

## 대규모 유전자 분석 기법을 이용한 육미지황원의 유전자 발현 연구

강봉주 · 김윤택\* · 조동우

한국한의학연구원 의료연구부, \*서강대학교 생명과학과

### Abstract

## Studies on Gene Expression of Yukmijihwang-tang using High-throughput Gene Expression Analysis Techniques

Kang Bongjoo · Kim Yuntaik\* · Cho Dongwuk

Dep. of Medical R&D, KIOM, \*Dep. of Life Science, University of Sogang

Yukmijihwang-tang (YM) is a noted herbal prescription in Chinese and Korean traditional medicines, and it has been known to reinforce the vital essence and has been widely used for a variety of disease such as stroke, osteoporosis, anti-tumor, and hypothyroidism. Regarding its traditional use, YM has been known to reinforce the Yin (vital essence) of liver and kidney. Also it has been known to reinforce nutrition and biological function in brain. Recently, studies suggested that YM increase antioxidant activities and exert the protective effect against oxidant-induced liver cell injury.

We investigated the high-throughput gene expression analysis on the Yukmijihwang-tang administrated in SD rats. Microarray data were validated on a limited number of genes by semiquantitative RT-PCR and Western blot analyses. The recent availability of microarrays provides an attractive strategy for elaborating an unbiased molecular profile of large number of genes in drug discovery. This experimental approach offers the potential to identify molecules or cellular pathways not previously associated with herbal medicine. Total RNA from normal control brain and Yukmijihwang-tang administrated brain were hybridized to microarrays containing 10,000 rat genes. The 52 genes were found to be up-regulated(twice or more) excluding EST gene. The nine genes were found to be down-regulated(twice or more) excluding EST gene.

Gene array technology was used to identify for the first time many genes expression pathway analysis that are cell cycle pathway, apoptosis pathway, electron transport chain pathway, cytoplasmic ribosomal protein pathway, fatty acid degradation pathway, and TGF-beta signaling pathway. These differentially expressed genes pathway analysis have not previously been investigated in the context of herbal medicine efficacy and represent novel factors for further study of the mechanism of herbal medicine efficacy.

**Key words :** Yukmijihwang-tang, DNA Chip, Gene Expression, Pathway Analysis

## I. 서 론

현대의 유전학과 분자생물학 분야의 연구방향이 과거의 DNA의 구조적 해석에서 기능적 해석과 유전자들의 상호 연관성을 규명하는 방향으로 연구 방향이 바뀌고 있는 것이다. 최근에 개발된 DNA chip은 여러 genome project로부터 축적된 방대한 양의 유전정보를 이용하여 시료를 효율적으로 분석할 수 있는 가장 주목 받고 있는 방법이다. 이는 DNA chip이 짧은 시간에 많은 양의 정보를 분석할 수 있으며 자동화가 용이하기 때문이다. DNA chip이란 염기서열을 알고 있는 DNA 분자들을 작은 면적의 solid support에 고밀도로 고정화 시킨 것을 말한다. Chip에 포함되는 DNA 분자는 대상 유기체의 DNA sequencing으로부터 얻어진 염기서열로부터 결정된다. DNA chip은 재조합 유전자기술과 PCR에 비견될 만큼 다양한 응용분야와 기존기술을 능가하는 장점을 가지고 있다. DNA chip은 그 이용방법에 따라 그 적용대상이 매우 넓기 때문에 응용분야 또한 광범위하다. 현재 DNA chip의 주 응용분야는 gene expression monitoring으로서, 이는 여러 genome project로부터 밝혀진 DNA 염기서열을 바탕으로 하여 chip을 제작, 이

용하여 cell내의 metabolism과 physiology, 그리고 각 유전자간의 상호 연관성을 규명하려는 시도이다. DNA chip은 mutation과 polymorphism의 확인, phenotype 분석에도 이용될 수 있으며, 신약개발 실험에 이용될 경우, 전체 신약개발 비용뿐 아니라 개발비용도 크게 절감 할 수 있다. 앞으로의 DNA chip의 가장 큰 응용분야는 유전병리학과 접목한 의약품 개발과 유전자 질병의 진단에 이용될 것으로 보이는데, 이 분야에는 수십 조 달러의 시장이 예상되고 있다.

DNA chip은 기존의 분자 생물학적 지식에 현대에 엄청난 발전을 한 기계 및 전자공학의 기술을 접목해서 만들어졌다. 기계 자동화와 전자 제어 기술등을 이용하여 적게는 수 백개부터 많게는 수십만개의 DNA를 아주 작은 공간에 집어 넣을 수 있게 만든 것이다. 즉 DNA chip이란 유전자 검색용으로서 엄청나게 많은 종류의 DNA를 고밀도로 붙여 놓은 것을 말한다(Fig 1). 이러한 DNA chip이 대체할 수 있는 기존의 대표적인 유전공학방법으로는 Southern과 Northern blot, 돌연변이 검색 그리고 DNA sequencing 등이 있다. 이와 같은 방법들과 가장 큰 차이점은 동시에 최소한 수백개 이상의 유전자를 빠른 시간 안에 검색할 수 있다는 것이다. 또

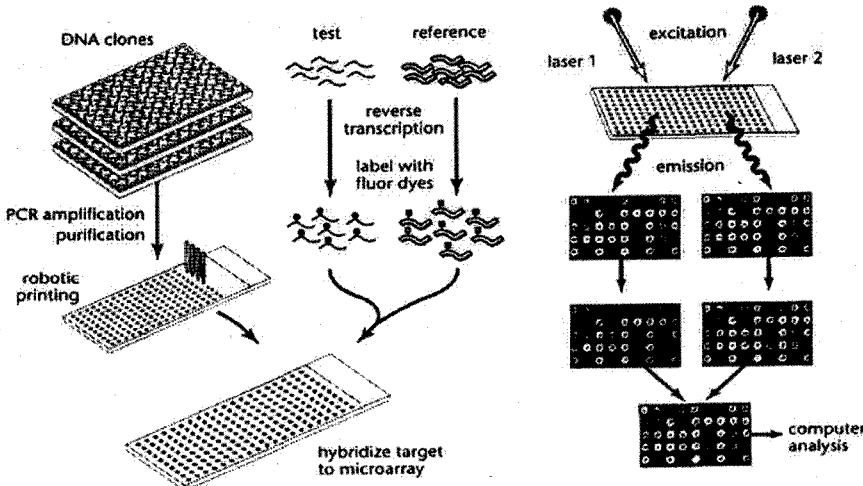


Fig. 1. cDNA microarray scheme

하나의 다른 점은 Southern이나 Northern blot의 경우 유전물질을 붙이는 매체로 nitrocellulose 막을 사용하는데 반하여 DNA chip에서는 유리와 같은 고형체를 사용한다는 것이다. 그럼으로서 DNA chip은 아주 적은 양의 유전물질을 고밀도로 붙일 수 있게 되었고 동시에 많은 수를 검색할 수 있게 된 것이다.

유전자 발현을 검색하는 데에는 cDNA chip이나 oligonucleotide chip이 기존의 방법들보다도 모두 뛰어나다. 일단 많은 수의 유전자들을 한번에 검색한다는 데에 그 의미가 있는 것이다. DNA chip을 이용할 수 있는 분야는 인체 유전자 기능분석 연구, 산업용 유전자 재조합 동식물 및 미생물 연구, 실험용 동식물 모델 연구, 암 및 질병관련 유전자 진단, 유전자 치료, 임상 병리학, 동식물 검역, 환경변화에 따른 생태학 연구, 식품 안전성 검사, 신약개발등과 암관련 유전자 돌연변이 검색진단, 유전병관련 유전자 돌연변이 검색진단, 약제내성 검색진단, DNA 염기서열 분석, 유전자 변이 가계도 작성, 법의학 (용의자확인, 친자 확인 등), DNA 고고학 등이다. 이처럼 다양한 분야에서 활용될 분자생물학의 강력한 도구로서 각광받는 DNA chip을 이용한 한약 및 한약재의 기전연구는 필수적이라 하겠다.

육미지황탕은 송대(宋代) 아래로 수 많은 의사들에 의해 신음허(腎陰虛) 및 간신부족증(肝腎不足證)로 인한 제증(諸症)을 치료하는 데에 사용되어 왔다.<sup>1)</sup> 이에 육미지황탕의 다양한 효능에 대해 연구가 되었고 참고 문헌 신장(腎臟)과 관련된 실험적 연구는 많이 되었지만<sup>2-3)</sup> 육미지황탕의 효능에 대한 분자생물학적 연구보고

는 접하지 못하였다. 본 연구에는 육미지황원의 작용기 전을 DNA chip을 통해서 밝혀보자 한다.

## II. 실험방법

### 1. 실험동물

실험동물은 200~250 g의 6주령된 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 사용하였다. 실험 전까지 일주일동안 12시간 밤/낮 (조명/07:00-19:00)을 유지하고 고형사료와 물을 자유로이 먹을 수 있게 조건을 동일화하였다. 동물사육 조건은 온도 23±2°C, 상대습도 55±5%로 하였다. 본 연구에 음성대조군 (Sham group)은 생리식염수를 경구 투여 하였고, 육미지황탕 (YM) 투여군은 300mg/kg으로 4주간 경구투여했다.

### 2. 탕제의 준비

400 g의 약재를 중류수에 1일 상온 방치한 후, 약탕기에서 30분간 전탕한 후, 다시 2시간동안 재탕했다. 그 후 채로 여과 후, 감암농축한 뒤 원심 분리하여 상층액을 수거했다. 이 상층액을 3MM filter paper(whatman)로 여과한 후 동결 건조한 후 -20°C에서 보관하며 사용했다. 이 추출물은 saline 또는 phosphate buffered saline pH 7.4에 용해하여 이용하였다 (Table 1).

Table 1. Components of Yungmijihwangwon (YM)

Component	Weight(g)
Rehmanniae radix preparat	15.0
Dioscoreae rhizoma	5.63
Corni fructus	5.63
Alismatis rhizoma	5.63
Moutan Cortex	5.63
Poria	5.63

### 3. Total RNA extraction

흰쥐의 두개골로부터 뇌를 DEPC 처리된 기구를 사용하여 적출한 후, 미리 전처리를 끝내고 냉각시킨 막자사발에 뇌조직을 넣고 액체 질소를 부어서 급속 냉각시켰다. 이것을 완전히 homogenization시켜 가루로 만든 후, 뇌조직 100mg당 1ml의 TRIreagent (molecular probe)를 넣고 상온에서 5분간 방치하였다. 여기에 0.2 volume의 chloroform을 첨가하고 15초 동안 vortexing 한 후 상온에 5-15분간 방치했다. 그리고 4°C, 12,000g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. TRIreagent 1ml 당 0.5ml 부피의 isopropanol을 첨가 후 상온에서 5-10분간 방치 후 4°C, 12,000g에서 8분간 원심분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 침전물에서 약 1ml의 75% ethanol을 첨가하고, 4°C, 7,500g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물을 건조시켜 50μl의 DEPC-water에 녹여 RNA농도를 측정하였다.

### 4. Microarray probing과 scanning

100μg total RNA (또는 2-5μg의 mRNA)용액에 5μg의 dt oligomer를 첨가하여 70°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 방치하였다. RNA용액에 2.5μg의 Superscript II revers transcriptase (GibcoBRL), 10μg의 5×reaction buffer, 5μl의 DTT (0.1M), 5μl의 10×dNTP5mM dATP, dCTP, dGTP,; 2mM dTTP, 2μl의 fluorescent nucleotide (최종농도 10nM Cy3-dUTP or Cy5-dUTP)를 첨가하여 50μl의 반응액을 만들어 37°C에서 2시간 반응시켰다. 이 반응액에 6μl의 3M NaOH를 첨가하여 65°C에서 30분 반응시켜 unlabeled RNA를 변성시켰다. 이 반응액에 30μl의 1M Tris-HCl (pH7.5)와 12μl의 1M HCl를 첨가하여 중화시켰다. Biospin 6 column (Bio-Rad)을 사용하여 unincorporated nucleotide와 salt로 제거하였다. Cy5 probe와 Cy3 probe를 동량씩 섞어 Microcon 30 (Milipore)으로 부피를 줄였다.

Hybridization solution들은 probe와 섞어 chamber에 넣어 50°C에서 16시간 hybridization 했다. 그리고 drain 까지 마친 후 scanner GMS 418 (genetic microsystems)로 scanning 하였다. 그리고 Imagene (Biodiscovery)으로 분석하였다.

### 5. Scatter Plot

Microarray 실험을 행하여 스캔한 이미지 그림은 분석 프로그램인 Imagene(Biodiscovery Inc)에서 분석을 하게 되는데 data의 filtering은 우선은 minimal intensity (negative control)로 1차적으로 선별을 하였고, 다음으로 signal to noise ratio인 SNR을 2상의 값만을 취하였다. SNR은 다음과 같은 식으로 구할 수 있다.  
(Signal intensity mean Background intensity mean) / background +SD

다음으로 CV (poor spot)로 0.4이하를 선별을 하였는데 이는 다음과 같다.

$$\text{Signal} + \text{SD} / \text{signal intensity mean}$$

이렇게 하여 선별해진 값들은 intensity가 수치화하여 나타난다. Cy3와 Cy5의 intensity의 signal 평균값을 scatter plot으로 나타낸 그림이다 (Fig. 2).

### 6. MA Plot

Scatter plot이 Cy3와 Cy5의 intensity만을 나타낸 그림이라면 MA plot은 intensity와 ratio와의 상관관계를 나타낸 그림이다. 여기에서 MA 값은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$M = \log_2 R/G, A = \log_2 R + \log_2 G/2$$

이 plot에서 ±1이상인 값이 2배이상 발현이 증가하거나 감소한 값이다 (Fig. 2).

### III. 결과 및 고찰

11,150(10k)여개의 rat 관련 유전자(EST gene)가 집적된 DNA chip을 이용해서 육미지황탕을 경구투여후 유전자 발현 연구를 하였다.

육미지황탕 투여군에서는 2배이상 발현량이 증가한 유전자들은 52개이며 이들 유전자들은 DNA binding protein(GATA-GT2), 70 kDa tumor specific antigen, S6 protein kinase, lamina associated polypeptide 2 (LAP2), DAP-like kinase, smooth muscle cell LIM

protein(SmLIM), cis-Golgi matrix protein GM130, adipocyte fatty acid binding protein(A-FABP), nuclear factor kappa B p105 subunit, hematopoietic lineage switch 2 related protein(Hls2-rp), (S)-2-hydroxy acid oxidase, ubiquitin-like protein, FGF receptor activating protein FRAG1(FRAG1), pancreatic phospholipase A-2<sup>o</sup>]다(Table 2).

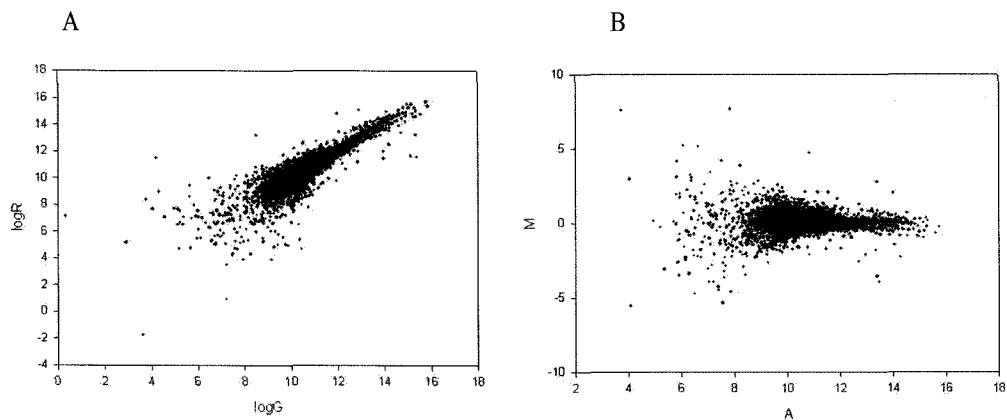


Fig. 2. Scatter plot and MA plot. A: Correlations between the total gene expression results of DNA chips obtained from brain slice which was administrated Yukmijihwangwon compared with the normal control group. B: MA plot analysis of log transformed epression unflagged data for two different RNA populations

**Table 2. Up-regulated genes in Yukmijihwangwon group. The right-hand column gives the ratio of mRNA for Yukmijihwangwon group to control of highly up-regulation**

Gene Title	Unigene#	log ratio
Rattus norvegicus cysteine sulfenic acid decarboxylase mRNA, complete cds	Rn.11321	2.156107
Rattus norvegicus mRNA for putative integral membrane transport protein (UST2r)	Rn.8844	2.084938
Rattus norvegicus synuclein 1 mRNA, complete cds	Rn.1827	2.080255
R.norvegicus mRNA for macrophage metalloelastase (MME)	Rn.33193	2.034284
Rattus norvegicus microtubule-associated protein 1A MAP1A (Mtap-1) mRNA,	Rn.11402	1.887123
Rattus norvegicus jagged protein mRNA, complete cds	Rn.11254	1.775607
R.norvegicus mRNA for ribosomal protein S9	Rn.3381	1.700116
Rat mRNA for prolactin-like protein D, complete cds	Rn.1928	1.686802
Rat kinesin light chain A mRNA	Rn.6013	1.640174
Rat cretine kinase-B (CKB) mRNA, 3' end	Rn.1472	1.607088
Rat mRNA for N-acetylglucosaminyltransferase I, complete cds	Rn.2712	1.573261
Rattus norvegicus zinc finger binding protein mRNA, complete cds	Rn.11383	1.567579
R.norvegicus Apo D mRNA	Rn.11339	1.558761
Rattus norvegicus interferon inducible protein 10 (IP-10) mRNA, complete cds	Rn.10584	1.552689
Rattus norvegicus large subunit ribosomal protein L36a mRNA, complete cds	Rn.755	1.545617
Rattus norvegicus mRNA for acyl-CoA synthetase 5, complete cds	Rn.3061	1.535379
Rat lung beta-galactoside-binding lectin mRNA, complete cds	Rn.57	1.473937
Rat placental lactogen II (rPLII) mRNA, partial cds	Rn.9749	1.404103
R.norvegicus mRNA for ARL gene 4	Rn.9258	1.391235
Rat mRNA for Mx3 protein	Rn.10374	1.39067
R.norvegicus mRNA for brain-derived neurotrophic factor (exon IV)	Rn.11266	1.378744
Rattus norvegicus dual-specificity protein tyrosine phosphatase (rVH6) mRNA,	Rn.4313	1.373025
Rat mRNA fragment for cardiac actin	Rn.3114	1.347105
Rattus norvegicus chemokine receptor LCR1 mRNA, complete cds	Rn.5289	1.306016
Rattus norvegicus mRNA for gC1qBP gene	Rn.2765	1.296614
Rat cell-binding bone sialoprotein mRNA, complete cds	Rn.9721	1.296239
Rattus norvegicus endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor, mRNA, complete cds	Rn.32904	1.295674
Rattus norvegicus transcription factor Maf1 mRNA, complete cds	Rn.10725	1.292052
Rat ribosomal protein S12 mRNA, complete cds	Rn.3379	1.188017
Rat mRNA for peroxisome assembly factor-1 (PAF-1), complete cds (clone T)	Rn.4065	1.17937
Rat mRNA for ciliary neurotrophic factor (CNTF)	Rn.6067	1.164157
Rattus norvegicus asparagine synthetase mRNA, secondary transcript, complete cds	Rn.11172	1.156959
Rattus norvegicus 5-oxo-L-prolinase mRNA, complete cds	Rn.3066	1.15347
Rattus norvegicus toll protein mRNA, complete cds	Rn.14534	1.147882
Rat core protein (HSPG) mRNA, complete cds	Rn.11127	1.131394
Rattus norvegicus mRNA for Rh blood group protein, complete cds	Rn.1943	1.122999
Rat NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase mRNA, complete cds	Rn.11359	1.12289
Rat 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta-5-delta-4 isomerase type II mRNA	Rn.11311	1.111818
Rattus norvegicus mRNA for pancreatic phospholipase A-2, complete cds	Rn.4283	1.101906
Rattus norvegicus FGF receptor activating protein FRAG1 (FRAG1) mRNA, complete cds	Rn.11001	1.081896
Rattus norvegicus ubiquitin-like protein mRNA, complete cds	Rn.2079	1.080203
R.norvegicus mRNA for (S)-2-hydroxy acid oxidase	Rn.10417	1.078409
Rattus norvegicus hematopoietic lineage switch 2 related protein (Hls2-rp) mRNA,	Rn.17112	1.067204
Rattus norvegicus nuclear factor kappa B p105 subunit mRNA, 3' end	Rn.2411	1.062401
Rattus norvegicus adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) mRNA, complete cds	Rn.4258	1.029387
Rattus norvegicus cis-Golgi matrix protein GM130 mRNA, complete cds	Rn.6165	1.029056
Rattus norvegicus smooth muscle cell LIM protein (SmLIM) mRNA, complete cds	Rn.4267	1.012316
Rattus norvegicus mRNA for DAP-like kinase	Rn.2311	1.009638
Rattus norvegicus lamina associated polypeptide 2 (LAP2) mRNA, complete cds	Rn.3364	1.009107
Rat S6 protein kinase mRNA, complete cds	Rn.4042	1.008778
Rattus norvegicus mRNA for 70 kDa tumor specific antigen, partial	Rn.13808	1.006093
Rat DNA binding protein (GATA-GT2) mRNA, complete cds	Rn.26251	1.004814

이에 반해서 2배이상 발현량이 감소한 유전자들은 총 9개이며 이들 유전자는  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase beta-3 subunit, Ste-20 related kinase SPAK, ribosome attached membrane protein 4 (RAMP4), Tctex-1, 14-3-3 protein theta- subtype, DnaJ homolog 2 mRNA, class A calcium channel variant riA-I (BCCA1), glutamate/ aspartate transporter protein, bassoon이다 (Table 3). 육미지황탕을 투여한 군에서 macrophage metalloelastase는 elastin을 분해 해서 extracellular matrix protein의 분해 촉진시켜 암의 전이에 많이 발현되는데 육미지황원 투여군에서 4배 증가했고, cretine kinase-B는 3배이상 증가했고 microtubule-associated protein 1A MAP1A과 같은 세포내 구조단백질이 3.6 배 증가했다.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase beta-3 subunit는 육미지황탕 투여군에서 40배 감소했다.

Adipocyte fatty acid binding protein(A-FABP)는 2 배가량 증가했는데 이 유전자는 LDL 대사에 관련된 protein으로 LDL을 세포안으로 이동시키는 transporter 와 같이 작용하여 지방세포 분화를 촉진하게 된다. 유전자 발현을 전체적 살펴보면 cell 중식, 이동, 구조, 대사 작용, stress관련, 신호전달 그리고 면역 관련 유전자들

을 포함한 전반적으로 다양한 유전자들의 발현의 증가되고 감소되어졌다.

경로 분석 (Pathway analysis) 연구에서 흰쥐 유전자는 현재까지 밝혀진 경로가 51개가 있으며 본 연구에서는 육미지황탕에 의하여 발현이 변화되는 유전자들이 어떠한 경로로 변화되는지를 살펴보기자 육미지황탕을 투여한 결과를 모두 51개의 경로에 대입시켜 보았다. 그 결과로써 세포 주기(cell cycle) 경로, apoptosis 경로, 전자 전달 사슬(electron transport chain) 경로, cytoplasmic ribosomal 단백질 경로, 지방산 분해 경로(fatty acid degradation), 그리고 신호 전달, TGF-beta 신호(TGF-beta signaling) 경로 등 6개의 경로를 살펴보기로 하겠다.

먼저 세포주기 (cell cycle) 경로를 보면, chk1 (Protein name Checkpoint kinase 1) 이 4배이상 증가했다. 그리고 CDC25A (M-phase inducer phosphatase 1)가 3.4배 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 3). 이 유전자는 세포분열 조절에서 dose dependent하게 induction을 시킨다. 세포주기의 진행을 위해 필요한 tyrosine protein phosphatase<sup>1)</sup>기도 하고 P<sub>23</sub>(CDC2)를 직접 탈인산화시키고 P<sub>34</sub>(CDC2) kinase 활성을 활성화시킨다.<sup>4)</sup>

Table 3. Down-regulated genes in Yukmijhwangwon group. The right-hand column gives the ratio of mRNA for Yukmijhwangwon group to control of highly down-regulation

Gene title	Unigene #	log ratio
Rat mRNA for $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase beta-3 subunit, complete cds	Rn.5041	-5.349565
Rattus norvegicus Ste-20 related kinase SPAK mRNA, complete cds	Rn.15731	-1.18227
R. norvegicus ribosome attached membrane protein 4 (RAMP4) mRNA	Rn.12237	-1.068916
Rattus norvegicus mRNA for Tctex-1, complete cds	Rn.29901	-1.008956
Rattus norvegicus mRNA for 14-3-3 protein theta-subtype, complete cds	Rn.2502	-1.039354
Rattus norvegicus DnaJ homolog 2 mRNA, complete cds	Rn.3904	-1.034562
Rattus norvegicus class A calcium channel variant riA-I (BCCA1) mRNA	Rn.11281	-1.118361
R.norvegicus mRNA for glutamate/aspartate transporter protein bassoon	Rn.34134	-1.489856
	Rn.29999	-1.744934

다음으로 세포 자연사 경로(apoptosis pathway)를 살펴보면, 본 실험 결과에서는 세포자연사(apoptosis)를 활성화시키는 NF- $\kappa$ B p105가 증가하고 반대로 BCL-2가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). NF- $\kappa$ B p105(transcription factor NF- $\kappa$ B p105 subunit)가 2배 정도 증가했으며, NF- $\kappa$ B p105는 NF- $\kappa$ B의 subunit p50의 전구체이다. NF- $\kappa$ B는 면역반응이나 염증반응에 관여하는 tumor necrosis factor(TNF), interleukin-1(IL-1), IL-6, IL-8, GM-CSF, inducible nitric oxide synthase

(iNOS), intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1), E-selectin, MHC class I, II 분자 등의 발현을 증가시키는 전사인자이다.<sup>5)</sup> BCL-2 (apoptosis regulator Bcl-2)는 1.62배 감소하는 경향을 보였는데 BCL-2는 apoptosis에서 미토콘드리아막의 투과성을 조절하며, cytochrome c를 세포질로 분비되는 것을 억제하고 APAF-1(apoptosis- activating factor)과 결합하여 apoptosis를 저해하는 것으로 알려져 있다.

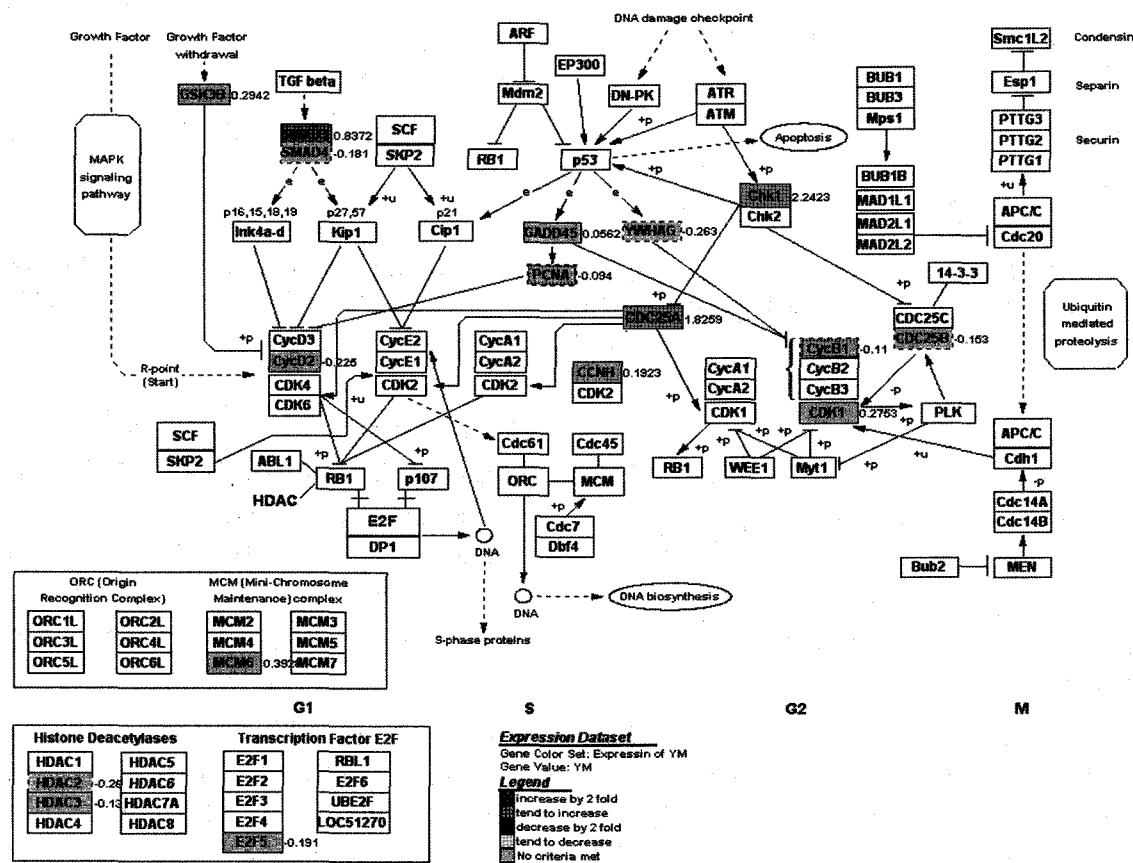


Fig. 3. Pathway analysis of cell cycle pathway using gene microarray pathway profiler that is a computer application designed to visualize gene expression data on screen representing biological pathways and groupings of genes

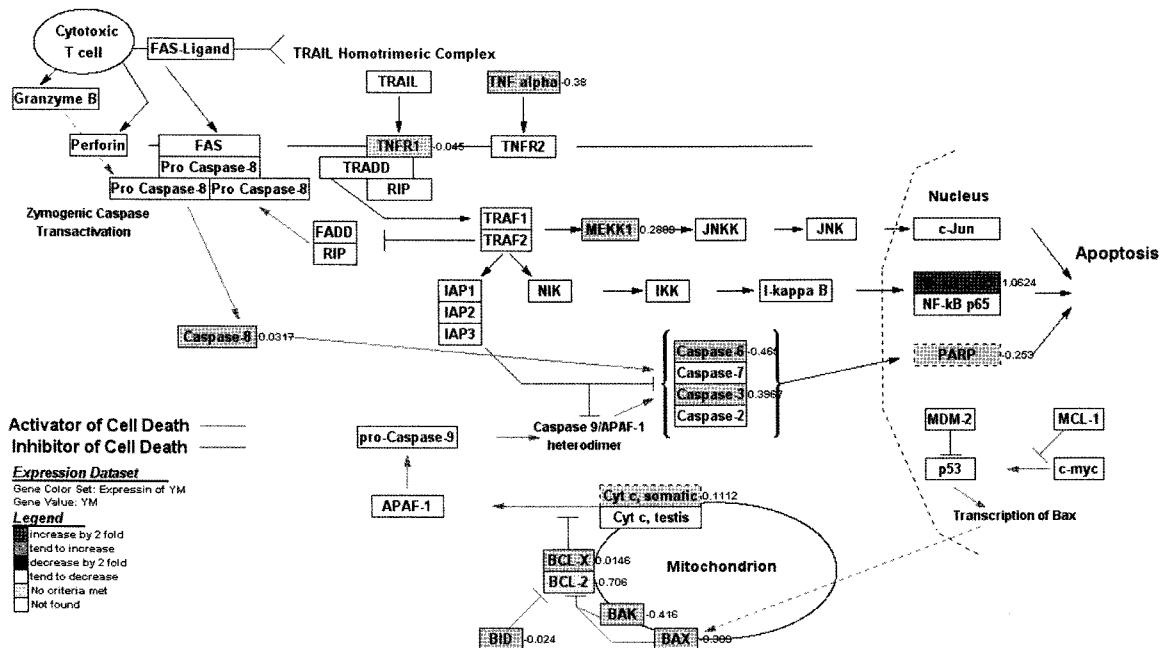


Fig. 4. Pathway analysis of apoptosis pathway using gene microarray pathway profiler that is a computer application designed to visualize gene expression data on screen representing biological pathways and groupings of genes

다음으로 전자전달계의 경로를 살펴보면 COX8h (Cytochrome c oxidase polypeptide VIII-heart, mitochondrial precursor)가 3.7배 증가했다 (Fig. 5). 이 유전자는 전자전달계의 마지막단계인 cytochrome c oxidase의 구성 polypeptide 중 하나로  $4 \text{ ferrocyanochrome c} + \text{O}_2 = 4 \text{ ferricyanochrome c} + 2 \text{ H}_2\text{O}$ 을 촉진한다.<sup>6-8)</sup>

다음으로 cytoplasmic ribosomal 단백질 경로에서는 ribosomal 단백질의 발현의 증가가 관찰되었다. 본 실험에서는 ribosomal 단백질 L36e, L44e과 p70 S6 kinase (Ribosomal protein S6 kinase I (EC 2.7.1.-) (S6K) (P70-S6K))가 발현 증가가 관찰되었으며, S24e (40S ribosomal protein S24 (S19))는 감소되었다.

다음으로 지방산 분해 경로(fatty acid degradation)를 보면은 fatty acid에서 acylCo-A로 분해되는 유전자들이 증가 (Long-chain fatty acid CoA ligase), 감소(Carnitine

O-palmitoyltransferase I) 되었다 (Fig. 6).<sup>9)</sup>

다음으로 TGF-beta signaling 경로를 보면 TGF-beta family는 cell proliferation에 관여해서 cell development에 한 역할을 담당하고 있다. 본 실험에서는 TGF-beta family로 알려진 BMP 유전자들은 별다른 발현의 변화를 보이지 않았으나 SMad는 증가하는 경향을 보였고 NK-kappa-B는 2배이상 증가했다. 반면 JNK2 유전자는 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 7). JNK2는 pro-inflammatory cytokines, UV radiation 과 heat shock 등의 신호 전달 및 유도에 관여하고 c-jun과 ATF2와 같은 전사요소를 인산화시켜 AP-1의 전사활성을 조절한다.<sup>10)</sup>

최근 유전자 연구에서 대규모 유전자 발현 분석을 위한 강력한 도구로서 DNA chip (microarray)이 각광을 받고 있다. 수 천번의 quantitative RT-PCR 또는

Northern blot을 한 것과 같은 효과를 가지고 있어 유전자 발현 연구에 시간과 효율의 극대성을 가지고 있어, drug discovery와 같이 drug의 생체내의 유전자 발현 및 조절에 대한 연구에 사용되고<sup>11)</sup> 있어 한약의 효능 연구에도 좋은 도구라 생각된다.

육미지황원 효능의 기전에 대해서 알려진 바는 없고 단지 신체의 생리·생화학적 변화에 대한 연구가 주로

이루어져서 육미지황원의 효능에 대한 기전연구가 매우 미흡하였다. 본 연구결과에서는 육미지황원의 투여에 의해 각종 유전자의 발현이 증가되고 일부는 감소되는 것으로 나타났고 유전자 발현을 생체내의 경로라는 큰 지도를 통해서 관찰하여 분자생물학적 해석으로 육미지황원의 효능 기전 연구에 활용하고자 한다.

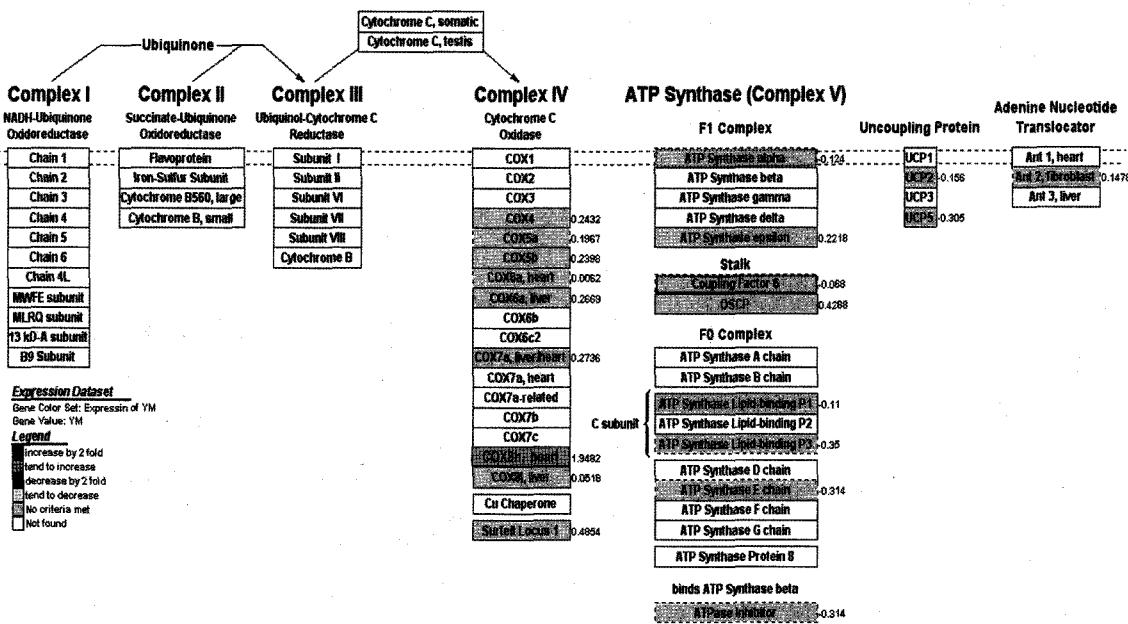


Fig. 5. Pathway analysis of Electron transport chain pathway using gene microarray pathway profiler that is a computer application designed to visualize gene expression data on screen representing biological pathways and groupings of genes

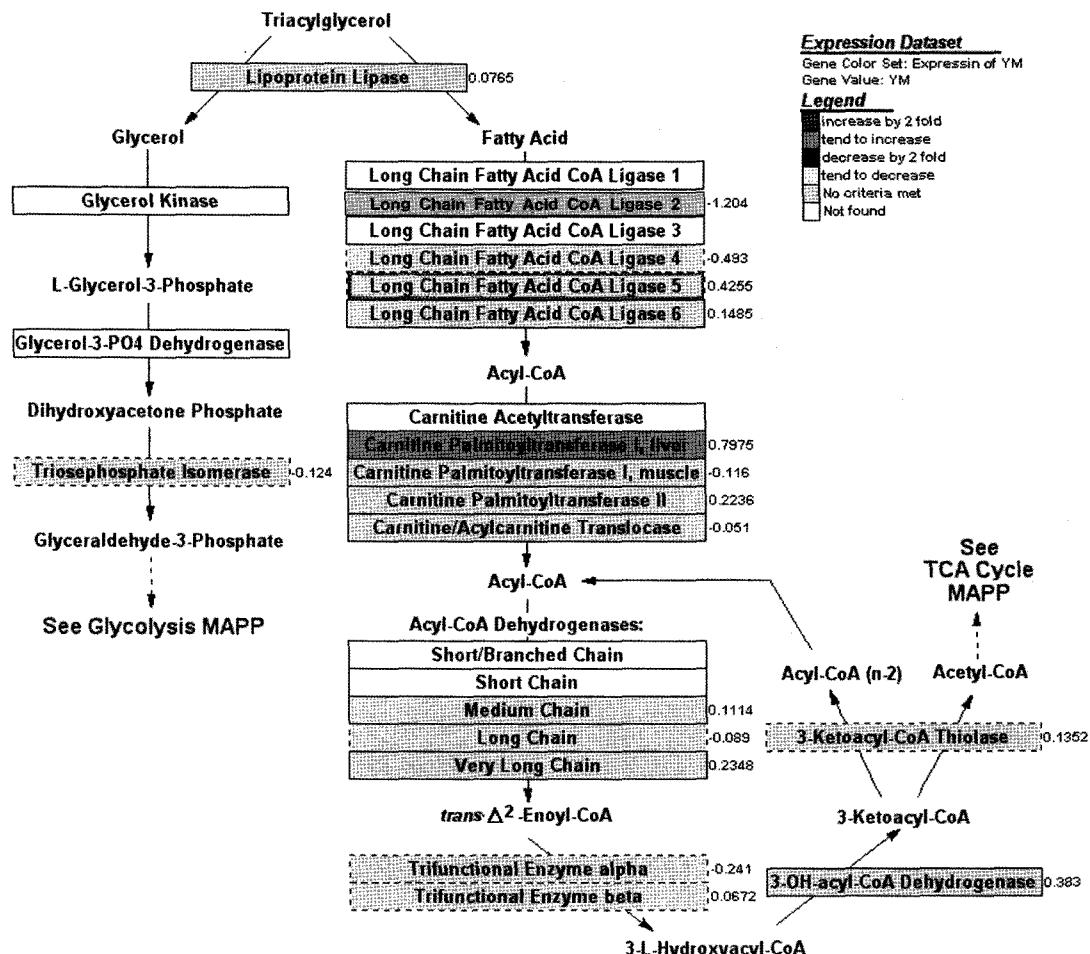


Fig. 6. Pathway analysis of Fatty acid degradation pathway using gene microarray pathway profiler that is a computer application designed to visualize gene expression data on screen representing biological pathways and groupings of genes

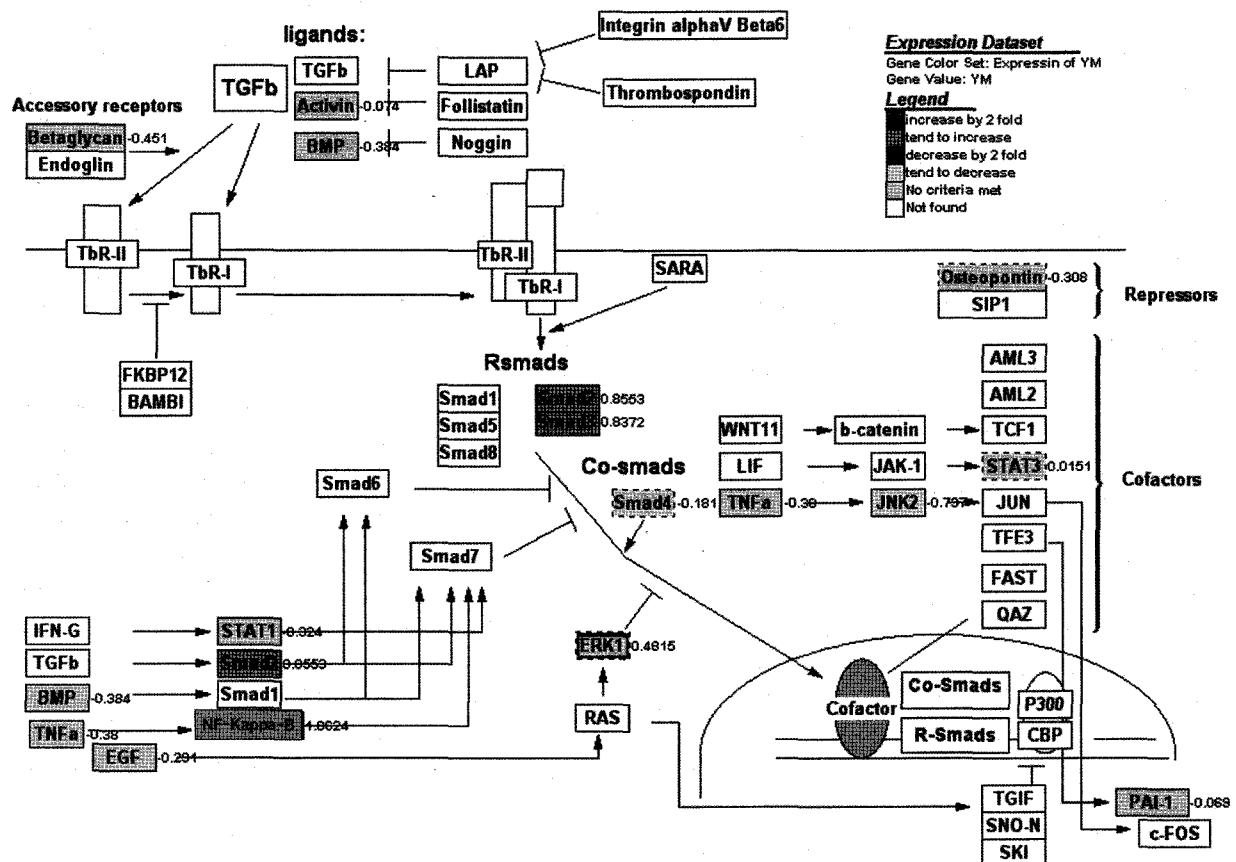


Fig. 7. Pathway analysis of TGF- $\beta$  signaling pathway using gene microarray pathway profiler that is a computer application designed to visualize gene expression data on screen representing biological pathways and groupings of genes

<색인어> 육미지황탕, 기전연구, 유전자발현

## 참 고 문 헌

1. 허준, 『동의보감』, 서울, 남산당, pp. 147, 1987.
2. Chen Y, Qu C, Zhong H, Xue Y, Zhou C, Li W, Cheng X. 「Effects of liuwei dihuang wan and some other TCM drugs on bone biomechanics and serum 25 (OH)D3 content in rats」 . 『Journal of Traditional Chinese Medicine』, 1994; vol.14; 298-302.
3. Jiang TL, Yan SC, Wang SF, Wu GL, Feng GW, Li LF, Li XM「Effect of "liuwei dihuang" decoction on prevention and treatment of tumor.」 , 『Journal of Traditional Chines Medicine』, 1984 vol.4: 59-68.
4. Jinno S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, Okayama H. 「Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle.」 , 『EMBO J.』, 1994; vol.13: 1549-1556.
5. May and Ghosh, 「Signal transduction through NF-kB [review]」 『Immun. Today』, 1998; vol.19 No.2: 80-88.
6. Scheja K, Kadenbach B. 「Nucleotide sequence of cDNA encoding subunit VIII of cytochrome c oxidase from rat heart.」 , 『Biochim. Biophys. Acta』, 1992; vol.1132: 91-93.
7. Lenka N, Basu A, Mullick J, Avadhani NG. 「The role of an E box binding basic helix loop helix protein in the cardiac muscle-specific expression of the rat cytochrome oxidase subunit VIII gene.」 , 『J. Biol. Chem.』, 1996; vol. 271:30281-30289.
8. Kadenbach B, Stroh A, Becker A, Eckersorn C, Lottspeich F. 「Tissue- and species-specific expression of cytochrome c oxidase isozymes in vertebrates.」 , 『Biochim. Biophys. Acta』, 1990; vol. 1015: 368-372.
9. Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry JD. 「Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocyte s.」 , 『J. Biol. Chem.』, 1996; vol. 271:6972-6977.
10. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. 「The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases」 『Nature』, 1994; Vol.369:156-160.
11. Choi DW. 「Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system」 . 『Neuron』, 1988; Vol.1 No.8: 623-634.