

## 배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 黃連이 유전자 표현에 미치는 영향

황주원, 김경훈, 신길조, 문일수\*

동국대학교 한의과대학 내과학교실, \*동국대학교 의과대학 해부학교실

### Effects of Gene expression by *Coptidis chinensis* FRANCH. in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells

Joo-won Hwang, Kyung-hun Kim, Gil-cho Shin, Il-soo Moon\*

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Guk University

\*Dept. of Anatomy, College of Medicine, Dong-Guk University

#### ABSTRACT

**Objectives :** The purpose of this investigation was to evaluate the effects of *Coptidis chinensis* FRANCH. on the alteration of gene expression in a hypoxic model using cultured rat cortical cells.

**Methods :** E18 rat cortical cells were grown in neurobasal medium containing B27 supplement. On 12 DIV, water extract from *Coptidis chinensis* FRANCH. was added (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) to the culture media 4 hrs. On 14 DIV, cells were given hypoxic insult (2%  $\text{O}_2/5\% \text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$ , 3 hrs), returned to normoxia and cultured for another 24 hrs. Total RNA was extracted from *Coptidis chinensis* FRANCH. treated and untreated cultures and alterations in the gene expression were analysed by microarray using rat 5K-TwinChips.

**Results :** Effects on some of the genes whose functions were implicated in neural viability were as follows: the expression of apoptosis-related genes such as Ciu (Global M = 1.3), of presynaptic inhibition's genes such as Penk-rs (Global M = 1.97), and of innate immunity's such as Crp (Global M = 1.95), Defensin (Global M = 2.14), and Dnasel13 (Global M = 1.57) increased. The expression of neurotrophic genes such as S100b (Global M = 1.42), and NF $\kappa$ B (Global M = 2.04) increased.

**Conclusions :** Analysing the genes expressed on microarray, shows *Coptidis chinensis* FRANCH. protects cells by increasing viability and neural nutrition.

**Key words :** *Coptidis chinensis* FRANCH. gene expression, hypoxia, microarray, herb

### 1. 緒 論

뇌세포가 활성을 유지하기 위해서는 산소와 glucose의 지속적이면서 충분한 공급이 필요한다<sup>1</sup>, 저산소증이 유발되면 수분간의 허혈상태 만으로도

중추신경세포는 비가역적인 손상을 입게 되어 운동, 감각, 인지 기능의 소실 등과 같은 신경학적 병증이 유발된다<sup>2</sup>. 일시적인 허혈상태는  $\text{Ca}^{2+}$ 의 증가를 야기하는데<sup>3</sup>,  $\text{Ca}^{2+}$ 의 증가는 활성산소(reactive oxygen species, 이하 ROS)를 생성하는 효소를 증가시켜 결과적으로 ROS를 증가시킨다<sup>4</sup>. 미토콘드리아(mitochondria)가 ROS에 노출되면 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential, 이하 MMP)가 소실되어 ATP를 합성할 수 없게 되

· 교신저자: 신길조 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2번지  
동국대학교 분당한방병원 한방내과  
TEL: 031-710-3710 FAX: 031-710-3780  
E-mail: shingcho@naver.com

고, 세포내  $Ca^{2+}$ 이 증가되어 세포괴사(necrosis)와 세포자연사(apoptosis)가 유발된다.<sup>5,6</sup>

최근 유전체들의 기능과 구조를 밝히는 새로운 기술의 하나인 DNA microarray는 수천개의 유전자 발현 양상(gene expression profile)을 동시에 분석하여 그 결과를 비교하는 방법으로, 최근 뇌와 신경계 같은 복잡한 조직의 유전자 발현 분석에 사용되고 있다.<sup>7-9</sup>

黃連은 味苦 無毒한데 心經으로 들어가 瀉心하고 脾胃 중의 濕熱을 제거한다. 清心, 除煩 등의 효능이 있어 心火亢盛으로 인한 心煩不眠, 血熱妄行으로 인한 吐血, 衄血을 치료한다<sup>10</sup>. 黃連에 관한 실험적 연구로는 黃連 추출물이 흰쥐의 지질대사에 미치는 효과<sup>11</sup>, 黃連이 BEAS-2B 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-16, GM-CSF level에 미치는 영향<sup>12</sup>, 黃連이 반복적인 코카인 투여로 인한 보행성 활동량과 c-Fos 발현에 미치는 효과<sup>13</sup>, 黃連의 세포사 방지와 산화스트레스에 미치는 영향에 대한 연구<sup>14</sup>는 있었으나, microarray기법에 의한 유전자 변화와 관련된 연구는 없었다. 따라서 본 연구에서는 저산소증에서 黃連의 신경세포 보호 기전을 알아보기 위하여 microarray기법으로 黃連이 유전자 표현에 미치는 영향을 조사하였다.

## II. 實驗

### 1. 재 료

#### 1) 약 제

실험에 사용된 黃連(*Coptidis chinensis* FRANCH., 이하 *C. chinensis* FRANCH.)은 대한약전 및 대한약전 외 한약 규격주해에 근거하여 동국대학교 경주 한방병원에서 구입하였다<sup>15</sup>.

#### 2) 黃連의 추출물 제조

黃連(2 g)에 20 ml의 증류수를 넣어 균질화하고 상온에서 4시간, 4 °C에서 18시간 전탕하였다. 이를 15,000 rpm에서 15분 간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.2 μm)한 후 소량씩 분주하여 -20 °C

에 보관하였다. 건조물 1 ml 씩 추출한 튜브 3개를 동결건조한 후 평균치를 사용하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 신경세포 배양

임신 18일(embryonic day 18: E<sub>18</sub>)의 *Sprague-Dawley*계 흰쥐 대뇌피질신경세포를 Brewer 등<sup>16</sup>의 방법에 따라 배양하였다. 즉, E<sub>18</sub>의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통 속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아를 취하고 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37 °C에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1 mM sodium pyruvate와 10 mM HEPES(pH 7.4)가 첨가된 Hank's balanced salt solution 용액(Invitrogen Life Technology, 이하 HBSS 용액) 5 ml로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1 ml HBSS 용액으로 옮기고, 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 이 후 분산된 세포를 모으고 세포수를 측정한 다음 약 1,500 cells / mm<sup>2</sup>가 되도록 B27을 첨가한 plating neurobasal media (Invitrogen Life Technology) (100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I, 0.1 ml 25 mM glutamate, 0.1 ml 25 mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 5% CO<sub>2</sub> 배양조에서 배양한 다음 2~3일 간격으로 배양액을 feeding neurobasal media (100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I)로 1/3씩 교환하였다.

#### 2) 저산소증 유발

Culture plate를 CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator (Forma Scientific Inc.)를 이용하여 2% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유도하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소 환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

#### 3) 유전자표현 분석(microarray)을 위한 RNA 추출

RNA 추출을 위한 배양은 60 mm dish를 사용하였다. 배양 12일(day 12 *in vitro*: DIV12)에 黃連

2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하고 DIV14에 저산소증을 유발하였다. 저산소 처리가 끝나고 24 시간 후에 배양액을 제거하고 5~10ml의 ice-cold PBS로 세척하였다. PBS를 제거하고 용액 D [4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate-2H<sub>2</sub>O, 0.5% (w/v) sodium lauryl sarcosinate, 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol] 1 ml를 각 culture dish에 넣어 세포를 용해시켰다. 용해된 lysate를 microfuge tube에 옮기고 tissue homogenizer로 15~30초간 균질화하였다. 여기에 용액 D 1 ml 당 0.1 ml의 2 M sodium acetate(pH 4.0), 1 ml의 phenol(4 °C), 0.2ml의 chloroform-isoamyl alcohol을 넣고 잘 섞어주었다. Tube를 얼음에 15분간 넣어둔 후 원심분리(10,000  $\times$  g, 20분, 4 °C)하여 상등액을 취하고 동일 부피의 isopropanol을 넣어 잘 섞어주었다. 이를 -20 °C에서 2시간 처리한 후 원심분리하여(10,000  $\times$  g, 30분, 4 °C) RNA를 침전시키고 용액 D로 녹였다. 이를 isopropanol로 한 번 더 침전시킨 후 75% alcohol로 2회 세척한 후 diethyl pyrocarbonate로 처리한 물에 녹이고 -70 °C에 보관하였다.

#### 4) Microarray

Microarray는 Digital Genomics(서울)에 의뢰하여 분석하였다. 대조군과 실험군의 저산소증 유발 세포에서 각각 분리한 20~50 $\mu\text{g}$ 의 total RNA로부터 oligo(dT) primer와 역전사효소를 이용하여 first cDNA strand를 만들고, 대조군은 Cy3 dye (green)로, 실험군은 Cy5 dye(red)로 표지하였다. 두 probe를 1:1 혼합하여 TwinChip™ Rat-5K (Digital Genomics)을 hybridization(3X SSC, 42°C, 16시간)하고 최종적으로 0.1X SSC로 상온에서 1분씩 4회 세척하였다.

### III. 結果

#### 1. Microarray 결과

본 연구에 사용한 흰쥐 대뇌신경세포는 저산소증 유발 후 3일 후부터 급격히 사망하기 시작하였

다. 따라서 저산소증 유발 후 3일 이전에 많은 유전자의 표현이 달라질 것으로 예상되어 1일 째에 total RNA를 분리하였다. 즉, DIV12의 배양세포에 黃連 추출물(2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 처리하고 DIV14에 저산소증을 유발하였으며, DIV15에 세포로부터 total RNA를 분리하였다. 이 때 소량의 RNA quality를 조사하여 28S rRNA/18S rRNA의 값이 1.7 이상인 최소로 분해된 RNA만을 사용하였다.

Microarray 전문회사인 Digital Genomics(서울)에 의뢰하여 TwinChip™ Rat-5K microarray chip을 형광사진으로 촬영하였다. MA plot에서 보면  $[M = \log_2(R/G), A = \{\log_2(R \times G)\}/2]$ , 대부분의 M 값이  $\pm 0.5$  사이로서 40% 정도 이내의 증감을 나타내었으며, M 값이  $\pm 2.0$  사이, 즉 4배 정도 차이를 내는 유전자들도 많이 포함되어 있었다. 전체적으로 볼 때 Global M 값이 +0.2 이상 즉 14% 이상 표현이 증가한 유전자는 1,227종, -0.2 이하 즉 14% 이상 표현이 감소한 유전자는 1,147종이었다.

#### 2. Apoptosis/cell death 관련 유전자 표현의 변화

Apoptosis/cell death 관련 유전자중 저산소증에서 黃連에 의하여 표현이 변화되는 유전자는 40종이었다. 이 가운데 22종은 표현이 증가하였으며, 17종은 표현이 감소하였다. Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105(이하 Nfkb1)는 Global M 값이 2.04로서 4배 이상 증가하였으며, 2배 이상 증가한 유전자들 가운데는 deoxyribonuclease I-like 3(Dnase1l3; Global M=1.57), S100 protein, beta polypeptide(S100b; Global M=1.42), clusterin(Clu; Global M=1.33), dynamin 2(Dnm2; Global M=1.30), arachidonate 12-lipoxygenase(Alox15; Global M=1.14)가 있었다(Table 1). 반면 ciliary neurotrophic factor(Cntf; Global M=-1.49), tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide(Ywhah; Global M=-1.44)는 감소하였다(Table 1).

Table 1. Apoptosis/Cell Death-Related Genes which are Up or Down-regulated by *C. chinensis* FRANCH. in Hypoxia

Gene Symbol	Golbal. M	GenBank. ACC	Title
Nfkb1	2.0441	AA858801	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105
Dnase1l3	1.5655	AI044062	Deoxyribonuclease I-like 3
S100b	1.4196	AA956175	S100 protein, beta polypeptide
Clu	1.3331	AA818413	Clusterin
Dnm2	1.3026	AA998487	Dynamin 2
Alox15	1.1409	AA924524	Arachidonate 12-lipoxygenase
Bid3	0.9476	AA925846	BH3 interacting (with BCL2 family) domain, apoptosis agonist
Cdh1	0.9170	AA818151	Cadherin 1
Lgals7	0.8284	AA955395	Lectin, galactose binding, soluble 7
Hmox1	0.7572	AA874884	Heme oxygenase (decycling) 1
Faf1	0.6876	AA957359	Fas-associated factor 1
Pglyrp1	0.6053	AA875213	Peptidoglycan recognition protein 1
C9	0.5902	AA998796	Complement component 9
Cstb	0.481	AA859814	Cystatin B
Mgmt	0.4552	AI044880	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
Pdcd8	0.4346	AA901280	Programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)
Inha	0.4286	AA955146	Inhibin alpha
Casp7	0.4220	AA817926	Caspase-7
Prf1	0.3811	AA901188	Perforin 1 (pore forming protein)
Vegf	0.3528	AA924335	Vascular endothelial growth factor
Tpt1	0.2937	AA900176	Tumor protein, translationally-controlled 1
Bcl2l1	0.2246	AA955261	Bcl2-like 1
Cntf	-1.4889	AA901112	Ciliary neurotrophic factor
Ywhah	-1.4444	AA926004	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide
Phlda1	-1.1809	AA900759	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
Dap	-0.8482	AA818903	Death-associated protein
Tubb5	-0.8069	AA858888	Tubulin, beta 5
C8b	-0.7926	AA819870	Complement component 8, beta polypeptide
Gsk3b	-0.5611	AA964758	Glycogen synthase kinase 3 beta
Accn1	-0.4520	AI145577	Amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal (degenerin)
Zfp162	-0.4381	AA874916	Zinc finger protein 162
Ets1	-0.3177	AA955279	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)
Spp1	-0.3142	AA964431	Secreted phosphoprotein 1
Rabep1	-0.2938	AA956332	Rabaptin 5
Gpx1	-0.2666	AA964788	Glutathione peroxidase 1
Tegt	-0.2507	AI058620	Testis enhanced gene transcript
Ripk3	-0.2417	AA900927	Receptor-interacting serine-threonine kinase 3
Sh3kbp1	-0.2362	AA901391	SH3-domain kinase binding protein 1
Faf1	-0.2270	AA819910	Fas-associated factor 1

3. 스트레스 반응 관련 유전자 표현의 변화

스트레스 반응 관련 유전자는 저산소증에서 黃連에 의하여 Golbal M 값이 +0.2 이상 즉, 14% 이상 표현이 증가한 유전자는 48종, 표현이 감소한 유전자는 35종이었다. 이 가운데 defensin beta 3

(Defb3: Global M=2.15), defensin beta 1(Defb1: Global M=2.13), Nfkb1(Global M=2.04), insulin induced gene 2(Insig2: Global M=2.00)가 4배 이상 증가하였고, complement factor I(Cfi)은 4배 이상 감소하였다(Global M=-2.12)(Table 2).

Table 2. 'Response to Stress'-Related Genes which are Up or Down-regulated by *C. chinensis* FRANCH. in Hypoxia

Gene. Symbol	Golbal. M	GenBank. ACC	Title
Defb3	2.153326	AA819022	Defensin beta 3
Defb1	2.12745	AA998504	Defensin beta 1
Nfkb1	2.0441	AA858801	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105
Insig2	1.995628	AA818627	Insulin induced gene 2
Crp	1.945706	AA926359	C-reactive protein, petaxin related
Xpo1	1.905483	AA818465	Exportin 1, CRM1 homolog (yeast)
Ahsg	1.737289	AA955349	Alpha-2-HS-glycoprotein
Calca	1.624542	AI059177	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha
Gng7	1.556651	AA925506	Guanine nucleotide binding protein, gamma 7
Fn1	1.501409	AA900988	Fibronectin 1
Prdx6	1.422512	AA859664	Peroxiredoxin 6
S100b	1.419577	AA956175	S100 protein, beta polypeptide
B2m	1.370357	AA817792	Beta-2 microglobulin
Eif2ak1	1.365792	AI145068	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 1
Clu	1.333135	AA818413	Clusterin
Tm4sf3	1.12941	AA957483	Transmembrane 4 superfamily member 3
Camk2g	1.094474	AA866334	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma
Mt3	1.058661	AA924772	Metallothionein 3
Cd81	1.047569	AA964328	CD 81 antigen
Ptafr	1.043695	AA924637	Platelet-activating factor receptor
Tlr4	0.9928812	AI044119	Toll-like receptor 4
B2m	0.9153309	AA818265	Beta-2 microglobulin
Serpinh1	0.9141965	AA859615	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1
Hmox1	0.7572474	AA874884	Heme oxygenase (decycling) 1
Hsbp1	0.7096242	AA874923	Heat shock factor binding protein 1
C9	0.5901697	AA998796	Complement component 9
Sod3	0.5646355	AA963644	Superoxide dismutase 3, extracellular
Apex1	0.4940049	AA900301	Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1
Mgmt	0.4552355	AI044880	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
Prkab1	0.4409523	AA924247	Protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit
Inha	0.428566	AA955146	Inhibin alpha

배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 黃連이 유전자 표현에 미치는 영향

Ptpn11	0.4251177	AA901405	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
Mst1	0.4217116	AA997938	Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)
Ucp2	0.4144999	AA998366	Uncoupling protein 2
Cspg6	0.4132986	AA999069	Chondroitin sulfate proteoglycan 6
Cfi	-2.11964	AA900791	Complement factor I
PPP3ca	-1.34676	AA957138	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform
A2m	-1.19876	AA817954	Alpha-2-macroglobulin
Pap	-0.84601	AI030627	Pancreatitis-associated protein
C8b	-0.79261	AA819870	Complement component 8, beta polypeptide
Thbd	-0.75366	AA900918	Thrombomodulin
Crp	-0.73622	AA818144	C-reactive protein, petaxin related
Chek2	-0.73405	AA875381	Protein kinase Chk2
Insig2	-0.73383	AA901073	Insulin induced gene 2
Thbd	-0.7313	AA818521	Thrombomodulin
Msh2	-0.71479	AA819079	Mismatch repair protein
Ninj1	-0.68238	AI044670	Ninjurin 1
Pmp	-0.64457	AA997369	Prion protein
Ptprc	-0.60002	AA924685	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
Gsk3b	-0.56109	AA964758	Glycogen synthase kinase 3 beta
C3	-0.52695	AI044782	Complement component 3
F2	-0.48822	AI071305	Coagulation factor 2
Dnaj1	-0.48021	AA818714	DnaJ-like protein
Atp1b1	-0.42835	AA925690	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide
Eif2ak1	-0.42594	AA925155	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 1
Gadd45a	-0.41501	AI070295	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha
Copeb	-0.4123	AA819048	Core promoter element binding protein

#### 4. 세포주기 관련 유전자 표현의 변화

저산소증에서 黃連에 의하여 표현이 변하는 '세포주기' 관련(cell cycle-related) 유전자 중 Global M 값이 +0.2 이상 즉, 14% 이상 표현이 증가한 유전자는 31종, 감소한 유전자는 30종이었다. 이 가

운데 peripheral myelin protein 22(이하 Pmp22: Global M=2.00) 유전자가 4배 증가하였고, phospholipase C, beta 1(Plcb1: Global M=-1.95), Ywhah(Global M=-1.44)는 2배 이상 감소하였다 (Table 3).

Table 3. Cell Cycle-Related Genes which are Up or Down-regulated by *C. chinesis* FRANCH. in Hypoxia

Gene Symbol	Global M	GenBank .ACC	Title
Pmp22	1.995825	AA818799	Peripheral myelin protein 22
Bmyc	1.713386	AA998830	Brain expressed myelocytomatosis oncogene
Raf1	1.272416	AA817992	Murine leukemia viral (v-raf-1) oncogene homolog 1 (3611-MSV)
Cdc2a	1.158905	AA899934	Cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)
Camk2g	1.094474	AA866334	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma

Cend1	1.058317	AA875417	Cyclin D1
ErbB2	0.987737	AA858862	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
Id2	0.916241	AA964507	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein
Mapk12	0.870197	AA924917	Mitogen-activated protein kinase 12
D123	0.857469	AI043975	D123 gene product
Pdgfa	0.646678	AI137550	Platelet derived growth factor, alpha
Akt2	0.624794	AA899820	Murine thymoma viral (v-akt) oncogene homolog 2
Par3	0.617714	AI044473	Three-PDZ containing protein similar to C. elegans PAR3 (partitioning defect)
Wt1	0.558052	AA965119	Wilms tumor 1
Aurkb	0.513204	AA996466	Aurora kinase B
Mafk	0.482485	AA818493	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K (avian)
Cdkn1b	0.473584	AA899090	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
Ccng1	0.46438	AA956549	Cyclin G1
Pdcd8	0.434587	AA901280	Programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)
Inha	0.428566	AA955146	Inhibin alpha
Ptpn11	0.425118	AA901405	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
Cspg6	0.413299	AA999069	Chondroitin sulfate proteoglycan 6
Itgb1	0.405927	AA819911	Integrin beta 1
Plcb1	-1.94877	AA924991	Phospholipase C, beta 1
Ywhah	-1.44357	AA926004	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide
Ppp3ca	-1.34676	AA957138	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform
Camk2d	-1.09932	AA925495	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta
Ccnb1	-0.90763	AA998164	Cyclin B1
Pgf	-0.81328	AA900295	Placental growth factor
Chek2	-0.73405	AA875381	Protein kinase Chk2
Msh2	-0.71479	AA819079	Mismatch repair protein
Rgs2	-0.68123	AA858950	Regulator of G-protein signaling protein 2
Cdk5	-0.63111	AA859338	Cyclin-dependent kinase 5
Mafk	-0.58974	AA858674	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K (avian)
Ccnf	-0.58676	AA900901	Cyclin F
Gsk3b	-0.56109	AA964758	Glycogen synthase kinase 3 beta
Vegfc	-0.53135	AA899702	Vascular endothelial growth factor C
Ppp6c	-0.50285	AA956187	Protein phosphatase V
Raf1	-0.47594	AA900883	Murine leukemia viral (v-raf-1) oncogene homolog 1 (3611-MSV)
Mapk6	-0.45456	AA859081	Mitogen-activated protein kinase 6
Ccng1	-0.42977	AA925142	Cyclin G1
Ran	-0.4265	AA858998	RAN, member RAS oncogene family
Gadd45a	-0.41501	AI070295	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha

5. 생리대사 관련 유전자 표현의 변화

저산소증에서 黃連에 의하여 표현이 변하는 '생리대사' 관련(physiological process-related) 유전자 중 Global M 값이 +0.2 이상 즉, 14% 이상 표현이 증가한 유전자는 326종, 감소한 유전자는 320종이었다. 표현이 증가한 유전자 가운데 Global M 값이 1.5 이상 즉, 2.8배 이상 증가한 유전자들을 Table 4에 나타내었다. 이 가운데 FXYP domain-containing ion transport regulator 1(Fxyd1; Global M=3.14)과 sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1(Sult1a1; Global M=2.90)은

6배 정도 증가하였고, 4배 이상 증가한 유전자들은 histidine decarboxylase(Hdc; Global M=2.38), mercaptopyruvate sulfurtransferase(Mpst; Global M=2.29), Defb3(Global M=2.15), Defb1(Global M=2.13), Nfkb1(Global M=2.04) 등이었다. 黃連에 의하여 2배 이상 표현이 감소한 유전자들을 Table 4에 나타내었다. 이 가운데 mevalonate (diphospho) decarboxylase(Mvd; Global M=-2.31)와 Cfi(Global M=-2.12)는 4배 이상 감소하였으며, 2배 이상 감소한 유전자는 28종이었다.

Table 4. Physiological Process-Related Genes which are Up or Down-regulated by *C. chinesis* FRANCH. in Hypoxia

Gene Symbol	Global M	GenBank ACC	Title
Fxyd1	3.135447	AA818939	FXYP domain-containing ion transport regulator 1
Sult1a1	2.895203	AA866493	Sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1
Hdc	2.381454	AA874841	Histidine decarboxylase
Mpst	2.288026	AA875446	Mercaptopyruvate sulfurtransferase
Defb3	2.153326	AA819022	Defensin beta 3
Defb1	2.12745	AA998504	Defensin beta 1
Nfkb1	2.0441	AA858801	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105
Znf354a	2.032971	AA965012	Zinc finger protein 354A
Gpd2	2.021423	AA925161	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2
Pmp22	1.995825	AA818799	Peripheral myelin protein 22
Sgne1	1.941122	AA998689	Secretory granule neuroendocrine protein 1
Kpnb1	1.919645	AA858941	Karyopherin (importin) beta 1
Xpo1	1.904583	AA818465	Exportin 1, CRM1 homolog (yeast)
Nudt4	1.899542	AA818182	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase type II
Mte1	1.892455	AA899721	Mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1
Ass	1.860945	AA924544	Arginosuccinate synthetase
Ywhaz	1.860308	AA858662	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
Bmpr1a	1.8365	AA924837	Bone morphogenetic protein receptor, type 1A
Cnga1	1.803852	AI070513	Cyclic nucleotide-gated cation channel
Folh1	1.797628	AI059788	Folate hydrolase
Xdh	1.774037	AA924540	Xanthine dehydrogenase
Hmgcs2	1.770542	AI136048	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2
Napsa	1.762302	AA858922	Napsin A aspartic peptidase



Col2a1	1.762154	AA899303	Procollagen, type II, alpha 1
Hsd17b2	1.754244	AI030996	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2
Ahsg	1.737289	AA955349	Alpha-2-HS-glycoprotein
Cd5	1.736192	AA925584	CD5 antigen
Acs15	1.732038	AA866319	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
Alb	1.725941	AA817940	Albumin
Dyrk1a	1.716215	AA957669	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A
Bmyc	1.713386	AA998830	Brain expressed myelocytomatosis oncogene
Gata1	1.689679	AA964254	GATA binding protein 1
Adnp	1.679512	AA900236	Activity-dependent neuroprotective protein
Nr1d2	1.669038	AA858968	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
Nt5	1.668559	AA858866	5 nucleotidase
Nup98	1.643083	AA924744	Nucleoporin 98
Dhcr7	1.620157	AA859471	7-dehydrocholesterol reductase
Rbp1	1.610507	AA860061	Retinol binding protein 1, cellular
P2rx7	1.602099	AI385229	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7
Alb	1.597639	AA866237	Albumin
Ogt	1.579477	AA925285	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase)
Rnpep	1.577909	AI137104	Arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)
Slc7a8	1.570398	AA899235	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8
Dnase1l3	1.565499	AI044062	Deoxyribonuclease I-like 3
Bckdhb	1.549709	AA925943	Branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide
Pfkm	1.537511	AA964978	Phosphofructokinase, muscle
Psmc2	1.503935	AA817972	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 2
Fnl	1.501409	AA900988	Fibronectin 1
Mvd	-2.307014	AI058569	Mevalonate (diphospho) decarboxylase
Cfi	-2.119638	AA900791	Complement factor I
Plcb1	-1.948772	AA924991	Phospholipase C, beta 1
Ldha	-1.821788	AI072330	Lactate dehydrogenase A
Fdps	-1.607909	AA818832	Farensyl diphosphate synthase
Hmgcs1	-1.575917	AA924800	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1
Limk2	-1.566438	AI058790	LIM motif-containing protein kinase 2
Fdps	-1.537475	AA859192	Farensyl diphosphate synthase
Comt	-1.530097	AA900964	Catechol-O-methyltransferase
Ap2a2	-1.526511	AI137408	Adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit
Dnm1	-1.51898	AI071582	Dynamin 1
Cntf	-1.488864	AA901112	Ciliary neurotrophic factor
Ywhah	-1.443572	AA926004	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide
Timp1	-1.405142	AA957593	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Tmod1	-1.380698	AI145620	Tropomodulin 1

Ppp3ca	-1.346759	AA957138	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform
Acly	-1.335028	AA900486	ATP citrate lyase
Gucy1a3	-1.319694	AA819293	Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
Pasma4	-1.319584	AA997517	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 4
Slc12a1	-1.31465	AI137982	Solute carrier family 12, member 1
Pdgfra	-1.299083	AA925099	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide
HK1	-1.295422	AI029744	Hexokinase 1
Gnai3	-1.284265	AI030489	Guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 3
Myo1e	-1.235581	AI059137	Myosin I E
Cd36	-1.209561	AA925752	Cd36 antigen
Phlda1	-1.180853	AA900759	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
Ednra	-1.168178	AA858906	Endothelin receptor type A
Camk2d	-1.09932	AA925495	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta
1G5	-1.064152	AA964719	Vesicle-associated calmodulin-binding protein
Cyp51	-1.01685	AA925346	Cytochrome P450, subfamily 51

6. 신호전달 관련 유전자 표현의 변화

저산소증에서 黃連에 의하여 표현이 변하는 '신호 전달' 관련(signal transduction-related) 유전자 중 Global M 값이 +0.2 이상 즉, 14% 이상 표현이 증가한 유전자는 88종, 감소한 유전자는 84종이었다. 2배 이상 증가한 유전자들을 Table 5에 나타내었다. 이 가운데 Nfkb1(Global M=2.04), preproenkephalin, related sequence(이하 Penk-rs; Global M=1.97),

secretory granule neuroendocrine protein 1(Sgnel; Global M=1.94)은 4배 정도 증가하였고, 2배 이상 증가한 유전자들은 30여종 있었다. 黃連에 의하여 52% 이상 표현이 감소한(Global M=-0.6) 유전자들을 Table 5에 나타내었다. 이 가운데 prostaglandin E receptor 1(Ptger1; Global M=-2.07)과 Plcb1 (Global M=-1.95)은 4배 정도 감소하였다.

Table 5. Signal Transduction-Related Genes which are Up or Down-regulated by *C. chinensis* FRANCH. in Hypoxia

Gene Symbol	Global M	GenBank ACC	Title
Nfkb1	2.0441	AA858801	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105
Penk-rs	1.966383	AA818276	Preproenkephalin, related sequence
Sgnel	1.941122	AA998689	Secretory granule neuroendocrine protein 1
Tnfrsf8	1.841896	AA924611	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8
Bmpr1a	1.8365	AA924837	Bone morphogenetic protein receptor, type 1A
Ahsg	1.737289	AA955349	Alpha-2-HS-glycoprotein
Cd5	1.736192	AA925584	CD5 antigen
Adnp	1.679512	AA900236	Activity-dependent neuroprotective protein
Pnoc	1.633178	AI044049	Prepronociceptin
Calca	1.624542	AI059177	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha
Gng7	1.556651	AA925506	Guanine nucleotide binding protein, gamma 7
Gnb1	1.539084	AA818588	Guanine nucleotide binding protein, beta 1

Sag	1.474968	AI070236	Retinal S-antigen
Gpr56	1.474334	AA819206	G protein-coupled receptor 56
Stmn3	1.465852	AA899649	Stathmin-like 3
Pak3	1.454282	AA997367	P21 (CDKN1A)-activated kinase 3
Tle4	1.44693	AA859009	Transducin-like enhancer of split 4, E (sp I) homolog (Drosophila)
Galr2	1.415947	AI071642	Galanin receptor 2
Dnm2	1.302576	AA998487	Dynamamin 2
Acvrl1	1.274333	AI030334	Activin A receptor type II-like 1
Raf1	1.272416	AA817992	Murine leukemia viral (v-raf-1) oncogene homolog 1 (3611-MSV)
Ptpnf	1.26827	AI111588	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
Baiap2	1.256877	AA819554	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2
Csnk1g3	1.219391	AA818472	Casein kinase 1, gamma 3
Ptger1	-2.06548	AA858510	Prostaglandin E receptor 1
Plcb1	-1.94877	AA924991	Phospholipase C, beta 1
Limk2	-1.56644	AI058790	LIM motif-containing protein kinase 2
Cntf	-1.48886	AA901112	Ciliary neurotrophic factor
Ywhah	-1.44357	AA926004	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide
Gucyl1a3	-1.31969	AA819293	Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
Pdgfra	-1.29908	AA925099	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide
Gnai3	-1.28427	AI030489	Guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 3
A2m	-1.19876	AA817954	Alpha-2-macroglobulin
Epor	-1.19529	AI172620	Erythropoietin receptor
Ednra	-1.16818	AA858906	Endothelin receptor type A
Alcam	-0.90029	AA875360	Activated leukocyte cell adhesion molecule
Bcap37	-0.88404	AA923959	B-cell receptor-associated protein 37
Adcy5	-0.86837	AA924059	Adenylate cyclase 5
Arf2	-0.85389	AA964530	ADP-ribosylation factor 2
Rab4b	-0.79491	AA818114	RAB4B, member RAS oncogene family
Pkn1	-0.77441	AA965091	Protein kinase N1
Grb2	-0.73771	AI071530	Growth factor receptor bound protein 2
Minpp1	-0.71843	AI071438	Multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase 1
Rgs2	-0.68123	AA858950	Regulator of G-protein signalling protein 2
Ywhaq	-0.67768	AA858957	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide
Dgkz	-0.65829	AI070924	Diacylglycerol kinase zeta
Ppap2a	-0.64863	AA818593	Phosphatidate phosphohydrolase type 2a
Adcy5	-0.64789	AI029771	Adenylate cyclase 5
Ptpro	-0.6469	AA858842	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, O
Cain	-0.64224	AA859586	Calcineurin binding protein 1
Pde2a	-0.63321	AA996754	Phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated
Freq	-0.63253	AI136914	Frequenin homolog (Drosophila)
Il2rb	-0.60229	AA866450	Interleukin 2 receptor, beta chain
Ptpnc	-0.60002	AA924685	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C

7. 전사(transcription) 관련 유전자 표현의 변화  
저산소증에서 黃連에 의하여 표현이 변하는 '유전자전사' 관련(transcription-related) 유전자 중 Global M 값이 +0.2 이상 즉, 14% 이상 표현이 증가한 유전자는 35종, 감소한 유전자는 45종이었다. Global M 값이 0.4, 즉 32% 이상 증가한 유전자들을 Table 6에 나타내었다. 이 가운데 Nfkb1(Global

M=2.04)와 zinc finger protein 354A(Znf354a: Global M=2.03)는 4배 이상 증가하였다. 黃連에 의하여 32% 이상 표현이 감소한(Global M=-0.4) 유전자전사 관련 유전자들을 Table 6에 나타내었다. 이 가운데 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1(Hmgcs1:Global M=-1.58)는 3배 정도 감소하였다.

Table 6. Transcription-Related Genes which are Up-regulated by *C. chinesis* FRANCH. in Hypoxia

Gene Symbol	Global M	GenBank ACC	Title
Nfkb1	2.0441	AA858801	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105
Znf354a	2.032971	AA965012	Zinc finger protein 354A
Gata1	1.689679	AA964254	GATA binding protein 1
Adnp	1.679512	AA900236	Activity-dependent neuroprotective protein
Nr1d2	1.669038	AA858968	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
Tle4	1.44693	AA859009	Transducin-like enhancer of split 4, E (sp I) homolog (Drosophila)
Timm44	1.409287	AI045558	Translocator of inner mitochondrial membrane 44
Dnm2	1.302576	AA998487	Dynamin 2
Nr3c2	1.24173	AI029599	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2
Tceb3	1.095143	AA900204	Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3
Dbp	1.029048	AI059589	D site albumin promoter binding protein
Myod1	0.980164	AA955902	Myogenic differentiation 1
Tcf1	0.825572	AI028906	Transcription factor 1
Hsbp1	0.709624	AA874923	Heat shock factor binding protein 1
Stat5b	0.652324	AA955730	Signal transducer and activator of transcription 5B
Safb	0.606642	AI029791	Scaffold attachment factor B
Wt1	0.558052	AA965119	Wilms tumor 1
Nr1h2	0.548991	AA875128	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2
S100a1	0.5316	AI111730	S100 calcium binding protein A1
Hoxa4	0.503738	AA900970	Homeo box A4
Mafk	0.482485	AA818493	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K (avian)
Atf4	0.447616	AA819001	Activating transcription factor 4
Neurod3	0.444929	AI028971	Neurogenic differentiation 3
TCEB2	0.401138	AA817828	Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2
Hmgcs1	-1.57592	AA924800	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1
Mxi1	-0.97726	AA956438	Max interacting protein 1
Nr2f2	-0.80576	AI058589	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
Ilf3	-0.78575	AA899489	Interleukin enhancer binding factor 3
Taf9l	-0.6924	AI059951	TAF9-like RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa

Mafk	-0.58974	AA858674	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K (avian)
Gtf2ird1	-0.57481	AA900046	General transcription factor II I repeat domain-containing 1
Gsk3b	-0.56109	AA964758	Glycogen synthase kinase 3 beta
Phf5a	-0.5555	AA925445	Transcription factor INI
Hes5	-0.53998	AA900438	Hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)
Runx1	-0.53568	AI044037	Runt related transcription factor 1
LOC245925	-0.52994	AI136213	CTD-binding SR-like protein rA9
Skd3	-0.51807	AA875411	Suppressor of K <sup>+</sup> transport defect 3
Rab11a	-0.50428	AA924941	RAB11a, member RAS oncogene family
Rab11a	-0.50023	AA963374	RAB11a, member RAS oncogene family
Tmpo	-0.49145	AI044110	Thymopoietin
Nedd8	-0.44853	AA866433	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 8
Rab2	-0.41692	AI070618	RAB2, member RAS oncogene family
Copeb	-0.4123	AA819048	Core promoter element binding protein
Ruvbl1	-0.41085	AI043861	RuvB-like protein 1

8. 면역 관련 유전자 표현의 변화

저산소증에서 黃連에 의하여 표현이 변하는 '면역' 관련(immune-related) 유전자 중 Global M 값이 +0.2 이상 즉, 14% 이상 표현이 증가한 유전자는 29종, 감소한 유전자는 21종이었다. Global M 값이 0.2 이상 증가한 유전자들을 Table 7에 나타내었다. 이 가운데 Nfkb1, Penk-rs(Global M=1.97), C-reactive protein, petaxin related(Crp: Global

M=1.95) 등은 4배 정도 증가하였다. 黃連에 의하여 Global M 값이 0.2 이상 감소한 면역관련 유전자들을 Table 7에 나타내었다. 이 가운데 Cfi(Global M=-2.12)은 4배 이상 감소하였으며, myxovirus (influenza virus) resistance 2(Mx2: Global M=-1.48)와 alpha-2-macroglobulin(A2m: Global M=-1.20)은 2배 이상 감소하였다.

Table 7. Immune Response-Related Genes which are Up or Down-regulated by *C. chinesis* FRANCH. in Hypoxia

Gene Symbol	Global M	GenBank ACC	Title
Nfkb1	2.0441	AA858801	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105
Penk-rs	1.966383	AA818276	Preproenkephalin, related sequence
Crp	1.945706	AA926359	C-reactive protein, petaxin related
Gbp2	1.933065	AA819701	Guanylate binding protein 2, interferon-inducible
Ahsg	1.737289	AA955349	Alpha-2-HS-glycoprotein
Cd5	1.736192	AA925584	CD5 antigen
Calca	1.624542	AI059177	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha
Fn1	1.501409	AA900988	Fibronectin 1
S100b	1.419577	AA956175	S100 protein, beta polypeptide
B2m	1.370357	AA817792	Beta-2 microglobulin
Cd81	1.047569	AA964328	CD81 antigen
Ptafr	1.043695	AA924637	Platelet-activating factor receptor

배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 黃連이 유전자 표현에 미치는 영향

Gal	1.010291	AA955779	Galanin
Tlr4	0.992881	AI044119	Toll-like receptor 4
B2m	0.915331	AA818265	Beta-2 microglobulin
Gpr105	0.894049	AI029892	G protein-coupled receptor 105
Pglyrp1	0.60527	AA875213	Peptidoglycan recognition protein 1
C9	0.59017	AA998796	Complement component 9
Cd3d	0.527372	AI137921	CD3 antigen delta polypeptide
Fth1	0.488891	AA818441	Ferritin, heavy polypeptide 1
Inha	0.428566	AA955146	Inhibin alpha
Hla-dmb	0.349507	AI146187	Major histocompatibility complex, class II, DM beta
Tcrg	0.278261	AA997294	T-cell receptor gamma chain
Cxcl10	0.262911	AI059907	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Znf179	0.251234	AA997188	Zinc finger protein 179
LOC360918	0.24777	AA956032	Similar to Platelet factor 4 precursor (PF-4) (CXCL4)
Fcgrt	0.235447	AA875464	Fc receptor, IgG, alpha chain transporter
A2m	0.234536	AA859825	Alpha-2-macroglobulin
Cd1d1	0.232928	AI044941	CD1d1 antigen
Cfi	-2.11964	AA900791	Complement factor I
Mx2	-1.48406	AI030615	Myxovirus (influenza virus) resistance 2
A2m	-1.19876	AA817954	Alpha-2-macroglobulin
Pap	-0.84601	AI030627	Pancreatitis-associated protein
RT1-M3	-0.82833	AI144896	RT1 class 1b, locus M3
C8b	-0.79261	AA819870	Complement component 8, beta polypeptide
Crp	-0.73622	AA818144	C-reactive protein, petaxin related
B7h3	-0.68079	AA858717	B7-H3
Ptpnc1	-0.60002	AA924685	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
C3	-0.52695	AI044782	Complement component 3
Ptms	-0.4989	AA899878	Parathyrosin
F2	-0.48822	AI071305	Coagulation factor 2
Itga1	-0.38756	AA964090	Integrin alpha 1
Tnfrsf1b	-0.35053	AA900380	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b
Tlr3	-0.32848	AA924130	Toll-like receptor 3
Hla-dma	-0.32808	AA924693	Major histocompatibility complex, class II, DM alpha
Spp1	-0.31417	AA964431	Secreted phosphoprotein 1
Sod2	-0.31097	AI029806	Superoxide dismutase 2, mitochondrial
Psmc9	-0.27899	AI111949	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9
Azgp1	-0.24691	AI059700	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc
Masp1	-0.22254	AA926053	Mannose-binding protein associated serine protease-1

#### IV. 考 察

ROS는 유기호흡 생물의 정상적인 대사과정과

내외부의 자극에 의하여 끊임없이 생성되는데<sup>17</sup>, 뇌 허혈·저산소 등과 같은 흥분독성(excitotoxicity) 상황에서는 ROS 생성이 촉진되어 방어체계의 한

계를 넘는 산화스트레스를 유발하여 신경세포 사멸을 야기한다<sup>18</sup>. 미토콘드리아 내외 두 막은 이온 구성 차이에 따라 일정한 전압차를 이루고 있는데, 이를 미토콘드리아 막전위(MMP)라 한다<sup>19</sup>. MMP는 미토콘드리아에서 ATP를 생산하는 원동력으로 미토콘드리아가 ROS에 노출되면 MMP가 소실되어 ATP를 합성할 수 없게 되어 막세포내  $Ca^{2+}$  증가가 일어나막세포괴사(necrosis)와 세포자살사(apoptosis)를 유발하는 중요한 원인이 된다<sup>6</sup>.

黃連은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속한 다년생 초본인 黃連(*Coptis chinensis* FRANCH.)의 根莖을 건조한 것으로, 《神農本草經》에 “味苦寒, 主熱氣, 目痛, 眇傷泣出, 明目, 腸澼, 腹痛下利, 婦人陰中腫痛, 久服令人不忘”이라고 문헌에 최초로 수록된 이후 淸熱燥濕, 淸心除煩, 瀉火解毒의 효능이 있어 濕熱의 實證에 多用되는데, 半夏瀉心湯, 三黃瀉心湯, 黃連解毒湯, 黃連湯, 回春涼膈散 등의 처방에서 주요 약재로 쓰인다<sup>20</sup>. 黃連의 주요성분은 berberine, coptisine, worenine, palmatine 등으로 혈관평활근 이완을 통한 혈압강하, 세균증식 억제에 의한 급·만성위염 및 세균성 이질의 치료, 해열, 止血, 利膽, 진정, 항암작용 등이 있는 것으로 보고되었다<sup>21</sup>.

黃連에 관한 실험적 연구로는 黃連의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균 효과<sup>22</sup>, 黃連이 반복적인 코카인 투여로 인한 보행성 활동량과 c-Fos 발현에 미치는 효과<sup>13</sup> 등에 대한 보고는 있으나, 黃連이 세포사방지나 산화스트레스에 미치는 영향에 대한 연구는 崔<sup>14</sup>에 의한 연구가 유일하다. 崔<sup>14</sup>는 黃連이 ROS 생성을 억제하고, MMP 소실방지 효능이 있어 DNA 손상을 막아 신경세포를 보호하고, 저산소증에서 신경 세포사를 억제하여 항산화효과가 있음을 확인하였다. 그러나 현재까지 세포사 억제를 위한 항산화효과에 대해 유전자 변화를 살펴보는 시도는 없었다. 이에 본 연구에서는 黃連이 저산소증에서 유전자 표현에 미치는 영향을 microarray 기법으로 조사하였다.

Apoptosis/cell death 관련 유전자 가운데 Nfkb1, Dnasel13, S100B, Clu, Dnm2, Alox15 유전자는 증가하였고, Cntf 유전자는 감소하였다. NF- $\kappa$ B family 유전자 전사인자들(RelA [p65], RelB, c-Rel, Nfkb1 [p105/p50] and Nfkb2 [p100/p52])은 세포의 성장(growth), 활성화(activation), 분화(differentiation) 및 생존(survival)에 중요한 역할을 한다<sup>23</sup>. Nfkb1 유전자는 apoptosis를 저해하거나 후 촉진하는 것으로 보고 되고 있는데<sup>24,25</sup>, human neutrophil의 경우 hypoxic shock 후 초기 3시간째에는 유전자 변화가 별로 없지만 6시간째에는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(G3PDH), microphage migration inhibitory factor(MIF), triosephosphate isomerase-1 and Nfkb(p65)가 2배 이상 증가하는 것으로 보고되고 있다<sup>26</sup>. 이들의 연구에 의하면 Nfkb p65는 저산소증에 의하여 조절되는 유전자로서, 저산소압(reduced oxygen tensions)에 의하여 표현이 증가되고 Nfkb 저해제들인 gliotoxin과 parthenolide를 처리하면 세포가 죽게된다. 따라서 黃連에 의한 Nfkb의 증가는 저산소증에서 신경세포의 생존에 도움이 될 것으로 이해된다.

Dnasel13<sup>27</sup> 유전자는 정확한 기능은 알려지지 않았지만, 대식세포에 의해 분비되는 ‘세포를 방어하는 수문장(cellular goalie)’ 역할로 세포를 보호할 것으로 추정된다<sup>28</sup>. 따라서 세포내에서 Dnasel13의 주된 표적은 자연사 조각파편(apoptotic debris)이라 생각되며<sup>29</sup>, 저산소증에서 黃連에 의한 Dnasel13의 증가는 저산소증에서 생성되는 세포 파편(cell debris)을 신속하게 제거함으로써 세포독성을 제거할 것으로 추정된다.

S100b는 세포내에서 S100B는 신호전달, 효소활성조절 및 칼슘항상성(calcium homeostasis)<sup>30</sup>에 관여하여 결국 세포의 형태(cell morphology)를 조절하고<sup>31</sup> apoptosis를 방지한다<sup>32</sup>. 또한 S100B는 세포분열촉진기능(mitogenic property)<sup>33</sup>이 있으며, 발생학적 가소성(developmental plasticity), 상해에 따른 연결생성(lesion-induced reactive synaptogenesis)

을 하는 것으로 보인다<sup>34</sup>. S100B는 다양한 뇌손상에서 분비되는 것으로 보고되고 있다<sup>35,36</sup>. 따라서 이러한 기능들을 종합해볼 때 저산소증에서 S100b의 증가는 조직의 손상을 억제하고 신경세포의 정상적 연접신호전달에 도움을 줄 것으로 해석된다.

Clu 유전자에 대한 보고에 따르면 Clu가 암치료에 저항하고(cancer therapy resistance) 암발달(tumour development)에 관여하는 anti-apoptotic protein임이 발표되고 있다<sup>37,38</sup>. Clu는 mitochondria에서 pro-apoptosis 유전자인 Bax를 저해하여 apoptosis를 억제하는데, Clu는 Bax oligomerization를 방해함으로써 mitochondria로부터 cytochrome c가 유리되고 이어서 분해효소(caspase) 활성이 일어나는 것을 방지한다<sup>39</sup>. 따라서 저산소증에서 Clu의 증가는 apoptosis를 억제하여 세포사를 억제하는 것으로 해석된다.

Dnm2는 세포질분열(cytokinesis)에 관여하여 초기 전기(early prophase)에서 중심체(centrosomes)와 핵막에 위치한다. 최근 proteomics를 통한 연구에 따르면 저산소증에서 Dnm2의 표현은 증가된다<sup>40</sup>. 그러나 저산소증에서 Dnm2가 어떤 역할을 하는지는 아직 알려진 바가 없다.

LOX는 산소(oxygen)를 다불포화지방산(polyunsaturated fatty acids)의 특정한 부위에 첨가시키는 효소로서 산소의 첨가부위에 따라 일반적으로 5-, 12- 혹은 15-LOX로 분류된다<sup>41</sup>. 12-LOX와 5-LOX는 뇌신경세포에서 특히 표현이 많이 된다<sup>42</sup>. 12-LOX는 세포분화와 세포사의 중요한 조절자로서 ROS의 일종인 peroxynitrite에 의한 신경세포의 자연사<sup>43</sup>와 glutathione 고갈 및 arachidonic acid에 의한 세포사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>44</sup>.

Cntf는 표현이 가장 많이 감소하였는데, Cntf는 IL-6 cytokine family에 속하며, 성체 신경계의 생리 유지와 손상회복에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다<sup>45</sup>. Cntf는 손상된 신경세포의 생존뿐 아니라 신경가지와 연결들의 유지와 재생에도

관여하는 것으로 보인다<sup>46</sup>. 세포 스트레스 하에서 Cntf는 아교세포(glia)에 의하여 분비되어 신경세포를 보호한다<sup>47</sup>. 대뇌의 일시적 허혈(transient global ischemia)에서 보면 해마의 반응성 별아교세포(reactive astrocyte)에서는 Cntf와 그 수용체인 CNTFRa가 현저히 증가하였으나 신경세포의 CNTFRa 표현 증가는 미미하였다<sup>48</sup>. 세포의 생존에 도움을 주는 Cntf가 왜 黃連에 의해서 표현이 크게 감소하였는지는 설명하기 어렵다.

스트레스 반응 관련 유전자 가운데는 Defb3와 Defb1이 4배 이상(각각 Global M = 2.15 및 2.13)으로 가장 많이 증가하였고, Crp도 4배 정도(Global M = 1.95)로 크게 증가하였다. Antimicrobial peptides(APs)는 선천성 면역계(innate immune system)의 효과분자(effector molecules)로서 주로 상피조직(epithelial tissues)에서 분비된다. Defensins은 AP 가운데 중요한 peptide family이다. 이들은 작고(3-5 kD), cysteine이 풍부한 양이온(cationic) peptides로서  $\alpha$ - 및  $\beta$ -defensin으로 분류된다.  $\beta$ -defensins은 미숙 가지세포(immature dendritic cells)와 T cells의 화학주성인자(chemotactic factors)로 작용함으로써 선천성(innate)과 후천성(adaptive) 면역반응의 연결고리가 되기도 한다<sup>49</sup>. 저산소증에서 黃連에 의한 defensin의 증가는 세포손상이라는 전반적인 상황에서 방어기전으로 합리적인 것으로 해석된다.

Crp와 alzheimer's Disease의 AP 단백질은 flat pentameric discs를 만들기 때문에 pentraxins이라 불린다. Crp는 상처나 감염 후에 민감하게 반응하여 혈청 수준이 사람의 경우 1,000배까지 증가하며, 모든 손상에 관여하는 비특이적 포지단백질(nonspecific marker)로 알려져 있었으나<sup>50</sup>, 최근에는 죽상동맥경화증과 관상동맥질환의 중요한 위험인자(risk factor)가 되고 있다<sup>51</sup>. Pentraxins의 주요 기능 가운데 하나는 항체-비의존형 방식(antibody-independent fashion)으로 보체 전형적 경로(classical complement pathway)를 활성화시키는 것이다<sup>52</sup>. Crp와 AP는 주



로 간세포에서 생성되는 것으로 알려져 왔으나<sup>53</sup>, 최근 연구보고에 따르면 뇌신경세포에서 직접 만들어진다<sup>54</sup>. 선천성 면역(innate immunity)은 국소적으로 작용하고<sup>55</sup>, 뇌에서의 보체 단백질(complement proteins)은 주로 신경세포에 의하여 만들어지기 때문에<sup>54</sup> brain pentraxins도 뇌신경세포에 의하여 만들어지는 것은 합당하다고 생각된다. 본 연구에서도 저산소 손상에서 黃連에 의한 Crp의 증가는 조직의 방어기전으로 매우 합당한 반응으로 해석된다.

세포주기 관련 유전자 중 31종은 표현이 증가하였고, 30종은 표현이 감소하였다. 생리대사 관련 유전자는 저산소증에서 黃連 추출물에 의하여 많은 표현변화가 있었으며, 326종은 표현이 증가하였고, 320종은 표현이 감소하였다. 신호전달 관련 유전자 중 24종은 표현이 증가하였고, 30종은 표현이 감소하였다. 전사(transcription) 관련 유전자 중 24종은 표현이 증가하였고, 20종은 표현이 감소하였다.

면역반응 관련 유전자 가운데 Penk-rs가 4배 정도(Global M = 1.97) 크게 증가하였다. Preproenkephalin (PPE)에서 파생하는 peptides들은 주로 신경전달 물질의 유리를 감소시킴으로서 주로 연접전 기전으로 흥분성 신경전달을 조절한다<sup>55</sup>. Glutamate 흥분독성(excitotoxicity)은 저산소증에서 신경세포사의 주된 원인이다<sup>56</sup>. NMDA receptor가 활성화되면 calcium을 세포내로 유입시킨다. 대다수의 신경전달 경로는 적절한 calcium 농도가 필요하지만, 오랫동안 과다하게  $Ca^{2+}$  농도가 높아지면 미토콘드리아 막의 기능이상(mitochondrial membrane dysfunction)과 세포사가 초래된다. 따라서 黃連에 의한 PPE의 증가는 흥분독성을 완화 또는 제거함으로써 신경세포사를 방지하는데 기여할 것으로 해석된다.

실험 결과 黃連에 의하여 많은 유전자들의 표현변화가 일어났다. 이전 黃芩, 蘇合香元, 牛黃清心元 추출물을 통한 유전자변화를 조사한 연구에 비하여, 黃連 추출물은 발현되는 유전자 종류가 5배 이상 많았고, 표현강도는 5배 정도 높았다<sup>57-9</sup>.

종합해 보면 ROS, MMP를 직접 억제하는 유전

자 표현은 보이지 않았으며, 한편 성장촉진, 면역, 흥분독성 제거(presynaptic inhibition) 등의 유전자는 많이 표현되었다. 이는 黃連이 직접적으로 ROS를 제거하는 것이 아니라 세포 전체의 활성을 높여 줌으로써 세포사를 방지하는 것으로 이해할 수 있다.

세포사를 촉진시키는 Alox15는 증가되고, 세포 손상을 방지하는 Cntf는 감소하였는데, 이에 대한 타당한 이유를 찾기 어려우나 黃連은 다른 약물보다 다양한 유전자를 발현시키는 것으로 보아 다른 유전자와의 상호작용이 있을 것으로 생각된다. 또한 黃連의 다양한 유전자 발현이 저산소환경에서의 세포사 방지효과뿐만 아니라 다양한 부분에서의 효능을 암시한다고 볼 수 있어, 향후 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

## V. 結 論

본 연구는 배양한 대뇌 신경세포를 이용하여 黃連이 저산소증에서 대뇌신경세포에 미치는 영향을 microarray 방법으로 조사하였다. 세포사와 관련된 주요 유전자의 표현변화를 보면 다음과 같다.

1. 표현이 변화된 유전자 대부분의 M 값은  $\pm 0.5$  사이로서 40% 정도 이내의 증감을 나타내었으며, M 값이  $\pm 2.0$  사이 즉 4배 정도 차이를 내는 유전자들도 많이 포함되어 있었다. 전체적으로 Global M 값이 +0.2 이상 즉 14% 이상 표현이 증가한 유전자는 1,227종, -0.2 이하 즉 14% 이상 표현이 감소한 유전자는 1,147종이었다.
2. 黃連은 저산소증에서 세포의 생존을 도와주는 유전자인 antiapoptosis(Clu), presynaptic inhibition (Penk-rs) 및 innate immunity(Crp, Defensin, Dnase113)를 증가시켰다.
3. ROS 생성과 MMP 소실을 덜어주는 신경영양 효과를 가지는 유전자인 S100b, NF $\kappa$ B를 증가시켰다.

Microarray를 통해 발현되는 유전자를 조사한 결과 黃連은 세포생존과 신경영양을 높이는 방향으로 세포를 보호함을 알 수 있었다.

### 參考文獻

1. Ames III A. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 34(1-2):42-68.
2. Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res* 1990;27(4):332-6.
3. Silver IA, Erecinska M. Ion homeostasis in rat brain in vivo: intra- and extracellular  $Ca^{2+}$  and  $H^+$  in the hippocampus during recovery from short-term, transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992;12(5):759-72.
4. Wingrave JM, Schaecher KE, Sribnick EA, Wilford GG, Ray SK, Hazen-Martin DJ, et al. Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res* 2003;73(1):95-104.
5. Rego AC, Oliveira CR. Mitochondrial Dysfunction and Reactive Oxygen Species in Excitotoxicity and Apoptosis: Implications for the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Neurochem Res* 2003;28(10):1563-74.
6. Gorman AM, Ceccatelli S, Orreinus S. Role of mitochondria in neuronal apoptosis. *Dev Neurosci* 2000;22(5-6):348-58.
7. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270(5235):467-70.
8. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999;21(1):10-14.
9. Whitney LW, Becker KG, Tresser NJ, Caballero-Ramos CI, Munson PJ, Prabhu VV, et al. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol* 1999;46(3):425-8.
10. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 4판. 서울: 永林社; 1998, p. 180-1.
11. 최용순, 이영일, 이상영. 황련뿌리 추출물 성분이 흰쥐의 지질대사에 미치는 효과. *생약학회지* 1996;27(3):246-53.
12. 김동일, 정희재, 정승기, 이형구. 오미자, 황련이 BEAS-2B 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. *경희의학* 2001;17(2):199-213.
13. 이봄비, 함대현, 이해정, 심인섭. 황련이 반복적인 코카인 투여로 인한 보행성 활동량과 c-Fos 발현에 미치는 효과. *한국심리학회지* 2001;13(1):57-69.
14. 최주리, 정승현. 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 黃連의 활성산소 억제 및 미토콘드리아 막전위 유지 효능. 학위논문(석사). 동국대학교 대학원; 2005.
15. 지형준, 이상인. 대한약전의 한약(생약) 규격집 주해서. 서울: 한국메디칼인텍스사; 1997, p. 153.
16. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 1993;35(5):567-76.
17. Ji LL, Leeuwenburgh C, Leichtweis S, Gore M, Fiebig R, Hollander J, et al. Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Ann N Y Acad Sci* 1998;854:102-17.

18. Cai J, Jones DP. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem* 1998;273(19):11401-4.
19. Griffiths EJ. Mitochondria-potential role in cell life and death. *Cardiovasc Res* 2000;46(1):24-7.
20. 吳普述著. 神農本草經. 초판. 서울: 醫聖堂: 2003, p. 79.
21. 新文豐出版公司. 新編中藥大辭典第三冊. 臺北: 新文豐出版公司: 1982, p. 2109-11.
22. 신정인, 서운교. 황련의 Helicobacter pylori 에 대한 항균 효과. 대한한방내과학회지 2003; 24(2):269-82.
23. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Kronke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I $\kappa$ B is necessary for activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 1993;365:182-5.
24. Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsuru M, Katz D, et al. Inhibition of NF- $\kappa$ B/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J* 1996;15(17):4682-90.
25. Grimm S, Bauer MKA, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K. Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J Cell Biol* 1996;134:13-23.
26. Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med* 2005;201(1):105-15.
27. Napirei M, Wulf S, Eulitz D, Mannherz HG, Kloeckl T. Comparative characterization of rat deoxyribonuclease 1 (Dnase1) and murine deoxyribonuclease 1-like 3(Dnase1l3). *Biochem J* 2005;389(Pt 2):355-64.
28. Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 1999;93:3956-63.
29. Wilber A, O'Connor TP, Lu ML, Karimi A, Schneider MC. Dnase1l3 deficiency in lupus-prone MRL and NZB/W F1 mice. *Clin Exp Immunol* 2003;134(1):46-52.
30. Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front. Biosci* 2002;7:d1356-68.
31. Nishi M, Kawata M, Azmitia EC. S100beta promotes the extension of microtubule associated protein2 (MAP2)-immunoreactive neurites retracted after colchicine treatment in rat spinal cord culture. *Neurosci. Lett* 1997;229(3):212-4.
32. Brewton LS, Haddad L, Azmitia EC. Colchicine-induced cytoskeletal collapse and apoptosis in N-18 neuroblastoma cultures is rapidly reversed by applied S-100beta. *Brain Res* 2001;912(1):9-16.
33. Goncalves DS, Lenz G, Karl J, Goncalves CA, Rodnight R. Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures. *Neuroreport* 2000;11(4):807-9.
34. Mcadory BS, Van Eldik LJ, Norden JJ. S100B, a neurotropic protein that modulates neuronal protein phosphorylation, is upregulated during lesion-induced collateral sprouting and reactive synaptogenesis. *Brain Res* 1998;813(1):211-7.
35. Herrmann M, Curio N, Jost S, Grubich C, Ebert AD, Fork ML, et al. Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short- and long-term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70(1):95-100.
36. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative Neurology*

- and *Neuroscience* 2003;21(3-4):97-108.
37. Miyake H, Hara I, Kamidono S, Gleave ME, Eto H. Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with intracellular clusterin expression. *Oncol Rep* 2003;10:469-73.
  38. Trougakos IP, So A, Jansen B, Gleave ME, Gonos ES. Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein J gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress. *Cancer Res* 2004;64:1834-42.
  39. Zhang H, Kim JK, Edwards CA, Xu Z, Taichman R, Wang CY. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol* 2005;7(9):909-15.
  40. Shakib K, Norman JT, Fine LG, Brown LR, Godovac-Zimmermann J. Proteomics profiling of nuclear proteins for kidney fibroblasts suggests hypoxia, meiosis, and cancer may meet in the nucleus. *Proteomics* 2005;5(11):2819-38.
  41. Shimizu T, Wolfe LS. Arachidonic cascade and signal transduction. *J Neurochem* 1990;55(1):1-15.
  42. Li Y, Maher P, Schubert D. A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron* 1997;19(2):453-63.
  43. Zhang Y, Wang H, Li J, Jimenez DA, Levitan ES, Aizenman E, et al. Peroxynitrite-induced neuronal apoptosis is mediated by intracellular zinc release and 12-lipoxygenase activation. *J Neurosci* 2004;24(47):10616-27.
  44. Wang H, Li J, Follett PL, Zhang Y, Cotanche DA, Jensen FE, et al. 12-Lipoxygenase plays a key role in cell death caused by glutathione depletion and arachidonic acid in rat oligodendrocytes. *Eur J Neurosci* 2004;20(8):2049-58.
  45. Weisenhorn DM, Roback J, Young AN, Wainer BH. Cellular aspects of trophic actions in the nervous system. *Int Rev Cytol* 1999;189:177-265.
  46. Dallner C, Woods AG, Deller T, Kirsch M, Hofmann HD. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia* 2002;37(4):374-8.
  47. Peterson WM, Wang Q, Tzekova R, Wiegand SJ. Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia. *J Neurosci* 2000;20(11):4081-90.
  48. Park CK, Ju WK, Hofmann HD, Kirsch M, Ki Kang J, Chun MH, et al. Differential regulation of ciliary neurotrophic factor and its receptor in the rat hippocampus following transient global ischemia. *Brain Res* 2000;861(2):345-53.
  49. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al.  $\beta$ -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999;286(5439):525-8.
  50. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994;15(2):81-8.
  51. Burke AP, Tracy RP, Kolodgie F, Malcom GT, Zieske A, Kutys R, et al. Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies. *Circulation* 2002;105:2019-23.
  52. Wolbink GJ, Brouwer MC, Buysmann S, ten Berge IJ, Hack CE. CRP-mediated activation of complement in vivo. *J Immunol* 1996;157(1):

- 473-9.
53. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Eng J Med* 1999;340(6):448-54.
  54. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain Res* 2000;887(1):80-9.
  55. Jiang ZG, North RA. Pre-and postsynaptic inhibition by opioids in rat striatum. *J Neurosci* 1992;12(1):356-61.
  56. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci* 1987; 10:299-302.
  57. 김성배, 정승현, 신길조, 이원철. 배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 黃芩이 유전자 표현에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2004; 25(4-2):324-36.
  58. 백진원, 이영표, 김완식, 정승현, 신길조, 이원철. 배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 蘇合香元이 유전자 표현에 미치는 영향. *대한한의학회지* 2004;25(2):127-37.
  59. 박동완, 김완식, 배철환, 정승현, 신길조, 이원철. 배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 牛黃清心元이 유전자 표현에 미치는 영향. *대한한의학회지* 2004;25(3):123-36.