

원저

산양산삼 증류약침의 혈맥주입 후 나타나는 혈장의 Proteom 분석

이동희* · 권기록*

* 상지대학교 한의과대학 침구학교실

Analysis of Serum Proteom after Intravenous Injection of cultivated wild ginseng pharmacopuncture

Dong Hee, Lee* · Ki Rok, Kwon*

* Dept. of Acupuncture & Moxibustion, Oriental Medical College, Sangji University

Abstract

Objectives : To observe the changes in the serum proteins after intravenous injection of cultivated wild ginseng pharmacopuncture.

Methods : Blood was collected before and after the administration of cultivated wild ginseng pharmacopuncture and only the serum was taken. Then differences in the spots on the scanned image after carrying out 2-Dimensional electrophoresis were located and conducted mass analysis and protein identification.

Results : Following results were obtained from the comparative analysis of serum proteins before and after the administration of cultivated wild ginseng pharmacopuncture.

1. 28 spots were identified before and after the administration.
2. In confirming manifestation degree, spots with more than two-times increase were 204, 1302, 2205, 3105, 7104, 8006, spots with more than one-time increase were 1101, 1505, 2013, 2403, 3009, 3010, 4002, 4009, 6704, 8101, and spots with decrease were 205, 801, 803, 3205, 5202, 6105, 6106, 7103, 9001, 9003.
3. After conducting protein identification, proteins 205, 804, 1302, 4009, 6105, 6106 are unidentified yet, and 1101 is unnamed protein. Protein 204 is identified as complement receptor CR2-C3d, 801 as YAP1 protein, 803 as antitrypsin polymer, 1505 as PRO0684, 2013 and 3010 as proapolipoprotein, 2205 as USP48, 2403 as vitamin D binding protein, 3009 as complement component 4A preprotein, 3105 as immunoglobulin lambda chain, 3205 as transthyretin, 4002 as Ras-related protein Ral-A, 4204 as beta actin, 5202 and 7104 as apolipoprotein L1, 6704 as alpha 2 macroglobulin precursor, 7103 as complement component 3 precursor, 8006 as testis-specific protein Y, 8101 as transferrin, 9001 as (Alpha-Oxy, Beta-(C112g)deoxy) T-State Human Hemoglobin, and 9003 as human hemoglobin.
4. Immune protein CR2-C3d(204), which acts against microbes and pathogenic organisms, was increased by more than two-times after the administration of pharmacopuncture.
5. Antitrypsin(803), which is secreted with inflammatory response in the lungs, was reduced after the administration of pharmacopuncture.
6. Proapolipoprotein(2013, 3010) and apolipoprotein(7104), key components of the HDL-cholesterol which plays an important role in preventing arteriosclerosis, were increased after the administration of pharmacopuncture.
7. Vitamin D binding protein(DBP, 2403), protecting the lung at the time of inflammatory response, was increased after the administration of pharmacopuncture.
8. Transthyretin(TTR, 3205), which is the main protein causing familial amyloid polyneuropathy(FAP), was decreased after the administration of pharmacopuncture.
9. Ras-related protein Ral-A(4002) that controls phospholipid metabolism, cytoskeletal formation, and membrane traffic, was increased after the administration of pharmacopuncture.

10. Testis-specific protein Y(8006), which takes part in determination of the gender, was increased by more than two-times after the administration of pharmacopuncture.

11. Transferrin(8101), which balances the iron level in the body, was increased after the administration of pharmacopuncture.

Conclusion : Above results support the notion that intravenous injection of cultivated wild ginseng pharmacopuncture induce changes in serum proteins and this research can be a pioneer work in finding biomarkers.

Key words : cultivated wild ginseng pharmacopuncture, 2-Dimensional electrophoresis, intravenous injection, proteomics, biomarker.

1. 緒 論

山蔘은 五加科(주릅나무과 ; Araliaceae)에 속한 다년생 초목인 人蔘(panax ginseng C. A. Mey.)이 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 蔘을 말하고1) 山養山蔘(樟腦蔘)은 산삼의 씨앗이나 幼蔘을 인위적으로 산에서 재배한 蔘을 의미한다. 예로부터 山蔘은 대표적인 補氣劑로, 靈藥으로 여겨졌으며 그 모양새가 사람을 닮았다고 하여 人蔘으로 표현되어 왔다²⁾. 性은 微寒, 微溫, 溫 등으로, 味는 甘, 苦 등으로 표현되고 있으며, 補五臟, 安精神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 久服輕身延年 등의 효능이 있다³⁾.

藥鍼療法은 鍼灸·經絡과 本草理論에 의하여 각종의 한약재를 일정한 방법으로 조제한 후 經穴 등에 주입하여 刺鍼과 藥物效果를 바탕으로 질병을 치료하는 新鍼療法이다4). 藥鍼의 시술부위는 대부분 辨證에 의해 선택된 經穴과 壓痛點 등이 대부분이고, 시술방법으로 靜脈(이하 血脈)을 치료 경로로 이용하는 방법이 중국에서는 활발히 이루어지고 있으나⁵⁾, 국내에서는 아직 연구단계이며 향 후 대중적인 치료법으로 발전하기 위해서는 보다 많은 연구가 필요한 실정이다.

그동안 인삼이나 인삼약침과 관련된 연구⁶⁻²³⁾는 많이 이루어졌으나 희귀성이나 高價 등의 문제로 인하여 산삼과 관련된 연구와 이의 혈액주입용 약침연구는 최근에야 이루어지고 있다. 권 등²³⁾은 mouse와 rat를 이용한 동물실험에서 산양산삼 증류약침을 혈액주입 하였을 때 아무런 급성·아급성 독성반응이 나타나지 않았고, 항암효과가 있음을 보고한 바 있다. 또한 임상 실험에

서도 vital sign이나 CBC, B/C 등의 혈액학적 소견에서도 유의한 차이를 나타내지 않았고, 전신증상에도 큰 영향을 미치지 않았음을 보고²⁵⁾한 바 있다. A549 human lung cancer cell을 이용한 in vitro 실험에서도 곡 등²⁶⁾과 조 등²⁷⁾은 산삼약침은 세포사멸 효과가 있고, 이의 기전은 apoptosis 유도에 의한 것으로 추정되며 특히, 동일한 농도에서 pH와 전해질을 조절한 경우에서 세포사멸효과가 우수하였음이 보고되었다.

이에 산양산삼 증류약침(이하 산삼약침)이 시술되었을 때 나타나는 인체의 반응을 혈액 내 단백질의 변화를 관찰하여 추적하고자 건강한 성인 남·여를 대상으로 산삼약침 시술 전·후에 채혈하여 이차원 전기영동을 시행하였고, gel 분석을 통하여 차이가 나는 spot을 찾아 질량분석과 단백질 동정을 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 方 法

1. 임상시험 참여자의 모집

5명의 진료교수와 1명의 간호사로 구성된 상지대학교 부속 한방병원 임상시험 심사위원회에서 산삼약침의 임상실험(Randomized Control Trials, RCT)에 대한 심의를 거친 후, 연구에 참여할 임상자원자를 모집하였다. 자원자의 자격은 본 연구의 의의를 충분히 인식하고 임상실험동의서에 참여를 신청한 20세 이상의 건강한 성인남녀를 대상으로 하였다. 실험 시행 전 감기를 앓고 있거나 다른 질환으로 인해 약물을 복용하고 있는 자는 연구대상에서 제외하였다. 또한 임상실험에 지원한 지원자 중 CBC, B/C, ESR 등의 혈액검사, 그리고 UA 등의 사전 검사를 통하여 이상소견이 발견된 자는 실

* 교신저자 : 권기록, 강원도 원주시 우산동 283
상지대학교 부속 한방병원 침구과
(Tel : 033-741-9257 E-mail: beevenom@paran.com)

험에서 제외하고 20명을 실험대상군으로 선정하였다.

2. 산삼 약침의 조제⁴⁾

산양산삼은 산삼 혹은 산양삼의 종자를 적절한 환경에서 재배한 것으로 수령은 10년으로 추정되며, 무게는 7-12g, 길이는 10-12cm 된 것을 사용하였다(Fig. 1, 2).

먼저 산삼을 흐르는 물에 깨끗이 세척하여 뇌두를 제거하지 않은 100g의 산삼을 증류수와 배합한 후 2시간 전탕하여 찌꺼기는 따로 분리하고, 전탕액을 무균실에 있는 증류추출기에 넣고 전탕하여 1,000cc의 약침을 얻었다. 얻어진 약침을 0.1 μ m 여과지로 여과한 후, 멸균된 용기에 일정 용량 주입하였고, 밀봉하여 멸균기에 다시 멸균과정을 거친 후 시료를 준비하였다(Fig. 3).

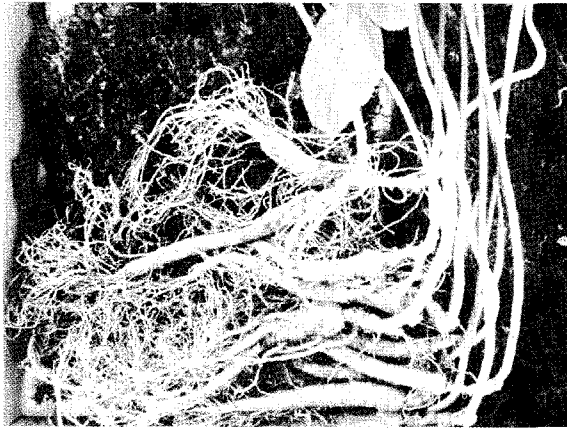


Fig. 1 The shape of cultivated wild ginseng in Korea These are about 10years old.

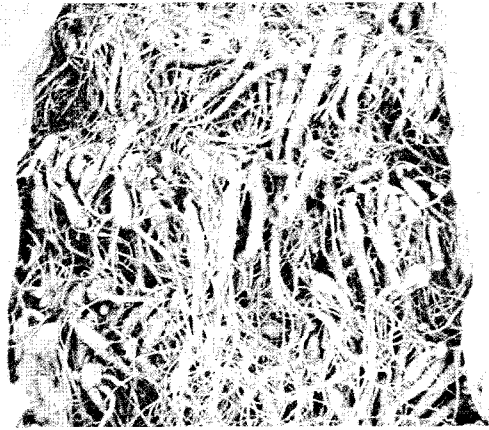


Fig. 2 The various shape of cultivated wild ginseng before making pharmacopuncture.

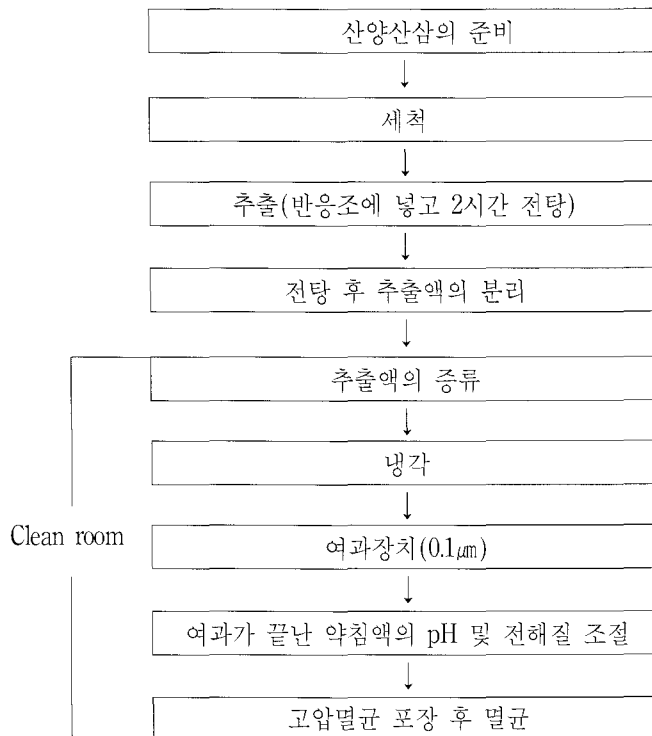


Fig. 3 Manufacturing process of cultivated wild ginseng pharmacopuncture

3. 약침의 시술

약침시술은 2회/week 시술을 원칙으로 총 4회를 시술 하였다. 시술방법은 약침을 Normal Saline 100cc(중외제약)에 mix하여 1회에는 1cc, 2회에는 3cc, 3회에는 6cc, 그리고 4회에는 10cc를 mix하여 총량이 20cc가 되도록 하였고, 주입시간은 1시간 전·후로 하였으며 주입속도는 1-1.2 ml/kg/hr로 조절하였다.

4. 채혈

산삼약침 시술 전과 후에 각각 5ml의 혈액을 채취한 후 EDTA가 들어 있는 Vacutainer(BD, NJ)에 넣었다가 원심 분리한 후 혈장(plasma)만을 1.5ml 튜브에 옮겨 -70°C에 보관한 후 실험에 사용하였다.

5. 재료

Urea, Thiourea, CHAPS, DTT, Benzamidine, Bradford solution, Acrylamide, Iodoacetamide, Bis-acrylamide, SDS, acetonitrile, trifluoroacetic acid 및 -cyano-4-hydroxycinnamic acid은 Sigma- Aldrich(Electrophoresis grade or ACS reagents, Ultrapure) 사의 제품을 사용하였고, Pharmalyte(pH3.5-10)는 Amersham Biosciences 사의 제품을 사용하였다. IPG DryStrips(pH4-10NL, 24cm)는 Genomine Inc.에서 제작된 제품을 사용하였으며, Modified porcine trypsin(sequencing grade)은 Promega 사의 제품을 사용하였다.

6. 단백질 추출

단백질 추출은 아세톤 침전법을 이용하였다. 배양액의 다섯 배 부피의 아세톤을 가하여 -20°C 에서 두 시간 침전시킨 다음, 원심 분리하여 침전된 단백질을 회수하였다. 침전된 단백질은 7M urea, 2M Thiourea, 4%(w/v) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 1%(w/v) dithiothreitol(DTT), 2%(v/v) pharmalyte, 1mM benzamidine으로 구성된 시료 용액으로 녹여서 이차원전기영동의 시료로 사용하였다. 단백질의 농도 측정은 Bradford 법²⁸⁾으로 수행하였다.

7. 이차원 전기영동

(2-Dimensional electrophoresis)

일차 Isoelectric focusing(IEF)를 위하여 IPG strips는 7M urea, 2M thiourea, 2% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS), 1% dithiothreitol(DTT), 1% pharmalyte로 구성된 reswelling 용액으로 상온에서 12-16시간 정도 reswelling 하였다. Strip 당 시료는 각각 200µg 을 사용하였으며, Amersham Biosciences 사의 Multiphore II system을 이용하여 제조회사의 사용 manual을 준수하여 20°C 에서 IEF를 수행하였다. IEF 조건은 150V에서 3,500V까지의 도달시간을 3시간 되게 하였으며, 3,500V에서 26시간 지속되도록 하여 최종적으로 96kVh가 되도록 설정하였다.

이차적으로 SDS-PAGE를 수행하기 전에 IPG Strips를 1% DTT를 함유한 equilibration buffer(50mM Tris-Cl, pH6.8, 6M urea, 2% SDS, 30% glycerol)로 10분간 incubation 하였으며, 이 후 2.5% iodoacetamide를 함유한 equilibration buffer로 10분간 더 incubation 하였다. Equilibration이 완료된 strips을 SDS-PAGE gels(20×24cm, 10-16%) 위에 배열시키고, Hoefer DALT 2D system(Amersham Biosciences)을 이용하여 20°C에서 최종적으로 1.7kVh가 되게 전개하였다. 이차원전기영동이 완료된 이차원 gel의 단백질은 Oakley 등²⁹⁾의 방법에 따라 은염색으로 시각화되었으며, 질량분석기에 의한 단백질 동정을 위하여 glutaraldehyde 처리 단계는 생략되었다. 은염색된 이차원 gel은 AGFA 사의 Duoscan T1200 스캐너로 scanning 하여 확장자가 TIFF인 파일의 형태로 컴퓨터에 저장하였다.

8. 이미지 분석

Scanning된 이미지로부터 단백질 spots의 발현변화 확인을 위한 정량적인 분석은 Phoretix 2D Evolution Softwae(version 2003.02, nonlinear dynamics, UK)를 이용하여 수행하였다. 각 spot의 quantity는 total valid spots의 intensity로 평균화(normalization)되었으며, 대조군에 비해 두 배 이상의 유의한 발현변화를 보여주는 단백질 spots를 선정하였다.

9. 질량 분석을 위한 단백질 절편화

단백질 spots는 Shevchenko의 방법³⁰⁾에 따라 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편으로 효소적으로 분해하였다. 젤 조각으로부터 SDS, 유기용매, 염색시약 등의 불순물을 제거하기 위하여 50% acetonitrile로 세척한 후, trypsin(8-10ng/ μ l)으로 reswelling 하고 8-10시간동안 37°C에서 incubation 하였다. 단백질 분해반응은 5 μ l 0.5% trifluoroacetic acid의 첨가에 의해 종결되었다. Trypsin에 의해 잘려진 단백질 단편들은 수용액 상태로 회수되었고, C18ZipTips(Millipore)을 이용하여 1-5 μ l 부피로 탈염 및 농축되었다. 이 농축액은 동량의 50% aqueous acetonitrile에 포화된 -cyano-4-hydroxycinnamic acid와 혼합되었고, 질량분석을 위하여 target plate 위에 적하하였다.

10. 단백질 동정

질량분석기는 Ettan MALDI-TOF(Amersham Biosciences)를 사용하였다. Target plate 상에 적하되어 있는 단백질 단편들은 337nm의 N2 laser 조사에 의해 기화된 다음, 20Kv injection pulse에 의해 가속되었다. 300 laser shots의 누적 peaks에 의해 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다. Mass spectrum의 분석을 위해서 trypsin의 자가분해에 의해 생성된 펩타이드의 ion peak m/z(842.510, 2211.1046)를 표준 peaks로 이용하였다. 분석이 완료된 mass spectrum으로부터 단백질 동정을 위하여 Rockefeller 대학에서 개발한 ProFound 검색엔진(http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)을 이용하였다.

III. 結 果

1. 이차원 전기영동에 의한 이미지 분석

산삼약침시술 전과 후의 혈장으로 이차원전기영동을 시행한 후, gel 분석을 통하여 expression 차이가 나는 spot을 찾아 질량분석과 단백질 동정을 통하여 spot을 분석하고자 하였다. Plasma sample 200 μ g을 analytical gel로 분석했으며 전체적인 proteome composition은 일반적인 plasma pattern과 크게 다르지 않았다(Fig. 4).

Gel 분석에서 약 500 여개의 spot을 평균적으로

detection하여 분석을 진행하였고, sample간의 개체차가 expression pattern에 반영되었으며, 이 개체차가 각각의 산삼약침시술 전과 후에서 일관되게 유지되어 있으므로 실험적으로 발생하는 오차는 무시하였다.

발현변화의 유의성에 대한 판단은 실험 전에 비해서 약침 시술 후에서 각 개체별로 부분적으로 또는 전체적으로 발현양이 증가하거나, 감소하는 경향이 있는 것을 선택하였다. 이 부분은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 첫째는 변화의 결과가 절대적인 양으로 봐서 전체적으로 증가하거나 전체적으로 감소한 경우이고, 둘째는 실험 전에서 개체차이로 인해서 기본적인 양에서 차이 나는 spot들이 약침 시술 후에서 증가하거나 감소하는 경향이 있는 부분들을 포함하고 있으며 개체별 차이로 인정되는 부분에 대한 선별은 시행하지 않았다. 이렇게 하여 28개의 spot이 선정되었다(Fig. 5).

각각의 spot에 대한 발현 변화는 다음과 같으며(Fig. 6), 발현변화 정도를 정리하면 Table. 1과 같다.

발현 정도를 확인 한 결과 두 배 이상 증가한 spot은 204, 1302, 2205, 3105, 7104, 그리고 8006이었으며, 한 배 가량 증가한 spot은 1101, 1505, 2013, 2403, 3009, 3010, 4002, 4009, 6704, 그리고 8101이었고, 감소한 spot은 205, 801, 803, 3205, 5202, 6105, 6106, 7103, 9001, 9003이었다.

2. 질량분석을 통한 단백질 동정

위 실험에서 결정된 spot들을 질량분석기를 통하여 단백질을 동정하였다. 동정된 것 중에 아직 확인이 안된 단백질은 205, 804, 1302, 4009, 6105, 6106이며, 1101의 경우 아직 이름이 없는 단백질로 확인되었다. 그리고 204는 complement receptor CR2-C3d, 801은 YAP1 단백질, 803은 antitrypsin polymer, 1505는 PRO0684, 2013과 3010은 proapolipoprotein, 2205는 USP48, 2403은 vitamin D binding protein, 3009는 complement component 4A preprotein, 3105는 immunoglobulin lambda chain, 3205는 transthyretin, 4002는 Ras-related protein Ral-A, 4204는 beta actin, 5202와 7104는 apolipoprotein L1, 6704는 alpha 2 macroglobulin precursor, 7103은 complement component 3 precursor, 8006은 testis-specific protein Y, 8101은 transferrin, 9001은 (Alpha-Oxy, Beta-(C112g)deoxy) T-State Human Hemoglobin, 9003은 human hemoglobin으로 확인되었다(Table 2.).

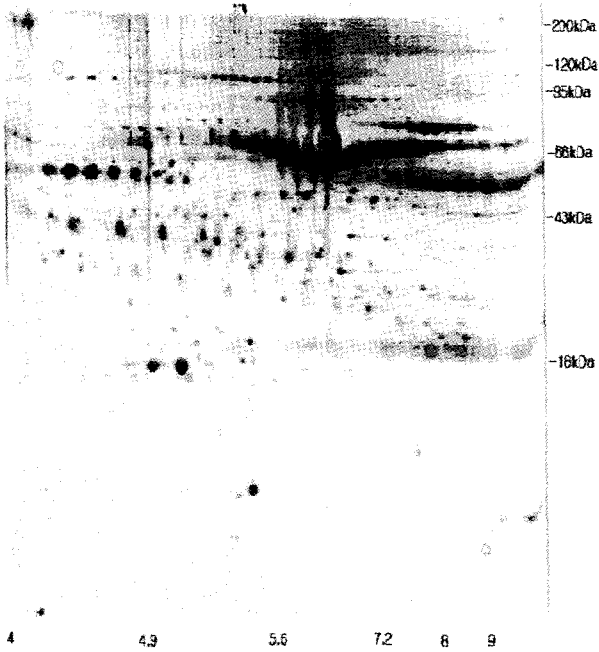


Fig. 4 2-Dimensional electrophoresis of plasma from the pl and molecular weight

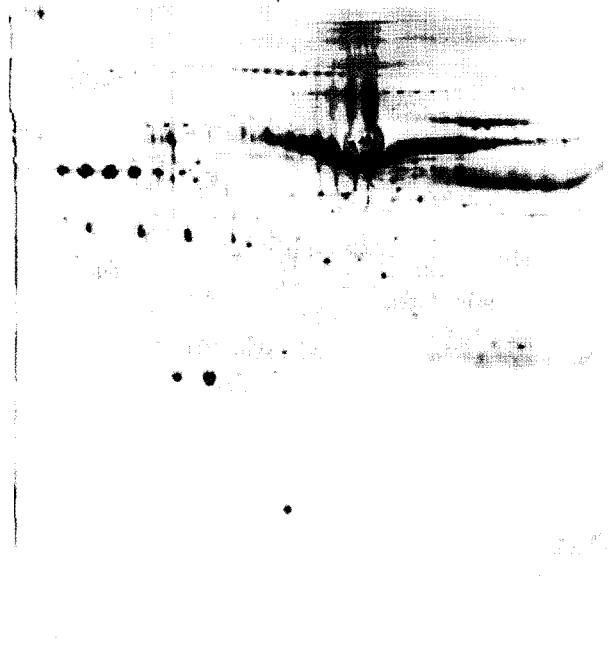


Fig. 5 2-Dimensional electrophoresis pattern of the human serum 28 protein spots were detected after intravenous injection of cultivated wild ginseng pharmacopuncture

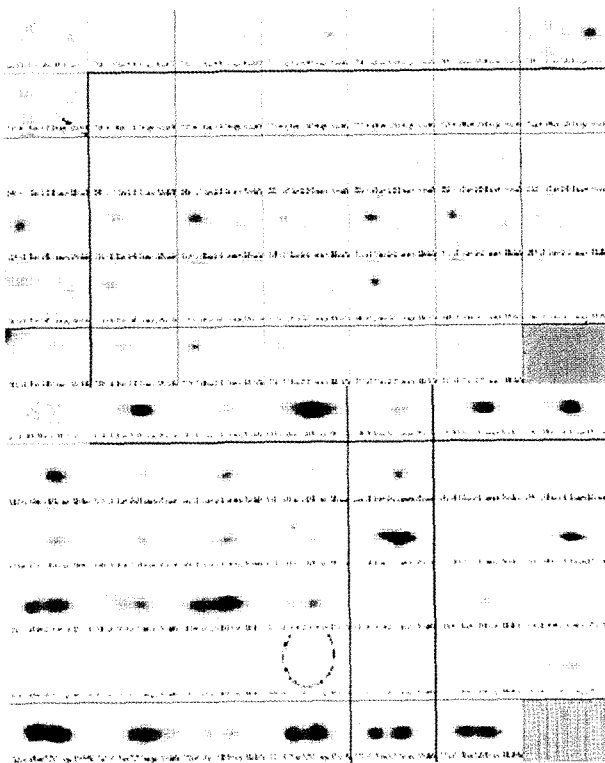


Fig. 6-1 Each spot image of 28 proteins

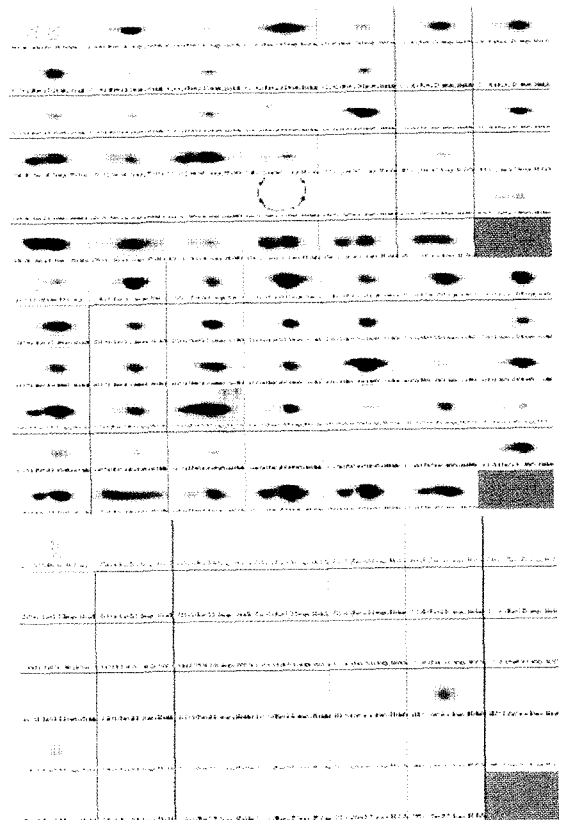


Fig. 6-2 Each spot image of 28 proteins

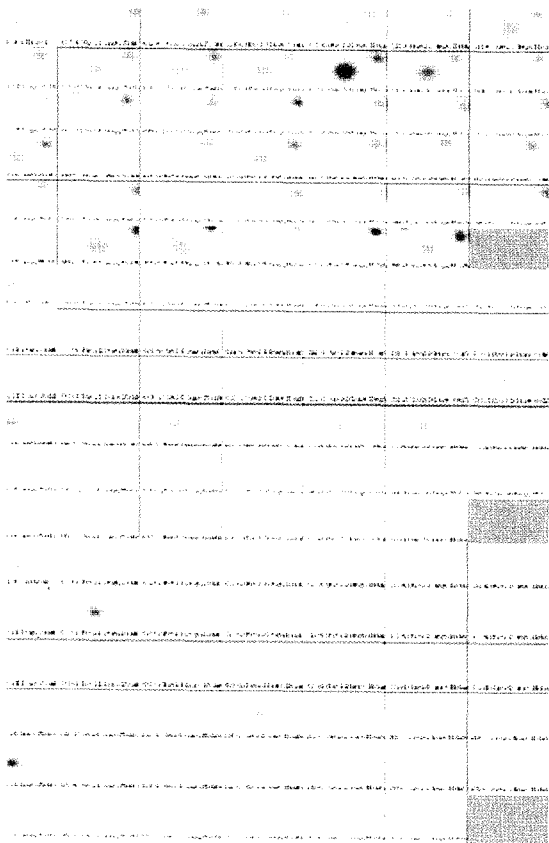


Fig. 6-3 Each spot image of 28 proteins

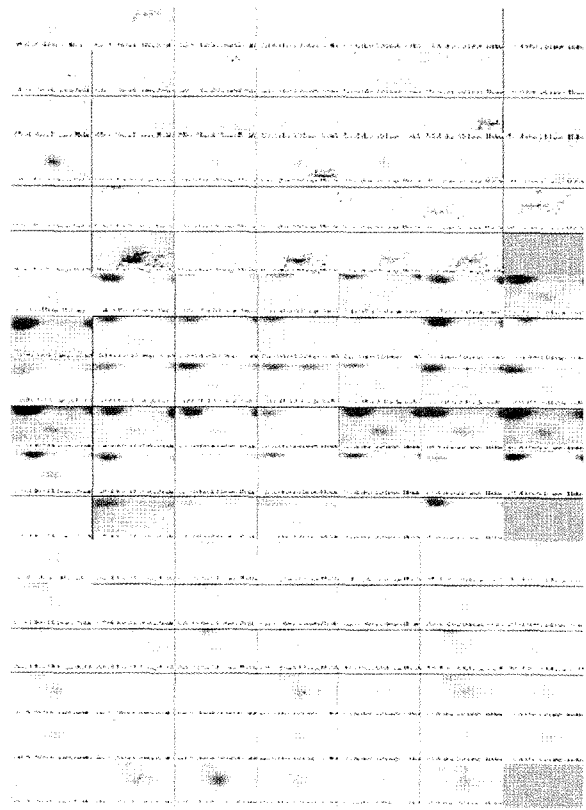


Fig. 6-4 Each spot image of 28 proteins

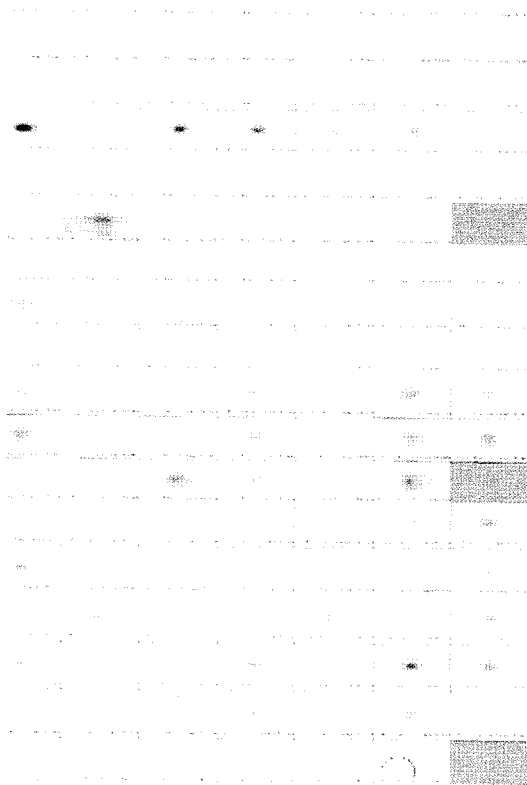


Fig. 6-5 Each spot image of 28 proteins

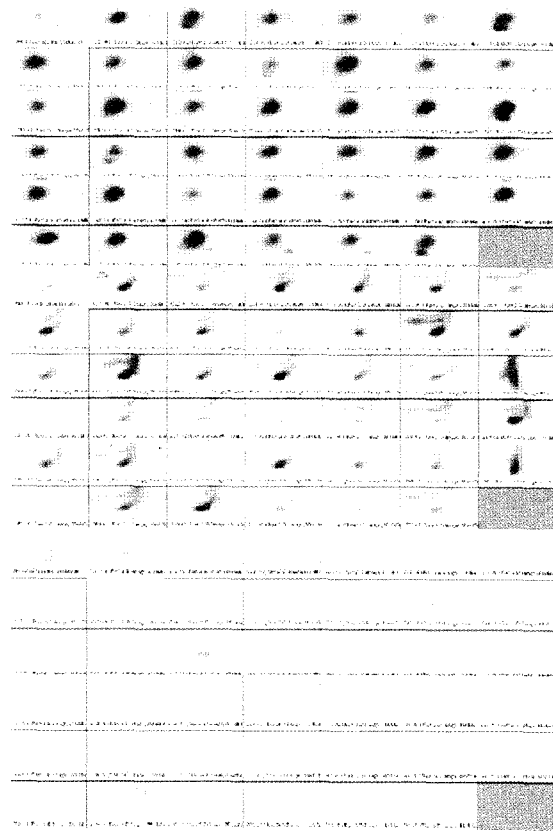


Fig. 6-6 Each spot image of 28 proteins

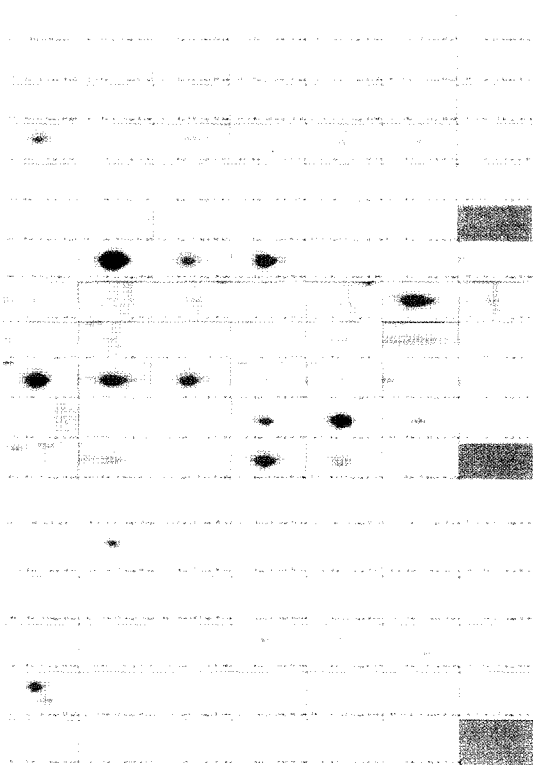


Fig. 6-7 Each spot image of 28 proteins

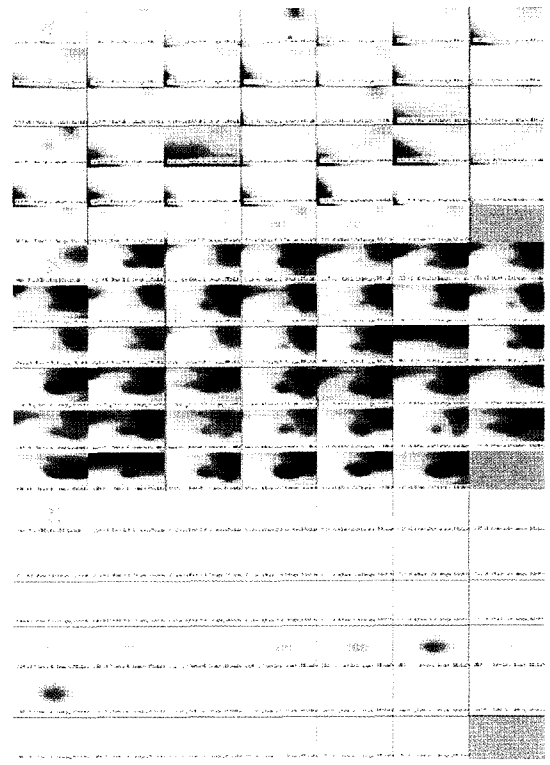


Fig. 6-8 Each spot image of 28 proteins

Table 1. The expression level of serum protein by 2-Dimensional electrophoresis.

No. of Spot	Molecular weight(kDa)	pI	Expression level
204	41.4	4.5	↑↑
205	40.8	4.6	↓
801	133.0	4.5	↓
803	131.8	4.7	↓
804	133.8	4.5	Not identified
1101	22.9	4.9	↑
1302	49.7	4.9	↑↑
1505	61.5	4.9	↑↑
2013	22.9	5.2	↑
2205	32.6	5.2	↑↑
2403	58.6	5.2	↑
3009	22.6	5.4	↑
3010	17.9	5.4	↑
3105	21.8	5.4	↑↑
3205	34.4	5.7	↓
4002	27.1	6.0	↑
4009	21.5	5.8	↑
4204	42.4	5.9	Not identified
5202	42.4	6.6	↓
6105	36.1	7.5	↓
6106	29.1	7.1	↓
6704	91.8	7.2	↑
7103	22.5	7.7	↓
7104	28.8	8.0	↑↑
8006	22.3	8.6	↑↑
8101	38.2	8.6	↑
9001	5.6	9.4	↓
9003	5.6	9.0	↓

Table 2-1. The detected proteins by 2-Dimensional electrophoresis after intravenous injection of cultivated wild ginseng pharmacopuncture.

Spot No	Gi No	Peptide Sequenced	Protein name	MW(kDa)	pI
204	14488494	FGLEKR WLILEK GYTQQLAFR KGYTQQLAFR QPSSAFAAFVKR AGDFLEANYMNLQR	Chain A, Cr2-C	41.4	4.5
205	-	-	-	40.8	4.3
801	23398532	LDPRFAMNQR YFLNHIDQTTTWQDPRK QSSFEIPDDVPLPAGWEMAK SHSRQASTDAGTAGALTPQHVR	YAP1 protein	133.0	4.5
803	7546268	SVLGQLGITK FLENEDRR LSITGTYDLK LGMFNIQHCK AVLTIDEKGTEAAGAMFL	Antitrypsin	131.8	4.7
804	-	-	-	133.8	4.5
1101	21757165	ICIHHPSSR VNEMDGLIAYSK ICIHHPSSRIIEYCR YEIDNDLMEFNILKNSFK SSGDSLPSYPVHSETMTARK	unnamed protein	22.9	4.9
1302	-	-	-	49.7	4.9
1505	6855601	SVLGQLGITK FLENEDRR LSITGTYDLK LGMFNIQHCK GKWERPFEVK VFSNGADLSGVTEEAPLKLSK LYHSEAFVNFVDTEEAKK KLYHSEAFVNFVDTEEAK	PRO0684	61.5	4.9
2013	178775	AHVDALR LEALKENGGAR DLATVYVDVLK WQEEMELYR THLAPYSDELRL LSPLGEEMRDR VQPYLDDFQKK KWQEEMELYR VEPLRAELQEGAR THLAPYSDELRLRQR LLDNWDSVTSTFSK DSGRDYVSQFEGSALGK	proapolipoprotein	22.9	5.2

Table 2-2. The detected proteins by 2-Dimensional electrophoresis after intravenous injection of cultivated wild ginseng pharmacopuncture.

Spot No	Gi No	Peptide Sequenced	Protein name	MW(kDa)	pI
2205	15079488	YFCENCQSK FNDEDIEKMEGK IWLEPCIRGVCR QLTDCISEFLKEEK LNTYIGFSEILDMEPYVEHK LQTQEKPNNTTVQVPAFSSRAGR	USP48 protein	32.6	5.2
2403	28373620	YTFELSR THLPEVFLSK RTHLPEVFLSK VMDKYTFELSR VMDKYTFELSR KFPSGTFEQVSQLVK SLGECCDVEDSTTCFNAK SCESNSPFPVHPGTAECCTK EVSLSLTEACCAEGADPDCYDTR HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFRK	Vitamin D Binding Protein	58.6	5.2
3009	14577919	GLCVATPVQLR GSFEFPVGDAVSK LPMMSRCEQR SFFPENWLWR TKGLCVATPVQLR EELVYELNPLDHR EGAIHREELVYELNPLDHR	complement component 4A preproprotein	22.6	5.4
3010	178775	AHVDALR LAEYHAK AKPALEDLR LSPLGEEMR QKLHELQEK LEALKENGGAR WQEEMELYR THLAPYSDEL R LSPLGEEMRDR VQPYLDDFQKK DYVSQFEGSALGK KWQEEMELYR VEPLRAELQEGAR THLAPYSDEL RQR LLDNWDSVTSTFSK DSGRDYVSQFEGSALGK	Proapolipoprotein	17.9	5.4
3105	1006640	ISGSKSGTSASLAITGLR SYSCQVTHEGSTVEK AAPSVTLFPPSSEELQANK	Ig lambda chain	21.8	5.4

Table 2-3. The detected proteins by 2-Dimensional electrophoresis after intravenous injection of cultivated wild ginseng pharmacopuncture.

Spot No	Gi No	Peptide Sequenced	Protein name	MW(kDa)	pI
3205	1827569	AADDTWEPFASGK CPLMVKVLD AVR KAADDTWEPFASGK GPTGTGESKCPLMVK ALGISPFHEHAEVVFTANDSGPR	Transthyretin	34.4	5.4
4002	131834	MAANKPK VFFDLMR VIMVGSGGVGK ANVDKVVFFDLMR	Ras-related protein Ral-A	27.1	6.0
4009	-	-	-	21.5	5.8
4204	14250401	IIAPPERK DSYVGDEAQSK AVFPSIVGRPR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK	beta actin	42.4	5.9
5202	13374347	GIGKDIR ALDNLAR VNEPSILEMSR ANLQSVPHASASRPR VTEPISAESGEQVER	apolipoprotein L1	42.4	6.6
6105	-	-	-	36.1	7.5
6106	-	-	-	29.1	7.1
6704	4557225	VDSHFR QGIPFFGQVR AIGYLNTGYQR VGFYESDVMGR VTAAPQSV CALR SGGRTEHPFTVEEFVLPK MCPQLQQYEMHGPEGLR LHTEAQIQEEGTVVELTGR SSSNEEVMFLTVQVKGPTQEFK	alpha 2 macroglobulin precursor	91.8	7.2
7103	4557385	VVPEGIR LPYSVVR AVLYNYR CCEDGMR SLKV VPEGIR HQQTVTIPPK QPVPGQQMTLK RHQQTVTIPPK AVLYNYRQNQELK SNLDEDIIAEENIVSR	complement component 3 precursor	22.5	7.7

Table 2-4. The detected proteins by 2-Dimensional electrophoresis after intravenous injection of cultivated wild ginseng pharmacopuncture.

Spot No	Gi No	Peptide Sequenced	Protein name	MW(kDa)	pI
7104	13374347	NWFLK GIGKDIR LRALADGVQK VNEPSILEMSRGVK ANLQSVPHASASRPR	apolipoprotein L1	28.8	8.0
8006	107878	VPERLR LRQGFCGVGR GFSVNEAIFKGV VQSGRGFSVNEAIFK	testis-specific protein Y	22.3	8.6
8101	14277728	ASYLDCIR KSCHTGLGR KASYLDCIR DSGFQMNQLR CQSFDRDHMK DSGFQMNQLR DSAHGFLKVPPR KDSGFQMNQLR	Transferrin	38.2	8.6
9001	1942686	SAVTALWGK VHLTPEEK LHVDPENFR VVAGVANALAHK LLVVYPWTQR VNVDEVGGEALGR EFTPPVQAAYQK VVAGVANALAHKYH GTFATLSELHCDK VLGAFSDGLAHLNLK FFESFGDLSTPDAVMGNPK	T-State Human Hemoglobin	5.6	9.4
9003	1431650	LHVDPENFR VNVDEVGGEALGR EFTPPVQAAYQK	Human Hemoglobin	5.6	9.0

IV. 考 察

프로티옴(proteome)은 단백질(protein)과 유전체(genome)의 합성용어로서 기능성 단백질을 전체적으로 해석하고 유전체의 기능뿐만 아니라 더 나아가 생물의 기능을 해명하려는 연구 분야이다³⁰⁾. 프로티옴의 연구에는 여러 생물 종들에 있어서 조직 및 시기 특이적으로 발현하고 있는 단백질의 database를 만들어 생명현상을 이해하고 나아가서 질병을 치료하거나 의약품의 개발,

환경문제와 식량문제를 극복하기 위한 유용한 식물을 만드는데 목적이 있다.

미국이나 유럽에서는 생물의 유전자 정보를 해독하는 유전체연구가 활발하게 진행되어 왔으며, 1995년 이후 많은 생물에서 유전체의 전체 염기서열이 결정되어 유전자의 구조와 유전자 발현에 대하여 더욱더 많은 이해가 가능하게 되었다. 그러나 유전체 해석에서 결정된 염기서열로부터 database를 이용한 상동단백질의 검색에 의하여 기능이 추정되는 단백질의 비율은 전 해

독(translation) 산물의 30%에서 50%정도에 지나지 않는 것을 알 수 있었다.

그 기능이 알려지지 않은 유전자들을 동정하기 위하여 최근에는 포스트 게놈 연구로서 단백질의 생화학적 및 물리학적 특성을 분석하여 단백질과 그것들을 암호화하는 게놈 DNA와의 관계를 밝히는 연구, 게놈정보를 이용하면서 프로틴은 연구가 추진되어야 할 필요성이 대두되고 있다. 대다수의 단백질은 해독 중 또는 해독 후에 여러 가지 변형과정을 거쳐 특유의 입체구조를 갖고 성숙단백질이 된다.

그리고 상호적으로 작용하며 그 기능을 발휘한다. 따라서 단백질의 기능을 밝히는 경우에는 반드시 기능을 하고 있는 단백질 그 자체를 분석하고, 번역 중 및 번역 후의 변형과정과 입체구조 및 상호작용 등에 관한 정보를 수집할 필요가 있다. 따라서 게놈 해석에 대응하기 위하여 대규모의 고효율적 방법인 단백질 해석, 다시 말하면 프로티오믹의 해석이 필요하다.

최근 임상적 의미에 있어서 사람의 질병을 예측하고 진단하는 방편으로 사람의 serum 또는 plasma를 이용하여 biomarker를 찾고자 많은 연구들이 진행되고 있다. 그러나 사람 serum의 경우 수십만의 손상되지 않고 변형되거나 분해된 단백질들이 있으므로 그대로 연구하기 위하여서는 쉽지가 않다. 그러므로 여러 방법을 이용하여 그 많은 단백질 가운데 질병과 관계있는 biomarker를 찾고 확인한 다음 실제 임상적으로 적용하기 위하여 많은 연구가 있어야 할 것이다.

약침요법은 鍼灸·經絡과 本草理論에 의하여 각종의 한약재를 일정한 방법으로 조제한 후 經穴 등에 주입하여 刺鍼과 藥物效果를 바탕으로 질병을 치료하는 新鍼療法이다⁴⁾. 약침의 시술부위는 辨證에 의해 선택된 經穴과 壓痛點 등이 대부분이며, 시술 방법으로 靜脈注入을 시행하는 경우는 중국에서 水鍼療法 혹은 穴位注射療法이라고 하여 procaine, vitamin 제제, 포도당과 같은 양방주사제제나 한약, 혹은 한약과 양약을 혼합해서 만든 다양한 제제들이⁵⁾ 임상에 사용되고 있으나 국내에서는 아직 연구단계에 있다.

인삼약침과 관련된 연구는 인삼약침의 제제별 및 종류별 연구와 진통¹⁾, 면역¹⁸⁻¹⁹⁾, 당뇨²⁰⁾, 혈압강하¹⁷⁾, 갑상선장애²²⁾, 항 Allergy²³⁾, 간 및 위기능 회복과 혈전 등²³⁾에 유의한 효과가 있고, 독성, 안전성¹⁶⁾ 등이 보고되었다.

산삼 혹은 산양산삼 증류약침을 혈액주입용으로 조제하여 보고된 실험으로는 권 등²⁴⁾이 mouse와 rat에서

급성·아급성 독성 및 항암효과를 관찰한 결과, 산양산삼 증류약침은 아무런 독성 반응을 나타내지 않았고, Sarcoma-180 복강암 유발 동물 모델에서 생존률을 115% 이상 증가시키는 결론을 얻은 바 있었다.

또한 무작위 대조 임상 실험에서도 인체에 특이한 변화를 일으키지 않았으며, CBC나 B/C, 그리고 UA 상에서도 유의한 변화를 일으키지 않았음을 보고²⁵⁾하였다.

A549 human lung cancer cell을 이용한 in vitro 실험에서도 산삼약침은 세포사멸 효과가 있고, 이의 기전은 apoptosis 유도에 의한 것으로 추정되며, 특히 동일한 농도에서 pH와 전해질을 조절한 경우에서 세포사멸효과가 우수하였음이 보고^{26,27)}되었다.

따라서 본 연구는 산삼약침을 시술하였을 때 나타나는 혈장의 protein 변화를 관찰하여 biomarker를 찾고자 하는 목적으로 시도되었다. 이를 위하여 건강한 성인 남·여 20명을 대상으로 시술 전과 시술 후에 각각 적정량 채혈한 뒤 이차원전기영동을 시행하였고 gel 분석을 통하여 차이가 나는 spot을 찾아 질량분석과 단백질을 동정하였다. 이 분석을 통하여 산삼약침을 시술하였을 때 혈액 내에 변화가 생기는 단백질의 spot을 찾아 질량분석과 단백질 동정을 통하여 분석하였다.

그 결과 산삼약침을 시술한 후에 나타나는 혈장 단백질의 발현에서 시술 전에 비하여 두 배 이상 증가한 spot은 204, 1302, 2205, 3105, 7104, 8006이었으며, 한 배 정도 증가한 spot은 1101, 1505, 2013, 2403, 3009, 3010, 4002, 4009, 6704, 8101이었고, 감소한 spot은 205, 801, 803, 3205, 5202, 6105, 6106, 7103, 9001, 9003이었다.

동정한 결과 아직 확인되지 않은 단백질은 205, 804, 1302, 4009, 6105, 6106이며, 1101의 경우 아직 이름이 없는 단백질로 확인되었다. 그리고 204는 complement receptor CR2-C3d, 801은 YAP1 단백질, 803은 antitrypsin polymer, 1505는 PRO0684, 2013과 3010은 proapolipoprotein, 2205는 USP48, 2403은 vitamin D binding protein, 3009는 complement component 4A preprotein, 3105는 immunoglobulin lambda chain, 3205는 transthyretin, 4002는 Ras-related protein Ral-A, 4204는 beta actin, 5202와 7104는 apolipoprotein L1, 6704는 alpha 2 macroglobulin precursor, 7103은 complement component 3 precursor, 8006은 testis-specific protein Y, 8101은 transferrin, 9001은 (Alpha-Oxy, Beta-(C112g)deoxy) T-State Human Hemoglobin, 9003은 human hemoglobin으로 확인되었다.

면역계는 외부로부터 침입해 오는 다양한 종류의 미

생물에 대항하기 위하여 존재하는 것으로 직접적으로 병원균이나 immunogen이 특이한 항원 수용기(specific antigen receter)에 접촉했을 때 B세포가 활성화되어 항체를 만들어내는 plasma 세포와 기억세포를 만들어 내게 된다. 지금까지 널리 알려진 바로는 다른 부가적인 신호로 B 세포의 CR2/CD19/CD81 막 단백질 복합체를 통하여 매개된다. 몇몇 종류의 complement가 특이하게 CR2에 의하여 인식되며 세균 막의 항원성 epitope와 C3d 분자가 동시에 존재할 경우 AgR과 CR2가 발현되는 B 세포에 의하여 인식된다³²⁻³⁵.

Complement receptor CR2는 면역계에서 중요한 단백질로 4가지 형태가 알려져 있다. 첫째는, C3d, C3dg 및 iC3 형태로 CR2의 short concensus repeats(SCR) 1,2에 결합하며 주로 항원의 면역원성(immunogenicity, 항체반응의 하나)을 증가시키고, 둘째는, Epstein-Barr virus(EBV)의 gp 350/220 형태로 CR2의 SCR 1, 2에 결합하여 EBV의 감염에 반응하며 IgE 생성을 증가시키는 역할을 한다³⁶⁻³⁷. 셋째는, CD23 형태로 SCR 5에서 8에 결합하며 세포사(apoptosis)가 일어날 때 세포의 생존에 관여하고 IgE 생성을 증가시키며³⁸, 넷째는, IFN α 형태로 SCR 1,2에 결합하여 세포증식을 억제하며 EBV의 감염을 억제한다³⁹.

그러므로 본 실험에서 산삼약침을 시술한 경우 CR2-C3d(204)가 두 배 이상 증가하였는데, 이것은 상기항바와 같이 미생물 또는 병원균이 외부에서 침입해 들어올 때 면역계에서 보호하는 작용으로 증가된 것으로 사료된다. 이미 여러 보고⁴⁰⁻⁴²의 내용과 같이 인삼의 경우 면역계에 작용하여 여러 종류의 사이토카인 분비를 증가시켜 외부로부터 들어오는 병원균이나 암으로부터 보호한다고 알려져 있는 것과 연관이 있을 것으로 사려된다.

YAP1(801)은 전사인자(transcription factor)로 빵효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발견되었으며, 주로 세포에서는 oxidative stress와 관련되어 있다. 특히 포유동물에서는 c-Fos와 c-Jun과 homology가 높은 전사인자이며, 이분법으로 분열하는 분열효모인 *Schzosaccharomyces pombe*에서는 PAP1과 *Candida albicans*에서는 CAP1이 homology가 높다. *S. cerevisiae*에서 Yap1은 세포질에서 주로 발견되나 산화성 물질인 diamide나 diethylmaleate를 처리할 경우 핵 내에 빠르게 축적된다⁴².

포유동물의 전사인자 중 YAP1과 관련이 있는 단백질로는 nuclear factor of activated T cell(NFAT)이 있는데

이것은 칼슘에 의하여 조절되며, 항원에 의한 자극에 의해 T 림프구의 활성화에 중요한 역할을 한다⁴³. 최근에 NFAT가 신경세포나 심장세포 및 다른 여러 세포의 기능과 발생에 매우 중요한 역할을 하고 있음이 발견되었다⁴⁴⁻⁴⁶.

NFAT 전사인자의 활성화는 YAP1과 같이 그 인자의 위치에 따라 주로 조절되는데, 세포가 자극을 받지 않은 경우 세포질에 존재하다가 적절한 자극, 즉 세포내 칼슘 농도의 증가, 칼슘/calmodulin에 의한 phosphatase, calcineurin 등에 의하여 자극을 받을 경우 NFAT가 탈인산화되며 핵 내에서 빠르게 움직이게 된다⁴⁷⁻⁴⁸.

T 세포에서 NFAT는 AP-1 전사인자와 핵 내에서 함께 작용하여 유전자발현을 일으킨다⁴⁹.

본 실험에서 산삼약침을 시술한 경우에서 YAP1이 감소한 것으로 나타났는데, YAP1 단백질의 경우 효모에서 나타나는 단백질로 잘못 확인된 것으로 사료되며, YAP1이 포유동물에서 나타나는 단백질로는 NFAT가 있는데 좀 더 많은 확인동정에 의하여 규명해야 할 것이다.

Antitrypsin(803)은 간세포에서 주로 많이 분비되는 확산성 단백질(diffusible protein)로⁵⁰ 대부분 조직에 존재하며 폐의 상피세포 내막액(lung epithelial lining fluid)의 주요 단백질 구성성분이다. 보통의 경우 2-5M 정도 분비되는 것으로 알려져 있으나 폐렴이나 급성호흡곤란증후군(acute respiratory distresssyndrome)과 같은 염증 반응이 일어날 때 폐에서 많은 양을 분비하여 10M 이상을 넘게 되면 어떤 경우에는 plasma에서도 관찰된다⁵¹⁻⁵².

Antitrypsin은 폐에서 중성구(neutrophil) elastase, protease 3, cathepsin G, plasminogen activator 및 림프구 granzyme과 같은 세린단백질분해효소를 저해하는 항단백질 분해효소로서 기능을 가지고 있으며⁵⁰, 항단백질 분해효소로서의 기능 중 특이한 경우로 단백질의 358과 351번째 메치오닌을 산화시킴으로써 단백질분해효소의 기능을 차단한다. 이런 기능은 단백질의 항산화성 기능과 관련하여 생물학적으로 매우 중요한 것으로 여겨진다⁵³⁻⁵⁴. 특히 중성구 defensin의 세포독성을 막을 뿐만 아니라 상피세포에서 interleukin-8의 생성을 조절하기도 한다⁵⁵⁻⁵⁶. 이것은 임상적으로 호흡기에 antitrypsin이 충분하지 않을 때 proinflammatory 인자로서 광범위한 항염증반응 중 중성구에 의한 폐염증의 조절에 중요한 인자로 여겨진다.

본 실험에서 관찰된 바로는 산삼약침 시술 후에

Antitrypsin이 감소한 것으로 나타났는데, 이것은 좀더 많은 연구를 함으로써 폐의 상피세포 보호 작용을 설명할 수 있으리라 생각된다.

관상동맥질환(coronary heart disease)의 위험성은 직접적으로 혈관 내에 존재하는 LDL 콜레스테롤(이하 LDL-C)과 HDL 콜레스테롤(이하 HDL-C)의 전체적인 양과 관련이 있으며, 혈관 내 LDL-C의 조절기작과 동맥경화(atherosclerosis)에서의 조절기작은 잘 알려져 있으나 HDL-C이 어떻게 작용하여 보호하는지에 대하여서는 아직 분명하지 않다⁵⁷⁻⁵⁸⁾.

HDL은 크기와 조성에서 여러 다른 분자들로 구성되어 혈액 순환하는 과정에 계속적으로 대사과정을 거치며 변하게 된다. 초기의 HDL은 간과 장에서 생성되며 주된 단백질인 apolipoprotein 즉 apoA-I는 propeptide (proapoA-I) 형태로 분비되어 빠르게 분해되면서 apoA-I 형태로 변하게 된다. 결국은 Apo A-I은 HDL의 주요 단백질 구성성분으로 콜레스테롤의 운반에 관여하며 동맥경화를 막아주는 기능을 한다.

이 단백질은 콜레스테롤의 역전송(reverse cholesterol transport)을 촉진시켜 말초혈관세포(peripheral blood cells)에서 간으로 콜레스테롤을 운반함으로써 제거하게 된다⁵⁹⁻⁶⁰⁾. 이미 인삼의 효능 실험에서 혈중 콜레스테롤의 함량 저하와 배설 촉진, 고콜레스테롤 혈증으로 야기되는 혈관병변을 예방하는 효과가 있음이 증명되었으며, 또 LDL-C의 감소와 HDL-C의 상승으로 동맥경화 지표의 개선효과가 있음이 연구되었다.

본 실험에서 산삼약침 주입 후에 2013과 3010인 proapolipoprotein과 7104인 apolipoprotein 단백질이 증가되었는데 이는 산삼약침이 동맥경화의 예방 기능이 있을 것으로 추정되어, 향후 연구에 중요한 의미가 되리라 여겨진다.

Vitamin D-binding protein(DBP, 2403)은 많은 기능을 가지고 있는 serum 단백질이다⁶¹⁾. 처음 발견 되었을 때 serum에 존재하므로 group-specific component(Gc-globulin)라 하였으며⁶²⁾, 아직까지 정확한 기능은 모르지만 법의학과 집단유전학에서는 매우 중요하게 여기는 단백질이다.

DBP는 다양한 조직에서 발현되며 간에서 분비되어 serum 내에 대부분 존재하고 있다⁶³⁾. 약 58 kDa 정도의 당단백질(monomeric glycoprotein)로 rat, mouse, 토끼, 거북이, 닭에도 존재하는 것으로 밝혀져 있다. 가장 중요한 기능 중 한 가지는 스테롤과 결합하거나 용해시켜

serum으로 운반하며 특히 vitamin D 대사산물의 전체의 20배 이상을 혈장(plasma) 내에서 운반한다.

다른 기능으로는 actin scavenger로 DBP는 monomeric G-actin과 관계가 있는데 단백질의 C-말단에 결합할 수 있는 부위가 존재한다⁶⁴⁾.

G-actin과의 결합은 조직손상, 즉 조직의 허혈(tissue ischemia)이나 염증이 생겼을 때 actin을 혈액순환을 통하여 분비하는 중요한 기작이다⁶⁵⁾. 이러한 actin과 DBP 복합체는 간염환자나 급성호흡곤란증후군 환자, 세균성 패혈성 쇼크나 세균성 폐렴 및 다발성 외상(multiple trauma) 환자에서는 매우 중요하다.

그리고 다른 기능으로 대식세포를 활성화(macrophage activation) 시킴으로써 병원균의 침입을 막고 암세포를 파괴시킨다⁶⁶⁾. 또 다른 기능으로 식세포(Phagocytic Cells)인 대식세포나 호중구(neutrophils)에 화학주성 효과(chemotactic effect)를 일으킨다⁶⁸⁻⁶⁹⁾. 특히 폐포 상피세포(alveolar epithelium)에 존재하여 폐 손상 시에 염증반응과 화학주성효과를 일으킨다⁷⁰⁾.

본 실험에서 산삼약침 주입 후에 2403인 DBP 단백질이 증가한 것으로 보아 산삼약침이 염증반응과 관련하여 이 단백질을 증가시킴으로써 폐를 보호할 수 있음을 추정할 수 있었다.

Transthyretin(TTR, 3205)은 가족성 아밀로이드 다면신경장애(familial amyloid polyneuropathy, FAP)를 일으키는 요인 중 아밀로이드 축적의 주된 구성 단백질로⁷¹⁾ TTR에 비정상적인 형태가 확인되었다. 그러므로 이 질환의 분자적 병태생리를 밝히는데 초기 단계로 중요하며, 질병의 발현 전 단계에서 위험성이 있는 사람의 유전적 검사로 TTR 돌연변이를 잠정적으로 사람을 확인하는데 도움이 된다.

아밀로이드원섬유(amyloid fibrils)의 주요 구성성분이 확인된 이후 면역조직화학적 방법을 통하여 FAP 환자의 말초신경계에서 널리 침적됨을 확인하였다. TTR은 주로 간에 의하거나 뇌의 맥락총(脈絡叢, choroid plexus)에 의하여 합성되지만⁷²⁾, 신경에서는 합성되는 것이 아니다. 즉 간이나 뇌의 맥락총에서 합성되어 분비된 다음 침적이 되는 조직으로 운반되는 것이다. 말초신경계에 침적된 TTR은 간 유래의 혈장단백질에서 파생되거나 뇌의 맥락총 유래의 뇌척수액(cerebrospinal fluid)에서 파생된다.

본 실험에서는 산삼약침 시술 후 3205인 이 단백질이 감소한 것으로 나타나 약침이 어느 정도 TTR에 의

한 뇌의 신경장애 진행을 억제할 수 있을 것으로 추정되었다.

세포골격의 증식, 분화 및 조절에 관여하는 세포조절 과정에 GTP 결합 단백질의 Ras가 관련되어 있다⁷⁹. Ras 단백질은 세포표면에서 핵으로 신호전달에 의하여 다양한 세포조절과정에 관여한다. 특히 직접적으로 관련이 있는 것으로 Ca²⁺/calmodulin과 Ras 단백질의 전달과정이다. 이는 Ras-관련 GTP-결합 단백질 중 하나로 RalGDS는 ras21과 특이적으로 상호작용하는 것으로 알려졌다⁸⁰, Ras 신호전달과정에서 직접적으로 작용을 하여 Raf/mitogen에 의한 단백질 kinase cascade의 활성화와 비슷하게 세포의 형질을 전환시킬 수 있다^{74,76}. Ral-A는 tyrosine kinase 매개에 의한 phospholipase D 활성화와 관련되어 있는데, 이것은 Ras에서 Ral로의 신호전달과정에 의하여 phospholipid 대사과정의 조절이 일어남을 제시한다⁷⁷. Ral은 RLIP (Ral interacting protein)과 Cdc42가 상호작용하여 세포골격형성을 조절할 수 있다⁷⁸. 이와 더불어 Ral-A는 원형질막, 세포내 이입소포(endocytotic vesicles) 및 시냅스소포(synaptic vesicle) 및 분비성 세포소기관(specialized secretory organelles)에 존재하는데^{79,80}, 이것은 Ral 단백질이 세포내외 운동(endo- and exocytosis)이나 막의 물질교통(membrane traffic)에 관여하고 있음을 제시한다.

본 실험에서 산삼약침 시술 후 이 단백질(4002)이 증가한 것으로 보아 산삼약침이 세포내 신호전달에 관여하는 단백질을 증가시킴으로써 phospholipid 대사과정의 조절, 세포골격형성을 조절 및 세포내외 운동이나 막의 물질교통(membrane traffic)에 관여하고 있음을 시사한다.

성 결정 부위 Y 유전자(Sex determining region Y gene, SRY)는 전사인자를 해독하는 유전자로 포유동물에서는 testis를 결정하게 된다. 특히 HMG(human menopausal gonadotropin) 계열의 단백질에 DNA 결합부위를 가지고 있다. SRY의 HMG 부위는 포유동물에서 고도로 보존된 부위로 다른 종의 SRY 유전자에서는 보이지 않는다⁸¹.

본 실험에서 산삼약침 시술 후 이 단백질(8006)이 증가한 것으로 보아 산삼약침이 성 결정에 관여하는 단백질을 발현시키는 부분에 관여함을 추정할 수 있었다.

철 결핍은 적혈구 대사항진이나 실혈(失血, blood loss) 등으로 철 수요는 증가하는데 비해 식이에 의한 철분 섭취 또는 장관흡수가 불충분하기 때문에 생기고, 세계 어디에서나 가장 흔히 볼 수 있는 영양 결핍이다. 그리

고 저장철이 고갈되고 hemoglobin 생산에 필요한 철 공급이 불충분하게 된 결과로 빈혈이 나타난다. 장에서 흡수되어 혈류로 방출된 철분은 transferrin에 의해 철 함유 단백질이 합성되는 조직으로 운반되어 저장된다⁸². 이런 transferrin의 기능적 혈장 농도를 총 철 결합능(Total Iron Binding Capacity, TIBC)이라고 하며, 생리적 상태에서는 이런 총 철 결합능의 약 1/3이 철분과 결합된 상태로 되어있다. 일단 흡수된 철분의 체내 분포는 hemoglobin 형태가 가장 많고, 그 다음으로 저장철인 ferritin 혹은 hemosiderin의 형태로, 나머지 소량은 산소를 함유한 여러 효소들 및 transferrin 내에 존재한다. 저장철에는 ferritin과 hemosiderin의 두 종류가 있다. Hemosiderin은 간 내의 Kuffer 세포와 비장 및 골수의 macrophage에 함유되어 있고, 쉽게 용해되지 않는 안정된 상태이며, prussian blue에 착색되어 나타난다. Ferritin의 일부는 혈청 내에도 존재하는데(혈청 ferritin), 이것은 체내 철 저장이 어느 정도인가를 알려주는 지표가 되므로 임상적으로 유용하다⁸³.

본 실험에서 산삼약침 시술 후 이 단백질(8101)이 증가한 것으로 보아 산삼약침이 transferrin이나 ferritin 단백질을 증가시킴으로써 체내 철 평형에 관여하고 있음을 알 수 있다.

이상의 내용을 종합해보면 산삼약침을 혈액주입 전과 후에 각각 채혈하여 이차원전기영동을 시행한 후, gel 분석을 통하여 차이가 나는 spot을 찾아 질량분석과 단백질을 동정을 통하여 분석한 결과 면역계에서 작용하는 complement receptor CR2-C3d, complement component 4A preprotein, complement component 3 precursor, immunoglobulin lambda chain, alpha 2 macroglobulin precursor, (Alpha-Oxy, Beta- (C112g)deoxy) T-State Human Hemoglobin 및 human hemoglobin이 발견되었고, 전사인자로 YAP1 단백질이 확인되었다.

간세포에서 주로 많이 분비되는 확산성 단백질인 antitrypsin이 확인되었고, 동맥경화를 예방할 수 있는 기능을 가진 것으로 매우 중요한 단백질인 proapolipoprotein이 확인되었으며, 스테롤과 결합하거나 용해시켜 serum으로 운반하고 조직손상, 즉 조직의 허혈이나 염증이 생겼을 때 actin을 혈액순환을 통하여 분비하며 대식세포를 활성화시키며 폐를 보호할 수 있는 기능을 가진 vitamin D binding protein이 확인되었다. 가족성 아밀로이드 다면신경장애(familial amyloid polyneuropathy, FAP) 진행을 막을 수 있는 기능을 가진 transthyretin과

phospholipid 대사과정의 조절, 세포골격형성을 조절 및 세포내 외 운동이나 막의 물질교통(membrane traffic)에 관여하고 있는 Ras-related protein Ral-A가 확인되었다. 산소분자를 공급하는 hemoglobin도 확인되었으며, 성 결정에 관여하는 testis-specific protein Y도 발현되었고 체내 철 평형에 관여하고 있는 transferrin도 확인되었다.

이러한 결과는 항 후 산삼약침 시술 후에 나타나는 인체 혈액 내의 단백질 변화, 즉 biomarker를 찾는 연구에 기여할 것으로 여겨지며 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 結 論

산양산삼 증류약침의 혈액주입이 혈장(serum) 내 단백질에 어떠한 변화를 일으키는지를 관찰하고자 임상 자원자들을 대상으로 시술 전·후 혈장단백질을 확보한 후 이차원 전기영동(2-Dimensional electroporesis)하여 질량분석과 단백질 동정을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 28개의 spot이 시술 전·후에 차이를 나타내었다.
2. 발현 정도를 확인 한 결과 두 배 이상 증가한 spot은 204, 1302, 2205, 3105, 7104, 8006이었으며, 한 배 가량 증가한 spot은 1101, 1505, 2013, 2403, 3009, 3010, 4002, 4009, 6704, 8101이었고, 감소한 spot은 205, 801, 803, 3205, 5202, 6105, 6106, 7103, 9001, 9003이었다.
3. 단백질 동정을 시행한 결과 아직 확인이 안 된 단백질은 205, 804, 1302, 4009, 6105, 6106이며, 1101의 경우 아직 이름이 없는 단백질로 확인되었다. 그리고 204는 complement receptor CR2-C3d, 801은 YAP1 단백질, 803은 antitrypsin polymer, 1505는 PRO0684, 2013과 3010은 proapolipoprotein, 2205는 USP48, 2403은 vitamin D binding protein, 3009는 complement component 4A preprotein, 3105는 immunoglobulin lambda chain, 3205는 transthyretin, 4002는 Ras-related protein Ral-A, 4204는 beta actin, 5202와 7104는 apolipoprotein L1, 6704는 alpha 2 macroglobulin

precursor, 7103은 complement component 3 precursor, 8006은 testis-specific protein Y, 8101은 transferrin, 9001은 (Alpha-Oxy, Beta-(C112g)deoxy) T-State Human Hemoglobin, 9003은 human hemoglobin으로 확인되었다.

4. 미생물 또는 병원균에 대항하는 면역단백질인 CR2-C3d(204)는 약침 시술 후 두 배 이상 증가되었다.
5. 폐의 염증반응이 있을 때 분비되는 antitrypsin(803)은 약침시술 후 감소하였다.
6. 동맥경화의 예방과 개선에 중요한 역할을 담당하는 HDL-cholesterol의 주요 성분인 proapolipoprotein (2013, 3010)과 apolipoprotein (7104)은 약침시술 후 증가하였다.
7. 염증반응에서 폐를 보호하는 역할을 담당하는 vitamin D binding protein(DBP, 2403)은 약침시술 후 증가하였다.
8. 가족성 아밀로이드 다면신경장애(familial amyloid polyneuropathy, FAP)를 일으키는 주요 단백질인 transthyretin은 약침 시술 후 감소하였다.
9. phospholipid 대사과정의 조절, 세포골격형성을 조절 및 세포내 외 운동이나 막의 물질교통(membrane traffic)에 관여하고 있는 Ras-related protein Ral-A(4002)는 약침시술 후 증가하였다.
10. 성 결정에 관여하는 testis-specific protein Y(8006)는 약침시술 후 200% 이상 발현되었다.
11. 체내 철 평형에 관여하고 있는 transferrin(8101)도 약침시술 후 증가되었다.

參考文獻

1. 신순식 외. 산삼 감정 기준의 객관성. 한의학연구소 동의 한의연 제 5집. 107-114. 2001.

2. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 영림사. 1994 ; 531.
3. 중약대사전편찬위원회. 원역중약대사전. 정담출판사. 1997 ; 7 : 3473-3479.
4. 대한약침학회. 약침요법 기술 지침서. 대한약침학회. 1999 ; 13-14, 112-118, 138-203.
5. 姜風 外. 蔘麥注射液 配合 西藥 抱救 急性 心筋梗塞 合病 心源性 休克 23例. 中國 中西醫 結合 雜誌. 1999 ; 19(7) : 433, 434.
6. 張方元 外. 癌症 疼痛 的 中醫 藥 治療 概況. 中國 中西醫 結合 雜誌. 1999 ; 19(8) : 503-505.
7. 王燕燕. 加用 生脈 注射液 治療 急性 心筋 梗塞 的 治療 效果 觀察. 中國 中西醫 結合 雜誌. 1999 ; 19(10) : 631, 632.
8. 하대유. 인삼에 대한 세포학 및 면역학적 연구. 대한 면역학회지. 1979 ; 1(1) : 45-52.
9. 山田昌之. 朝鮮 人蔘 的 研究. 日本 藥理 學會 誌. 1955 ; 51 : 390.
10. Brekhman. I.I, Panax ginseng. Gosudarst Isdat et Med. Lit. Leningard 1957 : 1.
11. Garriques. S, Panax Quinquefolia. Am Chem Pharm. 1954 : 90 : 331.
12. 최진호. 인삼의 신비. 교문사. 1984 : 13, 14.
13. Takagi, K. Proceedings International Ginseng Symposium, The Central Research Institute, Office of Monopoly, 1974 : 119.
14. 이산명 외. 인삼, 녹용 및 목향 수침이 흰쥐의 체중 및 소화관 호르몬 분비에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1988 ; 5(1) : 1-5.
15. 김웅시 외. 수삼, 백삼 및 홍삼수침이 Alloxan 당뇨병 흰쥐에 미치는 영향. 대한 침구학회지. 1989 ; 6(1) : 1-5.
16. 남윤석. 약침용 홍삼추출액의 안전성 연구. 경희대학교 대학원. 1996.
17. 강성길 외. 인삼수침이 진통 및 혈압에 미치는 영향. 동양의학회지. 1985 ; 11(2) : 66-75.
18. 김태운 외. 인삼수침전처리가 발암예방에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1988 ; 9(2) : 33-44.
19. 황경애 외. 인삼 및 녹용수침의 시간경과에 따른 면역효과연구. 경희의학. 1988 ; 4(2) : 150-157.
20. 이혜정 외. 강혈당작용에 의거한 종류별 인삼수침 엑기스 제법연구. 대한한의학회지. 13(1) : 23-40.
21. 김용석 외. 인삼수침이 흰쥐의 갑상선 기능저하에 미치는 영향. 경희의학. 1990 ; 6(2) : 202-210.
22. 임하변 외. 인삼수침이 항 알레르기에 미치는 영향. 경희의학. 1991 ; 7(1) 63-72.
23. 김창일 외. 농도별 인삼수침이 hydrocortisone acetate를 투여한 흰쥐의 체내대사에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1988 ; 9(2) : 33-44.
24. 권기록 외. 정맥주입용 산양산삼 증류약침의 급성·아급성 독성 실험 및 Sarcoma-180 항암 효과에 관한 실험적 연구. 대한약침학회지. 2003 ; 6(2) : 7-27.
25. 권기록. 정맥주입용 산삼약침이 인체에 미치는 영향에 관한 임상적 연구. 대한약침학회지. 2004 ; 7(1) : 15-26.
26. 곡경승 외. pH 및 전해질 조절 산양산삼 증류약침의 Apoptosis에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 2004 ; 21(6) : 1-15.
27. 조희철 외. 농도별 산양산삼 증류약침의 Apoptosis에 관한 실험적 연구. 대한약침학회지. 2004 ; 7(2) 5-15.
28. Bradford MM., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 ; 7 : 248-254.
29. Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 1986 ; 1 : 361-363.
30. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem. 1996 ; 1 : 850-858.
31. 우선희 외. 프로테옴 해석에 의한 벼 게놈 기능해석과 응용. 한국식물생명공학회지. 2003 ; 30(3) : 281-283.
32. Fearon DT, Carter RH., The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. Annu Rev Immunol. 1995 ; 13, 127, 149.
33. Janeway CAJ, Medzhitov R., Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. Cell. 1997 ; 91 : 295, 298.
34. Carroll MC, Fischer MB., Complement and the immune response. Curr Opin Immunol. 1997 ; 9 : 64,

- 69.
35. Muller-Eberhard H.J., Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem.* 1988 ; 57 : 321, 347.
36. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT., EpsteinBarr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci.* 1984 ; 81 : 4510, 4514.
37. Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y, Kieff E., EpsteinBarr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell.* 1987 ; 50 : 203, 213.
38. Delcayre AX, Salas F, Mathur S, Kovats K, Lotz M, Lernhardt W., EpsteinBarr virus/complement C3d receptor is an interferon alpha receptor. *EMBO J.* 1991 ; 10 : 919, 926.
39. Aubry JP, Pochon S, Graber P, Jansen KU, Bonnefoy JY., CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature.* 1992 ; 358, 505, 507.
40. Song Z, Moser C, Wu H, Faber V, Kharazmi A, Hoiby N. Cytokine modulating effect of ginseng treatment in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Cyst Fibros.* 2003 ; 2 : 112-119.
41. Liou CJ, Li ML, Tseng J., Intraperitoneal injection of ginseng extract enhances both immunoglobulin and cytokine production in mice. *Am J Chin Med.* 2004 ; 32 : 75-88.
42. Kuge S, Jones N, Nomoto A., Regulation of γ AP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* 1997 ; 16 : 1710-1720.
43. Rao A, Luo C, Hogan PG., Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 1997 ; 15 : 707-747.
44. Graef IA, Mermelstein PG, Stankunas K, Neilson JR, Deisseroth K, Tsien RW, Crabtree GR., L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature.* 1999 ; 401 : 703-708.
45. de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L, Langille BL, Crabtree GR, Mak TW., Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature.* 1988 ; 182-186, 392.
46. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN., A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 1998 ; 93 : 215-228.
47. Shaw KT, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J, Sharma S, Rao A, Hogan PG., Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 ; 92 : 11205-11209.
48. Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR., Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev.* 1997 ; 11, 824-834.
49. Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A., Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature.* 1992 ; 356 : 801-804.
50. Brantly M, Nukiwa T, Crystal RG., Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am. J. Med.* 1988 ; 84 : 1331.
51. Abrams WR, Fein AM, Kucich U, Kueppers F, Yamada H, Kuzmowycz T, Morgan L, Lippmann M, Goldberg SK, Weinbaum G., Proteinase inhibitory function in inflammatory lung disease: I. Acute bacterial pneumonia. *Am Rev Respir Dis.* 1984 ; 129 : 735, 741.
52. Braun J, Dalhoff K, Schaaf B, Wood WG, Wiessmann KJ., Characterization of protein-antiproteinase imbalance in bronchoalveolar lavage from patients with pneumonia. *Eur Respir J.* 1994 ; 7 : 127, 133.
53. Levine RL, Moskowitz J, Stadtman ER., Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life.* 2000 ; 50 : 301, 307.
54. Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, Levine RL., Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J. Biol. Chem.* 2000 ; 275 : 27258, 27265.
55. VanWetering S, MannesseLazeroms SPG, VanSterkenburg M, Daha MR, Dijkman JH, Hiemstra PS., Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1997 ; 16 :

- L888, L896.
56. Sivasothy P, Daffron TR, Hiemstra PS, Lomas DA., The interaction of M, S, Z, latent and cleaved plasma alpha-1-antitrypsin with human neutrophil defensin-1. *Thorax*. 1999 ; 54, 249.
 57. Eisenberg S., High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*. 1984 ; 25 : 1017, 1058.
 58. Tall AR., Plasma high density lipoproteins: metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest*. 1990 ; 86 : 379, 384.
 59. Paszty C, Maeda N, Verstuyft J, Rubin EM., Apolipoprotein A-I transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*. 1994 ; 94 : 899, 903.
 60. Liu AC, Lawn RM, Verstuyft JG, Rubin EM., Human apolipoprotein A-I prevents atherosclerosis associated with apolipoprotein (a) in transgenic mice. *J Lipid Res*. 1994 ; 35 : 2263, 2267.
 61. Shah PK, Nilsson J, Kaul S, Fishbein MC, Ageland H, Hamsten A, Johansson J, Karpe F, Cercek B., Effects of recombinant apolipoprotein A-I Milano on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1998 ; 97 : 780, 785.
 62. Cooke NE, Haddad JG., Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr. Rev*. 1989 ; 10 : 294, 307.
 63. Hirschfeld J., Immune-electrophoretic demonstration of qualitative differences in human sera and their relation to the haptoglobins. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*. 1959 ; 47 : 160, 168.
 64. McLeod JF, Cooke NE., The vitamin D-binding protein, -fetoprotein, albumin multigene family : detection of transcripts in multiple tissues. *J. Biol. Chem*. 1989 ; 264 : 217, 602, 1769.
 65. Van Baelen H, Bouillon R, De Moor P., Vitamin D-binding protein (Gc-globulin) binds actin. *J. Biol. Chem*. 1980 ; 255 : 2270, 2272.
 66. Lee WM, Galbraith RM., The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *New Engl. J. Med*. 1992 ; 326 : 1335, 1341.
 67. Yamamoto N, Homma S, Haddad JG, Kowalski MA., Vitamin D3 binding protein required for in vitro activation of macrophages after alkylglycerol treatment of mouse peritoneal cells. *Immunology*. 1991 ; 74 : 420, 424.
 68. Piquette CA, Robinson-Hill R, Webster RO., Human monocyte chemotaxis to complement-derived chemotaxins is enhanced by Gc-globulin. *J. Leukocyte Biol*. 1994 ; 55 : 349, 354.
 69. Kew RR, Webster RO., Gc-globulin (vitamin D-binding protein) enhances the neutrophil chemotactic activity of C5a and C5a des Arg. *J. Clin. Invest*. 1988 ; 82 : 364, 369.
 70. Metcalf JP, Thompson AB, Gossman GL, Nelson KJ, Koyama S, Rennard SI, Robbins RA., Gc-globulin functions as a cochemotaxin in the lower respiratory tract. A potential mechanism for lung neutrophil recruitment in cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis*. 1991 ; 143 : 844, 849.
 71. Costa PP, Figueira AS, Bravo FR., Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1978 ; 75 : 4499, 4503.
 72. Dickson PW, Aldred AR, Marley PD, Tu GF, Howlett GJ, Schreiber G., High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985 ; 127, 890, 895.
 73. Bos JL., Ras-like GTPases. *Biochim Biophys Acta*. 1997 ; 1333, M19-M31.
 74. Urano T, Emkey R, Feig LA., Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J*. 1996 ; 15 : 810-816.
 75. White MA, Vale T, Camonis JH, Schaefer E, Wigler MH., A role for the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation. *J. Biol. Chem*. 1996 ; 271 : 16439-16442.
 76. Herrmann C, Horn G, Spaargaren M, Wittinghofer A., Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem*. 1996 ; 271 : 6794-6800.
 77. Jiang H, Luo JQ, Urano T, Frankel P, Lu Z, Foster DA, Feig LA., Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced

- phospholipase D activation. *Nature*. 1995 ; 378 : 409-412.
78. Symons M, Derry JM, Karlak B, Jiang S, Lemahieu V, McCormick F, Francke U, Abo A., Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell*. 1996 ; 84 : 723-734.
79. Bielinski DF, Pyun HY, Linko-Stentz K, Macara IG, Fine RE., Ral and Rab3a are major GTP-binding proteins of axonal rapid transport and synaptic vesicles and do not redistribute following depolarization stimulated synaptosomal exocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1993 ; 1151 : 246-256.
80. Volkandt W, Pevsner J, Elferink LA, Scheller RH., Association of three small GTP-binding proteins with cholinergic synaptic vesicles. *FEBS Lett*. 1993 ; 317 : 53-56.
81. Dubin RA, Ostrer H., Sry is a transcriptional activator. *Mol Endocrinol*. 1994 ; 8 : 1182-1192.
82. Beutler E, Hoffbrand AV, Cook JD., Iron deficiency and overload. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2003 ; 40-61.
83. Brugnara C., Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clin Chem*. 2003 ; 49 : 1573-1578.