

원 저

배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 蘇合香元이 유전자 표현에 미치는 영향

백진원, 이영효, 김완식, 정승현, 신길조, 이원철
동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of *Sohaphyang-won* on the Gene Expression in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells

Jin-Won Paik, Yeung-Hyo Lee, Wan-Sik Kim, Sung-Hyun Jeong, Gil-Cho Shin, Won-Chul Lee

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : The purpose of this investigation was to evaluate the effects of *Sohaphyang-won* (SH) on the alteration in gene expression in a hypoxia model using cultured rat cortical cells.

Methods : E18 rat cortical cells were grown in neurobasal medium containing B27 supplement. On 12 DIV, SH was added (20 μ g/ml) to the culture media for 24 hrs. On 14 DIV, cells were given a hypoxic insult (2% O₂/5% CO₂, 37°C, 3 hrs), returned to normoxia and cultured for another 24 hrs. Total RNA was prepared from SH-untreated (control) and -treated cultures and alteration in gene expression was analyzed by microarray using rat 5K-TwinChips.

Results : Effects on some of the genes whose functions are implicated in neural viability are as follows:

- 1) For most of the genes altered in expression, the global M values were between -0.5 to +0.5. Among these, 1517 genes were increased in their expression by more than global M +0.1, while 1480 genes were decreased by more than global M -0.1.
- 2) The expression of apoptosis-related genes such as Bad (global M = 0.35), tumor protein p53 (T53) (global M = 0.28) were increased, while v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (Akt1) was decreased.
- 3) The expression of hemoglobin alpha 1 (probably neuroglobin) was increased by about 3.2-fold (global M = 1.7).
- 4) The expression of antioxidation-related catalase gene was increased (global M = 0.26).
- 5) The expression of PKCzeta (prkcz), an upstream kinase of MAPK, was increased (global M = 0.29).
- 6) The expression of retinoic acid receptor alpha (RAR α), which may regulate transcription in hypoxic stress, was increased (global M = 10.27).

Conclusions : In summary, the microarray data suggest that SH doesn't increase the expression of oxygen capture-, anti-oxidation- and 'response to stress'-related genes but decreases some anti-apoptosis genes which would help protect the hypoxic cells from apoptosis.

Key Words: *Sohaphyang-won*, gene expression, microarray, apoptosis, hypoxia

서 론

· 접수 : 2004년 4월 10일 · 논문심사 : 2004년 4월 13일
· 채택 : 2004년 4월 24일
· 교신저자 : 백진원, 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2 동국대
학교 분당 한방병원 6층 의국
(Tel : 031-710-3734(3753) Fax : 031-710-3780 E-mail
: tetris37@hanmail.net)

저산소증이 유발되면 각종 세포는 허혈성 손상을 입게되는데, 특히 뇌는 수분간의 허혈상태 만으로도 중추신경계를 구성하고 있는 신경세포와 신경교세

포 등이 손상을 입어 뇌와 신경계에 심각한 질환이 유발될 수 있다⁴⁾.

신경세포사의 기전은 초기 신경세포사와 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)로 구분한다. 초기 신경세포사는 일반적 세포사망의 과정인 세포괴사를 의미하고 있고, 지연성 신경세포사는 허혈성 손상을 받은 주변(penumbra region)이나 특정부위에서 일정시간을 두고 세포가 손상, 사망에 이르는 과정을 말하는데, 지연성 신경세포사의 중요한 기전중 하나가 apoptosis이다^{5,6)}.

최근 유전체들의 기능과 구조를 밝히는 새로운 기술의 하나인 DNA microarray^{7,8)}는 수천개의 유전자 발현 양상(gene expression profile)을 동시에 분석하여 그 결과를 비교하는 방법으로, 최근 뇌와 신경계 같은 복잡한 조직의 유전자 발현 분석에 사용되고 있다⁹⁾.

中風급성기에 다용되는 蘇合香元¹⁰⁾은 <太平惠民和劑局方>¹¹⁾에 처음 수록된 處方으로 開竅, 溫裏祛寒, 理氣止痛하는 效能이 있다. 中風, 中氣, 人事不省, 心腹痛, 小兒驚蓄, 産後中風, 氣逆, 氣鬱 등에 사용된^{12,13)} 蘇合香元에 대한 실험적 연구로는 安¹⁴⁾의 鎮痛, 抗痙攣, 抗瀉下 효과, 南¹⁵⁾의 저산소성 뇌장해에 대한 보호작용 및 심근 수축력 억제효과, 李¹⁶⁾의 심근 허혈 상태 회복 효과, 崔¹⁷⁾의 Rat에 유발된 뇌경색 면적 감소 효과, 李¹⁸⁾의 세포사망 보호효과 및 Bcl-2의 표현 증가와 caspase 표현 감소효과, 金¹⁹⁾의 세포사 방지효과 등이 있었다.

그러나 지금까지 蘇合香元이 저산소증에서 신경세포의 전반적인 유전자 표현의 변화에 미치는 영향에 대해서는 연구된 바가 없었다.

이에 본 연구에서는 microarray 기법을 적용하여 저산소증으로 apoptosis를 유발한 흰쥐의 대뇌신경세포에서 유전자 표현을 조사한 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 蘇合香元은 方藥合編²⁰⁾에 준하여 동국대학교 한의과대학 부속 경주한방병원에서 조제된 것으로 處方 구성과 함량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1.The Amount and Composition of Sohaphyang-won

Species	Part used	Latin name	Weight (mg/pill)
<i>Aucklandia lappa</i> Decne.	Root	<i>Helinii Radix</i> (唐木香)	7.5
<i>Atractylodes macrocephala</i> KOIDZ	Root	<i>Rhizoma Atractylis</i> (白朮)	7.5
<i>Aquilaria sinensis</i> GILG	Resin	<i>Aquillariae Lignum</i> (沈香)	7.5
<i>Styrax benzoin</i> DRYAND	Resin	<i>Benzoinum</i> (安息香)	7.5
<i>Eugenia caryophyllata</i> THUNB	Fruit	<i>Caryophylli Flos</i> (丁香)	7.5
<i>Bubalus bubalis</i> L.	Cornu	<i>Bubalus Fructus</i> (水牛角)	7.5
<i>Terminalia chebula</i> RETZ.	Fruit	<i>Terminaliae Fructus</i> (訶子皮)	7.5
<i>Cyperus rotundus</i> L.	Root	<i>Cyperis Rhizoma</i> (香附子)	7.5
<i>Piper longum</i> L.	Fruit	<i>Piperis longi Fructus</i> (畢撥)	7.5
<i>Moschus moschiferus</i> L.	Resin	<i>Moschus</i> (麝香)	7.5
<i>Boswellia carterii</i> BIRDW.	Resin	<i>Olibanum</i> (乳香)	3.75
<i>Liquidambar orientalis</i> MILL	Resin	<i>Styrax Liquidus</i> (蘇合油)	3.75
<i>Dryobalanops aromatica</i> GAERTN. f.	Resin	<i>Borneolum</i> (龍腦)	3.75
<i>Apis mellifera</i> L.		<i>Mel</i> (蜂蜜)	86.25
Total amount			173.50

2) 蘇合香元 물추출액 제조

蘇合香元 3.54g을 50ml 증류수에 넣어 균질화하고 상온에서 4시간, 4°C에서 18시간 혼돈 후, 이를 15,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.45µm)한 후 소량씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 건조물의 양은 1ml 추출액 3튜브를 동결 건조한 후 평균치를 사용하였다.

2. 방법

1) 신경세포 배양

임신 18일(embryonic day 18 : E18)의 Sprague-Dawley계 흰쥐의 대뇌 피질신경세포를 Brewer 등의 방법²¹⁾에 따라 배양하였으며, 蘇合香元 물추출액은 배양 12일(12 day in vitro : DIV)에 처리하였다. 즉, 임신 18일의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5분

간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아의 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37°C에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1mM sodium pyruvate와 10mM HEPES(pH 7.4) N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane-sulfonic acid]가 첨가된 Hank's balanced salt solution 용액(Gibco, BRL, 이하 HBSS용액) 5ml로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1ml HBSS 용액으로 옮기고 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 이 후 분산된 세포를 모으고 세포수를 측정 한 다음 약 15,000 cells/mm² 되도록 B27을 첨가한 plating Neurobasal media(Gibco, BRL)(100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25ml glutamax I, 0.1ml 25mM glutamate, 0.1ml 25mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 5% CO₂ 배양조에서 배양한 다음 2~3일간격으로 배양액을 feeding Neurobasal media(100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25ml glutamax I)로 1/3씩 교환하였다.

2) 저산소증 모델

12 DIV에 蘇合香元 물추출액을 20µg/ml 농도로 첨가하고, 2일 더 배양한 후 CO₂ Water Jacketed Incubator(Forma Scientific Inc.)를 이용하여 2% O₂/5% CO₂ 37°C 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유발하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상 산소환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

3) 蘇合香元 물추출액의 처리

12 DIV에 蘇合香元 물추출액을 20µg/ml의 농도로 첨가하고 2일 더 배양한 후 CO₂ Water Jacketed Incubator(Forma Scientific Inc.)를 이용하여 2% O₂/5% CO₂, 37°C 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유발하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상 산소환경 배양조에 옮기고 24시간 더 배양하고 total RNA를 분리하였다.

4) RNA 추출

RNA 추출을 위한 배양은 60mm dish를 사용하였다. 저산소증 처리를 마치고 24시간 더 배양한 후에 배양액을 제거하고 5~10ml의 ice-cold PBS로 수세하였다. PBS를 제거하고 용액 [4M guanidinium

thiocyanate, 25mM sodium citrate-2H₂O, 0.5% (w/v) sodium lauryl sarcosinate, 0.1M β-mercaptoethanol, 이하 용액D] 1ml을 각 culture dish에 넣어 세포를 용해하였다. 용해된 lysate를 microfuge tube에 옮기고 tissue homogenizer로 15~30초간 균질화하였다. 여기에 용액D 1ml 당 0.1ml의 2M sodium acetate(pH 4.0), 1ml의 phenol(4°C), 0.2ml의 chloroform-isoamyl alcohol을 넣고 잘 섞어주었다. tube를 얼음에 15분간 넣어둔 후 원심분리(10,000 × g, 20분, 4°C)하여 상등액을 취하고 동일부피의 isopropanol을 넣고 잘 섞어주었다. 이를 -20°C에서 2시간 처리한 후 원심분리(10,000 × g, 30분, 4°C)하여 RNA를 침전시키고 용액D에 녹였다. 이를 isopropanol로 한번 더 침전시킨 후 75% alcohol로 2회 수세한 후 diethylpyrocarbonate(DEPC)를 처리한 물에 녹이고 -70°C에 보관하였다.

5) Microarray

Microarray는 Digital Genomics(서울)에 의뢰하여 분석하였다. 대조군은 蘇合香元 물추출액을 처리하지 않았으며, 실험군은 蘇合香元 물추출액을 처리하였고, 저산소증을 유발시킨 후 실험군과 대조군의 세포에서 분리한 20~50µg의 total RNA로부터 oligo(dT) primer와 역전사효소를 이용하여 first cDNA strand를 만들고, 대조군은 Cy3 형광물질(green)로, 실험군은 Cy5 형광물질(red)로 표지하였다. 두 probe를 1:1 혼합하여 TwinChip™ Rat-5K(Digital Genomics)을 hybridization(3 × SSC, 42°C, 16시간)하고 최종적으로

Table 2. Apoptosis-related Genes Whose Transcription are Altered by SH in Hypoxia.

Gene	global.M	A	Title
Bad	0.3450164	10.2	bcl-2 associated death agonist
Tp53	0.2777309	11.4	tumor protein p53
Bid3	0.003366956	10.6	BH3 interacting domain 3
Pdcd2	-0.022688	9.95	programmed cell death 2
Bcl2l1	-0.03440893	8.27	Bcl2-like 1
Ngfr	-0.06656747	11.3	nerve growth factor receptor
Hmox1	-0.1285296	11	Heme oxygenase
Akt1	-0.2251355	13.3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
P2rx1	-0.252782	9.61	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1
Cycs	-0.257612	13.9	cytochrome c, somatic

Table 3. Growth and Maintenance-related Genes which are Up-regulated by SH in Hypoxia. Only Those Genes with Global M Values above 0.1 are shown.

Gene.Symbol	global.M	A	Title
Hba1	1.704708	7.353	hemoglobin, alpha 1
Rpl29	0.5181034	10.27	ribosomal protein L29
Tsc2	0.5168151	8.971	Tuberous sclerosis 2, (renal carcinoma)
Rps8	0.435837	12.31	ribosomal protein S8
Agri	0.3728767	11.38	Agri
Tgfa	0.3462781	10.39	Transforming growth factor, alpha
Slc4a4	0.335429	14.9	solute carrier family 4, member 4
Myh6	0.3310239	10.83	myosin heavy chain, polypeptide 6
Atp2b2	0.2921423	9.584	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 2
Ppp1ca	0.2877478	15.08	Protein phosphatase type 1 alpha, catalytic subunit
Tp53	0.2777309	11.38	tumor protein p53
Cacna1a	0.2682802	12.15	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1A subunit
Cacnb3	0.2639868	12.23	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit
Vhl	0.2468863	11.91	von Hippel-Lindau syndrome homolog
Atp1a2	0.2114276	11.76	ATPase, Na ⁺ K ⁺ transporting, alpha 2
Hmgb1	0.204514	12.82	high mobility group box 1
Slc2a4	0.1913835	11.54	solute carrier family 2, member 4
Cdkn1b	0.1878145	10.6	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
H1f0	0.1858231	12.55	Histone H1-0
Plau	0.1847871	11.64	Urinary plasminogen activator, urokinase
Myh11	0.1626439	12.07	myosin heavy chain 11
Rps29	0.1607557	10.24	Ribosomal protein S29
Nras	0.1579516	11.22	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
Ccnd3	0.1493238	13.48	Cyclin D3
Pxmp3	0.1445168	12.24	peroxisomal membrane protein 3
Slc16a7	0.1302943	11.72	solute carrier family 16, member 7
Fth1	0.1260673	14.71	ferritin, heavy polypeptide 1
Rps7	0.1225266	14.42	ribosomal protein S7
Slc1a3	0.1166077	11.71	solute carrier family 1, member 3
Rpl29	0.1144245	11.22	ribosomal protein L29
Abcd3	0.1128049	11.98	ATP-binding cassette, subfamily D (ALD), member 3
Apc	0.1076679	12.89	Adenomatosis polyposis coli
Clcn2	0.1044217	12.16	chloride channel 2
Abcc8	0.1041742	13.04	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 8
Id2	0.1028993	14.69	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein

Table 4. Growth and Maintenance-related Genes which are Down-regulated by SH in Hypoxia. Only Those Genes with Global M Values below -0.1 are shown.

Gene.Symbol	global.M	A	Title
Hba1	1.704708	7.353	hemoglobin, alpha 1
Rpl29	0.5181034	10.27	ribosomal protein L29
Tsc2	0.5168151	8.971	Tuberous sclerosis 2, (renal carcinoma)
Rps8	0.435837	12.31	ribosomal protein S8
Agri	0.3728767	11.38	Agri
Tgfa	0.3462781	10.39	Transforming growth factor, alpha
Slc4a4	0.335429	14.9	solute carrier family 4, member 4
Myh6	0.3310239	10.83	myosin heavy chain, polypeptide 6
Atp2b2	0.2921423	9.584	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 2
Ppp1ca	0.2877478	15.08	Protein phosphatase type 1 alpha, catalytic subunit
Tp53	0.2777309	11.38	tumor protein p53
Cacna1a	0.2682802	12.15	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1A subunit
Cacnb3	0.2639868	12.23	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit
Vhl	0.2468863	11.91	von Hippel-Lindau syndrome homolog
Atp1a2	0.2114276	11.76	ATPase, Na ⁺ K ⁺ transporting, alpha 2
Hmgb1	0.204514	12.82	high mobility group box 1
Slc2a4	0.1913835	11.54	solute carrier family 2, member 4
Cdkn1b	0.1878145	10.6	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
H1f0	0.1858231	12.55	Histone H1-0
Plau	0.1847871	11.64	Urinary plasminogen activator, urokinase
Myh11	0.1626439	12.07	myosin heavy chain 11
Rps29	0.1607557	10.24	Ribosomal protein S29
Nras	0.1579516	11.22	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
Ccnd3	0.1493238	13.48	Cyclin D3
Pxmp3	0.1445168	12.24	peroxisomal membrane protein 3
Slc16a7	0.1302943	11.72	solute carrier family 16, member 7
Fth1	0.1260673	14.71	ferritin, heavy polypeptide 1
Rps7	0.1225266	14.42	ribosomal protein S7
Slc1a3	0.1166077	11.71	solute carrier family 1, member 3
Rpl29	0.1144245	11.22	ribosomal protein L29
Abcd3	0.1128049	11.98	ATP-binding cassette, subfamily D (ALD), member 3
Apc	0.1076679	12.89	Adenomatosis polyposis coli
Clcn2	0.1044217	12.16	chloride channel 2
Abcc8	0.1041742	13.04	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 8
Id2	0.1028993	14.69	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein

Table 5. Cell Cycle-related Genes which are Altered by SH in Hypoxia.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Ppp1ca	0.2877478	15.08	Protein phosphatase type 1 alpha, catalytic subunit
Cdkn1b	0.1878145	10.6	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
Ccnd3	0.1493238	13.48	Cyclin D3
Id2	0.1028993	14.69	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein
Ccng1	0.08714915	15.24	Cyclin G1
Rbl2	0.04503928	11.98	retinoblastoma-like 2
Cdc5l	0.00837961	12.27	cell division cycle 5-like (S. pombe)
Ddit3	-0.05118128	12.9	DNA-damage inducible transcript 3
Top2a	-0.06622271	11.47	topoisomerase (DNA) 2 alpha
Nfib	-0.06771095	11.3	nuclear factor I/B
Ccng1	-0.1101585	11.8	Cyclin G1
Top2a	-0.1654002	11.31	topoisomerase (DNA) 2 alpha
Cdk4	-0.230568	9.94	cyclin-dependent kinase 4
Pmp22	-0.2610943	13.67	peripheral myelin protein 22
Polb	-0.3577916	9.173	DNA polymerase beta

Table 6. 'Response to stress' -related Genes which are Altered by SH in Hypoxia.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Cat	0.2576357	10.6	Catalase
Il1b	0.2334965	13.6	Interleukin 1 beta
Cat	0.1689657	10.3	Catalase
Pap	0.1392624	12.3	pancreatitis-associated protein
Nfkb1	0.0505542	13.4	nuclear factor kappa B p105 subunit
Prkg1	0.03372643	12.4	protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit
C3	0.008861606	14.1	Complement component 3
Crp	-0.0261307	11.8	C-reactive protein
B2m	-0.0791612	12.7	Beta-2-microglobulin
Hmox1	-0.1285296	11	Heme oxygenase
Pla2g1b	-0.1553007	9.26	phospholipase A2, group 1B
F2	-0.1583128	10.9	coagulation factor 2
Epo	-0.1616988	10.4	Erythropoietin
Adm	-0.1917878	10.8	adrenomedullin
Fn1	-0.2722343	14.1	Fibronectin 1

0.1 × SSC로 상온에서 1분씩 4회 수세하였다.

III. 結果

1. microarray 결과

본 연구에서 신경세포는 저산소증 유발 후 첫날

Table 7. Signal Transduction-related Genes which are Up-regulated by SH in Hypoxia. Only Those Genes with Global M Values above 0.1 are shown..

Gene Symbol	global.M	A	Title
Tsc2	0.5168151	8.97	Tuberous sclerosis 2, (renal carcinoma)
Dgkb	0.310641	8.7	diacylglycerol kinase, beta
Prkcz	0.2948205	10.5	protein kinase C, zeta
Syk	0.2893452	12.3	Spleen tyrosine kinase
Limk1	0.253969	9.31	LIM motif-containing protein kinase 1
Adcyap1	0.2519564	11.9	adenylate cyclase activating polypeptide 1
Plcg1	0.2358082	10.9	Phospholipase C, gamma 1
Mapk1	0.2337837	9.29	mitogen activated protein kinase 1
Glp1r	0.2147193	8.97	glucagon-like peptide 1 receptor
Map2k1	0.188925	12.4	mitogen activated protein kinase kinase 1
Plau	0.1847871	11.6	Urinary plasminogen activator, urokinase
Stat3	0.1757649	9.79	signal transducer and activator of transcription 3
Stmn1	0.1587369	10.2	stathmin 1
Nras	0.1579516	11.2	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
Gal	0.1511897	11.8	galanin
Gucy2c	0.1437614	10.2	guanylate cyclase 2C
Bmp4	0.1142811	11.3	Bone morphogenetic protein 4
Prkcb1	0.1084844	12.5	protein kinase C, beta 1
Ephb2	0.09132505	12.8	Eph receptor B2
Lhcgr	0.0864949	8.95	Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor
Gnai3	0.07463664	12.2	Guanine nucleotide binding, protein, alpha inhibiting polypeptide 3
Stmn1	0.06375217	14.4	stathmin 1
Mbp	0.05647674	12.9	Myelin basic protein
Fgfr2	0.05623782	12.9	fibroblast growth factor receptor 2
Gucy1b3	0.03842887	12.4	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3
Adcy6	0.0374446	13	adenyllyl cyclase 6
Pome2	0.03480589	12	Proopiomelanocortin, beta (endorphin, beta)
Pak3	0.01918876	13.8	p21 (CDKN1A)-activated kinase 3

은 거의 영향을 받지 않다가 3일 후부터 급격히 사망하였다. 따라서 저산소증이 유발된 첫날 이후 많은 유전자의 표현이 달라질 것으로 예상되어, 본 연구에서는 배양 12일에 蘇合香元 물추출액 20µg/ml 을 처리하고 2일 후에 저산소증을 유발하였으며, 3일 후에 세포로부터 total RNA를 분리하였다. 이때 소량의 RNA를 분석하여 A260/A280의 값이 1.5 이상이고, 28S rRNA/18S rRNA의 값이 2.0 이상인 최소로 분해된 RNA만을 사용하였다. microarray 전문화

Table 8. Signal Transduction-related Genes which are Down-regulated by SH in Hypoxia. Only Those Genes with Global M Values below -0.1 are shown.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Agt	-0.0087	12.85	angiotensinogen
Nrgn	-0.0177	11.72	neurogranin
Hck	-0.0202	11.89	Hemopoietic cell tyrosine kinase
Rgs12	-0.0344	13.23	regulator of G-protein signaling 12
Ntrk2	-0.0427	11.58	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
Ptprd	-0.0456	11.15	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D
Pnoc	-0.0586	13.35	Prepronociceptin (neuropeptide nociceptin) (N23K)
Limk2	-0.0629	12.98	LIM motif-containing protein kinase 2
Anxa1	-0.0632	10.78	annexin 1
Ngfr	-0.0666	11.29	nerve growth factor receptor
Madh7	-0.0727	8.956	MAD homolog 7 (Drosophila)
Sag	-0.0789	14.02	S-antigen
Cxcl10	-0.079	14.61	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Mapk14	-0.0801	10.78	mitogen activated protein kinase 14
Mog	-0.0898	10.09	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
Gng7	-0.0905	13.4	guanine nucleotide binding protein, gamma 7
Mapk3	-0.1059	13.21	mitogen activated protein kinase 3
Pdgfra	-0.1163	9.869	Platelet-derived growth factor receptor alpha
Hmox1	-0.1285	10.99	Heme oxygenase
Dlgh1	-0.1556	11.52	discs, large homolog 1 (Drosophila)
Arrb2	-0.1577	12.57	Arrestin, beta 2
Rab4a	-0.1587	13.04	RAB4A, member RAS oncogene family
Pak1	-0.1953	12.9	p21 (CDKN1A)-activated kinase 1
Akt1	-0.2251	13.33	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
Ahr	-0.2291	9.242	Aryl hydrocarbon receptor
Gabrd	-0.2342	10.17	gamma-aminobutyric acid A receptor, delta
Ptpn11	-0.2384	12.73	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
Gfra1	-0.2561	9.725	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1
Pmp22	-0.2611	13.68	peripheral myelin protein 22
Raf1	-0.2613	11.69	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
Tac1	-0.2688	9.934	Tachykinin (substance P, neurokinin A, neuropeptide K, neuropeptide gamma)
Gprk5	-0.2772	10.76	G protein-coupled receptor kinase 5
Gprk2l	-0.3161	11.41	G protein-coupled receptor kinase 2, groucho gene related (Drosophila)
Ddr1	-0.3331	12.8	Discoidin domain receptor family, member 1
Ptpro	-0.374	10.94	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O
Adcy4	-0.4213	8.622	adenylyl cyclase 4
Itrp3	-0.4223	8.245	inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor 3
Pik4cb	-0.488	9.166	phosphatidylinositol 4-kinase

Table 9. Transcription-related Genes which are Up-regulated by SH in Hypoxia. Only Those Genes with Global M Values above 0.1 are shown.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Ets1	0.40507	10.2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)
Alrp	0.38363	10	ankyrin-like repeat protein
Zhx1	0.31794	12.3	zinc-fingers and homeoboxes 1
Dlx5	0.30301	11.4	Distal-less homeobox
Nfyb	0.29592	9.17	nuclear transcription factor - Y beta
Znf354a	0.28004	12.7	zinc finger protein 354A
Tp53	0.27773	11.4	tumor protein p53
Rara	0.26759	8.39	"Retinoic acid receptor, alpha
Shox2	0.24846	13.5	Short stature homeobox 2
Vhl	0.24689	11.9	von Hippel-Lindau syndrome homolog
Nr3c2	0.21182	12.6	"nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2"
Hmgb1	0.20451	12.8	high mobility group box 1
Stat3	0.17576	9.79	signal transducer and activator of transcription 3
Meox2	0.12315	13.5	mesenchyme homeo box 2
Pitx3	0.11835	11.7	paired-like homeodomain transcription factor 3
Tcfubf	0.10502	11.8	transcription factor UBF
Hes1	0.0934	13.8	hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)
Hoxa2	0.07601	9.56	Homeo box A2
Nsep1	0.07042	12.7	nuclease sensitive element binding protein 1
Rbl2	0.04504	12	retinoblastoma-like 2
Cart1	0.01448	12.1	Cartilage homeo protein 1
Cdc5l	0.00838	12.3	cell division cycle 5-like (S. pombe)

사인 Digital Genomics(서울)에 의뢰하여 TwinChip™ Rat-5K microarray chip을 분석한 chip의 형광사진을 촬영하였다. 이때 蘇合香元 물추출액을 처리하지 않은 대조군의 RNA는 Cy3 형광물질(green)로, 蘇合香元 물추출액을 처리한 실험군은 Cy5 형광물질(red)로 표지하였다. TwinChip의 upper array와 lower array의 형광image가 서로 매우 유사한 것을 보아 재현성이 높음을 알 수 있었다. MA plot에서 보면 $M = \log_2(R/G)$, $A = \{\log_2(R \times G)\}/2$ 대부분의 M 값이 -0.5에서 +0.5 사이로서 40% 정도의 증감을 나타내었다. 이 가운데 Global M 값이 +0.1 이상 즉 7% 이상 표현이 증가한 유전자는 1517 종, -0.1 이하 즉 7% 이상 표현이 감소한 유전자는 1480 종이었다.

Table 10. Transcription-related Genes which are Down-regulated by SH in Hypoxia. Only Those Genes with Global M Values below -0.1 are shown.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Nfyc	-0.00352	10.5	nuclear transcription factor-Y gamma
Adora2a	-0.01191	11.5	adenosine A2a receptor
Tcf1	-0.01446	11.4	transcription factor 1
Runx 1	-0.0154	11.1	Runt related transcription factor 1
Gata4	-0.01847	12.2	GATA-binding protein 4
Copeb	-0.02173	9.08	core promoter element binding protein
Pdcd2	-0.02269	9.95	programmed cell death 2
Irf1	-0.02878	12.7	Interferon regulatory factor 1
Ddit3	-0.05118	12.9	DNA-damage inducible transcript 3
Gata6	-0.05393	10.2	GATA-binding protein 6
Top2a	-0.06622	11.5	topoisomerase (DNA) 2 alpha
Nfib	-0.06771	11.3	nuclear factor I/B
Madh7	-0.07265	8.96	MAD homolog 7 (Drosophila)
Tgfb1i4	-0.07889	12.9	Transforming growth factor beta stimulated clone 22
Stat5b	-0.08539	11.6	signal transducer and activator of transcription 5B
Dbp	-0.11704	10.2	D site albumin promoter binding protein
Thra	-0.11831	11.8	thyroid hormone receptor alpha
Tcf2	-0.13249	11.3	transcription factor 2
Cebpb	-0.1366	11.7	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
Yy1	-0.14585	10.4	YY1 transcription factor
Cebpd	-0.1557	13	CCAAT/enhancerbinding, protein (C/EBP) delta
Top2a	-0.1654	11.3	topoisomerase (DNA) 2 alpha
Egr4	-0.17599	10.7	early growth response 4
Ttf1	-0.18071	13.8	Thyroid transcription factor 1 TTF-1 NK-2 (Drosophila) homolog A (thyroid nuclear factor)
Fos1	-0.22873	11.4	Fos-like antigen 1
Ahr	-0.2291	9.24	Aryl hydrocarbon receptor
Nr3c1	-0.2354	10.5	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
Egr1	-0.2426	12.8	early growth response 1
Otx1	-0.28277	9.72	Orthodenticle (Drosophila) homolog 1
Gata1	-0.29378	10.5	GATA-binding protein 1 (globin transcription factor 1)
Pou3f4	-0.33208	13.5	POU domain, class 3, transcription factor 4
Nr1h2	-0.3765	8.85	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2
Myf6	-0.54599	11.6	myogenic factor 6

2. Apoptosis 관련 유전자 표현의 변화

Apoptosis 관련 유전자는 저산소증에서 蘇合香元 물추출액에 의하여 표현이 변화되는 유전자는 10개

였다. 이 가운데 2개는 표현이 증가되었으며 8개는 감소되었다(Table. 2). 이 가운데 Bad 유전자가 가장 많이 증가되었다(Global M = 0.35). 반면 v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1(이하 Akt1), purinergic receptor P2X(이하 P2rx1), somatic cytochrome c(이하 Cycs)는 약간 감소되었다(Global M = -0.23 ~ -0.26).

3. 세포의 성장과 유지에 관련된 유전자 표현의 변화
세포의 성장과 유지에 관련된 유전자중 저산소증에서 蘇合香元 물추출액에 의하여 유전자의 표현변화는 35개의 성장과 유지에 관련된 유전자가 표현이 증가되었으며(Table. 3), -0.1 이하인 52개는 감소되었다(Table. 4). 이 가운데 특이한 것은 hemoglobin alpha 1의 증가이다. 이 유전자는 약 3.2배 증가되었다(Global M = 1.7).

4. 세포주기 관련 유전자 표현의 변화
세포주기 관련 유전자중 저산소증에서 蘇合香元 물추출액에 의하여 7개의 유전자는 표현이 증가되었으며 8개는 감소되었다(Table. 5). 그러나 유전자표현 변화정도가 미약하였다(Global M = 0.28 ~ -0.36).

5. 스트레스 반응 관련 유전자 표현의 변화
스트레스 반응 관련 유전자는 저산소증에서 蘇合香元 물추출액에 의하여 7개의 유전자는 표현이 증가되었으며 8개는 감소되었다(Table. 6). 이 가운데 가장 많이 증가되는 것은 catalase 유전자로 나타났다(Global M = 0.26). 그리고 heme oxigenase(이하 Hmox1)는 약간 감소되었다(Global M = -0.13).

6. 신호전달 관련 유전자 표현의 변화
신호전달 관련 유전자는 저산소증에서 蘇合香元 물추출액에 의하여 28개의 유전자는 표현이 증가되었으며(Table. 7), 38개는 감소되었다(Table. 8). PKCzeta(이하 prkc)는 약간 증가되었다(Global M = 0.29).

7. 전사(transcription) 관련 유전자 표현의 변화

전사 관련 유전자는 저산소증에서 蘇合香元 물추출액에 의하여 22개의 유전자는 표현이 증가되었으며(Table. 9), 33개는 감소되었다(Table. 10). 이 가운데 retinoic acid receptor alpha(이하 RAR α)는 약간 증가되었다(Global M = 0.27).

IV. 考 察

蘇合香元은 牛黃清心元, 小續命湯, 疎風湯, 至寶丹, 通竅散, 星香正氣散 등과 함께 中風 急性期에 사용되는 處方으로¹⁰, 氣機閉塞에 사용되는 處方이다. 蘇合香元은 芳香開竅, 行氣溫中하는 效能이 있어 突然昏倒, 牙關緊閉, 不省人事, 心腹卒痛, 甚則昏厥하는 寒閉證에 활용되며, 中風, 中氣, 時行癱瘓之氣 및 中寒을 치료한다²³. 蘇合香元에 대한 실험적 연구로는 安¹⁴의 鎮痛·抗痙攣·抗瀉下 효과, 南¹⁵의 저산소성 뇌장해에 대한 보호작용 및 심근 수축력 억제효과, 李¹⁶의 심근 허혈 상태 회복 효과 및 崔¹⁷의 뇌경색 면적 감소 효과 등이 보고되었다. 또한 李¹⁸는 정상 산소 환경에서 25~45%의 세포사망 보호효과와 저산소증 모델에서 apoptosis 기전 중 Bcl-2의 표현 증가, caspase 표현 감소에 유효하게 작용함을 보고하였고, 金¹⁹은 저산소증모델에서 4~11%의 세포사 방지효과와 Oxygen-Glucose Deprivation 모델에서 세포 생존률이 약간 증가하는 작용을 보여 뇌졸중 발병 후 발생하는 대뇌신경 세포사 방지에 예방 효과가 있음을 보고하였다.

신경세포사는 크게 apoptosis와 necrosis의 두가지 형태가 있다. 초기 신경세포사에 나타나는 necrosis는 세포내 이온의 급격한 불균형, 세포질과 mitochondria의 팽창, 세포질 용해후 핵막의 파괴에 의해 유도된다⁹.

뇌허혈이 수분간만 지속되어도 신경세포는 저산소와 포도당 결핍으로 유발된 ATP대사장애로 허혈 손상에 취약한 부위에 선택적이고 심한 손상이 유발되는데 이는 즉각적으로 발생하지 않고 수시간에서 수일에 걸쳐 지연성으로 일어나며 이러한 세포사의 과정을 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)라고 한다. 지연성 신경세포사의 주요한 기전

의 하나가 apoptosis이다^{23,24}. Apoptosis는 내인성 세포자살프로그램을 통해 원치않는 여분의 세포를 제거하는 과정인데, caspase의 생화학적 조절을 통해 종국에는 DNA의 분절화를 일으키는 생화학적 cascade과정에서 apoptosis가 영향을 미치는 것으로 보인다²⁵. 또한 apoptosis는 세포막상에서 세포크기의 축소, 세포막융기의 돌출 및 apoptosis 소포체를 형성하며, 세포내에서 염색사용축, 핵분절, DNA분절과 같은 특이한 변화를 동반하여, 세포막과 핵 내에 특이한 형태학적 변화를 동반한다^{26,26}.

최근 생명체들에 대한 유전체(genome) 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이러한 연구는 유전체의 서열정보 및 유전체들의 기능과 구조를 밝히는 것이 주목적이며²⁷, 나아가 질병의 진단과 치료에 응용될 수 있으므로 의학 및 생명과학 분야 등에서 많은 연구가 진행되고 있다. 유전자를 찾고 기능을 알아내는데 종래에는 Southern or Northern blotting, PCR을 기본으로 한 subtractive suppressive hybridization(SSH), representational difference analysis(RDA), difference display 등의 방법이 있었으나, 기존의 유전자 연구방법으로는 한 연구자가 동시에 많은 수의 유전자에 대한 연구의 진행에 한계가 있어 새로운 연구방법이 필요하게 되었고, 이러한 수많은 유전자들의 발현정도를 동시에 살펴볼 수 있는 새로운 기술의 하나로 DNA microarray가 각광을 받고 있다^{28,29}.

본 연구에서는 배양한 흰쥐 대뇌신경세포를 이용한 저산소증모델에서 蘇合香元 물추출액이 신경세포 유전자에 미치는 영향과 신경세포사에 대한 연관성 및 신경세포보호효과 기전을 알아보기 위하여 DNA microarray 방법을 적용하여 유전자표현에 미치는 영향을 조사하였다.

그 결과 Global M 값이 +0.1 이상, 즉 7% 이상 표현이 증가한 유전자는 1517 종, -0.1 이하, 즉 7% 이상 표현이 감소한 유전자는 1480 종이었다.

Apoptosis 관련 유전자 중 proapoptosis 유전자인 Bad가 가장 많이 증가하였고(Global M = 0.35), Akt1은 감소하였다(Global M = 0.23). serine-threonine kinase 인 Akt1은 apoptotic genomic DNA 분절과 membrane phosphatidylserine(PS)의 노출을 방지하여 apoptosis를

방지하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁰. 따라서 이¹⁸⁾와 김¹⁹⁾의 연구에서 apoptosis 방지작용을 나타낸 蘇合香元이 유전자 표현변화에 있어 apoptosis 촉진 유전자인 Bad 유전자의 표현을 증가시키고 apoptosis 억제 유전자인 Akt1의 표현을 감소시킨 이유는 현재로서는 설명하기 어렵다.

세포의 성장과 유지에 관련된 유전자 중 저산소증에서 蘇合香元 물추출액에 의하여 35개는 표현이 증가하였으며, 52개는 감소하였다. 이는 전반적으로 저산소증에서 蘇合香元 물추출액은 성장과 유지에 관련된 유전자를 더 억제하는 것으로 생각된다. 이 중 hemoglobin alpha 1이 약 3.2배의 증가(Global M = 1.7)를 보였다. 산소운반능력을 갖는 globin은 척추동물에서는 혈액에서 발견되는 hemoglobin, 근육세포에 발견되는 myoglobin, 신경계에서 발견되는 neuroglobin(이하 Ngb) 등 3가지가 보고되고 있는데, 최근 Ngb은 주로 대뇌 신경세포에 분포하고 있음이 보고되었다. neuronal Ngb의 표현은 저산소증, 대뇌허혈, 그리고 COCl₂ 및 deferoxamine 등의 처리에 의하여 그 표현이 증가되며³¹, 신경세포에서 neurotrophic effects를 갖는 hemin에 의하여도 그 표현이 증가된다³². 본 연구에서는 hemoglobin 유전자의 표현이 증가되었으나, 실제 신경세포에서는 Ngb이 증가되었을 것으로 생각되며, 저산소증 모델에서 산소운반 유전자의 증가는 蘇合香元이 저산소증에서 신경세포 보호에 유의한 작용이 있음을 추정할 수 있다.

세포주기 관련 유전자 표현의 변화는 증가 및 감소한 유전자의 Global M 값이 0.28에서 -0.36정도로 변화값이 미약하였는데 이는 세포분열을 하지 않는 신경세포이기 때문일 것으로 추정된다.

스트레스 반응 관련 유전자 중 가장 많이 증가한 것은 catalase 유전자로 나타났다(Global M = 0.26). Hmox1은 약간 감소하였다(Global M = -0.13). 항산화 효소인 catalase는 저산소증에서 catalase mRNA가 증가됨이 보고되었고, Hmox1은 감소됨이 보고되었다^{33,34}. Hmox1은 heme을 biliverdin, iron 및 CO로 분해한다³⁵. 한편 Biliverdin은 biliverdin reductase에 의하여 bilirubin이 되는데, biliverdin과 bilirubin은 강한 항산

화 활성(antioxidant activity)을 갖기 때문에 저산소증으로 유발된 산화적 손상을 방어할 것으로 추정된다^{36,37}. 따라서 저산소증에서 蘇合香元 물추출액은 Hmox1을 증가시킬 것으로 예상되었으나, 본 연구에서는 억제하였는데, 이에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

신호전달 관련 유전자 중 prkcz는 약간 증가하였다(Global M = 0.29). 허혈성 저산소증 후 재산소화(reoxygenation) 동안에 MAPK의 upstream kinase로 작용하는 prkcz의 경우³⁸, prkcz/MAPK 경로를 억제하면 apoptosis가 일어나기 때문에 prkcz는 MAPK 신호전달을 통하여 세포사망을 방지할 수 있는 것으로 보인다³⁹. 따라서 저산소증에서 蘇合香元 물추출액에 의한 prkcz의 증가는 타당한 것으로 이해된다.

전사(transcription) 관련 유전자 가운데 RAR α 의 유전자가 약간(Global M = 0.27) 증가되었다. RAR α 의 기능은 아직 잘 알려져 있지 않지만, hypoxia, cobalt chloride, 그리고 desferrioxamine에 의하여 그 전사활성이 증가되어 간세포(hepatic cell)의 저산소 스트레스에서 유전자표현을 조절하는 것으로 추정된다⁴⁰. 또한 hASMC 및 EC 세포에서 저산소증에 의하여 RAR α 의 표현이 약 2.5배 증가하는 것으로 보고되었다. 이 유전자의 기능은 알려져 있지 않지만 저산소증에서 蘇合香元 물추출액에 의하여 약간 증가되는 것은 의미를 가질 것으로 추정된다.

본 연구의 결과는 저산소증에서 蘇合香元 물추출액에 의하여 수많은 유전자들의 표현이 변화됨을 보여준다. 그러나 대부분의 경우 Global M 값이 -0.5에서 +0.5 사이로서 약 40% 내외의 증감을 보였다. 이러한 사실은 蘇合香元 물추출액에 의하여 많은 유전자들의 표현이 변화하나 그 변화 범위가 크지 않음을 시사한다. 본 연구에서 蘇合香元 물추출액에 의하여 신경세포보호효과를 가진 유전자들의 표현이 억제된 경우도 있었으며, 저산소증에서 蘇合香元 물추출액에 의하여 수많은 유전자의 표현이 변화되기 때문에 어느 요인에 의하여 蘇合香元 물추출액이 세포보호효과를 보이는지는 단적으로 설명하기 어려우며 향후 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 結 論

본 연구에서는 배양한 대뇌 신경세포를 이용하여 蘇合香元이 저산소증에서 유전자표현에 미치는 영향을 microarray 방법으로 조사하였다. 신경세포사와 관련된 중요한 유전자의 표현을 보면 다음과 같다.

- 1) 표현이 변화한 유전자의 대부분의 Global M 값이 -0.5에서 +0.5 사이로서 40% 이내의 증감을 나타내었다. 이 가운데 Global M 값이 +0.1 이상 즉 7% 이상 표현이 증가한 유전자는 1517 종, -0.1 이하 즉 7% 이상 표현이 감소한 유전자는 1480 종이었다.
- 2) apoptosis 촉진유전자인 Bad(Global M = 0.35), tumor protein p53(T53)(Global M = 0.28)은 증가된 반면 억제유전자인 Akt1은 감소되었다.
- 3) 산소운반과 관련된 hemoglobin alpha 1은 약 3.2 배의 증가되었다(Global M = 1.7).
- 4) 항산화 관련 catalase 유전자의 표현이 증가되었다(Global M = 0.26).
- 5) MAPK의 upstream kinase인 prkcz의 표현이 증가되었다(Global M = 0.29).
- 6) 저산소 스트레스에서 유전자표현을 조절하는 것으로 추정되는 RAR α 의 표현이 증가되었다(Global M = 10.27).

이상의 결과를 요약하면 저산소증에서 蘇合香元 물추출액은 산소운반 능력, 항산화 관련 유전자들의 표현, 저산소 스트레스를 극복하는데 관여하는 여러 가지 유전자들의 표현을 증가시키고, 일부 anti-apoptosis 유전자의 표현은 감소시킴으로서 세포를 보호하는 것으로 이해된다.

參考文獻

1. Fernando MR, Nanri H, Yoshitake S, Nagatakuno K, Minakami S. Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells. *Eur J Biochem.* 1992;207:917-922.
2. Kontos H, Wei E, Ellis E, Jenkins L, Povlishock J, Rowe

- G, Hess M. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cat. *Circ Res.* 1985;57:142-151.
3. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods.* 1983;65:55-63.
4. Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allplurinol. *Pediatr Res.* 1990;27:332-336.
5. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972;26:239-245.
6. 고재영, 김양희. 신경계질환에서의 아포토시스. 유전 제2권. 서울: 월드사이언스. 1998:147-165.
7. Schenm M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995;270:467-470.
8. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet.* Jan 1999;21(1):10-14.
9. Whitney LW, Becker KG, Tresser NJ, Caballero-Ramos CI, Munsun PJ, Prabhu VV, Trent JM, McFarland HF, Biddison WE. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol.* 1999;46:425-428.
10. 차상현. 중풍치료의 문헌적 고찰과 침구치료에 대한 소견. 대한한의학회 내과학회 중풍학술대회논문집. 1995:59-69.
11. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 北京: 人民衛生出版社. 1985:83,134.
12. 龔廷賢. 萬病回春. 北京: 人民衛生出版社. 1984:67,162
13. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂. 1981:93.
14. 안영기, 최용태. 四關穴 鍼刺와 麝香蘇合香元이 鎮痛, 抗痙攣, 抗瀉下, 血清成分變化 및 胃기능에 미치는 영향. 경희대논문집. 1981:1-12.
15. 남상경. 牛黃清心元과 蘇合香元의 효능에 관한 연구. 경희대학교 박사학위논문. 1989.
16. 이영빈, 문상관, 고창남, 조기호, 김영석, 배형섭, 이경섭. 麝香蘇合元이 재판류장치하의 흰쥐 심장에 미치는 영향. 대한성인병학회. 1997;3(1):164-181.
17. 최은정, 신길조, 이원철. 蘇合香元이 실험적 뇌경색 흰쥐의 국소뇌혈류량 및 경색 면적에 미치는 영향.

- 대한한의학회지. 1997;18(1):456-469.
18. 이지훈, 윤경선, 정승현, 신길조, 문일수, 이원철. 蘇合香元이 저산소증 유발 배양 대뇌신경세포에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2003;24(1):104-112.
 19. 김재우. 배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소 및 저당/저산소증 모델에서 蘇合香元의 세포사 방지효과에 대한 연구. 동국대학교 석사학위논문. 2002.
 20. 黃度淵. 證脈·方藥合編. 서울: 南山堂. 1992:204.
 21. Brewer G. J, Torricelli J. R, Evege E. K, Price P. J. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res* 1993;35:567-576.
 22. 段富津. 方劑學. 上海: 上海科學技術出版社. 1995:173-174.
 23. Kirino T. delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 1982;239:57-69.
 24. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Progress in Brain Res.* 1985;63:39-58.
 25. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Inr Rev Cytol.* 1980;68:251-306.
 26. 원철환, 정승현, 신길조, 문일수, 이원철. 배양 대뇌신경세포의 저당-저산소증 모델에서 牛黃清心丸에 의한 세포사 방지 연구. 대한한의학회지. 2002;23(4):125-139.
 27. Rashidi, H.H, Buehler, L.K. bioinformatics Basic: Applications in Biological Science and Medicine. CRC Press. 2000.
 28. Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown P.O, Davis R.D. Parallel human genome analysis : microarray-based expression monitoring of 1000 genes : *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996;93:10614-10619.
 29. Schena, M, Shalon, D. Davis. R.W, and Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary dna microarray. *Science.* 1995;270:467-470.
 30. Kang JQ, Chong ZZ, Maiese K. Critical role for Akt1 in the modulation of apoptotic phosphatidylserine exposure and microglial activation. *Mol Pharmacol.* 2003 Sep;64(3):557-569.
 31. Sun Y, Jin K, Mao XO, Zhu Y, Greenberg DA. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:15306-15311.
 32. Zhu Y, Sun Y, Jin K, Greenberg D.A. Hemin induces neuroglobin expression in neural cells. *Blood.* 2002 October 1;100(7):2494-2498.
 33. Martin R, Fitzl G, Mozet C, Martin H, Welt K, Wieland E. Effect of age and hypoxia/reoxygenation on mRNA expression of antioxidative enzymes in rat liver and kidneys. *Exp Gerontol.* 2002 Dec;37(12):1481-1487.
 34. Lievre V, Becuwe P, Bianchi A, Bossenmeyer-Pourie C, Koziel V, Franck P, Nicolas MB, Dauca M, Vert P, Daval JL. Intracellular generation of free radicals and modifications of detoxifying enzymes in cultured neurons from the developing rat forebrain in response to transient hypoxia. *Neuroscience.* 2001;105(2):287-297.
 35. Liu Yi, Ortiz de Montellano PR. Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1. *J. Biol Chem.* 2000;275:5297-5307.
 36. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 1987;235:1043-1046.
 37. Martinez-Cruz F, Pozo D, Osuna C, Espinar A, Marchante C, Guerrero JM. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: Prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C. *J. Neurosci Res.* 2002 Aug 15;69(4):550-558.
 38. Takeda H, Matozaki T, Takada T, Noguchi T, Yamao T, Tsuda M, Ochi F, Fukunaga K, Inagaki K, and Kasuga M. PI 3-kinase gamma and protein kinase C-zeta mediate RAS-independent activation of MAP kinase by a Gi protein-coupled receptor. *EMBO J.* 1999;18:386-395.
 39. Mizukami Y, Kobayashi S, Uberall F, Hellbert K, Kobayashi N, Yoshida K. Nuclear mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase czeta during reoxygenation after ischemic hypoxia. *J. Biol Chem.* 2000 Jun 30;275(26):19921-19927.
 40. Chauvet C, Bois-Joyeux B, Danan JL. Retinoic acid receptor-related orphan receptor(ROR) alpha4 is the predominant isoform of the nuclear receptor RORalpha in the liver and is up-regulated by hypoxia in HepG2 human hepatoma cells. *Biochem J.* 2002 Jun 1;364(Pt 2):449-456.