

足三里 전침자극에 의한 흰쥐 hypothalamus의 유전자 발현 profile 분석

노삼웅¹ · 이기석² · 최기순² · 나영인³ · 홍무창¹ · 신민규¹ · 민병일² · 배현수^{1,3*}

1: 경희대학교 한의과대학 생리학교실, 2: 경희대학교 대학원 동서의학과, 3: 퓨리메드(주) 기업부설연구소

Gene Expression Profile of Rat Hypothalamus Treated with Electroacupuncture at ST36 Acupoint

Sam Woong Rho¹, Gi Seog Lee², Gi Soon Choi², Young In Na³, Moo Chang Hong¹,
Min Kyu Shin¹, Byung il Min², Hyun Su Bae^{1,3*}

1: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, KyungHee University,

2: Department of East-West Medicine, Graduate School, Kyunghee University, 3: Purimed R&D Institute

Electroacupuncture (EA) has been reported to increase pain threshold, and to enhance the NK cell activity by up-regulation of IFN- γ and endogenous β -endorphin. For the purpose of understanding the molecular mechanism of EA stimulation, we analyzed the gene expression profile of rat hypothalamus, treated on Zusanli (ST36) with EA, in comparison with control group by oligonucleotide chip microarray (Affymetrix GeneChip Rat Neurobiology U34 Array) and real-time RT-PCR. Sprague-Dawley (S-D) male rats were stimulated at the Zusanli (ST36) acupoint in restriction holder. Simultaneously the control group was given only holder stress without EA stimulation. In order to prove the appropriateness of EA treatment, we measured spleen NK cell activity with standard ⁵¹Cr release assay. NK cell activity of EA group was significantly increased comparing to control group. The microarray and PCR results show that EA treatment up-regulates expression of genes associated with 1) nerve growth such as NGF induced factor A and VGF, 2) signal transduction such as 5HT3 receptor subunit, AMPA receptor binding protein and Na-dependent neurotransmitter transporter, and 3) anti-oxidation such as superoxide dismutase and glutathione S-transferase. In addition, the activity of the anti-oxidative enzyme, SOD of hypothalamus, liver and RBC was enhanced compared to that of control. The list of differentially expressed genes may implicate further insight on the mechanism of acupuncture effects.

Key words : electroacupuncture, gene expression profile, hypothalamus, oligonucleotide chip, real-time RT-PCR, anti-oxidative effect

서 론

침술은 최초 고대에 砭石 등을 이용해서 통증부위를 자극하여 통증을 완화시킨 데서 시작된 것으로 추정되며¹⁾, 이후 외상에 의한 통증이나 후유증의 치료는 물론 내상 질환에도 응용되어 왔다. 침술의 원리는 經脈 상의 특정부위인 經穴을 자극하여 經絡과 臟腑의 氣를 조절하는 것으로^{2,3)} 임상적으로 축적된 경험의 臟象學說과 결합된 經絡理論을 토대로 발전한 것이다. 서양의학

에서도 침자극을 통증이나 수술 및 화학요법 후의 소화기 장애, 면역 저하 및 통증 조절을 위한 하나의 수단으로 인정하면서, 20세기 중반부터 침자극의 효과 및 진통기전에 대하여 본격적으로 연구하기 시작하였다. 이제까지 실험적 연구를 통하여 보고된 침자극의 효과는 크게 통증 억제와 면역 조절 두 가지로 나누어 볼 수 있다. 침자극에 의한 통증 억제의 기전은 opioid peptide, 특히 met-enkephalin에 의한 하행성 통각 조절을 통해서 이루어지는 것으로 추측되고 있으며^{4,5)}, 면역 조절의 기전은 interferon- γ 와 interleukin-2 분비의 증가 그리고 β -endorphin의 분비 증가에 의한 natural killer (NK) cell 활성의 증강에 의한 것으로 보고되고 있다^{6,7)}. 이러한 침자극의 통증 억제나 면역 조절 효과는 모두

* 교신저자 : 배현수, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학

· E-mail : hbae@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0323

· 접수 : 2004/06/12 · 수정 : 2004/07/10 · 채택 : 2004/08/02

hypothalamus가 중요한 대뇌 중추로서 작용하는 것으로 알려져 있다⁸⁻¹⁰⁾. 이에 따라 침자극이 중추신경계 특히 hypothalamus에서의 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 대부분 특정 병태 모델이 유발된 상태에서 침자극에 의한 치료 효과를 확인하고 면역 및 진통에 관련된 몇 가지 유전자를 확인한 연구가 대부분이다. 이와 같은 연구 방법은 병증 유발 혹은 치료효과를 확인하기 위한 평가를 거친 이후에 유전자의 발현을 평가하는 것이어서 그 과정에서 생기는 변화를 간과할 수 없다는 한계가 있다. 이에 본 연구에서는 일정 전침자극을 진통 및 면역 효과 관련 연구에서 가장 많이 사용되는 스톱트리 (ST36)穴에 부여한 후 바로 hypothalamus를 적출하여 유전자 발현 양상을 분석하여 봄으로써 순수하게 침자극이 중추신경계 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하여 보고자 하였다. 이때 침자극의 적절성 여부를 확인하기 위하여 별도로 脾藏 적출 후 침자극에 의하여 일반적으로 증강하는 것으로 알려진 NK cell 활성을 평가하였고 NK cell 활성이 증가한 실험동물의 hypothalamus를 실험에 사용하였다.

본 연구는 광범위한 유전자 발현 양상을 평가하기 위해 흰쥐의 중추신경계에서 발현하는 유전자가 2,000개 가량 실려 있는 oligonucleotide chip microarray를 이용하였으며 이를 통해서 확인된 주요 특이 유전자의 통계적 유의성을 확인하기 위해 각각의 유전자에 대하여 다수의 실험동물에서 real-time RT-PCR을 통하여 유전자 발현량을 확인하였으며, 그 결과 항산화에 관여하는 유전자 등이 검색된 것을 감안하여 hypothalamus와 간 조직과 혈액에서의 항산화효소 활성평가를 시행하였다.

이상의 연구로 침자극이 중추신경계 유전자 발현에 미치는 영향 및 침자극의 기전과 관련된 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실험방법

1. 전침자극

6-8 주령의 체중 200~230 g Sprague-Dawley (S-D)계 숫놈 흰쥐 (Charles River Korea, Seoul, Korea)가 실험에 사용되었다. 실험동물은 사료 (소동물용, 삼양유지, Seoul, Korea)와 물을 충분히 공급하면서 사육되었고 사육시설은 일반적인 조명과 22±1℃의 온도 및 55±5%의 습도를 유지시켰다. 실험동물은 각각 대조군 (control group, Con), 전침군 (electroacupuncture group, EA)으로 분류하였다. 전침군은 Yu의⁶⁾ 방법에 따라 실험동물은 3일간 30분씩 3회 아크릴 홀더에 넣은 상태에서 전침자극을 주었다. 전침자극은 멸균된 stainless still 호침 (diameter 0.25 mm, length 30 mm, Dong Bang Acupuncture Co., Seoul, Korea)으로 骨度分寸法에 준하여 인체의 足陽明胃經 스톱트리 (ST36)에 상응하는 부위¹¹⁾와 스톱트리 下 5 mm 부위를 兩極性으로 刺鍼한 후 전침자극기 (PG-6, Ito Co., Japan)를 사용하여 3-5 V의 전압, 0.05 msec의 지속시간, 2 Hz의 저주파 자극으로 부여하되 전침강도는 근육의 수축이 육안으로 확인되는 정도의 세기로 전압을 조정하였다. 대조군은 전침자극 없이 전침군과 같은 시간동안 홀더에

넣고 홀더 스트레스를 주었다. 전침자극 및 홀더 스트레스 부여 후 경주 탈골하여 실험동물을 희생시키고 비장 등의 조직을 적출하였다.

2. NK cell 활성 측정

실험동물의 비장세포에서 분리한 NK cell 활성의 측정은 standard 4h-51Cr release 분석법을 이용하여 측정하였다.

적출한 비장을 5% fetal bovine serum (Invitrogen Life Technologies, Rockville, U.S.A.), 50 μM β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.), 1% non-essential amino acid (Invitrogen), 20 mM hepes buffer (Invitrogen), 2 mM l-glutamate (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen), 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen)이 함유된 complete RPMI 1640 (Invitrogen) medium에서 멸균된 주사기로 파쇄한 후 cell strainer (Falcon, BD Biosciences, Bedford, U.S.A.)로 걸러낸다. 균질화된 비장세포에 1/2 부피의 lymphoprep (Nycomed Pharma As, Oslo, Norway)를 첨가하여 25분 동안 550 ×g에서 원심분리한 후 lymphocyte를 분리하였다. 분리된 lymphocyte는 Phosphate-buffered saline (Invitrogen)에 부유시켜 250 ×g에서 10분간 2회 원심분리하여 세척한 후 complete RPMI 1640 medium에 부유시키고 trypan blue (Sigma-Aldrich)로 염색하여 세포수를 측정하여 effector cell로 사용하였다. Target cell은 51Cr을 표지한 YAC-1 cell (Mouse lymphoma, KCBL, Seoul, Korea)을 사용하였다. 100 μl의 effector cell과 2×10⁵ cells/ml의 target cell 50 μl를 세포수가 10:1, 30:1, 100:1의 비율이 되도록 섞은 후 U-bottom 96 well microtiter plate에 넣고 37℃, 5% CO₂ incubator (Nuair Inc., Plymouth, U.S.A.)에서 4시간 동안 배양하였다. 배양액을 400 ×g에서 5분간 원심분리한 후 상청액 100 μl에서 gamma scintillation counter (Hewlett-Packard, Downer Grove, U.S.A.)로 실험적 51Cr 방출량 (ECR)을 측정하였다. 한편 target cell을 effector cell 없이 complete RPMI 1640 medium과 IN HCl에서 동일한 조건으로 배양하여 각각 일시적 51Cr 방출량 (SCR)과 최대 51Cr 방출량 (MCR)을 측정하였다. 이상을 Formula I에 대입하여 target cell의 percent specific lysis (PSL)를 얻었다.

Formula I. Percent specific lysis of target cell

$$PSL (\%) = \frac{ECR - SCR}{MCR - SCR} \times 100$$

PSL: percent specific lysis of target cell; ECR: experimental 51Cr release; SCR: spontaneous 51Cr release; MCR: maximum 51Cr release

3. Hypothalamus에서의 유전자 발현량 분석

1) Hypothalamus 적출 및 total RNA 분리

실험동물에서 hypothalamus를 적출하는 것은 비장 적출과 동시에 이루어 졌으며 적출 즉시 일부를 액체질소에서 동결시킨 후 -80℃에서 보관하여 사용하였다. 각 실험동물의 NK cell 활성 측정 결과 NK cell 활성이 평균값에서 표준편차를 제한 값 이상인 전침군 (n=6) 및 NK cell 활성이 평균에 표준편차를 더한 값 이하인 대조군 (n=6) 실험동물의 hypothalamus에서 TRIzol

reagent (Invitrogen)로 total RNA를 분리하였다. 동결된 조직에 200 μ l의 TRIzol reagent를 넣고 pellet pestle (Sigma-Aldrich)로 마쇄한 후 300 μ l의 TRIzol reagent를 더 넣은 다음 반응액을 실온에서 5분간 배양하였다. 반응액에 100 μ l의 chloroform (Sigma-Aldrich)를 넣고 잘 섞은 후 다시 3분간 실온에서 배양하였다. 반응액을 4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g에서 15분간 원심분리한 후 상청액을 새 tube에 옮기고 250 μ l의 isopropanol (Sigma-Aldrich)를 첨가한 후 실온에서 10분간 배양하였다. 반응액을 4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후 상청액을 제거하고 75% ethanol 500 μ l를 첨가한 후 다시 7,500 \times g에서 5분간 원심분리하여 pellet을 세척하였다. Pellet을 완전히 건조한 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC, Calbiochem, San Diego, U.S.A.) 처리 증류수로 녹였다. 분리된 total RNA는 spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc. Fullerton, U.S.A.)로 정량한 후 농도가 1 μ g/ μ l가 되도록 하였다. 분리된 total RNA는 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium-bromide (Et-Br, Sigma-Aldrich)로 염색하여 상태를 평가하였다.

2) Oligonucleotide chip microarray

(1) mRNA 정제

NK cell 활성 측정 결과가 각 군의 평균치에 가장 접근한 실험동물 각 1마리의 total RNA가 microarray에 사용되었다. Oligotex mRNA midi kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)을 사용하여 total RNA에서 mRNA를 정제하였다. 250 μ l의 total RNA에 250 μ l의 buffer OBB 및 15 μ l의 oligotex suspension을 넣고 pipette으로 잘 섞은 후 70 $^{\circ}$ C에서 3분, 이어서 실온에서 10분간 배양하였다. 반응액을 14,000 \times g에서 2분간 원심분리한 후 상청액을 제거하고 400 μ l의 buffer OW2로 pellet을 잘 섞은 후 spin column에 넣고 14,000 \times g에서 1분간 원심분리하였다. Spin column에 다시 400 μ l의 buffer OW2를 넣고 14,000 \times g에서 1분간 원심분리하였다. Spin column을 새 tube에 옮기고 30 μ l의 70 $^{\circ}$ C buffer OEB를 spin column에 주입하고 잘 섞은 후 14,000 \times g에서 1분간 원심분리하여 mRNA를 녹여냈다.

(2) Double strand (ds) cDNA 합성

mRNA는 spectrophotometer로 정량한 후 각각 1.5 μ g을 ds cDNA 합성에 사용하였다. cDNA 합성은 Superscript Choice System for cDNA Synthesis (Invitrogen)를 사용하였다. 10 μ l의 total RNA에 1 μ l의 100 μ M T7-(dT)24 primer (Genotech Co., Daejeon, Korea)를 넣고 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. 여기에 4 μ l의 5 \times first strand buffer, 2 μ l의 0.1 M dithiothreitol (DTT), 1 μ l의 10 mM dNTP mix, 2 μ l의 200 U/ μ l Superscript II reverse transcriptase를 넣고 잘 섞은 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하여 first strand cDNA를 합성하였다. First strand cDNA에 91 μ l의 DEPC 처리 증류수, 30 μ l의 second strand buffer, 3 μ l의 10 mM dNTP mix, 1 μ l의 10 U/ μ l E. coli DNA ligase, 4 μ l의 10 U/ μ l E. coli DNA polymerase, 1 μ l의 2 U/ μ l E. coli RNase H 등을 넣고 잘 섞어서 16 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 배양하고 다시 2 μ l의 5 U/ μ l T4 DNA polymerase를 넣은 후 16 $^{\circ}$ C에서 5분간 추가로 배양하여 second strand cDNA를 합성하였다. 합성된

ds cDNA에 10 μ l의 0.5 M EDTA를 넣고 섞어서 enzyme을 불활성화하였다. cDNA 정제를 위하여 합성된 cDNA에 162 μ l의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (Invitrogen)을 섞어서 phase lock gel heavy tube (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)에 넣고 12,000 \times g에서 5분간 원심분리한 후 상청액에 1/2 배 부피의 7.5 M ammonium acetate (Sigma-Aldrich), 2.5 배 부피의 -20 $^{\circ}$ C, 100% ethanol을 넣고 14,000 \times g에서 20분간 원심분리하여 침전시켰다. 상청액을 제거하고 남은 cDNA pellet에 400 μ l의 -20 $^{\circ}$ C, 80% ethanol을 넣고 14,000 \times g에서 5분간 원심분리하여 2번 세척한 후 다시 상청액을 제거하고 완전히 말렸다. 건조된 cDNA에 12 μ l의 DEPC 처리 증류수를 넣어 녹였다.

(3) Biotin-labeled cRNA 합성

12 μ l의 ds cDNA 중 3.3 μ l가 biotin-labeled cRNA 합성에 사용되었다. Biotin-labeled cRNA 합성은 ENZO BioArray highyield RNA transcript labeling kit (Affymetrix Co., St. Clara, U.S.A.)를 사용하였다. cDNA에 4 μ l의 10 \times Hy reaction buffer, 4 μ l의 10 \times biotin labeled ribonucleotides, 4 μ l의 10 \times DTT, 4 μ l의 10 \times Rnase inhibitor mix, 2 μ l의 20 \times T7 RNA polymerase를 넣고 DEPC 처리 증류수로 40 μ l가 되도록 한 후 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 배양하여 biotin-labeled cRNA 합성하였다. 합성된 biotin-labeled cRNA은 RNaeasy mini kit (Qiagen)을 사용하여 정제하고 spectrophotometer로 정량하여 1 μ g/ μ l의 농도가 되도록 하였다.

(4) Fragmented cRNA

합성된 cRNA 20 μ g에 2 μ l의 5 \times fragmentation buffer [200 mM Tris acetate pH 8.1, 500 mM potassium acetate (Sigma-Aldrich), 150 mM magnesium acetate (Sigma-Aldrich)]를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수로 40 μ l가 되게 하였다. 40 μ l의 반응액은 94 $^{\circ}$ C에서 35분간 배양하여 35-200 bases의 fragment가 되게 하였다.

(5) Genechip hybridization

Fragmented cRNA 5 μ g을 1,300개 이상의 rat 중추신경계 유전자가 탑재되어 있는 GeneChip $^{\circ}$ Rat Neurobiology U34 Array (P/N900283, Affymetrix)에 적용하였다. 일련의 과정은 제조사의 추천대로 mini format protocol을 따랐다. 50 μ l의 2 \times hybridization buffer [200 mM MES (2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acid, Sigma-Aldrich), 2 M [Na $^{+}$], 40 mM EDTA, 0.02% tween 20 (sigma-Aldrich)], 1.7 μ l의 3 nM control oligonucleotide B2 (Affymetrix), 5 μ l의 20 \times eukaryotic hybridization controls (bioB, bioC, bioD, creX 30 pM each) (Affymetrix), 1 μ l의 10 mg/ml herring sperm DNA (Promega Co., Madison, U.S.A.), 1 μ l의 50 mg/ml acetylated BSA (Invitrogen), 10 μ l의 0.5 μ g/ μ l fragmented cRNA 혼합액에 DEPC 처리 증류수를 첨가하여 100 μ l의 반응액을 만들었다. 반응액은 99 $^{\circ}$ C 5분, 45 $^{\circ}$ C 5분간 반응 후 15,000 \times g에서 5분간 원심분리하여 불용성물질을 제거하였다. Genechip은 septa를 통하여 80 μ l의 hybridization buffer를 채운 후 rotisserie hybridization oven (Affymetrix)으로 45 $^{\circ}$ C, 60 rpm에서 10분간 배양하였다.

Genechip에서 hybridization buffer를 제거한 후 80 μ l의 cRNA 반응액을 채우고 45°C, 60 rpm에서 16시간 동안 반응시켰다.

(6) Genechip의 염색과 scanning

Hybridization 반응이 종료된 genechip은 Genechip Fluidics Station (Affymetrix)의 mini_euk1 protocol에 따라 세척 및 염색한 후 Genechip System Confocal Scanner (Hewlett-Packard)를 이용하여 3 μ m resolution으로 두 번 scan 하여 평균값을 취하였다.

(7) Sample의 상태 평가

각 군의 cDNA, cRNA 및 fragmented cRNA는 1 μ g을 1% agarose gel에 전기영동하여 size 분포를 평가하였다. β -actin 및 GAPDH의 3' oligonucleotide와 5' oligonucleotide의 average differential expression (AD) ratio는 제조사의 권장대로 3 미만 인가를 확인하였다.

3) Real-time RT-PCR

Microarray 결과 유의성있게 많거나 혹은 적게 발현된 유전자 중 의미있는 유전자를 다수의 sample에서 통계적 유의성을 확인하여 보고자 real-time RT-PCR을 실시하였다.

(1) Single strand (ss) cDNA 합성

각 군 실험동물의 hypothalamus에서 추출한 total RNA 5 μ g을 ss cDNA 합성에 사용하였다. cDNA 합성은 Superscript II RNase H- reverse transcriptase (Invitrogen)를 사용하여 제조사의 protocol에 준하여 실시하였다. 5 μ g의 total RNA에 1 μ l의 10 \times DNase I reaction buffer, 1 μ l의 1 U/ μ l DNase I (Invitrogen)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수를 넣어 반응액이 10 μ l이 되게 한 후 실온에서 15분간 배양하여 오염되었는지 모를 DNA를 제거하였다. 반응 후 DNase I enzyme의 불활성화를 위하여 1 μ l의 25 mM EDTA를 넣고 65°C에서 10분간 배양하였으며 1 μ l의 반응액을 따로 분리하여 두고 후에 DNA 잔존 여부를 PCR로 확인하였다. 10 μ l의 반응액에 1 μ l의 0.5 μ g/ μ l Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen)를 첨가한 후 70°C에서 10분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 반응액에 4 μ l의 5 \times first strand buffer, 1 μ l의 10mM each dNTPs, 2 μ l의 0.1 M DTT, 1 μ l의 DEPC 처리 증류수를 첨가하고 잘 섞은 후 42°C에서 2분간 배양하여 반응액을 균질화하였다. 반응액에 1 μ l의 200 U/ μ l Superscript II RNase H- reverse transcriptase를 넣고 42°C에서 50 분간 배양하여 ss cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 70°C에서 15분간 배양하여 enzyme을 불활성화하였다. 한편 별도의 S-D rat whole brain에서 추출한 total RNA 10 μ g으로 상기 protocol에 준하여 ss cDNA를 합성하여 real-time PCR의 calibrator로 사용하였다.

(2) Real-time PCR

Reverse transcriptase가 PCR 효율을 떨어뜨리는 것을 막기 위하여 4배 희석한 ss cDNA 반응액 2 μ l를 PCR 반응에 이용하였다. PCR은 2 μ l의 cDNA에 12.5 μ l의 2 \times SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, U.K.), 각각 1.5 μ l의 5 μ M sense, antisense primer (Genotech), 7.5 μ l의 증류수를 넣어 25 μ l가 되게 한 후 GeneAmp 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Warrington, U.K.)에서 PCR하였다.

PCR 조건은 95°C에서 10분간 배양하한 후 95°C 15초, 62°C 45초를 40cycle 반복하였다. 모든 PCR은 sample 당 3개씩 3회 수행하여 평균값을 사용하였다. PCR에서 target product가 증폭되면서 방출되는 fluorescence의 양은 매 cycle 종료시 측정되며 각 반응액의 target product의 양이 최초 log phase에 접어드는 지점을 역치로 잡아서 역치에 도달한 cycle number (Ct)를 기준으로 standard curve에 대입하여 정량하였고 각 유전자의 발현량은 internal control로써 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalize하였다. 표준곡선은 calibrator cDNA를 단계적으로 희석하고 (1, 1/2, 1/4, 1/8) sample cDNA와 동시에 PCR하여 동일한 역치를 적용하여 얻은 Ct 값을 기준으로 작성하였으며 sample cDNA도 단계적으로 희석하여 (1, 1/2) PCR을 해서 calibrator와 PCR 효율을 비교함으로써 standard curve의 적절성을 평가하였다. 또 PCR 반응의 종료 후 60-95°C 사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하고 peak가 하나인지를 확인하는 한편 PCR 반응액을 2% agarose gel에서 전기영동함으로써 non-specific PCR product나 primer dimer 등이 없는지를 확인하였다. PCR에 이용된 primer (Genotech)의 sequence와 product length는 Table 1과 같다.

Table 1. Sequences of primer used for real-time PCR

Gene	Primer sequence	Product length (bp)
GAPDH	5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3' 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3'	236
IGFBP5	5'-CAA GGC CTC CAA GAT CAT TA-3' 5'-TAT CTC TTG CAG GTA AAG CA-3'	261
GRHR	5'-CAG CTT AGT TTG GGG AGG TTG GTT-3' 5'-ATG GGC AGT GAG GGA GCG TAA TA-3'	185
GSTA1	5'-TGC CAA AAT CAA GGA CAA AG-3' 5'-GGC TGC CAG GCT GAA GAA ACT-3'	243
ETB	5'-TGA GTC TAT GTG CTC TGA GTA TTG ACA-3' 5'-ACC TAT GGC TTC AGG GCA AGC-3'	161
PFRIC	5'-TAC ACT TGA GAC TTA TTG TG-3' 5'-TTC AAT AGA TAA TTC TGG AAG-3'	148
SDNT	5'-ATA GCC TGT ACT TAT CTT TGG-3' 5'-TAA CCC TCG ATC ACA TCT GG-3'	162
Shal1	5'-GGA TCC AAG GAA GCA ACA AT-3' 5'-AAG GGT GAA AAG GTA GCA AGA C-3'	145
5HT3RS	5'-GAT GTG AGT CCT GCA TCC TG-3' 5'-GCC ATA ATC ACA GAA GTA CTG-3'	159
MIF	5'-CGC CCA GAA CCG CAA CTA CA-3' 5'-CCG GAA GGT GGC CAT CAT TAC-3'	160
SOD1	5'-TTG GGC AAA GGT GGA AAT GA-3' 5'-CGG GAG GCT ATG GGT CTG-3'	160
GRIP2	5'-TGC TTC TTC CCC ACC CCA TTC TGT-3' 5'-CAA GGG CCT CTC CAA GCA CTC TCC-3'	160
NGFIA	5'-CCT CTC CGG GCT CCT CTA CCT A-3' 5'-GCT CCC CTC CCT TTG CTC TC-3'	160
VP	5'-CTG CCG CGG GCA TCT GCT GCA G-3' 5'-GCT CAG TAG ACC CGG GGC TTG-3'	202
SOM14	5'-GCT GGC CGG GCT CTG CAT CG-3' 5'-CTG GTT GGG CTC GGA CAG CAG-3'	160
VGf	5'-AAA CGG AAG CGG AAG AAG AAC G-3' 5'-CCC GGG GGA AAC ACC TCA T-3'	160

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IGFBP5: insulin-like growth factor-binding protein 5; GRHR: gonadotropin-releasing hormone receptor; GSTA1: glutathione-S-transferase alpha type (Ya); ETB: nonselective-type endothelin receptor; PFRIC: putative four repeat ion channel; SDNT: sodium-dependent neurotransmitter transporter; Shal1: K⁺ channel polypeptide; 5HT3RS: 5HT3 receptor subunit; MIF: macrophage migration inhibitory factor; SOD1: superoxide dismutase 1; GRIP2: glutamate receptor interacting protein 2; NGFIA: nerve growth factor induced factor A; VP: vasopressin; SOM14: Somatostatin-14

4. 조직내 항산화효소 활성 평가

1) 조직의 적출 및 전처리

간, 적혈구, 시상하부 조직이 항산화효소 활성 평가에 이용되었다. 혈액은 심장천자로 3 ml를 채취하여 EDTA bottle에 넣고 1,000 ×g에서 15분 동안 원심분리하여 혈장과 혈구를 분리하였다. 적혈구는 생리식염수로 세 번 세척 한 후 생리식염수와 1:1 비율로 희석하여 일부는 헤모글로빈 측정에 사용하였고 일부는 -80℃에 보관하였다가 항산화효소 활성 측정에 사용하였다. 항산화효소의 활성 측정을 위하여 100 μl의 적혈구 현탁액을 400 μl의 50 mM phosphate buffer (pH7.4)로 희석한 후 chloroform:ethanol (5:3) 용액 200 μl를 첨가하여 섞은 후 12,000 ×g에서 30분간 원심분리하여 그 상청액을 취하였다. 간 조직은 간문맥에서 생리식염수를 이용하여 탈혈시켜서 적출한 뒤 세척하였고, 뇌 조직은 시상하부를 분리하여 세척 후 각각 -80℃에 보관하였다가 분석에 사용하였다. 각 조직과 뇌 조직은 50 mM phosphate buffer와 함께 homogenizer로 충분히 마쇄하여 10% homogenate를 만들고 이를 4℃, 12,000 ×g에서 40분간 원심분리한 후 그 상청액을 항산화효소 활성 측정에 이용하였다.

2) Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

SOD 활성 측정은 Flohé¹²⁾의 방법에 따라 xanthine-xanthine oxidase system에서 cytochrome c의 환원정도에 의해 측정하였다. 먼저 50 mM phosphate buffer에 5 μM xanthine (Sigma-Aldrich)이 함유된 cytochrome c solution (Sigma-Aldrich)을 준비하였다. 각각 50 μl의 sample에 1 ml의 cytochrome c solution (Sigma-Aldrich)과 50 μl의 0.2 U xanthine oxidase (Sigma-Aldrich)를 혼합하여 spectrophotometer로 550 nm에서 1분 동안의 흡광도 변화를 측정하였다.

3) Glutathione peroxidase (GPx) 활성 측정

GPx 활성은 Flohé¹³⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 각각의 sample에 reaction mixture [0.1 M phosphate buffer, 2.4 U/ml glutathione reductase (Roche, Mannheim, Germany), 10 mM glutathione (Calbiochem)]를 가하고 37℃에서 10분간 배양한 후 100 μl의 1.5 mM NADPH (Calbiochem)를 가하여 37℃에서 3분간 배양하였다. 여기에 100 μl의 12 mM t-butyl hydroperoxide (Sigma-Aldrich)를 가하여 GPx 활성을 3분간 spectrophotometer로 340 nm에서 측정하였다.

5. Data 처리

NK cell 활성은 lytic unit 10% (LU10%)로 표시하였다. 1 LU10%는 10% specific lysis에 필요한 effector cell의 숫자로, 각 그룹의 LU10%는 effector cell 106개가 1 LU10%의 몇 배에 해당하는지를 표시한다. Real-time RT-PCR 결과는 각 sample의 Ct 값을 standard curve에 적용하여 상대정량하고 internal control 인 GAPDH의 양으로 normalize하여 표시하였다. SOD의 활성은 cytochrome c의 환원을 50% 저해하는 것을 1 unit으로 하였다. GPx의 활성은 1 μmol NADPH disappearance/min을 1 unit으로 하였다. 간과 hypothalamus의 단백질 함량은 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich)을 standard로 한 BCA protein assay kit

(Sigma-Aldrich)을 사용해서 정량하고 적혈구에서는 hemoglobin 함량을 측정하여 SOD와 GPx 활성을 normalize하였다.

이상의 Data는 mean±SEM (standard error mean)으로 표시하였고 결과의 유의성 평가는 SPSS 11.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, U.S.A.)를 이용하여 independent sample T-test를 실시하였다. RT-PCR 결과 선형회귀분석 및 plotting은 GraphicPad Prizm 3.02 (GraphicPad software Inc., U.S.A.)를 이용하였다. Genechip의 scan data는 GeneChip 3.1 software (Affymetrix)를 이용하여 분석하였다. Hybridization의 완전성은 control oligonucleotide B2, bioB, bioC, bioD, creX의 signal을 비교함으로써 평가하였다. 사용된 genechip에는 모든 probe oligonucleotide에 대하여 mismatch probe가 적재되어 있어 positive match에 대하여 상대적으로 mismatch가 큰 경우는 data에서 제거하였다. 각 유전자의 발현량은 signal intensity의 평균값으로 normalize하여 average differential expression (AD)을 구한 후 비교함으로써 발현량의 차이가 있는 유전자를 구분하였다. 하나의 유전자당 여러 개의 oligonucleotide가 적용되어 있으므로 각 oligonucleotide의 hybridization intensity의 평균값으로 비교를 하였으며 발현량의 차이를 확인하는 기준은 기본적으로 제조사의 algorithm을 따랐다.

결 과

1. 전침자극에 의한 NK cell 활성의 변화

전침군과 대조군의 NK cell 활성을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 전침군의 LU10%는 13.21±0.25 (n=6)이였으며 대조군은 9.21±0.57 (n=6)로서 전침군에서 대조군에 비하여 약 43.4% 가량 유의성있게 높은 NK cell 활성을 나타냄으로써 (p<0.001) 전침자극이 NK cell 활성을 증강시키며 본 실험에서 전침자극이 적절히 이루어진 것을 알 수 있다.

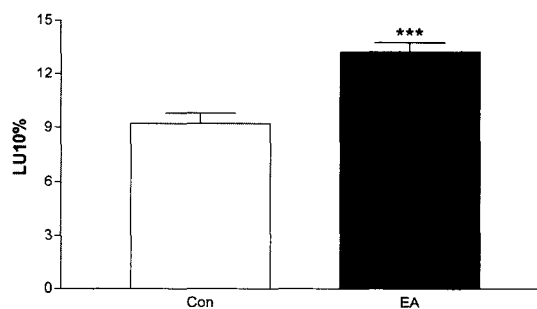


Fig. 1. Enhanced NK cell activity by EA treatment Con: control group treated with only holder stress. EA: EA group treated with electroacupuncture stimulation at ST36 acupoint for 30min/3times/3days in holder. NK cell activity is expressed as mean±SEM of LU10%, which is the quotient of 106 effector cell divided by the number of effector cell to kill 10% of target cell. *** : p<0.001 vs control group

2. Total RNA의 상태 평가

각 군의 hypothalamus에서 분리한 total RNA의 상태를 평가하기 위하여 1% agarose gel에서 전기영동하고 Et-Br로 염색한 결과는 생략하였다. 모든 sample에서 광범위한 사이즈의 RNA를 확인할 수 있고 18s rRNA와 28s rRNA band의 윤곽이 뚜렷하고

28s rRNA의 band가 18s rRNA의 band보다 짧은 것으로 total RNA는 훼손되지 않은 것을 확인할 수 있었다.

3. Genechip에 적용된 sample의 상태 평가

Genechip에 적용될 target cRNA의 준비가 적절하게 이루어졌는지를 확인하여 보고자 1% agarose gel에서 전기영동하고 Et-Br로 염색하여 본 결과는 생략하였다. 합성된 cDNA와 cRNA의 size 분포가 4,000 bp까지 광범위하게 분포하였으며 fragmented cRNA 역시 200 base 이하로 완전히 조각이 난 것을 확인할 수 있었다. Genechip에 적용된 cRNA가 full-length 인가를 확인하기 위하여 internal control인 β -actin 및 GAPDH의 3' oligonucleotide와 5' oligonucleotide의 AD ratio를 평가함에 Cut-off range는 제조사의 권장대로 3 미만으로 하였는데 대조군, 전침군 모두 조건을 만족시켰다.

4. Microarray

1) Scan image와 hybridization 효율

대조군, 전침군의 실험동물 중 평균값에 가장 접근한 NK cell 활성을 나타낸 실험동물의 total RNA에서 합성된 biotin-labeled cRNA를 genechip에 hybridization 시킨 후 scan 하여 pseudocolor로 표현한 image에서 외곽의 하얀 점으로 이루어진 사각형 경계선과 정중앙의 흰색 십자가 문양과 위쪽의 "GeneChip Rat Neuro" 글씨는 control oligonucleotide B2가 hybridization되어서 만들어낸 positive control로 hybridization의 완전성을 확인하기 위한 것이다. 두 개의 image 모두에서 선명한 표식을 확인할 수 있었으며 정중앙에서 약간 위 왼쪽에 존재하는 그물모양의 검은 색 선들은 negative control로서 두 개의 image 모두에서 선명한 선을 확인하였고, 그 image는 생략하였다.

Hybridization 효율의 평가를 위하여 첨가된 spike control의 AD ratio를 확인한 결과, 전침군의 spike control은 대조군의 spike control과 비교하였을 때 일정한 비율을 나타내었으며 hybridization 효율은 적절하여 결과의 신뢰도는 충분한 것으로 나타났고, 그 표는 생략하였다.

2) 각 군별 hybridization intensity의 비교

전침군과 대조군의 microarray scan 결과 signal value를 log-log scale의 scatter plot으로 표시하면 Fig. 2와 같다.

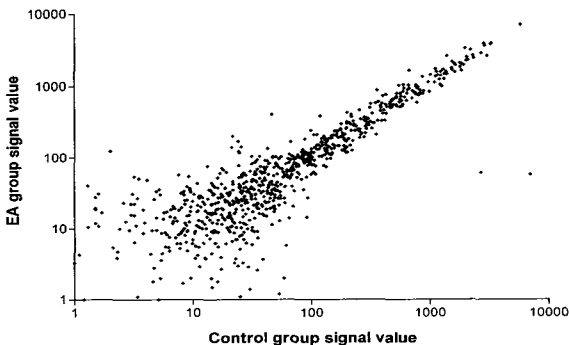


Fig. 2. Scatter plot of signal value means hybridization intensity in log-log scale. All signal value means AD, which was normalized with average signal value.

각 군의 signal value는 biotin-labeled cRNA가 oligonucleotide chip에 hybridization된 정도를 의미하며 각각 average signal value를 이용하여 normalize하였다.

3) 발현량의 차이를 보인 유전자

각 유전자의 발현량을 average signal value로 normalize하여 average differential expression (AD)을 구한 후 비교하였다. 유전자 probe set 내 oligonucleotide들의 hybridization intensity가 큰 편차를 가진 경우는 분석 프로그램의 algorithm이 제공하는 유의수준을 따름에 따라 |2| 이하의 경우에도 유의성을 지니는 것이 있거나 |2| 이상의 경우에도 유의성이 인정되지 않는 것이 있었다. 전침군에서 대조군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 21종으로 2종은 감소하고 19종은 증가하였다 (Table 2).

Table 2. The genes which significantly differentially expressed in Control and EA Group.

Gene Name	Fold*	ID#
Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP5)	-2.6	A1029920
Gonadotropin-releasing hormone receptor (GRHR)	-2.2	U92469
Glutathione S-transferase Yc1 subunit (GSTA1)	8.1	S72505
Synuclein alpha (SYN1)	4.9	S73007
Proteasome subunit RC8 (PSC8)	4.8	D90258
Nonselective-type endothelin receptor (ETB)	3.7	S65355
Putative four repeat ion channel (PFRIC)	3.6	AF078779
Sodium-dependent neurotransmitter transporter (SDNT)	3.1	S56141
K+ chanrel polypeptide (Shal1)	3.0	S64320
Small inducible cytokine subfamily D, 1 (SCYD1)	2.9	AF030358
5HT3 receptor subunit (5HT3RS)	2.8	U01227
Myelin-associated glycoprotein (MAG)	2.6	M22357
Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	2.6	S73424
Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1)	2.5	M25157
Glutamate receptor interacting protein 2 (GRIP2)	2.4	AF090113
Nerve growth factor induced factor A (NGFIA)	2.0	AF023087
Vasopressin (VP)	1.9	M64785
Microtubule-associated protein 1A (MAP1A)	1.9	M83196
Somatostatin-14 (SOM14)	1.8	K02248
Neuron-specific cortxin (NSC)	1.8	L15011
VGF	1.6	M74223

* Fold means ratio of hybridization intensity. The genes with negative value are abundant in control group, while positive value are abundant in EA group. # ID indicates the accession number of GenBank (NCBI).

대조군과 전침군 간에 발현량의 유의한 차이를 보인 유전자들의 기능 및 구조를 the european bioinformatics institute (EBI)의 InterPro database (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)의 기준에 따라 분석하여 분포를 살펴보면 Fig. 3과 같다.

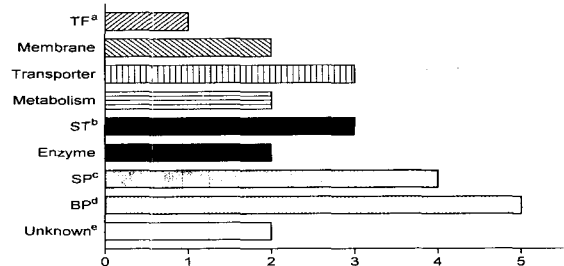


Fig. 3. Functional distribution of differentially expressed genes in microarray a: transcription factor; b: signal transducer; c: signaling pathway; d: binding protein; e: genes of unknown function. The functional annotation was based on InterPro database (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) of EBI (the european bioinformatics institute)

5. Real-time RT-PCR

전침군과 대조군 각각의 hypothalamus에서 분리된 total RNA를 분리하고 ss cDNA를 합성하여 genechip 결과에서 유의성있게 다르게 발현된 유전자 중 15가지 중요한 유전자에 대하여 real-time PCR을 한 결과는 다음과 같다.

1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalize하기 위한 internal control로써 사용된 GAPDH의 calibrator cDNA를 이용하여 작성한 standard curve와 dissociation curve는 생략하였으며 Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9994로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다.

2) IGFBP5

IGFBP5 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9975로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 IGFBP5 mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 68.2% ($p<0.05$)로 적게 발현되었다 (Fig. 4.A).

3) GRHR

GRHR 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9960으로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 GRHR mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 71.4%로 적게 발현되었으나 유의성은 없었다 (그래프 생략).

4) GSTA1

GSTA1 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9995로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 GSTA1 mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 443.6% ($p<0.001$)로 많이 발현되었다(Fig. 4.B).

5) ETB

ETB 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9978로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 ETB mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 233.6% ($p<0.01$)로 많이 발현되었다 (Fig. 4.C).

6) PFRIC

PFRIC 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9979로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 PFRIC mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 145.6%로 많이 발현되었으나 유의성은 없었다 (그래프생략).

7) SDNT

SDNT 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9969로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 SDNT mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 195.3% ($p<0.01$)로 많이 발현되었다 (Fig. 4.D).

8) Sha1

Sha1 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9903으로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 Sha1 mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 193.0% ($p<0.01$)로 많이 발현되었다 (Fig. 4.E).

9) 5HT3RS

5HT3RS 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9999로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 5HT3RS mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 243.6% ($p<0.01$)로 많이 발현되었다 (Fig. 4.F).

10) MIF

MIF 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9989로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 MIF mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 186.9% ($p<0.05$)로 많이 발현되었다 (Fig. 4.G).

11) SOD1

SOD1 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9981로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 SOD1 mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 293.6% ($p<0.001$)로 많이 발현되었다 (Fig. 4.H).

12) GRIP2

GRIP2 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9994로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 GRIP2 mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 132.9%로 많이 발현되었으나 유의성은 없었다 (그래프생략).

13) NGFIA

NGFIA 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9950으로 나타나서 적

절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 NGF1A mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 188.6% ($p < 0.05$)로 많이 발현되었다 (Fig. 4.I).

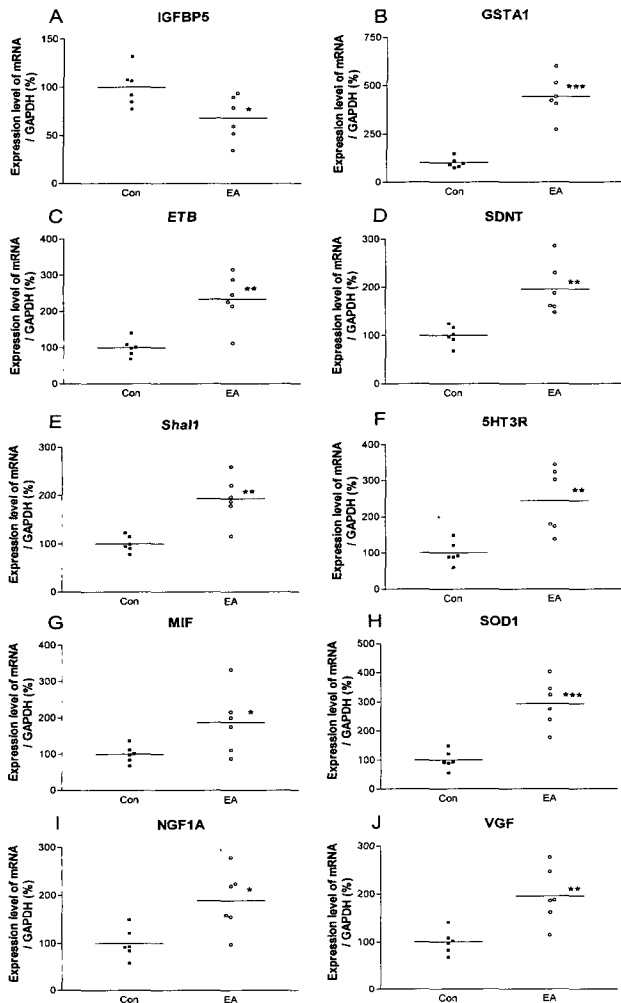


Fig. 4. Expression level of differentially expressed genes with statistical significance in real-time RT-PCR. The relative expression levels of mRNA were obtained according to standard curve and normalized with respective amount of GAPDH. Cross line indicates mean. A, IGFBP5; B, GSTA1; C, ETB; D, SDNT; E, Sha11; F, 5HT3R; G, MIF; H, SOD1; I, NGF1A; J, VGF. * : $p < 0.05$ vs control group, ** : $p < 0.01$ vs control group, *** : $p < 0.001$ vs control group

14) VP

VP 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9994로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 VP mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 131.4%로 많이 발현되었으나 유의성은 없었다 (그래프 생략).

15) SOM14

SOM14 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9998로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 SOM14 mRNA의 발현량은

대조군에 비하여 142.1%로 많이 발현되었으나 유의성은 없었다 (그래프 생략).

16) VGF

VGF 유전자에 대한 real-time PCR 결과 standard curve와 dissociation curve에서 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인할 수 있었으며 (그래프 생략) 농도별 Ct 값의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9955로 나타나서 적절한 것으로 인정되었다. 전침군에서의 VGF mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 195.3% ($p < 0.01$)로 많이 발현되었다 (Fig. 4.J).

6. 조직내 항산화효소 활성 평가

Genechip microarray와 real-time RT-PCR 결과 항산화에 관여하는 SOD1이나 GSTA1 유전자가 전침군에서 대조군에 비하여 유의하게 많이 발현된 데 대하여 확인하기 위해 hypothalamus, 간, 적혈구에서 실제 항산화효소의 활성을 평가하여 본 결과는 다음과 같다.

1) SOD 활성 측정

전침군과 대조군의 각 조직에서 SOD 효소의 활성을 측정, 비교하여 본 결과는 Fig. 5.A와 같다. 전침군의 hypothalamus (5.75 fold, $p < 0.05$), 간 (5.74 fold, $p < 0.05$), 적혈구 (3.36 fold, $p < 0.01$) 모두에서 SOD 활성은 대조군에 비하여 유의하게 높게 나타났다.

2) GPx 활성 측정

전침군과 대조군의 각 조직에서 GPx 효소의 활성을 측정, 비교하여 본 결과는 Fig. 5.B와 같다. 전침군의 hypothalamus와 간에서 GPx 활성은 다소 증가하는 것으로 나타났으나 통계적 유의성은 없었다.

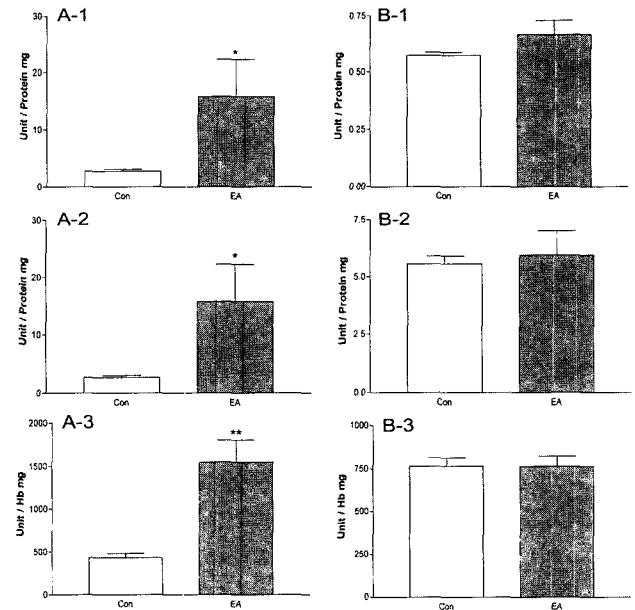


Fig. 5. Activity of SOD and GPx A, Activity of SOD: Hb, hemoglobin; SOD activity was determined by ability to inhibit cytochrome c from being reduced per protein mg (or Hb mg in RBC): A-1, SOD in hypothalamus; A-2, in liver; A-3, in RBC. B, Activity of GPx: GPx activity was determined by ability to remove 1umole NADPH/min per protein mg (or Hb mg in RBC): B-1, GPx in hypothalamus; B-2, in liver; B-3, in RBC * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ vs respective control group

고찰

刺鍼의 작용 원리는 臟腑에 絡屬된 經絡 위의 經穴을 자극함으로써 經絡과 臟腑의 氣血陰陽을 조절하여 불균형을 해소하며 神氣를 다스리는데 있다고 하였다^{2,3)}. 刺鍼의 효과에 있어서 중요한 요소는 질병의 위치를 파악하기 위한 辨證, 刺鍼의 強度와 深度를 결정하기 위한 환자와 기후환경 상태의 파악 및 氣至가 있다²⁾. 특히 刺鍼 자체의 효과에 결정적인 영향을 미치는 氣至는 刺鍼에 있어서 氣를 조절하는 것이 얼마나 중요한가를 보여주고 있다. 이러한 刺鍼의 원리는 특정부위인 經穴에 대한 침자극이 그 부위에 한정되지 않고 全身의이고 계통적인 작용과 치료효과를 가져오는 것을 설명하고 있으며 동양의학의 特長인 類機能體系를 반영하고 있다. 이러한 원리로 침요법은 단순히 통증을 치료하는 수단에 그치지 않고 많은 내상질환에도 응용되어져 왔으며 통증의 치료도 단순히 통증 자체를 제어하는 것이 아니라 통증의 원인이 된 氣血의 불균형을 해소함으로써 가능하게 하는 것으로 보고 있다. 이에 침요법의 효과와 기전을 현대과학의 척도로 연구하기 위한 많은 연구가 한국과 중국에서 오랫동안 이루어지고 있으며 서양에서도 수술 및 화학요법 후의 합병증, 중풍후유증, 두통, 생리통, 근막통증, 근섬유통, 요통, 천식 등에 대한 효과를 인정하고 많은 연구가 이루어지고 있다. 이제까지 실험적 연구를 통하여 보고된 침자극의 효과는 통증 억제와 면역 조절 두 가지로 크게 나누어 볼 수 있는데 통증 억제는 opioid peptide, 특히 met-enkephalin과 같은 proenkephalin계 opioid peptide에 의한 하행성 통각 조절을 통해서 이루어지는 것으로 추측되고 있으며^{4,5)}, 면역 조절의 기전은 interferon- γ 와 interleukin-2 분비의 증가 그리고 proopiomelanocortin계 opioid peptide인 β -endorphin의 분비 증가에 의한 NK cell 활성화의 증강에 의한 것으로 보고되고 있다^{6,7)}. 또 functional MRI 등을 이용한 많은 연구에서 침요법의 효과는 hypothalamus가 중요한 대뇌 중추로서 작용하는 것으로 알려져 있다⁸⁻¹⁰⁾. 이에 따라 침자극이 중추신경계 특히 hypothalamus에서의 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 이러한 연구의 어려움은 특정 병태 모델이 유발된 상태에서 침자극에 의한 치료 효과를 확인하고 유전자 발현을 확인하는 연구가 이루어져야 한다는 데 있다. 이와 같은 연구 방법은 병증 유발 혹은 치료효과를 확인하기 위한 평가를 거친 이후에 유전자의 발현을 평가하는 것이어서 그 과정에서 생기는 변화를 간과할 수 없으므로 순수하게 침자극이 중추신경계 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하는 데는 한계가 있다.

본 연구는 병태 유발이나 효과 확인과정의 처치와 같은 변수 없이 실험동물의 足三里 (ST36) 穴에 상응하는 부위에 전침자극을 부여한 후 바로 hypothalamus를 적출하여 유전자 발현 양상을 분석하여 봄으로써 순수하게 침자극이 중추신경계 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하여 보고자 하였다.

足三里 穴은 足陽明胃經의 合穴로서 調氣血, 補虛弱, 鎮痛止痛, 調理脾胃, 調中氣, 疏風化濕, 通調經絡氣血, 扶正培元, 祛邪防痺하는 효능을 지녔으며^{14,15)} 진통 및 면역과 관련된 기존 실험연

구에서 가장 많이 사용되고 있을 뿐 아니라 NK cell 활성화의 증강과 관련된 연구에서 사용된 바 있어 본 연구에서도 활용되었다. 단순한 침자극이 아닌 전침자극이 응용된 것은 3-5 V의 전압, 0.05 msec의 지속시간, 2 Hz의 저주파 등 객관적 자극을 부여하기 위한 것이었다. 이때 문제가 되는 침자극의 유효성 평가는 기존 연구를^{6,7)} 통하여 활성이 증가하는 것으로 알려진 비장의 NK cell 활성을 평가함으로써 침자극 효과 판단을 위한 일련의 실험 과정이 hypothalamus에 영향이 미치지 않도록 하는 한편 침자극이 NK cell의 활성을 증가시키는가 하는 것도 확인하여 보았다. 30분간 3회의 전침자극을 3일간 부여하고 전침군과 대조군의 NK cell 활성을 측정하였다. NK cell은 tumor cell이나 virus에 감염된 cell을 죽이는 기능을 지닌 면역세포로, 방사능이 지표된 tumor cell을 살해함으로써 유리된 방사능을 확인함으로써 그 활성을 평가한다. 본 연구에서는 ⁵¹Cr을 지표한 YAC-1을 사용하여 비장면역세포 당 YAC-1 살해 능력을 평가하였다. 그 결과 전침군에서 대조군에 비하여 43.4% 가량 유의성있게 높은 NK cell 활성을 나타냄으로써 전침자극이 NK cell 활성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었으며 전침자극의 유효성이 인정되었다. 대조군과 전침군의 실험동물 중 평균값에 가장 접근한 NK cell 활성을 나타낸 실험동물 hypothalamus의 total RNA가 genechip에 적용되었으며, 나머지 sample 중 NK cell 활성이 평균에서 표준편차를 제한 값 이상인 전침군 및 NK cell 활성이 평균에 표준편차를 더한 값 이하인 대조군 실험동물 hypothalamus의 total RNA가 real-time RT-PCR에 사용되었다.

본 실험에 사용된 genechip은 인위적으로 합성된 25 mer의 oligonucleotide 약 100만 copy를 probe로 사용하는 oligonucleotide chip 방식을 채택하고 있으며 각 유전자당 3' end에서 5' end에 이르기까지 5-20 종류의 probe를 사용하여 통계적으로 분석할 뿐 아니라 각 probe 마다 이와 유사한 mismatch probe를 배치함으로써 non-specific binding을 배제할 수 있는 algorithm을 구축하고 있다. RNA를 이용한 연구에서 어려운 점은 RNA 분자 구조 자체가 약해서 훼손되기 쉬워 뿐만 아니라 RNA 분해효소에 오염되기 쉬워서 full-length의 RNA를 보존하는 것이 어려우며 이를 완전하게 평가할 만한 방법도 없다는 점이다. 이는 각 유전자당 여러 개의 probe set를 적재하여 각 probe에 대한 hybridization 정도를 측정함으로써 통계적으로 평가하는 oligonucleotide chip 방식에서는 결과에 결정적인 영향을 미칠 수도 있다. Genechip 실험결과의 신뢰도를 확인하기 위해서 target cRNA의 평가와 hybridization 효율이 평가되었다. Target cRNA의 평가를 위해서 최초 분리된 total RNA의 상태, 합성된 cDNA와 cRNA 및 fragmented cRNA의 size 평가, internal control인 β -actin 및 GAPDH의 3' probe와 5' probe의 AD ratio를 평가하였다. RNA의 상태 평가를 위하여 기본적으로 실시되는 1% agarose gel 전기영동은 real-time RT-PCR에 사용된 total RNA까지 실시되었다. 모든 sample에서 광범위한 사이즈로 나타났으며 18s rRNA와 28s rRNA band의 윤곽이 뚜렷하고 28s rRNA의 band가 18s rRNA의 band보다 굵은 것으로 나타남으로써 훼손되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 합성된

cDNA와 cRNA의 size 분포가 4,000 bp까지 광범위하게 분포한 것으로 나타남으로써 full-length cRNA가 준비된 것을 확인할 수 있었다. 25 base 정도의 probe에 hybridization되기 적당하도록 조각을 낸 fragmented cRNA 역시 200 base 이하로 완전히 조각난 것이 확인되었다. β -actin 및 GAPDH의 3' oligo와 5' oligo의 AD ratio는 제조사가 권장하는 cut-off range인 3 미만으로 나타남으로써 target cRNA의 준비는 완전한 것으로 인정되었다.

Hybridization 효율은 genechip scanning image에서 인위적으로 첨가된 negative, positive control이 만드는 image를 확인하고 spike control의 AD ratio를 확인함으로써 평가하였다. Genechip scanning image에서 positive control이 만드는 image인 외곽의 하얀 점으로 이루어진 사각형 경계선과 정중앙의 흰색 십자가 문양과 위쪽의 "GeneChip Rat Neuro" 글씨는 모두 선명한 표식을 확인할 수 있다. Negative control이 만드는 image인 정중앙에서 약간 위 왼쪽에 존재하는 그물모양의 검은색 선들은 모두 선명하게 확인할 수 있다. 전침군의 spike control은 대조군과 비교하였을 때 일정한 ratio를 나타냄으로써 hybridization 효율은 적절한 것으로 인정되었다. 이러한 target cRNA와 hybridization 효율의 평가에서 적절한 결과가 나오므로써 genechip 결과의 신뢰도는 충분한 것으로 나타났다. Genechip 결과 발현량이 유의한 차이를 보인 유전자 중 15가지 중요한 유전자에 대하여 real-time RT-PCR 한 결과의 신뢰도는 calibrator cDNA가 작성한 standard curve의 선형회귀분석 결과, dissociation curve를 이용한 primer dimer 및 non-specific PCR product 존재 여부를 확인함으로써 평가하였다. Internal control로 사용된 GAPDH를 포함한 16종 유전자의 standard curve 작성에 사용된 data의 선형회귀 분석결과는 모두 R2가 0.99 이상으로 나타나서 신뢰도가 인정되었으며 dissociation curve에서는 모두 하나의 peak가 확인되었고 결과는 생략되었으나 임의로 선택된 PCR product의 agarose gel 전기영동 결과 모든 sample에서 specific band가 확인되어서 real-time RT-PCR 결과의 신뢰도는 충분한 것으로 나타났다. 전침군과 대조군의 target cRNA를 genechip에 hybridization한 결과 전침군에서 대조군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 21종으로 2종의 유전자가 발현이 감소하고, 19종의 유전자가 발현이 증가하였다.

전침군에서 대조군에 비하여 발현이 감소한 유전자를 살펴보면 IGFBP5 유전자는 61.5%가 감소하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 31.8%가 유의하게 감소한 것으로 나타났다. IGFBP는 insulin-like growth factor (IGF)에 결합하여 IGF가 기능을 수행하도록 하는 한편, IGF에 의존하지 않고 그 자체로도 세포 성장을 조절하는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다^{16,17}. IGF나 IGF receptor의 발현량이 변화하지는 않았으나 IGFBP5의 발현량이 감소한 것은 전침자극이 IGFBP5 의존 세포성장을 다소 억제시킬 가능성이 있는 것으로 볼 수 있을 것이다. GRHR 유전자는 44.5%가 감소하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 38.6% 감소한 것으로 나타났으나 유의성은 없었다. GRHR는 G-protein coupled receptor family 중 하나로서 pituitary gonadotrope에서 gonadotropin-releasing hormone (GRH)과 결합하여 GRH가 성

선 호르몬인 gonadotropin의 합성과 분비를 자극하도록 하여 생식 기능을 수행하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{18,19}.

전침군에서 대조군에 비하여 발현이 증가한 유전자를 살펴보면 GSTA1 유전자는 8.1 배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 443.6%로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. GSTA1은 glutathione (GSH)이 소수성 화합물과 결합하게 함으로써 외부 독성물질 및 생체 과산화물을 제거하게 하는 촉매작용을 하는 효소이다^{20,22}. GSTA1 유전자 발현이 전침군에서 증가한 것은 전침자극에 의하여 생체 독성물질 및 노폐물 제거를 촉진시키는 것으로 볼 수 있겠다. SYN1 유전자는 4.9 배로 증가한 것으로 나타났다. SYN1은 정상 생리상태의 기능은 구체적으로 밝혀지지 않았으나 membrane stability에 관여하는 cytoskeleton protein으로서의 기능을 수행할 것으로 추정되고 있다²³. PSC8 유전자는 4.8 배로 증가한 것으로 나타났다. PSC8은 단백질 분해효소로서 stress response에서 비정상적 단백질을 제거하고 면역반응에서 antigen peptide를 합성하는 기능을 수행한다²⁴. PSC8 유전자 발현이 전침군에서 증가한 것은 전침자극에 의하여 생체 비정상 단백질의 제거나 면역반응을 촉진시키는 것으로 볼 수 있을 것이다. ETB 유전자는 3.7배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 233.6%로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. ETB는 transmembrane G-protein coupled receptor로서 endothelium이 혈관 이완 또는 수축을 조절하는데 있어서 중요한 부분을 담당하는 것으로 알려져 있다²⁵. 이러한 endothelium에 의한 혈관의 조절은 수축보다는 이완에 더 큰 비중이 있는 것으로 전침자극이 혈관을 이완시켜서 혈류량을 증가시키는 것으로 볼 수 있을 것이다. PFRIC 유전자는 3.6 배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 145.6%로 많이 발현된 것으로 나타났으나 유의성은 없었다. PFRIC는 voltage-gated sodium and calcium channel으로 추정되는 cation channel이다²⁶. SDNT 유전자는 3.1 배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 195.3%로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. SDNT는 plasma membrane에 존재하면서 Na⁺에 의존해서, 주로 흥분성 neurotransmitter를 능동적으로 uptake하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다²⁷. Shal1 유전자는 3.0배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 193.0%로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. Shal1은 action potential을 형성하고 신경흥분 및 유연성을 조절하는 K⁺ channel group 중 신속하게 inactivation되는 transient group에 속한다^{28,29}. SCYD1 유전자는 2.9배로 증가하였다. SCYD1은 neuron과 신경계에서 대식작용을 하는 microglia 간의 cellular communication에 관여하는 것으로 알려져 있다³⁰. 5HT3RS 유전자는 2.8 배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 243.6%로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 5HT3RS는 다양한 second messenger signaling system을 활성화하고 이를 통한 간접적 혹은 직접적으로 ion channel의 기능을 조절함으로써 신속한 흥분성 반응을 유발하게 하는 serotonin (5-HT) receptor의 일종으로³¹, nerve growth factor (NGF)에 의하여 발현이 증가한다³². 전침군에서 5HT3RS 유전자의 발현이 증가한 것은 흥분성 신호 전달의 증가 및 NGF 증가의 간접적 증거라 볼 수 있다. MAG 유전자는 2.6 배로 증가

하였다. MAG는 neurite outgrowth를 제한하는 것으로 추정되고 있다³³. MIF 유전자는 2.6 배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 186.9%로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. MIF는 선천 면역체계에 있어서 중요한 매개체로서 만성염증과 자가면역 질환에서 숙주 방어에 있어서 중요한 작용을 하며 glucocorticoid의 항염증과 면역억제 작용의 평형을 유지하는 기능을 지닌 것으로 알려져 왔다^{34,35}. 최근 연구결과에 따르면 MIF는 neuronal cell의 증식 및 산화억제에 관여하는 것으로 나타났으며^{36,37} 세포 내 dopamine cytotoxicity에 대한 강력한 방어기제를 보이는 것으로 밝혀졌다³⁸. 전침자극에 의하여 MIF 유전자의 발현이 증가한 것은 흥분성 신호의 증가에 따른 cytotoxicity 및 세포의 산화를 억제하는 것으로 볼 수 있을 것이다. SOD1 유전자는 2.5 배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 293.6%로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. SOD1은 호흡이나 대사 및 산화 반응의 과정에서 필수적으로 생겨나는 superoxide를 molecular oxygen이나 hydrogen peroxide의 형태로 dismutation시킴으로써 oxygen-mediated free radicals의 축적으로 인한 세포 손상을 방지하는 촉매 역할을 담당하는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)의³⁹⁻⁴¹ 세 가지 isoform 중의 하나인데 대부분의 eukaryotic organism에서는 일반적으로 Cu와 Zn 모두에 결합하는 SOD1을 이용한다⁴². 전침자극에 의하여 SOD1 유전자의 발현이 증가한 것은 대사에 따른 세포 산화물의 제거를 촉진하는 것으로 볼 수 있다. GRIP2 유전자는 2.4 배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 132.9%로 많이 발현된 것으로 나타났으나 유의성은 없었다. GRIP2는 postsynaptic density/discs large/zona occludens-1 (PDZ) domain들을 지니며 glutamate receptor와 interaction하는 protein의 일종으로서 유사한 sequence를 지닌 GRIP1과 같이 glutamate receptor, 특히 AMPA receptor의 targeting과 localization에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 추정되며 특히 GRIP2는 synapse formation에 특이적으로 관여하는 것으로 알려져 있다⁴³. NGFIA 유전자는 2.0 배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 188.6%로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. NGFIA는 early growth response 1 (Egr-1) 이라 불리기도 하는 세 개의 zinc finger motif를 지닌 DNA-binding protein으로 growth factor, cytokine, cellular stress 등의 인자 특히 NGF에 의하여 신속하고 일시적으로 분비되며 세포의 성장 혹은 분화에 핵심 조절인자로 추정되고 있다^{44,45}. 전침자극에 의하여 NGFIA 유전자의 발현이 증가한 것으로 NGF에 의한 신경세포 성장 및 분화가 이루어지고 있음을 간접적으로 유추할 수 있다. VP 유전자는 1.9 배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 131.4%로 많이 발현된 것으로 나타났으나 유의성은 없었다. VP는 신장에서 항이뇨 작용을 보이고 말초에서는 혈관 수축을 유발하는 뇌하수체 후엽 호르몬이다⁴⁶. MAP1A 유전자는 1.9 배로 증가하였다. MAP1A는 neuronal cytoskeleton을 안정화하는 기능을 지닌 것으로 추정되고 있다⁴⁷. SOM14 유전자는 1.8 배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 142.1%로 많이 발현된 것으로 나타났으나 유의성은 없었다. SOM14는 뇌하수체 growth hormone인

somatotropin의 분비를 저하하고 췌장에서 glucagon과 insulin의 분비를 억제하는 somatostatin 호르몬의 일종이다⁴⁸. NSC 유전자는 1.8배로 증가하였다. NSC는 brain에 전체적으로 존재하나 cerebral cortex에 많이 존재하는 단백질로서 특별한 기능은 아직 밝혀진 바가 없다⁴⁹. VGF 유전자는 1.6배로 증가하였고 real-time RT-PCR 결과에서도 195.3%로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. NGF에 의해 신속하게 생성이 유발되는 VGF의 작용은 주로 NGF와 같은 neurotrophin이 MAP kinase pathway 혹은 다른 기전을 통하여 신경세포의 neuronal differentiation을 유발하는데 중요한 역할을 할 뿐 아니라 대사를 조절하여 에너지 balance 조절의 기능을 지닌 것으로 알려져 있다⁵⁰. 전침군에서 VGF 유전자의 발현이 증가한 것은 NGF에 의한 신경세포 성장 및 분화가 이루어지고 있으며 energy balance를 조절하는 것을 보여 준다.

Genechip 결과에서 다르게 발현한 것으로 나타난 유전자들을 european molecular biology laboratory (EMBL) 산하 EBI의 whole genome 및 proteome analysis를 위한 database인 InterPro에 의거해서 중복 분류하여 살펴보면 binding protein이 IGFBP5, ETB, 5HT3RS, MAG, MAP1A 등 5종, signaling pathway 관련 protein이 GRHR, ETB, 5HT3RS, GRIP2 등 4종, transporter protein이 PFRIC, SDNT, Shal1 등 3종, signal transducer가 SCYD1, VP, SOM14 등 3종, membrane protein이 SDNT, MAG 등 2종, metabolic protein이 PSC8, VGF 등 2종, enzyme이 GSTA1, SOD1 등 2종, transcription factor가 NGF1A 1종, 기능이 아직 확실히 밝혀지지 않은 단백질이 SYN1, NSC 등 2종이었다. 이상의 유전자 발현양상을 개략하여 도식화하여 보면 Fig. 6과 같다.

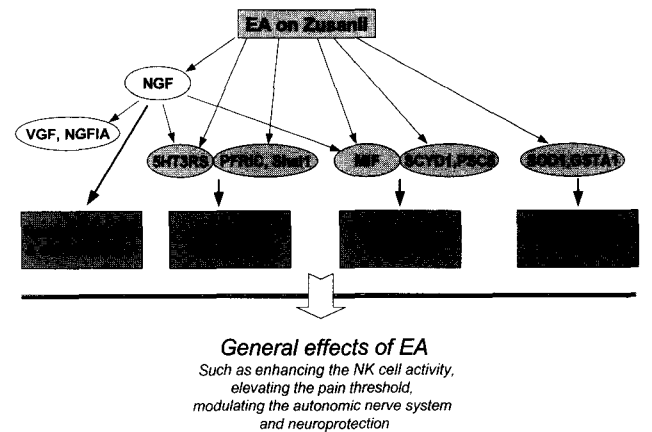


Fig. 6. Schematic diagram of regulating the expression of genes in hypothalamus by EA stimulation on Zusanli

Genechip과 real-time RT-PCR을 통하여 hypothalamus의 유전자 발현 양상을 확인하여 본 결과 특히 GSTA1과 SOD1 등 항산화에 관여하는 유전자가 전침군에서 많이 발현된 것으로 나타났다. 항산화는 일반적인 생체 대사 과정 전 범위 혹은 nitric oxide와 ozone을 포함한 대기오염물질, 항생제, 발암물질, 자외선, 방사선 에너지 흡수, 중금속, 일부 살충제 성분과 같은 환경

독소 등의 외적 요인으로 형성되는, 하나 혹은 그 이상의 짝을 이루지 못한 전자를 갖고 있는 원자 혹은 분자인 free radical⁵¹⁾, 즉 reactive oxygen species의 축적을 막기 위한 방어기제이다. 이러한 free radical의 축적은 핵산, 지질, 단백질 등과 같은 여러 생체내 화합물들과 반응하여 손상을 일으키며 이로써 심각한 대사 기능 이상 및 동맥경화, 폐기종, 당뇨병, 백내장, 암을 포함하여 노화와 관련된 여러 질환의 원인이 된다⁵²⁾.

인체의 대표적인 항산화효소는 SOD와 GPx가 있는데 SOD는 반응성이 큰 superoxide anion(O₂⁻)을 O₂와 반응성이 그보다 낮은 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 전환시키는 반응에서 촉매 작용을 하는 항산화효소이며 SOD에 의해 전환되어 형성된 hydrogen peroxide는 GPx에 의해 제거될 수 있게 된다⁵³⁾. 이에 실제로 전침자극이 조직에서 항산화효소의 활성을 증가시키는지 확인하여 보고자 hypothalamus, 간, 적혈구에서 SOD, GPx 등 항산화효소의 활성을 측정하여 보았다. 그 결과 전침군의 SOD의 활성은 hypothalamus, 간, 적혈구 모두에서 대조군에 비하여 유의성있게 높게 나타났으나 GPx 활성은 hypothalamus와 간에서만 다소 증가하는 것으로 나타났을 뿐 통계적 유의성은 없었다. 이와 같은 결과는 전침자극이 hypothalamus의 SOD 유전자 발현을 증가시킬 뿐 아니라 인체 각 조직의 SOD 활성을 증가시키는 것을 말하며 GPx의 활성이 큰 변화를 보이지 않은 것은 SOD의 작용에 의하여 발생한 hydrogen peroxide의 양이 아직 많지 않아 GPx 활성화가 충분히 일어나지 않은 것으로 보아야 하겠다.

이상의 genechip 및 real-time RT-PCR을 통한 hypothalamus 유전자 발현량 측정 및 조직 항산화효소 활성 측정 결과를 종합하여 보면 전침자극은 IGFBP5에 의한 신경세포 성장 및 분화는 감소하였으나 5HT3RS, MIF, NGFIA, VGF 등의 발현이 증가한 것으로 볼 때 신경세포의 성장 및 분화를 촉진시키는 것으로 유추할 수 있다. 또 5HT3RS, PFRIC, Shal1 등을 증가시켜서 신호전달을 촉진시키고 ETB를 증가시켜서 혈류량을 증가시키는 동시에 MIF, SOD1, PSC8, GSTA1을 증가시켜서 흥분성 신호의 증가에 따른 대사산물에 의한 cytotoxicity를 제어하는 것을 알 수 있다. 이는 침자극이 氣血의 흐름을 촉진시키는 것으로 추론이 가능하며, 특히 대사산물의 축적은 韓醫學에서 瘀血이나 痰飲에 해당하므로 항산화효소의 발현량과 활성이 증가한 사실은 침자극이 氣血의 흐름을 조절하여 瘀血과 痰飲을 제거를 활성화하는 것으로 볼 수 있다. 전침자극이 NK cell 활성을 증가시키고 SCYD1, PSC8, MIF 등 면역 관련 물질이 증가한 것은 인체를 방어하는 衛氣의 활동을 강화시키는 것으로 생각된다.

결 론

실험동물에 전침자극을 부여하고 NK cell 활성을 확인한 후 hypothalamus의 유전자 발현 양상을 분석하고 조직의 항산화효소 활성을 평가한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

전침자극은 NK cell 활성을 유의성있게 증강시켰다. 전침자극은 hypothalamus에서 신경세포 성장과 분화 시 증가하는 5HT3RS, MIF, NGFIA, VGF 유전자의 발현을 증가시켰다. 전침

자극은 hypothalamus에서 신호전달을 촉진시키는 5HT3RS, PFRIC, Shal1 유전자를 증가시켰다. 전침자극은 hypothalamus에서 혈관을 이완시키는 ETB 유전자의 발현을 증가를 증가시켰다. 전침자극은 hypothalamus에서 면역과 관련된 SCYD1, PSC8, MIF 유전자의 발현을 증가시켰다. 전침자극은 hypothalamus에서 대사산물에 의한 세포 손상을 막는 MIF, SOD1, PSC8, GSTA1 유전자의 발현을 증가시켰다. 전침자극은 hypothalamus, 간, 적혈구 등의 조직에서 SOD의 활성을 증가시켰다.

이상으로 볼 때 침자극은 신호전달과 신경세포의 성장 분화를 촉진시키고 혈관을 이완함으로써 氣血의 흐름을 촉진시켜서 어혈과 담음을 제거하고 면역 활성을 증강시켜서 衛氣의 기능을 강화한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 기초과학연구사업의 지원에 의한 것임 (R01-2000-000-00170-0).

참고문헌

1. 洪元植, 中國醫學史, p.15, 一中社, 서울, 2000.
2. 楊維傑, 黃帝內經靈樞譯解, p.10, 66, 543, 成輔社, 서울, 1980.
3. 楊維傑, 黃帝內經素問譯解, p.219, 成輔社, 서울, 1980.
4. Mansour, A, Watson, S. J., Akil, H. Opioid receptors: past, present and future. Trends Neurosci. 18(2):69-70, 1995.
5. Takeshige, C., Mera, H., Hisamitsu, T., Tanaka, M. and Hishida, F. Inhibition of the analgesia inhibitory system by D-phenylalanine and proglumide. Brain Res. Bull. 26(3):385-91, 1991.
6. Yu, Y., Kasahara, T., Sato, T., Asano, K., Yu, G., Fang, J., Guo, S., Sahara, M. and Hisamitsu, T. Role of endogenous interferon-gamma on the enhancement of splenic NK cell activity by electroacupuncture stimulation in mice. J. Neuroimmunol. 90(2):176-86, 1998.
7. Yu, Y., Kasahara, T., Sato, T., Guo, S. Y., Liu, Y., Asano, K., Hisamitsu, T. Enhancement of splenic interferon-gamma, interleukin-2, and NK cytotoxicity by S36 acupoint acupuncture in F344 rats. Jpn J. Physiol. 47(2):173-8, 1997.
8. Dafny, N., Dong, W. Q., Prieto-Gomez, C., Reyes-Vazquez, C., Stanford, J., Qiao J. T. Lateral hypothalamus: site involved in pain modulation. Neuroscience 70(2):449-60, 1996.
9. Vidal, C. and Jacob, J. The effect of medial hypothalamus lesions on pain control. Brain Res. 199(1):89-100, 1980.
10. Gollub, R. L., Hui, K. K. and Stefano, G. B. Acupuncture: pain management coupled to immune stimulation. Zhongguo Yao Li Xue Bao 20(9):769-77, 1999.
11. 全國韓醫科大學校, 鍼灸經穴學教室 : 鍼灸學(上), pp. 382-3, 集文堂, 서울, 1988.

12. Flohe, L., Becker, R., Brigelius, R., Lengfelder, E. and Otting, F. Convenient assay for superoxide dismutase. CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. CRC Press (3):287-8, 1988.
13. Flohe, L., Gunzler, W. A. and Schock, H. H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. FEBS Lett. 32(1):132-4, 1973.
14. 金庚植, 李任根, 鍼灸配穴辭典, pp.141-3, 一中社, 서울, 1991.
15. 上海中醫學院, 鍼灸學辭典, pp.51-2, 上海科技出版社, 上海, 1984.
16. Jones, J. I., Gockerman, A., Busby, W. H. Jr., Camacho-Hubner, C. and Clemmons, D. R. Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. J. Cell Biol. 121(3):679-87, 1993.
17. Kuemmerle, J. F., Zhou, H. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates growth and IGF-I secretion in human intestinal smooth muscle by Ras-dependent activation of p38 MAP kinase and Erk1/2 pathways. J. Biol. Chem. 277(23):20563-71, 2002.
18. Castro-Fernandez, C. and Conn, P. M. Regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) by RGS proteins: role of the GnRHR carboxyl-terminus. Mol. Cell Endocrinol. 191(2):149-56, 2002.
19. Cheng, C. K., Yeung, C. M., Hoo, R. L., Chow, B. K. and Leung, P. C. Oct-1 is involved in the transcriptional repression of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene. Endocrinology 143(12):4693-701, 2002.
20. Dixon, D. P., Laphorn, A., Edwards, R. Plant glutathione transferases. Genome Biol. 3(3):Reviews3004, 2002.
21. Hayes, J. D. and Pulford, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 30(6):445-600, 1995.
22. Mannervik, B. The isoenzymes of glutathione transferase. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 57:357-417, 1985.
23. George, J. M. The synucleins. Genome Biol. 3(1): Reviews 3002, 2002.
24. Hilt, W. and Wolf, D. H. Proteasomes: destruction as a programme. Trends Biochem. Sci. 21(3):96-102, 1996.
25. Watson, S. and Arkinstall, S. Endothelin. In: The G-protein linked receptor factsbook. pp.111-6, Academic Press, London, 1994.
26. Lee, J. H., Cribbs, L. L. and Perez-Reyes, E. Cloning of a novel four repeat protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. FEBS Lett. 445(2-3):231-6, 1999.
27. Farmer, M. K., Robbins, M. J., Medhurst, A. D., Campbell, D. A., Ellington, K., Duckworth, M., Brown, A. M., Middlemiss, D. N., Price, G. W. and Pangalos, M. N. Cloning and characterization of human NTT5 and v7-3: two orphan transporters of the Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporter gene family. Genomics 70(2):241-52, 2000.
28. Baldwin, T. J., Tsaur, M. L., Lopez, G. A., Jan, Y. N. and Jan, L. Y. Characterization of a mammalian cDNA for an inactivating voltage-sensitive K⁺ channel. Neuron 7(3):471-83, 1991.
29. Kopysova, I. L. and Debanne, D. Critical role of axonal A-type K⁺ channels and axonal geometry in the gating of action potential propagation along CA3 pyramidal cell axons: a simulation study. J. Neurosci. 18(18):7436-51, 1998.
30. Harrison, J. K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R. K., Streit, W. J., Salafranca, M. N., Adhikari, S. and Thompson, D. A. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95(18):10896-901, 1998.
31. Maricq, A. V., Peterson, A. S., Brake, A. J., Myers, R. M. and Julius, D. Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. Science 254(5030):432-7, 1991.
32. Isenberg, K. E., Ukhun, I. A., Holstad, S. G., Jafri, S., Uchida, U., Zorumski, C. F. and Yang, J. Partial cDNA cloning and NGF regulation of a rat 5-HT3 receptor subunit. Neuroreport. 5(2):121-4, 1993.
33. Niederost, B., Oertle, T., Fritsche, J., McKinney, R. A. and Bandtlow, C. E. Nogo-A and Myelin-Associated Glycoprotein Mediate Neurite Growth Inhibition by Antagonistic Regulation of RhoA and Rac1. J. Neurosci. 22(23):10368-76, 2002.
34. Roger, T., Glauser, M. P. and Calandra, T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. J. Endotoxin Res. 7(6):456-60, 2001.
35. Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T., Bernhagen, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. Microbes Infect. 4(4):449-60, 2002.
36. Fujimoto, S. Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in rat spinal cord and its kinetics on experimental spinal cord injury. Hokkaido Igaku Zasshi 72(4):409-30, 1997.
37. Kim, H. The effect of Moutan Cortex Radicis on gene expression profile of differentiated PC12 cells oxidative-stressed with hydrogen peroxide. Kyunghee, Seoul, 2002.
38. Weingarten, P. and Zhou, Q. Y. Protection of intracellular dopamine cytotoxicity by dopamine disposition and metabolism factors. J. Neurochem. 77(3):776-85, 2001.
39. Schinina, M. E., Barra, D., Bossa, F., Calabrese, L.,

- Montesano, L., Carri, M. T., Mariottini, P., Amaldi, F. and Rotilio, G. Primary structure from amino acid and cDNA sequences of two Cu,Zn superoxide dismutase variants from *Xenopus laevis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 272(2):507-15, 1989.
40. Parge, H. E., Hallewell, R. A. and Tainer, J. A. Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu,Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89(13):6109-13, 1992.
41. Schinina, M. E., Barra, D., Simmaco, M., Bossa, F. and Rotilio, G. Primary structure of porcine Cu,Zn superoxide dismutase. *FEBS Lett.* 186(2):267-70, 1985.
42. Van Camp, W., Bowler, C., Villarroel, R., Tsang, E. W., Van Montagu, M. and Inze, D. Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87(24):9903-7, 1990.
43. Dong, H., Zhang, P., Song, I., Petralia, R. S., Liao, D. and Huganir, R. L. Characterization of the glutamate receptor-interacting proteins GRIP1 and GRIP2. *J. Neurosci.* 19(16):6930-41, 1999.
44. Cao, X. M., Guy, G. R., Sukhatme, V. P. and Tan, Y. H. Regulation of the Egr-1 gene by tumor necrosis factor and interferons in primary human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 267(2):1345-9, 1992.
45. Gashler, A. and Sukhatme, V. P. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 50:191-224, 1995.
46. Acher, R., Chauvet, J. Structure, processing and evolution of the neurohypophysial hormone-neurophysin precursors. *Biochimie* 70(9):1197-207, 1988.
47. Noiges, R., Eichinger, R., Kutschera, W., Fischer, I., Nemeth, Z., Wiche, G., Propst, F. Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J. Neurosci.* 22(6):2106-14, 2002.
48. de Lecea, L., Criado, J. R., Prospero-Garcia, O., Gautvik, K. M., Schweitzer, P., Danielson, P. E., Dunlop, C. L., Siggins, G. R., Henriksen, S. J. and Sutcliffe, J. G. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381(6579):242-5, 1996.
49. Coulter, P. M. 2nd, Bautista, E. A., Margulies, J. E. and Watson, J. B. Identification of cortexin: a novel, neuron-specific, 82-residue membrane protein enriched in rodent cerebral cortex. *J. Neurochem.* 61(2):756-9, 1993.
50. Salton, S. R., Ferri, G. L., Hahn, S., Snyder, S. E., Wilson, A. J., Possenti, R., Levi, A. VGF: a novel role for this neuronal and neuroendocrine polypeptide in the regulation of energy balance. *Front. Neuroendocrinol.* 21(3):199-219, 2000.
51. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.* 8(2):89-193, 1985.
52. Wojtaszek, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322(Pt 3):681-92, 1997.
53. Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64:97-112, 1995.