

원저

胡桃藥鍼液이 RAW cell에서 遺傳子 發顯에 미치는 影響

하지영 · 김종인 · 고흥균

경희대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Microarray Analysis of Gene Expression in RAW Cells Treated with Juglandis Semen Herbal Acupuncture Solution

Ha Ji-young, Kim Jong-in and Ko Hyung-kyun

Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Objectives : Juglandis Semen herbal acupuncture solution(JSS) has a broad array of clinical applications in oriental medicine, including treatment of chronic musculoskeletal diseases such as arthritis. This study was performed to investigate the global gene expression profiles using microarray assay in RAW 264.7 cell line treated with JSS and to advance our understanding of the pharmacologic effect of JSS.

Methods : Change of the gene expression profile in RAW cell line following treatment with JSS alone, with lipopolysaccharide(LPS) alone, or with LPS plus JSS was investigated with a cut-off level of 2 fold change in the expression.

Results : Of the 8170 genes profiled in this study, 95 were upregulated and 42 downregulated following JSS treatment, 51 were upregulated and 21 downregulated following LPS treatment, and 88 were upregulated and 69 downregulated following costimulation of JSS and LPS.

Conclusion : JSS treatment induced upregulation of some genes including IL-10 with its possible implication in an antiinflammatory action of JSS. However, further research on expression profile changes induced by JSS treatment is expected.

Key words : Juglandis Semen, Juglandis Semen herbal acupuncture solution(JSS), microarray, lipopolysaccharide, IL-10

- 접수 : 2006년 7월 10일 · 수정 : 2006년 7월 15일 · 채택 : 2006년 7월 15일
· 교신저자 : 고흥균, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한방병원 침구과
Tel. 02-958-9194 E-mail : koh5795@chollian.net

I. 緒 論

류마티스 관절염은 관절을 둘러싸고 있는 활막 조직의 만성 염증성 질환으로 연골과 골과괴로 인해 관절의 파괴와 변형을 초래하는 대표적인 자가면역성 질환이다¹⁾. 류마티스 관절염의 직접적인 원인은 아직 밝혀져 있지 않으며 그 발병기전이나 병태생리에 대해서도 다양하게 연구가 진행되고 있지만 아직까지 류마티스 관절염의 근본적인 치료법은 없는 실정이다.

한의학적으로 류마티스 관절염은 歷節風, 白虎歷節風, 鶴膝風, 痛風, 痛痺, 痺症 등의 범주에 속한다²⁾. 류마티스 관절염에 대한 한의학적 치료로는 藥物療法, 鍼灸療法 및 物理療法 등이 있으며, 최근에는 經絡學說의 원리에 의거하여 한약재를 선택하여 有關한 穴位, 壓痛點 및 陽性 反應點에 주입하여 鍼과 藥物 작용을 통하여 인체의 기능을 조정하고 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하는 藥鍼療法³⁾이 류마티스 관절염 치료에 효과가 있음이 보고되고 있다⁴⁻⁶⁾. 류마티스 관절염에 대한 藥鍼療法의 연구는 주로 蜂毒藥鍼에 관한 연구가 진행되었으나 임상적으로 요통이나 관절염 등을 비롯한 만성적인 염증성, 통증성 질환 등에 사용되고 있는 胡桃藥鍼液(Juglandis Semen herbal acupuncture solution, JSS)에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

胡桃(Juglandis Semen)는 補腎益精, 強腰膝, 斂肺定喘, 潤腸 등의 效能이 있어 腎虛精虧, 腰痛, 筋骨無力, 虛寒喘咳, 腸燥便秘 등의 病症을 치료하는데 사용되어져 왔다⁷⁾. 胡桃藥鍼液에 대한 임상적 또는 실험적 연구로는 급성 신부전⁸⁾, 간조직 손상⁹⁾, 신부전에 대한 항산화¹⁰⁾, 유리기 소거와 항산화¹¹⁾, 신장 상피세포에 대한 보호¹²⁾, 급성 신부전의 apoptosis에 대한 방어¹³⁾, 신경교세포의 apoptosis에 대한 방어¹⁴⁾, 항알러지¹⁵⁾, 만성 咳嗽에 대한 보고¹⁶⁾ 등이 있어 실험을 통하여 胡桃藥鍼液의 효능을 과학적으로 규명하고 재해석하기 위한 노력이 계속되고 있어 임상적 치료영역의 확대가 기대되고 있다. 그러나 胡桃藥鍼液의 임상적 활용범위를 알아보기 위한 분자생물학적 유전자 발현에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

유전자 발현에 관한 정보를 연구하는 방법으로 microarray를 이용하여 대량의 유전자 발현 정보를

한꺼번에 평가하는 방법이 시도되고 있다. 이러한 microarray는 DNA sequencing, 변이 분석, 새로운 유전자의 발견, 유전자의 발현 분석 등의 분야에 다양하게 활용되고 있다¹⁷⁾. 한의학계에서도 한약물의 유전자 발현을 microarray를 이용하여 분석하여 전통적인 약물의 효능을 분자생물학적 유전자 발현을 통해서 재규명하고 재해석하여 새로운 임상적 활용 가능성을 넓히기 위한 여러 연구가 진행되고 있다¹⁷⁻²⁰⁾. 그러나 대부분의 microarray를 이용한 연구는 Lipopolysaccharide(LPS) 처치같은 병리학적 모델 없이 한약물 자체의 유전자 발현의 향진이나 저하를 관찰한 연구가 대부분이었다¹⁷⁻¹⁹⁾. LPS는 adjuvant 관절염 모델, collagen 관절염 모델과 함께 대표적인 류마티스 관절염 유발 실험 모델로 세포 실험에서 많이 이용되고 있다.

이에 저자는 胡桃藥鍼液의 염증성, 통증성 질환 치료에 대한 임상적 활용여부를 살펴보고자 LPS 모델을 도입하여 胡桃藥鍼液이 RAW cell의 유전자 발현에 미치는 영향을 microarray를 통하여 관찰한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

본 실험에서 사용된 胡桃는 경희대학교 부속 한방병원 약재과에서 300g을 구입한 후 정선하여 사용하였다.

2) 藥鍼液의 調製

胡桃 300g을 분쇄하여 flask에 넣고 증류수 2,000 ml를 가하여 3時間 煎湯하고 추출하여 여과하였다. 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하고 농축액에 증류수를 가하여 全量이 200ml가 되게 한 다음 실온까지 냉각하였다. 여기에 ethanol을 가하여 75% ethanol 용액 상태가 되게 만든 다음, 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporator로 감압 농축하여 생성된 농축액에 증류수 100ml를 가하여 용해시키고 ethanol을 가하여 85% ethanol 용액 상태가 되게 만든 다

음, 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporator로 감압 농축하여 생성된 농축액에 증류수 100ml를 추가하여 용해시키고 ethanol을 추가하여 95%ethanol 용액 상태가 되게 만든 다음, 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporator로 감압 농축하여 최종산물 30g을 회수하였다. 여기에 saline을 추가하고 10N NaOH로 pH 6-7로 조절하여 소량이 1,000ml되게 한 다음 이를 저온에서 24時間 방치한 후, nuclepore filter paper(0.45 μ m, 직경 25mm, USA)로 여과하고 가압멸균하여 약침액을 만들어 사용하였다²¹⁾. 실험에 사용한 胡桃藥鉞液은 최종 농도가 0.1, 0.3, 1.0 및 3.0 μ g/ml이 되도록 증류수에 희석하여 사용하였다.

3) 세포주

본 실험에 사용한 세포주는 RAW 264.7(KCLB #40071)이며, 한국 세포주 은행에서 구입하였다.

4) 시약

배양액으로서 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin은 GibcoBRL(USA)에서 구입하고, 3-(4,5-di methylthiazol-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 GenePloer™ TwinChip™ 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 Tele-che(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 RAW cell line은 DMEM 용액에

10% FBS를 첨가하여 배양하였다. 5% CO₂, 95% 공기, 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하고, 배양액은 3일마다 교환하였다.

3. MTT assay

胡桃藥鉞液을 처치하였을 때 생존하는 세포의 수를 측정하기 위해 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 작용을 이용한 MTT 시험을 하였다. ELISA reader로 595nm에서 측정된 흡광도의 값은 살아있는 세포의 수를 반영하며 세포 독성의 판정은 아래의 산출식에 따라 % viability로 나타났다.

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

RAW cell을 96 well plate(Corning, USA)에 well 당 배양액 100 μ l에 5 \times 10⁴개의 세포수가 되도록 serum free 배양액에 분주하고 검액은 胡桃藥鉞液의 최종 농도가 0.1, 0.3, 1.0 및 3.0 μ g/ml가 되도록 증류수로 희석하여 전처리하고 18시간 incubation하였으며, vehicle을 처치하지 않은 세포군을 대조군으로 하였다. 각 well에 MTT labeling reagent 용액을 10 μ l씩 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 solubilization solution을 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 배양기에 20시간 유치시키고 ELISA reader(Bio-Tek, USA)로 690nm를 참고치로 하여 595nm에서 측정하였다.

통계학적 분석은 student's t-test를 실시하여 각 군간의 통계학적 유의성을 검정하였다($\alpha=0.01$).

4. RNA 추출

LPS(Sigma, USA)²²⁾ 처치로 발현이 향진 또는 저하된 유전자의 관찰을 위해 실험군에는 배양된 세포에 LPS 1.0 μ g/ml를 3시간 처치하고, 대조군에는 vehicle을 처치하여 RNA를 추출하였다.

胡桃藥鉞液 처치로 발현이 향진 또는 저하된 유전자의 관찰을 위해 MTT 시험을 통해 결정된 농도와 시간에 따라 실험군에는 胡桃藥鉞液 3.0 μ g/ml를 처치하고 대조군에는 vehicle을 처치하여 18시간 경과 후 RNA를 추출하였다.

LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치시 발현이 항진 또는 저하되었던 유전자의 관찰을 위해 실험군에는 LPS 1.0 μ g/ml 를 3시간 처치한 후 胡桃藥鍼液을 처치하고 대조군에는 LPS 1.0 μ g/ml를 3시간 처치한 후 vehicle을 처치하여 18시간 경과 후 RNA를 추출하였다.

실험군과 대조군 각각에서 세포를 harvest하여 상층액을 제거하고 다시 세포를 suspension하였다. 세포 107개당 2.0ml의 RNAzol을 사용하여 lysis시키고 상온에서 10분간 방치하였다. 0.2ml chloroform을 첨가하여 15초간 흔들여 잘 섞어준 후 5분간 상온에서 방치하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 12,000g로 15분간 원심분리하고 상층액을 새로운 tube로 옮겨 동량의 isopropanol을 첨가하고 10분간 상온에서 방치하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 12,000g로 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 80% 에탄올 1.0ml을 첨가하여 원심분리하였다. 에탄올을 제거하고 적당량의 DEPC-DDW를 첨가하여 total RNA를 준비하였다.

5. cDNA 준비

Microtube에 1-17 μ l (10-20 μ g)의 total RNA와 3 μ l의 RT primer를 넣고 nuclease free water로 최종 20 μ l가 되도록 섞었다. 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 incubation 후 얼음에 방치하였다. 이 혼합액에 Superase-In RNase inhibitor 1 μ l를 첨가하였다. 별도의 tube에 5X Superscript II first strand buffer 8 μ l, dNTP mix 2 μ l, 0.1M DTT 4 μ l, Superscript II enzyme 2 μ l(400units), RNase free water 3 μ l를 혼합하였다. 이 enzyme 혼합액을 RNA가 포함된 상기의 혼합액과 잘 섞어 42 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켰다. 0.5M NaOH/50 mM EDTA 7 μ l를 첨가하여 반응을 중지시키고 65 $^{\circ}$ C에 10분간 유지시켜 DNA/RNA hybrids를 변성시켰다. 1.0M Tris-HCl, pH 7.5를 10 μ l 첨가하여 반응을 중화시켰다. 실험군의 cDNA와 대조군의 cDNA 혼합액을 한 tube로 합치고 10 mM Tris, pH 8.0 16 μ l로 실험군과 대조군 cDNA의 원래 tube를 세척한 후 실험군과 대조군 cDNA 혼합액에 넣어 총 130 μ l가 되도록 하였다. 5mg/ml linear acrylamide 3 μ l를 상기한 혼합액에 넣고 5 M NaCl 6 μ l 첨가하고 95-100% EtOH 540 μ l 넣고 섞어 -20 $^{\circ}$ C에 30분 방치하였다가 10,000g 이상으로 15분 원심분리하였다. 상층액을 덜어내고 cDNA pellet에 70% EtOH 30 μ l 넣어 섞고 10,000g 이상으로 5분

원심분리하여 상층액을 덜어내고 65 $^{\circ}$ C에 10분-30분 방치해 pellet을 말렸다. Nuclease free water를 넣어 10 μ l가 되게 하여 concentrated cDNA를 녹였다.

6. Microarray hybridization

2X formamide based buffer를 55 $^{\circ}$ C 10분간 가열을 반복하여 완전히 녹인 것 15 μ l, dT blocker 2 μ l, nuclease free water 3 μ l를 섞고 여기에 위에서 준비한 concentrated cDNA 10 μ l를 넣어 총 30 μ l로 맞추었다. 이 혼합액을 75-80 $^{\circ}$ C 10분, 45-50 $^{\circ}$ C 15-20분간 incubation하고 pre-warmed(hybridization 온도에서) microarray에 뿌려 coverslip 덮고 overnight 반응시켰다.

Microarray slide를 55-65 $^{\circ}$ C의 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 5,724-8,944 g로 2분간 원심분리하여 건조시켰다. Microarray 반응은 duplicate로 실시하여 평균값을 구하여 분석하였다.

7. Scanning and data analysis

Slide를 stage에 밀어 넣은 후 scan parameter를 기입하고 focus와 laser power를 조정후 red와 green의 파장에서 각각 Scanarray Lite(PerkinElmer Life Science, Billerica, MA)를 이용하여 scanning하고, GenePix Pro 3.0(Axon Instruments, Union City, CA)를 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 하였다²³⁾

III. 結 果

1. MTT assay

MTT assay 결과 대조군(100.0 \pm 4.8%)에 비하여 胡桃藥鍼液 실험군은 농도별로 0.1, 0.3, 1.0 및 3.0

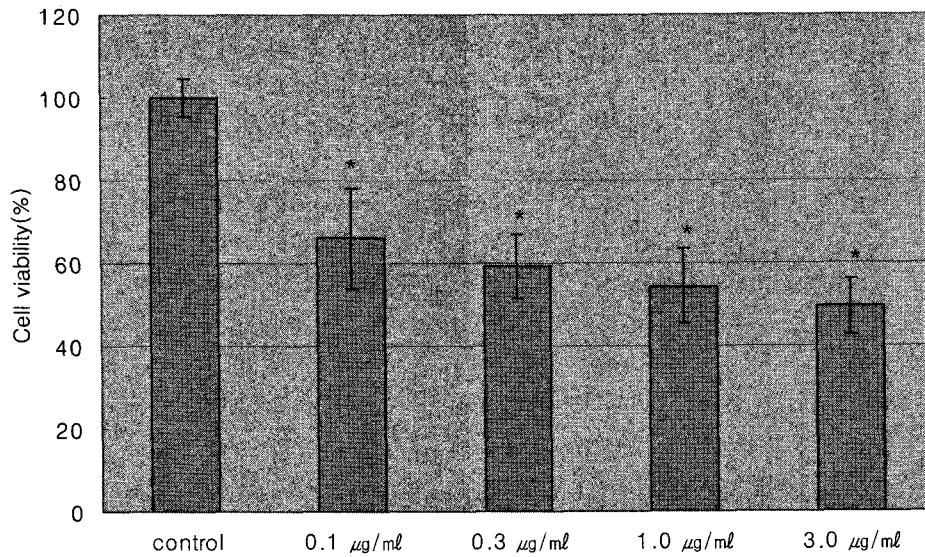


Fig. 1. The viability of RAW 264.7 cell by MTT assay
Cell viability(%) after 18 hours incubation of JSS at the respective concentrations. Percent viabilities of the treatment groups were calculated by MTT colorimetric assay compared with that of the control group. Values are given as percent(mean±S.D.). Asterisk(*) indicates significant difference from the control group(p<0.01). MTT=3-(4,5-di methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

µg/ml에서 각각 66.0±12.0, 59.3±7.7, 54.3±9.0, 49.5±6.7%의 세포생존율을 보여 각각 유의한 차이(p<0.01)를 나타냈다(Fig. 1). 따라서 본 실험에서胡桃藥鍼液의 처치 농도는 3.0µg/ml으로 결정하였다.

2. Microarray analysis

배양된 세포에 LPS 1.0µg/ml를 3시간 처치한 경우와 대조군에서 mRNA를 추출하여 microarray에 반응시킨 결과는 Fig. 2와 같다.

LPS 실험군의 cDNA spot intensity는 normalization 하여 log2 ratio 값으로 계산되었다(Fig. 3). 그 결과 2배 이상으로 발현이 향진된 유전자와 1/2 이하로 발현이 저하된 유전자를 구분할 수 있었다.

胡桃藥鍼液 실험군과 LPS 처치 후胡桃藥鍼液 실험군의 microarray 결과는 지면 관계상 생략한다.

3. LPS 처치시 발현이 향진된 유전자

LPS 1.0µg/ml를 3시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 발현이 향진된 유전자는

MARCKSL1, LLGL2, RPS6KB2, RPL19, NSEP1, UBE2S, RGS9, RASA4, IGF2, HNRPA2B1, MGC10854, PCYOX1, TRA2A, ATP5L, IFRD1, PPY, MED6, LPHN3, FZR1, CYP19A1, KIAA1404, LAF4, LOC440918, RSAD2, CUL5, CHRNB3, CCL18, SERPINB13, SMARCA5, LDB3, HNF4A, PFAAP5, PSMB4, DSC2, TTC12, NP, FNBP4, IL3RA, SCN9A, SOD2, CHEK1, CTSS, PRG1, MRPL49, DHFR, PP3856, TOP1, BCL2A1, CD44, MARCKSL1, MMP13 등으로 총 51종이었다(Table은 지면 관계상 생략함).

4. LPS 처치시 발현이 저하된 유전자

LPS 1.0µg/ml를 3시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 발현이 저하된 유전자는 LOC285835, CREB3L4, TMEM1, VAV3, DNAJC6, ShrmL, SFRS15, ABCC5, EFNB2, PFN2, PDE8B, GNA15, NR3C2, GPC4, KIAA0650, MARCH-III, PTPRF, PPAT, KIAA0831, NDUFV2, PALM 등으로 총 21종이었다(Table은 지면 관계상 생략함).



Fig. 2. 8.0k human cDNA microarray image of gene expression in RAW cells treated with LPS*

The green spots represent genes of control RAW cells labeled with Cy3-captured reagent that is over expressed compared to that of LPS-treated RAW cells. The red spots represent genes of LPS-treated RAW cells labeled with Cy5-captured reagent that is over expressed compared to that of control RAW cells. The yellow spots represent genes which showed no difference in expression level between two groups.

LPS* = lipopolysaccharide.

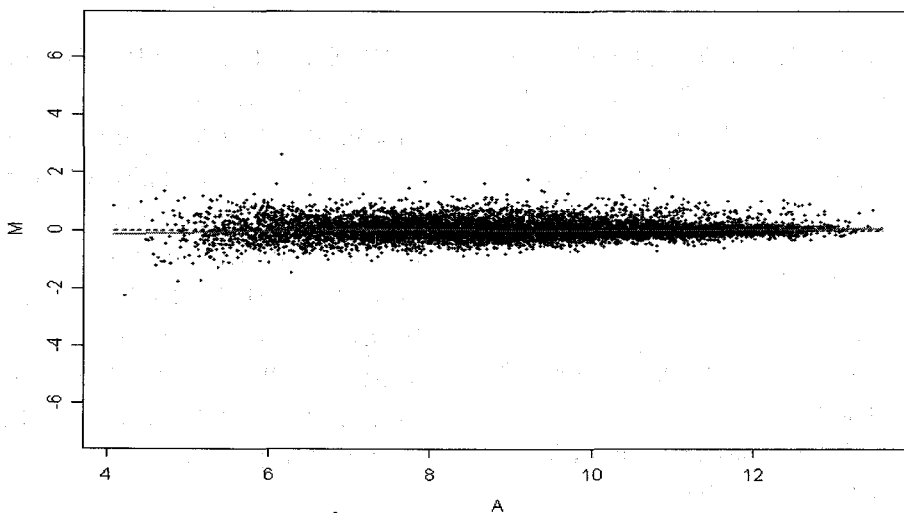


Fig. 3. Scattered plot of the normalization results by global M method in LPS* -treated and control RAW cells

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 LPS-treated and control RAW cells was converted to log₂ ratio, and that is global M method.

LPS* = lipopolysaccharide.

5. 胡桃藥鉞液 처치시 발현이 항진된 유전자

胡桃藥鉞液 3.0 μ g/ml을 18시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 발현이 항진된 유전자는 INE1, SLC25A5, MGC45477, PHF1, MRPL54, 07-Sep, ITGAL, CDNA: FLJ22803 fis, clone KAIA2685, PCBP2, HSPA8, SLC12A3, GRP58, KIF11, PPARBP, YEAST4-1, RPL14, MPHOSPH6, RPS29, FZRI, ICAM4, VAT1, CDR1, UGT2B11, PRDX1, RGS9, THRAP2, COG2, LRRC14, PRKCE, GNB2, RPS3, UQCRH, RNF10, MGC23280, LOC91316, MFNG, DHFR, RPS4X, RPL35, HNRPA1, H3F3A, SMARCA5, RPL10A, SIPA1L1, ATP5L, KIAA1404, Clone 24739 mRNA sequence, MARCKSL1, EIF4A2, RPL7A, TRA2A, RPL12, DAZ4, RASA4, SFPQ, LDB3, FTH1, MED6, CMYA5, RPS14, BCL9, LAF4, RPL17, MBD4, MDS006, NRGN, TTC12, DDX5, RPLP0, CAST, IGF2, PFAAP5, SF3B4, TGFBI, RPL11, NSEPI, SERPINB13, LLGL2, RPS7, MRPL3, PPM1D, RPL19, EIF4A1, CHEK1, PPY, PP3856, TCP10L, DLG3, YEAST4-1, RPL37, HNRPA2B1, TJP2, MYBL2, SH3GL2, IL10 등으로 총 95종이었다(Table은 지면 관계상 생략함).

6. 胡桃藥鉞液 처치시 발현이 저하된 유전자

胡桃藥鉞液 3.0 μ g/ml을 18시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 발현이 저하된 유전자는 NRBP2, ABCC5, TGM1, PLAUI, LOC285835, THBS4, ShrmL, ICAM3, GUSB, AGR2, AKAP12, CDNA: FLJ22642 fis, clone, ARID5A, STAF65 (gamma), OLFM4, Homo sapiens, clone IMAGE: 3604678, mRNA, CTHRC1, PDE8B, NCKAP1, YEAST9-1, NR2F6, TOP1, CAP2, EDG8, CNN3, FBXO7, MOSPD2, DACH1, NOC4, SP140, HRB, ATXN7, KIAA0247, DHX33, LPHN2, GPC4, PEX3, Transcribed locus, AXL, RREB1 등으로 총 42종이었다(Table은 지면 관계상 생략함).

7. LPS 처치후 胡桃藥鉞液 처치시

발현이 항진된 유전자

LPS 1.0 μ g/ml를 3시간 전처치한 후 胡桃藥鉞液 3.0 μ g/ml을 18시간 처치했을 때 LPS 1.0 μ g/ml를 3시간 전처치한 후 vehicle을 18시간 처치한 대조군에 비해 발현이 항진된 유전자는 OCLN, PITPNB, TRA2A, RPS4Y1, YEAST4-1, BGLAP, SDCBP, CIB1, PFAAP5, HNRPH2, RPL6, MGC45477, ZNF443, HNRPU, UBE2D2, KATNB1, RUSC2, CENPB, LAF4, PIGA, TDE1, SIPA1L1, CPOX, NCL, PPIG, ATP5C1, CTRB1, DLX5, ACTG2, HNRPF, MFNG, RPL10A, ACAT1, FNBP4, HMGB1, RPS4X, PRDX1, KCNQ2, POLR2E, KIAA1404, PCBP2, MARCKSL1, HNRPA1, PRG1, 07-Sep, Clone 24739 mRNA sequence, SYNJ1, EIF4A1, ADCY9, RNF10, CTSS, CCL8, NEO1, RPL7A, RPL35, ATP5L, RPS3, RPL12, MDS006, CMYA5, CHEK1, CALM2, IL10, SMARCA5, H3F3A, UGT2B11, TGFBI, EIF4A2, FTH1, IGF2, RPS10, TPT1, RPS14, SFPQ, RPL37, PP3856, RPL11, NSEPI, NRGN, RPL19, RPLP0, GRP58, RPL17, SF3B4, DDX5, RPS7, MRPL3, HNRPA2B1 등으로 총 88종이었다(Table은 지면 관계상 생략함).

8. LPS 처치후 胡桃藥鉞液 처치시 발현이 저하된 유전자

LPS 1.0 μ g/ml를 3시간 전처치한 후 胡桃藥鉞液 3.0 μ g/ml을 18시간 처치했을 때 LPS 1.0 μ g/ml를 3시간 전처치한 후 vehicle을 18시간 처치한 대조군에 비해 발현이 저하된 유전자는 DEFBI, ShrmL, NRBP2, PDE8B, ATXN7, Transcribed locus, ABCC5, TRIP12, DACH1, RDX, MARCH-III, KIAA1161, DNAJC6, CAP2, CREB3L4, STK25, Homo sapiens, clone IMAGE:5277945, mRNA, PTPRM, GPC4, HMGCL, YES1, HPS1, MGEA5, ARID5A, PEX3, OLFM4, AKAP12, CDNA: FLJ22642 fis, clone HSI06970, PCDHB6, ZNF395, AGR2, KIAA0650, KIAA0895, BMPER, RREB1, PFN2, SENP7, FBXO7, MTMR1, SP110, RICS, HTATSF1, CNN3, HRB, PPAT, ACPP, LOC285835, MYO1C, CPE, FLJ10300, REGL, TOP1, PHF10, RAMP1, PGF, SLC4A4, TMCC3, PLAUI, OXA1L, ICAM3, TPCN1,

SLC35F5, FAT, ANKRD15, Homo sapiens, clone IMAGE:3604678, mRNA, AUH, CRIPT, HTN3, FLJ10996 등으로 총 69종이었다(Table은 지면 관계 상 생략함).

IV. 考 察

류마티스 관절염은 관절을 둘러싸고 있는 활막조직의 만성 염증성 질환이며 대표적인 자가면역성 질환으로¹⁾, 그 발병기전이나 병태생리에 대해서도 다양하게 연구가 진행되고 있지만 직접적인 발병 원인은 밝혀져 있지 않으며 아직까지 류마티스 관절염의 근본적인 치료법은 없는 실정이다.

류마티스 관절염에 대한 한의학적 치료 중 藥鍼療法³⁾은 류마티스 관절염 치료에 효과가 있음이 보고되고 있다⁴⁻⁶⁾. 류마티스 관절염에 대한 藥鍼療法の 연구는 주로 蜂毒藥鍼에 관한 연구가 진행되었으나 임상적으로 요통이나 관절염 등을 비롯한 만성적인 염증성, 통증성 질환 등에 사용되고 있는 胡桃藥鍼液에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

胡桃藥鍼液의 기존 연구는 실험적으로 유발된 신장이나 간장 기능장애에 대한 보호 효과와 그 기전 등을 밝히는 것^{8-10,12-13)}에 초점이 맞추어졌을 뿐 胡桃藥鍼液의 임상적 활용도를 넓히기 위한 분자생물학적 유전자 발현에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

한의학계에서는 한약물의 유전자 발현을 microarray를 이용하여 대량으로 한꺼번에 분석하여 전통적인 약물의 효능을 분자생물학적 유전자 발현을 통해서 재규명하고 재해석하여 새로운 임상적 활용 가능성을 넓히기 위한 여러 연구가 진행되고 있다¹⁷⁻²⁰⁾. 그러나 대부분의 microarray를 이용한 연구는 LPS 처치 같은 병리학적 모델없이 한약물 자체의 유전자 발현의 향진이나 저하를 관찰한 연구가 대부분이었다¹⁷⁻¹⁹⁾. LPS는 adjuvant 관절염 모델, collagen 관절염 모델과 함께 대표적인 류마티스 관절염 유발 실험 모델로 세포 실험에서 많이 이용되고 있다.

이에 저자는 胡桃藥鍼液의 염증성, 통증성 질환 치료에 대한 임상적 활용여부를 살펴보고자 LPS 모델을 도입하여 胡桃藥鍼液이 RAW cell의 유전자 발현에 미치는 영향을 microarray를 통하여 관찰하고

자 하였다.

본 연구에서는 8170개의 유전자 발현 양상을 동시에 측정할 수 있는 microarray를 가지고 첫째, LPS 처치로 발현 향진 또는 억제된 유전자의 관찰, 둘째, 胡桃藥鍼液 처치로 발현 향진 또는 억제된 유전자의 관찰, 셋째, LPS 처치 후 胡桃藥鍼液 처치로 발현이 향진 또는 억제되었던 유전자의 관찰 등 세 단계로 진행하였다.

우선 RAW cell에 MTT assay를 시행하여 세포 생존율의 변화를 관찰한 결과 胡桃藥鍼液 0.1, 0.3, 1.0 및 3.0 μ g/ml 모든 농도의 실험군이 대조군에 비해 세포생존율의 유의한 변화를 가졌다($p < 0.01$). 따라서 본 연구에서 胡桃藥鍼液의 처치 농도는 3.0 μ g/ml으로 결정하였다.

다음으로 microarray를 시행하여 LPS 실험군, 胡桃藥鍼液 실험군, LPS 처치후 胡桃藥鍼液 실험군 등 각각의 실험군의 유전자 발현 프로파일이 변하는 양상을 관찰하여 각각의 대조군에 비해 2배 이상 발현이 향진되거나 1/2이하로 발현이 저하된 경우를 유의한 차이가 있는 것²¹⁾으로 판단하였다.

그 결과 LPS 실험군의 경우 총 8170개의 유전자 중 발현이 유의하게 향진된 유전자는 MARCKSL1, LLGL2, RPS6KB2, RPL19, NSEP1, UBE2S, RGS9, RASA4, IGF2, HNRPA2B1, MGC10854, PCYOX1, TRA2A, ATP5L, IFRD1, PPY, MED6, LPHN3, FZR1, CYP19A1, KIAA1404, LAF4, LOC440918, RSAD2, CUL5, CHRNB3, CCL18, SERPINB13, SMARCA5, LDB3, HNF4A, PFAAP5, PSMB4, DSC2, TTC12, NP, FNBP4, IL3RA, SCN9A, SOD2, CHEK1, CTSS, PRG1, MRPL49, DHFR, PP3856, TOP1, BCL2A1, CD44, MARCKSL1, MMP13 등으로 총 51종이 있었다.

LPS 처치시 발현이 유의하게 저하된 유전자는 LOC285835, CREB3L4, TMEM1, VAV3, DNAJC6, ShrmL, SFRS15, ABCC5, EFNB2, PFN2, PDE8B, GNA15, NR3C2, GPC4, KIAA0650, MARCH-III, PTPRF, PPAT, KIAA0831, NDUFV2, PALM 등으로 총 21종이 있었다.

胡桃藥鍼液 실험군의 경우 NE1, SLC25A5, MGC45477, PHF1, MRPL54, 07-Sep, ITGAL, CDNA: FLJ22803 fis, clone KAIA2685, PCBP2, HSPA8, SLC12A3, GRP58, KIF11, PPARBP, YEAST4-1, RPL14, MPHOSPH6, RPS29, FZR1, ICAM4, VAT1, CDRI, UGT2B11, PRDX1, RGS9, THRAP2, COG2,

LRRC14, PRKCE, GNB2, RPS3, UQCRH, RNF10, MGC23280, LOC91316, MFNG, DHFR, RPS4X, RPL35, HNRPA1, H3F3A, SMARCA5, RPL10A, SIPA1L1, ATP5L, KIAA1404, Clone 24739 mRNA sequence, MARCKSL1, EIF4A2, RPL7A, TRA2A, RPL12, DAZA, RASA4, SFPQ, LDB3, FTH1, MED6, CMYA5, RPS14, BCL9, LAF4, RPL17, MBD4, MDS006, NRG1, TTC12, DDX5, RPLP0, CAST, IGF2, PFAAP5, SF3B4, TGFBI, RPL11, NSEP1, SERPINB13, LLGL2, RPS7, MRPL3, PPM1D, RPL19, EIF4A1, CHEK1, PPY, PP3856, TCP10L, DLG3, YEAST4-1, RPL37, HNRPA2B1, TJP2, MYBL2, SH3GL2, IL10 등 총 95종이 발현이 유의하게 항진되었다.

胡桃藥鍼液 실험군 중 발현이 유의하게 항진된 총 95종에 대해 signal transduction, transcription, cell cycle, cell death, apoptosis, 스트레스 반응, 면역 반응, cellular physiological process 등 8종으로 분류하였다²⁴⁾.

유전자 발현이 항진된 총 95종 중 signal transduction에 관여하는 유전자는 ITGAL, GRP58, PPARBP, RGS9, PPKCE, GNB2, RASA4, BCL9, RPL17, NRG1, IGF2, PP3856, SH3GL2, IL10 등 14종, transcription에 관여하는 유전자는 PHF1, PPARBP, SMARCA5, MED6, LAF4, NSEP1, MYBL2 등 7종, cell cycle에 관여하는 유전자는 MPHOSPH6, FZR1, IGF2 등 3종, cell death와 apoptosis에 관여하는 유전자는 PRKCE, MYBL2, IL10 등 3종, 스트레스 반응에 관여하는 유전자는 INE1, HSPA8, MBD4, NSEP1, CHEK1, IL10 등 6종, 면역 반응에 관여하는 유전자는 FTH1, IL10 등 2종, cellular physiological process에 관여하는 유전자는 SLC25A5, PHF1, ITGAL, PCBP2, HSPA8, SLC12A3, GRP58, KIF11, PPARBP, RPL14, MPHOSPH6, RPS29, FZR1, VAT1, UGT2B11, PRDX1, PRKCE, RPS3, UQCRH, RNF10, DHFR, SMARCA5, RPL10A, RPL7A, TRA2A, RPL12, SFPQ, FTH1, MED6, RPS14, LAF4, RPL17, MBD4, DDX5, IGF2, PFAAP5, SF3B4, TGFBI, RPL11, NSEP1, RPS7, MRPL3, PPM1D, RPL19, EIF4A1, CHEK1, RPL37, HNRPA2B1, SH3GL2, IL10 등 총 52종이었다.

胡桃藥鍼液 실험군에서 발현이 유의하게 저하된 유전자는 NRBP2, ABCC5, TGM1, PLAU, LOC285835,

THBS4, ShrmL, ICAM3, GUSB, AGR2, AKAP12, CDNA: FLJ22642 fis, clone, ARID5A, STAF65 (gamma), OLFM4, Homo sapiens, clone IMAGE: 3604678, mRNA, CTHRC1, PDE8B, NCKAP1, YEAST9-1, NR2F6, TOP1, CAP2, EDG8, CNN3, FBXO7, MOSPD2, DACH1, NOC4, SP140, HRB, ATXN7, KIAA0247, DHX33, LPHN2, GPC4, PEX3, Transcribed locus, AXL, RREB1 등으로 총 42종이었다.

胡桃藥鍼液 실험군에서 발현이 유의하게 저하된 총 42종 중 signal transduction에 관여하는 유전자는 8종, transcription에 관여하는 유전자는 STAF65 (gamma), NR2F6, DACH1, SP140, RREB1 등 5종, cell cycle에 관여하는 유전자는 AXL 1종, cell death와 apoptosis에 관여하는 유전자는 NCKAP1 1종, 스트레스 반응에 관여하는 유전자는 PLAU 1종, cellular physiological process에 관여하는 유전자는 NRBP2, ABCC5, TGM1, THBS4, GUSB, AKAP12, STAF65(gamma), CTHRC1, PDE8B, NCKAP1, NR2F6, CAP2, FBXO7, DACH1, SP140, HRB, ATXN7, GPC4, RREB1 19종이었다.

胡桃藥鍼液 처치시 발현이 유의하게 항진된 유전자 중에서 가장 발현폭이 컸던 IL-10은 cytokine synthesis inhibitory factor라고도 불렀는데, T helper 1 cell에 의한 IFN γ 생산을 억제하기 때문이며 IFN α , TNF α , IL-12의 처치으로 단핵구에서 분비되고 IFN γ , IL-4, IL-10에 의해 억제된다²⁵⁾. IL-10은 류마티스 환자의 관절 대식세포, 단핵구 혹은 말초혈액 임파구에서 분비되는 항염증성 cytokine이다²⁶⁾. 염증성 cytokine인 TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-11과 항염증성 cytokine인 IL-4와 IL-10의 상호작용과 균형은 다양한 여러 질환의 병리학적 과정에서 중요한 역할을 한다²⁷⁾. 특히, IL-4와 IL-10은 TNF α , IL-1을 억제하여 關節炎의 다양한 증상들을 억제하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾.

MYBL2는 V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2의 약어로 b-myb이라고도 하는 다양한 기능을 가진 단백질로 transcription 특성 외에도 cell cycle을 조절하는 다른 유전자와 직접적으로 상호작용하는 능력을 가지고 있다²⁹⁾. B-myb는 c-myb과 함께 신경의 apoptosis를 방어하는 작용을 가지는데 다양한 신경계 퇴행성 질환에서 신경의 apoptosis는 중요한 역할을 갖는다. 따라서 MYBL2는 신경계 퇴행성 질환에서 신경의 apoptosis 방

어를 통한 신경 보호 효과와 관련이 있다³⁰. 이는 胡桃藥鍼液이 인간의 신경교종 세포에서 저산소증에 의해 유발된 apoptosis를 효과적으로 방어한다는 최근의 보고¹⁴)와 부합되는 결과이다.

Integrin은 heterodimeric α/β 세포표면 유착수용체로 세포가 세포외기질이나 혹은 다른 세포와 상호작용하는 것을 매개한다³¹). ITGAL(Integrin lymphocyte function associated antigen 1)은 CD11A라고도 하며 림프구, 과립구, 단핵구, 대식세포 등에서 발현되고 CD54(ICAM-1), CD102(ICAM-2), CD50(ICAM-3)에 결합한다³²). CAM(cell adhesion molecule)의 상호작용은 면역반응과 염증반응에서 중추적인 역할을 하며 ITGAL은 integrin type CAM으로 주로 백혈구의 이동과 혈관의 유출에 관여하며 근래에는 이것의 길항제를 염증과 자가면역반응을 조절하는 방법으로 연구 개발하고 있다³³). 하지만 CD11A의 증가는 IL10 증가와 상반된 결과로 추후 심도있는 연구가 필요하리라 사료된다.

胡桃藥鍼液 처치시 발현이 유의하게 감소된 PLAU(plasminogen activator, urokinase)는 plasminogen을 plasmin으로 전환시키는 유전자로 발현이 항진될 경우 다양한 종류의 인간의 암에서 전이나 나쁜 예후와 강력하게 관련성이 있는 것으로 보고되고 있다³⁴). 또한 류마티스 關節炎에서 urokinase type plasminogen activator, urokinase type plasminogen activator receptor, plasminogen activator inhibitor-type 1으로 구성된 fibrinolytic system은 항진되어 활액막의 증식과 주위 조직으로의 침습에서 중추적인 역할을 하는데 fibrinolytic system의 길항제는 이러한 증식과 침습을 막는다고 한다³⁵). 따라서 PLAU가 胡桃藥鍼液 처치시 유의하게 발현이 감소되었다는 것은 PLAU 발현 억제를 통한 류마티스 關節炎에 대한 치료제로서의 가능성을 추정할 수 있다.

NCKAP1은 NCK-associated protein으로 NAPI이라고도 하며 human chromosome 2q32에 위치하는 tyrosine kinase-binding protein family중의 하나이다. NCKAP1은 주로 대뇌피질과 해마 등 다양한 중추 신경계 조직에서 동시에 표현이 되며 대뇌에 존재하는 신경의 apoptosis를 유도하여 Alzheimer's disease와의 관련성이 보고되었다³⁶). 胡桃藥鍼液 처치시 NCKAP1의 발현이 유의하게 감소하였다는 것은 MYBL2의 발현 증가와 더불어 세포의 apoptosis 조절에 관여한다는 사실을 반증하는 결과이다.

LPS 처치 후 胡桃藥鍼液 처치로 발현이 항진된 유전자는 OCLN, PITPNB, TRA2A, RPS4Y1, YEAST4-1, BGLAP, SDCBP, CIB1, PFAAP5, HNRPH2, RPL6, MGC45477, ZNF443, HNRPU, UBE2D2, KATNB1, RUSC2, CENPB, LAF4, PIGA, TDE1, SIPA1L1, CPOX, NCL, PPIG, ATP5C1, CTRB1, DLX5, ACTG2, HNRPF, MFNG, RPL10A, ACAT1, FNBP4, HMGB1, RPS4X, PRDX1, KCNQ2, POLR2E, KIAA1404, PCBP2, MARCKSL1, HNRPA1, PRG1, 07-Sep, Clone 24739 mRNA sequence, SYNJ1, EIF4A1, ADCY9, RNF10, CTSS, CCL8, NEO1, RPL7A, RPL35, ATP5L, RPS3, RPL12, MDS06, CMYA5, CHEK1, CALM2, IL10, SMARCA5, H3F3A, UGT2B11, TGFBI, EIF4A2, FTH1, IGF2, RPS10, TPT1, RPS14, SFPQ, RPL37, PP3856, RPL11, NSEPI, NRGN, RPL19, RPLP0, GRP58, RPL17, SF3B4, DDX5, RPS7, MRPL3, HNRPA2B1 등으로 총 88종이 있었다.

LPS 처치 후 胡桃藥鍼液 처치로 발현이 항진된 총 88종의 유전자 중 signal transduction에 관여하는 유전자는 ADCY9, IL10, IGF2, PP3856, NRGN, GRP58 등 6종, transcription에 관여하는 유전자는 DLX5, HMGB1, POLR2E, KIAA1404, SMARCA5, NSEPI 등 6종, cell cycle에 관여하는 유전자는 CENPB 등 1종, cell death와 apoptosis에 관여하는 유전자는 IL10 등 1종, 스트레스 반응에 관여하는 유전자는 SDCBP, CIB1, HMGB1, CHEK1, IL10, NSEPI 등 6종, 면역 반응에 관여하는 유전자는 CTSS, IL10, FTH1 등 3종, cellular physiological process에 관여하는 유전자는 OCLN, PITPNB, TRA2A, RPS4Y1, SDCBP, CIB1, RPL6, HNRPU, UBE2D2, CENPB, LAF4, CPOX, NCL, PPIG, ATP5C1, CTRB1, DLX5, HNRPF, RPL10A, HMGB1, RPS4X, PRDX1, KCNQ2, POLR2E, KIAA1404, PCBP2, SYNJ1, EIF4A1, ADCY9, RNF10, CTSS, NEO1, RPL7A, RPL35, ATP5L, RPS3, RPL12, CHEK1, IL10, SMARCA5, UGT2B11, TGFBI, FTH1, RPS10, RPS14, SFPQ, RPL37, PP3856, RPL11, NRGN, RPL19, RPLP0, GRP58, RPL17, SF3B4, DDX5, RPS7, MRPL3, HNRPA2B1 등 59종이었다.

LPS 처치 후 胡桃藥鍼液 처치로 발현이 항진된 유전자 중 IL10, NSEPI, GRP58, NRGN은 胡桃藥鍼液 실험군의 실험 결과와 동일하게 유전자의 발현이

향진되었다.

발현이 향진된 유전자 중 NSEP1은 YB-1이라고도 하는데 cold shock 도메인에 속하여 다양한 세포의 성장과 사멸에 관여된 유전자의 transcription이나 translation을 조절하는 cell survival factor로 생각되고 있다. 최근의 보고에 의하면 NSEP1은 정상적인 후기의 배아 분화와 산화적 또는 독성 유전자, 종양 유전자로 유발되는 세포 스트레스 반응과 조기 노화 방지에서 중요한 역할을 한다고 한다³⁷⁾.

광우병을 유발하는 prion의 신경독성에 대한 보호 효과³⁸⁾가 있다고 알려진 GRP58은 포유동물의 신장의 원위 세뇨관에서 분포하고 있는 thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter와 상호 작용을 하는 유전자로 원위 세뇨관에서 가장 많이 분포한다³⁹⁾. 이 보고는胡桃藥鍼液과 관련된 기존의 실험 결과^{8,10,12-13)}에 대한 분자생물학적 기초를 제공하는 것으로 사료된다.

발현이 향진된 유전자 중 NRGN은 신경원 세포에 특이적인 RC3 유전자와 동의어로 수상돌기의 형성과 시냅스 유연성에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지며 인간의 뇌에서 갑상선 호르몬의 직접적인 목표가 된다. 이러한 사실은 어른에서 뿐만 아니라 발달과정 중에 있는 아이에서 갑상선호르몬저하증에서 유발되는 정신지체와 관련된 유전자로 알려져 있다⁴⁰⁾.

그러나胡桃藥鍼液과 중추신경계의 조절에 관여하는 유전자의 발현에 대해서는 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

발현이 향진된 유전자 중 CIB1은 calcium and integrin binding 1(calmyrin)으로 Alzheimer's disease 병리에서 중요한 역할을 하는 presenilin-2와 상호 작용을 하는 유전자이다. 최근의 연구에 의하면 Alzheimer's disease 뇌와 정상뇌를 비교한 경우 Alzheimer's disease 뇌의 전뇌 부위에서 현저하게 CIB1이 감소되어 있는 것을 보고하였다⁴¹⁾. 그러나胡桃藥鍼液과 중추신경계의 조절에 관여하는 유전자의 발현에 대해서는 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

발현이 향진된 유전자 중 SDCBP는 syntenin이라고도 하며 세포의 성장과 발달, 분화, 세포막의 단백질 복합체의 조직, B 세포 발달의 조절에 중요한 역할을 하며 종양의 전이와 관련된 유전자로 보고되고 있다⁴²⁾. 그러나胡桃藥鍼液과 종양 발생에 관여하는 유전자의 발현에 대해서는 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

LPS 처치 후胡桃藥鍼液 처치로 발현이 저하된 유전자는 DEFB1, ShmL, NRBP2, PDE8B, ATXN7, Transcribed locus, ABCC5, TRIP12, DACH1, RDX, MARCH-III, KIAA1161, DNAJC6, CAP2, CREB3L4, STK25, Homo sapiens, clone IMAGE:5277945, mRNA, PTPRM, GPC4, HMGCL, YES1, HPS1, MGEA5, ARID5A, PEX3, OLFM4, AKAP12, CDNA: FLJ22642 fis, clone HSI06970, PCDHB6, ZNF395, AGR2, KIAA0650, KIAA0895, BMPER, RREB1, PFN2, SENP7, FBXO7, MTMR1, SP110, RICS, HTATSF1, CNN3, HRB, PPAT, ACP, LOC285835, MYO1C, CPE, FLJ10300, REGL, TOP1, PHF10, RAMP1, PGF, SLC4A4, TMCC3, PLAU, OXA1L, ICAM3, TPCN1, SLC35F5, FAT, ANKRD15, Homo sapiens, clone IMAGE:3604678, AUH, CRIPT, HTN3, FLJ10996 등으로 총 69종이 있었다.

LPS 처치 후胡桃藥鍼液 처치로 발현이 저하된 총 69종의 유전자 중에서 signal transduction에 관여하는 유전자는 PDE8B, CAP2, STK25, YES1, AKAP12, RREB1, CPE, RAMP1, PGF, PLAU 등 10종, transcription에 관여하는 유전자는 DACH1, CREB3L4, RREB1, SP110, HTATSF1, HRB, PHF10 등 7종, 스트레스 반응에 관여하는 유전자는 RDX, STK25 등 2종, cellular physiological process에 관여하는 유전자는 NRBP2, PDE8B, ATXN7, ABCC5, TRIP12, DACH1, RDX, DNAJC6, CAP2, CREB3L4, STK25, PTPRM, GPC4, HMGCL, YES1, MGEA5, AKAP12, PCDHB6, RREB1, PFN2, SENP7, FBXO7, MIMR1, SP110, RICS, HTATSF1, CNN3, HRB, PPAT, ACP, CPE, PHF10, RAMP1, PGF, SLC4A4, PLAU, OXA1L, TPCN1, AUH 등 39종이었고, cell cycle, cell death, apoptosis, 면역반응에 관련된 유전자는 없었다.

이상의 결과를 종합하면 임상적으로胡桃藥鍼液을 골관절염이나 류마티스성 관절염 등 다양한 염증과 통증성 질환에 적용할 수 있는 분자생물학적 근거를 마련하는 기초 자료를 제공하였다. 또한胡桃藥鍼液 처치시 다양한 면역 반응 경로조절, cell cycle과 cell death, apoptosis에 관여된 여러 유전자 발현으로 미루어 최근의胡桃藥鍼液의 apoptosis 관련된 항산화나 항노화와 관련된 보고에 분자생물학적 기초를 제공하여 임상적인 적용 범위를 넓힐 수 있을 것이다.

V. 結 論

胡桃藥鍼液의 염증성, 통증성 질환 치료에 대한 임상적 활용여부를 살펴보고자 LPS 모델을 도입하여胡桃藥鍼液이 RAW cell의 유전자 발현에 미치는 영향을 microarray를 통하여 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT assay를 시행하여 세포생존율의 변화를 관찰한 결과胡桃藥鍼液 0.1, 0.3, 1.0 및 3.0 μ g/ml 모든 농도의 실험군이 대조군에 비해 세포생존율의 유의한 변화를 가졌다. 본 실험에서胡桃藥鍼液 처치 농도는 3.0 μ g/ml로 결정하였다.
2. LPS 실험군의 경우 총 8,170개의 유전자 중 발현이 유의하게 항진된 유전자는 총 51종이었고 발현이 유의하게 저하된 유전자는 총 21종이었다.
- 3.胡桃藥鍼液 실험군의 경우 발현이 유의하게 항진된 유전자는 총 95종이었고 발현이 유의하게 저하된 유전자는 총 42종이었다.
4. LPS 처치 후胡桃藥鍼液 실험군의 경우 발현이 유의하게 항진된 유전자는 총 88종이었고 발현이 유의하게 저하된 유전자는 총 69종이었다.

VI. 參考文獻

1. 배상철. 류마티스 관절염의 최신지견. 가정의학회지. 2001 : 22(1) : 22-26.
2. 전국 한의과대학 재활의학과 교실 편저. 동의재활의학과학. 서울 : 서원당. 1995 : 95-96.
3. 全國韓醫科大學 鍼灸·經穴學教室 편. 鍼灸學·下. 서울 : 集文堂. 1994 : 1457-1467.
4. 최도영, 이재동, 김태우. 봉독약침이 제2형 콜라겐 유도 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 : 19(2) : 79-92.
5. 김경민, 최도영, 박동석, 이윤호. 금주사액약침이 제2형 콜라겐 유도 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 : 19(3) : 2-14.
6. 김갑성, 윤종화, 장준혁, 김경호, 이승덕, 구민

- 숙. 시호약침이 생쥐의 Adjuvant 유발 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 : 19(3) : 38-51.
7. 신민교. 임상본초학. 서울 : 영림사. 1997 : 233-234.
8. 서정철, 이병훈, 윤현민, 송춘호, 안창범, 장경전. 호도약침이 Glycerol 에 의한 급성신부전 유발시 요농축능의 장애에 대한 영향. 대한침구학회지. 2001 : 18(3) : 114-122.
9. 이경태, 송춘호.胡桃藥鍼液이 수은(Hg)에 의한 간조직 손상에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999 : 16(3) : 221-230.
10. Ahn CB, Song CH, Kim WH, Kim YK. Effects of Juglans sinensis Dode extract and antioxidant on mercury chloride-induced acute renal failure in rabbits. J Ethnopharmacol. 2002 : 82(1) : 45-49.
11. 김철홍, 윤현민, 장경전, 송춘호, 안창범.胡桃藥鍼液의 유리기 소거와 항산화 효과에 대한 실험적 연구. 대한침구학회지. 2003 : 20(4) : 209-218.
12. 남상필, 조태성, 김철홍, 윤현민, 장경전, 송춘호, 안창범. 신장상피세포에서胡桃藥鍼液이 t-Butylhydroperoxide에 의한 세포막물질이동계의 장애에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003 : 20(6) : 128-139.
13. 박인범, 안창범, 장경전, 윤현민, 김철홍. 신세뇨관 상피세포에서 산화로 유발된 apoptosis에 대한胡桃藥鍼液의 방어효과. 대한침구학회지. 2004 : 21(3) : 1-12.
14. 윤현민, 허재영, 안창범. 호도약침이 인간의 신경교종 세포에 유발된 저산소증에 대한 방어효과. 대한침구학회지. 2003 : 20(2) : 173-183.
15. 백승일, 이용태, 장경전. 폐수, 격수의 호도약침 자극이 알레르기 반응에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003 : 20(4) : 180-191.
16. 노정두, 육태한, 송범룡, 최석우, 설현, 소용룡.胡桃藥鍼液의 만성해수의 현증완화에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003 : 20(5) : 236-243.
17. 이용경, 강성길, 고희균. 봉독약침액이 비만세포주의 CD/cytokine 유전자 발현에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003 : 20(5) : 50-62.

18. 한상원, 서정철, 이윤호, 최제용. 녹용약침액의 DNA chip을 이용한 유전자 발현 분석. 대한 침구학회지. 2003 : 20(6) : 34-44.
19. 소재진, 우현수, 김창환. 봉독의 주요성분인 Melittin과 MCDP이 비만세포주에서 유전자 발현에 미치는 영향에 대한 microarray 분석. 대한침구학회지. 2005 : 22 (3) : 37-51.
20. Yin CS, Lee HJ, Hong SJ, Chung JH, Koh HG. Microarray analysis of gene expression in chondrosarcoma cells treated with bee venom. *Toxicon*. 2005 : 45(1) : 81-91.
21. 劑建洪, 何冬梅. 穴位藥物注射療法. 南昌 : 江西科學技術出版社. 1989 : 1-8.
22. 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.
23. 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.
24. URL : http://digital-genomics.co.kr/BBS/View.html?B_id=kor_Gene_list&rowid=1305&Keyword=&searchOption=
25. Bonder CS, Davies KVL, et al. Endogenous interferon- α production by differentiation human monocytes regulates expression and function of the IL-2/IL-4 receptor γ chain. *Cytokine*. 2002 : 17(4) : 187-196.
26. Foey AD, Feldmann M, Brennan FM. CD40 ligation induces macrophage IL-10 and TNF- α production : differential use of the PI3K and p42/44 MAPK-pathways. *Cytokine*. 2001 : 16 : 131-142.
27. Piecyk M, Anderson P. Signal transduction in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatology*. 2001 : 15(5) : 789-803.
28. Lebberts E, Joosten L, et al. Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall(SCW) arthritis. More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. *Cytokine*. 1998 : 10(5) : 361-369.
29. Joaquin M, Watson RJ. Cell cycle regulation by the B-Myb transcription factor. *Cell Mol Life Sci.* 2003 : 60(11) : 2389-2401.
30. Liu DX, Biswas SC, Greene LA. B-myb and C-myb play required roles in neuronal apoptosis evoked by nerve growth factor deprivation and DNA damage. *J Neurosci.* 2004 : 24(40) : 8720-8725.
31. Luque A, Sanchez-Madrid F, Cabanas C. Functional regulation of the human integrin VLA-1 (CD49a/CD29) by divalent cations and stimulatory beta 1 antibodies. *FEBS Lett.* 1994 : 346(2-3) : 278-284.
32. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. *Immunobiology* 4th ed. London : Current Biology publication. 1999 : 579-590.
33. Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev.* 2002 : 22(2) : 146-167.
34. Ertekin-Taner N, Ronald J, Feuk L et al. Elevated amyloid beta protein (Abeta42) and late onset Alzheimer's disease are associated with single nucleotide polymorphisms in the urokinase-type plasminogen activator gene. *Hum Mol Genet.* 2005 : 14(3) : 447-460.
35. Nielsen A, Scarlett CJ, Samra JS, Gill A, Li Y, Allen BJ, Smith RC. Significant overexpression of urokinase-type plasminogen activator in pancreatic adenocarcinoma using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 : 20(2) : 256-263.
36. Suzuki T, Nishiyama K, Yamamoto A et al. Molecular cloning of a novel apoptosis-related gene, human Nap1 (NCKAP1), and its possible relation to Alzheimer disease. *Genomics.* 2000 : 63(2) : 246-254.
37. Lu ZH, Books JT, Ley TJ. YB-1 is

- important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence. *Mol Cell Biol.* 2005 ; 25(11) : 4625-4637.
38. Hetz C, Russelakis-Carneiro M et al. The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J Neurosci.* 2005 ; 25(11) : 2793-2802.
39. Wyse B, Ali N, Ellison DH. Interaction with grp58 increases activity of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 ; 282(3) : 424-430.
40. Martinez de Arrieta C, Morte B, Coloma A, Bernal J. The human RC3 gene homolog, NRG1 contains a thyroid hormone-responsive element located in the first intron. *Endocrinology.* 1999 ; 140(1) : 335-343.
41. Bernstein HG, Blazejczyk M et al. The Alzheimer disease-related calcium-binding protein Calmyrin is present in human forebrain with an altered distribution in Alzheimer's as compared to normal ageing brains. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005 ; 31(3) : 314-324.
42. Sarkar D, Boukerche H, Su ZZ, Fisher PB. mda-9/syntenin : recent insights into a novel cell signaling and metastasis-associated gene. *Pharmacol Ther.* 2004 ; 104(2) : 101-115.