으며, 로즈벵갈 대신 생리식염수를 동일한 방법으로 주사하고 광원을 조사한 대조군의 뇌조직에는 손상이 없었다. 또한, cDNA microarray 분석 결과, 로즈벵갈에 의한 병변 실험군에서는 262개의 2배 이상 발현이 증가된 유전자와 694개의 2배 이상 발현이 감소된 유전자가 관찰되었으며, 桃紅四物湯 투여에 의해서는 각 755개의 증가와 331개의 감소된 유전자를 확인하였다.

또한 각 유전자들의 비교를 위하여 hierarchical clustering으로 2배 이상 증감된 유전자를 분류하고, treeview 프로그램으로 dendrogram을 그리고, 적색은 발현양 증가, 그리고 녹색은 발현양 감소를 표시하였다. cDNA microarray에 사용된 total gene은 각 기능별로 나누어서 세포자멸사, 세포증식, DNA repair, 염증반응, 산화적 손상, 면역 반응, 세포신호전달, 세포주기 및 신생혈관생성 등에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분석하고 표시하였다. 桃紅四物湯 전처리군에서는 로즈벵갈에 의해 증가하거나 감소한 유전자들의 발현을 억제하거나 증가를 유도하였으며, 특히 세포자멸사에 관련된 Fas의 증가를 억제하였고, Bcl-2의 발현 감소를 억제하여 뇌손상으로 부터 보호하였다.

급성 뇌경색 환자의 뇌척수액과 혈액에서 염증성 사이토카인이 증가하는 것은 뇌경색의 크기 및 심각도와 관련이 있으며, 예후를 예측할 수 있다. TNF- $\alpha$ 는 염증반응을 개시하고 다른 사이토카인과 염증 매개물질의 발현을 유도한다<sup>41)</sup>. 허혈성 실험 모델에서 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 발현 증가가 중대뇌동맥 폐색 후 허혈이 발생한 대뇌 피질에서 보고되었다<sup>42)</sup>. 또한 중대뇌동맥 폐색 후 TNF- $\alpha$ 와 IL-1을 뇌 내로 주입하면 경색의 크기 및 부종이 증가하고 반면 TNF-1와 IL-1에 대한 중화항체를 주입하면 뇌손상이 감소된다는 보고가 있다<sup>43)</sup>. 본 cDNA microarray 결과에서는 IL-6를 제외한 대부분 염증성 사이토카인은 발현의 증감정도가 대조군에 비하여 2배 이상의 유의한 차이를 보이지 않았으나, 항염증 반응에 관여하는 IL-10의 경우 로즈벵갈에 의한 병변 실험군에서 1.7배 감소한 반면, 桃紅四物湯 전처리 시 1.01배로 회복되었다.

IL-6는 염증성 사이토카인의 활성지표로 사용되며<sup>44)</sup>, 급성 뇌경색 환자의 혈액에서는 건강인 군에 비해 증가된다. 특히 급성 뇌경색에서 IL-6의 증가는 뇌경색의 크기와 장기간의 예후를 평가하는데 임상적으로 중요하다<sup>45)</sup>. 본 연구의 cDNA microarray 결과에서 IL-6는 3.3배 발현이 증가하였으며, 이는 면역화학 염색을 통해 로즈벵갈에 의한 광화학적 뇌경색 마우스의

병변부위에서 단백질 발현이 증가하는 결과와 일치하였다. 그러나 桃紅四物湯을 5일간 미리 경구 투여한 후 병변을 유발한 그룹에서는 IL-6의 발현이 현저하게 감소하였다.

현재 인간의 질병이나 암과 관련된 유전자에 대한 연구는 심도 깊게 지속적으로 연구되고 있으나 뇌경색 발병과 관련된 유전자 수준에서의 발현 변화에 관한 보고는 부족한 실정이다. 이 연구에서 뇌경색과 관련된 세포자멸사나 염증 관련 유전자들의 발현 변화가 뚜렷하였으며, 면역 반응이나 산화적 손상에 관련된 유전자들의 발현 변화가 관찰되었다. 그러나 대다수 많은 유전자들이 기능상 분류가 명확하지 않은 상태이므로 각 유전자에 대한 각 실험군 간의 상호비교가 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 桃紅四物湯은 광화학적 색전에 의한 뇌경색 마우스 모델에서 뇌손상 보호효과를 나타내었다. 또한 cDNA microarray 분석결과는 뇌경색 발병과 관련된 유전자에 대한 정보를 제공하고 이를 통해 뇌경색 예방과 치료를 위한 분자생물학적 기반을 제공할 수 있을 것이며, 관련 단백질의 발현과 관련된 작용기전에 대한 보다 세밀한 연구가 계속되어야 할 것이다.

## 결 론

桃紅四物湯이 로즈벵갈 염료에 의한 광화학적 뇌경색 마우스에서 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MRI, 면역화학염색 및 cDNA microarray 등의 방법으로 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 로즈벵갈 염료에 의한 광화학적 색전술은 광원조사 부위에만 세포손상으로 인한 뇌경색을 초래하였으나 桃紅四物湯은 이러한 손상을 억제하였다. 桃紅四物湯은 로즈벵갈에 의한 뇌경색 모델에서 2배 이상 증가한 유전자의 발현을 억제시켰다. 桃紅四物湯은 로즈벵갈에 의한 뇌경색 모델에서 2배 이상 감소한 유전자의 발현을 증가시켰다. 桃紅四物湯은 로즈벵갈에 의한 뇌경색 모델에서 염증성 사이토카인 IL-6의 발현 증가를 억제시켰다. 桃紅四物湯은 광화학적 색전술에 의한 마우스 뇌경색 모델에서 세포자멸사, 염증 반응 및 염증성 사이토카인의 발현 등의 조절을 통해 세포사멸에 대한 보호효과를 나타냈다. 따라서 桃紅四物湯은 뇌경색 등의 뇌질환을 예방하는데 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 朱震亨. 新編 丹溪心法附餘. 서울, 大星文化社, p 67, 515, 533, 541, 1982.
2. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울, 醫聖堂, pp 711-712, 2002.
3. 경희의료원 한방병원 제2내과학교실. 오늘의 한방중풍치료. 서울, 서원당, p 15, 2004.
4. 통계청. 2006년 사망 및 사망원인 통계결과, 2007.
5. Donna, G.A., Fisher, M., Macleod, M., Davis, S.M. Stroke. Lancet, 371(9624):1612-1623, 2008.
6. Clark, W.M. Cytokines and reperfusion injury. Neurology, 49(suppl 4):10-14, 1997.

7. Beamer, N.B., Coull, B.M., Clark, W.M., Hazel, J.S., Silberger, J.R. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. Ann Neurol, 37: 800-804, 1995.
8. Fassbender, K., Rossol, S., Kammer, T., Daffertshofer, M., Wirth, S., Dollman, M., Hennerici, M. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia. kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. J Neurol Sci, 22: 135-139, 1994.
9. Vila, N., Castillo, J., Davalos, A., Chamorro, A. Proinflammatory Cytokines and Early Neurological Worsening in Ischemic Stroke. Stroke, 31: 2325-2329, 2000.
10. Dietrich, W.D., Busto, R., Watson, B.D., Scheinberg, P., Ginsberg, M.D. Photochemically induced cerebral infarction. II. Edema and blood-brain barrier disruption. Acta Neuropathol(Berl), 72(4):326-334, 1987.
11. Pevsner, P.H., Eichenbaum, J.W., Miller, D.C., Pivawer, G., Eichenbaum, K.D., Stern, A., Zakian, K.L., Koutcher, J.A. A photothrombotic model of small early ischemic infarcts in the rat brain with histologic and MRI correlation. J Pharmacol Toxicol Methods, 45(3):227-233, 2001.
12. Schroeter, M., Janderm, S., Stoll, G. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. J Neurosci Methods, 117(1):43-49, 2002.
13. Jares, P. DNA microarray applications in functional genomics. Ultrastruct Pathol, 30: 209-219, 2006.
14. Ehrenreich, A. DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. Appl Microbiol Biotechnol, 73: 255-273, 2006.
15. 郭瑾信. 桃紅四物湯이 Endotoxin으로 유발된 血栓症에 미치는 영향. 원광대학교대학원, 1989.
16. 趙權一. 배양심근세포의 산화적 손상에 대한 四物湯의 방어 효과. 원광대학교대학원, 2002.
17. 趙鈴林, 鄭鉉雨. 桃紅四物湯이 L1210細胞가 移殖된 마우스의 免疫系에 미치는 效果. 대한동의병리학회지 13(1):132-140, 1999.
18. 柳鳳善. 산화적 손상에 의해 유발된 심근세포 독성에 대한 桃紅四物湯의 방어효과. 원광대학교대학원, 2003.
19. 朴世旭. 桃紅四物湯이 急性 腦硬塞 患者의 末梢血液單核細胞에서 細胞活性物質 生成에 미치는 영향. 원광대학교대학원, 2004.
20. 崔恩彬. 大承氣湯이 중대뇌동맥 폐쇄 흰쥐의 신경세포 자연사에 미치는 영향. 경원대학교대학원, 2007.
21. 正법. 星香正氣散이 중대뇌동맥 폐쇄 흰쥐의 Bax 및 Bcl-2 발현에 미치는 영향. 경희대학교대학원, 2008.
22. 林圭. 加減補陽還五湯의 腦卒中 治療效果에 對한 研究. 동국대학교대학원, 2006.
23. 吳慶煥. 涼膈散火湯이 고지혈증 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌경색에 미치는 영향. 동국대학교대학원, 2008.



24. 鄭光植. 淸肺瀉肝湯이 MCAO에 의한 흰쥐의 腦虛血 損傷에 미치는 影響. 동의대학교대학원, 2008.
25. 李在畎. 흰쥐 뇌경색 model에서 천마의 항산화물질에 의한 뇌손상 억제 효과에 관한 연구. 인제대학교대학원, 2005.
26. 吳謙. 醫宗金鑑. 北京, 人民衛生出版社, pp 1145-1169, 1996.
27. 서무규. 성인병 노인병학. 서울, 고려의학, pp 37-49, 77-83, 107-122, 137-139, 142-149, 1992.
28. 大韓病理學會. 病理學. 서울, 고문사, pp 1263-1264, 1994.
29. 전국한의과대학심계내과학교실. 심계내과학. 서울, 군자출판사, p 107, 331, 336, 2006.
30. 辛民敎. 臨床本草學. 서울, 南山堂, pp 221-222, 249, 297-298, 300, 465, 467, 1986.
31. 한종현, 김기영. 한방약리학. 서울, 醫聖堂, p 169, 364, 375, 377, 479, 493, 2004.
32. 전용철. 當歸가 MCAO 모델에 흰쥐에서 gliosis 억제에 미치는 영향. 원광대학교대학원, 2008.
33. 신진봉, 문구, 이종덕, 원진희, 이재원. 桃仁이 중추신경 재생 촉진에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 21(1):145-152, 2007.
34. Li, D.Q., Li, Y., Liu, Y., Bao, Y.M., Hu, B., An, L.J. Catalpol prevents the loss of CA1 hippocampal neurons and reduces working errors in gerbils after ischemia-reperfusion injury. *Toxicol*, 46(8):845, 2005.
35. 柳濟原. Paeoniae radix decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death and increases cell proliferation in the dentate gyrus of streptozotocin-induced hyperglycemic Rats. 경희대학교대학원, 2004.
36. 金京善. 川芎의 口腔投與및 藥鍼施術이 흰쥐 MCAO로 유발된 局所腦虛血에 對한 콜린성 神經保護效果研究. 동신대학교대학원, 2004.
37. Anisimov, S.V. Application of DNA microarray technology to gerontological studies. *Methods Mol Biol*, 371: 249-265, 2007.
38. Lettieri, T. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environ Health Perspect*, 114: 4-9, 2006.
39. Robinson, M.J., Macrae, I.M., Todd, M., Reid, J.L., McCulloch, J. Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the rat. *Neurosci Lett*, 118: 269-272, 1990.
40. 김현수. 광화학적 허혈성 뇌경색 쥐 모델에서 행동평가의 유용성. 원광대학교대학원, 2005.
41. Zaremba, J., Losy, J. Cytokines in clinical and experimental ischemic stroke. *Neurol Neurochir Pol*, 38(1 Suppl 1):S57-62, 2004.
42. Yamasaki, Y., Matsuura, N., Shozuhara, H., Onodera, H., Itoyama, Y., Kogure, K. Interleukin-1 as a pathogenic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke*, 26: 676-681, 1995.
43. Barone, F.C., Arvin, B., White, R.F., Miller, A., Webb, C.L., Willette, R.N., Lysko, P.G., Feuerstein, G.Z. Tumor necrosis factor: a mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke*, 28: 1233-1244, 1997.
44. Barton, B.E. IL-6: Insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol*, 85: 16-20, 1997.
45. Waje-Andreassen, U., Krakenes, J., Ulvestad, E., Thomassen, L., Myhr, K.M., Aarseth, J., Vedeler, C.A. IL-6, an early marker for outcome in acute ischemic stroke. *Acta Neurologica Scandinavica*, 111(6):360-365, 2005.