

구속 스트레스 (immobilization stress)를 가한 rat의 hypothalamus에서의 유전자 발현 및 補心建脾湯의 항스트레스 효과에 관한 cDNA microarray 분석

이한창 · 염미정 · 김건호 · 최강덕¹ · 이승희² · 심인섭 · 이혜정 · 함대현*

경희대학교 동서의학대학원, 1: 경희대학교 의과대학 동서신장센터, 2: 동국대학교 한방병원 소아과

Gene Expression Analyses in Hypothalami of Immobilization-stressed and BoshimgeonbiTang-treated Mice Using cDNA Microarray

Han Chang Lee, Mi Jung Yeom, Gun Ho Kim, Kang Duk Choi¹,
Seoung Hee Lee², Insop Shim, Hye Jung Lee, Dae Hyun Hahm*

Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University,

1: East-West Kidney Center, Kyunghee Medical Center,

2: Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongsuk University

The genetic effects of restraint stress challenge on HPA axis and the therapeutic effect of Boshimgeonbi-Tang on the stress were studied with cDNA microarray analyses on hypothalamus using an immobilization-stress mouse as stress model. Male CD-1 mice were restrained in a tightly fitted and ventilated vinyl holder for 2 hours once a day, and this challenge was repeated for seven consecutive days. The body weights of the immobilization-stress mice were diminished about 25 percent degree as compared to normal ones. Seven days later, total RNA was extracted from the organs of the mouse, body-labeled with CyDye™ fluorescence dyes (Amersham Bioscience Co., NJ), and then hybridized to cDNA microarray chip. Scanning and analyzing the array slides were carried out using GenePix 4000 series scanner and GenePix Pro™ analyzing program, respectively. The expression profiles of 109 genes out of 6000 genes on the chip were significantly modulated in hypothalamus by the immobilization stress. Energy metabolism-, lipid metabolism-, apoptosis- and signal transduction-related genes were transcriptionally activated whereas DNA repair-, protein biosynthesis-, and structure integrity-related genes were down-regulated in hypothalamus. The 58 genes were up-regulated by the mRNA expression folds of 1.5 to 7.9. and the 51 genes were down-regulated by 1.5 - 3.5 fold. The 20 genes among them were selected to confirm the expression profiles by RT-PCR. The mRNA expression levels of Tnfrsf1a (apoptosis), Calm2 (cell cycle), Bag3 (apoptosis), Hspe1 (protein folding), Aatk (apoptosis), Dffa (apoptosis), Itgb1 (cell adhesion), Vcam1 (cell adhesion), Fkbp5 (protein folding), BDNF (neuron survival) were restored to the normal one by the treatment of Boshimgeonbi-Tang.

Key words : immobilization stress, gene expression, cDNA microarray, hypothalamus, BoshimgeonbiTang(補心建脾湯)

서 론

의화적인 의미에서의 스트레스(stress)란 내외적 환경자극(세

균감염, 독소, X선 노출, 외과수술, 근육훈련 등) 에 의한 인체의 비특이적 반응으로서 주로 내적인 긴장감이 유발됨으로써 위장관 출혈, 신장비대, 면역기능약화 등의 증상이 나타난다.^{1,2)}

글루코코르티코이드(glucocorticoids, cortisol)는 스트레스를 느낄 때 adrenal cortex(부신피질)에서 분비되는 steroids 호르몬의 일종으로 Glucocorticoids가 지속적으로 증가될 경우, 신경세포의

* 교신저자 : 함대현, 경기 용인시 기흥읍 서천리 경희대학교 동서의학대학원

· E-mail : dhahm@khu.ac.kr, · Tel : 031-201-2176

· 접수 : 2003/08/11 · 수정 : 2003/09/28 · 채택 : 2003/11/01

손상이 일어나며 특히, 기억과 학습을 관장하는 뇌의 해마 (hippocampus) 부위의 손상이 현저하다는 사실이 동물실험을 통해 입증되었다.³⁾ 인체의 스트레스 반응은 두뇌 시상하부 (hypothalamus)의 통제에 의해 부신 (adrenal gland)에서 부신흔 호르몬인 catecholamine과 glucocorticoid를 길항적으로 분비함으로써 일어나게 되며 그 경로는 다소 상이하다. 스트레스 호르몬인 글루코코티코이드의 경우에는 hypothalamus-pituitary (뇌하수체)-adrenal gland (HPA) axis의 신경전달체계를 통해 분비신호가 전달되는데 hypothalamus에서 분비된 corticotropin-releasing hormone (CRH)이 pituitary gland를 자극하여 부신피질 자극호르몬인 adrenocorticotrophic hormone (ACTH)이 분비되고 다시 이 호르몬에 의해 부신 피질이 자극되어 스트레스 호르몬인 글루코코티코이드가 최종적으로 분비되는 기전을 갖는다(Fig. 1).

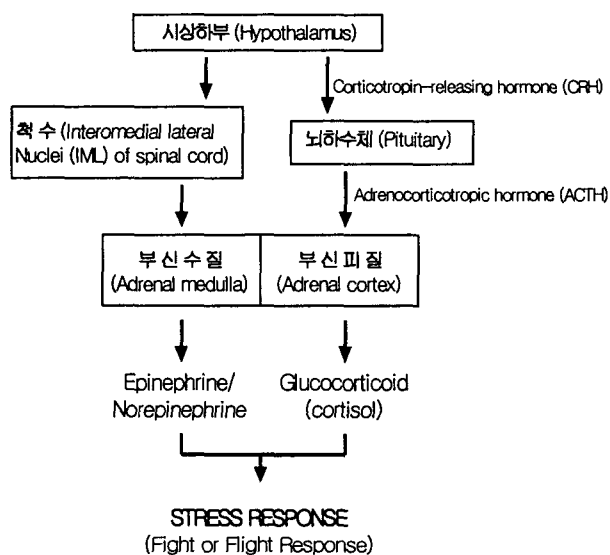


Fig. 1. Hypothalamic control of the adrenal gland during the stress response. (Fight or flight response: a kind of defense behavior including increasing blood pressure and the blood supply to the skeletal muscles, decreasing intestinal motility and blood flow to the intestine, and gluconeogenesis and lipolysis in the blood)

뇌의 hypothalamus는 원래 체온, 섭식, 섭수조절기능과 함께 정동(情動)행동 (fight or flight) 발현의 조절부위로서 생명을 위협하는 다양한 주위 환경으로부터 살아남기 위해 스스로를 변화시키는 조절 중추이고 adrenal gland는 epinephrine, norepinephrin, glucocorticoid 등의 호르몬 분비 조절을 통해 외부 스트레스에 대한 인체 반응을 조절하는 기관이다.³⁾

스트레스 요인 (stressor)은 크게 네 가지로 구분되는데 첫째, 열, 냉기, 소음, 진동 등의 물리적 요인 (physical stressor)과 모든 종류의 독성물질을 포함하는 화학적 요인 (chemical stressor), 둘째, 정서적인 부분을 자극함으로써 불안, 걱정, 공포, 좌절 등을 일으키게 하는 정신적 (psychological stressor), 셋째, 해고, 별거, 따돌림 등으로 표현되는 사회적 요인 (social stressor) 그리고 저혈당, 출혈, 과도한 운동 등으로 인해 인체의 심장혈관계 또는 대사 장애를 유발시키는 요인 등이 있다. 일반적인 스트레스는 상기 네 종류의 스트레스가 혼합된 상태로 나타나며 실험용 동물

에 주로 적용되는 구속 스트레스 (immobilization (IMO) stress), 통증자극 (painful stimulus), 저혈압 출혈 (hypotensive hemorrhage) 등의 방법도 여러 종류의 스트레스가 혼재된 상태로 나타나게 된다.²⁾

각종 스트레스에 의한 유전자 발현 연구는 현재까지 활발히 이루어지지 않았으나 1980년대 후반에 접어들면서 다양한 외부 자극에 대해 수분 이내에 반응함으로써 뇌 신경세포의 바이오 마커로 사용될 수 있는, 초기 발현 유전자 (immediate early genes, IEGs)의 일종인 fos 와 jun과 같은 전사조절인자 (transcription factor)의 발현을 mRNA 또는 단백질 수준에서 분석하는 연구들이 시작되었으며 더불어 스트레스 신호전달 축인 HPA axis에 관련된 호르몬이나 그 수용체 (receptor) 들의 발현 연구도 함께 수행되었다. 스트레스에 대한 두뇌신경반응 형태도 스트레스 요인에 따라 단계적 (processive) 형태와 전신적 (systemic) 형태로 나뉘는데 단계적 형태의 경우, IMO 스트레스가 이에 해당되며 c-fos mRNA가 뇌의 cortex와 limbic 부분에 스트레스가 가해진 후, 30분-2시간 내에 먼저 발현되고 나서 paraventricular hypothalamic nucleus (PVH)에 발현되는 반면 전신적 형태의 경우에는 PVH에서의 c-fos 발현이 최우선적으로 일어나게 된다.²⁴⁾

두뇌에서의 c-fos 발현 연구 외의 스트레스에 의한 유전자 발현 변화 연구가 최근 보고 되고 있는데 크게 인체의 스트레스 신호전달 및 반응의 축인 HPA axis의 hypothalamus나 스트레스 호르몬에 의한 신경세포 손상이 가장 많이 일어나는 hippocampus부위를 주요 대상으로 하여 이루어지고 있다. 급성 IMO 스트레스에 의해 heat shock proteins (HSPs)인 HSP27, HSP70⁵⁾, crystallin- α B⁷⁾ 등의 mRNA 발현이 증가되거나 신경세포의 생존에 필요한 BDNF (brain-derived neurotrophic factor)⁸⁻¹⁰⁾, NT-3 (neurotrophin-3), NGF (nerve growth factor) 등과 같은 neurotrophin류의 발현이 뇌의 hypothalamus 나 hippocampus에서 감소 혹은 일부 증가된다는 보고들이 최근에 이루어졌으며 cyclooxygenase-2 (COX-2)⁶⁾, antioxidant enzyme¹¹⁾, cell adhesion molecule¹²⁾, tryptophan hydroxylase (TPH)¹³⁾, IL-1 (interleukine-1), KGF-1 (keratinocyte growth factor-1) 등¹⁴⁾ 과 같이 통증, 노화, 암, 신경전달, 상처치료 등에 핵심적으로 관여하는 유전자들도 구속 스트레스에 의해 그 발현이 증감된다는 결과가 보고 되었으나 모두 단편적인 개개의 유전자 발현에 대한 연구에 그친 상황이며 관련 전체 유전자 발현 패턴이나 발현된 유전자 상호간의 관련성에 대한 종합적인 연구는 보고 된 바 없다.

최근들어 미국 캘리포니아의 Salk 연구소 연구팀이 캘리포니아 Affimetrix 사의 oligonucleotide microarray chip을 이용하여 실험용 mouse에 신체적 스트레스 (감염, 출혈)나 정서적 스트레스 (구속)를 가했을 때 신경내분비계 및 자율신경계를 조절하는 뇌의 PVH 부위에서의 유전자 발현 패턴을 분석하였으며 그 결과 신호전달 물질 (signaling molecule)과 neuropeptide 관련 유전자들이 양쪽 스트레스에서 공통적으로 발현된 반면, 면역관련 유전자들은 구속스트레스 실험군에서만 발견되었다.^{4,15)} 한편 독일 연구팀은 인간 peripheral blood mononuclear cell (PBMC)

에 대해 스트레스호르몬인 글루코코티코이드를 처리한 후, 그 발현이 촉진되는 유전자와 억제되는 유전자들을 cDNA microarray chip을 이용하여 분석한 결과 글루코코티코이드 호르몬이 chemokine, cytokine을 비롯한 선천적 면역 관련 유전자들 (innate immune-related genes)의 발현은 증가시키지만 획득 면역 관련 유전자들 (adaptive immune-related genes)의 발현은 억제시킨다는 결과를 발표한 바 있다.¹⁶⁾

본 연구는 대표적 정서적(emotional) 스트레스 모델의 하나인 구속(immobilization) 스트레스 mouse 모델을 이용하여 생체 스트레스 반응의 중심축의 하나인 뇌의 hypothalamus에서의 유전자 발현 변화를 cDNA microarray chip을 이용하여 분석하고 스트레스 완화에 효과적 한약제제로 알려진 보심건비탕(補心健脾湯)의 약리학적 치료 효과에 대한 유전자적 분석을 통해 한약 처방의 효과를 분자생물학적 측면에서 객관적으로 접근할 수 있는 실험적인 근거를 제시하고자 한다.

한의학에서 보심건비탕은 한의사 金定濟의 처방으로 가미온 담탕에 정전기미진탕을 합방하여 제조되었으며 정충, 번심, 불안, 초조, 불면, 음식무미난화, 위완비민동통, 조잡, 변비 등의 증을 대상 적응증으로 하여 구성된 처방이다. 보심건비탕은 향부자, 산조인, 산사육, 맥아, 진피, 죽여, 반하, 지실, 천궁, 창출, 백출, 백봉령, 후박, 곽향, 사인, 신곡, 자감초, 청목향, 생강으로 구성되어 있으며, 이 중 향부자, 천궁은 해물하며, 산조인은 안심신하고, 창출, 백출, 신곡, 맥아, 산사육, 사인은 소식도체하고, 반하, 백봉령, 진피, 감초, 생강은 소담하며, 죽여, 지실은 제번열, 강역기하여, 임상상 신경성 위염, 심장신경증으로 인한 정신, 신체장애에 이용할 수 있다고 하였다.¹⁷⁻¹⁹⁾

한편, 소아의 경우에도 심리적 갈등 때문에 식욕이나 수면 같은 신체의 생리기능에 변화를 일으키는 등의 심신장애가 다발한다. 보심건비탕은 복통을 동반하는 풍유병, 야경증, 화령기 아동의 신경성 식욕부진 및 소화불량, 과민성 대장증후군, 소아우울증 등에 광범위하게 응용할 수 있는 처방으로 현대인의 스트레스성 질환에도 효과적이라 할 수 있다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

이계교배(outbreed)된 4주령의 mouse male CD-1(ICR)을 실험에 사용하였고 (주)바이오제노믹스에서 구입하였다. 동물은 일정한 온도(23±1°C)와 규칙적인 조명(12시간 명/암)이 자동적으로 조절되는 동물실에서 사육되었고 사료와 음수가 자유롭게 공급되었으며, 약 일주일 정도의 적응기간을 거친 후, 본 실험에 사용되었다. 실험군은 정상군(n=10)과 구속 스트레스군(n=12) 그리고 약물치료군(n=9)의 세 그룹으로 나누어 주었다. Immobilization stress는 rodent restraint cone (Stoelting Co., IL, USA)을 구입하여 실험동물 몸에 맞도록 재단하여 사용하였으며 오전의 일정시간에 2시간씩, 일주일 동안 가하였다 (Fig. 2). mouse 몸무게는 개체의 크기에 맞는 플라스틱 용기에 넣은 후, digital balance로 측정하였다.

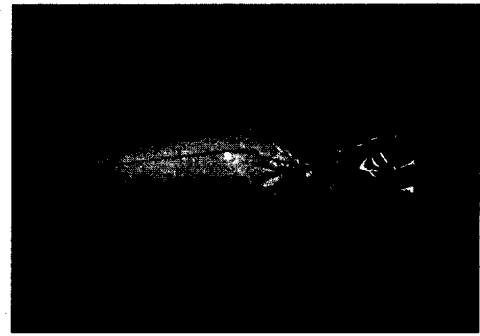


Fig. 2. IMO stress experiment using a rodent restraint cone.

2. 보심건비탕의 제조 및 투여

보심건비탕 열탕추출액 제조는 다음과 같다. 5000ml 용량의 볼 플라스크에 동국대 한방병원으로부터 구입한 보심건비탕 600g을 증류수 3L에 30분가량 담가 불려 놓는다. Multiple Roast Mantle (TOPS Co., 모델명 MS-EAM-JM) 약탕기에서 1.5시간을 끓인 후 거저로 걸러서 추출액만 플라스크에 모은다. 보심건비탕 약액을 플라스크에 담고 감압농축기(R-124A, Buchi Ltd., Switzzland)를 이용하여 감압농축 한다. 농축된 보심건비탕 약액을 식힌 후 Deep freezer(Upright type #725, Forma Scientific Co. USA)에서 overnight 방치하여 충분히 얼린 후, 72시간동안 완전히 동결건조(Telstar Lioalfa-6, Spain)시켰다. 약물투여는 약 0.2ml의 보심건비탕액 (400mg/kg)을 IMO stress를 가하기 매번 30분전에 시행하였으며 정상군과 구속 스트레스군의 경우에는 동량의 saline을 투여하였다.

3. 뇌적출

구속 스트레스 마지막 날에 plastic holder에서 풀어주자마자 경추 탈골시킨 후, decapping을 하고 필요한 뇌부위를 적출하여 부위별로 PBS(phosphate buffered saline)에 담가 냉장 보관하였다.

4. Total RNA의 정제

뇌의 hypothalamus 부위를 적출하여 RNA 보존액인 RNAlater™ (Ambion Co. TX)용액에 담근 후, 약 100mg의 각 뇌부위로부터 total RNA를 분리하였다. total RNA는 TRIzol™ (Life Technologies Ltd., MD)을 사용하여 protocol에 따라 분리 정제하였으며 추출 후에는 분광분석기로 260nm에서 정량한 후 -80°C에서 보관하였다. 실험의 정확도를 높이기 위해 한 종류 실험군에서 각기 추출되어 정제된 total RNA는 서로 혼합한 후, 일정량을 사용하였다.

5. 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

1µg의 total RNA를 65°C에서 15분 동안 denaturation시킨 후, Moloney murine leukemia virus의 reverse transcriptase (GIBCO BRL, MD, USA)을 이용하여 최종 부피가 25µl인 반응 혼합액에서 역전사 반응을 수행하여 cDNA mixture를 얻었다. cDNA는 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM

dNTP, 0.4mM의 각 primer와 0.5 U Taq polymerase (TaKaRa Co., Shiga, Japan)을 포함한 20 μ l의 반응 혼합액에서 PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Co., Waltham, MA, USA)를 사용하여 증폭되었다. 각각의 primer는 Genbank에 기록된 염기서열을 토대로 적당한 부위를 선택하여 제작하였으며 각각의 염기서열은 아래와 같고 PCR 분석 조건은 다음과 같다. Denaturation temperature: 95°C, 30초; Annealing temperature: 60-65°C, 30초, Polymerization temperature: 72°C, 30초.

- (1) GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
forward 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3'
reverse 5'-CTGTCTTACCACCTTCTTG-3'
- (2) Cd164 (CD164 antigen, 369bp)
forward 5'-gctaccagaaacctgtgcg-3'
reverse 5'-acaccaagacaaggacgat-3'
- (3) Tnfrsf1a (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a, 327bp)
forward 5'-accgtgacaatcccctgtaa-3'
reverse 5'-tccagccttctctcttttga-3'
- (4) Calm2 (calmodulin 2, 301bp)
forward 5'-gggacaataacaacaaggagc-3'
reverse 5'-tcattctcatcaaccttctcatctg-3'
- (5) Traf4 (Tnf receptor associated factor 4, 306bp)
forward 5'-caatgtagtcccctgcccta-3'
reverse 5'-tggctctggatgggtgcatata-3'
- (6) Itgb1 (Integrin beta 1, 345bp)
forward 5'-ttggattctccagaaggtgg-3'
reverse 5'-tgtgcccactgctgacttag-3'
- (7) Mor2 (Malate dehydrogenase, 382bp)
forward 5'-atatttggctgtgggctgc-3'
reverse 5'-tcgtccaactccatgcaaaa-3'
- (8) Ogg1 (8-oxoguanine DNA glycosylase 1)
forward 5'-actcgtccattctgctctcg-3'
reverse 5'-caatcactactccaagcca-3'
- (9) Bag3 (Bcl2-associated athanogene 3, 353bp)
forward 5'-aagtcacctctctgctga-3'
reverse 5'-tcagggtctacggaatccag-3'
- (10) Hspe1 (Heat shock 10kDa protein 1, 309bp)
forward 5'-tggctggacaagcttttagg-3'
reverse 5'-tgcctccatattctgggaga-3'
- (11) BDNF (Brain-derived neurotrophic factor, 292bp)
forward 5'-tggctgacacttttgagcac-3'
reverse 5'-gcagctttttatctgcccgc-3'
- (12) Dffa (DNA fragmentation factor, alpha subunit, 385bp)
forward 5'-ccaagagctctttgaggcag-3'
reverse 5'-cttccgaagcctatctctg-3'
- (13) Aatk (apoptosis-associated tyrosine kinase, 344bp)
forward 5'-tagactgggggtgtggctacc-3'
reverse 5'-tgctactagcccaggagaa-3'

- (14) Vcam1 (Vascular cell adhesion molecule, 389bp)
forward 5'-cccaaggatccagagattca-3'
reverse 5'-gtcattgtcacagcaccacc-3'
- (15) Fkbp5 (FK506 binding protein, 365bp)
forward 5'-gaagaccacgacattccga-3'
reverse 5'-aacgactctgaggctttgga-3'
- (16) Hspa9a (Heat shock protein, 74 kDa, A, 306bp)
forward 5'-tgctgctgatggacaaactc-3'
reverse 5'-ttcttctgctgcttctct-3'
- (17) Cryab (crystallin, alpha B, 304bp)
forward 5'-ctcttcgaccagttctctgg-3'
reverse 5'-tccggacttctctgtggaac-3'
- (18) Calm3 (calmodulin 3, 316bp)
forward 5'-aagccttctccctcttgac-3'
reverse 5'-tcattctgctgacttctcccc-3'

6. cDNA microarray 분석

1) Probe preparation

각 sample의 RNA는 50ug씩 사용되었고, 각각 Cy3(red)와 Cy5(green) 형광 표지된 nucleotide 존재 하에서 total RNA를 template로 역전사반응을 일으켜 형광표지가 되도록 cDNA를 제작한 후 3N NaOH로 template로 사용된 RNA를 제거하였다. 1M Tris와 1N HCl을 첨가하여 반응액을 중화시킨 후 Micro Bio-spin column™ (BD Bioscience Co., NJ, USA)을 이용하여 남아있는 free fluorescence dye인 Cy3와 Cy5를 제거함으로써 9.6ul의 형광표지 cDNA probe를 최종적으로 제조하였다.

2) Microarray hybridization

준비된 probe는 polyA(4mg/ml in TE) 0.5ul, yeast tRNA(4mg/ml) 0.5ul, human Cot1 DNA(1mg/ml) 5ul, 10% SDS 0.4ul, 20X SSC 4ul와 혼합한 후, 99°C에서 5분, 실온에서 5분 반응시킨 후, 1,200rpm으로 2분 동안 spin down시켜 상층액을 취하였다. 상층액은 약 6천개의 mouse 유전자가 배열된 TwinChip™ Mouse-6.0K (Digital-Genomics Co., Korea) microarray에 16시간 동안 hybridization 되도록 배양되었고, 수차례 세척하여 비 특이적 결합과 수분을 완전히 제거하였다.

3) Scanning and data analysis

cDNA chip의 scanning은 GenePix 4000B Microarray Scanner (Axon Instruments Co. CA, USA)를 사용하여 수행하였고 array slide의 scan data 분석을 위해 동 회사의 GenePix Pro™ 4.0 분석 program을 사용하였다.

결 과

본 실험에서 채택한 스트레스 유형은 비급성 반복구속 스트레스 (repeated but non-acute immobilization (IMO) stress)로서 IMO stress는 1936년 비엔나 출신의 Hans Selye에 의해 처음 사용되었으며 당시에는 rat의 두발을 끈으로 묶고 수건을 사용하여 몸 전체를 싸는 형태로 시작되었다.^{1,21)} 모든 형태의 구속 스트

레스는 물리적 요인 (physical stressor)과 정신적 요인 (psychological stressor) 이 복합된 형태로 표현되는데 억압 (restraint) 뿐 만 아니라, 저체온 및 고통에 의해서도 IMO 스트레스가 발생할 수 있다. 일반적으로 IMO는 스트레스를 가한 후 처음 30분 내에 스트레스 반응이 발생하기 때문에 급성 스트레스 모델로 많이 사용되고 있다. 한편 repeated IMO stress는 보통 7일에서 길게는 40여일 동안 1일 1회의 IMO를 가하게 되는데 chronic stress라고 볼 수는 없지만 매우 다양한 적응성 변화 (adaptive change)들이 일어나게 되며 acute model에서 흔히 보이는 immediate early gene 들의 발현 외에 좀더 다양한 스트레스 관련 생리적, 대사적, 유전학적 변화들이 일어나게 된다. Fig. 2. 는 실험동물에 IMO stress를 가하는 방법을 보여주고 있다. 1회 IMO 스트레스를 가하는 시간도 1시간에서 6시간까지 매우 다양하나 본 실험에서는 2시간을 채택하였다. Fig. 3. 에서 보는 바와 같이 약 7일간의 IMO stress를 가하였을 때 정상군에 비해 약 20%의 몸무게가 줄어드는 변화를 보였으며 이는 급성 (acute) 및 반복 (repeated) IMO stress를 가하였을 때 일반적으로 나타나는 임상적 관찰유형으로 IMO stress 모델의 척도로 사용될 수도 있다. IMO에 의한 stress 완화 및 치료를 위해 보심건비탕을 투여한 실험군에서는 약물 투여 3일째부터 몸무게가 회복되는 양상을 보였으며 7일째에는 정상군에 비해 유의성 있게 몸무게가 회복되었다.

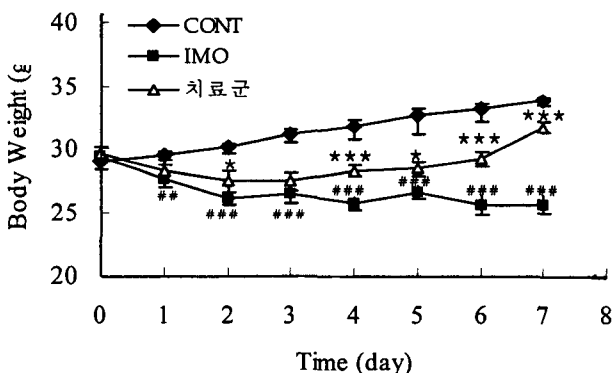


Fig. 3. Effects of Boshingeonbi-Tang on the body weights of IMO-stressed rats. Data were presented as means \pm S.E.M. The differences between the experimental groups were assessed by repeated ANOVA using SPSS program. The day 0 means the first day when the rats were IMO-stressed. (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 as compared to IMO group; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 as compared to control group)

IMO stress와 관련하여 급성 IMO stress 혹은 반복 IMO stress의 경우, 생체내의 스트레스 신호전달 경로인 HPA 축과 관련되거나, 세포신호 전달 또는 면역작용, 항산화기능과 관련된 유전자(혹은 단백질)들의 발현에 대한 개별적인 연구가 보고된 바 있다. Table 1. 에서 보는 바와 같이 HPA 축에 직접적으로 관련된 N-methyltransferase, tyrosine hydroxylase, dopamine β -hydroxylase, GTP cyclohydrolase I 등의 효소들은 IMO stress에 의해 그 발현량이 증가되며 대부분의 스트레스 반응에서 그 발현이 증가된다고 알려진 대표적 heat shock protein인 HSP70과 α B-crystallin, 그리고 염증유발 cytokine인 IL-6, 생체 immediate

early gene의 발현을 유도해주는 c-fos, c-jun 등과 같은 transcription factor 들의 유전자 발현이 증가된다고 보고되었으며, 반면에 피부상처 치료기능의 KGF-1과 IL-1, 그리고 생체 활성산소를 없애주는 각종 항산화효소들, 골형성에 주요 역할을 하는 osteocalcin 등의 순기능 유전자들은 그 발현이 IMO stress에 의해 감소됨으로써 IMO stress에 의해 제 기능을 수행하지 못하는 것으로 발표된 바 있다. 중추신경세포의 survival에 관여하는 neurotrophin의 일종인 BDNF의 경우에는 IMO stress에 대한 반응이 서로 엇갈려 보고되고 있는데 대체로 감소한다고 발표되는 경우가 우세한 상황이다.⁸⁻¹⁰

Table 1. IMO stress-related genes of which functions were previously reported

Gene	Regulation/organ	Function	Reference
N-methyltransferase (PNMT)	\uparrow / spleen	catecholamine biosynthesis	³² Jelokova et al. (2002)
Brain derived neurotrophic factor (BDNF)	\uparrow / hypothalamus	neuron cell survivor	³³ Rage et al. (2002)
	\downarrow / hippocampus		
Tyrosine hydroxylase (TH)	\uparrow / adrenal	catecholamine biosynthesis	³⁴ Serova et al. (1998)
Dopamine β -hydroxylase (DBH)	\uparrow / adrenal	norepinephrine biosynthesis	
GTP cyclohydrolase I (Gch)	\uparrow / adrenal	epinephrine biosynthesis	³⁵ Schaaf et al. (1998)
Interleukine-1 (IL-1)	\downarrow / fibroblast, epithelium	wound healing	
Keratinocyte growth factor-1 (KGF-1)	\downarrow / fibroblast, epithelium		³⁶ Mercado et al. (2002)
Synaptophysin	\downarrow / hippocampus	synaptic plasticity	³⁷ Thome et al. (2001)
Synaptotagmin	\uparrow / hippocampus		
c-fos	\uparrow / stomach	immediate early gene	³⁸ Ueyama et al. (2001)
c-jun	\uparrow / stomach	immediate early gene	
NGF-A	\uparrow / stomach	immediate early gene	
Cyclooxygenase-2	\uparrow / stomach	synthesis of signalling molecules	
Heat shock protein (HSP) 70	\uparrow / stomach	cheperone	³⁹ Micutkova et al. (2003)
Inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor (IP(3)R)	\downarrow / stellate ganglia	calcium release from intracellular pool	
manganese superoxide dismutase (Mn-SOD)	\downarrow / liver		⁴⁰ Oishi and Machida (2002)
copper/zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD)	\downarrow / liver	antioxidant enzymes	
glutathione peroxidase (GPx)	\downarrow / liver		⁴¹ Yun et al. (2002)
catalase (CAT)	\downarrow / liver		
α B-crystallin	\uparrow / hippocampus	heat shock protein	

neural cell adhesion molecule (NCAM)	↓ / hippocampus	cell adhesion	¹²⁴ Venero et al. (2002)
Galectin-3	↓ / liver, spleen	cell - cell and cell - matrix interactions, cell proliferation, angiogenesis	³¹¹ Dumic et al. (2000)
Interleukine-6 (IL-6)	↑ / liver, spleen	inflammation, multi-functional cytokine	³⁰¹ Kitamura et al. (1997)
Prolactin (PRL)	↑ / adenohypophysis	immunomodulation, (pituitary hormone)	⁴⁰¹ Klenerova et al. (2001)
Osteocalcin (OC)	↓ / plasma	bone formation	⁴³¹ Patterson-Buckendahl et al. (2001)

본 연구에서는 IMO stress에 의해 그 발현이 변화되는 유전자들을 종합적으로 분석하기 위해 6천여 개의 mouse 주요 유전자가 집적되어 있는 cDNA microarray chip을 사용하여 반복 IMO stress를 가한 실험군과 정상 실험군의 hypothalamus에서 뽑은 RNA를 이용하여 각각 Cy3 (red fluorescence dye, IMO군)와 Cy5 (green fluorescence dye, 정상군)으로 표지한 후, chip에 반응(hybridize)시킴으로써 그 발현이 증가한 (up-regulation) 유전자와 감소한 (down-regulation) 유전자를 찾아내었다.

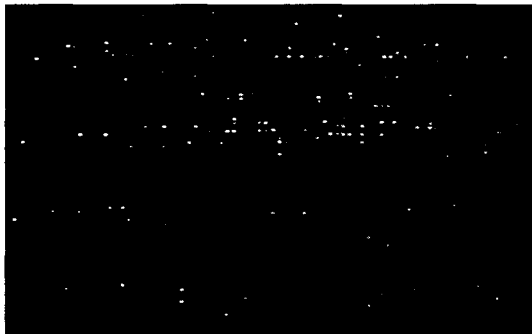


Fig. 4. mRNA Expression profile of hypothalamus of IMO-stressed rat brain. (Red spot means the gene of which mRNA expression is stimulated by IMO stress; yellow spot means the genes of which mRNA expression is not affected by IMO stress; green spot means the gene of which mRNA expression is repressed by IMO stress)

Fig. 4 ㉠에서 보는 바와 같이 빨간색을 띠는 spot은 정상적으로는 발현되지 않거나 그 발현이 미약한 유전자가 IMO stress에 의해 그 발현이 크게 증가되는 패턴을 의미하며 녹색 spot (Fig. 4 ㉡)은 반대의 경우로 정상적으로는 발현이 상당히 되어 있으나 IMO stress에 의해 그 발현이 억제되는 유전자를 의미한다. 노란색 spot (Fig. 4 ㉢)의 경우에는 정상군과 IMO stress군 모두에서 발현이 비슷한 정도로 이루어지는 것을 의미하는데 모든 경우에 있어 spot 색깔의 강도는 해당 유전자 발현의 양을 나타낸다.

실험결과 약 6천여 개의 유전자 가운데 총 109개의 유전자가 유의성 있게 그 발현이 변화된 것으로 나타났으며 그 기준은 발현이 증가한 경우 정상군의 발현에 비해 50%이상 (1.5배 증가) 증가된 spot들을, 감소한 경우 정상군의 발현량에 대해 75% (1.5배 감소) 이하로 감소된 spot들을 선택하였다 (Fig. 5).

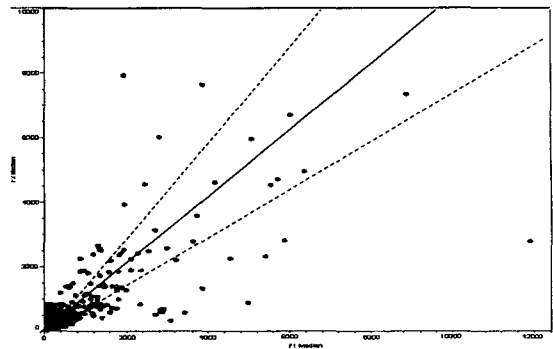


Fig. 5. Scatter plot representation of the gene expression in control vs. IMO-stressed experimental group. X- and Y-axis indicate the adjusted densities of IMO-stressed group (Cy3) and the control group (Cy5), respectively.

분석 결과 총 58개의 유전자가 1.5배에서부터 7.9배에 이르기까지 그 발현이 증가하였으며 51개의 유전자가 1.5배에서 3.5배까지 감소된 것으로 나타났다 (Table 2). 유전자들의 기능을 살펴보면 대체로 energy metabolism-, lipid metabolism-, apoptosis- 그리고 signal transduction에 관련된 유전자들의 mRNA 발현이 증가되었고 반면에 DNA repair-, protein biosynthesis-, 그리고 structure integrity에 관련된 유전자들의 mRNA 발현이 감소된 것으로 나타났다. IMO Stress와 관련하여 발현량이 증가된 유전자들 중에는 apoptosis와 관련된 Dffa, Aatk, Traf4, Tnfrsf1a, Bag3 등이 있으며 결국 IMO stress에 의해 apoptosis를 유발시키는 인자들의 발현이 증가한 것으로 여겨진다. Energy 및 지방 대사와 관련해서는 Atp9A, Atp2a2, Atp5o, ApoE, Snx2, Sreb1, Vcp, Mbtps1, Mtp 등의 발현이 증가했으며 이는 stress response의 하나로 stress상황을 벗어나기 위해 축적된 영양분으로부터 에너지를 생산, 비축하는 생체 방어 현상으로 풀이된다. 이외에 세포신호전달(signal transduction) 기능의 유전자인 Prkar1a, Akap12, Fbxw7, Sh3bp2, G3bp2-pen, Ppp2r1a, Ppp2r5c, Ccnd2, Drg1, Mark3, Csnk1a1 등의 발현이 증가했으며 각종 stress에 대한 방어기능을 수행하는 것으로 알려진 stress protein류로서 Hspa9, CryaB, Fkbp5, Tapbp, Hspe1 등이 증가되었고 그 밖에 각종 유전자 발현을 조절하는 transcriptional factor류로서 Tcf4, Tbp, Preb 유전자의 발현이 현저히 증가되었다.

Table 2. IMO Stress-related changes in gene expression in hypothalamus (shaded area indicates the genes which decreased in mRNA expression)

ORF	Fold	Gene	Function
A1414898	7.9 ↑	Scamp2	secretory carrier membrane protein 2
A1845324	4.0 ↑	Prkar1a	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha
A1451115	3.7 ↑	Tcof1	Treacher Collins Franceschetti syndrome 1, homolog
A1747086	3.6 ↑	Rps26	ribosomal protein S26
A1842597	3.2 ↑	Tcf4	transcription factor 4(development, DNA binding)
A1450766	3.2 ↑	Solt	SoxLZ/Sox6 leucine zipper binding protein in testis
A1480711	2.7 ↑	Atp9a	ATPase, class II, type 9A (metabolism)
A1413515	2.6 ↑	Tapbp	TAP binding protein (defense response)
A1505029	2.5 ↑	Capn10	calpain 10 (diabetes development)

AI854716	2.5 ↑	Atp2a2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 (metabolism)
AI836130	2.5 ↑	Akap12	A kinase (PKKA) anchor protein (gravin) 12 (signal transduction)
AI464573	2.4 ↑	Atp5o	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex
AI839583	2.3 ↑	Dffa	DNA fragmentation factor, alpha subunit (apoptosis regulator)
AI837050	2.3 ↑	Aatk	apoptosis-associated tyrosine kinase (apoptosis)
AI841577	2.2 ↑	Hspa9	heat shock protein, 74 kDa, A (ATP binding)
AI841591	2.2 ↑	Minpp1	multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase 1
AI836381	2.2 ↑	Act1	actin-like (beta-actin)
AI848248	2.1 ↑	ApoE	apolipoprotein E (lipid transport)
AI462808	2.0 ↑	Ccnd2	cyclin D2 (cyclin-dependent protein kinase, cell cycle)
AI465521	2.0 ↑	Snx1	sorting nexin 12 (transport)
AI850738	2.0 ↑	Fbxw7	F-box and WD-40 domain protein 7, archipelago homolog (N receptor signaling)
AI836396	2.0 ↑	Ptprn	protein tyrosine phosphatase (protein amino acid dephosphorylation)
AW413483	2.0 ↑	Sh3bp2	SH3-domain binding protein 2 (intracellular signaling cascade)
AI666563	2.0 ↑	Sf3b1	splicing factor 3b, subunit 1, 155 kDa (mRNA splicing)
AI482261	2.0 ↑	Sreb1	sterol regulatory element binding factor 1 (lipid metabolism, DNA binding)
AI643694	2.0 ↑	Cyr61	cysteine rich protein 61 (regulation of cell growth)
AI838216	2.0 ↑	Mbtps1	membrane-bound transcription factor protease (lipid metabolism)
AI841815	2.0 ↑	Cps2	cleavage and polyadenylation specific factor 2 (mRNA processing)
AW413990	2.0 ↑	Fkbp5	FK506 binding protein 5 (51kDa) (protein folding)
AI840277	1.9 ↑	Vcp	valosin containing protein (ATP binding)
AI503608	1.8 ↑	Igf1	insulin-like growth factor 1 (growth factor)
AI132520	1.8 ↑	Drg1	developmentally regulated GTP binding protein 1
AI849859	1.8 ↑	Fhl1	four and a half LIM domains 1 (development)
AW214553	1.8 ↑	Akt1	thymoma viral proto-oncogene 1 (regulation of cell cycle)
AI848067	1.8 ↑	Cryab	crystallin, alpha B
AI840074	1.8 ↑	G3bp2-pen	Ras-GTPase-activating protein (transport)
AI503761	1.7 ↑	Traf4	Tnf receptor associated factor 4
AW211960	1.7 ↑	Tnfrsf1a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a (apoptosis)
AI325498	1.7 ↑	Csnk1a1	casein kinase 1, alpha 1
AI854196	1.7 ↑	Bdnf	brain derived neurotrophic factor (growth factor)
AI850379	1.7 ↑	Mark3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3
AI132336	1.7 ↑	Bag3	Bcl2-associated athanogene 3 (apoptosis)
AI846646	1.7 ↑	Extl2	extotoses (multiple)-like 2 (transferase)
AI256517	1.6 ↑	Mttp	microsomal triglyceride transfer protein (lipid binding transporter)
AW321876	1.5 ↑	Pola1	polymerase (DNA directed), alpha 1
AI850723	1.5 ↑	Calm2	calmodulin 2 (calcium ion binding, cell cycle)
AI324671	1.5 ↑	Rpl30	ribosomal protein L30
AW212337	1.5 ↑	Hs6st1	heparin sulfate 6-O-sulfotransferase 1
AI327085	1.5 ↑	Hspe1	heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10, protein folding)
AI504369	1.5 ↑	Calm3	calmodulin 2 (calcium ion binding, cell cycle)
AI528687	1.5 ↑	Itgb1	integrin beta 1 (cell adhesion receptor)
AI850037	1.5 ↑	Ppp2r5c	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), gamma (signal transduction)
AI327297	1.5 ↑	Tbp	TATA box binding protein (transcriptional regulation)

AI596985	1.5 ↑	Preb	prolactin regulatory element binding (transcription regulator, DNA-binding)
AW322613	1.5 ↑	Cd164	CD164 antigen (cell adhesion molecule)
AI646240	1.5 ↑	Mlns1	Melastatin 1 (putative tumor suppressor)
AI851705	1.5 ↑	Ppp2r1a	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A
AI385718	1.5 ↑	Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (immune response)
AI482525	5.5 ↓	Chaf1a	chromatin assembly factor 1, subunit (DNA repair, chaperone)
AI604830	4.5 ↓	Gpr56	G protein-coupled receptor 56
AI506208	4.0 ↓	S100a10	S100 calcium binding protein A10 (calpactin, Ca ²⁺ binding)
AI482475	3.5 ↓	Lst1	leukocyte specific transcript 1
AI854799	3.0 ↓	Rplp1	ribosomal protein, large, P1
AI482502	3.0 ↓	G0s2	G0/G1 switch gene 2 (cell cycle)
AI854799	3.0 ↓	Rplp1	ribosomal protein, large, P1 (translational elongation)
AI324768	3.0 ↓	Krt11-16	keratin complex 1, acidic, gene 16 (cytoskeleton organization and biogenesis)
AI504950	2.7 ↓	Abcc3	ATP-binding cassette, sub-family C (ATP-binding cassette (ABC) transporter)
AI325486	2.4 ↓	Epb4.9	erythrocyte protein band 4.9
AI846627	2.4 ↓	Adam8	a disintegrin and metalloprotease domain 8 (integrin-mediated signaling pathway)
AI848283	2.3 ↓	Pphn	pantophysin
AW227563	2.2 ↓	Parn	poly(A)-specific ribonuclease (deadenylation nuclease)
AI843531	2.2 ↓	Crcp	calcitonin gene-related peptide-receptor component protein
AI848940	2.2 ↓	Hspa8	heat shock 70kD protein 8
AI845872	2.1 ↓	Stk19	serine/threonine kinase 19
AI503646	2.0 ↓	Rpl10	ribosomal protein 10
AI846864	2.0 ↓	Laptm4a	lysosomal-associated protein transmembrane 4A (transporter)
AI505105	2.0 ↓	Ogg1	8-oxoguanine DNA-glycosylase 1 (DNA repair)
AI835204	2.0 ↓	Mprs17	mitochondrial ribosomal protein S17 (protein biosynthesis)
AI846884	2.0 ↓	Timm8b	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog b (yeast)
AI848981	2.0 ↓	Sbx8	syntaxin 8
AI325940	2.0 ↓	Vbp1	von Hippel-Lindau binding protein 1
AI480832	1.9 ↓	Gains	galactosamine (N-acetyl)-6-sulfate sulfatase
AI607343	1.9 ↓	Sntb1	syntrophin, basic 1
AI173264	1.9 ↓	Rps28	ribosomal protein S28 (protein biosynthesis)
AI849738	1.9 ↓	Jph3	junctophilin 3
AI835204	1.9 ↓	Mprs17	mitochondrial ribosomal protein S17 (protein biosynthesis)
AI324227	1.8 ↓	Ywhag	3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide
AI853721	1.8 ↓	Wlap	Wilms' tumour 1-associating protein
AI847271	1.8 ↓	Ntan1	N-terminal Asn amidase (memory, locomotory behavior)
AI842939	1.8 ↓	Tph	tryptophan hydroxylase (aromatic amino acid metabolism)
AI849117	1.8 ↓	Rpl10	ribosomal protein L10A (protein biosynthesis)
AI843948	1.8 ↓	Psma3	proteasome (prosome, macropain) subunit (ubiquitin-dependent protein catabolism)
AI841584	1.8 ↓	Ube2e3	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3 (ubiquitin cycle)
AW412515	1.7 ↓	Rpl3	ribosomal protein L35a (protein biosynthesis)
AI661702	1.7 ↓	Ddx20	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 20 (mRNA processing)
AI842057	1.7 ↓	Bcap29	B-cell receptor-associated protein 29

AI844807	1.7 ↓	Mrpl27	mitochondrial ribosomal protein L27 (protein biosynthesis)
AI839962	1.7 ↓	Mor2	malate dehydrogenase, soluble (tricarboxylic acid cycle)
AI462730	1.6 ↓	Eed	embryonic ectoderm development
AI324691	1.6 ↓	Rps3	ribosomal protein S3 (protein biosynthesis)
AI849826	1.6 ↓	Six6	sine oculis-related homeobox 6 homolog (Drosophila) (regulation of transcription)
AI847083	1.6 ↓	Ppp1cb	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform
AI467605	1.5 ↓	Ddt	D-dopachrome tautomerase (melanin biosynthesis)
AI481879	1.5 ↓	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1
AI504287	1.5 ↓	Pigo	phosphatidylinositol glycan, class O
AI503059	1.5 ↓	Bop	CD8beta opposite strand (heart development, negative regulation of transcription)
AI847301	1.5 ↓	Rpl7a	ribosomal protein L7a (protein biosynthesis)
AI838492	1.5 ↓	Nov	nephroblastoma overexpressed gene (regulation of cell growth)
AI847860	1.5 ↓	Sphk2	sphingosine kinase 2 (protein kinase C activation)

한편, IMO stress에 의해 그 발현이 감소된 유전자로는 DNA repair 관련 유전자로 Chaf1a, Ogg1 등의 발현이 현저히 감소하였으며 protein biosynthesis 관련하여 Rplp1, Rpl10, Mprs17, Rps28, Mprs17, Tph, Rpl10, Rpl3, Rps3, Rpl7a 등의 발현이 고르게 감소되었고, 세포의 structure integrity에 관여하는 Krt1-16, Adam8, Jph3 유전자, 그리고 세포신호전달에 관여하는 효소인 Gpr56, Stk19, Sphk2 등의 발현이 감소된 것으로 나타났다. IMO stress에 따라 DNA 유전자의 외부 손상에 대한 방어 기작을 수행하는 기능으로 chromatin을 구성하는 histone-DNA binding에 관여하는 chromatin assembly factor 1 (Chaf1a)와 생체 내 활성산소 (Reactive Oxygen Species)의 공격에 의해 쉽게 변형된 8-oxoguanine base를 DNA strand에서 제거하는 효소인 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (Ogg1) 등의 발현수준이 약화됨으로써 스트레스에 의해 생체 유전자의 방어 체계는 손상되는 것으로 추정된다.

DNA chip을 이용하여 나타난 6천여 개 유전자의 발현수준 변화결과를 한번 더 검증하기 위해 다시 17개의 유전자를 선택하여 각각의 primer를 제작한 후, mRNA 발현 수준을 정확히 분석하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. cDNA microarray 분석 결과, IMO stress에 의해 뇌의 hypothalamus에서 그 발현이 증가되는 것으로 나타난 Tnfrsf1a, Calm2, Calm3, Bag3, Hspe1, Traf4, Hspa9, CryaB, Cd164, Bdnf, Fkbp5, Itgb1, Aatk, Dffa 등 14개의 유전자와 그 발현이 감소되는 것으로 나타난 유전자 중에 Vcam1와 Ogg1 그리고 Tricarboxylic acid (TCA) cycle 효소인 Mor2에 대한 RT-PCR 분석 결과 및 개개 유전자의 band intensity를 정량화하여 도식화한 결과는 Fig. 6. 에 제시되고 있다. 모든 정량화는 house keeping gene인 GAPDH의 band intensity에 대해 normalized된 수치로 표현되었다.

또한, Fig. 6. 에서 제시된 바와 같이 IMO stress에 의해 그 발현수준이 변화된 유전자에 대해 스트레스 치료효과가 있는 보심견비탕의 영향을 유전학적으로 분석하기 위해 치료군에 대해 동일 유전자에 대한 RT-PCR을 병행하였다. 비록 cDNA chip에

서의 증가비율과 정확히 일치하지는 않으나 Tnfrsf1a (apoptosis), Calm2 (cell cycle), Bag3 (apoptosis), CD164 (cell adhesion), Aatk (apoptosis), Dffa (apoptosis), Fkbp5 (protein folding), BDNF (neuron survival)의 유전자들이 IMO stress에 의해 그 발현이 증가되는 것으로 검증되었으며 Ogg1(DNA repair)과 Vcam1(cell adhesion) 유전자가 그 발현이 감소되는 것으로 검증되었다. 다른 유전자의 경우에는 cDNA chip 결과와 유의성이 있게 일치하지는 않았다.

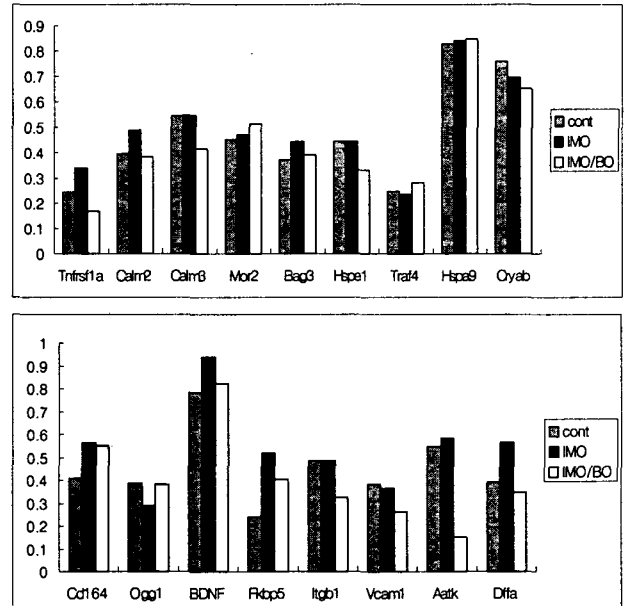


Fig. 6. RT-PCR analyses of IMO stress-related genes. Each PCR product was normalized to GAPDH. The total RNAs prepared from the one experimental group were mixed and then sampled for cDNA synthesis. (Cont: control group; IMO: IMO-stressed group; IMO/B: Boshingjeonbi-Tang-treated group)

한편 보심견비탕 치료군의 hypothalamus RNA에 대한 RT-PCR결과에서는 Tnfrsf1a (apoptosis), Calm2 (cell cycle), Bag3 (apoptosis), Aatk (apoptosis), Dffa (apoptosis), Fkbp5 (protein folding), BDNF (neuron survival) 유전자에서 IMO stress로 증가되었던 유전자 발현이 정상수준 혹은 그 이상으로 회복되는 결과를 보여주었으며 IMO stress로 발현수준이 감소되었던 유전자 중에서는 Ogg1(DNA repair) 유전자만이 약물 치료군에서 정상수준으로 회복되는 결과를 보였다 (Fig. 6).

고 찰

본 연구는 우울증의 동물모델로 널리 사용되고 있는, 반복 IMO stress를 가한 mouse를 사용하여 스트레스와 관련된 정신병리학적 증상이 유발될 경우의 두뇌 유전자 발현 양상을 종합적으로 분석하고 대표적 유전자 발현에 대한 한약재인 보심견비탕의 치료효과를 유전학적으로 검증해 보고자 하는 내용이다. 구속 스트레스는 정신병리학적 연구를 위한 동물모델 제작에 가장 널리 사용되는 스트레스 유발 방법으로서 뇌의 hippocampus, prefrontal cortex, cingulate cortex, raphe nuclei, amygdala 등의 신경 해부학적 부위가 이같은 구속 스트레스 반응에 관여하는

것으로 알려져 있고²²⁻²⁵⁾ Fig. 1. 에서 보는 바와 같이 HPA 축의 호르몬 작용에 의해 스트레스 신호가 시상하부로 전달되어 최종적인 스트레스 반응이 나타나게 된다.

한편, 세포성장, 세포증식, 분화, 세포생존 등의 세포활성을 조절하는 세포신호전달 매체의 하나인 mitogen-activated protein kinase (MAPK)가 두뇌의 synaptic plasticity와 remodeling 작용과 관련하여 중풍 등의 급성 자극에 의해서도 작용하는 것으로 알려져 있는데 다양한 형태의 외부 스트레스 자극에 의해서도 중추신경세포(특히, 두뇌) 내의 MAPK류에 속하는 Erk1/2, JNK/SAPK, p38 MAPK 등이 phosphorylation 되는 것으로 최근 보고 된 바 있다.^{26,27)} 한편, 급성 스트레스와 만성 스트레스의 경우, 동반되는 생리적, 생화학적, 또는 유전학적인 많은 변화들이 서로 상이하게 나타나게 되는데 본 연구에서는 만성 스트레스에 쯤든 근접된 스트레스 유형을 갖는 반복적 구속 스트레스를 적용하였다.

본 실험결과에서도 유의성 있게 발현양이 증가된 58개의 유전자들 가운데 Prkar1a, Akap12, Fbxw7, Sh3bp2, G3bp2-pen, Ppp2r1a, Ppp2r5c, Ccnd2, Drg1, Mark3, Csnk1a1 등의 유전자들이 세포신호전달(signal transduction) 기능의 세포신호전달 매개체인 것으로 확인되었으며 특히, MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3인 Mark3는 MAPK의 activation에 필수적인 매체로 알려져 있다. 이외에 다수의 세포신호전달 관련 kinase들의 발현이 현저히 증가된 것으로 밝혀졌다.

한편 스트레스와 관련하여 뇌의 인지 및 기억작용과 밀접히 연관되어 있는 hippocampus 부위의 신경세포가 심각하게 손상된다는 사실은 잘 알려져 있으며 신경 세포의 손상이 programmed cell death현상인 apoptosis에 의해 발생한다는 결과도 최근에 보고된 바 있다.^{20,28,29)} 실험 결과 스트레스 신호를 인지하는 hypothalamus의 경우에도 apoptosis와 관련된 유전자들의 발현이 크게 증가된 것으로 나타났으며 Dffa, Aatk, Traf4, Tnfrsf1a, Bag3 등의 apoptosis 관련 유전자들이 발굴되었다. 결국 IMO stress에 의해 apoptosis를 유발시키는 pro-apoptotic 인자들의 발현이 증가한 것으로 과도한 스트레스에 의해 두뇌의 hypothalamus 신경세포들이 손상될 수 있음이 증명되었다.

본 실험에 사용된 보십견비탕은 약 19종의 한약재로 구성된 복합 처방으로 성분 함량을 기준으로 볼 때, 주요 약재는 향부자, 산조인, 산사육, 진피 등을 꼽을 수 있는데 인체 기의 순환을 조절하고 울결을 풀어줌으로써 통증을 완화시키고 월경을 조절하며 자궁 수축을 완화해주는 약리작용을 갖는 향부자와 신경안정, 최면, 진통, 항경련, 혈압강하 등의 작용을 유도하는 산조인의 두 성분이 본 약재의 항스트레스 작용과 밀접하게 관련되는 것으로 추정된다.

향부자는 방동사니과 식물인 *Cyperus rotundus* L.의 건조된 뿌리줄기로서 중량 대비 약1%의 essential oil을 함유하는데 이 성분들이 여성자궁수축 완화, 진통, 항균 작용 등의 약리작용을 주로 나타내며 α -, β -cyperene (30-40%)과 α -, β -cyperol (40-49%) 그리고 cyperone (0.3%) 등이 주성분이며 이 외에 Kobusone, Copadiene, Epoxyquaine, Rotundone 등의 미량 oil류 들로 이루어

어져 있다.^{30,31)} 산조인은 갈매나무과 식물인 산조 (*Ziziphus jujuba* Mill)의 건조된 종자로서 동양권에서는 예로부터 인체의 기(氣)가 약해지거나 화(火)가 과할 경우 발생한다고 알려진 불면증, 경련, 광기, 정신착란 등의 질환에 대한 민간 치료에 사용되어 왔으며 마음을 다스리고 욕심과 분노를 삭혀주는 등의 정신적 균형을 조화롭게 유지시켜주는데 탁월한 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 주요 성분은 betulin, betulinic acid, glycoside jujuboside A, B 그리고 일부 vitamin류 와 유기산류, 그리고 sanjoinine라고 불리는 14종의 peptide alkaloid류가 최근에 분리되어 보고 된 바 있다. 한편, 이 식물의 진정작용은 종자와 과실에서 분리된 alkaloid류 에 의한 것으로 알려져 있다.^{30,31)} 본 처방의 단일 구성 성분들의 항스트레스 효과에 대해서는 이미 보고된 단일 성분들을 중심으로 연구가 진행 중에 있다.

2002년에 발표된 미국 NIH의 Galon 그룹의 연구에 의하면, 인간의 peripheral blood mononuclear cell을 대상으로 in vitro 에서 stress 호르몬인 glucocorticoid를 가한 후, microarray 분석 결과 chemokine, cytokine, complement family member 들을 비롯한 innate immune/inflammation 관련 유전자들이 대체로 up-regulation 된 반면 adaptive immune/cell adhesion 관련 유전자들이 감소된다는 연구결과를 발표한 바 있다.¹⁶⁾ 사용된 microarray 유전자 chip과 대상 세포조직이 다르기 때문에 정확히 비교되지는 않지만 stress에 의해 inflammation, apoptosis관련, 또는 세포 energy대사 관련 유전자들의 발현이 증가되는 반면, 세포 구조유지를 위한 단백질 합성 및 관련 유전자, 그리고 혈관신생(angiogenesis) 연관된 cell adhesion 유전자들의 발현이 억제된다는 공통된 패턴을 보였다.

본 실험을 통해 IMO stress가 반복적으로 생체에 가해졌을 때, 그 발현수준이 변화되는 유전자들이 분석되었으며 이는 잠재적으로 IMO stress에 대한 생체 작용기전을 규명하는데 유전학적 자료를 제공할 수 있고 또한 stress 예방 및 치료제 개발을 위한 유전자 수준의 drug target을 제공하며 더 나아가 본 실험을 통해 그 변화가 확인된 유전자들의 profile 분석을 이용하여 보십견비탕과 같은 한약 치료제제의 치료효과를 객관적으로 검증할 수 있는 functional DNA chip 및 분석 체계를 개발하는데 활용될 수 있으리라 사료된다.

결론

본 실험을 통해 우울증의 실험동물 모델로서 IMO stress를 가한 쥐의 hypothalamus 부위에서의 유전자 변화를 cDNA microarray를 이용하여 분석함으로써 스트레스 관련 주요 유전자들을 발굴하였으며 발굴된 주요 유전자들을 대상으로 스트레스 완화작용이 있다고 알려져 있는 한의학적 처방인 보십견비탕을 투여하였을 때의 치료효과를 transcription 수준에서의 유전자 발현량의 관점에서 증명하고자 하였다. 발굴된 유전자들을 활용하여 IMO stress 유발시의 스트레스 요인 감지, 전달 및 스트레스 반응에 대한 정확한 기전을 밝히지는 못했으나 스트레스에 의해 전반적인 세포 활성이 감소됨과 더불어 energy metabolism

관련, protein refolding 관련, pro-apoptotic 유발 및 세포신호전달 매체 유전자들의 발현이 급격히 증가됨을 관찰하였다. 보심견비탕을 투여하였을 때 몸무게 변화 분석을 통해 스트레스의 예방 및 완화 효과가 있음을 확인하였으며 선정된 유전자들을 대상으로 한 RT-PCR 분석을 통해서도 mRNA 발현량이 변화되었던 유전자들이 유의성 있게 회복됨을 관찰하였다. cDNA microarray를 이용하여 한의학적 치료방법에 대한 효과를 유전학적으로 증명했다는 본 실험 결과의 의미와 더불어 향후, 한의학적 치료에 대한 보조적 진단 및 치료효과 검증 방법으로 functional cDNA chip이 활용될 수 있음을 본 실험결과를 통해 제시하고자 한다.

참고문헌

- Selye H. A syndrom produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138: 32, 1936.
- Pacak K. and Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Rev.*, 22: 502-548, 2001.
- Rhoades R. and Pflanzner R., *Human physiology*, 3rd Ed., p345-349, Saunders Colledge Publishing, 1989.
- Reyes T.M., Walker J.R., DeCino C., Hogenesch J.B. and Sawchenko P.E. Categorically distinct acute stressors elicit dissimilar transcriptional profiles in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neurosci.*, 23:5607-5616, 2003.
- Vamvakopoulos N.C., Fukuhara K., Patchev V. and Chrousos G.P. Effect of single and repeated immobilization stress on the heat shock protein 70/90 system of the rat: glucocorticoid-independent, reversible of Hsp90 in the liver and spleen. *Neuroendocrinol.*, 57: 1057-1065, 1993.
- Senba E. and Ueyama T. Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci. Res.*, 29:183-207, 1997.
- Yun S.J., Hahm D.H. and Lee E.H. Immobilization stress induces the expression of alphaB-crystallin in rat hippocampus: implications of glial activation in stress-mediated hippocampal degeneration. *Neurosci. Lett.*, 324: 45-48, 2002.
- Smith M.A., Makino S., Kvetnansky R., and Post R.M. Stress and glucocorticoids affect the expression of the brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J. Neurosci.*, 15: 1768-1777, 1995.
- Rage F, Givalois L, Marmigere F, Tapia-Arancibia L, Arancibia S. Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats. *Neurosci.*, 112: 309-318, 2002.
- Schaaf MJ, de Jong J, de Kloet ER, and Vreugdenhil E. Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone. *Brain Res.*, 813: 112-120, 1998.
- Oishi K. and Machida K. Different effects of immobilization stress on the mRNA expression of antioxidant enzymes in rat peripheral organs. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 62: 115-121, 2002.
- Venero C., Tilling T., Hermans-Borgmeyer I., Schmidt R., Schachner M., and Sandi C. Chronic stress induces opposite changes in the mRNA expression of the cell adhesion molecules NCAM and L1. *Neurosci.*, 115: 1211-1219, 2002.
- Chamas F. and Sabban E.L. Role of the 5' untranslated region in the tissue-specific regulation of rat tryptophan hydroxylase gene expression by stress. *J. Neurochem.*, 82: 645-654, 2002.
- Mercado A.M., Quan N., Padgett D.A., Sheridan J.F., and Marucha P.T. Restraint stress alters the expression of interleukine-1 and keratinocyte growth factor at the wound site: an in situ hybridization. *J. Neuroimmunol.*, 129: 74-83, 2002.
- Sawchenko PE, Li HY, and Ericsson A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog. Brain Res.*, 122: 61-78, 2000.
- Galon J., Franchimont D., Hiroi N., Frey G., Boettner A., Eehart-Bornstein M., O'shea J.J., Chrousos G.P., and Bornstein S.R. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J.*, 16: 61-71, 2002.
- 보심견비탕의 항스트레스 효과에 관한 실험적 연구. 신용철, 경희대학교 한의과대학 석사학위 논문, 1991.
- 보심견비탕 (補心健脾湯)과 정전가미이진탕 (正傳加味二陳湯)의 적출장기, 항궤양, 위액·gastrin분비, 장관수송능 및 진통·진경작용에 대한 비교 연구. 한방내과학회지, 21: 87-99, 2000.
- 경희한방처방집-경희대학교 한의과대학 부속 한방병원
- Wang J, Charboneau R, Barke RA, Loh HH, Roy S. Mu-opioid reveptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.*, 169: 3630-3636, 2002.
- Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br. J. Exp. Pathol.*, 17: 234-248, 1975.
- Figueiredo HF, Doglas CM, and Herman JP. Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus. *Endocrinol.*, 143: 2534-2540, 2002.
- Gruen RJ, Wenberg K, Elahi R, and Friedhoff AJ.

- Alterations in GABAA receptor binding in the prefrontal cortex following exposure to chronic stress. *Brain Res.*, 684: 112-114, 1995.
24. Haddjeri N, Blier P, and De Montigny C. Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT1A receptors. *J. Neurosci.*, 18: 10150-10156, 1998.
 25. Lombardo KA, Herringa RJ, Balachandran JS, Hsu DT, Bakshi VP, Roseboom PH, and Kalin NH. Effects of acute and repeated restraint stress on corticotropin-releasing hormone binding protein mRNA in rat amygdala and dorsal hippocampus. *Neurosci. Lett.*, 302: 81-84, 2001.
 26. Bilang-Bleuel A, Rech J, De Carli S, Holboer F, and Reul JM. Forced swimming evokes a biphasic response in CREB phosphorylation in extrahypothalamic limbic and neocortical brain structures in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 15: 1048-1060, 2002.
 27. Meller E, Shen CS, Nikolao TA, Jensen C, Tsimberg Y, Chen J, and Guren RJ. *Brain Res.*, 979: 57-64, 2003.
 28. Yun SJ, Lee DJ, Kim MO, Jung B, Kim SO, Sohn NW, and Lee EH. Reduction but not cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase during stress-mediated cell death in the rat hippocampus. *Neuroreport*, 14: 935-939, 2003.
 29. Xu H, Qing H, Lu W, Keegan D, Richardson JS, Chlan-Fourney J, and Li XM. Quetiapine attenuates the immobilization stress-induced decrease of brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. *Neurosci Lett.*, 321: 65-68, 2002.
 30. Kee Chang Huang, *The Pharmacology of Chinese Herbs*. p131, p251. CRC Press, 1993.
 31. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순, *중의학대사전*, p2088, p4751. 도서출판 정담, 1997.
 32. Jelokova J, Rusnak M, Kubovcakova L, Buckendahl P, Krizanova O, Sabban EL, and Kvetnansky R. Stress increases gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in spleen of rats via pituitary-adrenocortical mechanism. *Psychoneuroendocrinol.*, 27: 619-633, 2002.
 33. Barbany G, and Persson H, Regulation of Neurotrophin mRNA Expression in the Rat Brain by Glucocorticoids. *Eur. J. Neurosci.*, 4: 396-403, 1992.
 34. Serova L, Sabban EL, Zangen A, Overstreet DH, and Yadid G. Altered gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and stress response in rat genetic model of depression. *Brain. Res. Mol. Brain Res.*, 63: 133-138, 1998.
 35. Thome J., Pesold B., Baader M., Hu M., Gewirtz J.C., Duman R.S. and Henn F.A. Stress differentially regulates synaptophysin and synaptotagmin expression in hippocampus. *Biol. Psychiatry*, 50: 809-812, 2001.
 36. Micutkova L, Kvetnansky R, and Krizanova O. Repeated immobilization stress reduces the gene expression of the type 1 and 2 IP3 receptors in stellate ganglia. *Neurochem. Int.*, 43: 557-561, 2003.
 37. Dumic J, Barisic K, Flogel M, Lauc G. Galectin-3 decreases in mice exposed to immobilization stress. *Stress*, 3:241-246, 2000.
 38. Kitamura H, Konno A, Morimatsu M, Jung BD, Kimura K, Saito Immobilization stress increases hepatic IL-6 expression in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238:707-711, 1997.
 39. Patterson-Buckendahl P, Rusnak M, Fukuhara K, and Kvetnansky R. Repeated immobilization stress reduces rat vertebral bone growth and osteocalcin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 280: R79-R86, 2001.
 40. Klenerova V, Sida P, Hynie S, Jurcovicova J. Rat strain differences in responses of plasma prolactin and PRL mRNA expression after acute amphetamine treatment or restraint stress. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 21: 91-100, 2001.