

원저

## 胡桃藥鍼液의 DNA chip을 이용한 유전자 발현 분석

하지영\* · 김종인\* · 서정철\*\* · 고흥균\*

\*경희대학교 한의과대학 침구학교실

\*\*대구대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

## Gene Expression Analysis Using cDNA Microarray Assay by Juglandis Semen Herbal Acupuncture Solution

Ha Ji-young\*, Kim Jong-in\*, Seo Jung-chul\*\* and Ko Hyung-kyun\*

\*Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

\*\*Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Korean Medicine, Dae Gu 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 lipopolysaccharide(LPS) alone, or with LPS plus JSS was investigated with a cut-off level of 2 fold change in the expression. Especially, Change of the gene expression by treatment with LPS alone was compared with that by treatment with LPS plus JSS with a cut-off level of 1/2 fold change in the expression.

*Results* : Of the 8170 genes profiled in this study, 51 were upregulated and 21 downregulated following LPS treatment, and 88 were upregulated and 69 downregulated following costimulation of JSS and LPS. Of the 51 genes upregulated following LPS treatment, 10 were downregulated following costimulation of JSS and LPS. Of the 21 genes downregulated following LPS treatment, 3 were upregulated following costimulation of JSS and LPS.

· 접수 : 2007년 1월 13일 · 수정 : 2007년 1월 20일 · 채택 : 2007년 1월 20일  
· 교신저자 : 고흥균, 서울특별시 동대문구 회기동 1 경희대학교 부속한방병원 침구과  
Tel. 02-958-9194 E-mail : koh5795@hanmail.net

*Conclusion* : JSS treatment induced upregulation of some genes including IL-10 and downregulation of that including MMP13 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, MMP13

## I. 緒 論

류마티스 관절염은 관절을 둘러싸고 있는 활막 조직의 만성 염증성 질환으로 연골과 골과피로 인해 관절의 파괴와 변형을 초래하는 대표적인 자가면역성 질환이다<sup>1)</sup>. 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 속한다<sup>2)</sup>. 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<sup>3)</sup>이 류마티스 관절염 치료에 효과가 있음이 보고되고 있다<sup>4-6)</sup>. 최근에는 藥鍼療法 중에서 補腎益精, 強腰膝 등의 效能이 있어 腎虛精虧, 腰痛, 筋骨無力 등의 病症을 치료하는데 사용되고 있는<sup>7)</sup> 胡桃(Juglandis Semen)를 이용한 胡桃藥鍼液(Juglandis Semen herbal acupuncture solution, JSS)의 류마티스 관절염에 대한 분자생물학적 유전자 발현에 대한 보고가 있었다<sup>8)</sup>.

한의학계에서는 한약물의 유전자 발현을 microarray를 이용하여 분석하여 전통적인 약물의 효능을 분자생물학적 유전자 발현을 통해서 재규명하고 재해석하여 새로운 임상적 활용 가능성을 넓히기 위한 여러 연구가 진행되고 있다<sup>9-12)</sup>.

이에 저자는 胡桃藥鍼液의 염증성, 통증성 질환 치료에 대한 임상적 활용여부를 살펴보고자 류마티스 관절염 유발 실험 모델로 세포 실험에서 많이 이

용되고 있는 Lipopolysaccharide(LPS)를 병리학적 모델로 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 부속한방병원 약제과에서 300g을 구입한 후 정선하여 사용하였다.

#### 2) 藥鍼液의 調製

胡桃 300g을 분쇄하여 flask에 넣고 증류수 2,000ml를 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 다음, 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporator로 감압 농축하여 생성된 농축액에 증류수 100ml를 가하여 용해시키고 ethanol을 가하여 95% ethanol 용액 상태가 되게 만든 다음, 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporator로 감압 농축하여 최종산물 30g을 회수하였다. 여기

에 saline을 加하고 10 N NaOH로 pH 6-7로 조절하여 全量이 1,000ml되게 한 다음 이를 저온에서 24時間 방치한 후, nuclepore filter paper(0.45 $\mu$ m, 직경 25 mm, USA)로 여과하고 가압멸균하여 약침액을 만들어 사용하였다<sup>13)</sup>. 실험에 사용한 胡桃藥鍼液은 최종 농도가 0.1, 0.3, 1.0 및 3.0 $\mu$ 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-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 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=](http://digital-genomics.co.kr/BBS/View.html?B_id=kor_Gene_list&rowid=1305&Keyword=&searchOption=)), hybridization cassette는 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% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하고, 배양액은 3일마다 교환하였다.

## 3. MTT assay

胡桃藥鍼液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.

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

RAW cell을 96 well plate(Corning, USA)에 well 당 배양액 100 $\mu$ l에 5 $\times$ 10<sup>4</sup>개의 세포수가 되도록 serum free 배양액에 분주하고 검액은 胡桃藥鍼液의 최종 농도가 0.1, 0.3, 1.0 및 3.0 $\mu$ g/ml가 되도록 증류수로 희석하여 전처리하고 18시간 incubation하였으며, vehicle을 처치하지 않은 세포군을 대조군으로 하였다. 각 well에 MTT labeling reagent 용액을 10  $\mu$ l씩 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 solubilization solution을 각 well에 100  $\mu$ l씩 첨가하여 배양기에 20시간 유지시키고 ELISA reader(Bio-Tek, USA)로 690nm를 참고치로 하여 595 nm에서 측정하였다.

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

## 4. RNA 추출

LPS(Sigma, USA)<sup>14)</sup> 처치로 발현이 향진 또는 저하된 유전자의 관찰을 위해 실험군에는 배양된 세포에 LPS 1.0 $\mu$ g/ml를 3시간 처치하고, 대조군에는 vehicle을 처치하여 RNA를 추출하였다.

LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치시 발현이 향진 또는 저하되었던 유전자의 관찰을 위해 실험군에는 LPS 1.0 $\mu$ g/ml를 3시간 처치한 후 胡桃藥鍼液을 처치하고 대조군에는 LPS 1.0 $\mu$ 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 흔들어 잘 섞어준 후 5분간 상온에서 방치하였다. 4°C에서 12,000g으로 15분간 원심 분리하고 상층액을 새로운 tube로 옮겨 동량의

isopropanol을 첨가하고 10분간 상온에서 방치하였다. 4°C에서 12,000g으로 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 80% 에탄올을 1.0ml를 첨가하여 원심분리하였다. 에탄올을 제거하고 적당량의 DEPC-DW를 첨가하여 total RNA를 준비하였다.

## 5. cDNA 준비

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

## 6. Microarray hybridization

2X formamide based buffer를 55°C 10분간 가열을 반복하여 완전히 녹인 것 15 $\mu$ l, dT blocker 2 $\mu$ l, nuclease free water 3 $\mu$ l를 섞고 여기에 위에서 준비한 concentrated cDNA 10 $\mu$ l를 넣어 총 30 $\mu$ l로 맞추었다. 이 혼합액을 75-80°C 10분, 45-50°C 15-20분간 incubation하고 pre-warmed(hybridization 온도

에서) microarray에 뿌려 coverslip 덮고 overnight 반응시켰다.

Microarray slide를 55-65°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 5,724-8,944g으로 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 조정한 후 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 향진되거나 1/2 이하로 발현이 저하된 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 하였다<sup>15)</sup>. 또한 LPS 실험군과 LPS 처치후 胡桃藥鍼液 실험군의 유전자 발현 양상의 변화를 평가하고 종합하여 LPS 실험군과 LPS 처치후 胡桃藥鍼液 실험군의 발현이 향진 또는 저하된 유전자의 변화를 비교하였다. 두 군의 비교시 LPS 실험군에 비해 유전자의 발현이 50% 이상 향진하거나 저하되는 것을 유의한 차이가 있는 것으로 보았다.

# 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  $\mu$ g/ml에서 각각 66.0 $\pm$ 12.0, 59.3 $\pm$ 7.7, 54.3 $\pm$ 9.0, 49.5 $\pm$ 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 3.0 $\mu$ g/ml으로 결정하였다.

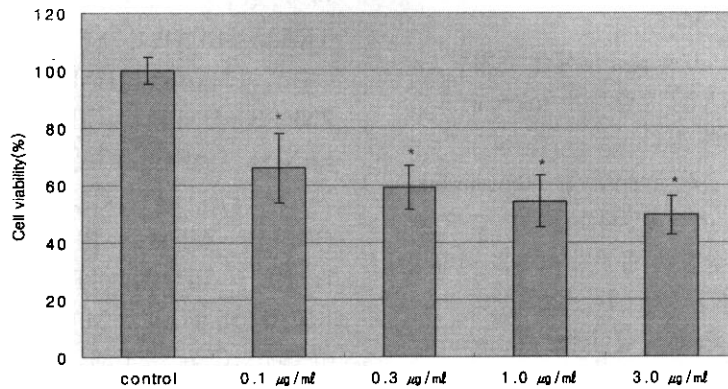


Fig. 1. The viability of RAW 264.7 cell by MTT assay

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).

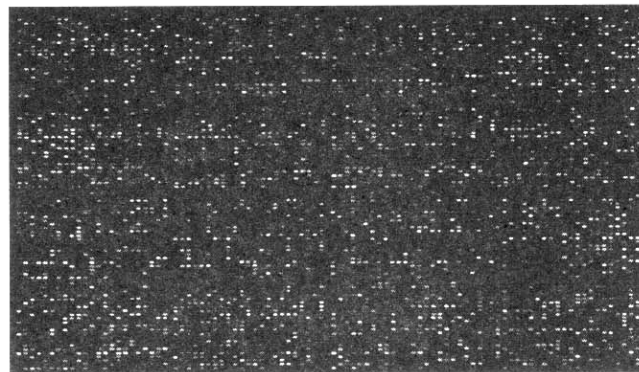


Fig. 2. 8.0k human cDNA microarray image of gene expression in RAW cells treated with LPS

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.

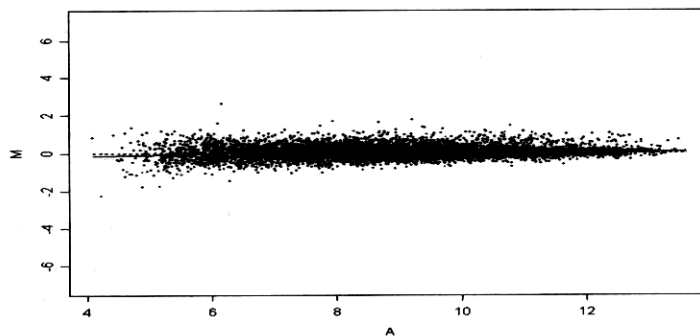


Fig. 3. Scattered plot of the normalization results by global M method in LPS-treated and control RAW cells

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 log<sub>2</sub> ratio, and that is global M method.

## 2. Microarray analysis

배양된 세포에 LPS 1.0 $\mu$ g/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.

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

## 3. LPS 처치시 발현이 향진된 유전자

LPS 1.0 $\mu$ g/ml를 3시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 발현이 향진된 유전자는 MARCKSL1, LGL2, RPS6KB2, RPL19, NSEP1, UBE2S, RGS9, RASA4, IGF2, HNRPA2B1, MGC10854, PCYOX1, TRA2A, ATP5L, IFRD1, PPY, MED6, LPHN3, FZR1, CYP19A1, KIAA1404, LAF4, LOC440918, RSAD2, CUL5, CHRN3, 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 1.0 $\mu$ g/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).

## 5. LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치시 발현이 향진된 유전자

LPS 1.0 $\mu$ g/ml를 3시간 전처치한 후 胡桃藥鍼液 3.0 $\mu$ g/ml를 18시간 처치했을 때 LPS 1.0 $\mu$ g/ml를 3시간 전처치한 후 vehicle을 18시간 처치한 대조군에

비해 발현이 향진된 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, NEOL, RPL7A, RPL35, ATP5L, RPS3, RPL12, MDS006, CMYA5, CHEK1, CALM2, IL10, SMARCA5, H3F3A, UGT2B11, TGFBI, EIF4A2, FTH1, IGF2, RPS10, TPT1, RPS14, SFPQ, RPL37, PP3856, RPL11, NSEP1, NRG1, RPL19, RPLP0, GRP58, RPL17, SF3B4, DDX5, RPS7, MRPL3, HNRPA2B1 등으로 총 88종이었다(Table은 지면 관계상 생략함).

## 6. LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치시 발현이 저하된 유전자

LPS 1.0 $\mu$ g/ml를 3시간 전처치한 후 胡桃藥鍼液 3.0 $\mu$ g/ml를 18시간 처치했을 때 LPS 1.0 $\mu$ 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, ACP, LOC285835, MYO1C, CPE, FLJ10300, REGL, TOP1, PHF10, RAMP1, PGF, SLC4A4, TMCC3, PLAU, OXAIL, ICAM3, TPCN1, SLC35F5, FAT, ANKRD15, Homo sapiens, clone IMAGE:3604678, mRNA, AUH, CRIPT, HTN3, FLJ10996 등으로 총 69종이었다(Table은 지면 관계상 생략함).

Table 1. Changes of Upregulated Gene Expression by Treatment to LPS without or with JSS

| Gene name   | Abbreviation | M1*    | M2*          | $\Delta^{**}(\%)$ |
|---|--------------|--------|--------------|-------------------|
| MARCKS-like 1   | MARCKSL1     | 1.0026 | 0.5386       | 46                |
| Lethal giant larvae homolog 2 (Drosophila)  | LLGL2        | 1.0083 | 0.5118       | 49                |
| Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 2   | RPS6KB2      | 1.0097 | 0.6243       | 38                |
| Ribosomal protein L19   | RPL19        | 1.0194 | 1.4167       | -39               |
| Nuclease sensitive element binding protein 1  | NSEP1        | 1.0233 | 1.3486       | -32               |
| Ubiquitin-conjugating enzyme E2S  | UBE2S        | 1.0244 | -0.1042      | 110               |
| Regulator of G-protein signalling 9   | RGS9         | 1.0249 | 0.2259       | 78                |
| RAS p21 protein activator 4   | RASA4        | 1.0252 | 0.8629       | 16                |
| Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)  | IGF2         | 1.0354 | 1.2864       | -24               |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1   | HNRPA2B1     | 1.0417 | 1.5814       | -52               |
| Hypothetical protein MGC10854   | MGC10854     | 1.0428 | 0.7817       | 25                |
| Prenylcysteine oxidase 1  | PCYOX1       | 1.0510 | 0.6271       | 40                |
| Transformer-2 alpha   | TRA2A        | 1.0513 | 1.0049       | 4                 |
| ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit g                    | ATP5L        | 1.0514 | 1.1957       | -14               |
| Interferon-related developmental regulator 1  | IFRD1        | 1.0523 | 0.6082       | 42                |
| Pancreatic polypeptide  | PPY          | 1.0549 | 0.1840       | 83                |
| Mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 6 homolog (yeast)                            | MED6         | 1.0675 | 0.8037       | 25                |
| Latrophilin 3   | LPHN3        | 1.0691 | no- response | no-response       |
| Fizzy/cell division cycle 20 related 1 (Drosophila)   | FZR1         | 1.0764 | 0.8996       | 16                |
| Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1  | CYP19A1      | 1.0766 | 0.4634       | 57                |
| KIAA1404 protein  | KIAA1404     | 1.0781 | 1.1128       | -3                |
| Lymphoid nuclear protein related to AF4   | LAF4         | 1.0790 | 1.0529       | 3                 |
| LOC440918   | none         | 1.0796 | 0.2121       | 80                |
| Radical S-adenosyl methionine domain containing 2   | RSAD2        | 1.0838 | -0.0234      | 102               |
| Cullin 5  | CUL5         | 1.0897 | 0.8940       | 18                |
| Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 3   | CHRNB3       | 1.1004 | no- response | no- response      |
| Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)                              | CCL18        | 1.1021 | 0.7080       | 36                |
| Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 13                         | SERPINB13    | 1.1163 | 0.9763       | 13                |
| SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5 | SMARCA5      | 1.1267 | 1.2392       | -10               |

|   |          |        |              |              |
|---|----------|--------|--------------|--------------|
| LIM domain binding 3  | LDB3     | 1.1439 | 0.8843       | 23           |
| Hepatocyte nuclear factor 4, alpha                              | HNF4A    | 1.1581 | 0.6792       | 41           |
| Phosphonoformate immuno-associated protein 5                    | PFAAP5   | 1.1656 | 1.0122       | 13           |
| Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 4           | PSMB4    | 1.1660 | 0.9475       | 19           |
| Desmocollin 2   | DSC2     | 1.1732 | 0.7420       | 37           |
| Tetratricopeptide repeat domain 12                              | TTC12    | 1.1901 | 0.6873       | 42           |
| Nucleoside phosphorylase  | NP       | 1.2137 | 0.4390       | 64           |
| Formin binding protein 4  | FNBP4    | 1.2142 | 1.0991       | 9            |
| Interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)                    | IL3RA    | 1.2481 | 0.9994       | 20           |
| Sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha                   | SCN9A    | 1.2527 | 0.0339       | 98           |
| Superoxide dismutase 2, mitochondrial                           | SOD2     | 1.2680 | 0.8377       | 34           |
| CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)                              | CHEK1    | 1.2789 | 1.2195       | 5            |
| Cathepsin S   | CTSS     | 1.2883 | 1.1648       | 10           |
| Proteoglycan 1, secretory granule                               | PRG1     | 1.3257 | 1.1278       | 15           |
| Mitochondrial ribosomal protein L49                             | MRPL49   | 1.3671 | 0.8736       | 36           |
| Dihydrofolate reductase   | DHFR     | 1.3770 | 0.6113       | 56           |
| Similar to CG3714 gene product                                  | PP3856   | 1.4071 | 1.3303       | 5            |
| Topoisomerase (DNA) I   | TOP1     | 1.4741 | no- response | no- response |
| BCL2-related protein A1   | BCL2A1   | 1.4890 | 0.9132       | 39           |
| CD44 antigen<br>(homing function and Indian blood group system) | CD44     | 1.5448 | 0.7954       | 49           |
| MARCKS-like 1   | MARCKSL1 | 1.7716 | 1.1209       | 37           |
| Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)                     | MMP13    | 2.7088 | 0.8589       | 68           |

\* M1 is global M when RAW cells were treated to LPS and M2 is global M when RAW cells were treated with JSS following treatment to LPS.

\*\*  $\Delta(\%) = 100 - (M2/M1 * 100)$ .

### 7. LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치시 LPS 처치로 발현이 향진되었던 유전자의 변화

LPS 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처치했을 때 발현이 향진되었던 총 51종의 유전자 중에서 LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치시에 UBE2S, RGS9, PPY, CYP19A1, LOC440918, RSAD2, NP, SCN9A, DHFR, MMP13 등 총 10종의 유전자는 발현이 유의하게 저하되는 경향을 보였고, HNRPA2B1 등 1종은 여전히 향진된 상태를 보였다(Table 1).

### 8. LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치시 LPS 처치로 발현이 저하되었던 유전자의 변화

LPS 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처치했을 때 발현이 저하되었던 총 21종의 유전자 중에서 LPS 처치후 胡桃藥鍼液 으로 처치했을 때에는 LOC285835, SFRS15, PTPRF 등 총 3종의 유전자 발현이 유의하게 향진되는 경향을 보였다(Table 2).



Table 2. Changes of Downregulated Gene Expression by Treatment to LPS without or with JSS

| Gene name   | Abbreviation | M1*     | M2*          | Δ**(%)       |
|---|--------------|---------|--------------|--------------|
| Hypothetical protein LOC285835                                      | LOC285835    | -2.2500 | -1.0478      | 53           |
| CAMP responsive element binding protein 3-like 4                    | CREB3L4      | -1.8263 | -1.1967      | 34           |
| Transmembrane protein 1   | TMEM1        | -1.4166 | -0.9173      | 35           |
| Vav 3 oncogene  | VAV3         | -1.3862 | no- response | no- response |
| DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6                         | DNAJC6       | -1.3518 | -1.2219      | 10           |
| Shroom-related protein  | ShrmL        | -1.2638 | -1.5786      | -25          |
| Splicing factor, arginine/serine-rich 15                            | SFRS15       | -1.2465 | -0.5179      | 58           |
| ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5             | ABCC5        | -1.2091 | -1.3201      | -9           |
| Ephrin-B2   | EFNB2        | -1.1639 | -0.6783      | 42           |
| Profilin 2  | PFN2         | -1.1591 | -1.0886      | 6            |
| Phosphodiesterase 8B  | PDE8B        | -1.1061 | -1.4133      | -28          |
| Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class) | GNA15        | -1.0971 | -0.6290      | 43           |
| Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2                     | NR3C2        | -1.0679 | -0.8445      | 21           |
| Glypican 4  | GPC4         | -1.0665 | -1.1758      | -10          |
| KIAA0650 protein  | KIAA0650     | -1.0561 | -1.1011      | -4           |
| Membrane-associated ring finger (C3HC4) 3                           | MARCH-III    | -1.0419 | -1.2541      | -20          |
| Protein tyrosine phosphatase, receptor type, F                      | PTPRF        | -1.0209 | -0.3920      | 62           |
| Phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase                       | PPAT         | -1.0140 | -1.0585      | -4           |
| KIAA0831  | KIAA0831     | -1.0113 | no- response | no- response |
| NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa               | NDUFV2       | -1.0098 | no- response | no- response |
| Paralemmin  | PALM         | -1.0073 | no- response | no- response |

\* M1 is global M when RAW cells were treated LPS and M2 is global M when RAW cells were treated with JSS following treatment to LPS.

\*\* Δ(%) = 100-(M2/M1\*100).

#### IV. 考 察

류마티스 관절염은 관절을 둘러싸고 있는 활막 조직의 만성 염증성 질환으로 연골과 골파괴로 인해 관절의 파괴와 변형을 초래하는 대표적인 자가면역성 질환이다<sup>1)</sup>. 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 속

한다<sup>2)</sup>. 류마티스 관절염에 대한 한의학적 치료 중 최근에는 藥鍼療法 중에서 補腎益精, 強腰膝 등의 효능이 있어 腎虛精虧, 腰痛, 筋骨無力 등의 病症을 치료하는데 사용되고 있는<sup>7)</sup> 胡桃를 이용한 胡桃藥鍼液의 류마티스 관절염에 대한 분자생물학적 유전자 발현에 대한 보고<sup>8)</sup>가 있었다. 한의학계에서는 한약물의 유전자 발현을 microarray를 이용하여 분석하여 전통적인 약물의 효능을 분자생물학적 유전자 발현을 통해서 재규명하고 재해석하여 새로운 임상적 활용 가능성을 넓히기 위한 여러 연구가 진행되고 있다<sup>8-12)</sup>. 이에 저자는 胡桃藥鍼液의 염증성, 통증성 질환 치료에 대한 임상적 활용여부를 살펴보고자 류

마티스 관절염 유발 실험 모델로 세포 실험에서 많이 이용되고 있는 LPS를 병리학적 모델로 도입하여 胡桃藥鍼液이 RAW cell의 유전자 발현에 미치는 영향을 microarray를 통하여 관찰하고자 하였다.

본 연구에서는 8170개의 유전자의 발현 양상을 동시에 측정할 수 있는 microarray를 가지고 첫째, LPS 처치로 발현 향진 또는 억제된 유전자의 관찰, 둘째, LPS 처치 후 胡桃藥鍼液 처치로 발현이 향진 또는 억제되었던 유전자의 관찰, 셋째, LPS 실험군과 LPS 처치후 胡桃藥鍼液 실험군의 유전자 발현 양상의 변화를 평가하고 종합하여 LPS 실험군과 LPS 처치후 胡桃藥鍼液 실험군의 발현이 향진 또는 저하된 유전자의 변화 비교 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 $\mu$ 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 $\mu$ g/ml로 결정하였다.

다음으로 microarray를 시행하여 LPS 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 것<sup>15)</sup>으로 판단하였다. LPS 실험군과 LPS 처치후 胡桃藥鍼液 실험군 비교시 LPS 실험군에 비해 유전자의 발현이 50% 이상 향진하거나 저하되는 것을 유의한 차이가 있는 것으로 보았다.

그 결과 LPS 실험군의 경우 총 8170개의 유전자 중 발현이 유의하게 향진된 유전자는 MARCKSL1, LLGL2, RPS6KB2, RPL19, NSEPI, UBE2S, RGS9, RASA4, IGF2, HNRPA2B1, MGC10854, PCYOX1, TRA2A, ATP5L, IFRD1, PPY, MED6, LPHN3, FZRL, 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.

LPS 처치 후 胡桃藥鍼液 처치로 발현이 향진된 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, NRG, RPL19, RPLP0, GRP58, RPL17, SF3B4, DDX5, RPS7, MRPL3, HNRPA2B1 등으로 총 88종이 있었다.

LPS 처치 후 胡桃藥鍼液 처치로 발현이 향진된 유전자 중 IL-10은 cytokine synthesis inhibitory factor라고도 불렀는데, T helper 1 cell에 의한 IFN $\gamma$  생산을 억제하기 때문이며 IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-12의 처치로 단핵구에서 분비되고 IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10에 의해 억제된다<sup>16)</sup>. IL-10은 류마티스 환자의 관절 대식세포, 단핵구 혹은 말초혈액 임파구에서 분비되는 항염증성 cytokine이다<sup>17)</sup>. 염증성 cytokine인 TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-11과 항염증성 cytokine인 IL-4와 IL-10의 상호작용과 균형은 다양한 여러 질환의 병리학적 과정에서 중요한 역할을 한다<sup>18)</sup>. 특히, IL-4와 IL-10은 TNF $\alpha$ , IL-1을 억제하여關節炎의 다양한 증상을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>19)</sup>.

LPS 처치 후 胡桃藥鍼液 처치로 발현이 저하된 유전자는 DEFB1, 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, PLAU, OXAIL, ICAM3, TPCN1, SLC35F5, FAT, ANKRD15, Homo sapiens, clone IMAGE:3604678, AUH, CRIPT, HTN3, FLJ10996 등으로 총 69종이 있었다.

LPS를 처치했을 때 발현이 항진되었던 총 51종의 유전자 중에서 LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치시에 UBE2S, RGS9, PPY, CYP19A1, LOC440918, RSAD2, NP, SCN9A, DHFR, MMP13 등 총 10종이 발현이 유의하게 저하되는 경향을 보였으나 HNRPA2B1 등 1종은 여전히 항진된 상태를 보였다(Table 1).

이 중 MMP13은 관절조직의 병리학적 파괴 과정 중 연골, 뼈, 활막액, 근처의 연부조직의 흡수에 관여하는 중요한 매개체인 27개 MMP군(matrix metalloproteinases)유전자 중 하나이다<sup>20-21</sup>. 류마티스성 關節炎과 골관절염에서 interstitial collagen (type I-III)은 관절 파괴의 주된 목표가 되는데 분비된 collagenase(MMP-1과 MMP-13)는 이러한 파괴에서 주된 역할을 한다<sup>22</sup>. MMP-1과 MMP-13은 IL-1과 TNF $\alpha$ 에 반응하여 증가하며 關節炎 조직에서 MMP-1과 MMP-13이 증가되는 것이 관찰되고 있어 최근의 關節炎 연구에서 MMP-1과 MMP-13 유전자 발현에 대한 조절은 중요한 이슈 중의 하나이다<sup>23</sup>. 즉, 胡桃藥鍼液이 MMP-13의 발현을 억제한다는 사실은 LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치시 IL-10의 발현 증가와 더불어 임상적 활용을 넓힐 수 있는 가능성을 시사한다.

SCN9A는 SCN1A, SCN2A, SCN8A 등과 함께 sodium channel을 조절하는 유전자로 간질이나 운동실조증, 통증에 대한 감수성이 높은 환자에서 주로 변이가 관찰된다<sup>24</sup>. SCN9A는 Na(v)1.7이라고 불리기도 하는데 주로 말초의 손상을 인지하는 뉴런에서 선택적으로 표현되어 발적, 종창, 열감, 부종 등 급성 염증성 통증에 주로 관련이 되어 통증의 경로를 연구하기 위한 중요한 유전자 중의 하나이다<sup>25</sup>. LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치시 SCN9A의 발현이 유의하게 감소한 것은 胡桃藥鍼液을 임상적으로 통증이나 염증성 질환에 적용할 수 있는 가능성을 시사한다.

RGS9는 regulator of G-protein signalling 9로 인간에 존재하는 19개의 RGS 유전자군 중의 하나<sup>26</sup>로 G-protein 수용체에 대한 조절을 통해서 중추신경계의 조절에 관여를 하는 것으로 알려져 있으며<sup>27</sup> 항정신성 약물로 유발되는 운동이상이나 레보도파로 유발되는 운동이상과 관련성이 있다<sup>28</sup>. 특히, T 림

프구의 면역반응과 관련하여 naive와 regulatory T cell 모두에 대해 RGS1, RGS9, RGS16의 발현 강도와 migration 능력 사이에 역상관계가 있음이 보고되었다<sup>29</sup>. 그러나 胡桃藥鍼液과 중추신경계의 조절에 관여하는 유전자의 발현에 대해서는 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

UBE2S는 ubiquitin-conjugating enzyme으로 인터페론을 처치하여 면역반응에서 중요한 역할을 하는 protein isolation을 조절하는 것으로 알려져 있다<sup>30</sup>. Ubiquitin-proteasome system은 ubiquitin-activating enzymes(E1S), ubiquitin-conjugating enzymes(E2S), ubiquitin ligase(E3S) 등으로 구성되는 복잡한 과정으로 단백질의 항상성 유지에 중요한 역할을 하며 정상 세포나 암과 관련된 세포 과정에서 중요한 역할을 담당한다. 최근에는 이러한 과정에 관여하는 유전자에 대한 조절을 통해 새로운 항암 치료법으로서의 가능성이 보고되고 있다<sup>31</sup>. 그러나 胡桃藥鍼液과 종양 발생에 관여하는 유전자의 발현에 대해서는 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

LPS를 처치했을 때 발현이 저하되었던 총 21종의 유전자 중에서 LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치했을 때에는 LOC285835, SFRS15, PTPRF 등 총 3종이 유의하게 발현이 항진되는 경향을 보였다(Table 2).

PTPRF는 protein tyrosine phosphatase, receptor type, F로 6개의 protein tyrosine phosphatase 그룹(PTPs) 중의 하나이다. PTP는 종양발생에서 중요한 역할을 하는 tyrosine phosphorylation을 조절하는 유전자로 알려져 있으며 최근의 보고에 의하면 여러 인간의 암 중에서 대장암의 발생에 관여를 한다. 특히, 변이된 PTP는 tumor suppressor gene으로 종양발생과정을 조절하는 치료제로서의 가능성이 보고된다<sup>32</sup>. 그러나 胡桃藥鍼液과 종양 발생에 관여하는 유전자의 발현에 대해서는 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

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.

## 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 結論을 얻었다.

1. MTT assay를 시행하여 세포생존율의 변화를 관찰한 결과 胡桃藥鍼液 0.1, 0.3, 1.0 및 3.0 $\mu$ g/ml 모든 농도의 실험군이 대조군에 비해 세포생존율의 유의한 변화를 가졌다. 본 실험에서 胡桃藥鍼液 처치 농도는 3.0 $\mu$ g/ml로 결정하였다.
2. LPS 실험군의 경우 총 8170개의 유전자 중 발현이 유의하게 항진된 유전자는 총 51종이었고 발현이 유의하게 저하된 유전자는 총 21종이었다.
3. LPS 처치 후 胡桃藥鍼液 실험군의 경우 발현이 유의하게 항진된 유전자는 총 88종이었고 발현이 유의하게 저하된 유전자는 총 69종이었다.
4. LPS를 처치했을 때 발현이 항진되었던 총 51종의 유전자 중에서 LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치시에 UBE2S, RGS9, PPY, CYP19A1, LOC440918, RSAD2, NP, SCN9A, DHFR, MMP13 등 총 10종의 유전자 발현이 유의하게 저하되는 경향을 보였고, HNRPA2B1 등 1종은 여전히 항진된 상태를 보였다.
5. LPS를 처치했을 때 발현이 저하되었던 총 21종의 유전자 중에서 LPS 처치후 胡桃藥鍼液 처치했을 때에는 LOC285835, SFRS15, PTPRF 등 총 3종의 유전자 발현이 유의하게 항진되는 경향을 보였다.

## 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 제 2형 콜라겐 유도 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(2) : 79-92.
5. 김경민, 최도영, 박동석, 이윤호. 금주사액약침이 제 2형 콜라겐 유도 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(3) : 2-14.
6. 김갑성, 윤종화, 장준혁, 김경호, 이승덕, 구민숙. 시호약침이 생쥐의 Adjuvant 유발 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(3) : 38-51.
7. 신민교. 임상본초학. 서울 : 영림사. 1997 : 233-234.
8. 하지영, 고희균, 김종인. 호도약침액이 RAW cell에서 유전자 발현에 미치는 영향. 대한침구학회. 2006 ; 23(4) : 135-148.
9. 이웅경, 강성길, 고희균. 봉독약침액이 비만세포주의 CD/cytokine 유전자 발현에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003 ; 20(5) : 50-62.
10. 한상원, 서정철, 이윤호, 최제용. 녹용약침액의 DNA chip을 이용한 유전자 발현 분석. 대한침구학회지. 2003 ; 20(6) : 34-44.
11. 소재진, 우현수, 김창환. 봉독의 주요성분인 Melittin과 MCDP이 비만세포주에서 유전자 발현에 미치는 영향에 대한 microarray 분석. 대한침구학회지. 2005 ; 22 (3) : 37-51.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Bonder CS, Davies KVL, et al. Endogenous interferon- $\alpha$  production by differentiation human monocytes regulates expression and function of the IL-2/IL-4 receptor  $\gamma$  chain. Cytokine. 2002 ; 17(4) : 187-196.
17. Foey AD, Feldmann M, Brennan FM. CD40 ligation induces macrophage IL-10 and TNF-

- a production : differential use of the PI3K and p42/44 MAPK-pathways. *Cytokine*. 2001 ; 16 : 131-142.
18. Piecyk M, Anderson P. Signal transduction in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatology*. 2001 ; 15(5) : 789-803.
  19. Lutterts E, Toostern LA, 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.
  20. Cawston T. Matrix metalloproteinases and TIMPs : properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today* 1998 ; 4(3) : 130-137.
  21. Poole AR et al. Type II collagen degradation and its regulation in articular in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2002 ; 61(suppl II) : 1178-1179.
  22. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1  $\beta$ . *Arthritis Res*. 2001 ; 3 : 381-388.
  23. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis : integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res*. 2002 ; 4(3) : 157-164.
  24. Meisler MH, Kearney JA. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest*. 2005 ; 115(8) : 2010-2017.
  25. Nassar MA, Stirling LC et al. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 ; 101(34) : 12706-12711.
  26. Laminie C, Murdock P, Walhin JP, Duckworth M, Blumer KJ, Scheideler MA, Garnier M. Selective expression of regulators of G-protein signaling (RGS) in the human central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004 ; 122(1) : 24-34.
  27. Sharifi JL, Brady DL, Koenig JI. Estrogen modulates RGS9 expression in the nucleus accumbens. *Neuroreport*. 2004 ; 15(15) : 2433-2436.
  28. Kovoor A, Seyffarth P, Ebert J, Barghshoon S, Chen CK, Schwarz S, Axelrod JD, Cheyette BN, Simon MI, Lester HA, Schwarz J. D2 dopamine receptors colocalize regulator of G-protein signaling 9-2 (RGS9-2) via the RGS9 DEP domain, and RGS9 knock-out mice develop dyskinesias associated with dopamine pathways. *J Neurosci*. 2005 ; 25(8) : 2157-2165.
  29. Agenes F, Bosco N, Mascarell L, Fritah S, Ceredig R. Differential expression of regulator of G-protein signalling transcripts and in vivo migration of CD4+ naive and regulatory T cells. *Immunology*. 2005 ; 115(2) : 179-188.
  30. Kim KI, Giannakopoulos NV, Virgin HW, Zhang DE. Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation. *Mol Cell Biol*. 2004 ; 24(21) : 9592-9600.
  31. Burger AM, Seth AK. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer : therapeutic implications. *Eur J Cancer*. 2004 ; 40(15) : 2217-2229.
  32. Wang Z, Shen D, Parsons DW, Bardelli A, Sager J, Szabo S, Ptak J, Silliman N, Peters BA, van der Heijden MS, Parmigiani G, Yan H, Wang TL, Riggins G, Powell SM, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers. *Science*. 2004 ; 304(5674) : 1164-1166.