원 저

Glioblastoma 세포주의 유해산소 손상을 억제하는 곽향정기산 약침액의 효과에 대한 마이크로어레이 연구

이홍석[1] · 인창식[2] · 고형균[1]*

[1]경희대학교 한의과대학 침구학교실
[2]포천중문의과대학 차바이오메디컬센터 침구과

Protective Effect of Gwakhyangjeonggisan Herbal Acupuncture Solution in Glioblastoma Cells: Microarray Analysis of Gene Expression

Hong-Seok Lee[1] · Chang-Shik Yin[2] · Hyeong-Gyun Koh[1]*

[1]Dept. of Acupuncture, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University; [2]Dept. of Acupuncture, CHA Biomedical Center, College of Medicine, Pochon CHA University

Abstract

Objectives : Neurological disorders have been one of main therapeutic targets of acupuncture. The present study investigated the protective effects of Gwakhyangjeonggisan herbal acupuncture solution (GHAS).

Methods : We performed 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in glioblastoma cells, and did microarray analysis with cells exposed to reactive oxigen species (ROS) of hydrogen peroxide by 8.0 k Human cDNA, with cut-off level of 2-fold changes in gene expression.

Results : MTT assay showed protective effect of GHAS on the glioblastoma cells exposed to hydrogen peroxide. When glioblastoma cells were exposed to hydrogen peroxide, 24 genes were downregulated. When the cells were pretreated with GHAS before exposure to hydrogen peroxide, 46 genes were downregulated. Many of the genes downregulated by hydrogen peroxide stimulation were decreased in the amount of downregulation or reversed to upregulation.

Conclusions : The gene expression changes observed in the present study are supposed to be related to the protective molecular mechanism of GHAS in the glioblastoma cells exposed to ROS stress.

Key words : *Gwakhyangjeonggisan herbal acupuncture solution (GHAS), Glioblastoma, Reactive oxigen species, Microarray, Gene expression*

Ⅰ. 서 론

약침요법은 최근 그 임상적 적용 범위가 더욱 넓어지고 있으며 여러 한약물의 약침제제가 적극적으로 연구되고 있다. 곽향정기산은 본래 '傷寒陰證如不分表裏證'에 사용하는 처방으로 먼저 '導引經絡' 함으로써 '不致變動' 하게 하는 용도로 사용하게 되는데[1], 중풍 초기에도 이와 같은 맥락에서 먼저 調氣하여 變證이 생기지 않도록 經絡을 導引하려는 목적으로 많이 응용되고 있다. 곽향정기산과 관련하여 기존에는 위장관기능 및 알레르기와 관련한 보고[2], 위장관기능에 관한 실험연구[3], 위장관 기능과 관련한 소음인방과의 비교연구[4], 가미방

※ 교신저자 : 고형균, 서울 동대문구 회기동 1번지
경희대학교 한방병원 침구과
(Tel : 02-958-9194 E-mail: koh5795@chollian.net)

의 비만관련 연구[5] 등이 보고된 바 있다.

수퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical, O_2^-.) 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical, HO.), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 일중항산소(singlet oxygen, $^1O_2$)와 같은 활성산소(reactive oxygen)는 생체에 산소독성을 일으킬 수 있다. 이들 유해산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 호흡기질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다[6,7].

신경계의 병증은 평균수명의 증가와 함께 그 발병이 더욱 증가하고 있으며 또한 회복된 후에도 비가역적 신경학적 결손을 남기는 경우가 많아 환자 본인뿐만 아니라 가족에게도 경제적으로 부담을 주고 있다. 중풍을 비롯한 만성 신경병증의 한방치료에 대한 기대가 점차 높아지고 있으며 효과적인 중풍치료법의 개발은 사회적으로 많은 관심의 대상이 되고 있고 특히 현재 한방병원 입원환자의 거의 대부분을 차지하고 있다[8]. 최근의 연구에 의하면 유해산소 손상이 신경계의 병증의 중요한 원인의 하나로 제시되고 있다[9].

Glial cell 중 astroglia는 뇌에 감염과 손상 등이 발생했을 때 조직의 생리적 평형을 유지시키는 데에 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 glial cell line은 뇌질환에 있어서의 세포손상 모델에 대한 실험연구에 많이 채용된다[10].

최근에는 유전자 발현에 관한 정보를 연구하는 방법으로서 기존의 개별 유전자 발현을 몇몇씩 관찰하던 방법에 비해 microarray를 이용함으로써 대량의 유전자 발현 정보를 한꺼번에 평가하는 방법이 시도되고 있다[11].

이에 저자는 중풍 초기의 기본적인 투약으로 導引經絡하기 위해 사용되어 온 곽향정기산에 대해 약침액으로서 신경계 손상에서의 활용가능성을 살펴보고 응용범위를 넓히기 위해 곽향정기산 약침액(Gwakhyangjeonggisan herbal acupuncture solution, 이하 GHAS로 약칭)을 처리하였을 때 유해산소 환경에 노출된 glial cell에 대한 보호효과를 확인하고 그 때의 유전자발현의 변화를 관찰하고자 하였다. 특히 microarray를 통해 대량의 유전자 발현 정보를 한꺼번에 획득하여 관찰함으로써 GHAS의 glial cell 보호효과를 분자생물학적으로 이해하는 데에 유용한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험 방법

1. 시약 및 재료

1) 藿香正氣散 藥鍼液

GHAS는 藿香正氣散 처방인 藿香, 紫蘇葉, 白芷, 大腹皮, 白茯苓, 厚朴, 白朮, 陳皮, 半夏, 桔梗, 甘草, 生薑, 大棗 등의 약재를 원방의 비율대로(Table 1)[5] 전탕하고 증류냉각액을 모아 1차로 0.45 um 여과막, 2차로 0.1 um 여과막으로 여과시킨 후 pH 7로 조절하여 고압멸균 후 사용하였다.

구체적으로 實驗에 사용한 藿香正氣散 藥鍼液은 藿香正氣散 360g을 取해 粗末하여 圓底 flask에 넣고, 蒸溜水 2,000㎖를 加한 後, 3時間 煎湯하여 抽出하고 濾過하였다. 濾液은 rotary evaporator로 減壓濃縮하고 濃縮液에 蒸溜水를 加하여 全量을 200㎖이 되도록 한 다음, 室溫까지 冷却하고 ethanol을 加하여 75% ethanol 溶液으로 되게 한 다음, 攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮한 濃縮液에 蒸溜水 100㎖를 加하고 溶解시킨 後, ethanol을 加하여 85% ethanol 溶液으로 되게 한 다음 攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮한

Table 1. Comparison and Dosage of Ingredients in *Gwakhyangjeonggisan*

Herb	Scientific Name	Dose(g)
藿香	Agastache rugosa	6
紫蘇葉	Perilla frutescens var. acuta Kudo	4
白芷	Angelica dahurica Bentham et Hooker	2
大腹皮	Areca cateche L.	2
白茯苓	Poria cocos (Schw.) Wolf	2
厚朴	Magnolia officinalis Rehder et Wilson	2
白朮	Atractylodes japonica Koidz.	2
陳皮	Citrus unshiu Markovich	2
半夏製	Pinellia ternata (Thunb.) Breitenbach	2
桔梗	Platycodon grandiflorum A. (Jacq) DC.	2
甘草炙	Glycyrrhiza glabra L.	2
生薑	Zingiber officinale Roscoe	4
大棗	Zizyphus jujuba Mill. var. inermis Rehder	4
Total amount		36

濃縮液에 蒸溜水 100㎖를 加하고 溶解시킨 後, ethanol을 加하여 95% ethanol 溶液으로 되게 한 다음 攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮하여 生成된 濃縮液에 生理食鹽水를 加하고 3% NaOH로 pH 6~7로 調節하여 全量이 1,000㎖가 되게 한 다음, 低溫에서 24時間 放置한 後 nuclepore filter (0.45㎛, 직경 25㎜, Millipore Corp, Pleasanton, California, USA)로 濾過하고 加壓滅菌하여 試料의 원액으로 使用하였다.

2) 세포주

본 실험에 사용한 세포주는 A172 Human glioblastoma cell line(ATCC #CRL-1620)이며, American Type Culture Collection(USA)에서 구입하였다.

3) 시약

배양액으로서 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin은 GibcoBRL(USA)에서, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Roche(Germany)에서 구입하였다.

RNA추출과 reverse transcription, microarray hybridization을 위한 RNAzol B는 Tel-Test(USA)를 사용하였다. Superscript II reverse transcriptase 등은 GibcoBRL(USA)에서 구입하였다. Microarray는 8170개의 Human gene의 cDNA로 구성된 GenePlorerTM TwinChipTM Human-8K(Digital-Genomics, Korea)를 사용했으며(full gene list, URL: http://digital-genomics.co.kr/BBS/View.html?B_id=kor_Gene_list&rowid=1305&Keyword=&searchOption=), hybridization cassette은 Telechem(USA)에서 구입하고 Cy3 혹은 Cy5 RT primer, dNTP mix, Superase-In RNase inhibitor, 3DNA capture reagent 등은 Genisphere(USA)를 사용하였다. 그 외 일반 시약은 Sigma(USA) 제품을 사용하였다.

2. 세포 배양

실험에 사용한 astroglial cell line은 DMEM 용액에 10% FBS를 첨가하여 배양하였다. 5% CO2, 95% 공기, 37℃ 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하고, 배양액은 3일마다 교환하였다.

3. MTT 시험

GHAS을 전처치하고 H_2O_2로 유해자극을 가했을 때 생존하는 세포의 수를 측정하기 위해 살아있는 세포의 mitochodrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 작용을 이용한 MTT 시험을 하였다. ELISA reader로 595 nm에서 측정한 흡광도(optical density)의 값은 살아있는 세포의 수를 반영하며 세포 독성의 판정은 다음의 산출식에 따라 % viability로 나타냈다.

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

먼저 glial cell을 96 well plate(Corning, USA)에 well당 배양액 100 ul에 5×10^4개의 세포수가 되도록 serum free 배양액에 분주하고 검액으로서 증류수에 희석한 GHAS를 최종 농도가 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 및 1000 ug/ml이 되도록 전처치하여 12시간 incubation하고, vehicle을 처치하지 않은 세포군을 대조군으로 하였다. H_2O_2 100 uM로 유해산소 자극을 주어[12] 3시간 incubation하였다. 각 well에 MTT labeling reagent 용액을 10 ul씩 가하여 37℃, 5% CO2 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 solubilization solution을 각 well에 100ul씩 첨가하여 배양기에 20시간 유치시키고 ELISA reader(Bio-Tek, USA)로 690 nm를 참고치로 하여 595 nm에서 측정하 였다.

모든 실험값은 평균값 ± 표준편차(mean ± standard deviation)로 하고, 통계학적 분석은 SAS(Statistic Analysis System) program을 이용하였다. Student's t-test를 실시하여 각 군간의 통계학적 유의성을 검정하였다(α =0.05).

4. RNA 추출

배양된 세포에 유해산소 자극으로서 100 uM/ml H_2O_2를 3시간 처치하거나 혹은 대조군으로서 vehicle을 처치하고 RNA를 추출하였다. 아울러 독성시험을 통해 결정한 농도와 시간에 따라 처치군에는 GHAS를 처치하고 대조군에는 vehicle을 처치하여 12시간 경과 후 유해자극으로서 100uM/ml H_2O_2를 3시간 처치하여 RNA

를 추출하였다.

처치군과 대조군 각각에서 세포를 harvest하여 상청액을 제거하고 다시 세포를 suspension하였다. 세포 10^7개당 2ml의 RNAzol을 사용하여 lysis시키고 상온에서 10분간 방치하였다. 0.2 ml chloroform을 첨가하여 15초간 흔들어 잘 섞어준 후 5분간 상온에서 방치하였다. 4℃에서 12000g로 15분간 원심분리하고 상층액을 새로운 tube로 옮겨 동량의 isopropanol을 첨가하고 10분간 상온에서 방치하였다. 4℃에서 12000g로 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 80% 에탄올 1ml을 첨가하여 원심분리하였다. 에탄올을 제거하고 적당량의 DEPC-DDW를 첨가하여 total RNA를 준비하였다.

5. cDNA 준비

Microtube에 1~17 ul (10~20 ug)의 total RNA와 3 ul의 RT primer를 넣고 nuclease free water로 최종 20 ul가 되도록 섞었다. 80℃에서 10분간 incubation 후 얼음에 방치하였다. 이 혼합액에 Superase-In RNase inhibitor 1 ul를 첨가하였다. 별도의 tube에 5X Superscript II first strand buffer 8 ul, dNTP mix 2 ul, 0.1M DTT 4 ul, Superscript II enzyme 2 ul(400 units), RNase free water 3 ul를 혼합하였다. 이 enzyme 혼합액을 RNA가 포함된 상기의 혼합액과 잘 섞어 42℃에서 2시간 반응시켰다. 0.5M NaOH/50 mM EDTA 7ul를 첨가하여 반응을 중지시키고 65℃에 10분 유치시켜 DNA/RNA hybrids를 변성시켰다. 1 M Tris-HCl, pH 7.5를 10ul 첨가하여 반응을 중화시켰다. 실험군의 cDNA와 대조군의 cDNA 혼합액을 한 tube로 합치고 10 mM Tris, pH 8.0 16 ul로 실험군과 대조군 cDNA의 원래 tube를 세척한 후 실험군과 대조군 cDNA 혼합액에 넣어 총 130 ul가 되도록 하였다.

5 mg/ml linear acrylamide 3 ul를 상기한 혼합액에 넣고 5M NaCl 6 ul 첨가하고 95~100% EtOH 540 ul 넣고 섞어 -20℃에 30분 방치하였다가 10000g 이상으로 15분 원심분리하였다. 상층액을 덜어내고 cDNA pellet에 70% EtOH 300 ul 넣어 섞고 10000g 이상으로 5분 원심분리하여 상층액을 덜어내고 65℃에 10분~30분 방치해 pellet을 말렸다. Nuclease free water를 넣어 10 ul가 되게 하여 concentrated cDNA를 녹였다.

6. Microarray 시험 protocol

Microarray 시험은 다음의 세 단계로 진행하였다.

첫째, 유해산소 자극으로 발현 항진 또는 억제된 유전자의 관찰

둘째, 곽향정기산 약침액 전처치로 발현 항진 또는 억제된 유전자의 관찰

셋째, 곽향정기산 약침액 전처치시 유해산소 자극으로 발현이 항진 또는 억제되었던 유전자의 변화 관찰

7. Microarray Hybridization

2X formamide based buffer를 55℃ 10분간 가열을 반복하여 완전히 녹인 것 15 ul, dT blocker 2 ul, nuclease free water 3 ul를 섞고 여기에 위에서 준비한 concentrated cDNA 10 ul를 넣어 총 30 ul로 맞추었다. 이 혼합액을 75~80℃ 10분, 45~50℃ 15~20분간 incubation하고 pre-warmed(hybridization 온도에서) microarray에 뿌려 coverslip 덮고 overnight 반응시켰다.

Microarray slide를 55~65℃의 2X SSC, 0.2% SDS로 10~15분 세척하고 2X SSC로 상온에서 세척하고 0.2X SSC에 상온에서 10~15분 세척하고 상온에서 95% EtOH로 씻어 cDNA를 고정시켰다. Microarray slide를 뚜껑이 열린 튜브에 담아 800~1000 RPM으로 2분 원심분리하여 건조시켰다. Microarray 반응은 duplicate로 실시하여 평균값을 구하여 분석하였다.

8. Scanning and Data Analysis

Slide를 stage에 밀어 넣은 후 scan parameter를 기입하고 focus와 laser power를 조정한 후 red와 green의 파장에서 각각 scanning하고, ImaGene과 ScanAlyze를 이용하여 각각의 spot에 대한 data를 저장하였다.

Normalization 과정을 거친 후 대조군에 비해 2배 이상 발현이 항진되거나 1/2 이하로 발현이 저하된 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 하여[13] 유해산소 자극시, GHAS로 전처치한 후 유해산소 자극시의 유전자 발현 양상의 변화를 평가하고 종합하여 유해산소 자극시의 변화와 GHAS 전처치시 변화를 비교하였다.

Ⅲ. 결 과

1. MTT 시험

GHAS을 12시간 전처치하고 H_2O_2 100 uM로 3시간 동안 유해자극을 가했을 때의 세포 생존율을 MTT 시험으로 측정한 결과 vehicle을 처치했을 때의 생존율은 대조군에 비해 65.7±1.2%였으며, GHAS를 처치한 경우 곽향정기산의 농도가 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 및 1000 ug/ml일 때의 생존율은 vehicle을 처리했을 때의 대조군에 비해 77.2±2.5, 82.0±1.9, 83.4±0.5, 85.8±2.5, 86.2±1.7, 87.0±1.1, 85.6±1.7 및 82.3±0.5%였다(Figure 1). 5, 10, 50, 100 및 500 ug/ml의 농도에서는 H_2O_2를 처리했을 때에 비해 t-test상 유의한 차이가 있었다($p<0.01$). GHAS의 전처치 농도는 100 ug/ml으로 결정하였다.

2. Microarray 반응

배양된 세포에 유해산소 자극으로서 H_2O_2 100 uM로 3시간 처치한 경우와 대조군에서의 mRNA를 추출하여 microarray에 반응시켰으며 또한 MTT 시험을 통해 결정된 농도인 GHAS 100 ug/ml로 12시간동안 전처치하고 유해자극으로서 H_2O_2 100 uM을 3시간 처치한 경우와 곽향정기산을 전처치하지 않은 대조군에서의 mRNA를 추출하여 microarray에 반응시켰다(Figure 2). 그 결과 red spot으로 발현이 항진된 유전자와 green spot으로 발현이 저하된 유전자가 다양하게 나타났다.

각 cDNA spot intensity는 normalization 과정을 거쳐 log2 ratio 값으로 계산되었다(Figure 3, 4). 그 결과 2배 이상으로 발현이 항진된 유전자와 2배 이하로 발현이 저하된 유전자를 구분할 수 있었다.

3. 유해산소 자극시 발현이 억제된 유전자

유해자극으로서 100 uM/ml H_2O_2를 3시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 발현이 억제된 유전자는 copine I, abl interactor 2, ATPase, Class II type 9A, Bardet-Biedl syndrome 1, KIAA0433 protein, transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila), Rho GTPase activating protein 1, EphA7, tankyrase 1 binding protein 1 182kDa, chromosome 11 hypothetical protein ORF4, KIAA0323, microphthalmia-associated transcription factor, cAMP responsive element binding protein 1, gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor pi, T-cell activation leucine repeat-rich protein, glucagon, H326, interleukin 2 receptor beta, acyl-CoA synthetase long-chain family

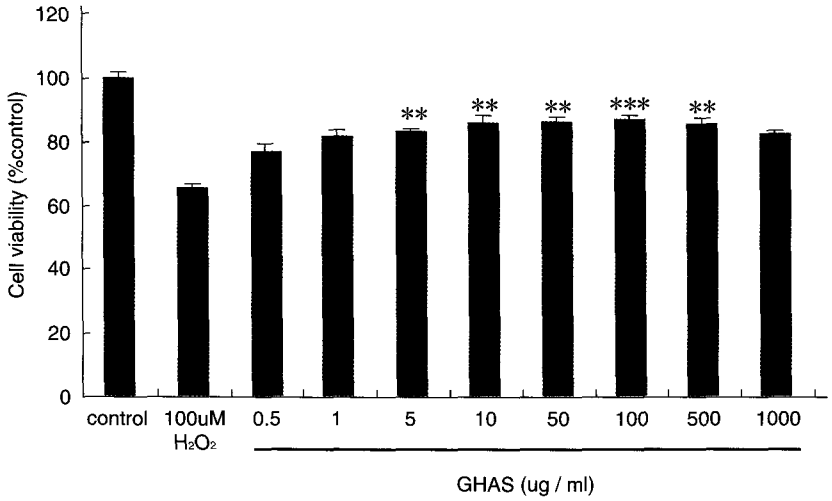

Fig. 1 The viability of human gliblastoma cell by MTT cytotoxicity assay
Cell viability (%) after 12 h incubation of GHAS (Gwakhyangjeonggisan Herbal Acupuncture Solution) at the respective concentrations. Percent viabilities of the treatment groups were calculated by MTT colorimetric assay compared with that of the control group. Values are given as percent (mean±S.D.). Asterisk (*) indicates statistical difference from the control group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

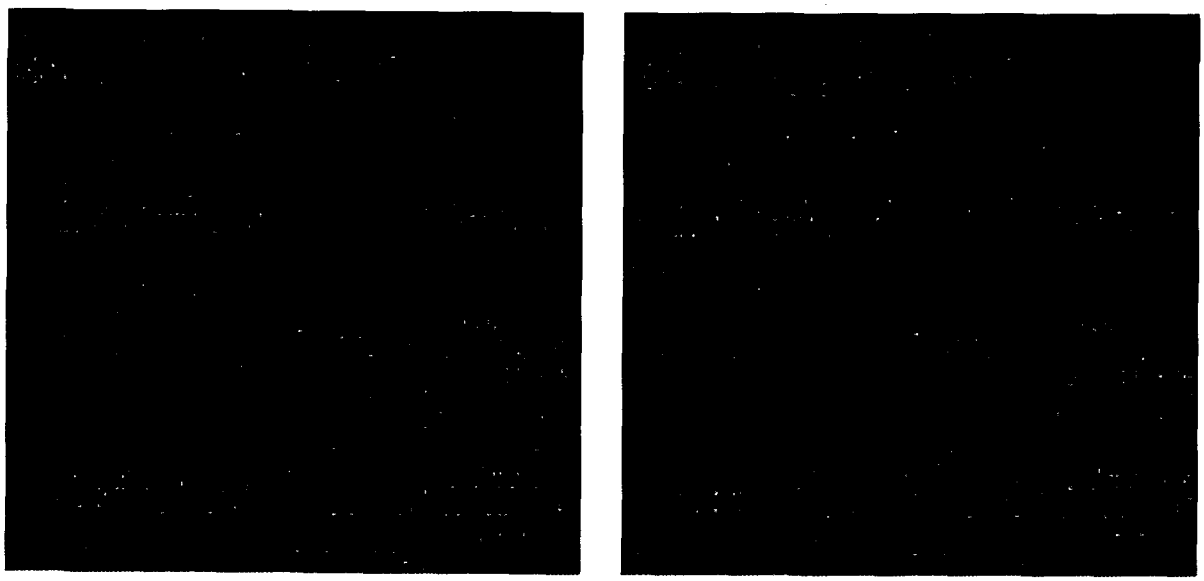

Fig. 2 0k human cDNA microarray image of gene expression in A172 human glioblastoma cells treated with GHAS for 12 h
(A) The green spots represent genes of A172 control labeled with Cy3-captured reagent that is over expressed compared to that of H2O2-exposed A172. The red spots represent genes of H_2O_2-exposed A172 labeled with Cy5-captured reagent that is over expressed compared to that of A172 control. (B) The green spots represent genes of H2O2-exposed A172 labeled with Cy3-captured reagent that is over expressed compared to that of GHAS pre-treated A172. The red spots represent genes of GHAS pre-treated A172 labeled with Cy5-captured reagent that is over expressed compared to that of H2O2-exposed A172. The yellow spots represent genes which showed no difference in expression level between two groups.

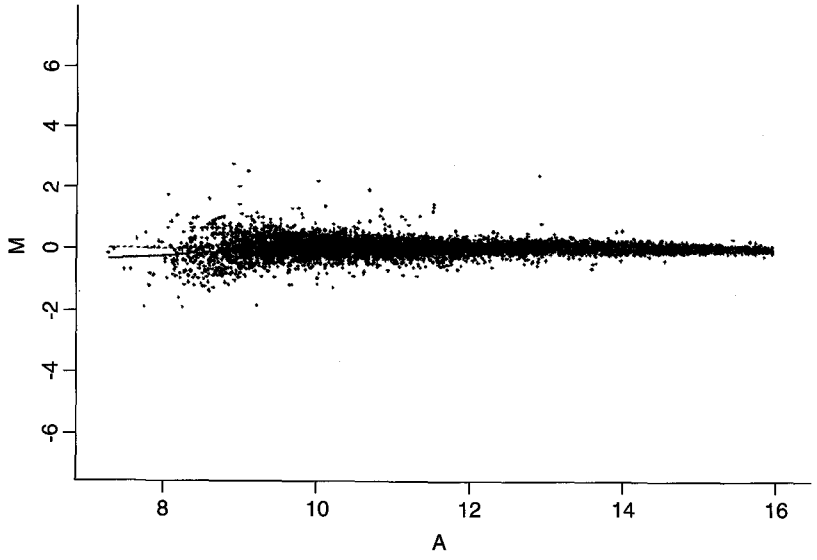

Fig. 3 Scattered plot of the normalization results by global M method in H_2O_2-exposed and control A172 cells
The primary data was normalized by the total spots of intensity between two groups, and then normalized by the intensity ratio of reference genes such as housekeeping genes in both groups. The expression ratio of H2O2-exposed and control A172 cells was converted to log2 ratio.

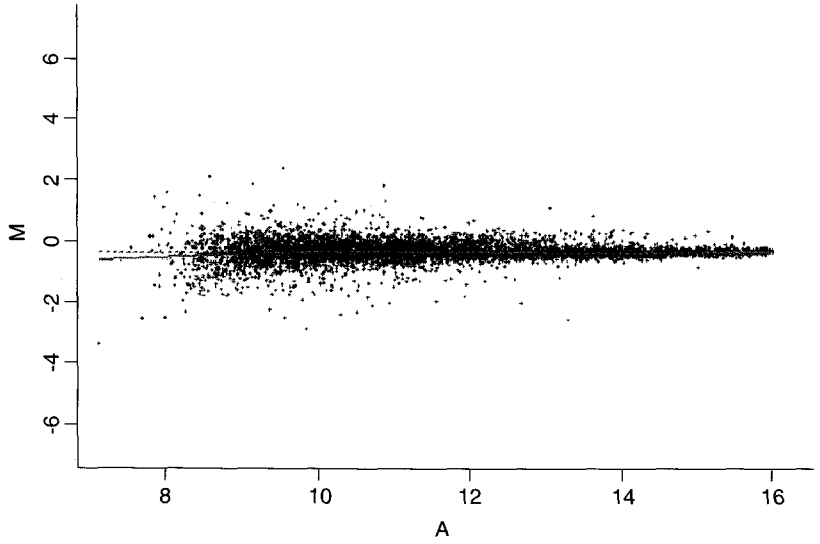

Fig. 4 Scattered plot of the normalization results by global M method in GHAS pre-treated and control A172 cells
The primary data was normalized by the total spots of intensity between two groups, and then normalized by the intensity ratio of reference genes such as housekeeping genes in both groups. The expression ratio of GHAS pre-treated and control A172 cells was converted to log2 ratio.

member 1, KIAA0367, srebp cleavage-activating protein, inhibitor of DNA binding 1 dominant negative helix-loop-helix protein, differentially expressed in hematopoietic lineages, collagen, type VIII alpha 1으로 24종이 있었다 (Table 2).

4. 곽향정기산 약침액 전처치시 발현 억제 유전자

GHAS 100 ug/ml을 12시간 전처치하고 대조군에는 vehicle을 전처치한 후 유해자극으로서 100 uM/ml H_2O_2를 3시간 처치했을 때 대조군에 비해 발현이 억제된 유전자는 activating transcription factor 3, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1), WD repeat domain 18, A kinase (PRKA) anchor protein 13, metal-regulatory transcription factor 1, chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (B-cell chemoattractant), ribosomal protein S6 kinase 70kDa polypeptide 2, calcitonin/calcitonin-related polypeptide alpha, fibulin 2, chitobiase, di-N-acetyl-, benzodiazapine receptor (peripheral) associated protein 1, phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, homeodomain interacting protein kinase 3, Bicaudal D homolog 1 (Drosophila), U2(RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor 1, eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein), manic fringe homolog (Drosophila), v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian), RNA binding protein with multiple splicing, KIAA0415 gene product, MUF1 protein, protein phosphatase 1D magnesium-dependent delta isoform, betaine-homocysteine methyltransferase, zinc finger protein 626, solute carrier family 17 (anion/sugar transporter) member 5, N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase), tetratricopeptide repeat domain 12, Nedd4 binding protein 3, B-cell CLL/lymphoma 2, ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D), Bardet-Biedl syndrome 1, COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast), kinesin family member 1B, KIAA0040 gene product, hypothetical gene supported by AK075558; BC021286, insulin-like growth factor 2 receptor, hypothetical protein DKFZp434D2328, cerebral cavernous malformations 1, KIAA0298 gene product. interleukin 3 receptor alpha (low affinity), guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class), dynamin 1, asparagine synthetase, solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport) member 2, CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) betam ras homolog gene family member E로 46종이 있었다(Table 3).

Table 2. List of Genes Down-regulated by Exposure to H_2O_2

Gene name	Abbreviation	M	GenBank#
copine I	CPNE1	-2.14	W92591
abl interactor 2	ABI2	-1.97	AF260261
ATPase, Class II, type 9A	ATP9A	-1.82	AA620508
Bardet-Biedl syndrome 1	BBS1	-1.68	N93061
KIAA0433 protein	KIAA0433	-1.68	AB007893
transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)	TLE1	-1.66	M99435
Rho GTPase activating protein 1	ARHGAP1	-1.62	U02570
EphA7	EPHA7	-1.59	AI801963
tankyrase 1 binding protein 1, 182kDa	TNKS1BP1	-1.48	W73588
chromosome 11 hypothetical protein ORF4	C11ORF4	-1.28	AI215021
KIAA0323	KIAA0323	-1.28	AB002321
microphthalmia-associated transcription factor	MITF	-1.28	Z29678
cAMP responsive element binding protein 1	CREB1	-1.21	H12371
gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi	GABRP	-1.17	AI560906
T-cell activation leucine repeat-rich protein	TA-LRRP	-1.17	D86984
glucagon	GCG	-1.13	J04040
H326	H326	-1.11	U06631
interleukin 2 receptor, beta	IL2RB	-1.10	NM_000878
acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	ACSL1	-1.08	D10040
KIAA0367	KIAA0367	-1.08	AB002365
SREBP cleavage-activating protein	SCAP	-1.07	AL040564
inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	ID1	-1.06	S78825
differentially expressed in hematopoietic lineages	GW112	-1.04	AI923293
collagen, type VIII, alpha 1	COL8A1	-1.03	X57527

Gene expression was profiled with TwinChipe (Digital Genomics) microarray. A cut-off level of 2-fold change was used.

5. 곽향정기산 약침액 전처치시 유해산소 자극으로 발현이 억제되었던 유전자의 변화

유해자극으로서 H_2O_2를 처치했을 때 발현이 억제되었던 24종의 유전자 중에서 곽향정기산으로 전처치했을 때에는 Rho GTPase activating protein 1이 발현이 항진되었으며, T-cell activation leucine repeat-rich protein, glucagon, srebp cleavage-activating protein, ATPase Class II type 9A, tankyrase 1 binding protein 1 182kDa, KIAA0323, gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor pi, H326, acyl-CoA synthetase long-chain family member 1, differentially expressed in hematopoietic lineages, collagen, type VIII alpha 1 등 11종이 발현 항진되는 경향이 있거나 발현 억제정도가 줄어드는 경향을 보였고, KIAA0433 protein, Bardet-Biedl syndrome 1, cAMP responsive element binding protein 1, microphthalmia-associated transcription factor, EphA7 등 5종은 여전히 발현이 억제된 상태를 보였다(Table 4).

Ⅳ. 고 찰

신경계는 세포의 신생이 적고 외상, 경색, 출혈, 감염 등의 급성손상이나 근위축성 측삭경화증, 치매, 파킨슨병을 비롯한 운동장애 등의 만성손상에서 주로 과도한 세포사가 문제가 되며, 특히 신경계의 만성퇴행성 장애에서는 apoptosis가 중요한 역할을 한다[4]. 중풍을 비롯한 신경계의 병증은 평균수명의 증가와 함께 그 발병

Table 3. List of Genes Down-regulated by Pretreatment of GHAS

Gene name	Abbreviation	M	GenBank#
activating transcription factor 3	ATF3	-3.27	N39944
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CDKN1A	-2.14	AA481712
WD repeat domain 18	WDR18	-1.92	BC001648
A kinase (PRKA) anchor protein 13	AKAP13	-1.66	AI674926
metal-regulatory transcription factor 1	MTF1	-1.57	X78710
chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (B-cell chemoattractant)	CXCL13	-1.53	AF044197
ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 2	RPS6KB2	-1.50	AB016869
calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	CALCA	-1.47	M26095
fibulin 2	FBLN2	-1.45	X82494
chitobiase, di-N-acetyl-	CTBS	-1.43	AI148751
benzodiazapine receptor (peripheral) associated protein 1	BZRAP1	-1.42	AB014512
phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	PMAIP1	-1.41	D90070
homeodomain interacting protein kinase 3	HIPK3	-1.40	AF004849
Bicaudal D homolog 1 (Drosophila)	BICD1	-1.39	U90030
U2(RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor 1	U2AF1	-1.37	AI872005
eukaryotic translation elongation factor 1 delta	EEF1D	-1.36	AA464988
manic fringe homolog (Drosophila)	MFNG	-1.36	AI347507
v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	REL	-1.35	X75042
RNA binding protein with multiple splicing	RBPMS	-1.34	D84110
KIAA0415 gene product	KIAA0415	-1.30	AB007875
MUF1 protein	MUF1	-1.27	X86018
protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	PPM1D	-1.25	U78305
betaine-homocysteine methyltransferase	BHMT	-1.25	U50929
zinc finger protein 626	ZNF626	-1.23	AA772405
solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5	SLC17A5	-1.23	AA258357
N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)	NAT1	-1.23	R79401
tetratricopeptide repeat domain 12	TTC12	-1.22	AA132777
Nedd4 binding protein 3	N4BP3	-1.22	AB002339
B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	-1.18	M14745
ataxia telangiectasia mutated	ATM	-1.16	U67093
Bardet-Biedl syndrome 1	BBS1	-1.16	N93061
COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein	COX11	-1.15	AF044321
kinesin family member 1B	KIF1B	-1.15	AB011163
KIAA0040 gene product	KIAA0040	-1.15	NM_014656
hypothetical gene supported by AK075558; BC021286	LOC374946	-1.14	AK092318
insulin-like growth factor 2 receptor	IGF2R	-1.14	J03528
hypothetical protein DKFZp434D2328	LOC91526	-1.12	AI274746
cerebral cavernous malformations 1	CCM1	-1.10	U90268
KIAA0298 gene product	KIAA0298	-1.06	AB002296
interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	IL3RA	-1.06	AI765858
guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq)	GNA15	-1.05	M63904
dynamin 1	DNM1	-1.05	L07809
asparagine synthetase	ASNS	-1.05	NM_001673
solute carrier family 3, member 2	SLC3A2	-1.04	AB018010
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	-1.04	AA557306
ras homolog gene family, member E	ARHE	-1.03	W03441

Gene expression was profiled with TwinChipe (Digital Genomics) microarray. A cut-off level of 2-fold change was used.

Table 4. Changes of Down-regulated Gene Expression Following with Exposure to H_2O_2 When GHAS Was Pretreated

Gene name	Abbreviation	M1*	M2*
copine I	CPNE1	-2.14	
abl interactor 2	ABI2	-1.97	
ATPase, Class II, type 9A	ATP9A	-1.82	0.14
Bardet-Biedl syndrome 1	BBS1	-1.68	-2.10
KIAA0433 protein	KIAA0433	-1.68	-1.16
transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)	TLE1	-1.66	
Rho GTPase activating protein 1	ARHGAP1	-1.62	1.01
EphA7	EPHA7	-1.59	-1.00
tankyrase 1 binding protein 1, 182kDa	TNKS1BP1	-1.48	0.11
chromosome 11 hypothetical protein ORF4	C11ORF4	-1.28	
KIAA0323	KIAA0323	-1.28	0.06
microphthalmia-associated transcription factor	MITF	-1.28	-1.22
cAMP responsive element binding protein 1	CREB1	-1.21	-2.00
gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi	GABRP	-1.17	0.25
T-cell activation leucine repeat-rich protein	TA-LRRP	-1.17	-0.35
glucagon	GCG	-1.13	-0.67
H326	H326	-1.11	0.54
interleukin 2 receptor, beta	IL2RB	-1.10	
acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	ACSL1	-1.08	0.18
KIAA0367	KIAA0367	-1.08	
SREBP cleavage-activating protein	SCAP	-1.07	-0.41
inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	ID1	-1.06	
differentially expressed in hematopoietic lineages	GW112	-1.04	0.57
collagen, type VIII, alpha 1	COL8A1	-1.03	0.11

* M1 is global M when glioblastoma cells were exposed to H_2O_2 and M2 is global M when glioblastoma cells were pretreated with GHAS before exposure to H_2O_2.

이 더욱 증가하고 있으며 회복된 후에도 비가역적 신경학적 결손을 남기는 경우가 많아, 효과적인 중풍치료법의 개발은 사회적으로 많은 관심이 집중되고 있다. 허혈성 중풍의 경우에도 신경계의 염증이나 재관류 손상을 중요한 문제로 고려해야 하며[15] 경색이나 외상은 발생원인은 다르지만 excitotoxicity, 유리기, 염증, apoptosis 등 유사한 기전이 작용하고 있으며 인체의 방어기전으로 공통적으로 heat shock protein, 항염증 cytokine, 항산화제 기능이 활성화된다[16]. Astroglia는 뇌에 감염과 손상 등이 발생했을 때 조직의 생리적 평형을 유지시키는 데에 중요한 역할을 하고 있기 때문에 glial cell line은 뇌질환에 있어서의 세포손상 모델에 대한 실험연구에 많이 채용된다[10].

약침은 水鍼 혹은 穴位注射療法이라고도 하는데, 침자극과 약물의 주입을 결합시킨 요법으로, 경락학설의 원리에 의거하여 약물을 유관 혈위, 압통점 혹은 반응점에 주입함으로써 침자극으로서의 작용과 약물의 효능이 상승효과를 나타내어 질병을 치료하는 요법이다[17]. 곽향정기산은 본래 '傷寒陰證如不分表裏證'에 사용하는 처방으로 먼저 '導引經絡' 함으로써 '不致變動' 하게 하는 용도로 사용하게 되는데[5], 아직 실험연구보고가 활발하지는 않지만[8,18] 임상현장에서는 중풍 초기에 먼저 調氣하여 變證이 생기지 않도록 經絡을 導引하려는 목적으로 응용빈도가 높은 처방이다. 따라서 곽향정기산에 대한 실험적 관찰과 임상적 유용성에 대한 연구가 뒷받침된다면 앞으로 약침제제로서 곽향정기산의

임상응용영역을 확대하면서 보다 정확하고 효과적으로 활용할 수 있게 될 것으로 기대된다.

Microarray 기술은 DNA sequencing, 변이 분석, 새로운 유전자 발견[19], 유전자 발현 분석 등의 분야에 활용되어 왔다. 유전자 발현의 연구에 있어서 microarray를 이용하면 수많은 유전자를 동시에 정량적으로 평가함으로써 생리적인 혹은 병리적인 과정에 대해 보다 다각도로 정확한 정보를 얻을 수 있게 되어 전통적인 '단일 유전자' 연구방법과 비교할 수 없는 매우 큰 장점을 지니고 있고[20-21] 신경학 분야에서도 생리기전, 병리기전, 치료기전을 연구하는 데에 유용한 정보를 제공하는 기술로 응용되고 있다[22]. 본 연구에서는 signal transduction, cell cycle, cell growth and maintenance, cell death, response to stress, transcription, immune response, apoptosis 등의 기능에 관여하는 8170종 유전자의 동시적 발현양상 profile을 측정할 수 있는 microarray를 가지고 유해산소 환경에 노출된 glial cell에 대한 GHAS의 보호효과에 관하여 분자생물학적으로 관찰해 보고자 하였다.

먼저 MTT 시험을 통해 GHAS이 glial cell에 대한 보호효과가 있는지 확인해 보았는데, H_2O_2로 활성산소의 유해자극을 주었을 때 생존율이 65.7±1.2%로 감소되었으나 GHAS 5, 10, 50, 100, 500 ug/ml을 전처치하면 유의한 보호효과가 있음이 관찰되었다. 이어서 GHAS의 glial cell에 대한 보호효과에 대해 분자생물학적으로 관찰하고자 mRNA를 추출하여 microarray에 반응시켜 발현양상을 확인해 본 결과 유해자극시 발현이 억제되었던 24종의 유전자는 GHAS으로 전처치하면 상당수의 유전자가 그 억제정도가 줄어들거나 발현이 약간 상승되는 경향을 보여서 이러한 유전자발현의 변화가 GHAS의 glial cell에 대한 보호효과와 관련이 있을 것으로 추정할 수 있었다. 발현이 변화된 주요 유전자를 기능별로 개괄하면 아래와 같다.

세포의 성장유지에 관여하는 유전자로 COL8A1 즉 collagen, type VIII, alpha 1은 유해자극시 억제되었다가 GHAS으로 전처치시 그 억제가 완화되었다. Collagen, type VIII, alpha 1은 collagen의 한 종류로 독특한 분포와 생리적 특성을 갖는 것으로 보고되었다[23]. GCG 즉 glucagon도 유해자극시 억제되었다가 GHAS으로 전처치시 그 억제가 완화되었다. GCG는 29개의 아미노산으로 구성된 췌장 호르몬으로 glycogenolysis와 gluconeogenesis를 유도한다. GCG는 Secretin, vasoactive intestinal peptide(VIP), gastric inhibitory peptide(GIP), glicentin과 함께 multigene family의 하나이다. Glucagon-like peptide 1(GLP 1)은 강력한 인슐린 분비촉진제이며 뇌실 내에서는 섭식을 강력히 억제한다[24] GLP 2는 장상피점막의 영양인자로 작용하며 crypt cell의 증식을 촉진하고 또한 위장운동, 위산분비, 장관상피의 장벽기능을 조절한다[25]. GABRP 즉 gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi도 유해자극으로 억제되었다가 GHAS 전처치로 억제가 완화되었다. GABA는 GABA A receptor에 결합하여 염소이온채널을 열면서 강력한 억제성 신경전달물질로 작용하고 subunit의 구성에 따라 수용체의 기능이 크게 달라질 수 있다[26]. TNKS1BP1 즉 tankyrase 1 binding protein 1, 182kDa도 유해자극으로 억제되었다가 GHAS 전처치로 억제가 완화되었다. Tankyrase 1은 telomeric-repeat binding factor(TRF1)에 결합하여 poly(ADP-ribosyl)ate시킴으로써 TRF1의 telomere 연장을 저해하는 작용을 조절한다고 알려져 있다[27]. ARHGAP1 즉 Rho GTPase activating protein 1는 유해자극시 억제되었다가 GHAS 전처치시 발현이 항진되었다. ARHGAP은 세포골격의 변화를 조절하며 신호전달에 관여하고, rho family의 하나인 rac은 호중구와 대식세포에서 감염에 대한 자기방어기전의 하나로 NADPH oxidase를 활성화하여 superoxide radical을 생성하는 작용을 조절한다고 알려져 있다[28].

스트레스반응과 관련된 유전자 중에는 SCAP 즉 SREBP cleavage-activating protein이 유해자극으로 억제되었다가 GHAS 처치로 억제가 완화되었다. SREBP (sterol regulatory element binding protein)은 SCAP(SREBP cleavage activating protein)과 함께 cholesterol 대사에 관여하며 저장성 배양액으로 스트레스를 가했을 때 단백질합성이 억제되고 Insig-1이 고갈되어 SREBP의 proteolytic activation이 촉발되는 것으로 보고된 바 있다[12,29].

본 연구에서는 곽향정기산 약침액이 유해산소환경의 중추신경계 세포에 미치는 영향을 유전자의 발현 수준에서 관찰하였다. 특히 microarray를 이용해 대량의 유전자의 동시발현 양상에 관한 자료를 획득하고 그 결과 발현에 상당한 변화가 있는 유전자를 관찰할 수 있었는데 이들 유전자발현의 변화는 곽향정기산 약침액의 중추신경세포 보호와 관련이 있는 분자생물학적 변화에 깊이 연관돼 있을 것으로 추정된다. 본 연구는 이후 곽향정기산 약침액의 작용기전과 효능에 대한 후속

연구의 기초가 되고 또한 향후 신경계 질환에서의 곽향정기산 약침액의 활용범위를 넓히는 데에 도움이 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

유해산소로 손상된 중추신경계 세포에 대한 곽향정기산 약침액의 보호효과와 유전자발현의 변화를 관찰하기 위해 human cDNA microarray chip으로 glioblastoma cell에서 분석한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. MTT 시험 결과 곽향정기산 약침액이 보호효과가 있는 것이 관찰되었다.

2. 유해산소환경에 노출시켰을 때 발현이 억제되는 유전자는 copine I 등 24종이 있었다.

3. 곽향정기산 약침액으로 전처치하고 유해산소환경에 노출시켰을 때 발현이 억제되는 유전자는 activating transcription factor 3, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) 등 46종이 있었다.

4. 유해산소환경에 노출시켰을 때 발현이 억제되었던 24종의 유전자는 곽향정기산 약침액으로 전처치하고 유해산소환경에 노출시킨 경우에는 상당수의 유전자가 그 억제정도가 감소하거나 발현이 약간 증가되는 경향을 보였다.

VI. 참고문헌

1. 허준(조선). 원본동의보감. 서울 : 남산당. 1998 : 386.
2. 김윤범. 곽향정기산과 가미방이 위장관기능 및 항알레르기에 미치는 영향. 서울 : 경희대학교대학원 논문. 1993.
3. 안정란. 가미곽정탕의 효능에 관한 실험적연구. 서울: 경희대학교대학원논문. 1993.
4. 윤희식, 유봉하, 박동원, 유기원. 곽향정기산과 소음인곽향정기산의 효능에 관한 실험적 비교연구. 경희한의대논문집. 1998 ; 21(1) : 197-211.
5. 이훈. 곽향정기산가미방이 고지방식이로 유도된 흰쥐의 체지방에 미치는 영향. 서울 : 경희대학교 대학원논문. 2003.
6. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch Biochem Biophys. 1986 ; 246(2) : 501-514.
7. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol. 1993 ; 23(1) : 21-48.
8. 박숙자, 권정남, 김영균. 중풍환자의 초발군과 재발군에 관한 임상적 고찰. 대한한의학회지. 2002 ; 23(3) : 119-133.
9. Smith WS. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. J Vasc Interv Radiol. 2004 ; 15(1 Pt 2) : S3-12.
10. Aschner M. Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. Neurotoxicology. 1998 ; 19(2) : 269-281.
11. 이웅경, 강성길, 고형균. 봉독약침액이 비만세포주의 CD/cytokine 유전자 발현에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003 ; 20(5) : 50-62.
12. Lee JN, Ye J. Proteolytic Activation of Sterol Regulatory Element-binding Protein Induced by Cellular Stress through Depletion of Insig-1. J. Biol. Chem. 2004 ; 279(43) : 45257-45265.
13. Hong X, Li Y, Hussain M, Sarkar FH. Gene expression profiling reveals novel targets of estramustine phosphate in prostate cancer cells. Cancer Lett. 2004 ; 209(2) : 187-195.
14. Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. Am J Med. 2000 ; 108(4) : 317-330.
15. Harris NR, Rumbaut RE. Age-related responses of the microcirculation to ischemia-reperfusion and inflammation. Pathophysiology. 2001 ; 8(1) : 1-10.
16. Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms : neuroprotective opportunities. Brain Res Brain Res Rev. 2002 ; 39(1) : 55-73.
17. 백승일, 이용태, 장경전. 폐수·격수의 호도약침 자극이 알레르기 반응에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003 ; 20(4) : 180-191.
18. 신동길, 김덕곤, 이진용. 비만아 9례에 대한 곽향정기산 가미방의 치료효과에 대한 임상적 고찰. 대

한한방소아과학회지. 2001 ; 15(1) : 183-194.

19. Stuhlmuller B, Ungethum U, Scholze S, Martinez L, Backhaus M, Kraetsch H-G, Kinne RW, Burmester G-R. Identification of known and novel genes in activated monocytes from patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2000 ; 43 : 775-790.
20. 유대열, 송창우, 유영춘, 박승용. 게놈기능연구프로토콜. 서울 : 월드사이언스. 2001 : 25, 35.
21. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001 : A10.2.
22. Luo Z, Geschwind DH. Microarray applications in neuroscience. Neurobiol Dis. 2001 ; 8(2) : 183-193.
23. Yamaguchi N, Benya PD, van der Rest M, Ninomiya Y. The cloning and sequencing of alpha 1(VIII) collagen cDNAs demonstrate that type VIII collagen is a short chain collagen and contains triple-helical and carboxyl-terminal non-triple-helical domains similar to those of type X collagen. J Biol Chem. 1989 ; 264(27) : 16022-16029.
24. Turton MD, O' Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. Nature. 1996 ; 379(6560) : 69-72.
25. Drucker DJ. Glucagon-like peptide 2. J Clin Endocrinol Metab. 2001 ; 86(4) : 1759-1764.
26. Milligan CJ, Buckley NJ, Garret M, Deuchars J, Deuchars SA. Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABAA and GABAC receptor subunits in native central neurons. J Neurosci. 2004 ; 24(33) : 7241-7250.
27. Sbodio JI, Chi NW. Identification of a tankyrase-binding motif shared by IRAP, TAB182, and human TRF1 but not mouse TRF1. NuMA contains this RXXPDG motif and is a novel tankyrase partner. J Biol Chem. 2002 ; 277(35) : 31887-31892.
28. Lancaster CA, Taylor-Harris PM, Self AJ, Brill S, van Erp HE, Hall A. Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. J Biol Chem. 1994 ; 269(2) : 1137-1142.
29. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: Sterol regulatory element-binding proteins. World J. Gastroenterol. 2004 ; 10(21) : 3081-3087.