

Original Articles

活絡湯의 cDNA Microarray를 이용한 유전자 발현에 미치는 영향

신철경* · 이채우** · 유선애*** · 윤현민** · 장경진** · 송춘호** · 안창범** · 김철홍**

*동의대학교 울산한방병원 한방내과

**동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

***동의대학교 한의과대학 소아과학교실

Genes expression by using cDNA Microarray in Whallak-tang

Cheol-kyung Sin* · Chae-woo Lee** · Sun-ae Yoo*** · Hyoun-min Youn** · Kyung-jeon Jang** · Choon-ho Song** · Chang-beohm Ahn** · Cheol-hong Kim**

*Department of Oriental Internal Medicine, Ulsan Oriental Medical Hospital, Dongeui University

**Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Dongeui University

***Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongeui University

ABSTRACT

Objective	This study was undertaken to determine the effect of Whallak-tang on expression of CD/cytokine Genes.
Methods	The expression of CD/Cytokine Genes were examined by cDNA microarray using the human mast cell line(HMC-1).
Results	The expression of ATP5F1, FLJ20671, unknown, KIAA0342, OAS2, unknown genes were increased in 200~300% range. The expression of unknown, MDS006, IFITM1, MRPL3, ZNF207, FTH1, FBP1, NRGN, NR1H2, KIAA0747 genes were decreased in 0~33% range.
Conclusion	These results would provide important basic data on the possibility of the clinical treatment of Whallak-tang in musculoskeletal disease.
Key words	<i>Whallak-tang, cDNA microarray, musculoskeletal disease.</i>

I. 序論

活絡湯은 活血, 通經活絡, 止痛 등의 효능이 있어 최근 성기 및 급성기 요통, 요각통, 견비통 등에 활용되는데 특히 관절염 등 근골격계의 염증성, 동통성 질환에서 광범위하게 응용되고 있다^{1,2)}.

서양의학에서 各種 關節炎과 筋骨格系에 痛症이 나타나

는 疾患에 대하여 病因病理와 臨床症狀을 살펴보면 한의 학에서 痺證의 範疇에 屬한다^{3,4)}.

痺證은 閉而不通하여 痛症이 발생함을 말하며 대개 風寒濕의 邪氣가 肌表經絡으로 侵入하거나 關節에 凝滯됨으로써 氣血運行이 順調롭지 못하여 肌肉, 筋骨, 關節 등에 麻木, 疼痛, 屈伸不利, 腫脹, 發赤, 熱感 등의 증상을 나타

※ Correspondence : Cheol-hong Kim, Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Dongeui University Tel : 051-850-7439 E-mail : kmdkch@deu.ac.kr

Received - 08.11-10 Accepted - 08.11-27

내며甚하면關節의強直性變形을招來한다⁵⁻⁷.治療原則은病的新久虛實을구분하여活血通絡,祛痰散寒,除濕清熱,祛風止痛 등의治法으로응용한다⁸.

사람의 유전자는 DNA로부터 발현되어 단백질을 만들게 되는데 이들 단백질이 모든 생명현상을 조절하는 역할을 맡게 된다. 따라서 특정상태의 세포나 조직에서의 유전자 발현 양상을 밝혀내는 것은 생명현상을 이해하는 가장 기본적이고 중요한 일이 될 수가 있다. 최근에는 유전자 발현에 관한 정보를 연구하는 방법으로 기존의 개별 유전자 발현을 관찰하던 방법에 비해 microarray를 이용함으로써 대량의 유전자 발현 정보를 평가하는 방법이 시도되고 있다⁹.

관절염에 대한 실험적연구¹⁰⁻¹¹는 많이 이루어졌으나活絡湯에 의한 연구로는 임 등²의 임상보고와 권¹²의 실험보고에서活絡湯이 급만성 근골격계 질환에 대해 광범위한 응용가능성이 있음을 제시하였으나 cDNA chip를 이용한 유전자발현에 관한 연구는 없었다.

이에活絡湯의 작용기전을 보다 깊이 이해하기 위해活絡湯이 인간 비만세포의 유전자 발현에 미치는 영향을 microarray를 통해 관찰함으로써 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험방법

1. 活絡湯의 준비

藥材는 東義大學校 附屬韓方病院 藥劑課에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며, 處方은 <동의대학교 한방병원 처방집>¹⁾에 기재된 것으로 處方內容과 1첩 분량은 Table 1과 같다.

檢液의 製造는 活絡湯 1첩 分量(약 102 g)을 取하여 蒸溜水 700 ml을 넣은 다음, 80 °C에서 3시간동안 熱湯處理하여 抽出된 液을 rotary evaporator에서 減壓 濃縮하였다. 濃縮된 液體를 凍結乾燥하고 乾燥器에서 24시간이상 放置하여 粉末로 만들어, 試料로 사용할 때마다 500 ug/ml을 buffer에 녹여 減壓滅菌하여 使用하였다.

2. 세포주

본 실험에는 사람 비만세포주(HMC-1)를 이용하였다. HMC-1(human mast cell line)은 leukemia 환자로부터 유래되었으며¹⁵, c-kit 수용체를 발현하고 IgE에 대한

Table 1. Composition of Whallak-tang used in this Study^{1,15,16)}

Herbs	Herb medicine name	Scientific name	Amounts(g)
木瓜	Chaenomelis Fructus	Chaenomelis sinensis KOEHNE	10
白屈菜	Chelidonii Herba	Chelidonium majus Linne	10
玄胡索	Corydalidis Tuber	rCorydalis turtschaninovii BESS	8
羌活	Radix osterici koreanii	Ostericum koreanum kitakawa	8
威靈仙	Radix clematidis	Clematis florida Thunb	6
獨活	Radix aralia cordatae	Aralia cordata thunb	6
當歸	Angelicae gigantis Radix	Angelica gigas NAKAI	6
乾地黃	Rehmanniae Radix	Rehmannia glutinosa LIBOSCH	6
赤芍藥	Radix Paeoniae rubra	Paeonia japonica MEYABE e TAKEDA	6
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	Atractylodes japonica KOIDZ	6
陳皮	Pericarpium Citri	Citrus unshiu MARCOR	4
乳香	Olibanum Mastix	Boswellia carterii BIRDW	4
沒藥	Myrrha Commiphora	Commiphora molmol ENGLER	4
紅花	Carthami flos	Carthamus Tinctorius L.	3
貢砂仁	Amomi Fructus	Amomum villosum LOUR	3
甘草	Glycyrrhizae Radix	Glycyrrhiza uralensis FISCH	2
生薑	Zingiberis Rhizoma	Zingiber officinale ROSC	4
大棗	Fructus zizyphi Jujubae	Zizyphus jujuba MILL	6
Total amounts			102

Fc ϵ RI가 결핍된 세포로, 주로 염증과 알러지 실험에 유용한 세포주이다.

3. 시약 및 재료

배양액 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM), fetal bovine serum(FBS), Human Cot-1 DNA, Ribonuclease Inhibitor, Superscript II reverse transcriptase, 100 u/ml penicillin and 100 ug/ml streptomycin 등은 GibcoBRL(USA)에서, poly(dA), oligo(dT), dNTP 등은 Pharmacia, Cy3-dU TP, Cy5-dUTP 등은 Amersham제품을 사용하였다. Hybridization cassette 는 Telechem에서 구입하였다. 일반 시약은 Sigma제품을 사용하였다. microarray chip(Crea Hi380-DC101)은 CreaGene Co.(한국)제품을 사용하였다. Confocal laser-scanning microscope Scan Array 5000은 Affimetrix(USA)를 사용하였다.

4. 세포 배양

실험에 사용한 HMC-1은 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin이 포함된 IMDM 용액에 배양하였다. 5% CO₂, 95% 공기, 37℃ 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하고, 배양액은 주 3회, 2~3일마다 교환하였다.

5. 活絡湯의 처치

실험군에는 1 mg/ml로 活絡湯을 처치하고, 대조군에는 동량의 vehicle을 처치하였다. 24시간이 지난 후 각각 RNA를 추출하여 Fluorescence probe 합성 과정을 밟았다.

6. RNA의 추출

活絡湯 혹은 vehicle를 처치한 실험군과 대조군 각각에서 원심분리기를 이용하여 세포를 harvest하여 상층액을 제거하고 다시 세포를 suspension하였다. 세포 10⁷개당 2 ml의 RNazol을 사용하여 lysis시키고 상온에서 10분간 방치하였다. 세포 10⁷개당 0.2 ml의 chloroform을 첨가하여 15초간 흔들어 잘 섞어준 후 5분간 상온에서 방치하였다. 4℃에서 12000×g로 15분간 원심분리한 후 상층

액을 새로운 tube로 옮겨 동량의 isopropanol을 첨가하고 10분간 상온에서 방치하였다. 다시 4℃에서 12000×g로 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 80% 에탄올 1 ml을 첨가하여 원심분리하였다. 에탄올을 제거하고 적당량의 DEPC-DDW를 첨가하여 녹여 total RNA를 준비하였다.

7. Fluorescence probe의 합성

총 RNA 100 ug(total)인 22 ul을 500 ug/ml의 oligo dT 2 ul과 혼합하여 70℃에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 방치하였다. 이 반응액에 5X reaction buffer 10 ul, 10X dNTP(즉 5 mM d(ACG)TP와 2 mM TTP) 5 ul, fluorescent nucleotide(대조군은 1 mM Cy3-dUTP, 실험군은 1 mM Cy5-dUTP) 2 ul, 1.5 ul RNasin, 2.5 ul의 superscript II reverse transcriptase(200U/ul) 등을 첨가하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 이후 이 반응액에 3 N NaOH 6 ul을 첨가하고 65℃에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거하고, 다시 1 M TrisHCl(pH 7.5) 20 ul, 1 N HCl 12 ul을 첨가하여 NaOH를 중화시켰다. 이 반응액을 Biospin 6 column에 옮겨 1000×g로 4분간 원심분리하고, Microcon 30 tube로 옮겨 12000×g로 3분간 다시 원심분리하였다.

8. Microarray Hybridization

형광물질과의 결합반응을 준비하기 위해 prehybridization buffer인 6X SSC, 0.2% SDS, 5X Denhardt's solution, 1 mg/ml salmon sperm solution 등을 microarray에 떨어뜨리고 22 mm×22 mm의 cover glass로 덮어 glue로 봉합한 후 2시간 동안 상온에서 방치하였다. 이후 봉합을 열고 2X SSC, 0.2X SSC로 세척하고 50 ml 튜브에서 3000 rpm으로 2분간 원심분리하였다. fluorescence probe 28.2 ul, poly(dA)(4 mg/ml in TE) 1 ul, yeast tRNA(4 mg/ml) 1 ul, human Cot I DNA(Amersham Pharmacia Biotech Inc. USA)(10 mg/ml) 1 ul, 10% SDS 0.8 ul, 20X SSC 8 ul을 혼합하여 99℃에서 5분간 방치하였다. 실온에서 5분간 방치한 후 반응액은 12000×g로 2분간 원심분리하고 이어서 microarray에 점적하여 microarray를 62℃에

서 overnight 반응시켰다. Hybridization된 microarray는 1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 세척하였다. 0.1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 50 °C에서 10분간 세척한 후 이어서 0.1X SSC 용액으로 10분간 다시 세척하였다.

9. Scanning and Data analysis

Hybridization이 끝난 microarray는 confocal laser-scanning microscope(Scan Array 5000)으로 scan하여 영상을 얻었다. Cy3(GHeNe laser)는 543 nm에서, Cy5(RHeNe laser)는 632 nm을 사용하였다. ImaGene과 ScanAlyze를 이용하여 각각의 spot에 대한 data를 저장한 후 median값을 사용하여 각 spot의 pixel intensity에서 local background intensity를 감하고 microarray상의 house-keeping gene의 intensity 값을 이용하여 녹색과 적색 파장에서의 두 형광영상을 normalization한 후 처치군과 대조군 사이에서 각 microarray상의 각 gene의 발현정도에 대한 ratio를 얻었다. 처치군과 대조군에서의 신호강도 차이가 3배 이상 차이나는 것을 유의한 것으로 보았다.

III. 結果

1. HMC cDNA microarray에서의 hybridization 양상

HMC cDNA microarray에 fluorescence hybridization된 영상은 Figure 1과 같다. 적색은 Cy3, 녹색은 Cy5에 의한 형광영상이다. 적색과 녹색은 처치군과 대조군에서 유전자 발현에 차이가 현저한 것을 의미하며, 황색은 두 군에서 유전자 발현에 큰 차이가 없는 것을 나타낸다.

Figure 1은 유전자 발현양상을 log로 표현한 것으로 X축으로 갈수록 발현이 저하된 것을 의미하고 Y축으로 갈수록 발현이 항진된 것을 의미한다.

Figure 1. Two-color image of an HMC-1 cDNA microarray. The array consists of PCR-amplified cDNA clones printed on glass; The diameter of each spot is 500 μm. A sample mixture consisting of Cy3-labelled mRNA from untreated cells and Cy5-labelled mRNA from Whallak-tang-treated cells was added. After scanning for each fluorescent dye false colour images (red for Cy3, green for Cy5) were superimposed. Yellow dots represent genes that show no change in expression. The hybridized microarray was scanned with the confocal laser scanner Scan Array 5000 (General Scanning) at 543 nm (red Cy3, GHeNe laser) and 632 nm (Cy5, RHeNe laser). Two independent experiments were performed.

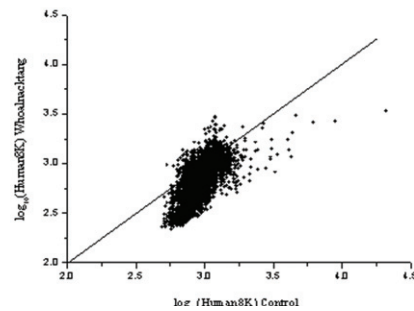
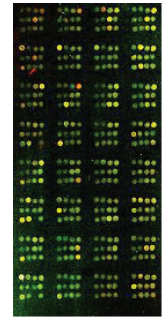


Figure 2. Scatter plot of microarray test of Whallak-tang. All elements exhibiting a minimum level of expression of intensity of > 2,500 fluorescent units (on a scale of 0 ~ 65,500 fluorescent units).

2. 活絡湯 처치시 발현이 항진된 CD/cytokine 유전자

대조군에 비하여 발현 강도가 3배 이상 차이나는 것을 유의한 것으로 했을 때 비만세포에 活絡湯 처치시 대조군에 비해 유의하게 발현이 항진되는 CD/cytokine 유전자는 관찰되지 않았다. 다만, 200~300% 범위로 발현이 항진되는 유전자로는 순서대로 ATP5F1, FLJ20671, unknown, KIAA0342, OAS2, unknown 등이 있었다 (Table 2).

Table 2. Genes upregulated in Whallak-tang-treated HMC-1 cells

Gene	ID	Normalized Ratio of Medians
ATP5F1	1929383	2.08014
FLJ20671	1726108	2.144969
unknown	1296720	2.163757
KIAA0342	1284961	2.265469
OAS2	3214930	2.336902
unknown	1424411	2.436853
unknown	952348	2.551209

ID is the name given to each gene in the Stanford Genome Database. Cy3-labelled mRNA came from HMC-1 cells before Whallak-tang treatment, and Cy5-labelled mRNA from Whallak-tang-treated HMC-1 cells. Normalized ratios of medians were calculated as Cy5 dividing Cy3 and the ratios more than 2.0 are shown in this table.

3. 活絡湯 처치시 발현이 저하된 CD/cytokine 유전자

발현강도가 3배 이상 차이나는 것을 유의한 것으로 했을 때 비만세포에 活絡湯 처치시 대조군에 비해 유의하게 발현이 저하되는 CD/cytokine 유전자는 대조군에 비해 0~33%의 발현을 보인 유전자로 순서대로 unknown, MDS006, IFITM1, MRPL3, ZNF207, FTH1, FBP1, NRGN, NR1H2, KIAA0747 등이 있었다 (Table 3).

Table 3. Genes downregulated in Whallak-tang-treated HMC-1 cells

Gene	ID	Normalized Ratio of Medians
unknown	1901271	0.16465
MDS006	440017	0.25012
IFITM1	2902903	0.28087
MRPL3	188431	0.29746
NF207	1901312	0.30610
FTH1	27775	0.31696
FBP1	1968576	0.32514
NRGN	1943863	0.32596
NR1H2	2581075	0.33160
KIAA0747	1995174	0.33282

ID is the name given to each gene in the Stanford Genome Database. Cy3-labelled mRNA came from HMC-1 cells before Whallak-tang treatment, and Cy5-labelled mRNA from Whallak-tang-treated HMC-1 cells. Normalized ratios of medians were calculated as Cy5 dividing Cy3 and the ratios less than 0.33 are shown in this table.

IV. 考察

西洋醫學에서의 各種 關節炎과 筋骨格系에 痛症이 나타나는 疾患, 例를 들면 骨關節炎, 류마티드 關節炎, 骨質

增殖性疾病, 痛風, 硬皮症, 閉塞性 血栓血管炎, 筋炎, 全身性紅斑性狼瘡 등은 病因病理와 臨床症狀를 살펴보면 한의학에서 痺證의 範疇에 屬한다^{3,4)}.

痺證은 閉而不通하여 痛症이 발생함을 말하며 대개 風寒濕의 邪氣가 人體의 營衛失調, 腠理空疎 或은 正氣虛弱한 틈을 타고 經絡으로 侵入하거나 關節에 凝滯됨으로써 氣血運行이 順調롭지 못하여 肌肉, 筋骨, 關節 등에 麻木, 重着, 疼痛, 屈伸不利, 腫脹, 發赤, 熱感 등의 증상이 있고 甚하면 關節의 強直性變形을 招來하는 病證의 하나이다⁵⁻⁷⁾.

痺證에 대한 최초의 言及으로 <黃帝內經素問·痺論篇>¹⁰⁾에 “風寒濕三氣雜至 合而爲痺也 其風氣勝者爲行痺 寒氣勝者爲痛痺 濕氣勝者爲着痺也”라고 하였다. 後世에는 歷節風, 白虎歷節風, 痛風, 鶴膝風, 痺痛 등으로 불렀다^{3,4)}. 分류를 살펴보면 實證인 경우에는 원인에 따라 行痺(風痺), 痛痺(寒痺), 着痺(濕痺), 熱痺, 瘀血痺 등으로 나누고, 虛證인 境遇에는 臨床의으로 氣血虛痺, 陽虛痺, 陰虛痺 등으로 나누었으며 五臟이 外部로 配屬되는 신체부위에 따라 筋痺, 脈痺, 肌痺, 皮痺, 骨痺, 그리고 五臟의 氣와 四時季節 및 五行의 상관관계에 따라 肝痺, 心痺, 脾痺, 肺痺, 腎痺, 腸痺, 胞痺로 구분된다^{3,7)}.

痺證의 治療原則은 寒者는 溫之하고, 熱者는 清之하며, 濕·痰·瘀 등의 有形之邪가 있으면 祛之하고, 虛者는 補之하는 것이라고 할 수 있으나^{3,17)}, 반드시 病의 新久虛實을 區分하여 活血通絡, 祛痰散寒, 除濕清熱, 祛風止痛 등의 治法으로 응용한다⁶⁾.

본 실험에서 사용된 活絡湯은 정확한 출전은 보이지 않으며 동의대학교 부속한방병원 처방집¹⁾을 기준으로 한 것으로서 木瓜, 白屈菜가 君藥, 玄胡索, 羌活이 臣藥, 威靈仙, 獨活, 當歸, 乾地黃, 赤芍藥이 佐藥, 蒼朮, 陳皮, 乳香, 沒藥, 紅花, 砂仁, 甘草, 生薑, 大棗가 使藥으로 구성된 처방이다.(Table1)

그 주요 구성약물에 대해 살펴보면,

木瓜는 舒筋活絡, 和胃化濕하여 脚氣浮腫, 濕痺膝痛, 腰膝無力, 吐瀉霍亂, 腹痛泄瀉 등을¹³⁾, 白屈菜는 理氣止痛, 止咳, 利水消腫, 解瘡毒하여 消炎, 鎮痛, 急慢性胃炎, 肝硬化腹水, 疥癬 등을¹⁴⁾, 玄胡索은 活血理氣의 要藥으로 活血, 散瘀, 理氣, 止痛하여 胸脇脘腹疼痛을 비롯한 一身의 上下 諸痛에 응용되고¹⁴⁾, 羌活은 發散風寒, 祛風濕止痛하여 惡寒發熱, 頭痛, 腰背肢節疼痛 등을¹³⁾, 威靈仙은 祛風濕, 通經絡하여 風濕痺痛과 上體痛風 등¹⁸⁾, 獨活은 祛風勝濕, 散寒止痛하여 痺痛, 兩足濕痺, 腰膝酸重疼痛, 下腿屈伸不利 등을¹⁴⁾, 當歸는 補血和血, 調經止痛, 祛瘀生新, 潤燥滑腸

하여 疲勞, 頭痛, 腰痛, 跌打血凝作脹, 一切血證, 腸燥便秘 등을 다스린다^{13,14,18}.

그리고, 赤芍藥은 涼血活血, 消癰散腫하여 癰腫疼痛, 婦人月經閉塞, 血滯疼痛 등을^{13,14}, 乳香은 活血止痛, 伸筋, 散瘀止痛하여 腕腹疼痛, 跌打傷痛, 風濕痺痛 등을¹³, 沒藥은 活血祛瘀止痛, 散血消腫하여 風濕痺痛, 產後血氣痛, 關節疼痛腫脹, 打撲捻挫 등을¹⁵, 紅花는 活血通經, 祛瘀止痛하여 經閉, 腹痛, 癥瘕, 瘀血疼痛, 關節痠痛, 瘡癰腫毒 등을 다스린다¹³.

위의 藥들이 배합되어 活血, 通經活絡, 止痛 등의 효능이 있어 最 급성기 및 급성기 腰痛, 腰脚痛, 肩臂痛 등에 활용되고 특히 關節염 등 근골격계의 염증성, 동통성 질환에서 광범위하게 응용되고 있다^{1,2,12}.

關節염에 대한 실험적연구로는 桂枝芍藥知母湯¹⁰, 三痺湯¹¹ 등이 있었다. 그러나 活絡湯을 이용한 연구는 林 등²의 임상보고에서 活絡湯이 급성요통에 유효하고 안전함을 제시하였고, 權¹²의 실험보고에서 급만성 근골격계 질환에 대해 유효성과 안전성을 규명하여 광범위한 응용가능성을 제시하였으나 미약한 실정이다.

인간 게놈 프로젝트는 사람으로서 살아가는데 필요한 모든 기능을 하는데 필수적인 유전적 정보를 가진 유전자들의 DNA 염기서열을 모두 밝히는 프로젝트이다. 그리고 DNA 염기서열 속에 있는 유전자의 실제적인 기능규명이 필요하며, 이를 위한 유전자 구조 분석의 획기적인 방법인 DNA chip을 이용하는 것은 많은 수의 유전자 발현 양상을 탐색할 수 있어, 유전자의 발현 해석, 유전자 진단, 유전자의 돌연변이, 의약품의 스크린 및 질환 진단용 등에 널리 응용될 수 있는 새로운 차원의 분석 시스템이다. 즉 여러 게놈프로젝트로부터 밝혀진 DNA 염기서열을 바탕으로 하여 DNA chip을 제작하고 이용하여 세포내의 작용 메커니즘 및 생리기작, 그리고 각 유전자의 상호 연관성을 규명할 수가 있다⁹.

이에 저자는 以上과 같은 이론적 근거를 토대로 活血, 通經活絡, 止痛 등의 효능이 있는 活絡湯이 유전자 발현에 미치는 영향을 파악하고자 본 실험을 시행하였다.

유전자 발현에 있어 대조군에 비하여 발현 강도가 3배 이상 차이나는 것을 유의한 것으로 했을 때 비만세포에 活絡湯 처치시 대조군에 비해 유의하게 발현이 향진되는 CD/cytokine 유전자는 관찰되지 않았다. 다만, 200~300% 범위로 발현이 향진되는 유전자로는 순서대로 ATP5F1, FLJ20671, unknown, KIAA0342, OAS2, unknown 등이 있었다(Table 2). 향진된 遺傳子

중 FLJ20671, unknown, KIAA0342, unknown 등은 아직 역할이 보고되지 않은 새로운 遺傳子였다.

ATP5F1는 adenosine triphosphate(ATP) 합성효소로서 세포 연료인 ATP를 미토콘드리아에서 생산한다. 이 기관 내에 존재하는 일련의 효소들은 음식물을 대사함으로써 얻어지는 에너지가 풍부한 화합물들을 분해하여 에너지를 만들어내는데, 이러한 에너지는 미토콘드리아 내부의 막에 전하를 역류하여 프로톤이라고 하는 양전하를 띤 입자를 이동시키는데 사용된다¹⁸. F1F0-ATP synthase는 서로 연결된 세 세트의 단백질 집합들로 구성되어 있다^{19,20}.

본 실험에서 活絡湯이 비만세포주에서 세포내 에너지 생산인자인 ATP5F1의 발현을 상승시켰는데 이는 活絡湯이 에너지 생성을 촉진하는 역할을 한다고 추정되는데 추후 심도있는 연구가 필요하다고 하겠다.

2-prime,5-prime oligoadenylate synthetases (OASs)는 interferon에 의해 유도되는 단백질이다²¹. Oligoadenylate synthetases는 단백질을 발현시키는 하나의 유전자인데 이 효소는 바이러스에 감염된 세포에 존재하는 바이러스 물질을 파괴하는 과정에 관여한다^{22,23}. 즉 interferon은 2' 5'-oligoadenylate synthetase를 활성화시켜 short oligonucleotide의 생성을 유도하고, 이것이 double strand RNA 존재 하에서 ribonuclease를 활성화시켜 감염 세포내에 있는 viral messenger RNA를 파괴함으로써 바이러스 단백질합성을 억제하는 항바이러스 작용을 하게 된다²².

본 실험에서 活絡湯이 비만세포주에서 전사조절인자인 OASs의 발현을 상승시켰는데 이는 活絡湯이 항바이러스 작용을 할 수 있음을 시사하는 것으로 바이러스 모델 실험을 통해 活絡湯의 효과에 대해 추후 심도있는 연구가 필요하다고 하겠다.

발현강도가 3배 이상 차이나는 것을 유의한 것으로 했을 때 비만세포에 活絡湯 처치시 대조군에 비해 유의하게 발현이 저하되는 CD/cytokine 유전자는 대조군에 비해 0%~33%의 발현을 보인 유전자로 순서대로 unknown, MDS006, IFITM1, MRPL3, ZNF207, FTH1, FBP1, NRG1, NR1H2, KIAA0747 등이 있었다 (Table 3).

減少된 遺傳子 중 unknown, MDS006과 KIAA0747은 아직 역할이 보고되지 않은 새로운 遺傳子였다.

Interferon-induced transmembrane protein 1(IFITM1)은 Interferon-induced protein(IFN-IP)의

하나이다²⁴⁾. IFN-IP는 신경보호의 기능이 있어 퇴행성 신경변화와 관련된 유전자를 억제함으로써 허혈 상태에 빠진 뇌세포를 보호한다. 따라서 IFN-IP는 뇌경색 치료의 목표 유전자가 될 수 있다²⁵⁾. 그러나 IFN-IP의 병태생리학적 역할은 아직 자세히 알려져 있지 않다.

본 실험에서 活絡湯이 비만세포주에서 IFN-IP의 하나인 IFITM1의 발현을 저하시켰는데 신경보호의 기능이 있는 유전자를 억제한다는 점에서 특이한 결과라고 하겠다. 따라서 IFN-IP가 뇌 뿐만 아니라 척수 또는 말초신경 세포의 퇴행성 변화도 억제하는지는 추후 심도있는 연구가 필요하다고 하겠다.

Mitochondrial ribosomal protein L3(MRPL3)은 mitochondrial ribosomal proteins(MRPs)의 한 종류이다²⁶⁾. Ou 등은 MRPL3은 Hepatitis B virus에 감염된 Hepatocellular Carcinoma(HCC)에서 과발현됨을 밝혔다²⁷⁾.

본 실험에서 活絡湯이 비만세포주에서 MRPL3의 발현을 저하시켰는데 이는 活絡湯이 일부 암의 억제제로서의 가능성을 시사한다고 하겠다. 그러나 Ou 등은 MRPL3의 과발현이 매우 빨리 분화하는 세포의 특징이지만 중앙형성을 직접적으로 의미하는 것은 아니라고 하였으므로²⁷⁾ 추후 심도있는 연구가 필요하다고 하겠다.

ZNF207(Zinc finger protein 207)은 zinc finger protein의 일종인데 DNA와 결합하여 전사를 조절하는 일종의 전사조절인자이다²⁸⁾. 최근 분화 발달을 조절하는 유전자로 전사조절 단백질인 이 단백질의 중요성이 크게 부각되고 있다. 아연(Zn) 원소는 zinc finger protein이라 불리는 것의 형성에 있어 중요한데 Zn^{2+} 는 cysteine과 histidine 아미노산 짝에 결합하여 '손가락'처럼 행동하며 특정 유전자 부위와 상호작용을 한다. 예를 들면, 쥐 유전자의 한 부분에서는 이 단백질이 세 개의 '손가락'을 사용해서 하나의 DNA 위치를 인식하게 된다²⁹⁾.

본 실험에서 活絡湯이 비만세포주에서 전사조절인자인 ZNF207의 발현을 저하시켰는데 전사조절인자가 어떤 단백질을 변화시키느냐에 따라 活絡湯의 작용 기전이 달라지는 바 추후 심도있는 연구가 필요하다고 하겠다.

박테리아로부터 인간에 이르기까지 모든 유기체는 철분을 필요로 하는데 이는 많은 중요한 효소와 단백질의 활동에 철 원자가 필요하기 때문이다. 인간의 경우는 특히 많은 양의 철분이 필요한데 이것은 산소 운반에 관여하는 적혈구내의 단백질이 결합된 헤모글로빈의 구성 요소이기 때문이다³⁰⁾. 인간의 신체에서는 매일 수백만의 적혈구들이

폐기되며, 철분 부족은 곧 빈혈을 야기시킨다. 체내에서 철분은 간에 ferritin의 형태로 저장된다. ferritin은 각각의 단백질분자가 수천의 철원자와 결합할 수 있어서 철분을 저장하는데 아주 좋은 구조를 가지고 있는 화합물이다. 각각의 헤모글로빈은 4개의 원자와 철을 함유한 단백질 1-2개를 포함하고 있다³¹⁾. Oberle 등은 돼지의 동맥 내피 세포에 대한 실험에서 과산화수소에 의한 세포 손상이 ferritin heavy chain mRNA의 유도에 의해 보호된다고 하였다³²⁾. Oberle 등은 또 이 연구에서 ferritin이 산화적 스트레스에 대한 세포 보호의 한 기전이라고 밝혔다³¹⁾.

본 실험에서 活絡湯이 비만세포주에서 ferritin heavy chain 1(FTH1)의 발현을 저하시켰는데 항산화의 기능이 있는 유전자를 억제한다는 점에서 특이한 결과라고 하겠다. 따라서 活絡湯의 항산화효과는 FTH1를 통하지 않고 다른 유전자를 매개로 이루어지는 것으로 생각되며 추후 심도있는 연구가 필요하다고 하겠다.

Fructose-1,6-bisphosphatase1(FBP1)은 Fructose-1,6-bisphosphate로부터 Fructose-6-phosphate를 생성하는 탈인산화반응을 수행한다. 이 반응은 글리코겐합성의 필수적인 반응이다³³⁾. 동물에서의 gluconeogenic FBP들간의 아미노산 서열은 약 90%의 상동성을 가진다³⁴⁾. 임상에서는 fructose-1,6-bis phosphatase가 부족할 경우 글리코겐합성이 차단되어 저혈당을 유발하게 된다³⁵⁾.

본 실험에서 活絡湯이 비만세포주에서 FBP1의 발현을 저하시켰는데 FBP의 결핍이 저혈당을 유발한다는 점에서 특이한 결과라고 하겠다. 즉 임상에서 活絡湯이 저혈당과는 관계없다는 점에서 FBP1 유전자의 발현이 감소된 것에 대해서는 추후 심도있는 연구가 필요하다고 하겠다.

Neurogranin(NRGN)은 p17 또는 RC3으로도 불리우는데 5개의 시냅틱 단백질(rab3a, synaptotagmin, GAP-43, SNAO-25, neurogranin) 중 하나이다³⁶⁾. 또한 NRGN은 Ca^{2+} 에 민감한 calmodulin과 결합하는 신경특이 단백질로서 수많은 post-synaptic signalling pathways의 조절에 관련되어 있다³⁷⁾.

본 실험에서 活絡湯 처치시 NRGN의 발현이 저하되었는데 cell signalling은 매우 복잡하므로 活絡湯이 구체적으로 신호 전달에 있어 어떤 역할을 하는지 추후 심도있는 연구가 필요하다고 하겠다.

Nuclear receptor superfamily 1, group H, member 2 (NR1H2)는 핵수용체 superfamily의 일종이다. LX receptors(LXRs)는 그들의 ligands가 알려져 있지 않기 때문에 핵수용체 superfamily의 orphan member

로 인식된다³⁸⁾. 이 중 LXR-alpha와 LXR-beta는 몇 가지 담즙산의 cholesterol을 포함하여 지질의 대사에 중요한 역할을 한다³⁹⁾. 또한 Kohro 등⁴⁰⁾은 monocyte가 macrophage로 분화하는 동안에 LXRa mRNA가 높이 유지된다고 보고하였다.

본 실험에서 活絡湯 처치시 NR1H2의 발현이 저하되었는데 活絡湯이 구체적으로 지질 대사와 세포 분화에 있어 어떤 역할을 하는지 더 깊은 연구가 필요하다고 하겠다.

이상에서 HMC-1의 CD/cytokine 유전자 발현을 통하여 活絡湯이 에너지 생성의 촉진, 항바이러스 작용, 중앙형성억제 등의 작용을 하여 근골격계 질환의 치료효과를 나타냄을 알 수 있었으며 이는 추후 연구에 대한 기초 자료를 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 結論

活絡湯의 유전자 발현에 미치는 영향을 cDNA microarray를 통해 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CD/cytokine 유전자 活絡湯 처치군과 대조군 사이의 유전자 발현강도가 3배 이상 차이나는 것을 유의한 것으로 판단한 결과 活絡湯 처치시 유의하게 발현이 증가하는 유전자는 관찰되지 않았다. 다만, 200~300% 범위로 발현이 향진되는 유전자로는 순서대로 ATP5F1, FLJ20671, unknown, KIAA0342, OAS2, unknown 등이 있었다.

2. 대조군에 비해 0~33%의 범위로 발현이 저하된 유전자는 순서대로 unknown, MDS006, IFITM1, MRPL3, ZNF207, FTH1, FBP1, NRG1, NR1H2, KIAA0747 등이 있었다.

VI. 參考 文獻

1. 동의대학교 한의과대학. 동의대학교 한방병원 처방집. 부산. 2001:441.
2. 임정은, 송호섭, 권순정, 이성노, 강미숙, 변임정, 황현서, 김기현. 鍼灸治療와 活絡湯투여가 급성요통 및 간기능에 미치는 영향에 관한 임상적 고찰. 대한침구

- 학회지. 2001;18(5):43~9.
3. 申鉉大 外. 東醫再活醫學科學. 서울:書苑堂. 1995:95~102.
4. 鄭錫熙 外. 痺證의 分類와 治療에 對한 考察. 東醫物理療法科學會誌. 1992;2(1):181~90.
5. 方 廣. 丹溪心法附錄. 서울:大星文化社. 1993:188~91.
6. 李 梴. 國譯編註醫學入門. IV卷. 서울:南山堂. 1989:193~212, 626~39.
7. 上海中醫學院 編. 內科學(上). 上海:上海科學技術出版社. 1983:234~8.
8. 王風岐 外. 炎症의 中醫辨證. 北京:中醫藥學技術出版社. 1990:434~40.
9. 박종훈. DNA Chip. 대한내분비학회지. 2000;15(4):17~23.
10. 申炳熙, 李鍾秀, 申鉉大. 桂枝芍藥知母湯이 제 II 형 Collagen유발 관절염의 항체에 미치는 영향. 동의 물리요법과학회지. 1994;4(1):121~33.
11. 정수현. 三痺湯이 Collagen으로 유발된 관절염에 미치는 영향. 세명대학교대학원. 2000.
12. 權純貞. 活絡湯이 Adjuvant 유발 관절염의 부종 및 혈액에 미치는 영향. 경원대학교대학원. 2002.
13. 辛民教. 臨床本草學. 서울:永林社. 1991:222, 300, 453~5, 467, 504, 668~9
14. 李尙仁. 本草學. 서울:修書院. 1981:428~9, 101~2, 231, 410, 532~3.
15. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. Leu-kemia Res 12. 1988:345~55.
16. 王 琦. 素問今釋. 貴州:貴州人民出版社. 1981:206~7.
17. 李京燮 外. 東醫心系內科學. 下卷. 서울:書苑堂. 1995:117~46.
18. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京:人民衛生出版社. 1983:339~44, 424~34.
19. Higuti T, Tsurumi C, Osaka F, Kawamura Y, Tsujita H, Yosh ihara Y, Tani I, Tanaka K, Ichihara A. Molecular cloning of cDNA for the import precursor of human subunit B of H(+)-ATP synthase in mito chondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991;178:1014~20.
20. Bosetti F, Yu G, Zucchi R, Ronca-Testoni S,

- Solaini G. Myocardial ischemic preconditioning and mitochondrial F1F0-ATPase activity. *Mol Cell Biochem.* 2000 Dec;215(1~2):31~7.
21. Hovanessian A G, Laurent A G, Chebath J, Galabru J, Robert N, Svab J. Identification of 69-kd and 100-kd forms of 2-5A synthetase in interferon-treated human cells by specific monoclonal antibodies. *EMBO J.* 6. 1987;1273~80.
 22. Marie I, Galabru J, Svab J, Hovanessian A G. Preparation and characterization of polyclonal antibodies specific for the 69 and 100 k-dalton forms of human 2-5A synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989;160:580~7.
 23. Marie I, Hovanessian A G. The 69-kDa 2-5A synthetase is composed of two homologous and adjacent functional domains. *J. Biol. Chem.* 1992;267:9933~9.
 24. Deblandre G A, Marinx O P, Evans S S, Majjaj S, Leo O, Caput D, Huez G A, Wathelet M G. Expression cloning of an interferon-inducible 17-kDa membrane protein implicated in the control of cell growth. *J. Biol. Chem.* 1995;270:23860~6.
 25. Kim YD, Sohn NW, Kang C, Soh Y. DNA array reveals altered gene expression in response to focal cerebral ischemia. *Brain Res Bull.* 2002;Sep,15;58(5):491~8.
 26. Kenmochi N, Suzuki T, Uechi T, Magoori M, Kuniba M, Higa S, W atanabe K, Tanaka T. The human mitochondrial ribosomal protein genes: mapping of 54 genes to the chromosomes and implications for human disorders. *Genomics.* 2001;77:65~70.
 27. Ou J-H, Yen T S B, Wang Y-F, Kam W K, Rutter W J, Cloning and characterization of a human ribosomal protein gene with enhanced expression in fetal and neoplastic cells. *Nucleic Acids Res.* 1987;15:891 9~34, Note: Erratum:*Nucleic Acids Res.* 1988;16:4196.
 28. Urnov FD. A feel for the template:zinc finger protein transcription factors and chromatin. *Biochem Cell Biol.* 2002;80(3):321~33.
 29. Pahl P, M B, Hodges Y K, Meltesen L, Perryman M B, Horwitz K B, Horwitz L D. ZNF207, a ubiquitously expressed zinc finger gene on chromosome 6p21.3. *Genomics.* 1998;53:410~2.
 30. Boyd D, Jain S K, Crampton J, Barrett K J, Drysdale J. Isolation and characterization of a cDNA clone for human ferritin heavy chain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1984;81:4751~5.
 31. Caskey J H, Jones C, Miller Y E, Seligman P A. Human ferritin gene is assigned to chromosome 19. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1983;80:482~6.
 32. Oberle S, Schroder H. Ferritin may mediate SIN-1-induced protection against oxidative stress. *Nitric Oxide.* 1997, Aug;1(4):308~14.
 33. Nakashima K. Liver fructose-1,6-bisphosphatase (author's transl). *Ta-mpakushitsu Kakusan Koso.* 1977;22(12):1585~9.
 34. Melloni E, Salamino F, Accorsi A. Degradation of rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase by lysosomal proteinases. *Ital J Biochem.* 1974, Nov-Dec;23(6):412~22.
 35. Shih DQ, Navas MA, Kuwajima S, Duncan SA, Stoffel M. Impaired glucose homeostasis and neonatal mortality in hepatocyte nuclear factor 3alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, Aug, 31;96(18):10152~7.
 36. Baudier J, Deloulme J C, Van Dorsselaer A, Black D, Matthes H W D. Purification and characterization of a brain-specific protein kinase C substrate, neurogranin (p17):identification of a consensus amino acid sequence between neurogranin and neuromodulin (GAP43) that corresponds to the protein kinase C phosphorylation site and the calmodulin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 1991;266:229~37.
 37. Martinez de Arrieta C, Perez Jurado L, Bernal J, Coloma A. Structure, organization, and chromosomal mapping of the human neurogranin gene (NRGN). 1997;*Genomics* 41: 243~9.
 38. Janowski B A, Grogan M J, Jones S A, Wisely

- G B, Kliewer S A, Corey E J, Mangelsdorf D J. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR-alpha and LXR-beta. Proc. Nat. Acad. Sci. 1999;96:266~71.
39. Shinar D M, Endo N, Rutledge S J, Vogel R, Rodan G A, Schmidt A. NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. 1994;Gene 147:273~6.
40. Kohro T, Nakajima T, Wada Y, Sugiyama A, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Imoto I, Inazawa J, Hamakubo T, Kodama T, Emi M. Genomic structure and mapping of human orphan receptor LXR alpha: upregulation of LXR α mRNA during monocyte to macrophage differentiation. J Atheroscler Thromb. 2000;7(3):145~51.
-