

## 염증이 유발된 인간기관지상피세포에서 오미자가 Microarray를 이용한 유전자 발현 분석에 미치는 영향

정진용, 정승기, 정희재, 이형구  
경희대학교 한의과대학 폐계내과학 교실

### Microarray Analysis of Gene Expression Profile by Treatment of Schizandrae fructus Extract in Inflammation-induced Human Epithelial A549 Cells

Jin-yong Jung, Sung-ki Jung, Hee-jae Jung, Hyung-koo Rhee  
Division of Allergy, Immune & Respiratory System,  
Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

#### ABSTRACT

**Objective :** The goal of this study was to determine the anti-asthma mechanism of SF on TNF- $\alpha$  induced activation on A549 (human type II-like epithelial) cells. Using oligonucleotide microarray, we sought to establish the molecular mechanism of the protective effects of SF on A549 cells.

**Material & Methods :** Cells were cultured in three different conditions: 1) negative control group was cultured in normal condition of DMEM, 2) positive control group was activated with TNF- $\alpha$ , IL-4, and IL-1 $\beta$ , and 3) SF treated group was previously treated with 0.1 $\mu$ g/ml SF after TNF- $\alpha$ , IL-4, and IL-1 activation. Cells of positive control and SF treated groups were cultured for 30 min, 1hr, 3hr and 6hr.

**Results :** The comparative analysis of the gene expression profile revealed that proinflammatory cytokines such as IL1F8, IL1F9, IL1R1, IL1RN, IL1RAPL1, IL8, TNFRSF4, TNFSF10c, TNFSF13, TRAF5, and TRAF7 and inflammation-related genes including MMP2, MMP11, MMP14, MMP15, MMP16, MMP19, MMP25, and MMP27 were down regulated with SF treatment. Cell adhesion molecule genes such as ITGB1, ITGBL1, selectin P ligand, selectin E, ICAM2, ICAM3, VCAM1, PECAM, FCER1G and MMP28 genes were also down-regulated in SF treated A549 cells.

**Conclusion :** These results suggest that the anti-asthmatic effects of SF could be mediated by regulating specific genes related with cell adhesion, proinflammatory cytokine and inflammation-related genes in A549 cells.

**Key words :** TNF- $\alpha$ , Schizandrae fructus, Gene expression profile, Microarray

## 1. 緒 論

五味子 (Schizandrae fructus)는 斂肺, 滋腎, 生津하는 효능이 있어 肺虛喘咳, 口乾作渴, 自汗, 盜汗,

勞傷羸瘦, 夢精, 滑精, 久瀉, 久痢 등을 치료하는 것으로 알려져 있으며, 上으로는 肺氣를 斂하고, 下로는 腎陰을 滋하여 肺虛喘咳를 收斂하여 止咳平喘하고 腎虛로 인한 遺精滑精을 收斂하여 固澁止遺의 效能이 있기 때문에 만성 호흡기 질환에 많이 사용되고 있다<sup>1</sup>.

기관지 천식은 임상적으로는 가역적인 기도폐쇄, 병리학적으로는 광범위한 기도염증, 생리학적

· 교신저자: 이형구 서울시 동대문구 회기동 1번지  
경희의료원 부속한방병원 한방5내과 의사실  
TEL: 02-958-9147 FAX: 02-958-9148  
E-mail: rheehk@khu.ac.kr

으로는 기관지과민성으로 특징되는 대표적인 만성 호흡기질환이다<sup>2</sup>. 한의학에서는 呼吸促急, 喘鳴有聲 등을 특징적인 증상으로 나타내는 哮喘證의 범주에 해당한다<sup>3</sup>.

기관지 천식은 Th<sub>2</sub> 세포에 의해 조절되며 비만 세포, 호염기구 그리고 호산구가 중요한 역할을 하는 염증반응으로 알려져 있다. 이런 기관지 천식의 예방 및 치료를 위해 여러 원인에 대한 분석, 염증반응 기전에 대한 이해, 새로운 치료 약물의 개발 등 다양한 방법의 수많은 연구가 진행되었지만 아직도 발생률을 획기적으로 감소시킬 만한 주요 원인이 무엇인지 밝혀내지 못하고 있다<sup>4</sup>.

한의학에서도 喘息에 대한 한의학적 치료 약물의 개발을 위하여 많은 연구가 있었는데, 고 등<sup>5</sup>이 역대의서를 고찰하였고, 황 등<sup>6</sup>에 의해 기관지천식의 임상 증상 평가 분석을 통한 임상증상 평가방법에 대한 연구고찰이 있었으며, 최근에는 천식과 호산구 및 화학주성 물질간의 관계가 중요시되면서 牡丹皮<sup>7</sup>, 金銀花<sup>8</sup> 등의 개별 藥物에 의한 화학주성 기전에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되었다.

五味子を 이용한 천식 관련 한의학 연구로는 IL-6, IL-16, GM-CSF에 대한 억제효능<sup>9</sup>, IL-4, IL-5에 대한 mRNA 전사억제효능<sup>10</sup>, 호산구의 화학주성 억제효과와 세포유착분자인 ICAM-1, VCAM-1 및 chemokine인 eotaxin, IL-8 발현 억제 효능<sup>11</sup> 등이 보고되었다.

현재까지의 연구로는五味자가 천식 치료에 도움이 되는 것을 확인할 수 있었으나 이러한 단편적인 효과 검증만으로는 전체적인 치료 기전의 흐름을 알기가 어렵기 때문에五味자를 이용하여 천식에 직접적으로 관여하는 주요 유전자를 전체적으로 분석한다면 천식의 새로운 치료기술로 개발될 가능성도 높아질 것으로 생각된다.

이에 본 저자는 기존의 기관지 천식연구를 토대로 하고 현대 과학기술의 발달로 얻어진 유전자칩(genechip)과 그 분석기술<sup>12</sup>을 이용함으로써 인간기관지상피세포에서 천식 유발에 관여하는 다양한

pathway에五味자가 어떠한 영향을 미치는지 oligonucleotide microarray를 통하여 유전자발현을 분석하였다.

이상의 연구를 통해 최근까지 대표적인 천식 유발 기전으로 인정되고 있는 호산구의 상피세포로의 이동 및 상피세포에서 호산구의 침윤을 통한 만성염증반응의 유발에 관여하는 화학주성 관련 cytokine의 유전자 발현 및 화학주성의 기전에 대해五味자가 미치는 영향과 관련하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

## II. 實 驗

### 1. 세 포

인간기관지상피세포주 A549 (Human type II-like epithelial cells) cell line을 Korean Type Culture Collection (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 본 실험에서 세포배양을 위하여 사용된 media는 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Hyclone, USA), 1% penicillin/streptomycin (BD Bioscience, USA) 25mM HEPES (MP Biomedicals, LLC, Germany), 2g sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>, JRH BIOSCIENCES, USA)가 포함된 RPMI-1640 (BD Bioscience, USA)를 사용하여 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기를 함유한 습도가 유지되는 조건에서 배양하였다.

### 2. 시료의 제조

五味子 (Schizandrae Fructus, *Schizandra chinensis* (TURCZ.) BAILL.)는 썬텐 제약(Sunten Pharmaceutical Co, Taipei, Taiwan)으로 부터 구입하였다. 1g의 오미자 분무 건조물에는 0.69g의 오미자 추출물이 0.31g의 전분이 포함되어 있다. 1g의 오미자 분무 건조물을 0.69ml의 멸균 증류수에 녹인 후 15,000×g에서 10분 동안 원심 분리한 후 상층액을 취했다. 상층액을 0.2μm의 syringe filter로 여과하여 stock을 만들어 4°C 냉장고에 보관 후 실험하기 전에 희석하여 사용하였다.

### 3. 세포 배양 조건과 오미자 처리 농도

100mm culture dish에 A549 cell을  $1 \times 10^6$  cells/ml로 파종한 후 TNF- $\alpha$  25ng/ml, IL-4 50ng/ml 과 IL-1 $\beta$  10ng/ml을 세포에 처리한 후 오미자 0.1 $\mu$ g/ml의 농도에서 30분, 1, 3, 6시간 동안 각각 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기를 함유한 습도가 유지되는 조건에서 배양하였다.

### 4. 인간기관지상피세포주에서의 유전자 발현량 분석

#### 1) Total RNA 분리

3의 방법과 같이 배양한 A549 cell pellet을 PBS로 세척하고 Trizol solution (Invitrogen, USA Life Technologies, USA)에 제조사의 protocol에 준하여 total RNA를 분리하였다. Cell pellet에 200 $\mu$ l의 Trizol reagent를 넣고 pellet pestle (Sigma-Aldrich, USA)로 마쇄한 후 300 $\mu$ l의 Trizol reagent를 더 넣은 다음 반응액을 실온에서 5분간 배양하고, 원심 분리 하는 과정을 반복하여 total RNA를 분리하였다.

분리된 total RNA는 spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies Inc. USA)로 측정하였다. 분리된 total RNA는 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium-bromide (Et-Br, Sigma-Aldrich, USA)로 염색하여 상태를 평가하였다.

#### 2) Oligonucleotide chip microarray

##### (1) Double strand (ds) cDNA 합성

Total RNA는 spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies Inc. USA)로 정량한 후 각각 3 $\mu$ g을 ds-cDNA 합성에 사용하였다. cDNA 합성은 GeneChip® Expression 3'-Amplification One-Cycle cDNA Synthesis kit (Affymetrix Inc. USA)를 사용하였다.

cDNA 정제를 위하여 합성된 cDNA에 600 $\mu$ l의 cDNA binding buffer를 첨가 한 뒤 3초 동안 회오리처럼 흔들어서 잘 섞고 이 중에서 500 $\mu$ l의 sample을 취하여 cDNA cleanup column에 넣은 후 1분 동안 12,000 $\times$ g에서 원심 분리를 반복하고,

정제된 ds-cDNA는 1% agarose gel에서 전기영동 후, ethidium-bromide (Et-Br, Sigma-Aldrich, USA)로 염색하여 상태를 평가하였다.

##### (2) Biotin-labeled cRNA 합성

20 $\mu$ l의 ds-cDNA를 biotin-labeled cRNA 합성에 사용되었다. Biotin-labeled cRNA 합성은 GeneChip® Expression 3'-Amplification Reagent for In vitro transcript (IVT) Labeling Kit (Affymetrix Inc., USA)를 사용하였다.

cRNA 정제를 위하여 합성된 cRNA에 350 $\mu$ l의 cDNA binding buffer를 첨가 한 뒤 3초 동안 회오리처럼 흔들어서 잘 섞어 250 $\mu$ l의 100% ethanol을 넣고 피펫으로 계량하여 섞어주고 700 $\mu$ l의 sample을 취하여 cRNA cleanup column에 넣은 후 15초 동안 12,000 $\times$ g에서 원심 분리를 반복하였다. 분리된 cRNA는 spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies Inc. USA)로 측정하였다. 분리된 total RNA는 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium-bromide (Et-Br, Sigma-Aldrich, USA)로 염색하여 상태를 평가하였다.

##### (3) Fragmented cRNA

합성된 cRNA 20 $\mu$ g에 8 $\mu$ l의 5 $\times$ fragmentation buffer를 첨가한 후 RNase-free water로 40 $\mu$ l가 되게 하였다. 40 $\mu$ l의 반응액은 94°C에서 35분간 배양하여 35-200 bp의 분절이 되게 하였다. 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium-bromide (Et-Br, Sigma-Aldrich, USA)로 염색하여 분절 상태를 평가하였다.

##### (4) Gene chip hybridization

Fragmented cRNA 15 $\mu$ g를 GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (P/N900470, Affymetrix Inc., USA)에 적용하였다. 일련의 과정은 제조사의 추천대로 standard format으로 GeneChip® Hybridization, Wash and Stain kit를 이용하여 protocol을 따랐다

##### (5) Gene chip의 염색과 scanning

Hybridization 반응이 종료된 gene chip은 Genechip Fluidics Station (Affymetrix)의 mini\_euk1 protocol

에 따라 세척 및 염색한 후 Genechip System Confocal Scanner (Hewlett-Packard)를 이용하여 3 μm resolution으로 두 번 scan하여 평균값을 취하였다.

(6) Sample의 상태 평가

각 군의 cDNA, cRNA 및 fragmented cRNA는 1μg을 1% agarose gel에 전기 영동하여 size 분포를 평가하였다.

GAPDH의 3' oligonucleotide와 5' oligonucleotide의 average differential expression (AD) ratio는 제 조사의 권장대로 3 미만인가를 확인하였다.

5. Data 처리

Gene chip의 scan data는 GeneChip version 5 software (Affymetrix)과 GenPlex v2.4을 이용하여 분석하였다. Hybridization의 완전성은 control oligonucleotide B2, bioB, bioC, bioD, cre의 signal을 비교함으로써 평가하였다.

군집분석(Clustering analysis)은 계층적 군집(Hierarchical clustering) 연산방식을 이용하였다. Pathway는 입력 데이터 (발현값을 갖는 유전자 리스트)의 KEGG pathway 목록과 해당 pathway의 p-value를 계산하여 분석하였다.

III. 結果

1) DEG selection 분석

각 시간(30분, 1, 3과 6시간)에 대해서五味子 처리 유무에 따라 probe set의 발현이 일정 수준 이상 변화 하는 유전자를 찾기 위해 comparison 분석을 시행하였다. 각각 시간대 별로 control에 비해五味子 투여군에서 발현차이가 나는 유의유전자를 선별하는데 발현차이는 Fold Change cutoff=2 (2-fold)로 하여 2배 이상 발현되거나(Up-regulated) 2배 이하 발현되는(Down-regulated) 유전자를 선별하는데,

이 때 모든 샘플에서 실험상에서 발현이 나타나지 않은 유전자 즉, detection이 "Absent"인 유전자를 제거하였다. (NC : Negative control, SF : Schizandrae Fructus, C: Positive control, 1 : 30min, 2 : 1hr, 3 : 3hr, 4: 6hr) 아래 테이블에 나타난 수치는 각 기준에 따라 선정된 probe set의 개수이다.

Table 1. DEG Selection

Control/ Experiment	Up	Up (GO 정보존재)	Down	Down (GO 정보존재)	Total (Up +Down)
NC / C1	751	510	1011	665	1762
NC / C2	1010	689	746	470	1756
NC / C3	1465	1147	1439	944	2904
NC / C4	1696	1322	1879	1329	3575
C1/ SF1	591	386	785	523	1376
C2 / SF2	452	296	1102	738	1554
C3 / SF3	1033	637	639	514	1672
C4 / SF4	989	673	769	514	1758

2) Clustering 분석

五味子 처리 후 시간에 따라 유사한 발현 패턴을 나타내는 probe set을 grouping 하기 위해 clustering 분석을 수행하였다. 분석의 대상은 Affymetrix HG U133 Plus 2의 총 54675개의 유전자 중에서 Negative Control, 30min, 1hr, 3hr, 6hr 모든 샘플에서 표준편차 (SD: Standard Deviation)가 큰 순서대로 10,000개의 유전자를 선정하여 진행하였다.

3) Molecular Function에 따른 그룹화

위의 DEG selection 방법을 이용하여 분석한 data에서 시간에 따라 up-regulation과 down-regulation된 gene을 구분한 후 molecular function을 기준으로 그룹화한 결과는 아래와 같다.

Table 2. Grouping by Molecular Function

## A. Up-regulated Gene

Gene Name (Gene symbol)	Fold*			
	30min	1hr	3hr	6hr
Ankyrin repeat and SOCS box-containing 4 (ASB4)	5.6	2.2	3.1	3.1
CAP-binding protein complex interacting protein 1 (DJBP)	4.9	1.8	2.5	2.8
Deleted in azoospermia 1 (DAZ1)	4.9	3.4	3.1	3.1
Collagen, type II, alpha 1 (primary osteoarthritis, spondyloepiphyseal dysplasia, congenital) (COL2A1)	4.6	0.5	2.7	0.9
Collagen, type X, alpha 1 (Schmid metaphyseal chondrodysplasia) (COL10A1)	4.9	5.2	1.4	0.8
Sushi, nidogen and EGF-like domains 1 (SNED1)	7.9	1.7	3.0	3.3
Mucin 4, cell surface associated (MUC4)	4.6	3.0	2.6	3.1
Tight junction protein 2 (zona occludens 2) (TJP2)	4.4	0.6	2.5	3.2
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 2 (PPFIA2)	4.4	1.0	2.2	3.8
Contactin 3 (plasmacytoma associated) (CNTN3)	4.3	0.18	2.7	4.2
Tenascin XB (TNXB)	3.7	2.1	2.2	5.0
CD44 molecule (Indian blood group) (CD44)	2.7	1.3	3.4	2.9
Extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific (ECM2)	2.2	1.2	0.5	3.1
FRAS1 related extracellular matrix 1 (FREM1)	1.2	0.1	3.0	2.4
Spondin 1, extracellular matrix protein (SPON1)	1.4	2.8	2.0	3.1
Ectodysplasin A (EDA)	1.6	1.7	1.2	0.5

\* Fold means ratio of hybridization intensity. The genes with negative value are abundant in control group, while positive value are abundant in SF treated group.

## B. Down-regulated Gene

## 1) Matrix metalloproteinase (MMP)

Gene Name (Gene symbol)	Fold*			
	30min	1hr	3hr	6hr
Matrix metalloproteinase 2 (MMP2)	-2.3	-0.8	-0.9	0.2
Matrix metalloproteinase 11 (MMP11)	-2.2	-1.5	-1.4	-0.5
Matrix metalloproteinase 14 (MMP14)	-0.7	-1.1	-1.5	-0.4
Matrix metalloproteinase 15 (MMP15)	-0.2	-3.0	-0.7	-2.2
Matrix metalloproteinase 16 (MMP16)	-2.9	-3.5	-4.5	-1.7
Matrix metalloproteinase 19 (MMP19)	-2.4	-0.5	-2.5	-0.3
Matrix metalloproteinase 25 (MMP25)	-0.7	-2.7	-1.5	-1.4
Matrix metalloproteinase 27 (MMP27)	-1.6	-3.3	-2.7	0.1
Matrix metalloproteinase 28 (MMP28)	-2.6	-1.7	-3.3	-1.0

Fold means ratio of hybridization intensity. The genes with negative value are abundant in control group, while positive value are abundant in SF treated group.

## 2) Growth factor-related genes

Gene Name (Gene symbol)	Fold*			
	30min	1hr	3hr	6hr
FGFR1 oncogene partner 2 (FGFR1OP2)	-1.8	-5.0	-5.7	-1.4
Fibroblast growth factor 4 (heparin secretory transforming protein 1, Kaposi sarcoma oncogene) (FGF4)	-1.8	-1.4	-0.4	-1.2
Fibroblast growth factor 5 (FGF5)	-3.5	-3.2	-0.9	-1.8
Fibroblast growth factor 12 (FGF12)	-2.1	-4.2	-1.2	-3.8
Fibroblast growth factor 18 (FGF18)	-2.0	-2.6	-0.9	-2.0
Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)(IGF1)	-3.6	-2.7	-0.5	0.0

Fold means ratio of hybridization intensity. The genes with negative value are abundant in control group, while positive value are abundant in SF treated group.

## IV. 考 察

기관지 천식은 임상상 반복적인 호흡기감염 혹은 allergen이나 온도, 운동 등의 인자에 대한 반응에 의해 발작적으로 호기성 호흡곤란, 천명, 과흡기, 기침, rale 등이 특징적으로 나타나는 증후군으로 설명되며<sup>3</sup>, 병태생리상 기도폐쇄, 기도과민성, 만성염증성 소견으로 표현된다<sup>4</sup>.

기관지 천식에 대한 최근까지의 연구를 종합해 보면, '치료'라는 개념에서 확장되어 '관리'라는 개념이 도입되어 현재는 기관지 천식의 장기간의 관리를 위해 환자의 중증도에 따라 4단계로 나누고 단계별로 치료하는 계단식 치료법을 표준 지침으로 확립하였다<sup>13</sup>. 경증의 환자들에서는 치료법이 단순하여 쉽게 적용이 가능하고 치료성적이 좋은 편이지만, 3단계인 중등도 지속성 천식은 몇 가지 이상의 선택치료가 동시에 제시되고 있으나 실제 적용이 까다롭고 임상적으로는 그렇게 심하지 않은 듯하나 4단계인 중증 지속성과 더불어 완전 조절이 어려운 것으로 알려졌다.

천식의 병태생리에 대한 최근의 이해에 근거하여 천식의 치료에서 보다 조기의 그리고 광범위한 흡입스테로이드제가 사용되었다. 하지만 사용을 중단하면 증상이 재발하며 여러 염증표지도 증가한

다. 즉, 스테로이드제가 천식 기관지의 염증을 억제하기는 하나 내재된 발병기전을 변화시키지 못한다<sup>4</sup>. 이에 면역약물학적 연구에 의해 최근에는 cytokine과 chemokine 억제제, 유착분자차단제, 항 IgE 치료와 같은 하향매체의 억제와 Th<sub>2</sub> 활성화를 억제하거나 새로운 면역치료방법을 이용한 Th<sub>2</sub> 표현의 예방 및 억제와 T 림프구 기능의 직접적인 차단, 그리고 흡입스테로이드제와 베타자극제의 병합요법 등 다양한 약물에 대한 연구 개발이 진행되고 있다. 또한 앞으로는 유전학적 연구를 통해 천식 관련 유전자나 혹은 그 유전자의 단백을 직접 조절하는 약물의 개발이 촉진될 수 있을 것이다.

한의학에서도 천식치료를 위하여 많은 연구가 이루어졌는데, 呼吸促急을 '喘'이라 하고 喉中有聲響을 '哮'라 하여 '哮喘'의 범주에서 기관지천식을 다루었으며, 고 등<sup>5</sup>이 醫學入門 萬病回春 및 濟衆新編 등 역대의서에 수록된 哮喘治方に 관한 문헌적 고찰을 하였고, 황 등<sup>6</sup>은 기관지천식의 임상증상 평가분석을 통한 호흡기계 질환의 임상증상 평가방법에 대한 연구고찰을 하였다.

기관지천식의 병태생리에 대한 최근의 연구를 통해 호산구 등과 관련된 기관지상피세포의 염증 유발이 주요 기전으로 밝혀짐에 따라 천식과 호산

구 및 화학주성 물질간의 관계가 중요시되면서 牧丹皮<sup>7</sup>, 金銀花<sup>8</sup> 등의 개별 약물에 의한 화학주성 기전에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되기도 하였다. 천식과 관련하여 五味子를 이용한 연구로는 김 등<sup>9</sup>이 오미자, 황연이 BEAS-2B 인간기관지상피세포의 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA 발현 억제효능이 있음을, 이 등<sup>10</sup>이 맥문동과 오미자가 Asthma model 내의 cytokine IL-4, IL-5 mRNA 전사억제효능이 있음을, 최 등<sup>11</sup>이 오미자가 호산구의 화학주성 억제효과와 세포유착분자인 ICAM-1, VCAM-1 및 chemokine인 eotaxin, IL-8의 발현 억제효능이 있음을 보고하였다. 그러나 기존의 연구들은 천식의 화학주성기전에 직접적으로 관여하는 주요 인자에 대한 五味子의 효과를 확인하기 어려운 한계가 있었다.

인간 기관지상피세포는 기도의 염증에서 중요한 IL-6, IL-8, regulated on activation in normal T cells expressed and secreted (RANTES), eotaxin 등의 매개물질들을 직접 분비하기도 하며<sup>14</sup>, 능동적으로 위의 매개물질들을 생산, 분해하면서 기도의 반응성을 조절한다<sup>15</sup>고 확인되어 천식의 병리에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 최근 기관지 천식의 기전에 관한 연구는 allergen이나 기도염증으로 인한 기도손상과 복구의 과정, 즉 기도 개형(airway remodeling)과 이로 인한 폐기능의 변화 분석에 연구가 집중되고 있으며, 이러한 변화와 관련된 기도 염증 기전과 관련 물질 그리고 염증 과정의 조절을 통한 치료 방법이 제시되고 있다<sup>16</sup>.

이에 저자는 오미자의 효능을 검증하기 위하여 유전자 발현조사 도구로 대규모 유전자 발현을 검색할 수 있고 광범위한 유전자 발현상태를 분석할 수 있는 인간의 유전자 54675여개가 탑재된 oligonucleotide chip microarray를 이용하였다. 염증 세포들의 활성화와 생존을 증가시켜 급성 및 만성적인 기도 염증반응을 조절하는 능동적인 세포인 기관지상피세포(A549 cell)에 Th<sub>2</sub> cell 계통의 proinflammatory cytokine인 IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$

로 자극한 후 五味子를 시간별로 처리하여 발현된 유전자를 gene ontology로 분석하여 molecular function 위주로 분석하였다. 이를 통해 염증과 관련된 주요 특이 유전자 발현의 증감을 관찰함으로써 五味子에 의한 항염증 작용기전을 밝혀 五味子의 효과를 극대화를 위한 연구에 활용하고자 하였다.

五味子를 A549에 투여한 후 시간별(30min, 1hr, 3hr, 그리고 6hr)로 배양하여 total cRNA를 분리하고 total cRNA에서 mRNA를 정제하고 double strand cDNA를 합성하였다. Biotin-labeled cRNA를 합성하고 cRNA를 분절화한 후 gene chip hybridization, 염색 및 scanning을 하였으며, oligonucleotide chip(Affix Metrix사)을 사용하였다.

五味子 투여 후 대조군과 비교하여 30min, 1hr, 3hr과 6hr 시간대별 유전자 발현을 gene chip 결과에서 발현된 유전자를 분석하여 보았다. DA plot을 통해 low intensity에서 발현이 주로 일어나는 것을 확인하였고, 그 중 log 값이 4배 이상 또는 이하 발현된 유전자중 30min, 1hr, 3hr과 6hr 시간대에 공통적으로 발현된 유전자를 DEG selection하여 살펴보고 over expression된 것과 down expression된 유전자를 molecular function 위주로 분석하였다. 특히 gene chip을 통하여 A549에서 유전자 발현양상을 확인한 결과 발현량이 유의한 차이를 보인 유전자 중 호산구의 접근, 유착, 경내피 이동 그리고 염증과 연관된 중요한 유전자를 검색하였다.

Up regulation gene을 살펴보면 transcription과 관련된 Ankyrin repeat and SOCS box-containing 4(ASB4)와 CAP-binding protein complex interacting protein 1(DJBP)등의 유전자와 extracellular matrix protein과 관련된 Collagen, type II, alpha 1(COL2A1), Collagen, type X, alpha 1(COL10A1), Extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific(ECM2), FRAS1 related extracellular matrix 1 (FREM1), 그리고 Spondin 1, extracellular matrix protein(SPON1) 등의 유전자 발현이 증가

하였다. 이는 염증에 관여하는 matrix metalloproteinase (MMP) family 유전자들의 감소로 인하여 증가한 것으로 본 실험결과를 통해五味자가 anti-inflammation에 관여한다고 사료된다.

Down regulation gene을 살펴보면, 염증에 관여하는 matrix metalloproteinase(MMP) 2, MMP11, MMP14, MMP15, MMP16, MMP19, MMP25, MMP27 그리고 MMP28의 유전자와 growth factor인 fibroblast growth factor 4(FGF4), FGFR1 oncogene partner 2 (FGFR1OP2), FGF5, FGF12, FGF18, 그리고 insulin-like growth factor 1(IGF1)과 proinflammatory cytokine과 관련된 Interleukin 1 family, member 8(IL1F8), IL1F9, Interleukin 1 receptor, type I(IL1R1), Interleukin 1 receptor antagonist(IL1RN), Interleukin 1 receptor accessory protein-like 1(ILIRAPL1), Interleukin 8(IL8), Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4 (TNFRSF4), TNFSF10c, TNFSF13, TNF receptor-associated factor 5(TRAF5), 그리고 TRAF7과 세포 migration에 관여하는 Fibronectin 1(FN1), Fibronectin type III and SPRY domain containing 1-like 그리고 Fibronectin type III domain containing 3B(FNDC3B)와 호산구의 침윤 유도에 관여하는 Platelet-activating factor receptor(PAFR), Leukotriene B4 receptor(LTB4R), Leukotriene C4 synthase(LTC4S), Chemokine(C-C motif) ligand 5(RANTES), 그리고 Monocyte chemoattractant protein 1 receptor(MCP1R)와 세포부착분자에 속하는 Integrin, beta 1(ITGB1), Integrin, beta-like 1(ITGBL1), Selectin P ligand(SELPLG), Selectin E (endothelial adhesion molecule 1) (SELE), Intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2), Intercellular adhesion molecule 3 (ICAM3), Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1), Platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen) (PECAM), 그리고 Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide

(FCER1G)의 발현이 감소하였다.

염증에 관여하는 MMP와 관련하여 기관지 천식 환자에 있어서 MMP9가 중성구, 림프구, 호산구의 이행에 중요한 역할을 하므로 MMP억제제가 ICAM-1과 VCAM-1의 발현을 감소시키고 IL-1 $\beta$ , IL-4, TNF- $\alpha$ 의 발현을 감소시킴으로 인해 염증세포의 이주를 조절한다는 연구가 있었고<sup>17</sup>, 기관지 천식 환자의 기도재구성은 기저막과 세포외기질의 교원질 침착과 연관있는데 단백분해효소인 MMP9과 그에 대한 억제 효소인 TIMP-1 간의 불균형과 기도재구성에 밀접한 연관이 있음도 밝혀졌다<sup>18</sup>.

IL-8은 기도에서 염증부위로 염증세포를 이동시키는 chemokine으로 기관지상피세포에서 직접 생산되며, 천식환자에서 발현이 증가되고, 특정 allergen으로 기관지 상피세포를 자극하는 경우 증가한다고 알려져 있다<sup>19</sup>. 이처럼 IL-8은 단핵구, 대식세포, 비만세포, 섬유모세포, 중성구, 내피세포와 기관지 상피세포 등에서 분비되며 특히 호중구에 강한 화학주성을 보이는 매개물질이다. IL-8은 천식환자의 기관지 상피세포에서 생성이 증가되었고<sup>8</sup>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , platelet activating factor 등에 의해서 기관지 상피세포에서 발현이 증가되었으며, 기도의 염증반응에 중요한 역할을 하였다. 특히 운동 유발성 천식의 후기반응에서 기도분비물에 중성구와 호산구들이 관찰되어 IL-8은 후기 반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 또한 IL-8은 IL-5, RANTES 등과 함께 복합적으로 호산구의 화학주성에 관여하는 것으로 보고되었으며<sup>20</sup>, 특히 호중구와 동시에 활성화되었을 때에만 호산구의 경기저세포막이동이 증대되는 것으로 확인되었다. 따라서 이 결과를 통해五味자 추출액이 IL-8의 발현을 억제함으로써 호중구와 호산구의 침윤을 능동적으로 억제하여 천식 및 기도개형과 관련된 염증반응을 치료할 수 있다는 사실을 추측할 수 있었다.

세포유착분자는 여러 염증성 질환의 발생에 중요한 역할을 담당하는 세포 표면의 glycoprotein으



로, 순환중인 염증세포를 혈관내피에 부착시키는 과정과 세포를 활성화시켜 내피를 통과하여 병변 부위로 이동하는 과정에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>4</sup>. 또한 세포간, 세포와 기질간 작용을 중재하는 세포표면 수용체로서 염증반응, 응고, 종양의 전이, 세포의 성장과 분화 등에서 다양한 역할을 수행한다<sup>21</sup>. 혈관내피세포에서 세포유착분자의 발현은 죽상동맥경화증, 류마티스성 관절염, 및 천식 등과 같은 질환의 병태생리에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 또한 TNF- $\alpha$ , IL-1과 같은 염증성 cytokine이 유착분자의 발현을 증가시킨다고 하였다<sup>22</sup>. 따라서 세포유착분자를 억제하면 효과적으로 염증을 조절할 수 있을 것으로 보고하기도 하였다<sup>7</sup>.

호산구가 혈액 내에서 혈관내피세포를 통과하여 조직 내로 이동하는 과정은 접근, 유착, 경내피이동의 3단계로 이루어지고 이때 여러 물질들이 관여한다<sup>4</sup>. 호산구의 접근과정에서는 염증세포가 혈관내피세포의 selectin 계열과 결합한다. 즉 IL-1이나 TNF- $\alpha$  등에 의해 혈관내피세포가 활성화되면 혈관내피세포에 E-selectin이나 P-selectin이 발현, 호산구와 유착하여 rolling이 일어난다. 유착단계에서는 호산구가 활성화되면서 lymphocyte function associate antigen (LFA)-1이나 macrophage-1 antigen (MAC-1) 등 integrin 계열의 물질을 표면화하고 혈관내피세포의 면역글로블린계 유착물질인 ICAM이나 VCAM 등과 강하게 결합하게 되고, 혈관내피세포를 투과하여 기도내로 이동하는 경내피이동단계에서는 platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1, IL-8 등이 주로 관여하게 된다<sup>2</sup>. 특히 ICAM-1과 VCAM-1은 혈관내피세포, 기관지상피세포, T 세포 및 호산구 등 많은 염증관련 세포에서 발현되어 기관지 병소로의 침윤을 매개한다는 점에서 치료의 중요한 목표분자로 인식되고 있으며<sup>23</sup>, IL-8의 경우는 호중구와 동시에 활성화되는 경우에 호산구의 경기저세포막이동을 촉진하는 것으로 보고되었다<sup>24</sup>.

호산구는 기도 염증에 있어서 중요한 인자로 기관지 천식에서 기도과민성과 점액 축적을 유도하고, 기도개형의 유발에 결정적인 역할을 한다고 보고되었으며, 객담 중의 호산구 조절이 치료에서 중요하다라는 사실이 알려졌다<sup>25</sup>.

세포유착분자 중 ICAM-1은 활성화된 호산구 표면의 LFA-1이나 MAC-1에 주로 결합하고, VCAM-1은 호산구 표면에만 존재하는 very late antigen (VLA)-4와 강하게 유착되어 경내피이동이 일어나 혈관 밖으로 이동시켜 결체조직의 침윤을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>26</sup>. 또한 염증성 매개체로서 내피세포를 활성화시키는 경우 ICAM-1과 VCAM-1의 발현이 증가하는데, 이 유착분자의 유도는 비교적 장시간 유지된다고 알려져 있어서 만성 염증시 호산구의 침윤과 관계가 있는 것으로 보여진다<sup>27</sup>. ICAM-1과 VCAM-1은 이러한 유착상태의 활성화를 기관지 병소에서도 수행함으로써 염증세포, 특히 호산구의 기관지 침윤을 매개한다는 점에서 치료의 중요한 목표분자로 인식되고 있다. 실험결과로 볼 때五味子 추출액은 호산구의 침윤시 기관지상피세포의 ICAM-1, VCAM-1 유전자 발현을 억제함으로써 호산구가 혈관으로부터 경내피로 이동하여 기관지 상피조직으로 침윤하는 마지막 과정에도 영향을 미치는 것으로 파악할 수 있었다.五味子가 기도의 염증반응을 다양한 측면에서 억제하여 천식치료에 효과가 있음을 알 수 있었다.

현재까지의 연구로五味子가 천식 치료에 도움이 되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 최 등<sup>11</sup>이 발표한 오미자의 호산구 화학주성 억제효과와 세포유착분자인 ICAM-1, VCAM-1 및 eotaxin, IL-8의 발현 억제 효능을 이 실험을 통하여 재확인 할 수 있었다. 이번 연구를 통하여五味子가 기관지상피세포에서 호산구의 침윤을 유도하는 PAFR, LTB4R, LTC4S, RANTES, 그리고 MCP1R를 억제하여 호산구의 이동과 경기저세포막 이동을 유의하게 저해함과 동시에 ICAM-1과 VCAM-1의

발현을 억제함으로써 기관지상피세포로 호산구 침윤을 방해하고 이를 통해 만성염증반응의 억제에 효과가 있는 것으로 유추할 수 있었다.

## V. 結論

五味자가 천식에 미치는 영향을 알아보고자 인간 기관지상피세포주인 A549 cell에五味자를 처리하고 30min, 1hr, 3hr과 6hr 시간대별로 oligonucleotide chip을 이용하여 발현된 유전자의 발현 양상을 gene ontology로 분석하여 molecular function위주로 분석하고, 다양한 유전자들의 발현 양상을 평가한바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. A549 cell에 IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  cytokine으로 자극하여 chemokine의 발현을 유도한 후五味子 추출액으로 처리한 결과, 염증에 관여하는 MMP2, MMP11, MMP14, MMP15, MMP16, MMP19, MMP25, MMP27 그리고 MMP28의 유전자 발현이 감소하는 경향을 보였다.
- 2.五味子 추출액을 처리한 A549 cell에서 proinflammatory cytokine과 관련된 IL1F8, IL1F9, IL1R1, IL1RN, IL1RAPL1, IL8, TNFRSF4, TNFSF10c, TNFSF13, TRAF5, 그리고 TRAF7의 발현이 감소하는 경향을 보였다.
- 3.五味子 추출액을 처리한 A549 cell에서 세포 이동에 관여하는 FN1, 그리고 FNDC3B와 호산구의 침윤 유도에 관여하는 PAFR, LTB4R, LTC4S, RANTES, 그리고 MCP1R와 세포유착 분자에 속하는 ITGB1, ITGBL1, Selectin P ligand, Selectin E, ICAM2, ICAM3, VCAM1, PECAM, 그리고 FCER1G의 발현이 감소하는 경향을 보였다.

## 參考文獻

1. 이용성 편저. 경약분류전. 서울: 도서출판 정담: 2002, p. 17, 25, 30.
2. 고영률. 천식의 병태생리. 소아알레르기 및 호흡기학회지. 2000;10(4):255-62.
3. 전국한의과대학폐계내과학교실 편저. 동의폐계내과학. 서울 : 도서출판 국진; 2004, p. 192-9, 320-31.
4. 이상엽, 인광호. 천식의 면역학적 기전. 결핵 및 호흡기질환. 2006;60(4):379-90.
5. 고재찬, 박양춘 김병택. 哮喘治方에 關한 文獻의 考察. 혜화의학. 2000;9(1):258-81.
6. 황준호, 이건영, 정승연, 이성현, 정희재, 정승기. 기관지천식의 임상 증상 평가 분석을 통한 호흡기계 질환의 임상증상 평가 방법 제언. 대한한방내과학회지. 2006;27(fal):1-9.
7. 문성훈, 정희재, 정승기, 이형구. 牡丹皮가 천식 유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):199-212.
8. 정광진, 정희재, 정승기, 이형구. 金銀花가 천식 유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):129-42.
9. 김동일, 정희재, 정승기, 이형구.五味子, 黃連이 BEAS-2B 人間 氣管支上皮細胞의 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level에 미치는 影響. 경희의학. 2001;17(2):199-214.
10. 이동생, 정희재, 정승기, 이형구. 麥門冬과五味子가 Asthma model 內의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響. 경희의학. 2000;16(2):170-81.
11. 최현, 신민규. 인간기관지상피세포 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에五味자가 미치는 영향. 경희대학교 박사학위논문. 2007.
12. 김종원, 김종대. DNA Microarray 분석기술. 전자공학회지. 2003;30(10):51-8.
13. 2005 한국 기관지천식 치료지침. The Korean academy of asthma, allergy & clinical

- immunology. 군자출판사. 2005.
14. Takizawa H. Bronchial epithelial cells in allergic reactions. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(3):305-11.
  15. 최동철. 기도염증과 기관지상피세포. 대한알레르기학회지. 1996;16(3):261-78.
  16. Busse WW, Rosenwasser LJ. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(3 Suppl):799-804.
  17. 박성주, 이경선, 김승수, 이용철, 이양근, 이홍범, 진선미. MMP억제제가 adhesion molecule 과 cytokines의 발현을 감소시킴으로써 염증세포의 이주를 조절할 수 있다. 결핵 및 호흡기학회지. 추계학술대회 초록집(포스터발표). 2003:(추계):136.
  18. 이숙영, 장재순, 김석찬, 권순석, 김영균, 김관형, 문화식, 송정섭, 박성학. 기관지 천식 환자에서 기도내 MMP-9 및 TIMP-1과 기도재구성의 연관성. 천식 및 알레르기 학회지. 춘계학술대회 초록집(포스터발표). 2001:(춘계):407.
  19. 손명현, 이경은, 최성연, 권병철, 김우경, 장광천, 장명웅, 김규연. 인체기관지상피세포에서 mycoplasma pneumoniae 항원이 IL-8 유전자 발현에 미치는 영향. 소아알레르기 및 호흡기학회지. 2004;14(1):38-45.
  20. Lampinen M, Rak S, Venge P. The role of interleukin-5, interleukin-8 and RANTES in the chemotactic attraction of eosinophils to the allergic lung. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(3):314-22.
  21. 이양근. 알레르기 질환에서의 유착분자. 중양의학. 1995;60(7):568-72.
  22. 주창엽, 정희재, 정승기, 이형구. 썬이 천식관련 chemokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2006;27(1):208-20.
  23. Wong CK, Wang CB, Li ML, Ip WK, Tian YP, Lam CW. Induction of adhesion molecules upon the interaction between eosinophils and bronchial epithelial cells: involvement of p38 MAPK and NF-kappaB. *Int Immunopharmacol*. 2006;6(12):1859-71.
  24. Kikuchi I, Kikuchi S, Kobayashi T, Hagiwara K, Sakamoto Y, Kanazawa M, Nagata M. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34(6):760-5.
  25. Alexis NE, Peden DB. Blunting airway eosinophilic inflammation results in a decreased airway neutrophil response to inhaled LPS in patients with atopic asthma: a role for CD14. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(4):577-80.
  26. Lebedeva T, Dustin ML, Sykulev Y. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(3):251-8.
  27. Argenbright LW, Barton RW. Interactions of leukocyte integrins with intercellular adhesion molecule 1 in the production of inflammatory vascular injury in vivo. The Shwartzman reaction revisited. *J Clin Invest*. 1992;89(1):259-72.